

香川県内のカルバペネム耐性腸内細菌科細菌の薬剤耐性遺伝子の検出状況

Detection of the Antimicrobial-Resistant Gene Extracted from the Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Isolated in Kagawa Prefecture

福田 千恵美 安藤 友美 岩下 陽子 内田 順子
 Chiemi FUKUDA Tomomi ANDO Yoko IWASHITA Junko UCHIDA

要 旨

2015年に香川県内の医療機関で検出されたカルバペネム耐性腸内細菌科細菌(CRE)10株について、PCR法による遺伝子解析を行った。菌種は、*Enterobacter* 属 7株、*Klebsiella pneumoniae* 2株、*Citrobacter freundii* 1株で、*Enterobacter* 属が CRE の主な菌種であることがわかった。検出遺伝子はカルバペネマーゼ産生遺伝子である IMP-1 型 3株、GES 型 1株、AmpC 産生遺伝子である CIT 型 1株、EBC 型 6株であった。そのうち1株は IMP-1 型と GES 型の2つの遺伝子を保有していた。この株はシーケンス解析で、IMP-11、GES-24 と判明した。報告数が少ない GES 型が県内で検出された。*Enterobacter* 属は CRE としての報告数は多いが、7株のうち6株は EBC 型であり、すべてがカルバペネマーゼを産生するわけではない。このように耐性機構には様々な要因が関連しており、薬剤感受性試験だけでは限界があり、カルバペネマーゼ産生株を検出するには遺伝子解析が不可欠である。今後も継続して、医療機関へ情報を還元するとともにカルバペネマーゼの動向を監視する必要がある。

Abstract

We carried out genetic analysis, by means of the PCR method, of 10 isolates of the carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) isolated in medical institutions in Kagawa Prefecture in 2015. Seven of the isolates are of the *Enterobacter* species, which control the antimicrobial-resistant traits of these isolates. The other isolates were the two isolates *Klebsiella pneumoniae* and the one isolate *Citrobacter freundii*. Among the isolates analyzed, three of them were found to possess the Carbapenemases gene of IMP-1 group, and one was of the GES group, and six of them possess the AmpC genes of EBC group and one of the CIT group. One of them was found to possess two genes, IMP-1 group and GES group of the Carbapenemases gene. The genes of this isolate were specified to be IMP-11 and GES-24 by sequence analysis. The rarely-reported GES group gene was detected in Kagawa Prefecture. Though the analysis by medicine often reports the isolates of the genus *Enterobacter* as CRE, six out of the seven isolates were found to be of the EBC group, and thus not all of them produce Carbapenemases. Therefore, in order to detect Carbapenemases, it is essential to conduct genetic analysis, because the antimicrobial susceptibility test may not be able to detect some aspects of the antimicrobial-resistant mechanism as seen above. It is important to continue the research of the antimicrobial-resistant genes and to supply feedback in cooperation with medical institutions.

キーワード：カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 薬剤耐性遺伝子 PCR法 カルバペネマーゼ

I はじめに

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: CRE) は、カルバペネム系薬剤に耐性を持つ腸内細菌の総称である。カルバペネム系薬剤は腸内細菌による感染症において最も重要な治療薬であり、耐性の場合、治療薬がなくなる可能性があ

る。CREはカルバペネム系薬剤の分解酵素であるカルバペネマーゼ (Carbapenemases) を産生する場合とカルバペネマーゼは産生しないが ESBL (Extended Spectrum β -Lactamase: 基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ) や AmpC の中でカルバペネム系薬剤を少量分解する酵素の過剰産生と菌外膜変化による薬剤透過性の低下、

排出機構の亢進等で耐性を示す菌外膜変異型がある。カルバペネマーゼ産生遺伝子は、プラスミド上に存在し菌種間を超えて伝達され、耐性遺伝子の拡散の速度、伝達菌種での危惧がある。CDC(Centers for Disease Control and Prevention:アメリカ疾病管理予防センター)によると米国では、過去10年間でCREの肺炎桿菌が7倍、腸内細菌科の菌種全般では、4倍に増えており、全米の病院の4%、長期急性期病院の18%でカルバペネム耐性腸内細菌科の細菌による感染症が発生している。また敗血症を起こした場合、約半数が死亡すると警戒されている¹⁾。日本では米国ほどの広がりはないが増加傾向で、アウトブレイクの報告もあり²⁾今後の動向を注視する必要がある。2014年9月に感染症法が改正されCRE感染症は5類全数報告疾患となった。今回、2015年に香川県内で検出されたCREの薬剤耐性遺伝子を解析し、県内での動向を調査した。

