

平成 30 年 8 月 31 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08663

研究課題名(和文) Clostridium difficileの簡易分子疫学解析法開発

研究課題名(英文) Development of PCR based open reading frame typing method for Clostridium difficile

研究代表者

鈴木 匡弘 (SUZUKI, Masahiro)

藤田保健衛生大学・医学部・准教授

研究者番号：70446649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Clostridium difficileのPCR based ORF typing法(POT法)の開発を行った。POT法では遺伝子の保有パターンによってゲノムの遺伝子型を決める。検出ORFは全ゲノムデータ比較と分離株を用いたPCR実験によって選別し、MLSTと相関の見られた10個と、同一ST型内での細分類に有効な6個を採用した。これらのORFは2反応系のmultiplex PCRによって検出した。POT法のSimpson's indexは0.976であった。POT法は4時間で取り扱いやすい遺伝子型が得られ、C. difficileの分子疫学および感染管理に有益と期待される。

研究成果の概要(英文)：Novel molecular epidemiology method called PCR-based ORF typing (POT) was developed for Clostridium difficile isolates. The genotype of POT is determined by detecting ORFs with plus, minus manner. ORFs choosing in this study shows different distribution patterns depending on genetic background of isolates. The ORFs were selected by comparing whole genome data of C. difficile, and testing clinical isolates using PCR. Finally, 10 ORFs showing correlations to MLST, and 6 ORFs which can classify isolates with same ST were selected. POT was constructed from 11-plex PCR detecting the 10 ORF and C. difficile marker, and 10-plex PCR detecting the 6 ORFs, toxins (toxin A, B, and binary toxin), and C. difficile marker. The discrimination power demonstrated by Simpson's index was 0.976. POT can perform within 4 hours using conventional PCR apparatus and get easy understandable genotypes. POT will make molecular epidemiological analysis of C. difficile easy and contributes to infection control.

研究分野：細菌学

キーワード：Clostridioides difficile 分子疫学 POT法

1. 研究開始当初の背景

Clostridioides (Clostridium) difficile は主要な院内感染原因菌として知られ、入院患者に重篤な下痢症をおこす原因となり、感染管理の重要性の高い菌である。*C. difficile* は健康人も保菌していることが少なくなく、院内感染によるものなのか、内因性のものであるかを判定するには遺伝子型タイピングが有効である。筆者らは従来から *C. difficile* の分子疫学解析に取り組んできたが、標準法の一つである PCR-ribotyping や毒素型のタイピングの実施効率は高くない。

病原菌の分子疫学解析は病原菌の性質の把握、流行の把握、集団感染の解析などに有効な方法である。分子疫学解析法の一つとして挙げられる multilocus sequence typing (MLST) は、遺伝子型を Sequence type (ST 型) として共有でき、病原菌の性質の把握や世界的な流行の把握に威力を発揮する一方、菌株識別能力が低い場合集団感染の解析には使えないことが多い。集団感染の解析に多用される分子疫学解析法としては pulsed field gel electrophoresis (PFGE) が挙げられる。PFGE は菌株識別能力が高く、集団感染の解析で威力を発揮する。その一方、電気泳動パターンと比較が難しく、特に実施機関が異なる場合の比較は困難であるため、特定の株の流行把握にはリファレンスセンターに頼る必要があり、分離菌の系統推定にも限界がある。また両分子疫学解析法とも手間とコストの面から多検体処理には向かない。

筆者らは院内感染原因菌の分子疫学解析を容易とするため、polymerase chain reaction (PCR) による簡易なタイピング法開発に取り組んできた。同一種の細菌ゲノムデータを比較し、共通しない部分を選び出し、臨床分離株における保有パターンを調べ、菌株毎に異なる保有パターンとなる ORF を 10 ~ 20 個程度検出することで遺伝子型タイピングが可能であることを見いだした。タイピングに有効な open reading frame (ORF) をマルチプレックス PCR で検出することで、4 時間程度で遺伝子型を決定できる。本法は PCR-based ORF typing (POT) 法として、黄色ブドウ球菌、緑膿菌、アシネトバクター属菌について開発に成功し、実用化されている。POT 法は ORF の有無によって遺伝子型を決定するため、データの比較が容易で、データベース化しやすい特徴を持つ。黄色ブドウ球菌の POT 法では 12-plex PCR を 2 反応実施することで、PFGE とほぼ同等の菌株識別能力の実現とメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) クローンの簡易同定が可能である。また、アシネトバクターの POT 法では 12-plex PCR を 1 反応実施することで、*Acinetobacter baumannii* 国際流行クローンの簡易同定及び菌種同定が難しい *A. calcoaceticus* - *A. baumannii* complex の種の簡易同定が可能である。POT 法で検出する ORF はゲノムデータの比較によって見いだ

