

称号及び氏名	博士（獣医学）	久保田 博之
学位授与の日付	平成29年5月31日	
論文名	定量的 PCR 法を用いたヒト糞便中 <i>Clostridium difficile</i> の解析	
論文審査委員	主査	山崎 伸二
	副査	向本 雅郁
	副査	笹井 和美

## 論文要旨

### 序論

*Clostridium difficile* は芽胞形成性、偏性嫌気性のグラム陽性桿菌であり、抗生物質関連下痢症や偽膜性大腸炎の主たる原因菌として知られている。同菌によって引き起こされる感染症は総じて CDI (*C. difficile* infection) と呼ばれ、CDI は医療現場を中心に大きな問題となっている。*C. difficile* の病原性は Toxin A および Toxin B という2種類の毒素に起因する。両毒素は構造、機能的に類似したタンパク質であり、ヒトの腸内で産生された後、腸管上皮細胞上の受容体に結合してエンドサイトーシスで取り込まれる。その後、細胞質内へ放出され、数多くのシグナル経路に関与する Rho ファミリーをグルコシル化することで不活性化し、細胞骨格の破壊などを誘導する。通常、健常な成人では *C. difficile* は腸管に定着せず、定着した場合も無症候となる。これは正常な腸内細菌叢や宿主の免疫応答によって *C. difficile* の定着や増殖が抑制されるためであると考えられている。従って、これらの抑制機能が減衰または崩壊すると同菌の定着もしくは CDI 発症につながりうる。高齢者では腸内細菌叢を攪乱する薬剤の使用頻度の上昇や免疫力の低下などが原因で、*C. difficile* の無症候性保菌者の割合、CDI 発症率のいずれも高いことが知られている。一方、乳児ではおそらく毒素への感受性が低いなどの理由によって CDI の発症は稀であるが、腸内細菌叢が未成熟であるため無症候性保菌者の割合は極めて高い。このような毒素産生性 *C. difficile* の無症候性保菌者が菌株を拡散させることで CDI の伝播に

関与している可能性も示唆されているため、同菌の分布を詳細に調べることは感染予防の点でも重要である。*C. difficile* の検出には主に培養法が用いられ、菌株を分離してその毒素産生能の有無が調べられる。ただし、培養法は熟練した技術を必要とし、迅速性に欠ける。そこで、本研究では定量的 PCR (qPCR) 法を用いた毒素産生性 *C. difficile* の迅速、簡便、高感度かつ高精度な定量法を確立した。同定量法と分離株の菌株タイピング法とを併せて解析することで、高齢者および乳児における毒素産生性 *C. difficile* の保菌率、糞便中の菌数、保菌形態を調べた。

## 第1章 *Clostridium difficile* の定量的 PCR 法の構築

*C. difficile* は Toxin A および Toxin B の産生能に基づき、3 種類に大別される。毒素産生株には両毒素産生性の A+B+型と Toxin B のみを産生する A-B+型があり、残りは毒素非産生性の A-B-型である。これまで、毒素産生性 *C. difficile* 検出用の PCR キットが市販されており、in house の PCR 法も多数報告されているが、それらは定性検出に留まる。そこで本研究では、16S rRNA 遺伝子および毒素遺伝子の *tcdA* および *tcdB* を標的とした TaqMan ベースの qPCR 法を構築した。新規 qPCR 法は、16S rRNA 遺伝子を標的とした場合はすべての *C. difficile* (A+B+型、A-B+型および A-B-型) を、*tcdB* を標的とした場合は A+B+型および A-B+型を、*tcdA* の場合は A+B+型を高精度に定量可能であった。また、純培養菌株の毒素産生能を調べたところ、qPCR による毒素遺伝子の検出結果と一致することが確認された。ヒト糞便へ菌数既知の A+B+型 *C. difficile* を添加して qPCR の検出下限値を確認したところ、糞便 1 g 当たり  $10^3$  個の標的菌を定量可能であった。また、従来から広く用いられている標準法の一つである毒素産生性検査培養 (Toxigenic culture, TC) と qPCR 法を用いて、糞便 235 検体中の毒素産生性 *C. difficile* を検出したところ、両手法の検出結果が一致することが確かめられた。以上の結果から、新規 qPCR 法は、毒素産生性 *C. difficile* を高感度かつ高精度に定量検出できることが明らかとなった。

