

[治 験]

糞便中 *Clostridium difficile* Toxin A および Toxin B 同時検出試薬の
有用性に関する比較検討上田安希子¹⁾・豊川真弘¹⁾・西 功¹⁾・砂田淳子¹⁾・坂田友美¹⁾
木村圭吾¹⁾・井上依子¹⁾・浅利誠志²⁾¹⁾ 大阪大学医学部附属病院臨床検査部²⁾ 大阪大学医学部附属病院感染制御部

(平成 22 年 8 月 13 日受付, 平成 23 年 1 月 21 日受理)

糞便中 *Clostridium difficile* Toxin A および Toxin B 同時検出試薬であるイムノカード CD トキシン A & B (ImmunoCard) と TOX A/B QUIK CHEK 「ニッスイ」(QUIK CHEK) の *C. difficile* 関連下痢症 (*C. difficile*-associated diarrhea; CDAD) の迅速診断における有用性を比較検討した。CDAD の標準的診断検査法である細胞毒性試験を対照とした場合の ImmunoCard の sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value はそれぞれ 85.2%, 93.2%, 82.1%, 94.4% (有病率 27%), 一方, QUIK CHEK は 74.1%, 93.2%, 80.0%, 90.7% であり, ImmunoCard は QUIK CHEK よりも約 10% sensitivity が優れていた。このような検出感度差は毒素産生株の培養上清および新鮮糞便検体を用いた希釈感度試験においても認められ, ImmunoCard は QUIK CHEK よりも 2~8 倍検出感度が優れていた。一方, ImmunoCard では滴下試料の吸収不良を引き起こす検体が 38 検体 (38%) 認められ, そのうち 2 検体は吸収不良に起因する検出感度の低下 (偽陰性) をきたしていた。これら偽陰性については試料滴下直前の遠心分離操作を加えることにより改善可能であったことから, ImmunoCard では遠心分離操作の追加により, よりいっそうの感度向上が可能と思われた。さらに, ImmunoCard および QUIK CHEK では非特異反応に起因する偽陽性が少なからず認められ, 有病率 10% の場合の PPV は 58.0% および 54.6% まで低下した。このような偽陽性検体は全例がグルタマートデヒドロゲナーゼ (GDH) 検査陰性であったことから, ImmunoCard と GDH 検査を組み合わせた 2 step approach 法は検査精度 (PPV) の向上に極めて有用と考えられた。

Key words: ImmunoCard Toxins A & B, TOX A/B QUIK CHEK, *Clostridium difficile* toxin, cytotoxicity assay, *C. difficile* culture

序 文

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) の主要な原因菌であり, 病院内における AAC 症例の 50~70%, AAD 症例の 12~25% に *C. difficile* が関与すると考えられている¹⁾。 *C. difficile* は芽胞を形成することに

より病院内環境で容易に生き残り, しばしば深刻な院内感染を引き起こすことから²⁾, *C. difficile* 関連下痢症 (*C. difficile*-associated diarrhea; CDAD) の正確な診断ならびにそれに基づく的確な感染予防対策が極めて重要である。

C. difficile の病原性は, 本菌が産生する 2 種類の毒素 (Toxin A; 腸管毒素, Toxin B; 細胞毒素) が大きな役割を果たしている。現在, *C. difficile* は毒素産生性により, Toxin A および Toxin B の両毒素を産生する菌株 (A^+B^+), Toxin B は産生するが Toxin A は産生しない変異株 (A^-B^+) および両毒素とも産生しない非病原性株 (A^-B^- 株) の 3 パターンに分類される。従来, A^-B^+ 株はヒト消化管における病原性が明

著者連絡先: (〒565-0871) 吹田市山田丘 2-15
大阪大学医学部附属病院臨床検査部
上田安希子
TEL: 06-6879-6680
FAX: 06-6879-6683

