

原 著

成牛及び子牛における *Clostridium difficile* の保菌状況

白井 優[†] 原田倫子 川端楓実 佐藤友美
樋口豪紀 田村 豊

酪農学園大学獣医学群 (〒069-8501 江別市文教台緑町582)

(2017年8月28日受付・2017年11月9日受理)

要 約

Clostridium difficile は、人の偽膜性大腸炎、抗菌薬関連下痢症の原因菌となる。*C. difficile* は、家畜や臨床患者から分離されることもある。そのため、伝播経路は不明であるが、市販肉と人の感染の関連及びレゼルボアとしての家畜の可能性が示唆されている。今回、牛における *C. difficile* の保菌状況について明らかにするために、成牛糞便119検体及び子牛糞便47検体から *C. difficile* を分離しPCRリボタイピング、毒素遺伝子の検出を実施した。成牛糞便からは分離されなかったものの、子牛糞便17% (8/47検体) から16株の *C. difficile* が分離された。16株は10のリボタイプに分類された。すべての株が何らかの毒素遺伝子を保有し、69%は *tcdA*, *tcdB*, *cdtA/B* の3種類の毒素遺伝子すべてを保有していた。以上の結果より、国内の子牛に毒素産生性の *C. difficile* が分布することが示された。

——キーワード：binary toxin, 子牛, *Clostridium difficile*, toxin A, toxin B.

-----日獣会誌 71, 261~265 (2018)

Clostridium difficile はグラム陽性の偏性嫌気性芽胞形成桿菌で、人の抗菌薬関連下痢症、偽膜性大腸炎の原因となる [1]。 *C. difficile* 感染症 (*Clostridium difficile* infections: CDI) は、抗菌薬の使用により正常腸内細菌叢が攪乱され、腸管内で毒素産生性 *C. difficile* が過増殖することによって発症する。そのため、米国では CDI は抗菌薬治療が行われる医療現場において、最も頻度の高い院内感染症として問題となっている (Centers for Disease Control and Prevention, US Department of Health and Human Services, Antibiotic Resistance Threats in the United States, (online), (<http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>), (2013)). 近年、人に病原性を示す *C. difficile* が食品や動物からも分離されており、食品や保菌動物の糞便で汚染された環境を介した市中感染が増加したとの報告もあり、人の健康への影響が懸念されている [2]。日本では、海外に比べて市中感染事例が少なく重篤化することも少ないが、注意が必要であるとされている [3]。

C. difficile は病原因子としてトキシン A (TcdA), トキシン B (TcdB), またはバイナリートキシン (CDT: CdtA/CdtB) を産生する株もある [1]。 TcdA 及び

TcdB をコードしている遺伝子は、TcdA 及び TcdB の調節遺伝子とともに pathogenicity locus (PaLoc) と呼ばれる染色体上の遺伝子座に位置している。一方、CDT は PaLoc とは異なる染色体上の位置に独立して存在することが知られている。 TcdA による腸管毒性、TcdB による細胞毒性はおもに人に対して病原性を示す [4]。 CDT は *in vitro* で腸管細胞毒性があることが知られているが、生体内での病原性については、十分に解明されていない [5]。しかし、CDT 産生株は非産生株に比べ、疫学的に TcdA 及び TcdB の産生量が多く、患者に重篤な症状を引き起こすため致死率が高いことが報告されている [5]。海外における臨床症例からは、TcdA, TcdB 及び CDT を産生する強毒株としてリボタイプ (RT) 027 及び 078 が主要なリボタイプとして報告されており [6]、これらが CDI の原因となった場合に重篤な症状を呈するリスクは高い [1]。一方、日本では臨床症例からの RT027 及び 078 の分離報告は少ない [7]。

海外では、牛や豚などの食用動物からも、強毒株 (RT078 及び 027) の分離があり、人臨床由来株と食用動物由来株の遺伝学的関連性が注目されている [8]。特に、牛は糞便のみならず市販牛挽肉からも強毒株である

[†] 連絡責任者：白井 優 (酪農学園大学獣医学群獣医学類食品衛生学ユニット)

〒069-8501 江別市文教台緑町582 ☎011-388-4723 FAX 011-388-4890 E-mail: usuima@rakuno.ac.jp

RT078 及び RT027 が分離されており、人の CDI との関連性について示唆されている [9-11].

