

過粘稠性肺炎桿菌感染症における 重症化機構の解明

五来 美里^{1*}, 有賀 聖^{2*}, 藤田 和恵³, 眞野 容子², 青木 渉¹, 松田 久仁子³,
嶋井 浩行³, 齋藤 好信³, 弦間 昭彦³, 古谷 信彦^{1,2}

¹ 文京学院大学大学院 保健医療科学研究科

² 文京学院大学 保健医療技術学部 臨床検査学科

³ 日本医科大学 呼吸器内科

* Equally contributed

要旨

近年、肝膿瘍を呈し血行性に播種、致死率の高い過粘稠性肺炎桿菌が注目されている。粘稠性に関わる因子として、莢膜血清型や *magA*, *rmpA* などの病原遺伝子が報告されているが、重症化機構の解明は十分ではない。そこで過粘稠性肺炎桿菌と非過粘稠性肺炎桿菌の細菌学的な違いについて検討した。過粘稠性肺炎桿菌で病原遺伝子非保有株や、非過粘稠性肺炎桿菌で病原遺伝子保有株が存在し、表現型と既知の病原遺伝子の保有状況は一致しなかった。非過粘稠性肺炎桿菌は肺胞上皮細胞への侵入性が高く、特に過粘稠性肺炎桿菌で病原遺伝子陽性株では細胞に侵入しにくく、リン酸緩衝生理食塩水による洗浄効果は低かった。以上より、重症化の要因のひとつとして菌体の臓器への付着のしやすさ、洗浄のしにくさが関与していると考えられた。過粘稠性肺炎桿菌感染症には、ドレナージや洗浄による迅速かつ適切な治療が、病態の回復につながる可能性があると考えられた。

キーワード

過粘稠性肺炎桿菌感染症, 重症化機構, 付着性

序論

肺炎桿菌は、市中感染の代表的な原因として重要なグラム陰性桿菌のひとつである。肺炎桿菌には菌の表現型として粘稠性を示す株が存在することは古くから知られていたが¹⁾、近年、高い粘稠性をもつ肺炎桿菌 (hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae*: hvKP) が、血行性に播種し、致死率の高い病態を引き起こすことが注目されている²⁾。また肝膿瘍だけでなく、敗血症、髄膜炎、肺炎などの感染症を呈することも報告されている³⁾。肺炎桿菌の病原因子として、莢膜血清型の違いや、粘稠性に関連する遺伝子として知られる *magA*, *rmpA* 遺伝子などとの関連性が報告されているが⁴⁾、重症化するメカニズムに関する報告は多くない。そこで、本研究では重症化機構の解明を目的とし、過粘稠性肺炎桿菌と非過粘稠性肺炎桿菌の細菌学的な違いについて検討した。

方法

2.1 使用菌株

当研究室保存の、肺炎桿菌臨床分離株 50 株を用いた。内訳は、喀痰由来 15 株、尿由来 14 株、便由来 10 株、膿由来 7 株、その他 (耳、膿、胆汁、ドレーン) 4 株の計 50 株であった。

2.2 過粘稠性試験 (String test)⁵⁾

-80℃で保存した菌を 5% ヒツジ血液寒天培地 (日本 BD, 東京) に接種し、35℃で 24 時間培養後、滅菌爪楊枝を用いて発育した菌の集落の伸長性を測定した。5mm 以上菌が伸長したものを過粘稠性肺炎桿菌、5mm 以下のものを非過粘稠性肺炎桿菌と判断した。

2.3 PCR法による病原因子の検索⁴⁾⁶⁾

McFarland 0.5 (1.5×10^8 CFU/mL) に調整した菌液を、滅菌生理食塩水で 1.5×10^5 CFU/mL に希釈し、10 μ L を LB broth (日本 BD, 東京) 3 mL に接種、35 $^{\circ}$ C, 135rpm で9時間振盪培養した。培養後遠心し、ポイル法 (98 $^{\circ}$ C,

