

博士論文

Clostridioides difficile の分子疫学、病原性関連遺伝子と

臨床背景の研究

岡田 雄大

Clostridioides difficile の分子疫学、病原性関連遺伝子と
臨床背景の研究

指導教員： 森屋 恭爾

申請者： 岡田 雄大

目次

要旨	1
序章	5
<i>Clostridioides difficile</i> 感染症	5
<i>Clostridioides difficile</i> の病原遺伝子	7
<i>Clostridioides difficile</i> の分子疫学	10
<i>Clostridioides difficile</i> の accessory gene regulator について	12
【第 1 章】 <i>C. difficile</i> の分子疫学、病原遺伝子及び toxin EIA 検査結果に関連する因子の検証	15
1. 目的	15
2. 材料と方法	16
a) 研究デザイン	16
b) 使用された <i>C. difficile</i> の菌株	17
c) MLST 及び病原遺伝子の評価	18
d) 臨床症例の定義と解析	20
e) 統計解析	21
3. 結果	22
a) 研究対象となった症例及び <i>C. difficile</i> 菌株	22
b) <i>C. difficile</i> 菌株の MLST に基づいた分子疫学と病原遺伝子について	23
c) Sequence type と <i>tcdA/tcdB</i> 、 <i>cdtA/B</i> 、 <i>tcdA</i> 欠損、 <i>tcdC</i> 欠損との関係	27
d) Toxin EIA 検査結果と <i>cdtA/B</i> 、 <i>tcdA</i> 欠損、 <i>tcdC</i> 欠損	28
e) 毒素産生株の症例における toxin EIA 陽性群と陰性群の臨床背景の比較	30
4. 考察	32
a) <i>C. difficile</i> の分子疫学と病原遺伝子について	32
b) 毒素遺伝子保有株が検出された症例の toxin EIA 陽性群と陰性群の比較	34
5. 結語	36
【第 2 章】 <i>Clostridioides difficile</i> accessory gene regulator の遺伝子型と分子系統学的な分布の研究	37

1. 目的	37
2. 材料と方法	38
a) <i>C. difficile</i> agr loci についての GenBank 上での <i>in silico</i> 解析	38
b) 研究対象となった <i>C. difficile</i> の菌株	39
c) 臨床株及び標準株の agr loci の遺伝子解析	40
d) 毒素遺伝子保有株の agr 亜型保有パターンと toxin EIA 検査結果の関係の検証	44
e) MLST に基づいた分子系統解析	45
3. 結果	46
a) <i>C. difficile</i> agr loci の亜型についての <i>in silico</i> 解析	46
b) CD630、R20291 と臨床株で見られる agr loci の型	54
c) MLST と Clade、agr パターン、毒素遺伝子の有無の対応	57
d) 毒素遺伝子保有株における toxin EIA 陽性と agr 亜型保有パターン関係の検証	61
e) MLST に基づいた分子系統解析に基づく、agr 亜型の分子疫学の検討	63
4. 考察	65
5. 結語	68
謝辞	69
引用文献	70

要旨

本研究の前半では、日本で過去に 1 報のみと数少ない *Clostridioides difficile* (*C. difficile*) の multilocus sequence typing (MLST) による分子疫学と病原遺伝子の関係の研究についての研究を行うとともに、既報では検証されていない toxin enzyme immunoassay (EIA) 検査に関連する微生物学的及び臨床的な考察を加えて解析した。後半では、*C. difficile* の accessory gene regulator (*agr*) loci の *in silico* 及び *in vitro* の解析により、*agr1* は毒素遺伝子の有無を問わずほとんどの菌株が保有する核酸・アミノ酸配列の多様性が低い locus であることと、*agr2* が遺伝子配列・アミノ酸配列に基づき 2 つの亜型に分けられることを世界で初めて示した。

本研究の前半の MLST による分子疫学と病原遺伝子 *tcdA/B*, *cdtA/B*, *tcdC* の有無の検証では、2013-2014 年に東京大学医学部附属病院で検出された *C. difficile* 計 105 株のうち、74 の毒素産生株では ST17, ST81, ST2, ST54, ST8, ST3, ST37, ST53 が多い一方で、毒素非産生株では ST109, ST15, ST100 が多かった。中国や韓国で多いとされる toxin A 欠損の毒素産生株 ST81, ST37 が多かった一方で、北米やヨーロッパでの流行が問題となった高病原性株が属する ST1 や ST11 に代表される *cdtA/B* 陽性の株が 4.8% と非常に少ないことは特筆すべきことであった。74 の毒素産生株が検出された便検体の *C. difficile* toxin EIA 検査結果 (陽性または陰性) と臨床背景や病原遺伝子の関連についての検証を行ったところ、38 例の EIA 陰性症例と比べ、36 例の EIA 陽性症例は有意に年齢が高く、慢性腎臓病の有病率や β ラクタム系抗菌薬・プロトンポンプ阻害薬への曝露率が有意に高かった一方で、病原遺伝子に関しては、EIA の陽性と *cdtA/B*、*tcdC* 欠損、*tcdA* 欠損変異の存在の有意な相関が見られなかった。本研究の前半の研究では、日本を代表する大学病院における *C. difficile* の分子疫学を明らかにしたことによって、国や地域、施設レベルで高病原性株を含めた菌株毎の流

行情報を把握する上での土台となる情報を示した点で大きな意義があると考え。本研究では EIA の陽性と *cdtA/B*、*tcdC* 欠損、*tcdA* 欠損変異との相関は示されなかった要因の一つとして、他の国や地域との菌株毎の流行状況の違いは挙げられた。この点についてのより詳細な検証のためには、本邦及び本施設において、可能であれば菌株毎での検証を十分なサンプル数で行う必要があり、今後の課題と考えられた。EIA 陽性と相関する臨床的なリスク因子の解析では、比較的少ないサンプル数ながら、*C. difficile* infection(CDI)の臨床的リスク因子についての過去の多くの報告と矛盾しない結果が得られ、過去の研究で得られた知見をより強固にする情報を得られたことには意義がある。

本研究の後半では *C. difficile* の毒素産生に必要と報告されている Quorum sensing (QS) 関連遺伝子である *agr* を研究対象とした。機能的な研究の準備としてまず分子疫学や核酸・アミノ酸配列について *in silico* 解析を行ったところ、従来から報告されている 2 種類の *agr* loci のうち、*agrB* と *agrD* のみから形成される *agr1* は遺伝的多様性が低く GenBank 上の *C. difficile* の Whole genome sequences の大半が保有することが判明した。一方で、GenBank の登録菌株の中では、*agrB*, *agrD*, *agrC*, *agrA* の 4 つの遺伝子から構成される *agr2* を保有しない菌株が多だけでなく、*agr2* の中でも互いに 80% 程度の核酸配列の相同性を示す 2 種類の亜型があることが判明した。本研究でこれらを各々 *agr2R* 及び *agr2M* と命名した。

GenBank のデータベース上で *agr1*, *agr2R*, *agr2M* を持つ各々の whole genome sequence(WGS) から抽出した *agr* の核酸配列に対して ORF 解析を施行し推定されたアミノ酸配列の多様性を見たところ、frameshift に伴う stop codon による配列の途絶が推定されるパターンを含めると Agr1_D: 2 種類、Agr1_B: 10 種類、Agr2R_D: 2 種類、Agr2R_B: 7 種類、Agr2R_C: 6 種

類、Agr2R_A: 3 種類、Agr2M_D: 1 種類、Agr2M_B: 2 種類、Agr2M_C: 3 種類、Agr2M_A: 3 種類となった。この *in silico* 解析の結果を踏まえ、東大病院の 2013-2014 年の計 133 の *C. difficile* 株と、標準株 CD630 と R20291 に対して *agr1* 及び *agr2R/2M* の保有パターンについて PCR 及び DNA sequencing で解析したところ、*agr1* のみの株が 34、*agr1+agr2R* が 61、*agr1+agr2M* が 26 あり、*agr* loci を持たない菌株が 2 つあった。MLST に基づく分子系統樹解析を最尤法で施行したところ、*agr1+agr2R* は Clade1 と Clade 2 に、*agr1+agr2M* は Clade 4 に主に見られ、Clade 1 の中で *agr2R* を持つ株と持たない株の明確な分岐点は系統樹上では指摘できなかった。2 つの *agr* loci を持たない菌株は Clade C-I 及び Clade C-III に属した。本研究の後半の意義の一つは、*agr2* が 2 つのグループ *agr2R* と *agr2M* に分類されることを初めて示し、臨床株においても *agr1*, *agr2R*, *agr2M* の存在を分子疫学と関連付けて示したことにある。その結果として、*agr1* の保有が *C. difficile* の生存に必須でないことや、*agr* の機能として毒素産生以外の Quorum sensing 機能への寄与が示唆された。また、GenBank の WGS 上の *agr* 亜型の ORF 解析で示されたアミノ酸配列の多様性は、*C. difficile* の異なる菌株同士の QS 現象を通じて *agr* の機能的な研究を行う上で土台となる情報である点で意義深い。*C. difficile* の *agr* と毒素産生については正の相関が示されているが、本研究では毒素産生株において toxin EIA 検査と *agr* 亜型の保有パターンには明確な相関は示されず、分子系統解析でも高病原性株や近縁株のみに分布する亜型は指摘されなかった。*agr* 亜型の保有パターンを明確に分ける信頼度の高い分布がないことから、進化の過程で *agr* が獲得や欠失を繰り返してきた可能性が示唆される。本研究で得られた情報を活用して、現在取

り組んでいる *C. difficile agr* の機能の研究を進め、CDI の治療や予防に役立つ薬剤の開発に寄与することを期待している。

序章

Clostridioides difficile 感染症

Clostridioides difficile (*C. difficile*)は芽胞形成能がある偏性嫌気性のグラム陽性菌であり、*Clostridium difficile* infection (CDI)の原因菌である。CDI は下痢を主な症状とした消化器感染症として知られるが、重症例では偽膜性腸炎や中毒性巨大結腸症、敗血症に陥り致命的な経過を辿ることもある。*C. difficile* により引き起こされる病態として CDI が初めて報告されたのは 1978 年であり[1]、以降は現在に至るまで CDI は主要な医療関連感染症の一つと認識されている。特に 2000 年以降、Toxin A と Toxin B の産生という従来の毒素産生株の特徴に加え、NAP1/RT027 (RT: PCR ribotype)及び RT078 に代表される、binary toxin 産生などの特徴を有する高病原性株の大流行が報告された北米とヨーロッパでは医療関連感染症の 15%、6%が CDI であると報告されている。[2, 3] 本邦においてはこれらの高病原性株の検出は稀ではあるものの、CDI の発生頻度は 0.8-4.71/10000 病日、CDI 患者の全死亡率は 3.4-15.1%であり、日本においても重要な院内感染症である。[4]

CDI の代表的な診断的な検査方法としては、toxin 及び GDH 抗原に対する Enzyme Immunoassay(EIA)検査、nucleic acid amplification tests(NAATs)、Cell cytotoxicity assay(CCTA)、Cytotoxigenic culture(CC)が挙げられる。[5] CCTA は便抽出液に対して、CC は便培養から分離された *C. difficile* のコロニーに対して cytotoxicity assay を施行する方法であり、CCTA や CC は toxin EIA、GDH EIA 及び NAAT の感度や特異度を検討する際の gold standard とされるものであるが、いずれも迅速に結果を得られるものではなく、検査そのものが施行できる設備がある施設も限られる。そのため、臨床現場では toxin・GDH EIA キットや、*C. difficile* の ToxinA または Toxin B をコードする遺伝子である *tcdA* や *tcdB* を対象とした NAATs が選択肢になることが多く、日本においては toxin・GDH EIA が広く普及

しているのが現状である。

Toxin EIA については、製品や対象とする菌株集団などの違いの影響を受けるものの、CCTA を gold standard とした場合に感度 67-83%/特異度>99%、CC と比較した場合には感度 45-58%/特異度>98%とも報告される。[5] また、CC を gold standard とした場合に、GDH EIA は感度 94.5/特異度 94.5%、NAAT は感度 93.2%/特異度 96.9%と報告される。[5]

CDI の診断方法として提唱される toxin/GDH EIA 検査や NAAT を組み合わせた 2-step の診断アルゴリズム[6, 7]の中で、toxin EIA 検査の特異度が非常に高いという特性から、適切な検体及び症例に対し施行された toxin EIA 検査が陽性の場合に CDI と確定診断することは妥当と考えられている。また、toxin EIA の陽性群で陰性群と比較し 30 日死亡率や合併症が有意に多いとの報告[8]や、重症 CDI と関連する NAAT の cycle threshold<26 の症例では EIA 陽性率>72%と高いとの報告[9]によっても、診断アルゴリズムにおける toxin EIA 検査の重要性が支持される。

本研究の主な目的は *C. difficile* の toxin 産生に関わる因子の解明にあるが、上述の通り、toxin EIA 検査は広く普及した検査系であり、また toxin EIA が陽性となることは毒素量が cutoff を超えたことの指標となるため、本研究の母集団を分ける基準として toxin EIA 検査結果を用いた。

Clostridioides difficile の病原遺伝子

CDI の臨床症状は *C. difficile* の毒素産生株が産生する toxin A (TcdA), toxin B (TcdB) により起こされると考えられている。[10] TcdA, TcdB は *Clostridium sordellii* lethal (TcsL) ・ hemorrhagic (TcsH) toxins、*Clostridium novyi* α -toxin (TcnA)、*Clostridium perfringens* toxin (TpeL) など、*C. difficile* と同じ Clostridia に属する他の細菌が産生する toxins とともに large clostridial glucosylation toxins の仲間と分類される。[11] これらの toxins は細胞周期、細胞接着、細胞分裂、細胞骨格維持といった細胞にとって必須な機能の regulator を担う Rho/Ras family GTPases を不活化することが知られている。[12] *C. difficile* の TcdA ・ TcdB においては、UDP-glucose を補助基質とした Rho-GTPase proteins の glucosylation を介して Rho タンパクを不活化することが主な生理活性と考えられている。[11]

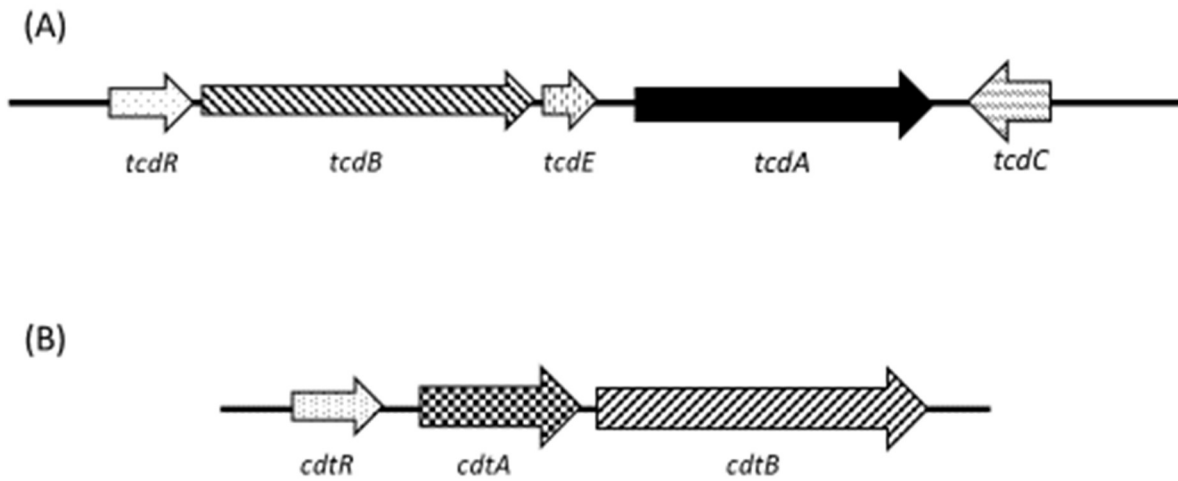
初期の動物実験において、粘膜からの分泌物の増加や粘膜の損傷、炎症を誘導する能力に関して TcdA が TcdB に勝るとされていた歴史的な経緯から、TcdA は enterotoxin と呼ばれることもある。一方、細胞培養環境では TcdB が TcdA よりも強力な作用を発揮することが初期の研究で示された[13, 14]ことから、TcdB は cytotoxin とも呼ばれる。現在では、TcdB の方が TcdA と比べてより *C. difficile* infection における免疫反応への寄与度が高いものの、TcdA と TcdB はそれぞれ単独で *C. difficile* infection の臨床症状を引き起こす能力があることが判明している。[11]

