

千葉市におけるカルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌の検出状況

東尾 裕江、鈴木 信一、吉原 純子、篠田 亮子、北橋 智子

三枝 真奈美、横井 一、山本 一重

(環境保健研究所 健康科学課)

要 旨 2017年4月から2018年7月までの期間に、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) として当所に搬入された16株について、PCR法による薬剤耐性遺伝子の検索とディスク法によるβ-ラクタマーゼ産生性の確認を行った。CREの菌種は、*Enterobacter cloacae*が12株、*Enterobacter aerogenes*が4株であった。CRE16株のうち、*E.cloacae*10株(62.5%)がカルバペネマーゼ (IMP型メタロβ-ラクタマーゼ) 遺伝子を保有するカルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌 (CPE) であり、残りの*E.cloacae*2株は、EBC型AmpCβ-ラクタマーゼ遺伝子を保有するカルバペネマーゼ非産生菌であった。一方、*E.aerogenes*4株は、検索対象としたAmpCβ-ラクタマーゼ遺伝子を保有しないカルバペネマーゼ非産生菌であった。

Key Words : カルバペネム耐性, CRE, カルバペネマーゼ, CPE

1. はじめに

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (carbapenem-resistant Enterobacteriaceae : CRE) 感染症は、2014年9月19日から感染症法に基づき、医療機関で発生した全例について保健所への届出が義務付けられている五類全数届出疾病である。平成29年3月28日付け厚生労働省通知¹⁾ (以下、通知) において、届出があった株は地方衛生研究所でβ-ラクタマーゼ遺伝子の検出と阻害剤を用いたβ-ラクタマーゼ産生性の確認をすることとなった。

カルバペネム耐性のメカニズムは、カルバペネム分解酵素 (カルバペネマーゼ) の関与や細胞膜透過性の低下などが挙げられる。カルバペネマーゼはβ-ラクタマーゼの一つであるが、カルバペネム系薬剤の分解能が高く、カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌 (carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* : CPE) は、それ自体が広域β-ラクタム剤に汎耐性を示し、他の複数の系統の薬剤にも耐性を示すことが多い²⁾。カルバペネマーゼ遺伝子は別の耐性遺伝子と共にプラスミド上に存在することが多い³⁾ことから、プラスミドの伝達による新たなCPEの出現や院内感染への関与⁴⁾が報告されている。このことから、搬入され

たCREがCPEであるか否かを確認することが重要となる³⁾。

そこで今回、2017年4月から2018年7月の間に当所に搬入されたCREについて、β-ラクタマーゼ遺伝子の検出とβ-ラクタマーゼ産生性の確認を実施したので、その結果を報告する。

2. 材料と方法

2.1 菌株

2017年4月から2018年7月までに当所に搬入されたCREは16株であった。血液から5株、腹水から4株、尿から2株、その他に臍臓腫瘍、喀痰、褥瘡、膿及び術後のドレーン排液から各1株が分離された。医療機関でCRE判定に用いられた薬剤はメロペネム (MPM) のみ、イミペネム (IPM) とセフメタゾール (CMZ) の組み合わせ、若しくはその両者であった (表1)。

2.2 菌種の同定

BTB培地に純培養後、Api20E (バイオメリュー・ジャパン) を用いて行った。

2.3 薬剤耐性遺伝子の検索

通知¹⁾に示されたカルバペネマーゼ遺伝子 (IMP、

NDM、KPC、OXA-48、VIM、GES、SMB)、基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ遺伝子 (CTX-M、TEM、SHV) 及び AmpC β-ラクタマーゼ遺伝子 (MOX、CIT、DHA、ACC、EBC、FOX) について、国立感染症研究所ホームページに掲載されている病原体検出マニュアル「カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症」⁵⁾に従い PCR 法を実施した。

2.4 β-ラクタマーゼ産生性の確認

CRE が産生しているβ-ラクタマーゼの種類を推定するために、通知¹⁾に示されたβ-ラクタマーゼ阻害剤であるメルカプト酢酸 (SMA) 又はアミノフェニルボロン酸 (APB) を用いたディスク法を実施した。前述の病原体検出マニュアル「カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症」⁵⁾に従い、阻害剤の存在下で、阻止円径の拡張がみられたものを阻害有り (陽性) とし、SMA によりカルバペネム系薬剤の阻止円が拡張した場合はメタロβ-ラクタマーゼ産生、APB により CMZ の阻止円が 5mm 以上拡張した場合は AmpC β-ラクタマーゼ産生と判定した。なお、メタロβ-ラクタマーゼをコードする遺伝子は、IMP、NDM、VIM 及び SMB の遺伝子型に分類される。

2.5 カルバペネム系薬剤に対する感受性

CRE 16 株の MPM と IPM に対する感受性を確認するため、CLSI のディスク拡散法に準じ、MPM (10µg/ディスク) 及び IPM (10µg/ディスク) に対する阻止円径を測定した。

表 1 CRE の分離由来臨床検体と判定薬剤

No.	菌種	臨床検体	判定に用いた薬剤	
			MPM	IPM+CMZ
1	<i>E.cloacae</i>	血液	+	+
2	<i>E.cloacae</i>	血液	+	NT
3	<i>E.cloacae</i>	血液	+	+
4	<i>E.cloacae</i>	血液	+	NT
5	<i>E.cloacae</i>	腹水	+	NT
6	<i>E.cloacae</i>	腹水	+	NT
7	<i>E.cloacae</i>	腹水	+	+
8	<i>E.cloacae</i>	腹水	+	+
9	<i>E.cloacae</i>	脾臓腫瘍	+	+
10	<i>E.cloacae</i>	尿	+	+
11	<i>E.cloacae</i>	喀痰	+	NT
12	<i>E.cloacae</i>	褥瘡	+	NT
13	<i>E.aerogenes</i>	血液	NT	+
14	<i>E.aerogenes</i>	尿	NT	+
15	<i>E.aerogenes</i>	膿	NT	+
16	<i>E.aerogenes</i>	術後のドレーン排液	NT	+

MPM:メロベナム IPM:イミベナム CMZ:セフメタゾール NT:未実施(不明も含む)

3. 結果

CRE 16 株について、菌種の同定を行った結果、*Enterobacter cloacae* が 12 株、*Enterobacter aerogenes* が 4 株であった。

PCR 法による薬剤耐性遺伝子の検索において、CRE 16 株のうち、*E.cloacae* 10 株 (62.5%) が IMP 型メタロβ-ラクタマーゼ遺伝子を保有していた。残りの *E.cloacae* 2 株は、IMP 型メタロβ-ラクタマーゼ遺伝子を保有していなかったが、EBC 型 AmpC β-ラクタマーゼ遺伝子を保有していた。*E.aerogenes* 4 株は、今回、検索対象としたβ-ラクタマーゼ遺伝子を保有していなかった (表 2)。なお、データとして示していないが、基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ遺伝子を保有する CRE は認められなかった。

ディスク法によるβ-ラクタマーゼ産生性の確認において、IMP 型メタロβ-ラクタマーゼ遺伝子を保有する *E.cloacae* 10 株については、SMA による阻害が認められたことから、メタロβ-ラクタマーゼを産生する CPE であることが示された。また、これらの 10 株のうち 2 株については、APB による阻害も認められた。EBC 型 AmpC β-ラクタマーゼ遺伝子を保有する *E.cloacae* 2 株については、APB による阻害が認められ、AmpC β-ラクタマーゼを産生する CRE であることが示された。一方、β-ラクタマーゼ遺伝子を保有していなかった *E.aerogenes* 4 株については、APB による阻害が認められ、AmpC β-ラクタマーゼを産生する CRE であることが示された (表 2)。

表 2 薬剤耐性遺伝子の検索とβ-ラクタマーゼの産生性

No.	菌種	メタロ-β-ラクタマーゼ		AmpC β-ラクタマーゼ	
		PCR	ディスク法	PCR	ディスク法
1	<i>E.cloacae</i>	IMP	+	-	-
2	<i>E.cloacae</i>	IMP	+	-	-
3	<i>E.cloacae</i>	IMP	+	-	-
4	<i>E.cloacae</i>	IMP	+	-	-
5	<i>E.cloacae</i>	IMP	+	-	-
6	<i>E.cloacae</i>	IMP	+	-	-
7	<i>E.cloacae</i>	IMP	+	-	-
8	<i>E.cloacae</i>	-	-	EBC	+
9	<i>E.cloacae</i>	IMP	+	-	+
10	<i>E.cloacae</i>	IMP	+	-	-
11	<i>E.cloacae</i>	IMP	+	-	+
12	<i>E.cloacae</i>	-	-	EBC	+
13	<i>E.aerogenes</i>	-	-	-	+
14	<i>E.aerogenes</i>	-	-	-	+
15	<i>E.aerogenes</i>	-	-	-	+
16	<i>E.aerogenes</i>	-	-	-	+

