

学位論文

「日本で分離されたカルバペネム耐性緑膿菌における  
メタロ型カルバペネマーゼの保有率および  
その特性に関する研究」

指導教授名 北里 英郎

申請者氏名 中山 亮

## 著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

## 学位論文要旨

【背景と目的】 薬剤耐性菌に対する対策を怠った場合、2050年には薬剤耐性菌感染症による死者数が年間1千万人、経済損失が100兆ドルに達するという衝撃的な予測が Jim O'Neill により報告されたことを皮切りに薬剤耐性菌に係る問題は、公衆衛生および社会経済的に重大な課題となっている。

2017年に世界保健機関は抗菌薬開発を要する12種類の薬剤耐性菌リストを公表した。このリストの最も緊急性の高い耐性菌の1つにカルバペネム耐性緑膿菌がある。カルバペネム耐性機構には、排出ポンプ亢進、ポーリン蛋白質の発現低下や変異があるが、カルバペネマーゼが特に高度耐性に寄与すると考えられている。カルバペネマーゼには、活性中心にセリン残基を要するセリン型と亜鉛イオンを要求するメタロ型に大別される。カルバペネマーゼ産生カルバペネム耐性菌に対する治療薬としてβ-ラクタム薬とβ-ラクタマーゼ阻害薬を配合した薬剤が上市されているが、アビバクタムなどいずれもセリン型カルバペネマーゼを阻害するβ-ラクタマーゼ阻害薬であり、メタロ型カルバペネマーゼを阻害できるβ-ラクタマーゼ阻害薬はない。

世界に分布する緑膿菌の保有するカルバペネマーゼは、阻害薬の存在しないメタロ型カルバペネマーゼが大半を占め、その主流がVIM型である。本邦におけるカルバペネマーゼ産生株の分離率は1.91%と低いとの報告もあるが、インド・ロシア・ギリシャなどではカルバペネマーゼ産生株の分離率が非常に高く、日本は常に流入のリスクに晒されている。本研究では、世界的に流行しているメタロ型カルバペネマーゼ産生緑膿菌の本邦への流入状況を調べることを目的に、三学会合同抗菌薬感受性サーベイランス事業において収集されたカルバペネム耐性緑膿菌を用いて、メタロ型カルバペネマーゼ産生緑膿菌感染症のサーベイランス、及び、メタロ型カルバペネマーゼのサブタイプ解析を行った。カルバペネム耐性緑膿菌に対する理解を深めるため、併せて各種抗菌薬の感受性につき検討も行った。

【方法】主たるメタロ型カルバペネマーゼである IMP 型、VIM 型、NDM 型遺伝子検出のためのリアルタイム PCR 系を構築した。本邦におけるメタロ型カルバペネマーゼ保有率およびそのサブタイプを調べるために 2006 年から 2015 年に収集された臨床分離緑膿菌 1716 株から CLSI の定めたメロペネムの耐性ブレイクポイントを参照しカルバペネム耐性緑膿菌 275 株を入手した。これらカルバペネム耐性緑膿菌の DNA を抽出し、メタロ型カルバペネマーゼ遺伝子をリアルタイム PCR にて検出した。PCR 陽性株は、シーケンス解析によりサブタイプを決定した。

次に、対象年度の全臨床分離緑膿菌に対するメロペネムの MIC データとメタロ型カルバペネマーゼ産生緑膿菌の関係を調べるため、PCR 結果とサーベイランス事業から供与された MIC データを用いて、メロペネム（カルバペネム）耐性株のメタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有率を調査した。また、カルバペネム耐性緑膿菌におけるメタロ型カルバペネマーゼ産生株と非産生株に対する抗菌薬の感受性特性につき分析を行った。メタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有率の地域差および領域差についてもカイ二乗法により検証した。

【結果と考察】臨床分離緑膿菌 1716 株に対するメロペネムの MIC 分布は、感受性域と耐性ブレイクポイントにピークをとる二峰性を示した。全緑膿菌の 16% に相当する 275 株がカルバペネム耐性緑膿菌に該当し、その内の 8.4%（全緑膿菌としては 1.3%）を占める 23 株がメタロ型カルバペネマーゼ産生緑膿菌であった。これら 23 株中、21 株が IMP 型、2 株が VIM 型であった。メタロ型カルバペネマーゼ産生緑膿菌の株数はメロペネム感受性の低下とともに増加し、MIC >128  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を示す株の 90% 以上がメタロ型カルバペネマーゼ産生緑膿菌であった。一方、非産生緑膿菌はメロペネム感受性の低下とともに減少した。以上より、カルバペネムへの高度耐性にはメタロ型カルバペネマーゼの寄与が非常に大きいことが示唆された。

カルバペネム耐性緑膿菌におけるメタロ型カルバペネマーゼ産生株に対する



MIC<sub>90</sub> はメロペネム >128 µg/mL、ピペラシリン >128 µg/mL、セフェピム >128µg/mL、アズトレオナム 64 µg/mL、アミカシン 128 µg/mL、レボフロキサシン >128 µg/mL、ミノサイクリン >128 µg/mL であった。一方で、非産生株は、メロペネム 32 µg/mL、ピペラシリン >128 µg/mL、セフェピム 32 µg/mL、アズトレオナム 64 µg/mL、アミカシン 8 µg/mL、レボフロキサシン 64 µg/mL、ミノサイクリン >128 µg/mL であった。メタロ型カルバペネマーゼ産生株は非産生株と異なり、カルバペネムのみならず他の抗緑膿菌活性を有する抗菌薬に対しても高度耐性を示した。

カルバペネム耐性緑膿菌のメタロ型カルバペネマーゼ保有率の地域差は認められなかったが、複雑性尿路感染症領域におけるメタロ型カルバペネマーゼ保有株分離率が、他領域（呼吸器感染症と手術部位感染症）に比べて有意に高かった。

本研究により、臨床分離緑膿菌の 1.3%がメタロ型カルバペネマーゼ産生緑膿菌であり、多くは IMP 型であることを明らかになった。過去 30 年間の年間分離率と比較しても大きな差は認められず、日本では極端な増加は起きておらず、本邦における主たるメタロ型カルバペネマーゼの種類にも大きな変化はないと考えられた。すなわち、世界的に流行しているメタロ型カルバペネマーゼ産生緑膿菌の本邦への流入は明確には起きていないことが確認された。

## 目次

	頁
1. 序論 .....	1
2. 方法	
2-1. メタロ型カルバペネマーゼ遺伝子検出のためのリアルタイム PCR 系の構築 .....	4
2-2. PCR 産物のシーケンス解析 .....	5
2-3. カルバペネム耐性緑膿菌株の入手と各種抗菌薬の MIC .....	6
2-4. カルバペネム耐性緑膿菌からのメタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有株の検出 .....	6
2-5. メタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有緑膿菌の地域差検討 .....	7
2-6. 各感染症領域におけるメタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有率の比較 ..	7
3. 結果	
3-1. メタロ型カルバペネマーゼ遺伝子検出のためのリアルタイム PCR 系の構築 .....	8
3-2. メタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有カルバペネム耐性緑膿菌に対するメロペネムおよびイミペネムの MIC .....	10
3-3. カルバペネム耐性緑膿菌に対する抗菌薬の感受性 .....	11
3-4. カルバペネム耐性緑膿菌の保有するメタロ型カルバペネマーゼ遺伝子の分類 .....	11
3-5. メタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有緑膿菌の地域差検討 .....	12
3-6. 各感染症領域におけるメタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有率の比較 ..	12
4. 考察	
4-1. メタロ型カルバペネマーゼ遺伝子検出のためのリアルタイム PCR 系の構築について .....	13
4-2. カルバペネム耐性緑膿菌のメタロ型カルバペネマーゼ遺伝子、各種抗菌薬に対する薬剤感受性およびその他の特徴について .....	13

5. 総括	16
6. 今後の課題	17
7. 謝辞	18
8. 引用文献	19
9. 業績目録	23
10. 図表	24

## 1. 序論

2014年、薬剤耐性菌に対する対策を怠った場合に2050年には薬剤耐性菌感染症による死者数が年間1千万人、経済損失が100兆ドルに達するというショッキングな予測がJim O’neillにより報告された (Figure 1) (1)。また、同年、世界の薬剤耐性菌の現状に関する初の動向調査報告を世界保健機関 (WHO) が発表した。一方、抗菌薬については、1960年代以降にメチシリン、アンピシリン、ゲンタマイシンなどの種々の抗菌薬が開発され、先進国における主な死因が感染症から非感染性疾患へと変化する中で製薬企業の主流も移行し、1980年代以降には新たな抗菌薬の開発は減少の一途を辿っている(2)。近年、新規抗菌薬等の開発は停滞し、将来的に薬剤耐性菌に対する対抗手段が枯渇することが懸念されており、現在に至っても薬剤耐性菌に係る問題は、公衆衛生および社会経済的に重大な影響を与えつつあると考えられている。

WHOは2017年に抗菌薬が効かない薬剤耐性菌の中で、抗菌薬開発が必要な12種類の薬剤耐性菌リストを公表した (Figure 2) (3)。このリストに最も緊急性の高い耐性菌 (Priority 1 : CRITICAL) の1つとして、カルバペネム耐性緑膿菌が記載されている。これらカルバペネム耐性緑膿菌の主な薬剤耐性機構としては、カルバペネムを菌体外に排出する排出ポンプの亢進、菌体内へのカルバペネムの流入を低下させる外膜の透過孔ポーリン蛋白の発現低下や変異があるが、カルバペネマーゼによるカルバペネムの不活性化が特に高度耐性化への寄与が大きいと考えられている(4,5)。このカルバペネマーゼには、その活性中心にセリン残基を必要とする酵素と亜鉛イオンを要求する酵素の2種類に大別され、前者はセリン型カルバペネマーゼ、後者はメタロ型カルバペネマーゼと呼ばれている(6)。これらカルバペネマーゼを発現するカルバペネム耐性菌に対する治療薬として、β-ラクタム薬にβ-ラクタマーゼ阻害薬を配合した薬剤が開発・上市されている。しかし、現在、臨床で使用できるβ-ラクタマーゼ阻害薬は、アビバクタムやバボロバクタムなどセリン型カルバペネマーゼに対する阻害薬

であり、メタロ型カルバペネマーゼを阻害できる阻害薬はない(7)。

IMP型とVIM型のメタロ型カルバペネマーゼは、1990年初頭に日本とイタリアの緑膿菌から初めて報告され、その後、世界中で種々のグラム陰性菌による当該遺伝子の保有が報告されている(8-12)。NDM型カルバペネマーゼは、肺炎桿菌で初めてその保有が報告され、その後、緑膿菌など他菌種での保有が報告されている(13,14)。全世界におけるカルバペネマーゼ遺伝子保有緑膿菌に関しては、その97.5%がこれらVIM型、IMP型、NDM型のメタロ型カルバペネマーゼを保有し、VIM型が主流であると報告されている(15)。また、カルバペネマーゼ産生緑膿菌の分離率は、本邦は1.91%と高いわけではないが、ギリシャ、インドおよびロシアでは、13.0, 17.7, 22.5%と非常に高く、日本は常に流入のリスクに晒されている(16,17)。本邦に目を向けてみると、IMP型カルバペネマーゼ遺伝子が緑膿菌の保有する主たるカルバペネマーゼ遺伝子であり、ついで、VIM型カルバペネマーゼ遺伝子が多いことが報告されているが、2006年以降は2009年、2012年それぞれで臨床分離緑膿菌300株程度の調査数であり、2006年以前と比較してその規模は十分と言えるものではない(18-21)。

本研究では、世界的に流行しているメタロ型カルバペネマーゼ産生緑膿菌の本邦への流入状況を調べることを目的に、三学会合同抗菌薬感受性サーベイランス事業において2006年から2015年の間に本邦にて収集された臨床分離緑膿菌1716株のうち、The Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI)の定めたメロペネムの耐性ブレイクポイントを参照しカルバペネム耐性緑膿菌275株を用いて、メタロ型カルバペネマーゼ産生緑膿菌感染症のサーベイランス、及び、メタロ型カルバペネマーゼのサブタイプ解析を行った。さらに、カルバペネム耐性緑膿菌に対する理解を深めるため、併せて各種抗菌薬の感受性につき検討もおこなった。メタロ型カルバペネマーゼ産生緑膿菌の遺伝子型の同定とその特性に関する本研究は、海外からのメタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有緑膿菌の流入のモニタリングに加えて、 $\beta$ -ラクタマーゼ阻害

薬の創薬標的とすべきメタロ型カルバペネマーゼのサブタイプ把握に繋がるため薬剤耐性菌対策において非常に意義がある。また、カルバペネム耐性緑膿菌に対する理解を深め、治療薬選択肢の一助ともなる。

具体的な研究の内容としては、主たるメタロ型カルバペネマーゼ遺伝子である IMP 型、VIM 型、NDM 型メタロ型カルバペネマーゼ遺伝子検出のためのリアルタイム PCR 系を構築した。対象年度に収集されたこれらカルバペネム耐性緑膿菌株から DNA を抽出し、構築したリアルタイム PCR 系を用いてメタロ型カルバペネマーゼ遺伝子の検出を行った。PCR 陽性の株については、シーケンス解析を行い、そのサブタイプを決定した。全臨床分離緑膿菌に対するメロペネムとイミペネムの MIC データとメタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有株の関係を調べるため、MIC 分布とカルバペネム耐性株の各 MIC におけるメタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有率を調査した。また、各 MIC のメタロ型カルバペネマーゼ遺伝子のサブタイプについて検討した。加えて、カルバペネム耐性緑膿菌株の中、メタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有株と非保有株に対する代表的な抗菌薬であるカルバペネム系（メロペネム、イミペネム）、ペニシリン系（ピペラシリン）、セフェム系（セフトジジム、セフェピム）、モノバクタム系（アズトレオナム）、アミノグリコシド系（アミカシン）、キノロン系（シプロフロキサシン、レボフロキサシン）、テトラサイクリン系（ミノサイクリン）の抗菌活性につき調査し、メタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有株に対する抗菌薬の感受性特性につき分析を行った。最後にメタロ型カルバペネマーゼ保有率の地域性と各感染症領域におけるメタロ型カルバペネマーゼ保有率についてカイ二乗法を用いて検証した。