らかではなかったが、A⁻B⁺株による偽膜性大腸炎の症例報告³⁾を皮切りに、世界各地で臨床分離報告^{4~6)}がなされ、現在ではA⁺B⁺株と同様に下痢症/腸炎を引き起こすと考えられている。A⁻B⁺株の分離頻度は、国内では6.8~39%程度と報告^{7~9)}されており、院内集団発生の報告⁹⁾も見られる。

CDADの細菌学的診断には糞便中に存在する*C. difficile* Toxin A および Toxin B の検出が有用¹⁰⁾であるが、これまで日本国内ではToxin B 検出法が利用できなかったことから、検出感度に問題¹¹⁾のある糞便中Toxin A 検出試薬が主に用いられてきた。また、近年A⁻B⁺株が出現し重要視されていることより糞便中のToxin B の検出が可能な検査試薬の開発・導入が切望されていた。この要求に対応し2007年6月、わが国においても糞便中Toxin A および Toxin B 同時検出試薬であるTOX A/B QUIK CHEK「ニッスイ」(QUIK CHEK, 日水製薬)が利用可能となり、さらに2009年にはイムノカードCDトキシンA & B (ImmunoCard, テイエフビー)も利用可能となったことから、CDADの細菌学的迅速検査の選択肢が広がった。

今回筆者らは、糞便中*C. difficile* Toxin A および Toxin B 同時検出試薬であるImmunoCardとQUIK CHEKの有用性評価を目的に、標準法である細胞毒性試験ならびに分離培養法を対照に両試薬の比較検討を行った。また、毒素産生株の培養上清および新鮮糞便検体を用いた希釈感度試験も併せて実施した。

対象および方法

1. 対象

2007年1月から2009年8月の間に、当検査室に*C. difficile* 検査を目的に提出された糞便694検体の中で、C.D.チェック・D-1法(塩野義製薬)、ユニクイック法(関東化学)、ImmunoCard法(テイエフビー)ならびに分離培養法の4法中少なくとも1法が陽性を示した57検体と、これら4法すべてが陰性を示した637検体から無作為抽出した43検体の合計100検体(患者総数97名、年齢10カ月~93歳、平均55.9歳)を対象とした。これらの検体はいずれも検体提出日に-80℃にて凍結保存し、使用直前に室温にて融解後、toxin 検出試薬の検討ならびに細胞毒性試験に供した。

2. 糞便中*C. difficile* toxin の検出

糞便中*C. difficile* Toxin A および Toxin B 検出試薬はImmunoCard および QUIK CHEK を使用し、いずれも添付文書に記載されている方法に従い実施し

た。

3. 細胞毒性試験による糞便中*C. difficile* Toxin B の検出

細胞毒性試験に用いるtoxin 抽出液は以下の方法¹²⁾に準じて調製した。すなわち、糞便検体1容に2%ウシ胎児血清添加L-グルタミン含有Eagle's minimum essential medium (EMEM, Gibco)を4容加えよく混和し、その後10,000×g, 2分間遠心した上清を孔径0.45 μm のシリンジフィルター(Millipore)でろ過しtoxin 抽出液とした。

細胞毒性試験は加藤らの方法¹²⁾に準じVero細胞(American Type Culture Collection CCL-81, 大日本製薬)とToxin B 中和抗体(*C. difficile* toxin anti-toxin kit, Techlab)を用いて行った。すなわち、toxin 抽出液に等量のEMEMを添加後、この液を2分割し、一方にToxin B 中和抗体(25倍希釈使用液)を添加後、中和抗体処理検体と未処理検体を作製し、それぞれ37℃で30分間反応させた。反応後、各検体40 μl を96穴マイクロプレートに接種した培養細胞液160 μl に添加し、37℃, 5%炭酸ガス存在下で培養した(最終糞便希釈率: 100倍)。細胞変性効果は24時間および48時間後に観察し、50%以上の細胞変性効果が認められかつ中和抗体により完全に中和された検体をToxin B 陽性と判定した。

