Clostridium difficileの胞子形成に及ぼすアミノ酸の影響

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: 沖野, 善則
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8297

金沢大学十全医学会雑誌　第101巻　第1号　68－78（1992）

Clostridium difficile の胞子形成に及ぼすアミノ酸の影響

金沢大学医学部微生物学講座（主任：中村信一教授）
沖　野　善　則

（平成4年1月10日受付）

偽膜性大腸炎，一部の抗生物質関連下痢症の原因菌である *Clostridium difficile* (*C. difficile*) の胞子形成に及ぼすアミノ酸の影響について5菌株を用いて，0.2%グルコース添加・非添加合成培地にて検討した．被験アミノ酸はヒスチジン，トリプトファン，グリシン，チロジン，アルギニン，フェニールアラニン，メチオニン，スレオニン，アラニン，リジン，セリン，バリン，イソロイシン，プロリン，アスパラギン酸，ロイシン，システイン，グルタミン酸であった．各アミノ酸欠損合成培地を使用することにより，充分な胞子形成にはトリプトファン，バリン，システイン，プロリンがグルコースの有無に関わりなく5株全株において必須であることが分った．更に，グルコース存在下においては，ロイシンおよびメチオニンが VPI 10463 株，KZ 1647 株において，ロイシンが KZ 1748 株において，メチオニンが KZ 1630 株において必須であった．またグルコース非存在下においてはロイシンが VPI 10463 株を除いた全株において必須であった．これらのアミノ酸はまた菌の発育にとっても必須であり，胞子形成にのみ必須のアミノ酸は存在しなかった．各アミノ酸量を基礎合成培地 (basal synthetic medium, BSM) の10倍量に増量した時，バリン，イソロイシン，プロリン，ロイシンが胞子形成に有効であったが，グルコース存在下ではプロリンが，グルコース非存在下ではイソロイシンが全株において最も有効であった．プロリンおよびイソロイシン濃度と胞子形成の関係を各々 KZ 1626 株，VPI 10463 株を用いて検討した結果，プロリンおよびイソロイシン濃度が各々 500mg/l, 4,000mg/l の時胞子形成率は100%に達した．各アミノ酸を BSM の10倍量含んでいる培地にて培養を行い，産生された脂肪酸をガスクロマトグラフィーにより解析した結果，プロリン以外の胞子形成促進アミノ酸およびスレオニン，アラニン，セリンが発酵・利用されることが示唆された．さらに，*C. difficile* の胞子形成と毒素原性の関係を0.2% Na_2HPO_4 添加ブレーン　ハート　インフュージョン (modified brain heart infusion, m-BHI)，イソロイシンおよびプロリンを各々 5,000mg/l, 600mg/l の高濃度に含む BSM (BSM reinforced with isoleucine and proline, BSM-IP) にて検討した．m-BHI では両者の間にはいかなる関係も見い出されなかった．しかしながら，グルコース不含 BSM-IP では 1ml 当り 10^5 以上の胞子を形成した菌株は有毒株では20株中5株 (25%) であったが，無毒株では20株中13株 (65%) であった．以上の結果，Stickland 反応において酸化基質あるいは還元基質として利用されるアミノ酸が胞子形成を促進すること，および無毒株のほうが有毒株より胞子形成能が強い可能性が示唆された．

Key words *C. difficile*, sporulation, amino acid, fermentation, toxigenesis

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)]．外因感染の場合，*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，本菌は嫌気性胞子形成菌であるので栄養型は大気下では速やかに死滅する．しかしながら，菌の耐久型である胞子は大気下でも長期間生存し，外因感染を引き起こす[3)4)]．

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[6]．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，胞子が死滅せず生存し，薬剤の投与中止により発芽・増殖することによると考えられている[7]．

以上のことは *C. difficile* の胞子形成が *C. difficile* 腸炎に重要な役割を演じていることを示すものである．

クロストリジウムの毒素原性については，*Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) のエンテロトキシン，*Clostridium botulinum* (*C. botulinum*) の C_2 毒素は胞子形成と密接に関係していることが明らかにされている[8)9)]．*C. difficile* の毒素原性については，毒素が培養後期に産生される[10)11)]ところから，本菌においても胞子形成が毒素産生に関係していることが考えられる．

本研究では，*C. difficile* 腸炎の外因感染，再発に重要な意義を有する胞子について，その形成条件を明らかにすることによ

Abbreviations: BHI, brain heart infusion; BSM, basal synthetic medium; BSM-I, BSM reinforced with isoleucine; BSM-IP, BSM reinforced with isoleucine and proline; BSM-P, BSM reinforced with proline; BSM-VIPL, BSM reinforced with valine, isoleucine, proline and leucine; *C. botulinum, Clostridium botulinum*; *C. difficile, Clostridium difficile*; *C. perfringens, Clostridium perfringens*; CU, cytotoxic unit;

り，本腸炎の予防・治療に寄与することを目的として，アミノ酸の胞子形成に及ぼす影響について検討した．更に *C. difficile* の胞子形成と毒素産生についても検討を加えた．

