

資料

広島県におけるカルバペネム耐性腸内細菌科細菌の検出状況

増田 加奈子, 平塚 貴大

Detection of Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in Hiroshima Prefecture

KANAKO MASUDA and TAKAHIRO HIRATSUKA

(Received October 18, 2019)

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) 118株のうち, プラスミドを介したカルバペネマーゼ遺伝子の水平伝播が問題となるカルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌 (CPE) は15株 (12.7%) であった。15株のCPEのうち, IMP型が12株 (80.0%) と最多で, そのうち, IMP-6が8株, IMP-1が4株であった。残りは, NDM型 (NDM-5), NDM型 (NDM-5) +KPC型, IMI型がそれぞれ1株であった。IMP-6 β -ラクタマーゼ遺伝子保有株は *Escherichia coli* が5株, *Klebsiella pneumoniae* が3株であり, 菌種は異なるが共通してIncNタイプのプラスミドを保有しており, IMP-6 β -ラクタマーゼ遺伝子がコードされているIncNタイプのプラスミドが菌種を超えて市中に蔓延している可能性が示唆された。IMP-6 β -ラクタマーゼはイミペネムの分解活性が低いため, カルバペネム系薬剤の感受性試験をイミペネム単剤で行った場合はカルバペネム感受性と判断され, CREとして届出されない危険性がある。また, 今回の調査では, NDM型とKPC型CPEが検出され, NDM型 (NDM-5) +KPC型 β -ラクタマーゼ遺伝子保有株は海外渡航歴がある患者由来であったが, NDM型 (NDM-5) β -ラクタマーゼ遺伝子保有株は海外渡航歴のない患者から検出された。これらの海外で問題となっているCPEは抗菌薬に高度耐性を示すため, 日本に定着しないよう, 今後も継続的な監視が必要である。

Key words : カルバペネム耐性腸内細菌科細菌, カルバペネマーゼ, 薬剤耐性遺伝子, β -ラクタマーゼ, プラスミド

緒言

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*, CRE) は, メロペネムやイミペネムなどのカルバペネム系薬剤や広域 β -ラクタム剤に耐性を示す腸内細菌科細菌である。CRE感染症は, 2014年9月から感染症法五類全数把握疾患に指定された。届出に必要な所見はメロペネム, またはイミペネムとセフメタゾールに対する耐性であるが, 腸内細菌科細菌におけるカルバペネム耐性機構は, カルバペネマーゼ産生の有無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している場合は, カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌 (carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, CPE) と呼び, ほとんどの β -ラクタム系薬剤を分解する。CPEは, プラスミドを介したカルバペネマーゼ遺伝子の水平伝播が問題となっており [1], 蔓延を最も警戒すべき耐性菌とされている。一方, カルバペネマーゼ非産生腸内細菌科細菌 (non-CPE) のカルバペネム耐性は, 細胞膜の透過性低下に加え, カルバペネム分解活性が弱いためカルバペネマーゼには分

類されないAmpCや基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) などの産生によることが多い [2]。現状の届出基準では, CPEとnon-CPEが混在しており, 院内感染などで特に問題となるCPE感染症の件数を把握するのが困難である。広島県では, 届出CREの薬剤耐性遺伝子の解析を行っており, 2019年6月までに当センターに搬入されたCREにおけるCPEの検出状況について報告する。

材料および方法

1 CRE感染症届出状況調査

2014年10月から2019年6月にCRE感染症として広島県 (広島市を除く) に届出された190症例について, 患者の年齢, 性別, 症状及び検体の情報を集計した。

2 供試菌株の菌種同定および薬剤感受性試験

届出CREのうち, 2015年7月から2019年6月に広島県感染症発生動向調査事業として当センターに検査依頼のあったCRE菌株118株を対象とした。同定および薬剤感受性試験は自動細菌同定感受性検査装置 (VITEK2 Compact, ビオメリュー) により行った。

