

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590691

研究課題名(和文)多剤耐性緑膿菌の耐性獲得機構の解明と簡易検査、感染制御への応用

研究課題名(英文)The elucidation of the acquisition of resistance mechanism in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and application to simple diagnosis system and infection control

研究代表者

浅井 さとみ (ASAI, Satomi)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：60365989

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：緑膿菌の抗菌薬耐性と耐性遺伝子の発現について、既存の遺伝子発現の状態を臨床分離株を用いて詳細に調査し、簡易迅速診断検査に用いるための耐性遺伝子の検索を行った。薬剤排出ポンプ機能の亢進に關与するMexEF-OprNとMexXY-OprM同時発現臨床菌株を用いて、各遺伝子発現の有無を可視的に観察するシステムや、Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA法)による耐性遺伝子の発現検出法の開発を新たに試みた。

Acinetobacter baumanniiでは、薬剤排出ポンプの關与は緑膿菌ほど強くなく、他の遺伝子発現の關与が考えられた。

研究成果の概要(英文)：The antimicrobial resistance and the expression of the drug resistance related genes were investigated using clinical isolates of drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* for the development of the examination for simple and quick diagnosis system. Using the clinical isolated *P. aeruginosa* which had co-expression of MexEF-OprN and MexXY-OprM, the development of the diagnosis systems for the detection of the resistance gene by observing presence of each gene expression visually and Enzyme-linked immunosorbent assay (the ELISA method) were tried.

The contribution of the drug effluxing pump was not strong in *Acinetobacter baumannii*, and contribution of other gene expression was considered.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：緑膿菌 アシネトバクター 多剤耐性 耐性獲得機構 迅速検査 感染制御

1. 研究開始当初の背景

メシチリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA)、多剤耐性アシネトバクター (multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*: MDR-Ab) や多剤耐性緑膿菌 (multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*: MDRP) による院内感染とその制御は、重篤な感染症を引き起こすことから臨床上大きな問題となっている。特に三次医療機関における耐性菌感染症は重症患者の予後に大きく影響するため、感染経路予防策や抗菌薬使用制限など様々な方策が導入されているが、MDRP と MDR-Ab に対する決定的な有効手段は明らかにされていない。MDRP と MDR-Ab に有効な感染制御法には、臨床菌株の迅速かつ正確な菌株同定により感染経路の解明を行うことに加え、両者の耐性化過程を解明、効率的に評価・予測し、多剤耐性化を回避することが必要である。そこで本研究では臨床菌株において見られる多段階の耐性化と遺伝子変異の相互関係、および菌発育環境条件 (投与された抗菌薬や温度など) と耐性遺伝子獲得発現の関係を調べ、それに基づく検査診断法および多剤耐性化回避法の確立を目指す。

2. 研究の目的

近年、多剤耐性緑膿菌および多剤耐性アシネトバクターによる病院内感染とその制御は臨床上大きな課題で社会問題化している。両者は有効な治療薬がない上に、発生は将来に渡って増加すると懸念され、耐性化の解明とそれに基づく診断法、制御法の開発は急務である。本研究では臨床上の多剤耐性機構を知るため、耐性緑膿菌の臨床分離株について、軽度の単剤耐性獲得から多剤耐性化への進展における分子機構を明らかにし、菌の発育環境と遺伝子変異の両面に焦点を当て、その相互関係に基づいた耐性化進展の回

避手法の開発を目指す。同時に、耐性菌検査診断法の開発と効率的感染制御の方法を明らかにする。

3. 研究の方法

耐性発現を解析するため重症熱傷センター入院中の患者から分離された緑膿菌臨床菌株を用い、様々な抗菌薬での菌発育環境変化における *mex* 遺伝子を中心とする既知の耐性関連遺伝子発現の有無と耐性度の関係を明らかにする。生体での抗菌薬投与下菌発育環境を培養条件下に再現し、2系統の薬剤耐性緑膿菌に低濃度の抗菌薬を長期間暴露させ、薬剤耐性度の変化と耐性遺伝子の発現状況を検討する。

