

Clostridium difficileの糖発酵性状

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/2297/9247

Clostridium difficile の糖発酵性状

金沢大学医学部医学科微生物学講座 (主任: 中村信一教授)

野 尻 孝 司

偽膜性大腸炎, 抗生物質関連腸炎の原因菌である *Clostridium difficile* (*C. difficile*) の糖発酵性状の特性を多数の菌株を用いて解析し, さらに糖発酵性状の不安定性を解明すべく菌の増殖, 糖の利用, 代謝産物としての有機酸産生, アンモニア産生について検討した. また, 本菌の毒素原性を遺伝子レベルで解析し, 糖発酵性状との関係を併せて検討した. 糖発酵性状の特性を解析するために, *C. difficile* 100菌株 (細胞毒性陽性60菌株, 同陰性40菌株) について, 28種類の糖に対する発酵性状を, ペプトン-寒天-基礎培地を用いて検討した. フルクトース, グルコース, マンニトール, マンノース, メレチトース, ソルビトールの発酵性状の判定には2日間の培養で充分であった (即時発酵糖). しかしながら, キシロース, リボース, サリシン, トレハロースの発酵性状の判定には7日間, セロビオースの場合には14日間の培養を要した (遅延発酵糖). KZ 1613 株を用いて即時発酵糖であるグルコース, および上述の遅延発酵糖について菌の増殖, 糖の消費, 有機酸およびアンモニア産生性を前還元嫌気減菌基礎培地を用いて検討し, 遅延発酵糖の特性について解析した. 遅延発酵糖は, その存在下における菌の増殖パターンにより, 培養1日目に, グルコースより劣るものの, 明らかな増殖を認める群 (キシロース, リボース, サリシン), 培養2日目以降に増殖が認められる群 (トレハロース, セロビオース) の2群に分けられた. 糖の消費は菌の増殖をほぼ反映し, 培養2日目でグルコースは全てが消費され, 遅延発酵糖については, 前者では, 37~51%が残存し, 後者では85%以上が残存していた. また7日目においては, サリシンは100%が消費されたが, 他の遅延発酵糖については, 17~58%が残存していた. 即時発酵糖であるグルコース添加培地における総酸産生量 (ガスクロマトグラフィーにより測定した有機酸の総量) は培養2日目までは培養時間と共に増加したが, 培養7日目の値は培養2日目とほぼ等しかった. 一方, 遅延発酵糖添加培地における総酸産生量は培養2日目より7日目の方が多く, かつグルコースの場合よりも多かった. 個々の酸については乳酸の産生がグルコースの場合にのみ明確に認められた. アンモニアの産生は培養2日目および7日目のいずれにおいてもグルコース添加培地では少なかった. 培養菌液中の総酸濃度からアンモニア濃度を減じた値 (Δ 酸濃度) と培養菌液の pH の関係を解析し模擬線と比較検討したところ, 回帰直線は遅延発酵糖添加の場合に比べ, グルコース添加の場合, より模擬線に近似していた. 更に, トキシンA, トキシンB遺伝子の存在を PCR 法にて検索し, 遺伝子レベルでの毒素原性と糖発酵性状の関係を解析した. 細胞毒性陽性60菌株中59菌株にトキシンA, トキシンB両遺伝子が検出され, 残り1菌株にはトキシンA遺伝子は検出されたが, トキシンB遺伝子は検出されなかった. 一方, 細胞毒性陰性の40菌株では両遺伝子いずれも検出されなかった. したがって, 表現形質上の毒素原性とソルビトール発酵性に見られた関係が (細胞毒性陽性株の圧倒的多数がソルビトール発酵陽性), 同時に遺伝子レベルでの毒素原性とソルビトール発酵性の関係においてもみられた.

Key words *Clostridium difficile*, sugar, fermentation, toxin, PCR

Clostridium difficile (*C. difficile*) は偽膜性大腸炎, 抗生物質関連腸炎の原因菌であり, 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^{1,2)}.

本菌の糖発酵性状は, 他の *Clostridium* 菌種と同様, 同定に際し重要であり, 本菌が最初に報告された時点で記載されている³⁾. Smith ら⁴⁾は臨床分離株, Hafiz ら⁵⁾は新生児および成人糞便から本菌の分離を試み, 保存株をも含め相当数の菌株について糖発酵性状を検討しているが, それらの成績には幾つかの相違点がみられる.

細菌同定に際し最も重要な Bergey マニュアル (Bergey's manual of systematic bacteriology)⁶⁾では糖発酵性状について詳

細に記載されており菌種同定に際し有力な性状となっている. しかしながら, *C. difficile* に関しては発酵可能糖の多くについて, 61~89%の菌株が陽性, あるいは60~90%の菌株が陰性とされており, これらの糖の発酵性状は同定に際し実際的には有効ではない.

細菌の糖発酵性状が他の培養・生化学性状と関連することは, しばしば見られる現象である. *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) の芽胞形成は遅延発酵糖であるラフィノース存在下では良好であり, 耐熱性菌株には遅延発酵糖であるセロビオース, サリシン発酵陽性株が多いとされている^{7,8)}. *C. difficile* ではソルビトール発酵性状と毒素原性との間に密接な関係が見られ, 有毒菌株にはソルビトール発酵陽性株が多く無毒菌株に

平成8年11月7日受付, 平成8年11月22日受理

Abbreviations: bp, base pair; *C. difficile*, *Clostridium difficile*; *C. perfringens*, *Clostridium perfringens*; dNTP, deoxynucleotide-triphosphate; *E. coli*, *Escherichia coli*; OD₅₆₀, optical density at 560 nm; PRAS, pre-reduced anaerobically sterilized; VPI, Virginia polytechnic institute

は同発酵陰性株が多いことが知られている⁹⁻¹¹⁾。しかしながら、糖発酵性状と遺伝子レベルでの毒素原性との関係は、本菌の毒素原性に関し遺伝子レベルでの解析が可能になったにもかかわらず¹²⁻¹⁵⁾、解析されておらず課題として残されている。

以上を鑑み、本研究では *C. difficile* の糖発酵性状を、多数の菌株を用いて解析し、更に糖発酵性状の不安定性を解明すべく菌の増殖、糖の利用、代謝産物としての有機酸産生、アンモニア産生について検討した。また、本菌の毒素原性を遺伝子レベルで解析し、糖発酵性状との関係を併せ検討した。

材料および方法

I. 使用菌株

金沢大学医学部医学科微生物学講座保存の *C. difficile* 細胞毒性陽性60菌株、同陰性40菌株を用いた。これらの菌株のほとんどは、著者の研究室で健康成人および抗生物質関連性下痢症患者から分離された¹⁶⁾¹⁷⁾。

II. 糖発酵性状試験

糖発酵性状試験は、Nakashioら¹⁸⁾の方法により行った。ペプトン-寒天-基礎培地 (2%プロテオースペプトンNo. 2 (Difco Laboratories, Detroit, USA), 0.5% NaCl, 0.05% システイン-塩酸塩一水化物, 0.1%寒天, pH7.2) 3ml (12×115 mm 小試験管) に被験糖を1% (サリシンの場合0.5%) の割合に加えた後、肝片加肝ブイオンで24時間前々培養し、更に24時間前培養した菌液0.1mlを植菌した。37°C, 2日間および7日間培養後、培養菌液のpHを測定し、対照として植菌された糖非添加培地の2日間および7日間培養後の培養菌液のpHとの差 (Δ pH) をもって糖発酵性を判定した。すなわち、 Δ pHが0.5未満を陰性、“-”, 0.5以上を陽性、“+”とした。被験糖としてアドニトール、アミグダリン、アラビノース、セロビオース、デキストリン、ズルシトール、エリトリトール、エスクリン、フルクトース、ガラクトース、グルコース、イノシトール、イヌリン、ラクトース、マルトース、マンニトール、マンノース、メリビオース、ラフィノース、ラムノース、リボース、サリシン、ソルビトール、ソルボース、スクロース、トレハロース、キシロース (いずれも和光純薬工業, 大阪), メレチトース (Difco Laboratories) の28種類を用いた。

