

表3 都道府県別の産科混合病棟状況とその施設分娩数そして母子同室までの時間別の施設数

都道府県	No	産科病棟の科別数					施設分娩件数 計					年間 平均 分娩 件数	母子同室までの時間					
		産科 単独	産婦 人科	産婦 人科 +1科	産婦人 科+2 科以上	施設 数計	産科 単独	産婦 人科	産婦 人科 +1科	産婦人 科+2 科以上	分娩件 数総計		生後 早期 から	生後 1日	生後 2日 以降	昼間 のみ	希望 者 のみ	母子 異室
北海道	1	5	5	8	6	24	3,188	2,092	4,966	2,166	12,412	517	10	8	3	2	1	
青森	2	2	1	1	2	6	1,060	220	200	796	2,276	379	4	2				
岩手	3	1	1	3	3	8	616	374	1,586	994	3,570	446	1	6			1	
宮城	4	6	1		1	8	5,207	504		145	5,856	732	6	2				
秋田	5	2		4	2	8	1,600		1,263	476	3,339	417	2	5			1	
山形	6	2	3	2	2	9	1,089	1,363	565	848	3,865	429	6	3				
福島	7	1	3		3	7	316	1,536		1,225	3,077	440	4	2			1	
茨城	8	2	3	1	2	8	1,190	4,545	673	708	7,116	890	4	2		2		
栃木	9	3	3	2		8	1,829	1,494	540		3,863	483	1	1	3	1	1	
群馬	10	1	3	2	2	8	340	1,784	340	2,839	5,303	663	4	4				
埼玉	11	7	5	3	3	18	5,805	3,342	1,681	827	11,655	648	6	4	4		2	
千葉	12	6	6	3	1	16	3,203	2,986	1,710	200	8,099	506	4	7		3	2	
東京都	13	20	17	6	13	56	18,565	15,607	2,860	4,292	41,324	738	25	10	4	6	1	
神奈川	14	10	13	3	9	35	8,729	9,718	1,740	4,001	24,188	691	18	9	1	2	5	
山梨	15	2	2			4	1,167	1,352			2,519	630	1	2			1	
長野	16	1	4	5	6	16	424	2,876	3,163	2,040	8,503	531	7	5		1	1	
静岡	17	4	3	5	6	18	3,523	1,907	2,327	2,541	10,298	572	4	7	1	4	2	
新潟	18	2	2	1	10	15	1,328	2,019	383	3,446	7,176	478	9	3		1	1	
富山	19	1	2	1	2	6	700	816	620	645	2,781	464	4			1	1	
石川	20	1	2	1	4	8	570	419	261	549	1,799	225	3				1	
福井	21	2		1	1	4	1,800		347	352	2,499	625		1			3	
岐阜	22	1	1	4	1	7	575	506	1,159	267	2,507	358	1	2	1	3		
愛知	23	14	7	5	12	38	9,745	4,064	2,723	4,050	20,582	542	12	14	1	5	5	
三重	24	1	2	3	2	8	319	1,541	1,043	585	3,488	436	1	2	1	2	2	
滋賀	25		2	3	2	7		686	933	267	1,886	269	1	3	1	2		
京都府	26	2	1	3	11	17	564	380	1,737	4,005	6,686	393	5	3	1		1	
大阪府	27	11	13	5	15	44	9,373	9,623	1,668	4,932	25,596	582	19	8	4	5	4	
兵庫	28	9	8	5	9	31	4,859	4,001	3,230	2,841	14,931	482	11	7	1	6	4	
奈良	29	2	1		3	6	1,523	348		1,470	3,341	557		6				
和歌山	30	1		3	1	5	591		1,434	450	2,475	495	2	1			1	
鳥取	31	1	1		2	4	264	442		612	1,318	330	2		1		1	
島根	32	1	2		3	6	3	1,362		883	2,248	375	3				1	
岡山	33	3	2	1	4	10	3,059	385	167	1,330	4,941	494	3	3	1		1	
広島	34	1	5	1	6	13	950	3,254	850	1,556	6,610	508	2	2		5	2	
山口	35	2	1	1	4	8	1,190	423	207	466	2,286	286	2	2	2	1	1	
徳島	36	1		2	3	6	400		1,152	780	2,332	389	2	1		1	2	
香川	37		5	2	4	11		1,514	1,220	1,397	4,131	376	2	2	1	1	1	
高知	38	1	3		2	6	162	1,392		425	1,979	330	3	1	2			
福岡	39	3	7	2	7	19	1,501	3,157	562	1,357	6,577	346	7	3	1	4	1	
佐賀	40		1	1		2		485	193		678	339	1	1				
長崎	41		2	2		4		662	430		1,092	273	3				1	
熊本	42	1	4	1	2	8	284	4,025	500	235	5,044	631	4	2			2	
大分	43	1	1	2	1	5	650	260	234	150	1,294	259	3	2				
宮崎	44	2	2	1	1	6	534	663	520	251	1,968	328	2	2	1		1	
鹿児島	45	1	2	4	3	10	165	922	1,201	389	2,677	268	5	1	2	1	1	
沖縄	46	2	1	1	3	7	941	760	260	860	2,821	403	5	1		1		
総計		142	153	104	179	578	99,901	95,809	46,648	20,733	301,006	521	224	152	37	60	37	

注：は0の枠を表す

表4 産科単独病棟と混合病棟における母子同室の割合

	分娩後すぐ	生後1日	生後2日以降	昼間だけ	希望時	母子異室	(計)
産科単独病棟	64	34	11	12	9	12	142
割合(%)	45.1	23.9	7.7	8.5	6.3	8.5	100
産科混合病棟	160	118	26	48	28	56	436
割合(%)	36.7	27.1	6.0	11.0	6.4	12.8	100
全体	224	152	37	60	37	68	578
割合(%)	38.8	26.3	6.4	10.4	6.4	11.8	100

の分娩数であった。総合病院でも数多くの分娩が行われ、主に産科患者で占められていた。しかしこの後40年間で分娩数は約半分になり、世代別にも65歳以上の老人が20%以上になると、産婦人科病棟は老いた婦人科患者を主に受ける混合病棟と変化してきた。

