

100℃で10分間加熱後、10,000~13,000 rpmで5分間遠心分離した上清をDNA鋳型として使用した。

5. β-ラクタマーゼ遺伝子検査

全株に対して、MBL遺伝子（IMP型、NDM型、VIM型）、KPC型カルバペネマーゼ遺伝子、OXA-48型カルバペネマーゼ遺伝子及びGES型β-ラクタマーゼ（GES型）遺伝子のマルチプレックスPCRを実施した¹⁵⁾。マルチプレックスPCRでカルバペネマーゼ遺伝子が検出された菌株に対しては、該当する遺伝子のシングルPCRも実施した¹⁴⁾。また、全株に対して、プラスミド性AmpC型β-ラクタマーゼ遺伝子のマルチプレックスPCRを実施した¹⁶⁾。

カルバペネマーゼ及びAmpC型β-ラクタマーゼ遺伝子のマルチプレックスPCRには、QIAGEN Multiplex PCR Plus Kit（QIAGEN, Venlo, Netherlands）を使用し、添付文書に従って、プライマー濃度0.2 μM、DNA量1 μL、反応液量25 μLになるよう反応液を調製した。増幅は、初期変性95℃5分、95℃30秒、60℃90秒、72℃60秒の反応

を30サイクル、最終伸張68℃10分という条件で実施した。

カルバペネマーゼ遺伝子のシングルPCRには、SapphireAmp Fast PCR Master Mix（タカラバイオ(株)、滋賀）を使用し、添付文書に従って、プライマー濃度0.8 μM、DNA量1 μL、反応液量25 μLになるよう反応液を調製した。増幅は、初期変性94℃1分、98℃5秒、55℃5秒、72℃10秒の反応を30サイクル、最終伸張72℃1分という条件で実施した。

結果はアガロースゲル電気泳動により判定した。使用したプライマーを表1に示した。

6. 菌種同定試験

感染症サーベイランスシステム（NESID）登録情報、または管轄保健所からの検体送付書に菌種名の記載がない菌株に対して、IDテスト・EB-20「ニッスイ」（日水製薬(株)、東京）を用いた菌種同定試験を実施した。検査法は添付文書に従った。

表1 β-ラクタマーゼ遺伝子検査に使用したプライマー（カルバペネム耐性腸内細菌科細菌）

検査対象	遺伝子型	プライマー名	配列 (5' → 3')	増幅産物のサイズ	文献
メタロ-β-ラクタマーゼ (マルチプレックスPCR)	IMP型	mc-imp-f1	TCTCRATCTATCCCCACGTATGC	269 bp	
		mc-imp-f2	TCTCAATCTATTCCAACATATGCATCTG		
		mc-imp-r1	GCGGACTTTGGCCAAGCTTCTA		
		mc-imp-r2	GCMGAATGTGGCCACGCTTCAA		
	NDM型	mc-ndm-f	CGGTTTGGCGATCTGGTTTT	207 bp	
		mc-ndm-r	GACCGGCAGGTTGATCTCC		
VIM型	mc-vim-f	GTTTGGTCGCATATCGCAAC	155 bp	15)	
	mc-vim-r	CCAATTTGCTTYTCAATCTCCG			
セリン-β-ラクタマーゼ (マルチプレックスPCR)	KPC型	mc-kpc-f	CGGAACCATTCGCTAAACTCG	322 bp	
		mc-kpc-r	AACAAATTGGCGGCGCGT		
	OXA-48型	mc-oxa48-f	GCTCTGGAATGAGAATAAGCAGCA	125 bp	
		mc-oxa48-r2	TAACCACGCCAAATCGAG		
	GES型	mc-ges-f2	CTGTGGCTAAAGTCCTCTATGGCG	94 bp	
		mc-ges-r2	GTCGCGTCTCCCGTTTGGTT		
メタロ-β-ラクタマーゼ (シングルPCR)	IMP型 (共通)	IMPgen-F	GAATAGRRTGGCTTAAAYTCTC	188 bp	
		IMPgen-R	CCAAACYACTASGTTATC		
	IMP-1型	IMP-1-F	ACCGCAGCAGAGTCTTTGCC	587 bp	14)
		IMP-1-R	ACAACCAGTTTTGCCTTACC		
IMP-2型	IMP-2-F	GTTTTATGTGTATGCTTCC	678 bp		
	IMP-2-R	AGCCTGTTCCCATGTAC			
AmpC型β-ラクタマーゼ (プラスミド性)	MOX型	MOX-F	GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT	520 bp	
		MOX-R	CACATTGACATAGGTGTGGTGC		
	CIT型	CIT-F	TGGCCAGAAGTACAGGCAAA	462 bp	
		CIT-R	TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC		
	DHA型	DHA-F	AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT	405 bp	
		DHA-R	CCGTACGCATACTGGCTTTGC		
	ACC型	ACC-F	AACAGCCTCAGCAGCCGTTA	346 bp	
		ACC-R	TTCGCCGCAATCATCCCTAGC		
EBC型	EBC-F	TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG	302 bp		
	EBC-R	CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT			
FOX型	FOX-F	AACATGGGGTATCAGGGAGATG	190 bp		
	FOX-R	CAAAGCGCGTAACCGGATTGG			

