

type ar-02 (Table 2). Among the 87 isolates, 18 different PCR ribotypes were identified (Fig.). Typing results by *slpA* sequence typing were found to be concordant with those by PCR ribotyping (Table 2). A total of 51 isolates belonging to PCR ribotype smz were classified into three *slpA* sequence subtypes (smz-01, -02, and -04), and the sequences of subtypes smz-02 and smz-04 differed by one and two deduced amino acids from that of smz-01. Two isolates showed the same PCR ribotype pattern (PCR ribotype og39) but their *slpA* amino acid sequences shared only 23% homology. All of the 12 A<sup>+</sup>B<sup>+</sup> isolates examined in the present study had the same *slpA* gene (type fr-01) but were typed into three different PCR ribotypes, 017, trf, and sgf.

#### **Direct typing by sequencing *slpA***

Nested PCR assay detecting *tcdB* was performed on DNA extracted from the 160 stool specimens, 109 (68%) were found positive for *tcdB* by the nested PCR, and *tcdB*-positive *C. difficile* was detected in 86 (79%) of the 109 stool specimens by culture (Table 3). No specimens negative for PCR detecting *tcdB* but positive for toxic culture were found. The 109 specimens that were PCR-positive for *tcdB* were examined for PCR assay detecting *slpA*. *slpA* was amplified by the nested PCR and sequenced in 90 of the 109 (83%) stool specimens tested; of these 90 specimens, *slpA* typing results were obtained in 83 and 7 specimens by primer set-A and primer set-B, respectively (Tables 2 and 3). Of the 90 stool specimens in which direct typing results were obtained, 77 specimens were positive for *C. difficile*-culture, and typing results from isolated strains agreed with those from direct typing in 76 specimens. In one stool specimen, the typing result on the recovered isolate (*slpA* sequence type og39-01) differed from that by direct typing with primer set-A (*slpA* sequence type smz-01). *C. difficile*-culture was repeated in the stool specimen, and 10 colonies were randomly selected and tested. Of 10 colonies examined for PCR ribotyping, 8 and 2 were typed as PCR ribotype smz and og39, respectively. The *slpA* genes of 2 of the 8 smz isolates and both og39 isolates obtained were sequenced, and PCR ribotype smz and og39 isolates were typed as *slpA* sequence types smz-01 and og39-01, respectively. Second PCRs with primer sets B and C were performed on the PCR product from the first PCR from this stool specimen; *slpA* sequence type og39-01 was obtained by PCR with the primer set C. In 13 stool specimens, *C. difficile* was not cultured but typing results were obtained by direct *slpA* sequence typing (Table 3). Of the 13 stool specimens, 6 were collected after vancomycin treatment started. No amplification was produced by PCRs for *slpA* in 9 stool specimens that were positive for *C. difficile* culture.

#### **Endemic and sporadic types at hospitals in Japan**

*slpA* sequence type smz (subtypes smz-01, smz-02, and smz-04)/PCR ribotype smz

isolates were yielded in 51 (59%) of 86 stool specimens from which *tcdB*-positive *C. difficile* was cultured, and *slpA* of type smz was detected in 60 (67%) of 90 stool specimens in which direct typing results could be obtained. In total, *slpA* sequence type smz was detected by culture and/or direct typing in 61 (62%) of 99 stool specimens positive for toxic culture and /or direct *slpA* sequence typing. Type smz was most frequently found at each of all four hospitals examined here; 2 subtypes (smz-01 and smz-02) were predominant at hospitals A and B, and only smz-01 was found at hospital D. *slpA* sequence subtype smz-04 was found to be unique to hospital C.

In the present study, 8 patients suffered from CDI caused by A<sup>+</sup>B<sup>+</sup> isolates at hospital D, which were all typed into *slpA* sequence type fr-01/PCR ribotype trf. Among A<sup>+</sup>B<sup>+</sup> isolates examined in this study, one isolate of PCR ribotype 017 and one isolate of PCR ribotype sgf were recovered from patients admitted at the same hospital in 2004 and 2007, respectively. Both patients suffered from CDI with severe complications; the patient with PCR ribotype 017 isolate died of CDI and the patient with PCR ribotype sgf survived after emergency colectomy. *slpA* sequence types gr, hr, and yok were recovered from sporadic cases, but were not predominant at any hospitals examined in this study.

One A<sup>+</sup>B<sup>+</sup> CDT<sup>+</sup> isolate was found to be *slpA* sequence type gc8-01/PCR ribotype 027 in this study (Kato *et al.*, 2007). No isolates with the *slpA* gene identical to that of PCR ribotype 078 (Goorhuis *et al.*, 2008) were found among the 87 isolates tested.

## DISCUSSION

*slpA* sequence typing was found to have reliable typability and discriminatory power in comparison with PCR ribotyping. To date, 24 different *slpA* sequence major types and 56 subtypes were found among *tcdB*-positive isolates (data not shown). Typing results by *slpA* sequence typing exhibit a high concordance with those by PCR ribotyping with the exception of 2 isolates, which belonged to the same PCR ribotype but were classified as different *slpA* sequence major types. While PCR ribotyping is based on detection of the variation in the spacer region between the 16S rRNA gene and the 23S rRNA gene, *slpA* sequence typing detects variability of the genes encoding surface layer protein. There may be differences between the genetic diversity of the spacer region and that of *slpA*. The limitations of this study include low number of strains examined for each *slpA* sequence type and PCR ribotype except types smz and fr. Further study using more clinical isolates is warranted to compare typing results of the two systems. A definite advantage of sequence-based typing techniques is the transportability of typing results from laboratory to laboratory. When an increase in the incidence of CDI

or in the severity of CDI cases is perceived, or one type is found to spread to multiple patients in a health care facility or an area, it is prudent to ascertain whether the epidemic or endemic strain corresponds to one of the hyper virulent strains previously reported worldwide (Barbut *et al.*, 2007; Warny *et al.*, 2005; McDonald *et al.*, 2005; Goorhuis *et al.*, 2008). Especially in the areas or countries where there is no experience in isolating the above-mentioned strains, identification of the specific strains by typing systems, which depend on banding-pattern analysis such as PCR ribotyping or PFGE analysis, is difficult without obtaining already-characterized reference strains. If the sequence results are previously registered in the database, obtaining reference strains for comparison is unnecessary. Although *slpA* sequence typing requires sequencing steps, once the typing results are obtained, it is easier and more objective to compare typing results of tested strains to those previously typed without repeating experiments. On this point, typing by sequencing analysis is not always time-consuming.

*slpA* sequence typing could be applied to direct typing successfully. Of 13 stool specimens, from which *C. difficile* was not cultured but typing results were obtained by direct *slpA* sequence typing, 6 were collected after vancomycin treatment started; vancomycin in the stool specimens might inhibit the growth of *C. difficile*. *slpA* sequence typing could analyze *C. difficile* in some stool specimens that were inadequate for culture, such as those obtained after starting treatment with vancomycin or metronidazole. Direct typing by sequencing *slpA* at present has the limitation of the tedious steps required. Since this typing method depends on the variability of the *slpA* gene, 3 sets of primers for the 2nd PCRs are needed to amplify the variable region of the gene, which complicates the procedure. Although the procedure must be simplified for practical use, the method would be valuable for detecting epidemiologically important strains.

Toxin B-positive *C. difficile* was recovered from 86 (54%) of 160 stool specimens tested. The stool specimens tested in this study were obtained from patients who had considerably severe symptoms and were sent to the National Institute of Infectious Diseases for further analysis. This is the major reason for the high prevalence.

Type smz strain has been documented to cause health-care associated infection in multiple hospitals in Japan (Kato *et al.*, 2001; Kato *et al.*, 2005a; Sawabe *et al.*, 2007). Killgore *et al.* (Killgore *et al.*, 2008) tested 42 *C. difficile* isolates from 4 countries in North America and Europe by 7 techniques including *slpA* sequence typing, and none of which were identified as *slpA* sequence type smz. In another report, only 3 of 33 isolates recovered from an outbreak in United States were type smz (Kato *et al.*, 2001;

Kato *et al.*, 2005a). Joost *et al.* examined the *slpA* sequences of their *C. difficile* isolates and compared the sequence results with the database registered; they found type smz in only 3% of isolates recovered from CDI patients at a university hospital in German (Joost *et al.*, 2009). While these limited studies suggest that type smz is not frequently isolated in North America or Europe, the real prevalence is unknown. *slpA* sequence typing could be useful for studying the distribution of the smz strain worldwide.

A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> *C. difficile* has been reported to cause nosocomial outbreaks (Kuijper *et al.*, 2001; Komatsu *et al.*, 2003) and to be predominant in Ireland, Poland (Barbut *et al.*, 2007; Pituch *et al.*, 2007), and Korea (Kim *et al.*, 2008) as well as in Japan (Rupnik *et al.*, 2003), indicating the emergence of CDI caused by A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> *C. difficile*. As far as we learned, A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> isolates that have 1.8 kbp deletions in the repeating sequences of *tcdA* (Kato *et al.*, 1999) including the ATCC 43598 strain, were all typed into the *slpA* sequence major type fr together with exceptional isolates that belong to serogroup X (data not shown). Notably, A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> *C. difficile* was isolated from two sporadic cases with severe complications although no specific characters were found in these isolates.

