

馬の *Clostridioides difficile* 感染症について上野孝範[†] (特)日本中央競馬会 競走馬総合研究所 微生物研究室 研究役)

1 はじめに

馬は巨大な盲腸や結腸で繊維成分の発酵を行ってエネルギーとして利用する後腸発酵動物である。成馬で容積100lに及ぶ後腸内には多種多様な細菌が棲息し、腸内細菌叢を形成している。正常な腸内細菌の構成叢は、ストレス、食餌や環境の変化、輸送、運動、抗菌薬処置などの影響を受けると変化することがあり、この結果、通常は低い菌数に抑えられている病原細菌が異常増殖する場合がある。その一つである *Clostridioides difficile* (*C. difficile*: 2016年秋に *Clostridium difficile* は再分類され属名が変更された [1, 2]) は、産生毒素により消化管粘膜を傷害し、下痢や腸炎を引き起こす。甚急性かつ重篤な経過をたどるものも多く、また芽胞菌であるため、診療施設や飼養環境への汚染も問題となっている。本稿では、日本中央競馬会 (JRA) 附属診療施設で経験した症例をふまえて、馬における *C. difficile* 感染症の概要を紹介する。

2 病原体

C. difficile は垂端在性楕円形の芽胞を形成する偏性嫌気性グラム陽性桿菌であり、土壌、干し草、砂などの自然環境やヒト、動物の腸管に棲息する。活動型菌体である栄養型細胞は、酸素存在下で容易に死滅するが、耐久型細胞である芽胞は非常に強い環境抵抗性を有しており、大気環境下でも長期にわたり休眠状態で生存が可能である [3]。

C. difficile は毒素産生株と非産生株に分けられ、消化管における病原性には、前者が産生する Toxin A (TcdA) と Toxin B (TcdB) が関わっている [4]。TcdA と TcdB は細胞内でグリコシルトランスフェラーゼとして作用し、細胞骨格の制御に関与する Rho ファミリー低分子量 G タンパク質を修飾または非活性化することにより、アクチン重合や転写活性、アポトーシス誘導などに影響を及ぼす。Rho ファミリー低分子量 G タンパク質は上皮細胞間をつなぐタイトジャンクション

の維持にも関与しているため、毒素によるタイトジャンクション傷害の結果、腸管上皮のバリア機能の低下が生じる。さらに、好中球の浸潤、炎症性サイトカインの産生、活性酸素中間体の産生、肥満細胞の活性化なども誘導し、炎症反応による腸管上皮細胞の傷害を引き起こす。このほかに第3の毒素といわれる binary toxin (CDT) も存在し、人では病原性の強い強毒型で TcdA 及び TcdB とともに産生がみられる。この毒素は、アクチン細胞骨格の分解や表面構造の改築による細菌附着性の増強を誘導するとされている [5]。

3 疫学

消化管に感染した毒素産生性の *C. difficile* は下痢・腸炎の要因となるが、発症は正常腸内細菌叢の攪乱とこれに付随した *C. difficile* の異常増殖を契機とする。事実、*C. difficile* は無症状の健康馬からも分離されており、感染及び保菌が発症に直結するわけではない。6カ月齢以下の健康な子馬を対象とした調査では、7.5% (226頭中17頭) の糞便から *C. difficile* が分離されたが、これを14日齢以下に限ると分離率は29% (56頭中16頭) であった [6]。また、分離された15株のうち6株は毒素産生性であることが確認されており、無症候であっても病原性を有す *C. difficile* を保菌している可能性が示唆されている。一方、健康成馬における保菌率は低く、調査により差はあるもののおおむね10%以下である [6-9]。

C. difficile の異常増殖を招く腸内細菌叢の攪乱は、さまざまな要因により引き起こされるが、重要視されているのは抗菌薬の投与である。人において *C. difficile* は、抗菌薬関連下痢症の主要原因菌の一つとして知られているが、馬においても同様である。抗菌薬投与と疝痛・下痢発症への関与を調査した研究では、抗菌薬投与後に急性の疝痛を呈した成馬の42% (43頭中18頭) から *C. difficile* が分離されている [6]。また、消化器症状を伴わないものの、*Rhodococcus equi* 感染症の治療目的で抗菌薬 (エリスロマイシンあるいはゲンタマイ

