

Recovery and Heat Resistance of Spores of Clostridium difficile

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8519

Clostridium difficile 孢子の検出および耐熱性について

金沢大学医学部微生物学講座 (主任: 中村信一教授)

宮 田 勝

偽膜性大腸炎, 一部の抗生物質関連腸炎の原因菌である *Clostridium difficile* (*C. difficile*) の孢子について, その検出, 耐熱性に関して *C. difficile* 有毒株30株を用いて検討した. 30株全株が変法ブレン ハート インフュージョン培地にて, 顕微鏡的には, 10^8 /ml 以上の孢子を形成した. しかしながら, 通常の寒天培地における孢子の検出率は2株のみが10%以上を示したが, 25株については0.01%以下を示し, 孢子の検出は通常の寒天培地では困難であった. これらの孢子の検出率はタウロコール酸塩法では $82.2 \pm 16.4\%$, リゾチーム法では $57.2 \pm 21.1\%$ であり, タウロコール酸塩法が孢子検出に, より有効であった. 次に, 4株を用いて孢子に傷害を与える加熱温度を検討したところ, 孢子の通常の寒天培地における検出率は80℃ 10分間加熱で急激に低下し, 80℃ 加熱は孢子を傷害することが分かった. これら加熱傷害孢子の検出についてタウロコール酸塩法とリゾチーム法を比較検討した. タウロコール酸塩法では90℃あるいは100℃ 10分間加熱した時, 孢子は全く検出されなかった. これに対してリゾチーム法では90℃ 10分間加熱では10.0~32.7%, 100℃ 加熱では0.2~2.1%の孢子が検出された. すなわち, リゾチーム法は熱傷害孢子の検出に有効であることが分かった. 被験30株について100℃ 加熱に対する孢子の耐熱性を, 耐熱性孢子数(リゾチーム法で測定)の総孢子数(70℃ 10分間加熱後タウロコール酸塩法で測定)に対する割合で検討した時, その値は2.5~30.9%であった. また, 4株についてD値を求めたが, D_{100} 値は5.5~15.5分を示した. 孢子の耐熱性に及ぼす培養液中の金属の影響について合成培地を用いて, Fe, Mg, Ca, Mn, Co に関して検討した. 被験3株のいずれにおいてもCa 添加培地において形成された孢子の耐熱性が高く, Ca 非存在下において形成された孢子の D_{100} 値は2.1~3.3分, Ca 1mM 存在下において形成された孢子の D_{100} 値は4.3~5.4分であった. 1株について孢子のCa, ジピコリン酸(dipicolinic acid, DPA) 含有量を解析した結果, 1mM Ca 添加培地において形成された孢子のCa, DPA 含有量はCa 無添加の場合に比べ高かった. 以上の結果は, *C. difficile* は, 孢子形成が良好で, かつその孢子の耐熱性は*Clostridium* 菌種の中ではかなり高いことを示している. さらに, *C. difficile* 孢子においてCa, DPA 含有量が耐熱性に関与していることを示唆している.

Key words *C. difficile*, spore, heat resistance, Ca, DPA

Clostridium difficile (*C. difficile*) は偽膜性大腸炎, 一部の抗生物質関連腸炎の原因菌である¹⁾. 本菌の主病原因子は2種類の毒素, トキシンA (エンテロトキシン) およびトキシンB (サイトトキシン) であると考えられている²⁾.

ヒトの *C. difficile* 腸炎においては腸内フローラとして存在している *C. difficile* による内因感染が主な感染経路と考えられているが, 病院での集団発生では外因感染が考えられている³⁻⁵⁾. 外因感染では, *C. difficile* 腸炎患者糞便からの *C. difficile* による病院環境の汚染が原因となる. この場合, 本菌は嫌気性孢子形成菌であるので栄養型細胞は大気下では速やかに死滅する. しかしながら, 菌の耐久型細胞である孢子は大気下でも長期間生存し, 外因感染を引き起こす⁶⁾. 従って, 本菌による外因感染の予防には病院環境における孢子の適切な検出法が必要とされる. この際, 臨床材料あるいは病院環境に存在する孢子は物理・化学的の傷害を受けていることが考えられ, 傷

害孢子をも検出することが重要となる.

C. difficile 孢子は通常の培地では検出が困難であり, 孢子の検出には, 孢子をチオグリコール酸ナトリウムで処理をした後リゾチーム添加培地に植菌する方法(リゾチーム法)⁶⁾, あるいは孢子をタウロコール酸ナトリウム添加培地に植菌する方法(タウロコール酸塩法)¹⁰⁾が有効であると報告されている. しかしながら, いずれの方法が孢子検出に, より有効であるかは不明のまま残されている.

ヒトの *C. difficile* 腸炎の治療にはバンコマイシンが使われるが, バンコマイシン投与を中止するとしばしば本腸炎が再発する⁹⁾. 再発の原因はバンコマイシン投与により *C. difficile* の栄養型細胞は死滅するが, 孢子は死滅せず生存し, 薬剤の投与中止により発芽・増殖することが考えられている¹⁰⁾.

以上の点に鑑み, 本研究では, *C. difficile* の孢子の検出, 孢子を傷害する因子としての加熱に対する耐熱性について検討し

平成5年11月30日受付, 平成6年1月5日受理

Abbreviations: BHI, brain heart infusion; BSM, basal synthetic medium; *C. botulinum*, *Clostridium botulinum*; CCFA, cycloserine-cefoxitin-fructose-agar; *C. difficile*, *Clostridium difficile*; *C. perfringens*, *Clostridium perfringens*; DPA, dipicolinic acid; GS-BHI, glucose and soluble starch-fortified BHI; m-BHI, modified BHI; TYGM, trypticase-yeast extract-glucose medium

た。

材料および方法

1. 使用株

金沢大学医学部微生物学講座保存の *C. difficile* 有毒株30株を用いた。

II. 培地

孢子形成用培地としてブレイン ハート インフュージョン (brain heart infusion, BHI) (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, USA) に Na_2HPO_4 を 0.2% の割合に添加した培地 (modified BHI, m-BHI)¹¹⁾ を用いた。120°C 15分間高圧蒸気滅菌後、気相を H_2 10%, CO_2 10%, N_2 80% の混合ガスに置換し 4°C にて保存した。培地を還元するため置換48時間後に使用した。

孢子数の測定には 0.8% グルコース, 1.0% 可溶性デンプン (和光, 大阪), 0.05% システインー塩酸塩, 1.3% 寒天加 BHI (日水, 東京) (glucose and soluble starch-fortified BHI, GS-BHI) 寒天培地を基礎培地として用いた。

孢子の耐熱性に及ぼす金属の検討には沖野¹²⁾ の成績に基づき表 1 に示した合成培地を基礎合成培地 (basal synthetic medium, BSM) として用いた。本培地の作製は沖野¹²⁾ の方法に準じて行った。

孢子のジピコリン酸 (dipicolinic acid, DPA) および Ca の含有量の測定のための孢子形成用培地としてはトリプティケースペプトン (BBL Microbiology Systems) 2%, 酵母エキス (Difco Laboratories, Detroit, USA) 0.5%, トリプトファン (関東化学, 東京) 0.01%, グルコース 0.2%, システインー塩酸塩 0.05% の培地 (pH7.2) (trypticase-yeast extract-glucose medium, TYGM) を用いた。