10分) でDNAを抽出後、94 $^{\circ}$ C 5分 (1 cycle), 94 $^{\circ}$ C 30秒, アニーリング (*magA* 50 $^{\circ}$ C, *rmpA* 46 $^{\circ}$ C, K1 50 $^{\circ}$ C, K2 50 $^{\circ}$ C) 30秒, 72 $^{\circ}$ C 1分の反応条件でPCRを行った。各Primer配列を示す(表1)。

表1 肺炎桿菌病原遺伝子のPrimer配列

Primer	Size(bp)	Forward	Reverse
<i>magA</i>	1283	GGTGCTCTTTACATCATTGC	GCAATGGCCATTTCGCTTAG
<i>rmpA</i>	535	ACTGGGCTACCTCTGCTTCA	CTTGATGAGCCATCTTTCA
K1	1283	GGTGCTCTTTACATCATTGC	GCAATGGCCATTTCGCTTAG
K2	641	GACCCGATATTCATACTTGACAGAG	CCTGAAGTAAATCGTAAATAGATGGC

2.4 増殖速度

McFarland 0.5 (1.5×10^8 CFU/mL) に調整した菌液を、滅菌生理食塩水を用いて 1.5×10^5 CFU/mL に希釈、10 μ L を LB broth 3mL に接種、35 $^{\circ}$ C, 135rpm で22時間振盪培養を行った。培養開始から、0, 1, 4, 7, 9, 12, 22時間後の菌液をサンプリングし、滅菌生理食塩水を用いて 10^9 倍まで希釈、LB agarを用いて生菌数の算定を行った。

2.5 肺炎桿菌培養上清による肺胞上皮細胞への傷害性の検討⁷⁾

McFarland 0.5 (1.5×10^8 CFU/mL) に調整した菌液を、滅菌生理食塩水を用いて 1.5×10^5 CFU/mL に希釈し、10 μ L を LB broth 3mL に接種、35 $^{\circ}$ C, 135 rpm で14時間振盪培養を行った。14時間振盪培養した菌液を3000 rpm で10分遠心、上清を0.22 μ m pore フィルター (sartorius stedim biotech, Germany) でろ過滅菌し、肺炎桿菌培養上清を得た。ヒト肺がん由来の細胞であるA549細胞をコンフルエントになる直前まで10% FCS入りRPMI1640培地 (和光純薬, 東京) で培養、 10^5 個/mLになるよう調整し、96well平底プレートに100 μ L撒き、CO₂ インキュベータで37 $^{\circ}$ C一晩培養した。10% FCS入りRPMI1640を捨て、FCS free RPMI1640, 90 μ Lに濾過滅菌した肺炎桿菌培養上清を10 μ L添加、CO₂ インキュベータで37 $^{\circ}$ C, 24時間反応させた後、Cell Counting Kit-8 (和光純薬, 東京) を各wellに10 μ Lずつ添加し、CO₂ インキュベータで1時間反応させた。その後Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific Inc., MA) を用いて波長450nmで吸光度を測定した。

2.6 肺胞上皮細胞への侵入性、付着性、リン酸緩衝生理食塩水による洗浄効果の検討⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾

培養上清による肺胞上皮細胞への傷害性と同様の条件でA549細胞を培養した。24well平底プレートに1mL接種し、CO₂ インキュベータで37 $^{\circ}$ C, 24時間培養した。10% FCS入りRPMI1640を捨て、FCS free RPMI1640で3回洗浄、最後にFCS free RPMI1640を900 μ L添加した。それぞれのwellにMcFarland 0.5 (1.5×10^8 CFU/mL) に調整した菌液を 10^5 /100 μ L添加、CO₂ インキュベータ内で3, 6時間反応させた。反応後の上清をLB agarを用いて生菌数の算定を行った。リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline : PBS) 1mLを用いwell内を3回洗浄、毎洗浄後の液をLB agarを用いてA549細胞から剥離した菌数を算定した。次に、FCS free RPMI1640で100 μ g/mLに調整したゲンタマイシン (和光純薬, 東京) を1mL添加後、CO₂ インキュベータで1時間反応させ、A549細胞表面の菌を死滅させた。反応後の上清は、LB agarを用いてA549細胞表面の菌が死滅したことを確認した。well内をPBSを1mL用い3回洗浄し、0.5%に調整したTriton X-100 (和光純薬, 東京) を添加、CO₂ インキュベータ内で10分間反応させ、A549細胞を破壊した後、LB agarを用いてA549細胞内に侵入した菌数の算定を行った。また、PBSによる洗浄効果の検討は、洗浄毎にPBSを回収、回収液内の菌数をA549細胞から剥離した菌数とし算定した。