3. 母子同室を推進するために

母子同室内容は、分娩当日-1日の同室は混合病棟278/436(63.4%)と産科単独病棟98/142(69.0%)で高かった。一方MRSA感染症予防は、分娩直後からの母子同室が最も効果がある。分娩1日での母子同室が混合病棟で118(26.9%)産科単独病棟で34(23.9%)であり、もう一步の支援が期待される。母子異室の頻度は、母子異室に近い形態つまり分娩後2-3日以後や昼間だけあるいは希望時の母子同室を含めると混合病棟36.7%、産科単独病棟31%となり、全体の1/3近い。

次に母子異室を改善するかどうかを聞いた所、完全母子異室の施設は、67.7%の改善表明があり、それに近い状況である昼間だけや生後2日以降の母子同室の施設は、これが母子同室であると考えているので改善表明が5.4~13.3%しかない。これらは早期からの完全母子同室を期待したい。

たかが母子ケアというべきではない。この時期における母子支援の最も大切な内容は、母親の安心感、つまりリラックスした分娩や子育ての周辺状況を提供することが一番大切なことであることがわかってきた。英国の小児科医で精神分析学者であったウィニコットは「赤ん坊と母親」の中で以下のように述べている⁹⁾、特に親子の最初の関係性は、母親との授乳状況にあり、このはじめに起こることがうまくゆくことが重要であると。特に日本のこれまでの母乳率(生後1-2カ月)を考えると、1960年以前の自宅分娩時代は90%以上であったのに、施設分娩が主となった1970年代には30%と最低を記録し、1980年以降は40%台を低迷している。これは、喪をかえせば母乳育児の原点である母親の安心感が早期授乳の時期から十分達成されていないことを意味している。

総合病院における母子同室は混合病棟の有無とはかわりがなく、都道府県別に差があり地方ごとに異なるという良い。東北全域と、北陸の新潟と富山、そ

して九州全域に母子同室が多く、北陸の石川、福井、京都、鳥根と四国の香川に母子異室が多い。この地域別較差に関して考察すると、三砂らのデータから母子同室を経験していない産科医ほど、母子同室の意義やそれを推進しようという意図が理解されていない¹⁰⁾。これは出身大学の産婦人科病棟における分娩・産褥の母子ケアのあり方が、研修の場として大学病院やその系列病院で学ぶ若い産科研修医の考え方に大きな影響を与えていると考えられた。助産師においても同様のことが考えられ、分娩研修の場がかれらの分娩に対する考え方を作っていると考えられる。

4. 今後の展望について(全国における産科混合病棟と母子異室の解消のために)

上記の2点を充足させてゆける体制を作るためには、以下のような観点が必要である。

- 1) 分娩は健康棟で管理されるべきである。
- 2) 分娩施設における正常産とハイリスク分娩との鑑別がなされるべきである。
- 3) 地域において、ハイリスク分娩を扱える施設を集約化するべきである。
- 4) 地域において正常産は、助産師が中心となる運営形態をつくる。助産師外来・担当助産師の指定制度・継続した助産診療が妊娠・分娩・産褥においてなされなければならない。
- 5) 正常産は、その運営にはできるだけ母に既知の助産師が中心となり、母乳育児を基本とした指導が適切になされなければならない。
- 6) 正常産は、その家族の基盤となるもので、夫・兄弟・祖父母などの立会いが保障されねばならない。
- 7) ハイリスク分娩においても上記の項目を成就できるよう、出来る限り体制づくりも含めての努力が母子の周辺で行われるべきである。

以上の項目を充足させてゆくためには、

- 1) 分娩はヘルスケアの一環として、バースセンターで行われる基本を確立する。
- 2) 産科棟がバースセンターとして機能するために地域化されることが必要である。
- 3) 分娩施設を集約化し、産科病床30床以上年間分娩数700以上で単独病棟をめざす。

4) ハイリスク母子のお産は、総合あるいは地域周産期センターで行える体制にする。

5) 都道府県の周産期医療協議会で、総合と地域周産期センターでの分娩の地域化を図る。

6) 総合あるいは地域周産期センターでは、院内助産所を開設し正常産のあり方を探る中心として機能することが望ましい。

7) 病院機能評価の項目に、①産科病棟単独化と②分娩後すぐからの母子同室を入れ、全国での分娩環境の改善を図ることが肝要である。

5. 全国における産科混合病棟と母子異室の解消のために

(H20年荒川班総括報告より 周産期医療ケアにおける提言より抜粋し、一部訂正)¹¹⁾

正期産における上記の問題点を総合病院において解消するには、病院機能評価で改善を目指す。対象となる大きな問題点は以下の2つである。

1) 混合病棟を解消すること

2) 母子同室を推進すること

1) 混合病棟の解消に向けて、病院機能評価の改善目標に入れる。

改善目標：産科病棟は健康棟である必要があり、一般の産科以外の疾病による入院患者との混合は避けなければならない。従って産婦人科病棟あるいは産婦人科以外との混合病棟は、今後は解消してゆく必要がある。

産科単独病棟の定義：医師以外は、産科棟のスタッフとして他病棟との交替はなく、入院患者も産科にかかわる母子だけである。

機能評価段階を以下のように分ける。

評価5：産科単独病棟であり、さらに地域に開かれた産科救急の受け入れ病院あるいはバースセンターとしての機能を果たしている。

評価4：産科単独病棟であり、地域に開かれた病院としても機能している。

評価3：産科単独病棟である。

評価2：産科単独病棟でなく、婦人科と共有されている。

評価1：産科単独病棟でなく、婦人科を含めた他科との共有である。

2) 母子同室と母乳育児支援を病院機能評価における改善目標に入れる

改善目標：母親への母乳育児支援を行うために、病棟は全て母子同室にして母乳育児ができるだけスムーズに行えるよう配慮しその体制を組んでいる。

機能評価段階を以下のように分ける。

評価5：分娩後すぐからの母子同室で、専任の母乳育児推進委員(医師・看護師・助産師・一般職員)を置き、病院からのサポートがあり、地域での母乳育児も推進支援している。

評価4：分娩後すぐからの母子同室であり、母乳育児推進を行い、そのための専任スタッフがいる。

評価3：分娩後すぐからの母子同室を原則として、母乳育児活動を推進している。

評価2：母子同室を原則として、母乳育児活動を推進している。

評価1：母子異室である。

おわりに

少産少死のために、病棟の効率的運営を迫られている病院が増加し、いまや国公立も含めた総合病院の産科病棟は、75%が混合病棟と化している。これは世界的にみても前代未聞の事態であり、母子ケアの充実が必要な病院分娩のあり方を模索する中で、医療従事者を含めた医療行政の大きな反省が迫られている。今後も更に産科病棟が混合病棟化されてゆく中では、今後の展望で述べたような体制作りが、急務である。このことは周産期医療関係者だけでなく行政担当者に周知を計り、早急に改善策を作らなければならない。

