

[症例報告]

本邦でヒト検体から分離されたバンコマイシン依存発育型腸球菌 (Vancomycin-dependent enterococci : VDE) の1例

川又大右¹⁾・佐々木雅一²⁾・佐藤麗華¹⁾・前橋由佳¹⁾・橘 秀昭³⁾・山口哲央⁴⁾

¹⁾ 戸田中央臨床検査研究所・細菌検査科

²⁾ 東邦大学医療センター大森病院・微生物検査室

³⁾ 昭和大学・歯学部

⁴⁾ 東邦大学・医学部微生物・感染症学講座

(令和元年12月14日受付, 令和2年2月28日受理)

今回我々は, vancomycin (VCM) 存在下のみで発育することが可能なバンコマイシン依存発育型腸球菌 (vancomycin-dependent enterococci : VDE) を臨床検体から分離した。VCM が含まれない通常培地では発育しないため, 菌種同定および薬剤感受性検査の判定が困難であった。解析の結果, *vanB* 遺伝子保有のバンコマイシン耐性腸球菌 (vancomycin resistant enterococci : VRE) であり, ペプチドグリカン前駆体の D-alanyl-D-alanine 末端合成に必要な D-Ala : D-Ala ligase の責任遺伝子である *ddl* 遺伝子内に 1,060 bp の挿入配列が確認された。D-Ala : D-Ala ligase が機能しなくなることで, VCM 存在下のみで発育する菌株が発生したと考えられた。世界的にも報告が少なく, 貴重な症例であり, 今後の臨床検査分野における VDE を含めた VRE 検出法に役立つと考える。

Key words: Vancomycin-dependent enterococci : VDE, VRE

序 文

腸球菌は腸管内常在菌であり, 比較的病原性は低い菌種の一つであるが, 尿路感染症や消化器系感染症, 菌血症の起原菌としても重要である。様々な薬剤に対して耐性を示す点も重要であり, 特に *Enterococcus faecium* に対する第一選択薬である vancomycin (VCM) への耐性は治療戦略上問題となる。バンコマイシン耐性腸球菌 (vancomycin resistant enterococci : VRE) は, 米国などの欧米諸国において 2000 年代から急激に検出が増えており, 治療抵抗性を示す腸球菌感染症の増加が懸念されているが, さらにバンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌 (vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* : VRSA) を発生させる供給源としても注意が必要である。幸いわが国では VRE の検出率は低く, VRSA の報告も過去にないため, 米国ほど深刻な状況にはないが, 今後検出が増える可能性は否定できない。

今回我々は通常の寒天培地では発育せず, VCM 含有培地のみで発育することが可能な腸球菌を検出した。解析の結果, この腸球菌はバンコマイシン依存発育型腸球菌 (vancomycin-dependent enterococci : VDE) と呼ばれるもので, 世界でも報告が少なく, 本邦ではヒトから検出した初

めのケースであった。VDE は VRE から表現型が変化した耐性菌であるが, VCM が含まれない通常培地では発育することができず, 標準的な検出方法では見落としてしまう可能性がある。検出には注意が必要であり, 貴重な症例と考え報告する。

症 例

患者 : 90 歳, 女性

既往歴 : 僧帽弁閉鎖不全, 発作性心房細動に伴う心不全, 嚥下機能低下

臨床経過 : 平成 XX 年 10 月より尿路感染症のため入院。以降, 尿路感染症, 胆道感染とともに長期に渡る中心静脈カテーテル (IVH) 留置のため, 血管内カテーテル関連血流感染症 (CRBSI) を繰り返していた。入院中の血液培養検査では *Enterococcus faecalis*, *Corynebacterium* sp., methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), methicillin resistant coagulase negative *Staphylococcus* (MRCNS), 基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) 産生腸内細菌科細菌などが分離されており, 過去に tazobactam/piperacillin (TAZ/PIPC), VCM, cefmetazole (CMZ) などの抗菌薬が投与されていた。

