

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791143

研究課題名(和文)高病原性を示す肺炎桿菌臨床分離株の遺伝学的特徴と病原因子に関する研究

研究課題名(英文) Analysis on the genetic characteristics and virulence factors of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* isolates from clinical samples

研究代表者

原田 壮平 (HARADA, Sohei)

東邦大学・医学部・非常勤研究生

研究者番号：30591630

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：本邦の高病原性の肺炎桿菌の疫学、病態について研究した。他国で高病原性の肺炎桿菌として注目されている莢膜遺伝子型K1株およびK2株、*rmpA*遺伝子保有株が本邦の臨床分離株においても稀ならず存在していることを示した。また、本邦のK1株は全国各地に拡散しているにも関わらず、遺伝学的同一性が高いことを解明した。加えて、血液培養から分離された侵襲性感染症起因菌株に限定しても、これらの高病原性株の頻度は臨床分離株全体を対象とした場合と大差がないことを確認した。また、本邦で分離されたK1株を用いたBalb/cマウス感染モデルの検討を行い、ヒトと類似の肝膿瘍に至る感染モデルが再現可能であることを示した。

研究成果の概要(英文)：I explored the epidemiology and pathogenesis of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* infection. *K. pneumoniae* isolates of capsular genotype K1 and K2 and isolates carrying *rmpA* gene, which have been identified as hypervirulent strains in other countries, were not rare among clinical isolates in Japan. Despite isolation from different geographic regions, K1 isolates in Japan showed high genetic relatedness. The proportion of the hypervirulent strains mentioned above in *K. pneumoniae* isolates recovered from blood was similar to that of hypervirulent strains in clinical isolates from various body sites. I performed experiment of Balb/c mouse model of infection with K1 strains isolated in Japan and established the model of infection accompanying the formation of liver abscess similar to the infection in human caused by these strains.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：肺炎桿菌 莢膜血清型 病原因子 MLST パルスフィールドゲル電気泳動 rep-PCR

## 1. 研究開始当初の背景

肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*) は感染症の起原菌として高頻度に分離される臨床的重要性の高い微生物である。肺炎桿菌の病原因子としては莢膜多糖体、リポ多糖、アドヘジン、シデロフォアなどが知られている。中でも莢膜多糖体は主要な病原因子と考えられており、77 の血清型に分類される。臨床で分離される肺炎桿菌における各莢膜血清型の頻度は地域・国ごとに差があるが、世界的には尿路感染症、肺炎、菌血症患者から分離される株では莢膜血清型 2 型 (以下、K2) が最多の頻度と考えられている。

台湾では 1990 年頃から市中発症の肺炎桿菌による原発性肝膿瘍の症例が増加し、これらの多くは敗血症を伴い、時に播種性の髄膜炎や眼内炎を伴うなど重症の病態を呈した。起原菌株の分子生物学的な解析を経て、この病態の起原微生物は主に莢膜血清型 1 型 (以下、K1) の肺炎桿菌と考えられている。また、K2 株や莢膜外多糖体合成の調節遺伝子である *rmpA* の保有株も重要とする報告もあるが基礎的検討は十分でない。また、K1 株、K2 株の中でも Multilocus Sequence Typing (以下、MLST) で分類された Clonal complex ごとに病原遺伝子保有頻度やマウスに対する致死性が異なることが知られている。

本邦における K1 株による市中の原発性肝膿瘍の報告は散発的なものにとどまり、その疫学の詳細は不明である。研究代表者の所属する研究室では東京都内の 2 大学病院で 2004 ~ 2006 年に分離された肺炎桿菌 104 株の解析を行い、K1 株が 11 株 (10.5%) 存在することを確認した (渋谷理恵ら、臨床微生物学会、2007)。また、研究代表者らは東京都内において 2 年間の間隔をあけて共に基礎疾患の無い 50 歳代および 20 歳代の同居中の父子に発症した肺炎桿菌による市中発症の肝膿瘍症例の起原菌株の解析を行い、両起原菌株はパルスフィールドゲル電気泳動 (以下、PFGE) で同一パターンを示し、MLST で ST23、病原遺伝子 *allS*, *rmpA*, *mrkD*, *kfu* を有するという台湾の肝膿瘍発症株と共通の特徴を有していることを確認した (Harada S et al. J Clin Microbiol, 2011)。これらの結果から、本邦の臨床分離株において K1 株が比較的高頻度に存在し、感染症臨床に大きな影響を及ぼしている可能性を考えた。

## 2. 研究の目的

- (1) 本邦の肺炎桿菌臨床分離株の分子生物学的特徴付け

台湾で 1993-1997 年に臨床分離された肺炎桿菌 1000 株のうち K1 株が占める割合は 21.7% であったと報告されている (Fung CP et al. J Infect Dis, 2000) のに対して欧米各

地で 1980 年前後に収集された肺炎桿菌 703 株のうち K1 株の占める割合は 1.5% (Cryz SJ Jr et al. J Clin Microbiol, 1986) と大きな差が認められている。この K1 株の分離頻度の違いが、地域ごとの肺炎桿菌感染症の臨床像の違いと関連している可能性がある。また、近年は韓国でも K1 株による肝膿瘍の増加が報告されており、これらの分離株のほとんどが ST23 である (Chung DR et al. J Clin Microbiol, 2008)。

ここまで述べた背景から、本邦の肺炎桿菌臨床分離株における K1 株、K2 株、*rmpA* 保有株の頻度や、これらのクローナリティー、病原遺伝子保有パターンを解析することは有意義であると判断した。

- (2) 本邦の肺炎桿菌分離株を用いたマウス感染モデルの検討

これまで、主に台湾で分離された肺炎桿菌の高病原性株の基礎的検討において、腹腔内投与などによるマウス感染モデルが用いられてきた。本邦の分離株が仮に他国の高病原性株と同一の莢膜血清型や病原因子保有パターンを有していても、検討の対象となっていない菌側因子の影響により異なる病態を呈する可能性がある。今後、本邦の臨床分離株を用いて、各病原因子の病態への貢献などの基礎的な検討を行うことを想定し、本邦の分離株を用いたマウス感染モデルの確立が必要であると考えられた。

- (3) 本邦の肺炎桿菌侵襲性感染症の臨床像と、起原菌株の分子生物学的特徴の関連の解析

肺炎桿菌の臨床分離株には実際に感染症の起原菌株となっているものと、起原菌株とはなっていないが検査部位に偶発的に定着していたものが含まれる。これらを正確に区別するためには各症例の状況を詳細に確認する必要があり、収集菌株の由来患者の後ろ向きのカルテレビューでは困難である。そこで、ほぼ確実に侵襲性感染症の起原菌株と判断できる血液培養の検出株に限定して前向きに肺炎桿菌菌株を収集して分子生物学的解析を行うとともに、由来患者の臨床情報を加えて解析することで本邦の肺炎桿菌侵襲性感染症の臨床像の把握と、起原菌株の特徴づけが可能と考えた。

## 3. 研究の方法

- (1) 本邦の肺炎桿菌臨床分離株の分子生物学的特徴付け

・ 対象菌株の収集と同定菌種の確認

2008 年 1-9 月に日本全国の 51 医療機関から臨床分離された肺炎桿菌 294 株を収集した。肺炎桿菌株の同定は各医療機関の自動機器

に依存していたため、すべての収集株について、遺伝学的手法（16S-23S ITS の PCR）と生化学反応（マロン酸試験と VP 試験）を施行し、正確な肺炎桿菌の同定を図った。

- ・ cps genotyping PCR による K1 株, K2 株の同定  
 莢膜多糖体の合成に関与するオペロン（以下、cps）上の血清型特異的な 2 遺伝子（wzy, wzx）を増幅するプライマーペアを用いた cps genotyping PCR (Fang et al. Clin Infect Dis, 2007) により収集株から K1 株, K2 株を同定した。

- ・ K1 株, K2 株の MLST, PFGE, rep-PCR によるクローナリティー解析  
 MLST Pasteur Web site (<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/>) に記載された方法で K1 株, K2 株の MLST を行った。また、PFGE, DiversiLab システムを用いた rep-PCR (Healy M et al. J Clin Microbiol, 2005) によるクローナリティー解析を実施した。

