

別紙

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興研究事業研究事業）
平成 24-26 年度 分担研究総合報告書

新たな薬剤耐性菌の耐性機構の解明及び薬剤耐性菌のサーベイランスに関する研究
分担課題 多剤耐性緑膿菌の院内感染対策に関する研究

研究分担者 切替 照雄 ((独)国立国際医療研究センター研究所・感染症
制御研究部・部長)

研究協力者 秋山 徹 ((独)国立国際医療研究センター研究所・病原微生物研究室・
室長)

多田 達哉 ((独)国立国際医療研究センター研究所・感染症制御研究部・
上級研究員)

島田 佳世 ((独)国立国際医療研究センター研究所・感染症制御研究部・
研究補助員)

霜島 正浩 (株式会社 BML 総合研究所・検査本部・次長)

研究要旨

本研究の目的は、多剤耐性緑膿菌の院内感染の実態を明らかにすること、ならびに、多剤耐性緑膿菌臨床分離株より流行型の薬剤耐性因子を同定し、それらを標的とする多剤耐性菌の迅速検出法を開発することである。2011年～2014年にかけて分離された多剤耐性緑膿菌の分子疫学解析、2012年度に得られた多剤耐性アシネトバクターバウマニー臨床分離株 49 株の分子疫学解析を行った。多剤耐性緑膿菌からは新規のメタロ-β-ラクタマーゼ IMP-type メタロ-β-ラクタマーゼ変異体 IMP-34、IMP-41、IMP-43 および IMP-44 の生物学的・酵素学的性状を明らかにし、メロペネムにより耐性を示す IMP-type が全国に広がりつつあることを明らかにした。さらに、AAC(6′)-Ib、AAC(6′)-Iae および IMP-type メタロ-β-ラクタマーゼ産生多剤耐性緑膿菌の迅速診断イムノクロマトキットの開発により、日本で分離される産生多剤耐性緑膿菌の約 8 割を迅速診断可能となった。これらの迅速診断キットの普及により、院内感染対策として多剤耐性緑膿菌のモニタリングならびに早期検出に有効であることが期待される。また、2012年に分離された多剤耐性アシネトバクターバウマニーにおいてはアミノグリコシド高度耐性を付与する 16S rRNA メチラーゼ ArmA 産生菌が 7 都道府県から分離されたことを明らかにした。

A. 研究目的

各地の医療施設において多剤耐性緑膿菌の分離報告及び院内感染報告が多数見受けられる。高度多剤耐性緑膿菌は、アミノグリコシド薬、ニューキノロン薬、カルバペネム薬に高度耐性を示し、治療が極めて困難であると共に、個々の施設内での感染伝播を引き起こす。今日の医療提携システムの

もとでは、施設を超えて広域に伝播拡大していくことも懸念されている。そのため、感染拡大の防止及び対策を講じ、医療の質と信頼を確保するために、高度多剤耐性緑膿菌の院内分離状況を把握する必要がある。本研究では、多剤耐性緑膿菌の分子疫学解析を行なうことにより重要な薬剤耐性因子を同定し、同菌の早期検出やモニタリング

に有用な簡便かつ迅速な薬剤耐性菌検出法の開発を目指す。

B. 研究方法

1. AAC(6')-Ib産生多剤耐性緑膿菌の迅速診断イムノクロマトキットの開発

Aminoglycoside-acetyltransferase

AAC(6')-IbのHisタグ付き組換え蛋白質をラットに免疫後、ハイブリドーマを作製し、その培養上清より精製した。第一次スクリーニングは、Hisタグ付きAAC(6')-Ibを用いてELISAにより実施した。

株式会社BML総合研究所より分与いただいた217株の多剤耐性緑膿菌臨床分離株を対象に、抗AAC(6')-Ibイムノクロマト試験を実施した。

さらに用いたモノクローナル抗体におけるエピトープマッピングを行なった。

2. 日本の医療施設で分離される多剤耐性緑膿菌の分子疫学解析

2011年~2014年に分離された多剤耐性緑膿菌臨床分離株950株(2011年度:169株、2012年度:186株、2013年度291株、2014年度:304株)において当研究部で開発したIMP-typeメタロ-β-ラクタマーゼ、AAC(6')-IaeおよびAAC(6')-Ibイムノクロマトキットを用いて迅速診断すると共に、IMPの亜型をPCRおよびシーケンスを用いて決定した。

3. 新規アミノグリコシド耐性因子AAC(6')-Iajの同定

2011年に分離多剤耐性緑膿菌臨床分離株に対し、amikacinに高度耐性(MIC >64 ug/ml)を示す株を対象に、既知のアミノグリコシド耐性因子をコードする遺伝子をPCRによりスクリーニングした。

