

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（歯学）	氏名	池田 光泰
学位授与の条件	学位規則第4条第①、2項該当		
論文題目 Evolution of a novel IMP-6 producing <i>P. aeruginosa</i> in a long-term care facility in Japan (わが国の長期療養型医療施設で出現した新たな IMP-6 産生緑膿菌)			
論文審査担当者			
主査	教授	小松澤 均	印
審査委員	教授	大毛 宏喜	
審査委員	教授	太田 耕司	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>【目的】 長期療養型医療施設（LTCF）の入院患者は急性期病院で医療行為を受けてから転院することが多く，市中に比べて耐性菌の保有リスクが高く，薬剤耐性菌（ARB）のリバーザーとなっている。日本においては LTCF における ARB の疫学調査に関する報告は少なく，実態は不明である。その理由として，LTCF では感染症症状が出ない限り，細菌学的検査を積極的に行う体制にはないことが挙げられる。2017年6月，広島県内のある LTCF の入院患者からカルバペネム耐性腸内細菌目細菌（CRE）が検出された。その患者は無症状で CRE の保菌者であった。その後，広島大学 院内感染症プロジェクト研究センターが LTCF での CRE の分子疫学的なサーベイランスを実施することになった。サーベイランスの結果，LTCF 入院患者検体より，我が国で初めてとなる <i>bla</i><sub>IMP-6</sub> 保有 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> を分離した。本研究では LTCF 内で耐性菌の分子疫学を通じて <i>bla</i><sub>IMP-6</sub> 保有 <i>P. aeruginosa</i> が誕生するメカニズムについて考察する。</p> <p>【方法】 2017年6月に小規模 LTCF（一般病床 50 床，療養病床 60 床）にて 24 名の入院患者を対象に喀痰，尿，便を採取し保菌調査を行った。また各フロアの処置室のシンクや排水溝を中心に計 40 ヶ所から環境サンプルを採取した。サンプリングしたスワブおよび検体は CHROMagar™ ESBL および CHROMagar™ mSuperCARBA™ を用いてスクリーニングした。菌種同定および薬剤感受性試験は，RAISUS S4 を用いた。PCR により各種 β-ラクタマーゼ遺伝子を検出した。菌株の相同性を比較するためにパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）を用いた。Illumina リードと MinION により得られたゲノムデータから Multilocus sequence typing（MLST）および薬剤耐性（AMR）遺伝子を検索し，プラスミドおよび全ゲノムを比較した。</p> <p>【結果・考察】 スクリーニングにより，患者 24 人中 23 人，および病院環境 40 ヶ所中 20 ヶ所から計 140 株の ARB を検出した。PCR を用いて解析した結果，7 菌種 67 株のカルバペネマーゼ産生菌（CPO）および 5 菌種 20 株の基質拡張型 β-ラクタマーゼ（ESBL）産生株（カルバペネマーゼ同時産生株は除く）を検出した。検出したカルバペネマーゼ遺伝子は，<i>bla</i><sub>IMP-1</sub>：6 株，<i>bla</i><sub>IMP-6</sub>：59 株，<i>bla</i><sub>TMB-1</sub>：2 株であった。<i>P. aeruginosa</i> から <i>bla</i><sub>IMP-6</sub> を 1 株検出した。51 株の <i>bla</i><sub>IMP-6</sub> 保有 CPO を <i>bla</i><sub>IMP-6</sub> プラスミド pKPI-6 をリファレンスとして比較した結果，50 株の <i>bla</i><sub>IMP-6</sub> を含む DNA はプラスミド全体にマッピングされたが，<i>P. aeruginosa</i> TC16G</p>			

