

[短 報]

糞便中 *Clostridium difficile* 毒素産生関連遺伝子検出キット Verigene CDF パネルの臨床的性能評価

矢口勇治¹⁾・上田淳夫²⁾・中村浩司²⁾・玉井清子¹⁾・鈴木広道³⁾

¹⁾ ミロクメディカルラボラトリー

²⁾ 筑波メディカルセンター病院臨床検査科

³⁾ 筑波メディカルセンター病院感染症内科・臨床検査医学科

(平成 29 年 1 月 23 日受付, 平成 29 年 3 月 21 日受理)

Clostridium difficile 関連下痢症診断のため提出された糞便 107 検体を対象として, *C. difficile* 毒素産生関連遺伝子検出キット Verigene CDF パネルの性能評価試験を実施した。グルタミン酸脱水素酵素 (gultamate dehydrogenase ; GDH) 抗原陽性は 43 検体, 毒素産生 *C. difficile* 陽性は 35 検体であった。毒素検出に対する陽性一致率と陰性一致率において, イムノクロマト法 (IC 法) である *C.DIFF* QUIK CHEK コンプリートは陽性一致率 57%, 陰性一致率 99%, *X/Pect* トキシン A/B は陽性一致率 49%, 陰性一致率 99% であった。一方, Verigene CDF パネルは陽性一致率 97%, 陰性一致率 100% であった。以上により, Verigene CDF パネルは, IC 法にて GDH 抗原陽性, *C. difficile* 毒素陰性を示す検体において, 高い有用性が示唆された。

Key words: *Clostridium difficile*, Verigene, 遺伝子診断

序 文

Clostridium difficile は, 抗菌薬関連下痢症 (antibiotic-associated diarrhea) に関与し, *C. difficile* 感染症 (*C. difficile* infection ; CDI) を引き起こす。CDI の多くが抗菌薬使用後の院内感染症とされており¹⁾²⁾, 適切な感染予防対策を早期に講じる必要がある。CDI の発症には *C. difficile* が産生する toxin A (腸管毒素) および toxin B (細胞毒素) が関与している³⁾。近年, 欧米では強毒型 *C. difficile* (BI/NAP1/027 株) による CDI のアウトブレイクが報告されており⁴⁾, 大きな社会問題となっている。BI/NAP1/027 株は, toxin A/toxin B 産生の negative regulator である *tcdC* の変異により toxin A/toxin B の産生性が亢進しており⁵⁾, さらに第 3 の毒素ともいわれる binary toxin

(actin-specific ADP-ribosyltransferase) を産生する。

CDI の診断には糞便から分離した *C. difficile* の毒素産生を確認するか, 糞便中の毒素を検出することが必要であるが, 糞便から *C. difficile* を分離培養するには時間を要するため迅速性に劣り, 日常診療における CDI の診断には不向きである。日本における現状は, *C. difficile* の特異抗原であるグルタミン酸脱水素酵素 (gultamate dehydrogenase ; GDH) や, toxin A および toxin B をイムノクロマト法 (IC 法) などで検出する簡易検査キットが, 体外診断用 (in vitro diagnostics ; IVD) 医薬品として市販されている。しかし, 現在の IC 法による簡易検査キットは分離培養検査に比べて迅速性には優れるが, 毒素の検出感度が十分ではない^{6)~8)}。そのため, 海外ではこれらの簡易検査キットと, PCR 法や LAMP 法などの糞便中毒素遺伝子検出法による 2 段階検査が推奨されている⁹⁾。

全自動遺伝子検査装置 Verigene システム (日立ハイテクノロジーズ) (図 1) はマイクロアレイ法を測定原理とし, 検体から直接, 標的とする病原体の核酸抽出から増幅反応, ハイブリダイゼーションを全自動で行い, 測定が 2 時間から 2.5 時間で完了することを最大の特徴とするシステムである¹⁰⁾。同システムの専

著者連絡先 : (〒305-8558) 茨城県つくば市天久保 1-3-1
筑波メディカルセンター病院感染症内科・臨床検査医学科
鈴木広道
TEL: 029-851-3511
FAX: 029-858-2773
E-mail: hsuzuki@tmch.or.jp

用遺伝子検査試薬である、Verigene CDF パネル（日立ハイテクノロジーズ、Verigene CDF）は、糞便検体を簡便な前処理法（図2）によって処理し、検体中の *C. difficile* toxin A/toxin B 産生遺伝子 (*tcdA/tcdB*) と、強毒型 *C. difficile* (BI/NAP1/027 株) の特徴である binary toxin 産生遺伝子 (*cdt*) および *tcdC* の変異 (117 番目塩基対の欠失) を、検査開始から約 2 時間で検出することが可能である。米国では、2012 年にアメリカ食品医薬品局 (U.S. Food and Drug Administration; FDA) から体外診断用医薬品として認可されている。

今回、本邦の市中病院における糞便検体を対象に、毒素産生 *C. difficile* 検出に対する Verigene CDF の性能について評価を実施した。



図1. 全自動遺伝子検査装置 Verigene システム

材料と方法

本評価試験は、筑波メディカルセンター病院（許可病床：453 床）において、2015 年 5 月 28 日から 2016 年 8 月 15 日の期間に、CDI 診断のため提出された糞便検体を対象として前向きに実施した。本試験は、試験計画書を筑波メディカルセンター病院倫理委員会に提出し承認を得て実施した。本試験の実施に際して、個人より同意の取得は行わないが、本試験実施について筑波メディカルセンター病院ホームページ上で掲示し情報公開を行い実施した。

試験手順概要について図3に示す。一次試験として、Verigene CDF を用いた検査を使用説明書に従って実施し、体外診断用医薬品として承認されている IC 法 2 試薬、*C.DIFF* QUIK CHEK コンプリット (*C.DIFF* QUIK CHEK, アリーアメディカル) および *X/Pect* トキシシン A/B (*X/Pect*, 関東化学) を用いた検査を添付文書に記載された方法に従い実施した。毒素検出に対して 3 法のいずれかが他 2 法と不一致を認めた場合、および *C.DIFF* QUIK CHEK において GDH 抗原陽性かつ toxin A/toxin B 陰性であった場合は、同検体を嫌気ポーターに無菌的に採取した後、ミロクメディカルラボラトリーにおいて、*C. difficile* 分離培養・同定および分離菌株から IC 法での toxin A/toxin B 検出を実施した（二次試験）。

C. difficile の分離培養は、糞便検体に 99% エタノールを等量混合し、攪拌して室温に 30 分間放置した後、

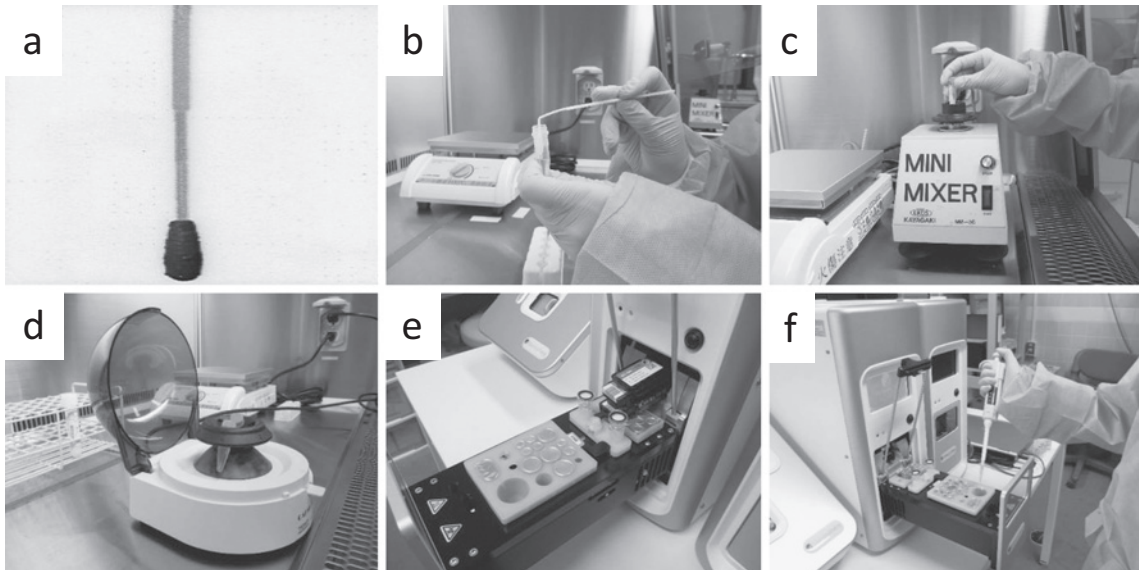


図2. Verigene CDF パネルおよび IC 法 2 試薬を用いた試験方法

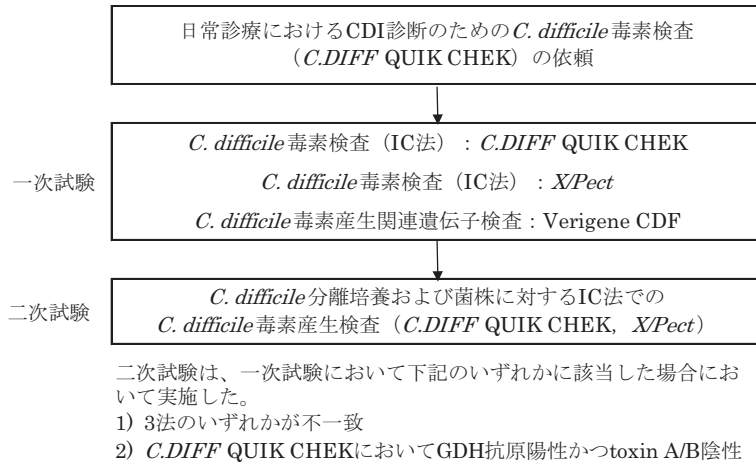


図3. 前処理方法

Verigene CDF パネル前処理工程。綿棒を用いて糞便検体を採取し、bufferに懸濁する (a, b)。ミキサーにて15秒間攪拌後、30秒間遠心する (c, d)。Verigene本体に試薬をセットし、サンプルの上清100μLを分注する (e, f)。

100 μLをCCMA培地EX (日水製薬) に塗抹し、アネロバック・ケンキ (三菱ガス化学) を用いて嫌気条件下にて48時間培養した。選択分離培地上の典型的な性状を呈したコロニーをグラム染色により菌体の大きなグラム陽性桿菌であることを確認し、必要に応じて生化学的同定キット (BD BBLCRYSTAL ANR, 日本ベクトン・ディッキンソン) によって菌種の同定を実施した。また、すべての分離菌株について、*C.DIFF* QUIK CHEKによるGDH抗原の陽性を確認した。

分離菌株からのIC法によるtoxin A/toxin Bの検出は*C.DIFF* QUIK CHEKおよび*X/Pect*を使用した。*X/Pect*については添付文書に従って測定した。*C.DIFF* QUIK CHEKにおいては、選択分離培地上のコロニー複数個を希釈液500 μLにMcFarland No.3の濁度となるように懸濁し、以降は添付文書に従って糞便検体と同様の手順で測定した。

一次試験において3法の結果が一致している場合および、一致していない場合は二次試験結果を基準結果として、それぞれの検査法に対する陽性一致率・陰性一致率を算出した。

一次試験、二次試験に必要な検体量がないと判断された場合、*C.DIFF* QUIK CHEK実施後、24時間以内に他の一次試験を実施できなかった場合については対象から除外した。また、2015年11月1日から2016年6月25日の期間においては、*C.DIFF* QUIK CHEKでGDH抗原陰性かつtoxin A/toxin B陰性を示した検体については除外した。

結 果

対象期間において、IC法による*C. difficile*毒素検査のため、439件の糞便検体の提出があった。これらの内、臨床性能評価のために十分な糞便検体の残量がなかった場合(93検体)、および*C.DIFF* QUIK CHEK実施後、24時間以内に比較評価を実施できなかった場合(48検体)を評価の対象外とした。また、2015年11月1日から2016年6月25日の期間に、*C.DIFF* QUIK CHEKにおいてGDH抗原、toxin A/toxin Bのいずれも陰性であった場合(190検体)、これらのいずれも該当しないが、プロトコルに定められた全ての検査を実施できなかった場合(1検体)を除外し、最終的に107検体(94症例)に対して臨床性能評価試験を実施した(図4)。検体由来の被験者背景は、男性55%、平均年齢72歳±21であり、外科系患者36%(34名)、悪性腫瘍罹患患者14%(13名)、糖尿病罹患患者15%(14名)、免疫抑制剤使用患者12%(11名)であった。

臨床性能評価試験結果を図5に示す。*C.DIFF* QUIK CHEKによるGDH抗原陽性、toxin A/toxin B陽性を認めた21検体の内、*X/Pect*では17検体のtoxin A/toxin B陽性を認め、全例Verigene CDFで*tcdA/tcdB*の検出を認めた。*X/Pect*においてtoxin A/toxin B陰性であった4検体の内、3検体はVerigene CDFにより*tcdA/tcdB*の検出を認め、培養で毒素産生*C. difficile*の検出を認めた。残りの1検体はVerigene CDFで*tcdA/tcdB*の検出を認めず、培養でも毒素産生*C. difficile*の検出を認めなかったことから、

C.DIFF QUIK CHEK の偽陽性と考えられた。

22 検体において *C.DIFF* QUIK CHEK による GDH 抗原陽性, toxin A/toxin B 陰性を認めた。これらの内, 1 検体で *X/Pect* により toxinA/toxinB 陽性であったが, Verigene CDF において *tcdA/tcdB* は検出されず, 培養においても毒素産生 *C. difficile* の検出

は認められなかったことから, *X/Pect* の偽陽性と考えられた。他 21 検体では *X/Pect* も同様に陰性であったが, この内, 14 検体において Verigene CDF で *tcdA/tcdB* の検出を認め, 培養で全例毒素産生 *C. difficile* の検出を認めた。残りの 7 検体は, Verigene CDF による *tcdA/tcdB* の検出を認めなかったが, 1 検体の分離培養において毒素産生 *C. difficile* を検出した。同分離菌株について約 5,000CFU/mL の濃度になるよう菌液を調整し, Verigene CDF による再測定を行った結果, *tcdA/tcdB* の検出を認めた。

残りの 64 検体では *C.DIFF* QUIK CHEK にて GDH 抗原陰性, toxin A/toxin B 陰性であった。これらは全例 Verigene CDF において *tcdA/tcdB* は検出されず, 培養でも毒素産生 *C. difficile* は検出されなかった。

以上の結果より, *C. difficile* の IC 法 2 試薬における陽性一致率, 陰性一致率はそれぞれ *C.DIFF* QUIK CHEK は陽性一致率 57.1%, 陰性一致率 98.6%, *X/Pect* は陽性一致率 48.6%, 陰性一致率 98.6% であった(表 1)。一方, Verigene CDF は陽性一致率 97.1%, 陰性一致率 100% であった。試験期間中に Verigene CDF において binary toxin 産生遺伝子 (*cdt*) および *tcdC* 変異の検出は認めなかった。

考 察

IC 法は毒素検出のみで用いた場合, 便中の毒素産生 *C. difficile* を十分に検出することができない。Humphries らは, 遺伝子検査法が 98% の症例で毒素産生 *C. difficile* を検出し得たのに対し, 軽症 *C. difficile* 感染では IC 法の感度は 49% のみであり, 重症例でも感

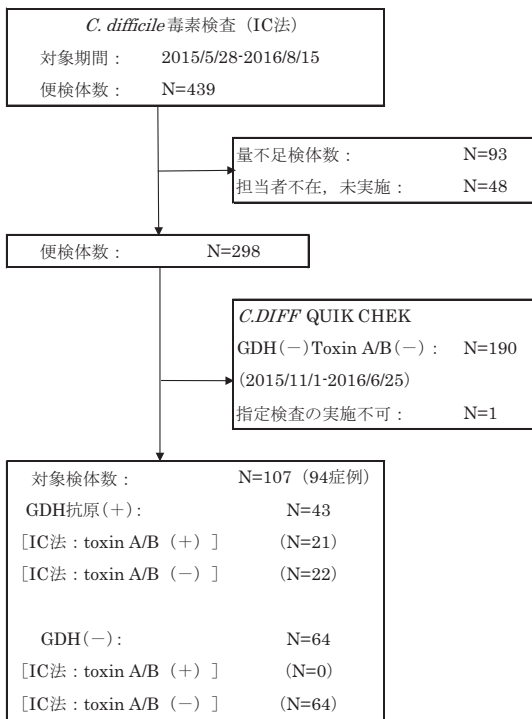


図 4. 試験対象糞便検体の選定方法

<i>C.DIFF</i> QUIK CHEK	<i>X/Pect</i> トキシン A/B	N (%)	Verigene CDF パネル	N (%)	<i>C. difficile</i> 分離培養菌株 (IC法)	
					toxin A/B(+)	toxin A/B(-)
GDH(+)toxin A/B(+) N=21	toxin A/B(+)	17 (81%)	<i>tcdA/tcdB</i> (+)	17 (100%)	3 (100%)	0 (0%)
	toxin A/B(-)	4 (19%)	<i>tcdA/tcdB</i> (-)	0 (0%)		
GDH(+)toxin A/B(-) N=22	toxin A/B(+)	1 (5%)	<i>tcdA/tcdB</i> (+)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)
	toxin A/B(-)	21 (95%)	<i>tcdA/tcdB</i> (-)	1 (100%)		
GDH(-)toxin A/B(-) N=64	toxin A/B(+)	0 (0%)	<i>tcdA/tcdB</i> (+)	3 (75%)	14 (100%)	0 (0%)
	toxin A/B(-)	64 (100%)	<i>tcdA/tcdB</i> (-)	1 (25%)		
					1 (16%)	6 (84%)
			<i>tcdA/tcdB</i> (+)	0 (0%)		
			<i>tcdA/tcdB</i> (-)	64 (100%)		

図 5. 臨床性能評価試験結果

表1. 本性能評価試験における各試薬の陽性一致率および陰性一致率

試薬名	陽性一致率	陰性一致率
C. DIFF QUIK CHEK	57.1%	98.6%
X/Pect トキシン A/B	48.6%	98.6%
Verigene CDF パネル	97.1%	100.0%

度は58%のみであったと報告している⁸⁾。我々の研究においても、C. DIFF QUIK CHEKのGDH抗原検査は、便中C. difficileの存在を的確に診断したが、毒素産生C. difficileの有無はC. DIFF QUIK CHEK, X/Pectのいずれにおいても不十分であった。

CDIは本邦においても入院費用の増大、入院期間の延長が報告されているが¹¹⁾、主要症状である下痢症は入院患者の12%、3週間以上の入院では27%の患者に認め¹²⁾、その大部分は浸透圧性下痢症などの非感染性下痢症であることが知られている¹³⁾。本研究結果でも示されているように、GDH抗原は便中のC. difficileの有無に対して鋭敏であるが、GDH抗原陽性の半数弱(46%)は毒素非産生株であることが報告されている¹⁴⁾。近年の研究では、毒素非産生C. difficile株はCDIの発症に対して防衛的に働くことが示されており¹⁵⁾、毒素産生C. difficileをより特異的に検出する方法が望まれている。

便中毒素産生C. difficile遺伝子診断法として、海外ではVerigene CDFの他に、Xpert C. difficile (GeneXpertシステム, Cepheid合同会社)、BDマックスCDIFF (BDマックス 全自動核酸抽出増幅検査システム, 日本ベクトン・ディッキンソン)、IMDx C. difficile assay (Abbot m2000 RealTime System, Abbot)、Loop-Mediated Isothermal Amplification法(LAMP法)を用いたillumigene C. difficile (illumine Molecular Diagnostic System, Meridian Bioscience, Inc.)、Verigeneシステムと同様にマイクロアレイ法を用いた腸管病原体を網羅的に検出するFilmArray GI panel (Filmarray system, ビオメリュー)が販売されている。この内、2016年12月時点で、本邦ではBDマックスCDIFFが体外診断用医薬品として認可されている(製造販売承認番号: 22800EZ00002000)。

今回、我々の研究ではVerigene CDFは便中のC. difficileが産生する毒素を、高い精度で検出できることが示された。Gilbreath JJらはXpert C. difficile, BDマックスCDIFFとの比較試験において、Verigene CDFは同等の精度を有することを示しており¹⁶⁾、米国で行われた多施設共同研究結果¹⁷⁾において、培養法

と高い一致率で迅速に結果が得られることが示されている。本邦では、国立国際医療研究センターでの単施設研究で同様の結果を報告している¹⁸⁾。今回、我々の研究成果と合わせ、本邦においてもVerigene CDFは毒素産生C. difficileに対する迅速遺伝子診断として高い精度を有することが示された。

研究に対する制限として、我々の研究は単施設前向き観察研究であり、他の地域では結果が異なる可能性があること、研究期間中において強毒株の検出を認めず、同評価がされていないことがあげられる。米国においては、強毒株は高い頻度で検出され⁸⁾、重症度とも相関が認められるが¹⁹⁾、本邦においての検出はまれであり²⁰⁾、Verigene CDFの国内での強毒株検出能については今後の追加検証が必要と考えられる。

利益相反: 本臨床試験は全自動遺伝子検査装置Verigeneシステムの測定項目の一つであるC. difficile毒素産生関連遺伝子検出キット(CDFパネル)の体外診断用医薬品(IVD)申請用データの取得を目的として実施された。臨床試験に関わる必要試薬・消耗品は日立ハイテクノロジーズ社より提供を受け実施された。

文 献

- 1) Brown, K.A., N. Khanafer, N. Daneman, et al. 2013. Meta-analysis of antibiotics and the risk of community-associated *Clostridium difficile* infection. *Antimicrob Agents Chemother* 57: 2326-2332.
- 2) Evans, C.T., N. Safdar. 2015. Current Trends in the Epidemiology and Outcomes of *Clostridium difficile* Infection. *Clin Infect Dis* 60: S66-71.
- 3) Kelly, CP, JT LaMont. 2008. *Clostridium difficile*-more difficult than ever. *N Engl J Med* 359: 1932-1940.
- 4) 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.
- 5) Voth, DE, JD Ballard. 2005. *Clostridium difficile* toxins: Mechanism of action and role in disease. *Clin Microbiol Rev* 18: 247-263.
- 6) Chapin, K.C., R.A. Dickenson, F. Wu, et al. 2011. Comparison of five assays for detection of *Clostridium difficile* toxin. *J Mol Diagn* 13: 395-400.
- 7) Novak-Weekley, S.M., E.M. Marlowe, J.M. Miller, et al. 2010. *Clostridium difficile* testing in the clinical laboratory by use of multiple testing algorithms. *J Clin*

- Microbiol 48: 889-893.
- 8) Humphries, R.M., D.Z. Uslan, Z. Rubin. 2013. Performance of *Clostridium difficile* toxin enzyme immunoassay and nucleic acid amplification tests stratified by patient disease severity. J Clin Microbiol 51: 869-873.
 - 9) Bagdasarian, N., K. Rao, P.N. Malani. 2015. Diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* in adults: a systematic review. JAMA 313: 398-408.
 - 10) 大楠清文, 江崎孝行. 2001. 遺伝子解析技術の新たな潮流と感染制御への適応. 日化療会誌 59: 441-453.
 - 11) Yasunaga, H., H. Horiguchi, H. Hashimoto, et al. 2012. The burden of *Clostridium difficile*-associated disease following digestive tract surgery in Japan. J Hosp Infect 82: 175-180.
 - 12) Garey, K.W., G. Graham, L. Gerard, et al. 2006. Prevalence of diarrhea at a university hospital and association with modifiable risk factors. Ann Pharmacother 40: 1030-1034.
 - 13) Polage, C.R., J.V. Solnick, S.H. Cohen. 2012. Nosocomial diarrhea: evaluation and treatment of causes other than *Clostridium difficile*. Clin Infect Dis 55: 982-989.
 - 14) Shim, J.K., S. Johnson, M.H. Samore, et al. 1998. Primary symptomless colonisation by *Clostridium difficile* and decreased risk of subsequent diarrhea. Lancet 351: 633-636.
 - 15) Gerding, D.N., T. Meyer, C. Lee, et al. 2015. Administration of spores of nontoxigenic *Clostridium difficile* strain M3 for prevention of recurrent *C. difficile* infection: a randomized clinical trial. JAMA 313: 1719-1727.
 - 16) Gilbreath, J.J., P. Verma, A.N. Abbott, et al. 2014. Comparison of the Verigene *Clostridium difficile*, Simplexa *C. difficile* Universal Direct, BD MAX *Cdiff*, and Xpert *C. difficile* assays for the detection of toxigenic *C. difficile*. Diagn Microbiol Infect Dis 80: 13-18.
 - 17) Carroll, K.C., B.W. Buchan, S. Tan, et al. 2013. Multi-center evaluation of the Verigene *Clostridium difficile* nucleic acid assay. J Clin Microbiol 51: 4120-4125.
 - 18) Tojo, M., M. Nagamatsu, K. Hayakawa, et al. 2014. Evaluation of an automated rapid diagnostic test for detection of *Clostridium difficile*. PLoS One 9: e106102.
 - 19) Rao, K., D. Micic, M. Natarajan, et al. 2015. *Clostridium difficile* ribotype 027: relationship to age, detectability of toxins A or B in stool with rapid testing, severe infection, and mortality. Clin Infect Dis 61: 233-241.
 - 20) Iwashima, Y., A. Nakamura, H. Kato, et al. 2010. A retrospective study of the epidemiology of *Clostridium difficile* infection at a University Hospital in Japan: genotypic features of the isolates and clinical characteristics of the patients. J Infect Chemother 16: 329-333.

The Performance of the Verigene CDF Panel in the Molecular Identification of Toxigenic *Clostridium difficile* in Stool Samples

Yuji Yaguchi¹⁾, Atsuo Ueda²⁾, Koji Nakamura²⁾, Kiyoko Tamai¹⁾, Hiromichi Suzuki³⁾

¹⁾Miroku Medical Laboratory Inc.

²⁾Department of Clinical Laboratory, Tsukuba Medical Center Hospital

³⁾Division of Infectious Diseases, Department of Medicine/Department of Clinical Laboratory Medicine, Tsukuba Medical Center Hospital

We prospectively evaluated the performance of the Verigene CDF panel, *C. DIFF* QUIK CHEK COMPLETE and Xpect *Clostridium difficile* Toxin A/B Test in May 2015 and August 2016. Forty-three of 107 stool samples were positive for glutamate dehydrogenase (GDH) and 35 were positive for toxigenic *C. difficile*. The positive concordance rate and negative concordance rate of the *C. DIFF* QUIK CHEK COMPLETE were 57% and 99%, respectively, while the positive concordance rate and negative concordance rate of the Xpect *Clostridium Difficile* Toxin A/B Test were 49% and 99%. In contrast, the Verigene CDF panel showed a positive concordance rate of 97% and a negative concordance rate of 100%. The Verigene CDF panel reliably detects toxigenic *C. difficile* in stool samples. It was considered highly valuable—especially in the immunochromatographic assays of GDH-positive and toxin—negative of stool samples.