材料と方法

Ⅰ．使用菌株

金沢大学医学部微生物学講座保存の *C. difficile* 有毒株20菌株，無毒株20菌株を用いた．それら菌株の中で，バージニアポリテクニック研究所および州立大学，嫌気性菌研究所 (Virginia Polytechnic Institute and State University, Anaerobe Laboratory) 菌株の VPI 10463 株，著者の研究室で健康成人から分離した KZ 1630 株，抗生物質関連下痢症患者から分離した KZ 1626, KZ 1647, KZ 1748 株を主に使用した．

Ⅱ．培　地

Haslam ら[12]のアミノ酸，ビタミン，蓮池ら[13]のミネラルを含む培地を基礎合成培地 (basal synthetic medium, BSM) とした (表1)．BSM はグルコースを含まない培地であるので，グルコースの有無を問題とする場合には特にグルコース非添加 BSM (BSM without glucose, G(−)BSM) と称した．またグルコースを0.2%の割に添加した BSM をグルコース添加 BSM (BSM with glucose, G(+)BSM) と称した．

BSM は以下の如くに作製した．1.25倍濃度のアミノ酸・ビタミン溶液の pH を NaOH 溶液を用いて7.4に調整した後，10倍濃度のミネラル溶液，5% $NaHCO_3$ 溶液を培地の最終容量の1/10量加えた (培地の最終 pH は約7.6)．培地は HA フィルター (日本ミリポアリミテッド，東京) にて濾過滅菌後，中試験管 (15×160mm) に 10ml ずつ分注した．気相を H_2 10%，CO_2 10%，N_2 80%の混合ガスに置換した後4℃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．

Table 1. Composition of basal synthetic medium (BSM)

Amino acids (g)		Vitamines (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	Minerals (mg)	
Serine	0.3	KH_2PO_4	900
Valine	0.3	Na_2HPO_4	5,000
Isoleucine	0.3	NaCl	900
Proline	0.3	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	26
Aspartic acid	0.3	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	20
Leucine	0.4	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	10
Cysteine	0.5	$(NH_4)_2SO_4$	40
Glutamic acid	0.9	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	4
		$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1
		$NaHCO_3$	5,000
		Distilled water (ml)	1,000

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

胞子形成に良好な複合培地としてブレーン　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%の割に添加した培地 (modified BHI, m-BHI)[14] を用いた．120℃15分高圧蒸気滅菌後，合成培地の場合と同様，気相を混合ガスに置換し4℃にて保存した．

総菌数，胞子数の測定には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−塩酸塩，1.3%寒天加 BHI (日水，東京) (glucose and soluble starch-fortified BHI, GS-BHI) 培地[15] を用いた．

Ⅲ．植菌および培養

菌の胞子形成に必須のアミノ酸を求めるための各種アミノ酸欠損 BSM への植菌には，G(+)BSM 16時間培養菌液を，他の場合には肝片加肝ブイヨン16時間培養菌液をも用いた．いずれの場合にも，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 (栄養型細胞数，10^3/ml；胞子数，＜1/ml)．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℃で培養した．5日間培養後胞子数を測定した．培養液中のサイトトキシン活性の測定には，HV フィルター (日本ミリポアリミテッド) にて濾過滅菌した培養液を用いた．

Ⅳ．菌の増殖の測定

菌の増殖の測定は島津ボシュロム　スペクトロニック 20A (島津，京都) を用い，波長560nm の吸光度 (optical density at 560nm, OD_{560}) を測定することにより行った．なお OD_{560} の測定は培養24，36時間，2，3，4，5日目に行った．

Ⅴ．総菌数および胞子数の測定

総菌数および胞子数の測定は，0.1%タウロコール酸ナトリウム (GR；半井，東京) 添加 GS-BHI 培地を用い混釈培養法により行った[16]．総菌数測定には非加熱培養菌液を，胞子数測定には70℃10分加熱培養菌液を用いた．被験培養菌液を0.05%システイン−塩酸塩加 BHI (日水) で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℃に保温した0.1%タウロコール酸ナトリウム添加 GS-BHI 培地 20ml を加え混和した．固化後37℃にて2日間嫌気ジャーを用い嫌気培養を行った．培養後成育したコロニー数を数えることにより培養液 1ml 当たりの総菌数，胞子数を算出した．

Ⅵ．産生脂肪酸の分析

培養液中に産生される脂肪酸の分析は Holdeman ら[17]の方法により，ガスクロマトグラム GC-7A (島津) を用い，ガスクロマトグラフィーにより行った．揮発性脂肪酸の分析には培養液 1ml に50% H_2SO_4 0.2ml, NaCl 0.4g，エチルエーテル 1ml を加え穏やかに混和後遠心 (700×g，5分) を行い，その上清液 (エーテル抽出液) を用いた．不揮発性脂肪酸の分析には培養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．即ち，培養液 1ml にメタノール 2ml，50% H_2SO_4 0.4ml を加え60℃にて30分加熱した．次いで蒸留水 1ml，クロロフォルム

G(−)BSM, BSM without glucose；G(+)BSM, BSM with glucose；G(−)BSM-IP, BSM-IP without glucose；G(+)BSM-IP, BSM-IP with glucose；GS-BHI, glucose and soluble starch-fortified BHI；m-BHI, modified BHI；OD_{560}, optical density at 560 nm