C. difficile の全ゲノム解析が初めて行われた菌株 CD630 のゲノムは全長が 4,290,252bp の環状ゲノムであることが判明し、以降、ゲノム長が 4.1-4.3Mbp の他の *C. difficile* の全ゲノムも続々と報告された。[15] その中で、*C. difficile* の病原性を規定する遺伝子は、PaLoc 及び CdtLoc に存在する。(9 ページ目概略図参照) TcdA, TcdB は各々、'PaLoc' と呼ばれる 19.6-kb の遺伝子領域にある *tcdA* 及び *tcdB* という遺伝子によりコードされている。[16, 17]

PaLoc には *tcdA*, *tcdB* の他に *tcdC*, *tcdE*, *tcdR* という遺伝子もある。*tcdR* は毒素産生を促進する RNA polymerase sigma factor の産生を司る一方で[18]、*tcdC* は毒素抑制因子の産生を担うとされる。後述する *cdtA/B* 陽性の菌株においては、*tcdC* 欠損が多いことが知られている。*tcdE* は毒素の細胞外への分泌に必要な *holin* の産生を司ることが報告されている。[17, 19]

C. difficile の臨床症状を引き起こす主な因子は TcdA 及び TcdB と考えられているが、一部の菌株はゲノム上の 6.2-kb 相当の領域 CdtLoc 内に存在する *cdtA* と *cdtB* からコードされる 2 つの component から成る binary toxins (CDT) を産生することが知られている。[20, 21] CDT は ADP-ribosyltransferase 活性を持ち、細胞骨格の *actin* を障害するほか、微小管重合による突起形成を促進するとの報告があるが、作用機序には不明な点も多い。[11] 北米やヨーロッパでの大流行で臨床的に大きな問題となった高病原性株 NAP1/RT027 や RT078 が *cdtA/cdtB* を持つことから、臨床的な観点からも *cdtA/B* は注目される。[22-25]

C. difficile の臨床的な病原性の有無は、一般には菌株が *tcdA* と *tcdB* の両方をゲノム上に持つかどうかで判断されるが、*tcdA* が欠損し *tcdB* のみ保有する毒素産生株や、極稀に *tcdA/tcdB* がないが *cdtA/B* のみ保有する株も存在することが知られている。[26-28] これまでの分子疫学的な研究では、*tcdA* と *tcdB* を両方持つ菌株は幅広く存在することが指摘されているが、*tcdA* 欠損株や、*tcdA/B* に加え *cdtA/B* を保有する菌株は分子系統学的に近縁と考えられる一部の集団に集簇しやすいことが示唆されており、分子疫学的な解析が菌株の臨床的な意義を考える上での背景情報としても重要と考えられる。



遺伝子領域 PaLoc (A)と CdtLoc (B)に含まれる遺伝子の概略図

(A) PaLoc には Toxin A をコードする *tcdA*, Toxin B をコードする *tcdB* の他、RNA polymerase sigma factor 産生を司る *tcdR*, 毒素産生抑制と推測されているタンパク TcdC 産生を司る *tcdC*, holin 産生を担う *tcdE* が含まれる。(B) CdtLoc には Binary Toxins のうちで enzyme として働く CDTa をコードする *cdtA*, binding を担う CDTb をコードする *cdtB*, 及び CDTa と CDTb の産生を制御する regulatory protein をコードするとされる *cdtR* がある。

Clostridioides difficile の分子疫学

これまでの *C. difficile* の分子疫学的な研究では、DNA を材料とした手法では以下に挙げられるようなものが報告されてきた：*Hind*IIIによる *C. difficile* の細胞内 DNA の切断パターンを解析する Restriction endonuclease analysis[29]、16S-23S rRNA intergenic Region に対する PCR amplicon のアガロースゲル上での泳動パターンにより分類する PCR ribotyping[30]、*Sma*Iによる染色体 DNA 切断パターンをアガロースゲル上で見る Pulsed-field gel electrophoresis(いわゆる North American pulse-field: NAP)[31]、arbitrary-primer PCR[32]、multilocus sequence typing (MLST)[33]、PaLoc に対する PCR 産物の制限酵素処理後の restriction patterns に基づく toxinotyping (毒素産生株のみが対象)。[34] その他、スライド凝集法による Serotyping[35]や Immunoblotting[36] についても報告がある。

歴史的には PCR ribotyping が広く使用されてきたが、PCR ribotyping をはじめとした DNA を材料とした分子疫学的な手法の多くはアガロースゲル泳動パターンの識別によるものである一方で、近年有用な手法として普及してきた MLST と比べると、後述のように結果解釈のプロセスの曖昧さが問題となりうる。

MLST は 1998 年に初めて *Neisseria meningitidis* の housekeeping genes の各々に対し DNA sequencing を施行し、各々の allele に対し番号を割り当てた上で菌株の分子タイピングを行う手法として報告された。[37] *C. difficile* で現在使用される MLST の手法は、7 つの housekeeping genes *adk*, *atpA*, *dxr*, *glyA*, *recA*, *sodA*, *tpi* を対象としたものである。[33] これらに対する allele の番号に対応する Sequence type (ST) や MLST Clade は <https://pubmlst.org/cdifficile/>で登録されたゲノム情報に基づいて施行できる。PCR amplicon の電気泳動パターンによって決定される PCR ribotyping と比較し、MLST は housekeeping genes を標的とした PCR amplicon の DNA sequencing で得られる DNA の核酸配列を用いて

ST を決定するため、結果の客観性や解釈の容易さの点で優れている。[30, 38]

C. difficile の MLST に基づいて分子系統解析を施行した過去の研究に則ると、*C. difficile* は現在 Clade 1, Clade 2, Clade 3, Clade 4, Clade 5, Clade C-I, Clade C-II, Clade C-III の計 8 つの Clade に分類され、toxin genes を含めた菌株の特徴が各々の Clade に集簇する傾向が知られている。[15, 33, 39-44] Clade 1 には *tcdA* +/*tcdB* + のみで *cdtA/B* を持たない毒素遺伝子保有株が多く属している一方で、Clade 2 と Clade 5 は *tcdA* +/*tcdB* + に加えて *cdtA/B* も陽性の高病原性とされる毒素遺伝子保有株が属している。[33, 39] また、Clade 4 は *tcdA* - が欠損し *cdtA/B* を持たない菌株が多く属しており、これらの菌株の割合はアジアで多いとされる。[33, 45-48]

日本の臨床株を対象とした MLST に基づく分子疫学研究では、Clade 1 の *tcdA/tcdB* のみ陽性の毒素遺伝子保有株である ST17, ST2, ST8 と、*tcdA* が欠損し *cdtA/B* を持たない ST81 が多い一方で、Clade 2 の ST1 や Clade 5 の ST11 に代表される *cdtA/B* 陽性の高病原性株はわずかだったとの報告[49]が 1 報のみあるのが現状である。MLST に基づく臨床株における分子疫学について報告することは今後の疫学の変化を辿る上でも非常に有意義であると考えられる。

Clostridioides difficile の accessory gene regulator について

細菌の Quorum sensing は近年学術的な注目が増している分野である。Quorum sensing は、細菌自身が分泌するシグナル分子を介して、集団として細菌の密集度、代謝や様々な生理的な活動を動的に調整することを指し[50]、Quorum sensing と病原因子の関連について報告されている細菌もある。[51-53]

C. difficile は低 GC 比率のゲノムを持つグラム陽性菌の門である Firmicutes に属するが、Firmicutes において Quorum sensing を担うものとして accessory gene regulator (*agr*) system といういわゆる two-component system の一つが知られている。[54] Firmicutes の細菌の中では *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)における *agr* system と病原因子の関係が最もよく理解されているが、その他の Firmicutes の細菌においても同様の報告がある。[54-56]

S. aureus の *agr* system を担うのは遺伝子上の *agr* loci にある 4 つの遺伝子 *agrC*, *agrA*, *agrD*, *agrB* であることが知られており、Firmicutes に属する菌の *agr* 類縁遺伝子でも同様の構成のものとされている。[54, 57] *S. aureus* の *agr* system の 4 つの亜型 *agrI*~*IV*は各々 4 つの遺伝子 *agrC*, *agrA*, *agrD*, *agrB* を持っているが、*agrD* の中心部の autoinducer-peptide (AIP)をコードする部位、pre-AIP に作用して AIP に変換する酵素活性部位をコードする *agrB*、*agrC* のうち histidine kinase の受容体部位をコードする部位の大きなバリエーションによって各々の亜型が区別されている[58, 59] AIP を介した Quorum sensing によって、違う亜型の *S. aureus* の菌株同士で発育や病原因子の発現に対し互いに影響を及ぼしあうことが知られている。[60, 61] *S. aureus* の *agr* は、*agrD*, *agrB* が各々 AIP の産生と酵素切断・

分泌を担う機構と、*agrC* が AIP の受容体としてシグナルを受け取り *agrA* をリン酸化するという機構の 2 つからなるいわゆる two-component system を構成している。

C. difficile が持つ *agr* 遺伝子の多様性に関しては、*agrB* と *agrD* の 2 つの遺伝子から成る *agr1* locus と、*agrC*, *agrA*, *agrB*, *agrD* の 4 つの遺伝子から成る *agr2* locus が存在することが知られており、代表的な菌株だと CD630 は *agr1* locus のみを保有する一方、高病原性株の標準株である R20291 は *agr1* と *agr2* の両方を保有する。[62, 63] しかし、*agr* の亜型の分子系統学的な分布や、*agr1* と *agr2* の中の遺伝的な多様性についての報告はこれまでない。

C. difficile の *agr* に関しては、過去に *agr2* locus の *agrA* と *agr1* locus の *agrBD* に対するノックアウト株を対象とした機能的な研究が報告されている[63-65]が、いずれの標的に対するノックアウト株においても毒素産生能が低下することが報告されている。また、*C. difficile* を液体培地で培養した際に得られる上清の中で 500-1000Da 相当の分子量の物質のみを含む液体を *C. difficile* の様々な液体培養に添加することにより、毒素産生が促進されることが観察されており[65]、*S. aureus* の *agr* に由来する AIP と同様なシグナル分子が *C. difficile* によっても作られると考えられる。実際に、*agr1*_BD をノックアウトした株の上清では毒素産生を促進する作用がないことも報告されており、*S. aureus* の *agr* と同様に *agr1*_BD が *C. difficile* における AIP 相当の物質の産生及び分泌を担っている可能性を支持する結果であった。[64] 加えて、*S. aureus* の AIP が持つとされる thiolactone 構造を切断することで知られる hydroxylamine という酵素でシグナル分子を処理すると、毒素産生促進作用が消失することが報告されているが、核酸配列から推測される *C. difficile* の AIP のアミ

ノ酸配列を合成する試みはこれまでのところ成功しておらず[65]、*C. difficile* AIP の正確な配列は現時点では知られていない。また、上述のシグナル分子は *C. difficile* の発育に関しては影響を与えないとする報告はある[64]ものの、十分な知見は得られていないのが現状である。

【第1章】*C. difficile* の分子疫学、病原遺伝子及び toxin EIA 検査結果に関連しうる因子の

検証

1. 目的

日本において MLST に基づく *C. difficile* 臨床株に対する分子疫学研究は過去に 1 例のみであるが、toxin EIA 検査結果と微生物学的・臨床的な因子の関連について検証した研究は過去にない。このことを踏まえ、当院における MLST に基づく *C. difficile* の臨床株の分子疫学について知るため、臨床の便検体から検出された *C. difficile* に対して MLST により ST を決定した上で結果を集計し傾向を分析した。また、病原遺伝子とされる *tcdA*, *tcdB*, *cdtA/B* と、toxin 制御に関連し *cdtA/B* 陽性株で多いとされる *tcdC* の欠損について評価し、ST との関連を評価した。

東京大学医学部附属病院に限らず、ほとんどの病院において *C. difficile* に関する日常の診療では便の toxin EIA 検査に基づいて CDI の診断や治療が行われているのが現状である。また、先行研究では EIA 検査陽性の検体で *cdtA/B* 陽性[8, 66]や *tcdC* deletion[67]がある株の検出が多いと報告されているが、本邦及び本施設の分子疫学においても同様の傾向が確認されるかどうかは検証の余地がある。この背景を踏まえ、本研究では *C. difficile* の毒素産生株が検出された便検体に対し、各々の症例及び対応する菌株を toxin EIA 検査が陽性のものと陰性のものに分類した上で、EIA 検査結果と ST や病原遺伝子の関連、CDI の重症化や再燃リスクを上げるとさせる臨床背景の関連について統計的に検証した。

2. 材料と方法

a) 研究デザイン

2013 年 3 月から 2014 年 7 月にかけて、東京大学医学部附属病院において toxin EIA 検査が施行された便検体を培養して検出された *C. difficile* の菌株に対し、分子遺伝学的な解析を施行した。更に、*C. difficile* が検出された便検体が採取された患者についての臨床情報を電子カルテシステムより収集した上で、後方視的に解析した。*C. difficile* 菌株に関して、同一の下痢のエピソードの中で初めて検出された *C. difficile* 以外は除外した。臨床情報から下痢のエピソードが確認できなかった検体についても、本研究の対象菌株/症例から除外した。また、小児と成人で CDI の特徴が異なる可能性を考慮し、18 歳未満の症例から検出された *C. difficile* 菌株及び症例は除外した。この研究は東京大学医学部の研究倫理委員会に承認された (審査番号 3538)。

b) 使用された *C. difficile* の菌株

研究対象の期間内で、toxin EIA 検査 (C. Diff Quik Chek Complete, Techlab, Inc., Blacksburg, VA, USA)に提出された便検体はすべて Cycloserine-cefoxitin-mannitol 寒天培地 (Nissui Pharmaceutical, Co., Ltd, Tokyo, Japan)上で enrichment なしで 37°Cの嫌気培養を 24 時間以上施行された。発育した菌が *C. difficile* であることの同定は、培養時点では寒天培地上でのコロニーの性状で施行され、後に本研究で施行された MLST 解析の過程で遺伝子的に確認された。*C. difficile* の菌株はスキムミルクに溶解し、以後の実験で使用するとき以外は-80°Cで保存した。

c) MLST 及び病原遺伝子の評価

PCR 用の DNA template は、検出された *C. difficile* を滅菌水に採取した上で 95°C で 10 分間の加熱処理により作成された。本研究の PCR は Emerald Amp PCR Master Mix kit (Takara Bio, Shiga, Japan)を用いて行われた。PCR は、denaturation 95°C30 秒、annealing (標的遺伝子毎の条件については表 1 参照)、extensions 72°C/amplicon 1kbp 当たり 60sec の条件で 40 サイクル施行後に final extension 72°C5 分というプロトコルを S1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)で施行した。PCR の amplicon は 1.5%アガロースゲルで電気泳動を 100V/30 分で施行の上で、エチジウムブロマイド 0.5ug/mL 含有の TAE buffer で染色し、amplicon の band を可視化した。