II 方法

1 供試菌株

2015年1月から12月の間に香川県内で5類感染症全数把握により報告されたCRE 13株のうち提供のあった5株及び調査研究協力施設の香川県立中央病院より提供のあったCRE 5株、合計10株を対象とした。

2 方法

(1) 菌種同定

普通寒天培地(日水製薬株式会社)に純培養後、BBLクリスタルE/NF(日本ベクトン・ディッキンソン株式会社)により同定を行った。

(2) 届出基準

感染症法の5類全数報告の届出基準は2通りある。すなわちメロペネム(MEPM)耐性の場合とイミペネム(IPM)とセフメタゾール(CMZ)2剤耐性の場合である。MEPM耐性の場合、MIC値が $2\mu\text{g/ml}$ 以上であるか、又はMEPMの感受性ディスク(KB)の阻止円の直径が 22mm 以下であること。IPM,CMZ耐性の場合、MIC値が $2\mu\text{g/ml}$ 以上であるか、又はIPMの感受性ディスク(KB)の阻止円の直径が 22mm 以下であること、及びCMZのMIC値が $64\mu\text{g/ml}$ 以上であること、又はCMZの感受性ディスク(KB)の阻止円の直径が 12mm 以下であることである。この届出基準と耐性遺伝子との関連を調査した。

(3) スクリーニング検査

普通寒天培地に純培養時、MEPMセンシ・ディスク(日本ベクトン・ディッキンソン株式会社)を培地上に置き遺伝子の欠落を防止しながら培養を行った。その純培養菌を生理食塩水 3ml にMcFarland No. 0.5濃度の菌液を作成し、Muller-Hinton培地(OXOID)に1綿棒菌液を均一に塗布後、クラブラン酸含有ディスク⁴⁾、3-アミノフェニルボロン酸⁵⁾、メルカプト酢酸ナトリウムディスク⁶⁾による阻害試験を行った。

(4) 耐性遺伝子の検出

a クラブラン酸含有ディスク阻害試験陽性の耐性遺伝子の検出

クラブラン酸含有ディスク阻害試験に陽性を示すESBL産生遺伝子であるTEM型、SHV型⁸⁾、CTX-M1型、CTX-M2型、CTX-M8型、CTX-M9型⁹⁾についてPCR法により検索した。(図1)

b 3-アミノフェニルボロン酸阻害試験陽性の耐性遺伝子の検出

3-アミノフェニルボロン酸阻害試験に陽性を示すAmp C産生遺伝子であるMOX型、CIT型、DHA型、ACC型、EBC型、FOX型¹⁰⁾及びKPC型についてPCR法により検索した。(図2、3)

c メルカプト酢酸ナトリウムディスク阻害試験陽性の耐性遺伝子の検出

メルカプト酢酸ナトリウムディスクに陽性を示すメタロβ-ラクタマーゼ産生遺伝子であるIMP-1型、IMP-2型、VIM-2型¹¹⁾、NDM型¹²⁾についてPCR法により検索した。(図3)

d 薬剤による阻害試験では検出されにくいカルバペネマーゼ産生遺伝子の検出

GES型¹³⁾、OXA-51型、OXA-58型、OXA-23型、OXA-24型¹⁴⁾、OXA-48型¹⁵⁾についてPCR法により検索した。(図3)

(5) Carba NP test

カルバペネマーゼ産生スクリーニングとして用いた。

a B-PERII, Bacterial Protein Extraction Reagent (Thermo) $100\mu\text{l}$ に菌を2白金耳分浮遊させ、5分間ボルテックスを行う。室温で30分間静置。

b 0.05%フェノールレッド溶液 1ml に0.1M ZnSO_4 溶液 $1\mu\text{l}$ を混和し、イミペネム 3mg を溶解させ、 $100\mu\text{l}$ ずつチューブに分注する。

c 調整菌液 $30\mu\text{l}$ を溶液に混和し、 37°C でインキュベーションし、60~120分後に色の変化を目視で確認

する¹⁶⁾。

陽性の場合、黄変するが OXA 型の場合、反応が偽陰性のあるので注意が必要である¹⁷⁾ (図4)。

(6) まれな耐性遺伝子のシーケンス解析

国内での検出数の少ない耐性遺伝子を保有する菌株については、国立感染症研究所細菌第二部第一室に送付し、シーケンス解析を依頼した。

III 結果

届出基準別の菌種と耐性遺伝子の検出状況を表1に示す。

菌種は *Enterobacter aerogenes* 5株、*Enterobacter cloacae* 2株、*Klebsiella pneumoniae* 2株、*Citrobacter freundii* 1株であった。