今回, 平成 XX+1 年 8 月 27 日より弛張熱を認め, 菌血症を疑い CMZ を開始。血液培養検査で *E. faecalis* および MRSA が検出されたため, 9 月 1 日より VCM および TAZ/PIPC の投与が開始された。その後, 状態は改善傾向にあったが, 9 月 12 日の IVH カテーテル交換時のカテ先培養より VRE および MRSA が検出された。同患者において VRE の検出は過去になく, 今回が初めてであった。同時に行った血

著者連絡先 : (〒143-8540) 東京都大田区大森西 5-21-16 (1 号館・9 階)
東邦大学医学部微生物・感染症学講座
山口哲央
TEL: 03-3762-4151(内線 2396)
FAX: 03-5493-5415
E-mail: tetsuo.yamaguchi@med.toho-u.ac.jp

表 1. 各種同定検査結果

| 機器・キット | TUM18855 株 (VDE) | TUM18856 株 (VRE) |
|---|--------------------------------------|---------------------------------------|
| MicroScan WalkAway (Pos Breakpoint Combo 3.2J) | 発育不良 菌種名なし | <i>Enterococcus faecium</i> 76.32% |
| BD フェニックス (PMIC/ID-86) | <i>Enterococcus faecium</i> 94% | <i>Enterococcus faecium</i> 94% |
| VITEK2 (GP カード) | <i>Enterococcus faecium</i> 97% | <i>Enterococcus faecium</i> 97% |
| rapid ID32 STREP | <i>Enterococcus faecium</i> 98.8% | <i>Enterococcus faecium</i> 98.8% |
| VITEK-MS | <i>Enterococcus faecium</i> 99% | <i>Enterococcus faecium</i> 99% |

MicroScan WalkAway は培養による細菌の十分な発育が前提の検査であり、VDE の同定は困難であった。

VDE, vancomycin-dependent enterococci ; VRE, vancomycin resistant enterococci

表 2. 薬剤感受性結果

| 薬剤名 | Microscan WalkAway (Pos Breakpoint Combo 3.2J) | | VITEK 2 (AST-P595) | |
|--------------|---|----------|-----------------------|----------|
| | TUM18855 (目視) | TUM18856 | TUM18855 | TUM18856 |
| penicillin G | 判定不能 (0.12) | >8 | 判定不能 | 32 |
| ampicillin | 判定不能 (NG) | >8 | 判定不能 | ≥32 |
| erythromycin | 判定不能 (NG) | >4 | 判定不能 | ≥8 |
| minocycline | 判定不能 (NG) | ≤4 | ≥16 | ≥16 |
| levofloxacin | 判定不能 (4) | >4 | 判定不能 | ≥8 |
| vancomycin | 判定不能 (>16) | >16 | 判定不能 | ≥32 |
| teicoplanin | 判定不能 (NG) | ≤8 | 判定不能 | ≤0.5 |
| linezolid | 判定不能 (NG) | ≤2 | - | - |

NG: 目視にて発育なし - : 未搭載薬剤

TUM18855 株は、Microscan WalkAway においてグロースウェル発育不良による判定不能であったため、目視による結果を参考値として記載 (正式な結果としては判定不能である)。

液培養検査では培養陰性であり、汚染菌である可能性が高かったが、追加で行った同患者の便を対象とした VRE スクリーニングでは、VRE 選択培地上に菌の発育を認めた (TUM18855)。この VRE 選択培地より分離された TUM18855 株は、羊血液寒天培地 M70 や BTB 乳糖加寒天培地などでは発育を認めず、VCM 含有培地のみで発育が可能な VDE と考えられた。これら耐性腸球菌は保菌と考えられたため、治療対象とはしなかったが、当該患者を個室隔離とし接触感染予防策を実施した。

