

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 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：2014～2016

課題番号：26460657

研究課題名(和文) 薬剤排泄ポンプを用いた多剤耐性菌簡易診断法の開発と感染制御への応用

研究課題名(英文) Development of the diagnostic method for detection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* using efflux pumps as a target, and its application to infection control

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：イミペネム、アミカシン、シプロフロキサシンのうち2系統以上の抗菌薬に耐性を示す薬剤耐性緑膿菌とアシネトバクターにおいて、多剤耐性化と遺伝子変異の相互関係、耐性遺伝子獲得の関係を調査した。その結果、薬剤排出ポンプの発現亢進が薬剤耐性緑膿菌と多剤耐性アシネトバクターのほぼ全例に関与していることが分かった。その一方で、薬剤排出ポンプの構成蛋白質の気質となるペプチドを供給する複合体蛋白(Bam複合体)の発現亢進はわずかであった。

薬剤耐性の緑膿菌とアシネトバクターにおいて、薬剤排出ポンプ発現のモニタリングは感染制御に役立つことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The mutations in the genes responsible for the development of antimicrobial resistance were investigated in the drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* which showed resistance to at least 2 among imipenem, amikacin and ciprofloxacin. As a result, the contribution of the efflux pumps was found involved in almost all drug-resistant strains. On the other hand, the complex protein which supplied peptides for efflux pumps did not significantly increased.

The monitoring of the efflux pumps of *P. aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* was suggested to be useful in infection control.

研究分野：臨床検査医学

キーワード：緑膿菌 アシネトバクター 多剤耐性菌 薬剤排出ポンプ Bam 簡易迅速検査 感染制御 real time RT-PCR

1. 研究開始当初の背景

2013年米国疾病予防センターが多剤耐性緑膿菌 (multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*, MDRP) やアシネトバクター (multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*, MDR-AB) をはじめとする耐性菌に関する警告と感染対策の重要性についての勧告を表明するなど、多剤耐性菌の蔓延は世界的に重要な問題となっている。申請者は、三次医療機関である大学医学部付属病院での MRSA 対策として段階的な方策を導入することでメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) 保菌率を 8% から 1% 台に減少させることに成功し、その理論的背景と有効な感染対策の手段を科学的に解明してきた (Am J Inf Control 2007; 35:115-121)。MRSA の感染制御に一定の成果が得られて来た一方、MDRP や MDR-AB による院内感染とその制御は、環境への残留、地域医療施設への拡大まん延、さらに治療の困難さなどのため診療上かつ社会的にも大きな課題となっている。特に多剤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決定的な有効手段は未だ明らかにされておらず、MRSA とは異なる感染制御法が必要である。申請者らは薬剤耐性の発現と進展が多段階の過程で生じること、院内のカルバペネム系薬総使用量とカルバペネム耐性緑膿菌の検出率が相関すること、薬剤排出ポンプによる耐性化は段階的に起こること (Infect Dis Clin Pract 2011; 19:38-42)、複数の排出ポンプ発現量の違い (バランス) と発現亢進が多剤耐性化に寄与することを明らかにしてきた。さらに、MDR-AB は特殊な遺伝子型 (clone complex, CC92) が本邦では見られること (Genome Announcements 01/2013; 1(4))、耐性獲得に緑膿菌ほど薬剤排出ポンプには依存せず OXA 型などのラクタマーゼとその上流にある IS*Aba1* の存在 (IPM 耐性) や、*gyrA* と *parC* の遺伝子変異 (CPFX 耐性)、*armA* の発現 (AMK 耐性) の複合発現が耐性化に関与していることを申請者は明らかにした。また、菌の耐性獲得機構には環境因子 (湿度・温度・酸素濃度など) が大きく関与することを解明し、MDRP の水平伝播が共用シャワーの使用に大きく影響すること (熱傷 2010; 37:55-62) をはじめとし、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 (Curr Microbiol 2012; 64:581-587) 環境の効果的清掃・消毒について検討してきた (環境感染誌 2013; 28:273-279, 熱傷 2013; 39:15-21)。これら一連の研究成果を踏まえ、臨床における耐性菌の高度耐性化には環境因子の解明が重要であるとの着想に至った。多剤耐性化の機構として、基礎的な分子病態が解明されてきたが、臨床分離株を用いた耐性化と選択の機構の関連は未だ不明な点が多い。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手段の開発が求められる。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 (抗菌薬の影響など) と耐性遺伝子獲得発現の関係を調査し、それに基づく検査診断法の開発および多剤耐性化回避法の確立を検討した。

