令和２年度・衛生研究所研究費事業報告

腸管出血性大腸菌複数回分離例のMLVA法におけるリピート数の変化の研究

（計画年度：令和２年度）

研究代表者
臨床微生物担当　佐藤孝志

共同研究者
臨床微生物担当　牟田萌枝子　塚本展子　倉園貴至
感染症検査室長　福島浩一

目的

腸管出血性大腸菌の分子疫学的解析手法の一つであるMultiple-locus variable-number tandem repeat analysis（以下，MLVA）のパターン変化の発生頻度や変異率などについては，in vitroにおける実験においての報告が複数されている．しかし，臨床分離株における変化に焦点をあてたデータについては未だ報告がない状況である．そのことから，生体内を経由した感染株がMLVAパターンへの影響を受ける可能性があるかを把握する目的として，当所で分離された血清型O157及びO26株の中で，同一患者から複数回分離されたケースを選定し，調査を実施した．

成果概要

1　対象菌株

2015年～2018年に当所で複数回分離・確認された61名分のEHEC202株（O157株：31名分114株，O26株：30名分88株）を対象とした．

2　対象菌株のスクリーニング

O157株では31名のうち7名（22.6%），O26株では30名のうち8名（26.7%）について，初発分離株のMLVAパターンからの変化が認められた．また，MLVAパターンの変化があった株の採取日と初発分離株の採取日との経過日数は中央値でO157株が6日，O26株が5.5日であった．MLVA特定17領域において，O157株では，O157-9，O157-3，O157-19，O157-37，EHC-1，EHC-6でリピート数の変化がみられたが，全てSingle locus variant（SLV）であった．一方，O26株はEHC-6又はO157-36のSLV，EHC-6及びO157-37のDouble locus variant（DLV）の変化がみられた．

3　感染者別の臨床分離株の詳細な調査

前項でMLVAパターンに変化のみられたO157感染者7名及びO26感染者8名の分離株のうち特に再分離の多かったO157感染者2名（感染者A及びB）及びO26感染者（感染者C及びD）について，1株につき12コロニーについて再度MLVA法を実施した．

感染者AはO157-3の1領域のみに変化があったが，経過6日目，10日目，19日目にみられたリピート数は全て異なっていた．感染者Bは経過5日目にのみ変化がみられO157-36領域に1コロニー，O157-37領域に1コロニーみられた．感染者Cは5領域にわたりパターン数の変化がみられ，そのうち3領域は経過5日目までに発生していた．感染者Dも4領域について変化が確認されたが，そのうち1領域が経過8日目，残る3領域が経過23日以降の分離株によるものであった．

4　初発分離株の継代培養によるMLVAパターンの変化の調査

O157感染者2名について50回の継代培養によるMLVAパターンの変化状況を調査したところ，継代により変化がみられたのは，Aの株で継代40回及び50回時に12コロニー中１コロニーにおいてO157-36にvariantがみられ，Bの株で継代50回時に12コロニー中の1コロニーO157-19にvariantが生じたのみであった．

自己評価

今回のMLVAに関する調査では，臨床分離株におけるMLVAパターン変化についての知見を得ることができた．MLVAはPFGEよりもクローナルターンオーバーの影響を受けにくい遺伝子型別であるといわれているが，今回の臨床分離株を調査した結果においても，そのパターン変化は一部のコロニーにとどまり，菌株同士の異動判定に影響しないことが確認された．

展望

MLVAパターンの変化を起こす要因については，温度，紫外線，栄養制限下など様々な条件について調査されている．感染中の生体内に起こる変化要因としては服薬が考えられるが，主に処方される薬のうち，特に整腸剤に注目してビフィズス菌などの腸内細菌との共培養による影響についても調査したい．

公表等

第32回日本臨床微生物学会総会・学術集会（2021）