

### 3 調査研究

#### 3・1 報 文

## 1) 熊本県内で検出されたカルバペネム耐性腸内細菌目細菌 (CRE) の 解析について

前田莉花 原田誠也 小原敦美 森 美聡 八尋俊輔

### 要 旨

2017 年度から 2021 年度までにカルバペネム耐性腸内細菌目細菌 (CRE) 感染症として届出された 18 名患者由来菌株 19 株について、耐性遺伝子及びカルバペネマーゼ産生等の確認試験を行った。その結果、カルバペネマーゼ産生株 (CPE) は 2 株 (10.5%) であり、*Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca* それぞれ 1 株から IMP 型カルバペネマーゼ遺伝子を検出した。IMP 型は日本国内で最も多く検出される遺伝子型に該当し、本県においても存在することが判明した。2017 年度から 2021 年度までに本県 (熊本市除く) で CRE 感染症として届出された 40 株に対し検査実施率が 47.5%にとどまることから、今後、より積極的に菌株を収集し、耐性遺伝子及びカルバペネマーゼ産生等の確認試験を行う必要がある。

キーワード : CRE, CPE, 薬剤耐性

#### はじめに

カルバペネム耐性腸内細菌目細菌 (carbapenem resistant Enterobacteriales ; CRE) 感染症は、メロペネムなどの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*Escherichia coli*などの腸内細菌目細菌による感染症の総称である。CREは院内感染の原因菌となり、かつ、近年、増加傾向にあり、その対策が国際社会の重要な課題となっている。このまま何も対策をとらなければ、2050 年には 100 万人が薬剤耐性菌感染症で死亡するとの予測<sup>1)</sup>もあり、世界保健機関 (WHO) が 2015 年 5 月に薬剤耐性に関わる国際行動計画<sup>2)</sup>を採択し、これにより、我が国でも「薬剤耐性 (Anti-microbial resistance ; AMR) 対策アクションプラン」(2016~2020 年)<sup>3)</sup>を策定した。

アクションプランの中で 6 つの項目について目標が設定され、その一つである「動向調査・監視」の一環として、平成 29 年 3 月 28 日厚生労働省健康局結核感染症課長通知 (健感発 0328 第 4 号) により、「カルバペネム耐性腸内細菌目細菌感染症」の届出があった際には、地方衛生研究所等で分離菌株の検査を行い、結

果を感染症サーベイランスシステムの病原体検出情報システムを通じて厚生労働省に報告することとされた。これを受け、当所では「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」(平成 10 年法律第 114 号) により届出のあった CRE について、保健所及び医療機関の協力のもと菌株の収集を行い、詳細な解析を行った。

#### 検査材料

2017 年度から 2021 年度までに CRE 感染症として届出されたもののうち、当所に搬入された菌株 19 株 (患者 18 名) を検査対象とした。

#### 方 法

##### 1. マルチプレックス PCR 法による β-ラクタマーゼ遺伝子の検出

PCR 法により ESBL (Extended spectrum β-lactamase) 遺伝子 6 種 (TEM 型, SHV 型, CTX-M-1 group, CTX-M-2 group, CTX-M-8/25 group, CTX-M-9 group)<sup>4-8)</sup>, カルバペネマーゼ遺伝子 6 種 (NDM 型, IMP 型, VIM

表 1 目的とする遺伝子型

ESBL	カルバペネマーゼ	AmpC
クラス A β-ラクタマーゼ遺伝子 (KPC 型を除く)	クラス B β-ラクタマーゼ遺伝子 (KPC 型⇒ClassA, OXA-48 型⇒ClassD)	クラス C β-ラクタマーゼ遺伝子
TEM 型	NDM 型	MOX 型
SHV 型	IMP 型	CIT 型
CTX-M-1 group	VIM 型	DHA 型
CTX-M-2 group	KPC 型	ACC 型
CTX-M-8/25 group	OXA-48-like 型	EBC 型
CTX-M-9 group	GES 型	FOX 型

型, KPC 型, OXA-48-like 型, GES 型)<sup>8-11)</sup> 及びβ-ラクタマーゼ AmpC β-ラクタマーゼ (以下「AmpC」という。) 遺伝子 6 種 (MOX 型, CIT 型, DHA 型, ACC 型, EBC 型, FOX 型)<sup>8,12)</sup> をそれぞれ検出した (表 1)。

## 2. ディスク法による表現型の確認

### 2.1 阻害剤を用いた β-ラクタマーゼ産生性の確認

β-ラクタマーゼ産生性の確認は, 国立感染症研究所薬剤耐性研究センター第一室作成の薬剤耐性菌検査研修資料<sup>13)</sup>及び国立感染症研究所病原体検出マニュアル「カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症」(以下「病原体検出マニュアル」という。)<sup>14)</sup>に準拠し実施した。クラス A β-ラクタマーゼ阻害剤であるアモキシシリン/クラブリ酸 (AMPC/CVA) 及びアンピシリン/スルバクタム (ABPC/SBT), クラス B メタロ-β-ラクタマーゼ阻害剤であるメルカプト酢酸ナトリウム (SMA), KPC 型カルバペネマーゼ及びクラス C β-ラクタマーゼ阻害剤である 3-アミノフェニルボロン酸 (APB) を用いたディスク法による β-ラクタマーゼ産生のスクリーニングを行った。

AMPC/CVA 及び ABPC/SBT を用いた試験では, 抗菌薬ディスクと AMPC/CVA ディスク又は ABPC/SBT ディスクとの間に, ディスクが並ぶ水平方向と垂直な方向に, 抗菌薬ディスク自体の阻止円径より大きく阻止円直径が拡張した場合に, 陽性と判定した。SMA を用いた試験では, 抗菌薬ディスクと SMA ディスクの中心を結ぶ線に対して垂直方向の阻止円径拡張が認められた場合に, 陽性と判定した。APB を用いた試験では, APB 添加により, カルバペネム系抗菌薬であるメロペネムの阻止円直径の拡張 (5 mm 以上) を認めた場合, 陽性と判定した。

### 2.2 カルバペネマーゼ産生性の確認

病原体検出マニュアルに従い, mCIM (modified Carbapenem Inactivation Method) によりカルバペネマー

ゼ産生の有無を調べた。

## 2.3 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は, 米国臨床検査標準協会 (Clinical and Laboratory Standards Institute ; CLSI) 標準ディスク拡散法)<sup>15)</sup>に従って実施し, 阻止円の直径により感性 (S), 中間 (I), 及び耐性 (R) と判定したが, 解析時には I は R とみなして集計した。供試薬剤は, ストレプトマイシン (SM) またはカナマイシン (KM), テトラサイクリン (TC), ナリジクス酸 (NA), シプロフロキサシン (CPFX), ホスホマイシン (FOM), 及びスルファメトキサゾール・トリメトプリム合剤 (ST) の 6 剤とした。

## 結 果

### 1. 菌株

供試菌株が分離された臨床材料は尿が 26.3% で最も多く, 次いで喀痰及び血液がそれぞれ 21.1%, その他胆汁, ドレーン排液等であった。また, 患者の年齢は 44 歳から 90 歳で 80 歳代が 50% と最も多く, 次いで 70 歳代が 27.8% であり, 70 歳以上で 8 割以上を占めた。性別は男性 12 名, 女性 6 名と男性が女性の 2 倍であった。菌種は *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella aerogenes* が最も多く, その他 *Serratia marcescens* 等であった (表 2)。

### 2. カルバペネマーゼ産生性の確認

菌株の β-ラクタマーゼ遺伝子検査結果を表 2 に示す。ESBL 遺伝子はどの菌株からも検出されなかった。カルバペネマーゼ遺伝子は *Enterobacter cloacae* 及び *Klebsiella oxytoca* それぞれ 1 株から検出され, どちらも IMP 型であった。AmpC 遺伝子は *Enterobacter cloacae* 3 株から検出され, いずれも EBC 型であった。

なお, カルバペネマーゼ遺伝子の PCR 法とディスク法の結果は矛盾がないことを確認した。また, EBC 型

遺伝子が検出された菌株 3 株のうち 2 株 (C36 及び C50) では APB を用いた試験においても陽性と判定されたが、残りの 1 株 (C44) については陽性と判定されなかった。一方、プラスミド性 AmpC や KPC 型遺伝子が検出されなかった菌株 11 株 (C29, C30, C37, C38, C40, C40-2, C41, C42, C43, C46 及び C49) が APB を用いた試験において陽性と判定された。

### 3. 薬剤感受性試験結果

NA, CPFX, SM, FOM の 4 剤, NA, KM, ST の 3 剤, SM, TC, FOM の 3 剤, NA, SM の 2 剤, NA, SM, ST それぞれ単剤に菌株が 1 株ずつ耐性を示した。また, FOM 単剤に 2 株耐性を示した (表 2)。

#### 考察とまとめ

CRE はカルバペネム耐性機序により大きく二つに分けられる。カルバペネマーゼを産生するカルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌 (以下「CPE」という。),

カルバペネマーゼ産生によらず ESBL や AmpC などの  $\beta$ -ラクタマーゼの過剰産生や外膜透過性の低下などによるものが多いとされる CRE (non-CPE) である<sup>16)</sup>。カルバペネマーゼは一般的にカルバペネム系も含むほとんどの  $\beta$ -ラクタム剤を加水分解する。また, カルバペネマーゼ遺伝子はプラスミド上に存在するため菌種間を水平伝播することができ, かつ, 同じプラスミド上に別の耐性遺伝子も存在することが多い。そのため, CPE はカルバペネマーゼ非産生菌にくらべ,  $\beta$ -ラクタム剤やそれら以外の複数の抗菌薬に対して耐性をもつ多剤耐性となる傾向が強く, プラスミド上のカルバペネマーゼ遺伝子や別の耐性遺伝子を他の菌に水平伝播することにより, 拡散伝播経路も複雑になる。このことから, CPE なのか, non-CPE なのか確認することは薬剤耐性菌の院内感染の対策を行う上で重要となる。今回, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca* それぞれ 1 株のカルバペネマーゼ産生が確認された。また, それら 2 株から IMP 型カルバペネマーゼが検出され, こ

表 2 届出された菌種及び  $\beta$  ラクタマーゼ検出状況

菌株番号	菌種	$\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子			阻害剤を用いた $\beta$ -ラクタマーゼ産生性			カルバペネマーゼ産生性	薬剤感受性
		ESBL	カルバペネマーゼ	AmpC	AMPC/CVA 又は ABPC/SBT	SMA	APB	mCIM	薬剤耐性パターン
C24	<i>Enterobacter ludwigii</i>	-	-	-	-	-	-	-	NA, CPFX, SM, FOM
C29	<i>Klebsiella aerogenes</i>	-	-	-	-	-	+	-	
C30	<i>Klebsiella aerogenes</i>	-	-	-	-	-	+	-	
C31	<i>Serratia marcescens</i>	-	-	-	-	-	-	-	SM
C32	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	-	-	-	-	
C36	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	EBC	-	-	+	-	NA
C37	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	-	-	+	-	
C38	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	-	-	+	-	ST
C39	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	IMP	-	-	+	-	+	NA, KM, ST
C40	<i>Klebsiella aerogenes</i>	-	-	-	-	-	+	-	
C40-2	<i>Klebsiella aerogenes</i>	-	-	-	-	-	+	-	
C41	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	-	-	+	-	
C42	<i>Klebsiella aerogenes</i>	-	-	-	-	-	+	-	
C43	<i>Serratia marcescens</i>	-	-	-	-	-	+	-	
C44	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	IMP	EBC	-	+	-	+	NA, SM
C45	<i>Serratia marcescens</i>	-	-	-	-	-	-	-	SM, TC, FOM
C46	<i>Klebsiella aerogenes</i>	-	-	-	-	-	+	-	FOM
C49	<i>Klebsiella aerogenes</i>	-	-	-	-	-	+	-	
C50	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	EBC	-	-	+	-	FOM

