

[Original Paper]

Analysis of Carbapenem-Resistant *Escherichia coli* Detected in the Northern Area of the Osaka Prefecture

Minase Maki*, Hiroyuki Itagaki** and Yuji Nakada*

* Department of Nursing, Faculty of Health Science, Aino University

** Aino Hospital

Abstract

Antimicrobial resistant microorganisms are a serious threat to global public health and action should be taken across all government sectors and societies to prevent their spread. In particular, carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) have spread on rapidly since 2000 and hence require immediate attention. In 2014, a large-scale CRE infection was reported at a hospital in Osaka city, and recognized widely in Japan.

From June 2012 to May 2014, which included the period of CRE diffusion at the hospital in Osaka city, we isolated 9 strains of carbapenem-resistant *Escherichia coli* from a medical facility located in the northern area of the Osaka prefecture.

We tested their antimicrobial sensitivity and analyzed the genes encoding metallo- β -lactamase and extended spectrum β -lactamase. All strains showed similar antimicrobial sensitivity and maintained *bla*_{IMP-6} and *bla*_{CTX-M-2}. These results are similar to those of the CRE detected at the hospital in Osaka city. However, we also detected the presence *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-9}, or *bla*_{TEM} in all 9 strains. We presumed that the antimicrobial-resistance genes that share the same origin spread to the surrounding area during bacterial replication.

Key Words : *Escherichia coli*, CRE, MBL, ESBL

大阪府北部地域検出カルバペネム耐性大腸菌の解析

牧 美南世*, 板垣博之**, 中田裕二*

【要 旨】 カルバペネム系抗菌薬に対し耐性を示す腸内細菌科細菌（CRE）が世界規模で急速に拡散し、対策を講じなければならない重要な課題となっている。本邦でも、2014年に大阪市内の病院にてCREの大規模医療施設内感染が報告され、広く認識されるようになった。今回、大阪市内での事例と重なる2012年6月からの2年間で、大阪府北部地域の医療施設にて検出された9菌株のカルバペネム耐性大腸菌について、メタロβ-ラクタマーゼおよび基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ遺伝子解析を行った。その結果、全ての菌株が *bla*_{IMP-6} および *bla*_{CTX-M-2} を保持するなど大阪市内の事例と共通した傾向を示した。一方、菌株により *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-9}, *bla*_{TEM} も検出されたことから、起源を同じくする耐性因子が発展しながら大阪府北部地域を含めた周辺域にも拡散していたことを示唆する結果となった。

キーワード：大腸菌, CRE, MBL, ESBL

I. はじめに

近代の化学療法剤の発見により、人類は感染症に対する有効な対抗手段を得ることができた。しかしながら間もなく発生した薬剤耐性菌の蔓延により、従来使用していた抗菌薬が使用できず治療が困難となる感染症が世界各地で確認されるようになってきている。OECDの報告¹⁾によると、現在の世界における薬剤耐性菌関連での死亡者数は年間約70万人であり、拡散防止策や抗菌薬の適正使用等の効果的な措置を講じなければ2050年には約1,000万人が薬剤耐性菌関連で死亡し、現在のがんによる死亡者数を超えることが予測されている。これらの現状を鑑み、世界保健機関は2014年に世界の薬剤耐性の現状に関する初の動向調査報告を発表し、翌年にグローバルアクションプラン²⁾を公表

した。また、本邦では2016年に“国際的に脅威となる感染症対策閣僚会議”の枠組みのもと、今後5年間で実施すべき薬剤耐性対策アクションプラン³⁾の公表を行っている。2016年に開催されたG7伊勢志摩サミットにおいても主要議題の一つになるなど、薬剤耐性菌の対策は全世界で早急に取り組まなければならない重要な課題となっている。

これまでに作用機序の異なる多くの抗菌薬が開発され、それらに対する耐性能を獲得した様々な薬剤耐性菌が発生している。その中でも、細菌感染症治療の切り札となっているカルバペネム系抗菌薬に対し耐性を示す腸内細菌科細菌（CRE：Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*）が2000年代以降急速に世界規模で拡散し問題となっている⁴⁾。腸内細菌科細菌はヒトの腸管に存在する常在細菌であり、大腸菌や肺炎桿菌、

