

【第48回 小島三郎記念文化賞】

病原細菌が獲得した新規薬剤耐性機構
(16S リボゾーマル RNA メチラーゼ) に関する体系的研究An Outline of New Molecular Mechanisms (16S rRNA Methyltransferases)
Acquired by Pathogenic Bacteriaあら かわ よし ちか
荒 川 宜 親
Yoshichika ARAKAWA

はじめに

2010年にインドやパキスタン地域を訪れ英国に帰国した多くの人々から、多剤耐性を獲得した肺炎桿菌や大腸菌が分離され、世界的に大きな関心事となった^{1,2)}。これらの分離株は、NDM-1と呼ばれる新型のメタロ-β-ラクタマーゼ (MBL) を産生しカルバペネムを含む多くのβ-ラクタム薬に耐性を示すため、今後の拡散が危険視されているが、NDM-1等のMBL産生株の多くは、同時に16SリボゾーマルRNAメチラーゼ (16S-RMTase) も産生しており³⁾、広範囲のアミノ配糖体系抗生物質に対しても、高度耐性を示す点が警戒されている。

I. 16S リボゾーマル RNA メチラーゼとは

16SリボゾーマルRNAメチラーゼとは、細菌のタンパク合成の装置であるリボゾームを構成する30Sリボゾームサブユニットの中に存在する16S rRNA (図1) をメチル化する酵素である。酵素学的には、

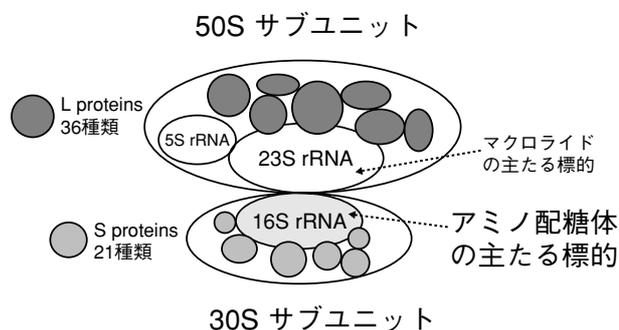


図1 細菌のリボゾームの模式図

16SリボゾーマルRNAメチルトランスフェラーゼとも呼ばれるが、本稿では、16S-RMTaseと省略する。

a. 16S-RMTaseの種類

細菌の細胞内で30Sリボゾームが、その構成要素である種々の蛋白やRNAから組み立てられてゆく過程で、16S rRNAの特定の箇所をメチル化することにより、30Sリボゾームの立体構造や機能の安定化等に寄与する一群の16S-RMTasesが知られている。たとえば、大腸菌のRsmGやYhiQ (RsmJ)などがその例である。一方、放線菌などアミノ配糖体系物質 (AG) を産生する菌種や菌株では、自らが産生したAGによって、自己のリボゾームの機能が損なわれないように、30Sリボゾーム中の16S rRNAの1405番のGあるいは1408番のAをメチル化する酵素を生来産生している。前者の例としては、KgmB (*Streptomyces tenebrarius*)、後者の例としては、KamA (*Streptomyces tenjimariensis*)などが知られている。しかし、2003年以降、腸内細菌科やブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌等のさまざまな菌種において、プラスミド媒介性の16S-RMTaseを産生し、各種のAGに耐性や抵抗性を獲得した臨床分離株の出現が相次ぎ、大きな関心事となっている⁴⁾。

b. 16S-RMTaseの機能と構造

16S-RMTasesの多くは、メチル基供与体としてS-アデノシルメチオニオンを用い、rRNAの塩基の側鎖のNをメチル化する⁵⁾。AG耐性に関与する16S-RMTasesは、1405番目のGのN7や1408A番目のN1をメチル化する (図2)。しかし、Sペプチドな

