

資料

薬剤耐性菌検索体制の整備に関する研究（第Ⅱ報）

Study about Maintenance of Medicine Resistant Bacteria Search System（Ⅱ）

中山 浩一郎¹ 山本 真実 岩切 忠文
濱田 結花 重久 朋史² 御供田 睦代³
川村 英樹⁴ 藺牟田 直子⁵ 西 順一郎⁵

1 はじめに

2016年4月5日に厚生労働省関係閣僚会議において、我が国として初めての薬剤耐性対策アクションプラン¹⁾が決定された。

抗菌薬等の不適切な使用を背景として、薬剤耐性菌が増加する中、治療の長期化や院内感染の原因にもなるため、大きな問題となっている。高齢化社会に伴い薬剤耐性菌による院内感染事例なども見受けられ、医療現場でも対策について取り組まれている。また、グローバル社会となり、海外からの輸入感染例も社会的に問題となっている。

2017年3月28日付け厚生労働省通知「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」により、CREを始めとした薬剤耐性菌について地方衛生研究所での詳細な解析が求められることとなった。

当センターでも感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律により、届出のあったCRE等の薬剤耐性菌について菌株の収集を行い、検査を実施し、県内における薬剤耐性菌遺伝子の検査体制の整備と調査を行っている。

本研究では、薬剤耐性菌の検査体制の整備を図り、県内における薬剤耐性菌の状況を把握するため、医療機関で検出された薬剤耐性の腸内細菌科細菌に対して薬剤耐性検査及び遺伝子型別検査を実施した。

2 調査対象

2017年1月～2018年12月に届出のあった薬剤耐性菌菌株39件の内訳は、CRE37件と多剤耐性アシネトバクター（MDRA）2件であった。検体別では喀痰検体由来株13件、尿検体由来株13件、血液検体由来株3件の順であった。

医療機関より研究対象として収集した菌株は患者由来株227件、環境由来株24件の計251件であった。内訳としてCRE17件、基質拡張型β-ラクタマーゼ（ESBL）産生菌165件、AmpC型β-ラクタマーゼ産生菌1件、β-ラクタマーゼ産生アシネトバクター属菌54件、β-ラクタマーゼ産生緑膿菌10件、その他の菌4件を対象とした。検体別では尿検体由来株77件、喀痰検体由来株53件、血液検体由来株24件の順であった。

3 検査方法

3.1 阻害剤を用いたβ-ラクタマーゼ産生性試験

国立感染症研究所病原体検出マニュアル「薬剤耐性菌」²⁾（以下「病原体検出マニュアル」という。）に準じて実施した。β-ラクタマーゼの阻害剤であるクラブラン酸、スルバクタム/アンピシリン、メルカプト酢酸ナトリウム、ボロン酸、クロキサシリン含有ディスクを用い、菌株のβ-ラクタマーゼの産生性を確認した。

1 徳之島保健所
2 県立北薩病院
3 退職（2019年3月）
4 鹿児島大学病院
5 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科

〒891-7101 大島郡徳之島町亀津4943-2
〒895-2526 伊佐市大口宮人502-4
〒890-0075 鹿児島市桜ヶ丘8-35-1
〒890-0075 鹿児島市桜ヶ丘8-35-1

3. 2 PCR法によるβ-ラクタマーゼ遺伝子の検出

ESBL遺伝子6種 (TEM型, SHV型, CTX-M-1group, CTX-M-9group, CTX-M-2group, CTX-M-8group), カルバペネマーゼ遺伝子5種 (IMP-1型, VIM型, KPC型, NDM型, OXA-48型), AmpC型β-ラクタマーゼ遺伝子6種 (MOX型, CIT型, DHA型, ACC型, EBC型, FOX型) の計17遺伝子について検索した。

3. 2. 1 ESBL遺伝子とカルバペネマーゼ遺伝子の検出

病原体検出マニュアルに準じた関東化学のシカジーニアス®ESBL遺伝子型検出キット及びシカジーニアス®カルバペネマーゼ遺伝子型検出キットを用いてPCRを実施した。

3. 2. 2 AmpC型β-ラクタマーゼ遺伝子の検出

平成28年薬剤耐性菌研修会資料³⁾に基づいて12種のプライマーを用いてマルチプレックスPCRを実施した。

3. 3 カルバペネマーゼ産生試験

病原体検出マニュアルに準じCarba NP testによりカルバペネマーゼ産生の有無を調べた。

3. 4 ダイレクトシーケンス解析

病原体検出マニュアルに準じカルバペネマーゼ遺伝子IMP型の型別をダイレクトシーケンス解析にて確認した。

4 結果

届出のあった菌株及び医療機関より収集した菌株のカルバペネマーゼ遺伝子検査結果を表1に示す。

届出のあった菌株39件中5件からIMP型のカルバペネマーゼ遺伝子が検出され、さらにダイレクトシーケンス解析により、IMP-1であることを確認した。菌種は5菌種で*Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter hormachei*, *Serratia*属がそれぞれ1件で、*Acinetobacter*属が2件であった。この5件については全て阻害剤を添加したディスク法とCarba NP testによりカルバペネマーゼ産生性であることを確認した。また、25件からESBLやAmpC遺伝子等のβ-ラクタマーゼ遺伝子も検出した。