III. 各糖添加培地の pH, 菌の増殖, 糖の消費, 代謝産物の解析

各糖添加培地における pH, 菌の増殖, 糖の消費, 有機酸, アンモニアの解析には Serikawa ら¹⁹⁾の培地を用いた (表1)。すなわち、変法肉-酵母-グルコース (de viande et de levures-glucosés) 培地から寒天とグルコースを除いた培地を前還元嫌気滅菌 (pre-reduced anaerobically sterilized, PRAS) 基礎培地と

し各糖を1% (サリシンの場合0.5%) に加えた培地 (17×165 mm 中試験管に5ml ずつ分注) を用いた。この培地に肝片加肝ブイオンで24時間前培養した菌液0.1mlを植菌し、37°Cで培養した。

IV. pH の測定

デジタル pH 計 6071型 (柴田科学, 東京) を用い pH を測定した。

V. 菌の増殖の測定

菌の増殖の測定は島津ボシユロム スペクトロニック 20A (島津, 京都) を用い、波長 560nm における吸光度 (optical density at 560nm, OD₅₆₀) を測定することにより行った。

VI. 糖の分析

被験糖はトリメチルシリル化した後、ガスクロマトグラフィーにより同定、定量した。

培養上清 1ml にトリクロロ酢酸 0.2ml を加え、室温で2時間放置し遠心 (1,500×g, 20分) を行い除タンパクした。この遠心上清全量を試験管にとりジエチルエーテル 1.5ml を加え、ゴム栓をして20回転倒混和しトリクロロ酢酸をエーテル層に抽出除去した。エーテル層を除去した後、同様の操作を2回繰り返し、残った水層を凍結乾燥した。トリメチルシリル化は、この凍結乾燥した試料に、Tri-Sil (Pierce Chemical Co., Rockford, USA) を 1ml 加え、密栓して、60°C, 30分間反応させて行った。遠心 (1,500×g, 15分) により得られた上清を、ガスクロマトグラフィー用の試料とした。

ガスクロマトグラフィーは、シリコン GE SE-30 (日本クロマ

Table 1. Composition of pre-reduced anaerobically sterilized (PRAS) basal medium

Bacto-peptone		1g
Yeast extract		1g
Resazulin (0.1% solution)		0.1ml
Mineral I		7.5ml
K ₂ HPO ₄	0.6%	
Mineral II		7.5ml
KH ₂ PO ₄	0.6%	
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.2%	
NaCl	1.2%	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.12%	
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.12%	
Na ₂ CO ₃ (8% solution)		5ml
Cysteine-HCl · H ₂ O		50mg
Distilled water		80ml

Bacto-peptone and yeast extract were purchased from Difco Laboratories, Detroit, USA.

Table 2. Oligonucleotide primers used to detect the toxin A and the toxin B genes

Toxin gene	Primer	Oligonucleotide sequence (5'-3' ^{a)})	Location within gene ^{b)}
Toxin A	KAG1	CTCGCATATAGCATTAGACCA	34-54
	KAG4	ATTCCCAACGGTCTAGTCC	919-938
Toxin B	KAG8	ATATCAGAGACTGATGAGGGA	3063-3083
	KAG10	AAACCTGGTGTCCATCCTGT	4098-4117

^{a)} Sequences derived from the toxin A and the toxin B genes.

^{b)} In nucleotides.

ト工業, 東京) を 3% にコーティングした Gas-chrom Q (メッシュ 80/100, 日本クロマト工業) を充填した 3mm×2m のガラスカラムを用い, ガスクロマトグラフ JGC-100 (日本電子, 昭島) にて窒素ガスを流動層とし, 注入部温度 200°C, カラム温度 170°C, 検出器温度 220°C で行った. トリメチルシリル化した糖は, 上記試料 2 μ l をカラムに注入し, 水素炎イオン化検出器にて検出した.

VI. 産生有機酸の分析

培養菌液中に産生される有機酸の分析は Holdeman ら²⁰⁾の方法により, ガスクロマトグラフ GC-7A (島津) を用い, ガスクロマトグラフィーにより行った. 揮発性有機酸の分析には培養菌液 1ml に 50% H₂SO₄ 0.2ml, NaCl 0.4g, エチルエーテル 1ml を加え穏やかに 20 回転倒混和後遠心 (700×g, 5 分) を行い, その上清液 (エーテル抽出液) を用いた. 不揮発性有機酸の分析には培養菌液のこれらの成分をメチル化した後クロロフォルムに抽出した. すなわち, 培養菌液 1ml にメタノール 2ml, 50% H₂SO₄ 0.4ml を加え 60°C にて 30 分加熱した. 次いで蒸留水 1ml, クロロフォルム 0.5ml を加え穏やかに 20 回転倒混和した. 遠心 (700×g, 5 分) 後, 下層のクロロフォルム層を分析に供した.

VII. アンモニアの定量

培養菌液中のアンモニア濃度は, アンモニア測定キット (アンモニアテストワコー, 和光純薬工業) を用い, キット添付の指示にしたがって測定した. すなわち, 被験試料 1ml に除タンパク試液 4ml を加え, よく混合した後遠心 (700×g, 10 分) し除タンパクした. 遠心上清液 2ml に発色試液 A, B, C をそれぞれ 2ml, 1ml, 2ml 加え, 37°C にて 20 分間反応させることによりアンモニアをインドフェノールに交換させた. 反応終了 5 分後に反応液の吸光度 (630nm) を島津ボッシュロム スペクトロニック 20A (島津) を用い測定した. 既知のアンモニア水溶液より検量線を作成し, 被験液中のアンモニア濃度を求めた.

VIII. 毒素遺伝子の解析

1. 標的遺伝子検出プライマーの作製

Dove ら²¹⁾による C. difficile トキシン A 遺伝子および Barroso ら²²⁾による トキシン B 遺伝子の塩基配列をもとに, トキシン A 遺伝子を標的とするセンスストランド KAG1 とアンチセンスストランド KAG4 プライマーを, 同様に トキシン B 遺伝子を標的とする KAG8 と KAG10 プライマーを設計, 合成した. これらのプライマーペアで増幅される各標的遺伝子の DNA 断片のサイズは, トキシン A 遺伝子, トキシン B 遺伝子各々 905 塩基数 (base pair, bp), 1055bp である (表 2).

2. PCR

PCR は, 500 μ l 容量微量遠心管内 50 μ l の反応系で実施した. 反応液は, 1 管あたり Ampli Taq[®] DNA ポリメラーゼ 2.5 単位 (0.5 μ l), 10×緩衝液 (100mM Tris-HCl pH 8.3, 500mM KCl, 15mM MgCl₂, 0.01% (W/V) ゼラチン) 5 μ l (いずれも Perkin Elmer, Foster City, USA), 各 2.5mM デオキシヌクレオチド (deoxynucleotide-triphosphate, dNTP) 混合液 4 μ l (United States Biochemical, Cleveland, USA), 50 μ M センスおよびアンチセンスストランドプライマー各 1 μ l に, 24 時間肝片加肝ブイオンまたは変法ブレインハートインフュージョンブロス¹⁰⁾ 培養菌液 2 μ l を加え, 滅菌蒸留水で最終容量 (50 μ l) に調整した. 反応条件は, オムニ E サーマルサイクラー (Hybaid Limited, Middlesex, UK) にてヒータードリッド使用状態で熱変性

94°C 1 分, アニーリング 55°C 1 分 30 秒, DNA 伸長 72°C 1 分 30 秒を 1 サイクルとし 30 サイクル行った.

