

日本化学療法学会 公益目的事業プロジェクト 尿路感染症由来 ESBL 産生大腸菌の全ゲノム 解析による細菌学的・分子生物学的検討

尿路感染症由来 ESBL 産生大腸菌ワーキング委員：高橋 聡，清田 浩
公益社団法人日本化学療法学会理事長：清田 浩
公益社団法人日本化学療法学会前理事長：門田淳一

はじめに

基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) 産生大腸菌は、市中感染、また、医療関連感染の原因菌として問題になっており、増加傾向であるとされている。とりわけ、市中感染における耐性菌の増加として、健康人に対しても感染症を発症しうる ESBL 産生大腸菌が国内外で問題となっている。大腸菌は尿路感染症の主たる原因菌であるが、キノロン耐性大腸菌が注目されているなかで、ESBL 産生大腸菌も分離頻度は低いながらも増加傾向である。さらに、急性単純性膀胱炎においても大腸菌の耐性が少なからず認められ、「治って当たり前」の市中感染症が、今後は、治療に難渋するのではないかと危惧されている。このような現状で、急性単純性膀胱炎と複雑性尿路感染症由来の大腸菌について、耐性にかかわる因子の分子生物学的分析を行うことは意義があると考え、検討を行った。

研究

本研究は、公益社団法人日本化学療法学会の公益目的事業として、急性単純性膀胱炎由来 ESBL 産生大腸菌と複雑性尿路感染症の耐性にかかわるゲノムレベルの特徴について分析をすることを目的として行った。分析を行った大腸菌は、三学会（日本化学療法学会、日本感染症学会、日本臨床微生物学会）合同抗菌薬感受性サーベイランスで収集された急性単純性膀胱炎と複雑性尿路感染症由来で、ESBL 産生大腸菌が 35 株と、比較のために非 ESBL 産生大腸菌が 5 株である。すでに、levofloxacin (LVFX) と sitafloxacin (STFX) の MIC は測定され、報告されている^{1,2)}。

大腸菌株からのゲノム DNA 抽出は、インスタジーン (BIO-RAD, Hercules, CA, USA) 法により実施した。DNA の定量は、Qubit™ dsDNA HS reagent (ライフテクノロジーズ ジャパン株式会社, 東京) 50 μ L と Qubit™ dsDNA HS buffer (ライフテクノロジーズ ジャパン株式会社) 9.950 μ L を混和し、Working solution を調製した。DNA 溶液が検量線範囲内であることを確認し、測定サンプル調製後は 3 時間以内に測定を終了させた。DNA 溶液の残余は冷凍 (-20°C) にて保存した。PCR は、Nextera PCR Master Mix (イルミナ株式会社, 東京) を用い、PCR System にて反応を行った (Table 1)。シーケンシングは、次世代シーケンサー (MiSeq, イルミナ株式会社) により行った。次世代シーケンサー (MiSeq) より出力された fastq ファイルを CLC Genomics Workbench ソフトウェア (version 9.0.1, CLC bio 社/QIAGEN 社, 東京) で設定したワーク

Table 1. Pattern of PCR

温度	時間	Cycle
72°C	3 min	1
95°C	30 sec	1
95°C	10 sec	
55°C	30 sec	12
72°C	30 sec	
72°C	5 min	1
10°C	∞	-

Ramp speed: Max, Reaction volume: 50 μ L

フロー①にて解析し、コンセンサス配列 (fasta ファイル) を取得した。得られた fasta ファイルを、キノロン耐性決定領域 (QRDR, Accession No. X06744) をリファレンス配列に設定したワークフロー②にて解析し、キノロン耐性遺伝子の変異情報を取得した。また、ワークフロー①より得られたコンセンサス配列 (fasta ファイル) を Center for Genomic Epidemiology サイト (<http://www.genomicepidemiology.org/>) 内の ResFinder 2.1, MLST 1.8 (MultiLocus Sequence Typing), PlasmidFinder 1.3 の各ツールにより解析した。これら次世代シーケンサーを用いた解析は LSI メディエンス (東京) において行った。

