

MICs of β -lactams for *P. aeruginosa* NCGM1900, *E. coli* transformants with *bla*_{IMP-1} and *bla*_{IMP-34}

Antibiotic(s) ^a	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
	<i>P. aeruginosa</i> NCGM1900	<i>E. coli</i> DH5 α (pHSG398/IMP-1)	<i>E. coli</i> DH5 α (pHSG398/IMP-34)	<i>E. coli</i> DH5 α (pHSG398)
Ampicillin	>1,024	32	32	2
Ampicillin-Sulbactam	512	16	16	1
Aztreonam	16	<0.25	<0.25	<0.25
Cefepime	1,024	2	2	2
Cefotaxime	>1,024	16	16	<0.25
Cefoxitin	>1,024	512	512	2
Cefozopran	1,024	4	4	<0.25
Cefpirome	256	0.25	0.5	<0.25
Ceftazidime	>1,024	512	512	<0.25
Ceftriaxone	>1,024	64	64	<0.25
Cefuroxime	>1,024	256	128	4
Cephadrine	>1,024	256	256	16
Doripenem	256	0.25	<0.25	<0.25
Imipenem	256	0.5	0.25	<0.25
Meropenem	512	0.5	0.25	<0.25
Moxalactam	>1,024	64	64	<0.25
Penicillin G	>1,024	128	128	32

^aThe ratio of the ampicillin to sulbactam was 2:1.

Table 3

Kinetic parameters of β -lactamase IMP-1 and IMP-34 with various substrates

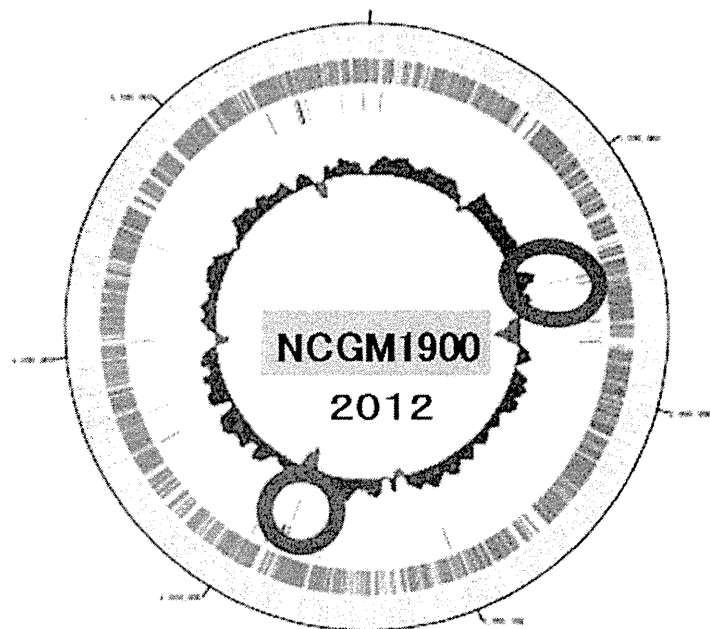
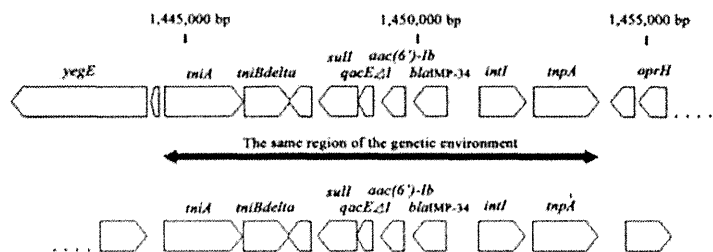
Substrate	<i>K_m</i> (μM) ^a		<i>k_{cat}</i> (s^{-1}) ^a		<i>k_{cat}/K_m</i> ($\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) ^a	
	IMP-1	IMP-34	IMP-1	IMP-34	IMP-1	IMP-34
Penicillin G	662	423	94	49	0.14	0.12
Ampicillin	340	355	16	13	0.048	0.037
Cephadrine	73	57	21	15	0.29	0.26
Cefoxitin	34	31	2.7	2.0	0.080	0.066
Cefotaxime	14	10	2.9	2.0	0.21	0.20
Ceftazidime	26	22	0.68	0.4	0.026	0.019
Cefepime	21	29	1.4	2.4	0.064	0.084
Aztreonam	NH ^b	NH ^b	NH ^b	NH ^b	NH ^b	NH ^b
Dripenem	39	39	4.8	3.8	0.12	0.096
Imipenem	58	59	6.9	4.9	0.12	0.083
Meropenem	37	46	2.3	2.0	0.062	0.043

^aThe *K_m* and *k_{cat}* values represent the means of three independent experiments \pm standard deviations.

^bNH; no hydrolysis was detected under conditions with a substrate concentration of up to 1mM and an enzyme concentration of up to 700nM.

Table 4

同構造のインテグロンカセットが染色体上に2か所



PacBio RSII
 沖縄県総合科学研究所との共同研究

Fig. 1

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 新型の薬剤耐性菌の構造と立体構造に立脚した
検出剤の分子設計並びに迅速・簡便検査法の確立

研究分担者 黒崎 博雅 (熊本大学大学院生命科学研究部・准教授)
研究協力者 山口 佳宏 (熊本大学環境安全センター・准教授)

研究要旨

本研究では *Serratia marcescens* 由来のメタロ-β-ラクタマーゼ (IMP-1) の 120 位のアスパラギン酸をグルタミン酸に置換した変異体 (D120E) の citrate 複合体の結晶化を行い、X線結晶構造解析 (1.9Å の分解能) によって立体構造を決定した。IMP-1-citrate 複合体の結晶構造との比較から、120 位の変異に伴い、活性中心に存在する 2 つの Zn (II) イオン (Zn1 と Zn2) の内、Zn1 周りの配位構造が大きく異なっていることがわかった。興味深いことに、citrate は酵素と 1:1 で活性中心の 2 つの Zn (II) イオンに結合し、その配位様式は IMP-1-citrate 複合体や VIM-4-citrate 複合体と同じであることが明らかとなった。

A. 研究目的

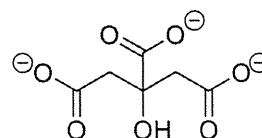
IMP-1、VIM-1、NDM-1 をはじめとするメタロ-β-ラクタマーゼを産生する薬剤耐性菌が日本はもとより、世界各国の医療施設から分離され深刻な問題になっている。メタロ-β-ラクタマーゼはほとんど全てのβ-ラクタム剤を分解し不活化する酵素である。この酵素はセリン型β-ラクタマーゼ阻害剤であるスルバクタムやクラブラン酸には無効であり、現在臨床で有効な阻害剤はない。

本研究では、種々のメタロ-β-ラクタマーゼの構造機能解析を通して、基質の認識および取り込み機構を解明すると共に、それらの立体構造に基づいたメタロ-β-ラクタマーゼ阻害剤・検出剤の開発を行っている。

以前、我々は全てのメタロ-β-ラクタマーゼの活性中心に保存されている 120 位のアスパラギン酸 (Asp120) の役割を明らかにするために、IMP-1 メタロ-β-ラクタマーゼにおいてグルタミン酸に置換した D120E を調製した [J. Biol. Chem. 280(21),

20824-20832 (2005)]。野生型 IMP-1 との比較から、Asp120 は活性中心の Zn (II) イオンに配位する H₂O または OH⁻ イオンがβ-ラクタム剤のβ-ラクタム環のカルボニル炭素へ求核攻撃できるように最適な位置に配置させる役割を担っていることを明らかにした。

本年度は D120E のグルタミン酸への変異に伴う Zn (II) 配位子と citrate (Figure 1) の Zn (II) 結合への影響を調べるために、D120E の citrate 複合体の結晶化と X線結晶構造解析を行い、我々が昨年度決定した IMP-1-citrate 複合体と Lassaux 等が報告した VIM-4-citrate 複合体 [Antimicrob. Agents Chemother. 55, 1248-1255 (2011)] の結晶構造と比較した。



Citrate

Figure 1. Chemical structure of citrate.

