

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460681

研究課題名(和文) 腸管凝集性大腸菌の凝集関連因子の同定と新規検査法の開発

研究課題名(英文) Identification of aggregation relative factor of enteroaggregative Escherichia coli (EAEC) and development of novel laboratory procedure.

研究代表者

蘭牟田 直子 (Imuta, Naoko)

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：00643470

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)：大腸菌8,729株(2001～2016年)から腸管凝集性大腸菌(EAEC)301株を検出した。2010年まではEAEC 025がESBL遺伝子CTX-Mと尿路病原性大腸菌の付着因子を高率に保有していた。系統解析では遺伝的多様性が著明で、各O血清群でクラスターを形成していた。2011年以後は、本来のEAEC 0111がCTX-Mを獲得しており、さらに髄膜炎の病原因子K1莢膜の遺伝子を持つEAECも出現した。本研究で明らかになった遺伝的多様性は新規EAEC検査法開発の基盤となるとともに、バイオフィルムを形成するEAECが小児腸管内で病原遺伝子と薬剤耐性遺伝子のリザーバーになる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Total of 211 strains were identified E.coli as EAEC from among total of 8,729 E. coli isolated from diarrheal children from 2001 to 2016. EAEC 025 dominantly harbored both antibiotics-resistance gene CTX-M and adhesion gene of uropathogenic E. coli. EAEC showed significant genetic diversity by lineage analysis and formed cluster of each O serotype. Although EAEC defined strong biofilm formation (BF), some of EAEC strains showed weak BF and emerged since 2011. Traditional EAEC 0111 acquired CTX-M gene and some of EAEC strains acquired K1 (neuC) gene, which gene were harbored high frequency among neonatal meningitis E. coli. The results of this study showed the significant genetic heterogeneity of remarkable EAEC clinical strains. In addition, EAEC may play a role of reservoir of antibiotics-resistant genes and virulence gene of E. coli, because strong aggregation and BF of EAEC may facilitate horizontal transfer of virulence and antibiotics-resistant genes in the intestine of children.

研究分野：大腸菌の病原因子

キーワード：EAEC aggR ESBL CTX-M

1. 研究開始当初の背景

enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) は、強いバイオフィーム形成能を特徴とし、わが国でも小児の下痢原性大腸菌の中で最も多く分離される新興病原菌である。近年、志賀毒素、基質拡張型ラクタマーゼ (ESBL)、尿路病原性大腸菌の病原因子などを持つ EAEC が出現し注目されているが、通常の細菌検査室では EAEC の同定が困難であるため臨床現場では十分認識されていない。

2. 研究の目的

本研究は腸管凝集性大腸菌 (EAEC) の凝集関連因子の同定と新規検査法の開発を目的とする。EAEC はわが国でも小児の下痢原性大腸菌の中で最も多く分離される新興病原菌である。近年、志賀毒素、基質拡張型ラクタマーゼ (ESBL)、尿路病原性大腸菌の病原因子などを持つ EAEC が出現し注目されているが、通常の細菌検査室では EAEC の同定が困難であるため臨床現場では十分に認識されていない。転写調節因子 *AggR* 遺伝子を保有する typical EAEC (tEAEC) は *aggR* をマーカーとして PCR で検出可能であるが、*aggR* を保有しない atypical EAEC (aEAEC) も多数存在する。本研究では、小児下痢症患者由来大腸菌から分離した EAEC の病原遺伝子の分子疫学的解析や系統解析を通じて新たな凝集関連因子を同定し、EAEC を一般臨床検査室で容易に検出できる検査を確立することとする。

3. 研究の方法

(1) 鹿児島市内の小児科診療施設で細菌性下痢症と診断され、鹿児島市医師会検査センターに提出された便から検出された大腸菌 8,729 株を対象とした。平成 27 年度は大阪公衆衛生研究所で分離された EAEC も含めて解析した。下痢原性大腸菌の付着因子や毒素遺伝子、尿路病原性大腸菌の病原遺伝子、ESBL 遺伝子について報告されたプライマー

