

氏名（本籍）	たなか えみ 田中 愛海（東京都）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	博第 334 号
学位授与の日付	令和 5 年 3 月 17 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	キノロン低感受性 <i>Haemophilus influenzae</i> に関する研究
論文審査委員	（主査）教授 中南 秀将 教授 田野中 浩一 教授 安達 禎之

論文内容の要旨

Haemophilus influenzae は、呼吸器感染症や感覚器感染症の起炎菌として知られている。特に、小児領域では *Streptococcus pneumoniae* と並び、主要な起炎菌の一つである。小児における本菌による感染症の治療には、第一選択薬としてβ-ラクタム系薬が使用されてきた。しかし、近年、β-ラクタム耐性菌が世界的に増加している。特に、日本をはじめとするアジアでは、β-ラクタム系薬に広く耐性を示すβ-lactamase non-producing ampicillin-resistant *H. influenzae* が全分離株の約半数を占めている。このような背景から、日本では小児用キノロン系薬である tosofloxacin が 2010 年に導入された。しかし、この導入以降、キノロン低感受性株が急速に増加している。*H. influenzae* のキノロン低感受性化は、標的遺伝子である DNA gyrase をコードする *gyrA* や *gyrB*, topoisomerase IV をコードする *parC* や *parE* のキノロン耐性決定領域に突然変異が生じることに起因する。キノロン低感受性株は、標的遺伝子のうち *gyrA* 単独あるいは *gyrA* および *parC* の両方に変異を有している。当教室では、キノロン低感受性株が小児用量の tosofloxacin の長時間暴露において生残することや、キノロン低感受性株による感染症患者にキノロン系薬が処方され、治療に難渋した症例を報告した。キノロン低感受性株は、通常の検査では「感受性」と判定されるため、キノロン系薬が漫然と使用されており、キノロン耐性化の進行が懸念される。これを防ぐためには、臨床現場でキノロン低感受性株を適切に検出し、有効な抗菌薬を使用することが重要である。また、キノロン低感受性株の出現機構や拡散機構を解明する必要がある。

本研究では、抗菌薬の適正使用を促進し、キノロン耐性 *H. influenzae* の出現・流行を抑止することを目的として、第 1 章では、キノロン低感受性 *H. influenzae* を臨床現場で簡便に検出できる方法を開発した。さらに、第 2 章では、*H.*

influenzae のキノロン低感受性株の出現・拡散機構を解明した。

第1章 キノロン低感受性 *Haemophilus influenzae* の簡易検出法の開発

グラム陰性菌のキノロン耐性化は段階的に進行することが知られており、まず *gyrA* に点変異が入り最小発育阻止濃度 (MIC) が上昇し、次いで *parC* にも点変異が入ることでさらに MIC が上昇する。キノロン低感受性 *H. influenzae* も、*gyrA* あるいは *gyrA* と *parC* の両方に変異を有している。キノロン系薬は、キノリン環の6位にフッ素原子が導入される前後でオールドキノロン系とニューキノロン系に大別される。ニューキノロン系薬は DNA gyrase と topoisomerase IV の両方に作用するのに対して、オールドキノロン系薬は DNA gyrase にのみ作用する。そこで、この作用点の違いを利用し、*gyrA* に変異をもつ低感受性株のみを検出する方法を開発した。検出法には、簡便で安価かつ臨床でも実施可能なディスク拡散法を用いた。2種類のオールドキノロン系薬 nalidixic acid (NA) と piperidic acid (PPA) を用いて、低感受性株 (n = 17) と感受性株 (n = 16) の阻止円を測定したところ、NA ディスクを使用した場合、全ての低感受性株で阻止円が消失した (Fig. 1A)。NA を用いた低感受性株検出法の感度と特異度は、いずれも 100%であった。さらに、PPA ディスクを使用した場合、*gyrA* 単独変異株では阻止円が認められたが、*gyrA* と *parC* の両方に変異を有する株で阻止円が消失した (Fig. 1B)。

以上の結果より、NA ディスクを用いて阻止円の消失を評価することで、キノロン低感受性株を高精度かつ簡便に検出できることが明らかとなった。さらに、PPA ディスクを用いた試験を併用することで、*parC* 変異の有無も推定できることが示された。

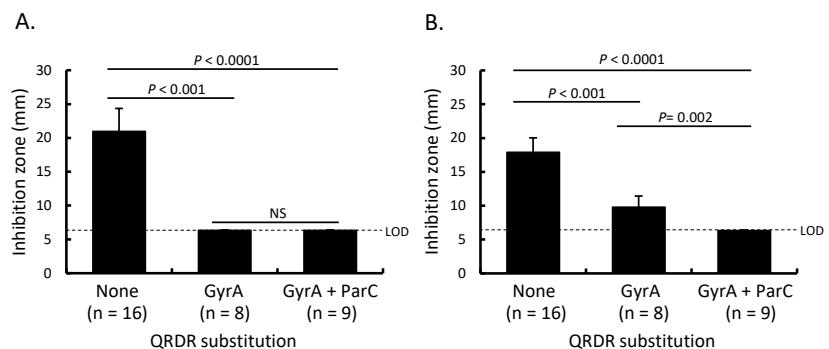


Figure 1. Association between inhibitory zone diameter and amino acid substitutions in quinolone resistance-determining regions (QRDRs).

