

[原 著]

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

澤辺悦子・北村優佳・古畑紀子・高橋里枝子・市村直也
春山友希・武部 功・萩原三千男・東田修二・東條尚子
東京医科歯科大学医学部附属病院検査部

(平成 23 年 6 月 8 日受付, 平成 23 年 9 月 7 日受理)

Clostridium difficile 感染症 (CDI) の迅速診断は、糞便中の毒素検出により行われるが検出感度が不十分であり、糞便の毒素検査のみでは CDI の診断は見落とされている可能性がある。今回、*C. difficile* 抗原グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GDH) と toxin A と toxin B を同時に検出可能な迅速キット *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE* (アリーアメディカル) (COMPLETE) が日本で初めて発売されたので、その有用性について検討した。対照検査は GDH を検出するイムノカード C. ディフィシル (テイエフビー) および toxin A/B を検出する TOX A/B QUIK CHEK 「ニッスイ」(日水製薬) を用い、分離培養法との比較検討を行った。また分離株コロニーからの毒素検出について検討した。その結果、培養法を対照とした場合の COMPLETE の GDH 検出および毒素検出の感度はそれぞれ 93.3%, 57.7% であった (対照キットの感度はそれぞれ 76.7%, 50%)。また、特異度は GDH, 毒素共に 100% の結果であった。分離株の COMPLETE による毒素検出は毒素産生株すべてが 4 mm 大 1 コロニーで検出可能であり、GDH 検出はすべての分離株が陽性であった。これらの結果から、COMPLETE は良好な糞便中 GDH の検出感度を有し、CDI のスクリーニング検査として、また分離株の迅速な毒素検出検査としても有用性があると考えられた。

Key words: *Clostridium difficile* 感染症, glutamate dehydrogenase, toxin A, toxin B, toxigenic culture, 院内感染

序 文

Clostridium difficile は抗菌薬投与後に発症する腸炎・下痢症の主要な原因菌である¹⁾。その病原性には増殖した *C. difficile* が産生する toxin A (TcdA) と toxin B (TcdB) が大きく関与している。*C. difficile* 感染症 (CDI) は抗菌薬使用に加えて高齢者、基礎疾患保有の長期入院患者で問題となることが多い。また芽胞を形成し病院環境下で長期に生存可能となるため院内感染原因菌としても重要視されている^{2~4)}。近年で

は、欧米で毒素過剰産生能を有する特定タイプ (BI/NAP1/027) の *C. difficile* による死亡例を伴うアウトブレイクが報告されている⁵⁾。CDI の診断は迅速検査として糞便中の毒素検出が行われており、2007 年 6 月には TcdA と TcdB の両方を検出できるキットがわが国で初めて発売された。多くの施設で利用されているが、検査試薬の感度は十分ではなく⁶⁾、糞便の毒素検出検査のみでは CDI の一部は診断されないまま見落とされている。

今回、*C. difficile* の抗原であるグルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GDH) と TcdA と TcdB を同時に検出可能な迅速キット (日本では 2011 年 4 月発売) *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE* (アリーアメディカル) (COMPLETE) の性能を試験し、有用性を評価したので報告する。本キットは酵素免疫反応 (EIA) を測

著者連絡先: (〒113-8519) 東京都文京区湯島 1-5-45
東京医科歯科大学医学部附属病院検査部
澤辺悦子
TEL: 03-5803-5621
FAX: 03-5803-5618
E-mail: e.sawabe.mlab@tmd.ac.jp

定原理としたイムノクロマト法の測定試薬であり、希釈液に酵素標識抗体を加え、糞便検体を混和調整後、調整液をキット検体添加部へ滴下し、15分静置後に判定部に洗浄液、基質液をそれぞれ滴下、10分後に結果判定を行う。判定部の中央に青色のコントロールドットラインが形成され、左側にGDH、右側に毒素の青色ラインが出現する。

