

## 短期間に異なる7名の患者より検出された meropenem 耐性 *Escherichia coli* の検討

<sup>1)</sup>大阪暁明館病院臨床検査科, <sup>2)</sup>東邦大学看護学部感染制御学

伊藤 隆光<sup>1)2)</sup> 金坂伊須萌<sup>2)</sup> 倉地 里枝<sup>2)</sup>  
金山 明子<sup>2)</sup> 小林 寅喆<sup>2)</sup>

(平成28年1月21日受付)

(平成28年11月21日受理)

Key words: carbapenem-resistant enterobacteriaceae (CRE), IMP-6, CTX-M-2

### 要 旨

2014年4月から5月にかけて、当院の7名の患者より meropenem (MEPM) に耐性を示す *Escherichia coli* が分離された。7名のうち1名は長期入院中の患者から分離されたが、他の6名は入院時に採取した喀痰から分離されたため院内感染の可能性は低いと考えられた。これらの患者より分離された *E. coli* 7株の imipenem (IPM) の MIC は 0.5 $\mu$ g/mL もしくは 1 $\mu$ g/mL であったが、MEPM は 8~32 $\mu$ g/mL を示した。また、すべての株は metallo  $\beta$ -lactamase (MBL) IMP-6 および extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) CTX-M-2 の遺伝子が確認された。Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) 解析により、7株は同一クローンであることが確認された。入院時の検体から分離された6名のうち2名は同一の介護施設からの受診であったが、その他の4名に入院前の関連性は認められなかった。これらの結果から、MBL 産生 *E. coli* がすでに広く市中に分布している可能性が示唆された。

[感染症誌 91:132~136, 2017]

### 序 文

近年、腸内細菌科をはじめとするグラム陰性桿菌において extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL), metallo  $\beta$ -lactamase (MBL), AmpC  $\beta$ -lactamase などの各種  $\beta$ -lactamase 産生菌種による医療関連感染や集団感染事例が報告されている<sup>1)2)</sup>。これらの  $\beta$ -lactamase 遺伝子はプラスミドにコードされていることから、菌種を超えて伝達され<sup>3)</sup>、各種抗菌薬耐性菌の拡大につながっている。この中で carbapenemase である MBL 産生菌は、他の  $\beta$ -lactamase 産生菌種に有効とされるカルバペネム系抗菌薬に対しても耐性を示すことから、当該菌による感染症を発症した場合には治療に用いることのできる抗菌薬が限られてくる。Carbapenemase は Ambler 分類<sup>4)</sup>でクラス A に属する KPC 型や、クラス B に属する IMP 型、VIM 型、NDM 型の metallo- $\beta$ -lactamase、クラス D に属する OXA 型など多くの種類が報告されているが、日本国内では IMP 型が主に検出され<sup>5)</sup>ESBL との同時産生株の分離も報

告されている<sup>6)</sup>。現在、MBL 産生腸内細菌の日本における分離頻度は極めて低いが、その一方で、高齢者を中心とした入院患者の腸管で保菌されている実態が報告され、同一クローンの病院内での拡散が指摘されている<sup>6)</sup>。さらに海外の医療機関ではこれらの耐性菌によるアウトブレイクが認められており、日本国内へ流入したと考えられる事例も報告されている<sup>7)</sup>。腸内細菌科のカルバペネム耐性菌 carbapenem-resistant enterobacteriaceae (CRE) 感染症は2014年より感染症法の5類感染症に分類され、日本においても医療機関にて監視すべき耐性菌とされた。

日本のこのような状況において今回我々は、単一医療機関にて1カ月間に7名の患者よりカルバペネム系抗菌薬である meropenem (MEPM) に耐性を示す *Escherichia coli* を分離した事例を経験したため、検出患者の背景および分離株の細菌学的性状について調査し、その関連性について検討した。

### 対象と方法

#### 1. 対象菌株

当院(病床数482床)において2014年4月から2014

別刷請求先: (〒554-0012) 大阪市此花区西九条5-4-8

大阪暁明館病院臨床検査科 伊藤 隆光

Table 1 Clinical characteristics of the study patients with meropenem-resistant *E. coli* isolates.

