

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591574

研究課題名(和文) 下痢症患者由来の大腸菌における病原遺伝子・薬剤耐性遺伝子のパンゲノム解析

研究課題名(英文) Pan-genome analysis of virulent and antibiotics-resistant genes among *Escherichia coli* isolated from diarrheal children

研究代表者

西 順一郎 (Nishi, Junichiro)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：40295241

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：2001年～10年の小児下痢症患者由来大腸菌において、腸管凝集性大腸菌(EAEC)はESBL遺伝子を有意に高い頻度で保有していた(20.8%, 31/149 vs. 1.1%, 64/6067; OR 24.6)。ESBL産生EAECのESBL遺伝子型はCTX-M-14、74.2%がO25:H4:ST131、B2群(腸管外病原性大腸菌)に属し、これまでのEAECと明らかに異なる系統であった。以上より、O25:H4:ST131がCTX-M-14とEAEC病原プラスミドを獲得し、小児間で伝播したことが示唆された。EAECはその凝集性から薬剤耐性遺伝子のリザーバとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：A total of 6,216 *E. coli* strains from diarrheal children from 2001 through 2010 in our district were examined for serotyping, ESBL genotyping, and virulence genes including *aggR* by PCR. In addition, MLSA of ESBL-producing EAEC strains were performed. The incidence of ESBL genes in *aggR*-positive EAEC strains (20.8%, 31/149) was significantly higher than in other *E. coli* strains (1.1%, 64/6067) (OR 24.6, 95% CI 15.5-39.3). ESBL genes were not detected in other pathotypes of diarrheagenic *E. coli*. All 31 ESBL-producing EAEC strains possessed CTX-M-14, most of which were found to be O25:H4:ST131. EAEC O111 and O126 strains mainly isolated since 1997 through 2010 never harbored ESBL genes, while the EAEC O25:H4:ST131 clone producing CTX-M-14 was detected in 2003 for the first time. These findings suggest that the O25:H4:ST131 clone horizontally acquired CTX-M-14 and EAEC virulence genes in our district. EAEC may play a role of reservoir of ESBL genes.

研究分野：感染症学、細菌学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、小児科学

キーワード：大腸菌 腸管凝集性大腸菌 ESBL(基質拡張型ラクタマーゼ) 下痢症 小児 遺伝子水平伝播 下痢病原性大腸菌 尿路病原性大腸菌

1. 研究開始当初の背景

大腸菌は、病原性のない腸管内常在菌から、腸管出血性大腸菌をはじめとする下痢原性大腸菌、尿路感染症や敗血症・髄膜炎をおこす腸管外病原性大腸菌に分類される。大腸菌は、バクテリオファージやプラスミドによって他菌種から多くの病原遺伝子や薬剤耐性遺伝子を取り込み、また株間で水平伝播しながら進化しているため遺伝的多様性が著明であるため、動的に変化する病原・薬剤感受性遺伝子の解析にはパンゲノムを視野にいたる解析が必要である。

下痢原性大腸菌は、6つの病原タイプ(pathotype)が知られていたが、最近 CDT (cytolethal distending toxin、細胞膨化毒素)を産生する大腸菌も本邦で報告されている。各タイプの検出頻度が国内外から報告されているが、いずれも特定のタイプに注目したものが多く、多数の株を対象とした総合的な検討は少ない。また、複数のタイプにわたって検出される病原因子もあり、新たな分類法も必要とされている。臨床検査室レベルでは、これらほとんどの病原因子検査法は確立されておらず、O抗原型の報告に終わるため臨床場面では病原性の判定に混乱がみられている。

腸管外病原性大腸菌については、尿路病原株や菌血症・髄膜炎の原因となる株の病原因子が知られているが、ヒト腸管から分離される大腸菌におけるこれらの病原因子の検出頻度は明らかではない。最近、市中感染で分離される大腸菌の中に、セフェム薬に広範な耐性を示す ESBL (基質拡張型ラクタマーゼ)産生菌やキノロン耐性の株が増えており、最近では NDM-1 (ニューデリーメタロラクタマーゼ)陽性のカルバペネム耐性菌も報告され、多剤耐性化が懸念されている。病院内で分離される大腸菌の薬剤感受性については報告があるが、市中で腸管に常在する大腸菌での薬剤感受性報告は少ない。

申請者は、過去に本邦の小児下痢症患児由来の大腸菌の病原遺伝子検出頻度を検討し、下痢原性大腸菌中4.3%が腸管凝集性大腸菌(EAEC)であることを報告した。その後一貫して EAEC の疫学的・基礎的研究を進めてきたが、これまでの病原タイプに含まれない株もさまざまな病原因子を保有することが示唆され、過去の分類に関わらない総合的なパンゲノム解析が必要と考えた。

