

糞便検体を用いた *Clostridioides difficile* 抗原 / 毒素検査試薬の比較検討

上 間 寛 嗣 知 念 志 依 那 平 良 大 輝 曲 瀬 川 裕 子 小 森 誠 嗣

沖縄赤十字病院 医療技術部 臨床検査課

要 旨

*Clostridioides difficile*感染症（以下、CDI）の診断補助試薬であるイムノクロマトグラフィー法を用いたGEテスト イムノクロマト-CD GDH/TOX「ニッスイ」（日水製薬）（以下、GE）と*C. DIFF* QUIK CHECK コンプリート（アリアー メディカル）（以下、QC）の性能評価の比較検討を行った。検討内容は、①臨床分離菌株を用いた*C. difficile*抗原（グルタメートデヒドロゲナーゼ（以下、GDH））の検出感度比較と②糞便検体47例の感度/特異度/陽性的中率/陰性的中率を比較した。結果は、①GEの方がGDH最小検出感度は高かった。②QCがGDH（特異度/陽性的中率）およびToxin（感度/特異度/陽性的中率/陰性的中率）でGEより少し高い結果となった。GEはGDH最小検出感度が高いが偽陽性反応も多く、Toxinは両試薬とも検出感度が過去の報告より低い結果となった。

現行の検査フローでは迅速性を欠くことからイムノクロマトグラフィー法の検査精度の向上および簡易に使用できる遺伝子検査の導入の体制ができることが望まれる。

Keywords : *Clostridioides difficile*, 糞便検体, イムノクロマトグラフィー法

序 文

*Clostridioides difficile*は、偏性嫌気性グラム陽性桿菌で抗菌薬関連下痢症・腸炎（antibiotic-associated diarrhea ; AAD）の主な原因菌である。CDIは、抗菌薬の長期使用により腸内細菌叢が乱れ、菌交代現象として*C. difficile*が増殖し、本菌が産生するToxin A（腸管毒）及びToxin B（細胞毒）などの毒素により腸管粘膜が傷害されることで下痢を引き起こす¹⁾。また、手指消毒用アルコールに耐性を持つ芽胞菌であるため²⁾、環境中に長期生存が可能であり、医療関連感染の原因微生物としても非常に重要な菌である。CDI診断では糞便中の毒素が陽性、もしくは毒素産生性の*C. difficile*を検出することが重要な要素の一つである。これらを検出する検

査法として細胞培養法を用いた糞便中の毒素検出やPCR法を用いた遺伝子検査法があるが、検査手技の煩雑さやコストの面から導入施設が少ないことが現状である。このことから一般的にイムノクロマトグラフィー法を原理とした糞便検体の直接検査法が行われているが、*C. difficile* Toxinの検出感度の低さが指摘されている^{3) 4)}。そのため、米国などのガイドラインでは多段階アルゴリズムを用いて検査を評価することが記載されており^{5) 6)}、当院では糞便からの直接検査にてGDH（+）Toxin（-）を示した検体に対して48時間嫌気培養を実施し、分離菌株の毒素産生性を確認している。

現在、国内で販売されているGDHおよびToxinの同時検出が可能なキットに、GEとQCの2種類がある。当院では2016年12月よりGEを使用しており、2016年12月から2018年8月22日までに725件を検査した。検査結果の内訳として糞便検体725件中154件（21.2%）がGDH（+）Toxin（-）を示した。糞

（平成30年10月12日受理）

著者連絡先：上間 寛嗣

（〒902-8588）沖縄県那覇市与儀1-3-1

沖縄赤十字病院 医療技術部 臨床検査課

便検体からの直接検査にてGDH (+) Toxin (-) を示した154件に対して、48時間嫌気培養検査を実施し、コロニーの発育を認めなかったものが57件 (7.9%) あった。このことから57件には偽陽性の可能性も示唆され、検査フローの見直しや、より検出感度の優れた試薬を選択することが重要であると考え、今回比較検討を行ったので報告する。

対象と方法

1. *C. difficile* 臨床分離株を用いたGDH最小検出感度の比較検討

(1) 対象

当院にてGDH (+) Toxin (+) の臨床検体より分離された *C. difficile* 3株

*RapID Kit ANA SYSTEM II (アムコ) にて同定確率99%以上 (菌コード: 000010)

(2) 方法

① CCMA培地EX (日水製薬) に菌株を接種し、嫌気培養にて2日間培養を実施した。

② 分離菌株を、McFarland 2.0 (推定菌濃度 6.0×10^8 CFU/mL) に調整した菌液を10倍、100倍、1,000倍、10,000倍に段階希釈し、それぞれを検体として添付文書に従い、GEおよびQCを用いて検査を実施した。