その中で、未知のアミノグリコシド耐性因子を保有していると思われる株のインテグロンをシーケンスし、耐性因子を同定した。

同定された耐性因子を大腸菌にクローニングし、薬剤耐性を解析するとともに、タンパク質精製し、活性を薄層クロマトグラフィーで確認した。

また、この因子がクロモソーム上にあるかどうかをサザンブロットにより確認した。

4. IMP-type MBL 変異体 IMP-43 および

IMP-44 の同定

2011年に分離された多剤耐性緑膿菌臨床分離株に対し、我々の開発したIMP産生緑膿菌迅速診断キットを用いてIMP産生菌をスクリーニングした。イムノクロマト陽性菌からゲノムを抽出し、IMPの亜型をPCRおよびシーケンスで確認した結果、新規IMP variant IMP-43 および IMP-44 を同定した。blaIMP-43 および IMP-44 大腸菌にクローニングし、薬剤耐性を解析するとともに、タンパク質精製し、酵素活性を測定した。

5. 日本の医療施設で分離された多剤耐性アシネトバクターバウマニー臨床分離株の分子疫学解析

2012年に分離された多剤耐性アシネトバクターバウマニー臨床分離株 49 株からゲノムを抽出し、次世代シーケンサを用いて全ゲノム配列を決定した。全ゲノム配列から薬剤耐性因子を同定すると共に、SNPを抽出し系統解析を実施した。

6. IMP-34 産生緑膿菌の全ゲノム配列の解析および IMP-34 の酵素活性

IMP-34 産生多剤耐性緑膿菌 NCGM1900 のゲノムを CTAB 法で抽出し、沖縄総合科学研究所にゲノム解析を依頼、PacBioRSII でシーケンスし、Minimus2 でアセンブルした。完全長の配列はアノテーションし、DDBJ に登録した。IMP-1 および IMP-34 産生緑膿菌を用いて pHSG389-blaIMP-1 および pHSG389-blaIMP-34 を得た。大腸菌 DH5α にトランスフォームしたトランスフォーマントを用いて種々の β-ラクタム剤に対する MIC を比較した。さらに、リコンビナント IMP-1 および-34 を生成し、酵素学的性状を明らかにした。

倫理面への配慮

研究対象は、患者情報と完全に切り離された臨床分離株を使用する。本研究内容は、疫学研究に関する倫理指針(文部科学省、厚生労働省)の対象外である。

C. 研究結果

1. AAC(6')-Ib 産生多剤耐性緑膿菌の迅速診

断イムノクロマトキットの開発

モノクローナル抗体のスクリーニングの結果、AAC(6')-Ib に高い反応性を示す8抗体を得た。これら8抗体の組み合わせの中で、最も濃いテストラインを生む2抗体 3A9/F1 および 3F9/F1 を用いてイムノクロマトキットを作成した(図1)。作成したイムノクロマトキットの感度は 7.6×10^6 cfu per test であった。AAC(6')-Ib の全長をカバーする、15残基のペプチドを設計しELISAによる解析を行った。その結果、得られた抗体のエピトープは、3A9/F1 は AAC(6')-Ib の 171-184aa 領域、3F9/F1 は 61-75aa 領域であった。

217株の多剤耐性緑膿菌を対象にAAC(6')-Ib イムノクロマト試験を実施した結果、キット陽性98株、陰性119株であり *aac(6')-Ib* のPCRの結果と完全に一致した。

2. 日本の医療施設で分離される多剤耐性緑膿菌の分子疫学解析

2011年から2014年に分離された950株を解析した結果、2011年に分離された169株では、IMP陽性107株(63.3%)、AAC(6')-Iae陽性84株(49.7%)、AAC(6')-Ib陽性34株(20.1%)、2012年に分離された186株では、IMP陽性128株(68.8%)、AAC(6')-Iae陽性100株(53.8%)、AAC(6')-Ib陽性42株(22.6%)、2013年に分離された291株では、IMP陽性170株(58.4%)、AAC(6')-Iae陽性129株(44.3%)、AAC(6')-Ib陽性90株(30.9%)、2014年に分離された304株では、IMP陽性176株(57.9%)、AAC(6')-Iae陽性115株(37.8%)、AAC(6')-Ib陽性107株(35.1%)であった。シーケンスにより各年で分離されたIMP陽性株のIMP亜型を決定した結果、2011年のIMP陽性株107株の内、IMP-1: 66株、IMP-6: 2株、IMP-7: 12株、IMP-10: 21株、IMP-43: 5株、IMP-44: 1株であった。2012年のIMP陽性株128の内、IMP-1: 70株、IMP-6: 13株、IMP-7: 17株、IMP-10: 20株、IMP-34: 3株、IMP-41: 1株、IMP-43: 4株であった。2013年のIMP陽性株170の内、IMP-1: 82株、IMP-6: 14株、IMP-7: 38株、IMP-10: 26株、IMP-34: 2株、IMP-41: 2株、

