

## 砂場における *Clostridium difficile* の汚染状況

金沢大学大学院医学系研究科環境医科学専攻細菌感染症制御学  
(旧講座名：微生物学)  
(主任：清水 徹教授)

小 幡 葵

*Clostridium difficile* は偽膜性大腸炎の原因菌であり、抗菌薬関連大腸炎/下痢症の主要な原因菌である。また、*C. difficile* は院内感染下痢症の重要な原因菌の一つであり、病院等における集団発生が多く報告されている一方で、市中感染も存在し、その感染経路や感染源に関してはほとんど解明されていない。これまでに *C. difficile* は小児における保有率が高いことが明らかになっており、ヒトを取り巻く様々な環境中に存在する *C. difficile* が環境を介して小児に伝播していることが考えられているが、日本において環境からの伝搬経路の検討はこれまでなされていない。本研究では、日常的に小児が接触しベットの動物の糞便等で汚染されやすい公園の砂場を対象として、土中における *C. difficile* の存在を検討し、さらに分離された *C. difficile* 菌株を毒素型タイピング、PCRリボタイピング、およびパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) タイピングを用いて解析することにより、公園の砂場の *C. difficile* 汚染の実態を検討した。石川県金沢市にある40の砂場からの *C. difficile* の分離頻度は47.5%であり、近隣の田および山林からはまったく分離されなかったことより、公園の砂場はそこで遊ぶ小児への *C. difficile* 感染源になり得ることが示唆された。また、砂から分離された *C. difficile* 菌株のタイピングの結果、ほとんどの分離菌が分子疫学上非常に近縁な菌株、あるいは特定の菌株が連続的に小さな変異を繰り返して生じた菌株であったことから、*C. difficile* 菌株の伝播は地域に密接した行動をとる保菌者や汚染源によって起きることが示唆され、特にベットのネコが伝搬に関与している可能性が考えられた。さらに、同一タイプの *C. difficile* が時期を経ても同じ砂場から検出されたことから、砂場を介した *C. difficile* のヒトへの伝播を防ぐには、定期的に砂の入れ替えを行う等の衛生上の対策が必要であると考えられた。以上のことより、*C. difficile* による市中および院内における伝播経路や偽膜性大腸炎を含む抗生物質関連下痢症の疫学的要因を考える上で、身近な環境からの汚染を常に考慮することの重要性が示唆された。

---

**Key words** *Clostridium difficile*, pseudomembranous colitis, hospital infection, community-acquired infection, genotyping.

---

*Clostridium difficile* は偽膜性大腸炎の原因菌であり、抗菌薬関連大腸炎/下痢症の主要な原因菌である<sup>1)</sup>。また *C. difficile* は院内感染下痢症の重要な原因菌の一つであり、病院等における集団発生が多く報告されているが、市中感染も存在する<sup>2)4)</sup>。その感染経路や感染源に関して、病院内においてはスタッフの手指を含む病院環境などが明らかになってきているのに比べ、市中感染の感染経路や感染源はほとんど解明されていない。

一方、これまでの研究により *C. difficile* は小児における保有率が高いと報告されてきている<sup>5)6)</sup>。他の市中感染同様、その伝搬および感染経路の解明は不十分であるが、*C. difficile* はヒトを取り巻く様々な環境中に存在することが報告されており、これらの環境を介して小児に伝播していることが考えられる<sup>7)8)</sup>。海外においては、生活の場に存在する土壌が *C. difficile* に汚染されていて、感染経路となりうるということが報告されているが<sup>9)</sup>、日本において同様の検討はこれまでなされていないのが現状である。そこで本研究では、日常的に小児が接触し、さらにベッ

トなど動物の糞便等で汚染されやすい公園の砂場を対象として、土中における *C. difficile* の存在を検討した。さらに砂場の土より分離された *C. difficile* 菌株を毒素遺伝子型別、PCRリボタイピングおよびパルスフィールドゲル電気泳動 (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE) を用いて解析することにより、公園の砂場の *C. difficile* 汚染の実態を検討し考察した。

### 材料および方法

#### 1. 対象

石川県金沢市内にある公園の砂場40ヶ所を対象とし (図1)、砂場1ヶ所につき四隅と中央部分の砂計5検体を採取した。採取した砂は実験に供するまで4℃にて保存した。さらに、*C. difficile* が検出された砂場のうち2ヶ所について4ヶ月間隔で3回同様の検査を実施した。また、検体を採取した砂場と同一地域にある近隣の田および山林各20ヶ所から1ヶ所につき1検体の土を採取し同様の検査を行った (図1)。

