

令和 5 年 5 月 3 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08819

研究課題名(和文) 感染症診断と感染制御支援のための新規高病原性肺炎桿菌解析法の構築とその臨床的評価

研究課題名(英文) Development of a rapid and easy genotyping method for identification and monitoring transmission events by hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*

研究代表者

川村 久美子 (Kawamura, Kumiko)

名古屋大学・医学系研究科(保健)・准教授

研究者番号：30335054

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)：本研究では肺炎桿菌の疫学調査に有用な肺炎桿菌解析法としてのmultiplex PCR typing methodを開発した。本法は、菌種の鑑別、薬剤耐性遺伝子(*bla*IMP, *bla*KPC)および病原遺伝子(莢膜型 K1, *rmpA/A2*)を検出可能な特異的primer set 25種類を用いた2つのPCR反応系で構成され、その結果をPOT値として数値化することで客観的な解析を可能にした。血液培養由来株を含む臨床分離株について、本法の正確性が検証されたことから、微生物検査室で肺炎桿菌株の伝播を監視するための迅速かつ簡単なジェノタイピング法として、感染制御および病院疫学調査に貢献できると考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で構築したmultiplex PCR typing methodは、病原性やアウトブレイクと関連する遺伝子型や莢膜型 K1)、薬剤耐性遺伝子および病原遺伝子の保有をOne-stepで解析する分子疫学解析法であり、分子疫学解析標準法と同等の性能を有していた。日常検査における本typing methodの導入は、肺炎桿菌とその近縁種の分布、カルバペネム耐性株および高病原性株の流布の実態を明らかにするとともに、日常診療におけるそれら菌株識別の有用性を明らかにすることに貢献するものと考えられる。加えて、それらの結果は病院の感染制御および院内感染への対策強化にも貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：We aimed to develop the multiplex PCR typing method for *K. pneumoniae* that would be useful in hospital epidemiology and outbreak investigation. This typing method consists of two multiplex PCR reactions that were designed to detect 25 ORFs specific to bacterial genetic lineages, species, antimicrobial-resistant genes (*bla*CTX-M, *bla*IMP and *bla*KPC), a capsular K1-specific gene and a virulence factor gene (*rmpA/A2*). The distribution patterns of ORFs among *K. pneumoniae* correlated well with multilocus sequence typing, and closely related species could be distinguished and antimicrobial resistance and hypervirulence genes were identified. This typing method is a rapid and easy genotyping method for monitoring transmission events by *K. pneumoniae* in clinical microbiology laboratories, and supplies clear and informative molecular typing results for the isolates. In addition, this would facilitate molecular epidemiological analysis in infection control and hospital epidemiology investigations.

研究分野：臨床微生物学

キーワード：高病原性肺炎桿菌 カルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌 multiplex PCR法 菌種マーカー sequence type 莢膜型K1 病原遺伝子(*rmpA/A2*) 薬剤耐性遺伝子