2. 研究の目的

MDRP や MDR-AB 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、感染リスクとなる免疫不全患者の増加のため、発生は将来に渡って増加すると懸念され、耐性化の病態解明とそれに基づく診断法、制御法の開発が期待される。しかしながら、実際の臨床分離株における耐性機構は不明な点が多い。

本研究では MDRP と MDR-AB の耐性獲得機構を知るため、耐性緑膿菌の臨床分離株について、軽度の単独薬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、また菌の発育環境 (抗菌薬投与) と耐性化進展の機能を解明することの一環として、過去のカルバペネム系薬の院内導入の状況とカルバペネム耐性緑膿菌との関係を統計学的に解析した。MDRP への進展を回避するための効率的感染制御の方法の試みを模索した。

3. 研究の方法

(1) 薬剤耐性緑膿菌 (2 剤耐性緑膿菌および MDRP) の簡易迅速検査法に使用する遺伝子の検索

耐性遺伝子発現の状態を臨床分離株で調査したところ、高度耐性化への進展には複数の薬剤排出ポンプ機能の亢進が大きく寄与することが確認された。そこで薬剤排出ポンプの構成蛋白の基質となるペプチドを供給する β -barrel assembly machinery (BAM) 複合体に着目した。ポンプの発現亢進により BAM 複合体が活性化または発現亢進すると推測された。そこで本研究では BAM 複合体の発現亢進を指標とした簡易診断法を検討した。

各種 *mex* 遺伝子 (*mexA*, *mexB*, *mexE*, *mexF*, *mexX*, *mexY*) 発現亢進株における BAM 複合体 (*BamA*, *BamB*, *BamC*, *BamD*, *BamE*) の発現状況をウエスタンブロット法にて確認後、real time RT-PCR 法にて *bam* 遺伝子 (*bamA*, *bamB*, *bamC*, *bamD*, *bamE*) の発現を調査した。ウエスタンブロット法と real time RT-PCR 法の結果から *Bam* 複合体中 (*bamA* ~ *E*) のいずれの遺伝子が簡易検査に最適か検討した。

(2) 薬剤耐性アシネトバクターについて
院内で検出された薬剤耐性アシネトバクターについて、遺伝子型 (ST)、ラクタマーゼの発現に不可欠な IS*Aba1* の発現、アミノ

グリコシド系薬耐性に *armA* 遺伝子の発現、ニューキノロン系薬耐性に *gyrA* と *parC* の遺伝子変異、外膜ポーリン(*oprD*, *carO*)発現、薬剤排出ポンプについて real time RT-PCRにて検索した。

(3) 緑膿菌の多剤耐性化回避法の検討

院内検出緑膿菌株を1患者初回検出検体(アウトブレイク株は省く)からランダムに100検体ずつ、独自に開発した5カルバペナム系薬最小発育阻止濃度(MIC)検出キットにてMICを測定した。MICが低いものから上位3薬のみを院内導入した結果を統計学的に解析した。MDRP進展を回避するためのエビデンスの構築を検討した。

4. 研究成果

(1) 薬剤耐性緑膿菌の簡易迅速検査法用遺伝子の検索について

予備実験ではMDRPにおけるBam複合体の発現または活性亢進が認められた。そこで様々なSTかつ薬剤耐性の緑膿菌を検討した結果、多剤耐性化と、直接的Bam複合体の活性亢進との相関は明らかではなかった。むしろ、*mexCD*以外の薬剤排出ポンプが前投薬(抗菌薬)との関連なく、ランダムに発現亢進していることが確認された。そこで、1回のRT-PCRで薬剤耐性緑膿菌の検出が可能になるmultiplex primerを作製した。PCRが容易に実施できない施設でも簡便に検査が可能な方法(LAMP法やイムノクロマト法)を検討中である。

(2) 薬剤耐性アシネトバクターについて

院内で検出された薬剤耐性アシネトバクターは、全てST208とST219のいずれかでclone complex(CC)92であった。ラクタマーゼの発現に不可欠なISAba1の発現、アミノグリコシド系薬耐性に*armA*遺伝子の発現、ニューキノロン系薬耐性に*gyrA*と*parC*の遺伝子変異、外膜*carO*発現低下が2剤薬剤耐性アシネトバクターにはみられたが、MDR-ABには加えて、薬剤排泄ポンプ(*adeB*, *adeJ*)の発現亢進が観察された。感染制御に必要な早期発見のために、CC92株には抗菌薬の耐性度に関わりなく感染対策を開始することが重要性であることが確認された。