[†] 連絡責任者: 上野孝範 (特)日本中央競馬会競走馬総合研究所微生物研究室)

〒329-0412 下野市柴1400-4 ☎0285-44-0090 FAX 0285-40-1064 E-mail: ueno@equinst.go.jp

表 JRA 診療施設における *C. difficile* 診断症例 (2010～2016 年)

発生年	下痢発症直前の医療処置と病態	抗菌薬全身投与	発症前入院	検出毒素	PCR ribotype	
2010	手術	変位疝	○	○	TcdA, TcdB, CDT	078
		第3中手骨々折	○	○	TcdA, TcdB, CDT	078
		角膜潰瘍	○	○	TcdA, TcdB, CDT	078
2011	手術	第1指骨々折	○	○	TcdA, TcdB, CDT	078
		変位疝	○	○	TcdA, TcdB, CDT	078
		変位疝	○	○	TcdA, TcdB, CDT	078
		去勢*	○	—	TcdA, TcdB	hnc08162
2012	手術	変位疝	○	○	TcdA, TcdB, CDT	078
		変位疝	○	○	TcdA, TcdB, CDT	078
	内科的治療	角膜潰瘍	○	○	TcdA, TcdB	014
		発熱	○	—	TcdA, TcdB	km0429
2013	手術	手根骨々折	○	—	TcdA, TcdB, CDT	rh13124
		変位疝	○	○	TcdA, TcdB, CDT	078
	内科的治療	蜂窩織炎	○	—	TcdA, TcdB	014
		蜂窩織炎	○	—	TcdA, TcdB, CDT	014
		輸送後発熱	○	—	TcdA, TcdB	014
		輸送後発熱	○	—	TcdA, TcdB	c056
		発熱	○	—	TcdA, TcdB	056
2014	手術	変位疝	○	○	TcdA, TcdB	c056
		第4中足骨々折	○	○	TcdA, TcdB	002
	内科的治療	蜂窩織炎	○	—	TcdA, TcdB	j41, 014
		肺炎	○	—	TcdB	017
2015	内科的治療	輸送後発熱	○	○	TcdB	017
		発熱, 下痢	○	—	TcdA, TcdB	不明
2016	手術	喉頭形成術*	○	○	TcdA, TcdB, CDT	078
	内科的治療	吸引性肺炎	○	○	TcdA, TcdB, CDT	078
				TcdB, CDT	078	

*: 手術の目的

シンとリファンピシリン)を投与された子馬の44%(16頭中7頭)からも *C. difficile* は分離されている。JRA 附属診療施設でも、2010～2016年の期間に診療を行った重篤な下痢・腸炎発症馬のうち27頭において毒素産生性 *C. difficile* の感染を確認しているが(表)、いずれも発症前に抗菌薬が投与されていた。ただし、ストレス、飼料の変化、輸送、手術なども腸内細菌叢の変化を招来する誘因であり[10]、下痢・腸炎発症馬は外科的手術や運動制限を伴う治療もあわせて施されていたことから、*C. difficile* が増殖した経緯は複合的であった可能性もある。

また、*C. difficile* 感染を原因とした下痢・腸炎を発症した馬による周囲環境の汚染も問題となっている。

C. difficile の芽胞は、アルコールや乾燥に対する抵抗性が高く、無機物表面では数カ月残存することから、汚染された環境が改善されない場合は他馬への感染が容易に起こり得ると考えられる。人において *C. difficile* の院内感染が問題となっているが、JRA 診療施設内においても *C. difficile* による重篤な下痢・腸炎が続発した時期があった。すべての症例(7例)が外科的手術と抗菌薬の投与を受けており、このうち6例は侵襲の多い手術であったため術後入院していた。多くの症例は術後3、4日目に疝痛症状や下痢が顕在化し、全症例の糞便からは毒素産生性の *C. difficile* が分離された。これら分離菌の遺伝子型別を rRNA の配列多型を基にしたサブタイプ分類法である PCR リボタイピング法により判定し