2. 糞便検体を用いたGEとQCの比較検討

(1) 対象

① 期間: 2018年3月~4月および8月~9月

② CDI診断目的に提出された糞便検体47例を対象とし、原則提出日に検査を実施し、当日に出来なかった場合には4℃冷蔵庫にて保存し、2日以内に検査を実施した。

*患者重複を防ぐために、1患者1検体として期間中の初回提出された検体に対して検査を実施した。

(2) 方法

① 提出された糞便検体を添付文書に従ってGEおよびQCにて検査を実施した。

② 同時に、CCMA培地EXに滅菌綿棒を用いて直接検体を塗布し、白金耳にて画線塗沫を

行い、35℃嫌気培養を実施した。

③ 両試薬でGDH (-) Toxin (-) となった検体は48時間培養で判定し、それ以外のもは最大96時間まで培養を延長した。

④ CCMA培地EX上に発育したコロニーのうち、R型黄色コロニーでグラム陽性桿菌を確認した上で、両試薬にて再検査を実施した。QCに関しては、谷野らの報告に従い⁷⁾、キット添付の希釈液にてMcFarland 4.0 (推定菌濃度 12.0×10^8 CFU/mL) 以上に調整し、検査を実施した。

結果

1. *C. difficile* 臨床分離株を用いたGDH及びToxinの最小検出感度

Table 1の結果より、推定菌濃度 6.0×10^5 CFU/mLにてGDHの検出感度に差が認められ、GEの方がQCより最小検出感度が良好であった。

Table 1 *C. difficile* 臨床分離株を用いたGDH最小検出感度の比較検討

推定菌濃度 (CFU/mL)	菌株1		菌株2		菌株3	
	GE	QC	GE	QC	GE	QC
6.0×10^8	+	+	+	+	+	+
6.0×10^7	+	+	+	+	+	+
6.0×10^6	+	+	+	+	+	+
6.0×10^5	+	-	+	-	+	-
6.0×10^4	-	-	-	-	-	-

2. 糞便検体を用いたGEとQCの比較検討

Table 2-1の結果より、算出した感度/特異度/陽性的中率 (以下: PPV)/陰性的中率 (以下: NPV) をTable 2-2に示す。Table 2-2よりGDHは特異度、陽性的中率の項目でQCがGEに比べて高い結果を示した。Toxinは感度、特異度、PPV、陰性的中率のすべてでQCがGEに比べて高い結果を示した。糞便検体からの直接法と培養検査で結果の不一致が認められた事例がGDHで5件、Toxinで1件認められた。GDHの不一致の内訳は、GEのみGDH (+) を示したものが3件、QCのみGDH (+) を示したものが1件、GEとQCの両方でGDH (+) を示し

Table 2-1 培養検査 (Toxigenic culture) を対照とした, GEおよびQCの検査結果 (n=47)

			Toxigenic culture	
			Positive	Negative
GE	GDH	Positive	15	4
		Negative	0	28
	Toxin	Positive	2	1
		Negative	7	37
QC	GDH	Positive	15	2
		Negative	0	30
	Toxin	Positive	3	0
		Negative	6	38

Table 2-2 GEおよびQCの検査試薬の比較 (n=47)

		感度 (%)	特異度 (%)	PPV (%)	NPV (%)
GE	GDH	100.0	87.5	78.9	100.0
	Toxin	22.2	97.4	66.7	84.1
QC	GDH	100.0	93.8	88.2	100.0
	Toxin	33.3	100.0	100.0	86.4

たものが1件認められた。いずれも96時間嫌気培養検査で菌の発育は認められなかった。Toxinで結果の不一致が認められたものは、直接法にてGEでGDH (+) Toxin (+), QCでGDH (+) Toxin (-)を示したが、培養検査にて発育した菌株を再検査したところ両試薬でGDH (+) Toxin (-)となり、糞便検体で検査を実施した場合と培養後の菌株で検査した場合でGEの試薬の方で結果の不一致が認められた (Table 3)。

考 察

今回、臨床菌株を用いた最小検出感度の検討ではGDHの抗原濃度を直接測定することが出来ないため、菌濃度を調整した菌液の段階希釈による検出感度の比較を実施した。結果は、推定菌量 6.0×10^5 CFU/mLの菌液濃度にて両試薬での検出感度に違いが認められた (Table 1)。これは両メーカーの添付文書に記載されているGDH最小検出感度 (QC: 0.8ng/mL GE: 0.18ng/mL) と類似する結果であることからGEはQCと比較して検出感度が高いことが矛盾しない結果となった。

