

令和 2 年 5 月 30 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08991

研究課題名(和文) 耐性菌迅速診断法と治療法の開発および感染制御への応用

研究課題名(英文) The development of quick diagnostic procedure, the therapy and application to infection control for drug resistant bacteria

研究代表者

浅井 さとみ (ASAI, Satomi)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：60365989

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：緑膿菌臨床分離株で、薬剤耐性緑膿菌の排出ポンプのmexB, mexF, mexYのうちいずれか(1～3個)の発現が標準株よりも1.5倍以上亢進していた。細菌の揮発成分の分析では、緑膿菌には有機酸の一部に特徴的揮発化学物質のピークが得られた。抗菌活性物質(抗体)の作製は緑膿菌で殺菌作用のあるポリクローナル抗体を作製した。感受性株、多剤耐性株いずれにも容量依存性のある殺菌作用のあるポリクローナル抗体を作製することができた。次にモノクローナル抗体の候補を20個選択し、1つ1つの性能を確認した。II度熱傷マウスを均一に作製し、抗菌物質の効果判定に備えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多剤耐性の緑膿菌(MDRP)やアシネトバクターバウマニ(MDR-AB)をはじめとする耐性菌の蔓延は世界的に深刻な問題となっている。2015年「薬剤耐性(AMR)タスクフォース」が厚生労働省に設置され、薬剤耐性微生物の拡大を阻止し、薬剤耐性の研究や薬剤耐性微生物に対する予防・診断・治療手段を確保するための研究開発を推進すべく薬剤耐性対策アクションプランが呈示された。発現機序に基づく迅速な診断、効果的制御、治療法の開発が喫緊の課題である。そこで本研究では、緑膿菌とアシネトバクターバウマニを中心に下記の取り組みを行った。

研究成果の概要(英文)：The expression of efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* (such as mexB, mexF, mexY) was enhanced more than that of PA01. By the analysis of *Pseudomonas aeruginosa*, the characteristic peak of the volatilization chemical was obtained. Polyclonal antibodies of *Pseudomonas aeruginosa* with the bactericidal action was made. We chose the candidate of the monoclonal antibody 20 next and confirmed one performance each.

The mouse with second degree burn was made uniformly and prepared for the effect measurement of the antibacterial agent.

研究分野：臨床検査学

キーワード：耐性遺伝子 多剤耐性獲得機構 緑膿菌 アシネトバクター 薬剤耐性菌 抗菌作用 熱傷マウスモデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多剤耐性の緑膿菌 (MDRP) やアシネトバクター (MDR-AB) をはじめとする耐性菌の蔓延は世界的に深刻な問題となっている。本邦においても 2015 年「薬剤耐性 (AMR) タスクフォース」が厚生労働省に設置され、薬剤耐性微生物の拡大を阻止し、薬剤耐性の研究や薬剤耐性微生物に対する予防・診断・治療手段を確保するための研究開発を推進すべく薬剤耐性対策アクションプランが提示された。申請者らは、理論的背景と科学的根拠に基づく MRSA 感染対策を段階的に導入し、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) 保菌率を激減させることに成功した。その一方で薬剤耐性緑膿菌やアシネトバクター (IPM・AMK・CPFX のうち 2 剤以上に耐性) は、MRSA と異なる感染制御法が必要であり、病院環境中の長期間生息、地域医療施設への拡大まん延、治療の困難さなどのため、臨床的かつ社会的に重大な課題となっている。特に多剤耐性のグラム陰性桿菌感染症は免疫不全や高齢患者の治療予後に大きく影響するため、早期発見・効果的治療における方策が必要である。

2. 研究の目的

申請者らは、重症熱傷センターにおける MDRP の水平伝播が共用シャワーの使用に大きく影響していることを明らかにし、環境衛生に有効な紫外線パルス波除菌装置の開発と有用性の評価を行い、環境の清掃・消毒について効果的方法を明らかにした。また、重症熱傷センターや集中治療室を中心に発生した耐性菌の感染経路と薬剤耐性獲得機構を解明し、アウトブレイクを制圧または未然に防いできた。これらの方策により、薬剤耐性緑膿菌やアシネトバクターの発生は減少してきたものの、長期治療に伴う耐性菌の選択や耐性誘導、病院環境中の長期間生息を背景とした散発発生事例が散発し、完全制圧に向けて大きな困難に直面している。このように耐性菌による感染制御は国内医療機関内に留まらず、市中感染症としても世界的に重大な課題であり、発現機序に基づく迅速な診断、効果的制御、治療法の開発が喫緊の課題である。そこで本研究では、緑膿菌とアシネトバクターバウマニを中心に下記の取り組みを行った。