No.	Age	Sex	Specimen	Date of isolation	Date of hospitalization	Disease on hospitalization	Admission route
GMH-1	89	F	sputum	Late in Apr. 2014	From in March. 2012	Parkinson's disease, etc.	Already admitted
GMH-2	68	M	sputum	Late in Apr. 2014	Late in Apr. 2014	Acute pneumonia	Nursing facility
GMH-3	87	F	sputum	Late in Apr. 2014	Late in Apr. 2014	Acute pneumonia	Home
GMH-4	86	F	sputum	Late in Apr. 2014	Late in Apr. 2014	Acute pneumonia	Home
GMH-5	84	F	sputum	Early in May. 2014	Early in May. 2014	Acute pneumonia	Home
GMH-6	79	F	sputum	Early in May. 2014	Early in May. 2014	Acute pneumonia	Home
GMH-7	96	F	sputum	Late in May. 2014	Late in May. 2014	Acute pneumonia	Nursing facility

年5月に7名の患者喀痰より分離された MEPM 耐性 *E. coli* 7株 (GMH-1~GMH-7) を対象とした。

喀痰は、トリプチケースソイ II 5% ヒツジ血液寒天培地/チョコレート II 寒天培地 (ベクトン・ディッキンソン) にて 35.0°C, 5%CO<sub>2</sub> 環境下にて 18~24 時間培養後、発育菌を VITEK2 (sysmex) バージョン 05.04, 同定カード GN にて同定した。抗菌薬感受性は、CLSI M07-A10 に準じた微量液体希釈法にて各種抗菌薬の MIC を測定した。測定抗菌薬は以下の抗菌薬とした。Piperacillin (PIPC), cefazolin (CEZ), cefmetazole (CMZ), cefotaxime (CTX), ceftazidim (CAZ), cefepime (CFPM), imipenem (IPM), MEPM, amikacin (AMK), levofloxacin (LVFX), minocycline (MINO)。

### 2. metallo $\beta$ -lactamase 産生性および ESBL 産生性

MBL 産生性は Sodium Mercaptoacetate (SMA), CAZ および MEPM ディスク (栄研化学) を用い、添付文書に従い、各抗菌薬ディスクの阻止円径より SMA に隣接した CAZ の阻止円径が、SMA と CAZ のディスクの中心を繋いだ軸方向に対して垂直方向に 5mm 以上の拡大が認められた場合に MBL 産生株と判定した。ESBL 産生性は CLSI M100-S20 に従い、CTX, CAZ, および cefotaxime/clavulanic acid (CTX/CVA), ceftazidime/clavulanic acid (CAZ/CVA) ディスク (栄研化学) を用いた確認試験を実施した。抗菌薬単独ディスクと比較し、クラブラン酸含有ディスクの阻止円径が 5mm 以上の拡大が認められた場合に ESBL 産生株と判定した<sup>8)</sup>。

### 3. $\beta$ -lactamase 遺伝子型別

国立感染症研究所にて PCR 法を用いて実施した。MBL 遺伝子は、各菌株を TE-8 buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0) 700 $\mu$ L に McFarland No. 0.5 の濁度に調整し、100°C 10 分加熱後、上清 1 $\mu$ L を illustra Hot Start Mix RTG (GE Healthcare) にて 94°C 2 分の後、94°C 1 分、55°C 1 分、72°C 1 分 30 秒を 29 サイクル行い、72°C 5 分反応させ、アガロースゲル電気泳動にて増幅を確認した<sup>7)9)10)</sup>。ESBL 遺伝子は、各菌株を蒸留水 500 $\mu$ L に McFarland No.0.5 の濁度に調整し、100°C 10 分加熱後、上清 10 $\mu$ L を 94°C 2 分の後、94°C

