

From August to October 2015, 586 clinical samples and 34 samples obtained from ICU-environment were collected from Shaku Mujib Medical University Hospital. Three hundred of environmental samples in the community were obtained from various 30 locations in the Dhaka city. Each sample was cultured with CHROMagar mSuperCARBA. Modified carbapenemase inactivation method was performed on the growth strains, and resistant genes were detected by PCR.

CP strains were isolated from 50 clinical samples (8.5%), 11 ICU-environment samples (32.4%) and 2 community-environment samples (0.6%). Among clinical samples, CP strains were isolated from urine, blood, tracheal aspirate, sputum, swab and main bacterial species were *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Acinetobacter baumannii*. In ICU-environment samples, CP strains were isolated from water of oxygen flowmeter, bed handrail, nurse desk, handrail of a door, operation panel of a ventilator and main species were *Pseudomonas aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*. In community-environment samples, CP strains were isolated from switch panel of the elevator, and main bacterial species were *Serratia phymuthica*. PCR analysis showed the detection of resistant genes of NDM-1/-5/-7/-4 (total 68.0%), OXA-23 like (20.0%), OXA-181/-48 (total 8.0%), VIM (4.0%) from the clinical isolates. NDM-1/-7/-1 variant (total 100%) and VIM (100%) genes were also detected from the samples obtained from the ICU and community-environment, respectively.

In this study, we isolated various CP strains from clinical samples obtained in University hospital in Dhaka. Moreover, CP strains were also isolated from ICU environment and community environment. These results suggest that contamination of environment with CP strains may cause the transmission of bacterial resistance in Bangladesh.

P1-08.

化学物質の呼吸器アレルギー感作性の新規 *in vitro* 評価法の開発

(大学院修士課程2年免疫制御研究部門)

○大橋 美緒

(医学総合研究所 免疫制御研究部門)

溝口 出、千葉祐規乃、長谷川英哲

徐 明利、善本 隆之

アレルギー疾患には、大きく分けて皮膚アレルギーである接触性皮膚炎と呼吸器アレルギーである喘息がある。その中で、職業性喘息の患者は、欧米では大人の喘息患者の中で15-18%を占めるとも言われるがその対策は極めて遅れている。感作性を検出する評価法としては、近年の国際的な流れである動物を用いない代替法への移行により、*in vitro* 評価法の開発が進められている。ところが、皮膚と呼吸器の感作性物質に対する危機管理体制が全く異なるにもかかわらず、既存の評価法ではこれらの感作性の違いを識別できない。そこで、本研究では、呼吸器と皮膚アレルギーの根本的な作用機序の違いであり呼吸器感作性に特徴的なヘルパー T (Th) 2 細胞への分化誘導能に着目し、その差異により両者を識別することのできる *in vitro* 評価法の開発を試みた。

より生体に近い *in vitro* 評価法を開発するため、気道上皮細胞株とヒト末梢血 CD14 陽性単球より分化誘導した未成熟 DC、繊維芽細胞株の3種類の細胞を、多孔質の Scaffold (足場材) を用いてそれぞれ3次元培養後、順に重層し3次元共培養系を構築した。次に、呼吸器および皮膚感作性化学物質として、それぞれ代表的な3種類ずつの化学物質を用いて刺激後、免疫組織学的解析とリアルタイム RT-PCR による解析を行った。その結果、各物質で刺激後、抗 CD11c 抗体を用いた解析で、上皮細胞層や繊維芽細胞層への DC の顕著な移動は見られなかった。次に、mRNA 発現解析により、DC 層で DC 成熟化の指標である副刺激分子 CD80 や CD86 などの発現増強には差がなかったが、皮膚感作性化学物質の刺激に比べ呼吸器感作性化学物質の刺激により Th2 分化に重要な副刺激分子 OX40L のより強い発現増強が見られた。以上の結果は、この3次元共培養系が呼吸器と皮膚感作性化学物質の識別可能

な新しい *in vitro* 評価法になり得る可能性を示唆している。

P1-09.