医療機関より研究対象として収集した菌株251件中47件からIMP型カルバペネマーゼ遺伝子を検出し、ダイレ

クトシーケンス解析によりIMP-1であることを確認した。菌種別では、腸内細菌科細菌が9菌種11件、*Acinetobacter*属菌が3菌種32件、緑膿菌が2菌種4件であった。この47件については全て阻害剤を添加したディスク法とCarba NP testによりカルバペネマーゼ産生があることを確認した。また、204件からESBLやAmpC遺伝子等のβ-ラクタマーゼ遺伝子、環境中の*Acinetobacter*属菌よりNDM遺伝子も1件検出された。

5 考察とまとめ

CREにはカルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌 (CPE) と非産生菌 (non-CPE) があり、院内感染で問題となるのはCPEである。届出のあったCRE感染症患者由来の菌株37件のうち、CPEは3件 (8%) であった。届出のあったMDRAの2件についてカルバペネマーゼ産生菌は100%であった。(図1)

医療機関より研究対象として収集した菌株のうち、*Acinetobacter baumannii* 48件中カルバペネマーゼ産生菌が28件 (58%), *Pseudomonas aeruginosa* 9件中カルバペネマーゼ産生菌が3件 (33%) であった。腸内細菌科細菌は187件で、*Klebsiella pneumoniae*等のCPEは10件 (5%) であった。(図2)

届出のあった患者由来の菌株及び医療機関より研究対象として収集した菌株から検出されたカルバペネマーゼ遺伝子は、ダイレクトシーケンス解析の結果全てIMP-1であり、これは日本で多く報告される遺伝子型に該当する。

カルバペネマーゼ遺伝子はプラスミド上に存在し、腸内細菌科細菌であればプラスミドを介して異なる菌種間でも水平伝達が起こりうる⁴⁾。そのため、遺伝子の型とその遺伝子が存在するプラスミドのタイプを調べることは疫学調査の上で重要である。

今回、阻害剤を用いたβ-ラクタマーゼ産生性試験、PCR法によるβ-ラクタマーゼ遺伝子の検出等については、検査体制が整備できた。

PFGEの検査については、一部の細菌でしか実施しなかったため、今後他の菌種についても検出法を検討する。

今後も県内における薬剤耐性遺伝子の動向を把握するため、継続して菌株の収集と解析を行い、データを蓄積するとともに、なお一層精度の高い検査体制を整備していく必要がある。

表1 届出のあった菌株および医療機関より収集した菌株のカルバペネマーゼ遺伝子検査結果

対象	菌種	件数	カルバペネマーゼ遺伝子型	
届出 (39件)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	IMP-1(1)	
	<i>Enterobacter hormachei</i>	1	IMP-1(1)	
	<i>Serratia sp.</i>	3	IMP-1(1)	
	<i>Escherichia coli</i> 他	27	検出せず	
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	1	IMP-1(1)	同時にTEM型も検出あり
	<i>Acinetobacter sp.</i>	1	IMP-1(1)	同時にCTX-M-9 groupも検出あり
医療機関 (251件)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	29	IMP-1(2)	同時にCTX-M-2 group, SHV型も検出あり
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	6	IMP-1(2)	同時にCTX-M-9 groupも検出あり
	<i>Enterobacter cloacae</i>	5	IMP-1(1)	
	<i>Enterobacter hormachei</i>	4	IMP-1(1)	
	<i>Enterobacter intermedium</i>	2	IMP-1(1)	
	<i>Escherichia coli</i>	109	IMP-1(1)	
	<i>Citrobacter flurendi</i>	6	IMP-1(1)	同時にTEM型も検出あり
	<i>Leclecia adecarboxylata</i>	1	IMP-1(1)	
	<i>Providencia rettgeri</i>	1	IMP-1(1)	
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	24	検出せず	
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	48	IMP-1(28)	同時にCTX-M-1 group, TEM型も検出あり
	<i>Acinetobacter ursingii</i>	3	IMP-1(3)	同時にTEM型, CIT型等も検出あり
	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	2	IMP-1(1)	同時にTEM型も検出あり
			NDM(1)	環境中からの検出
		<i>Acinetobacter sp.</i>	1	検出せず
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9	IMP-1(3)	同時にTEM型も検出あり
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1	IMP-1(1)	

