

2015年から2021年までに山梨県内でヒトから分離されたカルバペネム耐性腸内細菌科細菌について

柳本恵太 山上隆也

Characterization of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae from Humans in Yamanashi, 2015-2021

Keita YANAGIMOTO, Takaya YAMAGAMI

キーワード：カルバペネム耐性腸内細菌科細菌（CRE）、薬剤耐性遺伝子

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌（Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae : CRE）感染症は、2014年9月より感染症法5類全数把握対象疾患に指定されている。カルバペネム系抗菌薬は細菌感染症に用いられる抗菌薬の中でも非常に重要であり、CRE感染症の蔓延は公衆衛生上の脅威と考えられている¹⁾。CREはβ-ラクタマーゼの一種であるカルバペネマーゼを産生するCPEと、その他のβ-ラクタマーゼを産生し、外膜蛋白の変異等の他の機序との組み合わせにより耐性化しているものに分けられている²⁾。前者のCPEが産生するカルバペネマーゼにはIMP型、KPC型、NDM型、VIM型、GES型、OXA-48型などがあり、これらの遺伝子は細菌間で水平伝播することから³⁾注視していく必要がある。後者が産生するβ-ラクタマーゼには基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ（ESBL）とAmpC型β-ラクタマーゼ（AmpC）が含まれる^{2,3)}。CREの耐性機序について現在の状況を確認することは、今後生じる耐性遺伝子の変化を把握していく上で重要である。

そこで本研究では、山梨県内のCRE感染症起因菌の状況を調査するため、2015年から2021年までにヒトから分離されたCREの菌種、保有している耐性遺伝子について調査した。

調査方法

1 供試菌株

2015年から2021年にかけて、県内の医療機関等で分離され、保健所を通じて菌株の提供があった31株のヒト由来CREを対象とした。

2 菌種同定

供試菌株の菌種同定にはApi20Eを用いた。

3 β-ラクタマーゼ表現型

β-ラクタマーゼの表現型は、病原体検出マニュアル⁴⁾

による阻害剤を用いた方法により確認した。

4 β-ラクタマーゼ遺伝子検出

β-ラクタマーゼ遺伝子の検出はマルチプレックスPCR法で行い、ESBLにはLeらの方法⁵⁾を、カルバペネマーゼ遺伝子の検出はWatahikiらの方法⁶⁾を、AmpC遺伝子の検出はPérez-Pérezらの方法⁷⁾を用いて行った。

5 カルバペネマーゼ活性

カルバペネマーゼの産生はCarbaNPテスト⁸⁾を用いて確認した。

結果

1 供試菌株の菌種

CRE 31株は5菌種に分類された（表1）。最も多く分離されたのは*Enterobacter cloacae*で16株（52%）を占め、*Klebsiella aerogenes*（旧*Enterobacter aerogenes*）が9株（29%）、*Klebsiella pneumoniae*が3株（10%）と続いた。他には*Escherichia coli*が2株、*Citrobacter freundii*が1株分離された。集団感染が疑われる事例由来株はなかった。

表1 供試されたCREの菌種

菌種	菌株数	割合 (%)
<i>E. cloacae</i>	16	52
<i>K. aerogenes</i>	9	29
<i>K. pneumoniae</i>	3	10
<i>E. coli</i>	2	6
<i>C. freundii</i>	1	3

2 年次別月別分離株数

年間の分離株数は2016年が0株であったことを除けば2~10株で平均分離株数は4株だった(図1)。月別では9月と12月が最多でそれぞれ7株であり、それ以外は1~3株であった(図2)。

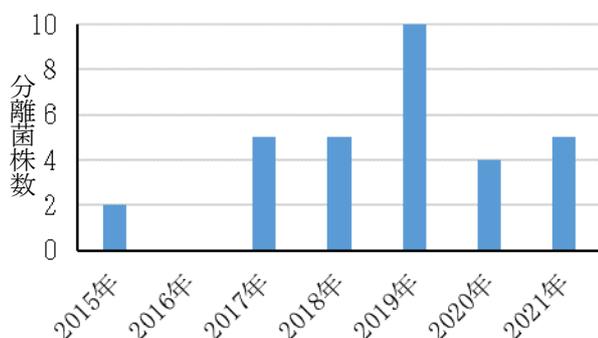


図1 年次別分離状況

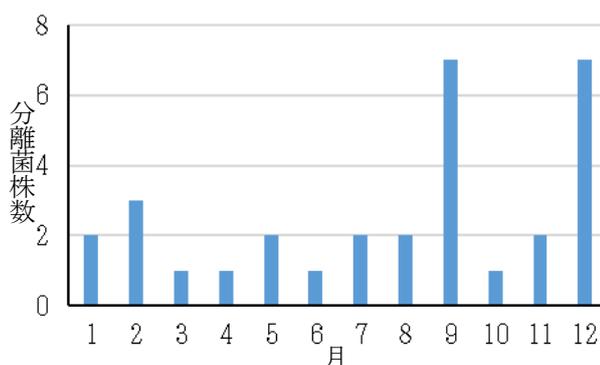


図2 月別分離状況

3 β-ラクタマーゼ検出状況

31株の分離株のうち、β-ラクタマーゼの表現型およびマルチプレックスPCR法でカルバペネマーゼを産生していると判定されたのは2株(6%)で、NDM型とKPC型と判定された。ESBL産生株は3株で、全てCTX-M-1 groupと判定された。AmpCは表現型で陽性と判定されたのは22株であったが、AmpC遺伝子が検出されたのは7株で、全てEBC型であった。菌種別では*K. pneumoniae* 3株がNDM型とCTX-M-1 groupの産生株、*E. coli* 2株がKPC型とCTX-M-1 groupの産生株、*E. cloacae* 7株がEBC型の産生株であった(表2)。なお、CarbaNPテストの結果、NDM型とKPC型のカルバペネマーゼ産生株は陽性で、他は陰性と判定された。