[謝辞]

この研究は、厚生労働科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)新型薬剤耐性菌等に関する研究(H21-新興-一般-008)(主任研究者 荒川宜親)により行われた。また統計学的な解析に関しては、国立精神・神経医療研究センタートランスレーショナルメディカルセンター情報・管理解析部生物統計解析室室長米本直裕先生にご指導いただいた。さらに忙しい時間を割いて、私達のアンケート調査にご協力頂いた全国の産科併設総合病院の産婦人科病棟を管理運営されている医師、助産師、看護師の皆様方に心からお礼を申し上げます。

文 献

- 1) 産科病棟における混合化の実態調査に関する報告書。社団法人日本助産師会作成平成15年度厚生労働省医療関係者養成確保対策費等補助金 看護職員確保対策特別事業。2003:3-44
- 2) 北島博之：わが国の多くの総合病院における産科混合病棟とMRSAによる新生児院内感染との関係。環境感染誌 2008;23:129-134
- 3) 北島博之：正常新生児病棟におけるMRSAによるSSSS(2つの事件)。シンポジウム「院内感染対策をめぐって」日本未熟児新生児学会雑誌 2004;16:41-47
- 4) O'Connor S, Vietze PM, Sherrod KB, Sandler HM, Altmeier WA 3rd. Reduced incidence of parenting inadequacy following rooming-in. Pediatrics 1980;66(6):176-82
- 5) Olds DL, Kitzman H, Hanks C, et al. Effects of nurse home visiting on maternal and child functioning: age-9 follow-up of a randomized trial. Pediatrics 2007;120(4):e832-45
- 6) Lvoff NM, Lvoff V, Klaus MH. Effect of the baby-friendly initiative on infant abandonment in a Russian hospital. Arch Pediatr Adolesc Med 2000;154(5):474-7

- 7) 中山まき子：身体をめぐる政策と個人。母子健康センター事業の研究。勁草書房。2001：66-194
- 8) 病院機能評価事業 <http://jcqhc.or.jp/works/evaluation/>
- 9) ウィニコット：第6章 幼児期の環境の健康さ。「赤ん坊と母親」ウィニコット著作集 1 成田善弘，根本真弓訳，岩崎学術出版社。1993：69-77
- 10) 三砂ちづる，竹原健二，岡井崇，戸田律子，他：日本の赤ちゃんは出生後に母子同室で過ごしているか 一産婦人科医と助産師を対象とした横断研究より—母性衛生 2006：47：448-53
- 11) 北島博之：平成20年度厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）分担研究報告 薬剤耐性菌の発生動向のネットワークに関する研究 NICUにおける院内感染サーベイランス方法の改善および院内感染予防対策ガイドラインの作成について（総括報告）2008：22-23

The Mother-infant Care and Rooming-in Status in the Mixed or Obstetrics-Only Wards at General Hospitals in Japan

Hiroyuki Kitajima

Department of Neonatology, Osaka Medical Center and Research Institute for Maternal and Child Health

A national questionnaire-survey about the mixed obstetrics wards and rooming-in was carried out in 833 general hospitals in Japan. 578 replies (69.4%) were obtained. The results are shown as follows: Only obstetric wards are at 142 hospitals (24.6%) and mixed wards with other departments are at 436 (75.4%). The hospitals have over 500 beds totally are 91 of 142 former hospitals (64.1%) and 140 of 436 latter ones (33.5%). The mixed departments besides obstetrics are gynecological one 434 of 436 (99.5%), medical 162 (37.2%), surgical 97 (22.2%), pediatric 133 (30.5%) and others except for obstetrical and gynecological one are totally 283 hospitals (49.0%).

Rooming-in is set regardless of the number of mixed departments in general hospitals. Rooming-in is started early just after birth in 224 hospitals (38.8%), 1 day after birth in 152 (26.3%), over 2 days after birth in 37 (6.4%), daytime only in 60 (10.4%), only for mothers to wish in 37 (6.4%) and no rooming-in 68 (11.8%). These various state of mother-infant cares after birth are seen generally in most of hospitals. The differences in the type of rooming-in are revealed in various prefectures from 0 to 80% hospitals with rooming-in, from 0 to 75% hospitals with separating mothers and their infants. Mother-infant cares just after birth including rooming-in must be improved in every district in Japan.

**Handbook for
Prevention of
Healthcare
Associated Infections
in the NICU**

(The 1st edition)

<http://www.nih.go.jp/niid/bac2/janis/nicu/index.html>

CONTENTS

Introduction

1. Outline of this handbook
2. Evaluation of items recommended in this handbook
3. Notes on the terms used in this handbook
4. Abbreviations used in this handbook

Chapter 1: Infection control system in the NICU

1. Education and training of medical workers
2. Set up and organizational structure of an anti-infection committee at a hospital¹⁻³⁾
 - 1) Infection control committee (ICC)
 - 2) Infection control team (ICT)
 - Reference item 1: Infection control doctor (ICD)
 - Reference item 2: Hospital infections
(healthcare-associated infections)
3. Composition of infection control organizations in the NICU and their authorities
 - 1) Organizational structure
 - 2) Authorities
 - 3) Evaluation of infection control
4. NICU staff and assignments
5. Relationships with other departments
6. Vaccination of medical workers in the NICU and the patients' families
7. Preventive vaccination and palivizumab for infants in the NICU
8. Surveillance operations
9. Budget of bacteriological surveillance
 - Reference matters: Concepts of budget for the prevention of hospital infections abroad

Chapter 2 Laying a steppingstone for infection prevention (establishing normal bacterial flora in neonates)

1. Establishing normal bacterial flora in neonates by

- mother-infant skin contact
2. Establishing the oral resident flora in neonates by smearing with breast milk
 3. Nursing with mother's milk
 4. Establishing normal flora in the neonate intestine by early administration of bifidobacteria
 5. Hygiene of the genitalia of pregnant women

