

## 論文の内容の要旨

### 1 申請者

防衛医科大学校 三 沢 和 央

### 2 論文題目

遺伝子解析情報を基にした細菌の薬剤耐性に関わる領域の解析ならびに新しい変異検出法の検討

### 3 目的

近年登場した新たな遺伝子シーケンス方法を活用し、①βラクタマーゼ非産生アンピシリン耐性（β-lactamase-negative ampicillin-resistant, BLNAR）型インフルエンザ菌の耐性遺伝子型と表現型である最小発育阻止濃度（Minimum Inhibitory Concentration, MIC）との関連から、ペニシリン結合蛋白質（Penicillin Binding Protein, PBP）をコードする遺伝子内の新たな変異部位の特定および潜在的遺伝子変異の広がりを網羅的に把握する。②携帯型ナノポアシーケンサーおよびマルチプレックス PCR を併用し、結核菌の薬剤耐性遺伝子変異を網羅的に同定する。

### 4 対象並びに方法

- ① 防衛医科大学校病院 微生物検査室で過去に同定されたβラクタマーゼ非産生のインフルエンザ菌に対して、HiSeq 2500（Illumina, San Diego, CA）による遺伝子解析情報から PBP をコードする部位の一塩基多型（Single Nucleotide Polymorphism, SNP）とβラクタム系およびセフェム系抗菌薬の MIC との相関の有無を統計学的に解析する。
- ② ナショナルバイオリソースから譲渡された結核菌 3 株および防衛医科大学校病院検査室に保管された結核菌 5 株を利用し、標準治療の 5 剤＋キノロン系抗菌薬の薬剤耐性に関連する 15 遺伝子領域の遺伝子型を、携帯型ナノポアシーケンサー MinION™（Oxford Nanopore Technology, Oxford, UK）を用いて解析し、既存の次世代シーケンサーである MiSeq（Illumina, San Diego, CA）と結果を比較し、その成績および問題点を検証する。

### 5 成績

- ① βラクタマーゼ非産生のインフルエンザ菌 34 株中、遺伝子学的な基準から同一の *H. influenzae* と判定されない 2 株、および PBP 全長を決定できない 5 株を除外した合計 27 株を対象とした結果、MIC と有意に相関したのは過去に報告のあった *fts-I* 遺伝子の SSN および KTG 領域内の SNP であった。報告のない新規の SNP は認めなかった。  
一方で耐性遺伝子型を有する株の約 4 割にあたる 10 株は表現型では感受性を示した。
- ② 設計した 4 プライマーセットによるマルチプレックス PCR では、1 反応チューブあたり 10 pg の DNA 量で目的の産物を増幅することができた。シーケンス方法の確立のため最初にナショナルバイオリソースから譲渡された 3 株を用いた解析を行い、約 24 時

間程度の解析時間によるデータから、塩基配列の決定及び一塩基変異の同定を行うことが十分に可能であった。*rrs* 遺伝子に関しては、National Center for Biotechnology Information が提供する Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) を利用したフィルターをかけることで正しく一塩基変異を同定できた。一方、塩基の欠損および挿入部位の検出は完全ではなく、MinION のみのデータから正しく同定することが難しかった。このプライマーセットを利用し、防衛医大検査室保管の 5 株についても解析を行い、薬剤耐性関連領域の遺伝子型を概ね確認することができた。

## 6 考 察

- ① BLNAR 型インフルエンザ菌の新しい遺伝子変異部位の発見には至らなかったものの、表現型に現れない潜在的な耐性遺伝子変異は臨床現場で広く分布している可能性が示唆された。遺伝子型と表現型の乖離が認められた理由としては、遺伝子の SNP 以外の耐性誘導機序やインフルエンザ菌と鑑別困難な近縁種の存在が問題を複雑化している可能性もあると考えられた。
- ② ナノポアシーケンサーとマルチプレックス PCR を併用することで、短時間で網羅的な結核菌の薬剤耐性遺伝子変異、特に SNP の同定が可能であった。ただし変異部位の検出方法についてはさらなる改善が必要と考えられた。

## 7 結 論

次世代シーケンサーを併用することで、細菌の網羅的な遺伝子変異の検出が可能となった。これにより未同定の耐性遺伝子変異が広く分布している可能性が本研究により明らかとなったことから、今後薬剤感受性／耐性検査の情報収集だけではなく、遺伝子変異の同定、解析も重要な情報となると考えられる。その際、携帯型ナノポアシーケンサーは、網羅的な耐性遺伝子の特定に対して有効性が期待される。