- ・ K1 株, K2 株の病原遺伝子の保有の確認  
 既報の 9 つの病原遺伝子 (*rmpA*, *fimH*, *kfu*, *cf29a*, *uge*, *wabG*, *allS*, *mrkD*, *ureA*) の保有の有無について、特異的プライマーを用いた PCR で確認した (Brisse S et al. PLoS One, 2009)。

- ・ *rmpA* 遺伝子保有株の同定  
 K1 株, K2 株以外の *rmpA* 保有株を特異的プライマーを用いた PCR で同定した。

(2) 本邦の肺炎桿菌分離株を用いたマウス感染モデルの検討

- ・ K1 株を用いたマウス感染実験  
 研究代表者が以前の研究 (Harada S et al. J Clin Microbiol, 2011) で得た市中発症の原発性肝膿瘍起因菌株である TUM9518 株 (K1, *rmpA* (+)) と、(1) で得られた K1 株である 1-11 株 (K1, *rmpA*(-)) を、6 週齢の Balb/c マウス 5 匹に 10<sup>4</sup> CFU の腹腔内投与を行い、2 週間の観察を行った。

(3) 本邦の肺炎桿菌侵襲性感染症の臨床像と、起因菌株の分子生物学的特徴の関連の解析

- ・ 参加施設の倫理委員会承認  
 全国 23 施設において、血液培養から検出された肺炎桿菌の収集と解析、由来患者の臨床情報の抽出について、倫理委員会承認を得た。

- ・ 対象菌株と臨床情報の収集  
 2013 年 12 月から 2014 年 3 月に全国 23 施設で血液培養から検出された肺炎桿菌

株のうちで患者の同意が得られたものを収集した。また、由来患者の患者背景（基礎疾患、免疫不全の有無など）、発症状況（市中、院内、医療関連）、感染臓器、感染症の重症度などの臨床情報を収集した。

- ・ 収集菌株からの K1 株, K2 株, *rmpA* 陽性株の同定

収集菌株に対して cps genotyping PCR および *rmpA* 遺伝子特異的プライマーを用いた PCR により、K1 株, K2 株, *rmpA* 陽性株を同定した。

- ・ 収集菌株の全ゲノム解析  
 収集菌株の MLST と耐性遺伝子スクリーニングを意図して、全ゲノム解析を実施した。Nextera XT DNA Sample Prep Kit (Illumina, San Diego, CA, USA) でシーケンズライブラリーを準備し、MiSeq sequencer (Illumina) を用いてシーケンシングを行った。

#### 4. 研究成果

(1) 本邦の肺炎桿菌臨床分離株の分子生物学的特徴付け

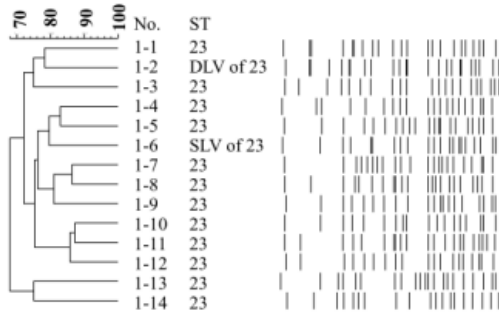
全国から収集された肺炎桿菌臨床分離株のうちで遺伝学的手法（16S-23S ITS の PCR）と生化学反応（マロン酸試験と VP 試験）により、真に肺炎桿菌と同定されたのは 259 株であった。これらのうちで、K1 株は 14 株, K2 株は 16 株, *rmpA* 陽性株は 42 株（うち、K1 株は 12 株, K2 株は 8 株）であった。

