道衛研所報 Rep. Hokkaido Inst. Pub. Health, 71, 67–71（2021）

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）

Annual Report on the Regional Surveillance of Antimicrobial Resistant Bacteria in Hokkaido（2020）

小川　恵子　　三津橋和也　　森本　洋

Keiko Ogawa, Kazuya Mitsuhashi and Yo Morimoto

Key words：antimicrobial resistant bacteria（薬剤耐性菌）；CRE（カルバペネム耐性腸内細菌科細菌）；VRE（バンコマイシン耐性腸球菌）；Hokkaido（北海道）

緒　　言

抗菌剤に対する薬剤耐性の問題は、古くはペニシリンG実用化直後の1940年代半ばまで遡るが[1]、特に近年、新規の抗菌剤開発が減少し、世界中で薬剤耐性による公衆衛生上の脅威が増大している[2-4]。欧州連合及び欧州経済地域では年間約33,000人[5]、米国では年間約34,000人[6]、日本では年間約8,000人[7]が薬剤耐性菌により死亡していると推定されている。また、ヒトの医療のみならず、獣医療・畜水産分野での抗菌剤使用や、野生動物・自然環境中での薬剤耐性拡散の影響も懸念されることから、多分野が連携して取り組むべき世界的な課題として認識されている[2,4]。

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌（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）は院内感染の原因となる代表的な薬剤耐性菌で[8-10]、世界保健機関（WHO）も優先的に調査すべき薬剤耐性菌として挙げている[11]。わが国では、上記3種類にバンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌（VRSA）を加えた4種類の薬剤耐性菌による感染症を、「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。本道でも、2019年6月1日から開始した薬剤耐性菌サーベイランスにおいて、これら4疾患の起因菌に対し、当所で薬剤耐性遺伝子等の検査を実施している[12]。本稿では、2020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、2020年1～12月に道立10保健所管内で届出されたCRE感染症患者29名（1名は後に届出削除）のうち、6保健所管内の17名から分離された菌株が当所に搬入された。釧路保健所管内の患者1名からは、静脈血、喀痰、尿からの分離株が各1株、計3株が搬入された。また、旭川市保健所から届出された患者2名のうち、1名（道立保健所管内在住）から分離された1株が当所に搬入され、合計20株に対して検査を実施した。

VREは、2020年1～12月に道立2保健所（江差、帯広）管内で届出されたVRE感染症患者3名のうち、帯広保健所管内で届出された患者1名から分離された1株が当所に搬入された。また、届出患者と同一病院の患者2名（届出なし）から分離された2株も搬入され、合計3株に対して検査を実施した。

2020年は、道立保健所管内でMDRA及びVRSA感染症の届出はなかった。

2．カルバペネマーゼ産生性試験

CREに対して、阻害剤（メルカプト酢酸ナトリウム、ボロン酸）を用いたディスク法によるカルバペネマーゼ産生性試験（メタロ-β-ラクタマーゼ（MBL）、KPC型カルバペネマーゼ（KPC型））を実施した。検査法は、病原体検出マニュアルに準拠した[13,14]。

3．CREの菌種同定

CREのうち、感染症サーベイランスシステム（NESID）に菌種名の登録がなかった1株（菌株No.2361）に対し、IDテスト・EB-20「ニッスイ」（日水製薬(株)、東京）による菌種同定を実施した。

4．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。抗菌剤ディスク（CREの場合はセファロスポリン系、VREの場合はバンコマイシン）を設置して培養したミューラーヒントン寒天平板培地（OXOID, Basingstoke, UK）から、ディスク周囲の菌体を滅菌水200 μL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。

5．カルバペネマーゼ遺伝子検査

CREに対して、MBL遺伝子（IMP型、NDM型、VIM

型）、KPC 型遺伝子、OXA-48 型 β-ラクタマーゼ（OXA-48 型）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]。

カルバペネ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[15]。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。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．腸球菌の菌種同定及びバンコマイシン耐性遺伝子検査

