

北海道における薬剤耐性菌サーベイランスの年次報告 (2022)

Annual Report on the Regional Surveillance of Antimicrobial Resistant Bacteria in Hokkaido (2022)

小川 恵子 佐藤 凜 竹脇優太郎

Keiko OGAWA, Rin SATOH and Yutaro TAKEWAKI

Key words : antimicrobial resistant bacteria (薬剤耐性菌) ; CRE (カルバペネム耐性腸内細菌目細菌) ;
Hokkaido (北海道) ; NDM (ニューデリー・メタロ- β -ラクタマーゼ) ; *Klebsiella oxytoca*
(クレブシエラ・オキシトカ)

緒 言

薬剤耐性菌は世界的に深刻な公衆衛生上の脅威である¹⁾。推定で、2019年の薬剤耐性菌に関連した死者数は世界中で495万人、このうち127万人で薬剤耐性菌が直接の死因になったと考えられている²⁾。しかし、各地域で問題となっている薬剤耐性菌の種類や脅威の程度は一様ではなく^{1, 2)}、適切な対策を実施するためには、各地域の発生動向を正確に把握することが重要となる。

わが国では、カルバペネム耐性腸内細菌目細菌 (CRE)、バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE)、薬剤耐性アシネトバクター (MDRA) 及びバンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌 (VRSA) による感染症を、「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) で五類感染症全数把握対象疾患に定めている。この中でも特にCREに関しては、患者からの分離株の検査法や検査結果の報告について、厚生労働省が詳細を定め³⁾、共通の基準に基づいた全国規模のサーベイランスが実施されている。本道では、2019年6月1日から薬剤耐性菌サーベイランスを開始し⁴⁾、札幌市を除く道立及び中核市保健所(合計29カ所)管内で発生した上記4菌種に関して分離株の検査を実施している。また、地域への情報提供の一環として各年の検査結果をまとめて報告している⁵⁻⁷⁾。本稿では、2022年1~12月の本サーベイランスの検査結果をまとめて報告する。

方 法

1. 検査対象菌株

CREは、2022年1~12月に届出された10保健所管内51事例のうち、6保健所管内16事例から分離された17株(1事例は同一患者由来2株搬入)が当所に搬入された。

19保健所管内では、CREの届出がなかった。また、札幌市を除く道内29保健所管内で、CRE以外の本サーベイランス対象菌種(VRE、MDRA及びVRSA)の届出はなかった。

2. β -ラクタマーゼ産生性試験

阻害剤(メルカプト酢酸ナトリウム、ボロン酸、クロキサシリン、クラブラン酸、スルバクタム)を用いたディスク法による β -ラクタマーゼ産生性試験(メタロ- β -ラクタマーゼ(MBL)、KPC型カルバペネマーゼ、AmpC β -ラクタマーゼ(AmpC)、基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ(ESBL))を実施した。検査法は、病原体検出マニュアル⁸⁾及び平成27年度院内感染に関連する薬剤耐性菌の検査に関する研修(国立感染症研究所主催)にて指導を受けた検査法⁹⁾に準拠した。

3. DNA抽出

検査対象菌株からのDNA抽出は以下のとおりに行った。メロペネムディスクを置いて培養したミューラーヒントン寒天平板培地(OXOID)から、ディスク周囲の菌体を滅菌水200 μ LにMcFarland 0.5になるよう懸濁した。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。

4. β -ラクタマーゼ遺伝子検査(PCR)

MBL遺伝子(IMP型、NDM型及び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PCR¹⁰⁾もしくはシングルPCR⁸⁾を実施した。プラスミド性AmpC遺伝子のマルチプレックスPCR¹¹⁾を実施した。ESBL遺伝子(TEM型、SHV型、CTX-M-1グループ、CTX-M-2グループ及びCTX-M-9グループ)のマルチプレックスPCR¹²⁾もしくはシングルPCR^{13, 14)}を実施した。

マルチプレックス PCR には、QIAGEN Multiplex PCR Plus Kit (QIAGEN) を使用し、添付文書に従って、プライマー濃度 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 、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、最終伸長 68℃ 10 分の条件で実施した。

カルバペネマーゼ及び ESBL 遺伝子のシングル PCR には、SapphireAmp Fast PCR Master Mix (タカラバイオ(株)) を使用し、添付文書に従って、プライマー濃度 0.8 $\mu\text{mol/L}$ 、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、最終伸長 72℃ 1 分の条件で実施した。

結果はアガロースゲル電気泳動により判定した。

5. β -ラクタマーゼ遺伝子のサブタイプ同定

PCR により NDM 型 MBL 遺伝子が確認された菌株に対して、サンガー・シークエンス解析によりサブタイプを同定した^{8,15)}。NDM 型 MBL 遺伝子の PCR には、ExTaq (タカラバイオ(株)) を使用し、添付文書に従って、プライマー濃度 0.8 $\mu\text{mol/L}$ 、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、94℃ 30 秒、55℃ 30 秒、72℃ 1 分の反応を 30 サイクル、最終伸長 72℃ 1 分の条件で実施した。増幅産物は ExoSAP-IT PCR Product Cleanup Reagent (ThermoFisher) で精製後、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher) 及び ABI 3500xL (ThermoFisher) を用いてシークエンス解析を実施した。得られた塩基配列は、National Center for Biotechnology Information (NCBI) の Reference Gene Catalog¹⁶⁾ の参照配列と比較し、サブタイプを決定した。

結 果 及 び 考 察

1. 2022 年の菌株搬入状況及びカルバペネム耐性腸内細菌目細菌 (CRE) の検査実施率について

2022 年 1～12 月の道立及び中核市保健所管内における

CRE 検査実施状況を表 1 に示した。

2022 年に届出された CRE 感染症 51 事例 (10 保健所) のうち、16 事例 (6 保健所) の分離株 (17 株) が当所に搬入された。年間合計の検査実施率は 31.4% (51 事例中 16 事例) であった。

本サーベイランスでは、道立保健所管内の事例に加え、2020 年 4 月から中核市保健所管内の検査依頼も受け入れている。これまでの検査実施率 (2019 年は道立のみ、2020 年以降は中核市含む) は 2019 年 6～12 月 85.0% (20 事例中 17 事例)、2020 年 58.1% (31 事例中 18 事例)、2021 年 37.1% (35 事例中 13 事例) と低下傾向にあった。2022 年は、第 46 週までの時点で検査実施率 18.6% (43 事例中 8 事例) と過去最低の水準であった。保健所別に比較すると、全事例の検査を依頼する保健所と、依頼がない保健所に二分され、CRE の現状把握に著しい地域差が生じていた。そこで 2022 年 11 月に、北海道庁から病原体検査の検体確保徹底に関する注意喚起が行われた¹⁷⁾。その結果、第 47～52 週の検査実施率は 100% (8 事例中 8 事例) と著しく改善した。

2. β -ラクタマーゼ遺伝子検出状況について

2022 年に認められたカルバペネマーゼ産生株 (CPE) の検査結果を表 2 に示した。検査を実施した 16 事例のうち CPE は 2 事例で、いずれも NDM-1 MBL 産生 *Klebsiella oxytoca* であった。NDM-1 MBL 産生 *K. oxytoca* の検出は台湾¹⁸⁾、デンマーク¹⁹⁾、中国²⁰⁾ 等海外からの報告はあるが、国内の CRE 病原体サーベイランスでは他県で確認されていない^{21, 22)}。道立及び中核市保健所管内で初確認であると同時に、全国的にも珍しい事例であった。

NDM 型 MBL は、2008 年に世界で初めて確認されたカルバペネマーゼで²³⁾、日本では 2009 年に初めて確認された²⁴⁾。当初はインド・パキстанを中心としたアジア諸国への渡航歴のある患者からの分離が主²⁵⁾ であったことから、「海外型カルバペネマーゼ」と呼ばれる。しかし、近年、海外渡航歴のない患者からも報告され、国内で潜在的に拡散している可能性も指摘されている^{22, 26-28)}。今回、NDM-1 MBL 産生 *K. oxytoca* が分離された患者 2 名も海外渡航歴

