

# クロストリジオイデス・ディフィシルのトキシンB遺伝子検出

## Clinical detection of *Clostridioides difficile* toxin B gene

おか だ ゆう や もり なが よし とも やなぎ はら かつ のり  
 岡 田 侑 也<sup>1)</sup> : 森 永 芳 智<sup>1,2)</sup> : 柳 原 克 紀<sup>1,2)</sup>  
 Yuya OKADA Yoshitomo MORINAGA Katsunori YANAGIHARA

### はじめに

クロストリジオイデス・ディフィシルの診断法は、現行の培養法やイムノクロマト法検査に加えて、新たな診断機器の開発に伴い診療への貢献が期待されている。またクロストリジオイデス・ディフィシル感染症の診療ガイドラインのなかでも、トキシンB遺伝子検出の位置づけが提示された。トキシンB遺伝子検出検査は2019年4月より保険が適用され、遺伝子検査を診療に活かす機会が増えてきた。

### I. クロストリジオイデス・ディフィシル感染症と細菌学的背景

#### 1. 診断の理解に必要な細菌学的知識

クロストリジオイデス・ディフィシルは、グラム陽性の偏性嫌気性菌で、抗菌薬関連下痢症/腸炎の重要な原因菌の1つである。本菌による感染症はクロストリジオイデス・ディフィシル感染症(CDI)といわれ、症状としては下痢や腹痛などの軽症例がほとんどであるが、重症例では内視鏡検査で偽膜の形成が認められる偽膜性腸炎や、巨大結腸症まで様々な症状が認められることが知られている<sup>1,2)</sup>。本菌は、芽胞を形成することで、酸素が存在する環境や乾燥的な環境であっても最小限の生命活動を維持することができるため、院内感染対策の面でも重要な菌の1つである。

CDIの発症にはトキシンを産生する株が関わり、診断にはこのトキシン産生株を検査で検出する。治

療にはバンコマイシンやメトロニダゾール、フィダキソマイシンが使用され、通常は治療反応性がよいが、再発例が多いことも特徴であり、適切に診断することが重要である。本菌はトキシン産生性に関らず、腸内環境に定着しても存在することがあるため、CDIを診断する上で、定着と発症を区別して考えなくてはならない。

#### 2. トキシンAとトキシンB

本菌が産生する毒素にはトキシンA、トキシンBという2つの毒素がある。トキシンAはエンテロトキシンであり、腸管腔内への水分の誘導、好中球の遊走などで腸管の炎症を惹起する。トキシンBはサイトトキシンの作用があり、細胞障害性を持つ。トキシンAもサイトトキシン活性を持つが、その活性はトキシンBの方が強い。本菌のなかにはトキシンA、トキシンBの両方を産生する株(トキシンA(+)/トキシンB(+))、トキシンBのみを産生する株(トキシンA(-)/トキシンB(+))があり、これらがCDIを起こすことがある。また、両毒素とも産生しない毒素非産生株(トキシンA(-)/トキシンB(-))は、病原性を持たない<sup>3,4)</sup>。

#### 3. その他の病原因子

欧米を中心にみられる株の中には強毒株として知られるものがあり、アウトブレイクを起こして多くの重症例・死亡例が見られている。その代表株である027/NAP/BI株は、トキシンA・Bの発現を抑制する遺伝子に変異があるため、両トキシンの産生が過剰となっていることに加え<sup>5)</sup>、第3のトキシンといわれるバイナリートキシンを産生することが特徴

1)長崎大学病院 検査部  
 ☎852-8501 長崎県長崎市坂本1-7-1  
 2)長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科  
 病態解析・診断学分野(臨床検査医学)

1)Department of Laboratory Medicine, Nagasaki University Hospital  
 (1-7-1 Sakamoto, Nagasaki 852-8501, Japan)  
 2)Department of Laboratory Medicine, Nagasaki University Graduate  
 School of Biomedical Sciences

である。027/NAP/BIとは、3種類の菌株のタイピング手法の結果を組み合わせた名前である。わが国では、バイナリートキシン遺伝子を有する株は散見されているものの、必ずしも重症例ではなく、現在のところこのような強毒株を示す株は問題とはなっていない<sup>6~8)</sup>。