## 2. 方法

### 2-1. メタロ型カルバペネマーゼ遺伝子検出のためのリアルタイム PCR 系の構築

IMP-1 遺伝子保有株 *Escherichia coli* KUB3151, VIM-2 遺伝子保有株 *Pseudomonas aeruginosa* KUB3182 および NDM-1 遺伝子保有株 *E. coli* KUB3605 からフェノール・クロロホルム抽出により DNA を抽出した。すなわち、TE 緩衝液 100  $\mu$ L を入れたエッペンドルフチューブに上記菌株をそれぞれ懸濁し 100  $^{\circ}$ C で 5 分間煮沸し、そこにフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25 : 24 : 1) (311-90151, ニッポンジーン, 日本) を添加した。ボルテックスマキサーにて攪拌し 12,000 rpm 5 分間 4  $^{\circ}$ C にて遠心した後、3 層のうち最上層 80  $\mu$ L を取り出した。取り出した溶液に 5 mol/L NaCl 溶液を 8  $\mu$ L 添加し、90  $\mu$ L のイソプロパノールにより DNA を沈殿させた。室温にて 5 分間放置し、13,000 rpm 5 分間 4  $^{\circ}$ C にて遠心後、上清を除去し大塚蒸留水 100  $\mu$ L にて再溶解し、ストック DNA 抽出液とした。ストック DNA 抽出液の DNA 含量を Nanodrop One (ThermoFisher SCIENTIFIC, 日本) にて測定し、40 ng/ $\mu$ L に調整し各カルバペネマーゼ遺伝子のリアルタイム PCR 用陽性対照 DNA 試料とした。

Mendes らの方法(22)、国立感染症研究所 病原体検出マニュアル(23)、および Notake らの方法(24)を参照し、リアルタイム PCR 反応条件およびプライマーへの M13 配列付加の効果につき検討した (Table 1)。使用したプライマーの配列は Table 2 に示した。リアルタイム PCR 用陽性対照 DNA 試料を 0.49 - 40 ng/ $\mu$ L の 3 倍希釈系列を調製した。2.5  $\mu$ L (1.23~100 ng) をテンプレートとして、Luna universal qPCR Master Mix(M3003, New England Biolabs Japan, 日本)を用いて各カルバペネマーゼ遺伝子を標的としたリアルタイム PCR 反応を行った。リアルタイム PCR 反応の条件は、以下の 3 条件を検討した。条件① : 94  $^{\circ}$ C で 300 秒間の初期変性ステップに続き、変性、アニーリング及び伸長反応を各々に 94  $^{\circ}$ C で 20 秒, 53  $^{\circ}$ C で 45 秒, 72

°C で 30 秒間行い、これを 35 サイクル繰り返した。最後に融解曲線分析を実施した。  
条件②：94 °C で 120 秒間の初期変性ステップに続き、変性、アニーリング及び伸長反応を各々に 94 °C で 60 秒, 55 °C で 60 秒, 72 °C で 90 秒間行い、これを 30 サイクル繰り返した。最後に 72 °C で 5 分間の最終伸長反応を行い、融解曲線分析を実施した。条件③：95 °C で 600 秒間の初期変性ステップに続き、変性、アニーリング及び伸長反応を各々に 95 °C で 30 秒, 62 °C で 60 秒, 72 °C で 60 秒間行い、これを 30 サイクル繰り返した。最後に 72 °C で 10 分間の最終伸長反応を行い、融解曲線分析を実施した。融解曲線分析には LightCycler96 Application Software (Roche) を使用した。いずれの PCR 産物も 1%アガロースゲルを用いて、100 V, 30 分間電気泳動後、Gel Red 染色液 (Biotium, 41002) で 30 分間染色し、紫外線照射下に確認した。

陽性対照 DNA 試料の 3 倍希釈系列データを絶対定量解析に供し、検量線の傾きを算出する。この傾きを次式に当てはめて PCR 効率を少数第一位まで求めた。

$$\text{PCR 効率(\%)} = \left\{ \left( 10^{\frac{-1}{\text{傾き}}} \right) - 1 \right\} \times 100$$

リアルタイム PCR の反応条件間の比較は、各プライマーにおける PCR 効率と PCR 検出感度( $\Delta$ Cq)を算出し、Microsoft Excel 2016 を用いて一元配置分散分析を実施した。有意差が出た場合に Stat Preclinica (株式会社タクミインフォメーションテクノロジー, 日本)を用いて Fisher の制約付有意差検定を実施した。M13 配列付加の PCR 効率および PCR 検出感度への影響は Microsoft Excel 2016 を用いて *t* 検定を実施した。

## 2-2. PCR 産物のシーケンス解析



FastGene Gel/PCR Extraction Kit (FG-91202, NIPPON Genetics, 日本) を用いてPCR産物を精製した後、M13プライマーを用いたDNAシーケンスをEurofins Genomics(東京, 日本)にて実施した。DNAシーケンス結果はComprehensive Antibiotic Resistance Database (<https://card.mcmaster.ca/home>) を参照して GENETYX (株式会社 エス・ディー・シー, 日本) により解析した。

### 2-3. カルバペネム耐性緑膿菌株の入手と各種抗菌薬の MIC

三学会合同抗菌薬感受性サーベイランス事業において、2006年から2015年に収集された臨床分離緑膿菌 1716 株から CLSI の定めたメロペネムの耐性ブレイクポイントを参照し、カルバペネム耐性緑膿菌 275 株を購入した。対象年度の全臨床分離緑膿菌に対する抗菌薬の MIC は、三学会合同抗菌薬感受性サーベイランス事業から提供頂いた。カルバペネム耐性緑膿菌の由来（各感染症領域、収集地域）に関する情報も併せて入手したが、いずれも研究前に既に匿名化された情報であり、倫理審査委員会に諮る必要はなかった。

### 2-4. カルバペネム耐性緑膿菌からのメタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有株の検出

カルバペネム耐性緑膿菌 275 株から DNA を抽出し、40 ng/ $\mu$ L に調製した。2-1 で構築したメタロ型カルバペネマーゼ遺伝子検出のためのリアルタイム PCR 検出系（条件③）と M13 付加 general primer を用いて 100 ng/reaction の DNA 試料から IMP 型、VIM 型、および NDM 型メタロ型カルバペネマーゼ遺伝子を検出した。PCR 陽性検体は、2-2 の手法により DNA シーケンス解析を実施し、カルバペネマーゼ遺伝子のサブタイプを予測した。そのサブタイプ予測に基づき全長配列をカバーするプライマーセット選択し PCR 陽性 DNA サンプルのリアルタイム PCR を再度実施した。得られた PCR 産物を用いて、定法によりカルバペネマーゼ遺伝子のサブタイプ

を決定した。

#### 2-5. メタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有緑膿菌の地域差検討

カルバペネム耐性緑膿菌におけるメタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有率の地域性を検討することを目的に、日本を任意の6つの地域に分割し、各地域におけるカルバペネム耐性緑膿菌総数に対するメタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有率についてカイ二乗法により検証した。

#### 2-6. 各感染症領域におけるメタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有率の比較

緑膿菌におけるメタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有率の領域性を検討することを目的に、呼吸器感染症、複雑性尿路感染症および手術部位感染の3領域におけるメタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有率について緑膿菌総数およびカルバペネム耐性緑膿菌総数それぞれで補正しカイ二乗法により検証した。

### 3. 結果

#### 3-1. メタロ型カルバペネマーゼ遺伝子検出のためのリアルタイム PCR 系の構築

カルバペネマーゼ遺伝子を検出する PCR 法はいくつかの文献報告がある。本研究では多検体から IMP 型、VIM 型、および NDM 型カルバペネマーゼ遺伝子を効率的に検出および同定するため、PCR に加えてゲルからの PCR 産物の切り出しといった手間を要するゲル電気泳動による検出よりも、非特異的増幅の少ない条件下でのリアルタイム PCR による PCR 産物の検出からシーケンス解析という効率的な作業手順を想定していた。しかしながら、同一試験内でこれら 3 遺伝子をリアルタイム PCR により検出および解析した報告は、調べた範囲においてなかった。そこで、Mendes らの方法、国立感染症研究所の病原体検出マニュアル、および、Notake らの方法を参考にリアルタイム PCR 系の構築を試みた。Table 1 の通り、Mendes らの方法はマルチプレックスリアルタイム PCR に IMPgen プライマーおよび VIMgen プライマーを用いて、IMP 型および VIM 型カルバペネマーゼ遺伝子等を検出していた。国立感染症研究所の病原体検出マニュアルは Mendes らのプライマーを参照し PCR 条件を変更していた。Notake らの方法は、M13 配列を付加したサブタイプを区別可能な各種 IMP 用全長プライマーを用いて PCR とゲル電気泳動を実施し、各サブタイプの IMP 型カルバペネマーゼ遺伝子を検出・同定していた。

本試験においては、前述の通り、多検体から IMP 型、VIM 型、および NDM 型カルバペネマーゼ遺伝子を効率的に検出および同定するために、高い PCR 効率のみならず非特異的増幅が起こりにくい条件での実施が望まれる。そのような条件を探索する目的で、リアルタイム PCR 条件とプライマーの組み合わせを検討した。すなわち、各条件でのリアルタイム PCR の PCR 効率および PCR 検出感度を比較検討した。また、プライマーに M13 配列を付加することで非特異的増幅の軽減が期待され(25)、更にシーケンスにおいても目的遺伝子に関係なく M13 配列部分をシーケンスプラ

イマーとして汎用できるという利点もある。そこで、本試験においては各種サブタイプの共通配列を有する Mendes らの IMPgen プライマーと VIMgen プライマーおよび自作 NDMgen プライマーを対照プライマーとし、これら general primer に M13 配列を付加したプライマーを自作し、その性能を比較することで、M13 配列付加による PCR 効率、PCR 検出感度ならびに非特異的増幅への影響を検討した。各条件での検討結果を Figure 3-11 に示し、PCR 効率、PCR 検出感度および非特異的増幅の結果を Table 3-5 にまとめた。

PCR 効率は Mendes らの方法が最も低く  $81.4 \pm 8.0\%$  であった。病原体検出マニュアルや Notake らの方法は Mendes らの方法に比べて有意に高く、それぞれ  $94.1 \pm 7.6\%$  と  $97.9 \pm 10.2\%$  であった。M13 配列付加による PCR 効率の改善は認められなかった (general primer;  $91.8 \pm 13.3\%$  v.s. general primer M13;  $90.5 \pm 8.68\%$ , n.s.)。

PCR 検出感度に関しては、Notake らの方法において M13 配列付加により 0.54 サイクル分検出感度が増加したが、いずれの方法間でも有意な差は認められなかった。

非特異的増幅に関しては、Mendes らの方法では M13 配列付加にかかわらず全てのプライマーで非特異的増幅が認められ、特に NDMgen プライマー使用時に VIM 株において検量線範囲内のサイクル数で非特異的増幅が認められた。Mendes らの方法に比べて病原体検出マニュアルの方法では、非特異的増幅の発生頻度が大きく改善し、NDMgen プライマーと NDMgen M13 プライマー以外では非特異的増幅は認められなかった。さらに、Notake らの方法では、M13 配列付加プライマーとの組み合わせにより、3 遺伝子すべてにおいて非特異的増幅が認められなかった。

以上の結果をまとめる。M13 配列を使用しても PCR 効率と検出感度に常法との有意な差はなかったが、Notake らの PCR 条件では、自作した M13 配列付加プライマーにより非特異的増幅なく目的遺伝子の増幅ができた。

また、M13 配列を使用することで、シーケンスの作業効率が向上するため、シー

クエンス効率を考慮し、M13 配列付加プライマーを用いて、Notake らの PCR 条件でメタロ型カルバペネマーゼを検出することとした。

### 3-2.メタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有カルバペネム耐性緑膿菌株に対するメロペネムおよびイミペネムの MIC

メタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有がカルバペネム耐性にどのように寄与するかを検討するために三学会合同抗菌薬感受性サーベイランス事業において 2006 年から 2015 年に収集された臨床分離緑膿菌 1716 株のカルバペネム(メロペネム)の MIC 分布と各 MIC におけるメタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有カルバペネム耐性緑膿菌株の保有率の関係性につき解析を行った (Figure 12)。その結果、メロペネムの MIC 分布は、0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  および 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  にピークを持つ二峰性を示した。なお、8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  は CLSI(27)の耐性ブレイクポイントに一致した。1716 株の臨床分離緑膿菌の中、16%に相当する 275 株がメロペネム耐性を示した。さらに、その中の 8.4%に当たる 23 株がメタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有株であった。メロペネムの MIC 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を超える各 MIC 分画に含まれる菌株数は MIC の増加に伴い漸減する一方で、各 MIC 分画に含まれるメタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有比率は増加した。すなわち、メロペネムの MIC と各 MIC に該当する株数は逆相関し、メロペネムの MIC が 8, 16, 32, 64, 128, > 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$  と増加するとともに、当該株数は 128, 84, 30, 9, 9, 15 株と減少した。一方で、メタロ型カルバペネマーゼ保有株数は、各 MIC において 0, 1, 1, 2, 5, 14 株と増加し、MIC が 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を超える株においては 93%という高い割合でメタロ型カルバペネマーゼを保有していた。イミペネムの MIC 分布に基づいて同様の解析した場合も、メロペネムでの解析と類似の結果が観察された (Figure 13)。

