

令和 6 年 9 月 30 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08853

研究課題名（和文）*Bacillus cereus*ハイリスククローン感染症の病態および分布状況の解明研究課題名（英文）Clinical characteristic and molecular epidemiology of high-risk clone *Bacillus cereus* ST1420

研究代表者

鈴木 里和（Suzuki, Satowa）

国立感染症研究所・薬剤耐性研究センター・室長

研究者番号：30373400

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）：国内の医療機関での血流感染症より分離される*Bacillus cereus*はハイリスククローンと想定されたST1420以外の多様なST型が含まれており、*B. anthracis*に近縁とされるclade1のCereusIIIに属する株が多い傾向があり、食品分離株とは異なるものの、特定の系統株と血流感染との明確な相関は見いだせなかった。一方、*B. cereus*が血液検体より分離された症例の中に、検体採取時の汚染（contamination）の可能性が高い症例と、明らかな血流感染症を発症し、致命的となった劇症型*B. cereus*血流感染症があり、これらの病態を区別する必要性が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で収集した菌株の系統解析から、明確な相関は見いだせなかったものの、血流感染とST1420やST365 complexなど*B. anthracis*と近縁とされるclade1のCereusIIIとの関与を示唆する成果が得られた。また、我が国で*B. cereus*血流感染症が注目されやすい要因として、独自のST型が存在する可能性も示唆できた。*B. cereus*による血流感染症のなかに、軽症型と劇症型の異なる病態があることを自験例と文献から明らかにし、血流感染と特定の系統株との明確な相関が示せなかった要因の一つとして、これらを区別せずに解析した点が考えられ、病態を明確にした解析の重要性を示した。

研究成果の概要（英文）：*Bacillus cereus* isolated from bloodstream infections (BSI) at several hospitals in Japan, includes a variety of ST types other than the presumed high-risk clone ST1420. Although isolates belonging to CereusIII in clade1, which are closely related to *B. anthracis*, are relatively observed more often in BSI cases, no significant correlation was found between specific strain types and BSI. However, among cases where *B. cereus* was isolated from blood specimens, there were cases with a high possibility of contamination at the time of sampling, as well as cases clearly manifesting as severe BSI leading to fatal acute *B. cereus* infections. It became evident that distinguishing between these clinical conditions is necessary.

研究分野：感染症疫学

キーワード：*Bacillus cereus* 院内感染 血流感染

1. 研究開始当初の背景

2000年代以降、我が国では *B. cereus* 血流感染症の院内感染アウトブレイク事例や、*B. cereus* によるカテーテル関連血流感染症が問題となっており、そのリスク因子解析に関する臨床疫学研究が国内の研究者より多く報告されている。これらの報告では中心静脈カテーテルよりも末梢血管カテーテルの留置がリスクとしてあげられており、その要因として輸液製剤の pH 値の違いが示唆されているがそのみでの説明は困難である。加えて清拭タオルを含むリネン類の *B. cereus* による汚染が原因とされる事例も複数報告されているが、病院環境の汚染により血管カテーテルから *B. cereus* が侵入するのであれば、中心静脈カテーテルの留置の方が末梢血管カテーテルよりそのリスクが低いことには疑問が残る。

2016年に米国の医療機関において9か月間に5名の *B. cereus* による中枢神経感染症が発生し、うち4名が死亡した事例が報告された (Rhee et al. OFID 2016)。症例の多くが腹痛を訴え症例対照研究ではバナナとクランベリージュースの喫食が唯一の有意なリスクであった。元来 *B. cereus* は食中毒の原因細菌として認識されており、食品からも高頻度に分離される。末梢血管カテーテル留置患者は中心静脈カテーテル留置患者よりも経口摂取をしていることが多く、本邦の疫学研究では見落とされていた観点からの論文であった。*B. cereus* が食品などを介して病院環境を汚染し、さらに経口的に患者の体内に入ることによって腸管を侵入門戸とした血流感染症が発生している可能性が考えられた。一方、*B. cereus* は環境に広く存在することから、すべての系統株が腸管を経た血流感染を起こすわけではなく、Akamatsuらが報告したハイリスククローン ST1420 など特定の系統株の関与が示唆された。

2. 研究の目的

腸管を侵入門戸とした血流感染症の原因となるハイリスククローンを探索するために、血液など無菌検体と食品の両方より共通して分離されたり、院内感染などを起こしたりした *B. cereus* をハイリスククローンとし、臨床検体および食品検体由来の菌株を幅広く収集し、全ゲノム解析を実施しそれらの分布を明らかにする。また、血流感染の症例については臨床情報を収集しハイリスククローンとそれ以外における病態の違いを明らかにする。さらに、ハイリスククローンを検査室などで効率的に検出できる手法を生化学性状、MALDI Biotyper の質量分析波形などから検討する。

3. 研究の方法

研究協力医療機関および衛生試験所 (民間の検査センター) に依頼し、臨床検体および食品検体より分離された *B. cereus* を収集した。研究協力医療機関からは分離患者の基本情報およびアウトブレイク関連株の是非など疫学情報も併せて収集した。検査室では *Bacillus* 属として検出し、種レベルの同定が実施されていないことがあるため、分与された菌株は MYP 培地でスクリーニングをし、*B. cereus* group と一致するコロニー性状を示した菌株のみ詳細な解析に進めた。

対象菌株については、Illumina プラットフォームにて全ゲノム解析をもとに multilocus sequence typing (MLST) を実施した。さらに MLST シェーマに用いられる7つの allele の配列をすべて連結した concatenate 配列をもとに系統解析を実施した。

4. 研究成果

(1) 研究協力医療機関より送付された *B. cereus* group 36 株について全ゲノム解読を行った。解読した36株は、血流感染のアウトブレイク株14株(2施設由来)、非アウトブレイク株22株(3施設由来)で20株が無菌検体(血液・羊水)由来、残り13株が非無菌検体由来、3株は由来検体不明であった。全ゲノム解析と MLST シェーマに用いられる7つの allele の concatenate 配列をもとにした系統解析は上記36株の他に比較対照として Priest らが報告している菌株と日本国内の院内感染由来株84株の ST の配列を PubMLST の Web site より取得し、計120株で実施した。

系統解析から、Priest らの提案する clade 1、clade 2 (*B. thuringiensis*) に加え、それらに分類されない Others に分けられ、36株中22株(61%)が clade 1、11株(31%)が clade 2、3株(8%)が Others に分類された。無菌検体由来株は非無菌検体由来株に比べ、clade 1 の株が有意に多かった。(P=0.037)。ただし、血流感染のアウトブレイク由来14株がすべて clade 1 であり、これらを除く22株のみでは、無菌検体と非無菌検体で clade の分布に有意差は認めなかった (P=1.000)。

Priest らは clade 1 をさらに4群 (Cereus I, Cereus II, Cereus III, *B. anthracis*) に分類しているが、本解析で国内の分離株のみからなる群を認めたため、これを Cereus IV および

Cereus V とした。血流感染のアウトブレイク株 14 株は Cereus II (n=5), Cereus III (n=5), Cereus V (n=4) であった。非アウトブレイク株のうち clade 1 となった 8 株は Cereus II (n=3), Cereus IV (n=2), Cereus V (n=3) となり、Cereus III に含まれる株はなかった。アウトブレイク由来や無菌検体由来株は Cereus III 又は IV に多い傾向を認めたが、解析株数が少なく、統計学的有意差は認めなかった。さらに異なる医療機関の血流感染症由来 10 株の MLST 解析を実施したところ、10 株のうち 4 株は ST365-complex に属していた。

当初日本国内でのハイリスククローンと考えられた ST1420 は MLST シェーマにおける allele 番号では 62-1-93-109-55-102-210 となり ST365 の 34-1-32-1-18-33-24 とは allele 番号の一致数による分類である ST365-complex には属しない。しかし、7 つの allele をすべて連結し concatenate 配列の系統解析と Priest らの分類名に基づくと、ST1420 と ST365 complex はいずれも *B. anthracis* に近縁とされる clade1 の Cereus III に属していた。ST365 complex に属する株は国内の異なる地域の医療機関より散発的に分離されており、血流感染症の割合が高いことが示唆された。また ST365 complex に属する株のうち 2 株は新規 allele を含む新規 ST であった。