表2 PCR法による病原因子の検索

	臨床分離株 n = 50	喀痰 n = 15	尿 n = 14	便 n = 10	膿 n = 7	その他 n = 4 (耳, 膿, 胆汁, ドレーン)
過粘稠性試験陽性	15 (30%)	6(40.0%)	1(7.1%)	1(10.0%)	4(57.1%)	3(75.0%)
病原遺伝子 <i>magA</i>	3(6.0%)	2(13.3%)	0(0.0%)	1(10.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)
<i>rmpA</i>	11(22.0%)	5(33.3%)	0(0.0%)	3(30.0%)	1(14.2%)	2(50.0%)
莢膜血清型 K1	3(6.0%)	2(13.3%)	0(0.0%)	1(10.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)
K2	6(12.0%)	3(20.0%)	1(7.1%)	1(10.0%)	1(14.2%)	0(0.0%)

結果

3.1 過粘稠性試験 (String test)

50株中、過粘稠性肺炎桿菌は15株(30.0%)、非過粘稠性肺炎桿菌は35株(70.0%)であった(図1)。分離部位ごとに過粘稠性肺炎桿菌の分離率は異なり、最も高頻度で分離された材料は、膿(57.1%)、次いで喀痰(40.0%)であった(表2)。

3.2 PCR法による病原因子の検索

表現型と病原因子の保有状況の関連を検討するため、莢膜血清型、*magA*、*rmpA* 遺伝子検索を行った。過粘稠性試験と莢膜血清型、*magA*、*rmpA* 遺伝子の関連について示す(表2)。50株中、*magA* 陽性は3株(6.0%)、*rmpA* 陽性11株(22.0%)、莢膜血清型1型(K1)は3株(6.0%)、莢膜血清型2型(K2)は6株(12.0%)であった。過粘稠性試験の結果と*magA*、*rmpA* 遺伝子の保有状況が必ずしも一致せず、*magA* または *rmpA* 遺伝子を保有していない過粘稠性肺炎桿菌(6株, 12.0%)と、*magA* または *rmpA* 遺伝子を保有している非過粘稠性肺炎桿(2株, 4.0%)が存在した。

3.3 増殖速度の比較

菌の増殖する速度の違いが重症化に關与する可能性を考え、過粘稠性、非過粘稠性肺炎桿菌別の増殖速度の違いについて検討した。肺炎桿菌の各検討時間における生菌数算定結果を示す(図2)。過粘稠性肺炎桿菌と非過粘稠性肺炎桿菌では増殖速度に有意な差は認められなかった。しかし、過粘稠性肺炎桿菌6株中2株で増殖速度の低下がみられたため、莢膜血清型と菌の増殖速度、*magA*、*rmpA* 遺伝子の関連性について検討を行ったところ、過粘稠性肺炎桿菌で増殖の遅い2株中1株は、*magA* かつ *rmpA* 遺伝子陽性で莢膜血清型はK1であり、もう1株は *rmpA* 遺伝子陽

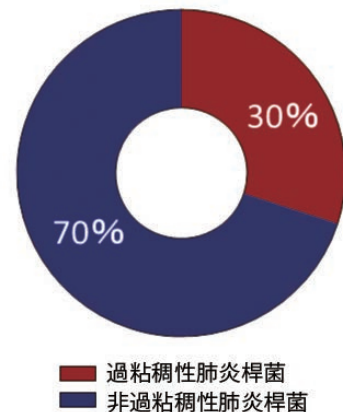


図1 過粘稠性試験 (String test)

