

2017年度に広島市で分離されたカルバペネム耐性腸内細菌科細菌の検査状況と遺伝子解析

青田 達明 千神 彩香* 栗林 智早 山本 美和子
松室 信宏 坂本 綾

平成 29 年 3 月 28 日付厚生労働省通知に基づき、2017 年 4 月以降、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症の届出があった場合は、当該耐性菌の収集及び詳細な解析を実施している。2017 年度に収集した CRE 菌株 6 株について、 β -ラクタマーゼ産生性スクリーニング試験、カルバペネム耐性遺伝子の検出及び塩基配列の解析を実施した結果、6 株中 5 株からカルバペネム耐性遺伝子である IMP-6 MBL 遺伝子を検出した。この 5 株はイミペネムに対する耐性が弱く、うち 2 株はイミペネム単剤でのスクリーニングでは CRE と把握できない菌株であった。

キーワード： カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症、CRE、カルバペネマーゼ、IMP-6 MBL 遺伝子、ステルス型

はじめに

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌(CRE)は、細菌感染症の治療に用いられるカルバペネム系抗菌薬に対し耐性を示すことから、米国をはじめとし国際的に大きな関心事となっており、本邦における医療現場でも CRE への対策が重要な課題となっている。CRE のカルバペネム耐性機序は様々であり、プラスミド性のカルバペネム耐性遺伝子は複数の菌種間で水平伝播することから¹⁾、特に医療現場ではその蔓延に注意をしなければならない。平成 29 年 3 月 28 日付厚生労働省通知(通知)において、CRE 感染症の届出がなされた場合は、地域における薬剤耐性菌の蔓延などの流行状況を把握するため、地方衛生研究所等で当該耐性菌に係る詳細な解析を行う必要があると示された。

本市では 2017 年 4 月以降、CRE 感染症の届出があった場合、関係機関の協力のもと CRE 菌株の試験検査を実施している。CRE のカルバペネム耐性に関与する耐性遺伝子の種類を把握し、蔓延状況や院内感染の兆候等について関係機関と情報共有をすることができれば、本市の CRE 感染症の予防対策に寄与できると考える。今回、2017 年度に収集した CRE 菌株 6 株について、通知に基づいたカルバペネム耐性遺伝子の検出とそれらの詳細な塩基配列を解析した結果、検出された耐性遺伝子型に一定の傾向がみられたので報告する。

方法

1 供試菌株

2017 年 4 月から 2018 年 3 月までに CRE の届出があり、菌株の収集が可能であった 3 菌種 6 株を用いた。菌種の内訳は、*Escherichia(E.) coli* が 4 株、*Enterobacter(E.) cloacae* が 1 株、*E. aerogenes* が 1 株であった(表 1)。

2 β -ラクタマーゼ産生性スクリーニング試験(ディスク拡散法)

プラスミドの脱落を防ぐよう純培養した被検菌を、滅菌生理食塩水中に McFarland 0.5 となるよう懸濁し、綿棒を用いてミューラーヒントン II 寒天培地(日本 BD)に塗布した。この培地上に各種抗菌薬含有ディスク及び酵素阻害剤含有ディスク(日本 BD, 栄研化学)を配置し、37°C で一晩培養後に阻止円形成の有無を調べ、その表現型について確認した。使用した薬剤及び阻害剤は、国立感染症研究所(感染研)より示された方法を用いて実施した。

3 カルバペネマーゼ遺伝子の検出(PCR 法)

滅菌生理食塩水中に懸濁した被検菌を 100°C 10 分の加熱処理後に遠心し、回収した上清を鋳型 DNA とした。IMP-1 型、IMP-2 型、NDM 型、KPC 型、OXA-48 型、VIM 型、KHM 型、GES 型の検出を行った。DNA 合成酵素は、TaKaRa Ex Taq[®] Hot Start Version(TaKaRa)を使用し、プライマー配列及び反応条件は、感染研より示された方法に従った(表 2, 図 1(a))。

