

[症 例]

長期血液透析患者より分離されたバンコマイシン高度耐性の
VanD型 *Enterococcus raffinosus*丸山英行*¹⁾・谷本弘一²⁾・柴田尚宏³⁾
菅野治重*⁴⁾・池 康嘉²⁾・荒川宜親³⁾

1) 帝京大学医学部附属市原病院 (*現：千葉県済生会習志野病院 所属)

2) 群馬大学医学部微生物学講座

3) 国立感染症研究所 細菌第二部

4) 千葉大学医学部附属病院 (*現：高根病院 所属)

(平成16年2月3日受付, 平成16年6月18日受理)

Enterococcus faecalis, *Enterococcus faecium*などの菌種において, *vanA*, または*vanB*遺伝子クラスターを保有する株がVancomycin Resistant *Enterococcus* (VRE)として欧米の臨床現場で増加しているが, *vanD*を保有する株の国内外での検出例は未だ少ない。しかし, 今回, 国内の医療施設に入院中の患者よりVanD型のVREが分離されたので報告する。症例は, 基礎疾患に糖尿病, 慢性腎不全を有し, 腎透析時, 頻回にバンコマイシン(VCM)を投与されていた。患者の左下肢壊死部褥創からVCM, テイコプラニン(TEIC)共に高度耐性(>256 μ g/ml)を示す*Enterococcus*が分離され, 生化学性状および16S rRNAの解析による遺伝子学的同定により*Enterococcus raffinosus*であることが確認された。またVan型を確認するために行ったPCR解析では, *vanA*, *vanB*, *vanC*を検出する既存のプライマーにより増幅がかからなかったため, 新たに細菌のD-Ala-D-Ala ligaseを増幅可能なPCRプライマーを設計し, PCR増幅されたDNA断片をシーケンスしたところ*vanD4*と高い相同性が確認された。

Key words: *Enterococcus raffinosus*, *vanD*型遺伝子, *vanD4*, VRE, バンコマイシン耐性

Vancomycin resistant *Enterococcus* (VRE)は近年, バンコマイシン(VCM)などのグリコペプチド系抗生物質の長期投与患者や, 東南アジアやフランスといった諸外国からの輸入鶏肉などから検出される機会が増えている^{1, 2)}。その多くは*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*などの菌種であり, 特に, VCM高度耐性株は, *vanA*, または*vanB*遺伝子のいずれかを保有している。また表現型ではVCMとテイコプラニン(TEIC)の両方に対し高度耐性を示す*vanA*遺伝子を保有するClass A型と, VCM耐性であるがTEIC低感受性を示す*vanB*遺伝子を保有するClass B型と

いった差が見られる³⁾。今回我々は, 基礎疾患に糖尿病, 慢性腎不全を有し, 腎透析時, 頻回にVCMを投与されていた患者よりVCMに高度耐性を示す*Enterococcus raffinosus*を分離し, その遺伝子解析を行った結果, 国内ではじめての*vanD*型遺伝子保有株であることを確認したので報告する。

I. 症 例

症 例：73歳, 男性。

主 訴：意識障害, 顔面・下肢浮腫出現, 血清クレアチニン上昇。

既往歴：50歳時に糖尿病の診断を受け他院にて入院加療。

家族歴：特記すべき事項なし。

現病歴：基礎疾患である糖尿病と慢性腎不全治療のため, 平成12年1月当院内科に入院。腎機能障害増悪のため入院直後より腎透析を開始した。週1回のペー

著者連絡先：(〒275-8580) 千葉県習志野市泉町1-1-1
社団福祉法人恩賜財団済生会
千葉県済生会習志野病院 検査科
丸山英行
TEL 047-473-1281 内線3307
FAX 047-473-7884・7885

