

長野県におけるカルバペネム耐性腸内細菌目細菌感染症の 発生状況（2017年度～2022年度）

古川由美¹・松山満貴¹・市川奈緒¹・関口真紀^{1,2}・小野諭子¹・和田由美¹

2017年度から2022年度までに当所に搬入された、カルバペネム耐性腸内細菌目細菌感染症患者由来菌株143株について、PCR法によるカルバペネマーゼ遺伝子の検出と、阻害剤を用いた β -ラクタマーゼ産生性の確認試験を行った。また、カルバペネマーゼの他に、AmpC β -ラクタマーゼ（以下、AmpC）や基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ（extended-spectrum β -lactamase：以下、ESBL）の検出も併せて行った。

カルバペネマーゼ遺伝子が検出されたのは4株で、全てIMP型であった。また、AmpC遺伝子が検出されたのは18株で、EBC型17株、CIT型1株であった。ESBL遺伝子が検出されたのは3株で、CTX-M-2 groupが1株、CTX-M-9 groupが1株、CTX-M-2 groupとSHV型を両方保有しているものが1株であった。

長野県内でもカルバペネマーゼ遺伝子を保有する株が確認されており、薬剤耐性菌による感染症のまん延や院内感染を防止するため、地域における監視を続けていくことが重要である。

キーワード：カルバペネム耐性腸内細菌目細菌感染症、耐性遺伝子、 β -ラクタマーゼ

1 はじめに

感染症の治療に使用する抗菌薬はさまざまあるが、カルバペネム系抗菌薬は、グラム陰性桿菌感染症の治療薬として重要な位置を占めている^{1)~4)}。近年は、イミペネムやメロペネムなどのカルバペネム系薬剤に耐性を持つ腸内細菌目細菌の増加が世界的に問題となっている^{5)~8)}。

カルバペネム耐性腸内細菌目細菌（carbapenem-resistant Enterobacterales：以下、CRE）感染症⁹⁾は大きく二つに分けられる。すなわちカルバペネマーゼを産生するものは、カルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌（CPE：carbapenemase-producing Enterobacterales）による感染症であり、カルバペネマーゼを産生しない腸内細菌目細菌（non-CPE）による感染症と区別することが多い¹⁰⁾。

カルバペネマーゼ遺伝子は、菌種間を超えて容易に水平伝達するため¹¹⁾、通常の菌種同定検査ではCPEの発見が遅れる可能性があり、感染拡大につながる恐れがある^{12),13)}。そのため、CRE菌株の遺伝子検査を行いCPEであるか確認することが重要である。

CRE感染症は、2014年9月から感染症法の五類

全数把握対象疾患となり、2017年3月28日には厚生労働省健康局結核感染症課長通知¹⁴⁾により、感染症法の届出基準を満たした薬剤耐性菌が患者から検出された際には、保健所に届出され、地方衛生研究所等で耐性遺伝子等の試験検査を行うこととなった。

当所でもこの通知により、2017年度から検査を実施している。これは、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ことを目的としている。

今回、2017年度から2022年度までに当所へ搬入された菌株のCRE感染症の発生状況及び試験検査の結果についてまとめたので報告する。

2 材料及び方法

2.1 医療機関から提供されたCRE感染症の患者情報

2017年4月から2023年3月に医療機関より保健所に届出された症例のうち、当所に菌株の搬入があった143株について、発生届に記載された患者の年齢、性別、症状、分離材料について集計を行った。

1 長野県環境保全研究所 感染症部 〒380-0944 長野市安茂里米村1978

2 現：長野県佐久保健福祉事務所 健康づくり支援課 〒385-8533 佐久市跡部65-1

2.2 菌種の同定，耐性遺伝子の検出及びβ-ラクタマーゼ産生性確認試験

CRE 感染症の患者届出症例に係る当所への搬入菌株について，菌種の同定，遺伝子検査等の流れを図1に示す。

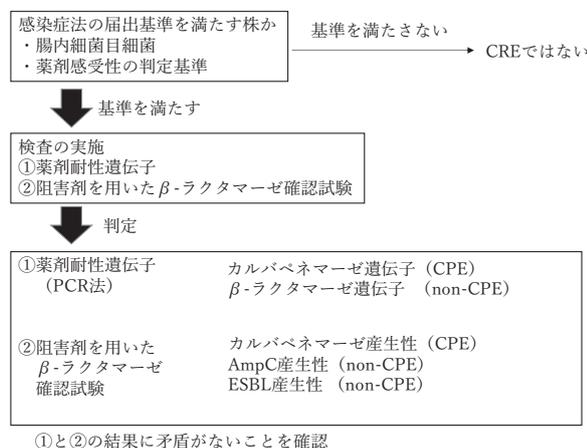


図1 CRE 感染症検査の流れ

2.2.1 菌種の同定

搬入菌株について，ID テスト・EB-20（島津ダイアグノスティクス(株)）又は API 20 E（バイオメリュー・ジャパン(株)）を用いて菌種同定し，腸内細菌目細菌であることを確認した。