0.5ml を加え穏やかに混和した．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．サイトトキシン活性の測定

培養液中のサイトトキシン活性の測定は BHK-21/WI-2 細胞を用い，マイクロタイター法により行った[14]．細胞の観察は試料添加後，24，48時間後に行い，ウエル中の全ての細胞が円形化する添加試料の最大希釈倍数（2倍段階希釈）を被験試料の細胞毒性単位 (cytotoxic unit, CU)/50μl とした．

成　　績

Ⅰ．胞子形成に必須のアミノ酸

アミノ酸1種類のみを欠損した G(+)BSM, G(−)BSM における胞子形成を *C. difficile* 5菌株を用いて検討し，*C. difficile* の胞子形成に必須のアミノ酸を求めた．各アミノ酸欠損培地において形成される胞子数が BSM における胞子数に較べ，10^{-1} 倍以下のとき，そのアミノ酸を胞子形成に必須のアミノ酸と判定した（表2）．

グルコースが存在する場合，トリプトファン，バリン，システイン，プロリンが5株全株で，ロイシンおよびメチオニンが VPI 10463, KZ 1647 株において，ロイシンが KZ 1748 株において，メチオニンが KZ 1630 株において充分な胞子形成に必須のアミノ酸であることが分かった．

グルコースが存在しない場合，トリプトファン，バリン，システイン，プロリンが全株において，ロイシンが VPI 10463 を

Table 2. Amino acids essential for sporulation of *C. difficile* strains in G(+)BSM and G(−)BSM

Medium[a]	Deprived amino acid	Growth[b] and number of spores ($\log_{10}$/ml) produced in strain									
		VPI 10463		KZ 1630		KZ 1626		KZ 1748		KZ 1647	
		Growth	Spores	Growth	Spores	Growth	Spores	Growth	Spores	Growth	Spores
G(+)BSM	Tryptophan	−	0.8	−	1.5	−	−[c]	−	2.6	−	2.6
	Valine	−	0.8	−	0.8	−	−	−	1.2	−	0.3
	Cysteine	−	0.3	−	1.3	−	0.8	−	2.0	−	−
	Proline	++	0.6	++	1.1	++	0.3	++	1.9	++	−
	Leucine	+	4.0	++	4.8	++	2.3	++	3.5	+	2.7
	Methionine	++	2.7	++	3.1	+++	2.7	+++	4.9	+	2.8
	None	+++	5.2	+++	4.4	+++	2.9	+++	5.0	+++	4.3
G(−)BSM	Tryptophan	−	−	−	−	−	−	−	2.6	−	1.3
	Valine	−	−	−	−	−	−	−	1.0	−	0.3
	Cysteine	−	0.6	−	1.0	−	1.3	−	1.3	−	−
	Proline	+	0.7	+	1.4	+	2.8	+	1.9	+	1.0
	Leucine	+	1.7	+	1.0	+	2.2	+	1.9	++	3.0
	None	++	2.2	++	5.5	++	5.1	++	5.7	++	5.5
m-BHI		+++	6.0	+++	6.3	+++	5.5	+++	6.4	+++	6.0

a) G(+)BSM, basal synthetic medium with 0.2% glucose; G(−)BSM, basal synthetic medium without glucose; m-BHI, modified brain heart infusion.
b) −, no visible growth; +, the maximum value of OD_{560} during 5 days of incubation (OD_{max})≦0.2; ++, 0.2<OD_{max}≦0.4; +++, OD_{max}>0.4.
c) −, no spore/ml.

Table 3. Amino acids enhancing sporulation of *C. difficile* strains in G(+)BSM and G(−)BSM

Medium[a]	Reinforced amino acid[b]	Growth[c] and number of spores ($\log_{10}$/ml) produced in strain									
		VPI 10463		KZ 1630		KZ 1626		KZ 1748		KZ 1647	
		Growth	Spores	Growth	Spores	Growth	Spores	Growth	Spores	Growth	Spores
G(+)BSM	Valine	+++	5.5	+++	5.4	+++	4.6	+++	5.8	+++	4.7
	Isoleucine	+++	5.1	+++	5.3	+++	5.1	+++	5.4	+++	5.2
	Proline	+++	5.7	+++	5.4	+++	5.7	+++	6.5	+++	6.2
	Leucine	+++	4.0	+++	3.2	+++	5.2	+++	5.0	+++	3.5
	None	+++	5.1	+++	4.4	+++	2.7	+++	5.2	+++	4.7
G(−)BSM	Valine	++	3.9	++	6.6	++	5.3	++	6.0	++	6.5
	Isoleucine	++	4.7	++	6.5	++	5.4	++	6.0	++	6.5
	Proline	++	3.5	++	5.8	++	5.2	++	5.5	++	5.4
	Leucine	+++	3.7	+++	4.4	+++	4.6	+++	5.7	+++	5.5
	None	++	2.0	++	5.4	++	5.4	++	5.4	++	5.5
m-BHI		+++	5.7	+++	6.2	+++	5.8	+++	6.0	+++	5.7

a), c) Refer to the foot notes of Table 1.
b) Concentration of amino acid, 10-fold higher than that of BSM.

