

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08161

研究課題名(和文) 小児腸管内バイオフィーム形成大腸菌が薬剤耐性遺伝子の水平伝播を促進する機構の解明

研究課題名(英文) Horizontal transmission of antimicrobial gene among biofilm-producing Escherichia coli in the intestine of children

研究代表者

西 順一郎 (Junichiro, Nishi)

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：小児下痢症患者由来大腸菌(2001-2019年)から検出したESBL CTX-M遺伝子保有株354株のうち、バイオフィーム形成に重要なAggR遺伝子を保有する腸管凝集性大腸菌(typical EAEC)が41株(11.6%)、侵襲性に関わるK1莢膜遺伝子保有株が43株(12.1%)みられた。また、バイオフィーム形成能をもつAggR遺伝子非保有のatypical EAEC 143株(2011-2019年)のうち、CTX-M遺伝子保有株は9株(6.3%)、プラスミド性AmpC型-ラクタマーゼ遺伝子保有株が1株(0.7%)みられ、このうち2株(22.2%)がK1莢膜遺伝子を保有していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児下痢症患者由来大腸菌から検出されるESBL(基質特異性拡張型-ラクタマーゼ)産生菌のうちバイオフィーム形成能の強い腸管凝集性大腸菌(typical EAEC)が11.6%を占め、またこれまで注目されていないatypical EAECにも薬剤耐性遺伝子保有大腸菌がみられることが明らかになった。また、これらの株の中には侵襲性に関わるK1莢膜遺伝子を一定の割合で保有していた。小児の腸管内で薬剤耐性遺伝子と病原遺伝子の水平伝播が活発に進んでおり、今後薬剤耐性遺伝子と病原遺伝子を併せ持った病原性の強い大腸菌の出現が懸念されるため、これらの株を選択しないよう小児への経口抗菌薬の適正使用が望まれる。

研究成果の概要(英文)：Among a total of 354 ESBL (extended-spectrum -lactamase) CTX-M gene-positive Escherichia coli strains from diarrheal children in Kagoshima (2001-2009), 41 strains (11.6%) of biofilm-producing AggR-positive enteroaggregative E. coli and 43 strains (12.1%) of invasive K1 capsular gene-positive strains were detected. Furthermore, among a total of 143 biofilm-producing atypical EAEC without AggR (2011-2019), nine strains (6.3%) of ESBL CTX-M gene-positive E. coli and one strains (0.7%) of plasmid-borne AmpC -lactamase gene-positive E. coli were detected, of which one strain (11.1%) possessed the K1 capsular gene.

研究分野：細菌学

キーワード：大腸菌 基質特異性拡張型-ラクタマーゼ 腸管凝集性大腸菌(EAEC) CTX-M K1莢膜遺伝子 バイオフィーム

1. 研究開始当初の背景

基質特異性拡張型 -ラクタマーゼ (ESBL) 産生をはじめとする大腸菌の薬剤耐性化は、小児感染症診療でも重大な課題であるが、抗菌薬適正使用の普及にも関わらず改善の兆しがみられない。我々は2001年からの小児腸管由来大腸菌株の解析で、下痢原性大腸菌のひとつである腸管凝集性大腸菌 (EAEC) の一部が、ESBL 産生大腸菌の出現当初から継続して ESBL CTX-M 遺伝子を保有していたことを報告した。EAEC は乳幼児が感染・保菌しやすく、またバイオフィーム形成能が高く付着性が強いいため集団保育で広がり、ESBL 遺伝子伝播のリザーバーとなっていると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、薬剤耐性菌出現の新規予防薬開発につなげることをめざし、ESBL CTX-M 産生腸管凝集性大腸菌 (EAEC) 株をモデルとして、バイオフィーム産生菌が薬剤耐性遺伝子の水平伝播の実態を明らかにし、それを促進するメカニズムを解明することを目的とする。また、当初の予定にはなかったが、バイオフィーム形成能をもつがこれまであまり注目されていなかった atypical EAEC や血液由来大腸菌にも着目し、その中の薬剤耐性遺伝子や病原遺伝子の頻度についても明らかにすることとした。

