

[原 著]

岐阜県下におけるバンコマイシン耐性腸球菌の検出状況と
その判定に関する問題点について山岡一清¹⁾・岩田幾世²⁾・奥田清保²⁾・松川洋子³⁾
沢村治樹⁴⁾・上野一恵⁵⁾¹⁾ 岐阜医療技術短期大学・衛生技術学科²⁾ 岐阜県立岐阜病院・臨床検査部³⁾ 岐阜県立多治見病院・臨床検査部⁴⁾ 岐阜大学附属病院・中央検査部⁵⁾ 岐阜大学名誉教授

(平成 16 年 12 月 7 日受付, 平成 17 年 4 月 8 日受理)

2003 年 1 月～2004 年 7 月までの間に岐阜県内の 3 病院において分離された *Enterococcus* 属 (腸球菌) の検出状況を調査した。その結果, バンコマイシン耐性腸球菌が 5 株分離された。*Enterococcus faecalis* が尿と膿からそれぞれ 1 株ずつ, *Enterococcus avium* 1 株が膿から, また, *Enterococcus faecium* 2 株が糞便材料から分離された。これらの 5 株を, 同定感受性検査を再検査するとともに, PCR 法による遺伝子検査を行った。糞便材料から分離された *E. faecium* の 1 株が, E-test で MIC 値: $\geq 256 \mu\text{g/ml}$ と耐性で *vanA* 遺伝子を保有していたことが判明した。その症例は, MRSA 敗血症および MRSA 肺炎の治療のためにバンコマイシンを長期に使用されており, 監視培養の目的で便培養を行ったところ, *vanA* 遺伝子を有する VRE が分離されたものであった。その他の 4 株については, 同定検査は誤っていなかったが, 感受性検査では, 4 株すべてが感受性となった。また, *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2* 遺伝子を保有していないことが確認され, 感受性検査の誤りが判明した。感受性検査結果の誤りの要因は, 明確にはできなかったが, 接種菌量やコンタミネーションの有無などが考えられた。自動機器による腸球菌の判定では, VRE と判定されたら, 直ちに再検査を実施し報告をするべきである。また, 院内感染拡大防止策の一環として, バンコマイシンを長期に使用している患者では便中の腸球菌など通常, 感染有意菌と判断されない場合でも積極的な検査の実施を考慮すべきものと考えられた。

Key words: VRE, 誤判定, 院内感染, 院内感染対策, 監視培養

はじめに

Enterococcus 属 (腸球菌) は, ほとんどのヒトや動物の腸内細菌叢を構成している細菌種であるが, いわゆる日和見感染を引き起こす病原細菌でもあり, 免疫や各種抵抗力の低下した患者に対して, 致命的な重症

感染症や病院内感染症の原因菌としても重要視されている。バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) による重症感染症の増加は, わが国はもちろんのこと, 欧米諸国においても重要な感染症対策課題として注目されている。

著者連絡先: (〒501-3892) 岐阜県関市市平賀字長峰
795-1
岐阜医療技術短期大学衛生技術学科
山岡一清
TEL: 0575-22-9401
FAX: 0575-23-0884
E-mail: yamaoka@u-gitu-ms.ac.jp

今回, 岐阜県内の 3 病院における *Enterococcus* 属分離状況および薬剤感受性状況を集計した。また, バンコマイシン耐性遺伝子の検索を, *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2* 遺伝子の有無について検査したところ, *vanA* を保有する菌株が分離されたので併せて報告する。

材料と方法

1) 岐阜県下における腸球菌の検出状況

県立岐阜病院, 県立多治見病院では, 種々の臨床材料(尿, 膿汁, 喀痰, 生殖器分泌物など)から分離された *Enterococcus* 属の分離状況と薬剤感受性成績を2003年1月~2004年7月までの期間を集計した。

2) 薬剤感受性検査

県立岐阜病院, 県立多治見病院では上記期間内に分離された *Enterococcus* 属, 岐阜大学病院では, 2003年1月~12月までに臨床材料から分離された *Enterococcus* 属の薬剤感受性成績を集計した。薬剤感受性検査に使用した自動機器は各病院で異なり, 県立岐阜病院では, セプター (BD) を使用し分離された378株について実施した。県立多治見病院では, Vitec II (日本ビオメリュー) を使用し, 分離された194株について実施した。岐阜大学病院では, MIC2000 (長瀬産業) を使用し分離された580株について実施した。3病院ともバンコマイシン (VCM) の感受性カテゴリーは同じで, S (MIC 値: $\leq 4 \mu\text{g/ml}$), I (MIC 値: $8 \sim 16 \mu\text{g/ml}$), R (MIC 値: $\geq 32 \mu\text{g/ml}$) に基づいた成績を臨床に報告している。