3. PCR 産物の電気泳動

PCR 終了後, 各産物の 9 μ l について電気泳動装置 (ミュービッド 2, アドバンス, 東京) により 100 V 定電圧下で 0.5 μ g/ml エチジウムブロマイド添加 1.5% アガロースゲル電気泳動を行い, トランスイルミネーター FVI-20M (フナコシ, 東京) の紫外光で増幅遺伝子断片を確認, 撮影記録した. なお分子量マーカーとしては, AmpliSize[™] DNA サイズスタンダード (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) を用いた.

X. 統計学的検討

pH と酸濃度の関連性の検討は, pH の酸濃度への回帰方程式を求めることにより行った. 回帰係数の差の検定は, t 検定で行った.

成 績

I. 糖発酵性状の特性

C. difficile 100 菌株 (細胞毒性陽性 60 菌株および同陰性 40 菌株) の 28 種類の糖に対する発酵性状を, ペプトン-寒天-基礎培地を用い検討した. 判定は, 培養 2 日目, 7 日目に培養菌液 pH を測定することにより行った (表 3). 被験 28 種類の糖のうち発酵陽性を示したものは, フルクトース, グルコース, マンニトール, マンノース, メレチトース, ソルビトール, キシロース, リボース, サリシン, トレハロース, セロビオースの 11 種類であった. フルクトース, グルコース, マンニトール, マンノース, メレチトース, ソルビトールに関しては, 培養 2 日目と 7 日目における発酵陽性株数は同数であり, 発酵性状の判定には 2 日間の培養で充分であった (即時発酵). すなわち, フルクトース, グルコース, マンニトール, マンノースに関しては, 被験全株が陽性を示し, メレチトースおよびソルビトールについては各々 91 株, 64 株が陽性反応を示した.

キシロース, リボース, サリシン, トレハロース, セロビオ

Table 3. Sugar fermentation by C. difficile in incubation period of 2 and 7 days

Sugar	Number of fermentation-positive strains in incubation period of	
	2 days	7 days
Fructose	100	100
Glucose	100	100
Mannitol	100	100
Mannose	100	100
Melezitose	91	91
Sorbitol	64	64
Xylose	56	100
Ribose	85	100
Salicin	57	99
Trehalose	23	99
Cellobiose	8	82
17 other sugars ^{a)}	0	0

^{a)} Adonitol, amygdalin, arabinose, dextrin, dulcitol, erythritol, esculin, galactose, inositol, inulin, lactose, maltose, melibiose, raffinose, rhamnose, sorbose and sucrose.

ースに関しては培養2日目では発酵陰性と判定される菌株が相当数(キシロース, 44菌株; リボース, 15菌株; サリシン, 43菌株; トレハロース, 77菌株; セロビオース, 92菌株)存在したが, 培養7日目では, キシロース, リボースに関しては全菌株が発酵陽性を示し, サリシン, トレハロース, セロビオースにおいても各々99, 99, 82菌株が発酵陽性を示した。7日目判定でサリシン, トレハロース, セロビオース各々に対して発酵陰性を示した菌株について, 更に7日間培養した結果, サリシン発酵陰性の1菌株, トレハロース発酵陰性の1菌株は依然として陰性を示したが, セロビオース発酵陰性を示した18菌株中17菌株が発酵陽性を示した。

他の17種類の糖について培養7日目の Δ pH は, 0.00~0.33にすぎず, いずれも発酵陰性と判定された。

II. 遅延発酵糖の解析

KZ 1613株を用い, 遅延発酵糖について菌の増殖, 糖の消費, 有機酸およびアンモニア産生性を, 代表的即時発酵糖のグルコースを対照とし, PRAS基礎培地を用いて検討した。

1. 菌の増殖と培養菌液 pH (図1)

即時発酵糖であるグルコース添加培地においては, 菌の増殖(OD_{560} 値)は, 培養1日目に最高値(OD_{560} 値, 1.24)に達した後培養3日目まで OD_{560} 値は, 急激に減少し, 以後, 培養7日目

まで OD_{560} 値は, ほぼ同値を示した。また, 糖非添加基礎培地では, 培養1日目に最高 OD_{560} 値 (0.45) に達した後漸減した。

遅延発酵糖は, キシロース, リボースおよびサリシン, ならびにトレハロースおよびセロビオースの2群に分けられた。キシロース, リボースおよびサリシン添加培地における菌の増殖は, 培養1日目ではグルコース添加培地と糖非添加基礎培地のほぼ中間値 (OD_{560} 値: キシロース, 0.86; リボース, 0.81; サリシン, 0.81) を示した。培養2日目における菌の増殖は, サリシン添加培地では最高値 (OD_{560} 値, 0.90) に達し, キシロース, リボース添加培地では, グルコース添加培地での1日目とほぼ同程度に達した (OD_{560} 値: キシロース, 1.16; リボース, 1.08)。培養3日目以後, サリシン添加培地では OD_{560} 値の増減は見られなかったが, キシロース, リボース添加培地では OD_{560} 値は徐々に増加し, 培養5日目には最高値 (OD_{560} 値: キシロース, 1.32; リボース, 1.20) に達した。トレハロース, セロビオース添加培地における菌の増殖は, 互いに類似していた。培養1日目では糖非添加基礎培地とほぼ同程度であり, 培養2日目においても OD_{560} 値の明らかな増加は認められなかった。しかしながら, OD_{560} 値は培養3日目には顕著に増加し, 培養6日目には最高値 (OD_{560} 値: トレハロース, 1.03; セロビオース, 1.00) に達した。

培養菌液 pH は, 培養1日目に最高 OD_{560} 値を示したグルコースの場合, 培養2日目に最低値 (pH 5.78) を示した。サリシン添加培地では糖非添加基礎培地に比べ明らかに良好な増殖を示したにもかかわらず pH の低下は少なく培養7日目においても pH 6.28に過ぎなかった。キシロースあるいはリボース添加培地では, 前述の如く培養1日目の増殖は, グルコースに比べて幾分不良であるが, 互いに同程度であり, その後の増殖はむしろキシロース添加培地の方が良好であったにもかかわらず, pH の低下はむしろリボース添加の場合, より顕著であった。すなわち, リボースの場合, 培養1日目には pH 6.17を示し, 培養5日目以降では pH 5.64に達したが, キシロースに関しては培養1日目では pH 6.32, 培養7日目では pH 5.78であり, リボースの場合程には pH は低下しなかった。培養2日目まで糖非添加基礎培地に比べて菌の明らかな増殖が認められなかったトレハロース, セロビオース添加培地培養菌液の pH は, 培養2日目以後漸次低下し, 培養7日目には, トレハロース添加培地の pH 値は5.84, セロビオース添加培地の pH 値は6.08を示した。