されており、ほとんどの菌種に適応可能であると推定される。PCR ベースの遺伝子の有無によってタイピングする方法は海外でも開発が進められているが、既知の病原遺伝子を利用するものが多く、菌株識別能力が劣る傾向がある。その一方ゲノム比較を利用した方法も発表されつつあり、十分な菌株識別能力を実現している。

2. 研究の目的

本研究では院内感染原因菌として報告の多い *C. difficile* の PCR ベースの遺伝子型タイピング法すなわち POT 法の開発、ならびに性能評価を目的とする。

POT 法開発は (1) 目的菌種における多様性調査、(2) ゲノムデータの比較と検出候補 ORF の抽出、(3) 臨床分離株を用いた検出候補 ORF の保有状況調査と ORF の絞り込み、(4) マルチプレックス PCR 用プライマー設計の順に進められる。

(1) 分子疫学解析法を開発するためには、臨床分離される菌の遺伝的多様性を把握しておく必要がある。そのために臨床分離される *C. difficile* の標準的な分子疫学解析法である、PCR-ribotyping や MLST 解析によって調査し、遺伝的多様性を明らかにする。(2) さらに新たに開発する分子疫学解析法に利用可能な ORF を見つけるため、*C. difficile* ゲノムデータの比較を行い、株レベルで *C. difficile* を特徴付ける部分の検索を行う。(3) ゲノム比較によって得られた検出 ORF 候補は、臨床分離株における保有状況を PCR で調査し、タイピングに有効な ORF を取捨選択することで、遺伝子型を決めるのに必要な最小限の ORF を明らかにする。(4) 選び出された ORF を 12-plex 程度のマルチプレックス PCR で検出可能な検出系を設計した後、検出 ORF の絞り込みに使用しなかった菌株も含めて、菌株識別能を計測する。さらに PCR-ribotyping や MLST 解析との比較も行い、*C. difficile* POT 法との相関も明らかにする。

3. 研究の方法

保存されている *C. difficile* 菌株を用いた。PCR-ribotyping は Stubbs SL et al. の方法に従って実施した。PCR-ribotyping は 147 株についてデータを取得し、臨床分離された *C. difficile* の遺伝的多様性に関する基礎データとした。MLST 解析は MiSeq による全ゲノム解析結果を利用した。MLST 解析に用いた菌株は PCR-ribotyping の結果と、本研究によって設計された POT 法を基に 65 株を選択して実施した。

C. difficile ゲノムデータ比較はゲノムデータは ORF 単位に分割し、相互比較を行った。データの比較には blastn、および MySQL を利用し、独自に開発した Ruby スクリプトを使用した。*C. difficile* ゲノムデータはインターネットデータベース上の 28 株および独自に全ゲノム解析した 37 株を用いた。前述の方法を用いてゲノム比較マップを検討し、菌株間

に共通しない部分を抽出した。菌株間で共通しない部分が ORF 1-5 個程度から構成されている場合、各部分から 1 個ずつ候補 ORF とした。また菌株間で共通しない部分がおおむね ORF 6 個以上から構成されている場合、その中から 1-2 個ずつを抽出し、候補 ORF とした。

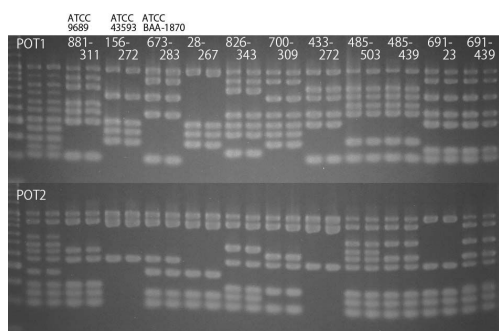
候補 ORF を検出するためのプライマーを設計し、PCR-ribotyping の結果から選び出した臨床分離株の代表株 32 株における保有状況調査を実施した。代表株の選抜は異なる PCR-ribotyping パターンの株と同一 PCR-ribotyping パターンの株を含めることで、異なる遺伝子型の株が異なる ORF 保有パターンとなり、同一遺伝子型の株が同一の ORF 保有パターンとなるよう考慮した。代表株のおよそ 30~70% 程度の株が保有する ORF を選択する。さらに代表株における ORF 保有パターンを元にタイピングに用いる ORF を絞り込んだ。

