

[原 著]

プラスミド水平伝達を介し多菌種へ耐性伝播した
IMP-1 メタロ-β-ラクタマーゼ産生腸内細菌科細菌による院内感染事例

安部朋子¹⁾・永田由美²⁾・松井真理³⁾・青木知信²⁾・柴山恵吾³⁾
関塚剛史⁴⁾・山下明史⁴⁾・堀内寿志⁵⁾・山口佳子⁶⁾・渡邊真理¹⁾
大隈英子¹⁾・黒田 誠⁴⁾・鈴木里和³⁾

¹⁾ 福岡市立こども病院検査部

²⁾ 福岡市立こども病院感染対策室

³⁾ 国立感染症研究所細菌第2部

⁴⁾ 国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター

⁵⁾ 福岡市立市民病院検査部

⁶⁾ 福岡市立こども病院薬剤部

(平成 28 年 9 月 16 日受付, 平成 29 年 3 月 17 日受理)

当院において、プラスミド水平伝達を介し多菌種へ伝播したメタロ-β-ラクタマーゼ (MBL) 産生腸内細菌科細菌の院内感染事例を経験した。

初検出の患者 A は集中治療室 (ICU) 長期入院患者であり、尿検体よりイミペネムに耐性を示す MBL 産生 *Enterobacter aerogenes* が検出された。患者 A においては、1 年 4 ヶ月の入院期間中、一度も MBL 産生菌が検出されておらず、院内で獲得した可能性が示唆されたため、関連病棟で保菌調査と環境培養を実施した。その結果、9 か月間に初検出患者を含めた計 15 名から 5 属 7 菌種にわたる 23 株の MBL 産生腸内細菌科細菌 (MBL-producing *Enterobacteriaceae*, MPE) を検出し、さらに環境培養でも注入関連器具の洗浄ブラシから MPE を検出した。これらの菌株はいずれも PCR 法で IMP-1 型 MBL 遺伝子が検出され、うち、8 株 (*Enterobacter aerogenes*, 1 株, *Klebsiella pneumoniae*, 2 株, *Klebsiella oxytoca*, 1 株, *Serratia marcescens*, 2 株, *Escherichia coli*, 1 株, *Citrobacter freundii*, 1 株) のプラスミド解析を実施したところほぼ同一のプラスミドを共有していた。

本事例では検出した菌株は複数菌種にわたっていたが、菌種が異なる菌株やパルスフィールド電気泳動法 (PFGE) によるタイピングが一致しない菌株においても、プラスミドの全塩基配列解析により水平伝播であることが解明できた。

本事例により、薬剤耐性遺伝子がプラスミドによって媒介される MBL 産生菌の場合には複数菌種の検出でも院内伝播を疑うことが重要であり、菌種が異なることによって院内感染の探知が遅れることがないように注意を払わなければならないことが示唆された。

Key words: カルバペネム耐性腸内細菌科細菌, メタロ-β-ラクタマーゼ, IMP-1, プラスミド, シークエンス解析

序 文

腸内細菌科細菌による感染症の切り札的抗菌薬であるカルバペネムに耐性となりうるカルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌 (carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, CPE) の出現と蔓延が世界的な脅威になりつつある¹⁾。CPE に有効な抗菌薬はきわめて限定的で感染症の難治化が予想されることから、CPE の

著者連絡先: (〒813-0017) 福岡市東区照葉 5-1-1
福岡市立こども病院検査部
安部朋子
TEL: 092-682-7000
FAX: 092-682-7300
E-mail: abet.t@fcho.jp

表 1. 各保菌調査時期の対象患者および検体の採取タイミングと回数

実施時期	対象	採取回数	採取タイミング	実施患者数	スクリーニング陽性菌分離患者数
期間① 2013年5月	患者 A と同時期に ICU または NICU に入院していた患者 ICU に入院歴のない X 階病棟の長期入院患者	1 回	患者 A の検出直後	34 名	7 名
期間② 2013年6月 ～8月	全 ICU 入室患者	3 回	入院時 ICU 退出時 退院時	289 名	10 名
期間③ 2013年9月 ～ 2014年1月	X 階病棟または NICU の循環器科入院患者	2 回	入院時 退院時		

出現が医療機関に与える影響は大きく計り知れない。CPE の蔓延には医療環境での伝播が影響していると考えられており、2010 年には英国におけるインドへの医療ツアーに関連した NDM-1 産生菌のひろまりが報告され²⁾報道等でも大きく取り上げられた。