除いた4株において胞子形成に必須のアミノ酸であることが分かった.

これら胞子形成に必須のアミノ酸が欠損した G(+), G(−)BSM における菌の発育は，全アミノ酸を含んでいる G(+), G(−)BSM に比べ明らかに不良であり，特にトリプトファン，バリン，システイン欠損 BSM ではグルコースの有無に関わりなく菌の発育は全くみられなかった．イソロイシン欠損 G(+), G(−)BSM においては，発育は遅く G(+), G(−)BSM に較べると最高 OD_{560} 値は幾分低かったが，胞子形成の点では差異は認められなかった.

以上の結果，胞子形成に必須のアミノ酸は同時に菌の発育に必須のアミノ酸であり，菌の発育には必須でないが，胞子形成には必須のアミノ酸は存在しなかった.

Ⅱ．胞子形成を促進するアミノ酸の検討

1．胞子形成促進アミノ酸

アミノ酸1種類のみの濃度を BSM の10倍濃度に増量した G(+)BSM, G(−)BSM における胞子形成を検討し，*C. difficile* の胞子形成を促進するアミノ酸を求めた．各アミノ酸強化 BSM において形成された胞子数が BSM における胞子数に較べ 10^1 倍以上多い時，そのアミノ酸を胞子形成促進アミノ酸と判定した (表3).

グルコースが存在する場合，KZ 1626 株においてはバリン，イソロイシン，プロリン，ロイシンが，KZ 1630 株においてはバリン，プロリンが，KZ 1748 株，KZ 1647 株においてはプロリンが胞子形成を促進した．特にプロリン強化 G(+)BSM において5株全株が最高の胞子数を示し，G(+)BSM ではプロリンが胞子形成に最も有効なアミノ酸であることが示唆された.

グルコースが存在しない場合，VPI 10463 株ではバリン，イソロイシン，プロリン，ロイシンが，KZ 1630 株および KZ 1647 株ではバリン，イソロイシンが胞子形成を促進した．特にイソロイシン強化 G(−)BSM においては5株全株が最高の胞子数 (VPI 10463 株を除きバリン強化 G(−)BSM と同程度) を示し，G(−)BSM ではイソロイシンが胞子形成に最も有効なアミノ酸であることが示唆された.

いずれのアミノ酸強化 G(+), G(−)BSM においても菌の増殖は，培養5日間における最高 OD_{560} 値を各 BSM と比較したと

Table 4. Concentration of valine, proline, isoleucine and leucine, and spore production of *C. difficile* strain KZ 1626 in G(+)BSM

Kind of amino acid reinforced	Concentration (mg/l)	Growth[a)]	Number of spores produced (log_{10}/ml)
None[b)]		⧺	3.4
Valine	600	⧺	5.3
	900	⧺	5.3
Proline	600	⧺	5.5
	900	⧺	5.5
Isoleucine	600	⧺	5.4
	900	⧺	5.2
Leucine	800	⧺	5.1
	1,200	⧺	5.0

a) Refer to the foot notes of Table 1.
b) Concentration of valine, proline, isoleucine and leucine in G(+)BSM are 300, 300, 300 and 400 mg/l, respectively.

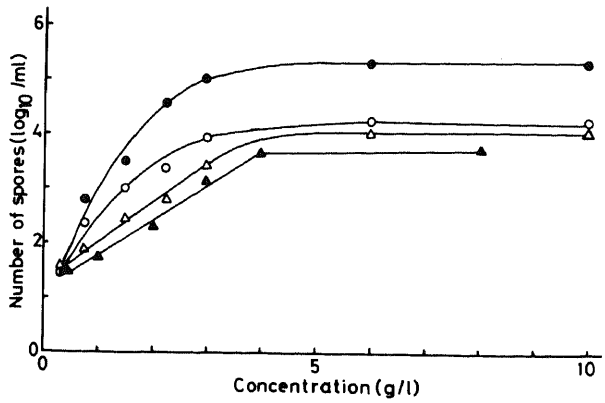

Fig. 1. Concentration of valine, isoleucine, proline and leucine, and spore production of *C. difficile* strain VPI 10463 in G(−)BSM. ○, valine ; ●, isoleucine ; △, proline ; ▲, leucine.

