

資料

薬剤耐性菌検索体制の整備に関する研究

Study about Maintenance of Medicine Resistant Bacteria Search System

中山 浩一郎	穂積 和佳 ¹	山本 真実
岩元 由佳 ²	浦元 千織 ³	御供田 睦代
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アクションプランが決定された。

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け出のあった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3月に届出のあったCRE感染症患者由来のCRE15件と、医療機関より研究対象として収集したCRE9件、基質拡張型βラクタマーゼ（ESBL）産生菌98件、AmpC型βラクタマーゼ産生菌1件の計123件を対象とした。

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」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（ACV）、スルバクタム（S/A）、メルカプト酢酸ナトリウム（SMA）、ボロン酸、クロキサシリン含有ディスクを用いて、検体のβラクタマーゼの産生性を確認した（図1）。

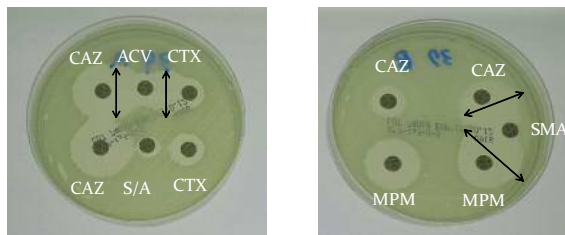
3.2 PCR法によるβラクタマーゼ遺伝子の検出

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。

病原体検出マニュアルに準じたPCR法により確認を行った。

1 県立大島病院
2 熊毛支庁屋久島事務所
3 退職
4 鹿児島大学病院
5 鹿児島大学大学院歯学総合研究科

〒894-0015 奄美市名瀬真名津町18-1
〒891-4311 熊毛郡屋久島町安房650
〒890-0075 鹿児島市桜ヶ丘8-35-1
〒890-0075 鹿児島市桜ヶ丘8-35-1



Class A βラクタマーゼ Class B βラクタマーゼ

Class A：阻害剤ACV, S/Aにより，抗菌薬CTX（セフトキシム）とCAZ（セフトジジム）が阻止円を拡張する場合を陽性

Class B：阻害剤SMAにより，抗菌薬CAZ, MPM（メロペネム）の発育阻止帯の形成を認めた場合を陽性

図1 ディスク拡散法による判定

3. 2. 1 ESBL遺伝子とカルバペネマーゼ遺伝子検出

国立感染症研究所の病原体検出マニュアルに準じたPCR法の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

12種のプライマーを用いたマルチプレックスPCRを実施した。

3. 3 カルバペネマーゼ産生試験

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

ダイレクトシーケンス解析によるカルバペネマーゼ遺伝子を確認した。

4 結果

届出のあったCREと届出対象外のCRE計24株の検査結果を表1に示す。菌種は8種で、*Enterobacter aerogenes* 6株、*Enterobacter cloacae* 5株、*Klebsiella pneumoniae* 5株の順に多かった。遺伝子型別により24株中8株からIMP-1型のカルバペネマーゼ遺伝子が検出された。またこの8株については全て阻害剤を用いたディスク法とCarba NP testの両方でカルバペネマーゼ産生性が確認できた。

ESBL産生菌及びAmpC産生菌の遺伝子検出状況を表2に示す。菌株は99株で菌種別では*E.coli* 65株、*Klebsiella pneumoniae* 14株の順に多かった。

検出遺伝子はCTX-M型，TEM型，SHV型などのESBL遺伝子が主で，複数の遺伝子を持つ株も多くあった。AmpC遺伝子が検出された株は3株（CIT型2株，ACC型1株）あり，カルバペネマーゼ遺伝子が検出された株はなかった。

5 考察とまとめ

CREにはカルバペネマーゼ産生菌（CPE）と非産生菌があり，院内感染対策上問題となるのはCPEである。

今回届出のあったCREと届出対象外のCRE計24株のうち，CPEは8株で約30%を占めた。

また，この8株から検出されたカルバペネマーゼ遺伝子は全てIMP-1型であり，日本で多く報告される遺伝子型に該当した。

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。今回，CPEが検出された8株についても菌種は異なっており，同一の菌株由来かどうかについても，プラスミド解析等を行い，より詳細な解析を行う必要がある。

検査体制整備においては，さらにパルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE法）の検査の確立を行う。

県内における薬剤耐性遺伝子の動向を把握するため，鹿児島大学との共同研究及び届出のあった薬剤耐性菌についてさらにデータを集積するとともに，保健所や医療機関と連携し情報収集及び検査体制の整備に努めていきたい。

謝辞

今回の調査において，御協力をいただきました鹿児島大学病院川村英樹先生，鹿児島大学医歯学総合研究科 蘭牟田直子先生，西順一郎先生に深謝いたします。

参考文献

- 1) 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）
- 2) 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

表1 CREの遺伝子検出状況 (件数はのべ件数)

	件数	検出されたβラクタマーゼ遺伝子
<i>Enterobacter aerogenes</i>	6	検出なし(6)
<i>Enterobacter cloacae</i>	5	IMP-1型(1), EBC型(2),ACC型(1), TEM型+CTX-M-9 group (1)
<i>Enterobacter hormachei</i>	2	IMP-1型(2)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5	IMP-1型+SHV型(2), SHV型+CTX-M-2 group (1) TEM型+SHV型+DHA型(1),検出なし(1)
<i>Klebsiella oxitoca</i>	1	IMP-1型+CTX-M-9 group (1)
<i>Citrobacter koseri</i>	2	CTX-M-2 group (2)
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	1	IMP-1型(1)
<i>Serratia sp.</i>	1	IMP-1型(1)
不明	1	検出なし(1)

()は、検出した菌株数

表2 ESBL産生菌及びAmpC産生菌の遺伝子検出状況 (件数はのべ件数)

	<i>E.coli</i> (65株)	<i>K.pneumoniae</i> (14株)	<i>K.oxytoca</i> (3株)	<i>E.aerogenes</i> (2株)	<i>E.cloacae</i> (2株)	<i>E.hormachei</i> (2株)	<i>C.freundii</i> (2株)	<i>C.koseri</i> (3株)	<i>P.mirabilis</i> (6株)
TEM型	18	8	0	0	1	0	0	2	5
SHV型	2	14	0	0	2	1	0	0	0
CTX-M-1 group	18	6	0	0	1	1	0	0	0
CTX-M-2 group	0	0	0	0	0	0	0	3	4
CTX-M-8 group	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CTX-M-9 group	42	6	0	0	0	0	0	0	1
MOX型	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DHA型	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ACC型	0	0	0	0	1	0	0	0	0
CIT型	1	0	0	0	0	0	1	0	0
FOX型	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EBC型	0	0	0	0	0	0	0	0	0

上段：ESBL遺伝子型別による菌株数 下段：AmpC遺伝子型別による菌株数