国内分離株では IMP 型が優位で IMP-1 型が多く³⁾、院内感染事例の報告も散見されている。2007 年に新生児集中治療室で発生した国内の院内感染事例では、IMP-1 型 メタロ-β-ラクタマーゼ (MBL) 産生 *K. pneumoniae* の同一菌株の伝播によるものであったとの報告がある⁴⁾。平成 23 年 6 月 11 日付の厚生労働省医政局指導課長通知の多剤耐性菌の院内感染を疑う基準として記載された内容には、「一例目の発見から四週間以内に、同一病棟において新規に同一菌種による感染症の発病症例（一部菌種は保菌者含む）」あるいは「同一機関内で同一菌株と思われる感染症の発病症例（抗菌薬感受性パターンが類似した症例等）（一部菌種は保菌者を含む）が計 3 例以上 特定された場合を基本とすること」⁵⁾とあるように、従来より院内感染は一般的に同一菌種で起こりうることが多いとされていた。しかし、近年、プラスミドを介した伝播により複数菌種による大規模な院内感染の事例が発生し⁶⁾、このような事例に対応するため、上記通知の改正を念頭に第 11 回院内感染対策中央会議で検討された結果、平成 26 年、薬剤耐性菌による院内感染を疑う際に菌種が異なってもその疑いを否定しきれない旨の注意喚起がなされた⁷⁾。

今回われわれは、複数の患者から IMP-1 MBL を産生する様々な菌種の腸内細菌科細菌 (Metallo-β-lactamase producing Enterobacteriaceae, MPE) による院内感染を経験した。菌種は異なっていたもの、

の、当院においてそれまでほとんど検出されていなかった MPE が、特定の病棟の入院患者において複数検出されたことから院内感染と判断し、細菌検査室および感染制御チーム (Infection control team, ICT) コアメンバーを含む感染対策室を中心に、事例の収束にむけて保菌調査、環境調査ならびに感染対策を行った。さらに分離菌株のプラスミド解析により水平伝播の実態を明らかにすることができたためその経緯と結果を報告する。

材料と方法

1. 事例の端緒

2013 年 5 月、当院集中治療室 (ICU) に入院中の男児 (患者 A) の尿検体よりイミペネムの MIC 値が 8 μg/ml を超える *E. aerogenes* が分離された。本菌株に対してメルカプト酢酸ナトリウム (SMA) ディスク法による MBL 産生のスクリーニング検査を実施したところ陽性であった。患者 A は菌検出の 1 年 4 か月前より入院しており、その間に実施された細菌検査で MBL 産生菌が分離されたことはなかったことから、患者 A が院内で MBL 産生菌を獲得した可能性が示唆された。さらに、患者 A と同じ診療科など関連病棟の保菌調査を実施したところ、複数の患者から様々な菌種の MPE が検出され、菌種は異なっていたものの院内感染と考えた。

2. 保菌患者調査

①対象患者

調査期間と対象患者を表 1 に示す。採取検体はいずれも便とした。

初検出患者 A 以外の MPE 保菌者を把握するため、関連病棟の入院患者を対象として保菌調査を実施

した。患者 A が入室していた ICU は 8 床で、患者 A も含め、心臓血管外科系の術後患者が多く入室している。心臓血管外科の患者は、術前に X 病棟または ICU と同フロアの新生児集中治療室 (NICU) に数日間入院し、術後に ICU に入室した後、NICU か X 病棟のいずれかを経て退院することが多い。

1) 初回の保菌調査 (期間①) : 34 名

まずは患者 A の MPE 分離検体採取日である 5 月 1 日より前 7 日間に ICU と NICU に入室していた患者 25 名を対象とした。この保菌調査において陽性者を認めたため調査対象を拡大し、時期を問わず ICU 入室歴のあった入院患者 8 名と X 病棟の長期入院患者 1 名を追加した。

2) 初回の保菌調査終了後、2013 年 6 月から 8 月までの約 3 か月間 (期間②-1) : 98 名

ICU において MPE を獲得した患者を探知する事を目的に、すべての ICU 入室患者に対して、入院時、ICU 退出時および退院時の 3 回、保菌調査を実施した。

3) 2013 年 9 月から翌年 1 月までの約 5 か月間 (期間②-2) : 191 名

期間②-1 の保菌調査で ICU では MPE を獲得する患者は確認できず、X 病棟で MPE を獲得した者を数名認めたため、調査の中心を ICU から X 病棟と NICU にうつし、X 病棟と NICU に入院する循環器科の患者を対象として、入院時と退院時の 2 回、保菌調査を実施した。

保菌調査開始時には、感染対策委員会の承認を受け、保菌調査の対象患者からは、検体採取目的に関する説明を行い、書面での同意を得た。

②分離培養検査

培地は基質拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) 産生菌をスクリーニングするための分画 I (ESBL 培地) と MBL 産生菌をスクリーニングするための分画 II (MBL 培地) からなる 1 次スクリーニング用分画培地であるバイタルメディア ESBL/MBL スクリーニング寒天培地 (極東製薬) を用いた。採取された便をこの培地に接種し 37°C で 18 時間~24 時間培養した。MBL 培地に発育したコロニーを DHL 寒天培地 (日水製薬) に再分離し、単一コロニーをポアメディア ミュラーヒントン S 寒天培地 (栄研化学) で純培養した後、SMA ディスク法を実施した。SMA ディスク法には、セフトラジウムディスク (KB ディスク '栄研', 栄研化学)、イミペネムディスク (センシ・ディスク, ベクトンデックソン), メタロ- β -ラクタマーゼ SMA '栄研' メルカプト酢酸ナトリウム 3 mg/ディスク (栄研化学) を用いた。SMA ディスク法陽性と判定された株をス

