

# 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

眞野容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 522 号

学位申請者 : ま 眞 の 野 よう 容 こ 子

学位審査論文 : Molecular analysis of the integrons of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected by nationwide surveillance programs across Japan

(日本の全国サーベイランスプログラムで収集された臨床材料から分離されたメタロー $\beta$ -ラクタマーゼ産生緑膿菌のインテグロン構造の分子生物学的解析)

著 者 : Yoko Mano, Tomoo Saga, Yoshikazu Ishii, Ayumi Yoshizumi, Robert A. Bonomo, Keizo Yamaguchi, Kazuhiro Tateda

公 表 誌 : BMC Microbiology DOI 10.1186/s 12866-015-0378-8

論文内容の要旨 :

【背景と目的】カルバペネム系薬は、緑膿菌による感染症治療に対して有効性が高い抗菌薬である。しかし、近年臨床材料から分離される緑膿菌のカルバペネム耐性株の出現が問題となっている。カルバペネム系薬を分解するメタロー $\beta$ -ラクタマーゼ (MBL) の産生は、カルバペネム系薬を含む多くの  $\beta$  ラクタム系薬に対して耐性を示すのみならず、多剤耐性を示す割合が高いことが特徴である。blaMBL 遺伝子は、プラスミド上に存在し、複数の耐性因子をコードする遺伝子を蓄積する特異な構造のインテグロンと呼ばれる遺伝子カセット内に認められることが多い。そのような背景から、複数の耐性因子が菌種を超えて他菌株に同時に伝播することが可能となる。これまで本邦では、MBL を産生する緑膿菌に関して、MBL の種類として IMP 型の検出頻度が高いこと、また緑膿菌は Multilocus Sequence Typing (MLST) による遺伝解析で Sequence Type (ST) 235 や ST357 の分離頻度が高いことが報告されている。しかし、これらはいずれも特定の地域から報告されたものである。したがって、全国レベルのサーベイランスプログラムで収集された MBL 産生緑膿菌の分子生物学的特徴は未だ把握されていない。本研究は全国規模で収集された緑膿菌を対象として、MBL 産生緑膿菌の遺伝的背景を明らかにすることを目的に、MBL 産生株を選択しそれらの菌株のインテグロン構造を解析するとともに、MLST を実施した。

【方法】全国 47 都道府県、100 医療施設において臨床材料から分離された緑膿菌 2004 年 996 株および 2006 年 992 株、合計 1988 株が収集された。最小発育阻止濃度 (MIC) は Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI) が推奨する微量液体希釈法に準じて測定した。セフトアジジムあるいはイミペネムに耐性を示す菌株を対象として、セフトアジジム (30 $\mu$ g) とメルカプト酢酸ナトリウム (30 $\mu$ g) を用いた double-disk synergy test によりスクリーニングを実施した。表現型から MBL 産生が疑われた菌株は、保有する blaMBL のグループ型別を PCR 法で確認し、陽性の 44 株を得た。次いで、インテグロンの内部構造は、インテグロンに共通する塩基配列を利用して、PCR 法で増幅して得られた DNA 断片をもとに、Primer walking 法により解析した。緑膿菌の分子系統解析は、MLST およびパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) により解析した。

【結果】 MBL 産生緑膿菌が分離された検査材料の多くが尿路由来検体であった。MBL 産生株はセフトアジジム、イミペネム、シプロフロキサシンに耐性を示した。MBL 遺伝子の内訳は blaIMP 保有株が 43 株で、その内訳は blaIMP-1 が 31 株、blaIMP-10 が 5 株、blaIMP-7 が 3 株、blaIMP-6 が 2 株、blaIMP-11 が 1 株、blaIMP-41 が 1 株であった。1 株は blaVIM-2 を保有していた。blaMBL は、全て class 1 インテグロン構造内に存在した。MLST による系統解析から、44 株の緑膿菌は、ST235 と ST357 を含む 9 種類の ST 型に分類された。多くの ST235 株は関東地方から分離されていた。In113 に分類されるインテグロンは、高頻度で ST235/pulsotype B 株が保有していた。一方、ST357 は In994 のインテグロンを保有し、主に中部地方から分離された。