B. 研究方法

(1) D120E の発現と精製

D120E は、既に報告された方法[J. Biol. Chem. 280(21), 20824-20832 (2005)]に従って、大腸菌 BL21 (DE3) で発現させ、イオン交換カラムクロマトグラフィー[HiTrap SP-HP]と疎水性相互作用カラムクロマトグラフィー[HiTrap Phenyl HP]、ゲル濾過カラムクロマトグラフィー[HiLoad 16/600 Superdex 75 pg]によって精製した。カラムクロマトグラフィーにおいて、緩衝液はすべて 20 mM Tris-HCl, pH 7.4 を基本として用いた。8 L の培養液から、約 100 mg の D120E を得た。酵素の純度は、SDS-PAGE によって確認した (95%以上)。

(2) D120E の結晶化

D120E の結晶は、IMP-1-citrate 複合体の結晶化条件に従って行った。60 mg/mL の D120E (20 mM HEPES-NaOH, pH 7.5) をタンパク質溶液とし、0.2 M 酢酸ナトリウム、PEG4000 (30% w/v) を含む 0.1 M クエン酸-クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) をリザーバ溶液として D120E の結晶化を蒸気拡散法によって 20°C で行った。D120E 結晶は、あらかじめ IMP-1 の結晶を調製し、その結晶を粉々に砕き希釈した溶液を seed とし析出させた (Micro-seeding 法)。seeding してから数日後に結晶が析出した。

(3) D120E-citrate 複合体の X 線結晶構造解析

D120E-citrate 複合体の結晶は、高エネルギー加速器研究機構にある Photon Factory (PF) の BL-5A において、クライオプロテクタントなしで 100 K で、X 線回折データを収集した。X 線回折データは、HKL2000 を使って解析した。

D120E-citrate 複合体の構造解析は、IMP-1 の原子座標 (PDB code; 1DD6) を使って、分子置換法で行った。分子置換法は、CCP4 ソフトウェアパッケージにある MolRep プログラムを使い、精密化は REFMAC

プログラムを使った。モデリングは Coot によって行った。

C. 研究結果と考察

(1) D120E-citrate 複合体の結晶構造

Citrate の結晶構造は、1.9 Å の分解能で解析され、空間群 $P1$ 、結晶格子 $a = 47.7 \text{ \AA}$ 、 $b = 72.9 \text{ \AA}$ 、 $c = 82.2 \text{ \AA}$ 、 $\alpha = 84.8^\circ$ 、 $\beta = 75.6^\circ$ 、 $\gamma = 73.7^\circ$ であった。非対称単位中に D120E 分子は 4 分子 (分子 A~D) 存在していた。D120E の分子 A から D の各々の活性中心には、2 つの Zn(II) イオン (Zn1 と Zn2) と 1 分子の citrate が存在した。精密化とモデリングによって現時点での、 R_{working} と R_{free} 値はそれぞれ 0.163 と 0.202 まで解析した。

(2) D120E-citrate 複合体と IMP-1-citrate 複合体の全体構造の比較

我々は平成 25 年度に IMP-1-citrate 複合体の結晶構造を 2.0 Å の分解能で決定した。IMP-1-citrate 複合体においても非対称単位中に IMP-1 分子は 4 分子 (分子 A~D) 存在していた。IMP-1-citrate 複合体では分子 A から D の C_α 炭素を重ね合わせた時の root mean square difference (rmsd) は 0.20 から 0.26 Å であった。一方、D120E-citrate 複合体では 0.19 から 0.26 Å であった。これらの結果、IMP-1-citrate 複合体と D120E-citrate 複合体の各々の分子 A~D はほぼ同一の全体構造を取っていることがわかった (Figure 2)。そのため、これ以降 IMP-1 および D120E それぞれの分子 B について議論する。

IMP-1-citrate 複合体と D120E-citrate 複合体の分子 B 同士の C_α 炭素 [Leu39-Glu296] を重ね合わせた時の rmsd は 0.23 Å であり、全体構造はほぼ同じであることがわかった。

IMP-1-citrate 複合体と D120E-citrate 複合体は共にメタロ-β-ラクタマーゼに特徴的な $\alpha\beta/\beta\alpha$ サンドイッチ構造を有し、closed 構造を形成していた (Figure 3a)。この closed 構造は choncha

等が報告した IMP-1-メルカプトカルボン酸阻害剤 (see chemical structure in Figure 4) 複合体 (Figure 3b) [Biochemistry 39(15), 4288-4298 (2000)] や我々が決定した IMP-2 の構造に類似していることがわかった [Biol. Pharm. Bull. 38(1), 96-101 (2015)]。IMP-1-citrate 複合体と D120E-citrate 複合体構造の重ね合わせから、活性中心にある citrate 分子はほぼ同じ位置に存在していた (Figure 2)。

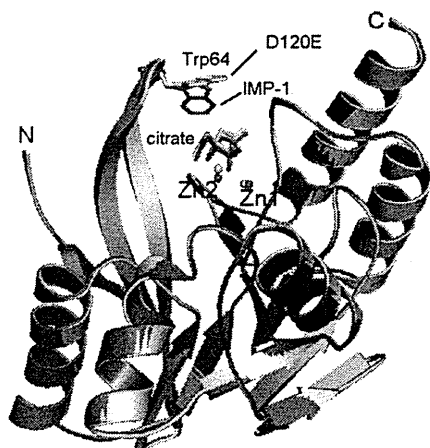


Figure 2. The superimposed complex structures of IMP-1 and D120E with citrate. Molecule B of each citric complex is only depicted. Zinc(II) ions are represented as spheres. Citrate and Trp64 in IMP-1 and D120E are shown as magenta and yellow sticks, respectively. The figure was prepared with the PyMol software (<http://pymol.sourceforge.net/>).