図1 緑色水様の大結腸内容



図2 小結腸粘膜表面における偽膜形成

たところ、全例が人で高病原性とされている 078 型であったことが明らかとなった。下痢・腸炎の発生時期は重複していなかったが、検出された遺伝子型が同一であったことから、診療・繋養環境へ残存した *C. difficile* からの感染を疑い、後項で述べる対策をとった。その結果、診療施設内外で散発的に *C. difficile* 感染を伴う下痢・腸炎は認められるものの、分離菌の遺伝子型は多様化し、078 型の割合も低下したことから、汚染環境を起因とした続発的な感染は抑制されているものと推測される。

4 臨床症状と病理所見

C. difficile 感染による下痢・腸炎の主要な臨床症状として、下痢、可視粘膜の充血、血液再充填時間の延長、発熱、頻脈、頻呼吸、脱水、痙痛、腹囲膨満などが認められる。重症例では、甚急性の水様ないし泥状の下痢や虚脱なども観察され、発症数日後に安楽死の判断がなされることもある。本疾患にのみ観察される特徴的な所見はなく、臨床症状のみで他の消化器感染症と区別することは困難である。また、臨床症状と同様に、剖検時あるいは組織鏡検時に認められる多くの病変も *C. difficile* 感染症に特有のものではなく、他の感染症や非感染性の消化器疾患でも観察されるさまざまな像を示す。ゆえに、臨床症状と病理所見から下痢・腸炎の原因が *C. difficile* であることを見抜くのは難しい。

C. difficile 感染症における消化管病変形成部位は、発症時の月齢により相違がみられる [11]。1 カ月齢以下の子馬は主として十二指腸から近位空腸に病変が認められ、これ以降の月齢・年齢では、大結腸及び盲腸に病変を形成する傾向がある。影響を受けた部位の漿膜面は、腸粘膜の出血あるいはうっ血を反映して、び慢性に赤色調や青色調を帯びており、漿膜下に多病巣性の出血

がみられる場合もある。消化管内には、若齢子馬では血色水様、このほかの年齢では緑色ないし淡褐色水様の内容を満たしていることが多い (図1)。小腸は管壁がやや肥厚し、粘膜面ではび慢性の発赤や黄土色ないしオレンジ色の偽膜が認められる。盲結腸壁は粘膜下の水腫あるいは出血により肥厚し、粘膜面は多病巣性ないしび慢性に緑色や赤色を呈す。粘膜上には黄褐色や明緑色の偽膜も時折観察される (図2)。消化管以外の臓器においては、粘膜バリアの損傷に伴うエンドトキシンショックや播種性血管内凝固症候群を起因とした、肺水腫や心内・外膜下出血などの変化が生じやすい。

組織学的には、び爛ないし潰瘍形成を伴った壊死性腸炎あるいは出血性壊死性腸炎の病態を呈す。主要な病変として、粘膜の凝固壊死、粘膜固有層や粘膜下組織における水腫・出血、粘膜固有層や粘膜下組織の中小血管における硝子血栓の形成があげられる (図3, 4)。またこの他に、粘膜固有層及び粘膜下組織浅層では好中球を主体とした軽度から中程度の細胞浸潤が、壊死粘膜表面では細胞屑や食渣を含む線維素塊の付着が認められることもある。人においてはフィブリンと好中球の滲出を伴う腸粘膜の局所的なび爛 (volcano lesion [12]) が *C. difficile* 感染症の特徴所見として知られているが、筆者らの経験上、馬において同様の組織病変を形成した症例はごくわずかである (図5)。われわれが剖検時に採取したサンプルは広範に粘膜が壊死・消失したものが多数であることから、初期病変と考えられる volcano lesion の形成時期以後の病変を観察しているものと推測している。

