

研究

Clostridium difficile 抗原迅速診断キット (C.DIFF QUIK CHEK コンプリート) の有用性に関する検討

赤羽貴行¹⁾, 久住裕俊²⁾, 村山範行¹⁾, 小穴こず枝³⁾, 川上由行³⁾

¹⁾ 安曇野赤十字病院検査部

²⁾ 静岡県立総合病院検査部 検査技術室

³⁾ 信州大学医学部保健学科 検査技術科学専攻

Assessment of the C.DIFF QUIK CHEK Complete assay, a new glutamate dehydrogenase and A/B toxin combination lateral flow assay

要旨

Clostridium difficile の病原性には2種類の毒素 (toxin A, toxin B) が大きく関与しており、*C. difficile* 感染症 (CDI) の細菌学的診断では糞便中の本菌毒素を検出することが重要である。今回、*C. difficile* の抗原であるグルタマートデヒドロゲナーゼ (GDH) と toxin A, toxin B を同時検出することが可能な迅速キットである C.DIFF QUIK CHEK コンプリート (アリーアメディカル; コンプリート) の有用性について、X/Pect トキシシン A/B (関東化学; X/Pect) を対照に検討した。

菌株からの毒素検出では PCR 法により毒素遺伝子が確認された 48 株中、コンプリートは 48 株 (100%), X/Pect は 45 株 (93.8%) が陽性となり、X/Pect では毒素産生パターン A⁻B⁺CDT⁻ タイプの 4 株中 3 株が検出不能であった。糞便 45 検体からの毒素検出では PCR 法により毒素が確認された 29 検体において、コンプリートでは 20 検体 (69.0%), X/Pect では 16 検体 (55.2%) が毒素陽性となった。コンプリートにより毒素陰性となった残り 9 検体はすべて GDH が陽性であった。

コンプリートは糞便および毒素産生パターン A⁻B⁺CDT⁻ タイプを含めた菌株からの毒素検出に優れ、CDI の診断用キットとして有用であると考えられた。また、毒素検出の他に、GDH の検出もできるため、GDH 陽性・毒素陰性の場合には迅速診断キットのみではなくさらに分離培養を併用することにより検出率の向上に繋がることが期待される。

Takayuki Akahane, et al : ISSN 1343-2311 Nisseki Kensa 46 : 12—16,2013(2012.12.04 受理)

KEYWORDS

Clostridium difficile, 迅速診断キット, toxin A, toxin B

はじめに

Clostridium difficile は抗菌薬関連腸炎 (antibiotic-associated colitis; AAC) や抗菌薬関連下痢症 (antibiotic-associated diarrhea; AAD) の主要な起因菌として知られ^{1,2)}, その病原性には本菌が産生する2種類の毒素 (toxin A, toxin B) が大きく関

与している³⁾。本菌は芽胞を形成することにより病院内環境では容易に生存することが可能である。そのため、*C. difficile* 感染症 (CDI) は抗菌薬使用とともに高齢者や基礎疾患を有する患者においては医療関連感染として重要視され、アウトブレイク等の問題になる事例が多い⁴⁻⁷⁾。

表 1 PCR 法による毒素遺伝子検査に使用したプライマー

| 検出遺伝子 | プライマー | Sequence(5'-3') |
|----------------------|---------|---------------------------------|
| <i>tcdA</i> 非反復配列 | NK3 | GGAAGAAAAGAAGCTTCTGGCTCACTCAGGT |
| | NK2 | CCCAATAGAAGATTCAATATTAAGCTT |
| <i>tcdA</i> 反復配列 | NK11 | TGATGCTAATAATGAATCTAAAATGGTAAC |
| | NK9 | CCACCAGCTGCAGCCATA |
| | NKV011 | TTTTGATCCTATAGAATCTAACTTAGTAAC |
| <i>tcdB</i> | NK105 | CACTTAGCTCTTTGATTGCTGCACCT |
| | NK104 | GTGTAGCAATGAAAGTCCAAGTTTACGC |
| <i>cdtB</i> | cdtBpos | CTTAATGCAAGTAAATACTGAG |
| | cdtBrev | AACGGATCTCTTGCTTCAGTC |

CDI の細菌学的診断では、分離培養、遺伝学的検査、細胞毒性試験および迅速診断検査があるが、日常検査としては糞便中の本菌毒素を検出する迅速診断キットを採用している施設が多く、近年各メーカーから本菌の毒素を検出する迅速診断キットが発売されている。今回、*C.difficile* の抗原であるグルタマートデヒドロゲナーゼ (GDH) と toxin A, toxin B を同時検出することが可能な迅速キットである C.DIFF QUIK CHEK コンプリート (アリーアメディカル; コンプリート) の有用性について、X/Pect トキシン A/B (関東化学; X/Pect) を対照に検討した。