## II. CDI 診断とトキシン B 遺伝子検出

### 1. 診断フローチャートと便性状評価

欧州や米国では CDI に関連するガイドラインが存

在していたが、日本でも日本感染症学会と日本化学療法学会が CDI 診療ガイドラインを作成している<sup>9)</sup>。わが国のガイドラインでは、CDI 診断のためのフローチャートを通常診療時とアウトブレイク等の流行期で分けていることが特徴である(図1~3)<sup>9)</sup>。通常診療時はイムノクロマト法をまず行い、遺伝子検査(NAAT: Nucleic Acid Amplification Test)は第二段階目に位置付けられている。アウトブレイク時は、必要に応じて培養検査を併用しながら、可能な施設では NAAT をはじめから利用してもよい。

通常診療とアウトブレイクのどちらの場合でも、CDI 診断のためには患者の便の性状評価が大切とな

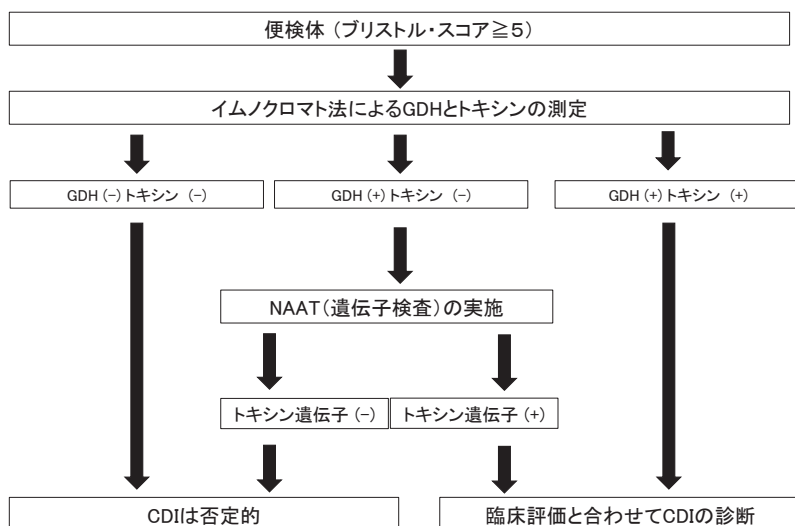


図1 クロストリジオイデス・デフィシル感染症診断のフローチャート(通常診療時)(文献9)から引用改変)

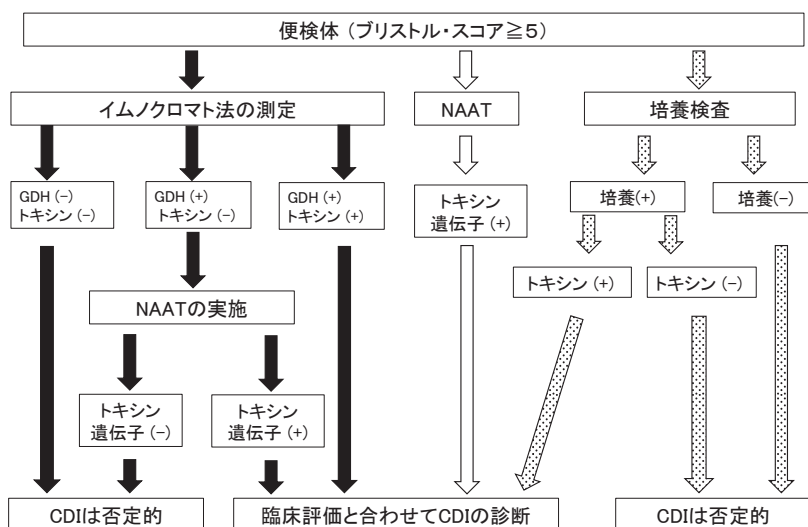


図2 クロストリジオイデス・デフィシル感染症診断のフローチャート(アウトブレイク時の NAAT 検査可能の場合)(文献9)から引用改変)

