

# 東邦大学学術リポジトリ

Toho University Academic Repository

タイトル	Molecular characterization of Neisseria gonorrhoeae isolates collected through a national surveillance programme in Japan, 2013: Evidence of the emergence of a ceftriaxone resistant strain from a ceftriaxonesusceptible lineage
別タイトル	2013年に日本の全国サーベイランスプログラムで分離された淋菌の分子疫学解析:セフトリアキソン感性系統からセフトリアキソン耐性株が出現した科学的根拠
作成者(著者)	綾見(花尾), 麻美
公開者	東邦大学
発行日	2022.03.16
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: 中島耕一 / タイトル: Molecular characterization of Neisseria gonorrhoeae isolates collected through a national surveillance programme in Japan, 2013: Evidence of the emergence of a ceftriaxone resistant strain from a ceftriaxonesusceptible lineage / 著者: Mami Hanao, Kotaro Aoki, Yoshikazu Ishii, Ken Shimuta, Makoto Ohnishi, Kazuhiro Tateda / 掲載誌: Journal of Antimicrobial Chemotherapy / 巻号・発行年等: 76(7): 1769-1775, 2021 /
著者版フラグ	none
報告番号	32661甲第1021号
学位記番号	甲第700号
学位授与年月日	2022.03.16
学位授与機関	東邦大学
DOI	10.1093/jac/dkab104
その他資源識別子	<a href="https://academic.oup.com/jac/article/76/7/1769/6261155">https://academic.oup.com/jac/article/76/7/1769/6261155</a>
メタデータのURL	<a href="https://mylibrary.toho-u.ac.jp/webopac/TD36160350">https://mylibrary.toho-u.ac.jp/webopac/TD36160350</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

綾見（花尾）麻美より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号甲第700号

学位申請者： あや 綾      み 見      はなお (花尾)      ま 麻      み 美

学位論文： Molecular characterization of *Neisseria gonorrhoeae* isolates collected through a national surveillance programme in Japan, 2013: Evidence of the emergence of a ceftriaxone-resistant strain from a ceftriaxone-susceptible lineage

(2013年に日本の全国サーベイランスプログラムで分離された淋菌の分子疫学解析：セフトリアキソン感性系統からセフトリアキソン耐性株が出現した科学的根拠)

著者： Mami Hanao, Kotaro Aoki, Yoshikazu Ishii, Ken Shimuta, Makoto Ohnishi, Kazuhiro Tateda

公表誌： Journal of Antimicrobial Chemotherapy 76(7): 1769-1775, 2021

論文内容の要旨：

背景：薬剤耐性淋菌による淋菌感染症の増加が公衆衛生上の問題となっている。淋菌治療の第一選択薬であるセフトリアキソンに耐性の淋菌の出現および増加により治療の選択肢がさらに狭まる懸念が生じている。セフトリアキソンを含む第三代セファロスポリン系薬耐性メカニズムは、その主要な標的であるペニシリン結合タンパク2 (PBP2) にモザイク状の変異が入ることによる薬剤親和性の低下である。セフトリアキソン高度耐性株 (H041) は、2009年に本邦で初めて分離され、その動向が注視された。2010年から2012年にかけて京都・大阪地域でサーベイランスが実施されたが、H041株の拡散は認められなかった。しかし、そのサーベイランスから2年後、H041とは異なる遺伝的系統のセフトリアキソン耐性株 GU140106株 (2014年) および FC428株 (2015年) が相次いで報告された。それらの菌株が保有した PBP2 をコードする遺伝子 *penA* の一部が口腔内常在ナイセリア属菌の *penA* に類似しており、遺伝子の相同組換えによりそれらの *penA* が成り立ったことが示唆された。新たなセフトリアキソン耐性株の出現を把握するためには、分離株の全ゲノム解析ならびにモザイク変異 PBP2 セフトリアキソン耐性への寄与度を解

析する必要がある。

目的：本邦で複数系統のセフトリアキソン耐性淋菌が出現した時期に行われたサーベイランスで収集された菌株の薬剤感受性、遺伝的系統、ならびにセフトリアキソン耐性メカニズムを調べる目的で本研究を行った。

方法：2013年に行われた全国薬剤サーベイランスで収集された淋菌55株を対象に、寒天平板希釈法による薬剤感受性試験およびMiSeq（イルミナ社）によるドラフトゲノム解析を行った。得られたドラフトゲノムを用いて multilocus sequence typing (MLST)、Neisseria gonorrhoeae-Multiantigen sequence typing (NG-MAST) およびコアゲノム上の single nucleotide polymorphisms (SNPs) を元に系統樹解析を行った。モザイク変異 PBP2 のセフトリアキソン耐性の寄与は PCR で増幅した全長 *penA* 遺伝子による自然形質転換体の薬剤感受性検査により行った。形質転換体に目的の遺伝子組換えが起こっていることは MinION（オックスフォード・ナノポアテクノロジー社）を用いた完全長ゲノム解析により確認した。

