



Title	日本におけるClostridium difficile関連下痢症の疫学的解析ならびに細菌学的検査診断法の諸問題に関する研究
Author(s)	豊川, 真弘
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49820
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

【3】

氏 名	とよ かわ まさ ひろ 豊 川 真 弘
博士の専攻分野の名称	博 士（保健学）
学 位 記 番 号	第 2 2 4 6 8 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 20 年 9 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科保健学専攻
学 位 論 文 名	日本における <i>Clostridium difficile</i> 関連下痢症の疫学的解析ならびに 細菌学的検査診断法の諸問題に関する研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 山本 容正 (副査) 教 授 稲垣 忍 教 授 三善 英知

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

日本における *C. difficile* 関連下痢症の疫学的解析を行う目的で、遠く離れた2病院（大阪，東京）においてCDAD患者より分離された *C. difficile* 菌株を対象にtoxin産生性ならびに菌株型（遺伝子型）の解析を行った。さらに、toxin A&B検出試薬の日本への導入（厚生労働省承認申請）を目的に、新たに開発されたtoxin A&B検出試薬の臨床性能評価を、標準法である cytotoxicity assayならびに従来法であるtoxin A抗原検出法と比較することにより行った。

【日本における *Clostridium difficile* 関連下痢症由来菌株の疫学的解析】

1. 材料および方法

1) 材料

2003年6月から2006年7月までに大阪大学医学部附属病院（病院A）臨床検査部において分離された99株（総検体数865検体）、ならびに2005年4月から10月までに東京都老人医療センター（病院B）・臨床検査部において分離された97株（総検体数220検体）を対象とした。

2) 方法

PCR法による毒素産生遺伝子（*tcdA*, *tcdB*, *cdtA/B*）の検出ならびにPCR ribotyping（一部はPFGE法も実施）を実施した。なお、Binary toxin遺伝子（*cdtA/B*）保有株については、*tcdC*遺伝子のシークエンシングを併せて実施した。

1. 結果

1) 2 病院における毒素産生株に占める A'B'株の割合はそれぞれ 18.6%（病院 A）および 16.4%（病院 B）であった。これら 2 病院より分離された A'B'株の 94.7%（18/19）は PCR ribotyping にて同一タイプ（ribotype z）と判定され、PFGE 法では 5 つのサブタイプに分類された。

2) 病院 A および B とともに同一 ribotype 型菌（PCR ribotype smz）が最も優勢（それぞれ 27.9%，59.7

%)に検出されており、次いで多く検出された ribotype は 2 病院ともに ribotype z (A'B'株)であった。
 3) *cdtA/B* は病院 A 由来株 1 株 (0.2%) のみが保有していた。なお、この 1 株の *tdcC* 遺伝子のシーケンシングを実施したところ、NAP1/027 株にみられる遺伝子変異は認められなかった。

3. 結論

1) A'B'変異株はすでに日本国内に広く存在しており、主要な院内感染原因菌のひとつであると考えられた。また、これら A'B'変異株の多くは同一の遺伝子型であったことから、共通の菌株が伝播したものと推察された。A'B'株による CDAD は日本で用いられてきた糞便中 toxin A 抗原検出法では検出できないことから、toxin B を検出可能な検査法を早急に導入する必要がある。
 2) 日本では少なくとも 1990 年代後半以降、単一 ribotype 型菌 (PCR ribotype smz;A'B'株) による流行が続いているものと考えられた。この PCR ribotype smz は米国における流行株とは異なる ribotype であった。
 3) 今回の検討では欧米諸国において大きな問題となっている current NAP1/027 株は検出されなかった。しかし、すでに国内の病院において histric BI/NAP1 株の存在が確認されており、今後、日本においても current NAP1/027 株が出現する可能性が高いことから、国レベルでのサーベイランスの実施が強く望まれた。

【CDADの迅速診断における糞便中toxin Aおよびtoxin B同時検出キットの有用性に関する検討】

1. 材料および方法

1) 材料

2005年5月から10月までの5ヶ月間に、東京都老人医療センター・研究検査科に*C. difficile*検査を目的に提出された糞便検体のなかで本実験への使用に関して文書にて患者同意が得られた146検体 (患者総数117名, 年齢62~105歳, 平均81.1歳) を対象とした。

2) 方法

糞便中toxin Aおよびtoxin B同時検出キットであるImmunoCard Toxin A&Bを用いて、toxin A検出キットであるUniquickならびに標準法であるcytotoxicity assayとの比較検討を行った。また、糞便からの*C. difficile*分離培養を併せて実施し、分離菌株のtoxin産生型をPCR法によるtoxin遺伝子検出により同定した。

