

アンケート送付依頼状

各都道府県/政令指定都市  
地方衛生研究所等所長宛

敬啓

感染症法では、バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)＜全数＞、バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)＜全数＞、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)＜定点＞、ペニシリン耐性肺炎球菌(PNPS)＜定点＞、薬剤耐性緑膿菌＜定点＞の5つの耐性菌による感染症患者が発生した場合、保健所を通じて届け出る事が求められています。

これらの様々な薬剤耐性菌の確認試験などが、各自治体の地方衛生研究所等に依頼される事も多くなってきておりますので、各々の地方衛生研究所等における薬剤耐性菌の試験・検査体制の充実等を厚生労働科学研究の一環として調査する事になりました。

つきましては、別添の調査用紙を貴下担当職員にお渡し頂き、質問事項に御回答頂き、お手数ですが宛封の封筒にて、10月16日までに御返送願いますようお願い致します。

草々

平成18年9月\*日

分担研究課題  
「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」  
富山県衛生研究所 所長  
倉田 毅

平成18年度厚生労働科学研究費補助金  
〔新興・再興感染症研究事業〕  
「薬剤耐性菌等に関する研究(118-新興-11)」班  
主任研究者 荒川宜親

アンケート送付依頼状

地方衛生研究所等  
細菌、病原体等検査・解析  
担当責任者様

感染症法では、バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)＜全数＞、バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)＜全数＞、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)＜定点＞、ペニシリン耐性肺炎球菌(PNPS)＜定点＞、薬剤耐性緑膿菌＜定点＞の5つの耐性菌による感染症患者が発生した場合、保健所を通じて届け出る事が求められています。

しかし、様々な理由から、それらの耐性菌の確認試験などは、各自治体の地方衛生研究所等で実施できます。国立感染症研究所に直接、解析依頼が来る事も多いのが現状となっています。

最近、国内各地の医療機関においてVREや薬剤耐性緑膿菌(MDRP)感染症では「薬剤耐性緑膿菌」による大規模なアウトブレイク事例も発生しており、公衆衛生上もそれらの蔓延を防止する実効ある対策が必要となっています。

- 2 -

3. 薬剤耐性菌の検査や解析について医療機関等から依頼があった場合、随時対応することは可能ですか。(該当する項目に○をつけ、設問にご回答ください)

- a. 可能  
対応可能な耐性菌の種類、複数記入可
- b. 現時点では体制が整備されていないが、将来的には可能  
検査体制の整備を考えている耐性菌の種類
- c. 現時点では体制整備の手立てはない  
理由

4. 地方衛生研究所での薬剤耐性菌の検査体制を整備強化する必要があると思いませんか。(該当する項目に○をつけ、理由をお答えください)  
ある なし  
理由

設問4. で「ある」と回答された方におきます。

5. 地方衛生研究所での薬剤耐性菌の検査体制整備に最も必要と思われる事は何ですか。(該当する項目1つに○をつけてください)  
a. 人員増加  
b. 検査に必要な機材の整備  
c. 検査・解析方法の講習会  
d. その他 具体的に:

II. 現在実施可能な薬剤耐性菌の検査・解析について  
(該当する項目に○をつけ、設問に回答してください)

1. バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)について

- 1. 菌種の同定  
a. 可能  
b. 不可能  
「不可能」と回答した場合、その理由
- 2. 薬剤感受性試験(最小発育阻止濃度測定)  
a. 可能  
測定方法に○をつけてください  
ディスク拡散法・微量液体希釈法・寒天希釈法・E-テスト  
その他( )
- b. 不可能  
「不可能」と回答した場合、その理由

3. 薬剤耐性遺伝子(van 遺伝子等)の検出

- a. 可能  
検査方法の参考になっている文献、資料、マニュアル
- b. 不可能  
「不可能」と回答した場合、その理由
- 4. バルスフィールドゲル電気泳動法による遺伝子型別解析  
a. 可能でありその結果の解釈についても自信あり、  
b. 可能であるがその結果の解釈については自信なし、  
c. 不可能  
「不可能」と回答した場合、その理由

2. バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)について

- 21 -

そこで、各自治体の地方衛生研究所等におけるVRE、VISA、MRSAなどの検査・解析機能をさらに整備・強化する事が重要になりつつあると認識し、厚生労働科学研究費により現状調査を実施する事になりました。

本調査の電算結果は参加協力施設にお返しするとともに、今後、実施を計画している技術研修会などの企画に反映させて頂きたいと考えております。

つきましては、別添の調査用紙に御記入の上、御返送頂けますようお願い致します。

分担研究課題  
「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」  
富山県衛生研究所 所長  
倉田 毅

平成18年度厚生労働科学研究費補助金  
〔新興・再興感染症研究事業〕  
「薬剤耐性菌等に関する研究(118-新興-11)」班  
国立感染症研究所 細菌第二部  
主任研究者 荒川宜親

研究協力者  
富山県衛生研究所  
総研正副  
磯谷順子

秋田県健康環境センター  
八橋 潤

岐阜県健康環境研究所  
白木 登

国立感染症研究所 細菌第二部  
鈴木和昭

アンケート内容

注: このアンケートにおける「薬剤耐性菌」とは、感染症法の感染症発生動向調査対象疾患の病原体であるバンコマイシン耐性腸球菌、バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌、ペニシリン耐性肺炎球菌、薬剤耐性緑膿菌およびその他の院内感染対策上問題となる薬剤耐性菌(ESBL産生菌、アシネトバクター属、セラチア属等)のことを示します。

I. 薬剤耐性菌の検査体制について

- 1. 現在の細菌検査担当者数: 人
- 2. これまでに医療機関などから薬剤耐性菌の検査などを依頼されたことがありますか。(該当する項目に○をつけ、設問にご回答ください)  
a. 依頼されたことがあり、検査を実施した。  
耐性菌や遺伝子の種類、複数記入可  
検査・解析内容
- b. 依頼されたが、実施しなかった  
実施しなかった理由
- c. 依頼された事はない

- 20 -

1. 菌種の同定

- a. 可能  
b. 不可能  
「不可能」と回答した場合、その理由
- 2. 薬剤感受性試験(最小発育阻止濃度測定)  
a. 可能  
測定方法に○をつけてください  
ディスク拡散法・微量液体希釈法・寒天希釈法・E-テスト  
その他( )
- b. 不可能  
「不可能」と回答した場合、その理由

3. 薬剤耐性遺伝子(van 遺伝子等)の検出

- a. 可能  
検査方法の参考になっている文献、資料、マニュアル
- b. 不可能  
「不可能」と回答した場合、その理由
- 4. バルスフィールドゲル電気泳動法による遺伝子型別解析  
a. 可能でありその結果の解釈についても自信あり、  
b. 可能であるがその結果の解釈については自信なし、  
c. 不可能  
「不可能」と回答した場合、その理由

3. メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)について

- 1. 菌種の同定  
a. 可能  
b. 不可能  
「不可能」と回答した場合、その理由
- 2. 薬剤感受性試験(最小発育阻止濃度測定)  
a. 可能  
測定方法に○をつけてください  
ディスク拡散法・微量液体希釈法・寒天希釈法・E-テスト  
その他( )
- b. 不可能  
「不可能」と回答した場合、その理由

3. 薬剤耐性遺伝子(van 遺伝子)の検出

- a. 可能  
検査方法の参考になっている文献、資料、マニュアル
- b. 不可能  
「不可能」と回答した場合、その理由
- 4. 遺伝子型別(バルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)による解析など)  
a. PFGE 解析が可能でありその結果の解釈についても自信あり、  
b. PFGE 解析が可能であるがその結果の解釈については自信なし、  
c. 不可能  
「不可能」と回答した場合、その理由
- D. PFGE 解析以外の遺伝子型別試験法を実施  
試験法および参考になっている文献、資料、マニュアル

4. ペニシリン耐性肺炎球菌(PNPS)について

- 1. 菌種の同定  
a. 可能  
b. 不可能

- 「不可能」と回答した場合、その理由
2. 薬剤感受性試験（最小発育阻止濃度測定）
    - a. 可能  
測定方法に○をつけてください  
ディスク拡散法・微量液体希釈法・寒天希釈法・E-テスト  
その他（ ）
    - b. 不可能  
「不可能」と回答した場合、その理由
  5. 薬剤耐性緑膿菌（＝多剤耐性緑膿菌、MRGN）について
    1. 菌種の同定
      - a. 可能
      - b. 不可能  
「不可能」と回答した場合、その理由
    2. 薬剤感受性試験（最小発育阻止濃度測定）
      - a. 可能  
測定方法に○をつけてください  
ディスク拡散法・微量液体希釈法・寒天希釈法・E-テスト  
その他（ ）
      - b. 不可能  
「不可能」と回答した場合、その理由
    3. 薬剤耐性遺伝子の検出
      - a. 可能  
検査対象としている薬剤耐性遺伝子  
検査方法の参考としている文献、資料、マニュアル
      - b. 不可能  
「不可能」と回答した場合、その理由
    4. 遺伝子型別（パルスフィールドゲル電気泳動法：PFGEによる解析など）
      - a. PFGE解析が可能でありその結果の解釈についても自信あり
      - b. PFGE解析が可能であるがその結果の解釈について自信なし
      - c. 不可能  
「不可能」と回答した場合、その理由
    4. PFGE解析以外の遺伝子型別試験法を実施  
試験法および参考としている文献、資料、マニュアル
  6. 上記以外の薬剤耐性菌について検査・解析が実施可能ですか。  
（該当する項目に○をつけてください）
    - a. 可能  
耐性菌の種類、実施検査内容など具体的な回答してください
    - b. 不可能
  7. これまでに衛生研究所等で実施した試験検査結果が法的な証拠等として用いられた事  
はありますか？（耐性菌の検査以外も含む）  
（該当する項目に○をつけてください）
    - a. あり
    - b. なし
    - c. 不明
  8. 地方衛生研究所等における耐性菌検査の充実強化について関心がありますか？  
（該当する項目に○をつけてください）
    - a. あり
    - b. なし