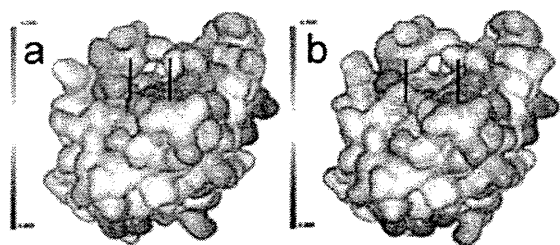
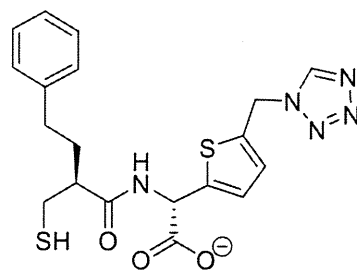


Figure 3. Comparison of the molecular surfaces of (a) IMP-1-citrate complex and (b) IMP-1-mercaptocarboxylate inhibitor complex (PDB accession code: 1DD6). Citrate and a mercaptocarboxylate inhibitor are omitted from the active site. Zn(II) atoms are shown as spheres. The figure was prepared with MolFeat software (FiatLux Corporation).



Mercaptocarboxylate inhibitor:
2-[5-(1-tetrazolylmethyl)thien-3-yl]-N-[2-(mercaptomethyl)-4-(phenylbutyryl)glycine]

Figure 4. Chemical structure of mercaptocarboxylate inhibitor, 2-[5-(1-tetrazolylmethyl)thien-3-yl]-N-[2-(mercaptomethyl)-4-(phenylbutyryl)glycine] [Biochemistry 39(15), 4288-4298 (2000)].

(3) D120E-citrate 複合体と IMP-1-citrate 複合体の活性中心構造の比較

Zn(II)-ligand の結合距離と結合角を Table 1 に示す。D120E-citrate 複合体と IMP-1-citrate 複合体はいずれも活性中心に2つの Zn(II) [Zn1 と Zn2 とする] を有するが、Zn1 回りの配位構造に大きな違いがみられた。IMP-1-citrate 複合体の Zn1 回りは tetrahedral 構造 [His116, His118, His196, citrate の COO⁻基の酸素原子が Zn1 に配位] を取っていた (Figure 5a)。一方、D120E-citrate 複合体の Zn1 回りは、His119, His196, citrate の COO⁻基の酸素原子と Glu120 の COO⁻基の酸素原子がエクアトリアル平面を形成し、His116 がアクシャル位から Zn1 に配位した square-pyramidal 構造を取っていた (Figure 5b)。この配位構造の違いは Glu120 の COO⁻基が2座配位子として Zn1 と Zn2 に結合することによって引き起こされたと考えられる。

D120E-citrate 複合体と IMP-1-citrate 複合体の Zn2 回りはいずれも octahedral 構造 [Asp120 (または Glu120), Cys221, His263 と citrate の脱プロトン化した水酸基の酸素原子と2つの COO⁻基の酸素原子] を形成していた。ここで

注目すべきことは、Asp120 から Glu120 への変異に伴う構造変化にも関わらず、citrate の Zn(II) への結合様式は同じであるという点である。

Table 1. Zinc(II)-ligand distances (Å) of IMP-1 and D120E in complexed with citrate

		IMP-1	D120E
Zn(II)-ligand		distance ^a	
Zn1	His116NE2	2.0	2.1
	His118ND1	2.1	2.1
	His196NE2	2.0	2.1
	Glu120OE1		2.0
	OB1	2.1	2.1
	(citrate carboxylate)		
Zn2	Asp120OD2	2.0	
	Glu120OE2		2.1
	Cys221SG	2.5	2.6
	His263NE2	2.0	2.0
	OH	2.1	1.8
	(citrate hydroxyl)		
	OA1	2.3	2.2
	(citrate carboxylate)		
	OB1	2.6	2.4
	(citrate carboxylate)		
Zn1	Zn2	3.6	3.7

^aThe distances of Zn(II)-ligand (Å) for the citrate complexes of IMP-1 and D120E are quoted for molecule B. The average ligand-Zn(II)-ligand angles for molecule B in the citrate complexes of IMP-1 are 109° for Zn1 and 89° for Zn2, whereas those for molecule B in the citrate complexes of D120E are 95° for Zn1 and 89° for Zn2.

さらに、citrate の3つある C00⁻基の2つは隣接のアミノ酸残基 (Lys221 と Asn223) と水素結合を形成し、残り1つはフリーの状態にあった。

(4) VIM-4-citrate 複合体構造と IMP-1-citrate 複合体構造の比較

Lassaux 等は VIM-4-citrate 複合体の X線結晶構造 [1.9 Å 分解能, Antimicrob. Agents Chemother. 55(3), 1248-1255 (2011)] を報告している。VIM-4 も IMP-1 や D120E 同様に $\alpha\beta/\beta\alpha$ 構造を形成している。IMP-1 とのアミノ酸一次配列相同性は 29% とかなり低いが、2つの Zn(II) [Zn1 と Zn2] に配位するアミノ酸残基は保存されている。Zn1 と Zn2 回りはそれぞれ tetrahedral と octahedral 構造を形成し (Figure 6)、IMP-1-citrate 複合体と同じであった (Figure 5a)。

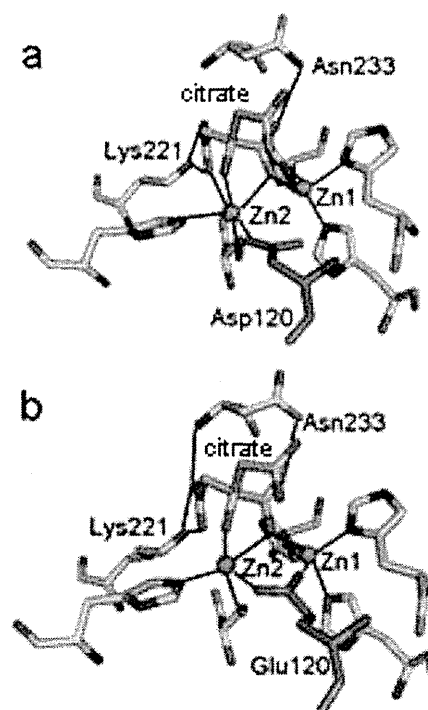


Figure 5. Active sites of (a) IMP-1 and (b) D120E in complex with citric acid. Molecule B of each citrate complex is only depicted. Zn(II) atoms are shown as orange spheres. His116, His118, His196, Lys 224, Asn233, His263, Asp120, and Cys221 residues and citrate are represented as sticks. The figure was prepared with PyMol software (<http://pymol.sourceforge.net/>).

