

【委員会報告】

日本化学療法学会 公益目的事業プロジェクト
β-ラクタム系薬耐性腸内細菌科細菌に関する多施設共同研究

β-ラクタム系薬耐性腸内細菌科細菌ワーキング委員：石井 良和, 清田 浩
公益社団法人日本化学療法学会理事長：清田 浩
公益社団法人日本化学療法学会前理事長：門田 淳一

はじめに

カルバペネム系薬耐性腸内細菌科細菌 (CRE) と基質特異性拡張型 β-ラクタマーゼ (ESBL) 産生腸内細菌科細菌は、腸内細菌科細菌による感染症治療に使われる抗菌剤の多くに耐性を示すことから临床上の問題となっている。米国疾病予防管理センターや世界保健機関では喫緊の対応が必要、あるいは重大な感染症の原因となる耐性菌として医療機関に注意喚起している。腸内細菌科細菌は健常人も保菌する細菌であり、その急速且つ広範な伝播が懸念されている。しかし、国内外を見ても CRE や ESBL 産生腸内細菌科細菌の保菌の現状に関する報告がなく、その実態は把握されていない。また、諸外国では尿路検体由来 ESBL 産生腸内細菌科細菌に関して、耐性と病原性の観点からゲノムレベルの解析が進められている。しかし、諸外国と日本で検出される ESBL の種類は異なっており、わが国の ESBL 産生大腸菌の遺伝的背景を把握し、諸外国と比較することは重要である。

“One day survey” 多施設共同研究

本研究は、公益社団法人日本化学療法学会の公益目的事業として、全国の感染症拠点病院にご協力いただき、本邦の病院を受診あるいは入院中の患者における CRE および ESBL 産生腸内細菌科細菌の保菌状況および分離された CRE および ESBL 産生腸内細菌科細菌のゲノムレベルでの特徴について検討することを目的として検討した。

これまでの疫学調査は、菌株や患者情報収集に数カ月から1年という長期間を要していたが、本研究は、公益社団法人日本化学療法学会が実施した「*Clostridium difficile* 感染症 “1日” 多施設共同研究」と同一手法を用い、短期間に網羅的に菌株収集を行った (館田一博, 石井良和, 大西健児, 星野一樹, 木村利美, 岩田敏, 渡辺彰, 清田浩, 門田淳一: 日本化学療法学会公益事業プロジェクト *Clostridium difficile* 感染症 “1日” 多施設共同研究。日化療会誌 2017; 65: 1-3)。患者糞便検体および臨床情報の収集に際しては、東邦大学医学部倫理委員会から承認を受け (No. 27124)、参加各施設はそれぞれの倫理委員会もしくはそれに該当する院内の委員会から承認を受けて実施した。

本学会会員を含む全国の感染症拠点 38 施設の先生のご協力をいただき、本研究は遂行された。Table 1 に参加施設および代表担当者のお名前を掲載させていただいた。各施設において、微生物検査室から提出された便検体 (施設ごとの検体数は1~12検体) を研究対象とした。提出された便検体は中央検査機関 (LSI メディエンス, 東京) において、選択培地クロモアガー ESBL (関東化学, 東京) およびクロモアガー mSuper CARBA (関東化学) を用いて培養を実施した。培地上に発育したコロニーは、凍結保存用の培地に懸濁して東邦大学医学部微生物・感染症学講座において、BD Phoenix 100 (日本 BD, 東京) および BD Phoenix NMIC/ID-208 を用いて生化学的手法による菌種同定および薬剤感受性検査を実施した。生化学的手法により腸内細菌科細菌と同定された菌株は、次世代シーケンサー、MiSeq (イルミナ, 東京) を用いてドラフト全ゲノム配列を決定して、Center for Genomic Epidemiology (<http://www.genomicepidemiology.org/>) が提供する Web tool などを利用して解析した。

