

〔資料〕

石川県におけるカルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症の発生状況

— 2020年度 —

石川県保健環境センター 健康・食品安全科学部

城座 美夏・塩本 高之・児玉 洋江
谷村 睦美

〔和文要旨〕

2020年度において、石川県に届出されたカルバペネム耐性腸内細菌科細菌（CRE）感染症の発生状況及び患者から分離された菌株のカルバペネマーゼ産生性を調べた。21株のうちカルバペネマーゼ産生が示唆された株は2株であった。そのうち1株は*bla_{IMP-6}*を保有しており、もう1株は主要なカルバペネマーゼ遺伝子を保有しておらず、カルバペネマーゼ活性を持つAmpC β -ラクタマーゼ産生株あるいは稀なカルバペネマーゼの産生株である可能性が示唆された。CREがCPEであるか否かの結果判定においては、遺伝子検査と表現型検査の総合的解釈をすることが重要と思われた。

キーワード：感染症，薬剤耐性菌，カルバペネム耐性腸内細菌科細菌，カルバペネマーゼ

1 はじめに

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌（以下、CRE）感染症は、2014年9月19日より「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」（以下、感染症法）において5類全数把握対象感染症となり、診断した医師は届出の義務がある。本感染症は、メロペネム（以下、MEPM）等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腸内細菌科細菌による感染症の総称である。2017年3月28日には、地域における薬剤耐性菌のまん延などの流行状況を把握するため、CRE感染症の届出があった際は地方衛生研究所等において耐性遺伝子等の試験検査を実施する旨、厚生労働省健康局結核感染症課長より通知（以下、通知）が発出された¹⁾。

腸内細菌科細菌におけるカルバペネム耐性機序は、カルバペネマーゼ産生性の有無により2つに大別され

2)、カルバペネマーゼを産生している場合は、カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌（以下、CPE）と呼ぶ。CPEはほとんどの β -ラクタム剤を加水分解するカルバペネマーゼを産生することから、 β -ラクタム剤に汎耐性となることが多い²⁾。また、カルバペネマーゼ産生に寄与するカルバペネマーゼ遺伝子はプラスミド上に存在することが多く、菌種を越えて水平伝播しうる²⁾。このことより、院内感染のリスクになると考えられるため、CREがCPEであるか否かを確認することが重要である。

本報では、2020年度の石川県（以下、本県）におけるCRE感染症患者発生状況と、患者由来株を対象に実施したカルバペネマーゼ産生性等の検査結果について報告する。なお、2016年に、腸内細菌科細菌に分類されていた菌種の一部が他の科に変更されたことから³⁾、これまでの腸内細菌科細菌（*Enterobacteriaceae*）と同義の用語として、より上位レベルである腸内細菌目細

Prevalence of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae Infections in Ishikawa Prefecture from April 2020 to March 2021. by SHIROZA Mika, SHIOMOTO Takayuki, KODAMA Hiroe and TANIMURA Mutsumi (Health and Food Safety Department, Ishikawa Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science)

Key words : Infectious Disease, Antimicrobial Resistant Bacteria, Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, Carbapenemase

菌 (*Enterobacteriales*) を使用することが提唱されたが、本報では混乱を避けるためにこれまで使用されてきた腸内細菌科細菌 (*Enterobacteriaceae*) の表記を使用する。

2 材料と方法

2.1 CRE 感染症の発生状況

2020年4月～2021年3月の1年間に、感染症法に基づき本県に届出されたCRE感染症21事例に対し、菌種名、患者の症状、分離された検体について集計した。菌種名に関し、*Enterobacter aerogenes* で届出されていた事例については、2017年に国際原核生物分類命名委員会において菌名が変更されたことに伴い、*Klebsiella aerogenes* (以下、*K.aerogenes*) として集計した。

2.2 CRE の検査

2.1 で届出された事例から分離され、通知に基づき搬入されたCRE21株を供試菌株とした。

(1) β -ラクタマーゼ産生性の確認 (以下、阻害試験)

下記ア、イ、ウについて国立感染症研究所病原体検出マニュアル²⁾ (以下、マニュアル) に従い実施した。

ア KPC型カルバペネマーゼ産生性のスクリーニング
MEPMディスクに3-アミノフェニルボロン酸 (以下、APB) を添加し、阻止円の拡張 (原則5mm以上) が見られたものを陽性とした。

