

タイトル	Molecular characterization of blaNDM carrying IncX3 plasmids: blaNDM 16b likely emerged from a mutation of blaNDM 5 on IncX3 plasmid
別タイトル	blaNDM搭載IncX3 プラスミドの分子生物学的解析:blaNDM 16bがIncX3 プラスミド上のblaNDM 5 の変異により出現した可能性について
作成者（著者）	有吉, 司
公開者	東邦大学
発行日	2023.03.14
掲載情報	東邦大学大学院医学研究科 博士論文 内容の要旨及び審査結果の要旨.
資料種別	学位論文
内容記述	主査：南木敏宏 / タイトル：Molecular characterization of blaNDM carrying IncX3 plasmids: blaNDM 16b likely emerged from a mutation of blaNDM 5 on IncX3 plasmid / 著者：Tsukasa Ariyoshi, Kotaro Aoki, Hiroaki Kubota, Kenji Sadamasu, Yoshikazu Ishii, Kazuhiro Tateda / 掲載誌：Microbiology Spectrum / 巻号・発行年等：10(4): e0144922, 2022 /
著者版フラグ	none
報告番号	32661甲第1056号
学位記番号	甲第728号
学位授与年月日	2023.03.14
学位授与機関	東邦大学
メタデータのURL	<a href="https://mylibrary.toho.u.ac.jp/webopac/TD22489648">https://mylibrary.toho.u.ac.jp/webopac/TD22489648</a>

# 博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

有吉 司より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号甲第 728 号

学位申請者 : あり よし つかさ  
有 吉 司

学位論文 : Molecular characterization of *bla*<sub>NDM</sub>-carrying IncX3 plasmids: *bla*<sub>NDM-16b</sub> likely emerged from a mutation of *bla*<sub>NDM-5</sub> on IncX3 plasmid

(*bla*<sub>NDM</sub> 搭載 IncX3 プラスミドの分子生物学的解析: *bla*<sub>NDM-16b</sub> が IncX3 プラスミド上の *bla*<sub>NDM-5</sub> の変異により出現した可能性について)

著 者 : Tsukasa Ariyoshi, Kotaro Aoki, Hiroaki Kubota, Kenji Sadamasu, Yoshikazu Ishii, Kazuhiro Tateda

公表誌 : Microbiology Spectrum 10(4): e0144922, 2022

論文内容の要旨 :

背景・目的

カルバペネム耐性腸内細菌目細菌(CRE)感染症は、グラム陰性菌による感染症治療の抗菌薬の一種であるカルバペネム系薬および広域 β-ラクタム系薬に耐性を有する腸内細菌目細菌による感染症を指す。CRE は、カルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌(CPE)と非 CPE に分類される。CPE による感染症は、医療機関で急速に拡大し高い死亡率を示すことから、臨床および公衆衛生上、非常に重要である。主要な CPE の 1 つであるニューデリーメタロ β ラクタマーゼ (NDM) 産生 CPE は、アジア圏を中心に世界的に急速に拡大している。特に、*bla*<sub>NDM</sub> 搭載 IncX3 プラスミド保有腸内細菌目細菌は、数多く報告されており、搭載されている *bla*<sub>NDM</sub> バリエントは、*bla*<sub>NDM-1</sub>, -4, -5, -7, -17, -19, -20, -21, -33 など多岐にわたっている。そのため、IncX3 プラスミドは、*bla*<sub>NDM</sub> の拡散を媒介していると考えられている。本研究で、*bla*<sub>NDM-16b</sub> 搭載 IncX3 プラスミドを初めて検出したため、当該プラスミドの分子生物学的解析と出現経緯の推定のため、各種解析を実施した。

対象・方法

供試菌株は、2018 年に東京都健康安全研究センターに搬入された *bla*<sub>NDM-16b</sub> 保有大腸菌 1 株(TA8571)である。TA8571 に対し、

全ゲノム解析、接合伝達実験、薬剤感受性試験を実施した。全ゲノム解析で獲得した *bla*<sub>AM-16b</sub> 搭載 IncX3 プラスミド (pTMTA8571-1) の塩基配列と、既報の *bla*<sub>AM</sub> 搭載 IncX3 プラスミド 141 本の塩基配列との共有遺伝子の比較解析を行った。

