

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08325

研究課題名(和文) 薬剤耐性化が進むK1大腸菌の系統解析とワクチン標的分子の探索

研究課題名(英文) Phylogenetic analysis of K1 Escherichia coli with antibiotic resistance and investigation of vaccine targets

研究代表者

蘭牟田 直子 (IMUTA, NAKO)

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：00643470

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：小児腸管由来大腸菌9,525株(2001～19年)から基質特異性拡張型 -ラクタマーゼ CTX-M遺伝子保有株355株を検出した。K1莢膜遺伝子保有大腸菌43株中14株(33%)が髄膜炎原因菌に多いO1/018であった。38株(88%)が系統群B2に属し、他の系統群では腸管凝集性大腸菌の病原遺伝子保有株がみられた。CTX-Mハイブリッド型の出現やST131大腸菌clade解析でcladeの移行が明らかになった。本研究で明らかになったCTX-M遺伝子保有K1大腸菌の推移と多様性は、K1大腸菌に対するワクチン標的分子探索の基盤となり小児腸管内での病原・薬剤耐性遺伝子の活発な伝播を示唆するものである

研究成果の学術的意義や社会的意義

ESBL CTX-M遺伝子保有K1莢膜遺伝子保有大腸菌は、増加傾向にあることが示唆された。またCTX-M保有株の中に、髄膜炎の原因菌に多い血清型O1/018の株や下痢原性大腸菌の一つであり凝集付着と強固なバイオフィーム形成を特徴とする腸管凝集性大腸菌の病原遺伝子保有株が検出され、薬剤耐性遺伝子と病原遺伝子を併せ持つ株は治療が困難になることが予想されるため注意が必要である。また、CTX-M hybrid type株がみられたことから、小児の腸管内で病原遺伝子と薬剤耐性遺伝子の活発な伝播がおこっていることが示唆された。このため適正な抗菌薬治療と継続的な耐性菌サーベイランスが必要であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：A total of 355 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) CTX-M gene-positive Escherichia coli strains (CTX-M strains) including 43 K1 capsule gene-positive-strains (CTX-M/K1 strains) were detected from 9,525 E. coli strains from diarrheal children since 2001 through 2019. The majority of CTX-M/K1 strains were isolated since 2011 through 2019 and 14 (33%) strains were O1/018, which are the major serotypes causing meningitis. Although 38 (88%) CTX-M/K1 strains belonged to the phylogroup B2, a strain harboring virulence gene of enteroaggregative E. coli (EAEC) belonged to phylogroup D. Further, we demonstrated the emergence of CTX-M hybrid type and the change of ST131 clade types. CTX-M/K1 strains showed diversity and increased in this decade. These results are valuable for searching for K1 E. coli vaccine targets and suggest active horizontal transfer of antimicrobial resistant genes and virulence genes in the intestine of children.

研究分野：感染症、病原遺伝子

キーワード：ESBL産生菌 CTX-M K1莢膜遺伝子 下痢原性大腸菌 腸管凝集性大腸菌 髄膜炎

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

大腸菌の K1 莢膜多糖体は新生児髄膜炎や敗血症の主な原因因子であるが、K1 莢膜保有大腸菌 (K1 大腸菌) の分子疫学的解析は十分ではない。近年、基質特異性拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ (Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, ESBL) 産生大腸菌を保菌する妊婦も多いため、垂直感染による ESBL 産生菌による髄膜炎の報告もみられている。また、ESBL 産生大腸菌は院内だけでなく市中にも広がっており、下痢原性大腸菌 (DEC) の病原遺伝子を保有する ESBL 産生菌も出現し、病原性を持つ ESBL 産生大腸菌が臨床的に大きな問題となっている。