表2 菌種別β-ラクタマーゼ産生状況

菌種	遺伝子型	株数
<i>K. pneumoniae</i>	NDM型	1
<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-1 group	2
<i>E. coli</i>	KPC型	1
<i>E. coli</i>	CTX-M-1 group	1
<i>E. cloacae</i>	EBC型	7

考 察

本研究では、2015年から2021年までに山梨県内のヒトから分離されたCREの菌種や、β-ラクタマーゼの検出状況について調査を行った。分離菌株数は年間4~5株程度であり、2020年の国内の患者報告数である1,956例⁹⁾から算出した県内比は全体の0.25%程度となる。これは全国に対する山梨県の人口比0.65%程度よりも低い状況であった。

菌種別では*E. cloacae*、*K. aerogenes*、*K. pneumoniae*の順で分離株数が多く、これら3菌種で90%を超えていた。国内の状況では、*K. aerogenes*、*E. cloacae*、*K. pneumoniae*の順に多いことが報告されており⁹⁾、主な菌種は同様であるが、山梨県内では*E. cloacae*の分離株数が多い傾向があった。

CPEは2株(6%)が確認され、それぞれKPC型とNDM型カルバペネマーゼを産生する*E. coli*と*K. pneumoniae*であった。KPC型は米国、中国などで、NDM型はインドなどで多く検出されており¹⁰⁾、今回のCPE 2株は渡航者由来であることが疑われた。また、山梨県内のCREに占めるCPEの割合は、国内のカルバペネマーゼ遺伝子陽性率16~18%⁹⁾と比較すると1/3程度であり、低い水準であった。国内で多く検出されるIMP型が今回の調査では確認できなかったことが要因と考えられた。

その他のβ-ラクタマーゼでは、表現型でAmpC陽性(3-アミノフェニルボロン酸による阻害陽性)と判定されながら遺伝子は検出できない株が約半数の15株確認された。今回検出対象以外のAmpCを保有している可能性や、3-アミノフェニルボロン酸はAmpC以外のβ-ラクタマーゼへの阻害が確認されている¹¹⁾ため、これらのβ-ラクタマーゼを保有している可能性が考えられた。

以上の結果から、2021年までの山梨県内ではCRE、CPEは蔓延しておらず、国内外と比較し、良好な状況にあると考えられた。最近の動向として、薬剤耐性を監視すべき菌種として腸内細菌科細菌ではなく、腸内細菌目細菌と上位レベルへの変更が提唱されている²⁾。今後の研究の範囲は、腸内細菌目細菌を意識する必要があると考えられる。

まとめ

1. 山梨県内のヒトから分離された CRE の菌種は *E. cloacae*, *K. aerogenes*, *K. pneumoniae* の順で多かった。
2. CPE は 2 株 (NDM 型、KPC 型カルバペネマーゼ) が分離されたが、IMP 型は確認されなかった。
3. 2021 年までの山梨県内の CRE、CPE の検出状況は比較的少なく、良好な状況であると考えられた。

謝 辞

貴重な菌株を提供いただいた医療機関・検査機関の関係者の皆様に深謝いたします。

参考文献

- 1) K. Oka et al.: Clinical Characteristics and Treatment outcomes of Carbapenem-resistant Enterobacterales infections in Japan, *J. Glob. Antimicrob. Resist.*, **29**, 247-252 (2022)
- 2) 原田壮平: 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**, 229-238 (2021)
- 3) Logan LK, Weinstein RA: The Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: The Impact and Evolution of a Global Menace, *J. Infect. Dis.*, **215**(S1), S28-S36 (2017)
- 4) 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, 30-50, (2020)
- 5) QP Le et al.: Characteristics of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Retail Meats and Shrimp at a Local Market in Vietnam, *Foodborne Pathog. Dis.*, **12**, 719-725, (2015)
- 6) Watahiki M et al.: Single-Tube Multiplex Polymerase Chain Reaction for the Detection of Genes Encoding Enterobacteriaceae Carbapenemase, *Jpn. J. Infect. Dis.*, **73**, 166-172, (2020)
- 7) FJ Pérez-Pérez et al.: Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR, *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 2153-2162, (2002)
- 8) Nordmann P, Poirel L, Dortet L: Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, *Emerg. Infect. Dis.*, **18**, 1503-1507, (2012)
- 9) 国立感染症研究所: カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: CR-E) 病原体サーベイランス, 2020 年, *IASR*, **43**, 215-216, (2022)
- 10) Hansen GT: Continuous Evolution: Perspective on the Epidemiology of Carbapenemase Resistance Among Enterobacterales and Other Gram-Negative Bacteria, *Infect. Dis. Ther.* **10**, 75-92, (2021)
- 11) Pasteran F et al.: Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of *Enterobacteriaceae*, *J. Clin. Microbiol.*, **47**, 1631-1639, (2009)