再検査については, それぞれの病院にて同一機器および同一ロットを使用して検査した。また, 岐阜大学病院では, さらに E-test (アスカ純薬) を用いて検査した。

3) バンコマイシン耐性遺伝子検査

3病院で検出された腸球菌のうち感受性カテゴリーが I または R の菌株について PCR 法による VCM 耐性遺伝子検査を行った。滅菌蒸留水に一夜培養菌を懸濁させ, 100°C で 10 分加熱後, $12,000 \text{ rpm}$ で 10 分間遠心し, その上清を DNA として使用した。PCR は表 1 に示す *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2* 遺伝子を検出するためのプライマーを用いて実施した。反応条件は, 94°C 2 分の後, 94°C 1 分, 54°C 1 分, 72°C 1 分を 30 サイクル行い, 最後に 72°C 10 分反応させて電気泳動法にて, PCR 産物の有無を確認した^{1), 2)}。

結 果

1) 岐阜県下における腸球菌の検出状況 (表 2)

2003年1月~2004年7月までの期間に3病院において, *Enterococcus* 属が合計 1,138 株分離され分離菌株数の多い順に, *Enterococcus faecalis* が 790 株, *Enterococcus faecium* が 200 株, *Enterococcus avium* が 101 株分離された。3病院とも *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium* の順に多く分離された。

材料別分離状況では, 県立岐阜病院, 県立多治見病院の2病院の集計ではあるが尿から 239 株, 膿から 111 株, 呼吸器系から 80 株, 生殖器系から 61 株など多くの種類の材料から分離された。

表 1 VRE 遺伝子検出のための PCR プライマー

遺伝子	サイズ	プライマー	
<i>vanA</i>	732 bp	A1	5'-GGGAAAACGACAATTGC-3'
		A2	5'-GTACAATGCGGCCGTTA-3'
<i>vanB</i>	635 bp	B1	5'-ATGGGAAGCCGATAGTC-3'
		B2	5'-GATTTTCGTTCTCGACC-3'
<i>vanC1</i>	822 bp	C1	5'-GGTATVAAGGAAACCTA-3'
		C2	5'-CTTCCGCCATCATAFCT-3'
<i>vanC2</i>	439 bp	C3	5'-CTCCTACGATTCTCTTG-3'
		C4	5'-CGAGCAAGACCTTTAAG-3'

文献 1 より

表 2 *Enterococcus* 属の分離状況 (県立岐阜・多治見病院: 2003. 1~2004. 7)

	尿	呼吸器系	消化器系	膿	生殖器系	血液	その他	計
<i>E. faecalis</i>	188	71	7	77	51	15	17	426
<i>E. faecium</i>	24	7		10	2	6	5	54
<i>E. avium</i>	11		5	12	5	1	3	37
その他	16	2	3	12	3	1	12	49
計	239	80	15	111	61	23	37	566

2) 薬剤感受性検査結果

分離株のバンコマイシンに対する薬剤感受性試験結果を表3に示す。県立岐阜病院では、尿から分離された *E. faecalis* の1株 (GP1株) と膿から分離された *E. faecalis* 1株 (GP2株) が MIC 値: $\geq 32 \mu\text{g/ml}$ と VCM 耐性株であった。また、膿から分離された *E. avium* 1株 (GP3株) が MIC 値: $8\sim 16 \mu\text{g/ml}$ と VCM 中間耐性であった。岐阜大学病院では、糞便材料から分離された *E. faecium* 1株 (GU1株) が MIC 値: $8\sim 16 \mu\text{g/ml}$ と VCM 中間耐性で、さらに1株が、MIC 値: $\geq 32 \mu\text{g/m}$ と VCM 耐性株 (GU2株) であった。県立多治見病院からは、低感受性株の分離はなかった。

3) 感受性検査の再検とバンコマイシン耐性遺伝子検査結果

これらのバンコマイシン低感受性腸球菌5株について感受性検査の再検とPCR法によるバンコマイシン耐性遺伝子検査を行った。その結果、岐阜大学病院の糞便材料から分離された *E. faecium* (GU2株) は、E-testによる感受性の再検査でも MIC 値: $\geq 256 \mu\text{g/ml}$ と高値を示し、*vanA* 遺伝子を保有していたことが判明した (図1)。本症例は、52歳男性で、基礎疾患 (肝機能障害、膠原病) を有し、入院時には、MRSA 敗血症および MRSA 肺炎の治療のためにバンコマイシンを長期に使用しており、監視培養の目的で便培養を行ったところ、初回の培養で *vanA* 遺伝子を有する

