

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461589

研究課題名(和文) 小児由来の腸管凝集性大腸菌のゲノム解析を通じた病原・薬剤耐性遺伝子伝播機構の研究

研究課題名(英文) Transmission of virulence and antibiotic resistance genes among
Enteroaggregative Escherichia coli strains isolated from children

研究代表者

西 順一郎 (Nishi, Junichiro)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：40295241

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：わが国の腸管凝集性大腸菌(EAEC) 167株の系統解析を行い、5つの主要なクローンを同定した。その中には、尿路病原性大腸菌とのハイブリッド株で基質拡張型ラクタマーゼblaCTX-Mを高率に保有するO25:H4/ST131もみられた。小児腸管由来大腸菌におけるblaCTX-M陽性株の割合は2003年から増加し、2013年には10.7%に達した。blaCTX-M陽性大腸菌192株における病原遺伝子の割合は、EAEC aggR 19%、腸管病原性大腸菌(EPEC) eae 0.01%、K1莢膜neuC 15.1%だった。小児腸管内でblaCTX-Mと病原遺伝子の著明な水平伝播が起こっている。

研究成果の概要(英文)：We performed phylogenetic analysis of enteroaggregative Escherichia coli (EAEC) 167 strains isolated in Japan and found five major clones including an EAEC/UPEC (uropathogenic E. coli) hybrid clone O25:H4/ST131 possessing extend-spectrum beta-lactamase (ESBL) blaCTX-M gene. The incidence of blaCTX-M-positive strains among E. coli isolates from diarrheal children increases since 2013, and reached to 10.7% in 2013. Pathogenic genes among blaCTX-M-positive E. coli strains were as follows: EAEC aggR, 19%; EPEC (enteropathogenic E. coli) eae, 0.01%; K1 capsule gene neuC, 15.1%. These results suggest the pronounced horizontal transfer of blaCTX-M and pathogenic genes.

研究分野：感染症学

キーワード：Escherichia coli EAEC ESBL K1 capsule

1. 研究開始当初の背景

腸管凝集性大腸菌 (Enteroaggregative *Escherichia coli*, EAEC) は、腸管粘膜に凝集附着する乳幼児の主要な新興下痢原性大腸菌であるが、わが国ではまだ十分認識されていない。2011年に志賀毒素と基質拡張型ラクタマーゼ (ESBL) を産生するハイブリッド EAEC が欧州で大アウトブレイクを引き起こし、EAEC の重要性が強く認識された。EAEC の病原因子は、一部の株で特有の付着因子などが報告されているが、遺伝的多様性がきわめて大きく、ほとんどの株で明らかになっていない。我々は 1990 年代以降、200 株以上の EAEC を検出し、その 21% が ESBL 遺伝子を保有していることを見出している。また、小児下痢症患者由来大腸菌の中で ESBL 産生菌の占める割合は、年々増加していることを確認している。

2. 研究の目的

わが国で分離された EAEC の MLSA による系統解析を通じて、EAEC の新たな病原因子の解明と ESBL 遺伝子の伝播機構の解明、さらには下痢原性大腸菌の薬剤耐性化予防の基盤づくりを目的とする。また、小児腸管由来 ESBL 産生大腸菌における病原遺伝子の検出頻度を検討し、薬剤耐性菌の病原性を明らかにする。

3. 研究の方法

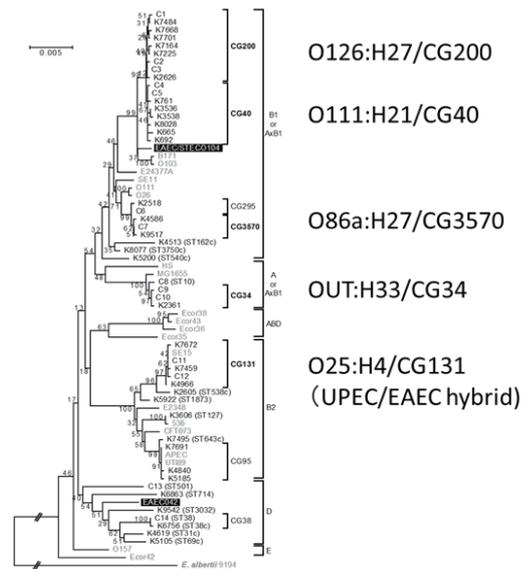
2001 年から 2010 年に鹿児島県の小児下痢症患者および大阪府公衆衛生研究所で分離された転写因子遺伝子 *aggR* を有する typical EAEC167 株を対象に、multilocus sequence type (MLST) による系統解析と PCR による病原遺伝子の解析を行った。また 2003 年から 2013 年に鹿児島県の小児から分離された ESBL 遺伝子 (*bla_{CTX-M}*) 陽性大腸菌 192 株を対象に、下痢原性大腸菌の病原遺伝子と新生児髄膜炎関連大腸菌 (NMEC) にみられる K1 莢膜遺伝子 *neuC* の分布を検討した。