なお, m-BHI, 合成培地は中試験管 (15×160mm) に 10ml ずつ, TYGM は 3,000ml 容のフラスコに 2,000ml ずつ作製した。

III. 植菌および培養

m-BHI, TYGM への植菌には肝片加肝ブイオン16時間培養菌液を, 各金属イオン濃度が異なる合成培地への植菌には BSM 16時間培養菌液を用いた。m-BHI, 合成培地に植菌する場合, 培養菌液の 10^{-3} 希釈液の 0.1ml を 10ml の被験培地に植菌した。TYGM の場合, 10^{-1} 希釈培養菌液 0.2ml を 2,000ml の TYGM に植菌した。希釈, 植菌は全て上述の混合ガス噴射下で行い, 同ガス存在下で 37°C で培養した。m-BHI, 合成培地では 5 日間培養後, 孢子数を測定した。TYGM の場合, 14 日間培養した。

IV. 孢子数の測定

1. 培養法

被験培養菌液を 70°C 10分間加熱後, タウロコロール酸塩法⁷⁾あるいはリゾチウム法⁹⁾にて測定した。

1) タウロコロール酸塩法

70°C 10分間加熱培養菌液を, 0.05% システインー塩酸塩加 BHI (日水) にて10倍段階希釈を行い, その 0.1ml を直径 90mm のペトリ皿に注入し, 56°C に保温した 0.1% タウロコロール酸ナトリウム (GR, ナカライテスク, 京都) 添加 GS-BHI 寒天培地 20ml を加え混合した。固化後 37°C にて 2 日間嫌気ジャーを用い嫌気培養を行った。培養後発育したコロニー数を数えることにより培養菌液 1ml 当りの孢子数を算出した。

2) リゾチウム法

70°C 10分間加熱培養菌液 3 容に 2M チオグリコール酸ナトリウム (5N NaOH 溶液により pH10.0 に調整) 1 容を添加し, 50°C にて30分間処理した。処理培養菌液を上述の場合と同様に希釈を行い, その 0.1ml を直径 90mm のペトリ皿に注入し, 2mg/ml 濃度のリゾチウム (和光) 溶液 0.1ml および 56°C に保温した GS-BHI 寒天培地 20ml を加え混合した。固化後はタウロコロール酸塩法と同様の手順にて培養を行い, 培養菌液 1ml 当りの孢子数を算出した。

2. 顕微鏡法

Table 1. Composition of basal synthetic medium (BSM)

Amino acids(g)		Vitamins(μg)	
Histidine	0.1	Thiamine	1,000
Tryptophan	0.1	Ca-D-pantothenate	1,000
Glycine	0.1	Nicotinamide	1,000
Tyrosine	0.1	Riboflavin	1,000
Arginine	0.2	Pyridoxine	1,000
Phenylalanine	0.2	p-aminobenzoic acid	50
Methionine	0.2	Biotin	12.5
Threonine	0.2	Folic acid	12.5
Alanine	0.2	B ₁₂	5.0
Lysine	0.3		
Serine	0.3	Minerals (mg)	
Valine	0.3	KH ₂ PO ₄	900
Isoleucine	0.3	Na ₂ HPO ₄	5,000
Proline	0.6	NaCl	900
Aspartic acid	0.3	CaCl ₂ ·2H ₂ O	26
Leucine	0.4	MgCl ₂ ·6H ₂ O	20
Cysteine	0.5	MnCl ₂ ·4H ₂ O	10
Glutamic acid	0.9	(NH ₄) ₂ SO ₄	40
		FeSO ₄ ·7H ₂ O	4
		CoCl ₂ ·6H ₂ O	1
		NaHCO ₃	5,000
		Glucose(g)	2
		Distilled water(ml)	1,000

All amino acids except for cysteine (Kanto Chemical, Tokyo) and all vitamins except for biotin (Sigma, St. Louis, USA) were purchased from Wako, Osaka.

細菌計算盤(エルマ光学, 東京)を用い, 位相差顕微鏡にて屈折性胞子を数えた。

V. 胞子の耐熱性の検討

培養菌液の遠心(3,500×g, 5分)沈査を0.05Mリン酸緩衝液(pH7.0)に懸濁したものを胞子液とした。

D値(胞子数が1/10に減少するのに要する加熱時間)は, 胞子液を2, 4, 6, 8, 10分間加熱したあとリゾチーム法により生残胞子数を測定することにより求めた。90℃加熱, 100℃加熱におけるD値を各々D₉₀, D₁₀₀値として表示した。

VI. 胞子の精製

KZ 1647株の4,000ml TYGM培養菌液を出発材料として, Labbeら¹³⁾の方法により胞子を精製した。培養菌液を3,000×g, 20分間遠心することにより集菌した。遠心沈査を脱イオン水30mlに懸濁した後, 超音波発生装置UR-200P(トミー精工, 大阪)を用い, 200Wにて合計20分間(2分, 10回)超音波処理を行い, 菌体を破壊した。破壊菌液を2,000×g, 15分間遠心を行い, 沈査を脱イオン水20mlに懸濁した。懸濁液について500×g, 15分間の遠心洗浄を, 遠心上清液が水様透明になるまで繰り返した(計12回)。最終遠心沈査について胞子の精製度を光学顕微鏡にて確認した後凍結乾燥し, Ca, DPAの測定に供した。

VII. 胞子のCa含量の測定

亀井ら¹⁴⁾の方法に準じて胞子のCa含量を測定した。凍結乾燥した胞子試料1mgを100ml容のビーカーに採取し, 濃硝酸2容に対し濃塩酸1容の混合液を10ml注加し, 全量をマイクロケルダールフラスコに移し, 直火で湿式分解した。有機物が分解して内容物が完全に透明になった時点で分解を終了した。室温まで放冷後内容物を100ml容ビーカーに移し, ホットプレート上で蒸発乾固させた。0.1N塩酸5mlを加え加熱溶解した後10ml容メスフラスコに移し, 10%塩化ランタン溶液(原子吸光分析用, 和光)を最終濃度が250ppmとなるように加え, 脱イオン水を全量が10mlになる様添加した後, 偏光ゼーマン原子吸光分光光度計日立Z-8000(日立, 東京)で422.7nmの吸収を測定した。なお, 使用する器具はすべて5mMエチレンジアミン四酢酸および脱イオン水で洗浄したものを使用した。

VIII. 胞子のDPA含量の測定

DPAの測定はJanssenら¹⁵⁾の方法に従った。凍結乾燥した胞子試料1mgをガラス遠心管(3.5×10cm)に採取し, 脱イオン水5mlを加えて, 121℃15分間加熱した。室温まで放冷した後,

1M酢酸0.1mlを添加して1時間室温に放置した。放置後1,500×g, 10分間遠心した後, その上清液4mlを試験に供した。試薬[アスコルビン酸(和光)1g, Fe(NH₄)(SO₄)₂·6H₂O 1gを0.5M酢酸緩衝液(pH5.5)100mlに溶解した試薬]1mlを上清4mlに添加して発色させた後, 440nmにおける吸光度を島津ポシュロムスペクトロニック20A(島津, 京都)を用い測定した。

