

県内におけるカルバペネム耐性腸内細菌科細菌（CRE）の 発生動向と耐性遺伝子の保有状況について

川原康彦 保田和里 福留智子 内山浩子 吉野修司 杉本貴之

Surveillance of Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* infection diseases and the detection of resistance gene in Miyazaki prefecture.

Yasuhiko KAWAHARA, Asato YASUDA, Tomoko FUKUDOME, Hiroko UCHIYAMA
Shuji YOSHINO, Takayuki SUGIMOTO

要 旨

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌（CRE）による感染症は2014年9月から2018年12月までに県内で44例の届出があった。患者は高齢者が多く、肺炎や尿路感染症で検出頻度が高かった。

当研究所に搬入のあったCRE 33株について薬剤耐性遺伝子の検出を行った結果、2株から *bla*_{IMP-1} を検出した。県内においてもカルバペネマーゼ遺伝子を保有する株が存在することが確認された。

キーワード カルバペネマーゼ, CRE, 薬剤耐性

はじめに

腸内細菌科には *Escherichia coli* や *Klebsiella pneumoniae* 等が含まれ、ヒトの腸管内や上気道等に常在菌として存在し、比較的病原性は少ない菌種が多い。しかし、基礎疾患のある患者や高齢者では日和見感染として、尿路感染症や肺炎、敗血症など様々な部位で感染症を起こす。近年では基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ（ESBL）やAmpC型βラクタマーゼを産生する腸内細菌科細菌が増加しており、それらの治療や重症感染症患者の治療の際には広域スペクトラムのカルバペネム系抗菌薬が使用されている¹⁾。しかし、カルバペネム系抗菌薬に耐性を示すカルバペネム耐性腸内細菌科細菌（Carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* : CRE）は世界的に急速に増加しており、医療現場で院内感染を起こしたり、抗菌薬が無効であるなど問題となっている。このカルバペネム系抗菌薬に耐性を示す機構は大きく2つに分けられ、カルバペネマーゼと呼ばれるβラクタマーゼを産生するものと、ESBLやAmpC型βラクタマーゼを大量に産生し、かつ外膜ポーリンの変化により薬剤の取込が減少することで耐性を示すものがある。特に前者はカルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌（Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* : CPE）とよばれ、カルバペネマーゼを産生する遺伝子がプラスミド上に存在し、

ほとんどのβラクタム系抗菌薬のみならず、他系統の薬剤にも耐性を示すことで多剤耐性傾向になる²⁾。また、このプラスミドは他菌種へ伝達してしまうことが知られており、過去にも国内でCPEが持つプラスミドが複数菌種に伝搬するアウトブレイク事例が報告されている³⁾。

O'niel は「このまま対策を行わなければ2050年に1000万人が薬剤耐性菌で死亡する」⁴⁾と報告しており世界的に対策が行われ始めている。

2014年9月19日には「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」においてCREは5類全数届出対象疾患となり、基準を満たす細菌が検出された際は、届出が必須となった。また、2017年3月28日には厚生労働省健康局結核感染症課長通知⁵⁾において地域の薬剤耐性菌のまん延状況の把握を行うため、地方衛生研究所でCREの耐性遺伝子等の試験を行うこととなった。