回答者のお名前、御所属等を御記入下さい。

お名前 職名  
御所属  
連絡先電話番号：  
FAX：  
E-mail address  
ご協力ありがとうございました

（資料2）

事務連絡  
平成19年4月9日

都道府県  
各 政令市 衛生主管部（局）  
特別区 院内感染対策主管課 御中

厚生労働省医政局指導演

クロストリジウム・ディフィシル及び多剤耐性緑膿菌（MRGN）に係る院内感染対策の徹底について

院内感染対策については、従前より「医療施設における院内感染の防止について」（平成17年2月1日医政指第0201004号医政局指導演長通知）等を参考に対応いただいているところであり、また、医療法（昭和23年法律第205号）第25条第1項の規定に基づく立入調査の機会等を通じて医療機関等に対して指導いただいているところです。

標記については、先般開催されました「第4回院内感染対策中央会議」（座長：小林寛伊東京医療保健大学学長）において更なる取組の徹底が提案されたところで、各医療機関においては、これまでの取組の他、別添資料に記載のある事項を参考として適切な対応が求められます。

貴院におかれましては、改めて着下の医療機関に対して、別添資料の他、関係法令、通知等を参考に、院内感染管理体制の確立等、院内感染防止に関する指導を徹底するよう、よろしく願います。

なお、各病原体に関連する資料として、国立感染症研究所感染症情報センターのホームページにおいて関連情報が掲載されており、同時に、国立国際医療センターのホームページにおいて厚生労働省科学研究による院内感染対策に関するガイドラインが掲載されておりますので、ご活用いただけますようお願いいたします。

〇照会先 医政局指導演 徳木  
留 通 03-3595-2194  
FAX 03-3503-8562

別添

1. 【クロストリジウム・ディフィシル】

【背景】

- (1) CDC（米国疾病予防管理センター）において、下痢や腸炎の原因になるクロストリジウム・ディフィシルの検出数が増加している報告がなされている。
- (2) クロストリジウム・ディフィシルは芽胞産生菌であり、アルコール系やクロルヘキシジン等の通常の消毒薬や煮沸滅菌に耐え、院内で広まるもMRSA（メチシリン耐性黄色ブドウ球菌）やVRE（バンコマイシン耐性腸球菌）より対策が困難である。
- (3) 北米地域及び欧州地域等では、患者の発生数が多く、感染症を発症すると従来型のクロストリジウム・ディフィシルによる感染症と比べ重症な経過をたどり、死亡率が極端に高くなる強毒株の広がりが問題となっている。
- (4) 日本においては、2005年に中部地区の医療施設で1例確認され、また、2001にも関東地区でも1例確認されていた事が保存株の解析から確認されており、後者は市中感染症として発症していた。

【提案】

- (1) 抗生物質や抗がん剤に関連した下痢症/腸炎が臨床的に疑われた場合は、必要な細菌学的検査を行うこと。
- (2) 強毒株による腸炎などが疑われ、死亡率を含めた重篤例、難治例に関しては、保健所、地方衛生研究所、国立感染症研究所等に随時相談し、技術的支援を得るよう努めること。

国立感染症研究所 細菌第二部長 荒田直樹

2. 【多剤耐性緑膿菌（MRGN）】

【背景】

多剤耐性緑膿菌が医療施設で蔓延することを防止するためには、各医療機関においては、以下に示した対策を実施することが重要と考えられる。

- (1) 病院長のリーダーシップ：病院長の強いリーダーシップのもとに、多剤耐性緑膿

菌分離に重点を当てた感染対策プログラムを実施する。

- (2) 職員教育（異知徹底）：すべての医療従事者が多剤耐性緑膿菌に関する十分な知識を持つ。
- (3) 感染対策に関わる院内体制を見直し：権限を有する院内感染対策委員会と実行力のある感染制御チーム（ICT）を組織し日常的な活動を実施する。
- (4) 多剤耐性緑膿菌分離の重点的な監視：
- (7) 監視体制の強化と早期検出：ICT及び細菌検査室が中心となり、多剤耐性緑膿菌の早期検出を図るとともに、得られた情報をすみやかに医療現場に報告し、周知する。
- (8) 地域連携：地域内の医療機関と多剤耐性緑膿菌の分離状況等に関する情報について情報を共有し、連携して対策に生かす。
- (5) 感染制御マニュアルの作成：標準予防策、接触予防策、場合によっては経沫子予防策の手順（多剤耐性緑膿菌感染制御マニュアル）を作成する。
- (6) 個室管理：原則個室管理とする、あるいはゾーニングによる管理を徹底する。
- (7) 感染経路の特定：着尿、尿前測定、尿処理や吸引法などの方法を点検し見直す。
- (8) 環境の整備：適切な環境表面（病棟内の水回り、汚物処理室など）の衛生管理を行う。
- (9) 抗緑膿菌薬の適正使用：特にカルバペネム系の使用法が適正かどうかを再検討し、必要であれば是正する。

平成18年度 厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
「薬剤耐性菌等に関する研究」（主任研究者 荒川直樹）  
分担研究「高度多剤耐性緑膿菌の院内感染対策に関する研究」（分担研究者 切野照雄）

（資料3）



医業安第83号  
平成10年7月31日

各都道府県衛生主管部（局）長 殿

厚生省医業安全局安全対策課長

バンコマイシン耐性緑膿菌（VRE）に対する院内感染防止対策の徹底について

標記については、平成9年4月23日指第41号健康感染51号厚生省健康政策局指導課長、厚生省保健医療局エイズ結核感染症課長連名通知「バンコマイシン耐性緑膿菌（VRE）に対する院内感染防止対策について」により貴管下医療施設への周知徹底方をお願いしているところである。

当該通知を发出した時点では、我が国においては、バンコマイシン耐性緑膿菌（VRE）の患者の報告はなかったが、現在までの間にバンコマイシン耐性緑膿菌（VRE）の感染者の発生は9件報告されている。欧米におけるバンコマイシン耐性緑膿菌（VRE）の感染者の発生状況を鑑みると、今後当該菌の感染者の発生が増加してくることも想定されるため、バンコマイシン耐性緑膿菌（VRE）に対する院内感染防止対策の観点から、当該通知について、引き続き関係機関への周知徹底方をお願いする。

あわせて、バンコマイシン耐性緑膿菌（VRE）による感染症患者の発生が広がる場合には、当面、貴部（局）を通じて迅速に当該（昨年7月厚生省の機構改革により院内感染対策の所掌が医業安全局に移管）あて情報提供されるよう、貴部より貴管下医療施設に対して再度協力依頼方をお願いする。



事務連絡  
平成10年7月31日

各都道府県衛生主管部（局）  
院内感染対策担当課長 殿

厚生省医業安全局安全対策課

バンコマイシン耐性緑膿菌（VRE）について（情報提供）

標記については、平成10年7月31日医業安第83号通知「バンコマイシン耐性緑膿菌（VRE）に対する院内感染防止対策の徹底について」でお知らせしたところですが、それに関連して、バンコマイシン耐性緑膿菌（VRE）に関する情報が、国立感染症研究所のホームページ（<http://idsc.nih.go.jp/others/vre-index.html>）に掲載されていますので参考にされるとともに関係機関への周知方をお願いします。

- （内容） 一般向け情報：バンコマイシン耐性緑膿菌（VRE）とは？  
 専門家向け情報：1. VRE検出法と抗菌薬耐感性試験など  
 2. 臨床材料からVREを疑う菌が検出された場合  
 3. 糞便等検査材料よりのVREの選択分離  
 4. 保菌者からのVREの排出の特徴と感染防止対策  
 5. 具体的な対応策  
 6. グリコペプチド系抗菌薬について  
 7. VanA、VanB遺伝子のPCRによる検出  
 問い合わせ・参考資料

（資料4）



医政指発第0201004号  
平成17年2月1日

各都道府県  
政令市  
特別区  
衛生主管部（局）長 殿

厚生労働省医政局指導課長

医療施設における院内感染の防止について

標記については、これまでも医療法（昭和23年法律第205号）第25条第1項の規定に基づく立入検査の機会等を通じて対応いただいているところであるが、MRSA（メチシリン耐性黄色ブドウ球菌）、VRE（バンコマイシン耐性緑膿菌）及びノロウイルスをはじめとした各種の病原体に起因する院内感染が依然発生していることから、最新の科学的根拠に基づいた院内感染防止に関する留意事項等を、別記のごとく取りまとめるとともに、これらに関する医療法施行規則の一部を改正する省令（平成17年厚生労働省令第12号）を2月1日に公布し、同日より施行したところであるので、貴部におかれては、今後の院内感染防止対策の推進に当たって活用されるとともに、貴管下医療機関に対する周知方及び院内感染防止体制の徹底について指導方よろしくお願ひする。

また、別記の取りまとめに当たり、平成15年度厚生労働科学研究費補助金（厚生労働科学特別研究事業）による「国、自治体を含めた院内感染対策全体の制度設計に関する緊急特別研究」（主任研究者：小林寛伊・N.T.T東日本関東病院名誉院長）の分担研究報告書「医療施設における院内感染（病院内感染）の防止について」（別添）を参考としたので、併せて活用方をお願いする。