IX. 統計処理

タウロコール酸塩法とリゾチーム法による胞子検出率の差の検定には, Studentのt検定を用い, p<0.05を有意とした。

成 績

I. *C. difficile* 株の胞子形成能

m-BHI 5日間培養菌液中の胞子数を顕微鏡的に測定した。被験30株の培養液1ml当りの胞子数は10^{6.1}~10^{7.4}(平均10^{7.0})であり, 12株は10⁶台, 18株は10⁷台を示し, *C. difficile* 株は極めて胞子形成が良好なことが分かった。

II. GS-BHI 寒天培地による胞子の検出

m-BHI培養菌液を70℃10分間加熱後, 原液1.0mlあるいはその10倍段階希釈菌液0.1mlをGS-BHI寒天培地に植菌・培養することにより胞子の検出を試みた。先に述べた如く, いずれの株においても培養菌液1ml当り10⁶以上の胞子が顕微鏡的に認められたにもかかわらず, GS-BHI寒天培地にて検出された胞子数は極めて少なく, 2株(KZ 1610, KZ 1660)をのぞき, 10³台/ml以下であった。顕微鏡法にて算出された胞子数を100%とした時の胞子検出率を表2に示した。被験30株中25株については検出率は0.01%以下であり, 本培地では極めて検出され難かった。10%以上の検出率を示した株は, KZ 1660(検出率, 37%)およびKZ 1610(検出率, 17%)の2株のみであった。

以上の結果, *C. difficile* は極めて胞子形成は良好であるが, その胞子の検出は通常の培地では困難であることが分かった。

III. 胞子検出のためのタウロコール酸塩法とリゾチーム法の比較

タウロコール酸塩法とリゾチーム法による胞子検出率を, 顕微鏡法にて算出された胞子数を100%として, 比較することにより両方法の有効性を比較検討した(表3)。

タウロコール酸塩法における被験30株の検出率は47%以上であり, 22株が80%以上の検出率を示した。一方, リゾチーム法の場合, 検出率は32%以上を示し, 80%以上の検出率を示した株は5株にすぎなかった。両方法を比較するとタウロコール酸塩法, リゾチーム法おののにおける検出率は82.2±

Table 2. Recovery of *C. difficile* spores in GS-BHI agar medium^{a)}

Recovery rate ^{b)} (%)	Number of strains
>10 ⁻⁵ , ≤10 ⁻⁴	5
>10 ⁻⁴ , ≤10 ⁻³	7
>10 ⁻³ , ≤10 ⁻²	13
>10 ⁻² , ≤10 ⁻¹	2
>10 ⁻¹ , ≤10 ⁰	1
>10 ⁰ , ≤10 ¹	0
>10 ¹	2

^{a)} Brain heart infusion supplemented with 0.8% glucose, 1.0% soluble starch, 0.05% L-cysteine·HCl, and 1.3% agar.

^{b)} (Number of spores recovered in GS-BHI agar medium/number of spores enumerated microscopically)×100 (%).

Table 3. Comparison of taurocholate method and lysozyme method for recovery of *C. difficile* spores

Method ^{a)}	Number of strains showing recovery rate ^{b)} (%) of						
	>30 ≤40	>40 ≤50	>50 ≤60	>60 ≤70	>70 ≤80	>80 ≤90	>90
Taurocholate	0	1	2	3	2	1	21
Lysozyme	9	4	8	0	4	2	3

^{a)} Refer to Materials and Methods.

^{b)} (Number of spores recovered in GS-BHI agar medium/number of spores enumerated microscopically)×100 (%).

16.4% (平均値±標準偏差), 57.2±21.1% であり, タウロコール酸塩法が統計学上有意に孢子検出に有効であることが分かった ($p < 0.0001$).

以上の結果に基づき, 以後の実験では 70°C 10分間加熱後に タウロコール酸塩法にて求めた孢子数を培養菌液中の孢子数とした.

IV. 加熱孢子の検出

1. 孢子傷害温度

各温度で10分間処理した孢子を GS-BHI 培地にて検出することにより孢子に傷害を与える加熱温度を決定した. 本実験には GS-BHI 寒天培地での孢子検出率が良好な KZ 1610, KZ 1660 株および検出率が 0.01% 以下の KZ 1648, KZ 1628 株, 合計 4 株を用いた.

被験 4 株すべてにおいて 80°C 10分間加熱したとき検出率は明らかに減少した (図 1). すなわち, 80°C 10分間加熱した場合の KZ 1660, KZ 1610, KZ 1648, KZ 1628 株の検出率は 70°C 10分間加熱における検出率の 0.05%, 1.2%, 5.0%, 5.8% まで減少した.

85°C 10分間加熱した時, KZ 1660 株の孢子は 0.0001% の低い検出率で検出されたが, 他の 3 株では孢子は全く検出されなかった. 90°C 以上の加熱ではいずれの株においても孢子は全く検出されなかった.

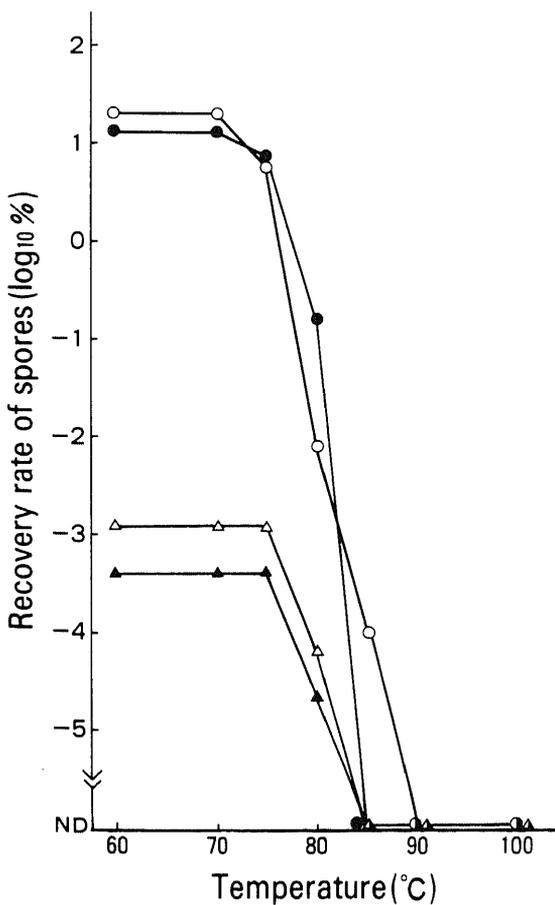


Fig. 1. Recovery of heat-treated spores of *C. difficile* in GS-BHI agar medium. ○, KZ 1660; ●, KZ 1610; △, KZ 1648; ▲, KZ 1628; ND, not detected.

以上の結果, 80°C 以上の加熱は孢子を傷害することが分かった.