結果及び考察

1. 2021年の菌株搬入状況及びカルバペネム耐性腸内細菌科細菌（CRE）の検査実施率について

2021年1～12月に道立保健所管内で届出されたCRE感染症事例は30件であった。このうち3件は滝川保健所管内で7月、10月、11月の計3回、同一患者からCREが届出された事例であったことから、実際の患者数は28名であった。当所には、滝川保健所の同一患者事例3件を含む届出事例10件（患者数8名）からの分離株が搬入され、検査実施率は届出数で33.3%（30件中10件）、患者数で28.6%（28名中8名）であった。

旭川市保健所管内の届出事例は3件（患者数3名）であった。全事例から分離株が搬入され、検査実施率は100%（3件中3件）であった。札幌市、小樽市、函館市保健所管内の届出事例はそれぞれ50件、0件、2件で、これら3市から当所への菌株搬入はなかった。政令市・中核市を含む道内全域の検査実施率（届出数）は、15.3%（85件中13件）であった。

VRE感染症は江差保健所管内で1件届出されたが、当所への菌株搬入はなかった。また、政令市・中核市を含む道内全域でMDRA及びVRSA感染症の届出はなかった。

CREについて、これまでの道立保健所管内届出事例の検査実施率（届出数）の推移を見ると、2019年6～12月85.0%（20件中17件）¹³⁾、2020年58.6%（29件中17件）¹⁷⁾、2021年33.3%（30件中10件）と年々低下している。2020年からは政令市・中核市からの検査依頼も受け入れているが、検査実績があるのは旭川市保健所管内の事例のみである。CREのうち、臨床分野においてより大きな

問題となり得るのはカルバペネマーゼ産生株であるが^{8,14)}、感染症法上の届出に必要な検査項目にはカルバペネマーゼ産生性や遺伝子の確認が含まれていないため¹⁴⁾、地方衛生研究所における詳細な解析が求められている¹⁸⁾。CRE（特にカルバペネマーゼ産生株）の正確な現状把握には、届出された全症例に対してカルバペネマーゼ産生性・遺伝子検査を実施する必要がある。しかし、本道においては検査実施率が低下し、適切な全例検査が実施されていない状況にある。CRE検査実施率低下を招いた要因の一つとして考えられるのは、新型コロナウイルス感染症（COVID-19）対応による医療機関や保健所担当者の業務負担の増加である。しかし海外では、薬剤耐性菌（CREを含む）と新型コロナウイルスの重複感染が報告されている¹⁹⁾。また国内でも、COVID-19パンデミック期間中に、第三世代セファロスポリン耐性*K. pneumoniae*の感染患者数及び分離率が増加したことが報告されている²⁰⁾。このような状況下においてCRE検査実施率の低下は、今後の薬剤耐性対策を進めていく上で大きな問題となり得る。検査実施率の上昇を目指した体制の充実化を図ることが急務と考える。

