

# 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

香川成人より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号甲第 771 号

学位申請者 : 香 川 成 人

学位論文 : Molecular epidemiological and antimicrobial-resistant mechanisms analysis of prolonged *Neisseria gonorrhoeae* collection between 1971 and 2005 in Japan

(日本における 1971 年から 2005 年の間に分離された淋菌に関する分子疫学のおよび薬剤耐性メカニズムの解析)

著 者 : Narito Kagawa, Kotaro Aoki, Kohji Komori, Yoshikazu Ishii, Ken Shimuta, Makoto Ohnishi, Kazuhiro Tateda

公表誌 : JAC-Antimicrobial Resistance 6(2): d1ae040, 2024  
DOI: 10.1093/jacamr/d1ae040

論文内容の要旨 :

背景・目的 : 薬剤耐性淋菌の拡散は、極めて重要な公衆衛生上の問題である。淋菌は淋病治療薬に対する耐性菌が必ず出現し、それに対応して第一選択として推奨される治療抗菌薬が切り替えられてきた歴史がある。薬剤耐性淋菌出現の歴史を分子疫学および分子生物学的に理解することは、今後の淋菌感染症の治療戦略を考える上で重要である。本研究では、本邦で 1971 年から 2005 年に分離された淋菌について genotyping および薬剤耐性遺伝子解析を行い、淋菌ポピュレーションの経年変化、現在も流行する薬剤耐性淋菌の特定系統の出現、および耐性メカニズムの変遷を明らかにすることを目的とした。

対象・方法 : 本研究では、1971 年から 2005 年にかけて東京都と神奈川県で分離された 243 株の淋菌を供試菌株とした。薬剤感受性検査は、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M07-ED11 ガイドラインに従い、寒天平板希釈法で測定した。対象薬剤はペニシリン G (PCG)、セフィキシム (CFIX)、セフトリアキソン (CTRX)、シプロフロキサシン (CPFX)、アジスロマイシン (AZM)、およびスペクチノマイシン (SPCM) の 6 薬剤とした。測定範囲は PCG、CPFX、および AZM が 0.03~64mg/L、CFIX および CTRX が 0.015~1mg/L、SPCM が 0.5~256mg/L とした。最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration : MIC) の解釈は CLSI M100-ED33 の臨床的ブレイクポイントを用いた。耐性基準のない CFIX および CPFX は >0.25mg/L、AZM は >1mg/L を

非感性と定義した。また、遺伝子型別と薬剤耐性因子解析は Illumina プラットフォームを用い、Multilocus Sequence Typing (MLST) および *Neisseria gonorrhoeae* Sequence Typing for Antimicrobial Resistance (NG-STAR) のスキームとデータベースを参照して実施した。

結果：243 株のうち、102 株 (42.0%) が PCG に対して耐性を示し、34 株 (14.0%) が CPFY に対して耐性を示した。また、1 株 (0.4%) が SPCM に対して耐性を示し、7 株 (2.9%) が CFIX に非感性を示した。CTRX および AZM に対する耐性株は確認されなかった。MLST により、243 株は 83 の異なるシーケンスタイプ (ST) に分類された。このうち 10 株以上の検出を認めた ST は、ST1901 (n=17)、ST1918 (n=13)、ST1594 (n=12)、ST1927 (n=12)、ST1963 (n=12)、ST1920 (n=11)、ST1590 (n=10)、ST6959 (n=10) であった。最も多く検出された ST1901、ST7363、および ST1596 は 2001 年以降に初めて分離された菌株だった。年代別に ST 数をみると、1971-1979 年が 42 STs、1980-1989 年が 34 STs、1990-1999 年が 22 STs、2001-2005 年が 13 STs であった。キノロン耐性決定領域 (QRDR) の解析では、アミノ酸置換が 1 か所の菌株が 27 株、2 か所の株が 22 株、3 か所の株が 6 株検出され、CPFY の MIC と比較するとアミノ酸置換が 1 か所の場合は 0.03~1 mg/L、2 か所の場合は 8~64 mg/L、3 か所の場合は  $\geq 64$  mg/L であった。今回の研究では QRDR でのアミノ酸置換は、1987 年に初めて発見され、2 か所または 3 か所の置換は 2001 年に初めて発見された。ペニシリン結合タンパク質 2 をコードする遺伝子である *penA* の解析では、243 株の *penA* は 33 の異なるアリルに分類され、うち 7 株は広域スペクトルセファロスポリン (ESC) の感受性低下に関与するモザイク様変異を有する *penA* アリル (*penA*<sup>mosaic</sup>) 10.001 (n=6) および 10.016 (n=1) であった。これらの *penA*<sup>mosaic</sup> アリルを有する株は、ST7363 または ST1596 に分類され、CFIX  $\geq 0.25$  mg/L および CTRX  $\geq 0.125$  mg/L を示していた。また、*penA*<sup>mosaic</sup> アリルを有する 7 つの株すべてに、QRDR に 2 か所または 3 か所の変異が見られた。