今回、宮崎県内におけるCRE感染症の発生状況及び当研究所に搬入されたCREが保持する薬剤耐性遺伝子の調査を行ったので報告する。

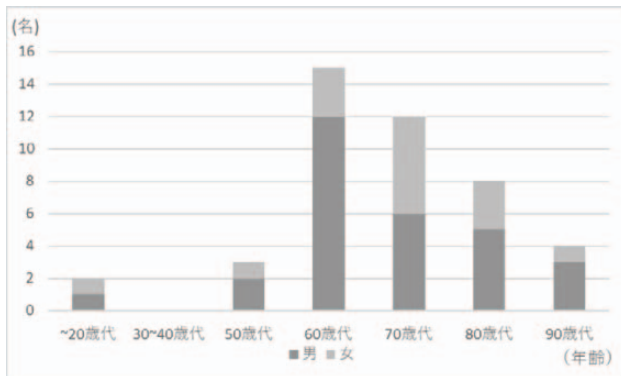


図1 CRE感染症届出患者の年代・男女別

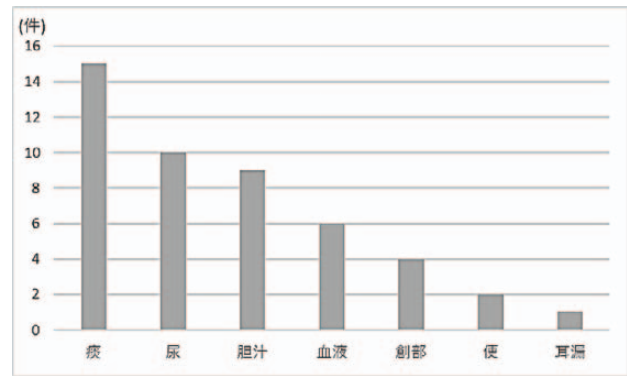


図2 CRE感染症届出患者の検出由来材料

材料と方法

1 CRE感染症の届出状況

感染症サーベイランスシステム (NESID) を用いて2014年9月から2018年12月までにCRE感染症として登録された情報を基に、年齢・男女比、由来材料及び菌種の集計を行った。

2 耐性遺伝子の検査

1) 材料

2017年3月から2018年12月までに県内で5類感染症として届出され、当研究所に搬入された27株と、医療機関から依頼のあったCREの判定基準を満たすが保菌と判定された6株の計33株を対象とした。薬剤感受性試験は医療機関で実施した検査結果を参考にした。

2) 方法

①前培養

医療機関から搬入のあった菌株をミューラーヒントン寒天培地 (OXOID) に画線塗抹し、濃厚部にCAZディスク (ベクトン・ディッキンソン) を置き、一晚純培養したものを供試菌株とした。

②遺伝子型の検出及びカルバペネマーゼ産生遺伝子の型別

病原体検出マニュアル⁶⁾に従い、カルバペネマーゼ6種 (NDM型, KPC型, IMP-1型, IMP-2型, VIM型及びOXA48型), ESBL5種 (TEM型, SHV型, CTX-M-1型, CTX-M-2型及びCTX-M-9型), AmpC型β-ラクタマーゼ6種 (MOX型, CIT型, DHA型, ACC型, EBC型及びFOX型) の計17種類のβ-ラクタマーゼ産生遺伝子についてPCR法で検索した。また、カルバペネマーゼ産生遺伝子が検出された場合はダイレクトシーケンスで塩基配列を決定した。得られた配列の相同性検索を行い遺伝子の同定を行った。

③ディスク法による表現型別

マニュアルに基づき、クラブラン酸 (CA) による阻害試験、メルカプト酢酸 Na (SMA) による

阻害試験、ボロン酸 (BA) による阻害試験、クロキサシリン (MCIPC) による阻害試験及びmodified Carbapenem Inactivation Method (mCIM)⁷⁾により各種βラクタマーゼの表現型別を行った。

結果

1 CRE感染症の届出状況

対象期間に届出は44例あった。菌種は *Enterobacter* 属が多く、次いで *E. coli* や *K. pneumoniae* 等が多く検出された。年齢別では60歳代が15例と最も多く、次いで、70歳代が12例、80歳代が8例となり、高齢者に多い傾向がみられた (図1)。また男女比は男性が女性の2倍であった。

CREの由来材料は喀痰が15例と最も多く、次いで尿10件、胆汁9件、血液6件、創部4件、便2件、耳漏1件 (重複あり) となった (図2)。尿及び血液の両方から検出され、尿路性敗血症の状態と推測されるものも3例あった。

2 耐性遺伝子の検出

当研究所に搬入されたCRE33株の菌種内訳は *E. aerogenes* 12株, *E. cloaca* 9株, *E. cancerogenus* 1株, *C. koseri* 3株, *E. coli* 5株, *Proteus mirabilis* 2株, *Serratia marcescens* 1株で、*Enterobacter* 属が3分の2を占めた。カルバペネマーゼのPCR法ではカルバペネマーゼのIMP-1型が2株検出された。この2株についてシーケンス解析を行ったところ、ともに *bla*_{IMP-1} であった。ESBLについては重複も含めるとTEM型が4株と最も多く、CTX-M-1型及びCTX-M-9型が3株ずつ、SHV型及びCTX-M-2型が1株ずつ検出された。AmpC型βラクタマーゼは *Enterobacter* 属22株中4株からEBC型が検出され、その他の菌種からは検出されなかった。

