

[治 験 論 文]

嫌気培養を必要としない C. Diff 選択増菌培地の性能評価

大川内沙織¹⁾・名取達矢¹⁾・内田宣邦²⁾・新井恵理子¹⁾・堀内一樹¹⁾

¹⁾ 信州大学医学部附属病院 臨床検査部

²⁾ 関東化学株式会社 技術・開発本部生命科学研究所

(令和4年3月9日受付, 令和4年5月30日受理)

Clostridioides difficile (*C. difficile*) 感染症 (CDI) の診断において実施されるイムノクロマト法 (IC 法) は, トキシンの検出感度が十分でないという問題点がある。C. Diff 選択増菌培地 (C. Diff 培地) は嫌気培養を必要としない *C. difficile* の選択増菌培地であり, 黄変したものを陽性として培養液を対象に IC 法を行うことで高感度にトキシンの検出が可能である。

クロストリジオイデス・ディフィシル抗原定性検査依頼のあった糞便 100 件を用いて toxigenic culture 法 (TC 法) と比較した本検討では, トキシンの検出感度が糞便からの直接 IC 法 (direct-IC 法) で 27.3% であったのに対し, C. Diff 培地の増菌培養液からの IC 法 (C. Diff-IC 法) では 24 時間培養で 36.4%, 48 時間培養で 72.7% であった。*C. difficile* 発育感度は 24・48 時間培養ともに 85.7% で, 特異度はそれぞれ 83.5%, 75.9% であった。非特異反応もみられるため, 培地の色調の変化だけでなく C. Diff-IC 法を組み合わせる必要があると考えられた。

C. Diff 培地は好気培養で *C. difficile* を増菌培養できることから, 嫌気培養や遺伝子検査を行うための設備がなく, CDI の検査が IC 法に限られる施設において有用であると考えられた。

Key words: *Clostridioides difficile*, 好気培養, 選択増菌培地, C. DIFF QUIK CHEK コンプリート, CDI

序 文

Clostridioides difficile (*C. difficile*) は, 下痢症や偽膜性腸炎を発症する *C. difficile* 感染症 (CDI) の原因菌である。CDI は抗菌薬の投与で腸内細菌叢が攪乱され, トキシン産生性の *C. difficile* が増殖することによって起こり, 糞便中のトキシンの証明, あるいはトキシン産生性の *C. difficile* を分離することで診断される¹⁾。

トキシンの証明には, *C. difficile* 抗原であるグルタメートデヒドロゲナーゼ (GDH) とトキシンが同時に検出可能であるイムノクロマト法 (IC 法) や, *C. difficile* 毒素遺伝子を検出する核酸増幅 (NAAT) 検査が行われている²⁾³⁾。IC 法は約 30 分で結果が得られる簡便で迅速性に優れた検査であることから様々な施設で広く用いられているが, トキシンの検出感度が十分でない⁴⁾⁵⁾。そのため, 2018 年に *Clostridioides* (*Clostridium*) *difficile* 感染症診療ガイドラインで示されたフローチャートでは, GDH 陽性・トキシン陰性であった検体に対して NAAT 検査を用いるアルゴリズムを提唱している。NAAT 検査を施行できない施設では, *C. difficile* の分離培養を行い, コロニーからの IC 法によってトキシン産生の有無を評価する toxigenic culture 法 (TC 法) が用いられるが, *C. difficile* は偏性嫌気性菌であるため, 実施は嫌

気培養が可能な施設に限られる。

C. Diff 選択増菌培地 (関東化学, 以下 C. Diff 培地) は, 嫌気培養を必要としない *C. difficile* の選択増菌培地である。本培地に糞便検体を接種し好気培養を行うと, 糞便中の *C. difficile* が選択的に増菌され, pH 変化により培地が赤色から黄色に変化する (Figure 1)。24 時間および 48 時間培養で培地が黄色に変化したものを陽性と判定し, 培養液を対象に IC 法を行うことによってトキシン検出が可能である。

本培地は嫌気培養や NAAT 検査を実施できず, トキシンの検出方法が IC 法に限られる場合に有用であると考えられる。本検討では, 糞便からの直接 IC 法と比較し C. Diff 培地の性能評価を行った。

材料および方法

信州大学医学部附属病院で, 2019 年 11 月から 2020 年 6 月までの期間にクロストリジオイデス・ディフィシル抗原定性検査依頼のあった糞便 100 件を対象とした。検体は Bristol stool scale 4 から 7 であり, 下痢便とは限らなかった。なお, 同一患者からの重複検体は対象から除いた。

