

13. 神奈川県で検出されたカルバペネム耐性腸内細菌科細菌 の分子疫学解析

○政岡 智佳 (神奈川県衛生研究所)

鈴木 美雪 (神奈川県衛生研究所)

【研究目的及び必要性】

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (Carbapenem Resistance Enterobacteriaceae; CRE) 感染症は、カルバペネム系薬剤に耐性を示す腸内細菌科の細菌による感染症で、「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 (感染症法)」に基づく 5 類全数把握疾患である。カルバペネム系薬剤は臨床において重要な治療薬の一つであり耐性菌の出現は医療上の大きな問題となっている。さらに、CRE のうちカルバペネム分解酵素であるカルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌 (Carbapenemase producing Enterobacteriaceae; CPE) は、カルバペネマーゼ非産生性 CRE と比較して β -ラクタム系薬以外の薬剤にも耐性を示す場合も多く、菌血症症例において予後が悪いとの報告もあり¹⁾、特に注意が必要である。

神奈川県は 2019 年の都道府県別の CRE 感染症発生報告数が東京都に次いで第 2 位となっており、全国的に見ても CRE 感染症の発生の多い地域であるといえる²⁾。また、国内でも CRE による院内感染が報告されており³⁾、地域で検出されている CRE 菌株について流行状況を把握することは重要であるといえる。

当所ではこれまで感染症法に基づく届出のあった CRE 菌株について、薬剤耐性遺伝子の検出や β -ラクタム薬分解酵素の産生性確認等の検査を実施してきたが、菌株同士の比較を行うような調査は実施していなかった。そこで、本研究では、県内で検出されている CRE 菌株の遺伝子型の分布状況を把握することを目的とし、当所に搬入された CRE 菌株について分子疫学解析を実施した。

【材料および方法】

2018 年度及び 2019 年度に当所に搬入された CRE 菌株のうち搬入株数の多かった *Enterobacter cloacae* 37 株及び *Klebsiella aerogenes* 31 株について、解析を実施した。解析にはパルスフィールドゲル電気泳動 (Pulsed-field gel electrophoresis: PFGE) 法を用いて、制限酵素 *Xba* I 及び *Spe* I を使用し、6 V/cm、パルスタイム 2.2~54.2 秒、12°C の条件下で 19 時間電気泳動した。得られた泳動パターンについて BioNumerics Ver. 6.6 (Applied Maths 社) を用いてクラスター解析し、菌種ごとにデンドログラムを作成した。得られた遺伝子型と、菌株が検出された地域 (8 地区 (A~H))、搬入時期及び薬剤耐性遺伝子保有状況などの疫学情報を合わせて分子疫学解析を実施した。

【結果及び考察】

PFGE で得られたバンドパターンについて類似度 90% で解析を実施したところ、*E. cloacae* では *Xba* I 及び *Spe* I のどちらの解析でも 5 つのクラスターが確認された (クラスター I ~

V)。Xba I を用いた解析の結果を図 1 に示した。Xba I で形成されたクラスター I、II、IV、V は Spe I でも同じ菌株によってクラスターが形成されたが、クラスター III では Xba I で 3 株 (No. 15、No. 16、No. 17) 含まれていたのに対し、Spe I では 2 株 (No. 16、No. 17) のみとなった。しかし、Spe I でクラスターに含まれなかった No. 15 の菌株も No. 16 及び No. 17 の菌株と類似度が 88.2% と比較的高く、さらに検出された地域及び薬剤耐性遺伝子が一致しておりこれらの菌株は関連があることが疑われた。このことから、今回解析を実施した *E. cloacae* では制限酵素 Xba I と Spe I による識別能に大きな差はないと考えられた。一方、*K. aerogenes* では Xba I による解析ではクラスターは形成されず、Spe I を用いた解析では 2 つのクラスターが形成された (図 2、クラスター VI、VII)。クラスター VI の No. 44 及び No. 45 は Xba I では類似度 72.2% で、薬剤耐性遺伝子はどちらの菌株も検出されず、搬入時期は 1 年以上離れており、検出された地域も異なっていたため散発例だと考えられた。一方、クラスター VII を形成した No. 38 及び No. 39 は Xba I では類似度 86.7% で、両菌株ともに薬剤耐性遺伝子は検出されず、搬入時期は 5 ヶ月離れていたが、検出された地域は同一であり関連が疑われた。これらのことから、菌株の関連性については、遺伝子型別以外の検査結果や疫学情報も用いて総合的に判断していく必要があると考えられた。