表1 CRE 菌株のβラクタマーゼの検出状況

菌種	薬剤感受性			PCR			表現型				
	IPM/CS	MEPM	CMZ	AmpC	ESBL	カルバペネマーゼ	CVA	BA	MCIPC	SMA	mCIM
<i>Enterobacter aerogenes</i>	2	≤1	>32	EBC型	-	-	-	+	+	-	-
	2	≤1	>32	-	-	-	-	+	+	-	-
	2	≤1	>32	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	≤0.25	≥64	-	-	-	-	+	+	-	-
	4	≤1	≥64	-	-	-	-	+	+	-	-
	2	≤1	≥64	-	-	-	-	+	+	-	-
	2	≤0.25	≥64	-	-	-	-	+	+	-	-
	4	≤1	≥64	-	-	-	-	+	+	-	-
	4	≤1	≥64	-	-	-	-	+	+	-	-
	2	≤0.5	≥64	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	2	≤0.5	≥64	-	-	-	-	+	+	-	-
	2	≤0.5	≥64	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	≤1	≥64	-	-	-	-	+	+	-	-
	4	≤1	≥64	-	-	-	-	+	+	-	-
	2	≤1	>32	EBC型	-	-	-	+	+	-	-
	2	≤1	>32	-	-	-	-	+	+	-	-
	2	≤1	≥64	EBC型	-	-	-	+	+	-	-
	2	≤1	>32	-	-	-	-	+	+	-	-
	2	≤1	≥64	-	TEM型、SHV型	-	+	+	+	-	-
	2	≤0.5	≥64	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>Citrobacter koseri</i>	2	≤1	>32	EBC型	-	-	-	+	+	-	-
	2	≤1	>32	-	-	-	-	+	+	-	-
	2	≤1	≥64	EBC型	-	-	-	+	+	-	-
<i>Escherichia coli</i>	2	≤1	>32	-	-	-	-	+	+	-	-
	2	≤1	>32	-	-	-	-	+	+	-	-
	2	≤1	≥64	-	TEM型	-	+	+	+	-	-
	2	≤0.5	≥64	-	-	-	-	+	+	-	-
	2	≤1	>32	EBC型	-	-	-	+	+	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	2	≤1	≥64	-	-	-	-	+	+	-	-
	R	S	R	-	CTX-M-2型	-	+	-	-	-	-
	NT	≥4	NT	-	-	IMP-1	-	-	-	+	+
	≥8	≥8	≥64	-	TEM型	IMP-1	-	-	-	+	+
<i>Serratia marcescens</i>	NT	2	NT	-	CTX-M-1型	-	+	-	-	-	-
	NT	4	NT	-	CTX-M-1型	-	+	-	-	-	-
	0.5	2	≥64	-	CTX-M-9型	-	+	-	-	-	-
	NT	2	32	-	CTX-M-1型、CTX-M-9型	-	+	-	-	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	≤1	2	≤16	-	TEM型、CTX-M-9型	-	+	-	-	-	-
	≥16	2	≥64	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	8	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	≤1	≥64	-	TEM型	-	-	+	+	-	-

NT: not test

ディスクを用いた表現型の検査ではカルバペネマーゼを産生する2株のみmCIMが陽性となり、他は陰性であった。また、SMAディスクを用いたMBLの阻害試験もこの2株の陽性であった。各種βラクタマーゼの阻害試験では菌種や遺伝子検査と矛盾するような結果はなかった。

考 察

感染症法の届出は全国では年間約1,600例の報告⁸⁾があり、本県では年間10例程度で少ない傾向である。この要因としては都市部と比較し、本県の人口が少ないことや外国人の割合が少なく海外から持ち込まれる機会が少ないことが考えられる。菌種についても全国では*E. cloacae*、*E. aerogenes*、*K. pneumoniae*、*E. coli*が多いが本県についても同様の傾向がみられた。また喀痰や尿からの検出が多く、高齢者に多い傾向がみられた。

