

[ノート]

兵庫県におけるカルバペネム耐性腸内細菌目細菌（CRE）感染症 患者由来菌株の解析（2017～2023 年）

齋藤 悦子^{1*} 池端 真帆¹ 荻田 堅一¹ 坂野 桂² 押部 智宏¹ 大岡 徹彦¹

Analysis of carbapenem-resistant *Enterobacterales* (CRE) in Hyogo Prefecture, 2017-2023.

Etsuko SAITO^{1*}, Maho IKEBATA¹, Kenichi OGITA¹, Katsura SAKANO², Tomohiro OSHIBE¹ and
Tetsuhiko OOOKA¹

¹ Infectious Disease Research Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health Science, 1819-14, Kanno, Kanno-cho, Kakogawa 675-0003, Japan ²Kakogawa Health and Welfare Office, Higashi-Harima District Administration Office, Hyogo Prefecture

We investigated 192 carbapenem-resistant *Enterobacterales* (CRE) isolates from patients of CRE infection and patient information in Hyogo prefecture for 2017- 2023. Forty-eight (25.0%) isolates were carbapenemase-producing *Enterobacterales* (CPE) and 30 (88.2%) of 34 *Escherichia coli* isolates and 11 (45.8%) of 24 *Klebsiella pneumoniae* isolates were CPE.

The most dominant carbapenemase-encoding gene was *bla*_{IMP-6} (41/48) , followed by *bla*_{NDM-1} (4/48) , *bla*_{IMP-1} (2/48) , *bla*_{IMP-19} (1/48) . Thirty-six of 41 *bla*_{IMP-6} harboring isolates carried *bla*_{CTX-M-2}, suggesting that these isolates had IncN plasmid encoding *bla*_{IMP-6} and *bla*_{CTX-M-2}. In 2022 and 2023, 4 CPE isolates harboring *bla*_{NDM-1} were detected from patients without history of overseas travel. Continuous investigation of CRE isolates is useful in understanding regional characteristics of CRE infection.

I はじめに

近年、薬剤耐性（AMR: Antimicrobial Resistance）菌が世界的な問題となっている。2015年にWHOは「AMRに関するグローバル・アクション・プラン」を採択し、加盟各国に薬剤耐性対策を推進するための自国の行動計画を策定することを求めた。これを受け、日本でも2016年に「AMR対策アクションプラン（2016-2020）」を策

定し、現在は新たに取りまとめられた「AMR対策アクションプラン（2023-2027）」¹⁾に基づき、ヒト、動物、環境に関わるものが連携して取り組むワンヘルス・アプローチの考え方に基づく取り組みが推進されている。

カルバペネム耐性腸内細菌目細菌（carbapenem-resistant *Enterobacterales*, CRE）は抗菌薬の中でも重要なカルバペネム系抗菌薬に耐性を示す腸内細菌目細菌で、なかでもカルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌（carbapenemase-producing *Enterobacterales*, CPE）はカルバペネム系抗菌薬だけでなくほとんどのβ-ラクタム系抗菌薬に耐性を示し、医療現場で脅威となっている。CPEのカルバペネマーゼをコードする遺伝子の多くは

¹ 兵庫県立健康科学研究所 感染症部

* 〒675-0003 兵庫県加古川市神野町神野 1819-14

² 兵庫県東播磨県民局 加古川健康福祉事務所

他の系統の薬剤耐性遺伝子とともにプラスミド上に存在し、接合により菌種を越えて伝達され、医療現場での拡散など大きな問題となることが知られている。

CRE 感染症は 2014 年より感染症法で五類全数把握対象疾患に指定され、さらに 2017 年 3 月の厚生労働省健康局結核感染症課長通知により、地方衛生研究所等は耐性遺伝子検出など分離株の検査を行い、感染症サーベイランスシステム（NESID）により報告することとされている²⁾。CRE についてカルバペネマーゼやその他のβ-ラクタマーゼ遺伝子保有状況などを解析し、地域における流行状況を把握することは、CRE 感染症対策を講じる上で重要である。今回、2017 年から 2023 年に当所に搬入された CRE の届出患者情報と薬剤耐性遺伝子検出状況をまとめたので報告する。

