

[原 著]

当院で分離された *Clostridium difficile* の分子疫学的解析

沢辺悦子<sup>1,2)</sup>・欠塚杏奈<sup>2)</sup>・千田俊雄<sup>2)</sup>・大澤佳代<sup>4)</sup>・岡村 登<sup>2)</sup>  
 武部 功<sup>1)</sup>・角田千能<sup>1)</sup>・遠井初子<sup>1)</sup>・古畑紀子<sup>1)</sup>  
 西堀眞弘<sup>1)</sup>・奈良信雄<sup>1)</sup>・三宅修司<sup>3)</sup>・吉澤靖之<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> 東京医科歯科大学医学部附属病院 検査部

<sup>2)</sup> 東京医科歯科大学大学院保健衛生学研究科 生体防御検査学分野

<sup>3)</sup> 東京医科歯科大学医学部附属病院 呼吸器科

<sup>4)</sup> 神戸大学医学部 保健学科検査技術科学専攻

(平成14年10月8日受付, 平成15年3月4日受理)

1999年10月より2000年10月の間に東京医科歯科大学医学部附属病院に入院中, 抗菌薬投与と関連して下痢が見られた57名の患者の糞便より分離された *Clostridium difficile* 59株について, パルスフィールド電気泳動法 (PFGE) とPCRリボタイピング法による染色体DNAの型別, およびPCRによる毒素遺伝子型別を行い解析した。PFGEは34パターン, 類似度80%以上の泳動パターンを同一とした型別ではA~Wの23型に, PCRリボタイピングはa~z, aaの27パターンに分けられた。分離株の約70%を占めた血液内科の病棟においてPFGEのA型, PCRリボタイピングのa型の組み合わせ (A-a型) が12株 (29%) と最も多く検出され, それらはすべてToxin A<sup>+</sup> B<sup>+</sup>であった。

今回の調査から易感染患者の多い病棟での特定の *C. difficile* の定着, 伝播の可能性が示唆された。今後, 十分な院内感染防止対策を励行していく必要があると思われる。

**Key Words:** *C. difficile*, PFGE, PCRリボタイピング, 毒素遺伝子, 院内感染

*Clostridium difficile* は抗菌薬が投与された後の下痢症あるいは腸炎の主要な原因菌である<sup>1,2)</sup>。内視鏡所見で偽膜形成が認められた場合には, 偽膜性腸炎の診断により本菌の感染症と考えられるが偽膜形成が認められない下痢症・腸炎も見られ<sup>3)</sup>, また検査室に届けられる糞便検体の患者において内視鏡検査の実施は存外少ないと思われる。その背景もあり細菌学的診断は必須と考えられ, 現在検査室では糞便中の *C. difficile* 毒素の検出, 嫌気培養による本菌の分離等が行われている。

*C. difficile* の産生する毒素は強い腸管毒性を持つ Toxin A と強い細胞毒性を示す Toxin B の2種類が存

在する<sup>2,4)</sup>。

*C. difficile* による感染症は, 宿主の腸管に生息する正常細菌叢が抗菌薬の使用などによりバランスをくずし本菌が異常増殖して引き起こされる<sup>5)</sup>。本菌は欧米において院内集団発生で問題となっているが, これらは患者間の交差感染や医療従事者, 環境からの菌獲得によると考えられる<sup>5)</sup>。

また, *C. difficile* 感染症には, 中毒性巨大結腸や消化管穿孔などの重篤な状態から無症候性のキャリアーまで, 引き起こされる症状には幅があり<sup>6)</sup>, その発症には抗菌薬の使用以外にも患者の年齢, 基礎疾患, 入院期間, 緩下剤の使用や経管栄養施行等の医療行為を含めた患者側の要因が大きく影響している<sup>7)</sup>。一方, 無症候性のキャリアーの存在は院内感染の感染源になりうるといわれている<sup>6)</sup>。