#### 結果・考察

全ゲノム解析の結果、TA8571 は sequence type746 の大腸菌であり、4 本のプラスミドを保有していた。また、13 個の獲得性薬剤耐性遺伝子とキノロン耐性決定領域内に 4 つの変異が検出されたが、プラスミドに搭載されていた獲得性薬剤耐性遺伝子は、*bla*<sub>AM-16b</sub> のみであった。保有していたプラスミドの 1 本である pTMTA8571-1 は、46,161bp であり、供与菌 (TA8571) 1 コロニー当たり約  $2.0 \times 10^{-5}$  の割合で受容菌に接合伝達され、接合伝達体はアズトレオナムを除く  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬に対する高度耐性を惹起した。pTMTA8571-1 に搭載されていた *bla*<sub>AM-16b</sub> は、水平伝達に関わる遺伝子である IS26、*trpF*、IS*Aba125* などで構成された Tn*I25* 関連領域にコードされており、この構造は既報の *bla*<sub>AM</sub> 搭載 IncX3 プラスミドと類似していた。そのため、141 本の *bla*<sub>AM</sub> 搭載 IncX3 プラスミドの塩基配列を GenBank や先行論文から引用し、pTMTA8571-1 を加え比較解析を行った。その結果、これらのプラスミドは 34 の共有遺伝子を保有しており、共有遺伝子の塩基配列のマルチアライメントの長さは、22,846bp であった (各プラスミド塩基配列の平均長は約 46,923bp)。続いて、得られたマルチアライメントを基に系統解析を行った結果、共有遺伝子内の塩基置換数は平均 1.08 と非常に少なかったが、プラスミドに搭載されている *bla*<sub>AM</sub> バリエント毎に系統樹上でグループを形成した。また、描画した系統樹の形は、*bla*<sub>AM-5</sub> に対する *bla*<sub>AM-1</sub>、-4、-5、-7、-16b、-17、-19、-20、-21、-33 への塩基置換を示したフローチャートの形と類似していた。加えて、共有遺伝子塩基配列から *bla*<sub>AM</sub> の塩基配列を除き同様の系統解析を行った結果、共有遺伝子内の塩基置換数は減少し、系統樹上でも *bla*<sub>AM</sub> バリエント毎にグループを形成しなくなった。以上のことから、本研究で解析した 142 本の *bla*<sub>AM</sub> 搭載 IncX3 プラスミドの共有遺伝子は、搭載されている *bla*<sub>AM</sub> のバリエントに関係なくほとんど変異していないが、*bla*<sub>AM</sub> には点変異が生じている可能性が示唆された。そのような背景から、アジアを中心に広く拡散している *bla*<sub>AM-5</sub> 搭載 IncX3 プラスミドの *bla*<sub>AM-5</sub> 内の 698 番目のシトシンがチミンに変異し *bla*<sub>AM-16b</sub> は出現したものと考えられた。

解析対象の *bla*<sub>AM</sub> 搭載 IncX3 プラスミドは、アジアを中心に南アメリカを除く世界中で報告されており、プラスミドを保有する菌種は大腸菌や *Klebsiella pneumoniae* をはじめとする様々な腸内細菌目細菌であった。また、これらの菌株は、人からだけでなく動物や環境からも分離されている。そのため、今後世界中のあらゆる宿主で、様々なバリエントの *bla*<sub>AM</sub> 搭載 IncX3 プラスミドが検出される可能性が示唆された。

#### 結論

本研究は、我々の知る限り、*bla*<sub>AM-16b</sub> 搭載 IncX3 プラスミドの分子生物学的特徴を報告した最初の研究である。世界中で広く拡散している *bla*<sub>AM</sub> 搭載 IncX3 プラスミドは、非常に類似した共有遺伝子を持っており、*bla*<sub>AM-16b</sub> 搭載 IncX3 プラスミドはアジアを中心に広く拡散している *bla*<sub>AM-5</sub> 搭載 IncX3 プラスミドの変異により出現した可能性が示唆された。*bla*<sub>AM</sub> 搭載 IncX3 プラスミドは、*bla*<sub>AM-16b</sub> のような *bla*<sub>AM</sub> の稀な変異体や新規変異体の出現の温床となる可能性があり、このプラスミドに対し、より一層の注意が必要である。