平成19年5月8日受付, 平成19年6月8日受理

Abbreviations : L-CCMA, lysozyme-cycloserine-cefoxitin-mannitol agar; PFGE, pulsed-field gel electrophoresis

## II. *C. difficile* の分離培養

検体となる砂からの *C. difficile* の分離培養は、アルコール処理による芽胞選択を行い、lysozyme-cycloserine-cefoxitin-mannitol agar (L-CCMA) (方法1)、及び半流動性培地 (方法2) を使用することにより行った。

本研究で使用したL-CCMA培地の組成は、1Lあたり、プロテアーゼペプトン No.2 (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA) 40g; 寒天 20g; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g; NaCl 2g; MgSO<sub>4</sub> 0.1g; マンニトール 6g; ニュートラルレッド (1%エタノール溶液) 3ml; タウロコール酸ナトリウム (ナカライテスク, 京都) 1g; cycloserine (ナカライテスク) 300mg; cefoxitin (Sigma, St.Louis, USA) 10mg; lysozyme 1gであった。また、半流動性培地の組成は上記L-CCMA培地中の寒天を5gとし、ニュートラルレッドおよびlysozymeを除いたものを用いた。

検体5gと99.5%エタノール5mlを混合し、室温にて30分間静置して芽胞以外の菌を死滅させた。その後もう一度混和し、砂が沈降した後上清を回収した。その上清を3krpmで30分間、室温にて遠心分離し、沈殿を回収して、生理食塩水200 $\mu$ lにて牽濁した。100 $\mu$ lの処理検体を予備還元したL-CCMA培地に塗布し、48時間嫌気培養した。残り100 $\mu$ lの処理検体は半流動性培地に嫌気下で混和し、37 $^{\circ}$ C, 48時間嫌気培養した。それぞれの検体について、コロニーの性状から *C. difficile* と判定された1コロニーを無作為に分離し、それを継代および保存した。

## III. *C. difficile* の同定

*C. difficile* の同定は、Allenら<sup>9)</sup>、及びKatoら<sup>10)</sup>の方法に従って行い、*C. difficile* のrRNA遺伝子を検出するPCRにより確認した<sup>11)</sup>。毒素遺伝子のタイピングはKatoら<sup>10)</sup>の方法に従いPCR法により行った。すなわち、既報<sup>10)12)</sup>においてKatoらが設計した配列をもつプライマーセットNK3-NK2, NK11-NK9, NK104-NK105を合成して用い、toxin A陽性・toxin B陽性 (A+・B+)、toxin A陰性・toxin B陽性 (A-・B+)、toxin A陰性・toxin B陰性 (A-・B-) の毒素遺伝子型別同定を行った。

## IV. *C. difficile* のタイピング

PCRリポタイピングはStubbsら<sup>13)</sup>の方法に準じて行った。得られたPCR産物は75 $^{\circ}$ Cで30分間加熱することにより濃縮後、3%アガロースゲル (ナカライテスク) にて定電圧12V/cm, 4時間電気泳動し解析した。PFGEによるタイピングは、Katoら<sup>10)</sup>の方法に従って行った。*C. difficile* を嫌気培養後、集菌、洗浄し、ゲルブロックを作成した。ゲルブロックを溶解緩衝液 [0.8%サルコシル (Fluka, Buchs, Switzerland), 1.5mg/ml proteinase K (ナカライテスク), 0.5M EDTA, 10mM Tris-HCl(pH8.0)] 中にて50 $^{\circ}$ C, 一晚静置することにより、溶菌およ

びDNA抽出を行った。ゲルブロックをTris-EDTA緩衝液 (10mM Tris-HCl [pH7.5], 1mM EDTA) で洗浄し proteinase K を取り除いた後、制限酵素 *Sma*I (NEB, Beverly, USA) を用い、得られたDNAを制限消化した。電気泳動は、6V/cm, パルスタイム25秒3時間, 50秒20時間で行った。PFGEのバンドパターンの解析はTenoverら<sup>15)</sup>の判定基準を参考に、DNAバンド4本以上の差異をメジャータイプ, 3本以下の差異をサブタイプとして判定した。