クリーニング陽性菌とし、同定検査と薬剤感受性検査を実施した。同定検査は、生化学性状試験管培地で行った。使用した生化学性状試験管培地は、TSI 培地・シモンズクエン酸塩培地、クリステンゼン尿素培地 (以上栄研化学)、LIM 培地・VP 半流動培地 (以上 KOJIN)、DNA 寒天培地「ニッスイ」(日水製薬)、マロン酸塩培地 '栄研' (栄研化学)、Decarboxylase Base Moeller (Difco) を基礎培地に使用したアルギニン脱炭酸試薬、オルニチン脱炭酸試薬、ONPG ディスク (日水製薬) である。試験管法で同定困難な場合には、VITEK2 compact GN カード (シスメックス・ビオメリュー) で同定した。薬剤感受性検査は、フローゼンプレート (栄研化学) を用いた微量液体希釈法で実施した。

スクリーニング培地に発育しなかった場合および、ESBL 培地のみ発育し MBL 培地に発育しなかった場合、および MBL 培地に発育したが SMA ディスク法陰性となった菌株はスクリーニング陰性菌とした。

3. 環境調査

①対象および検体採取

環境調査は ICU、X 病棟を対象として計 4 回実施した。MPE 保菌者の病室のほか、病棟の処置室や沐浴室、トイレなどの高頻度接触部位や水回りなど、のべ 57 ヶ所から検体を採取した。環境検体の採取方法は、「病院感染対策実践ガイド」⁸⁾の「拭き取り試験法」に基づき、検体採取用スワブを滅菌生理食塩水で少し湿らせ、約 10 cm×10 cm 四方を縦・横方向に各 10 回、右下斜め・左下斜めに各 5 回拭き取ったものを検体とした。採取場所が凸凹している場合には概ね一定の面積となるように採取した。スポンジは、全体を滅菌ビーカー内でプレインハートインヒュージョンブロス (BBL) 200 ml に浸漬、振り出したのち、このブロス約 10 ml をチューブに移し、3000 回転 10 分間遠心後、沈渣 1 白金耳量を検体とした。ブラシ類は、ブラシ毛のついている範囲を中央の金具に沿って採取綿棒を上下に移動させ、ブラシを回しながら一周分採取した。

②分離培養検査

培地は、バイタルメディア ESBL/MBL スクリーニング寒天培地 (極東製薬)、ヒツジ血液寒天培地、DHL 寒天培地 (以上日水製薬) の 3 種類を用いた。ただし、バイタルメディア ESBL/MBL スクリーニング寒天培地は 6 分割、DHL 培地は 2 分割して使用した。採取した検体を 3 種類の培地に一律に接種、35°C で 48 時間培養し発育の有無を確認し、さらに室温で 2 日間観察し判定した。

MBL 培地に発育を認めたコロニーは保菌患者調査における分離培養検査と同様に SMA ディスク法および菌種の同定を実施した。ただし菌種の同定は SMA ディスク法陽性と判定された株についてのみ行った。

4. 分離菌株の遺伝子解析

保菌調査および環境調査でスクリーニング陽性菌と判定された菌株は国立感染症研究所細菌第 2 部において遺伝子解析を実施した。MBL 遺伝子の検索は IMP-1 型, IMP-2 型, VIM-2 型, および NDM 型について PCR 法で実施³⁹⁾, MBL 遺伝子が検出された株を本事例における MPE と定義した。MPE については, パルスフィールド電気泳動法 (PFGE) によるタイピング解析に基づいて菌株の同一性を, 次世代シーケンサーを用いた S1-PFGE プラスミド解析により MBL 遺伝子を保有するプラスミドの同一性を検討した。

PFGE は Bender らの方法を一部改変して行った⁴⁰⁾。制限酵素は *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli* と *E. aerogenes*, *Enterobacter cloacae* についてはそれぞれ XbaI と SpeI (いずれも New England Biolabs) 用いた。

S1-PFGE プラスミド解析は 2013 年 5 月～7 月に患者 A～F の 6 名から検出された 8 株 (*E. aerogenes*, 1 株, *K. pneumoniae*, 2 株, *K. oxytoca*, 1 株, *S. marcescens*, 2 株, *E. coli*, 1 株, *C. freundii*, 1 株) について実施した。

PFGE タイピング解析と同様に作成した DNA プラグを 40 分間 S1 Nuclease (Takara) で処理後に電気泳動し, プラスミド DNA をエチジウムブロマイド染色で検出した。検出したプラスミドバンドを切り出し, 切り出したゲルより Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) を用いてプラスミド DNA を抽出した。抽出した DNA を Nextera XT DNA Sample Prep Kit (Illumina) のプロトコルに準じて DNA ライブラリを作成し, MiSeq ベンチトップ型次世代シーケンサー (Illumina) によりシーケンス解析を実施した。

