

茨城県におけるカルバペネム耐性腸内細菌科細菌の検査状況

○伊師 拓哉、石川 加奈子、相原 義之¹、金崎 雅子

¹現：健康・地域ケア推進課

要旨

茨城県衛生研究所では、2017年7月からカルバペネム耐性腸内細菌科細菌（CRE）の検査を実施している。直近の2年間（2019年1月から2020年12月）で当所に搬入されたCRE菌株について、ディスク拡散法によるβ-ラクタマーゼ産生性のスクリーニング検査、カルバペネマーゼ産生性のスクリーニング検査、PCR法による薬剤耐性遺伝子検査を実施した結果、96株中11株がカルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌（CPE）と判定された。検出されたカルバペネマーゼ遺伝子は、IMP-1が7株、IMP-6が2株、NDM-5が2株であった。

キーワード：カルバペネム耐性腸内細菌科細菌（CRE）、カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌（CPE）、カルバペネマーゼ遺伝子

1. はじめに

CRE感染症はグラム陰性菌による感染症の治療薬として重要な位置付けであるカルバペネム系抗菌薬及び広域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の総称である。CREがカルバペネム系抗菌薬に耐性を示すメカニズムは、β-ラクタマーゼの産生量増加及び外膜蛋白（ポーリン）の変化によるものと、カルバペネム分解酵素であるカルバペネマーゼの産生によるものの2つに大別される¹⁾。特に後者のメカニズムによるものはCPEと呼ばれ、カルバペネマーゼ遺伝子がプラスミド上に存在することから、薬剤耐性が菌種を越えて伝播する可能性があり、特に警戒が必要である²⁾。

近年、CREの増加は世界的な問題となっている。CRE感染症は2014年9月19日より5類全数把握疾患に追加された。また、2017年3月に発出された厚生労働省通知³⁾により、CRE感染症の届出があった際は、地方衛生研究所等で当該病原体の検査を実施し、結果を感染症サーベイランスシステム（NESID）に報告することとされた。

当所では2017年7月からCRE検査を実施している。本報では当所における直近の2年間（2019年1月から2020年12月）の検査状況について報告する。

2. 材料と方法

2-1 供試菌株

2019年1月から2020年12月までの間にCRE感染症の患者から分離され、当所に搬入された菌株96株を検査材料とした。

2-2 菌種の同定

搬入された全菌株に対し、アピ20E（ピオメリュー）による菌種確認を行った。

2-3 ディスク拡散法によるβ-ラクタマーゼ産生性のスクリーニング検査

メタロβ-ラクタマーゼ（MBL）産生性のスクリーニング検査では、薬剤ディスクとしてセフトジジム（CAZ）及びメロペネム（MEPM）を用い、阻害剤としてメルカプト酢酸ナトリウム（SMA）ディスクを使用した。KPC型カルバペネマーゼ産生性のスクリーニング検査では、薬剤ディスクとしてMEPMを用い、阻害剤として3-アミノフェニルボロン酸（APB）を

使用した。検査及び結果判定の方法は病原体検出マニュアル⁴⁾に従った。

基質拡張型β-ラクタマーゼ (ESBL) 産生性のスクリーニング検査では、薬剤ディスクとして CAZ 及びセフトキシム (CTX) を用い、阻害剤としてクラブラン酸及びスルバクタムを使用した。結果判定は薬剤ディスクと阻害剤の間で阻止円の拡張が認められた株を陽性とした。

AmpC β-ラクタマーゼ産生性のスクリーニング検査では、薬剤ディスクとしてセフメタゾール (CMZ) を用い、阻害剤として APB 及びクロキサシリン (MCIPC) を使用した。検査及び結果判定の方法は病原体検出マニュアル⁴⁾に従った。

2-4 カルバペネマーゼ産生性のスクリーニング検査

CLSI M100 に記載された modified Carbapenem Inactivation Method (mCIM)^{5, 6)}に従って、カルバペネマーゼ産生性を確認した。

2-5 PCR 法による薬剤耐性遺伝子検査

検査対象遺伝子は、カルバペネマーゼ遺伝子 (IMP 型、NDM 型、KPC 型、OXA-48 型、VIM 型、GES 型)、ESBL 遺伝子 (TEM 型、SHV 型、CTX-M-1 group、CTX-M-2 group、CTX-M-9 group)、AmpC β-ラクタマーゼ遺伝子 (MOX 型、CIT 型、DHA 型、ACC 型、EBC 型、FOX 型) とし、マルチプレックス PCR 法⁷⁾及び病原体検出マニュアル⁴⁾に記載された方法を用いた。