なお、本通知は、地方自治法（昭和22年法律第67号）第245条の4第1項に規定する技術的助言であることを申し添える。

おつて、「医療施設における院内感染の防止について」（平成3年6月26日付け指発第46号厚生省健康政策局指導課長通知）は廃止する。

院内感染防止に関する留意事項

院内感染とは、①医療施設において患者が原疾患とは別に新たになり患した感染症、②医療従事者等が医療施設内において感染した感染症のことである。

院内感染は、人から人へ直接、又は医療器具等を媒介して発生する。特に、免疫力の低下した患者、未熟児、老人等の易感染患者は、通常の病原微生物のみならず、感染力の弱い微生物によっても、院内感染を起こす可能性がある。

このため、院内感染防止対策は、個々の医療従事者ごとに対策を行うのではなく、医療施設全体として対策に取り組むことが必要である。

(感染制御の組織化)

○ 病院長等の医療施設の管理者が積極的に感染制御に関わるとともに、診療部門、看護部門、薬剤部門、臨床検査部門、事務部門等の各部門を代表する職員により構成される「院内感染対策委員会」を設け、院内感染に関する技術的事項等を検討するとともに、全ての職員に対する組織的な対応方針の指示や教育等を行うこと。

○ 院内全体で活用できる総合的な院内感染対策マニュアルを整備し、また、必要に応じて、各部門ごとにそれぞれ特有の対策を盛り込んだマニュアルを整備すること。これらのマニュアルは、最新の科学的根拠や院内体制の実態に基づき適時見直しを行うこと。

○ 検体からの薬剤耐性菌の検出情報等、院内感染対策に重要な情報が、臨床検査部門から診療部門へ迅速に伝達されるよう、院内部門間の感染症情報の共有体制を確立すること。

(標準予防策と感染経路別予防策等)

○ 感染防止の基本として、例えば手袋・ガウン・マスク等の個人用防護具を、感染性物質に接する可能性に応じて適切に配備し、医療従事者にその使用法を正しく周知する等の標準的予防策を実施するとともに、必要に応じて、院内部門や、対象患者及び対象病原微生物等の特性に対応した感染経路別予防策(空気予防策、飛沫予防策、接触予防策)を実施することにより、易感染患者を防御する環境整備に努めること。

○ 近年の知見によると、消毒薬の噴霧、散布、蒸(くん)蒸や紫外線照射などは効果が不確実であるだけでなく、作業者への危険性もあることから、これらの方法については、単に病室等を無菌状態とすることを目的として漫然と実施しないこと。

○ 近年の知見によると、粘着マット及び薬液浸漬マットについては、感染防止効果が認められないことから、原則として、院内感染防止の目的としては、これらを使用しないこと。

○ 近年の知見によると、定期的な環境微生物検査は必ずしも施設の清潔度の指標とは相関しないことから、一律に実施するのではなく、例えば、院内感染経路を疫学的に把握する際に行う等、必要な場合に限定して実施すること。

(医療材料、医療機器等の洗浄、消毒、滅菌)

○ 医療材料、医療機器等を安全に管理し、適切な洗浄、消毒又は滅菌を行うとともに、消毒薬や滅菌用ガスが生体に有害な影響を与えないよう十分に配慮すること。

○ 使用済みの医療材料は、消毒、滅菌に先立ち、洗浄を十分行うことが必要であるが、その方法としては、現場での一次洗浄は極力行わずに、可能な限り中央部門で一括して十分な洗浄を行うこと。

(手術と感染防止)

○ 手術室は、空調設備により周辺の各室に対して陽圧を維持し、清浄な空気を供給するとともに、清掃が容易にできる構造とすること。

○ 手術室内を無菌状態とすることを目的とした、消毒薬を使用した床消毒については、日常的に行う必要はないこと。

○ 近年の知見によると、水道水と滅菌水による手洗いを比較した場合でも、意手洗いの減菌効果の差が認められず、清潔な流水で十分であるとされていることから、必ずしも滅菌水を使用する必要はないこと。

○ 近年の知見によると、集中治療室などの清潔領域への入室に際して、履物交換と個人用防護具着用を一律に常時実施することによる感染防止効果が認められないことから、院内感染防止を目的としては、必ずしも実施する必要はないこと。

(手洗い及び手指消毒)

○ 手洗い及び手指消毒のための設備・備品等を整備するとともに、患者処置の前には必ず手指消毒を行うこと。

○ 手術時手洗い及び手指消毒の方法としては、持続殺菌効果のある速乾性擦式消毒薬(アルコール製剤等)による消毒又は手術時手洗い用の外用消毒薬(クロルヘキシジン・スクラブ製剤、ポビドンヨード・スクラブ製剤等)と流水による消毒を基本とし、流水を使用した手指消毒においても、アルコール製剤等による擦式消毒を併用することが望ましいこと。

(職業感染防止)

○ 注射針の使用の際、針刺しによる医療従事者等への感染を防止するため、使用済みの注射針に再びキャップするいわゆる「リキャップ」を原則として禁止し、注射針専用の廃棄容器等を適切に配置するとともに、診療の状況等必要に応じて、針刺しの防止に配慮した安全器材の活用を検討するなど、医療従事者等を対象とした適切な感染予防対策を講ずること。

(環境整備と環境微生物調査)

○ 空調設備、給湯設備等、院内感染対策に有用な設備の適切な整備や、院内の清掃などを行い、院内の環境管理を適切に行うこと。

○ 環境整備の基本は清掃であるが、その際一律に広範囲の環境消毒を行わないこと。血液もしくは体液による汚染がある場合は、汚染局所の拭拭除去及び消毒を基本とすること。

○ ドアノブ、ベッド欄など、医療従事者や患者が頻繁に接触する箇所については、定期的に拭拭し、必要に応じてアルコール消毒を行うこと。

(新生児集中治療部門での対応)

○ 保育器の日常的な消毒は必ずしも必要ではないが、消毒薬を使用した場合には、その残留毒性に十分注意を払うこと。

○ 新生児集中治療管理室においては、特に未熟児などの易感染状態の患児を取り扱うことが多いことから、カテーテル等の器材を介した院内感染防止に留意し、気道吸引や創傷処置においても適切な無菌操作に努めること。

(感染性廃棄物の処理)

○ 感染性廃棄物の処理については、『廃棄物処理法に基づく感染性廃棄物処理マニュアル』(平成16年3月16日環廃産発第040316001号環境省大臣官房廃棄物・リサイクル対策部長通知による)に掲げられた基準を遵守し、適切な方法で取り扱うこと。

(その他)

○ 医療法(昭和23年法律第205号)及び感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律(平成10年法律第114号)の規定を遵守し、感染症の発生に関して規定された届出を適切に行うことは当然であるが、その他の院内感染発生を疑う事例がある場合には、保健所等の行政機関に適切相談し、技術的支援を得るよう努めること。

医政総発第1030001号  
医政指発第1030002号  
平成19年10月30日

各都道府県衛生主管部(局)長 殿

厚生労働省医政局総務課長



厚生労働省医政局指導課長



薬剤耐性菌による院内感染対策の徹底及び発生後の対応について

院内感染対策については、「医療施設における院内感染の防止について」(平成17年2月1日医政指発第0201004号厚生労働省医政局指導課長通知)及び「良質な医療を提供する体制の確立を図るための医療法等の一部を改正する法律の一部の施行について」(平成19年3月30日医政発第0330010号厚生労働省医政局長通知)を、特にバンコマイシン耐性腸球菌(VRE)及び多剤耐性緑膿菌(MDRP)等の薬剤耐性菌による院内感染に関しては、「バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)に対する院内感染防止対策について」(平成9年4月23日指第41号・健医感発第51号健康政策局指導課長・保健医療局エイズ結核感染症課長連名通知)、「多剤耐性緑膿菌(MDRP)をはじめとする院内感染防止対策の徹底について」(平成18年7月6日厚生労働省医政局指導課事務連絡)等を参考に貴管下医療施設に対する指導方お願いしているところである。

しかしながら、これらの通知等の発出後においても、高度の医療を提供する特定機能病院をはじめとし、地域の中核病院においても、VRE、

MDRP等の薬剤耐性菌による院内感染事例が散見されている。また、事例の発生に至った原因の究明、患者や家族への説明等事例発生後の対応についての課題も指摘されているところである。

については、貴管下の医療機関に対して、関係法令、通知等を参考に、実施体制の確認等を含め、院内感染対策に関する指導の徹底を改めてお願いする。

特に院内感染対策を含めた医療安全管理体制の整備として、事例発生への対応に当たっては、「医療安全管理者の業務指針および養成のための研修プログラム作成指針の送付について」(平成19年3月30日医政発第0330019号・薬食発第0330009号厚生労働省医政局長・医薬食品局長連名通知)の別添の1.の3.の4)医療事故への対応に関する事項を参考とされたい。

また、患者や家族への説明については、医療法及び保険医療機関及び保険医療担当規則等の規定に基づく対応のほか、「診療情報の提供等に関する指針の策定について」(平成15年9月12日医政発第0912001号厚生労働省医政局長通知)の3の診療情報の提供に関する一般原則、6の診療中の診療情報の提供、7の診療記録の開示、9の連携に対する診療情報の提供及び11の診療情報の提供に関する苦情処理に関する事項を参考とされたい。

また、各医療機関において重大な院内感染事例が発生し、当該医療機関内のみでの対応が困難な事態が発生した場合又は発生したことが疑われる場合や患者、住民からの相談等において調査が必要な場合には、保健所、医療安全支援センター、地方衛生研究所等の行政機関の専門家等による支援体制の確保をお願いしてきたところであるが、必要に応じ、国立感染症研究所等の協力を得ることについても考慮されたい。

平成19年12月27日 発行 (110部)

平成18年度厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)