## 1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号甲第 728 号	氏 名	有 吉 司
学位審査担当者	主 査	南 木 敏 宏
	副 査	内 藤 篤 彦
	副 査	近 藤 元 就
	副 査	中 野 裕 康
	副 査	佐 藤 二 美
<p>学位論文の審査結果の要旨：</p> <p>カルバペネム系薬および広域 β-ラクタム系薬に耐性を有する腸内細菌目細菌による感染症は、カルバペネム耐性腸内細菌目細菌感染症と呼ばれ、その中でカルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌による感染症は、医療機関で急速に拡大し高い死亡率を示すことから、臨床および公衆衛生上、非常に重要である。特にニューデリーメタロβラクタマーゼ (NDM) 産生菌がアジア圏を中心に世界的に急速に拡大しているが、その遺伝子 <i>bla<sub>NDM</sub></i> 搭載 IncX3 プラスミド保有腸内細菌目細菌は、数多く報告されており、搭載されている <i>bla<sub>NDM</sub></i> バリエントも多岐にわたる。申請者らは、2018 年に東京都健康安全研究センターに搬入された <i>bla<sub>NDM-16b</sub></i> 保有大腸菌 (TA8571) の全ゲノム解析、接合伝達実験、薬剤感受性試験を実施し、<i>bla<sub>NDM-16b</sub></i> 搭載 IncX3 プラスミドを検出し、その分子生物学的解析と出現経緯の推定を行った。全ゲノム解析の結果、TA8571 は大腸菌であり、4 本のプラスミドを保有していた。その中の 1 つ (pTMTA8571-1) が <i>bla<sub>NDM-16b</sub></i> 搭載 IncX3 プラスミドであった。pTMTA8571-1 は、接合伝達され、接合伝達体はアズトレオナムを除く β-ラクタム系抗菌薬に対する高度耐性を惹起した。pTMTA8571-1 に搭載されていた <i>bla<sub>NDM-16b</sub></i> は、その構造は既報の <i>bla<sub>NDM</sub></i> 搭載 IncX3 プラスミドと類似しており、141 本の <i>bla<sub>NDM</sub></i> 搭載 IncX3 プラスミドの塩基配列を GenBank や先行論文から引用し、pTMTA8571-1 を加え比較解析を行った。その結果、<i>bla<sub>NDM</sub></i> 搭載 IncX3 プラスミドの共有遺伝子は、搭載されている <i>bla<sub>NDM</sub></i> のバリエントに関係なくほとんど変異していないが、<i>bla<sub>NDM</sub></i> には点変異が生じている可能性が示唆された。アジアを中心に広く拡散している <i>bla<sub>NDM-5</sub></i> 搭載 IncX3 プラスミドの <i>bla<sub>NDM-5</sub></i> 内の 698 番目のシトシンがチミンに変異し <i>bla<sub>NDM-16b</sub></i> は出現したものと考えられた。解析対象の <i>bla<sub>NDM</sub></i> 搭載 IncX3 プラスミドは、アジアを中心に南アメリカを除く世界中で報告されており、プラスミドを保有する菌種は大腸菌や <i>Klebsiella pneumoniae</i> をはじめとする様々な腸内細菌目細菌であった。また、これらの菌株は、人からだけでなく動物や環境からも分離されている。そのため、今後世界中のあらゆる宿主で、様々なバリエントの <i>bla<sub>NDM</sub></i> 搭載 IncX3 プラスミドが検出される可能性が示唆された。本研究は、<i>bla<sub>NDM-16b</sub></i> 搭載 IncX3 プラスミドの分子的特徴を解析した報告である。<i>bla<sub>NDM</sub></i> 搭載 IncX3 プラスミドは、<i>bla<sub>NDM-16b</sub></i> のような稀な変異体や新規変異体の出現の温床となる可能性があり、このプラスミドに対し、より一層の注意が必要であることが本研究により示唆された。</p> <p>2022 年 10 月 25 日に審査委員全員出席のもと学位審査会が開かれ、申請者からの本研究のプレゼンテーションの後に質疑応答がなされた。審査委員より、1 塩基置換の特徴、バリエント発生の子防法、各バリエントの特徴、世界中への拡がりの変異の関連等、沢山の質疑がされたが、申請者はその全てに的確に回答した。</p> <p>本研究は、<i>bla<sub>NDM-16b</sub></i> 搭載 IncX3 プラスミドの分子的特徴を見出し、<i>bla<sub>NDM</sub></i> 搭載 IncX3 プラスミドの重要性、バリエントの発生経緯も推測し得た研究であり、審査委員が全員一致して学位授与に値すると判断した。</p>		