### 3-3. カルバペネム耐性緑膿菌に対する抗菌薬の感受性

メタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有株に対する抗菌薬の感受性特性を分析することを目的に、メタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有株と非保有株に対する各種抗菌薬の MIC を比較した (Table 6)。その結果、ミノサイクリンを除く全ての抗菌薬のメタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有株に対する MIC<sub>50</sub> は、非保有株のそれよりも 1 管以上高い値を示した。それと同様に、ピペラシリン、アズトレオナムとミノサイクリンを除く全抗菌薬の MIC<sub>90</sub> も非保有株に比べて高値を示した。加えて、メタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有株は、ピペラシリン、アズトレオナムとアミカシンを除く全ての抗菌薬に対して全株が耐性を示した。

一方、非保有株に対する評価抗菌薬の MIC<sub>50</sub> 値は、メロペネム、イミペネム、レボフロキサシンを除くすべての抗菌薬において感性あるいは中間耐性域にあった。MIC<sub>90</sub> 値は、アミカシンを除いてすべて耐性域にあった。非保有株におけるカルバペネム (メロペネムとイミペネム) 感受性は、僅か 0~3.2% であり、ペニシリン系抗菌薬のピペラシリン、モノバクタム系のアズトレオナム、フルオロキノロン系のシプロフロキサシンとレボフロキサシンに対する抗菌薬の感受性率は 22.3~42.1% に止まり、セファロスポリン系のセフトジジム、セフェピムの感受性は 54.0~61.9% に及び、アミドグリコシド系のアミカシンに至っては 96.0% と高い感受性を示した。

### 3-4. カルバペネム耐性緑膿菌の保有するメタロ型カルバペネマーゼ遺伝子の分類

カルバペネム耐性緑膿菌が保有するメタロ型カルバペネマーゼの種類を同定することを目的に、3-1 で構築したリアルタイム PCR 系にて増幅した PCR 産物の塩基配列を解析した (Table 7)。23 株のメタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有株のうち、21 株は IMP 型、2 株は VIM 型であった。シークエンス解析によりバリエーション型別を実施したところ、IMP 型は、IMP-1 が 16 株、IMP-7 が 2 株、IMP-10、IMP-34、IMP-41 が各 1 株であった。また、VIM 型は、2 株ともに VIM-2 であった。

### 3-5. メタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有緑膿菌の地域差検討

日本を北海道・東北、関東、中部、関西、中国・四国、九州・沖縄の任意の6地域に分けて、カルバペネム耐性緑膿菌総数に対するメタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有率の地域差を検討した (Table 8)。各地域におけるメタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有率は、平均値 9.2%であり、関西が最小値の 5.6%を、北海道・東北地域が最大値の 15.0%を示した。各地域のメタロ型カルバペネマーゼ保有率に統計的な有意差は認められなかった。

### 3-6. 各感染症領域におけるメタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有率の比較

緑膿菌におけるメタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有率の領域性を検討することを目的に、呼吸器感染症、複雑性尿路感染症、手術部位感染症の3感染症領域におけるメタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有率について検証した (Table 9,10)。緑膿菌総数およびカルバペネム耐性緑膿菌総数に対するメタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有率は、手術部位感染症領域が最小値の 0%、複雑性尿路感染症はそれぞれ最大値の 3.8%と 28.6%を示した。複雑性尿路感染症の緑膿菌総数およびカルバペネム耐性緑膿菌総数に対するメタロ型カルバペネマーゼ保有率は、いずれも他領域 (呼吸器感染症+手術部位感染症領域) に比べて有意に高かった。

## 4. 考察

### 4-1. メタロ型カルバペネマーゼ遺伝子検出のためのリアルタイム PCR 系の構築について

原核生物のゲノムサイズは 500~9500 kbp と 20 倍の幅がある(27)。特に緑膿菌のゲノムサイズは 5500~7000 kbp であり、環状ゲノムと種々のプラスミドで形成されている(28)。また、肺炎桿菌と大腸菌のゲノムサイズは、それぞれ 5500 kbp、4500~5500 kbp と報告されている(29, 30)。つまり、PCR にて検出する標的遺伝子の DNA 濃度はテンプレートとする DNA 試料の濃度を一律に揃えて PCR を実施したとしても、原核生物全体では 20 倍、緑膿菌の株間では 1.4 倍程度の幅が存在する。本研究では、ゲノム DNA 試料 (100 ng/reaction) の 1/81 量のテンプレート量でも検出可能な系となっており、ゲノムサイズの異なる株間、引いては種間の差を十分に補える検出力を備えた条件にてリアルタイム PCR を実施できていると考えられる。本試験系はこれらグラム陰性桿菌の保有するメタロ型カルバペネマーゼ遺伝子の検出にも適応可能と考えられる。

Table 4 に示す通り、M13 配列付加により、非特異的増幅の軽減が認められた。特に NDMgen プライマー使用時は、PCR 条件に依存せず検量線範囲内のサイクル数に非特異的増幅が認められたが、M13 配列付加により軽減が認められた (Figure 11, 18)。宿主にコードされない塩基配列を 5' 末端に付加したプライマーを用いることで評価系のパフォーマンスが向上することは、これまでに多くの論文に報告されており、本試験においても矛盾しない結果であった(25)。

### 4-2. カルバペネム耐性緑膿菌のメタロ型カルバペネマーゼ遺伝子、各種抗菌薬に対する薬剤感受性およびその他の特徴について

本研究により、IMP 型メタロ型カルバペネマーゼが、2006 年~2015 年に本邦にお



いて収集されたカルバペネム耐性緑膿菌の主たるメタロ型カルバペネマーゼであることが判明した。そのサブタイプに関しては、IMP-1 が最多であり、IMP 型保有株 23 株中 16 株であった。それに続き、IMP-7 が 2 株、IMP-10、IMP-34 そして IMP-41 がそれぞれ 1 株であった。VIM 型は VIM-2 保有株が 2 株であった。これは、これまでの報告と同様の傾向であった(18 -21)。

メタロ型カルバペネマーゼ保有株に対するカルバペネムの MIC 分布に関する解析からメタロ型カルバペネマーゼ遺伝子を保有する株は、カルバペネムに対して高度耐性であることが確認された (Table 7, Figure 12, 13)。IMP-1 のカルバペネマーゼ活性は高く(31 - 33)、そのようなカルバペネマーゼ活性の高い Class B  $\beta$ -ラクタマーゼの産生が、カルバペネム高度耐性化に大きく貢献していると考えられた。

本試験ではメタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有株のメタロ型カルバペネマーゼの酵素活性測定を実施してはいないが、メタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有株の多くがメタロ型カルバペネマーゼを産生し、その産生がカルバペネム耐性に寄与していると考えられる。事実、メタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有株 23 株のメロペネムとセフェピムの MIC は、すべての株でそれぞれ  $\geq 128 \mu\text{g/mL}$  と  $\geq 64 \mu\text{g/mL}$  であり、カルバペネマーゼの発現を予期する結果となっていた。ただし、メタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有株が必ずカルバペネマーゼを産生しているわけではないため、厳密な意味では、一部の株においてカルバペネマーゼを産生していない可能性を排除できない。

メタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有カルバペネム耐性緑膿菌の問題は、 $\beta$ -ラクタム薬に対して高度耐性を示すだけでなく、フロオロキノロン系抗菌薬、アミノグリコシド系抗菌薬など  $\beta$ -ラクタム薬以外の主たる感染症治療薬に高度耐性を示すことにある。これら抗菌薬への耐性機序は、*bla*<sub>IMP-1</sub> インテグロンによる酵素の獲得、*gyrA* や *parC* 遺伝子の変異による耐性化、AAC(6')-Iae や AAC(6')-Iag といったアミノグ

リコシドアセチルトランスフェラーゼの産生によると考えられる(34-36)。本研究で見いだされた株がどのような機序により多剤耐性を獲得したかは今後の研究に譲りたい。

1992年から2002年間のメタロ型カルバペネマーゼ産生緑膿菌の分離率は0.4～2.0%と報告されている(37-40)。本研究では、2006年から2015年に収集された1716株の臨床分離緑膿菌の中、23株がメタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有株であり、その分離率はおおよそ1.3%であった。この結果から、メタロ型カルバペネマーゼ保有株の存在頻度は、過去30年大きな変化はなく極端な増加はないと考えられた。このようにその分離率を低頻度に抑え込めているのは、本邦の臨床における抗菌薬の適正使用の努力の賜物であるかもしれない。

近年、メタロ型カルバペネマーゼ遺伝子を保有するST235やST357という2種のクローンが日本中に伝播していることが報告されている(18, 40)。本試験においてはST型の判定は実施しなかったが、本試験において検出されたメタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有株も、当該クローンそのもの、あるいは近縁である可能性が考えられた。

メタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有株分離率は、複雑性尿路感染症領域で有意に高値を示した。この複雑性尿路感染症は、尿路にガンなどの基礎疾患を有し、解剖学的構造あるいは機能の異常を背景に尿流障害がある状態や感染防御機構が破綻した患者に生じる尿路感染症である。抗菌薬の治療期間が長く耐性菌も多く発生するため治療困難な場合も多いと言われており、その事実と矛盾しない結果であった(41,42)。また、メタロ型カルバペネマーゼ産生緑膿菌が尿路感染症で多いとの報告とも一致した(18)。

## 5. 総括

本研究では、臨床分離緑膿菌の 1.3%がメタロ型カルバペネマーゼ産生緑膿菌であり、91.3%が IMP 型であることを明らかにし、本邦における主たるメタロ型カルバペネマーゼは、依然 IMP 型が主流であり、世界の型別とは異なることが確認された。すなわち、世界的に流行しているメタロ型カルバペネマーゼ産生緑膿菌の本邦への流入が、少なくとも顕著には起きていないことを確認した。

本研究を通して、主たるメタロ型カルバペネマーゼである IMP 型、VIM 型、NDM 型遺伝子検出のためのリアルタイム PCR 系を構築した。本邦にて 2006 年から 2015 年に収集された 1716 株の臨床分離緑膿菌からカルバペネム（メロペネム）耐性緑膿菌 275 株を入手し、そのうち 23 株がメタロ型カルバペネマーゼ遺伝子を保有することを明らかにした。メロペネムの MIC 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を超える株に関して、各 MIC 分画に含まれる菌株数は MIC の増加に伴い漸減する一方で、各 MIC 分画に含まれるメタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有比率は増加することを明らかにし、メタロ型カルバペネマーゼ遺伝子がカルバペネム耐性に大きく寄与している可能性を示した。カルバペネマーゼ遺伝子の種類に関しては、IMP 型と VIM 型が検出され、IMP-1 が最多であり、世界の型別とは異なることを明らかにした。メタロ型カルバペネマーゼ遺伝子株の抗菌薬の感受性の特徴は、非保有株と異なり、カルバペネムのみならず他の抗緑膿菌活性を有する抗菌薬に対しても高度耐性を示した。これらメタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有株の分離率は凡そ 1.3% (23/1716 株) であり、これまでの報告と大差はなく過去 30 年の年間分離率 (0.4~3.1%) と大きな変化はないと推測された。さらに本研究ではカルバペネム耐性緑膿菌におけるメタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有率の地域差は認められなかった。複雑性尿路感染症におけるメタロ型カルバペネマーゼ保有株分離率が、他領域（呼吸器感染症および手術部位感染症）に比べて有意に高かった。

## 6. 今後の課題

本研究で構築したリアルタイム PCR 系に使用した IMPgen M13 プライマーならびに VIMgen M13 プライマーは、ほぼすべての IMP バリエントと VIM バリエントをカバーできるが、プライマー配列の都合上、必ずしもすべての IMP と VIM のバリエントを検出できるわけではない。すなわち、blaIMP-27, 35, 61, 64 および blaVIM-16, 27, 49 は当該プライマーセットでは検出できない可能性がある。今後の試験では、それらサブタイプも検出可能なプライマーセットの準備が望まれる。本試験では、IMP 型、VIM 型、NDM 型の検出を行ったが、SPM 型など他のメタロ型カルバペネマーゼ遺伝子検出を実施しなかった。ブラジルなど他国においては SPM-1 産生緑膿菌のエンデミッククローンの存在(43)も報告されており、日本国内への当該クローンの流入の可能性もゼロではない。また、インド、ギリシャ、ロシアなどのカルバペネマーゼ産生緑膿菌分離率が非常に高い国からのカルバペネマーゼ産生緑膿菌の流入も危惧される。今後の試験では、より多様な種類のメタロ型カルバペネマーゼ遺伝子の検出系を用意し、継続的にメタロ型カルバペネマーゼ産生緑膿菌感染症のサーベイランスの実施が重要であると考えらる。

## 7. 謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えてくださり、多大なる御教授を賜りました北里大学大学院 医療系研究科の北里英郎教授に謹んで深謝申し上げます。また、感染症領域の知識の少なかった私に多くの知識をご教授くださった北里大学 大村智記念研究所感染制御研究センター及び感染創薬学講座の花木秀明教授に謹んで深謝申し上げます。

貴重なご助言と御指導を賜りました、北里大学大村智記念研究所感染制御研究センターの中江太治顧問、松井秀仁上級研究員に厚く御礼申し上げます。また、研究活動を支え励まして下さいました、感染制御研究センターの津田愛美講座研究員、伊藤環特任助教、日高淳講座研究員、竹本浩司講座研究員、藤本孝一講座研究員、鈴木由美子助手、遠藤晴美研究員、山口幸恵研究員、財部祐季子研究員、竹内千恵子研究員に感謝申し上げます。

