

資料

薬剤耐性菌検索体制の整備に関する研究（第Ⅲ報）

Study about Maintenance of Antimicrobial Resistant Bacteria
Search System (Ⅲ)

| | | |
|----------------------|------------------------|----------------------|
| 上 村 晃 秀 | 眞 鍋 佳 月 | 山 本 真 実 |
| 岩 切 忠 文 ¹ | 濱 田 結 花 | 本 田 俊 郎 |
| 川 村 英 樹 ² | 藺 牟 田 直 子 ³ | 大 岡 唯 祐 ³ |
| 西 順 一 郎 ³ | | |

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、我が国で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。

薬剤耐性菌は治療の長期化や院内感染の原因となっており、医療現場でも対策に取り組んでいるものの、院内感染の事例等は未だ見受けられる。また、社会のグローバル化に伴い海外から持ち込まれる事例も増え、輸入感染症としての側面も問題視されるようになっている。

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うとともに遺伝子型別検査を実施している。

2017～2019年度における研究では、薬剤耐性菌の検索体制の整備を図り、県内における薬剤耐性菌の状況を把握するため、届出の菌株と協力医療機関で検出された薬剤耐性菌の菌株について薬剤耐性検査及び遺伝子型別検査を実施した。今回、3年間に得られた結果について報告する。

2 調査対象

2017年1月～2020年3月に届出のあった薬剤耐性菌菌株66件の内訳は、CRE64件と多剤耐性アシネトバクター（MDRA）2件であった。検体別の多い順に、喀痰検体由来株25件、尿検体由来株22件、血液検体由来株8件であった。

医療機関から研究対象として収集した菌株は患者由来株368件、環境由来株37件の計405件であった。内訳としてCRE24件、基質拡張型β-ラクタマーゼ（ESBL）産生菌275件、AmpC型β-ラクタマーゼ産生菌3件、β-ラクタマーゼ産生 *Acinetobacter* 属菌65件、β-ラクタマーゼ産生 *Pseudomonas* 属菌34件、その他の菌4件を対象とした。検体別の多い順に、尿検体由来株152件、喀痰検体由来株79件、血液検体由来株40件であった。

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

国立感染症研究所の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 退職（2020年3月）

2 鹿児島大学病院

3 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科

〒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-2group，CTX-M-8group，CTX-M-9group），カルバペネマーゼ遺伝子7種（IMP-1型，VIM型，GES型，KPC型，NDM型，OXA-48型，IMP-6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19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(株)製のシカジーニアスESBL遺伝子型検出キット2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2を用いてPCR検査を実施した。

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検査を実施した。

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-1型の型別をダイレクトシーケンス解析にて確認した。

3. 5 タイピング解析

病原体検出マニュアルに準じパルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE）を用いて同一菌株の確認をした。

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66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、ダイレクトシーケンス解析によりカルバペネマーゼ遺伝子IMP-1を確認した。また、44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405件中59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12件、*Acinetobacter*属菌が4菌種40件、*Pseudomonas*属菌が2菌種7件であった。この59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であることを確認した。また、333件からESBLやAmpC遺伝子等のβ-ラクタマーゼ遺伝子を検出した。

IMP-1のカルバペネマーゼ遺伝子以外に*Acinetobacter*属菌よりNDM遺伝子2件、*Pseudomonas aeruginosa*からGES型遺伝子1件を検出した。

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64件のうち、CPEは3件（5%）であった。届出のあったMDRAの2件についてはカルバペネマーゼ産生菌であった（図1）。

医療機関から研究対象として収集した菌株のうち、腸内細菌科細菌は306件で、*Klebsiella pneumoniae*等のCPEは12件（4%）であった。*Acinetobacter*属菌は65件で、その中の*Acinetobacter baumannii*が49件中カルバペネマーゼ産生菌は29件（59%）であった。また、*Pseudomonas*属菌は34件で、その中の*Pseudomonas aeruginosa*が29件中カルバペネマーゼ産生菌は7件（24%）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ている遺伝子型に該当した。