検出遺伝子は IMP-1 型3株 (*E. cloacae* 1株、*K. pneumoniae* 2株) GES 型 1株 (*K. pneumoniae*)、CIT 型1株 (*C. freundii*)、EBC 型6株 (*E. aerogenes* 5株、*E. cloacae* 1株) が検出された。このうち、カルバペネマーゼはIMP-1型とGES型であった。

GES 型保有株は IMP-1 型遺伝子も同時に保有していた。この株を国立感染症研究所に解析依頼した結果、IMP-11、GES-24 と判明した。

IMP-1 型と GES 型保有株は、Carba NP test が陽性であった。

届出基準薬剤は、カルバペネマーゼ産生株は、3株とも MEPM と IPM,CMZ の2種類が耐性であった。菌外膜変異型株は、CIT 型はMEPM と IPM,CMZ の2種類耐性で、EBC 型6株はすべて IPM,CMZ 耐性であった。

Enterobacter 属の中で、*E. cloacae* は、カルバペネマーゼ産生遺伝子を持つ割合が2株中1株、*E. aerogenes* は、すべて菌外膜変異型であった。

IV 考察

Enterobacter 属が全体の7割を占めており、CRE の主な菌種であることがわかった。*Enterobacter* 属の中でも、*E. cloacae* は、カルバペネマーゼ産生遺伝子を持つ割合が2株中1株、*E. aerogenes* は、すべて菌外膜変異型と同じ属でも菌種によって薬剤耐性遺伝子の保有状況が異なり、正確な菌種の同定が重要である。

Carba NP test と PCR 法によるカルバペネマーゼ産生遺伝子の結果は一致しており、Carba NP test は短時間で検査できる利点があるので、カルバペネマーゼ産生

株のスクリーニング検査として有用である。

カルバペネマーゼ産生株の届出基準薬剤は、MEPM と IPM,CMZ の2種類が耐性であったのにならべ、*Enterobacter* 属の EBC 型はすべて IPM,CMZ 耐性であり、MEPM 耐性の場合、カルバペネマーゼの可能性が高い。しかしMEPM と IPM,CMZ の2種類耐性の CIT 型があるように、届出基準薬剤だけではカルバペネマーゼ産生株とは判断できない。

また、カルバペネマーゼ産生株は、すでに日本に定着している型と外国からの持込み型があり³⁾、IMP-1 型は日本定着型である。IMP-1 型と GES 型の2つの耐性遺伝子を保有する株は国内ではまだ報告例がない。国立感染症研究所で行った解析で、IMP-11、GES-24 と判明し、IMP-11 は国内定着型であるが、GES-24 は検出数が少なく貴重な保有株であった。検出数の少ない GES 型が検出され、国内の浸潤が危惧される。

Enterobacter 属が保有していた EBC 型と *C. freundii* が保有していた CIT 型は、染色体上に保有している Amp C 産生遺伝子である。そのうち *C. freundii* 1株は、SCVs (Small colony variants : 小型コロニー変種)¹⁸⁾ であった。BTB 寒天培地、37°C、18 時間培養において直径2~3mm のコロニーを示し (図5、6)、同じ条件で1週間培養を続けても大きな変化は見られなかった。菌の発育阻害が起こるほど外膜を変化させていることが窺われ、長期間、カルバペネム系薬剤に暴露されていたと推測された。

このように CRE の耐性機構は様々な要因が関連しており、カルバペネマーゼ産生株を検出するには遺伝子解析が不可欠である。

V 結論

2014 年9月に感染症法が改正され CRE 感染症が5類全数報告疾患となった。地方衛生研究所において、薬剤耐性遺伝子を解析し、国内での耐性遺伝子の動向を調査することは、国の薬剤耐性(Antimicrobial Resistance : AMR)対策アクションプランに則っている¹⁹⁾。