B. cereus 血流感染症や院内感染事例の報告は海外に比べ日本からが多いこと、ハイリスククローンとして報告された ST1420 も新規 ST であったことから、我が国特有の *B. cereus* 系統株が国内に広く存在し、感染症、特に血流感染を引き起こしている可能性が示唆された。さらに、今年度の臨床情報の収集から *B. cereus* の血流感染症は採血時の汚染との鑑別が困難な症例から、数日で死に至る転帰となる劇症型の症例に分かれ、この劇症型血流感染症と ST365-complex との関与が示唆された。今後はこれら劇症型血流感染症由来の菌株のゲノム配列上の特徴を明らかにし、病原因子および検出に有用な遺伝子配列の検証が必要であると考えられた。

研究期間が COVID-19 の流行と重なったため、当初予定していた地方衛生研究所との共同研究は見送り、また医療機関からも十分な数の菌株の収集および臨床情報の収集を実施することができなかった。そのため、食品由来の *B. cereus* group 菌株の収集は衛生検査所に依頼し、2018 年~2020 年にかけて国内の食品（詳細不明）より分離された 20 株について解析を実施した。20 株の ST は多様であったが、ST24 が 3 株と最も多く、ついで ST144、ST164、ST1571 がそれぞれ 2 株ずつであったが、その他の ST として ST26、ST142、ST160、ST611、ST1483、ST2163 が 1 株ずつとなった。また新規 ST が 5 株あった。食品由来株の多くが Priest らが分類している clade2 により近縁であり、患者由来株、とくに無菌検体由来株とは異なる系統の株であることが示唆された。医療機関での血流感染のハイリスククローンである ST1420 はこれらの食品分離株には存在しなかったが、1 株は Priest らが分類している clade 1 の Cereus III に比較的近縁であった。

国内の医療機関での血流感染症より分離される *B. cereus* は、ハイリスククローンと想定されていた ST1420 以外の多様な ST 型が含まれているものの、*B. anthracis* に近縁とされる clade1 の Cereus III に属する株が多く、かつ、ST365-complex との関与も示唆はされた。今後より症例数を積み重ねた検討が必要と考えられた。また血流感染症の症例は、検体採取時の汚染 (contamination) の可能性が高い症例と、劇症型 *B. cereus* 血流感染症例とが混在していた。本研究の当初の仮説であった消化管からの侵入による血流感染症を主に劇症型を引き起こすと考えられるが、同様の症例を文献的に検索すると、今回の研究において確認された症例も含め、血液疾患を基礎疾患に持つことの多いことが明らかとなった。剖検結果の報告がなされた症例においては、*B. cereus* の集簇を伴う消化管潰瘍を認め、従来の血管カテーテル以外が侵入門戸であることを示唆していた。今回特定の系統株と血流感染との明確な相関は見いだせなかった要因のひとつとして、血流感染症としている中に、検体採取時の汚染 (contamination) の可能性が否定できない軽症例から劇症型 *B. cereus* 血流感染症の多様病態が混在していたことが考えられた。今後、*B. cereus* 血流感染症の病態を分けた上での研究が必要と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名 Kobayashi Ayako, Higashi Hideaki, Shimada Tomoe, Suzuki Satowa | 4. 巻 5 |
| 2. 論文標題 Baseline and seasonal trends of Bacillus cereus and Bacillus subtilis from clinical samples in Japan | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Infection Prevention in Practice | 6. 最初と最後の頁 100272 ~ 100272 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.infpip.2023.100272 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Furuta Yoshikazu, Tsujinouchi Mai, Shawa Misheck, Zorigt Tuvshinzaya, Miyajima Yuya, Paudel Atmika, Suzuki Satowa, Higashi Hideaki | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Complete Genome Sequences of 24 Strains of Bacillus cereus Isolated from Nosocomial Infection and Bacteremia Cases in Japan | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements | 6. 最初と最後の頁 e01203-21 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mra.01203-21 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計0件

〔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 | 小林 彩香 (Kobayashi Ayako) (30962873) | 帝京大学・医学部・講師 (32643) | |

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 |
|---------|---------|