C. difficile の発育の有無とトキシン産生性は TC 法の結果を対照とし, 糞便からの直接 IC 法 (direct-IC 法) と C. Diff 培地による増菌培養後の IC 法 (C. Diff-IC 法) を比較した。本文中の IC 法とは C. DIFF QUIK CHEK コンプリート (コージンバイオ) を使用して GDH とトキシンを検出したものを指し, 方法と判定については添付文書に従った。

1) toxigenic culture 法 (TC 法)

糞便検体を直接 CCMA 培地 EX (日水製薬) に塗布し, 35℃

著者連絡先: (〒390-8621) 長野県松本市旭 3-1-1
信州大学医学部附属病院臨床検査部
名取達矢
TEL: 0263-37-3493
FAX: 0263-34-5316

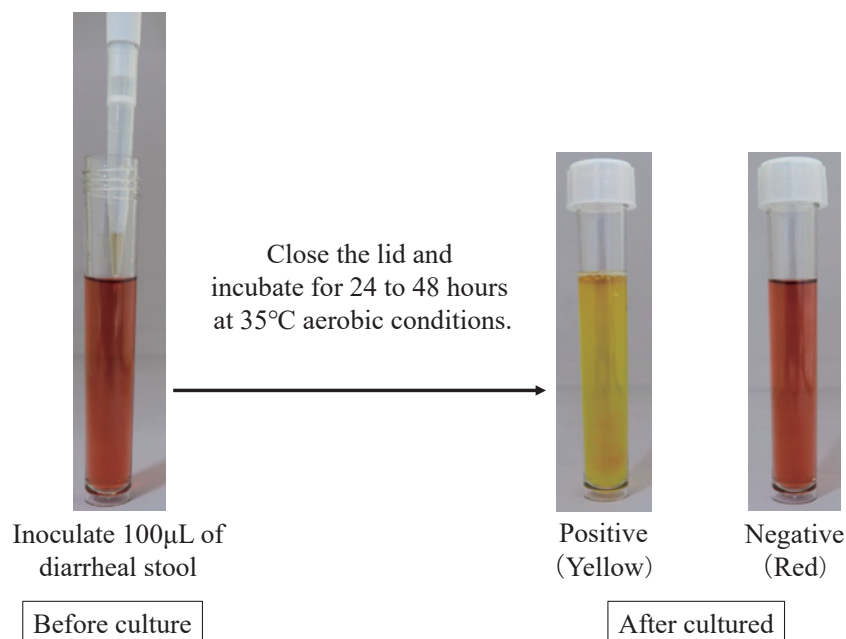


Figure 1. C. Diff medium
C. Diff medium turns yellow due to an increase in pH caused by bacterial growth.

Table 1. 21 cases of *C. difficile* culture positive

	TC method	direct-IC method	C. Diff-IC method	
			C. Diff medium 24h Positive	C. Diff medium 48h Positive
GDH + /Toxin +	11	3	4	8
GDH + /Toxin -	10	14	13	10
GDH - /Toxin -	0	4	1	0

で48時間嫌気培養を行い *C. difficile* の発育の有無を確認した。培地に *C. difficile* のコロニーが発育していた場合は、72時間の純培養後のコロニーから McFarland4.0 の菌液を作成し、IC法を行うことでトキシン産生性を確認した。

また、*C. difficile* が発育した検体については、分離したコロニーからシカジーニース DNA 抽出試薬 ST (関東化学) を用いて DNA を抽出し、シカジーニース毒素遺伝子検出キット (*C. difficile* 用) (関東化学) による PCR 法にて ToxinA/B 遺伝子、Binary toxin 遺伝子を検出した。

2) 糞便からの直接 IC 法 (direct-IC 法)

糞便検体を対象として C. DIFF QUIK CHEK コンプリートを使用した。判定と方法については添付文書に従った。

3) C. Diff 培地による増菌培養後の IC 法 (C. Diff-IC 法)

C. Diff 培地に糞便検体を 100 μL 接種し、35°C 好気条件下で24時間および48時間培養を行った。24時間培養後に培地が黄変したものを陽性と判定し、培養液を対象にIC法を行った。培地の色調に変化がなかった場合は48時間まで培養を延長し、黄変がみられれば同様にIC法を行った。また、黄変していてもIC法にてトキシン陰性だった場合は48時間まで培養を延長し、再度IC法を行った。

結 果

TC法でCCMA培地EXに *C. difficile* が発育したのは100件中21件であり、そのうちトキシン陽性は11件、陰性は10件であった。これはPCR法によるトキシン遺伝子検出結果と一致した。この11件のうち、トキシンA陽性B陽性が10件、トキシンA陰性B陽性が1件、Binary toxin はすべて陰性であった。