MLST と toxin 関連遺伝子 (*tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *cdtA*, *cdtB*)の解析では、PCR の primer は、過去の研究で使用されたものを使用した(表 1)。[33, 49, 68, 69] MLST と *tcdC* の遺伝子配列の DNA sequencing は PCR amplicon を Eurofins genomics (Ebersberg, Germany)へ提出して施行した。MLST で施行した DNA sequencing の結果は PubMLST (<https://pubmlst.org/C.difficile/>).の sequence query page とデータを照合し ST を決定した。また、*tcdC* の配列は、*C. difficile* VPI 10463 の PaLoc 領域の遺伝子配列 (GenBank accession number: X92982.1)を比較対象として遺伝子配列の欠損の有無について解析した。

表 1. 本研究で PCR に使用されたプライマーの一覧

	annealing condition	プライマー名	DNA 配列(5'-->3')	引用元
MLST				
<i>adk</i>	56°C/30 秒	adk1F2	CGTTGTTGGAGTTGCTTTGG	[49]
		adk1R2	TGTCAGCAACTATTTTACCTGCT	[49]
<i>atpA</i>	56°C/30 秒	atpA1F	TGATGATTTAAGTAAACAAGCTG	[33]
		atpA1R	AATCATGAGTGAAGTCTTCTCC	[33]
<i>dxr</i>	56°C/30 秒	dxr3F	GCTACTTTCCATTCTATCTG	[33]
		dxr4R	CCAACCTCTTTGTGCTATAAA	[33]
<i>glyA</i>	56°C/30 秒	glyA1F	ATAGCTGATGAGGTTGGAGC	[33]
		glyA1R	TTCTAGCCTTAGATTCTTCATC	[33]
<i>recA</i>	56°C/30 秒	recA2F	CAGTAATGAAATTGGGAGAAGC	[33]
		recA2R	ATTCAGCTTGCTTAAATGGTG	[33]
<i>sodA</i>	56°C/30 秒	sodA5F	CCAGTTGTCAATGTATTCAATTC	[33]
		sodA6R	ATAACTTCATTTGCTTTTACACC	[33]
<i>tpi</i>	56°C/30 秒	tpi2F	ATGAGAAAACCTATAATTGCAG	[33]
		tpi2R	TTGAAGGTTTAAACACTTCCACC	[33]
毒素遺伝子				
<i>tcdA</i>	54°C/30 秒	tcdA-F3345	GCATGATAAGGCAACTTCAGTGGTA	[68]
		tcdA-R3969	AGTTCCTCCTGCTCCATCAAATG	[68]
<i>tcdB</i>	54°C/30 秒	tcdB-F5670	CCAAARTGGAGTGTTACAAACAGGTG	[68]
		tcdB-R6079A	GCATTTCTCCATTCTCAGC	[68]
		tcdB-R6079B	GCATTTCTCCGTTTTTCAGC	[68]
<i>cdtA</i>	54°C/30 秒	cdtA-F739A	GGGAAGCACTATATTAAAGCA	[68]
		cdtA-F739B	GGGAAACATTATATTAAAGCA	[68]
		cdtA-R958	CTGGGTTAGGATTATTTACTGGACCA	[68]
<i>cdtB</i>	54°C/30 秒	cdtB-F617	TTGACCCAAAGTTGATGTCTGATTG	[68]
		cdtB-R878	CGGATCTCTTGCTTCAGTCTTTATAG	[68]
16S rDNA	54°C/30 秒	PS13	GGAGGCAGCAGTGGGGAATA	[68]
		PS14	TGACGGGCGGTGTGTACAAG	[68]
<i>tcdC</i>	47°C/30 秒	tcdC-F(-17)	AAAAGGGAGATTGTATTATGTTTTTC	[68]
		tcdC-R(+462)	CAATAACTTGAATAACCTTACCTTCA	[68]
<i>tcdA</i> deletion	56°C/30 秒	NK9	CCACCAGCTGCAGCCATA	[69]
		NK11	TGATGCTAATAATGAATCTAAAATGGTAA C	[69]

d) 臨床症例の定義と解析

便の toxin EIA 検査を施行されたすべての患者の医療情報を確認した。まず、無形便(下痢)についての明記がない症例と、検査施行時点で 18 歳未満の症例は除外した。

また、toxin EIA 検査が施行されたが、便培養で *C. difficile* が検出されなかった症例は除外された。

上記の除外基準に該当しない症例/菌株に対して、臨床情報として年齢、性別、(入院症例では)入院日・退院日、toxin EIA 検査時点での在院日数、検査前の 1 か月間での抗菌薬投与歴、糖尿病・慢性腎臓病・悪性腫瘍・炎症性腸疾患の合併の有無、1 か月以内の化学療法歴、500/uL 未満の好中球減少、1 週間以内の免疫抑制薬の投与歴、腹部の外科手術歴、経管栄養、発症 1 週間以内のプロバイオティクスやプロトンポンプ阻害薬の投与歴の有無について電子カルテで確認した。得られた臨床情報に関して、toxin EIA 陽性群と陰性群に分けて比較した結果を統計的に解析した。また、陽性群と陰性群で検出された菌株の病原遺伝子についても統計的に比較検討した。

e) 統計解析

統計解析は JMP Pro 14 (SAS Institute Japan, Tokyo, Japan)を用いて行った。名義尺度のデータに対しては χ^2 二乗検定、離散変数のデータに対しては Wilcoxon 検定を行った。すべての統計解析において、有意水準は $\alpha=0.05$ ($P<0.05$)とした。

3. 結果

a) 研究対象となった症例及び *C. difficile* 菌株

除外基準を適応後に残った 105 個の *C. difficile* 菌株及び対応する 105 の症例を研究対象とした。

105 個の菌株に対して MLST と toxin 関連遺伝子 (*tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *cdtA*, *cdtB*) の解析を施行した。105 個の菌株のうち、74 個は毒素産生 *C. difficile* であった。毒素産生株が検出された 74 症例のうち、EIA 陽性 36 例と EIA 陰性 38 例の比較を以下で行った。

b) *C. difficile* 菌株の MLST に基づいた分子疫学と病原遺伝子について

ST の分布や Clade, toxin 遺伝子の情報を表 2 に示す。多く検出された ST として

ST17 (n=12)、ST81 (n=9)、ST2 ・ ST15 ・ ST54 ・ ST109 (n=7)、ST8 ・ ST3 ・ ST100

(n=4)が挙げられる。似た性質を持つ菌の集簇を可視化するための Clade analysis で

は、Clade 1 の菌株が 72 例と最も多く、次いで Clade 4 が 24 例と多かった。Clade

2、Clade 3 及び PubMLST のデータベース照合で Clade に分類不能な菌株は 4 つあっ

た。Clade ごとの主要な ST については表 3 に、数が多かった ST の EIA の陽性群及

び陰性群での割合は表 4 に示す。

表 2: *C. difficile* 臨床株の MLST に基づく分子疫学と病原遺伝子の解析結果の一覧
(NT: PaLoc がない非毒素産生株のために未検出)

ST	Clade	検出株数	<i>tcdA</i>	<i>tcdB</i>	<i>cdtA/B</i>	<i>tcdC</i> 欠損
ST17	1	12	+	+	-	No
ST81	4	9	-	+	-	No
ST2	1	7	+	+	-	No
ST15	1	7	NT	NT	NT	NT
ST54	1	7	+	+	-	No
ST109	4	7	NT	NT	NT	NT
ST8	1	4	+	+	-	No
ST3	1	4	+(<i>n</i> = 3)	+(<i>n</i> = 3)	-	No
			NT (<i>n</i> = 1)	NT (<i>n</i> = 1)		NT
ST100	1	4	NT	NT	NT	NT
ST37	4	3	-	+	-	No
ST53	1	3	+	+	-	No
ST35	1	2	+	+	-	No
ST55	1	2	+	+	-	No
ST14	1	2	+	+	-	No
ST5	3	1	+	+	+	54 bp del
ST7	1	1	+	+	-	No
ST26	1	1	NT	NT	NT	NT
ST28	1	1	NT	NT	NT	NT
ST33	1	1	+	+	-	No
ST41	2	1	+	+	+	18 bp del
ST42	1	1	+	+	-	No
ST48	1	1	+	+	-	No
ST58	1	1	+	+	-	No
ST63	1	1	+	+	-	No
ST123	2	1	+	+	+	18 bp del
ST129	1	1	+	+	-	No
ST153	1	1	+	+	-	No
ST159	4	1	NT	NT	NT	NT
ST201	3	1	+	+	+	18 bp del
ST205	1	1	NT	NT	NT	NT
ST223	2	1	+	+	+	18 bp del
ST243	4	1	NT	NT	NT	NT

ST247	1	1	+	+	-	No
ST278	1	1	+	+	-	No
ST301	1	1	+	+	-	18bp del
ST303	Unknown	1	NT	NT	NT	NT
ST304	Unknown	1	+	+	-	No
ST400	1	1	+	+	+	No
ST401	4	1	NT	NT	NT	NT
ST402	Unknown	1	NT	NT	NT	NT
ST403	4	1	NT	NT	NT	NT
ST404	1	1	+	+	-	No
ST405	4	1	NT	NT	NT	NT
ST406	1	1	NT	NT	NT	NT
ST407	Unknown	1	NT	NT	NT	NT
ST408	1	1	NT	NT	NT	NT

表 3: Clade 1~4 で検出頻度が高かった ST のまとめ

	総数	主な毒素産生株	主な非毒素産生株
Clade 1	72	ST17 (16.7%) ST2・ST54 (9.7%)	ST15 (9.7%) ST100 (5.6%)
Clade 4	24	ST81 (37.5%) ST37 (12.5%)	ST109 (29.2%)
Clade 2	3	ST41, ST123, ST223 (33.3%)	-
Clade 3	2	ST5, ST201 (50%)	-
未知	4	ST304 (25%)	ST303, ST402, ST407 (25%)

表 4: 検出数上位 1 位から 5 位までの毒素産生株の ST の EIA 陽性群と陰性群での数の比較

	総数	EIA 陽性	EIA 陰性
ST17/Clade 1	12	8	4
ST81/Clade 4	9	3	6
ST2/Clade 1	7	1	6
ST54/Clade 1	7	5	2
ST8/Clade 1	4	2	2
その他	35	17	18

c) Sequence type と *tcdA/tcdB*、*cdtA/B*、*tcdA* 欠損、*tcdC* 欠損との関係

研究対象となった 105 個の菌株のうち、74 例は毒素産生株、31 例が非毒素産生株であり、毒素産生株のすべてで *tcdC* が存在し、非毒素産生株では *tcdC* が検出されないことが確認された。(表 2) 毒素産生株のうち、*cdtA/B* は 5 株、*tcdA* の欠損がある株は 12 株、*tcdC* の 18bp または 54bp 欠損は 6 株で検出された。(表 2、表 5) 6 株の *tcdC* 部分欠損株のうち、5 つが *cdtA/B* 陽性であり、残り 1 つが *cdtA/B* 陰性で *tcdA/B* のみ陽性の株だった。毒素産生株と陰性株が同一の ST 内で検出されたのは ST3 のみで、ST3 では 3 株が毒素産生株、1 株が非毒素産生株だった。(表 2)

d) Toxin EIA 検査結果と *cdtA/B*、*tcdA* 欠損、*tcdC* 欠損

毒素産生株が検出された 74 症例のうち、toxin EIA 陽性群が 36 例、toxin EIA 陰性群が 38 例だった。*cdtA/B*、*tcdA* 欠損、*tcdC* 欠損が見られる株の割合に関しては、toxin EIA 陽性群と陰性群では統計的に有意な差は見られなかった。(表 5)

表 5 : EIA 陽性群と陰性群における *C. difficile* 毒素産生株の *cdtA/B*, *tcdA* 欠損、*tcdC* 欠損株の割合の比較

	EIA 陽性 (N=36)	EIA 陰性 (N= 38)	P 値
<i>cdt A/B</i> 陽性	5 (13.9%)	1 (2.6%)	0.0762
<i>tcdC</i> 部分欠損 (18 or 54 bp)	4 (11.1%)	2 (5.3%)	0.3570
<i>tcdA</i> 欠損	3 (8.3%)	9 (23.7%)	0.0734

e) 毒素産生株の症例における toxin EIA 陽性群と陰性群の臨床背景の比較

毒素産生株が検出された 74 の症例のうち、EIA 陽性群 (36 例)と EIA 陰性群 (38 例)の臨床背景について比較した。EIA 陽性群は年齢が有意に高く (71.8 ± 12.4 vs 62.4 ± 17.6 years, $P=0.0106$)、EIA 検査施行前の入院日数が 3 日以上である症例の割合も有意に多かった (97.2% vs 78.9% , $P=0.0162$)。また、EIA 陽性群の方が有意に慢性腎臓病の有病率が高かった (41.7% vs 18.4% , $P=0.0288$)。

抗菌薬全般への曝露は EIA 陽性群で有意に多く (100% vs 89.5% , $P=0.0453$)、中でも β ラクタム系抗菌薬への曝露が EIA 陽性群で有意に多かった (100% vs 78.9% , $P=0.0097$)。抗菌薬以外では、プロトンポンプ阻害薬の使用率が EIA 陽性群で有意に高かった (83.3% vs 62.2% , $P=0.0426$)。

上述の項目以外では、両群間で統計的に有意な差は見られなかった。本研究で解析した項目については表 6 で網羅的に示す。

表 6: *C. difficile* toxin EIA 検査の陽性群と陰性群の患者の臨床背景の比較

	EIA 陽性(N = 36)	EIA 陰性(N = 38)	P 値
年齢 (平均 ± 1 標準偏差)	71.8 ± 12.4	62.4 ± 17.6	0.0106
男性	17 (47.2%)	15 (39.5%)	0.5013
3 日以上の在院あり	35 (97.2%)	30 (78.9%)	0.0162
糖尿病	9 (25.0%)	6 (15.8%)	0.3246
慢性腎臓病	15 (41.7%)	7 (18.4%)	0.0288
炎症性腸疾患	1 (2.8%)	4 (10.5%)	0.1844
活動性の悪性腫瘍	16 (44.4%)	15 (39.5%)	0.6649
血液悪性腫瘍	9 (25.0%)	7 (18.4%)	0.4920
固型臓器悪性腫瘍	7 (19.4%)	8 (21.1%)	0.8634
1 か月以内の抗悪性腫瘍化学療法	8 (22.2%)	9 (23.7%)	0.8812
好中球減少 (<500/ μ L)	1 (2.8%)	3 (7.9%)	0.3306
免疫抑制薬の使用	10 (27.8%)	14 (36.8%)	0.4051
副腎皮質ステロイド(CS)	10 (27.8%)	14 (36.8%)	0.4051
CS 以外の免疫抑制薬	4 (11.1%)	4 (10.5%)	0.9355
1 か月以内の腹部外科手術歴	5 (13.9%)	3 (7.9%)	0.4065
入院前のすべての腹部外科手術歴	15 (41.7%)	9 (23.7%)	0.0986
1 週間以内の経管栄養	5 (14.3%)	4 (10.5%)	0.6255
全身投与の抗菌薬使用歴			
4 週間以内の抗菌投与歴	36 (100.0%)	34 (89.5%)	0.0453
β ラクタム系抗菌薬	36 (100.0%)	30 (78.9%)	0.0036
第 3・第 4 世代セファロスポリン系	12 (33.3%)	12 (31.6%)	0.8720
β ラクタム系・ β ラクタマーゼ阻害薬配合	15 (41.7%)	13 (34.2%)	0.5086
カルバペネム系	6 (16.7%)	4 (10.5%)	0.4400
フルオロキノロン系抗菌薬	4 (11.1%)	2 (5.3%)	0.3570
その他の抗菌薬	16 (44.4%)	16 (42.1%)	0.8391
1 週間以内のプロトンポンプ阻害薬投与歴	30 (83.3%)	23 (62.2%)	0.0426
1 週間以内のプロバイオティクス製剤投与歴	8 (22.2%)	10 (27.0%)	0.6339

