

[原 著]

Clostridium difficile 関連検査の臨床的有用性の検討丸山篤芳¹⁾・吉村 平²⁾・森下芳孝³⁾・登 勉⁴⁾¹⁾ 三重大学医学部附属病院 輸血部²⁾ 三重県立志摩病院 内科³⁾ 三重大学医学部附属病院 中央検査部⁴⁾ 三重大学医学部 臨床検査医学講座

(平成16年2月3日受付, 平成16年6月16日受理)

Clostridium difficile 毒素抗原検査の有用性を検討するため、糞便性状とトキシンA陽性率、便中白血球、および培養検査の関係を解析した。三重大学医学部附属病院において、1999年10月から2002年9月までの期間に*C. difficile* 毒素抗原検査目的で提出された糞便検体128件を対象とした。トキシンA陽性検体は下痢便検体43件のうち28件(65.1%)、固形便検体85件のうち17件(20.0%)であった。さらに、経日的に検体提出された症例を調べた結果、Vancomycin投与後の固形便からトキシンA陽性結果が7日以上持続した症例が30症例のうち11例(36.7%)に認められた。腸管粘膜傷害に伴い出現する便中白血球の有無を調べた結果、下痢便検体におけるトキシンA陽性28件のうち便中白血球陽性は24件(85.7%)、固形便検体におけるトキシンA陽性17件のうち便中白血球陽性は1件(5.9%)となり、臨床症状を伴わないトキシンA陽性結果を除外するために便中白血球を組み合わせることは有用と考えられた。今回、培養で確認された*C. difficile* 23株は全て毒素産生株であったが、糞便検体におけるトキシンAと便中白血球の検査結果がともに陰性であった症例が13例(56.5%)あった。培養検査は毒素産生株の保菌状態を検出することも多いと考えられる。

Key words: *Clostridium difficile*, トキシンA, 便中白血球, 毒素遺伝子

*Clostridium difficile*は長期入院患者における偽膜性腸炎や抗生物質随伴性下痢症(*C. difficile*-associated diarrhea; 以下, CDAD)等,*C. difficile* 関連性腸炎の原因菌として临床上重要である¹⁾。*C. difficile*はヒトの腸管内に保菌されている場合もあるが、腸内細菌等に比べると菌量も少なく健康人では病原性を発揮しえないと考えられている²⁾。しかし、毒素産生株が抗菌薬投与に伴う菌交代現象により過剰に増殖すると、病原性を発揮し腸炎を発症する³⁾。

現在,*C. difficile* 感染症診断のための臨床検査として嫌気培養や毒素抗原検出が実施されているが、検査結果と臨床症状が食い違う症例が認められる。特に毒素抗原検査が陽性であり、臨床症状を示さない症例を

経験することが多い。従って、提出検体で毒素抗原検査が陽性となった場合、その結果が临床上重要であるか否かを適切に判断することが必要となる。そこで今回、毒素抗原検査が陽性であった場合に临床上の重要度を測る指標として、腸管粘膜傷害に伴い出現する便中白血球に注目し、その有用性を検討するため提出検体の性状とトキシンA陽性率、および便中白血球の関係を解析した。加えて、*C. difficile* 培養菌株の毒素抗原と毒素遺伝子を確認し、培養検査の意義を再考した。

I. 材料と方法

1. 対象検体と検体性状の定義

1999年10月から2002年9月までの期間に、三重大学医学部附属病院中央検査部に抗菌薬関連腸炎を疑い*C. difficile* 毒素抗原検査目的で提出された糞便検体のうち、重複症例を除いた128件を対象とし、検体性状、トキシンA、便中白血球を調べた。さらに、初回検体

著者連絡先：(〒514-8507) 三重県津市江戸橋2丁目174番地
三重大学医学部附属病院中央検査部 丸山篤芳
TEL 059-232-1111(代表) FAX 059-231-5252
E-mail marutoku@clin.medic.mie-u.ac.jp

提出時に糞便検体からのトキシンAが陽性を示した後、経日的に検体提出され、Vancomycin (VCM) の投与が確認された30症例について、トキシンAの結果が陰性化するのに要した日数を追跡調査した。

糞便検体の性状は固形便、軟便、水様便に分類した。CDADを発症していても典型的な水様便を呈さない症例も存在するため、検査結果と検体性状の比較には水様便と軟便を合わせて下痢便と定義した。