*: 現 健康福祉局保健部環境衛生課

4 ESBL 遺伝子の検出 (PCR 法)

基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) 遺伝子である CTX-M-1 group, CTX-M-2 group, CTX-M-9 group の検出を行った。DNA 合成酵素は, TaKaRa Ex Taq[®] Hot Start Version (TaKaRa) を使用し, プライマー配列及び反応条件は, 感染研より示された方法に従った (表 2, 図 1(a))。

5 AmpC 遺伝子の検出 (PCR 法)

AmpC 遺伝子である MOX 型, CIT 型, DHA 型, ACC 型, EBC 型, FOX 型の検出を行った。DNA 合成酵素は, TaKaRa Ex Taq[®] Hot Start Version (TaKaRa) を使用し, プライマー配列及び反応条件は, 感染研より示された方法に従った (表 2, 図 1(b))。

6 塩基配列解析

IMP-1 型遺伝子陽性となった検体について, 感

染研より示された IMP-all プライマー (表 2) を使用し, 目的遺伝子の増幅を行った。サイクルシーケンスは, BigDye[™] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を使用した。3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて増幅断片の塩基配列を解析し, 遺伝子型を決定した。

結 果

1 β -ラクタマーゼ産生性スクリーニング試験

結果を表 3 に示す。カルバペネマーゼ阻害剤であるメルカプト酢酸ナトリウム (SMA) 及びボロン酸 (APB) を用いたスクリーニング試験の結果, *E. coli* (No. 1~3, 5) 及び *E. cloacae* は SMA による阻害効果が認められた。一方, APB による阻害効

表 1 供試菌株

No.	菌 種	血 清 型	届 出	症 状	分 離 材 料
1	<i>E. coli</i>	O25:H4	2017 年 4 月	肺炎	喀痰
2	<i>E. coli</i>	OUT:H18	2017 年 5 月	尿路感染症	尿
3	<i>E. coli</i>	O25:HUT	2017 年 6 月	尿路感染症	尿
4	<i>E. cloacae</i>	-	2017 年 6 月	尿路感染症	尿
5	<i>E. coli</i>	OUT:H4	2017 年 9 月	尿路感染症	尿
6	<i>E. aerogenes</i>	-	2018 年 2 月	胆嚢炎	胆汁