2.2.2 耐性遺伝子の検出

国立感染症研究所病原体検出マニュアル「薬剤耐性菌」¹⁰⁾のPCR法に用いるテンプレートDNAの抽出方法，CRE 感染症の検査方法に準じて実施した。

(1) カルバペネマーゼ遺伝子

2017年4月から2020年9月までは通知¹⁴⁾に原則実施と記載されているIMP型，NDM型，KPC型，OXA-48型についてPCR法を行った。2020年12月以降は，VIM型，GES型を加えたマルチプレックスPCR法¹⁰⁾で検出を行った。

(2) AmpC 遺伝子及びESBL 遺伝子

AmpC 遺伝子については，MOX型，CIT型，DHA型，ACC型，EBC型，FOX型についてマルチプレックスPCR法により検出を行った。ESBL 遺伝子はCTX-M-1 group，CTX-M-2 group，CTX-M-9 group（必要に応じてTEM型，SHV型）についてPCR法により検出を行った。

2.2.3 β-ラクタマーゼ産生性確認試験

国立感染症研究所病原体検出マニュアル「薬剤耐性菌」¹⁰⁾の阻害剤を用いたβ-ラクタマーゼ産生性の確認方法に準じて実施した。

メルカプト酢酸ナトリウム（SMA）ディスク，メロペネム（MEPM）ディスク，イミペネム（IPM）ディスク，セフトジジム（CAZ）ディスク，セフメタゾール（CMZ）ディスクは栄研化学（株）製，3-アミノフェニルポロン酸，クロキサシリンナトリウム一水和物は東京化成工業（株）製を用い，IMP型，NDM型，KPC型カルバペネマーゼ産生性及びAmpC産生性を判定した。

なお，ESBL産生性は，すべて栄研化学（株）製のディスクを用い確認した。アモキシシリン/クラヴラン酸（ACV）ディスク及びスルバクタム/アンピシリン（S/A）ディスクを阻害剤ディスクとして使用し，抗菌薬ディスクは，セフトジジム（CAZ）ディスク及びセフォタキシム（CTX）ディスクを用いた。阻害剤ディスクと抗菌薬ディスクが並ぶ水平方向に対して垂直な方向に，抗菌薬ディスク自体の阻止円より大きく阻止円径の拡張が認められるものを陽性とした。

3 結果

3.1 医療機関から提供されたCRE 感染症の患者情報

対象期間内に当所に菌株が搬入されたCRE 143株の年度ごと内訳は2017年度22株，2018年度28株，2019年度27株，2020年度24株，2021年度21株，2022年度21株であった。

男女別では，男性85名，女性58名で，男性の方が多かった（図2）。年齢別では，0～10歳が9名，30歳代が5名，40歳代が4名，50歳代が7名，60歳代が15名，70歳代が51名，80歳代が38名，90歳以上が14名であり，60歳以上が全体の82.5%と大半を占めていた（図2）。

分離材料別では，尿が44件と最も多く，次いで血液，喀痰等，胆汁，膿，穿刺液（腹水，胸水等）で，その他は8件であった（図3）。通常無菌的であるべき血液などの検体は59件で全体の41.2%を占めた。

