



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Prevotella属における β -lactamaseを中心とした薬剤耐性遺伝子と薬剤感受性プロファイルに関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2023-06-26 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 横山, 颯大 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/00101276

氏名（本籍）	横山 颯大（愛知県）
学位の種類	博士（医科学）
学位授与番号	甲第 64 号
学位授与日付	令和 5 年 3 月 25 日
専攻	医療情報学専攻
学位論文題目	<i>Prevotella</i> 属における β -lactamase を中心とした薬剤耐性遺伝子と薬剤感受性プロファイルに関する研究 (Study on antimicrobial resistant genes including <i>cfxA</i> variant, and related antimicrobial susceptibility profile in <i>Prevotella</i> spp.)
学位論文審査委員	(主査) 教授 寺田 知新 (副査) 教授 上田 浩 (副査) 教授 田中 香お里

論文内容の要旨

目的： *Prevotella* 属はグラム陰性偏性嫌気性桿菌で、口腔、消化管、女性泌尿生殖器の常在細菌叢を構成する菌群の一つであり、近年では薬剤耐性菌の増加が懸念されている。さらに、*Prevotella* 属を含めた嫌気性菌では薬剤耐性遺伝子が水平伝播によって様々な菌種間で拡大している可能性がある。*Prevotella* 属において、抗菌薬耐性遺伝子の出現と拡大に関与する根本的なメカニズムを解明することは、本菌群が関与する感染症に対する効果的な治療戦略を見出すことに繋がる。また、今日、抗菌薬多剤耐性菌の蔓延が世界的な問題になっており、耐性菌の蔓延を抑制する適正使用が重要視されている。そこで本研究では *Prevotella* 属の薬剤耐性遺伝子の保有状況を調べるとともに薬剤感受性プロファイルとの関連を検討し、それらの遺伝子の薬剤耐性への寄与、また、*Prevotella* 属における主要な耐性メカニズムである β -lactamase 遺伝子 *cfxA* とその周辺構造について解析した。

対象と方法： *Prevotella* 属の臨床分離45株を対象とした。10種類の抗菌薬（ampicillin, ampicillin/sulbactam, ceftriaxone, cefotaxime, ceftazidime, cefmetazole, meropenem, minocycline, clindamycin, metronidazole）に対するMIC（最小発育阻止濃度）値を寒天平板希釈法によって決定し、 β -lactamase産生については、ニトロセフィンディスクによって確認した。また、PCR法によって、薬剤耐性遺伝子（*cfxA*、*tetQ*、*ermF*、*nim*）を検出した。*cfxA* 遺伝子については増幅した近隣領域の全長塩基配列を決定し、MEGA softwareを使用してアミノ酸配列に変換した。全長アミノ酸配列を決定した *CfxA* を対象に、UPGMA法を用いて系統樹を作成した。

結果と考察： *Prevotella* 45株のうち、35株（77.8%）が β -lactamase を産生し、その全ての株が *cfxA* 遺伝子を保有していた。その他の薬剤耐性遺伝子については、*tetQ* 遺伝子は24株（53.3%）、*ermF* 遺伝子は8株（17.8%）が保有していたが、*nim* 遺伝子は検出されなかった。*cfxA* 保有は一部 β -lactam系薬、*tetQ* 保有は minocycline、*ermF* 保有は clindamycin に対する低感受性・耐性と相関が見られた。また、33株の *cfxA* について、全長塩基配列を決定して解析した結果、3つの *cfxA* variant が確認され、*cfxA2*（45.5%）が最も検出頻度が高く、次いで *cfxA3*（42.4%）であった。3つめの variant はこれまで報告がない新規 variant *cfxA7* で、

12.1%の株で検出された。CfxA7のアミノ酸配列には既知のCfxA variantsで報告のない1箇所のアミノ酸置換 (L155F) が確認された。また、3つのcfxA variantの薬剤感受性プロファイルは異なっており、cefmetazole とmeropenemを除く β -lactam系抗菌薬のMIC分布で見ると、cfxA3保有株が高濃度域 (ampicillin; 4-128 μ g/mL, ampicillin/sulbactam; 0.25-8 μ g/mL, ceftriaxone; 4-<128 μ g/mL, cefotaxime; 1-32 μ g/mL, ceftazidime; 2-128 μ g/mL) 、cfxA2保有株は中間 (ampicillin; 1-<128 μ g/mL, ampicillin/sulbactam; 0.25-2 μ g/mL, ceftriaxone; 1-16 μ g/mL, cefotaxime; 0.5-8 μ g/mL, ceftazidime; 1-16 μ g/mL) 、cfxA7 は低濃度域 (ampicillin; 0.25-0.5 μ g/mL, ampicillin/sulbactam; 0.25-0.5 μ g/mL, ceftriaxone; 0.5 μ g/mL, cefotaxime; 0.125-0.25 μ g/mL, ceftazidime; 0.25-0.5 μ g/mL) のMIC値を示した。

結論：本研究で検出したcfxA variant別の薬剤感受性プロファイルではペニシリン系抗菌薬、セファロスポリン系抗菌薬について特徴的なプロファイルを示し、病院検査室で薬剤感受性測定が困難なPrevotella属でもこれらの耐性遺伝子 (cfxA についてはvariant) を検出することで抗菌薬の選択に有用な情報となると考えられた。また、cfxA近傍の遺伝子解析からPrevotella属においても多剤耐性で知られる近縁のBacteroides属と同様な可動性因子による薬剤耐性遺伝子の拡散の可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