スで腎透析を行い透析終了時に感染予防薬として VCM0.5g を 3～9 月の 7 ヶ月にわたり定期的に投与されていた。3 月 11 日、左下肢関節以下に糖尿病によると考えられる壊死性潰瘍が出現。4 月から 8 月にかけて起炎菌、部位の特定できない炎症性反応が持続するようになり、原因微生物不明の肺炎を反復。8 月 23 日、発熱および呼吸不全となり両肺野に肺炎と思われる浸潤影を認めた。培養では確認できなかったが主治医は緑膿菌による肺炎を疑いゲンタマイシン (GM) を投与。8 月 28 日、一応の解熱傾向は認めるものの、この次期より呼吸不全状態で意識レベルも低下し全身状態が悪化傾向となる。9 月 4 日、壊死部褥創の培養で Coagulase negative Staphylococcus と Enterococcus を分離した。Enterococcus は薬剤感受性試験の結果より VCM に高度耐性を示したことから VRE を疑い国立感染症研究所で精査を行った。9 月 8 日、患者の VRE 保菌状態を確認するため提出された便培養からも同様の株を分離した。主治医は患者の状態から保菌と判断したが、VRE 検出は VCM 長期投与の影響と考え、透析時の VCM 投与を中止しミノサイクリン (MINO) への変更を指示した。9 月 9 日、患者はかねて治療中の原疾患に起因すると考えられる合併症および、8 月下旬からの肺炎による重篤な呼吸障害により永眠された。分離された VRE と死亡原因との直接的な因果関係は認められなかった。尚、患者は個室管理であったため周囲の患者および環境からの VRE 検索は行わなかった。

II. 細菌学的検査

1. 生化学的性状による同定検査

同定検査は MicroScan WalkAway Pos Combo41C

Panel (DADE BEHRING) および BBL CRYSTAL Gram-Positive ID System/GP (BD) を用いて行った。キットにおける同定では MicroScan Panel において同定確率 98% 以上で *E. raffinosus* となり、CRYSTAL GP による同定でも同様に高い確率 (98.4%) で *E. raffinosus* と同定された。両キットによる同定では高い確率で *E. raffinosus* と同定されたが、分離株は *E. raffinosus* の特徴の一つであると考えられるラフィノース (RAF) が非分解であること、薬剤感受性試験でアンピシリン (ABPC) に耐性を示すこと、VCM, TEIC に高度耐性を示すことなどから *vanA* 遺伝子を保有する Class A の *E. faecium* との誤同定の可能性が疑われた。同様に性状に近い *Leuconostoc* spp. の可能性も疑い各菌種の生化学的性状を検証した結果、分離株は *E. faecium* とはアルギニン (ARG) の分解が陰性で合致せず、また *Leuconostoc* とはピロリドニルアリルアミダーゼ (PYR) が陽性であったため性状が合致しなかった (表 1)。各菌種とは同定のキーとなる性状が合致しなかったため、分離株は既存の株と一部、生化学的性状が合致しない部分は認められたが *E. raffinosus* である可能性が高いと判断された。

2. 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は同定検査と同様に MicroScan Pos Combo41C Panel を用いて測定した。MicroScan Panel における薬剤感受性試験の結果を表 2 に示す。VCM の MIC 値は $>8\mu\text{g/ml}$ を示し、ABPC の MIC 値も $>8\mu\text{g/ml}$ を示した。この結果からは VRE であるかどうか判別できないため、Etest (アスカ純薬) を用いて簡易的に MIC を測定したところ VCM, TEIC 共に $>256\mu\text{g/ml}$ の高度耐性であることを確認した。薬剤感受性試験の結果からは *vanA* 遺伝子を保有する Class

表 1 分離株の生化学的性状と類似菌種との比較

項目	分離株	<i>E. raffinosus</i>	<i>E. faecium</i>	<i>Leuconostoc</i> sp.
V P テスト	+	+	+	+
エスクリン加水分解	+	+	+	+
ピロリドニルアリルアミダーゼ	+	+	+	-
アルギニン加水分解	-	-	+	-
酸産生性				
マンニトール	+	+	+	-
ラクトース	-	+	+	d
トレハロース	+	d	+	+
ソルビトール	-	+	-	d
アラビノース	+	+	+	+
ラフィノース	-	+	-	d
運動性	-	-	-	-
色素産生	-	-	-	-

d : 不定

部分は同定のキーとなる性状の相違点を示す

AのVREである可能性が非常に高いと考えられた。

III. 遺伝子学的検査

1. 遺伝学的な手法による同定の確認

細菌学的検査では主として生化学的性状に基づく同定結果に若干の疑問が残ったため、細菌の16S ribosomal RNA (16S rRNA) の解析を行った。保存領域遺伝子の切断部位を替えて2ヶ所をそれぞれシーケンス解析した⁴⁾ 結果、16S-40fプライマーを用いたものでは、データベースに登録されている accession number AF061003の*E. raffinosus*の16S rRNAのシーケンスと極めて高い相同性を示した(表3)。同様に別のプライマーを用いたシーケンス結果でも99.775%で*E. raffinosus*と高い相同性を示し、保存領域のいずれの切断部位でも*E. raffinosus*であることが強く示唆され、本菌は*E. raffinosus*である可能性が最も高いと考えられた。