## 成 績

### I. *C. difficile* の分離方法による検出率の違い

検体の採取は金沢市内において適度に分散し、かつお互いにそう遠く離れていない40カ所の砂場と、それら砂場の近隣に存在する田および山林それぞれ20カ所から行なった (図1)。砂場からの計200検体について、方法1でのみ陽性となったのは10検体 (全検体数の5%)、方法2でのみ陽性となったのは17検体 (8.5%)、両方法とも陽性となったのは10検体 (5%) で、*C. difficile* 陽性検体は全部で37検体 (18.5%) であった (表1)。また、近隣の田および山林の検体からは方法1および方法2いずれの方法でも分離されなかった (表1)。

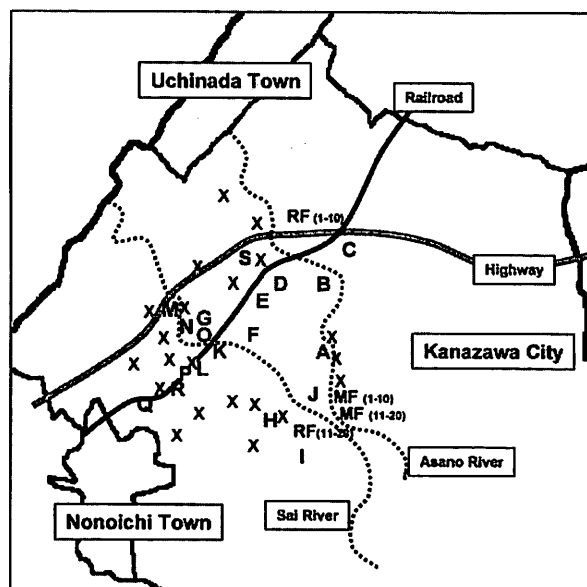


Fig. 1 The location of public park sandpits (A to S, and X), rice fields (RF), and mountain fields (MF) in Kanazawa city from which soil samples were collected. The *C. difficile*-positive sandpits were shown as A to S (corresponding to A to S in Table 2), whereas *C. difficile*-negative ones were indicated by X.

Table 1 Isolation results for *C. difficile* in soil

Sample	Number of samples tested	Number (%) of <i>C. difficile</i> positive samples by method 1	Number (%) of <i>C. difficile</i> positive samples by method 2	Number (%) of <i>C. difficile</i> positive samples by both method 1 and 2
Sandpit	200	10(5)	17(8.5)	10(5)
Rice field	20	0(0)	0(0)	0(0)
Forest	20	0(0)	0(0)	0(0)

## II. 砂場からの分離頻度及びタイピング

砂場40ヶ所中19ヶ所(47.5%)において5検体の砂から1検体以上の*C. difficile*が分離された(表2)。1検体からそれぞれ1菌株を分離し、合計36菌株を対象に毒素型タイピング、PCRリボタイピング、およびPFGEタイピングを行った。毒素型タイピングの結果、すべての分離菌株のうち16菌株がトキシンA陽性・トキシンB陽性株で、21菌株がトキシンA陰性・トキシンB陰性株であった。しかしながらトキシンA陰性・トキシンB陽性株は分離されなかった。さらにPCRリボタイピングでは計11の異なるタイプが認められ、PFGEタイピングにおいては36株中35株が17メジャータイプに分けられ、それらはさらに22のサブタイプに分けられた。残りの1株については、調製時のDNA分解のためにPFGEによるタイピングは不可能であっ

Table 2 Typing results of *C. difficile* from soil

Samdpt	PCR ribotype/PEGE type <sup>1)</sup> , toxin gene type <sup>2)</sup> , of isolates(number of isolates)
A	nak/S11, A <sup>+</sup> B <sup>+</sup> (1)
B	tai/S31, A <sup>+</sup> B <sup>+</sup> (2)
C	don/S16P1-a, A <sup>+</sup> B <sup>+</sup> (1)
D	don/S42, A <sup>+</sup> B <sup>+</sup> (1)
E	bab/S16-a, A <sup>-</sup> B <sup>-</sup> (1)
F	bab/S16-b, A <sup>-</sup> B <sup>-</sup> (1), tam/S74, A <sup>-</sup> B <sup>-</sup> (1), don/S16p1-a, A <sup>+</sup> B <sup>+</sup> (1)
G	tam/NT <sup>3)</sup> , A <sup>-</sup> B <sup>-</sup> (1)
H	bab/S16-b, A <sup>-</sup> B <sup>-</sup> (1), bab/S16-c, A <sup>-</sup> B <sup>-</sup> (1), bab/S16-d, A <sup>-</sup> B <sup>-</sup> (1), bab/S16-e, A <sup>-</sup> B <sup>-</sup> (1), sal/S91, A <sup>-</sup> B <sup>-</sup> (1)
I	don/S16p1-a, A <sup>+</sup> B <sup>+</sup> (1)
J	don/S16p1-c, A <sup>+</sup> B <sup>+</sup> (1)
K	tam/S120, A <sup>-</sup> B <sup>-</sup> (2), mik/S121, A <sup>-</sup> B <sup>-</sup> (1)
L	sin/S130, A <sup>-</sup> B <sup>-</sup> (1)
M	bab/S155, A <sup>-</sup> B <sup>-</sup> (1), bab/S16-c, A <sup>-</sup> B <sup>-</sup> (1), bab/S16-d, A <sup>-</sup> B <sup>-</sup> (2)
N	wak/S162, A <sup>+</sup> B <sup>+</sup> (1), don/S16p1-a, A <sup>+</sup> B <sup>+</sup> (2), tam/S2-1, A <sup>-</sup> B <sup>-</sup> (1)
O	don/S16p1-a, A <sup>+</sup> B <sup>+</sup> (1)
P	don/S16p1-a, A <sup>+</sup> B <sup>+</sup> (1)
Q	bab/S155, A <sup>-</sup> B <sup>-</sup> (1), osi/S197P, A <sup>-</sup> B <sup>-</sup> (1), osi/S201P, A <sup>-</sup> B <sup>-</sup> (1)
R	don/S209, A <sup>+</sup> B <sup>+</sup> (1)
S	don/S16p1-a, A <sup>+</sup> B <sup>+</sup> (1)

1) Major type was determined when the DNA band difference was more than 4, unless otherwise classified into subtypes (ex. S16-a, S16-b, S16-c)

2) A<sup>+</sup>B<sup>+</sup>, toxin A-positive, toxin B-positive, A<sup>-</sup>B<sup>-</sup>, toxin A-negative, toxin B-negative

3) NT, non-typable by PFGE due to DNA degradation

た。砂場CとDにおけるそれぞれdon/S16P1-aとdon/S42のように、同一のPCRリボタイプを示す菌株がPFGE解析により異なるタイプに分けられる結果となった例が存在したが、同一のPFGEタイプを示す菌株が異なるPCRリボタイプに分別されることはなかった。

また、*C. difficile*が分離された19ヶ所の砂場のうち、6ヶ所(F, H, K, M, N, およびQ)から複数のタイプの菌株が分離された(表2)。またPCRリボタイプ/PFGEタイプの組合せのうち、don/S16p1-aが7ヶ所、bab/S16-bが2ヶ所、bab/S16-cが2ヶ所、bab/S16-dが2ヶ所、bab/S155が2ヶ所の異なる砂場から分離された。

## III. 同一箇所での再検査による検討

*C. difficile*陽性となった砂場のうち、砂場HとMの2ヶ所については4ヶ月間隔で3回追跡検査を行った(表3)。その結果、砂場Hは4回すべて*C. difficile*陽性、砂場Mは3回のみ陽性であった。タイピングの結果、砂場HからはPCRリボタイプ/PFGEタイプの組合せのうち、bab/S16-dが4回とも検出され、bab/S16-b, bab/S16-c, bab/S16-f, sal/S91がそれぞれ2回ずつ検出された。また砂場Mではbab/S16-cが2回続けて検出された。

さらに細かく検討すると2ヶ所の砂場からPCRリボタイプがbab, PFGEメジャータイプがS16, サブタイプの異なる菌株が5菌株分離された。またbab/S16-c, bab/S16-dの2菌株が両方の砂場から検出された。

## 考 察

本研究で用いた菌の分離方法の違いにより、*C. difficile*検出率には差が見られた。また方法1のみ、方法2のみで分離された分離検体も存在した。方法1で分離され方法2で分離されなかった検体において、分離されたコロニー数が多い検体もあったことから、どちらか一方の方法でのみ分離されるケースは検体中の*C. difficile*菌数が少ないことによるものではなく、それぞれの方法の違いにより検出効率に差があるものと考えられた。平板培地上に塗布する方法と半流動培地に混和してシャーレ中で固化させる方法の違い(どちらも嫌気下で行った)によって、このように分離効率に差が出ることは予想外であったが、芽胞から発芽するための条件が異なるなどの可能性も考えられた。そのため、方法1および方法2はどちらか一方が分離法として優れているとは言い難く、今後土壌中の*C. difficile*を検出する際には、本研究のように両方法を併用することが必要であ

Table 3 Follow-up study on *C. difficile*-positive soil

Samdpt	PCR ribotype/PEGE type, toxin gene type of isolates at examination (number of isolates)			
	First	Second	Third	Fourth
H	bab/S16-b, A <sup>-</sup> B <sup>-</sup> (1)	bab/S16-c, A <sup>-</sup> B <sup>-</sup> (1)	bab/S16-b, A <sup>-</sup> B <sup>-</sup> (1)	bab/S16-d, A <sup>-</sup> B <sup>-</sup> (1)
	bab/S16-c, A <sup>-</sup> B <sup>-</sup> (1)	bab/S16-d, A <sup>-</sup> B <sup>-</sup> (1)	bab/S16-d, A <sup>-</sup> B <sup>-</sup> (1)	bab/S16-f, A <sup>-</sup> B <sup>-</sup> (1)
	bab/S16-d, A <sup>-</sup> B <sup>-</sup> (1)		bab/S16-f, A <sup>-</sup> B <sup>-</sup> (1)	sal/S91, A <sup>-</sup> B <sup>-</sup> (1)
	bab/S16-e, A <sup>-</sup> B <sup>-</sup> (1)		bab/S275P, A <sup>-</sup> B <sup>-</sup> (1)	sal/S358, A <sup>-</sup> B <sup>-</sup> (1)
	sal/S91, A <sup>-</sup> B <sup>-</sup> (1)			mal/S361, A <sup>-</sup> B <sup>-</sup> (1)
M	bab/S155, A <sup>-</sup> B <sup>-</sup> (1)	bab/S16-c, A <sup>-</sup> B <sup>-</sup> (1)	don/S16P1-a, A <sup>-</sup> B <sup>-</sup> (1)	
	bab/S16-c, A <sup>-</sup> B <sup>-</sup> (1)		tam/S120, A <sup>-</sup> B <sup>-</sup> (1)	
	bab/S16-d, A <sup>-</sup> B <sup>-</sup> (1)			

ると考えられた。他の病原性クロストリジウムであるボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*) を土から分離する際に、土に共存するウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) 等の菌により、ボツリヌス菌の発育が阻害されることがすでに知られている<sup>16)</sup>。そこで *C. difficile* に関しても同様に、その発育を阻害する菌が存在する可能性についてさまざまな方法で検討してみたが、今までのところ砂場の土からは *C. difficile* の発育を阻害する菌は分離・同定されていない (未発表データ)。

砂場からの *C. difficile* の分離頻度は47.5%であり、検査した砂場のおよそ半分が *C. difficile* で汚染されていたことを示した。このことより砂場はヒトへ、特に遊びに砂場を利用する小児への *C. difficile* 感染源になり得ることが示唆された。また、*C. difficile* は公園の砂場からは高頻度に分離されたが、同一地域の田や山林の土からはまったく分離されなかったことより (図1, 表2)、公園の砂場は *C. difficile* に汚染されやすい特殊な状況にあることが示された。*C. difficile* はヒトを取り巻く環境、すなわち住居の庭、公園、集合住宅付近などの土壤中に芽胞の形で存在している<sup>7)</sup>。おそらく、ヒトやペットなどの動物の腸内に常在している *C. difficile* が、排泄物を介して生活環境を汚染することが原因であろう。このことは、今回あまりヒトとの関わりがない田や山林からまったく本菌が分離されなかった理由としても妥当であると考えられる。また、各砂場から分離される *C. difficile* のタイプは、メジャータイプが一致する分子疫学上非常に近縁な菌株、あるいは特定の菌株が連続的に小さな変異を繰り返しマイナータイプに分類された菌株がほとんどであった。これらの菌株の伝播は地域に密着した行動をとる保菌者や汚染源によって起きていると考えられる。また、近隣の田や山林からはまったく検出されなかったことより、野生の動物等による汚染は考えにくい。さらに、1ヶ所の砂場から複数のタイプの *C. difficile* が同時に分離されることから、砂場への汚染源は地域に複数存在する可能性が考えられた。*C. difficile* の主たる汚染源はヒトや動物の糞便であるが、特に都市部にある公園の砂場を糞便で汚染するのはネコが多いことが報告されている<sup>16)</sup>。また、ペットとして飼われているネコは *C. difficile* を保有する頻度が高いという報告もあり<sup>8)17)</sup>、本研究が対象とした砂場に高頻度に存在する *C. difficile* はペットのネコ由来であることが強く示唆される。また同一タイプの *C. difficile* が異なる複数の砂場から分離されることから、砂場への汚染源がネコの糞便と仮定すると、汚染源のネコが砂場間を絶えず移動して複数の砂場を同一の *C. difficile* 菌株で汚染している、あるいはネコ間でさまざまなタイプの *C. difficile* が相互に伝播している可能性が強く考えられた。

最後に、同一タイプの *C. difficile* が時期を経ても同じ砂場から検出されたことから、同一の汚染源が同一の砂場を長期にわたって汚染させ続けているか、もしくは *C. difficile* の耐久性芽胞が長期間再増殖可能な状態で土中に存在していることが考えられた。今回は、*C. difficile* により汚染されていない砂場がどの程度の頻度・期間で汚染されるに至るかについては検討していないが、砂場はネコなどのペットによって頻繁に汚染される状態にあると考えられる<sup>18)</sup>。よって、砂場を介した *C. difficile* のヒトへの伝播を防ぐには、定期的に砂の入れ替えを行う等の衛生上の対策が必要であると考えられる。特に、小児が集団で生活する保育園、幼稚園などの施設にある砂場では積極的な対策が必要になるかもしれない。

以上、あまりヒトや動物 (ペット) との密な接触がない田や山林に比べて、常に子供の遊び場となり、またペットなどの行動範囲内にある砂場は *C. difficile* に汚染されやすいという本研究の結果は、*C. difficile* による市中および院内における伝播経路や偽膜性大腸炎を含む抗生物質関連下痢症の疫学的要因を考える上で、こういった身近な環境からの汚染を常に考慮する必要があることを強く示唆するものである。

## 結 論

石川県金沢市の公園に存在する40の砂場から *C. difficile* を分離し、合計36菌株を対象に毒素型タイピング、PCRリボタイピング、およびPFGEタイピングを行った。さらに2ヶ所の砂場について4ヶ月間隔でさらに3回追跡検査を行い、以下の結果を得た。

1. 40の砂場からの *C. difficile* の分離頻度は47.5%であった。
2. 各砂場から分離された *C. difficile* のタイプは、メジャータイプが一致する分子疫学上非常に近縁な菌株、あるいは特定の菌株が連続的に小さな変異を繰り返しマイナータイプに分類された菌株がほとんどであった。
3. 追跡調査を行った2つの砂場では、同一タイプの *C. difficile* が時期を経ても同じ砂場から検出された。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、全般にわたって御指導を賜りました金沢大学大学院医学系研究科環境医学専攻細菌感染症制御学中村信一教授 (現金沢大学理事・副学長) に深甚なる謝意を表します。また、御指導と御校閲を頂きました尾崎栄二郎先生に深く感謝いたします。最後に本研究にご協力いただきました同講座の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Lyerly DM, Krivan HC, Wilkins TD. *Clostridium difficile*: its disease and toxins. Clin Microbiol Rev 1: 1-18, 1988
- 2) McFarland LV, Elmer GW, Stamm WE, Mulligan ME. Correlation of immunoblot type, enterotoxin production, and cytotoxin production with clinical manifestations of *Clostridium difficile* infection in a cohort of hospitalized patients. Infect Immun 59: 2456-2462, 1991
- 3) Kato H, Kato N, Watanabe K, Yamamoto T, Suzuki K, Ishigo S, Kunihiro S, Nakamura I, Killgore GE, Nakamura S. Analysis of *Clostridium difficile* isolates from nosocomial outbreaks at three hospitals in diverse areas of Japan. J Clin Microbiol 39: 1391-1395, 2001
- 4) Karlstorm O, Fryklund B, Tullus K, Burman LG. A prospective nationwide study of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in Sweden. Clin Infect Dis 26: 141-145, 1988
- 5) Yamamoto-Osaki T, Kamiya S, Sawamura S, Kai M, Ozawa A. Growth inhibition of *Clostridium difficile* by intestinal flora of infant faeces in continuous flow culture. J Med Microbiol 40: 179-187, 1994
- 6) Matsuki S, Ozaki E, Shozu M, Inoue M, Shimizu S, Yamaguchi N, Karasawa T, Yamagishi T, Nakamura S. Colonization by *Clostridium difficile* of neonates in a hospital and infants and children in three day-care facilities of Kanazawa, Japan. Int Microbiol 8: 43-48, 2005
- 7) Saif NAL, Brazier JS. The distribution of *Clostridium*

*difficile* in the environment of South Wales. J Med Microbiol 45: 133-137, 1996

8) O'Neill G, Adams JE, Bowman RA, Riley TV. A molecular characterization of *Clostridium difficile* isolates from humans, animals and their environments. Epidemiol Infect 111: 257-264, 1993

9) Allen SD, Emery CL, Siders JA. Clostridium. In PR Murray, EJ Baron, MA Tenover, FC Tenover, RH Tenover (eds), Manual of Clinical Microbiology, 7th ed, p654-671, American Society for Microbiology, Washington D.C. 1999

10) Kato H, Kato N, Watanabe K, Iwai N, Nakamura H, Yamamoto T, Suzuki K, Kim SM, Chong Y, Wasito EB. Identification of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* by PCR. J Clin Microbiol 36: 2178-2182, 1998

11) Gumerlock PH, Tang YJ, Meyers FJ, Silva J Jr. Use of the polymerase chain reaction for the specific and direct detection of *Clostridium difficile* in human feces. Rev Infect Dis 13: 1053-1060, 1991

12) Kato N, Ou CY, Kato H, Bartley SL, Luo CC, Killgore GE, Ueno K. Detection of toxigenic *Clostridium difficile* in stool specimens by the polymerase chain reaction. J Infect Dis 167: 455-458, 1993

13) 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

14) Kato H, Kato N, Watanabe K, Ueno K, Ushijima H, Hashira S, Abe T. 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

15) Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis : criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 33: 2233-2239, 1995

16) Smith LD. Inhibition of *Clostridium botulinum* by strains of *Clostridium perfringens* isolated from soil. Appl Microbiol 30: 319-323, 1975

17) Borriello SP, Honour P, Turner T, Barclay F. (1983) Household pets as a potential reservoir for *Clostridium difficile* infection. J Clin Pathol 36: 84-87, 1983

18) Minami T, Nagata K. Defecation habits of cats and dogs and contamination by toxocara eggs in public park sandpits. Am J Trop Med Hyg 54: 122-126, 1996

**Contamination of *C. difficile* in public park sandpits.** Aoi Obata, Department of Bacteriology, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 Juzen Med. Soc., 116, 36 – 40 (2007)

**Key words** *Clostridium difficile*, pseudomembranous colitis, hospital infection, community-acquired infection, genotyping

#### Abstract

*Clostridium difficile* is major causative agent for pseudomembranous colitis and antibiotics-associated colitis/diarrhea. While *C. difficile* is responsible for many nosocomial diarrhea cases, it also causes community-acquired infections of which infection routes remain unknown. It is suggested that children acts as reservoirs of *C. difficile* and that they are infected with environmental *C. difficile* through the environment common to their daily lives. In this study, the existence of *C. difficile* was examined in public park sandpits where not only children but also pet animals may have contacts frequently. The isolated *C. difficile* strains were subsequently classified into genotypes using toxin-typing, ribotyping, and PFGE (pulsed-field gel electrophoresis)-typing. The isolation frequency of *C. difficile* from 40 public park sandpits in Toyama prefecture, Japan was 47.5%, while *C. difficile* was not detected in rice fields and woods in the neighborhood public parks, which suggested that the sandpits could be possible sources of infection of *C. difficile* to children. The genotyping results clearly indicated that the majority of *C. difficile* isolates was closely related each other from the point of view of molecular epidemiology or seemed to be evolved with very minor continuous mutations. These results suggest that the transmission of *C. difficile* is mediated by reservoirs and/or sources of infection that may have close contact with their local areas. Pet cats were thought to be possible transmitters of environmental *C. difficile*. Furthermore, the same strain of *C. difficile* was detected from the same sandpit at several intervals, which indicates that it would be better to take sanitary actions including frequent replacement of the sand to prevent the *C. difficile* transmission to children. Taken together, when one consider the transmission route of *C. difficile* in nosocomial or community-acquired infection leading to antibiotics-associated diarrhea or pseudomembranous colitis, it would be important to take the environment near at hand into consideration.