

大石貴幸より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号甲第 574 号

学位申請者 : おお 大      いし 石      たか 貴      ゆき 幸

学位審査論文 : Molecular epidemiological analysis of human- and chicken-derived isolates of *Campylobacter jejuni* in Japan using next-generation sequencing

(次世代シーケンスを用いた日本におけるヒトおよび鶏由来 *Campylobacter jejuni* の分子疫学的解析)

著 者 : Takayuki Ohishi, Kotaro Aoki, Yoshikazu Ishii, Masaru Usui, Yutaka Tamura, Michiko Kawanishi, Kenji Onishi, Kazuhiro Tateda

公 表 誌 : Journal of Infection and Chemotherapy DOI:10.1016/j.jiac.2016.11.011

論文内容の要旨 :

目的: 日本における 2007 年から 2014 年の期間に検出されたヒトおよび鶏由来 *Campylobacter jejuni* を対象として、抗菌薬感受性と遺伝学的関連性について検討することを目的とした。本研究では、各種抗菌薬感受性、multilocus sequence typing (MLST) による主要 sequence type (ST) および ST complex、各種抗菌薬耐性因子をコードする遺伝子の保有状況および lipooligosaccharide biosynthesis loci class (LOS locus class) について解析し、それらの関連性について検討した。

方法: 東京都内の 2 医療施設においてヒト便検体から検出された 106 株の *C. jejuni* と、北海道、東京、岐阜、滋賀、兵庫、山口、福岡で流通していた鶏肉、および東北、中部、中国、四国、九州の農場で採取された鶏糞から検出された各々 57 株、22 株の合計 185 株の *C. jejuni* を供試菌株とした。抗菌薬感受性検査は Clinical and Laboratory Standards Institute の方法に準拠した微量液体希釈法、MLST、薬剤耐性因子をコードする遺伝子の保有状況および LOS locus class は次世代シーケンサーを用いたドラフト全ゲノムデータを基に検討した。

結果: ヒトおよび鶏由来株ともに ST-21 complex が主要クローンであった。これらの菌株は imipenem、chloramphenicol および erythromycin に耐性を示さず、ampicillin と streptomycin 耐性株の検出頻度は低く、tetracycline、ciprofloxacin および nalidixic acid に対しては 38-49% が耐性を示した。ST-21 complex のうちでは ST 4526 が高率に検出されたが、これらの菌株

は tetracycline および ciprofloxacin 耐性、ampicillin 感受性であった。全鶏由来株で quinolones に耐性を示した 38 株のうち 37 株は GyrA 86 位 threonine から isoleucine (T86I) のアミノ酸変異を有していた。全ヒト由来株のうち nalidixic acid および ciprofloxacin に耐性を示した各々 47 株中 16 株、および 48 株中 17 株では GyrA T86I アミノ酸変異が検出されなかった。ST-21 complex に属するヒト由来株は、LOS locus class A、B、C、D および E に、鶏由来株は 1 株を除き LOS locus class C および D に分類された。鶏由来株のうち最も優勢 (10 株) に検出された ST51 (ST-443 complex) に属する鶏由来株はすべて LOS locus class E に分類された。

考察: 本研究から、日本におけるヒトおよび鶏由来 *C. jejuni* は共通する遺伝的背景を有する菌株が拡散し、かつ同様の薬剤感受性パターンを示したことから、鶏肉を介してヒトへ拡散していることが示された。一方で、一部のヒトおよび鶏から共通して分離された菌株において、ST と薬剤感受性成績の関連性は確認されたが、薬剤感受性成績と薬剤耐性遺伝子保有の関連性、および ST と LOS locus class 分類に差異が認められた。ヒトから分離される特定の遺伝背景の *C. jejuni* は牛など他の動物にも由来する可能性が指摘されており、鶏由来 *C. jejuni* 以外のリソースに由来する *C. jejuni* がヒトに健康被害を与えている可能性が示唆された。今後は他の動物種に由来する *C. jejuni* のゲノムレベルの解析も併せて検討する必要がある。

# 1. 学位審査の要旨および担当者

|              |     |         |
|--------------|-----|---------|
| 学位番号甲第 574 号 | 氏 名 | 大 石 貴 幸 |
| 学位審査担当者      | 主 査 | 瓜 田 純 久 |
|              | 副 査 | 草 地 信 也 |
|              | 副 査 | 島 田 英 昭 |
|              | 副 査 | 西 脇 祐 司 |
|              | 副 査 | 村 上 義 孝 |

## 学位審査論文の審査結果の要旨 :

これまでに細菌の株レベルのゲノムタイピングは主としてパルスフィールドゲル電気泳動法に代表されるフラグメント解析が主流であったが、近年 7 つの必須遺伝子の塩基配列を解読し、その塩基配列の相違をデータベースで照合することにより分類・同定する手法である multilocus sequence typing (MLST) 法が開発された。7 つの必須遺伝子の塩基配列の違いから ST 型を決定し、分類する手法である。今回、日本各地の鶏とヒトから検出された *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) の菌株について、MLST による主要 ST および ST complex、各種抗菌薬耐性因子をコードする遺伝子 GyrA 遺伝子変異の保有状況およびギランバレー症候群の発症に関与すると考えられている LOS locus class について解析し、その多様性と特徴を明らかにする一方、Clinical and Laboratory Standards Institute の方法に準拠した微量液体希釈法で施行した抗菌薬感受性検査の結果と比較検討した。7 種類の遺伝子配列から決定した ST 型は ST-21 が最も大きな集団を作っていることが知られており、Fig1 に示すように eBURST 解析で表現できる。ST-21 の 1 遺伝子変異型 (single locus variant) の *C. jejuni* がそのまわりに環状に分布しており、遺伝子変異が多くなると、遠くに分布する形となっている。ヒトおよび鶏由来株ともに ST-21 complex が主要クローンであった (Table2)。その中で ST 4526 が高率に検出されたが、これらの菌株は tetracycline および ciprofloxacin 耐性、ampicillin 感受性であった (Table2)。全鶏由来株で quinolones に耐性を示した 38 株中 37 株は GyrA 86 位 threonine から isoleucine (T86I) のアミノ酸変異を有していたが、全ヒト由来株のうち nalidixic acid 耐性 47 株中 16 株、ciprofloxacin 耐性 48 株中 17 株では GyrA T86I アミノ酸変異が検出されず (Fig2)、ヒト分離株では薬剤耐性にはこの変異以外の要因が示唆された。ST-21 complex に属するヒト由来株は、LOS locus class A-E に、鶏由来株は 1 株を除き class C および D に分類され、ギランバレー症候群に多い class A、B は鶏には少なかった。日本におけるヒトおよび鶏由来 *C. jejuni* はともに多様な遺伝的背景を有するが、ST-21 complex が多くを占め、一定の割合で鶏-ヒト感染が感染拡大に関与していることが示唆された。学位審査では投与された抗菌薬の関連、地域差、鶏糞便採取法、ST 型と薬剤耐性、ホモロジーの定義、MLST 法の原理とメリットなど、活発な議論となったが、的確な回答をいただいた。日本各地に点在する鶏を宿主とする *C. jejuni* および都内のヒトに感染した *C. jejuni* の遺伝的多様性と特徴を明らかにした価値ある論文であり、学位に相当すると結論し審議は終了した。