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

肺炎桿菌とは、腸内細菌目細菌に属するグラム陰性桿菌で、医療環境において易感染状態にあるホストに感染症を引き起こす日和見病原体である(後述の hvKp に対し classical *K. pneumoniae*, cKp)。この cKp は日々抗菌薬に曝露されることにより、複数系統の抗菌薬に耐性を獲得していることが多く、国際的に監視すべき 6 種の耐性病原体(ESKAPE)に含まれている。なかでも、抗菌薬治療の切り札的存在であるカルバペネムに耐性を示すカルバペネマーゼ産生菌 (Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, CPE)の出現と増加が临床上重大な問題視となっている。さらに、近年では莢膜過形成により高粘稠性を示す高病原性肺炎桿菌 (hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*, hvKp)の出現し、肺炎桿菌感染症を取り巻く事態はさらに深刻になりつつある。CPE は抗菌薬治療の切り札的存在であるカルバペネムを含めた多系統の抗菌薬に対して耐性を獲得しているため、治療に使用できる抗菌薬に限られる。さらに、産生する酵素型によっては最小発育阻止濃度が感性と判定される株も存在するため、検査室で行われる薬剤感受性試験で CPE の検出が難しい場合もあり、治療に難渋する事例も増えつつある。一方、アジア地域を中心にアウトブレイク事例が増えつつある hvKp 感染症には、肝膿瘍、敗血症性眼内炎や髄膜炎の報告がある。本感染症は易感染状態のホストのみならず健康人が感染することもあり、さらに続発性に複数臓器に感染が生じることもある侵襲性を示すことが特徴である。そのため、救命率向上のためには早期の原発巣の特定と適性治療の開始が重要である。hvKp 株は莢膜産生を促進する遺伝子(*rmpA/A2*)の保有していることが多く、特定の莢膜型(K1,K2)との関連性も報告されており、本菌株においては莢膜型と *rmpA/A2* の保有の特定は診療上大きな意義をもつ。また、医療機関では特定の sequence type(ST 型)によるアウトブレイクが発生する危険性があり、迅速な感染対策のためには ST 型の特定が重要であると言われており、その重要性が増しつつある。さらに肺炎桿菌については、近年の全ゲノム解析により 7 つの近縁種が存在することが明らかとなり、そのうち *K. pneumoniae*, *K. variicola*, *K. quasipneumoniae* は臨床材料からの分離が報告されている。*K. variicola* による敗血症の死亡率は、*K. pneumoniae* のそれよりも高い傾向にあることや *K. quasipneumoniae* が耐性遺伝子の伝播に関与しているなど菌種の特異性も報告されており、肺炎桿菌における近縁種鑑別に関心が集まっている。以上の理由から、臨床検査の現場においては、治療効果の向上および救命率改善のために、肺炎桿菌とその近縁種の鑑別、cKp と hvKp の鑑別、耐性菌(特に CPE)の同定、クローン(CPE の世界的流行クローンや病原性と関連する ST 型)の特定が急務となっている。

2. 研究の目的

本研究では以下の 2 点を目的とする。

- ① CPE の世界的流行クローンや病原性と関連する ST 型の特定、肺炎桿菌と近縁種の鑑別、hvKp 株に特異的な病原遺伝子群の保有や莢膜型別、ならびにカルバペネマーゼ産生遺伝子の保有を One-step で検出する multiplex PCR typing method を構築し、hvKp 株の識別を可能にすること
 - ② 日常診療における hvKp 感染症の早期診断と適性治療の開始および救命率向上における本法導入の貢献度を評価することで、より有用な解析法の構築を目指す
- 本研究成果は、hvKp 感染症の診断・治療および救命率の向上、院内感染対策に貢献することが期待される。

3. 研究の方法

(1) multiplex PCR typing method の原理

肺炎桿菌と近縁種の鑑別、hvKp 株の特定およびクローン識別のための新規 typing 法「multiplex PCR typing method」の構築にあたり、Genomic islet、Genomic island、病原因子(莢膜型および病原遺伝子)、薬剤耐性遺伝子の 4 つの要素(遺伝子)を対象とした。それら要素(遺伝子)の増幅領域の選択は、すでに登録されている全データを基にし、primer set の設計および反応条件の最適化を行うこととした。2 要素(Genomic islet および Genomic island)については、すでに登録されている全データを基に各々選択した。莢膜型 K1 や K2 など特定の莢膜型は病原性や特定の ST 型との関連性が報告されており、莢膜型別は hvKp 株の特定に有用である。今回は K1 を対象とした。病原

遺伝子としては *rmpA* と *rmpA2* を検出対象とした。4 つ目の要素である薬剤耐性遺伝子の検出は、2 種類のカルバペネマーゼ産生遺伝子(IMP, KPC 型)を検出することで CPE を特定した。

(2) PCR 結果の数値変換方法

multiplex PCRの結果は、株の「POT値」として変換された(Suzuki Masahiro, *et al. J Clin Microbiol*, 2014. 52: 2925–2932)。始めに、各アンプリコンの存在または非存在によって2進数(+の場合は1、-の場合は0)に変換し、2進数を10進数に変換してPOT値を計算した。具体的には、種を示すものを除く各2進数の結果に2nを掛け合わせた(POT1およびPOT2値についてはn=5はの、POT3値についてはn=9-0)。たとえば、ATCC BAA-1705株(図1、レーン1、111010-010010-0000010001)は、まず58-18-17に変換され、 $1 \times 32 + 1 \times 16 + 1 \times 8 + 0 \times 4 + 1 \times 2 + 0 \times 1$ 、 $0 \times 32 + 1 \times 16 + 0 \times 8 + 0 \times 4 + 1 \times 2 + 0 \times 1$ 、 $0 \times 512 + 0 \times 256 + 0 \times 128 + 0 \times 64 + 0 \times 32 + 1 \times 16 + 0 \times 8 + 0 \times 4 + 0 \times 2 + 1 \times 1$ の計算後、POT値を63-63-1023(111111-111111-1111111111)と表した。