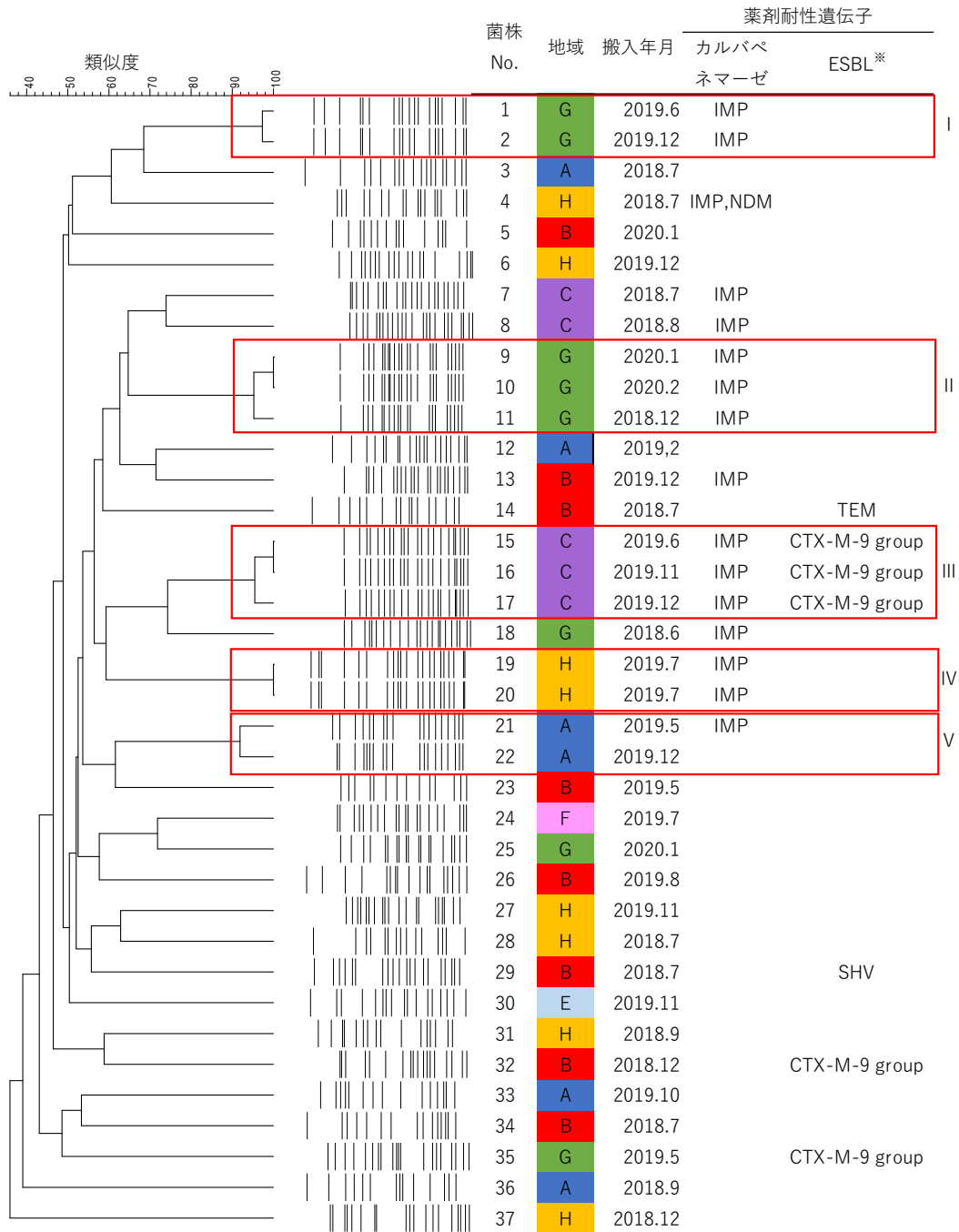
E. cloacae で Xba I を用いた解析において形成されたクラスター I、II、III 及び IV では、各クラスターを構成する菌株の検出地域及び薬剤耐性遺伝子の検出状況が一致していた。クラスター V では薬剤耐性遺伝子の検出状況は異なっていたが、検出地域は同じであった。遺伝子型だけでなく検出地域や薬剤耐性遺伝子の検出状況が一致していることから、各クラスター内の菌株が同一クローンである可能性が示唆された。また、クラスター IV を除く他のクラスターは菌株が搬入された時期が半年以上あいていた。特にクラスター II では 1 年以上の期間をあけて検出された菌株が含まれており、地域によっては同一クローンの菌株が半年以上にわたって維持されていることが明らかとなった。