【対象および方法】

1. 対象

当院検査部において 2007 年 8 月から 2010 年 10 月に糞便検体から分離され PCR 法による毒素遺伝子 (toxin A, toxin B および binary toxin) の検出を実施した *C. difficile* 67 株と、2010 年 4 月から 2011 年 10 月に CDI を疑い培養および TOX A/B QUIK CHEK 「ニッスイ」(日水製薬) を用いた迅速診断キットによる両検査が行われた糞便 45 検体を対象とした。

なお、PCR 法による toxin A, toxin B および binary toxin の各毒素遺伝子の検出は既報^{3, 8, 9)}に従い、toxin A 遺伝子 (*tcdA*) の非反復塩基配列 (NK3-NK2) と反復塩基配列 (NK11-NK9), toxin B 遺伝子 (*tcdB*) の非反復塩基配列 (NK105-NK104), および binary toxin 遺伝子 (*cdtA/cdtB*) の *cdtB*

の 4 種類について実施した。各プライマーは表 1 に示した通りである。

表 2 検討に用いた 3 種類の毒素産生パターン

| PCR法による毒素産生パターン | 菌株数 |
|--|-----|
| A ⁺ B ⁺ CDT ⁻ | n=2 |
| A ⁺ B ⁺ CDT ⁺ | n=2 |
| A ⁻ B ⁺ CDT ⁻ | n=2 |

A : toxin A , B : toxin B , CDT : binary toxin

2. 各迅速診断キットによる菌株からの毒素検出

対象菌株はブルセラ HK 寒天培地 (極東製薬) 上で、35°C, 嫌気条件下で 48 時間培養した後、培地に発育したコロニーのうち 2 コロニーを採取し、4ml のブレインハートインヒュージョンブイヨン培地 (栄研化学; BHI 培地) に接種し、35°C で 72 時間培養した。培養後の増菌した BHI 培地を糞便とみなし、コンプリートおよび X/Pect の各添付文書に従い毒素検出を実施した。また、毒素産生パターンの異なる計 6 株 (表 2) を用いて、前述と同様に BHI 培地による増菌培養後 24 時間から 72 時間までの 12 時間毎に毒素の検出状況を検討した。

3. 各迅速診断キットによる糞便からの毒素検出
糞便からの毒素検出は、コンプリートおよび X/Pect の各添付文書に従い実施した。

表3 臨床分離株からの毒素検出の比較

| | | PCR法による毒素産生パターン | | | 毒素産生小計 | 毒素非産生 | PCR法との一致率 (%) |
|--------|----|--|---|---|--------|-------|---------------|
| | | A ⁺ B ⁺ CDT ⁻ n=42 | A ⁻ B ⁺ CDT ⁺ n=2 | A ⁻ B ⁻ CDT ⁻ n=4 | | | |
| コンプリート | 陽性 | 42 | 2 | 4 | 48 | 0 | 100 |
| | 陰性 | 0 | 0 | 0 | 0 | 19 | |
| X/Pect | 陽性 | 42 | 2 | 1 | 45 | 0 | 93.8 |
| | 陰性 | 0 | 0 | 3 | 3 | 19 | |

A : toxin A, B: toxin B, CDT: binary toxin

表4 異なる毒素産生パターン菌株の培養時間による毒素検出状況

| PCR法による毒素産生パターン | 培養時間 | コンプリート | X/Pect |
|---|------|----------|----------|
| A ⁺ B ⁺ CDT ⁻ n=2 | 24時間 | +(薄いライン) | +(薄いライン) |
| | 36時間 | + | + |
| | 48時間 | + | + |
| | 60時間 | + | + |
| | 72時間 | + | + |
| A ⁺ B ⁺ CDT ⁺ n=2 | 24時間 | - | - |
| | 36時間 | +(薄いライン) | + |
| | 48時間 | + | + |
| | 60時間 | + | + |
| | 72時間 | + | + |
| A ⁻ B ⁻ CDT ⁻ n=2 | 24時間 | - | - |
| | 36時間 | +(薄いライン) | - |
| | 48時間 | + | - |
| | 60時間 | + | - |
| | 72時間 | + | - |

【結果】

1. 菌株からの毒素検出

C. difficile 67 株中 PCR 法により毒素遺伝子が確認された 48 株では、コンプリートは 48 株 (100%)、X/Pect は 45 株 (93.8%) が陽性となった。X/Pect では毒素産生パターン toxin A 非産生, toxin B 産生, および binary toxin 非産生 (A⁺B⁺CDT⁻) タイプの 4 株中 3 株が検出不能であった (表 3)。

