

[総 説]

Clostridioides difficile 感染症に関わる検査

國島広之

聖マリアンナ医科大学感染症学講座

(令和5年3月29日受付)

Clostridioides difficile は医療施設において最も多くみられる嫌気性菌であり、ヒト・動物・環境から広く分離される。芽胞を形成しアルコール抵抗性であることから院内感染の原因ともなる。保菌者もみられるため、Bristol Stool Scale 5以上の臨床症状がみられる場合に、適切に検体採取を行う。NAAT検査は高い感度を有することから、結果判明後のCDI治療薬投与期間の短縮ならびに追加検査の抑制、入院期間の短縮による、医療費の抑制が報告されている。現在、Covid-19のパンデミックに伴い、各種感染症遺伝子機器が多くの医療施設で導入されており、中小病院も含め最初からNAAT検査を行うこともできる。医療施設では、感染症医、検査専門医、認定臨床微生物検査技師の連携により、GDH・トキシンによる迅速診断検査、NAAT検査、培養検査の特徴を考慮しつつ、丁寧に検査診断する必要がある。

Key words: *Clostridioides difficile*, GDH, トキシン, NAAT

はじめに

Clostridioides difficile は、1935年にHALLとO'TOOLEが健常新生児から発見し、培養が遅く困難(difficult)であったことから*Bacillus difficile*と命名された、グラム陽性桿菌に染色される偏性嫌気性菌である。周毛性鞭毛を有し、亜端在性の芽胞を形成する。選択培地であるCCFA(cycloserine-cefoxitin fructose agar)培地では3~5mmの菊花状のコロニーを形成し、馬小屋臭と呼ばれる特有の臭いがある。本菌は2016年に*Clostridium difficile*から*Clostridioides difficile*に名称変更された³⁾。

本菌はヒトだけでなく家畜や伴侶動物、河川など幅広い環境から分離され、入院患者のスクリーニング検査では約10%から検出される¹⁾。菌量や毒素量、腸内細菌叢やそのディスバイオーシス、抗毒素抗体やレセプターの有無等が発症に関わるとされる。

1977年にクリンダマイシンによる偽膜性腸炎から分離され、抗菌薬関連腸炎(antibiotic-associated diarrhea: AAD)における主要な原因菌である。2003年にはカナダで強毒株(B1/NAP1/027型)と呼ばれた変異株による腸炎が多発した²⁾。tcdC(negative regulator)遺伝子の欠損によりtoxin A, toxin Bの産生量が20倍ほどに増加し、加えてADPリボシル化作用を有するbinary toxinも産生し、北米また欧州で重症例を含む感染の拡大が見られた。芽胞を形成することから、各種消毒薬に抵抗性であり、しばしば医療関連感染の原因菌ともなる。

1. *C. difficile* 感染症

C. difficile 感染症は発熱や下痢を来とし、重症例では偽膜性腸炎、巨大結腸症、麻痺性イレウスや、ごく稀に菌血症や創部感染症がみられる。わが国では、「2歳以上でBristol Stool Scale 5以上(表1)の下痢を認め、CDI検査にて便中のトキシンが陽性もしくはトキシン産生性の*C. difficile*を分離する、もしくは下部消化管内視鏡や大腸病理組織にて偽膜性腸炎を呈するもの」と定義されている⁴⁾。下痢は、24時間以内に3回以上もしくは平常時よりも多い便回数で、泥状もしくは水様便を目安としている。まずは、Bristol Stool Scaleを用いて患者の症状を客観的に評価する。なお、検体採取の際は下痢便の固形部分を採保することから、現場の看護師等による理解と評価が大切である。また、緩下薬の投与歴、炎症性腸疾患などの基礎疾患や、経鼻経管栄養などでも下痢症状がみられるため、CDI以外の病態との鑑別、発熱や炎症所見、治療後の経過などを総合的に考慮して判断することも大切である⁵⁾(図1)。

C. difficile 感染症は通常、抗菌薬投与1週間前後から発症することが多い。加えて、数ヶ月は発症リスクがあることや、プロトンポンプ阻害薬(PPI)による発症リスクの増加はより長期にわたる。感染時期や発症状況により、医療施設発症CDI、市中発症医療施設関連CDI、市中関連CDIに分類される(表2)。退院28日後までは市中発症医療施設関連CDIに分類されることや、外来や在宅診療でも抗菌薬療法が行われること、海外では市中関連CDIも多く見られ、外来診療においても丁寧な診断が必要である。