Citrate の3つの C00⁻基は隣接の Phen62, Tyr67, Arg228 と Asn233 と疎水性相互作用

ならびに水素結合している。この点が IMP-1-citrate 複合体や D120E-citrate 複合体と大きく異なっている。

以前、我々は VIM-2-阻害剤複合体の X 線結晶構造を報告した[J. Med. Chem. 50, 6647-6653 (2007)]。野生型 VIM-2 構造[Garcia-Saez et al. J. Mol. Biol. 375, 604-611 (2008)]との比較から、Arg228 と Asn233 残は基質または阻害剤の認識と取り込みに重要な働きを担っていることを明らかにした。IMP-1-citrate 複合体や D120E-citrate 複合体では、citrate は Lys221 と Asn233 と水素結合しているが、VIM-4 では 221 位は His に置き換わっている。従って VIM-4 の His221 の側鎖は IMP-1 や D120E の Lys221 に比べ短いため、活性中心に結合している citrate の COO⁻基と結合できないことがわかった。そのため、VIM-4 の Asn233 残基が IMP-1 や D120E の Lys221 の代わりに基質または阻害剤の認識・取り込みの役割を担っていることが明らかとなった。

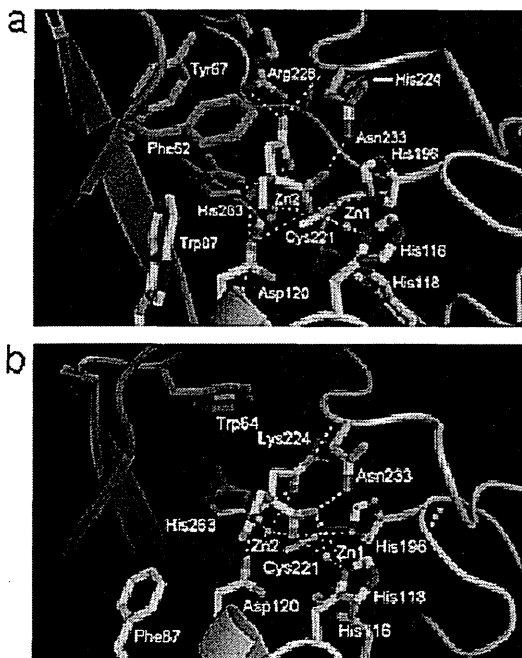


Figure 6. Active site comparisons of (a) VIM-4 and (b) IMP-1 (complexed with citrate). Zn(II) atoms are shown as spheres. The figure was prepared with PyMol software (<http://pymol.sourceforge.net/>).

D. 結論

我々は IMP-1 の 120 位のアスパラギン酸をグルタミン酸に置換した変異体 D120E の citrate 複合体の X 線結晶構造を 1.9Å の分解能で決定した。IMP-1-citrate 複合体の結晶構造の比較から、アスパラギン酸とグルタミン酸では活性中心の Zn(II) イオンの配位構造が異なっていることがわかった。しかしながら、IMP-1-, D120E-, VIM-4-citrate 複合体においても、citrate の Zn(II) への配位様式は全く同じであることがわかった。

本研究の成果は citrate のような polycarboxylate 化合物は全てのメタロ-β-ラクタマーゼに有効な阻害剤のリード化合物になり得ると考えられる。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Yamaguchi Y, Matsueda S, Matsunaga K, Takashio N, Toma-Fukai S, Yamagata Y, Shibata N, Wachino J, Shibayama K, Arakawa Y, Kurosaki H. Crystal structure of IMP-2 metallo-β-lactamase from *Acinetobacter* spp. Biol. Pharm. Bull. 38(1), 96-101 (2015).

2. 学会発表

1) Crystal structure of IMP-2 metallo-β-lactamase from *Acinetobacter* spp.

Hiromasa Kurosaki, Yoshihiro Yamaguchi, Sachiko Toma-Fukai, Yuriko Yamagata, Naohiro Shibata, Jun-ichi Wachino, Keigo Shibayama, Yoshichika Arakawa

第 13 回あわじしま感染症・免疫フォーラム in 奈良(2014/09/23-36)

G. 知的財産権の出願・登録状況

- | | |
|-----------|------|
| 1. 特許取得 | 該当なし |
| 2. 実用新案登録 | 該当なし |
| 3. その他 | 該当なし |

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

地方衛生研究所における薬剤耐性菌等に関する細菌学的、疫学的調査解析機能の強化に関する研究
「アシネトバクター属菌の鑑別法に関する研究」

研究分担者 佐多徹太郎（富山県衛生研究所）
研究協力者 綿引 正則（富山県衛生研究所）
研究協力者 清水美和子（富山県衛生研究所）
研究協力者 八柳 潤（秋田県健康環境センター）
研究協力者 鈴木 匡弘（愛知県衛生研究所）

研究要旨

Acinetobacter 属菌、特に *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex (ACBC) を構成する 4 つの *genospecies* (*A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. pittii*, *A. nosocomialis*) を迅速に鑑別する遺伝子検査法を検討した。昨年度は、*rpoB* 遺伝子を対象とした MultiplexPCR 法を考案し、*A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis* を鑑別することが可能となったことを報告した。今年度は、この方法の有用性を評価するため、引き続き県内医療機関から分離された ACBC 40 株について検討した。また、本鑑別法の客観的な評価を得るため他の研究機関への評価を依頼し、28 株の ACBC を用いて検討した。その結果、ACBC 構成菌種の鑑別能は *rpoB* 配列による系統解析結果とよく一致した。従って、実用レベルの鑑別法として使用できると思われる。

A. 研究目的

地方衛生研究所（地研）は、公衆衛生領域で発生する様々な健康危機事例に際し、検査を通じて科学的エビデンスを提供し、健康危機事例の早期探知や拡大防止に資することを目的の一つとする。従って、近年問題となりつつある医療関連機関における薬剤耐性菌の広がりに対して、地研の役割が期待されるなかで、検査機能の強化が望まれている。

アシネトバクター属菌は、ブドウ糖非発酵グラム陰性短桿菌で、ヒトに病原性を示す菌種としては *Acinetobacter baumannii* がよく知られている。さらに、ヒトに対して感染症を起こす可能性がある *A. calcoaceticus*, *A. genospecies 13TU* (以下、*A. nosocomialis*)、*A. genospecies 3* (以下、*A. pittii*) とは、ほぼ同様な生化学的性状を示すため、医療機関等で汎用さ

れている自動同定機器や一般の検査法では正しく鑑別することは難しく、そのため *A. calcoaceticus-baumannii* complex (ACBC) と呼ばれている。さらに、アシネトバクター属菌は高い形質転換能をもち外来遺伝子を取り込むシステムを有していることに関連して、*A. baumannii* の多剤耐性化と医療機関でしばしば検出される *A. nosocomialis* や *A. pittii* との関連性など不明な点が多いのも事実である。アシネトバクター属菌は、医療機関内で院内感染や日和見感染を起こすことが知られており、特に *A. baumannii* は多剤耐性化しやすく、しばしば集団発生による死亡例も報告されている。このような中で 2011 年 1 月、薬剤耐性アシネトバクターは感染症法の 5 類感染症(定点)に追加され、また、2014 年 9 月には全数報告対象感染症となり、報告基準が設けられた。従って、*A. baumannii* の院

内対策をするうえで、アシネトバクター属菌の分離状況を把握することは重要である。それには、ACBC 構成菌種を簡便に鑑別する方法が必要である。

アシネトバクター属菌は、DNA-DNA 分子交雑法で区別された遺伝子型 (genospecies) で歴史的には分類されており、ACBC は生化学的性状での鑑別が難しいため、遺伝子型による簡便な鑑別法が利用されている。例えば blaOXA51-like を検出するアシネトバクター属菌は、*A. baumannii* とほぼ判定できる。しかし、この方法は極めて簡便ではあるが、細菌の鑑別法としての意味づけは不明である。また、16SrRNA 配列による分類も DNA-DNA 分子交雑法による分類には及ばず、極めて近縁な細菌の鑑別法として、蛋白質をコードしている遺伝子配列の多型を利用した鑑別法が開発されており、その対象遺伝子は、*recA*, *gyrB*, *rpoB* などがよく利用される。