結果概要

本研究では、2016年7月から12月までの5カ月間に全国38施設から268の便検体 (施設平均7.1検体) が収集され、そのうちの209症例において症例表を回収することができた。LSI メディエンスにおいて各選択培地上に発育し、保存された菌株数と東邦大学医学部微生物・感染症学講座において同定された菌種名を纏めて Table 2 に示した。クロモアガー ESBL からは110株、クロモアガー mSuper CARBA からは27株が分離・保存された。薬剤感受性検査成績から5株が2 mg/L 以上のイミペネム濃度で発育を認め、このうちの2株が>8 mg/L でも発育した。さらに、これら5株はいずれも64 mg/L 以上のセフメタゾール濃度での発育が認められたため、感染症法の CRE の報告基準に合致する菌株であることが確認され、菌種は、*Enterobacter aerogenes* が3株、*Enterobacter cloacae* が1株、*Citrobacter braakii* が1株であった。これら5株を含め、2 mg/L 以上のメロペネム濃度で発育を認めた菌株は存在しなかった。薬剤感受性検査成績から、CRE である5株を含むカルバペネマーゼ産生が疑われる菌株の全ゲノム解析を実施した

Table 1. List of participating medical facilities and representative officials

Prefectures	Representative persons	Name of medical facilities
Hokkaido	Hiroshi Sakata	Asahikawa-Kosei General Hospital
Hokkaido	Nobuhisa Ishiguro	Hokkaido University Hospital
Hokkaido	Masanori Matsukawa	Takikawa Municipal Hospital
Hokkaido	Hiroshi Hotta	Japanese Red Cross Asahikawa Hospital
Iwate	Chihiro Tohno	Iwate Prefectural Kuji Hospital
Miyagi	Mitsuo Kaku	Tohoku University Hospital
Gunma	Yutaka Tokue	Gunma University Hospital
Gunma	Nobuyuki Uchida	Haramachi Red Cross Hospital
Ibaraki	Takefumi Saito	National Hospital Organization Ibarakihigashi National Hospital
Saitama	Kotaro Mitsutake	Saitama Medical University International Medical Center
Saitama	Hiroshi Okada	Koshigaya Municipal Hospital
Saitama	Akihiko Kawana	National Defense Medical College Hospital
Tokyo	Toshimi Oda	Showa General Hospital
Tokyo	Yoshihito Niki	Showa University Hospital
Tokyo	Tomohiko Koibuchi	IMSUT Hospital The Institute of Medical Science, The University of Tokyo
Tokyo	Taito Miyazaki	Toho University Omori Hospital
Kanagawa	Hiromu Takemura	St. Marianna University School of Medicine Hospital
Kanagawa	Yuko Komase	St. Marianna University School of Medicine, Yokohama City Seibu Hospital
Kanagawa	Hiroyuki Kunishima	Kawasaki Municipal Tama Hospital
Niigata	Hiroki Tsukada	Niigata City General Hospital
Fukui	Hiromichi Iwasaki	University of Fukui Hospital
Shizuoka	Shoichi Onodera	Fuji City General Hospital
Gifu	Nobuo Murakami	Gifu University Hospital
Aichi	Hiroshige Mikamo	Aichi Medical University Hospital
Aichi	Chihiro Hasegawa	Nagoya City East Medical Center
Osaka	Hiroshi Kakeya	Osaka City University Hospital
Osaka	Akira Ukimura	Osaka Medical College Hospital
Okayama	Tadashi Ishida	Kurashiki Central Hospital
Yamaguchi	Junichi Yoshida	Shimonoseki City Hospital
Hiroshima	Shinji Akagi	Mazda Hospital
Shimane	Tsukasa Nakamura	Shimane Prefectural Central Hospital
Fukuoka	Kazuhiro Yatera	Hospital of University of Occupational and Environmental Health, Japan
Fukuoka	Toru Takada	Fukuoka University Hospital
Fukuoka	Kouichi Mashiba	Kitakyushu Municipal Medical Center
Nagasaki	Katsunori Yanagihara	Nagasaki University Hospital
Nagasaki	Yuichi Fukuda	Sasebo City General Hospital
Nagasaki	Toyomitsu Sawai	Nagasaki Harbor Medical Center
Oita	Jun-ichi Kadota	Oita University Hospital

Table 2. Breakdown of the recovered organisms from selective agar plates including duplicate patients