C. difficile 感染症は腸管細菌叢の破綻であるディスバイオーシスが関連し、かつ発症後もディスバイオーシスがすることが知られている。したがって約20~30%が再発し⁶⁾⁷⁾、感染症のなかでも最も再発が多い疾患である。再発は「適切な診療を受けたにもかかわらず、CDI発症後8週間以内にCDIを再度発症したもの」と定義されている⁴⁾。再発では原疾患

著者連絡先：(〒216-8511) 神奈川県川崎市宮前区菅生 2-16-1
聖マリアンナ医科大学感染症学講座
國島広之
TEL: 044-977-8111
E-mail: h2kuni@marianna-u.ac.jp

の治療の延期や QOL の低下⁸⁾、医療コストの増加などを来す⁹⁾。高齢者、CDI 診断後の抗菌薬の使用歴、腎不全などの重篤な基礎疾患の存在、CDI の既往、PPI の使用など再発のリスク因子を考慮する。わが国における診療ガイドラインにおける治療薬の選択では、発症既往・重症度・再発リスク・難治の評価を行い、メトロニダゾール、バンコマイシンの他、再発や再発リスク例ではフィダキソマイシンを第一選択薬としている⁴⁾。

2. *C. difficile* 感染症の検査診断

C. difficile 感染症の検査診断は培養検査、glutamate dehydrogenase (GDH) ならびにトキシンによる迅速診断検査、*C. difficile* 毒素遺伝子検査である Nucleic acid amplification test (NAAT) が用いられる。*C. difficile* の抗原としてのグルタメートデヒドロゲナーゼ (GDH) とトキシンを組み合わせた迅速診断キットが広く用いられている。便中 GDH 検

査は感度が 70~98% 程度、トキシン検査の感度は 60~80% 程度とされる¹⁰⁾¹¹⁾。便中トキシン検査の感度は必ずしも十分ではないため、GDH 陽性・トキシン陰性はトキシン産生性と非産生性 *C. difficile* の何れも可能性がある。したがって、GDH 陽性・トキシン陰性の場合に NAAT 検査を行うか、菌株の分離培養を行いトキシン産生性を評価する二段階法を行う。また、二段階法でイムノクロマト法による toxin 検査を行う際には、48 時間培養コロニーで McF5.0 以上の菌液を作製して実施することが必要である¹²⁾。

ゴールドスタンダードである菌株の分離培養は、分子疫学解析を行うことができるものの嫌気培養に 48~72 時間要する。分子疫学的では PCR リボタイピング、パルスフィールド電気泳動法 (PFGE)、Restriction endonuclease analysis 法 (REA)、トキシンタイプ、multilocus sequence typing (MLST)、surface-layer protein A 法 (slpA)、multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA)、全ゲノムシーケンス (WGS) などがある。

3. NAAT 検査

近年では、Covid-19 のパンデミックに伴い、各種感染症遺伝子機器が多くの医療施設で導入されていることから、中小病院も含め最初から NAAT 検査を行うこともできる。現在のところ、NAAT 検査は偽陽性がみられること、高価であること、保険取上の制限等の留意点があるものの、より適切かつ迅速な感染症診断を行う上では有用性が高い。米国における ICER (Incremental cost-effectiveness ratio) を指標とする費用対効果では、「NAAT のみ」が最も優れた医療経済効果がみられている。NAAT 検査は高い感度を有するため、*C. difficile* 感染症の除外診断により、結果判明後の CDI 治療薬投与期間の短縮ならびに追加検査の抑制¹³⁾¹⁴⁾、入院期間の短縮¹⁵⁾をもたらし、医療費の抑制が報告されている。

表 1. Bristol Stool Scale

下痢の性状については、観察者によって表現や認識が異なるため Bristol Stool Scale にて評価することを推奨する。CDI を疑った際には、Bristol Stool Scale 5 以上の便を検査に提出する。

スコア	便の性状
1	硬くてコロコロの塊糞状の便
2	ソーセージ様だが硬い便
3	表面にひび割れのあるソーセージ状の便
4	表面が滑らかでやわらかいソーセージ状の便
5	半固形のやわらかい便
6	境界不明、不定形の泥状便
7	固形物を含まない液体状の便