IMP-43: 5株であった。2014年のIMP陽性株176の内、IMP-1: 99株、IMP-6: 7株、IMP-7: 29株、IMP-10: 32株、IMP-34: 1株、IMP-43: 8株であった。

3. 新規アミノグリコシド耐性因子AAC(6')-Iajの同定

2011年に分離された多剤耐性緑膿菌臨床分離株から新規アミノグリコシド耐性因子AAC(6')-Iajが同定された(図2)。

AAC(6')-IajはAAC(6')-Iaと70%の相同性を持ち、AAC(6')-Iae、AAC(6')-Iafに比べ、*arbakacin*耐性が高かった(Table1)。

同定された *aac(6')-Iaj* 遺伝子はクロモソーム上に存在していた。

4. IMP-type MBL 変異体 IMP-43 および IMP-44 の同定

2011年に分離された多剤耐性緑膿菌臨床分離株から新規IMP variant、IMP-43 およびIMP-44を同定した(図3)。IMP-43 およびIMP-44産生多剤耐性緑膿菌は共にインテグロン内に *aac(6')-Ib* を保有し、ST357であった。

IMP-43は全国5県に広がっており、IMP-7とのアミノ酸比較で1アミノ酸置換(Val67Phe)が見られた。IMP-44は1株のみでIMP-11と比較すると、2アミノ酸置換(Val67Phe およびPhe87Ser)が見られた。

酵素活性を測定すると、IMP-43はIMP-7に比べ、*cefotaxime*、*ceftazidime*、*cefepime*、*dripenem*、*imipenem* および *meropenem* に対して *kcat/Km* 値が高く、*penicillin G*、*ampicillin*、*cephradine* および *cefoxitin* に対し、*kcat/Km* 値が低かった。IMP-44とIMP-11においても同様の結果であった。特にIMP-44は *carbapenem* に対する *kcat/Km* 値が顕著に高かった(Table2)。

5. 日本の医療施設で分離された多剤耐性アシネトバクターバウマニー臨床分離株の分子疫学解析

日本の医療施設(7県、12医療施設)(図4)から分離された多剤耐性アシネトバクター49株において種々の薬剤に対するMICを調べたところ、アミノグリコシド系薬に対するMICが全ての株で高度耐性を示した

(Table 3)。全ゲノム解析を行った結果、全ての株から 16S rRNA methylase ArmA をコードする遺伝子 *armA*、アミノグリコシドアセチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子 *aac(6′)-Ib* が検出された。さらに、山口県の 2 医療施設から分離された 4 株においてはカルバペネム系薬に対し MIC >64μg/ml 以上の高度耐性を示し、*blaOXA-72* を保有していた。

分子系統解析の結果、大きく 3 つの clade に分かれ、シーケンスタイピング (ST) 208 を示す clade、ST455 を示す clade および ST512 を示す clade に分かれた (図 5)。*blaOXA-72* 保有株 4 株は ST512 clade に分類された。

また、ゲノム解析から *armA* 遺伝子はクロモソームに存在していることが明らかとなった。

6. IMP-34 産生緑膿菌の全ゲノム配列の解析および IMP-34 の酵素活性

IMP-34 産生多剤耐性緑膿菌 NCGM1900 (Accession no. AP014622) の完全長のゲノム配列を明らかにした結果、*aac(6′)-Ib* および IMP-34 を含むインテグロン *tnpA-int1-bla_{IMP-34}-aac(6′)-Ib-qacEdeltaI-sulI-orfX-tniBdelta-tniA* が同一ゲノム上に 2 か所確認された(図 6)。

pHSG389-*blaIMP-1* および pHSG389-*blaIMP-34* のトランスフォーマントを用いて種々の β-ラクタム剤に対する MIC を比較した結果、pHSG389 を持つコントロールと比較するとアズトレオナム以外の β-ラクタム剤に対する MIC が上昇していたが、pHSG389-*blaIMP-1* および pHSG389-*blaIMP-34* の比較では違いが見られなかった(Table 1)。また、酵素活性の比較では IMP-34 は IMP-1 に比べて全体的に低い活性を示した (Table 4)。

D. 考察

1. AAC(6′)-Ib 産生多剤耐性緑膿菌の迅速診断イムノクロマトキットの開発

過去、我々の開発した AAC(6′)-Iae および IMP-type MBL 産生多剤耐性緑膿菌臨床分離

株迅速診断キットと本年開発した AAC(6′)-Ib 産生多剤耐性緑膿菌臨床分離株迅速診断キットを組み合わせると日本で分離される多剤耐性緑膿菌の約 8 割を迅速に検出できることが分かった。これらの迅速診断キットの普及により、院内感染対策として多剤耐性緑膿菌のモニタリングならびに早期検出に有効であることが期待される。