IMP:IMP型メタロβ-ラクタマーゼ EBC:EBC型AmpC β-ラクタマーゼ

カルバペネム系薬剤に対する感受性を確認するため、MPM と IPM に対する阻止円径の測定を実施した。その結果、PCR 法とディスク法により CPE と判定された *E.cloacae* 10 株のうち、9 株は MPM と IPM に対する阻止円径が CRE の届出基準である 22mm 以下であったが、残りの 1 株は MPM と IPM に対する阻止円径が共に 22mm 以上であった。一方、カルバペネマーゼ非産生と判定された *E.cloacae* 2 株のうち、1 株は MPM が 24mm 以上、IPM が 22mm 以下であったが、残り 1 株は MPM と IPM が共に 24mm 以上であった。なお、カルバペネマーゼ非産生と判定された *E.aerogenes* 4 株のうち、3 株は MPM が 24mm 以上、IPM が 22mm 以下であったが、残り 1 株は MPM と IPM が共に 26mm 以上であった。

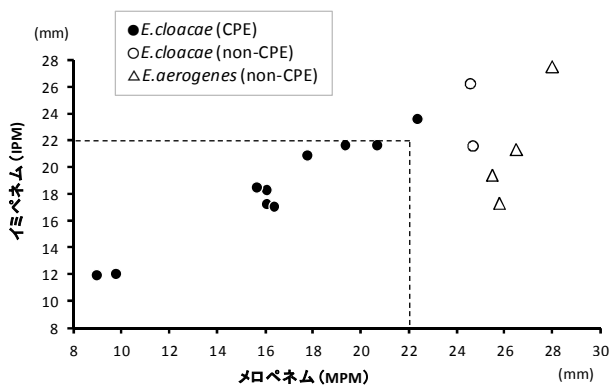


図1 カルバペネム系薬剤に対する阻止円径

4. 考察

PCR 法により薬剤耐性遺伝子を検索した結果、*E.aerogenes* 4 株は β -ラクタマーゼ遺伝子を保有していなかったが、ディスク法により β -ラクタマーゼ産生性を確認した結果、APB による阻害が認められたことから、今回、検索対象としていない AmpC β -ラクタマーゼ遺伝子を保有する可能性があると考えられた。また、PCR 法とディスク法により CRE と判定された *E.cloacae* 10 株のうち、2 株については、ディスク法で APB による阻害も認められた。このことから、*E.aerogenes* と同様に検索対象としていない AmpC β -ラクタマーゼ遺伝子を保有する可能性があると考えられた。

当所に搬入された CRE16 株について、カルバペネム系薬剤 (MPM と IPM) に対する阻止円径を測定した結果、CPE と判定された *E.cloacae* 10 株のうち、1 株については MPM と IPM に対する阻止円径が共に届出

基準の 22mm を超えた。このことから、ディスク法において、CRE の届出基準を満たさない株の中に CPE が存在する可能性が示唆された。MPM に対する阻止円径が 22mm 以下となった CRE は、CPE と判定された *E.cloacae* 9 株のみであった。しかしながら、IPM に対して 22mm 以下となった CRE は、これら 9 株の CPE に加え、カルバペネマーゼ非産生と判定された *E.cloacae* 1 株と *E.aerogenes* 3 株も含まれたことから、CPE の検出には MPM が適していると考えられた。

国内における CRE の約 3 割が CPE であると報告⁶⁾されているが、今回の薬剤耐性遺伝子検索と β -ラクタマーゼ産生性の確認によって、当所に搬入された CRE 16 株において、CPE の占める割合は 62.5% (10 株) と高い傾向が認められたことから、本市において CPE の地域流行が懸念される状況であることが判明した。従って、今後も継続して市内の CRE に対する薬剤耐性遺伝子の保有状況と β -ラクタマーゼの産生性を明らかにし、CPE やカルバペネマーゼ非産生菌の検出状況とカルバペネマーゼ遺伝子型の動向を監視することが、本菌による感染症のまん延を防止する上で重要である。

文献

- 1) カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) 感染症等に係る試験検査の実施について 健感発 0328 第 4 号 平成 29 年 3 月 28 日
- 2) 病原微生物検出情報 (IASR) カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症 The Topic of This Month, Vol.35, No.12, 2014, 281-282
- 3) カルバペネムに耐性化傾向を示す腸内細菌科細菌の問題 (2017) 四学会連携提案 平成 29 年 10 月 25 日
- 4) 病原微生物検出情報 (IASR) カルバペネム耐性腸内細菌科細菌による院内感染事例について Vol.38, No.11, 2017, 229-230
- 5) 国立感染症研究所 病原体検出マニュアル 薬剤耐性菌 平成 28 年 12 月改訂版
- 6) 化学療法領域 特集 2 カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) Vol.32, No.11, 2016, 66-11