2. 結果

1) Cytotoxicity assayを対照とした場合のImmunoCard Toxin A&Bのsensitivity, specificity, positive predictive valueおよびnegative predictive valueはそれぞれ86.2%, 93.8%, 91.8%および89.4%であり、Uniquick (60.0%, 97.5%, 95.1%および75.2%) に比べ検出感度が有意 (p=0.0016) に向上していた。
 2) Cytotoxicity assay陽性でA'B'株が分離された糞便におけるImmunoCard Toxin A&Bの陽性率は90.6% (Uniquick:67.9%, p=0.008), 一方、A'B'株が分離された糞便におけるImmunoCard Toxin A&Bの陽性率は70.0%であった。
 3) Cytotoxicity assayにおいて、toxin活性が認められたにもかかわらず抗*C. difficile* toxin B中和抗体による中和が認められなかった検体が12症例13検体あり、これらはいずれも*C.perfringens* enterotoxin に対する抗体にて中和されたことより、enterotoxin 産生*C.perfringens*による下痢症と考えられた。

2. 結論

1) 日本で使用されてきた糞便中 toxin A 抗原検出法 (Uniquick) は cytotoxicity assay に比べ検出感度が極めて低かった (陽性率: 60.0%)。これは、糞便中 toxin A 抗原検出法は A'B'株による CDAD を検出できないことに加え、A'B'株による CDAD であっても検出感度が低いことに起因した。これらの結果は、日本においてはこれまで多くの症例において正しい検査診断がなされていなかったことを示すものである。
 2) 新たに開発された糞便中 toxin A および B 同時検出キット (Immunocard Toxin A&B) は糞便中 toxin A 抗原検出法 (Uniquick) よりも CDAD 診断における検出感度が極めて高かった。これは、ImmunoCard Toxin A&B は A'B'による CDAD の細菌学的診断が可能となったことに加え、A'B'による CDAD における陽性率も有意に向上したことに起因した。ただし、残念ながら ImmunoCard A&B は A'B'による CDAD においては検出感度が不十分 (陽性率: 70.0%) であることから、必要に応じて分離培養法を併せて実施することが望ましいと思われた。
 3) Enterotoxin 産生 *C.perfringens* は、toxin 産生 *C. difficile* とともに、高齢者 AAD における重要な

原因菌であると考えられた。今後、AAD における enterotoxin 産生 *C.perfringens* の病原的意義が明らかにされるとともに、検査室レベルでも実施可能な細菌学的検査診断法の確立が望まれた。

論文審査の結果の要旨

本研究は、日本における*Clostridium difficile* 関連下痢症 (CDAD) の疫学的解析を行う目的で、遠く離れた2病院 (大阪, 東京) においてCDAD患者より分離した*C. difficile* 菌株を対象にtoxin産生性ならびに菌株型 (遺伝子型) の解析を行ったものである。その結果、日本国内では欧米流行株とは異なる菌株 (PCR ribotype smz) による流行が明らかとなり、さらに、日本においてはトキシンAを産生せずトキシンBのみを産生する変異株 (A-B+変異株, PCR ribotype z) もまた主要な流行型のひとつであることが明らかとなった。A-B+株によるCDADは国内で用いられてきた糞便中トキシンA抗原検出法では検出できないことから、日本においてもトキシンBの検出が可能な検査法を早急に導入する必要性が本研究において指摘された。

そこで、トキシンA&B検出試薬の日本への導入 (厚生労働省承認申請) を目的に、新たに開発された糞便中トキシンA&B抗原検出試薬 (Immunocard Toxin A&B) の臨床性能評価も本研究で検討した。その結果、Immunocard Toxin A&Bは、標準法であるcytotoxicity assayに比べると検出感度は劣る (A+B+株によるCDAD:陽性率90.6%, A-B+株によるCDAD:陽性率70.0%)ものの、従来法であるトキシンA抗原検出法よりも検出感度が有意に向上 (86.2% v.s. 60.0%, p=0.0016) していることが明らかとなった。

さらに、本研究を通して、エンテロトキシン産生*Clostridium perfringens* は、トキシン産生*C. difficile* とともに高齢者下痢症における重要な原因菌であることが明らかとなった。

以上のことより、本論文は博士 (保健学) の学位授与に値するものと考えられる。