【表 K1 株の分離地域, ST type, 病原遺伝子保有パターン】

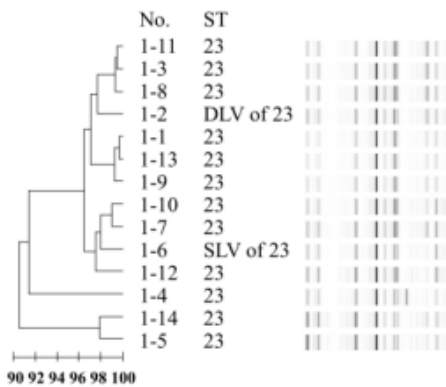
No.	地域	ST	<i>fim</i>	<i>kfu</i>	<i>uge</i>	<i>wabG</i>	<i>allS</i>	<i>mrkD</i>	<i>cf29a</i>	<i>ureA</i>	<i>rmpA</i>
1-1	関東	23	+	+	+	+	+	+	-	+	+
1-2	中部	DLV of 23	+	+	+	+	+	+	-	+	+
1-3	九州	23	+	+	+	+	+	+	-	+	+
1-4	四国	23	+	+	+	+	+	+	-	+	+
1-5	東北	23	+	+	+	+	+	+	-	+	+
1-6	九州	SLV of 23	+	+	+	+	+	+	-	+	+
1-7	関東	23	+	+	+	+	+	+	-	+	+
1-8	中国	23	+	+	+	+	+	+	-	+	+
1-9	九州	23	+	+	+	+	+	+	-	+	+
1-10	関東	23	+	+	+	+	+	+	-	+	+
1-11	東北	23	+	+	+	+	+	+	-	+	-
1-12	中部	23	+	+	+	+	+	+	-	+	-
1-13	中国	23	+	+	+	+	+	+	-	+	+
1-14	東北	23	+	+	+	+	+	+	-	+	+

K1 株は全国各地から分離されていたにもかかわらず、14 株中 12 株は ST23 であり、残りの株も 1 株は ST23 の single locus variant (SLV)、1 株は ST23 の double locus variant (DLV) であり、相同性が高いことが示唆された。また、病原遺伝子の保有パターンも 2 株で *rmpA* 遺伝子を欠いていたほかはすべての株で同一のパターンを示していた。

【図 K1 株の PFGE 結果とデンドログラム】



【図 K1 株の rep-PCR 結果とデンドログラム】



PFGE および rep-PCR による相同性解析でも、K1 株 14 株は高い相同性を示した。

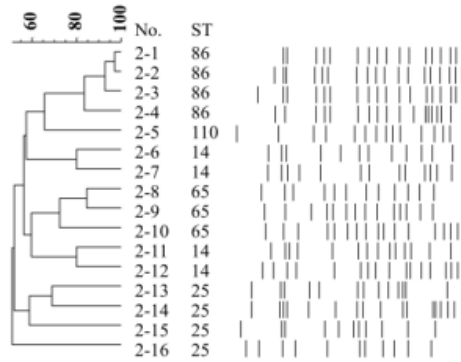
【表 K2 株の分離地域, ST type, 病原遺伝子保有パターン】

No.	地域	ST	<i>fim</i>	<i>kfu</i>	<i>uge</i>	<i>wabG</i>	<i>allS</i>	<i>mrkD</i>	<i>cf29a</i>	<i>ureA</i>	<i>rmpA</i>
2-1	九州	86	+	-	+	+	-	+	-	+	+
2-2	九州	86	+	-	+	+	-	+	-	+	+
2-3	関東	86	+	-	+	+	-	+	-	+	+
2-4	東北	86	+	-	+	+	-	+	-	+	+
2-5	近畿	110	+	-	+	+	-	+	-	+	-
2-6	関東	14	+	+	+	+	-	+	-	+	-
2-7	関東	14	+	+	+	+	-	+	-	+	-
2-8	中国	65	+	-	+	+	-	+	-	+	+
2-9	四国	65	+	-	+	+	-	+	-	+	+
2-10	関東	65	+	-	+	+	-	+	-	+	+
2-11	四国	14	+	+	+	+	-	+	-	+	-
2-12	中部	14	+	+	+	+	-	+	-	+	-
2-13	関東	25*	+	-	+	+	-	+	-	+	-
2-14	中部	25*	+	-	+	+	-	+	-	+	-
2-15	九州	25*	+	-	+	+	-	+	-	+	-
2-16	関東	25*	+	-	+	+	+	+	-	+	+

