

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07112

研究課題名（和文）肺炎桿菌が高い粘稠性を示す新規メカニズムの解析

研究課題名（英文）The analysis of the novel mechanism of hypermucoviscosity of *K. pneumoniae*.

研究代表者

鹿山 鎮男（Kayama, Shizuo）

国立感染症研究所・薬剤耐性研究センター・主任研究官

研究者番号：50432761

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、日本で臨床分離された粘稠性を示す *K. pneumoniae* のゲノム解析を実施し、粘稠性と病原遺伝子および薬剤耐性遺伝子との相関を検討した。その結果、*rmpA/rmpA2* 遺伝子を持つ株は37℃で高度な粘稠性を発現している株の割合が多かった。一方、*rmpA/rmpA2* 遺伝子を持たない株は室温で高度な粘稠性を示すことが分かった。また、もともと粘稠性を示す株に、薬剤耐性遺伝子を保有するプラスミドが転移することで粘稠性を示す薬剤耐性株が発生したと推察された。これにより、薬剤耐性を示す高病原性株が発生するメカニズムを明らかにできる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

粘稠性を示す *K. pneumoniae* は、病原性が高いとの報告がある。また、このような株は薬剤耐性を示すことがほとんどないとも報告されてきた。しかし近年、粘稠性を示す薬剤耐性菌の分離が散見されるようになった。そこで、本研究では、日本で臨床分離された粘稠性を示す *K. pneumoniae* のゲノム解析を実施し、粘稠性と病原遺伝子および薬剤耐性遺伝子との相関を検討した。これにより、薬剤耐性を示す高病原性株が発生するメカニズムを明らかにできる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analyzed the genome of hypermucoviscous *K. pneumoniae* clinical isolates in Japan and examined the relationship between hypermucoviscosity and pathogenic genes and antibiotic resistance genes. As a result, a large proportion of strains carrying the *rmpA/rmpA2* gene expressed hypermucoviscosity at 37°C. On the other hand, the strains without the *rmpA/rmpA2* gene showed hypermucoviscosity at room temperature. In addition, it was inferred that an antibiotic resistant plasmid was transferred to the originally hypermucoviscous strain, resulting in the development of a hypermucoviscous antibiotic resistant strain. This suggests the possibility of clarifying the mechanism of the development of highly pathogenic strains showing antibiotic resistance.

研究分野：細菌学

キーワード：薬剤耐性 病原性 遺伝子

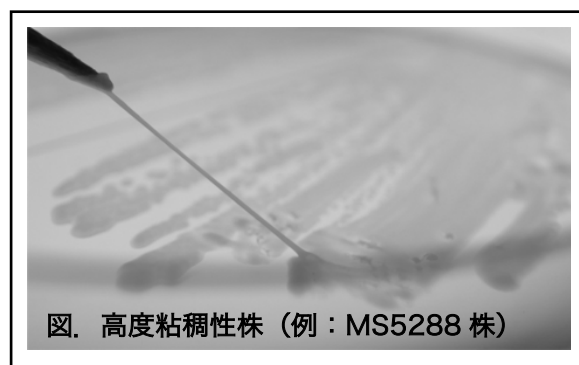
## 1. 研究開始当初の背景

日本において肺炎は平成 23 年度より死因順位の第 3 位に位置し、その後も増加を続け、平成 27 年の全死亡者に占める割合は 9.4%となった(平成 27 年度厚生労働省調べ)。そこで申請者は、肺炎の主要な原因菌の一つである肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*) の中でも、特に高い病原性を示す粘稠度が高い (string test 陽性) 株に着目した。申請者が現在までに保有する臨床分離株を用いた検討で、以下の二点が判明している。

- ① 最も高い粘稠性を示す株は、粘稠性に関与する既知の遺伝子を保有していなかった。
- ② 粘稠性が高い株が同時に薬剤耐性遺伝子を保有する例はほとんど知られていなかったが、この高度粘稠株は薬剤耐性遺伝子を保有していた。

そこで、本研究期間内に *K. pneumoniae* の高度粘稠性に関わる新規因子を同定し、薬剤耐性遺伝子との関連を検討することでその病原性発揮メカニズムを明らかにし、病原性抑制法の開発を目的とする。

*Klebsiella pneumoniae* は肺炎を起こすことでよく知られているグラム陰性桿菌であり、ヒトの鼻腔、口腔、腸管の正常細菌叢に常在している。易感染宿主を中心とした感染が一般的であると考えられてきたが、1990 年代より台湾を中心として組織侵襲性が高い *K. pneumoniae* による原発性肝膿瘍が報告されはじめた (Fang CT. 2004. J Exp Med 199 (5): 697-705)。これらの分離株の多くは高度粘稠性 (hypermucoviscosity phenotype) を示すことが報告されている (図)。高度粘稠性を示す高病原性 *K. pneumoniae* は食細胞による貪食に抵抗性を示し、眼内炎や髄膜炎といった病変を形成することが報告されている (Nadasy KA. 2007. Clin Infect Dis 45 (3): e25-e28)。この高度粘稠性に関与している因子として、主に染色体性因子 *magA* とプラスミド性因子 *rmpA* の 2 つの遺伝子が報告されている (Yu. 2006. Clin Infect Dis 42 (10): 1351-58)。本邦においても、粘稠性を示す *K. pneumoniae* に関する報告があり (Ito et al, 2015. J Clin Microbiol 53 (3): 879-86)、既知の粘稠性関連遺伝子を保有していることが示されている。