1 分、55°C 1 分、72°C 1 分 30 秒を 30 サイクル反応させ、アガロースゲル電気泳動にて増幅を確認した<sup>11)12)</sup>。

### 4. pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) 解析

国立感染症研究所にて実施した。CHEF Mapper システム (Bio-Rad), 制限酵素 *Xba*I を用いて、スイッチングタイム 12.6s-40.1s, 6V/cm, 24 時間泳動を行った。

## 結 果

### 1. 対象症例

MEPM 耐性 *E. coli* が分離された 7 症例を Table 1 に示した。1 例目は 2012 年 3 月より腰椎圧迫骨折、パーキンソン病などで入院中であったが、2014 年 4 月下旬、誤嚥性肺炎の診断により喀痰培養検査を実施したところ MEPM 耐性 *E. coli* が分離された (GMH-1)。2~7 例目は 2014 年 4 月下旬から 5 月下旬、発熱などにより介護施設や自宅から一般外来受診もしくは救急搬送され、いずれも急性肺炎の診断にて入院となり、入院時に実施した喀痰培養より MEPM 耐性 *E. coli* が分離された (GMH-2~GMH-7)。

### 2. 抗菌薬感受性検査

分離株 GMH-1~GMH-7 の抗菌薬感受性結果を Table 2 に示した。カルバペネム系抗菌薬の IPM の MIC は 0.5 $\mu$ g/mL もしくは 1 $\mu$ g/mL で感受性を示したが、MEPM は 8~32 $\mu$ g/mL で耐性を示し CRE と判定した。他の抗菌薬では、AMK に対しては 4 $\mu$ g/mL を示したが、セファロsporin 系およびペニシリン系、キノロン系抗菌薬にはいずれも耐性を示し、テトラサイクリン系抗菌薬に対しては中等度耐性を示した。

### 3. 耐性遺伝子型別

分離株 GMH-1~GMH-7 の  $\beta$ -lactamase 遺伝子型別を Table 2 に示した。7 株すべてにおいて ESBL は CTX-M-2, MBL は IMP-6 の遺伝子型が確認された。

### 4. PFGE パターン解析

分離株 GMH-1~GMH-7 の PFGE パターンを Fig. 1 に示した。GMH-5 のみ 1 本のバンドが異なるが、その他はすべて同一の泳動パターンを示した。Tenover<sup>13)</sup> の報告に従い、分離された 7 株はすべて同一クローンと判定した。

Table 2 Antibacterial susceptibility profiles and type of  $\beta$ -lactamase of seven *E. coli* isolates recovered from the study patients.

	MIC <sup>1)</sup> ( $\mu\text{g/mL}$ )											Type of $\beta$ -lactamase <sup>2)</sup>	
	PIPC	CEZ	CMZ	CTX	CAZ	CFPM	IPM	MEPM	AMK	LVFX	MINO	ESBL	MBL
GMH-1	>128	>128	>128	>128	>128	>128	1	32	4	32	8	CTX-M-2	IMP-6
GMH-2	>128	>128	>128	>128	>128	>128	1	32	4	32	8	CTX-M-2	IMP-6
GMH-3	>128	>128	>128	>128	>128	>128	0.5	16	4	32	8	CTX-M-2	IMP-6
GMH-4	>128	>128	>128	>128	128	>128	0.5	16	4	32	8	CTX-M-2	IMP-6
GMH-5	>128	>128	>128	>128	>128	>128	0.5	16	4	32	8	CTX-M-2	IMP-6
GMH-6	>128	>128	>128	>128	>128	>128	1	32	4	32	8	CTX-M-2	IMP-6
GMH-7	>128	>128	>128	>128	>128	>128	0.5	8	4	32	8	CTX-M-2	IMP-6

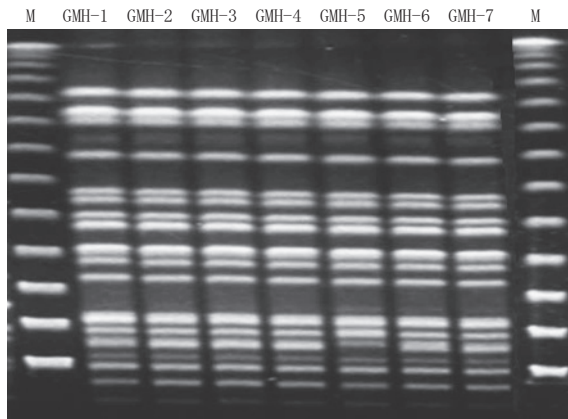
1) MIC was determined with the broth microdilution method according to CLSI M07-A10.