2. カルバペネマーゼ遺伝子検出状況について

2021年に検査を実施した届出事例由来CRE13株の検査結果と、NESIDまたは管轄保健所から得られた患者情報及び菌種を表2に示した。検査の結果、釧路保健所管内の届出患者由来の1株（菌株No.2518、*Serratia marcescens*）がIMP-1型MBL遺伝子陽性であった。

過去3年間でカルバペネマーゼ遺伝子が検出された菌株数は、2019年3株（検査菌株数18株）¹³⁾、2020年0株（検査菌株数20株）¹⁷⁾、2021年1株（検査菌株数13株）と大きな変動は認められなかった。また、今回確認された

表2 カルバペネム耐性腸内細菌科細菌の検査結果と患者情報

菌株 No.*1	管轄 保健所	患者情報*2			菌種	検査結果	
		年齢層	性別	届出病院		産生性試験	遺伝子検査
2491	滝川	70代	男	病院1	<i>Klebsiella aerogenes</i> *3	AmpC	-
2494	釧路	80代	男	病院2	<i>Serratia marcescens</i>	AmpC	-
2517	旭川市	60代	男	病院3	<i>K. aerogenes</i> *3	AmpC	-
2518	釧路	80代	男	病院4	<i>S. marcescens</i>	MBL	+ (IMP-1型)
2552	旭川市	80代	男	病院6	<i>Enterobacter cloacae complex</i>	AmpC	-
2553	旭川市	80代	男	病院3	<i>K. aerogenes</i> *3	AmpC	-
2555	釧路	70代	男	病院2	<i>K. aerogenes</i> *3	AmpC	-
2603*4	滝川	70代	女	病院7	<i>K. aerogenes</i> *3	AmpC	-
2607	滝川	80代	男	病院7	<i>E. cloacae</i>	AmpC	+ (EBC型)
2609	留萌	90代	女	病院8	<i>K. pneumoniae</i>	-	-
2612*4	滝川	70代	女	病院7	<i>K. aerogenes</i> *3	AmpC	-
2616*4	滝川	70代	女	病院7	<i>K. aerogenes</i> *3	AmpC	-
2655	滝川	80代	女	病院7	<i>K. aerogenes</i> *3	AmpC	-

*1：北海道立衛生研究所・細菌グループ（細菌感染症）における菌株識別番号

*2：感染症サーベイランスシステム（NESID）登録情報，または管轄保健所からの検体送付書記載内容を一部改変

*3：旧称 *E. aerogenes*

*4：同一患者由来株。2021年7月、10月、11月にNESID届出

AmpC：AmpC型β-ラクタマーゼ

MBL：メタロ-β-ラクタマーゼ

-：検出せず

IMP-1 型 MBL 遺伝子は 2019 年にも検出されていることから¹³⁾、これまでに検査実績のある菌株間の比較においては、道内の CRE の現状に大きな変化はないと考えられた。

3. クロキサシリン阻害試験及び modified Carbapenem Inactivation Method (mCIM) の導入について

本サーベイランスでは、2020 年まで KPC 型カルバペネマーゼ産生性試験として、メロペネム (MEPM) 及びセフメタゾール (CMZ) ディスクを用いたポロン酸阻害試験のみを実施してきた^{13, 17)}。2021 年 1~2 月に搬入された CRE 2 株 (表 3、菌株 No.2491、2517、いずれも *K. aerogenes*) は、MEPM ディスクでポロン酸阻害陽性、CMZ ディスクでポロン酸阻害陰性となったことから、KPC 型カルバペネマーゼ産生が疑われた。しかし遺伝子検査の結果、カルバペネマーゼ遺伝子は認められなかった。そこで、カルバペネマーゼ産生性試験として有用な mCIM と、KPC 型カルバペネマーゼと AmpC 型 β -ラクタマーゼ産生性の鑑別試験として推奨されているクロキサシリン阻害試験を実施した¹⁴⁾。その結果、2 株とも mCIM でカルバペネマーゼ産生は認められなかった。また、1 株 (菌株 No.2491) は MEPM と CMZ の両方でクロキサシリン阻害陽性、1 株 (菌株 No.2517) は MEPM でクロキサシリン阻害陽性となったことから、AmpC 型 β -ラクタマーゼ産生株と判定することができた。4 月に搬入された菌株 (表 3、菌株 No.2552、*Enterobacter cloacae* complex) においても MEPM でのみポロン酸阻害陽性となり、AmpC 型 β -ラクタマーゼ産生株と判定するためにクロキサシリン阻害試験が有用であった。これらを踏まえ以後は、搬入され