糞便検体を用いた検討では、培養検査を対照とし

Table 3 GEまたはQCと培養検査での結果の不一致 (n=6)

検体 No.	検査試薬	糞便検体検査結果		培養検査	培養後再検査結果	
		GDH	Toxin		GDH	Toxin
No.1	GE	+	-	-	/	
	QC	-	-			
No.2	GE	+	-	-	/	
	QC	-	-			
No.3	GE	+	-	-	/	
	QC	-	-			
No.4	GE	-	-	-	/	
	QC	+	-			
No.5	GE	+	-	-	/	
	QC	+	-			
No.6	GE	+	+	+	+	-
	QC	+	-		+	-

たGE及びQCによるGDH/Toxin検査を行い、感度/特異度/PPV/NPV(単位:%)を比較した (Table2-1, 2-2)。GEのGDHは感度/特異度/PPV/NPVの順に100/85/75/100となり、Toxinは22/97/67/84となった。一方、QCのGDHは100/94/88/100で、Toxinは33/100/100/87となった。GDHの感度は両試薬ともに100%であり、差を認めなかったことから、糞便検体を用いる上ではGDH最小検出感度差を考慮する必要性は低いと考えられた。しかし、GEでは付属綿棒、QCでは付属スポイトを用いて検体の一部を採取するため、採取方法の違いや採取部位によって偽陰性が起こる可能性もあり、検査の際には提出された検体を採取前に均一にするなど注意する必要がある。また、GEのPPVはQCに比べて低く、非特異反応がQCより多いことからQCの方がGDHに関して優れていることを示唆する結果となった。Toxinの感度は、GEで22.2%, QCで33.3%とどちらも過去の報告^{3) 4)}より低い結果となった。他の報告よりも感度が低かった要因として、糞便中の菌量が少なくそれによりToxinが検出感度以下であった可能性が考えられる。当院の検査体制では、48時間嫌気培養で判定を行っているが、今回の検討では

96時間まで培養を延長することにより、少量のコロニーの発育を2件の検体で認めた。このことから、菌量が少ないことによりToxinが検出できず、今回の検出感度に影響したものと考えられる。

糞便検体を用いたGEとQCの比較検討にて、直接法と培養検査で結果の不一致が6件認められた (Table 3)。Table 3より検体No.1～No.6の6件のうちNo.1～No.5は直接法にて、2つの試薬のいずれかまたは両方でGDH (+) を示したが96時間嫌気培養にて菌の発育を認めなかった。No.6は糞便検体のToxinの結果でGEとQCに結果に不一致が認められ、培養検査で発育したコロニーを用いて再検査をした結果、両試薬ともGDH (+) Toxin (-) となり、GEの結果が糞便検体を用いた場合とコロニーを用いた場合で結果の不一致が認められた。偽陽性になる要因として、CDIに対する抗菌薬投与後の死菌や他の菌との交差反応および薬剤、食物などとの非特異反応が挙げられる。和泉らは、経腸管洗浄剤がQCのToxin検出に偽陽性を示すことを報告しており、他のイムノクロマト法を原理とした検査試薬にも影響を及ぼす可能性があることを述べている⁸⁾。今回の検討で不一致を示した検体の中に、CDI治療薬の投与後に提出されたものはなかった。No.5の症例では1週間後に糞便検体が再提出されており、その検体では培養検査にてGDH (+) Toxin (-) の*C. difficile*が検出されたことから、対象だった検体では培養検査の検出感度以下だったことが考えられる。No.6のToxinの結果が不一致だった症例では、患者に制酸剤・緩下剤であるマグミットが処方されており、同薬剤を滅菌生理食塩水に溶かし両試薬の添付文書に従い、検査を行ったところQCでは偽陽性反応が認められず、GEではToxinの判定位置に偽陽性反応が検出された (Figure 1-1, 1-2)。QCでは抽出液をメンブレンに浸透させた後に、洗浄液にて洗浄する過程があるが、GEには洗浄過程がないことから何かしらの反応で偽陽性反応が認められたと考えられるが、詳細な検討は今回実施出来なかった。No.1～No.3に関しては今回原因を特定することが出来なかったが、No.6などのように処方されている薬剤に非特異反