培養結果と菌株の特徴

便検体は、BTB 乳糖加寒天培地、VRE 選択培地 (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社) を用いて好気条件下にて 35~36°C 48 時間分離培養を行った。BTB 乳糖加寒天培地には、*Enterococcus* sp. と *Candida* sp. を疑う発育、VRE 選択培地には VRE を疑うピンク色の発育を認めた。VRE 選択培地上のコロニー (TUM18855 株) はグラム染色上陽性球菌であり、全自動同定感受性装置 MicroScan WalkAway 96SI (ベックマン・コールター株式会社) を使用し、Pos Break-

point Combo 3.2J にて菌種同定を行ったところ、グロースウェルに発育を認めず菌種同定不能であった (表 1)。薬剤感受性結果も機械読みでは判定不能となったが、目視にて発育の確認を行った結果、VCM 含有ウェルでは発育を認め、MIC は >16 µg/mL を示していた。その他の薬剤では発育不良であったが、penicillin G (PCG)、levofloxacin (LVFX) に軽度の発育を認めた。参考値ながら MIC 値を測定したが、グロースウェルに発育を認めていない状態での値であり、信頼性はないと考えられた (表 2)。この菌をミュラーヒントン II 寒天培地 (MHA) (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社) および羊血液寒天培地 M70 (栄研化学株式会社)、BTB 乳糖加寒天培地に塗布し継代培養を試みたが発育を認めず、VCM 存在下でのみ良好な発育を認めた (図 1)。その後、ampicillin (ABPC)、levofloxacin (LVFX)、VCM、teicoplanin (TEIC) についてディスク拡散法を実施した結果、VCM の周囲にのみ良好な発育を認め、他の MHA には発育を認めなかった (図 2)。VCM 存在下でのみ発育が可能な VDE であることが分かった。質量分析装置 (VITEK-MS、バイオメリュー・ジャパン株式会社) では *Enterococcus fae-*

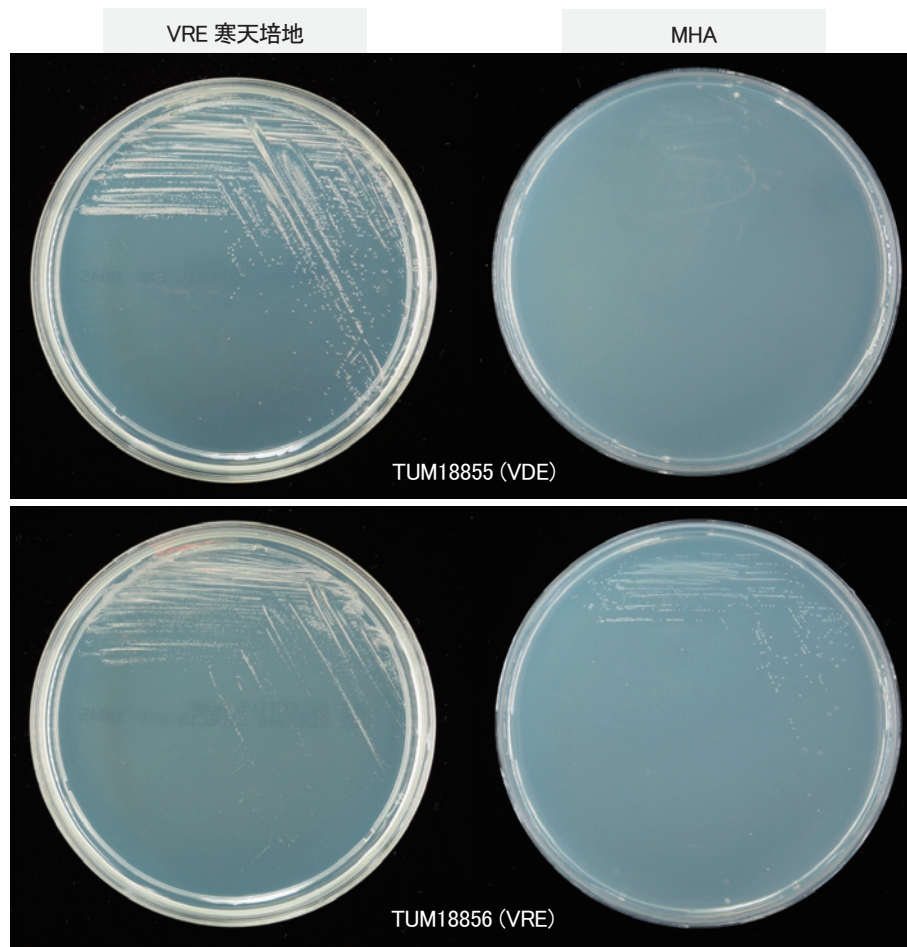


図 1. VRE 選択培地と抗菌薬非含有 MHA 培地を用いた培養結果 (24 時間培養)
 TUM18855 (VDE) : VRE 選択培地では良好な発育を認めたものの, MHA では発育を認めなかった。
 TUM18856 (VRE) : VRE 選択培地, MHA 共に良好な発育を認めた。
 VDE, vancomycin-dependent enterococci ; VRE, vancomycin resistant enterococci

