

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

MRSA 薬への曝露により DAP の MIC 値の上昇を認めたことから、DAP に対する非感性化には複雑な要因があることが示唆された。今後、DAP に対する非感性化についてさらに検討していく必要がある。

P1-11.

MRSA に対するリゾホスファチジルコリンの作用とバンコマイシンとの併用効果

(大学院修士課程 2 年微生物学)

○三好 菜摘

(微生物学)

宮崎 治子、江原 友子、大楠 清文

松本 哲哉

【目的】 細胞膜を構成するホスファチジルコリンから生成されるリゾホスファチジルコリン (Lysophosphatidylcholine: LPC) は、乳化力が強い両性界面活性剤である。LPC はグラム陽性球菌、特に MRSA を含む黄色ブドウ球菌に対して抗菌作用を有することを学会で報告した。そこで今回、MRSA に対する LPC と抗 MRSA 薬のバンコマイシン (VCM) との併用効果について検討した。また長期使用を行った場合の耐性化の有無を確認するため、LPC 曝露後の感受性の変化についても検討を行った。

【方法】 1. MRSA の LPC に対する MIC 測定: MRSA の臨床分離株 32 株と ATCC 3 株を対象に、卵黄由来の LPC (卵黄リゾレシチン LPC-1、キューピー) を用いて微量液体希釈法を行い、MIC を測定した。

2. LPC と VCM 併用時の生菌数測定: LPC に対して近い MIC 値を示した MRSA 11 株を用いて、① Muller-Hinton 液体培地のみを対照、② LPC 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 単独、③ 1/4 MIC の VCM 単独及び ④ LPC と VCM の併用の各条件下で培養し、6 時間後までの生菌数の変化を測定した。

3. LPC 曝露による MRSA の感受性の変化: MRSA 11 株を LPC 16、または 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 含有の Muller-Hinton 寒天培地で 30 日間継代培養し、初日と 10 日毎に LPC の MIC を測定した。

【結果】 今回検討した全 35 株の MIC 値は 32~> 2,048 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で中央値は 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。6 時間

の培養後の生菌数は、ほとんど全ての株が 1/4 MIC の VCM 単独では増加していた。LPC 単独では半分弱の株の生菌数が減少していた。LPC と VCM の併用では半数以上の株が VCM 単独と比較して 3~4 以下に生菌数が減少した。LPC 曝露後の感受性の変化については、今回検討に用いた MRSA 11 株全株が 30 日間曝露しても LPC に対する MIC 値の明かな上昇は認めなかった。

【考察】 上記の結果より VCM に LPC を併用することで MRSA の殺菌効果の増強が確認された。

また LPC 7 日間曝露での耐性化は認めなかった。今後さらに臨床等での応用の可能性について検討を行っていく予定である。

P1-12.

Astma COPD overlap syndrome (ACOS) 発症機序と喫煙の関連性

(社会人大学院博士課程 3 年呼吸器内科学)

○河越淳一郎

【目的】 Th2 性炎症の喘息と好中球炎症の COPD が合併した病態である ACOS において、増悪と呼吸機能の低下という観点からは COPD よりも予後が悪い疾患である。それを踏まえて今回、喫煙による慢性気道炎症が ACOS の発症にどのように関わっているかを検討した。

【対象と方法】 当院通院中の喘息患者および COPD 患者、閉塞性性障害を有さない喫煙者における呼気 NO 値、血清好酸球数値、IgE 値、そして気道リモデリング病態にかかわる因子である Periostin 値および IL-13、そして IL-13 の発現に関与する IL-33、さらに好中球に発現し初期免疫にかかわる Lipocalin2 について測定した。

【結果および考察】 喫煙歴の有無に関わらず、閉塞性障害を認めた患者では血清好酸球、IgE 値、Periostin 値が高い傾向にあり、血清 NGAL 値は有意に高かった。気管支喘息患者において血清 NGAL 値は閉塞性障害の進行に関する有用な指標となる可能性が示唆された。