

[症例報告]

Binary toxin 産生性 *Clostridioides difficile* (*Clostridium difficile*) による市中型偽膜性大腸炎の1例

石村さおり¹⁾²⁾・折田 環¹⁾・小林敦子²⁾・加藤はる³⁾

¹⁾ 宝塚市立病院中央検査室

²⁾ 宝塚市立病院感染対策室

³⁾ 国立感染症研究所細菌第二部

(平成 29 年 2 月 20 日受付, 平成 29 年 6 月 21 日受理)

Clostridioides difficile (*Clostridium difficile*) 感染症 (CDI) は, 抗菌薬使用等による腸内フローラの攪乱によって引き起こされることが多い。今回, 我々は, 抗菌薬使用歴がない外来下痢患者で, binary toxin 産生性 *C. difficile* による偽膜性大腸炎の症例を経験した。患者は下痢と食欲不振で発症して外来受診し入院となった。発症 2 か月前に抗菌薬の投与歴はなく, また過去の入院歴もなかった。入院第 3 病日に行った迅速キットによる糞便中クロストリジウムデフィシル抗原 (glutamate dehydrogenase, GDH) および toxin A/toxin B は陰性であったが, その後も頻回の下痢と腹痛が続いたため, 第 8 病日に下部消化管内視鏡検査を実施したところ, 大腸の広範囲に偽膜形成を認めた。分離菌株は toxin A 陽性 toxin B 陽性 binary toxin 陽性であり, PCR-ribotype 019/*slpA* sequence type cr-03 と同定された。本症例は, binary toxin 産生性 *C. difficile* に起因する市中感染型重症 CDI であった。

Key words: *Clostridioides difficile* (*Clostridium difficile*) 感染症 (CDI), glutamate dehydrogenase (GDH), binary toxin, 偽膜性大腸炎

序 文

Clostridioides difficile (*Clostridium difficile*) は有芽胞のグラム陽性桿菌で, 芽胞の状態では, 熱, 乾燥, 消毒薬への抵抗性が強く, 医療関連感染の重要な原因菌である。また, 抗菌薬関連下痢症の主要な原因菌である。抗菌薬使用等により健全な腸内フローラのバランスが崩れることが *C. difficile* の過増殖を招き, その結果 *C. difficile* が産生する toxin A, ならびに toxin B が病原性を発揮し *C. difficile* 感染症 (CDI) を引き起こす。また 2000 年以降, 北米, およびヨーロッパの一部の国では toxin A, toxin B に加えて第三の毒素である binary toxin 産生株による感染が注目されて

いる¹⁾²⁾。今回我々は, 抗菌薬使用歴がなく入院歴もない外来患者で binary toxin 産生 *C. difficile* による CDI 重症例を経験した。

症 例

症例は 70 歳代, 男性。高脂血症, 高血圧ならびに軽度貧血の既往があり, 長年に渡り投薬治療を受けていたが薬歴には抗菌薬やプロトンポンプ阻害剤 (PPI)³⁾ は含まれていなかった。また過去に遡って入院歴もなかった。入院 4 日前に下痢と食欲不振が発症した。症状が水様性下痢になり 3 日間続いたため近医を受診, その際には構語障害を呈していた。精査目的で当院に紹介され, 脱水による腎機能異常および神経症状を伴った消化管感染症の診断で入院加療となった。

来院時現症

意識清明。体温 36.7°C。血圧 112/60 mmHg。脈拍 68/min。正・腹部はグル音微弱, 平坦・軟, 自発痛・右下腹部に圧痛があった。入院日 (第 1 病日) には頻