「薬剤耐性菌等に関する研究(118-新興-11)」班

主任研究者 荒川寛規

分担研究課題

「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、疫学的調査解析機体の強化に関する研究」

分担研究者 富山県衛生研究所 所長 倉田 毅

協力研究者 富山県衛生研究所 総引正則

秋田県保健環境センター 磯沼順子

岐阜県保健健康センター 八柳 謙

国立感染症研究所 白木 豊

愛知県衛生研究所 鈴木里和

加賀県衛生研究所 鈴木里和 (平成19年～)

問合せ先: 富山県衛生研究所総務部(担当: 総引正則 masumori.watshiki@pref.toyama.lg.jp)

〒939-0382 富山県射水市中山4-17-1

TEL 0766-56-8112 / FAX 0766-56-7226

薬剤耐性菌等に関する研究班

新型の薬剤耐性菌の耐性機構・立体構造の物理化学的解析とその耐性機能ならびに  
立体構造に基づいた検出剤の分子設計に関する研究

基質認識が拡大した三残基欠損型 AmpC β-ラクタマーゼの X 線結晶構造解析

分担研究者 黒崎博雅 熊本大学大学院医学薬学研究部構造機能物理化学分野

## 研究要旨

β-ラクタマーゼはペニシリンをはじめとするβ-ラクタム系抗生物質を加水分解することでその抗菌作用を失活する酵素である。そのためβ-ラクタマーゼを産生する細菌はβ-ラクタム剤耐性菌として医療上大きな問題となっている。1994年に、クラス C に属する大腸菌 HKY28 が臨床分離株として単離され、この菌の産生する AmpC β-ラクタマーゼは、基質および阻害剤に対する親和性が上昇することが報告された。この酵素とこれまでに報告されている大腸菌由来の AmpC β-ラクタマーゼ (native AmpC) のアミノ酸配列を比較したところ、本酵素は Gly286、Ser287、Asp288 の三残基欠損した AmpC β-ラクタマーゼ (AmpC<sup>D</sup>) であることがわかった。

本研究では、三残基欠損に伴う AmpC<sup>D</sup> と native AmpC の基質ならびに阻害剤の親和性の違いを構造学的に明らかにすることを目的とし、AmpC<sup>D</sup> の結晶化と X 線結晶構造解析を行った。1.7Å の分解能で決定した AmpC<sup>D</sup> の構造解析結果から、欠損した三残基 (Gly286、Ser287 および Asp288) 周辺の Asn289~Leu293 の領域で著しい構造変化が起こっていることがわかった。この構造変化により酵素活性ポケットに大きな空間を与え、基質特異性が変化することを明らかにした。

## 研究協力者

山口佳宏 (熊本大学環境安全センター)

### A. 研究目的

β-ラクタマーゼは、Ambler らによってアミノ酸配列の相同性に基づき、A~D の 4 つのクラスに分類されている (1)。クラス A、C および D の酵素は活性中心にセリン残基を持つセリンβ-ラクタマーゼであり、一方、クラス B は活性中心に亜鉛イオンを含有するメタロβ-ラクタマーゼである。

1994 年に、国立感染症研究所細菌第二部の荒川

らにより、クラス C に属する染色体性 AmpC β-ラクタマーゼを産生する *E. coli* HKY28 が人尿検体から臨床分離株として単離された (4)。この酵素のアミノ酸の一次配列から、現在までに報告されている *E. coli* 由来の AmpC β-ラクタマーゼと比較すると、Gly286、Ser287、Asp288 の三残基が欠損している AmpC β-ラクタマーゼ (以下 AmpC<sup>D</sup> と略す) であることがわかった (図 1)。さらに AmpC<sup>D</sup> の三残基欠損した部位に Gly286、Ser287、Asp288 を再び導入した AmpC<sup>D</sup> β-ラクタマーゼ変異体 (以下 AmpC<sup>R</sup> と略す) を調製し、各種β-ラクタム剤に対

する加水分解の速度論的研究が行なわれた(4)。Amp<sup>C</sup>と Amp<sup>R</sup>との比較から、Amp<sup>C</sup>はセフトキシムを除き、セフトジジム、セフェピム等の第三代セフェム系抗生物質に対する耐性レベルを増加させるβ-ラクタマーゼであることが明らかとなった。

本研究は、AmpC β-ラクタマーゼによく保存されている三残基(Gly286、Ser287、Asp288)が欠損することで Amp<sup>C</sup>の立体構造がどのように変化し、それに伴って基質特異性がどのように拡大するのかを明らかにするために、Amp<sup>C</sup>の大量発現系を構築し、X線結晶構造解析による三次元構造を明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. プラスミド抽出

菌株 *E. coli* CS14-2 pBCKS<sup>+</sup>/Amp<sup>C</sup>を 30 μg/mL クロラムフェニコールを含む LB 寒天培地にストリークし、37°Cで一晩放置した。形成した菌のコロニーから菌体を釣菌し、30 μg/mL クロラムフェニコールを含む 5 mL の LB 培地に植菌し 37°C で 12 時間、振とう培養(150 rpm)した。培養した菌体液を Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System を使い、以下の手順でプラスミドを抽出した。

培養した菌体液 5 mL を 15 mL 遠沈管に移し、4,000×g で 5 分間遠心した後、デカントして上清を捨てた。その後、4,000×g で 1 秒間遠心してマイクロピペットで上清をきれいに除いた。これに cell resuspension solution(250 μL)、ついで cell lysis solution(250 μL)を加え invert(4 回)を行い、その後 alkaline protease solution(10 μL)を加え、さらに invert(4 回)を行い室温で 5 分間放置した。室温放置後、の neutralization solution(350 μL)を加え、invert(4 回)し、12,000 rpm で 5 分間遠心した。

マイクロピペットで上清を注意して回収し、回収上清液(約 600 μL)をスピнкаラムに載せ、

12,000 rpm で 2 秒間遠心した。ろ液を捨てさらに残りの回収上清液を入れ、12,000 rpm で 1 分間遠心した。ろ液を捨てスピнкаラムに column wash solution(700 μL)を加え、12,000 rpm で 1 分間遠心し、ついでろ液を捨てた後 column wash solution(300 μL)を加え、12,000 rpm で 1 分間遠心した。

DNA を吸着しているカラム 1.5 mL をマイクロチューブの上に移し nuclease-free water(100 μL)を加え、1 分間放置した。その後 12,000 rpm で 1 分間遠心し、プラスミド DNA(約 100 μL)を得た。

### 2. Transformation (前々培養)

100 μL の competent cell (JM109) の入ったマイクロチューブ(1.5 mL)に抽出したプラスミド液(10 μL)を加え静かに攪拌した後、氷上に 30 分放置した。その後 42°C の水浴中に 50 秒置いた後、すぐに氷上に移した。2 分後、予め 37°C に保っていた SOC 溶液(900 μL)を加え、37°C で 1 時間振とう培養を行った(150 rpm)。1 mL の菌体液を濃縮するため、12,000 rpm で 5 秒間遠心し、上清 900 μL を除き、残りの液を穏やかに懸濁した。懸濁液 100 μL を 30 μg/mL クロラムフェニコールを含む 10 mL の 2×LB 培地に加え、37°C で 12 時間、振とう培養(150 rpm)をした。

### 3. Amp<sup>C</sup>の培養・精製

30 μg/mL クロラムフェニコールを含む 25 mL の LB 培地(2 本)に前々培養液を 1 mL ずつ接種し、37°C で 12 時間、振とう培養(150 rpm)をした。その後、30 μg/mL クロラムフェニコールを含む 2 L の LB 培地(5 本)に前培養液を 10 mL ずつ接種し、37°C で 24 時間、振とう培養(150 rpm)をした。24 時間後に培養液を回収し、4°C で 15 分遠心(5,000×g)して菌体を集めた。これを 20 mM BisTris-HCl buffer(pH 6.5)で懸濁し、4°C で 30 分遠心(5,000×g)し、湿菌重量で約 50 g の菌体を得た。湿菌重量 1 g に対して 1 mL の割合になるように 20 mM BisTris-HCl buffer(pH 6.5)を加えて再懸濁し、氷浴中で 20 秒おきに 10 秒間の超音

波破碎を 30 回行った。破碎した菌体液を 2°C で 75 分間超遠心(100,000×g)し、上清液を回収後 MILLEX GP 0.45 μm フィルターでろ過し、粗酵素溶液とした。

粗酵素の精製はカラムクロマトグラフィーを使って行った。まず SP Sepharose Fast Flow カラム(φ 26 mm×10 cm, 流速 60 mL/h)を使い、20 mM BisTris-HCl buffer(pH 6.5)中の NaCl 濃度(0~0.5 M)によって塩勾配をかけ、10 mL ずつ分取した。各分画に含まれるタンパク質濃度を 280 nm の吸光度を測定し、ニトロセフィン加水分解活性を有する分画(70 mL)を集めた。

この液をアミコン YM-10 で 20 mM BisTris-HCl buffer (pH 6.5, 1 M 硫酸, 0.3 M NaCl)に変換し、10 mL まで濃縮した。

濃縮液を Phenyl Sepharose 6Fast Flow(low sub)カラム(φ 16 mm×5 cm, 流速 60 mL/h)を使い、20 mM BisTris-HCl buffer (pH 6.5, 1 M 硫酸)中の硫酸濃度(1.0~0.5 M)によって勾配をかけ、5 mL ずつ分取した。前述の方法でタンパク質を含む活性分画を集め、2 mL まで濃縮した。