II 材料と方法

1. 供試菌株

2017 年 4 月から 2023 年 12 月に兵庫県管内の CRE 届出患者から分離され、当所に搬入された CRE 菌株 192 株を検体として用いた。

2. CRE 感染症患者の届出情報

感染症サーベイランスシステム（NESID）に登録された情報を元に、主な症状、分離検体、性別、年代について集計を行った。

3. 菌種の確認

生化学性状試験及び質量分析法（MALDI-TOF MS）により菌種の確認を行った。質量分析は Microflex FRL（ブルカーダルトニクス）、解析ソフトは Biotyper を使用した。

4. カルバペネマーゼ産生性確認試験

病原体検出マニュアル³⁾に従い、modified Carbapenemase Inactivation Method（mCIM）により実施した。

5. 阻害剤を用いたβ-ラクタマーゼ産生性の確認

病原体検出マニュアル³⁾及び薬剤耐性菌研修会資料⁴⁾に従い、メルカプト酢酸ナトリウム（SMA）ディスク、クラブラン酸及びスルバクタム、アミノフェニルボロン酸及びクロキサシリンを阻害剤とし、メトロβ-ラクタマーゼ、基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ（ESBL）、AmpC 型β-ラクタマーゼ産生性の確認を行った。

6. PCR 法による耐性遺伝子検出と型別

カルバペネマーゼ（IMP 型、NDM 型、KPC 型、OXA-48 型、VIM 型及び GES 型）、ESBL（TEM 型、SHV 型、CTX-M-1 group、CTX-M-2 group、CTX-M-9 group 及び CTX-M-8/25 group）、AmpC β-ラクタマーゼ（MOX 型、CIT 型、DHA 型、ACC 型、EBC 型及び FOX 型）について、QIAGEN multiplex PCR plus kit を用いた multiplex PCR 法により検索した⁵⁾。カルバペネマーゼ及び ESBL 遺伝子が検出された菌株について、型別用プライマーを用いて PCR 法を実施し、得られた産物の塩基配列をダイレクトシーケンス法により決定し、アミノ酸配列の確認により型別を行った。

III 結果及び考察

1. CRE 感染症患者の届出情報

当所に搬入された CRE 菌株数は 2017 年に 19 株、2018 年に 30 株、2019 年に 36 株、2020 年に 23 株、2021 年に 24 株、2022 年に 26 株、2023 年に 34 株であり、継続的に搬入があった。性別は男性が 119 例（62.0%）、女性が 73 例（38.0%）であり、男性の方が多かった。患者の年代は 30 代から 100 代で、60 代以上が 90%以上を占めた（Fig. 1）。

主な症状は、尿路感染症が 92 例で最も多く（47.9%）、次いで肺炎が 33 例（17.2%）、菌血症 24 例（12.5%）、敗血症 20 例（10.4%）であった。また 31 例（16.1%）に発熱の記載があった（Fig. 2）。

CRE が分離された検体については、尿が 78 例（40.6%）で最も多く、次いで血液が 44 例（22.9%）、喀痰 27 例（14.1%）、腹水 11 例（5.7%）、膿 10 例（5.2%）、胆汁 7 例（3.6%）であった。その他 15 例（7.8%）は創部の感染部位や術後のドレーン排液等であった（Fig. 3）。