※ ()は, 検出した菌株数

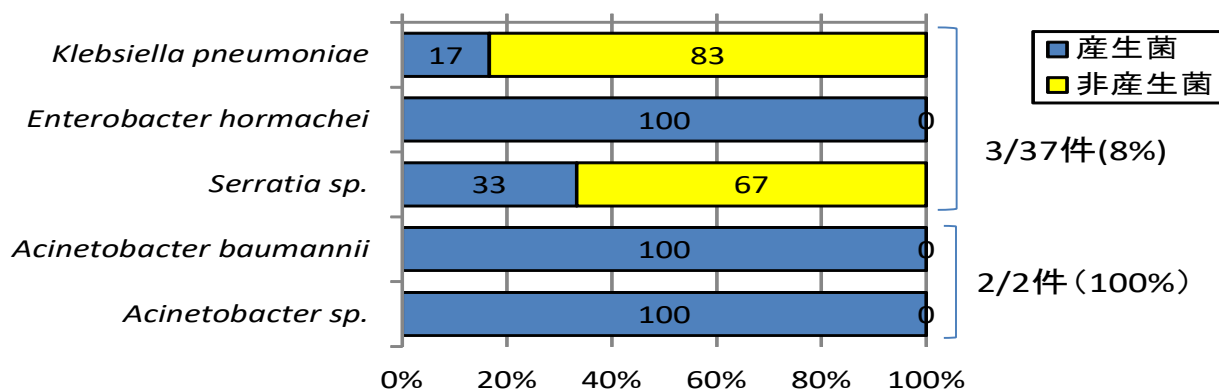


図1 届出のあった患者菌株のカルバペネマーゼ産生菌と非産生菌の割合

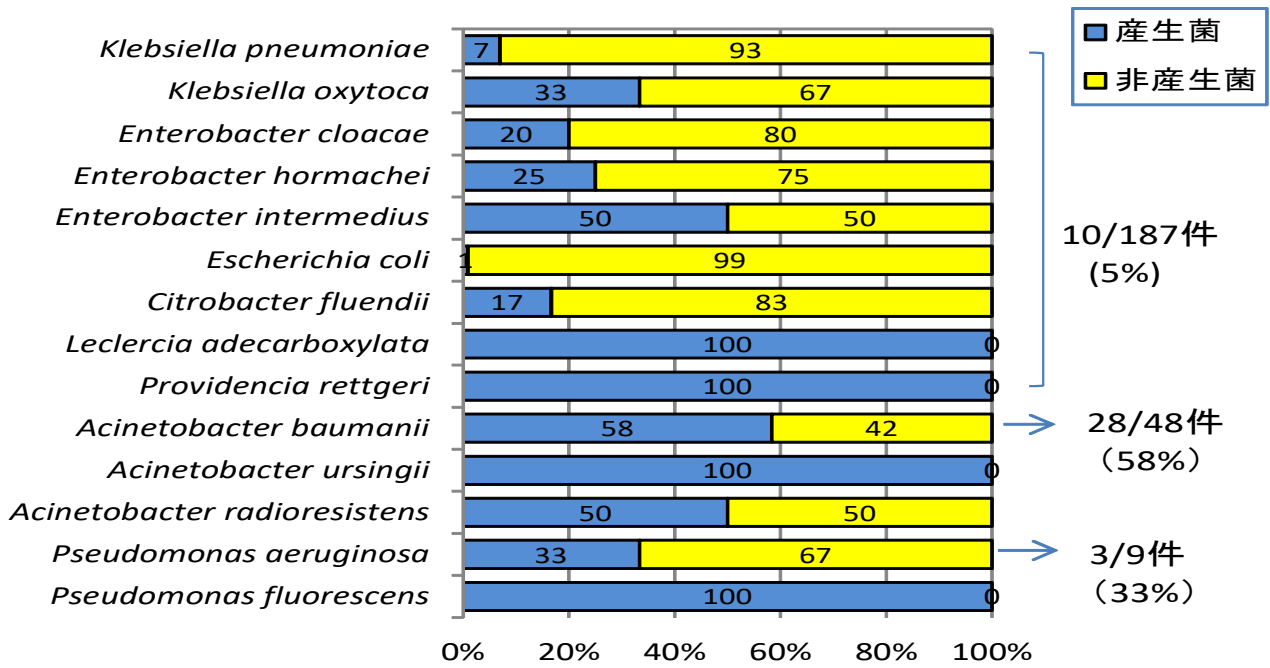


図2 医療機関より収集した菌株のカルバペネマーゼ産生菌と非産生菌の割合

参考文献

- 1) 厚生労働省；薬剤耐性（AMR）について,
<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000120172.html> (2019/3/9アクセス)
- 2) 国立感染症研究所；病原体検出マニュアル「薬剤耐性菌」(2016年12月改訂版)
- 3) 国立感染症研究所細菌第二部；平成28年薬剤耐性菌研修会資料
- 4) 国立感染症研究所感染症情報センター；微生物検出情報, 35 (12), 281～291 (2014)