

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007 ～ 2009
 課題番号：19590578
 研究課題名(和文) クロストリディウム・ディフィシル北米流行強毒株の迅速直接検出法の開発と実用化
 研究課題名(英文) Rapid detection of hyper virulent strains of *Clostridium difficile* and application to direct detection from stool specimens
 研究代表者
 加藤 はる (HARU KATO)
 国立感染症研究所 細菌第二部 室長
 研究者番号：00273136

研究成果の概要(和文)：細胞表面タンパクをコードする遺伝子(*slpA*)の配列を比較することによるクロストリジウム・ディフィシルのタイピング法(*slpA* sequence typing)を評価し、日本の医療施設において分離された菌株を解析した。*slpA* sequence typing は、タイプ能と解析力が良好で、特に再現性と解析結果の比較の容易性に非常に優れていた。また、*slpA* sequence typing は、糞便検体からのダイレクト・タイピングに応用が可能であった。検討した 160 糞便検体のうち、北米流行高病原性株 PCR ribotype 027 が分離されたのは 1 株のみであった。次に、得られた *slpA* の遺伝子配列データを基にして、loop-mediated isothermal amplification (LAMP)法により PCR ribotype 027 株に特異的な *slpA* (*slpAgc8*)を検出する方法を確立した。本法は PCR ribotype 027 株の迅速な同定に有用と考えられた。

研究成果の概要(英文)：A typing system for *Clostridium difficile* by sequencing the surface layer protein A gene (*slpA*) was evaluated, and clinical isolates in Japan were analyzed by this method. *slpA* sequence typing was found to have reliable typability and discriminatory power, and the typing results were highly reproducible and comparable. *slpA* sequence typing could be applied to direct typing successfully. The emerging strain, PCR ribotype 027 was recovered from one of the 160 specimens tested. Based on the sequence data of *slpA*, loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method detecting *slpA* of PCR ribotype 027 (*slpAgc8*) was established. The LAMP assay detecting *slpAgc8* appears to be a valuable tool for the rapid identification of this type.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|------|-----------|
| 2007 年度 | 1,500,000 | 0 | 1,500,000 |
| 2008 年度 | 1,100,000 | 0 | 1,100,000 |
| 2009 年度 | 900,000 | 0 | 900,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 0 | 3,500,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：臨床検査医学

1. 研究開始当初の背景

2000年頃を境に、欧米でクロストリジウム・ディフィシル感染症例の増加に伴って高病原性 PCR ribotype 027 株の流行が認められ、注目されている。日本では、クロストリジウム・ディフィシル感染症に対する関心が低く、適切な診断がなされないために、PCR ribotype 027 株の流行の実態を含め、本疾患の疫学に関しては不明である。

2. 研究の目的

- ①. PCR ribotype 027 株をはじめとした国内外で問題となる菌株との比較解析が容易にできるタイピング法の確立
- ②. 分離培養ステップをせずに行うダイレクト・タイピングへの応用
- ③. 簡便で迅速な PCR ribotype 027 株の同定法の確立

3. 研究の方法

- ①. 日本の複数の病院における抗菌薬関連下痢症・腸炎症例からの糞便検体の収集
- ②. クロストリジウム・ディフィシルの分離
- ③. 細胞表面タンパクをコードする遺伝子 (*slpA*) の配列を決定することによるタイピング (*slpA* sequence typing) 法の確立
- ④. *slpA* sequence typing の糞便検体から抽出した DNA におけるタイピング (ダイレクト・タイピング) への応用
- ⑤. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法により PCR ribotype 027 株に特異的な *slpA* (*slpAgc8*) を検出する方法の確立

4. 研究成果

- ①. 160 糞便検体から、87 菌株のクロストリジウム・ディフィシルを分離した。*slpA* sequence typing により解析したところ、*slpA* sequence typing は、PCR ribotyping と比較して、同等のタイプ能および解析力を示し、特に再現性とタイピング結果の比較の容易性に非常に優れていた。
- ②. 90 糞便検体から直接抽出した DNA において、*slpA* sequence typing が可能であり、そのうち培養陽性であった 77 検体については、ダイレクト・タイピング結果と分離菌株におけるタイピング結果が一致した。*slpA* sequence typing は、ダイレクト・タイピングとして有用であった。

