

| | |
|--------|---|
| 氏名（本籍） | 飯原大稔（岐阜県） |
| 学位の種類 | 博士（再生医科学） |
| 学位授与番号 | 甲第 712 号 |
| 学位授与日付 | 平成 19 年 3 月 25 日 |
| 学位授与要件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当 |
| 学位論文題目 | 眼感染症から分離されるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌のキノロン系薬剤に対する耐性遺伝子群の変異の現状とデータベース化に関する研究 |
| 審査委員 | （主査）教授 江崎 孝 行 （副査）教授 伊藤 善 規 教授 山本 哲 也 |

論文内容の要旨

分子生物学的手法による感染症の迅速診断技術は急速な進歩を遂げ、従来法である培養法や免疫学的抗原検出法等の日常検査で診断できない症例においても起因菌を同定検出できるようになった。しかしながら、治療に必要な薬剤感受性情報を分子生物学的手法で予測するまでには至っていない。増加する薬剤耐性菌の動向を把握するためにも、起因菌が持つ耐性遺伝子の塩基配列情報の解析は不可欠である。そこで我々の研究室では、薬剤耐性遺伝子の配列を迅速決定し、配列情報から耐性を推測し、治療方針を支援するデータベースを構築している。

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) を含む黄色ブドウ球菌は、細菌性の角膜炎、結膜炎、及び、涙腺炎の主要な起因菌である。また、近年、黄色ブドウ球菌におけるフルオロキノロン耐性株の分離頻度が急速に増加しており、臨床上の問題として注目されている。特に、高濃度のフルオロキノロン点眼剤の集中的な使用がこれらの問題を引き起こしていると懸念されている。しかし、眼科領域から分離された菌株について、その耐性機構を調査した報告はない。

本研究では、薬剤耐性遺伝子データベース構築の一部として、感染症治療に点眼剤のような特殊な形態の製剤を使用する眼科領域においても耐性遺伝子の発生が他の領域と同じであるか、収集した耐性遺伝子の情報に基づいた薬剤感受性予測がこれらの領域でも適用できるかどうかを調査するために、眼感染症から分離された MRSA のフルオロキノロン耐性を遺伝子レベルで解析するとともに、検出した耐性遺伝子が薬剤感受性に与えている影響を検討した。

対象と方法

本研究には、2 箇所の地理的に離れた医療施設で分離された 21 株の MRSA を使用した。これらの菌株の染色体 DNA を制限酵素 *Sma*I で切断後、パルスフィールドゲル電気泳動を実施し、その泳動パターン (PFP) に基づいて分類を行った。塩基配列解析は *gyrA*、*gyrB*、*griA*、および *griB* 遺伝子を対象とした。分離菌株より DNA を抽出した後、PCR 法により各遺伝子のフルオロキノロン耐性決定領域 (QRDR) を増幅した。増幅産物を精製後、ダイレクトシーケンス法にて塩基配列を決定した。変異の検出は、DNA DataBank に登録してある野生株の塩基配列と比較して行った。最小発育阻止濃度 (MIC) は Clinical Laboratory Standards Institute M7-A7 に準拠した微量液体希釈法にて測定した。薬剤は、レボフロキサシン (LVFX) およびガチフロキサシン (GFLX) を使用した。薬剤濃度は 0.125 µg/mL～2048 µg/mL の範囲で実施した。得られた耐性遺伝子配列の多型および感受性を、文献的に収集した情報と比較した。

結果

分離菌株は PFP に基づいて、16 のグループに分類された。これらのなかで同一の患者から重複して分離された 5 株を除いた 16 株では、9 種類の遺伝子変異型が観察され、高い遺伝子変異の所有率が確認された。10 株 (62.5%) で 4~5 箇所に変異が確認され、LVFX (256 - 526 µg/mL) および GFLX (32 - 128 µg/mL) の両剤に高度の耐性を示した。5 株 (31.3%) で 2 箇所に変異が確認され、LVFX (8 µg/mL) および GFLX (2 - 4 µg/mL) であり低度の耐性と判断された。1 株が 1 箇所に変異を所有し、唯一この株が両薬剤に感受性を示した。変異の位置は、*gyrA* ではコドン 84、85、88 番目、*griA* では 80、84 番目において高頻度に検出され、その変異のタイプおよび感受性に与える影響は、これまでの報告と一致した。また PFP 解析では、同一の PFP を示す株から異なった遺伝子変異型が検出された。一方、異なる PFP において同一の遺伝子型を示す株が検出された。

考察

本研究では、薬剤耐性遺伝子データベース構築の一部として、眼科領域から分離された MRSA のキノロン耐性遺伝子の変異の現状と感受性に及ぼす影響について調査した。その結果、耐性遺伝子のバリエーションと薬剤感受性に影響する変異が明らかになった。これらは、点眼薬という特殊な剤形を用いる眼科領域でも他領域と同様の傾向を示し、起因菌の分離部位による違いが無いことが確認された。

耐性化の原因にはオープンリーディングフレーム (ORF) の変異以外に遺伝子の転座、プロモーターの変異、欠損など多様であり、このような場合は、ORF のデータベースでは対応できない。しかし、実際は ORF の変異で耐性が予測できる例が殆どで、解析例ではこのようなケースはなかった。これらのことから、ORF のデータベース構築の有用性が確認できた。

効果的なデータベースを構築していくためには、薬剤耐性機構を明らかにすると同時に、臨床分離株から得られる耐性遺伝子および感受性情報を常に収集してデータベース化する作業を継続する必要があると考えられる。

論文審査の結果の要旨

申請者 飯原大稔は、眼科領域から分離される黄色ブドウ球菌のキノロン耐性遺伝子の変異の現状を分析し、遺伝情報による治療薬の選択基準のデータベース化の有用性を検証し、耐性配列情報提供が迅速な治療支援になることを報告した。この研究は、臨床感染症学に有用な貢献をしたと認める。

[主論文公表誌]

Emerging multiple mutations and high-level fluoroquinolone resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from ocular infections

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 56 (3), 297-303 (2006).