過粘稠性肺炎桿菌は50株中15株(30.0%)、非過粘稠性肺炎桿菌は35株(70.0%)であった。

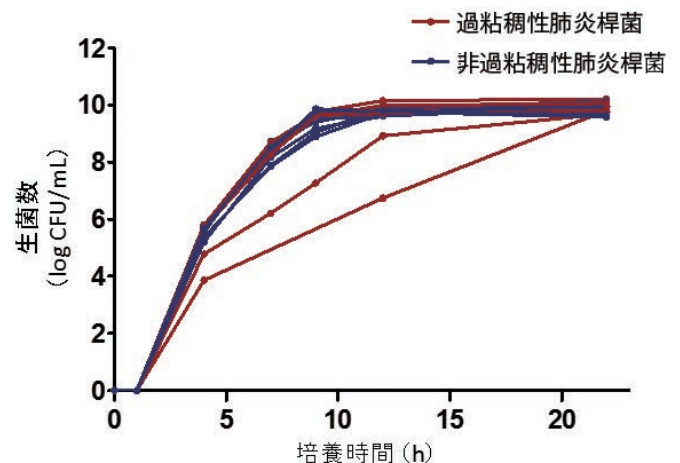


図2 増殖速度

過粘稠性肺炎桿菌と非過粘稠性肺炎桿菌は、増殖速度に明らかな差は認められなかった。しかし、過粘稠性肺炎桿菌で病原遺伝子陽性株2株で増殖速度の低下が認められた。

性で莢膜血清型は K2 であった。

3.4 肺炎桿菌培養上清による肺胞上皮細胞への傷害性の検討

肺炎桿菌の菌体外分泌物が生体に影響を与える可能性を考え、肺胞上皮細胞に対する傷害性への検討を行った。過粘稠性肺炎桿菌と非過粘稠性肺炎桿菌の培養上清による A549 細胞への傷害性の違いを示す (図 3)。細胞生存率は過粘稠性肺炎桿菌と非過粘稠性肺炎桿菌共に明らかな差は認めず、両群ともコントロールの LB broth との比較で明らかな差を認めないことから、肺炎桿菌培養上清による細胞傷害性は低いことが示唆された。

3.5 肺胞上皮細胞への菌の侵入性の検討

細胞侵入性の違いにより重症化する可能性を考え、過粘稠性肺炎桿菌、非過粘稠性肺炎桿菌の病原遺伝子の有無による肺胞上皮細胞への菌の侵入性の検討を行った。過粘稠性肺炎桿菌、非過粘稠性肺炎桿菌の病原遺伝子の有無による A549 細胞への侵入性の違いを示す (図 4)。非過粘稠性肺炎桿菌は過粘稠性肺炎桿菌と比較し、6 時間後に約 6.5 倍の菌が細胞内に侵入しており、非過粘稠性肺炎桿菌の方が A549 細胞への侵入性が高かった。一方、過粘稠性肺炎桿菌では、*magA* または *rmpA* 遺伝子陽性株では細胞に侵入しにくい傾向にあった。

3.6 肺胞上皮細胞への菌の付着性、リン酸緩衝生理食塩水による洗浄効果の検討

過粘稠性肺炎桿菌は、肺胞上皮細胞に強固に付着し剥離しにくく炎症局所で菌が増殖するために重症化しやすい可能性を考え、菌の上皮細胞への付着性を検討した。過粘稠性肺炎桿菌、非過粘稠性肺炎桿菌の病原遺伝子の有無による A549 細胞への付着性の違いを示す (図 5)。過粘稠性肺炎桿菌の中で、*magA* または *rmpA* 遺伝子陽性株は、非過粘稠性肺炎桿菌と比較し、PBS 洗浄時に A549 細胞から剥離しにくく、細胞から剥離した菌数は非過粘稠性肺炎桿菌と比較し、約 1/10 倍と非常に少なかった。

考察

本研究では、過粘稠性肺炎桿菌感染症による重症化機構の解明を目的とし、過粘稠性肺炎桿菌と非過粘稠性肺炎桿菌の細菌学的な違いについて検討を行った。過粘稠性肺炎桿菌は、非過粘稠性肺炎桿菌と比較し肺胞上皮細胞に付着・定着しやすく、洗浄されにくいという結果が得られ、炎症

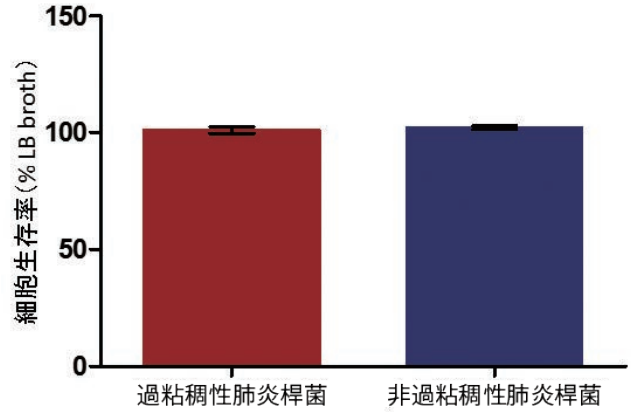


図 3 肺炎桿菌の培養上清による細傷害性
過粘稠性肺炎桿菌、非過粘稠性肺炎桿菌の培養上清による傷害性は低く、両群に明らかな差は認められなかった。

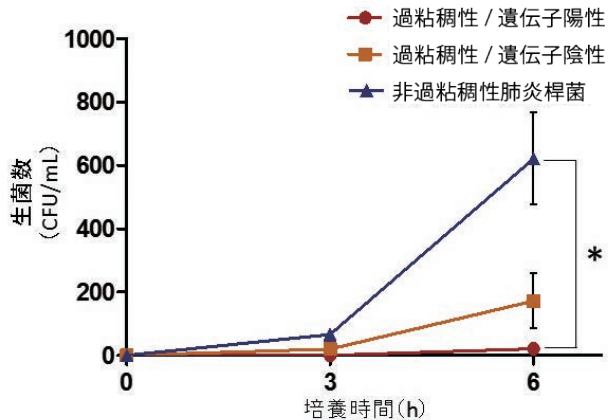


図 4 肺胞上皮細胞に対する肺炎桿菌の侵入性の検討
非過粘稠性肺炎桿菌は過粘稠性肺炎桿菌と比較し、有意な肺胞上皮細胞へ菌の侵入を認めた。それに対し、過粘稠性肺炎桿菌で特に *magA*, *rmpA* 遺伝子保有株は肺胞上皮細胞にほとんど侵入しなかった。(*P=0.0161)

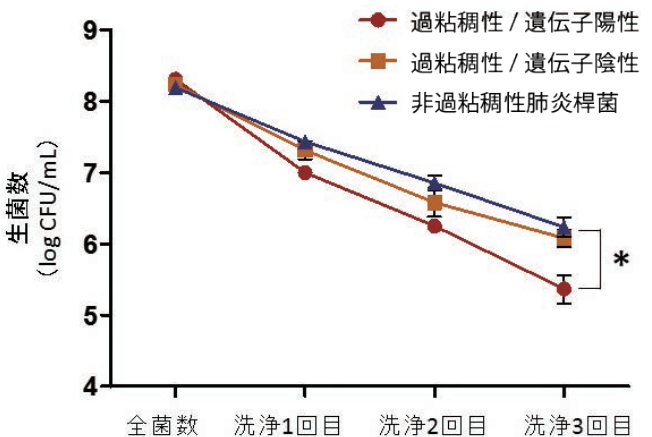


図 5 肺胞上皮細胞に対する PBS による肺炎桿菌の洗浄効果の検討
過粘稠性肺炎桿菌かつ病原遺伝子陽性株は PBS 洗浄による肺胞上皮細胞からの菌の剥離が少なく洗浄効果が乏しいという結果を示した。(*P=0.002)