その他*E. raffinosus*以外に確率の高かった菌種としては、*E. avium* (99.550%), *E. maldoratus* (99.195%) などの菌種であったが、通常VREとして報告されることが多い*E. faecium*, *E. faecalis*といった菌種との

相同性は認められず、*Leuconostoc*との相同性も認められなかった。

シーケンスで極めて高い相同性を示したAF061003の*E. raffinosus*と分離株の照合結果を図1に示す。照合の一致率は99.799%で497核酸塩基対のうち分離株の161位、AF061003では213位にあたる核酸塩基が1ヶ所異なるだけで他はすべて一致していた。

2. van 遺伝子の検証

このVCM 高度耐性株のvan 遺伝子を確認するため vanA, vanB, vanC, vanD1, vanD2, およびvanEの検出可能なプライマーを用いPCRを行ったが、既存のプライマーではPCR産物は検出されなかった。VCM, TEICの耐性度が高いことからvanAもしくはvanDのバリエーションである可能性が考えられたため、大腸菌のD-Ala-D-Ala ligase A (*ddlA*), D-Ala-D-Ala ligase B (*ddlB*)とVREのVanAタイプのligase間で保存されているようなアミノ酸配列からゲスマーを設計し、vanD遺伝子群との同一性を検証した。これがV1, V2プライマー⁵⁾である(図2)。V1, V2により増幅されたligase 遺伝子の一部をシーケンスしたところvanD4とは1ヶ所、vanD1で11ヶ所、vanD2で

表2 薬剤感受性試験

薬 剤	MIC(μg/ml)
Vancomycin	>8
Ampicillin	>8
Benzylpenicillin	>8
Clavulanic acid/Amoxicillin	>16
Imipenem	>8
Erythromycin	>4
Clindamycin	>2
Levofloxacin	2
Minocycline	4
Chloramphenicol	<=4

MicroScan PosCombo41CPanel

表3 16SrRNA シーケンスによる相同性順位

16S-40f primer		
1. AF061003	:	<i>Enterococcus raffinosus</i> (1496) [f]
2. Y18296	:	<i>Enterococcus raffinosus</i> (1425) [f]
3. AF061012	:	<i>Enterococcus maldoratus</i> (1500) [f]
4. Y18339	:	<i>Enterococcus maldoratus</i> (1461) [f]
5. AF133535	:	<i>Enterococcus avium</i> (1524) [f]
6. Y18274	:	<i>Enterococcus avium</i> (1523) [f]
	:	:
	:	:

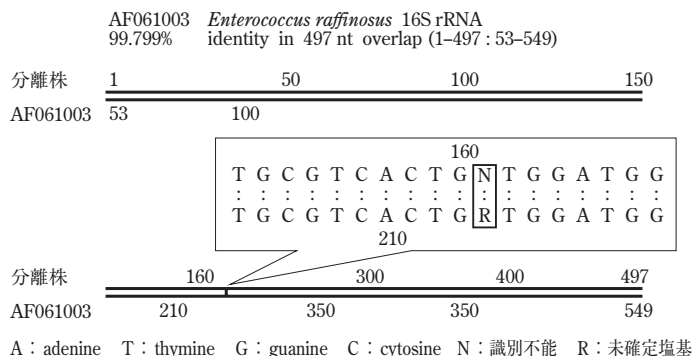


図1 最も相同性の高かった菌種との照合結果

13ヶ所, *vanD3*で14ヶ所の相違が確認され, この結果から*vanD4*とDNAレベル99%と最も高い相同性があることは確認された(図3)。

また, 既知の*vanD1*タイプのクラスターと同じ遺伝子構成になっているか否かを調べるために, 報告されている塩基配列を元に設計したプライマーによってPCR産物が得られるかを調べた(図4)。PCRで得られた増幅産物と*vanD*型遺伝子との相同性の一致率は99%で, 589核酸塩基対のうち分離株33位の塩基と*vanD*型遺伝子1623位の塩基が一对異なり, これまでの各シーケンス結果と同様に1ヶ所のみ塩基対が異なっていた(図5)。

IV. 考察

*vanD*遺伝子を保有する腸球菌の検出例は国内外を問わず未だ少ない。特に*E. raffinosus*では*vanA*遺伝

子を保有する株がごく少数ではあるものの報告されている⁶⁾のみで, *vanD*遺伝子保有株の確認例はない。また, 既に報告されている*vanD*遺伝子保有株のほとんどは*E. faecium*であり, その表現型としては, グリコペプチド系薬剤であるVCMには高度耐性であるものの, TEICには感受性かまたは中等度耐性を示す株が一般的と報告されている^{7, 8)}。今回我々が検出した株は, *vanD*遺伝子を保有した*E. raffinosus*というこれまでVREとして報告された例のない菌種であること, また表現型においてもVCM, TEIC共に高度耐性を示し, 報告されている*vanD*遺伝子保有株と異なる耐性パターンを示した。表現型においてClass Bに近い*vanA*遺伝子保有株や, 一方でClass Aに近い*vanB*遺伝子保有株などではTEICにおける耐性度が, 典型的な株より変化しているため, 従来のVCMとTEICに対する感受性の差による簡易的遺伝子推定法では識

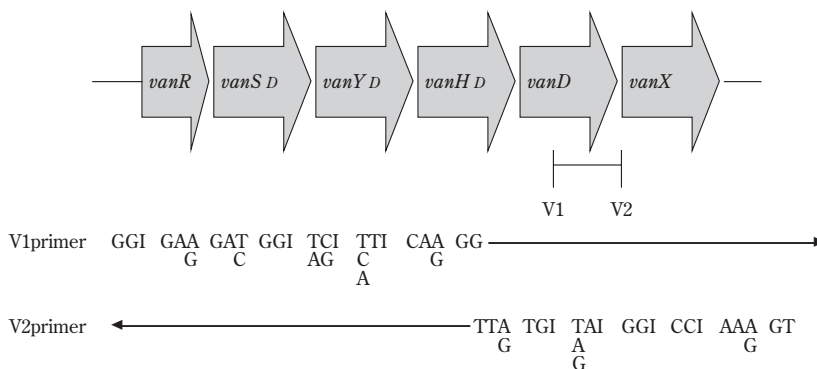


図2 設計したV1, V2プライマーとその位置

	1							100
分離株	V	I	M	E	K S	T S	T G	
VanD4	G							
VanD1	G	T	T	E R	D V	E R		
VanD2	G	T	A	E R	D V	R R		
VanD3	110 G	T	T	A	E R	D V	E R 210	
	101							196
分離株	G					R	E K S	
VanD4								
VanD1						M C		
VanD2	E					K M C		
VanD3	211				I	K M C	306	

アミノ酸配列 A: alanine
 C: cysteine
 D: aspartate
 E: glutamate
 G: glycine
 I: isoleucine
 K: lysine
 M: methionine
 R: arginine
 S: serine
 T: threonine
 V: valine

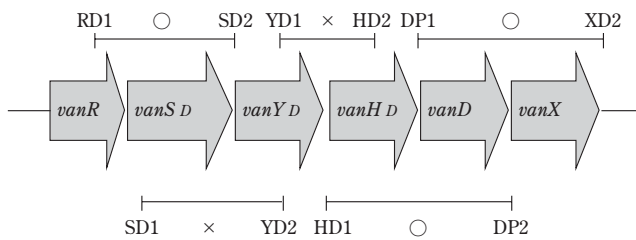
図3 VanD型遺伝子産物各亜型とのアミノ酸配列による相同性の検証

別が困難である。これらTEICの耐性度が変化している株では、*van* 遺伝子クラスターの中の *vanS* 遺伝子内に変異が発生し、この変異の結果 *vanS* 蛋白（センサー蛋白）のアミノ酸配列が変化していることが報告されている⁹⁻¹²⁾。しかし、今回の *vanD* 型 *E. raffinosus* では、センサー蛋白の変異や *vanD* 遺伝子クラスターの高発現ではなく、VanD4と1ヶ所のアミノ酸配列の置換を保有する新規のVanD4様リガーゼの産生が、TEIC 高度耐性に関係している可能性があり、その解析を進めている。

E. raffinosus の名前は、ラフィノース (RAF) 分解能に由来する。しかし、本菌はRAF利用能が陰性であることや、16S rRNAのシーケンスとの照合結果から、少なくとも *E. raffinosus* に最も近いと判定された。*E. raffinosus* は *E. faecalis*, *E. faecium* といった菌種に比べ日常的な臨床材料からの検査では、その分離頻度は低く、腸球菌における感染症の原因菌としても注目されることは少ない菌種である。今回の症例も患者の便培養より本菌が分離されていることから、感染症ではなく単なる保菌例と考えられたが、原疾患治療過程によるVCM長期投与が、未だ稀な *vanD* 遺伝子