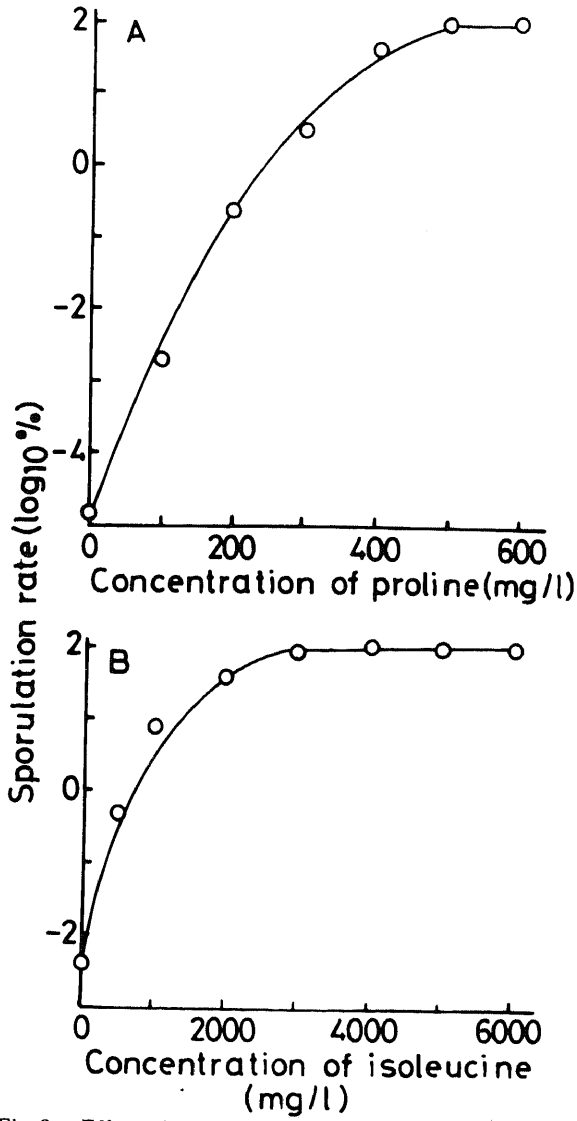

Fig. 2. Effect of proline for strain KZ 1626 (A) in G(+)BSM and isoleucine for strain VPI 10463 (B) in G(−)BSM on the sporulation.

き，G(−)BSM におけるロイシン強化 BSM を除き，明らかな差異は認められなかった．ロイシンの場合，ロイシン強化 G(−)BSM における5株の最高 OD_{560} 値は0.42〜0.64であり，G(−)BSM の最高 OD_{560} 値 (0.25〜0.30) に較べ明らかに高かった．

以上の結果，バリン，イソロイシン，プロリンを増量した場合，増殖よりもむしろ胞子形成がより促進されるものと考えられた．

2．胞子形成促進アミノ酸の濃度と胞子形成の関係

各胞子形成促進アミノ酸の濃度と胞子形成について，G(+)BSM に関しては KZ 1626 株，G(−)BSM に関しては VPI 10463 株を用いて検討した．

G(+)BSM の場合，バリン，プロリン，イソロイシン，ロイシン共に BSM の2倍量，即ち各々 600, 600, 600, 800mg/l が胞子形成に充分に有効な濃度であった (表4)．

G(−)BSM の場合，G(+)BSM に比べ大量のアミノ酸が胞子形成促進に必要であった．バリン，イソロイシン，プロリンでは BSM の20倍量，即ち 6,000mg/l，ロイシンでは BSM の10倍量，4,000mg/l の時，充分な胞子形成が認められた (図1)．

G(+)BSM, G(−)BSM 各々について胞子形成に最も有効なアミノ酸であったプロリン，イソロイシンに関し，胞子形成率の観点からより詳細に解析した (図2)．

G(+)BSM については，プロリンが 0mg/l の時，胞子はほとんど形成されず，胞子形成率は0.000013%にすぎなかったが，プロリン濃度の増量と共に胞子形成率は上昇し，プロリン濃度が 500ml/l の時100%に達した．

G(−)BSM でのイソロイシン濃度と胞子形成の関係については，イソロイシン濃度が 0mg/l の場合にも多少の胞子形成が認められ，胞子形成率は0.0036%であった．イソロイシンの培地への添加により胞子形成率は上昇したが，先述のごとく G(+)BSM におけるプロリンに比べ，より大量を要した．胞子形成率はイソロイシンの濃度が 1,000mg/l までは急激に上昇し，以降イソロイシン濃度の増加と共に穏やかに上昇し，4,000mg/l の時100%に達した．

3．胞子形成促進アミノ酸の利用能

C. difficile が胞子形成促進アミノ酸をエネルギー源として利用し得る可能性を，各アミノ酸強化 G(−)BSM 5日培養液中の代謝脂肪酸をガスクロマトグラフィーを用い解析することにより検討した．

各アミノ酸強化 G(−)BSM 培養液中の代謝脂肪酸量を G(−)BSM の場合と比較した時，胞子形成促進アミノ酸4種類中プロリンを除いた3種類 (バリン，イソロイシン，ロイシン) ではいずれかの脂肪酸が著しく増加した (表5)．即ち，G(−)BSM に比べバリンではイソ酪酸が6.9〜9.2倍，イソロイシンではイソ吉草酸が7.4〜8.2倍，ロイシンではイソ吉草酸とイソカプロン酸が各々4.0〜5.0倍，7.9〜9.1倍に増量した．即ちこれら3種類のアミノ酸は *C. difficile* によりエネルギー源として利用され得る可能性が示された．胞子形成非促進アミノ酸13種類については，スレオニン，アラニン，セリン強化培地では各々プロピオン酸・酪酸，酢酸・酪酸，酢酸・酪酸に明らかな増量がみられ，これら3種類のアミノ酸もまた *C. difficile* によりエネルギー源として利用されうる可能性が示された．