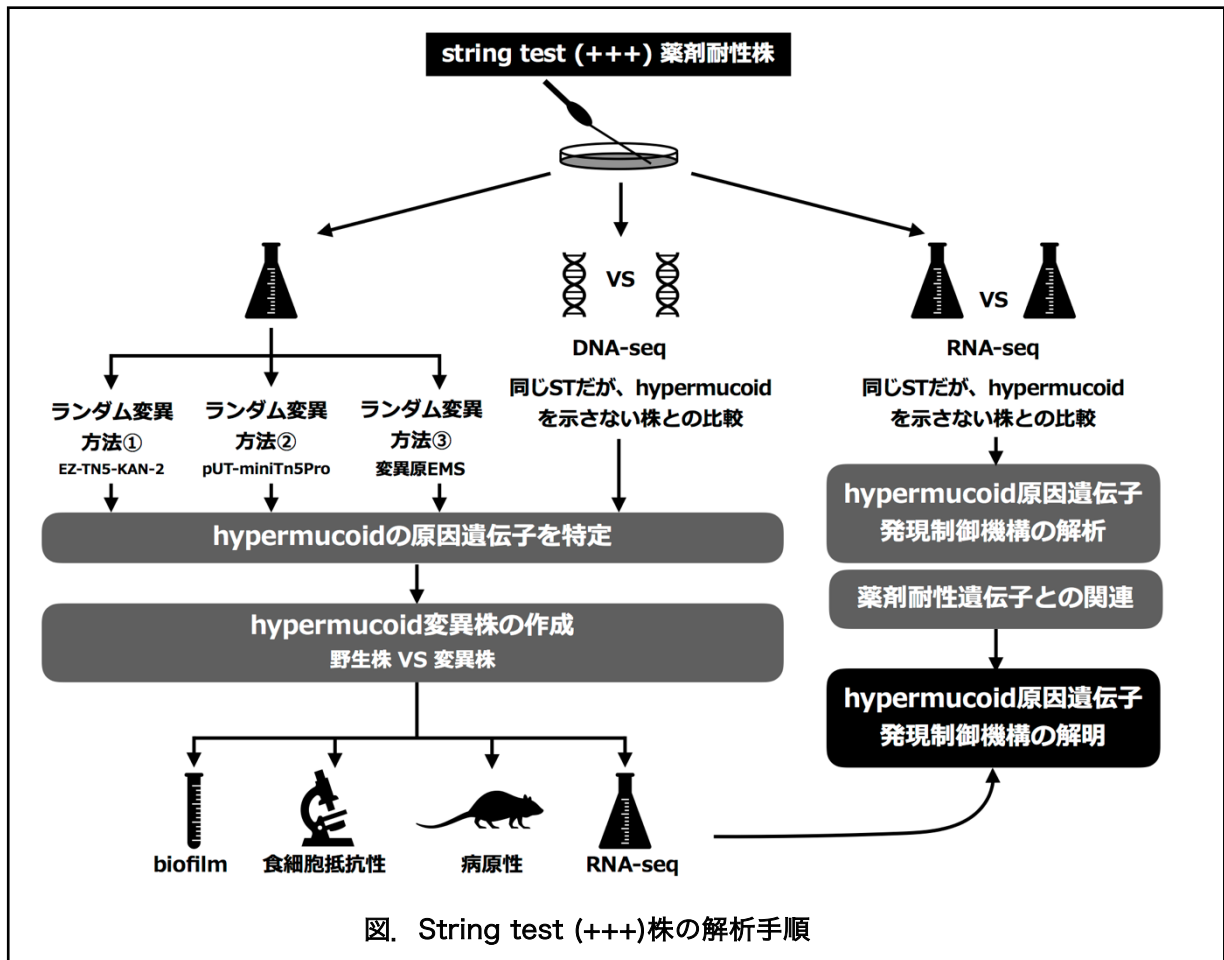


## 2. 研究の目的

調査の過程で申請者が分離した高度粘稠性 *K. pneumoniae* は、*magA* や *rmpA* のような既知の粘稠性関連因子を保有しておらず、未知の調節因子の関与が強く推定される。この因子を明らかにし、高度粘稠性の原因を解明することが本研究課題の目的である。

### 3. 研究の方法

高度粘稠性を示す薬剤耐性 *K. pneumoniae* のランダム変異株ライブラリを作成し、スクリーニングを行うことで原因遺伝子を明らかにする計画を立てた（下図）。