4. 考察

a) *C. difficile* の分子疫学と病原遺伝子について

MLST に基づいた *C. difficile* の臨床株の疫学研究は日本において過去に 1 報のみであり、本研究の結果は日本での *C. difficile* の分子疫学を知る上で貴重な情報である。本研究では ST17, ST2, ST54 が多かったが、過去に日本で施行された MLST 及び PCR ribotyping による研究でもこれらの ST に対応する菌株が多いことが報告されている。[49, 70-72] また、本研究で検出された ST81 と ST37 に属する *tcdA* 欠損を伴う毒素遺伝子保有株の割合は 11.4% であり、これらの菌株の割合が 10-30% とされる中国や韓国と言った近隣国での研究と矛盾しない。[45-47, 73] アジア圏以外では *tcdA* 欠損の毒素遺伝子保有株は稀にアウトブレイクが見られる[74, 75]ものの割合としては少なく、アメリカ合衆国やヨーロッパからの報告では臨床菌株におけるこれらの菌株の割合は 3-5% 未満と報告されており、本研究での割合と比して極めて少ない。[76, 77]

北米やヨーロッパでの流行が大問題となった ST1 (RT027)や ST11 (RT078)に代表される Binary toxin (CDT)産生株は本研究で 5 株 (4.8%)と非常に少ない点は北米やヨーロッパと対照的な一方で、過去の日本及び近隣のアジア圏の国からの研究と同様の傾向であると考えられた。[45-47, 49, 73] 本研究で検出された CDT 産生株は ST41, ST123, ST223 に属するものであった。これらの ST の株は ST1/RT027 株と同じ Clade2 に属し、ST1/RT027 株と同様に *cdtA/B*, *tcdC* の 18bp 欠損、フルオロキノロン耐性があることや、重症感染症の原因となりうることについての報告がある[33, 78-80] 一方で、ST1/RT027 株とは TcdB の構造や細胞毒性、毒素産生能に関して違いが見られることも報告されている。[78, 81]

毒素遺伝子非保有株の中で本研究の様に ST15、ST109、ST100 が多い傾向は、MLST に基づいた過去の日本の研究と合致した。[49] 毒素遺伝子非保有株が注目される理由の一つとして、非毒素産生株の腸管定着が CDI を予防する可能性が示唆されていることが挙げられる。[82-86] 欧米で多いとされる高病原性株の流行が日本でほとんど見られない原因が非毒素産生株の疫学の違いである可能性もある。本研究の結果が非毒素産生株による CDI 予防の研究及び臨床応用に役立つことを期待したい。

本研究の ST3 で見られたように、同じ ST の中で毒素遺伝子を保有する株と保有しない株が混在するということは既に報告されており、実際に ST3 に関してもそのような報告がある。[47] また、本研究では毒素遺伝子非保有株のみだった ST109 と ST100 に関しても、毒素遺伝子保有株が属していることが過去に報告されており、*C. difficile* の進化を考える上でも興味深い知見と考えられる。[39, 48, 87]

本研究で示された MLST に基づく分子疫学や病原遺伝子の研究の limitation は、サンプル数が小さい単施設研究であることにより、本施設や本邦の菌株や病原遺伝子の分布を正確に反映していない可能性があることである。ただし、過去の国内の他施設やアジア圏からの報告と似た傾向が示されていることは、本研究の妥当性を支持するものである。

b) 毒素遺伝子保有株が検出された症例の toxin EIA 陽性群と陰性群の比較

日本で MLST を用いた *C. difficile* の分子疫学研究は過去に 1 報のみであるが、toxin EIA 検査結果と微生物学的因子・臨床的因子の関係の検証まで踏み込んだ研究は本研究が初めてである。

過去の研究からは、CDI における toxin EIA の陽性は *C. difficile* 菌株の *cdtA/B* の保有や *tcdC* 部分欠損の存在と正の相関を示すことが示唆される[8, 66, 67] が、本研究では *cdtA/B* について同様な傾向の観察された程度で統計的に有意な違いは示されなかった。有意な違いがみられなかった理由としては、過去の欧米からの報告で見られる高病原性株 ST1 や ST11 が少ないといった特徴が本研究の対象菌株ではないことや、サンプル数が少ないことにより統計的な傾向が現れなかった可能性が考えられる。*tcdA* 欠損が EIA 陽性群と陰性群で占める割合に関して、本研究では統計的に有意な差は示されなかったが、この点に関しては過去の研究で同様の結果が報告されている。[47, 88]

EIA 陽性群と陰性群の臨床的な背景の比較では、EIA 陽性群では陰性群と比べ、より年齢が高いこと、3 日以上入院していた患者の割合が多いこと、慢性腎臓病の有病率が高いこと、抗菌薬（特に β ラクタム系抗菌薬）とプロトンポンプ阻害薬への曝露が多かったことが判明した。これらの因子は、CDI 発症のリスク因子としてこれまでも報告されてきたものであるが[89-93]、本研究と異なる菌株の分子疫学の中での研究と同様にこれらの因子が CDI のリスクとして示されたことには意義がある。また、プロバイオティクスの使用が CDI 発症リスクを抑えるという過去の研究が存在する[94, 95]ことから、プロバイオティクス製剤使用によって EIA 陽性率が低下する可能性があると考えて解析したが、本研究ではプロバイオティクス製剤への

曝露率に関して EIA 陽性群と陰性群で統計的に有意な差は示されなかった。

本研究の toxin EIA 検査陽性と病原遺伝子や臨床的な CDI のリスク因子における検証の limitation は主に 2 つある。微生物学的な因子に関しては、解析対象とした *cdtA/B*、*tcdC* 欠損、*tcdA* 欠損を持つ菌株が比較的少ないことにより統計的な意義が限られ、ST 毎に分けて検証するに足るサンプル数でもなかった。ただし、過去の他国からの報告との菌株の疫学分布の違いによって、本研究の病原遺伝子解析では統計的に有意な結果が得られなかった可能性も十分にあり、本研究の結果がサンプル数の小ささのみで棄損されないと考える。

また、toxin EIA 陽性群、陰性群ともに解析対象数が非常に少ないことから、統計的な意義が限定されるが、その中でも、toxin EIA 陽性と相関する臨床的なリスク因子が、過去の異なる分子疫学での研究と同様に本研究において示されたことは有意義と考える。

5. 結語

本研究は、日本で施行された MLST に基づく *C. difficile* の臨床株の分子疫学についての 2 報目となる。過去の日本の研究と同様に、toxin A 欠損の毒素遺伝子保有株が比較的多く、高病原性の binary toxin 産生株が少ない傾向が示された。今後、MLST に基づく *C. difficile* の分子疫学解析が益々主流となっていくことが想定される中で、当院のような先進医療を担う大病院における疫学を報告したことの意義は大きいと考えられる。また、本研究で観察された分子疫学的な傾向を地理的に離れた諸外国の疫学と比較しながら継続的に評価することにより、*C. difficile* の国、地域、施設レベルでの高病原性株をはじめとした臨床的に重要な菌株の流行状況を把握するうえで欠かせない。また、グローバルな観点から国や地域別の *C. difficile* の分子疫学を知ることが、CDI の発症予防に有用な腸内細菌叢の構築や、非毒素産生株およびプロバイオティクス製剤の研究に資することが期待される。

毒素遺伝子保有株が検出された症例の中では、EIA 陽性群は陰性群と比べて年齢が高く、 β ラクタム系抗菌薬やプロトンポンプ阻害薬への曝露率が高いことが統計的に有意な差として見られたことは過去の多くの報告でも確認されたことであった一方で、EIA 陽性と *C. difficile* の病原遺伝子との関連は本研究では示されなかった。

【第2章】*Clostridioides difficile* accessory gene regulator の遺伝子型と分子系統学的な分布の研究

1. 目的

C. difficile の accessory gene regulator(*agr*)としては *agr1* と *agr2* の 2 つの locus が知られているが、核酸配列・アミノ酸配列の多様性については知られていない。この背景を踏まえ、*C. difficile agr* について現在理解されている以上の核酸・アミノ酸配列の多様性について検証するため、まず初めに GenBank のデータベース上の *C. difficile* Whole Genome Sequences(WGS)に対して *in silico* 解析を施行した。次に、*in silico* 解析で推定された核酸配列の型の多様性が実際に *C. difficile* の実験室株及び臨床株において存在するかを確認した。また、臨床的な観点からは、第1章の毒素遺伝子保有株において確認された *agr* 型の保有パターンと、toxin EIA 検査結果に何らかの相関があるかどうかを検証した。

最後に、*C. difficile agr* の多様性について得られた知見を踏まえ、MLST に基づく分子系統解析の結果と *agr* 型の保有パターンの臨床株における分布を明らかにした。

2. 材料と方法

a) *C. difficile* agr loci についての GenBank 上での *in silico* 解析

C. difficile の株 CD630 (GenBank accession number : AM180355.1) の *agr1* locus と株 R20291 (GenBank accession number : FN545816.1) の *agr2* locus の遺伝子配列を用いて、*Clostridioides difficile* に対応する taxid 1496 に限定して BLAST search (program: discontinuous megablast) を施行し、GenBank 上に登録された *C. difficile* の Whole genome sequence (2020 年 5 月 14 日時点で 84 のデータあり) 上にある *agr* の homologues を探した。その結果、*agr2* の中で互いに遺伝子配列の相同性が 80% 程度しかない亜型が 2 つ指摘されたため、従来から報告されている *agr2* locus を *agr2R*、新しく本研究で指摘された *agr2* の homologue を *agr2M* と名付けた。上記の BLAST search で、*agr2R* と *agr2M* に対応するもの以外の検索結果は query coverage が 4-31% と極めて低く、相同遺伝子としての比較対象に含めなかった。

GenBank のデータベース上にある *C. difficile* の whole genome sequence 上で確認された *agr1*、*agr2R*、*agr2M* の亜型に関して、DNA 配列に基づいて ChromasPro (Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Australia) で ORF 解析 (Genetic Code: standard) を施行した上で、推定されるアミノ酸配列の多様性について検証した。

b) 研究対象となった *C. difficile* の菌株

C. difficile の臨床株については、第 1 章同様に東京大学医学部附属病院で 2013 年 4 月から 2014 年 7 月に便検体から検出された計 133 株の菌株を使用した。標準株は CD630 株に該当する ATCC BAA-1382 (CD630) と R20291 株に該当する NCTC 13366 (R20291) を使用した。

Toxin EIA 陽性と *agr* 亜型の保有パターンとの関係についての解析では、第 1 章で研究対象となった 105 例のうち毒素遺伝子を保有する 74 株/症例のうち、保存菌株の再分離が可能だった 72 例が *agr* 亜型のスクリーニング PCR の対象とした。

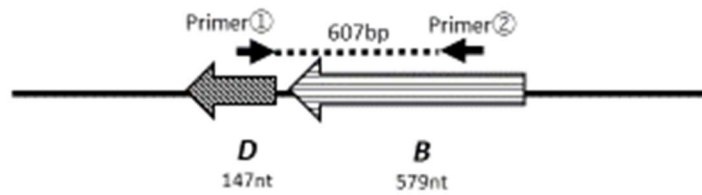
c) 臨床株及び標準株の *agr* loci の遺伝子解析

臨床株及び標準株は第 1 章と同様の手法で嫌気培養され、寒天培地上に発育した菌を 95°C で 10 分間の加熱処理したものを以下の PCR で使用した。PCR では Emerald Amp PCR Master Mix kit (Takara Bio, Shiga, Japan) を、アガロースゲルの電気泳動では amplicon の大きさの評価のために 100bp の DNA ladder (Toyobo, Osaka, Japan) を使用した。本研究の PCR は Emerald Amp PCR Master Mix kit (Takara Bio, Shiga, Japan) を用いて行われた。PCR 条件は、denaturation 95°C 30 秒、annealing (標的遺伝子毎の条件については表 1 参照)、extensions 72°C/amplicon 1kbp 当たり 60sec という条件で 40 サイクル施行後に final extension 72°C 5 分というプロトコルを S1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) で施行した。PCR の amplicon は 1.5% アガロースゲルで電気泳動を 100V/30 分で施行の上で、エチジウムブロマイド 0.5ug/mL 含有の TAE buffer で染色し、amplicon の band を可視化した。MLST と毒素遺伝子保有の解析は、第 1 章と同じ方法で施行した。MLST 及びその結果を用いた ST と Clade の決定も第 1 章と同様に施行し、上記 *in silico* 解析で新たに発見された菌株については PubMLST (<https://pubmlst.org/cdifficile/>) のデータベースを参照して ST と Clade を決定した。すべての ST に対応する housekeeping gene の allele の配列も PubMLST のデータベースにあるものを利用した。

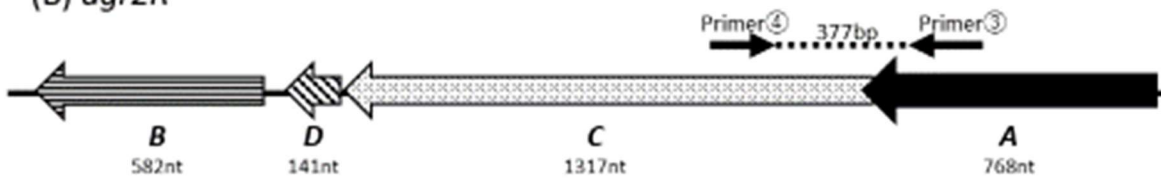
CD630 (AM180355.1) の *agrB1* と *agrD1* の配列にまたがるプライマーペア① *agr1*_BD_F/② *agr1*_BD、R20291 (FN545816.1) の *agr2R_C* と *agr2R_A* にまたがるプライマーペア③ *agr2R_AC_F*/④ *agr2R_AC_R*、*agr2M_C* と *agr2M_A* にまたがるプライマーペア⑤ *agr2M_AC_F*/⑥ *agr2M_AC_R* を核酸配列に基づいて設計し、標準株及び臨床株に対して *agr1*, *agr2R*, *agr2M* のスクリーニング PCR を施行する際に用いた。3

つの *agr* loci *agr1*, *agr2R*, *agr2M* とプライマーの配置の概要については図 1 に、プライマーの配列は表 1 に示す。これらの PCR で得られた amplicons は Sanger 法を用いて Eurofins Genomics (Ebersberg, Germany) で DNA sequencing を施行され、目的の遺伝子領域の DNA 配列が得られたかどうかを確認された。スクリーニング PCR で *agr1* locus が検出されなかった菌株に対しては、確認のために *agr1* を挟み込むように設計したプライマーペア 1_drk_F: CCCCCTAAATTGGCGCACTA/1_drk_R: AGCGCTTAAATATGTGAAAGAACA (annealing: 55°C/30 秒, 想定 amplicon 1510bp) 及び b1d1_f: GCCTTTTAACAATGGGGAAAAGG/b1d1_r: CACTATATCCCCCTAAATTGGCGC (annealing: 60°C/30 秒, 想定 amplicon 1154bp) を用いて PCR を行い、*agr1* の有無について追加で確認を行った。

