

徳島県における薬剤耐性菌検査に関する検討

徳島県立保健製薬環境センター

佐藤 豪・川上 百美子・篠原 礼*・河野 郁代

Studies of Antimicrobial Resistances in Tokushima Prefecture

Go SATO, Yumiko KAWAKAMI, Aya SHINOHARA*, and Ikuyo KAWANO

Tokushima Prefectural Public Health, Pharmaceutical and Environmental Sciences Center

要 旨

薬剤耐性菌（以下「AMR」という。）の検出例は世界中で増加傾向にあり、特に近年では広域抗菌薬カルバペネムに耐性を示す腸内細菌科細菌（以下「CRE」という。）による院内感染が世界的な脅威となっている。徳島県においても今後 CRE 感染症の件数が増えると予想されるため、従来の AMR 検査を改良し、主として院内感染時に医療機関に対して迅速な情報提供を行うための遺伝子検査体制について検討した。また、検討した手法を用い、2017～2020 年度に当センターに搬入された CRE25 株を用い、Multiplex PCR 法及びパルスフィールド電気泳動法（以下「PFGE」という。）による解析を試みた。

Key words : カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*, Multiplex PCR, パルスフィールド電気泳動法 pulsed-field gel electrophoresis

I はじめに

AMR は、抗菌薬に耐性を持つ感染症原因菌の総称である。抗菌薬は、20 世紀初頭に微生物から見いだされ、感染症治療において多大な恩恵を受けた。しかし今日では、ほとんどの抗菌薬に対して AMR が認められるようになっており、一方で新たな抗菌薬の開発件数は減少している。その結果、AMR に起因する死亡者数は年々増加しており、英国の薬剤耐性レビュー委員会によると、このまま何も対策を講じなければ、AMR による死亡者は 2050 年には癌による死亡者数を抜き、1000 万人に達する¹⁾と試算されている。さらに近年では CRE が現れ、米国疾病予防センターはこれに「悪夢の細菌 (Nightmare bacteria)」と名付けた。こうした危機的状況に対し、2015 年に開催された世界保健総会において「薬剤耐性対策グローバル・アクションプラン」²⁾が決定され、日本においては 2016 年に薬剤耐性アクションプランが策定された³⁾。

日本でも 2010 年頃から CRE の感染例が報告されており⁴⁾、2014 年から国内の CRE 感染症は全数報告の対象疾患となった。同年には厚生労働省通知において、「CRE を含む 5 種類の多剤耐性菌については、保菌も含め 1 例目が検知された時点で、アウトブレイクに準じた厳重な感染対策を実施することとされた⁵⁾。

しかし、CRE の判定を行うには医療機関だけでは難しく、保健所や地衛研による協力が望ましい。2017 年には、CRE 感染症届出時には地衛研等での試験検査の実施及び地域内の医療機関等への情報提供を行う旨の通達がなされた⁶⁾。本県では 2015 年より CRE 検査の準備がなされてきたが、通達に示された主要なカルバペネマーゼ遺伝子（以下「CPE」という。）のみが対象であり、これに因らない CRE の検査体制は未整備であった。本研究では、CPE に加え、それには分類されない AmpC β -ラクタマーゼ（以下「AmpC」という。）や基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ（以下「ESBL」とい

*現 保健福祉部東部保健福祉局（徳島保健所）

う。)などの遺伝子を標的とした Multiplex PCR 法について検討した。さらに、2017 年度から 2020 年度までに搬入された CRE について、PFGE による解析を実施したので報告する。

II 材料と方法

1 材料

2017 年 4 月から 2020 年 3 月までに搬入された CRE25 株及びその抽出 DNA を用いて検査を行った。菌種の内訳は、*Escherichia coli* 4 検体、*Enterobacter cloacae* 4 検体、*Citrobacter freundii* 1 検体、*Klebsiella aerogenes* 8 検体、*K. pneumoniae* 4 検体、*Morganella morganii* 1 検体、*Serratia marcescens* 3 検体であった。いずれも検査時に菌液とされ、検査終了後はマイクロバンク（イワキ株式会社）を用いて -80°C に保存とした。