を利用して multiplex PCR を行った。テンプレートとなる DNA は加熱遠心後上澄みを用い、96 穴マイクロタイタープレートによる多検体を対象とした PCR システムを利用した。血清型はデンカ生研の「病原性大腸菌免疫血清」や「K 抗原免疫血清」を用いたが、PCR 法による型別決定も同時に行った。細胞付着能は HEp-2 細胞付着試験、バイオフィーム形成はマイクロタイタープレート法で定量化した。(2) 得られた EAEC の MLSA (multi locus sequence analysis) による系統解析を行った。7 つのハウスキーピング遺伝子を PCR で増幅し、シーケンス (ABI capillary sequencers) で塩基配列を決定、解析ソフト「Mega5」を用いた系統解析により系統樹を作成した。PCR による系統群の決定も行った。(3) 分離された EAEC について、MLSA (multi locus sequence analysis) による系統解析を行った。7 つのハウスキーピング遺伝子を PCR で増幅し、シーケンスで塩基配列を決定、解析ソフト「Mega5」を用いた系統解析により系統樹を作成した。PCR による系統群の決定も実施した。

4. 研究成果

(1) 2010 年までに鹿児島県で収集した腸管凝集性大腸菌 (EAEC) (typical EAEC169 株と atypical EAEC44 株) および大阪府立公衆衛生研究所で分離された typical EAEC 31 株の計 244 株を対象とし、各株の O・H 血清群を決定し、病原遺伝子分布状況を PCR で検索、さらに MLSA (multilocus sequence analysis) による系統解析を行った。その結果、typical EAEC では O111・O25・O126・O86 などがみられ、付着因子 AAF の I から V のうちいずれかの遺伝子を保有していた。O untypable の typical EAEC や atypical EAEC では、既知の付着遺伝子の検出率は低かった。EAEC O25 の多くは、尿路病原性大腸菌 (UPEC) の付着因子遺伝子 *afaB* と

成能を検討した結果、これまで O126 の EAEC 株は EAEC の染色体上の *aaiC* を保有し biofilm index (BI) が 0.2 以上と強いバイオフィルム形成能を示す株であったが、今回は O1 株以外の全ての株が *aaiC* を保有していたにもかかわらず BI が 0.2 以下だった。また、CTX-M 遺伝子を保有する株は O111 と UT の 3 株で、すべて BI が 0.2 以上の株であった。新生児髄膜炎の原因となる大腸菌 (NMEC) の多くが保有する K1 莢膜遺伝子の *neuC* は、O126 と O1 の 2 株が保有していた。NMEC の原因となる大腸菌の多くは O 血清型が 1 や 18 であることが知られているが、今回検出された O1 株は *neuC* を保有していたが *aaiC* や EAEC の既知の線毛遺伝子が検出されず、BI も低い値であった。一方 O126 株は *aaiC*、AAF II を保有し BI が高い値を示し強いバイオフィルム形成を示す株であった。2014 年以降 EAEC の検出頻度は低下していたが、本来の EAEC が CTX-M 遺伝子だけでなく K1 莢膜遺伝子も獲得していることが分かった。

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 1 件)

1. Naoko Imuta, Tadasuke Ooka, Kazuko Seto, Ryuji Kawahara, Toyoyasu Koriyama, Tsuyoshi Kojo, Atsushi Iguchi, Koichi Tokuda, Hideki Kawamura, Kiyotaka Yoshiie, Yoshitoshi Ogura, Tetsuya Hayashi, Junichiro Nishi. 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* 54 (8):00711-16, 2016 査読あり

〔学会発表〕(計 21 件)