【考察】 本邦で検出される主要 MBL 遺伝子は、blaIMP-1 group であった。blaIMP 陽性緑膿菌 ST235 は、インテグロン構造内に aacA28 も保有する菌株の割合が 88.2% を占め、アルベカシンを除くアミノグリコシド耐性を示し、多剤耐性化に深く関与していると思われた。アルベカシンは日本において MRSA 感染症の治療薬として使用されている。今回の検討から、多剤耐性緑膿菌に対する治療薬として有用であることが示唆された。本研究の限界の一つは、対象菌株が古い点で、結果は現在の臨床診療への応用が期待されていない可能性があることである。しかし、今回報告したインテグロン構造の大部分が INTEGRALL データベース上に登録されていなかったことから、今回得られた知見は重要であると思われる。さらに、本研究からマイコバクテリウム属以外の菌種にも fosI が存在することが初めて明らかになった。

【まとめ】 本研究は、全国規模で収集された緑膿菌を使って MBL 産生株の分子生物学的手法を用いて疫学情報を提供した初めての報告であり、今後 MBL 産生菌のサーベイランスに対して基本的な分子疫学情報を提供した。

## 1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号甲第 522 号	氏 名	眞 野 容 子
学位審査担当者	主 査	赤 羽 悟 美
	副 査	中 野 裕 康
	副 査	中 島 耕 一
	副 査	宮 崎 修 一
	副 査	武 城 英 明

  

学位審査論文の審査結果の要旨：

多剤耐性緑膿菌 (multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: MDRP) は、感染症法でカルバペネム系薬、フルオロキノロン系薬、アミノ配糖体系薬の全てに耐性を示す緑膿菌と定義されており、主な院内感染症起因菌の一つである。メタロ-β-ラクタマーゼ (MBL) は、全ての β-ラクタム系抗菌薬の β-ラクタム環を分解する細菌酵素として薬剤耐性に関与し、多剤耐性緑膿菌の多くが産生する。MBL やアミノ配糖体修飾不活化酵素などの耐性遺伝子の多くは、プラスミド上のインテグロン構造と呼ばれる遺伝子カセット内に存在する。これらの耐性遺伝子は、主としてプラスミドにより伝達するため、医療施設内において院内感染として拡散する危険性が極めて高い。これまで日本国内の MBL 産生多剤耐性緑膿菌の型や検出頻度について、特定の地域からの報告はあったものの、全国規模の解析はなされていなかった。そこで申請者らは、本邦の MBL 産生緑膿菌の遺伝的背景を明らかにすることを目的として、全国レベルのサーベイランスプログラムにおいて 2004 年と 2006 年に収集された菌株の遺伝子型とインテグロン構造を解析した。その結果、全国の MBL 産生緑膿菌の遺伝子型およびインテグロン構造の検出動向を明らかにし、新たに 13 種類のインテグロン構造を見出し INTEGRALL データベースに登録した。また、今回分離した MBL 産生緑膿菌がアルベカシン (MRSA 感染症治療薬) に対して感受性を示したことから、多剤耐性緑膿菌に対する治療薬としての可能性を提示した。さらに、結核菌以外の菌種では初めて、MBL 産生緑膿菌のインテグロン構造内にホスホマイシン耐性遺伝子を検出した。上記の通り、本研究は、本邦の MBL 産生緑膿菌に関する重要な分子疫学情報を提供した。

学位審査において申請者は、研究の背景及び内容について、その意義とリミテーションを含めて詳細かつ明快に発表を行った。その後、審査員から、①尿路系からの検出頻度が高い理由、②ホスホマイシン耐性遺伝子が緑膿菌インテグロンに存在する理由、③インテグロン構造のシーケンス解析を行う意義など、数多くの質問があった。これらに対して申請者は、①尿道カテーテルなどの医療器具と医療従事者を介して院内に感染が広まり、患者を介して医療施設間で感染が広まった可能性が考えられる、②マイコバクテリアと緑膿菌に同時に感染した際、プラスミドが伝播しインテグロンに取り込まれた可能性が考えられる、③インテグロンのシーケンス解析を行うことによりクローンの同定やデータベース化を行い、感染対策や治療薬の開発に繋げることができるなど、的確に回答した。以上より、本研究は、本邦における今後の多剤耐性緑膿菌に対する感染防御と疫学研究の基礎的データを提供した重要な研究であり、学位を授与するに値するものであると審査員全員一致で結論した。