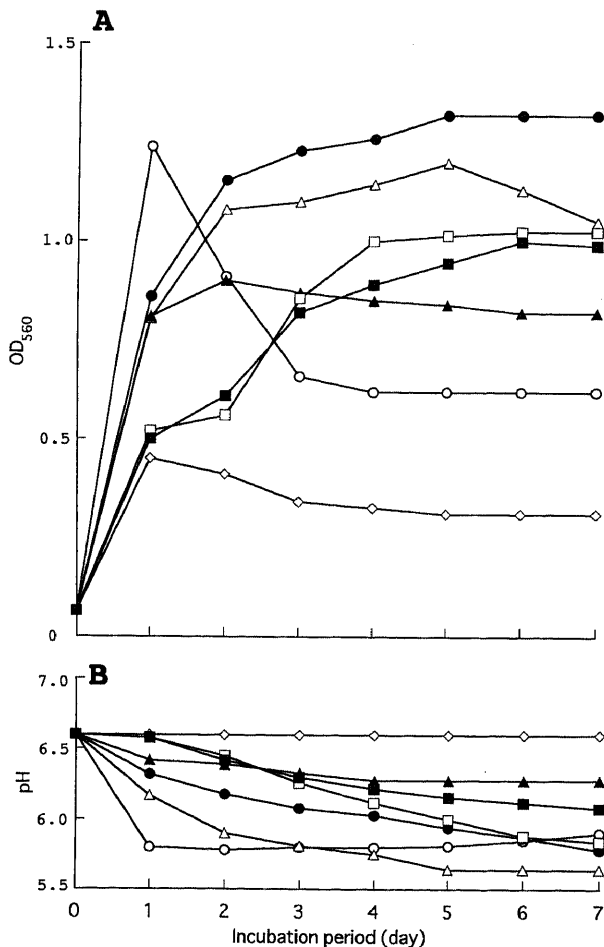


Fig. 1. Bacterial growth (A) and change in pH (B) in PRAS medium with different sugars in *C. difficile* strain KZ 1613. ○, glucose; ●, xylose; △, ribose; ▲, salicin; □, trehalose; ■, cellobiose; ◇, no sugar.

Table 4. Consumption of sugars by *C. difficile* KZ 1613 in PRAS medium

Sugar ^{a)}	Consumption rate (%) in incubation period of	
	2 days	7 days
Glucose	100	100
Xylose	49	75
Ribose	54	83
Salicin	63	100
Trehalose	1	42
Cellobiose	14	44

^{a)} Concentration : 1% with a exception of salicin (0.5%).

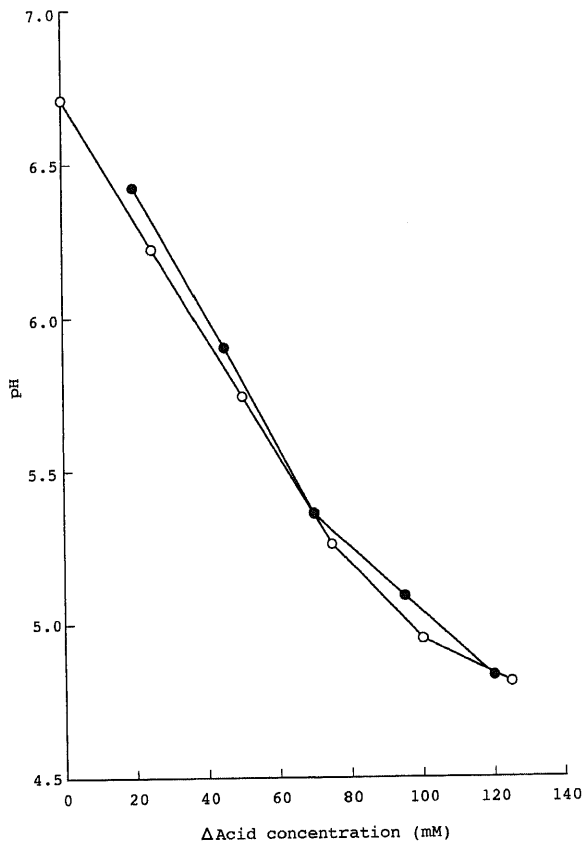


Fig. 2. Relationship between Δ Acid concentration and pH in PRAS medium in simulation experiment (simulation curve). Δ Acid concentration (mM) = concentration of acetic acid (mM) - concentration of ammonia added (mM). Concentration of ammonia added (mM): \circ , 0; \bullet , 30.

2. 糖の消費

培養2日目および7日目の残存糖量をガスクロマトグラフィーにより測定することにより、菌の遅延発酵糖消費能について検討した。

培養2日目では、即時発酵糖であるグルコースは全てが消費されたが、遅延発酵糖についてはいずれも相当量が残存していた(表4)。遅延発酵糖の培養2日目における消費量は、培養1日目で明確な増殖を示したキシロース、リボース、サリシンでは各々49%、54%、63%の量が消費されていたが、培養2日目まで明らかな増殖が認められなかったトレハロース、セロビオースでは消費量は、各々1%、14%にすぎなかった。培養7日目においてはサリシンでは100%、キシロース、リボースについては約80%が消費されたが、後2者については約40%が消費されにすぎなかった。

3. 有機酸およびアンモニアの産生

培養菌液の pH の変動に最も大きな影響を与える因子は代謝産物としての有機酸およびアンモニアであることに鑑み、使用培地への有機酸およびアンモニア添加による変動を検討し(模擬線)、培養菌液の pH の変動との関係について検討した。

1) 模擬線

まず、種々の濃度の酢酸、酪酸、あるいは乳酸を PRAS 基礎培地に加え pH の変動を検索した結果、pH 低下曲線は同じであったので、酸として酢酸を用い模擬線を作成した(図2)。酢酸のみを添加した場合の酸濃度と pH の関係は、アンモニア30 mM を添加した PRAS 基礎培地に酢酸を添加したときの Δ 酸濃度(酸濃度からアンモニア濃度を減じた濃度)と pH の関係とほぼ一致した。

2) 培養菌液中の有機酸およびアンモニア濃度と pH の変動
培養2日目および7日目に有機酸およびアンモニア濃度を測

Table 5. Concentration of organic acid products and ammonia in culture of PRAS medium containing different sugars of C. difficile KZ 1613

Sugar	Incubation period (day)	pH	Concentration (mM)											Ammonia	Δ Acid ^{b)}
			Acid ^{a)}										L		
			Total	A	P	iB	B	iV	V	iC	C				
Glucose	0.5	6.35	22.6	9.9	0.0	1.2	6.0	0.9	0.2	4.4	0.0	0.0	3.9	18.7	
	1	6.06	51.2	14.1	0.0	2.9	22.5	1.5	1.6	5.0	0.0	3.6	3.4	47.8	
	2	5.78	68.4	20.3	0.0	2.5	31.4	1.3	2.5	4.0	0.1	6.3	3.1	65.3	
	7	5.90	76.4	25.7	0.0	2.5	34.9	1.3	2.4	4.6	0.1	4.9	14.0	62.4	
Xylose	2	6.37	70.9	35.6	1.4	5.4	24.6	2.2	3.3	3.0	0.6	0.0	38.8	32.1	
	7	5.86	129.9	52.0	1.8	5.4	57.3	2.2	7.3	2.7	1.2	0.0	43.3	96.6	
Ribose	2	6.07	94.6	40.9	1.6	5.2	36.0	2.2	4.7	2.8	0.6	0.6	17.5	77.1	
	7	5.71	134.7	43.5	1.8	5.4	67.2	2.3	9.4	2.7	1.5	0.9	27.2	107.5	
Salicin	2	6.37	68.6	34.0	2.9	5.6	19.3	2.5	1.1	3.0	0.2	0.0	34.6	34.0	
	7	6.19	101.6	49.9	4.0	7.1	32.7	3.1	1.3	3.3	0.2	0.0	39.7	61.9	
Trehalose	2	6.48	58.7	34.2	2.0	6.2	9.2	2.7	1.2	3.0	0.2	0.0	35.7	23.0	
	7	5.80	126.3	38.6	1.9	4.9	64.4	2.3	9.1	2.5	1.6	1.0	33.0	93.3	
Cellobiose	2	6.56	45.3	22.2	1.5	6.6	7.4	2.5	0.9	3.3	0.1	0.8	29.9	15.4	
	7	6.16	93.0	48.2	2.0	6.0	28.6	2.4	2.5	3.0	0.3	0.0	29.0	64.0	
None	2	6.62	49.2	25.6	2.2	7.0	6.2	2.9	0.9	3.5	0.2	0.7	41.1	8.1	
	7	6.60	58.5	32.0	2.9	8.1	7.0	3.4	0.9	3.5	0.0	0.7	47.1	11.4	

^{a)} A, acetic acid; P, propionic acid; iB, isobutyric acid; B, butyric acid; iV, isovaleric acid; V, valeric acid; iC, isocaproic acid; C, caproic acid; L, lactic acid.