## 8. 引用文献

1. O'Neill J.: Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. 2016;11-12
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 (2016-2020), 2016;11-12
3. WHO: Global Priority List of Antibiotic-resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics. 2017;1-7
4. Meletis G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Ther Adv Infect Dis*. 2016;3(1):15-21.
5. Tamma PD, Wang R, Lewis S, Opene BNA, Simner PJ. Is there a carbapenem MIC cutoff value that distinguishes carbapenemase-producing and noncarbapenemase-producing carbapenem non-susceptible *Pseudomonas* and *acinetobacter* isolates? *Infect Control Hosp Epidemiol* 2017;38(11):1378e9.
6. Bush K. Past and present perspectives on  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2018;62:e01076-18.
7. Bush K, Bradford AP. Interplay between  $\beta$ -lactamases and new  $\beta$ -lactamase inhibitors. *Nat Rev Microbiol* 2019;17(5):295e306.
8. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35(1):147e51.
9. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, et al. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43(7):1584e90.
10. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 2005;18(2):306e25.
11. Meletis G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Ther Adv Infect Dis* 2016;3(1):15e21.
12. Hong DJ, Bae IK, Jang IH, Jeong SH, Kang HK, Lee K. Epidemiology and characteristics of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Chemother* 2015;47(2):81e97.
13. Halaby T, Reuland AE, Al Naiemi N, et al. A case of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase 1 (NDM-1)-producing *Klebsiella pneumoniae* with putative secondary transmission from the Balkan region in the Netherlands. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(5):2790-2791.
14. Jovicic B, Lepsanovic Z, Suljagic V, Rackov G, Begovic J, Topisirovic L, Kojic M. Emergence of NDM-1 metallo- $\beta$ -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical

- isolates from Serbia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(8):3929-31.
15. Wang MG, Liu ZY, Liao XP, Sun RY, Li RB, Liu Y, et al. Retrospective Data Insight into the Global Distribution of Carbapenemase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics (Basel).* 2021;10(5):548.
  16. Kazmierczak KM, de Jonge BLM, Stone GG, Sahm DF. Longitudinal analysis of ESBL and carbapenemase carriage among *Enterobacterales* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected in Europe as part of the International Network for Optimal Resistance Monitoring (INFORM) global surveillance programme, 2013-17. *J Antimicrob Chemother.* 2020;75(5):1165-1173.
  17. Walters MS, Grass JE, Bulens SN, Hancock EB, Phipps EC, Muleta D, et al. Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* at US Emerging Infections Program Sites, 2015. *Emerg Infect Dis.* 2019;25(7):1281-1288.
  18. Mano Y, Saga T, Ishii Y, Yoshizumi A, Bonomo AR, Yamaguchi K, et al. Molecular analysis of the integrons of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected by nationwide surveillance programs across Japan. *BMC Microbiol* 2015;21:15e41.
  19. Yamaguchi K, Ishii Y, Tateda K, Iwata M, Watanabe N, Shinagawa M, et al. Nationwide surveillance of parenteral antibiotics containing meropenem activities against clinically isolated strains in 2012. *Jpn J Antibiot* 2014;67(2):73e107.
  20. Kouda S, Ohara M, Onodera M, Fujiue Y, Sasaki M, Kohara T, et al. Increased prevalence and clonal dissemination of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with the blaIMP-1 gene cassette in Hiroshima. *J Antimicrob Chemother* 2009;64(1):46e51.
  21. Shimizu W, Kayama S, Kouda S, Ogura Y, Kobayashi K, Shigemoto N, et al. Persistence and epidemic propagation of a *Pseudomonas aeruginosa* sequence type 235 clone harboring an IS26 composite transposon carrying the blaIMP-1 integron in Hiroshima, Japan, 2005 to 2012. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59(5):2678e87.
  22. Mendes RE, Kiyota KA, Monteiro J, Castanheira M, Andrade SS, Gales AC, Pignatari AC, Tufik S. Rapid detection and identification of metallo- $\beta$ -lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. *J Clin Microbiol.* 2007;45(2):544-7.
  23. 国立感染症研究所：病原体検出マニュアル 薬剤耐性菌，2016.12月改訂版 Ver1.1, 32-35
  24. Notake S, Matsuda M, Tamai K, Yanagisawa H, Hiramatsu K, Kikuchi K. Detection of IMP metallo- $\beta$ -lactamase in carbapenem-nonsusceptible *Enterobacteriaceae* and non-glucose-fermenting Gram-negative rods by

- immunoassay. J Clin Microbiol. 2013;51(6):1762-8.
25. Vandebussche F, Mathijs E, Lefebvre D, De Clercq K, Van Borm S. A Tale of Tails: Dissecting the Enhancing Effect of Tailed Primers in Real-Time PCR. PLoS ONE 2016;11(10): e0164463.
  26. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 30th ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute, USA, 2020.
  27. Islas, S., Becerra, A., Luisi, P.L. et al. Comparative Genomics and the Gene Complement of a Minimal Cell. Orig Life Evol Biosph 2004;34, 243–256.
  28. Klockgether J, Cramer N, Wiehlmann L, Davenport CF and Tümmler B *Pseudomonas aeruginosa* genomic structure and diversity. Front. Microbio. 2011;2:150.
  29. Rafiq Z, Sam N, Vaidyanathan R. Whole genome sequence of *Klebsiella pneumoniae* U25, a hypermucoviscous, multidrug resistant, biofilm producing isolate from India. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2016;111(2):144-146.
  30. Rode CK, Melkerson-Watson LJ, Johnson AT, Bloch CA. Type-specific contributions to chromosome size differences in *Escherichia coli*. Infect Immun. 1999;67(1):230-236.
  31. Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poirel L, Woodford N, Miriagou V. Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. Clin Microbiol Infect 2012;18(5):432e8.
  32. Bou G, Vila J, Seral C, Castillo FJ. Detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in various scenarios and health settings. Enferm Infecc Microbiol Clín 2014;32(Suppl 4):24e32.
  33. Queenan AM, Shang W, Flamm R, Bush K. Hydrolysis and inhibition profiles of beta-lactamases from molecular classes A to D with doripenem, imipenem, and meropenem. Antimicrob Agents Chemother 2010;54(1):565e9.
  34. Sekiguchi J, Asagi T, Miyoshi AT, Fujino T, Kobayashi I, Morita K, et al. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain that caused an outbreak in a neurosurgery ward and its aac(6')-Iae gene cassette encoding a novel aminoglycoside acetyltransferase. Antimicrob Agents Chemother 2005;49(9): 3734e42.
  35. Kitao T, Tada T, Tanaka M, Narahara K, Shimojima M, Shimada K, et al. Emergence of a novel multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain producing IMP-type metallo- $\beta$ -lactamases and AAC(6')-Iae in Japan. Int J Antimicrob Agents 2012;39(6):518e21.
  36. Kobayashi K, Hayashi I, Kouda S, Kato F, Fujiwara T, Kayama S, et al. Identification and characterization of a novel aac(6')-Iag associated with the



- blaIMP-1-integron in a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. PloS One 2013;8(8):e70557.
37. Senda K, Arakawa Y, Nakashima K, Ito H, Ichiyama S, Shimokata K, et al. Multifocal outbreaks of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad-spectrum beta-lactams, including carbapenems. Antimicrob Agents Chemother 1996;40(2):349e53.
  38. Kurokawa H, Yagi T, Shibata N, Shibayama K, Arakawa Y. Worldwide proliferation of carbapenem-resistant gram-negative bacteria. Lancet 1999;354:955e1999.
  39. Yamasaki K, Komatsu M, Yamashita T, Shimakawa K, Ura T, Nishio H, et al. Production of CTX-M-3 extended-spectrum beta-lactamase and IMP-1 metallo beta-lactamase by five Gram-negative bacilli: survey of clinical isolates from seven laboratories collected in 1998 and 2000, in the Kinki region of Japan. J Antimicrob Chemother 2003;51(3):631e8.
  40. Kimura S, Alba J, Shiroto K, Sano R, Niki Y, Maesaki S, et al. Clonal diversity of metallo-beta-lactamase-possessing *Pseudomonas aeruginosa* in geographically diverse regions of Japan. J Clin Microbiol 2005;43(1):458e61.
  41. 日本化学療法学会. JAID/JSC 感染症治療ガイドライン 2015—尿路感染症・男性性器感染症. 日本化学療法学会雑誌 2016;64(1):1-30
  42. 日本緩和医療学会. がん患者の泌尿器症状の緩和に関するガイドライン (2016年版) II章 背景知識 6.尿路感染症. 2016;50-57
  43. M Silva Fernanda, Carmo Mirian S, Silbert Suzane, Gales Ana C. SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa*: analysis of the ancestor relationship using multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and automated ribotyping. Microb Drug Resist 2011;17(2):215e20.

## 9. 業績目録

### 【原著論文】

1. Nakayama R , Inoue-Tsuda M , Matsui H , Ito T , Hanaki H : Classification of the metallo  $\beta$ -lactamase subtype produced by the carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Japan. J Infect Chemother , "in·press"
2. Goto T , Nakayama R , Yamanaka M , Takata M , Takazawa T , Watanabe K , Maruta K , Nagata R , Nagamine J , Tsuchida A , Kato H : Effects of DSP-8658, a novel selective peroxisome proliferator-activated receptors  $\alpha/\gamma$  modulator, on adipogenesis and glucose metabolism in diabetic obese mice. Exp Clin Endocrinol Diabetes , 2015;123(8):492~499.
3. Nariai T , Fujita K , Kawane K , Mori M , Nakayama R , Matsuda K , Katayama S , Fukuda N , Hori S , Iwata M , Hasegawa F , Suzuki K , Kato H : DSR-71167, a novel mineralocorticoid receptor antagonist with carbonic anhydrase inhibitory activity, separates urinary sodium excretion and serum potassium elevation in rats. J Pharmacol Exp Ther , 2015;354(1):2~9.
4. Shiomi Y , Yamauchi T , Iwabu M , Okada-Iwabu M , Nakayama R , Orikawa Y , Yoshioka Y , Tanaka K , Ueki K , Kadowaki T : A Novel Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR) $\alpha$  Agonist and PPAR $\gamma$  Antagonist, Z-551, Ameliorates High-fat Diet-induced Obesity and Metabolic Disorders in Mice. J Biol Chem , 2015;290(23):14567~14581.
5. Iwabu M , Yamauchi T , Okada-Iwabu M , Sato K , Nakagawa T , Funata M , Yamaguchi M , Namiki S , Nakayama R , Tabata M , Ogata H , Kubota N , Takamoto I , Hayashi K Y , Yamauchi N , Waki H , Fukayama M , Nishino I , Tokuyama K , Ueki K , Oike Y , Ishii S , Hirose K , Shimizu T , Touhara K , Kadowaki T : Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1 $\alpha$  and mitochondria by Ca<sup>2+</sup> and AMPK/SIRT1. Nature 2010;29:464(7293):1313~1319.

### 【総説】

1. 中山 亮、山内敏正、門脇 孝 : 治療学、44(11):1302~1307 2010.

10. 図表

## DEATHS ATTRIBUTABLE TO AMR EVERY YEAR

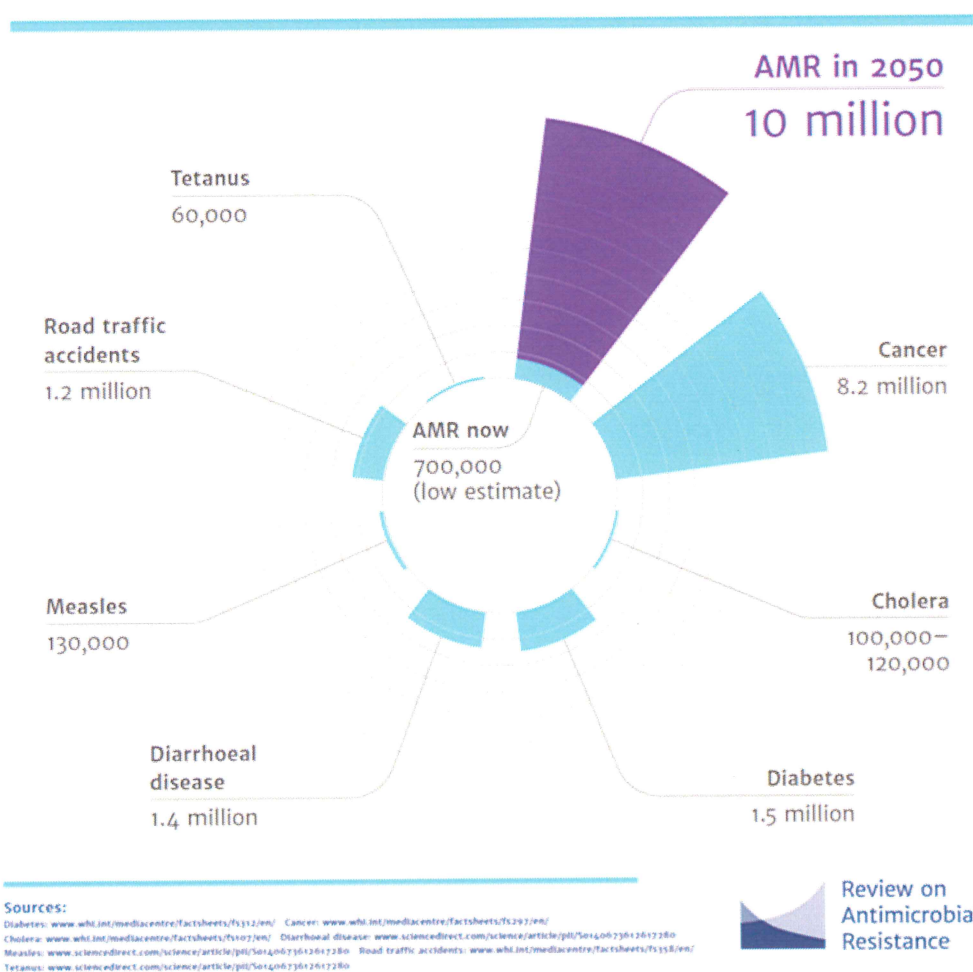


Figure 1 薬剤耐性菌感染症による死者数

O'Neill J.: Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. 2016;11-12より引用

## WHO PRIORITY PATHOGENS LIST FOR R&D OF NEW ANTIBIOTICS

### Priority 1: CRITICAL<sup>#</sup>

*Acinetobacter baumannii*, carbapenem-resistant  
*Pseudomonas aeruginosa*, carbapenem-resistant  
*Enterobacteriaceae*\*, carbapenem-resistant, 3<sup>rd</sup> generation cephalosporin-resistant

### Priority 2: HIGH

*Enterococcus faecium*, vancomycin-resistant  
*Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant, vancomycin intermediate and resistant  
*Helicobacter pylori*, clarithromycin-resistant  
*Campylobacter*, fluoroquinolone-resistant  
*Salmonella spp.*, fluoroquinolone-resistant  
*Neisseria gonorrhoeae*, 3<sup>rd</sup> generation cephalosporin-resistant, fluoroquinolone-resistant

### Priority 3: MEDIUM

*Streptococcus pneumoniae*, penicillin-non-susceptible  
*Haemophilus influenzae*, ampicillin-resistant  
*Shigella spp.*, fluoroquinolone-resistant

<sup>#</sup> *Mycobacteria* (including *Mycobacterium tuberculosis*, the cause of human tuberculosis), was not subjected to review for inclusion in this prioritization exercise as it is already a globally established priority for which innovative new treatments are urgently needed.