結果概要

急性単純性膀胱炎由来株からは 8 株の ESBL 産生大腸菌を、複雑性尿路感染症由来株からは 27 株の ESBL 産生大腸菌と 5 株の非 ESBL 産生大腸菌を検討対象とした。解析を行った結果を、急性単純性膀胱炎と複雑性尿路感染症、すでに測定されていた LVFX と STFX の MIC, multilocus sequence typing (MLST), FimH 型, ESBL encoding gene and sequence type, quinolone resistant-determining region (QRDR) で示す (Table 2)。LVFX が 32 μ g/mL 以上を示す株では、ST131, かつ, FimH30 が高頻度に認められた。さらに, multilocus sequence typing (MLST), FimH 型, ESBL encoding gene and sequence type で分布を検討すると, ST131, かつ, FimH30, かつ, *bla*_{CTX-M-27} が 11 株で最多であった (Table 3)。また, *bla*_{CTX-M-14} が 10 株であり, そのうち, ST38 が 4 株, ST131 が 3 株であった。この結果は, 日本化学療法学会 公益目的事業プロジェクトの β -ラクタム系薬耐性腸内細菌科細菌に関する多施設共同研究の結果と同様であった。

まとめ

急性単純性膀胱炎および複雑性尿路感染症由来 ESBL 産生大腸菌株を対象として次世代シーケンサーを用いて抗菌薬耐性にかかわる分析を行った。

LVFX の MIC が 32 μ g/mL 以上の株では, ST131, FimH30, かつ, *bla*_{CTX-M-27} を示す株が高頻度であった。

分析を行った ESBL 産生大腸菌 35 株のなかで, 2 株は *bla*_{CTX-M} と同時に *bla*_{OXA-1} を, 11 株は *bla*_{TEM-1B} を, 1 株は *bla*_{TEM-1B} と *bla*_{TEM-169} を, 1 株は *bla*_{TEM-1A} を, 1 株は *bla*_{TEM-1C} を発現していることが示された。

Table 2. Characteristics of strains and results of molecular analysis

No.	AUC or CUTI	ESBL	LVFX (MIC; μg/mL)	STFX (MIC; μg/mL)	MLST	FimH	ESBL encoding gene and sequence types			QRDR
1	CUTI	+	64	8	ST648	H27	blaCTX-M-14	blaTEM-1B		Ser83Leu Asp87Asn
2	CUTI	+	64	4	ST131	H30	blaCTX-M-15	blaOXA-1		Ser83Leu Asp87Asn
3	CUTI	+	64	8	ST131	H30	blaCTX-M-15	blaOXA-1		Ser83Leu Asp87Asn
4	CUTI	+	64	4	ST131	H30	blaCTX-M-27			Ser83Leu Asp87Asn
5	CUTI	+	32	2	ST131	H30	blaCTX-M-27	blaTEM-1A		Ser83Leu Asp87Asn
6	CUTI	+	32	2	ST131	H30	blaCTX-M-14	blaTEM-1B		Ser83Leu Asp87Asn
7	CUTI	+	32	2	ST131	H30	blaCTX-M-27			Ser83Leu Asp87Asn
8	CUTI	+	32	2	ST131	H30	blaCTX-M-27			Ser83Leu Asp87Asn
9	CUTI	+	32	2	ST131	H30	blaCTX-M-27			Ser83Leu Asp87Asn
10	CUTI	+	32	2	ST131	H30	blaCTX-M-14	blaTEM-1B		Ser83Leu Asp87Asn
11	CUTI	+	32	2	ST131	H30	blaCTX-M-14			Ser83Leu Asp87Asn
12	CUTI	+	32	2	ST648	None	blaCTX-M-15	blaTEM-1B		Ser83Leu Asp87Asn
13	CUTI	+	32	2	ST131	H30	blaCTX-M-27			Ser83Leu Asp87Asn
14	CUTI	+	32	2	ST131	H30	blaCTX-M-27			Ser83Leu Asp87Asn
15	CUTI	+	32	2	ST224	H61	blaCTX-M-3	blaTEM-1B	blaTEM-169	Ser83Leu Asp87Asn
16	CUTI	+	32	2	ST131	H30	blaCTX-M-27	blaTEM-1C		Ser83Leu Asp87Asn
17	CUTI	+	32	2	ST131	H30	blaCTX-M-15			Ser83Leu Asp87Asn
18	CUTI	+	32	2	ST131	H30	blaCTX-M-27			Ser83Leu Asp87Asn
19	CUTI	+	32	2	ST533	H31	blaCTX-M-27			Ser83Leu Asp87Asn
20	AUC	+	8	2	ST131	H30	blaCTX-M-27			Ser83Leu Asp87Asn
21	AUC	+	32	2	ST405	H27	blaCTX-M-14			Ser83Leu Asp87Asn
22	CUTI	+	4	0.5	ST23	H35	blaCTX-M-55	blaTEM-1B		Ser83Leu Asp87Asn
23	CUTI	+	1	0.125	ST69	H27	blaCTX-M-3	blaTEM-1B		Ser83Leu
24	CUTI	+	0.5	≤0.06	ST550	H54	blaCTX-M-15	blaTEM-1B		Asp87Gly
25	CUTI	+	1	≤0.06	ST38	H5	blaCTX-M-14	blaTEM-1B		Ser83Leu
26	CUTI	+	0.5	≤0.06	ST38	H5	blaCTX-M-14			Ser83Leu
27	CUTI	+	1	0.125	ST38	H5	blaCTX-M-14	blaTEM-1B		Ser83Leu
28	CUTI	+	≤0.06	≤0.06	ST95	H41	blaCTX-M-27			
29	CUTI	+	0.5	≤0.06	Unknown	H41	blaCTX-M-14	blaTEM-1B		Asp87Asn
30	AUC	+	1	≤0.063	ST131	H22	blaCTX-M-8			Ser83Leu
31	AUC	+	0.5	≤0.063	ST1163	H453	blaCTX-M-27	blaTEM-1B		Ser83Leu
32	AUC	+	4	0.5	ST131	H30	blaCTX-M-15	blaCTX-M-27		Ser83Leu Asp87Asn
33	AUC	+	8	0.5	ST131	H30, H41	blaCTX-M-27			Ser83Leu Asp87Asn
34	AUC	+	0.5	≤0.063	ST38	H5	blaCTX-M-14			Ser83Leu
35	AUC	+	1	0.125	ST1177	H65	blaCTX-M-14	blaTEM-1B		Ser83Leu
36	CUTI	-	0.125	≤0.06	ST95	H18				
37	CUTI	-	≤0.063	≤0.06	ST12	H5				
38	CUTI	-	0.5	≤0.06	ST357	H21				Ser83Leu
39	CUTI	-	0.5	≤0.06	ST131	H41				Ser83Leu
40	CUTI	-	≤0.063	≤0.06	ST95	H250				