得られたシーケンスリード配列は国立感染症研究所病原体ゲノム解析センターが開発したプラスミド解析ソフトウェアである Global Plasmidome Analyzing Tool (GPAT) により assembly を行い, 連結配列を作成した。各プラスミドの replicon type は PCR-based replicon typing で得られる replicon の配列を基準にした相同性検索により判定した⁴¹⁾。

プラスミド間の相同性は, 上記で得られた連結配列およびシーケンスリード配列を元に仮想環状プラス

ミド配列を作成し, Artemis Comparison Tool (ACT, Wellcome Trust Sanger Institute) を使用し, 比較を行った。

5. 感染防止対策

初検出患者 A より MPE が分離された時点で感染対策室室長, 感染制御医師 (ICD), 感染管理認定看護師 (ICN), 感染制御認定薬剤師, 細菌検査室臨床検査技師からなる緊急コア ICT 会議を開催し, 病棟ラウンドを実施した。また, 関連診療科科長への報告, ICU 病棟スタッフへの感染対策強化を感染対策室より指示した。対策開始後も, コア ICT での分析検討会を毎週実施し, 新たな陽性者の報告やカルバペネム系抗菌薬使用状況の動向の確認, 感染対策の検討を重ね, さらに全職種全職員対象に MBL 産生菌についての勉強会を開催した。

感染経路の調査として, MPE 陽性患者について, 主に感染対策室が共通項目の有無を検討した。検討を行った項目は, 入院歴・入院目的・術式履歴・主治医・病室移動歴・抗菌薬使用歴・栄養摂取手段・排泄手段・他院入院歴などである。さらに, 看護ケア・医療器具・医療機器など共通する物品, 人, 時間についても検証した。

結 果

保菌調査, 環境調査

期間①の保菌調査の結果, 34 名中 7 名 (20.6%) からスクリーニング陽性菌が分離された。また, 期間②では, 8 か月間で 289 名が対象となり, うち 10 名 (3.5%) よりスクリーニング陽性菌が分離された (表 1)。4 回実施した環境調査では計 57 検体が採取され, そのうち 4 回目の環境調査で採取した X 病棟の注入器具洗浄用ブラシ検体からのみスクリーニング陽性菌が 2 株分離された。

PCR 法による MBL 遺伝子の検出

患者 A やスクリーニング陽性者からは複数のスクリーニング陽性株が分離されており, これらの重複株を含めた患者由来の合計 26 株に対して PCR 法による MBL 遺伝子の検出を実施したところ 26 株中 23 株 (88.5%) で IMP-1 型 MBL 遺伝子が検出された。IMP-1 型 MBL 遺伝子陰性であった残り 3 株は IMP-2 型, VIM-2 型, NDM 型の MBL 遺伝子も陰性であった。環境由来株は 2 株とも IMP-1 型 MBL 遺伝子が検出された。調査期間ごとの IMP-1 型遺伝子が検出された菌の菌種と菌株数を表 2 に示す。最終的に, 症例 A から最初の MPE が検出された 2013 年 5 月から翌年 1 月までの約 9 か月間に, 15 名の患者 (患者 A～O) と

表2. 初検出患者 A と保菌調査各期間および環境調査で検出された IMP-1 型遺伝子検出の菌種と株数

	患者 A (初検出例)	期間①	期間②	環境調査	合計
<i>Enterobacter aerogenes</i>	2		2		4
<i>Enterobacter cloacae</i>			2		2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	2	3		6
<i>Klebsiella oxytoca</i>		1	3		4
<i>Serratia marcescens</i>		1	3	1	5
<i>Escherichia coli</i>		1	1		2
<i>Citrobacter freundii</i>	1				1
<i>Kluyvera intermedia</i>				1	1
合計	4	5	14	2	25