2. 日本の医療施設で分離される多剤耐性緑膿菌の分子疫学解析
2011 年から 2014 年にかけて日本の医療施設から分離された多剤耐性緑膿菌臨床分離株の薬剤耐性因子を比較した結果、IMP 産生株及び AAC(6′)-Iae 産生株は減少傾向にあり、AAC(6′)-Ib 産生株は増加傾向にあることが明らかとなった。さらに、IMP タイプの亜型においては 2010 年までには見られなかった新たな IMP タイプである IMP-34, -43, -44 が出現し、関東地方を中心に広がりつつあることが明らかとなった。これらの亜型はメロペネムにより強い活性を示すことが分かっており、今後、モニタリングを続けていくことが重要であることが示唆された。

3. 新規アミノグリコシド耐性因子 AAC(6′)-Iaj の同定

AAC(6′)-Iaj 産生多剤耐性緑膿菌は大阪で分離された。現在、日本の医療施設に広まっている AAC(6′)-Iae 産生多剤耐性緑膿菌に比べ、*arbekacin* 耐性が高く、今後、注意深くモニタリングしていく必要がある。

また、*aac(6′)-Iaj* 遺伝子を含む integron は 1975 年にイギリスで分離された緑膿菌由来 plasmid R1033(accession no. U12338)に存在する In4 integron にゲノム環境が類似していることが分かった。

4. IMP-type MBL 変異体 IMP-43 および IMP-44 の同定

IMP-7 と IMP-43 および IMP-11 と IMP-44 のアミノ酸配列をそれぞれ比較した結果、67 番目のアミノ酸が Val から Phe に変異していた。Subclass B1 に属する MBL の 60 から 66 番アミノ酸残基は基質との相互作用に重要な active loop を形成することが分か

っている。この変異が酵素活性に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

また、IMP-11 と IMP-44 のアミノ酸比較では 67 番目に加え、87 番目アミノ酸残基も Phe から Ser へ変異していた。87 番目アミノ酸残基は IMP と同じ subclass B1 に分類される VIM-2 において酵素の stability と folding に関係していると報告されている。この 87 番目の変異によるベンゼン環の欠損は IMP-44 におけるより効率的な carbapenem の分解に寄与している可能性が考えられた。

5. 日本の医療施設で分離された多剤耐性アシネトバクターバウマニー臨床分離株の分子疫学解析

2012 年に分離された多剤耐性アシネトバクターバウマニー臨床分離株 49 株は全て高度アミノグリコシド耐性を示し、16S rRNA methylase ArmA をコードする遺伝子 *armA* が検出された。過去、日本で *armA* 遺伝子を保有するアシネトバクターバウマニーの報告は少なく、高頻度での分離報告はない。

高度アミノグリコシド耐性に寄与する 16S rRNA methylase 産生菌の報告は、中国、韓国、東南アジア諸国で多く報告されている。よって、これらの国々から日本に持ち込まれた可能性が高いと考えられる。

今後も持続的なモニタリングを続けると共に、16S rRNA methylase 産生高度アミノグリコシド耐性菌を迅速に検出できるシステムを開発する必要があると思われる。

6. IMP-34 産生緑膿菌の全ゲノム配列の解析および IMP-34 の酵素活性

2011 年より IMP-34 産生多剤耐性緑膿菌が分離されるようになった。blaIMP-34 は広島県で分離された *Klebsiella pneumoniae* のプラスミドから同定された。この blaIMP-34 がプラスミドから緑膿菌の染色体上に転移した可能性が考えられる。また、同一染色体上に aac(6')-Ib および IMP-34 を含むインテグロンが 2 か所存在することで、より多くの酵素を産生している可能性が示唆された。

E. 結論

本研究から、我々の開発した迅速診断キットを用いることで日本で分離される多剤耐性緑膿菌の約 8 割が迅速に検出可能であることが分かった。また、カルバペネム系薬に対してより高い耐性を示す IMP-type MBL の新興も明らかとなった。さらに、我々の行った日本の医療施設で分離された多剤耐性アシネトバクターバウマニー臨床分離株の分子疫学解析から、高度アミノグリコシド耐性を付与する 16S rRNA メチラーゼ産生株の出現が明らかとなった。以上のことから、今後、より詳細なモニタリングが必要であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Dahal RK, Mishra SK, Shimada K, Ohara H, **Kirikae T**, Pokhrel BM. Identification of a novel 6'-N-aminoglycoside acetyltransferase, AAC(6')-Iak from a multidrug-resistant clinical isolate of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(10): 6324-6327
- 2) Tada T, Shrestha B, Miyoshi-Akiyama T, Shimada K, Ohara H, **Kirikae T**, Pokhrel BM. NDM-12 a novel New Delhi metallo-β-Lactamase variant from a carbapenem-resistant *Escherichia coli* clinical isolate in Nepal. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58(10): 6302-6305
- 3) Tojo M, Mawatari M, Hayakawa K, Nagamatsu M, Shimada K, Mezaki K, Sugiki Y, Kuroda E, Takeshita N, Kustuna S, Fujiya Y, Miyoshi-Akiyama, **Kirikae T**, Ohmagari N.: Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from a traveler returned from Brunei. *J Infect*

