




学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第 645 号	氏名	TSHIBANGU EVARISTE KABAMBA
審査委員会委員		主査氏名	伊東 弘樹 (伊東印)
		副査氏名	平松 和史 (平松印)
		副査氏名	小宮 孝作 (小宮印)
<p>論文題目 Next-Generation Sequencing of the Whole Bacterial Genome for Tracking Molecular Insight into the Broad-Spectrum Antimicrobial Resistance of <i>Helicobacter pylori</i> Clinical Isolates from the Democratic Republic of Congo (コンゴ民主共和国におけるヘリコバクター・ピロリ臨床分離株の広域抗菌薬耐性に関する分子的洞察のための全細菌ゲノム次世代シーケンス解析)</p> <p>論文掲載雑誌名 Microorganisms</p> <p>論文要旨 ヘリコバクター・ピロリ菌に対する薬剤耐性 (AMR) がアフリカにおいて深刻な問題となっている。適切な薬剤の選択のためには抗菌薬感受性試験 (AST) を必要とするが、時間を要するためほとんどのアフリカ諸国では利用できていない。そのため、AST よりも迅速かつ費用効果の高い方法の必要性が強調されている。本研究では、コンゴ民主共和国 (DRC) の臨床分離株を対象に全細菌ゲノム次世代シーケンス解析を用いてピロリ菌の AMR に関連する遺伝子の特定を行い、本解析の実現可能性を検証した。DRC のキンシャサにある 4 つの病院において、2017 年と 2018 年に上部胃十二指腸内視鏡検査を受けた 220 人の患者をエントリーした。分離に成功した 109 株のうち、102 株の表現型 AST を評価した。各分離株の全ゲノム配列 (WGS) は、次世代シーケンシングを用いて取得した。Miseq データの質を評価した後、各分離株のドラフトゲノムは SPAdes を用いて新規に構築し、RAST ソフトウェアを使用して注釈を付けた。PacBio および Illumina HiSeq プラットフォームでさらなるシーケンスを行った WGS を国立遺伝学研究所で完全なゲノムに構築し内部標準に用いた。AMR をコードする遺伝子型を確認するために WGS データをスクリーニングした。プラスミドは PlasmidSeeker ツールにより評価し、データは CLC Genomic Workbench、MEGA、Swiss-Modeller サーバー、R ソフトウェアを用いて分析した。その結果、メトロニダゾール (MTZ)、レボフロキサシン (LEVO)、アモキシシリン (AMX) およびクラリスロマイシン (CLA) に対する耐性率はそれぞれ 90.2%、65.7%、34.3% および 23.5% と広域な AMR が確認された。耐性株に β-ラクタマーゼやプラスミドがコードした遺伝子は検出されなかった。構築したゲノムに基づいた WGS ベースのメソッドを構築し、数種類の AMR に関連した主要な遺伝子変異を特定できた。これらの変異には西洋やアジア人で過去に多く報告されているものだけでなく、pbp-1A (T558S、F366L など)、gyrA (A92T、A129T など)、gyrB (R579C など) および rdxA (R131_K166del など) 遺伝子において、数種類の新規の変異株が含まれていた。WGS の AST を予測するうえでの高いパフォーマンスが、特に AMX、CLA および LEVO について確認された。</p> <p>本研究結果は、WGS によって臨床現場における治療法を決定するための重要な情報を提供するだけでなく、AMR メカニズムを迅速に確認でき、AST に代わる重要な手段となりえることが期待されるため、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

最終試験
の結果の要旨
~~学力の確認~~

審査区分 ①・論	第 645 号	氏 名	TSHIBANGU EVARISTE KABAMBA
審 査 委 員 会 委 員		主査氏名	伊東 弘樹 
		副査氏名	平松 和史 
		副査氏名	小宮 幸平 
<p>学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から、研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <p>①薬剤耐性のピロリ菌が世界中で増加していることを示したが、コンゴで増加しているというデータはないのか。</p> <p>②これまでにコンゴにおける <i>H.pylori</i> の感染率に関する報告はあるか。</p> <p>③コンゴにおける <i>H.pylori</i> の除菌成功率はどの程度か。</p> <p>④肺炎や尿路感染症において、コンゴではどのような抗菌薬が使用されることが多いのか。</p> <p>⑤対象症例の居住地はコンゴ全域か、それともキンシャサに限られているのか。</p> <p>⑥サンプルサイズはどのように決定したか。このサンプルサイズで、決定的な結論を得るのに十分か。</p> <p>⑦コンゴの4病院からピロリ菌を採取しているが、この4病院はどのような性格の病院であるか。一般化出来るかどうか重要な視点だと思うがどう考えるか。</p> <p>⑧希釈法と Etest の両方で薬剤感受性検査をした菌株はどのくらいあるのか。また両法で MIC 値に差は認められたのか。</p> <p>⑨アモキシシリンに対する変異株が多種類検出されているが、変異の種類と MIC 値の間には関係性が認められるか。</p> <p>⑩菌株を収集した4つの病院のなかで、薬剤耐性率に差が認められたか。</p> <p>⑪耐性菌が検出された患者の背景を検討したか。</p> <p>⑫キノロン耐性機序のなかで、<i>parC</i> や <i>parD</i> 遺伝子について検討を行ったか。</p> <p>⑬アモキシシリンやメトロニダゾールに対して、WGS の感度はやや低い抗菌薬耐性メカニズムが他に存在すること以外に、考えられるその他の原因がないか。</p> <p>⑭CAM 耐性の場合に考慮するのは、他のマクロライド系抗菌薬との交差耐性であるが、どのように考えるか。CAM 耐性の際に、EM や AZM は治療候補になるか。</p> <p>⑮適切な治療レジメンを見つける以外に、耐性菌を減らすことも重要になるが、どのような方法が考えられるか。人間以外にも動物や植物への抗菌薬の不適切治療が問題になると思うか。</p> <p>⑯本検討では、次世代シーケンサーを用いて評価しているが、今回発見した耐性遺伝子を臨床現場で測定する場合、従来の方法と比べてどの程度安く見積もれるか。</p> <p>⑰コンゴでは医師の処方箋なしに抗菌薬を購入することができるか。</p> <p>⑱今回の検討結果から、どのような抗菌薬の組み合わせが最も有効な治療であると言えるか。</p> <p>⑲薬剤耐性機序の一つである por in の発現状況について、検討はなされているか。</p> <p>これらの質疑に対して、申請者はおおむね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