(3) 全ゲノム解析

全ゲノムは既報(Humberto Barrios-Camacho, *et al. Sci Rep*. 2019. 9(1): 10610)に従って実施し、得られたデータから *in silico* 解析および菌種の同定を行うとともに、multilocus sequence typing 解析により ST の同定、莢膜血清型、薬剤耐性遺伝子ならびに病原遺伝子の保有を確認した。

4. 研究成果

(1) 肺炎桿菌の遺伝子型を識別するための open reading frame(ORF)の選択

肺炎桿菌の遺伝子型を識別するために、計 68 の候補 ORF が選択し。68 のうち、分布パターンが ST に匹敵する 12 の ORF と、同一の ST の系統内で可変の分布パターンを示す 4 つの ORF の組み合わせを検討した結果、ST を予測する 12 の ORF は、ゲノム上の genomic island 領域に、個々の株を識別する後者の ORF はプラスミドおよび genomic island 上に存在した。*K. pneumoniae*、*K. variicola* および *K. quasipneumoniae* の種特異的マーカーとしては KPHS_00880、Kvar_2627 および AVR78_05960 の 3 株のリファレンス株を選択し、それらの遺伝子は選択した菌株でのみ存在し、指定種以外の菌株には存在しないことを確認した。さらに、莢膜 K1 特異的遺伝子、4 つの抗菌薬耐性遺伝子(*bla*_{CTX-M} グループ 1、*bla*_{CTX-M} グループ 9、*bla*_{IMP} および *bla*_{KPC})、および病原遺伝子(*rmpA/A2*)も同一検出系に含めるようにした。

様々な検討の結果、上記 ORF を検出する合計 25 の primer set を決定した。

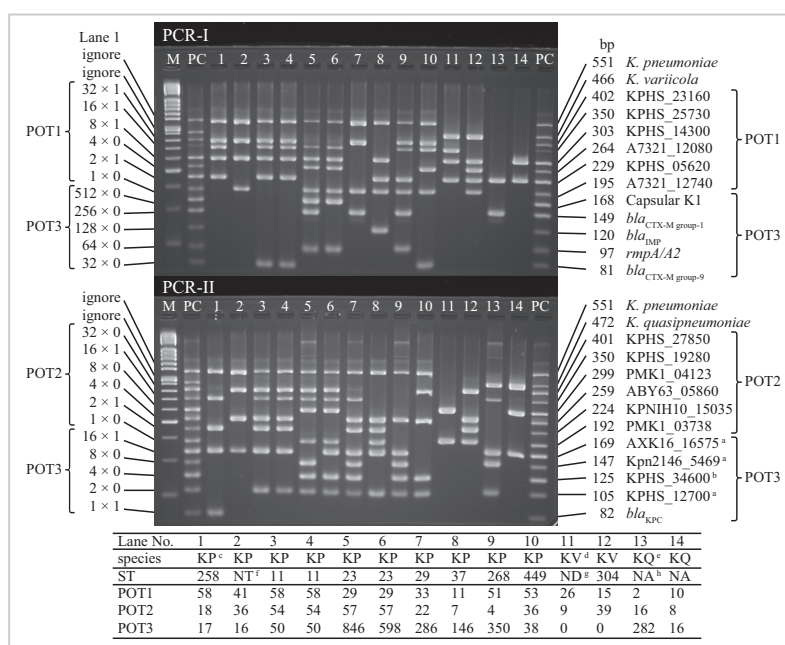


図1. multiplex PCR typing method のアガロースゲル電気泳動パターン。レーン 1 (ATCC BAA-1705) の PCR ラダー パターンの例を、下段表には 10 進数に変換された POT 値を示す。ND:未検出, NA:不適応。

