

学位番号甲第 504 号

学位申請者 : 青 池 望<sup>のぞみ</sup>

主 論 文 : Molecular characterization of extraintestinal *Escherichia coli* isolates in Japan: Relationship between sequence types and mutation patterns of quinolone resistance-determining regions analyzed by pyrosequencing

(日本における腸管外大腸菌臨床株の遺伝子学的解析: パイロシーケンスを用いたキノロン耐性決定領域の変異パターン解析結果とシーケンスタイプの相関関係)

著 者 : Nozomi Aoike, Tomoo Saga, Ryuji Sakata, Ayumi Yoshizumi, Soichiro Kimura, Morihiro Iwata, Sadako Yoshizawa, Yasuyuki Sugawara, Yoshikazu Ishii, Keizo Yamaguchi, Kazuhiro Tateda

公 表 誌 : Journal of Clinical Microbiology 51 (6) : 1692-1698, 2013

論文内容の要旨 :

【目的】フルオロキノロン系抗菌薬 (以下 FQ) は臨床上有用性が高いため、病原細菌の FQ 耐性化は重要である。腸内細菌科細菌の FQ 耐性機構は標的酵素の変異、薬剤透過性変化、伝達性キノロン耐性遺伝子の三種類が知られている。このうち特に標的酵素の変異が主要である。染色体上にあるキノロン標的酵素遺伝子 *gyrA*、*parC* のキノロン耐性決定領域 (以下 QRDR) と呼ばれる領域の変異の数が増すにつれて FQ 耐性度が上昇する。Pyrosequencing 法はリアルタイム塩基配列解析システムの一つで、短いリード長 (~40 塩基) であれば従来の Sanger 法に比べて迅速、簡便に塩基配列を解析できる。今回我々は、Pyrosequencing 法を用いた大腸菌の *gyrA* と *parC* の QRDR

変異の評価系を構築し、腸管外大腸菌の臨床分離株の変異を検討した。また、菌株の遺伝的系統解析に用いられる Multilocus Sequence Typing (MLST) 法を実施して sequence type (ST)を決定し、FQ 感受性との相関を検討した。

【方法】大腸菌の *gyrA* と *parC* の既知の塩基配列からプライマーを設計し、Pyrosequencing 法による解析系を構築した。この方法を用いて、2009 年に東邦大学医療センター大森病院微生物検査室で連続的に分離された腸管外大腸菌 140 菌株 (血液由来 20 菌株、尿由来 61 菌株、痰由来 59 菌株) について、GyrA の 81-87 番目、ParC の 78-84 番目のアミノ酸をコードする QRDR 塩基配列を解析した。結果は Sanger 法結果および FQ の最小発育阻止濃度 (MIC) と比較した。薬剤透過性変化の影響は、エフラックスポンプ阻害剤添加による MIC 変化で評価した。伝達性キノロン耐性遺伝子 (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6′)-Ib-cr*) は PCR 法で検出した。全 140 菌株から無作為に選択した 34 菌株について MLST 法を実施して ST を決定し、キノロン耐性化との関係を検討した。

【成績】全 140 菌株のうち FQ 耐性株は 35 菌株 (25%) であった。Pyrosequencing 法で 139 菌株の QRDR 変異が正しく解析可能であった。QRDR 変異数と薬剤感受性に相関がみられた。すなわち、変異がなかった 81 菌株は FQ であるシプロフロキサシンの MIC が 0.03 µg/ml 以下、一ヶ所変異 (22 菌株) は 0.13~2 µg/ml、二ヶ所変異 (2 菌株) は 2 µg/ml、三ヶ所・四ヶ所 (計 35 菌株) は 8 µg/ml 以上であった。エフラックス阻害薬の添加で FQ 感受性は変化しなかった。*aac(6′)-Ib-cr* は 2 株で検出された。MLST 法を実施した 34 菌株は 19 の ST に分類された。FQ 耐性 9 菌株は 4 つの ST に分類され、うち 6 菌株 (67%) が ST131 であった一方、FQ 感性株 25 菌株は 16 の ST に分類された。

【考察】本研究では Pyrosequencing 法を用いた大腸菌の QRDR 変異解析法を構築した。Pyrosequencing は時間、労力の点で Sanger 法よりも優れるため、本法は臨床微生物検査室で臨床分離菌株のキノロン耐性の遺伝的解析をより容易に実現する現実的な選択肢になりうると考える。今回の 140 株の腸管外大腸菌の検討では FQ 耐性菌は全体の 25% を占めた。これは本邦の尿由来菌株の報告よりも高く、本研究が喀痰などの尿以外の検体からの分離菌株も対象としていることが一因と推測している。シプロキサシンの大腸菌における現行の耐性ブレイクポイント (MIC 4 µg/ml 以上) は、遺伝的に QRDR の三ヶ所以上の変異保有に相当することが確認された。一方、同じ腸内細菌科でサルモネラ属菌では最近、治療失敗例の報告を受けて、同薬の耐性ブレイクポイントは MIC 0.06 µg/ml 以上に引き下げられ、大腸菌の FQ ブレイクポイントも現在再検討されている。今回、シプロフロキサシンの MIC が 0.06 µg/ml 以上の大腸菌は QRDR 変異を一ヶ所以上有することが確認された。臨床現場で FQ の MIC 測定域を広げることは現実的な困難を伴うが、本法による QRDR 変異の遺伝的評価はそれを補う役割を果たすと期待される。MLST を用いた大腸菌の遺伝的系統解析は広く実施されているが、今回の検討結果は対象を薬剤感受性や病原性で限定していない菌株のデータであるという点が貴重である。ST131 大腸菌株は世界的に観察される多剤耐性系統として知られる。我々の検討でも ST131 は FQ 耐性菌株の 67% を占めており、本系統の世界的な拡がりが見られた。