4. 糞便からの*C. difficile* 分離・同定および分離菌株の毒素産生遺伝子の確認

糞便検体に99%エタノールを等量混合し、室温にて30分~1時間放置した後、cycloserine-cefoxitin-mannitol agar (CCMA, 極東製薬)に100 μl 接種し嫌気条件下で48時間培養した。CCMA上の典型的な性状のコロニーに対しグラム染色性を確認し、必要に応じてC.D.チェック・D-1を実施して菌種の同定を行った。分離菌株の毒素産生遺伝子の確認は、加藤らの方法^{13, 14)}に準じPCR法による毒素遺伝子検出にて確認した。すなわち、Toxin A 遺伝子の検出はNK9-NK11-NKV011のプライマーセットを用いたマルチプレックスPCR法(*tcdA*-PCR)¹³⁾を実施し、Toxin B 遺伝子の検出はNK104-NK105のプライマーセットを用いたPCR法(*tcdB*-PCR)¹⁴⁾を実施した。*tcdA*-PCRにて1,266 bpの増幅産物が得られ、かつ*tcdB*-PCRにて204 bpの増幅産物が得られた菌株をA⁺B⁺, *tcdA*-PCRにて714 bpの増幅産物が得られ、かつ*tcdB*-PCRにて204 bpの増幅産物が得られた菌株をA⁻B⁺, *tcdA*-および*tcdB*-PCRともに増幅産物が得られなかった菌株をA⁻B⁻と同定した。

5. 毒素産生株の培養上清および新鮮糞便検体を用いた希釈感度試験

希釈感度試験に用いる培養上清は、毒素産生株 (A^+B^+ 株, A^-B^+ 株) をそれぞれブレインハートインフュージョンブロス (BHI, Becton Dickinson and Company) で 72 時間培養後, 3,000 rpm, 15 分間遠心し, その上清を孔径 $0.45 \mu\text{m}$ のシリンジフィルター (Millipore) でろ過して作製した。この培養上清を滅菌 phosphate-buffered saline (PBS, 日水製薬) 溶液にて 2 段階希釈し, これら 2 倍希釈系列を検体として ImmunoCard, QUIK CHEK ならびに細胞毒性試験を実施した。新鮮糞便検体用いた希釈感度試験では, ImmunoCard で陽性となった糞便 1 検体 (A^+B^+ 株) を用い, 検体提出日当日に滅菌 PBS 溶液にてあらかじめ 10 倍希釈後さらに 2 段階希釈し, その 2 倍希釈系列を検体として ImmunoCard, QUIK CHEK ならびに細胞毒性試験を実施した。

6. 有意差検定

すべての有意差検定は統計用ソフト (StatFlex version 4.2, アーテック) を使用し, χ^2 独立性の検定あるいは Yates' 補正 (10 未満のデータが存在する場合) により実施した。また p 値が 0.05 以下を有意と判定した。

結 果

1. 糞便中 Toxin A および Toxin B 検出試薬の比較成績

Table 1 に細胞毒性試験を対照とした場合の ImmunoCard および QUIK CHEK の比較成績を示した。細胞毒性試験にて陽性となった 27 検体のうち ImmunoCard 陽性は 23 検体, QUIK CHEK 陽性は 20 検体であった。細胞毒性試験にて陰性となった 73 検体のうち ImmunoCard 陰性は 68 検体, QUIK CHEK 陰性も 68 検体であり, 細胞毒性試験を対照とした場合の sensitivity, specificity, positive predic-

Table 1. Comparison of ImmunoCard Toxins A & B and TOX A/B QUIK CHEK Test Results with Cytotoxicity Assay

Assay kit		Cytotoxicity assay		Sensitivity (%)	Specificity (%)	Positive predictive value (%)	Negative predictive value (%)
		Positive	Negative				
ImmunoCard Toxins A & B	Positive	23	5	85.2*	93.2*	82.1*	94.4*
	Negative	4	68				
TOX A/B QUIK CHEK	Positive	20	5	74.1	93.2	80.0	90.7
	Negative	7	68				

* Not significant

Table 2. Comparison of ImmunoCard Toxins A & B and TOX A/B QUIK CHEK test results with toxigenic culture

