

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3報)

吉原 純子、野本 さとみ、本宮 恵子、佐々木 彩華、

石橋 恵美子、横井 一、大塚 正毅

(環境保健研究所 健康科学課)

要 旨 2020年4月から2021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15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1株(6.7%)のみであり、*Enterobacter cloacae* (IMP-1)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型が検出された。

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および広域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「感染症の予防及び感染症の患者の医療に関する法律」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及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。

今回、2020年4月から2021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

2020年4月から2021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CRE15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(ビオメリュー・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AmpCβ-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AmpCβ-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。

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、ミューラー・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型および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およびAmpCβ-ラクタマーゼ産生性の確認は3-アミノフェニルボロン酸 (APB) およびクロキサシリン (MCIPC) をMPMディスクとセフメタゾール (CMZ) ディスクに10μL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±2.0°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

当所に搬入された菌株は15株であったが、そのうち1株については、コンタミネーションが確認され、CRE感染症発生届が取り下げられたことから病原体検出情報システムの登録は14件であった。年齢階級・性別の届出数を図1に示した。

年齢階級別の届出数は70歳代が最も多く8件 (n=14, 57.1%)、60歳代が4件 (28.6%)、50歳代と80歳代が各1件 (7.1%) であった。

また、性別の届出数は男性が12件、女性が2件であり、男性が女性の6倍であった。なお、渡航歴のある患者はいなかった。

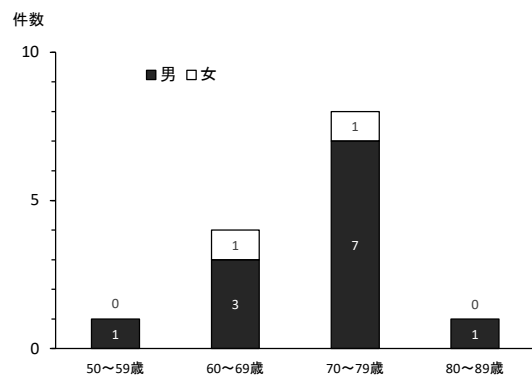


図1 年齢階級・性別届出数 (n=14)

分離材料別の菌株数は、血液、尿、喀痰、胆汁、膿が各2株 (n=14, 14.3%)、髄液、滲出液、腹水、便が各1株 (7.1%) であった。そのうちCPEは喀痰から検出された1株であった。また、本来無菌であるべき検体 (血液、胆汁、髄液、滲出液、腹水) からの分離は7株 (50.0%) であった (図2)。

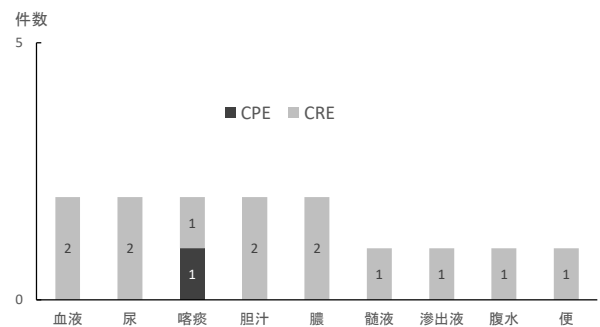


図2 分離材料別届出菌株数 (n=14)

3.2 菌種

供試菌株14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6株 (42.9%)、*E.cloacae*が7株 (50.0%)、*Serratia marcescens*が1株 (7.1%) 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*6株および*E.cloacae*5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。

*E.cloacae*1株 (千葉市 No.57) 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。

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	MCIPC	
<i>K.aerogenes</i>	6	-	-	-	+	-	-	-	+	+	NT
<i>E.cloacae</i>	5	-	-	-	+	-	-	-	+	+	NT
<i>E.cloacae</i> (No.57)	1	IMP-1	-	-	-	+	-	-	-	-	+
<i>E.cloacae</i> (No.69)	1	-	-	EBC	+	-	-	-	+	+	NT
<i>S.marcescens</i>	1	-	-	-	NT	-	-	-	+	+	NT

+* : 阻止円の差5mm以下 NT : Not Test

また、別の *E.cloacae* 1 株 (千葉県 No.69) 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。

S.marcescens 1 株からは β-ラクタマーゼ遺伝子は検出されなかった。

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* 6 株、*E.cloacae* 6 株および *S.marcescens* 1 株に APB と MCIPC 添加ディスクによる阻害効果が確認された。

