

東邦大学学術リポジトリ

Toho University Academic Repository

タイトル	Full length whole genome sequencing analysis of emerged meropenem resistant mutants during long term in vitro exposure to meropenem for borderline meropenemsusceptible carbapenemase producing and noncarbapenemase producing Enterobacterales
別タイトル	Meropenem のin vitro 長期投与で得られたmeropenem 感受性のボーダーラインであるカルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌と非カルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌由来のmeropenem 耐性株に対する全ゲノム解析
作成者（著者）	遠藤(堤)裕子
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. 6.
資料種別	学位論文
内容記述	主査：赤羽悟美 / タイトル：Full length whole genome sequencing analysis of emerged meropenem resistant mutants during long term in vitro exposure to meropenem for borderline meropenemsusceptible carbapenemase producing and noncarbapenemase producing Enterobacterales / 著者：Yuko Tsutsumi Endo, Kotaro Aoki, Masakaze Hamada, Haruka Nakagawa Kamura, Yoshikazu Ishii, Kazuhiro Tateda / 掲載誌：Journal of Antimicrobial Chemotherapy / 巻号・発行年等：78(1): 209-215, 2022 /
著者版フラグ	none
報告番号	32661甲第1068号
学位記番号	甲第740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	https://mylibrary.toho-u.ac.jp/webopac/TD29811006

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

遠藤（堤）裕子より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号甲第740号

学位申請者： 遠 藤 （ 堤 ） 裕 子

学位論文： Full-length whole-genome sequencing analysis of emerged meropenem-resistant mutants during long-term *in vitro* exposure to meropenem for borderline meropenem-susceptible carbapenemase-producing and non-carbapenemase-producing *Enterobacterales*

(Meropenem の *in vitro* 長期投与で得られた meropenem 感受性のボーダーラインであるカルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌と非カルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌由来の meropenem 耐性株に対する全ゲノム解析)

著者： Yuko Tsutsumi Endo, Kotaro Aoki, Masakaze Hamada, Haruka Nakagawa Kamura, Yoshikazu Ishii, Kazuhiro Tateda

公表誌： Journal of Antimicrobial Chemotherapy 78(1): 209-215, 2022

論文内容の要旨：

背景・目的：カルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌 (Carbapenemase-Producing Enterobacterales: CPE) に対する有効な治療選択肢は限られている。日本では、IMP 型 (IMP-1 及び IMP-6) メタロ-β-ラクタマーゼ産生 CPE の流行が特徴的である。透析膜モジュールを用いた非臨床薬物動態 (Pharmacokinetics: PK) 再現モデルである Hollow-Fiber Infection Model (HFIM) は、抗菌剤を2週間以上細菌に曝露できるシステムであり、長期投与した時に出現した耐性株の検討はいくつかの薬剤で検討されている。それらの研究結果では、全ゲノム解析による遺伝子の点変異が明らかにされているが、β-ラクタマーゼ遺伝子を持つ細菌に対して、HFIM を用いた耐性菌の検討及び耐性メカニズムの解析は明らかにされていない。今回、Meropenem (MEPM) の Minimum Inhibitory Concentration (MIC) が Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) の規定する感受性のボーダーラインである 1mg/L の CPE と非カルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌 (non-CPE) に対して、HFIM を用いて MEPM 1g を 1 日に 3 回

(8 時間毎) 投与した際の評価を行い、全ゲノム解析を含む分子生物学的解析を用いて耐性菌の耐性メカニズムを明らかにした。方法：使用菌株はプラスミド上に IMP-6 及び CTX-M-2 遺伝子を持つ CPE である大腸菌 TUM13867 及び染色体上に CTX-M-2 を持つ non-CPE である *Citrobacter koseri* (*C. koseri*) TUM13189 を用いた。薬剤感受性試験は CLSI ガイドライン M07 に準拠して実施し、MEPM に対する耐性菌出現頻度は 3×MIC の MEPM 含有平板上に発育した菌数を測定することで算出した。HFIM は central vessel、膜モジュール及び培地として CAMHB を用いて構築した。薬物濃度 (MEPM 1g 1日3回投与) の再現はシリンジポンプとペリスタポンプを用いて実施した。35°C で 3 時間培養を行い、投与開始時約 1×10^6 CFU/mL となるように接種菌量を設定した。投与開始後は 35°C にて 120 時間及び 124 時間まで治療を行った (n=2)。HFIM における MEPM の薬物濃度は既報データから算出した各種動態パラメータを用いてヒト血中濃度推移を再現した。薬物濃度測定法は、Bioassay 法にて測定した。サンプリングは、治療開始後 0、2、24、72 及び 120 もしくは 124 時間後に実施し、MHA 平板及び 3×MIC MEPM 含有平板へサンプルを塗抹し、発育した菌数を計測した。全ゲノム解析は DNA ライブラリー調整後、MiSeq 及び MimION にてシーケンスを行い、変異解析を行った。また、親株及びそれぞれの耐性株のプラスミド数及び IMP-6 の転写量解析を dPCR 及び qPCR にて実施した。

