

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

青木弘太郎より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号甲第 605 号

学位申請者 : 青木弘太郎

学位審査論文 : Molecular characterization of IMP-1-producing *Enterobacter cloacae* complex isolates in Tokyo

(東京で分離された IMP-1 産生 *Enterobacter cloacae* complex の分子生物学的解析)

著者 : Kotaro Aoki, Sohei Harada, Koji Yahara, Yoshikazu Ishii, Daisuke Motooka, Shota Nakamura, Yukihiro Akeda, Tetsuya Iida, Kazunori Tomono, Satoshi Iwata, Kyoji Moriya, Kazuhiro Tateda

公表誌 : Antimicrobial Agents and Chemotherapy

論文内容の要旨 :

腸内細菌科細菌をはじめとするグラム陰性菌におけるカルバペネム系薬分解酵素 (カルバペネマーゼ) は、カルバペネム系薬耐性に寄与する主要な耐性因子である。カルバペネマーゼ産生菌を含む薬剤耐性菌および薬剤耐性遺伝子拡散状況は、分子生物学的手法の一つである Multilocus sequence typing (MLST) などにより把握されている。例えば、大腸菌の sequence type (ST) 131 あるいは肺炎桿菌の ST258 に属する菌株クローンが、それぞれ bla_{CTX-M} あるいは bla_{KPC} の拡散に重要な役割を果たしていることが明らかになった。海外で分離される *Enterobacter cloacae* complex (ECC) が産生する主要なカルバペネマーゼは、KPC 型酵素であり、本酵素はその起源を一にすると考えられている。一方、本邦の主要なカルバペネマーゼは IMP 型酵素 (メタロ-β-ラクタマーゼ: MBL) であるが、詳細な解析はこれまでになされていない。本研究では、東京都内の病床数 900 以上の 3 医療施設から分離された IMP-1 産生 ECC を対象として、次世代シーケンサー (NGS) を用いて全ゲノム解析による分子疫学的検討およびプラスミドの全ゲノム解析を実施した。

供試菌株の分離期間は、施設 A : 2007 年 1 月~2011 年 2 月、施設 B : 2010 年 5 月~9 月、および施設 C : 2008 年 7 月~2010 年 10 月であり、菌株数はそれぞれ 20 株、40 株、および 11 株の計 71 株だった。 bla_{IMP-1} (IMP-1 遺伝子) を PCR 法によりスクリーニングを実施したところ全株陽性であった。71 株の全供試菌株を対象として、NGS の MiSeq (illumina) を用いて全ゲノム配

列を解読した。ゲノム解析は全ゲノム解析データベースに登録されているゲノムデータを対象として実施した。MLSTにより、供試菌株71株は7つの異なるST型に分類された。そのうち、49株がST78に属し、菌種はAverage Nucleotide Identityにより *Enterobacter hormaechei* と同定された。*E. hormaechei* ST78 49株はコアゲノム領域の single nucleotide polymorphism に基づいた分子系統解析により3つの系統 (clade) に分けられた。Clade 1および2に属する株は複数施設から分離されていたが、clade 3に属する株は単一施設からの分離されていた。ベイズ法に基づいて進化速度を推定すると、clade 1および2は約120年前に分岐したと推定された。Clade 1に属する12株中10株およびclade 2に属する4株中1株は遺伝子構造が酷似した接合伝達性 *bla*_{IMP-1} 搭載 IncHI2 プラスミドを保有していた。IncHI2はMiSeqのみでは完全長環状プラスミド配列を決定することが出来なかったため、PacBio RS (Pacific Biosciences) を用いて解読した。完全長決定 *bla*_{IMP-1} 搭載 IncHI2 プラスミド (pMTY11043_IncHI2) は、アジア太平洋地域の他の国で検出された *bla*_{IMP-1} 搭載プラスミドと骨格構造を共有していた。Clade 3に属する33株のうち、31株は接合伝達性 *bla*_{IMP-1} 搭載 IncW プラスミドを保有していた。1株は接合伝達性 *bla*_{IMP-1} 搭載 IncN プラスミドを保有しており、もう1株はその IncW プラスミドを欠失し、インテグロン (In1426) 中に遺伝子カセットとして *bla*_{IMP-1} を搭載する IncFIB プラスミドを保有していた。