\* *Enterobacteriaceae* include: *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Proteus spp.*, and *Providencia spp.*, *Morganella spp.*

Figure 2 抗菌薬開発が必要な12種類の薬剤耐性菌リスト  
WHO: Global Priority List of Antibiotic-resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics. 2017;1-7より引用

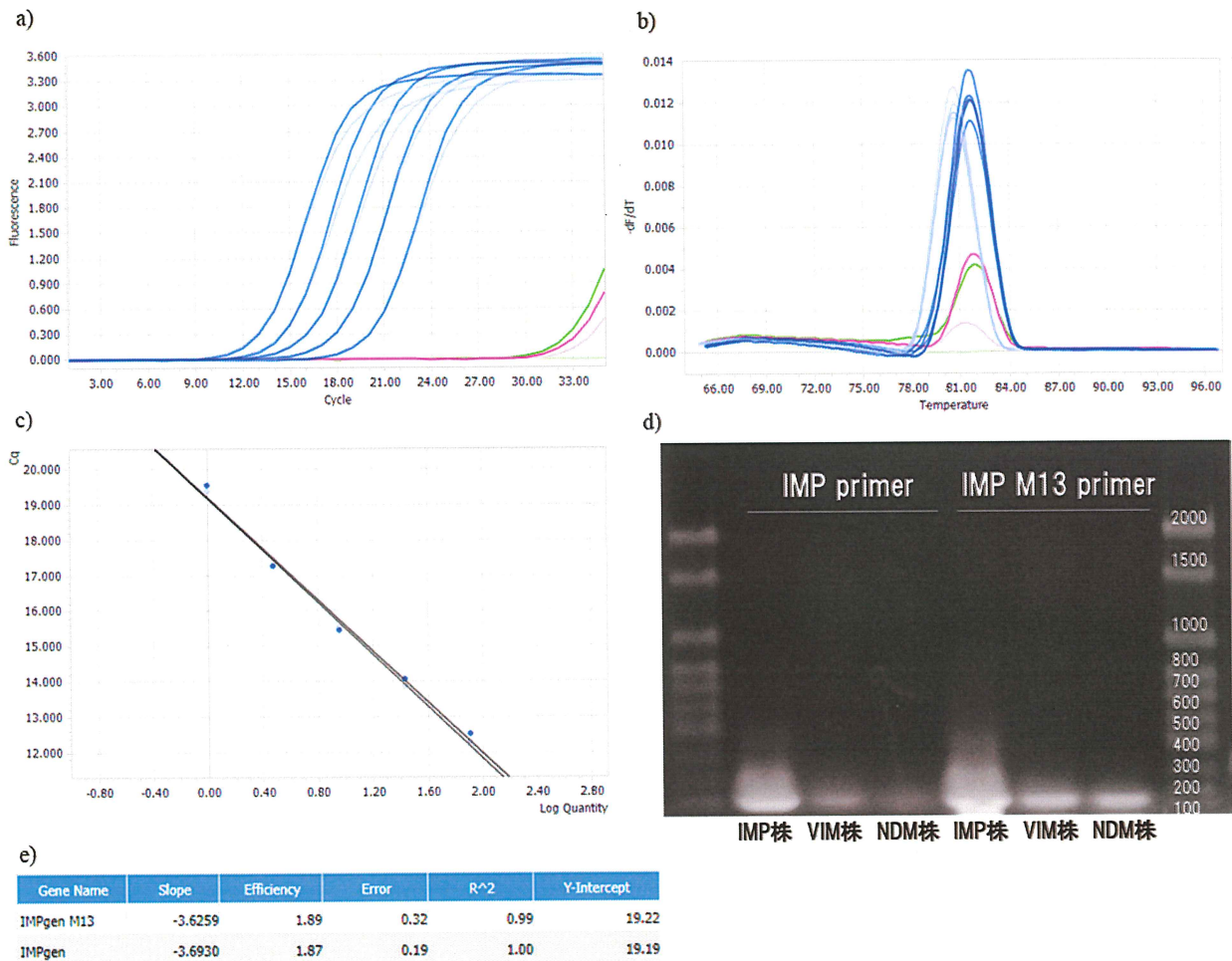


Figure 3 条件①でのリアルタイムPCRによるIMP型遺伝子の検出結果

水色 — : IMP株 + IMPgen primer, 桃色 — : VIM株 + IMPgen primer, 薄緑色 — : NDM株 + IMPgen primer,  
 青色 — : IMP株 + IMPgen M13 primer, 紅色 — : VIM株 + IMPgen M13 primer, 緑色 — : NDM株 + IMPgen M13 primer

a)増幅曲線 b)融解曲線 c)検量線 d)リアルタイムPCR産物の電気泳動像 e)検量線の解析結果

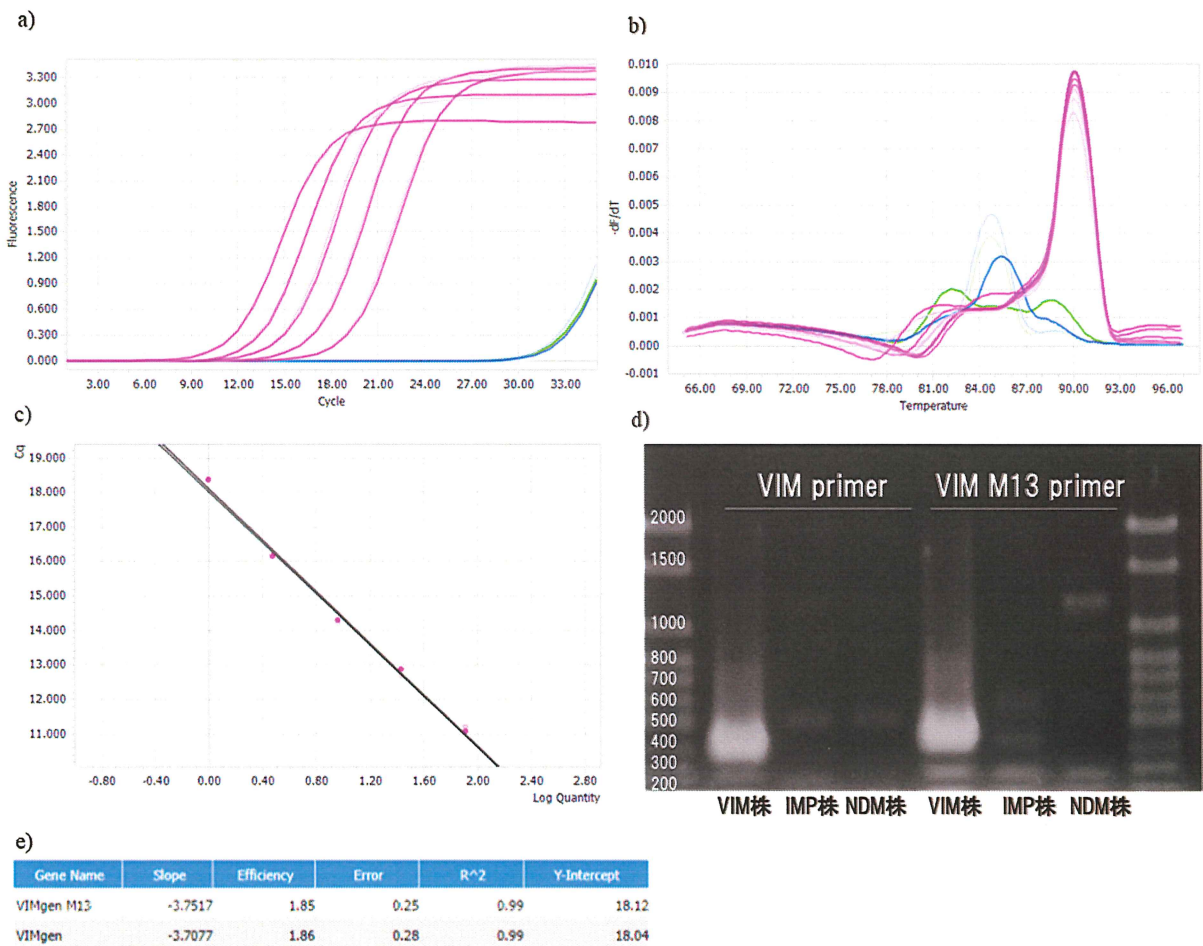


Figure 4 条件①でのリアルタイムPCRによるVIM型遺伝子の検出結果

水色 — : IMP株 + VIMgen primer, 桃色 — : VIM株 + VIMgen primer, 薄緑色 — : NDM株 + VIMgen primer,  
 青色 — : IMP株 + VIMgen M13 primer, 紅色 — : VIM株 + VIMgen M13 primer, 緑色 — : NDM株 + VIMgen M13 primer

a) 増幅曲線 b) 融解曲線 c) 検量線 d) リアルタイムPCR産物の電気泳動像 e) 検量線の解析結果



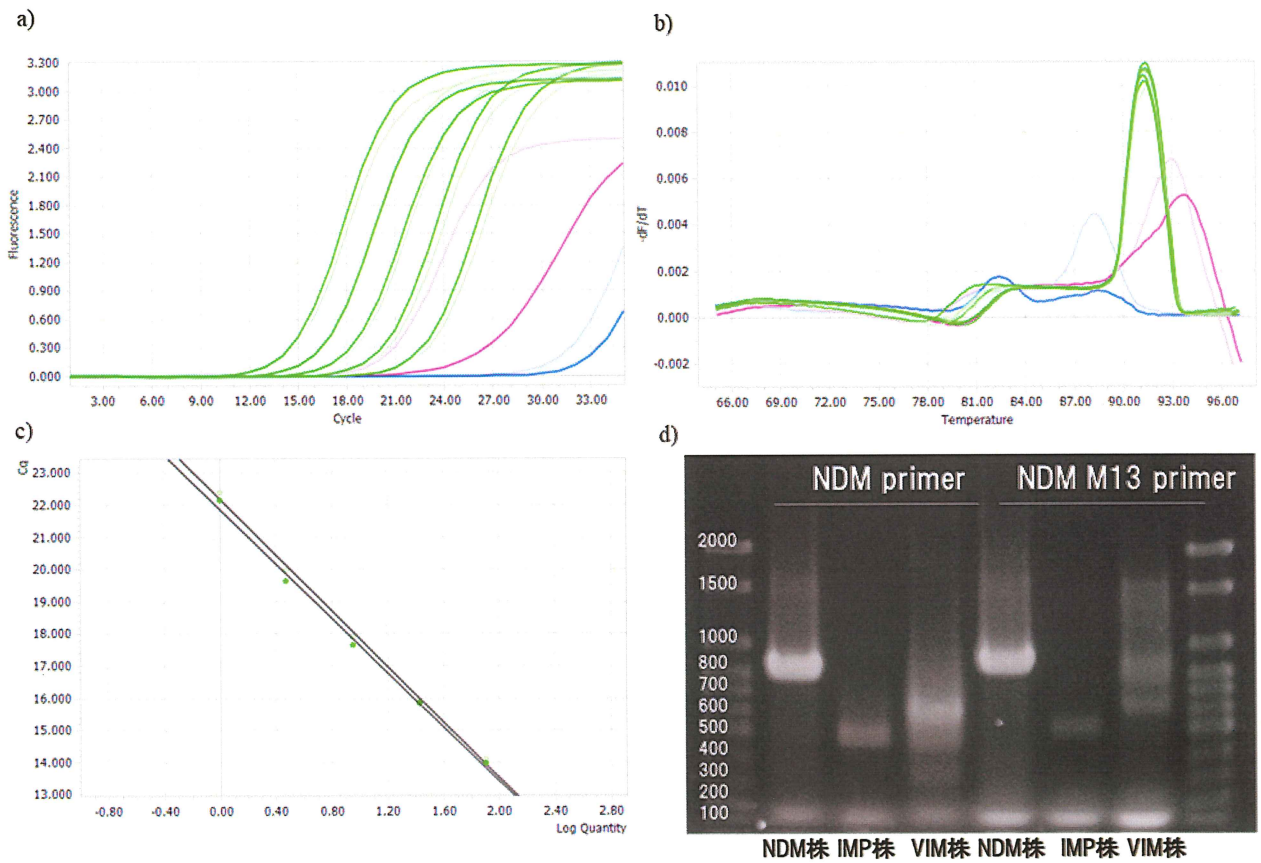


Figure 5 条件①でのリアルタイムPCRによるNDM型遺伝子の検出結果

水色 — : IMP株 + NDMgen primer, 桃色 — : VIM株 + NDMgen primer, 薄緑色 — : NDM株 + NDMgen primer,  
 青色 — : IMP株 + NDMgen M13 primer, 紅色 — : VIM株 + NDMgen M13 primer, 緑色 — : NDM株 + NDMgen M13 primer