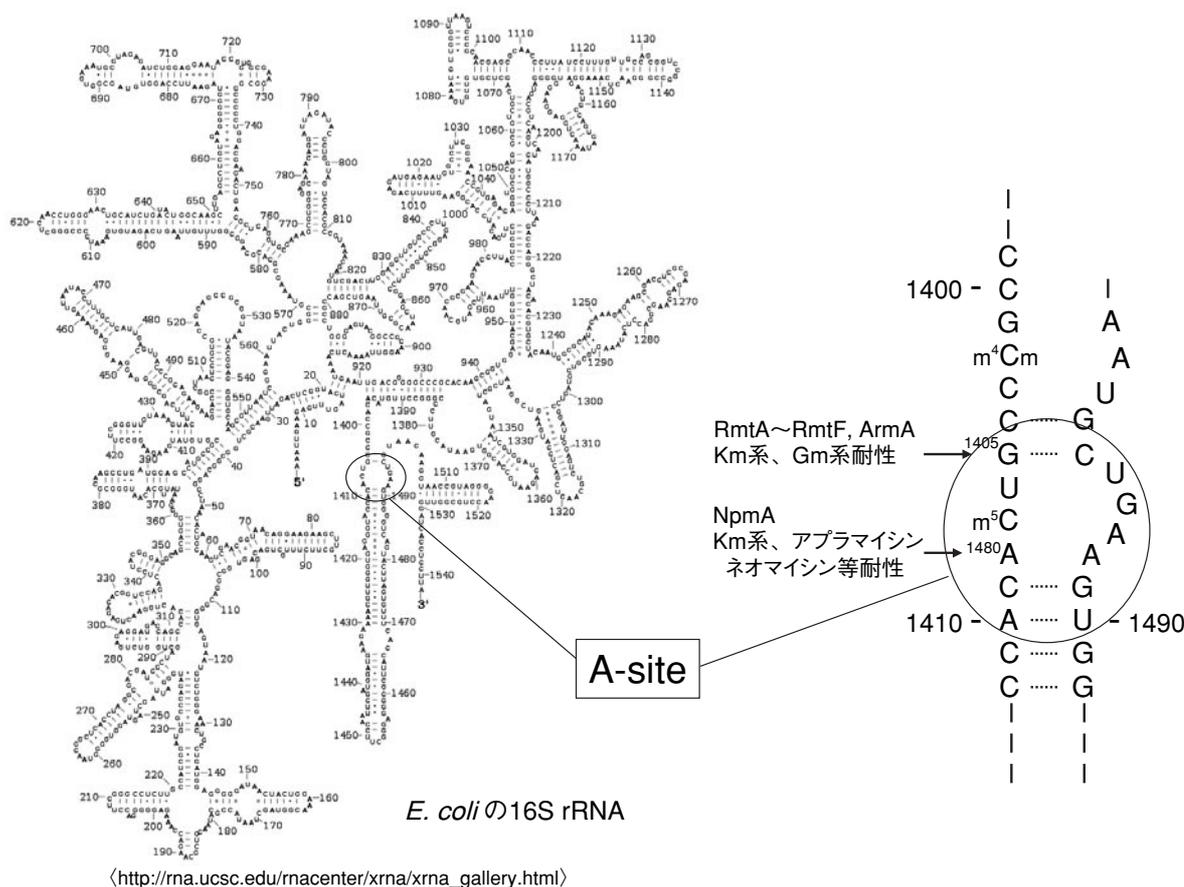


図2 細菌の16S rRNAのアミノ配糖体結合領域と、メチル化部位

どが取り外された裸の状態の16S rRNAをメチル化することはできず、完全な30Sリボゾームの状態でのみ、16S rRNAのA-siteの1405や1408番目の塩基をメチル化することができる。1405Gのメチル化酵素の産生株は、日常診療でよく用いられるゲンタマイシン系とカナマイシン系の双方のAGに高度耐性(MIC, > 512 μg/ml)を示すことが特徴である。一方、1408Aをメチル化する酵素を産生する株は、ゲンタマイシン系やカナマイシン系とともに、アプラマイシンやネオマイシン(=フラジオマイシン)など、分子構造がかなり異なる系列のAGにも耐性を示すことが特長である。

16S rRNAと21個のS proteinsから構成される完全な30Sリボゾームでのメチル化部位は、分子の表面からやや奥まった箇所であり、そこに到達できるようにするためか、アミノ配糖体耐性に関与する16S-RMTasesは、アミノ酸残基数で250~290個程度と比較的小型の酵素である。特に、1408Aをメチル化するプラスミド媒介性のNpmAや染色耐性のKamAは、アミノ酸残基数が219個と、1405Gメチ

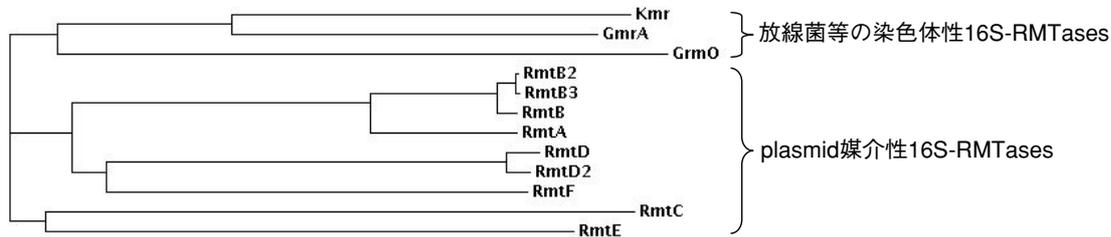
ル化酵素より、分子量がかなり小さいことが特徴である(図3)。

II. アミノ配糖体耐性に関与するプラスミド媒介性の16S-RMTases

現時点までに、腸内細菌科の菌種やブドウ糖非発酵グラム陰性菌が、伝達性プラスミド等による媒介などにより、外来性に獲得した16S-RMTasesは、大別すると7種類に及んでおり、それらが検出された菌種や地理的な分布を(表1)に示す。

a. RmtA

16S rRNAの1405Gをメチル化する酵素として、筆者らの研究グループが国内で分離された*Pseudomonas aeruginosa*より世界で最初に発見した⁶⁾。RmtAはこれまでのところ、*P. aeruginosa*でのみ検出されているが、そのような株は、多くは日本で分離されており、また、韓国でも多少の報告が出始め、最近、スイスでも分離が報告されている。



Kmr PEAIRTKALPKALGAHSSTRERLP-ILTEMYAEVFDRLDTPATVRDLACGMNPLVPMPLPAGT-TYLASDIDHRLMDFAGTVLALGV-PNRVEVRDLLTDPDPEPADVTFKFAVCP 205
 GmrA DEAVRAALRRAMSVHSTRELRP-HLAEFYQEIFRHVP-QPNTLRDLACGLNPLAAPMGLSDQT-VYVASDIDARLIGFVDAALTRLGV-AHRTSVVDLLEDRLDEPTDVTLLKTLPC 203
 RmtB2 -----VKKALSLHASTKERLA--ELDTLYDFIFSA-ETPRRVLDIACGLNPLALYE-RGVASV---WGCVDVHQGLGDVITPFAREKDW-DFTFALQDVLCPAPAEAGDLALIFKLLPL 178
 RmtB3 -----VKKALSLHASTKERLA--ELDTLYDFIFSA-ETPRRVLDIACGLNPLALYE-RGVASV---WGCVDVHQGLGDVITPFAREKDW-DFTFALQDVLCPAPAEAGDLALIFKLLPL 178
 RmtB -----VKKALSLHASTKERLA--ELDTLYDFIFSA-ETPRRVLDIACGLNPLALYE-RGIASV---WACDIHQGLGDVITPFAREKDW-DFTFALQDVLCPAPAEAGDLALIFKLLPL 178
 RmtA -----VQKALSLHASTKERLA--ELDTLYDFIFSG-GVPHRVLDIACGLNPLALFI-RDITSV---WACDIHQGLGDVITPFAREKDW-DFTFALQDVMCTPPTGDALALVFKLLPL 178
 RmtD -----WEALLGMHASTRERLPEVESMDRVFDQLFEASGTPARILDACGLNPVYL AHRLPNAAI---AGVDISGQCVNIRAFGGA-----EARLDLCEIPEDEADAALMFKVLP 175
 RmtD2 -----WEALLGMHASTRERLPEVESMDRVFDQLFEAIGTPARILDACGLNPVYL AHRLPNAAI---AGVDISGQCVNIRAFGGA-----EARLDLCEIPEDEADAALMFKVLP 175
 RmtF -----ALAAALSLHASTRERLP--GADEWMRRVSPFLGADARVLDLACGLNPILLGS-MGVTA---LGMDIHLGCVRLVNETARARGW-HTRARACDLLSETPAEADAALMFKVLP 187
 RmtC TEWEKEICLKLINLHTSTNERTV--AYDELQYKIFEVTVPTSDIAGCALNPFSPFFTEAGMLGQYIGFDLDKGMIEAIEHSLRNLNAPEGIVVKQGDILSDPSGESDILLMFKLYL 208
 RmtE -AQLIDITMQIMQSHSTKERLG--DIEAVCSFLSTHISKEGSVMDIGCGFNPLALLHEFPAT--YYAYDICEGINILNKYFSLKKGGEYRAELLDAVSVTPKPKVDVALLFKLLPL 193
 GrmO ---RRDWCRQVLGHFSTAERLP--DLDTFYPTLFLGVPVPPETVADIACALNPFVPLREVSDAR-YVGYDFNATFVELGNAFLARLTHP-ECEIRHEEVLTDGHRVSADLGLLLKTYHC 225

