

博士論文（要約）

大腸菌菌血症を繰り返した症例の臨床的・微生物学的解析

小林 竜也

本研究の前半では、*Escherichia coli* (*E. coli*)による菌血症を繰り返した症例において、これらを *E. coli* の遺伝的相同性がある群とない群の 2 群に分け、症例の臨床的特徴と *E. coli* の分子生物学的特徴を 2 群間で比較・解析した。後半では、*E. coli* の表現型としての溶血能の有無を検討し、溶血に関与する因子として、第 1 章で検討した因子以外の 2 種類の因子の有無を PCR 法で検索し、遺伝子配列の比較を行った。また、血液寒天培地上で観察された溶血性を液体培地上でも再現することを目的とし、最適な条件の検討を行い、既知の溶血に関与する因子以外に、溶血に関与している因子が存在している可能性を示した。

本研究の前半の *E. coli* による菌血症を繰り返した症例の研究では、2013-2019 年の間に東京大学医学部附属病院において、*E. coli* 菌血症を繰り返した 70 症例を抽出し、原因微生物となった 140 例に対して施行した Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase Chain Reaction (ERIC-PCR)の結果でこれらを遺伝的相同性の有無により 2 群に分類した。遺伝的相同性がある群 49 症例と遺伝的相同性がない群 21 症例の患者背景を比較したところ、前者で腎不全、後方で悪性新生物がそれぞれ有意に多かった。また、菌血症の原因微生物となった *E. coli* について、phylogenetic group や multilocus sequence typing (MLST)による分類、20 個の病原因子の有無、抗菌薬に対する感受性やバイオフィーム形成能の有無の検索を行い、それぞれについて上記の 2 群間で比較・解析した。*E. coli* の phylogenetic group および sequence type については 2 群間でそれぞれ有意差がみられた。遺伝的相同性のある群で 8 つの病原因子の保有率が有意に高く、また保有している病原因子の数も有意に多かった。一方で、抗菌薬感受性やバイオフィーム形成能は 2 群間で有意差がなかった。この研究では、繰り返す *E. coli* 菌血症における臨床的および微生物学的特徴を明らかにすることを目的としたが、繰り返す *E. coli* 菌血症の症例を遺伝的相同性の有無で 2 群に分けて比較・解析した研究の中では、過去最大の症例数を対象とした研究である。病原因子の有無や保有数と菌血症を繰り返すこととの関連についてはさらなる検証が必要と考えられるが、繰り返す *E. coli* 菌血症の症例において、遺伝的相同性の有無による臨床的・分子生物学的特徴を明らかにしたことは今後の研究において有意義であると考えられる。

本研究の後半の、*E. coli* の溶血性に関する研究では、第 1 章で解析した病原因子のうち、表現型として日常の微生物検査でも観察し易い溶血性に着目し、まず第 1 章で解析対象とした *E. coli* 140 株の血液寒天培地上での溶血性を確認した。溶血に関与する因子である *hlyA* を保有する *E. coli* は全て血液寒天培地で溶血性を示したが、*hlyA* を保有しない *E. coli* にも血液寒天培地上で溶血を示す菌株が 2 株 (検体番号 221, 355) 存在した。*hlyA* 以外の因子が溶血に関与している可能性の有無を調べるため、*hlyA* 以外に溶血に関与し得るとされている *hlyE*, *ehxA* の保有の有無を PCR 法で検索した。対象とした菌株の中に *ehxA* を保有している検体は存在せず、検体番号 221, 355 の *E. coli* はいずれも *hlyE* を保有しており、*hlyE* が溶血に関与している可能性が示唆された。

次に、*hlyE*の遺伝子配列を比較するために、*hlyE*を保有する菌株で、*hlyE*の DNA sequencing を行い、塩基配列を参照配列と比較した。検体番号 221 は参照配列と比較して 1 箇所のアミノ酸変異が存在するのみであったが、検体番号 355 は、配列中に 1 塩基の欠損があり、フレームシフト変異により以降のアミノ酸配列が stop codon を多く含む配列に変化していた。この結果から、検体番号 355 が保有している *hlyE* は機能していない可能性が高く、既知の溶血に関与する因子以外が溶血に関与している可能性が考えられた。検体番号 221 の *E. coli* は血液寒天培地上で溶血性を示したが、検体番号 221 と同一患者から検出され、第 1 章の解析で検体番号 221 と遺伝的相同性があると判定された *E. coli* 菌株（検体番号 222）は血液寒天培地上で溶血性を示さなかった。この 2 株について、次世代シーケンサーで DNA sequencing を行い whole genome multi locus sequence typing (wgMLST) を用いて菌株間の遺伝子配列比較を行ったところ、この 2 株は極めて高い遺伝子配列の相同性を示し、既知の溶血に関与する因子の遺伝子配列の違いによって表現型が変化しているのではないことが示唆された。

血液寒天培地上で確認された溶血が液体培地上でも確認可能か否かを検証するために、液体培地中で溶血を確認するための最適な条件につき検証した。*hlyA* を保有する *E. coli* は CaCl_2 の存在下で培養時間によらず強い溶血性を示したが、検体番号 221, 355 を含む *hlyA* を保有しない *E. coli* は CaCl_2 の有無や培養時間によらず有意な溶血性を示さなかった。検体番号 355 は、血液寒天培地上で培養した検体を使用することで、液体培地で培養した場合と比較して有意に強い溶血性を示した。この結果から、既知の溶血に関与する因子とは異なる、血液寒天培地上で培養することによって発現する何らかの因子が検体番号 355 で観察された溶血に関与している可能性が示唆された。

現時点では *hlyA* を保有しない *E. coli* の溶血に関与する因子の特定には至っていないが、今後 real time PCR 等の手法を用いて、培養条件により遺伝子発現の程度に相違があるか否かを検証することで、溶血性に関与する因子の特定に近づくことができ、その因子の人体への影響や病原因子としての関与の有無を検証することは *E. coli* 感染症の診断、治療に有益となる可能性がある。また、検体番号 221 と 222 は極めて遺伝子配列の相同性が高く、遺伝子発現の程度の違いが表現型としての溶血性の違いを生み出している可能性があり、real time PCR で *hlyE* を含めた遺伝子の発現を確認することは有意義であると考えられる。