

氏 名	溝口 綾子
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	博甲第 9244 号
学位授与年月	令和元年5月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審 査 研 究 科	人間総合科学研究科
学位論文題目	Cefotaxime 非感性 <i>Haemophilus influenzae</i> 株の Penicillin-binding Protein 3 変異および水平伝播の解析
主 査	筑波大学教授 医学博士 川上 康
副 査	筑波大学准教授 医学博士 竹内 薫
副 査	筑波大学准教授 博士（医学） 小畠 真奈
副 査	筑波大学講師 博士（医学） 際本 拓未

論文の内容の要旨

溝口綾子氏の博士学位論文は、PBP3のアミノ酸変異G555EおよびY557Hが、*H. influenzae*の cefotaxime (CTX) のminimum inhibitory concentration (MIC) を非感性レベルに上昇させる要因であることを初めて見出し、CTX非感性株が患者間で伝播していること、および変異*ftsI*遺伝子が*H. influenzae*内で水平伝播している可能性を見出し、施設内での耐性菌の伝播予防が重要であることを示したものである。その要旨は以下のとおりである。

（目的）*Haemophilus influenzae*は、健常人の上気道に常在し、肺炎、中耳炎、副鼻腔炎、結膜炎を起こし、時に咽頭蓋炎、骨髓炎、関節炎や髄膜炎などの重症感染症の原因になる。第三世代セファロsporin系抗菌薬であるCTXは、*H. influenzae*感染症の第一選択薬の一つとされている。アメリカ臨床検査標準協会が定めた*H. influenzae*がCTXに感性であるMICの基準は2 μ g/mLだが、近年この基準を超える株が報告されている。CTXのMICが上昇する機序は、作用部位であるpenicillin-binding protein 3 (PBP3) の変異とされ、数種のPBP3のアミノ酸変異が提示されている。しかし今まで研究されてきたMIC値の上昇は、感性基準の範囲内でありMICを4 μ g/mL以上に上昇させるPBP3のアミノ酸変異の報告は、著者の検討および論文審査委員による論文検索において他にない。

著者は、2014年に日本の市中病院の慢性期病棟入院患者から、CTXのMICが16 μ g/mLに上昇した*H. influenzae* (16-11株) を分離した。本病棟では複数の患者から8 μ g/mLの株を検出しており、CTX非感性の株が広がっている可能性を著者は考えた。そのため著者は、この株のPBP3をコードしている*ftsI*遺伝子を解析し、CTXのMICが非感性のレベルにまで上昇する要因、およびCTX非感性株が院内伝播している可能性について検討を行ったものである。

（対象と方法）

① CTXのMIC高度上昇に関する解析

2014年11月～2015年7月に、16-11株を分離した病棟に入院している患者の喀痰から分離された*H. influenzae* 3株、2014年～2016年に他施設で患者の血液から分離された*H. influenzae* 6株を用いている。16-11株の*ftsI*遺伝子を増幅し、CTXのMICが0.016 μ g/mLの*H. influenzae* Rd株に

electroporation法を用いて導入している。得られた遺伝子組み換え株と臨床分離株の *ftsI* 遺伝子の塩基配列を解析し、CTXのMICが8 μ g/mL以上を示す株に特徴的な遺伝子変異を調べている。また、その遺伝子変異を持つ株をsite-directed mutagenesisで作成し、CTXのMICが上昇するかを確認している。

② 院内伝播の解析

2014年11月に上記病棟から分離された *H. influenzae* 18株、および別の月に分離されたCTXのMICが8 μ g/mLの株の遺伝子の相同性を、pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) を用いて確認している。更にそのうちの2株について、*ftsI* 遺伝子の塩基配列解析を行っている。

(結果)

著者は16-11株の *ftsI* 遺伝子をRd株に導入し、CTXのMICが8 μ g/mLと0.25 μ g/mLの株を得ている。この株と臨床分離株のPBP3のアミノ酸配列を比較し、CTXのMICが8 μ g/mL以上の株にのみ共通して、555番目のglycineがglutamic acid:G555E、557番目のtyrosineがhistidine:Y557Hの二つのアミノ酸変異があった。感性株にG555Eアミノ酸変異だけを生じさせた株は、CTXのMICが1 μ g/mLまでしか上昇せず、G555EとY557Hの2点変異を生じさせた株は、8 μ g/mLまで上昇した。また、両変異がある非感性株の555番目のglutamic acidがglycineに戻った株は、MICが1 μ g/mLに低下している。

PFGE解析では、11月に分離された18株のうち、CTX非感性の3株は同じパターンを示し、それ以外の15株は2パターンで検出されている。またCTX非感性の16-11株と20-7株は、PFGEパターンは異なっていたが、*ftsI* 遺伝子の塩基配列は全く同じであるとしている。

(考察)

著者はCTXのMICを非感性と判断される4 μ g/mL以上に上昇させるには、PBP3のG555EとY557Hの両アミノ酸変異必要であると考察している。また、CTX非感性の3株が同じPFGEパターンであり、同一株の可能性があると考えている。異なるPFGEパターンのCTX非感性の2株が、同じ *ftsI* 遺伝子配列であったことから、菌そのものの伝播だけでなく *ftsI* 遺伝子の水平伝播も起こっていた可能性があると考察している。

審査の結果の要旨

(批評) PBP3のアミノ酸変異G555EおよびY557Hが、*H. influenzae*のCTXのMICを非感性レベルに上昇させる要因であることを著者は見出した。また、CTX非感性株が患者間で伝播していること、および変異 *ftsI* 遺伝子が *H. influenzae* 内で水平伝播している可能性を見出し、施設内での耐性菌の伝播予防が重要であることを示し、*H. influenzae* 感染の病態理解に重要な知見を見出している。

平成31年3月22日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。よって、著者は博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。