

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 4 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 2021 年 4 月から 2022 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 (CRE) 感染症として届出があり、当所に菌株の搬入があった 13 株について薬剤耐性遺伝子検査を実施した。その結果、カルバペネマーゼ遺伝子が確認されたカルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌 (CPE) は 4 株 (30.8%) であり、全て *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* 3 株 (23.1%) 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动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、2021 年 4 月から 2022 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

2021 年 4 月から 2022 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 13 株を調査対象とした。

菌株は、BTB 培地 (日水製薬) 等に塗布し、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の確認は、Api20E (バイオメリュー・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、以下のマルチプレックス 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 (MBL) 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 AmpC β-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、ESBL 産生性の確認は、アモキシリン/クラバン酸 (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 で一晚培養し、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、カルバペネマーゼの産生性を確認法するために 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について、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 60 歳代が最も多く 4 件 (30.8%)、次に 50 歳代と 80 歳代が各 3 件 (23.1%) であった。最年少は 0 歳、最高齢は 93 歳であり、共に女性であった。性別の届出数は男性が 10 件、女性が 3 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。

分離材料別届出菌株数を図 2 に示した。尿と喀痰が各 3 株 (23.1%)、血液が 2 株 (15.4%)、表皮、胆汁、膿、腹腔排液、潰瘍が各 1 株 (7.7%) であり、本来無菌であるべき検体 (血液、胆汁、腹腔排液) からの分離

は 4 株 (30.8%) であった。

なお、カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌 (Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae : CPE) は尿由来の 2 株と血液および表皮由来の各 1 株の 4 株 (30.8%) であった。

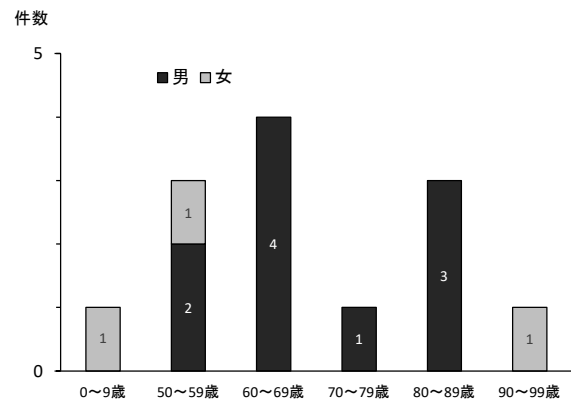


図 1 年齢階級・性別届出数 (n=13)

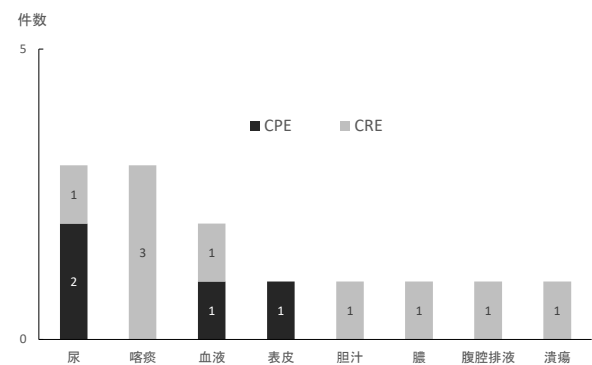


図 2 分離材料別届出菌株数 (n=13)

3.2 菌種

供試菌株 13 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 *E. cloacae* が 8 株 (61.5%)、*Klebsiella* (旧 *Enterobacter*) *aerogenes* が 5 株 (38.5%) 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、*E. cloacae* 4 株 (30.8%) から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、全て IMP-1 であった。

E. cloacae 3 株 (23.1%) からは、プラスミド性 AmpCβ-ラクタマーゼ遺伝子が検出され、全て EBC 型であった。

E. cloacae 1 株および *K. aerogenes* 5 株からは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、届出された 13 株全てから染色体性 AmpCβ-ラクタマーゼ遺伝子が検出された。