2-6 シークエンスによるカルバペネマーゼ遺伝子の解析

カルバペネマーゼ遺伝子の保有が確認された株については、シークエンスを実施し塩基配列を決定した。IMP 型については病原体検出マニュアル⁴⁾の方法に従い、NDM 型については Kaase らの方法⁸⁾に従った。

3. 結果

3-1 CRE 感染症の発生状況

当所における CRE 感染症の届出に基づく検査依頼件数は、2019 年は 51 件、2020 年は 45 件であった。患者の性別は、男性 65 例 (67.7%)、女性 31 例 (32.3%) であった。年齢分布は 0～93 歳で、60 歳以上の患者が全体の 84.4% を占めていた (表 1)。臨床症状は尿路感染症 31 例 (27.4%)、肺炎 24 例 (21.2%)、菌血症・敗血症 20 例 (17.7%)、胆嚢炎・胆管炎 11 例 (9.7%)、腹膜炎 7 例 (6.2%)、その他 20 例 (17.7%) であった (複数の症状が記載されているものを含む) (表 2)。分離検体は、尿 27 例 (27.8%)、血液 26 例 (26.8%)、喀痰 23 例 (23.7%)、胆汁 6 例 (6.2%)、腹水 5 例 (5.2%)、膿 4 例 (4.1%)、その他 6 例 (6.2%) であった (表 3)。菌種は、*K. aerogenes* 54 株 (56.3%)、*E. cloacae* 26 株 (27.1%)、*C. braakii* 4 株 (4.2%)、*E. coli* 4 株 (4.2%)、*K. pneumoniae* 3 株 (3.1%)、*C. freundii* 2 株 (2.1%)、*S. ficaria* 1 株 (1.0%)、*S. marcescens* 1 株 (1.0%)、*Klebsiella sp.* 1 株 (1.0%) であった (表 4)。これらの結果は、2019 年 CRE 病原体サーベイランス⁹⁾とおおむね同様の傾向であった。薬剤耐性を MEPM の基準で判定した症例は 6 例 (6.3%)、イミペネム (IPM) と CMZ の基準で判定した症例は 72 例 (75.0%)、両方で判定した症例は 18 例 (18.8%) であった。

表1 年齢別及び男女別CRE届出件数

年齢	性別		割合
	男性	女性	
10歳未満	0	1	1.0%
10代	0	2	2.1%
20代	0	0	0.0%
30代	2	0	2.1%
40代	1	2	3.1%
50代	2	5	7.3%
60代	6	5	11.5%
70代	26	5	32.3%
80代	27	8	36.5%
90代	1	3	4.2%

表2 診断別件数

診断名(重複あり)	件数	割合
尿路感染症	31	27.4%
肺炎	24	21.2%
菌血症・敗血症	20	17.7%
胆嚢炎・胆管炎	11	9.7%
腹膜炎	7	6.2%
その他	20	17.7%

表3 分離検体別件数

分離検体名(重複あり)	件数	割合
尿	27	27.8%
血液	26	26.8%
喀痰	23	23.7%
胆汁	6	6.2%
腹水	5	5.2%
膿	4	4.1%
その他	6	6.2%

表4 菌種別株数

菌種名	株数	割合
<i>K. aerogenes</i>	54	56.3%
<i>E. cloacae</i>	26	27.1%
<i>C. braakii</i>	4	4.2%
<i>E. coli</i>	4	4.2%
<i>K. pneumoniae</i>	3	3.1%
<i>C. freundii</i>	2	2.1%
<i>S. ficaria</i>	1	1.0%
<i>S. marcescens</i>	1	1.0%
<i>Klebsiella sp.</i>	1	1.0%

3-2 搬入菌株の検査結果

当所に搬入された 96 株に対し、ディスク拡散法による β -ラクタマーゼ産生性のスクリーニング検査、カルバペネマーゼ産生性のスクリーニング検査、PCR 法による薬剤耐性遺伝子検査を実施した結果、CPE と判定された菌株は 11 株 (11.5%) であった。検出されたカルバペネマーゼ遺伝子は、IMP 型が 9 株 (81.8%)、NDM 型が 2 株 (18.2%) であった。これらを遺伝子型別するためにシークエンス解析した結果、IMP 型については、IMP-1 が 7 株 (*E. cloacae* 5 株、*C. freundii*、*S. ficaria*)、IMP-6 が 2 株 (*E. coli*、*K. pneumoniae*) であった。NDM