2. トキシンA, 便中白血球の検出

C. difficile が産生するトキシンAは、イムノクロマト法を測定原理としたユニクイック (関東化学) を用いて検出した。ユニクイックは糞便検体からトキシンAを高感度に検出することが可能である⁴⁾。便中白血球は糞便検体より直ちに塗抹標本を作製後、グラム染色後に顕微鏡下にて観察した。

3. 培養菌株の検討

糞便検体128件のうち*C. difficile* 検出を目的とした63件について嫌気培養を実施した。*C. difficile* の嫌気培養検査は、糞便検体を90%エタノールで等量混合し、15分室温放置後、嫌気状態に還元されたCCFA agar (日本バクテンディッキンソン) を用い嫌気的条件下で48時間培養した。続いて、偏性嫌気性の確認のために、蛍光黄色ラフ形コロニーを好気および嫌気的条件下で純培養した。嫌気培養のみで発育した純培養株を対象にVitek ANIカード (日本ビオメリュー) で菌種を同定した。次に、同定された菌株について毒素遺伝子とトキシンAを確認した。分離菌毒素遺伝子の検出はKatoらが報告している方法^{5,6)} に準拠した。すなわち、*C. difficile* のコロニーをTE buffer 100 μ lに懸濁し、95 $^{\circ}$ Cで10分間加熱後、15,000回転2分間遠心分離した上清を遺伝子検出のための試料とした。PCRにはGene Amp2400 (PERKIN ELMER) を使用した。反応液50 μ l中には1 μ lのDNA抽出液、1.25UのAmpliTaq Gold DNA Polymerase (アプライドバイオシステムズ)、10pmol/lのprimer NK9 (5'-CCA CCA GCT GCA GCC ATA-3')とprimer NK11 (5'-TGA TGC TAA TAA TGA ATC TAA AAT GGT AAC-3')、5 μ lの $\times 10$ AmpliTaq Gold buffer、200 μ Mの $\times 10$ d NTPが含まれる。PCR条件は95 $^{\circ}$ C 10分の後、94 $^{\circ}$ C 20秒、62 $^{\circ}$ C 120秒を35サイクル、最後に74 $^{\circ}$ C 5分にて行った。エチジウムブロマイド添加2%アガロースゲルにて電気泳動後、紫外線照射下でPCR産物の有無を確認した。なお、今回使用したprimerはトキシンAとトキシンBの両遺伝子の有無の確認が可能である。同定株のトキシンA産生の確認は、チオグリコレート液体培地 (栄研化学) で48

時間嫌気培養した培養菌液1 mlを15,000回転3分間遠心分離し、上清を試料としてユニクイックで検討した。

II. 結果

1. 検体性状とトキシンA, 便中白血球の関係

糞便検体128件の検体性状とトキシンAを比較した結果、下痢便検体43件のうち28件 (65.1%) でトキシンAが陽性であり、固形便検体85件のうち17件 (20.0%) でトキシンAが陽性であった。次に、糞便検体128件の検体性状と便中白血球を調べた結果、下痢便検体43件のうち28件 (65.1%) で便中白血球を認め、固形便検体85件のうち6件 (7.1%) で便中白血球を認めた。トキシンAと便中白血球の検体陽性率を下痢便検体と固形便検体について比較した結果、下痢便検体では陽性率に有意差を認めなかったが、固形便検体ではトキシンA陽性率と便中白血球陽性率の間に有意差を認めた ($p < 0.01$)。

さらに、糞便検体128件の検体性状とトキシンAの結果別にみた便中白血球の有無を調べた。結果、下痢便検体におけるトキシンA陽性28件のうち便中白血

Table 1 Results of specimen attribute and *C. difficile* toxin A and fecal leukocytes in 128 stool samples

Specimen attribute	<i>C. difficile</i> toxin A	Fecal leukocytes
Diarrhetic 43	Positive 28/43 (65.1)	Positive 24/28 (85.7)
		Negative 4/28 (14.3)
	Negative 15/43 (34.9)	Positive 4/15 (26.7)
		Negative 11/15 (73.3)
Formed 85	Positive 17/85 (20.0)	Positive 1/17 (5.9)
		Negative 16/17 (94.1)
	Negative 68/85 (80.0)	Positive 5/68 (7.4)
		Negative 63/68 (92.6)
		(%)

Table 2 The persistent duration of positive *C. difficile* toxin A following vancomycin treatment