3. 研究の方法

(1) 対象菌株

2001～2019年に鹿児島市内の小児科診療所から通常の診療で鹿児島市医師会検査センターに提出された便培養検査で検出されたすべての大腸菌 9,525 株から検出された ESBL CTX-M 遺伝子陽性 354 株

2011～2019年に検出された AggR 遺伝子非保有の腸管凝集性大腸菌 (atypical EAEC) 143 株

鹿児島大学病院で 2019～2022年に検出された血液由来大腸菌 135 株

(2) PCR による ESBL 遺伝子・病原遺伝子の検出

パソタイプ	対象遺伝子
薬剤耐性 ESBL CTX-M AmpC 型	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{shv} <i>bla</i> _{CMY-2}
下痢原性大腸菌 (DEC)	EPEC: <i>eeae</i> , <i>bfp</i> ; ETEC: <i>st. 1t</i> ; EIEC: <i>ipaH</i> ; EHEC, <i>stx1</i> , <i>stx2</i> ; DAEC: <i>daa</i> ; CTEC: <i>cdtB</i> , EAEC: <i>aggR</i> , <i>aatA</i> , <i>aap</i> , <i>aaf aafA</i> , <i>agg3A</i> , <i>hdaA</i> , <i>agg5A</i> , <i>pet</i> , <i>astA</i> , <i>sepA</i> , <i>sat</i> , <i>pic</i> , <i>aaic</i>
尿路病原性大腸菌 (UPEC)	S fimbriae (<i>sfa</i>), P-fimbriae (<i>pap</i>), afimbrial adhesin (<i>afa</i>), cytotoxic necrotizing factor (<i>cnf1</i>), aerobactin (<i>aer</i>)
新生児髄膜炎大腸菌 (NMEC)	K1 莢膜遺伝子 <i>neuC</i>

(3) O 血清群および H 血清群の決定

デンカ生検の「病原性大腸菌免疫血清」と PCR 法による型別決定を合わせて行う。

(4) バイオフィーム形成能

バイオフィーム形成能はマイクロタイタープレート法で定量化する。Atypical EAEC のスクリーニングには OD₆₀₀ 0.2 の基準を用いた。

(5) HEp2 細胞付着試験

マイクロタイタープレートを用いて培養した HEp2 細胞に大腸菌株を添加し、3 時間反応後洗浄して付着様式を鏡で判定する。Typical AA (aggregative adherence) と atypical

AAのパターンに分類した。

(6) CTX-M タイプ

PCR産物のシーケンスによって決定した。

(7) MLST (multilocus sequence type) と系統群 (phylogroup) の決定

7つのハウスキーピング遺伝子 (*adhA*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA*) をPCRで増幅し、シーケンスで塩基配列を決定、解析ソフト「MEGA5」を用いた系統解析を行う。A~Fの系統群はPCR法で決定した。

(8) 薬剤感受性検査

ESBL と AmpC 型 β -ラクタマーゼ産生は、AmpC/ESBL 鑑別ディスク (関東化学) で確認した。

4. 研究成果

(1) ESBL CTX-M 遺伝子保有株における typical EAEC と病原遺伝子保有頻度

ESBL CTX-M 遺伝子保有株 354 株のうち、バイオフィーム形成に重要な AggR 遺伝子を保有する腸管凝集性大腸菌 (typical EAEC) は 41 株 (11.6%) であった。その血清型は O25:H4/ST131 が 23 株 (56.1%) と多く、O111:H14 が 5 株 (12.2%) を占めた。系統群は O25:H4/ST131 が B2、O111:H14 が B1 であり、O25:H4/ST131 は 2010 年まで、O111:H14 は 2011 年以降に検出されていた。これらの株が保有する CTX-M 遺伝子のタイプは、CTX-M14 が 39 株 (95.1%) と多く、CTX-M15 と CTX-M-27 がそれぞれ 1 株だった。