cium (99%) と同定された (表 1)。

TUM18855 株が分離された便検体から, 再度, 羊血液寒天培地 M70, BTB 乳糖加寒天培地, VRE 選択培地を用い培養を実施したところ, 羊血液寒天培地 M70, BTB 乳糖加寒天培地より VDE 様を示さない VRE が分離された (TUM18856 株)。この菌株は VCM 非含有培地および VRE 選択培地においても良好な発育を認め, Etest 法, ディスク法において VCM 耐性が確認された (図 1, 図 2)。MicroScan Walk-Away による同定確率は 76.32% と低く, 質量分析装置 (VITEK-MS) では *E. faecium* (99%) と同定 (表 1)。VRE 選択培地上から分離した TUM18855 株 (VDE) と, 羊血液寒天培地 M70 および BTB 乳糖加寒天培地から分離した TUM18856 株 (VRE) は同一菌と捉え, *E. faecium* (VRE) として臨床へ報告した。TUM18855 株 (VDE) は VCM 非含有培地では発育を認めず, MicroScan Walk-Away による菌種同定が困難であったため, VITEK2 (GP, AST-P595) および rapid ID32 STREP (バイオメリュー・ジャパン株式会社) を用いて菌種同定を追加で行なったところ, *E. faecium* と同定された (表 1)。VITEK2 による薬剤感受性結果は, 多くの薬剤が陽性コントロール発育不良による判定不能であっ

たが, minocycline (MINO) は $\geq 16 \mu\text{g}/\text{mL}$ と判定された (表 2)。TUM18855 株 (VDE) および TUM18856 株 (VRE) は, 東邦大学医学部 微生物・感染症学講座にて BD フェニックス (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社) により菌種同定を追加し, 菌株から得られた DNA を用いて遺伝子解析を行なった。BD フェニックスを用いたグラムポジティブ PMIC/ID-86 パネルによる菌種同定では *E. faecium* (94%) と判定された (表 1)。16S rRNA 遺伝子解析では *E. faecium* の type strain である LMG 11423 と 99.8% の相同性を示した。バンコマイシン耐性遺伝子 (*vanA* および *vanB*) の保有状況を PCR により確認したところ, *vanA* は検出されず, *vanB* が検出された (Primer はそれぞれ *vanA* が VanA A1 : 5'-GGAAAACGACAATTGC-3' および VanA A2 : 5'-GTACAA TGCGGCCGTTA-3', *vanB* が VanB B1 : 5'-ATGGGAAGC CGATAGTC-3' および VanB B2 : 5'-GATTTTCGTTCTCTCGA CC-3' を用いた)¹⁾²⁾。

ddl 遺伝子変異の検出を目的として *ddl*_Fw : 5'-TAGGTG GAAGCGGATTGA-3' および *ddl*_Re : 5'-AAAGATTGACG CTGATGG-3' を用いて PCR を行なったところ, TUM18856 株では想定されたサイズ (202 bp) の PCR 産物が確認された