2 方法

(1) 被検菌の DNA 抽出

国立感染症研究所が公開するプロトコル⁷⁾に沿って行った。被検菌をミューラーヒントン寒天培地に塗布し、最も濃厚に塗布した部分にセフトジジウムディスクを静置し、一晚（16～18 時間）培養した。その後、ディスク周囲の菌を滅菌綿棒でかき取り、滅菌水を入れたマイクロチューブに濁度が McFarland 0.5 になるように懸濁した。この懸濁液を 100°C で 10 分間加熱後、放冷し、4°C 13,000 回転で 5 分間遠心した。この上清を DNA テンプレートとして使用した。

(2) Multiplex PCR 法

従来の Single PCR 法に代わり、検査の省力化が期待される Multiplex PCR 法を用いた薬剤耐性遺伝子の検出を検討した。CPE、ESBL 及び AmpC β 遺伝子の Multiplex PCR 法に用いるプライマーセットについては、それぞれ Watahiki ら⁸⁾、Pérez-Pérez ら⁹⁾及び Le ら¹⁰⁾の記述に従った。ただし ESBL 遺伝子の Multiplex PCR 法については記述されている 6 つのプライマーセットのうち、5 つ（TEM 型、SHV 型、CTX-M-1 型、CTX-M-2 型及び CTX-M-9 型）を用いた。いずれの Multiplex PCR 法も QIAGEN Multiplex PCR Plus Kit（QIAGEN）を用い、反応条件は 95°C 5 分、（95°C 30 秒、60°C 1 分 30 秒、72°C 1 分） \times 25 回、68°C 10 分、4°C over night とした。2 または 3%ア

ガロースゲルで PCR 増幅産物の電気泳動を行った後、エチジウムブロマイドで染色し UV 照射により各バンドのサイズを確認した。

(3) PFGE

国立感染症研究所のプロトコル⁷⁾及び研修配付資料¹¹⁾に従って操作を行った。被検菌の準備及び菌液の調製は（1）の手順に従って行った。マーカー株は *Salmonella braenderup* を使用した。*E. coli*、*E. cloacae*、*M. morganii* についてはリゾチーム処理を省略した。泳動時間については、上記のプロトコルでは 24 時間とされていたが、実際行ってみたところバンドがゲル下方に偏ってしまったため、本研究においては 19 時間で行った。電気泳動後の染色は（2）と同様に行った。得られた泳動像については、解析ソフト「BioNumeric ver 7.1」（APPLIED MATHS）を用いて Ward 法で系統樹を作成し、パターン的一致率から県内のアウトブレイクの可能性について検討した。なお、系統解析は同一菌種のみを対象として行い、1 菌種 1 検体の被検菌（*C. freundii* 及び *M. morganii*）については行わなかった。

III 結果及び考察

1 Multiplex PCR 法

全ての *E. coli*、*K. pneumoniae* 及び *M. morganii* から CPE、ESBL または AmpC β 遺伝子が検出された。一方で *C. freundii*、*K. aerogenes* 及び *S. marcescens* からはこれらの遺伝子は検出されなかった。*E. cloacae* からは半数の 2 検体から AmpC 遺伝子が検出された。検出された耐性遺伝子の詳細については表 1 に示す。このうち、*E. coli* からは 4 株中 3 株で NDM 型、TEM 型が検出された。また残り 1 株からは EBC 型が検出された。NDM 型は海外で検出されることが多いが、近年では国内例の報告も散見される¹²⁾。また、*K. pneumoniae* からは全ての株で SHV 型及び CTX-M グループが検出された。日本では *K. pneumoniae* の院内感染の事例において CTX-M グループの検出が数多く報告されている¹³⁻¹⁵⁾ ことから、この結果はその事実を裏付けていると考えられる。一方、SHV 型については、*K. pneumoniae* はその染色体上にこの耐性遺伝子と相同性の高

