

札幌市でまん延が懸念されたカルバペネム産生腸内細菌目細菌の モニタリング調査報告

石黒真琴 大門世理奈*1 佐藤耶舞羽 菊地正幸 三上 篤 八田智宏
伊藤政彦*2 松原加奈*2 土田 翔*2

1. 緒 言

札幌市では、2018年11月からカルバペネム耐性腸内細菌目細菌（carbapenem-resistant Enterobacterales: CRE）感染症の患者由来株の検査を実施している。検査で検出されるカルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌（carbapenemase-producing Enterobacterales: CPE）の種類は年度ごとに傾向が異なり、全国でも報告の少ないカルバペネマーゼ遺伝子型が検出されることがある¹⁾。その多くは単発的な検出であったが、2021年2月から2022年11月の期間で、断続的にNDM型カルバペネマーゼ遺伝子陽性 *Klebsiella oxytoca* が検出された。その発生動向を注視していたが、2022年12月以降、当所の検査において当該株は検出されていない。しかし、検査対象は発生届のあった患者由来株のみであり、保菌者及びその由来株については把握できておらず、NDM型カルバペネマーゼ遺伝子陽性 *K. oxytoca* の水面下でのまん延が懸念されたため、2023年5月から12月までの期間でモニタリング調査を実施した。

本稿では、モニタリング調査の概要と検査結果について報告する。

2. 方 法

2-1 調査背景

2021年2月に搬入されたCRE感染症患者由来株から、市内で初めてNDM型カルバペネマーゼ遺伝子陽性のCPEが3株検出された。3株とも同時期に検出され、患者らに海外渡航歴はなく、菌種はすべて

*K. oxytoca*であった。3株目が検出されて以降は確認されなくなり、単発的な検出と考えられた。しかし、それから18か月後の2022年8月から11月にかけての4か月間で、10株のNDM型カルバペネマーゼ遺伝子陽性 *K. oxytoca* が複数の医療機関から検出された。なお、初めに検出された3株を含めた全13株について、シークエンスによるNDM型カルバペネマーゼ遺伝子の型別を行ったところ、すべてNDM-1であった。NDM型カルバペネマーゼ遺伝子陽性 *K. oxytoca* の市内でのまん延や院内感染を懸念し注視していたが、2022年11月を最後に当該株の医療機関からの届出や検出は途絶えた（図1）。しかし、当所の検査では保菌者の把握ができていないことや、初めの検出から期間があいて再び検出された状況から、水面下での感染が継続している可能性も考えられたため、2023年5月から12月までの期間で、*K. oxytoca* を対象としたモニタリング調査を実施することとした。

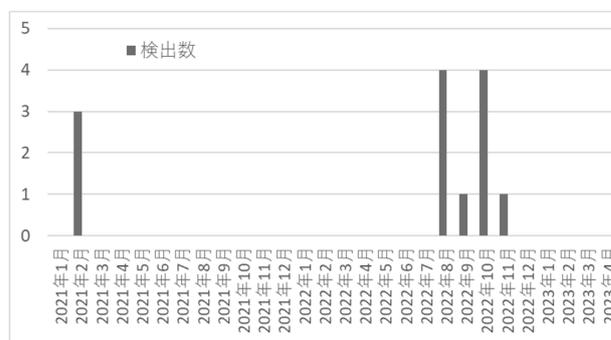


図1 NDM型遺伝子陽性 *K. oxytoca* の検出状況

2-2 供試菌株

当所のCRE感染症患者由来株の検査では、NDM型

*1 現 保健福祉局保健所食品監視担当課 *2 札幌臨床検査センター

カルバペネマーゼ遺伝子陽性 *K. oxytoca* は、便・腸粘液・腸液等の腸管系検体から分離されたものが半数以上を占めた（表 1）。そのため、腸管系検体から分離された株に調査対象を絞り、2023 年 5 月下旬から 2023 年 12 月の期間で、便・腸粘膜等の腸管系検体から分離された *K. oxytoca* 180 株について検査を実施した。

表 1 NDM 型遺伝子陽性 *K. oxytoca* の分離検体

NDM 型カルバペネマーゼ遺伝子陽性 <i>K. oxytoca</i> が分離された検体	検体数
便・腸粘膜・腸液	7
医療器具（カテーテル等）	4
血液	1
喀痰	1

2-3 PCR 法による薬剤耐性遺伝子の検出とシーケンスによるカルバペネマーゼ遺伝子の型別

カルバペネマーゼ遺伝子を検出するため、マルチプレックス PCR 法 (KPC 型、IMP 型、NDM 型、VIM 型、OXA-48 型、GES 型)²⁾ と病原体検出マニュアル³⁾ に準じたプライマーを用いた PCR 法を実施した。PCR 法でカルバペネマーゼ遺伝子が検出され、カルバペネマーゼ産生の所見が得られた株については、PCR 産物のダイレクトシーケンスにより得られた塩基配列を National Center for Biotechnology Information (NCBI) の参照配列と比較して型別を行った。

