

研究

当院における *Clostridium difficile* 関連下痢症/ 腸炎検査の toxin A 迅速診断キット「ユニクイック」の評価

赤羽貴行¹⁾、保坂 力¹⁾、村山範行¹⁾、加藤はる²⁾
小穴こず枝³⁾、川上由行³⁾

¹⁾安曇野赤十字病院 検査部、²⁾国立感染症研究所 細菌第二部、

³⁾信州大学医学部保健学科

Evaluation of a rapid detection test, "uniquick" for *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis in our hospital

要旨

Clostridium difficile は偽膜性大腸炎の原因菌であり、抗菌薬関連下痢症/腸炎の主要な原因菌である。また、本菌は芽胞を介した院内感染起因菌として注目され、2種類の毒素(toxin A、toxin B)が本菌の病原性において重要な役割をしている。

555 検体を対象に糞便中toxin A 検出法(ユニクイック)と培養法の成績を比較評価した。培養陽性が233 検体(42.0%)、ユニクイックによる toxin A 陽性が184 検体(33.2%)であった。ユニクイック陰性・培養陽性93 検体中から分離された93 株においてユニクイックにより toxin A 産生性を調べたところ、81 菌株が toxin A 陽性、12 菌株が陰性であった。Toxin A 陰性12 菌株のうち毒素産生パターンを調べた4 株の成績は A⁻B⁻菌株が1 株、A⁻B⁺菌株が3 株であった。

toxin A のみを検出するユニクイックは培養法に比べ陽性率が低く、A⁻B⁺菌株による *C.difficile* 関連下痢症を見逃す可能性も高いため、培養法との併用が推奨される。今後は toxin A 及び toxin B 両毒素検出キットの臨床検査現場への導入が、*C.difficile* 感染症のより確実な検査のためには急務であると考えられる。

Akahane Takayuki et al:ISSN 1343-2311 Nisseki Kensa 40:16-19, 2006 (2006.10.16 受理)

KEYWORDS

Clostridium difficile、toxin A、toxin B、迅速検査、培養法

【はじめに】

Clostridium difficile は抗菌薬関連下痢症/腸炎(CDAD)、偽膜性大腸炎の起因菌として知られており¹⁾、抗菌薬関連下痢症/腸炎の主要な原因菌である。また、芽胞を介した院内感染の起因菌としても注目されている²⁻⁵⁾。*C.difficile* 感染症の診断のために、選択培地による *C.difficile* を検出する培養法、迅速診断キット(ユニクイックTM:関東化学)

を用いた糞便中の毒素(toxin A)を直接検出する方法、および *C.difficile* の D-1 抗原を検出するラテックス凝集法(CDチェック D-1:シオノギ製薬)の各種検査法が一般的に行われている。しかし、*C.difficile* 感染症では、2種類の毒素[toxin A(エンテロトキシン)、toxin B(サイトトキシン)]が重要な役割をしているため^{6,7)}、検体から本菌を検出することよりも本毒素を証明することが本質的である。

ユニクイックは迅速検査であるため、培養法に比べ早く結果がわかる有用性(1時間程度)はあるが、toxin A のみの検出しかできないことや感度が低いという問題⁸⁾がある。当院検査部では、*C.difficile* 感染症の検査として、ユニクイックを用いた toxinA の検出と、その補助検査として CCMA 培地(日水製薬)による培養法(迅速検査陰性の場合には培養で得られた菌株で毒素検査を再度実施)を行っている。今回我々は迅速診断キット「ユニクイック」と培養法の成績を比較検討し、若干の文献的考察を加えて報告する。

【方法】

当院検査部で、ユニクイックと培養法の両者を検査開始した2005年7月から2006年9月の15ヶ月間に *C.difficile* 感染症の検査として提出された555検体を対象とした。なお、対象期間中は一人の患者で複数回の検査が行われていたが、すべてのデータを対象とした。

迅速診断キットはユニクイックを用い、添付文書に従って toxin A を検出した。培養法は、加藤ら⁹⁾の推奨した以下の方法を用いて行った。0.3ml~0.5mlの糞便検体を同量の99%エタノールと混同し、時々攪拌しながら30分から1時間放置した後、CCMA培地にサンプルを100 μ l塗布しコンラージ棒で拵げた。嫌気BOX内で2日間培養し、培地上で黄色コロニーを形成し、グラム染色により芽胞の存在を確認したものを *C.difficile* と同定した。

また、迅速検査陰性・培養陽性の場合には、培養で得られた菌株をブレインハートインフュージョンで3-5日間増菌後、その培養液においてユニクイックで毒素検出検査を実施した。この菌株におけるユニクイック検査で陰性となった12株中4株(2005年7月から11月検査分)について、国立感染症研究所においてPCRによる毒素産生パターンの同定を実施した。

表1 ユニクイックと培養法との比較

		<i>C.difficile</i> 培養		
		陽性	陰性	計
糞便中toxinA検出 (ユニクイック)	陽性	140	44	184
	陰性	93	278	371
	計	233	322	555

表2 ユニクイック陰性・培養陽性93株のtoxin A産生性(ユニクイック)検査成績

株数	判定
81株	toxin A産生性陽性
12株	toxin A産生性陰性

表3 ユニクイック陰性・培養陽性 12株中4株*の毒素産生パターン

菌株No.	毒素産生パターン
131	A ⁻ B ⁻
108	A ⁻ B ⁺
124	A ⁻ B ⁺
148	A ⁻ B ⁺

*:2005年7月-11月検査分

【結果】

ユニクイック及び培養法での陽性数を表1に示した。培養法では、対象555検体中、培養陽性として *C.difficile* が検出されたものは233検体(42.0%)であった。培養陽性例に対するユニクイックの陽性率は60.1%(140/233)であった。