日本においては、成豚から 0.8% (2/250 検体) [12]、子豚から 57.5% (69/120 検体) [13] の *C. difficile* が分離されており、いずれにおいても RT078 が検出されている [13]. しかし、日本の食用動物における *C. difficile* の分布状況の調査は豚のみでしか実施されておらず、他の食用動物における分布状況は不明である。

そこで今回、牛における *C. difficile* の保菌状況について実態を明らかにするため、成牛及び子牛の糞便から *C. difficile* を分離し、その分布状況を明らかにするとともに、分離株の性状を調べた。

材料及び方法

材料: 2015 年 10~11 月までにと畜場へ搬入された生後 27~131 カ月齢 (年齢不明を含む) の成牛糞便 119 検体 (65 農場), 5 農場 (A~E) で飼育されている生後 1~19 日齢の子牛糞便 47 検体を材料とした。

糞便からの *C. difficile* の分離・同定: 牛糞便 0.5g に滅菌生理食塩水を 500 μ l を加えた懸濁液に、1ml のエタノールを加えてボルテックスした後、1 時間静置した。その後、CCMA-EX 培地 (日水製薬株, 東京) に 200 μ l 接種し、37 $^{\circ}$ C 48 時間嫌気培養を行った。培地に発育した *C. difficile* と疑われるコロニーを 1 検体当たり最大 3 つ釣菌し CCMA-EX 培地に継代し嫌気培養した。その後、変法 GAM 培地 (日水製薬株, 東京) に継代し、37 $^{\circ}$ C 48 時間嫌気条件で純培養を行った。なお、最大 3 つ釣菌した株は、同定を行い、その後の試験で RT 及び薬剤感受性試験 (差は 2 管以内) が同じだったものを同一株として扱った。

同定試験: 同定は Kikuchi ら [14] の方法による PCR 法により行った。

毒素遺伝子の検出: Multiplex PCR 法により毒素遺伝子 (*tcdA*, *tcdB*, *cdtA* 及び *cdtB*) の保有を決定した [15].

トキシノタイプ: PCR-RFLP 法により全長 19kbp の PaLoc 配列中の *tcdA* 及び *tcdB* の A1, A2-A3, A3, B1 領域を増幅し、毒素遺伝子の型別を実施した [16].

PCR リボタイプ: 全分離株及び RT が判明している ATCC 株に対して、16S rRNA と 23S rRNA の遺伝子間スペーサー領域をターゲットとした PCR リボタイプを行った [17]. 泳動像の解析には BioNumericsTM (Applied Maths NV, Sint-Martens-Latem, Belgium) を用い、系統樹解析は、それぞれのバンドの泳動距離を基にした Dice の相動性係数を求める方法で行った。系統樹の作製には、Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA) を用いた。

薬剤感受性試験: Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) の方法に従い、バンコマイシン (VCM), メトロニダゾール (MNZ), クリンダマイシン (CLDM), セフトリアキソン (CTRX), エリスロマイシン (EM), シプロフロキサシン (CPFX), レボフロキサシン (LVFX), テトラサイクリン (TET) の 8 薬剤に対する最小発育阻止濃度 (MIC) を寒天平板希釈法によって測定した。精度管理株として *C. difficile* ATCC 700057 を用いた。細菌の薬剤に対する感性または耐性を判定するためのブレイクポイントについて、VCM, EM は CLSI の基準を用いたが、CLSI にブレイクポイントの記載がない MNZ, CLDM, CTRX, TET については、Oka ら [18] の報告, CPFX, LVFX については Bourgault ら [19] の報告のブレイクポイントを採用した。

成績

分離率: 成牛糞便 119 検体から *C. difficile* は分離されなかった。5 農場中 2 農場の子牛糞便 17% (8/47 検体) から *C. difficile* が分離され、計 16 株 (D 農場由来の 6 検体から 12 株, E 農場由来の 2 検体から 4 株) の *C. difficile* が分離された (表 1)。