2. 菌種の内訳

分離された菌種は、*K. aerogenes* が 86 株（44.8%）で最も多く、次いで *E. coli* が 34 株（17.7%）、*E. cloacae* complex が 33 株（17.2%）、*K. pneumoniae* が 24 株（12.5%）、*S. marcescens* が 6 株（3.1%）、*C. freundii* が 3 株（1.6%）、*P. alcalifaciens* が 2 株（1.0%）、その他が 4 株であった。2022 年に NESID で報告された全国の CRE の菌種は、*K. aerogenes*（39.8%）が最も多く、次いで *E. cloacae* complex（29.1%）、*K. pneumoniae*（9.6%）、*E. coli*（5.3%）、*S. marcescens*（4.3%）、*C. freundii*（2.2%）であり、上位 6 菌種の順は 2017 年以降変わっていない⁶⁾。兵庫県で検出された CRE の検出上位の菌種は全国の状況と比較し、*E. cloacae* complex が少な

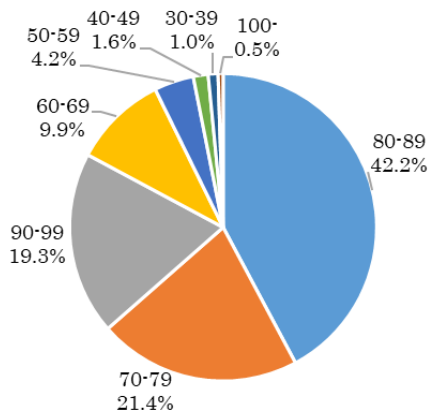


Fig.1 Patient age of CRE infection

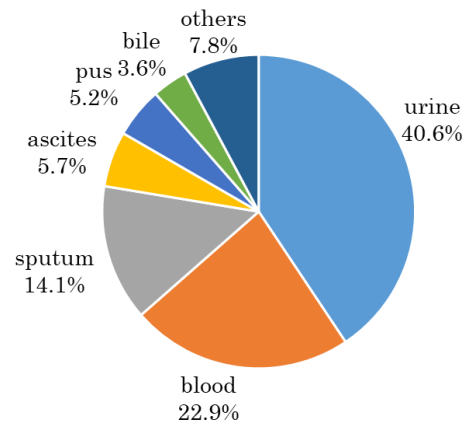


Fig.3 Specimen source

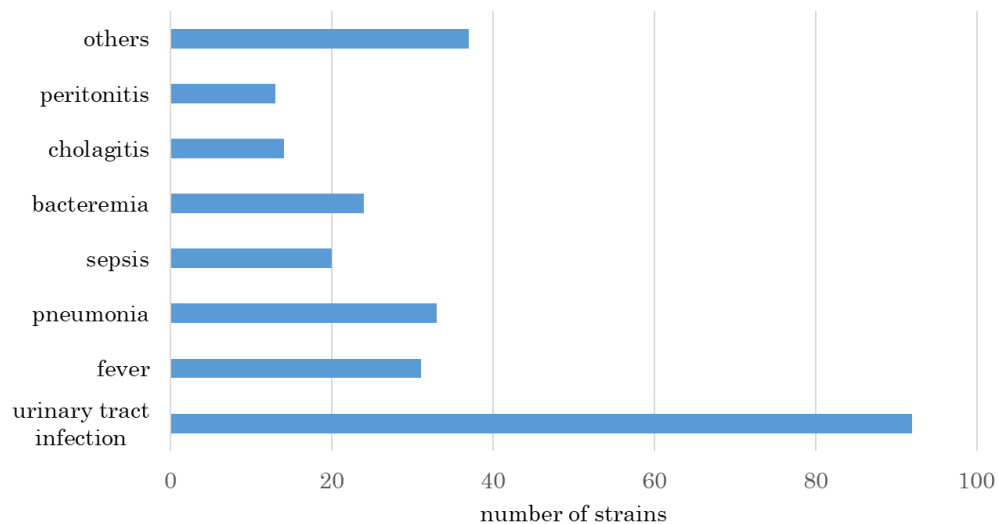


Fig.2 Main symptoms of CRE infection patients

く, *E. coli* と *K. pneumoniae* が多い傾向にあった。

3. β -ラクタマーゼ遺伝子検出状況