症状別では，尿路感染症が48件と最も多く，他は菌血症，敗血症，肺炎，胆嚢炎，胆管炎，腹膜炎等であった（図4）。

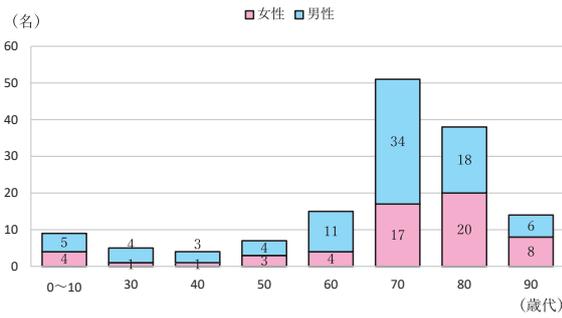


図2 CRE 感染症搬入菌株の患者の年齢・性別

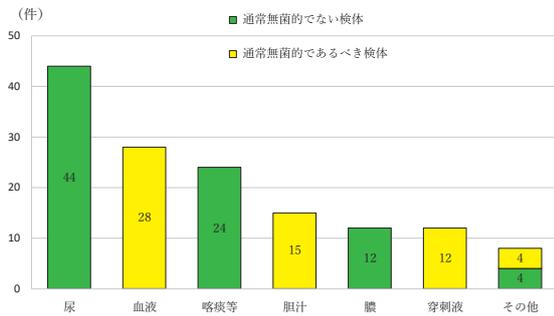


図3 CRE 感染症搬入菌株の分離材料

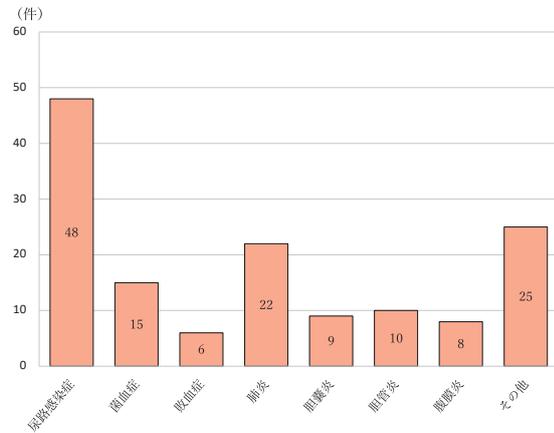


図4 CRE 感染症搬入菌株の患者の症状

3.2 菌種の同定, 耐性遺伝子の検出及びβ-ラクタマーゼ産生性確認試験

3.2.1 菌種の同定

当所に菌株の搬入があった143株のうち、同定された菌種は図5のとおりで、*Klebsiella aerogenes*(2017年に*Enterobacter aerogenes*から菌名変更¹⁵⁾) 80株(55.9%), *Enterobacter cloacae* complex (*Enterobacter cloacae*含む¹⁶⁾) 47株(32.8%)であり、2菌種で全体の88.7%と大半を占めた。

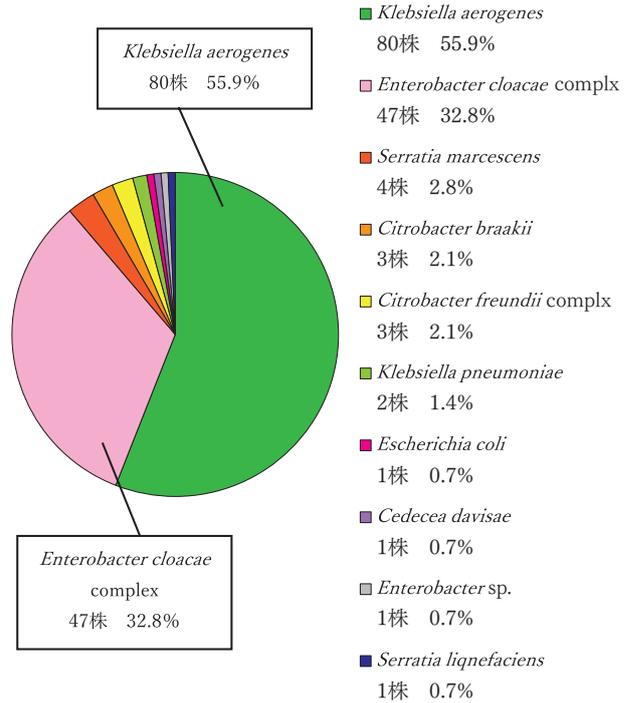


図5 CRE 感染症の同定菌種

3.2.2 耐性遺伝子の検出

143株のうち、薬剤耐性遺伝子が検出されたのは22株であった(表1)。

そのうち、カルバペネマーゼ遺伝子が検出されたのは4株で遺伝子型はいずれもIMP型であり、菌種は*Enterobacter cloacae* complexであった。

AmpC遺伝子が検出されたのは18株で、遺伝子型はEBC型が17株、CIT型が1株であった。菌種はEBC型が全て*Enterobacter cloacae* complexで、CIT型が*Escherichia coli*であった。