1. 蘭牟田直子、大岡唯祐、吉家清貴、西 順一郎 髄膜炎リスクを持つ腸管内 K1 大腸菌 O1/O18 の薬剤耐性遺伝子獲得 第 91 回日本細菌学会総会、第 14 回日韓国際微生物学シンポジウム 2018.03.27-29
2. 蘭牟田直子、大岡唯祐、古城 剛、郡山豊泰、児玉祐一、川村英樹、吉家清貴、西 順一郎 小児腸管由来 ESBL 産生 K1 陽性大腸菌 O1/O18 株の 遺伝的背景の検討 第 87 回日本感染症学会西日本地方会学術集会 2017.10.26-28
3. 蘭牟田直子、児玉祐一、西 順一郎 髄膜炎のリスクを持つ腸管内 K1 大腸菌 O1・O18 への ESBL 遺伝子水平伝播 第 49 回日本小児感染症学会総会・学術集会 2017.10.21-22
4. Naoko Imuta, Tadasuke Ooka, Kiyotaka Yoshiie, Junichiro Nishi The emergence of diarrheagenic *Escherichia coli* and K1-positive *E. coli* possessing the ESBL blaCTX-M gene in the intestine of diarrheal children in Japan the 117th General Meeting of the American Society for Microbiology 2017.6.1-6
5. 蘭牟田直子、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 小児腸管由来の ESBL 産生大腸菌における病原遺伝子保有状況 (2001 ~ 2013) 第 91 回日本感染症学会総会・学術集会 2017.04.06-08
6. 蘭牟田直子、大岡唯祐、徳田浩一、西 順一郎 小児腸管由来 ESBL 産生大腸菌の推移と病原遺伝子保有状況 (2001 ~ 2013) 第 13 回日本小児

- 消化管感染症研究会
2017.02.04
7. 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
 8. 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ESBL遺伝子blaCTX-M保有頻度の年次推移(2001~2013)第69回日本細菌学会九州支部総会 2016.09.1-2
 9. Naoko Imuta, Tadasuke Ooka, Kiyotaka Yoshiie, Junichiro Nishi Variation of biofilm forming ability of AggR-positive Escherichia coli strains the 116th General Meeting of the American Society for Microbiology 2016.06.16-21
 10. 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 2016.06.09-11
 11. 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 2016.04.15-16
 12. 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 016.03.23-25
 13. 藺牟田直子、大岡唯祐、徳田浩一、西順一郎 下痢症患者由来大腸菌におけるK1莢膜陽性株の頻度とその特徴 第12回日本小児消化管感染症研究会 2016.02.06
 14. 藺牟田直子、大岡唯祐、徳田浩一、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) - EAEC O111・O127のCTX-M遺伝子獲得 - 第68回日本細菌学会九州支部総会 2015.09.04-05
 15. Naoko Imuta, Tadasuke Ooka, Kazuko Seto, Kiyotaka Yoshiie, Junichiro Nishi 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 2015.05.31-2015.06.02
 16. Naoko Imuta, Tadasuke Ooka, Kazuko Seto, Kiyotaka Yoshiie, Yoshitoshi Ogura, Tetsuya Hayashi, Junichiro Nishi Genetic heterogeneity of AggR-positive enteroaggregative Escherichia coli (EAEC) 第88回日本細菌学会総会 2015.03
 17. 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・学術集会 2014.10
 18. 藺牟田直子、勢戸和子、田口真澄、郡山豊泰、吉家清貴、久保田知洋、西順一郎 ESBLを産生する腸管凝集性大腸菌(EAEC)の遺伝的多様性 第84回日本感染症学会西日本地方会学術集会 2014-10

19. 藺牟田直子、大岡唯祐、勢戸和子、
徳田浩一、吉家清貴、小椋義俊、林
哲也、西順一郎 腸管凝集性大腸
菌 (EAEC) の遺伝的多様性第 67
回日本細菌学会九州支部総会
2014-09
20. 藺牟田直子、大岡唯祐、勢戸和子、
田口真澄、小椋義俊、林哲也、西順
一郎 ESBL を産生する腸管凝集性
大腸菌 (EAEC) の遺伝的多様性
第 18 回腸管出血性大腸菌感染症研
究会 2014.07
21. 藺牟田直子、久保田知洋、常 彬、
西 順一郎 鹿児島県の小児侵襲性肺
炎球菌感染症 - 血清型 19A の増加
と PCV13 補助的追加接種の必要性
- 第 88 回日本感染症学会学術講演
会 2014.06.18-20

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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

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

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()