当研究所に搬入された33株のうち*Citrobacter koseri* 2株からIMP型が検出され、ともにbla_{IMP-1}であった。医療機関に問い合わせたところ、この患者ら2名は海外渡航歴がなかったことから、県

内の医療機関や市中で保菌又は感染したものと推測された。bla_{IMP-1}は国内型とよばれ、日本国内で検出頻度の高いカルバペネマーゼ遺伝子であり、本県においても存在することが確認された。今回検出されたbla_{IMP-1}は院内でのアウトブレイク事例が報告されており⁴⁾、本県でも同様のアウトブレイクを起こす恐れがある。また、他県では外来型とよばれるKPC型のアウトブレイク事例⁹⁾があり、アウトブレイクを未然に防ぐために、本県においてもCPEを継続して調査し、医療機関等に情報提供及び啓発していく必要がある。

AmpC型βラクタマーゼについては*Enterobacter*属からEBC型が検出されたが、EBC型は*Enterobacter*属の染色体由来であり染色体性AmpC型βラクタマーゼを検出したものと思われる。菌種は*Enterobacter*属が多かったが、今回解析を行った22株は全て届出基準のIPM/CS及びCMZの基準を満たす株のみで、染色体由来AmpC型βラクタマーゼの過剰産生と外膜ポーリンの変化によるカルバペネム系抗菌薬の感受性の低下によるものと推測された。

ESBL 産生菌は医療現場では検出頻度の高い耐性菌であるが、当研究所に搬入された *E. coli* 5 株全てがいずれかの ESBL を産生していた。

また、CPE だけでなく国内では多剤耐性緑膿菌、アシネトバクター及びバンコマイシン耐性腸球菌についても院内アウトブレイクがみられるため、今後はこれらの薬剤耐性菌についても検査体制の構築を図っていく必要があると考える。

国内の下水処理水からのカルバペネマーゼを産生する *K. pneumoniae* の検出報告¹⁰⁾ もあり、ヒトの生活環境から自然環境中に CPE が排出されていることが予想される。これらを考慮し、今後は県内の河川水等を対象とした汚染状況も調査していきたい。

謝 辞

本調査の実施にあたり検体収集にご協力いただきました県内各保健所、宮崎市保健所、菌株提供いただきました医療機関、検査センターの関係各位に深謝いたします。

参考文献

- 1) 日本化学療法学会, JAID/JSC 感染症治療ガイドライン 2015 –尿路感染症・男性性器感染症–. 2015.
- 2) 荒川宜親, カルバペネム耐性腸内細菌科 (carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, CRE) 等 新型多剤耐性菌のグローバル化と臨床的留意点, 日本化学療法学会雑誌, 63 (2) 187-197, 2015.
- 3) Jim O’neill, Antimicrobial Resistance : Tackling a crisis for the health and wealth of nations, 2014
- 4) 阿部朋子ら, プラスミド水平伝達を介し多菌種へ耐性伝播した IMP-1 メタロ-β-ラクタマーゼ産生腸内細菌科細菌による院内感染事例, 日本臨床微生物学会雑誌, Vol.27 No.3 p20-29, 2017.
- 5) 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.
- 6) 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 p30-42, 2016
- 7) M100-S27 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing , Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.
- 8) 国立感染症研究所, カルバペネム耐性腸内細菌

科細菌 (CRE) 感染症, IASR Vol.40 p17-18, 2019.

- 9) 阿部孝一, 渡邊ひとみ. 郡山市保健所管内における KPC 型カルバペネム耐性腸内細菌科細菌による院内感染事例, IASR Vol.40 p27, 2019.
- 10) Tsuyoshi Sekizuka et al. Complete Genome Sequence of a *bla*_{KPC-1}-Positive *Klebsiella pneumoniae* Strain Isolated from the Effluent of an Urban Sewage Treatment Plant in Japn, mSphere, 2018.