局所から菌が排除されにくいことが過粘稠性肺炎桿菌感染症の重症化に関与している可能性が示された。

肺炎桿菌は、グラム陰性桿菌で腸内細菌科に属しており、ヒトの腸内常在菌である。また、呼吸器感染症や尿路感染症、および肝・胆道感染症の主要な起病菌であり、菌血症や敗血症も起こし得る。肺炎桿菌の病原因子としては、莢膜血清型や過粘稠性、リポ多糖^{11) 12)}などが知られており、なかでも台湾を中心に報告の多い過粘稠性を示す肺炎桿菌による肝膿瘍が注目されている。台湾で問題となっている菌株は、一般的な肺炎桿菌に比べさらに高度な粘稠性を示し、莢膜血清型は1型(K1)、*magA*陽性で、multilocus sequence typing (MLST)は、ST23に分類されるものが多いこと、血行性感染を合併する頻度が高く、それに伴って髄膜炎、眼内炎などを引き起こし重症化すると報告されている¹³⁾。しかし、過粘稠性肺炎桿菌感染症に対する重症化機構の解明は十分ではない。そこで今回私どもは、肺炎桿菌の粘稠度の違いによる細菌学的な違いが、過粘稠性肺炎桿菌感染症の重症化機構に与える影響の解明を目的とし検討を行った。

過粘稠性試験の結果、過粘稠性肺炎桿菌は50株中15株(30.0%)、非過粘稠性肺炎桿菌は35株(70.0%)であり既知の報告¹⁴⁾と同様の分離頻度であった。また、分離部位ごとに過粘稠性肺炎桿菌の分離頻度は異なっており、既知の報告同様、最も高頻度に分離された材料は、喀痰と膿であった。

現在、肺炎桿菌の粘稠性と関連する因子として莢膜血清型と*magA*、*rmpA*遺伝子が知られている^{4) 14)}。今回の検討では、過粘稠性肺炎桿菌15株中6株(40.0%)が*rmpA*遺伝子陽性、2株(13.3%)が*magA*遺伝子陽性で、過粘稠性試験との関連性が強い病原因子は*rmpA*遺伝子と考えた。Yuらの報告¹⁵⁾では血液培養から分離された肺炎桿菌151例のうち58例(36.7%)が過粘稠性肺炎桿菌で、そのうち90%が*rmpA*遺伝子陽性、29%が*magA*遺伝子陽性であり、また中本らの報告²⁾では、血液培養から分離された肺炎桿菌151例のうち過粘稠性肺炎桿菌は25例(16.6%)で認められ、そのうち88%が*rmpA*遺伝子陽性、8%が*magA*遺伝子陽性であった。私どもの検討結果は、過粘稠性試験の結果と関連性の高い病原因子は*rmpA*遺伝子であるという点は既報と同様であるが、*rmpA*遺伝子の陽性率は既知の報告より低かった。本検討では、ボイル法を用いて核酸抽出を行ったが、核酸抽出法の違いにより解析結果が得られる割合を示すcall rateに差異があることが報告されており¹⁶⁾、遺伝子の検出率に影響を与えた可能性が推測される。今後、核酸抽出法など遺伝子検出方法

に関する詳細な検討が必要と考えた。また、*magA*、*rmpA*遺伝子を保有していない過粘稠性肺炎桿菌と、*magA*、*rmpA*遺伝子を保有している非過粘稠性肺炎桿菌が存在したことから、過粘稠性試験の結果と病原因子の保有状況は必ずしも一致せず、他にも過粘稠性に関連する遺伝子が存在する可能性があり、今後もさらなる検討を要する。

増殖速度の違いに関する検討では、過粘稠性肺炎桿菌と非過粘稠性肺炎桿菌で増殖速度に著しい差は認められず、菌の増殖速度と重症化の関連性は低いことが示唆された。しかし、過粘稠性肺炎桿菌かつ*magA*または*rmpA*遺伝子発現陽性株の2株で菌の増殖が遅い性質をもつ株が存在したことから、過粘稠性肺炎桿菌の中でも病原因子の保有状況により増殖速度が異なる可能性が示唆され、今後菌株数を増やし検討を行う必要があると考えた。