本研究では、ACBC を構成する上記 4 つの菌種を迅速に鑑別することを可能にする PCR ベースの方法を開発することを目的とし、当初は *gyrB* 配列を対象とし、その後アシネトバクター属菌の鑑別に有効であるとされる *rpoB* の配列多型を複数のプライマーで検出する Multiplex PCR 法を考案し、その鑑別能について昨年度、その有用性について報告した。最終年度の今年度は、さらに検討数を増やすことと、他の研究機関で本鑑別法の評価を依頼したのでその結果について報告する。

B. 研究方法

B-1 供試菌株および供試 DNA

富山県内の医療機関で分離され、自動細菌同定検査装置等で同定された *Acinetobacter* 属菌 42 株のうち、生育しなかった 2 株を除いた 40 株 (AcT071~078, 080~111) を対象とした (表 1)。また、愛媛県内で分離された同じく *Acinetobacter* 属菌 28 株 (E01~28) を本鑑別法の評価の

ために用いた (表 2)。

B-2. 培養と DNA 抽出

トリプチケースソイ寒天培地で生育させた新鮮コロニーの一部を 100 μ L 5% (W/V) キレックス 100 に懸濁し、100°C 10 分間処理を行い、遠心上清を分取し、TE 緩衝液を用いて 50ng/ μ L 濃度に希釈し、PCR の鋳型とした。保管は、凍結保管とした。

B-3. 感受性試験

富山県の医療機関で分離されたアシネトバクター属菌の薬剤感受性試験は、センシディスク (日本ベクトン・ディッキンソン) を用い、判定はディスクの判定法に従った。使用した 12 ディスクは以下の通りである: セフトキサシム (CTX), セフトジジム (CAZ), イミペネム (IPM), メロペネム (MEPM), アズトレオナム (AZT), セフェピム (CFPM), ピペラシリン (PIPC), アミカシン (AMK), シプロフロキサシン (CPFX), ミノサイクリン (MINO), コリスチン (CL), スルフィソキサゾール (G. 25)。

B-4. PCR と DNA sequencing

供試菌株から抽出した DNA を用いた PCR は、blaOXA51-like、blaOXA23-like 及び integron マーカーである integrase 遺伝子を検出するプライマーを用いて実施した (プライマー配列等、昨年の報告書に記載)。PCR は、QIAGEN Multiplex PCR Kit (Qiagen, Inc.) を用いて、増幅産物は、1.5%アガロース S (ニッポンジーン) で電気泳動し、臭化エチジウムで染色、脱色後、写真撮影した。

ACBC 鑑別 PCR は、KODFX (Toyobo) を使用し、プライマーセットは MC-6/MD-6 を用いた (図 1)。増幅産物の検出は、2% NuSieve®3:1 Agarose (Takara) で電気泳動し、臭化エチジウムで染色、脱色後、写真撮影した。

*rpoB*の部分配列決定は、昨年度の報告と同様、La Scolaらの報告

(J. Clin. Microbiol., 44:827-832, 2006)を参照して、*rpoB*内の Zone1 及び Zone2 の配列解析を行った。配列決定用の鋳型調製は、PCR 後、増幅物を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)を用いて精製し、これを鋳型として、BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit Ver3.1を用いて解析した。得られたデータは、Sequencher[®]で塩基配列の品質チェック、トリミング後、Web ベースの Blast 検索を実施し、菌種を推定し、*rpoB* 塩基配列による鑑別結果とした。

(倫理面への配慮)

本研究は、患者情報を切り離した臨床分離株のみを用いているため、倫理上の問題は発生しない。

C. 研究結果

C-1. 富山県内の医療機関で分離されたアシネトバクター属菌を用いた PCR 鑑別結果

今年度、富山県の医療機関に協力を依頼し、アシネトバクター属菌の収集した 40 株を用いて、MC-6/MD-6 混合プライマーを用いた PCR を実施した。供試した 40 株の薬剤感受性試験、PCR による遺伝子保有状況、及び *rpoB* 配列による菌種の同定結果を示した (表 1)。

まず、感受性試験の結果であるが、すべての株でカルバペネム (IPM, MEPM) に感性、ニューキノロン (CPFX) には 39 株が感性で、1 株のみ耐性を示していた。また、21 株がアズトレオナム (AZT) に耐性を示した。この 40 株について、*rpoB* 配列から同定された株の分離頻度は、*A. baumannii*, 20/40 (50%); *A. nosocomialis*, 4/40 (10%); *A. pittii*, 8/40 (20%); *A. spp.*, 8/40 (10%) であり、*A. spp* 株の内訳は、*A. soli*, 2/40 (5%) で、残りは *A. guilloulae*, *A. ursingii*, *A.*

guilloulae, *A. heamolyticus* が一株ずつで、残りの 3 株については、*A. spp* のままであった (図 2、表 1)。

rpoB 配列の同定結果と PCR での鑑別結果を比較すると、ACBC に限定した結果を示すと、*A. baumannii*, *A. nosocomialis* については、完全に一致していた。しかし、8 株のうち 2 株の *A. pittii* は、PCR では明確に *A. pittii* とは判断できなかった。また、今年度、*A. calcoaceticus* は、分離されなかった。

ここで、*rpoB* 配列で *A. pittii* と判定し、PCR では *A. spp* と判定された 2 株 (AcT082 及び AcT092) について検査結果を見てみると (図 3)、ここでは、AcT092 の例のみを示したが、典型的な *A. pittii* では、反応 B で、約 700bps と 130bps に増幅産物が検出される (AcT091) が、AcT092 では、反応 A に 130bps 付近に増幅物が検出されるが、700bp 付近に増幅物が検出されず、典型的な *A. pittii* のパターンとは異なるものであった。また、*rpoB* 配列の Blast 検索を行ったところ、AcT091 と AcT092 は、結果は同一でなかった (図 3)。

C-2. 愛媛県内の医療機関で分離されたアシネトバクター属菌を用いた PCR 鑑別結果

愛媛県内で分離された *Acinetobacter* 属菌 28 株を用いて、本鑑別法で評価した。

まず、感受性試験の結果であるが、カルバペネム (MEPM) に耐性、ニューキノロン (CPFX) に耐性株が 1 株検出された。この株は、その他 CTX, CAZ, AZT, CFPM, PIPC, G. 25 に耐性を示した。残りの 27 株はほとんどの薬剤に対して感性であった。

この 28 株について、*rpoB* 配列から同定された株の分離頻度は、*A. baumannii*, 19/28 (68%); *A. nosocomialis*, 1/28 (3.6%); *A. pittii*, 4/28 (14%); *A. spp.*, 4/28 (14%) であり、*A. spp* 株の内訳は、*A. soli*, 2/28 (7.1%) と *Acinetobacter* GS13B と *A. heamolyticus* が一株ずつであった (図

4、表2)。

rpoB 配列の同定結果と PCR での鑑別結果を ACBC に限定して比較すると *A. baumannii*, *A. nosocomialis* 及び *A. pittii* については、完全に一致していた。