VRE に対して、*ddl* 遺伝子のマルチプレックス PCR による菌種同定（*Enterococcus faecalis*、*E. faecium*）を実施した[14]。また、バンコマイシン耐性遺伝子（*vanA*、*vanB*、*vanC 1*、*vanC 2/3*）のマルチプレックス PCR を実施した[14]。

ddl 遺伝子及びバンコマイシン耐性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℃20 秒、55℃2 分の反応を 35 サイクル、最終伸張 74℃5 分という条件で実施した[14]。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 2 に示した。

結果及び考察

1．カルバペネム耐性腸内細菌科細菌（CRE）

2020 年に検査を実施した CRE 20 株の検査結果と、NESID に登録された患者情報及び菌種を表 3 に示した。検査の結果、全株でカルバペネマーゼの産生及び遺伝子は認められなかった。

CRE の届出に必要な検査項目は、分離株の菌種同定とカルバペネム系薬剤及び広域 β-ラクタム剤への耐性の確認だけで、カルバペネマーゼ産生性や遺伝子の確認は義務

表 1　カルバペネ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
メタロ-β-ラクタマーゼ	IMP 型	mc-imp-f 1	TCTCRATCTATCCCCACGTATGC	269 bp
		mc-imp-f 2	TCTCAATCTATTCCAACATATGCATCTG	
		mc-imp-r 1	GCGGACTTTGGCCAAGCTTCTA	
		mc-imp-r 2	GCMGAATGTGGCCACGCTTCAA	
	NDM 型	mc-ndm-f	CGGTTTGGCGATCTGGTTTT	207 bp
		mc-ndm-r	GACCGGCAGGTTGATCTCC	
	VIM 型	mc-vim-f	GTTTGGTCGCATATCGCAAC	155 bp
		mc-vim-r	CCAATTTGCTTYTCAATCTCCG	
セリン-β-ラクタマーゼ	KPC 型	mc-kpc-f	CGGAACCATTCGCTAAACTCG	322 bp
		mc-kpc-r	AACAAATTGGCGGCGGCGT	
	OXA-48 型	mc-oxa 48-f	GCTCTGGAATGAGAATAAGCAGCA	125 bp
		mc-oxa 48-r 2	TAACCACGCCCAAATCGAG	
	GES 型	mc-ges-f 2	CTGTGGCTAAAGTCCTCTATGGCG	94 bp
		mc-ges-r 2	GTCGCGTCTCCCGTTTGGTT	

*：PCR に用いたプライマー配列は、文献 15 に従った。

表 2　菌種同定及びバンコマイシン耐性遺伝子検査に使用したプライマー（バンコマイシン耐性腸球菌）

検査対象	菌種・遺伝子型	プライマー名	配列（5'→3'）*	増幅産物のサイズ
ddl 遺伝子	*Enterococcus faecalis*	ddl-E.faeclis-F	ATCAAGTACAGTTAGTCT	941 bp
		ddl-E.faeclis-R	ACGATTCAAAGCTAACTG	
	Enterococcus faecium	ddl-E.faecium-F	TAGAGACATTGAATATGCC	525 bp
		ddl-E.faecium-R	CATCGTGTAAGCTAACTTC	
バンコマイシン耐性遺伝子	*vanA*	vanA-F	GGGAAAACGACAATTGC	732 bp
		vanA-R	GTACAATGCGGCCGTTA	
	vanB	vanB-F	ATGGGAAGCCGATAGTC	635 bp
		vanB-R	GATTTCGTTCCTCGACC	
	vanC 1	vanC-1-F	GGTATCAAGGAAACCTC	822 bp
		vanC-1-R	CTTCCGCCATCATAGCT	
	vanC 2/3	vanC-2/C-3-F	CTCCTACGATTCTCTTG	439 bp
		vanC-2/C-3-R	CGAGCAAGACCTTTAAG	