以上の結果，*C. difficile* がエネルギー源として利用しうるアミノ酸は必ずしも胞子形成促進アミノ酸ではないことが分かった．

Ⅲ．複合培地および合成培地における胞子形成と毒素原性

1．胞子形成用合成培地

グルコース存在・非存在いずれの場合においても良好な胞子形成を示すアミノ酸であるバリン，イソロイシン，プロリン，ロイシンを各々 6,000, 5,000, 6,000, 4,000mg/l に含む BSM (BSM reinforced with valine, isoleucine, proline and leucine, BSM-VIPL)，グルコース存在培地で特に有効なプロリンを 600mg/l，グルコース非存在培地で特に有効なイソロイシンを 5,000mg/l を含む BSM (BSM reinforced with isoleucine and proline, BSM-IP)，および各々一方のみを含む BSM (BSM

Table 5. Gaschromatographic analysis of fatty acid products of *C. difficile* in G(−)BSM containing each amino acid effective or non-effective on sporulation at high concentration

Amino acid	Effectiveness on sporulation	Increased fatty acid	Amount (mM) of each fatty acid in the tested medium[a] in strain				
			VPI 10463	KZ 1630	KZ 1626	KZ 1748	KZ 1647
Valine	+	Isobutyric acid (2.9)[b]	20.1	25.8	26.0	23.2	26.7
Isoleucine	+	Isovaleric acid (3.0)	22.9	24.2	24.7	22.2	23.4
Proline	+	None					
Leucine	+	Isovaleric acid (3.0) Isocaproic acid (6.5)	12.2 52.9	15.0 59.2	12.7 52.5	12.1 59.3	13.6 51.2
Threonine	−	Propionic acid (0.4) Butyric acid (1.5)	8.1 5.4	11.5 7.7	8.4 6.0	9.5 7.7	11.8 9.2
Alanine	−	Acetic acid (9.4) Butyric acid (1.5)	ni[c] ni	17.3 2.7	23.3 5.2	18.0 2.8	16.0 3.2
Serine	−	Acetic acid (9.4) Butyric acid (1.5)	28.3 2.5	29.1 3.3	26.9 3.0	25.2 3.1	29.3 4.3
Other 10 amino acids[d]	−	None					

a) G(−)BSM containing each amino acid at high concetration. Concentration of each amino acid in the tested medium is 10-fold higher than that of BSM.
b) Amount of each fatty acid produced in G(−)BSM (mean value of 5 strains). Range: isobutyric acid, 8.9—9.7 mM; propionic acid, 0.3—0.5 mM; isobutyric acid, 2.4—3.6 mM; butyric acid, 1.3—1.8 mM; isovaleric acid, 2.6—3.6 mM; isocaproic acid, 5.4—7.4 mM.
c) Not increased.
d) Histidine, tryptophan, glycine, arginine, phenylalanine, methionine, lysine, aspartic acid, cysteine and glutamic acid.

reinforced with proline, BSM-P; BSM reinforced with isoleucine, BSM-I) についてグルコース存在・非存在下における胞子形成を上述の5菌株について比較検討した（表6）.

グルコース存在下では全株において BSM-IP と BSM-P が胞子形成に最も有効であった（両培地における胞子数の差異は $10^{0.4}$ 倍以下）. グルコース非存在下では BSM-IP と BSM-I が胞子形成に最も有効であった（両培地における胞子数の差異は $10^{0.3}$ 倍以下）. 即ち, BSM-IP はグルコース存在・非存在のいずれの場合にも胞子形成には極めて有効な培地であることが示唆された.

2. m-BHI, グルコース添加 BSM-IP (BSM-IP with glucose, G(+)BSM-IP), グルコース非添加 BSM-IP (BSM-IP without glucose, G(−)BSM-IP) における胞子形成と毒素原性

有毒20菌株, 無毒20菌株を m-BHI にて培養した時, 良好な胞子形成がみられ胞子数は $10^{5.2}$～$10^{7.4}$/ml におよんだ. 10^6/ml 以上の胞子数を示した菌株は有毒株, 無毒株共に20株中16株 (80%) であり両者間には差異は認められなかった（表7）. また有毒株におけるサイトトキシン活性と胞子数の間には何らの関係も認められなかった.

更に, G(+)BSM-IP, G(−)BSM-IP における胞子形成を毒素原性との関係において解析した（表8）. 有毒株はグルコースの存在の有無に関わりなく胞子形成は不良であり, G(+)BSM-IP, G(−)BSM-IP では共に5株 (25%) が 10^5 以上の胞子数を示したにすぎず, 両培地間には胞子形成に関して明確な差異は認められなかった. これに反し, 無毒株は本合成培地において, 特にグルコースが存在しない時, 良好な胞子形成を示した. 即ち 10^5 以上の胞子数を示した菌株は G(+)BSM-IP では7株 (35%) にすぎなかったが, G(−)BSM-IP では13株 (65%) も存在した.

有毒株の G(+)BSM におけるサイトトキシン活性は m-BHI での値の1/2～1/16にすぎなかった. G(−)BSM と比べると VPI 10463 株では等しかったが (2,048 CU/50 μl), 他の菌株では32～512倍高かった. しかしながら, 胞子数とサイトトキシン活性の間には明らかな関係は認められなかった.