(A) *agr1*



(B) *agr2R*



(C) *agr2M*

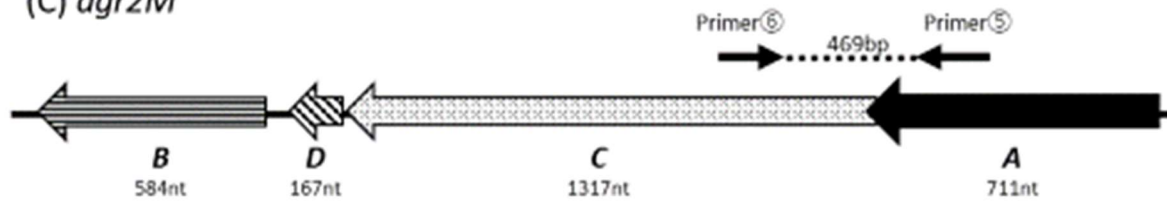


図 1: *C. difficile* *agr1* (A), *agr2R* (B), *agr2M* (C)の遺伝子構成とスクリーニング PCR に使用したプライマーの概略図と想定される amplicon の塩基数。

各々の locus は、*agr1* が *agr1_D* と *agr1_B* の 2 つ、*agr2R* と *agr2M* はそれぞれ *agr2R_B*, *agr2R_D*, *agr2R_C*, *agr2R_A* 及び *agr2R_B*, *agr2R_D*, *agr2R_C*, *agr2R_A* の 4 つの遺伝子からなる。スクリーニング用のプライマーは *agr1* の *B* と *D*、*agr2R* と *agr2M* の *A* と *C* にまたがる amplicon を得られるように設計した。

表 1: 本研究で *agr1*, *agr2R*, *agr2M* に対するスクリーニング PCR で使用されたプライマーと標的遺伝子毎の PCR の annealing condition

	annealing condition	番号	名称	DNA 配列 (5'-->3')
<i>agr1</i>	60°C/30 秒	①	<i>agr1</i> _BD_F	GGCTGATGAATAATCCAAGGACAGGTA CTA
		②	<i>agr1</i> _BD_R	GCTTTCATAGTTAATATAACCACCATGC
<i>agr2R</i>	52°C/30 秒	③	<i>agr2R</i> _AC_F	GACCTACTGCAGAACCTTCAGC
		④	<i>agr2R</i> _AC_R	GAGTTAAAGGCTTGAAACTTGC
<i>agr2M</i>	54°C/30 秒	⑤	<i>agr2M</i> _AC_F	GTGAATTTGGATTTTTCAGATGCC
		⑥	<i>agr2M</i> _AC_R	AGCTAAACCTTCCCCCATC

d) 毒素遺伝子保有株の *agr* 亜型保有パターンと toxin EIA 検査結果の関係の検証

第 1 章において施行した toxin EIA 検査結果と *C. difficile* の微生物学的因子との関連の検証に加え、臨床株の *C. difficile agr* 亜型の保有パターンと toxin EIA 検査結果の関係を検証した。統計解析は JMP Pro 14 (SAS Institute Japan, Tokyo, Japan)を用いて行い、有意水準は $\alpha=0.05$ ($P<0.05$)として名義尺度のデータに対し χ^2 二乗検定を行った。

e) MLST に基づいた分子系統解析

MLST に基づいた分子系統解析に使用する遺伝子配列としては、過去の研究[33] に倣い MLST が標的とするゲノム上の 7 つの *housekeeping genes* の配列を結合したものをを用いることとした。用いられた配列は、CD630、R20291、臨床株の MLST allele 情報に加え、過去に MLST Clade C-I、C-II、C-III に属すると報告された ST について PubMLST から得られた allele 情報である。[15, 40-44] 分子系統解析については、Biopython の Bio.Phylo ライブラリで構築した環境下で、PhyML により Maximum likelihood method でなされた。[96-98] 解析結果を分子系統樹で図示する際は、iTOL v5 (<https://itol.embl.de/>)を用いた。[99] PubMLST データベースおよび過去の研究で MLST Clade が同定されていない菌株については、本研究の分子系統樹によって Clade を決定した。

3. 結果

a) *C. difficile* *agr* loci の亜型についての *in silico* 解析

CD630 (GenBank accession number: AM180355.1)の *agr1* と R20291 (GenBank accession number: AM545816.1)の *agr2* の DNA 配列を使用して、BLAST で *agr* の homologues を探した。CD630 の *agr1* に関しては、GenBank 上のほとんどの *C. difficile* 菌株で *agr1* と核酸配列の相同性が 96%以上の配列を持つことが判明した一方で、*agr2* に関しては、R20291 の *agr2* と核酸相同性が 95%以上の菌株の集団の他に、R20291 (FN545816.1)の *agr2* と DNA 配列の相同性が 80.33-80.37%、M68 (FN668375.1)の *agr2* と 95%以上の相同性を持つ遺伝子領域を持つ whole genome sequences の一群もあった(表 2)。後者のグループの中には、toxin A 欠損の毒素遺伝子保有株として知られる M68 (ST37/Clade 4 に属する)があり、R20291 と相同性が高い *agr2* を *agr2R*、M68 の *agr2* と相同性が高いグループを *agr2M* と命名した。また、各々のグループの *agr* locus の遺伝子の構成については、図 1 に示す。

表 2: GenBank のデータベース上の whole genome sequences (WGS)のうち、本研究で発見された *agr2M* を持つと判明したものの一覧

菌株名	Accession No.	ST	Clade
DSM 29629	CP016104.1	ST39	Clade 4
DSM 29627	CP016102.1	ST37	Clade 4
CD161	CP029154.1	ST37	Clade 4
CDT4	CP029152.1	ST37	Clade 4
M68	FN668375.1	ST37	Clade 4
CF5	FN665652.1	ST86	Clade 4
DSM28669	CP012323.1	ST109	Clade 4
BJ08	CP003939.1	_*	_*
DSM29637	CP016106.1	ST83	Clade 1
CBA7204	CP029566.1	ST203	Clade 1

*BJ08 の WGS には *adk* (MLST の対象となる 7 つの housekeeping gene の 1 つ)がなかったが、6 つの housekeeping gene は ST37 と同じである。

次に、ORF 解析から R20291 (FN545816.1)の *agr2R* と M68 (FN668375.1)の *agr2M* から得られると想定されるアミノ酸配列の比較を、各々の構成遺伝子 A, B, C, D について行った。A, B, C, D のアミノ酸配列の比較のために、Clustal Omega で作成したアミノ酸配列の多重アラインメントを図 2 に示す。図 2 から、相同率だと AgrB 60.1%、AgrA 79.7%、AgrC 67.6%、AgrD 76.1%と決して高くはない上、特に AgrD と AgrA では著しいアミノ酸数の差がある。

また、GenBank 上に登録された whole genome sequence のうち、*agr* loci を持つと推定されるものを抽出し、*agr* の亜型とコンポーネント別に推定されるアミノ酸配列のグループ分けと配列の比較を施行した結果を表 3 に示す。

Agr1 に関しては、D にはアミノ酸が 48 個中で 1 つのみ違う亜型が存在した。また、B にはアミノ酸 192 個中で最大 11 個が基準株と異なるものを含めて 7 つの亜型が存在する他、基準株と相同性が高いが frameshift に伴う stop codon により途中で分断すると推定されるアミノ酸配列が 3 パターン見られた。

Agr2R に関しては、D で 2 種類、C で 6 種類の基準株と同じ長さのアミノ酸配列が推定された。B と A では完全な長さの亜型がそれぞれ 6 種類及び 2 種類、frameshift に伴う stop codon による途絶が推定されるものがそれぞれ 1 種類ずつ見られた。

Agr2M に関しては、基準株と同じ長さのアミノ酸配列が D が 1 種類、B が 2 種類、C が 2 種類、A が 3 種類に分類され、C では frameshift に伴う stop codon による途絶が推定されるものも 1 パターンあった。

表 3: GenBank 上の *C. difficile* の Whole genome sequences(WGS)上にある *agr* loci の homologues に対し ORF 解析を施行しアミノ酸配列の亜型を解析した結果。 Agr1_D と Agr1_B は CD630(AM180355.1)、Agr2R_D・B・C・A は R20291(FN545816.1)、Agr2R_D・B・C・A は M68(FN668375.1)を基準株とした。

Agr1_D の亜型

	WGS の一例 (accession)	nt/aa 数	aa 変異	観察された Clade
1_D_1	AM180355.1	147/48	-	Clade 1, 2, 3, 4
1_D_2	FN665653.1	147/48	T43K	Clade 5

Agr1_B の亜型

	WGS の一例 (accession)	nt/aa 数	aa 変異	観察された Clade
1_B_1	AM180355.1	579/192	-	Clade 1
1_B_2	FN545816.1	579/192	L139F	Clade 2
1_B_3	CP012309.1	579/192	R137G	Clade 1? *
1_B_4	CP011847.1	579/192	V181M	Clade 1
1_B_5	CP020378.1	579/192	T144I, V192I	Clade 3
1_B_6	FN668375.1	579/192	I100L, T144I, T170K, V192I	Clade 4
1_B_7	FN665653.1	579/192	M18V, I38V, T42A, I100L, V122A, K143R, T144I, S163N, A173T, V181I, V192I	Clade 5
1_B_8	CP025047.1	578/99	N99Ifs*1	Clade 1
1_B_9	CP019469.1	578/60	L50Yfs*11	Clade 1
1_B_10	CP045224.1	578/46	F46Lfs*1	Clade 5

* CP012309.1 は PubMLST で ST の同定が不能だが、ST237/Clade1 と *tpi* の allele のみが違う。

Agr2R_D の亜型

	WGS の一例 (accession)	nt/aa 数	aa 変異	観察された Clade
2R_D_1	FN545816.1	141/46	-	Clade 1, 2
2R_D_2	CP020380.1	141/46	Q39K	Clade 3

Agr2R_B の亜型

	WGS の一例 (accession)	nt/aa 数	aa 変異	観察された Clade
2R_B_1	FN545816.1	582/193	-	Clade 2
2R_B_2	CP012321.1	582/193	S42L, N191S	Clade 1
2R_B_3	CP019870.1	582/193	S42L, A87V, N191S	Clade 1
2R_B_4	CP019858.1	582/193	S42L, V58I, N191S	Clade 1
2R_B_5	CP028529.1	582/193	S42L, K106R, N191S	Clade 1
2R_B_6	CP020378.1	582/193	S21N, I50M, S96A, N103D, V151I, N191S, D192E	Clade 3
2R_B_7	CP027014.1	578/107	S42L, K104Ifs*4	Clade 1

Agr2R_C の亜型

	WGS の一例 (accession)	nt/aa 数	aa 変異	観察された Clade
2R_C_1	FN545816.1	1317/438	-	Clade 2
2R_C_2	CP028529.1	1317/438	I102V, D280N, H291N, N426D	Clade 1
2R_C_3	CP012321.1	1317/438	I7V, F50I, I102V, D280N, E331K, L357I	Clade 1
2R_C_4	CP027014.1	1317/438	I7V, F50I, I102V, D280N, E331K, L357I, D398N	Clade 1
2R_C_5	CP019870.1	1317/438	I7V, F50I, I102V, D280N, E331K, L357I, K399N	Clade 1
2R_C_6	CP020378.1	1317/438	V72A, I102V, G105S, D280N, H291N, I330V, L357I	Clade 1

Agr2R_A の亜型

	WGS の一例 (accession)	nt/aa 数	aa 変異	観察された Clade
2R_A_1	FN545816.1	768/255	-	Clade 2
2R_A_2	CP028529.1	768/255	L8F	Clade 1
2R_A_3	CP012321.1	769/12	F5Lfs*8	Clade 1, 3

Agr2M_D の亜型

	WGS の一例 (accession)	nt/aa 数	aa 変異	観察された Clade
2M_D_1	FN668375.1	168/55	0	Clade 1, 4

Agr2M_B の亜型

	WGS の一例 (accession)	nt/aa 数	aa 変異	観察された Clade
2M_B_1	FN668375.1	585/194	-	Clade 4
2M_B_2	CP016106.1	582/194	F54L	Clade1

Agr2M_C の亜型

	WGS の一例 (accession)	nt/aa 数	aa 変異	観察された Clade
2M_C_1	FN668375.1	1317/438	-	Clade 4
2M_C_2	CP16106.1	1317/438	N36K	Clade 1
2M_C_3	FN665652.1	1316/45	N36Ifs*10	Clade 4

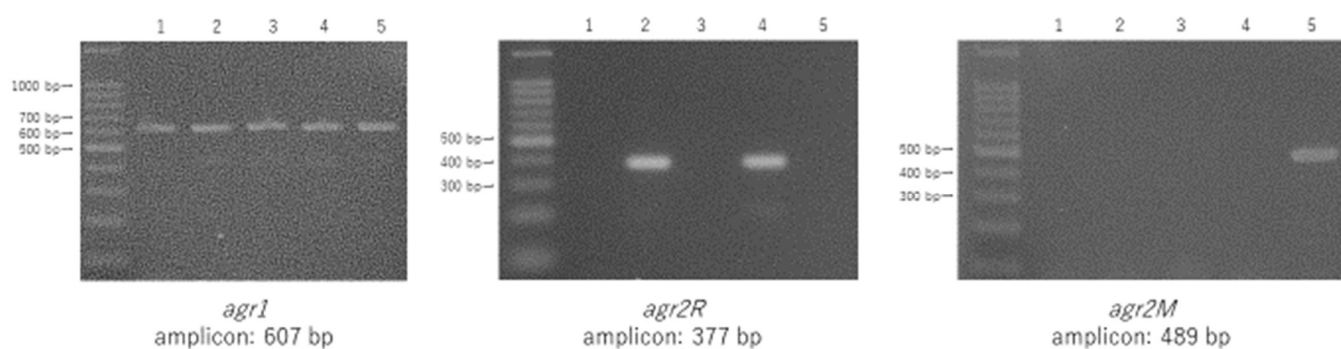
Agr2M_A の亜型

	WGS の一例 (accession)	nt/aa 数	aa 変異	観察された Clade
2M_A_1	FN668375.1	711/236	-	Clade 4
2M_A_2	CP012323.1	711/236	I56L, I66M, R127K	Clade 4
2M_A_3	CP016106.1	711/236	C45S, I66M, V207A	Clade 1

b) CD630、R20291 と臨床株で見られる *agr* loci の型

標準株 CD630、R20291 及び 133 の臨床株を対象とし、表 1 のプライマーを用いて *agr1*, *agr2R*, *agr2M* のスクリーニング目的に PCR を施行し、amplicon の存在をアガロースゲル電気泳動で確認した (図 3)。

図 3: PCR による *agr1*、*agr2R*、*agr2M* のスクリーニングで得られた amplicon のアガロースゲル上での電気泳動結果の例。各々の写真の 1~5 の数字は 1: CD630 (標準株)、2: R20291 (標準株)、3: ST54/Clade1 (臨床株)、4: ST17/Clade 1(臨床株)、5: ST81/Clade 4(臨床株)を示す。