- Chemother.* 2014; in press.
- 4) Tojo M, Nagamatsu M, Tanaka M, Narahara K, Miyoshi-Akiyama, **Kirikae T**, Ohmagari N.: Evaluation of an automated rapid diagnostic test for detection of *Clostridium difficile*. *PLoS One.* 2014; 9(8): e106102
 - 5) Tojo M, Tada T, Shimojima M, Tanaka M, Narahara K, Miyoshi-Akiyama T, **Kirikae T**, Ohmagari N. Dissemination in Japan of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing IMP-type metallo- β -lactamases and AAC(6')-Iae/AAC(6')-Ib. *J Infect Chemother.* 2014; 20(9): 586-588
 - 6) Hayakawa K, Miyoshi-Akiyama, **Kirikae T**, Nagamatsu M, Shimada K, Mezaki K, Sugiki Y, Kuroda E, Kubota S, Takeshita N, Kutsuna S, Tojo M, Ohmagari N.: Molecular and Epidemiological Characterization of IMP-Type Metallo- β -Lactamase-Producing *Enterobacter cloacae* in a Large Tertiary Care Hospital in Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58(6): 3441-3450
 - 7) Tojo M, Fujita T, Ainoda Y, Nagamatsu M, Hayakawa K, Mezaki K, Sakurai A, Masui Y, Yazaki H, Takahashi H, Miyoshi-Akiyama, Totsuka K, **Kirikae T**, Ohmagari N.: Evaluation of an automated rapid diagnostic assay for detection of Gram-negative bacteria and their drug-resistance genes in positive blood cultures. *PLoS One.* 2014; 9(4): e94064
 - 8) Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Shimada K, **Kirikae T**. Biochemical analysis of metallo- β -lactamase NDM-3 from a multidrug-resistant *Escherichia coli* strain isolated in Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58(6):3538-3540
 - 9) Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Shimada K, Shimojima M, **Kirikae T**. Dissemination of 16S rRNA methylase ArmA-producing *Acinetobacter baumannii* and emergence of OXA-72 carbapenemase-coproducers in Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58(5): 2916-2920
 - 10) Hashimoto A, Nagamatsu M, Ohmagari N, Hayakawa K, Kato Y, **Kirikae T**.: Isolation of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* from a traveler returning from a foreign country to Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2014; 67(2): 120-121
 - 11) Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Dahal RK, Sah MK, Ohara H, Shimada K, **Kirikae T**, Pokhrel BM. NDM-1 metallo- β -lactamase and ArmA 16S rRNA methylase producing *Providencia rettgeri* clinical isolates in Nepal. *BMC Infect Dis.* 2014; 14(1): 56.
 - 12) Hamada Y, Watanabe K, Tada T, Mezaki K, Takeuchi S, Shimizu T, **Kirikae T**, Ohmagari N. Three cases of IMP-type metallo- β -lactamase-producing *Enterobacter cloacae* blood stream infection in Japan. *J Infect Chemother.* 2013; 19(5): 956-958.
 - 13) Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Dahal RK, Mishra SK, Ohara H, Shimada K, **Kirikae T**, Pokhrel BM. Dissemination of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates with various combinations of carbapenemases (NDM-1 and OXA-72) and 16S rRNA methylases (ArmA, RmtC and RmtF) in Nepal. *Int J Antimicrob Agents.* 2013; 42(4): 372-374.
 - 14) Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Shimada K, Shimojima M, **Kirikae T**. IMP-43 and IMP-44 metallo- β -lactamases with increased carbapenemase activities in multidrug-resistant *Pseudomonas aeurinosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57(9): 4427-4432.
 - 15) Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Kato Y, Ohmagari N, Takeshita N, Hung NV, Phuong DM, Thu TA, Binh NG, Anh NQ,

Nga TT, Truong PH, Xuan PT, Thu LT, Son NT, Kirikae T. Emergence of 16S rRNA methylase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in hospitals in Vietnam. *BMC Infect Dis*. 2013; 13(1): 251.

- 16) Miyoshi-Akiyama T, Hayakawa K, Ohmagari N, Shimojima M, Kirikae T: Multilocus sequence typing (MLST) for characterization of *Enterobacter cloacae*. *PLoS One* 8(6): e66358.
- 17) Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Dahal RK, Sah MK, Ohara H, Kirikae T, Pokhrel BM. NDM-8 metallo- β -lactamase in a multidrug-resistant *Escherichia coli* strain isolated in Nepal. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57(5): 2394-2396.
- 18) Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Shimada K, Shimojima M, Kirikae T. Novel 6'-N-Aminoglycoside Acetyltransferase AAC(6')-Iaj from a Clinical Isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57(1): 96-100.
- 19) Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Tanaka M, Narahara K, Shimojima M, Kitao T, Shimada K, Kirikae T. Development of an immunochromatographic assay for rapid detection of AAC(6')-Ib-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *J Microbiol Methods*. 2012; 91(1): 114-6