VREが分離された。その後、2週ごとの便培養を2回行ったが、VREは分離されなかった。

その他の4株 (GP1, 2, 3株, GU1株) については、

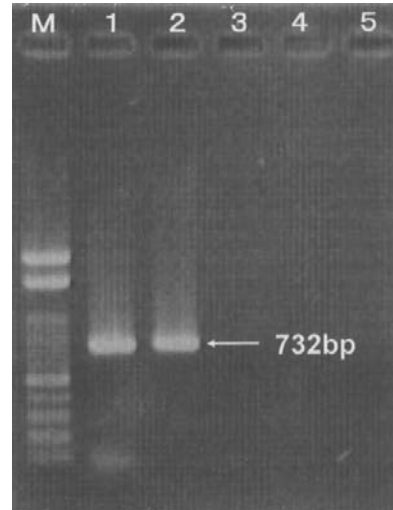


図1 感受性検査でバンコマイシン低感受性と判定された腸球菌におけるPCR法による *vanA* 遺伝子の検出

M: マーカー, Lane 1: 陽性コントロール, Lane 2: GU2株 (岐阜大学病院で分離されたVRE株), Lane 3: GU1株, Lane 4: GP1株, Lane 5: GP2株

表3 バンコマイシンに対する薬剤感受性成績

	<i>E. faecalis</i> (n=275)			<i>E. faecium</i> (n=29)			<i>E. avium</i> (n=28)		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
県立岐阜病院 2003. 1~2004. 7	273		2 GP1, 2株	29			27	1 GP3株	
県立多治見病院 2003. 1~2004. 7	151			25			9		
岐阜大学病院 2003. 1~12	364			144	1 GU1株	1 GU2株	64		
再検結果	GP1, 2, 3株 GU1株: S (MIC 値: $\leq 4 \mu\text{g/ml}$) GU2株: MIC 値: $\geq 256 \mu\text{g/ml}$, E-test による								

S (MIC 値: $\leq 4 \mu\text{g/ml}$), I (MIC 値: $8\sim 16 \mu\text{g/ml}$), R (MIC 値: $\geq 32 \mu\text{g/ml}$)

再検査の結果、同定検査は誤っていなかったが、感受性検査では、すべて感受性となり、*vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2* 遺伝子も保有していなかった。

考 察

バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) は、1988年に *vanA* 遺伝子を保有する *E. faecium* がイギリスにおいて分離されたのが最初であった³⁾。その後、わが国でも藤田らが臨床材料からの分離例を報告し⁴⁾、病院内における注意が必要な、重要な菌種であるとの位置づけがなされた。また、バンコマイシン耐性腸球菌感染症は5類感染症全数把握疾患であり、診断した医師は7日以内に最寄りの保健所に届け出る必要がある⁵⁾。

近年の細菌検査室では、全自動細菌検査装置による同定検査、薬剤感受性検査が、主流となっており、検査結果の判定など煩わしさが減少している反面、技師の感染症に対する知識の資質が問われることも多くなってきている。山根ら⁶⁾は、全自動細菌検査装置を用いたバンコマイシン耐性腸球菌の判定について検討した結果、日常検査で用いる手法でいかにVREを正しく検出するかという点が問題で、特に微量液体希釈法を用いた薬剤感受性を採用する全自動細菌検査装置では、耐性菌を偽感性に誤判定する傾向が指摘された。VREに関しても、*vanA* 型VREのように高度耐性を示す株については、良好に検出されるものの、*vanB* 型VREでは偽感性の頻度が高いとも報告している。これらの偽感性や偽耐性の出現頻度は、判定プログラムを改良したことにより誤判定の頻度を低減することができた。今回筆者らは、全自動細菌検査装置による菌種の同定および薬剤感受性検査の結果を集計したが、RまたはIと判定された5菌株のうち、1株のみが*vanA* 遺伝子保有のVREであった。その他の4株については、直ちに再検査を同一機種および同一ロットで行った結果、同定に誤りはなかったが、感受性株であることが判明したため、臨床へは、結果の訂正報告を行った。感受性検査結果の誤りの要因は、明確にはできなかったが、接種菌量やコンタミネーションなどが考えられた。

VREの検査法には、佐竹ら⁷⁾は、NCCLSで標準化されたディスク拡散法、希釈法、バンコマイシン6μg/ml添加ブレインハートインフュージョン寒天培地を用いる方法があると紹介しており、いずれの方法も24時間培養後に判定を行うことが重要であるとも紹介している。また、河村らは、細菌自動同定機器にてバンコマイシン耐性連鎖球菌と判定された菌株を詳細に解析を行ったところ、バンコマイシンに自然耐