表 1 検出された耐性遺伝子及び菌種

	CPE	ESBL	AmpC
IMP	1 (<i>K. pneumoniae</i>)	TEM	1 (<i>E. coli</i>)
NDM	3 (<i>E. coli</i>)	TEM + CTX-M-1	2 (<i>E. coli</i>)
		TEM + SHV + CTX-M-2	1 (<i>K. pneumoniae</i>)
		TEM + SHV + CTX-M-1 + CTX-M-9	1 (<i>K. pneumoniae</i>)
		SHV + CTX-M-1	1 (<i>K. pneumoniae</i>)
		TEM + SHV + CTX-M-1 + CTX-M-2	1 (<i>K. pneumoniae</i>)
			DHA
			EBC
			1 (<i>M. morganii</i>)
			3 (<i>E. coli</i> 1, <i>E. cloacae</i> 2)

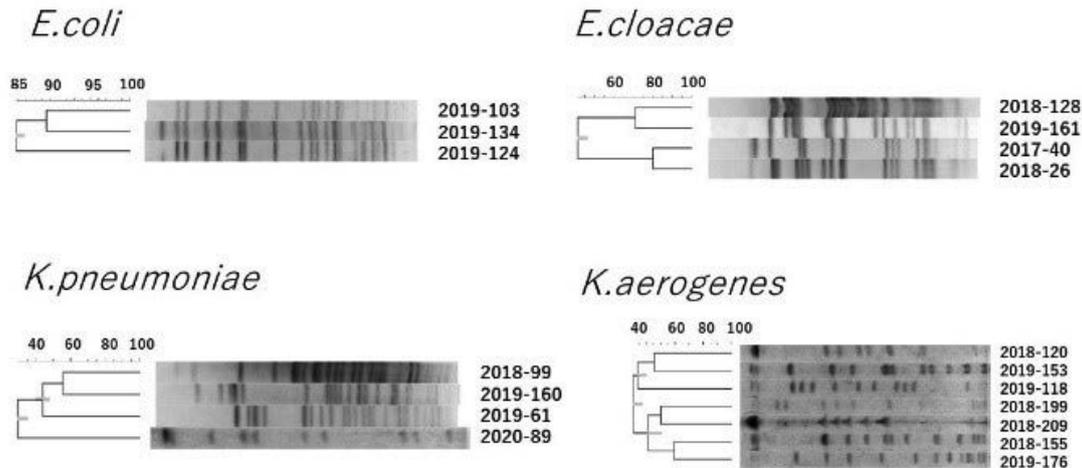


図1 PFGEバンドパターンによる系統樹

いLEN-1遺伝子を有しているため¹⁶⁾、MultiplexPCR法のみでは、どちらを検出しているのか判断するのは困難である。

以前の行政検査で行っていたSingle PCR法の結果と、今回行ったMultiplexPCR法の結果は一致した。これにより、この手法が従来と同等の検査能力を有し、かつ検査に係るコストを削減できることが明らかとなった。

2 PFGE

被検菌25検体についてPFGEを行ったところ、*E. coli*3検体、*E. cloacae*4検体、*C. freundii*1検体、*K. aerogenes*7検体、*K. pneumoniae*4検体、*M. morgani*1検体からバンドパターンが明瞭な泳動像が得られた。*S. marcescens*3検体についてはいずれも泳動像がスメアとなってしまい、解析を行うことができなかった。

得られたバンドパターンから系統解析を行ったところ、*E. coli*3検体については85%以上の相同性が得られた(図1)。

また、*E. cloacae*4検体のうち2検体で80%以上の相同性が得られた。一方で、*E. cloacae*の残りの2検体は70%、*K. aerogenes*7検体は60%以下、*K. pneumoniae*4検体は60%未満の相同性であった。Tenoverの分類¹⁷⁾に照らせば*E. coli*3検体及び*E. cloacae*2検体は「関連性がある(バンドの相違が2~3)」と判断される。このうち*E. coli*3検体は同一の医療機関から搬入され、検査により院内感染に起因すると判断されたもので、今回のPFGEでその結果が裏付けられた。相同性が80%以上を示した*E. cloacae*2検体は別々の医療機関から検査依頼を受けたもので、搬入された年度も異なり、両者の関係性については不明である。その他の*E. cloacae*2検体、*K. aerogenes*7検体、*K. pneumoniae*4検体については関連性を確認できなかった。

IV まとめ

本研究によって検討したMultiplexPCR法により、検査に係る費用や労力は大幅に減らすことができた。この稿では述べていないが、Single PCR法にVIM-2型及びGES型のプライマーセットを加え、シーケンサーによるIMP型及びNDM型のさらに詳細な遺伝子型鑑別についても検討を行った。今後は、IMI型、KHM型、SMB型のプライマーセットも加えていきたい。