3 カルバペネマーゼ産生性の確認

Carba NP テスト [3] によりカルバペネマーゼ産生性を確認した。つまり、被検菌をLysis buffer (Bacterial Protein Extraction Reagent, thermo fisher scientific) に溶菌後、イミペネム・フェノールレッド溶液と混和し、37°Cで2時間まで反応させ、黄変した株をCPEとした。

4 カルバペネマーゼ遺伝子の検出および遺伝子型の決定

病原体検出マニュアル [4] に従い、カルバペネマーゼ遺伝子であるNDM型、KPC型、IMP型、VIM-2型、OXA-48型、IMI型βラクタマーゼ遺伝子について、PCR法により検索した。IMP型βラクタマーゼ遺伝子が検出された株については、IMP-1 allプライマー [4] を用いてシーケンス解析を行った。また、NDM型βラクタマーゼ遺伝子が検出された株についても、Pre-NDMプライマー [5] を用いてシーケンス解析を行った。塩基配列の決定はBigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) にて実施した。得られた塩基配列からBLAST解析にて遺伝子型を決定した。さらに、IMP型βラクタマーゼ遺伝子の遺伝子型が決定された株については、Kayamaらの方法 [6] に基づいてPCR法によりIMP-1 βラクタマーゼ遺伝子

とIMP-6 βラクタマーゼ遺伝子を判別した。

5 プラスミドレプリコンタイピング

IMP型βラクタマーゼ遺伝子が検出された株について、PBRT 2.0 kit (DIATHEVA) を用いPCR法によりレプリコンタイピングを行った。

結 果

1 CRE感染症届出状況調査

CRE感染症届出状況の調査結果を図1に示した。2014年1件、2015年26件、2016年38件、2017年35件、2018年61件、2019年6月時点で29件の計190件の届出があった。年齢、性別の分布は60歳以上が89.4% (170件/190件) を占め、男性が107件、女性が83件であった。CRE感染症による症状は尿路感染症が最も多く、次いで肺炎、胆管炎、菌血症、敗血症、腹膜炎、胆管炎が主な症状であった。CREは尿、喀痰、血液、胆汁などから分離されていた。

2 CPEの検出状況

118株のCREのうち、Carba NP テストによりCPEと判定された株は、15株 (12.7%) であった (図2)。CPE15株の遺伝子型の内訳 (図2) は、IMP型が12株 (80.0%) と最多であった。シーケンス解析によりIMP