## 第2章 高齢者の糞便中の *Clostridium difficile* 解析

高齢者のうち特に長期療養施設の入居者では *C. difficile* の保菌率が高いことが知られているが、その腸内菌数レベルや定着性は十分に明らかにされていなかった。そこで本研究では、フランスの4つの老人ホーム (#1-#4) に居住する82名の健康な被験者から90日に1回、計3回採便して qPCR 法で解析した。その結果、毒素産生性 *C. difficile* の保菌率は1回目が1.2%、2回目が3.8%、3回目が2.7%であった。施設間で比較すると、毒素産生性 *C. difficile* の3回の検出率は施設#1ではすべて0%、施設#2では0~7.1%、施設#3では4.2~8.7%、施設#4では0~3.2%であった。その腸内菌数は平均で糞便 1 g 当たり約  $10^4$  個であり、腸内細菌叢のマイナー集団であった。全期間を通して毒素産生性 *C. difficile* が1回でも検出された被験者は82名中4名 (5%) であり、そのうち1名では3回すべての採便で検出され、残り3名では

1 回のみで検出された。これらの糞便から培養法を用いて分離した *C. difficile* を Multilocus sequence typing (MLST) 法で解析したところ、それぞれの被験者からは異なる菌株タイプの毒素産生株が検出され、菌株の伝播等は確認されなかった。一方、同一被験者の3回の採取便から得られた分離株は同一タイプであったことから、同被験者では毒素産生性 *C. difficile* が長期に渡って腸内に定着していることが明らかとなった。

### 第3章 乳児の糞便中の *Clostridium difficile* 解析

健康な乳児における *C. difficile* 保菌率は高く、1歳未満では17~100%と報告されている。年齢別に見ると乳児の *C. difficile* 保菌率は生後6か月までにピークに達し、その後は低下して2歳頃までには成人と同程度になることがわかっている。乳児の無症候性保菌者は成人の CDI を媒介する可能性が指摘されていることから、生後6か月までの *C. difficile* 保菌形態や腸内菌数を調べることは CDI 感染予防の点でも重要である。そこで本研究では、ベルギーで出生した乳児111名から生後180日まで定期的に糞便を採取し、qPCR 法で解析した。毒素産生性 *C. difficile* は胎便からは全く検出されなかったが、生後3日では2%から検出された。同保菌率は生後90日では5%に留まっていたが、その後に急上昇して離乳期には13%、生後180日では15%に達した。生後3日から生後180日までの各検体群における qPCR 菌数の平均値はいずれも糞便1g当たり約  $10^7$  個であり、乳児の日齢による差はなかった。一部の乳児では、糞便1g当たり  $10^8$  個以上もの毒素産生株が長期に渡って検出された。生後180日までに毒素産生性 *C. difficile* が検出された乳児は111名中18名(16%)であり、そのうち11名では異なる2回以上の採取便から検出された。これらの糞便から分離株を取得して PCR リボタイピングおよび MLST で解析した結果、同11名すべてにおいて、同一の乳児から経時的に分離された株は常に同一の菌株タイプであった。このことから、乳児腸内の毒素産生性 *C. difficile* は一過的ではなく長期に渡って定着していることが明らかとなった。また、乳児において最も高頻度で同定された菌株タイプは、成人の CDI 患者由来株で高頻度に同定される菌株タイプと同一であったことから、乳児腸内に定着している毒素産生株は疾病を引き起こしうる病原性株であることが示唆された。