いずれかのカルバペネマーゼ遺伝子が陽性であった株は 48 株 (25.0%) であり, 全て mCIM 陽性であった。年別にみると, 2017 年は 7 株 (36.8%), 2018 年は 12 株 (40%), 2019 年は 7 株 (19.4%), 2020 年は 4 株 (17.4%), 2021 年は 5 株 (20.8%), 2022 年は 3 株 (11.5%), 2023 年は 10 株 (29.4%) で, 2017 年と 2018 年, 2023 年に高い割合を示した。2018 年から 2022 年に報告された全国の CRE のカルバペネマーゼ遺伝子陽性率は 14.9%-17.4% であり^{8,13)}, これらに比較して 2022 年以外はやや高い傾向であった。カルバペネマーゼ遺伝子陽性率は菌種によって大きく異なり, *E. coli* で最も高く (88.2%), 次いで *K. pneumoniae* (45.8%), *E. cloacae*

complex (15.2%) の順に高かった (Fig.4)。

検出されたカルバペネマーゼ遺伝子は IMP 型が 44 株 (91.7%) と大半を占め, IMP-6 が 41 株から, IMP-1 が 2 株から, IMP-19 が 1 株から検出された。また NDM-1 が *K. pneumoniae* 2 株と *E. cloacae* complex 2 株から検出された。

IMP 型カルバペネマーゼ遺伝子が検出される菌種は地域特異性があり, 関東甲信静では *E. cloacae* complex が最も多く, 近畿では *K. pneumoniae* や *E. coli* が多いことが報告されている^{12,14)}。また日本で検出される IMP 型のほとんどは IMP-1 と IMP-6 であり, IMP-6 は主に近畿や中四国で検出され, IMP-1 はそれ以外の地域を中心に全国的に検出されることが知られている^{8,10-14)}。兵庫県での検出状況もこれらの報告と同様の傾向がみられた。また, 2023 年に 1 株から検出された IMP-19 は 2022 年に