AUC: acute uncomplicated cystitis, CUTI: complicated urinary tract infection

本研究は、分離頻度が増加傾向である尿路感染症由来のESBL産生大腸菌に関する遺伝子レベルでの分析を次世代シーケンサーを用いて行っており、その結果を提供した。今回得られたデータは、分子疫学的な基礎データとなり、今後の尿路感染症治療、そして、尿路を介する感染制御への貢献が期待される。

Table 3. Results of detected ESBL encoding genes with *bla*_{CTX-M}, sequence types by multilocus sequence typing and FimH typing

ST	FimH	<i>bla</i> _{CTX-M-3}	<i>bla</i> _{CTX-M-8}	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>bla</i> _{CTX-M-27}	<i>bla</i> _{CTX-M-55}	total
23	35						1	1
38	All 5			4				4
69	27	1						1
95	41					1		1
131	30 in 17 strains, 22, 30 & 41		1	3	4	12		20
224	61	1						1
405	27			1				1
533	31					1		1
550	54				1			1
648	27, none			1	1			2
1,163	453					1		1
1,177	65			1				1
Unknown	41					1		1
total		2	1	10	6	16	1	36

One strain with ST131 and FimH30 showed both *bla*_{CTX-M-15} and *bla*_{CTX-M-27}. One strain with ST131 showed both FimH30 and 41.

利益相反自己申告：

高橋 聡はシノテスト株式会社より奨学寄付金を受けている。

清田 浩は富山化学工業(株)，第一三共(株)，アステラス製薬(株)，大正富山医薬品(株)，アストラゼネカ(株)，旭化成ファーマ(株)より奨学(奨励)寄付金を受けている。

門田淳一は申告すべきものなし。

文献

- 1) Ishikawa K, Matsumoto T, Yasuda M, Uehara S, Muratani T, Yagisawa M, et al: The nationwide study of bacterial pathogens associated with urinary tract infections conducted by the Japanese Society of Chemotherapy. J Infect Chemother 2011; 17: 126-38
- 2) Hayami H, Takahashi S, Ishikawa K, Yasuda M, Yamamoto S, Uehara S, et al: Nationwide surveillance of bacterial pathogens from patients with acute uncomplicated cystitis conducted by the Japanese surveillance committee during 2009 and 2010: antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* and *Staphylococcus saprophyticus*. J Infect Chemother 2013; 19: 393-403