濃縮した活性分画を Sephacryl HR-100 (φ 16 mm×80 cm, 流速 6 mL/h)を使い、20 mM BisTris-HCl buffer(pH 6.5, 1 M 硫酸, 0.3 M NaCl)で 3 mL ずつ分取した。前述の方法でタンパク質を含む活性分画を集め、アミコン YM-10 で 20 mM BisTris-HCl buffer(pH 6.5, 1 M 硫酸, 0.3 M NaCl)に変換し、10 mL まで濃縮した。濃縮液を再び Phenyl Sepharose 6Fast Flow(low sub)カラム(φ 16 mm×5 cm, 流速 60 mL/h)を使い、20 mM BisTris-HCl buffer (pH 6.5, 1 M 硫酸)中の硫酸濃度(1.0~0.5 M)によって勾配をかけ、溶出させ 5 mL ずつ分取した。SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により単一バンドであることを確認し、アミコン YM-10 とアミコン Ultra を使い約 2 mL まで濃縮した。この溶液を精製酵素として-80°Cで保存した。

#### 4. AmpC<sup>D</sup>の結晶化

結晶化には蒸気拡散法を用いた。温度 20°C、リ

ザーバー溶液(20% PEG 4000、10% iso-propanol、0.1 M Na Citrate、pH 5.6:1 μL)、タンパク質溶液 1 μL の条件から結晶が析出した。

#### 5. AmpC<sup>D</sup>の X 線結晶構造解析

X 線測定は、高輝度光科学研究センター(SPring-8)のビームライン BL41XU で行なった。

測定条件は、温度 100 K、カメラ長 200 mm、検出器 ADSC Quantum-315、一枚あたりの露光時間は 1 秒、振動角 1°、全振動角 180°(180 枚)の条件で行なった。プログラム HKL2000(8)を使い、収集したデータの指数付け、反射強度の積算、および反射強度のスケーリングを行った。

解析には、*E. coli* 由来の AmpC (PDB; 2BLS) (9) を Search model とし分子置換法を用いた。プログラムは CCP4(2)を用いて精密化し、グラフィックプログラム O(6)と Coot(5)でモデルの修正を行なった。

### C. 研究結果

#### 1. AmpC<sup>D</sup>と native AmpC の全体構造の比較

結晶学データ(分解能 1.7 Å)を表 1 に示す。

AmpC<sup>D</sup>の全体構造(図 2 右)は、クラス C β-ラクタマーゼに属する native AmpC(PDB code 2BLS; 図 2 左)(9)、P99(PDB; 1XX2)(7)、*E. cloacae* 由来の GC1(PDB; 1GCE)(3)の構造と同様、N 末端と C 末端が同一面にある構造をとっていることがわかった。

AmpC<sup>D</sup>と native AmpC(PDB; 2BLS)の Cα 原子の重ね合わせの RMSD(root-mean-deviation)は 0.68 Å であり、この中でアミノ酸残基 Ile48~Lys50、Pro94~Lys99 および欠損した三残基周辺に位置する Asn289~Leu293 のアミノ酸で RMSD 値が高いことがわかった。

Ser64 残基はクラス C β-ラクタマーゼの加水分解反応の活性中心と考えられている。この Ser64 に加えて Lys67、Gln120、Tyr150、Asn152、Lys315、Thr316、Ala318、および Gln120 残基もまた、加水分解活性に重要な役割を担っていると推定さ



れている。

Native AmpC と AmpC<sup>D</sup> の活性部位周辺の残基間の距離を表 2 に示した。Lys67N $\zeta$  と Ser640 $\gamma$  の距離が native AmpC では 4.73 Å であったのに対し、AmpC<sup>D</sup> では 2.68 Å であった。また、活性部位周辺残基の水素結合ネットワークを図 3 に示す。

#### D. 考察

AmpC<sup>D</sup> の X 線結晶構造解析は 1.7Å の分解能で分子置換法により決定することができた。AmpC<sup>D</sup> の全体構造は、非結晶単位に独立した二つの分子 (分子 A と分子 B) を含んでいた。分子 A と分子 B の C $\alpha$ 炭素の重ね合わせから、両分子間の全体構造の著しい変化は認められなかった。

つぎに、AmpC<sup>D</sup> と native AmpC (分解能 2.0 Å; PDB code 2BLS) の分子 A を比較すると Ile48~Lys50、Pro94~Lys99 ならびに Asn289~Leu293 領域において RMSD 値が高いことがわかった。

特に、AmpC<sup>D</sup> の三残基欠損領域近傍に存在する Asn289、Lys290、Ile291、Ala292、Leu293 のアミノ酸残基の C $\alpha$ 炭素の RMSD は、それぞれのアミノ酸残基の RMSD の値に比べて高く、また最も変化が見られた部分でもあった。この原因は、native AmpC において上の 5 残基は  $\alpha$ -helix 構造を形成しているのに対し、AmpC<sup>D</sup> ではこれらの残基はループ構造へと変化しているためであると考えられる (図 4)。この結果、AmpC<sup>D</sup> において上の 5 残基は活性中心の Ser64 の 0 $\gamma$  から遠ざかるように配向する。表 3 に特に活性中心から離れていた Asn289 ならびに Lys290 と活性中心の Ser640 $\gamma$  との距離を示す。AmpC<sup>D</sup> では、Asn289 と Lys290 の活性中心 Ser640 $\gamma$  からの距離は平均で約 15 Å 離れており、native AmpC の 12 Å 比べ約 3 Å 長くなっている。これらのことから、基質および阻害剤が結合すると考えられている活性ポケットに大きな空間を与えていることが明らかとなった。

さらに本研究の結果は、以前の AmpC<sup>D</sup> の種々の速度論解析ならびドッキング実験の結果を支持

している (例えば、三残基欠損することで第三代セファロスポリン系抗生物質、 $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤の親和性が上昇する) (4)。

つぎに、活性中心部位周辺のアミノ酸残基間の水素結合ネットワークを native AmpC のそれと比較すると、Ser64、Lys67 以外は大きな変化は認められなかった (図 3)。ここで Ser64 は求核試薬として、Lys67 は Ser64 の求核性の増大に関与していると考えられている。

Lys67 と Ser64 の水素結合を比較すると、Ser640 $\gamma$  と Lys67 の主鎖の N における水素結合は native AmpC ではいずれも観測された。Ser640 $\gamma$  と Lys67N $\zeta$  間における水素結合は、native AmpC では形成していなかったのに対し、AmpC<sup>D</sup> では形成していることがわかった (図 3)。

このことから、AmpC<sup>D</sup> における Ser640 $\gamma$  と Lys67N $\zeta$  間における水素結合は求核試薬として作用する Ser64 の基質ならびに阻害剤への方向づけと求核性の増大に寄与していると考えられる。

#### E. 総括

今回、*E. coli* 由来の三残基 (Gly286、Ser287、Asp288) 欠損した AmpC<sup>D</sup>  $\beta$ -ラクタマーゼの構造を 1.7Å の分解能で決定することができた。決定した X 線結晶構造結果から、三残基が欠損することで隣接する Asn289~Leu293 残基の領域に著しい構造変化を引き起こす事がわかった。この構造変化により native AmpC に比べ活性ポケットが拡大し、その結果、基質特異性に影響を与える事がわかった。

本研究の成果は、今後の AmpC  $\beta$ -ラクタマーゼに対する基質ならびに阻害剤の分子設計を行なう上で重要な知見を与えられる。

#### F. 参考論文

1. Ambler, R. P. 1980. The structure of  $\beta$ -lactamases. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 289:321-31.

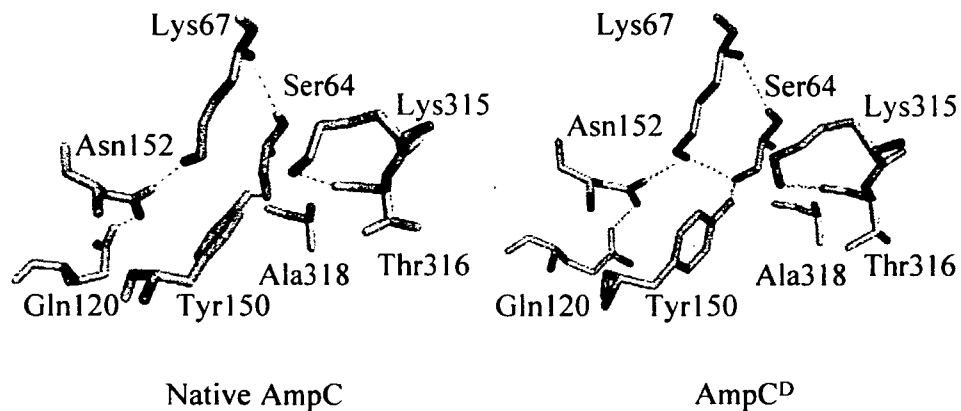
2. Collaborative Computational Project Number 4. 1994. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. Sect. D: Biol. Crystallogr.* **50**:760-763.
  3. Crichlow, G. V., M. Nukaga, V. R. Doppalapudi, J. D. Buynak, and J. R. Knox. 2001. Inhibition of class C  $\beta$ -lactamases: structure of a reaction intermediate with a cephem sulfone. *Biochemistry* **40**:6233-9.
  4. Doi, Y., J. Wachino, M. Ishiguro, H. Kurokawa, K. Yamane, N. Shibata, K. Shibayama, K. Yokoyama, H. Kato, T. Yagi, and Y. Arakawa. 2004. Inhibitor-sensitive AmpC  $\beta$ -lactamase variant produced by an *Escherichia coli* clinical isolate resistant to oxyiminocephalosporins and cephamycins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:2652-8.
  5. Emsley, P., and K. Cowtan. 2004. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. Sect. D: Biol. Crystallogr.* **60**:2126-2132.
  6. Jones, T. A., J.-Y. Zou, S. W. Cowan, and M. Kjeldgaard. 1991. Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr. Sect. A: Found. Crystallogr.* **47**:110-19.
  7. Lobkovsky, E., P. C. Moews, H. Liu, H. Zhao, J.-M. Frère, and J. R. Knox. 1993. Evolution of an enzyme activity: crystallographic structure at 2-Å resolution of cephalosporinase from the *ampC* gene of *Enterobacter cloacae* P99 and comparison with a class A penicillinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:11257-61.
  8. Otwinowski, Z., and W. Minor. 1997. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* **276**:307-326.
  9. Usher, K. C., L. C. Blaszcak, G. S. Weston, B. K. Shoichet, and S. J. Remington. 1998. Three-dimensional structure of AmpC  $\beta$ -lactamase from *Escherichia coli* bound to a transition-state analogue: possible implications for the oxyanion hypothesis and for inhibitor design. *Biochemistry* **37**:16082-16092.
- G. 研究発表
1. 論文発表  
なし
  2. 学会発表  
なし
- H. 知的所有権の出願・登録状況
1. 特許出願  
なし
  2. 実用新案登録、その他  
なし

