

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 (第 2 報)

吉原 純子、野本 さとみ、篠田 亮子、佐々木 彩華、

石橋 恵美子、横井 一、山本 一重

(環境保健研究所 健康科学課)

要 旨 2019 年 4 月から 2020 年 3 月の 1 年間に、市内医療機関からカルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症として届出があり、当所に菌株の搬入があった 22 株について薬剤耐性遺伝子検査を実施した。カルバペネマーゼ遺伝子が確認された CPE (カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌) は 6 株 (27.3%) であり、その内訳は、*Citrobacter freundii* が 1 株 (IMP-1)、*Enterobacter cloacae* が 4 株 (IMP-1)、*Escherichia coli* が 1 株 (NDM-4) であった。また、カルバペネマーゼ遺伝子以外の β -ラクタマーゼ遺伝子として、*E. cloacae* 1 株から EBC 型が、*E. coli* 1 株から CTX-M-9 型が検出された。NDM 型は海外からの報告が多く、当所で検査を開始してから初めて検出された。発生届のあった患者は全く渡航歴がないことから、国内での NDM 型耐性遺伝子の伝播が危惧された。

Key Words : カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE), カルバペネマーゼ、 β -ラクタマーゼ

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、メロペネムなどのカルバペネム系薬剤及び広域 β -ラクタム剤に対して耐性を示す腸内細菌科細菌による感染症である。2014 年 9 月 19 日から感染症法に基づく感染症発生動向調査の五類全数把握疾患に指定された。

また、2017 年 3 月 28 日付の厚生労働省通知により、CRE 感染症の届出があった際には、地方衛生研究所等での試験検査の実施および地域内の医療機関等への情報提供を行うとともに必要に応じた対策の実施を行うこととなった¹⁾。

今回、2019 年 4 月から 2020 年 3 月に市内医療機関から届出のあった CRE 感染症患者から分離された菌株について、薬剤耐性遺伝子の保有状況を調査したので報告する。

2. 材料と方法

2.1 供試菌株

2019 年 4 月から 2020 年 3 月の 1 年間に、市内医療機関から CRE 感染症として届出があり、当所に搬入された CRE 22 株を調査対象とした。

菌株は、BTB 培地 (日水製薬) に塗布し、濃厚塗布部にメロペネム (MPM) ディスク (ベクトン・ディッキンソン) を置き、一晚培養後、ディスク周囲に発育したコロニーを検査に用いた。

2.2 菌種の同定

CRE 発生届に記載された菌種であるかの確認は、Api20E (ピオメリュー・ジャパン) を用いて実施した。

2.3 β -ラクタマーゼ遺伝子の検出

供試菌株から DNA をアルカリ抽出し、遠心分離後の上清を鋳型 DNA として、マルチプレックス PCR²⁾を実施した。

カルバペネマーゼ遺伝子については、IMP 型、NDM 型、KPC 型、OXA-48 型の主要な 4 種と稀に報告のある GES 型、VIM 型、SMB 型のマルチプレックス PCR を実施した。

基質拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) 遺伝子については、SHV 型、TEM 型および CTX-M 型、プラスミド性 AmpC β -ラクタマーゼ遺伝子については、MOX 型、CIT 型、DHA 型、ACC 型、EBC 型および FOX 型のマルチプレックス PCR を実施した。

なお、腸内細菌科細菌である多くのグラム陰性桿菌は、染色体上に *ampC* 遺伝子を保有する³⁾ことから PCR⁴⁾により染色体性 AmpC β -ラクタマーゼ遺伝子の有無を確認した。

2.4 カルバペネマーゼ遺伝子の型別

IMP 型メタロ- β -ラクタマーゼ遺伝子が検出された株については、IMP-1 と IMP-2 を型別するための PCR⁵⁾を実施し、IMP-1 であった場合には、さらに IMP-1 と IMP-6 を識別する PCR⁶⁾を実施した。

なお、IMP 型以外のカルバペネマーゼ遺伝子が検出された株については、PCR 産物の塩基配列を決定し、得られたアミノ酸配列について NCBI (National Center for Biotechnology Information) のサイトで参照配列と比較した。

2.5 阻害剤を用いた β -ラクタマーゼ産生性の確認

供試菌株を滅菌生理食塩水に懸濁し、McFarland 0.5 の菌液とした後、ミュラー・ヒントン (MH) 寒天培地 (OXOID) に均一に塗抹し、以下に示す阻害剤ディスクを病原体検査マニュアル⁵⁾に基づき配置した。