候補となる緑膿菌の耐性遺伝子発現を可視化させる検査診断システムを構築するために、通常の検査室で簡便に施行できる手法を開発する。上記 () の手法を用い、耐性アシネトバクターの耐性獲得機構の解明を行った。

4. 研究成果

緑膿菌の抗菌薬耐性と耐性遺伝子の発現について、臨床分離株を用いて詳細に調査し、簡易迅速診断検査に用いるための耐性遺伝子の検索を行った。薬剤排出ポンプ機能の亢進に關与する MexEF-OprN と MexXY-OprM 同時発現臨床菌株を用いて、各遺伝子発現の有無を可視的に観察するシステムや、Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA 法) による耐性遺伝子発現の検出法を開発を新たに試みた。

Acinetobacter baumannii については、薬剤排出ポンプの関与は緑膿菌ほど強くなく他の遺伝子発現の関与が考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 56 件)

1. Oki M, Asai A, Saito-Nakano Y, Nakayama T, Tanaka H, Ohmae H, Nozaki T, Miyachi H. A Case of Quadruple Malaria Infection Imported from Mozambique to Japan. Am J Trop Med Hyg 2014, doi:10.4269/ajtmh.13-0477 査読有
2. Tanaka Y, Tanaka Y, Gondo K, Maruki Y, Kondo T, Asai S, Matsushita H, Miyachi H. Performance evaluation of platelet counting by novel fluorescent dye staining in the automated hematology analyzers XN-Series. Platelet counting by dye staining. J Clin Lab Analysis 2014 doi:10.1002/jcla.21691. 査読有
3. 大菅淳, 大島利夫, 山本由香梨, 野宮沙織, 浅井さとみ, 宮地勇人. 東海大学医学部付属病院における抗酸菌検出状況. 臨床と微生物 41; 89-95, 2014. 査読無
4. 野宮沙織, 大島利夫, 山本由香梨, 大菅淳, 岩脇研次, 浅井さとみ, 宮地勇人. 全自動細菌迅速同定感受性測定装置改良型「RAISUS ANY」による *Haemophilus influenzae* と *Streptococcus pneumoniae* の MIC 値測定の評価. Kameraden 58;19-23, 2014. 査読無
5. 浅井さとみ, 福土広通, 高梨昇, 宮地勇人. 生理学的検査の精度管理 超音波検査の精度管理・精度保証. 臨床検査 55: 607-613, 2014. 査読無
6. Tanaka Y, Matsushita H, Tanaka Y, Maruki Y, Hayashi F, Kondo T, Asai S, Miyachi H. Elimination of interference by lipids in the low WBC mode in the automated hematology analyzer XN-2000. Int J Lab Hematol 36; 1-5, 2013, AID IJLH12114 査読有
7. Suzuki M, Matsui M, Suzuki S, Rimbara E, Asai S, Miyachi H, Takata T, Hiraki Y, Kawano F, Shibayama K. Genome Sequences of multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* strains from nosocomial outbreaks in Japan. Genome Announcements 01/2013; 1(4). DOI:10.1128/genomeA.00476-13 査読無
8. Tanaka Y, Matsushita H, Tanaka Y, Maruki Y, Kondo T, Asai S, Miyachi H. Evaluation of the body fluid mode of automated hematology analyzer XN-series for extremely low peripheral white blood cell counts. Int J Lab Hematol 32 : 731-736, 2013 doi: 10.1111/ijlh.12114. 査読有
9. Asai S, Okami K, Nakamura N, Shiraishi S, Sugimoto R, Damdinsuren A, Sato S, Matsushita H, Suzuki Y, Miyachi H. Localized or diffuse lesions of the submandibular glands in IgG4-related disease in association with differential organ involvement. J Ultrasound Med 2013;32 : 731-736. 査読有
10. 山本由香梨, 大島利夫, 大菅淳, 野宮沙織, 浅井さとみ, 宮地勇人. C.DIFF QUIK CHEK コンプリートによる *Clostridium difficile* 抗原およびトキシン A/B 検出の評価と運用について. 医療と検査機器・試薬 36;349-353, 2013. 査読無
11. 大橋茉耶, 浅井さとみ, 梅澤和夫, 剣持功, 佐々木美夏, 岩下英夫, 蓮沼裕也, 大島利夫, 猪口貞樹, 宮地勇人. 熱傷センターにおける多剤耐性 *Acinetobacter baumannii* 多発とその感染制御. 熱傷 2013; 39:15-21. 査読有
12. 浅井さとみ, 角田隆俊, 宮地勇人. CAPD 腹膜炎. IV. 腹膜炎, 肝・胆道系感染症,

