

# *Clostridioides difficile* 検出法と薬剤感受性に関する検討

佐藤 勇樹<sup>1)</sup>・品川 雅明<sup>1)</sup>・葦澤 慎也<sup>1)</sup>・佐伯 理知<sup>1)</sup>  
八鍬 佑貴<sup>1)</sup>・田中真輝人<sup>1)</sup>・柳原 希美<sup>1,2)</sup>・高橋 聡<sup>1,2)</sup>

<sup>1)</sup> 札幌医科大学附属病院検査部\*

<sup>2)</sup> 札幌医科大学医学部感染制御・臨床検査医学講座

受付日：2019年5月13日 受理日：2019年8月20日

毒素産生性 *Clostridioides difficile* の検出には、イムノクロマトグラフィー法 (IC 法) が汎用されている。*C. difficile* の binary toxin 産生株や毒素過剰産生株の分離頻度に関する報告は少ない。また、薬剤感受性試験はほとんどの施設で実施されていない。そこで、IC 法による毒素産生性 *C. difficile* 検出能の評価および各種毒素産生性、薬剤感受性に関する検討を行った。2015年2月～2016年7月に抗菌薬関連下痢症疑いで提出された糞便 285 検体を対象とした。培養法で 50 検体 (17.5%) から *C. difficile* が検出され、35 株 (70.0%) が toxin A/B 陽性であった。培養法を比較対照とした IC 法の toxin A/B の陽性一致率、陰性一致率は 22.9%、99.6% であった。Toxin A, toxin B 遺伝子保有株の内訳は 50 株中 A+B+ が 21 株 (42.0%)、A-B+ が 14 株 (28.0%)、A-B- が 15 株 (30.0%)、binary toxin 遺伝子保有株は毒素産生性 *C. difficile* 35 株中 1 株 (2.9%)、毒素過剰産生株を疑う株はみられなかった。毒素産生性 *C. difficile* 35 株の MIC<sub>90</sub> は penicillin G が 4 μg/mL, tazobactam/piperacillin が 8 μg/mL, metronidazole (MNZ) が 2 μg/mL, vancomycin (VCM) が 1 μg/mL, fidaxomicin (FDX) が 0.12 μg/mL で FDX が最も低かった。IC 法は簡便性かつ迅速性に優れているが、毒素検出の感度は十分とはいえない。また、毒素過剰産生株を疑う株や MNZ, VCM や FDX の第一選択薬に対して耐性株は分離されなかったが、今後も *C. difficile* 感染症に対する継続したサーベイランスを実施していく必要があると考えられる。

**Key words:** *Clostridioides difficile*, immunochromatography, toxin B, susceptibility, fidaxomicin

## はじめに

毒素産生性 *Clostridioides difficile* は抗菌薬関連下痢症における原因菌の一つであり、*C. difficile* infection (CDI) 発症には toxin A, toxin B および binary toxin が病原因子として関与している。Toxin A および toxin B の検出には、イムノクロマトグラフィー法 (IC 法) が汎用されているが、糞便検体から直接 toxin A および toxin B を検査する方法は検出感度が低いことが指摘されている<sup>1)</sup>。また、欧

米で問題となっている強毒株、binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) 産生株や *tcdC* に欠損を有していることが特徴である毒素過剰産生株 BI/NAPI/027 株は、本邦においてもそれぞれ約 6%<sup>2)</sup>、0.01%<sup>3)</sup> 分離されていることが報告されているが、分離頻度に関する報告は少ない。*C. difficile* の薬剤感受性試験は、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)<sup>4)</sup> により寒天平板希釈法を用いる最小発育阻止濃度 (MIC) が示されているが、操作が煩雑であることからほとんどの施設で実施さ

\*北海道札幌市中央区南 1 条西 16 丁目 291

れていないのが現状である。一方、*C. difficile* の主な治療薬である metronidazole (MNZ) や vancomycin (VCM) に対し、本邦において耐性株に関する報告はほとんどみられないが<sup>5,6)</sup>、海外においては耐性株の報告<sup>7)</sup>が散見されており、本邦においても分離される可能性がある。また、近年、fidaxomicin (FDX) は有用な治療薬として注目されているが、本邦における感受性に関する報告は少ない。そこで、当院で提出された糞便を用いて培養法を比較対照とした IC 法による毒素産生性 *C. difficile* (toxin A および toxin B) 検出能の評価に加えて、培養法で分離された *C. difficile* で遺伝子検査法を用いた各種毒素産生性、薬剤感受性試験による MIC 分布の調査を行った。