*C. difficile* の型別法は表現型を利用した方法と遺伝子型を利用した方法に大きく分けられるが, 前者には血清型別やウェスタンブロット法など, 後者に

著者連絡先: (〒113-8519) 文京区湯島1-5-45

東京医科歯科大学医学部附属病院検査部

沢辺悦子

TEL 03-5803-5621

FAX 03-5803-5618

E-mail e.sawabe.mlab@tmd.ac.jp

パルスフィールドゲル電気泳動法 (pulsed field gel electrophoresis, PFGE), PCRリボタイピングなどが利用されている。現在のところ標準法と呼べる方法はなく、より有用な疫学結果を得るため、複数の型別法を組み合わせて解析される場合が多い<sup>4)</sup>。

東京医科歯科大学医学部附属病院における糞便材料からの *C. difficile* の分離は、1996年から1998年までは年間およそ30株前後であったが、1999年に約70株と急激に増加し2000年も同様の傾向を示した。本研究では院内感染の実態を調査するため、PFGEによる型別とPCRリボタイピングと毒素遺伝子型別を組み合わせ解析を行ったので報告する。

## I. 材料・方法

### 1. 使用菌株

本大学附属病院に1999年10月から2000年10月までの間に入院中、抗菌薬投与と関連して下痢が見られた57名の患者由来の糞便より分離された *Clostridium difficile* 59株を用いた (重複をさけるため1名の患者より1株としたが2名の患者では、それぞれ4ヵ月、11ヵ月後に分離された株を含めた)。検体は分量を嫌気ポーター (クリニカルサブライ) で採取後、CCMA培地 (日水) で48時間嫌気培養し黄色・ラフ型のコロニーの芽胞形成・グラム陽性桿菌の確認を行い、CDチェック (シオノギ) にて陽性となったコロニーを *C. difficile* とした。なお、1糞便検体からは1コロニーを採取し検査を行った。また糞便からユニクイック (関東化学) による直接 Toxin A の検出も同時に行った。

### 2. PFGE法

加藤らの方法<sup>8)</sup> に従い菌株を8 mlのTYG培地に接種し、37℃で1晩嫌気培養した後、菌液の1mlを新しい8 mlのTYG培地に加え、37℃で5時間嫌気培養した後TES buffer で2回洗浄後集菌し、1.2%低融点アガロース (Incert Agarose; FMC) と菌液を混和させ、プラグモールドにてゲルブロックを作成し、pro-

teinase K (1.5mg/ml) (和光純薬) で蛋白分解を行い、phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) にてproteinase Kを不活化後、制限酵素 *Sma* I (TAKARA) を30℃にて一晩作用させDNAを切断した。制限酵素処理を行ったゲルは1.2%泳動用アガロース (Bio-Rad) に埋め込み、0.5×TBE bufferを4℃冷却しながらパルスタイム20~60秒、電圧6V/cm、22時間の泳動条件にてPFGE装置であるCHEF-DR II (Bio-Rad社) により泳動を行った。泳動終了後エチジウムブロマイド染色 (1 μg/ml) して、紫外光で写真撮影した。なおDNAサイズマーカーにはLambda ladder (Bio-Rad) を用いた。解析はBio-Rad社のFingerprinting Version 1.6を用い、菌株間の相似値はDiceの計算方法 (2×同一バンド数×100/両方の株のバンド総数)、クラスタリングはUPGMA法を選択し系統樹を作成後、類似度80%以上のクラスター内のパターンを同一型とした<sup>9-11)</sup>。

### 3. PCRリボタイピング

加藤らの方法の変法で行った<sup>12-14)</sup>。菌株を脱気した10mlのFastidious broth<sup>15)</sup> に接種し、37℃で1晩嫌気培養した後、菌液1mlを集菌後Cartwrightら<sup>14)</sup> のDNAの抽出法に従いlysis bufferで洗浄後lysozyme (10mg/ml) を含んだlysis bufferに溶かし、10% SDS (sodium dodecyl sulfate) を加え37℃1時間インキュベート後、フェノールとフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコールで除蛋白処理をし、エタノール沈殿によってDNAを精製抽出し、TE buffer 50μlに溶かし、その5μlをテンプレートDNAとした。PCR反応液の組成は×1PCR緩衝液、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、200 μM dNTP混合液、プライマー<sup>13)</sup> 各25 pmol、Taq polymerase (Promega) 1.25 Uで全量を50μlとした。このプライマーは16S rRNA遺伝子と23S rRNA遺伝子間のスパーサー領域を増幅するために設計されており、表1の条件下で増幅後PCR産物は75℃で30分濃縮し、アガロース (3%) (TAKARA) ゲル電気泳動 (120V, 500mA, 90分) を行い、終了後エチジウム

表1 PCRのプライマーと条件

	Primer	Sequence	Amplifying	condition
16S rRNA <sup>13)</sup> 23S rRNA		5'-CTGGGGTGAAGTCGTAACAAGG-3'	35サイクル	96℃ 1min
		5'-GCGCCCTTTGTAGCTTGACC-3'		56℃ 1min
				72℃ 2min
Toxin A	NK9 <sup>16)</sup>	5'-CCACCAGCTGCAGCCATA-3'	35サイクル	95℃ 20sec
	NK11	5'-TGATGCTAATGAATCTAAAAATGGTAAC-3'		62℃ 120sec
Toxin B	NK104 <sup>16)</sup>	5'-GTGTAGCAATGAAAAGTCCAAGTTTACGC-3'	35サイクル	95℃ 20sec
	NK105	5'-CACTTAGCTCTTTGATTGCTGCACCT-3'		55℃ 120sec
			74℃ 5min	

表2 Toxin型別, 病棟別 PFGE型・パターンと PCRリボタイプ

Toxin A B	病棟	PFGE型 パターン PCRリボタイプ	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	UT*	計							
			2	8	15	16	19	14	21	1	13	20	23	6	17	18	7	3	11	12	25	4	32	5	26	27		28	33	29	30	34	9	22
-	-	I																								1	1							
-	-	II				1						1								2							4							
-	-	V	1	1											1	1	1				1	1	1				16							
-	-	VII				1	1	1	1	1	1				1	1	1						1	1		2								
-	+	II											1				1										2							
-	+	V														4	1										5							
-	+	VII														1											1							
+	+	II			1																						1							
+	+	III																						1			1							
+	+	IV	1		1																						2							
+	+	V	4	7	1	1	1	1	1			1							2								1							
+	+	VI											1														1							
+	+	VII																									1							
+	+	VIII																							1		1							
+	+	IX																									1							
		計	5	1	7	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	59						

\* UT, untypable

プロマイド染色 (1µg/ml) して, 紫外光で写真撮影した。DNAサイズマーカーは100bp DNA Ladder (Promega) を用いた。

4. 毒素遺伝子の検出

PCRによる毒素遺伝子の検出は加藤らの方法に従った<sup>16)</sup>。テンプレートDNAはリボタイプピングで使用したDNAを1µl使用した。PCR反応液の組成は×1PCR緩衝液, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, 200µM dNTP混合液, プライマー<sup>16)</sup>各6 pmol, Taq polymerase 0.75Uで全量を30µlとした。プライマーは Toxin A 遺伝子の繰り返し塩基配列に由来するNK11とNK9のプライマーセットおよびToxin B遺伝子の繰り返し塩基配列ではない部分に由来するNK104とNK105のプライマーセットを用いた。表1の条件下で増幅後, PCR産物はアガロース (2%) (TAKARA) ゲル電気泳動 (100V, 500mA, 60分) を行い, 終了後エチジウムプロマイド染色 (1µg/ml) して, 紫外光で写真撮影した。

II. 結果

1. PFGEによる型別

臨床分離株59株の分析の結果, PFGEによる泳動パターンは34パターンに分類され, 類似度80%以上を同一とした型別ではA~Wの23型に分けられた (図1)。また4株がバンドの出ない型別不能株 (UT) であった。型別が可能であった55株のうち, 類似度80%以上を同一とした型別分類ではA型が18株 (31%) と最も多くパターンNo.15 (11株) No.2 (5株), No.8 (1株), No.16 (1株) が含まれた。次に多かったO型は8株 (14%) で4つのパターンNo.27 (5株), No.26 (1株), No.28 (1株), No.33 (1株) が含まれ

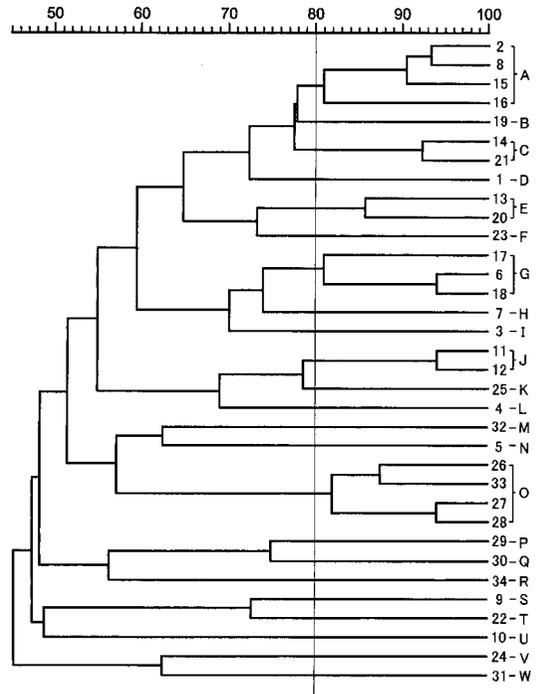


図1 *C. difficile* 59株におけるPFGE解析のDendrogram

スケールは類似度 (%) を表し, 左側の数字はPFGEパターン右側のアルファベットはPFGE型を表す。PFGEは34パターン, 類似度80%以上の泳動パターンを同一とした型別ではA~Wの23型に分けられた。

た。その他のパターンは1~2株の頻度であった (表2)。A型, O型のそれぞれの構成パターンのバンドの違いは1~3本であり Tenoverら<sup>9)</sup> のPFGE型別の解釈基準の“きわめて関連あり”に相当した (図2のA型-15, 2, 16のパターンおよびO型-27, 28参照)。

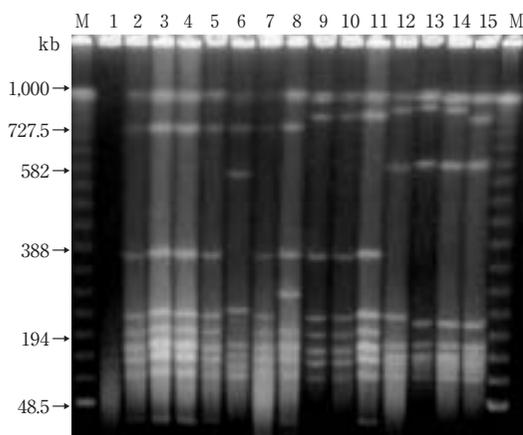


図2 PFGEパターン

レーン1, 型別不能株; レーン2~5, 7, A-15型; レーン6, E-13型; レーン8, A-16型; レーン9~11, A-2型; レーン12~14, O-27型; レーン15, O-28型; レーンM, lambda ladder マーカー

## 2. PCRリボタイピング

PCRリボタイピングではすべての株でバンドを得ることが出来、泳動パターンは27 (a~z, aa) 型に分けられた。最も多くを占めたのはa型の13株で全体の22%を占めた。次いでj型が8株, f型が5株であった (表2, 図3)。

## 3. PFGE型とPCRリボタイプ

PFGEによる型別とPCRリボタイプを組み合わせると36の型に分けられ, PFGE型のA型, リボタイプのa型 (以下A-a型) が13株と最も多く全体の22%を占め, 次いでPFGE型のO型, リボタイプのj型 (以下O-j型) が7株で全体の12%を占めた。2つのタイピングはほぼ相関していたが, 不一致の株も少数見られた。PFGE-A型に属するPFGEパターン15には3つのPCRリボタイプ (11株中7株がa型, 3株がu型, 1株がf型) が含まれた。u型はa型とバンド2本のみが異なり, f型は4本以上が異なっていた (図3のa, u型参照)。またPCRリボタイプf型は5つのPFGEパターン15, 6, 18, 3, 10 (4つのPFGE型A, G, I, U) に分かれた (表2)。

## 4. 毒素遺伝子の検出

Toxin A, B 遺伝子のPCRにおいてそれぞれ約1,200bp, 約200bpのPCR産物が得られた株をそれぞれの毒素遺伝子陽性とした。Toxin A<sup>-</sup>B<sup>+</sup>の株はすべてToxin A 遺伝子のプライマーで1,200bpのPCR産物は検出されなかったが, 約700bpの産物が検出された (図4)。59株のうち, Toxin A<sup>-</sup>B<sup>-</sup>が23株 (39%), Toxin A<sup>-</sup>B<sup>+</sup>が8株 (14%), Toxin A<sup>+</sup>B<sup>+</sup>は28株

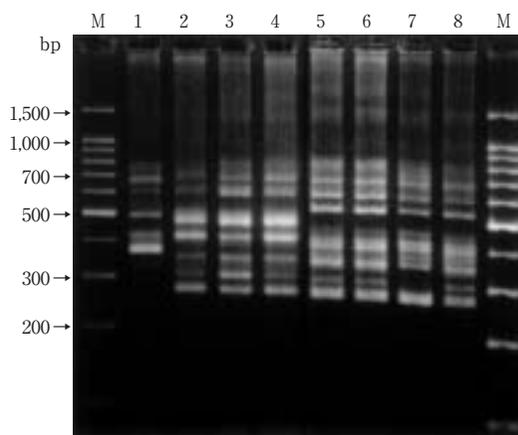


図3 PCRリボタイプパターン

レーン1, h型; レーン2~4, j型, レーン5, 6, 8, a型; レーン7, u型; レーンM, 100bp ladder マーカー

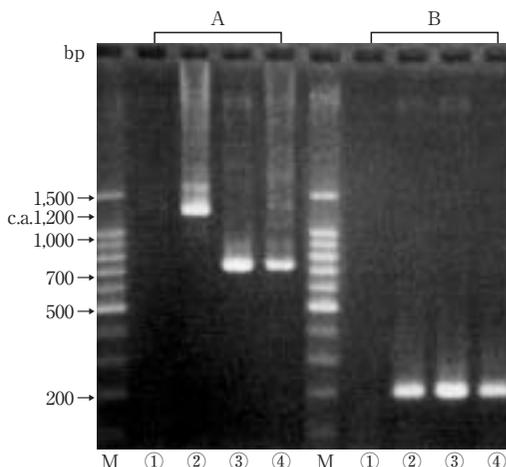


図4 毒素遺伝子検出用PCRの電気泳動像

A, プライマーNK11/NK9を使用したToxin A 遺伝子検出用PCR; B, プライマーNK104/NK105を使用したToxin B 遺伝子検出用PCR; レーン1, Toxin A<sup>-</sup>B<sup>-</sup>; レーン2, Toxin A<sup>+</sup>B<sup>+</sup>; レーン3および4, Toxin A<sup>-</sup>B<sup>+</sup>; レーンM, 100bp ladder マーカー

(47%) であった。その中で, Toxin A<sup>-</sup>B<sup>+</sup>はPCRリボタイプがj型の株だけであった。またPFGEパターン, PCRリボタイプともにToxin 型別に重複は見られず, いずれかのToxin型に分類された (表2)。

## 5. 病棟別の分布

*C. difficile* 59株のうち, V病棟から41株が検出され, 次に多かったのはII病棟の7株 (12%) であった。前者は血液内科 (平均年齢58歳), 後者は小児科 (平均年齢12歳) で, 抗癌療法, 抗菌薬投与を受けている免疫不全の易感染患者が多い病棟であった。多数株を

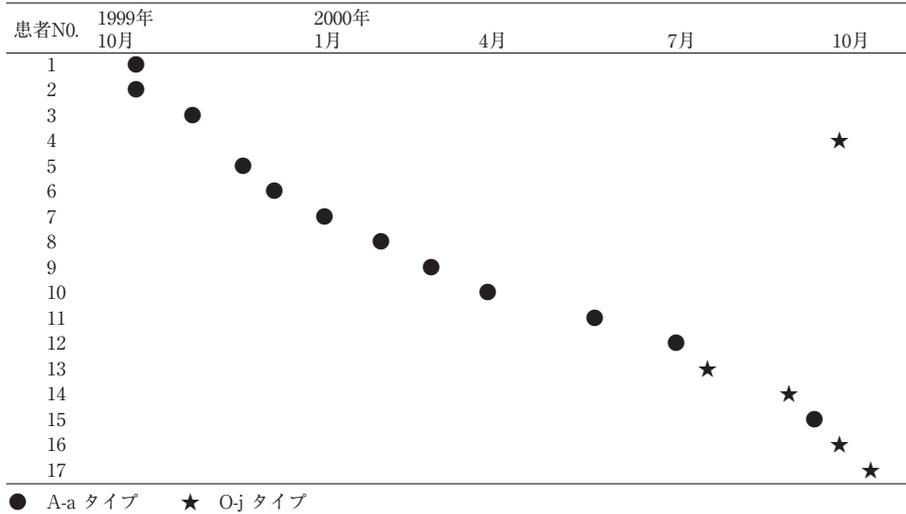


図5 V病棟における *C. difficile* の分離推移

占めたV病棟ではA-a型が12名の患者より12株(29%), O-j型が5名の患者より5株(12%)検出された(表2)。A-a型の12株はすべてToxin A<sup>+</sup> B<sup>+</sup>であり, O-j型はすべてToxin A<sup>-</sup> B<sup>+</sup>であった。V病棟におけるこの2つの型を検出した患者の分離推移を見たところ, A-a型は調査期間すべてにわたり分離されていたが, O-j型は2000年7月以降から出現した(図5)。また, *C. difficile* の分離が2~5ヵ月継続している患者も見られたが遺伝子型別は未検査のため不明であった。

### III. 考察

抗菌薬関連下痢症の疑いのある57名の患者由来の糞便より分離された *C. difficile* 59株を用いた本研究で, 本学附属病院の血液内科病棟においてA-a型(PFGE型-PCRリボタイプ)が調査期間全般に分離されたことから, この病棟での定着, 伝播の可能性が示唆された。またそれらはすべてToxin A<sup>+</sup> B<sup>+</sup>株であり, 下痢症・腸炎を起こしうる株であった。本菌による院内感染の認識は欧米と比べはるかに低く, 適切な臨床診断および検査が行われないうちに感染の実態が不明であることを加藤ら<sup>6)</sup>は指摘している。今回の調査から本菌による院内伝播が確認できたことは院内感染対策上きわめて有意義であった。本菌による下痢症・腸炎は医療器具, 医療従事者を介した接触伝播が最も問題となるが<sup>17)</sup>, Feketyは *C. difficile* 性下痢症/腸炎の予防のためのガイドラインの中でスタンダードプレコーションの徹底強化および使い捨て用手袋の使用など

の必要性をあげている<sup>18)</sup>。

今回用いたPFGE型別とPCRリボタイプングは, ほぼ相関していたがPCRリボタイプが複数のPFGE型に分かれる傾向があった(PCRリボタイプfは4つのPFGE型にg, h, jはそれぞれ2つのPFGE型に分かれた)。また, その逆でPFGEパターンが異なるPCRリボタイプを含む場合もあった(PFGE A-15は3つのPCRリボタイプ, M-32は2つのPCRリボタイプを含む)(表2)。

PCRリボタイプングでは増幅後に不安定なPCR産物を除去するため75℃30分の濃縮操作を行っているが<sup>19)</sup>, 細い不明瞭なバンドや輝度の異なるバンドの識別判定に苦慮した事例もあり, 目視判定においてバンド識別はPFGEの方が容易であった。

しかし本研究で, PFGEでのサンプル作製途中でエンドヌクレアーゼによるDNAの消化に起因すると思われる型別不能の株<sup>20)</sup>が4株検出され, それらはリボタイプがすべて異なるA<sup>+</sup> B<sup>+</sup>の株であった。加藤ら<sup>12)</sup>は, 日本の3ヶ所の病院で分離された *C. difficile* 120株中87株(73%)が型別不能株であったと報告している。今回の分析では型別不能株は少なく, 問題となった病棟においては1株だったためPFGEによるタイプングで十分疫学調査が可能であった。菌のスクレアーゼにより型別不能となる菌株の存在するPFGE法に代わって, 欧米ではPCRリボタイプングやamplified fragment length polymorphism (AFLP) という方法<sup>21)</sup>もごく最近 *C. difficile* に応用されている。国内

では石郷ら<sup>22)</sup>が arbitrarily primed PCR法を使用し、加藤らは複数のタイピングを用い疫学調査を行っている<sup>8,12,16)</sup>。我々の今回の研究では2つのDNAタイピングを用いたことにより単独の解析結果をより確実にすることができたと思われた。PFGE型だけの場合、毒素産生株と非産生株が混在した(パターン分類では混在しなかった)がPCRリボタイプを併用することにより明瞭に分けられ、きわめて信頼性のある結果が得られた。

また今回の調査で Toxin A<sup>-</sup> B<sup>+</sup>の株が8株検出されたが、従来毒素産生株は Toxin Aと Toxin Bを常に同時に産生し非産生株はどちらも産生しないとされてきた。Toxin Bは Toxin Aと異なり単独でウサギの腸管ループ試験で液体貯留を起こさないことから、Toxin Aが腸炎下痢症を引き起こす主たる毒素と考えられている。しかし最近、Toxin Bは細胞培養法で検出されるものの、モノクローナル抗体を使用した酵素結合抗体免疫アッセイで Toxin Aが検出されない菌株があることがわかってきた。加藤ら<sup>6,16)</sup>はこの菌株は Toxin Aおよび Toxin B両方の遺伝子の一部に変異が認められ、特定の血清型と関連があること、ヒトの消化管における病原性については明らかでないことを報告している。今回検出された8株では、腸炎、下痢症の程度が明らかでなく、Toxin A<sup>+</sup> B<sup>+</sup>患者の臨床的症狀と違いを示す情報は得られなかった。またリボタイプがすべてj型(PFGE型別でも1株を除きすべてO型)であったことから特定の型との関連性も考えられた。Toxin A<sup>-</sup> B<sup>+</sup>については今後さらに症例数を増やし臨床症状を加え、その臨床的意義、無症候性キャリアーとの関連について調査する必要があると思われた。

今回の調査から易感染患者の多い病棟の *C. difficile* の定着、伝播の可能性が示唆された。早期の院内感染対策として、臨床での抗菌薬の適正使用<sup>3)</sup>、危険因子を伴う患者の下痢・腸炎に対しての本菌の細菌検査の必要性の認識、発症した患者および糞便の適切な処理や使い捨て手袋の使用の徹底が大切であると考えられた。

#### 文 献

- 1) 上野一恵, 小林とよ子, 渡辺邦友: 薬剤性腸炎—細菌学的立場から, 臨床成人病, 14: 1039~1049, 1984.
- 2) 斎藤裕輔, 渡 二郎, 藤谷幹浩, 他: 薬剤性腸炎の起因薬剤と病態発生機序, 胃と腸, 35: 1117~1124, 2000.
- 3) 稲松孝思, 安達桂子: *C. difficile* による偽膜性大腸炎, 化学療法の領域, 14: 65~71, 1998.
- 4) 加藤はる, 加藤直樹: *C. difficile* 性下痢症/腸炎の検査法と疫学調査のためのタイピング法, 化学療法の領域 14: 982~990, 1998.
- 5) 加藤はる, 加藤直樹, 渡辺邦友, 他: *Clostridium difficile* と院内感染, 臨床微生物迅速診断研究会誌, 7: 11~17, 1995.
- 6) 加藤はる, 加藤直樹, 中村信一: *Clostridium difficile* の分子疫学と病原性, 日本細菌学雑誌, 53: 611~619, 1998.
- 7) 加藤直樹, 加藤はる, 渡辺邦友: 注目される感染症デオフィシル菌, 臨床科学, 33: 1145~1150, 1997.
- 8) Kato, H., N. Kato, K. Watanabe, et al.: Application of typing by pulsed-field gel electrophoresis to the study of *Clostridium difficile* in a neonatal intensive care unit. J. Clin. Microbiol., 32: 2067~2070, 1994.
- 9) Tenover, F.C., R.D. Arbeit, R.V. Goering, et al.: Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J. Clin. Microbiol., 33: 2233~2239, 1995.
- 10) 満田年宏: 分子疫学の初歩と病院感染対策 画像処理と系統樹解析, INFECTION CONTROL, 11, 232~243, 2002.
- 11) 満田年宏: 分子疫学的解析手法を感染管理の現場でどう生かすか?, INFECTION CONTROL, 11, 590~601, 2002.
- 12) Kato, H., N. Kato, K. Watanabe, et al.: Analysis of *Clostridium difficile* isolates from nosocomial outbreaks at three hospitals in diverse areas of Japan. J. Clin. Microbiol., 39: 1391~1395, 2001.
- 13) Stubbs, S. L. J., J. S. Brazier, G. L. O' Neill, et al.: 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.
- 14) Cartwright, C. P., F. Stock, S. E. Beekmann, et al.: PCR amplification of rRNA intergenic spacer regions as a method for epidemiologic typing of *Clostridium difficile*. J. Clin. Microbiol., 33: 184~187, 1995.
- 15) Cartwright, C. P., F. Stock, V. J. GILL: Improved enrichment broth for cultivation of fastidious organisms. J. Clin. Microbiol., 32: 1825~1826, 1994.
- 16) Kato, H., N. Kato, K. Watanabe, et al.: Identification of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* by PCR. J. Clin. Microbiol., 36: 2178~2182, 1998.
- 17) 岡 慎一: 偽膜性大腸炎患者腸管内における *Clostridium difficile* の動態と環境汚染について, 感染症誌, 62: 685~694, 1988.
- 18) Fekety, R.: Guidelines for the diagnosis and management of *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis. Am. J. Gastroenterol., 92: 739~750, 1997.

- 19) O'Neill G. L., F. T Ogunsola, J. S Brazier, et al.: Modification of a PCR ribotyping method for application as a routine typing scheme for *Clostridium difficile*. *Aerobe*, 2: 205 ~ 209, 1996.
- 20) 満田年宏: 分子疫学の初歩と病院感染対策 接触感染原因菌, *INFECTION CONTROL*, 10, 716 ~ 723, 2001.
- 21) Klaassen, C. H., H. A. V. Haren, A. M. Horrevorts.: Molecular fingerprinting of *Clostridium difficile* isolates: pulsed-field gel electrophoresis versus amplified fragment length polymorphism. *J. Clin. Microbiol.*, 40: 101 ~ 104, 2002.
- 22) 石郷潮美, 入山純司, 浅野裕子: *Clostridium difficile* 性下痢症/腸炎と院内感染, *医学検査*, 47: 1555 ~ 1559, 1998.

## Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing and PCR Ribotyping of *Clostridium difficile* Isolated in a University Teaching Hospital

Etsuko Sawabe<sup>1, 2)</sup>, Anna Kakezuka<sup>2)</sup>, Toshio Chida<sup>2)</sup>, Kayo Osawa<sup>4)</sup>  
Noboru Okamura<sup>2)</sup>, Isao Takebe<sup>1)</sup>, Chino Sumita<sup>1)</sup>, Hatsuko Toi<sup>1)</sup>, Noriko Huruhata<sup>1)</sup>  
Masahiro Nishibori<sup>1)</sup>, Nobuo Nara<sup>1)</sup>, Shuji Miyake<sup>3)</sup>, Yasuyuki Yoshizawa<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Clinical Microbiology Laboratory,  
Tokyo Medical and Dental University Hospital

<sup>2)</sup> Department of Microbiology and Immunology,  
Graduate School of Allied Health Sciences, Tokyo  
Medical and Dental University

<sup>3)</sup> Department of Pulmonary Medicine, Tokyo Medical  
and Dental University Hospital

<sup>4)</sup> Department of Medical Technology, Faculty of Health  
Sciences, Kobe University School of Medicine

*Clostridium difficile* strains isolated from patients hospitalized in the Tokyo Medical and Dental University Teaching Hospital from October 1999 to October 2000 were analyzed by three typing methods; pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), PCR ribotyping and PCR toxigenicity. Fifty-five of the 59 isolates were classified into 23 types (A-W) with 34 electrophoretic patterns by PFGE, and all of the isolates were classified into 27 types (a-z, aa) by PCR ribotyping. In the ward in which 70% of *C. difficile* strains were isolated, the strains with PFGE type A and PCR ribotype a were the most frequently isolated and they were all positive for both toxin A and B. These results suggested that the nosocomial spread of *C. difficile* had occurred in the particular ward.