また、侵襲性に関わる K1 莢膜遺伝子保有株は 43 株 (12.1%) みられ、O 血清群は O1 が 9 株 (20.9%)、O18 と O25 が 5 株 (11.6%)、O86 が 4 株 (9.3%) だった。CTX-M タイプは、CTX-M14 が 27 株 (62.8%) と多かったが、CTX-M15 が 6 株 (14.0%)、CTX-M-27 が 3 株 (7.0%) と CTX-M14 以外のタイプも比較的多くみられた。尿路病原性大腸菌 (UPEC) の病原遺伝子は多く検出されたが、EAEC 以外の下痢病原性大腸菌の病原遺伝子はみられなかった。なお、AggR 遺伝子と K1 莢膜遺伝子を両方保有する株 (O86:H11) も 1 株みられた。

(2) Atypical EAEC における薬剤耐性遺伝子

2011~2019 年に下痢症患者由来大腸菌から検出されたバイオフィーム形成能をもつ AggR 遺伝子非保有の atypical EAEC 143 株のうち、CTX-M 遺伝子保有株は 9 株 (6.3%) みられた。O 血清群は UT (untypable) が 5 株 (55.6%)、O127 が 2 株 (22.2%)、O25、O111 がそれぞれ 1 株、系統群は B2 が 4 株 (44.4%)、B1 と D がそれぞれ 2 株、F が 1 株だった。プラスミド性 AmpC 型 β -ラクタマーゼ遺伝子保有株が 1 株 (0.7%) みられ、このうち 2 株 (22.2%) が K1 莢膜遺伝子を保有していた。