性である *Weissella confusa*, *Pediococcus acidilactici* が誤同定されており、細菌自動同定機器だけに頼ってはいは正しい結果が得られない場合があることに留意すべきであると報告している⁸⁾。全自動細菌検査装置を用いた検査が多くなっている現状において、今後、耐性菌に対する種々の機器での検討が必要であると思われる。VREの報告の重大さを考慮するとVREと判定された菌株が分離された場合、同定および感受性検査の再検査を直ちに行い、最終報告とするべきである。感受性の再検査は、E-testのような簡便な手法でも良い^{7), 9)}。

小栗らは、東日本における患者糞便内のVRE検出状況を調査し、*vanA*, *vanB* 陽性腸球菌を分離している¹⁰⁾。しかし、わが国におけるVREの分離頻度は極めて低く盲目的なスクリーニング培養によるVRE検出は推奨できない。本報告におけるVRE分離症例は、バンコマイシンの長期使用例であり、院内感染予防の一環として糞便のスクリーニング培養を実施した。その後、患者糞便の検査を2回行ったが、VREは分離されず、他の患者からも分離されなかったことから、感染拡大を未然に防止できた可能性がある。バンコマイシンを長期に使用している患者では便中の腸球菌など通常、感染有意菌と判断されない場合でも積極的な感受性検査の実施を考慮すべきものと考えられた。

文 献

- 1) Duka-Malen, S., S. Evers, P. Courvalin. 1995. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33: 24-27.
- 2) 小澤良之, 橋本由利子, 野村隆浩, 池 康嘉. 1999. 薬剤耐性機構と疫学—バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE)—, *臨床と微生物* 26: 111-120.
- 3) Leclercq, R., E. Derlot, J. Duval, P. Courvalin. 1988. Plasmid mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N. Eng. J. Med.* 319: 157-161.
- 4) 藤田直久, 谷本弘一, 富田治芳, 他. 1997. 高度バンコマイシン耐性 (*vanA*) 腸球菌 (*E. faecium*) の尿路感染症患者からの分離とその遺伝学的性質. *日本細菌学会雑誌* 52: 174.
- 5) 荒川宣親. 2000. 感染症の話, VRE (Vancomycin Resistant Enterococci: バンコマイシン耐性腸球菌). *IDWR* 20: 8-10.
- 6) 仲宗根 勇, 山根誠久, 他. 2003. 全自動細菌検査装置, RAISUSによるバンコマイシン耐性腸球菌の判定. *JARMAM* 14: 151-158.
- 7) 佐竹幸子. 2004. 院内感染対策—VRE (VanA, VanB タイプ). *臨床と微生物* 31: 437-444.

- 8) 河村好章, 伊藤葉子, 江崎孝行, 他. 2003. バンコマイシン耐性連鎖球菌と誤同定された *Weissella confusa* 及び *Pediococcus acidilactici* の分離例—細菌自動同定装置による誤同定のケースあれこれ—. 日本臨床微生物雑誌 13(抄録): 192.
- 9) Farrag, N., I. Eltringham, H. Liddy. 1996. Vancomycin-dependent *Enterococcus faecalis*, Lancet 348: 1581-1582.
- 10) 小栗豊子, 三澤成毅, 中村文子, 他. 2001. 東日本における患者糞便内のバンコマイシン耐性 *Enterococcus* (VRE) 検出状況—45 施設の成績—. 感染症学雑誌 75: 541-550.

Incidence of Vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE) in Gifu Prefecture: Evaluation of the Validity of Fully Automated Microbiology Systems

Kazukiyo Yamaoka¹⁾, Ikuyo Iwata²⁾, Kiyoyasu Okuda²⁾, Youko Matukawa³⁾,
Haruki Sawamura⁴⁾, Kazue Ueno⁵⁾

¹⁾ Gifu College of Medical Technology

²⁾ Clinical Laboratory of Gifu Prefectural Gifu Hospital

³⁾ Clinical Laboratory of Gifu Prefectural Tajimi Hospital

⁴⁾ Clinical Laboratory of Gifu University General Hospital

⁵⁾ Professor emeritus of Gifu University

Five strains of enterococci with reduced susceptibility to Vancomycin (VCM) were isolated from three hospitals in Gifu Prefecture between January 2003 and July 2004. These five strains were retested in identification and susceptibility with the same fully automated microbiology systems, with PCR detection of VRE genes. Identification of all strains produced the same results, however, susceptibility of four strains showed VCM-susceptible. Only one strain showed VCM-resistance with MIC of 256 $\mu\text{g}/\text{ml}$ or over in gradient diffusion test (E-test), carrying a *vanA* gene. The patient who had VRE was 52-year-old man with long-term use of VCM for the treatment of MRSA septicemia and MRSA pneumonia. VRE were isolated from stool sample for screening culture. When VRE is detected using fully automated microbiology system, identification and susceptibility should be retested before final reporting. Screening culture may be recommended in patients with long-term use of VCM to prevent the spread of VRE in the hospital.