(3) カルバペナム系薬の使用選択の検討

2006年から計画的に緑膿菌の定期的MIC測定に基づく院内導入カルバペナム系薬の選択を行った。その結果DRPM、MEPM、BIPMの順でMIC値が継続して低く、この3剤のみを院内導入した結果、カルバペナム系薬使用量の総量は著変なし~増量傾向にもかかわらず、院内全体で検出されるカルバペナム系薬耐性緑膿菌が有意に減少した(それぞれ $p=0.00068$, $p=0.0017$)。

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9件)

Yamada, S, Yamamoto Y, Umezawa K, Asai S, Miyachi H, Hashimoto M, Inokuchi S. Exploratory data analysis for medical data using interactive data visualization. 2016 14th International Conference on ICT and Knowledge Engineering. IEEE 査読有7804091, 7-11, 2017. DOI: 0.1109/ICTKE.2016.7804091.

Umezawa K, Asai S, Iwashita H, Minakawa Y, Ohashi M, Ohshima T, Hayashi H, Matsui M, Inokuchi S, Miyachi H. Molecular characteristics of a series of clinical isolates of drug-resistant *Acinetobacter baumannii* ST219 strain: the implications of a sequence analysis of the *blaOXA-51*-like. J Emerg Med Trauma Surg Care 査読有3(2),1-4, 2016. ISSN: 2378-8798

Komiyama T, Ogura J, Hirokawa T, Kamikuchi H, Asai S, Miyachi H, Kobayashi H. Analysis to Estimate Genetic Variations in the Idarubicin-Resistant Derivative MOLT-3. Int J Molecular Sci 査読有18(1), 2016. doi: 10.3390/ijms18010012

Kimura K, Sekine Y, Umezawa K, Furukawa S, Takahashi M, Asai S, Miyachi H, Tukamoto T, Ozano T. Clinical application of ammonia emanating from severe burn patients during critical care. J Jpn Association on Odor Environment 査読有47(6), 421-429, 2016.

Umezawa K, Asai S, Ohshima T, Iwashita H, Ohashi M, Sasaki M, Kaneko A, Inokuchi S, Miyachi H. Outbreak of drug-resistant *Acinetobacter baumannii* ST219 caused by oral care using tap water from contaminated hand hygiene sinks as a reservoir. Am J Infect Control 査読有43(11), 1249-51, 2015.

Asai S, Umezawa K, Iwashita H, Matsui M, Shibayama K, Inokuchi S, Miyachi H. An outbreak of *blaOXA-51*-like- and *blaOXA-66*- positive *Acinetobacter baumannii* ST208 in the emergency intensive care unit. J Med Microbiol 査読有63(1); 1517-1523, 2014.

Hayashi K, Lee JB, Kurosaki Y, Nozawa M, Asai S, Takeshita K, Hayashi T. Evaluation of fractions and isolated polysaccharides from *Sasa veitchii* for their preventive effects on influenza A virus infection. J Functional Foods 査読有10, 25-34, 2014

小川綾乃, 五嶋玲子, 小柳紀子, 高橋明子, 高梨昇, 浅井さとみ, 宮地勇人. 超音波診断装置による交差感染防止対策. 医学検査 査読有65(2), 172-180, 2016.

野崎司, 浅井さとみ, 宮地勇人. 尿沈渣中にみられる細菌形態の変化. 検査と技術 44(3), 194-199, 2016.

[学会発表](計 15 件)

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. 薬剤耐性誘導の影響を分析する可視化システム. 第 16 回西東京統計研究会 2017 年 3 月 18 日 横浜情報文化センター(神奈川県横浜市)

梅澤和夫, 山田実俊, 浅井さとみ, 橋本昌宜, 宮地勇人, 猪口貞樹, 山本義郎. 薬剤耐性誘導のデータマイニングによるアプローチ 2 (解析結果). 第 81 回神奈川県感染症医学会 2017 年 3 月 18 日 横浜情報文化センター(神奈川県横浜市)

浅井さとみ, 梅澤和夫, 岩下英夫, ダムディンスレンアナラ, 美奈川由貴, 大橋茉耶, 橋本昌宜, 大島利夫, 宮地勇人. 緑膿菌の抗菌薬耐性化における薬剤排出ポンプ遺伝子発現の特徴. 第 81 回神奈川県感染症医学会 2017 年 3 月 18 日 横浜情報文化センター(神奈川県横浜市)