In the present study, one isolate was identified as PCR ribotype 027; none of 87 isolates tested was PCR ribotype 078. To date, we have recognized just sporadic CDI cases caused by *slpA* sequence type gc8/PCR ribotype 027 isolates in Japan, which were historic isolates (Kato *et al.*, 2007; Sawabe *et al.*, 2007). It was documented that PCR ribotype 078 more frequently causes community-associated diseases (Goorhuis *et al.*, 2008). All patients examined in this study had health-care associated infection, which might be one of the reasons why CDI caused by PCR ribotype 078 was not found. Typing by sequencing of *slpA* could be a reliable tool for discovering CDI cases and outbreaks due to these epidemic strains, which may have been overlooked.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank G. E. Killgore, B. Limbago, A. Thompson, L. C. McDonald (Centers for Disease Control and Prevention, US), S. Johnson, W. Zukowski, S. P. Sambol, D. N. Gerding (Hines VA Hospital, US), J. Brazier (University Hospital of Wales, UK), E. J. Kuijper, R. J. van den Berg (Leiden University Medical Center, The Netherlands), J. Pepin, E. H. Frost (University of Sherbrooke, Canada), B. Nicholson, C. Woods (Duke University School of Medicine, US), and P. Savelkoul (VU University Medical Center, The Netherlands) for providing the US36, NL8, US37 and US42 strains and strain information, E. J. Kuijper and D. Bakker (Leiden University Medical Center, The Netherlands) for providing the UMCG12(3) strain, and M.

Nagasawa, Y. Kajihara, S. Ono (National Defense Medical College Hospital, Japan), A. Nakamura, Y. Iwashima, Y. Wakimoto (Nagoya City University Hospital, Japan), and T. Tazawa, J. Okada (Kanto Medical Center NTT EC, Japan) for their assistance in the collection of specimens. The technical assistance of Y. Yoshimura, K. Kai and Y. Taki is also gratefully acknowledged. A grant-in-aid for Scientific Research (C) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology and a grant (H19-Shinko-011) from the Ministry of Health, Labor, and Welfare, Japan supported this study.

## REFERENCES

- Barbut, F., Mastrantonio, P., Delmee, M., Brazier, J., Kuijper, E. & Poxton, I. (2007).** Prospective study of *Clostridium difficile* infections in Europe with phenotypic and genotypic characterisation of the isolates. *Clin Microbiol Infect* **13**, 1048-1057.
- Calabi, E. & Fairweather, N. (2002).** Patterns of sequence conservation in the S-Layer proteins and related sequences in *Clostridium difficile*. *J Bacteriol* **184**, 3886-3897.
- Delmee, M., Laroche, Y., Avesani, V. & Cornelis, G. (1986).** Comparison of serogrouping and polyacrylamide gel electrophoresis for typing *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol* **24**, 991-994.
- Eidhin, D. N., Ryan, A. W., Doyle, R. M., Walsh, J. B. & Kelleher, D. (2006).** Sequence and phylogenetic analysis of the gene for surface layer protein, *slpA*, from 14 PCR ribotypes of *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol* **55**, 69-83.
- Goorhuis, A., Bakker, D., Corver, J., Debast, S. B., Harmanus, C., Notermans, D. W., Bergwerff, A. A., Dekker, F. W. & Kuijper, E. J. (2008).** Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078. *Clin Infect Dis* **47**, 1162-1170.
- Goorhuis, A., Van der Kooi, T., Vaessen, N., Dekker, F. W., Van den Berg, R., Harmanus, C., van den Hof, S., Notermans, D. W. & Kuijper, E. J. (2007).** Spread and epidemiology of *Clostridium difficile* polymerase chain reaction ribotype 027/toxinotype III in The Netherlands. *Clin Infect Dis* **45**, 695-703.
- Joost, I., Speck, K., Herrmann, M., & von Muller, L. (2009).** Characterisation of *Clostridium difficile* isolates by *slpA* and *tcdC* gene sequencing. *Int J Antimicrob Agents* **33** Suppl 1, S13-18.
- Karjalainen, T., Saumier, N., Barc, M. C., Delmee, M. & Collignon, A. (2002).** *Clostridium difficile* genotyping based on *slpA* variable region in S-layer gene sequence: an alternative to serotyping. *J Clin Microbiol* **40**, 2452-2458.

- Kato, H., Ito, Y., van den Berg, R. J., Kuijper, E. J. & Arakawa, Y. (2007). First isolation of *Clostridium difficile* 027 in Japan. *Euro Surveill* **12**, E070111-070113.
- Kato, H., Kato, N., Katow, S., Maegawa, T., Nakamura, S. & Lyerly, D. M. (1999). Deletions in the repeating sequences of the toxin A gene of toxin A- negative, toxin B- positive *Clostridium difficile* strains. *FEMS Microbiol Lett* **175**, 197-203.
- Kato, H., Kato, N., Watanabe, K., Iwai, N., Nakamura, H., Yamamoto, T., Suzuki, K., Kim, S. M., Chong, Y. & Wasito, E. B. (1998). Identification of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* by PCR. *J Clin Microbiol* **36**, 2178-2182.
- Kato, H., Kato, N., Watanabe, K., Yamamoto, T., Suzuki, K., Ishigo, S., Kunihiro, S., Nakamura, I., Killgore, G. E. & Nakamura, S. (2001). Analysis of *Clostridium difficile* isolates from nosocomial outbreaks at three hospitals in diverse areas of Japan. *J Clin Microbiol* **39**, 1391-1395.
- Kato, H., Yokoyama, T. & Arakawa, Y. (2005a). Typing by sequencing the *slpA* gene of *Clostridium difficile* strains causing multiple outbreaks in Japan. *J Med Microbiol* **54**, 167-171.
- Kato, H., Yokoyama, T., Kato, H. & Arakawa, Y. (2005b). Rapid and simple method for detecting the toxin B gene of *Clostridium difficile* in stool specimens by loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol* **43**, 6108-6112.
- Keel, K., Brazier, J. S., Post, K. W., Weese, S. & Songer, J. G. (2007). Prevalence of PCR ribotypes among *Clostridium difficile* isolates from pigs, calves, and other species. *J Clin Microbiol* **45**, 1963-1964.
- Killgore, G., Thompson, A., Johnson, S., Brazier, J., Kuijper, E., Pepin, J., Frost, E. H., Savelkoul, P., Nicholson, B. & other authors (2008). Comparison of seven techniques for typing international epidemic strains of *Clostridium difficile*: restriction endonuclease analysis, pulsed-field gel electrophoresis, PCR-ribotyping, multilocus sequence typing, multilocus variable-number tandem-repeat analysis, amplified fragment length polymorphism, and surface layer protein A gene sequence typing. *J Clin Microbiol* **46**, 431-437.
- Kim, H., Riley, T.V., Kim, M., Kim, C. K., Yong, D., Lee, K., Chong, Y. & Park, J. W. (2008). Increasing prevalence of toxin A-negative, toxin B-positive isolates of *Clostridium difficile* in Korea: impact on laboratory diagnosis. *J Clin Microbiol* **46**, 1116-1117.
- Komatsu, M., Kato, H., Aihara, M., Shimakawa, K., Iwasaki, M., Nagasaka, Y., Fukuda, S., Matsuo, S., Arakawa, Y. & other authors (2003). High frequency of antibiotic-associated diarrhea due to toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium*

*difficile* in a hospital in Japan and risk factors for infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **22**, 525-529.

**Kuijper, E. J., Barbut, F., Brazier, J. S., Kleinkauf, N., Eckmanns, T., Lambert, M. L., Drudy, D., Fitzpatrick, F., Wiuff, C. & other authors (2008).** Update of *Clostridium difficile* infection due to PCR ribotype 027 in Europe, 2008. *Euro Surveill* **13**, 433-439.

**Kuijper, E. J., de Weerdt, J., Kato, H., Kato, N., van Dam, A. P., van der Vorm, E. R., Weel, J., van Rheeën, C. & Dankert, J. (2001).** Nosocomial outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea due to a clindamycin-resistant enterotoxin A-negative strain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **20**, 528-534.

**McDonald, L. C., Killgore, G. E., Thompson, A., Owens, R. C., Jr., Kazakova, S. V., Sambol, S. P., Johnson, S. & Gerding, D. N. (2005).** An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. *N Engl J Med* **353**, 2433-2441.

**Pituch, H., van Leeuwen, W., Maquelin, K., Wultanska, D., Obuch-Woszczatynski, P., Nurzynska, G., Kato, H., Reijans, M., Meisel-Mikolajczyk, F. & other authors. (2007).** Toxin profiles and resistances to macrolides and newer fluoroquinolones as epidemicity determinants of clinical isolates of *Clostridium difficile* from Warsaw, Poland. *J Clin Microbiol* **45**, 1607-1610.

**Rupnik, M., Kato, N., Grabnar, M. & Kato, H. (2003).** New types of toxin A-negative, toxin B-positive strains among *Clostridium difficile* isolates from Asia. *J Clin Microbiol* **41**, 1118-1125.

**Samore, M., Killgore, G., Johnson, S., Goodman, R., Shim, J., Venkataraman, L., Sambol, S., DeGirolami, P., Tenover, F. & other authors (1997).** Multicenter typing comparison of sporadic and outbreak *Clostridium difficile* isolates from geographically diverse hospitals. *J Infect Dis* **176**, 1233-1238.

**Sawabe, E., Kato, H., Osawa, K., Chida, T., Tojo, N., Arakawa, Y. & Okamura, N. (2007).** Molecular analysis of *Clostridium difficile* at a university teaching hospital in Japan: a shift in the predominant type over a five-year period. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **26**, 695-703.

**Stubbs, S., Rupnik, M., Gibert, M., Brazier, J., Duerden, B., & Popoff, M. (2000).** Production of actin-specific ADP-ribosyltransferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile*. *FEMS Microbiol Lett* **186**, 307-312.