LEAQKGLGKLLDQINSPLVVSFPTKTLGRRSRGMYQTHSAEFARRVA-ERPWKCEIEFGDELVYVVTKG----- 277
 LETQRRGSGWEVIDIVNSPIIVVTFPTKSLGQRSGKMFQNSQSFESQAR-ERSCRITQRLIEIGNELIYVQK----- 274
 LEREQAGSAMALLQSINTPRMVASFPTRSLGGRGKGMENYAAWFEGGLP-TEFEIEDKKTIGTEL IYLKKN----- 251
 LEREQAGSAMALLQSINTPRMVASFPTRSLGGRGKGMENYAAWFEGGLP-TEFEIEDKKTIGTEL IYLKKN----- 251
 LEREQAGSAMALLQSINTPRMVASFPTRSLGGRGKGMENYAAWFEGGLP-AEFEIEDKKTIGTEL IYLKKN----- 251
 LEREQAGSAMALLQALATPRIAVSFPTRSLGGRGKGMENYAAWFEGALP-DEFEIEDKKTIGTEL IYVMIKRKN----- 251
 LERQRAGAAMDALMRVNAEIVASFPTRSLGGRNVGMEKHYSWMEAHVP-ENRAIAARLTGENELFYVLKRR----- 247
 LERQRTGAAMEALMRVNAEIVASFPTRSLGGRNVGMEKHYSWMEAHVP-ENRAIAARLTGENELFYVLKRR----- 247
 LEAQKTGRAEELASLRAPRLVVFPTRTLGGRGVMEKHYSWMEAHVP-DLTVSVDLTVSDELVYLVERT----- 259
 LDRQEEASGLKILQEWYKNAIVSFPTRSLGGRNVGMEKHYSWMEAHVP-DLTVSVDLTVSDELVYLVERT----- 281
 LQQQKKGKGFSTILEELDFDKAIVSFPTRSLGGRNVGMEKHYSWMEAHVP-DLTVSVDLTVSDELVYLVERT----- 273
 MEGRRPGAGLALVDRLACRHHVVSFPTRAMGRAAVFVPRHVEELAEALAR-DRGWSWSRATLASEDLVAIHKE----- 297

図3 1405Gをメチル化する16S-RMTasesの遺伝的関連性

表1 プラスミド媒介性の16S-RNTases

名称	DBへの登録年(分離年)	最初に分離された国(菌種)	論文報告年(報告者)	同時に保持されることが多い他の耐性遺伝子	これまでに産生が確認されている菌種	これまでに検出されている国や地域	その他
RmtA	2002 (1997)	日本 (緑膿菌)	2003 (Yokoyama K, et al.)	水銀耐性遺伝子	<i>P. aeruginosa</i>	日本、韓国、スイス	
ArmA	2002 (1996)	ポーランド (<i>C. freundii</i>)	2003 (Galimand, M, et al.)	<i>bla</i> _{CTX-M3} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>aacC2</i> , <i>aadA2</i> , <i>dfxA2</i> , <i>sul1</i> , <i>bla</i> _{NDM-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{SHV-12} , など多数	<i>C. freundii</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. enterica</i> , <i>P. stuartii</i> , <i>Providencia</i> sp., <i>P. aeruginosa</i> , <i>A. baumannii</i>	日本、韓国、中国、台湾、米国、スイス、英国、オマーン、スペイン、ポーランド、フランス、スウェーデン、ノルウェー、パキスタン、バングラデシュ、アフガニスタン、オーストラリア、マダガスカル、ギリシャ、ドイツ、他	牛、鶏、ブタなどから。 <i>ArmA</i> を産生する <i>E. coli</i> や <i>Salmonella enterica</i> が分離されている。
RmtB	2003 (2002)	日本 (<i>S. marcescens</i>)	2004 (Doi Y, et al.)	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>aadA2</i> , <i>qepA</i> , <i>bla</i> _{NDM-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{CMY-58} , <i>bla</i> _{kpc-2} , <i>bla</i> _{OXA-10} , <i>bla</i> _{VIM-1}	<i>S. marcescens</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>C. freundii</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>M. organii</i> , <i>L. adedcarboxylata</i> ,	日本、韓国、中国、米国、台湾、ブラジル、フランス、オーストラリア、ベルギー、バングラデシュ、ギリシャ、トルコ、エジプト、他	牛、鶏、ブタなどから。 <i>ArmA</i> を産生する <i>E. coli</i> などの腸内細菌科に属する各種の菌が分離されている。
RmtC	2004 (2003)	日本 (<i>P. mirabilis</i>)	2006 (Wachino J, et al.)	<i>aphA1</i> , <i>bla</i> _{NDM-1}	<i>P. mirabilis</i>	日本、インド、バングラデシュ、パキスタン、オーストラリア、ケニア、フランス、英国、米国	<i>S. enterica</i> Virchowが冷凍食品から分離されている
NpmA	2006 (2003)	日本 (<i>E. coli</i>)	2007 (Wachino J, et al.)		<i>E. coli</i>	日本	
RmtD	2006 (2005)	ブラジル (緑膿菌)	2007 (Doi J, et al.)	<i>bla</i> _{SPM-1}	<i>P. aeruginosa</i>	ブラジル、アルゼンチン、チリ	
RmtD2	2009 (2007)	アルゼンチン (緑膿菌)	2011 (Tijet N, et al.)	<i>cat</i> , <i>dfxA12</i> , <i>aadA2</i> , <i>sul1</i>	<i>P. aeruginosa</i>		
RmtE	2010 (不明)	米国 (<i>E. coli</i>)	2010 (Davis MA, et al.)	<i>aph</i> (3')-Ia, <i>aphA7</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i>	<i>E. coli</i>	米国	
RmtF	2012 (2011)	La Reunion島 (<i>K. pneumoniae</i>)	2012 (Galimand M, et al.)	<i>aac</i> (6')-Ib	<i>K. pneumoniae</i>	La Reunion島	

b. RmtB

RmtAと同様に1405Gをメチル化する酵素として、国内のヒトの臨床検体から分離された *Serratia marcescens* から最初に発見された⁷⁾。その後、世界各地からさまざまな菌種において発見が相次ぎ、現時点で、最も広範に拡散している16S-RMTasesの一つとなっている。ヒトのみならず家畜や食肉などからもRmtB産生菌が分離されている。また、一部のアミノ酸残基が置換したRmtB2やRmtB3などのヴァリエントが出現している。

c. RmtC

RmtAやRmtBと同様に1405Gをメチル化する酵素として、国内のヒトの臨床検体から分離された *Proteus mirabilis* から世界で最初に発見された⁸⁾。その後、インドなどで散発的に検出されていたが、2010年以降、国際的に問題となっている、NDM-1産生株の中に、RmtCを同時に産生する株が多数出現するようになり、欧州、北米、アフリカ、オセアニアなどで検出されている。また、サルモネラ属菌でも産生株が分離されている。