A. nalidixic acid disc (30 µg/disc); B. piperidic acid disc (30 µg/disc); LOD, limit of detection (6.35 mm).

第2章 遺伝子水平伝播を介したキノロン低感受性株の出現機構の解析

第1節 キノロン低感受性 *Haemophilus influenzae* の水平伝播機構の解析

一般的に、細菌における自然点変異の頻度は 10^{-8} ~ 10^{-7} 程度と必ずしも高くない。そのため、近年のキノロン低感受性株の急増は、点変異以外の要因もあることが予測される。*Haemophilus* 属菌は高い自然形質転換能をもち、遺伝子の伝播によって薬剤耐性や抗原決定領域、病原因子を菌間で共有していることが分かっている。そこで、点変異以外の要因として、自然形質転換によるキノロン耐性の水平伝播が起こるのではないかという仮説を立て、キノロン低感受性 *H. influenzae* の水平伝播機構について研究した。まず、キノロン低感受性 *H. influenzae* 2018-Y40 株の培養上清を感受性株と混合し、NA 含有培地で選択した。その結果、コントロールと比較して有意に多くの NA 耐性株が得られた。ここで得られた NA 耐性株の *gyrA* は、2018-Y40 株のものと組み換わっており、キノロン標的遺伝子が水平伝播することが示された。本実験で使用した 2018-Y40 株は、複数の prophage 領域を保有している。また、培養上清中には、outer membrane vesicle, 細胞外 DNA の存在が考えられる。そこで、水平伝播に寄与する因子を検討するために、これらの要因をそれぞれ排除して実験を行った。その結果、細胞外 DNA を除去した場合にのみ、NA 耐性株が得られなかった。このことにより、細胞外 DNA の取り込みが *H. influenzae* のキノロン低感受性化に寄与することが示された。*Haemophilus* 属菌は、uptake signal sequence (USS) という短い繰り返し配列の認識を介して遺伝子を取り込む自然形質転換能を有することが知られている。*H. influenzae* のゲノムデータを検索したところ、*gyrA* の後半部に USS が存在することが明らかになった。そこで、USS を含む *gyrA* 断片と含まないものをそれぞれ PCR で作成し、キノロン感受性株と混合して NA 含有培地で選択した (Fig. 2)。その結果、USS を含む断片を用いた場合に、有意に多くの NA 耐性株が得られた (Fig. 2 A, B)。一方、*parC* 上には USS は認められなかったものの、USS と 1 塩基のみ異なる類似配列 (uptake signal-like sequence, USLS) が存在していた。そこで、*gyrA* と同様に様々な *parC* 断片を作成し、*gyrA* 変異を有する NA 耐性株と混合後、PPA 培地で選択した (Fig. 2)。その結果、USLS を含む断片を用いた場合に、有意に多くの PPA 耐性株が得られた (Fig. 2 C, D)。以上のことから、*H. influenzae* のキノロン低感受性化は、USS や USLS の認識を介した *gyrA* や *parC* の水平伝播によって生じることが明らかとなった。