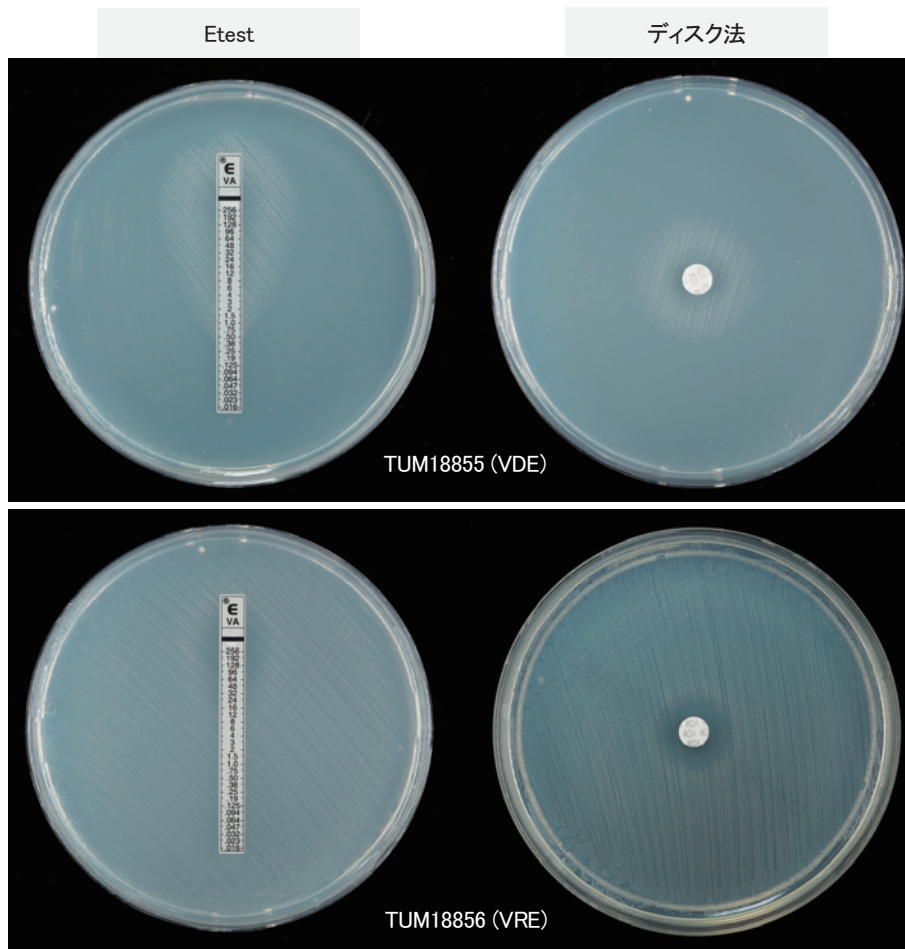


図2. Etest 法およびディスク法 (vancomycin および MHA)
 TUM18855 株 (VDE) : Etest テープおよびディスク周辺のみ発育を認める。
 TUM18856 株 (VRE) : 培地全体に発育を認め、Etest テープおよびディスク周辺のみ発育阻止を認める。
 VDE, vancomycin-dependent enterococci ; VRE, vancomycin resistant enterococci

が、TUM18855 株では 1,200 bp 付近に PCR 産物が確認された。サンガー法により塩基配列を確認したところ、TUM18855 株では *ddl* 遺伝子内に 1,060 bp の挿入配列を認め、さらにアミノ酸に frame shift 変異が起こっていた。

考 察

VDE は 1993 年に初めて報告された³⁾。菌の発育に VCM が必要であるという衝撃とグリコペプチド系抗菌薬高度耐性化の観点から、当時は様々な議論がなされた^{4)~7)}。世界的に広がる可能性が懸念されたが、幸いその後も VDE の報告は限定されている^{3)8)~11)}。本邦においては VRE 自体の検出が少ないため、遭遇する機会は少ないと考えられるが、通常培養が困難であることを考えると、これまでにその存在が見逃されていた可能性は否定できない。VDE は VRE の表現形が変わって発生したタイプであり、基本的に VCM 耐性である。耐性菌の見逃しは抗菌薬適正使用に大きく影響するため、注意が必要である。