2. 研究の目的

本研究では、当科に保存してある約 6500 名の下痢症患児由来大腸菌において、病原遺伝子を網羅的に調べ、下痢原性および腸管外病原性大腸菌の分子疫学を明らかにし、臨床現場での複数の病原因子を対象とした新たな迅速検出法の開発につなげる。さらに、現在問題となっている薬剤耐性遺伝子の市中分離大腸菌での分布状況を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

これまで保存してある菌株および今後収集予定の大腸菌の DNA から、下痢原性大腸菌、腸管外病原性大腸菌の病原遺伝子をマルチプレックス PCR 法で検出した。PCR 陽性になった遺伝子については、リアルタイム RT-PCR 法で転写を確認し、培養細胞を用いて付着性や細胞障害性を検討した。PCR 産物はシーケンスを行い、推定アミノ酸配列を基にした系統解析を行い、O 抗原型や他の遺伝子型と比較した。薬剤耐性遺伝子の検出は同様に PCR 法で行い、陽性株については実際の薬剤感受性を確認し、病原タイプとの関連を検討した。また検出された EAEC については、house-keeping 遺伝子の内部配列を用いた MLST (multilocus Sequence Typing) 解析を行い系統解析を行った。

4. 研究成果

平成 23 年度は、小児下痢症患児由来大腸菌における EAEC と ESBL 産生菌の頻度を調べ、その関連性を検討した。2004 年～2010 年の小児下痢症由来大腸菌 4,512 株中 ESBL 遺伝子は 89 株(2.0%) (CTX-M, 81; SHV, 8)から検出され、EAEC は 108 株(2.4%)であった。EAEC 株における ESBL 遺伝子の保有率は 27.8%(30/108)であり、EAEC 以外の大腸菌における頻度 1.3%(59/4404)に比べて有意に高かった (OR 28.3, 95% CI 17.3-46.4)。また、年次別 ESBL 遺伝子の検出頻度は、2004～2010 年において 1.2%から 5.3%へ、EAEC の検出頻度は 2.0%から 4.5%へ、ともに増加傾向が見られた。CTX-M の遺伝子型は、CTX-M-14 が多くみられた。

平成 24 年度は、さらに 2001 年～2003 年の株も含めて検討した。6,216 株中 EAEC は 149 株(2.4%)、ESBL 産生菌は 95 株(1.5%)であり、いずれも年別に増加傾向がみられた。ESBL 産生 EAEC は、2003 年から検出され 2007 年と 2008 年に比較的多く見られた。EAEC 株における ESBL 遺伝子の保有率は 20.8%(31/149)であり、EAEC 以外の大腸菌における頻度 1.1%(64/6067)に比べて有意に高かった (OR 24.6, 95% CI 15.5-39.3)。ESBL 産生 EAEC の O 抗原型は O25 が多く、O111 や O126 を中心としたこれまでの EAEC とは異なるパターンであり、新たな EAEC クローンが ESBL 遺伝子を獲得したことが示唆された。また ESBL 産生 EAEC の 81%(25/31)は、尿路病原性大腸菌で見られる afimbrial adhesin (afa) 遺伝子を保有していることがわかり、凝集性付着や ESBL 遺伝子の獲得に関与していることが示唆された。

その他の病原タイプでは、カンピロバクターで高頻度に検出される細胞膨化致死毒素 CDT に着目して遺伝子分布を検討した。小児下痢症患児由来大腸菌 3,781 株中 84 株(2.2%)が CDT 遺伝子を保有しており、遺伝子型では I 型が 77.4%(65/84)を占めた。わが国

でも CDT 産生大腸菌が比較的多く検出されることが明らかになった。

平成 25 年度は、ESBL 産生 EAEC 増加のメカニズムを探るために、ESBL 産生 EAEC 株についてその特徴を分析するとともに、他の EAEC160 株とともに MLST による系統解析を行った。ESBL 産生 EAEC 31 株の ESBL 遺伝子型はすべて CTX-M-14 型であり、74.2%が O25:H4:ST131 であった。MLSA ではそれらは系統分類 B2 群（腸管外病原性大腸菌）に属し、O111、O126、O86 が属する B1 群と明らかに異なる系統に属していた。EAEC の調節転写因子である AggR 遺伝子の系統解析では、このクローンの AggR は O111 とほとんど一致し、O126 や O86 とは異なる系統であった。以上の結果から、2003 年頃から尿路病原性大腸菌 O25:H4:ST131 クローンが、ESBL 遺伝子 CTX-M-14 を獲得後、または同時に、EAEC O111 から AggR をプラスミド性に獲得し、小児のあいだで伝播したことが示唆された。