d. RmtD

RmtA～RmtCと同様に1405Gをメチル化する酵素として、ブラジルのヒトの臨床検体から分離された *P. aeruginosa* から最初に発見された⁹⁾。その後、南米地域を中心に検出されているが、これまでにRmtD1、RmtD2の2つのヴァリエントが確認されている。またMBLであるSPM-1産生株の中に、RmtDを同時に産生する株が多数分離されている。

e. RmtE

RmtA～RmtDと同じグループに属する酵素として、米国ワシントン州のウシから分離された *Escherichia coli* から最初に発見された¹⁰⁾。これまでのところ、ヒト由来株や他の地域の分離株からは検出されていない。

f. RmtF

RmtA～RmtEと同じグループに属する酵素として、マダガスカル島沖の島のヒト臨床検体から分離された *K. pneumoniae* で最初に発見された¹¹⁾。2012

年のICAACでは、インド等でもRmtF産生株が分離されているとの情報が交換されていた。

g. RmtG

RmtA～RmtFと同じグループに属する酵素として、新たにブラジルで検出されたとの情報があるが、現時点では、詳細は不明である。

h. ArmA

1996年にポーランドで分離された *Citrobacter freundii* が保有する *bla*_{CTX-M-3} を担う巨大プラスミド上に16S-RMTase様の遺伝子が存在することが、データベースに登録された情報で2002年に公開された¹²⁾が、登録者(Golebiewskiら)は、それに気が付かず、研究者の間でもあまり問題視されなかった。その後、フランスのパスツール研の研究グループにより同様の遺伝子が *Klebsiella pneumoniae* でも確認され、ArmAと命名された¹³⁾。ArmA産生株は、現在、各種の腸内細菌の菌種のみならず *Acinetobacter* 属菌にも広がり、また、RmtBと同様に、ヒトおよび家畜などからも分離され、世界中に最も広がりつつある16S-RMTasesの1つとなっている。

Ⅲ. 16S-RMTase 産生株の問題点

16S-RMTase産生株は多剤耐性を示すことが多く、また、家畜や食品からも分離されている。さらに、サルモネラ属菌などの病原性の強い菌種からも16S-RMTase産生株が見つかる³⁾。

a. 広範囲アミノ配糖体高度耐性化に関与

1405Gの修飾酵素か1408Aの修飾酵素かの違いにより、耐性となるAGの範囲が若干異なるが、両者のいずれかを産生する株は、日常的に用いられる種々のAGに高度耐性(MIC, > 512 μg/ml)を獲得する傾向があり、特に後者は、ネオマイシンやアブラマイシンなどのAGにも耐性を付与するという特長が見られる。

b. MBL同時産生株が多い

ArmAやRmtB、RmtCを産生する株の中には、NDM-1やSPM-1などのMBLを同時に産生する株が多く、それらは、多剤耐性を示す傾向がある。

c. 広域β-ラクタマーゼ同時産生株多い

ArmA や RmtB を産生する株の中には、CMY 型や CTX-M 型等のセファロスポリナーゼを同時に産生する株が多く、それらは、多剤耐性傾向を示すことが多い。

d. 16S-RMTase 産生株が、家畜や食品からも分離

鶏やブタ、ウシなどから分離された *E. coli* などの腸内細菌科の菌種等で、RmtB や ArmA を産生する株が検出されている。検出の報告は中国からが多いが、米国、英国、スペイン等からも報告がある。

e. 16S-RMTase を産生するサルモネラや赤痢菌が出現

サルモネラ属菌で、ArmA を産生する株が、ブルガリア、英国、フランス、アルジェリア、中国などから報告されている。また、米国からは、2005 年に RmtC を産生するサルモネラ属菌が分離されている。一方、赤痢菌については、ArmA 産生株がブルガリアから報告されている。

IV. 16S-RMTase の遺伝子を担う転位因子

16S-RMTase の遺伝子は、IS (挿入配列) 等、さまざまな転位性のエレメントにより媒介されている。*rmtA* は、 $\kappa\gamma$ と命名されている因子¹⁴⁾、*rmtB* は、Tn3 と IS26、*rmtC* は *ISEcp1*、*rmtD* は、リコンビナーゼの遺伝子と考えられる *orf494*、*armA* は *ISCR1*、*npmA* は IS26 と、種々の挿入因子や DNA の組換えに関与する因子により媒介されていることが明らかとなっている。このことは、これらの遺伝子が、他の生物、おそらく環境中の非病原性細菌などから取り込まれたものと考えられているが、それらの起源は不明である。

V. 16S-RMTases 以外の新しい耐性機構や関連技術

筆者の研究グループがこの間、発見した新たな薬剤耐性機構やそれに関連する実績を以下に紹介する。

a. plasmid 媒介性の MBL (IMP-1) の発見

IMP-1 型の MBL 産生菌は既に世界中から分離さ

れているが、IMP-1 は 1991 年に愛知県内の病院で分離されたイミペネム耐性の *S. marcescens* から世界で最初に発見された¹⁵⁾。筆者は、この株を、分離者である中村民夫氏の名前にちなんで、TN9106 株と命名した。なお、それ以前にも、緑膿菌で伝達性のイミペネム耐性を示す株が存在していることは群馬大学の研究グループから報告されていたが、酵素の遺伝子のクローニングやアミノ酸配列等の構造を最初に解明したのは、筆者の研究グループである。IMP という名前には、*imipenem* を分解するためそれをういた治療が *impossible* になるので、臨床的に *impact* が高いという意味を込めたが、他方、*imp* には「小さい悪魔」という意味もあり、この酵素の特徴を示す良い名称であると評価されている。

b. MBL 産生株を簡便に識別する SMA 法の開発と実用化

MBL を産生する菌株は、カルバペネムに対し耐性を示すことが多いが、緑膿菌等では、膜の透過性の低下 (D2 ポーリンの減少など) 等により耐性を示す株も多い。また、MBL 産生株でも必ずしもカルバペネム高度耐性を示すわけではなく、「I」や「S」と判定される株も散見される。他方、MBL 産生株の場合、多くは、CAZ に高度耐性を示すが、日常検査では、ブレイクポイント付近の濃度でしか薬剤感受性試験をしておらず、また、SHV-由来 ESBL や CMY 型セファロスポリナーゼ産生株に対しては、CAZ の MIC が高くなるため、MBL 産生株との鑑別が難しい。