*in vivo*における lysozyme のマウスノロウイルス (MNV) に対する抗ウイルス効果の検討

(大学院修士課程2年微生物学)

○中嶋 真帆

(微生物学)

Khandakar M.A. Haque、小林 了、松本 哲哉

【はじめに】 マウスノロウイルス (MNV) に対する *in vitro* の lysozyme の有効性については報告があるが、*in vivo* における効果は明らかでない。マウスに lysozyme を経口投与した後 MNV を経口感染させることにより、*in vivo* における lysozyme の抗ウイルス効果を調べることを目的とする。

【材料と方法】 MNV は、Dr. Vergin (Washington University, USA) から供与された MNV-1.CW1 を用いた。MNV はマクロファージ細胞株 RAW264.7 で増殖させ、90,000 g で3時間超遠心して実験に用いた。MNV 1.0×10^7 pfu を C57BL/6、CD1d 欠損および BALB/c マウスに経口感染させ、マウスの便を感染後0から10日目まで継続的に採取した。便は PBS で溶解後フィルター滅菌し、プラークアッセイでウイルス量を測定した。さらに、MNV 特異的なプライマーを使った RT-PCR 法で MNV RNA の検出を行った。lysozyme の抗ウイルス効果は、lysozyme を MNV 感染の3日前からマウスに経口投与し、lysozyme 投与群と非投与群の便中の MNV 量を比較して検定した。

【結果および考察】 MNV を RAW264.7 に感染させると 1.5×10^6 pfu/ml のウイルス液が得られ、超遠心で5倍に濃縮できた。C57BL/6 マウスの MNV の経口感染では、便中からプラークは検出されなかったが、RT-PCR 法でウイルス RNA を確認できた。これは、C57BL/6 マウスでは MNV は便中から排出されるものの、不活化されると思われた。BALB/c および CD1d 欠損マウスでは、マウスの便から僅かに不活化されていないウイルスが検出された。現在、BALB/c および CD1d 欠損マウスを使って、*in vivo* における lysozyme の抗ウイルス効果を検討中である。

P1-10.

ダプトマイシン非感性 MRSA の臨床分離株における細菌学的検討

(大学院修士課程1年微生物学)

○三橋 彩乃

(微生物学)

大神田 敬、石 雄介、江原 友子

大楠 清文、松本 哲哉

【目的】 国内で2011年に承認された抗 MRSA 薬のダプトマイシン (DAP) は、これまで臨床分離された殆ど全ての MRSA 株に対して良好な感受性を示してきた。しかし、今回、ある一つの医療機関から DAP 非感性 MRSA の臨床分離株8株が分離された。このような DAP 非感性株の高頻度の出現は非常に稀なことであるため、今後の本薬剤への非感性化を予測する意味でも分離された背景を調べることは重要であると考えられる。そこで本研究では、今回得られた8菌株について、菌株の分子疫学解析や耐性機序、さらに抗菌薬曝露の影響などを検討した。

【方法】 DAP 非感性 MRSA の臨床分離株8株を用いて、抗 MRSA 薬に対する薬剤感受性試験を行った。POT 法による分子疫学解析は、シカジーニアス分子疫学解析 POT キット (関東化学) を用いて POT 値を算出し、各菌株を比較解析した。また、*mprF* 遺伝子のシーケンス解析を行い、アミノ酸配列の変異を確認した。さらに、各菌株に対する $1/2$ MIC の VCM、DAP 存在下で2週間培養を継続した後、同薬剤の MIC 値を微量液体希釈法で測定した。

【結果】 対象8株のうち1株が ABK に対して耐性を示し、POT 法では、5株が同一のクローンの可能性が高いという結果になった。一方、*mprF* 遺伝子のシーケンス解析では、8株全ての *mprF* 遺伝子に各々異なるアミノ酸変異を認め、これまでに報告されていない新たな変異がそのうち6株に発見された。VCM の2週間曝露による MIC については、両薬剤ともに値の上昇が認められたが、DAP の曝露では VCM のみ上昇が認められた。

【考察】 今回の結果から、DAP 非感性の MRSA 株が同一病院で多く分離された理由の一つは院内での伝播が考えられる。しかし、その耐性化を誘導したアミノ酸変異は必ずしも同一部分ではない。抗