2. 加熱傷害孢子のタウロコール酸塩法による検出

75°C 以下の加熱では被験 4 株のすべてについてほとんどの孢子は検出された. (図 2). 孢子傷害温度である 80°C で加熱した時, いずれの株においても孢子検出率は顕著に減少した. すなわち, KZ 1660, KZ 1610, KZ 1648, KZ 1628 の検出率はおの

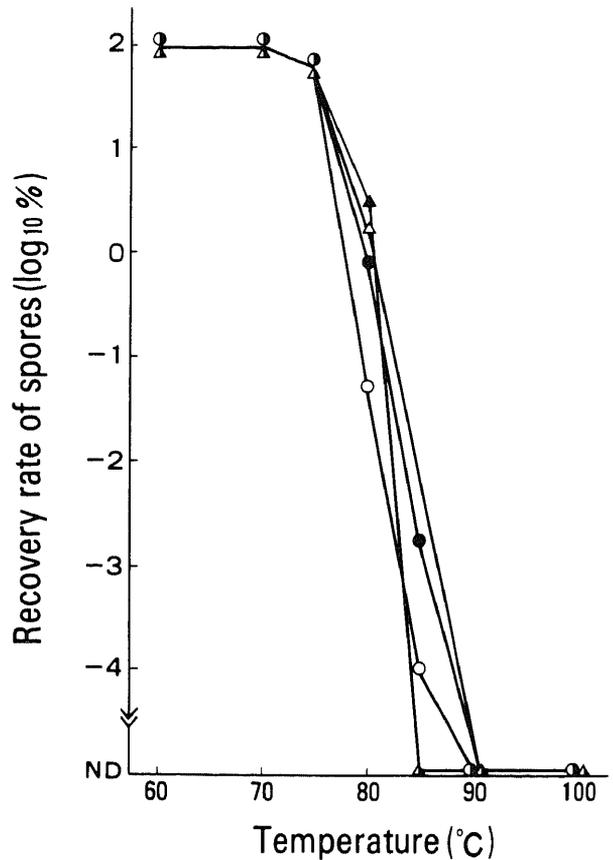


Fig. 2. Recovery of heat-treated spores of *C. difficile* by the taurocholate method. ○, KZ 1660; ●, KZ 1610; △, KZ 1648; ▲, KZ 1628; ND, not detected.

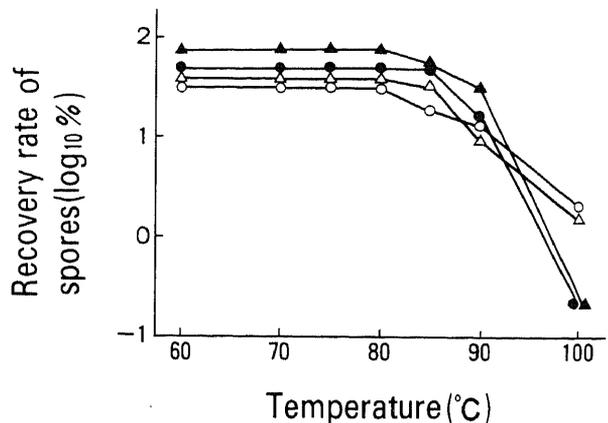


Fig. 3. Recovery of heat-treated spores of *C. difficile* by the lysozyme method. ○, KZ 1660; ●, KZ 1610; △, KZ 1648; ▲, KZ 1628.

おの 0.05%, 0.7%, 2.1%, 2.9% まで減少した。85℃ 10分間の加熱条件では、検出率はさらに著しく減少し、KZ 1660 株, KZ 1610 株ではおのおの 0.0001%, 0.0015% まで減少した。他の 2 株においては孢子は全く検出されなかった。90℃ 以上の加熱ではいずれの株においても孢子は全く検出されなかった。

3. 加熱傷害孢子のリゾチーム法による検出

4 株ともに 80℃ 以下の加熱条件下では孢子検出率は減少しなかった (図 3)。85℃ 加熱では KZ 1610 株を除き、検出率はやや減少した。90℃ 加熱における KZ 1660, KZ 1610, KZ 1648, KZ 1628 株の孢子検出率は 10~32.7% であり、検出率の低下は少なかった。しかしながら、100℃ で加熱した時、孢子検出率は顕著に減少した。すなわち、KZ 1660, KZ 1610, KZ 1648, KZ 1628 株の 100℃ 加熱の検出率は 2.1, 0.2, 1.8, 0.2% にすぎなかった。

以上の結果、リゾチーム法はタウロコール酸塩法に比べ熱傷害孢子の検出には有効であることが分かった。

Table 4. Resistance of *C. difficile* spores to heating at 100℃ for 10 min

Percentage ^{a)} of spores surviving heating at 100℃ for 10 min	Number of strains
> 1.0, ≤10.0	11
>10.0, ≤20.0	16
>20.0, ≤30.0	1
>30.0, ≤40.0	2

^{a)}Total numbers of spores were determined by taurocholate method after heating at 70℃ for 10 min, and numbers of spores surviving heating at 100℃ for 10 min by lysozyme method.

V. *C. difficile* 孢子の耐熱性

C. difficile 30株を用いて孢子の 100℃ 加熱に対する耐熱性を検討した。本実験においては孢子数をタウロコール酸塩法において測定し、100℃ 加熱に対して耐性の孢子はリゾチーム法により測定した。被験全株ともに 100℃ 加熱後においても孢子は検出された。総孢子数に対する耐熱性孢子の割合は 2.5~30.9% であり、株により幾分相違が認められた (表 4)。

耐熱性をより正確に知るため耐熱性孢子の割合が 1%, 10%, 20%, 30% 台の株の中からおのおの 1 株を選び 90℃ および 100℃ 加熱における耐熱性孢子数をリゾチーム法により測定し、各温度における D 値を求めた。D₉₀ 値は、いずれの株も 60 分以上であったが、D₁₀₀ 値は、5.5~15.5 分を示し、先述の成績を確認した (表 5)。

VI. 孢子の耐熱性に及ぼす培養液中の金属の影響

Fe, Mg については 0.01mM および 1mM 添加 BSM, Ca, Mn, Co については無添加および 1mM 添加 BSM において形成された孢子について 3 株を用い、その耐熱性を検討した。加熱は各金属毎に行い、100℃ 5 分間加熱後の生残孢子数の 70℃ 10分間加熱耐性孢子数に対する割合 (%) で比較した (表 6)。この際、孢子数はリゾチーム法により求めた。

被験金属 5 種類中 Ca を除いては、低濃度・高濃度の両者間には孢子の耐熱性の明らかな差異は認められなかった。Ca に関しては Ca 不含 BSM において形成された孢子の 100℃ 5 分間加熱後の生残率は 0.2~2.5% であったのに対して、Ca 1mM 添加 BSM において形成された孢子の生残率は 3.0~15.8% であり、後者の方が明らかに耐熱性が強かった。

以上のことを確認するため D₁₀₀ 値を求めた。KZ 1630, KZ 1647, KZ 1748 株の孢子の D₁₀₀ 値は Ca 不含 BSM の場合、

Table 5. Heat resistance of *C. difficile* spores

Strain	Percentage of spores surviving heating at 100℃ for 10 min ^{a)}	D value (min) at (°C)	
		90	100
KZ 1626	4.2	>60	5.5
KZ 1638	17.7	>60	12.5
KZ 1628	27.8	>60	14.5
KZ 1698	30.9	>60	15.5

^{a)} These data were obtained in the test shown in Table 4.