文献 4 より

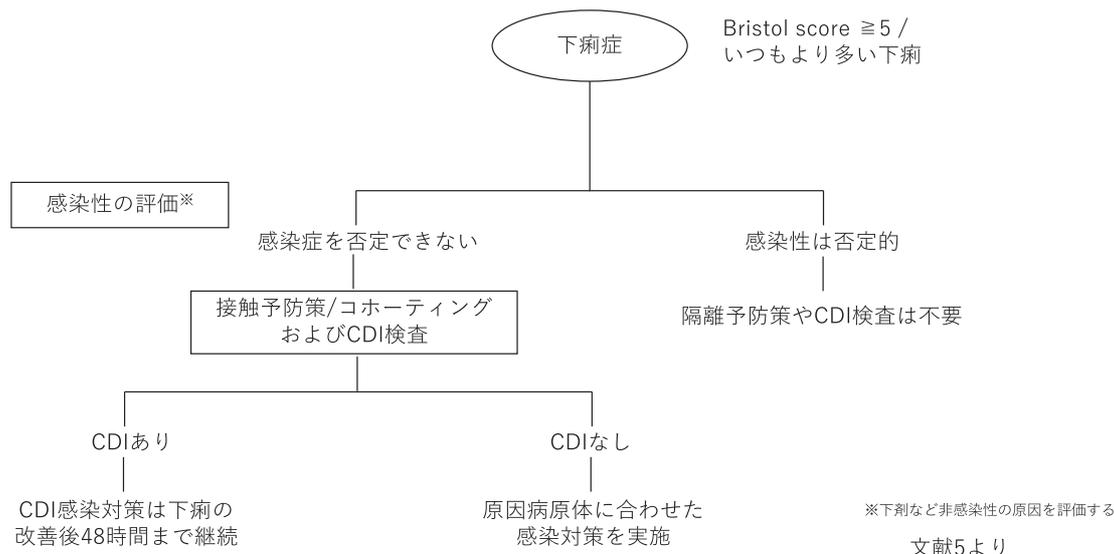


図 1. CDI を疑う下痢における感染対策のフローチャート

Bristol score ≥ 5 の下痢症 (24 時間以内に 3 回以上もしくは平常時よりも多い便回数) がみられた際には、緩下薬などの医原性の下痢を始めとして、感染性の有無を判断する。感染性を否定できない場合は、CDI の検査ならびに感染対策を積極的に行うことが推奨される。CDI と診断された場合には、CDI 感染対策は下痢の改善後 48 時間まで継続する。

表2. 感染時期や発症状況による CDI の定義
 CDI を感染時期や発症状況によって、医療施設発症 CDI, 市中発症医療施設関連 CDI, 市中関連 CDI に定義する。

日本語表記	英語表記	定義
医療施設発症 CDI	Healthcare facility-onset (HO) CDI	入院後3日を超えて発症。10,000患者・日あたりの症例数。
市中発症医療施設関連 CDI	Community-onset, healthcare facility-associated (CO-HCFA) CDI	医療関連施設から退院後28日以内に市中で発症。1,000入院患者あたりの症例数。
市中関連 CDI	Community-associated (CA) CDI	過去12週以内に入院歴がなく市中で発症。