肺胞上皮細胞に対する傷害性への検討では、細胞生存率は過粘稠性肺炎桿菌と非過粘稠性肺炎桿菌共に明らかな差は認めず、両群ともコントロールのLB brothとの比較で明らかな差を認めないことから肺炎桿菌の菌体外分泌物は細胞への傷害性は低いことが示唆された。

過粘稠性肺炎桿菌、非過粘稠性肺炎桿菌、病原遺伝子の有無による肺胞上皮細胞への菌の侵入性の検討より、非過粘稠性肺炎桿菌の方が肺胞上皮細胞への侵入性が高く、それに対し、過粘稠性肺炎桿菌の中で特に*magA*、*rmpA*遺伝子保有株は肺胞上皮細胞に侵入しにくい傾向にあった。しかし、肺胞上皮細胞へ侵入した菌数は全体のごくわずかであった。Carstenらの報告では¹⁰⁾、莢膜を有しない肺炎桿菌は、莢膜を有する肺炎桿菌より容易に細胞内に侵入すると報告している。肺炎桿菌は菌体周囲に多糖類を主成分とする厚い莢膜を有し、過粘稠性肺炎桿菌のコロニーに触れると糸を引くほど粘稠性が高いといった特徴は厚い莢膜によるものとされる。今回の結果は既知の報告と同様で、過粘稠性肺炎桿菌が肺胞上皮細胞内に侵入しにくい要因として、過粘稠性肺炎桿菌は肺胞上皮細胞に付着し、侵入が妨げられている可能性を考えた。さらに、肺胞上皮への菌の付着、リン酸緩衝生理食塩水による洗浄効果の検討において、過粘稠性肺炎桿菌のうち特に病原遺伝子陽性株では、PBS洗浄による細胞からの菌の剥離が少ないという結果であった。過粘稠性肺炎桿菌は感染臓器に付着しやすく洗浄されにくいいため炎症局所で容易に増殖することが、治療に奏功しにくい要因のひとつである可能性を考えた。過粘稠性肺炎桿菌感染症を診た場合、抗菌薬投与とともに積極的な洗浄やドレナージによる菌の排除が必要と考えた。

結語

本研究より、肺炎桿菌の過粘稠性が重症化には、菌体そのものの粘稠性による感染臓器への付着のしやすさ、洗浄されにくさが関与している可能性が示唆された。過粘稠性肺炎桿菌感染症には、抗菌薬投与とともにドレナージや洗浄による迅速かつ適切な治療が、病態の回復につながる可能性があると考えた。また今回の研究では、過粘稠性試験の結果と既に報告されている病原因子である *magA*, *rpmA* 遺伝子の保有状況が必ずしも一致しなかったことから、これらとは異なる病原遺伝子の関連が示唆され、病原遺伝子に関する更なる検討が必要と考える。