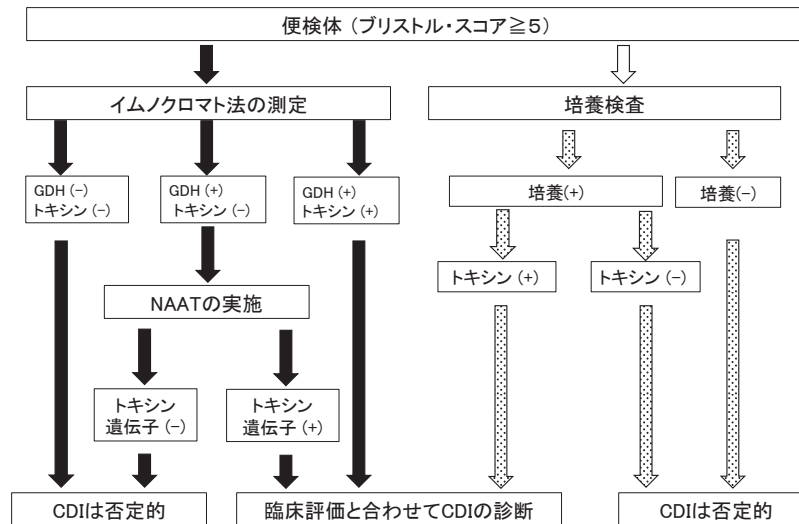


図3 クロストリジオイデス・ディフィシル感染症診断のフローチャート  
(アウトブレイク時のGDH・トキシン検査後のNAATの場合)

(文献9)から引用改変)

表1 Bristol Stool Scale による性状分類

Bristol Stool Scale	一般的表現	
1	コロコロ便	硬くてコロコロの塊状の(排便困難な)便
2	硬い便	ソーセージ状であるがでこぼこした(塊状の)便
3	やや硬い便	表面にひび割れのあるソーセージ状の便
4	普通便	表面がなめらかで柔らかいソーセージ状、あるいは蛇のようなどぐろを巻く便
5	やや柔らかい便	はっきりとした断端のある柔らかい半分固形の(容易に排便できる)便
6	泥状便	端がほぐれて、ふにゃふにゃの不定形の小片便、泥状の便
7	水様便	水様で、固形物を含まない液体状の便

KW Heaton, J Radvan, H Cripps, et al. Defecation frequency and timing, and stool form in the general population: a prospective study. Gut. 1992 Jun; 33(6): 818-824. (文献10)より)

る。便の性状評価には Bristol Stool Scale のようなスコア化が有用であり(表1)<sup>10)</sup>、ブリストル・スコアが5以上の下痢の場合に検査を行う<sup>10)</sup>。便の性状評価が重要とされる背景には、検査結果のみでは定着しているクロストリジオイデス・ディフィシルを区別できないためである。また、トキシンが検出された場合でも、もう一度臨床評価と合せて最終的にCDIと診断する。

## 2. クロストリジオイデス・ディフィシルの検査法

イムノクロマト法を原理としたキットにより、糞便検体中の本菌の存在とトキシン産生性の両者を安価で迅速に評価できる。イムノクロマト法で検出しているグルタミン酸デヒドロゲナーゼ(GDH)は本菌が産生する酵素であり、GDH陽性は本菌が検体中に存在することを意味する。一方、トキシン産生性についてはトキシンAとトキシンBの両方を検

出するものが現在利用されている。イムノクロマト法の検査特性には特徴があり、GDH検査の感度が良く、トキシン検査は特異度が高い。そのため、イムノクロマト法の結果で両者が陰性の場合にはCDIではない可能性が高く、両者が陽性の場合にはCDIが考えられる。しかしながら、トキシン検査の感度は約50~70%程度と高くないため<sup>11,12)</sup>、GDH陽性でトキシン陰性の場合には、偽陰性の症例が含まれる可能性がある。

培養検査は、トキシン産生性は直接的にはわからないが、少ない菌量であっても本菌の存在を検出できる。特殊培養であるため、検体提出時に適切に検査依頼を行う必要がある。CCMA培地(サイクロセリン・セフォキシチン・マニトール寒天培地)やCCFA培地(サイクロセリン・セフォキシチン・フルクトース寒天培地)という専用培地を用いて嫌気条件下で培養を行い、約1~3日後に菌の発育が観

察される。トキシン産生を間接的に知る方法として、発育したコロニーからイムノクロマト法検査を行う *toxigenic culture* という方法もあるが、コロニーの中にはトキシン産生株と非産生株が混在している可能性がある。培養検査は、疫学的な調査やアウトブレイク時の菌株の相同性の評価として利用できるというメリットがある。

### 3. トキシン B 遺伝子検査 (NAAT)

従来から CDI 診断における検出対象として、トキシン B 遺伝子が注目されていたが、手間と時間がかかり経験も必要であった<sup>13, 14)</sup>。また、標準化や精度管理の面でも通常検査法として用いることが難しかった。しかしながら、近年自動機器の開発が進み、糞便検体を直接利用し、遺伝子の抽出・増幅・解析を行うことにより、煩雑性や手作業によるコンタミネーションの課題が解消され、臨床レベルでトキシン B 遺伝子を検出することができるようになった。海外では既に臨床利用されていたが、わが国でも 2019 年 4 月に保険適用となるのは初めての機器が承認された。