(1) 緑膿菌臨床分離株の分析

院内細菌検査室で検出された緑膿菌臨床分離株 (100 株以上) と標準株 (PAO1) を用い、耐性関連遺伝子の発現状態と薬剤感受性の関係を明らかにし、それに基づく迅速診断法を検討することを目的とした。

薬剤耐性～多剤耐性の緑膿菌臨床分離株について耐性獲得機構について蓄積したデータを基に効率的感染制御のための迅速診断法の開発を目的とした。

(2) 細菌の揮発成分の分析

黄色ブドウ球菌の検出で実績のある細菌の揮発成分を利用した簡易検査法を開発を目的とした。

緑膿菌

アシネトバクター バウマニ

(3) 抗菌活性物質 (抗体) の作製

多剤耐性菌においても効果を示す抗菌活性物質 (抗体) の作製のためのデータを蓄積に基づき、緑膿菌に対する抗体の作製を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 緑膿菌臨床分離株の分析

診断法作製の準備段階として抗菌薬耐性化に関与する薬剤排泄ポンプの各遺伝子 *mex* 遺伝子の発現 (*mexB*, *mexD*, *mexF*, *mexY*) を中心に発現の特徴を調査した。さらに遺伝子型が異なる 98 株を用いて全塩基配列について解析した。

いずれの組み合わせが検査として最適か確認し、有効なプライマー作製を試みた。

(2) 細菌の揮発成分の分析

緑膿菌、アシネトバクター バウマニにおいて、細菌の揮発成分を捕臭し、ガスクロマトグラフィーを用いて臭気の定量化と揮発成分を分析した。その結果によって、呈色反応キットの組み合わせによる簡易検査キットの開発を模索した。

(3) 抗菌活性物質（抗体）の作製

緑膿菌に抗菌作用を示すペプチドは、Bam 複合体に対して作用し殺菌効果があることを共同研究者が確認済である。そこで当該ペプチドに対する抗体を作製後（ポリクローナル抗体）、モノクローナル抗体の作製を試みた。

4. 研究成果

(1) 緑膿菌臨床分離株の分析結果

緑膿菌の排出ポンプの発現は、現在一般的にいわれている抗菌薬毎に特徴的ではないことが判明した。薬剤耐性緑膿菌は、*mexB*, *mexF*, *mexY*のうちいずれか（1～3個）の発現が標準株よりも1.5倍以上亢進していた。

*mexD*は感受性、薬剤耐性にかかわらず標準株より著明に発現しているものが多く、一定の傾向を示さなかった。

の結果を受けて、*mexB*, *mexF*, *mexY*に共通する multiplex primer を作製した。

(2) 細菌の揮発成分の分析の結果

緑膿菌に関しては、有機酸の一部にある程度特徴的な揮発化学物質のピークが得られたため、既存の有機酸インジケータにて捕臭可能と考えられた。その一方で、有機酸インジケータには感度が低く、インジケータそのものの改良が必要であることがわかった。

現在、インジケータの感度を上げる改良を行っている。

アシネトバクターバウマニにおいては、特徴的な揮発物質はなく、むしろ培地の臭気を分析する結果になってしまった。インジケータの使用は不可能であるとの結論に至った。

(3) 抗菌活性物質（抗体）の作製

緑膿菌において、既存のペプチドを用いポリクローナル抗体を作製した。感受性株、多剤耐性株いずれにも容量依存性のある殺菌作用のあるポリクローナル抗体を作製することができた。次にモノクローナル抗体の候補を20個選択し、1つ1つの性能を確認したところ、殺菌作用があるモノクローナル抗体は認められなかった。

抗菌作用のある人体に無害な物質（ペプチド、モノクローナル抗体、低分子化合物）を開発し検証するために、II度熱傷マウスを均一に作製できるよう取り組み、抗菌物質の効果判定に備えた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 12件）