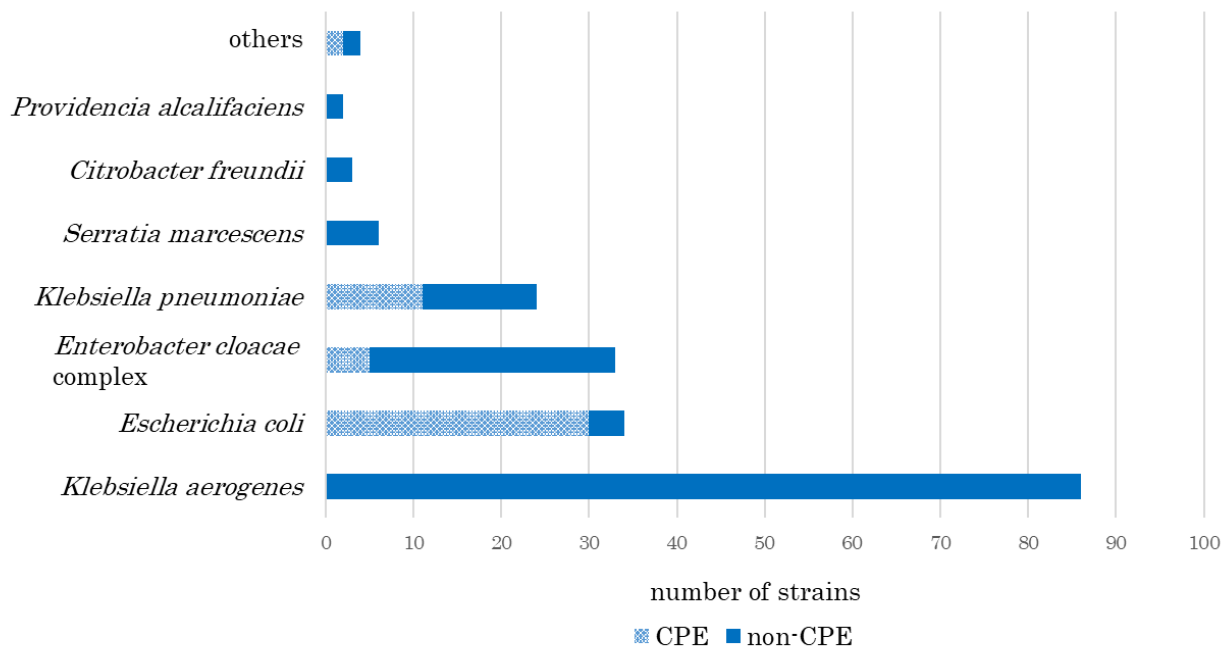


Fig.4 Distribution by bacterial species of CRE

関東甲信静地域より1株の報告があるのみの稀な型であった⁸⁾。

最も検出数の多かった *K. aerogenes* は全て non-CPE であり、ほとんどの株でアミノフェニルボロン酸及びクロキサシリンを用いた阻害試験で陽性となり、AmpC β-ラクタマーゼ産生が示唆された。これらの株は今回検索した AmpC β-ラクタマーゼ遺伝子はすべて陰性であったが、元来保有している染色体性の AmpC β-ラクタマーゼの過剰産生と外膜透過性低下によりカルバペネム耐性を示したものと考えられた¹⁵⁾。

近年、海外型のカルバペネマーゼが渡航歴のない患者から各地で検出され、多くが NDM 型であったことが報告され^{8, 11-13)}、札幌市では NDM-1 陽性の *K. oxytoca* が地域内で蔓延している可能性が報告されている¹⁶⁾。兵庫県でも 2022 年に同一医療機関の海外渡航歴のない患者 2 名から分離された *K. pneumoniae* 2 株が NDM 型カルバペネマーゼ遺伝子陽性となり、型別の結果共に NDM-1 であった。NDM-1 は 2023 年に別の医療機関より届出された *E. cloacae* complex から検出されており、今後の動向を注視する必要がある。

CPE の 48 株のうち、41 株からは ESBL 遺伝子も検出された (Table 1)。これらのうち 37 株は CTX-M-2 group 遺伝子を保有しており、12 株は CTX-M-9 group 遺伝子、7 株は CTX-M-1 group 遺伝子を保有していた。シーケンス解析の結果、CTX-M-2 group 遺伝子は全て CTX-M-2 であり、CTX-M-1 group 遺伝子は全て CTX-M-15、CTX-M-9

group 遺伝子は CTX-M-14 と CTX-M-27 であった。近畿地方の *K. pneumoniae* や *E. coli* などの間の IMP-6 の拡散には CTX-M-2 を共保有する IncN プラスミドが関与していることが報告されており¹⁷⁾、兵庫県内においてもこのタイプのプラスミドが拡散していることが示唆された。*E. coli* 12 株と *K. pneumoniae* 2 株から TEM 型遺伝子、*K. pneumoniae* 8 株からは SHV 型遺伝子が検出されたが、シーケンス解析の結果全てペニシリナーゼであった。また、3 株から EBC 型遺伝子が検出された。これらの株は全て *Enterobacter cloacae* complex であり、染色体上に保有しているものが検出されたものと考えられた。

Non-CPE 144 株のうち 40 株から何らかの耐性遺伝子が検出され (Table 2)、CTX-M 型 ESBL 遺伝子が検出されたものは 16 株あった。