結果：CPE 及び non-CPE のいずれも初期殺菌が見られたものの菌数は再増殖した。また、治療中に MEPM 耐性菌が出現した。CPE 及び non-CPE の耐性株はそれぞれ 4mg/L 及び 16mg/L であった。CPE の耐性株は IMP-6 の repressor である *ardK* の truncate が生じており、CTX-M-2 を含む 27,505bp の欠失が生じていた。また、IMP-6 をコードするプラスミドのコピー数は親株と比較して 4.18 倍上昇しており、IMP-6 の転写量は 4.21 倍上昇していた。Non-CPE の耐性株は透過孔 (*ompC*) 含む 49,316bp の欠失がみられ、CTX-M-2 を含む element の三重複がみられた。

考察：CPE の耐性株の *bla_{IMP-6}* 転写量は TUM13867 のそれと比べて増加しており、IMP-6 の高発現がメロペネムの MIC 値の上昇をもたらしたことが示唆された。CPE の耐性株における *bla_{IMP-6}* の転写量の増加は、*ardK* の切断に加え、プラスミド数の増加、あるいは細胞あたりの *bla_{IMP-6}* 保有プラスミドコピー数の増加によるものと考えられた。また、transconjugant の株では、ドナー株とは逆に、維持されているプラスミド数が明らかに低いことが示された。我々は、pMTY20902_IncN 上の *bla_{IMP-6}* による高い IMP-6 MBL の発現が、宿主株にとって毒となる可能性が考えられた。菌体内に蓄積された MBL は外膜小胞に封じ込められ、菌体外に放出されるが、接合伝達実験でレシピエントとして用いた実験室株では親株よりも解毒能が低い可能性がある。非 CPE 由来の MEPM 耐性株の MEPM 耐性機構は、三重化した *bla_{CTX-M-2}* による CTX-M-2 大量発現と染色体上の *ompC* 欠失による *ompC* ファミリーポリンの機能喪失によるものと考えられた。また、*C. koseri* では染色体上の AmpC が高発現していることが MEPM 耐性に寄与している可能性がある。グラム陰性菌では、MEPM や imipenem の負荷により、ゲノムの大きな変化や染色体の欠失を持つ耐性変異体が発見されることが報告されている。我々の検討結果からも、抗菌薬負荷に応答してダイナミックなゲノム変化を起こした耐性株が選択され、環境に適応していったと考えられる。

結論：MEPM 感性菌であってもその MIC 値がボーダーラインの菌株であれば、MEPM 1g 1日3回で治療した場合にゲノム変異を伴った耐性株を選択する可能性があることが示唆された。

1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号甲第 740 号	氏 名	遠 藤 (堤) 裕 子
学位審査担当者	主 査	赤 羽 悟 美
	副 査	杉 山 篤
	副 査	南 木 敏 宏
	副 査	近 藤 元 就
	副 査	渡 邊 学

学位論文の審査結果の要旨 :

本邦では IMP 型メタロ-β-ラクタマーゼ産生 CPE (カルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌) の流行が問題となっているが、CPE に対する有効な治療選択肢は限られている。微生物・感染症学講座で開発した Hollow-Fiber Infection Model (HFIM) は透析膜モジュールを用いた非臨床薬物動態 (PK) 再現モデルである。申請者は、meropenem (MEPM) の MIC が Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) の感性ボーダーラインである 1mg/L の菌株における MEPM 耐性化の可能性と機序を明らかにする目的で、CPE としてプラスミド上に bla_{IMP-6} 及び $bla_{CTX-M-2}$ を保有する *Escherichia coli* TUM13867 および non-CPE (カルバペネマーゼ非産生腸内細菌目細菌) として染色体上に $bla_{CTX-M-2}$ を保有する *Citrobacter koseri* TUM13189 について、HFIM を用いて MEPM 投与による耐性菌の出現を評価し、耐性メカニズムを解析した。HFIM において MEPM 1g 1 日 3 回投与時のヒト血中薬物濃度を再現し、投与開始前から開始後 120 時間 (CPE) および 124 時間 (non-CPE) までの総菌量と耐性菌量の変化と分子生物学的解析を行った。その結果、CPE と non-CPE において 24 時間後以降に MEPM 耐性菌が出現し、CPE においては bla_{IMP-6} の repressor である *ardK* の切断と bla_{IMP-6} 搭載プラスミドコピー数の増加により bla_{IMP-6} が高発現していること、non-CPE においては三重化した $bla_{CTX-M-2}$ により CTX-M-2 が大量産生され、MEPM の外膜透過路である *ompC* を含む領域が欠失していた。以上の結果より、MEPM 感性株でもその MIC 値がボーダーラインの菌株による感染症に対しては、MEPM の通常治療によりゲノム変異を伴った耐性株が出現する可能性があることを初めて明らかにした。

学位審査会は 2022 年 12 月 26 日に開催された。出席者は杉山、南木、近藤、赤羽、書面審査は渡邊であった。審査委員からは、研究対象として MEPM を選んだ理由、HFIM 評価系について、抗菌薬 MIC の評価方法について、他の耐性機序が存在する可能性、本研究結果を踏まえて CLSI の臨床ブレイクポイントについての考え、CPE 感染症に対する治療プロトコルおよび新規薬剤開発における意義等多数の質問があった。申請者は個々の質問に対して本研究の限界を踏まえて的確かつ明快に回答した。本研究は MEPM 感性菌における MEPM 暴露による耐性株出現の可能性とその機序を明らかにし、今後の抗菌薬治療法と新規治療薬の開発に向けて重要な知見をもたらすものであり、審査委員全員一致の下、学位に値する論文であると結論した。