本研究で解析した都内3医療施設から分離されたMBL産生ECC全71株は*bla*_{IMP-1}を保有していたが、多様なST型の菌株が含まれていた。従って、多様な遺伝的背景のIMP-1産生ECCが、東京都内におけるIMP-1産生ECCの拡散に関与していることが示唆された。また、遺伝的距離が離れているにもかかわらず、*E. hormaechei* ST78のclade 1および2に属する全菌株は互いに酷似した*bla*_{IMP-1} 搭載 IncHI2 プラスミドを保有していたことから、このプラスミドは接合伝達によって伝播・獲得されたことが推察された。東京都内における*bla*_{IMP-1} 拡散にはIncHI2, IncW, IncN, およびIncFIBの4つのレプリコンタイプのプラスミドが関与し、また、アジア太平洋地域での*bla*_{IMP-1}の拡散にはこれと類似するプラスミド骨格のIncHI2プラスミドが関連したことが示唆された。

1. 学位審査の要旨および担当者

| | | |
|--------------|-----|-----------|
| 学位番号甲第 605 号 | 氏 名 | 青 木 弘 太 郎 |
| 学位審査担当者 | 主 査 | 赤 羽 悟 美 |
| | 副 査 | 澁 谷 和 俊 |
| | 副 査 | 中 島 耕 一 |
| | 副 査 | 瓜 田 純 久 |
| | 副 査 | 草 地 信 也 |

学位審査論文の審査結果の要旨 :

本研究の成果は、Antimicrobial Agents and Chemotherapy に 2018 年に公表された。カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌 (CPE) は、グラム陰性菌による重篤な感染症の治療薬であるカルバペネム系薬を含むほぼ全ての β ラクタム系薬に耐性を示す現在最も注視されている耐性菌の一つである。世界中に拡散したカルバペネマーゼをコードする bla_{qpc} は、それを搭載するプラスミドが特定の肺炎桿菌 クローンである Sequence type (ST) 258 に保有され、米国から拡散したことが明らかとなっている。一方、本邦において検出頻度の高いカルバペネマーゼの遺伝子型である bla_{IMP-1} がどのようにして拡散したのかについては不明であった。申請者は、本邦における bla_{IMP-1} の拡散経路を明らかにすることを目的として、東京都の 900 床以上の大規模病院で 2007 年から 2011 年に分離された bla_{IMP-1} 陽性 *Enterobacter cloacae* complex (ECC) 71 株について次世代 DNA シークエンサーを用いて全ゲノム解析を実施し、菌株間の遺伝的関連性と bla_{IMP-1} 搭載プラスミドの特徴を解析した。ECC 71 株のうち、*E. hormaechei* ST78 に属する菌株が 49 株と最も多く (表 1)、コアゲノムにおける一塩基多型 (SNPs) に基づく分子系統解析により、3 系統 (clade 1~3) が存在したことが明らかとなった (図 1)。clade 3 は単一病院で分離されていたのに対し、clade 1 および 2 は複数の病院から分離された菌株から構成されていた (表 2)。進化速度の推定により、clade 1 および 2 は約 120 年前に分岐したと考えられたが (図 S1)、一部の菌株は酷似した遺伝子構造の接合伝達性 bla_{IMP-1} 搭載 IncHI2 プラスミドを保有していた (表 3, 図 S2)。本プラスミドの塩基配列は、台湾およびオーストラリアで検出された bla_{IMP-1} 搭載 IncHI2 プラスミドのバックボーンと酷似していた (図 2)。以上の結果から、東京の中心地区において多様な遺伝的背景の bla_{IMP-1} 陽性 ECC が拡散しており、その主要なクローンは *E. hormaechei* ST78 であることが明らかとなった。東京だけでなくアジア・環太平洋地域においても、IncHI2 プラスミドは bla_{IMP-1} を拡散する重要な役割を果たしている可能性が示された。

学位審査会は平成 30 年 1 月 24 日 16 時から行われ、審査委員からは、clade 1 および 2 が系統分岐した当時の外的要因、ゲノムの組換えが系統解析に与える影響、単一施設において短期間に分離された菌株が clade 3 に集積したことの解釈、プラスミドが伝達された経路、これらの耐性菌の拡散範囲などについて質問があった。申請者は、個々の質問に対して自身のデータを基に文献的考察を交えながら本研究の限界を踏まえて的確に回答した。以上より、本研究はカルバペネム系薬耐性菌の拡散機序の解明に向けて重要な新規の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。