

# 平成30年度 病院医学教育研究助成成果報告書

報告年月日	平成31年 4月 3日
研究・研修課題名	院内伝播防止を目的とした <i>Clostridium difficile</i> の分子疫学解析検査の構築
研究・研修組織名 (所属)	感染制御部
研究・研修責任者名 (所属)	馬庭恭平 (検査部：感染制御部)
共同研究・研修実施者名 (所属)	竹内志津絵、川島史祥 (検査部) 石原慎之、石飛映美、坂根圭子、西村信弘、森山英彦、城有美、佐野千晶 (感染制御部)

区分	<input type="checkbox"/> 学会発表、 <input type="checkbox"/> 論文掲載、 <input type="checkbox"/> 資格取得、 <input type="checkbox"/> 認定更新、 <input type="checkbox"/> 試験合格 <input type="checkbox"/> 単位取得、 <input checked="" type="checkbox"/> その他の成果(今後学会発表・論文投稿を行う予定)
該当者名(所属)	馬庭恭平 (検査部)
学会名(会期・場所、認定名等)	
演題名・認証交付先等	
取得日・認定期間等	

## 目的及び方法、成果の内容

### ① 目的

*Clostridium difficile* (*Clostridioides difficile*: 以下 CD)は抗菌薬投与後に正常細菌叢が攪乱される結果、CD の異常増殖と毒素産生が起こり、下痢や偽膜性大腸炎などの感染症を起こすとされる。CD 感染症の病原性は増殖した CD が産生する toxinA と toxinB が関連し、toxinA は腸管毒性を有し、toxinB は細胞毒性を有している。toxinA と toxinB を産生する株が有毒株であるとされていたが、近年 toxinB のみ産生する株も有毒株とされる。一方で toxinA と toxinB を産生しない株も存在し、これらは病原性をもたず、無毒株であるとされている。また、第3の毒素とよばれる binary toxin 産生菌も散見されており臨床問題となっている。

CD は芽胞を形成することにより病院環境で生き残り医療従事者や患者の手を介して広がり院内感染を引き起こすことがあるため、院内感染対策上でも重要な菌である。CD の院内伝播が疑われた際の感染源の特定や感染経路の究明には分子疫学解析法 (PFGE 法など) が必要だが、処理時間が長いことなどから日常業務への導入は困難であった。今回簡便に毒素遺伝子検出と分子疫学解析が可能である PCR-based ORF Typing (POT) 法の原理に基づいた、マルチプレックス PCR を用いて当院の CD を調査するとともに、検査体制を整えることを目的とする。

### ② 方法

検討対象は2018年5月から2019年1月に検査部に出された便検体の残余検体168検体を用いた。検討試薬はシカジーニアス® 分子疫学解析 POT キット (C. ディフィシル用：以下 POT 法) を使用した。本製品は菌株の識別ができると同時に毒素産生遺伝子の検出が可能という特徴をもつ。そこで今回の検討内容は (1) 従来法 (イムノクロマト法：IC 法) と POT 法の毒素産生遺伝子検出の比較、(2) POT 法を用いた CD の分子疫学解析、(3) binary toxin 産生株の有無について行った。検討方法を以下に示す。

1. 臨床残余検体を用いて IC 法 (CD 抗原・毒素) での検査を行う。
2. CD 抗原陽性検体を CCMA 培地に塗布し、48 時間嫌気培養する。
3. 嫌気培養で発育を認めた菌株を質量分析装置で同定検査を行う。
4. POT 法により毒素産生遺伝子と分子疫学解析を行い、当院での CD の特徴を調査する。

### ③ 成果

#### 1. 結果

IC 法で CD 抗原検査が陽性であった 70 株を培養し、培地上で発育が認められた 55 株について質量分析装置を用いて同定検査を行った。55 株中 50 株が CD であり、残りの 5 株は CD 以外の *Clostridium*

属であった。以下は50株の解析結果である。50株は同一患者からの2株を含んだ結果である。

(1) IC法と毒素産生検出精度の比較

結果を表1に示す。培養でCDを認めた50株を対象としたところIC法で毒素検査が陽性になったものに関してはPOT法でも毒素遺伝子はすべて陽性であった。しかし、IC法で毒素検査陰性であった38株中PCR法で毒素遺伝子陽性となったものは20株で認められ、IC法の感度は37.5%であった。