a)増幅曲線 b)融解曲線 c)検量線 d)リアルタイムPCR産物の電気泳動像 e)検量線の解析結果

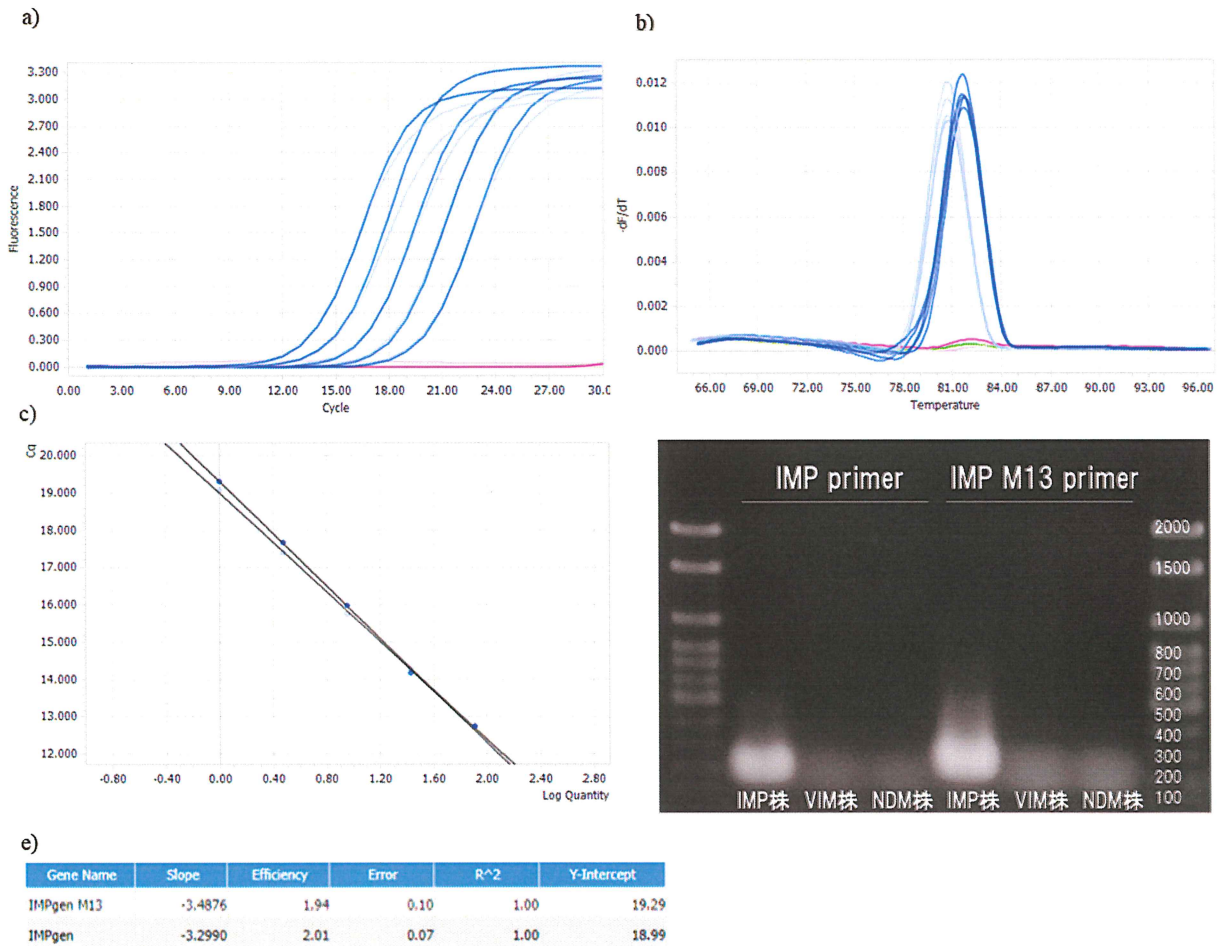
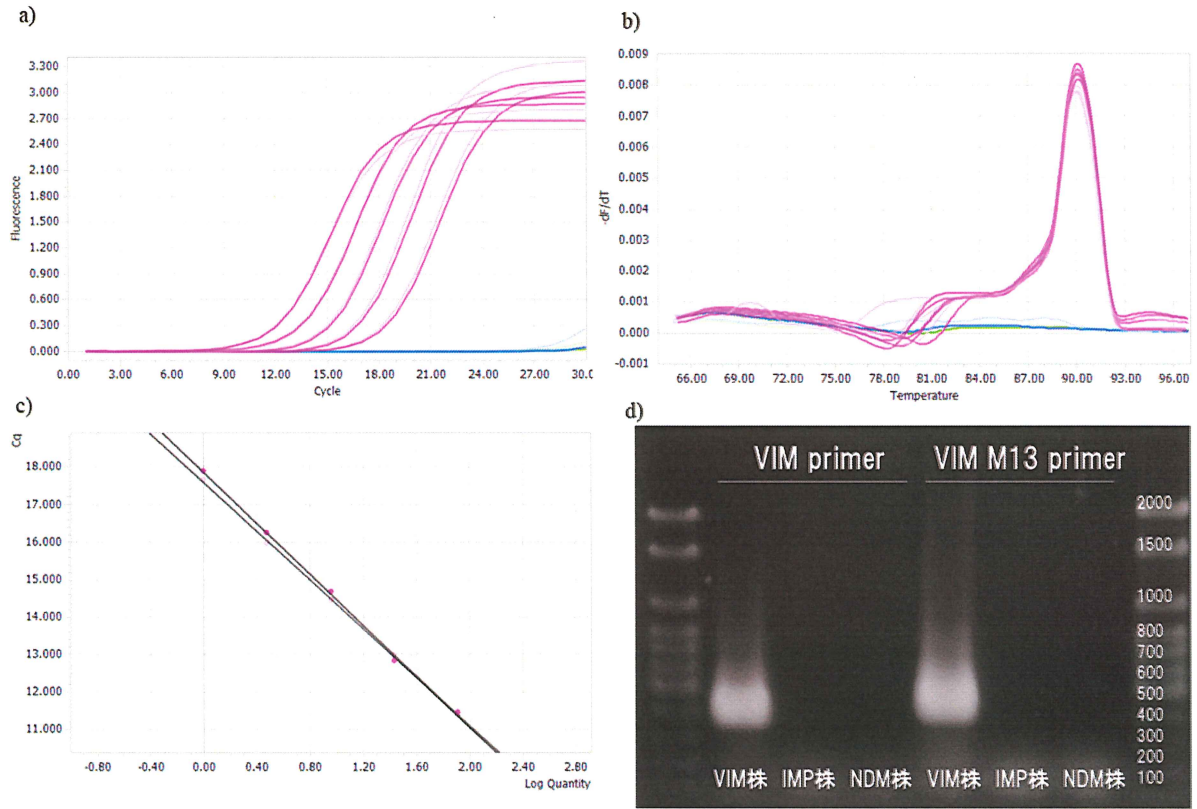


Figure 6 条件②でのリアルタイムPCRによるIMP型遺伝子の検出結果

水色 — : IMP株 + IMPgen primer, 桃色 — : VIM株 + IMPgen primer, 薄緑色 — : NDM株 + IMPgen primer,  
 青色 — : IMP株 + IMPgen M13 primer, 紅色 — : VIM株 + IMPgen M13 primer, 緑色 — : NDM株 + IMPgen M13 primer

a)増幅曲線 b)融解曲線 c)検量線 d)リアルタイムPCR産物の電気泳動像 e)検量線の解析結果





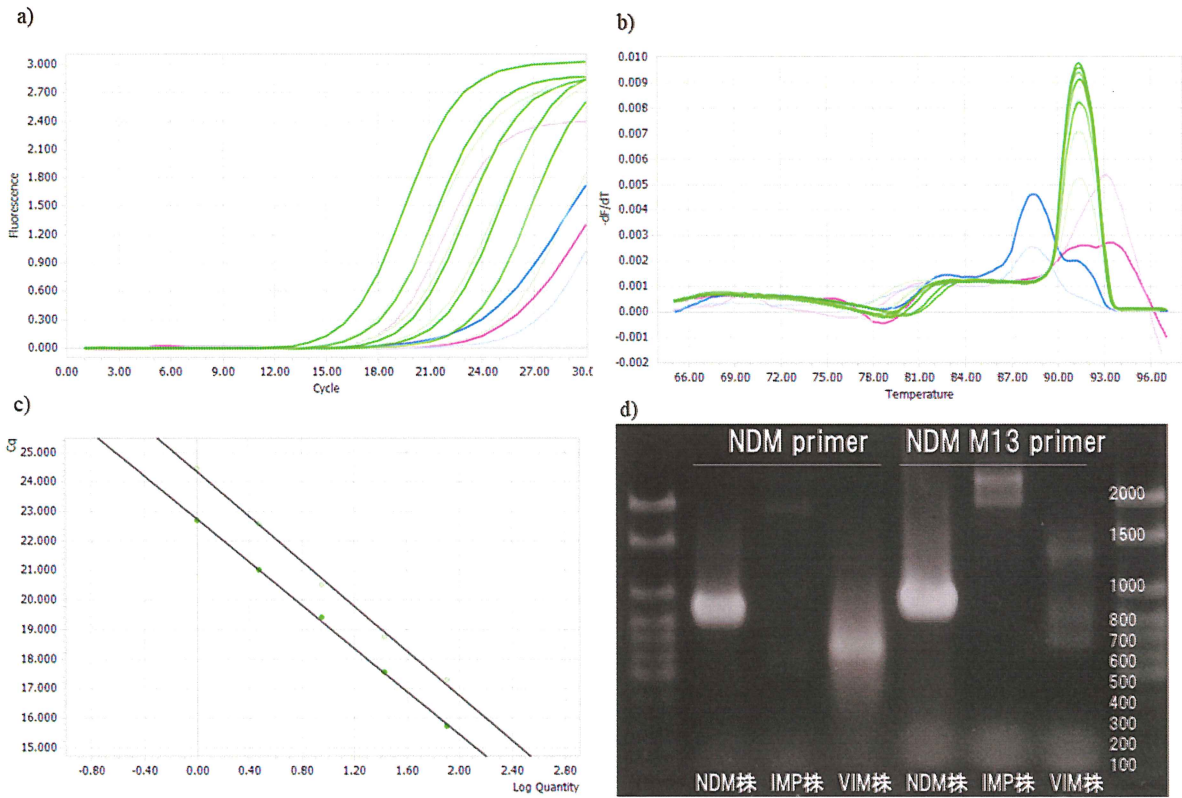
e)

Gene Name	Slope	Efficiency	Error	R <sup>2</sup>	Y-Intercept
VIMgen M13	-3.4058	1.97	0.11	1.00	17.87
VIMgen	-3.2591	2.03	0.07	1.00	17.60

Figure 7 条件②でのリアルタイムPCRによるVIM型遺伝子の検出結果

水色 — : IMP株 + VIMgen primer, 桃色 — : VIM株 + VIMgen primer, 薄緑色 — : NDM株 + VIMgen primer,  
 青色 — : IMP株 + VIMgen M13 primer, 紅色 — : VIM株 + VIMgen M13 primer, 緑色 — : NDM株 + VIMgen M13 primer

a)増幅曲線 b)融解曲線 c)検量線 d)リアルタイムPCR産物の電気泳動像 e)検量線の解析結果



Gene Name	Slope	Efficiency	Error	R <sup>2</sup>	Y-Intercept
NDMgen M13	-3.6553	1.88	0.10	1.00	22.76
NDMgen	-3.7999	1.83	0.20	1.00	24.34

Figure 8 条件②でのリアルタイムPCRによるNDM型遺伝子の検出結果

水色 — : IMP株 + NDMgen primer, 桃色 — : VIM株 + NDMgen primer, 薄緑色 — : NDM株 + NDMgen primer,  
 青色 — : IMP株 + NDMgen M13 primer, 紅色 — : VIM株 + NDMgen M13 primer, 緑色 — : NDM株 + NDMgen M13 primer

a)増幅曲線 b)融解曲線 c)検量線 d)リアルタイムPCR産物の電気泳動像 e)検量線の解析結果

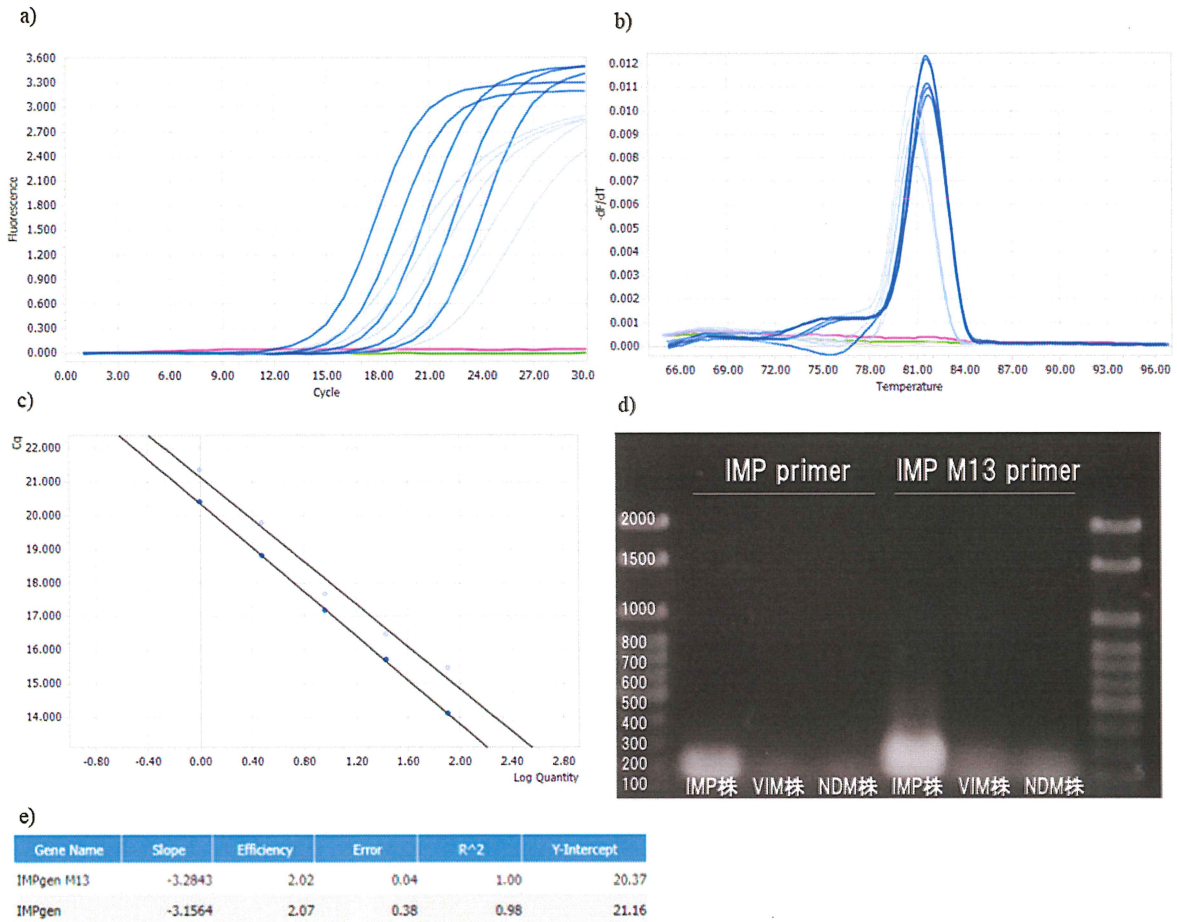


Figure 9 条件③でのリアルタイムPCRによるIMP型遺伝子の検出結果

水色 : IMP株 + IMPgen primer, 桃色 : VIM株 + IMPgen primer, 薄緑色 : NDM株 + IMPgen primer,  
 青色 : IMP株 + IMPgen M13 primer, 紅色 : VIM株 + IMPgen M13 primer, 緑色 : NDM株 + IMPgen M13 primer