**Stubbs, S. L., Brazier, J. S., O'Neill, G. L. & Duerden, B. I. (1999).** PCR targeted to the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region of *Clostridium difficile* and construction of a library consisting of 116 different PCR ribotypes. *J Clin Microbiol* **37**, 461-463.

Warny, M., Pepin, J., Fang, A., Killgore, G., Thompson, A., Brazier, J., Frost, E. & McDonald, L. C. (2005). Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *Lancet* **366**, 1079-1084.

**Table 3.** Comparison of results of *tcdB*+ *C. difficile* culture and direct PCR for detecting *tcdB* and *slpA* in 160 stool specimens

<i>tcdB</i> + <i>C. difficile</i> culture	Direct PCR for:		No. of stool specimens
	<i>tcdB</i>	<i>slpA</i>	
+	+	+	77
+	+	-	9
-	+	+	13
-	+	-	10
-	-	ND*	51
Total			160

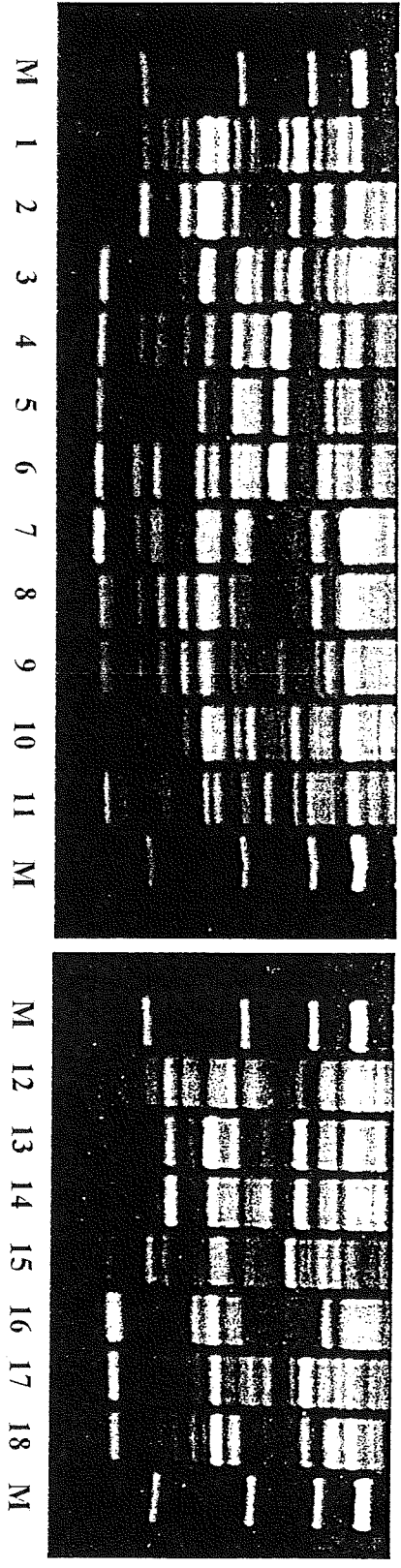
\*ND, not done.

**Figure legend**

Fig. PCR ribotype patterns of *C. difficile* isolates representing 18 different PCR ribotypes. Lane 1, PCR ribotype km0403; lane 2, km0429; lane 3, g9376; lane 4, 017, lane 5, trf; lane 6, sgf; lane 7, 001; lane 8, 014; lane 9, gc0637; lane 10, nt0442; lane 11, gc0577; lane 12, smz; lane 13, 002; lane 14, tk0437; lane 15, 027; lane 16, gc0578; lane 17, gc0636; lane 18, og39; lanes M, 100 bp ladder as a molecular weight size marker.



500 bp -  
300 bp -



**Table 1.** Primers for *slpA* sequencing typing

Primers	Direction	Sequence (5'-3')	Position of primer for 2nd PCR (DDBJ accession no. of <i>slpA</i> of the representative isolate)
<b>1st PCR</b>			
slpAcom19	→	GTTGGGAGGAATTTAAGRAATG	
slpAcom22	←	GCWGTYYTCTATCTATCDTYWCC	
<b>2nd PCR</b>			
<b>Set-A</b>			
slpAcom33	→	TAGGYGATGGDRAWTAYGTWG	311-331 (AB180242)
slpAcom30	←	CATAWBBYTYAGCTAAAKHTTBWGC	832-856 (AB180242)
<b>Set-B</b>			
slpAy32-1	→	TAGGYGATGGAAAATAYGTTTC	287-307 (AB258981)
slpAxr-1	→	TAGGTGATGGAGATTTAGTAATC	299-320 (AB239686)
slpAyok-9	→	GTTGCACATGGTGTAAACACAGGC	157-177 (AB240196)
slpAcom30	←	CATAWBBYTYAGCTAAAKHTTBWGC	853-877(AB258981)
<b>Set-C</b>			
slpAog39-3	→	GTTGYWRATRHRARAKTATGTTG	364-385 (AB259787)
slpAog39-6	←	TTAWWSCATCAKARTCWGTTGC	955-976 (AB259787)

**Table 2.** Typing results of recovered isolates and direct typing results obtained from 160 stool specimens

<i>slpA</i> sequence type*	DDBJ accession number	PCR ribotype	Toxin production	No. of isolates / No. of stool specimens typed directly						2nd primer set used for direct typing
				recovered at hospital:				Other	Total	
				A 36†	B 44	C 26	D 41			
ar-02	AB259785	km0403	A*B*CDT <sup>+</sup>	1/0					1/0	NA‡
cr-02	AB258979	km0429	A*B*CDT <sup>-</sup>	1/1					1/1	A
cr-03	AB258980	g9376	A*B*CDT <sup>+</sup>				1/1		1/1	A
fr-01	AB236153	017 §	A*B*CDT <sup>-</sup>					1/1	1/1	A
		trf	A*B*CDT <sup>-</sup>				8/9	2/3	10/12	A
		sgf	A*B*CDT <sup>-</sup>					1/1	1/1	A
gr-01	AB249984	001 §	A*B*CDT <sup>-</sup>			2/1	2/2		4/3	A
hr-01	AB231583	014 §	A*B*CDT <sup>-</sup>		1/1		3/1		4/2	A
		gc0637	A*B*CDT <sup>-</sup>				2/1		2/1	A
kr-02	AB258982	nt0442	A*B*CDT <sup>-</sup>					1/1	1/1	B
xr-03	AB261625	gc0577	A*B*CDT <sup>-</sup>				1/1		1/1	B
smz-01	AB180242	smz	A*B*CDT <sup>-</sup>	13/14	8/12		9/9‡	1/1	31/36‡	A
smz-02	AB181350	smz	A*B*CDT <sup>-</sup>	9/13	5/5	1/1			15/19	A
smz-04	AB256018	smz	A*B*CDT <sup>-</sup>			5/5			5/5	A
yok-01	AB240196	002 §	A*B*CDT <sup>-</sup>		1/0			2/2	3/2	B
yok-02	AB257283	tk0437	A*B*CDT <sup>-</sup>		1/1				1/1	B
og39-01	AB259787	og39	A*B*CDT <sup>-</sup>				1/1‡		1/1‡	C
t25-01	AB259786		A*B*CDT <sup>-</sup>		1/0				1/0	NA
gc11-01	AB258983	gc0578	A*B*CDT <sup>-</sup>				1/1		1/1	B
gc13-01	AB269265	gc0636	A*B*CDT <sup>-</sup>				1/1		1/1	B
gc8-01	AB249986	027 §	A*B*CDT <sup>+</sup>				1/1		1/1	A
Total number of isolates / total number of specimens typed				24/28	17/19	8/7	30/27‡	8/9	87/90‡	

\* Isolates were assigned to different *slpA* sequence major types when they had 20 or more amino acid differences, and to subtypes (01, 02, 03, and 04) when they had less than 20 such differences.

† No. of stool specimens examined.

‡ NA, no PCR products were amplified by any of 2nd primer sets used.

§ A nomenclature of Stubbs *et al.* was used for PCR ribotypes 017, 001, 014, 002, and 027 (Stubbs *et al.*, 1999).

‡ In one specimen, two *slpA* sequence types, smz-01 and og39-01 were identified.