### 総括

以上の結果から、ヒト糞便中の *C. difficile* および毒素産生性 *C. difficile* の高感度な分別定量が可能となり、健康な高齢者および乳児における保菌率や腸内菌数が明らかとなった。分離株のタイピング法と併せた包括的解析によって、毒素産生性 *C. difficile* は高齢者の5%において糞便1g当たり約  $10^4$  個で、乳児では16%において約  $10^7$  個の高菌数で検出され、高齢者ではそれらの多くが一過性であるのに対して多くの乳児では腸内に定着していることが明らかになった。また、乳児が *C. difficile* の病原性株を住環境中から獲得している可能性や、乳児が病原性株および

CDI の伝播に関与している可能性が示唆された。これらは CDI の伝播の抑制につながりうる重要な知見であると考えられる。本研究で我々が構築した qPCR 法は、培養操作を経ずに毒素産生性 *C. difficile* を短時間で高精度に定量できる特徴を有するため、同菌の測定を必要とするさまざまな基礎研究や臨床研究への応用が期待できる。例えば、無症候性保菌者と CDI 発症者間での菌数の違い、症状の重篤度と菌数の関連性、治療による菌数の推移、などを調べる研究が挙げられる。また、食物や環境中の汚染度合いを調べるのにも利用可能である。今後、これらの *C. difficile* 研究を更に発展させていくことで、CDI 発症のメカニズムが解明され、感染制御あるいは予防方法が確立されることを期待する。

## 審査結果の要旨

*Clostridium difficile* は芽胞形成性、グラム陽性偏性嫌気性桿菌であり、抗生物質関連下痢症や偽膜性大腸炎の主たる原因菌として知られている。同菌によって引き起こされる感染症は総じて **CDI (*C. difficile* infection)** と呼ばれ、CDI は医療現場を中心に大きな問題となっている。*C. difficile* の病原性は **Toxin A** および **Toxin B** という 2 種類の毒素に起因する。両毒素は構造、機能的に類似したタンパク質であり、腸管上皮細胞上の受容体に結合してエンドサイトーシスで取り込まれる。その後、細胞質内で数多くのシグナル経路に関与する **Rho** ファミリーをグリコシル化することで不活性化し、細胞骨格を破壊する。通常、健常な成人では *C. difficile* は腸管に定着せず、定着した場合も無症候である。これは正常な腸内細菌叢や宿主の免疫応答によって *C. difficile* の定着や増殖が抑制されるためであると考えられている。従って、これらの抑制機能が崩壊すると同菌の定着もしくは **CDI** 発症に繋がらう。高齢者では腸内細菌叢を攪乱する薬剤の使用頻度の上昇や免疫力の低下などが原因で、*C. difficile* の無症候性保菌者の割合、**CDI** 発症率のいずれも高い。一方、乳児ではおそらく毒素への感受性が低いなどの理由によって **CDI** の発症は稀であるが、腸内細菌叢が未成熟であるため無症候性保菌者の割合は極めて高い。このような毒素産生性 *C. difficile* の無症候性保菌者が菌株を拡散させることで **CDI** の伝播に関与している可能性も示唆されているため、同菌の分布を詳細に調べることは感染予防の点でも重要である。*C. difficile* の検出には主に培養法が用いられ、菌株を分離してその毒素産生能の有無が調べられるが、培養法は迅速性に欠け、熟練した技術を必要とする。

申請者は定量的 **PCR (qPCR)** 法を用いた毒素産生性 *C. difficile* の迅速、簡便、高感度かつ高精度な定量法の開発を試み、確立した同定量法と分離株の菌株タイピング法とを併せて解析することで、高齢者および乳児における毒素産生性 *C. difficile* の保菌率、糞便中の菌数、保菌形態を調べた。

