

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19179

研究課題名(和文)ESBL産生大腸菌ST131クローンの全ゲノム解析による責任サブクローン同定

研究課題名(英文)Whole genome analysis of ESBL-producing E. coli ST131 clone and definition of its responsible subclone

研究代表者

松村 康史(Yasufumi, Matsumura)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：80726828

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：大腸菌は最も重要な感染症の起炎菌の一つであるが、薬剤耐性菌の急増により世界的脅威となっている。耐性菌の増加は耐性因子を持ったST131のクローン性増殖によることが明らかになっている。そこで、日本の複数の急性期病院から分離された薬剤耐性(ESBL産生)大腸菌ST131型株の全ゲノム解析を行った。日本で最も多いCTX-M-27型ESBLを有するST131は新規のサブクローンに属し、諸外国でも検出されていることを証明しえた。このC1-M27と名付けた大腸菌ST131の菌株タイプが、日本および全世界での薬剤耐性大腸菌の増加の原因と判明したことで、今後耐性菌の制御に向けた研究につながると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Escherichia coli is one of the most common pathogen in humans. Recent increase in drug-resistant E. coli is an emerging public health threat and is driven by clonal spread of a specific bacterial lineage with drug resistant mechanisms, called ST131. We performed whole genome sequencing analysis of ESBL-producing E. coli collected from multiple Japanese acute care hospitals. CTX-M-27-producing ST131, the most common type in Japan belonged to a novel subclone and was also present outside Japan. The discovery of this novel subclone, named C1-M27, will contribute control of drug resistant E. coli.

研究分野：臨床微生物学

キーワード：全ゲノム解析 薬剤耐性菌 クローン

1. 研究開始当初の背景

(1)大腸菌は最も重要な感染症の起炎菌の一つであるが、薬剤耐性菌の急増が世界的脅威となっている。WHO の Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014 においても、大腸菌感染症の治療薬として重要な第3世代セファロスポリンとキノロン系抗菌薬に対する耐性菌が最も大きな世界的課題であり、それらによる感染症が感染症死亡を大きく増やしていることが明記されている。これら第3世代セファロスポリンとキノロン系抗菌薬に対する耐性菌の増加は、近年の研究により耐性因子を持ったST131 と呼ばれる世界的なクローン性増殖によることが明らかになっている(1)。

(2)欧米の分離株を中心に検討されたこれまでの研究によると、ST131 の中でもCTX-M-15型ESBLを産生し、*fimH*タイプ30を有するH30Rxサブクローンが世界的に主要なタイプとされている。しかし、私が進めてきた日本におけるST131の解析によると、国際的トレンドに同調して日本でもESBL産生ST131クローンが増加しているものの、CTX-M-27型ESBLを有するST131 *fimH*30 (非H30Rx)が多く、CTX-M-15型をH30Rxタイプは多くなかった(2)。そのため、日本におけるST131の増加原因が未知のサブクローンである可能性を考えた。

2. 研究の目的

日本におけるESBL産生キノロン耐性大腸菌ST131クローンについて、*fimH*タイプングおよび全ゲノム解析により、サブクローンレベルでのクローン性増殖の実態を解明し、その分離頻度、多剤耐性率、耐性遺伝子、病原遺伝子、染色体上のgenomic islandsなどの細菌学的特徴を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)2001年から2012年に京都府・滋賀県の10施設で、臨床検体より分離されたESBL産生大腸菌1141株を対象とする。ESBL遺伝子の保有とST131型が確認された株について、サブクローン解析、薬剤感受性、病原因子解析等を行った。

(2)上記のST131株から、代表的な菌株45株を選択し、全ゲノム解析を行い、系統樹解析からサブクローンの同定を行った。新たなサブクローンC1-M27について、簡易検出に有用なマーカーについて検索した。

(3)全ゲノム解析には、Illumina社のMiSeqおよびNextSeq500シーケンサーとNextera

XT library preparation kitを用いた。遺伝子の同定やタイプングには、SRST2, BLAST 検索を用いた。ドラフトゲノムの作成にはVelvet optimiser, PAGITを用いた。系統樹解析では、H30RxのリファレンスゲノムであるEC958に対してマッピングとアライメントを行いコアゲノムを同定した。コアゲノムから得られたコアSNPを用いMaximum-likelihood treeを得た。クレード特異的領域の決定にはGegeneesを用いたパンゲノム解析を行った。