また、解析結果を医療機関へ早期に還元することで、治療法の早期変更や院内感染の早期発見につながる。

今後も継続して、医療機関へ情報を還元するとともにカルバペネマーゼの動向を監視する必要がある。

謝辞：今回、遺伝子解析及び査読を賜りました国立感染症研究所細菌第二部第一室 松井真理先生に深謝いた

します。

文献

- 1) CDC, “CDC: Action needed now to halt spread of deadly bacteria,”: http://www.cdc.gov/media/releases/2013/p0305_deadly_bacteria.html.
- 2) <http://www.nih.gov/niid/ja/dr-b-m/dr-b-iasrs/5213-pr4182.html>
- 3) <http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kananshou19/dl/multidrug-resistant-bacteria.pdf>
- 4) CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing ; Twentieth Informational Supplement, M100-S20, Jan. 2010.
- 5) T. Yagi, J. Wachino, et al. 2005. Practical Methods Using Boronic Acid Compounds for Identification of Class C β -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* ; Journal of Clinical Microbiology, June, p.2551–2558.
- 6) Y. Arakawa, N. Shibata, et al. 2000. Convenient Test for Screening Metallo- β -Lactamase-Producing Gram-Negative Bacteria by Using Thiol Compounds ; Journal of Clinical Microbiology, Jan. , p.40–43.
- 7) 国立感染症研究所 病原体検出マニュアル 薬剤耐性菌
<http://www.nih.gov/niid/images/lab-manual/Resistant20130104.pdf>
- 8) Arlet G, et al. 1991. Construction by polymerase chain reaction and use of intragenic DNA probes for three main types of transferable beta-lactamases (TEM, SHV, CARB) ; FEMS Microbiol Lett 1991 19-26.
- 9) Shibata N, et al. 2006. PCR Classification of CTX-M-Type β -Lactamase Genes Identified in Clinically Isolated Gram-Negative Bacilli in Japan ; Antimicrob Agents Chemother. 50(2): 791-795.
- 10) Pérez-Pérez F.J et al. 2002. Detection of Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamase Genes in Clinical Isolates by Using Multiplex PCR ; Clin Microbiol 40(6): 2153-2162.
- 11) Nishio, H., M. Komatsu, N. Shibata, et al. 2004. Metallo- β -lactamase-producing gram-negative bacilli: laboratory-based surveillance in cooperation with 13 clinical laboratories in the Kinki Region of Japan. ; J. Clin. Microbiol. 42: 5256-5263.
- 12) Pfeifer Y et al. 2011. Molecular characterization of bla_{NDM-1} in an *Acinetobacter baumannii* strain isolated in Germany in 2007 ; J Antimicrob Chemother. 66: 1998-2001.
- 13) Queenan A et al. 2007. Carbapenemases ; the Versatile Lactamases American Society for Microbiology. 20(3): 440-458.
- 14) Turton J et al. 2006. The role of IS *Aba1* in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii* ; FEMS Microbiol Lett 2006 72-77.
- 15) Poirel L et al. 2004. Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in *Klebsiella pneumoniae* ; Antimicrob Agents Chemother. 48(1): 15-22.
- 16) Laurent Dortet et al. 2012. Rapid Identification of Carbapenemase Types in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. by Using a Biochemical Test ; Antimicrob. Agents Chemother. 56:6437-6440.
- 17) Tijet N et al. 2014. Reply to “Further Proofs of Concept for the Carba NP Test” ; Antimicrob Agents Chemother. 2014.58:1270.
- 18) Proctor R et al. 2005. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections ; Nature Reviews Microbiology 4:295-305.
- 19) 薬剤耐性(Antimicrobial Resistance : AMR)対策アクションプラン National Action Plan on Antimicrobial Resistance 2016-2020, 国際的に脅威となる感染症対策関係閣僚会議, 平成28年4月5日.

表1 菌種と耐性遺伝子の検出状況

No.	菌株名	届出	届出基準薬剤	Carba NP test	検出遺伝子
1	<i>Citrobacter freundii</i>	なし	MEPM + IPM,CMZ	-	CIT
2	<i>Enterobacter cloacae</i>	あり	MEPM + IPM,CMZ	+	IMP-1
3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	なし	MEPM + IPM,CMZ	+	IMP-1
4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	なし	MEPM + IPM,CMZ	+	IMP-1、GES
5	<i>Enterobacter cloacae</i>	なし	IPM,CMZ	-	EBC
6	<i>Enterobacter aerogenes</i>	あり	IPM,CMZ	-	EBC
7	<i>Enterobacter aerogenes</i>	あり	IPM,CMZ	-	EBC
8	<i>Enterobacter aerogenes</i>	あり	IPM,CMZ	-	EBC
9	<i>Enterobacter aerogenes</i>	なし	IPM,CMZ	-	EBC
10	<i>Enterobacter aerogenes</i>	あり	IPM,CMZ	-	EBC

