

機関番号：15101
 研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20790413
 研究課題名 (和文) 緑膿菌の抗菌薬耐性に関わる外膜蛋白質変異の迅速検査法の開発とサーベイランスの実践
 研究課題名 (英文) Rapid detection of alteration of outer membrane proteins conferring antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and application to surveillance
 研究代表者
 堀井 俊伸 (HORII TOSHINOBU)
 鳥取大学・医学部・准教授
 研究者番号：80283430

研究成果の概要 (和文)：緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* のカルバペネム系薬耐性に関与している OprD 変異をタンパク質レベルで迅速に検出することが可能な測定系および外膜タンパク質抽出法を構築した。さらに、カルバペネム系薬耐性株として臨床分離された *P. aeruginosa* の収集を行い、本研究で構築した測定系および外膜タンパク質抽出法を用いて OprD 変異によるカルバペネム系薬耐性に関するサーベイランスを実施した。

研究成果の概要 (英文)：Rapid detection of OprD alteration conferring carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* was developed. To survey carbapenem resistance caused by OprD alteration, carbapenem-resistant *P. aeruginosa* isolates were collected from all over the country and detected the alteration using our newly developed methods.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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： 臨床微生物学

1. 研究開始当初の背景

緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* において、抗菌薬耐性は治療を困難にさせるだけでなく病院感染症のアウトブレイクの原因となる頻度を高くする。なかでも、外膜タンパク質である OprD/OprM の変異は *P. aeruginosa* におけるカルバペネム系薬耐性の主要な機序の一つであるが、現在のところ、これを日常診療の臨床検査で検出することは不可能である。

2. 研究の目的

OprD/OprM 変異をタンパク質レベルで定量または定性するための測定系を構築し、最終的には、迅速かつ簡便で臨床応用が可能な測定系として完成させることを目的に研究を行う。さらに、構築した検出系を用いて、OprD/OprM 変異による *P. aeruginosa* のカルバペネム系薬耐性の分布状況を明らかにするための疫学的解析(サーベイランス)をできるだけ規模を大きくして行い、適切な抗菌薬療法を推進するためのエビデンスを得ることも視野に入れた研究を展開する。

3. 研究の方法

(1) *P. aeruginosa* の OprD/OprM 変異をタンパク質レベルで定量または定性するための方法を確認することを目的とし、Western blot 法ならびに酵素抗体測定法 enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) を応用した測定系を構築し、迅速で、高感度

かつ特異的に OprD/OprM 変異が検出できるよう、改良のための検討を重ね、測定条件を最適化する。

(2) OprD/OprM を含む外膜タンパク質の抽出法を構築する。迅速に効率よく目的とする外膜タンパク質を抽出することができるようにするための検討を重ね、抽出条件を最適化する。

(3) 日本全国からカルバペネム系薬耐性株として臨床分離された *P. aeruginosa* を収集し、サーベイランスを実施する。収集した臨床分離株について、寒天平板希釈法により、imipenem, meropenem, doripenem の最小発育阻止濃度を決定した後、本研究で構築した外膜タンパク質抽出法ならびに OprD/OprM 変異検出系 (Western blot 法および ELISA) を用いて測定を行い、各測定系の感度や特異度などを検証するとともに、わが国におけるカルバペネム系薬耐性の分布状況を明らかにする。さらに、適切な抗菌薬療法や医療関連感染対策を推進するためのエビデンスを得るための分析を行う。

4. 研究成果

(1) *P. aeruginosa* における OprD 変異を迅速で高感度かつ特異的に検出する測定系として、Western blot 法ならびに ELISA の技術を応用した測定系を構築した。

(2) *P. aeruginosa* の培養液から OprD/OprM を含む外膜タンパク質を迅速かつ高率よく検出することを可能とする抽出系を構築した。

(3) 日本全国より、カルバペネム系薬耐性株として臨床分離された *P. aeruginosa* の収集を行い、OprD 変異によるカルバペネム系薬耐性に関するサーベイランスを開始した。収集したそれぞれの株について、まず、imipenem, meropenem, doripenem の最小発育阻止濃度を決定し、これまで構築した外膜タンパク質迅速抽出系、Western blot 法による測定系、ELISA 法による測定系を用いて、OprD 変異の検出を実施した。