毒素遺伝子保有率及びトキシノタイプ: 69% (11/16 株) が *tcdA/tcdB* 及び *cdtA/cdtB* を保有しており、31% (5/16 株) が *tcdA* 及び *cdtA/cdtB* を保有していた (表 1)。 *tcdA*, *tcdB* 及び *cdtA/cdtB* を保有している 11 株は、すべてトキシノタイプ V に分類された。 *tcdA* と *cdtA/cdtB* が陽性だった 5 株のトキシノタイプは、4 株が XIb, 1 株が XIa を示した。これら 5 株は、PCR による毒素遺伝子の検出では *tcdA* 陽性と判定されたが、トキシノタイプの結果 *tcdA* の A1 領域の配列を保有していなかった。

PCR リボタイプ: リボタイプによる型別の結果、10 の RT (R1~R10) に型別された (R1: 4 株, R2~R4: 各 2 株, R5~R10: 各 1 株) (図)。子牛由来株の RT の中で、今回比較した ATCC 株と同一の RT は認められなかった。

薬剤感受性試験: 子牛糞便由来 16 株は、すべての株が VCM, MNZ, CTRX に対して感受性を示し、CPFX に対して耐性を示した (表 2)。また、CLDM, EM, LVFX, TET の 4 薬剤に対して耐性を示す株が認められた。

考察

今回、成牛糞便から *C. difficile* は分離されなかったが、子牛糞便から 17% の割合で *C. difficile* が分離された。海外においても、成牛糞便に比べて子牛糞便からの分離率が高いことが報告されている [9, 10, 20]。豚や人においても、若齢時の糞便からの *C. difficile* の分離

表1 子牛糞便由来 *C. difficile* の毒素遺伝子保有による型別

株名	農場	<i>tcdA/tcdB/cdtA, B</i> PCRによる判定	B1 PCR fragment type* ¹ (Hinc II /Acc I restriction pattern)	A1 PCR fragment type	A2 PCR fragment type	A3 PCR fragment type* ⁴ (EcoR I restriction pattern)	Toxinotype
15D1	D	+/+/+	3	+	+	8	V
15D3	D	+/+/+	3	+	+	8	V
15D4	D	+/+/+	3	+	+	8	V
15D5	D	+/+/+	3	+	+	8	V
15D6	D	+/-/+	-* ²	-* ³	+	5d	XIa
15D7	D	+/+/+	3	+	+	8	V
15D9	D	+/+/+	3	+	+	8	V
15D10	D	+/+/+	3	+	+	8	V
15D13	D	+/+/+	3	+	+	8	V
15D15	D	+/+/+	3	+	+	8	V
15D16	D	+/+/+	3	+	+	8	V
15D17	D	+/+/+	3	+	+	8	V
15D19	E	+/-/+	-* ²	-* ³	+	8	XIb
15D20	E	+/-/+	-* ²	-* ³	+	8	XIb
15D22	E	+/-/+	-* ²	-* ³	+	8	XIb
15D24	E	+/-/+	-* ²	-* ³	+	8	XIb

*1: B1 制限酵素処理産物を 1~8 の制限パターンにより決定 [16]

*2: B1 領域が増幅されなかった株を - と表記

*3: A1 領域が増幅されなかった株を - と表記

*4: A3 制限酵素処理産物を 1~16 の制限パターンにより決定 [16]

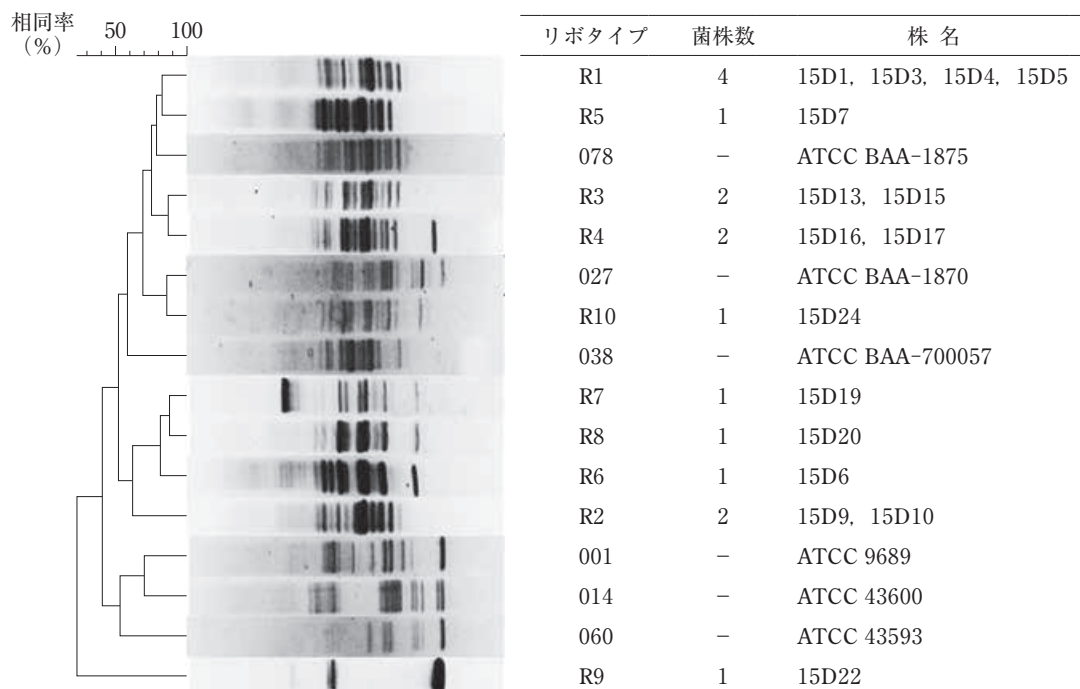


図 子牛糞便由来株の PCR リボタイピングによる型

率は成長後の糞便からの分離率よりも高い [13]. 以上の結果より, 日本の牛においても *C. difficile* の保菌率が若齢であるほど高いことが示された.

子牛糞便由来株の RT は, 強毒株として知られる RT078 及び RT027 と一致しなかった. しかし, 今回分離されたすべての株が何らかの毒素遺伝子を保有してお

り, 11 株 (69%) は TcdA/TcdB 及び CdtA/CdtB を保有し, RT078 のトキシノタイプと同一のトキシノタイプ V を示した. トキシノタイプ V の毒素は, RT078 でなくとも強い病原性を示す [5]. 残り 5 株 (31%) は Cdt のみの保有 (TcdA/TcdB は陰性) であったが, トキシノタイプは人に対して病原性を示すことが知られて

表2 子牛糞便由来 16 株の薬剤感受性

薬剤	MIC range ($\mu\text{g/ml}$)	Break Point ($\mu\text{g/ml}$) [*]	耐性割合% (株数)
VCM	1	≥ 32	0
MNZ	0.25~1	≥ 32	0
CLDM	4~16	≥ 8	50 (8)
CTRFX	16~32	≥ 64	0
EM	1~256<	≥ 8	31 (5)
CPFEX	4~32	≥ 4	100 (16)
LVFX	4~16	≥ 8	6 (1)
TET	0.25~16	≥ 16	69 (11)

* : MNZ, CLDM, CTRFX, TET の Break Point は Oka ら [18] の報告を, VCM, EM は CLSI, CPFEX, LVFX は Bourgault ら [19] の報告を参照した。

おり, 人の臨床例から分離されることもあるトキシノタイプ XIa または XIb を示した [21]. 以上の結果より, 子牛は人に病原性を示す株を保菌することが示された。

トキシノタイプ XIa 及び XIb に分類された株は, 毒素遺伝子検出を行う PCR 法では TcdA 陽性を示したが, TcdA 毒素遺伝子の A1 領域を保有していなかった. したがって, 毒素遺伝子検出 PCR 試験による毒素遺伝子の一部増幅により毒素遺伝子の保有を判定すると誤判定することが示唆された [21]. 人の臨床現場では糞便から TcdA/TcdB 毒素検出をおもに抗原検出により行っているため, TcdA 保有を誤って陽性とする可能性は低い, 実験室レベルで TcdA を保有する株と誤判定されることを防ぐため, 現在の Multiplex PCR 法による毒素遺伝子検出のみではなく, トキシノタイプピングや毒素産生検出試験を組み合わせて実施する必要がある。