文献4より

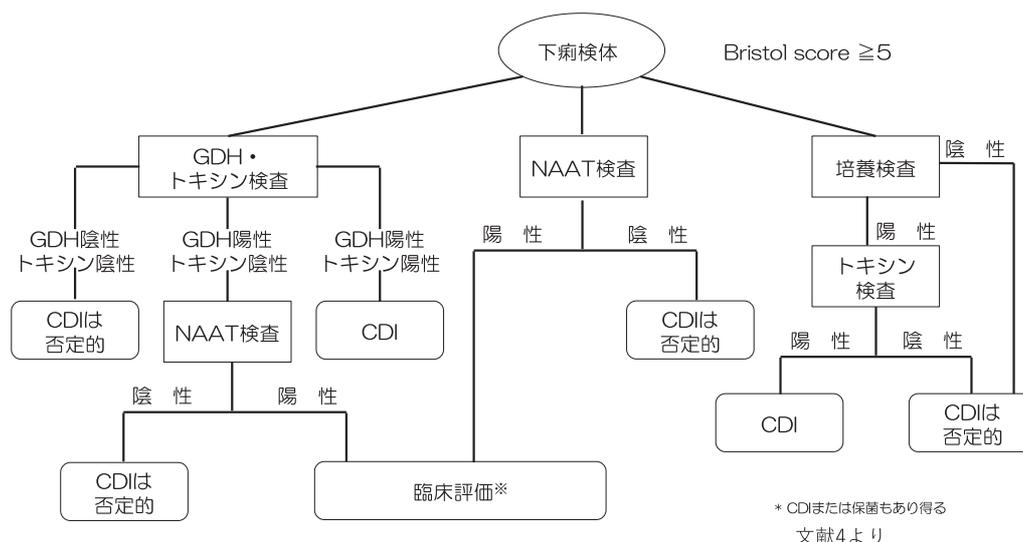


図2. C. difficile 検査のフローチャート

C. difficile 感染症の検査診断は GDH ならびにトキシンによる迅速診断検査, C. difficile 毒素遺伝子検査である NAAT 検査, 培養検査が用いられる。迅速診断検査のトキシンの感度は低いため, GDH 陽性・トキシン陰性の場合には二段階法を用いる。NAAT 検査は感度が高いため, 抗原検査を実施せずに NAAT を行うこともできる。培養検査は分子疫学解析などに用いることができる。

表3. 検査法の種類と特徴

酵素免疫測定法は, 迅速性に優れるものの, トキシンの感度が低い。トキシン遺伝子検出法は迅速性と感度に優れるものの, コストが高い (費用対効果は優れる可能性あり)。

原理/検査法	検出対象	感度	特異度	迅速性	コスト
酵素免疫測定法 (EIA)	GDH	○	○	◎	◎
	トキシン	△	○	◎	◎
トキシン遺伝子検出法 (全自動機器を含む)	トキシン遺伝子	◎	○	◎	○

文献4より

何れにしても臨床症状を踏まえ, 迅速診断キット, NAAT 検査, 培養検査の特徴を考慮して検査を行うことが大切であり (図1)⁴⁾, 感染症医や臨床検査専門医, 認定臨床微生物検査技師, ICMT が連携し, 適切な検査診断, diagnostic stewardship を行うことが求められる。

4. 薬剤感受性検査

薬剤低感受性 C. difficile 株では, 有効性の低下が示唆されており, MTZ 低感受性 C. difficile 株は, MTZ sub-MIC 下では, バイオフィルム生産の促進, 腸管上皮細胞の附着性の増加がみられ, CDI 再発のリスクとの関連が示唆されている¹⁶⁾。米国ヒューストンでは, CDI 患者 438 例のうち VCM

非感受性株は 26%, MTZ 非感受性株は 29%, ナイロビでは 98 例のうち VCM 非感受性株は 67%, MTZ 非感受性株は 85% にみられたとともに, マウス CDI モデルにおいて VCM 非感受性株では CDI の根治はできなかった¹⁷⁾。

わが国における検討では薬剤耐性株の報告は数少ないものの^{18)~20)}, 今後の動向に留意する必要がある, 薬剤感受性サーベイランス体制の構築が期待される。なお, C. difficile の薬剤感受性は, The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; EUCAST と Clinical and Laboratory Standards Institution; CLSI では, メトロニダゾールでは EUCAST (耐性>2), CLSI (耐性≥32) など異なるブレイクポイントが設定されている。

5. 無症状者に対する *C. difficile* 検査

C. difficile はヒトや環境からも広く検出され、入院患者の約10%に保菌者がみられる¹⁾。フィダキソマイシンのような抗芽胞効果を有する薬剤では期間が短縮されるものの、メトロニダゾールやバンコマイシンによるCDIの治療後において、便中の*C. difficile* 検出は持続することが知られている²⁾。日本環境感染学会による*Clostridioides difficile* 感染対策ガイドでは、下痢症状が消失した後も便中に*C. difficile* を排出し、環境を汚染させ続ける可能性がある患者は治療終了後に再燃するリスクが高いため、可能であれば下痢が治まってから少なくとも48時間は接触予防策を継続することが望ましいとしている⁴⁾。*C. difficile* 保菌者はCDI発症リスクとなりうることや伝播リスクがあることが報告されているものの、保菌者に対する個室隔離を含めた接触予防策や抗*C. difficile* 薬の投与は検討されない。したがって、*C. difficile* 治療後も陽性が持続しうること、保菌者は必ずしも隔離の対象としていないことから、*C. difficile* 治療後の陰性化確認は不要である。*C. difficile* 感染症は環境消毒が有効な感染症の一つであり、UV-Cや過酸化水素噴霧装置による環境消毒が検討されることもある²⁾。リボタイピング027型等の強毒株やアウトブレイクの際などを含め、地域の専門家と協議の上で無症状者に対する*C. difficile* 検査を実施することは選択肢となる⁵⁾。