ESBL遺伝子が検出されたのは3株で、CTX-M-2 groupが2株、CTX-M-9 groupが1株であった。また、CTX-M-2 groupのうち1株はSHV型を同時に保有していた。菌種は、CTX-M-2 group (SHV型同時保有含む)は2株とも*Klebsiella pneumoniae*, CTX-M-9 groupは*Escherichia coli*であった。

Enterobacter cloacae complex 2株はCPE (IMP型)とAmpC (EBC型)遺伝子を両方保有していた。また、*Escherichia coli* 1株はAmpC (CIT型)とESBL (CTX-M-9 group)遺伝子を両方保有していた。

3.2.3 β-ラクタマーゼ産生性確認試験

カルバペネマーゼ遺伝子が検出された4株は、メルカプト酢酸ナトリウムでの阻害効果が認められた。

AmpC遺伝子が検出された18株のうち、ボロン

表1 耐性遺伝子及びβ-ラクタマーゼ産生性の検出状況

年度	菌種名 ※	PCR法			阻害剤を用いたβ-ラクタマーゼ確認試験			
		CPE	AmpC	ESBL	メルカプト酢酸Na	ボロン酸	クロキサシリン	クラブラン酸
2017	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	—	EBC	—	CMZ	CMZ	CMZ	—
	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	—	EBC	—	CMZ	CMZ	CMZ	—
	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	—	EBC	—	—	—	CMZ	—
	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	—	EBC	—	CMZ	CMZ	CMZ	—
2018	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	—	EBC	—	CMZ	CMZ	CMZ	—
	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	IMP	—	—	MPM, IPM, CAZ	—	—	—
	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	—	EBC	—	—	CMZ	CMZ	—
	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	IMP	EBC	—	CAZ	CMZ	CMZ	—
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	—	—	CTX-M-2	—	—	—	—
2019	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	—	EBC	—	—	CMZ	CMZ	—
	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	—	EBC	—	—	CMZ	CMZ	—
	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	—	EBC	—	—	CMZ	CMZ	—
2020	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	—	EBC	—	—	CMZ	CMZ	—
	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	—	EBC	—	—	CMZ	CMZ	—
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	—	—	CTX-M-2, SHV	—	—	—	CAZ, CTX
2021	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	—	EBC	—	—	CMZ	CMZ	—
	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	—	EBC	—	—	CMZ	CMZ	—
2022	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	—	EBC	—	—	CMZ	CMZ	—
	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	—	EBC	—	—	CMZ	CMZ	—
	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	IMP	EBC	—	MPM, IPM, CAZ	—	—	—
	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	IMP	—	—	MPM, IPM, CAZ	—	—	—
	<i>Escherichia coli</i>	—	CIT	CTX-M-9	—	CMZ	CMZ	—

※ *Enterobacter cloacae* complexは2021年度まで*Enterobacter cloacae*で報告

酸、クロキサシリン両方に阻害が認められたのは、16株であった。

ESBL 遺伝子が検出された3株のうち、クラブラン酸に阻害が認められたのは1株であった(表1)。

4 考察

長野県内(長野市除く)でCRE感染症の検査を開始した2017年度から2022年度までの期間で、*Enterobacter cloacae* complex 4株からCPEが検出され、遺伝子型はIMP型であった。

CPE検出率は2018年度7.1%、2022年度9.5%であり、2017年度、2019年度、2020年度、2021年度は検出されなかった。

全国の報告数と比当所に搬入された菌株数は少なく、単純に比較できないが、2018年(17.6%)¹⁷⁾、2019年(16.5%)¹⁸⁾、2020年(17.4%)¹⁹⁾、2021年(15.1%)²⁰⁾の全国の検出率より低かった。県内でも2018年度に2株、2022年度に2株CPEの検出はあったが、それ以降搬入された株からの検出はなく、限定的なものであると推察された。

抗菌薬の暴露等の影響によって広範囲な抗菌薬を分解するようになるAmpC²¹⁾を産生するnon-CPEは毎

年2~4株検出されており、EBC型が検出されたのは全て*Enterobacter cloacae* complexであった。腸内細菌目細菌のうち*Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Citrobacter freundii*などは染色体上にAmpCをコードする遺伝子を元々保有しているため^{21), 22)}、染色体性AmpCと推察された。また、CIT型が検出された*Escherichia coli*は、染色体性かプラスミド性かの判断は困難であった²³⁾。