結果：55株中32株(58%)の株がセフィキシムに耐性で、1株(2%)がセフトリアキソンに耐性であった。55株は9つのMLST-ST型に分類された。MLST-ST1901は19株と最も多く、次いでST7363が12株、ST7359は11株であった。NG-STAR分類で最も多いモザイク *penA* 型は10.001(20株)、ついで34.001(13株)であった。系統樹解析では、55株の淋菌は大きく3つの系統群(クレードA~C)に分類された。セフトリアキソン耐性株 TUM15748 以外のセフィキシム耐性株は全て系統樹のクレードBおよびCに分類された。TUM15748はセフィキシムおよびセフトリアキソンに感性的なクレードAに属していた。TUM15748のセフトリアキソンのMICは0.5mg/LでMLST-ST7359、NG-MAST ST6771に分類され、新規のPBP2を保有していた(PBP2TUM15748、*penA*型169.001)。PBP2TUM15748はGU140106株や口腔内常在菌である *Neisseria perflava* および *Neisseria cineria* の保有するPBP2に部分的に一致していた。TUM15748の *penA* 遺伝子の全長を用いた自然形質転換実験では、MLST-ST7363に属するセフトリアキソン感性株であるNG9807株のMICは16倍以上となった。

考察：本研究では、本邦で分離されたセフトリアキソン耐性株(H041、GU140106、およびFC428)と同系統の遺伝子型の菌株は検出されなかったが、セフィキシムやセフトリアキソンに感性的な系統であるMLST-ST7359に属するセフトリアキソン耐性株を初めて解析して報告した。TUM15748の *penA* 形質転換体のセフトリアキソンのMIC値がTUM15748のそれと同等まで上昇したことから、PBP2TUM15748がセフトリアキソン耐性に重要な役割を果たしていたと考えられた。PBP2TUM15748と口腔内常在菌 *Neisseria* 属菌のPBP2とをコードする *penA* 塩基配列の部分的な一致性から、それらの遺伝子がモザイク状に組換えを起こしてPBP2TUM15748が成り立ったことが強く示唆された。

1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号甲第 700 号	氏 名	綾 見 (花尾) 麻 美
学位審査担当者	主 査	中 島 耕 一
	副 査	杉 山 篤
	副 査	村 上 義 孝
	副 査	西 脇 祐 司
	副 査	中 田 雅 彦
<p>学位論文の審査結果の要旨：</p> <p>薬剤耐性淋菌による淋菌感染症の増加が公衆衛生上の問題となっている。淋菌治療の第一選択薬であるセフトリアキソンに耐性の淋菌の出現および増加により治療の選択肢がさらに狭まる懸念が生じている。本邦でも 2009 年以降 3 株のセフトリアキソン耐性株が分離されており、新たなセフトリアキソン耐性株の出現を把握するためには、分離株の全ゲノム解析ならびにモザイク変異 PBP2 セフトリアキソン耐性への寄与度を解析する必要があると考えられている。そこで筆者らは本邦で複数系統のセフトリアキソン耐性淋菌が出現した 2013 年に行われたサーベイランスで収集された菌株 (55 株) の薬剤感受性、遺伝的系統、ならびにセフトリアキソン耐性メカニズムを調べる目的で本研究を行った。</p> <p>結果として薬剤感受性試験からは 55 株中 32 株 (58%) の株がセフィキシムに耐性で、1 株 (2%) がセフトリアキソンに耐性であったことが確認された。multilocus sequence typing (MLST)、Neisseria gonorrhoeae-Multiantigen sequence typing (NG-MAST) およびコアゲノム上の single nucleotide polymorphisms (SNPs) を元に行った系統樹解析では大きく 3 つの系統群に分類された。分類されたセフトリアキソン耐性株 (TU15748) について注目し、セフトリアキソンを含む第三世代セファロスポリン系薬耐性メカニズムの主要な標的であるペニシリン結合タンパク 2 (PBP2) を解析したところ新規の PBP2 を保有していることが明らかになった。今回確認された TU15748 が保有していた新規 PBP2 の PBP2TU15748 は口腔内常在菌である <i>Neisseria perflava</i> および <i>Neisseria cineria</i> の保有する PBP2 に部分的に一致していることが明らかになった。また TU15748 の PBP2 をコードする <i>penA</i> 遺伝子の全長を用いた自然形質転換実験ではセフトリアキソン感性株の MIC が上昇することが確認された。以上から PBP2TU15748 がセフトリアキソン耐性に重要な役割を果たし、PBP2TU15748 と口腔内常在ナイセリア属菌の PBP2 とをコードする <i>penA</i> 塩基配列の部分的な一貫性から、それらの遺伝子がモザイク状に組替えを起こして PBP2TU15748 が成り立ったことが強く示唆された。</p> <p>学位審査会は 2021 年 9 月 29 日 15 時より多目的室 4 において審査委員全員出席の下開催された。申請者より明快なプレゼンテーションがなされた後に審査委員とのディスカッションがなされた。2013 年以降の薬剤耐性淋菌の出現状況、今回使用した 55 株のサンプリングとしての妥当性 (分離地域や登録施設の偏りの有無など)、今回実施した淋菌の分子タイピング手法の原理と従来法との違い、今後の耐性菌発生予防の具体的な手段などについて議論がなされ、申請者はいずれも真摯かつ丁寧に回答していた。</p> <p>以上より審査委員全員一致にて、本研究が学位に相当する研究であることを確認して審査会を終了とした。</p>		