2. 学会発表

- 1) 多田達哉・秋山徹・島田佳世・切替照雄 日本の医療施設で分離される多剤性緑膿菌株の分子疫学解析、第43回薬剤耐性菌研究会、平成26年10月、金沢
- 2) 多田達哉・秋山徹・切替照雄 IMP-43 and -44 producing multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Japan、第87回日本細菌学会総会、平成26年3月、東京都船堀
- 3) Teruo Kirikae. Dissemination of 16S rRNA methylase ArmA-producing *Acinetobacter*

baumannii and emergence of OXA-72 carbapenemase-coproducers in Japan. Japan-Korea Symposium, The 25th Annual Meeting of Japanese Society for Clinical Microbiology、平成26年2月、名古屋

- 4) 多田達哉・秋山徹・島田佳世・小原博・Pokhrel M Bharat・切替照雄 ネパールの医療施設で分離された院内感染起因菌としても多剤耐性グラム陰性菌の解析、第42回薬剤耐性菌研究会、平成25年10月、熱海
- 5) 多田達哉・秋山徹・切替照雄 日本の医療施設で分離される多剤耐性緑膿菌株の分子疫学解析、第86回日本細菌学会総会、平成25年3月、幕張
- 6) 多田達哉・秋山徹・島田佳世・切替照雄 医療施設で分離される多剤耐性緑膿菌株の解析、第41回薬剤耐性菌研究会、平成24年10月、下呂

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

MICs of various aminoglycosides for <i>E. coli</i> strains transformed with <i>aac(6)-Iaj</i>										
Strain ^a	MIC ^b (µg/ml)									
	AMK	ABK	DIB	GEM	ISP	KAN	NEO	NET	SIS	TOB
NCGM1588	128	32	1024	8	512	1024	256	>1024	1024	128
<i>E. coli</i> DH5α/pSTV28	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	2	0.25	1	0.25
<i>E. coli</i> DH5α/pSTV28- <i>aac(6)-Iaj</i>	16	4	16	0.5	4	32	8	32	4	16

^a The MICs for *E. coli* strains were determined with Mueller-Hinton broth preparations containing chloramphenicol (30 µg/ml) and individual aminoglycoside.
^b AMK, amikacin; ABK, arbekacin; DIB, dibekacin; GEM, gentamicin; ISP, isopamicin; KAN, kanamycin; NEO, neomycine; NET, netilmicin; SIS, sisomicin; TOB, tobramycin.

Table 1

Kinetic parameters of β-lactamase IMP-1, IMP-7, IMP-11, IMP-30 and IMP-31 with various substrates												
Substrate	<i>K_m</i> (µM) ^a				<i>k_{cat}</i> (s ⁻¹) ^a				<i>k_{cat}/K_m</i> (µM ⁻¹ ·s ⁻¹) ^a			
	IMP-7	IMP-43	IMP-11	IMP-44	IMP-7	IMP-43	IMP-11	IMP-44	IMP-7	IMP-43	IMP-11	IMP-44
Penicillin G	207±19	3176±236	574±18	482±53	25.3 ± 0.7	64 ± 3	36±2	14±1	0.12	0.02	0.063	0.029
Ampicillin	180±10	494±40	230±21	627±80	9.1 ± 0.6	3.5 ± 0.2	7.4±0.6	11±1	0.051	0.0072	0.032	0.017
Cephadrine	27±2	69±5	39±4	119±8	8.0 ± 0.3	10.3 ± 0.8	14.6±0.7	14.1±0.2	0.29	0.15	0.38	0.12
Cefoxitin	33±1	55±5	4.4±1.2	53±5	4.18 ± 0.05	3.48 ± 0.05	3.2±0.1	12±1	0.13	0.062	0.76	0.22
Cefotaxime	24±2	6.8±0.9	35±4	27±3	1.88 ± 0.07	7.2 ± 0.1	4.3±0.2	44±1	0.08	1.1	0.12	1.6
Ceftazidime	59±4	14±2	29±3	63±4	0.89 ± 0.05	1.9 ± 0.1	1.33±0.09	5.6±0.2	0.015	0.14	0.046	0.089
Cefepime	50±6	30±4	40±5	64±5	1.34 ± 0.04	4.6 ± 0.1	2.00±0.04	19.4±0.7	0.027	0.16	0.05	0.31
Aztreonam	NH ^b	NH ^b	NH ^b	NH ^b	NH ^b	NH ^b	NH ^b	NH ^b	NH ^b	NH ^b	NH ^b	NH ^b
Dripenem	63±5	59±7	101±10	257±27	6.8 ± 0.2	10.0 ± 0.4	11.3±0.6	589±40	0.11	0.17	0.11	2.3
Imipenem	254±20	268±23	142±7	119±11	20 ± 1	49 ± 2	19.2±0.5	165±5	0.078	0.18	0.13	1.4
Meropenem	59±7	24±2	50±5	137±16	2.6 ± 0.2	8.2 ± 0.3	5.9±0.2	335±13	0.044	0.34	0.12	2.5

^a The *K_m* and *k_{cat}* values represent the means of three independent experiments ± standard deviations.
^b NH; no hydrolysis was detected under conditions with a substrate concentration of up to 1mM and an enzyme concentration of up to 700nM.