まず、変異株作成にあたり適切な野生株を選択する目的で高度粘稠性を示す *K. pneumoniae* の簡便なスクリーニング方法として string test を実施した。string test とは、寒天培地上にて一夜培養したコロニーを釣菌し、5mm 以上の糸を引く株を陽性と判断する試験である。これにより、臨床分離株から野生株の候補の選択を試みた。しかし、候補として挙げられた臨床分離株は高度な薬剤耐性を示す株のみであった。すでに薬剤耐性を獲得している臨床分離株にランダム変異プラスミドを導入するのが困難であったこと、変異原 EMS を使用した変異誘導では変異箇所が多いために候補遺伝子の絞り込みが困難と推定されたことなどから、表現型から株を選択し、それらを比較することにより候補遺伝子を絞り込む方針に変更した。次に、これらの遺伝子の変異株を作成し、粘稠性を失うことを確認し、薬剤耐性遺伝子との共存効率に関して検討を実施する。また、粘稠性と病原性との関連を明らかにする目的で、バイオフィルム形成能や食細胞に対する抵抗性、マウスに対する病原性に関して野生株との比較を行う。

#### 4. 研究成果

本研究では、日本で臨床分離された string test 陽性 *K. pneumoniae* のゲノム解析を実施し、粘稠性と病原遺伝子および薬剤耐性遺伝子との相関を検討した。粘稠性は string test で評価し、ゲノムタイピング（配列型、莢膜型、病原遺伝子、薬剤耐性遺伝子）は全ゲノム配列に基づいて行い、病原性プラスミドと薬剤耐性プラスミドは全ゲノム配列を用いて解析し、塩基配列がすでに公開されているプラスミドと比較した。その結果、*rmpA/rmpA2* 遺伝子を持つ株は 37°C で高度な粘稠性を発現している株の割合が多く、これらの遺伝子を持たない株は室温で高度な粘稠性を示していた。*rmpA/rmpA2* 保有株は、37°C で室温よりも高い粘稠性を示す以外の特徴として、ESBL や carbapenemase を保有せず、ほとんどが呼吸器から分離された株であった。一方、これとは異なるクラスターで、*rmpA/rmpA2* 陰性だが高い粘稠性を示す集団が認められた。それらは ESBL や carbapenemase を保有し、室温では 37°C よりも高い粘稠性を示すという、*rmpA/rmpA2* 陽性株の集団とは全く異なる特徴を有しており、それらは多くが血流感染からの分離株であった。高度粘稠性を示す 23 株（13.5%）が ESBL または carbapenemase を保有していたが、そのうち 5 株はカルバペネム耐性であり、中国で報告があった病原性プラスミド pLVPK と相同性が高いプラスミドと、日本で報告があった IMP-6 保有 pKPI-6 と相同性が高いプラスミドが共存していることも明らかになった。また、カルバペネム耐性を示した高度粘稠性 5 株は、過去に粘稠性を示したと報告があった sequence type（ST36 が 1 株、ST65 が 2 株、ST268 が 2 株）であることが分かった。これにより、もともと病原性を示す株に、薬剤耐性遺伝子を保有するプラスミドが転移することでこのような株が発生した可能性が推察された。

未知の高度粘稠性因子を明らかにするため、上記の検討にて候補として適切と考えられた中国由来 KPC-2 保有 string test 陽性 *K. pneumoniae* の解析を実施した。この株は粘稠性に関与する既知の遺伝子を保有しておらず、*K. pneumoniae* の高度粘稠性に関わる新規因子を同定する必要がある。同一の患者より、酷似した遺伝的背景を有するが粘稠性を示さない臨床分離株が存在し、ドラフトゲノム配列を得て比較解析を実施したところ、粘稠性に関与する候補として 7 遺伝子まで絞り込んだ。現在も原因遺伝子を特定すべく実験的に検討している。

上記に示した解析により、肺炎桿菌の粘稠性に関する未知の調節因子は galactose operon inducer、sialic acid transporter、glycosyltransferase など複数が関与していると推定される結果が得られた。これらの解析は現在も実施中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鹿山鎮男, 菅井基行
2. 発表標題 日本におけるステルス型CPEの動向を追う
3. 学会等名 第56回日本細菌学会中部支部総会 & ビブリオシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鹿山鎮男、横田和久、大毛宏喜、菅井基行
2. 発表標題 3. 広島県内の医療施設にて中国からの帰国者より分離されたstring test陽性blaKPC-2保有K. pneumoniaeの解析
3. 学会等名 第66回日本化学療法学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鹿山鎮男、菅井基行
2. 発表標題 String test 陽性肺炎桿菌の分子疫学解析
3. 学会等名 中四国乳酸菌研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鹿山鎮男、横田和久、Le Nguyen Tra Mi、鈴木仁人、矢原耕史、柴山恵吾、大毛宏喜、菅井基行
2. 発表標題 13. 広島県内にて中国からの帰国者より分離されたstring test陽性blaKPC-2保有K. pneumoniaeの解析
3. 学会等名 第44回広島感染症研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鹿山鎮男、Le Mi Nguyen Tra、鈴木仁人、矢原耕史、横田和久、柴山恵吾、大毛宏喜、菅井基行
2. 発表標題 18. 広島県内の医療施設において分離された中国由来string test陽性blaKPC-2保有K. pneumoniaeの解析
3. 学会等名 第30回 日本臨床微生物学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------