* 藍野大学医療保健学部看護学科

** 藍野病院中央診療部検査課

エンテロバクター属などが含まれる。これまでに問題とされてきた多剤耐性緑膿菌や多剤耐性結核菌、病院感染型メチシリン耐性黄色ブドウ球菌などの薬剤耐性菌は、高齢者や入院患者など免疫力の低下した人に感染し発症することが多い。しかし CRE は健康な人でも腸管内に定着し、症状が現れないまま保菌状態になりやすい特徴がある⁵⁾。このことから医療施設内だけでなく、市中においても表立つことなく拡散することが懸念されている。

カルバペネム系抗菌薬は最新のβ-ラクタム系抗菌薬であり、細胞壁の合成を阻害する作用を持つ。細菌がカルバペネム系抗菌薬に対し耐性を獲得する機序は、二つのグループに大別されている⁶⁾。一つはカルバペネム系抗菌薬を効率的に分解することで高度耐性を示すカルバペネマーゼ産生であり、もう一つは通常では発現しない染色体上 *ampC* 遺伝子の IS 挿入による過剰生産や特定の外膜タンパクの減少・欠失などで、これらは低度耐性を示す。高度耐性をもたらすカルバペネマーゼは、β-ラクタム系抗菌薬を基質として分解するβ-ラクタマーゼに属し、これらは活性部位からメタロβ-ラクタマーゼ (MBL: Metallo-β-lactamase) とセリンβ-ラクタマーゼに分類される。MBL はモノバクタム系を除き、カルバペネム系抗菌薬を含むほぼ全てのβ-ラクタム系抗菌薬を分解する代表的なカルバペネマーゼであり、本邦で検出率の高い IMP 型や、欧州やインドを中心に広がりつつある VIM 型、NDM 型などが存在する⁷⁾。さらにカルバペネマーゼには、KPC 型、OXA 型、GES 型などのセリンβ-ラクタマーゼも含まれているが、本邦での報告例は少ない⁷⁾。セリンβ-ラクタマーゼには、現在使用頻度の高い第三世代セファロスポリン系抗菌薬を分解する酵素が出現しており、基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ (ESBL: Extended Spectrum β-lactamase) と呼ばれている。ESBL には欧米型と称される TEM 型、SHV 型や、現在本邦で主流となっている CTX-M 型などが存在する。また、CTX-M 型などのセファロスポリナーゼが過剰発現した場合でも、カルバペネム系抗菌薬に耐性を示すことが知られている⁸⁾。これらの MBL や ESBL 等を産生する遺伝子はプラスミド上に存在することが多く、接合等により他菌株や他菌種へ容易に耐性能が伝播する点でも問題である^{4,9)}。

本邦では、2014 年に大阪市内の病院にて MBL を保持した CRE の大規模医療施設内感染が報告¹⁰⁾され、その存在が広く認識されるようになった。さらに 2015 年末から 2016 年初頭にかけて行われた大阪府北

部地域における入院患者の CRE 保菌アクティブサーベランスの結果、11.8% の患者から CRE が検出され、感染拡大が懸念されている¹¹⁾。今回、関西地方における CRE の初期報告である大阪市内での事例と重なる期間に、大阪府北部地域の医療施設にて検出されていたカルバペネム耐性大腸菌について、薬剤感受性試験と MBL および ESBL 遺伝子の解析を行った。今回の解析により得られた結果と大阪市内での検出菌株報告とを比較検討することで、当時の耐性因子分布状況を把握し今後の感染管理対策に活用することを目的とした。

II. 対象と方法

1) 対象菌株

大阪府北部地域に位置する病床約 1,000 床の慢性期療養患者が多数を占める X 病院にて、2012 年 6 月から 2014 年 5 月までの 2 年間に検体より得られた、カルバペネム系抗菌薬であるメロペネム (MEPM) に耐性を示す大腸菌を対象菌株とした。

2) 培養条件

Luria-Bertani (LB) 培地もしくは Mueller-Hinton (MH) 培地を用い、固体培養では 37°C で 24 時間静置培養、液体培養では 37°C、200 rpm で一晩振とう培養を行った。また、必要に応じて各種抗菌薬を添加した。

3) DNA 操作

基本的な DNA の取扱いや PCR、DNA 断片のクローニング、DNA シークエンス等は、以前記載した方法^{12,13)}に準じ、各製品の推奨する条件下にて行った。トータル DNA の抽出はシカジーニクス® DNA 抽出試薬 (関東化学) を用いて行った。PCR はサーマルサイクラーに GeneAmp PCR System 2700 thermal cycler (Applied Biosystems) を用い、DNA ポリメラーゼに KOD-plus (TOYOBO) を用いた。