The days following VCM	No. of toxin A positive cases
< 7days	19(63.3)
\geq 7days	11(36.7)
	(%)

球陽性は24件(85.7%)、便中白血球陰性は4件(14.3%)であり、トキシンA陰性15件のうち便中白血球陽性は4件(26.7%)、便中白血球陰性は11件(73.3%)であった。固形便検体におけるトキシンA陽性17件のうち便中白血球陽性は1件(5.9%)、便中白血球陰性は16件(94.1%)であり、トキシンA陰性68件のうち便中白血球陽性は5件(7.4%)、便中白血球陰性は63件(92.6%)であった(Table 1)。

VCMの投与が確認された30症例中19例(63.3%)では、VCM投与後7日未満でトキシンAが陰性化した。しかし、11例(36.7%)ではVCM投与後7日以上経過してもトキシンAは陽性であった(Table 2)。トキシンAが陰性化した時点の糞便性状は全例で改善しており、便中白血球は確認されなかった。

2. 糞便性状とトキシンA, *C. difficile* 嫌気培養の関係

嫌気培養を実施した63件のうち23件(36.5%)で*C. difficile* が分離・同定された。嫌気培養を実施した63件のうち下痢便検体は21件あったが、これらの下痢便においてトキシンAが陽性を示した10件全てで

Table 3 Results of specimen attribute and *C. difficile* toxin A and anaerobic culture for *C. difficile* detection in 63 stool samples

Specimen attribute	<i>C. difficile</i> toxin A	anaerobic culture for <i>C. difficile</i> detection
Diarrhetic 21	Positive 10/21 (47.6)	Positive 10/10 (100) Negative 0/10 (0)
	Negative 11/21 (52.4)	Positive 6/11 (54.5) Negative 5/11 (45.5)
Formed 42	Positive 7/42 (16.7)	Positive 0/7 (0) Negative 7/7 (100)
	Negative 35/42 (83.3)	Positive 7/35 (20.0) Negative 28/35 (80.0)

(%)

Table 4 Comparison of specimen attribute and microbiological results on 23 stool samples and their clinical isolates

Strain No.	Specimen attribute	Stool samples		Clinical isolates	
		<i>C. difficile</i> toxin A	Fecal leukocytes	<i>C. difficile</i> toxin A	Toxin A, B gene
1	Formed	-	-	+	+
2	Formed	-	-	+	+
3	Formed	-	-	+	+
4	Formed	-	-	+	+
5	Formed	-	-	+	+
6	Formed	-	-	+	+
7	Formed	-	-	+	+
8	Semiformed	-	-	+	+
9	Semiformed	-	-	+	+
10	Semiformed	-	-	+	+
11	Semiformed	-	-	+	+
12	Semiformed	-	-	+	+
13	Semiformed	-	-	+	+
14	Semiformed	+	-	+	+
15	Semiformed	+	-	+	+
16	Semiformed	+	-	+	+
17	Semiformed	+	+	+	+
18	Watery	+	+	+	+
19	Watery	+	+	+	+
20	Watery	+	+	+	+
21	Watery	+	+	+	+
22	Watery	+	+	+	+
23	Watery	+	+	+	+

C. difficile が培養された。また、下痢便においてトキシシン A が陰性を示した 11 件のうち培養陽性は 6 件 (54.5%)、培養陰性は 5 件 (45.5%) であった。固形便検体 42 件においてはトキシシン A が陽性を示した 7 件全てで *C. difficile* が培養されず、トキシシン A 陰性 35 件のうち培養陽性は 7 件 (20.0%)、培養陰性は 28 件 (80.0%) であった (Table 3)。

3. 培養菌株のトキシシン A と毒素遺伝子の有無

嫌気培養で検出された *C. difficile* 23 株のトキシシン A と毒素遺伝子の検出結果と、糞便検体でのトキシシン A と便中白血球の検査結果を Table 4 に示した。全ての培養菌株でトキシシン A 産生、トキシシン A、B 両遺伝子が確認された。しかし、23 株のうち糞便検体でのトキシシン A と便中白血球がともに陰性を示した検体が 13 件 (56.5%) あった。これら 13 件の性状は固形便が 7 件 (53.8%)、軟便が 6 件 (46.2%) であり、水様便を呈した検体はなかった。糞便検体でのトキシシン A と便中白血球がともに陽性を示した検体は 7 件 (30.4%) あった。これら 7 件の性状は水様便が 6 件 (85.7%)、軟便が 1 件 (14.3%) であり、固形便を呈した検体はなかった。糞便検体からの直接検査でトキシシン A 陽性、便中白血球陰性を示した検体は 3 件 (13.0%) で認められ、検体性状は全て軟便であった。