1) *C. difficile* 培養陽性の21件 (Table 1)

direct-IC法でGDH陽性・トキシン陽性であったのは3件であり、TC法を基準とした場合のトキシン検出感度は27.3% (3/11件)であった。GDH陽性・トキシン陰性は14件、GDH・トキシンともに陰性は4件であった。

C. Diff 培地が24時間培養で黄変したのは18件であり、48時間まで培養を延長しても新たに黄変したものはなかった。24時間培養後のC. Diff-IC法でトキシンが検出されたのは4件であったが、48時間まで培養を延長することで累計8件となり、TC法を基準とした場合のトキシン検出感度は24時間培養で36.4% (4/11件)、48時間培養で72.7% (8/11件)であった。

2) *C. difficile* 培養陰性の79件 (Table 2)

direct-IC法はすべてGDH陰性・トキシン陰性であり、偽

Table 2. 79 cases of *C. difficile* culture negative

	direct-IC method	C. Diff-IC method	
		C. Diff medium 24h Positive	C. Diff medium 48h Positive
GDH+/Toxin+	0	0	0
GDH+/Toxin-	0	0	1
GDH-/Toxin-	79	13	18

陽性反応はみられなかった。

C. Diff 培地では 24 時間培養で 13 件の黄変が見られたが、C. Diff-IC 法は 13 件すべてが GDH 陰性・トキシン陰性であった。48 時間まで培養を延長することで新たに 6 件が黄変し、累計 19 件が培養陽性判定となり、特異度は 24 時間培養で 83.5% (66/79 件)、48 時間培養で 75.9% (60/79 件) であった。

考 察

TC 法を対照とした場合の direct-IC 法の感度は、今回使用した C. DIFF QUIK CHEK コンプリットでは 41.9%⁵⁾、57.7%⁶⁾、GE テスト イムノクロマト-CD GDH/TOX「ニッスイ」(日本製薬)では 48.8%³⁾であったとの報告がある。本検討では、トキシンの検出感度は direct-IC 法で 27.3% (3/11 件)であったのに対し、C. Diff 培地を用いた C. Diff-IC 法では 24 時間培養で 36.4% (4/11 件)、48 時間培養で累計 72.7% (8/11 件)と、direct-IC 法よりも優れた結果となった。培養を延長することで検出可能であった 4 件はすべて 24 時間培養の時点で C. Diff 培地の黄変がみられていたが、C. Diff-IC 法では GDH 陽性・トキシン陰性であった。24 時間培養後の C. Diff-IC 法にてトキシン陰性となった検体についても、48 時間まで培養を延長することでトキシンの検出感度の上昇が期待できる。C. Diff-IC 法におけるトキシンの検出数が培養を延長することで増加したのは、*C. difficile* が対数増殖期の後にトキシンを産生することに由来する⁷⁾と考えられる。C. Diff 培地を用いた場合、培養時間を要するもののトキシンの検出感度は既報告を上回ると考えられる。

また、TC 法を対照とした C. Diff 培地における *C. difficile* の検出感度は 24 時間培養と 48 時間培養で変わらず 85.7% (18/21 件)であった。24 時間培養では 13 件、48 時間まで培養を延長することで累計 19 件の非特異的な培地黄変がみられ、特異度は 24 時間培養で 83.5% (66/79 件)、48 時間培養で 75.9% (60/79 件)となった。本培地は *C. difficile* が選択的に増菌され、pH が上昇することによって培地が黄変するが、培地中に含まれる種々の抗菌薬に耐性を示す *C. difficile* 以外の細菌の発育や、糞便検体自体の pH が高い状態である場合には非特異的な培地黄変が起これと考えられる。そのため本培地のみで *C. difficile* の有無を判断するには適さず、培地が黄変したものに関しては C. Diff-IC 法を行う必要があると考えられる。クロストリジオイデス・ディフィシル抗原定性検査は IC 法 1 回についてのみ診療報酬点数が算定されるが、糞便検体に対して IC 法を行い GDH 陽性・トキシン陰性となった場合、NAAT 検査が施行できない施設においては TC 法による培養検体での IC 法の再実施が推奨

されている。この際 2 回目の IC 法に関しては算定の対象とはなっておらず、C. Diff 培地を用いた場合にも同様の課題は解消していない。

TC 法では *C. difficile* の発育を認めるものの、C. Diff 培地で黄変しなかったものは 3 件であり、direct-IC 法では GDH 陽性・トキシン陰性が 2 件、GDH 陰性・トキシン陰性が 1 件であった。この 3 件について 48 時間培養後の C. Diff-IC 法を行ったところ、2 件は GDH 陽性・トキシン陰性であり、1 件は GDH 陰性・トキシン陰性であった。糞便中の *C. difficile* の菌量が少ない場合は、培地の pH が変化しない、もしくは C. Diff 培地中の選択剤によって発育が阻止されるなどの理由で黄変しないことがあると考えられる。また、TC 法で *C. difficile* 培養陰性となったうち 1 件が 48 時間培養後の C. Diff-IC 法で GDH 陽性・トキシン陰性となったが、GDH の偽陽性反応と考えられた。