EAEC は、他の大腸菌に比べて極めて高い頻度で ESBL 遺伝子を保有しており、その凝集性から EAEC が ESBL 遺伝子のリザーバ となっている可能性が示唆された。本研究は、特定の下痢病原性大腸菌が薬剤耐性遺伝子の伝播に参与していることを示しており、大腸菌全体のパンゲノム解析を進めてゆく上で有意義な成果となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 20 件)

1. Tamura K, Matsubara K, Ishiwada N, Nishi J, Ohnishi H, Suga S, Ihara T, Chang B, Akeda Y, Oishi K, Japanese I. P. D. Study Group. Hyporesponsiveness to the infecting serotype after vaccination of children with seven-valent pneumococcal conjugate vaccine following invasive pneumococcal disease. *Vaccine* 2014;32(13):1444-1450 (査読有)
2. Tamai M, Matsushita S, Miyahara H, Imuta N, Ikeda R, Kawai K, Nishi J, Sakamoto A, Shigihara T, Kanekura T. Antimicrobial effect of an ultrasonic levitation washer disinfectant with silver electrolysis and ozone oxidation on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Dermatol* 2013;40(12):1020-1026 (査読有)
3. Kodama Y, Okamoto Y, Nishi J, Hashiguchi S, Yamaki Y, Kurauchi K, Tanabe T, Shinkoda Y, Nishikawa T, Suda Y, Kawano Y. Ramsay hunt syndrome in a girl with acute lymphoblastic leukemia during maintenance therapy. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2013;35(5):e224-225 (査読有)
4. Nishi J, Tokuda K, Imuta N, Minami T, Kawano Y. Prospective safety monitoring of Haemophilus influenzae type b and heptavalent pneumococcal conjugate vaccines in Kagoshima, Japan. *Jpn J Infect Dis*. 2013; 66(3):235-237 (査読有)
5. Oishi T, Ishiwada N, Matsubara K, Nishi J, Chang B, Tamura K, Akeda Y, Ihara T, Nahm MH, Oishi K; the Japanese IPD Study Group. Low opsonic activity to the infecting serotype in pediatric patients with invasive pneumococcal disease. *Vaccine*. 2013;31(5):845-849 (査読有)
6. Yoshinaga M, Ushinohama H, Sato S, Tauchi N, Horigome H, Takahashi H, Sumitomo N, Kucho Y, Shiraishi H, Nomura Y, Shimizu W, Nagashima M. Electrocardiographic screening of 1-month-old infants for identifying prolonged QT intervals. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2013;6(5):932-938 (査読有)
7. Awasthi SP, Asakura M, Chowdhury N, Neogi SB, Hinenoya A, Golbar HM, Yamate J, Arakawa E, Tada T, Ramamurthy T, Yamasaki S. Novel cholera toxin variants, ADP-ribosylating toxins in *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 strains, and their pathogenicity. *Infect Immun* 2013;81(2):531-541 (査読有)
8. Matsumoto K, Shigemi A, Yaji K, Shimodozono Y, Takeda Y, Ikawa K, Morikawa N, Miyahara H, Kawamura J, Orita M, Tokuda K, Nishi J, Yamada K: Reduction in the incidence of MRSA with use of alcohol-based hand rub solutions and gloves. *J Infect Chemother* 2012;18(2):269-271(査読有)
9. Ueno K, Nomura Y, Masamoto I, Masuda K, Morita Y, Eguchi T, Okamoto Y, Kawano Y. Potential role of autoantibody in severe neutropenia of a patient with Kawasaki Syndrome. *Scand J Immunol* 2012;75(1):120-126(査読有)
10. Yoshikawa H, Nomura Y, Masuda K, Koriya C, Arata M, Hazeki D, Yanagimoto K, Ueno K, Eguchi T, Kawano Y. Serum procalcitonin value is useful for predicting severity of Kawasaki disease. *Pediatr Infect Dis J* 2012;31(5):523-525 (査読有)
11. Nomura Y, Arata M, Masuda K, Koriyama C, Suruki N, Ueno K, Yoshikawa H, Eguchi T, Kawano Y. Kawasaki disease patients with six principal symptoms