以上から本研究により阻害剤を用いたβ-ラクタマーゼ産生性試験（ディスク法）、PCR法によるβ-ラクタマーゼ遺伝子の検出等について検査体制の整備ができた。

タイピング解析検査のPFGEについては、*Acinetobacter baumannii*を対象に検討した結果、同一のタイプが3種類確認された。

また、CREにおいて、β-ラクタマーゼ遺伝子がプラスミドを介して腸内細菌科の他の異なる菌種間でも水平伝達が起こる⁴⁾ことが知られており、プラスミド解析の検討を行う必要がある。

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菌株の遺伝子解析を行い、データの蓄積と得た情報

を医療機関等に提供し、院内感染対策の一助となるよう努める。

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 (66件) | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 9 | IMP-1 (1) | 同時にSHV型検出 |
| | <i>Enterobacter hormachei</i> | 2 | IMP-1 (1) | 同時にCTX-M-1 group検出 |
| | <i>Serratia sp.</i> | 4 | IMP-1 (1) | |
| | <i>Escherichia coli</i> 他 | 49 | 検出せず | |
| | <i>Acinetobacter baumannii</i> | 1 | IMP-1 (1) | 同時にTEM型検出 |
| | <i>Acinetobacter sp.</i> | 1 | IMP-1 (1) | 同時にCTX-M-1 group検出 |
| 医 療 機 関 (405件) | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 43 | IMP-1 (2) | 同時にCTX-M-2 group, SHV型検出 |
| | <i>Klebsiella oxytoca</i> | 7 | IMP-1 (2) | 同時にCTX-M-9 group検出 |
| | <i>Enterobacter cloacae</i> | 8 | IMP-1 (2) | |
| | <i>Enterobacter hormachei</i> | 5 | IMP-1 (1) | |
| | <i>Enterobacter intermedium</i> | 2 | IMP-1 (1) | |
| | <i>Escherichia coli</i> | 185 | IMP-1 (1) | |
| | <i>Citrobacter flurendi</i> | 6 | IMP-1 (1) | 同時にTEM型検出 |
| | <i>Leclecia adecarboxylata</i> | 1 | IMP-1 (1) | |
| | <i>Providencia rettgeri</i> | 1 | IMP-1 (1) | |
| | <i>Enterobacter aerogenes</i> 他 | 48 | 検出せず | |
| | <i>Acinetobacter baumannii</i> | 49 | IMP-1 (28) | 同時にCTX-M-1 group, TEM型等検出 |
| | | | NDM(1) | |
| | <i>Acinetobacter ursingii</i> | 7 | IMP-1 (7) | 同時にTEM型, CIT型等検出 |
| | <i>Acinetobacter radioresistens</i> | 2 | IMP-1 (1) | 同時にTEM型検出 |
| | | | NDM(1) | 環境中からの検出 |
| | <i>Acinetobacter sp.</i> | 7 | IMP-1 (4) | 同時にTEM型検出 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 29 | IMP-1 (6) | 同時にCTX-M-1 group, TEM型も検出 | |
| | | GES (1) | | |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 1 | IMP-1 (1) | | |
| <i>Pseudomonas alcaligenes</i> 他 | 4 | 検出せず | | |