## 1. 材料と方法

### 1. 対象

2015年2月から2016年7月までに札幌医科大学附属病院(以下、当院)において、抗菌薬関連下痢症疑いで提出された糞便447検体のうち、Bristol Stool Scale 5以上<sup>8)</sup>であった285検体(Scale 5:22検体, Scale 6:162検体, Scale 7:101検体)を対象とした。IC法および培養法は、検体提出当日に実施した。遺伝子解析および薬剤感受性検査は培養法で分離された *C. difficile* を凍結(-80℃)保存し、検討する際に室温融解し、継代培養後、検査を実施した。本検討は当院臨床研究審査委員会の承認(承認番号:292-249)を受けて実施した。

### 2. IC法

*C. DIFF* QUIK CHEK コンプリート (QUIK CHEK, アリーアメディカル) を用いた。操作は添付書に従い、糞便検体から直接、グルタミン酸脱水素酵素 (GDH) 抗原 (IC法・GDH) と toxin A/B (IC法・toxin A/B) の検査を行った。IC法の成績は、培養法を比較対照として一致率で比較した。

### 3. 培養法

前処理は糞便に99.5%アルコールを等量混合し攪拌後、室温で1時間放置した。CCMA培地EX(日水)に、前処理液100μLを接種し、塗布後、37℃、嫌気条件下で48時間培養した。培地上で *C. difficile* 様のコロニーの発育を認めた場合はMALDI Biotyper (MALDI, Bruker Daltonics) を用いて、Score 2,000以上を *C. difficile* と確定し、菌数を測定した (colony forming units: CFU/mL)。また、QUIK

CHEK添付の希釈液で *C. difficile* と同定されたコロニーからMcFarland No.4以上の菌液を作製し、その菌液を用いてQUIK CHEKにて分離株のGDH抗原(培養法・GDH)とtoxin A/B(培養法・toxin A/B)の検査を実施した<sup>9)</sup>。

### 4. 毒素産生性

Toxin A および toxin B 産生性は Kato らの方法<sup>10)</sup>、binary toxin 産生性は Stubbs らの方法<sup>11)</sup>に従い、polymerase chain reaction (PCR) 法により、toxin A・B コード遺伝子 (*tcdA*・*tcdB*)、binary toxin コード遺伝子 (*cdtA*・*cdtB*) の有無で判定した。すなわち、toxin A 産生性は *tcdA* について NK9-NK11-NKV011 のプライマーセットを使用し、toxin B 産生性は *tcdB* について NK104-NK105 のプライマーセット、binary toxin 産生性は *cdtA* について *cdtApos-cdtArev* と *cdtB* について *cdtBpos-cdtBrev* の2種類のプライマーセットを使用し PCR を実施した。これらの PCR 結果をもとに、*tcdA* にて1,266 bp、かつ *tcdB* にて204 bp の増幅産物が得られた菌株を toxin A/B ともに産生 *C. difficile* 株 (A+B+)、*tcdA* にて714 bp、かつ *tcdB* にて204 bp の増幅産物が得られた菌株を toxin A 非産生 toxin B 産生 *C. difficile* 株 (A-B+)、*tcdA*、*tcdB* の両 PCR ともに増幅産物が認められない菌株を toxin A/B ともに非産生 *C. difficile* 株 (A-B-) と同定した。また、binary toxin については *cdtA* および *cdtB* にて、それぞれ375 bp および510 bp の増幅産物がいずれも得られた場合に産生株と判定した。毒素産生抑制遺伝子 *tcdC* は Spigaglia ら<sup>12)</sup>の方法に従いシーケンス解析により117番目と330~347番目の部位に欠失があるか否かを確認した。