た全菌株に対して、クロキサシリン阻害試験を実施するよう検査項目を追加した。

2020 年までは MBL 産生性試験として、阻害剤にメルカプト酢酸ナトリウムを用いたディスク法のみを実施してきた^{13, 17)}。今回認められた IMP-1 型 MBL 遺伝子陽性株は、1 回目の MBL 産生性試験 (ディスク法) では MBL 産生性が確認できなかったが、マルチプレックス PCR で IMP 型遺伝子が検出された (表 4)。そこで、MBL 産生性試験 (ディスク法) の再検査、mCIM 及びシングル PCR による遺伝子検査を実施した結果、MBL 産生性と IMP-1 型遺伝子を確認することができた (表 4)。1 回目の MBL 産生性試験 (ディスク法) で結果が陰性となった要因は不明であった。今後も同様の事例が発生する可能性を考慮し、ディスク法による β -ラクタマーゼ産生性試験と遺伝子検査の結果に齟齬が認められた場合は、mCIM を実施するよう検査項目を追加した。

本稿を終えるに当たり、平素から感染症発生動向調査にご理解・ご協力いただいている関係者の皆様、及び検査法についてご指導いただいている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。

文 献

- 1) 平松啓一：細菌の化学療法. 標準微生物学 第 10 版 (平松啓一, 中込 治編), 医学書院, 東京, 2009, pp.142-167
- 2) 国際的に脅威となる感染症対策関係閣僚会議：薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプラン National Action Plan on Antimicrobial Resistance 2016-2020, 平成 28 年 4 月 5 日,

表 3 β -ラクタマーゼ産生性試験の判定でクロキサシリン阻害試験が有用であった菌株の検査結果 (詳細)

菌株 No.*1	菌種	検査結果							判定
		MBL 産生性	ポロン酸阻害		クロキサシリン阻害		mCIM	遺伝子検査	
			MEPM	CMZ	MEPM	CMZ			
2491	<i>Klebsiella aerogenes</i> *2	-	+	-	+	+	-	-	AmpC
2517	<i>K. aerogenes</i> *2	-	+	-	+	-	-	-	AmpC
2552	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	-	+	-	+	-	NT	-	AmpC

*1: 北海道立衛生研究所・細菌グループ (細菌感染症) における菌株識別番号

*2: 旧称 *E. aerogenes*

AmpC: AmpC 型 β -ラクタマーゼ

MBL: メタロ- β -ラクタマーゼ

MEPM: メロペネム

CMZ: セフメタゾール

mCIM: modified Carbapenem Inactivation Method

-: 検出せず

NT: 検査せず

表 4 β -ラクタマーゼ産生性試験の判定で mCIM が有用であった菌株の検査結果 (詳細)

菌株 No.*1	菌種	検査結果				判定
		MBL 産生性		mCIM	遺伝子検査	
		1 回目	2 回目			
2518	<i>Serratia marcescens</i>	-	+	+	+	(IMP-1 型) MBL