4. 研究成果

(1)3種類の特徴的なグループ1,2,3(特に3)がESBL産生大腸菌の増加に寄与していることが明らかとなった。グループ1はCTX-M-14産生H30Rxサブクローンで、2002年に出現し増加した後、減少傾向を示していた。グループ2はCTX-M-15産生H30Rxパンデミッククローンで、2006年に出現し一定数を保っていた。グループ3は、CTX-M-27産生H30Rxサブクローンで、2006年に出現し急増し2010-2012年において半数以上を占めていた。すべてのグループがキノロン耐性を有しており、virotype Cが多かった。

(2)上記3つのグループを中心に、代表的な菌株45株を選択し、全ゲノム解析を行った。全ゲノムによる系統樹解析(図1)から、グループ3は、クレードCに属する未報告の新たなサブクローンであることがわかった。このサブクローンは、他のクローンには存在しない特異的遺伝子を有しており、M27PP1と命名した(図2)。

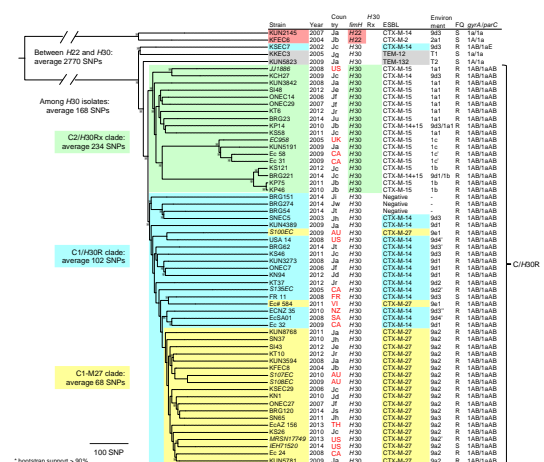


図1 系統樹。青はグループ1 (C1)、緑がグループ2 (C2)、黄色がグループ3 (C1-M27)に対応。

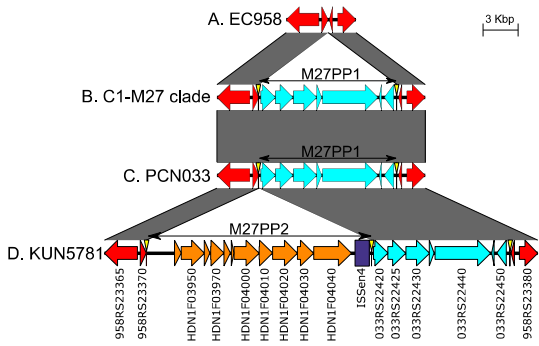


図2 C1-M27 クレイドの染色体に挿入された M27PP1

アメリカ・カナダ・オーストラリア・タイ等他地域の CTX-M-27 産生株はこのサブクローンに属することがわかり、このサブクローン(サブクレイド)を C1-M27 と命名した。日本のみならず世界的な分布が認められ、H30Rx のようなパンデミッククローンである可能性が示唆された。

(3)C1-M27 は他のクレイドとほぼ同じパターンの病原遺伝子群を有していた(図3)

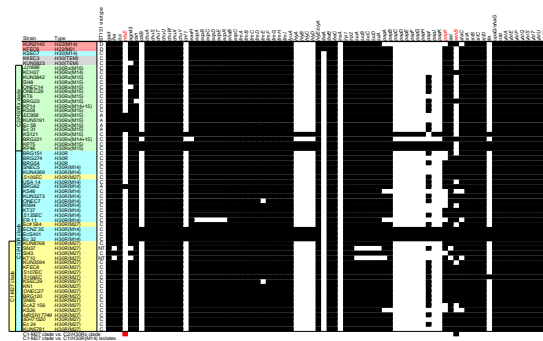


図3 病原遺伝子群の分布。左側の色が系統樹の色と対応している。

(4)プラスミドレプリコンタイピングでは、IncF がすべての株で陽性で C1 クレイドは F1:A2:B20、C2 クレイドは F2:A1:B-タイプを多く有していた(図4)

(5)耐性遺伝子の解析

C1-M27 クレイドは、他の C1 クレイドと比べ、*bla*<sub>TEM-1</sub> 陰性、*aac*(3)-*III*d 陰性、*In*54 陽性率が有意に高いという特徴があった。

(6)Genomic island の解析

これまでに同定された 2 3 種類の ST131 に特異的な genomic island について、C1-M27 クレイドが保有しているかを調べた。他の C1 クレイド株と比べて、C1-M27 は Prophage 1 を欠いていることがわかった。C1-M27 を含む C1 クレイドでは、多くの株が Prophage 6, GI-SelC, Prophage 8 を欠いていた。