### 5. 薬剤感受性試験による MIC 分布の調査

CLSI<sup>4)</sup>に準拠し、寒天平板希釈法を用いて5種類の抗菌薬 penicillin G (PCG)、tazobactam/piperacillin (TAZ/PIPC)、MNZ、VCM、FDX の MIC を測定した。なお、TAZ/PIPC の MIC は、TAZ を 4 μg/mL に固定し、主剤である PIPC の MIC で表記した。薬剤感受性用培地は、ヘミン (5 mg/mL、富士フィルム和光純薬)、ビタミン K1 (1 mg/mL、富士フィルム和光純薬)、綿羊無菌脱繊維血液 (5% v/v、コージンバイオ) を添加したブルセラ寒天培地 (富士フィルム和光純薬) を作製した。接種菌液の調整は、凍結した *C. difficile* をブルセラ寒天培地

Table 1. Comparison of the detection of *C. difficile* glutamate dehydrogenase (GDH) directly from feces with that from selective anaerobic culture in an immunochromatography (IC) assay

		Culture GDH	
		+	-
IC assay	+	46	1
GDH	-	4	234
Concordance Rate			
Positive		92.0%	
Negative		99.6%	
Total		98.2%	
PPV <sup>a)</sup>		97.9%	
NPV <sup>b)</sup>		98.3%	

<sup>a)</sup> PPV: positive predictive value

<sup>b)</sup> NPV: negative predictive value

Table 2. Comparison of the detection of *C. difficile* toxin A/B directly from feces with that from toxigenic culture in an immunochromatography (IC) assay

		Culture toxin A/B	
		+	-
IC assay	+	8	1
toxin A/B	-	27	249
Concordance Rate			
Positive		22.9%	
Negative		99.6%	
Total		90.2%	
PPV <sup>a)</sup>		88.9%	
NPV <sup>b)</sup>		90.2%	

<sup>a)</sup> PPV: positive predictive value

<sup>b)</sup> NPV: negative predictive value

に48時間継代培養し、嫌気性菌用 ABCM プロス (栄研) で McFarland No.0.5 の *C. difficile* 菌液を調整した。*C. difficile* 菌液を1スポット1  $\mu$ L (約  $10^5$  CFU) になるように薬剤感受性用培地に接種し、Bugbox (BAKER) 内で嫌気条件下 ( $N_2$ : 80%,  $CO_2$ : 10%,  $H_2$ : 10%), 37°C で48時間培養し、菌の発育が認められない最小濃度を MIC とした。なお、精度管理として、嫌気条件であるか否かの確認は、薬剤未添加の培地および薬剤感受性用培地に精度管理株 *C. difficile* (ATCC700057) をスポットして、嫌気条件下で48時間培養後、発育の有無および CLSI の QC レンジ値内か否かで確認した。また、好気性菌による培地の汚染あるいは調整した菌液のコンタミネーションの有無を確認する目的で、薬剤未添加の培地に調整した菌液をスポットして5%  $CO_2$  で発育の有無を確認した。各薬剤に対する感受性は、CLSI および European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)<sup>13)</sup> の解釈基準をもとに判定した。なお、CLSI および EUCAST で解釈基準が定められていない FDX については、An agency of the European Union の epidemiological cut-off values<sup>14)</sup> を適用した。測定した MIC から MIC<sub>50</sub> および MIC<sub>90</sub>, MIC range を算出し、他の報告と比較した。

## 6. 統計解析

培養法・toxin A/B 陽性検体のうち、IC 法・toxin

A/B 陰性検体と IC 法・toxin A/B 陽性検体から分離された *C. difficile* の菌量について Mann-Whitney の U 検定を用いて  $p < 0.05$  で有意差ありと判定した。

## II. 結果

### 1. IC 法と培養法の比較成績

対象 285 検体のうち、培養法で *C. difficile* が検出された検体は 50 検体 (17.5%) であり、菌量は  $1.0 \times 10^1 \sim 3.0 \times 10^6$  CFU/mL であった。IC 法・GDH の成績は、培養法との一致率で示した (Table 1)。IC 法・GDH と培養法・GDH の陽性一致率は 92.0% であった。すなわち、培養法・GDH で陽性を示し、IC 法・GDH 陰性であった検体が、50 検体中 4 検体 (8%) みられた。IC 法・GDH のみ陰性であった 4 検体は、10, 20, 40, 500 CFU/mL と菌量が少ない傾向がみられた。一方、陰性一致率、全体一致率、陽性的中率、陰性的中率は 99.6%, 98.2%, 97.9%, 98.3% であった。