標準株では、CD630 が *agr1* のみ陽性だった一方、R20291 は *agr1* と *agr2R* が陽性であり、CD630 と R20291 は共に *agr2M* は陰性だった。133 の臨床株では、*agr1* 陽性株は計 131(98.5%)株、*agr2R* 陽性株は計 61(45.9%)株、*agr2M* 陽性株は 26(19.5%)株だった。2 株のみ、スクリーニング PCR で *agr1* 陰性と判定された株については、前述の 2 通りのプライマーペア 1_drk_F/1_drk_R 及び b1d1_f/b1d1_r を使用した PCR でも *agr1* に対応する amplicon は検出されなかった。

c) MLST と Clade、*agr* パターン、毒素遺伝子の有無の対応

C. difficile の *agr* の機能が毒素産生能に大きく寄与するとの報告があることから [63-65]、各々の ST に対応する Clade、*agr* パターン及び毒素遺伝子の有無についての対応を調べた。各々の ST 別の結果を表 4 に、Clade 毎の *agr* パターンの特徴は表 5 に示す。ST297 と ST402 の臨床株(どちらも 1 株のみ)だけが *agr1* 陰性だった。また、Clade 4 で *agr2R* が陽性だったのは ST198 のみで、同一の ST に *agr2R* 陽性と陰性の株が両方含まれているのは ST3 と ST11 だけだった。

表 4 : 本研究の *C. difficile* 臨床株における ST 毎の MLST-Clade、検体数、*agr1*, *agr2R*, *agr2M* の有無、毒素遺伝子(*tcdA* または *tcdB*)の有無の一覧

ST	Clade	検体数	<i>agr1</i>	<i>agr2R</i>	<i>agr2M</i>	毒素遺伝子
ST17	1	12	+	+	-	+
ST109	4	11	+	-	+	-
ST81	4	10	+	-	+	+
ST2	1	9	+	-	-	+
ST15	1	9	+	+	-	-
ST54	1	9	+	-	-	+
ST8	1	8	+	+	-	+
ST3	1	5	+	+ (<i>n</i> = 4) - (<i>n</i> = 1)	-	+ (<i>n</i> = 4) - (<i>n</i> = 1)
ST37	4	4	+	-	+	+
ST100	1	4	+	+	-	-
ST26	1	3	+	-	-	-
ST35	1	3	+	+	-	+
ST53	1	3	+	+	-	+
ST11	5	2	+	+ (<i>n</i> =1) - (<i>n</i> =1)	-	+
ST14	1	2	+	-	-	+
ST48	1	2	+	+	-	+ (<i>n</i> =1) - (<i>n</i> =1)
ST55	1	2	+	-	-	+
ST401	4	2	+	-	-	-
ST407	C-I	2	+	-	-	-
ST5	3	1	+	-	-	+
ST28	1	1	+	-	-	-
ST41	2	1	+	+	-	+
ST42	1	1	+	+	-	+
ST49	1	1	+	-	-	+
ST58	1	1	+	-	-	+
ST63	1	1	+	+	-	+
ST66	1	1	+	+	-	+
ST123	2	1	+	+	-	+
ST129	1	1	+	+	-	+
ST153	1	1	+	+	-	+
ST159	4	1	+	-	+	-
ST183	1	1	+	-	-	+
ST198	4	1	+	+	-	+
ST201	3	1	+	-	-	+
ST205	1	1	+	+	-	-
ST223	2	1	+	+	-	+
ST243	4	1	+	-	-	-
ST247	1	1	+	+	-	+
ST278	1	1	+	-	-	+
ST297	C-I	1	-	-	-	-
ST301	1	1	+	+	-	+
ST303	C-I	1	+	-	-	-
ST304	1	1	+	-	-	+
ST400	1	1	+	+	-	+
ST402	C-III	1	-	-	-	-
ST403	4	1	+	-	-	-
ST404	1	1	+	+	-	+
ST405	4	1	+	-	-	-

ST406	1	1	+	+	-	-
ST408	1	1	+	-	-	+

表 5: Clade と *agr* の亜型の対応表

Clade	1	2	3	4	5	C-I	C-III	total
<i>agr1</i>	32	0	2	5	1	3	0	44
<i>agr1</i> + <i>agr2R</i>	57	3	0	1	1	0	0	61
<i>agr1</i> + <i>agr2M</i>	0	0	0	26	0	0	0	26
Negative	0	0	0	0	0	1	1	2
Total	89	3	2	32	2	4	1	133

d) 毒素遺伝子保有株における toxin EIA 陽性と *agr* 亜型保有パターンの関係の検証

Toxin EIA 検査結果と *C. difficile* *agr* 亜型の保有パターンの関係を表 6 に示す。表 6 のデータに対する χ^2 二乗検定では $p=0.1835(>0.05)$ であり、*agr1* のみを持つ株、*agr1+agr2R* を持つ株、*agr1+agr2M* を持つ株の集団の中で、有意に EIA 陽性または陰性になりやすい傾向を示すグループは示されなかった。

表 6: 毒素遺伝子保有株の *agr* 亜型の保有パターンと toxin EIA 検査結果の関係

Toxin EIA	陽性	陰性	合計	<i>P</i> 値
<i>agr1</i>	12	12	24	
<i>agr1</i> + <i>agr2R</i>	20	16	36	
<i>agr1</i> + <i>agr2M</i>	3	9	12	
Total	35	37	72	<i>p</i> =0.1835

e) MLST に基づいた分子系統解析に基づく、*agr* 亜型の分子疫学の検討

本研究の臨床株の ST と標準株 CD630(ST54)、R20291(ST1)に対して、MLST に基づいて分子系統解析を施行した。これらの菌株の中で既知の ST で網羅されていない MLST Clade は Clade C-I, Clade C-II, Clade C-III(PubMLST にはこれらの Clade の情報がない)であったため、C-I~C-IIIに対応する ST は過去の文献を参照して、解析対象に含めた。[15, 40-44] MLST の対象となる 7 つの housekeeper genes の DNA 配列を連結した配列を上記の ST に対して作成し、PhyML で maximum likelihood method(model TN93, 1000 replicates)を用いて解析した結果を図 4 に示す。

系統樹の分岐の確からしさの検証として広く使用されている Felsenstein の bootstrap method では、分岐の信頼性の目安を bootstrap $\geq 70\%$ 以上とした研究が多い [100-102] このことを踏まえて、系統樹上の分岐の bootstrap value を検証したところ、Clade 1 の中で、*agr1* のみ陽性の ST と *agr1+agr2R* 陽性の ST のグループの間には、bootstrap value ≥ 70 となる単一の分岐で分離されるような箇所はなかった。また、Clade 4 内の *agr1* のみ陽性の ST、*agr1+agr2M* が陽性の ST、*agr1+agr2R* の ST の分布に関しても同様に bootstrap value ≥ 70 の分岐による *agr* 亜型の系統樹上での明確な境界は指摘されなかった。

臨床株で見られた ST297、ST303、ST402、ST407 は PubMLST 上で Clade についての情報がなかったが、本研究の系統樹結果を参照すると ST297、ST303、ST407 は Clade C-Iに、ST402 は Clade C-IIIに該当すると考えられた。

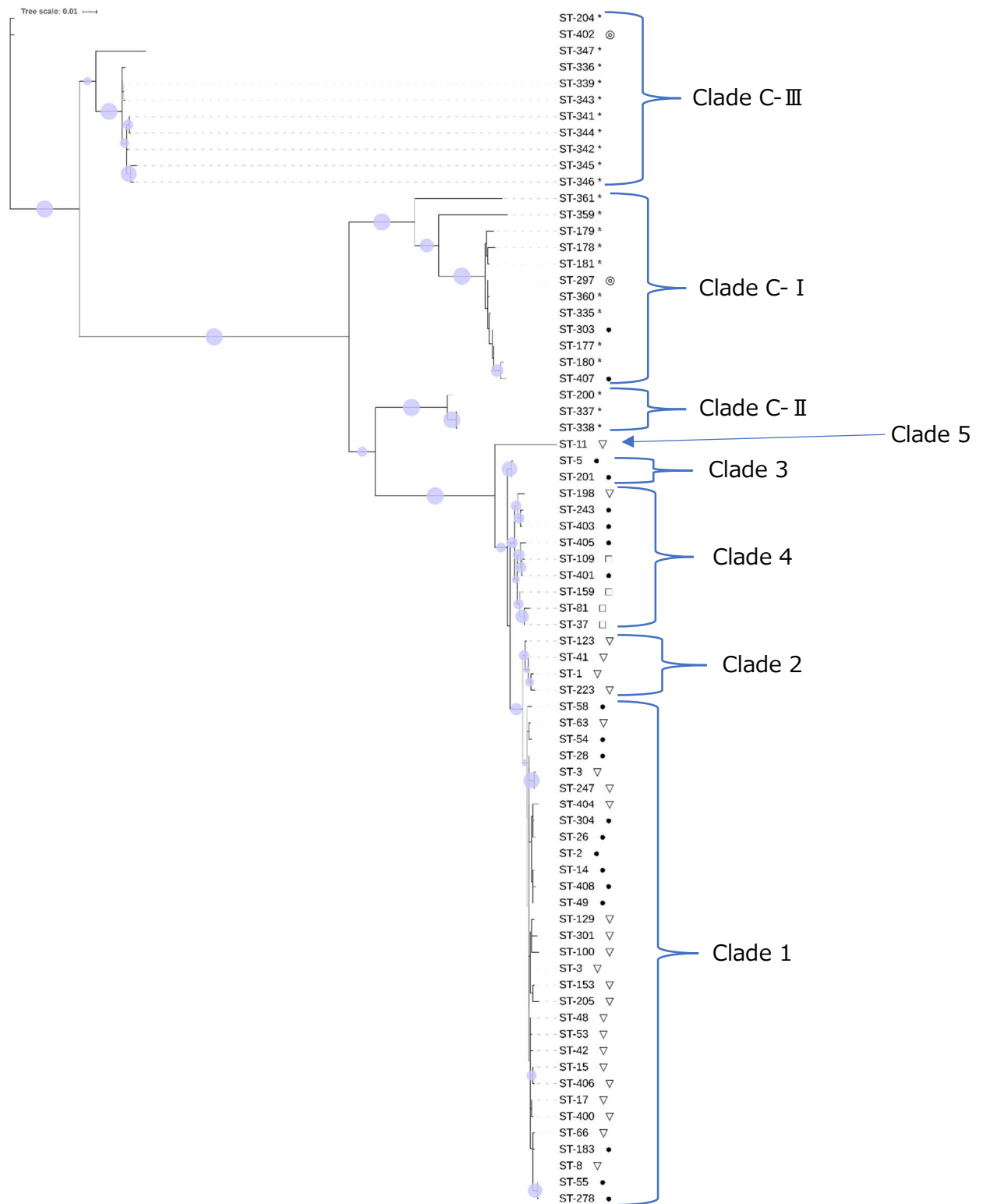


図 4: MLST に基づく分子系統樹。青い円は bootstrap value>50 の分岐を示し、大きい円ほど bootstrap value が高い。●: *agrI*; ▽: *agrI* +2*R*; □: *agrI* +2*M*; ◎: *agr* なし; *: C-I~C-IIIの株(過去研究より)

4. 考察

本研究では *C. difficile* *agr* に着目し、従来から報告がある *agr1* locus の多様性が比較的低いことと、*agr2* locus が実際には *agr2R* と *agr2M* という 2 つの比較的異なる遺伝子・アミノ酸配列を持つ 2 つの亜型に分けられることを *in silico* 解析で示した。過去の研究で存在を指摘されていた *agr1* と *agr2R*[62, 103]という亜型の存在が確認されただけでなく、Clade 4 の菌株で多く見られた *agr2M* の存在が本研究で初めて示されたことは特筆すべきことである。

過去の *C. difficile* *agr* の機能についての研究においては、*agr* と毒素産生についての報告が多かった[63-65]が、本研究では臨床株においては毒素遺伝子の有無を問わずほぼすべての株が *agr1* を持ち、*agr2R* または *agr2M* も併せて保有しうると判明した。このことは、*agr* の機能のうちで、毒素産生以外のいわゆる Quorum sensing に関与するものの存在を示唆するものである。

過去に *C. difficile* の *agr1* をノックアウトした菌株についての研究では、*agr1* のノックアウト株においても発育が見られた[64]ことから、*agr1* の欠失は *C. difficile* にとって致命的でないと考えられたが、実際に本研究においても *agr1* を持たない菌株が 2 つ存在した。同様に、*agr2R* や *agr2M* を保有しない菌株が存在することから、*C. difficile* において *agr* loci は亜型を問わず生存に必要不可欠ではないと考えられる。

C. difficile の *agr* の機能についての過去の研究は限られるが、異なる菌株同士の相互作用として Quorum sensing の機能的な研究を行うに際して、*agr* の亜型ごとの各々のコンポーネントのアミノ酸配列が異なると想定される菌株同士を研究対象とする必要が出てくる可能性は比較的高い。その点、本研究において、GenBank 上での *in silico* 解析で得られた *agr* loci の核酸配列を基に、機能的な違いが見られる可能性のあるタンパクの

アミノ酸配列を ORF 解析で網羅的に推定したことの意義は大きいと考えられる。本研究で網羅的に示された推定アミノ酸配列結果の中で特筆すべきことは、*agrI*, *agr2R*, *agr2M* のいずれにおいても D のアミノ酸配列には多様性がほとんどないことである。*S. aureus* の *agr*[57]に準じて考えると、pre-AIP をコードする D の配列に多様性がないということは、B による酵素処理・切断や AIP 分泌のプロセスが菌株毎に変わらない限りは、*C. difficile* の *agr* に由来する Quorum sensing のシグナルは菌株を問わず同じものである可能性がある。本研究で推定したアミノ酸配列の結果の妥当性が高いことが実証された場合には、*C. difficile agr* が Quorum sensing において果たす機能についての研究の焦点は、同一菌種の異なる菌株同士の現象ではなく、異なる菌種同士が関わる現象となる可能性も考えられる。実際にそのような事例はあり[104]、例えば *S. aureus* の *agr* の機能は *S. schleiferi* の *agr* 由来の AIP を介して抑制されることが報告されている。

臨床的な観点からは、第 1 章の研究と関連し、毒素遺伝子保有株において toxin EIA 検査の陽性と *agr* 亜型の保有パターンの相関についての検証を行ったが、有意な結果は観察されなかった。過去の研究が存在しないため比較検討ができないが、本研究のスクリーニング PCR に基づく *agr* 亜型の保有パターンによる分類は、ST による分類よりも分解能で遥かに劣るため菌の特徴を十分に反映できない可能性が考えられる。

本研究の分子系統解析では存在する全ての ST を対象とはしていないものの、その中でも特記すべき発見がいくつかあった。各々の *agr* パターンを分子系統樹の上で明確に分断する分岐は指摘されなかったが、例えば *agr2R* を持つ菌株はほとんどが Clade 1 または Clade 2 に属することや、*agr2M* を持つ菌株がすべて Clade 4 に属することが示すように、*agr* のパターン別に系統樹上での偏在は観察された。また、本研究では同一の ST の中で *agr* の保有パターンが異なるものが混在することが初めて示された。*C.*

difficile が進化の過程で *agr* を獲得した過程は現時点では不明であるため、同一 ST の中の *agr* パターンの乖離がその解明の一つの手がかりになることが期待される。