(3) 血液由来大腸菌における薬剤耐性菌

鹿児島大学病院で 2019~2022 年に検出された血液由来大腸菌 135 株のうち、ESBL CTX-M 遺伝子保有株は 32 株 (23.7%) みられた。このうち O25:H7/ST131 が 21 株 (65.6%) を占め、O86:H18 が 4 株 (12.5%)、O1 が 2 株だった。32 株中、K1 莢膜遺伝子保有株は O1:H35 の 1 株だったが、血清抵抗遺伝子 *iss* は 29 株 (90.6%) が保有していた。AmpC 型 β -ラクタマーゼ産生株は 5 株 (3.7%) であり、そのうち 1 株がプラスミド性 AmpC 型 β -ラクタマーゼ遺伝子 CMY-2 を保有していた。5 株とも血清抵抗遺伝子 *iss* を保有していた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Ooka T, Gotoh Y, Hatanaka S, Yoshimori M, Nishitarumizu K, Kojo K, Kosakamoto H, Sameshima K, Kuroki Y, Chibana N, Doi Y, Yoshino S, Harada T, Seto K, Ikeda T, Miyanochara H, Nakayama K, Gokuden M, Imuta N, Kawamura H, Ogura Y, Hayashi T, Nishi J	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 A Salmonella enterica serovar Oranienburg clone caused a cluster of bacteremia cases in persons with no recognizable underlying diseases in Japan	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Open Forum Infect Dis	6. 最初と最後の頁 ofac695
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ofid/ofac695	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 Ichiki K, Ooka T, Shinkawa T, Inoue S, Hayashida M, Nakamura D, Akimoto M, Yoshimitsu M, Kawamura H, Nakamura M, Obama Y, Gotoh Y, Hayashi T, Nishi J, Ishitsuka K	4. 巻 29(4)
2. 論文標題 Genomic and phylogenetic characterization of Elizabethkingia anophelis strains: The first two cases of life-threatening infection in Japan	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Infect Chemother	6. 最初と最後の頁 376-383
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2023.01.005	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 Hachisu Y, Tamura K, Murakami K, Fujita J, Watanabe H, Tanabe Y, Kuronuma K, Kubota T, Oshima K, Maruyama T, Kasahara K, Nishi J, Abe S, Nakamura M, Kubota M, Hirai S, Ishioka T, Ikenoue C, Fukusumi M, Sunagawa T, Suzuki M, Akeda Y, Oishi K	4. 巻 51(2)
2. 論文標題 Invasive Haemophilus influenzae disease among adults in Japan during 2014-2018	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Infection	6. 最初と最後の頁 355-364
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s15010-022-01885-w	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 Nakae K, Ooka T, Murakami K, Hara-Kudo Y, Imuta N, Gotoh Y, Ogura Y, Hayashi T, Okamoto Y, Nishi J	4. 巻 12
2. 論文標題 Diversification of Escherichia albertii H-Antigens and Development of H-Genotyping PCR	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Microbiol	6. 最初と最後の頁 737979
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2021.737979	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 Iuchi H, Ohori J, Kiyama S, Imuta N, Nishi J, Kurono Y, Yamashita M.	4. 巻 21(1)
2. 論文標題 Effectiveness of antibacterial agents against cell-invading bacteria such as Streptococcus pyogenes and Haemophilus influenzae	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Microbiol	6. 最初と最後の頁 148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12866-021-02217-y	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 Chang B, Kinjo Y, Morita M, Tamura K, Watanabe H, Tanabe Y, Kuronuma K, Fujita J, Oshima K, Maruyama T, Abe S, Kasahara K, Nishi J, Kubota T, Ohnishi M, Suga S, Oishi K.	4. 巻 11(6)
2. 論文標題 Chang B, Kinjo Y, Morita M, Tamura K, Watanabe H, Tanabe Y, Kuronuma K, Fujita J, Oshima K, Maruyama T, Abe S, Kasahara K, Nishi J, Kubota T, Ohnishi M, Suga S, Oishi K.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Cell Infect Microbiol	6. 最初と最後の頁 17573
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcimb.2021.617573	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 Ikeda T, Shinagawa T, Ito T, Ohno Y, Kubo A, Nishi J, Gotoh Y, Ogura Y, Ooka T, Hayashi T	4. 巻 3(1)
2. 論文標題 Hypoosmotic stress induces flagellar biosynthesis and swimming motility in Escherichia albertii	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Commun Biol	6. 最初と最後の頁 87
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-0816-5	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 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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shimbashi R, Suzuki M, Chang B, Watanabe H, Tanabe Y, Kuronuma K, Oshima K, Maruyama T, Takeda H, Kasahara K, Fujita J, Nishi J, Kubota T, Tanaka-Taya K, Matsui T, Sunagawa T, Oishi K	4. 巻 26(10)
2. 論文標題 Effectiveness of 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine against invasive pneumococcal disease in adults, Japan, 2013-2017	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Emerg Infect Dis	6. 最初と最後の頁 2378-2386
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3201/eid2610.191531	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7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 川村英樹、福山竜子、茂見茜里、西 順一郎
2. 発表標題 当院で分離されたグラム陰性桿菌に対するタゾバクタムセフトロザンの感受性に関する検討
3. 学会等名 第97回日本感染症学会総会・学術講演会・第71回日本化学療法学会学術集会合同学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大岡唯祐、後藤 恭宏、林 哲也、西 順一郎
2. 発表標題 大腸菌における astA 遺伝子バリエーションの同定およびその分布
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 蘭牟田直子、児玉祐一、西 順一郎
2. 発表標題 小児下痢症患者由来大腸菌における下痢原性大腸菌の頻度とESBL 産生菌の検討(2011~2019年)
3. 学会等名 第54回日本小児感染症学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 蘭牟田直子、児玉祐一、中村隼人、大岡唯祐、西 順一郎
2. 発表標題 小児下痢症患者由来大腸菌における下痢原性大腸菌の頻度と推移 (2011~2019年)
3. 学会等名 第96回日本感染症学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村 隼人、蘭牟田直子、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

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 西 順一郎
2. 発表標題 耐性菌シンポジウム：耐性と病原性を併せ持つ危険な進化の可能性「グラム陰性桿菌」
3. 学会等名 第94回日本感染症学会学術講演会
4. 発表年 2020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	蘭牟田 直子 (Imuta Naoko) (00643470)	鹿児島大学・医歯学域医学系・助教 (17701)	
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	大岡 唯祐 (Ooka 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
---------	---------