また、IC 法・toxin A/B と培養法・toxin A/B の陽性一致率は 22.9% であった (Table 2)。すなわち、培養法・toxin A/B で陽性を示し、IC 法・toxin A/B 陰性であった検体が、27 検体みられた。培養法・toxin A/B 陽性 35 検体中、IC 法・toxin A/B 陰性 27 検体と IC 法・toxin A/B 陽性 8 検体から分離された *C. difficile* の菌量で Mann-Whitney の U 検定を用いて比較したところ、IC 法・toxin A/B 陰性の菌量は  $1.0 \times 10^1 \sim 5.44 \times 10^5$  CFU/mL (中央値  $2.00 \times 10^3$  CFU/mL)、IC 法・toxin A/B 陽性の

Table 3. Comparison of our reports and 3 published studies on toxin A/B genes

Toxin genes	Our data	Hara et al <sup>17)</sup>	Nakagawa et al <sup>1)</sup>	Salazar et al <sup>18)</sup>
<i>tcdA</i> + <i>tcdB</i> +	21 (42.0%)	65 (60.7%)	13 (48.1%)	101 (70.6%)
<i>tcdA</i> - <i>tcdB</i> +	14 (28.0%)	16 (15.0%)	10 (37.0%)	10 (7.0%)
<i>tcdA</i> - <i>tcdB</i> -	15 (30.0%)	26 (24.3%)	4 (14.8%)	32 (22.4%)
Total	50	107	27	143

Table 4. Comparison of our reports and 2 published studies on binary toxin genes

Toxin genes	Our data	Iwashima et al <sup>2)</sup>	Kilic et al <sup>19)</sup>
<i>cdtA</i> + <i>cdtB</i> +	1 (2.9%)	4 (5.6%)	11 (23.9%)
<i>cdtA</i> - <i>cdtB</i> -	34 (97.1%)	67 (94.4%)	35 (76.1%)
Total	35	71	46

菌量は  $2.0 \times 10^2 \sim 4.20 \times 10^5$  CFU/mL (中央値  $2.42 \times 10^4$  CFU/mL) で、 $p \geq 0.05$  となり有意差はみられなかった。一方、陰性一致率は 99.6% であり、培養法・toxin A/B で陰性、IC 法・toxin A/B 陽性を示した検体が、1 検体みられた。この 1 検体は IC 法・GDH および培養法・GDH も陽性であり、菌量は *C. difficile* が分離された 50 検体中、最も多い  $3.04 \times 10^6$  CFU/mL であった。そのため、糞便中に複数株の *C. difficile* の存在を疑い、糞便を再度検体から培養し、発育のみられたすべてのコロニーを掻きとり IC 法で再検査を実施したが陰性であり、PCR 法でも A-B- 株であった。全体一致率、陽性的中率、陰性的中率は 90.2%, 88.9%, 90.2% であった。

## 2. 遺伝子検査による各種毒素遺伝子の結果

Toxin A/B 遺伝子の内訳は 50 株中 A+B+ が 21 株 (42.0%), A-B+ が 14 株 (28.0%), A-B- が 15 株 (30.0%) であった (Table 3)。Binary toxin 遺伝子は、毒素産生性 *C. difficile* 35 株中 1 株 (2.9%) が保有していた (Table 4)。一方、*tcdC* のシーケンス解析の結果、117 および 330~347 番目の部位に欠失がみられる株はなかった。

## 3. 薬剤感受性試験成績

毒素産生性 *C. difficile* 35 株の薬剤感受性試験における対象 5 薬剤の MIC range および MIC<sub>50</sub>, MIC<sub>90</sub>, 薬剤感受性率を Table 5 に示した。MIC<sub>50</sub> および MIC<sub>90</sub> は PCG が 2, 4  $\mu\text{g/mL}$ , TAZ/PIPC が 2, 8  $\mu\text{g/mL}$ , MNZ が 0.5, 2  $\mu\text{g/mL}$ , VCM が 0.5, 1  $\mu\text{g/mL}$ , FDX が 0.12, 0.12  $\mu\text{g/mL}$  で FDX の MIC<sub>50</sub> と MIC<sub>90</sub> が最も低かった。また、PCG の MIC<sub>50</sub> および MIC<sub>90</sub> は耐性域であったが、TAZ/PIPC,