1. 著者名 Tachibana H, Kakino A, Kazama M, Feng M, Asai S, Umezawa K, Nozaki T, Makiuchi T, Kamada T, Watanabe H, Horiki N, Cheng X, Masuda G.	4. 巻 145(14),
2. 論文標題 Development of a sensitive immunochromatographic kit using fluorescent silica nanoparticles for rapid serodiagnosis of amebiasis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Parasitology	6. 最初と最後の頁 1890-1895
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1017/S0031182018000690	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takiguchi H, Takeuchi T, Niimi K, Tomomatsu H, Tomomatsu K, Hayama N, Oguma T, Aoki T, Urano T, Asai S, Miyachi H, Asano K.	4. 巻 13(5)
2. 論文標題 Proportion and clinical characteristics of non-asthmatic non-smokers among adults with airflow obstruction.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 e0196132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0196132	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Asai S, Ohshima T, Iwashita H, Ishi Y, Minakawa Y, Aoki K, Machida S, Umezawa K, Tateda K, Miyachi H	4. 巻 26 (5)
2. 論文標題 Carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae in a febrile neutropenia patient with acute myelogenous leukemia after hematopoietic stem cell transplantation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Infect Dis Clin Pract	6. 最初と最後の頁 e38-e39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/IPC.0000000000000633	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Umezawa K, Sekine Y, Kimura K, Asai S, Saitoa T, Inokuchi S, Miyachi H.	4. 巻 66(9)
2. 論文標題 Emanation of fenitrothion from the skin surface of a patient who attempted to commit suicide by acute poisoning.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Rinshobyori	6. 最初と最後の頁 949-956
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ohshima T, Osaki T, Yamamoto Y, Asai S, Miyachi H, Kamiya S	4. 巻 56(12)
2. 論文標題 Evaluation of Risk Factors for Clostridium difficile Infection Based on Immunochromatography Testing and Toxigenic Culture Assay	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Clin Microbiol	6. 最初と最後の頁 e00555-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JCM.00555-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ogasawara A, Matsushita H, Tanaka Y, Shirasugi Y, Ando K, Asai S, Miyachi H	4. 巻 489
2. 論文標題 A simple screening method for the diagnosis of chronic myeloid leukemia using the parameters of a complete blood count and differentials	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinica Chimica Acta	6. 最初と最後の頁 249-253
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cca.2018.08.038	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 浅井さとみ, 梅澤和夫, 野崎 司, 池田四郎, 関根嘉香, 宮地勇人	4. 巻 21(2)
2. 論文標題 病院内臨床検査室における環境の臭気について	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Indoor Environ	6. 最初と最後の頁 139-143
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 間瀬浩安, 野崎司, 篠生孝幸, 浅井さとみ, 宮地勇人	4. 巻 44(1)
2. 論文標題 ポリマー剤とカーボン剤を併せた固相抽出カートリッジによる高極性有機リン化合物およびカーバメイト系化合物の同時抽出法の開発	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本臨床検査自動化学会誌	6. 最初と最後の頁 22-27
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 小笠原篤, 田中雄三, 田中由美子, 村山広道, 安藤潔, 中村直哉, 浅井さとみ, 宮地勇人	4. 巻 28(1)
2. 論文標題 AITLの骨髓浸潤にCD20 gating法が有用であった1例	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cytometry Research	6. 最初と最後の頁 47-49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.18947/cytometryresearch.28.1_47	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 浅井さとみ	4. 巻 32(1)
2. 論文標題 耳鼻咽喉科領域における感染対策 - 臨床検査医の立場から -	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本耳鼻咽喉科学会神奈川県地方部会会報	6. 最初と最後の頁 60-67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Furukawa S, Sekine Y, Kimura K, Umezawa K, Asai S, Miyachi H.	4. 巻 1053