*：PCR に用いたプライマー配列は、文献 14 に従った。

表3　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		カルバペネマーゼ遺伝子
2172	岩見沢	70代	男	病院1	*Klebsiella aerogenes**3	−
2204	帯広	70代	女	病院2	*Escherichia coli*	−
2223	室蘭	70代	女	病院3	*K. aerogenes**3	−
2235	滝川	70代	女	病院4	*Enterobacter cloacae*	−
2264	滝川	70代	男	病院4	*E. asburiae*	−
2281	旭川市*4	70代	男	病院5	*E. coli*	−
2306	滝川	50代	女	病院4	*E. cloacae*	−
2360	滝川	80代	男	病院4	*E. cloacae*	−
2361	滝川	60代	男	病院4	*Enterobacter sp.*	−
2373	滝川	70代	男	病院4	*K. aerogenes**3	−
2448	留萌	70代	女	病院6	*K. pneumoniae*	−
2452*5	留萌	80代	男	病院6	*K. pneumoniae*	−
2466	滝川	80代	男	病院4	*K. aerogenes**3	−
2467	滝川	70代	男	病院4	*K. aerogenes**3	−
2468	釧路	60代	男	病院7	*K. aerogenes**3（静脈血由来）	−
2469					*K. aerogenes**3（喀痰由来）	−
2470					*K. aerogenes**3（尿由来）	−
2471	釧路	70代	女	病院7	*K. aerogenes**3	−
2472	留萌	80代	女	病院6	*K. pneumoniae*	−
2489	留萌	80代	女	病院6	*K. pneumoniae*	−

*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）に登録された情報を一部改変
*3：旧称 *E. aerogenes*
*4：患者は道立保健所管内在住者
*5：2020年11月にNESID届出、12月に削除
−：検出せず

づけられていない[14]。CREのカルバペネム耐性機構は、カルバペネマーゼの産生によるものと、それ以外の要因（カルバペネマーゼ以外のβ-ラクタマーゼの産生と膜透過性の低下）によるものの、2種類に大別される[8,14]。カルバペネマーゼ産生株は非産生株に比べ多剤耐性になりやすい傾向にあり、臨床分野においてより大きな問題である[8,14]。そのため、厚生労働省は地方衛生研究所に、分離株に対するカルバペネマーゼ産生性試験及び遺伝子検査の実施を求めている[16]。以上のことから、地域内のCRE（特にカルバペネマーゼ産生株）の現状把握には、検査実施率の向上が重要となる。

2020年の道立保健所管内における検査実施率（患者数）は58.6%（29名中17名）で、2019年6～12月の検査実施率（患者20名中17名、85.0%）[13]に比べて低下した。全国のCRE病原体サーベイランスの集計では、検査実施状況を示す指標として、NESID病原体検出情報システムへのCRE検査結果の報告率（原則実施する検査項目結果がすべて報告された菌株数を、患者届出数で除した値）を示している[17-19]。全国におけるCRE検査結果の報告率は、2017年48.1%[17]、2018年72.2%[18]、2019年77.1%[19]と、増加傾向にある。一方、検査が実施された菌株のうちカルバペネマーゼ遺伝子陽性株の割合は、2017年は28%（865株中239株）[20]であったが、2018年は17.6%（1,684株中297株）[18]、2019年は16.5%（1,799株中296株）[19]と、報告率が70%を超えた2年間はほぼ横ばい状態であった。道立保健所管内のCREにおけるカルバペネマーゼ遺伝子陽性率は、全国と同程度であった2019年6～12月の16.7%（18株中3株）[13]に比べて、2020年は0%（19株中0株）と低い値であった。CREにおけるカルバペネマーゼ遺伝子陽性率を正確に把握するには、届出された全症例に対して遺伝子検査を実施するのが最も望ましい。だが、現時点ではまだ全例検査には至っていない。今後、検査実施率の上昇を目指した体制の充実化が望まれる。

2020年には、道立保健所だけでなく、中核市である旭川市保健所管内の届出患者についても菌株が搬入され、検査を実施することができた。この点は、北海道全域のCREの現状把握に向けて一歩前進したといえた。

2．バンコマイシン耐性腸球菌（VRE）

2020年に検査を実施したVRE3株の検査結果と、患者情報を表4に示した。検査の結果、3株とも *vanA* 遺伝子保有 *E. faecium* であった。

VREのバンコマイシン耐性機構は、バンコマイシンの作用部位である細胞壁の構成要素、ムレインモノマーの構造変化である[1]。それを引き起こすバンコマイシン耐性遺伝子には複数の種類があり、中でも特に臨床的、疫学的に問題となるのは、プラスミド上に存在して異なる菌株間で伝達しうる *vanA* 及び *vanB* 遺伝子である[14,21]。また、腸球菌（*Enterococcus* 属菌）には20種以上の種が含まれる