Assay		Toxigenic culture		Sensitivity (%)	Specificity (%)	Positive predictive value (%)	Negative predictive value (%)
		Positive	Negative				
ImmunoCard Toxins A & B	Positive	23	5	69.7*	92.5*	82.1*	86.1*
	Negative	10	62				
TOX A/B QUIK CHEK	Positive	20	5	60.6	92.5	80.0	82.7
	Negative	13	62				
Cytotoxicity assay	Positive	26	1	78.8	98.5	96.3	90.4
	Negative	7	66				

* Not significant vs. TOX A/B QUIK CHEK

tive value (PPV), negative predictive value (NPV) は, ImmunoCard が 85.2%, 93.2%, 82.1%, 94.4%, QUIK CHEK が 74.1%, 93.2%, 80.0%, 90.7% であった。Table 2 に分離培養法を対照とした場合の ImmunoCard, QUIK CHEK ならびに細胞毒性試験の比較成績を示した。分離培養法にて毒素産生株 (A^+B^+ , A^-B^+) が検出された 33 検体のうち ImmunoCard 陽性は 23 検体, QUIK CHEK 陽性は 20 検体, 細胞毒性試験陽性は 26 検体であった。分離培養法にて *C. difficile* 陰性あるいは毒素非産生株 (A^-B^-) が検出された 67 検体のうち ImmunoCard 陰性は 62 検体, QUIK CHEK 陰性は 62 検体, 細胞毒性試験陰性は 66 検体であり, 分離培養法を対照とした場合の sensitivity, specificity, PPV, NPV は, ImmunoCard が 69.7%, 92.5%, 82.1%, 86.1%, QUIK CHEK が 60.6%, 92.5%, 80.0%, 82.7%, 細胞毒性試験が 78.8%, 98.5%, 96.3%, 90.4% であった。また, 細胞毒性試験にて陽性となった 27 検体のうち, 分離培養法にて A^+B^+ が検出された 22 検体における sensitivity は ImmunoCard が 90.9%, QUIK CHEK が 77.3% であり, A^-B^+ が検出された 4 検体における sensitivity は ImmunoCard が 50.0%, QUIK

CHEK が 75.0% であった。

2. 毒素産生株の培養上清および新鮮糞便検体を用いた希釈感度試験成績

Table 3 に毒素産生株の培養上清および新鮮糞便検体を用いた細胞毒性試験, ImmunoCard ならびに QUIK CHEK の希釈感度試験成績を示した。 A^+B^+ 株の培養上清を用いた場合, 細胞毒性試験は 128 倍希釈, ImmunoCard は 64 倍希釈, QUIK CHEK は 8 倍希釈まで検出可能であった。 A^-B^+ 株の培養上清を用いた場合は, 細胞毒性試験は 64 倍希釈, ImmunoCard は 8 倍希釈まで検出可能であり, QUIK CHEK は原液のみ検出可能であった。一方, 新鮮糞便検体の希釈系列では, 細胞毒性試験は 160 倍希釈, ImmunoCard は 40 倍希釈, QUIK CHEK は 20 倍希釈まで検出可能であった。

3. 乖離データの解析

Table 4 に細胞毒性試験, 分離培養法, ImmunoCard ならびに QUIK CHEK の 4 法の結果に乖離が認められた検体の内訳を示した。Type 1~3 は細胞毒性試験陽性かつ分離培養法にて毒素産生株が検出された検体である。このうち Type 1 は ImmunoCard 陽性, QUIK CHEK 陰性の 3 検体 (いずれも A^+B^+ 株),

Table 3. Limit of detect by cytotoxicity assay, ImmunoCard Toxins A & B and TOX A/B QUIK CHEK with toxin extracts and stool sample