MNZ, VCM, FDX は MIC<sub>50</sub> および MIC<sub>90</sub> ともに感性域であった。

## III. 考察

*C. difficile* toxin の検出は CDI 診断の補助となり、適切な治療、院内感染対策を行うために迅速かつ正確な検出が求められる。*C. difficile* toxin の検査法は細胞培養法を用いた toxin B 活性を検出する細胞毒性試験、本検討で比較対照法とした培養法、糞便中の toxin を検出する核酸増幅検査、そして、多くの施設で用いられてる IC 法がある。細胞毒性試験は、感度・特異度ともに秀でた方法であり、CDI 診断の gold standard として位置づけられるが、測定手技が煩雑であるため、検査室では実施されていないのが現状である。核酸増幅検査は簡便で迅速であるが、コストが高い点、専用機器を必要とする点に問題がある。培養法、IC 法はともにコスト面では比較的安価であるが培養法は結果判定までに時間を要し、IC 法は toxin 検出の感度が低いことが指摘されている。本検討でも IC 法・toxin A/B と培養法・toxin A/B の陽性一致率は 22.9% であり、IC 法・toxin A/B の感度は不十分であることが確認された。培養法は CCMA 培地 EX で増菌してから IC 法で検査をするため、培養法・toxin A/B 陽性で IC 法・toxin A/B 陰性の 27 検体は菌量が少なく、偽陰性になったと推測したが、培養法・toxin A/B 陽性の 35 検体で IC 法・toxin A/B 陰性と IC 法・toxin A/B 陽性の検体から分離された *C. difficile* の菌量で有意差はみられなかったことから、菌量以外の毒素産生量などの要因が IC 法・toxin A/B 偽陰性の原因と考えられた。また、今回、IC 法・toxin

Table 5. Susceptibility of all *C. difficile* isolates to 5 antimicrobials

Antimicrobial agent	No. of strains	MIC: $\mu\text{g}/\text{mL}$			Susceptibilities (%)			Reference
		MIC range	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	CLSI	EUCAST	EMA	
PCG <sup>a)</sup>	35	0.5-8	2	4	11.4	—	—	Our data 5)
	157	1-8	4	4	—	—	—	
TAZ/PIPC <sup>b)</sup>	35	0.25-8	2	8	100	—	—	Our data 5)
	157	1-32	8	16	—	—	—	
MNZ <sup>c)</sup>	35	0.5-2	0.5	2	100	100	—	Our data 6) 7)
	100	0.12-1	0.25	0.5	—	—	—	
	208	0.25-4	0.5	1	—	—	—	
VCM <sup>d)</sup>	35	0.5-2	0.5	1	—	100	—	Our data 6) 7)
	100	0.5-1	0.5	0.5	—	—	—	
	208	0.5-4	0.5	1	—	—	—	
FDX <sup>e)</sup>	35	0.03-0.25	0.12	0.12	—	—	100	Our data 6) 7)
	100	0.03-0.5	0.12	0.25	—	—	—	
	208	0.06-1	0.25	0.5	—	—	—	

<sup>a)</sup> PCG: penicillin G

<sup>b)</sup> TAZ/PIPC: tazobactam/piperacillin

<sup>c)</sup> MNZ: metronidazole

<sup>d)</sup> VCM: vancomycin

<sup>e)</sup> FDX: fidaxomicin

A/B 陽性, 培養法・toxin A/B 陰性を示した症例が1検体みられ, 原因として toxin 非産生株を含む複数株の *C. difficile* の存在が考えられたが詳細は不明であった。腸管洗浄剤による IC 法・toxin の偽陽性の報告<sup>15)</sup>もあるが, 今回の症例では, 使用されていない。一方, IC 法・GDH は培養法・GDH と陽性一致率, 陰性一致率, 全体一致率, 陽性的中率, 陰性的中率で高い一致率を示し, IC 法・GDH の結果から糞便中 *C. difficile* の存在を的確に診断することができた。少数ではあるが IC 法 GDH 陰性, 培養法・GDH 陽性が4検体みられ, そのうち2検体は toxin 産生株であり, IC 法・GDH 陽性の場合のみ培養法を追加している施設は toxin 産生株を見逃す可能性があり, IC 法 GDH 陰性であっても臨床症状も合わせて判断する必要がある。