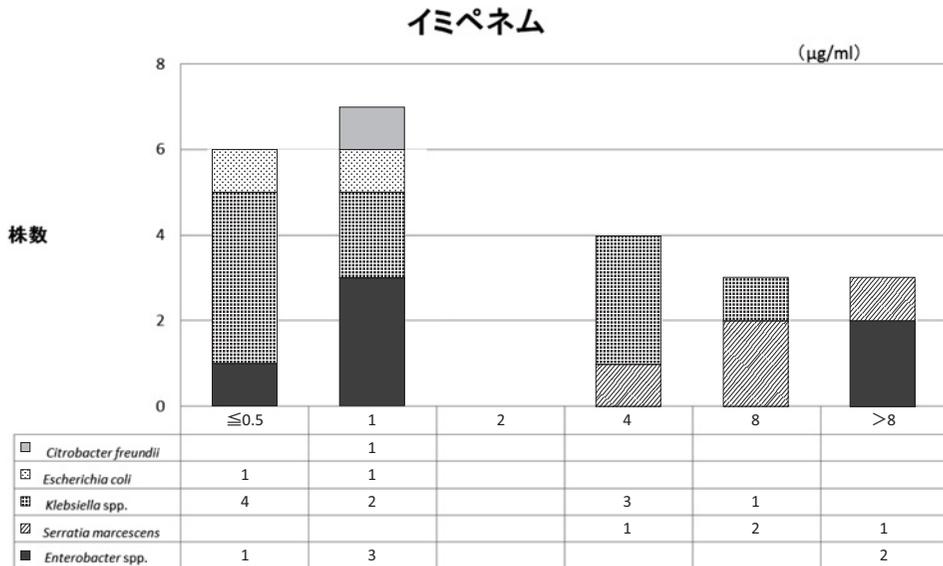


図 1-1. カルバペネム系薬剤の MIC 分布, イミペネム

環境 1 検体から 6 属 8 菌種にわたる 25 株の MPE が確認された。

薬剤感受性検査

患者由来 5 属 7 菌種 23 株の MPE のカルバペネム系薬剤の MIC 分布図を図 1 に示す。カルバペネム系薬剤の MIC 値は $\leq 0.5 \mu\text{g/ml}$ から $> 8 \mu\text{g/ml}$ まで幅広く分布しており、CLSI M100-S21¹²⁾以降の基準で感性とされる $1 \mu\text{g/ml}$ 以下の株は、患者由来 MBL 産生菌 23 株中、イミペネムでは 13 株 (56.5%)、メロベネムでは 17 株 (73.9%) をしめていた。MIC 値の分布は 2 峰性を示し、菌種によって偏りが見られた。イ

ミペネム、メロベネムともに *S. marcescens* は高い MIC 値を示し、*E. cloacae*、*E. coli*、*C. freundii* では $2 \mu\text{g/ml}$ 以上の株は検出されず、*E. aerogenes* は株によって低値から高値まで幅広く分布していた。*K. pneumoniae*、*K. oxytoca* では、イミペネムでは幅広い濃度を、メロベネムでは全株 $1 \mu\text{g/ml}$ 以下を示した。その他の薬剤の感受性結果を表 3 に示す。すべての株が第 3 世代セファロsporin 系薬剤に対して耐性を示し、特にセフトジジムの MIC は $> 16 \mu\text{g/ml}$ と高度耐性を示した。セファマイシン系はすべての株で耐性を示したが、モノバクナム系では 2 株以外は感性的で

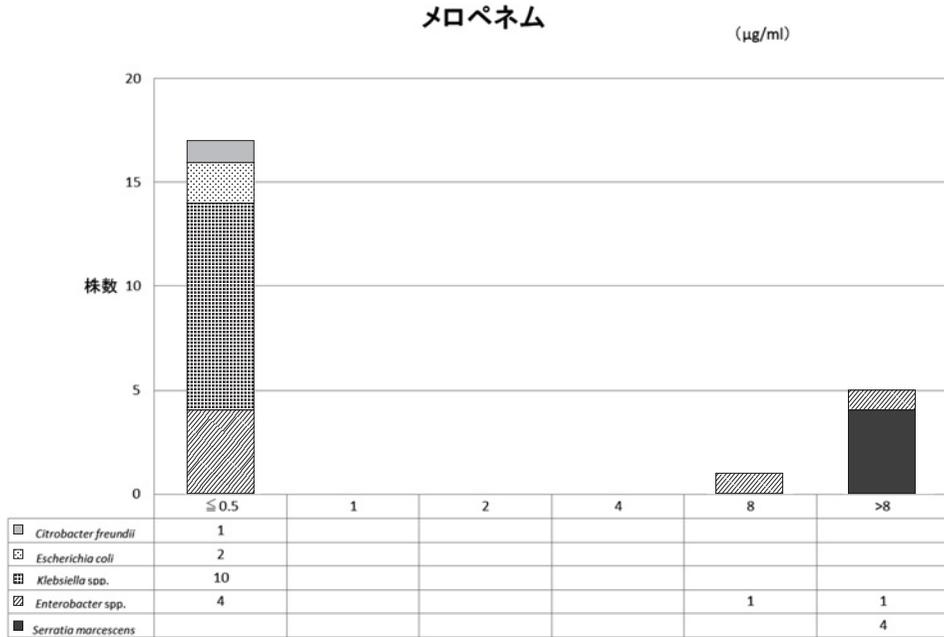


図 1-2. カルバペネム系薬剤の MIC 分布, メロペネム

表 3. 患者由来 MPE23 株のカルバペネム系薬剤以外の薬剤感受性検査結果 (CLSI M100-S22 準拠)