5 診断及び治療法

糞便あるいは腸内容からの *C. difficile* の分離には、芽胞がアルコール抵抗性を示すことを利用した選択処理

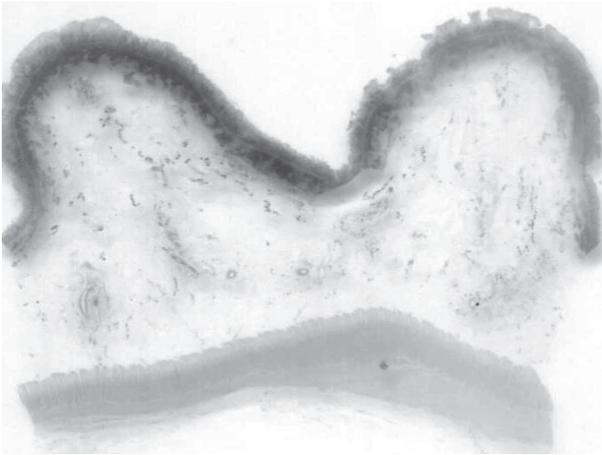


図3 大結腸粘膜下組織における水腫 (HE 染色)



図5 大結腸粘膜の“volcano lesion” (HE 染色)

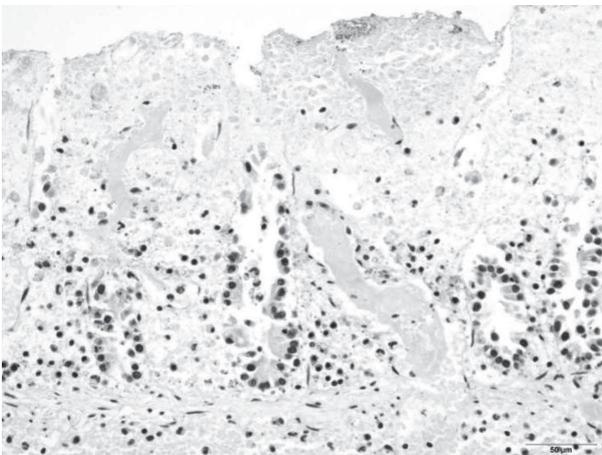


図4 大結腸粘膜表層の壊死 (HE 染色)

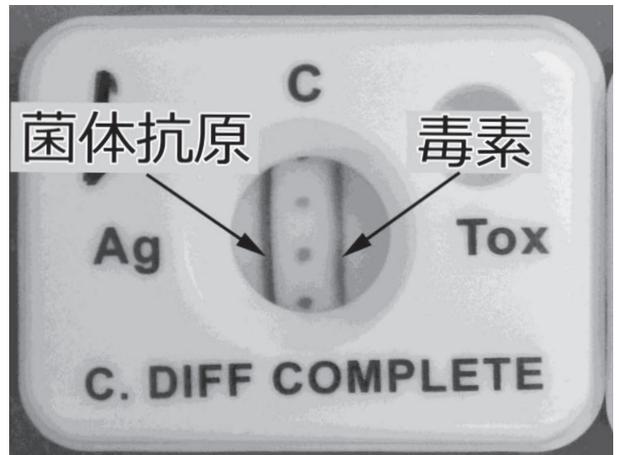


図6 *C. difficile* 簡易検査キット

(検体と 99%エタノールを等量混合後、室温で 30～60 分インキュベーション) が有用である [13]. この処理により、糞便や腸内容中の他の菌の発育を抑制することで分離率の上昇が期待できるとともに、培養後の釣菌が容易になる利点もある. 選択処理後、CCFA (Cycloserine Cefoxitin Fructose Agar) 培地や CCMA (Cycloserine Cefoxitin Mannitol Agar) 培地などの *C. difficile* 選択培地を用いて嫌気培養を実施する. *C. difficile* はラフ型の黄色コロニーを形成し、増殖時に産生した有機酸による悪臭を伴う. この臭いは馬小屋臭とも表現されることもあるが、厩舎に入った際にふわっと漂っているような生易しいものではなく、英語表現の horse manure (馬糞堆肥)のごとく、強烈で独特な臭いであることを申し添える. また、*C. difficile* は毒素非産生株も存在することから、分離菌の毒素産生能の確認も必要となる. 産生毒素の検出方法には、細胞毒性試験や TcdA 及び TcdB 遺伝子をターゲットとした PCR 法などがあるが、JRA 診療施設ではイムノクロマトグラフ法を応用した検査キット (C. DIFF QUIK CHEK コンプリート、アーリアメディカル(株)、東京) を用いている

(図6). このキットは 20 分程度で測定可能であり、毒素 (TcdA 及び TcdB) だけでなく菌体抗原も検出できるため、迅速診断あるいは下痢・腸炎罹患馬剖検時の *C. difficile* 感染リスク回避に役立っている.