トキシン B 遺伝子検査は感度・特異度共に高いことが特徴で、感度 87～100%、特異度 98.8～99.4%である(表 2)<sup>15)</sup>。また、自動機器のいくつかでは、強毒株でみられる遺伝子の検出にも対応している。いずれも測定に関する用手的過程は極力簡素化されており、専用のカートリッジに検体添加後は原

則自動化が整えられ、120 分以内に結果が判明する。

診断フローチャートで示されているように、通常診療でのトキシン B 遺伝子検査は、イムノクロマト法で GDH 陽性トキシン陰性の場合の確認検査として位置づけられる。前述のイムノクロマト法の偽陰性を補うことが可能であり、NAAT を行うことによってトキシン産生 *Clostridium difficile* の検出感度・検出率が上昇する<sup>16, 17)</sup>。しかしながら、NAAT の結果を解釈する上では、定着患者での非 CDI 下痢症との鑑別にも配慮する必要がある。例えば、炎症性腸疾患や免疫不全患者は、非 CDI 下痢の発症率が高い一方、*Clostridium difficile* の腸管への定着も多い。したがって、CDI と診断して治療を行う場合も、その反応性を観察する必要がある。

アウトブレイク時は、はじめから NAAT を行うことにより、感染対策面での介入をより適切かつ迅速に行える可能性がある。そのため、フローチャートでもその選択肢が示されているが、今後のエビデンスの蓄積が必要である。

多くの施設ではまだ NAAT を利用できる環境にないが、ガイドラインで NAAT の利用場面が整理され、また保険収載により徐々にその利用機会は広がるものと思われる。しかしながら、NAAT の最も重要な課題として、医療費に与える影響が不明であることが挙げられる。保険収載上は 450 点であり、算定条件は、表 3 に示す入院患者に対して CDI 診

表 2 トキシン B 遺伝子検査キット一覧

	BD MAX Cdiff	Verigene CDF	Xpert C.difficile
感度	87.0(65.3～96.6)	95.2(74.1～99.8)	100(82.1～100)
特異度	98.8(95.3～99.8)	99.4(96.2～100)	98.8(95.3～99.9)
測定時間	110～120分	110～120分	35～45分
測定項目	tcdB	tcdB tcdA cdtA/cdtB tcdC 変異	tcdB tcdA cdtA/cdtB tcdC 変異

tcdB: トキシン B 遺伝子、tcdA: トキシン A 遺伝子、cdtA/cdtB: バイナリートキシン遺伝子、tcdC 変異: トキシン産生の制御に関わる遺伝子 (文献15)から引用改変)

表 3 クロストリジオイデス・ディフィシル感染症  
トキシン B 遺伝子検査実施時の算定条件

以下の①～③をいずれも実施した場合に限り

- ① クロストリジオイデス・ディフィシル(CD)感染症を疑う場合であって、クロストリジオイデス・ディフィシル抗原定性検査において、CD 抗原陽性かつ CD トキシン陰性であること。
- ② 2 歳以上で Bristol Stool Scale 5 以上の下痢症状があること。
- ③ 24 時間以内に 3 回以上、又は平常時より多い便回数があること。



療ガイドラインに基づいてクロストリジオイデス・ディフィシルのトキシシンB遺伝子検出を行った場合となっており、検体検査管理加算(Ⅱ)以上、感染防止対策加算(Ⅰ)の施設基準を届けている施設のみ実施することが認められている。該当施設の中には包括医療となっている施設が少なくないので、解析コストが安価ではないNAATの費用対効果の検証も今後必要である。また、NAATを利用することによりCDI診療の適正化が促進されるが、間接的に入院期間やアウトブレイクの抑制にも影響することも考えられることから、トータルコストの視点からの解析も重要である。

## おわりに

感染症診断領域における遺伝子検査は急速に発展しており、腸管感染症を起こす微生物の遺伝子検査を同時に多項目で検査する遺伝子検査も登場している<sup>18)</sup>。下痢症の診断では感染性と非感染性の鑑別が難しいが、遺伝子検査はこれらの鑑別に利用できるツールである。現在は、クロストリジオイデス・ディフィシル診療にNAATを活用できるようになったばかりであり、これからわが国独自のエビデンスを蓄積していく段階である。

