

東邦大学学術リポジトリ

Toho University Academic Repository

タイトル	Genetic environment surrounding blaOXA 55 like in clinical isolates of Shewanella algae clade and enhanced expression of blaOXA 55 like in a carbapenem resistant isolate
別タイトル	臨床分離されたShewanella algae 群におけるblaOXA 55 like の遺伝的周辺構造およびカルバペネム耐性分離株における blaOXA 55 likeの遺伝的発現量増加について
作成者（著者）	大瀨, 侑季
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：中野裕康 / タイトル：Genetic environment surrounding blaOXA 55 like in clinical isolates of Shewanella algae clade and enhanced expression of blaOXA 55 like in a carbapenem resistant isolate /著者：Yuki Ohama, Kotaro Aoki, Sohei Harada, Tatsuya Nagasawa, Tomoo Sawabe, Lisa Nonaka, Kyoji Moriya, Yoshikazu Ishii, Kazuhiro Tateda /掲載誌：mSphere /巻号・発行年等：6(5): e0059321, 2021 /
著者版フラグ	none
報告番号	32661甲第1040号
学位記番号	甲第719号
学位授与年月日	2022.03.16
学位授与機関	東邦大学
DOI	10.1128/mSphere.00593 21
その他資源識別子	https://journals.asm.org/doi/10.1128/mSphere.0059321?url_ver=Z39.88-2003&rft_id=ori:rid:crossref.org&rft_dat=cr_pub%20%20pubmed
メタデータのURL	https://mylibrary.toho.u.ac.jp/webopac/TD52275772

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

大濱侑季より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号甲第719号

学位申請者 : おお はま ゆう き
大 濱 侑 季

学位論文 : Genetic environment surrounding *bla*_{OXA-55-like} in clinical isolates of *Shewanella algae* clade and enhanced expression of *bla*_{OXA-55-like} in a carbapenem-resistant isolate

(臨床分離された *Shewanella algae* 群における *bla*_{OXA-55-like} の遺伝的周辺構造およびカルバペネム耐性分離株における *bla*_{OXA-55-like} の遺伝的発現量増加について)

著者 : Yuki Ohama, Kotaro Aoki, Sohei Harada, Tatsuya Nagasawa, Tomoo Sawabe, Lisa Nonaka, Kyoji Moriya, Yoshikazu Ishii, Kazuhiro Tateda

公表誌 : mSphere 6(5): e0059321, 2021

論文内容の要旨 :

Shewanella 属菌は、非発酵グラム陰性桿菌に分類される通性嫌気性菌であり、海洋環境から分離される菌種であるが、胆汁や血液等からの臨床材料から分離され、ヒトへの感染症を起こすことが知られている。カルバペネム耐性腸内細菌目細菌が保有するカルバペネム加水分解クラスD β-ラクタマーゼ (CHDL) 遺伝子の起源として考えられている菌種であり、臨床および環境の両方に存在する *Shewanella* 属菌の遺伝的背景が注目されている。

最近のゲノム解析の研究から、*S. algae* 分離株における *bla*_{OXA-55-like} の存在が確認されたが、この種のβ-ラクタム耐性、特にカルバペネム耐性における *bla*_{OXA-55-like} の関与は不明であった。さらに、*bla*_{OXA} の遺伝的環境が *S. algae* および *Shewanella carassii*、*Shewanella chilikensis*、*Shewanella laindica* などの *S. algae* 群に含まれる種に共通しているかどうかはこれまでに報告されていない。

この研究では、*Shewanella* 属菌と同定された菌種のうち、東京大学医学部附属病院で分離された臨床分離株 8 株、東邦大学医療センター大森病院で分離された臨床分離株 1 株と臨床由来の ATCC 49138 株 1 株の計 10 株と環境分離株 13 株を供試し、

MiSeq (Illumina) および MINion (ナノポアテクノロジー) を用いて全ゲノム解析を実施した。また、公共データベース (GeneBank) に登録されている *Shewanella* 属菌および基準株 (Type Strain) の登録データを用いて ANI 解析を行い、*Shewanella* 属菌の正確な同定を試みた。臨床分離株 10 株のうち 8 株は *S. algae*、残りの 2 株は、*Shewanella chilikensis* および *Shewanella carassii* と同定された。これらの菌種は遺伝子構造が類似しているため、*S. algae* 群として分類されていると報告されている。*Shewanella* 属菌は種を正しく同定することが困難であり、質量分析装置 (MALDI-TOF MS) での同定は、登録されているスペクトルデータが不十分であることから、臨床で分離されたすべての *S. algae* 群の分離株は、*Shewanella putrefaciens* と誤同定されており、GenBank に登録されているドラフト全ゲノム配列のいくつかは、今回の同定結果とは異なる *Shewanella* 属菌の名前で登録されている菌種も存在した。

