

*Clostridium difficile*に関する調査研究

【保健衛生室】

山根由美・上田 豊・井田正巳

1 はじめに

2003年ごろから、カナダおよび米国において、クロストリジウム・ディフィシル関連下痢症の急激な増加、重篤な合併症および死亡例が報告され始めた。その後、米国で集団発生した菌株が調査され、その多くが同一タイプの強毒株であることが明らかになった。この強毒株は、従来の株に比べて毒素の産生量が多いため発症すると重篤な経過をたどり、死亡率が高くなることが確認されている。また、欧州各国でも強毒株が確認され世界的な感染拡大が懸念されている。日本国内では、集団発生の事例はないが、数例の散発事例が報告されている。

今回、県内の医療施設でのクロストリジウム・ディフィシルについて分離状況を調査し、毒素遺伝子型の検査手順を確立し、健康危機管理への迅速対応に備えるための調査研究を行ったので報告する。

2 調査方法

1) 調査期間

平成21年10月～平成22年1月。

2) 対象検体

協力医療機関の入院患者で、*C. difficile*関連疾患を疑い「CD トキシン」(迅速検査)の検査が行われた便73検体の提供を受け、検査対象とした。

3) 方法

(1) 前処理

糞便検体を同量の99%エタノールで混合させ、室温で30～60分インキュベーションした。

(2) 培養

前処理した検体を7%馬血液寒天培地(非選択培地)とCCMA-EX培地(日水)・CCFA培地(日本BD)(選択培地)に塗布し、37℃48時間嫌気培養した。

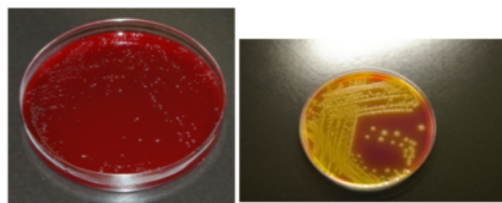


図1 培地上の発育コロニー

(3) 継代培養

選択培地に発育したコロニーから1コロニー釣菌し、7%馬血液寒天培地に塗布し、37℃48時間嫌気培養した(図1)。

(4) 菌の同定

「アピ20Aキット」(シスメックス・ピオメリュー)にて菌種の同定を行った。

(5) 迅速キットによる毒素の確認

BHI培地で5～7日嫌気培養した菌液で、「TOXA/B QUICK CHECK」(ニッスイ)、「イムノカードCDトキシンA&B」(テーエフビー)の2種類のキットを用いて確認した。

(6) PCR法による毒素の確認

毒素Aを検出するtcdA、毒素Bを検出するtcdB・tcdB2、強毒株であるバイナリートキシンを検出するcdtA・cdtB、毒素産生を調節するtcdCの6種類のプライマーを用いて、毒素遺伝子の確認を行った。

(7) 薬剤感受性試験

日本ベクトン・ディッキンソン社製センシ・ディスクのモキシフロキサシン(MXF)・ガチフロキサシン(GAT)・レブプロキサシン(LVX)・アンピシリン(AM)・エリスロマイシン(E)・クリンダマイシン(CC)・セフメタゾール(CMZ)・セフォキシチン(FOX)・ペラシリン(PIP)・ミノサイクリン(MI)10種類の薬剤を用いてK-B法に準じて感受性試験を行った。

(8) 遺伝子解析

嫌気状態にしたブレインハートインフュージョン培地で菌を嫌気培養して増菌し、嫌気状態にしたTYG培地に1ml 加え3時間嫌気培養した菌液を制限酵素 Sma を用いてDNAを切断し、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)を行いパターンの比較を行った。

3 結果及び考察

(1) 培養

73検体中25検体から *C. difficile* を分離した。

(2) 生化学性状

表1より生化学性状はブドウ糖、マンニトール、マンノース、メレチトースを酸性化し、エスクリンを加水分解した。これまでに報告されている *C. difficile* と同様の性状を示した。

表1 アピキットによる生化学性状

	陽性数
インドール	
ウレアーゼ	
ブドウ糖	22
D-マンニトール	15
乳糖	1
白糖	
マルトース	
サリシン	15
D-キシロース	1
L-アラビノース	
ゼラチン	
エスクリン	22
グリセリン	
D-セロビオース	
D-マンノース	21
D-メレチトース	20
D-ラフィノース	
D-ソルビトール	
L-ラムノース	
D-トレハロース	
CAT	

(3) 迅速キットによる毒素の確認

医療機関での迅速キットの結果が陰性であったが、培養後の菌液を用いた迅速キットの結果が陽性となったものが7検体あった。これは便に排泄された菌量が少なかったためと考えられた。

(4) PCR法の結果

毒素A産生毒素B産生が21株、毒素A非産生毒素B産生が4株認められた。バイナリートキシン・毒素産生を調節する遺伝子は認められなかった。強毒株は、tcdA・tcdB2・cdtA・cdtBをすべて保有することが知られていることから、今回の菌株は強毒株とは異なるものと考えられた。

(5) 薬剤感受性の結果

表2に示したとおり7剤に耐性を示す株が21株、5剤に耐性を示す株が1株、4剤に耐性を示す株が

1株、3剤に耐性を示す株が1株、2剤に耐性を示す株が1株であった。

表2

耐性薬剤						耐性株数	
LVX5	FOX	E	GAT	CC2	MXF	CMZ	21
LVX5	FOX	E	GAT	MI			1
LVX5	FOX	E	MI				1
LVX5	FOX	CC2					1
LVX5	FOX						1

(6) PFGE解析

院内感染の可能性を把握するために、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)による解析を実施したが、明確な結果は得られなかった。

4 まとめ

今回の調査では、強毒株は分離できなかったが、薬剤感受性試験の結果からニューキノロン系の薬剤に耐性を示している菌が多く分離された。

PFGEは *C. difficile* ではDNAのdegradationが生じやすいため、明確な結果が得られないことがあると報告されているが今回の調査研究でも同様の結果となり確実な成績を得るためには、迅速で簡易な遺伝子解析の方法を確立する必要があると思われた。

5 参考文献

1) Antikainen et al., Detection of virulence genes of *Clostridium difficile* by multiplex PCR, APMIS 117; 607-613, 2009