2)  $\beta$ -lactamase was detected with the PCR technique.

PIPC: piperacillin, CEZ: cefazolin, CMZ: cefmetazole, CTX: cefotaxime, CAZ: ceftazidime, CFPM: cefepime, IPM: imipenem, MEPM: meropenem, AMK: amikacin, LVFX: levofloxacin, MINO: minocycline

ESBL: extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, MBL: metallo  $\beta$ -lactamase

Fig. 1 Pulsed-field gel electrophoresis banding patterns after *Xba* I digestion of *E. coli* isolates. Lane GMH-1, GMH-2, GMH-3, GMH-4, GMH-5, GMH-6, and GMH-7; isolates from the study patients, and lane M; CHEF DNA size standards lambda ladder marker (Bio Rad).



## 考 察

今回、当院において1カ月間の短期間に7名の患者よりCREを分離した。

当該患者7名のうち最初にCREが分離された患者については、入院から2年が経過した2014年4月下旬に誤嚥性肺炎のため喀痰培養検査を実施しCREを分離した。しかし、その間の細菌検査は実施していなかったため本菌の由来や感染の時期は特定できなかった。その他の6名はいずれも肺炎疑いで救急搬送もしくは外来受診し、入院時に採取した喀痰からCREが分離された外部からの持ち込み例であった。これらについては念のため検体採取時や検査工程での本菌の汚染を考慮し調査を行ったが、検体採取場所が異なること、採取にはすべて新しい器具を用いたことからその可能性は否定された。しかしながら本事例分離株はす

べて同一の抗菌薬感受性パターン、 $\beta$ -lactamase 遺伝子型を示し、PFGE解析においてもすべて同一クローンを示したことから同一株であることが考えられ、何らかの共通する背景の存在が示唆された。持ち込み例のうち2例は同一介護施設からの受診であり、介護施設において同一クローンを獲得した可能性が考えられたが、その他の4例はそれぞれの自宅から受診し、受診前の共通の医療機関や介護施設の入所歴は確認できなかった。以上のことから、介護施設での同一CREの存在が推測され、さらに医療機関外の地域においても同一CRE株が存在していることが示唆された。介護老人保健施設や長期療養型施設では入所者からmethicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)をはじめとする各種抗菌薬耐性菌の分離例が報告されているため<sup>14)</sup>、施設内では各種耐性菌の保菌者が多く存在している可能性がある。また近年では市中医療機関の受診患者をはじめ市販食品や市中の環境から抗菌薬耐性菌が分離される例が報告されていることから、CREもすでに市中に分布している可能性がある<sup>15)</sup>。しかしながら、日常的に細菌検査を実施する機会のない介護施設や自宅からの受診例では各種耐性菌の存在を検知することができないため、入院時には監視培養を行い耐性菌の保菌状況を把握したうえで、早期に適切な予防策を施すことが重要であると考え、今回の事例において、CREが院外より持ち込まれたと判断された全例は、いずれも入院時に喀痰の細菌検査を実施したため早期に院内での感染拡大防止に繋がった。

本事例7株のMEPMのMICは8~32 $\mu\text{g/mL}$ であったが、IPMは0.5 $\mu\text{g/mL}$ もしくは1 $\mu\text{g/mL}$ と低い値を示した。また $\beta$ -lactamase 遺伝子は7株すべてにおいてIMP-6型であった。IMP-6型株はIPMのMICがMBL非産生株と同等の低い値を示すため、IPMのみで感受性検査を行った場合はMBL産生株を