表 2 プライマー配列

プライマー	配列 (5' -3')	サイズ	プライマー	配列 (5' -3')	サイズ																																																												
IMP-1 型	f ACCGCAGCAGAGTCTTTGCC	587bp	CTX-M-1 group	f GCTGTTGTTAGGAAGTGTC	516bp																																																												
	r ACAACCAGTTTTGCCTTACC			r CCATTGCCCGAGGTGAAG		IMP-2 型	f GTTTTATGTGTATGCTTCC	678bp	CTX-M-2 group	f ACGCTACCCTGCTATTT	779bp or 780bp	r AGCCTGTTCCCATGTAC	r GCTTCCGCCTTCTGCTC	NDM 型	f TTGCCAATATTATGCACCC	420bp	CTX-M-9 group	f GCAGATAATACGCAGGTG	393bp	r ATGGCATAAGTCGCAATCC	r CGGCGTGGTGGTGTCTCT	KPC 型	f ATGTCACTGTATCGCCGTCT	893bp	MOX 型	f GCTGTCAAGGAGCACAGGAT	520bp	r TTTTCAGAGCCTTACTGCC	r CACATTGACATAGGTGTGGTGC	OXA-48 型	f TTGGTGGCATCGATTATCGG	744bp	CIT 型	f TGGCCAGAACTGACAGGCAAA	462bp	r GAGCACTTCTTTTGTGATGGC	r TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	VIM 型	f ATGTTCAAACCTTTGAGTAAG	801bp	DHA 型	f AACTTTACAGGTGTGCTGGGT	405bp	r CTACTCAACGACTGAGCG	r CCGTACGCATACTGGCTTTGC	KHM 型	f ATACGCCCATTTACGCCACA	465bp	ACC 型	f AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA	346bp	r GTCGCCAATTTCCGTGAC	r TTCGCCGCAATCATCCCTAGC	GES 型	f CTTCATTACGCACTATTAC	827bp	EBC 型	f TCGGTAAGCCGATGTTGCGG	302bp	r TAACTTGACCGACAGAGG	r CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT	IMP-all	f ATGAGCAAGTTATCTGTATTC	741bp	FOX 型
IMP-2 型	f GTTTTATGTGTATGCTTCC	678bp	CTX-M-2 group	f ACGCTACCCTGCTATTT	779bp or 780bp																																																												
	r AGCCTGTTCCCATGTAC			r GCTTCCGCCTTCTGCTC		NDM 型	f TTGCCAATATTATGCACCC	420bp	CTX-M-9 group	f GCAGATAATACGCAGGTG	393bp	r ATGGCATAAGTCGCAATCC	r CGGCGTGGTGGTGTCTCT	KPC 型	f ATGTCACTGTATCGCCGTCT	893bp	MOX 型	f GCTGTCAAGGAGCACAGGAT	520bp	r TTTTCAGAGCCTTACTGCC	r CACATTGACATAGGTGTGGTGC	OXA-48 型	f TTGGTGGCATCGATTATCGG	744bp	CIT 型	f TGGCCAGAACTGACAGGCAAA	462bp	r GAGCACTTCTTTTGTGATGGC	r TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	VIM 型	f ATGTTCAAACCTTTGAGTAAG	801bp	DHA 型	f AACTTTACAGGTGTGCTGGGT	405bp	r CTACTCAACGACTGAGCG	r CCGTACGCATACTGGCTTTGC	KHM 型	f ATACGCCCATTTACGCCACA	465bp	ACC 型	f AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA	346bp	r GTCGCCAATTTCCGTGAC	r TTCGCCGCAATCATCCCTAGC	GES 型	f CTTCATTACGCACTATTAC	827bp	EBC 型	f TCGGTAAGCCGATGTTGCGG	302bp	r TAACTTGACCGACAGAGG	r CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT	IMP-all	f ATGAGCAAGTTATCTGTATTC	741bp	FOX 型	f AACATGGGGTATCAGGGAGATG	190bp	r TTAGTTGCTTGGTTTTGATG	r CAAAGCGCGTAACCGGATTGG				
NDM 型	f TTGCCAATATTATGCACCC	420bp	CTX-M-9 group	f GCAGATAATACGCAGGTG	393bp																																																												
	r ATGGCATAAGTCGCAATCC			r CGGCGTGGTGGTGTCTCT		KPC 型	f ATGTCACTGTATCGCCGTCT	893bp	MOX 型	f GCTGTCAAGGAGCACAGGAT	520bp	r TTTTCAGAGCCTTACTGCC	r CACATTGACATAGGTGTGGTGC	OXA-48 型	f TTGGTGGCATCGATTATCGG	744bp	CIT 型	f TGGCCAGAACTGACAGGCAAA	462bp	r GAGCACTTCTTTTGTGATGGC	r TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	VIM 型	f ATGTTCAAACCTTTGAGTAAG	801bp	DHA 型	f AACTTTACAGGTGTGCTGGGT	405bp	r CTACTCAACGACTGAGCG	r CCGTACGCATACTGGCTTTGC	KHM 型	f ATACGCCCATTTACGCCACA	465bp	ACC 型	f AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA	346bp	r GTCGCCAATTTCCGTGAC	r TTCGCCGCAATCATCCCTAGC	GES 型	f CTTCATTACGCACTATTAC	827bp	EBC 型	f TCGGTAAGCCGATGTTGCGG	302bp	r TAACTTGACCGACAGAGG	r CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT	IMP-all	f ATGAGCAAGTTATCTGTATTC	741bp	FOX 型	f AACATGGGGTATCAGGGAGATG	190bp	r TTAGTTGCTTGGTTTTGATG	r CAAAGCGCGTAACCGGATTGG												