2. 論文標題 Simultaneous and multi-point measurement of ammonia emanating from human skin surface for the estimation of whole body dermal emission rate	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Chromatography B	6. 最初と最後の頁 60-64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jchromb.2017.03.034. Epub 2017 Apr 2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ohshima T, Nomiya S, Yamamoto Y, Miyazawa M, Ohsuga J, Hisada A, Iwawaki K, Asai S, Miyachi H.	4. 巻 42
2. 論文標題 Performance evaluation of a newly developed and fully automated bacteriological analyzer "RAISUS ANY" for antimicrobial susceptibility testing of fastidious bacteria Haemophilus influenzae and Streptococcus pneumoniae.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Tokai J Exp Clin Med	6. 最初と最後の頁 37-40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ohshima T, Asai S, Miyazawa M, Yamamoto Y, Hisada A, Kumazawa C, Hashimoto M, Fukawa K, Iwashita H, Umezawa K, Yamada S, Yamamoto Y, Miyachi H.	4. 巻 42
2. 論文標題 The implementation of a hospital-wide practice for the selective use of carbapenems based on the monitoring of susceptibility of Pseudomonas aeruginosa isolates.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Tokai J Exp Clin Med	6. 最初と最後の頁 176-181
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ushijima A, Komai T, Masukawa A, Oikawa K, Morita N, Asai S, Mukai S, Okumura N, Kobayashi Y, Miyachi H.	4. 巻 137
2. 論文標題 Hypodysfibrinogenemia with a heterozygous mutation of Cys326Ser by the novel transversion of TGT to TCT in a patient with pulmonary thromboembolism and right ventricular thrombus	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cardiology	6. 最初と最後の頁 167-172
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000457899. Epub 2017 Apr 19.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 宮地 勇人, 荒川 聡, 浅井 さとみ	4. 巻 65
2. 論文標題 ゲノム医療時代の臨床検査室の新たな役割と取組み: 遺伝学的検査の利用と環境整備	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 臨床病理	6. 最初と最後の頁 547-551
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 梅澤和夫, 山田実俊, 浅井さとみ, 橋本昌宜, 宮地勇人, 山本義郎, 猪口貞樹
2. 発表標題 カルバペネム耐性緑膿菌発生と使用抗菌薬の関係
3. 学会等名 第46回日本救急医学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浅井さとみ
2. 発表標題 耳鼻咽喉科領域における感染対策 - 臨床検査医の立場から -
3. 学会等名 日本耳鼻咽喉科学会神奈川県地方部会 第183回耳鼻咽喉科・頭頸部外科学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮澤美紀, 浅井さとみ, 田部由香梨, 大島利夫, 宮地勇人
2. 発表標題 Bordetella bronchisepticaが検出された下気道感染の2症例
3. 学会等名 第30回日本臨床微生物学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大島利夫, 小沼守, 浅井さとみ, 宮地勇人
2. 発表標題 市中Clostridioides difficile感染症における感染源としての伴侶動物の役割
3. 学会等名 第30回日本臨床微生物学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小笠原篤, 浅井さとみ, 田中由美子, 沖将行, 大前比呂思, 中野由美子, 野崎智義, 橘裕司, 宮地勇人
2. 発表標題 マラリア原虫混合感染における末梢血液像検査と病原体核酸検査の有用性比較
3. 学会等名 日本染色体遺伝子検査学会 第36回総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浅井さとみ, 大島利夫, 梅澤和夫, 橋本昌宜, 宮地勇人
2. 発表標題 薬剤耐性緑膿菌コントロールのためのカルバペネム系薬の使用種類制限の取組み
3. 学会等名 第65回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 橋本昌宜, 小原健人, 浅井さとみ, 梅澤和夫, 宮澤美紀, 宮地勇人
2. 発表標題 病棟薬剤師による集中治療室での抗菌薬適正使用支援と効果
3. 学会等名 第66回日本化学療法学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浅井さとみ, 梅澤和夫, 岩下英夫, 宮地勇人
2. 発表標題 多剤耐性Acinetobacter baumanniiの分子機構の解析
3. 学会等名 第64回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 梅澤和夫, 関根嘉香, 木村桂大, 浅井さとみ, 宮地勇人
2. 発表標題 パラコート中毒患者における皮膚ガス揮発性ガス分析
3. 学会等名 第64回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 美奈川由貴、梅澤和夫、谷津亮祐、浅井さとみ、宮地勇人
2. 発表標題 病棟におけるノートパソコンキーボードカバーの消毒法の検討
3. 学会等名 第33回日本感染環境学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浅井さとみ、金子明寛、高梨昇、宮地勇人
2. 発表標題 口唇梅毒の超音波検査所見について
3. 学会等名 第83回神奈川県感染症医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 谷津亮祐、梅澤和夫、美奈川由貴、浅井さとみ、宮地勇人
2. 発表標題 ベッドサイドにおける環境消毒薬の検討
3. 学会等名 第83回神奈川県感染症医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 橘裕司、垣野あずみ、風間真、馮萌、浅井さとみ、梅澤和夫、野崎司、牧内貴志、堀木紀行、程訓佳、増田剛太
2. 発表標題 赤痢アメーバ症迅速血清診断のための蛍光イムノクロマト法の開発と評価
3. 学会等名 第87回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田実俊、山本義郎、梅澤和夫、浅井さとみ、橋本昌宜、宮地勇人、猪口貞樹
2. 発表標題 薬剤耐性誘導の影響を分析する探索的可視化システムの開発
3. 学会等名 日本計算機統計学会第31回大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考