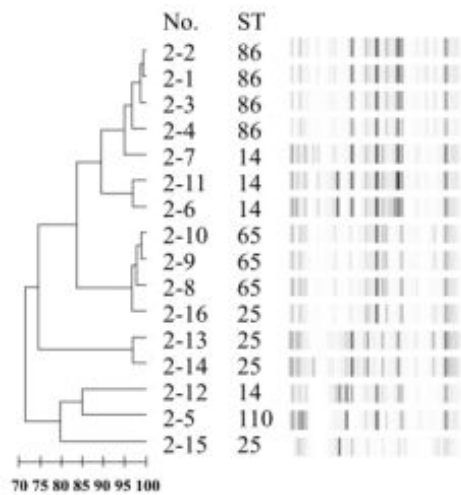
K2 株も全国各地で分離されていた。K1 株とは異なり、K2 株は MLST で ST65 のグループ (ST25 は ST65 の SLV である) 7 株、ST14 4 株、ST86 4 株、ST110 1 株に分かれた。

同一の ST type の菌株はそれぞれ同一の病原遺伝子保有パターンを示していたが、ST25 の株で 1 株 (2-16) のみ例外が認められた。

【図 K2 株の PFGE 結果とデンドログラム】



【図 K2 株の rep-PCR 結果とデンドログラム】



PFGE および rep-PCR による相同性解析では、K2 株は全体としては K1 株と比較して低い相同性であった。K2 株の同一の ST type の株同士は比較的高い相同性を示していた。

K1 株と K2 株を合わせた PFGE および rep-PCR による相同性解析結果を EpiCompare v1.0 (<http://www.ridom.de/epicompare/>) で比較したところ、PFGE における 70%以上の相同性というカットオフは、rep-PCR における 95%以上の相同性というカットオフと比較的高い一致率を示していた (Adjusted Rand's coefficient: 0.675, Wallace's coefficient 1: 0.692, Wallace's coefficient 2: 0.771)。

(2) 本邦の肺炎桿菌分離株を用いたマウス感染モデルの検討

K1 の *rmpA* 遺伝子保有株 TUM9518 株) と(1)で得られた K1 の *rmpA* 遺伝子非保有株 1-11 株を用いて、マウス感染実験を行った。6 週齢の Balb/c マウス 5 匹に  $10^4$  CFU の腹腔内投与を行い、2 週間の観察を行った。結果、両群ともにほぼすべてのマウスが死亡し、

*rmpA* 遺伝子保有株投与群ではびまん性肝膿瘍形成が見られたのに対して、*rmpA* 遺伝子非保有株投与群では、微小肝膿瘍の散発を認めた。以上から、同プロトコールにより対象菌株の腹腔内投与から肝膿瘍に至る感染実験が可能であることが確認され、投与菌量の調整や肝の肉眼的、顕微鏡的観察により各菌株の病原性評価が可能であることが示唆された。

(3) 本邦の肺炎桿菌侵襲性感染症の臨床像と、起因菌株の分子生物学的特徴の関連の解析

倫理委員会承認を得られた 23 施設において 2013 年 12 月から 2014 年 3 月の期間に血液培養から肺炎桿菌が検出された患者のうち本人あるいは代諾者の了承が得られた例は 148 例であった。収集された血液培養由来の肺炎菌株のうち、8 株が K1 株、9 株が K2 株、19 株が *rmpA* 遺伝子保有株（うち、K1 株は 7 株、K2 株は 6 株）であった。(1)で示した様々な部位から臨床分離された肺炎桿菌の疫学と顕著な差異は認められなかった。収集株についてはさらに全ゲノムシーケンシングを実施しており、今後、得られたゲノム情報から Multilocus sequence typing による ST type の決定、主要病原因子プロファイルの確認、耐性遺伝子保有の確認を行う予定である。さらにこれらの菌株遺伝子情報と臨床情報との照らし合わせにより、臨床像との関連を解析する予定である。

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)

[学会発表](計 2 件)

1. Harada S, Ishii Y, Saga T, Kouyama Y, Koguchi S, Tateda K: Molecular epidemiology and virulence gene profiles of *Klebsiella pneumoniae* isolates of capsular genotype K1 and K2 in Japan. IDWeek 2012, San Diego, USA, 2012.10.20
2. 原田 壮平, 石井 良和, 館田 一博. 本邦で臨床検体より分離された莢膜血清型 1 型, 2 型に属する肺炎桿菌株の遺伝学的解析. 第 54 回日本感染症学会中日本地方会学術集会, 奈良, 2011.11.24

6 . 研究組織

(1)研究代表者

原田 壮平 (HARADA, Sohei)  
東邦大学・医学部・非常勤研究生  
研究者番号：30591630

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし