

資 料

岐阜県におけるカルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症の届出情報と患者由来株のカルバペネム耐性機序の解析 (2014-2017年)

野田万希子, 門倉由紀子, 酢谷奈津, 亀山芳彦

要 旨

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) 感染症が全数届出疾患となった2014年9月19日から2017年12月31日の間に岐阜県内の保健所 (岐阜市保健所を含む) へ報告された30例の届出情報の集計を行った。その結果、診断時の年齢が65歳以上であった例が23例と70%以上を占めていたこと、症状は尿路感染症が12例 (40.0%) と最も多いこと、検出された菌株の半数以上 (56.6%) はエンテロバクター属菌であること等の特徴があり、全国の集計と同様の傾向が認められた。

患者由来株の搬入があった28例分 (28株) のCREのカルバペネム耐性機序の解析を行った結果、5株 (17.9%) でカルバペネマーゼ産生が確認され、全株がIMP-1型のメタロ-β-ラクタマーゼを産生していた。その詳細な遺伝子型を解析したところ、4株ではIMP-1、1株ではIMP-6β-ラクタマーゼ遺伝子であることが判明した。岐阜県においても、本邦で優勢に検出されるIMP-1型のメタロ-β-ラクタマーゼを保有する株が検出されることが明らかとなった。

キーワード: カルバペネム耐性腸内細菌科細菌, 薬剤耐性遺伝子, 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 *Enterobacteraceae*, CRE) 感染症は、イミペネムやメロペネム等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。腸内細菌科 (Family *Enterobacteriaceae*) には300近くの菌種が属しており、そのうち大腸菌 (*Escherichia coli*), 肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*), *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes* は臨床材料から比較的高率に検出される菌種である¹⁾。これらの細菌はヒトの腸管や上気道等に常在し、多くの場合は無害である。しかし、加齢や基礎疾患等で免疫力が低下すると日和見感染を引き起こし、下気道感染症 (肺炎等), 尿路感染症 (膀胱炎等), 血流感染症 (敗血症, 菌血症等) を引き起こすことがある。近年、これらのグラム陰性菌感染症の治療に使用されるカルバペネム系薬剤に対する耐性を獲得したCREが世界的に問題となっている²⁾。本邦では2014年9月19日にCRE感染症が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全数把握対象の5類全数把握疾患に指定され、この感染症の発生動向が把握されることとなった。

CREはカルバペネム耐性機序により2つに分類さ

れる。1つはβ-ラクタム剤を分解するβ-ラクタマーゼの一種で、カルバペネム系薬剤の分解酵素であるカルバペネマーゼを産生する細菌 (carbapenemase-producing *Enterobacteraceae*, CPE) である。CPEが持つカルバペネマーゼ遺伝子は通常プラスミド上に存在し、カルバペネム耐性を示さない他の腸内細菌科細菌に伝達されその細菌を耐性化させ得ることから、菌種を超えてカルバペネム耐性が拡散することが危惧されている。カルバペネマーゼの種類と分布には特徴があり、本邦ではIMP型のメタロ-β-ラクタマーゼ (metallo-β-lactamase, MBL) が優勢である³⁾。日常的にCREの検査を行って地域のカルバペネマーゼの傾向を把握することにより、海外からの持ち込みや持ち込み例を発端とした耐性菌の広がりを探知することが可能となる。

もう1つのカルバペネム耐性機序は、基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ (extended-spectrum β-lactamase, ESBL) やAmpCβ-ラクタマーゼ等、カルバペネマーゼとは異なるタイプのβ-ラクタマーゼを過剰産生し、さらに菌の外膜の変化による薬剤の透過性低下や、薬剤排出機構の亢進等の結果としてカルバペネム耐性を示すnon-CPEである。non-CPEであっても、菌種とβ-ラクタマーゼ遺伝子の組み合わせを把握しておくこ

とは院内感染対策の上でも重要である。

当所では2015年5月より県内保健所(岐阜市保健所を含む)に届出されたCRE感染症の患者由来株の収集を開始した。今回、2017年末までに届出があったCRE感染症の届出情報の集計を行うとともに、患者由来株のカルバペネム耐性機序の解析を行った。

2 材料と方法

2.1 CRE感染症の届出情報

2014年9月19日～2017年12月31日の期間に医療機関より県内保健所に報告された症例について、厚生労働省の感染症発生动向調査事業の感染症サーベイランスシステム(NESID)に登録された届出情報を基に各種疫学情報を集計した。

2.2 CRE感染症患者由来株の検査

2.2.1 供試菌株

当所に搬入されたCRE感染症28例分の菌株を用いた。なお、同じ患者由来株が複数株搬入された場合は、届出の主たる原因菌と思われた1株のデータを用いた。ミューラーヒントン寒天培地(OXOID)上で純培養であることを確認後、全株についてアピ20EまたはラピッドID32Eアピ(ビオメリュー)による菌種確認を行った。

2.2.2 カルバペネム耐性機構の解析

2.2.2.1 ディスク法によるβ-ラクタマーゼのスクリーニング

各種β-ラクタマーゼに特異的な阻害剤を用いたスクリーニングを行った。カルバペネマーゼのスクリーニングは、MBL(IMP型、NDM型等)の阻害剤としてメルカプト酢酸ナトリウム(SMA)ディスク(栄研化学)を、KPC型カルバペネマーゼの阻害剤として3-アミノフェニルボロン酸(APB, 東京化成工業)を用い、病原体検出マニュアル⁴⁾の方法に従って実施した。

カルバペネマーゼ以外のβ-ラクタマーゼを対象としたスクリーニングは以下のとおり実施した。ESBLのスクリーニングは、セフトラジジムとセフトキサシムディスクを用い、阻害剤としてクラブラン酸(CVA)含有ディスクを使用した。薬剤ディスクとCVA含有ディスクとの間に阻止帯が形成された株をESBLスクリーニング陽性とした。AmpCβ-ラクタマーゼのスクリーニングは、セフメタゾールディスクを用い、阻害剤としてAPB 500 μgとクロキサシリン(MCIPC, 東京化成工業) 200 μgを使用した。阻害剤を添加しないディスクの阻止円径に対し、APB及びMCIPCを添加したディスクの阻止円径が拡張した株をAmpCβ-ラクタマーゼスクリーニング陽性とした。

2.2.2.2 カルバペネマーゼ産生を確認する試験

カルバペネマーゼ産生の有無をcarbapenem-inactivation method (CIM)⁵⁾またはmodified CIM (mCIM)⁶⁾により確認した。

2.2.2.3 PCR法による薬剤耐性遺伝子の検出

病原体検出マニュアル⁴⁾に従い、IMP型、NDM型、KPC型、OXA-48型、GES型のカルバペネマーゼ遺伝子を対象にPCRを実施した。その他に、CTX-M-1 group, CTX-M-2 group, CTX-M-9 group, TEM型, SHV型のESBL遺伝子を対象としたPCR^{7,8)}と、MOX型, CIT型, DHA型, ACC型, EBC型, FOX型のプラスミド性AmpCβ-ラクタマーゼ遺伝子を対象としたPCR⁹⁾を全株に対して実施した。

2.2.2.4 シーケンスによるMBL遺伝子の解析

IMP-1型のMBL遺伝子が検出された株について、病原体検出マニュアル⁴⁾に従ってIMP-1 allプライマーによりβ-ラクタマーゼ遺伝子の全長のシーケンスを実施し塩基配列を決定した。アミノ酸置換後の配列をBlast検索しIMPのタイプを決定した。

2.2.2.5 プラスミド解析

国立感染症研究所薬剤耐性研究センター及び病原体ゲノム解析研究センターに依頼し、8株のプラスミド解析を行った。具体的には、S1 nuclease処理後にパルスフィールド・ゲル電気泳動(PFGE)を行ってプラスミドDNA断片と染色体DNA断片を切出し、それぞれDNA抽出を行った後にMiSeqベンチトップ型次世代シーケンサー(illumina)により配列解読を行った。得られた配列を病原体ゲノム解析研究センター開発のGlobal Plasmidome Analyzing Tool (GPAT)により解析を行い、薬剤耐性遺伝子及びプラスミドレプリコンタイプの検索を行った。

3 結果と考察

3.1 CRE感染症の届出情報

岐阜県内の14医療機関より、2014年0例、2015年8例、2016年9例、2017年13例の合計30例の届出があった(表)。届出時の死亡例は1例(No.3)であった。患者の性別は男性21例(70.0%)と男性の方が多かった。届出時の年齢は40～94歳であり、65歳以上が23例で全体の76.6%を占めていた。症状は尿路感染症が12例(40.0%)と最も多く、菌血症・敗血症が9例(30.0%)、肺炎が5例(16.7%)、胆管炎4例、腹膜炎が1例、その他が2例(腹腔内腫瘍、足背部挫創)であった(うち3例は複数の症状の記載があった)。耐性を確認した薬剤はイミペネムとセフメタゾールのみが14例(50.0%)、メロペネムのみが10例(35.7%)、両方で耐性が確認された症例が6例(21.4%)であった。分離菌の菌種は*E. cloacae*が9例(30.0%)で最も多く、

表 CRE感染症の届出情報と届出菌株の検査結果

症例 No.	届出情報					検査結果 ^{*2}						
	医療 機関	診断 年/週	症状	菌種	薬剤 ^{*1}	カルバペ ネマーゼ 産生 ^{*3}	PCR ^{*4}			プラスミド解析		
							カルバペ ネマーゼ 遺伝子	ESBL 遺伝子	AmpC β-ラクタマーゼ [*] 遺伝子	プラスミド [*] レプリコン タイプ	薬剤耐性 遺伝子 ^{*5}	
1	A	2015/03	敗血症	<i>Enterobacter aerogenes</i>	I							
2	B	2015/06	敗血症	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	M, I							
3	C	2015/07	尿路感染症 敗血症	<i>Serratia marcescens</i>	M	-	-	-	-			
4	C	2015/09	胆管炎	<i>Citrobacter species</i>	I	-	-	-	-			
5	B	2015/18	敗血症	<i>Enterobacter aerogenes</i>	M	-	-	CTX-M-1 group	-		検出なし	検出なし
6	C	2015/19	肺炎	<i>Serratia marcescens</i>	I	-	-	-	-			
7	D	2015/20	尿路感染症	<i>Citrobacter freundii</i>	M	+	IMP-1型 MBL	-	(CIT型)	IncHI1A IncHI1B		<i>bla</i> _{IMP-1}
8	B	2015/23	敗血症	<i>Enterobacter aerogenes</i>	M, I	-	-	-	-			
9	E	2016/11	尿路感染症	<i>Escherichia coli</i>	M	+	IMP-1型 MBL	CTX-M-2 group CTX-M-9 group	-	IncN		<i>bla</i> _{IMP-6} <i>bla</i> _{CTX-M-2}
10	F	2016/17	肺炎	<i>Enterobacter cloacae</i>	I	-	-	-	(EBC型)			
11	G	2016/19	胆管炎	<i>Enterobacter cloacae</i>	M, I	-	-	-	-			
12	B	2016/24	敗血症	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	M	-	-	CTX-M-1 group TEM型, (SHV型)	-	IncFIB		<i>bla</i> _{TEM-1D} <i>bla</i> _{CTX-M-15}
13	H	2016/24	その他	<i>Escherichia coli</i>	M	-	-	-	CIT型			
14	I	2016/27	腹膜炎	<i>Enterobacter cloacae</i>	M	+	IMP-1型 MBL	-	(EBC型)	IncHI1A IncHI1B		<i>bla</i> _{IMP-1}
15	J	2016/34	肺炎	<i>Enterobacter aerogenes</i>	I	-	-	-	-			
16	K	2016/35	尿路感染症	<i>Serratia marcescens</i>	M, I	-	-	CTX-M-2 group TEM型	-	pSM22		<i>bla</i> _{TEM-1D}
17	L	2016/39	肺炎	<i>Enterobacter cloacae</i>	M, I	-	-	-	(EBC型)			
18	B	2017/09	尿路感染症 敗血症	<i>Enterobacter aerogenes</i>	I	-	-	-	-			
19	G	2017/15	肺炎	<i>Serratia marcescens</i>	I	-	-	-	-			
20	C	2017/18	尿路感染症	<i>Enterobacter aerogenes</i>	I	-	-	-	-			
21	B	2017/29	尿路感染症	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	M	-	-	CTX-M-1 group TEM型, (SHV型)	-			
22	M	2017/31	尿路感染症	<i>Enterobacter cloacae</i>	I	-	-	-	(EBC型)			
23	M	2017/31	尿路感染症	<i>Enterobacter cloacae</i>	I	-	-	-	(EBC型)			
24	B	2017/32	尿路感染症	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	I	-	-	CTX-M-1 group TEM型, (SHV型)	-			
25	I	2017/32	菌血症	<i>Enterobacter cloacae</i>	M	+	IMP-1型 MBL	-	(EBC型)			
26	B	2017/33	敗血症 胆管炎	<i>Enterobacter aerogenes</i>	I	-	-	-	-			
27	M	2017/35	その他	<i>Enterobacter cloacae</i>	I	-	-	-	-			
28	N	2017/40	尿路感染症	<i>Enterobacter aerogenes</i>	I	-	-	-	-			
29	C	2017/51	尿路感染症	<i>Providencia rettgeri</i>	M, I	+	IMP-1型 MBL	-	-			
30	C	2017/51	胆管炎	<i>Enterobacter cloacae</i>	M	-	-	-	-			