III. 考 察

現在、臨床検査室で実施されている CDAD 診断のための臨床検査は、主に糞便検体からの嫌気培養とトキシシン A 検査である。しかし、嫌気培養検査は 48 時間以上の長時間を要するため迅速診断に役立つとは言い難い。また、偽膜性腸炎の診断には内視鏡下で偽膜を確認することが重要であるが、症例の 90% 前後において *C. difficile* が検出されるため⁷⁾、内視鏡検査に替わる検査として、糞便検体を用いて短時間で結果が得られるトキシシン A 検査の診断的意義は高いと考えられる。

今回の検討結果で示したように、固形便でトキシシン A が陽性を示す検体や VCM 治療後もトキシシン A の陽性結果が持続する症例が存在し、トキシシン A の検査結果判定のみでは診断や治療効果の判定が困難な例も少なくない。VCM 治療後、症状が軽快している症例でトキシシン A が検出される理由として、ユニクイックのトキシシン A 検出感度が 1.4ng/ml と高いことや、固形便は水分含有率が低く毒素が濃縮されていることが考えられるが、下痢症とは言い難い固形便において陽性結果を呈する検体はトキシシン A が検出されていても診断上の有意性には疑問がある。トキシシン A に

便中白血球の検査を組み合わせることで、固形便での臨床的有意性を推測することができ、臨床症状を伴わないトキシシン A 陽性例を除外できる。

便中白血球を確認することでトキシシン A の検出に加え、腸管粘膜破壊を伴っている病態を把握できる。毒素抗原検査の頻回実施の有効性は認められていないが⁸⁾、CDAD の治療開始後もトキシシン A 陽性の持続する症例では、便中白血球の陰性化を治療効果判定に用いることが可能と考えられる。ただし、便中白血球の形態は時間が経過するにつれ確認し難くなる。今回、便中白血球を確認するための塗抹標本は検体提出後直ちに作成したが、検体採取後の経過時間は不明である。トキシシン A が陽性であった下痢便検体 28 件のうち、便中白血球を認めなかった 4 件 (14.3%) では時間の経過に伴い便中白血球が確認されなかった可能性もあるため、検体採取後直ちに塗抹標本を作成することに注意を払わなければならない。一方、糞便の軟便化が CDAD 発症の危険因子であるとの報告もあるため⁹⁾、軟便検体でトキシシン A 陽性、便中白血球陰性を示す症例では経過観察が重要と考えられる。

毒素産生株が産生する毒素にはトキシシン A とトキシシン B があり¹⁰⁾、通常は両方の毒素を産生すると考えられている。しかしながら、トキシシン A 陰性、トキシシン B 陽性株も少なからず報告されている⁶⁾。今回、培養検査で分離された菌株は全てトキシシン A、B 両遺伝子保有株であったが、下痢の症状があるにもかかわらずトキシシン A 陰性を示し、潰瘍性大腸炎など他の腸炎が考えられない場合は、トキシシン A 陰性、トキシシン B 陽性株の腸炎への関与も考慮する必要がある。しかしながら、トキシシン B を検出できる簡易キットは国内では市販されていないため、検査を実施できない施設が多いと考えられる。

今回、嫌気培養された *C. difficile* 23 株は全て毒素産生株であり、これら 23 株のうち 13 株 (56.5%) が分離された症例では検体からのトキシシン A、便中白血球がともに陰性であり、13 株のうち半数以上の 7 件は固形便であった。推測の域を出ないが、これら糞便中からトキシシン A や白血球が検出されず、培養検査で毒素産生株が検出される症例は、腸炎を伴わない検体からの分離であるため、存在しても菌量が少ないか毒素を活発に産生していない状態の *C. difficile* 毒素産生株を保菌している状態にあるとも考えられる。このように、培養結果のみで検出菌の起炎性は判断できない症例も存在する。また、水様便を呈した 6 例全てで検体からのトキシシン A、便中白血球がともに陽性であったため、培養結果を確認するまでもなく CDAD の判定が可能

であった。培養検査は確定診断の材料や *C. difficile* の保菌者調査、院内感染の調査などの疫学的研究に用いるには有用であるが、迅速診断においての有用性は高くないと考えられる。