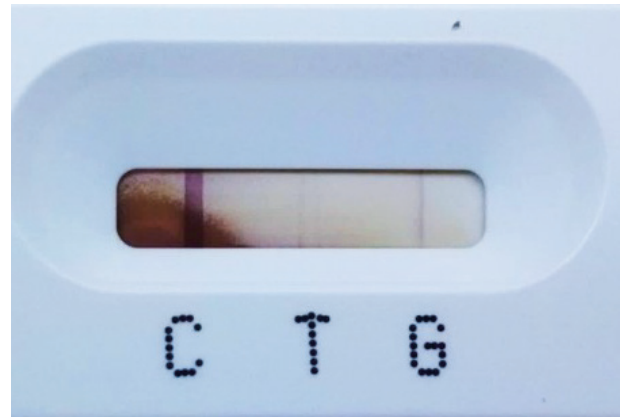


Figure 1-1 No.6便検体の結果
(C : Control, T : ToxinA/B, G : GDH)
Toxinの判定ラインの位置に二重のラインが認められた。



Figure 1-2 制酸・緩下剤入りの試薬の結果
(C : Control, T : ToxinA/B, G : GDH)
No.6で起きた反応と同様の反応が認められた。

応が起こっている可能性も考えられ、今後さらなる検証が必要であると考えられる。

提出された検体の性状や採取状況を評価することは、検査をする上で検査結果に影響を及ぼす重要な要素の一つである。CDIの診断に際して、検査に用いる糞便検体はBristol Stool Form Scale⁹⁾などの客観的指標を用いて評価し、Bristol Stoolが5～7の性状の検体を用いることが推奨されている。今回、対象期間中に提出された検体の中にはBristol Stoolが5～7以外の検体や、メトロニダゾールなどのCDI治療薬が投与された後に提出された検体も認められた。当院では前述したとおり、直接法にてGDH (+) Toxin (-) を示した場合は培養検査を行い、発育したコロニーを用いて再検査を実施している。その場合、培養に用いる培地や嫌気パックと試薬の再検査費用を定価で考えると1検体あた

り約1,660円の検査コストが増加する。また、検査の面だけでなく、病棟での接触感染予防策の実施や使用中の抗菌薬の中止およびメトロニダゾールやバンコマイシンの投与が行われるなど医療コストの増加や不要な抗菌薬投与が行われてしまう可能性がある。現在の検査フローでは培養検査に日数がかかってしまうため、迅速性の観点から検査材料の評価をしっかりと行うことで検査精度を高めることや、より感度、特異度が高く、かつ簡易で迅速に結果が得られるPCR法などの遺伝子検査法を用いた検出法の Nucleic acid amplification test (NAAT)¹⁰⁾ を中規模施設でも導入できるような体制が望まれる。

引用文献

- 1) 神谷 茂：ディフィシル菌感染症の基礎と臨床，モダンメディア，2010；56：233-241
- 2) Oughton MT, Loo VG, Dendukuri N, *et al.* : Hand hygiene with soap and water is superior to alcohol rub and antiseptic wipes for removal of *Clostridium difficile*.” *Infect Control Hosp Epidemiol* 2009；30：939-944
- 3) 西尾 美津留，宮木 祐輝，小川 有里子：*Clostridium difficile* ToxinおよびGDH抗原同時検出試薬の検出性能に関する比較検討，*医学検査* 2018；67：469-474
- 4) 山本 由香梨，大島 利夫，大菅 淳，他：*C. DIFF CHECK コンプリート*による *Clostridium difficile* 抗原およびトキシンA/B 検出の評価と運用について，*医療と検査機器・試薬*，2013；36：349-353
- 5) Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, *et al.* : Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adult : 2010 update by the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) and the Infectious Diseases Society of America (IDSA), *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2010；31：431-455
- 6) Crobach MJ, Planche T, Eckert C, *et al.* : European Society of Clinical Microbiology and Infection Diseases : Update of the diagnostic guidance document for *Clostridium difficile* infection, *Clin Microbiol Infect*, 2016；22 (Suppl 4) : S63-S81
- 7) 谷野 洋子，木村 武史，牛山 正二，他：Toxigenic cultureを用いた毒素産生 *Clostridium difficile* 検出の基礎的検討，*医学検査* 2015；63：680-685
- 8) 和泉 彬彦，大河原 愛，杉山 嘉史，他：経口腸管洗浄剤が *Clostridium difficile* Toxin 検出キットに与える影響，*医学検査* 2014；63：288-293
- 9) Lewis SJ, Heaton KW. : Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time.” *Scand J Gastroenterol*. 1997；32 (9) : 920-4
- 10) 松浦 成美，佐伯 裕二，梅木 一美，他：*C. DIFF QUIK CHECK COMPLETE* にてクロストリジウム・ディフィシル抗原（グルタミン酸デヒドロゲナーゼ（GDH））陽性・トキシン陰性を示した検体におけるBD マックスCDIFFを用いた遺伝子検査の有用性，*医学検査* 2018；67：451-455