### 2. 研究の目的

大腸菌による新生児髄膜炎・敗血症の疾病負担は依然として大きい。また、ESBL、AmpC 型  $\beta$ -ラクタマーゼおよびカルバペネマーゼを産生する薬剤耐性大腸菌による髄膜炎・敗血症のリスクも高まっている。大腸菌の K1 莢膜多糖体はその主要な病原因子であるが、予防法は確立しておらず、今後妊婦に投与し移行抗体で新生児 K1 大腸菌感染症を予防するワクチン開発が期待される。しかし、K1 莢膜多糖体は自己抗原と共通エピトープを有し免疫原性がなくワクチン標的分子にならない。本研究では、便・血液・髄液由来の K1 大腸菌株の分子疫学解析、系統解析、病原性の検討を通じて、K1 莢膜以外のワクチン標的分子を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 鹿児島市内の小児科診療施設で細菌性下痢症が疑われ、鹿児島市医師会検査センターに提出された便培養で検出された大腸菌 9,525 株を対象とした。さらに鹿児島大学病院入院患者の血液由来大腸菌 35 株 (消化器外科 12 株、消化器内科 7 株、血液膠原病内科 5 株、救急科 11 株) を含めて検討した。K1 莢膜遺伝子、DEC の毒素遺伝子、尿路病原性大腸菌の病原遺伝子、ESBL 遺伝子の検出は PCR 法で行った。テンプレートとなる DNA は加熱遠心後上澄みを用い、96 穴マイクロタイタープレートによる多検体を対象とした PCR システムを利用した。血清型はデンカ生研の「病原性大腸菌免疫血清」や「K 抗原免疫血清」を用いたが、PCR 法による型別決定も同時に行った。H 血清群は報告されているプライマーを用いて multiplex PCR で行った。

(2) 分離された K1 大腸菌、DEC、ESBL CTX-M 遺伝子保有株について、PCR による phylogroup の決定を行った。CTX-M 遺伝子保有株についてはシークエンス型別を行い、CTX-M 型を決定した。また、Sequence type (ST) 131 を PCR 法で決定し、multiplex PCR で ST131 大腸菌の Clade 解析を行った。また、血液由来株と ESBL 産生腸管凝集性大腸菌はバイオフィーム形成能 (BI)<sup>1)</sup> も検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) 研究 1 年目成果

2017・18 年に鹿児島県で収集した小児下痢症患者由来大腸菌 646 株 (2017 年 337 株、2018 年 309 株) と 2018 年の鹿児島大学病院入院患者の血液由来大腸菌 35 株 (消化器外科 12 株、消化器内科 7 株、血液膠原病内科 5 株、救急科 11 株) を対象とした。K1 莢膜遺伝子は便由来株の 17.6%、血液由来株の 15.2% が保有していた。DEC の病原遺伝子の検出頻度は便由来株で腸管凝集性大腸菌 (EAEC) 0.7%、腸管病原性大腸菌 (EPEC) 4.3%、血液由来株では EAEC が

2.8%で、他の DEC 病原遺伝子は検出されなかった。

便由来 EAEC の O 血清群は O86・O111・O127 がみられ、O127 以外は強い BI を示し、EAEC の染色体上の遺伝子 *aaiC* を保有する典型的な EAEC であった。一方、血液由来 EAEC は O6 で phylogroup B2 に属し尿路病原性大腸菌 (UPEC) の病原遺伝子 (*afa*, *pap*) を保有、BI は 0.14 と低い値を示した。

CTX-M 遺伝子の保有率は便由来株 8.0%、血液由来株 34.2%であった。便由来株ではプラスミド性 AmpC CMY-2 遺伝子保有株が 0.9%、K1 莢膜遺伝子保有 EPEC が 7%、K1 莢膜遺伝子と CTX-M 遺伝子を両方保有する株が 1.3%みられた。便由来株の CTX-M 型は、CTX-M-27 が最も多く、次いで CTX-M-15 が多くみられた。また、CTX-M グループ 1 と 9 のハイブリッドタイプ CTX-M-64 が 1 株見られた。

血液由来株では K1 莢膜遺伝子保有株の 80%を救急部の株が占め BI が低かった。一方、CTX-M 保有株は消化器外科・内科の株が 92%を占めた。患者背景の違いによる大腸菌の遺伝的多様性が示唆され、それに応じた治療法やリスク管理が必要と考えられた。

## (2) 研究 2 年目成果

2019 年の便由来 139 株を対象に病原遺伝子、基質特異性拡張型ラクタマーゼ (CTX-M 遺伝子) の検出、CTX-M 型別を行うとともに、2001~19 年の CTX-M 遺伝子保有株 (CTX-M 株) の ST131 clade を検討した。

2019 年は、K1 莢膜遺伝子保有株 (K1 株) 30.4%、EAEC4.4%、EPEC2.2%であった。CTX-M 遺伝子保有株は 5.9%、K1 莢膜遺伝子保有 CTX-M 保有株 (CTX-M/K1 株) 0.7%で、CTX-M 型は 14 と 27、ほとんどが系統群 B2 であった。