※ ()は、検出した菌株数

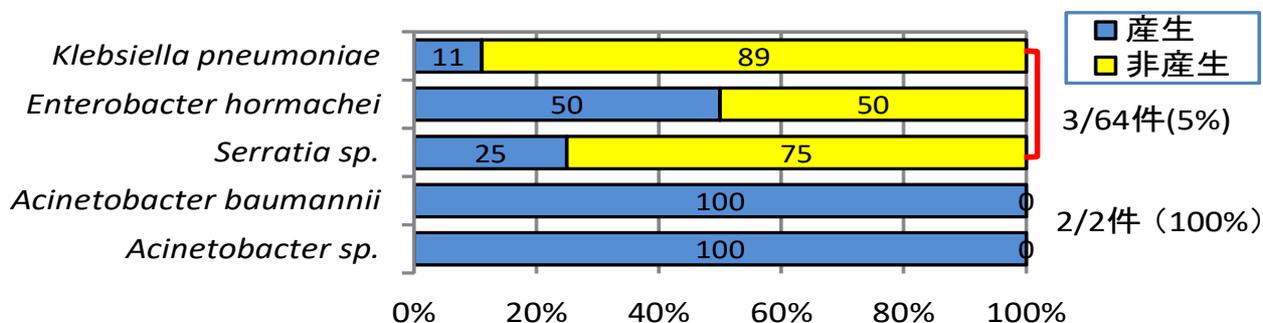


図1 届出のあった患者菌株のカルバペネマーゼ産生菌と非産生菌の割合

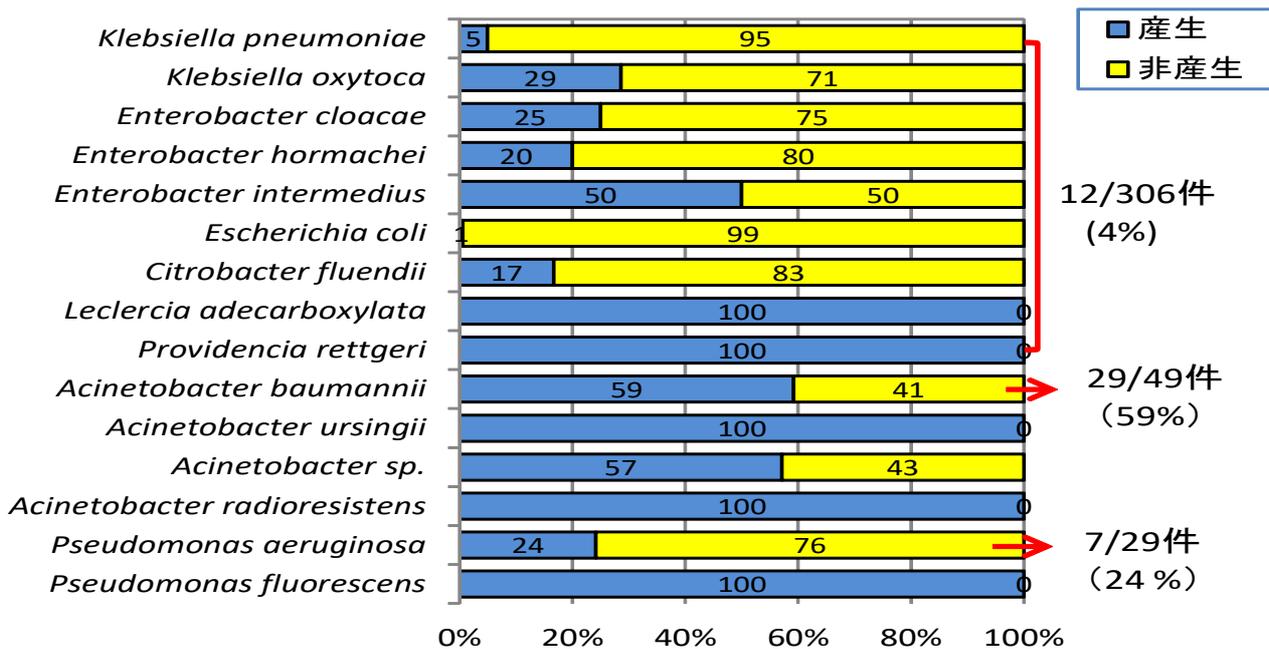


図2 医療機関から収集した菌株のカルバペネマーゼ産生菌と非産生菌の割合

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>（2020/6/29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；令和元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）