Table 2

MIC₅₀ and MIC₉₀ values and percent antimicrobial resistance of *A. baumannii* clinical isolates

Antimicrobial agent	<i>A. baumannii</i> (n=49)				
	Breakpoint for resistance ^a (µg/ml)	% Resistance	Range (µg/ml)	MIC ₅₀ (µg/ml)	MIC ₉₀ (µg/ml)
Amikacin	≥64	100	>1,024	>1,024	>1,024
Arbekacin	-	-	1,024->1,024	>1,024	>1,024
Colistin	≥4	8	≤0.25-4	2	2
Ciprofloxacin	≥4	100	32-1,024	256	512
Gentamicin	≥16	100	512->1,024	>1,024	>1,024
Imipenem	≥16	100	16-64	16	64
Meropenem	≥16	100	16-128	16	128
Tigecycline ^b	-	-	≤0.25-4	1	4

^a Break points for antimicrobial resistance were determined according to the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute (M07-A9).

^b MICs to tigecycline were 4 µg/ml for 6 isolates, 2 µg/ml for 7, 1 µg/ml for 18, 0.5 µg/ml for 12, and ≤0.25 µg/ml for 6.

Table 3

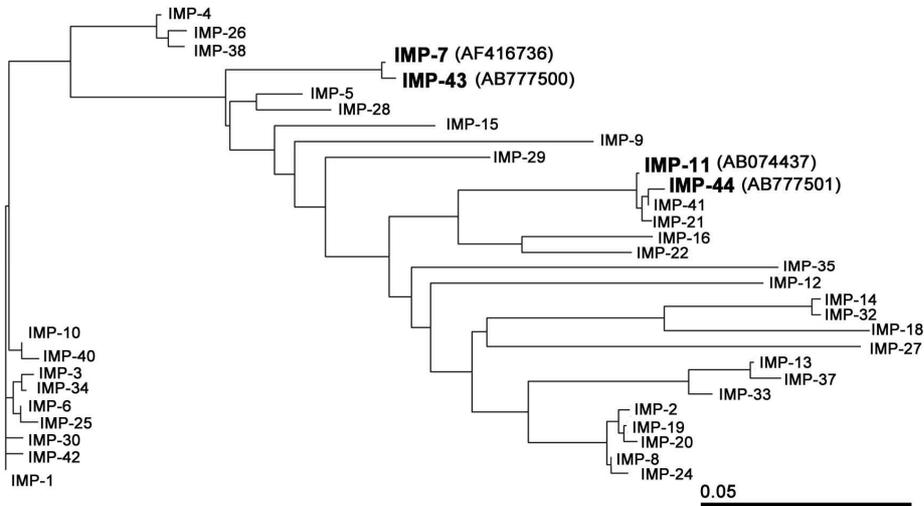


Fig. 3

49 isolates of multidrug-resistant *A. baumannii*
(July 2012 - December 2012)