そこで、熊本大学薬学部の後藤正文教授の研究グループと協同で MBL を特異的に阻害する物質を検索し、メルカプト酢酸やメルカプトプロピオン酸が、多くの MBL を特異的に阻害することを発見した¹⁶⁾¹⁷⁾。引き続き、栄研化学株式会社の研究チームと一緒に、メルカプト酢酸ナトリウム (SMA) を含有する disk 拡散法を開発した。この試験法は、IMP-1 や VIM-2 などの MBL を主として産生する菌株では、特異度、感度とも実用性に耐える結果が得られ、国内では広く使われている。しかし、残念ながら海外では入手が困難であるため、時々、海外からの提供依頼に応じて供与することもあるが、メルカプト化合物を用いた試験法に関する論文¹⁷⁾ は、これまでに 230 回以上、欧文論文に引用されており、海外

でも高い関心が寄せられている。なお、IMP-1と同時に染色耐性の AmpC を大量に産生している株や、NDM-1 産生株のように、CMY 型や CTX-M 型の β -ラクタマーゼを同時に産生している株では、SMA を用いた試験法の原法で、偽陰性となる場合もある。そこで、CAZ の代わりに MEPM の disk を用い、しかも SMA disk との間隔を 5～8mm に短縮すること (Modified SMA-disk 法) で、検出が可能となることは、国内で分離された NDM-1 産生株を用いた試験で確認されている。

c. *Klebsiella* 属菌の染色体性 β -ラクタマーゼの解析

筆者が、大学院生や助手の時代には、生来ペニシリンに耐性を獲得している *Klebsiella* 属菌の産生する β -ラクタマーゼについて種々研究を行った。その結果、*K. pneumoniae* が染色体依存性に産生するペニシリナーゼは、それまで、プラスミドに媒介されていることが知られていた TEM-1 ペニシリナーゼとアミノ酸配列が近いことが確認された¹⁸⁾。この結果から、プラスミド上に存在する TEM-1 ペニシリナーゼの遺伝子は、*Klebsiella* 属菌の染色体性ペニシリナーゼの遺伝子が、IS (挿入配列) などの作用で、プラスミド上に転位したものである可能性が示され、プラスミド媒介性の各種の耐性遺伝子の起源を考える上で重要な示唆を与えるものとなった。その後、同様のプラスミド媒介性の SHV-1 ペニシリナーゼのアミノ酸配列が決定され、それは、TEM-1 よりさらに *K. pneumoniae* の染色体性ペニシリナーゼ (LEN-1) に近いことが明らかとなり、われわれの仮説がさらに強く補強されることになった。

同時に、*Klebsiella oxytoca* の β -ラクタマーゼについても研究を行った。*K. oxytoca* は、ペニシリンのみならず初期のセファロスポリンや経口セファロスポリン、さらにセフォペラゾンなどにも耐性を示す株があり、その産生する β -ラクタマーゼは、ペニシリナーゼではなく緑膿菌やエンテロバクター等が産生するセファロスポリナーゼ (クラス C) に近いのではと、当時、一般的には推定されていた。しかし、われわれの研究から、*K. oxytoca* の β -ラクタマーゼは、*K. pneumoniae* のペニシリナーゼと同様に、クラス A に属する β -ラクタマーゼであることが明らかとなり¹⁹⁾、クラス A でもセファロスポリンを分解可能な酵素が存在することが確認された。

その後、スルバクタム/セフォペラゾンに耐性を示す、*Klebsiella oxytoca* について、解析した結果、RbiA と命名した K1 型 β -ラクタマーゼの過剰産生株であることが明らかとなった²⁰⁾。

d. プラスミド媒介性 AmpC の発見

1990 年代の初頭には、ESBL など、クラス A に属するプラスミド媒介性の β -ラクタマーゼはいくつか発見されていたが、クラス C に属するものはほとんど知られていなかった。筆者は、名古屋大学附属病院の泌尿器科に入院していた膀胱ガン患者さんの尿より分離された菌株の中から、ラタモキシム (製剤名：シオマリル) に耐性を示す、*K. pneumoniae* を 1991 年に発見した。解析の結果、この株が産生する β -ラクタマーゼのアミノ酸配列は、当時、部分的にアミノ酸配列が確定されクラス C に属することが判明していた MIR-1 型セファロスポリナーゼと類似していることが明らかになり、全シーケンスを決定し MOX-1 と命名した^{21, 22)}。MOX-1 はその後、セファマイシンを分解するという一方で、CMY-1 や CMY-2 などと連番を付して命名された一群の CMY 型セファロスポリナーゼの中で台湾から検出された CMY-8 に近いことが明らかとなり、プラスミド媒介性 AmpC 型セファロスポリナーゼの草分け的存在となった。

e. ボロン酸を用いたクラス C 型 β -ラクタマーゼの簡便識別法

プラスミド媒介性の CMY 型や DHA 型などのセファロスポリナーゼや染色耐性の AmpC 型セファロスポリナーゼの産生株は、セファマイシンにも耐性を示す場合が多く、MBL 産生株との鑑別が必要となる。そこで、これらのクラス C 型 β -ラクタマーゼの阻害物質について検討し、ボロン酸化合物が、クラス C 型 β -ラクタマーゼ産生株の鑑別に有用なことを発見した²²⁾。その後、アミノフェニルボロン酸などが、KPC 型カルバペネマーゼ産生株の検出にも利用可能であることが発見されている。

f. セフォタキシム耐性腸内細菌科菌種の解析

2000 年以降、セフォタキシムやセフトリアキソンに耐性を獲得した大腸菌や肺炎桿菌が急増しつつあるが、1995 年頃に分離されたセフォタキシム耐性

大腸菌を解析した結果、Toho-1型の β -ラクタマーゼの遺伝子を染色体上やプラスミド上に複数コピー保有する株であることが判明した²³⁾。その後、国内で分離された多数の腸内細菌科の菌種について、解析した結果、国内には、既に、CTX-M-1やCTX-M-2、CTX-M-9などの各グループに属するCTX-M型ESBLを産生する株が侵入し、一部の医療機関でアウトブレイクを引き起こしていることが明らかとなった²⁴⁾。さらに、2000年以降、セフトキシムとレボフロキサシンの両者に耐性を示す大腸菌の急増の背景に血清型O25:H4、MLST型ST131と判定される特定の大腸菌のクローンの増加があることが、明らかとなっている²⁵⁾。