材料と方法

1. 対象検体

2009年8月から2010年2月までの期間に、東京医科歯科大学医学部附属病院検査部において、入院患者56名から提出されたCDI疑いの糞便56検体を対象とした。

2. 糞便中GDHと毒素の検出

C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE (COMPLETE) および対照としてGDH検出キットであるイムノカードC. ディフィシル(ティエフビー)(ImmunoCard)とTcdAとTcdB検出キットのTOX A/B QUIK CHEK「ニッスイ」(日水製薬)(TOX)を添付文書に従い使用した。すなわち、酵素標識抗体を添加した希釈液に糞便検体25 μ lを加え、検体添加部(ImmunoCardは検体窓)へ滴下し、一定時間後に判定部(ImmunoCardは反応窓)に洗浄液、基質液を滴下後、所定時間後に結果判定した。

3. 糞便からの*C. difficile*の分離と同定

嫌気ポーターに採取された糞便はCCMA培地EX(日水製薬)で48時間嫌気培養し、R型・マンニット分解のコロニーについてグラム染色を行い、CDチェックD-1(塩野義製薬)で同定した。

4. 分離株の毒素遺伝子の検出

PCR法による分離株の毒素遺伝子の検出は加藤らの方法⁷⁾に従い行った。テンプレートDNAはTES bufferにコロニーを懸濁後、95 $^{\circ}$ C 10分加熱し15,000

rpm、4 $^{\circ}$ C、5分間遠心した上清を使用した。プライマーはNKV011-NK11-NK9(*tcdA*-PCR)とNK104-NK105(*tcdB*-PCR)を使用した。プロダクトパターンから分離株をtoxin A⁺B⁺, toxin A⁻B⁺, toxin A⁻B⁻型に型別した。

5. 分離株のGDHと毒素検出

COMPLETEを用い、CCMA培地EX上の4mm大コロニーひとつを希釈液500 μ lと酵素標識抗体1滴に懸濁後、キット検体添加部へ滴下し、糞便と同様の操作で測定を行った。

6. 分離株のGDHと毒素の検出限界

*C. difficile*の分離株toxin A⁺B⁺, toxin A⁻B⁺各2株, toxin A⁻B⁻1株について48時間培養したコロニーから、濁度計を用いてMcFarland (McF.) 3, 1, 0.5の菌液を作り、さらにMcF. 1から10, 100倍希釈系列を作成した。各濃度の25 μ lを検体量として添付の希釈液と酵素標識抗体に加え、糞便と同様の操作で測定を行った。また各濃度の菌数は定量エーゼ(1 μ l)を用いてCCMA培地EXに塗抹分離を行い、概数を測定した。

7. 倫理的対応

本研究は東京医科歯科大学医学部倫理委員会にて承認後、実施した。

結 果

1. 糞便中GDHと毒素の検出と培養結果

糞便56検体のうち、*C. difficile*培養陽性は30検体(毒素型はtoxin A⁺B⁺ 22株, A⁻B⁺ 4株, A⁻B⁻ 4株), 培養陰性は26検体であった。培養法を対照とした場合の各キットの糞便GDH検出および培養陽性であった糞便検体の毒素検出の感度・特異度をTable 1と2に示した。COMPLETEの糞便GDHの検出感度は93.3%で、検出されなかった検体2例はtoxin A⁺B⁺株の菌量の少ない検体であった。COMPLETE

Table 1. Detection of GDH by COMPLETE and ImmunoCard compared with *C. difficile* culture

GDH kit		Number of specimens with the following assay result:		Sensitivity (%)	Specificity (%)
		Culture			
		Positive	Negative		
COMPLETE	Positive	28	0	93.3	100
	Negative	2	26		
ImmunoCard	Positive	23	0	76.7	100
	Negative	7	26		

Table 2. Detection of toxin by COMPLETE and TOX compared with C. difficile toxigenic culture

Toxin kit		Number of specimens with the following assay result:			Sensitivity (%)	Specificity (%)
		Toxin type				
		A ⁺ B ⁺	A ⁻ B ⁺	A ⁻ B ⁻		
COMPLETE	Positive	12	3	0	57.7	100
	Negative	10	1	4		
TOX	Positive	11	2	0	50	100
	Negative	11	2	4		

Table 3. Detection of GDH and toxin in stool specimens and C. difficile isolates by COMPLETE

Culture result	Toxin type ^a	COMPLETE result				Number of isolates (stools)	
		Stool		Isolates		Subtotal	Total
		GDH	Toxin	GDH	Toxin		
+	A ⁺ B ⁺	+	+	+	+	12	22
		+	-	+	+	8	
		-	-	+	+	2	
	A ⁻ B ⁺	+	+	+	+	3	4
		+	-	+	+	1	
		+	-	+	-	4	
-	-	-	ND ^b	ND	26	26	
Total					56	56	

^a Toxin types were determined by PCR performed with isolates.