Sample	Dilution ratio	Cytotoxicity assay	ImmunoCard Toxins A & B	TOX A/B QUIK CHEK
Toxin extracts of A^+B^+ strain	1/8	+	+	+
	1/16	+	+	-
	1/32	+	+	-
	1/64	+	+	-
	1/128	+	-	-
	1/256	-	-	-
Toxin extracts of A^-B^+ strain	1/1	+	+	+
	1/2	+	+	-
	1/4	+	+	-
	1/8	+	+	-
	1/16	+	-	-
	1/32	+	-	-
	1/64	+	-	-
	1/128	-	-	-
Stool sample*	1/10	+	+	+
	1/20	+	+	+
	1/40	+	+	-
	1/80	+	-	-
	1/160	+	-	-
	1/320	-	-	-

* Fresh stool sample detected A^+B^+ strain

Type 2 は ImmunoCard 陰性, QUIK CHEK 陽性の 1 検体 (A^-B^+ 株), Type 3 は ImmunoCard と QUIK CHEK がともに陰性の 3 検体 (A^+B^+ 2 株, A^-B^+ 1 株) であった。Type 4 は細胞毒性試験は陽性であるが分離培養法にて毒素産生株が検出されなかった 1 検体であり, ImmunoCard 陽性, QUIK CHEK 陰性であった。Type 5, 6 は細胞毒性試験陰性で分離培養法にて毒素産生株が検出された検体であった。このうち Type 5 は ImmunoCard と QUIK CHEK がともに陰性の 6 検体 (A^+B^+ 5 株, A^-B^+ 1 株), Type 6 は ImmunoCard 陽性, QUIK CHEK 陰性の 1 検体 (A^-B^+ 1 株) であった。Type 7~9 は細胞毒性試験陰性かつ分離培養法にて毒素産生株が検出されなかった検体である。このうち Type 7 は ImmunoCard 陰性, QUIK CHEK 陽性の 3 検体, Type 8 は ImmunoCard, QUIK CHEK とともに陽性の 2 検体, Type 9 は ImmunoCard 陽性, QUIK CHEK 陰性の 2 検体であった。

考 察

今回著者らは, 糞便中 *C. difficile* Toxin A および Toxin B 同時検出試薬である ImmunoCard と QUIK CHEK の有用性評価を目的に, 臨床材料(凍結保存糞便検体)を用いた比較検討を行った。その結果, 細胞毒性試験を対照とした場合, ImmunoCard は QUIK CHEK よりも約 10% sensitivity が高く, 分離培養法を対照とした場合にも同様の結果が得られた。これらの結果は, ImmunoCard は, 統計学的有意差は認められないものの, QUIK CHEK よりも CDAD 診断における sensitivity が優れていることを示すものである。一方, 両試薬の添付文書に記載されている最小検

出感度を比較すると, ImmunoCard は Toxin A/B とともに 3 ng/ml, QUIK CHEK は Toxin A が 0.63 ng/ml, Toxin B は 1.25 ng/ml と記載されている。これらの数値を単純に比較すると QUIK CHEK は ImmunoCard よりも Toxin A で約 4.8 倍, Toxin B でも 2.4 倍検出感度が優れることになり, 今回の著者らの成績と大きく乖離する。しかしながら, 毒素産生株の培養上清および新鮮糞便検体を用いた希釈感度試験では, ImmunoCard は QUIK CHEK よりも毒素産生株の培養上清で 8 倍, 新鮮糞便検体でも 2 倍検出感度が高いことが明らかとなり, 今回の筆者らの成績と矛盾しない結果であった。免疫学的測定法を原理とする Toxin A および Toxin B 検出試薬は, 迅速性は優れるものの, 標準法である細胞毒性試験に比べ検出感度が劣る^{11, 15)} ことから, CDAD 診断検査として導入する際は, 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。