イ クロキサシリン (以下、MCIPC) を用いた AmpC β -ラクタマーゼ産生性の確認

APBはKPC型カルバペネマーゼの他に AmpC β -ラクタマーゼも阻害することから²⁾、阻害試験アにおいて、APBで阻害が認められた2株を対象とし、マニュアルに従い実施した。セフメタゾールディスクにMCIPCを添加し、阻止円の拡張 (原則5mm以上) が見られたものを陽性とした。

ウ メタロ- β -ラクタマーゼ (以下、MBL) 産生性のスクリーニング

MEPM及びセフタジジムディスクとメルカプト酢酸ナトリウム (以下、SMA) ディスクを使用し、いずれかの抗菌薬ディスクと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見られたものを陽性とした。

(2) modified Carbapenem Inactivation Method (以下、mCIM)

カルバペネマーゼによるMEPM分解に伴ったMEPMディスクの抗菌作用低下を利用したカルバペネマーゼ産生性の確認をマニュアルに従い実施した。判定基準を図1に示す。阻止円径及び阻止円内部コロニーの有無から判定した。

(3) Carba NP テスト

mCIM陽性及び判定保留となった7株を対象とした。

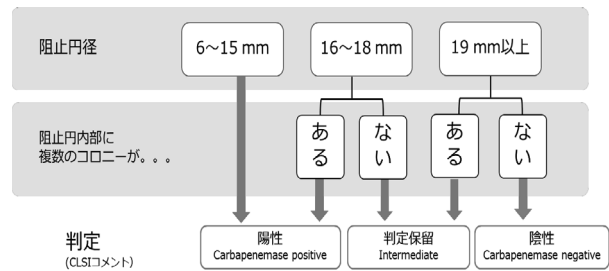


図1 mCIM判定基準

引用元：国立感染症研究所 病原体検出マニュアル薬剤耐性菌 (令和2年6月改訂版Ver2.0)

カルバペネマーゼによるイミペネム分解に伴った溶液のpH変化による色調変化を利用したカルバペネマーゼ産生性の確認をマニュアルに従い実施した。反応開始後120分以内に黄変したものを陽性、弱い黄変がみられたものを判定保留とした。

(4) PCR法によるカルバペネマーゼ遺伝子の検出

マニュアルに従い、全21株を対象にPCR法によるカルバペネマーゼ遺伝子 (IMP-1型、IMP-2型、NDM型、KPC型、OXA-48型、VIM型、GES型) の検出を試みた。事例番号1については、稀なカルバペネマーゼ遺伝子の保有が否定できないことから、稀なカルバペネマーゼ遺伝子 (KHM型、IMI型) の検出をマニュアルに従い追加で実施した。

(5) シークエンス解析によるカルバペネマーゼ遺伝子の型別

IMP-1型MBL遺伝子を検出した株については、マニュアルに従い実施したシークエンス解析により遺伝子配列を確認し、*bla_{IMP-1}*と*bla_{IMP-6}*の鑑別を行った。

3 結果

3.1 CRE 感染症の発生状況

2020年4月～2021年3月の期間に届出があった21事例について表1に示す。

症状別では、尿路感染症のみが5例、肺炎のみが3例、菌血症のみ、胆管炎のみがそれぞれ2例、腹膜炎、膿胸、臍ヘルニア部皮膚感染、胆嚢炎、左眼結膜炎、外耳道炎、尿路感染症・精巣上体炎、尿路感染症・肺炎・腸炎、敗血症・胆管炎がそれぞれ1例だった。分離検体別では、尿が6例、血液が4例、喀痰が3例、胆汁が2例、膿、胸水、臍ヘルニア瘻孔、眼脂、耳漏、血液・胆汁がそれぞれ1例だった。菌種別では、*K.aerogenes*が9例 (42.9%)、*Enterobacter cloacae*が6例 (28.6%)、*Enterobacter cloacae* complex、*Escherichia coli*がそれぞれ2例 (各9.5%)、*Citrobacter braakii*、*Serratia marcescens*がそれぞれ1例 (各4.8%)であった。

3.2 CRE の検査

表 1 CRE 感染症発生状況及び検査結果 (2020 年度)