次に、クラスターを形成した *E. cloacae* 11 株中 10 株が IMP 型のカルバペネマーゼ遺伝子を保有する CPE であった。カルバペネマーゼ遺伝子の多くはプラスミド上に存在することが知られており、クラスター V で No. 21 と No. 22 の薬剤耐性遺伝子の検出状況が異なっていたのは、No. 22 の菌株ではカルバペネマーゼ遺伝子を含むプラスミドが脱落した可能性が考えられた。また、PFGE の遺伝子型が異なっても、カルバペネマーゼ遺伝子を保有する同一プラスミドの水平伝達による院内感染も報告されており⁴⁾、疫学情報で菌株の関連性が疑われる場合はプラスミドの全塩基配列解析などのさらなる解析を実施する必要があると考えられた。

今回の調査によって神奈川県内では、*K. aerogenes* による CRE 感染症の発生は遺伝子型が多様であり散発例が多いと考えられた一方で、*E. cloacae* では CRE の中でも特に注意の必要な CPE の同一クローンが、地域によっては半年以上にわたって維持されていることを明らかにすることができた。CRE 感染症のように病原体に複数の菌種が含まれている場合でも同一菌種間においては PFGE による遺伝子型別は有効であり、さらに菌株の薬剤耐性遺伝子の保有状況や他の疫学情報と合わせることで、地域における病原菌の分布状況をより正確に把握することができ感染症対策に役立てることができると考えられた。

【今後の課題】

プラスミドによる薬剤耐性遺伝子の水平伝播が起こりうる CRE 感染症では、PFGE による遺伝子型が異なっても同一プラスミドによる院内感染等の恐れがある。さらに、プラスミドは異なる菌種にも伝播する可能性があるため、菌株の疫学情報を収集し関連が疑われる場合は PFGE による遺伝子型や菌種が異なっても、プラスミドの全塩基配列解析などのより詳細な解析が必要であると考えられた。CRE 感染症は、国内での発生が増加しているだけでなく、海外からの持ち込みも問題となっており、今後も地域で流行している株について把握するためにも監視を続けていく必要があると考えられた。