- have a high risk of being a non-responder. *Pediatr Int* 2012;54(1):14-18 (査読有)
12. Shima A, Hinenoya A, Asakura M, Nagita A, Yamasaki S. Prevalence of *Providencia* strains among children with diarrhea in Japan. *Jpn J Infect Dis* 2012;65(6):545-547 (査読有)
 13. Shima A, Hinenoya A, Asakura M, Sugimoto N, Tsukamoto T, Ito H, Nagita A, Faruque SM, Yamasaki S. Molecular characterizations of cytolethal distending toxin produced by *Providencia alcalifaciens* strains isolated from patients with diarrhea. *Infect Immun* 2012;80(4):1323-1332 (査読有)
 14. Shiramaru S, Asakura M, Inoue H, Nagita A, Matsuhisa A, Yamasaki S. A cytolethal distending toxin gene-based multiplex PCR assay for detection of *Campylobacter* spp. in stool specimens and comparison with culture method. *J Vet Med Sci* 2012;74(7):857-862 (査読有)
 15. Kawamura H, Nishi J, Imuta N, Tokuda K, Miyanochara H, Hashiguchi T, Zenmyo M, Yamamoto T, Ijiri K, Kawano Y, Komiya S: Quantitative analysis of biofilm formation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains from patients with orthopaedic device-related infections. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2011;63(1):10-15 (査読有)
 16. Miyahara E, Nishie M, Takumi S, Miyanochara H, Nishi J, Yoshiie K, Oda H, Takeuchi M, Komatsu M, Aoyama K, Horiuchi M, Takeuchi T: Environmental mutagens may be implicated in the emergence of drug-resistant microorganisms. *FEMS Microbiol Lett*. 317(2):109-116, 2011 (査読有)
 17. Ueno K, Nomura Y, Arata M, Maruyama S, Tanabe T, Eguchi T, Kawano Y. Development of Kawasaki syndrome in autoimmune neutropenia after treatment with granulocyte colony-stimulating factor. *Pediatr Int* 2011;53(3):388-390 (査読有)
 18. Haldar S, Chatterjee S, Sugimoto N, Das S, Chowdhury N, Hinenoya A, Asakura M, Yamasaki S. Identification of *Vibrio campbellii* isolated from diseased farm-shrimps from south India and establishment of its pathogenic potential in an *Artemia* model. *Microbiology* 2011;157(Pt 1):179-188 (査読有)
 19. Kabir SM, Kikuchi K, Asakura M, Shiramaru S, Tsuruoka N, Goto A, Hinenoya A, Yamasaki S. Evaluation of a cytolethal distending toxin (cdt) gene-based species-specific multiplex PCR assay for the identification of *Campylobacter* strains isolated from diarrheal patients in Japan. *Jpn J Infect Dis* 2011;64(1):19-27 (査読有)
 20. Yamasaki S, Asakura M, Neogi SB, Hinenoya A, Iwaoka E, Aoki S. Inhibition of virulence potential of *Vibrio cholerae* by natural compounds. *Indian J Med Res* 2011;133:232-239 (査読有)
- [学会発表](計 23 件)
(国際学会)
1. 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,
 2. Kawamura H, Shigemi A, Koriyama T, Matsumoto K, Orita M, Komiya S, Tokuda K, Nishi J. Effects of Care Bundle for Preventing Orthopedic Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Surgical Site Infections (SSI). ID Week 2013, 2013.10.2-6, San Francisco, USA
 3. Kawamura H, Tokuda K, Imuta N, Miyanochara H, Koriyama T, Kawano Y, Komiya S, Nishi J. Usefulness of phage open-reading frame typing method for the epidemiological analysis of nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreaks in a tertiary care hospital in Japan. ID Week 2012, 2012.10.17-21, San Diego, USA
 4. Nishi J, Imuta N. Prevalence of dispersin (Aap) among diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from children with diarrhea in Kagoshima, Japan. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 2011.9.6-10, Sapporo
 5. Imuta N, Nishi J. Prevalence of cytolethal distending toxin (CDT) gene among *Escherichia coli* isolates from children with diarrhea in Kagoshima, Japan. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 2011.9.6-10, Sapporo

(国内学会)