^b ND, not done.

の糞便毒素の検出感度は57.7%であった。

2. 分離株の COMPLETE による毒素検出

C. difficile の毒素検出は毒素産生株26株すべてが4mm大1コロニーで検出可能であり、GDH検出は培養陽性30株すべてが陽性の結果であった (Table 3).

3. 分離株5株の検出限界測定結果 (Table 4)

GDH検出はすべての株で対照キットとの差が認められた。COMPLETEは5株のうち、10⁴CFU/mlで検出可能な株が3株あり、残り2株が10⁶CFU/mlで検出可能であった。一方、対照キットは10⁷CFU/mlで検出可能が1株、残り4株が10⁸CFU/mlを必要とした。毒素検出においても、対照キットとの差が認められた。COMPLETEはtoxin A⁺B⁺株、A⁻B⁺株共に10⁸CFU/mlで検出可能であった。対照キットはtoxin A⁺B⁺株の1株とtoxin A⁻B⁺株2株が10⁸CFU/mlの濃度でも検出ができなかった。この

toxin A⁺B⁺株の1株、toxin A⁻B⁺株は添付希釈液にコロニーを懸濁する方法において、toxin A⁺B⁺株はCOMPLETE、対照キット共に1コロニー、toxin A⁻B⁺株ではCOMPLETEは1コロニー、対照キットは10コロニーで毒素が検出可能であった。

考 察

わが国において、C. difficile 感染症の診断は迅速キットを用いた糞便中の毒素検出により行われているが、その感度は十分ではなく正確なCDI診断が行われていないのが現状である⁸⁾。細胞培養法による毒素の検出が診断検査のゴールドスタンダードとされているが、煩雑であり日常検査に取り入れることは困難である。米国においては近年、糞便中C. difficile 抗原検査でスクリーニングを行い、陽性検体について細胞培養法による毒素検出に進み、毒素陰性例においてもCDIが疑わしい場合には培養法を行い、分離株の毒素

Table 4. Comparison of the bacterial concentrations in *C. difficile* strains with detectable GDH and toxin

Sample	McFarland ^a CFU ^b	3		1		0.5		1×1/10		1×1/100	
		10 ⁸ /ml		10 ⁷⁻⁸ /ml		10 ⁶⁻⁷ /ml		10 ⁵⁻⁶ /ml		10 ⁴ /ml	
Colony ^c or Sample ^d		10 colonies	1 colony	Sample 25 μl							
GDH	A ⁺ B ⁺	COMPLETE	NT ^e	+	NT	+	+	+	+	+	+
		ImmunoCard	NT	NT	NT	+	+	+	-	-	-
	A ⁻ B ⁺	COMPLETE	NT	+	+	+	+	+	+	+	-
		ImmunoCard	NT	NT	+	-	-	-	-	-	-
	A ⁻ B ⁻	COMPLETE	NT	+	+	+	+	+	+	+	+
ImmunoCard		NT	NT	+	+	NT	-	-	-	-	
Toxin	A ⁺ B ⁺	COMPLETE	NT	+	NT	+	+	-	-	-	-
		TOX	NT	+	NT	+	+	-	-	-	-
	A ⁻ B ⁺	COMPLETE	NT	+	+	+	-	-	-	-	-
		TOX	NT	+	-	-	-	-	-	-	-
	A ⁻ B ⁺	COMPLETE	NT	+	+	-	-	-	-	-	-
		TOX	+	-	-	-	-	-	-	-	-

^a The concentrations of the strains were adjusted by a turbidity measuring instrument.

