

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	イランディ プトラ プラトモ IrandiPutraPratomo
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 Correlation Analysis between Antibiotic Resistance Gene Profile and Susceptibility to Gentamicin, Clindamycin, and Minocycline in Clinically Isolated Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (メチシリン耐性黄色ブドウ球菌の臨床分離株における抗菌薬耐性遺伝子分布とゲンタマイシン、クリンダマイシン、ミノサイクリン感受性の関連についての解析)			
論文審査担当者			
主査教授	坂口 剛正	印	
審査委員	教授 志馬 伸朗		
審査委員	准教授 横崎 典哉		
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>メチシリン耐性ブドウ球菌（MRSA）関連死亡率の上昇と多剤耐性株の増加が明らかになってきており、迅速な抗菌感受性サーベイランスは、MRSA 感染コントロールにおいて必須である。次世代シーケンシング（NGS）技術は、MRSA 抗菌感受性サーベイランスを目的とした場合、臨床的 MRSA 感染のアウトブレイクにおけるゲノムプロファイリングを可能にし、従来の方法と比較して簡便な方法となりうる。そこで、本研究は、NGS 技術を用いた臨床 MRSA 株のゲンタマイシン（GEN）、クリンダマイシン（CLI）、ミノサイクリン(MIN)感受性におけるゲノム情報と表現型（最小阻止濃度：MIC）との相関を後方視的に検討した。</p> <p>本研究では、2009年10月～12月（36株）および2013年1月～2014年3月（56株）の2つの期間で、広島大学病院の入院患者からMRSA分離株92株を対象とした。GEN、CLI、およびMINのMICデータは、CLSI M100-S19ガイドラインの改訂基準に従って分類した。GEN耐性株は、GEN MICが8 mg/L以上を示す株、CLI耐性株は、CLI MICレベルが2 mg/L以上の株、MIN耐性株は、8 mg/L MIN MICレベル以上の株として定義した。菌株のゲノムDNAを抽出し、イルミナ社のMiSeqシーケンサーを用いて塩基配列を決定した。各株の塩基配列をSPAdesを用いて組み立て、その新規の全ゲノムアセンブリを得た。ResFinderのオンライン遺伝子マッピングツールを使用したインシリコ解析は、>90%の相同性および>60%の塩基配列長の閾値で行い、アセンブリのそれぞれからゲノム上の抗菌感受性プロファイルを得た。この方法では、取得したマクロライド・リンコサミド・ストレプトグラミンB感受性に関連する2つの遺伝子 <i>aac</i> (6') <i>aph</i> (2'') および <i>spc</i>、アミノグリコシド感受性に関連する遺伝子 <i>ermA</i>、テトラサイクリン感受性に関連する遺伝子である <i>tetM</i> が同定可能となった。得られたプロファイルとGEN、CLI、およびMINのMICレベルとの関連を分析した。χ^2検定は、得られた薬剤耐性遺伝子の検出とMICレベルからの感受性閾値における関連性の検討に使用し、ゲノム検出パターンとGEN、CLI、MINのMICレベルとの間の相関を記述するためにFisherの独立性試験を行い、CramerのV係数を計算した。</p> <p>その結果、GENに対する耐性株は、75.00%（69/92）で、これらの株の大部分（91.30%、63/69）は、>16 mg/LのGEN MICレベルを示した。CLIに対する耐性株は、68.48%（63/92）株で、これらの株の大部分（80.95%、51/63）は、>4 mg/L CLI MICレベルを示した。MINに対する耐性株は40.22%（37/92）株で、これらの株のすべてが >8 mg/L MIN MICレベルを示した。インシリコの抗菌剤耐性遺伝子の検出では、</p>			

63.04% (58/92) の株が *aac(6')aph(2'')*⁺、77.17% (71/92) 株が *spc*⁺、77.17% (71/92) 株が *ermA*⁺で、69.57% (64/92) 株が *tetM* を有していた。*spc*⁺株全例が *ermA*⁺であった。*aac(6')aph(2'')*検出と GEM MIC レベル (p <0.001)、*ermA* 検出および CLI MIC レベル (p <0.001)、および *tetM*⁺と MIN MIC レベル (p <0.001) との間の関連性を認めた。6つの遺伝子検出パターンが同定され、*aac(6')aph(2'')*⁺*spc*⁺*ermA*⁺*tetM*⁺ が 45.65% (42/92) 株に、*aac(6')aph(2'')*⁺*spc*⁺*ermA*⁺*tetM* が 1.09% (1/92) 株に、*aac(6')aph(2'')*⁺*spc*⁺*ermA*⁺*tetM*⁺ が 23.91% (22/92) 株に、*aac(6')aph(2'')*⁺*spc*⁺*ermA*⁺*tetM* が 6.52% (6/92) 株に *aac(6')aph(2'')*⁺*spc*⁺*ermA*;*tetM* が 16.30% (15/92) に、*aac(6')aph(2'')*⁺*spc*⁺*ermA*;*tetM* が 6.52% (6/92) 株に見られたが、*aac(6')aph(2'')*⁺*spc*⁺*ermA*;*tetM*⁺ と *aac(6')aph(2'')*⁺*spc*⁺*ermA*;*tetM*は認められなかった。同時検出パターンは、GEN-MIC レベル (φc= 0.398、p <0.001)、CLI-MIC レベル (φc= 0.448、p <0.001) および MIN-MIC レベル (φc= 0.515、p <0.001) と相関した。