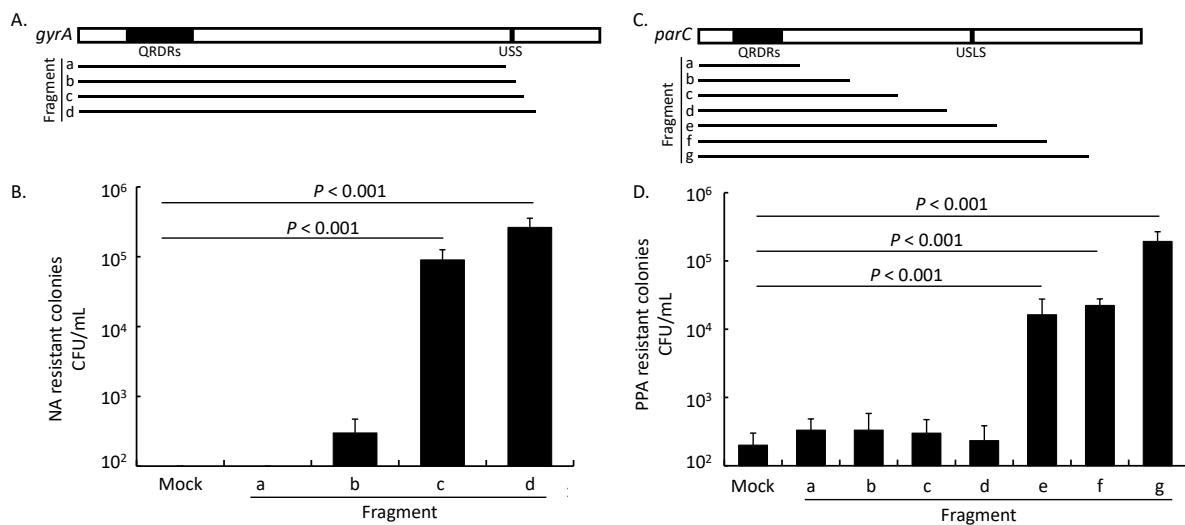


Figure 2. Role of the uptake signal sequence in horizontal transfer of *gyrA* and *parC*. (A), (C). The bold lines indicate *gyrA* and *parC* sequence, respectively. Each fragment represents the PCR product of different length that was used for transfer assay. Fragment of *gyrA*, a dose not contain USS, whereas b-d contain it. Fragment of *parC*, a-d do not contain USLS, whereas e-g contain it. USS, uptake signal sequence; USLS, uptake signal-like sequence; QRDRs, quinolone resistance-determining regions. (B), (D). Bar graph indicating CFU/mL of each resistant colonies obtained from transfer assay. NA, nalidixic acid; PPA, pipemidic acid.

第 2 節 複数遺伝子の同時水平伝播の検討

キノロンの低感受性化は段階的に進行すると考えられているが、本邦でアウトブレイクした sequence type (ST) 422 のキノロン低感受性 *H. influenzae* 株は、*gyrA* と *parC* の両方に変異を有し、*gyrA* のみに変異を有する菌株は認められていない。また、本章第 1 節において、標的遺伝子の水平伝播がキノロン低感受性化に寄与することが明らかとなった。これらのデータから、キノロン低感受性化に寄与する複数の遺伝子が同時に伝播する可能性について検証した。2018-Y40 株のゲノム DNA を抽出し、様々な感受性菌と混合し、PPA 培地でそれぞれ選択したところ、添加した DNA の濃度依存的に、*gyrA* と *parC* の両方の遺伝子が同時に組み換わった株が得られた (Fig. 3)。得られた株のゲノム解析を行ったところ、複数箇所でも組換えが認められ、特に 10 kbp 以上の大きな組換えが 3 か所で確認された。すなわち、*H. influenzae* がゲノム DNA を取り込み、同時に複数の領域を組み換え、耐性化しうることが明らかとなった。さらに、水平伝播実験に受容菌として用いた臨床分離株の中には、高頻度に遺伝子を組み換える株が存在していた (Fig. 3, 2017-22B 株)。このことから、臨床分離株の中には、高い組み換え能を有する株“潜在的耐性株”が存在する可能性が示された。

以上の結果から、キノロン低感受性 *H. influenzae* は、変異を有した標的遺伝子を細胞外から取り込むことによって出現することが明らかになった。さらに、一度に複数の遺伝子が組換わり、非段階的にキノロン系薬に低感受性化する新しいメカニズムが明らかになった。

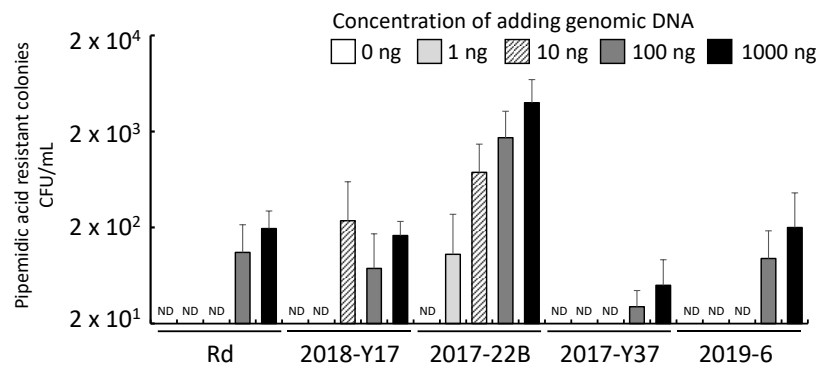


Figure 3. Horizontal gene transfer with varying concentrations of genome DNA.
The bar graph indicates CFU/mL of pipemidic acid resistant colonies obtained from transfer assay.

総括

薬剤耐性は世界的に深刻な問題となっており、各国で様々な対策が実施されている。特に、幅広い菌種に有効なキノロン系薬の不適切な使用は、常在菌などの薬剤耐性を招くことが危惧されている。本研究では、キノロン系薬に治療抵抗性を示すにも関わらず、通常の検査で「感受性」と判定されるキノロン低感受性 *H. influenzae* に着目し、第1章では、本菌を臨床現場で簡便かつ高精度に検出できる方法を開発した。第2章では、従来、水平伝播せず段階的に耐性化すると考えられていたキノロン耐性が、標的遺伝子の USS や USLS の認識を介して水平伝播すること、ならびに複数遺伝子が同時に伝播しうることを明らかにした。臨床現場においてキノロン低感受性 *H. influenzae* が増加している現状を鑑みると、今後この経路によるキノロン低感受性株の流行が危惧される。キノロン低感受性 *H. influenzae* を早期に検出する方法を開発し、新たなキノロン耐性機構を解明した本研究成果は、抗菌薬の適正使用を促し、薬剤耐性菌の出現と伝播を防ぐための新規薬剤のターゲットを提示することに大きく寄与すると考えられる。

【研究成果の掲載誌】

- (1) E. Tanaka, T. Wajima, N. Noguchi. *J Med Microbiol*, 68, 1227-1232 (2019).
- (2) E. Tanaka, T. Wajima, K. Uchiya, H. Nakaminami. *Antimicrob Agents Chemother*, 66, e0196721 (2022).
- (3) E. Tanaka, T. Wajima, H. Nakaminami, K. Uchiya. *J Antimicrob Chemother*. 77, 3270-3274 (2022).

【論文審査の結果の要旨】

Haemophilus influenzae は、呼吸器感染症や感覚器感染症の起炎菌として知られている。特に、小児領域では *Streptococcus pneumoniae* と並び、主要な起炎菌の一つである。小児における本菌による感染症の治療には、第一選択薬としてβ-ラクタム系薬が使用されてきた。しかし、近年、β-ラクタム耐性菌が世界的に増加している。このような背景から、日本では小児用キノロンである *tosufloxacin* が 2010 年に導入された。しかし、この導入以降、キノロン低感受性株が急速に増加している。*H. influenzae* のキノロン低感受性化は、標的遺伝子である DNA gyrase をコードする *gyrA* や *gyrB*, topoisomerase IV をコードする *parC* や *parE* のキノロン耐性決定領域に突然変異が生じることに起因する。キノロン低感受性株は、標的遺伝子のうち *gyrA* 単独あるいは *gyrA* および *parC* の両方に変異を有している。キノロン低感受性株は、通常の検査では「感受性」と判定されるため、キノロン系薬が漫然と使用されており、キノロン耐性化の進行が懸念される。これを防ぐためには、臨床現場でキノロン低感受性株を適切に検出し、有効な抗菌薬を使用することが重要である。また、キノロン低感受性株の出現機構や拡散機構を解明する必要がある。

本学位申請研究では、抗菌薬の適正使用を促進し、キノロン耐性 *H. influenzae* の出現・流行を抑止することを目的として、第 1 章では、キノロン低感受性 *H. influenzae* を臨床現場で簡便に検出できる方法を開発した。さらに、第 2 章では、*H. influenzae* のキノロン低感受性株の出現・拡散機構を解明した。

第 1 章では、オールドキノロン系薬を使用したキノロン低感受性 *H. influenzae* の簡易検出法を開発し、ナリジクス酸のペーパーディスクを用いて阻止円の消失を評価することで、キノロン低感受性株を高精度、簡便かつ安価に検出できることを明らかにした。さらに、ピペミド酸のペーパーディスクを用いた試験を併用することで、*parC* 変異の有無を推定できることを示した。

第 2 章では、キノロン低感受性株の出現機構について解析し、第 1 節では、*H. influenzae* がわずかな細胞外 DNA を取り込み、自身の遺伝子と組換えを起こすことで、キノロン標的遺伝子が水平伝播することを明らかにした。また、この水平伝播が Uptake Signal Sequence (USS) や Uptake Signal Like Sequence (USLS) の認識を介して起こることを示した。第 2 節では、複数のキノロン標的遺伝子が同時に水平伝播し、これまで段階的に進行するとされていたキノロン低感受性化が、非段階的に発生する新しいメカニズムを明らかにした。加えて、水平伝播で得られたキノロン低感受性株は、ゲノム全体で多くの組換えが起こっていることを示した。

本研究で開発したディスク法による簡易検出法は、キノロン低感受性 *H. influenzae* の早期検出や抗菌薬の適正使用に寄与することが期待される。また、水平伝播による新たなキノロン耐性機構の解明は、薬剤耐性菌の出現と伝播を防ぐための新規薬剤のターゲットを提示する極めて有用な情報になると考える。した

がって、本論文は、博士（薬学）の学位論文として相応しいものと判断する。