# クロストリジウム・ディフィシル 感染症と感染対策



加藤 はる 国立感染症研究所 細菌第二部

## クロストリジウム・ディフィシル感染症は どのような疾患か

クロストリジウム・ディフィシル感染症は、そのほとんどが消化管感染症で、下痢や粘液便が認められることが多い。軽度な消化管症状を来す症例から重症例まで、幅広い症状を呈することが特徴のひとつで、重症例では、頻度は低いものの、イレウス、中毒性巨大結腸 (toxic megacolon)、消化管穿孔などにより緊急開腹手術が必要になる場合もあり、クロストリジウム・ディフィシル感染症が直接の原因で死亡する場合もある。また、本疾患は再発することが多く、治療を困難なものにしている。再発には、症状回復後も消化管から菌が排除されずにキャリアとなり再び発症する“再燃”と、菌が排除された後に新しい菌を獲得することによる“再感染”がある。

クロストリジウム・ディフィシル感染症は、抗菌薬や抗腫瘍薬の使用、外科手術など、消化管の常在細菌叢が攪乱された状態で発症することが多い。抗菌薬のなかでも、腸内フローラを攪乱しやすい薬剤、すなわち広域スペクトラムの抗菌薬や、強い抗嫌気性菌作用を持つ薬剤が誘因となりやすい。発症から6～8週間前に使用した抗菌薬は関連していると考えられる。しかし、抗菌薬関連下痢症・腸炎の原因がすべてクロストリジウム・ディフィシルではない<sup>1)</sup>ので、治療を開始する前には必ず細菌学的検査を行う必要がある。本疾患の発症およびクロストリジウム・ディフィシルの消化管定着には、抗菌薬使用のほかに、基礎疾患の重症度や、加齢、クロストリジウム・ディフィシル毒素に対する免疫反応、制酸剤や消化管蠕動を抑制する薬剤の使用、経管栄養等との関連が報告されており、宿主側因子が複雑に関与している。本疾患の発症に宿主側因子の影響が強いということは、再発する症例は複数回再発を繰り返すことが多いことから理解できる。

クロストリジウム・ディフィシル感染症は、医療関連感染のひとつとして重要である。クロストリジウム・ディフィシルは、偏性嫌気性菌で酸素の存在下で増殖できないが、芽胞のかたちでは、酸素の存在下でも長く生存し続ける。また、

芽胞の状態では、アルコールやクロルヘキシジン等の消毒薬は無効である。そのため、感染症例からの糞便によって汚染された医療スタッフの手指や、病室環境、医療機器が感染源や感染経路となって、施設内感染を引き起こす。最近では、市中感染例の増加も注目されており、外来症例においても、抗菌薬使用歴がある場合や他に下痢の原因が考え難い症例では、本疾患を疑う必要があると考えられる。

## クロストリジウム・ディフィシル感染症の 診断のためには、 どのように検査を進めればよいのか

クロストリジウム・ディフィシルは、偽膜性大腸炎の原因菌として知られ、偽膜性大腸炎は内視鏡、外科手術あるいは剖検で、消化管に偽膜形成が認められた場合に診断される。偽膜形成が認められた場合は、細菌学的検査を行わなくてもクロストリジウム・ディフィシルによる感染症と診断できると考えられている。一方、偽膜形成が認められない症例は多いので、内視鏡で偽膜形成が認められなくてもクロストリジウム・ディフィシル感染症を否定できない。イレウス症状が主症状の場合は、糞便検体採取が難しい上に、内視鏡検査施行も困難を伴うため、CT検査が有用であったとの報告がある。血液検査では、白血球増多および低アルブミン血症が重症度の指標になる。

クロストリジウム・ディフィシル感染症の診断には糞便検体において細菌学的検査を行う必要がある(図1)。糞便検体採取は、消化管症状のある症例から、バンコマイシンやメロニダゾール等の治療を開始する前に行う。基本的に、消化管症状がなくクロストリジウム・ディフィシルを消化管保有している症例の検査や、治療経過をチェックするための検査は必要ない。同じ検査室(検査センター)で検査を行うのであれば、毒素検出目的およびクロストリジウム・ディフィシル分離培養目的に輸送容器を分ける必要はない。嫌気性菌培養用の輸送容器を使用する必要はないが、5mL以上(大きな梅干しサイズ以上)の検体が採取されると、より信頼

できる検査結果が期待できる。重要なことは、“提出する検体がクロストリジウム・ディフィシル感染症を疑っている症例からの検体であること”を、臨床検査室に連絡することである。

細菌学的検査では、まず糞便検体中の毒素検出を行う。クロストリジウム・ディフィシルが産生するtoxin Aとtoxin Bの2毒素が本菌の病原性に大きな役割を果たしている。臨床的に分離される菌株は、toxin A陽性toxin B陽性、toxin A陰性toxin B陽性、さらにtoxin A陰性toxin B陰性に大きく分けられる。toxin A陽性toxin B陰性株の臨床分離の報告もあるが、遺伝子学的な検討のみによる報告であり、現在のところ詳細は不明である。toxin A陰性toxin B陽性株は、toxin A陽性toxin B陽性株と同様に、消化管感染症の原因となり、医療関連感染を引き起こす。従って、毒素検出検査は、toxin Aおよび/あるいはtoxin Bの検出が必要である。toxin A陰性toxin B陰性菌株も下痢症例から分離されることがあるが、クロストリジウム・ディフィシルがその下痢・腸炎の直接原因ではない可能性が高い。ただし、毒素非産生菌株であってもクロストリジウム・ディフィシルが消化管内で増殖している状態は、腸内フローラが攪乱されていることの指標にはなりうると思われる。

糞便中の毒素検出には、市販の酵素抗体法によるtoxin Aとtoxin Bを同時に検出するキットが、広く使われている。toxin A陽性株による感染か、toxin A陰性株による感染かの区別はできない。現在日本で使用認可されているキット、TOX A/B QUIK CHEK (日水製薬株式会社)では、糞便検体を採取したら、できれば2~8℃で保存し24時間以内に検査することが勧められているが、72時間までの冷蔵保存であれば結果に影響しないというデータが示されている。検体提出日当日に結果報告が得られるが、酵素抗体法による毒素検出検査の感度がやや低いため、特に、結果が陰性であった場合は分離培養検査の併用を考慮する必要がある。

クロストリジウム・ディフィシルの産生する毒素には、toxin Aおよびtoxin B以外に、binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase)がある。2000年ごろより北米およびヨーロッパのいくつかの国で流行しているBI/NAP1/027菌株がtoxin Aおよびtoxin Bに加えて、本毒素を産生することから注目されているが<sup>2),3)</sup>、その臨床的意義については明確ではない。加えて、以前より豚や

牛から分離されることが知られ、最近ではヒトの腸炎においても問題となっているPCR ribotype 078菌株もbinary toxinを産生する<sup>4)</sup>。現在のところ、本毒素を検出するキットはないが、PCR法等によるbinary toxin遺伝子の検出は、BI/NAP1/027菌株や、078株のような特定の高病原性株のモニタリングに有用である。

クロストリジウム・ディフィシル分離培養検査は、酵素抗体法による毒素検出と比較すると感度が良好で、さらに施設内感染が疑われた場合に、菌株の解析が可能となるため、毒素検出検査と併用して実施することが勧められる。特に、クロストリジウム・ディフィシル感染症例が多く認められる医療施設や病棟、さらに、抗菌薬を頻用する必要がある症例、重篤な基礎疾患を持つ症例、高齢者などのハイリスク症例が多い医療施設や病棟等では、毒素検出検査だけではなく、ルーチンに培養検査を行うことで、より適切な治療や感染予防を行うことが可能となる。日常診療では毒素検出検査による細菌学的検査を行うことで一定期間のモニタリングを行い、毒素検出陽性症例数の増加や、複数例の発症が続いたときに、培養検査併用を開始するという方法も一案である。個々の症例においては、まず、毒素検出検査を行い、陰性結果であった場合に、主治医と検査室

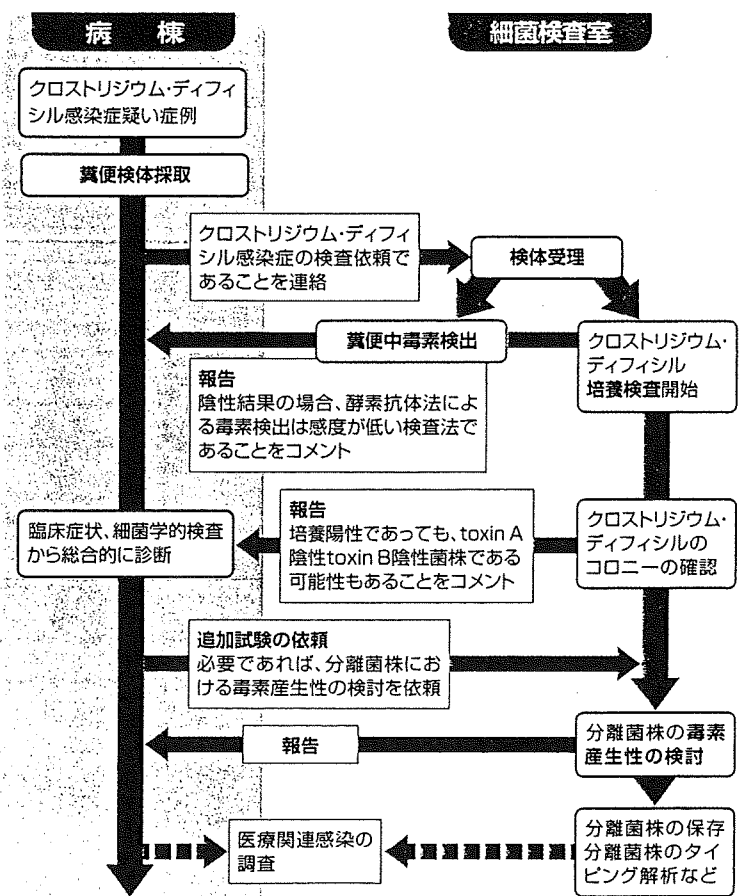


図1: クロストリジウム・ディフィシル感染症の細菌学的検査の流れ

で話し合った上で、保存しておいた糞便検体において培養検査を行うという方法もある。酵素抗体法による毒素検出は、培養検査と比較すると感度が低いので、スクリーニング検査にはならないことに留意すべきである。