D. 考察

A. baumannii 以外で市中感染及び医療関連感染の原因としてこれまで報告があるのは、*A. lwoffii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis*, *A. ursingii*, *A. johnsonii* や *A. soli* 等である。しかし、*A. baumannii* 以外で多いのは、ACBC であり、ACBC に含まれる *A. calcoaceticus* はほとんど医療機関から分離されないことから、医療機関で鑑別の必要な菌種は、*A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis* である。

そこで、*rpoB* 配列を用いると *Acinetobacter* 属菌が鑑別できることを利用して、塩基配列決定を行わないで同定できる方法を検討した。その結果、昨年度の報告書において、*rpoB* を対象とした Multiplex PCR 法を開発し、その型別能力を検討したところ、*A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis* について、迅速な鑑別が可能であることを示した。今年度はさらにこの方法を評価するため、富山県と愛媛県で分離された株で評価した。その結果、*rpoB* 配列結果と PCR の結果はほぼ相関することが確認された。

今年度の検査結果から、*rpoB* 配列では *A. pittii* であったが、PCR 法では *A. spp* となった2株が検出された。しかし、この結果をよく検討すると、非典型的な *A. pittii* であることが分かった (図3)。*rpoB* 配列の Blast 検索の結果から、典型的な *A. pittii* の配列とは異なっており、*A. spp* と判定が正解と思われた。この株は、*A. pittii* の variant 株の可能性はあるが、これを明らかにするためにはさらに解析が必要である。

また、*Acinetobacter* 属菌の分離割合をみると、富山県では本年の解析数40株と昨

年の解析株の合計109株のうち、*A. baumannii* は、41.3%で、ほとんどの薬剤に感性であり、現在、薬剤耐性となりやすいとされる *A. baumannii* 内の遺伝系統と知られている international clone II (ICII) は、含まれていない可能性がある (未実施)。別の全国調査によると *A. baumannii* の分離率は74%であるとされており、また愛媛県ではニューキノロンとカルバペネム耐性株が一株分離されているが、*A. baumannii* の分離率は68%であった。このことから、*A. baumannii* の分離率が高いほど、高度な薬剤耐性菌とされる ICII の系統が入り込んでいることが示唆される。今後、更なる調査が必要である。

E. 結論

ACBC 構成アシネトバクター属菌を PCR で鑑別する実用的な方法を開発し、その有用性を評価した。

今回、開発した ACBC 構成菌種の鑑別法は、医療機関で分離される、*A. calcoaceticus* 以外の3種が対象である。わずかに非典型株の存在のため、*rpoB* 配列の解析が必要となる場合もあるが、今回の鑑別法は、迅速な方法として有用であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

4. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 綿引正則、清水美和子、金谷潤一、木全恵子、磯部順子、松井真理、鈴木匡弘、荒川宜親、柴山恵吾、佐多徹太郎。*A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex (ACBC) の PCR による同定法開発の試み。第88回日本感染症学会学術講演会、平成26年6月18日~20日 (福岡市)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

の仙波敬子先生には、今回開発した検査法について、評価試験にご協力を頂きました。ここに感謝の意を表します。

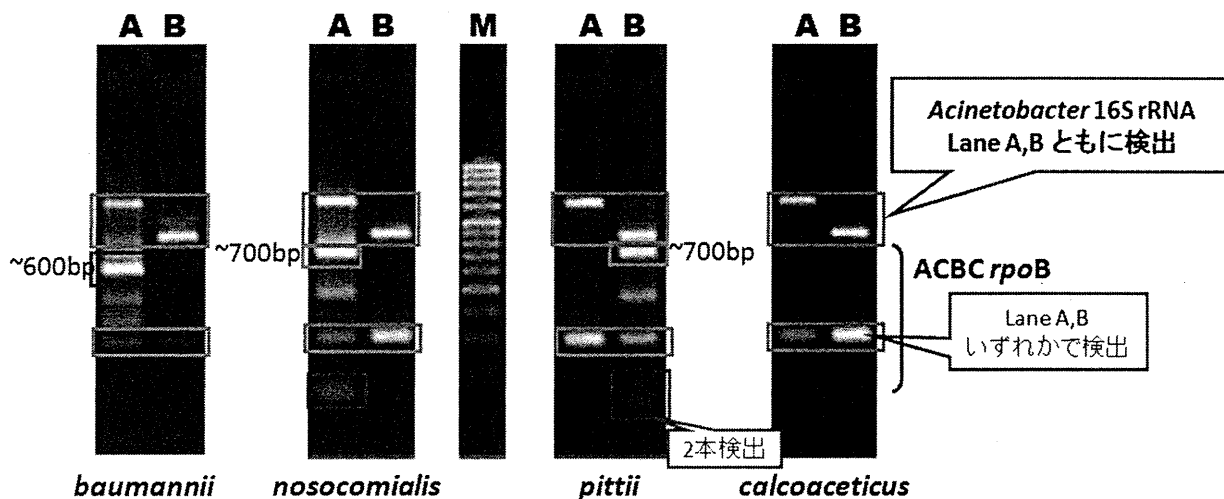
I. 謝辞

愛媛県立衛生環境研究所・微生物試験室

MC-6/MD-6を用いたACBC構成4菌種の鑑別点:まとめ

Lane A: preference reaction for *A. baumannii* or *nosocomialis*

Lane B: preference reaction for *A. pittii* or *calcoaceticus*



本法のPCRは、KODFX(Toyobo)を使用

鑑別点:

- ① PCR (lane) A 及び B ともに 16S rRNA 由来の増幅サイズが異なる増幅物が検出されること。
- ② *A. baumannii* と *A. nosocomialis* は、PCR(lane)A の増幅物で以下のとおり、判定する。
 - ・ 600bp が検出されれば、*A. baumannii* と判定
 - ・ 700bp と 130bp 付近に増幅物があれば、*A. nosocomialis* と判定
- ③ *A. pittii* は、PCR(lane)B の増幅物の有無で判定する。
 - ・ 700bp と 130bp 付近に増幅物があれば、*A. pittii* と判定
 - ・ *A. calcoaceticus* は、今のところ判定できない。

図1. MC-6/MD-6 プライマーセットを用いた ACBD 構成 4 菌種の鑑別点

平成25-26年度 医療機関分離ACBC 109株の同定結果(富山県)