今回用いた ImmunoCard および QUIK CHEK はともにメンブレンデバイスを用いた試薬であり, 糞便検体・検体希釈液・酵素標識抗体を混和した試料を直接メンブレンに滴下し吸収させて使用する。今回の検討において, 糞便中の粘液物質や残さによるメンブレンの目詰まりが原因となり, 滴下した試料が完全には吸収されなかった検体が ImmunoCard でのみ 38 検体 (38%) 認められ, その内訳は ImmunoCard 陽性 6 検体, 陰性 32 検体であった。このような検体では試料の吸収不良に起因する検出感度の低下(偽陰性)をきたしている可能性が示唆されたことから, ImmunoCard 陰性の吸収不良検体 32 検体中, 細胞毒性試験が陽性であった 2 検体 (Table 4 中, Type 2 の 1 検体と Type 3 の 1 検体) を対象に, 試料滴下直前の遠

Table 4. Disagreement samples among the results of ImmunoCard Toxins A & B, TOX A/B QUIK CHEK, cytotoxicity assay and toxigenic culture

Type	Cytotoxicity assay	Toxigenic culture	ImmunoCard Toxins A & B	TOX A/B QUIK CHEK	Number of stool samples	Toxin type of isolate	
						A ⁺ B ⁺	A ⁻ B ⁺
1	Positive	Positive	Positive	Negative	3	3	0
2	Positive	Positive	Negative	Positive	1	0	1
3	Positive	Positive	Negative	Negative	3	2	1
4	Positive	Negative	Positive	Negative	1	—	—
5	Negative	Positive	Negative	Negative	6	5	1
6	Negative	Positive	Positive	Negative	1	0	1
7	Negative	Negative	Negative	Positive	3	—	—
8	Negative	Negative	Positive	Positive	2	—	—
9	Negative	Negative	Positive	Negative	2	—	—

心分離操作（15,000 rpm, 2分間）の有用性に関する検討を行った。その結果、これら2検体はいずれも、遠心分離操作を加えることにより、糞便中 toxin の検出が可能であった。これらの結果は、ImmunoCard においては、テストカードの構造上、滴下試料の吸収不良を引き起こす検体が多く認められ、この吸収不良が原因で偽陰性となる検体が少なからず存在することを示している。幸い、このような吸収不良検体に対しては試料添加直前の遠心分離操作を加えることにより検出感度が改善されたことから、ImmunoCard では遠心分離操作の追加により、よりいっそうの感度向上が可能と思われた。

一方、免疫学的測定法を測定原理とする抗原検出法において、非特異反応に起因する偽陽性は避けることのできない重要な課題である。今回の検討において、細胞毒性試験結果に基づく CDAD の有病率は 27% であり、ImmunoCard および QUIK CHEK の PPV はそれぞれ 82.1% および 80.0% といずれも比較的低い成績であった。さらに、PPV は対象集団の有病率による影響を受け、有病率が低くなるほど偽陽性反応の相対的増加により低下^{15, 16)} することから、有病率 10% の場合の PPV を算出したところ、それぞれ 58.0% および 54.6% まで低下した。これらの成績は、ImmunoCard あるいは QUIK CHEK で陽性となった検体の約 2 割（有病率 27% の場合）あるいは約 4 割（有病率 10% の場合）に偽陽性検体が含まれることを意味しており、CDAD 診断上極めて重要な問題である。このような偽陽性の問題は Crobach らも指摘している¹⁵⁾。さらに彼らは、有病率 5% ($n=10,000$) の集団を対象に、GDH 試薬と Toxin A および Toxin B 検出試薬（有病率 5% での PPV=55%）を組み合わせた 2 step approach 法のシミュレーションの結果、偽陽性検体減少による PPV (89.9%) の約 35% もの向上が認められたことから、偽陽性の問題を改善するにはグルタマートデヒドロゲナーゼ (GDH) 検査の併用 (2 step approach 法) が有用であると報告¹⁵⁾ している。そこで著者らは、ImmunoCard で陽性を示した検体を対象に GDH 検査 (C. D. チェック・D-1) を実施する 2 step approach 法の有用性を評価する目的で、本検討の対象糞便 100 検体の結果を用いて解析を行った (GDH 検査の結果は日常業務で測定した結果を用いた)。その結果、2 step approach 法を用いた場合の sensitivity, specificity, PPV, NPV はそれぞれ 77.8%, 100%, 100%, 92.4% となり、ImmunoCard 単独に比べ GDH 検査の偽陰性に起因する sensitivity の低下が認められたものの、ImmunoCard の偽陽