	range	MIC50	MIC90	R (耐性) 割合
ampicillin	≤0.5~>16	>16	>16	100.0 %
piperacillin	≤0.5~>64	16	64	8.7 %
tazobactam/piperacillin	≤16~>64	≤16	≤16	4.3 %
sulbactam/ampicillin	≤4~>16	>16	>16	100.0 %
cefazolin	≤0.5~>16	>16	>16	100.0 %
cefepoxime proxetil	≤1~>4	>4	>4	100.0 %
cefotaxime	≤0.5~>32	32	>32	100.0 %
sulbactam/cefoperazone	≤1~>32	32	>32	
ceftazidime	≤0.5~>16	>16	>16	100.0 %
aztreonam	≤4~>16	≤4	≤4	4.3 %
cefmetazole	≤1~>32	>32	>32	100.0 %
flomoxef	≤8~>32	32	>32	
minocycline	≤0.5~>16	2	8	4.3 %
gentamicin	≤0.5~>16	8	32	30.4 %
fosfomicin	≤8~>256	≤8	32	0.0 %
levofloxacin	≤0.25~>40	≤0.25	≤0.25	0.0 %
sulfamethoxazole-trimethoprim	≤10~>40	≤10	40	8.7 %

あった。また、アミノグリコシド系では、23 株中 7 株 (30.4%) がゲンタマイシンに耐性であった。

PFGE 解析による菌株の同一性の検討

PFGE 解析の対象とした菌株は、15 名の患者由来

MPE23 株と環境培養由来株のうち患者からも分離されていた *S. marcescens* の 1 株である。PFGE 解析の結果、*S. marcescens* は、異なる 4 名の患者由来株と環境由来株は同一バンドパターンを示した。しかし、

率は 62.5% と職員の関心度の高さがうかがわれた。参加できなかった職員には、勉強会資料と簡単な確認問題を後日メールで配信した。勉強会終了後のアンケート調査では、実践に役立つ内容であったという意見が、80% 以上あった。

考 察

本事例では約 9 か月間に初検出患者を含め、合計 15 名の患者および環境から 25 株の MPE が確認され菌種は 6 属 8 菌種にわたっていた。

平成 23 年 6 月に発出された厚生労働省医政局指導課の通知においても「1 か月に同一菌種の・・・」⁵⁾との記載があるように、一般的な院内感染のアウトブレイクでは、短期間に単一菌種が検出されることが多い。本事例では期間①において検出された MPE がいずれも菌種が異なっていたため、当初アウトブレイクとしてとらえるべきかの判断が困難であった。しかし、初検出患者 A が当院で出生し複数回の手術を受け、今回 ICU に 1 年以上入院している患者であり外部からの持ち込みの可能性がほぼなかったということに加え、厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業検査部門年報での主要な腸内細菌科細菌の菌種におけるカルバペネム耐性菌の割合が 1% 未満¹³⁾であったことから、期間①に患者 A と同じ病棟の複数患者から検出された MPE が市中からの個別に持ち込まれたとは考えにくく、アウトブレイクとして対策を進めるべきと判断した。一般的な同一菌株の水平伝播による院内感染事例とは異なり、MPE の菌種が多様であったうえ、PFGE 解析では、同じ菌種であっても *S. marcescens* 以外は全く異なるバンドパターンを示しており、院内伝播を示唆する所見は得られなかった。つまり、従来の調査手法では解明できなかったこともまた、本事例が過去の院内感染事例と異なる点である。しかし前述の通り、症例の疫学的背景からは MPE の院内伝播が強く示唆されたため、IMP-1 型 MBL 遺伝子を保有する同一のプラスミドの伝播の可能性を考え、次世代シーケンシング技術を用いた全塩基配列解読によるプラスミド解析を行った。プラスミドの解析結果、本事例の MPE が保有する IMP-1 型 MBL 遺伝子は、異なる菌種であっても塩基配列が全長にわたってほぼ一致する IncL/M プラスミドに担われており、同一のプラスミドの院内伝播を示唆するものであった。オーストラリアでは、2000 年代にメルボルンの病院で MBL 遺伝子の *bla*_{IMP-4} が水平伝達より複数の菌種にひろまると推測される院内感染事例が¹⁴⁾、さらにこのメルボルンでは *bla*_{IMP-4} を持つ IncA/C のプラスミドが、地理

的に離れたシドニーでは同じく *bla*_{IMP-4} を持つ IncL/M のプラスミドが異なる菌種の腸内細菌科細菌で認められたとの報告がなされている¹⁵⁾。今回われわれが経験した院内感染事例においても、*bla*_{IMP-1} を持つ Inc L/M のプラスミドが複数の菌種で認められたことから、薬剤耐性遺伝子がプラスミドによって媒介される MBL 産生菌の場合には複数菌種の検出でも院内伝播を疑うことが重要であり、菌種が異なることによって院内感染の探知が遅れることがないように注意を払わなければならないことが示唆された。菌種が同一の場合でも PFGE 解析の解析結果は限定的な役割しか果たさない場合があるので、感染源や感染経路の正確な解明にはプラスミドの全塩基配列解析が必要となってくる。その後平成 26 年 12 月には厚生労働省医政局地域医療計画課よりこのようなプラスミドが関与する異なる菌種によるアウトブレイクへの注意喚起の課長通知が発出された⁷⁾。

