

平成 27 年度病院医学教育研究助成成果報告書

報告年月日：平成 28 年 3 月 31 日

研究・研修課題名	LAMP法によるCD毒素遺伝子検出の評価
研究・研修組織名（所属）	感染対策室・検査部
研究・研修責任者名（所属）	森山英彦（感染対策室・検査部）
共同研究・研修者名（所属）	竹内志津絵、淵田比呂志、馬庭恭平、坂根圭子、西村信弘、栗屋幸一、廣瀬昌博

目的及び方法、成果の内容

①目 的

抗菌薬関連腸炎の原因菌である *Clostridium difficile* の検査はイムノクロマト法による菌体抗原検査と毒素検出により行っている。しかし、毒素検査の感度が低いため菌体抗原陽性、毒素陰性の患者に対して症状により投薬が行われている現状がある。毒素検査を LAMP 法にし、感度を上げることにより不必要な抗菌薬投与の抑制を検討する。

②方 法

検討内容として、①培養法を標準法としてイムノクロマト法による菌体抗原検出の性能を評価する。②培養法により分離した *Clostridium difficile* の LAMP 法によるトキシン B 遺伝子検出（分離菌法）を標準法としてイムノクロマト法の CD 毒素検出の性能を評価する。③培養により分離した *Clostridium difficile* の LAMP 法によるトキシン B 遺伝子検出（分離菌法）を標準法として LAMP 法のトキシン B 遺伝子検出（便直接法）の性能を評価する。

A) 検査方法

①培養検査：便を CCMA 培地（日水製薬株式会社）に接種。48 時間嫌気性培養を行い、発育したコロニーを質量分析（VITEK-MS）により同定した。

②イムノクロマト法による菌体抗原と CD 毒素検出：C.DIFF QUIK CHEK コンプリート（アーリアメディカル株式会社）を用いた。

③LAMP 法によるトキシン B 遺伝子検出：6 種類のプライマーを用い、Loopamp DNA 増幅試薬キット（栄研化学株式会社）にて測定した。測定機器は LAMP 法専用リアルタイム濁度測定装置 Loopamp EXIA（栄研化学）を用いた。

使用したプライマーを示す。

HK101-F3:5'-GTATCAACTGCATTAGATGAAAC-3'

HK101-B3:5'-CCAAAGATGAAGTAATGATTGC-3'

HK101-FIP:5'-CTGCACCTAACTTACACCATCTATCTTCCTACATTATCTGAAGGATT-3'

HK101-BIP:5'-GAGCTAAGTGAAACGAGTGACCCGCTGTTGTTAAATTTACTGCC-3'

HK101-FL:5'-AATAGTTGCAATTATAGG-3'

HK101-BL:5'-AGACAAGAAATAGAAGCTAAGATAGG-3'

④便からの核酸抽出：便から精製水を用いて 10% 乳剤を作成し、PURE 法（栄研化学）を用いて抽出した。

B) 対象

Clostridium difficile の検査目的で検査部に提出された便 100 検体を用いた。

③成 果

表1 培養検査とイムノクロマト法による菌体抗原
検出の比較

		イムノクロマト法菌体抗原	
		陽性	陰性
培養検査	陽性	27	1
	陰性	5	67

感度:96.4% 特異度:93.1%

表2 分離菌トキシンB遺伝子(LAMP法)と
イムノクロマト法によるCDトキシン検出の比較

		イムノクロマト法CDトキシン	
		陽性	陰性
分離菌 トキシンB 遺伝子 (LAMP法)	陽性	10	9
	陰性	4	77

感度:52.6% 特異度:95.1%

表3 分離菌トキシンB遺伝子(LAMP法)と
便直接トキシンB遺伝子検出(LAMP法)の比較

		便直接トキシンB遺伝子(LAMP法)	
		陽性	陰性
分離菌 トキシンB 遺伝子 (LAMP法)	陽性	16	3
	陰性	0	81

感度:84.2% 特異度:100%

培養法を標準法としてイムクロマト法による菌体抗原を評価した結果、感度 96.4%、特異度 93.1%と良好な結果となった(表1)。2法が乖離した検体の内、培養法陽性、イムクロマト法による菌体抗原陰性の1検体はイムクロマト法の感度不足によるものと考えられた。また、培養法陰性、イムクロマト法菌体抗原陽性を5検体認め、イムクロマト法の偽陽性反応と考えられた。

培養により検出した *Clostridium difficile* の LAMP 法によるトキシン B 遺伝子検出(分離菌法)を標準法として、イムクロマト法の CD 毒素検出の性能を評価した結果、感度 52.6%、特異度 95.1%となった(表2)。2法が乖離した検体の内、LAMP 法によるトキシン B 遺伝子検出(分離菌法)陽性、イムクロマト法 CD 毒素陰性を9検体認め、イムクロマト法 CD 毒素検出の感度不足によるものと考えられた。また、イムクロマト法 CD 毒素陽性、LAMP 法によるトキシン B 遺伝子検出(分離菌法)陰性を4検体認め、イムクロマト法の偽陽性反応と考えられた。このことからイムクロマト法による CD 毒素検出は感度不足であり、診断に用いるには限界があった。イムクロマト法による抗原陽性で毒素陰性の検体の内、約半数はトキシン B 遺伝子が陽性であり、診断ガイドラインにおいても菌体抗原陽性、CD 毒素陰性の場合、培養により分離した菌株での再検査を推奨している。次に LAMP 法によるトキシン B 遺伝子検出(分離菌法)を標準法として、便直接法によるトキシン B 遺伝子検出(LAMP 法)を評価した。その結果、感度 84.2%、特異度 100%と良好な結果となった(表3)。2法が乖離した検体を3検体認め、LAMP 法によるトキシン B 遺伝子検出(分離菌法)陽性、便直接法によるトキシン B 遺伝子陰性であった。この原因は便直接法の感度不足や便成分による反応阻害が考えられた。便直接法による便からの核酸抽出には PURE 法を用いた。この方法は処理時間が 20 分程度であり迅速な処理が可能である。また、今回核酸抽出に用いた便乳剤の量は 200 μ l であり、さらに検体量を増やすことで感度が上がる可能性を残している。便直接法によるトキシン B 遺伝子検出(LAMP 法)のみで CD 腸炎が診断できれば、診断の迅速化や検査コストの削減にもつながるため、今後症例を増やして検討を行いたい。