KPC 型	f ATGTCACTGTATCGCCGTCT	893bp	MOX 型	f GCTGTCAAGGAGCACAGGAT	520bp																																																												
	r TTTTCAGAGCCTTACTGCC			r CACATTGACATAGGTGTGGTGC		OXA-48 型	f TTGGTGGCATCGATTATCGG	744bp	CIT 型	f TGGCCAGAACTGACAGGCAAA	462bp	r GAGCACTTCTTTTGTGATGGC	r TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	VIM 型	f ATGTTCAAACCTTTGAGTAAG	801bp	DHA 型	f AACTTTACAGGTGTGCTGGGT	405bp	r CTACTCAACGACTGAGCG	r CCGTACGCATACTGGCTTTGC	KHM 型	f ATACGCCCATTTACGCCACA	465bp	ACC 型	f AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA	346bp	r GTCGCCAATTTCCGTGAC	r TTCGCCGCAATCATCCCTAGC	GES 型	f CTTCATTACGCACTATTAC	827bp	EBC 型	f TCGGTAAGCCGATGTTGCGG	302bp	r TAACTTGACCGACAGAGG	r CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT	IMP-all	f ATGAGCAAGTTATCTGTATTC	741bp	FOX 型	f AACATGGGGTATCAGGGAGATG	190bp	r TTAGTTGCTTGGTTTTGATG	r CAAAGCGCGTAACCGGATTGG																				
OXA-48 型	f TTGGTGGCATCGATTATCGG	744bp	CIT 型	f TGGCCAGAACTGACAGGCAAA	462bp																																																												
	r GAGCACTTCTTTTGTGATGGC			r TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC		VIM 型	f ATGTTCAAACCTTTGAGTAAG	801bp	DHA 型	f AACTTTACAGGTGTGCTGGGT	405bp	r CTACTCAACGACTGAGCG	r CCGTACGCATACTGGCTTTGC	KHM 型	f ATACGCCCATTTACGCCACA	465bp	ACC 型	f AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA	346bp	r GTCGCCAATTTCCGTGAC	r TTCGCCGCAATCATCCCTAGC	GES 型	f CTTCATTACGCACTATTAC	827bp	EBC 型	f TCGGTAAGCCGATGTTGCGG	302bp	r TAACTTGACCGACAGAGG	r CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT	IMP-all	f ATGAGCAAGTTATCTGTATTC	741bp	FOX 型	f AACATGGGGTATCAGGGAGATG	190bp	r TTAGTTGCTTGGTTTTGATG	r CAAAGCGCGTAACCGGATTGG																												
VIM 型	f ATGTTCAAACCTTTGAGTAAG	801bp	DHA 型	f AACTTTACAGGTGTGCTGGGT	405bp																																																												
	r CTACTCAACGACTGAGCG			r CCGTACGCATACTGGCTTTGC		KHM 型	f ATACGCCCATTTACGCCACA	465bp	ACC 型	f AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA	346bp	r GTCGCCAATTTCCGTGAC	r TTCGCCGCAATCATCCCTAGC	GES 型	f CTTCATTACGCACTATTAC	827bp	EBC 型	f TCGGTAAGCCGATGTTGCGG	302bp	r TAACTTGACCGACAGAGG	r CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT	IMP-all	f ATGAGCAAGTTATCTGTATTC	741bp	FOX 型	f AACATGGGGTATCAGGGAGATG	190bp	r TTAGTTGCTTGGTTTTGATG	r CAAAGCGCGTAACCGGATTGG																																				
KHM 型	f ATACGCCCATTTACGCCACA	465bp	ACC 型	f AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA	346bp																																																												
	r GTCGCCAATTTCCGTGAC			r TTCGCCGCAATCATCCCTAGC		GES 型	f CTTCATTACGCACTATTAC	827bp	EBC 型	f TCGGTAAGCCGATGTTGCGG	302bp	r TAACTTGACCGACAGAGG	r CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT	IMP-all	f ATGAGCAAGTTATCTGTATTC	741bp	FOX 型	f AACATGGGGTATCAGGGAGATG	190bp	r TTAGTTGCTTGGTTTTGATG	r CAAAGCGCGTAACCGGATTGG																																												
GES 型	f CTTCATTACGCACTATTAC	827bp	EBC 型	f TCGGTAAGCCGATGTTGCGG	302bp																																																												
	r TAACTTGACCGACAGAGG			r CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT		IMP-all	f ATGAGCAAGTTATCTGTATTC	741bp	FOX 型	f AACATGGGGTATCAGGGAGATG	190bp	r TTAGTTGCTTGGTTTTGATG	r CAAAGCGCGTAACCGGATTGG																																																				
IMP-all	f ATGAGCAAGTTATCTGTATTC	741bp	FOX 型	f AACATGGGGTATCAGGGAGATG	190bp																																																												
	r TTAGTTGCTTGGTTTTGATG			r CAAAGCGCGTAACCGGATTGG																																																													

(a)カルバペネマーゼ遺伝子及びESBL 遺伝子検出用反応

条件		} 30cycles
94°C	2min	
94°C	1min	
55°C	1min	
72°C	1min30sec	
72°C	5min	
4°C	∞	

(b)AmpC 遺伝子検出用反応条件

条件		} 25cycles
94°C	3min	
94°C	30sec	
64°C	30sec	
72°C	1min	
72°C	5min	
4°C	∞	

図1 PCR 反応条件

果は認められなかった。*E. aerogenes* は、SMA 及び APB どちらの阻害効果も認められなかった。

カルバペネマーゼを除く β-ラクタマーゼ阻害剤であるスルバクタム(S/A), クラブラン酸(CVA), クロキサシリン(MCIPC)によるスクリーニング試験の結果, *E. coli*(No. 1, No. 3 及び No. 5)は CVA による阻害効果が認められた。*E. aerogenes* は MCIPC による阻害効果が認められた。

2 薬剤耐性遺伝子の検出

結果を表3に示す。カルバペネマーゼ遺伝子検

出試験の結果, *E. coli*(No. 1~3 及び No. 5)及び *E. cloacae* から, Class B β-ラクタマーゼに分類される IMP-1 型メタロ β-ラクタマーゼ(MBL)遺伝子が検出された。

ESBL 遺伝子検出試験の結果, *E. coli*(No. 1~3 及び 5)及び *E. cloacae* から, CTX-M-2 group の遺伝子が検出された。また, *E. coli*(No. 1)からは更に CTX-M-9 group の遺伝子が検出された。

AmpC 遺伝子検出試験の結果,*E. cloacae*から EBC 型遺伝子が検出された。

一方で *E. aerogenes* は,いずれの β-ラクタマーゼ遺伝子も検出されなかった。

3 塩基配列解析

IMP-1 型 MBL 遺伝子を検出した 2 菌種 5 株について塩基配列を解析した結果, 5 株の遺伝子型は全て IMP-6 MBL 遺伝子であった(表3)。

考 察

2017 年度に検査した 6 株のうち 5 株は, IMP-1 型に属するカルバペネマーゼ遺伝子を保有する CRE であった。この 5 株について塩基配列を解析した結果, 5 株の IMP-1 型 MBL 遺伝子は全て IMP-6 MBL 遺伝子であった。IMP 型カルバペネマーゼは国内で広く検出される酵素とされるが²⁾, 地域によって検出される遺伝子型が異なる傾向がある。西日本を中心に IMP-1 型に属する IMP-6 MBL 遺伝子が流行伝播していることが報告されており³⁾, 当所における検査結果はこの検出傾向と一致していた。一方 *E. aerogenes* は, 検査を実施したいずれの β-ラクタマーゼ遺伝子も検出しなかった。このことから, 当該菌株のカルバペネム耐性機序としては, 染色体性 AmpC β-ラクタマーゼの過剰生産及び外膜タンパクの変異や欠損による薬剤透過性