- 膵臓感染症，消化管感染症．腹膜炎，腹腔内膿瘍． - 症候群から感染症単一疾患までを含めて - 下 臓器別感染症編 感染症症候群（第2版）別冊日本臨牀新領域別症候群シリーズ No.25 .日本臨牀 2013; 25:267-272, 2013. 査読無
13. 高橋万葉, 関根嘉香, 古川英伸, 浅井さとみ, 宮地勇人. ヒト皮膚から放散するアセトアルデヒドの室内空气中濃度に及ぼす影響. 室内環境 2013;16:15-22. 査読有 **平成 25 年度室内環境学会賞論文賞受賞**
 14. 岩下英夫, 浅井さとみ, 梅澤和夫, 大橋茉耶, 佐々木美夏, 大島利夫, 金子明寛, 宮地勇人. 歯科診療ユニットにおける細菌学的環境調査に基づく効果的な消毒法の検討. 環境感染誌 28; 273-279, 2013. 査読有
 15. 大島利夫, 浅井さとみ, 大菅淳, 山本由香梨, 野宮沙織, 矢部みはる, 矢部普正, 加藤俊一, 鬼塚真仁, 安藤潔, 大崎敬子, 神谷茂, 宮地勇人. 造血幹細胞移植患者における内因性細菌叢監視培養検査の臨床的意義. J Germfree Life Gnotobiol 43; 91-96, 2013. 査読有
 16. 浅井さとみ, 宮地勇人. 付加価値ある超音波検査の報告書と運用効果 頸部腫瘍の超音波検査を中心に . 超音波検査の報告書作成: 臨床検査専門医の役割と実践. Lab Clin Pract 31;61-67, 2013. 査読無
 17. Asai S, Okami K, Nakamura N, Shiraishi S, Yamashita T, Damdinsuren A, Matsushita H, Miyachi H. Sonographic appearance of the submandibular glands in patients with immunoglobulin G4-related disease. J Ultrasound Med 2012;31:489-493. 査読有
 18. Umezawa K, Asai S, Inokuchi S, Miyachi H. A Comparative Study of the Bactericidal Activity and Daily Disinfection Housekeeping Surfaces by a New Portable Pulsed UV Radiation Device. Curr Microbiol 2012;64: 581-587. 10.1007/s00284-012-0110-y. 査読有
 19. 蓮沼裕也, 浅井さとみ, 大島利夫, 大橋茉耶, 林京子, 宮地勇人. LAMP 法による新型インフルエンザウイルス (A/H1N1 pdm) 検出システムの基礎的性能評価. 日本臨床検査自動化学会会誌 2012; 37: 59-64. 査読有
 20. 上田美枝, 児玉三彦, 南谷晶, 浅井さとみ, 正門由久. リハビリテーションにおける感染対策 当院の感染対策 現状でのリハビリテーションにおける感染対策の実際. J Clin Rehabilitation 2012;21,144-150. 査読無
 21. 古川大輔, 浅井さとみ, 中郡聡夫. 【外科感染領域の MRSA 感染症への対応を再考する】 消化器外科におけるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌検出の動向. 日本外科感染症学会雑誌 9,143-150, 2012. 査読有
 22. 浅井さとみ, 宮地勇人. 臨床検査に基づく院感染対策活動. Lab CP 30(1); 9-15, 2012. 査読無
 23. 浅井さとみ, 宮地勇人. 感染症診療における遺伝子関連検査. Medical Technology 40(13); 1425-1431, 2012. 査読無
 24. 増川敦子, 浅井さとみ, 宮地勇人. 抗酸菌症における核酸増幅検査. Medical Technology 40(13); 1581-1586:2012. 査読無
 25. 宮地勇人, 浅井さとみ. 感染症の遺伝子検査. 月間レジデント 医学出版 5; 62-69: 2012. 査読無