4. 研究成果

(1) EAEC の系統解析 (図 1)

EAEC の MLST による系統解析では、系統群 B1 に属する O111:H21/clonal group 40 (CG40)、O126:H27/CG200、O86a:H27/CG3570 および OUT:H33/CG34 の 4 つがわが国における歴史的な EAEC のクローンであることがわかった。また系統群 B2 に属する EAEC O25:H4/CG131 が 2003 年から新たに出現し、ESBL (*CTX-M*) を高率に産生していた。さらに、EAEC O25:H4/CG131 は、世界的に蔓延している尿路病原性大腸菌 (uropathogenic *E. coli*, UPEC) O25:H4/ST131 が EAEC の病原プラスミドを獲得したハイブリッド株であることが示唆された。

図1 AggR陽性EAEC169株の系統解析

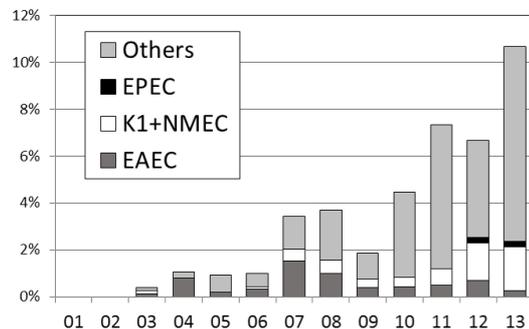


(2) ESBL 産生大腸菌の頻度と病原遺伝子の分布 (図 2)

bla_{CTX-M} 保有大腸菌は 2003 年に出現し、その後年々増加し 2013 年には 10.7% に達した。CTX-M 型は、14 (62%)、27 (16%)、15 (12%) の順に多かった。*bla_{CTX-M}* 陽性株 192 株中、EAEC の *aggR* を 19% (36 株) が保有し、その O 血清群は UPEC に多い O25 から 2011 年以降本来の EAEC に多い O111 に移行した。さらに 2012 年には、腸管病原性大腸菌 (EPEC) の付着遺伝子 *eae* 保有株が 2 株出現した。K1 莢膜遺伝子 *neuC* は 15.1% (29 株) にみられ、髄膜炎原因菌に多い K1 大腸菌 O1 と O18 が 11 年から増加した。

以上の結果から、EAEC を中心とする小児腸管内大腸菌において *bla_{CTX-M}* や病原遺伝子の顕著な水平伝播が示唆され、便由来大腸菌の病原遺伝子と薬剤耐性遺伝子の水平伝播の監視が重要と考えられた。

図2 下痢症患者由来大腸菌におけるESBL産生株の割合と病原遺伝子の分布



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 10 件)