IMP 型及び NDM 型等のメタロ- β -ラクタマーゼ産生性の確認はメルカプト酢酸ナトリウム (SMA) ディスク、KPC 型カルバペネマーゼ産生性の確認は 3-アミノフェニルボロン酸 (APB) を MPM ディスクとセフメタゾール (CMZ) ディスクに 10 μ L 添加したディスク、基質拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) 産生性の確認は、アモキシリン/クラブラン酸 (ACV) ディスクとスルバクタム/アンピシリン (S/A) ディスクを阻害剤として配置し、35.0 \pm 2.0 $^{\circ}$ C で一晩培養し、阻害効果の確認を行った。

2.6 カルバペネマーゼ産生性の確認

PCR によるカルバペネマーゼ遺伝子の検出 (遺伝子検査) と阻害剤を用いた β -ラクタマーゼ産生性の確認 (表現型検査) の判定結果に矛盾がなかった株については、カルバペネマーゼ産生性の確認法として modified Carbapenem Inactivation Method (mCIM) を実施した。検査方法は CLSI^{7,8)}に記載された手順に従った。

3. 結果

3.1 CRE 感染症の届出状況

感染症発生動向調査システムに CRE 感染症として登録された件数は 21 件であり、そのうち 1 件については、2 菌株 (血液及び尿由来) の検査依頼があったことから、病原体検出情報システムの登録は 22 株であった。年齢階級・性別の届出数を図 1 に示した。

年齢階級の届出数は 70 歳代が最も多く 7 件 (n=21、33.3%)、40 歳代と 60 歳代が各 4 件 (n=21、19.0%)、50 歳代と 80 歳代が各 3 件 (n=21、14.3%) であった。

また、性別の届出数は男性が 16 件、女性が 5 件であり、男性が女性の約 3 倍であった。なお、渡航歴のある患者はいなかった。

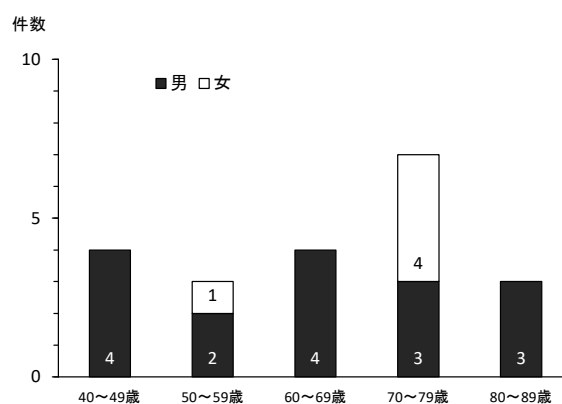


図 1 年齢階級・性別届出数

分離材料別の菌株数は、血液が最も多く 6 株 (27.3%) であり、次いで尿が 5 株 (22.7%)、喀痰が 3 株 (13.6%)、胆汁、膿、創部が各 2 株 (9%)、腹水および便が各 1 株 (4.5%) であった。また、本来無菌であるべき検体 (血液、胆汁、腹水) からの分離は 9 株 (40.9%) であった (図 2)。

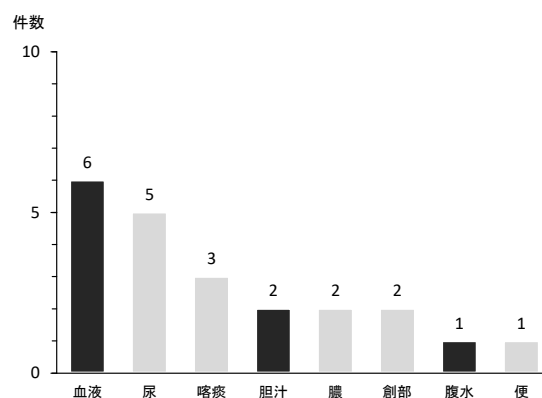


図 2 分離材料別届出菌株数

表 1 供試菌株の検査結果

菌種	株数	βラクタマーゼ遺伝子				阻害効果				Carbapenemase 産生性 (mCIM)
		Carbapenemase	ESBL	プラスミド性 AmpC	染色体性 AmpC	SMA	ACV	S/A	APB	
<i>K. aerogenes</i>	15	-	-	-	+	-	-	-	+	NT
<i>C. freundii</i>	1	IMP-1	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>E. cloacae</i>	4	IMP-1	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>E. cloacae</i>	1	-	-	EBC	+	-	-	-	+	NT
<i>E. coli</i>	1	NDM-4	CTX-M-9	-	-	+	-	-	-	+