クロストリジウム・ディフィシルの分離培養は、検体中の菌量が少なくなければ培養を開始して24時間～48時間後に選択培地上で典型的なコロニーが認められるので、臨床サイドに陽性結果の速報が可能である。症状が重篤でなければ、誘因となったと考えられる抗菌薬を中止して経過をみている間に結果が得られる。培養陰性であることの報告は4日以上培養が必要である。培養陽性であっても分離された菌がtoxin A陰性toxin B陰性である可能性があるため、検査室から臨床サイドに結果報告する際にコメントする必要がある。次のステップとして、検査室と主治医、病棟看護スタッフ、ICT等で話し合い、臨床経過、糞便中毒素検出結果、さらに培養検査結果からだけでは、総合的な診断が難しく、治療や予防対策の方針を決定できないと判断されれば、分離菌株における毒素産生性の検討を毒素検出キットを用いて行う。もちろん、経済的な問題や検査室でのマンパワーの問題が解決されれば、分離されたコロニーにおける毒素産生性の検討をルーチンに行うことは、より適切な診断につながる。

日本では、クロストリジウム・ディフィシル感染症の細菌学的検査における毒素検出検査法としてまだC.D.チェック・D-1(塩野義製薬株式会社)を使用している医療施設がある。本試験法は毒素ではなく、クロストリジウム・ディフィシルの産生するグルタメートデヒドロゲナーゼを検出する検査法であり、感度も特異度も低いので、本疾患の細菌学的診断検査として単独に使用するのは適切ではない。

### クロストリジウム・ディフィシル感染症の治療はどのように行うのか

クロストリジウム・ディフィシル感染症と診断される前に、抗菌薬関連下痢症・腸炎と診断された時点で、誘因となったと考えられる抗菌薬使用を中止、あるいは変更して臨床経過をみる。クロストリジウム・ディフィシル感染と診断されても、症状が重篤でない場合は、抗菌薬(バンコマイシンあるいはメロニダゾール内服)治療を行わずに回復する症例が少なくないため、まず誘因となった薬剤を中止して2～3日間経過をみるのが基本である(図2)。塩酸

ロペラミドのような消化管蠕動を抑制する薬剤の使用は、中毒性巨大結腸の誘因となるので禁忌である。

米国では、クロストリジウム・ディフィシル関連下痢症・腸炎の治療薬として米国Food and Drug Administration(FDA)に認可されているのは経口バンコマイシンだけであるが、バンコマイシンと比較して安価であること、バンコマイシンとほぼ同等の治療効果が報告されていることから、軽度および中等度の下痢症・腸炎の場合はメロニダゾールが頻繁に使用されている。日本においても、メロニダゾールは嫌気性菌感染症の治療薬としては認可されていないが、現在多くの医療施設でクロストリジウム・ディフィシル感染症例に処方されている。バンコマイシンのかわりにメロニダゾールを処方する理由のひとつに、バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)の消化管での増殖・定着の助長が挙げられることがあるが、腸内フローラを乱しVREの消化管内での増殖・定着を促進するのは、どちらの薬剤も同様であるとされる<sup>5)</sup>。

バンコマイシンあるいはメロニダゾール内服(7～10日間)を開始し、治療が奏効すれば通常内服を開始して1～2日で症状の改善傾向が認められる。メロニダゾールによる治療で症状が回復してこない、あるいは増悪するようであ

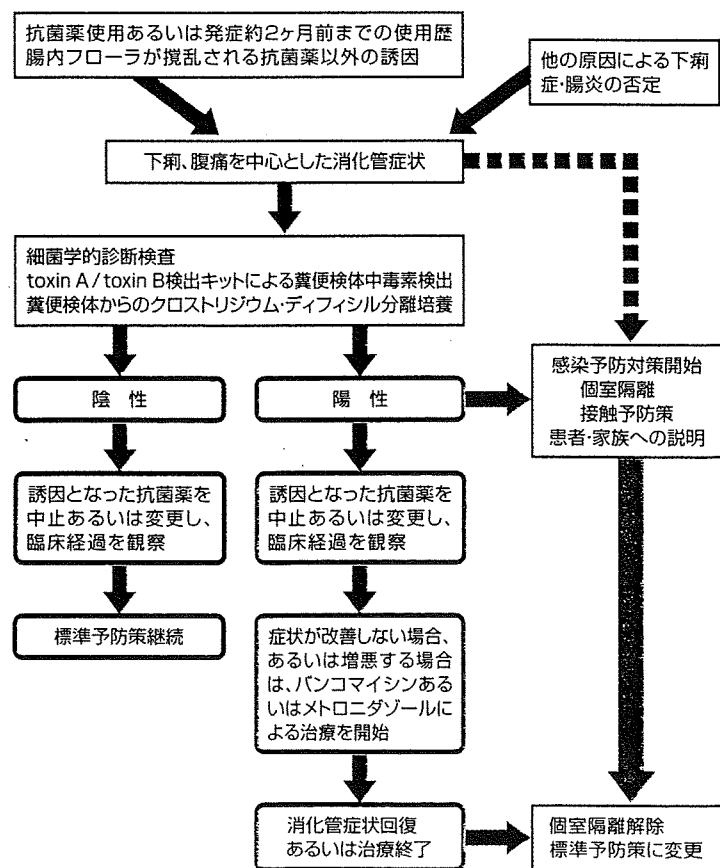


図2:クロストリジウム・ディフィシル感染症発症の経過と対応

ればバンコマイシン内服に切り替える。バンコマイシンあるいはメロニダゾール内服開始後は分離培養が難しくなること、症状回復後も毒素や菌の検出が続く症例が多いことから、治療中に細菌学的検査を行い、その結果を治療を終了するか続けるかの指標にするのは、意味がない。また、前述のように、バンコマイシンにしてもメロニダゾールにしても、この薬剤自体が腸内フローラにダメージを与えるので、長期間の内服は意味がないばかりか、再発を助長することにつながる<sup>6)</sup>。バンコマイシンは静注投与では消化管内で十分な薬剤濃度が得られないので、内服できない場合は、経鼻チューブや注腸、あるいは消化管に直接挿入したカテーテルによって、消化管内に薬剤を到達させる必要がある。

症状が重篤である場合には、細菌学的検査結果報告を待たずにバンコマイシンによる治療を開始する。イレウス、中毒性巨大結腸、消化管穿孔、昇圧剤に反応しない血圧低下、ショックなどの合併症を伴う劇症腸炎では、緊急手術が必要になる症例がある。クロストリジウム・ディフィシルによる劇症腸炎は稀ではあるが、欧米では前述の高病原性菌株の流行に伴い、症例数の増加が報告されており、緊急手術施行に関しては迅速な判断が必要である。

海外では、バンコマイシンやメロニダゾール以外の抗菌薬や、毒素吸着薬、さらに免疫学的な治療法について臨床試験がなされている。プロバイオティクスについては、多くの報告がなされているものの、クロストリジウム・ディフィシル感染症の治療や再発予防にルーチンに使用できることを示唆する十分なエビデンスはないと考えられている<sup>7)</sup>。

## クロストリジウム・ディフィシル感染症の感染予防対策はどのように行えばよいのか

クロストリジウム・ディフィシル感染症の予防対策としては、宿主側のリスクの軽減と、感染経路の遮断の2つに分けられる。多くの医療施設で行われている予防対策について表にまとめたが、医療施設によって、どのような基礎疾患を持った症例が入院しているのか、その疾患に対してどのような治療を行っているのか、さらに、利用できる施設設備や医療機器、マンパワーの問題など、状況が大きく異なるので一概に指針を設けるの

は難しい。基本的な考え方にそって、できるところから工夫していくことが重要なのではないかと考える。

宿主側のリスク軽減として最も効果的な予防対策は、医療施設全体での抗菌薬適正使用である。クリンダマイシン、第2世代以上のセファロスポリン、ペニシリン系抗菌薬に加え、最近ではフルオロキノロン使用とクロストリジウム・ディフィシル感染症発症の関連が指摘されている。腸内フローラの主構成をなす *Bacteroides* 属等の偏性嫌気性菌に有効な薬剤の使用は、クロストリジウム・ディフィシル感染症だけでなく、VREの消化管定着の誘因となる。クロストリジウム・ディフィシル感染症に罹患した症例では、腸内フローラが回復するのに2ヶ月程度かかるといわれているので、症状回復後2ヶ月間は抗菌薬の使用に注意しなければならない。一方、プロトン・ポンプ阻害剤およびヒスタミンH<sub>2</sub>受容体拮抗剤の使用がクロストリジウム・ディフィシル感染症発症と関連があるという報告がなされているが、関係がなかったという報告もあり、議論の残るところである。

クロストリジウム・ディフィシル感染症の予防対策における手指衛生の基本は、石けんと流水による手洗いである。

表：クロストリジウム・ディフィシル感染症における感染予防対策

1. 宿主側のリスクを軽減	
抗菌薬適正使用	広域スペクトラム抗菌薬使用、抗嫌気性菌作用のある抗菌薬の使用を避ける クロストリジウム・ディフィシル感染症に罹患した症例は再発しやすいため、回復後2ヶ月間は抗菌薬使用に注意する
その他のリスクの見直し	制酸剤、消化管蠕動を抑制する薬剤、経管栄養などがクロストリジウム・ディフィシル消化管定着および感染症発症のリスクファクターとして報告されている
2. 感染経路を遮断	
手指衛生	石けんと流水によって手洗いを行う(アルコールは芽胞に無効なので、速乾性擦り込み式アルコール製剤による手指消毒だけでは不十分であることに注意) 患者本人および家族にも石けんと流水による手洗いを実行してもらうよう説明する
個室隔離 あるいは コーホーティング	特にトイレは個別使用が望ましい 個室隔離解除： ■ 下痢症状回復時 ■ 下痢症状回復2~3日後 ■ バンコマイシン(あるいはメロニダゾール)内服終了時 ■ バンコマイシン(あるいはメロニダゾール)内服終了2~3日後などを基準にする
接触予防策	排泄物(特に糞便)を扱うケアの見直しと確認、さらにスタッフ全員への徹底 ■ 排泄ケアを2名のスタッフで行うなどのケア・ステップの工夫 ■ 処置ごとに、使い捨て手袋および使い捨てエプロンの着脱を徹底 ■ 使用後の便器の処理 ● ベッドバンウォッシャー使用による洗浄 ● ベッドバンウォッシャーが利用できない場合、0.1%(1,000 ppm)次亜塩素酸ナトリウムに30分浸漬 ● 水様便の場合は、ポータブル便器に使い捨ての排便処理袋を装着 ■ 使用後の陰部洗浄ボトルの処理 ● ベッドバンウォッシャー使用による洗浄 ● ベッドバンウォッシャーが利用できない場合、0.1%(1,000 ppm)次亜塩素酸ナトリウムに30分浸漬 ● 感染症例での専用ボトルの使用も一案 ■ 使用後のオムツは、病室の床に置かず、直ちに排便処理袋などに密封して廃棄
環境の清拭	病室やトイレは、糞便で汚染されやすいところ、頻りに接触するところを中心に清拭する ■ ベッド欄やコールボタン、枕灯のスイッチ等よく触れるところは、1日1回以上消毒薬を用いて清拭 ■ 病室やトイレ(特に共同トイレを使用する場合)の掃除を清掃業者に委託する場合は、業者と清掃方法について、よく話し合う
消毒薬の適正使用	消毒薬は、現在のところ、次亜塩素酸ナトリウム0.1%(1,000 ppm)~0.5%(5,000 ppm)の使用が勧められている ■ 各医療施設で供給されている次亜塩素酸ナトリウム溶液の濃度を確認し、使用時に適切に希釈し使用する ■ 希釈早見表を作成し、汚物室などに掲示する

クロストリジウム・ディフィシルは芽胞のかたちではアルコールが無効なので、速乾性擦り込み式アルコール製剤は流水で手洗いをを行った後で使用する。患者本人や患者の家族にも、排便後や介護時の手洗いを実行してもらうよう説明する必要がある。

クロストリジウム・ディフィシル感染症を疑われた症例は、可能であれば個室で隔離あるいはコーホーティングを行う。トイレは個別使用が望ましい。個室隔離は、下痢症状がなくなった時点で解除するのが基本とされるが、下痢症状回復後2～3日経過をみて解除することもよく行われる。また、バンコマイシン(あるいはメロニダゾール)による治療が必要であった症例では、治療終了時あるいは治療終了2～3日後に解除するという基準を設けている施設もある。下痢症・腸炎回復後もしばらくクロストリジウム・ディフィシル陽性であることが少なくないため、アウトブレイク時には症状回復後も退院時まで隔離を続けたという報告もある。

クロストリジウム・ディフィシルは、糞便で汚染された(医療スタッフの手指を含む)環境を介して伝播していくので、特に排泄ケアには十分な注意が必要である。使い捨て手袋および使い捨てエプロンの着脱や使用後の便器や陰部洗浄ボトルの処理など、基本的なステップが適切に行われているか、医療スタッフ全員で確認することが第一に重要である。症状が回復した後も、クロストリジウム・ディフィシルを消化管保有していることが少なくないという理由から、個室隔離および接触予防策を退院時まで続けた方がよいのではないかという意見もある。一方、発症せずに無症候に消化管保有している症例は、検査も治療も必要ないが、回復後の症例と同様に感染源になりうるのではないのかという問題が残る。下痢症状がなければ病室環境は汚染されにくいと考えられているが、無症候キャリアの皮膚や病室環境も汚染されるという報告もある<sup>8)</sup>。特にハイリスク症例が多く入院している病棟では、クロストリジウム・ディフィシル感染症回復後の症例も含めて、全症例で標準予防策をしっかり行うことが必要である。

クロストリジウム・ディフィシル感染症例の病室やトイレにおいて、糞便で汚染されやすいところ、頻繁に患者や医療スタッフが接触するところを中心に、清拭を行う。ベッド柵、コールボタン、枕灯のスイッチ等のよく触るところは、1日1回以上消毒薬を用いて清拭する。病室やトイレの清掃を外部業者に委託している場合は、業者スタッフと、どこを、どのような方法で、どのような頻度で清掃を行うか、十分に打ち合わせる必要がある。消毒薬は、現在のところ、次亜塩素酸ナトリウムが使用される。クロストリジウム・ディフィシルの芽胞

を不活化するには、0.5%(5,000ppm)の次亜塩素酸ナトリウムを用いると10分以内であるが、0.1%(1,000ppm)の次亜塩素酸ナトリウムでは30分の浸漬が必要であると報告されている<sup>9)</sup>。供給されている次亜塩素酸ナトリウム溶液の濃度を確認して、使用目的にあった濃度に使用時に調製することが必要である。

## さいごに

最近の疫学的変化に関する報告によって、クロストリジウム・ディフィシル感染症が注目されているが、本感染症はそもそも稀な感染症ではない。検査が行われなければ、診断されないの、見過ごされてきた症例は多いと思われる。感染症例が見過ごされれば、医療関連感染事例も見過ごされる。いちど、多数の症例にひろがると、非常に感染管理が難しいことでも知られる。一方で、本感染症は宿主、側因子の影響を強く受けることから、抗菌薬を使用している症例・入居者が少ない施設では、標準予防策がしっかりなされていれば、無症候キャリアについては大きな問題にはならないと考えられる。本感染症に関する基本的な理解をした上で、医療施設ごとに柔軟性のある感染対策を講じることが必要なのではないかと思われる。

### 【謝辞】

矢野久子、福留元美、村端真由美、中村教、加藤秀章、岩島康仁(名古屋市立大学)の諸氏より貴重なご意見をいただきましたことに、深謝いたします。

### 【文献】

1. Beaugerie, L, and JC Petit. Microbial-gut interactions in health and disease. Antibiotic-associated diarrhoea. Best Pract Res Clin Gastroenterol 18 : 337-352 2004.
2. McDonald, LC, GE Killgore, A Thompson, et al. An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. N Engl J Med 353 : 2433-2441 2005.
3. Warny, M, J Pepin, A Fang, et al. Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. Lancet 366 : 1079-1084. 2005.
4. Goorhuis, A, D Bakker, J Corver, et al. Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078. Clin Infect Dis 47 : 1162-1170 2008.
5. Al-Nassir, WN, AK Sethi, Y Li, et al. Both oral metronidazole and oral vancomycin promote persistent overgrowth of vancomycin-resistant enterococci during treatment of *Clostridium difficile*-associated disease. Antimicrob Agents Chemother 52 : 2403-2406 2008.
6. Gerding, DN, CA Muto, and RC Owens, Jr. Treatment of *Clostridium difficile* infection. Clin Infect Dis 46 Suppl 1 : S32-42 2008.
7. Dendukuri, N, V Costa, M McGregor, et al. Probiotic therapy for the prevention and treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea: a systematic review. CMAJ 173 : 167-170 2005.
8. Riggs, MM, AK Sethi, TF Zabarsky, et al. Asymptomatic carriers are a potential source for transmission of epidemic and nonepidemic *Clostridium difficile* strains among long-term care facility residents. Clin Infect Dis 45 : 992-998 2007.
9. Perez, J, VS Springthorpe, and SA Sattar. Activity of selected oxidizing microbicides against the spores of *Clostridium difficile*: relevance to environmental control. Am J Infect Control 33 : 320-325 2005.





## Epstein-Barr-Virus-Infected CD15 (Lewis X)-Positive Hodgkin-Lymphoma-Like B Cells in Patients with Rheumatoid Arthritis

Hirotake Inomata<sup>§,1</sup>, Masami Takei<sup>\*§,1</sup>, Hiroyuki Nakamura<sup>2</sup>, Shigeyoshi Fujiwara<sup>2</sup>, Hidetaka Shiraiwa<sup>1</sup>, Noboru Kitamura<sup>1</sup>, Shunsei Hirohata<sup>3</sup>, Hiroyuki Masuda<sup>1,4</sup>, Jin Takeuchi<sup>1</sup> and Shigemasa Sawada<sup>\*,1</sup>

<sup>1</sup>Division of Hematology and Rheumatology, Department of Medicine, Nihon University School of Medicine, Tokyo, Japan

<sup>2</sup>Department of Infectious Diseases, National Research Institute for Child Health and Development, Tokyo, Japan

<sup>3</sup>Department of Rheumatology and Infectious Diseases, Kitasato University School of Medicine, Kanagawa, Japan

<sup>4</sup>Intellim Corporation, Tokyo, Japan

**Abstract:** Patients with rheumatoid arthritis (RA), especially those who are treated with methotrexate (MTX), might have an increased risk of Hodgkin lymphoma (HL), a malignancy that is associated with Epstein-Barr virus (EBV). Here we describe a monoclonal EBV-infected B-lymphoblastoid cell line (LCL) called TKS-1 that was established from cells that spontaneously converted from an MTX-treated RA patient. TKS-1 has properties similar to HL cells and it is distinctly different from control LCLs established from normal individuals. TKS-1 cells express the HL-associated surface markers CD15 and CD30 (Takei *et al.* 1989). Like Hodgkin Reed-Sternberg (H-RS) cells of EBV-positive HL, TKS-1 cells express EBNA1 mRNA transcribed from the Qp promoter of the virus, whereas control LCLs use the Cp or Wp promoter to transcribe mRNA. TKS-1 cells can proliferate in an anchorage-independent manner and possess a cloning efficiency comparable to that of the Burkitt lymphoma (BL) line Raji. In addition, two EBV-positive LCLs established by cocultivated CD34+ cells isolated from the bone marrow of patients with RA and peripheral blood B lymphocytes from a healthy EBV-seronegative individual also expressed CD15. These results indicate that EBV-infected B-lymphoblastoid cells from patients with RA tend to acquire properties similar to HL cells.