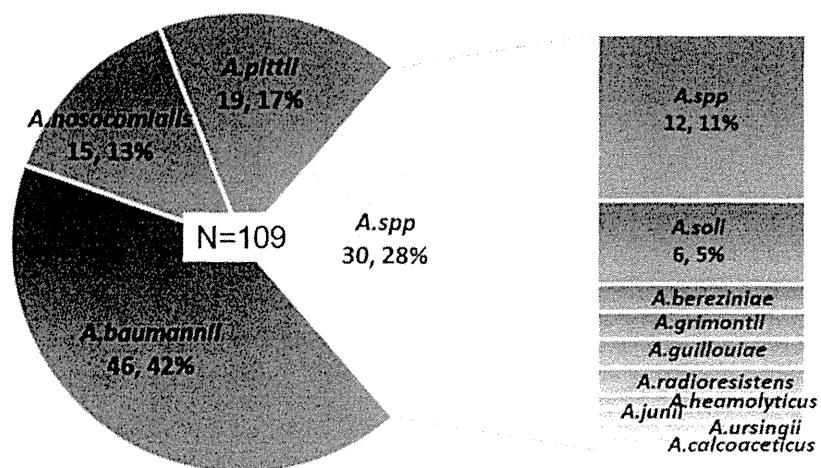
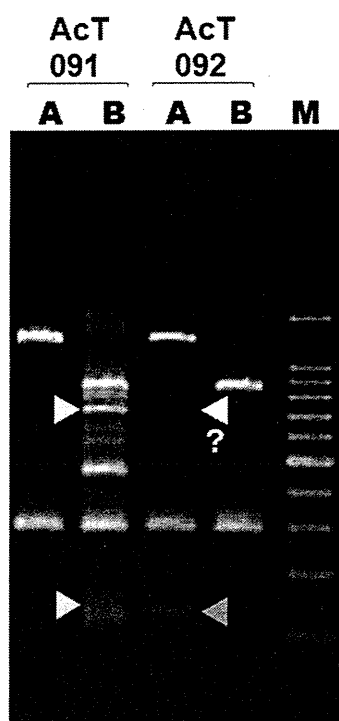


図2. 平成25-26年に富山県の医療機関から分離されたACBC株の同定結果

PCR判定とrpoB配列の不一致例 (AcT082, 092)



rpoB PCRの判定

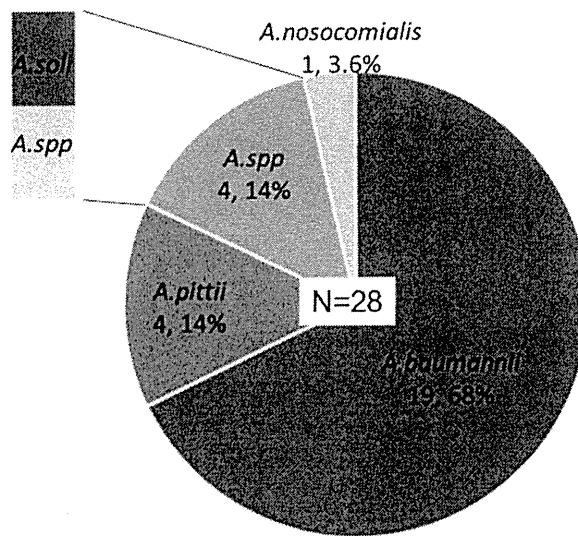
AcT091: 典型的なpittiiパターン
rpoB配列もpittiiと一致
AcT-92: 非典型的nosocomialis?
rpoB配列はpittiiにヒット

rpoB sequenceとのblast結果

AcT091: Identities=861/861(100%)
pittiiと一致
AcT092: Identities=842/867(97%)
pittiiと判定

- 配列の多型を検出: PCRの限界

図3. PCR判定とrpoB配列解析による鑑別結果の不一致例



- baumanniiの分離率は、68%と全国データ (74%) に近い。
- 二剤耐性 (MEPM&CPFX) のbaumanniiが1株分離されている。

図4. 平成26年に愛媛県の医療機関から分離されたACBC株の同定結果

表 1

平成26年度 医療機関分離ACBC 40株の同定結果(富山県)

菌株ID	使用薬剤ディスク											OXA51遺伝子		tpoB遺伝子	
	CTX	CAZ	IPM	MEPM	AZI	CFPM	PPC	AMK	CFEX	MIND	CI	G-25	PCR	sequencing	
ACT070															
	no growth														
ACT071	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	
ACT072	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	
ACT073	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	
ACT074	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	
ACT075	I	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	-	A.spp	
ACT076	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	-	A.spp	
ACT077	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	
ACT078	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	
ACT079															
	no growth														
ACT080	I	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	-	A.spp	
ACT081	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	
ACT082	I	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	-	A.spp	
ACT083	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	
ACT084	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	
ACT085	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	A.spp	
ACT086	I	I	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	A.spp	
ACT087	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	
ACT088	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	A.nosocomialis	
ACT089	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	
ACT090	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	A.nosocomialis	
ACT091	I	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	-	A.pittii	
ACT092	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	A.spp	
ACT093	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	
ACT094	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	
ACT095	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	
ACT096	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	
ACT097	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	-	A.pittii	
ACT098	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	
ACT099	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	
ACT100	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	+	A.baumannii	
ACT101	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	-	A.pittii	
ACT102	I	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	-	A.pittii	
ACT103	I	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	-	A.spp	
ACT104	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	A.nosocomialis	
ACT105	I	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	-	A.nosocomialis	
ACT106	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	
ACT107	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	
ACT108	I	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	-	A.pittii	
ACT109	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	A.spp	
ACT110	I	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	-	A.pittii	
ACT111	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	-	A.spp	

表 2

平成26年度 医療機関分離ACBC 28株の同定結果(愛媛県)

菌株ID	使用薬剤ディスク												OXAS1遺伝子		rpoB遺伝子	
	CTX	CAZ	IPM	MEPM	AZT	CFPM	PIPC	AMK	CPFX	MINO	CL	G.25	PCR	PCR	sequencing	
E01	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	+	<i>A.baumannii</i>	<i>A.baumannii</i>	
E02	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	+	<i>A.baumannii</i>	<i>A.baumannii</i>	
E03	S	S	S	S	I	S	S	I	S	S	S	S	+	<i>A.baumannii</i>	<i>A.baumannii</i>	
E04	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	-	<i>A.spp</i>	<i>A.soli</i>	
E05	S	S	S	S	I	S	S	I	S	S	S	S	+	<i>A.baumannii</i>	<i>A.baumannii</i>	
E06	I	S	S	S	I	S	S	I	S	S	S	S	+	<i>A.baumannii</i>	<i>A.baumannii</i>	
E07	I	S	S	S	I	S	S	I	S	S	S	S	+	<i>A.baumannii</i>	<i>A.baumannii</i>	
E08	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	-	<i>A.spp</i>	<i>A.soli</i>	
E09	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	+	<i>A.baumannii</i>	<i>A.baumannii</i>	
E10	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	+	<i>A.baumannii</i>	<i>A.baumannii</i>	
E11	I	S	S	S	I	S	S	I	S	S	S	S	+	<i>A.baumannii</i>	<i>A.baumannii</i>	
E12	I	S	S	S	I	S	S	I	S	S	S	S	+	<i>A.baumannii</i>	<i>A.baumannii</i>	
E13	I	S	S	S	I	S	S	I	S	S	S	S	+	<i>A.baumannii</i>	<i>A.baumannii</i>	
E14	I	S	S	S	I	S	S	I	S	S	S	S	-	<i>A.nosocomialis</i>	<i>A.nosocomialis</i>	
E15	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	+	<i>A.baumannii</i>	<i>A.baumannii</i>	
E16	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	-	<i>A.pittii</i>	<i>A.pittii</i>	
E17	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	<i>A.spp</i>	<i>A.spp</i>	
E18	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	+	<i>A.baumannii</i>	<i>A.baumannii</i>	
E19	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	<i>A.baumannii</i>	<i>A.baumannii</i>	
E20	S	S	S	S	I	S	S	I	S	S	S	S	+	<i>A.baumannii</i>	<i>A.baumannii</i>	
E21	I	S	S	S	I	S	I	I	S	S	S	S	+	<i>A.baumannii</i>	<i>A.baumannii</i>	
E22	R	R	S	R	R	R	R	S	R	I	S	R	+	<i>A.baumannii</i>	<i>A.baumannii</i>	
E23	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	<i>A.pittii</i>	<i>A.pittii</i>	
E24	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	<i>A.baumannii</i>	<i>A.baumannii</i>	
E25	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	<i>A.pittii</i>	<i>A.pittii</i>	
E26	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	<i>A.pittii</i>	<i>A.pittii</i>	
E27	I	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	+	<i>A.baumannii</i>	<i>A.baumannii</i>	
E28	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	R	S	-	<i>A.spp</i>	<i>A.GS13B</i>	

