

***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、ハノイ市内の4医療機関より収集された糞便検体における *Clostridium difficile* 分離培養が開始された。*C. difficile* 17 菌株より NIHE において抽出した DNA サンプルにおいて、国立感染症研究所で PCR による毒素遺伝子検出および PCR ribotyping 解析を行ったところ、NIHE による結果と国立感染症研究所における結果に乖離が認められたため、NIHE における実験プロトコルの見直しを行った。Toxin A 陽性 toxin B 陽性 binary toxin 陰性であった5株中3株は異なる3病院における分離株であったが、同一 PCR ribotype と同定され、さらに、そのタイプは日本では頻りに分離されるタイプではなかった。新しい高病原性株の発生源・温床となる可能性の高いベトナムにおいて CDI の疫学研究は急務と考えられた。また、国立感染症研究所で解析が開始された36株中 toxin A 陽性 toxin B 陽性 binary toxin 陰性株が13株、toxin A 陰性 toxin B 陽性 binary toxin 陰性株が10株であった。特にアジアで toxin A 陰性 toxin B 陽性株の分離率が高いことが報告されてきたことに鑑み、今後の検討で注目していく必要があると思われた。

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い、44 臨床検体を使用して評価を行った。検討検体数を増やす必要があるが、本法は、臨床検査として使用でき、さらに *C. difficile* による感染と無症候キャリアを区別できうる画期的検査法と考えられた。

【Summary】 Stool specimens were collected from 4 healthcare facilities in Hanoi, and *Clostridium difficile* culture was started in National Institute of Hygiene and Epidemiology (NIHE), Viet Nam. DNA samples extracted from 17 isolates in NIHE were sent to National Institute of Infectious Diseases (NIID), where PCR detecting the toxin genes and PCR ribotyping were performed. Discrepancies were found between the results by NIHE and those by NIID, leading to the review of the protocol of experiments in NIHE. Of 5 toxin A-positive, toxin B-positive, binary toxin-negative isolates tested, 3 came from 3 different hospitals and were classified as the same type that is not frequently recovered in Japan. Further study is warranted to clarify CDI epidemiology in Viet Nam, which has a high potential to be a new source and hotbed of hypervirulent strains, such as BI/NAP1/027. Of a total of 36 isolates examined for toxigenicity, 13 were toxin A-positive, toxin B-positive, binary toxin-negative and 10 were toxin A-negative, toxin B-positive, binary toxin-negative. As reported especially in Asia, high isolation rate of toxin A-negative, toxin B-positive should be noted.

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 and evaluated using 44 clinical specimens. The method could be used for clinical examination and has potential to distinguish between *C. difficile* infection and asymptomatic colonization with *C. difficile*.

研究協力者

妹尾充敏	国立感染症研究所
Mitsutoshi Senoh	細菌第二部
福田靖	Department of Bacteriology
Tadashi Fukuda	II, National Institute of
柴山恵吾	Infectious Diseases
Keigo Shibayama	
Vu Thi Thu Huong	Department of Bacteriology
Tăng Thị Nga	National Institute of Hygiene
Lê Thị Trang	and Epidemiology

Tham Chi Dung (NIHE), Hanoi, Viet Nam

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。加えて、本菌は医療関連感染の原因として重要であり、院内アウトブレイク発生がしばしば認められ、米国 CDC からは“urgent threat”として警告されている。

ベトナムでは、医師処方箋なしで抗菌薬の購入が

可能であること、抗菌薬使用ガイドラインがないことから、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、その実態は不明である。本研究は、ベトナム NIHE において、CDI の細菌学的検査システムを確立し、第一にハノイ市内の医療機関における CDI の実態を調べることである。

疫学的見地からは、2000 年以降、欧米での *C. difficile* 感染症(CDI)症例数の急激な増加に伴い、高病原性株 BI/NAP1/027 の分離率が急増したことが注目されている。日本では、BI/NAP1/027 による感染症例は散発事例しか認められていないが、BI/NAP1/027 株ではない特定のタイプの菌株が複数の医療機関で流行株・優勢株として認められている。本研究では、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、その臨床背景も含めて検討し、ベトナムをはじめとしたアジアにおける CDI 感染実態を調査する足がかりとする。

一方、入院患者では無症候に消化管に *C. difficile* を保有している患者（無症候キャリア）が多く、診断が難しい場合が少なくない。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。

## B. 研究方法

### 1. NIHE 研究室における *C. difficile* 細菌学的検査システムの構築とハノイにおける CDI 分子疫学

- (a) NIHE において分離した *C. difficile* 17 菌株からの DNA 抽出サンプルが、国立感染症研究所へ送付され、国立感染症研究所において、PCR による毒素遺伝子検出、PCR ribotyping を行った。
- (b) 2013 年 10 月 27 日から 11 月 1 日まで、研究分担者がベトナムへ出張し NIHE を訪問した。その際、研究分担者が実験室現場で、実際の実験内容について確認作業を行い、さらに、今後の研究計画について話し合った。また、NIHE 滞在中、10 月 29 日に、「NIID-NIHE second meeting on collaborative research program」で検討結果について発表および討議を行った。
- (c) 共同研究ネットワークを構築しているハノイ市の 4 医療機関、Tropical Infectious Hospital、Dong Da Hospital、National Hospital of Geriatrics、および Bac Mai Hospital のうち、今回は Bac Mai Hospital を訪問し、院内見学および医師と意見交換をした。
- (d) NIHE において分離された *C. difficile* 36 菌株が NIID に送付され、同定確認と毒素遺伝子検出を行った。

### 2. 新しい細菌学的検査法の開発

- (a) 消化管症状のある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、44 臨床

検体から RNA を抽出し、RT-PCR を行った。従来の検査法である毒素産生性 *C. difficile* 分離培養法、酵素抗体法によるグルタマートデヒドロゲナーゼ(GDH)検出、酵素抗体法による糞便中毒素 (toxin A/toxin B) 検出および、PCR 法による毒素遺伝子検出の 4 法による結果と比較した。

- (b) 以上の結果を論文にまとめた。

## 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とハノイにおける CDI 分子疫学

- (a) NIHE より送付された DNA サンプルにおいて、PCR により toxin A 遺伝子、toxin B 遺伝子、binary toxin 遺伝子検出および PCR ribotyping 解析を行った。5 サンプルが toxin A 陽性 toxin B 陽性、5 サンプルが toxin A 陰性 toxin B 陽性、6 サンプルが toxin A 陰性 toxin B 陰性であり、残りの 1 サンプルは PCR によって同定できなかった。Binary toxin 遺伝子が検出されたサンプルはなかった。17 サンプル中 2 サンプルにおいて、NIHE における結果と国立感染症研究所における結果に乖離が認められた。PCR ribotyping 解析では、(国立感染症研究所で) toxin A 陽性 toxin B 陽性と同定された 5 サンプルのうち、3 サンプルで同一バンドパターンを認めたが、日本で頻繁に分離されるタイプではなかった。この 3 サンプル(3 株)は異なる 3 医療機関由来であった。Toxin A 陰性 toxin B 陽性と同定された 5 サンプルのうち 4 サンプルで、PCR ribotype 017 と同一パターンであった(図 1)。Toxin A 陰性 toxin B 陰性と同定された 6 サンプルはすべて同一バンドを示した。
- (b) NIHE での実験過程を検証したところ、糞便検体から *C. difficile* を分離し菌株保存までに、純培養するステップがないことが判明した。Single colony を釣菌するステップを行うよう SOP を改訂した。研究室では実験前後の手指衛生にタオルを共用することはなくなっていた。
- (c) Bac Mai Hospital では、医師との意見交換に加え、病棟の見学をした。病棟では、狭いベッドを 2 名以上の患者が共同使用しており、さらに 24 時間家族がつきそう過密な病棟環境であった。「患者のケアの際に手袋を着用してはいけない」というポスターが掲示されており、適切な標準予防対策がなされていないことが推察された。

- (d) NIHE より送付された 36 菌株は、すべて *C. difficile* であることを確認した。PCR による毒素遺伝子検出を行ったところ、binary toxin 遺伝子陽性株は認められなかった。Toxin A 陽性 toxin B 陽性が 13 株、toxin A 陰性 toxin B 陽性株が 10 株、toxin A 陰性 toxin B 陰性株が 13 株であった。医療機関別では、Tropical Infectious Hospital では toxin A 陰性 toxin B 陽性株が多く、Bac Mai Hospital では toxin A 陽性 toxin B 陽性株が多かった (表 1)。

## 2. 遺伝子学的検査法の開発

- (a) 検討した 44 検体中、12 検体で 5 検査法すべてにおいて陽性、22 検体で 5 検査法すべてにおいて陰性であり、計 34 検体で結果が一致した (表 2)。3 検体では酵素抗体法による結果のみが陰性であった。4 検体において、PCR 陽性、毒素産生性 *C. difficile* 分離培養陽性、酵素抗体法による GDH 検出陽性であったが、酵素抗体法による毒素陰性であり、RT-PCR による毒素遺伝子検出も陰性であった。残る 3 検体では GDH のみ検出され、毒素陰性 *C. difficile* が分離された。
- (b) 論文作成を行い投稿した。

## D. 考察

1. NIHE 研究室における *C. difficile* 細菌学的検査システムの構築とハノイにおける CDI 分子疫学
- NIHE における解析結果と国立感染症研究所における解析結果を比較することにより、NIHE 研究室における基本的な細菌学的実験手法の検証が可能であった。今後も、実験方法の見直しと整理を続けることが必要と考えられた。
- 検討した 36 菌株では binary toxin 遺伝子陽性株は認められなかった。36 株のタイピング解析の結果はまだ得られていないが、binary toxin 陽性である BI/NAP1/027 株および PCR ribotype 078 株は現在のところ分離は認められていない。Type 027 株および 078 株は分離されていないものの、DNA サンプルで送付された 5 株の toxin A 陽性 toxin B 陽性株のうち、3 株が同一 PCR ribotype であり、少なくとも日本でよく分離されるタイプではなかったこと、本 3 株が異なる 3 医療機関由来であったことが注目された。今後検討菌株数をふやす必要があるが、抗菌薬適正使用がなされず、病院衛生環境が整っていない状況のベトナムが、新しい高病原性菌株の発生源・温床になる可能性は高く、このことを考慮し調査にあたるべきと思われた。
- 一方、Tropical Infectious Hospital では特に toxin A 陰性 toxin B 陽性株が多いことが注目された。DNA サンプルが送付され検討した 5 株中 4 株が PCR ribotype 017 であり、さらに PCR

ribotype 017 と同定された 4 菌株は異なる 3 病院由来であった。PCR ribotype 017 株は、ポーランド、韓国、アイルランド等で優勢株のひとつとして注目されている。ハノイにおける toxin A 陰性 toxin B 陽性株について注目していく必要がある。

今後、4 医療機関との連携を深めて、CDI 感染実態を調べていく必要があるが、医療機関におけるモチベーションをあげ、さらに協力を得るために、研究室での解析結果を医療現場に迅速にフィードバックしていくシステム構築が必要ではないかと考えられた。

## 2. 遺伝子学的検査法の開発

44 検体の臨床検体において、酵素抗体法で毒素陽性であった 12 検体すべてにおいて、RT-PCR による毒素遺伝子検出が可能であったことから、本法は実際の臨床検査として使用可能であることが検証された。また、PCR 陽性、毒素産生性 *C. difficile* 分離培養陽性、酵素抗体法による GDH 検出陽性であったが、酵素抗体法による毒素陰性、RT-PCR による毒素遺伝子検出陰性の検体が 4 検体認められた。本 4 症例の臨床経過詳細は不明であるが、検査結果から、*C. difficile* は芽胞あるいは死菌の状態では患者の消化管内に存在し、CDI 以外の原因で消化管症状が認められていたことが示唆された。CDI か、他の原因で下痢・腸炎であり *C. difficile* を消化管保有しているかを区別することは、治療を考える上で重要である。検討症例数を増やし、臨床病態との関連を調べる必要があるが、本法は、CDI と無症候キャリアを区別する画期的な検査法と考えられた。

## E. 結論

欧米や日本で流行株・優勢株として報告されていない PCR ribotype 菌株がハノイ市内の医療機関で優勢である可能性が示唆された。

RT-PCR によって栄養型の毒素産生性 *C. difficile* だけを選択的に検出する方法の開発を行った。本法は、*C. difficile* による感染症と無症候キャリアを区別する画期的な新規検査法を考えられた。

## F. 健康危機情報

ベトナム、ハノイでは、日本とも欧米とも異なる CDI 感染実態があることが推察され、今後詳細な疫学研究が急務であることが明らかとなった。

## G. 研究発表

1. 論文発表  
該当なし
2. 学会発表  
該当なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図 1 .

ハノイ市内の 4 医療機関で分離された toxin A 陽性 toxin B 陽性 binary toxin 陰性 5 菌株(Lane 1 から 6 まで)の PCR ribotype pattern

Lane a から d までは日本、欧米で流行株として報告のある toxin A 陽性 toxin B 陽性 binary toxin 陰性株。Lane 1, 3, 6 の菌株が同一 PCR ribotype と同定された。Lane 2 の結果は、NIHE での DNA 抽出ステップに問題があったため、評価できない。

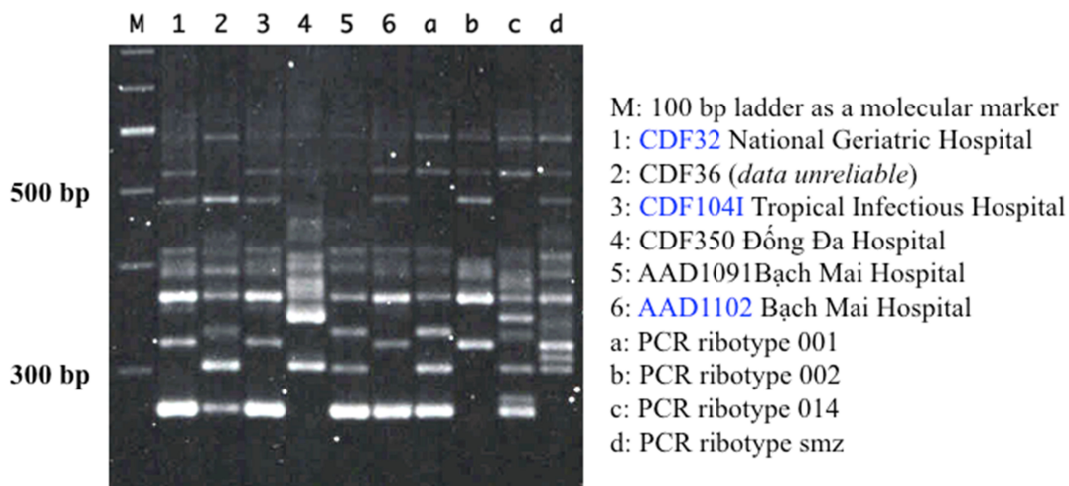


表 1 .

ハノイ市内 4 医療機関で分離された 36 菌株の毒素産生性検討結果

Hospital	Toxin production of isolates			Total
	A <sup>+</sup> B <sup>+</sup>	A <sup>-</sup> B <sup>+</sup>	A <sup>-</sup> B <sup>-</sup>	
National Geriatric Hospital	2*	1	3	6
Tropical Infectious Hospital	1	5	5	11
Đống Đa Hospital	1	1	1	3
Bạch Mai Hospital	9	3	4	16
Total	13	10	13	36

A<sup>+</sup>B<sup>+</sup>, toxin A-positive, toxin B-positive; A<sup>-</sup>B<sup>+</sup>, toxin A-negative, toxin B-positive; A<sup>-</sup>B<sup>-</sup>, toxin A-negative, toxin B-negative; \*number of isolates recovered.

表 2.

44 臨床検体における RT-PCR および PCR による *tcdA* 検出、毒素産生性 *C. difficile* 培養、酵素抗体法による GDH および毒素(toxins A & B)検出結果の比較

Number of stool specimens	RT-PCR	PCR	Toxigenic culture	EIA for	
				GDH	Toxins A/B
12	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	-
1	+	+	+	-	-
4	-	+	+	+	-
3	-	-	-	+	-
22	-	-	-	-	-

GDH, glutamate dehydrogenase; \* non-toxigenic *C. difficile* was isolated from 3 specimens.