

## 千葉市におけるカルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌の検出状況 (第5報)

吉原 純子、野本 さとみ、本宮 恵子、若岡 未記

三枝 真奈美、横井 一、西村 正樹

(環境保健研究所 健康科学課)

**要旨** 2022年4月から2023年3月の1年間に、カルバペネム耐性腸内細菌目細菌 (CRE) 感染症として届出があり、当所に菌株の搬入があった24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目細菌 (CPE) は *Enterobacter cloacae* 1株および *Klebsiella pneumoniae* 1株の合計2株 (8.3%) であり、全てIMP-1であった。また、カルバペネマーゼ以外のβ-ラクタマーゼとして、基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ (ESBL) が *K. pneumoniae* の3株 (12.5%) から、プラスミド性 AmpC β-ラクタマーゼ (EBC型) が *E. cloacae* 3株および *Enterobacter* sp. 1株の合計4株 (16.7%) から検出された。

**Key Words :** カルバペネム耐性腸内細菌目細菌 (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目細菌 (Carbapenem Resistant Enterobacterales : 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目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市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<sup>1)</sup>。

今回、2022年4月から2023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

2022年4月から2023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24株 (千葉市 No.83~106) 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 (栄研化学) 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 (ピオメリュー・ジャパン) を用いて実施し、Api20Eで同定できなかった場合については、16SrDNAシーケンスを実施した。

#### 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PCR<sup>2)</sup>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、およびOXA-48型の主要な4種と稀に報告のあるGES型、VIM型、およびSMB型のマルチプレックスPCRを実施した。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、腸内細菌目細菌である多くのグラム陰性桿菌は、染色体上に *ampC* 遺伝子を保有することから<sup>3)</sup>、PCR<sup>4)</sup>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型とIMP-2型を型別するためのPCR<sup>5)</sup>を実施し、IMP-1型であった場合には、さらにIMP-1とIMP-6を識別するPCR<sup>6)</sup>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<sup>5)</sup>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<sup>7), 8)</sup>に記載された手順に従った。

## 2.7 *K. pneumoniae* の粘稠性試験 (string test)

*K. pneumoniae* は組織侵襲性が高い株が知られていることから、羊血液寒天培地上のコロニーを用いて、5mm以上の糸を引く侵襲性株を見分ける簡易スクリーニング検査 (string test)<sup>9)</sup>を実施した。

## 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70歳代が最も多く9件 (37.5%)、次いで80歳代が6件 (25%)、60歳代が

4件 (16.7%)であった。20歳代から40歳代の届出はなく、最年少は18歳、最高齢は94歳であり、共に女性であった。性別の届出数は男性が14件 (58.3%)、女性が10件 (41.7%)であり、男性の方が多かった。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。喀痰が6株 (25%)、胆汁と血液が各4株 (16.7%)、腹水と膿が各3株 (12.5%)、尿が2株 (8.3%)、胸水とドレーン排液が各1株 (4.2%)であった。本来無菌であるべき検体 (胆汁、血液、腹水、胸水、ドレーン排液) からの分離は13株 (54.2%)であった。

なお、カルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌 (Carbapenemase-Producing Enterobacterales: CPE) は喀痰と胆汁から分離された各1株の合計2株 (8.3%)であった。

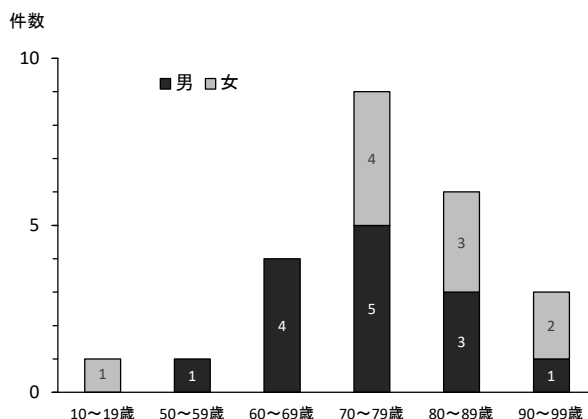


図1 年齢階級・性別届出数 (n=24)

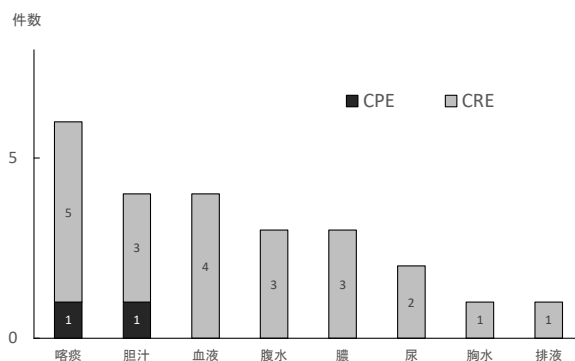


図2 分離材料別届出菌株数 (n=24)