型については、2 株とも NDM-5 であり、いずれも菌種は *E. coli* であった (図 1)。なお、ディスク拡散法による MBL 産生性のスクリーニング検査及び mCIM では、これら 11 株すべてで陽性が確認された。

ESBL 遺伝子については、TEM 型が 3 株 (*K. aerogenes*、*K. pneumoniae*、*E. coli*)、SHV 型が 2 株 (*K. pneumoniae*)、CTX-M-1 group が 2 株 (*E. coli*、*K. pneumoniae*)、CTX-M-2 group が 2 株 (*K. pneumoniae*、*E. coli*)、CTX-M-9 group が 1 株 (*E. coli*) であった。

AmpC β -ラクタマーゼ遺伝子については、EBC 型が 9 株 (*E. cloacae*)、CIT 型が 2 株 (*C. freundii*)、DHA 型が 1 株 (*K. pneumoniae*) であった。

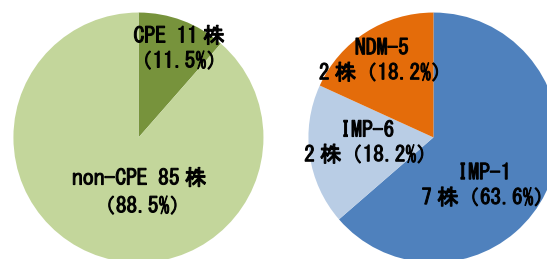


図 1 CPE 検出割合及び遺伝子型別

3-3 考察

CRE 感染症の届出に基づき、2019 年 1 月から 2020 年 12 月までに当所に搬入された 96 株のうち、CPE と判定された株は 11 株 (11.5%) であった。これは、2019 年 CRE 病原体サーベイランス⁹⁾ (296/1,799、16.5%) と比較して低い割合であった。

国内で主に検出されるカルバペネマーゼは IMP 型であり、その多くは IMP-1 と IMP-6 である。これらの分布には地域特性があることが知られており、IMP-1 は全国から分離され、IMP-6 は西日本地域を中心に分離されている⁹⁾。当所での検査の結果、IMP-1 が 7 株、IMP-6 が 2 株であったが、IMP-6 が検出された患者と西

日本地域との関連性は不明であった。IMP-1とIMP-6はMBL遺伝子が一塩基異なるだけであるが、これによりIMP-6のIPM分解活性はMEPM分解活性の7分の1にまで低下する¹⁰⁾。このため、IMP-6産生株に対するカルバペネム系薬の感受性試験をIPMだけで行った場合、IPMに感性となり見落とされる危険性があることから「ステルス型」と呼ばれ、院内感染対策上、重要な耐性菌であるとされている¹¹⁾。

NDM型は海外型カルバペネマーゼである⁹⁾。当所でNDM-5が分離された患者は海外渡航歴がなかったが、都市部に近い地域から検出されたことから、都市部からの流入の可能性が推察された。

今回の結果では、西日本地域を中心に検出されるIMP-6や海外型カルバペネマーゼであるNDM-5が検出され、CPEの広がりが示唆された。薬剤耐性菌によるアウトブレイクを未然に防ぐためには、正確かつ迅速に検査を実施し、医療機関への情報提供をすることが重要であると考えられる。

文献

- 1) 荒川宜親. 病原微生物検出情報 IASR 35: 283-284, 2014
- 2) 国立感染症研究所. 病原微生物検出情報 IASR 40: 17-18, 2019
- 3) 厚生労働省健康局結核感染症課長通知健感発 0328 第4号「カルバペネム耐性腸内細菌科細菌(CRE)感染症等に係る試験検査の実施について」. 平成29年3月28日
- 4) 国立感染症研究所. 病原体検出マニュアル 薬剤耐性菌. 2020
- 5) CLSI 2018. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; M100-S28
- 6) CLSI 2017. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; M100-S27
- 7) Watahiki M. *et al.* 2020. *Jpn J Infect Dis.* 73 (2) : 166-172
- 8) Kaase M. *et al.* 2011. *J Antimicrob Chemother.* 66 (6) : 1260-1262
- 9) 国立感染症研究所. 病原微生物検出情報 IASR 42: 123-124, 2021
- 10) Yano H. *et al.* 2001. *Antimicrob Agents Chemother.* 45 (5) : 1343-1348
- 11) 鹿山鎮男 他. 2016. THE CHEMICAL TIMES. 239: 3-9