6. 環境検査

環境の微生物検査は、環境清掃・消毒の適正性の評価として行うことができる。また、アウトブレイク時において病棟・病室の稼働制限が発生した際、十分な清掃・消毒後に病棟・病室の稼働制限を解除する際の検査としても考慮できる⁵⁾。

環境清掃・消毒の適正性を客観的に評価する方法として、

1) 直接的観察指導と2) 環境検査が行われる。環境検査は更に蛍光塗料検査やATPふき取り検査など、拭き取りの適正性を簡易的に迅速・安価に観察する方法と、培養検査や核酸増幅検査により毒素産生*C. difficile* を検出する微生物方法に分けられる。

環境の培養検査は環境汚染の確認が可能であると共に、分子疫学解析を追加で用いることで疫学調査に寄与しうる。採取法として、*C. difficile* ではフロックタイプを用いた場合でもスワブによる採取では検出率が低く、スポンジもしくはコンタクトプレート法による採取で検出率が良いと報告されている^{23)~25)}。現在、ATP (Adenosine triphosphate) ふき取り検査は簡便・迅速かつ、分かりやすい清掃の指標として、ICT活動のなかで用いられている。ATPふき取り検査のATP値と培養陽性率は有意に相関し、ATP値が250RLU未満の場合には同部位から培養陽性率は3%であったのに対して、それ以上では19%であったと報告されている²⁶⁾。

おわりに

C. difficile 感染症は医療施設において最も多くみられる嫌気性菌感染症の一つである。Bristol Stool Scaleを用いた適切な臨床症状の評価、適切な検査法の選択による診断は治療や感染対策とも密接に繋がることから、多職種と連携

が重要である。特に近年では各種感染症の迅速かつ適確な診断のために、遺伝子検査の重要性が謳われており、より積極的な活用が期待されている。

利益相反：利益相反：なし

文 献

- 1) Leekha, S, KC Aronhalt, LM Sloan, et al. 2013. Asymptomatic *Clostridium difficile* colonization in a tertiary care hospital: admission prevalence and risk factors. *Am J Infect Control* 41: 390-393.
- 2) Loo, VG, L Poirier, MA Miller, et al. 2005. A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. *N Engl J Med* 353: 2442-2449.
- 3) Lawson, PA, DM Citron, KL Tyrrell, et al. 2016. Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) *Prévot* 1938. *Anaerobe* 40: 95-99.
- 4) 公益社団法人日本化学療法学会・一般社団法人日本感染症学会 CDI 診療ガイドライン作成委員会編. *Clostridioides difficile* 感染症診療ガイドライン 2022. *日治療誌* 71: 1-90, *感染症誌* 97: S1-S96.
- 5) 一般社団法人日本環境感染学会 *Clostridioides difficile* 感染対策ガイドライン策定委員会編. 2022. *Clostridioides difficile* 感染対策ガイド. *環境感染誌* 37 (Suppl. II).
- 6) Johnson, S. 2009. Recurrent *Clostridium difficile* infection: causality and therapeutic approaches. *Int J Antimicrob Agents* 33 (Suppl 1): S33-S36.
- 7) Deshpande, A, V Pasupuleti, P Thota, et al. 2015. Risk factors for recurrent *Clostridium difficile* infection: a systematic review and meta-analysis. *Infect Control Hosp Epidemiol* 36: 452-460.
- 8) Wilcox, MH, H Ahir, JE Coia, et al. 2017. Impact of recurrent *Clostridium difficile* infection: hospitalization and patient quality of life. *J Antimicrob Chemother* 72 (9): 2647-2656.
- 9) Kunishima, H, K Ito, T Laurent, et al. 2018. Healthcare burden of recurrent *Clostridioides difficile* infection in Japan: A retrospective database study. *J Infect Chemother* 24: 892-901.
- 10) Planche, TD, KA Davies, PG Coen, et al. 2013. Differences in outcome according to *Clostridium difficile* testing method: a prospective multicentre diagnostic validation study of *C difficile* infection. *Lancet Infect Dis* 13: 936-945.
- 11) Hara, T, H Suzuki, T Oyanagi, et al. 2020. Clinical evaluation of a non-purified direct molecular assay for the detection of *Clostridioides difficile* toxin genes in stool specimens. *PLoS One* 15: e0234119. doi: 10.1371/journal.pone.0234119. eCollection 2020.
- 12) 木部泰志, 清祐麻紀子, 堀田多恵子, 他. 2022. *Clostridioides difficile* コロニーを用いた C.DIFF QUIK CHEK コンプリートにおける最適な CD トキシン検査条件. *日臨微誌* 32: 25-29.
- 13) Guinta, MM, K Bunnell, A Harrington, et al. 2017. Clinical and economic impact of the introduction of a nucleic acid amplification assay for *Clostridium difficile*. *Ann Clin Mi-*