事例番号	菌種名	症状	検体	阻害試験 ^{※1,2}	mCIM	CarbaNP テスト	カルバペネマーゼ遺伝子
1	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	腹膜炎	膿	APB、MCIPC	+	+	-
2	<i>Enterobacter cloacae</i>	胆管炎	血液	-	-	n.t.	-
3	<i>Klebsiella aerogenes</i>	菌血症	血液	-	-	n.t.	-
4	<i>Enterobacter cloacae</i>	肺炎	喀痰	-	-	n.t.	-
5	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	尿路感染症、精巣上体炎	尿	-	-	n.t.	-
6	<i>Enterobacter cloacae</i>	肺炎	喀痰	-	-	n.t.	-
7	<i>Klebsiella aerogenes</i>	膿胸	胸水	-	保留	-	-
8	<i>Klebsiella aerogenes</i>	尿路感染症	尿	-	-	n.t.	-
9	<i>Klebsiella aerogenes</i>	尿路感染症	尿	-	-	n.t.	-
10	<i>Klebsiella aerogenes</i>	尿路感染症	血液	-	保留	-	-
11	<i>Klebsiella aerogenes</i>	菌血症	血液	-	-	n.t.	-
12	<i>Citrobacter braakii</i>	臍ヘルニア部皮膚感染	臍ヘルニア瘻孔	-	-	n.t.	-
13	<i>Escherichia coli</i>	尿路感染症、肺炎、腸炎	尿	SMA	+	保留	<i>bla</i> _{IMP-6}
14	<i>Enterobacter cloacae</i>	胆管炎	胆汁	-	保留	-	-
15	<i>Enterobacter cloacae</i>	胆嚢炎	胆汁	-	-	n.t.	-
16	<i>Klebsiella aerogenes</i>	尿路感染症	尿	-	保留	-	-
17	<i>Serratia marcescens</i>	左眼結膜炎	眼脂	APB、MCIPC	-	n.t.	-
18	<i>Klebsiella aerogenes</i>	外耳道炎	耳漏	-	-	n.t.	-
19	<i>Enterobacter cloacae</i>	肺炎	喀痰	-	保留	-	-
20	<i>Klebsiella aerogenes</i>	敗血症、胆管炎	血液、胆汁	-	-	n.t.	-
21	<i>Escherichia coli</i>	尿路感染症	尿	-	-	n.t.	-

n.t.: 未実施

※1: 阻害試験にて陽性と判定したものについてその阻害剤名を記載

※2: MCIPC を用いた阻害試験は APB で阻害が認められた株のみ実施

検査の結果について表1に示す。

(1) 阻害試験

事例番号13において、SMAのみで阻害が認められた。

事例番号1, 17の2株では、APB及びMCIPCで阻害が認められた。

残りの18株については、SMAとAPBいずれにおいても阻害は認められなかった。

(2) mCIM

事例番号1, 13の2株のみが陽性で、事例番号7, 10, 14, 16, 19の5株は判定保留、残り14株は全て陰性であった。陽性であった2株のうち、事例番号13は、前述のとおり、SMAにて阻害が認められた株であり、MBL産生菌であると思われた。

(3) Carba NP テスト

mCIM陽性であった2株のうち、事例番号1は陽性、事例番号13は判定保留であり、カルバペネマーゼ産生が示唆された。また、mCIM判定保留であった5株は全て陰性であった。

(4) PCR法によるカルバペネマーゼ遺伝子の検出

事例番号13からカルバペネマーゼ遺伝子を検出し、遺伝子型はIMP-1型であった。残り20株からは今回検出を試みたカルバペネマーゼ遺伝子は検出されなかった。

(5) シーケンス解析によるカルバペネマーゼ遺伝子の型別

IMP-1型が検出された事例番号13についてシーケンス解析を行ったところ、*bla*_{IMP-6}であった。

4 考 察

2020年度におけるCRE感染症の届出数は21事例で、2019年度(21事例)⁴⁾から増減はなかった。また、*K.aerogenes*を起因菌とする事例の割合は全国的に増加しており⁵⁾、本県においても、2017年度(26.7%)⁶⁾に比べ、2018年度(45.5%)⁴⁾、2019年度(52.4%)⁴⁾、2020年度(42.9%)と同様の傾向がみられた。

2020年度は、CPEの検出が1事例あり、2017年の通知によりCREの検査を開始して以降、本県では2例目となる*bla*_{IMP-6}保有株によるものであった。*bla*_{IMP-6}は主に西日本で検出される遺伝子型で、イミペネムに感性を示す特徴を持つことから、見落とされる可能性があるため^{7) 8)}、臨床現場においては*bla*_{IMP-6}の存在を念頭においた検査の実施が重要と思われた。