2-4 カルバペネマーゼ産生性試験と阻害剤を用いた β -ラクタマーゼ産生性確認

PCR 法でのカルバペネマーゼ遺伝子の検出もれを防ぐため、mCIM 法によるカルバペネマーゼ産生性の確認を行った。ただし、180 株中 8 株は発育しなかったため、mCIM 法は 172 株に対してのみ実施した。mCIM 法で陽性または判定保留となった株については、阻害剤としてメルカプト酢酸ナトリウム (SMA)、ボロン酸、クロキサシリン及びクラブラン酸を用いた β -ラクタマーゼ産生性確認を行った。

検査は、病原体検出マニュアル³⁾ と国立感染症研究所薬剤耐性研究センターが行った薬剤耐性菌研修会資料⁴⁾ に基づき実施した。

3. 結 果

3-1 カルバペネマーゼ遺伝子検出数と遺伝子型

供試菌株 180 株に対しカルバペネマーゼ遺伝子検出を目的として実施した PCR 法の結果を表 2 に示す。カルバペネマーゼ遺伝子が検出されたのは 7 株であった。カルバペネマーゼ遺伝子の内訳は、NDM 型が 1 株、IMP 型が 6 株となり、モニタリング調査の目的としていた NDM 型カルバペネマーゼ遺伝子陽性 *K. oxytoca* は 1 株検出された。また、カルバペネマーゼ遺伝子のシーケンス型別の結果、NDM 型は NDM-1、IMP 型はすべて IMP-1 であった。

表 2 カルバペネマーゼ遺伝子陽性株数

カルバペネマーゼ遺伝子検出数	7 株	
カルバペネマーゼ 遺伝子型	NDM 型	1 株
	IMP 型	6 株

3-2 mCIM 法と阻害剤を用いた β -ラクタマーゼ産生性確認試験の結果

mCIM 法を実施した 172 株のうち、陽性となった株は 8 株であった。8 株の検査結果の概要を表 3 に示す。8 株中 7 株 (No. 1~6、No. 8) はカルバペネマーゼ遺伝子が検出された株であり、阻止円を形成しなかった。残りの 1 株 (No. 7) はカルバペネマーゼ遺伝子が検出されず、阻止円径 17mm で阻止円内部に複数のコロニーを有していた。阻害剤を用いた β -ラクタマーゼ産生性確認（以下、ディスク法）では、カルバペネマーゼ遺伝子が検出された 7 株はメタロ β -ラクタマーゼ産生の所見を示し、遺伝子型と矛盾しなかった。カルバペネマーゼ遺伝子が検出されなかった No. 7 はディスク法で β -ラクタマーゼ産生の所見を示さず、また、薬剤感受性ディスク（メロペネム (MPM)、イミペネム (IPM)、セフメタゾール (CMZ)) を用いたディスク拡散法では、

表3 mCIM法で陽性となった8株の検査結果

No.	菌株 分離月	遺伝子検査		表現型検査								
		カルバペネマーゼ遺伝子型	シーケンズ 型別	mCIM法		阻害剤によるβ-ラクタマーゼ産生確認				阻止円径(mm)		
				判定	阻止円径	SMA	ボロン酸	クロキサシリン	クラブラン酸	MPM	IPM	CMZ
1	6月	IMP	IMP-1	+	6	+	-	-	-	26	24	14
2	6月	NDM	NDM-1	+	6	+	-	-	-	17	20	15
3	7月	IMP	IMP-1	+	6	+	-	-	-	27	26	14
4	7月	IMP	IMP-1	+	6	+	-	-	-	26	25	14
5	8月	IMP	IMP-1	+	6	+	-	-	-	25	24	12
6	8月	IMP	IMP-1	+	6	+	-	-	-	27	25	13
7	12月	-	-	+	17	-	-	-	-	32	31	29
8	12月	IMP	IMP-1	+	6	+	-	-	-	24	24	14

MPM と IPM で 30mm 以上、CMZ で 29mm の阻止円を形成した。以上の結果から No. 7 は、今回のモニタリング調査の目的としていた NDM 型カルバペネマーゼ遺伝子陽性株ではないと推測され、本稿ではカルバペネマーゼ産生株として取り扱わないこととした。なお No. 7 については、クラス A β-ラクタマーゼ遺伝子 5 種 (TEM 型、SHV 型、CTX-M-1 group、CTX-M-2 group、CTX-M-9 group) と 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) を標的とした PCR 法⁴⁾も実施したが、いずれの遺伝子も検出されなかった。