S. algae と同定された 8 株と Type Strain (JCM21037) 株の計 9 株において、Ampicillin、Ampicillin-Clavulanic acid、Piperacillin、Imipenem、Meropenem、Cefazolin、Cefotaxime、Ceftazidime、Aztreonam の計 9 薬剤において微量液体希釈法を用いた薬剤感受性試験を行った。その結果、1 株の *S. algae* からカルバペネム耐性を示す株が検出された。さらに、11 株の *S. algae* から抽出した粗酵素液を用いて β -ラクタム系抗菌薬 5 薬剤 Oxacillin、Nitrocefin、Benzylpenicillin、Meropenem、Imipenem を基質とした酵素活性を測定したところ、カルバペネムに耐性を示した 1 株は全ての薬剤において他の株と比較し、mg 当たりの酵素活性の変化が著しく高い結果となった。また、カルバペネム耐性を示した 1 株は定量リアルタイム PCR にて、転写量高値を認めた。これらの結果が *bla*_{XA-55-like} 遺伝子のアミノ酸配列の違いに基づく結果であると仮定し、*S. algae* 9 株で形質転換体を用いた 9 薬剤の薬剤感受性試験を行ったが、広域スペクトルセファロスポリンやカルバペネムの MIC 値に相違は見られなかった。

今回の研究結果では、*S. algae* が保有する *bla*_{XA-55-like} のわずかなアミノ酸配列の違いおよびその周辺構造がカルバペネムに対する感受性に直接影響を与えるという確定的な証拠は得られなかった。しかし、唯一のカルバペネム耐性分離株は、高レベルの *bla*_{XA-55-like} の遺伝子転写および β -ラクタマーゼ活性を示し、*bla*_{XA-55-like} の増加が未知のメカニズムを介してカルバペネム耐性に寄与することを示した研究結果となった。

これらの発見をより詳細に解明するためには、*S. algae* 群の臨床的重要性と抗菌薬耐性メカニズムについて研究を行い、より多くの臨床分離株を含むさらなる研究が必要であると考えられた。

1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号甲第 719 号	氏 名	大 濱 侑 季
学位審査担当者	主 査	中 野 裕 康
	副 査	南 木 敏 宏
	副 査	三 上 哲 夫
	副 査	狩 野 修
	副 査	武 城 英 明

学位論文の審査結果の要旨：

Shewanella 属菌は、非発酵グラム陰性桿菌に分類される通性嫌気性菌であり、海洋環境から分離される菌種であるが、胆汁や血液等からの臨床材料から分離され、ヒトへの感染症を起こすことが知られている。本研究では、*Shewanella* 属菌と同定された臨床分離株及び環境分離株の全 23 菌株を全ゲノム解析し、さらにデータベース (GeneBank) に登録されている *Shewanella* 属菌の配列と比較した。臨床検体から同定された分離株 10 株のうち 8 株、および環境分離株の 1 株は *S. algae* として同定されたが、他の 14 株は *Shewanella* spp. であることが明らかとなった。*S. algae* として同定された 9 株は、カルバペネム耐性に関与する *bla_{OX4-55-like}* を含む 12.5 kb の領域は高度に保存されており、さらに *S. algae* 株以外の株でも *bla_{OX4-55-like}* を保持している菌株の場合には、高度に保存されていた。

S. algae と同定された 9 株を用いて薬剤感受性試験を行ったところ、臨床分離株 TUM17834 は、*bla_{OX4-55-like}* 遺伝子の高発現が認められ、β-ラクタマーゼ活性も示しており、*bla_{OX4-55-like}* の増加とカルバペネム耐性が相関することが示された。しかしカルバペネム耐性を示した TUM17384 株由来の *bla_{OX4-55-like}* 遺伝子を大腸菌に過剰発現させてもカルバペネム耐性を示さなかったことから、TUM17384 株に存在するなんらかの他の因子もカルバペネム耐性に関与していると考えられた。

学位審査会は 2022 年 1 月 27 日 20 時から行われた。三上、武城の 2 名は書面審査にて参加した。審査委員からは、1) *S. algae* の TUM17384 株が強いカルバペネム耐性が認められたにもかかわらず、責任と考えられる遺伝子を外来性に導入した大腸菌ではなぜ、カルバペネム耐性が認められなかったのか、2) TU17384 株で *bla_{OX4-55-like}* 遺伝子が他の解析した株に比較して高発現しているメカニズムは何か、3) 臨床分離株と環境で存在する株との違いがある理由はなぜか、4) *S. algae* が分離された患者の臨床的にはどのような疾患の患者であったのかなど、様々な質問がなされた。申請者はこれらの全ての質問に対して、自身の実験と実験結果から導き出される正当な解釈に基づき的確に返答した。審査委員全員一致で学位に値する論文と認め、医学研究科委員会に報告することとして、学位審査会を終了した。