^{b)} Total acid concentration minus ammonia concentration.

定した。即時発酵糖のグルコースについては、培養2日目まで完全に消費されたところから培養0.5日目、1日目についても検討した。

いずれの糖についても主揮発性有機酸は、酢酸、酪酸であり、その他少量のプロピオン酸、イソ酪酸、イソ吉草酸、吉草酸、イソカプロン酸、カプロン酸の産生が認められた。不揮発性有機酸としては乳酸の産生が特にグルコースについて認められた。これらの有機酸の総和を総酸とした(表5)。

即時発酵糖であるグルコースにおける総酸産生量は培養2日目までは培養時間と共に増加したが、培養2日目(68.4mM)と7日目(76.4mM)には大きな差異は認められなかった。培養1日目に明らかな菌の増殖が認められたキシロース、リボース、サリシンの場合、グルコースの場合と比べ、培養2日目には各々1.0, 1.4, 1.0倍量、培養7日目には更に各々1.7, 1.8, 1.3倍量の有機酸産生が見られた。一方、培養2日目までは糖非添加基礎培地と同程度の増殖を示したトレハロース、セロビオースについては、その総酸量は培養2日目においては糖非添加の

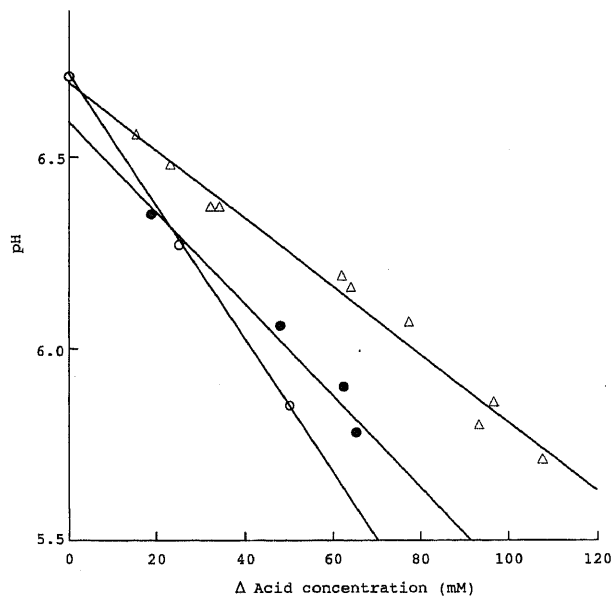


Fig. 3. Relationship between Δ Acid concentration in and pH of cultures in PRAS medium with different sugars in strain KZ 1613. \circ , simulation curve (refer to Fig. 2) ($Y = -0.01812X + 6.714$, $r = -0.996802$, $p < 0.01$, $n = 5$); \bullet , glucose ($Y = -0.01141X + 6.576$, $r = -0.98645$, $p < 0.01$, $n = 4$); \triangle , slowly fermented sugars ($Y = -0.008834X + 6.691$, $r = -0.99052$, $p < 0.01$, $n = 10$).

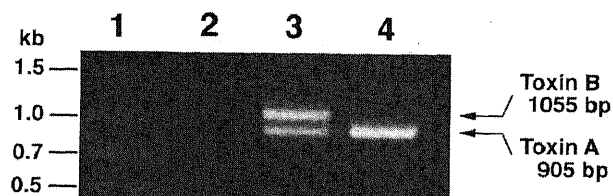


Fig. 4. PCR amplification of toxin gene fragments. Lane 1, AmpliSize™ DNA size standard as a molecular size marker; lane 2, nontoxicogenic strain KZ 1610; lanes 3 and 4, toxicogenic strains KZ 1613 and KZ 1729, respectively.

場合と同程度であったが、培養7日目ではトレハロースでは126.3mM、セロビオースでは93.0mMを示し、グルコースに比べ高濃度であった。

アンモニアの産生は、即時発酵糖であるグルコース添加培地では少なく、7日目においても14.0mMにすぎなかった。遅延発酵糖添加培地でのアンモニア量はいずれの糖についても、また培養2日目および7日目いずれにおいてもグルコース添加培地よりも多かった。しかしながら、その濃度は最高の場合でも対照の糖非添加基礎培地とほぼ同程度であった。遅延発酵糖添加培地におけるアンモニア量をグルコース添加培地での値と比較すると、培養2日目においては、5.6~12.5倍、7日目では1.9~3.1倍量であった。

総酸濃度からアンモニア濃度を減じた値(Δ 酸濃度)と培養菌液のpHの関係を解析し、先に述べた模擬線と比較検討した(図3)。

Δ 酸濃度と培養菌液pHの間にはグルコースについては $Y = -0.01141X + 6.576$ ($r = -0.98645$, $p < 0.01$)、遅延発酵糖については $Y = -0.008834X + 6.691$ ($r = -0.99052$, $p < 0.01$)の相関が認められ、グルコースの場合、より模擬線($Y = -0.01812X + 6.714$, $r = -0.996802$, $p < 0.01$)に近似していた。しかしながら3つの回帰係数の差の検定を行ったところ、お互いに3者間には有意の差が認められた($p < 0.01$)。

Ⅲ. 遺伝子レベルでの毒素原性と糖発酵性状の解析

1. PCR法による細胞毒性陽性株・同陰性株の同定

トキシンA、トキシンB遺伝子が証明されているVPI 10463株の24時間肝片加肝ブイオン培養菌液を用いて、各プライマーペアにより増幅させたPCR産物を解析した。

Table 6. Comparison of toxigenic and nontoxigenic *C. difficile* strains for sugar fermentation ability

Sugar	Genetic toxigenicity ^{a)}	Rate (%) of strains showing fermentation-positive in incubation period of 7 days
Melezitose	+	88.3
	-	95
Sorbitol	+	86.7
	-	30
Xylose	+	100
	-	100
Ribose	+	100
	-	100
Salicin	+	98.3
	-	100
Trehalose	+	100
	-	97.5
Cellobiose	+	83.3
	-	80
Other 4 sugars ^{b)}	+	100
	-	100

^{a)} Toxigenicity was determined by PCR method with primers against toxins A and B. +, toxin A and toxin B genes-positive 59 strains, and toxin A gene-positive but toxin B gene-negative 1 strain; -, toxin A and toxin B genes-negative 40 strains.

^{b)} Fructose, glucose, mannitol and mannose.

センスストランド KAG1 とアンチセンスストランド KAG4 プライマーによるトキシンA遺伝子の増幅では 905bp 付近に、KAG8 と KAG10 プライマーによるトキシンB遺伝子の増幅では 1055bp 付近にバンドが見られた。いずれも想定されるサイズの DNA 断片であった。以上の結果に基づき細胞毒性陽性60菌株、同陰性40菌株について本 PCR を行い、トキシンA、トキシンB遺伝子の有無について検討した。細胞毒性陽性60菌株中59菌株にトキシンA、トキシンB両遺伝子が検出されたが、残り1菌株 (KZ 1729) にはトキシンA遺伝子は検出されたが、トキシンB遺伝子は検出されなかった (図4)。一方、細胞毒性陰性40菌株では両遺伝子いずれも検出されなかった。

2. 遺伝子レベルでの毒素原性と糖発酵性状

遺伝子レベルでの毒素原性と糖発酵性状について解析した (表6)。発酵陽性糖11種類中ソルビトール発酵性状と毒素原性との間には密接な関係が見られた。すなわち、トキシンA、トキシンB両遺伝子陽性菌株59菌株およびトキシンA遺伝子陽性、トキシンB遺伝子陰性の1菌株 (KZ 1729)、合計60菌株中52菌株 (86.7%) がソルビトール陽性であったのに対して、同陰性菌株40菌株中12菌株 (30%) のみがソルビトール陽性を示したにすぎなかった。トキシンA遺伝子陽性、トキシンB遺伝子陰性の1菌株は、ソルビトール発酵陽性であり、他の糖発酵においても、他の菌株と異なる点はなかった。

考 察

細菌学において糖発酵性と言う時の糖には様々の発酵可能物質、糖、アルコール、配糖体等の炭水化物が含まれており、その判定は培養菌液 pH の測定によって行われる^{20)23) 25)}。

C. difficile は偽膜性大腸炎、一部の抗生物質関連性下痢症の原因菌である¹²⁾。*C. difficile* の糖発酵性状については本菌が最初に記載されて以来いくつかの報告が見られる^{2) 6)}。詳細な記載は細菌の同定上最も重要な Bergey マニュアル⁶⁾に見られる。以下、主として本マニュアルとの対比で著者の結果について論じる。Bergey マニュアルでは90~100%の菌株が陽性反応の時“+”、90~100%の菌株が陰性反応の時“-”、61~89%の菌株が陽性反応の時“±”、40~60%の菌株が陽性反応の時“d”、11~39%の菌株が陽性反応の時“干”、60~90%の菌株が陰性で残りが弱陽性の時“-w”と表されている。また、Bergey マニュアルの糖発酵性状はバージニア ポリテクニク研究所 (Virginia polytechnic institute, VPI) マニュアル²⁰⁾に基づいている事を考えると培養2日目の成績と理解される。従って先ず本研究での2日間培養での結果について比較検討した。Bergey マニュアルで“+”と記載されている糖はグルコースとフルクトースのみ (セロビオースは“+w”と記載されているが、VPI マニュアルでは“-”とされており誤植と思われる) であるが、本研究では、フルクトース、グルコース、マンニトール、マンノースについては100%の菌株が、メレチトースについては91%の菌株が発酵陽性を示した。マンニトール、マンノース、メレチトースは Bergey マニュアルでは各々“±”、“±”、“d”とされているが、マンニトール、マンノースに関しては Hafizら⁹⁾は発酵陽性、VPI マニュアルでは弱陽性としており、これらの2糖は *C. difficile* により発酵されるものと思われる。メレチトースに関する記載は少ないが、VPI マニュアルでは菌株により様々とされていることを参考にすると、先の2糖に比べ菌株による発酵能の強弱に差異があり、対象とした菌株により異なる可能性

がある。ソルビトール発酵については、Bergey マニュアルでは“-w”と記載されているが、その発酵能は毒素原性と関係し、本研究では細胞毒性陽性菌株で86.7%の菌株が、細胞毒性陰性菌株では30%の菌株が陽性反応を示した。他の研究^{9) 11)}をも考え合わせると、ソルビトール発酵性状については有毒菌株と無毒菌株に分けて記すことが的確と思われる。具体的には有毒菌株については“±”、無毒菌株については“干”と記すことが妥当と思われる。キシロース、サリシン、トレハロース、セロビオースは Bergey マニュアルでは“-w”と記載されているが、本研究におけるそれらの糖に対する2日間培養での発酵陽性率は各々56%、57%、23%、8%であり、概ね Bergey マニュアルの記載と一致した。リボースについては Bergey マニュアルでは“-”と記載されているが、VPI マニュアルでは“-”とされている。本研究では85%の菌株が発酵陽性を示し、“±”とされることになり大きく異なるが、その理由としては、この糖の発酵性状は対象とした菌株により相当異なる可能性が考えられる。その他の糖について Bergey マニュアルでは“-”と記載されているが、本研究でも100菌株全てが発酵陰性を示した。

以上を総括すると、2日間培養で判定する場合、フルクトース、グルコース、マンニトール、マンノース、メレチトース発酵が“+”、キシロース、リボース、サリシン、トレハロース、セロビオース発酵については発酵陽性率からは各々“d”、“±”、“d”、“干”、“-”、またソルビトール発酵は有毒菌株では“±”、無毒菌株では“干”、とされる事が分かった。しかしながら、“±”、“d”、“干”と表現される性状は菌同定上は役立たないものであり、発酵性状をより明らかにするために7日間培養で判定することを試みた。その結果キシロースおよびリボースでは全菌株が、サリシン、トレハロースでは1菌株を除き発酵陽性と判定され、これらの糖は、“+”とされる事が分かった。セロビオースについては7日間培養では82%が発酵陽性を示し、更に7日間培養した時、99%が発酵陽性を示し、本糖も基本的には発酵されることが分かった。フルクトース、グルコース、マンニトール、マンノース、メレチトース、ソルビトール発酵性状は培養2日目と7日目の成績は一致した。また、2日間培養で全菌株が発酵陰性を示した糖については7日間培養でも全菌株が発酵陰性を示した。以上の結果、7日間培養すれば糖発酵性状はほぼ明確にされ、Bergey マニュアルで“-w”と記載されている糖も菌同定上極めて有用であることが分かった。Hafiz ら⁹⁾は、アラビノース、ズルシトール、イノシトール、ガラクトース、ラフィノース、マルトース、スクロースについて発酵陽性としているが、Bergey マニュアルでは陰性と記載されており、上述の如く本研究で用いた100菌株全株もまた発酵陰性を示した。恐らくは本菌のほとんどは、これらの糖を発酵しないものと考えられる。

本研究では培養2日目で全体として発酵陽性と判定される糖を即時発酵糖、その判定に7日間以上の培養を要する糖を遅延発酵糖としたが、上述の如く *C. difficile* はフルクトース、グルコース、マンニトール、マンノース、メレチトース、ソルビトールを即時発酵し、キシロース、リボース、サリシン、トレハロース、セロビオースを遅延発酵することが分かった。次に遅延発酵糖の発酵様式を即時発酵糖のグルコースと対比させ、キシロース、リボース、サリシン、トレハロース、セロビオース発酵が培養2日目で陰性、同7日目に陽性と判定された KZ 1613 株を用いて詳細に検討した。遅延発酵糖は増殖曲線の点

から2群に分かれることが分かった。すなわち、培養1日目における菌の増殖はグルコースより悪いが糖非添加対照培地より明らかに良好な糖類(キシロース, リボース, サリシン), ならびに菌の増殖は培養1日目まで糖非添加対照培地とほぼ等しいが培養2日目以後に明確に増加する糖類(トレハロース, セロピオース)の2群に分かれた。培養菌液 pH はおおむね菌の増殖につれて低下した。糖の消費についてはグルコースでは培養2日目で完全に消費されたが、遅延発酵糖では前者においては培養2日目では49~63%が消費されたにすぎず、培養7日目においてもサリシンは100%が消費されたが他の2糖については約20%が残存していた。また後者については培養2日目では85%以上が残存し、培養7日目においても約60%が残存していた。以上の菌の増殖、糖の消費から考えると、前者では該糖の発酵に関与する酵素活性は培養早期から存在するが、その活性が弱いものと推察される。後者については該糖の分解酵素の誘導あるいは突然変異体の出現が考えられるが被験菌株の殆どが遅延分解することから分解酵素の誘導の可能性が推察される。この点については更に検討を要する。*Clostridium* 属では、糖は Embden-Meyerhof 経路を経てピルビン酸となり発酵代謝される²⁵⁾²⁶⁾。サリシンは β -グルコシダーゼにより加水分解されグルコースを遊離し、キシロース, リボースはフルクトース-6-リン酸およびグリセルアルデヒド-3-リン酸となり、これらは Embden-Meyerhof 経路に入り分解代謝される。トレハロース, セロピオースは各々 α -グルコシダーゼ, β -グルコシダーゼにより2分子のグルコースに加水分解される。したがって前3者の糖については各々相当する酵素活性が弱く、後2者については各々相当する基質特異的 α -, β -グルコシダーゼが誘導されるものと考えられる。

糖発酵性状は培養菌液 pH の低下により判定される²⁰⁾²³⁾²⁵⁾。これは発酵により生じる有機酸が培養菌液 pH を低下せしむる事に基づいているが、培地中にはアンモニアを代表とするアルカリ性物質が産生され、また、培地中の酸性物質, アルカリ性物質が消費される。すなわち培養菌液 pH は単に発酵により生じる酸によってのみ規定されるわけではない。本研究では産生された有機酸およびアンモニア量を測定し、両者を用いた模擬線との近似性を検討することにより、遅延発酵糖の特徴について検討した。即時発酵糖のグルコース, および遅延発酵糖の両者について、各々 Δ 酸濃度と pH の間には直線関係が認められた。しかしながら、グルコースの場合は、模擬線により近似し、遅延発酵糖の場合は Δ 酸濃度の増加の割には pH の低下は少なかった。すなわち、グルコースの場合は培養菌液の pH を規定する圧倒的な因子は産生される有機酸とアンモニアであるが、遅延発酵糖の場合は他の因子が相当な比重を占めていることが分かった。これらの主要な因子としては培地中に含まれている炭酸ガス, リン酸の菌による消費が考えられる。更に、グルコースに比べ遅延発酵糖の場合、乳酸産生が少ないこと、アンモニア産生量が多いことを考慮すると、遅延発酵糖存在下における菌の代謝は即時発酵糖のグルコース存在下の場合と異なるように思われる。

C. difficile の主病原因子はトキシンA, トキシンBである¹²⁾。本菌の毒素原性と糖発酵性状については、有毒菌株にはソルビトール発酵陽性菌株が多く、逆に無毒菌株にはソルビトール発酵陰性菌株が多いことが報告されている^{9)~11)}。この際の有毒菌株とは培養上清中の細胞毒性を測定することにより規定したも

のである。近年、トキシンA, トキシンB遺伝子の塩基配列が明らかにされ、毒素原性を遺伝子の有無で決定できるようになり、臨床応用可能となってきた¹⁵⁾²⁷⁾²⁸⁾。一方、分離菌株についても毒素原性を PCR 法を用いて遺伝的に同定することが可能となってきた^{12)~15)}。以上を鑑み、本研究では、トキシンA, トキシンB遺伝子の塩基配列²¹⁾²²⁾から独自に設計したプライマーを用いた PCR 法によりトキシンA, トキシンB遺伝子の有無を検討し、遺伝子レベルでの毒素原性と糖発酵性状の関係を解析した。培養上清中に細胞毒性が見られなかった無毒菌株40菌株全てはいずれのプライマーセットを用いた PCR に対しても陰性を示し、これらの40菌株は全てトキシンA, トキシンBのいずれの遺伝子も有していない事が分かった。培養上清中に細胞毒性を認められた有毒菌株60菌株は全菌株共にトキシンA遺伝子検出用プライマーセットを用いたPCRでは陽性を示したが、1菌株はトキシンB検出用プライマーセットを用いた PCR では陰性反応を示した。この菌株はトキシンB遺伝子を欠損しているのか、あるいは用いたプライマーセットに対する反応性が悪かったのか、すなわちトキシンB遺伝子の一部の塩基配列が他の菌株と異なっているのかは更に検討する必要があるが、本研究では一応トキシンB遺伝子陰性菌株とした。これらの結果は、有毒菌株はほんの少数を除きトキシンA, トキシンB両遺伝子を有するという他の報告^{12)~15)}と一致するものであった。以上の成績から表現形質としての毒素原性とソルビトール発酵性状に見られた関係(有毒菌株には圧倒的にソルビトール発酵陽性菌株が多い)は、遺伝子レベルでの毒素原性に関しても成立することが分かった。細菌の毒素原性とソルビトール発酵性状との関係については *Escherichia coli* (*E. coli*) においても見られる。通常の *E. coli* はソルビトール発酵陽性であるが、志賀毒素産生性 *E. coli* O157: H7 は一般的にソルビトール発酵陰性である。稀にソルビトール発酵陽性の志賀毒素産生性 *E. coli* O157: H7 株が存在するが、毒素産生の強弱, 毒素性状については差異がなかったと述べられている²⁹⁾。*C. difficile* についてはこのような検討がなされておらず、今後の課題である。

代表的な糖発酵 *Clostridium* 菌種の *C. perfringens* については糖発酵性状が種々検討されており、サリシン, ラフィノース, メリビオース等が遅延発酵糖であると報告されている⁷⁾⁹⁾。また、ラフィノースおよびメリビオースは芽胞形成を促進し、かつラフィノースは芽胞形成と関係するエンテロトキシンの産生をも促進する事が知られている³⁰⁾。*C. difficile* の毒素産生は芽胞形成と関係しており³¹⁾、本研究で明らかとなった遅延発酵糖について、芽胞形成および毒素産生への関わりについては今後の検討課題である。

結 論

C. difficile の糖発酵性状の特性を100菌株を用いて解析し、さらに遅延発酵について、菌の増殖, 糖の利用, 代謝産物としての有機酸およびアンモニア産生の観点から検討した。また、遺伝子レベルでの毒素原性を解析し、糖の発酵性状との関係を検討した結果以下の結論を得た。

1. *C. difficile* 100菌株(細胞毒性陽性60菌株, 同陰性40菌株)の28種類の糖に対する発酵性状をペプトン-寒天-基礎培地を用いて検討した結果、11種類の糖に対して発酵陽性を示した。フルクトース, グルコース, マンニトール, マンノース, メレチトース, ソルビトールの発酵性状の判定には2日間の培養で

充分であった(即時発酵糖)が、キシロース、リボース、サリシン、トレハロースの発酵性状の判定には7日間、セロピオースの場合には14日間の培養を要した(遅延発酵糖)。

2. C. difficile KZ 1613 株を用いて遅延発酵糖添加培地における菌の増殖パターンを解析することにより遅延発酵糖は、培養1日目にグルコースより劣るものの明らかな菌の増殖を認める群(キシロース、リボース、サリシン)、および培養2日目以降に菌の増殖を認める群(トレハロース、セロピオース)の2群に分けられた。

3. 糖の消費は菌の増殖をほぼ反映し、即時発酵糖であるグルコースは、2日目で全てが消費されたが、遅延発酵糖については、2日目では相当量が残存しており、キシロース、リボース、サリシンでは37~51%が、トレハロース、セロピオースでは85%以上が残存していた。7日目においては、サリシンは100%消費されたが、他の糖では17~58%が残存していた。

4. 培養菌液中の総酸量は、即時発酵糖であるグルコースにおいては培養2日目まで培養と共に増加し、培養2日目と7日目には大きな差異は認められなかったが、遅延発酵糖では、培養2日目より7日目の方が多く、かつグルコースよりも多かった。個々の酸についてはグルコースの場合のみ乳酸産生が明確に認められた。

5. アンモニアの産生はグルコースでは少なかった。

6. 培養菌液中の総酸濃度からアンモニア濃度を減じた値(Δ 酸濃度)と培養菌液のpHの間には相関が認められ、回帰直線は即時発酵糖であるグルコースの方が遅延発酵糖よりも模擬線に近似していた。

7. 細胞毒性陽性60菌株中59菌株にトキシンA、トキシンB両遺伝子がPCR法にて検出され、1菌株にはトキシンA遺伝子のみが検出された。一方、細胞毒性陰性の40菌株では両遺伝子いずれも検出されなかった。

8. トキシンA、トキシンB両遺伝子陽性59菌株とトキシンA遺伝子陽性1菌株、計60菌株中52菌株(86.7%)がソルビトール発酵陽性を示し、トキシンA、トキシンB両遺伝子陰性40菌株中12菌株(30%)のみがソルビトール発酵陽性を示したにすぎなかった。

以上の結果は、C. difficile の発酵糖は即時発酵糖と遅延発酵糖に分けられ、遅延発酵糖存在下における菌の代謝は即時発酵糖の場合と異なる事を示唆している。さらに、表現形質上の毒素原性とソルビトール発酵性状にみられた関係は、同時に遺伝子レベルでの毒素原性においても成立することを示している。

謝 辞

稿を終るに臨み、終始御懇篤なる御指導と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、本研究遂行にあたり、終始直接の多大なる御指導と御協力を頂きました微生物学教室山川清孝講師ならびに唐澤忠宏医学部講師に心から感謝の意を表します。また、サリシンの解析に御協力頂いた株式会社ヤクルト本社中央研究所木村一雅氏ならびに統計学的検討について御指導頂きました石川県立中央病院歯科口腔外科医長岡部孝一博士に深謝致します。さらに本研究遂行にあたり多大なる御協力を頂きました金沢大学医学部微生物学教室の諸先生に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Bartlett JG. Antibiotic-associated pseudomembranous colitis. Rev Infect Dis 1: 530-539, 1979
- 2) Lyerly DM, Krivan HC, Wilkins TD. *Clostridium difficile*: its

disease and toxin. Clin Microbiol Rev 1: 1-18, 1988

- 3) Hall IC, O' Toole E. Intestinal flora in new-born infants with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. Am J Dis Child 49: 390-402, 1935
- 4) Smith LDS, King E. Occurrence of *Clostridium difficile* in infections of man. J Bacteriol 84: 65-67, 1962
- 5) Hafiz S, Oakley CL. *Clostridium difficile*: isolation and characteristics. J Med Microbiol 9: 129-136, 1976
- 6) Cato EP, George WL, Finegold SM. Genus *Clostridium*. In PHA Sneath, NS Mair, ME Sharpe, JG Holt (eds), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, p1141-1200, Williams & Wilkins, Maryland, 1986
- 7) Nishida S, Seo N, Nakagawa M. Sporulation, heat resistance, and biological properties of *Clostridium perfringens*. Appl Microbiol 17: 303-309, 1969
- 8) Nakamura S, Nishida S. Reinvestigation of the relationship between sporulation, heat resistance and some biochemical properties in strains of *Clostridium perfringens*. J Med Microbiol 7: 451-457, 1974
- 9) Nakamura S, Serikawa T, Mikawa M, Nakashio S, Yamakawa K, Nishida S. Agglutination, toxigenicity and sorbitol fermentation of *Clostridium difficile*. Microbiol Immunol 25: 863-870, 1981
- 10) Toma S, Lesiak G, Magus M, Lo HL, Delmée M. Serotyping of *Clostridium difficile*. J Clin Microbiol 26: 426-428, 1988
- 11) Delmée M, Homel M, Wauters G. Serogrouping of *Clostridium difficile* strains by slide agglutination. J Clin Microbiol 21: 323-327, 1985
- 12) Wren B, Clayton C, Tabaqchali S. Rapid identification of toxigenic *Clostridium difficile* by polymerase chain reaction. Lancet 335: 423, 1990
- 13) Kato N, Ou C, Kato H, Bartley SL, Brown VK, Dowell Jr VR, Ueno K. Identification of toxigenic *Clostridium difficile* by the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 29: 33-37, 1991
- 14) McMillin DE, Muldrow LL, Laggette SJ. Simultaneous detection of toxin A and toxin B genetic determinants of *Clostridium difficile* using the multiplex polymerase chain reaction. Can J Microbiol 38: 81-83, 1992
- 15) Tang YJ, Gumerlock PH, Weiss JB, Silva Jr J. Specific detection of *Clostridium difficile* toxin A gene sequences in clinical isolates. Mol Cell Probes 8: 463-467, 1994
- 16) Nakamura S, Mikawa M, Nakashio S, Takabatake M, Okado 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
- 17) Nakamura S, Nakashio S, Mikawa M, Yamakawa K, Okumura S, Nishida S. Antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* from different sources. Microbiol Immunol 26: 25-30, 1982
- 18) Nakashio S, Nakamura S, Nishida S. Variable sugar fermentation by clostridia. Microbiol Immunol 26: 877-884, 1982
- 19) Serikawa T, Nakamura S, Nishida S. Distribution of

- Clostridium botulinum* type C in Ishikawa Prefecture, and applicability of agglutination to identification of nontoxigenic isolates of *C. botulinum* type C. *Microbiol Immunol* 21: 127-136, 1977
- 20) Holdeman LV, Cato E, Moore WEC. *Anaerobe Laboratory Manual*, 4th ed, p79-152, Virginia Polytechnic Institute and State University, Virginia, 1977
- 21) Dove CH, Wang S-Z, Price SB, Phelps CJ, Lyerly DM, Wilkins TD, Johnson JL. Molecular characterization of the *Clostridium difficile* toxin A gene. *Infect Immun* 58: 480-488, 1990
- 22) Barroso LA, Wang S-Z, Phelps CJ, Johnson JL, Wilkins TD. Nucleotide sequence of *Clostridium difficile* toxin B gene. *Nucleic Acids Res* 18: 4004, 1990
- 23) Duguid JP. Cultivation of micro-organisms. *In* R Cruickshank (ed), *Handbook of Bacteriology*. E. & S., 10th ed, p184-244, Livingstone Limited, London, 1960
- 24) Cowan ST. *Manual for the Identification of Medical Bacteria*, 2nd ed, p22-41, Cambridge University Press, Cambridge, 1974
- 25) Andreesen JR, Bahl H, Gottschalk G. Introduction to the physiology and biochemistry of the genus *Clostridium*. *In* NP Minton, DJ Clarke (eds), *Biotechnology Handbooks Vol 3 Clostridia*, p27-62, Plenum Press, New York, 1989
- 26) Gottschalk G. *Bacterial Metabolism*, 2nd ed, p96-103, p208-282, Springer-Verlag, New York, 1986
- 27) Boondeekhun HS, Gurtler V, Odd ML, Wilson VA, Mayall BC. Detection of *Clostridium difficile* enterotoxin gene in clinical specimens by the polymerase chain reaction. *J Med Microbiol* 38: 384-387, 1993
- 28) Ratcliff RM, Goodwin AA, Lanser JA. Use of gene amplification to detect *Clostridium difficile* in clinical specimens. *Pathology* 26: 477-479, 1994
- 29) Fratamico PM, Buchanan RL, Cooke PH. Virulence of an *Escherichia coli* O157: H7 sorbitol-positive mutant. *Appl Environ Microbiol* 59: 4245-4252, 1993
- 30) Labbe RG, Rey DK. Raffinose increases sporulation and enterotoxin production by *Clostridium perfringens* type A. *Appl Environ Microbiol* 37: 1196-1200, 1979
- 31) Kamiya S, Oguma H, Meng XQ, Nakamura S. Correlation between cytotoxin production and sporulation in *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol* 37: 206-210, 1992