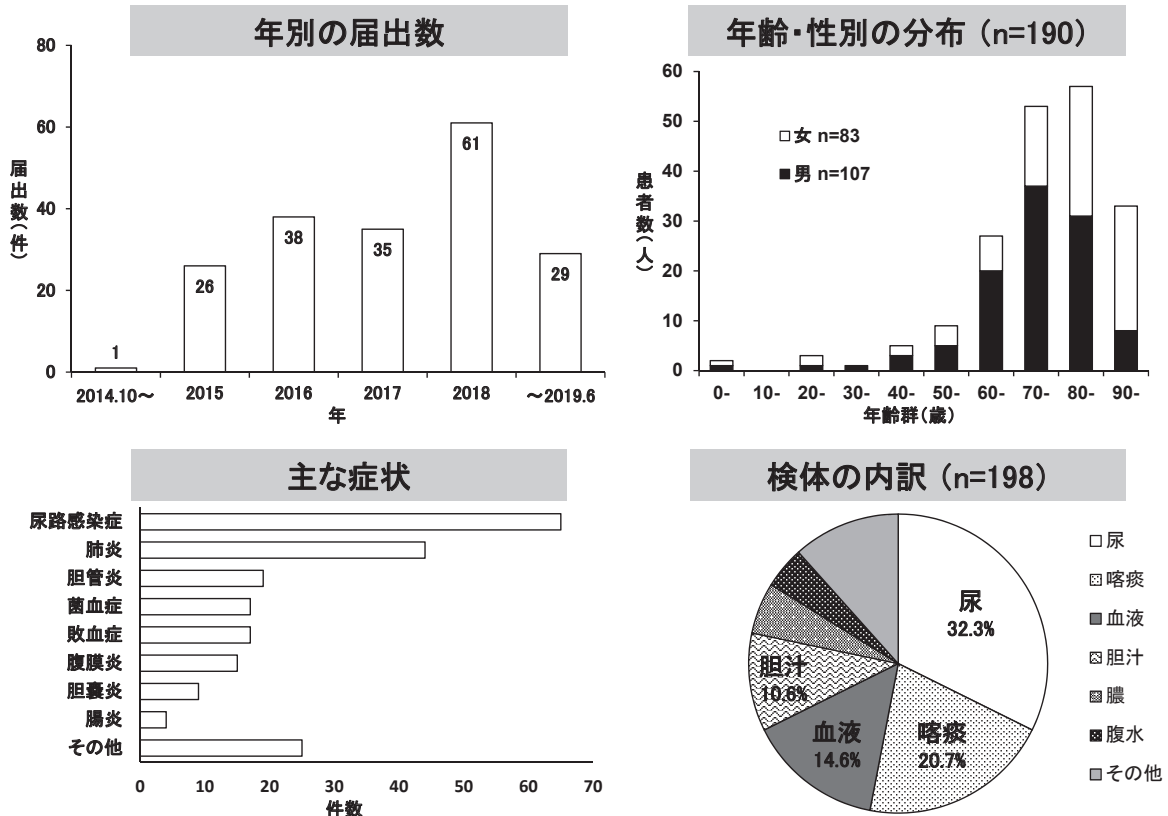


図1 広島県におけるCRE感染症届出状況 (2014年10月~2019年6月)

型12株のうち, IMP-6が8株 (CPEの53.3%), IMP-1が4株 (CPEの26.7%) であることがわかった. 残りの3株は, NDM型 (NDM-5), NDM型 (NDM-5) +KPC型, IMI型がそれぞれ1株であった.

3 菌種別CREにおけるCPEの割合

菌種別のCPEの割合を図3に示した. CREの半数を占めた*Klebsiella aerogenes*と*Morganella morganii*は全株がnon-CPEであった. CPEは*Enterobacter cloacae* 31株中2株 (6.5%), *Escherichia coli* 9株中6株 (66.7%), *Klebsiella pneumoniae* 6株中4株 (66.7%), *Serratia marcescens* 2株中1株 (50.0%), *Citrobacter koseri* 1株, *Kluyvera cryocrescens* 1株であり, 菌種によってCPEの割合が異なった.

4 CPEの薬剤感受性

CPEの多くはβ-ラクタム系薬剤に耐性を示したが, IMP-6 β-ラクタマーゼ遺伝子保有株においてはカルバペネム系薬のメロペネムには耐性を示すものの, 同じカルバペネム系薬のイミペネムには感受性を示した (表

1). IMP型β-ラクタマーゼ遺伝子保有株とIMI型β-ラクタマーゼ遺伝子保有株はアミノグリコシド系のアミカシンとゲンタマイシンには感受性を示したが, NDM型β-ラクタマーゼ遺伝子保有株はいずれも耐性を示した.

5 PCR法によるIMP-1 β-ラクタマーゼ遺伝子とIMP-6 β-ラクタマーゼ遺伝子の判別

IMP-1 β-ラクタマーゼ遺伝子判定用プライマーを用いた場合 (図4左), IMP-6 β-ラクタマーゼ遺伝子保有株ではバンドは検出されなかったが, IMP-1 β-ラクタマーゼ遺伝子保有株ではバンド (120bp) が検出された. 一方で, IMP-6 β-ラクタマーゼ遺伝子判定用プライマーを用いた場合 (図4右), IMP-1 β-ラクタマーゼ遺伝子保有株ではバンドは検出されなかったが, IMP-6 β-ラクタマーゼ遺伝子保有株ではバンド (120bp) が検出された.