Chapter 3 Improving the environment

1. Disinfection of medical instruments and tools
2. Handling of reusable tools and materials
Reference: ?
3. Disinfection of incubators
Reference matters: Method to check the cleanness of incubators
4. Disinfection of the environment: Cleanness and cleaning of the NICU
 - 1) Management of the air of the NICU
 - 2) Management of the water supply system of the NICU
Reference 1. Sampling sites for Legionella testing
Reference 2. Sampling methods for the detection of Legionella
 - 3) Cleaning and disinfection of the indoor environment
Reference: ?
5. Changing shoes, clothes, and mask
 - 1) Changing shoes
 - 2) Wearing a gown/changing clothes
 - 3) Wearing a cap and a mask
6. Hand hygiene
 - 1) Hand disinfection and washing and the use of gloves
 - 2) Hand care

Chapter 4 Management of Drugs and Fluids

1. Use of antibiotics
 - 1) Characteristics of the NICU
 - 2) Empirical administration
 - 3) Prophylactic administration of antibiotics

- 4) Appropriate use of antibiotics
2. Preparation of drug solutions and infusion preparations
 - 1) Necessity of ward pharmacists
 - Reference matter 1: Precautions in dispensing TPN solutions¹⁾
 - Reference matter 2: Procedure of drug mixing at the ward
 - 2) Centralized and sterile preparation of TPN solutions
 - 3) Replacement of the infusion set
 - 4) Management of a needleless system
 - 5) Non-oral infusions
 - 6) Quality control of intravenous mixtures

Chapter 5 Methods for the management of various parts

1. Neonatal skin care
 - 1) Bathing
 - 2) Application of ointments
 - 3) Skin care in extremely premature infants
 - Reference matters: Application and removal of adhesive bandage, electrodes, etc.
2. Routine umbilical cord care
3. Management of central venous catheters
 - 1) Clean insertion procedure
 - 2) Protection and fixation of the catheter insertion site
 - 3) Duration of central venous catheterization and the use of a filter
4. Management of peripheral arterial catheters
5. Management of umbilical artery and vein catheters
 - 1) Fixation, withdrawal, and replacement of catheter and duration of catheterization
 - Reference matter: Low-dose heparinization in umbilical arterial catheterization
 - 2) Care of the catheter insertion site
 - Reference matter 1: Definition of catheter-related bloodstream infections
 - Reference matter 2: Factors involved in CR-BSI
6. Prevention of ventilator-associated pneumonia
 - 1) Shortening of the period of ventilation management
 - 2) Respiratory channel

- 3) Warming and humidifying
- 4) Suction of airway secretion
- 5) Measures to prevent aspiration
- 6) Prevention of the oropharyngeal settlement of microorganisms
- 7) Prophylactic systemic administration of antibiotics

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

多剤耐性緑膿菌の院内感染対策に関する研究

- 研究分担者 切替 照雄 ((独) 国立国際医療研究センター研究所・感染症制御研究部・部長)
- 研究協力者 秋山 徹 ((独) 国立国際医療研究センター研究所・感染症制御研究部・室長)
- 多田 達哉 ((独) 国立国際医療研究センター研究所・感染症制御研究部・研究員)
- 島田 佳世 ((独) 国立国際医療研究センター研究所・感染症制御研究部・研究補助員)
- 霜島 正浩 (株式会社 BML 総合研究所・検査本部・次長)

研究要旨

本研究の目的は、多剤耐性緑膿菌の院内感染の実態を明らかにすること、ならびに、多剤耐性緑膿菌臨床分離株より流行型の薬剤耐性因子を同定し、それらを標的とする多剤耐性菌の迅速検出法を開発することである。本年度は、2011年に分離された多剤耐性緑膿菌から同定された新規アミノグリコシド耐性因子 AAC(6')-Iaj の同定、IMP-type metallo- β -lactamase(MBL)の variant である IMP-43 および IMP-44 の機能解析、AAC(6')-Ib 産生多剤耐性緑膿菌の迅速診断キットの開発、および迅速診断キットを用いて 2012 年度に分離された多剤耐性緑膿菌のスクリーニングを行なった。AAC(6')-Ib 産生多剤耐性緑膿菌の迅速診断イムノクロマトキットの開発により、AAC(6')-Iae 産生多剤耐性緑膿菌の迅速診断イムノクロマトキットと併用することで、日本で分離される多剤耐性緑膿菌の約 8 割が検出可能となった。これらの迅速診断キットの普及により、院内感染対策として多剤耐性緑膿菌のモニタリングならびに早期検出に有効であることが期待される。

A. 研究目的

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

今日の医療提携システムのもとでは、施設を超えて広域に伝播拡大していくことも懸念されている。そのため、感染拡大の防止及び対策を講じ、医療の質と信頼を確保するために、高度多剤耐性緑膿菌の院内分離状況を把握する必要がある。本研究では、多剤耐性緑膿菌の分子疫学解析を行なうことにより重要な薬剤耐性

因子を同定し、同菌の早期検出やモニタリングに有用な簡便かつ迅速な薬剤耐性菌検出法の開発を目指す。

B. 研究方法

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

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

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

さらに用いたモノクローナル抗体におけるエピトープマッピングを行うため、AAC(6')-Ibの全長をカバーする5残基のペプチドを設計しELISAによる解析を行った。

2. 新規アミノグリコシド耐性因子AAC(6')-Iajの同定

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

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

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

認した。

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

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

2011年に分離された多剤耐性緑膿菌臨床分離株に対し、我々の開発したIMP産生緑膿菌迅速診断キットを用いてIMP産生菌をスクリーニングした。イムノクロマト陽性菌からゲノムを抽出し、IMPの亜型をPCRおよびシーケンスで確認した。

新規IMP variantは大腸菌にクローニングし、薬剤耐性を解析するとともに、タンパク質精製し、酵素活性を測定した。

4. 2009年から2012年までに分離された多剤耐性緑膿菌臨床分離株の比較解析

我々が開発したIMP、AAC(6')-IaeおよびAAC(6')-Ib産生緑膿菌迅速診断キットを用いて2009年から2010年にかけて分離された多剤耐性緑膿菌臨床分離株217株、2011年に分離された多剤耐性緑膿菌臨床分離株161株および2012年に分離された多剤耐性緑膿菌臨床分離株219株においてIMP-type MBL、AAC(6')-IaeおよびAAC(6')-Ib産生菌の分離数を比較した。

さらに、2009年～2011年に分離されたAAC(6')-Ib産生株66株について分子疫学解析を行なった。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