表 4　バンコマイシン耐性腸球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			検査結果		備考*2
		年齢層	性別	届出病院	菌種	バンコマイシン耐性遺伝子	
2359	帯広	80 代	女	病院 8	*Enterococcus faecium*	*vanA*	尿路感染症を発症
2374	帯広	60 代	女	病院 8	*E. faecium*	*vanA*	NESID 届出なし
2375	帯広	70 代	男	病院 8	*E. faecium*	*vanA*	NESID 届出なし

*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情報を一部改変

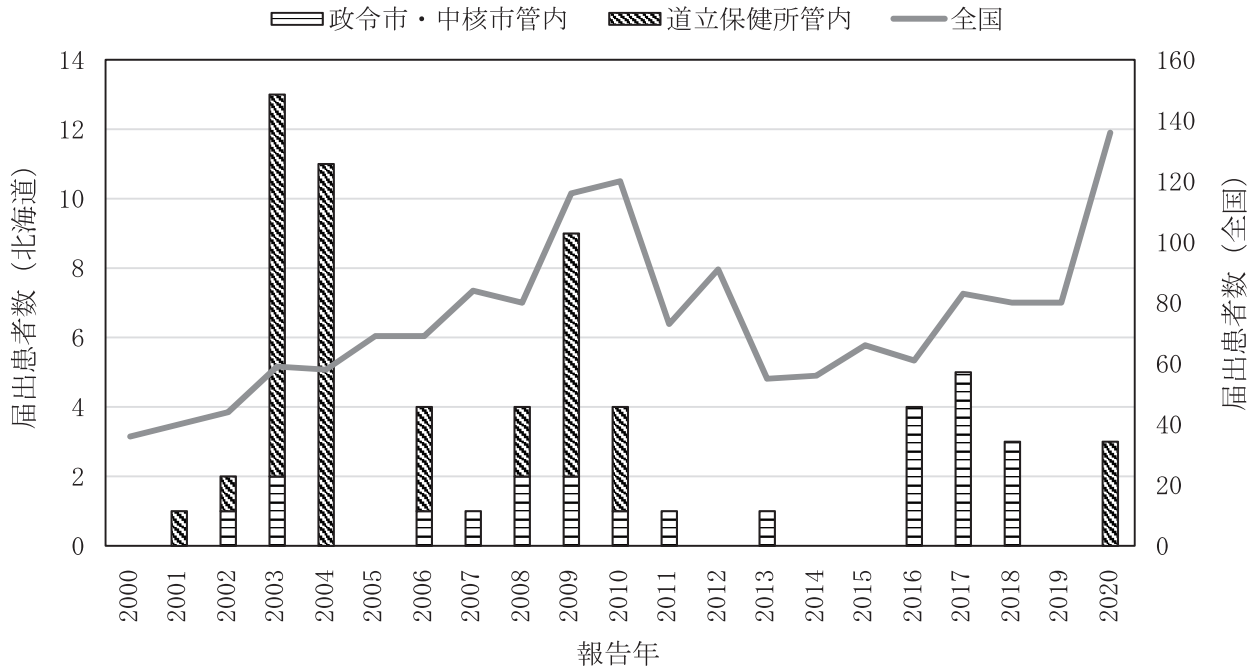

図 1　バンコマイシン耐性腸球菌（VRE）感染症の届出患者数（2000～2020 年）

北海道感染症情報センターホームページ[25]参考

が、臨床検体からの分離が多いのは、*E. faecalis*、*E. faecium*、*E. gallinarum*、*E. casseliflavus*、*E. avium* などである[14]。中でも *vanA* 遺伝子保有 *E. faecium* は、臨床的、疫学的に特に問題となる VRE の一つと考えられている[14]。実際に他県では、*vanA* 遺伝子保有 *E. faecium* による院内感染事例で、1 人から複数の患者への伝播や環境を介した伝播が報告されている[22]。また、別の事例では、異なる種の腸球菌間で伝達される *vanA* 遺伝子保有プラスミドが、患者由来 *E. faecium* で報告されている[23]。