## 文 献

- 1) Burke KE, Lamont JT. Clostridium difficile infection: a worldwide disease. Gut Liver. 2014 Jan ; 8(1): 1-6.
- 2) Rupnik M, Wilcox MH, Gerding DN. Clostridium difficile infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. Nat Rev Microbiol. 2009 Jul ; 7(7): 526-536.
- 3) Warny M, Pepin J, Fang A, Killgore G, Thompson A, et al. Toxin production By an emerging strain of Clostridium difficile associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. Lancet. 2005 Sep 24-30 ; 366(9491): 1079-1084.
- 4) Schwan C, Stecher B, Tzivelekidis T, et al. Clostridium difficile toxin CDT induces formation of microtubule-based protrusions and increases adherence of Bacteria. PLoS Pathog. 2009 Oct ; 5.
- 5) LaBBé AC, Poirier L, MacCannell D, et al. Clostridium difficile infections in a Canadian Tertiary Care Hospital Before and during a regional epidemic associated with the BI/NAP1/027 strain. Antimicrob Agents Chemother. 2008 ; 52 : 3180-3187.
- 6) Okada Y, Kaku N, Kosai K, et al. Molecular epidemiology of Clostridioides difficile and risk factors for the detection of toxin gene-positive strains. J Infect Chemother. 2019 Apr ; 25(4): 262-266.
- 7) Kato H, Ito Y, van den Berg RJ, et al. First isolation of Clostridium difficile 027 in Japan. Euro Surveill. 2007 Jan 11 ; 12(1)
- 8) Nishimura S, Kou T, Kato H, et al. Fulminant pseudomembranous colitis caused By Clostridium difficile PCR ribotype 027 in a healthy young woman in Japan. J Infect Chemother. 2014 Nov ; 20(11): 729-731.
- 9) 日本化学療法学会/日本感染症学会CDI診療ガイドライン作成委員会 編. Clostridioides(Clostridium)difficile感染症診療ガイドライン
- 10) KW Heaton, J Radvan, H Cripps, et al. Defecation frequency and timing, and stool form in the general population: a prospective study. Gut. 1992 Jun ; 33(6): 818-824.
- 11) Kosai K, Iwanaga Y, Akamatsu N, et al. Performance evaluation of the Verigene® Clostridium difficile nucleic acid test, an automated multiplex molecular testing system for detection of C. difficile toxin. J Infect Chemother. 2017 Oct ; 23(10): 674-677.
- 12) Morinaga Y, Akamatsu N, Matsuda J, et al. Diagnostic utilities of a fully automated molecular test for toxigenic Clostridium difficile. J Infect Chemother. 2018 Feb ; 24(2): 88-91.
- 13) Kato H, Kato N, WatanaBe K, et al. Identification of toxin A-negative, toxin B-positive Clostridium difficile By PCR. J Clin Microbiol. 1998 Aug ; 36(8): 2178-2182.
- 14) Persson S, Jensen JN, Olsen KE. Multiplex PCR method for detection of Clostridium difficile tcdA, tcdB, cdtA, and cdtB and internal in-frame deletion of tcdC. J Clin Microbiol. 2011 Dec ; 49(12): 4299-4300.
- 15) GilBreath JJ, Verma P, ABBott AN, et al. Comparison of the Verigene Clostridium difficile, Simplexa C. difficile Universal Direct, BD MAX Cdiff, and Xpert C. difficile assays for the detection of toxigenic C. difficile. Diagn Microbiol Infect Dis. 2014 Sep ; 80(1): 13-18.
- 16) Swindells J, Brenwald N, Reading N, et al. Evaluation of diagnostic tests for Clostridium difficile infection. J Clin Microbiol. 2010 Feb ; 48(2): 606-608.
- 17) Bagdasarian N, Rao K, Malani PN. Diagnosis and treatment of Clostridium difficile in adults: a systematic review. JAMA. 2015 Jan 27 ; 313(4): 398-408.
- 18) 矢口勇治, 上田淳夫, 中村浩司, 他 : 糞便中 Clostridium difficile 毒素産生関連遺伝子検出キット Verigene CDF パネルの臨床的性能評価 日本臨床微生物学雑誌(0917-5059)27巻3号 Page188-194(2017.06)