

## 4. 早産児において生後早期に保菌される母親由来の大腸菌の病原因子の解析

○小泉 亜矢

群馬県立小児医療センター 新生児科

### 【研究目的】

大腸菌は新生児早発型敗血症で2番目に多い起因菌であり、特に重症感染症のハイリスク群である早産児において重要である。新生児早発型敗血症は主に母体の膣・外陰部から産道を介し上行性に子宮内、胎児へと細菌が伝播することにより発生する。近年は細菌のゲノム解析により病原性に関わる因子が明らかになりつつあり、病態の解明に重要な情報となっている。新生児の敗血症・髄膜炎を起こす大腸菌の80%以上がK1抗原を有することは広く知られているが、これらの病態の発生機序には他にも多くの病原因子(virulence factors)が複雑に関与していると予測されており、これらの因子が実際にどのように関与しているかはまだ十分に解明されていない。

今回の研究は、早産児において分娩前後に母体の産道を介して新生児に伝播する大腸菌の病原因子を解析し、新生児重症感染症のリスクの高い菌株の分子生物学的特徴を明らかにすることを目的とした。

### 【研究の必要性】

本研究は、早産児に重症感染症を起こすリスクの高い大腸菌株の分子生物学的特徴を明らかにすることで、母児感染予防対策の確立と早産児の予後改善に寄与する可能性がある。

### 【研究計画】

#### 1. 検体の採取

群馬県内の総合周産期センター及び地域周産期センターの新生児集中治療室(NICU)3施設(群馬県立小児医療センター、群馬大学付属病院、桐生厚生総合病院)で出生した在胎35週未満あるいは出生体重2000g未満の早産児とその母体を対象とする。

①新生児：入院時(出生直後)に咽頭または気管吸引物、便、血液より培養検体を採取する。

②母体：切迫早産で産科に入院した際に膣分泌物及び膣肛門部より培養検体を採取する。前期破水症例では入院から分娩まで2週間毎に、それ以外の切迫早産例では5週間毎に採取する。

上記で検出、解析した検体を母体培養陽性かつ新生児培養陽性群（以下垂直伝播群）、母体培養陽性かつ新生児培養陰性群（以下 control 群）に分け、保有する病原因子の相違を比較する。両群間の差の検定には Mann-Whitney U 検定および Fisher の直接確率検定を用い、 $p < 0.05$  を有意差ありとした。

## 2. 病原因子の検出

①K1 抗原：ラテックス凝集法抗原検査（PASTOREX Meningitis: Bio Rad）を用る。

②Phylogenetic typing：PCR 法を用いて4つのグループ（A,B1,B2,D）に分類する。

③病原性関連遺伝子の検出：腸管外病原性大腸菌で既知の遺伝子21種類（表1）について multiplex PCR 法を用いて解析する。

**表1. ExPECで代表的な病原因子21種類**

VF gene		VF gene	
<i>afa</i>	afimbrial adhesion	<i>usp</i>	uropathogenic specific protein
<i>aer</i>	aerobactin	<i>kpsMT</i>	Group 2 capsule
<i>cnf1</i>	cytotoxic necrotizing factor 1	<i>traT</i>	serum resistance associates
<i>sja/foc</i>	S/F1C fimbriae	<i>jyuA</i>	yersiniabactin receptor for ferric yersiniabactin uptake
<i>pap</i>	P fimbriae	<i>cvaC</i>	colicin V
<i>fimH</i>	type 1 fimbriae adhesion	<i>hly</i>	alpha hemolysin
<i>PAI</i>	pathogenic island marker of CFT073	<i>ompT</i>	outer membrane protease T
<i>ETTT</i>	type III secretion system	<i>ibeA</i>	invasion of brain endothelium
<i>iroN</i>	catecholate siderophore receptor	<i>chuA</i>	Phylogenetic grouping
<i>iha</i>	iron-regulated gene A homologue adhesin	<i>TspE4.C2</i>	Phylogenetic grouping
		<i>yjaA</i>	Phylogenetic grouping

*Takahashi et al (2006)*

### 【実施内容・結果】

調査期間中に、垂直伝播群6株、コントロール群65株の大腸菌が検出された。垂直伝播群は、敗血症が2例、髄膜炎が1例、Fetal inflammatory response syndrome (FIRS)が1例、保菌が2例であった。

## 1. 病原因子の解析

保有する病原因子は新生児培養陽性群で12.5 (11~16)個、control 群が10 (1~18)個 (いずれも中央値

**表2. 各病原因子の頻度の比較**

	垂直伝播群 n=6	コントロール群 n=65
K1 antigen	5 (83.3)	44 (67.7)
Virulence factors genes		
付着因子		
<i>sja/foc</i>	1 (16.7)	5 (6.2)
<i>pap</i>	1 (16.7)	16 (24.6)
<i>fimH</i>	6 (100)	60 (92.3)
<i>afa</i>	1 (16.7)	3 (4.6)
<i>iha</i>	3 (50)	22 (33.8)
侵入因子		
<i>ibeA</i>	3 (50)	23 (35.4)
<i>ETTT</i>	0 (0)	17 (26.2)
鉄補捉因子		
<i>iroN</i>	2 (33.3)	8 (12.3)
<i>fyuA</i>	6 (100)	51 (78.5)
<i>aer</i>	4 (66.7)	24 (36.9)
血清抵抗因子		
<i>traT</i>	6 (100)	44 (67.7)
毒素		
<i>cnf1</i>	1 (16.7)	2 (3.1)
<i>cvaC</i>	1 (16.7)	1 (1.5)
<i>hly</i>	2 (16.7)	2 (3.1)
Protectin		
<i>KpsMT</i>	6 (100)	48 (73.8)
<i>OmpT</i>	6 (100)	52 (80)
その他		
<i>PAI</i>	6 (100)	44 (67.7)
<i>usp</i>	6 (100)	40 (61.5)

(範囲)) で新生児培養陽性群で有意に多くの因子を保有していた。(p =0.003) それぞれの病原因子の保有頻度の比較では、両群間に有意差を認めなかった (表 2)。

## 2. Phylogenetic grouping

新生児培養陽性群は全例が病原性が高いとされる group B2 に属していた。control 群でも病原性の高い group B2 (63%) と group D1 (23%) が大半を占めており、病原性の低い group A は 13.8% と少なかった。

## 3. 臨床経過と病原因子の比較

敗血症、髄膜炎、FIRS を合併した株は全て ampicillin 耐性菌あるいは広域  $\beta$  ラクターマーゼ (ESBL) 産生菌であった。保有する病原因子数は髄膜炎株で 16 個と最も多く、*cnf1, hly, sfa/foc* の 3 つの遺伝子の特異的に保有していた。(表 3)

**表 3. 垂直伝播群の臨床経過と菌株の特徴**

Cas e No.	Clinical course	Total VFs no.	Phylogenetic group	Antimicrobial susceptibility
1	meningitis	16	B2	ESBL
2	sepsis	13	B2	ABPC-R
3	sepsis	12	B2	ESBL
4	FIRS	12	B2	ABPC-R
5	colonization	13	B2	ABPC-S
6	colonization	11	B2	ABPC-S

## 4. 薬剤耐性と病原因子との関連

病原因子の総保有数は ampicillin 耐性菌と感受性菌、ESBL 産生菌と非産生菌でそれぞれ有意差を認めなかった。鉄捕捉因子の *aer* 遺伝子、血清抵抗因子の *traT* 遺伝子は ampicillin 耐性菌で有意に多かった。( *aer*: 66.7% v.s. 23.5%,  $p \leq 0.01$ , *traT*: 87.5% v.s. 61.7%,  $p \leq 0.05$ )

### 【考察と今後の課題】

今回の調査により以下のことが明らかになった。第一に、早産妊婦の大半は腸管細菌叢とは異なる腸管外病原性大腸菌を保有していた。第二に、新生児培養陽性群では、臨床経過が重篤なほど多数の病原因子を保有する傾向にあった。第三に、薬剤耐性菌と病原因子の保有数には有意差がなかったが、耐性菌が多く保有する因子が幾つか認められ、感染成立に関与している可能性があった。

早産妊婦の大半は腸管外病原性大腸菌を保有していた。妊婦で検出される大腸菌の性質について、Soez-Lopez らは腔培養株と子宮内感染株を比較した調査を行っており、子宮内感染株の半数以上は病原性の高い group B2 に属していたとし、腔に常在する大腸菌株と子宮内感染株は異なる性質を持つ可能性を報告している。<sup>1</sup> 今回の結果もこれに一致するものであり、早産妊婦では子宮感染のリスクの高い株を潜在的に保有している可能性が考えられる。ただし今回は早産妊婦を対象を限定しており、正産にいたった妊婦株との比較検討が今後必要である。