Table 6. Sporulation of *C. difficile* strains in different synthetic media

Medium[b]		Growth[a] and number of spores ($\log_{10}$/ml) produced in strain									
		VPI 10463		KZ 1630		KZ 1626		KZ 1748		KZ 1647	
		Growth	Spores	Growth	Spores	Growth	Spores	Growth	Spores	Growth	Spores
Glucose(+)	BSM	⧺	4.4	⧺	4.6	⧺	3.0	⧺	5.5	⧺	4.5
	BSM-VIPL	⧺	4.0	⧺	3.4	⧺	4.9	⧺	5.4	⧺	4.9
	BSM-IP	⧺	5.7	⧺	4.5	⧺	4.9	⧺	5.8	⧺	5.2
	BSM-P	⧺	5.3	⧺	4.3	⧺	4.8	⧺	6.1	⧺	5.3
Glucose(−)	BSM	⧻	1.7	+	5.4	⧻	5.1	⧻	6.0	⧻	5.7
	BSM-VIPL	⧻	3.9	⧻	5.1	⧻	5.3	⧻	6.5	⧻	5.6
	BSM-IP	+	4.8	+	6.2	+	5.4	+	6.5	+	6.7
	BSM-I	+	4.5	+	6.2	⧻	5.2	⧻	6.3	⧻	6.5

a) Refer to the foot notes of Table 1.
b) Concentration of glucose, 0.2%; BSM, basal synthetic medium; BSM-VIPL, BSM reinforced with valine (6,000mg/l), isoleucine (5,000mg/l), proline (6,000mg/l) and leucine (4,000mg/l); BSM-IP, BSM reinforced with isoleucine (5,000mg/l) and proline (600mg/l); BSM-P, BSM reinforced with proline (600mg/l); BSM-I, BSM reinforced with isoleucine (5,000mg/l).

Table 7. Toxigenesis and sporulation of *C. difficile* strains in m-BHI

Toxigenesis	Number of strains tested	Number of strains producing spores in m-BHI in number (level/ml) of		
		10^7	10^6	10^5
Toxigenic	20	3	13	4
Nontoxigenic	20	1	15	4

Table 8. Toxigenesis and sporulation of *C. difficile* strains in BSM-IP with and without glucose

Toxigenesis	Number of strains tested	Presence of glucose[a]	Number of strains producing spores in number (level/ml) of				
			10^6	10^5	10^4	10^3	10^2
Toxigenic	20	+	1	4	9	3	3
		−	1	4	6	8	1
Nontoxigenic	20	+	1	6	9	3	1
		−	7	6	6	1	0

a) +, BSM-IP with 0.2% glucose (G(+)BSM-IP); −, BSM-IP without glucose (G(−)BSM-IP).

考 察

ヒトの *C. difficile* 腸炎においては，ヒトの腸内フローラ[18)~20)]あるいは泌尿生殖器フローラ[21)]として本菌が存在しているところから，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* 菌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 ^{36}S 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[22)~27)]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[4)]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%の割りに *C. difficile* を検出している．*C. difficile* は嫌気性胞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，胞子の形で病院環境に長期間生存する．Kim ら[4)]は胞子は6ヶ月間病室の床に生存していたと述べている．即ち，外因感染の主役は胞子であると考えられている．

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，Bartlett ら[6)]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，更に再発者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胞子が残り薬剤の投与中止により胞子が発芽・増殖をして再発すると考えられている．

以上述べた如く，*C. difficile* 腸炎において本菌の胞子は大きな役割を演じており，胞子の形成条件を明らかにすることは本腸炎の予防・治療に新しい方向を示すものと考えられる。それ故，本研究では *C. difficile* の胞子形成条件について，特にアミノ酸に関して検討した．

クロストリジウム属の菌種は全て一様に胞子形成が良好なわけではなく，胞子形成は菌種により，更には同一菌種においても菌株毎に異なる．*C. difficile* の場合，胞子形成は極めて良好であるが，一方，本菌の胞子は極めて発芽が困難である[15)28)29)]．本菌の胞子の発芽・発育には，胞子をチオグリコール酸ナトリウムで処理をした後に，リゾチーム添加培地に植菌する方法[15)28)]，および0.1%タウロコール酸ナトリウム添加培地に植菌する方法[16)29)30)]がある．前者は熱 (80℃以上の加熱) あるいはアルカリ傷害胞子の発芽・発育には極めて優れており完全な発芽・発育をもたらす[31)]．以上の点に鑑み本研究では胞子数の測定にはタウロコール酸ナトリウム添加培地を用いることとした．

著者らは先に BSM を用いた予備実験でグルコース濃度と胞子形成について検討した際，*C. difficile* 菌株の中にはグルコースが存在した方が胞子形成が良好な菌株と，グルコースが存在しない方が胞子形成が良好な菌株が存在することをみいだした[32)]．従って，本研究ではグルコース存在および非存在の両者について検討することとした．