2003 年から 19 年に鹿児島県で収集した小児下痢症患者由来大腸菌 9,525 株から 355 株 (3.7%) の ESBL CTX-M 遺伝子保有株 (CTX-M 株) を検出し、そのうち EAEC と EPEC の病原遺伝子保有株 (CTX-M/EAEC 株、CTX-M/EPEC 株) がそれぞれ 11.6%、0.85%検出された。CTX-M/EAEC 株は、2003 年に出現し、その後年々増加、2013 年には 10%以上に達したが、その後減少傾向にありながら、一定頻度で継続的に検出されている。一方、CTX-M/EPEC 株は、2012、2013 年にそれぞれ 1 株ずつ検出された。

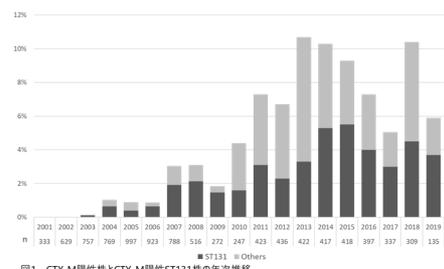


図1. CTX-M陽性株とCTX-M陽性ST131株の年次推移

次に、CTX-M 株における *E. coli* ST131 (CTX-M-ST131 株) について、その頻度や血清型を検討し clade 解析を行った。その結果、CTX-M/ST131 株は CTX-M 株の 50.4%を占め、2014 年以降は 50%前後で継続的に検出された。

CTX-M/ST131 株で多く検出された O 血清型は O25、CTX-M 型は CTX-M-14、phylogroup B2 に属する株が多かった。Clade 解析において 2008 年までは clade B に属する株が多く、その多くは CTX-M/EAEC であった。その後、clade は C1

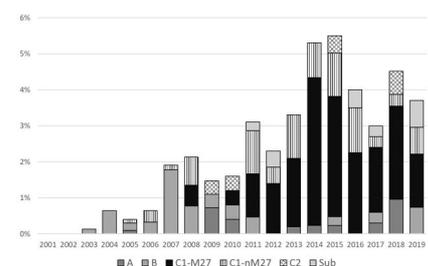


図2. ST131株におけるCladeの推移

を経て、2011 年以降は Clade C1-M27 が増加していた。

( 3 ) 研究 3 年目成果

鹿児島県で収集した小児下痢症患者由来の CTX-M 遺伝子保有大腸菌 355 株から、K1 莢膜遺伝子保有大腸菌 (CTX-M/K1 株) 43 株 (12.1%) を同定した。これらの各株の病原遺伝子保有状況、phylogroup、CTX-M タイプの検討を行った。CTX-M/K1 株は 43 株中 34 株 (79.1%) が 2011 年以降に検出された株であった。38 株 (88.4%) が phylogroup B2 に属し、phylogroup E が 3 株 (7%)、phylogroup A と D が 1 株 (2.3%) ずつであった。Phylogroup D の株は、EAEC の病原遺伝子も保有し CTX-M 型は 14 であった。CTX-M 型は、CTX-M-14 が 27 株 (63%)、CTX-M-15 が 6 株 (14%)、CTX-M-27 が 3 株 (7%) であり、CTX-M-14 と CTX-M-15 の hybrid type である CTX-M-64 が 2 株 (2015 年、2018 年) 検出された。これらの株は O78:H7 と OUT:H33 で、ともに phylogroup B2 に属していた。