4) 薬剤感受性試験

ピペラシリン (PIPC)、スルバクタム/アンピシリン (S/A)、セフトジジム (CAZ)、セフォゾプラン (CZOP)、MEPM、アミカシン (AMK)、ミノサイクリン (MINO)、レボフロキサシン (LVFX) について、薬剤感受性試験をファルコバイオシステムズに委託し、WalkAway system plus (Beckman Coulter)

により行った。CLSIのガイドライン¹⁴⁾に基づき、感受性(S:susceptible)、中間(I:intermediate)、耐性(R:resistant)と判断した。

5) SMAテストによるMBL産生株のスクリーニング

MBL産生を簡便に確認する検査として、SMAテスト¹⁵⁾を行った。McFarland標準濁度0.08~0.120となるように調整した菌体を塗抹したMH培地に、イミペネム(IPM)ディスクおよびCAZディスク(日本ベクトン・ディッキンソン)と隣接してSMAディスク(栄研化学)を置き24時間培養を行った。培養後、IPMディスク周囲の阻止帯がSMAディスク側に拡大した場合、MBL産生陽性と判定した。

6) IMP型MBL遺伝子のPCR検出

日本における検出頻度の高いIMP型MBL遺伝子について、Yanらの方法¹⁶⁾に従いPCR検出を行った。IMP-1グループおよびIMP-2グループ検出用プライマー(表1)を用い、各菌株のトータルDNAとDNAポリメラーゼを加えサンプル調整を行った。PCR反応は初期熱変性を94℃で2分を行った後、94℃:30秒-57℃:30秒-68℃:1分を27サイクル、最後に68℃で2分の伸長反応を行った。対象菌株のPCR産物は100bp DNA Ladder (TOYOBO)とともに、1%アガロースゲルにて30分間電気泳動した。

7) MBL遺伝子のDNA配列解析

前述のIMP型MBL遺伝子検出に用いた各菌株のPCR産物を精製後、HincII (TOYOBO)で制限酵素処理したpUC118とともにDNA Ligation Kit Ver.1 (TAKARA)を用いてライゲーションを行った。得られたプラスミドを大腸菌DH5α株に形質転換し、各PCR産物をクローニングした。これらについてBigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)を用いてシーケンス反応後、DNAシーケンサー (PRISM3130, ABI)にてPCR

産物のDNA配列を決定した。また、得られた配列の相同性解析にはBLAST¹⁷⁾を用いた。

8) ESBL遺伝子のPCR検出

ESBL遺伝子型検出キット(関東化学)を用い、1検体につき2種類のマルチプレックスPCRを行うことで、CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9の各グループと、TEM型, SHV型を合わせた6種類の代表的なESBL遺伝子について検出を行った。PCR反応は、94℃:15秒-66℃:15秒-72℃:40秒を30サイクル行い、得られたPCR産物は100bp DNA Ladderとともに2%アガロースゲルにて50分間電気泳動した。

III. 結 果

1) 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験の結果、MEPMに耐性を示す9菌株の大腸菌が得られた。これらの菌株は、異なる患者から散発的に得られたが、共通してPIPC, S/A, CAZ, CZOP, MEPM, LVFXに対して耐性を示し、AMKに対し感受性を示した。MINOについては菌株により中等度耐性もしくは感受性を示した(表2)。

2) MBL産生株のスクリーニング

SMAテストの結果、9菌株全てが陽性を示しMBL産生を示唆する結果となった(表3)。

3) IMP型MBL遺伝子解析

対象菌株について、IMP型MBL遺伝子のPCR検出を行った結果、9菌株全てからIMP-1グループのMBL遺伝子保持を示す740bpのPCR産物が得られた。各菌株のPCR産物についてDNA配列解析を行った結果、全ての菌株が*bla*_{IMP-1}の640ntが*agt*(Serine)から、*ggt*(Glycine)に変化したDNA断片を保持していた。この変異はIMP-1グループに含まれるIMP-6と定義される¹⁸⁾ことから、対象菌株が保持するMBL遺伝子は全て*bla*_{IMP-6}と同定された(表3)。

4) ESBL遺伝子解析

ESBL遺伝子型のマルチプレックスPCR検出により、9菌株全てがCTX-M-2グループの遺伝子を保持していることが明らかとなった(図1, 表3)。さらにAUH-81, -96, -136, -137はCTX-M-1グループ、AUH-107, -139, -140はCTX-M-9グループの遺伝子

表1 IMP型MBL検出用プライマー¹⁶⁾

プライマー名	プライマー配列 (5'-3')	標的 遺伝子	増幅 サイズ (bp)
IMP1_F	TGAGCAAGTTATCTGTATTC	<i>bla</i> _{IMP-1}	740
IMP1_R	TTAGTTGCTTGGTTTTGATG		
IMP2_F	GGCAGTCGCCCTAAAACAAA	<i>bla</i> _{IMP-2}	737
IMP2_R	TAGTTACTTGGCTGTGATGG		

表2 X病院検出カルバペネム耐性大腸菌の薬剤感受性試験

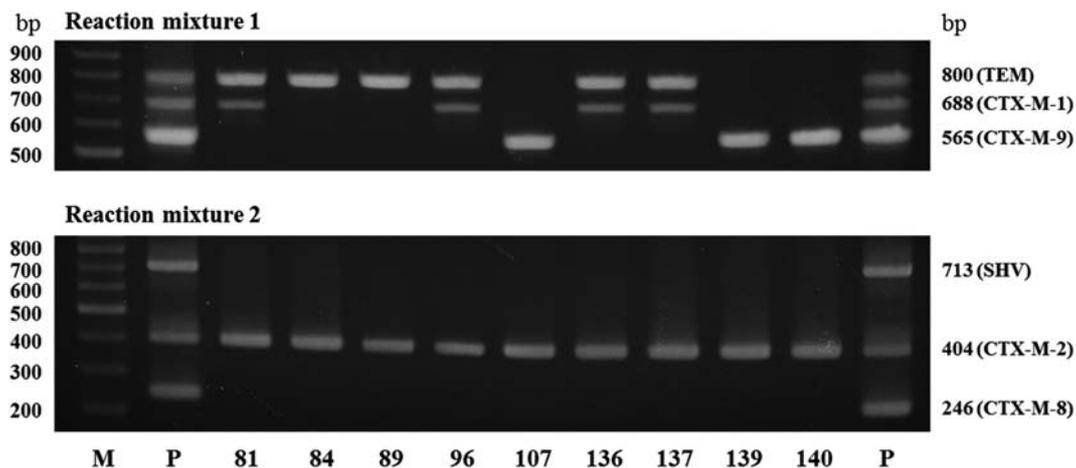
菌株	検体	PIPC	S/A	CAZ	CZOP	MEPM	AMK	MINO	LVFX
AUH-81	尿	R	R	R	R	R	S	I	R
AUH-84	尿	R	R	R	R	R	S	I	R
AUH-89	尿	R	R	R	R	R	S	S	R
AUH-96	尿	R	R	R	R	R	S	I	R
AUH-107	尿	R	R	R	R	R	S	S	R
AUH-136	尿	R	R	R	R	R	S	S	R
AUH-137	尿	R	R	R	R	R	S	S	R
AUH-139	喀痰	R	R	R	R	R	S	I	R
AUH-140	尿	R	R	R	R	R	S	S	R

PIPC: Piperacillin, S/A: Sulbactam/Ampicillin, CAZ: Ceftazidime, CZOP: Cefozopran, MEPM: Meropenem, AMK: Amikacin, MINO: Minocycline, LVFX: Levofloxacin
S: 感受性, I: 中間, R: 耐性

表3 対象菌株の薬剤耐性因子解析

菌株	SMA	MBL	ESBL				TEM	SHV
			CTX-M-1group	CTX-M-2group	CTX-M-8group	CTX-M-9group		
AUH-81	+	<i>bla</i> _{IMP-6}	+	+	-	-	+	-
AUH-84	+	<i>bla</i> _{IMP-6}	-	+	-	-	+	-
AUH-89	+	<i>bla</i> _{IMP-6}	-	+	-	-	+	-
AUH-96	+	<i>bla</i> _{IMP-6}	+	+	-	-	+	-
AUH-107	+	<i>bla</i> _{IMP-6}	-	+	-	+	-	-
AUH-136	+	<i>bla</i> _{IMP-6}	+	+	-	-	+	-
AUH-137	+	<i>bla</i> _{IMP-6}	+	+	-	-	+	-
AUH-139	+	<i>bla</i> _{IMP-6}	-	+	-	+	-	-
AUH-140	+	<i>bla</i> _{IMP-6}	-	+	-	+	-	-

SMA: SMA テストによる MBL 産生の確認¹⁵⁾
MBL: DNA 配列解析による MBL 遺伝子の同定
ESBL: 各 ESBL 遺伝子のマルチプレックス PCR による検出



M: 100bp DNA marker, P: positive control, 81~140: 菌株番号 (AUH-No.)

図1 マルチプレックス PCR による各種 ESBL 遺伝子の電気泳動

を同時に保持していた。また、AUH-81, -84, -89, -96, -136, -137 は TEM 型の遺伝子も検出されたことから、“CTX-M-1, CTX-M-2, TEM”, “CTX-M-2, TEM”, “CTX-M-2, CTX-M-9” の ESBL 遺伝子を

持つ 3 系統が存在し、順に“AUH-81, -96, -136, -137”, “AUH-84, -89”, “AUH-107, -139, -140” の菌株が含まれることが明らかとなった。

IV. 考 察

2014年に報告された大阪市内におけるCREの大規模な院内感染事例では、大阪市保健所が国立感染症研究所とともに実地疫学調査を行っている。その際、2013年7月から2014年3月までの検体由来CRE菌株を対象とした解析を行い、カルバペネム系抗菌薬に高度耐性を示すMBL産生株25菌株が得られている。さらにプラスミドの解析が可能であった18菌株では、全て *bla*_{IMP-6} を保持していることが確認されている¹⁰⁾。IMP型のMBLは現在53の亜型¹⁹⁾が報告されており、それぞれ基質特異性などの性状が異なる。IMP-6はIMP-1とアミノ酸配列が1箇所変化しており、カルバペネム系抗菌薬の中でイミペネムに対する分解活性が弱い特徴を持つ¹⁸⁾。薬剤感受性試験では感受性を示すが、生体内では耐性を示す場合があり、カルバペネム系抗菌薬の薬剤感受性試験にイミペネムを用いる病院では見落とされる危険性がある。以上のことからIMP-6産生株はステルス型と呼ばれ、治療が遅れる場合があり問題となっている。また、*bla*_{IMP-6} 保持株は同時にCTX-M-2グループのESBL遺伝子を保持していることも確認されている²⁰⁾。

大阪市内の事例と同時期の大阪府北部地域医療施設を対象とした今回のカルバペネム耐性大腸菌は、全ての菌株がSMA陽性であったことからMBLの産生が示唆された。さらにMBL遺伝子配列解析の結果、全ての菌株が *bla*_{IMP-6} を保持しており、大阪市内の事例と共通した結果となった。またESBL遺伝子検出でも全ての菌株がCTX-M-2グループの遺伝子を保持しており、このことも大阪市内の事例と共通していた。大阪市内での事例では、*bla*_{IMP-6} と同時に *bla*_{CTX-M-2} を含むIncNプラスミドの検出が報告²⁰⁾されており、今回の対象菌株も同様なプラスミドを保持している可能性がある。これらの結果から、大阪市内でのステルス型CREによる大規模医療施設内感染発生時には、今回研究対象とした大阪府北部地域の医療施設でも同一起源と考えられる耐性因子を保持するステルス型カルバペネム耐性大腸菌が検出されていたことが明らかになった。一方、今回行った詳細なESBL遺伝子解析の結果から、新たに“CTX-M-1, CTX-M-2, TEM”, “CTX-M-2, TEM”, “CTX-M-2, CTX-M-9”のESBL遺伝子を持つ3系統の存在が明らかとなった(表3)。以上のことから、起源を同じくする耐性因子に加え、他の耐性遺伝子の転移などにより異なる系統が派生していたことが示唆された。また、2015年末

から2016年初頭にかけて行われた大阪府北部地域における入院患者のCRE保菌アクティブサーベランスでは、11.8%の患者からCREが検出されたとの報告¹¹⁾があるが、これらは大阪府北部地域で数年をかけて表立らずに進行していった結果と推察できる。

一般的にMBL産生株はカルバペネム系抗菌薬に耐性を示すが、アズトレオナムなどのモノバクタム系抗菌薬には感受性を示す場合がある。しかしESBL産生株はモノバクタム系抗菌薬にも耐性を示すことから、MBLとESBLの両方を産生する菌株はほぼすべてのβ-ラクタム系抗菌薬に耐性を示すこととなる。今回の対象菌株はアミカシン感受性を示しているため現在アミノグリコシド系抗菌薬による治療方法は残されているが、海外ではアミノグリコシド耐性遺伝子を獲得したCREも確認されており^{21,22)}、今後のさらなる耐性因子の獲得状況、多様性について監視を継続する必要がある。

