

***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)がハノイ市内の4医療機関と *Clostridium difficile* 感染症(CDI)の研究をするためにネットワーク構築を行い、NIHEにおいて *C. difficile* 分離培養が開始された。ハノイの医療機関は、抗菌薬適正使用が行われていない、病棟で複数患者が1ベッドを共有するなど過密な状況で感染管理が難しい等により、*C. difficile* 高病原性株の発生源・温床となりやすいと考えられた。ベトナムにおける CDI の感染実態調査および疫学調査は急務であると考えられた。

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・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】A network of National Institute of Hygiene and Epidemiology (NIHE) and 4 healthcare facilities in Hanoi has been successfully constructed to investigate epidemiology of *Clostridium difficile* infection (CDI) in Hanoi and *C. difficile* culture was started in NIHE. Healthcare facilities in Hanoi, where antimicrobial stewardship program and infection control are not adequately performed, has a high potential to be a new source and hotbed of hypervirulent strains, such as BI/NAP1/027. Further study is urgent to investigate current status and epidemiology of CDI in Viet Nam.

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

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、抗菌薬使用ガイドラインもないため、抗菌薬の使用の乱用・多用が懸念され、従って *C. difficile* 感染症(CDI)症例数が多いと推測される。しかし、CDIの臨床検査はまったく行われていないため、その感染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。

一方、欧米では特に 2000 年以降の症例数の急激な増加に伴い、CDI は、いっそう注目されている。世界各地で米国をその発生源と報告される高病原性株 BI/NAP1/027 の分布や伝播を含めて、疫学的検討が進んでいるところであるが、ベトナムを含め、アジアにおける CDI の疫学については非常に情報に乏しい。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、感染実態を調査する足がかりとする。

C. difficile は、重症感染症を引き起こすことがある反面、無症候キャリアも多く、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

システムの構築とハノイにおける CDI 分子疫学

- (a) 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。
- (b) ハノイ市の 4 病院、National Hospital of Infectious Diseases、Tropical Infectious Hospital、Dong Da Hospital、National Hospital of Geriatrics、および Bac Mai Hospital とのネットワーク構築を行い、糞便検体収集と *C. difficile* 分離培養が NIHE で開始された。
- (c) 2013 年 1 月 16 日から 1 月 21 日まで、および、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。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、協力医療機関のうち、National Hospital of Geriatrics、Dong Da Hospital、および Bac Mai Hospital を訪問し、医師との意見交換および病棟内の見学をした。
- (d) 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。
- (e) 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) 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。まず、毒素遺伝子検出の RT-PCR 条件検討を行った。PCR primer は toxin A 遺伝子配列から選んだプライマー、NK3-NK2 (J Clin Microbiol, 1991, 29, 33-7)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、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* を含む便検体を調製して実験を行った。各検体から RNA を抽出し、(a)で得られた結果を元に RT-PCR を行った。
- (c) 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メ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。

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) 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 4 医療機関入院症例から採取した糞便検体の収集と、NIHE 研究室において *C. difficile* の分離培養が開始された。最初の 2 例は症例報告がなされた。
 - (c) NIHE 研究室では、NIHE における実験結果と国立感染症研究所における実験結果の乖離を中心に、基本的技術ステップを見直し、一部実験プロトコルを改訂した。医療機関では、ひとつのベッドが複数の患者により共用され、標準予防策が十分に行われることができない状況であった。
 - (d) NIHE より送付された DNA 抽出物 17 サンプルにおいて、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。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。
 - (e) NIHE において分離された *C. difficile* 36 菌株において 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. 新しい細菌学的検査法の開発
 - (a) *C. difficile* 毒素遺伝子検出の 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 (図 1)。
 - (b) 便検体から直接 RNA を抽出する方法として、フェノール・クロロホルムによる抽出法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(図 2)。

- (c) 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。

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った。特に、NIHE が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たことは非常に評価できる。一方、基本的な細菌学的実験技術は、継続して見直していく必要があると考えられた。

欧米では、2000 年以降の高病原性株 BI/NAP1/027 による大流行が注目されている。BI/NAP1/027 株は、フルオロキノロン耐性獲得を含む遺伝子変異が認められた菌株が、米国をその発生源として世界中に伝播していき、疫学的に大きな影響を及ぼしたとされている。ハノイ市内の 4 医療機関分離株では現在のところ、binary toxin 遺伝子陽性株は認められておらず、binary toxin 陽性の BI/NAP1/027 株が流行している可能性は低いように考えられる。しかし、検討菌株数が少なく限られたデータであるが、検討された toxin A 陽性 toxin B 陽性 binary toxin 陰性 5 菌株中 3 株が同一タイプで、現在まで欧米や日本で流行株として報告されたタイプではなかったこと、さらに、本 3 株は異なる 3 医療機関由来であったことが注目された。抗菌薬適正使用がなされておらず、病棟病床が過密で有効な感染対策が困難なハノイの医療機関が、CDI の温床になっていることは想像に難くない。新しい高病原性株の発生源・温床となりうるハノイ市内の医療機関における調査は、アジア、世界にとっても重要であると考えられた。

2. 新しい細菌学的検査法の開発

CDI であるのか、他の原因で下痢・腸炎で同時に *C. difficile* を消化管保有しているだけであるのかを細菌学的検査によって区別できれば、治療を考える上で有用である。近年、real-time PCR などにより糞便中毒素遺伝子を検出するキットが利用されはじめているが、無症候キャリアにおいても陽性結果が出るため過剰診断ではないかという報告が認められる。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、本研究で開発した RT-PCR により糞便中の毒素 RNA を検出する方法は、CDI と無症候キャリアを区別しうる画期的な検査法と考えられた。

E. 結論

NIHE とハノイ市内の 4 医療機関がネットワークを構築し、今まで情報のなかったベトナムにおける CDI の感染実態および分子疫学についての調査検討が開始された。

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しうる画期的な新規検査法と考えられた。

F. 健康危機情報

C. difficile は米国 CDC から "urgent threat" として警告されている。CDI アウトブレイク発生の条件がそろっているベトナムにおいて、CDI 感染実態を調べることは urgent であると考えられた。

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 回日本環境感染学会総会 横浜 2013 年 3 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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 ⁺ B ⁺	A ⁻ B ⁺	A ⁻ B ⁻	
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⁺B⁺, toxin A-positive, toxin B-positive; A⁻B⁺, toxin A-negative, toxin B-positive; A⁻B⁻, toxin A-negative, toxin B-negative; *number of isolates recovered.

図 1 . 異なる量の RNA を添加して行った RT-PCR の結果

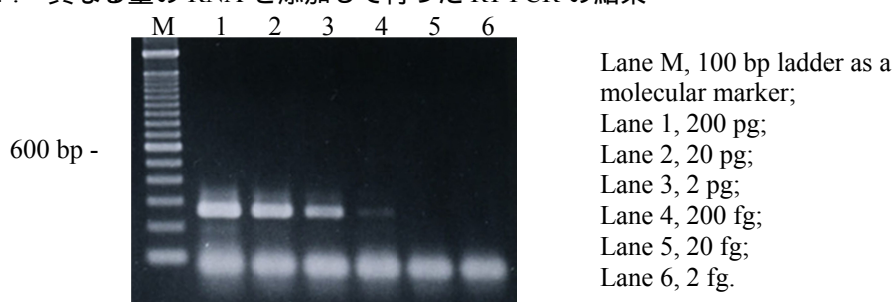


図 2 . 栄養型、芽胞、死菌の *C. difficile* を含む糞便検体から抽出した RNA における RT-PCR の結果

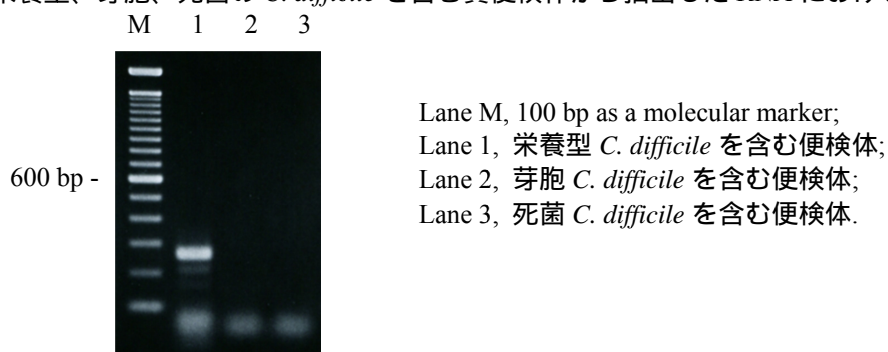


表 2 . 44 臨床検体における RT-PCR および PCR による *tcdA* 検出、毒素産生性 *C. difficile* 培養、酵素抗体法による GDH および毒素(toxins A & B)検出結果の比較

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.