

# 論 文 概 要

## ○論文題名

Cefotaxime 非感性 *Haemophilus influenzae* 株の  
Penicillin-binding Protein 3 変異および水平伝播の解析

## ○指導教員

人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻 人見 重美 教授

(所属) 筑波大学大学院人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻

(氏名) 溝口 綾子

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、骨髄炎、関節炎や髄膜炎などの重症感染症の原因になる。第三世代セファロスポリン系抗菌薬であるcefotaxime (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minimum inhibitory concentration (MIC) の基準は2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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、ほとんどが感性基準の範囲内で、MICを4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上に上昇させるPBP3のアミノ酸変異の報告は、私の知る限りない。

2014年、日本の一市中病院の慢性期病棟入院患者から、CTXのMICが16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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考えた。そのため、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調べた。

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株を用いた。16-11株の*ftsI*遺伝子を増幅し、CTXのMICが0.016  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の*H. influenzae* Rd株にelectroporation法を用いて導入した。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  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上を示す株に特徴的な遺伝子変異を調べた。また、その遺伝子変異を持つ株をsite-directed mutagenesisで作成し、CTXのMICが上昇するか確認した。

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  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の株の遺伝子の相同性を、pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) を用いて確認した。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た。

結果：

16-11株の*ftsI*遺伝子をRd株に導入し、CTXのMICが8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ と0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の株を得た。この株と臨床分離株のPBP3のアミノ酸配列を比較したところ、CTXのMIC

が 8 µg/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 µg/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 µg/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 µg/mL に低下した。

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た。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だった。

考察：

CTX の MIC を非感性と判断される 4 µg/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だと考えた。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た。更に、異なる PFGE パターンの CTX 非感性の 2 株が、同じ *ftsI* 遺伝子配列だったことから、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えた。

結論：

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、初めて見出した。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た。