26. Komai T, Nakazawa G, Asai S, Ikari Y. Fatal fulminate myocarditis associated with novel influenza A (H1N1) infection. *Eur Heart J*. 32, 283, 2011. 査読有
27. Asai S, Ohshima T, Yoshihara E, Jin G, Umezawa K, Inokuchi S, Miyachi H. Differential co-expression of Mex efflux pumps in a clinical strain of metallo-beta-lactamase producing-*Pseudomonas aeruginosa* during the stepwise evolution of resistance to aminoglycosides. *Inf Dis Clin Pract* 2011;19, 38-42. 査読有
28. 浅井さとみ, 松下弘道, 宮地勇人. 悪性リンパ腫の診断プロセスにおける超音波検査の有用性. 第 67 回関東・甲信越支部例会 シンポジウム 2: 検査の領域間連携と知識集約型サービス: 生理検査編 (4). *Lab Clin Pract* 59 (1); 89-96, 2011. 査読無
29. 浅井さとみ, 大島利夫, 梅澤和夫, 猪口貞樹, 宮地勇人. 熱傷患者の共用シャワー室使用における耐性緑膿菌の水平伝播とその制御. *熱傷* 2011;37:55-62. 査読有 **2012 年度日本熱傷学会学術奨励賞受賞**
30. 宮地勇人, 松下弘道, 浅井さとみ. 白血病における抗がん剤耐性の分子機構. *血液内科* 2011; 63: 493-497. 査読無
- [学会発表](計 63 件)
1. Ohshima T, Asai S, Miyachi H. The evaluation of antimicrobial susceptibility testing for *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* by an automated analyzer "RAISUS ANY." The 9th Cherry Blossom Symposium, April 18, 2014, Yokohama
2. 岩下英夫, 浅井さとみ, 梅澤和夫, 宮地勇人. 細菌学的環境調査に基づく歯科診療環境の精巢・消毒法の検討. 第 22 回日本口腔感染症学会総会・学術大会, 2013 年 11 月 17 日 八王子
3. 大島利夫, 浅井さとみ, 宮地勇人. 造血幹細胞移植患者における血液培養と血流感染対策. 第 60 回日本臨床検査医学会学術集会, 2013 年 1 月 3 日 神戸
4. 浅井さとみ, 梅澤和夫, 関根嘉香, 宮地勇人. 細菌産生ガスを指標とした腸内細菌細菌叢モニタリング法の開発. 第 60 回日本臨床検査医学会学術集会 2013 年 1 月 3 日 神戸
5. 岩下英夫, 浅井さとみ, 大島利夫, 梅澤和夫, 金子明寛, 宮地勇人. パルス式紫外線照射装置(クリアパルス)を用いた有床義歯の衛生的管理と細菌学的評価. 第 60 回日本臨床検査医学会学術集会, 2013 年 1 月 3 日 神戸
6. 大島利夫, 野宮沙織, 浅井さとみ, 宮地勇人. *Haemophilus influenzae* の薬剤感受性試験の自動化測定と測定標準化について. 第 24 回神奈川県臨床検査医学会大会, 2013 年 9 月 21 日 横浜
7. 岩下英夫, 浅井さとみ, 梅澤和夫, 宮地勇人. 歯科診療環境の細菌学的環境調査と効果的な清掃・消毒法の検討. 第 72 回神奈川県感染症医学会, 2013 年 6 月 11 日 横浜
8. 梅澤和夫, 浅井さとみ, 猪口貞樹, 宮地勇人. 携帯型パルス紫外線照射装置の抗菌作用の検討. 第 73 回神奈川県感染症医学会, 2013 年 9 月 21 日 横浜
9. 小林倫子, 梅澤和夫, 浅井さとみ, 宮地勇人. 口腔外科領域病棟入院患者の MRSA 発生要因. 第 28 回日本環境感染学会総会, 2013 年 3 月 1 日 横浜
10. 吉田光子, 浅井さとみ, 梅澤和夫, 宮地勇人. *Clostridium difficile* 感染患者多