^b Colonies were counted on the plate of CCMA-EX.

^c A dose of 10 colonies or of 1 colony was added to the diluent and conjugate.

^d A 25 μl sample adjusted to each concentration was added to the diluent and conjugate.

^e NT, not tested.

産生性を検査する方法などが報告されている⁹⁾。今回検討した COMPLETE は、培養法で *C. difficile* の菌量の少ない検体 2 例で糞便中 GDH が陰性の結果であったものの、検出感度は 93.3% と良好な結果であった。添付文書による COMPLETE の GDH の検出感度は 0.8 ng/ml であり、対照キット ImmunoCard の 125 ng/ml と比べると 100 倍以上の感度を有している。今回行った分離株の GDH 検出限界においてもそれを裏づける結果が得られ、CDI のスクリーニング検査として有用性があることが確かめられた。一方、毒素の検出は対照キットと比べ 2 例多く検出されたが、感度は 58% であり、これまでの市販キットと同等レベルと考えられた。毒素産生型で詳細を見ると、toxin A⁺B⁺ の株が検出された検体において検出感度は 54.5% であり、toxin A⁻B⁺ 株のそれは 75% と A⁻B⁺ 株の検体のほうが良い結果が得られた。添付文書による毒素検出感度は TcdA は 0.63 ng/ml で対照

キット TOX と同じであり、TcdB においては COMPLETE が 0.16 ng/ml、TOX は 1.25 ng/ml と記載されている。今回行った分離株の毒素検出の限界測定において toxin A⁺B⁺ 株では大きな差は認められず、A⁻B⁺ 株において COMPLETE は 1 コロニー、TOX で 10 コロニーを要した点は、添付文書記載の TcdB の検出感度の違いが大きく影響していると思われる。しかしながら、toxin A⁺B⁺ に比べ A⁻B⁺ 株は分離例数が少なく、検討が十分とはいえないため今後、A⁻B⁺ 株分離糞便検体の数を増やして検討する必要がある。

国内で利用できる毒素検出キットは 1999 年に発売された TcdA のみ検出のユニクイック (関東化学) が最初であり、TcdA と TcdB 両毒素を検出可能なキットが 2007 年に TOX、2009 年にイムノカード CD トキシン A&B (テイエフビー) (イムノカード)、2010 年には X/Pect トキシン A/B (関東化学) が発売され

た。Alcala ら¹⁰⁾ はこれら両毒素検出の3キットにおける細胞培養法(細胞毒性試験)と比較した感度が49%から66.7%と低いことを報告している。また国内では中川ら⁶⁾ が臨床的にCDIと考えられた症例を真の陽性とした場合のTOXの感度が50%に満たなかったと述べている。著者らは、2000年から2004年において毒素産生分離株(toxin A⁺B⁺株)のユニクイックでの糞便中毒素検出感度が、38%から63%で平均47%であったことを、またTOXに切り替えた2008年以降においても同様に低い感度であることをそれぞれ2006年と2009年の日本臨床微生物学会総会で報告している。上田ら¹¹⁾ はイムノカードとTOXを細胞培養法と比較した感度が、それぞれ85.2, 74.1%であり、培養法(毒素産生分離株検出)と比較した場合には感度が69.7, 60.6%であったと報告している。以上のことから、糞便を用いた毒素検出キットだけではCDIの正確な診断をすることが困難であることを示唆している。

COMPLETEは糞便中のGDHと毒素が一つのアッセイで同時に検出できることが最大の利点である。共に陽性であれば、CDIの迅速な診断・治療および院内感染対策を実施できる。共に陰性の場合、CDIの可能性は低いと考えられる。しかしながら、今回の検討で見られた培養法でC. difficileの菌量の少ない検体例もあることを考慮に入れ症例により培養が必要な場合も考えられる。さらにGDH陽性・毒素陰性の場合には分離培養の実施が強く勧められる。培養後、COMPLETEは分離株1コロニーからGDHと毒素が検出可能であり、分離株の迅速な毒素検出検査としても有用性が高いと考えられた。感度の高いGDH検査でスクリーニングし、陽性ならば培養検査を行い、次に分離株を用いた毒素検査を行うことで、より正確にCDI診断のための検査を短時間で行うことができると思われる。

米国医療疫学学会(SHEA)と米国感染症学会(IDSA)による成人のCDIに関するガイドラインの改訂版¹²⁾が2010年5月に発行された。その中で臨床検査室においてCDI診断に最適な検査法は何か?との問いかけに対して勧告が掲載されており、その一部を以下に抜粋する(*勧告の強さとエビデンスの質を表示)。

- 糞便培養は最も感度の高い検査であり、疫学研究に不可欠である(A-II*)。
- 糞便培養は所要時間が長い臨床実用ではないが、培養に続く毒素産生分離株の同定を行えばその感度、特異度は他の臨床検査結果の標準と

なる(B-III)。

- C. difficile毒素A/B検出のEIA法は迅速であるが細胞培養法より感度が低いため診断の代替法としては不十分である(B-II)。
- 毒素検査は臨床的に最も重要であるが、感度の低さが問題である。この問題を解決するための可能な方法は、一次スクリーニングとしてGDHをEIA法で検出後、GDH陽性検体について確認検査として細胞培養法または分離株の毒素検出検査を実施するという2段階法である(B-II)。

米国においてのCDI検査は以前より、最初に糞便GDH検査でスクリーニングを行い、陽性の場合に毒素検出のための簡易キット、細胞培養法またはPCR法を、さらに分離株の細胞培養法による毒素試験などを組み合わせた2ステップ、3ステップアルゴリズム^{9,13,14)}が発表されており、今回のガイドラインの改訂でも、この方法が勧告として採り入れられている。今回検討したキットを利用すれば、わが国においても簡便にC. difficileのGDHと毒素が一つの測定で同時に検出可能となり、さらに毒素検出の感度の低さを培養後の分離株の毒素検出検査で補うことができるため、より正確なCDI診断検査が行えるようになると思われる。

当院のCDI検査法は糞便の毒素検出感度が低いことを考慮し、2007年4月から分離株の毒素検出検査を行っている。当初はTcdAのみを検出するユニクイックを使用し、分離株をブルセラHK半流動培地(極東製薬)で48時間培養後、培養液を用いた毒素検出検査を行っていた。2008年4月からは、TcdAとTcdBを検出可能なTOXに変更し、分離株を液体培地に継続培養することなくコロニーからの毒素検出を行っている。分離株の毒素検出検査は一般的には行われていないことが多く、実施したとしても分離株の培養液を得るため、さらに48時間の培養を要し迅速なCDI診断には至っていない。

今回の検討で、COMPLETEによる分離株の毒素検出は毒素産生株4mm大1コロニーで陽性の結果が得られた。当院ではこれまで毒素検出にはA⁺B⁺株は1コロニー、A⁻B⁺株は10コロニーが必要であったが、今回の検討によりA⁻B⁺株においても1コロニーで毒素検出が可能となり、少数分離例においても純培養の時間が不要となる。また毒素検出と同時にGDHを検出するためC. difficileの同定を兼ねることができる。

今回、C. difficile抗原GDHと毒素TcdAとTcdBを同時に検出可能な新しいキットCOMPLETEの性

能を評価した結果、スクリーニング検査として極めて有用性が高いことが確認された。抗原陽性・毒素陰性の場合には分離培養法を行い、COMPLETEを用いて分離株の毒素検出検査を実施することで、糞便中の毒素検査のみでは見落とされていたCDIの診断をより確実に、しかもより短時間で実施することが可能になると考えられる。