表 1 供試菌株の検査結果

菌種	菌株 No.	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>	94	11	-	-	-	+	-	-	-	+	+	NT
		3	-	-	EBC	+	-	-	-	+	+	NT
<i>E. cloacae</i>	3	3	-	-	-	+	-	-	-	+	+	NT
		1	IMP-1	-	-	+	+	-	-	-	-	+
<i>K. pneumoniae</i>	102	1	IMP-1	SHV	-	NT	+	-	-	-	-	+
		88	1	-	TEM/SHV/CTX-M1	-	NT	-	+	+	-	-
		106	1	-	SHV/CTX-M1	-	NT	-	+	-	-	-
<i>S. marcescens</i>		1	-	-	-	NT	-	-	-	-	-	NT
<i>Enterobacter</i> sp.	95	1	-	-	EBC	+	-	-	-	+	-	NT
		104	1	-	-	-	+	-	-	-	-	NT

NT : Not Test

### 3.2 菌種

供試菌株 24 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 aerogenes* が 11 株 (45.8%)、*E. cloacae* が 7 株 (29.2%)、*K. pneumoniae* が 3 株 (12.5%)、*Serratia marcescens* が 1 株 (4.2%)、*Enterobacter* sp. が 2 株 (8.3%) であった。これらのうち Api20E で菌種を同定できなかった菌株は No.94、No.95 および No.104 の合計 3 株であった。菌株 No.94 は、16SrDNA シーケンスの結果、発生届と同じ *K. aerogenes* となった。菌株 No.95 は、発生届は *E. cloacae* であったが、16SrDNA シーケンスでは *Enterobacter asburiae* となり、*Enterobacter cloacae* complex に分類されるが、NSEID の登録菌種名に合わせて *Enterobacter* sp. とした。菌株 No.104 は、発生届では *K. aerogenes* であったが、16SrDNA シーケンスでは *Enterobacter* 属と判定されたことから、*Enterobacter* sp. とした。

### 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* 1 株および *K. pneumoniae* 1 株の合計 2 株 (8.3%) 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、両者ともに IMP-1 であった。

*E. cloacae* 3 株および *Enterobacter* sp 1 株の合計 4 株 (16.7%) からは、プラスミド性 AmpC β-ラクタマーゼ遺伝子が検出され、全て EBC 型であった。

ESBL 遺伝子は、*K. pneumoniae* 3 株 (12.5%) から、それぞれ SHV 型のみ、TEM/SHV/CTX-M1 型の 3 種類、SHV/CTX-M1 型の 2 種類が検出された。

*K. aerogenes* 11 株、*E. cloacae* 7 株および *Enterobacter* sp. 2 株からは染色体性 AmpC β-ラクタマーゼ遺伝子が検出された。

### 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* 11 株と *E. cloacae* 6 株の合計 17

株 (70.8%) で APB と MCIPC 添加ディスクによる阻害効果が確認された。

カルバペネマーゼ遺伝子が検出された *E. cloacae* 1 株と *K. pneumoniae* 1 株の合計 2 株 (8.3%) で SMA ディスクによる阻害効果が確認された。

ESBL 遺伝子が検出された *K. pneumoniae* 3 株では、菌株 No.88 で ACV ディスクと S/A ディスクの両方、菌株 No.106 で ACV ディスクのみに阻害効果が確認された。また、菌株 No.102 では両方共に阻害効果が確認されなかった。

### 3.5 カルバペネマーゼ産生性

遺伝子検査で IMP-1 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* 1 株および *K. pneumoniae* 1 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。

### 3.6 *K. pneumoniae* の粘稠性試験 (string test)

*K. pneumoniae* 3 株について、string test を実施した結果、5mm 以上の糸を引く侵襲性株は確認されなかった。

## 4. 考察

本市では、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 2020 年度に 14 件、2021 年度は 13 件、2022 年度は 24 件であり、今年度は前年度の約 2 倍であった。分離材料は喀痰、血液、尿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<sup>10)</sup> とほぼ同様の傾向であった。

今年度、届出された菌種は、*K. aerogenes* (11 株)、*E. cloacae* (7 株)、*K. pneumoniae* (3 株)、*S. marcescens* (1 株)、*Enterobacter* sp. (2 株) の 5 菌種であった。菌株の菌種確認は、Api20E を使用しているが、全ての菌種を同定できるわけではなく、*Enterobacter* 属については、*E. asburiae*、*E. cloacae*、*E. cancerogenus*

の3菌種の同定が可能である。CREの届出菌種は腸内細菌目細菌であるが、同属内においては菌種の性状が類似するものが多く、16SrDNAシーケンスでも同定が困難な菌種もあることから、正確な菌種の同定には、次世代シーケンサーの活用を検討していく必要がある。

届出された24株のうち、カルバペネマーゼ遺伝子を保有するCPEは、*E. cloacae* (1株)と*K. pneumoniae* (1株)の合計2株であり、遺伝子型は共に国内で多く検出されているIMP-1であった。なお、*K. pneumoniae*については、ESBL遺伝子も保有していた。本市ではCREの届出数は前年比の約2倍であったが、CPEは前年度と比べ、減少した。