TC 法でトキシン陽性であるにもかかわらず direct-IC 法、C. Diff-IC 法ともに陰性となったのは 2 件であり、どちらも抗菌薬の投与後の下痢であったが、クロストリジオイデス・ディフィシル抗原定性検査が陰性となったため下痢の原因は不明として整腸剤を処方されたのみであった。このように CDI はトキシン検査が陽性とならなければ診断されず、トキシンの検出感度が十分でない direct-IC 法は過少診断に繋がっている⁸⁾と考えられる。

C. difficile は 2019 年の CDC による勧告において最も上位の脅威とされており、各国で CDI 検査のガイドラインが作成されている。本邦でも 2018 年に *Clostridioides* (*Clostridium*) *difficile* 感染症診療ガイドラインが作成され、検査のフローチャートが示された。しかし、NAAT 検査や TC 法が施行できない場合、トキシンの検出は感度が十分でない糞便からの direct-IC 法に限られる。本培地は好気培養のみで *C. difficile* を培養可能な選択増菌培地であり、培養時間を必要とするがより高い感度でトキシンを検出することが可能であるため、嫌気培養や遺伝子検査を行うための設備がない施設で有用であると考えられる。

倫理規定：糞便検体は信州大学医学部附属病院の臨床研究 (4514) における残余検体の二次利用について同意を得たものである。

利益相反：申告すべき利益相反はありません。

文 献

- 1) 國島広之, 高野知憲, 山崎行敬. 2020. *Clostridioides difficile* 感染症と腸内細菌. PROGRESS IN MEDICINE 40: 275-279.
- 2) 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.
- 3) 國島広之, 大毛宏喜, 鈴木広道, 他. 2018. *Clostridioides (Clostridium) difficile*. 感染症診療ガイドライン.
 - 4) 古霜麻紀, 原 稔典, 木場由美子, 他. 2013. C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE における *C. difficile* 抗原検出の有用性. 広島臨床検査 2: 6-18.
 - 5) 西尾美津留, 宮本祐輝, 小川有里子, 他. 2018. *Clostridium difficile* Toxin および GDH 抗原同時検出試薬の検出性能に関する比較検討. 医学検査 67: 469-474.
 - 6) 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.
 - 7) Ketley, J. M., S. C. Haslam, T. J. Mitchell, et al. 1984. Production and release of toxins A and B by *Clostridium difficile*. J. Med. Microbiol. 18: 385-391.
 - 8) Mori, N., S. Yoshizawa, T. Saga, et al. 2015. Incorrect diagnosis of *Clostridium difficile* infection in a university hospital in Japan. J Infect Chemother 21: 718-722.

Performance evaluation of C. Diff selective multiplication broth medium without anaerobic culture

Saori Ookawachi¹⁾, Tatsuya Natori¹⁾, Norikuni Uchida²⁾, Eriko Arai¹⁾, Kazuki Horiuchi¹⁾

¹⁾Department of Laboratory, Medicine Shinshu University Hospital

²⁾Life Science Laboratory, Technology & Development Division, Kanto Chemical Co., Inc.

The immunochromatographic (IC) method used in the diagnosis of *Clostridioides difficile* (*C. difficile*) infection (CDI) is a simple and rapid test, but has the problem of insufficient sensitivity in detecting toxins. C. Diff medium is a selective multiplication medium for *C. difficile* that does not require anaerobic incubation, and feces are incubated aerobically for 24-48 hours after inoculation, and those that turn yellow are considered positive, and the IC method can be used to detect toxin with high sensitivity. In this study of 100 fecal samples, sensitivity of toxin detected by the direct-IC method were 27.3%, by the C. Diff medium method were 36.4% in 24-hour incubation and 72.7% in 48-hour incubation. The sensitivity for *C. difficile* growth was 85.7% for both 24- and 48-hour cultures, and the specificity was 83.5% and 75.9%, respectively. The sensitivity of *C. difficile* growth was 85.7% for 24- and 48-hour incubations, and the specificity was 83.5% and 75.9% for 24- and 48-hour incubations, respectively. Since nonspecific reactions were also observed, it was considered necessary to use the C. Diff-IC method in combination with the color change of the medium. Since C. Diff medium can be used to culture *C. difficile* under aerobic conditions, it may be useful in facilities that do not have facilities for anaerobic culture or genetic testing, and where testing for CDI is limited to the IC method.