2 つ multiplex PCR 反応セットに分割し、リファレンス株 *K. pneumoniae* (KPHS_00880)を識別するための primer set は、PCR-I と-II 両方の反応セットに含めた結果、各々の反応系に 13 の primer set で構成された。PCR-I のアンプリコンサイズは 81 から 551bp の間に、PCR-II のアンプリコンサイズは 82 から 551bp の間になった。結果を図 1 に示す。泳動の結果から遺伝子型を POT1-POT2-POT3 値として表現した。そこから CC または ST は、ターゲット番号 3~8 および 15~20 の分布パターンから計算された POT1 値と POT2 値の組み合わせによって予測した。病原遺伝子および抗菌薬耐性遺伝子の保有は POT3 値によって特定された。その結果、解析した 192 株 (136 株の *K. pneumoniae* と 8 つのリファレンス株、33 株の *K. variicola* と 1 つのリファレンス株、14 株の *K. quasipneumoniae* は、それぞれ 95、26、および 11 種類の POT 値に分類された。

(2) ST 型との関連性

136 株の *K. pneumoniae* は 61 の ST 型に分類された。頻繁に検出された ST は、ST23 (11/136)、ST37 (9/136)、ST280 (8/136)、ST29 (7/136)、ST412 (7/136) であった。*K. pneumoniae* 136 株の SNP ベースの系統樹では、ほとんどが同じ ST に属し、クラスターを形成しており、POT1~POT2 値の組み合わせは同じクラスター内で同一であった。全体として、54 種類の POT1-POT2 値の異なる組み合わせが、異なるクラスターで観察された。たとえば、ST280 の POT1-POT2 値は 33-6 で、ST29 の値は 33-2 に分類された(図 2)。一方、同じ POT1-POT2 値を持つ株も異なる ST に分類されたっており、肺炎桿菌の多様性が判明した。統計解析の結果、ST と POT1-POT2 値の間の ARI は 0.817 となった。33 株の *K. variicola* のうち、32 株が 30 種類の異なる ST 型に分類され、ST16 (3/33)が最も頻繁に観察された。*K. variicola* では、25 種類の POT 値で、異なる POT 値で同一の ST を示す株はなかった。*K. quasipneumoniae* 14 株については、合計 12 種類の POT 値となり、その中で、NUKP-48 株と NUKP-108 株、NUKP-16 株と NUKP-77-1 株は、それぞれ 104 と 14 の SNP を示し、これらのペアの POT 値が同一であったことから、それらの株は関連していると考えられた。

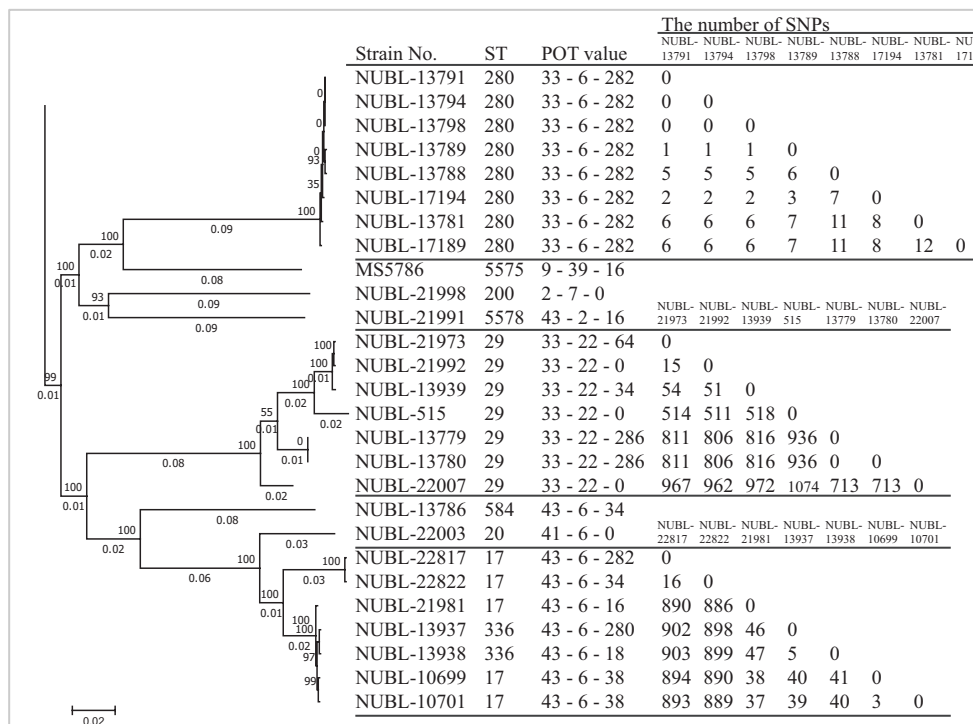


図 2. *Klebsiella pneumoniae* の SNPs tree.

