

厚生労働科学研究委託費
新興・再興感染症に対する革新的 医薬品等開発推進研究事業
(アジアの感染症担当研究施設とのラボラトリーネットワークの促進と共同研究体制の強化に関する研究)
委託業務成果報告書

***Clostridium difficile* 感染症の細菌学的検査システムとタイピング・システムの確立、および
アジアにおける *C. difficile* 感染症分子疫学への応用**

Establishment of a scheme for laboratory diagnosis and typing analysis for *Clostridium difficile* infection (CDI) and application of it to epidemiological study of CDI in hospitals in Asia

担当責任者 加藤はる (国立感染症研究所 細菌第二部)
Haru Kato (Department of Bacteriology II, National Institute of Infectious Diseases)

【研究要旨】ベトナム、ハノイ市内の4医療施設における下痢患者から分離された *Clostridium difficile* 22株について解析した。Toxin A 陽性 toxin B 陽性 binary toxin 陰性株が12株、toxin A 陰性 toxin B 陽性 binary toxin 陰性株が10株認められた。最も頻繁に認められたタイプはPCR ribotype 017/*slpA* sequence type 017であり、調べた4施設で少なくとも1株は分離された。Toxin A 陽性 toxin B 陽性 binary toxin 陰性株では、5株がPCR ribotype og39/*slpA* sequence type og39-01にタイプされた。本タイプは香港において2番目に優勢なタイプとして報告され興味深い結果と考えられた。

日本の15医療施設より非アウトブレイク時に分離された120株、および2医療施設におけるアウトブレイク時に分離された39株について検討した。最も優勢であったのはPCR ribotype smz/ysmz (toxin A 陽性 toxin B 陽性 binary toxin 陰性)で39.2%をしめ、PCR ribotype trf (toxin A 陰性 toxin B 陽性 binary toxin 陰性)が15.8%、さらに、PCR ribotype 002 (13.3%)、PCR ribotype 014 (10.8%)が続いた。PCR ribotype smz/ysmz および PCR ribotype trf は、調べた2病院のアウトブレイク時において同時に流行株になっていたことが明らかになり、type smz/ysmz と type trf は endemic 株であると同時に、epidemic 株であることがわかった。

平成27年2月2日から5日まで、National Institute of Hygiene and Epidemiology の Dr. Vu Thi Thu Huong が来日し、主にタイピング解析について技術移転を行った。

【Summary】A total of 22 *Clostridium difficile* recovered from 4 healthcare facilities in Hanoi were analyzed. Of these, 12 and 10 were A-positive, toxin B-positive, binary toxin-negative, and toxin A-negative, toxin B-positive, binary toxin-negative, respectively. The most predominant type was PCR ribotype 017/*slpA* sequence type 017, and at least one isolate of this type was found in each of the 4 hospitals examined. Among toxin A-positive, toxin B-positive, binary toxin-negative isolates, 5 were typed as PCR ribotype og39/*slpA* sequence type og39-01, which was reported to be the second predominant type in Hong Kong.

A total of 120 *C. difficile* isolates collected from 15 different Japanese hospitals in non-outbreak settings, and 39 isolates from outbreaks in two Japanese hospitals were analyzed. Among these isolates, PCR ribotype smz/ysmz (toxin A-positive, toxin B-positive, binary toxin-negative) was most frequently identified (39.2%), followed by PCR ribotype trf (toxin A-negative, toxin B-positive, binary toxin-negative) (15.8%), PCR ribotype 002 (13.3%) and PCR ribotype 014 (10.8%). Types smz/ysmz and trf concurrently caused outbreaks in both of the hospitals examined. The PCR ribotypes smz and trf were identified as major types not only circulating in but also causing outbreaks in Japan.

Dr. Vu Thi Thu Huong (National Institute of Hygiene and Epidemiology, Hanoi) visited National Institute of Infectious Diseases, Tokyo from 2nd to 6th February 2015, and attended at a training course for laboratory tests for *C. difficile* infection.