NT: Not Test

3.2 菌種

供試菌株 22 株の検査結果を表 1 にまとめた。

菌株の性状を確認した結果、菌種は *Klebsiella* (旧 *Enterobacter) aerogenes* が 15 株 (68.2%)、*E. cloacae* が 5 株 (22.7%)、*E. coli* および *C. freundii* が各 1 株 (4.5%) であった。

3.3 β-ラクタマーゼ遺伝子の検出および型別

マルチプレックス PCR において、*K. aerogenes* 15 株からカルバペネマーゼ遺伝子、ESBL 遺伝子およびプラスミド性 AmpCβ-ラクタマーゼ遺伝子は検出されなかったが、染色体性 AmpCβ-ラクタマーゼ遺伝子が検出された。

C. freundii 1 株および *E. cloacae* 4 株からはカルバペネマーゼ遺伝子 (IMP 型) が検出され、PCR による遺伝子型別の結果、IMP-1 であった。

また、別の *E. cloacae* 1 株からは、プラスミド性 AmpCβ-ラクタマーゼ遺伝子 (EBC 型) および染色体性 AmpCβ-ラクタマーゼ遺伝子が検出された。

E. coli 1 株からは、カルバペネマーゼ遺伝子 (NDM 型) が検出され、シークエンスの結果 NDM-4 であった (Accession No. JQ348841)。また、ESBL 遺伝子 (CTX-M-9 型) も検出された。

3.4 β-ラクタマーゼ産生性

阻害剤を用いた β-ラクタマーゼ産生性の確認試験において、*K. aerogenes* 15 株および *E. cloacae* 1 株に APB 添加ディスクによる阻害効果が確認された。

また、*C. freundii* 1 株および *E. cloacae* 4 株に SMA ディスクによる阻害効果が確認された。ACV ディスクと S/A ディスクにおいては阻害効果は確認されなかった。

3.5 カルバペネマーゼ産生性

遺伝子検査でカルバペネマーゼ遺伝子が検出され、表現型検査においても判定に矛盾がなかった 6 株 (*C. freundii* 1 株、*E. cloacae* 4 株、*E. coli* 1 株) について、mCIM を実施した結果、全て陽性であり、カルバペネマーゼ産生性腸内細菌科細菌 (CPE) は 6 株 (27.3%) であることが明らかとなった。

4. 考察

千葉市では、2017 年 4 月から厚生労働省の通知に基づき、CRE の検査を実施しているが、その届出数は 2017 年に 16 件、2018 年に 20 件、2019 年に 21 件と毎年増加傾向にある。全国でも同様に届出数が増加しており^{9),10)}、65 歳以上の患者が全体の約 80%、年齢中央値は 75 歳、男性は約 60%となっており、本市においても 60 歳以上が 14 件と全体の 66.7%を占め、男性は約 76.2%と全国とほぼ同様の傾向を示した。

分離材料の上位は血液、尿、喀痰であり、これらの検体中から薬剤耐性菌が分離されていることから、手術や尿路カテーテル、酸素吸入等の医療器具を介した院内感染予防対策の実施が重要であると考えられる。

届出された菌種は、*K. aerogenes* が最も多く、全国と同様の傾向であり、これら 15 株は全てカルバペネマーゼ非産生腸内細菌科細菌 (non-CPE) であった。*K. aerogenes* からカルバペネマーゼ遺伝子が検出された事例はなく、この菌が元々染色体上に保有する *ampC* 遺伝子および外膜透過性の低下の関与が考えられた。2018 年以降、CRE 感染症の届出数の増加とともに non-CPE の割合も増加しており、これは報告数の増加に加え、一部のイミペネム薬剤感受性測定試薬の仕様の変更¹¹⁾が関与していると考えられた。

今回の調査において、CPE 6 株のうち IMP 型は 5 株 (*C. freundii* 1 株、*E. cloacae* 4 株)、NDM 型は 1 株 (*E. coli* 1 株) であった。IMP 型は国内での報告が多く、50 種以上の遺伝子型が知られており、その多くが IMP-1 である。IMP-1 と IMP-6 は 1 塩基のみの違いであるため、これらの判別にはシークエンス解析が必要であるが、今回の調査において、IMP-1 と IMP-6 の判別を PCR で実施した結果、全て IMP-1 となり、シークエンス解析より迅速に判別が可能であった。