保有株の定着と増殖を促進したものと考えられる。つまり、VCMの長期間投与がなんらかの形で *vanD* 遺伝子保有株の出現と定着に関与していたことは十分予想されるため、今後、透析患者のみならず、MRSA感染症患者等に対するVCM等のグリコペプチド系薬剤の適正使用と特に癌患者、血液疾患患者、開胸開腹手術後の患者などのハイリスク患者におけるVREの早期検出の為の有効な監視培養の実施など、より一層の留意が必要となっている。

このようなVCM、TEICに高度耐性を有する *vanD* 遺伝子が、どのような由来で患者に定着したかは定かではない。仮に患者本人がもともと保有していた *vanD4* 遺伝子が、VCMの長期投与によりTEICにも高度耐性を有する株に変異したとすれば、変異前の親株の存在が不可欠であり、それらの存在を証明しなければならない。しかしながら、今回の株を検出する以前の培養検査でEnterococcusの同定・感受性試験は行っておらず、また変異株検出後に患者が亡くなられたため、親株の存在は証明できていない。状況から考えるに、親株の *vanD4* 遺伝子が変異し今回確認された *vanD4* 様遺伝子が新たに出現したとは考えにくく、そ



○は増幅可能、×は増幅不能の部分

図4 PCRによるVanD1遺伝子群との同一性の検証

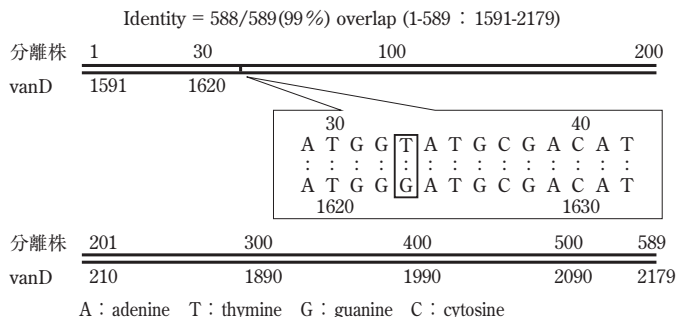


図5 VanD型遺伝子との相同性の検証

れよりは、当初から患者に定着していた*vanD4*様遺伝子保有株がVCMによって選択されたと考えるのが妥当と思われるが、あくまでも推測の域をでない。

vanD 遺伝子は現時点では、染色体上に存在することが多く*vanA*と一部の*vanB*のようにプラスミド媒介性に伝搬することは、これまでのところ報告されていない。本文には示さなかったが、この株を親株として用いた接合実験の結果でも、バンコマイシン感受性株への*vanD* 遺伝子の接合伝達は確認できなかった。しかしながら、多くは染色体性とされている*vanB* 遺伝子クラスターが、プラスミド依存性に媒介されている例も知られており、今後、*vanD* 遺伝子のプラスミド上への移行にも十分注意が必要である。さらに、*vanE*、*vanG* 遺伝子なども相次いで報告されるなど^{13, 14)} 新しいタイプの遺伝子、またはそれらのバリエーション(変種)が、伝達性プラスミドやそれに担われたトランスポゾンなどの作用で、*Enterococcus* 属間に広く伝搬する危険性が否定されるものではない。そこで、今後、このようなグリコペプチド耐性株が各種の*Enterococcus* 属菌から検出される可能性を十分考慮して日常的な検査業務にあたりつつ、様々な菌種におけるVREの早期検出に注意することが必要となっている。

本論文の要旨は第13回日本臨床微生物学会総会(平成14年1月25日)にて発表した。

(Editor: 大阪大学医学部附属病院感染制御部 朝野和典)

文 献

- 1) 山中千恵子, 本岡直樹, 矢田博三, 他. 1998. 鶏におけるバンコマイシン耐性腸球菌の保有状況. 平成9年度日本獣医公衆衛生学会年次大会抄録: 400-401.
- 2) H. Yoshimura, M. Ishimaru, Y. S. Endoh, et al. 1998. Isolation of glycopeptide-resistant enterococci from chickens in Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 3333.
- 3) R. Patel. 2003. Clinical impact of vancomycin-resistant enterococci. *J. Antimicrob. Chemother.* 51 (Suppl 3): iii 13-21.
- 4) T. Sasaki, T. Nishiyama, M. Shintani, et al. 1997. Evaluation of a new method for identification of