※ESBL:Extended spectrum β -lactamase

図 1 制限酵素 *Xba* I を用いた *E. cloacae* の解析結果

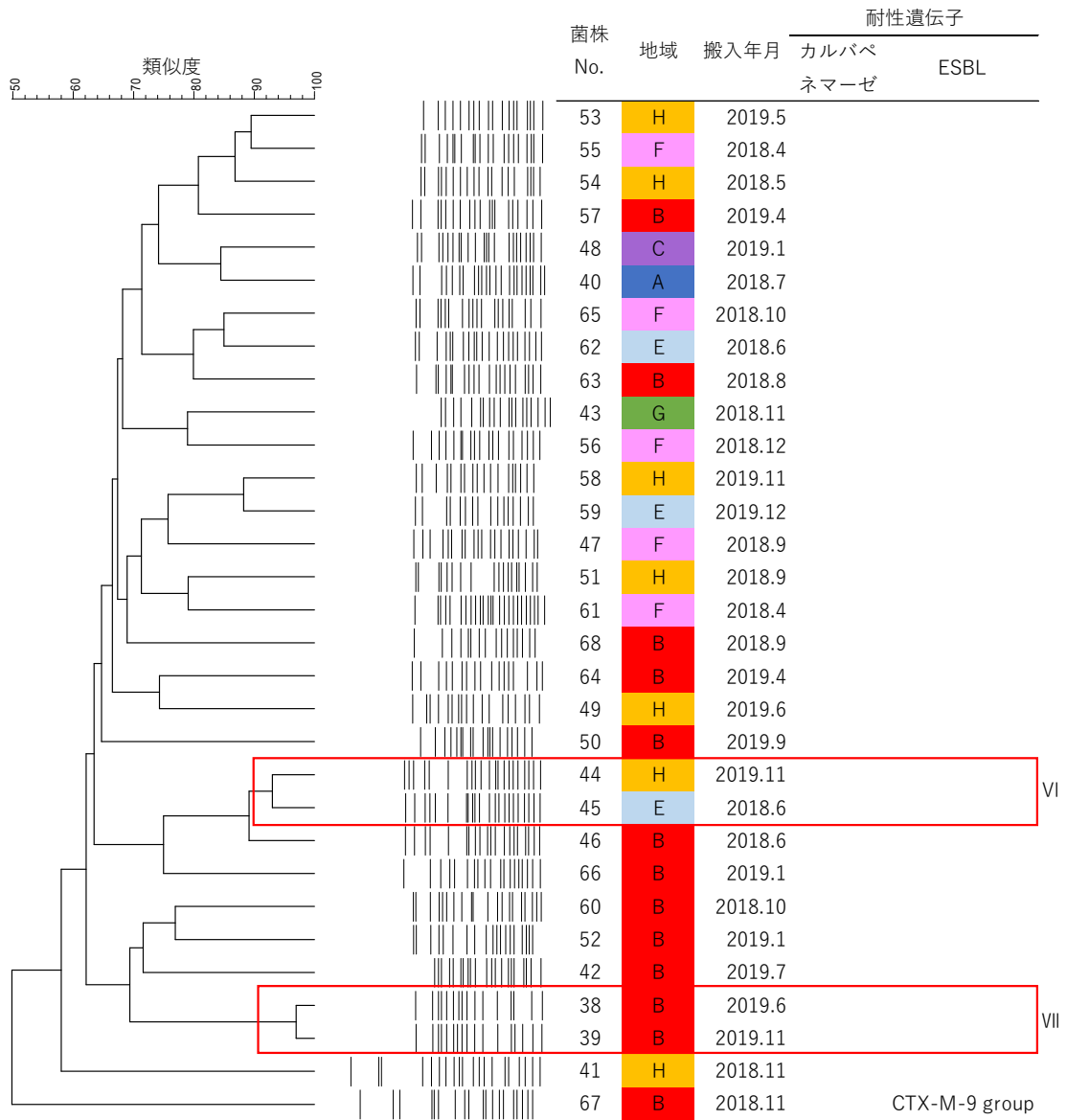


図2 制限酵素 *Spe* I を用いた *K. aerogenes* の解析結果

【参考文献】

- 1) 病原微生物検出情報. Vol. **40**, 8-9(2019)
- 2) 感染症発生動向調査事業年報 2019年(令和元年)確定報告データ: 厚生労働省健康局結核感染症課、国立感染症研究所感染症疫学センター. <https://www.niid.go.jp/niid/ja/allarticles/surveillance/2270-idwr/nenpou/10115-idwr-nenpo2019.html>
- 3) 阿部孝一ら: 郡山市保健所管内における KPC 型カルバペネム耐性腸内細菌科細菌による院内感染事例, 病原微生物検出情報, Vol. **40**, 11(2019)
- 4) 安部朋子ら: 病原微生物検出情報, Vol. **35**, 289-290(2014)

【経費使途明細】

| 使 途 | 金 額 |
|--------------------------------------|-----------|
| 消耗品費 (試薬: 制限酵素 <i>Xba</i> I) | 55,660 円 |
| 消耗品費 (試薬: 制限酵素 <i>Spe</i> I 1500U) | 26,400 円 |
| 消耗品費 (試薬: ProteinaseK (PK) Solution) | 62,590 円 |
| 事務費 (振込手数料) | 660 円 |
| 消耗品費 (試薬: <i>Spe</i> I 300U) | 15,620 円 |
| 消耗品費 (試薬: SeaKem Gold Agarose) | 108,020 円 |
| 事務費 (振込手数料) | 990 円 |
| 消耗品費 (器材: ロングハイパーフィルターチップシステムラック) | 29,480 円 |
| 事務費 (振込手数料) | 770 円 |
| 合 計 | 300,190 円 |
| 大同生命厚生事業団助成金 | 300,000 円 |