Table 6. Influence of metals on heat resistance of *C. difficile* spores produced in synthetic medium

Metal added	Concentration (mM)	Percentage ^{a)} of spores surviving heating at 100℃ for 5 min in strain of		
		KZ 1630	KZ 1647	KZ 1748
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0	0.5	0.2	2.5
	1.0	3.6	3.0	15.8
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.01	0.3	0.1	0.5
	1.0	0.8	0.2	1.0
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0	0.3	0.6	0.5
	1.0	0.6	0.3	0.5
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01	1.0	0.5	0.8
	1.0	0.6	0.2	1.6
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0	0.2	0.6	0.7
	1.0	0.3	0.8	0.8

^{a)}Total numbers of spores were determined by lysozyme method after heating at 70℃ for 10min. ...

Table 7. Heat resistance, and Ca and DPA^{a)} contents of *C. difficile* strain KZ 1647 spores produced in TYGM^{b)} with or without CaCl₂ addition

Concentration of CaCl ₂ ·2H ₂ O added (mM)	D ₁₀₀ value (min)	Content (μg/mg spore)	
		DPA	Ca
0	2.4	32	2.3
1	4.1	52	4.7

^{a)}DPA, dipicolinic acid^{b)}TYGM, trypticase-yeast extract-glucose medium

各々 2.1, 2.8, 3.3 分であったが, Ca 1mM 添加 BSM においては各々 5.4, 4.3, 5.3 分であり, 約 2 倍の値を示した。

Ⅶ. 孢子の Ca, DPA 含有量

KZ 1647 株を用い孢子の Ca, DPA 含有量を解析した。本解析に必要な孢子を得るには大量の培養を要し, BSM は不適であった。それ故, 予備実験で Ca 添加と耐熱性の関係が BSM の場合と同様に認められる培地を探索し, TYGM を用いることとした。

解析結果を表 7 に示した。1mM Ca 添加 TYGM において形成された孢子の DPA, Ca 含有量は Ca 無添加の場合に比べ高かった。

考 察

ヒトの *C. difficile* 腸炎においては, ヒトの腸内フローラ^{16)~18)}あるいは泌尿生殖器フローラ¹⁹⁾として本菌が存在していることから, 内因感染が主であると考えられている。しかしながら, 入院患者の抗生物質関連腸炎患者分離 *C. difficile* 株の抗菌血清による凝集反応, プラスミド DNA のアガロース電気泳動パターン, バクテリオファージおよびバクテリオシン感受性, 可溶性蛋白の電気泳動パターン, 菌体内蛋白への ³⁵S 標識メチオニンの取り込みパターン, 染色体 DNA の制限酵素切断パターン等の疫学的研究^{20)~26)}から, 特に病院での集団発生は外因感染が主であると考えられている。

Kim ら⁹⁾は病院環境における *C. difficile* の存在について詳細に検討し, *C. difficile* 腸炎患者の病室, 集中治療室では各々 9.3%, 11%, *C. difficile* 非保菌患者の病室, 集中治療室では各々 2.6%, 2.8% の割合に *C. difficile* を検出している。*C. difficile* は嫌気性孢子形成菌であるので, 大気下では栄養型細胞は速やかに死滅するが, 孢子の形で病院環境に長時間生存する。Kim ら⁹⁾は孢子は 6 ヶ月間病室の床に生存していたと述べている。すなわち, 外因感染の主役は孢子であると考えられている。

Borriello ら²⁶⁾は家畜, ペットの糞便から *C. difficile* の検出を試み, 数%~数 10% の割合に本菌を検出した。

以上の事は病院のみならず, 種々の環境において, 本菌による汚染が起こり得る事を示している。環境中の孢子は熱, 乾燥, アルカリ, 酸, 消毒薬, 紫外線等種々の物理・化学的因子により傷害を受ける可能性がある。外因感染は経口感染であり, その際汚染食品による感染が重要であり, 孢子の耐熱性が問題となる。

C. difficile 腸炎の治療にはバンコマイシンが用いられているが, バンコマイシン投与中止後しばしば再発する。再発の頻度は報告者により異なるが, Bartlett⁹⁾は高率に再発が起きると報告している。彼は治療患者 189 名中 46 名 (24%) に再発がおこ

り, さらに再発者 46 名中 11 名 (46%) に 2 度目の再発が起こったと述べている。起炎菌はバンコマイシンに感受性であるので, 本薬剤投与により栄養型細胞は死滅するが孢子が残り薬剤の投与中止により孢子が発芽・増殖をして再発すると考えられている。

以上の諸点を鑑み, 本研究では *C. difficile* 孢子の検出, 耐熱性を中心に検討した。

Clostridium 属は嫌気性の孢子形成菌であるが, 孢子形成能は各菌種により異なり, また同一菌種でも菌株間にはその孢子形成能にはかなりの相違がみられる^{27)~29)}。本研究では *C. difficile* 30 株について顕微鏡的にその孢子形成能を検討したが, 全株が 10⁶/ml 以上の孢子を形成した。このことは本菌は極めて孢子形成が良好な菌種であることを示している。

Clostridium 属の孢子は一般にペプトン培地, ペプトン-グルコース培地, BHI 培地で容易に発芽・発育し, その検出には特別な工夫を要しない^{27)~29)}。*C. difficile* の孢子は上述の培地では極めて検出しがたいことは, Ionesco⁶⁾, Raibaud ら³⁴⁾により既に示されている。本研究ではまず GS-BHI を用いての孢子の検出率を顕微鏡的に求めた孢子数との比較により求めた。GS-BHI を用いての検出率は 2 株を除き 1% 以下であり, さらに 25 株 (83%) については検出率は 0.01% 以下であった。すなわち, *C. difficile* の孢子は他の *Clostridium* 菌種と比べ極めて発芽・発育し難いことがより明確となった。

孢子がコロニーとして発育し検出される場合の最初の過程は, 孢子の発芽による栄養型への変化である。すなわち, 孢子がコロニーとして検出されるということは, 孢子の発芽が起こっていることを意味する。孢子検出のためのリゾチーム法は 1963 年 Gould ら³⁵⁾により最初に報告され, Ionesco⁶⁾により *C. difficile* の孢子の検出にも有効であることが明らかにされた。本法による孢子の発芽は, チオグリコール酸ナトリウムが孢子殻蛋白の S-S 結合を切断することによりリゾチームが孢子内部に入り易くし, 次いで侵入したリゾチームがコレクスのペプチドグリカンに作用することによって考えられている³⁶⁾³⁷⁾。タウロコール酸ナトリウムが孢子の発芽に有効なことは, 最初, 真菌の *Myxomycetes* について報告³⁸⁾され, Raibaud ら³⁴⁾によって *C. difficile* の検出にも有効であることが示された。タウロコール酸塩法に用いられているタウロコール酸ナトリウム濃度 (0.1%) は栄養型細胞に影響しない³⁹⁾ところから, タウロコール酸ナトリウム添加サイクロセリン-セフォキシチン-フルクトース-寒天 (cycloserine-cefoxitin-fructose-agar, CCFA) は糞便材料からの *C. difficile* 分離には優れた方法であると報告されている⁴⁰⁾。また, 環境からの *C. difficile* 孢子の検出に際してもタウロコール酸ナトリウム添加 CCFA が CCFA より優れていることが報告されている⁴¹⁾⁴²⁾。タウロコ