本研究の limitation は主に 3 つある。まず、*in silico* 解析は GenBank 上の WGS 上の *agr* loci を対象としていたため、premature termination codon があると推定された *agr* 構成遺伝子の機能変化や欠損を表現型や mRNA の発現を通した評価が施行できなかった。また、過去の *C. difficile agr* のアミノ酸変異と機能の関連について蓄積された知見が少ないため、推定アミノ酸配列から機能の有無の推定を行うことが困難である。これらの 2 つの limitation に関しては、現在取り組んでいる *agr* のノックアウト株の研究において、機能的な研究の一環として mRNA 発現を評価することで発展的に解決すべき課題と考えられる。上述の 2 つの limitation に加え、本研究では toxin EIA 検査時の *C. difficile* のみを分離対象としていたため、便中での複数菌株の共存、菌株の交代や持続保菌に対する *agr* 亜型パターンの影響を検証できなかったことも limitation として挙げられる。

以上のような limitation が挙げられるが、それでも尚、*agr* 亜型について本研究で示された多様性や分子疫学的な分布についての知見は、今後 *C. difficile agr* の臨床的な意義や微生物学的な機能の検証を施行する上で重要な土台となると考える。

5. 結語

C. difficile agr に関して、*agr1* locus の多様性が比較的 low、かつほとんどの菌株がゲノム上に保有していることが示された。また、過去に報告されている *agr2* locus が、実際には *agr2R* と *agr2M* という 2 つの比較的異なる遺伝子・アミノ酸配列を持つ 2 つの亜型に分けられることを *in silico* 解析で示した上で、臨床株における *agr2R* と *agr2M* の存在を示した。過去の *C. difficile agr* の研究では *agr* と毒素産生の関連が報告されてきたが、毒素遺伝子を持たない臨床株でも *agr1* を持つ菌株がほとんどであり、加えて *agr2R* または *agr2M* を保有するものもあったことは特筆に値する。また、*in silico* 解析を進展させ、*agr* の亜型ごとの個々のコンポーネント B, D, C, A について存在する可能性があるアミノ酸配列を網羅的に示した結果、*agr1*, *agr2R*, *agr2M* のいずれにおいても D のアミノ酸配列には多様性がほとんどない可能性が高いと示された。

MLST に基づく分子系統学的な解析においては、*agr1* はほとんどの臨床株が保有することから系統樹上でも普遍的に分布していた一方で、*agr2R* の分布は Clade1 と Clade2 に、*agr2M* の分布は Clade4 に限定された。*C. difficile* の進化の過程と *agr* との関連は不明であるが、*agr2R* と *agr2M* に関してはある程度の偏在が見られたことは、*C. difficile* の進化についての今後の研究に資する可能性がある。

本研究で *in silico* に示された *agr loci* の亜型が標準株だけでなく臨床株で実際に存在することが示され、ORF 配列に基づくアミノ酸配列の推定結果は臨床株での *agr loci* 毎のアミノ酸配列の推定にも役立つと考えられる。現在、私たちは CRISPR-Cas9 system による *agr loci* の knockout 株の作成に取り組んでいるが、毒素産生や、単一菌株及び複数菌株の competition assay として成長や芽胞化に代表される *agr* の機能的な研究を今後行うに際し、本研究で得られた結果が活用できることに期待する。

謝辞

本研究を遂行する機会を頂き、日頃から御指導、御鞭撻を賜りました東京大学医学部附属病院感染症内科・感染制御部 森屋恭爾教授に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、常日頃から有意義な御助言や御指導を頂いた、東京大学医学部附属病院感染症内科 奥川周先生、感染症内科 119 研究室員の先生方、及び、東京大学医学部附属病院感染制御部微生物検査室の皆様、東京医科歯科大学大学院医歯総合研究科分子病原体検査学分野 齋藤良一教授および研究室員の皆様に深く感謝致します。

なお、本論文の内容の一部は下記に印刷公表されています：

- (1) 令和元年 12 月 19 日 ACCESS MICROBIOLOGY 2 巻 2 号

「Epidemiology and virulence-associated genes of *Clostridioides difficile* isolates and factors associated with toxin EIA results at a university hospital in Japan」

- (2) 令和 2 年 5 月 14 日 ACCESS MICROBIOLOGY 2 巻 7 号

「Genetic diversity and epidemiology of accessory gene regulator loci in *Clostridioides difficile*」

引用文献

- [1] J. G. Bartlett, T. W. Chang, M. Gurwith, S. L. Gorbach, and A. B. Onderdonk, "Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia," (in eng), *N Engl J Med*, vol. 298, no. 10, pp. 531-4, Mar 9 1978.
- [2] A. Cassini *et al.*, "Burden of Six Healthcare-Associated Infections on European Population Health: Estimating Incidence-Based Disability-Adjusted Life Years through a Population Prevalence-Based Modelling Study," (in eng), *PLoS Med*, vol. 13, no. 10, p. e1002150, Oct 2016.
- [3] S. S. Magill *et al.*, "Changes in Prevalence of Health Care-Associated Infections in U.S. Hospitals," (in eng), *N Engl J Med*, vol. 379, no. 18, pp. 1732-1744, Nov 1 2018.
- [4] T. V. Riley and T. Kimura, "The Epidemiology of Clostridium difficile Infection in Japan: A Systematic Review," (in eng), *Infect Dis Ther*, vol. 7, no. 1, pp. 39-70, Mar 2018.
- [5] T. Planche and M. H. Wilcox, "Diagnostic pitfalls in Clostridium difficile infection," (in eng), *Infect Dis Clin North Am*, vol. 29, no. 1, pp. 63-82, Mar 2015.
- [6] M. J. Crobach *et al.*, "European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the diagnostic guidance document for Clostridium difficile infection," (in eng), *Clin Microbiol Infect*, vol. 22 Suppl 4, pp. S63-81, Aug 2016.
- [7] L. C. McDonald *et al.*, "Clinical Practice Guidelines for Clostridium difficile Infection in Adults and Children: 2017 Update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA)," (in eng), *Clin Infect Dis*, vol. 66, no. 7, pp. e1-e48, Mar 19 2018.
- [8] C. R. Polage *et al.*, "Overdiagnosis of Clostridium difficile Infection in the Molecular Test Era," (in eng), *JAMA Intern Med*, vol. 175, no. 11, pp. 1792-801, Nov 2015.
- [9] M. I. Garvey, C. W. Bradley, M. A. C. Wilkinson, and E. Holden, "Can a toxin gene NAAT be used to predict toxin EIA and the severity of Clostridium difficile infection?," (in eng), *Antimicrob Resist Infect Control*, vol. 6, p. 127, 2017.
- [10] G. P. Carter *et al.*, "Defining the Roles of TcdA and TcdB in Localized Gastrointestinal Disease, Systemic Organ Damage, and the Host Response during Clostridium difficile Infections," (in eng), *mBio*, vol. 6, no. 3, p. e00551, Jun 2 2015.
- [11] K. Aktories, C. Schwan, and T. Jank, "Clostridium difficile Toxin Biology," (in eng), *Annu Rev Microbiol*, vol. 71, pp. 281-307, Sep 8 2017.
- [12] T. Jank, T. Gieseemann, and K. Aktories, "Rho-glucosylating Clostridium difficile toxins A and B: new insights into structure and function," (in eng), *Glycobiology*, vol. 17, no. 4, pp. 15r-22r, Apr 2007.
- [13] E. Chaves-Olarte, M. Weidmann, C. Eichel-Streiber, and M. Thelestam, "Toxins A and B from Clostridium difficile differ with respect to enzymatic potencies, cellular substrate specificities, and surface binding to cultured cells," (in eng), *J Clin Invest*, vol. 100, no. 7, pp. 1734-41, Oct 1 1997.
- [14] S. T. Donta, N. Sullivan, and T. D. Wilkins, "Differential effects of Clostridium difficile toxins on tissue-cultured cells," (in eng), *J Clin Microbiol*, vol. 15, no. 6, pp. 1157-8, Jun 1982.
- [15] D. R. Knight, B. Elliott, B. J. Chang, T. T. Perkins, and T. V. Riley, "Diversity and Evolution in the Genome of Clostridium difficile," (in eng), *Clin Microbiol Rev*, vol. 28, no. 3, pp. 721-41, Jul 2015.
- [16] V. Braun, T. Hundsberger, P. Leukel, M. Sauerborn, and C. von Eichel-Streiber, "Definition of the single integration site of the pathogenicity locus in Clostridium difficile," (in eng), *Gene*, vol. 181, no. 1-2, pp. 29-38, Nov 28 1996.
- [17] G. A. Hammond and J. L. Johnson, "The toxigenic element of Clostridium difficile strain VPI 10463," (in eng), *Microb Pathog*, vol. 19, no. 4, pp. 203-13, Oct 1995.

- [18] N. Mani and B. Dupuy, "Regulation of toxin synthesis in *Clostridium difficile* by an alternative RNA polymerase sigma factor," (in eng), *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 98, no. 10, pp. 5844-9, May 8 2001.
- [19] K. S. Tan, B. Y. Wee, and K. P. Song, "Evidence for holin function of *tcdE* gene in the pathogenicity of *Clostridium difficile*," (in eng), *J Med Microbiol*, vol. 50, no. 7, pp. 613-619, Jul 2001.
- [20] G. P. Carter *et al.*, "Binary toxin production in *Clostridium difficile* is regulated by CdtR, a LytTR family response regulator," (in eng), *J Bacteriol*, vol. 189, no. 20, pp. 7290-301, Oct 2007.
- [21] M. R. Popoff, E. J. Rubin, D. M. Gill, and P. Boquet, "Actin-specific ADP-ribosyltransferase produced by a *Clostridium difficile* strain," (in eng), *Infect Immun*, vol. 56, no. 9, pp. 2299-306, Sep 1988.
- [22] L. C. McDonald *et al.*, "An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*," (in eng), *N Engl J Med*, vol. 353, no. 23, pp. 2433-41, Dec 8 2005.
- [23] S. Bacci, K. Molbak, M. K. Kjeldsen, and K. E. Olsen, "Binary toxin and death after *Clostridium difficile* infection," (in eng), *Emerg Infect Dis*, vol. 17, no. 6, pp. 976-82, Jun 2011.
- [24] V. G. Loo *et al.*, "A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality," (in eng), *N Engl J Med*, vol. 353, no. 23, pp. 2442-9, Dec 8 2005.
- [25] M. Warny *et al.*, "Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe," (in eng), *Lancet*, vol. 366, no. 9491, pp. 1079-84, Sep 24-30 2005.
- [26] D. Drudy, S. Fanning, and L. Kyne, "Toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile*," (in eng), *Int J Infect Dis*, vol. 11, no. 1, pp. 5-10, Jan 2007.
- [27] C. Eckert *et al.*, "Prevalence and pathogenicity of binary toxin-positive *Clostridium difficile* strains that do not produce toxins A and B," (in eng), *New Microbes New Infect*, vol. 3, pp. 12-7, Jan 2015.
- [28] A. M. King, K. E. Mackin, and D. Lyras, "Emergence of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* strains: epidemiological and clinical considerations," (in eng), *Future Microbiol*, vol. 10, no. 1, pp. 1-4, 2015.
- [29] C. R. Clabots *et al.*, "Development of a rapid and efficient restriction endonuclease analysis typing system for *Clostridium difficile* and correlation with other typing systems," (in eng), *J Clin Microbiol*, vol. 31, no. 7, pp. 1870-5, Jul 1993.
- [30] S. L. Stubbs, J. S. Brazier, G. L. O'Neill, and B. I. Duerden, "PCR targeted to the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region of *Clostridium difficile* and construction of a library consisting of 116 different PCR ribotypes," (in eng), *J Clin Microbiol*, vol. 37, no. 2, pp. 461-3, Feb 1999.
- [31] M. Kristjánsson *et al.*, "Comparison of restriction endonuclease analysis, ribotyping, and pulsed-field gel electrophoresis for molecular differentiation of *Clostridium difficile* strains," (in eng), *J Clin Microbiol*, vol. 32, no. 8, pp. 1963-9, Aug 1994.
- [32] F. Barbut, N. Mario, J. Frottier, and J. C. Petit, "Use of the arbitrary primer polymerase chain reaction for investigating an outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in AIDS patients," (in eng), *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, vol. 12, no. 10, pp. 794-5, Oct 1993.
- [33] D. Griffiths *et al.*, "Multilocus sequence typing of *Clostridium difficile*," *J Clin Microbiol*, vol. 48, no. 3, pp. 770-8, Mar 2010.
- [34] M. Rupnik and S. Janezic, "An Update on *Clostridium difficile* Toxinotyping," (in eng), *J Clin Microbiol*, vol. 54, no. 1, pp. 13-8, Jan 2016.
- [35] S. Toma, G. Lesiak, M. Magus, H. L. Lo, and M. Delmée, "Serotyping of *Clostridium difficile*," (in eng), *J Clin Microbiol*, vol. 26, no. 3, pp. 426-8, Mar 1988.

- [36] S. R. Heard, B. Rasburn, R. C. Matthews, and S. Tabaqchali, "Immunoblotting to demonstrate antigenic and immunogenic differences among nine standard strains of *Clostridium difficile*," (in eng), *J Clin Microbiol*, vol. 24, no. 3, pp. 384-7, Sep 1986.
- [37] M. C. Maiden *et al.*, "Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms," (in eng), *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 95, no. 6, pp. 3140-5, Mar 17 1998.
- [38] C. W. Knetsch, T. D. Lawley, M. P. Hensgens, J. Corver, M. W. Wilcox, and E. J. Kuijper, "Current application and future perspectives of molecular typing methods to study *Clostridium difficile* infections," (in eng), *Euro Surveill*, vol. 18, no. 4, p. 20381, Jan 24 2013.
- [39] K. E. Dingle *et al.*, "Clinical *Clostridium difficile*: clonality and pathogenicity locus diversity," (in eng), *PLoS One*, vol. 6, no. 5, p. e19993, 2011.
- [40] K. E. Dingle *et al.*, "Evolutionary history of the *Clostridium difficile* pathogenicity locus," (in eng), *Genome Biol Evol*, vol. 6, no. 1, pp. 36-52, Jan 2014.
- [41] R. Chen *et al.*, "Whole genome sequences of three Clade 3 *Clostridium difficile* strains carrying binary toxin genes in China," (in eng), *Sci Rep*, vol. 7, p. 43555, Mar 6 2017.
- [42] J. Kim, Y. Kim, and H. Pai, "Clinical Characteristics and Treatment Outcomes of *Clostridium difficile* Infections by PCR Ribotype 017 and 018 Strains," (in eng), *PLoS One*, vol. 11, no. 12, p. e0168849, 2016.
- [43] G. Ramirez-Vargas *et al.*, "Novel Clade C-I *Clostridium difficile* strains escape diagnostic tests, differ in pathogenicity potential and carry toxins on extrachromosomal elements," (in eng), *Sci Rep*, vol. 8, no. 1, p. 13951, Sep 17 2018.
- [44] K. Imwattana *et al.*, "*Clostridium difficile* ribotype 017 - characterization, evolution and epidemiology of the dominant strain in Asia," (in eng), *Emerg Microbes Infect*, vol. 8, no. 1, pp. 796-807, 2019.
- [45] Y. B. Chen *et al.*, "Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolated from hospitals during a 4-year period in China," (in eng), *J Med Microbiol*, vol. 67, no. 1, pp. 52-59, Jan 2018.
- [46] J. Kim *et al.*, "Epidemiology of *Clostridium difficile* infections in a tertiary-care hospital in Korea," (in eng), *Clin Microbiol Infect*, vol. 19, no. 6, pp. 521-7, Jun 2013.
- [47] Y. Luo *et al.*, "Molecular epidemiology of *Clostridium difficile* in two tertiary care hospitals in Shandong Province, China," (in eng), *Infect Drug Resist*, vol. 11, pp. 489-500, 2018.
- [48] R. Wang, L. Suo, H. X. Chen, L. J. Song, Y. Y. Shen, and Y. P. Luo, "Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolated from the Chinese People's Liberation Army General Hospital in China," (in eng), *Int J Infect Dis*, vol. 67, pp. 86-91, Feb 2018.
- [49] Y. Kuwata *et al.*, "Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolated from a university teaching hospital in Japan," (in eng), *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, vol. 34, no. 4, pp. 763-72, Apr 2015.
- [50] M. Whiteley, S. P. Diggle, and E. P. Greenberg, "Progress in and promise of bacterial quorum sensing research," (in eng), *Nature*, vol. 551, no. 7680, pp. 313-320, Nov 15 2017.
- [51] K. Ohtani, H. Hayashi, and T. Shimizu, "The *luxS* gene is involved in cell-cell signalling for toxin production in *Clostridium perfringens*," (in eng), *Mol Microbiol*, vol. 44, no. 1, pp. 171-9, Apr 2002.
- [52] V. Sperandio, C. C. Li, and J. B. Kaper, "Quorum-sensing *Escherichia coli* regulator A: a regulator of the LysR family involved in the regulation of the locus of enterocyte effacement pathogenicity island in enterohemorrhagic *E. coli*," (in eng), *Infect Immun*, vol. 70, no. 6, pp. 3085-93, Jun 2002.
- [53] J. Zhu, M. B. Miller, R. E. Vance, M. Dziejman, B. L. Bassler, and J. J. Mekalanos, "Quorum-sensing regulators control virulence gene expression in *Vibrio cholerae*," (in eng), *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 99, no. 5, pp. 3129-34, Mar 5 2002.