g. プラスミド媒介性のキノロン排出ポンプ

グラム陰性菌が、キノロンやフルオロキノロンに耐性を獲得する主なメカニズムは、染色体性のGyrAやParCなどのDNAの複製に関与する酵素のQRDR(キノロン耐性決定領域)のアミノ酸置換である。その他、緑膿菌等では、膜に存在するMexAB-OprMなどの排出機構が関与していることが知られていたが、プラスミド媒介性のフルオロキノロン排出機構は知られていなかった。*rmtB*の遺伝子を担うプラスミドを接合伝達する過程で、フルオロキノロンに対する耐性度も上昇するという現象に気づき、詳しく解析を行ったところ、QepAと命名した排出ポンプの遺伝子が、*rmtB*を担う伝達性プラスミド上に存在していることが明らかとなった²⁶⁾。RmtBについては、上述したように、既に、世界各地に産生株が広がっているが、特に中国で分離される大腸菌などから、RmtBとQepAを同時に産生する株が、高頻度に分離される事態となっている。

h. ペニシリン低感受性B群連鎖球菌

B群連鎖球菌(GBS)においては、近年まで、すべてペニシリンに感受性と見なされており、耐性菌の出現や存在は想定されていなかった。しかし、2000年頃から国内の学会発表などでペニシリンに低感受性を示すGBSの存在が時々指摘され始めたものの、専門家の方々からは、検査エラーなどとして退けられ、無視されていた。著者らは、検査技師の方々との情報交換をする中で、GBSにおいてペニシリン低感受性の出現の可能性を想定し、実際に、

寒天平板希釈法により正確に試験を実施すると、PCGのMIC値が0.12やそれを超える株があることを確認し、詳しい解析を行った。その結果、PBP2Xにアミノ酸置換を獲得すると、PCGのMIC値が上昇することや、そのような株では、セフトキシムのMICが大きく上昇すること等を発見した²⁷⁾。さらに、ペニシリン低感受性株(PRGBS)を簡便にスクリーニングする方法として、セフトブテンdiskを用いる方法を考案した²⁸⁾。この方法は、国内で出現しているPRGBSを検出する方法としては、感度、特異度は良好であるが、一部に、偽陽性や偽陰性になる株も散見されるため、さらなる改良が必要と考えている。

それとともに、PRGBSは、遺伝的に多様性に富むこと²⁹⁾や医療機関内において患者間で伝播して院内感染の原因となりうること³⁰⁾等が、その後の研究で明らかとなっている。

i. アシネトバクター属菌における消毒薬抵抗性

海外では、多剤耐性アシネトバクターによる院内感染が問題となっている。アシネトバクターに対する消毒剤の効果に及ぼす有機物の影響や抗菌薬耐性と消毒薬抵抗性との関連性について解析し、有機物の混入により、常用濃度の10%程度の濃度の消毒薬に耐える株が出現していることや、抗菌薬耐性株には、消毒薬にも抵抗性を示す株が多いこと等が確認された^{31,32)}。

おわりに

薬剤耐性に関してこれまで、多岐の課題について、多くの方々と連携して研究を行ってきたが、今回は、既に成果や評価が定まっている一部について、ご紹介した。表2には、これまでに私が関与して実施された主な研究の一覧を示す。このたび第48回小島三郎記念文化賞を受賞させていただくにあたり、この受賞は、表2に示す多くの方々との協同受賞と理解しており、また、今回の受賞が、薬剤耐性菌に関する研究に従事しておられる多くの方々にとって、幾ばくかの励みにしていただくことができれば本望である。

表2 薬剤耐性菌に関するこれまでの研究に参画していただいた方々

主たる研究者	研究課題の概要(年)	主たる研究者の当時のポジション	主たる研究者の現在のポジション	備考
荒川宜親	肺炎桿菌の染色体性ペニシリンナーゼに関する研究(1984-1986)	名古屋大学大学院医学研究科 博士課程学生	名古屋大学大学院医学系研究科 分子病原細菌学/耐性菌制御学 教授	<i>Klebsiella</i> 属菌の染色体性β-ラクタマーゼを世界で最初に解明
	<i>K. oxytoca</i> の染色体性β-ラクタマーゼに関する研究(1986-1990)			
	MBL産生株の簡便なスクリーニング法の開発(2000)	国立感染症研究所細菌第二部 部長		メルカプト化合物を用いたスクリーニング法を開発
堀井俊伸	ラタモキセフ耐性肺炎桿菌が産生するβ-ラクタマーゼの解析(1991-1992)	名古屋大学医学部 学生	浜松医科大学感染制御学分野 教授	プラスミド媒介性のクラスC β-ラクタマーゼ(MOX-1)を世界で最初に全容解明
小佐野悦夫	カルバペネム耐性 <i>S. marcescens</i> の解析(1992-1994)	愛知学院大学歯学部講師/名古屋大学大学院医学研究科 客員研究員	歯科医院開業	IMP-1を世界で最初に特定し解析
千田一嘉	カルバペネム耐性緑膿菌等の解析(1995-1997)	名古屋大学大学院医学研究科 大学院生	国立病院機構長寿科学研究所センター附属病院 医師	臨床分離緑膿菌におけるIMP-1産生株について解析
伊藤秀郎	<i>S. marcescens</i> のMBLを媒介するplasmidの解析(1993-1997)	名古屋大学医学部保健学科講師-准教授	名古屋大学医学部保健学科 名誉教授	臨床分離セラチアにおけるIMP-1産生に与するプラスミドについて解析
木村幸司	スルバクタム/セフォペラゾン耐性の <i>K. oxytoca</i> のβ-ラクタマーゼに関する研究(1995-1996)	名古屋大学医学部 学生	名古屋大学大学院医学系研究科 分子病原細菌学/耐性菌制御学 講師	SBT/CPZ耐性β-ラクタマーゼについて解析
	GBSにおけるペニシリン等低感受性機構の解析およびPRGBSの簡便なスクリーニング法の開発(2005-2012)	国立感染症研究所細菌第二部 RR-研究員-主任研究員		PBP2Xの変異がペニシリン低感受性に与していることを発見。セフチピテンを用いたPRGBSの簡便スクリーニング法の開発に成功
勝野暁志	尿検体からのPCRによるIMP-1の検出法の確立(1995-1996)	名古屋大学大学院医学研究科 博士課程学生	泌尿器科医師	PCR条件を確立
黒川博史	ESBL産生菌の研究(1994-2012)	国立感染症研究所研究生-協力研究員	(株)ミロクメディカルラボラトリー	SHV-24, TEM-91などを発見
八木哲也	セフトキシム耐性大腸菌の産生するβ-ラクタマーゼの解析(1995-2000)	名古屋大学大学院医学研究科 大学院生	名古屋大学大学院医学系研究科 臨床感染制御学 教授	複数のToho-1の遺伝子のコピーが、1つの菌に存在することを確認
	クラスCβ-ラクタマーゼ阻害剤を用いたAmpC/CMY等産生株のスクリーニング法の開発(2004-2005)	国立感染症研究所細菌第二部 研究員		ボロン酸を用いたAmpCやCMY産生株の簡便なスクリーニング法の開発
柴田尚宏	CTX-M型ESBLおよびMBLの遺伝子解析(1999-2009)	国立感染症研究所細菌第二部 研究員	東濃厚生病院呼吸器内科 医長	国内におけるCTX-M型ESBLのタイプを把握
横山佳子	アルベカシン耐性緑膿菌の解析(2003)	国立感染症研究所細菌第二部 リサーチレジデント	京都女子大学 准教授	RmtAを世界で最初に発見
和知野純一	新型のESBLおよびMBL、さらに16S rRNA methyltransferaseなどの研究(2002-2012)	名古屋大学大学院医学系研究科 修士課程-群馬大学大学院医学研究科博士課程学生、国立感染症研究所細菌第二部 RR-研究員-主任研究員	名古屋大学大学院医学系研究科 分子病原細菌学/耐性菌制御学 助教	GES-3, GES-4の発見 RmtC, NpmAの発見
土井洋平	AmpC型β-ラクタマーゼの解析(2001-2004)	国立感染症研究所細菌第二部 研究員	ピッツバーグ大学感染症内科 准教授	アミノ酸残基が欠損し基質特異性が変化したAmpCの解析およびRmtBを世界で最初に発見した。また、AAC(6)-Iadの発見
	RmtBに関する研究(2003-2004)			
	新型アミノグリコシド修飾酵素の解析(2003-2004)			
山根一和	16S rRNAメチラーゼ産生菌に関する研究(2003-2010)	国立感染症研究所細菌第二部 研究員	川崎医科大学 講師	RmtAを担う転位ユニットの構造を解明
	プラスミド媒介性のフルオロキノロン排出ポンプに関する研究(2006-2008)			世界で最初にQepAを発見
鈴木里和	セフトキシム耐性大腸菌の分子疫学解析(2008-2009)	国立感染症研究所細菌第二部 研究員-主任研究員	国立感染症研究所細菌第二部 主任研究員	国内でのCTX/LVFX耐性大腸菌の急増の背景に、O25:H4-ST131の増加が関与していることを確認
筒井敦子	MBL産生緑膿菌の医療施設内伝播に関する研究(2008-2010)	国立感染症研究所細菌第二部 JANIS担当職員	順天堂大学内科 医師	VIM-2型MBL産生株の病院内での消長の様式に関してその要因を解析
長野則之	CTX-M-2型ESBL産生菌に関する研究(2002-2004)	船橋市立医療センター	船橋市立医療センター 主任技師	CTX-M-2型ESBLを産生する <i>Proteus mirabilis</i> および <i>Acinetobacter baumannii</i> による院内感染について解析
	ペニシリン低感受性GBSの分子疫学等解析(2007-2012)			PRGBSは遺伝的に多様な背景を持つこと、およびPRGBSは、院内感染することを証明
外山雅美	同上	同上	船橋市立医療センター	
長野由起子	同上およびCTX-M-64に関する研究(2008-2009)	国立感染症研究所細菌第二部 客員研究員	国立感染症研究所細菌第二部 客員研究員	同上および赤痢患者より分離された菌株よりCTX-M-64を発見
川村久美子	アシネトバクター属菌における消毒薬抵抗性に関する研究(2006-2012)	名古屋大学医学部保健学科 准教授	名古屋大学大学院医学系研究科 准教授	有機物の混入で消毒薬の効果が減弱することおよび、抗菌薬耐性株は、消毒薬に対しても抵抗性を示すことを示す。