【まとめ】Pyrosequencing を用いた簡便な QRDR 変異解析システムを構築し、大腸菌臨床分離株を解析した。本法は疫学的解析に有用なツールになることが期待される。

## 1. 論文審査の要旨および担当者

学位番号甲第 504 号	氏 名	青 池 望
論文審査担当者	主 査	澁 谷 和 俊
	副 査	杉 山 篤
	副 査	宮 崎 修 一
	副 査	高 橋 啓
	副 査	瓜 田 純 久
<p>論文審査の結果の要旨 :</p> <p>平成 26 年 1 月 30 日 (木) 10:00-11:00 医学部第 2 セミナー室 (医学部 3 号館 2 階) にて、書面での事前審査者 1 名を含む 5 名の審査者により学位審査を行った。</p> <p>研究概要 :</p> <p>【目的】フルオロキノロン系抗菌薬 (以下 FQ) の腸内細菌科細菌に関する主要な耐性機構で標的酵素の変異は、染色体上にあるキノロン標的酵素遺伝子 <i>gyrA</i> および <i>parC</i> のキノロン耐性決定領域 (以下 QRDR) と呼ばれる領域の変異の数が増すにつれて FQ 耐性度が上昇することが知られている。本研究では、Pyrosequencing 法を用いた大腸菌の <i>gyrA</i> と <i>parC</i> の QRDR 変異の評価系を構築し、腸管外大腸菌の臨床分離株を用いて、新規評価系の精度検証、ならびに変異耐性菌の分離状況について検討した。【方法】大腸菌の <i>gyrA</i> と <i>parC</i> の既知の塩基配列からプライマーを設計し、Pyrosequencing 法による解析系を構築した。この方法を用いて、2009 年に東邦大学医療センター大森病院微生物検査室で連続的に分離された腸管外大腸菌 140 菌株 (血液由来 20 菌株、尿由来 61 菌株、痰由来 59 菌株) について、GyrA の 81-87 番目、ParC の 78-84 番目のアミノ酸をコードする QRDR 塩基配列を解析した。結果は Sanger 法結果および FQ の最小発育阻止濃度 (MIC) と比較した。薬剤透過性変化の影響は、エフラックスポンプ阻害剤添加による MIC 変化で評価した。伝達性キノロン耐性遺伝子 (<i>qnrA</i>, <i>qnrB</i>, <i>qnrS</i>, <i>aac(6')-Ib-cr</i>) は PCR 法で検出した。全 140 菌株から無作為に選択した 34 菌株について MLST 法を実施して ST を決定し、キノロン耐性化との関係を検討した。【成績】全 140 菌株のうち FQ 耐性株は 35 菌株 (25%) であった。Pyrosequencing 法で 139 菌株の QRDR 変異が正しく解析可能であった。QRDR 変異数と薬剤感受性に相関がみられた。すなわち、変異がなかった 81 菌株は FQ であるシプロフロキサシンの MIC が 0.03 <math>\mu\text{g/ml}</math> 以下、一ヶ所変異 (22 菌株) は 0.13~2 <math>\mu\text{g/ml}</math>、二ヶ所変異 (2 菌株) は 2 <math>\mu\text{g/ml}</math>、三ヶ所・四ヶ所 (計 35 菌株) は 8 <math>\mu\text{g/ml}</math> 以上であった。エフラックス阻害剤の添加で FQ 感受性は変化しなかった。<i>aac(6')-Ib-cr</i> は 2 株で検出された。MLST 法を実施した 34 菌株は 19 の ST に分類された。FQ 耐性 9 菌株は 4 つの ST に分類され、うち 6 菌株 (67%) が ST131 であった一方、FQ 感性株 25 菌株は 16 の ST に分類された。【考察及び結論】本研究で構築した新規評価法は、迅</p>		

速性および簡便性で従来法より優れることを確認し得た。また、QRDR 領域の検出精度が従来法と同等であることを証明し、検討に資した腸管外大腸菌における FQ 耐性菌の頻度が 25%であることを明らかにした。多剤耐性系統として知られている ST131 大腸菌株が FQ 耐性菌株の 67%を占めており、本系統の世界的な拡散に関する示唆を得た。Pyrosequencing 法を用いた新規 QRDR 変異解析システムを構築して大腸菌臨床分離株を解析し、従来法に対して迅速性および簡便性に優れると同時に精度に関する非劣勢を証明した。

**学位公開審査会の質疑応答：**

主たる質疑内容は次の通り。対象サンプルの妥当性、喀痰から分離された菌株に薬剤耐性菌株が多い理由、キノロン耐性化リスクに対する DDS (drug delivery system) や細胞外基質あるいは点変異の蓄積あるいは遺伝子水平伝播の関与、QRDR の特定の部位に変異が生じる理由、新規評価法で結果が得られなかった 1 菌株についての見解、耐性化に対する、新規評価法の創薬への応用。申請者は、これらの質疑について適切に応答し、研究の制限や今後の課題について言及した。主たる応答として、サンプルが単年内に連続的に分離された偏りのない菌株群であること、大腸菌のキノロン標的遺伝子は染色体上にあり、水平伝播しないと推定していること、感染臓器による薬剤暴露の程度の相違に起因することなどを記す。

**審議：**

新規キノロン耐性遺伝子変異解析システムを構築し、従来法に対して迅速性および簡便性に優れると同時に精度に関する非劣勢を証明した独創的な研究であり、学位授与に相当すると判断した。