Prevotella 属はグラム陰性偏性嫌気性桿菌で、口腔、消化管、女性泌尿生殖器の常在細菌叢を構成する菌群の一つであり、近年では薬剤耐性菌の増加が懸念されている。さらに、Prevotella 属を含めた嫌気性菌では薬剤耐性遺伝子が水平伝播によって様々な菌種間で拡大している可能性がある。Prevotella 属において、抗菌薬耐性遺伝子の出現と拡大に関与する根本的なメカニズムを解明することは、本菌群が関与する感染症に対する効果的な治療戦略を見出すことに繋がる。また、今日、抗菌薬多剤耐性菌の蔓延が世界的な問題になっており、耐性菌の蔓延を抑制する適正使用が重要視されている。本論文ではPrevotella 属の薬剤耐性遺伝子の保有状況を調べるとともに薬剤感受性プロファイルとの関連を検討し、それらの遺伝子の薬剤耐性への寄与、また、Prevotella 属における主要な耐性メカニズムである β -lactamase 遺伝子 cfxA とその周辺構造について解析した。Prevotella 属の臨床分離 45 株を対象とし、 β -lactamase 産生、寒天平板希釈法による 10 種類の抗菌薬に対する MIC(最小発育阻止濃度)値の決定、また、PCR 法による薬剤耐性遺伝子 (cfxA、tetQ、ermF、nim) の検出をおこなった。加えて cfxA 遺伝子陽性株については、本遺伝子の全長塩基配列を決定し、アミノ酸配列による CfxA 間の比較、系統関係の解析を行った。その結果、被験株の Prevotella 77.8%が β -lactamase を産生し、その全ての株が cfxA 遺伝子に起因することを示した。また、その他の薬剤耐性遺伝子については、テトラサイクリン耐性遺伝子 tetQ (53.3%)、マクロライド・リンコマイシン系耐性遺伝子 ermF (17.8%) の分布が確認された。他方、海外では嫌気性菌感染症治療の第一選択薬であり、近年、本邦でも嫌気性菌に適用可能となったメトロニダゾール耐性遺伝子 nim は検出されなかった。表現型としての薬剤感受性プロファイルとの関連については、cfxA 保有は一部 β -lactam 系薬 (ampicillin、ceftriaxone、cefotaxime、ceftazidime、cefmetazole) 、tetQ 保有は minocycline、ermF 保有は clindamycin に対する低感受性・耐性と相関が見られた。また、33 株の cfxA について、全長塩基配列を決定して解析した結果、3 つの cfxA バリエーションの存在を確認した。cfxA2 (45.5%) が最も多く、次いで cfxA3 (42.4%) であった。3 つめのバリエーションはこれまで報告がない新規の cfxA7 で、12.1%の株で検出された。CfxA7 のアミノ酸配列の解析から、こ

の新規バリエントは、既知の CfxA バリエントで報告のない 1 箇所のアミノ酸置換 (L155F) をもつことが明らかとなった。これら 3 つの cfxA バリエントの薬剤感受性プロファイルは異なっており、cefmetazole と meropenem を除く β -lactam 系抗菌薬の MIC 値は、cfxA3 保有株では高濃度域、cfxA2 保有株では中間、cfxA7 では低濃度域に分布していた。本研究によって、Prevotella 属では、今回検討した耐性遺伝子が関連する抗菌薬への低感受性・耐性に寄与すること、cfxA はバリエント別にペニシリン系抗菌薬、セファロスポリン系抗菌薬について特徴的なプロファイルを示すことが示され、病院検査室では薬剤感受性測定が困難な Prevotella 属でもこれらの耐性遺伝子 (cfxA については variant) を検出することで抗菌薬の選択に有用な情報となると考えられた。また、cfxA 近傍の遺伝子解析から Prevotella 属においても多剤耐性で知られる近縁の Bacteroides 属と同様な可動性因子による薬剤耐性遺伝子の拡散の可能性が示唆された。

これらの知見は、解明が進んでいない Prevotella 属の薬剤耐性機構の解明と実臨床に寄与するものであり、申請者 横山颯大 氏の論文は、学術的価値が極めて高く、審査の結果、学位論文に値するものと判定した。

最終試験結果の要旨

横山 颯大 氏の学位論文の主要部分は、審査付き学術雑誌に公表済みの一編の論文に基づくものであり、本論文が学位論文として、完成された内容である事を確認した。

また、公聴会において、学位論文の内容に関する事項、すなわち、本研究において検討した *Prevotella* 属臨床分離株の各種抗菌薬に対する薬剤感受性・耐性プロファイルおよび薬剤耐性遺伝子の分布と耐性遺伝子の抗菌薬低感受性・耐性への寄与、主要な耐性因子である β -lactamase として専ら cfxA 遺伝子が保有されていること、加えて cfxA 遺伝子及びその周辺遺伝子の解析、アミノ酸配列比較により明らかとなった新規バリエントを含むバリエントによる薬剤感受性の違い、研究成果の持つ意義などについて、諮問を行った。申請者からは十分な内容の回答を得られたので、博士 (医科学) の学位に適するものと判断し、最終試験に合格と判定した。

論文リスト

Sodai Yokoyama, Masahiro Hayashi, Takatsugu Goto, Yoshinori Muto, Kaori Tanaka, Identification of cfxA gene variants and susceptibility patterns in β -lactamase-producing *Prevotella* strains. *Anaerobe* 79 :102688 (2023) 【CS:5.6】