

破傷風患者の病原体診断目的で開発した ELISA 法と破傷風菌の毒素産生能への応用

◎志多田 千恵¹⁾、坂本 智代美¹⁾、高橋 元秀¹⁾、久米田 幸介²⁾
熊本保健科学大学¹⁾、KM バイオロジクス株式会社²⁾

【目的】国内の破傷風患者数は例年約 120 名と報告されているが、起因菌である *Clostridium tetani* は土壤中に芽胞として存在しており、日常の生活環境で破傷風菌の感染リスクがあることを意識する人は少ない。我々は既に、熊本県内の土壤中の破傷風菌の分布調査をおこない、科学的に感染リスクを再確認している。一方で、分離した破傷風菌の同定は実験動物（マウス）を利用して毒素活性（麻痺・致死）を試験する方法が一般的である。我々は毒素定量を目的に ELISA 法の開発を進めており、本研究では本 ELISA 法を実験動物法と比較することにより、本法の実験動物を用いない試験法への転換の可能性を検討した。【方法】開発した ELISA 法は、1 ステップ・サンドウィッチ法で、純度の破傷風特異抗体をプレートに固相化し、HRP 標識破傷風抗体とあらかじめ任意に希釈した標準毒素液（活性既知）および検体毒素（活性未知）を同時に添加・混合し、37°C 2 時間反応させた。基質として TMB を添加し、37°C 30 分間静置後、1M 硫酸を添加して反応を停止し 2 波長（450 nm、620 nm）で吸

光度を測定し、標準液と検体毒素の用量反応曲線から平行線定量法により検体毒素の相対値を算出した。検体は、県内の土壌から分離した破傷風菌 166 株を BHI 培地に 37°C 96 時間培養した上清で、この毒素量を上記 ELISA で測定した。【結果】開発した ELISA 法で標準毒素液を 2 倍階段希釈して得られた結果、マウスの致死活性相当では 800~6000 LD₅₀ の範囲で測定可能であった。分離した 166 株の破傷風菌の培養上清を ELISA 法とマウス法と比較した結果は、それぞれ高値、中程度、低値の菌株に分類された。【考察】破傷風毒素活性試験としてマウス法から開発した ELISA 法への転換が可能と考えられた。感染患者から破傷風菌が分離されない場合には他の病原体診断が求められる。感染部のデブリドマン後の材料等には破傷風菌増殖に伴う毒素が混入する可能性が高い。これらの患者検体から破傷風毒素を検出することは臨床診断の一助となる。この開発した ELISA 法を基礎として、さらに迅速な方法であるイムノクロマト法の開発も進めている。 連絡先 096-275-2271

Clostridioides difficile 核酸キット「スマートジーン CD トキシン B」の性能評価

◎横尾 篤美¹⁾、塚本 のはら¹⁾、成田 妙子¹⁾、弥永 正子¹⁾、中島 久恵¹⁾、船島 由美子²⁾、永沢 善三²⁾
医療法人社団 高邦会 高木病院¹⁾、国際医療福祉大学 福岡保健医療学部²⁾

【はじめに】*Clostridioides difficile* (*C. difficile*) は医療関連感染の原因菌として最も多くみられる嫌気性菌であり、下痢症や偽膜性腸炎などの *C. difficile* 感染症 (CDI) を示す。本邦の CDI の検査は、イムノクロマト法を原理とした迅速診断キット (*C. difficile* 特異抗原 ; GDH・トキシン検査) が広く使用されているが、トキシン感度が低いことから、GDH 陽性・トキシン陰性の場合には核酸増幅検査 (Nucleic Acid Amplification test ; NAAT) もしくは Toxigenic culture (TC) により毒素産生性を確認する必要がある。今回、我々は迅速診断キットの抽出液残試料を用いて *C. difficile* の NAAT が可能な「スマートジーン CD トキシン B」 (株式会社ミズホメディール) について評価を行ったので報告する。

【方法】2019年5月から2020年10月の期間に提出された CDI 疑いの残余糞便 157 検体を対象とした。便検体を用いて迅速診断キット「クイックチェイサー CD GDH/TOX」の測定を行い、このキットの抽出液残試料を用いて「スマートジーン CD トキシン B」の測定を行

った。対照は別法の NAAT として、同じ試料を用いてリアルタイム PCR を行った。また、便培養を行い質量分析計 (MALDI Biotyper) で *C. difficile* が同定された 97 検体について TC を行った。

【結果】「スマートジーン CD トキシン B」の成績は、リアルタイム PCR に対して感度 100% (81/81)、特異度 100% (76/76)、TC に対して感度 89.8% (79/88)、特異度 97.1% (67/69) であった。

【考察】「スマートジーン CD トキシン B」は、リアルタイム PCR および TC と高い一致率を示した。本キットは迅速診断キットの抽出液残試料を用いて短時間で簡便な NAAT が可能であり、GDH 陽性・トキシン陰性となった場合の NAAT として使用性も高く、CDI 診療や院内感染対策に有用であると考えられた。

なお、本評価は国際医療福祉大学倫理委員会 (No. 19-1fh-008) 及び高邦会高木病院倫理審査委員会 (362) の承認を得て実施した。

(連絡先 : 0944-88-8283)