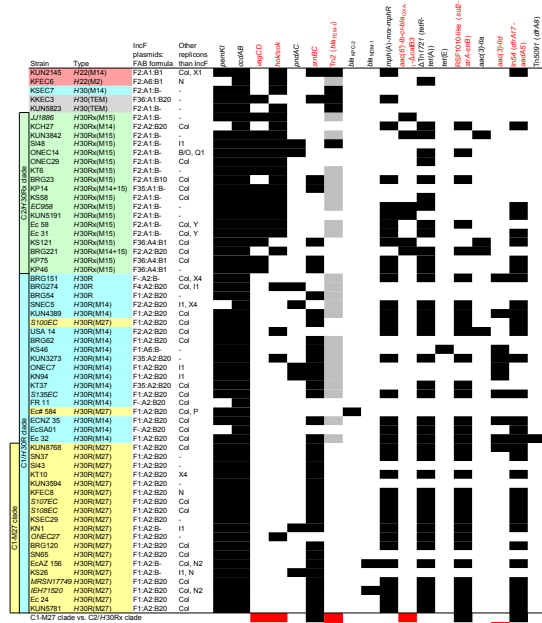


図4 プラスミド・耐性遺伝子の分布。左側の色が系統樹の色と対応している。

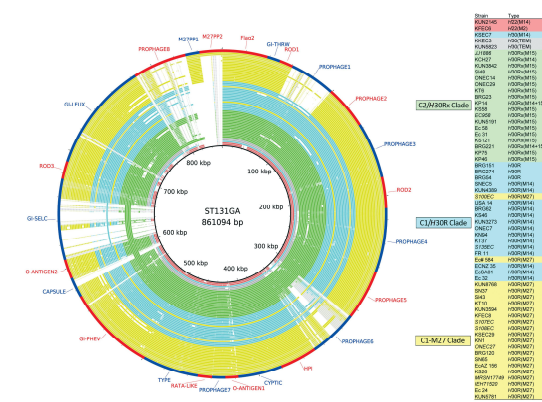


図5 Genomic island の有無

(7)この研究結果により、薬剤耐性大腸菌増加の原因としての ST131 のクローン性増殖の実態が明らかとなっただけでなく、全ゲノム解析によりそのクローンが世界的分布を疑う新規クローンであることを明らかとなった。今後の耐性菌制御には本クローンの特徴をさらに検討し、対策につなげることが重要であると考えられ、公衆衛生上重要なクローンの発見という意味で、本研究は大きな意義を持っているといえる。

<引用文献>

(1) Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. Lancet Infect Dis. 2008;8:159-66.  
 (2) Matsumura Y, Johnson JR, Yamamoto M, Nagao M, Tanaka M, Takakura S, Ichiyama S; Kyoto-Shiga Clinical Microbiology Study Group. CTX-M-27- and CTX-M-14-producing, ciprofloxacin-resistant Escherichia coli

of the H30 subclonal group within ST131 drive a Japanese regional ESBL epidemic. J Antimicrob Chemother. 2015;70:1639-49. (3) Petty NK, Ben Zakour NL, Stanton-Cook M, Skippington E, Totsika M, Forde BM, et al. Global dissemination of a multidrug resistant *Escherichia coli* clone. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111:5694-9.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

Matsumura Y, Pitout JD, Gomi R, Matsuda T, Noguchi T, Yamamoto M, Peirano G, DeVinney R, Bradford PA, Motyl MR, Tanaka M, Nagao M, Takakura S, Ichiyama S. Global *Escherichia coli* Sequence Type 131 Clade with *bla*<sub>CTX-M-27</sub> Gene. Emerg Infect Dis. 2016 Nov;22(11):1900-1907. doi: 10.3201/eid2211.160519. (査読有)

〔学会発表〕(計2件)

1. Y. Matsumura, R. Gomi, T. Matsuda, J. Pitout, R. DeVinney, M. Yamamoto, T. Noguchi, M. Nagao, M. Tanaka, S. Ichiyama. The emergence of *Escherichia coli* ST131 H30 that produce CTX-M-27 in Japan. The 26th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Amsterdam, Netherlands. 2016.4.10. Oral presentation: 0246.
2. 松村康史, 野口太郎, 山本正樹, 中野哲志, 長尾美紀, 田中美智男, 一山智: 国内外に分布する CTX-M-27 遺伝子陽性 ST131 型大腸菌の新規クレード、第91回日本感染症学会総会・学術講演会 第65回日本化学療法学会学術集会 合同学会、2017.4.8

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：

権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

松村 康史 (MATSUMURA, Yasufumi)  
京都大学大学院医学研究科・助教  
研究者番号：80726828

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )