

***Clostridium difficile* 感染症の信頼性の高い細菌学的検査システムの確立と
アジアにおける *C. difficile* 感染実態調査**

Establishment of a reliable system for laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection and molecular epidemiology of *C. difficile* infection in Asia

研究分担者 加藤はる (国立感染症研究所 細菌第二部)
Haru Kato (Department of Bacteriology II, National Institute of Infectious Diseases)

【研究要旨】ベトナム National Institute of Hygiene and Epidemiology (NIHE)において *Clostridium difficile* 分離培養を開始し、現在までまったく情報のなかったベトナムの医療機関における *C. difficile* 感染症についての検討が開始された。ハノイ市内の4医療機関とNIHEが協力し、ネットワーク構築を行っているが、臨床現場の実態の把握がさらに必要であることが明らかとなった。また、現在使用されている *C. difficile* 検査法よりも臨床病態を反映できる新しい細菌学的検査法として、RT-PCR法を用いた *C. difficile* 毒素遺伝子検出法の開発を行った。

【Summary】 Laboratory techniques for diagnosis of *Clostridium difficile* infection including *C. difficile* culture were introduced to National Institute of Hygiene and Epidemiology (NIHE), Viet Nam, where there has been no data about *C. difficile* infection available. A network of NIHE and 4 healthcare facilities in Hanoi has been constructed. More discussion and communication with clinical side should be required to know current status of healthcare-associated infection in Hanoi. As a more reliable laboratory test, a novel method detecting vegetative cells of *C. difficile* from fecal specimens by amplifying the repeating sequences of toxin A gene by reverse transcription PCR (RT-PCR) was established.

研究協力者

妹尾充敏	国立感染症研究所
Mitsutoshi Senoh	細菌第二部, Department of
柴山恵吾	Bacteriology II, National
Keigo Shibayama	Institute of Infectious
	Diseases
Vu Thi Thu Huong	Department of Bacteriology
Tăng Thị Nga	National Institute of Hygiene
Lê Thị Trang	and Epidemiology
Tham Chi Dung	(NIHE), Hanoi, VietNam

における疫学情報は乏しい。本研究は、ベトナム、ハノイ市の協力医療機関入院症例から分離された *C. difficile* 菌株の解析に加え、ハノイ市の協力医療機関における臨床背景も含めて調査し、感染実態を調査する足がかりとする。

さらに、*C. difficile* は、無症候キャリアが多く、診断が難しい場合は少なくない。本研究では、遺伝子学的手法を用いた、より臨床病態を反映できる、新しい細菌学的検査法を開発評価することを目的のひとつとする。

A. 研究目的

Clostridium difficile は抗菌薬関連下痢症・腸炎の主要な原因菌である。ベトナムでは、医師処方箋なしで抗菌薬の購入が可能であり、抗菌薬の使用の乱用が懸念されるにもかかわらず、*C. difficile* 感染症(CDI)の臨床検査はまったく行われていないため、CDIの実態についてはまったく情報がない。本研究の第一の目的は、ベトナムNIHEにおいて、CDIの細菌学的検査システムを確立することである。

C. difficile 感染症は、欧米では1980年代より医療関連感染として問題となっているが、特に2000年になってからの症例数の急激な増加に伴い、現在、いっそう注目されている。世界各地で高病原性株 BI/NAP1/027 の分布や伝播を含めて、疫学的検討が進んでいるが、ベトナムをはじめアジアに

B. 研究方法

- NIHE 研究室における *C. difficile* 細菌学的検査システムの構築
 - 2012年7月29日から8月5日まで、国立感染症研究所で、NIHEのVu Thi Thu HuongにCDIの細菌学的検査の技術講習を行った。
 - ハノイ市の4病院、National Hospital of Infectious Diseases、Dong Da Hospital、National Hospital of Geriatrics、およびBac Mai Hospitalからの糞便検体収集と *C. difficile* 分離培養がNIHEで開始された。
 - 2013年1月16日から1月21日まで、研究分担者がNIHEを訪問し、臨床検体の収集や分離培養に関して現場で打ち合わせを行った。
 - 1月17日に、ハノイ市内の協力医療機関の

うち、National Hospital of Infectious Diseases および Dong Da Hospital を訪問した。

2. 新しい細菌学的検査法の開発

- (a) RT-PCR の条件検討を行うため、純培養した *C. difficile* から RNA を抽出した後、DNase 処理したものを Template RNA として用いた。PCR 条件は、95 20 秒, 55 2 分を 35 サイクル繰り返した。PCR primer は J Clin Micro, 1991, 29, 33-7 の NK3, NK2 を使用した。
- (b) 便検体中の *C. difficile* 毒素遺伝子を検出できるか否か検討するため、純培養した *C. difficile* を *C. difficile* 陰性便検体に接種し、栄養型 *C. difficile* を含む便検体を調製した。さらに、純培養した *C. difficile* をアルコール処理、またはオートクレーブ処理し、芽胞状態の *C. difficile*、または死菌の *C. difficile* を調製した後、それぞれ *C. difficile* 陰性便検体に接種し、芽胞 *C. difficile* を含む便検体、死菌 *C. difficile* を含む便検体を調製した。便検体からの RNA 抽出の条件検討を行った後、各便検体から RNA を抽出し、(a) で得られた結果を元に RT-PCR を行った。
- (c) 臨床便検体についても本検査法が有用か否か検討するため、臨床便検体から RNA を抽出し、RT-PCR を行った。便検体からの RNA 抽出は (b) で得られた結果を元に、RT-PCR の条件は (a) で得られた結果を元に行った。また、従来の検査法である培養法、酵素免疫測定法、PCR 法の結果と比較した。

倫理面への配慮

「*Clostridium difficile* 医療関連感染に関する研究」は国立感染症研究所ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会において承認された（受付 114）。

C. 結果

1. NIHE 研究室における *C. difficile* 細菌学的検査システムの構築

- (a) Vu Thi Thu Huong が、嫌気培養法の基本的手技、糞便検体からの *C. difficile* の分離培養、同定、菌株保存、さらに、PCR による毒素遺伝子検出などの基本的技術を習得した。
- (b) ハノイ市内の医療機関入院症例から採取した糞便検体から、*C. difficile* の分離がなされ、最初の 2 例は症例報告がなされた。
- (c) NIHE 研究室での分離培養ステップを確認した。グラム染色のステップや *C. difficile* の同定方法を見直すことを指摘した。実験の前後に手指衛生を行ってはいたが、流水による手洗い後に、少なくとも数日間洗濯されていないタオルを複数実験室使用者で共有していたので、注意を促した。また、

検体採取に使用している輸送容器が小さく検体を入れにくいものである点、協力研究者（医師）に記入してもらった質問様式が多項目にわたり複雑であるにもかかわらず、重要な質問項目が抜けている点、CDI 症例の詳細な臨床情報を得るために、カルテをそのままコピーし個人情報の管理に注意していない点などを指摘した。

- (d) National Hospital of Infectious Diseases および Dong Da Hospital で、CDI について一般的な事項および日本の現状について説明を行った。National Hospital of Infectious Diseases では、臨床検査室および ICU を見学した。臨床検査室では、嫌気チャンバーがあったが、まったく使用されていなかった。ICU の廊下はガラスなしの窓でそのまま外に連絡しており、汚物処理室自体が存在しなかった。使用後の医療機器は ICU 病室のなかのシンクで洗浄していた。手指衛生用のシンクはみあたらなかったため、医療スタッフはほとんど手洗いをしていないと推察された。Dong Da Hospital では、CDI について質問が多く出て、関心の高さが感じられた。一方、医療機関での話し合いではまったく話題に出なかったが、ハノイ市内の医療機関では、ICU 以外では「1 ベッドを数名（夏季は 4-5 名）の患者が同時に使用することが一般的である」ということが、NIHE 関係者と討議を重ねる上でわかってきた。

2. 遺伝子学的検査法の開発

- (a) *C. difficile* 毒素遺伝子検出のための RT-PCR の条件検討を行ったところ、逆転写反応は 30 で 10 分間反応させた後、42 で 20 分間反応させることにより、良好な結果が得られることが分かった。また、一反応系に必要な RNA 量は > 200 fg であった (Fig. 1)。

(b)

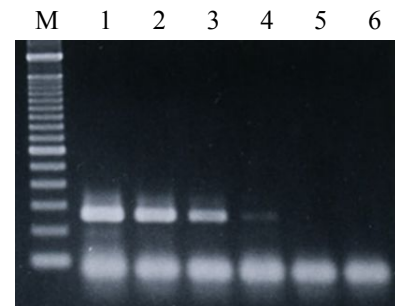


Fig. 1. 異なる量の RNA を添加して行った RT-PCR. M: 100 bp DNA marker; 1: 200 pg; 2: 20 pg; 3: 2 pg; 4: 200 fg; 5: 20 fg; 6: 2 fg

- (c) 便検体から直接 RNA を抽出し、RT-PCR が行えるか否か検討するため、カラム式

の RNA 抽出法とフェノール・クロロホルムによる RNA 抽出法を行い、RNA の純度や収量を比較した。その結果、フェノール・クロロホルムによる抽出法の方が高純度で収量も多かった。栄養型 *C. difficile* を含む便検体、芽胞 *C. difficile* を含む便検体、死菌 *C. difficile* を含む便検体からそれぞれ RNA を抽出し、RT-PCR を行ったところ、本法では栄養型 *C. difficile* を含む便検体のみ陽性の結果が得られた (Fig. 2)。

- (d) 臨床便検体 5 検体を用いて RT-PCR を行い、従来の検査法である培養法、酵素免疫測定法、PCR 法の結果と比較した。その結果、5 検体ともすべての検査法で陽性となった。

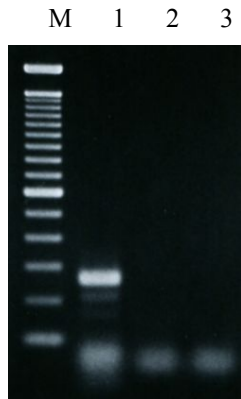


Fig. 2. 異なる状態の *C. difficile* を含む便検体から抽出した RNA を用いて行った RT-PCR. M: 100 bp DNA marker; 1: 栄養型 *C. difficile* を含む便検体; 2: 芽胞 *C. difficile* を含む便検体; 3: 死菌 *C. difficile* を含む便検体

D. 考察

- NIHE 研究室における *C. difficile* 細菌学的検査システムの構築
ベトナムで今までまったく行われていなかった、嫌気培養および *C. difficile* 培養検査が、NIHE で開始されたことは大きな進展である。特に、ハノイ市内の医療機関とネットワークを組み、協力しながらシステム構築を進めていることが、評価できる。しかしながら、病原体を扱っているにもかかわらず、手指衛生に無頓着である等、新しい技術の導入には意欲的であっても、非常に基本的な衛生概念が抜け落ちているというアンバランスが感じられた。
訪問した医療機関のうち、Dong Da Hospital では医師の CDI への関心が高く、今後の協力関係に期待できると考えられた。よりいっそうのコミュニケーションが必要と思われた。
「ハノイ市内の病院では、1 ベッドを複数の患者が共有し、満足に臥位にさえなれないこともある状況が一般的」である事実は、分担研究者がベトナムを訪問し、会話を続けた上で引き

出した情報であった。このことから、日本および欧米の医療機関での CDI の感染管理の考え方をそのままベトナム、少なくともハノイ市の医療機関に導入することは非常に困難であると考えられた。本研究で、分離培養された *C. difficile* 菌株について解析する場合も、他国の医療状況と異なることを念頭に入れて比較解析をしなければならないことを示している。

2. 遺伝子学的検査法の開発

現在用いられている検査法には、それぞれ欠点がある。培養法は時間がかかる上、毒素産生性 *C. difficile* と毒素非産生性 *C. difficile* の区別ができない。酵素免疫測定法は感度が悪い。PCR 法は生菌と死菌の区別ができない。しかし、今回開発した RT-PCR 法を用いた検査法は、それらの欠点を克服しているため、今後の *C. difficile* の細菌学的検査法として有用であると考えられる。純培養菌による実験と添加実験において、良好な結果が得られたが、臨床便検体については 5 検体の結果しか得られていないため、今後は検体数を増やし、本法の信頼性を高める必要がある。

E. 結論

ベトナムで、*C. difficile* 分離培養を開始した。研究室で、病原体の解析を行うこと、新しい技術を導入していくことが重要であることはもちろんであるが、臨床現場の実態の把握も、必須であると考えられた。今回開発した新規細菌学的検査法は栄養型 *C. difficile* を特異的に検出することが可能であることが明らかになった。これは *C. difficile* 感染症診断に有益であると考えられる。

F. 健康危機情報

CDI を含めた医療関連感染として重要な感染症における検討は、分離された病原体における解析だけでなく、医療現場との情報共有が重要と考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

Vu Thi Thu Huong, Nguyen Binh Minh, Tang Thi Nga, Le Thi Trang, Ngo Trong Toan, Tham Chi Dung, Pham Thang, Haru Kato, Mitsutoshi Senoh, Keigo Shibayama and Nguyen Tran Hie. Case reports of antibiotic-associated diarrhea and pseudomembranous colitis caused by 2 bacterial clones of *Clostridium difficile* A-B+ and *Clostridium difficile* A+ B+ in Ha Noi city, Viet Nam. 2012. Journal of Preventive Medicine 22 (5), p. 81-90 (in Vietnamese).

2. 学会発表

- Mitsutoshi Senoh, Haru Kato, Keigo Shibayama. Rapid detection method of live *Clostridium difficile*. 4th International *Clostridium difficile* Symposium. Slovenia, 2012 Sept.
- 妹尾充敏、加藤はる 栄養型毒素産生性

Clostridium difficile の新規検査法の開発 第 28 回 H. 知的財産権の出願・登録状況
日本環境感染学会総会 横浜 2013 年 3 月 なし