- crobiol Antimicrob 16: 77.
- 14) Peppard, WJ, NA Ledebor. 2014. Implementation of Polymerase Chain Reaction to Rule Out *Clostridium difficile* Infection Is Associated With Reduced Empiric Antibiotic Duration of Therapy. *Hosp Pharm* 49: 639-643.
 - 15) Sewell, B, E Rees, I Thomas, et al. 2014. Cost and Impact on Patient Length of Stay of Rapid Molecular Testing for *Clostridium difficile*. *Infect Dis Ther* 3: 281-229.
 - 16) Impact of Subinhibitory Concentrations of Metronidazole on Morphology Motility, Biofilm Formation and Colonization of *Clostridioides difficile*. 2022. *Antibiotics (Basel)* 11 (5): 624. doi: 10.3390/antibiotics11050624.
 - 17) Darkoh, C, K Keita, C Odo, et al. 2022. Emergence of Clinical *Clostridioides difficile* Isolates With Decreased Susceptibility to Vancomycin. *Clin Infect Dis* 74 (1): 120-126.
 - 18) Kunishima, H, J Chiba, M Saito, et al. 2013. Antimicrobial susceptibilities of *Clostridium difficile* isolated in Japan. *J Infect Chemother* 19: 360-362.
 - 19) Yamagishi, Y, N Nishiyama, Y Koizumi, et al. 2017. Antimicrobial activity of fidaxomicin against *Clostridium difficile* clinical isolates in Aichi area in Japan. *J Infect Chemother* 23: 724-726.
 - 20) Yanagihara, K, N Akamatsu, J Matsuda, et al. 2018. Susceptibility of *Clostridium* species isolated in Japan to fidaxomicin and its major metabolite OP-1118. *J Infect Chemother* 24: 492-495.
 - 21) Bobulsky, GS, WN Al-Nassir, MM Riggs, et al. 2008. *Clostridium difficile* skin contamination in patients with *C. difficile*-associated disease. *Clin Infect Dis* 46 (3): 447-450.
 - 22) Kato, H, M Hagihara, N Asai, et al. 2022. A systematic review and meta-analysis of decontamination methods to prevent hospital environmental contamination and transmission of *Clostridioides difficile*. *Anaerobe* 73: 102478. doi: 10.1016/j.anaerobe.2021.102478.
 - 23) Claro, T, S Daniels, H Humphreys. 2014. Detecting *Clostridium difficile* spores from inanimate surfaces of the hospital environment: which method is best? *J Clin Microbiol* 52: 3426-3428.
 - 24) Engelhardt, NEP, NF Foster, S Hong, et al. 2017. Comparison of two environmental sampling tools for the detection of *Clostridium difficile* spores on hard bathroom surfaces in the hospital setting. *J Hosp Infect* 96: 295-296.
 - 25) Otter, JA, NL Havill, NM Adams, et al. 2009. Environmental sampling for *Clostridium difficile* swabs or sponges? *Am J Infect Control* 37: 517-518.
 - 26) Deshpande, A, B Sitzlar, D Fertelli, et al. 2013. Utility of an adenosine triphosphate bioluminescence assay to evaluate disinfection of *Clostridium difficile* isolation rooms. *Infect Control Hosp Epidemiol* 34: 865-867.

Laboratory Diagnostic Methods for *Clostridioides difficile*

Hiroyuki Kunishima

Department of Infectious Diseases, St. marianna University School of Medicine

Clostridioides difficile is the most common anaerobic bacterium in healthcare facilities and is widely isolated from humans, animals, and the environment. *C. difficile* can cause nosocomial infections because it forms spores and is alcohol-resistant. Because of its high sensitivity, the NAAT test has been reported to shorten the time required to administer CDI drugs, reduce the need for additional tests, and shorten hospital stays, thereby reducing healthcare costs. Due to the Covid-19 pandemic, various rapid molecular identification systems have been introduced in many medical facilities, and NAAT testing can be performed from the beginning, including small and medium-sized hospitals. Medical facilities need to carefully examine and diagnose the disease in collaboration with infectious disease physicians, laboratory specialists, and certified clinical microbiologists, taking into consideration the characteristics of rapid diagnostic tests using GDH and toxin, NAAT tests, and culture tests.