CTX-M-15 を保有するものが最も多く 11 株 (*K. pneumoniae* 9 株、*E. coli* 2 株) であり、CTX-M-14 が 2 株 (*K. pneumoniae* 1 株、*E. cloacae* complex 1 株)、CTX-M-33 が 1 株 (*E. coli*)、CTX-M-2 が 1 株 (*P. stuartii*)、CTX-M-9 が 1 株 (*E. cloacae* complex) であった。CTX-M 型 ESBL 産生菌の主体は *E. coli* であるが¹⁵⁾、今回 CRE の中から検出された ESBL 産生菌 (non-CPE) は *K. pneumoniae* が最も多かった。検出された TEM 型遺伝子、SHV 型遺伝子は、*K. pneumoniae* 1 株から検出された型別不能の SHV を除き全てペニシリナーゼであった。

AmpC 型遺伝子が検出された non-CPE は 23 株あり、うち 20 株から EBC 型遺伝子が検出された。また *K.*

Table 1 Bacterial species and β -lactamase genotype of CPE

bacterial species	detected β -lactamase genes	number of strains
<i>E. coli</i>	IMP-6, CTX-M-2	9
	IMP-6, CTX-M-2, CTX-M-27	7
	IMP-6, CTX-M-2, TEM	5
	IMP-6, CTX-M-2, CTX-M-14, TEM	3
	IMP-6, TEM	3
	IMP-6, CTX-M-15,	1
	IMP-6, CTX-M-15, CTX-M-2, TEM	1
	IMP-1, CTX-M-15, CTX-M-2	1
<i>K. pneumoniae</i>	IMP-6, CTX-M-2, SHV	4
	IMP-6, CTX-M-15, CTX-M-2, TEM,	2
	IMP-6, CTX-M-2	2
	NDM-1, SHV	2
	IMP-19, SHV	1
<i>E. cloacae</i> complex	IMP-6, CTX-M-2	2
	NDM-1, CTX-M-9, EBC	2
<i>R. omithinolytica</i>	IMP-6, CTX-M-2, EBC	1
	IMP-1	1
<i>K. oxytoca</i>	IMP-6, CTX-M-2	1

pneumoniae 2 株から DHA 型遺伝子が, *M. morganii* 1 株から MOX 型遺伝子と DHA 型遺伝子が検出された. これらの株は *K. aerogenes* 同様, カルバペネマーゼ以外の β -ラクタマーゼの過剰産生と膜透過性の変化等によりカルバペネム耐性を示したものと推察された.

IV 結 論

2017 年から 2023 年に届出された CRE 感染症患者由来菌株 192 株のうち 48 株 (25.0%) が CPE であり, CPE の占める割合は全国平均に比べやや高い傾向にあった. CPE は IMP-6 を保有する *E. coli* と *K. pneumoniae* が多く, 近畿地方特有の傾向に合致するものであったが, 2022 年以降これまで検出のなかった NDM-1 保有株が海外渡航歴のない患者から検出されており, 今後の動向に注意する必要がある. CRE の耐性遺伝子保有状況等を継続的に解析することは, 地域での拡散状況を把握するのに有用と考えられる.

謝 辞

検体採取, 連絡調整にご協力いただきました県保健医療部疾病対策課, 県健康福祉事務所並びに医療機関の皆様方に深謝いたします.

文 献

- 1) 国際的に脅威となる感染症対策の強化のための国際連携等関係閣僚会議: 薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプラン 2023-2027. 令和 5 年 4 月 7 日 (2023)
- 2) 厚生労働省健康局結核感染症課長通知: 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

Table 2 Bacterial species and β -lactamase genotype of non-CPE

bacterial species	detected β -lactamase genes	number of strains
<i>E. coli</i>	CTX-M-15	1
	CTX-M15, TEM	1
	CTX-M-33	1
	CTX-M-15, TEM, SHV	6
<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-15, TEM	2
	CTX-M-15, SHV	1
	CTX-M-14, SHV	1
	SHV	1
	SHV, DHA	1
	TEM, SHV, DHA	1
	CTX-M-14	1
<i>E. cloacae</i> complex	CTX-M-9, EBC	1
	TEM	1
	EBC	19
<i>P. stuartii</i>	CTX-M-2, TEM	1
<i>M. morganii</i>	MOX, DHA	1