性結果を完全に除去することが可能であった。

ImmunoCard では、反応窓の色調変化を目視判定し、青色の色調変化が認められた場合に陽性と判定するが、先に筆者らは、白色に近い淡青色から濃青色までさまざまな色調変化のうち、強い色調に対する陽性判定への信頼性は高いが、弱い色調に対しては偽陽性反応が含まれることを報告しており¹¹⁾、今回の解析でも同様の傾向が認められた。そこで筆者らは、ImmunoCard 陽性検体のうち、弱い色調を示した検体に限り GDH 検査を併用する 2 step approach 法の有用性を評価する目的で前述の 2 step approach 法と同様の解析を行った。その結果、sensitivity, specificity, PPV, NPV はそれぞれ 85.1%, 100%, 100%, 94.8% となり、ImmunoCard 単独と同等の sensitivity であり、かつ ImmunoCard の偽陽性結果を完全に除去することが可能であった。したがって、ImmunoCard を用いた 2 step approach 法では、その偽陽性反応の色調変化の傾向を生かし、陽性検体のうち弱い色調を示した検体に対してのみ GDH 検査を併用することにより、GDH 検査偽陰性に起因する sensitivity 低下を防止できる可能性が示唆され、さらに GDH 検査併用により生じるコストの削減にもつながると推察された。

今回著者らは、糞便中 *C. difficile* Toxin A および Toxin B 同時検出試薬である ImmunoCard と QUIK CHEK の比較検討し、ImmunoCard は QUIK CHEK に比べ sensitivity が高く CDAD 診断における有用性が高いことが明らかになった。さらに ImmunoCard を用いた追加検討により以下の点が示唆された。①ImmunoCard を使用する際には吸収不良に伴う偽陰性の改善を目的に、試料添加直前の遠心分離操作を加えることが望ましい、②ImmunoCard (第 1 step) と GDH 検査 (第 2 step) を組み合わせた 2 step approach 法は検査精度 (PPV) の向上に極めて有用である。

文 献

- 1) 加藤はる, 加藤直樹. 2002. *Clostridium difficile* 感染症と細菌学的検査. 日臨徴誌 12: 115-122.
- 2) Warny, M., J. Pepin, A. Fang, et al. 2005. Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. Lancet 366: 1079-1084.
- 3) Limaye, A. P., D. K. Turgeon, B. T. Cookson, et al. 2000. Pseudomembranous colitis caused by a Toxin A(-) B(+) strain of *Clostridium difficile*. J. Clin. Microbiol. 38: 1696-1697.
- 4) Toyokawa, M., A. Ueda, M. Tsukamoto, et al.