4. 研究成果

ORF の保有パターン調査の結果、10 個の ORF の有無の組み合わせで、ST 型と関連のある分子疫学解析が可能であった。また、6 個の ORF の有無を組み合わせることで、同一 ST 型の分離株を細分類することができた。

ST 型と関連の見られた 10 個の ORF に *C. difficile* のマーカーを加えた 11-plex PCR (POT1) および、同一 ST 型群の細分類および毒素遺伝子検出に *C. difficile* のマーカーを加えた 10-plex PCR 反応系 (POT2) の 2 系統のマルチプレックス PCR 反応による POT 法が設計できた (図)。ORF の検出バンドの有無を 1, 0 に置き換え、10 進法化することで、POT1、POT2 における保有パターンを数値で表した。

図



POT 法による調査の結果、POT1 の 10 個の ORF の有無の組み合わせで、MLST 型と関連のある分子疫学解析が可能であった。MLST 解析を行った 65 株におけるこの 10 個の ORF の保有パターンは 25 通りであった。この保有パターンは ST 型を single locus variant をまとめた clonal complex (CC) とした場合、全て CC 型と 1 対 1 で対応した (表)。

POT2 の 6 個の ORF の有無を組み合わせることで、同一 ST 型の分離株をさらに細分類することができた。147 株の臨床分離株は POT1 だけで 25 種類に分類できたが、POT1 と POT2

の組み合わせで 64 種類の POT 型に分けることができ、Simpson's index は 0.976 となった。一方、同一の菌株による PCR-ribotyping の Simpson's index は 0.924 であった。

表

POT1	POT2	ST	PCR-ribo type	Number of strain
1	272	ST297	ND01	2
28	267	ST11	078	1
129	272	ST204	ND03	1
306	259	ST4	ND04	2
306	323	ST4	ND04	1
359	275	ST49	ND05	1
389	275	ST69	ND06	2
405	276	ST15	ND07	1
405	436	ST15	ND07	1
408	272	ST302	0141 like	1
433	272	ST26	ND08	1
477	503	ST54	012	1
485	275	ST13	0141 like	1
485	275	ST2	014	1
485	307	ST2	0141 like	1
485	311	ST2	0141 like	1
485	439	ST2	014	1
485	503	ST2	0141 like	1
487	435	ST14	0141 like	1
500	308	ST83v	ND09	1
685	272	New	ND11	2
691	3	ST17	018	5
691	3	ST17v	018	1
691	23	ST17	018	3
691	151	ST17	ND12	1
691	259	ST17	0181 like	1
691	279	ST17	018	3
691	387	ST17	0181 like	1
691	439	ST17	018	1
700	181	ST81	369	1
700	309	ST81	369	3
700	373	ST81	369	1
700	437	ST81	369	1
826	23	ST8	002	1
826	83	ST8	002	1
826	87	ST8	002	1
826	343	ST8	002	2
827	259	ST42	ND23	1
852	256	ST100	ND08'	1
852	436	ST100	ND13	1
893	435	ST44	ND22	1
944	311	ST325	ND14	1
946	311	ST103	ND15	1
954	407	New	ND17	1
978	183	ST58	ND18	1
978	307	ST58	0141 like	1
978	311	ST58	ND14	1
1009	272	ST3	ND21	1
1009	436	ST3	ND20	1
1013	275	ST102	ND21	1

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) 鈴木匡弘、山田和弘

*Clostridium difficile*用 POT 法の開発
第 29 回日本臨床微生物学会総会・学術集会、
2018

(2) 鈴木匡弘

*Clostridium difficile*用 POT 法の開発
第 92 回日本感染症学会学術講演会、2018

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：*Clostridium difficile* の遺伝子型タイプ
ピング法及びこれに用いるプライマーセ
ット

発明者：鈴木匡弘、山田和弘

権利者：愛知県

種類：特許

番号：特願 2017-125087

出願年月日：平成 29 年 6 月 27 日

国内外の別：国内

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 匡弘 (SUZUKI, Masahiro)

藤田保健衛生大学・医学部・准教授

研究者番号：70446649

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

山田 和弘 (YAMADA, Kazuhiro)

愛知県衛生研究所・生物学部・主任

研究者番号：90564857