資料

福井県におけるカルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症の解析（平成29年～令和元年）

横山孝治・児玉佳・永田暁洋・東方美保

Analysis of Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* infection in Fukui Prefecture in2017-2019

Koji YOKOYAMA, Kei KODAMA, Akihiro NAGATA, Miho TOHO

１．はじめに

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌（carbapenem-resistant Enterobacteriaceae : CRE）感染症は、グラム陰性菌による感染症の治療において最も重要な抗菌薬であるメロペネムなどのカルバペネム系抗菌薬および広域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。CRE は主に感染防御機能の低下した患者や外科手術後の患者、抗菌薬を長期にわたって使用している患者などに感染症を起こす。また健常者に感染症を起こすこともあり、いずれも肺炎などの呼吸器感染症、尿路感染症、敗血症、髄膜炎、その他多様な感染症を起こし、院内感染の原因となる[1]。また、CRE のなかでもカルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌（CPE）はカルバペネム系抗菌薬だけでなくほとんどのβ-ラクタム系抗菌薬に耐性を示し、プラスミドを介して腸内細菌科細菌の別の菌種に水平伝達されるため院内感染の原因になりやすい。そのため CPE の検出が重要となる。国内では、平成 26 年 9 月 19 日に CRE 感染症が感染症法に基づく感染症発生動向調査の 5 類全数把握疾患に追加された。平成 29 年 3 月 28 日には厚生労働省健康局結核感染症課長通知[2]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等で CRE の耐性遺伝子等の試験検査を行うこととなった。

今回、平成 29 年から令和元年に福井県内で届出された CRE 感染症の発生状況および薬剤耐性遺伝子等の菌株性状についてまとめたので報告する。

２．材料および方法

２．１　CRE 感染症の届出情報

平成 29 年 7 月～令和元年 12 月に県内医療機関より 5 類感染症として保健所に届出のあった症例について、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もとに集計を行った。

２．２　CRE 感染症菌株の検査

２．２．１　供試菌株

平成 29 年 7 月～令和元年 12 月に 5 類感染症として保健所に届出され、当センターに搬入された 29 株について検査を行った。

２．２．２　検査方法

２．２．２．１　菌種同定試験

被検菌株を普通寒天培地平板に画線塗抹し、薬剤耐性遺伝子に関連するプラスミドの脱落を防ぐため、β-ラクタム系の抗菌薬ディスクを置いた。塗抹した寒天培地を 36±1℃で 16～18 時間培養し純培養であることを確認後、ID テスト EB-20（日水製薬）を用いて菌種確認を行った。

２．２．２．２　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[3]に従い、カルバペネマーゼ 7 種（NDM 型、KPC 型、IMP-1 型、IMP-2 型、VIM 型、OXA48 型および GES 型）、ESBL（基質特異性拡張型 β-ラクタマーゼ）6 種（TEM 型、SHV 型、CTX-M-1 group、CTX-M-2 group、CTX-M-9 group および CTX-M-8/25 group）、AmpCβ-ラクタマーゼ 6 種（MOX 型、CIT 型、DHA 型、ACC 型、EBC 型および FOX 型）の計 19 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。

２．２．２．３　阻害剤を用いたβ-ラクタマーゼ産生性の確認

病原体検出マニュアル[3]および薬剤耐性菌研修会資料[4]に従い、クラブラン酸およびスルバクタムによる阻害試験、メルカプト酢酸ナトリウムによる阻害試験、ボロン酸およびクロキサシリンによる阻害試験より、各種 β-ラクタマーゼ産生性のスクリーニングを行った。

２．２．２．４　薬剤感受性試験

市販の感受性試験用ディスク（センシディスク，BD）を用いて実施した。供試薬剤はアンピシリン（ABPC）、セフォタキシム（CTX）、ゲンタマイシン（GM）、カナマイシン（KM）、イミペネム（IPM）、ノルフロキサシン（NFLX）、シプロフロキサシン（CPFX）、ナリジクス酸（NA）、ST 合剤（SXT）、メロペネム（MEPM）、セフタジジム（CAZ）、ホスホマイシン（FOM）、クロラムフェニコール（CP）、セフォキシチン（CFX）、アミカシン（AMK）、ストレプトマイシン（SM）、テトラサイクリン（TC）、セフメタゾール（CMZ）の 18 薬剤とした。

２．２．２．５　PFGE による遺伝子解析

病原体検出マニュアル[3]を参照し、パルスフィールド・ゲル電気泳動（PFGE）を実施した。対象は病院Ａの 7 例を含む平成 31 年/令和元年に届出のあった全 11 例を対象とした。制限酵素は Spe I（TaKaRa)を用い、37℃で一晩処理を行った。マーカーには Salmonella Braenderup H9812 株を使用した。泳動条件は 6.0V/cm、14℃、スイッチングタイム 12.6-40.1 秒、泳動時間 24 時間とした。泳動パターンの解析には Fingerprinting Ⅱ（Bio-Rad）を使用した。