表1

		POT法		
		toxinA(+)/B(+)	toxinA(-)/B(+)	toxinA(-)/B(-)
IC法	toxin(+)	11	1	0
	toxin(-)	20	0	18

(2) CDの分子疫学解析

今回発育したCD50株のPOT法でのPOT型についての結果を表2に示す。CDのPOT型は44タイプに分類され、485-439、691-387、484-311、826-279については複数認められた。ただし、691-387に関しては同一患者からの2件を含む。

表2

POT型	件数	POT型	件数
485-439	3	549-276	1
691-387	3	664-436	1
484-311	2	668-436	1
826-279	2	673-187	1
257-356	1	673-447	1
257-436	1	690-387	1
273-52	1	700-337	1
357-259	1	732-272	1
384-272	1	732-308	1
385-292	1	816-272	1
405-272	1	825-259	1
405-500	1	826-311	1
432-272	1	826-343	1
433-272	1	826-55	1
476-247	1	848-260	1
477-503	1	852-4	1
480-439	1	901-371	1
484-275	1	912-439	1
484-439	1	916-283	1
485-311	1	944-272	1
486-307	1	946-275	1
487-311	1	957-383	1

\* 691-387は同一患者を含む(2件)

(3) binary toxin 産生株の有無について

binary toxin が陽性だったもののPOT型とIC法のtoxin結果、PCRでのtoxinA、toxinBの結果を表3に示す。対象中binary toxin が陽性だったものは4株であった。

表3

POT型	IC法		POT法		
	GDH	Toxin	ToxinA	ToxinB	binary toxin
673-187	+	+	+	+	+
673-447	+	+	+	+	+
916-283	+	+	+	+	+
957-383	+	-	+	+	+

## 2、まとめ

今回調査した結果従来法である IC の毒素検出の感度は 37.5%と低い結果であった。既報でも IC 法の感度は 57.7%<sup>1)</sup>、35.8%<sup>2)</sup> といった報告が有り、おおむね一致する結果であった。CD50 株の POT 法での POT 型については 44 タイプ認められた。複数認められたものは 4 タイプあったが検体提出日や入院病棟から院内での伝播の可能性は低く、明らかな関連性は認められなかった。また同一患者から同じ POT 型の CD が検出されたおり、今回の症例では再燃であると考えられた。このように同一患者から POT 型を調べることで再燃か再感染かを予測することができ、有効な治療にもつながるのではないかと考えられる。

近年米国では CD 感染症が急激に増加し、中でも毒素遺伝子変異株 (BI/NAP1/027 株) は毒素の産生量が高く強毒株とされている。BI/NAP1/027 株は binary toxin 産生することが特徴とされ、今回本調査で 4 株検出された。Iwashima らが調査した CDI 疫学調査では、binary toxin 産生株の検出頻度は 5.6%と報告されている<sup>3)</sup>。今回の調査では 50 株中 4 株 (8%) と非常に高かったことや強毒株かどうかは POT 法では判別できないため今後さらなる調査が必要だと考える。

POT 法を用いた CD の分子疫学解析法は PCR を用いて約 4 時間で検査が可能のため迅速であり、かつ同時に toxinA と toxinB、binary toxin の産生遺伝子検出が可能であるため非常に有用な検査だと考えられた。この研究を行うことで現在まで患者背景や病棟、接触歴等でしか判断できなかった院内伝播が把握でき、より明確な院内感染対策を講じることができると考えられる。また微生物検査室として遺伝子検査を用いた疫学解析の手法を導入できたことで感染対策に有用な検査結果を提供できる。

## 参考文献

- 1) 澤辺悦子, 他: 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. 日本臨床微生物学会誌 21: 7~13, 2011
- 2) 原稔典, 他: 当院で分離された Clostridium difficile における Binary toxin 産生遺伝子保有状況. 医学検査 64(2): 242~246, 2015
- 3) Iwashima Y, et al. : 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, 2010.