ル酸ナトリウムが孢子の検出に有効な機構は不明であるが、同薬剤は孢子殻あるいはコルテックスを攻撃する表面活性剤として働いていると考えられる。

被験30株全株共にリゾチーム法、タウロコール酸塩法のいずれの方法においても30%以上の孢子検出率を示した。しかしながら、検出率はリゾチーム法では $57.2 \pm 21.1\%$ 、タウロコール酸塩法では $82.2 \pm 16.4\%$ であり、タウロコール酸塩法の方が孢子検出にはより有効であった。

孢子の熱に対する安定性は菌種により異なる。*Clostridium perfringens* (*C. perfringens*)には100℃加熱に対して耐性と非耐性の株が存在するが、いずれの株も70℃10分間の加熱に対しては安定であり、80℃10分間の加熱では孢子は傷害を受け、その検出率は低下する⁴⁹⁾。*Clostridium botulinum* (*C. botulinum*)についてはA型菌の孢子の活性化温度は80℃10分間加熱⁴⁹⁾であるが、E型菌ではD値は75℃加熱で急激に低下する⁴⁹⁾。すなわち*C. botulinum* 孢子はA型菌では80℃以上、E型菌では75℃の加熱で傷害を受けると考えられる。本研究で示された如く、GS-BHIにおける*C. difficile*の孢子の検出率は80℃10分間加熱で急激に低下し、80℃以上の加熱は*C. difficile* 孢子に対し傷害を与えることが分かった。

*C. difficile*の熱傷害孢子の検出にはタウロコール酸塩法よりリゾチーム法の方がより有効であった。加熱が孢子に与える傷害が軽度の場合、コルテックスに存在する自己融解酵素が不活化され、さらに傷害が進行するとコアに存在する蛋白質、核酸が変性し、死滅する。リゾチーム法では先述の如く、リゾチームがコルテックス中の不活化された融解酵素の働きを補い、発芽を誘発すると考えられている。

リゾチーム法により*C. difficile* 30株の耐熱性を検討した結果、100℃10分間加熱後においても孢子数(70℃10分間加熱後の孢子数)の2.5~30.9%が生残した。さらに4株についてD₉₀、D₁₀₀値を求めた結果、D₉₀値は60分以上、D₁₀₀値は5.5~15.5分であった。*Clostridium* 菌属の中で耐熱性が強い耐熱性*C. perfringens*のD₁₀₀値が6~17.6分であることを考えると、*C. difficile*はかなり耐熱性の強い菌種であると言える。

孢子に耐熱性を与える因子としては、孢子のCa、DPA含量もまた重要な因子と考えられている⁴⁹⁾。本研究ではCaを含め5種類の金属について孢子の耐熱性に与える影響に関して合成培地を用いて検討したが、Caについての耐熱性への関与が示唆された。Ca不含培地において形成された孢子のD₁₀₀値は2.1~3.3分、Ca 1mM添加培地において形成された孢子のD₁₀₀値は4.3~5.4分であり、被験3株のいずれにおいてもCa添加培地において形成された孢子の耐熱性が高かった。さらに、一株についてCa、DPA含量を検討した時、Caを添加した場合の方がそれらの含有量が高かった。Ca非添加においてもCaが検出されたが、培地に加えたペプトン、酵母エキス中に微量のCaが含まれていたためと考えられる。Ca含量については高い方が耐熱性が高いことが示されており^{49)~53)}、*C. difficile*の場合も同様の結果が得られた。DPAと耐熱性の関係については、その量は耐性と関係しないとする報告と、関係するとの報告があり一致しない^{49)~55)}。*C. difficile*の場合には上述の如く、DPA含量の高い方が耐熱性が高いと思われる。すなわち、*C. difficile* 孢子においてもDPA、Ca含有量が耐熱性に関与していることが推察された。

孢子の耐熱性には孢子の含水量、コアの物理化学的構造が関

与しており⁴⁹⁾、*C. difficile*の高い耐熱性の機序の解明にはそういった方面からの検討が必要と思われる。

結 論

*C. difficile*の孢子について、その検出および耐熱性について有毒30株を用いて検討し、次の結果を得た。

1. 被験30株共にm-BHI培地において、光学顕微鏡的には、10⁶/ml以上の孢子形成を示したが、孢子の検出は通常の培地では困難であった。

2. タウロコール酸塩法とリゾチーム法による孢子検出率を比較検討したところ、タウロコール酸塩法の方が孢子検出に有効であった。

3. 4株を用いて孢子に傷害を与える加熱温度を検討したところ、80℃加熱は孢子を傷害することが分かった。また、加熱傷害孢子の検出にはリゾチーム法が有効であった。

4. 被験全株ともに100℃10分間加熱に対し耐性を示し、耐熱性孢子数の総孢子数に対する割合は、2.5~30.9%であった。また、D₉₀値は、60分以上、D₁₀₀値は、5.5~15.5分を示した。

5. 孢子の耐熱性に及ぼす培養液中の金属の影響について3株を用いて合成培地にて検討した結果、Ca不含の場合に比べ、Ca 1mM添加培地において形成された孢子の方が、耐熱性が高かった。

6. KZ 1647株を用い孢子のCa、DPA含有量を解析した結果、1mM Ca添加TYGMにおいて形成された孢子のCa、DPA含有量はCa無添加の場合に比べ高かった。

以上の結果は、*C. difficile*は孢子形成が良好で、かつその孢子は耐熱性が強いことを示している。さらに*C. difficile* 孢子の耐熱性にCa、DPA含有量が関与していることを示唆している。

謝 辞

稿を終えるに臨み、終始御懇篤なる御指導御校閲を賜りました恩師中村信一教授に衷心より深甚なる謝意を表します。また、原子吸光法について御指導戴きました本学薬学部衛生化学講座、宮崎元一教授ならびに統計学的検討について御指導戴きました本学歯科口腔外科学講座、岡部孝一講師に深く感謝致します。さらに、本研究の遂行にあたり多大な御協力を戴きました微生物学教室の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Bartlett, J. G.: Antibiotic-associated pseudomembranous colitis. Rev. Infect. Dis., 1, 530-539 (1979).
- 2) Lysterly, D. W., Krivan, H. C. & Wilkins, T. D.: *Clostridium difficile*: its disease and toxin. Clin. Microbiol. Rev., 1, 1-18 (1988).
- 3) Mulligan, M. E., Rolfe, R. D., Finegold, S. M. & George, W. L.: Contamination of a hospital environment by *Clostridium difficile*. Curr. Microbiol., 3, 173-175 (1979).
- 4) Kim, K. H., Fekety, R., Batts, D. H., Brown, D., Cudmore, M., Silva, Jr. J. & Waters, D.: Isolation of *Clostridium difficile* from the environment contacts of patients with antibiotic-associated colitis. J. Infect. Dis., 143, 42-50 (1981).
- 5) Testore, G. P., Pantosti, A., Cerquetti, M., Babudieri, S., Panichi, G. & Gianfrilli, P. M.: Evidence for cross-infection in an outbreak of *Clostridium difficile*-associated