- [54] A. Wuster and M. M. Babu, "Conservation and evolutionary dynamics of the agr cell-to-cell communication system across firmicutes," (in eng), *J Bacteriol*, vol. 190, no. 2, pp. 743-6, Jan 2008.
- [55] X. Qin, K. V. Singh, G. M. Weinstock, and B. E. Murray, "Effects of *Enterococcus faecalis* fsr genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence," (in eng), *Infect Immun*, vol. 68, no. 5, pp. 2579-86, May 2000.
- [56] N. Autret, C. Raynaud, I. Dubail, P. Berche, and A. Charbit, "Identification of the agr locus of *Listeria monocytogenes*: role in bacterial virulence," (in eng), *Infect Immun*, vol. 71, no. 8, pp. 4463-71, Aug 2003.
- [57] L. Tan, S. R. Li, B. Jiang, X. M. Hu, and S. Li, "Therapeutic Targeting of the *Staphylococcus aureus* Accessory Gene Regulator (agr) System," (in eng), *Front Microbiol*, vol. 9, p. 55, 2018.
- [58] P. Dufour *et al.*, "High genetic variability of the agr locus in *Staphylococcus* species," (in eng), *J Bacteriol*, vol. 184, no. 4, pp. 1180-6, Feb 2002.
- [59] S. Jarraud *et al.*, "Exfoliatin-producing strains define a fourth agr specificity group in *Staphylococcus aureus*," (in eng), *J Bacteriol*, vol. 182, no. 22, pp. 6517-22, Nov 2000.
- [60] G. Ji, R. Beavis, and R. P. Novick, "Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants," (in eng), *Science*, vol. 276, no. 5321, pp. 2027-30, Jun 27 1997.
- [61] Y. Tal-Gan, M. Ivancic, G. Cornilescu, and H. E. Blackwell, "Characterization of structural elements in native autoinducing peptides and non-native analogues that permit the differential modulation of AgrC-type quorum sensing receptors in *Staphylococcus aureus*," (in eng), *Org Biomol Chem*, vol. 14, no. 1, pp. 113-21, Jan 7 2016.
- [62] G. L. Marsden, I. J. Davis, V. J. Wright, M. Sebaihia, E. J. Kuijper, and N. P. Minton, "Array comparative hybridisation reveals a high degree of similarity between UK and European clinical isolates of hypervirulent *Clostridium difficile*," (in eng), *BMC Genomics*, vol. 11, p. 389, Jun 21 2010.
- [63] M. J. Martin *et al.*, "The agr locus regulates virulence and colonization genes in *Clostridium difficile* 027," (in eng), *J Bacteriol*, vol. 195, no. 16, pp. 3672-81, Aug 2013.
- [64] C. Darkoh, C. Odo, and H. L. DuPont, "Accessory Gene Regulator-1 Locus Is Essential for Virulence and Pathogenesis of *Clostridium difficile*," (in eng), *MBio*, vol. 7, no. 4, Aug 16 2016.
- [65] C. Darkoh, H. L. DuPont, S. J. Norris, and H. B. Kaplan, "Toxin synthesis by *Clostridium difficile* is regulated through quorum signaling," (in eng), *MBio*, vol. 6, no. 2, p. e02569, Feb 24 2015.
- [66] E. R. Dubberke *et al.*, "*Clostridium difficile* colonization among patients with clinically significant diarrhea and no identifiable cause of diarrhea," (in eng), *Infect Control Hosp Epidemiol*, vol. 39, no. 11, pp. 1330-1333, Nov 2018.
- [67] S. D. Goldenberg and G. L. French, "Lack of association of tcdC type and binary toxin status with disease severity and outcome in toxigenic *Clostridium difficile*," (in eng), *J Infect*, vol. 62, no. 5, pp. 355-62, May 2011.
- [68] S. Persson, M. Torpdahl, and K. E. Olsen, "New multiplex PCR method for the detection of *Clostridium difficile* toxin A (tcdA) and toxin B (tcdB) and the binary toxin (cdtA/cdtB) genes applied to a Danish strain collection," *Clin Microbiol Infect*, vol. 14, no. 11, pp. 1057-64, Nov 2008.
- [69] N. Kato *et al.*, "Identification of toxigenic *Clostridium difficile* by the polymerase chain reaction," (in eng), *J Clin Microbiol*, vol. 29, no. 1, pp. 33-7, Jan 1991.
- [70] Y. Iwashima *et al.*, "A retrospective study of the epidemiology of *Clostridium difficile* infection at a University Hospital in Japan: genotypic features of the isolates and clinical characteristics of the patients," (in eng), *J Infect Chemother*, vol. 16, no. 5, pp. 329-33, Oct 2010.

- [71] H. Kato *et al.*, "Analysis of *Clostridium difficile* isolates from nosocomial outbreaks at three hospitals in diverse areas of Japan," (in eng), *J Clin Microbiol*, vol. 39, no. 4, pp. 1391-5, Apr 2001.
- [72] E. Sawabe *et al.*, "Molecular analysis of *Clostridium difficile* at a university teaching hospital in Japan: a shift in the predominant type over a five-year period," (in eng), *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, vol. 26, no. 10, pp. 695-703, Oct 2007.
- [73] B. Wang, Z. Lv, P. Zhang, and J. Su, "Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of human *Clostridium difficile* isolates from a single institution in Northern China," (in eng), *Medicine (Baltimore)*, vol. 97, no. 25, p. e11219, Jun 2018.
- [74] M. J. Alfa *et al.*, "Characterization of a toxin A-negative, toxin B-positive strain of *Clostridium difficile* responsible for a nosocomial outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea," (in eng), *J Clin Microbiol*, vol. 38, no. 7, pp. 2706-14, Jul 2000.
- [75] D. Drudy, N. Harnedy, S. Fanning, M. Hannan, and L. Kyne, "Emergence and control of fluoroquinolone-resistant, toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile*," (in eng), *Infect Control Hosp Epidemiol*, vol. 28, no. 8, pp. 932-40, Aug 2007.
- [76] K. A. Davies, H. Ashwin, C. M. Longshaw, D. A. Burns, G. L. Davis, and M. H. Wilcox, "Diversity of *Clostridium difficile* PCR ribotypes in Europe: results from the European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of *Clostridium difficile* infection in hospitalised patients with diarrhoea (EUCLID), 2012 and 2013," (in eng), *Euro Surveill*, vol. 21, no. 29, Jul 21 2016.
- [77] F. C. Lessa *et al.*, "Burden of *Clostridium difficile* infection in the United States," (in eng), *N Engl J Med*, vol. 372, no. 9, pp. 825-34, Feb 26 2015.
- [78] C. L. Costa *et al.*, "A MLST Clade 2 *Clostridium difficile* strain with a variant TcdB induces severe inflammatory and oxidative response associated with mucosal disruption," (in eng), *Anaerobe*, vol. 40, pp. 76-84, Aug 2016.
- [79] S. K. Lim *et al.*, "Emergence of a ribotype 244 strain of *Clostridium difficile* associated with severe disease and related to the epidemic ribotype 027 strain," (in eng), *Clin Infect Dis*, vol. 58, no. 12, pp. 1723-30, Jun 2014.
- [80] M. C. Wehrhahn *et al.*, "A series of three cases of severe *Clostridium difficile* infection in Australia associated with a binary toxin producing clade 2 ribotype 251 strain," (in eng), *Anaerobe*, vol. 55, pp. 117-123, Feb 2019.
- [81] C. Quesada-Gomez *et al.*, "Analysis of TcdB Proteins within the Hypervirulent Clade 2 Reveals an Impact of RhoA Glucosylation on *Clostridium difficile* Proinflammatory Activities," (in eng), *Infect Immun*, vol. 84, no. 3, pp. 856-65, Jan 11 2016.
- [82] J. K. Shim, S. Johnson, M. H. Samore, D. Z. Bliss, and D. N. Gerding, "Primary symptomless colonisation by *Clostridium difficile* and decreased risk of subsequent diarrhoea," (in eng), *Lancet*, vol. 351, no. 9103, pp. 633-6, Feb 28 1998.
- [83] D. N. Gerding *et al.*, "Administration of spores of nontoxigenic *Clostridium difficile* strain M3 for prevention of recurrent *C. difficile* infection: a randomized clinical trial," (in eng), *Jama*, vol. 313, no. 17, pp. 1719-27, May 5 2015.
- [84] K. J. Nagaro *et al.*, "Nontoxigenic *Clostridium difficile* protects hamsters against challenge with historic and epidemic strains of toxigenic BI/NAP1/027 *C. difficile*," (in eng), *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 57, no. 11, pp. 5266-70, Nov 2013.
- [85] S. P. Sambol, M. M. Merrigan, J. K. Tang, S. Johnson, and D. N. Gerding, "Colonization for the prevention of *Clostridium difficile* disease in hamsters," (in eng), *J Infect Dis*, vol. 186, no. 12, pp. 1781-9, Dec 15 2002.
- [86] S. A. Villano, M. Seiberling, W. Tatarowicz, E. Monnot-Chase, and D. N. Gerding, "Evaluation of an oral suspension of VP20621, spores of nontoxigenic *Clostridium difficile* strain M3, in healthy subjects," (in eng), *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 56, no. 10, pp. 5224-9, Oct 2012.

- [87] Y. B. Chen *et al.*, "Molecular epidemiology of *Clostridium difficile* in a tertiary hospital of China," (in eng), *J Med Microbiol*, vol. 63, no. Pt 4, pp. 562-9, Apr 2014.
- [88] M. Kawada *et al.*, "Evaluation of a simultaneous detection kit for the glutamate dehydrogenase antigen and toxin A/B in feces for diagnosis of *Clostridium difficile* infection," (in eng), *J Infect Chemother*, vol. 17, no. 6, pp. 807-11, Dec 2011.
- [89] M. P. Hensgens, A. Goorhuis, O. M. Dekkers, and E. J. Kuijper, "Time interval of increased risk for *Clostridium difficile* infection after exposure to antibiotics," (in eng), *J Antimicrob Chemother*, vol. 67, no. 3, pp. 742-8, Mar 2012.
- [90] V. G. Loo *et al.*, "Host and pathogen factors for *Clostridium difficile* infection and colonization," (in eng), *N Engl J Med*, vol. 365, no. 18, pp. 1693-703, Nov 3 2011.
- [91] C. A. Muto *et al.*, "A large outbreak of *Clostridium difficile*-associated disease with an unexpected proportion of deaths and colectomies at a teaching hospital following increased fluoroquinolone use," (in eng), *Infect Control Hosp Epidemiol*, vol. 26, no. 3, pp. 273-80, Mar 2005.
- [92] K. Rao *et al.*, "*Clostridium difficile* ribotype 027: relationship to age, detectability of toxins A or B in stool with rapid testing, severe infection, and mortality," (in eng), *Clin Infect Dis*, vol. 61, no. 2, pp. 233-41, Jul 15 2015.
- [93] R. M. Humphries, D. Z. Uslan, and Z. Rubin, "Performance of *Clostridium difficile* toxin enzyme immunoassay and nucleic acid amplification tests stratified by patient disease severity," (in eng), *J Clin Microbiol*, vol. 51, no. 3, pp. 869-73, Mar 2013.
- [94] C. S. Lau and R. S. Chamberlain, "Probiotics are effective at preventing *Clostridium difficile*-associated diarrhea: a systematic review and meta-analysis," (in eng), *Int J Gen Med*, vol. 9, pp. 27-37, 2016.
- [95] N. T. Shen *et al.*, "Timely Use of Probiotics in Hospitalized Adults Prevents *Clostridium difficile* Infection: A Systematic Review With Meta-Regression Analysis," (in eng), *Gastroenterology*, vol. 152, no. 8, pp. 1889-1900.e9, Jun 2017.
- [96] E. Talevich, B. M. Invergo, P. J. Cock, and B. A. Chapman, "Bio.Phylo: a unified toolkit for processing, analyzing and visualizing phylogenetic trees in Biopython," (in eng), *BMC Bioinformatics*, vol. 13, p. 209, Aug 21 2012.
- [97] P. J. Cock *et al.*, "Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics," (in eng), *Bioinformatics*, vol. 25, no. 11, pp. 1422-3, Jun 1 2009.
- [98] S. Guindon, J. F. Dufayard, V. Lefort, M. Anisimova, W. Hordijk, and O. Gascuel, "New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0," (in eng), *Syst Biol*, vol. 59, no. 3, pp. 307-21, May 2010.
- [99] F. D. Ciccarelli, T. Doerks, C. von Mering, C. J. Creevey, B. Snel, and P. Bork, "Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life," (in eng), *Science*, vol. 311, no. 5765, pp. 1283-7, Mar 3 2006.
- [100] J. Felsenstein, "CONFIDENCE LIMITS ON PHYLOGENIES: AN APPROACH USING THE BOOTSTRAP," (in eng), *Evolution*, vol. 39, no. 4, pp. 783-791, Jul 1985.
- [101] F. Lemoine *et al.*, "Renewing Felsenstein's phylogenetic bootstrap in the era of big data," (in eng), *Nature*, vol. 556, no. 7702, pp. 452-456, Apr 2018.
- [102] D. M. Hillis and J. J. Bull, "An Empirical Test of Bootstrapping as a Method for Assessing Confidence in Phylogenetic Analysis," *Systematic Biology*, vol. 42, no. 2, pp. 182-192, 1993.
- [103] R. A. Stabler *et al.*, "Comparative genome and phenotypic analysis of *Clostridium difficile* 027 strains provides insight into the evolution of a hypervirulent bacterium," (in eng), *Genome Biol*, vol. 10, no. 9, p. R102, 2009.
- [104] J. Canovas *et al.*, "Cross-Talk between *Staphylococcus aureus* and Other *Staphylococcal* Species via the *agr* Quorum Sensing System," (in eng), *Front Microbiol*, vol. 7, p. 1733, 2016.