β-ラクタマーゼの構造遺伝子変異によって基質特異性が変化することで、本来分解しないはずの抗菌薬も分解するようになったESBL²⁴⁾を産生するnon-CPEは3株検出されており、菌種は*Klebsiella pneumoniae*が2株、*Escherichia coli*が1株であった。CTX-M型はセフトキシム(CTX)、セフトリアキソン(CTRX)、セフェピム(CFPM)に高度耐性を示すが、セフトジウム(CAZ)、アズトレオナム(AZT)には見かけ上感性和判定されることがある^{24), 25)}。PCRでCTX-M-2 groupが検出されたが、阻害剤を用いたβ-ラクタマーゼ産生性確認試験でクラブラン酸の阻害が見られなかった株があった。しかしこの株は、ESBL産生性試験で、CAZに比べCTXにより耐性だったため、検出に矛盾はないとした。また、CTX-M-9 groupが検出された株はAmpCも同時に保有しており、ディスク法でクラブラン酸の阻害が認められなかったが、複数のβ-ラクタマ

一ゼを産生する株は阻害効果が確認できないことがあるためと推察された²⁶⁾。

5 まとめ

2017年度から2022年度までの期間に、当所に搬入されたCRE感染症の菌株数は143株で、毎年21~28株搬入があり、年度による大きな差はあまりなかった。県内でのCPE検出数は4株であり、検出されたのは、2018年度2株、2022年度2株であった。

これまで県内ではCRE感染症による大規模な院内感染は発生していないが、一般的に薬剤耐性遺伝子を保有する菌は、医療従事者の手指や医療器具等を介して拡散されることがあり¹¹⁾、薬剤耐性菌の院内感染対策を行う上で注意が必要である。

なお、国内での検出数が増加し、定着が危惧されている海外型カルバペネマーゼ遺伝子(NDM型やKPC型)^{13), 27)}の検出は認められなかったが、新型コロナウイルス感染症の流行により減少していた海外からの旅行者が増加していることもあり、海外型を定着させないためにも、今後も継続して発生動向や β -ラクタマーゼ検出状況を監視していく必要がある。

謝辞

本調査にあたり、検体収集、情報提供等にご協力いただきました各医療機関及び各保健所の関係各位の皆様様に深謝いたします。

文献

- 1) 山野佳則 (2013) 新規 β -ラクタム系抗菌薬の創製及び開発の将来展望, MEDCHEM NEWS, 3 : 7-10
- 2) 平井敬二 (2020) 日本発の抗菌薬開発の歴史と今後の展望について, 日本化学療法学会雑誌, 68 (4) : 499-509
- 3) 佐伯康匠 (2022) 抗菌薬開発の歴史と現状 - 薬剤耐性菌との戦い -, 森ノ宮医療大学紀要, 16 : 1-8
- 4) E. J. Septimus and K. M. Kuper (2009) Clinical challenges in addressing resistance to antimicrobial drugs in the twenty-first century, Clinical Pharmacology & Therapeutics, 86 (3) : 336-339
- 5) WHO (2017) Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development

- of new antibiotics
- 6) CDC (2019) Antibiotic Resistance Threats Report
 - 7) CDC, Where Resurgence Spreads: Across the World : <https://www.cdc.gov/drugresistance/across-the-world.html#:~:text=How%20Germs%20Can%20Spread,through%20international%20borders%20each%20year> (2024年1月確認)
 - 8) 厚生労働省, 薬剤耐性 (AMR) 対策について : <https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000120172.html> (2024年1月確認)
 - 9) 国立感染症研究所/厚生労働省健康局結核感染症課 (2019) カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) 感染症, 病原体微生物検出情報, 40 (2) : 17-21
 - 10) 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 : 30-49
 - 11) Amy J. Mathers, Heather L. Cox, Brandon Kitchel, Hugo Bonatti, Ann Karen C. Brassinga, Joanne Carroll, W. Michael Scheld, Kevin C. Hazen and Costi D. Sifri (2011) Molecular Dissection of an Outbreak of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Reveals Intergenous KPC Carbapenemase Transmission through a Promiscuous Plasmid, mBio, 2 (6) : 00204-11
 - 12) 原田壮平 (2021) 薬剤耐性腸内細菌目細菌の基礎と疫学Update, 日本臨床微生物学会雑誌, 31 (4) : 299-238
 - 13) 荒川宜親 (2015) カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, CRE) 等新型多剤耐性菌のグローバル化と臨床的留意点, 日本化学療法学会雑誌, 63 (2) : 187-197
 - 14) 厚生労働省健康局結核感染症課長通知 (平成29年3月28日付け健感発 0328 第4号) 「カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) 感染症に係る試験検査の実施について」
 - 15) B. J. Tindall, G. Sutton and G. M. Garrity (2017) *Enterobacter aerogenes* Hormaeche and Edwards 1960 (Approved Lists 1980) and *Klebsiella mobilis* Bascomb et al. 1971 (Approved Lists 1980) share the same nomenclatural type (ATCC 13048) on the Approved Lists and are homotypic synonyms, with consequences for the name *Klebsiella mobilis* Bascomb et al. 1971 (Approved Lists 1980), Int J Syst Evol Microbiol, 67 (2) : 502-504
 - 16) Anne Davin-Regli, Jean-Philippe Lavigne and Jean-