- diarrhoea in a surgical unit. J. Med. Microbiol., 26, 125-128 (1988).
- 6) Ionesco, H.: Initiation de la germination des spores de *Clostridium difficile* par le lysozyme. C. R. Acad. Sci. (D) (Paris), 287, 659-661 (1978).
- 7) Raibaud, P., Ducluzeau, R., Dubos, F., Hudault, S., Bewa, H. & Muller, M. C.: Implantation of bacteria from the digestive tract of man and various animals into gnotobiotic mice. Am. J. Clin. Nutr., 33 (Suppl.), 2440-2447 (1980).
- 8) Wilson, K. H., Kennedy, M. J. & Fekety, F. R.: Use of sodium taurocholate to enhance spore recovery on a medium selective for *Clostridium difficile*. J. Clin. Microbiol., 15, 443-446 (1982).
- 9) Bartlett, J. G.: Treatment of antibiotic-associated pseudomembranous colitis. Rev. Infect. Dis., 6 (Suppl. 1), s235-s241 (1984).
- 10) Finegold, S. M. & George, W. L.: Therapy directed against *Clostridium difficile* and its toxins: complications of therapy. In R. D. Rolfe & S. M. Finegold (eds.), *Clostridium difficile: Its Role in Intestinal Disease*, p341-357, Academic Press, San Diego, 1988.
- 11) Nakamura, S., Mikawa, M., Nakashio, S., Takabatake, M., Okada, I., Yamakawa, K., Serikawa, T., Okumura, S. & Nishida, S.: Isolation of *Clostridium difficile* from the feces and the antibody in sera of young and elderly adults. Microbiol. Immunol., 25, 345-351 (1981).
- 12) 沖野善則: *Clostridium difficile* の孢子形成に及ぼすアミノ酸の影響. 十全医会誌, 101, 68-78 (1992).
- 13) Labbe, R. G. & Duncan, C. L.: Growth from spores of *Clostridium perfringens* in the presence of sodium nitrite. Appl. Microbiol., 19, 353-359 (1970).
- 14) 亀井俊郎, 上門英明, 金子京子, 中井芳江, 佐藤 順: 生乳から分離された *Bacillus subtilis* 孢子と *Bacillus cereus* 胞子のカルシウム, ジピコリン酸含量に及ぼす孢子形成培地の影響. 防菌防黴, 19, 445-450 (1991).
- 15) Janssen, F. W., Lund, A. J. & Anderson, L. E.: Colorimetric assay for dipicolinic acid in bacterial spores. Science, 127, 26-27 (1958).
- 16) Viscidi, R., Willey, S. & Bartlett, J. G.: Isolation rates and toxigenic potential of *Clostridium difficile* isolates from various patient populations. Gastroenterology, 81, 5-9 (1981).
- 17) George, W. L., Rolfe, R. D. & Finegold, S. M.: *Clostridium difficile* and its cytotoxin in feces of patients with antimicrobial agent-associated diarrhea and miscellaneous conditions. J. Clin. Microbiol., 15, 1049-1053 (1982).
- 18) Stark, P. L., Lee, A. & Parsonage, B. D.: Colonization of the large bowel by *Clostridium difficile* in healthy infants: quantitative study. Infect. Immun., 35, 895-899 (1982).
- 19) Hafiz, S., McEntegart, M. G., Morton, R. S. & Waitkins, S. A.: *Clostridium difficile* in the urogenital tract of males and females. Lancet, 1, 420-421 (1975).
- 20) Wust, J., Sullivan, N. M., Hardegger, U. & Wilkins, T. D.: Investigation of an outbreak of antibiotic-associated colitis by various typing methods. J. Clin. Microbiol., 16, 1096-1101 (1982).
- 21) Clabots, C. S., Gerding, D., Mulligan, M., Kwok, R., Schaberg, D., Fekety, R. & Reterson, L.: *Clostridium difficile* plasmid isolation as an epidemiologic tool. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 7, 312-315 (1988).
- 22) Poxton, I. R., Aronsson, B., Mollby, R., Nord, C. E. & Collee, J. G.: Immunochemical fingerprinting of *Clostridium difficile* strains isolated from an outbreak of antibiotic-associated colitis and diarrhoea. J. Med. Microbiol., 17, 317-324 (1984).
- 23) Tabaqchali, S., Holland, D., O'Farrell, S. & Silman, R.: Typing scheme for *Clostridium difficile*: its application in clinical and epidemiological studies. Lancet, 2, 935-938 (1984).
- 24) Kuijper, E. J., Oudbier, J. H., Stuijbergen, W. N. H. M., Jansz, A. & Zanen, H. C.: Application of whole-cell DNA restriction endonuclease profiles to the epidemiology of *Clostridium difficile*-induced diarrhea. J. Clin. Microbiol., 25, 751-753 (1987).
- 25) Devlin, H. R., Au, W., Foux, L. & Bradbury, W. C.: Restriction endonuclease analysis of nosocomial isolates of *Clostridium difficile*. J. Clin. Microbiol., 25, 2168-2172 (1987).
- 26) Borriello, S. P., Honour, P., Turner, T. & Barclay, F.: Household pets as a potential reservoir for *Clostridium difficile* infection. J. Clin. Pathol., 36, 84-87 (1983).
- 27) Tamai, K. & Nishida, S.: Taxonomy of *Clostridium bif fermentans* and *Clostridium sordellii*. II. Toxigenic and sporulating potencies in substrains of a *Clostridium sordellii* strain. J. Bacteriol., 88, 1647-1651 (1964).
- 28) Yamagishi, T., Ishida, S. & Nishida, S.: Isolation of toxigenic strains of *Clostridium perfringens* from soil. J. Bacteriol., 88, 646-652 (1964).
- 29) Nishida, S. & Nakagawara, G.: Relationship between toxigenicity and sporulating potency of *Clostridium novyi*. J. Bacteriol., 89, 993-995 (1965).
- 30) Sanada, I. & Nishida, S.: Isolation of *Clostridium tetani* from soil. J. Bacteriol., 89, 626-629 (1965).
- 31) Sebalt, M. & Schaeffer, M. P.: Toxigenese et sporulation chez *Clostridium histolyticum*. C. R. Acad. Sci. (Paris) (Group 13), 260, 5398-5400 (1965).
- 32) Nakamura, S., Serikawa, T., Yamakawa, K., Nishida, S., Kozaki, S. & Sakaguchi, G.: Sporulation and C₂ toxin production by *Clostridium botulinum* type C strains producing no C₁ toxin. Microbiol. Immunol., 22, 591-596 (1978).
- 33) Hickey, C. S. & Johnson, M. G.: Effects of pH shifts, bile salts, and glucose on sporulation of *Clostridium perfringens* NCTC 8798. Appl. Environ. Microbiol., 41, 124-129 (1981).
- 34) Raibaud, P., Ducluzeau, R., Muller, M. C. & Sacquet, E.: Le taurocholate de sodium, facteur de germination in

vitro et *in vivo*, dans le tube digestif d'animaux "gnotoxéniques", pour les spores de certaines bactéries anaérobies strictes isolées de fèces humaines et animales. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 125B, 381-391 (1974).