Cobas Liat の当院における性能評価

◎野邊 紗耶香¹⁾、小濱 祐行¹⁾、中村 政敏¹⁾、政元 いずみ¹⁾、山口 宗一¹⁾、橋口 照人¹⁾
鹿児島大学病院 検査部¹⁾

【はじめに】新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) 感染症 (COVID-19)は、世界的な流行拡大が続いている。

COVID-19 の診断として行われている SARS-CoV-2 核酸増幅検査には、多数の検査機器、試薬が存在する。今回、新規に導入した Cobas Liat (ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社) において、ウイルス輸送培地 (以下 VTM) として、スギヤマゲン社 (以下 SVTM) とグライナー社 (以下 GVTM) をそれぞれ使用し、同時に現行法との最小検出感度の比較検討を行ったので報告する。

【対象および方法】被検対象として SVTM および GVTM それぞれに陽性コントロール(2019-nCoV Positive Control; Integrated DNA Technologies CO., Ltd.)を懸濁させ、100 copies/mL, 50 copies/mL, 25 copies/mL, 12.5 copies/mL となるよう段階希釈を行い、比較用検体を作成した。これら段階希釈した模擬検体は、Cobas Liat (以下 C法) と BD マックス(Becton, Dickinson and Company.) で核酸抽出を行い、SARS-CoV-2 Detection Kit -Multi- (TOYOBO CO., Ltd.) 試薬を用いて QuantStudio5 (Thermo Fisher

Scientific Co. 以下 Q法) にてそれぞれ測定した。

【結果】陽性コントロールを用いた最小検出濃度は、C法では 100 copies/mL であり、添付文書の最小検出濃度である 12.0 copies/mL を超える結果となった。Q法では 12.5 copies/mL であった。また、SVTM および GVTM での比較検討結果は、同様の結果が得られ、VTM による差は認めなかった。

【考察】添付文書の最小検出濃度である C法における 12.0 copies/mL について、考察を行ったところ、検証に使用している陽性コントロールと VTM の種類がそれぞれ異なっていることが原因であり、我々の検証結果である 100 copies/mL は、感度が高い点から臨床上の測定において、問題はないと考えられた。

【結語】Cobas Liat における SARS-CoV-2 核酸増幅検査は、本検討において高い臨床性能を有することが示唆された。
連絡先：099-275-5561

血液学検査用採血管を用いた EDTA-modified Carbapenem Inactivation Method の検討

◎坂梨 大輔¹⁾、川本 柚香¹⁾、宮崎 成美¹⁾、大野 智子¹⁾、山田 敦子¹⁾、中村 明子¹⁾、太田 浩敏¹⁾、三嶋 廣繁¹⁾
愛知医科大学病院¹⁾

【目的】Metallo β -lactamase (MBL)産生菌の鑑別法である EDTA-modified Carbapenem Inactivation Method (eCIM)について、EDTA 溶液の代用として血液学検査用採血管が利用可能か検討した。

【対象と方法】遺伝子解析にて MBL 保有が確認された 33 株；IMP-unsequenced：1 株、IMP-1：10 株、IMP-6：16 株、NDM：5 株、VIM：1 株および Serine 型 carbapenemase 保有が確認された 10 株；IMI/NMC：1 株、KPC：3 株、OXA-48：6 株を対象とし、CLSI M100 S-28 に基づいた EDTA 5-mM eCIM (CLSI-eCIM)と血液学検査用採血管 (ISO 6710 準拠；EDTA 4.11~6.84 mM)を用いた eCIM；BD Vacutainer EDTA Tube 2 mL (BD-eCIM)および極東 EDTA-2K Insepack II-D 2-mL tube (極東-eCIM)を比較した。

【結果】各 eCIM の MBL 鑑別性能は CLSI-eCIM (感度 61%、特異度 80%)、BD-eCIM (感度 82%、特異度 90%)および極東-eCIM (感度 85%、特異度 70%)であった。CLSI-eCIM では IMP-1 産生菌 1 株と IMP-6 産生菌 12 株、BD-

eCIM では IMP-6 産生菌 6 株および極東-eCIM では IMP-6 産生菌 5 株がそれぞれ偽陰性となった；IMP-6 産生菌を除いた各 eCIM の感度は CLSI-eCIM で 94%、BD-eCIM および極東-eCIM で 100%であった。また、Serine 型 carbapenemase 産生菌 10 株のうち CLSI-eCIM と BD-eCIM では OXA-48 型産生菌 2 株、極東-eCIM では OXA-48 型産生菌 3 株がマイクロコロニーの発育を伴う阻止円拡大を認め陽性と判定された (偽陽性)。

【考察】本検討では BD-eCIM、極東-eCIM とともに CLSI-eCIM より高い感度を示し、BD-eCIM は特異度も CLSI-eCIM より良好な成績であった。従って、eCIM は血液学検査用採血管を代用して実施可能であることが示唆された。ただし、各 eCIM とともに IMP-6 産生菌の検出感度が低い傾向にあったことから、実施に当たっては地域疫学を考慮することが必要と考えられた。また、阻止円内にマイクロコロニーが認められた場合は別法にて精査することが望ましいと考えられた。

連絡先：0561-62-3311 (内線 35823)