*1: 北海道立衛生研究所・細菌グループ (細菌感染症) における菌株識別番号

MBL: メタロ- β -ラクタマーゼ

mCIM: modified Carbapenem Inactivation Method

-: 検出せず

- <https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/0000120769.pdf> (確認：2022年5月25日)
- 3) The Review on Antimicrobial Resistance: Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. (2014), https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf (確認：2022年5月25日)
 - 4) World Health Organization: Global action plan on antimicrobial resistance. (2015), https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/193736/9789241509763_eng.pdf?sequence=1 (確認：2022年5月25日)
 - 5) Cassini A, Högberg LD, Plachouras D, Quattrocchi A, Hoxha A, Simonsen GS, Colomb-Cotinat M, Kretzschmar ME, Devleeschauwer B, Cecchini M, Ouakrim DA, Oliveira TC, Struelens MJ, Suetens C, Monnet DL, the Burden of AMR Collaborative Group: Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect. Dis.*, **19** (1), 56-66 (2019)
 - 6) Centers for Disease Control and Prevention: Antibiotic resistance threats in the United States 2019. (2019), <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf> (確認：2022年5月25日)
 - 7) Tsuzuki S, Matsunaga N, Yahara K, Gu Y, Hayakawa K, Hirabayashi A, Kajihara T, Sugai M, Shibayama K, Ohmagari N: National trend of blood-stream infection attributable deaths caused by *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in Japan. *J. Infect. Chemother.* **26**(4), 367-371 (2020)
 - 8) 国立感染症研究所感染症情報センター：＜特集＞カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症．病原微生物検出情報，**35** (12), 1-2 (2014)
 - 9) 国立感染症研究所薬剤耐性研究センター，感染症疫学センター：2020年におけるバンコマイシン耐性腸球菌感染症届出患者の増加について．病原微生物検出情報，**42**(5), 14-15 (2021)
 - 10) Ramirez MS, Bonomo RA, Tolmasky ME: Carbapenemases: Transforming *Acinetobacter baumannii* into a yet more dangerous menace. *Biomolecules*, **10**(5), doi: 10.3390/biom10050720 (2020)
 - 11) World Health Organization: Global Priority List of Antibiotic-resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics. (2017), <https://www.quotidianosanita.it/allegati/allegato4135670.pdf> (確認：2022年7月28日)
 - 12) 北海道保健福祉部長通知地保第557号「薬剤耐性菌サーベイランスの実施について」, 平成31年4月25日
 - 13) 小川恵子, 三津橋和也, 宮島祥太, 森本 洋：北海道における薬剤耐性菌サーベイランスの年次報告 (2019)．道衛研所報，**70**, 55-59 (2020)
 - 14) 国立感染症研究所：病原体検出マニュアル 薬剤耐性菌. (2020), <https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/ResistantBacteria20200604.pdf> (確認：2022年5月25日)
 - 15) Watahiki M, Kawahara R, Suzuki M, Aoki M, Uchida K, Matsumoto Y, Kumagai Y, Noda M, Masuda K, Fukkuda 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**(2), 166-172 (2020)
 - 16) Pérez- Pérez FJ and Hanson ND: Detection of Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamase Genes in Clinical Isolates by Using Multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **40**(6), 2153-2162 (2002)
 - 17) 小川恵子, 三津橋和也, 森本 洋：北海道における薬剤耐性菌サーベイランスの年次報告 (2020)．道衛研所報，**71**, 67-71 (2021)
 - 18) 厚生労働省健康局結核感染症課長通知健感発 0328 第4号「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
 - 19) Kariyawasam RM, Julien DA, Jelinski DC, Larose SL, Rennert-May E, Conly JM, Dingle TC, Chen JZ, Tyrrell GJ, Ronksley PE and Barkema HW: Antimicrobial Resistance (AMR) in COVID-19 Patients: a Systematic Review and Meta-analysis (November 2019-June 2021). *Antimicrob. Resist. Infect. Control.*, **11**:45, doi: 10.1186/s13756-022-01058-z (2022)
 - 20) Hirabayashi A, Kajihara T, Yahara K, Shibayama K and Sugai M: Impact of the COVID-19 Pandemic on the Surveillance of Antimicrobial Resistance. *J. Hosp. Infect.*, **117**, 147-156 (2021)