a)増幅曲線 b)融解曲線 c)検量線 d)リアルタイムPCR産物の電気泳動像 e)検量線の解析結果

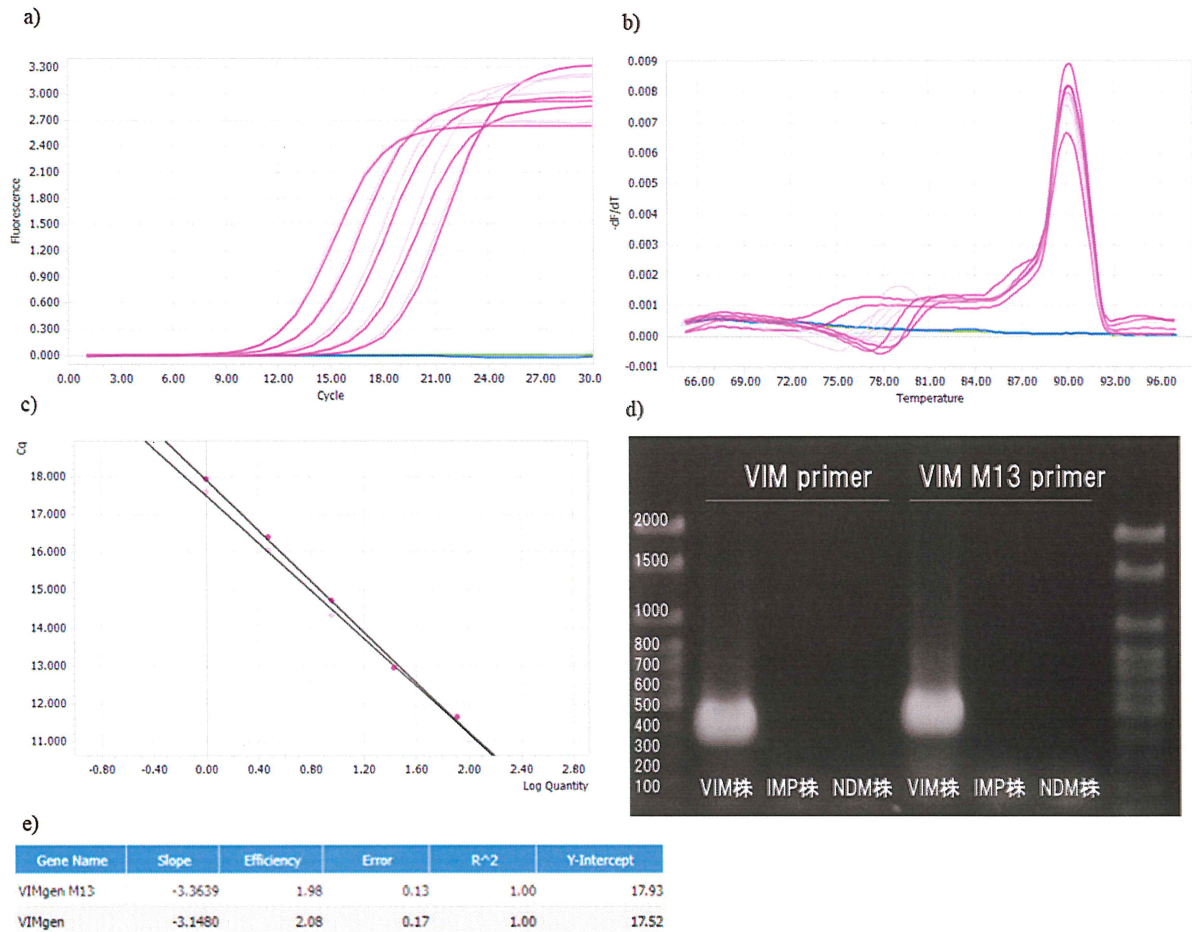
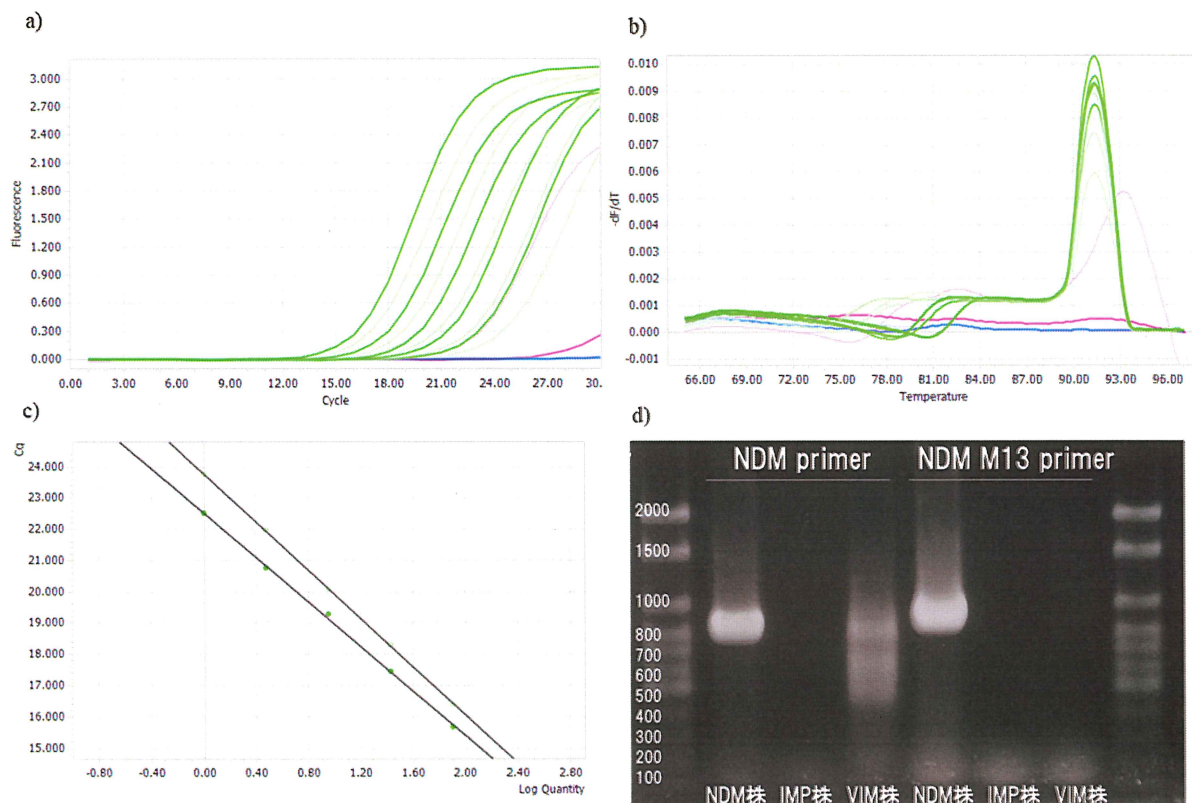


Figure 10 条件③でのリアルタイムPCRによるVIM型遺伝子の検出結果

水色 — : IMP株 + VIMgen primer, 桃色 — : VIM株 + VIMgen primer, 薄緑色 — : NDM株 + VIMgen primer,  
 青色 — : IMP株 + VIMgen M13 primer, 紅色 — : VIM株 + VIMgen M13 primer, 緑色 — : NDM株 + VIMgen M13 primer

a)増幅曲線 b)融解曲線 c)検量線 d)リアルタイムPCR産物の電気泳動像 e)検量線の解析結果





e)

Figure 11 条件③でのリアルタイムPCRによるNDM型遺伝子の検出結果

水色 — : IMP株 + NDMgen primer, 桃色 — : VIM株 + NDMgen primer, 薄緑色 — : NDM株 + NDMgen primer,  
 青色 — : IMP株 + NDMgen M13 primer, 紅色 — : VIM株 + NDMgen M13 primer, 緑色 — : NDM株 + NDMgen M13 primer

a)増幅曲線 b)融解曲線 c)検量線 d)リアルタイムPCR産物の電気泳動像 e)検量線の解析結果

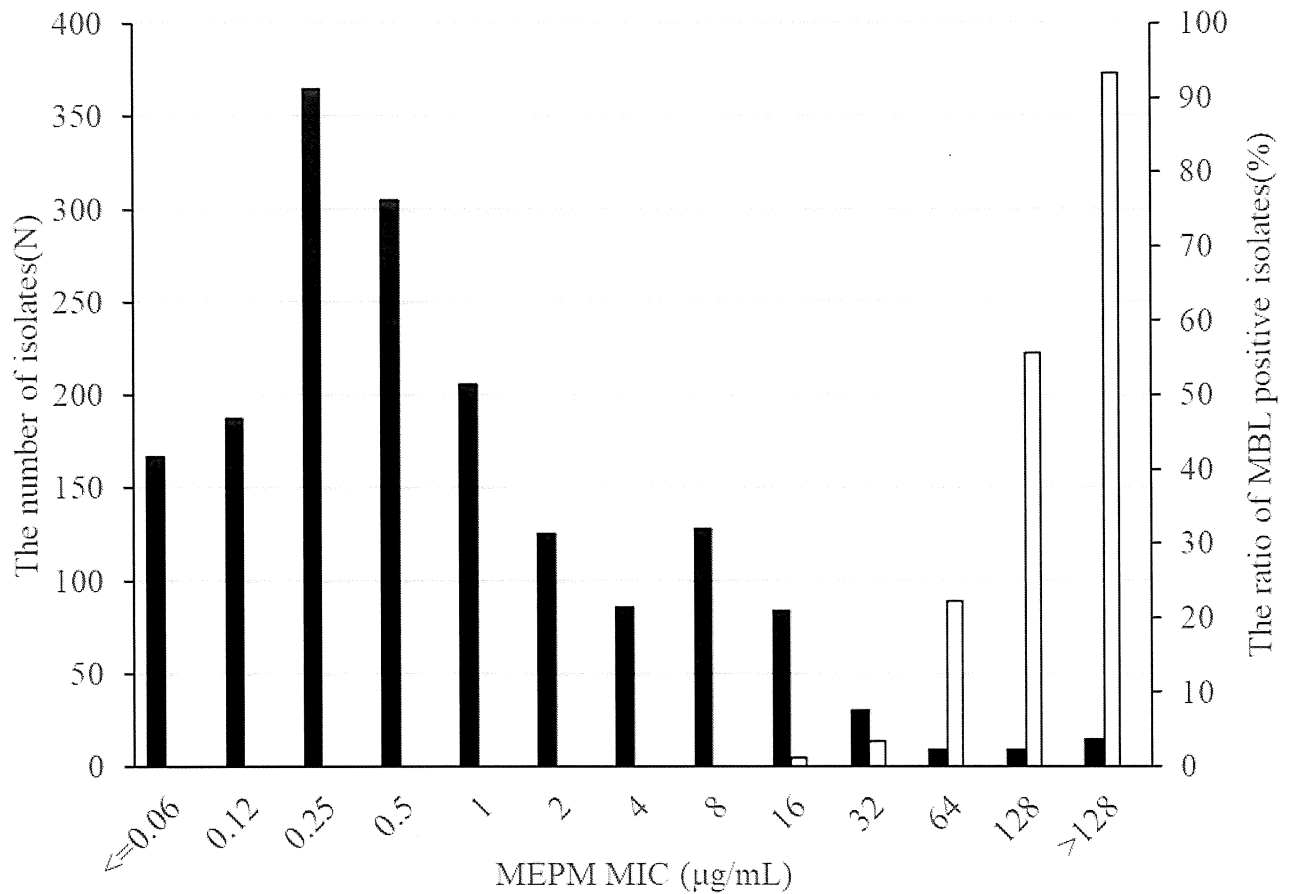


Figure 12

メロペネムのMIC分布と各MIC分画におけるメタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有率

■:メロペネムのMIC分布 □:各MIC分画におけるメタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有率