今回、24株のうち22株がカルバペネマーゼ非産生腸内細菌目細菌(non-CPE)であった。non-CPEが多い理由としては、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<sup>11)</sup>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なってしまうことが考えられる。

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<sup>12)</sup>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、医療機関との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可能性がある。CRE感染症として届出された菌株については、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(病原体検出情報システム)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。

ESBL遺伝子は、*K. pneumoniae* 3株から検出され、阻害剤を用いたβ-ラクタマーゼ産生性の確認試験でそれぞれ異なる結果となった。

菌株No.102は、SHV型の他にカルバペネマーゼ遺伝子(IMP-1)も同時に保有していたため、IMP型の影響を受け、ACVディスクとS/Aディスクの阻害効果が確認されなかったものと考えられた。

菌株No.88では、TEM/SHV/CTX-M1型の3種類の遺伝子を保有していたため、ACVディスクとS/Aディスクの両方で阻害効果が確認されたものと考えられた。

菌株No.106では、SHV/CTX-M1型の2種類の遺伝子を保有していたが、CTX-M1型は、ACVディスクでのみ阻害効果が確認されること<sup>13)</sup>およびCTX-M1型の反応が強く表れたことにより、ACVディスクのみで阻害が確認されたものと考えられた。

以上のように、保有するESBL遺伝子の組み合わせによって、菌株ごとに異なる阻害効果が確認されたが、保有する遺伝子と表現型の間に矛盾はなかった。本来、染色体上に*ampC*遺伝子を保有しない*K. pneumoniae*は、ESBLの産生量の増加や外膜蛋白の減少や欠失によりカルバペネム耐性と判定されることもあり、詳細な検査が必要となるが、今回検出された菌株(No.88とNo.106)において、mCIMによるカルバペネマーゼ産生性は確認されなかった。

なお、院内感染の原因菌として分離されるESBL産生菌は、*K. pneumoniae*のTEM型およびSHV型が主流であったが、近年では大腸菌のCTX-M型が増加している<sup>14)</sup>。また、ESBL産生菌による感染症に対するカルバペネム系薬剤の多用が、この薬剤耐性が増加する一因となる可能性が指摘されており<sup>14)</sup>、CPEのみならずESBL産生菌の動向についても注視する必要がある。

プラスミド性AmpCβ-ラクタマーゼ遺伝子のうち、EBC型の保有が*E. cloacae* 3株と*Enterobacter sp.* 1株で確認された。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<sup>3)</sup>、EBC型の検出は、*Enterobacter*属の染色体上に存在する*ampC*遺伝子が、プラスミドに転移したことを示唆するものと考えられた。一方、染色体性AmpCβ-ラクタマーゼ遺伝子は、*K. aerogenes* 11株、*E. cloacae* 3株、*Enterobacter sp.* 1株から検出され、これらの菌株の染色体上に存在する*ampC*遺伝子に由来するものと考えられた。

今回、当所に搬入された菌株のうち、*S. marcescens* 1株については、β-ラクタマーゼ遺伝子の保有と阻害剤を用いたβ-ラクタマーゼの産生性が確認されなかった。

また、*Enterobacter* sp. 1 株（菌株 No.104）については、染色体性 AmpC β-ラクタマーゼ遺伝子の保有が確認されたが、APB と MCIPC 添加ディスクによる阻害効果は確認されなかった。しかし、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。

CRE 感染症の治療は難航することが多いため、搬入された菌株については、薬剤耐性だけでなく、その病原性について確認することも重要であると考え。特に、過粘稠性を示す高病原性の *K. pneumoniae* は、肝膿瘍や転移性膿瘍を発症する組織侵襲性が高い株であることから、今回、*K. pneumoniae* 3 株について、string test を実施したが、過粘稠性を示す高病原性の株は確認されなかった。

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、耐性遺伝子を標的とした PCR 法およびカルバペネマーゼ産生試験等の複数の検査結果を踏まえて菌株を解析し、その結果を医療機関等に還元していく大きな役割がある。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*<sub>IMP-1</sub> and *bla*<sub>IMP-6</sub> 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) Lee Hc, *et al.* : Clinical implications of hypermucoviscosity phenotype in *Klebsiella pneumoniae* isolates: association with invasive syndrome in patients with community-acquired bacteraemia, *J Intern Med*, 259, 606-614, 2006
- 10) 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、2021 : IASR vol.44 130-131, 2023 年 8 月
- 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) 病原微生物検出情報 : Vol.40, No.2 (No.468), 6-10, 2019
- 13) 平成 30 年度薬剤耐性菌の検査に関する研修資料
- 14) 石井良和 : 基質拡張型 β-ラクタマーゼ産生腸内細菌目細菌臨床と微生物, vol.50, No.1, 近代出版, 29-35, 2023