(4) 可能なかぎり多くの臨床分離株を対象としたサーベイランスとするために、今後、本研究を発展させることにしている。

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 7 件)

- ① Horii T, Tamai K, Mitsui M, Notake S, Yanagisawa H, Blood stream infections caused by *Acinetobacter ursingii* in an obstetrics ward, *Infection, Genetics and Evolution*, 査読あり, 2011, 11, 52-56
- ② 太田博美, 藤原弘光, 田中祐子, 谷本綾子, 堀井俊伸, 上山潤一, 岡崎俊朗, 血液培養検査で繰り返して *Rhodococcus equi* を分離した 1 症例, *日本臨床微生物学雑誌*, 査読あり, 20, 2010, 38-43
- ③ Horii T, Ohtsuka H, Osaki M, Ohkuni H, Use of a dual priming oligonucleotide system to detect multiple sexually transmitted pathogens in clinical specimens, *Letters in Applied Microbiology*, 査読あり, 49, 2009, 46-52
- ④ Horii T, Adachi A, Morita M, Detection of carbapenem resistance in clinical mucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates, *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 査読あり, 41, 2009, 873-876
- ⑤ Miyazaki H, Horii T, Nagura O, Suda T, Chida K, Nakamura H, Effect of the inoculum size on carbapenem susceptibilities of β -lactamase-negative, ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*, *Current Microbiology*, 査読あり, 58, 2009, 18-24
- ⑥ Takayama T, Ito T, Suzuki K, Ushiyama T, Horii T, Miura K, Ozono S, BK virus nephropathy: Clinical experience in a university hospital in Japan, *International Journal of Urology*, 査読あり, 16, 2009, 924-929
- ⑦ Horii T, Osaki M, Muramatsu H, Fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Klebsiella oxytoca*, *Chemotherapy*, 査読あり, 54, 2008, 323-327

〔学会発表〕（計6件）

- ① 堀井俊伸, シンポジウム: 手術部の安全: 術後感染症の防止, 第47回日本麻酔科学会中国・四国支部学術集会, 2010年9月11日, 米子
- ② 上灘紳子, 堀井俊伸, シンポジウム: 手指衛生のコンプライアンスを改善するための取り組み-部門の特徴を捉えた取り組み-, 第25回日本環境感染学会総会, 2010年2月5日, 東京
- ③ Horii T, Antimicrobial susceptibility testings against clinical mucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates, 26th International Congress of Chemotherapy and Infection, June 19-21, 2009, Toronto
- ④ 堀井俊伸, シンポジウム: 遺伝子検査の現状と未来: 抗菌薬耐性を制御するための遺伝子検査とこれからの感染症診療, 第54回日本臨床検査医学会中国・四国支部総会・第149回日本臨床化学会中国支部例会・総会・第19回日本臨床化学会四国支部例会・総会・第5回合同地方会, 2009年2月7日, 岡山
- ⑤ Horii T, Mai Osaki, Fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Klebsiella oxytoca*, 13th International Conference on Infectious Diseases, June 19-22, 2008, Kuala Lumpur
- ⑥ 堀井俊伸, セミナー: 抗菌薬耐性の制御に向けて-抗菌薬療法をど

う適切に進めるか-, 第78回日本感染症学会西日本地方会学術集会, 2008年12月5日, 広島

〔図書〕（計1件）

- ① Horii T, Nova Science Publishers, Chapter 3.8. Utility and availability of plasma exposure in healthcare facilities. Akikazu Sakudo and Hideharu Shintani, eds: Sterilization and disinfection by plasma: sterilization mechanisms, biological and medical applications, 2011, 215-222

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀井 俊伸 (HORII TOSHINOBU)
鳥取大学・医学部・准教授
研究者番号: 80283430

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし