

[原 著]

酵素抗体法（迅速キット）による *Clostridium difficile* トキシン検出検査と  
毒素産生性 *C. difficile* の分離培養との比較検討

大木まゆみ<sup>1)</sup>・三澤成毅<sup>1)</sup>・荒井ひろみ<sup>1)</sup>・川瀬友季子<sup>1)</sup>・長南正佳<sup>1)</sup>・川上剛明<sup>1)</sup>  
久野 豊<sup>1)</sup>・堀井 隆<sup>1)</sup>・近藤成美<sup>2)</sup>・三宅一徳<sup>2)</sup>・田部陽子<sup>2)</sup>・大坂顯通<sup>1)3)</sup>

<sup>1)</sup> 順天堂大学医学部附属順天堂医院臨床検査部

<sup>2)</sup> 順天堂大学医学部臨床検査医学科

<sup>3)</sup> 順天堂大学医学部輸血学・幹細胞制御学

（平成 24 年 11 月 6 日受付，平成 25 年 10 月 24 日受理）

*Clostridium difficile* のトキシン A とトキシン B の迅速検査キット TOX A/B QUIK CHEK (TOX A/B) による便中トキシン検出法を毒素産生性 *C. difficile* の分離培養と比較した。また，toxin B 陽性 *C. difficile* 培養陽性検体における便中トキシン検出と培養菌量との関係を検討した。

臨床的に *C. difficile* 感染症 (*Clostridium difficile* infection : CDI) が疑われた患者から採取された 232 検体中，培養陽性は 92 検体であった。92 検体からの分離菌株は，PCR 法により toxin A および toxin B 遺伝子を検出した結果，toxin A 陽性 toxin B 陽性株は 55 検体から，toxin A 陰性 toxin B 陽性株は 11 検体から，toxin A 陰性 toxin B 陰性株が 26 検体から分離され，toxin B 遺伝子陽性は合計 66 株であった。Toxin B 陽性 *C. difficile* の分離培養結果を対照とした TOX A/B による便中トキシン検出感度は，42.4% (28/66)，特異度は 98.8% (164/166) であり感度が低かった。便中トキシン検出と培養菌量との間では，菌量が多い方がトキシン陽性となりやすい傾向が認められた。

以上より，TOX A/B による便中トキシン検査は感度が低いため，日常検査では，臨床的に CDI が疑われるにもかかわらず，迅速検査キットで便中トキシン陰性の場合には，*C. difficile* 抗原である glutamate dehydrogenase の検査やトキシン同時検査キット，培養検査，または分離菌株を用いたトキシン検査が必要であると考えられた。

**Key words:** *Clostridium difficile*, 便中トキシン検査, TOX A/B QUIK CHEK, トキシン遺伝子

序 文

*Clostridium difficile* は，健康成人の 5~10% に腸管内保菌が認められ，通常は病原性を示さない<sup>1)</sup>。しかし，抗菌薬や抗がん剤の使用によって腸管内の正常な常在細菌叢が破綻すると，*C. difficile* の異常増殖を原因とする感染症 (*Clostridium difficile* infection : CDI) が生じる。CDI は，米国において抗菌薬関連下痢症 (antibiotic-associated diarrhea : AAD) の 15~25% と推定されており<sup>2)</sup>，*C. difficile* は患者や医療従

事者を介した施設内感染の原因菌となる<sup>3)4)</sup>。CDI の診断は便中トキシンの証明が重要である。*C. difficile* が産生する毒素にはトキシン A とトキシン B の 2 種類あり，両者が病原性に関与することが報告されている<sup>5)~7)</sup>。トキシン検出検査法は細胞毒素試験が gold standard であるが，特殊な培養設備と技術を必要とし，48 時間以上の時間を要する。このため，日常検査では糞便検体中のトキシンを検出する免疫学的検査キットが広く使用されている。

今回，*C. difficile* トキシン A，B 迅速検出キット TOX A/B QUIK CHEK を用いた便中のトキシン検出検査結果を，toxin B 陽性 *C. difficile* の分離培養結果と比較検討し，同キットを用いた迅速検査の有用性を評価した。

著者連絡先：(〒113-8431) 東京都文京区本郷 3-1-3  
順天堂大学医学部附属順天堂医院臨床検査部  
三澤成毅  
TEL: 03-3813-3111 (内 5172)

### 材料および方法

検討期間および材料は、2007年9月から2010年8月の間に当院臨床検査部へ *C. difficile* の検査を目的に提出された糞便 355 検体である。なお、同一患者からの重複検査は対象から除いた。また、対象は CDI を疑う検体に絞るため、診療録の記載を優先し下痢<sup>2)</sup>が3回以上認められる検体を対象とした。ただし、下痢の回数が2回以下の場合には糞便の性状が以下に示す下痢便の検体は対象に含めた。糞便の性状は水様便、泥状便、粘液便、消化不良便を下痢便とした。その結果、232 検体を最終的な検討対象とした。

*C. difficile* トキシン迅速検査キットは、enzyme immunoassay (EIA) 法に基づく TOX A/B QUIK CHEK 「ニッスイ」(TECHLAB 社/日水製薬、以下 TOX A/B) を用いた。TOX A/B では、トキシン A または B のいずれかが存在する場合に陽性と判定される。TOX A/B による検査は、原則検体提出の当日に実施した。当日の検査が不可能であった場合には、2日間までは冷蔵 (4°C) 保存、それ以降は凍結 (-80°C) 保存した。

*C. difficile* の培養および同定は、CCMA 培地 EX (日水製薬、以下 CCMA 培地) を使用し、ダイヤ嫌気パック (三菱化学メディエンス) にて 35°C、48 時間嫌気培養した。*C. difficile* の同定は、CCMA 培地上の特徴的な集落性状と臭気、およびグラム染色による形態で行った。培養菌量の判定は、 $\leq 10^3$ /ml を 1+,  $10^4 \sim 10^5$ /ml を 2+,  $\geq 10^6$ /ml を 3+ に分類した。

分離菌株の toxin A および toxin B 遺伝子の検出は、加藤らの方法<sup>8)9)</sup>に準じ、PCR 法にて行った。すなわち、新鮮純培養菌を滅菌蒸留水 50  $\mu$ l に McFarland No. 0.5~1 の濁度に調整、100°C、10 分間加熱溶菌後、その遠心清 2.5  $\mu$ l を template DNA とした。PCR 反応液は TAKARA TAQ R001B (タカラバイオ) を用いて調製し全量 25  $\mu$ l で行った。サーマルサイクラーは Gene Amp PCR System 9600-R (日本ロシユ) を用いた。Toxin A 遺伝子検出用プライマーは、NK9 (5'-CCA CCA GCT GCA GCC ATA-3'), NK11 (5'-TGA TGC TAA TAA TGA ATC TAA AAT GGT AAC-3') および NKV011 (5'-TTT TGA TCC TAT AGA ATC TAA CTT AGT AAC-3') を用い、95°C、20 秒 (denature)、62°C、120 秒 (annealing) で 35 サイクル行った。Toxin B 遺伝子検出用プライマーは NK104 (5'-GTG TAG CAA TGA AAG TCC AAG TTT ACG C-3'), NK105 (5'-CAC TTA GCT CTT TGA TTG CTG CAC CT-3') を用い、95°C、20 秒 (denature)、55°C、

Table 1. TOX A/B QUIK CHEK による便中トキシン検出と toxin B 陽性 *C. difficile* の分離培養との比較

	培養			
		Toxin B 産生性		
		+	-	
TOX A/B	+	28	1	1
	-	38	25	139
合計		66	26	140

\*A+B+ (55 株), A-B+ (11 株); \*\*A-B- (26 株).

120 秒 (annealing) で 35 サイクル行った。増幅産物は 1.5% アガロースゲル電気泳動後、エチジウム・ブロマイド染色を行い、紫外線照射下で観察した。PCR の結果から、分離菌株を toxin A 陽性 toxin B 陽性 (A+B+), toxin A 陰性 toxin B 陽性 (A-B+), toxin A 陰性 toxin B 陰性 (A-B-) と同定した。

Toxin B 陽性 *C. difficile* の分離培養陽性検体において、便中トキシン検出結果と培養菌量との間に有意な関係があるかを、オッズ比、Fisher の正確確率検定および  $\chi^2$  独立性の検定を行って検討した。これらの統計学的処理は、統計用ソフト (Stat Flex version 6.0: アーテック) を用い、*p* 値が 0.05 未満を有意と判定した。

### 結 果

#### 1. TOX A/B QUIK CHEK による便中トキシン検出と toxin B 陽性 *C. difficile* の分離培養との比較

232 検体の TOX A/B による便中トキシン検出と *C. difficile* 分離培養結果、および分離菌株の toxin B 産生性を比較した (Table 1)。*C. difficile* は 232 検体中 92 検体から分離された。培養陽性 92 検体のうち toxin B 陽性 *C. difficile* は 66 検体 (A+B+55 検体, A-B+11 検体) から分離され、便中トキシン陽性は 28 検体であった。Toxin B 陰性 *C. difficile* が分離された 26 検体では、便中トキシン陽性は 1 検体認められた。一方、培養陰性であった 140 検体では、トキシン陽性が 1 検体認められた。TOX A/B による便中トキシン検出感度は 42.4% (28/66)、特異度は 98.8% (164/166) であった。

#### 2. Toxin B 陽性 *C. difficile* 培養陽性検体における便中トキシン検出結果と培養菌量との関係

Toxin B 陽性 *C. difficile* 培養陽性 66 検体について、便中トキシン検出と培養菌量との関係を調べた (Table 2)。便中トキシンが陽性になる傾向を培養菌

Table 2. Toxin B 陽性 *C. difficile* 培養陽性検体における便中トキシン検出結果と培養菌量との関係

培養菌量 <sup>a</sup>	TOX A/B QUIK CHEK		Odds 比 (95% 信頼区間)	p 値 <sup>b</sup>
	+	-		
1+	5	14	1	
2+	5	10	1.40 (0.319 ~ 6.14)	0.7176*
3+	18	14	3.60 (1.07 ~ 12.06)	0.0378**

<sup>a</sup>1+,  $\leq 10^3$ /ml; 2+,  $10^4 \sim 10^5$ /ml; 3+,  $\geq 10^6$ /ml.

<sup>b</sup>1+との比較.

\*Fisher の正確確率検定. \*\* $\chi^2$  検定.

量 1+ を基準にみるとオッズ比は、2+ では 1.40、3+ では 3.60 であり、培養菌量が 3+ の場合に 1+ と比較して有意 ( $p=0.0378$ ) に便中トキシンが陽性となりやすい傾向が認められた。

## 考 察

Toxin B 陽性 *C. difficile* 分離培養検査を対照法とした TOX A/B による糞便検体からのトキシン検出感度は、特異度は 98.8% と高かったが、感度は 42.4% と低い結果であった。TOX A/B によるトキシン検出感度に関する報告は、便の細胞毒性試験との比較では 77.2%<sup>10)</sup>、54.9%<sup>11)</sup>、84.3%<sup>12)</sup>、74.1%<sup>13)</sup>、分離菌株の培養上清を用いた細胞毒性試験との比較では、74.4%<sup>12)</sup>、との報告がある。細胞毒性試験は gold standard であるが、培養細胞の準備や維持が困難である。そこで、本検討では毒素産生性 *C. difficile* 分離培養法を対照法として TOX A/B による便中トキシン検出法の評価を行った。これと同様の検討では、感度が 60.6%<sup>13)</sup>、75.0%<sup>14)</sup>、50.0%<sup>15)</sup> との報告がある。今回の検討を含め、感度がそれぞれ異なっていた原因には、検討対象とした母集団の違いが影響した可能性があると考えられた。

便中トキシンの検出は培養菌量と関係があり、菌量が多い方がトキシン陽性となりやすい傾向が認められた。これと同様の傾向は Shin らも報告<sup>16)</sup>している。培養菌量と CDI の重症度との関連については、今回は検討することができなかった。

一方、培養検査は日数を要することから、CDI に関する米国のガイドライン<sup>2)</sup>や Goldenberg らの報告<sup>17)</sup>では、検出感度と特異度を上昇させるために EIA 法によるトキシン検査と *C. difficile* の抗原である glutamate dehydrogenase (GDH) 検査の併用を推奨している。最近、このような背景を受け TOX A/B に代わって GDH とトキシンの同時検査が可能で新しいキットが新たに市販され、TOX A/B は発売中止に至った。しかし、

この新しいキットによるトキシン検出感度は 57.7%<sup>15)</sup> と TOX A/B よりやや高いものの感度は十分とは言えない結果が報告されている。

以上より、EIA 法による糞便中のトキシン検出検査だけでは CDI の診断に有用な情報を提供するには不十分であると考えられた。本製品以外にもトキシンのみを検出する迅速検査キットが市販されている。このようなキットを使用した場合には、結果の解釈に注意すべきと考えられた。したがって、臨床的に CDI が疑われる場合は、GDH 検査や GDH とトキシンの同時検査が可能で新しいキット、培養検査、または分離菌株を用いたトキシン検査<sup>18)</sup>の追加実施が必要であると考えられた。

なお、本論文の要旨は第 20 回日本臨床微生物学会総会(仙台市, 2009 年 1 月)において発表した。

**利益相反:** 本研究の施行に関して申告すべき利益相反はありません。

## 文 献

- 1) Kato, H., H. Kita, T. Karasawa, et al. 2001. Colonisation and transmission of *Clostridium difficile* in healthy individuals examined by PCR ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *J. Med. Microbiol.* 50: 720-727.
- 2) 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.
- 3) 村端真由美, 加藤はる, 矢野久子, 他. 2008. 長期入院がん患児における *Clostridium difficile* 消化管保有と院内伝播に関する検討. *感染症誌* 82: 419-426.

- 4) Kuijper, E.J., J. de Weerd, H. Kato, et al. 2001. Nosocomial outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea due to a clindamycin-resistant enterotoxin A-negative strain. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 20: 528-534.
- 5) 加藤はる, 加藤直樹. 2002. *Clostridium difficile* 感染症と細菌学的検査. *日臨微誌* 12: 115-122.
- 6) Limaye, A.P., D.K. Turgeon, B.T. Cookson, et al. 2000. Pseudomembranous colitis caused by a toxin A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> strain of *Clostridium difficile*. *J. Clin. Microbiol.* 38: 1696-1697.
- 7) Lyras, D., J.R. O'Connor, P.M. Howarth, et al. 2009. Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*. *Nature* 458: 1176-1179.
- 8) 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.
- 9) Kato, H., N. Kato, S. Katow, 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.
- 10) Turgeon, D.K., T.J. Novicki, J. Quick, et al. 2003. Six rapid tests for direct detection of *Clostridium difficile* and its toxins in fecal samples compared with the fibroblast cytotoxicity assay. *J. Clin. Microbiol.* 41: 667-670.
- 11) Alcalá, L., L. Sánchez-Cambronero, M.P. Catalán, 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.
- 12) Eastwood, K., P. Else, A. Charlett, et al. 2009. Comparison of nine commercially available *Clostridium difficile* toxin detection assays, a real-time PCR assay for *C. difficile tcdB*, and a glutamate dehydrogenase detection assay to cytotoxin testing and cytotoxic culture methods. *J. Clin. Microbiol.* 47: 3211-3217.
- 13) 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検討. *日臨微誌* 21: 51-58.
- 14) 戸田宏文, 宇都宮孝治, 佐藤かおり, 他. 2009. 臨床検体を用いた TOX A/B QUIK CHEK 「ニッスイ」の評価. *医学検査* 58: 938-942.
- 15) 澤辺悦子, 北村優佳, 古畑紀子, 他. 2011. *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. *日臨微誌* 21: 253-259.
- 16) Shin, B.M., E.Y. Kuak, E.J. Lee, et al. 2009. Algorithm combining toxin immunoassay and stool culture for diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *J. Clin. Microbiol.* 47: 2952-2956.
- 17) Goldenberg, S.D., P.R. Cliff, G.L. French. 2010. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *J. Clin. Microbiol.* 48: 3048-3049.
- 18) 沢辺悦子, 古畑紀子, 春山友希, 他. 2008. *Clostridium difficile* の培養コロニーにおける toxin A, toxin B 検出試薬 TOX A/B QUIK CHEK 「ニッスイ」の有用性の検討. *日本嫌気性菌感染症研究* 38: 52-54.

Evaluation of a commercial enzyme immunoassay test kit for detection of *Clostridium difficile* toxins A and B in stool specimens

Mayumi Oki<sup>1)</sup>, Shigeki Misawa<sup>1)</sup>, Hiromi Arai<sup>1)</sup>, Yukiko Kawase<sup>1)</sup>, Masayoshi Chounan<sup>1)</sup>,  
Takaaki Kawakami<sup>1)</sup>, Yutaka Kuno<sup>1)</sup>, Takashi Horii<sup>1)</sup>, Shigemi Kondo<sup>2)</sup>,  
Kazunori Miyake<sup>2)</sup>, Yoko Tabe<sup>2)</sup>, Akimichi Ohsaka<sup>1)3)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Clinical Laboratory, Juntendo University Hospital

<sup>2)</sup>Department of Clinical Laboratory Medicine, Juntendo University School of Medicine

<sup>3)</sup>Department of Transfusion Medicine and Stem Cell Regulation, Juntendo University School of Medicine

We evaluated the performance of detection of *Clostridium difficile* toxins A and B in stool specimens by a rapid enzyme immunoassay test kit, TOX A/B QUIK CHEK (TOX A/B), in comparison with toxigenic culture as the reference method. In addition, semiquantitative analysis of *C. difficile* culture was compared with the stool toxin detection by TOX A/B. A total of 232 diarrheal stool specimens were collected and assayed from patients suspected of having *C. difficile* infection (CDI). Of the 92 culture-positive specimens, PCR analysis revealed 55 toxin A- and toxin B-positive isolates, 11 toxin A-negative and toxin B-positive isolates, and 26 toxins A- and B-negative isolates. Therefore, 66 specimens showed positive toxigenic culture results; in comparison with the toxigenic culture method, the sensitivity and specificity of the TOX A/B test for detection of toxins A and B in stool specimens were 42.4% (28/66) and 98.8% (164/166), respectively. The results of toxin detection by TOX A/B were likely positive in the specimen with the greater number of colonies on semiquantitative culture plate. Because the TOX A/B test has a low sensitivity for toxin detection in stool samples, analysis using a combination of the glutamate dehydrogenase antigen test and culture as well as toxigenic culture should be performed in suspected CDI cases with negative results for stool toxins using rapid test kits during routine testing.