表 1 カルバペネム耐性腸内細菌目細菌 (CRE) 検査実施状況 (2022 年 1～12 月、保健所別)

管轄保健所 (道立、中核市)	第 1～46 週 (注意喚起*1 前)		第 47～52 週 (注意喚起*1 後)		年間合計	
	届出事例数	検査実施数 (検査実施率 (%))	届出事例数	検査実施数 (検査実施率 (%))	届出事例数	検査実施数 (検査実施率 (%))
保健所①	3	3 (100.0)	1	1 (100.0)	4	4 (100.0)
保健所②	1	0 (0.0)	0	—	1	0 (0.0)
保健所③	2	0 (0.0)	0	—	2	0 (0.0)
保健所④	3	3 (100.0)	2	2 (100.0)	5	5 (100.0)
保健所⑤	0	—	2	2 (100.0)	2	2 (100.0)
保健所⑥	10	0 (0.0)	2	2 (100.0)	12	2 (16.7)
保健所⑦	1	0 (0.0)	0	—	1	0 (0.0)
保健所⑧	2	0 (0.0)	1	1 (100.0)	3	1 (33.3)
保健所⑨	19	0 (0.0)	0	—	19	0 (0.0)
保健所⑩	2	2 (100.0)	0	—	2	2 (100.0)
小計	43	8 (18.6)	8	8 (100.0)		
合計					51	16 (31.4)

*1: 令和 4 年 (2022 年) 11 月 18 日付け感染症第 3841 号「感染症法に基づく検体等の送付の徹底について」による病原体検査に関する注意喚起

表2 カルバペネム耐性腸内細菌目細菌 (CRE) の検査結果と患者情報 (カルバペネマーゼ産生株; CPE)

管轄	菌株	患者情報 ^{*2}				菌種	検査結果	
保健所	No. ^{*1}	年齢層	性別	届出病院	海外渡航歴		産生性試験	遺伝子検査 (PCR、シーケンス解析)
保健所①	3006	90代	女	病院 A	なし	<i>Klebsiella oxytoca</i>	MBL	+ (<i>bla</i> _{NDM-1})
	3029	80代	男	病院 B	なし	<i>K. oxytoca</i>	MBL	+ (<i>bla</i> _{NDM-1})

^{*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) 登録情報を一部改変

MBL: メタロ-β-ラクタマーゼ

はなかったことから、国内感染事例と考えられたが、感染経路の特定には至らなかった。その後 2023 年 5 月末現在まで NDM-1 MBL 産生 *K. oxytoca* の届出はなく、事例は収束したと考えられる。

2022 年に認められたカルバペネマーゼ非産生株 (non-CPE) の検査結果を表 3 に示した。non-CPE の主流 (14 事例中 10 事例) は AmpC 産生株で、これは 2021 年以前と同様の傾向であった。残り 4 事例のうち、2 事例は CTX-M-1 グループ ESBL 遺伝子保有株であった (保健所①管内・菌株 No.2933 及び保健所⑥管内・菌株 No.3031)。CTX-M 型 ESBL 遺伝子保有株は過去にも、2019 年に 1 事例 (CTX-M-2 グループ、IMP 型 MBL 遺伝子を同時保有、*K. oxytoca*)、2020 年に 2 事例 (いずれも CTX-M-1 グループ遺伝子保有 *Escherichia coli*)、当所の検査で確認している。ESBL 産生株は感染症法の届出対象ではないが、主要

な薬剤耐性菌の一つであり、国立感染症研究所が実施している薬剤耐性菌サーベイランス (JARBS) でも調査対象とされている²⁹⁾。ESBL 遺伝子のサブタイプに関する情報は、本道の薬剤耐性菌対策において重要な基礎データとなり得ることから、今後、シーケンス解析によりサブタイプを同定し、道内の関係機関に情報提供する予定である。

本稿を終えるに当たり、平素から感染症発生動向調査の検体確保と疫学調査にご協力いただいている関係者の皆様、ならびに検査法や対策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) 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