	283		296
AmpC <sup>D</sup>	IIN	---	NKIALAAR
AmpC <sup>R</sup>	IINGSDN		KIALAAR
K12 AmpC	IINGSDN		KIALAAR
GC1	VVEGSDS		KVALAPL
P99	VVEGSDS		KVALAPL
CHE	VVEGSD	-----	PL

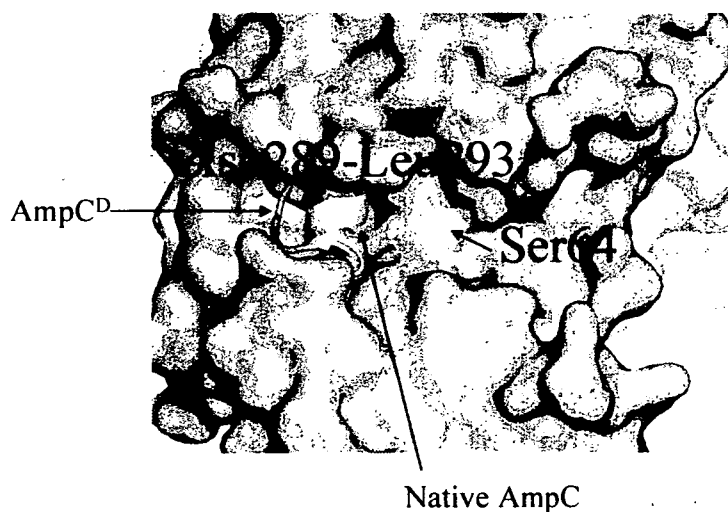
**Figure 1.** Predicted amino acid sequence of the AmpC  $\beta$ -lactamase of *E. coli* HKY28 aligned with that of *E. coli* K-12. The 3-amino acid deletion in the HKY28 AmpC is boxed (5).



**Figure 2.** (A) Overall structures of (A) native AmpC  $\beta$ -lactamase (PDB code 2BLS, left) and (B) AmpC<sup>D</sup>  $\beta$ -lactamase.



**Figure 3.** Comparison of hydrogen bonding network between Active site of the monomer A in AmpC (left) and that of monomer A in AmpC<sup>D</sup> (Right)



**Figure 4.** Superposition of molecular surface representations of native AmpC (PDB code 2BLS) and AmpC<sup>D</sup>. The structures of Asn289~Ile293 region in AmpC and AmpC<sup>D</sup> are  $\alpha$ -helix for native AmpC and loop for AmpC<sup>D</sup>, respectively.

**Table 1.** Crystallographic data collection and refinement statistics for the AmpC<sup>d3</sup> enzyme

<b>Data collection</b>	
Resolution (Å)	50.0–1.70
Wave length (Å)	1.07
<b>Cell dimensions</b>	
<i>a</i> , <i>b</i> , and <i>c</i> (Å)	47.1, 47.4, 81.5
$\alpha$ , $\beta$ , and $\gamma$ (°)	82.6, 80.9, 65.4
Space group	<i>P</i> 1
Completeness (%)	94.3
$R_{\text{merge}}^a$ (outer shell)	0.062 (0.267)
No. of observed reflections	141726
No. of unique reflections	65343
$\langle I \rangle / \langle \sigma \rangle$	18.1
<b>Refinement statistics</b>	
R.m.s.d deviation from ideal <sup>b</sup>	
Bond lengths (Å)	0.029
Angles (deg.)	2.3
$R_{\text{working}}^c$	0.154
$R_{\text{free}}^d$	0.208

<sup>a</sup> $R_{\text{merge}} = \frac{\sum |I_j - \langle I_j \rangle|}{\sum I_j}$ , where  $I_j$  is the observed intensity for reflection  $j$  and  $\langle I_j \rangle$  is the average intensity calculated for reflection  $j$  from replicate data. <sup>b</sup>R.m.s.d: root-mean-square-deviation. <sup>c</sup> $R_{\text{working}} = \frac{\sum |F_o - F_c|}{\sum F_o}$ , where  $F_o$  and  $F_c$  are the observed and calculated structure factors, respectively. <sup>d</sup> $R_{\text{free}} = \frac{\sum |F_o - F_c|}{\sum F_o}$  for 5% of the data not used at any stage of structural refinement.

**Table 2.** Distances of active site residues for AmpC<sup>d3</sup> and Native AmpC

Atom pair	AmpC <sup>d3</sup> (Å)	AmpC (Å)
Ser64Oγ-Lys67Nζ	2.7	4.7
Ser64Oγ-Tyr150OH	3.0	3.4
Ser64O-Lys67N	3.0	3.0
Lys315N-Thr316O	2.8	3.1
Asn152Oδ-Lys67Nζ	2.7	2.4
Gln120Oε1-Asn152Nδ	2.9	2.2

**Table 3.** Distances from O $\gamma$  of Ser64 in native AmpC and AmpC<sup>D</sup>

Amino acid residue	Native AmpC		AmpC <sup>D</sup>	
	atom	distance <sup>a</sup> (Å)	atom	distance <sup>a</sup> (Å)
Asn289	N	10.9 (11.2)	N	15.3 (15.4)
	C $\alpha$	10.3 (11.0)	C $\alpha$	14.9 (14.9)
	O $\delta$	7.7 (8.7)	O $\delta$	13.6 (13.6)
	N $\delta$	7.9 (8.3)	N $\delta$	12.8 (12.7)
	O	11.5 (11.8)	O	14.2 (15.7)
Lys 290	N	12.7 (13.1)	N	16.0 (17.1)
	C $\alpha$	13.8 (14.3)	C $\alpha$	16.3 (15.8)
	N $\zeta$	17.5 (18.0)	N $\zeta$	18.4 (20.6)
	O	14.7 (15.0)	O	16.1 (17.7)
	Average	11.8 (12.3)	Average	15.2 (15.9)

<sup>a</sup>The distances given are for monomers A of native AmpC and AmpC<sup>D</sup>.

The distances observed in monomer B are in parentheses.

薬剤耐性菌等に関する研究班

新型の薬剤耐性菌の耐性機構・立体構造の物理化学的解析とその耐性機能ならびに  
立体構造に基づいた検出剤の分子設計に関する研究

IMP-1 メタロ-β-ラクタマーゼアポ酵素の調製法の確立と溶液中における  $Zn^{2+}$  の動的挙動の解明

分担研究者 黒崎博雅 熊本大学大学院医学薬学研究部構造機能物理化学分野

**研究要旨**

メタロ-β-ラクタマーゼの 1 つである IMP-1 (WT IMP-1) は、ほとんど全てのβ-ラクタム剤を加水分解し不活化する複核 Zn 酵素である。しかしながら、WT IMP-1 のβ-ラクタム加水分解機構を解明する上で重要である活性中心に存在する  $Zn^{2+}$  と活性との相関は未だ詳細に解明されていない。

本研究では、WT IMP-1 の溶液中における  $Zn^{2+}$  の動的挙動を明らかにすることを目的とし、WT IMP-1 の  $Zn^{2+}$  を取り除いたアポ酵素 (apoIMP-1) を調製し、これを用いて  $Co^{2+}$  置換 IMP-1 酵素 ( $Co^{2+}$ -IMP-1) の分光学的特徴づけを行った。さらに、apoIMP-1 に 1 当量の  $Zn^{2+}$  を添加して調製した単核  $Zn^{2+}$  型 IMP-1 酵素 (mono- $Zn^{2+}$ -IMP-1) の X-ray Absorption Fine Structure (XAFS) 解析も行った。

**研究協力者**

山口佳宏 (熊本大学環境安全センター)

水分子、Asp のカルボキシレート、His のイミダゾール基、Cys のチオレートが配位している (サイト 2)。

**A. 研究目的**

クラス B β-ラクタマーゼは、活性中心に  $Zn^{2+}$  を要求するメタロ-β-ラクタマーゼ (MBLs) である。

1996 年に *B. fragilis* が産生する MBL の一つである CcrA の X 線結晶構造 (4) が、また、2000 年には、*P. aeruginosa* 由来の IMP-1 の X 線結晶構造が Concha らによって報告された (3)。CcrA の 3 次元構造および活性中心を図 1 に示す。CcrA は  $\alpha\beta/\beta\alpha$  のサンドイッチ構造を形成し、そのβ-シート間の広くて浅い溝の底に活性中心が存在する。その活性中心には 2 つの  $Zn^{2+}$  が存在し、1 つ目の  $Zn^{2+}$  ( $Zn1$ ) には 3 つの His のイミダゾール基が配位し (サイト 1)、2 つ目の  $Zn^{2+}$  ( $Zn2$ ) には、