第1章では、16S rRNA 遺伝子および2種類知られている毒素遺伝子の *tcdA* および *tcdB* を標的とした qPCR 法を構築した。新規 qPCR 法は、16S rRNA 遺伝子を標的とした場合は全ての *C. difficile* (A<sup>+</sup>B<sup>+</sup>型、A<sup>-</sup>B<sup>+</sup>型および A<sup>-</sup>B<sup>-</sup>型) を、*tcdB* を標的とした場合は A<sup>+</sup>B<sup>+</sup>型および A<sup>-</sup>B<sup>+</sup>型を、*tcdA* の場合は A<sup>+</sup>B<sup>+</sup>型を高精度に定量できた。また、純培養菌の毒素産生能を調べたところ qPCR による毒素遺伝子の検出結果と一致した。ヒト糞便へ菌数既知の A<sup>+</sup>B<sup>+</sup>型 *C. difficile* を添加して qPCR の検出下限値を確認したところ、糞便 1 g 当たり 10<sup>3</sup> 個の標的菌を定量可能であった。また、従来から広く用いられている毒素産生性検査培養 (Toxigenic culture, TC) と qPCR 法を用いて、糞便 235 検体中の毒素産生性 *C. difficile* を検出したところ、両手法の検出結果が一致することが確かめられた。以上の結果から、新規 qPCR 法は、毒素産生性 *C. difficile* を高感度かつ高精度に定量検出できることを明らかとした。

第2章では、フランスの4つの老人ホームに居住する82名の健康な被験者から90日に1回、計3回採便して qPCR 法で解析した。その結果、毒素産生性 *C. difficile* の保菌率は1回目が1.2%、2回目が3.8%、3回目が2.7%であった。施設間で比較すると、毒素産生性 *C. difficile* の3回の検出率は施設1では全て0%、施設2では0~7.1%、施設3では4.2~8.7%、施設4では0~3.2%であった。その腸内菌数は平均で糞便 1 g 当たり約 10<sup>4</sup> 個であり、腸内細菌叢のマイナー集団であった。全期間を通して毒素産生性 *C. difficile* が1回でも検出された被験者は82名中4名(5%)であり、そのうち1名では3回全ての採便で検出され、残り3名では1回のみ検出された。これらの糞便から培養法を用いて分離した *C. difficile* を MLST 法で解析したところ、それぞれの被験者からは異なる遺伝子型の毒素産生株が検出され、菌株の伝播は確認されなかった。一方、同一被験者の3回の採取便から得られた分離株は同じ遺伝子型であり、毒素産生性 *C. difficile* が長期にわたって腸管内に定着していることを明らかとした。

第3章では、ベルギーで出生した乳児111名から生後180日まで定期的に糞便を採取し、qPCR 法で解析した。毒素産生性 *C. difficile* は胎便からは全く検出されず、生後3日で2%、生後90日では5%、離乳期は13%、生後180日では15%と日齢とともに上昇した。生後3日から180日までの各検体群で糞便 1 g 当たり約 10<sup>7</sup> 個が検出された。一部の乳児では、糞便 1 g 当たり 10<sup>8</sup> 個以上もの毒素産生株が長期にわたって検出された。生後180日までに毒素産生性 *C. difficile* が検出された乳児は111名中18名(16%)、そのうち11名では異なる2回以上の採取便から検出された。分離菌を PCR リボタイピングおよび MLST で解析した結果、同一の乳児から経時的に分離された株は常に同じ遺伝子型であった。以上より、乳児腸内の毒素産生性 *C. difficile* は一過的ではなく長期間定着していることを明らかとした。また、乳児において最も高頻度で同定された遺伝子型は、成人の患者由来株で高頻度に同定される遺伝子型と同一であり、乳児腸内に定着している毒素産生株は病原性株であることを示した。

本研究において、ヒト糞便中の毒素産生、非産生性 *C. difficile* を高感度な分別定量できる qPCR を開発し、健康な高齢者や乳児における保菌率や腸内菌数を明らかとした。高齢者ではそれらの多くが一過性であるのに対して多くの乳児では腸管内

に定着していることを明らかとした。また、乳児が *C. difficile* の病原性株を住環境中から獲得している可能性や、乳児が病原性株および CDI の伝播に関与している可能性が示唆された。これらの成果は、*C. difficile* 感染症の病態解析や重篤度と菌数の関連性等様々な研究に応用可能であり、*C. difficile* 感染症の制御や予防法確立に繋がることが期待され、医学領域のみならず獣医学領域においても多大な貢献をするものと考えられる。従って、本論文の審査及び学力確認の結果をあわせて博士(獣医学)の学位を授与することを適当と認める。