(ST235) は *bla*<sub>IMP-6</sub> integron のみがマッピングされた。また *bla*<sub>IMP-6</sub> integron 領域の塩基配列を詳細に解析した結果、*bla*<sub>IMP-6</sub> の上流に位置する *aacA4'*<sub>3</sub> に pKPI-6 の *aacA4'*<sub>3</sub> とは異なる 1 塩基多型 (C305T) を認めた。この一塩基多型は LTCF 内で分離された全ての *bla*<sub>IMP-6</sub> を有する CPO が保有していた。一方で、広島県内の 12 施設を対象として院内感染症プロジェクト研究センターが 2009 年から実施してきた ESBL 産生菌・CPO サーベイランスで分離された 84 株の *bla*<sub>IMP-6</sub> 保有 CPO と近畿地区で 2006-2011 年に分離された *bla*<sub>IMP-6</sub> 保有 CPO を調べた結果、広島県内の他施設では 1 施設の急性期病院 (B Hospital) からのみ 2016, 2017 年に 2 株の一塩基多型が検出された。また、この一塩基多型は近畿地区の急性期病院 (A Hospital) から 1 株のみ検出された。pKPI-6 をリファレンスとして *bla*<sub>IMP-6</sub> 保有プラスミドとのコアゲノム系統樹による解析を実施した結果、B Hospital から 2016 年に検出された株は LTCF とは別のクラスターに属していたが、2017 年に B Hospital から検出された株と近畿由来 A Hospital から検出された株は LTCF と同じクラスターに属していた。*bla*<sub>IMP-6</sub> の保有が確認された *P. aeruginosa* TC16G の *bla*<sub>IMP-6</sub> integron の周辺構造を解析した結果、*P. aeruginosa* P34 株の染色体 (accession no. CP032552) と構造が類似し、*bla*<sub>IMP-6</sub> integron は染色体上の領域 (nt 2,489,981~nt 2,498,421) に組み込まれていることが明らかとなった。また、TC16G 株の *bla*<sub>IMP-6</sub> integron の上流には *tnpR* および *tnpA* を認めた。TC16G 株の *bla*<sub>IMP-6</sub> integron の脱落の可能性を評価するために、TC16G 株を 10 回継代培養した培養液を培地に撒き、発育したコロニーを解析した結果、99% (99/100 コロニー) は *bla*<sub>IMP-6</sub> integron を保持していた。*bla*<sub>IMP-6</sub> integron の染色体上への組み込みを実証するために、LTCF 内で患者喀痰検体から分離されたカルバペネマーゼ非産生 *P. aeruginosa* PC08S (ST235) と *bla*<sub>IMP-6</sub> 保有大腸菌を用いて接合伝達実験を行った。その結果、*bla*<sub>IMP-6</sub> integron は  $2.8 \times 10^{-7}$  の頻度で接合伝達した。PC08S 株および PC08S transconjugant 株の *bla*<sub>IMP-6</sub> integron の周辺構造を解析した結果、*bla*<sub>IMP-6</sub> integron のみが PC08S 株の染色体上に組み込まれていた。TC16G 株と実験的に作成した PC08S transconjugants 株のゲノム配列比較の結果、TC16G 株と PC08S 株は染色体上に各々二つの *tnpR*, *tnpA* 配列を保有し、PC08S transconjugant 株は TC16G 株の *tnpA* とは異なる *tnpA* の下流に挿入されていることが明らかとなった。以上のことから *bla*<sub>IMP-6</sub> プラスミドが近畿地区の急性期病院から広島県の LTCF の中に入り込んだ可能性、あるいは LTCF に元来存在し、*bla*<sub>IMP-6</sub> 保有 CPO として院内感染をおこし、患者腸管内で *bla*<sub>IMP-6</sub> integron が *P. aeruginosa* に伝達され、新たな IMP-6 産生 *P. aeruginosa* を生み出したことが強く示唆された。

以上の結果から、本論文は *P. aeruginosa* が腸内細菌目プラスミド由来の *bla*<sub>IMP-6</sub> integron を染色体上に獲得し、IMP-6 産生 *P. aeruginosa* の出現を実証した。耐性菌が蔓延した環境下では腸内細菌目細菌から非発酵菌へ水平伝播により新たな耐性菌が出現することを示した点で高く評価される。

よって審査委員会委員全員は、本論文が池田光泰に博士 (歯学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。