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

モノクローナル抗体のスクリーニングの結果、AAC(6')-Ib に高い反応性を示す 8 抗体を得た。これら 8 抗体の組み合わせの中で、最も濃いテストラインを生む 2 抗体 3A9/F1 および 3F9/F1 を用いてイムノクロマトキットを作成した (Fig1-1)。作成したイムノクロマトキットの感度は 7.6×10^6 cfu per test であった。

エピトープマッピングの結果、得られた抗体のエピトープは、3A9/F1 は AAC(6')-Ib の 171-184aa 領域、3F9/F1 は 61-75aa 領域であった (Fig1-2)。

217 株の多剤耐性緑膿菌を対象に AAC(6')-Ib イムノクロマト試験を実施した結果、キット陽性 98 株、陰性 119 株であり *aac(6')-Ib* の PCR の結果と完全に一致した (Table 1-1)。

2. 新規アミノグリコシド耐性因子 AAC(6')-Iaj の同定

2011 年に分離された多剤耐性緑膿菌臨床分離株から新規アミノグリコシド耐性因子 AAC(6')-Iaj が同定された (Fig2-1)。

AAC(6')-Iaj は AAC(6')-Ia と 70% の相同性を持ち、AAC(6')-Iae、AAC(6')-Iaf に比べ、arbakacin 耐性が高かった (Table2-1)。

薄層クロマトグラフィーによる酵素活性解析から、ゲンタマイシンおよびリビドマイシン以外のアミノグリコシドを分解することが明らかとなった (Fig2-2)。

また、サザンブロットの結果より、同定さ

れた *aac(6')-Iaj* 遺伝子はクロモソーム上に存在することが分かった。

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

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

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

大腸菌にクローニングし、薬剤耐性を比較すると、IMP-43 は IMP-7 に比べて dripenem および meropenem に耐性であり、IMP-44 は IMP-11 に比べて dripenem、imipenem、meropenem および panipenem に耐性であった (Table3-1)。

酵素活性を測定すると、IMP-43 は IMP-7 に比べ、cefotaxime、ceftazidime、cefepime、dripenem、imipenem および meropenem に対して *kcat/Km* 値が高く、penicillin G、ampicillin、cephradine および cefoxitin に対し、*kcat/Km* 値が低かった。IMP-44 と IMP-11 においても同様の結果であった。特に IMP-44 は carbapenem に対する *kcat/Km* 値が顕著に高かった (Table3-2)。

4. 2009 から 2012 年までに分離された多剤耐性緑膿菌臨床分離株の比較解析

2009～2010 年分離株では 217 株中、80.2%(174/217) が IMP 産生株、69.6% (151/217) が AAC(6')-Iae 産生株、14.3%(31/217) が

AAC(6')-Ib 産生株であった。2011 年分離株では 161 株中、62.7%(101/161)が IMP 産生株、49.7%(80/161)が AAC(6')-Iae 産生株、21.7%(35/161)が AAC(6')-Ib 産生株であった。2012 年に分離された多剤耐性緑膿菌臨床分離株 219 株中、70.8%(155/219)が IMP 産生株、55.3%(121/219)が AAC(6')-Iae 産生株、22.8%(50/219)が AAC(6')-Ib 産生株であった。

これらの結果から、IMP 産生株および AAC(6')-Iae 産生株は 2010 年から 2011 年にかけて減少したが、2012 年には増加したことが分かった。AAC(6')-Ib 産生株は 2010 年から 2012 年にかけて増加していることが明らかとなった。

AAC(6')-Ib 産生株 66 株における分子疫学解析の結果、PFGE パターン解析から 4 つのクラスターに分類され、最大のクラスターに含まれる株は全て ST235 及び O11 であった。AAC(6')-Ib 産生株は全国 20 都道府県で分離された。さらにこのクラスターに含まれる株中、60%が IMP-7 を保有し、IMP-7/AAC(6')-Ib 産生株は全国 9 都府県で分離された。

D. 考察

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

過去、我々の開発した AAC(6')-Iae および IMP-typeMBL 産生多剤耐性緑膿菌臨床分離株迅速診断キットと本年開発した AAC(6')-Ib 産生多剤耐性緑膿菌臨床分離株迅速診断キットを組み合わせると日本で分離される多剤耐性緑膿菌の約 8 割を迅速に検出できることが分かった。これらの迅速診断キットの普及により、

院内感染対策として多剤耐性緑膿菌のモニタリングならびに早期検出に有効であることが期待される。

2. 新規アミノグリコシド耐性因子 AAC(6')-Iaj の同定

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

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

3. IMP-43 および IMP-44 の同定

IMP-7 と IMP-43 および IMP-11 と IMP-44 のアミノ酸配列をそれぞれ比較した結果、67 番目のアミノ酸が Val から Phe に変異していた。SubclassB1 に属する MBL の 60 から 66 番アミノ酸残基は基質との相互作用に重要な *active loop* を形成することが分かっている。この変異が酵素活性に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

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

が考えられた。

4. 2009 から 2012 年までに分離された多剤耐性緑膿菌臨床分離株の比較解析

2009 年から 2012 年にかけて日本の医療施設から分離された多剤耐性緑膿菌臨床分離株の薬剤耐性因子を比較した結果、IMP 及び AAC(6')-Iae 産生株は 2011 年に約 20%減少したが、2012 年には増加傾向を示した。AAC(6')-Ib 産生株は 2009 年から 2012 年にかけて年々、増加していることが分かった。

AAC(6')-Iae 産生株の多くが ST235 を示すことから、AAC(6')-Ib 産生株の多くは AAC(6')-Iae 産生株と同じ origin である可能性が示唆された。

E. 結論

本研究から、日本の医療施設における院内感染起因菌である多剤耐性緑膿菌から高頻度で分離される AAC(6')-Iae、AAC(6')-Ib および IMP-1 産生高度多剤耐性緑膿菌の増減が明らかとなった。また、AAC(6')-Ib 産生菌は増加傾向にあり、我々の開発した迅速診断キットを用いることで日本で分離される多剤耐性緑膿菌の約 8 割が検出可能であることが分かった。さらに、meropenem に対して高い耐性を示す IMP-type MBL の新興も明らかとなり、今後、詳細なモニタリングが必要であると考えられる。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Shimada K, Shimojima M, **Kirikae T**. Novel 6'-N-Aminoglycoside Acetyltransferase AAC(6')-Iaj from a Clinical Isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Jan;57(1):96-100.
- 2) Hamada Y, Watanabe K, Tada T, Mezaki K, Takeuchi S, Shimizu T, **Kirikae T**, Ohmagari N. Three cases of IMP-type

metallo- β -lactamase-producing *Enterobacter cloacae* blood stream infection in Japan. *J Infect Chemother*. *Impress*.