考察：本研究では、薬剤耐性淋菌が出現する前の年代に分離された貴重な菌株を含めた包括的な分子疫学的解析を通じて、薬剤耐性株の出現時期におけるポピュレーションの変化と系統多様性の低下を明らかにした。我々のデータは薬剤耐性が特定の ST (ST1901、ST7363、および ST1596) においてフルオロキノロン耐性および広域セファロスポリン耐性の順に段階的に獲得されたことを示していた。淋病治療薬に対する抗菌薬の切り替えによる選択圧に適応したこれらの ST が高率に分離されるようになったと考えられた。

結論：1971 年から 2005 年にかけて淋菌感染症に用いられた抗菌薬の選択圧によって耐性菌が出現し、それが段階的に繰り返されて特定系統に属する複数系統の抗菌薬に対する耐性淋菌が出現したと考えられた。

1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号甲第 771 号		氏 名	香 川 成 人			
学位審査担当者	主 査	三 上 哲 夫				
	副 査	内 藤 篤 彦				
	副 査	中 島 耕 一				
	副 査	片 桐 由 起 子				
	副 査	永 尾 光 一				
学位論文の審査結果の要旨：						
<p>本邦で分離された淋菌について genotyping および薬剤耐性遺伝子解析を行い、淋菌ポピュレーションの経年変化、薬剤耐性淋菌の特定系統の出現の有無、および耐性メカニズムの変遷について検討した。</p> <p>1971 年から 2005 年にかけて本邦で分離された 243 株の淋菌を使用した。薬剤感受性検査は、寒天平板希釈法で測定した。遺伝子型別と薬剤耐性因子の解析は Illumina プラットフォームを用い、既存のスキームにより実施した。243 株のうち、102 株 (42.0%) がペニシリン G に対して耐性を示し、これは分離時期との関連はなかった。対照的にシプロフロキサシン (CPFX) 耐性の 34 株とセフィキシム (CFIX) 非感性の 7 株は、全てが 2001 年以降の分離株であった。243 株は 83 の異なるシークエンスタイプ (ST) に分類され、このうち ST1901、ST7363、および ST1596 は 2001 年以降に初めて分離された菌株だった。ペニシリン結合タンパク質 2 をコードする遺伝子 <i>penA</i> の解析では、243 株の <i>penA</i> は 33 の異なるアリルに分類され、うち 7 株はモザイク様変異アリル <i>penA</i><sup>mosaic</sup> である 10.001 (n=6) および 10.016 (n=1) であり、ST7363 または ST1596 に分類され、CFIX に非感性、CTX 耐性を示していた。キノロン耐性決定領域 (QRDR) の解析では、アミノ酸置換が 1 か所の菌株が 27 株、2 か所の株が 22 株、3 か所の株が 6 株検出され、アミノ酸置換が複数の株では、CPFX の MIC が高い値を示した。<i>penA</i><sup>mosaic</sup> アリルを有する 7 つの株すべてに、QRDR に複数の変異が見られた。薬剤耐性株の出現時期におけるポピュレーションの変化と系統多様性の低下が明らかとなり、薬剤耐性が特定の ST においてフルオロキノロン耐性および広域セファロスポリン耐性の順に段階的に獲得されたことを示していた。使用された抗菌薬の選択圧によって耐性菌が出現し、それが繰り返されて特定系統に属する複数系統の耐性淋菌が出現したと考えられた。</p> <p>2024 年 8 月 27 日の学位審査会では申請者のプレゼンテーションの後に審査委員から、選択圧という考え方について、抗生剤が使われた時期と耐性菌の出現の関係、QRDR の 3 重変異株の由来についての考え方、などについて質問がなされ、申請者はその全てに対して適切に回答した。審査委員の全員一致により学位授与に値する研究と評価し、学位審査会を終了した。</p>						