『Clostridioides (*Clostridium*) *difficile* 感染症診療ガイドライン<sup>8)</sup>』における CDI の定義は CDI 検査にて糞便中のトキシンが陽性もしくはトキシン産生性の *C. difficile* を分離することであり, 本検討では *C. difficile* と同定された内の 30% が毒素非産生株であるため, 分離培養にて *C. difficile* を検出した場合, toxin 産生性の確認が必要になる。2016 年に IC 法と培養法を組み合わせたアルゴリズムが報告<sup>16)</sup>されており, IC 法・GDH 陽性で IC 法・toxin A/B が陰性の場合, 培養法を追加することが推奨されている。本検討の結果からも IC 法のみによる

toxin A/B の検出では感度が低く CDI を見逃す可能性があるため, 培養法, さらに *C. difficile* が分離された際には toxin 産生性の確認を行う必要性を確認できた。

毒素産生性について原ら<sup>17)</sup>, 中川ら<sup>1)</sup>の本邦におけるデータ, Salazar ら<sup>18)</sup>のコロンビアにおけるデータと比較し, A-B+株が当院では比較的高い傾向にあった。A-B+株が多い理由として, 医療機関や地域性による違いが考えられるが, 北海道地区の報告がなく比較することができなかった。また, 今回の調査で binary toxin 産生遺伝子保有株は1株検出されたものの, *tcdC* のシーケンス解析の結果, 部分欠失を認めなかった。Kilic ら<sup>19)</sup>の米国におけるデータと比べ, Iwashima ら<sup>2)</sup>の本邦におけるデータでは binary toxin 遺伝子の分離頻度は少ない傾向がみられた。北米を中心にアウトブレイクした強毒株 BI/NAP1/027 株は, *tcdC* 遺伝子に変異があり toxin A および B の産生亢進が確認されている。本検討では遺伝子型別を実施していないため BI/NAP1/027 か否かを判別はできないが, 近年では, 動物や食事から毒素過剰産生株の体内への取り込みが懸念されている。したがって, *C. difficile* の培養検査, toxin A, toxin B および binary toxin 産生遺伝子の保有状況, 毒素過剰産生株の疫学的調査は, 地域や施設の現状を知るうえで今後も実施する必要があると考えられた。

FDX は、本邦において 2018 年 7 月より製造承認され、RNA ポリメラーゼ阻害作用を有する新規抗菌薬である。そして、抗菌スペクトルが狭いため、正常な腸内細菌叢を攪乱しにくい、*C. difficile* の芽胞形成および toxin 産生を阻害するという特性をもっている。CDI の治療で非重症例は MNZ、重症例は VCM、再発例は VCM か FDX、難治例は FDX が第一選択薬として推奨されている<sup>8)</sup>。本検討では第一選択薬となっている 3 薬剤に対して耐性株はみられず、既報<sup>5-7)</sup>と比較して VCM、FDX は同等であったが、MNZ の MIC<sub>90</sub> は若干高い傾向がみられた。Karlowsky ら<sup>7)</sup>の報告では MNZ、VCM から耐性株が検出されていたが、当院で分離された株は PCG 以外の薬剤はすべての株で感性的であった。将来的に MNZ や VCM 耐性株が本邦で分離されることが予想されるため、検査が可能な施設を中心に継続的に今後も観察する必要がある。FDX の MIC range, MIC<sub>50</sub>, および MIC<sub>90</sub> が他の薬剤に比べて最小値を示したことについては本邦ではまだ承認されたばかりで使用されておらず、選択圧がかかっていないことが理由として考えられる。