また、IMP 型が検出された *E.cloacae* 1 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、表現型検査の判定と矛盾がなかった *E.cloacae* 1 株について、mCIM を実施した結果、陽性となり、カルバペネマーゼ産生性腸内細菌科細菌 (CPE) は 1 株 (6.7%) であった。

4. 考察

千葉県では、2017 年 4 月から厚労省の通知に基づき 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ったが、2020 年は 14 件と減少した。

分離材料は血液、尿、喀痰など多様であったが、病原体サーベイランスに基づく全国の報告⁹⁾とほぼ同様の傾向であった。

届出された菌種は、*K.aerogenes* (6 株) が最も多く、これら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に起因するものと考えられた。

CRE 感染症の届出の際に確認で用いられる薬剤は、イミペネム (IPM) と CMZ を使用している医療機関が多いこと、一部の IPM 薬剤感受性測定試薬の仕様の変更の影響¹⁰⁾、現在の届出基準ではカルバペネマーゼ遺伝子を保有していない菌株でも届出対象となることが non-CPE の割合の増加に影響していると考えられた。

一方、カルバペネマーゼを産生するにも関わらず、薬剤感受性試験でカルバペネム感性 (CRE の届出基準以下のカルバペネム MIC (最小発育阻止濃度) を示す) と判定されてしまうステルス型 CPE の存在が報告¹¹⁾されており、このタイプの CPE は検査で検出されない可能性があるため、警戒する必要がある。

プラスミド性 AmpCβ-ラクタマーゼ遺伝子 (EBC 型) が検出された 1 株は、発生届では *K.pneumoniae* と記載されていたが、性状確認の結果、*E.cloacae* であった。

また、コンタミネーションが確認された 1 株については、発生届では *Proteus vulgaris* と記載されていたが、性状確認の際に、*Pseudomonas aeruginosa* が混在していることが判明した。どの時点でコンタミネーションが起きたのかは不明であったが、*P.aeruginosa* は腸内細菌科細菌ではないことから発生届は取り下げられた。

このように CRE 感染症として届出された菌株であっても地方衛生研究所で菌の性状等を正確に確認することが重要である。

今回検出された CPE 1 株は *E.cloacae* (IMP-1 型) のみであった。

なお、昨年市内から検出された海外型カルバペネマーゼ遺伝子である NDM 型は検出されなかった。これは 2019 年から新型コロナウイルス感染症が世界的に流行し、人流が制限されたことや医療機関の受診が控えられ、届出数が減少した可能性が考えられた。

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、カルバペネマーゼ遺伝子をプラスミド等の伝達性遺伝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、地方衛生研究所等に CRE 感染症として届出された菌株において、カルバペネマーゼ遺伝子を保有する CPE を検索し、NESID (病原体検出情報) へ菌株情報を登録することで国や地方自治体および医療機関との情報を共有することが極めて重要である。

今回届け出のあった *S. marcescens* 1 株については、*Serratia* 属は、染色体上に *ampC* 遺伝子を元々保有しているが、この遺伝子を検出するプライマーがなく PCR 法で染色体性 AmpC β-ラクタマーゼ遺伝子の有無が確認できなかった。その他の確認試験でも薬剤耐性が確認されず、判定に苦慮する結果となったが、ボロン酸による阻害が弱いながらも確認されたことから、染色体性 AmpC β-ラクタマーゼの関与があると考えられた。薬剤耐性は外膜透過性の低下や作用点の変異等 β-ラクタマーゼが関与しない機序で発現する可能性もあり複数の耐性機序を理解し、正しい判定結果を導く必要がある。

今回検査を実施した *E. cloacae* のうち 4 株については同時期に同じ医療機関からの届出であったことから、PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis) を実施したところ、バンドパターンは全て異なる結果となり、院内感染の可能性は否定された。

地方衛生研究所では、発生届を基に、届出菌株の性状や保有する耐性遺伝子等を解析し、医療機関等に還元していく大きな役割があると考えられる。

今後も市内医療機関と連携し、薬剤耐性菌の動向監視を継続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) カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (carbapenem-resistant Enterobacteriaceae : CRE) 病原体サーベイランス, 2019 : IASR vol.42 123-124, 2021
- 10) 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
- 11) 病原微生物検出情報 : Vol.40, No.2 (No.468), 6-10, 2019