

## 最終審査の結果の要旨

2015年入学	研究分野 分子生物学	氏名 金坂 伊須萌
審査委員	(主査) 理学研究科教授 藤崎 真吾 (副査) 理学研究科教授 永田 喜三郎 (副査) 理学研究科教授 岸本 利彦 (副査) 看護学研究科教授 小林 寅喆	
成績 合格		
<p>(最終試験結果の要旨)</p> <p>審査委員4名は、論文提出者に対して2019(平成31)年2月13日、博士学位論文の内容およびその関連項目につき口頭試問を行った結果、全員一致して合格と判定した。</p>		

論文審査の要旨及び審査結果の要旨

2015年入学	研究分野 分子生物学	氏名 金坂 伊須萌
審査委員	(主査) 理学研究科教授 藤崎 真吾 (副査) 理学研究科教授 永田 喜三郎 (副査) 理学研究科教授 岸本 利彦 (副査) 看護学研究科教授 小林 寅喆	
(論文題目) Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> の daptomycin に対する感受性変化に関する細菌学的要因の解析		
<p>(論文審査の要旨及び審査結果の要旨)</p> <p>Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) は、医療関連感染の主要な原因菌であり、多剤耐性菌のなかで院内における分離頻度が最も高い。daptomycin (DAP) は、現在国内で使用されている抗 MRSA 薬のなかで最新のものであり、比較的耐性菌の出現頻度が低いとされているが、すでに DAP に対する感受性が低下した MRSA の出現が報告されている。本論文は、東邦大学医療センター佐倉病院において分離された DAP-susceptible (DAP-S) MRSA、DAP 投与後に分離された DAP-non susceptible (DAP-NS) MRSA、および DAP-NS MRSA より <i>in vitro</i> で得られた感受性復帰変異株を解析し DAP 感受性の変化に関わる機構の解明を試みた結果をまとめたものである。</p> <p>佐倉病院において MRSA 感染症の治療のために DAP が用いられた 27 例中 4 例で DAP-NS MRSA が出現した。この 4 症例において分離された DAP-NS MRSA (A2, B2, C4, D2) を DAP 非含有寒天培地で毎日継代培養し 20 日後に得られた株を <i>in vitro</i> 感受性復帰変異株とした。これらの株と DAP 投与前または投与直後に分離されていた DAP-S MRSA (A1, B1, C1, D1) を対象として解析を行った。それぞれの株における DAP およびバンコマイシンの minimum inhibitory concentration (MIC) を微量液体希釈法により測定した。それぞれの系統の株が最初に分離された株に由来することをパルスフィールドゲル電気泳動法により確認した。その後、各株について <i>mprF</i> 遺伝子の塩基配列決定、透過型電子顕微鏡による細胞壁厚さの測定、DAP 濃度を段階的に変えた寒天培地を用いた population analysis を行った。また、DAP 含有培地に DAP-S 株および <i>in vitro</i> 感受性復帰変異株を塗布して耐性化コロニーを選択し、耐性化菌を順次さらに DAP 濃度を上げた寒天培地に塗布して各段階のコロニーを計数することにより、DAP 耐性化の頻度を測定した。最後に共同研究者による全ゲノム解析の結果を援用しながら DAP 耐性化と DAP 再感受性化の機構を考察した。</p>		

いずれの症例においても院内で最初に分離された株における DAP の MIC は 0.38  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以下であるのに対し、DAP 投与後出現した DAP-NS 株における DAP の MIC は全て 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であった。これらの株から *in vitro* で得られた全ての感受性復帰株における DAP の MIC は 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であった。4 株全てにおいて DAP 耐性化に伴いバンコマイシンの MIC がわずかに上がり、3 株 (B2, C4, D2) において DAP 再感受性化に伴いバンコマイシンの MIC がわずかに下がった。DAP-NS 株 4 株中 3 株 (A2, B2, D2) は、親株の DAP-S MRSA より細胞壁が有意 ( $p < 0.01$ ) に厚かった。これらの株由来の *in vitro* 感受性復帰変異株の細胞壁の厚さは元の株の細胞壁の厚さとほぼ同様の値を示した。残る 1 株 (C4) は細胞壁の厚さの変化が小さく有意差が認められなかったが増減の傾向は他の 3 株と同じであった。*in vitro* 感受性復帰株は、1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  または 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の DAP を含む培地での population analysis において元の DAP-S 株と DAP-NS 株の中間的な値を示した。*in vitro* 感受性復帰変異株全てが DAP 耐性化実験において元の DAP-S 株と比較して高頻度で耐性化した。DAP-NS 株 4 株は、いずれも *mprF* 遺伝子中に元の DAP-S 株には見られない変異を有していた。3 株においてアミノ酸置換 (A2:T345I, B2:L776S, D2:L826F) の原因となる塩基置換が、1 株においてアミノ酸欠失 (459-466del) の原因となる塩基欠失が認められた。*in vitro* 感受性復帰変異株 4 株全てにおいて DAP-NS 株にあるこれらの変異が残存していた。感受性復帰変異株においては *mprF* 遺伝子以外の部分に DAP-NS 株には見られない 1 個から 5 個の変異が認められた。

DAP 耐性化に伴い細胞壁が肥厚した株の再感受性化の過程において細胞壁の薄化がその原因となっている可能性が示唆された。しかし細胞壁の変化があまり認められない株もあり細胞壁の厚さのみで DAP 感受性の変化を説明することはできない。また、*mprF* 変異が細胞壁の肥厚化と DAP 耐性化を引き起こしていることは否定できないが、*mprF* 変異を有したまま細胞壁の薄化と DAP 感受性化が起きることが明らかとなった。*in vitro* 感受性復帰変異株は、DAP の再暴露により元の DAP-S 株よりも容易に DAP 耐性化した。したがって臨床において DAP 投与中断により DAP-NS MRSA が再感受性化した場合でも、本事象と同様に耐性菌が再出現する可能性を念頭に、DAP 投与においては薬剤感受性測定によるモニタリングを実施し慎重に実行する必要がある。

以上のように本論文提出者は、臨床における MRSA の DAP 耐性化と感受性化の過程で起きる現象を多角的に明らかにして、その機構の解明に近づいた。感受性化した株が容易に再耐性化することを定量的に示してモニタリングの必要性を明らかにしたことは実用上の意義がある。これらの事実を評価し審査委員は本論文提出者には博士の学位を授与される十分な資格があると一致して認めた。