これは日本国内で多く検出される遺伝子型に該当し、県内でも CPE が存在していることが確認された。

2019 年の全国での CRE のカルバペネマーゼ遺伝子陽性率は 17.6%<sup>17)</sup>であり、当所の検査結果においては 10.5%と全国に比べ低い傾向が見られた。2017 年度から 2021 年度までに熊本県(熊本市除く)において届出された CRE 40 株(39 名)のうち 19 株(18 名)が検査のため当所に搬入され、検査実施率は菌株で 47.5%(40 株中 19 株)にとどまっている。全体の傾向をより正確に把握するためには、より多くの菌株を収集し、耐性遺伝子及びカルバペネマーゼ産生等の確認試験を行う必要があると考えられる。

また、EBC型遺伝子が検出された菌株3株のうち APB を用いた試験において陽性と判定されなかった1株については、EBC型セファロsporinase 遺伝子が活性化していないため APB を用いた試験において陽性とならなかったものと考えられた。

今後も保健所や医療機関の協力のもと、菌株を収集し、解析を行い、薬剤耐性の変化や拡大の予兆の把握を行っていくことが必要である。

#### 文 献

- 1) Antimicrobial Resistance Chaired by Jim O'Neil. AMR Review Paper : Tackling a crisis for the health and wealth of nations (2014).
- 2) Global action plan on antimicrobial resistance . <https://www.who.int/publications/i/item/978924150976> (2022 年 10 月閲覧)
- 3) 厚生労働省 : 薬剤耐性(AMR)対策アクションプラン 2016-2020. <https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900-000-Kenkoukyoku/0000120769.pdf> (2022 年 10 月閲覧)
- 4) Yagi T et al., FEMS Microbiol Lett., 184, 53-56 (2000).
- 5) Shibata N et al. , J Clin Microbiol., 41 (12), 5407-13 (2003).
- 6) Poirel L et al., Antimicrob Agents Chemother., 48 (1), 15-22 (2004).
- 7) Le QP et al., Foodborne Pathog., 12 (8), 719-725 (2015).
- 8) AMED 日本医療研究開発機構(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)「薬剤耐性菌サーベイランスの強化及びゲノム解析の促進に伴う迅速検査法開発に関する研究班」開発によるカルバペネマーゼ・ESBL・AmpC 遺伝子スクリーニング用マルチプレックス PCR 法
- 9) Shibata N et al., Antimicrob Agents Chemother., 50 (2), 791-795 (2006).
- 10) 荒川宜親 : 厚生労働省科学研究費補助金「新型薬剤耐性菌等に関する研究」平成 22 年度研究報告書(我が国における新たな薬剤耐性菌の実態に関する研究), p.11-27 (2011 年)
- 11) Watahiki M et al., JJID, 73, 166-172 (2020) .
- 12) Pérez-Pérez F.J et al., J Clin. Microbiol., 40 (6), 2153-2162 (2002) .
- 13) 松井真理 : 国立感染症研究所薬剤耐性研究センター : 2015 年度研修資料
- 14) 国立感染症研究所 : 病原体検出マニュアル カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症 (2020 年 6 月改訂版 ver2.0).
- 15) CLSI:VET01 Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals, 5th Edition,
- 16) Nordmann P. et al., Clin Microb Infect., 18 (5), 432-438 (2012) .
- 17) IASR Vol. 42 p123-124: 2021 年 6 月号