6 IMP型β-ラクタマーゼ遺伝子保有株のプラスミドレプリコンタイピング

IMP-1 β-ラクタマーゼ遺伝子保有株間では共通した

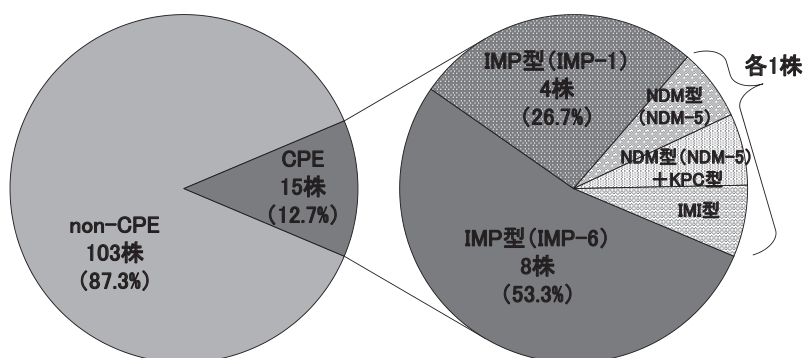


図2 CREにおけるCPEとカルバペネマーゼ遺伝子型の割合

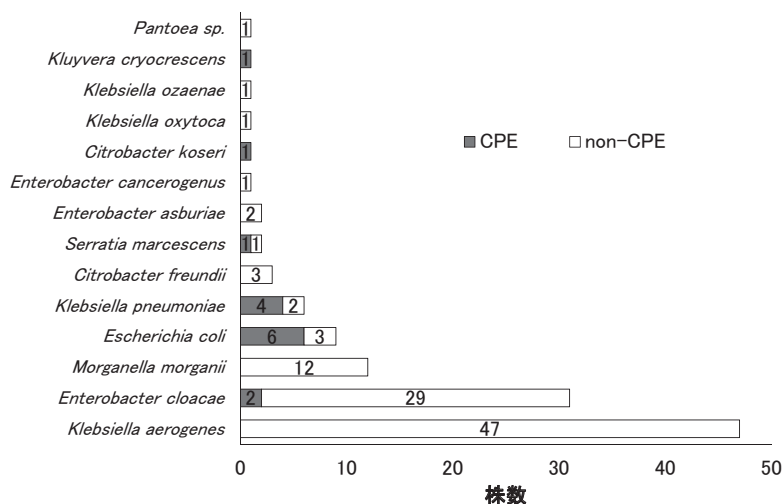


図3 菌種別CREにおけるCPEの割合

表1 CPEの薬剤感受性

遺伝子型	菌種	薬剤感受性 (R:耐性 I:中間 S:感性)														
		アンピシリン	ピペラシリン	セフアゾリン	セフトチアム	セフメタゾール	セフトキシム	セフトジジム	セフエピム	イミベネム	メロベネム	アミカシン	ゲンタマイシン	シプロフロキサシン	レボフロキサシン	ミノサイクリン
IMP-6	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	I	R	R	R
		R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	S	S	R	R	R
		R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	I
		R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	S
		R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	S	S	R	R	R
		R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
IMP-1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	S	S	R	S	R	S	I	R	S	I	S	S	S
		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	I
		R	R	R	R	R	R	R	R	ND*	R	S	S	R	I	R
		R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	R	S
		R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
NDM-5+KPC型	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	
NDM-5	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	
IMI型	<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	

