

主論文の要旨

Molecular epidemiological analysis and risk factors for acquisition of carbapenemase-producing *Enterobacter cloacae* complex in a Japanese university hospital

ある日本の大学病院におけるカルバペネム耐性 *Enterobacter cloacae* complex の分子疫学と耐性機構、保菌リスク因子の研究

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
生体管理医学講座 臨床感染統御学分野

(指導：八木 哲也 教授)

手塚 宜行

【緒言】

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE)、特にカルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌 (CPE) は全世界的な公衆衛生上の脅威となっており、日本でも CRE は感染症法に基づく感染症発生動向調査 5 類全数把握疾患に追加された。日本の CRE のサーベイランス基準はメロペネム最小発育阻止濃度 (MIC) $\geq 2\mu\text{g}/\text{mL}$ またはセフメタゾール MIC $\geq 64\mu\text{g}/\text{mL}$ かつイミペネム MIC $\geq 2\mu\text{g}/\text{mL}$ となっている。厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業から、CRE の有病率は 0.27% と他国と比べて低く、また菌種別にみると CRE の約半数は *E. cloacae* complex (EC) を含むエンテロバクター属で、IMP 型のカルバペネマーゼが多いことが明らかになった。CRE の世界的な流行で初期に問題になったのは大腸菌や肺炎桿菌であったため、カルバペネム耐性 EC (CREC) の研究はいまだ少ない。また CPE は non-CPE と比べると伝播する可能性が高いと示唆されており、この 2 つを区別することは感染制御に関する重要な検査テーマの 1 つとして挙げられている。そのため名古屋大学医学部附属病院で検出された CREC の分子疫学、カルバペネマーゼの有無とカルバペネマーゼの保有リスク、プラスミド解析を行った。

【方法】

2012 年 4 月から 2016 年 3 月の期間で、名古屋大学医学部附属病院入院中に初めて検出された CREC とそれを検出した時点での患者の情報を電子カルテから後方視的に抽出した。CREC のうちカルバペネマーゼ産生 EC (CPEC) を検出した患者と non-CPEC を検出した患者で症例対照研究を実施し、CPEC 獲得のリスク因子を評価した。CREC の同定と感受性検査は MicroScan Walkaway で行った。EC のうち、メロペネム MIC $\geq 2\mu\text{g}/\text{mL}$ またはセフメタゾール MIC $\geq 64\mu\text{g}/\text{mL}$ かつイミペネム MIC $\geq 2\mu\text{g}/\text{mL}$ の場合、CREC と定義した。カルバペネマーゼ産生は Modified Carbapenemase Inactivation Method (mCIM) を実施し、mCIM 陽性の場合にはカルバペネマーゼ産生ありと判断し、*bla*_{IMP-1}、*bla*_{IMP-2}、*bla*_{NDM-1}、*bla*_{VIM-2}、*bla*_{KPC} の Polymerase chain reaction (PCR) を実施し、さらに PCR 産物のシーケンスを行ってカルバペネマーゼの種類を同定した。

分子疫学解析として Repetitive extragenic palindromic PCR による DiversiLab と Multi Locus Sequence Typing (MLST) を行った。EC の種名は Hoffmann らの報告をもとに *hsp60* PCR のシーケンス結果から ClustalW を用いて決定した。プラスミド解析は分子疫学解析から代表的な 7 つの菌株で実施した。MiniSeq と MinION で Whole genome sequencing を行い、アセンブリは Unicycler と Miniasm、アノテーションは PATRIC server で行った。*bla*_{IMP-1} を持つプラスミドの線形比較は BLAST を用いて行い、Easyfig で視覚化した。