見逃す可能性があるステルス型 CRE が指摘されており、*Klebsiella* 属では ISMRK (imipenem-susceptible but meropenem-resistant *Klebsiella*) として報告されている<sup>16)</sup>。当院では IPM および MEPM の両抗菌薬の感受性検査を実施していたため MEPM の結果から MBL 産生菌を推定可能であった。一方、香月ら<sup>17)</sup>が報告している IMP-1 型 MBL 産生 *Klebsiella pneumoniae* は IPM および MEPM の MIC が共に 0.5 $\mu$ g/mL と低い値であるため、両抗菌薬を用いた感受性検査によっても MBL 産生株を推測することは困難である。そのため、適切に MBL 産生株を検出するための感受性測定薬剤の選択が重要となり、CRE の判定にはカルバペネム系抗菌薬のみではなく、厚生労働省の届出基準にも示されている cefmetazole (CMZ) をはじめ、その他の抗菌薬も含めて判断する必要がある<sup>18)</sup>。また、結果には示していないが本事例の7株は AST-N268 カードを用いた VITEK2 システムにより CRE のスクリーニングが可能であったが、カードの種類<sup>19)</sup>や自動機器の種類によっては IMP-6 型株の検出が困難であるため<sup>20)</sup>、適切な CRE の検出方法を早急に確立することが望まれる。

今回の CRE はすべて CTX-M-2 遺伝子を保有する ESBL 産生株であった。前述の ISMRK は、MBL 遺伝子 *bla*<sub>IMP-6</sub> と ESBL 遺伝子 *bla*<sub>CTX-M-2</sub> の両方をプラスミド pKPI-6 上に保有する<sup>16)</sup>。本プラスミドおよび類似プラスミド保有腸内細菌が本事例および関西を中心とした医療機関の調査においても検出されており<sup>5)</sup>、すでに ESBL 産生 MBL 遺伝子保有株が当該地域に広く分布しているものと考えられた。

以上のことから、本抗菌薬耐性菌が介護施設や市中で広く蔓延している可能性が示唆された。医療機関においては外来、院外からの転院患者に対し、確実に耐性菌を分離するための検査工程の構築および継続したサーベイランスが重要であると同時に、感染症治療および感染制御に細心の注意を払う必要があると考える。

謝辞：本研究にあたり耐性遺伝子型別および PFGE 解析を実施していただいた国立感染症研究所細菌第二部、鈴木和先生および松井真理先生に深謝いたします。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

#### 文 献

- 1) 安永さおり, 寺田さと子, 早川恭江, 加藤千景, 鈴木匡弘, 山田和弘, 他: 同一病棟で長期に渡り分離された CTX-M-14 型 ESBLs 産生 *Escherichia coli* の検討. 感染症誌 2011; 85: 347—54.
- 2) 伊藤隆光, 福井康雄, 小野憲昭, 池田文昭, 金山明子, 小林寅祐: 同一患者から検出された *Ser-*

*ratia marcescens* の metallo- $\beta$ -lactamase 産生株および非産生株に関する検討. 感染症誌 2013; 87: 189—94.

- 3) Ito H, Arakawa Y, Ohsaka S, Wacharctayankun R, Kato N, Ohta M: Plasmid-mediated dissemination of the metallo- $\beta$ -lactamase gene *bla*<sub>IMP</sub> among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 824—9.
- 4) Ambler RP: The structure of  $\beta$ -lactamases. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 1980; 289: 321—31.
- 5) 大石和徳: 厚生労働科学研究費補助金「多剤耐性菌の疫学と国内における対応策に関する研究」平成 26 年度研究報告書 (我が国における新たな多剤耐性菌の実態に関する研究). 2015 年 3 月; p. 1—6.
- 6) 吉川耕平, 長川隼人也, 園田美代子, 嶋谷泰明, 竹田真未, 木下幸保: 糞便中における ESBL と MBL 産生腸内細菌科菌の検出状況. 日臨微生物誌 2014; 24: 9—16.
- 7) 荒川宜親: 厚生労働科学研究費補助金「新型薬剤耐性菌等に関する研究」平成 22 年度研究報告書 (我が国における新たな多剤耐性菌の実態に関する研究). 2011 年 3 月; p. 11—27.
- 8) Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, nineteenth informational supplement M100-S20. CLSI, Wayne, PA, 2010.
- 9) Shibata N, Doi Y, Yamane K, Yagi T, Kurokawa H, Shibayama K, *et al.*: PCR typing of genetic determinants for metallo- $\beta$ -lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. J Clin Microbiol 2003; 41: 5407—13.
- 10) Poirel L, Heritier C, Tolun V, Nordmann P: Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 15—22.
- 11) Shibata N, Kurokawa H, Doi Y, Yagi T, Yamane K, Wachino J, *et al.*: PCR classification of CTX-M-Type  $\beta$ -lactamase genes identified in clinically isolated Gram-Negative Bacilli in Japan. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50: 791—5.
- 12) Yagi T, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, Arakawa Y: A preliminary survey of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) in clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan. FEMS Microbiology Letters 2000; 184: 53—6.
- 13) Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, *et al.*: Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. J CLIN Microbiol 1995; 33: 2233—9.