なお、本論文の要旨は第22回日本臨床微生物学会総会（岡山，2011年1月）において発表した。

文 献

- 1) 稲松孝思, 安達桂子. 1998. *C. difficile* による偽膜性大腸炎. 化学療法の領域 14: 65-71.
- 2) Johnson, S., M. H. Samore, K. A. Farrow, et al. 1999. Epidemics of diarrhea caused by a clindamycin-resistant strain of *Clostridium difficile* in four hospitals. N. Engl. J. Med. 341: 1645-1651.
- 3) Kato, H., N. Kato, K. Watanabe, et al. 2001. Analysis of *Clostridium difficile* isolates from nosocomial outbreaks at three hospitals in diverse areas of Japan. J. Clin. Microbiol. 39: 1391-1395.
- 4) Sawabe, E., H. Kato, K. Osawa, et al. 2007. Molecular analysis of *Clostridium difficile* at a university teaching hospital in Japan: a shift in the predominant type over a five-year period. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. 36: 695-703.
- 5) 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.
- 6) 中川莉彩, 飯沼由嗣, 山本正樹, 他. 2010. *Clostridium difficile* トキシン迅速検査キットの評価と微生物学的検討. 感染症誌 84: 147-152.
- 7) 加藤はる. 2003. クロストリディウム・ディフィシル毒素. 臨床検査 47: 169-174.
- 8) 加藤はる. 2008. *Clostridium difficile* 関連疾患について. *Clostridium difficile* 関連疾患 (CDAD) vs ICT. 感染対策 ICT ジャーナル 3: 11-18.
- 9) Reller, M. E., C. A. Lema, T. M. Perl, et al. 2007. Yield of stool culture with isolate toxin testing versus a two-step algorithm including stool toxin testing for detection of toxigenic *Clostridium difficile*. J. Clin. Microbiol. 45: 3601-3605.
- 10) Alcalá, L., L. S. Cambroneró, M. P. Catalan, et al. 2008. Comparison of three commercial methods for rapid detection of *Clostridium difficile* toxins A and B from fecal specimens. J. Clin. Microbiol. 46: 3833-3835.
- 11) 上田安希子, 豊川真弘, 西 功, 他. 2011. 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研究. 日臨微誌 21: 51-58.
- 12) Cohen, S. H., D. N. Gerding, S. Johnson, et al. 2010. Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 Update by the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) and the Infectious Diseases Society of America (IDSA). Infect. Control. Hosp. Epidemiol. 31: 431-455.
- 13) Fenner, L., A. F. Widmer, G. Goy, et al. 2008. Rapid and reliable diagnostic algorithm for detection of *Clostridium difficile*. J. Clin. Microbiol. 46: 328-330.
- 14) Larson, A. M., A. M. Fung, F. C. Fang. 2010. Evaluation of *tcdB* real-time PCR in a three-step diagnostic algorithm for detection of toxigenic *Clostridium difficile*. J. Clin. Microbiol. 48: 124-130.

Evaluation of the C. Diff Quik Chek Complete Assay, a New Glutamate Dehydrogenase and A/B Toxin Combination Assay for the Rapid Diagnosis of *Clostridium difficile* Infection

Etsuko Sawabe, Yuka Kitamura, Noriko Furuhashi, Rieko Takahashi, Naoya Ichimura, Yuki Haruyama, Isao Takebe, Michio Hagihara, Shuji Toda, Naoko Tojo
Department of Clinical Laboratory, Tokyo Medical and Dental University Hospital of Medicine

C. Diff Quik Chek Complete (COMPLETE) is a new rapid immunoassay designed to test for the presence of both glutamate dehydrogenase (GDH) and *Clostridium difficile* toxins A and B. In this study we evaluated the ability of COMPLETE to diagnose *C. difficile* infection (CDI). The results of this assay in stool were compared with the results of ImmunoCard *C. difficile* (ImmunoCard), TOX A/B QUIK CHEK "NISSUI" (TOX), and a toxigenic culture. In comparison with the culture, the sensitivity and specificity for GDH detection were 93.3% and 100% for COMPLETE and 76.7% and 100% for ImmunoCard, respectively, and the sensitivity and specificity for toxin detection were 57.7% and 100% for COMPLETE and 50% and 100% for TOX, respectively. In addition, a COMPLETE assay with 1 colony (4 mm in diameter) of growth on the CCMA directly detected both the GDH and toxins. Rather than relying solely on testing for toxins A and B, it may be more accurate to screen with COMPLETE and then follow with a stool culture when the results of the screening are GDH-positive and toxins-negative. COMPLETE seems to be very useful for determining the presence of toxigenic *C. difficile* strains for the laboratory diagnosis of CDI.