CRE の中にはカルバペネム系の薬剤感受性試験において明確な耐性を示さないステルス型¹²⁾と呼ばれる株が存在し、IMP 型では IMP-1、IMP-6、IMP-11 等はその存在が知られていることから、薬剤感受性試験だけでなく、耐性遺伝子の検出および型別解析も合わせて実施していくことが重要である。

また、当所で CRE の検査を開始してから今回初めて NDM 型が検出され、NDM-4 であることが明らかとなった。NDM 型は他の β -ラクタマーゼを同時に産生する株も多く、今回分離された *E.coli* も CTX-M-9 型の ESBL 遺伝子も保有していたが、表現型検査では判定が陰性であったことから、NDM 型の作用に隠された可能性が考えられた。

NDM 型は海外での報告が多いが、近年、国内での報告も増加している。今回検出された NDM-4 は、渡航歴の無い患者から検出され、国内でも報告が少ない型であった。NDM 型については、渡航歴の無い患者や病院内の病棟洗浄用シンクから NDM-1 が検出された事例¹³⁾の報告もあることから、この患者は生活環境内で薬剤耐性菌の曝露を受けた可能性が示唆され、国内での NDM 型の伝播が危惧された。CRE 感染症は感染経路を特定することが困難であるが、様々な事例から耐性菌が伝播される可能性のあるルートを想像し、予防対策を考えていく姿勢が重要である。

CRE の中でも CPE は、 β -ラクタム剤以外の抗菌薬に耐性を示す場合が多く、non-CPE より治療予後が悪い報告¹⁴⁾がある。また、CPE はカルバペネマーゼ遺伝子をプラスミド等の伝達性遺伝因子上に保有するため、薬剤耐性遺伝子が菌種を超えて伝播する危険性があることから、CRE 感染症として届出された株の中で、カルバペネマーゼ遺伝子を保有する CPE を検索することが極めて重要である。

今後市内で検出された耐性遺伝子の保有状況を医療機関や他の行政等に提供し、医療分野だけでなく、環境分野にも目を向けた包括的な薬剤耐性菌の動向を監視していくことが重要である。

文 献

- 1) 厚生労働省健康局結核感染症課長通知：カルバペネム耐性腸内細菌科細菌（CRE）感染症等にかか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) Watahiki M.*et al.* : Single-Tube Multiplex polymerase Chain Reaction for the Detection of Genes Encoding Enterobacteriaceae Carbapenemase, *jpn. J. Infect. Dis.*, 73(2), 166-172, 2020
- 3) 山崎勝利, 小松方, 他 : 臨床と微生物, vol.40, No.3, 近代出版, 225-231, 2013
- 4) M Rottman, *et al.* : Chromosomal *ampC* genes in *Enterobacter* species other than *Enterobacter cloacae* and ancestral association of the ACT-1 plasmid-encoded cephalosporinase to *Enterobacter aburiae*, *FEMS Microbiology Letters*, 210, 87-92, 2002
- 5) 国立感染症研究所：病原体検出マニュアル「薬剤耐性菌」, H28.12 月改訂版 V1.1 p 30-42, 2016
- 6) Nakano A.*et al.* : Rapid Identification of *bla*_{IMP-1} and *bla*_{IMP-6} by Multiplex Amplification Refractory Mutation System PCR, *Ann Lab Med*, 38, 378-380, 2018
- 7) CLSI 2017. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, M100-S27
- 8) CLSI 2018. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, M100-S28
- 9) 病原微生物検出情報, Vol.39, 162-163, 2018
- 10) 病原微生物検出情報, Vol.40, 17-32, 2019
- 11) 鈴木里和 : 薬剤耐性菌サーベイランス情報のリスク評価耐性, 第 31 回日本臨床微生物学会・学術集会発表資料, 2020
- 12) 鹿山鎮男, 他 : 輸入型カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌 (CPE) について, 病原微生物検出情報, Vol.40, 9-10, 2019
- 13) 林 航, 他 : NDM 型産生菌の患者臨床材料からの検出履歴のない施設の病棟洗浄用シンクより検出された NDM-1 メタロ β -ラクタマーゼ産生 *Acinetobacter pittii*, 病原微生物検出情報, Vol.40, 12-13, 2019
- 14) 八木哲也, 他 : カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症の治療, 病原微生物検出情報, Vol.40, 8-9, 2019