#### おわりに

以上より、当院の検体で IC 法を用いた毒素産生性 *C. difficile* の検出能を評価したが感度は十分とはいえない。現状では GDH を同時に検出する IC 法を使用し、培養法を組み合わせることが CDI 診断検査の向上につながることを示唆された。しかし、培養で分離したコロニーから IC 法を実施することは保険適用外であること、検査手技が添付文書に記載されていないため検査法により結果がばらつく可能性があることから、導入する際には各施設で培養法の追加基準や学会より提言されているガイドラインなどを参考に検査法を検討することが重要である。今回の調査では毒素過剰産生株や第一選択薬に対して耐性株はみられなかったが、今後も *C. difficile* 感染症の疫学が変化する可能性があるため、サーベイランスを継続することが重要であると考えられた。

本論文は第 67 回日本化学療法学会総会にて発表し、座長より投稿の推薦を受けたものである。

利益相反自己申告：高橋 聡は、第一三共株式会社から講演料を、アボットジャパン株式会社から受

託研究費を、株式会社シノテストから奨学寄付金を受けている。

#### 文献

- 1) 中川莉彩, 飯沼由嗣, 山本正樹, 松村康史, 白野倫徳, 松島 晶, 他: *Clostridium difficile* トキシン迅速検査キットの評価と微生物学的検討。感染症誌 2010; 84: 147-52
- 2) Iwashima Y, Nakamura A, Kato H, Kato H, Wakimoto Y, Wakiyama N, et al: A retrospective study of the epidemiology of *Clostridium difficile* infection at a University Hospital in Japan: genotypic features of the isolates and clinical characteristics of the patients. J Infect Chemother 2010; 16: 329-33
- 3) Kato H, Kato H, Ito Y, Akahane T, Izumida S, Yokoyama T, et al: Typing of *Clostridium difficile* isolates endemic in Japan by sequencing of *slpA* and its application to direct typing. J Med Microbiol 2010; 59: 556-62
- 4) Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, twenty-seventh informational supplement. CLSI document M100-S27, CLSI, Wayne, PA. 2017
- 5) Kunishima H, Chiba J, Saito M, Honda Y, Kaku M: Antimicrobial susceptibilities of *Clostridium difficile* isolated in Japan. J Infect Chemother 2013; 19: 360-2
- 6) Yamagishi Y, Nishiyama N, Koizumi Y, Matsukawa Y, Suematsu H, Hagihara M, et al: Antimicrobial activity of fidaxomicin against *Clostridium difficile* clinical isolates in Aichi area in Japan. J Infect Chemother 2017; 23: 724-6
- 7) Karlowsky J A, Laing N M, Zhanel G G: In vitro activity of OPT-80 tested against clinical isolates of toxin-producing *Clostridium difficile*. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52: 4163-5
- 8) CDI 診療ガイドライン作成委員会 編: *Clostridioides (Clostridium) difficile* 感染症診療ガイドライン, 日本化学療法学会, 日本感染症学会, 東京, 2018; 22-4
- 9) 日本臨床微生物学会: 腸管感染症検査ガイドライン。日臨微生物誌 2010; 20 (Suppl): 29-32
- 10) Kato H, Yokoyama T, Kato H, Arakawa Y: Rapid and simple method for detecting the toxin B gene of *Clostridium difficile* in stool specimens by loop-mediated isothermal amplification. J Clin Microbiol 2005; 43: 6108-12
- 11) Stubbs S, Rupnik M, Gibert M, Brazier J, Duerden B, Popoff M: Production of actin-specific ADP-ribosyltransferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile*. FEMS Microbiol Lett 2000; 186: 307-12
- 12) Spigaglia P, Mastrantonio P: Molecular analysis of the pathogenicity locus and polymorphism in the putative negative regulator of toxin production (TcdC) among *Clostridium difficile* clinical isolates. J Clin Microbiol 2002; 40: 3470-5
- 13) European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing: Breakpoint tables for interpre-