4. 考 察

2018 年 11 月に CRE の検査を開始して以来、札幌市では OXA-48 型や IMI 型といった報告頻度の低いカルバペネマーゼ遺伝子陽性 CPE が単発的に検出されている¹⁾。今回のモニタリング調査の対象とした NDM 型カルバペネマーゼ遺伝子陽性 *K. oxytoca* についても単発的な検出と思われたが、初めの検出から約 1 年半経過後に市内で検出が続き、2022 年 11 月を最後に検出されていない。

K. oxytoca を対象としたモニタリング調査の結果、2023 年 6 月に分離された 1 株が NDM 型カルバペネマーゼ遺伝子陽性 CPE と確認された。また、IMP 型カルバペネマーゼ遺伝子陽性 CPE が 6 株確認されたが、IMP 型カルバペネマーゼ遺伝子陽性 *K. oxytoca* は、CRE 感染症患者由来株の検査では 2021

年 12 月に 1 株検出されていたのみであり、今回の調査で複数人の保菌が確認されたことは想定外の結果であった。なお、カルバペネマーゼ遺伝子陽性であった 7 株に関する感染症法に基づく発生届はなく、保菌と考えられた。

今回の調査では、目的としていた NDM 型カルバペネマーゼ遺伝子陽性 *K. oxytoca* は 1 株確認されたが、約 7 か月間のみという短い期間での実施で、腸管系検体由来株のみを対象としたということもあり、正確なまん延状況の把握はできていない。より精度の高いモニタリング調査を行うには、腸管系以外の検体由来株も対象とした長期間の調査を行うなど、方法の改善が必要である。

2024 年 7 月末現在、CRE 患者由来株からの新たな NDM 型カルバペネマーゼ遺伝子陽性 *K. oxytoca* の検出はない。しかし、初めの検出から約 1 年半経過後に再び検出されたことや、今回の調査で保菌者が確認されていることから、当該株が市内近郊から完全に消滅している状況とは考えにくく、今後も継続した監視が必要と考えられる。また、IMP 型カルバペネマーゼ遺伝子陽性 *K. oxytoca* についても一定数保菌者がいることが確認され、今後も市内における CRE 感染症の原因菌になる可能性が考えられ、この株についても注視する必要がある。

CPE の菌種とカルバペネマーゼ遺伝子型の組合せに地域性があることも知られており⁵⁾、市内で検出される菌種とカルバペネマーゼ遺伝子型の組合せ

の把握は、CPE 拡散状況の目安のひとつとなると考えられる。今後は可能な限り積極的な監視も視野に入れて CRE 感染症の発生状況を把握し、情報提供を行うことで CRE の拡散防止に努めていきたい。

5. 結 語

日本国内で報告される CPE のカルバペネマーゼ遺伝子型の中で、NDM 型は海外型と呼ばれ検出頻度は低かったが、近年、海外渡航歴の無い症例から NDM 型カルバペネマーゼ遺伝子陽性 CPE の分離が増加している⁵⁾。2023 年 5 月下旬から 12 月末までの期間で、市内でまん延が懸念された NDM 型カルバペネマーゼ遺伝子陽性 *K. oxytoca* の地域における拡散状況確認のため、モニタリング調査を実施した。調査の結果、NDM 型カルバペネマーゼ遺伝子陽性 *K. oxytoca* 1 株と IMP 型カルバペネマーゼ遺伝子陽性 *K. oxytoca* 6 株が検出された。7 株はすべて保菌と推測された。今後は積極的な調査を含めた検査結果などの情報を蓄積し、必要に応じて情報発信することで市内の CRE の拡散防止につなげていきたい。

謝辞：ご指導いただいた国立感染症研究所薬剤耐性研究センターの先生方に深謝いたします。

6. 文 献

- 1) 石黒真琴, 尾島拓也, 大門世理奈 他: 札幌市におけるカルバペネム耐性腸内細菌目細菌 (CRE) 感染症患者由来株の検査結果報告 (2018~2022 年度), 札幌市衛生研究年報, **50**, 37-43, 2023
- 2) Watahiki, M, Kawahara, R, Suzuki, M et al: Jpn. J. Infect. Dis. **73**, 166-172, 2020
- 3) 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
- 4) 薬剤耐性菌研修会資料 (2018 年 9 月修正 Ver. 5_ 国立感染症研究所薬剤耐性研究センター)
- 5) 国立感染症研究所 感染症疫学センター: カルバペネム耐性腸内細菌目細菌 (carbapenem-resistant Enterobacterales: CRE) 病原体サーベイランス, 2022 年