【結果】

4 年間で CREC39 例が該当し、うち 20 例が CPEC で、すべて IMP-1 を保持して

いた (Figure 1)。CREC は 65-79 歳の患者で最も多く検出され、ほぼすべての患者に併存疾患、約 75% に手術歴を認めた (Table 1)。CPEC 検出患者は non-CPEC 検出患者と比べ、CREC 検出までの入院期間が長く (26.5 日と 12 日、 $p=0.008$)、尿道カテーテル留置 (オッズ比 [OR] 5.36, 95%信頼区間 [CI] 1.14-30.9, $p=0.023$) と挿管状態 (OR 7.53, 95%CI 1.47-53.8, $p=0.008$) にある患者の割合が優位に高かった。CREC は非清潔検体からの分離が 34 例 (87.2%) で、CPEC は non-CPEC と比べ、喀痰から検出される割合が高かった (OR 4.40, 95%CI 0.94-25.0, $p=0.048$) (Table 2)。清潔検体から検出された 5 例 (12.8%) を含めた 21 例 (53.8%) の CREC が感染症の起炎菌となっており、うち肺炎の 7 例 (17.9%) と腹膜炎の 6 例 (15.4%) が最も多かった。30 日死亡率や入院死亡率は有意差を認めなかった。DiversiLab による分子疫学的解析では CREC は 27 の遺伝子型に分けられ、4 つの CPEC のクラスターを認めた。うち 3 つのクラスターの CPEC は、検出年が異なっており、明らかな疫学的関係のない患者からも検出されていた (Figure 2)。hsp60 シークエンス解析から *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii* が 13 例 (33.3%) と最多であり、次に多かったのは *E. asburiae* の 9 例 (23.1%) であった。MLST では 31 のシークエンスタイプ (ST) に分けることができ、うち 11 の新規 ST を認めた。ST 113 が 7 例 (17.9%) と最多で、次に多かったのは ST 53 の 6 例 (15.4%) であった。ST 53 と ST 1047 は MLST で用いられる 7 つの領域のうち、1 領域のみで 7 塩基異なっていた。それ以外の ST は 7 つの領域のうち 3 つ以上で異なっていた。この分子疫学の結果から、代表的な 7 つの CPEC 株で whole-genome sequencing によるプラスミド解析を実施した (Figure 3)。不和合性群は全て IncHI2A であり、7 つのうち 6 つのプラスミドはほぼ同じ接合因子や可動性因子、*bla*_{IMP-1}、*aac*(6')-IIc、*sul1* を含むクラス 1 インテグロン構造を保持していた (Table 3)。残り 1 つのプラスミドでも *bla*_{IMP-1}、*aac*(6')-1a、*sul1* を含むクラス 1 インテグロン構造を保持していたが、接合因子や可動性因子は異なっていた。7 つのプラスミド全てが水銀、ヒ素、テルライトの重金属耐性遺伝子を保持しており、6 つのプラスミドが HipBA トキシン/アンチトキシンシステムを保持していた。

【考察】

分子疫学解析により、CPEC は同じ遺伝子型のものが疫学的に関係のない患者から検出されていたが、non-CPEC は全て異なる遺伝子型であった。CPEC は全て *bla*_{IMP-1} を保持しており、遺伝的に異なる CPEC であっても構造的類似性の高い IncHI2A プラスミドを保持していた。これらの結果から、病院内での CPEC の拡散は、菌の水平伝播とプラスミドの伝播の組み合わせによる複雑なメカニズムであることが推察された。代表的な CPEC のプラスミド解析により、IncHI2A レプリコンタイプ、*bla*_{IMP-1} を含むクラス 1 インテグロン構造、重金属耐性遺伝子とトキシン/アンチトキシンシステムが明らかになったが、これは東京から報告されている *Enterobacter hormaechei* から検出された IncHI2A レプリコンタイプの pMTY11043 の構造に非常に相関性が高かった。このプラスミドは特に病院環境において、プラスミドを維持しやすいトキ

シン/アンチトキシンシステムや重金属耐性遺伝子などを保持しやすい可能性がある。そのため今後、地域や全国でのプラスミド解析を含めた CPEC の分子疫学的情報の集積が必要である。

【結語】

長期入院と膀胱留置カテーテル、挿管が CPEC 保菌のリスク因子であった。CREC の分子疫学解析とプラスミド解析により、CPEC 株は non-CPEC に比べて水平伝播しやすく、遺伝的に異なる CPEC でも IncHI2A レプリコンタイプで *bla*_{IMP-1} を含むクラス 1 インテグロン構造を持つ相同性の高いプラスミドを保持していることが示された。