表3 カルバペネム耐性腸内細菌目細菌 (CRE) の検査結果と患者情報 (カルバペネマーゼ非産生株; non-CPE)

管轄	菌株	患者情報 ^{*2}				菌種	検査結果	
保健所	No. ^{*1}	年齢層	性別	届出病院			産生性試験	遺伝子検査 (PCR)
保健所①	2664	70代	女	病院 C	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	AmpC		-
	2933	50代	女		<i>K. pneumoniae</i>	-	+(TEM型, SHV型, CTX-M-1グループ)	
保健所④	2672	80代	男	病院 D	<i>E. cloacae</i> complex	AmpC		+ (EBC 型)
	2673	60代	女		<i>E. cloacae</i> complex	AmpC		+ (EBC 型)
	2979	80代	女		<i>K. aerogenes</i> ^{*3}	AmpC		-
	3038	60代	女		<i>E. cloacae</i> complex	AmpC		-
	3039	80代	男		<i>K. aerogenes</i> ^{*3}	AmpC		-
保健所⑤	3033, 3034 ^{*4}	60代	男	病院 E	<i>Serratia marcescens</i>	AmpC		-
	3035	80代	男	病院 F	<i>K. aerogenes</i> ^{*3}	AmpC		-
保健所⑥	3031	80代	男	病院 G	<i>K. pneumoniae</i>	ESBL	+(TEM型, SHV型, CTX-M-1グループ)	
	3036	80代	男	病院 H	<i>K. aerogenes</i> ^{*3}	AmpC		-
保健所⑧	3032	80代	男	病院 I	<i>K. aerogenes</i> ^{*3}	AmpC		-
保健所⑩	3003	80代	男	病院 J	<i>K. pneumoniae</i>	-		+ (SHV 型)
	3004	70代	女		<i>K. pneumoniae</i>	-		+ (SHV 型)