担当協力者

妹尾充敏 Mitsutoshi Senoh	国立感染症研究所 細菌第二部
福田靖 Tadashi Fukuda	Department of Bacteriology II, National Institute of
柴山恵吾	

Keigo Shibayama	Infectious Diseases
Vu Thi Thu Huong	Department of Bacteriology
Tăng Thị Nga	National Institute of Hygiene and Epidemiology
Lê Thị Trang	(NIHE), Hanoi, Viet Nam

A. 研究目的

Clostridium difficile は抗菌薬関連下痢症・腸炎の主要な原因菌である。加えて、本菌は医療関連感染の原因として重要であり、院内アウトブレイク発生がしばしば認められ、米国 CDC からは“urgent threat”として警告されている。

2000 年以降、欧米での *C. difficile* 感染症(CDI)症例数の急激な増加に伴い、高病原性株 BI/NAP1/027 の分離率が急増したことが注目されている。Whole genome sequence による解析から、フルオロキノロン耐性遺伝子獲得とともに、本 BI/NAP1/027 株が世界中に広がっていったことが明らかにされ、2 lineage の存在が報告されているが、興味深いことにどちらの lineage も北米がその起源と考えられている。

一方、日本では、BI/NAP1/027 による感染症例は散发事例しか認められていないが、BI/NAP1/027 株ではない特定のタイプの菌株が複数の医療施設で流行株・優勢株として認められている。この結果からアジアでは、北米やヨーロッパとは異なる菌株が流行している可能性が示唆された。日本以外では、韓国や香港、中国などから分子疫学について報告がなされているが、ベトナムにおいては、そもそも *C. difficile* 感染症の検査がなされていないので、まったく情報がない。

本研究では、まずベトナムの Department of Bacteriology National Institute of Hygiene and Epidemiology (NIHE)において *C. difficile* 細菌学的検査および分離菌株のタイピングを行うシステムを整え、さらに、ハノイ市の協力医療施設入院症例から分離された *C. difficile* 菌株の解析を開始する。一方で、日本の医療施設で分離された最近の菌株について検討し、あわせて、アジアにおける CDI 感染実態を調査する足がかりとする。

開発してきた Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)を用いた、新しい細菌学的検査法に関して論文報告した。

B. 研究方法

1. NIHE 研究室における *C. difficile* 細菌学的検査システムおよびタイピング・システムの構築とハノイにおける CDI 分子疫学
 - (a) ハノイ市内の National Geriatric Hospital (NGH)、Tropical Infectious Hospital (TIH)、Bach Mai Hospital (BMH)、Đông Đa Hospital (DDH)の4医療施設で CDI 疑い患者からの検体において NIHE において分離された *C. difficile* 37 菌株が NIID に送付され、同定確認と毒素遺伝子検出を行った。
 - (b) さらに、上記 37 菌株のうち、toxin B 陽性株について、PCR ribotyping と *slpA* sequence typing によるタイピング解析を行った。
 - (c) 平成 27 年 2 月 2 日から 2 月 6 日まで、NIHE の共同研究者が来日し、主にタイピング法に関して、技術移転を行った。

2. 日本の医療施設における CDI 分子疫学
 - (a) 平成 23 年度と平成 24 年度の 2 年間に於いて、日本の医療施設 15 施設において、CDI 症例 5-10 例を無作為に選び、分離株を収集した。
 - (b) 15 医療施設のうち 2 医療施設で、それぞれ平成 21 年および平成 22 年にアウトブレイク発生が認められ、得られた計 39 株について検討した。
3. 新しい細菌学的検査法の開発
RT-PCR による検査法の開発・評価について論文にまとめ、投稿した。

倫理面への配慮

「*Clostridium difficile* 医療関連感染に関する研究」は国立感染症研究所ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会において承認された(受付 114)。ベトナムでは NIHE の倫理審査委員会承認された。