表3 阻害剤によるスクリーニング試験及び遺伝子検出試験結果

No.		薬剤ディスク			阻 害 剤					検 出 遺 伝 子
		MEPM	IPM	CMZ	SMA	APB	S/A	CVA	MCIPC	
1	<i>E. coli</i>	R	S	R	+	-	-	+	-	IMP-6, CTX-M-2group, CTX-M-9group
2	<i>E. coli</i>	R	R	R	+	-	-	-	-	IMP-6, CTX-M-2group,
3	<i>E. coli</i>	R	R	R	+	-	-	+	-	IMP-6, CTX-M-2group
4	<i>E. cloacae</i>	R	R	R	+	-	-	-	-	IMP-6, CTX-M-2group, EBC 型
5	<i>E. coli</i>	R	S	R	+	-	-	+	-	IMP-6, CTX-M-2group
6	<i>E. aerogenes</i>	S	R	R	-	-	-	-	+	検出せず

CMZ : セフメタゾール

R : 耐性, S : 感性(BD センシ・ディスク™添付文書)

+ : 阻害あり, - : 阻害なし

の低下が関与していると考えられる⁴⁾。

IMP-6 MBL 遺伝子は IMP 型カルバペネマーゼに属する遺伝子の中でも特殊な薬剤耐性パターンを示し、メロペネム (MEPM) に耐性を示すがイミペネム (IPM) に対しては感受性を示すことから「ステルス型」と呼ばれ警戒されている³⁾。ステルス型は、臨床において IPM のみで感受性試験を行った場合に CRE として把握することができず、効果のない抗菌薬を投与してしまう可能性があるため問題となっている。今回 IMP-6 MBL 遺伝子を検出した 5 株はいずれも、MEPM と比較し IPM に対して低度耐性を示しており、IPM 単剤でのスクリーニングではカルバペネム耐性と把握することができない IPM 感受性菌も含まれていた。

IMP-6 MBL 遺伝子をはじめとするカルバペネマーゼ遺伝子は、伝達性プラスミド上に存在し菌種間で媒介されるため、カルバペネム感受性菌がプラスミドを獲得するとカルバペネムへ耐性化することがある。医療機関において複数菌種に起因する院内感染が発生した場合は、その原因及び感染経路の解明が困難となるため、CRE の早期発見と感染拡大防止対策が重要である。また近年では、IMP-6 MBL 遺伝子を原因とする複数菌種の CRE が関与する院内感染も報告されている⁵⁾。今回 5 株から IMP-6 MBL 遺伝子を検出したが、各 CRE 菌株が分離された医療機関は異なるため院内感染事例とは考えにくい。しかし今回の検査により、本市の医療機関でも IMP-6 MBL 遺伝子を持つ CRE が分離されていることが明らかとなったため、今後は分離状況等について関係機関と適切に情報共有を

行い、院内感染が疑われる届出がなされた場合は、関係機関と協力し、より詳細な検査を行う必要があると考える。

謝 辞

調査を担当された健康推進課及び各区保健センターの皆様、菌株の分与にご協力いただきました市内医療機関の皆様に深謝いたします。

文 献

- 1) 安部朋子 他: プラスミド水平伝達が関与した院内感染事例, 病原微生物検出情報, 35(12), 289~290(2014)
- 2) 荒川宜親: 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(2015)
- 3) 鹿山鎮男 他: 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」, THE CHEMICAL TIMES, 239(1), 3~9(2016)
- 4) 荒川宜親: 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, 病原微生物検出情報, 35(12), 283~284(2014)
- 5) 山岸拓也 他: 大阪市内大規模病院におけるカルバペネム耐性腸内細菌科細菌の長期間にわたる院内伝播, 病原微生物検出情報, 35(12), 290~291(2014)