まず、TUM18855 株 (VDE) は通常培養では検出できなかったことが分かる。VDE を検出するためには VCM 含有

培地を用いることが重要であり、それがスタートになる。さらに菌種の同定にも工夫が必要である。通常培地では発育しないため、通常培養を基本とする方法では同定が難しいということになる。今回の検討では MicroScan WalkAway ではグロースウェルを含めた各ウェルにおける発育不良により菌種同定が難しく、VITEK2, rapid ID32 STREP および BD フェニックスでは *E. faecium* と同定できた。質量分析装置、16S rRNA 遺伝子解析でも同様の結果であり、VITEK2, rapid ID32 STREP および BD フェニックスでは正確に同定できたことが分かる。しかし、薬剤感受性検査は判定が難しい。VCM 以外の薬剤ではそもそも発育しないため、効果の有無は判定できないが、臨床現場では VRE に準じた対応が必要である。VDE の発生機序は、ペプチドグリカン (細胞壁) 前駆体の D-alanyl-D-alanine 末端合成に必要な D-Alanine : D-Alanine (D-Ala : D-Ala) ligase の責任遺伝子である *ddl* 遺伝子の変異によって起こると報告されている¹²⁾¹³⁾。*Ddl* 遺伝子に変異が起きるとペプチドグリカン合成が行えなくなり、細菌は増殖どころか生存できなくなる。しかし、他の ligase (例えば *vanA* 遺伝子や *vanB* 遺伝子がコードする D-Ala : D-

Lactate (Lac) ligase など) を保持している場合は D-Ala : D-Ala ligase がなくてもペプチドグリカン合成できるため、増殖が可能となる。すなわち、VDE が発生するためには VRE の存在が不可欠ということになる。VRE は少なくとも二つの ligase (D-Ala : D-Ala ligase および D-Ala : D-Lac ligase) を保持しているが、通常時のペプチドグリカン合成では D-Ala : D-Ala ligase が主に働いていると考えられる。ここで *ddl* 遺伝子に変異が起こると、D-Ala : D-Ala ligase が失活し細胞増殖ができなくなるが、VCM 刺激が加わることで D-Ala : D-Lac ligase が活性化され細胞増殖が可能となる、大変興味深い現象である。本症例では解析の結果、TUM18855 (VDE)、TUM18856 (VRE) とともに *vanB* 遺伝子保有の VRE 株であり、TUM18855 株 (VDE) の *ddl* 遺伝子内には 1,060 bp の挿入配列が確認された。アミノ酸に frame shift 変異も起こっており、ligase の機能に影響を与えている可能性が高いと考えられた。

VDE は VCM 負荷により発生すると考えられている³⁾。TUM18856 (VRE) は *vanB* 遺伝子保有株であり、TEIC 感性株であったが、TUM18855 (VDE) において *vanB* の発現量が高くなっているとすれば、VCM および TEIC の感受性が悪くなっている可能性がある。実際、VDE から TEIC 耐性株が発生したという報告もある¹⁴⁾。VDE はグリコペプチド系抗菌薬高度耐性化の過程である可能性についても注意が必要である。

近年、AMR 対策アクションプランが制定され、抗菌薬適正使用の重要性が指摘されている。抗菌薬の使用制限と感染症起因菌に対する適切な抗菌薬の選択が重要であるが、高齢者への対応は難しい。特に 90 歳を超えるような超高齢者では、嚥下機能の低下により摂食困難となることも多く、中心静脈栄養を必要とするような場合は、誤嚥性肺炎や CRBSI、それに加えて尿路感染症を繰り返すことも少なくない。このようなケースで入院期間が長期間におよぶと、抗菌薬が適正に使用されていたとしても、徐々に耐性菌の検出が増えてくる。特に問題となっているのは腸管内常在菌の耐性化である。何らかの理由で抗菌薬が投与されると胆汁から排泄された抗菌薬が腸管内で細菌叢を攪乱し、耐性菌が選択される。わが国では特に ESBL 産生腸内細菌科細菌の検出が年々増えており問題になっているが、世界的にはより深刻なカルバペネム耐性腸内細菌科細菌や VRE の検出が問題となっている。

今後起こり得る様々な耐性菌の広がりには備える必要があるため、本症例のような入院期間と抗菌薬投与が長期におよぶ患者や、入退院を繰り返す患者に対して、VDE を含めた VRE スクリーニングを積極的に行うことが治療および院内感染対策において重要となる。