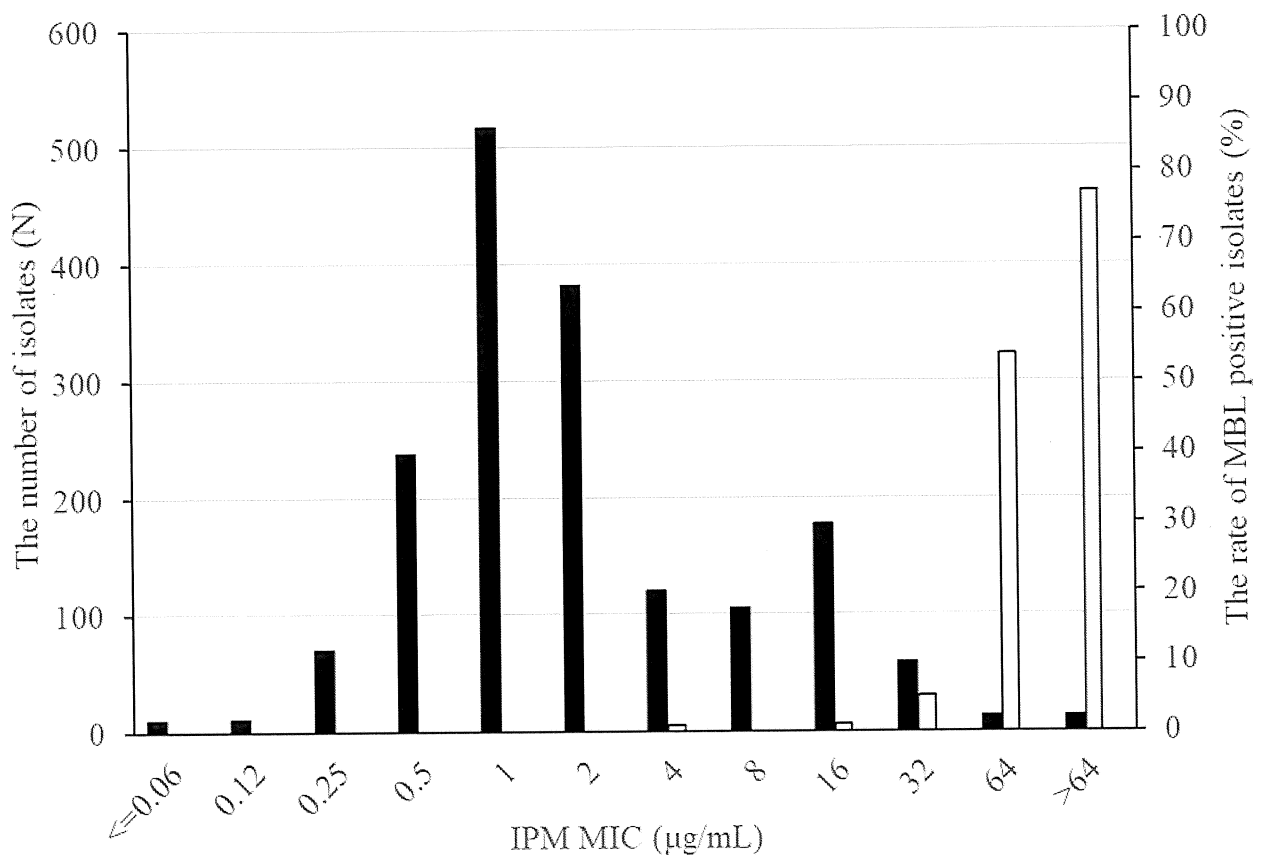


Figure 13

イミペネムのMIC分布と各MIC分画における今回同定したメタロ型カルバペネマーゼの遺伝子保有率

■: イミペネムのMIC分布 □: 各MIC分画におけるメタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有率

Table 1 本試験において参照した文献におけるPCRの条件

参考文献	プライマー	検出法	PCR条件	特徴
Mendesらの方法	IMPgen VIMgen など	ゲル電気泳動 マルチプレックス リアルタイムPCR + 融解曲線解析	条件① 94°C 300秒→(94°C 20秒, 53°C 45秒, 72°C 30秒) × 35サイクル→融解曲線 分析	本試験で使用したIMPと VIMのgeneral primer配列 マルチプレックスリアルタイ ムPCRの実施実績がある
病原体検出マニュアル	IMPgen NDMgen	言及なし	条件② 94°C 120秒→(94°C 60秒, 55°C 60秒, 72°C 90秒) × 30サイクル→72°C 5分	アニーリング温度が Mendesらの方法とNotake らの方法の間の温度
Notakeらの方法	IMP-1 M13 IMP-7 M13 IMP-2 M13 など	ゲル電気泳動	条件③ 95°C 600秒→(95°C 30秒, 62°C 60秒, 72°C 60秒) × 30サイクル→72°C 10分	標的遺伝子に依存しない M13プライマーを用いた シーケンス解析



Table 2 本試験で使用了メタロ型カルバペネマーゼ遺伝子検出用プライマーセットとシーケンス用配列

Targets	Primer set	use	Primer sequence (5' to 3')	Ref
IMP-general	IMP_gen	Amplification	F:GAATAG(A/G)(A/G)TGGCTTAA(C/T)TCTC R:CCAAAC(C/T)ACTA(C/G)GTTATC	(19)
VIM-general	VIM_gen	Amplification	F:GTTTGGTCGCATATCGCAAC R:AATGCGCAGCACCAGGATAG	(19)
NDM-general	NDM_gen	Amplification	F:ATGGAATTGCCCAATATTATG R:TCAGCGCAGCTTGTCGGCC	This study
IMP-general	IMP_gen_M13	Amplification	F:TGTA AACGACGGCCAGTGAATAG(A/G) (A/G)TGGCTTAA(C/T)TCTC R:CAGGAAACAGCTATGACCCCAAAC(C/T) ACTA(C/G)GTTATC	This study
IMP-1, 10, 34	IMP-1_whole-M13	Amplification	F:TGTA AACGACGGCCAGTATGAGCAAG TTATCTGTATTTC F:CAGGAAACAGCTATGACCTTAGTTGCTT GGTTTTGATGG	(21)
IMP-7	IMP-7_whole-M13	Amplification	F]TGTA AACGACGGCCAGTATGAAAAAG TTATCAGTATTTC R:CAGGAAACAGCTATGACCTTAGTTACTT GGTTTTGATAG	(21)
IMP-41	IMP-41_whole-M13	Amplification	F:TGTA AACGACGGCCAGTATGAAAAAA CTATTTGTTTTATGT R:CAGGAAACAGCTATGACCTTAATGAAC AGTGTTACTTT	(21)
VIM-general	VIM_gen_M13	Amplification	F:TGTA AACGACGGCCAGTGTGGTTCGC ATATCGCAAC R:CAGGAAACAGCTATGACCAATGCGCAG CACCAGGATAG	This study
VIM-2	VIM-2_whole-M13	Amplification	F:TGTA AACGACGGCCAGTATGTTCA(A/C) (A/G)(C/T)TTTTGAGTAAG R:CAGGAAACAGCTATGACCGCTACTCAA CGACTGAGCGATTG	This study
NDM-general	NDM_gen_M13	Amplification	F:TGTA AACGACGGCCAGTATGGAATTGC CCAATATTATG R:CAGGAAACAGCTATGACCTCAGCGCAG CTTGTCGGCC	This study
Univeral	M13	Sequence	F:TGTA AACGACGGCCAGT R:CAGGAAACAGCTATGACC	(21)

Table 3 PCR効率の結果一覧

PCR効率 (%)	Mendesらの方法 条件①	感染症研究所の方法 条件②	Notakeらの方法 条件③	3つの方法
IMPgen	86.5	101.0	107.4	
IMPgen M13	88.7	93.5	101.6	
VIMgen	86.1	102.7	107.8	
VIMgen M13	84.7	96.6	98.3	
NDMgen	70.0	83.3	81.6	
NDMgen M13	72.4	87.7	90.7	
general primer	80.9 ± 9.4	95.7 ± 10.7	98.9 ± 15.0	91.8 ± 13.3
generalM13 primer	81.9 ± 8.5	92.6 ± 4.5	96.9 ± 5.6	90.5 ± 8.68
both primers	81.4 ± 8.0	94.1 ± 7.6*	97.9 ± 10.2*	-

Means ± SD, \*:  $P < 0.05$  v.s. Mendesらの方法

Table 4 PCR検出感度の結果一覧

PCR検出感度 (Cq)	Mendesらの方法 条件①	感染症研究所の方法 条件②	Notakeらの方法 条件③	3つの方法
IMPgen	19.19	18.99	21.16	
IMPgen M13	19.22	19.29	20.37	
VIMgen	18.04	17.60	17.52	
VIMgen M13	18.12	17.87	17.93	
NDMgen	22.19	24.34	23.78	
NDMgen M13	22.88	22.76	22.54	
general primer	19.8 ± 2.1	20.3 ± 3.6	20.8 ± 3.1	20.3 ± 2.6
generalM13 primer	20.1 ± 2.5	20.0 ± 2.5	20.3 ± 2.3	20.1 ± 2.1
both primers	19.9 ± 2.1	20.1 ± 2.8	20.6 ± 2.5	-

Table 5 非特異的増幅の結果一覧

非特異的増幅	Mendesらの方法 条件①			感染症研究所の方法 条件②			Notakeらの方法 条件③		
	IMP株	VIM株	NDM株	IMP株	VIM株	NDM株	IMP株	VIM株	NDM株
IMPgen	-	+	-	-	-	-	-	-	-
IMPgen M13	-	+	+	-	-	-	-	-	-
VIMgen	+	-	+	-	-	-	-	-	-
VIMgen M13	+	-	+	-	-	-	-	-	-
NDMgen	+	2+	-	+	2+	-	-	2+	-
NDMgen M13	+	+	-	+	+	-	-	-	-
general primer	+:2	+:1, 2+:1	+:1	+:1	2+:1	-	-	2+:1	-
general M13 primer	+:2	+:2	+:2	+:1	+:1	-	-	-	-

+: 検量線範囲外のサイクルに非特異的増幅がある 2+: 検量線範囲内のサイクルに非特異的増幅がある  
 IMP株: IMP-1遺伝子保有株*Escherichia coli*KUB3151、VIM株: VIM-2遺伝子保有株*Pseudomonas aeruginosa*  
 KUB3182、NDM株: NDM-1遺伝子保有株*E. coli*KUB3605

Table 6 メタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有カルバペネム耐性緑膿菌株と非保有株の各種抗菌薬に対する薬剤感受性比較

Organisms (no. of isolates)	Drug	MIC range ( $\mu\text{g/mL}$ )	MIC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	MIC <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	CLSI guidelines	
					% Susceptible	% Resistant
MBL negative CRPA (252)	Meropenem	8 to >128	8	32	0	100
	Imipenem	2 to >64	16	32	3.2	93.3
	Piperacillin	1 to >128	32	>128	42.1	37.3
	Ceftazidime	1 to >64	8	64	61.9	29.8
	Cefepime	0.5 to >128	8	32	54.0	23.4
	Aztreonam	0.5 to >128	16	64	29.0	43.7
	Amikacin	0.25 to >128	4	8	96.0	2.78
	Ciprofloxacin	$\leq 0.06$ to >64	1	64	39.0	46.6
	Levofloxacin	0.25 to >128	4	64	22.3	61.8
	Minocycline	1 to >128	64	>128	-	-
MBL positive CRPA (23)	Meropenem	16 to >128	>128	>128	0	100
	Imipenem	4 to >64	64	>64	0	95.7
	Piperacillin	8 to >128	>128	>128	8.7	73.9
	Ceftazidime	>64	>64	>64	0	100
	Cefepime	64 to >128	>128	>128	0	100
	Aztreonam	4 to >128	32	64	21.7	65.2
	Amikacin	4 to 128	64	128	26.1	69.6
	Ciprofloxacin	4 to >64	64	>64	0	100
	Levofloxacin	8 to >128	64	>128	0	100
Minocycline	8 to >128	64	>128	-	-	

Table 7 各メロペネムMIC画分におけるメタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有株数とそのサブタイプ

Meropenem MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )	No. of isolates	No. of MBL positive isolates	Subtypes of MBL (no. of isolates)
8	128	0	-
16	84	1	IMP-7(1)
32	30	1	VIM-2(1)
64	9	2	IMP-1(1), IMP-7(1)
128	9	5	IMP-1(4), VIM-2(1)
>128	15	14	IMP-1(11), IMP-10(1), IMP-34(1), IMP-41(1)
TOTAL	275	23	

Table 8 メタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有緑膿菌とそのサブタイプの地域分布

Area	MBL-positive/CRBP-r isolates (%)	Subtypes of MBL(no. of isolates)
Sendai and Hokkaido/Tohoku district	3/20 (15.0)	IMP-1(2), IMP-10(1)
Tokyo and Kanto district	2/31 (6.5)	IMP-1(1), IMP-7(1)
Nagoya and Chubu district	4/41 (9.7)	IMP-7(1), IMP-41(1), VIM-2(2)
Osaka and Kansai district	3/53 (5.6)	IMP-1(2), IMP-34(1)
Hiroshima and Chugoku/Shikoku district	6/58 (10.3)	IMP-1(6)
Fukuoka and Kyushu/Okinawa district	5/72 (6.9)	IMP-1(5)

Table 9 メタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有緑膿菌分離率の領域比較(総緑膿菌株数での補正)

Clinical specimens	The number of isolates		The number of <i>P. aeruginosa</i> isolates
	MBL-positive	MBL-negative	
RTI	13 (1.1%)	1197	1210
cUTI	10 (3.8%)	252	262
SSI	0 (0%)	244	244
Total	23 (1.3%)	1693	1716

cUTI vs. 他領域(RTI+SSI)  
10/262 vs. 13/1454;  $P < 0.0005$



Table 10 メタロ型カルバペネマーゼ遺伝子保有緑膿菌分離率の領域比較(カルバペネム耐性緑膿菌株数での補正)

Clinical specimens	The number of isolates		The number of CRPA isolates
	MBL-positive	MBL-negative	
RTI	13 (5.8%)	227	226
cUTI	10 (28.6%)	25	35
SSI	0 (0%)	14	14
Total	23 (8.36%)	252	275

cUTI vs. 他領域(RTI+SSI)  
10/35 vs. 13/240;  $P < 0.0005$