PFGEのバンドパターンによる系統解析は院内感染事例等のアウトブレイク時における分子疫学的解析に有用であるが、手法が複雑で結果が得られるまでに数日を要する。近年、プロテイナーゼK等のタンパク質分解酵素を使用せず、検査時間を短縮できる手法が開発されている¹⁸⁾。この手法を導入することにより、検査時間を十数時間短縮できることが期待される。

謝辞 本稿を終えるにあたり、検体の提供、搬送にご協力いただいた医療機関及び保健所の関係者の方々に深謝いたします。

参考文献

- 1) O'Neill J. : Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations (2016)
- 2) WHO : Global Action Plan on Antimicrobial Resistance , <http://www.emro.who.int/health-topics/drug-resistance/global-action-plan.html> (2021年6月29日現在)
- 3) 厚生労働省 : 薬剤耐性アクションプラン (2016-2020) , <https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/0000120769.pdf> (2021年6月29日現在)

- 4) 平井 潤, 山岸 由佳, 三嶋 廣繁 : I. 注目される感染症. 1. カルバペネム耐性腸内細菌科細菌. 日本内科学雑誌, **103**(11), 2657-2665 (2014)
- 5) 厚生労働省医政局地域医療計画課通知 : 医療機関における院内感染対策について, 平成 26 年 12 月 19 日, 医政地発 1219 第 1 号 (2014)
- 6) 厚生労働省健康局結核感染症課通知 : 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, 平成 29 年 3 月 28 日, 健感発 0328 第 4 号 (2017)
- 7) 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)
- 8) Watahiki M., Kawahara R., Suzuki M., *et al.* : Single-Tube Multiplex Polymerase Chain Reaction for the Detection of Genes Encoding *Enterobacteriaceae* Carbapenemase, *Japanese Journal of Infectious Diseases*, **73**, 166-172 (2020)
- 9) Pérez- Pérez F.J., Hanson N.D. : Detection of Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamase Genes in Clinical Isolates by Using Multiplex PCR, *Journal of Clinical Microbiology*, **40**(6), 2153-2162 (2002)
- 10) Le Q.P., Ueda S., Nguyen T.N.H., *et al.* : Characteristics of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Retail Meats and Shrimp at a Local Market in Vietnam, *Foodborne Pathogens and Disease*, **12**(8), 719-725 (2015)
- 11) 国立感染症研究所 : 令和元年度 薬剤耐性菌の検査に関する研修 タイピングコース I 配布資料 (2019)
- 12) 国立感染症研究所, 厚生労働省健康局, 結核感染症課 : (特集) カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) 感染症 : 病原体検出情報 **40**(2), No.468 (2019)
- 13) 川上小夜子, 斧康雄, 山本美和, 他 : 当院で分離された *Escherichia coli* と *Klebsiella pneumoniae* の産生する Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL) に関する基礎的研究—第 2 報, 感染症学雑誌, **74**, 24-29 (1999)
- 14) Yagi T., Kurokawa H., Shibata N., *et al.* : A preliminary survey of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan, *FEMS Microbiology Letters*, **184**, 53-56 (2000)
- 15) 金森政人, 遠藤英子 : 院内感染起因腸内細菌に拡散・伝播する CTX-M 型 ESBL 遺伝子, 杏林医学会誌, **35**(3), 205-214 (2004)
- 16) Arakawa Y., Ohta M., Kido N., *et al.* : Close evolutionary relationship between the chromosomally encoded β -lactamase gene of *Klebsiella pneumoniae* and the TEM β -lactamase gene mediated by R plasmids, *Federation of European Biochemical Societies*, **207**(1), 69-74 (1986)
- 17) Tenover F.C., Arbeit R.D., Goering R.V., *et al.* : Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing, *Journal of Clinical Microbiology*, **33**(9), 2233-2239 (1995)
- 18) 白木 豊 : 非酵素法の改良による迅速・簡便なパルスフィールドゲル電気泳動法の開発, 獣医公衆衛生研究, **3**(22-2), 30-32 (2020)