C. 結果

1. NIHE 研究室における *C. difficile* 細菌学的検査システムおよびタイピング・システムの構築とハノイにおける CDI 分子疫学
 - (a) NIHE より送付された 37 菌株は、すべて *C. difficile* であることを確認した。PCR による毒素遺伝子検出を行ったところ、binary toxin 遺伝子陽性株は認められなかった。Toxin A 陽性 toxin B 陽性が 13 株、toxin A 陰性 toxin B 陽性株が 11 株、toxin A 陰性 toxin B 陰性株が 13 株であった。
 - (b) 上記 37 株中 toxin B 陽性 24 株のうち、toxin A 陰性 toxin B 陽性株で 1 株、toxin A 陰性 toxin B 陽性株で 1 株は、同じ検体から分離され同じタイプであったため、表には、22 株におけるタイピング結果をまとめた。本 22 株は 7 タイプに分けられた。もっとも優勢であったのは、toxin A 陰性 toxin B 陽性株の PCR ribotype 017/*slpA* sequence type fr-01 で、22 株中 9 株(40.9%)であった。本タイプ菌株は 4 施設すべてに認められた。Toxin A 陽性 toxin B 陽性株では、PCR ribotype og39/*slpA* sequence type og39-01 が 5 株(22.7%)認められ、NGH、TIH、BMH の 3 医療施設からの検体において分離された。
 - (c) 共同研究者である Dr. Vu Thi Thu Huong が、平成 27 年 2 月 2 日から 6 日まで 5 日間にわたって、国立感染症研究所村山庁舎で実験を行うとともに、今後の共同研究について打ち合わせを行った。
2. 日本の医療施設における CDI 分子疫学
 - (a) 15 医療施設において、アウトブレイクではない状況で分離された計 120 株について

て検討を行った。Toxin A 陽性 toxin B 陽性 binary toxin 陰性 PCR ribotype smz/ysmz が最優勢であり、15 病院すべてで分離が認められた。Toxin A 陰性 toxin B 陽性 binary toxin 陰性株はすべて PCR ribotype trf にタイプされ、2 番目に優勢であった。PCR ribotype 002 および type 014 が続いて頻繁に分離され、以上 4 タイプが 120 株中 95 株 (79.2%) をしめた。北米や英国で問題となっている PCR ribotype 027 株は 1 株認められたのみであった。また、ハノイ分離株で複数株認められた type og39 は 120 株中 2 株、cc835 は 1 株認められた。

- (b) 2 医療施設におけるアウトブレイクでは、どちらの医療施設においても PCR ribotype smz/ysmz および PCR ribotype trf が、同時に流行していた。

4. 新しい細菌学的検査法の開発

Microbiol Immunol に論文が掲載された。

D. 考察

ハノイ分離株では、toxin A 陰性 toxin B 陽性株が 22 株中 10 株と優勢で、そのなかでも、PCR ribotype 017 株が 9 株を占めたことは注目すべきであった。PCR ribotype 017 株は、ポーランド、アイルランド、韓国、アルゼンチン等で、アウトブレイク流行株として報告され、ハノイ医療施設におけるアウトブレイクの可能性が示唆された。ハノイ分離株のうち toxin A 陽性 toxin B 陽性株で PCR ribotype og39/*slpA* sequence type og39 が最優勢(22.7%)であった。PCR ribotype og39/*slpA* sequence type og39 株は、日本の非アウトブレイク株では、120 株中 2 株であったものの、今までの我々の検討で 1990 年代より散発的に認められている。香港からは、PCR ribotype 002 に続いて *slpA* sequence type og39 株が、2 番目に優勢であったと報告されている。PCR ribotype og39/*slpA* sequence type og39 株が、アジアで重要なタイプである可能性が考えられた。現在のところ、ハノイ分離株は検討菌株数が少ないため、さらに菌株数を増やして解析する必要があると考えられた。

日本の医療施設からの分離株では、PCR ribotype smz/ysmz が最優勢で、非アウトブレイク株の 39.2% を占めた。さらに、アウトブレイク時でも、2 医療施設でそれぞれ 42.9%、50.0% が PCR ribotype smz/ysmz であることから、本タイプは日本では endemic でもあり epidemic でもあることが明らかとなった。PCR ribotype smz は、1990 年代より日本の医療施設では CDI 症例より認められている。本タイプが、今回検討したベトナム分離株には認められなかった点は注目すべきであった。また、toxin A 陰性 toxin B 陽性株では、ベトナムをはじめ、ポーランド、アイルランド、韓国、アルゼンチン等で問題