2003. Pseudomembranous colitis caused by Toxin A-negative/Toxin B-positive variant strain of *Clostridium difficile*. J. Infect. Chemother. 9: 351–354.
- 5) Drudy, D., S. Fanning, L. Kyne., 2007. Toxin A-negative, Toxin B-positive *Clostridium difficile*. Int. J. Infect. Dis. 11: 5–10.
- 6) Renate, J., E. C. J. van den Berg, D. Claas, H. Oyib, et al. 2004. Characterization of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* isolates from outbreaks in different countries by amplified fragment length polymorphism and PCR ribotyping. J. Clin. Microbiol. 42: 1035–1041.
- 7) Kikkawa, H., S. Hitomi, M. Watanabe. 2007. Prevalence of toxin A-nonproducing/toxin B-producing *C. difficile* in the Tsukuba—Tsuchiura district, Japan. J. Infect. Chemother. 13: 35–38.
- 8) Toyokawa, M., A. Ueda, I. Nishi, et al. 2008. Isolation and characterization of *C. difficile* from 2 geographically separate hospitals in Japan. LABMEDICINE 39: 282–286.
- 9) Komatsu, M., H. Kato, M. Aihara, et al. 2003. High frequency of antibiotic-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. 22: 525–529.
- 10) Allen, D. S., L. C., Emery, M. D. Lyerly, et al. 2003. Tests for diagnosis of *Clostridium difficile* disease. American Society for Microbiology, Washington, D.C.: 845–847.
- 11) 豊川真弘, 上田安希子, 西 功, 他. 2007. *Clostridium difficile* 関連下痢症の迅速診断における糞便中 Toxin A および Toxin B 同時検出キットの有用性に関する検討. 感染症誌 81: 33–38.
- 12) Kato, H., T. Yokoyama, H. Kato, et al. 2005. Rapid and simple method for detecting the toxin B gene of *Clostridium difficile* in stool specimens by loop-mediated isothermal amplification. J. Clin. Microbiol. 43: 6108–6812.
- 13) Kato, H., N. Kato, S. Kato, et al. 1999. Deletions in the repeating sequences of the Toxin A gene of Toxin A-negative, Toxin B-positive *Clostridium difficile* strains. FEMS Microbiol. Lett. 175: 197–203.
- 14) Kato, H., N. Kato, K. Watanabe, et al. 1998. Identification of Toxin A-negative, Toxin B-positive *Clostridium difficile* by PCR. J. Clin. Microbiol. 36: 2178–2182.
- 15) Crobach, M. J., O. M. Dekkers, M. H. Wilcox, et al. 2009. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): Data review and recommendations for diagnosing *Clostridium difficile*-infection (CDI). Clin. Microbiol. Infect. 15: 1053–1066.
- 16) Planche, T., A. Aghaizu, R. Holliman, et al. 2008. Diagnosis of *Clostridium difficile* infection by toxin detection kits: A systematic review. Lancet Infect. Dis. 8: 777–784.

Comparison of Two Immunoassays for Detection of *Clostridium difficile* Toxins A and B in Stool Specimens

Akiko Ueda¹, Masahiro Toyokawa¹, Isao Nishi¹, Atsuko Sunada¹, Tomomi Sakata¹,
Keigo Kimura¹, Yoriko Inoue¹, Seishi Asari²

¹) Laboratory for Clinical Investigation, Osaka University Hospital

²) Department of Infection and Prevention, Osaka University Hospital

We evaluated the usefulness of two rapid immunoassays, ImmunoCard Toxins A & B (ImmunoCard) and TOX A/B QUIK CHEK “NISSUI” (QUIK CHEK) for detection of *Clostridium difficile* Toxins A & B in stool specimens, in the diagnosis of *C. difficile*-associated diarrhea (CDAD). In comparison with the cytotoxicity assay as the gold standard for the diagnosis of CDAD, the sensitivity, specificity, positive predictive values (PPV) and negative predictive values (NPV) were 85.2%, 93.2%, 82.1% and 94.4% for ImmunoCard, 74.1%, 93.2%, 80.0% and 90.7% for QUIK CHEK respectively (at a CDAD prevalence of 27%). The sensitivity of ImmunoCard was about 10% higher than that of QUIK CHEK. Furthermore, the detection limit of ImmunoCard was superior to that of QUIK CHEK 2 to 8 times by the dilution test with culture supernatants of toxigenic strains and fresh stool specimens. On the other hand, insufficient

absorption of the diluted samples was observed in 38 samples (38%) in ImmunoCard, and two of these samples showed decrease in the limit of detection due to insufficient absorption. It seemed that the sensitivity of ImmunoCard could be increased by application of centrifuge process because such false negative samples showed positive results by application of the centrifuge process just prior to the sample addition to test device. There were more than a few samples which showed false positive by nonspecific reaction in both ImmunoCard and QUIK CHEK, and each PPV fell to 58.2% and 54.6% at the prevalence rate of 10%, respectively. All of these samples were negative on glutamate dehydrogenase (GDH) test, so it seemed very useful to use the two-step approach with ImmunoCard and GDH test for ensuring the high PPV and the correct diagnosis of CDAD.