MBLs の中で *B. cereus* が産生する Bc II や CcrA はこの  $Zn^{2+}$  イオンに対して、IMP-1 の配位環境と似ているにもかかわらず、 $Zn^{2+}$  イオンに対する解離定数は BcII では  $Zn1: 0.6 \text{ nM}$ ,  $Zn2: 1.5 \text{ }\mu\text{M}$  (7)、CcrA では  $Zn1, Zn2: 10 \text{ }\mu\text{M}$  以下 (5) とそれぞれ異なっており、 $Zn^{2+}$  イオンと酵素活性との相関について多くの議論がなされているが未だに解決されていないのが現状である。

本研究では、野生型の IMP-1 (以下 WT IMP-1 と略す) における溶液中の配位構造を明らかにすることを目的とした。まず IMP-1 から  $Zn^{2+}$  を除いたアポ酵素 (以下 apoIMP-1 と略す) を調製して  $Zn^{2+}$  とほぼ同じイオン半径で分光学的に追跡できる

Co<sup>2+</sup>を用いて UV-Vis スペクトルならびに MCD (Magnetic circular dichroism) スペクトルを測定した。

つぎに、apoIMP-1 に 1 当量の Zn<sup>2+</sup>を添加し monoIMP-1 を調製し、Zn<sup>2+</sup>配位環境と動的挙動を X-ray Absorption Fine Structure (XAFS) により解析した。

## B. 研究方法

### 1. *E. coli* BL21(DE3) (pET9a/d-IMP) からの IMP-1 の抽出と精製

*S. marcescens* TN9106 株由来のシグナルペプチドが除かれた pET9a/d-IMP で形質転換した *E. coli* BL21(DE3) から IMP-1 をすでに報告されている方法に従って抽出・精製した(11)。ただし、OD<sub>600</sub> が約 3.5 の時に、IPTG を 1 mM となるように添加した。10 L の培養液から、約 240 mg の精製酵素を得ることができた。精製された酵素の純度検定は、15% SDS-PAGE を用いて行った。

### 2. IMP-1 部位特異的変異酵素 (mutant C221A) の抽出と精製

部位特異的変異法によって得られた変異導入プラスミドを用いて形質転換させた *E. coli* XL-1 Blue (pET/IMP-C221A) と *E. coli* BL21 (DE3) star (Competent Cell) を用いて、IPTG 添加後の培養温度を 20°C に変更して抽出・精製を行った。

### 3. WT、mutant C221A の apo 酵素の調製

IMP-1 溶液 (50 mM MOPS-NaOH, 1.0 M NaCl (pH 6.5) 緩衝液) に 30%グリセリンになるようグリセリンを加えた後、50 mM MOPS-NaOH, 1.0 M NaCl 緩衝液 (pH 6.5) に溶かした 200 mM EDTA 溶液を 50 mM となるように少しずつ加え、30°C で 12 時間置いた。Cephalothin 加水分解活性が EDTA 未処理の IMP-1 に対して 5%になったことを確認した後、5°C で PD-10 カラム (φ 16×50 mm) を使い、30%グリセリンを含む 50 mM MOPS-NaOH, 1.0 M NaCl 緩衝液 (pH 7.0) で溶出し、約 200 μL 毎に分取した。それぞれ分光光度計を用いて 280 nm の吸光度を測

定した。Mutant C221A の apo 酵素 (以下 apo mutant C221A と略す) の調製についても同様の方法で行った。

### 4. Co<sup>2+</sup> 置換酵素の Magnetic Circular Dichroism (MCD) スペクトル測定

Apo 酵素を調製した後、酵素 1 当量あたり Co<sup>2+</sup> 溶液 1 当量、ついで 2 当量添加し、室温で 15 分間放置した後 JASCO J-500A の分光光度計を用いて、1.31 T で MCD スペクトルを測定した。

### 5. MonoIMP-1 の X-ray Absorption Fine Structure (XAFS) 測定

990 μM の apoIMP-1 を調製した後、Zn<sup>2+</sup> を 1 当量となるように加え、SPring8 BL37XU で X 線吸収スペクトルを測定した。Zn の K-edge の X 線吸収スペクトルは、4.6 GeV のビームエネルギーで、19 素子 SSD (Solid state detector) (CANBERRA) を利用した蛍光法で測定した。サンプルである monoIMP-1 は MOPS 緩衝液 (50 mM, 1.0 M NaCl, 30% グリセリン) 中で約 1 mM の濃度で測定に使い、1.5 μL の微量セルに 5 μL ずつマウントして 100 K で測定した。ピーク領域は積算して、*k*<sup>2</sup> の重みをかけてフーリエ変換を行った。

## C. 研究結果

### 1. ApoIMP-1 と apo mutant C221A 酵素の調製と性質

WT IMP-1 と mutant C221A のそれぞれの酵素を 30%グリセリンを含む 50 mM MOPS-NaOH, 1.0 M NaCl, 50 mM EDTA 緩衝液 (pH 6.5) 中、30°C でインキュベートした。Cephalothin を用いて加水分解活性を測定し、50 mM EDTA を含まない 50 mM MOPS-NaOH (pH 7.0)、1.0 M NaCl 緩衝液中の加水分解活性を 100%としたとき、加水分解活性が 5%以下になったことを確認した。ついでゲルろ過 (PD-10) によりタンパク分画から EDTA を分離し、それぞれの apo 酵素を調製した。

### 2. Co<sup>2+</sup>置換酵素の UV-Vis スペクトル

アルゴン気流下室温で、ApoIMP-1 と apo mutant



C221A 酵素それぞれに  $\text{CoCl}_2$  を 0.2 当量ずつ 3 当量まで添加し UV-可視スペクトル測定した。得られたスペクトルから apo 酵素のスペクトルを差し引いたものを図 2 に示した。

ApoIMP-1 のでは、 $\text{CoCl}_2$  溶液を添加していくと 344 nm と 527 nm、554 nm、613 nm、636 nm に吸収が現れた。これらの吸収は加えた  $\text{Co}^{2+}$  の濃度とともに増大し、2 当量の  $\text{Co}^{2+}$  添加で吸収はほぼ変化しなくなった(図 2 inset、 $[\text{Co}^{2+}]/[\text{apoIMP-1}]$  に対する  $\Delta\epsilon$  のプロット参照)。1 当量  $\text{Co}^{2+}$  添加のピーク強度に対して、2 当量添加した際のピーク強度は約 4 倍であった。

一方、apo mutant C221A では apoWT IMP-1 で観察された 350 nm 付近の吸収はまったく観察されず、550 nm に極大をもつ吸収が現れ、1 当量  $\text{Co}^{2+}$  添加で吸収はほぼ変化しなくなった(図 2 下、inset 参照)。

### 3. $\text{Co}^{2+}$ 置換酵素の MCD スペクトル

ApoIMP-1 と apo mutant C221A 酵素に 1 当量ならびに 2 当量の  $\text{Co}^{2+}$  を添加して調製した mono- $\text{Co}^{2+}$ -IMP-1 と di- $\text{Co}^{2+}$ -IMP-1 酵素の MCD スペクトルを測定した。

室温における MCD スペクトルを図 3 に示す。IMP-1 において、1 当量の  $\text{Co}^{2+}$  の添加(mono- $\text{Co}^{2+}$ -IMP-1 が溶液中で生成)で 335 nm に負のコットン効果、360 nm に正のコットン効果が観察された。また、500~700 nm にかけてブロードな負のコットン効果が現れた。

つぎに 2 当量の  $\text{Co}^{2+}$  を添加した際(di- $\text{Co}^{2+}$ -IMP-1 が溶液中で生成)に 335 nm、360 nm、555 nm、610 nm、635 nm にはっきりとしたピークが観察された。

一方、mutant C221A においては、1 当量ならびに 2 当量の  $\text{Co}^{2+}$  を添加しても 335 nm と 360 nm の吸収は全く観察されなかった。また、555 nm に 1 つだけ負のコットン効果が見られ、IMP-1 で見られた 600~650 nm 付近には吸収は観察されなかった。

### 4. Mono-Zn-IMP-1 の XAFS 解析

ApoIMP-1 (900  $\mu\text{M}$ ) に  $\text{Zn}^{2+}$  を 1 当量添加して調製した単核 Zn IMP-1 酵素(mono- $\text{Zn}^{2+}$ -IMP-1)を調製し 100 K で、Zn の X 線吸収を利用した XAFS 測定を行った。得られた生データを  $k^2$  の重みをかけてフーリエ変換して得られた原子間距離 R (Å) に対し、縦軸にフーリエ変換 FT 強度をプロットした(図 4)。

### D. 考 察

MBLs は活性中心に 2 つの非対称な  $\text{Zn}^{2+}$  結合サイトを有し、生理的条件下ではほとんどの MBLs が 2 つの  $\text{Zn}^{2+}$  を含むと報告されている(1, 2, 4)。しかし、配位環境が同じアミノ酸残基でも活性中心に  $\text{Zn}^{2+}$  を 1 つしか含まない MBL が確認されているが、酵素活性を有している(6)。このように MBLs の  $\text{Zn}^{2+}$  の個数と活性の相関はまだ解明されていない。

そこで本研究では、IMP-1 を用い活性中心内の  $\text{Zn}^{2+}$  の挙動について検討した。

これまでの apoIMP-1 酵素の調製については、沈殿などの理由からその調製が難しかった。2000 年 Haruta 等は apoIMP-1 酵素を、EDTA で処理したのち透析法で調製したが、 $\text{Zn}^{2+}$  による活性の回復は 30%であったと報告している(8)。