1. Imuta N, Ooka T, Seto K, Kawahara R, Koriyama T, Kojoyo T, Iguchi A, Tokuda K, Kawamura H, Yoshiie K, Ogura Y, Hayashi T, Nishi J. Phylogenetic analysis of enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) isolates from Japan reveals emergence of CTX-M-14-producing EAEC O25:H4 clones related to sequence type 131. *J Clin Microbiol* (査読有) 54(8):2128-2134, 2016
 2. Yoshida M, Nakanaga K, Ooka T (他 7 名, 5 番目) Complete Genome Sequence of *Mycobacterium ulcerans* subsp. shinshuense. *Genome Announc* (査読有) 4(5), 2016,
 3. Garcia BG, Ooka T (他 10 名, 2 番目) Genetic relatedness and virulence properties of enteropathogenic *Escherichia coli* strains of serotype O119:H6 expressing localized adherence or localized and aggregative adherence-like patterns on HeLa cells. *Int J Med Microbiol* (査読有) 2016;306(3):152-164
 4. Tajiri H, Nishi J, Ushijima K, Shimizu T, Ishige T, Shimizu M, Tanaka H, Brooks S. A role for fosfomycin treatment in children for prevention of hemolytic uremic syndrome accompanying Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection. *Int J Antimicrob Agents* (査読有) 46(5):586-589, 2015
 5. Ooka T, Ogura Y, Katsura K, Seto K, Kobayashi H, Kawano K, Tokuoka E, Imuta N, Nishi J Defining the genome features of *Escherichia albertii*, an emerging enteropathogen closely related to *Escherichia coli*. (他 22 名, 1・16・17 番目) *Genome Biol Evol* (査読有) 7(12):3170-3179, 2015
 6. Ogura Y, Mondal SI, Ooka T (他 8 名, 7 番目) The Shiga toxin 2 production level in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is correlated with the subtypes of toxin-encoding phage. *Sci Rep* (査読有) 5:16663, 2015
 7. Murakami K, Etoh Y, Tanaka E, Ichihara S, Ooka T (他 4 名, 7 番目) Shiga toxin 2f-producing *Escherichia albertii* from a symptomatic human. *Jpn J Infect Dis* (査読有) 67(3):204-208, 2014
 8. Kusumoto M, Fukamizu D, Ogura Y, Yoshida E, Yamamoto F, Iwata T, Ooka T, Akiba M, Hayashi T. Lineage-specific distribution of insertion sequence excision enhancer in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from swine. *Appl Environ Microbiol* (査読有) 80(4):1394-1402, 2014
 9. Iguchi A, Ooka T (他 14 名, 4 番目) *Genome Biol Evol* (査読有) *Genome evolution and plasticity of *Serratia marcescens*, an important multidrug-resistant nosocomial pathogen.* 6(8):2096-2110, 2014
 10. Hinenoya A, Ooka T (他 8 名, 6 番目) Molecular characterization of cytolethal distending toxin gene-positive *Escherichia coli* from healthy cattle and swine in Nara, Japan. *BMC Microbiol* (査読有) 14:97, 2014
- 〔学会発表〕(計 10 件)
1. 藺牟田直子, 徳田浩一, 西 順一郎. 小児の便由来大腸菌における ESBL 産生 K1 莢膜保有株の割合第 48 回日本小児感染症学会総会 2016.10.19-20 岡山コンベンションセンター(岡山県・岡山市)
 2. Imuta N, Ooka T, Yoshiie K, Nishi J. Variation of biofilm forming ability of aggR-positive *Escherichia coli* strains. The 116th General Meeting of the American Society for Microbiology, 2016.6.16-20, Boston (USA).
 3. 藺牟田直子, 川村英樹, 徳田浩一, 西 順一郎. 下痢症患者由来大腸菌における ESBL (CTX-M) 遺伝子保有頻度の年次推移 第 64 回日本化学療法学会総会 2016.6.9-11 神戸国際会議場・神戸ポートピアホテル(兵庫県・神戸市)
 4. 西 順一郎, 藺牟田直子, 川村英樹, 徳田浩一. 下痢症患者由来大腸菌における K1 莢膜遺伝子と ESBL (CTX-M) 遺伝子の分布. 第 64 回日本化学療法学会総会 2016.6.9-11 神戸国際会議場・神戸ポートピアホテル(兵庫県・神戸市)
 5. 藺牟田直子, 大岡唯祐, 古城 剛, 郡山豊泰, 徳田浩一, 川村英樹, 吉家清貴, 西 順一郎. 下痢症患者由来大腸菌における K1 莢膜遺伝子の分布 第 90 回日本感染症学会総会・学術講演会 2016.4.15-16 仙台国際センター・新展示施設(宮城県・仙台市)
 6. 藺牟田直子, 大岡唯祐, 吉家清貴, 西 順一郎. 下痢症患者由来大腸菌における腸管凝集性大腸菌 EAEC と ESBL 産生大腸菌の動向(2011~2013)第 89 回日本細菌学会総会 2016.3.23-25 大阪国際交流センター(大阪府・大阪市)
 7. Imuta N, Ooka T, Seto K, Yoshiie K, Nishi J. Genetic heterogeneity of AggR-positive enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC); emergence of EAEC/UPEC O25:H4:ST131 producing ESBL. The 115th General Meeting of the American Society for Microbiology, 2015.6.1-3, New Orleans (USA).
 8. Imuta N, Ooka T, Seto K, Yoshiie K,

- Ogura Y, Hayashi T, Nishi J. Genetic heterogeneity of AggR-positive enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC): emergence of EAEC/UPEC O25:H4:ST131 producing ESB. 第 88 回日本細菌学会総会 2015.3.26-28 長良川国際会議場 (岐阜県・岐阜市)
9. 藺牟田直子、徳田浩一、西 順一郎 . 下痢原性大腸菌の薬剤耐性化 - ESBL 産生腸管凝集性大腸菌 (EAEC) . 第 46 回日本小児感染症学会総会・学術集会 2014.10.18-19、京王プラザホテル (東京都)
10. Nishi J, Imuta N, Tokuda K, Yoshiie K. Molecular epidemiological analysis of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC). The 114th General Meeting of the American Society for Microbiology, 2014.5.17-20, Boston (USA).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
特になし

〔その他〕
ホームページ
<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~bacterio/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

西 順一郎 (NISHI Junichiro)
鹿児島大学・医歯学域医学系・教授
研究者番号：40295241

(2)研究分担者

大岡 唯佑 (OOKA Tadasuke)
鹿児島大学・医歯学域医学系・講師
研究者番号：50363594

藺牟田 直子 (IMUTA Naoko)
鹿児島大学・医歯学域医学系・助教
研究者番号：00643470