- Marie Pagès (2019) *Enterobacter* spp. : Update on Taxonomy , Clinical Aspects , and Emerging Antimicrobial Resistance , Clinical Microbiology Reviews, 32 (4) : 00002-19
- 17) 国立感染症研究所/厚生労働省健康局結核感染症課 (2019) カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (carbapenem-resistant Enterobacteriaceae : CRE) 病原体サーベイランス, 2018, 病原体微生物検出情報, 40 (9) : 157-158
- 18) 国立感染症研究所/厚生労働省健康局結核感染症課 (2021) カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (carbapenem-resistant Enterobacteriaceae : CRE) 病原体サーベイランス, 2019, 病原体微生物検出情報, 42 (6) : 123-124
- 19) 国立感染症研究所/厚生労働省健康局結核感染症課 (2022) カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (carbapenem-resistant Enterobacteriaceae : CRE) 病原体サーベイランス, 2020, 病原体微生物検出情報, 43 (9) : 215-216
- 20) 国立感染症研究所/厚生労働省健康局結核感染症課 (2023) カルバペネム耐性腸内細菌目細菌 (carbapenem-resistant Enterobacteriaceae : CRE) 病原体サーベイランス, 2021, 病原体微生物検出情報, 44 (8) : 130-131
- 21) George A. Jacoby (2009) AmpC beta-lactamases, Clinical Microbiology Reviews, 22 (1) : 161-182
- 22) Hanson N. D. and Sanders C. C. (1999) Regulation of inducible AmpC beta-lactamase expression among Enterobacteriaceae, Current Pharmaceutical Design, 5 (11) : 881-894
- 23) 山崎勝利・小松方・福田砂織・豊川真弘・西功・幸福知己・中井依砂子・戸田宏文・佐藤かおり・小野保・西尾久明・末吉範行・木田兼以・折田環・中村竜也・直本拓己・木下承皓・和田恭直 (2013) 2011年に臨床材料から分離したプラスミド性 AmpC β -lactamase 産生腸内細菌の調査, 日本臨床微生物学雑誌, 23 (3) : 194-202
- 24) A. Matagne, J. Lamotte-Brasseur and J. M. Frère (1998) Catalytic properties of class A beta-lactamases : efficiency and diversity, Biochem J, 330 (2) : 581-598
- 25) 荒川宜親 (2003) 広域 β -ラクタム薬耐性に関与する β -ラクタマーゼの特徴と遺伝的相関, 日本臨床微生物学雑誌, 13 (3) : 150-161
- 26) Mark E. Rupp and Paul D. Fey (2003) Extended spectrum beta-lactamase (ESBL) -producing Enterobacteriaceae : considerations for diagnosis , prevention and drug treatment, Drugs, 63 (4) : 353-365
- 27) 国立感染症研究所/厚生労働省健康局結核感染症課 (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, 病原体微生物検出情報, 35 (12) : 283-284

Surveillance of Carbapenem-resistant Enterobacterales infections in Nagano Prefecture (2017-2022)

Yumi FURUKAWA¹, Miki MATSUYAMA¹, Nao ICHIKAWA¹, Maki SEKIGUCHI^{1,2},
Satoko ONO¹ and Yumi WADA¹

¹ Infectious Disease Division, Nagano Environmental Conservation Research Institute,
1978 Komemura, Amori, Nagano 380-0944, Japan

² Present address: Saku Health and Welfare Office, 65-1 Atobe, Saku 385-8533, Japan