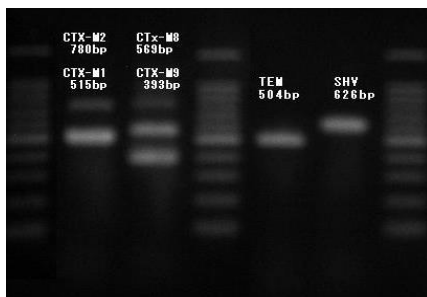


図1 ESBL 産生遺伝子

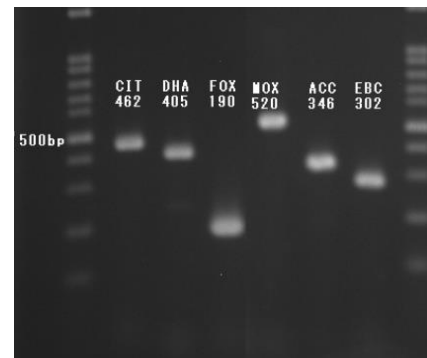


図2 Amp C 産生遺伝子

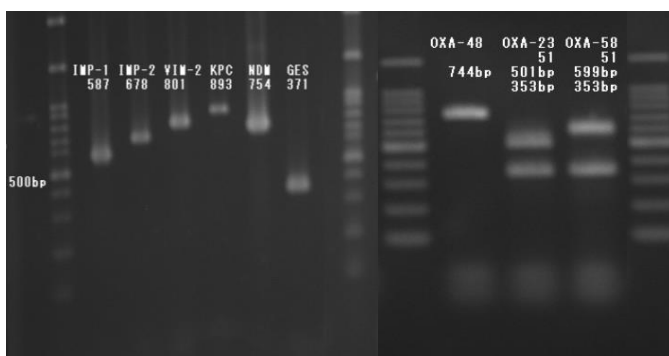


図3 カルバペネマーゼ産生遺伝子



陽性（黄）陰性（紅）

図4 Carba NP test

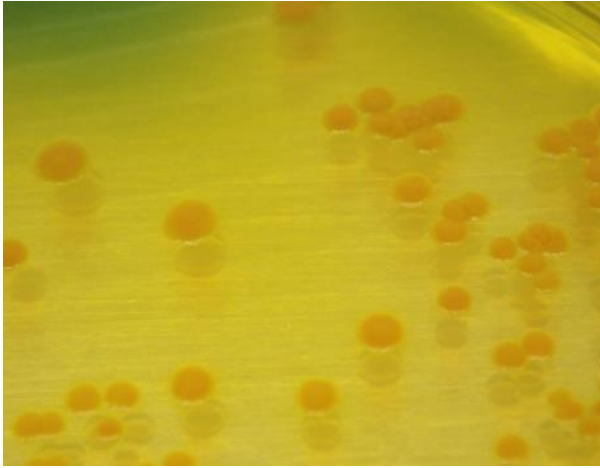


図5 通常発育の *C. freundii*
(37°C18hr 好気培養後)

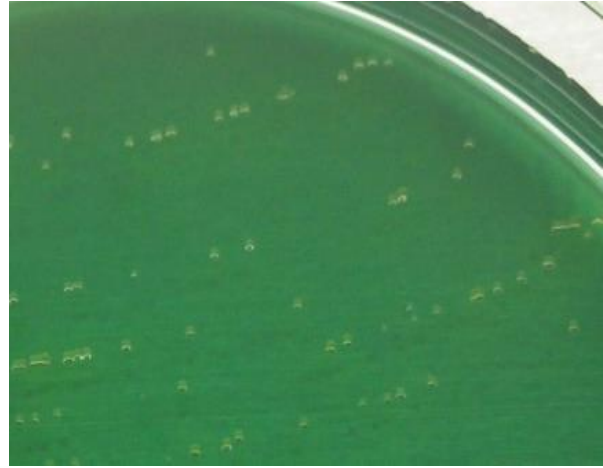


図6 小型コロニー変種(SCVs)の *C. freundii*
(37°C18hr 好気培養後)