^{*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) 登録情報を一部改変

^{*3}: 旧称 *E. aerogenes*

^{*4}: 同一患者由来株。2022 年 11 月及び 12 月に検体採取

AmpC: AmpC β-ラクタマーゼ

MBL: メタロ-β-ラクタマーゼ

ESBL: 基質特異性拡張型 β-ラクタマーゼ

-: 検出せず

- ン National Action Plan on Antimicrobial Resistance 2023-2027, 令和 5 年 4 月 7 日, https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/ap_honbun.pdf (確認: 2023 年 5 月 24 日)
- 2) Antimicrobial Resistance Collaborators: Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*, **399**, 629-655 (2022)
 - 3) 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
 - 4) 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
 - 5) 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)
 - 6) 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)
 - 7) 小川恵子, 三津橋和也, 竹脇優太郎: 北海道における薬剤耐性菌サーベイランスの年次報告 (2021). 道衛研所報, **72**, 27-31 (2022)
 - 8) 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: 2023 年 5 月 26 日)
 - 9) 国立感染症研究所: 薬剤耐性菌研修会資料 (2014 年 9 月作成 Ver.2). (2014)
 - 10) 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, 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)
 - 11) Pérez-Pérez FJ, 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)
 - 12) 四宮博人: 地研ネットワークを利用した食品およびヒトから分離されるサルモネラ, 大腸菌, カンピロバクター等の薬剤耐性の動向調査. 厚生労働科学研究費補助金 (食品の安全確保推進研究事業)「食品由来薬剤耐性菌のサーベイランスのための研究」, 平成 30 ~ 令和 2 年度 総合研究報告書, 国立感染症研究所, 東京, 令和 3 年 3 月, pp.14-48
 - 13) Shibata N, Kurokawa H, Doi Y, Yagi T, Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Kimura K, Ishikawa S, Kato H, Ozawa Y, Shibayama K, Kai K, Konda T, Arakawa Y: PCR classification of CTX-M-Type β -lactamase genes identified in clinically isolated Gram-negative bacilli in Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **50**(2), 791-795 (2006)
 - 14) Yagi T, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, Arakawa Y: 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) Kaase M, Nordmann P, Wichelhaus TA, Gatermann SG, Bonnin RA, Poirel L: NDM-2 carbapenemase in *Acinetobacter baumannii* from Egypt. *J. Antimicrob. Chemother.*, **66**, 1260-1262 (2011)
 - 16) National Center for Biotechnology Information (NCBI) Reference Gene Catalog, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/> (確認: 2023 年 5 月 26 日)
 - 17) 保健福祉部感染症対策局感染症対策課長通知感染症第 3841 号「感染症法に基づく検体等の送付の徹底について」, 令和 4 年 11 月 18 日
 - 18) Huang TW, Wang JT, Lauderdale TL, Liao TL, Lai JF, Tan MC, Lin AC, Chen YT, Tsai SF, Chang SC: Complete sequences of two plasmids in a *bla*_{NDM-1}-positive *Klebsiella oxytoca* isolate from Taiwan. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **57**(8), 4072-4076 (2013)
 - 19) Hammerum AM, Hansen F, Nielsen HL, Jakobsen L, Stegger M, Andersen PS, Jensen P, Nielsen TK, Hansen LH, Hasman H, Fuglsang-Damgaard D: Use of WGS data for investigation of a long-term NDM-1-producing *Citrobacter freundii* outbreak and secondary *in vivo* spread of *bla*_{NDM-1} to *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca*. *J. Antimicrob. Chemother.*, **71**, 3117-3124 (2016)
 - 20) Wang J, Yuan M, Chen H, Chen X, Jia Y, Zhu X, Bai L, Bai X, Fanning S, Lu J, Li J: First report of *Klebsiella oxytoca* strain simultaneously producing NDM-1, IMP-4, and KPC-2 carbapenemases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **61**(9), e00877-17 (2017)
 - 21) 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, 全国地方衛生研究所: カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: CRE) 病原体サーベイランス, 2017 年. 病原微生物検出情報, **39**(9), 14-15 (2018)
 - 22) 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, 全国地方衛生研究所: カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) 病原体サーベイランスにおける海外型カルバペネマーゼ遺伝子検出株, 2017 ~ 2018 年. 病原微生物検出情報, **40**(9), 12-13 (2019)
 - 23) Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, Walsh TR: Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, *bla*_{NDM-1}, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **53**(12), 5046-5054 (2009)
 - 24) Chihara S, Okuzumi K, Yamamoto Y, Oikawa S, Hishinuma A: First case of New Delhi metallo- β -lactamase 1-producing *Escherichia coli* infection in Japan. *Clin. Infect. Dis.*, **52**, 153-154 (2011)
 - 25) 鈴木里和, 松井真理, 鈴木仁人, 柴山恵吾: 外来型カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌の検出状況. 病原微生物検出情報, **35**(12), 7-8 (2014)
 - 26) 鈴木里和, 松井真理, 鈴木仁人, 長野幸子, 柴山恵吾, 秋沢宏次, 石黒信久, 外山雅美, 多田弘士, 齊藤さとみ, 長野則之, 関塚剛史, 山下明史, 加藤健吾, 黒田 誠: NDM-5 メタロ- β -ラクタマーゼ産生大腸菌 ST410 による国内感染事例. 病原微生物検出情報, **37**(4), 24-26 (2016)
 - 27) 綿引正則, 内田 薫, 木全恵子, 金谷潤一, 磯部順子, 大石和徳, 高本恭子, 佐々木一成, 高橋慎太郎, 得田和彦, 押田尚宏: 医療関連感染を疑った NDM-5 メタロ- β -ラクタマーゼ産生大腸菌を保菌していた 2 症例—富山県. 病原微生物検出情報, **41**(5), 22 (2020)
 - 28) 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, 全国地方衛生研究所: カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: CRE) 病原体サーベイランス, 2019 年. 病原微生物検出情報, **42**(6), 15-16 (2021)
 - 29) 薬剤耐性研究センター耐性菌ナショナル・サーベイランス (JARBS) ホームページ: JARBS-GNR 速報, https://www.dropbox.com/s/3myo7ibxxnq43ss/JARBS_quick_report1_2021.pdf?dl=0 (確認: 2023 年 6 月 1 日)