地方衛生研究所における薬剤耐性菌等に関する細菌学的、疫学的調査解析機能の強化に関する研究 研究協力報告書「アシネトバクター属菌の感染疫学解明に関する研究」

研究分担者 佐多徹太郎（富山県衛生研究所）
研究協力者 八柳 潤（秋田県健康環境センター）
研究協力者 鈴木 匡弘（愛知県衛生研究所）
研究協力者 綿引 正則（富山県衛生研究所）

研究要旨

国内におけるアシネトバクター属菌の感染疫学に関する知見を得ることを目的とした。*A. baumannii* の次世代シーケンサーを使用した全ゲノム解析データに基づいた *A. baumannii* International Clone II (IC II) の SNP 系統樹解析と *A. baumannii* の薬剤耐性遺伝子の検索を実施した。SNP 系統樹解析により MDRA が他の *A. baumannii* IC II クラスターに属する株と異なる起源と感染疫学を持つ可能性が示唆された。院内感染防止策構築の基礎となる MDRA の感染疫学に関して、今後さらなる調査が必要である。

A. 研究目的

アシネトバクター (*Acinetobacter*) 属菌は自然環境中に広く分布し、同じ、非発酵菌である緑膿菌と同様にしばしば院内感染を惹起する。さらに、緑膿菌と異なり湿潤環境のみならず、乾燥状態にも耐えることから、ひとたび病院環境内に定着した場合、その除去は容易ではない。

2008 年秋から 2009 年 1 月に福岡大病院で多剤耐性アシネトバクター (MDRA) の院内感染が発生し、26 人が感染し 4 人が死亡するという院内感染事例が発生し、平成 22 年 2 月には帝京大学医学部附属病院で入院患者 46 名が多剤耐性アシネトバクターに感染し、死亡者が計 27 名となる深刻な健康被害が発生した。このように、国内では多剤耐性アシネトバクターによる、深刻な健康被害を伴う院内感染が既に発生していることから対策を講じる必要があるが、国内におけるア

シネトバクター属菌の感染疫学に関する知見は極めて乏しいことが対策構築上の問題である。

本研究は、国内におけるアシネトバクター属菌の感染疫学に関する知見を得ることを目的として 24 年度から実施した。研究初年度である 24 年度は、秋田県と愛知県の医療機関において分離されたアシネトバクター属菌の菌種同定と薬剤感受性について検討し、*A. baumannii*、*A. pittii*、*A. nosocomialis*、*A. calcoaceticus*、*A. sp. Close to 13TU* の分離頻度が高いことを明らかにした一方、秋田県と愛知県で菌種分布に明瞭な違いがあることを示し、地域に特有の感染疫学が存在している可能性を指摘した。MDRA は確認されなかったものの *A. baumannii* には 5 剤以上の薬剤耐性を獲得した株が認められること、*A. baumannii* 以外のアシネトバクター属菌では比較的薬剤耐性株が少ないこ

とを明らかにした。さらに、MLST 解析により愛知県には耐性傾向が強いといわれる International clone II (IC II)が存在していることも示し、これまで殆ど明らかになっていない国内におけるアシネトバクター属菌の感染疫学の一端を明らかにすることができた。

今年度は次世代シーケンサーを使用した全ゲノム解析データに基づいた *A. baumannii* IC II の系統樹解析を行い、国内におけるアシネトバクター属菌の感染疫学に関する知見を集積した。さらに、次世代シーケンサーを使用して *A. baumannii* の薬剤耐性遺伝子を検索した。

B. 研究方法

1. 全ゲノム解析による系統樹解析と薬剤耐性遺伝子の検索

愛知県で分離された 9 株および秋田県で分離された 8 株の *A. baumannii* IC II を供試し、次世代シーケンサー (Illumina MiSeq) を使用して全ゲノム解析を行った。得られたデータと、感染症研究所で解析した MDRA 3 株のデータ、GenBank に登録された国内外の株のデータを併せて single nucleotide polymorphisms (SNP) による系統樹解析を行った。系統樹解析は MUMmer (Genome Biology, 5:R12, 2004) を用いた SNP 抽出、RAxML (Bioinformatics, btu033, 2014) による系統樹解析、MEGA6 (Molecular Biology and Evolution 28: 2731-2739, 2011) による系統樹描画の手順で行った。また、ResFinder 2.1 (<http://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) により薬剤耐性遺伝子の検索を実施した。

2. 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は KB 法により実施した。供試薬剤はセフトキシム (CTX),

セフトジジム (CAZ), イミペネム (IPM), メロペネム (MEPM), アズトレオナム (AZT), セフェピム (CFPM), ピペラシリン (PIPC), アミカシン (AMK), シプロフロキサシン (CPFX), ミノサイクリン (MINO), コリスチン (CL), スルフイソキサゾール (G) とした。

C. 研究結果

全ゲノム解析による系統樹解析と薬剤耐性遺伝子の検索

愛知県で分離された 9 株の *A. baumannii* International Clone II、秋田県で分離された 8 株の *A. baumannii* IC II、感染症研究所で解析した MDRA 3 株、そして国内外で報告されたデータを併せて作成した SNP 系統樹を図 1 に示した。国内で分離された *A. baumannii* IC II は愛知株、秋田株と共に同一のクラスターに分類され、これらが非常に近縁な株であることが明らかとなった。また、秋田県と、愛知県由来株は各県内由来株によるサブクラスターを形成していた。これに対して、感染症研究所で解析した MDRA はこれらとはやや距離が離れたクラスターに分類されることが明らかとなった。一方、海外で分離された株については、系統樹の外周に位置する多彩な距離に分類され、国内株とは遺伝的な隔たりが大きいことが示された。

全ゲノム解析に供試した 17 株の *A. baumannii* の KB 法による感受性試験結果 (表 2) と薬剤耐性遺伝子の一覧 (表 3) を示した。全ての分離株が CTX、CAZ、PIPC、CPFX 耐性であった。また、愛知県で分離された 11H01 株は CL を除く 11 剤に耐性を示し、多剤耐性アシネトバクターであった。この株は OXA-23 を保有していた。ResFinder による検索では OXA-51like (OXA-66, OXA-83) も含め