- 発とその感染制御. 第 28 回日本環境感染学会総会, 2013 年 3 月 1 日 横浜
11. 梅澤和夫, 浅井さとみ, 橋本昌宜, 宮地勇人, 猪口貞樹. 多剤耐性緑膿菌発生予測因子の推定. 第 41 回日本救急医学会総会, 2013 年 10 月 21 日 東京
 12. 大橋茉耶, 浅井さとみ, 岩下英夫, 大島利夫, 梅澤和夫, 宮地勇人. 空気流動型ベッドを介した MDRAB の感染リスク評価と対策. 第 59 回日本臨床検査医学会学術集会, 2012 年 12 月 1 日 京都
 13. 岩下英夫, 浅井さとみ, 大島利夫, 宮地勇人. 歯科診療環境における細菌学的検査と効果的な消毒法の検討. 第 59 回日本臨床検査医学会学術集会, 2012 年 12 月 1 日 京都
 14. 山本由香梨, 大島利夫, 浅井さとみ, 宮地勇人. C.DOFF QUIK CHEK コンプリートによる *Clostridium difficile* トキシン A/B 及び抗原検出の評価と運用について. 第 59 回日本臨床検査医学会学術集会, 2012 年 11 月 30 日 京都
 15. 野宮沙織, 大島利夫, 浅井さとみ, 宮地勇人. 全自動細菌迅速同定感受性測定装置 RAISUS ANY の有用性の評価について. 第 59 回日本臨床検査医学会学術集会, 2012 年 11 月 30 日 京都
 16. 大橋茉耶, 浅井さとみ, 佐々木美夏, 大島利夫, 宮地勇人. 院内感染対策活動における専従の臨床検査技師の役割. 第 23 回神奈川県臨床検査医学会大会, 2012 年 6 月 2 日 横浜
 17. 大橋茉耶, 浅井さとみ, 蓮沼裕也, 梅澤和夫, 剣持功, 猪口貞樹, 宮地勇人. 重症熱傷患者における多剤耐性 *Acinetobacter baumannii* の多発とその感染制御. 第 38 回日本熱傷学会総会・学術集会, 2012 年 6 月 1 日 東京
 18. 山本由香梨, 大島利夫, 浅井さとみ, 宮地勇人. C.DIFF WUIK CHECK コンプリートによる *Clostridium difficile* トキシン A・B および抗原検出性能の評価. 第 23 回日本臨床微生物学会総会, 2012 年 1 月 21 日 横浜
 19. 大島利夫, 浅井さとみ, 山本由香梨, 大菅淳, 蓮沼裕也, 宮地勇人. 抗 MRSA 薬の MIC 値測定における菌液調整と薬剤希釈濃度設定がおよぼす影響について. 第 23 回日本臨床微生物学会総会, 2012 年 1 月 21 日 横浜.
 20. 浅井さとみ, 大島利夫, 蓮沼裕也, 大橋茉耶, 岩下英夫, 梅澤和夫, 良原栄策, 宮地勇人. 多剤耐性緑膿菌の臨床分離株における分子機構の解明. 第 58 回日本臨床検査医学会学術集会, 2011 年 11 月 18 日 岡山
 21. 岩下英夫, 浅井さとみ, 大島利夫, 大橋茉耶, 蓮沼裕也, 金子明寛, 宮地勇人. 歯科診療ユニットと周辺設備の細菌学的感染リスク. 第 58 回日本臨床検査医学会学術集会, 2011 年 11 月 18 日 岡山
 22. 大橋茉耶, 浅井さとみ, 野宮沙織, 蓮沼裕也, 大島利夫, 宮地勇人. 重症熱傷患者と周囲環境における薬剤耐性 *Acinetobacter baumannii*. 第 58 回日本臨床検査医学会学術集会, 2011 年 11 月 18 日 岡山
- 〔図書〕(計 0 件)
 〔産業財産権〕
 出願状況(計 0 件)
 取得状況(計 0 件)
 〔その他〕なし
 ホームページ等 なし
6. 研究組織
 (1)研究代表者
 浅井 さとみ (Asai, Satomi) 東海大学・医学部・講師 研究者番号: 60365989
 (2)研究分担者 なし
 (3)連携研究者 宮地 勇人 (Miyachi, Hayato) 東海大学・医学部・教授
 研究者番号: 20174195