本研究では透析法を用いず、直接 EDTA を WT IMP-1 溶液に加え、さらに酵素の変性による沈殿を防ぐため 30%のグリセリンを緩衝液中に加えた。その IMP-1 溶液を 30°C で 12 時間インキュベートした。この時点で活性がインキュベート前の 5% 以下に低下した。その後直ちに 4°C の環境で PD-10 によるゲルろ過を行った。このようにして調製した apo 酵素の  $\text{Zn}^{2+}$  量をフレーム式原子吸光法で 1 分子あたり 0.025 個含まれていることがわかった。また、 $\text{Zn}^{2+}$  を加えると活性が 100%回復したことから、apoIMP-1 の調製に成功した。

つぎに、Ar 下において  $\text{Co}^{2+}$  置換酵素( $\text{Co}^{2+}$ -IMP-1)、その分光学的特徴づけを行った。 $\text{Co}^{2+}$ -IMP-1 の UV-Vis スペクトルにおいて、344 nm

に Cys のチオール基から  $\text{Co}^{2+}$  への電荷移動吸収帯 (CT バンド) が見られることから、 $\text{Co}^{2+}$  はサイト 2 にある 221 位の Cys と配位することがわかった。また、その CT バンドは apo IMP-1 に  $\text{Co}^{2+}$  を 1 当量添加した際に  $\Delta\varepsilon = 300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  の吸収があり、2 当量添加した際には  $1,200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  までピークが上昇し、そのピークの増強度が約 3 倍であることがわかった。500-700 nm には Zn1 サイトの His116-X-His118 による d-d 遷移と思われる吸収が観察された。さらに、apo 酵素 1 分子に対して、1 当量の  $\text{Co}^{2+}$  を添加した際に、サイト 1、サイト 2 の両サイト由来の吸収が同時に観察された。MCD 解析でも同様のスペクトル結果が得られた。WT では 221 位の Cys のチオール基から  $\text{Co}^{2+}$  への CT バンドであると考えられる 336 nm、360 nm でのそれぞれ負、正のコットン効果が観察され、500-700 nm にも d-d 遷移由来と思われる 555 nm、610 nm、635 nm のピークが観察された。2 当量の  $\text{Co}^{2+}$  を添加したサンプルでは、これらのピークがそれぞれ増大していた。

そこで、500-700 nm の吸収帯がサイト 1 由来の d-d 遷移であることを確認するため、サイト 2 の Cys の変異体 (mutant C221A) ならびに mutant C221A の apo 酵素を調製し、 $\text{Co}^{2+}$  置換酵素 ( $\text{Co}^{2+}$ -C221A) UV-Vis スペクトルを測定した。 $\text{Co}^{2+}$ -IMP-1 とは異なる吸収スペクトルを与えた。全体的に吸収が弱く、Cys のチオール基から  $\text{Co}^{2+}$  への CT バンドはほとんど観察されず、d-d 遷移は 560 nm に 1 つの極大を示し、600 nm 以上の吸収はなかった。MCD 解析においても  $\text{Co}^{2+}$  置換された mutant C221A では、350 nm 付近のコットン効果はほとんど観察されず、555 nm の 1 つのピークのみが観察された。原子吸光測定の結果 mutant C221A 1 分子あたり約 1 個しか  $\text{Zn}^{2+}$  が含まれていないことから、 $\text{Co}^{2+}$  置換酵素において、 $\text{Co}^{2+}$  はサイト 1 に配位していると考えられた。これより 555 nm のピークはサイト 1 の His116-X-His118 由来であることが考えられ、また WT のときに観察された 600 nm 付近の

ピークはサイト 2 由来であることが示唆された。

注目すべきことは、UV-Vis スペクトル同様に MCD においても apoIMP-1 酵素に 1 当量の  $\text{Co}^{2+}$  を添加した際にサイト 1 とサイト 2 由来の吸収が同時に観測された点である。UV-Vis スペクトル、MCD スペクトル測定の結果より mono- $\text{Co}^{2+}$ -IMP-1 の  $\text{Co}^{2+}$  はサイト 1 とサイト 2 に分布しているか、または 2 つのサイトの間位置していると考えられる。

そこで apoIMP-1、1 分子に対し 1 当量の  $\text{Zn}^{2+}$  を加え、mono- $\text{Zn}^{2+}$ -IMP-1 の XAFS 測定を行うことで溶液中での配位環境を調べた。今回得られた結果では、1 つの大きなピークと shoulder が観察された (図 4)。MBL である BcII は、IMP-1 と同じ  $\text{Zn}^{2+}$  リガンドを活性中心に保存しているにも関わらず、生理的条件下では単核  $\text{Zn}^{2+}$  酵素であることが知られており、その XAFS 測定も報告されている (9)。今回の結果は BcII の結果と非常に類似したスペクトルを与えていることがわかった。特に、1 st shell に shoulder が観察されており、BcII では Cys221 のチオール基の寄与であると考えられている (10)。Mono- $\text{Zn}^{2+}$ -IMP-1 では実測データから 1 個の  $\text{Zn}^{2+}$  への配位数を N/O が 3、S が 0.3 (表 1)、 $\text{Zn}^{2+}$  に配位していると仮定してフィッティングすると実測データとよく一致した (図 4)。

$\text{Co}^{2+}$ -IMP-1 酵素の UV-Vis スペクトルおよび MCD の結果から、

(1) 1 個目の  $\text{Co}^{2+}$  が分布している、または両サイトの間位置していること、

(2) CT バンドの吸収が 1 当量の  $\text{Co}^{2+}$  添加の際に比べ、2 当量添加したときにピークの上昇度が 3 倍になっていたことがわかった。また XAFS 解析の結果から mono- $\text{Zn}^{2+}$ -IMP-1 では 0.3 のチオール配位が予想されたことから、IMP-1 の活性中心が単核型のときは、 $\text{Zn}^{2+}$  はサイト 1 とサイト 2 に 7:3 の割合で分布していると考えられる (図 5)。

## E. 総括

以上のように、本研究では本邦で初めて発見された IMP-1 メタロ-β-ラクタマーゼの apo 酵素調製法を確立し、溶液中の Zn<sup>2+</sup> の挙動を明らかにした。

本研究成果は IMP-1 と同様の構造をもつ MBL ファミリーに属する酵素、またその他の複核金属含有酵素等における阻害剤を開発する上で重要な知見を与えると考えられる。

#### F. 参考論文

1. Carfi, A., E. Duée, R. Paul-Soto, M. Galleni, J.-M. Frère, and O. Dideberg. 1998. X-ray structure of the ZnII β-lactamase from *Bacteroides fragilis* in an orthorhombic crystal form. *Acta Crystallogr. Sect. D: Biol. Crystallogr.* 54:45-57.
2. Carfi, A., S. Pares, E. Duée, M. Galleni, C. Duez, J.-M. Frère, and O. Dideberg. 1995. The 3-D structure of a zinc metallo-β-lactamase from *Bacillus cereus* reveals a new type of protein fold. *EMBO J.* 14:4914-21.
3. Concha, N. O., C. A. Janson, P. Rowling, S. Pearson, C. A. Cheever, B. P. Clarke, C. Lewis, M. Galleni, J.-M. Frère, D. J. Payne, J. H. Bateson, and S. S. Abdel-Meguid. 2000. Crystal structure of the IMP-1 metallo β-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and its complex with a mercaptocarboxylate inhibitor: binding determinants of a potent, broad-spectrum inhibitor. *Biochemistry* 39:4288-98.
4. Concha, N. O., B. A. Rasmussen, K. Bush, and O. Herzberg. 1996. Crystal structure of the wide-spectrum binuclear zinc β-lactamase from *Bacteroides fragilis*. *Structure* 4:823-36.
5. Crowder, M. W., Z. Wang, S. L. Franklin, E. P. Zovinka, and S. J. Benkovic. 1996. Characterization of the metal-binding sites of the beta-lactamase from *Bacteroides fragilis*. *Biochemistry* 35:12126-32.
6. Cuchural, G. J., Jr., M. H. Malamy, and F. P. Tally. 1986. Beta-lactamase-mediated imipenem resistance in *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30:645-8.
7. de Seny, D., U. Heinz, S. Wommer, M. Kiefer, W. Meyer-Klaucke, M. Galleni, J.-M. Frère, R. Bauer, and H. W. Adolph. 2001. Metal ion binding and coordination geometry for wild type and mutants of metallo-beta-lactamase from *Bacillus cereus* 569/H/9 (BcII): a combined thermodynamic, kinetic, and spectroscopic approach. *J. Biol. Chem.* 276:45065-78.
8. Haruta, S., H. Yamaguchi, E. T. Yamamoto, Y. Eriguchi, M. Nukaga, K. O'Hara, and T. Sawai. 2000. Functional analysis of the active site of a metallo-beta-lactamase proliferating in Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:2304-9.
9. Kuwabara, S., and E. P. Abraham. 1967. Some properties of two extracellular beta-lactamases from *Bacillus cereus* 569/H. *Biochem. J.* 103:27C-30C.
10. Meyer-Klaucke, W., R. P. Soto, M. Hernandez Valladares, H. Adolph, H. Nolting, J.-M. Frère, and M. Zeppezauer. 1999. A Comparison of *Bacillus Cereus* and *Aeromonas Hydrophilia* Zn-β-lactamases. *J. Synchrotron Rad.* 6:400-402.
11. Osano, E., Y. Arakawa, R. Wacharotayankun, M. Ohta, T. Horii, H. Ito, F. Yoshimura, and N. Kato. 1994. Molecular characterization of an enterobacterial metallo beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob.*

**G. 研究発表**

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

**H. 知的所有権の出願・登録状況**

1. 特許出願

なし

2. 実用新案登録、その他

なし