*1 確認に用いた薬剤名 I; イミペネムとセフトメゾール、M; メロペネム

*2 空欄は菌株未搬入または検査未実施

*3 CIMまたはmCIMにより実施

*4 菌種より、染色体性のβ-ラクタマーゼである可能性がある遺伝子型を括弧で示した

*5 症例No.9: 染色体DNAかプラスミドDNAのどちらに由来するかは不明のDNA断片より*bla*_{CTX-M-27}(CTX-M-9 group)を検出
症例No.16: 染色体DNAの可能性が考えられるDNA断片より*bla*_{CTX-M-2}(CTX-M-2 group)を検出

続いて *E. aerogenes* が8例 (26.7%), *K. pneumoniae* と *Serratia marcescens* が各4例, *E. coli* が2例, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter sp.*, *Providencia rettgeri* が各1例であった。2016年に届出があった全国1,581例の集計報告¹⁰⁾では、65歳以上が77.2%を占めていたこと、男性の割合が62.1%であったこと、尿路感染症の割合が32.4%と最も多かったこと、エンテロバクター属菌による報告が61.9%を占めていたこと等が報告されており、岐阜県でも同様の傾向であった。

3.2 CRE 感染症患者由来株の検査

CRE 感染症の患者由来株28株のカルバペネム耐性機構の解析結果を表に示した。28株のうち、カルバペネマーゼ産生試験 (CIM または mCIM) が陽性で、かつカルバペネマーゼ遺伝子が検出され CPE と判定された菌株は5株 (17.9%) であった。この5株は本邦で優勢に検出されている IMP-1 型の MBL を産生していた。IMP-1 型の中の詳細なタイプを確認するためにシーケンス解析を行ったところ、IMP-1 β -ラクタマーゼ遺伝子 (*bla_{IMP-1}*) と決定された株が4株、IMP-6 (*bla_{IMP-6}*) と決定された株が1株であった。国内の CPE の分布を検討した報告³⁾によると、東日本では *bla_{IMP-1}*、西日本では *bla_{IMP-6}* を保有する株が多く検出されており、岐阜県では *bla_{IMP-1}* を保有する CPE の方が多かったものの、両方のタイプが存在していた。また、プラスミド解析の結果、*bla_{IMP-6}* をコードしているプラスミドのレプリコンタイプは IncN であり、ESBL 遺伝子である *bla_{CTX-M-2}* (CTX-M-2 group) も同じプラスミドにコードされていることが分かった。鹿山らは、西日本で検出された CPE の解析で IncN タイプのプラスミドに *bla_{IMP-6}* と *bla_{CTX-M-2}* がコードされていたことを報告している¹¹⁾。今回当県で検出された *bla_{IMP-6}* を産生する CPE はプラスミド解析においても西日本に検出されるタイプと特徴が一致していることが示唆された。

さらに、CPE 5株の菌種や確認に用いた薬剤に注目してみると、菌種は *E. cloacae* (2株), *E. coli*, *C. freundii*, *P. rettgeri*, 薬剤はメロペネムのみで耐性確認された株が4株、メロペネム、イミペネムとセフメタゾール両方で耐性確認された株が1株であった。松井らは、全国の医療機関から収集した CRE 100株の調査の結果、CPE は34株 (34.0%) であり、最も株数が多かった *E. aerogenes* 29株の中には CPE は1株も認められなかったこと、イミペネムとセフメタゾールのみ耐性が確認された35株の中にも CPE が1株も認められなかったことを報告している³⁾。岐阜県においても、*E. aerogenes* が8株、イミペネムとセフメタゾールのみで耐性確認された株が13株あったが、これらはすべて CPE ではなく、松井らの報告と一致していた。

一方、non-CPE と判定された株は23株であった。染色体上に元来保有している β -ラクタマーゼ遺伝子を PCR で検出している可能性がある組み合わせ (*K. pneumoniae* の SHV 型 ESBL 遺伝子, *E. cloacae* の EBC 型, *C. freundii* の CIT 型の AmpC β -ラクタマーゼ遺伝子) を除くと、6株 (No.5, 12, 13, 16, 21, 24) からプラスミド性が疑われる ESBL または AmpC β -ラクタマーゼ遺伝子が検出された。このうち3株 (No.5, 12, 13) についてプラスミド解析によって検証を行った。No.5 は、菌株搬入時の検査で CTX-M-1 group の ESBL 遺伝子とサイズが一致する薄いバンドが検出されていたが、プラスミド解析の結果、該当する遺伝子はプラスミド断片にも染色体断片の中にも検出されなかった。ディスク法によるスクリーニングの結果でも AmpC β -ラクタマーゼの関与が示唆されており、菌株搬入時の検査で ESBL 遺伝子と判定したバンドは偽陽性であると推察された。また No.12 と No.16 では、TEM 型の ESBL 遺伝子はプラスミド上に存在し、いずれも ESBL としての機能を持たない β -ラクタマーゼ (non-ESBL) として知られる *bla_{TEM-1D}* であった。さらに、No.12 では CTX-M-1 group の ESBL 遺伝子である *bla_{CTX-M-15}* がプラスミド上で検出されたが、No.16 では CTX-M-2 group の ESBL 遺伝子である *bla_{CTX-M-2}* が染色体と推察されるゲノム断片から検出された。このように、プラスミド解析を行うことにより詳細な薬剤耐性遺伝子の種類や所在の推察ができた。

PCR でいずれの薬剤耐性遺伝子も検出されなかったか、もしくは染色体上に元来保有している耐性遺伝子のみが検出された残りの17株では、全株が染色体性の AmpC β -ラクタマーゼを保有するとされる菌種 (エンテロバクター属菌, *S. marcescens*, *C. freundii* 等) であった。ディスク法によるスクリーニングの結果でも AmpC β -ラクタマーゼの関与が示唆されたことから、染色体性の AmpC β -ラクタマーゼの作用でカルバペネム耐性化した株と推察された。