新生児培養陽性群では、臨床経過が重篤なほど多数の病原因子を保有する傾向にあった。特に髄膜炎株では、*cnf1*、*hly*、*sfa/foc* の 3 つの遺伝子が検出されたが、他の垂直伝播株では検出されなかった。*cnf1* は細菌の細胞質から分泌され、宿主の *cnf1 receptor1* と結合し脳の微小血管内皮細胞への侵入に関与しているとされている。<sup>2</sup> *hly* は宿主内での細菌の増殖に関与し、新生児髄膜炎で代表的な K1 株の約 8 割で陽性との報告もある。<sup>3</sup> *sfa/hoc* は微小血管内皮細胞への付着を促す因子であり、<sup>45</sup> 腔培養や血液培養検体で多く検出されるとの報告もある。<sup>6</sup> 今回の調査でも、髄膜炎株は敗血症株が保有していないこれらの因子を保有していることから、症例数が少なく断定はできないが、脳血流関門へ侵入するための特異的な病態に関与している可能性が疑われた。

薬剤耐性菌と病原因子との関連については、ampicillin 耐性菌<sup>7</sup> や ESBL 産生菌<sup>8</sup> において、耐性菌株で *pap* (線毛因子) が多かったという報告がある一方で、耐性菌と感受性菌で有意な差はないという報告もあり、<sup>9</sup> 統一した見解は得られていない。Ampicillin 耐性大腸菌ではプラスミド上に病原遺伝子の集まった特定領域を保有していることが知られており、病態の成立に関連している可能性がある。周産期領域で検出される菌株に関する報告はまだ少なく、さらなるデータの蓄積が必要である。

今後は、対象株のプラスミドプロファイリングを行い、病態に関与している遺伝子の解析を進めていく予定である。

## 【参考文献】

- [1] E. Sáez-López, E. Guiral, D. Fernández-Orth, S. Villanueva, A. Goncé, M. López, I. Teixidó, A. Pericot, F. Figueras, M. Palacio, T. Cobo, J. Bosch, and S. M. Soto, "Vaginal versus Obstetric Infection Escherichia coli Isolates among Pregnant Women: Antimicrobial Resistance and Genetic Virulence Profile," *PLoS One*, vol. 11, no. 1, p. e0146531, Jan. 2016.
- [2] M.-H. Wang and K. S. Kim, "Cytotoxic necrotizing factor 1 contributes to Escherichia coli meningitis," *Toxins (Basel)*, vol. 5, no. 11, pp. 2270–80, Nov. 2013.
- [3] A. F.-P. Sonnen and P. Henneke, "Role of

- pore-forming toxins in neonatal sepsis.," *Clin. Dev. Immunol.*, vol. 2013, p. 608456, Jan. 2013.
- [4] J. Parkkinen, T. K. Korhonen, A. Pere, J. Hacker, and S. Soinila, "Binding sites in the rat brain for *Escherichia coli* S fimbriae associated with neonatal meningitis.," *J. Clin. Invest.*, vol. 81, no. 3, pp. 860–5, Mar. 1988.
- [5] N. V. Prasadarao, C. A. Wass, and K. S. Kim, "Identification and characterization of S fimbria-binding sialoglycoproteins on brain microvascular endothelial cells.," *Infect. Immun.*, vol. 65, no. 7, pp. 2852–60, Jul. 1997.
- [6] S. Watt, P. Lanotte, L. Mereghetti, M. Moulin-Schouleur, B. Picard, and R. Quentin, "Escherichia coli strains from pregnant women and neonates: intraspecies genetic distribution and prevalence of virulence factors.," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 41, no. 5, pp. 1929–35, May 2003.
- [7] N. Karami, C. Hannoun, I. Adlerberth, and A. E. Wold, "Colonization dynamics of ampicillin-resistant *Escherichia coli* in the infantile colonic microbiota.," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 62, no. 4, pp. 703–8, Oct. 2008.
- [8] A. Chmielarczyk, M. Pobiega, J. Wójkowska-Mach, D. Romaniszyn, P. Adamski, P. B. Heczko, and M. Bulanda, "Molecular epidemiology, plasmid analysis, virulence, and resistance of *Escherichia coli* isolated from neonatal intensive care units in Poland.," *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 76, no. 4, pp. 542–5, Aug. 2013.
- [9] V. Houdouin, S. Bonacorsi, P. Bidet, M. Bingen-Bidois, D. Barraud, and E. Bingen, "Phylogenetic background and carriage of pathogenicity island-like domains in relation to antibiotic resistance profiles among *Escherichia coli* urosepsis isolates.," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 58, no. 4, pp. 748–51, Oct. 2006.

#### 【経費使途明細】

実験用物品購入費	
陽性コントロール用遺伝子合成費用	¥169,719
PCR プライマー作成費用	¥21,222
K 1 抗原検出用抗原キット	¥66,657
菌株保存用バイアル	¥93,312
合計	¥350,910
大同生命厚生事業団助成金	¥300,000