- 35) Gould, G. W. & Hitchins, A. D.: Sensitization of bacterial spores to lysozyme and to hydrogen peroxide with agents which rupture disulphide bonds. J. Gen. Microbiol., 33, 413-423 (1963).
- 36) Gould, G. W. & Hitchins, A. D.: Germination of spores with Strange and Dark's spore lytic enzyme. In L. L. Campbell & H. O. Halvorson (eds.), Spores III, p213-221, American Society for Microbiology, Ann Arbor, 1965.
- 37) Gould, G. W. & King, W. L.: Action and properties of spore germination enzymes. In L. L. Campbell (ed.), Spores IV, p276-286, American Society for Microbiology, Bethesda, 1969.
- 38) Elliott, E. W.: The swarm-cells of *Myxomycetes*. Mycologia, 41, 141-170 (1949).
- 39) Wilson, K. H.: Efficiency of various bile salt preparations for stimulation of *Clostridium difficile* spore germination. J. Clin. Microbiol., 18, 1017-1019 (1983).
- 40) Wilson, K. H., Kennedy, M. J. & Fekety, F. R.: Use of sodium taurocholate to enhance spore recovery on a medium selective for *Clostridium difficile*. J. Clin. Microbiol., 15, 443-446 (1982).
- 41) Buggy, B. P., Wilson, K. H. & Fekety, R.: Comparison of methods for recovery of *Clostridium difficile* from an environmental surface. J. Clin. Microbiol., 18, 348-352 (1983).
- 42) Buggy, B. P., Hawkins, C. C. & Fekety, R.: Effect of adding sodium taurocholate to selective media on the recovery of *Clostridium difficile* from environmental surfaces. J. Clin. Microbiol., 21, 636-637 (1985).
- 43) Nishida, S., Seo, N. & Nakagawa, M.: Sporulation, heat resistance, and biological properties of *Clostridium perfringens*. Appl. Microbiol., 17, 303-309 (1969).
- 44) Smith, L. D. S.: Botulism, p34-63, Charles C Thomas

Publisher, Springfield, 1977.

- 45) Roberts, T. A. & Gibson, A. M.: The relevance of *Clostridium botulinum* type C in public health and food processing. J. Food Technol., 14, 211-226 (1979).
- 46) Roberts, T. A.: Heat and radiation resistance and activation of spores of *Clostridium welchii*. J. Appl. Bacteriol., 31, 133-144 (1968).
- 47) Weiss, K. F. & Strong, D. H.: Some properties of heat-resistant and heat-sensitive strains of *Clostridium perfringens*. I. Heat resistance and toxigenicity. J. Bacteriol., 93, 21-26 (1967).
- 48) 蜂須賀養悦: 芽胞学, 第1版, 170-190頁, 東海大学出版会, 東京, 1988.
- 49) Lundgren, D. G. & Cooney, J. J.: Chemical analyses of asporogenic mutants of *Bacillus cereus*. J. Bacteriol., 83, 1287-1293 (1962).
- 50) Sugiyama, H.: Studies on factors affecting the heat resistance of spores of *Clostridium botulinum*. J. Bacteriol., 62, 81-96 (1951).
- 51) Grelet, N.: Le déterminisme de la sporulation de *Bacillus megatherium*. V constituants minéraux du milieu synthétique nécessaires à la sporulation. Ann. Inst. Pasteur., 83, 71-79 (1952).
- 52) Amaha, M. & Ordal, Z. J.: Effect of divalent cations in the sporulation medium on the thermal death rate of *Bacillus coagulans* var. J. Bacteriol., 74, 596-604 (1957).
- 53) Black, S. H., Hashimoto, T. & Gerhardt, P.: Calcium reversal of the heat susceptibility and dipicolinate deficiency of spores formed "endotrophically" in water. Can. J. Microbiol., 6, 213-224 (1960).
- 54) Levinson, H. S.: Some germination factors of mesophilic spore formers, In H. O. Halvorson (ed.), Spores II, p14-23, Burgess Publishing Company, Minneapolis, 1961.
- 55) Church, B. D. & Halvorson, H.: Dependence of the heat resistance of bacterial endospores on their dipicolinic acid content. Nature, 183, 124-125 (1959).

Recovery and Heat Resistance of Spores of *Clostridium difficile* Masaru Miyata, Department of Bacteriology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-J. Juzen Med Soc., 103, 144-153 (1994)

Key words *C. difficile*, spore, heat resistance, Ca, DPA

Abstract

Recovery and heat resistance of spores of *Clostridium difficile* (*C. difficile*), which is the cause of pseudomembranous colitis and some cases of antibiotic-associated diarrhea, were examined using 30 toxigenic strains. Numbers of more than 10^6 /ml of spores were observed microscopically in all strains in modified brain heart infusion cultures. Recovery rates of the spores, however, were quite poor in ordinary growth medium; the recovery rates were less than 0.01% in 25 strains and in only 2 strains more than 10%. These spores were more effectively recovered by a taurocholate method than by a lysozyme method. The mean values of recovery rates were $82.2 \pm 16.4\%$ in the former and $75.2 \pm 21.1\%$ in the latter. By incubation of heat-treated spores in ordinary growth medium, the temperature which injured spores was determined in 4 strains. With all strains there was a considerable decline in the recovery rates of their spores when heated at 80°C for 10 min, showing that the determinative temperature which injured spores was 80°C. When the taurocholate method and lysozyme method were examined for the recovery of heat-treated spores, it was shown that the latter is more effective than the former; viable spores of all strains injured at 90°C or 100°C for 10 min could not be recovered at all by the taurocholate method, while, by the lysozyme method, 10-32% of injured spores heated at 90°C for 10 min, or 0.2-2.1% of those at 100°C for 10 min were recovered. To examine resistance of spores against heating at 100°C, cultures of all 30 strains were heated at 100°C for 10 min and the numbers of viable spores, which were determined by the lysozyme method, were compared with number of spores determined by the taurocholate method after heating at 70°C for 10 min. The ratios of spores resistant against heating at 100°C to those resistant against heating at 70°C ranged from 2.5 to 30.9%. The D_{100} values ranged from 2.1 to 35.5 min in 4 strains tested. The effects of metals, Fe, Mg, Ca, Mn and Co, on heat resistance of spores were examined by using a synthetic medium. In all 3 strains tested, heat resistance was higher in spores produced in the presence of 1 mM Ca than those in the absence of Ca; the D_{100} values were 2.1-3.3 min in the absence of and 4.3-5.4 min in the presence of 1 mM Ca. Further, Ca and the dipicolinic acid (DPA) contents of spores were measured in one strain in relation to heat resistance. The Ca and DPA contents were higher in spores produced in the presence of Ca than in those produced in the absence of Ca. These findings indicate that *C. difficile* strains sporulate readily, and that the spores are fairly highly heat-resistant among *Clostridium* species. In addition, it is suggested that the DPA and Ca contents might be associated with heat resistance of spores of *C. difficile*.