- 14) 川田悦夫, 巽 武司, 森田豊穂: 療養病床における入院時耐性菌の検出状況. 日老医誌 2013; 50: 555—6.
- 15) 石原ともえ, 古川一郎, 黒木俊郎, 神山 務: 市販鶏肉および市中病院外来患者における ESBL 産生菌の検出状況. 日食微生物会誌 2011; 28: 123—7.
- 16) Kayama S, Shigemoto N, Kuwahara R, Oshima K, Hirakawa H, Hisatsune J, *et al.*: Complete nucleotide sequence of the IncN plasmid encoding IMP-6 and CTX-M-2 from emerging Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59: 1356—9.
- 17) 香月耕多, 永沢善三, 村谷哲郎: 新生児集中治療室の複数の患者より分離されたメタロ-β-ラクタマーゼ産生 *Klebsiella pneumoniae* に関する検討. 日臨微生物誌 2011; 21: 185—92.
- 18) 厚生労働省ホームページ. <http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshok11/01-05-140912-1.html>.
- 19) Koizumi A, Kasahara K, Komatsu Y, Ui K, Mizuno F, Nakayama A, *et al.*: Evaluation of the Vitek 2 AST-N269 card for detection of meropenem resistance in imipenem-susceptible meropenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 3908.
- 20) Harino T, Kayama S, Kuwahara R, Kashiwama S, Shigemoto N, Onodera M, *et al.*: Meropenem resistance in imipenem-susceptible meropenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates not detected by rapid automated testing systems. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 2735—8.

Bacteriological Properties of Meropenem-resistant *Escherichia coli*  
Isolated from Seven Patients within a Month

Takamitsu ITO<sup>1,2)</sup>, Izumo KANESAKA<sup>2)</sup>, Satoe KURACHI<sup>2)</sup>, Akiko KANAYAMA<sup>2)</sup> & Intetsu KOBAYASHI<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Clinical Laboratory, Osaka Gyomeikan Hospital,

<sup>2)</sup>Department of Infection Control and Prevention, Faculty of Nursing, Toho University

From April to May 2014, a total of seven cases of meropenem (MEPM)-resistant *Escherichia coli* were isolated from the sputum specimens in 7 different patients in a community hospital.

The MICs of MEPM for isolates were 8 to 32 μg/mL, whereas the MICs of imipenem (IPM) were 0.5 μg/mL or 1 μg/mL. All of the isolates possessed the metallo β-lactamase (MBL) IMP-6 gene, and were CTX-M-2 type extended-spectrum β-lactamase (ESBL)-producers. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) patterns for the isolates were identical.

At the time of specimen collection, one patient had been hospitalized for a long time and the other six patients had been comparatively recently admitted to the hospital. Of the six patients, two had been staying in the same nursing facility before admission, whereas the remaining 4 patients had no relationship with each other because they had been in separate locations. Thus, these cases were not considered to be nosocomially-acquired infection.

Our findings suggest that MBL-producing *E. coli* has been spreading widely in the community such as in local nursing facilities.