３．結果

３．１　CRE 感染症の届出情報

対象期間に 29 件の届出があった。年ごとの内訳は平成 29 年 6 件、平成 30 年 12 件、平成 31 年/令和元年 11 件であった。男女比の内訳は男性 19 名、女性 10 名で男性

の方が多かった。年齢は 22 歳から 90 歳（平均 74.4 歳）で、80 歳代が 14 名と最も多く、次いで 60 歳代が 6 名、70 歳代が 5 名だった。高齢者と呼ばれる 65 歳以上の割合は 82.8%と大部分を占める結果となった（図 1）。

材料別では尿が 14 件と最も多く、次いで腹水 6 件、喀痰 4 件、血液 4 件、便 1 件、ドレーン先端 1 件だった（図 2 重複あり）。また、血液、胸腹水、髄液など無菌的であるべき材料に該当する検体は 11 件、37.9%であった。症状別では尿路感染症が 14 件と最も多く、次いで腹膜炎が 5 件、肺炎が 4 件だった（図 3 重複あり）。無菌的であるべき材料からは比較的重症と思われる敗血症や腹膜炎の発症につながるケースが多くみられた。

CRE 感染症の届出数を病院ごとに年次別で比較すると、病院 A について平成 31 年/令和元年に 7 件と県内で最も多くの届出が確認された（図 4）。

３．２　CRE 感染症菌株の検査

菌種別では、*Klebsiella aerogenes* 19 株、*Enterobacter cloacae* 6 株、*Enterobacter asburiae* 1 株、*Escherichia coli* 1 株、*Klebsiella pneumoniae* 1 株、*Serratia marcescens* 1 株であった。

検出された耐性遺伝子について、カルバペネマーゼ遺伝子は IMP 型が 1 株であった。AmpC 遺伝子は EBC 型が最も多く 23 株、次いで ACC 型 3 株、DHA 型 2 株だった。ESBL 遺伝子は CTX-M-1 group が 1 株検出された（表 1）。

阻害剤を用いたβ-ラクタマーゼ産生性の確認試験ではカルバペネマーゼ遺伝子（IMP 型）が検出された 1 株（菌株 No.6）において、メルカプト酢酸ナトリウムで阻害効果が認められ、CPE であると確認された。また、DHA 型と CTX-M-1 group の 2 種類の耐性遺伝子を検出した株（菌株 No.7）では、クラブラン酸およびボロン酸で阻害効果が認められたものの、クロキサシリンでは認められなかった。残りの 27 株については全てボロン酸およびクロキサシリンで阻害効果が認められ、AmpCβ-ラクタマーゼ産生が耐性獲得に寄与している可能性が高かった（表 1）。

薬剤感受性試験について、耐性または中間の感受性を示した薬剤数を比較した。Non-CPE 株（カルバペネマーゼ非産生株）の多くが 4～9 剤であったのに対して、CPE 株は 16 剤と多くの薬剤に耐性または中間の感受性を示した。また、平成 31 年/令和元年に病院 A から届け出のあった 7 症例について薬剤感受性パターンを確認したが、パターンが一致する菌株は確認されなかった（表 2）。次に PFGE を実施したが菌の同一性は確認されなかった。

