

教育シンポジウム 1 : 研究と外部資金獲得

臨床と教育の両立場から考える外部資金獲得

相 原 正 宗 *

要 旨 私はここ数年、九州大学において大学病院の臨床検査技師としての立場と同大学内にある臨床検査技師養成課程の教員としての立場を行き来しつつ、一貫して細菌を対象とした研究を行っている。ここでは、私がこれまでに臨床の現場で得た疑問や気づきが研究推進の助けとなる外部資金の獲得にどのようにつながっていったか、その経緯を紹介する。

キーワード 細菌、研究、外部資金

私はここ数年、九州大学において大学病院の臨床検査技師としての立場と同大学内にある臨床検査技師養成課程の教員としての立場を行き来してきた。現在は後者である教員職に属しているが、病院での臨床検査も兼務しており、主に感染症検査や遺伝子検査に携わっている。所属は変わり続けているものの、一貫して臨床分離細菌の研究に取り組んでおり、いずれの立場においても研究を推進するうえで外部資金は大きな助けになっている。ここでは、私がこれまでに臨床の現場で得た疑問や気づきがどのように外部資金の獲得へとつながっていったか、その経緯を紹介する。

細菌培養検査を目的とした検体は、病原菌への影響を避けるため、抗菌薬投与前に採取されることが多い。抗菌薬投与が始まり、臨床では患者から得られる様々な情報から治療経過を判断していくが、その過程で改めて同じ感染組織から細菌培養の検体を採取することがある。その際、以前の検査で報告した病原菌種を改めて分離することがあるが、初回分離株とは異なり治療薬への耐性を認める場合がある。この感受性の違いが生じる理由として、i) 同じ菌種ではあっても、遺伝的

背景や薬剤感受性の異なる複数のクローンがもともと感染組織内に存在しており、抗菌薬選択圧によりそれらの割合が変化した結果なのか、ii) 単一クローンが選択圧下でゲノムを変化させ薬剤耐性を獲得した「宿主内ゲノム進化」の結果なのか、技師の立場から検査結果をどのように解釈すべきか疑問を抱いていた。細菌培養検査で得られる菌種同定と薬剤感受性検査の結果は検体から分離されるたった一つの菌体/コロニーに由来するため、感染組織内に存在する病原菌のクローン性を明らかにするには検査の限界がある。したがって、この疑問を明らかにするためには日常検査にはない研究的アプローチが必要であり、その中でも、近年目覚ましい発展を遂げている次世代シーケンサーを用いたゲノム解析が最も適していると考えられた。日常検査の中で抱えていた疑問を検証する手始めとして、ある一人の血液腫瘍患者の血液培養検体から分離された *Klebsiella pneumoniae* 2 株 (Kp1, Kp2) を対象にゲノム解析を行った¹⁾。Kp1 は発熱を伴う好中球減少期に採取された血液培養検体から分離され、多くの抗菌薬に感性であった。Kp1 の薬剤感受性が判明する前に投与が

* 九州大学大学院医学研究院保健学部門検査技術科学分野 aihara.masamune.402@m.kyushu-u.ac.jp

開始されていたカルバペネム系抗菌薬での治療が継続され、血液培養の陰性化と患者の解熱が確認された後、同種造血幹細胞移植が施行された。Kp1 が分離された 33 日後、移植後の熱発時に採取された血液培養検体から Kp2 が分離された。この Kp2 は Kp1 とは全く異なる薬剤感受性パターンを示し、アミノグリコシド系抗菌薬を除くすべての抗菌薬に耐性であった。しかし、日常検査で確認できる薬剤耐性遺伝子の獲得等は認められず、多剤耐性化の理由を明らかにすることはできなかった。Kp1 と Kp2 の関係性を明らかにし、Kp2 が多剤耐性を獲得した原因を特定するため、両株の全ゲノム比較解析を行った。その結果、約 500 万塩基対ある染色体 DNA のうち、Kp1 と Kp2 の違いはわずか 3 塩基であり、そのうち 2 つが耐性化に寄与する変異であることが判明した。このことから、Kp1 は選択圧下で生存に有利な変異を選択的に獲得したと考えられ、Kp1 から Kp2 への宿主内ゲノム進化が示唆された。この経験を通じて、日常検査で抱いていた疑問が少し解消された気がしたと同時に、抗菌薬投与中の生体内で生じる薬剤耐性進化の過程を臨床情報と結びつけて明らかにすることが、少なくとも医療現場における新たな薬剤耐性菌の発生防止につながるのではないかと考えるようになった。そこで、ゲノム解析による宿主内ゲノム進化データの蓄積を主とした基礎研究計画を科研費に、また得られた知見を薬剤耐性対策へと直結させるやや臨床寄りの研究計画を民間財団助成に時期をずらして申請したところ、幸いにもどちらも助成を受けることができた。この民間財団助成には所属長の推薦が必要

であり、推薦は 1 名に限られていた。しかし、大講座制である本部門では教員の専門性で競合することが他の医局等に比べて少なく、推薦という点において本部門から申請する利点を活かすことができたのではないかと考えている。

