

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（学術）	氏名	Hazim Omar Abdelgalil Khalifa
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
<p>論文題目</p> <p>Molecular Pharmacological Studies on Multidrug-Resistant Bacteria: Analysis of Antimicrobial Resistance Mechanisms and Evaluation of Antimicrobial and Antivirulence Activities of Novel Plant Extracts</p> <p>（多剤耐性菌の分子薬理学的解析：抗菌剤耐性化機構の解析と新規植物抽出物の抗菌・抗病原性活性の評価）</p>			
<p>論文審査担当者</p> <p>主査 教授 島本 整</p> <p>審査委員 教授 中野 宏幸</p> <p>審査委員 教授 浅川 学</p> <p>審査委員 教授 三本木 至宏</p>			
<p>〔論文審査の要旨〕</p> <p>近年、さまざまな抗生物質に対して耐性を示す薬剤耐性菌が大きな社会問題となっている。本論文は、(1) 薬剤耐性菌の耐性化機構を遺伝子レベルで明らかにすることによって、公衆衛生上の助けとなることを目指し、(2) 薬剤耐性菌に対抗する手段の1つとして植物抽出液の抗菌活性と病原性遺伝子発現抑制活性を明らかにしたものである。</p> <p>本論文は、4章で構成されている。第1章は「序論」であり、抗生物質に関する基礎と薬剤耐性菌の耐性化機構についての現状をまとめて述べている。また、第4章「総括」では、本論文で明らかにした結果について総合的な考察を加え、将来の展望をまとめている。</p> <p>第2章では、エジプトの病院で単離された臨床分離株を中心に薬剤耐性菌の耐性化機構を遺伝子レベルで明らかにしている。</p> <p>II-1 では、臨床現場で感染症に対する最終選択薬の1つとして用いられるカルバペネムを分解する酵素（カルバペネマーゼ）の遺伝子を保有する株について、さまざまな解析を行った結果をまとめている。エジプトの病院の入院患者より単離された128株のグラム陰性菌について解析を行ったところ、驚くべきことに、その中の65株（51%）がいずれかのカルバペネマーゼ遺伝子を保有していた。それらは、<i>bla<sub>OXA-48</sub></i>が32株（49%）、<i>bla<sub>NDM-1</sub></i>が31株（48%）、<i>bla<sub>VIM</sub></i>が17株（26%）で、13株が2つの遺伝子、1株が3つの遺伝子を保有していた。それらの65株についてパルスフィールドゲル電気泳動法によって系統解析を行った結果、クローンは存在していないことが明らかになった。</p>			

II-2 では、同じエジプトの病院の臨床分離株で *bla*<sub>NDM-4</sub> 遺伝子と *bla*<sub>NDM-5</sub> 遺伝子をそれぞれ保有する肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*) が同じ患者から単離され、それら 2 株について、詳細な解析を行った。それぞれの株におけるプラスミドの解析、カルバペネマーゼ遺伝子の存在についてサザンブロットハイブリダイゼーションによる解析、MLST 方による菌株のタイピング、プラスミドの接合伝達能の試験などを行った。同一の患者から *bla*<sub>NDM-4</sub> 遺伝子と *bla*<sub>NDM-5</sub> 遺伝子をそれぞれ保有する株が同時に感染した初めての例となった。

II-3 では、エジプトの臨床分離株について、インテグロンと呼ばれる可動性遺伝因子を保有している株を探索し、128 株中 66 株 (52%) がクラス 1 インテグロンを保有しており、3 株 (2%) がクラス 2 インテグロンを保有していたことを明らかにした。これらのインテグロン保有株は、他に  $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子 (*bla*) やプラスミド性キノロン耐性遺伝子なども含んでおり、エジプトにおける薬剤耐性菌の実態を明らかにした。

II-4 では、さまざまな多剤耐性菌に対する最終選択薬として用いられるコリスチン (ポリミキシン E) の耐性遺伝子 *mcr-1* を保有する株について、詳細な解析を行ったものである。さまざまな由来の臨床分離株、動物分離株、食品分離株、計 431 株について *mcr-1* 遺伝子のスクリーニングを行ったところ、エジプトのウシの乳房炎由来の大腸菌 1 株のみから *mcr-1* 遺伝子が発見された。この株はさまざまな抗生物質に対して耐性を示す多剤耐性株であり、*mcr-1* 遺伝子以外に 2 つのクラス 1 インテグロンと *bla*<sub>TEM-1</sub> 遺伝子を保有していた。これは、エジプトにおける *mcr-1* 最初の事例となった。

第 3 章では、薬剤耐性菌対策の 1 つとして、植物抽出液の抗菌作用と病原性遺伝子発現抑制作用について解析を行った結果をまとめている。

III-1 では、3 つの植物抽出液 (ブルーベリー、ラズベリー、ストロベリー) の抗菌活性について解析を行い、いずれも 10 種のグラム陰性菌と 4 種のグラム陽性菌に何らかの効果を示すことを明らかにした。特に、コレラ菌 (*Vibrio cholerae* O1/O139) に対する効果が強かったことから、コレラ菌の病原性に関連のある遺伝子 (コレラ毒素遺伝子、腸管定着因子遺伝子) に対する発現抑制効果を調べた。その結果、ラズベリーがコレラ毒素遺伝子の発現を抑制し、3 つすべての植物抽出液が腸管定着因子遺伝子の発現を有意に抑制することを明らかにした。

III-2 では、マキベリーとザクロの抽出液の多剤耐性菌に対する効果を調べた。いずれの抽出液も高濃度でメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA), *Acinetobacter baumannii*, 緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) に対して抗菌作用を示すことを明らかにした。また、透過型電子顕微鏡観察も行い、植物抽出液成分が上記耐性菌の膜に作用していることを明らかにした。

本研究は、臨床分離の薬剤耐性菌に関して多くの新しい知見を与えるとともに薬剤耐性菌に対する対策法の 1 つとして植物抽出液を利用する方法を提案する大変興味深いものである。審査の結果、本論文の著者は博士 (学術) の学位を授与される十分な資格があるものと認められる。