今回、我々は、1 症例の中で VRE とそこから派生したと考えられる VDE を経験し、VDE の特徴と VDE 発生の原因を検討した。これらの情報が、今後の臨床検査分野における

VDE を含めた VRE 検出に役立つことを期待している。

利益相反：申告すべき利益相反なし

文 献

- 1) 富田治芳, 野村隆浩, 久留島潤, 他. 2014. バンコマイシン耐性腸球菌. 日本臨床微生物学雑誌 24: 180-194.
- 2) Dutka-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.
- 3) Fraimow, HS, DL Jungkind, DW Lander, et al. 1994. Urinary tract infection with an *Enterococcus faecalis* isolate that requires vancomycin for growth. Ann Intern Med 121: 22-26.
- 4) Farrag, N, I Eltringham, H Liddy. 1996. Vancomycin-dependent *Enterococcus faecalis*. Lancet 348: 1581-1582.
- 5) Wilks, M. 1997. Vancomycin-dependent enterococcus. Lancet 349: 429.
- 6) Hayek, L. 1997. Vancomycin-dependent enterococcus. Sensitivity plate of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from urine. Lancet 349: 429-430.
- 7) Rossney, AS, SJ McConkey, CT Keane. 1997. Vancomycin-dependent enterococcus. Lancet 349: 430.
- 8) Green, M, JH Shlaes, K Barbadora, et al. 1995. Bacteremia due to vancomycin-dependent *Enterococcus faecium*. Clin Infect Dis 20: 712-714.
- 9) Majumdar, A, GW Lipkin, TS Elliott, et al. 1999. Vancomycin-dependent enterococci in a uraemic patient with sclerosing peritonitis. Nephrol Dial Transplant 14: 765-767.
- 10) Tambyah, PA, JA Marx, DG Maki. 2004. Nosocomial infection with vancomycin-dependent enterococci. Emerg Infect Dis 10: 1277-1281.
- 11) Banerjee, T, S Anupurba. 2013. Isolation and characterization of the first vancomycin-dependent *Enterococcus* from India. Indian J Med Microbiol 31: 91-92.
- 12) Baptista, M, F Depardieu, P Reynolds, et al. 1997. Mutations leading to increased levels of resistance to glycopeptide antibiotics in VanB-type enterococci. Mol Microbiol 25: 93-105.
- 13) Sng, LH, N Cornish, CC Knapp, et al. 1998. Antimicrobial susceptibility testing of a clinical isolate of vancomycin-dependent enterococcus using D-alanine-D-alanine as a growth supplement. Am J Clin Pathol 109: 399-403.
- 14) Mitchell, SL, LM Mattei, K Alby. 2017. Whole genome characterization of a naturally occurring vancomycin-dependent *Enterococcus faecium* from a patient with bacteremia. Infect Genet Evol 52: 96-99.

A case report of Vancomycin-dependent Enterococci from human sample in Japan

Daiyu Kawamata¹⁾, Masakazu Sasaki²⁾, Reika Sato¹⁾, Yuka Maebashi¹⁾, Hideaki Tachibana³⁾, Tetsuo Yamaguchi⁴⁾

¹⁾Toda Central Medical Laboratory

²⁾Department of Clinical Laboratories, Toho University Omori Medical Center

³⁾Department of Dentistry, Showa University

⁴⁾Department of Microbiology and Infectious Disease, Toho University School of Medicine

We obtained vancomycin-dependent Enterococci (VDE) from clinical specimens, which can grow only with the presence of vancomycin. Since growth of the strain was not observed on normal agar medium plate without vancomycin, it was difficult to identify bacterial species and determine antimicrobial susceptibility. As a result of analysis, the strain was Vancomycin Resistant Enterococci (VRE) possessing *vanB* gene, and insertion sequence of 1,060 bp into *ddl* gene, which is responsible gene of D-Ala: D-Ala ligase required for D-alanyl-D-alanine terminal synthesis of peptidoglycan, was confirmed. It was considered that the strain that grew only in the presence of vancomycin was generated by the failure of D-Ala: D-Ala ligase. There are few reports worldwide, and it is a valuable case, and I think it will be useful for VRE detection methods including VDE in the future clinical laboratory field.