共同研究者(相手方の研究を支援または相互に協力したもの)
 群馬大学大学院医学系研究科 池康嘉、富田治芳、谷本弘一
 東海大学医学部 藤本修平

熊本大学生命科学研究部 黒崎博雅 韓国カトリック大学 YJ Park
 国立国際医療研究センター 切替照雄 中国南中国農業大学 JH Liu

文 献

- 1) Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, Walsh TR. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, *bla*_{NDM-1}, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother.* Dec ; **53** (12) : 5046-5054, 2009.
- 2) Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, Chaudhary U, Doumith M, Giske CG, Irfan S, Krishnan P, Kumar AV, Maharjan S, Mush-taq S, Noorie T, Paterson DL, Pearson A, Perry C, Pike R, Rao B, Ray U, Sarma JB, Sharma M, Sheridan E, Thirunarayan MA, Turton J, Upadhyay S, Warner M, Wel-fare W, Livermore DM, Woodford N. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK : a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis.* Sep ; **10** (9) : 597-602, 2010.
- 3) Wachino J, Arakawa Y. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria : an update. *Drug Resist Updat.* Jun ; **15** (3) : 133-148, 2012.
- 4) Doi Y, Arakawa Y. 16S ribosomal RNA methylation : emerging resistance mechanism against aminoglyco-sides. *Clin Infect Dis.* Jul 1 ; **45** (1) : 88-94, 2007.
- 5) Wachino J, Shibayama K, Kimura K, Yamane K, Suzuki S, Arakawa Y. RmtC introduces G1405 methylation in 16S rRNA and confers high-level aminoglycoside resistance on Gram-positive microorganisms. *FEMS Microbiol Lett.* Oct ; **311** (1) : 56-60, 2010.
- 6) Yokoyama K, Doi Y, Yamane K, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, Yagi T, Kato H, Arakawa Y. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet.* Dec 6 ; **362** (9399) : 1888-1893, 2003.
- 7) Doi Y, Yokoyama K, Yamane K, Wachino J, Shibata N, Yagi T, Shibayama K, Kato H, Arakawa Y. Plasmid-medi-ated 16S rRNA methylase in *Serratia marcescens* confer-ring high-level resistance to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother.* Feb ; **48** (2) : 491-496, 2004.
- 8) Wachino J, Yamane K, Shibayama K, Kurokawa H, Shiba-ta N, Suzuki S, Doi Y, Kimura K, Ike Y, Arakawa Y. Novel plasmid-mediated 16S rRNA methylase, RmtC, found in a *Proteus mirabilis* isolate demonstrating extraordinary high-level resistance against various aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother.* Jan ; **50** (1) : 178-184, 2006.
- 9) Doi Y, de Oliveira Garcia D, Adams J, Paterson DL. Coproduction of novel 16S rRNA methylase RmtD and metallo- β -lactamase SPM-1 in a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* Mar ; **51** (3) : 852-856, 2007.
- 10) Davis MA, Baker KN, Orfe LH, Shah DH, Besser TE, Call DR. Discovery of a gene conferring multiple-aminoglyco-side resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* Jun ; **54** (6) : 2666-2669, 2010.
- 11) Galimand M, Courvalin P, Lambert T. RmtF, a new mem-ber of the aminoglycoside resistance 16S rRNA N7 G1405 methyltransferase family. *Antimicrob Agents Chemother.* Jul ; **56** (7) : 3960-3962, 2012.
- 12) Gołebiewski M, Kern-Zdanowicz I, Zienkiewicz M, Adam-czyk M, Zylinska J, Baraniak A, Gniadkowski M, Bar-dowski J, Cegłowski P. Complete nucleotide sequence of the pCTX-M3 plasmid and its involvement in spread of the extended-spectrum β -lactamase gene *bla*_{CTX-M3}. *Antimi-crob Agents Chemother.* Nov ; **51** (11) : 3789-3795, 2007.
- 13) Galimand M, Courvalin P, Lambert T. Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteri-aceae* due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob Agents Chemother.* Aug ; **47** (8) : 2565-2571, 2003.
- 14) Yamane K, Doi Y, Yokoyama K, Yagi T, Kurokawa H, Shi-bata N, Shibayama K, Kato H, Arakawa Y. Genetic envi-ronments of the *rmtA* gene in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* Jun ; **48** (6) : 2069-2074, 2004.
- 15) Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, Ohta M, Horii T, Ito H, Yoshimura F, Kato N. Molecular characteriza-tion of an enterobacterial metallo β -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipen-em resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* Jan ; **38** (1) : 71-78, 1994.
- 16) Goto M, Takahashi T, Yamashita F, Koreeda A, Mori H, Ohta M, Arakawa Y. Inhibition of the metallo- β -lactamase produced from *Serratia marcescens* by thiol compounds. *Biol Pharm Bull.* Nov ; **20** (11) : 1136-1140, 1997.
- 17) Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H, Goto M. Convenient test for screening metallo- β -lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol.* Jan ; **38** (1) : 40-43, 2000.
- 18) Arakawa Y, Ohta M, Kido N, Fujii Y, Komatsu T, Kato N. Close evolutionary relationship between the chromoso-mally encoded β -lactamase gene of *Klebsiella pneumoniae* and the TEM β -lactamase gene mediated by R plasmids. *FEBS Lett.* Oct 20 ; **207** (1) : 69-74, 1986.
- 19) Arakawa Y, Ohta M, Kido N, Mori M, Ito H, Komatsu T, Fujii Y, Kato N. Chromosomal β -lactamase of *Klebsiella oxytoca*, a new class A enzyme that hydrolyzes broad-spectrum β -lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* Jan ; **33** (1) : 63-70, 1989.
- 20) Kimura K, Arakawa Y, Ohsuka S, Ito H, Suzuki K, Kurokawa H, Kato N, Ohta M. Molecular aspects of high-level resistance to sulbactam-cefoperazone in *Klebsiella oxytoca* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* Sep ; **40** (9) : 1988-1994, 1996.
- 21) Horii T, Arakawa Y, Ohta M, Ichiyama S, Wacharo-tayankun R, Kato N. Plasmid-mediated AmpC-type β -lac-tamase isolated from *Klebsiella pneumoniae* confers resistance to broad-spectrum β -lactams, including mox-alactam. *Antimicrob Agents Chemother.* May ; **37** (5) :