BHI 培地での培養 24 時間後からの毒素検出状況の検討 (表 4) では、毒素産生パターン toxin A 産生, toxin B 産生, および binary toxin 非産生 (A⁺B⁺CDT⁻) タイプは両キットとも判定ラインが薄いものの 24 時間後から検出可能であった。毒素産生パターン toxin A 産生, toxin B 産生, および binary toxin 産生 (A⁺B⁺CDT⁺) タイプは両キットとも 24 時間後では検出できなかったが、36 時間後

から検出可能であった。また、毒素産生パターン A⁻B⁺CDT⁻ タイプは X/Pect では検出されず、コンプリートにおいては 36 時間後から検出可能であった。

2. 糞便検体からの毒素検出

糞便検体からの毒素検出の結果を表 5 に示した。45 検体中、培養検査により *C. difficile* が分離され PCR 法により毒素遺伝子が確認された toxin 陽性 29 検体 (迅速検査・培養検査ともに陽性 14 検体, 迅速検査陰性・培養検査陽性 15 検体) は、コンプリートでは 20 検体 (69.0%)、X/Pect では 16 検体 (55.2%) が陽性となった。その内訳は、両キットとも陽性となったのが 13 検体、コンプリートのみ陽性が 7 検体、X/Pect のみ陽性が 3 検体、両キットともに陰性が 6 検体であった。また、毒素遺伝子検査により toxin 陽性であっ

表5 糞便 45 検体からの毒素検出の比較

| | | Toxin 陽性 n=29 ^{*1} | | 迅速検査陰性・ 培養検査陰性 n=16 | 合計 | 陽性 一致率 (%) | 陰性 一致率 (%) |
|--------|----|-----------------------------|-----------------|---------------------------|----|------------------|------------------|
| | | 迅速・培養とも 陽性 n=14 | 培養のみ陽性 n=15 | | | | |
| コンプリート | 陽性 | 11 | 9 | 0 | 20 | 69.0 (20/29) | 100 (16/16) |
| | 陰性 | 3 ^{*2} | 6 ^{*2} | 16 ^{*3} | 25 | | |
| X/Pect | 陽性 | 10 | 6 | 0 | 16 | 55.2 (16/29) | 100 (16/16) |
| | 陰性 | 4 | 9 | 16 | 29 | | |

*1: Toxin 陽性29検体中、
両キットとも陽性 13 検体
コンプリートのみ陽性 7 検体
X/Pectのみ陽性 3 検体
両キットとも陰性 6 検体

*2: Toxin 陽性29検体中、コンプリートで陰性と
なった9検体ではGDHは陽性
*3: 迅速検査陰性・培養検査陰性16検体中、
コンプリート陰性となった16例では3例が
GDH陽性(A⁻B⁺CDT⁻)

た検体でコンプリートにおいて毒素陰性となった9検体（迅速検査・培養検査ともに陽性3検体，迅速検査陰性・培養検査陽性6検体）は，*C. difficile* の抗原であるGDHはすべて陽性であった。

迅速検査陰性・培養検査陰性16検体の検討において，コンプリートによる毒素はすべて陰性であった。そのうち3検体はGDH陽性であったが，PCR法による毒素遺伝子は確認されなかった。

【考察】

CDIの細菌学的診断としては，糞便中の*C. difficile*が産生する2種類の毒素（toxin A，toxin B）を検出することが重要である。2007年6月まではtoxin Bの検出ができないキットしか市販されておらず，同年7月からはtoxin Aとtoxin Bの両方を検出できるキットが数種類発売され，さらに2011年4月にはtoxin Aとtoxin BとGDH抗原を同時に検出可能なコンプリートが発売された。

今回，菌株からの毒素検出において，コンプリートでは毒素産生パターンにかかわらずすべて検出されており良い成績が得られた。一方，X/Pectでは毒素産生パターンA⁻B⁺CDT⁻で低い検出率となった。添付文書に記載されている毒素検出感度によると，toxin Aはコンプリートで0.63 ng/ml，X/Pectで0.6 ng/ml，

toxin Bはコンプリートで0.16 ng/ml，X/Pectで3.8 ng/mlとある。toxin Bに関して，X/Pectによる検出感度はコンプリートよりかなり劣るために，今回，毒素産生パターンA⁻B⁺CDT⁻において両キットでの大きな成績の違いになったと推測される。さらにこの感度の違いは，培養時間による毒素検出状況の検討においても影響を及ぼしていた。