引用文献

- 1) David.K THE NETTER COLLECTION of Medical Illustrations, Vol.3: Respiratory system, 2nd Ed.2011; 3:182-183, Philadelphia, Sanders.
- 2) 中本啓太郎, 小出卓, 長友禎子, 他 Hypremucoviscosity phenotype の *Klebsiella pneumoniae* による肝膿瘍・敗血症性肺塞栓症の重症例. 感染症学雑誌 2011;85(4) : 366-369.
- 3) Fang CT, Chuang YP, Shun CT, et al. A Novel Virulence Gene in *Klebsiella pneumoniae* Strains Causing Primary Liver Abscess and Septic metastatic Complications, J Exp Med 2004; 199(5):697-705.
- 4) Brisse S, Fevre C, Passet V, et al. Virulent Clones of *Klebsiella pneumoniae*: Identification and Evolutionary Scenario Based on Genomic and Phenotypic Characterization. PLoS One 2009; 4(3):e4982.
- 5) Lin WH, Wang MC, Tseng CC, et al. Clinical and microbiological characteristics of *Klebsiella pneumoniae* isolates causing community-acquired urinary tract infections. Infection 2010; 38(6): 459-464.
- 6) Turton JF, Baklan H, Siu LK, et al. Evaluation of a multiplex PCR for detection of serotypes K1, K2 and K5 in *Klebsiella* sp. and comparison of isolates within these serotypes. FEMS Microbiol Lett 2008; 284(2):247-52.
- 7) 青木渉, 藤田和恵, 三上愛里, 他. マクロライド薬長期投与患者から分離された *Pseudomonas aeruginosa* の病原因子に関する検討. 文京学院大学保健医療技術学部紀要 2013;6:19-25.
- 8) Sahly H, Podschun R, Oelschlaeger TA, et al. Capsule impedes adhesion to and invasion of epithelial cells by *Klebsiella pneumoniae*, Infect Immun 2000; 68(12):6744-9.
- 9) Cortés G, Álvarez D, Saus C, et al. Role of Lung Epithelial Cells in Defense against *Klebsiella pneumoniae* Pneumonia. Infect Immun 2002; 70(3): 1075-1080.
- 10) Struve C, Krogfelt KA. Role of capsule in *Klebsiella pneumoniae* virulence: lack of correlation between in vitro and in vivo studies. FEMS Microbiol Lett 2003; 218(1):149-54.
- 11) Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp.as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin Microbiol Rev 1998; 11(4):589-603.
- 12) Yu VL, Hansen DS, Ko WC, et al. Virulence characteristics of *Klebsiella* and clinical manifestations of *K. pneumoniae* bloodstream infections. Emerg Infect Dis 2007; 13(7):986-93.
- 13) 松本哲哉. 感染症道場, Vol.3 No.1 微生物と感染症診療 肺炎桿菌. メディカルレビュー社 2014;26-33.
- 14) Siu LK, Yeh KM, Lin JC, et al. *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: a new invasive syndrome. Lancet Infect Dis 2012; 12(11): 881-87.
- 15) Yu WL, Ko WC, Cheng KC, et al. Association between *rpmA* and *magA* genes and clinical syndromes caused by *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. Clin Infect Dis 2006; 42(10):1351-8.
- 16) Sironen A, Uimari P, Vilkki J, et al. Comparison of different DNA extraction methods from hair root follicles to genotype Finish Landrace boars with the Illumina PorcineSNP60 BeadChip. Agricultural and food science 2011; 20:143-150.

Higher Adherence of Hypermucoviscos *Klebsiella Pneumoniae* to Epithelial Cells May Indicate Prolonged Infection

Misato Gorai¹ *, Satoshi Ariga² *, Kazue Fujita³, Yoko Mano², Wataru Aoki¹,
Kuniko Matsuda³, Hiroyuki Takoi³, Yoshinobu Saito³, Akihiko Gemma³, Nobuhiko Furuya^{1,2}

1Graduate School of Health Care Science, Graduate School of Bunkyo Gakuin University

2 Department of Clinical Laboratory Medicine, Faculty of Health Science Technology
Bunkyo Gakuin University

3 Department of Pulmonary Medicine and Oncology, Graduate School of Medicine,
Nippon Medical School

* Equally contributed

Abstract

New hypervirulent (hypermucoviscous) clinical variant of *Klebsiella pneumoniae* (hvKP) has emerged over the last decade and a frequent cause of nosocomial infections, such as abscess and pneumonia. Despite its clinical relevance, little is known about the mechanisms underlying the increased virulence and mucoviscosity of hvKP compared with classic *K. pneumoniae* (cKP). The aim of this study is to investigate the characteristics of hvKP and the interaction between the hvKP and the epithelial cells contributes to the pathogenesis of *K. pneumoniae*. Classic KP invasion of lung epithelial cells significantly increased compared with hvKP invasion of them. However, adhesion of hvKP to lung epithelial cells was significantly stronger than that of cKP. Furthermore, hvKP was more difficult to remove than cKP from lung epithelial cells by phosphate buffered saline. We conclude that higher adherence of hvKP to epithelial cells may indicate prolonged infection. Thus, this study emphasize the importance of the need to drain abscesses/closed space infections caused by hvKP with antimicrobial treatment for optimal outcome.

Key words — hypermucoviscos *Klebsiella pneumoniae* infection, pathogenic mechanisms, adherence

Bunkyo Journal of Health Science Technology vol8: 7-13