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	SA	APB	MCIPC	
<i>E.cloacae</i>	4	IMP-1	-	-	+	+	-	-	-	-	+
	3	-	-	EBC	+	-	-	-	+	+	NT
	1	-	-	-	+	-	-	-	+	+	NT
<i>K.aerogenes</i>	5	-	-	-	+	-	-	-	+	+	NT

NT : Not Test

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、*E.cloacae* 4 株と *K.aerogenes* 5 株で 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* 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、かつ表現型検査の判定と矛盾がなかった *E.cloacae* 4 株について、mCIM を実施した結果、全て陽性となり、カルバペネマーゼの産生が確認された。

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 年度に 16 件、2018 年度に 20 件、2019 年度に 21 件、2020 年度に 14 件であり、2021 年度は 13 件と前年度とほぼ同様であった。分離材料は尿、喀痰、血液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。

今年度、届出された菌種は、*E.cloacae* (8 株) と *K.aerogenes* (5 株) の 2 菌種のみであった。そのうち CPE は *E.cloacae* の 4 株であり、遺伝子型は全て IMP-1 型であった。IMP-1 型は全国でも毎年多く検出されているが、千葉県では前年度は 1 件であり、今年度は 4 倍の検出であった。しかし、これらは全て異なる医療機関から届出されており、局所的な院内感染の可能性は低いと考えられた。

届出された 13 株のうち 9 株はカルバペネマーゼ非産生腸内細菌科細菌 (non-CPE) であった。

そのうち *E.cloacae* (3 株) からは、プラスミド性 AmpCβ-ラクタマーゼ遺伝子 (EBC 型) が検出された。

プラスミド性 AmpCβ-ラクタマーゼ遺伝子は、染色体上に存在する *ampC* 遺伝子がプラスミドに転移したと考えられており、EBC 型は *Enterobacter* 属由来の

染色体上の *ampC* 遺伝子がプラスミドに転移したことから今回検出されたと考えられる。

また、EBC 型は、環境中に β-ラクタム薬が存在することによって AmpC を多量に産生する誘導型³⁾であり、*E.cloacae* 1 株で CMZ ディスクの周囲に誘導耐性が確認された。

E.cloacae 1 株と *K.aerogenes* 5 株からは染色体性 AmpCβ-ラクタマーゼ遺伝子のみが検出され、これらの菌が元々染色体上に保有する *ampC* 遺伝子によるものと考えられた。

CRE 感染症の届出基準を満たしている場合でも、non-CPE が検出される理由としては、CRE 感染症の届出の際に確認で用いられる薬剤が、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変更の影響¹⁰⁾および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も届出対象としていることが考えられる。

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受性となるステルス型 CPE の存在が報告¹¹⁾されている。このタイプの CPE は、届出基準に基づく抗菌薬の種類によっては MIC 値 (最小発育阻止濃度) が届出基準値以下となることから、CRE の届出以上に、潜在的な CPE が存在する可能性がある。したがって、MIC 値が届出基準以下で感受性と判定された場合でも、感受性試験において複数のカルバペネム系薬を併用することや、何らかの耐性因子を保有している可能性を考慮し、mCIM や CarbaNPtest 等のカルバペネマーゼ産生試験等を積極的に実施する必要がある。また、臨床所見等から CRE を疑う場合には、ステルス型 CPE の存在を念頭に置き、積極的に地方衛生研究所等に検査を依頼するなど、協力体制を整備することが重要である。

CRE の中でも CPE は、β-ラクタム薬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して施設内や環境内に拡

散する危険性がある。CRE 感染症として届出された菌株について、地方衛生研究所等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によって国、地方自治体および医療機関と情報を共有し、地域における CPE の動向を各方面から注視することが極めて重要である。

また、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ることから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。

地方衛生研究所では、発生届を基に、届出菌株の性状を各種培地で確認し、MIC 値等の薬剤感受性試験の他、阻害剤を用いたディスク法や耐性遺伝子を標的とした PCR 法、カルバペネマーゼ産生試験等の複数の検査結果から菌株を解析し、医療機関等に薬剤耐性菌の様々な情報を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。

- 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

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