近年，欧米を中心に強毒株としてアウトブレイク起こしているBI/NAP1/027型の*C. difficile*はbinary toxinが陽性である¹⁰⁾。検討菌株数としては少なかったが今回の検討菌株の中にbinary toxin陽性株が2株含まれており，両キットともtoxin Aとtoxin Bは検出されていた。今後はbinary toxin陽性株についてデータをさらに蓄積し，このタイプの菌が国内に拡散していった場合に備えることが必要と考える。

糞便検体からの毒素検出では，コンプリートはX/Pectより陽性一致率が約15ポイント高くなっていたが，PCR法により毒素遺伝子が確認された糞便検体でもコンプリートでは9検体（31%），X/Pectで13検体（45%）が毒素陰性を示し，迅速診断キットのみを使用して糞便検体からの毒素検出を行っている臨床の現場では，かなりの確率で本来のCDIを見落としている可能性が強く示唆された。加藤ら¹¹⁾も迅速診断キットの感度が充分でないため迅速診断キットのみではCDI

の診断としては不十分ではあると指摘している。澤辺ら¹²⁾、中川ら¹³⁾、蔵田ら¹⁴⁾も CDI の診断では迅速診断キットに併用して分離培養を行うことが望ましく、迅速診断キットの感度不足を補うことができるとしている。今回の検討で明らかにされたように菌株を用いた毒素検出では両キットとも高い感度があるため、培養により菌が分離されていれば CDI の診断をより確実にを行うことが可能となる。各社より市販されている数種類の迅速診断キットの中でコンプリートは、素毒検出の他に唯一 GDH の検出も同時にできるため、GDH 陽性・毒素陰性の場合に限って培養法を併用すれば、すべての検査に培養法を併用するよりも労力とコストの削減となり、さらに感度の高い CDI 診断に繋がることを期待される。

【結語】

コンプリートは X/Pect に比べ、糞便および毒素産生パターン A⁻B⁺CDT⁻ タイプを含めた菌株からの毒素検出に優れ、CDI の診断用キットとしての有用性が高いことが示唆された。CDI の細菌学的診断法として、迅速診断キットのみではなく分離培養も併用することにより検出率の向上に繋がることが期待される。

なお、本内容は第 61 回日本医学検査学会(2012 年 6 月：三重県津市)において発表した。

【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—。JARMAN 14:121-126,2003
- 2) Bartlett JG： Antibiotic-associated diarrhea. N Engl Med 346:334-339,2002
- 3) 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
- 4) Jonson, S., M.H.Samore, K.A.Farrow, et al.： Epidemics of diarrhea caused by a clindamycin-resistant strain of *Clostridium difficile* in four hospitals. N Engl Med 341:1645-1651,1999
- 5) Warny, M., J.Pepin, A.Fang, et al.： Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. Lancet 366:1079-1084,2005
- 6) Sawabe, E., H.Kato, K.Osawa, 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. J Clin Microbiol Infect 36:695-703,2007
- 7) 村端真由美, 加藤はる, 矢野久子 ほか： 長期入院がん患児における *C. difficile* 消化管保有と院内伝播に関する検討. 感染症誌 82:419-426,2008
- 8) Terhes G., Urban E., Soki J., et al.： Community-acquired *C. difficile* diarrhea caused by binary toxin, toxin A, and toxin B gene-positive isolates in Hungary. J Clin Microbiol 42:4316-4318, 2004
- 9) Stubbs S., Rupnik M., Gibert M., et al.： Production of actin-specific ADP-ribosyltransferase (binary toxin) by strains of *C. difficile*. FEMS microbiology letters 186:307-312,2000
- 10) Warny M., Pepin J., Fang A., et al.： Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. Lancet 366:1079-1084,2005
- 11) 加藤はる： *Clostridium difficile* 関連疾患について. *Clostridium difficile* 関連疾患(CDAD) vs ICT. 感染症 ICT ジャーナル 3:11-18,2008
- 12) 澤辺悦子, 北村優佳, 古畑紀子 ほか： *Clostridium difficile* 感染症の迅速診断における糞便中 *C. difficile* 抗原およびトキシン A/B 同時検出キット; C.DIFF QUIK CHEK COMPLETE の有用性に関する検討. 日本臨床微生物学雑誌 21:253-259,2011
- 13) 中川莉彩, 飯沼由嗣, 山本正樹 ほか： *Clostridium difficile* 迅速診断キットの評価と微生物学的検討. 感染症誌 84:147-152,2010
- 14) 蔵田訓, 大崎敬子, 田口晴彦 ほか： *Clostridium difficile* 迅速診断キットの基礎的評価. 臨床と微生物 37:465-470,2010