美奈川由貴, 浅井さとみ, 大橋茉耶, 宮地勇人. インフルエンザ感染の施設内多発事例の要因分析: 抗原迅速検査結果に基づく院内動向解析の有用性. 第 63 回日本臨床検査医学会学術集会 2016 年 9 月 3 日 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

浅井さとみ, 梅澤和夫, 岩下英夫, ダムディンスレンアナラ, 美奈川由貴, 大橋茉耶, 大島利夫, 宮地勇人. 緑膿菌の抗菌薬耐性化における薬剤排出ポンプ遺伝子の発現と測定意義. 第 63 回日本臨床検査医学会学術集会 2016 年 9 月 3 日 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

大島利夫, 浅井さとみ, 宮澤美紀, 久田明史, 山本由香梨, 野宮沙織, 梅澤和夫, 宮地勇人. カルバペネム系薬の MIC 値に基づく薬剤使用制限による耐性緑膿菌のコントロールとその効果. 第 27 回日本臨床微生物学会総会 2016 年 1 月 30 日 仙台国際センター(宮城県仙台市)

浅井さとみ, 大島利夫, 石井良和, 岩下英夫, 美奈川由貴, 大橋茉耶, 宮地勇人. 高度多剤耐性肺炎桿菌臨床分離株における耐性分子機構の解明. 第 62 回日本臨床検査医学会学術集会 2015 年 11 月 21 日 長良川国際会議場(岐阜県岐阜市)

美奈川由貴, 浅井さとみ, 岩下英夫, 大橋茉耶, 梅澤和夫, 大島利夫, 宮地勇人. 薬剤耐性アシネトバクター多発における遺伝子相同性解析の有用性. 第 62 回日本臨床検査医学会学術集会 2015 年 11 月 21 日 長良川国際会議場(岐阜県岐阜市)

梅澤和夫, 浅井さとみ, 木村桂太, 関根嘉香, 宮地勇人. 揮発性物質解析による細菌同定法の開発. 第 62 回日本臨床検査医学会学術集会 2015 年 11 月 22 日

長良川国際会議場(岐阜県岐阜市)

浅井さとみ, 梅澤和夫, 岩下英夫, 大橋茉耶, 佐々木美夏, 大島利夫, 宮地勇人. MBL 非産生多剤耐性 *Acinetobacter baumannii* の耐性分子機構の解明. 第 22 回日本遺伝子診療学会大会 2015 年 7 月 18 日 かながわ労働プラザ(神奈川県横浜市)

浅井さとみ, 大島利夫, 石井良和, 青木弘太郎, 岩下英夫, 大橋茉耶, 佐々木美夏, 美奈川由貴, 館田一博, 宮地勇人. 高度多剤耐性 *Klebsiella pneumoniae* の耐性分子機構の解明: 次世代シーケンサー利用の意義. 第 22 回日本遺伝子診療学会大会 2015 年 7 月 18 日 かながわ労働プラザ(神奈川県横浜市)

浅井さとみ, 梅澤和夫, 岩下英夫, 大橋茉耶, 佐々木美夏, 大島利夫, 宮地勇人. 薬剤耐性 *Acinetobacter baumannii* アウトブレイク事例における分子疫学的解析と耐性機構の解明. 第 77 回神奈川県感染症医学会 2015 年 3 月 21 日 かながわ労働プラザ(神奈川県横浜市)

浅井さとみ, 梅澤和夫, 岩下英夫, 大橋茉耶, 佐々木美夏, 大島利夫, 宮地勇人. 薬剤耐性 *Acinetobacter baumannii* 臨床分離菌株における耐性獲得分子機構の解析. 第 61 回日本臨床検査医学会学術集会 2014 年 11 月 23 日 福岡国際会議場(福岡県福岡市)

[図書](計 2 件)

岩下英夫, 浅井さとみ, 宮地勇人. 高頻度接触表面の清掃・消毒方法 - 対象と手順. 感染対策 ICT ジャーナル 査読無 12(1), 27-30, 2017.

浅井さとみ, 中村直哉, 大上研二, 小川吉明, 宮地勇人. リンパ節・唾液腺ほか. リンパ節の反応性病変. 超音波×病理対比アトラス. 検査と技術 査読無 42: 1052-1054, 2014.

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

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・准教授

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: 20174196

(4) 研究協力者

良原 栄策 (YOSHIHARA, Eisaku)

東海大学 工学部・客員准教授

大島 利夫 (OHSHIMA, Toshio)

東海大学医学部附属病院 臨床検査技師