

(様式6-C) C. 学位論文 (Thesis) で発表論文のない場合

橋本 佑輔 氏から学位申請のため提出された論文の審査要旨

題 目 Characteristics of vancomycin-resistant enterococci (VRE) isolated from medical fields in Japan

(日本国内の医療現場より分離されたバンコマイシン耐性腸球菌に関する解析)

学位論文 (Thesis)

発表予定論文

タイトル

(1) Dissemination and genetic analysis of the stealthy *vanB* gene clusters of *Enterococcus faecium* clinical isolates in Japan

(日本国内におけるVanB型バンコマイシン低度耐性腸球菌に関する解析)

BMC Microbiology (投稿中)

Yusuke Hashimoto, Jun Kurushima, Takahiro Nomura, Koichi, Tanimoto, Kiyoko Tamai, Hideji Yanagisawa, Komei Shirabe, Yasuyoshi Ike, Haruyoshi Tomita

(2) Molecular characterization of the VanD-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* clinical isolates from a fecal sample from a same patient after vancomycin therapy.

(県内医療機関入院患者より得られたVanD型バンコマイシン耐性腸球菌3株に関する解析)

(投稿準備中)

Yusuke Hashimoto, Takahiro Nomura, Jun Kurushima, Hidetada Hirakawa, Koichi Tanimoto, Haruyoshi Tomita

論文の要旨及び判定理由

日本国内の医療現場より分離されたバンコマイシン耐性腸球菌(VRE)に関し、VanB型バンコマイシン低度耐性腸球菌、VanD型バンコマイシン耐性腸球菌の二種類の耐性型について臨床分離株を基に分子生物学的解析を行った。

近年、バンコマイシン (VAN) 耐性遺伝子を保持しながらもVAN感受性を示すVAN低度耐性腸球菌が国内外で少数報告されている。これらが臨床現場にてVAN耐性へ復帰した症例も既に報告されており、臨床現場で脅威になりうると考えられている。日本国内では感染症法にてMinimum Inhibitory Concentration (MIC)値 16mg/L以上のVRE感染症は届出疾患とされているが、この値に満たない低度耐性株はモニタリングされていないためその疫学的知見は乏しく、またVAN低度耐性のメカニズムについての分子生物学的解析を行った論文はない。本研究では国内の2病院で検出されたVAN MIC値 3mg/Lを示すVanB型VAN低度耐性株 計19株について検討を行った。PFGE、MLST解析での疫学解析からは、同様の遺伝的背景を持つVanB型VAN低度耐性株が国内の異なる県に位置する2つの病院で広がっていることを明らかにした。またこれらVanB型VAN低度耐性株は他実験株へ接合伝達が可能であり、元株・接合伝達株ともに $10^6 \sim 10^7/\text{cell}$ と比較的高頻度にVAN耐性へ復帰した。復帰株の多くがセンサー蛋白であるVanS<sub>B</sub>の細胞質内ドメインに変異を保有しており、またReal-time PCR法により*vanB*耐性遺伝子群の転写量が増加していることが明らかとなった。

VanB型VAN低度耐性株は、*vanB*耐性遺伝子群内に3つの特有の塩基変異を保有していた。これら3つの変異をVanB型VAN高度耐性株の塩基配列に置換するとVAN MIC値は16mg/Lまで回復し、これら3つの変異がVAN低度耐性化に関与していた。

VanD型VAN耐性は世界的に見ても報告例の極めて少ない耐性型である。今回、県内医療機関に入院中の同一患者より3株のVanD型VAN耐性*E. faecium*が検出され、解析を行った。本患者には長期間のVAN治療歴が存在した。MLST、PFGE解析よりこれら3株（AA620, AA622, AA624）はクローナルな株であることが判明したが、VAN MIC値はAA620が64mg/L、AA622/AA624は16mg/Lと異なっていた。AA620の*ddl*遺伝子内には機能的に重要な塩基配列近傍に12bpの欠失が、また*vanSb*遺伝子内には1bpの欠失によるフレームシフトを確認した。これら2つの変異により細胞壁合成に必要な前駆体はD-Ala-D-Lac優位となり、AA622/AA624と比較してAA620のVAN耐性高度化に繋がっていると推測された。またこの*vanD*耐性遺伝子群、ならびに周辺構造の解析からは腸管内嫌気性菌である*Ruminococcus* spp.と類似性が高いことが推測された。

本研究では、国内で臨床分離された複数の遺伝子型VREについて、分子疫学的解析と耐性機構の詳細な分子遺伝学的解析を行い、多くの知見を得るとともに、VREの厳格なモニタリングが重要であることを示した。これらの知見は今後のVREの制御と感染対策に貢献するものと認められ、博士（医学）の学位に値するものと判定した。

平成 30 年 2 月 7 日 （審査年月日）

審査委員

主査	群馬大学教授（医学系研究科） 分子細胞生物学分野担任	石 崎 泰 樹 印
副査	群馬大学教授（医学系研究科） 法医学分野担任	小 湊 慶 彦 印
副査	群馬大学教授（医学系研究科） 生体構造学分野担任	松 崎 利 行 印

参考論文

1. New colony multiplex PCR assays for the detection and discrimination of vancomycin-resistant enterococcal species.

(バンコマイシン型及び腸球菌属の判別の為の新たなマルチプレックスPCRの開発)

雑誌名 Journal of Microbiological Methods, Volume 145, Pages 69-72, February, 2018

著者名 Takahiro N, Yusuke H, Jun K, Hidetada H, Koichi T, Zheng B, Genjie R, Feng X, Ji an L, Junzo H, Motoyuki S, Haruyoshi T