外部資金の獲得をきっかけに宿主内ゲノム進化の解析症例を増やしていく過程で、興味深い薬剤耐性強化機構に遭遇した。この症例ではプラスミド性 extended-spectrum β -lactamase (ESBL) 産生 *K. pneumoniae* が徐々に薬剤耐性を強化する過程を追跡することに成功したが²⁾、その進化の初期段階で 220 kb のプラスミド上にある約 36 kb の領域のみがコピー数を増やしていることが明らかになった。この増幅された 36 kb の領域には ESBL 遺伝子をはじめ様々な薬剤耐性遺伝子が局在しており、これらの遺伝子にコードされる耐性要因の産生量増加に伴って薬剤耐性が強化されていることを確認した。36 kb の DNA 配列をより細かく解析していくと、その両端に薬剤耐性グラム陰性で高頻度に検出される挿入配列（可動遺伝因子）の一つである IS26 が位置していることが分かった。順方向の IS26 に挟まれた構造は pseudo-compound transposon (PCTn) と呼ばれ、in vitro の実験により転移ユニットとして機能することが示されている³⁾。一方、様々な臨床分離株の解析報告では、薬剤耐性遺伝子を含む多様な長さの PCTn のコピー数が細菌細胞内で増えていることが報告されており、増幅ユニットとしての機能も示唆されていたが³⁾、PCTn がどのように増幅されているのかについて十分に解明されていない。そこで、薬剤耐性グラム陰性桿菌におい

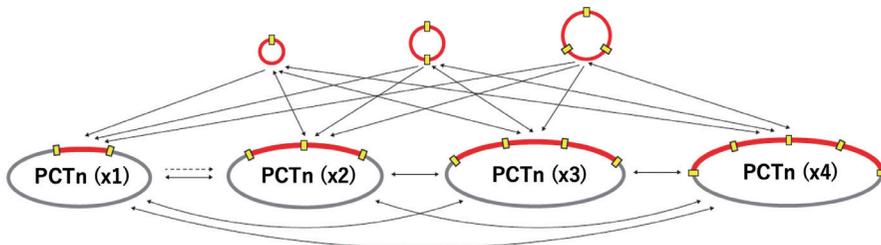


図 1 Pseudo-compound transposon (PCTn) の動的な増幅機構の模式図

て高率に認められる PCTn がどう増幅されているかを分子レベルで明らかにし、得られた知見を抗菌薬ストレスへの環境適応反応の制御に活用することを目的とした基礎研究計画を民間財団助成に申請し、採択されるに至った。この助成をもとに、PCTn 増幅の発生前後の株を用いて解析することで、図 1 に示すような PCTn の動的な増幅機構が明らかになった⁴⁾。36 kb の PCTn (図中赤線) はプラスミド上で直列に重複するという従来から知られていた増幅とともに、プラスミド上で隣り合う PCTn 同士の相同組み換えにより切り出され、プラスミドとは異なる独立した環状の DNA 分子として多量体を形成し、細胞内に蓄積していることが明らかになった。単一クローンの細菌集団内でも PCTn は絶えず動的な増幅機構を維持しており、短時間で変動しうる量依存的な耐性強化機構は日常検査にどのような影響を及ぼしているのか疑問を持ち、それを検証するための研究計画も民間財団からの助成を受けるに至った。

上述のとおり、私の研究の多くは臨床分離株を対象とした解析である。つまり、研究の源泉は臨床現場 (検査室) に存在しており、そこで見出された興味深い生命現象を研究室での研究テーマへと発展させているに過ぎない。したがって、大学教員としての仕事をしつつ臨床と密に関わり続けることは、自身の技師としてのスキル維持と実臨床に即した教育面への波及効果のみならず、自身の研究発展においても大きな利点があると考えている。また、教員が積極的に臨床に参画することは、特に大学病院のように研究面での貢献も期待される現場においてある程度の恩恵をもたらすと

前向きに捉え、検査室の技師を巻き込んだ臨床研究にも携わるよう努めている。もちろん、一人の教員が関与できる研究の数に限界はあるが、これまで先輩方が行ってきたことと同様に、臨床検査に関わる研究に参画する人材を増やす努力は今後も続けていく必要があると考えている。研究を活性化し、それに関わる人数を増やしていくことは外部資金の分配や細目設定にも通ずる可能性があり、臨床を巻き込んだ教員の臨床研究への参画がさらに広く普及することを期待している。

文 献

- 1) Aihara M, Nishida R, Akimoto M, Gotoh Y, Kiyosuke M, Uchiyama T, et al. Within-host evolution of a *Klebsiella pneumoniae* clone: Selected mutations associated with the alteration of outer membrane protein expression conferred multidrug resistance. *J Antimicrob Chemother* 2021; 76: 362-9.
- 2) Yoshino M, Aihara M, Gotoh Y, Akimoto M, Tatsuhara W, Kiyosuke M, et al. Stepwise Evolution of a *Klebsiella pneumoniae* Clone within a Host Leading to Increased Multidrug Resistance. *mSphere* 2021; 6: e0073421.
- 3) Varani A, He S, Siguier P, Ross K, Chandler M. The IS6 family, a clinically important group of insertion sequences including IS26. *Mob DNA* 2021; 12: 11.
- 4) Aihara M, Gotoh Y, Shirahama S, Matsushima Y, Uchiyama T, Kang D, et al. Generation and maintenance of the circularized multimeric IS26-associated translocatable unit encoding multidrug resistance. *Communications Biology* 2024; 7: 597.