C. difficile の毒素抗原検査が普及するにつれ、腸炎の症状が存在しないにもかかわらず毒素抗原陽性を示す症例を CDAD と診断する危険性がある。また、培養検査で陽性となっても無症候性であれば *C. difficile* の排菌は治療の対象とするべきではない¹¹⁾ が、現状では、すべての担当医がこの点を理解しているとはいえず、これらの検査の陽性結果だけでは、臨床症状を伴わない症例に対して VCM の過剰投与を招く恐れもある。

臨床検査室において糞便検体のグラム染色は実施されることは少ないが、CDAD 迅速診断において毒素抗原検査と便中白血球検査を組み合わせることで臨床的有用性が向上すると考えられる。

(Editor: 岐阜大学生命科学総合実験センター嫌気性菌分野 渡邊邦友)

文 献

- 1) Johnson S, Gerding DN. 1998. *Clostridium difficile*-associated diarrhea. Clin. Infect. Dis. 26: 1027-1034.
- 2) 木下博明, 東野正幸. 1991. 偽膜性腸炎の疫学. 外科. 53:1488-1492.
- 3) 神谷 茂. 1994. *Clostridium difficile* の毒素産生機構に関する研究. 日本細菌学雑誌. 49:375-383.
- 4) 近藤 啓, 村上千恵, 小川真美, 他. 2000. クロストリジウムトキシン A 検出キット「ユニクイック」の有用性に関する検討. 臨床検査機器・試薬. 23:479-482.
- 5) Kato N, Ou CY, Kato H, et al. 1991. Identification of toxigenic *Clostridium difficile* by the polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 29:33-37.
- 6) Kato H, Kato N, Watanabe K, et al. 1998. Identification of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* by PCR. J. Clin. Microbiol. 36:2178-2182.
- 7) Nakamura S, Mikawa M, Nakashio S, et al. 1981. Isolation of *Clostridium difficile* from the feces and the antibody in sera of young and elderly adults. Microbiol. Immunol. 25: 345-351.
- 8) Renshaw AA, Stelling JM, Doolittle MH. 1996. The lack of value of repeated *Clostridium difficile* cytotoxicity assays. Arch. Pathol. Lab. Med. 120: 49-52.
- 9) Manabe YC, Vinetz JM, Moore RD, et al. 1995. *Clostridium difficile* colitis: an efficient clinical approach to diagnosis. Ann. Intern. Med. 123: 835-840.
- 10) Lyerly DM, Krivan HC, Wilkins TD. 1988. *Clostridium difficile*: its disease and toxins. Clin. Microbiol. Rev. 1:1-18.
- 11) Johnson S, Homann SR, Bettin KM, et al. 1992. Treatment of asymptomatic *Clostridium difficile* carriers (fecal excretors) with vancomycin or metronidazole. A randomized, placebo-controlled trial. Ann. Intern. Med. 117:297- 302.

Evaluation of *Clostridium difficile*-related diagnostic tests

Tokuyoshi Maruyama¹⁾, Hitoshi Yoshimura²⁾, Yoshitaka Morishita³⁾, Tsutomu Nobori⁴⁾

¹⁾ Division of Blood Transfusion, Mie University Hospital

²⁾ Department of Internal Medicine, Mie Prefectural Shima Hospital

³⁾ Central Clinical Laboratories, Mie University Hospital

⁴⁾ Department of Laboratory Medicine, Mie University School of Medicine

Patients positive for *Clostridium difficile* toxin A can be asymptomatic. In this study, we evaluated the clinical usefulness of *C. difficile*-related diagnostic tests in 128 clinical stool specimens. Out of 85 formed stools, 17 (20.0%) were positive for toxin A. Among 30 cases that were serially tested for toxin A, 11 (36.7%) were positive for toxin A for more than 7 days following vancomycin treatment. Fecal leukocytes were present in 24 (85.7%) of 28 toxin-A-positive diarrhetic stools, and in 1 (5.9%) of 17 toxin-A-positive formed stools. All 23 clinical isolates cultured from stools presenting various specimen attributes tested positive in assays for the toxin A antigen and gene. However, both toxin A and fecal leukocytes were absent in 13 (56.5%) of 23 stool specimens. Seven (53.8%) of these 13 stools were formed in specimen attribute. Detection of fecal leukocytes may be clinically useful in avoiding false-positive toxin A results. A culture test was found to be useful in the detection of asymptomatic carriers.