CTX-M/K1 株は、一定頻度で継続的に検出され、2011 年以降の頻度はそれ以前より増加し、髄膜炎の原因となる大腸菌に多い O 血清型 O1/O18 の株や CTX-M 遺伝子の hybrid type、さらに DEC の病原遺伝子を獲得した株も出現していた。このことから、病原遺伝子を同時に保有する ESBL CTX-M 遺伝子保有株の推移を継続的にサーベイランスし、監視する必要があると考える。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shogo Otake, Takahiro Yamaguchi, Naoko Imuta, Junichiro Nishi, Masashi Kasai	4. 巻 62(8)
2. 論文標題 A case of polymicrobial bacteremia due to lung abscess after respiratory syncytial virus infection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatrics International	6. 最初と最後の頁 994-996
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ped.14220	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Imashioya T, Kodama Y, Ooka T, Nakagawa S, Nishikawa T, Tanabe T, Okamoto Y, Imuta N, Kirishima M, Tanimoto A, Koriyama T, Nishi J, Kawano Y.	4. 巻 25(12)
2. 論文標題 Liver abscess due to Sterigmatomyces halophilus in a boy with acute lymphoblastic leukemia.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Infect Chemother	6. 最初と最後の頁 1047-1049
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2019.05.21 IF 1.539	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Otake S, Yamaguchi T, Imuta N, Nishi J, Kasai M.	4. 巻 62(8)
2. 論文標題 A case of polymicrobial bacteremia due to lung abscess after respiratory syncytial virus infection.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatr Int	6. 最初と最後の頁 994-996
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ped.14220	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kato H, Yamaguchi H, Ito Y, Imuta N, Nishi J, Kasai M.	4. 巻 86(8)
2. 論文標題 Escherichia coli O157 enterocolitis followed by non-diarrheagenic Escherichia coli bacteremia.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Indian J Pediatr	6. 最初と最後の頁 750
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12098-019-02916-5. IF 1.136	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 石井茂樹、鈴東昌也、横山亮平、高村一成、日高倫子、山村桂子、大平智子、下之段秀美、盛武浩、蘭牟田直子、西順一郎、中谷圭吾	4. 巻 124
2. 論文標題 熱傷で外来管理中に市中型MRSAによるトキシックショック症候群を発症した男児例	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本小児科学雑誌	6. 最初と最後の頁 340-341
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 秋吉瑞希、堀江昭好、蘭牟田直子、西順一郎、成相昭吉	4. 巻 33
2. 論文標題 無荚膜型インフルエンザ菌による子宮内感染が疑われた新生児例	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 小児感染免疫	6. 最初と最後の頁 35-39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 蘭牟田直子、大岡唯祐、西 順一郎
2. 発表標題 腸管凝集性大腸菌 (EAEC) の遺伝的多様性とバイオフィーム形成能
3. 学会等名 第33回日本バイオフィーム学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 蘭牟田直子、児玉祐一、西 順一郎
2. 発表標題 腸管凝集性大腸菌 (EAEC) の遺伝的多様性 - ESBL CTX-M遺伝子保有クローンの変化 -
3. 学会等名 第51回日本小児感染症学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 蘭牟田直子、大岡唯祐、児玉祐一、吉家清貴、西 順一郎
2. 発表標題 下痢症患児由来大腸菌におけるESBL CTX-M遺伝子およびAmpC型 -ラクタマーゼCMY-2遺伝子保有大腸菌の頻度 2018年
3. 学会等名 第89回日本感染症学会西日本地方会学術集会 第62回日本感染症学会中日本地方会学術集会 第67回日本化学療法学会西日本支部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大岡唯祐、勢戸和子、小椋義俊、井口純、中村佳司、後藤恭宏、蘭牟田直子、本田己喜子、池田徹也、杉谷和加奈、今野貴之
2. 発表標題 新興下痢症起因菌Escherichia albertiiの0抗原合成系の多様性と遺伝子タイピング法の開発
3. 学会等名 第23回腸管出血性大腸菌感染症研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 蘭牟田直子、郡山豊泰、福山竜子、児玉祐一、大岡唯祐、吉家清貴、西順一郎
2. 発表標題 腸管凝集性大腸菌EAECの遺伝的多様性とその変化-2011～2018-
3. 学会等名 第31回日本臨床微生物学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 蘭牟田直子、中村隼人、大岡唯祐、西順一郎
2. 発表標題 小児腸管由来大腸菌におけるESBL CTX-M遺伝子保有大腸菌の頻度と病原遺伝子の検討 (2001～2019)
3. 学会等名 第95回日本感染症学会学術講演会 第69回日本化学療法学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村隼人、藺牟田直子、大岡唯祐、西順一郎
2. 発表標題 血液由来大腸菌による病原遺伝子とESBL CTX-M遺伝子の分布
3. 学会等名 第95回日本感染症学会学術講演会 第69回日本化学療法学会総会
4. 発表年 2021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
研究分担者	児玉 祐一 (KODAMA YUICHI)  (20535695)	鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・講師  (17701)	
研究分担者	西 順一郎 (NISHI JUNICHIROU)  (40295241)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授  (17701)	
研究分担者	大岡 唯祐 (OOOKA TADASUKE)  (50363594)	鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授  (17701)	

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
---------	---------