

[原 著]

パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) 型別法の改善後における
Clostridium difficile の院内分布の解析奈田 俊¹⁾・鈴木匡弘³⁾・大蔵照子²⁾・中西由起子²⁾
望月まり子²⁾・馬場尚志^{2, 4)}・八木哲也⁵⁾

1) 前 名古屋大学医学部附属病院検査部

2) 名古屋大学医学部附属病院検査部

3) 愛知県衛生研究所

4) 名古屋大学医学部附属病院難治感染部

5) 名古屋大学医学部附属病院中央感染制御部

(平成 21 年 5 月 22 日受付, 平成 21 年 8 月 31 日受理)

2004 年 1 月から 2008 年 12 月までの 5 年間に、糞便検体から分離された *Clostridium difficile* (*C. difficile*) は 340 株であったが、そのうちトキシン遺伝子型を 248 株で決定したところ、A⁺/B⁺ が 141 株 (56.9%), A⁻/B⁺ が 26 株 (10.5%), A⁻/B⁻ が 81 株 (32.7%) であった。トキシン遺伝子保有株のうち 136 株について、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法による型別の解析を実施し、病院内での分布状態を調べた。PFGE 型では型別不能であった 4 株を除いた 132 株がデンドログラム解析で 51 種類に分類された。そのうち A 型から L 型までの 12 種類には 85 株 (62.5%) が含まれ、複数患者由来であったが、残りの 39 種類には 47 株 (34.6%) が含まれ患者固有の型であった。35 株 (25.7%) が最も多い A 型であったが、この型は泳動 buffer と泳動用ゲルに 200 μM チオ尿素を添加しない方法ではスミア状態で型別不能であった。一方、C 型の菌はすべてトキシン型 A⁻/B⁺ であった。A 型、B 型、J 型は同一年内で同一病棟からの分離例があり、施設内伝播も疑われた。同一の PFGE 型の菌が最長 5 年間分離される例もあり、*C. difficile* は芽胞を形成し院内環境に長期間生存しているか、または長期間にわたり人体から検出されることが示された。

Key words: *Clostridium difficile*, PFGE, チオ尿素, トキシン, ユニクイック

序 文

Clostridium difficile は偏性嫌気性の有芽胞グラム陽性桿菌であり、本邦の健康成人の保有率は糞便の培養結果から 7.6%とされている¹⁾。入院患者では保有率は高いとされ、海外の報告では、入院患者の 20~40%がキャリアになることが報告されている^{2, 3)}。*C. difficile* は β-ラクタム系抗菌薬をはじめ、他の多くの抗菌薬治療による菌交代症として *C. difficile* 感染症

(CDI) を引き起こし、下痢や中毒性巨大結腸症などの症状を呈し、病理組織学的には偽膜形成が見られる、いわゆる偽膜性腸炎をきたす場合もある¹⁾。*C. difficile* の毒素産生株の病原性には、トキシン A (エンテロトキシン)、トキシン B (サイトトキシン) が関与しているが、近年、北米、欧州で病原性が強いトキシン A と B の産生量が多く、また binary toxin を産生する菌が院内感染として拡散し脅威となっている^{4, 5)}。

院内感染の疫学調査においては、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法は、種々の菌種においてその優れた菌株識別能からゴールドスタンダードとみなされている⁶⁾。しかし、*C. difficile* に関しては DNA 分解により PFGE 型別不能となる菌株の存在が知られている^{7~9)}。当検査室で分離した菌株でも PFGE 型別不能のものが多く存在し、そのため、病院内での菌の

著者連絡先: (〒466-8650) 名古屋市昭和区鶴舞町 65 番地
名古屋大学医学部附属病院検査部
大蔵照子
TEL: 052-744-2614
FAX: 052-744-2613
E-mail: t-ookura@med.nagoya-u.ac.jp

広がりやを正確に把握できない状態であり、PCR リボタイピングなど他の型別法を用いて菌株の識別をしなければならなかった。最近、PFGE 法での型別不能を改善するためのプロトコルの報告¹⁰⁾があり、その方法を用いて PFGE 型別を実施したところ、良好な結果が得られた。本論文においては、過去 5 年間に分離した *C. difficile* のトキシン遺伝子型と PFGE 型別の検討を行ったので報告する。

対象と方法

1. 対象

2004 年 1 月から 2008 年 12 月までの 5 年間に、当検査室に提出された糞便検体の中で迅速トキシン検査のオーダーがあったものについてユニクイック（関東化学）を用いて検査し、同時に培養依頼のあったものについては検体をアルコールで前処理し、その混合液を CCMA 培地（日水製薬）に接種し 4 日間嫌気培養を行った¹¹⁾。発育したコロニーを純培養した後、PCR 法で *C. difficile* の同定とトキシン遺伝子の検索を行い、同時に 10% スキムミルクで -80°C で保存した。今回、トキシン遺伝子を有する株を対象として、10% スキムミルクから CCMA 培地に菌を接種して嫌気培養し、発育してきた菌株（97 名の患者からの 136 株）を PFGE に供した。

2. 方法

(1) ユニクイックを用いたトキシン A 検出法

ユニクイック（関東化学）を用いて添付文書に従い、希釈液に糞便 1 白金耳程度を入れて混和後 13,500 rpm 10 分遠心し、上清 125 μ l を試薬キットの接種部に接種して 30 分後に青いラインの有無を判定した。

(2) PCR 法を用いた *C. difficile* の同定およびトキシン遺伝子の検出

PCR 法による *C. difficile* の同定およびトキシン A および B 遺伝子検出を行った。*C. difficile* の同定には Gumerlock らの報告にあるプライマー PG48(5'-CTCTTGAACTGGGAGACTTGA-3') および PG49(5'-ACTGAGAGTAGCTTTA-3') を用いた¹²⁾。また、トキシン A および B 遺伝子検出は Kato らの報告にあるプライマー NK2(5'-CCCAATAGAAGATTCAATATTAAGCTT-3') および NK3(5'-GGAA-GAAAACAACCTTCTGGCTCACTCAGCT-3')¹³⁾ によるトキシン A または B 遺伝子の有無の確認、ならびにプライマー NK9(5'-CCACCAGCTGCAGCCATA-3'), NK11(5'-TGATGCTAATAATGAATCTAAAATGGTAAC-3') および NKV011(5'-TTTTGATCCTATAGAATCTAACTTAGTAAC-[S2]3')^{14, 15)}

によるトキシン A とトキシン B の鑑別を併用した。菌株はブルセラ HK 寒天平板（極東製薬）で 2 日間嫌気培養し、生じたコロニーを TE バッファー (pH 8.0) におよそ McFarland 1.0 から 3.0 となるよう懸濁し、100°C 10 分間加熱後 14,000 rpm で遠心分離して、その上清をテンプレートとして使用した。EXTaq（タカラバイオ）の説明書に従って 1 反応につき 20 μ l の PCR 反応液を調整し、プライマーはそれぞれ 0.2 μ M、EXTaq は 0.4 unit、テンプレートは 2 μ l を添加した。PCR 反応は PG48 および PG49、ならびに NK2 および NK3 の反応系については 95°C 20 秒、55°C 120 秒のサイクルを 35 回、NK9、NK11 および NKV011 の反応系については 95°C 20 秒、60°C 120 秒のサイクルを 35 回実施した。PCR 産物は TAE バッファーに溶解した 2% アガロースゲルにて 100 V、30 分電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色後写真撮影し、目的サイズの PCR 産物の存在を確認することで、*C. difficile* の同定ならびにトキシン A および B 遺伝子の有無を決定した。

(3) PFGE 法

PFGE 法は、Alonso らの方法¹⁰⁾に準じて実施した。保存培地から CCMA 培地（日水製薬）に発育した 1 コロニーをブレインハートインフュージョンブイオン (BHI) 培地（栄研化学）に接種し、37°C 18 時間嫌気培養を行った。BHI 培地を 3,000 rpm 20 分遠心し上清を捨て、Washing Solution (0.15 M NaCl, 0.01 M EDTA) で 3 回洗浄し、沈渣に Pett IV (10 mM Tris-HCl, 1 M NaCl) を添加し、McFarland 4.0 の濃度に調整した。この菌液 100 μ l と 1.5% 低融点アガロース（和光純薬）100 μ l を混合してプラグモールドにてゲルブロックを作製した。このゲルブロックをリゾチーム 2 mg/ml (Lysis 溶液: 10 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 100 mM EDTA, 0.5% sodium *N*-dodecanol-salcosinate (SDS) 0.2% deoxycholate, 0.5% Brij-58) の 500 μ l で、37°C 2 時間反応させて溶菌し、リゾチーム液を取り除き、プロテイナーース K（和光純薬）75 U/ml (ES solution: 0.25 M EDTA, 1% SDS) を 500 μ l 添加し、50°C 18 時間反応させてタンパク質分解を行った。さらにゲルブロックを幅 1 mm にスライスし、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 処理を行い、プロテイナーース K を不活化後、TE バッファーで 3 回洗浄した。このゲルブロックに制限酵素は *Sma*I（タカラバイオ）を 30°C 1 晩反応させて DNA を切断した。200 μ M チオ尿素（和光純薬）を添加した 0.9% アガロース（和光純薬）を作製し、そのウェルに *Sma*I 処理済みのゲルブロック片と λ ladder

表 1. 5 年間の検査結果

年	培養			ユニクイック		
	実施数 (件)	陽性数 (件)	陽性率 (%)	実施数 (件)	陽性数 (件)	陽性率 (%)
2004	233	53	22.7	237	19	8.0
2005	261	65	24.9	309	41	13.2
2006	341	57	16.7	343	52	15.2
2007	342	83	24.3	453	92	20.3
2008	384	82	21.4	612	123	20.1
合計	1,561	340	22.3	1,954	327	16.7

表 2. 培養とユニクイックを同時に依頼された検体における培養結果とトキシン A 検出結果の内訳

培養 (件)	ユニクイック (件)			
		陽性	陰性	合計
	陽性	110 (8.8%)	164 (13.2%)	274 (22.0%)
陰性	99 (7.9%)	873 (70.1%)	972 (78.0%)	
合計	209 (16.8%)	1,037 (83.2%)	1,246 (100%)	

表 3. トキシン遺伝子保有型とユニクイックの結果の比較

トキシン遺伝子保有型	ユニクイック		
		陽性	陰性
A ⁺ /B ⁺	67 (34.2%)	53 (27.0%)	120
A ⁻ /B ⁺	4 (2.0%)	16 (8.2%)	20
A ⁻ /B ⁻	17 (8.7%)	39 (19.9%)	56
合計	88	108	196

一致率
感度
特異度

62.20%
55.80%
72.30%

マーカー (Bio-Rad) を埋込んだ。電気泳動は泳動装置 (CHEF-DR II: BIO-RAD) を用いて、泳動バッファーには 200 μ M チオ尿素添加した 0.5 \times TBE を使用して、泳動条件はパルスタイム 4-30 秒 20 時間で実施した。泳動後、アガロースゲルをエチジウムブロマイド染色し撮影した。

なお、初期段階に実施した PFGE 法のプロトコールは、上記に述べた Alonso らの方法¹⁰⁾とは異なっていたが、主な相違点は、0.9%アガロースゲル (和光純薬) と 0.5 \times TBE 泳動バッファーに 200 μ M チオ尿素を添加していない点とリゾチーム、プロテイナーゼ K の濃度が約半分であった。

(5) PFGE 型の解析

泳動パターンを Finger Printing II (BIO-RAD) を使用してデンドログラム解析を行い、類似度 80%以上

を同一型とみなして、複数の菌株を含む PFGE 型を頻度の高い順に A 型から S 型までに分類したが、1 株のみの PFGE 型は単独型とした。

結 果

(1) 培養結果とユニクイックの陽性率

5 年間の培養検査とユニクイックによるトキシン A 検出結果を表 1 に示した。各年における培養件数は 233 件から 384 件と増加傾向であり、陽性率は 16.7%から 24.9%の範囲で推移を示し、ユニクイック件数は 237 件から 612 件と増加傾向であり、陽性率は 8.0%から 20.3%の範囲で推移を示した。表 2 に培養とユニクイックを同時に依頼された検体についての結果を示した。検体からの菌検出の有無とトキシン A 検出の有無が一致した検体は 78.9%で、培養陽性でト

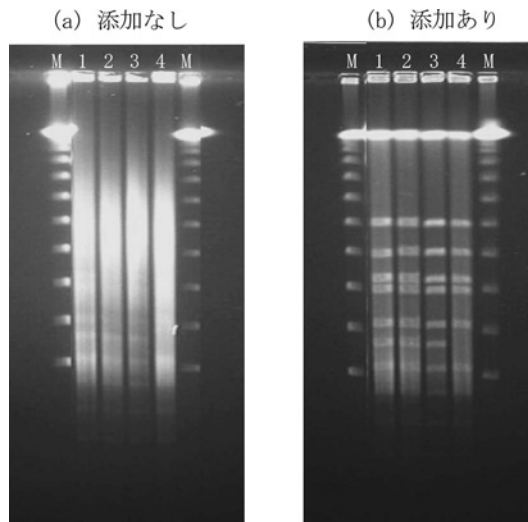


図1. チオ尿素添加前後での PFGE 型の比較
M: lambda ladder marker, 1: 菌株 NL5090, 2: 菌株 NL5092, 3: 菌株 NL5094, 4: 菌株 NL5122

キシシン A 検出も陽性であったものは 8.8%, 少なくとも片方が陽性を示したものは 29.9%, ユニクイックの陽性率は 16.8%, 培養の陽性率は 22.0%であった。

(2) トキシシン遺伝子の検出の結果

表1より5年間に *C. difficile* 培養陽性株数は 340 株であったが、そのうち 248 株でトキシシン遺伝子の検出を行った。トキシシン遺伝子保有株の内訳は A⁺/B⁺ が 141 株 (56.9%), A⁻/B⁺ が 25 株 (10.1%), A⁻/B⁻ が 81 株 (32.7%), binary toxin 陽性は 1 株であった。表3にトキシシン遺伝子の検出を行った 248 株のうち、検体からユニクイックを実施したものは 196 件であり、その結果を示した。両法の一一致率は 62.2%, PCR 法をゴールドスタンダードとするとユニクイックの感度は 55.8%, 特異度 72.3%であった。また不一致例として A⁻/B⁺ の 4 株と A⁻/B⁻ の 17 株がユニクイックで陽性の結果であった。

(3) PFGE 型の解析

チオ尿素を添加しない場合には DNA 分解によりスメア状となり型別不能であった任意の 4 菌株のゲルブロックを用いて、チオ尿素の添加の有無での PFGE パターンの比較を行った。図1に示すようにチオ尿素を添加した場合には、バンドが明瞭に確認された。

本研究の初期段階でのチオ尿素を添加しない方法⁹⁾では、DNA 分解によりバンドが確認できない型別不能株は 45 株であった。

図2に Alonso らの方法¹⁰⁾に準じて実施したチオ尿

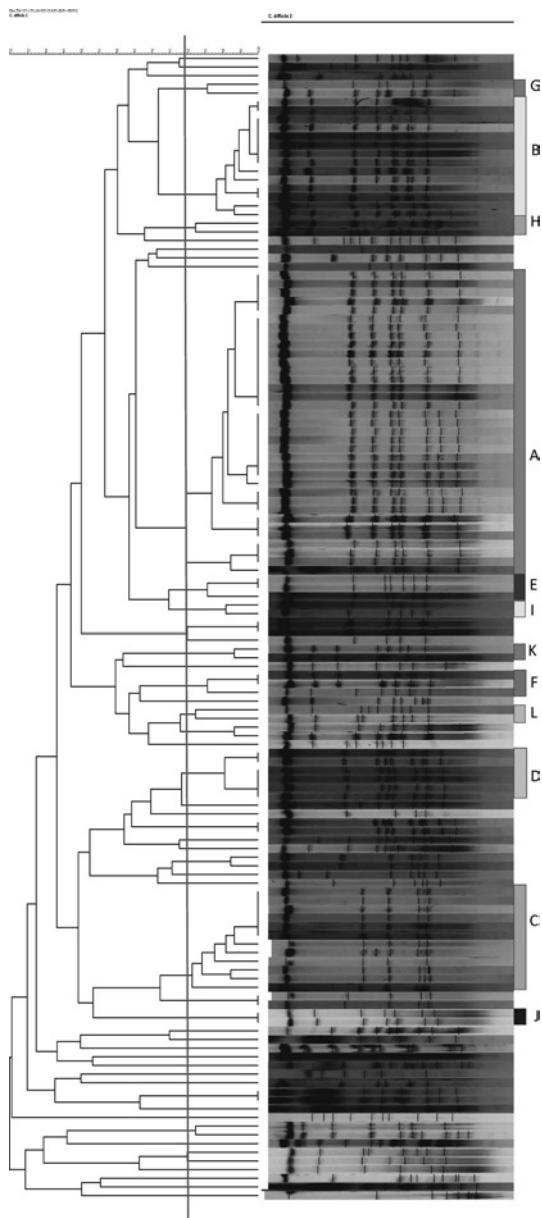


図2. *Clostridium difficile* 132 株の PFGE 型
A~L: 複数患者から分離された菌の PFGE 型
類似度 80%以上で型別した。

素を添加して PFGE 法を実施して得られた PFGE 型の dendrogram を示した。培養陽性株数は 340 株であったが、菌株保存を実施していなかったものや、保存培地から菌が発育してこない場合もあり、PFGE 法を実施できたのは患者 97 名由来の 136 株であった (表4)。そのうち 4 株については、チオ尿素を添加し

表 4. PFGE 型とトキシン遺伝子保有型による年次的変化

	PFGE 型	トキシン遺伝子 保有型	株数 (患者数)	2004 年	2005 年	2006 年	2007 年	2008 年
複数患者由来型 85 株 (62.5%)	A	A ⁺ /B ⁺	35 (23)	1 (1)		5 (5)	19 (10) ^a	10 (8) ^a
	B	A ⁺ /B ⁺	14 (14)		3 (3)	6 (6)	1 (1)	4 (4)
	C	A ⁻ /B ⁺	12 (8)		1 (1)	3 (2)	4 (3) ^b	4 (3) ^b
	D	A ⁺ /B ⁺	6 (4)	4 (2)		1 (1)	1 (1)	
	E	A ⁺ /B ⁺	3 (3)	1 (1)			2 (2)	
	F	A ⁺ /B ⁺	3 (3)			1 (1)	1 (1)	1 (1)
	G	A ⁺ /B ⁺	3 (3)		1 (1)	1 (1)		
	H	A ⁺ /B ⁺	2 (2)					2 (2)
	I	A ⁺ /B ⁺	2 (2)		1 (1)			1 (1)
	J	A ⁺ /B ⁺	2 (2)					2 (2)
	K	A ⁺ /B ⁺	2 (2)				2 (2)	
	L	A ⁺ /B ⁺	2 (2)			1 (1)		1 (1)
	患者固有型 47 株 (34.6%)	M-S (P 除く)	A ⁺ /B ⁺	12 (6)			3 (2)	3 (2) ^c
P		A ⁻ /B ⁺	2 (1)				2 (1)	
単独型		A ⁺ /B ⁺	33 (30)		2 (2)	10 (10)	7 (7)	14 (11)
型別不能 4 株 (2.9%)	NT	A ⁺ /B ⁺	4 (4)			1 (1)	2 (2)	1 (1)
合計			136 (108)*	6 (4)	8 (8)	32 (30)	44 (32)	46 (37)

*: 実質患者数は 97 名であるが, 11 名は複数の PFGE 型を示した.

a~c: 同一患者からの菌が年をまたいで分離された例.

ても型別不能であったので, 図 2 には 132 株の PFGE 型を示した。デンドログラム解析から 51 種類の型に分類された。図 2, 表 4 に示したとおり, PFGE 型の A 型から L 型は複数患者に由来する株で構成されており, 多いものから A 型 35 株 (25.7%), 次いで B 型 14 株 (10.3%), C 型 12 株 (8.9%) であった。表 4 にはそれぞれの型を示した患者数も併せて示した。PFGE 型の M 型から S 型を示した株は同一患者からの 2 株ずつ分離され, 同一の型であった。残りの 33 種類の単独型には 30 名の患者に由来していた。図 2 の PFGE 型の A 型において, バンド数が 6 本の群 (23 株) と 7 本の群 (12 株) があるが, 6 本の群のうち 9 株が同一患者由来であった。表 4 において対象とした 97 名の患者のうち, 21 名の患者からは *C. difficile* が複数回分離され, そのうち 10 名からの各々の菌株の PFGE 型は同一であったが, 11 名から分離された各々の菌株の PFGE 型は異なるものが含まれていた。したがって, 表 4 において, PFGE 型単位で集計した場合には 108 名となっている。なお, PFGE 型の C 型を示した 12 株と P 型を示した 2 株がトキシン遺伝子型では A⁻/B⁺ で, これ以外は A⁺/B⁺ であった。

(4) PFGE 型の年代別変化

表 4 に年代別に各 PFGE 型の分離株数と患者数の変化を示した。複数患者由来型は PFGE 型の A 型から L 型で 136 株のうち 85 株 (62.5%) であった。また患者固有であった M 型～S 型は合計 47 株 (34.6%) であった。H 型, J 型, K 型は単年しか分離されなかったが, 他の型は 2 年から 5 年間にわたって分離されていた。特に A 型は患者数, 菌株数とも一番多く 23 名から 35 株が分離されており, 2007 年, 2008 年の分離頻度が高かった。

考 察

表 2 において培養陽性, ユニクイック陰性株が 164 株みられたが, これはトキシン非産生株, トキシン B のみ産生株も含まれているためと考えられる。また, 培養菌の 141 株 (56.9%) が PCR でトキシン遺伝子 A⁺/B⁺ であった。また, 表 3 からトキシン遺伝子 A⁺/B⁺ の 120 株中 67 株がユニクイックで陽性であり, 検出感度は 55.8% でかなりの低値である。この原因としては, ユニクイックでは検体の質にも影響を受け水様便の場合にはトキシンが希釈されていることや検体の採取量の影響が考えられる。また, A⁻/B⁺ と A⁻/B⁻ を示した 21 株でユニクイックが陽性を示し

たが、これは検体中に複数の株の存在、ユニクックの偽陽性、あるいはPCRにおける偽陰性が原因と考えられる。また、表2において、ユニクックが陽性の209件のうち、99件(47.4%)は培養が陰性であり、培養法の困難さを表していると考えられ、培養方法も改良が必要かもしれない。

近年、*C. difficile* トキシンBを検出できるキットが発売され利用できるようになり、CDIの早期診断に有用である。また、培養法は結果がでるまで日数がかかるのが難点であり、さらに発育した*C. difficile* がトキシン非産生株である場合もある。今回実施した当院の集計ではトキシン遺伝子非保有株は32.7%であることがわかった。今回の検討したのはトキシンAのみを検出できるキットであるが、CDIの診断のため毒素の検出キットと培養は併用すべきと思われる。分離株を用いた毒素遺伝子の検索が、毒素検出キットの感度の低さを補完し、また、培養で菌が回収できない検体でもキットによる毒素検出がこの点を補完することによって感度を上げることが可能となるからである。さらに、培養法は医療施設内での疫学調査だけでなく、その地域や全国の医療施設の流行株モニタリングを行う目的のためにも必要であると考えられる。

PFGE法は、種々の菌種においてその優れた菌株識別能から、病院内感染の疫学的手法として広く応用されてきた⁶⁾。しかしながら、実際に当院で分離された*C. difficile* でPFGE法を実施したところ、MRSAなどに比較してバンドがスメア状となり、型別判定できない株が多く存在した。本研究の初期段階でのチオ尿素を添加しない方法では、DNA分解によりバンドが確認できない型別不能株は45株であったが、チオ尿素を添加した方法ではA型35株、B型1株、R型2株、単独型7株に分類された。すなわち、A型35株はすべてがチオ尿素を添加しない方法ではスメア状を示していた。

Katoらは2001年に日本の3カ所の病院からの*C. difficile* 120株中87株(73%)が型別不能であったと報告している⁷⁾。また、Sawabeらの報告によると、1999年から2004年の5年間に分離した*C. difficile* の148株のうち、55株がDNAの分解により型別不能であった。この55株はチオ尿素の添加で型別可能となり、そのうちの同一PFGE型の33株は院内で一番高頻度の型であったと報告されている⁸⁾。Sawabeら⁸⁾の泳動条件のパルスタイムが、われわれの条件とは異なっているため、この両者の型別不能株が同一型かどうか判断できない。施設間、または地域での流行株を比較するシステム開発が望まれる。

PFGE型で型別不能株が存在した報告は外国でもみられ、Bidet⁹⁾、Corkill¹⁶⁾らはスメア状態の株はPCRリボタイプ1、セロタイプGであったと報告しているが、われわれはセロタイプを実施していない。当検査室の大蔵がPCRリボタイプによる型別を実施したところ、初期の方法によるPFGE法でスメア状態の型別不能株の多くが同一PCRリボタイプと一致を示し、いくつかの病棟から集中して分離されていて同一なクローンであることが予測された。

改良したプロトコールは方法の項に詳しく記載したが、チオ尿素を添加する方法は、他にも報告^{8, 10, 17, 18)}されているのでチオ尿素の添加が、スメア状態を解決するポイントであると思われる。しかし、チオ尿素を添加してもスメア状態でバンドができないことも経験しており、DNA抽出法など何らかの他の要因の影響が考えられるので今後の課題である。

表3にPFGE法に使用した菌株の年次の推移を示したが、2004年と2005年には保存株数が少なく、2006年から2008年には培養陽性株をすべて保存することにした時期である。また、しかし、分離培地から純培養したときに発育しない、また保存培地から菌が発育してこない場合もあり、今回の検討では全菌株での検討ではなく、発育しやすい菌株に偏っている可能性があると考えられる。

PFGE型のA型は当院では流行型で35株(25.7%)が含まれ、菌株数と患者数の推移は2004年には1株(1名)、2006年には5株(5名)、2007年には19株(10名)、2008年には10株(8名)で検討した期間の後半に集中している。患者が同一病棟内で同時期に入院した例があり、施設内での伝播も疑われた。

次いでB型は14株(10.3%)であり、2008年に同一病棟からの分離例はあるが、同時期の入院歴はみられていない。PFGE型のC型は12株(8.8%)で、トキシン遺伝子型はA⁻/B⁺であり、同一病棟で同時期に分離された例はないが、過去にはA⁻/B⁺株の院内集団発生例の報告がある¹⁹⁾。また、このようなA⁻/B⁺のトキシン型には当院で実施しているユニクックでは検出できないので、当院でもA型、B型両方を検出するキットの導入を検討する必要がある。こうした主要なPFGE型の株はここ3年間に一貫して分離されており、芽胞形成を介して病院内の環境に広く分布している²⁰⁾、入院患者にも保有率が高いと考えられる。

21名の患者からは2株から10株と複数株が分離され、同一患者でPFGE型が一致したものは10例で、残り11例はPFGE型が異なっていた。この11例では、複数菌による同時感染、または菌交代による

感染であることが示唆される。

PFGE 型の K 型を示した菌は 2 患者から分離されていたが、そのうち 1 患者は外来患者で入院歴はなく外来での抗生剤投与による偽膜性腸炎と診断されている。このことは、病院外からの持ち込み例も考慮する必要があると思われる。

今回、トキシン遺伝子型別と PFGE 型別の 2 法での疫学調査を実施してきた。PFGE 型別法では、主要な型においてはバンドの数が 4 から 7 本程度と少なく、デンドログラム解析では機械的に 80%以上を同一とみなして解析した。今後 PCR リボタイピングなど他の型別法のデータも加味して、検討する必要があると思われる。

文 献

- 1) Kato, H., H. Kita, T. Karasawa, et al. 2001. Colonisation and transmission of *Clostridium difficile* in healthy individuals examined by PCR ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *J. Med. Microbiol.* 50: 720-727.
- 2) Bartlett, J.G. 2006. The new epidemic of *Clostridium difficile*-associated enteric diseases. *Ann. Intern. Med.* 145(10): 758-764.
- 3) Cookson, B. 2007. Hypervirulent strains of *Clostridium difficile*. *Postgrad. Med. J.* 83(979): 291-295.
- 4) Martin, H., B. Willey, D.E. Low, et al. 2008. Characterization of *Clostridium difficile* strains isolated from patients in Ontario, Canada, from 2004 to 2006. *J. Clin. Microbiol.* 46: 2999-3004.
- 5) Fenner, L., R. Frei, M. Gregory, et al. 2008. Epidemiology of *Clostridium difficile*-associated disease at University Hospital Basel including molecular characterisation of the isolates 2006-2007. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 27: 1201-1207.
- 6) Tenover, F.C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, et al. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2233-2239.
- 7) Kato, H., N. Kato, K. Watanabe, et al. 2001. Analysis of *Clostridium difficile* isolates from nosocomial outbreaks at three hospitals in diverse areas of Japan. *J. Clin. Microbiol.* 39: 1391-1395.
- 8) Sawabe, E., H. Kato, K. Osawa, et al. 2007. Molecular analysis of *Clostridium difficile* at a university teaching hospital in Japan: A shift in predominant type over a five-year period. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 26(10): 695-703.
- 9) Bidet, P., V. Lalande, B. Salauze, et al. 2000. Comparison of PCR-ribotyping, arbitrary primed PCR, and pulsed-field gel electrophoresis for typing *Clostridium difficile*. *J. Clin. Microbiol.* 38: 2484-2487.
- 10) Alonso, R., A. Martin, T. P. Martin, et al. 2005. An improved protocol for pulsed-field gel electrophoresis typing of *Clostridium difficile*. *J. Med. Microbiol.* 54: 155-157.
- 11) 加藤はる, 加藤直樹. 2002. *Clostridium difficile* 感染症と細菌学的検査. *日本臨床微生物学雑誌* 12: 115-121.
- 12) Gumerlock, P. H., Y. J. Tang, F. J. Meyers, et al. 1991. Use of the polymerase chain reaction for the specific and direct detection of *Clostridium difficile* in human feces. *Rev. Infect. Dis.* 13: 1053-1060.
- 13) Kato, N., C.Y. Ou, H. Kato, et al. 1991. Identification of toxigenic *Clostridium difficile* by the polymerase chain reaction: *J. Clin. Microbiol.* 29: 33-37.
- 14) Kato, H., N. Kato, K. Watanabe, et al. 1998. Identification of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2178-2182.
- 15) Kato, H., N. Kato, S. Katow, et al. 1999. Detections in the repeating sequences of toxin A gene of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 175: 197-203.
- 16) Corkill, J. E., R. Graham, C. A. Hart. 2000. Pulsed-field gel electrophoresis of degradation-sensitive DNAs from *Clostridium difficile* PCR ribotype 1 strains. *J. Clin. Microbiol.* 38: 2791-2792.
- 17) Corne, H., W. Klaassen, A. Hanneke, et al. 2002. Molecular fingerprinting of *Clostridium difficile* isolates: Pulsed-field gel electrophoresis versus amplified fragment length polymorphism. *J. Clin. Microbiol.* 40: 101-104.
- 18) Killgore, G., T. Angela, S. Jhonson, et al. 2008. Comparison of seven techniques for typing international epidemic strains of *Clostridium difficile*: Restriction endonuclease analysis, pulsed-field gel electrophoresis, PCR-ribotyping, multilocus sequence typing, multilocus variable-number tandem-repeat analysis, amplified fragment length polymorphism, and surface layer protein A gene sequence typing. *J. Clin. Microbiol.* 46: 431-437.
- 19) 佐藤洋子, 加藤はる, 小岩井健司. 2004. がんセンターにおける toxin A 陰性 toxin B 陽性 *Clostridium difficile* による下痢症の院内集団発生. *感染症誌* 78: 312-319.
- 20) Fawley, W. N., P. Paunell, P. Verity, et al. 2005.

Molecular epidemiology of *Clostridium difficile* infection and the significance of subtypes of

the United Kingdom epidemic strain (PCR Ribotype 1). J. Clin. Microbiol. 43: 2685–2696.

Analysis of *Clostridium difficile* Strains Isolated in a Hospital Using an Improved Procedure of Pulsed-Field Gel Electrophoresis

Toshi Nada¹, Masahiro Suzuki², Teruko Ohkura¹, Yukiko Nakanishi¹,
Mariko Mochizuki¹, Hisashi Baba^{1, 3}, Tetsuya Yagi⁴

¹ Department of Clinical Laboratory, Nagoya University Hospital

² Department of Microbiology and Medical Zoology, Aichi Prefecture Institute of Public Health

³ Department of Infectious Diseases, Nagoya University Hospital

⁴ Center of National University Hospital for Infection Control, Nagoya University Hospital

From January 2004 to December 2008, we isolated 340 *Clostridium difficile* strains from fecal sample, and we tested for toxin type of 248 strains using PCR method. The isolates comprise of 141 toxin type A⁺/B⁺ (56.9%), and 25 A⁻/B⁺ (10.5%), A⁻/B⁻ (32.7%), and one binary toxin type. One hundred thirty six *Clostridium difficile* isolates recovered from feces of 97 patients, were analyzed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). They were classified into 51 PFGE types using the identity criteria of $\geq 80\%$ similarity in the dendrogram analysis. Eighty-five strains (62.5%), which were isolated from different patients, were divided into 12 PFGE types (from type A to type L), and the other 47 strains showed unique 40 PFGE types. Although PFGE type A (35 strains) were the most predominant genotype, these strains showed non-typable DNA degradation until the addition of 200 μ M thiourea into 0.9% agarose gel and TBE running buffer. 12 strains of PFGE type C and 2 strains of PFGE type P were toxin A⁻/B⁺, which showed false negative results for rapid toxin detection test. As strains of PFGE type A, B, and J were isolated from the same ward in a year, these strains might spread via nosocomial transmission. Some strains with same PFGE types were isolated consistently for 2–5 years, suggesting that they are surviving in the hospital environment or in the human gastrointestinal tract for such a long time.