- bacteria based on sequence homology of 16S rRNA gene. *PDA. J. Pharm. Sci. Technol.* 51: 242-247.
- 5) S. Dutka-Malen, C. Molinas, M. Arthur, et al. 1992. Sequence of the *vanC* gene of *Enterococcus gallinarum* BM4174 encoding a D-alanine: D-alanine ligase-related protein necessary for vancomycin resistance. *Gene.* 112: 53-58.
- 6) W. W. Wilke, S. A. Marshall, S. L. Coffman, et al. 1997. Vancomycin-resistant *Enterococcus raffinosus*: molecular epidemiology, species identification error, and frequency of occurrence in a national resistance surveillance program. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 29: 43-49.
- 7) Y. Cetinkaya, P. Falk, C. G. Mayhall. 2000. Vancomycin-resistant Enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 13: 686-707.
- 8) B. Perichon, P. Reynolds, P. Courvalin. 1997. VanD-type glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* BM 4339. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 2016-2018.
- 9) Y. Hashimoto, K. Tanimoto, Y. Ozawa, et al. 2000. Amino acid substitutions in the VanS sensor of the VanA-type vancomycin-resistant enterococcus strains result in high-level vancomycin resistance and low-level teicoplanin resistance. *FEMS Microbiol. Lett.* 185: 247-254.
- 10) M. Baptista, P. Rodrigues, F. Depardieu, et al. 1999. Single-cell analysis of glycopeptide resistance gene expression in teicoplanin-resistant mutants of a VanB-type *Enterococcus faecalis*. *Mol. Microbiol.* 32: 17-28.
- 11) Y. Ike, K. Tanimoto, Y. Ozawa, et al. 1999. Vancomycin-resistant enterococci in imported chickens in Japan. *Lancet* 353(9167): 1854.
- 12) B. E. Ostrowsky, N. C. Clark, C. T. Eliopoulos, et al. 1999. A cluster of VanD vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* molecular characterization and clinical epidemiology. *J. Infect. Dis.* 180: 1177-1185.
- 13) M. Fines, B. Perichon, P. Reynolds, et al. 1999. VanE, a new type of acquired glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* BM4405. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 2161-2164.
- 14) S. J. McKessar A. M. Berry, J. M. Bell, et al. 2000. Genetic characterization of vanG, a Novel vancomycin resistance locus of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 3224-3228.

Identification of VanD type *Enterococcus raffinosus* which has acquired a high-level resistance to vancomycin from a patients with long-term haemodialysis

Hideyuki Maruyama¹⁾, Koichi Tanimoto²⁾, Naohiro Shibata³⁾, Harushige Kanno^{**4)}
Yasuyoshi Ike²⁾ and Yoshichika Arakawa³⁾

¹⁾Icihara Hospital, Teikyo University School of Medicine (*Current address : Saiseikai Narashino Hospital, Chiba)

²⁾Department of Microbiology, Gunma University School of Medicine

³⁾Department of Bacterial Pathogenesis and Infection Control, National Institute of Infectious Diseases

⁴⁾Chiba University Hospital (**Current address : Takane Hospital)

Vancomycin resistant enterococci (VRE) which harbor *vanA* or *vanB* gene cluster have emerged and being proliferating in clinical settings located in Europe and North America. However, VRE strains belonging to *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* which possess *vanD* gene are still very rare at present. In such circumstance, a VRE strain belonging to class D was isolated from an inpatient hospitalized in a Japanese clinical setting, and we characterized the feature of the VRE strain, as well as the clinical background of the patient. The patient has been suffered from diabetes mellitus and developed renal failure. He was administered with vancomycin after every haemodialysis for years to prevent bacterial infection. A strain of enterococci demonstrating a very high-level of resistance (MIC, >256 µg/ml) to both vancomycin and teicoplanin was isolated from gangrene at bed sore in his left lower extremity. This strain was identified as *E. raffinosus* by the conventional protocol of bacterial identification depend on mainly biochemical feature, although this strain could not utilize raffinose. Therefore, the nucleotide sequence of 16S rRNA was checked to confirm the species of this strain. As a conclusion, this strain was identified as *E. raffinosus* and found to harbor a gene closely related to *vanD4* by a sequencing analysis of the PCR product amplified with PCR primers for detection of the genetic determinants for bacterial D-Ala-D-Ala ligases.