- 3) Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Tanaka M, Narahara K, Shimojima M, Kitao T, Shimada K, **Kirikae T**. Development of an immunochromatographic assay for rapid detection of AAC(6')-Ib-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *J Microbiol Methods*. 2012 Oct;91(1):114-6.
- 4) Kitao T, Tada T, Tanaka M, Narahara K, Shimojima M, Shimada K, Miyoshi-Akiyama T, **Kirikae T**. Emergence of a novel multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain producing IMP-type metallo- β -lactamase and AAC(6')-Iae in Japan. *Int J Antimicrob Agents*. 2012 Jun;39(6):518-21.

2. 学会発表

- 1) 多田達哉・秋山徹・島田佳世・切替昭雄. 医療施設で分離される多剤耐性緑膿菌株の解析、第 41 回薬剤耐性菌研究会、平成 24 年 10 月、下呂

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む。)

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

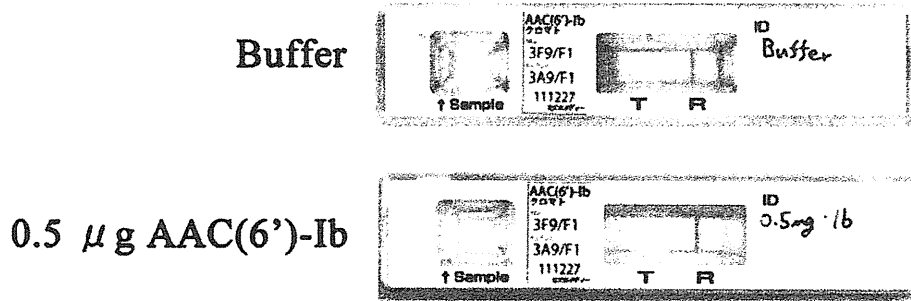


Fig 1-1

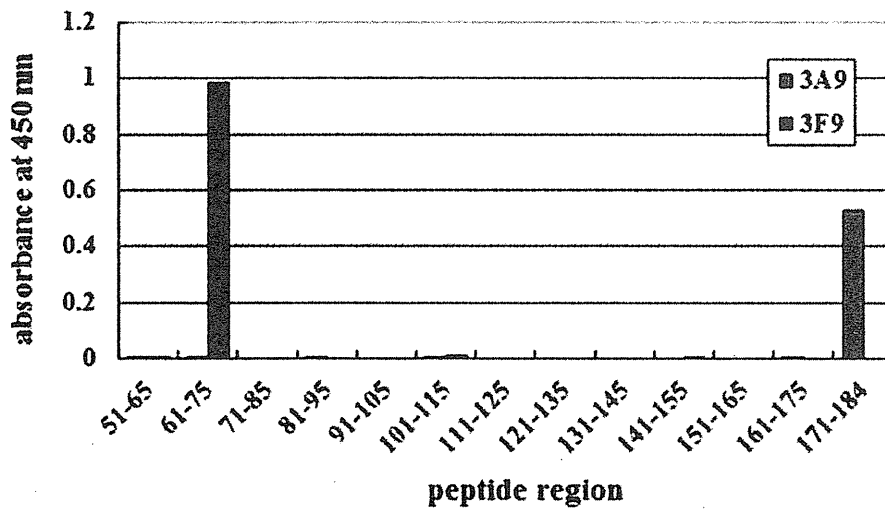


Fig 1-2

Specificity of the AAC(6')-Ib immunochromatographic assay compared with PCR detection of *aac(6')-Ib*.

Result of PCR detection	No. of Isolates (n=217)	Result of AAC(6')-Ib immunochromatographic assay		Specificity (%)
		Positive	Negative	
Positive	98	98	0	100
Negative	119	0	119	100

Table 1-1

MICs of β -lactams for <i>P. aeruginosa</i> NCGM, <i>E. coli</i> strains transformed with IMP-1, IMP-7, IMP-7', IMP-11 and IMP-11'					
Antibiotic(s) ^a	<i>E. coli</i> DH5 α	<i>E. coli</i> DH5 α	<i>E. coli</i> DH5 α	<i>E. coli</i> DH5 α	<i>E. coli</i> DH5 α
	(pHSG398/IMP-7)	(pHSG398/IMP-43)	(pHSG398/IMP-11)	(pHSG398/IMP-44)	(pHSG398)
Ampicillin	16	8	32	8	2
Ampicillin-Sulbactam	8	4	16	4	1
Aztreonam	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25
Cefepime	4	4	16	16	<0.25
Cefmetazole	256	32	256	64	1
Cefoselis	8	8	32	4	<0.25
Cefotaxime	32	32	128	128	<0.25
Cefoxitin	512	64	512	128	2
Cefozopran	8	8	32	32	<0.25
Cefpirome	32	32	4	1	<0.25
Cefsulodin	>512	>512	>512	>512	256
Ceftazidime	512	512	256	256	<0.25
Ceftriazone	64	64	128	256	<0.25
Cefuroxime	512	512	512	>512	4
Cepharadine	512	512	512	128	16
Dripenem	0.5	2	8	32	<0.25
Imipenem	0.5	0.5	2	8	<0.25
Meropenem	0.5	2	16	64	<0.25
Moxalactam	256	256	256	>512	<0.25
Panipenem	1	1	2	16	<0.25
Penicillin G	32	32	64	32	32
Piperacillin	2	2	4	2	2
Piperacillin/Tazobactam	2	2	1	1	1
Ticarcillin	512	64	512	128	2
Ticarcillin/Clavulanic acid	256	64	512	128	2

^aThe ratio of the ampicillin to sulbactam was 2:1. The ratio of piperacillin to tazobactam was 4:1. The ratio of ticarcillin to clavulanic acid was 15:1.

