

動物における *Clostridioides difficile* 分離状況とヒトとの関連性

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*

受付日：2020年4月15日 受理日：2020年5月15日

Clostridioides difficile は、ヒトの抗菌薬関連下痢症・偽膜性大腸炎において主要な原因菌である。感染者は治療が困難であり再発することも多く、特に欧米ではその約10%が死にいたるとされ、年間約20,000人が*C. difficile* 感染症（CDIs）により死亡していると推計されており、大きな問題となっている。日本においては欧米ほど重症化することは少ないとされるものの、CDIsが発生している。*C. difficile* は、健康な動物からも分離され、その分子疫学解析にはPCRリボタイピングという型別方法が広く用いられており、海外では市中感染によるヒト臨床由来株と動物由来株の両方からヒトに対して特に強い病原性を示すリボタイプ078が認められ、重篤なCDIsと動物の関係が示唆されている。そこでわれわれは、日本の動物や動物から派生する食品の*C. difficile* 保有状況とCDIsの関係を明らかにすることを目的として、ワンヘルスの理念に従い研究を展開してきた。結果、日本の健康家畜および伴侶動物もヒトにCDIsを起こし得る*C. difficile* を保有していること、食品（市販肉や野菜）も低率であるが*C. difficile* に汚染されていることを明らかにした。本総説では、われわれの研究成果による日本の動物等における*C. difficile* の分布状況について紹介する。

Key words: antibiotic-associated diarrhea, *Clostridioides difficile*, community acquired infection, One Health

はじめに

Clostridioides (Clostridium) difficile は、ヒトの抗菌薬関連下痢症・偽膜性大腸炎において主要な原因菌であり、抗菌薬の治療を受けた後に発症することが多く重要な医療関連感染症とされる。感染者は治療が困難であることが多く、適切に治療しても約30%で再発が認められるとされ、特に欧米ではその約10%が死にいたるとされる。アメリカでは、年間約20,000人が*C. difficile* による感染症（CDIs）により死亡していると推計されており、Centers for Disease Control and Prevention (CDC) はCDIsを最も警戒が必要な細菌感染症（urgent threat）と指定している¹⁾。また、近年、世界各国で報告数が

増加傾向にある^{2,3)}。日本においては欧米ほどCDIsが重症化することが少なく、報告数も少ないとされてきたが、病院での検査の頻度などが重症例や報告数の頻度の低さに影響している可能性も指摘されており、日本においても重要な医療関連感染症である⁴⁾。その重要性から2018年には國島らが中心となり『*Clostridioides (Clostridium) difficile* 感染症診療ガイドライン』が作成された⁵⁾。

これまで、CDIsは主に医療関連感染症とされてきたが、近年、市中感染型のCDIs（CA-CDIs）の報告が海外において増加している⁶⁻⁸⁾。CA-CDIsとは、過去12週以内に入院歴がなく、抗菌薬の投与がないにもかかわらずCDIsを発症する例をいう⁹⁾。海外では、*C. difficile* は、動物、食品、環境などが

*北海道江別市文京台緑町582

Table 1. Presence and characterization of *C. difficile* in Japanese animals and foods

Source		% Positive ratio (positive/ tested samples)	% Toxigenic (toxigenic/ isolated strains)	Main PCR ribotypes or specific ribotypes	Study period	References
Livestock	Finishing pig	0.8 (2/250)	50 (1/2)	078	2011	¹³⁾
	Piglet	57.5 (69/120)	61 (61/100)	078	2012	¹⁴⁾
	Cattle	N.D. (0/119)	—	—	2015	¹⁵⁾
	Calves	17 (8/47)	100 (16/16)	—	2015	¹⁵⁾
Companion animals	Dogs	30 (62/204)	47 (32/68)	—	2013	¹⁹⁾
Meats	Beef meat	1.6 (2/127)	100 (2/2)	—	2015-2019	¹⁶⁾
	Pork meat	0.5 (1/200)	0 (0/1)	—	2015-2019	¹⁶⁾
	Pig liver	N.D. (0/24)	—	—	2015-2019	¹⁶⁾
	Chicken meat	6.7 (6/89)	16.7 (1/6)	—	2015-2019	¹⁶⁾
	Chicken liver	3.6 (1/28)	0 (0/1)	—	2015-2019	¹⁶⁾
Vegetables	Raw vegetables	3.3 (8/242)	44.4 (4/9)	014	2015-2017	¹⁶⁾
Compost	Manure compost	36 (5/14)	82 (9/11)	078	2014-2015	¹⁷⁾

—: Data not available or not applicable.

N. D., Not determined.

らも分離されている。*C. difficile* の分子疫学解析には PCR リボタイピングという型別方法が広く用いられているが (16S rRNA と 23S rRNA 遺伝子に挟まれた領域の多様性を PCR 法を利用し分類したもの)、ヒトの CDIs における原因菌と類似の分子疫学性状を示す株がそれらの由来から分離されることが海外において報告されている¹⁰⁾。特に、海外でヒトに対して強い病原性を示すリボタイプ 078 が、動物などから分離されており、重篤な CDIs と動物などの関係、CA-CDIs の原因である可能性が示されている¹¹⁾。日本における CA-CDIs の疫学は不明であるが、日本でも CA-CDIs は報告されている¹²⁾。一方で、日本において動物、食品、環境等における *C. difficile* の分布状況は不明であった。そこでわれわれは、日本の動物とそれに関連する食品や環境における *C. difficile* 保有状況とヒトの CDIs の関係を明らかにすることを目的として、ワンヘルスの理念に従い研究を展開してきた。本総説ではその成果を紹介する。

1. 家畜での *C. difficile* 分布状況

海外ではこれまで家畜の中でも豚糞便からの分離報告が比較的多い¹⁰⁾。そこで、日本の豚における *C. difficile* の分布状況を明らかにするため、出荷直前の豚糞便 250 検体から *C. difficile* の分離を行った¹³⁾。結果、2 検体 (0.8%) から *C. difficile* が分離された (Table 1)。次に、海外の報告をもとに出荷前の豚

に比べて分離率が高いことが予想された子豚糞便 120 検体から、*C. difficile* の分離を行った¹⁴⁾。結果、69 検体 (57.5%) から *C. difficile* が分離された (Table 1)。豚糞便と子豚糞便の分離株について、毒素遺伝子保有率はそれぞれ 50% および 61% であった。また、分離株の多くは、動物とヒトの間での拡散が指摘されている強毒型リボタイプ 078 であり、日本の豚が強毒株を高率に保菌していることが明らかとなった。現在のところ、日本のヒトにおいて、ヒトに対して強い病原性を示すことが知られているリボタイプ 078 のような *C. difficile* は拡散していないが、CA-CDIs の報告の増加との関連も含めて、今後は注意が必要である。

さらに、豚由来 *C. difficile* のうち、リボタイプ 078 に分類された株について、海外のリボタイプ 078 株 (豚由来株およびヒト臨床由来株) と MLVA 解析 (リボタイプ以上に詳細な分子疫学解析方法, multi-locus variable-number tandem repeat analysis, 反復配列の繰り返し回数による比較) により比較したところ、遺伝学的に近縁であった。日本は、海外より種豚を輸入していることから、種豚を介して強毒型の *C. difficile* が伝播した可能性がある¹⁴⁾。そのため、*C. difficile* に限らず動物を介した海外からの病原微生物の侵入の可能性については、注視し予防していく必要がある。

また、日本の牛について出荷前の牛糞便 119 検体

と子牛糞便 47 検体から *C. difficile* の分離を行ったところ、子牛糞便 8 検体 (17%) から *C. difficile* が分離された¹⁵⁾ (Table 1)。一方で、出荷前の牛からは *C. difficile* が分離されなかった。子牛から分離された株のすべてが毒素産生性を示し、そのうち 69% は強い毒素産生性を示したことから、ヒトへ伝播した際には、CDIs を引き起こす可能性があることが示された。

II. 家畜からヒトへの *C. difficile* 伝播の可能性

家畜からヒトへの *C. difficile* の伝播を防ぐためには、伝播経路を明らかにする必要がある。家畜からヒトへの主要な伝播経路として考えられるのは食肉を介して伝播するという経路である。そこで、日本の市販肉 (鶏肉 89 検体、鶏レバー 28 検体、豚肉 200 検体、豚レバー 24 検体、牛肉 127 検体) から、*C. difficile* を分離した。結果、鶏肉 6 検体 (6.7%)、鶏レバー 1 検体 (3.6%)、豚肉 1 検体 (0.5%)、牛肉 2 検体 (1.6%) から *C. difficile* が分離された¹⁶⁾ (Table 1)。豚レバーからは、分離されなかった。細かい分離法などが異なるため、海外の分離率と比較するのは難しいが、海外と比べて肉からの *C. difficile* の分離率は低い傾向を示した。鶏肉からの分離率が、豚肉や牛肉からの分離率に比べて比較的高いのは、他の腸内細菌科細菌における分離率と同様の傾向であり、食肉処理過程法の違い (牛と豚は個別に処理、一方で鶏はまとめて処理) によるものと考えられる。また、牛肉由来株は子牛糞便由来株と類似した分子疫学性状を示し、食肉処理の過程で牛が保有する *C. difficile* が肉に伝播したことが示唆された。

家畜糞便の多くは、堆肥として処理され、堆肥は農作物を栽培する圃場に散布される。通常、堆肥に含まれる病原微生物は堆肥化の工程における発酵熱により死滅するとされるが、*C. difficile* は芽胞形成菌であり、堆肥化を経ても残存することが予想され、堆肥から土壌、農作物等を介してヒトへ伝播する可能性がある。そこで、実際に豚農場の完熟堆肥 14 検体から *C. difficile* の分離を行ったところ 5 検体 (36%) から *C. difficile* が分離された¹⁷⁾ (Table 1)。分離株の中には、強毒株であるリボタイプ 078 も含まれた。以上のことから、堆肥化処理を経ても *C. difficile* は死滅せず、堆肥中に残存することが明らかとなり、ヒトへの伝播経路の一つとなっていることが示唆された。実際、市販野菜 242 検体から *C. diffi-*

cile を分離したところ 8 検体 (3.3%) から *C. difficile* が分離された¹⁶⁾。野菜は生で食することもあることから、野菜からの *C. difficile* のヒトへの伝播を防ぐため、よく水で流してから食するなど、注意が必要であることが考えられる。

野菜由来株の中には、日本のヒト臨床現場でも比較的良好に分離されるリボタイプ 014 が分離された。リボタイプ 014 は海外においても環境を含むさまざまな由来から分離報告があり¹⁸⁾、広く世界中に広がっている可能性がある。

III. 伴侶動物における *C. difficile* 分布状況

動物からヒトへの *C. difficile* の伝播リスクを考えた際、ヒトと接触の機会が多い伴侶動物が *C. difficile* を保菌している場合にリスクが高いと考えられた。そこで、日本のイヌ糞便 204 検体について *C. difficile* 保有状況を調べたところ 62 検体 (30%) が陽性を示した¹⁹⁾ (Table 1)。イヌに関しては、豚や牛と異なり年齢による分離率の差は認められなかった。毒素産生性を示す株は 47% であった。また、日本のある病院で分離されたヒト由来株とリボタイプや PFGE (pulsed field gel electrophoresis) 解析による比較を行ったところ同一の株が存在した。そこで、それらの株について、全ゲノム配列を明らかにし比較したところ、きわめて類似のゲノム配列を示した。以上のことから、イヌはヒトに CDIs を起こし得る *C. difficile* を保有していることが示された。よって、伴侶動物の一部はヒトに対して病原性を示す *C. difficile* を保有しており、伴侶動物との過度な接触は *C. difficile* の伝播リスクがあることが示された。現在のところ、日本の猫における *C. difficile* の分布状況について調べたデータはないが、海外では猫からの分離報告もあり²⁰⁾、今後、日本の猫における分布状況についても解明の必要があると考えられる。

IV. 動物および食品由来 *C. difficile* の薬剤感受性状況

これまでにわれわれが分離してきた動物および食品由来 *C. difficile* の薬剤感受性状況について Table 2 に示す。CDIs の治療には、バンコマイシンやメトロニダゾールが使用される。バンコマイシンに対する感受性について、過去の日本における臨床分離株をもとにして算出したブレイクポイント (耐性は 32 mg/L 以上)¹⁴⁾ より耐性を判定すると、日本で分離された動物および食品由来 *C. difficile* はすべて

Table 2. Antimicrobial susceptibility of *C. difficile* isolates from animals and foods in Japan

Antimicrobials	MIC ($\mu\text{g/mL}$) Break point	Livestock (Piglet, Calves) ^{14, 15)}		Companion animals (Dogs) ¹⁹⁾		Retail foods ¹⁶⁾	
		MIC ($\mu\text{g/mL}$)	No. of resistant isolates (n = 116)	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	No. of resistant isolates (n = 68)	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	No. of resistant isolates (n = 20)
		Range		Range		Range	
Vancomycin	$\geq 32^a, \geq 2^b$	1-4	0, 10 (9%) ^d	0.5-8	0, 1 (2%) ^d	0.25-1	0, 0
Metronidazole	$\geq 32^c, \geq 2^b$	0.125-8	0, 10 (9%) ^d	0.6-1	0, 0	0.125-0.5	0, 0
Clindamycin	$\geq 8^c$	0.25->256	67 (58%)	0.5-256	60 (88%)	1-16	10 (50%)
Ceftriaxone	$\geq 64^c$	2->256	6 (5%)	32-256	40 (59%)	8-32	0
Erythromycin	$\geq 8^a$	1->256	51 (44%)	0.5-256	16 (24%)	0.25-4	0
Ciprofloxacin	$\geq 4^a$	0.5-128	91 (78%)	4-256	32 (47%)	2-8	18 (90%)

MIC, minimum inhibitory concentration.

^a The value was the previous report break point¹⁴⁾.

^b The value was the EUCAST break point.

^c The value was CLSI break point.

^d Resistant isolates were classified by EUCAST break point.

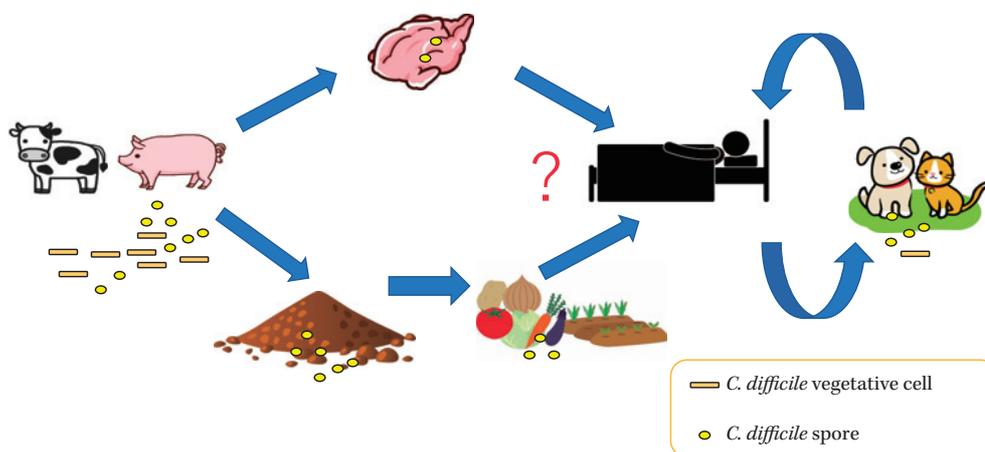


Fig. 1. Estimation of the transmission routes of *C. difficile* among humans, animals, foods, and the environment

感受性を示したが、The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) に定められたブレイクポイント (耐性は 2 mg/L 以上) より耐性を判定すると家畜由来株の 9%、イヌ由来株の 2% が耐性を示した。メトロニダゾールの感受性について、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) のブレイクポイント (耐性は 32 mg/L 以上) をもとに耐性を判定すると、動物および食品由来 *C. difficile* はすべて感受性を示したが、EUCAST に定められたブレイクポイント (耐性は 2 mg/L 以上) より耐性を判定すると家畜由来株の 9% が耐性を示した。日本の動物および食品由来 *C. difficile* はバンコマイシンおよびメトロニダゾール

に対して、概ね感受性を示したが、EUCAST のブレイクポイントより判定すると、耐性を示す株も存在した。また、メトロニダゾールに関しては、日本の動物病院でも比較的良好に使用される抗菌薬であり、他国においては動物由来 *C. difficile* のメトロニダゾールに対する感受性が低下していることが報告されている²¹⁾。以上のことから、今後の動物および食品由来 *C. difficile* のバンコマイシンおよびメトロニダゾールに対する耐性動向については注視が必要である。さらに、その他の抗菌薬に対する耐性株も認められたが、耐性率については、ヒトの臨床由来株と比較して低い傾向を示した (ヒトの臨床由来株は抗菌薬の投与を受けた後に分離された株が多いた

め、高い耐性割合を示しやすいと考えられる)¹⁴⁾。現在、動物からヒトへの耐性菌の伝播が懸念されている。*C. difficile* についても動物において薬剤耐性を獲得し、ヒトへ伝播する可能性があり、ヒトが細菌感染症になった際に抗菌薬の有効性を保つためにも、獣医療においても抗菌薬の慎重使用が求められる。

おわりに

現在、日本を含む各国において CA-CDIs の増加が報告されており、われわれの研究成果からも動物や環境との関連も示唆される (Fig. 1)。現在のところ、ヒトおよび動物において *C. difficile* の分布についてモニタリングするプログラムは日本にはない。今後、海外のデータと比較し、ヒトへの伝播および拡散を防ぐためにも、各分野において *C. difficile* のモニタリングシステムをつくり、その関連について継続的にモニタリングをしていく必要があると考える。そのうえで、伝播経路の遮断、動物分野においては動物における保菌率の低減方法、海外からの侵入防止等の対策が必要となると考えている。

利益相反自己申告：著者白井優は受託研究・共同研究費としてミヤリサン製薬株式会社、DS ファーマアニマルヘルス株式会社より資金援助を受けている。

文献

- Centers for Disease Control and Prevention: Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013 [cited 2020 Aug 19] <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-Threats-2013-508.pdf>
- Lessa F C, Mu Y, Bamberg W M, Beldavs Z G, Dumyati G K, Dunn J R, et al: Burden of *Clostridium difficile* infection in the United States. *N Engl J Med* 2015; 372: 825-34
- McDonald L C, Owings M, Jernigan D B: *Clostridium difficile* infection in patients discharged from US short-stay hospitals, 1996-2003. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 409-15
- Kato H, Senoh M, Honda H, Fukuda T, Tagashira Y, Horiuchi H, et al: *Clostridioides (Clostridium) difficile* infection burden in Japan: A multicenter prospective study. *Anaerobe* 2019; 60: 102011
- 國島広之, 大毛宏喜, 鈴木広道, 中村 敦, 松本一明, 三鴨広繁, 他: *Clostridioides (Clostridium) difficile* 感染症診療ガイドライン, 日本化学療法学会/日本感染症学会, 東京, 2018
- Anderson D J, Rojas L F, Watson S, Knelson L P, Pruitt S, Lewis S S, et al: Identification of novel risk factors for community-acquired *Clostridium difficile* infection using spatial statistics and geographic information system analyses. *PloS One* 2017; 12: e0176285
- Clohessy P, Merif J, Post J J: Severity and frequency of community-onset *Clostridium difficile* infection on an Australian tertiary referral hospital campus. *Int J Infect Dis* 2014; 29: 152-5
- Nanwa N, Sander B, Krahn M, Daneman N, Lu H, Austin P C, et al: A population-based matched cohort study examining the mortality and costs of patients with community-onset *Clostridium difficile* infection identified using emergency department visits and hospital admissions. *PloS One* 2017; 12: e0172410
- Cohen S H, Gerding D N, Johnson S, Kelly C P, Loo V G, McDonald L C, et al: Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA). *Infect Control Hosp Epidemiol* 2010; 31: 431-55
- Hensgens M P, Keessen E C, Squire M M, Riley T V, Koene M G, de Boer E, et al: *Clostridium difficile* infection in the community: a zoonotic disease? *Clin Microbiol Infect* 2012; 18: 635-45
- Kuijper E J, Coignard B, Tüll P: Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12 (Suppl 6): 2-18
- 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* 2015; 21: 864-7
- Asai T, Usui M, Hiki M, Kawanishi M, Nagai H, Sasaki Y: *Clostridium difficile* isolated from the fecal contents of swine in Japan. *J Vet Med Sci* 2013; 75: 539-41
- Usui M, Nanbu Y, Oka K, Takahashi M, Inamatsu T, Asai T, et al: Genetic relatedness between Japanese and European isolates of *Clostridium difficile* originating from piglets and their risk associated with human health. *Front Microbiol* 2014; 5: 513
- Usui M, Harada M, Kawabata F, Sato T, Higuchi H, Tamura Y: Prevalence of *Clostridium difficile* in Japanese cows and calves. *J Jpn Vet Med Assoc* 2018; 71: 261-5
- Usui M, Maruko A, Harada M, Kawabata F, Sudo T, Noto S, et al: Prevalence and characterization of *Clostridioides difficile* isolates from retail food products (vegetables and meats) in Japan. *Anaerobe* 2019; 61: 102132
- Usui M, Kawakura M, Yoshizawa N, San L L, Nakajima C, Suzuki Y, et al: Survival and prevalence of *Clostridium difficile* in manure compost derived from pigs. *Anaerobe* 2017; 43: 15-20
- Collins D A, Riley T V: *Clostridium difficile* in Asia: Opportunities for One Health Manage-

- ment. Trop Med Infect Dis 2018; 4: 7
- 19) Usui M, Suzuki K, Oka K, Miyamoto K, Takahashi M, Inamatsu T, et al: Distribution and characterization of *Clostridium difficile* isolated from dogs in Japan. Anaerobe 2016; 37: 58-61
- 20) Koene M G, Mevius D, Wagenaar J A, Harmanus C, Hensgens M P, Meetsma A M, et al: *Clostridium difficile* in Dutch animals: their presence, characteristics and similarities with human isolates. Clin Microbiol Infect 2012; 18: 778-84
- 21) Spigaglia P, Drigo I, Barbanti F, Mastrantonio P, Bano L, Bacchin C, et al: Antibiotic resistance patterns and PCR-ribotyping of *Clostridium difficile* strains isolated from swine and dogs in Italy. Anaerobe 2015; 31: 42-6

Prevalence of *Clostridioides difficile* in animals and its relationship with human infections

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, Hokkaido, Japan

Clostridioides difficile (*C. difficile*) is the major causative agent of antibiotic-associated diarrhea, and of pseudomembranous colitis, its more severe form, in humans. These conditions are difficult to treat, and the infection frequently relapses. It is estimated that about 10% of the patients die of this infection in Western countries. In the United States, the Centers for Disease Control and Prevention cautions that *C. difficile* infections (CDIs) pose an urgent threat to public health. Although the severity of CDIs in Japan is lower than that in the Western world, this infection is also a public health concern in Japan. *C. difficile* has also been isolated from healthy animals. Based on molecular analysis similar ribotypes were observed among *C. difficile* strains isolated from community-acquired cases of CDI, as well as from healthy animals. We isolated and characterized *C. difficile* from Japanese animals and food products. We found pathogenic *C. difficile* contamination in healthy livestock, companion animals, and retail foods, including meats and vegetables. In this review, we show the prevalence and characteristics of *C. difficile* isolated from Japanese animals and foods through the One Health approach.