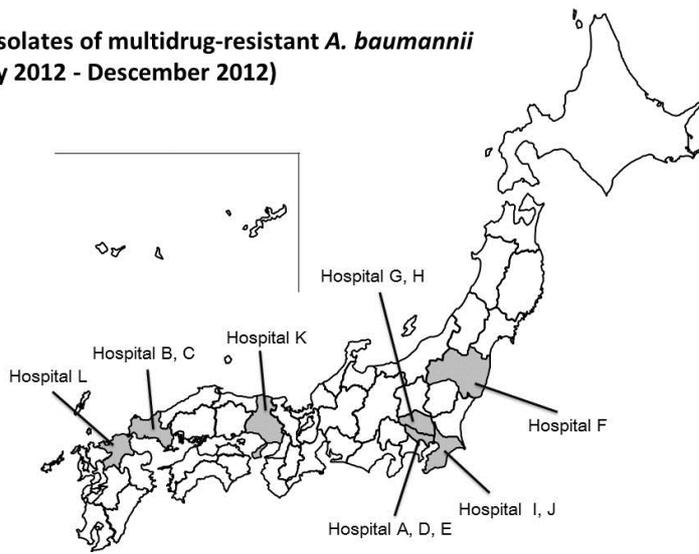


Fig. 4

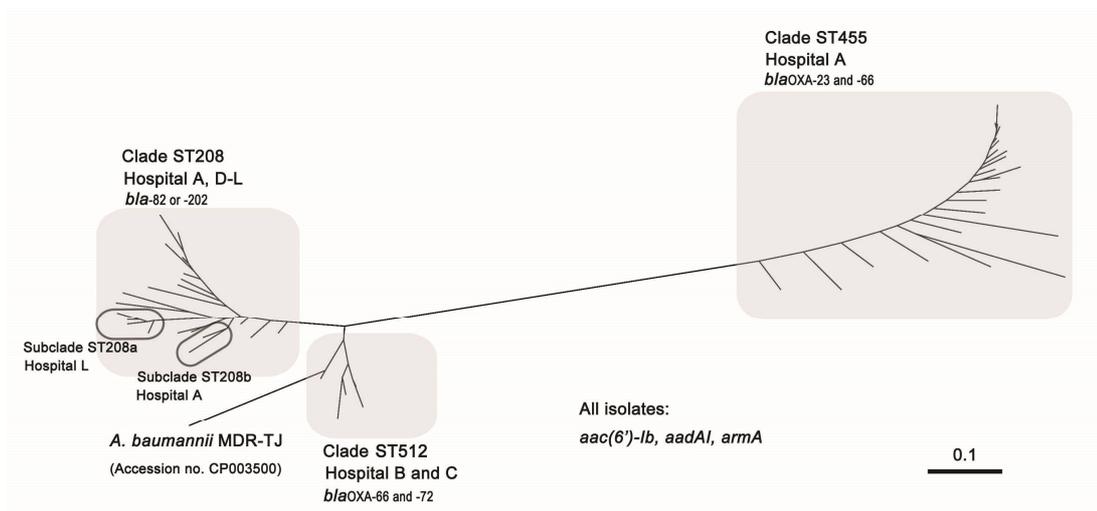


Fig. 5

同構造のインテグロンカセットが染色体上に2か所

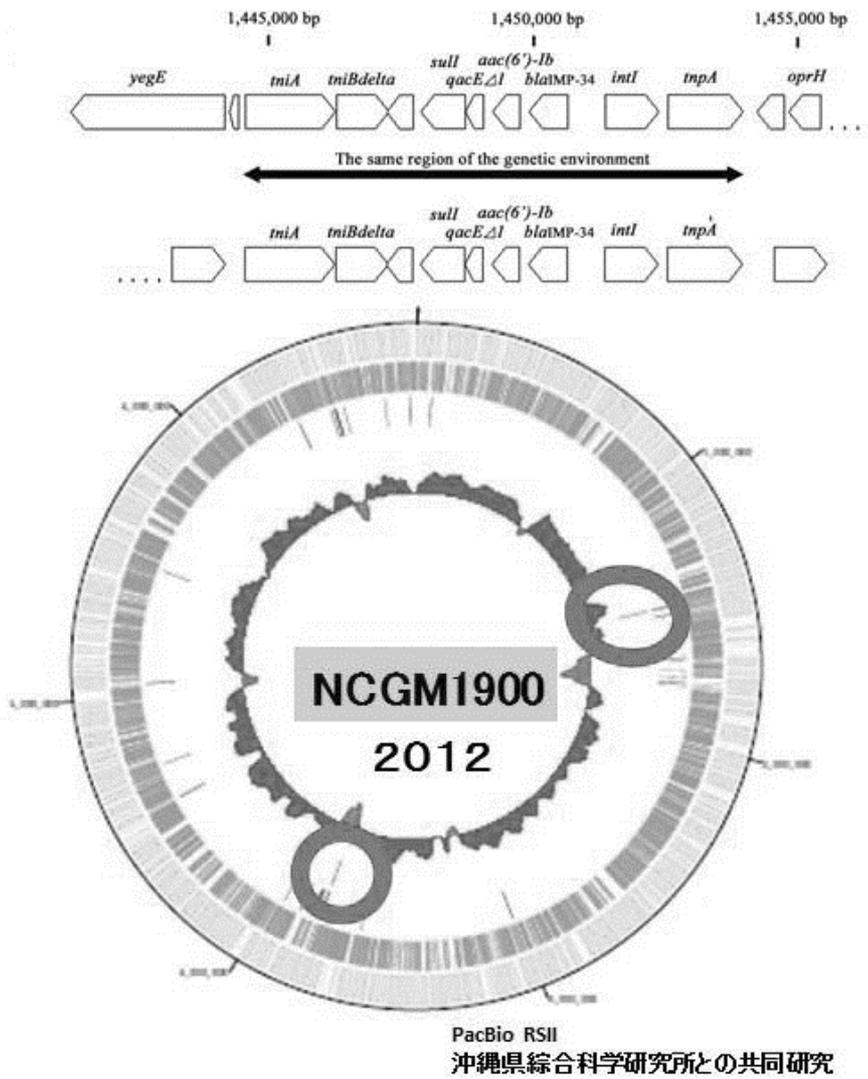


Fig. 6