Table 3-1

Kinetic parameters of β -lactamase IMP-1, IMP-7, IMP-11, IMP-30 and IMP-31 with various substrates

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

^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 3-2

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

メタロ-β-ラクタマーゼの構造機能解析と阻害剤の分子設計

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)
研究協力者 切替 照雄 (国立国際医療研究センター・研究所感染症制御研究部・部長)

研究要旨

本研究では *Citrobacter freundii* 由来の KHM-1 メタロ-β-ラクタマーゼの結晶化を行い、1.94 Å の分解能で X 線結晶構造解析を行った。KHM-1 の全体構造は他のメタロ-β-ラクタマーゼと同様に αβ/βα モチーフ構造をとっていることがわかった。KHM-1 の活性中心には 3 つの Zn(II) イオン (Zn1, Zn2, Zn3) が存在し、Zn1 と Zn2 の配位構造は IMP-1 や CcrA メタロ-β-ラクタマーゼと同様な複核構造を形成していた。しかし、Zn3 では 2 つの His 残基と 2 つの水分子が配位しているが、その内 1 つの His 残基はイミダゾレートとして Zn1 と Zn3 の両方に配位しているユニークな構造であることがわかった。IMP-1 の分子構造との比較から、ループ 2 の領域に変化がみられた。特に KHM-1 のループ 2 上にある Asn187 残基は約 1.4 Å ほど活性中心から遠ざかった位置にあり、IMP-1 よりも広い活性ポケットを形成していることがわかった。Zn1 と Zn2 の占有率はそれぞれ 100% と 70% であることから、Zn2 は Zn1 よりも結合親和性が低く活性中心から抜けやすいことが示唆された。

A. 研究目的

KHM-1 は 1997 年に本邦において *Citrobacter freundii* から単離されたメタロ-β-ラクタマーゼである。この酵素はモノバクタムを除くほとんど全ての β-ラクタム剤を加水分解するが、いくつかの β-ラクタム剤において速度論的パラメータは大きく異なっている。表 1 に KHM-1 と IMP-1 による 4 種類の β-ラクタム剤に対する速度論的パラメータを示す。KHM-1 において、ベンジルペニシリンでは $K_m = 1,340 \mu\text{M}$, $k_{\text{cat}} = 23 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{cat}}/K_m = 1.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 、イミペネムでは、 $K_m = 268 \mu\text{M}$, $k_{\text{cat}} = 15 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{cat}}/K_m = 5.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ に対し、セフトキシムでは $K_m = 13 \mu\text{M}$, $k_{\text{cat}} = 2,181 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{cat}}/K_m = 1.7 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 、セフトジジムでは $K_m = 8 \mu\text{M}$, $k_{\text{cat}} = 118 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{cat}}/K_m = 1.5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ となっている。一方、IMP-1 に

おいて、ベンジルペニシリンでは $K_m = 520 \mu\text{M}$, $k_{\text{cat}} = 320 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{cat}}/K_m = 6.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 、イミペネムでは、 $K_m = 39 \mu\text{M}$, $k_{\text{cat}} = 46 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{cat}}/K_m = 1.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ に対し、セフトキシムでは $K_m = 4 \mu\text{M}$, $k_{\text{cat}} = 16 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{cat}}/K_m = 4.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 、セフトジジムでは $K_m = 44 \mu\text{M}$, $k_{\text{cat}} = 8 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{cat}}/K_m = 1.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ となっている。KHM-1、IMP-1 それぞれのベンジルペニシリンの k_{cat}/K_m を 1 とした時、残りの 3 つの β-ラクタム剤に対する相対的な k_{cat}/K_m 値を算出してみた。IMP-1 においては、イミペネム、セフトキシム、セフトジジムはそれぞれ 3 倍、6 倍、3 倍であるのに対し、KHM-1 では 2 倍、10,000 倍、1,000 倍となった。これらの結果から、KHM-1 はセファロスポリン系 β-ラクタム剤に対して高い加水分解活性を有していることがわかる。

本研究では上述した IMP-1 とは異なる基質特異性がどのようにして発現されるのかを立体構造変化の観点から明らかにするために KHM-1 の結晶化を試みた。その結果、X 線結晶解析により KHM-1 の立体構造を決定することに成功した。

B. 研究方法

(1) KHM-1 の培養・精製

KHM-1 遺伝子 (*bla_{KHM-1}*) は、研究協力者である切替部長によって、pET28a ベクターにサブクローニングされた (KHM-1/pET28a)。このベクターによって形質転換させた大腸菌 BL21 (DE3) を、カナマイシン 50 μ g/mL 含む LB 寒天培地に植菌して 37°C で一晩培養した。形成したコロニーは、カナマイシン 50 μ g/mL 含む LB 培地 10 mL に植菌して、37°C、150 rpm で一晩培養した (前培養)。前培養液を 1 mL とり、カナマイシン 50 μ g/mL 含む LB 培地 2 L に植菌し、37°C、150 rpm で濁度 (OD_{600}) が 0.4~0.8 に達するまで培養した。この本培養は、計 4 本の 5 L 培養瓶で行った (8 L 培養)。その後、最終濃度が 0.1 mM になるように IPTG を加え、さらに 4 時間培養した。8 L の培養液は、3,000 \times g、4°C で 15 分間遠心を行い、KHM-1 を発現させた大腸菌を集菌した。この大腸菌に、1g-大腸菌/mL になるように、20 mM BisTris-HCl (pH 6.5) を加え再懸濁し、氷浴中で 25 秒おきに 5 秒間の超音波破碎を 60 回行った。破碎した菌体液を 30,000 \times g、4°C で 30 分間遠心し、上清液を 0.45 μ m フィルターでろ過した後、粗酵素溶液とした。

KHM-1 は粗酵素溶液からイオン交換カラムクロマトグラフィーとゲルろ過カラムクロマトグラフィーを使って行った。イオン交換カラムクロマトグラフィーは、20 mM BisTris-HCl (pH 6.5) で平衡化された陽イオン交換樹脂 SP-HP (ϕ 26 mm \times 10 cm) を使い、粗酵素溶液をカラム上部に乗せ、20 mM BisTris-HCl (pH 6.5) で吸着させ洗浄した後、0.3 M NaCl を含む 20 mM BisTris-HCl (pH 6.5) で塩濃度の勾配をかけ KHM-1 の抽出を行った。280 nm の吸収を

もつ分画に対して SDS-PAGE を行い、KHM-1 の純度を調べた。しかしイオン交換カラムクロマトグラフィーでは KHM-1 の精製が不十分だったため、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーを行った。SDS-PAGE において、KHM-1 の分子サイズと同じバンドを持つ分画を集め、濃縮した後、0.3 M NaCl を含む 20 mM BisTris-HCl (pH 6.5) で平衡化されたゲルろ過用カラム HiLoad 16/60 Superdex 75 pg prep grade に乗せ、0.3 M NaCl を含む 20 mM BisTris-HCl (pH 6.5) で分離を行った。280 nm の吸収をもつ分画に対して SDS-PAGE を行った結果、KHM-1 の純度は 95% 以上であることを確認した。また、精製した KHM-1 酵素は、ニトロセフィン (β -ラクタム剤の一つ) 溶液に添加したところ、黄色の溶液が赤色に変化したことから、ニトロセフィン分解活性があることを確認した。