助成金に関する記述

本研究の一部は、平成27年度藍野大学奨励研究費を用いて行われた。

利益相反状態の開示

本研究に関して申告すべき利益相反はない。

引用文献

- 1) Cecchini M, Langer J, Slawomirski L. Antimicrobial resistance in G7 countries and beyond: economic issues, policies and options for action. Paris: OECD; 2015: 17-21.
- 2) World Health Organization. Global action plan on antimicrobial resistance. 2015. [引用 2016-11-1]. URL: <http://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/global-action-plan/en/>
- 3) 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. [引用 2016-11-1]. URL: <http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/0000120769.pdf>
- 4) Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm!. Trends in Molecular Medicine 2012; 18(5): 263-72.
- 5) Zhao ZC, Xu XH, Liu MB, Wu J, Lin J, Li B. Fecal carriage of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in a Chinese university hospital. Am J Infect Control 2014; 42(5): 61-4.
- 6) Lee EH, Nicolas MH, Kitzis MD, Pialoux G, Collatz E, Gutmann L. Association of two resistance mechanisms in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae*

- with high-level resistance to imipenem. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35(6): 1093-8.
- 7) 荒川宜親. カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) の臨床：その疫学動向から診断・治療まで. *感染と抗菌薬* 2015; 18(2): 164-71.
 - 8) 徳江豊. 基質特異性拡張型βラクタマーゼ (ESBL) 産生菌. *感染と抗菌薬* 2015; 18(2): 140-4.
 - 9) Bernard H, Tancrede C, Livrelli V, Morand A, Barthelemy M, Labia R. A novel plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase not derived from TEM- or SHV-type enzymes. *J Antimicrob Chemother.* 1992; 29(5): 590-2.
 - 10) 山岸拓也, 松井珠乃, 大石和徳, 伊東宏明, 福住宗久, 松井真理, 鈴木里和, 柴山恵吾, 関塚剛史, 山下明史, 黒田誠, 吉田英樹, 廣川秀徹, 坂本徳裕, 伯井紀隆, 奥町彰礼, 津田侑子, 松生誠子, 半羽宏之, 松本健二, 今井龍也, 中山浩二, 谷和夫, 吉村高尚, 甲田伸一, 上平朝子, 谷口美由紀, 小川吉彦, 宮本敦史, 中森正二, 多和昭雄, 朝野和典. 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, 病原微生物検出情報 2014; 35(12): 10-1.
 - 11) 吉田寿雄, 湯川理己, 山本倫久, 河原隆二, 萩谷英大, 明田幸宏, 朝野和典. 大阪府北摂地域における CRE スクリーニング調査——CRE 陽性者の追跡調査——. *日本感染症学会中日本地方会学術集会抄録集* 2016; 第 59 回: 470.
 - 12) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
 - 13) Maki M, Tsuruta H, Kawahara F, Awaji A, Itagaki H, Nakada Y. Analysis of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital with a dominant population of geriatric inpatients. *Aino journal* 2013; 12: 39-43.
 - 14) Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; nineteenth informational supplement. (Clinical and Laboratory Standards Institute; M100-S20). Wayne, Pa: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010.
 - 15) Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H, Goto M. Convenient test for screening metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol* 2000; 38(1): 40-3.
 - 16) Yan JJ, Hsueh PR, Ko WC, Luh KT, Tsai SH, Wu HM, Wu JJ. Metallo-beta-lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45(8): 2224-8.
 - 17) DNA Data Bank of Japan. Blastn [引用 2016-11-1]. URL: <http://www.ddbj.nig.ac.jp/index-j.html>
 - 18) Yano H, Kuga A, Okamoto R, Kitasato H, Kobayashi T, Inoue M. Plasmid-encoded metallo-beta-lactamase (IMP-6) conferring resistance to carbapenems, especially meropenem. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45(5): 1343-8.
 - 19) Lahey CLINIC. β-lactamase classification and amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant enzymes. 2016 [引用 2016-11-1]. URL: <http://www.lahey.org/Studies/>
 - 20) 国立病院機構大阪医療センターにおけるメタロβラクタマーゼ (MBL) 産生腸内細菌科の集積に関する外部調査報告書. 2016. [引用 2016-11-1]. URL: www.onh.go.jp/ict/img/pdf/MBL_201601.pdf
 - 21) 荒川宜親. 忍び寄る多剤耐性菌の恐怖! 早期検出と感染防止対策の重要性. *アニムス* 2015; 20(4): 17-24, 27-8.
 - 22) Zhang Y, Lin X, Bush K. In vitro susceptibility of β-lactamase-producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) to eravacycline. *J Antibiot (Tokyo)* 2016; 69(8): 600-4.