C. difficile はメトロニダゾール (ニトロイミダゾール系抗菌薬) に感受性を有するため、海外では *C. difficile* 感染馬へのメトロニダゾール投与が推奨されているが [14]、本邦においてメトロニダゾールは動物用医薬品として未承認であり、かつ食用動物への使用も禁止されていることから、獣医師の裁量で人用医薬品を使用する場合は、所有者に対し食用に供するため出荷してはならない旨を出荷禁止指示書により指示しなければならない. このほかに下痢及び腸管傷害に対する対症治療として、電解質液及び膠質液の輸液や抗炎症薬の投与も実施されている. さらに、腸管粘膜傷害に伴う腸内細菌の体内移行 (バクテリアルトランスロケーション) への対策として、広域スペクトラム抗菌薬やエンドトキシン吸着能を有するポリミキシン B などの全身投与が行われる場合もある.



図7 隔離馬房



図8 隔離馬房床面

壁面や床面の資材間の隙間をなくし、馬房内に排水口を設けている。

6 予防及び感染対策

C. difficile 感染症の予防には、さまざまな発症リスクへの対応が肝要である。特に *C. difficile* の芽胞は乾燥や消毒薬への耐性も高いことから、発症馬を起点とした環境汚染の拡大を防止するために適切な対処が必要となる。JRA 診療施設では、重篤な下痢を主訴として受診した、あるいは入院中に下痢を発症した馬については速やかに隔離厩舎へ収容し（図7）、前記した簡易検査キットで *C. difficile* 感染の診断を行っている。陽性の場合にはメトロニダゾールによる治療を開始し、陰性の場合も隔離下で経過を観察しつつ下痢症に対する治療を継続する。隔離厩舎内では専用の長靴を使用し、医療処置や厩舎作業で馬体あるいは馬体周囲に接する際は、使い捨て手袋やガウン等の防護具を着用するよう取り決めている。また不必要な汚染を防ぐため、飼料及び敷料の保管場所は収容馬房から離し事毎に必要な量を搬入するが、馬具、飼葉桶、ほうき等の飼養管理上必要な道具は当該馬専用とし、汚損が激しい場合は消毒後に廃棄・交換している。

患者退去後の馬房消毒においては、*C. difficile* の芽胞に対して効果的な薬剤の選択及び使用方法が重要となる。馬を飼養する際に一般的に用いられている7系統11種類（第四級アンモニウム塩系、ピグアナイド系、アルデヒド系、塩素系、酸化剤系、ヨード系及びアルコール）の消毒薬について、*C. difficile* の芽胞への効果を当研究室で検証したところ、室温・有機物非存在下では、アルデヒド系、塩素系、並びに酸化剤系消毒薬に殺芽胞効果が認められた [15]。一方、有機物（10% FBS）存在下ないし低温条件（4℃）で同様の実験を行ったところ、常温・有機物非存在下で殺芽胞効果を示した消毒薬のうち、十分な効果を示したのは酸化剤系の一部のみであった。このことから *C. difficile* 感染馬の飼養環境を消毒する場合には、消毒薬の適切な選択に加え、

有機物による消毒作用減弱の防止に留意する必要があることが確認された。JRA 診療施設内で *C. difficile* による下痢・腸炎が続発した2011年以前に使用していた隔離（入院）馬房の床面は、一般的な馬房と同様の構造（締め固めた土の上にゴムマットを敷設）であったため流水を用いた洗浄は難しく、消毒効果に影響を及ぼす量の有機物が環境表面に残存していた可能性は否めない。2012年に隔離厩舎は改修され、馬房は容易に流水洗浄できる形状となり、高圧洗浄機を用いた馬房壁面や床面の洗浄が可能となった（図8）。これに伴い一連の消毒作業工程を見直した結果、JRA 診療施設内での *C. difficile* が関連する下痢・腸炎の発生は2014年を境に減少に転じている。