腸内細菌科細菌の IMP 型 MBL 産生菌では MIC が緑膿菌ほど高くならず、イミペネムの MIC が 1 μg/ml 以下の株も存在する¹⁴⁾¹⁵⁾。本事例で分離された MBL 産生菌についても同様にカルバペネム系薬剤の MIC 値は必ずしも高くなかった。CLSIM100-S21 以降の判定基準に基づいて判定すると、メロペネムに対しては約 70% が感性で、スクリーニングには検出感度の高い選択培地の使用が必要であった。バイタルメディア ESBL/MBL スクリーニング寒天培地は、MBL 産生菌選択剤としてセフトジジムを使用しているため、全ての株がセフトジジム耐性であった本事例の MPE の選択性を高めることができたと考えられる。さらに、基礎培地が DHL 培地であるため、発育してきたコロニーの形状から菌種の推定が可能であり、複数菌種を効率よく検出するには有用であった。

SMA ディスク法は、緑膿菌で IMP 型 MBL 産生菌が比較的蔓延しているわが国では、病院の細菌検査室で普及している検査法である。今回の解析で実施した SMA ディスク法の判定では、感染対策上、誤った陰性判定による保菌者の見落としが懸念されたこともあり明らかな陰性像以外は陽性と判定した。カルバペネム系薬剤による阻止円形が小さく、SMA ディスク判定が比較的容易な緑膿菌にくらべ、腸内細菌科細菌の菌種では阻止円形が比較的大きいうえ、SMA による阻害効果も明瞭ではなく、判定にやや習熟を要すると思われた。保存された菌株について PCR で確認された MBL 産生菌と非産生菌とを比較したところ、阻止円の拡張する方向の違いを認識できた。薬剤含有ディスクとして、今回の解析ではセフトジジムとイミペネ

ムを使用した。IPM型やVIM型が蔓延している日本においては、MBLの検出感度がカルバペネムより高いセフトジジムをカルバペネムに加えて使用するとよいと報告がある¹⁶⁾。その一方でCPE検出の指標薬剤としてメロペネムが感度および特異度の点から最適であることが示されている¹⁷⁾。これらの報告を鑑みて現在当院ではセフトジジムとメロペネムを用いてSMA法を行なっている。

患者A検出時は連休中であつたが、細菌室と感染対策室の緊急時の連絡体制が確立していたため、混乱することなく速やかに初動態勢を整える事ができた。主治医への耐性菌検出報告と感染防止対策だけにとどまらず、保菌者1例のみの検出ではあつたが関連病棟入院患者の保菌調査に踏み切つたことで、院内伝播の全容を明らかにすることができた。注入器具の単回使用化は必要とされながらもコストがかかるためなかなか踏み切れないことが多い。しかし、今回の事例では、感染対策の全般的な強化に加え、注入器具およびその取り扱いがMPEの院内伝播と関連していることを示し、最終的に単回使用化を導入できたことで院内伝播を収束させることができたと考えられる。

感染対策の強化を行っていく過程では、多職種のコミュニケーションがより深まったことで情報共有をスムーズに進めることができた。また、清掃職員も含め病院職員全体で感染対策全般についての意識を向上することができた。初検出の患者Aに加え最初のスクリーニングで数名の陽性者が検出された際に、躊躇することなく直ちに保健所に相談し対策支援を受けるとともに詳細な遺伝子学的な解析を実施し、その結果を得たことがわれわれの次への行動を後押ししたと考えている。今後、CPEを蔓延させないためには、院内の感染対策だけではなく、当院から後方病院への転院の際に情報提供を確実に行うことや、後方病院の状況によっては感染対策の支援や指導も必要があるものと思われたため、現在感染対策室を中心に取り組んでいる。本事例は、検査室がMBLのスクリーニングなどの役割を果たす中、感染対策室と連携して病院の感染対策の向上に役立つことができた事例であつた。

本論文の要旨は第25回日本臨床微生物学会総会において発表された。

謝辞：本研究は厚生労働省科学研究費補助金新興・再興感染症研究事業および国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）の感染症実用化研究事業新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業の支援によって実施された。