Toxin B 陽性 *C. difficile* 培養結果と、糞便検体からの *slpA* 遺伝子直接検出結果の比較

| <i>tcdB</i> + <i>C. difficile</i> culture | Direct PCR for <i>slpA</i> | No. of stool specimens |
|---|----------------------------|------------------------|
| Positive | Positive | 77 |
| Positive | Negative | 9 |
| Negative | Positive | 13 |
| Negative | Negative | 10 |
| Negative | Not done | 51 |
| Total | | 160 |

- ③. 検討した 160 糞便検体においては、PCR ribotype 027 株が分離されたのは 1 検体のみで、PCR ribotype 027 株による施設内伝播を示すエビデンスはなかった。
- ④. 得られた *slpA* シークエンスデータを基に、プライマーを設計し、loop-mediated isothermal amplification (LAMP) による PCR ribotype 027 株に特異的な *slpA* 遺伝子 (*slpAgc8*) を検出する方法を確立した。

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 4 件)

Sawabe, E, H. Kato, K. Osawa, T. Chiba, N. Tojo, Y. Arakawa, N. Okamura. Molecular analysis of *Clostridium difficile* at a university teaching hospital in Japan: a shift in the predominant type over a five-year period. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007; 26: 695-703.

村端真由美、加藤はる、矢野久子、小椋正道、柴山順子、脇本幸夫、荒川宜親、溝上雅史. 長期入院がん患児における *Clostridium difficile* 消化管保有と院内伝播に関する検討. *感染症学雑誌* 2008;82:419-426.

加藤はる. *Clostridium difficile* 感染症について. *日本病院薬剤師会雑誌* 2009;45:897-902.

Haru Kato, Hideaki Kato, Yoichiro Ito, Takayuki Akahane, Sayuri Izumida, Toshiyuki Yokoyama, Chiharu Kaji, Yoshichika Arakawa. Typing of *Clostridium difficile* isolates endemic in Japan by sequencing *slpA* and application to direct typing 2010 *in press*

[学会発表] (計 12 件)

加藤はる 他. *slpA* 遺伝子配列解析による *Clostridium difficile* のタイピング法 第 81 回日本感染症学会総会 2007 年 4 月京都

Haru Kato *et al.* Detection of the toxin B gene of *Clostridium difficile* in stool specimens by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and direct typing of the *slpA* gene by sequencing. 2nd International *Clostridium difficile* Symposium 2007 June Maribor (Slovenia)

Haru Kato *et al.* Typing system for *Clostridium difficile* by sequencing the *slpA* gene and its application to direct typing from stool specimens. 47 th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2007 September Chicago (US)

加藤はる. *Clostridium difficile* 流行株 BI/NAP1/027 について. 第 4 回日本環境感染学会教育委員会講習会 (第 23 回環境感染学会総会) 2008 年 2 月長崎

加藤はる 他. PCR による *Clostridium difficile* BI/NAP1/027 株の同定. 第 8 2 回日本感染症学会総会 2008 年 8 月島根

加藤はる 他. 日本の医療機関で臨床分離された binary toxin 遺伝子陽性 *Clostridium difficile* 菌株について. 第 3 9 回日本嫌気性菌感染症研究会 2009 年 3 月岐阜

加藤はる *Clostridium difficile* 感染対策 ～ 欧米から始まった新たな展開～ 第 8 1 回 ICD 講習会 2009 年 3 月名古屋

加藤はる 他. 日本の医療機関での binary toxin 遺伝子陽性 *Clostridium difficile* 臨床分離株について. 第 83 回日本感染症学会総会 2009 年 4 月 東京

Haru Kato *et al.* A rapid and simple identification of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 by loop-mediated isothermal amplification method. 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2009 May Helsinki (Finland)

加藤はる. *Clostridium difficile* 感染症と薬剤部の関わり. 第 31 回病院薬剤師会近畿学術大会 専門薬剤師分科会 「感染制御領域」2010 年 1 月東京

加藤はる. Q and A レクチャー *Clostridium difficile* 感染症 -よくある質問から -第 25 回日本環境感染学会総会 2010 年 2 月 東京

加藤はる. 教育講演 *Clostridium difficile* 感染症 -変化する疫学と日本における現状- 第 40 回日本嫌気性菌感染症研究会 2010 年 3 月

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕
○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等
http://www.nih.go.jp/niid/bac2/C_difficile/

6. 研究組織
(1) 研究代表者
加藤はる (HARU KATO)
国立感染症研究所 細菌第二部 室長
研究者番号 : 00273136

(2) 研究分担者 ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ()

研究者番号 :