6. Imuta N, Yoshiie K, Matayoshi S, Nishi J. High prevalence of afimbrial adhesin gene among ESBL producing EAEC isolates. 第 86 回日本細菌学会総会 2013.3.18-2, 千葉
7. Yoshiie K, Imuta N, Matayoshi S, Nishi J. Mixed culture of Escherichia coli strains easily produce drug resistant population. 第 86 回日本細菌学会総会 2013.3.18-20 千葉
8. 蘭牟田直子, 徳田浩一, 河野嘉文, 西 順一郎. ESBL(基質拡張型 ラクタマーゼ)を産生する腸管凝集性大腸菌の薬剤耐性状況 第 44 回日本小児感染症学会総会・学術集会 2012.11.24 北九州
9. 蘭牟田直子, 郡山豊泰, 徳田浩一, 又吉盛健, 吉家清貴, 西 順一郎. 過去 10 年間の小児下痢症患児由来大腸菌における ESBL 産生菌の推移 - 腸管凝集性大腸菌の薬剤耐性化 - 第 82 回日本感染症学会西日本地方学術集会 2012.11.5-7 福岡
10. 蘭牟田直子, 吉家清貴, 又吉盛健, 西 順一郎. ESBL 産生腸管凝集性大腸菌は afimbrial adhesin I 遺伝子(afal)を高頻度に保有する. 第 65 回日本細菌学会九州支部総会 2012.8.25 那覇
11. 蘭牟田直子, 郡山豊泰, 徳田浩一, 西 順一郎. ESBL を産生する腸管凝集性大腸菌の検出頻度と薬剤耐性状況. 第 16 回腸管出血性大腸菌感染症研究会 2012.7.19 秋田
12. 郡山豊泰, 松元一明, 川村 英樹, 西 順一郎. 鹿児島大学病院における過去 3 年間の ESBL 産生菌の遺伝子型解析と薬剤感受性試験. 第 86 回日本感染症学会総会. 2012.4.25-26 長崎
13. 蘭牟田直子, 郡山豊泰, 川村秀樹, 西 順一郎. 小児下痢症患者由来の大腸菌における ESBL (基質拡張型 ラクタマーゼ)産生菌の年次推移. 第 86 回日本感染症学会総会. 2012.4.25-26 長崎
14. Imuta N, Nishi J. High prevalence of ESBL genes among enteroaggregative Escherichia coli (EAEC) isolates in Kagoshima, Japan. 第 85 回日本細菌学会総会. 2012.3.27-29, 長崎
15. 蘭牟田直子, 西 順一郎. 腸管凝集性大腸菌は ESBL (基質拡張型 ラクタマーゼ)遺伝子を高頻度に保有する. 第 8 回日本小児消化管感染症研究会 2012.2.11 東京
16. 蘭牟田直子, 西 順一郎, 徳田浩一, 河野嘉文. 小児下痢症患児から分離された大腸菌における cytolethal distending toxin (CDT)遺伝子保有状況. 第 43 回日本小児感染症学会 2011.10.29-30 岡山市
17. 徳田浩一, 西 順一郎, 蘭牟田直子, 河野嘉文. 腸管出血性大腸菌サーベイランスにおける地理情報システム (GIS) を用いた効果的情報還元に関する研究. 第 43 回日本小児感染症学会 2011.10.29-30 岡山市
18. 西 順一郎, 蘭牟田直子, 河野嘉文. 小児下痢症患児から分離された大腸菌における ESBL (基質拡張型 ラクタマーゼ) 遺伝子の保有状況. 第 43 回日本小児感染症学会 2011.10.29-30 岡山市
19. 西 順一郎, 蘭牟田直子, 郡山豊泰. 小児下痢症患児由来大腸菌における病原遺伝子と -ラクタマーゼ遺伝子の分布. 第 81 回日本感染症学会西日本地方学術集会 2011.10.6-8 北九州市
20. 郡山豊泰, 松元一明, 川村英樹, 西 順一郎. 鹿児島大学病院における過去 3 年間の基質拡張型 -ラクタマーゼ(ESBL)産生菌の検出状況. 第 81 回日本感染症学会西日本地方学術集会 2011.10.6-8 北九州市
21. 西 順一郎, 蘭牟田直子, 郡山豊泰, 川村英樹. 小児下痢症患児由来大腸菌における下痢原性大腸菌と EBL(基質拡張型 ラクタマーゼ)産生菌の分布. 第 64 回日本細菌学会九州支部総会 2011.8.26 北九州
22. 西 順一郎, 蘭牟田直子. 小児下痢症患児由来の大腸菌における ESBL(基質拡張型 ラクタマーゼ)遺伝子の分布. 第 15 回腸管出血性大腸菌感染症研究会 2011.7.15-16 大阪
23. 田尻 仁, 西 順一郎, 山元公恵, 牛島高介, 高野智子. 小児の腸管出血性大腸菌感染における HUS および脳症合併に関連する因子の検討. 第 15 回腸管出血性大腸菌感染症研究会 大阪 2011.7.15-16

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<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) 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号: 40295241

(2) 研究分担者

野村 裕一 (NOMURA, Yuichi) 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号: 90237884

(3)連携研究者

山崎 伸二 (YAMASAKI, Shinji) 大阪府立大
学大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号：70221653