また、主要なカルバペネマーゼ遺伝子を保有しないが、APBによる阻害を受ける株が2株(事例番号1, 17)検出された。APBはKPC型カルバペネマーゼのほか AmpC β -ラクタマーゼも阻害することが知られて

おり²⁾、これら2株はMCIPCによる阻害も受けていたことから、いずれの株も APBによる阻害はAmpC β -ラクタマーゼ産生によるものと推測された。一方で、事例番号1はmCIM及びCarba NP テストで陽性となった。AmpC β -ラクタマーゼの一部は、ごく弱くカルバペネムを分解する活性を持ち、その過剰産生及び外膜の変化により、カルバペネムに対する耐性を持つとの報告があることから⁹⁾、事例番号1はカルバペネマーゼ活性をもつAmpC β -ラクタマーゼ産生株であると推測された。また、今回PCR法により9種類のカルバペネマーゼ遺伝子の検出を行ったが、それ以外の稀なカルバペネマーゼを産生している可能性もあることから、今後も検討を重ねる必要がある。今回の検討により、CREがCPEであるか否かの結果判定において、遺伝子検査と表現型検査の総合的解釈をすることの重要性が確認された。

5 まとめ

- (1) 2020年度のCRE感染症の事例数は2019年度から増減はなく、全国同様に*K.aerogenes*を起因菌とする報告の割合の増加傾向がみられた。
- (2) 2020年度はCPEの検出が1事例あり、2017年の通知によりCREの検査を開始して以降、本県では2例目となる*bla_{IMP6}*保有株によるものであった。
- (3) 主要なカルバペネマーゼ遺伝子を保有しないものの、カルバペネマーゼ産生が示唆された株が1株検出されたことから、カルバペネマーゼ活性を持つAmpC β -ラクタマーゼ産生株あるいは稀なカルバペネマーゼの産生株であると推測された。CREがCPEであるか否かの結果判定において、遺伝子検査と表現型検査の総合的解釈をすることが重要と思われた。

文 献

- 1) 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
- 2) 国立感染症研究所：病原体検出マニュアル 薬剤耐性菌，令和2年6月改訂版 Ver.2.0
- 3) ADEOLU Mobolaji, ALNAJAR Seema, NAUSHAD Sohail, GUPTA, Radhey S. : Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘Enterobacteriales’ :proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. Nov., Yersiniaceae fam. Nov., Hafniaceae fam. Nov., Morganeliaceae fam. Nov., and Budviciaceae fam. Nov., **66**, 5575-5599 (2016)
- 4) 塩本高之, 児玉洋江, 木村恵梨子, 谷村睦美 : 石川県におけるカルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症の発生状況について-2018年度及び2019年度-, 石川県保健環境センター研究報告書, **57**, 44-47
- 5) 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2019年, <https://www.niid.go.jp/niid/ja/cre-m/cre-idwrs/10319-cre-210423.html> (2021年8月1日)
- 6) 木村恵梨子, 小坂恵, 塩本高之, 谷村睦美 : 石川県におけるカルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症の発生状況について-2017年度-, 石川県保健環境センター研究報告書, **55**, 43-46
- 7) 中野竜一 : カルバペネム耐性腸内細菌科 (CRE) における薬剤耐性機序の実態解明と耐性獲得機構の解明, THE JAPANESE JOURNAL OF ANTIBIOTICS, **69** (2), 81-89 (2016)
- 8) YANO Hisakazu, KUGA Akio, OKAMOTO Ryoichi, KITASATO Hidero, KOBAYASHI Toshimitsu, INOUE Matsuhisa : Plasmid-Encoded Metallo- β -Lactamase (IMP-6) Conferring Resistance to Carbapenems, Especially Meropenem, ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, **45** (5), 1343-1348 (2001)
- 9) JOUSSET, Agnès B., OUESLATI Saoussen, BERNABEU Sandrine, TAKISSIAN Julie, CRETON Elodie, VOGEL Anaïs, SAUVADET Aimie, COTELLON Garance, GAUTHIER Lauraine, BONNIN, Rémy A., DORTET Laurent, and NAAS Thierry : False-Positive Carbapenem-Hydrolyzing Confirmatory Tests Due to ACT-28, a Chromosomally Encoded AmpC with Weak Carbapenemase Activity from Enterobacter kobei, ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, **63** (5), e02388-18 (2019)