(3) 臨床分離株への応用

構築した本法を用いて 2015 年~2021 年に名古屋大学医学部附属病院検査部で血液培養陽性ボトルから分与された肺炎桿菌 273 株を解析した。近縁 3 菌種の割合は、*K. pneumoniae* 71.1%(194 株)、*K. quasipneumoniae* 11.7%、*K. variicola* 17.2%となり、全ゲノム解析と一致した。*K. pneumoniae* 194 株の ST 型では ST14(31 株)が最も

分離頻度が高く、その結果は全ゲノム解析と MLST 解析の結果と一致していた。ESBL 関連遺伝子は *K. pneumoniae* で 68 株、*K. quasipneumoniae* で 2 株であった。今回の multiplexPCR 法で検出すべき *bla*_{CTX-M} グループ 1 と 9 については、CTX-M-15 が 10 株全て *bla*_{CTX-M} グループ 1 陽性として正確に検出された。CPE 関連遺伝子については、*K. pneumoniae* のみで *bla*_{IMP} と *bla*_{KPC} 保有株が 1 株ずつ存在したが、本法はそれらの保有を正確に検出していた。hvKp 株に関する莢膜型と莢膜過形成に関する情報としては、*K. pneumoniae* のみで、莢膜型 K1 を 7 株、病原遺伝子 *rmpA* の 21 株の保有を検出しており、multiplexPCR typing 法の結果は全ゲノム解析の結果と完全に一致していた。以上の結果から、今回構築した multiplex PCR typing 法は臨床分離株においても、肺炎桿菌の近縁菌種の同定、ST 型の分布、病原遺伝子ならびに薬剤耐性遺伝子を正確に解析することが確認できた。さらに、血液培養陽性由来の肺炎桿菌では、*K. variicola* と *K. quasipneumoniae* が約 3 割を占めるものの、それら 2 菌種が保有する病原遺伝子や耐性遺伝子の数や種類は、*K. pneumoniae* が保有するそれらよりも少ないことを明らかにした。今後は近縁菌種まで日常検査で詳細に同定する意義があるかについては、患者背景の情報を含めた解析が必要であると考えられる。

5. 結論

本研究では、肺炎桿菌と近縁種の鑑別、hvKp 株に特異的な病原遺伝子群の保有や莢膜型別ならびにカルバペネマーゼ産生遺伝子の保有を One-step で検出する「multiplex PCR typing method」を構築することができた。血液培養陽性ボトルから分与された臨床分離株においても、肺炎桿菌と近縁菌種の鑑別、ST 型の分布、病原遺伝子 *rmpA* ならびに薬剤耐性遺伝子(*bla*_{IMP}, *bla*_{KPC})を正確に解析することが確認できた。今回の研究で、血液培養陽性ボトルから分離された臨床分離株では、近縁種である *K. variicola* と *K. quasipneumoniae* が約 3 割を占めることが明らかになったが、それら 2 菌種が保有する病原遺伝子や耐性遺伝子の数は、*K. pneumoniae* が保有するそれらよりも少ないことを明らかになった。次なる研究では、近縁菌まで日常検査内で詳細に同定する意義があるかについて、患者背景の情報を含めた解析が必要であることが示唆された。

<引用論文>

- Suzuki Masahiro, *et al.* New PCR-based open reading frame typing method for easy, rapid, and reliable identification of *Acinetobacter baumannii* international epidemic clones without performing multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol*, 2014. 52: 2925–2932
- Humberto Barrios-Camacho, *et al.* Molecular epidemiology of *Klebsiella variicola* obtained from different sources. *Sci Rep*. 2019. 23; 9(1): 10610

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Norizuki C, Wachino J-I, Jin W, Kimura K, Kawamura K, Nagano N, Arakawa Y.	4. 巻 59(10)
2. 論文標題 Practical agar-based disk diffusion tests using sulfamoyl heteroarylcarboxylic acids for identification of subclass B1 metallo-beta-lactamase-producing Enterobacterales	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Microbiology	6. 最初と最後の頁 e0076121-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JCM.00761-21	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 -
1. 著者名 Sarangi J, Matsuo N, Nonogaki R, Hayashi M, Kawamura K, Suzuki M, Jin W, Tamai K, Ogawa M, Wachino J-I, Kimura K, Yagi T, Arakawa Y.	4. 巻 75 (1)
2. 論文標題 Molecular epidemiology of Enterobacter cloacae complex isolates with reduced carbapenem susceptibility recovered by blood culture	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 41 - 48
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7883/yoken.JJID.2021.141	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 Suzuki M, Norizuki C, Wachino J-I, Kawamura K, Nagano N, Nagano Y, Hayashi W, Kimura K, Doi Y, Arakawa Y.	4. 巻 28 (4)
2. 論文標題 Dissecting the clonality of I1 plasmids using ORF-based binarized structure network analysis of plasmids (OSNAp)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of infection and chemotherapy	6. 最初と最後の頁 473 - 479
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jiac.2021.12.003	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 Matsuo N, Nonogaki R, Hayashi M, Wachino J-I, Suzuki M, Arakawa Y, Kawamura K.	4. 巻 64
2. 論文標題 Characterization of bla CTX-M-27/F1:A2:B20 Plasmids Harbored by Escherichia coli Sequence Type 131 Sublineage C1/ H 30R Isolates Spreading among Elderly Japanese in Nonacute-Care Settings	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Antimicrob Agents Chemother	6. 最初と最後の頁 e00202-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/AAC.00202-20.	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 Hayashi M, Matsui M, Sekizuka T, Shima A, Segawa T, Kuroda M, Kawamura K, Suzuki S.	4. 巻 23
2. 論文標題 Dissemination of IncF group F1:A2:B20 plasmid-harboring multidrug-resistant Escherichia coli ST131 before the acquisition of bla CTX-M in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Glob Antimicrob Resist	6. 最初と最後の頁 456-465
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jgar.2020.10.021.	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 Yamamoto H, Iijima A, Kawamura K, Matsuzawa M, Suzuki , Arakawa Y.	4. 巻 99
2. 論文標題 Fatal fulminant community-acquired pneumonia caused by hypervirulent Klebsiella pneumoniae K2-ST86	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Medicine	6. 最初と最後の頁 e20360
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MD.0000000000020360.	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 Nonogaki R, Iijima A, Kawamura K, Kayama S, Sugai M, Yagi T, Arakawa Y, Doi Y, Suzuki M.	4. 巻 133
2. 論文標題 PCR-based ORF typing of Klebsiella pneumoniae for rapid identification of global clones and transmission events.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Appl Microbiol.	6. 最初と最後の頁 2050-2062
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jam.15701.	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3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 法月千尋、和知野純一、Jin Wanchun, 木村幸司、川村久美子、荒川宜親
2. 発表標題 Practical agar-based disk-diffusion tests for the identification of subclass B1 metallo- β -lactamase-producing Enterobacterales using sulfamoyl heteroarylcarboxylic acids
3. 学会等名 第33回日本臨床微生物学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野々垣里奈、鈴木匡弘、川村久美子
2. 発表標題 感染症診断と感染制御支援のための新規高病原性肺炎桿菌解析法の構築とその評価 -分子疫学解析手法としてのPOT法の構築-
3. 学会等名 2021年度東海乳酸菌研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 磯貝美結、鈴木匡弘、川村久美子
2. 発表標題 敗血症 血流感染患者由来 Klebsiella pneumoniae および近縁2菌種(K. variicola, K. quasipneumoniae)の分子疫学的特徴の解析
3. 学会等名 2022年度東海乳酸菌研究会
4. 発表年 2023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	八木 哲也 (Yagi Tetsuya) (70333573)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901)	
研究 分担者	鈴木 匡弘 (Suzuki Masahiro) (70446649)	藤田医科大学・医学部・准教授 (33916)	

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