主要な *aac(6')aph(2'')*⁺*spc*⁺*ermA*⁺*tetM*⁺ MRSA 株の MIC は、>16 mg/L GEN (40/42)、>4 mg/L CLI (26/42) >8 mg/L MIN (30/42) であり、その存在は 2009 年から 2013 年の間に増加傾向であった。本研究において、ゲノムと耐性の表現型相関分析から、MRSA における迅速な薬剤感受性情報を提供できる可能性を明らかにした。*aac(6')aph(2'')* 検出および GEN-MIC レベルの相関は、以前の報告と同様の結果であった。この研究では、*erm* クラス遺伝子の性質から MRSA 株における *ermA* 検出の際にエリスロマイシンと CLI 耐性を区別することの重要性を示していたが、エリスロマイシン感受性試験は、当院の定期検査では検査していないことから、CLI-MIC レベルを含む相関分析の詳細な検討は困難であった。エリスロマイシン感受性試験を含む今後の検討が必要と考えられた。*aac(6')aph(2'')* および *tetM* 遺伝子を含む *ermA*⁺ MRSA における CLI の耐性が高くなっている機序は未知であり、これらも今後の検討が必要と考えた。MIN-MIC レベルは、以前の報告に示されているように *tetM* の存在と相関した。本研究により、臨床 MRSA 株の中の多剤耐性株の検出が、*aac(6')aph(2'')* -*spc-ermA-tetM* のインシリコ同時検出を用いることで可能となることを示唆した。NGS 技術と他の方法論の組み合わせは、高い感度と特異性で MRSA の抗菌薬感受性と機序を明らかにする検査方法として、正確で信頼性の高い情報を有効に提供し、新たな時代の到来を告げるものである。

以上から、臨床分離 MRSA 株において、次世代シーケンサー (NGS) を使用したゲノム解析による抗菌剤耐性遺伝子の存在の検出は、侵襲も少なく、迅速かつ正確に結果が得られ一度に多くの遺伝子を検索できる点で臨床応用の可能性があり、さらに薬剤感受性試験を含む他の検査法と組み合わせることにより薬剤耐性メカニズムなどの研究が可能となると結論した。

以上の結果から、本論文は、多剤耐性ブドウ球菌 (MRSA) の多種類の薬剤耐性遺伝子を分離株由来 DNA を用いた次世代シーケンサー (NGS) によるゲノム解析にて検出する方法が、迅速かつ侵襲が少なく診断の一助となり、耐性獲得機序も明らかにしうることの検討を行った点で高く評価される。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士 (医学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	イランディ プトラ プラトモ IrandiPutraPratomo
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 Correlation Analysis between Antibiotic Resistance Gene Profile and Susceptibility to Gentamicin, Clindamycin, and Minocycline in Clinically Isolated Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (メチシリン耐性黄色ブドウ球菌の臨床分離株における抗菌薬耐性遺伝子分布とゲンタマイシン、クリンダマイシン、ミノサイクリン感受性の関連についての解析)			
最終試験担当者			
主査教授	坂口 剛正	印	
審査委員 教授	志馬 伸朗		
審査委員 准教授	横崎 典哉		
〔最終試験の結果の要旨〕			
判定合格			
上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成29年5月8日の第68回広島大学研究科発表会（医学）及び平成29年4月24日日本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。			
<ol style="list-style-type: none"> 1 多剤耐性ブドウ球菌 MRSA の薬剤耐性遺伝子とそのメカニズム 2 多剤耐性ブドウ球菌 MRSA のゲノム解析法 3 多剤耐性ブドウ球菌 MRSA の外来、入院株でのゲノムの差異 4 多剤耐性ブドウ球菌 MRSA のゲノムデータの院内感染への応用 5 多剤耐性ブドウ球菌 MRSA のゲノム解析の臨床応用と今後の展開 			
これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するのに必要な学識を有するものと認めた。			