となっている 017 株ではないタイプ、PCR ribotype trf が優勢株 / 流行株となっていることが興味深い点であった。

E. 結論

ハノイ市内の医療施設では、海外でアウトブレイク菌株として報告されている PCR ribotype 017 株 (toxin A 陰性 toxin B 陽性) が優勢であった。Toxin A 陽性 toxin B 陽性菌株では、欧米で流行株・優勢株として報告されていないタイプが優勢である可能性が示された。

日本においては、PCR ribotype smz/ysmz (toxin A 陽性 toxin B 陽性) と PCR ribotype trf (toxin A 陰性 toxin B 陽性) の 2 タイプが、優勢株・流行株であった。

F. 健康危機情報

北米を起源とする PCR ribotype 027 株が世界中に広がり、CDI の疫学に大きな影響を及ぼしたように、ベトナムや日本をはじめとしたアジアを起源とする「アジアに特有の高病原性株」の存在を調べる必要があると考えられた。特に抗菌薬適正使用や適切な感染対策がなされていないベトナムでの CDI 分子疫学解析は重要と考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Senoh M, Kato H, Murase T, Hagiya H, Tagashira Y, Fukuda T, Iwaki M, Yamamoto A, Shibayama K. 2014. Reverse transcription polymerase chain reaction-based method for selectively detecting vegetative cells of toxigenic *Clostridium difficile*. Microbiol Immunol 58: 615-620.
- Nishimura S, Kou T, Kato H, Watanabe M, Uno S, Senoh M, Fukuda T, Hata A, Yazumi S. 2014. Fulminant pseudomembranous colitis caused by *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 in a healthy young woman in Japan. J Infect Chemother 20: 729-731.

1. 学会発表

- 加藤はる 教育講演 4 *Clostridium difficile* 感染症について. 第 88 回日本感染症学会学術講演会 2014 年 6 月 福岡
- Kato H. 国際シンポジウム All about *Clostridium difficile* infection in the world 「What is going on about *Clostridium difficile* infection in Japan?」 第 45 回日本嫌気性菌感染症学会 2015 年 2 月 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

TABLE 1. Typing results of 22 *C. difficile* isolates recovered from 4 hospitals in Hanoi

Toxin production	PCR ribotype	<i>slpA</i> ST	No. of isolates from hospital:				Total No. of isolates (%)
			NHG	TIH	BMH	DDH	
A ⁺ B ⁺ CDT ⁻	cr	cr-01			1		1 (4.5)
	001	gr-01			1		1 (4.5)
	okz	gr-02	1				1 (4.5)
	cc835	kr-03.1			3	1	4 (18.2)
	og39	og39-01	1	1	3		5 (22.7)
A ⁻ B ⁺ CDT ⁻	017	fr-01	1	3	4	1	9 (40.9)
	trf	fr-01		1			1 (4.5)
Total			3	5	12	2	22

A⁺B⁺CDT⁻, toxin A 陽性 toxin B 陽性 binary toxin 陰性; A⁻B⁺CDT⁻, toxin A 陰性 toxin B 陽性 binary toxin 陰性; *slpA* ST, *slpA* sequence type; NHG, National Geriatric Hospital; TIH, Tropical Infectious Hospital; BMH, Bach Mai Hospital; DDH, Đống Đa Hospital.

TABLE 2. Distribution of prevalent PCR ribotypes recovered from 15 hospitals in non-outbreak settings and 2 hospitals in outbreak settings

PCR ribotype	No. of isolates (%) recovered from 15 hospitals in non-outbreak settings	No. of isolates (%) in an outbreak setting at :	
		hospital A	hospital B
smz /ysmz	47 (39.2)	9 (42.9)	9 (50.0)
trf	19 (15.8)	6 (28.6)	9 (50.0)
002	16 (13.3)	0	0
014	13 (10.8)	5 (23.8)	0
og39	2 (1.7)	0	0
cc835	1 (8.3)	0	0
001	1 (8.3)	0	0
Other types	23 (19.2)	1 (4.8)	0
Total	120	21	18