今回本道の事例で確認されたものも、*vanA* 遺伝子保有 *E. faecium* であった（表 4）。本サーベイランスの検査項目[12]として分離株の分子疫学的解析は含まれていないため、今回の VRE 3 株が遺伝子学的に近縁な菌株かどうか、確認はとれていない。しかし、分離株の分子疫学的解析は、感染源や伝播経路を特定する一助となり、感染対策を実施する上で重要である。今後の事例対応で必要とされる可能性もあるため、今回の VRE を用いて検査法の条件検討を行い、当所の検査体制の充実化を図る予定である。

今回の事例では、VRE による尿路感染症を発症した届出患者由来株（1 株）のほかに、同一病院の別の患者 2 名（届出なし）からの分離株（2 株）に対しても行政検査依頼があった。院内感染対策として、感染症法の届出対象となる発症者以外の保菌者に対しても対応することが重要とされていることから[24]、当該病院が届出患者以外の患者からの分離株についても行政検査を依頼したと推察された。当該病院における感染対策について当所は情報を得ていないが、その後 2021 年 6 月現在まで VRE 感染症の届出がないことから、適切な対処が行われたと考えられた。

全国及び北海道（政令市・中核市管内及び道立保健所管内）における VRE 感染症の届出患者数を図 1 に示した。全国における届出患者数は、2010 年の 120 件をピークに 2011～2019 年は年間 100 件未満で推移していたが、2020 年には 26 都道府県から過去最多の 135 件が届出され、全国的な増加が懸念されている[9]。道立保健所管内においては、2010 年以前は 2000 年、2005 年、2007 年を除いてほぼ毎年、年間 1～11 件の届出があったが、2011～2019 年は年間 0 件で推移していた。ところが、2020 年に 3 件が届出され、道立保健所管内では 9 年ぶりの VRE 感染症の

発生となった（図1）。届出がなかった状況から一転して増加した要因は不明だが、全国的な傾向[9]とも一致しており、今後も注視する必要がある。

本稿を終えるに当たり、平素から感染症発生動向調査にご理解・ご協力いただいている関係者の皆様に、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年，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，https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/0000120769.pdf（確認：2021年5月27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：2021年5月27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：2021年5月27日）
5）Cassini A, Hogberg LD, Plachouras D, Quattrocchi A, Hoxha A, Simonsen GS, Colomb-Cotinat M, Kretzschmar ME, Devleesschauwer 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：2021年5月27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.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1（確認：2021年5月27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：2021年5月27日）
15）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**(2)，166–172（2020）
16）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
17）松井真理，鈴木里和，菅井基行：カルバペネム耐性腸内細菌科細菌病原体サーベイランス報告状況．病原微生物検出情報，**40**(2)，19–20（2019）
18）国立感染症研究所薬剤耐性研究センター，国立感染症研究所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，2018年．病原微生物検出情報，**40**(9)，11–12（2019）
19）国立感染症研究所薬剤耐性研究センター，国立感染症研究所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）
20）国立感染症研究所薬剤耐性研究センター，国立感染症研究所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）
21）荒川宜親：バンコマイシン耐性腸球菌感染症，https://www.niid.go.jp/niid/ja/kansennohanashi/469-vre.html（確認：2021年5月27日）
22）Fujikura Y, Hamamoto T, Kanayama A, Kaku K, Yamagishi J and Kawana A: Bayesian reconstruction of a vancomycin-resistant *Enterococcus* transmission route using epidemiologic data and genomic variants from whole genome sequencing. J. Hosp. Infect., **103**，395–403（2019）
23）Hashimoto Y, Kita I, Suzuki M, Hirakawa H, Ohtaki H and Tomita H: First Report of the Local Spread of Vancomycin-Resistant Enterococci Ascribed to the Interspecies Transmission of a *vanA* Gene Cluster-Carrying Linear Plasmid. mSphere5: e00102-20. https://doi.org/10.1128/mSphere.00102-20（確認：2021年5月31日）
24）厚生労働省医政局地域医療計画課長通知医政地発1219第1号「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
25）北海道感染症情報センターホームページ：バンコマイシン耐性腸球菌感染症（データ），http://www.iph.pref.hokkaido.jp/kansen/426/data.html（確認：2021年5月31日）