今回分離された子牛糞便由来株と人の CDI 患者から分離された株 [13] の薬剤感受性プロファイルを比較すると, ヒト臨床由来株の耐性割合は TET を除く薬剤に対して子牛糞便由来株の耐性割合に比べて高い値を示した. ヒト臨床由来株は医療現場の CDI 患者から分離されたものであり, 抗菌薬投与を受けた患者からも分離されている. そのため, 子牛糞便由来株に比べて TET を除くすべての薬剤の耐性割合が高かったことが示唆された. 抗菌薬の使用に伴い *C. difficile* においても曝露を受けた薬剤に対して感受性が低下することが示唆されている [13]. 今回分離された子牛糞便由来株全株は, CDI になった際の治療に用いられる VCM 及び MNZ に対して感受性を示したが, 今後も家畜由来 *C. difficile* の薬剤に対する感受性を保つため, 獣医師には抗菌薬の慎重使用が求められる。

今回の調査により, 牛も豚及び人と同様に, 若齢で *C. difficile* が高率に分離されることが明らかとなった. 分離菌株はすべての株が何らかの毒素遺伝子を保有しており, その中でも強毒株として知られる RT078 と同一のトキシノタイプ V を示す強毒であることが推定される

株も検出された. 以上のことより, 牛は人に CDI を引き起こす株を保菌することがあることが示された。

稿を終えるにあたり, 採材に協力していただいた食肉衛生検査所及び臨床獣医師の方々に深謝する。

引用文献

- [1] Rupnik M, Wilcox MH, Gerding DN : *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis, Nat Rev Microbiol, 7, 526-536 (2009)
- [2] Taori SK, Wroe A, Hardie A, Gibb AP, Poxton IR : A prospective study of community-associated *Clostridium difficile* infections: the role of antibiotics and co-infections, J Infect, 69, 134-144 (2014)
- [3] Mori N, Aoki Y : Clinical characteristics and risk factors for community-acquired *Clostridium difficile* infection: A retrospective, case-control study in a tertiary care hospital in Japan, J Infect Chemother, 21, 864-867 (2015)
- [4] Voth DE, Ballard JD : *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease, Clin Microbiol Rev, 18, 247-263 (2005)
- [5] Bacci S, Mølbak K, Kjeldsen MK, Olsen KE : Binary toxin and death after *Clostridium difficile* infection, Emerg Infect Dis, 17, 976-982 (2011)
- [6] Martin JS, Monaghan TM, Wilcox MH : *Clostridium difficile* infection: epidemiology, diagnosis and understanding transmission, Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 13, 206-216 (2016)
- [7] Senoh M, Kato H, Fukuda T, Niikawa A, Hori Y, Hagiya H, Ito Y, Miki H, Abe Y, Furuta K, Takeuchi H, Tajima H, Tominaga H, Satomura H, Kato H, Morita S, Tanada A, Hara T, Kawada M, Sato Y, Takahashi M, Higuchi A, Nakajima T, Wakamatsu Y, Toyokawa M, Ueda A, Roberts P, Miyajima F, Shibayama K : Predominance of PCR-ribotypes, 018 (smz) and 369 (trf) of *Clostridium difficile* in Japan: a potential relationship with other global circulating strains?, J Med Microbiol, 64, 1226-1236 (2015)
- [8] Keessen EC, Gaastra W, Lipman LJ : *Clostridium difficile* infection in humans and animals, differences and similarities, Vet Microbiol, 153, 205-217 (2011)
- [9] Rodriguez-Palacios A, Borgmann S, Kline TR, Lejeune JT : *Clostridium difficile* in foods and animals: history and measures to reduce exposure, Anim Health Res Rev, 14, 11-29 (2013)
- [10] Rodriguez-Palacios A, Koohmaraie M, LeJeune JT : Prevalence, enumeration, and antimicrobial agent resistance of *Clostridium difficile* in cattle at harvest in the United States, J Food Protect, 74, 1618-1624 (2011)
- [11] Weese JS, Avery BP, Rousseau J, Reid-Smith RJ : Detection and enumeration of *Clostridium difficile* spores in retail beef and pork, Appl Environ Microb, 75, 5009-5011 (2009)
- [12] Asai T, Usui M, Hiki M, Kawanishi M, Nagai H, Sasaki Y : *Clostridium difficile* isolated from the fecal con-

- tents of swine in Japan, *J Vet Med Sci*, 75, 539-541 (2012)
- [13] Usui M, Nanbu Y, Oka K, Takahashi M, Inamatsu T, Asai T, Kamiya S, Tamura Y : Genetic relatedness between Japanese and European isolates of *Clostridium difficile* originating from piglets and their risk associated with human health, *Front Microbiol*, 5, 513 (2014)
- [14] Kikuchi E, Miyamoto Y, Narushima S, Itoh K : Design of species-specific primers to identify 13 species of *Clostridium* harbored in human intestinal tracts, *Microbiol Immunol*, 46, 353-358 (2002)
- [15] Persson S, Jensen JN, Olsen KE : Multiplex PCR method for detection of *Clostridium difficile* *tcdA*, *tcdB*, *cdtA*, and *cdtB* and internal in-frame deletion of *tcdC*, *J Clin Microbiol*, 49, 4299-4300 (2011)
- [16] Persson S, Torpdahl M, Olsen KE : New multiplex PCR method for the detection of *Clostridium difficile* toxin A (*tcdA*) and toxin B (*tcdB*) and the binary toxin (*cdtA/cdtB*) genes applied to a Danish strain collection, *Clin Microbiol Infec*, 14, 1057-1064 (2008)
- [17] Stubbs SL, Brazier JS, O'Neill GL, Duerden BI : PCR targeted to the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region of *Clostridium difficile* and construction of a library consisting of 116 different PCR ribotypes, *J Clin Microbiol*, 37, 461-463 (1999)
- [18] Oka K, Osaki T, Hanawa T, Kurata S, Okazaki M, Manzoku T, Takahashi M, Tanaka M, Taguchi H, Watanabe T, Inamatsu T, Kamiya S : Molecular and microbiological characterization of *Clostridium difficile* isolates from single, relapse, and reinfection cases, *J Clin Microbiol*, 50, 915-921 (2012)
- [19] Bourgault AM, Lamothe F, Loo VG, Poirier L : In vitro susceptibility of *Clostridium difficile* clinical isolates from a multi-institutional outbreak in Southern Québec, Canada, *Antimicrob Agents Ch*, 50, 3473-3475 (2006)
- [20] Bandelj P, Blagus R, Briski F, Frlic O, Vergles Rataj A, Rupnik M, Ocepek M, Vengust M : Identification of risk factors influencing *Clostridium difficile* prevalence in middle-size dairy farms, *Vet Res*, 47, 41 (2016)
- [21] Eckert C, Emirian A, Le Monnier A, Cathala L, De Montclos H, Goret J, Berger P, Petit A, De Chevigny A, Jean-Pierre H, Nebbad B, Camiade S, Meckenstock R, Lalande V, Marchandin H, Barbut F : Prevalence and pathogenicity of binary toxin-positive *Clostridium difficile* strains that do not produce toxins A and B, *New Microbes New Infect*, 3, 12-17 (2015)

Prevalence of *Clostridium Difficile* in Japanese Cows and Calves

Masaru USUI[†], Michiko HARADA, Fumi KAWABATA, Tomomi SATO, Hidetoshi HIGUCHI and Yutaka TAMURA

*School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University, 582 Midorimachi, Bunkyo-dai, Ebetsu, 069-8501, Japan

SUMMARY

Clostridium difficile is responsible for pseudomembranous colitis and antibiotic-associated diarrhea. It is often isolated from patients and food-producing animals. Although transmission remains speculative, meat products could be a common source of *C. difficile* infection in humans and food-producing animals could also serve as a reservoir. To clarify its prevalence in cattle in Japan, we isolated *C. difficile* using fecal samples from 119 cows and 47 calves. Sixteen isolates were obtained from eight of the 47 calf fecal samples (17%), but specific strains were not isolated from the 119 cow fecal samples. The sixteen strains were sorted into 10 PCR ribotypes. All isolates were somewhat toxin-positive and 69% of isolates had three types of toxin genes (*tcdA*, *tcdB*, and *cdtA/B*), which were involved in pathogenicity in humans. Therefore, our results demonstrated that toxigenic *C. difficile* was prevalent in Japan. — Key words : binary toxin, calf, *Clostridium difficile*, toxin A, toxin B.

[†] Correspondence to : Masaru USUI (Laboratory of Food Microbiology and Food Safety, Department of Health and Environmental Sciences, School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University)

582 Midorimachi, Bunkyo-dai, Ebetsu, 069-8501, Japan

TEL 011-388-4723 FAX 011-388-4890 E-mail : usuima@rakuno.ac.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 71, 261 ~ 265 (2018)