届出を提出した14医療機関のうち、5医療機関からは複数 (2~8例) の届出があった。CRE の菌種が同一で発生時期が近い場合や、患者の病室や病棟等の疫学的リンクがあった例では PFGE 検査を実施した。一部の医療機関では、比較した菌株の PFGE パターンが類似していたことから院内での伝播が疑われた (データ示さず)。CRE が検出された場合には、感染症の発症の有無や CPE, non-CPE に関わらず、院内での細菌の伝播が起こらないように院内感染対策を確実に遂行する必要がある。

CRE のカルバペネム耐性機構の解析を行うことで、地域に存在する CPE の出現動向の監視が可能である。

さらに詳細な解析であるプラスミド解析を行うことにより、特定のプラスミドを保有しているCPEの広がりを把握することができ、薬剤耐性菌の分布や地域を超えた伝播を考察する上で有用と考えられる。岐阜県内では検出されていないものの、国内で検出されるCPEの中にはIMP型とGES型の同時産生株も報告されており¹²⁾、本県においても今後も監視が必要と考える。

謝 辞

本調査の実施にあたり、検体収集等にご協力いただきました各保健所の関係各位にお礼を申し上げます。また、プラスミド解析を行っていただきました国立感染症研究所の薬剤耐性研究センター及び病原体ゲノム解析研究センターの先生方に深謝いたします。

文 献

- 1) 厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業：検査部門公開情報2016年1～12月年報，2017.
- 2) 耐性菌検査法ガイド作成作業部会：耐性菌検査ガイド，臨床微生物学会誌，27，2017.
- 3) 松井真理，鈴木里和，林美智子，瀬川孝耶，川上小夜子，柴山圭吾：国内78医療機関より収集したカルバペネム耐性腸内細菌科細菌（CRE）の分子疫学解析，第28回日本臨床微生物学会総会学術集会要旨，2017.
- 4) 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v1.1，30-42，2016.
- 5) Van der Zwaluw K., De Haan A., Pluister G.N., Bootsma H.J., De Neeling A.J., Schouls L.M.: The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the carba NP test to access phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods, PLOS ONE, 23, 10(3), 1-13, 2015.
- 6) CLSI: Performance standards for antimicrobials susceptibility testing, twenty-seventh informational supplement, M100-S27, 2017.
- 7) Shibata N., Kurokawa H., Doi Y., Yagi T., Yamane K., Wachino J. et al.: PCR classification of CTX-M-type β -lactamase genes identified in clinically isolated gram-negative bacilli in Japan, Antimicrob Agents Chemother, 50(2), 791-795, 2006.
- 8) Yagi T., Kurokawa H., Shibata N., Shibayama K., Arakawa Y.: A preliminary survey of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan, FEMS microbial Lett, 184, 53-56, 2000.
- 9) Perez-Perez F.J., Hanson H.D.: Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR, J Clin Microbiol, 40(6), 2153-2162, 2002.
- 10) 国立感染症研究所：感染症法に基づくカルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症の届出状況，2016年，感染症疫学センターHP，2017.
- 11) Kayama S., Shigemoto N., Kuwahara R., Oshima K., Hirakawa H., Hisatsune J. et al.: Complete nucleotide sequence of the IncN plasmid encoding IMP-6 and CTX-M-2 from emerging carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in Japan, Antimicrob Agents Chemother, 59, 1356-1359, 2015.
- 12) 福田千恵美，安藤友美，岩下陽子，内田順子：香川県内のカルバペネム耐性腸内細菌科細菌の薬剤耐性遺伝子の検出状況，香川県環境保健研究センター所報，第15号，47-52，2016.

Report of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* infectious diseases and detection of antimicrobial-resistant genes in clinical isolates in Gifu Prefecture (2014-2017)

Makiko NODA, Yukiko KADOKURA, Natsu SUDANI and Yoshihiko KAMEYAMA

Gifu Prefectural Research Institute for Health and Environmental Sciences:
1-1, Naka-fudogaoka, Kakamigahara, Gifu 504-0838, Japan