学 位 論 文 要 旨

氏名 TSHIBANGU EVARISTE KABAMBA

論 文 題 目

Next-Generation Sequencing of the Whole Bacterial Genome for Tracking Molecular Insight into the Broad-Spectrum Antimicrobial Resistance of *Helicobacter pylori* Clinical Isolates from the Democratic Republic of Congo

(コンゴ民主共和国におけるヘリコバクター・ピロリ臨床分離株の広域抗菌薬耐性に関する分子的洞察のための全細菌ゲノム次世代シーケンス解析)

要 旨

ア. 諸言 Introduction. *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) resistance to antibiotics seriously threatens human health in Africa. Antimicrobial susceptibility testing (AST) is increasingly needed to guide the *H. pylori* treatment but remains laborious and unavailable in most African countries. This emphasizes the need for more rapid and cost-effective molecular methods that can enable a reliable prediction of the phenotypic antimicrobial resistance (AMR). The present study aimed to assess the phenotypic AMR, identify related genetic determinants, and explore the feasibility of genomic NGS-based approaches for tracking resistance in *H. pylori* clinical isolates from the Democratic Republic of Congo (DRC) in Middle Africa.

イ. 研究対象及び方法 Methods A total of 220 patients undergoing upper gastro-duodenal endoscopy were recruited in 2017 and 2018 from four hospitals located in Kinshasa, the capital city of DRC. Of 109 *H. pylori* strains successfully isolated, 102 were subjected to the phenotypic AST by Agar dilution method and E-Test® method. The whole genome sequence (WGS) of each isolate was obtained through next-generation sequencing (NGS) by an Illumina Miseq platform. After quality assessment of Miseq data, the draft genome of each isolate was *de novo* assembled using SPAdes.

and annotated using the RASTtk pipeline of RAST Software. The WGS of one isolate was additionally sequenced by PacBio and Illumina HiSeq platforms, and assembled in a complete genome by the National Institute of Genetics (Tokyo, Japan), to serve as internal control. Different WGS-based methods were compared and validated for the discovery of AMR-related mutations. The most accurate WGS-based method was further used to screen WGS data for the occurrence of genotypes encoding AMR. Possible plasmids were assessed by PlasmidSeeker tool. The data were handled and analysed using CLC genomic Workbench, MEGA, Swiss-Modeller server, and R Software. Mutations are reported following the recommendations from the Human Genome Variation Society (HGVS)

之. 結 果 Results and discussion. We noted a broad-spectrum AMR of *H. pylori* with resistance rates to metronidazole (MTZ), levofloxacin (LEVO), amoxicillin (AMX), and clarithromycin (CLA) of 90.2%, 65.7%, 34.3%, and 23.5%, respectively. Neither β -lactamases nor plasmid-encoded genes were detected. Resistance were chromosomally encoded by isolates. A WGS-based method relying on annotated genome assembly could be validated for variant discovery in AMR-related genes and displayed discovery rates of 100%. This method identified several mutations in key genes that were statistically related to phenotypic AMR. These included mutations often reported in Western and Asian populations and, interestingly, several putative AMR-related new genotypes in the *pbp-1A* (e.g., T558S, F366L), *gyrA* (e.g., A92T, A129T), *gyrB* (e.g., R579C), and *rdxA* (e.g., R131_K166del) genes. WGS showed high performance for predicting AST phenotypes, especially for AMX, CLA, and LEVO (Youden's index and Cohen's Kappa > 0.80). These outcomes demonstrate the potentials of WGS for fast tracking AMR and discovery of new mechanisms of resistance in conditions with low access to phenotypic AST.

才. 結 語 Conclusion. *H. pylori* resistance is high in DRC and requires AST to guide patients' treatment in clinical practice. WGS-based methods constitute an accurate alternative to the phenotypic AST that provides substantial decision-making information for public health policy makers and clinicians in Africa, while providing insight into AMR mechanisms for researchers.