

審査の結果の要旨

氏名 岡田 雄大

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、*agr* の多様性の検証や実験室株・臨床株における垂型の検証や分子疫学との関連について解析した。その結果、以下の知見が得られた。

1. 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% と非常に少なかった。
2. 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。
3. *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* を対象とし、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いだけでなく、*agr2* の中でも互いに 80% 程度の核酸配列の相同性を示す 2 種類の垂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。

4. *C. difficile* *agr* の *in silico* 解析結果を踏まえ、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。
5. 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。
6. 毒素遺伝子を保有する臨床株において 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。

以上、本研究の前半では *C. difficile* の MLST による分子疫学解析でアジア圏からの報告と同様に Clade 1 について Clade 4 の菌株が多い傾向が示され、また本研究の菌株においては toxin EIA 検査陽性と *cdtA/B*、*tcdC* 欠損、*tcdA* 欠損変異の相関がないことが示された。今後、国・地域・施設レベルで高病原性株の増加を含めた分子疫学や臨床像の変化を知る際に土台となる貴重な情報が本研究により得られたと考える。

本研究の後半では、*agr2* の中の 2 つのグループ *agr2R* と *agr2M* を発見し、*agr* 亜型毎のアミノ酸配列の多様性を示した上で、臨床株における *agr1*, *agr2R*, *agr2M* の実在を分子疫学と関連付けて示した。本研究で示された *agr* の多様性は、*agr* の機能的な研究を通じ *C. difficile* infection の治療薬の開発に役立ちうる上、*C. difficile* の進化の過程の解明に役立つ可能性があると考ええる。

よって本論文は博士（医学）の学位請求論文として合格と認められる。