著者連絡先: (〒665-0827) 兵庫県宝塚市小浜 4 丁目 5-1

宝塚市立病院中央検査室

石村さおり

TEL: 0797-87-1161

FAX: 0797-87-4419

E-mail: takarasakin@gmail.com

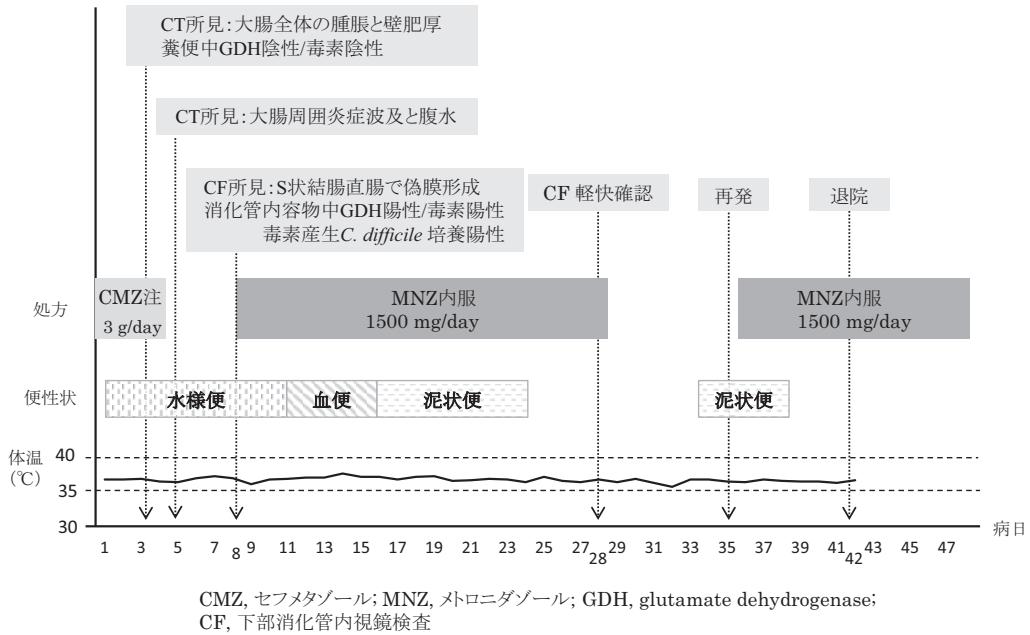


図1. 臨床経過

表1. 入院時(第1病日)血液検査結果

WBC	113×10 ² /μL	TP	6.8 g/dL	UN	54.4 mg/dL
RBC	315×10 ⁴ /μL	Albumin	3.4 g/dL	Creatinine	1.72 mg/dL
Hb	10.6 g/dL	AST	32 U/L	eGFR	30.81
Ht	30.5 %	ALT	15 U/L	Glucose	106 mg/dL
PLT	10.4×10 ⁴ /μl	LD	320 U/L	CRP	17.7 mg/dL
		ALP	169 U/L		

WBC, white blood cell count; RBC, red blood cell count; Hb, hemoglobin; Ht, hematocrit; PLT, platelet count; TP, total protein; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; LD, lactate dehydrogenase; ALP, alkaline phosphatase; UN, urea nitrogen; eGFR, estimated glomerular filtration rate; CRP, C-reactive protein

回に水様便を認め排便回数を数えることができない状態だった(図1)。血液検査では炎症反応の上昇と腎機能異常を認めた(表1)。来院時の腹部CT検査では、大腸全体に炎症性変化と考えられる腫脹と壁肥厚を認め、また周囲の脂肪組織にも広範に炎症の波及を認めた(図2)。

臨床経過

生魚を喫食した翌日より発症したという食歴から、感染性胃腸炎原因菌目的の便培養材料を採取後、第1病日から5日間、セフメタゾール(CMZ) 3 g/dayと整腸剤による治療を開始した。しかし症状の改善傾向

が見られなかったため、第3病日に糞便中クロストリジウムディフィシル抗原(glutamate dehydrogenase, GDH)および毒素(toxin A/toxin B)検出の迅速検査を実施したが、GDH、毒素とも陰性だった。その後も症状が続き第5病日に再び腹部CT検査を行ったところ、第1病日より大腸周辺脂肪組織への炎症の波及が更に広くなり、また腹水が認められた(図3)。画像と症状からCDIを強く疑い、第8病日に下部消化管内視鏡検査(CF)を実施したところ、S状結腸から直腸の全周性に白色～帯黄色の浮腫状粘膜と偽膜形成を認め、介在する健常粘膜はほぼ消失して

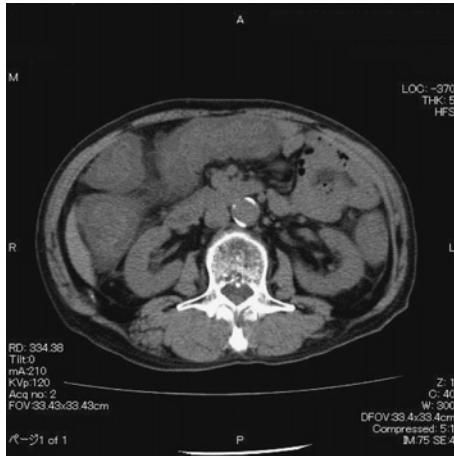


図2. 第1病日腹部CT画像

大腸全体に腫脹と壁肥厚があり炎症性変化を認め、周辺脂肪組織へも広範に炎症の波及が認められた。

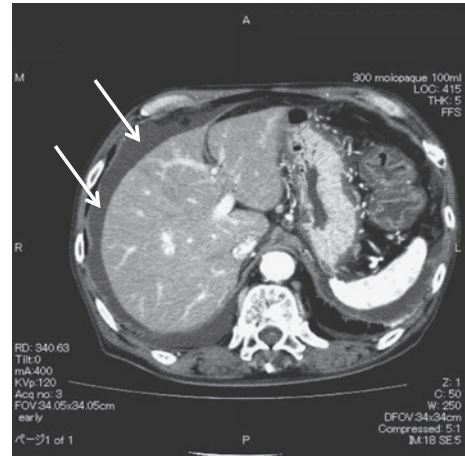


図3. 第5病日腹部造影CT画像

第1病日と比較して周囲の脂肪組織の炎症波及が広がり、また腹水(矢印)の貯留が認められた。

おり(図4a, 図4b), 偽膜性大腸炎の診断が得られた。CMZは5日間で終了、整腸剤のみの継続であったのに加え、同日よりメトロニダゾール(MNZ)1500mg/dayの内服治療を開始したところ、第28病日に消化管症状の回復が認められたためMNZの内服を終了した。MNZ内服終了1週間後の第35病日に強い腹痛、軟便・泥状便を発症、頻回に排便する状態となり、再発と診断され、第36病日より再び14日間のMNZ内服が行われた。腎機能低下があったことを考慮し、VCMへの切り替えは行われず、MNZによる治療は初回、再発のエピソードで合計35日間に及んだが、第42病日をもって軽快退院となった。

細菌学的検査

便培養検査: 第1病日に採取した便で、CHROMagar O157TAM(関東化学), SS寒天培地(栄研化学), TCBS寒天培地(栄研化学), CCDA培地(OXOID)を用いて感染性胃腸炎原因菌検索目的の便培養検査を実施した。各選択培地で腸管出血性大腸菌, *Salmonella* 属, *Shigella* 属, *Yersinia* 属, *Campylobacter* 属, *Vibrio* 属, および *Aeromonas* 属の発育は認めなかった。

C. difficile 感染症目的の便検査

(1) GDH/毒素検出検査

C.DIFF QUIK CHEK COMPLETE(アリーアメディカル)を使用した。第3病日に採取された糞便検体ではGDH陰性/毒素(toxin A and/or toxin B)陰性であったが、第8病日にCFを行った際に採取された消化管内容物では、GDH陽性/毒素陽性だった。

(2) *C. difficile* 培養・同定検査

第3病日に採取された検体では、GDH陰性であったため、*C. difficile* 培養等のそれ以上の検査は行われなかった。第8病日に採取された消化管内容物に等量のエタノールを加え、60分処理後⁴⁾, Cycloserine-Cefoxitin-Mannitol Agar培地EX(CCMA培地EX, 日水製薬)を用いて、35°C嫌気条件下で48時間培養をおこなった。集落辺縁ラフ型でマンニト分解のグラム陽性桿菌の発育を認め、この集落をCCMA培地EXに継代培養し、初代分離と同様の集落性状を確認した上でGDH陽性/毒素陽性を確認し、毒素産生性 *C. difficile* の同定結果を得た。

(3) *C. difficile* 菌株解析

第8病日採取検体より分離された *C. difficile* 菌株についてさらに詳しく解析した。PCRにより toxin A 遺伝子, toxin B 遺伝子, および binary toxin 遺伝子を検出したところ^{5)~7)}, 分離菌株は toxin A 陽性 toxin B 陽性 binary toxin 陽性と同定された。また、16S-23S rRNA 遺伝子間の intergenic spacer region を PCR により増幅させることにより行うタイピング法(PCR-ribotyping)⁸⁾⁹⁾により type 019 とタイプされ(図5), surface layer protein A をコードする遺伝子配列の多様性を利用した方法(*slpA* sequence typing)により, type cr-03 と型別された⁹⁾。

考 察

本症例は当初、生魚喫食歴があったため、*Vibrio* 属などによる感染性胃腸炎を疑い *C. difficile* 感染症

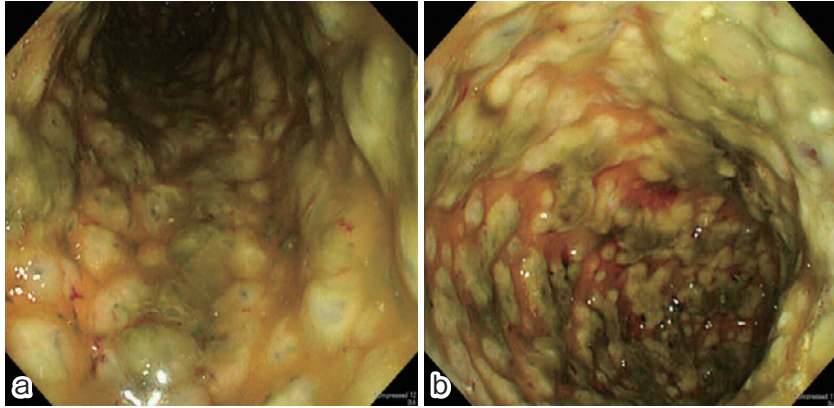


図 4a, b. 第 8 病日下部消化管内視鏡直腸画像
全周性に浮腫状粘膜と偽膜が認められた。

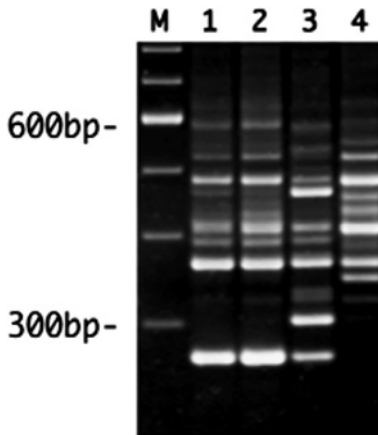


図 5. 分離菌株における PCR-ribotype pattern
lane 1, 本症例よりの分離株；lane 2, PCR-ribotype 019 株；lane 3, PCR-ribotype 027 株；lane 4, PCR-ribotype 078 株；lane M, DNA サイズマーカー（100 bp ladder）

(CDI) 確定診断に至るまでにセフメタゾール (CMZ) による治療が行われた。CF および細菌学的検査により CDI の診断がなされたのは第 8 病日であったが、入院時より下痢が認められ、第 1 病日に実施した腹部 CT 検査で既に大腸の広範囲に炎症の波及像を認めたため、抗菌薬投与歴なく発症した市中獲得型重症 CDI であると判断した。本症例のように抗菌薬投与歴も入院歴・長期療養施設入所歴もない外来患者が下痢症状を訴えて来院した場合、CDI が診断の選択肢に入らないことが多い。CDI の市中感染は医療関連感染と比較して感染実態があきらかではないが、医療関連感染例と比較すると抗菌薬使用歴がない症例が多いと報

告されている^{3)10)~12)}。米国のある地域の住民対象の集団ベース研究では、認められた CDI のうち市中獲得型が 41% を占めた¹²⁾。この Khanna らの調査では、市中獲得型 CDI 患者は、院内獲得型 CDI 患者と比較して若年であり、重篤な基礎疾患がなく、抗菌薬使用が少ない傾向が認められたものの、イレウスや中毒性巨大結腸等の合併や再発率は市中獲得型と院内獲得型で差がなかったことが明らかとなった¹²⁾。本症例は、70 歳代と高齢ではあったが、重篤な基礎疾患や抗菌薬使用歴がない点はこれらの報告の市中獲得 CDI に認められる特徴と一致していた。日本においても、本症例のような市中獲得型 CDI は見過ごされている可能性が高いと考えられた。

また、本症例は生魚喫食後に腸炎を発症した。CDI は食中毒としてのエビデンスはないものの、魚介類からの *C. difficile* 分離が報告されている¹³⁾¹⁴⁾。本症例が喫食した魚介類の詳細な情報も食品残品もなく、本例における食品と CDI 発症の因果関係は不明であった。食品との関連も含め、市中感染型 CDI について今後検討していく必要があると考えられる。

第 3 病日に採取した糞便検体では GDH 陰性毒素検査陰性であったことで治療開始時から疑った食中毒などの感染性胃腸炎をより一層疑う状況となった。*C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE* は GDH、毒素とも酵素免疫反応 (EIA) による検査である。EIA による GDH 検出感度は 90% を超えほぼ 100% に近く、培養法との一致率も高いが、毒素検出の感度は低く約 50% 程度であると報告されている¹⁵⁾。しかし EIA による GDH 測定は PCR-ribotype 027 以外の菌株が分離された検体については毒素産生性 *C. difficile* 分離培養と比

較すると感度が約70%であり、必ずしもスクリーニング法として有用ではないとの報告がある¹⁶⁾。当院では迅速検査でGDH陰性の場合には次の検査ステップは行わないアルゴリズムによって検査を行っていたため、本症例の第3病日の便について *C. difficile* 培養を実施しなかったが、結果的に適切な判断ではなかったと考えられた。臨床症状や画像の情報から総合的に判断し、CDIが疑わしい場合は迅速検査の結果が陰性であっても、培養法等のより感度の高い検査の追加が必要と考えられた¹⁰⁾。

本症例で分離された *C. difficile* 菌株は binary toxin 陽性と同定された(図5)。PCR-ribotype 027 (BI/NAP 1/027) *C. difficile* は、2000年以降に北米を中心に多くのアウトブレイクの流行株となり hypervirulent 株としてよく知られる binary toxin 陽性株である。Heらの whole-genome sequence 解析による検討では、PCR-ribotype 027 株が、北米から大陸を超えて急速に広がったことが検証されたが、このHeらの研究で調べられた日本由来のPCR-ribotype 027 菌株は、北米起源から広がった菌株ではなかったと報告されている¹⁾。また、動物からの分離が報告されてきたPCR-ribotype 078 菌株も binary toxin 産生株であり、ヒトのCDIにおける本菌分離の増加と重症化との関連がヨーロッパから報告されている²⁾。興味深いことに、PCR-ribotype 078 株による感染症例は、027 株による感染症例と比較すると、より年齢が若く、市中獲得型が多かったと報告されている²⁾。PCR-ribotype 027 株および078 株による感染とCDIの重症化および不良転帰の関係の報告は少なくないものの、特に本2タイプ菌株が流行していない状況では、重症化と関係がないと認識されている¹⁷⁾。本症例より分離された菌株は、PCR-ribotype 019 と型別された。PCR-ribotype 019 株は、米国、オランダ、カナダ、英国から収集検討された42株中1株で同定され¹⁸⁾、稀な分離ではないが、現在のところ特に流行株として注目されているタイプではないと考えられる。日本での研究では、PCR-ribotype 019 (Japan-ribotype g9376) は、2003年から2007年までのCDI症例からの分離株87株中1株⁹⁾で、2011年から2013年までのCDI症例からの分離株159株中1株¹⁹⁾で認められたが、日本の医療機関でも優勢株・流行株となったという報告はない。

slpA sequence typing は、菌体表面タンパクのひとつである surface layer protein A をコードする遺伝子配列の多様性を利用した方法であり、*slpA* 遺伝子の variable region をPCRで増幅した産物をシーケンスすることにより行う⁹⁾。菌株間比較が電気泳動パ

ンドパターンの比較によらないため、異なる研究室におけるタイピング結果をインターネット等で比較できる点、multilocus sequence typing や multilocus variable-number tandem-repeat analysis のように複数の遺伝子解析をする必要がない点で、優れている。本症例分離株で認められた *slpA* sequence type cr-03 は、カナダでの分離株2株では1株はPCR-ribotype 019であったが、もう1株は異なるPCR-ribotype であり¹⁸⁾、日本分離株で報告された2株はどちらもPCR-ribotype 019 株であった⁹⁾¹⁹⁾。例外はあるものの、*slpA* sequence typing 結果とPCR-ribotyping 結果は概ね一致していると報告されている⁹⁾¹⁸⁾¹⁹⁾。

一方、上記PCR-ribotype 027 や078とは関係なく、binary toxin 陽性株による感染とアウトカムの関係の報告から¹⁷⁾、binary toxin の病原性における役割が注目されている。日本では、これまでのところ、binary toxin 産生性 *C. difficile* は優勢株としても流行株としても報告がない¹⁹⁾。日本での調査で¹⁹⁾、優勢株かつ流行株であったPCR-ribotype 018 株は binary toxin 陰性株であるが、本株はヨーロッパの調査において重症化との関連性が優位に認められている²⁰⁾。一方、PCR-ribotype 027 株による健康な若年女性に発症した重症型CDI例²¹⁾や、同じ病棟の2名の入院患者に6週間の時間を経て発症した binary toxin 陽性株 (PCR-ribotype ash1101/*slpA* sequence type ts592-02) による死亡例²²⁾が報告され、日本における binary toxin 陽性株によるCDI事例の疫学について、本例のような市中感染例も含め、今後詳細な検討が必要と考えられた。

本論文の要旨は平成26年第25回日本臨床微生物学会(2014年2月)において発表した。また、AMED委託研究開発費(新興・再興感染症に関する革新的医薬品等開発推進研究事業)のサポートを受けた。

謝辞: 本症例の報告にあたり、菌株解析を実施頂きました国立感染症研究所細菌第二部の妹尾充敏先生、福田靖先生に深謝いたします。

利益相反: 申告すべき利益相反なし

文 献

- 1) He, M, F Miyajima, P Roberts, et al. 2013. Emergence and global spread of epidemic healthcare-associated *Clostridium difficile*. Nat Genet 45: 109-113.
- 2) Goorhuis, A, SB Debast, LA van Leengoed, et al. 2008. *Clostridium difficile* PCR ribotype 078: an emerging strain in humans and in pigs? J Clin Microbiol 46:

- 1157-1158.
- 3) Dial, S, JA Delaney, V Schneider, et al. 2006. Proton pump inhibitor use and risk of community-acquired *Clostridium difficile*-associated disease defined by prescription for oral vancomycin therapy. *Cmaj* 175: 745-748.
 - 4) 日本臨床微生物学会腸管感染症検査ガイドライン委員会. 2010. 抗菌薬関連下痢症腸管感染症検査ガイドライン. *日臨微誌* S1: 20-35.
 - 5) 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.
 - 6) 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.
 - 7) Stubbs, S, M Rupnik, M Gibert, et al. 2000. Production of actin-specific ADP-ribosyltransferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile*. *FEMS Microbiol Lett* 186: 307-312.
 - 8) Stubbs, SL, JS Brazier, GL O'Neill, et al. 1999. PCR targeted to the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region of *Clostridium difficile* and construction of a library consisting of 116 different PCR ribotypes. *J Clin Microbiol* 37: 461-463.
 - 9) Kato, H, H Kato, Y Ito, et al. 2010. Typing of *Clostridium difficile* isolates endemic in Japan by sequencing of *slpA* and its application to direct typing. *J Med Microbiol* 59: 556-562.
 - 10) Reigadas, E, L Alcala, M Marin, et al. 2015. Missed diagnosis of *Clostridium difficile* infection; a prospective evaluation of unselected stool samples. *J Infect* 70: 264-272.
 - 11) Collins, CE, MD Ayturk, JM Flahive, et al. 2014. Epidemiology and outcomes of community-acquired *Clostridium difficile* infections in Medicare beneficiaries. *J Am Coll Surg* 218: 1141-1147.
 - 12) Khanna, S, DS Pardi, SL Aronson, et al. 2012. The epidemiology of community acquired *Clostridium difficile* infection: A population-based study. *Am J Gastroenterol* 107 (1): 89-95.
 - 13) Norman, KN, RB Harvey, K Andrews, et al. 2014. Survey of *Clostridium difficile* in retail seafood in College Station, Texas. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 31: 1127-1129.
 - 14) Pasquale, V, V Romano, M Rupnik, et al. 2012. Occurrence of toxigenic *Clostridium difficile* in edible bivalve molluscs. *Food Microbiol* 31: 309-312.
 - 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 AB 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) Tenover, FC, S Novak-Weekley, CW Woods, et al. 2010. Impact of strain type on detection of toxigenic *Clostridium difficile*: comparison of molecular diagnostic and enzyme immunoassay approaches. *J Clin Microbiol* 48: 3719-3724.
 - 17) Gerding, DN, S Johnson, M Rupnik, et al. 2014. *Clostridium difficile* binary toxin CDT: Mechanism, epidemiology, and potential clinical importance. *Gut Microbes* 5 (1): 5-27.
 - 18) Killgore, G, A Thompson, S Johnson, et al. 2008. Comparison of seven techniques for typing international epidemic strains of *Clostridium difficile*: Restriction Endonuclease analysis, pulse-field gel electrophoresis, PCR-ribotyping, multilocus sequence typing multilocus variable-number tandem-repeat analysis, amplified fragment length polymorphism, and surface layer protein A gene sequence typing. *JCM* 46 (2): 431-437.
 - 19) Senoh, M, H Kato, T Fukuda, et al. 2015. Predominance of PCR-ribotypes, 018 (smz) and 369 (trf) of *Clostridium difficile* in Japan: a potential relationship with other global circulating strains? *J Med Microbiol* 64: 1226-1236.
 - 20) Bauer, MP, DW Notermans, BH van Benthem, et al. 2011. *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. *Lancet* 377: 63-73.
 - 21) Nishimura, S, T Kou, H Kato, et al. 2014. Fulminant pseudomembranous colitis caused by *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 in a healthy young woman in Japan. *J Infect Chemother* 20: 729-731.
 - 22) Tagashira, Y, H Kato, M Senoh, et al. 2013. Two cases of fulminant colitis due to binary toxin-positive *Clostridium difficile* that are not PCR ribotype 027 or type 078. *J Med Microbiol* 62: 1486-1489.

A case of community-acquired pseudomembranous colitis caused by binary toxin-positive *Clostridioides difficile* (*Clostridium difficile*)

Saori Ishimura^{1) 2)}, Tamaki Orita¹⁾, Atsuko Kobayashi²⁾, Haru Kato³⁾

¹⁾Clinical Laboratory, Takarazuka City Hospital

²⁾Infection Control Office, Takarazuka City Hospital

³⁾Department of Bacteriology II, National Institute of Infectious Diseases

We report a case of community-acquired pseudomembranous colitis caused by binary toxin-positive *Clostridioides difficile* (*Clostridium difficile*). The patient had watery diarrhea and neurological symptoms following dehydration and admitted to hospital. He had no history of hospitalization and use of antibiotics in two months before onset. The test results of enzyme-immunoassay detecting both glutamate dehydrogenase and toxins A/B in stool specimen were negative on the 3rd day of admission. However, endoscopy findings showed typical formation of pseudomembrane in the large intestine. *C. difficile* recovered from this case was toxin A-positive, toxin B-positive, binary toxin-positive, and identified as PCR-ribotype 019/*slpA* sequence type cr-03. Further studies are warranted to know the role of binary toxin-positive strains in *C. difficile* infection including community-acquired infection.