### INTRODUCTION

The relationship between rheumatoid arthritis (RA) and Epstein-Barr virus (EBV)-associated lymphoproliferative disorders including Hodgkin lymphoma (HL) is inconclusive and controversial. We previously established a monoclonal EBV-infected B-lymphoblastoid cell line (LCL) called TKS-1 [1]. The disease-modifying anti-rheumatic drug (DMARD) methotrexate (MTX) sometimes causes malignancies of this type [2] and in some patients these EBV-associated lymphomas completely regress when MTX therapy is reduced or discontinued [3]. Mariette *et al.* have performed a nationwide prospective study that suggests an increased risk for HL [4], but not for non-Hodgkin lymphoma (NHL) in patients with RA who are treated with MTX. However, Baecklund *et al.* demonstrated on 378 consecutive Swedish patients with RA that the most common DMARDs including MTX are not in themselves a risk factor for RA-associated lymphomas, nor does treatment further increase the risk associated with high inflammatory activity [5]. Although most "excess" lymphomas in RA are of the aggressive diffuse large B cell lymphoma type, the presence of EBV in RA-associated lymphomas is low.

The CD15 antigen is a marker of granulocytes, macrophages and activated T cells and 37-100% of Hodgkin-Reed Sternberg (H-RS) cells and the malignant cells of HL are positive for this antigen [6]. The CD15 antigen binds to the adhesion molecule, P-selectin [7] and the anti-CD15 antibody recognizes the sugar moiety lacto-N-fucopentaose-III (LNF-III) [8, 9] or Lewis X antigen. P-selectin is an external membrane protein on activated platelets that has also been referred to as platelet activation-dependent granule-external membrane protein (PADGEM), granule membrane protein 140 (GMP-140) or CD62 [10, 11].

An association between RA and EBV is also recognized [12-14]. Direct evidence includes a demonstration of EBV-encoded small nuclear RNA (EBER-1) and latent membrane protein (LMP)-1 in the synovial cells of RA [15]. Other studies subsequently confirmed this finding [16-20] except for one that did not find evidence of EBV infection in a synovial lesion of RA [14]. Another notable finding associating EBV with RA is that the expression of signalling lymphocytic-activation molecule associated protein (SAP) transcripts is decreased in T cells from RA patients [21]. This protein plays an essential role in cytotoxic T and NK cells that are involved in the immune response to EBV.

To gain insight into the relationships between each of EBV and RA with HL, we characterized the surface phenotypes, EBV gene expression, and malignant potential of EBV-infected lymphoblastoid cell line (LCL) (TKS-1) established from a patient with RA and found that these cells tended to acquire properties similar to those of HL cells.

\*Address correspondence to these authors at the Division of Hematology and Rheumatology, Department of Medicine, Nihon University School of Medicine, 30-1 Oyaguchi Itabashi-ku, Tokyo, Japan; Tel: +81-3-3972-8111; Fax: +81-3-3972-2893; E-mails: numtakei@med.nihon-u.ac.jp, sswd98@med.nihon-u.ac.jp

<sup>§</sup>These authors contributed equally to this work

## MATERIALS AND METHODS

### Cells

Peripheral blood mononuclear cells from a patient with RA were stimulated with phorbol myristate acetate (PMA) to establish the EBV<sup>+</sup> B lymphoblastoid cell line TKS [1]. Two subclones (type 1 & 2) of TKS were isolated by repeated limiting dilution in 96-well micro-culture plates. The phenotypes of these clones were CD15<sup>+</sup> CD30<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup> CD20<sup>+</sup> (type 1) and CD15<sup>+</sup> CD30<sup>+</sup> CD19<sup>-</sup> CD20<sup>+</sup> (type 2) (Fig. 1). The type 1 subclone of TKS cells (TKS-1) reacted with the following antibodies against surface antigens: Ig light chain kappa, HLA-DR, Leu 10, Leu 12 (CD19), Leu 16 (CD20), Leu M1 (CD15), and Ki-1 (CD30). These cells did not react against the antibodies OKM1 (CD11b), Leu M2, Leu M3 (CD14), Leu M4, or to T cell surface or natural killer cell antigens. TKS-1 cells were peroxidase-negative, slightly positive for non-specific esterase that was not inhibited by NaF, had monoclonal immunoglobulin light chain gene rearrangement and expressed EBNA-1 mRNA [1]. The RABM/EBV<sup>+</sup> 1-3 cell lines are EBV<sup>+</sup> LCLs that were established by co-cultivating bone marrow CD34<sup>+</sup> cells obtained from RA patients with peripheral B cells isolated from an EBV-seronegative healthy individual [22]. Akata and Raji are EBV<sup>+</sup> Burkitt lymphoma (BL) cell lines, BJAB is an EBV-negative B lymphoma line [23]. GL-1 and CBL2 are EBV<sup>+</sup> LCL established by infecting peripheral B cells from a healthy donor with EBV, and DI-1 and DI-5 are LCLs that were spontaneously established from an EBV seropositive donor. Table 1 summarizes the cell lines used in this study. All cell lines were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) and antibiotics.

**Table 1. Cell Lines Used in this Study and Positive Ratio of CD15/CD19**

Cell Line	Origin of Cell Lines	CD15/CD19
TKS	Mononuclear cells from peripheral blood of RA patient were cultured with PMA for 4 weeks and then clusters formed	+
TKS-1	TKS as described above, subclone. Two limiting dilutions performed	+++ (98%)
RABM/EBV+1 2 3	EBV positive B cell lines obtained by co-cultured RA bone marrow CD34 <sup>+</sup> cells and normal EBV negative peripheral B cells	- +++ (83) +++ (86)
B95-8 LCL	Normal B cell line transformed with B95-8 supernatant. Normal donor is same as RABM/EBV1-3 described above.	±
Akata, BJAB, Raji	Burkitt lymphoma cell lines GL-1 and CBL2 are EBV <sup>+</sup> LCL	-
GL-1 and CBL2, DI-1, DI-5	Established by infecting peripheral B cells from healthy donor with EBV. DI-1 and DI-5 are LCLs spontaneously established from EBV-seropositive donor	-

### Monoclonal Antibodies (mAbs) and Flow Cytometry

The mAbs Leu M1, Leu 12 and Leu 16 were purchased from Becton Dickinson (Sunnyvale, CA, USA), and the mAb Ki-1 was obtained from Dakopatts (Glostrup, Denmark).

Fluorescein isothiocyanate (FITC)- or phycoerythrin (PE)-conjugated mouse IgG used as a control and PE-conjugated anti-mouse IgG as the second antibody were purchased from Dakopatts. The reactivity of cell lines with these antibodies was analyzed using flow cytometers (Cyto ACE-150, Nippon Bunko, Tokyo and FACSCalibur, Becton Dickinson).

### Stimulation with PMA

TKS-1 and Raji cells (both 5 x 10<sup>5</sup>/ml) were resuspended in fresh culture medium containing 10 ng/ml of PMA. Two-thirds of the medium was replaced every 2 days with fresh medium containing PMA for 7 days. Control cells were cultured in solvent medium. The expression of CD15, CD30, CD19, and CD20 was examined by staining the cells at 0, 3, 5 and 7 days after starting the experiment. TKS-1 and Raji cell viability exceeded 80% throughout the experiments, which were performed in three flow cytometry studies.

### Western Blotting

Cells were lysed in SDS sample buffer, fractionated by SDS-PAGE and then transferred to nitrocellulose membranes. Non-specific binding was blocked with 5% non-fat milk and the membranes were incubated with appropriately diluted antibodies. The EBNA-1 and EBNA-2 proteins and LMP-1 were detected using serum from an individual who was EBV-seropositive, and the PE2 (DAKO, Denmark) and S12 mAbs, respectively. The membranes were then incubated with horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse antibody and proteins were visualized using an enhanced chemiluminescence assay (GE Healthcare).

### Analysis of Promoter Usage for EBNA-1 in CD15<sup>+</sup> B Cells

First-strand cDNA was synthesized from total RNA (5 µg) extracted from each cell line using TRIzol (Invitrogen), oligo (dT) primers and the SuperScript III first strand synthesis system (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. We performed RT-PCR using the Cp-mRNA-specific primers, 5'-CATCTAAACCGACTGAAGAA-3' (sense) and 5'-CCC TGAAGGTGAACCGCTTA-3' (antisense); Wp-mRNA-specific primers, 5'-GTCCACACAAATCCTAG-3' (sense) and 5'-CCCTGAAGGTGAACCGCTTA-3' (antisense); Cp/Wp-EBNA1-specific primers, 5'-TGGCGTGTGACGTG GTGTAA-3' (sense) and 5'-CATTTCCAGGTCTGTACC T-3' (antisense); Qp-EBNA1-specific primers, 5'-GTGCGC TACCGGATGGCG-3' (sense) and 5'-CATTTCCAGGTC CTGTACCT-3' (antisense); or the 18S ribosomal RNA-specific primers 5'-TACATGCCGACGGGCGCTGACC-3' (sense) and 5'-CCTGCTGCCTTCCCTTGGATG-3' (antisense). Transcripts were amplified using a GeneAmp PCR System 9700 thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA) and Paq5000 DNA polymerase (Stratagene, La Jolla, CA, USA) in a total volume of 50 µl for 30-35 cycles, and the PCR products were analyzed by 2% agarose gel electrophoresis.