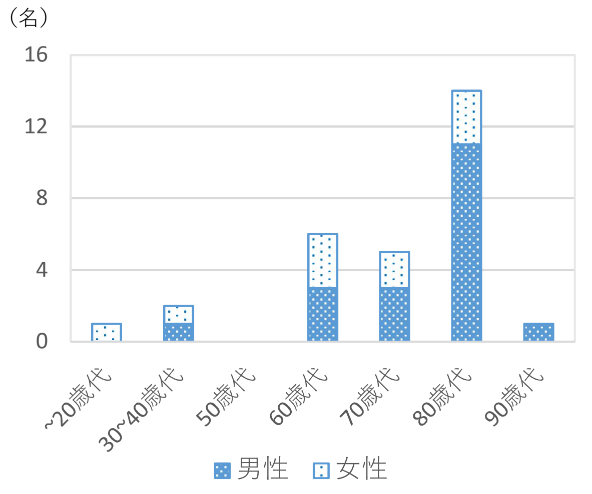

図 1　CRE 感染症届出患者の年代・男女別

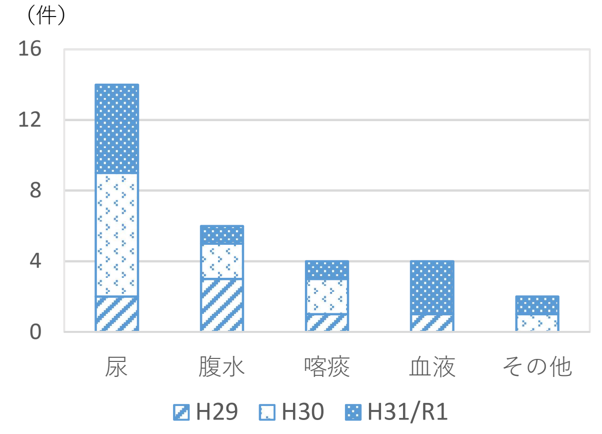

図 2　CRE 感染症届出患者の分離由来材料

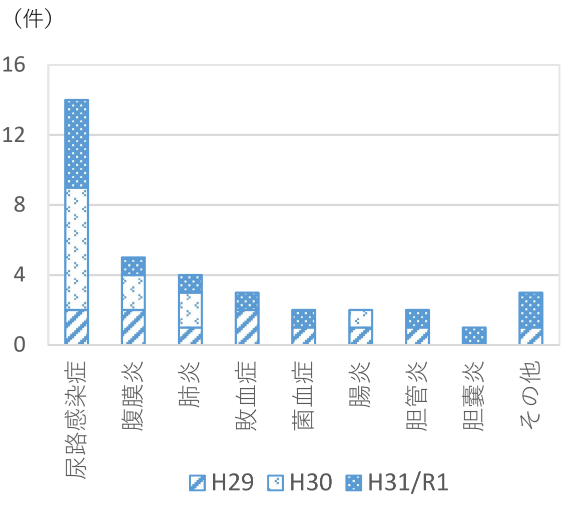

図 3　CRE 感染症届出患者の疾患

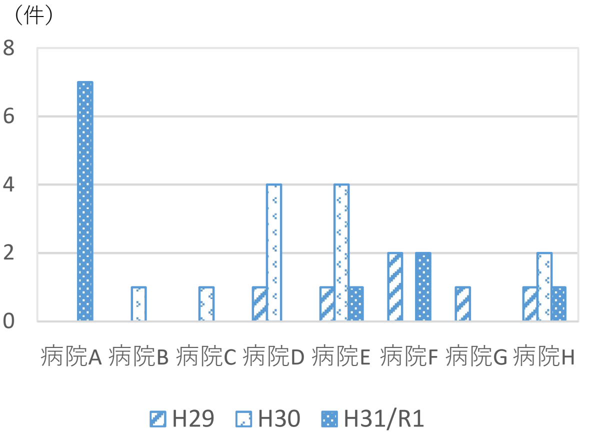

図 4　病院別にみた CRE 感染症届出数

４．考察

福井県における平成 29 年から令和元年に届出のあった CRE 感染症について、65 歳以上の高齢者が大半を占め、男性の割合が高かった。菌種の約 8 割は、*K.aerogenes*、*E.cloacae* であった。全国的にみても 65 歳以上の高齢者が多く、*K.aerogenes* と *E.cloacae* で全体の約 6 割を占めており、本県は全国的な発生状況と同様の傾向を示した [5]。また CRE 感染症の年次届出件数に大きな変化は認められず明らかな流行は認められなかった。

今回対象とした CRE の多くはカルバペネマーゼ非産生株であったが、僅かながらカルバペネマーゼ遺伝子も検出され、県内での CPE が確認された。検出された CPE は Non-CPE と比較すると、β-ラクタム系薬剤以外にも多くの薬剤に耐性を示すことが確認された。

Non-CPE は、AmpCβ-ラクタマーゼや ESBL の産生量の増加と外膜蛋白（ポーリン）が変化したことによる薬剤の膜透過性低下によるものが多い。
また *K.aerogenes*、*E.cloacae* 等は染色体上に AmpCβ-ラクタマーゼ遺伝子（EBC 型）を元来保有している。Non-CPE 28 株中 *K.aerogenes* は 19 株、*E.cloacae* は 5 株あり、このうち *K.aerogenes* 16 株、*E.cloacae* 5 株から EBC 型が検出され、多くが染色体由来と考えられた。