Organisms	No. of strain
<i>Escherichia coli</i>	46
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	19
<i>Klebsiella oxytoca</i>	3
<i>Enterobacter cloacae</i>	31
<i>Enterobacter aerogenes</i>	11
<i>Citrobacter</i> spp.	24
<i>Proteus mirabilis</i>	1
<i>Hafnia alvei</i>	2
Total	137

が、カルバペネマーゼをコードする遺伝子は検出されなかった。クロモアガー ESBL 培地上に発育した 110 株に対して、Clinical and Laboratory Standards Institute のドキュメントに記載されている ESBL 確認検査を実施したとこ

Table 3. Results of detected ESBL encoding genes and sequence types of *Escherichia coli* by multilocus sequence typing excluding of isolates from same patients

ST	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	<i>bla</i> _{CTX-M-3}	<i>bla</i> _{CTX-M-8}	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>bla</i> _{CTX-M-27}	Total
ST38	0	0	0	6	0	0	6
ST73	0	0	0	0	0	1	1
ST95	0	0	0	1	0	0	1
ST131	0	1	0	4	2	8	15
ST357	0	0	0	1	0	0	1
ST443	0	0	0	0	0	1	1
ST648	0	0	0	1	0	0	1
ST1049	1	0	0	0	0	0	1
Novel ST	0	0	1	0	0	0	1
Total	1	1	1	13	2	10	28

ろ、29株がESBL産生菌であることが確認された。菌種の内訳は、*Escherichia coli*が28株、*Proteus mirabilis*が1株であった。*E. coli*のESBLをコードする遺伝子の内訳と検出菌株数は、*bla*_{CTX-M-2}が1株、*bla*_{CTX-M-3}が1株、*bla*_{CTX-M-8}が1株、*bla*_{CTX-M-14}が13株、*bla*_{CTX-M-15}が2株、*bla*_{CTX-M-27}が10株であり、*bla*_{CTX-M-9}グループが82% (23/28株)を占めていた。また、*E. coli*をmultilocus sequence type (MLST)により、遺伝型を型別すると、ST131が15株 (54%)を占め、次いでST38が6株 (21%)、ST73、ST95、ST357、ST443、ST648、ST1049がそれぞれ1株であった。なお、*P. mirabilis*が保有するESBLをコードする遺伝子は*bla*_{CTX-M-2}であった (Table 3)。

まとめ

本研究は本学会が過去に実施した「*Clostridium difficile*感染症“1日”多施設共同研究」の手法を用いて実施した調査研究である。本学会員をはじめとする諸先生にご協力をいただき、短期間に前向きな疫学研究を実施することができた。以下、本研究結果の概要を示す。

1. CREは収集された268の糞便検体のうち、2 mg/L以上のイミペネム濃度を含有する培地に発育し、且つ64 mg/L以上のイミペネム濃度を含有する培地に発育する菌株が5検体 (1.9%)から検出された。
2. 2 mg/L以上のメロペネム濃度で発育を認める菌株は存在しなかった。
3. カルバペネマーゼをコードする遺伝子保有株は検出されなかった。
4. ESBL産生株は29検体 (11%)から検出され、主要なESBL遺伝子型は*bla*_{CTX-M-9}であった。
5. ESBLをコードする遺伝子陽性大腸菌の主要ST型はST131であった。

本研究は、本邦の患者が保菌するCREおよびESBL産生腸内細菌科細菌に関する疫学情報、遺伝学的特性を網羅的に解析し、その結果を提供した。このような研究はこれまでに実施されておらず、今回得られるデータがもたらす意義は感染症治療のために重要なばかりか、感染制御あるいは感染管理のために重要なデータを提供することが期待される。

【利益相反自己申告】

石井良和は申告すべきものなし。

門田淳一は塩野義製薬株式会社、第一三共株式会社、杏林製薬株式会社、MSD株式会社、ファイザー株式会社、大正富山医薬品株式会社、ベーリンガーインゲルハイム株式会社より講演料を受けている。

門田淳一は南江堂株式会社より原稿料を受けている。

清田 浩は富山化学工業株式会社、アステラス製薬株式会社、大鵬薬品工業株式会社、第一三共株式会社、大正富山医薬品株式会社より奨学寄付金を受けている。