利益相反：申告すべき利益相反なし。

文 献

- 1) Nordmann, P, T Naas, L Poirel. 2011. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis* 17: 1791-1798.
- 2) Kumarasamy, KK, MA Toleman, TR Walsh, et al. 2010. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis* 10: 597-602.
- 3) 荒川宜親. 2011. 厚生労働省科学研究費補助金「新型薬剤耐性菌等に関する研究」. p. 11-27, 平成22年度研究報告書（我が国における新たな薬剤耐性菌の実態に関する研究）.
- 4) 香月耕多, 永沢善三, 村谷哲郎. 2011. 新生児集中治療室の複数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. *日臨誌* 21: 185-192.
- 5) 「医療機関等における院内感染対策について」（平成23年6月17日医政指発0617第1号）別記医療機関等における院内感染対策に関する留意事項.
- 6) 大阪市内大規模病院におけるカルバペネム耐性腸内細菌科細菌の長期間にわたる院内伝播. 国立感染症研究所 <http://www.nih.go.jp/niid/ja/diseases/ka/cre/2387-idsc/iasr-news/5213-pr4182.html>. 2017年1月6日現在.
- 7) 「医療機関等における院内感染対策について」（平成26年12月19日医政地発1219第1号）.
- 8) 日本臨床衛生検査技師会. 2008. 臨床検査技師のための病院感染対策実践ガイド. p. 121-123. 日本臨床衛生検査技師会, 東京.
- 9) Shibata, N, Y Doi, K Yamane, et al. 2003. PCR typing of genetic determinants for metallo-β-lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *J Clin Microbiol* 41: 5407-5413.
- 10) Bender, JB, CW Hedber, JM Besser, et al. 1997. Surveillance by molecular subtype for *Escherichia coli* O157: H7 infections in Minnesota by molecular subtyping. *N Engl J Med* 337: 388-394.
- 11) Carattoli, A, A Bertini, L Villa, et al. 2005. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J. Microbiol. Methods* 63: 219-228.
- 12) CLSI. 2011. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twnty-First Informational Supplement. CLSI document M100-S21. Clinical and

Laboratory Standards, Wayne, PA.

- 13) 厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業検査部門公開情報 <http://www.nih-janis.jp/report/kensa.html> (2016年8月10日現在).
- 14) Peleg, AY, C Franklin, JM Bell, et al. 2005. Dissemination of the metallo- β -lactamase gene *bla*_{IMP-4} among gram-negative pathogens in a clinical setting in Australia. *Clin Infect Dis* 41: 1549-1556.
- 15) Espedido, BA., SR. Partridge, JR. Iredell. 2008. *bla*_{IMP-4} in different genetic contexts in Enterobacteriaceae isolates from Australia. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 2984-2987.
- 16) Arakawa, Y, N Shibata, K Shibayama, et al. 2000. Convenient test for screening metallo- β -lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol* 38: 40-43.
- 17) 鈴木里和, 松井真理, 鈴木仁人, 他. 腸内細菌科カルバペネマーゼ産生菌の検出に適したスクリーニング薬剤の検討. 国立感染症研究所. <http://www.nih.go.jp/niid/ja/dr-b-m/dr-b-iasrs/4687-pr4124.html>. 2017年1月6日現在.

A nosocomial outbreak caused by IMP-1 metallo- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae of multiple species by plasmid-mediated horizontal gene transfer

Tomoko Abe¹⁾, Yumi Nagata²⁾, Mari Matsui³⁾, Tomonobu Aoki²⁾, Keigo Shibayama³⁾,
Tsuyoshi Sekizuka⁴⁾, Akifumi Yamashita⁴⁾, Hisashi Horiuchi⁵⁾, Yoshiko Yamaguchi⁶⁾, Mari Watanabe¹⁾,
Eiko Okuma¹⁾, Makoto Kuroda⁴⁾, Satowa Suzuki³⁾

¹⁾Department of Clinical Laboratory, Fukuoka Children's Hospital

²⁾Infection Control Office, Fukuoka Children's Hospital

³⁾Department of Bacteriology II, National Institute of Infectious Diseases

⁴⁾Pathogen Genomics Center, National Institute of Infectious Diseases

⁵⁾Department of Clinical Laboratory, Fukuoka City Hospital

⁶⁾Department of Pharmacy, Fukuoka Children's Hospital

We report a nosocomial outbreak caused by metallo- β -lactamase (MBL)-producing Enterobacteriaceae (MPE) of multiple species. Because the first case A was hospitalized in the intensive care unit (ICU) for 16 months prior to the isolation of imipenem-resistant MBL-producing *Enterobacter aerogenes* from a urine sample, nosocomial transmission of the MBL producer within the ICU was suspected. Active surveillance to detect other colonized cases was conducted in the ward associated with case A. As a result, 23 MPE isolates of seven species in five genera of Enterobacteriaceae were obtained from 15 patients, including the first case A. Environmental investigation also detected MPE isolates from a brush used to wash injection-related devices. All 23 isolates were positive for the IMP-1-type MBL genes, and eight isolates of different species shared almost identical plasmids. Nosocomial outbreaks of antimicrobial-resistant bacteria are usually caused by clones of a single species. However, in this outbreak, the MPE isolates belonged to seven different species that shared almost identical plasmids harboring the IMP-1-type MBL gene. Accordingly, we conclude that plasmid-mediated horizontal gene transfer of the IMP-1-type MBL gene was involved in this outbreak. Given that plasmid-mediated horizontal transfer of the MBL gene is known to occur among Enterobacteriaceae, it is important to consider the possibility of nosocomial outbreak even when isolates in an outbreak belong to different bacterial species.