- tation of MICs and zone diameters Version 9.0, 2019
- 14) An agency of the European Union: Assessment report Dificlir fidaxomicin: European Medicines Agency, London, 2011
  - 15) 和泉彬彦, 大河原愛, 杉山嘉史, 原田ひろみ, 杵淵雅彦, 廣瀬春香, 他: 経口腸管洗浄剤が *Clostridium difficile* Toxin 検出キットに与える影響。医学検査 2014; 63: 288-93
  - 16) Crobach M J, Planche T, Eckert C, Barbut F, Terveer E M, Dekkers O M, et al: European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the diagnostic guidance document for *Clostridium difficile* infection. Clin Microbiol Infect 2016; 22 (Suppl 4): S63-81
  - 17) 原 稔典, 古霜麻紀, 小野寺一, 木場由美子, 長岡里枝, 大毛宏喜, 他: 当院で分離された *Clostridium difficile* における Binary toxin 産生遺伝子保有状況。医学検査 2015; 64: 242-6
  - 18) Salazar C L, Reyes C, Atehortua S, Sierra P, Correa M M, Paredes-Sabja D, et al: Molecular, microbiological and clinical characterization of *Clostridium difficile* isolates from tertiary care hospitals in Colombia. PLoS One 2017; 12: e0184689
  - 19) Kilic A, Alam M J, Tisdell N L, Shah D N, Yapar M, Lasco T M, et al: Multiplex Real-Time PCR Method for Simultaneous Identification and Toxigenic Type Characterization of *Clostridium difficile* From Stool Samples. Ann Lab Med 2015; 35: 306-13

## Evaluation of methods of detection and antimicrobial susceptibility of *Clostridioides difficile* isolates in Sapporo, Japan

Yuki Sato<sup>1)</sup>, Masaaki Shinagawa<sup>1)</sup>, Shinya Nirasawa<sup>1)</sup>, Masachika Saeki<sup>1)</sup>,  
Yuki Yakuwa<sup>1)</sup>, Makito Tanaka<sup>1)</sup>, Nozomi Yanagihara<sup>1,2)</sup> and Satoshi Takahashi<sup>1,2)</sup>

<sup>1)</sup> Division of Laboratory Diagnosis, Sapporo Medical University Hospital, 291 South-1, West-16 Chuo-ku, Sapporo, Hokkaido, Japan

<sup>2)</sup> Department of Infection Control and Laboratory Medicine, Sapporo Medical University School of Medicine

An immunochromatography (IC) assay is widely used for detection of toxigenic *Clostridioides difficile*. There are few reports on the frequency of *C. difficile* binary toxin-producing strains and hypervirulent strains. Antimicrobial susceptibility has not been performed in most facilities. We evaluated the detectability of toxigenic *C. difficile* with the IC assay kit “*C. DIFF* QUIK CHEK COMPLETE.” Additionally, we investigated the toxigenicity and antimicrobial susceptibility in clinical *C. difficile* strains. Two hundred eighty-five fecal samples were collected from patients suspected as having antibiotic-associated diarrhea between February 2015 and July 2016. *C. difficile* was detected in 50 samples (17.5%) with selective anaerobic culture. Of 50 *C. difficile* strains, 35 (70.0%) were positive for toxin A/B. The specific PCR for toxin genes (*tcdA*, *tcdB*, *cdtA* and *cdtB*) showed 21 (42.0%) of toxin A+B+, 14 (28.0%) of A-B+ and 15 (30.0%) of toxin A-B-. The bacterial concentrations in 50 samples ranged from  $1.0 \times 10^1$  to  $3.0 \times 10^6$  colony forming units per milliliter. The positive and negative concordance rate between the IC assay and toxigenic culture were 22.9% and 99.6%, respectively. Only 1 strain possessed a binary toxin gene. No strains suspected as having a hypervirulent lineage were observed. Fidaxomicin (FDX) had the lowest value of MIC<sub>90</sub> (0.12 μg/mL) compared to 4 antimicrobial agents [penicillin G, tazobactam/piperacillin, metronidazole (MNZ) and vancomycin (VCM)]. In conclusion, the IC assay is simple and rapid, but has insufficient sensitivity for toxin detection. Therefore, the combination of this assay and other examination tests would improve the diagnostic accuracy in *C. difficile* infections. To monitor those strains showing hypervirulence and demonstrating antimicrobial resistance to therapeutic agents like MNZ, VCM and FDX, continuous surveillance is needed.