(2) 結晶化

5 mg/mL の KHM-1 酵素溶液 (20 mM HEPES-NaOH (pH 7.5)) と次のリザーバー溶液 (0.20 mM BisTris-HCl (pH 6.5), 0.1 M ammonium sulfate, 5 mM zinc (II) nitrate, 30 (w/v)% PEG 4000) を用い、20°C で結晶化を行うと約 1 ヶ月後に大きく厚みのある透明な結晶 (0.3 \times 0.5 \times 0.2 mm) が析出した。

(3) X 線結晶構造解析

PF のビームライン BL5A において X 線回折データを収集し、HKL2000 を使い indexing, integrating, scaling を行った。

KHM-1 の構造は、*Pseudomonas aeruginosa* 由来の IMP-1 (PDB code: 1DDK) を search model として分子置換法によって決定した。解析プログラムは CCP4 の *REFMAC5* を用いて精密化し、グラフィックプログラム *Coot* でモデルの修正を行った。表 2 に回折データと精密化で得られたデータをまとめた。

C. 研究結果

(1) KHM-1 の全体構造

KHM-1 は非結晶単位中に独立した 2 分子 (分子 A と分子 B) が存在していた。分子 A と分子 B の C α 炭素を重ね合わせた時の r.m.s.d (root mean standard deviation)

は 0.5 Å であり、全体構造には大きな違いは確認されなかった。そのため、これ以降分子 A について述べる。

KHM-1 の全体構造は 6 つの α -ヘリックスと 12 の β -シートから成り、 α -ヘリックスが β -シートを囲んでいる $\alpha\beta/\beta\alpha$ モチーフ構造をとっていることがわかった(図 1, 2)。活性中心は β -シートの間に位置し、3 個の Zn(II)イオン(Zn1, Zn2, Zn3)が存在していた(図 2)。

(2) 活性中心構造

KHM-1 の活性中心構造を Zn(II)イオン周りの電子密度マップ ($2|F_o| - |F_c|$) と共に図 3 に示す。Zn1 には 3 つのヒスチジン残基(His97, His99, His159)と水分子(Wat1)が配位し、歪んだ四面体構造を形成していた。Wat1 はさらに Zn2 にも配位し、アスパラギン酸残基(Asp101)と水素結合を形成していることがわかった。Zn1-His の平均結合距離は 2.0 Å であった。Zn1-Wat1 と Zn2-Wat1 の結合距離はそれぞれ 1.7 Å と 2.1 Å であり、Zn1 と Zn2 の距離は 3.6 Å であった。

一方、Zn2 にはアスパラギン酸(Asp101)、システイン(Cys178)とヒスチジン残基(His217)と水分子(Wat3)が配位し、歪んだ三角両錐構造を形成していた。Zn3 は 2 つのヒスチジン(His99, His190: Zn-His190 の結合距離は 2.0 Å)と 2 つの水分子とからなる四面体構造を形成していた。

(3) Zn2 の占有率

Zn2 周りの電子密度マップ ($2|F_o| - |F_c|$) から判断すると Zn2 サイトに存在する Cys178 では、側鎖が alternate している可能性が示唆された。2 つのコンフォメーションの内、一つは Zn2 への配位型、もう一方は非配位型とし、それぞれの占有率を 0.7 と 0.3 とした。これに伴って、Zn1 と Zn2 の占有率をそれぞれ 1.0 と 0.7 として精密化を行うと、Zn1 と Zn2 の温度因子 (*B*-factor) は 16.6 Å² と 21.1 Å² とほぼ近い値をとった。

(4) KHM-1 と IMP-1 のループ 1 とループ 2 の構造比較

KHM-1 と IMP-1 は基質認識に重要なループ 1 とループ 2 が存在する(図 1, 2, 4)。そこで両者のループ構造を比較した。まず KHM-1 と IMP-1 構造の重ね合わせを行った。KHM-1 の Pro25-Lys44、Leu50-Ala239 と IMP-1 の Pro25-Glu44、Val150-Glu239 領域の C α 炭素を重ね合わせた時の r. m. s. d は 0.80 Å であった。ここで KHM-1 のループ 1 は、7 個のアミノ酸残基(Lys44-Ile45-Glu46-Gly47-Trp48-Gly49-Leu50; 図 1)から構成される。しかし、この領域は熱振動が激しく明瞭な電子密度は観測されず、disorder していることがわかった。そのため、IMP-1 のループ 1 との構造比較はできなかった。

ループ 2 は 10 個のアミノ酸残基から構成され、KHM-1 では Lys181-Pro182-Glu183-Gly184-Leu185-Gly186-Asn187-Leu188-Ser189-His190 からなる。IMP-1 では 183 位は Tyr、189 位は Gly、190 位は Asp に置換され、その他のアミノ酸残基は保存されている。図 4 から、KHM-1 の Asn187 残基は IMP-1 の Asn187 よりも約 1.4 Å ほど活性中心から遠ざかった位置にあることがわかった。

D. 考察

本研究では KHM-1 の結晶化に成功し、X線結晶構造解析によって 1.94 Å の分解能で分子構造を決定した。KHM-1 は本邦で発見された *Citrobacter freundii* 由来の KHM-1 と他のメタロ- β -ラクタマーゼとのアミノ酸配列の相同性は、IMP-1 (59%)、VIM-1 (38%)、NDM-1 (26%)、SPM-1 (46%)、SIM-1 (59%) であると報告されている。¹

KHM-1 の全体構造はこれまでに分子構造が明らかになっている IMP-1 や CcrA メタロ- β -ラクタマーゼと同様に $\alpha\beta/\beta\alpha$ モチーフ構造をとっていた。Zn1 と Zn2 の配位構造はそれぞれ四面体と三角両錐構造を形成しており、IMP-1 や CcrA と同様の配位幾何学をとっていることがわかった。Zn1 と Zn2 を架橋している Wat1 は Zn(II)イオンとの結合距離から判断すると OH⁻として存在