*測定不可

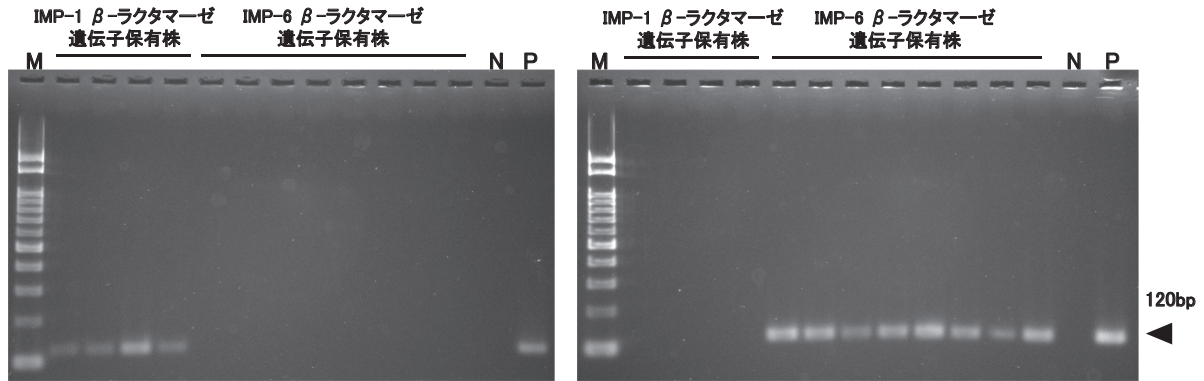


図4 IMP-1 β-ラクタマーゼ遺伝子 (左) とIMP-6 β-ラクタマーゼ遺伝子 (右) を判別するPCR

表2 IMP型のプラスミドレプリコンタイプ

遺伝子型	菌種	レプリコンタイプ	医療機関	診断年/月
IMP-6	<i>Escherichia coli</i>	N, FIB, FIA, FII	A	2016/3
		N	B*	2016/3
		N	B	2017/12
		N, FIB, FIA, II γ, FII	C	2019/1
		N, II γ	C	2019/4
		N, FIIK	B*	2016/3
IMP-1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	N	D	2016/5
		N, FIIK	E	2018/5
		-	F	2016/1
		-	G	2018/3
		II a	H	2018/3
<i>Enterobacter cloacae</i>	HI2	I	2019/5	

*同一患者

レプリコンタイプは見られなかった(表2)。一方で, IMP-6 β -ラクタマーゼ遺伝子保有株は*E. coli*が5株, *K. pneumoniae*が3株で菌種は異なるが, 共通してIncNタイプのプラスミドを保有していた(表2)。また, それらの株は検出された医療機関や診断年月が必ずしも同一ではなかった。

考 察

広島県におけるCRE感染症の届出は年々増加傾向にあり, 患者は60歳以上の高齢者が多く, 主に尿路感染症や肺炎の原因菌として検出されていた。届出CREのうち, CPEは12.7%と1割程度であったが, その割合は菌種によって大きく異なっていた。今回の調査では, 西日本に多いとされるIMP-6 β -ラクタマーゼ遺伝子[7, 8]の検出率が高く, IMP-6 β -ラクタマーゼ遺伝子がコードされているIncNタイプのプラスミド[8]が異なる菌種かつ, 異なる時期に異なる医療機関で検出されたことから, 菌種を超えて市中に蔓延している可能性が示唆された。

IMP-6 β -ラクタマーゼはイミペネムの分解活性が低いため, カルバペネム系薬剤の感受性試験をイミペネム単剤で行った場合はカルバペネム感受性と判断され, CREとして届出されない可能性がある。さらに, IMP-6 β -ラクタマーゼ遺伝子保有株は見かけ上イミペネムに感受性を示すものの, 試験管内において菌濃度を増やすと明らかに菌の増殖がみられることから[9], 臨床的に治療効果のない抗菌薬が投与される危険性がある。IMP-1 β -ラクタマーゼ遺伝子とIMP-6 β -ラクタマーゼ遺伝子の違いは1アミノ酸変異をもたらす1塩基のみであり, その型別にはシーケンス解析が必要となるが[10], PCR法によるIMP-1 β -ラクタマーゼ遺伝子とIMP-6 β -ラクタマーゼ遺伝子の判別結果とシーケンス解析結果が一致したことから, PCR法による判別はスクリーニングとして非常に有用であった。

さらに, NDM型やKPC型CPEの多くは輸入例とされており[11], NDM型(NDM-5)+KPC型 β -ラクタマーゼ遺伝子保有株は海外渡航歴があり, かつ現地で医療受診歴のある患者から検出されたが, NDM型(NDM-5) β -ラクタマーゼ遺伝子保有株は海外渡航歴のない患者から検出された。2016年にはすでにNDM型(NDM-5)CPEによる国内感染事例が報告されているため[12], 今回の株も関連性を精査する必要があることから, 国立感染症研究所にプラスミド解析を依頼しているところである。NDM型やKPC型など海外での蔓延が問題となっているCPEは抗菌薬に高度耐性を示すため[13], 院内はもとより市中における蔓延を阻止する必要があるが, 今後も継続的な監視が必要である。

文 献

- [1] 安部朋子, 永田由美, 松井真理, 青木知信, 柴山 恵, 関塚剛史, 山下明史, 堀内寿志, 山口佳子, 渡邊真理, 他. (2014): プラスミド水平伝達を介し多菌種へ耐性伝播したIMP-1 メタロ- β -ラクタマーゼ産生腸内細菌科細菌による院内感染事例. 日本臨床微生物学雑誌27, 20-29.
- [2] 荒川宜親. (2014): 腸内細菌科菌種におけるカルバペネム耐性メカニズムとその特長および動向. IASR 35: 283-284.
- [3] Nordmann P, Poirel L, Dortet L. (2012): Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. Emerg Infect Dis. 68: 1503-1507.
- [4] 国立感染症研究所 (2016): 病原体検出マニュアル 薬剤耐性菌 H28. 12月改訂版Ver 1.1: 30-42.
- [5] Kaase M, Nordmann P, Wichelhaus TA, Gatermann SG, Bonnin RA, Poirel L. (2011): NDM-2 carbapenemase in *Acinetobacter baumannii* from Egypt. J Antimicrob Chemother. 66: 1260-1262.
- [6] Kayama S, Shigemoto N, Kuwahara R, Onodera M, Yokozaki M, Ohge H, Kato F, Hisatsune J, Sugai M. (2012): Rapid Detection of *bla*_{IMP-6} by Amplification Refractory Mutation System. J Microbiol Methods. 88: 182-184
- [7] Yano H, Ogawa M, Endo S, Kakuta R, Kanamori H, Inomata S, Ishibashi N, Aoyagi T, Hatta M, Gu Y, et al. (2012): High Frequency of IMP-6 among Clinical Isolates of Metallo- β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Japan. Antimicrob Agents Chemother. 56: 4554-4555.
- [8] Kayama S, Shigemoto N, Kuwahara R, Oshima K, Hirakawa H, Hisatsune J, Jové T, Nishio H, Yamasaki K, Wada Y, et al. (2014): Complete Nucleotide Sequence of the IncN Plasmid Encoding IMP-6 and CTX-M-2 from Emerging Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* in Japan. 59: 1356-1359.
- [9] 鹿山鎮男, 桑原隆一, 繁本憲文, 木場由美子, 久恒順三, 大毛宏喜, 菅井基行. (2016): 薬剤耐性菌の基礎知識「ESBLおよびカルバペネマーゼ産生菌」. ケミカルタイムス 239: 3-9.
- [10] 松井真理, 鈴木里和, 鈴木仁人, 筒井敦子, 柴山恵吾. (2014): カルバペネム耐性腸内細菌科細菌の検査. IASR 35: 285-287.

- [11] 鈴木里和, 松井真理, 鈴木仁人, 甲斐久美子, 吉村由美子, 瀧世志江, 柴山恵吾. (2013): わが国におけるNDM型, KPC型およびOXA-48型カルバペネマーゼ産生菌分離状況. IASR 34: 238-239.
- [12] 鈴木里和, 松井真理, 鈴木仁人, 長野由紀子, 柴山恵吾, 秋沢宏次, 石黒信久, 外山雅美, 多部田弘士, 斉藤さとみ, 他. (2016): NDM-5メタロ- β -ラクタマーゼ産生大腸菌ST410による国内感染事例. IASR 37: 82-84.
- [13] 外山雅美, 長野由起子, 柴山恵吾, 長野則之, 荒川宜親. (2013): 海外より来日した患者から検出されたNDM-1メタロ- β -ラクタマーゼとOXA-181カルバペネマーゼ等を同時に産生する広範囲抗菌薬耐性肺炎桿菌. IASR 34: 237-238.