0328 第 4 号 (2017)

- 3) 国立感染症研究所: 病原体検出マニユアル薬剤耐性菌 令和 2 年 6 月改定版 Vre2.1, (2020)
- 4) 薬剤耐性検査法マニユアル__令和元年度 薬剤耐性菌の検査に関する研修 (令和元年 11 月修正_Ver.6.1)
- 5) Watahiki, M., Kawahara, R., Suzuki, M., Aoki, M., Uchida, K., Matsumoto, Y., Kumagai, Y., Noda, M., Masuda, K., Fukuda, C., Harada, S., Senba, K., Suzuki, M., Matsui, M., Suzuki, S., Shibayama, K. and Shinomiya, H. : Single-tube multiplex polymerase chain reaction for the detection of genes encoding Enterobacteriaceae carbapenemase. Jpn. J. Infect. Dis., **73**, 166–172 (2020)
- 6) 中山達哉, 山口貴弘, 陣内理生, 河原隆二, 朝倉宏, 久米田裕子, 長谷篤: 輸入食品におけるプラスミド伝播が推定されるセフェム系及びカルバペネム系プラスミド性薬剤耐性菌の汚染状況. 日食微誌, **38** (2), 67-66 (2021)
- 7) Pérez-Pérez, F. J. and Hanson, N. D. : Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. J. Clin. Microbiol., **40**, 2153–2162 (2002)
- 8) 国立感染症研究所: 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. 病原体検出情報 (IASR) , **45**, 129-130 (2024)
- 9) 国立感染症研究所: カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (carbapenem-resistant Enterobacterales: CRE) 病原体サーベイランス, 2017 年. 病原体検出情報 (IASR) , **39**, 162-163 (2018)
- 10) 国立感染症研究所: カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (carbapenem-resistant Enterobacterales, CRE) 病原体サーベイランス, 2018 年. 病原体検出情報

- (IASR) , **40**, 157-158 (2019)
- 11) 国立感染症研究所: カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (carbapenem-resistant Enterobacterales: CRE) 病原体サーベイランス, 2019 年. 病原体検出情報 (IASR) , **42**, 23-124 (2021)
- 12) 国立感染症研究所: カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (carbapenem-resistant Enterobacterales: CRE) 病原体サーベイランス, 2020 年. 病原体検出情報 (IASR) , **43**, 215-216 (2022)
- 13) 国立感染症研究所: 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, 2021 年. 病原体検出情報 (IASR) , **44**, 130-131 (2023)
- 14) 梅田薫, 秋吉充子, 柴川紗恵子, 平井佑治, 中村寛海, 説田景, 吉田英樹: 大阪市におけるカルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) 感染症 サーベイランス (2015 年～2020 年) . 地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所研究年報, **5**, 25-31 (2021)
- 15) 原田荘平: 薬剤耐性腸内細菌目細菌の基礎と疫学 Update. 日臨微生物会誌, **31** (4) , 229-238 (2021)
- 16) 石黒真琴, 尾島拓也, 大門世理奈, 菊地正幸, 三上篤, 伊藤智: 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) . 札幌市衛研年報, **50**, 37-43 (2023)
- 17) Kayama, S., Shigemoto, N., Kuwahara, R., Oshima, K., Hirakawa, H., Hisatsune, J., Jové, T., Nishio, H., Yamasaki, K., Wada, Y., Ueshimo, T., Miura, T., Sueda, T., Onodera, M., Yokozaki, M., Hattori, M., Ohge, H. and Sugai, M. : Complete Nucleotide Sequence of the IncN Plasmid Encoding IMP-6 and CTX-M-2 from Emerging Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* in Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* **59**, 1356-1359 (2014)

(令和 7 年 3 月 31 日受理)