7 終わりに

C. difficile 感染症は、正常腸内細菌叢の攪乱に伴う毒素産生性 *C. difficile* の異常増殖により生じると推察されている。現在当研究室では、次世代シーケンサーを応用した馬腸内細菌叢の網羅的解析を実施し、「攪乱」を起こすとされる抗菌薬投与などの誘因が腸内細菌叢に与える影響の解明に取り組んでいる。各種誘因に対する腸内細菌叢の構成変動と *C. difficile* 感染症の発症状況との関連が明らかになれば、飼養管理あるいは診療業務を行ううえで遭遇する *C. difficile* 感染症の発症リスクについてさらなる理解が進むと思われる。また発症馬の管理においては、糞便により汚染された環境からの経口（糞口）感染についての対策が重要であり、感染拡大を防止するため隔離処置や消毒作業を実施する際には、芽胞菌であり環境生残性が高い *C. difficile* の特性に十分留意する必要があると考える。

参 考 文 献

- [1] Oren A, Garrity GM : List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published, *Int J Syst Evol Microbiol*, 66, 1-3 (2016)
- [2] Lawson PA, Citron DM, Tyrrell KL, Finegold SM : Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) *Prevot 1938, Anaerobe*, 40, 95-99 (2016)
- [3] Kramer A, Schwefke I, Kampf G : How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review, *BMC Infect Dis*, 6, 130 (2006)
- [4] Voth DE, Ballard JD : *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease, *Clin Microbiol Rev*, 18, 247-263 (2005)
- [5] Gerding DN, Johnson S, Rupnik M, Aktories K : *Clostridium difficile* binary toxin CDT: mechanism, epidemiology, and potential clinical importance, *Gut Microbes*, 5, 15-27 (2014)
- [6] Baverud V, Gustafsson A, Franklin A, Aspan A, Gunnarsson A : *Clostridium difficile*: prevalence in horses and environment, and antimicrobial susceptibility, *Equine Vet J*, 35, 465-471 (2003)
- [7] Weese JS, Staempfli HR, Prescott JF : A prospective study of the roles of *Clostridium difficile* and enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in equine diarrhoea, *Equine Vet J*, 33, 403-409 (2001)
- [8] Medina-Torres CE, Weese JS, Staempfli HR : Prevalence of *Clostridium difficile* in horses, *Vet Microbiol*, 152, 212-215 (2011)
- [9] Schoster A, Arroyo LG, Staempfli HR, Shewen PE, Weese JS : Presence and molecular characterization of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* in intestinal compartments of healthy horses, *BMC Vet Res*, 8, 94 (2012)
- [10] Baverud V : *Clostridium difficile* diarrhea: infection control in horses, *Vet Clin North Am Equine Pract*, 20, 615-630 (2004)
- [11] Keel MK, Songer JG : The comparative pathology of *Clostridium difficile*-associated disease, *Vet Pathol*, 43, 225-240 (2006)
- [12] Price AB, Davies DR : Pseudomembranous colitis, *J Clin Pathol*, 30, 1-12 (1977)
- [13] Borriello SP, Honour P : Simplified procedure for the routine isolation of *Clostridium difficile* from faeces, *J Clin Pathol*, 34, 1124-1127 (1981)
- [14] Weese JS, Toxopeus L, Arroyo L : *Clostridium difficile* associated diarrhoea in horses within the community: predictors, clinical presentation and outcome, *Equine Vet J*, 38, 185-188 (2006)
- [15] Ochi A, Niwa H, Kinoshita Y, Ueno T, Katayama Y : Comparative efficacies of disinfectants against bacteria causing healthcare-associated infections, *J Equine Vet Sci*, 39, S4 (2016)