- 984-990, 1993.
- 22) Horii T, Arakawa Y, Ohta M, Sugiyama T, Wacharotayankun R, Ito H, Kato N. Characterization of a plasmid-borne and constitutively expressed *bla*_{Mox-1} gene encoding AmpC-type β -lactamase. *Gene*. Feb 11 ; **139** (1) : 93-98, 1994.
 - 23) Yagi T, Wachino J, Kurokawa H, Suzuki S, Yamane K, Doi Y, Shibata N, Kato H, Shibayama K, Arakawa Y. Practical methods using boronic acid compounds for identification of class C β -lactamase -producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*. Jun ; **43** (6) : 2551-2558, 2005.
 - 24) Yagi T, Kurokawa H, Senda K, Ichiyama S, Ito H, Ohsuka S, Shibayama K, Shimokata K, Kato N, Ohta M, Arakawa Y. Nosocomial spread of cephem-resistant *Escherichia coli* strains carrying multiple Toho-1-like β -lactamase genes. *Antimicrob Agents Chemother*. Dec ; **41** (12) : 2606-2611, 1997.
 - 25) Shibata N, Kurokawa H, Doi Y, Yagi T, Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Kimura K, Ishikawa S, Kato H, Ozawa Y, Shibayama K, Kai K, Konda T, Arakawa Y. PCR classification of CTX-M-type β -lactamase genes identified in clinically isolated gram-negative bacilli in Japan. *Antimicrob Agents Chemother*. Feb ; **50** (2) : 791-795, 2006.
 - 26) Suzuki S, Shibata N, Yamane K, Wachino J, Ito K, Arakawa Y. Change in the prevalence of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Japan by clonal spread. *J Antimicrob Chemother*. Jan ; **63** (1) : 72-79, 2009.
 - 27) Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Arakawa Y. Plasmid-mediated *qepA* gene among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan. *Antimicrob Agents Chemother*. Apr ; **52** (4) : 1564-1566, 2008.
 - 28) Kimura K, Suzuki S, Wachino J, Kurokawa H, Yamane K, Shibata N, Nagano N, Kato H, Shibayama K, Arakawa Y. First molecular characterization of group B streptococci with reduced penicillin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother*. Aug ; **52** (8) : 2890-2897, 2008.
 - 29) Kimura K, Wachino J, Kurokawa H, Suzuki S, Yamane K, Shibata N, Arakawa Y. Practical disk diffusion test for detecting group B streptococcus with reduced penicillin susceptibility. *J Clin Microbiol*. Dec ; **47** (12) : 4154-4157, 2009.
 - 30) Nagano N, Nagano Y, Kimura K, Tamai K, Yanagisawa H, Arakawa Y. Genetic heterogeneity in *pbp* genes among clinically isolated group B Streptococci with reduced penicillin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother*. Dec ; **52** (12) : 4258-4267, 2008.
 - 31) Nagano N, Nagano Y, Toyama M, Kimura K, Tamura T, Shibayama K, Arakawa Y. Nosocomial spread of multidrug-resistant group B streptococci with reduced penicillin susceptibility belonging to clonal complex 1. *J Antimicrob Chemother*. Apr ; **67** (4) : 849-856, 2012.
 - 32) Kawamura-Sato K, Wachino J, Kondo T, Ito H, Arakawa Y. Reduction of disinfectant bactericidal activities in clinically isolated *Acinetobacter* species in the presence of organic material. *J Antimicrob Chemother*. Mar ; **61** (3) : 568-576, 2008.
 - 33) Kawamura-Sato K, Wachino J, Kondo T, Ito H, Arakawa Y. Correlation between reduced susceptibility to disinfectants and multidrug resistance among clinical isolates of *Acinetobacter* species. *J Antimicrob Chemother*. Sep ; **65** (9) : 1975-1983, 2010.