### Agarose Clonability Assays

Cells (100 or 500) suspended in the top layer of 0.33% agar in RPMI 1640 containing 10% FBS were poured onto a basal layer of 0.5% agar in RPMI 1640 containing 10% FBS in 35-mm plates, and incubated at 37°C for 26 days. Colonies were counted under a microscope.

### Cluster of differentiation positivity of subclones from TKS cells

	CD15	CD30	CD19
Type 1	89.2(%) (113)	91.8 (82)	97.7 (109)
Type 2	98.5 (221)	95.2 (161)	4 (N/A)

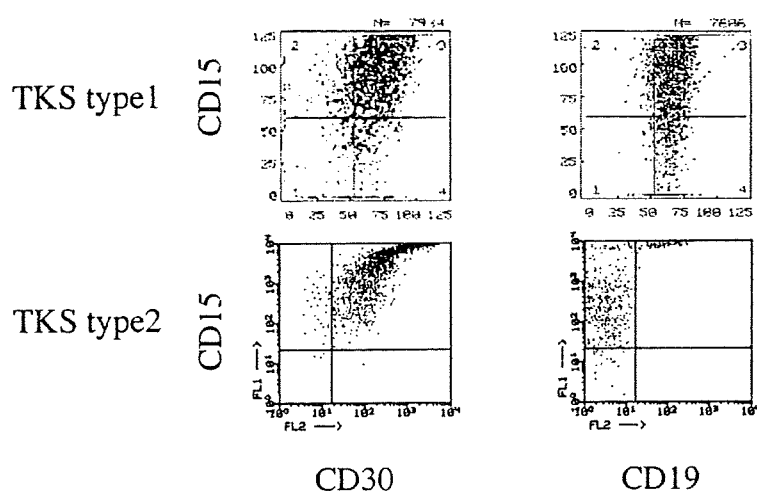


Fig. (1). Cluster of differentiation positivity of subclones from TKS cells. Two TKS subclones (type 1&2) were isolated by repeated limiting dilution in 96-well micro-culture plates. The phenotypes of these clones were CD15<sup>+</sup> CD30<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup> CD20<sup>+</sup> (type 1) and CD15<sup>+</sup> CD30<sup>+</sup> CD19<sup>-</sup> CD20<sup>+</sup> (type 2). Type 1 TKS subclone (TKS-1) reacted with following antibodies against surface antigens: Ig light chain kappa, HLA-DR, Leu 10, Leu 12 (CD19), Leu 16 (CD20), Leu M1 (CD15), and Ki-1 (CD30). These cells were unreactive to antibodies OKM1 (CD11b), Leu M2, Leu M3 (CD14), Leu M4, or to T cell surface or natural killer cell antigens. Numbers in parentheses are MFI values. Dot plots show representative flow cytometry data.

## RESULTS

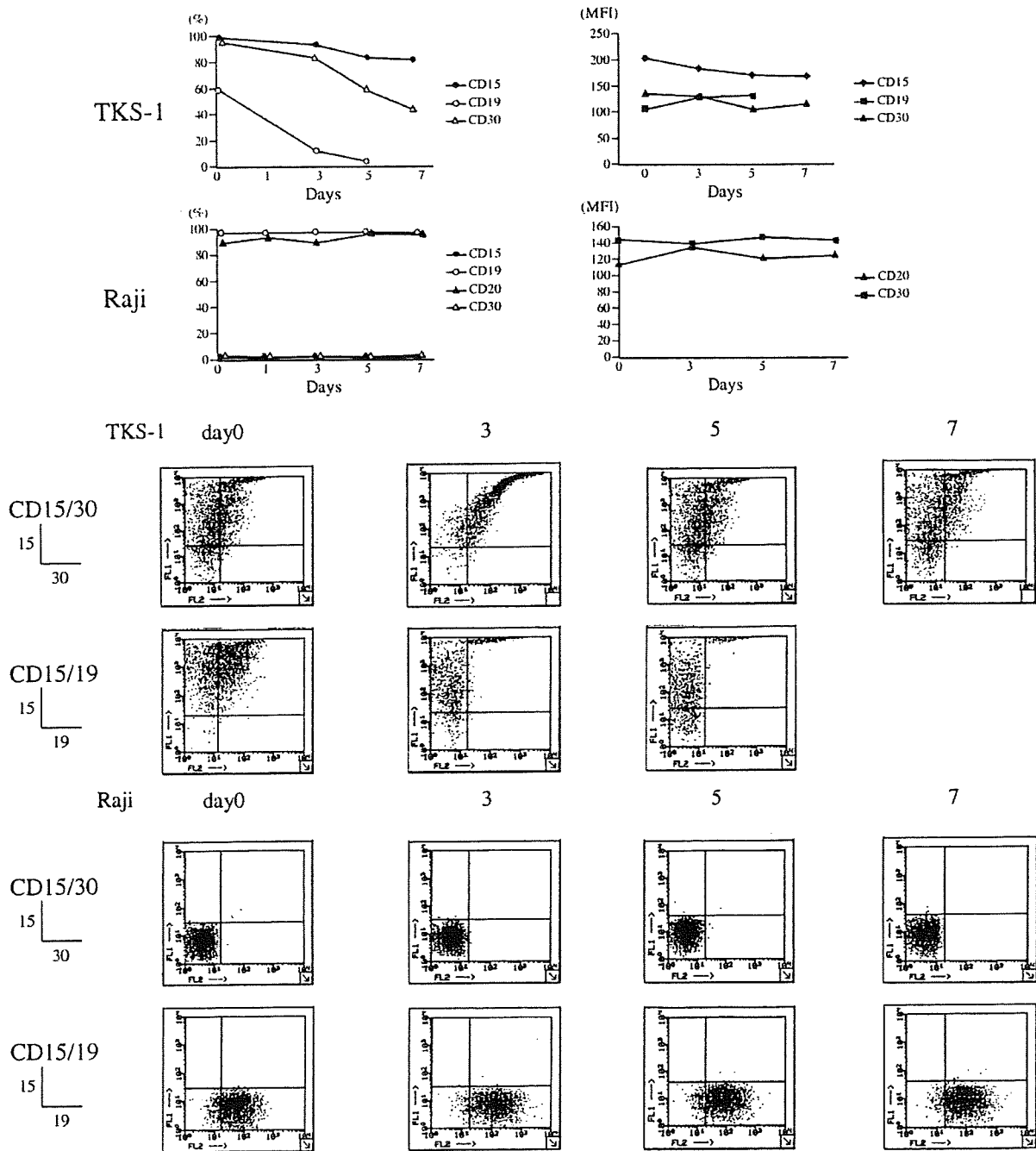
### Effects of PMA Stimulation on CD15<sup>+</sup> B Cells

We previously showed that TKS-1 cells express the two HL markers CD15 and CD30 [1]. Since a study has described a change in the expression of these HL markers in H-RS cells after stimulation with the tumour promoter phorbol-12- myristate-13-acetate (PMA) [24], we examined their expression in PMA-stimulated TKS-1 cells. Fig. (2) shows the changes in the ratios (%) of TKS-1 or Raji cells that expressed CD15, CD30, CD19 or CD20 during PMA stimulation. Most TKS-1 cells remained CD15<sup>+</sup> for 7 days after PMA stimulation. CD30 expression gradually declined, and less than 50% of the cells were positive by day 7. CD19-positive cells decreased rather quickly and only a few cells were positive by day 5. In contrast, the expression of CD19, CD20, CD15, and CD30 in Raji cells did not significantly change, and most cells remained for CD19 and CD20 positive, and CD15 and CD30 negative. After more prolonged exposure to PMA, TKS-1 cells lost CD19 and

CD20 expression, but continued to express both CD15 and CD30 (data not shown). Figs. (1, 2) shows representative dot plots of the flow cytometry data and mean fluorescence intensity (MFI) values.

### Analysis of EBV Gene Expression in TKS-1 Cells

Three types of latent EBV infection with distinct profiles of viral gene expression are recognized in various EBV-related tumours and cell lines. The type I latency found in BL and gastric carcinoma cells is characterized by the expression of EBV nuclear antigen 1 (EBNA1) as the sole EBV protein. Type II latency represented by HLs, T-cell lymphomas and nasopharyngeal carcinomas is characterized by the expression of EBNA1, latent membrane protein 1 (LMP1) and LMP2. The type III latency that occurs in LCLs established *in vitro* by EBV infection and lymphoproliferative disorder in immunocompromised hosts, is characterized by the expression of EBNA 1, 2, 3A, 3B and 3C, as well as LMPs 1, 2A and 2B, all of which are growth transformation-associated viral proteins. Messenger RNAs coding for



**Fig. (2).** Effects of PMA on surface makers of TKS-1 and Raji cells. TKS-1 and Raji cells ( $5 \times 10^5$  cells/ml each) were resuspended in fresh medium containing either 10 ng/ml PMA or solvent. Two-thirds of the medium was replaced with fresh medium every 2 days. Expression of CD15, CD30, CD19, and CD20 was examined by flow cytometry at 0, 1, 3, 5, 7 days after starting the experiment. Data are representative of three repeated experiments. Dot plots show representative flow cytometry data.

EBNA1 as well as other EBNA's are transcribed from either of the Cp or Wp promoters of the virus in type III latency, whereas EBNA1 mRNA is transcribed from the Qp promoter in types I and II latency [25].

We examined EBV gene expression to determine the type of EBV latency in TKS-1 cells. Fig. (3) shows that TKS-1 and its subclones expressed EBNA1 and LMP1 at similar levels to those in EBV-positive LCLs established