一方、ユニクイックでは対象555検体中、184検体(33.2%)が陽性となった。そのうち44例は培養陰性であった。

また、ユニクイック陰性・培養陽性93検体中、分離菌株の toxin A 産生性が陽性となったのは81検体から分離された81菌株で、陰性となったのは12検体であった(表2)。その12検体から得られた12株中検討した4株(2005年7-11月検査分)の毒素産生パターンは、A⁻B⁻が1株、A⁻B⁺が3株であった(表3)。

【考察】

今回検討した toxin A を検出するユニクイックの感度は培養陽性例に対する成績では60.1%となり、石郷ら⁸⁾の成績とほぼ同様な成績となった。今回は gold standard とされている細胞培養法による toxin B 検出との比較はしていないが、石郷ら⁸⁾の報告ではユニクイックは、細胞培養法と比較して感度83.3%、特異度100%と良好な成績としている。しかし、ユニクイック陰性371検体中、93検体(25.1%)で菌の分離培養が陽性となり、その93検体から分離された93菌株の toxin A 産生性をユニクイックで検査したところ、そのうち81株(21.8%)が toxin A

陽性株であった。つまり、最初のユニクイック検査で陰性となった5分の1は、実際、糞便中に toxin A を産生する *C.difficile* が存在したことになり、ユニクイックのみ使用する検査では *C.difficile* 関連下痢症が見落とされていた可能性があり、培養法を併用する価値があることを示している。また、ユニクイック陰性・培養陽性となった4検体からはA⁻B⁻菌株が1株、A⁻B⁺菌株が3株分離され、このA⁻B⁺菌株による *C.difficile* 感染症はユニクイックでは検出できないことになる。

C.difficile は toxin A 及び toxin B を産生し、CDAD 等の感染症の起原菌として重要であるが、国内においては毒素検出として市販キットによる toxin A の検出しか出来ていないのが現状である。すなわち、現段階では多くの病院でA⁻B⁺菌株によるCDADは見逃されている可能性が高い。しかし、A⁻B⁺菌株による症例も多数報告されており¹⁰⁻¹³⁾、その重要性も認識されている。PCR等による toxin B 遺伝子の検出による検査は可能である¹⁴⁾が、一般的な細菌検査室での施行は難しい。欧米では toxin B も toxin A と同時に検出可能なキットが発売がされており、ルーチン検査での対応が可能である。国内でも早急に臨床検査の現場に導入され、*C.difficile* 感染症がより確実に検査できることを期待する。

文献

1. 加藤はる：Clostridium difficile 関連下痢症—分子疫学と細菌学的検査—JARMAM 14: 121-126,2003.
2. 佐藤洋子、加藤はる、小岩井健司、他：がんセンターにおける toxin A 陰性 toxin B 陽性 Clostridium difficile による下痢症の院内集団発生.感染症誌 78:312-319,2004.
3. Brazier, J. S.: The epidemiology and typing Clostridium difficile.J.Antimicrob. Chemother.41:47-57,1998.
4. Johnson,S.,et al.:Epidemics of diarrhea caused by a clindamycin-resistant strain of Clostridium difficile in four hospitals. N.Engl.J.Med. 341:1645-1654,1999.
5. Kato,H.,et al.: Analysis of Clostridium difficile isolates from nosocomial outbreaks at three hospitals in diverse areas of Japan.J.Clin.Microbiol.39:1391-1395,2001.
6. 加藤はる、加藤直樹、中村信一：感染症の診断・治療・疫学における遺伝子検査、微生物病原因子の検出—Clostridium difficile の toxinA. 臨床と微生物 (増刊号) 26:139-144,1999.
7. 加藤はる：クロストリディウム・ディフィシル毒素.臨床検査 47:169-174,2003.
8. 石郷潮美、浅野裕子、入山純司、他：Clostridium difficile 性下痢症/腸炎における迅速診断用キット ToxinA 検出キットの有用性.臨床と微生物 26:103-105,1999.
9. 加藤はる、加藤直樹：Clostridium difficile 感染症と細菌学的検査.日本臨床微生物学雑誌,12:115-122,2002.
10. Limaye AP.Turgeon DK.,Cookson BT., et al.:Pseudomembranous colitis caused by atoxin A(-)B(+) strain of Clostridium difficile .J.Clin. Microbiol. 38:1696 -1697, 2000.
11. Komatsu,M.,et al.:High frequency of antibiotics-associated diarrhea due to toxin A-negative,toxin B-positive Clostridium difficile in a hospital in Japan and risk factors for infection. Eur. J.Clin.Microbiol.Infect.Dis. 22:525-529,2003.
12. Johnson,S.,et al.:Internatinal typing study of toxin A-negative, toxin B-positive Clostridium difficile. J.Clin. Microbiol.41:1543-1547,2003.
13. 加藤はる、加藤直樹：Toxin A 陰性 toxin B 陽性 Clostridium difficile. 検査と技術, 31:666-669,2003.
14. 加藤はる：Clostridium difficile の toxinB 検出法.検査と技術 34:862-864,2006.