表 1　阻害剤を用いた β-ラクタマーゼ産生性スクリーニングと遺伝子型

No	菌種名	ディスク法による β-ラクタマーゼ産生スクリーニング検査				PCR法による β-ラクタマーゼ遺伝子検出		
		クラブラン酸	メルカプト酢酸Na	ボロン酸	クロキサシリン	カルバペネマーゼ	AmpC β-ラクタマーゼ	ESBL
1	*K.aerogenes*	−	−	＋	＋	−	EBC	−
2	*K.aerogenes*	−	−	＋	＋	−	EBC	−
3	*K.aerogenes*	−	−	＋	＋	−	EBC	−
4	*K.aerogenes*	−	−	＋	＋	−	EBC	−
5	*K.aerogenes*	−	−	＋	＋	−	EBC	−
6	*E.cloacae*	−	＋	−	−	IMP	EBC	−
7	*E.coli*	＋	−	＋	−	−	DHA	CTX-M1
8	*K.aerogenes*	−	−	＋	＋	−	−	−
9	*K.aerogenes*	−	−	＋	＋	−	EBC	−
10	*E.cloacae*	−	−	＋	＋	−	EBC	−
11	*E.absuriae*	−	−	＋	＋	−	EBC	−
12	*E.cloacae*	−	−	＋	＋	−	EBC	−
13	*K.pneumonia*	−	−	＋	＋	−	DHA	−
14	*K.aerogenes*	−	−	＋	＋	−	ACC	−
15	*K.aerogenes*	−	−	＋	＋	−	ACC、EBC	−
16	*K.aerogenes*	−	−	＋	＋	−	EBC	−
17	*K.aerogenes*	−	−	＋	＋	−	EBC	−
18	*K.aerogenes*	−	−	＋	＋	−	EBC	−
19	*K.aerogenes*	−	−	＋	＋	−	EBC	−
20	*K.aerogenes*	−	−	＋	＋	−	EBC	−
21	*S.marcescens*	−	−	＋	＋	−	−	−
22	*E.cloacae*	−	−	＋	＋	−	EBC	−
23	*K.aerogenes*	−	−	＋	＋	−	EBC	−
24	*E.cloacae*	−	−	＋	＋	−	EBC	−
25	*K.aerogenes*	−	−	＋	＋	−	−	−
26	*K.aerogenes*	−	−	＋	＋	−	EBC	−
27	*K.aerogenes*	−	−	＋	＋	−	EBC	−
28	*E.cloacae*	−	−	＋	＋	−	EBC	−
29	*K.aerogenes*	−	−	＋	＋	−	EBC、ACC	−

表 2　薬剤感受性試験結果（病院 A 由来 7 例）

No	ABPC	CTX	GM	KM	IPM	NFLX	CPFX	NA	SXT	MEPM	CAZ	FOM	CP	CFX	AMK	SM	TC	CMZ	合計
22	R	S	S	S	I	S	S	I	S	S	S	R	S	R	S	I	S	R	7
23	R	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	I	S	R	6
24	R	R	S	S	I	S	S	I	S	I	S	R	S	R	S	S	S	R	8
25	R	I	S	S	I	S	S	I	S	S	S	R	S	R	S	I	S	R	8
26	R	I	S	S	I	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	R	6
28	R	I	S	S	I	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	I	S	R	7
29	R	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	R	S	R	S	I	S	R	6

平成 31 年/令和元年は病院 A からの報告が集中したため院内感染を疑ったが、薬剤感受性試験のパターンおよび PFGE の結果からは否定的であった。国立感染症研究所によると、全国における平成 30 年の CRE 感染症届出数は平成 29 年までの約 1.4 倍に増加しており、特に non-CPE タイプの *K.aerogenes* の報告が増加している。この要因として、病院で使用されている薬剤感受性自動測定装置での試薬の仕様変更が影響し、本来の感受性よりも強い耐性と判定されている可能性がある [6]。当センターにてディスク法による薬剤感受性試験を実施したところ、病院Aでは令和元年の 7 株中 4 株が届出基準を満たさない結果となり、当県もこの影響を受けているのかもしれない。

５．まとめ

平成 29 年から令和元年において福井県内で届出された CRE のカルバペネマーゼ遺伝子検出率は 3.4％（1／29 株）と多くはカルバペネマーゼ非産生株であった。

令和元年は特定の病院からの報告が集中した事からも、今後も継続して発生動向および β-ラクタマーゼ遺伝子の検出状況について注視する必要がある。

参考文献

1) 国立感染症研究所：カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症　https://www.niid.go.jp/niid/ja/cre-m/cre-iasrtpc/5238-tpc418-j.html,　IASR　Vol.35　p.281-282：2014 年 12 月号
2) 厚生労働省健康局：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（健感発 0328 第 4 号平成 29 年 3 月 28 日）
3) 国立感染症研究所：病原体検出マニュアル　薬剤耐性菌（平成 28 年 12 月改訂 Ver1.1）
4) 国立感染症研究所　薬剤耐性研究センター：平成 30 年度薬剤耐性菌研修会資料
5) 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　https://www.niid.go.jp/niid/ja/cre-m/cre-iasrtpc/8614-468t.html,　IASR Vol. 40 p17-18: 2019 年 2 月号
6) 松井真理　他：カルバペネム耐性腸内細菌科細菌　病原体サーベイランス、2017-2018 年, 第 31 回　日本臨床微生物学会　2020 年 1 月