本研究では先ず各種アミノ酸欠損 BSM を用い *C. difficile* の胞子形成に必須のアミノ酸を求めた．被験菌株の充分な発育にはトリプトファン，バリン，システイン，プロリン，ロイシン，メチオニン，イソロイシンが必須であった．Haslam ら[12)]もこれらのアミノ酸が *C. difficile* の発育に必須であると報告している．しかしながら，欠損した時菌の発育がまったく認められないアミノ酸は，著者の成績ではトリプトファン，バリン，システインであったが，Haslam ら[12)]の成績ではこれら3種に加うるにプロリン，イソロイシン，ロイシン，メチオニンであった．これは著者らの培地の pH は7.6であるが Haslam らの培地の pH が約9と極めて高いことに起因するものと思われる．

C. perfringens の必須アミノ酸はアルギニン，グルタミン酸，ヒスチジン，ロイシン，フェニールアラニン，スレオニン，トリプトファン，チロジン，バリンの9種類[33)34)]，*C. botulinum* A, B, E 型菌の必須アミノ酸はアルギニン，イソロイシン，ロイシン，メチオニン，フェニールアラニン，トリプトファン，チロジン，バリンの8種類[35)]であることを考えると，*C. difficile* の場合必須アミノ酸の種類は少ないように思われる．

上に述べた *C. difficile* の発育に必須のアミノ酸が欠損した培地においては，同時に胞子形成もまた不良であったが，菌の発育が悪いことは菌の代謝合成が充分に機能していないことを意味するものであり，胞子形成が不良なことは当然のことと思われる．

また，欠損した時，菌の発育が全てのアミノ酸を含む場合と同じだが，胞子形成が不良なアミノ酸が存在しなかったことから，胞子形成にのみ必須のアミノ酸は存在しない様に思われた．

次に各アミノ酸を10倍量に増量した各種アミノ酸強化培地を用いて，胞子形成を促進するアミノ酸について検討した．グルコースの有無に関わりなくバリン，イソロイシン，プロリン，ロイシンが胞子形成に有効なアミノ酸であった．グルコース存在下では特にプロリンが，グルコース非存在下では特にイソロイシンが有効であった．これらのアミノ酸を増量した時，菌の発育はほとんど影響は受けず，総菌数に対する胞子数の割合 (胞子形成率) はこれらアミノ酸の増量と共に上昇し，プロリン，イソロイシン各々 500mg/l, 4,000mg/l の時100%の値を示した．即ち，これらのアミノ酸は先述の如く発育に必須であるが，更に胞子形成に極めて有効なアミノ酸であることが分かった．イソロイシンは *C. botulinum* E 型，*C. perfringens* の胞子形成に有効なアミノ酸である[36)37)]．*C. perfringens* の胞子形成にはイソロイシンの外にメチオニン，セリン，リジンが[37)]，*C. botulinum* A 型の胞子形成にはアルギニン[38)]が有効と報告されている．胞子形成を促進するアミノ酸については好気性胞子形成菌である *Bacillus* について特に研究されており，*Bacillus cereus*[39)40)]，*Bacillus subtilis*[41)]の胞子形成にはグルタミン酸が有効であるとされている．

胞子形成促進アミノ酸の *C. difficile* による利用能を明らかにするため G(−)BSM 培養液中の代謝脂肪酸をガスクロマトグラフィーにより解析した．*C. difficile* はペプトン−酵母エキス−グルコース培地でイソ吉草酸，吉草酸，イソカプロン酸，酢酸，プロピオン酸，イソ酪酸，酪酸を産生する[42)]が G(−)BSM でも同様の脂肪酸産生パターンを示した．各アミノ酸を10倍量に増量した時，バリン，イソロイシン，ロイシン，スレオニン，アラニン，セリンでは各々特定の脂肪酸量が2〜9倍増加し，これらのアミノ酸が *C. difficile* により発酵・利

用されている可能性が示された．これらの中でバリン，イソロイシン，ロイシンは胞子形成促進効果を示すアミノ酸であった．しかしながら，4種類の胞子形成促進アミノ酸のうち唯一プロリンについては，10倍，あるいはそれ以上に増量した場合にも代謝脂肪酸の増量は認められなかった．

アミノ酸の発酵様式には単一アミノ酸を利用する方式と，クロストリジウム属特有のものとして，2種のアミノ酸の一方を電子供与体，他方を電子受容体として利用する方式 (Stickland 反応) とがある[43]．上記の発酵・利用が示唆された6種類のアミノ酸のうち，胞子形成に有効なアミノ酸であるバリン，イソロイシン，ロイシンは単一アミノ酸を利用する方法によっては発酵されないが，Stickland 反応によって発酵されるアミノ酸である．この際，これらのアミノ酸は電子供与体として働き，プロリンは電子受容体として働く[43]．即ち，胞子形成に有効なアミノ酸は Stickland 反応による発酵に関与するアミノ酸であることが分かった．

有毒クロストリジウム菌種の中で *C. perfringens*[8]，*C. botulinum*[9]，*Clostridium novyi*[44]，*Clostridium histolyticum*[45]，*Clostridium tetani*[46]についてはその毒素原性と胞子形成の間には密接な関係が存在すると報告されている．特に *C. perfringens* のエンテロトキシン，*C. botulinum* の C_2 毒素について詳細に研究され，それらの毒素は胞子形成期に産生され培地中に放出され，かつ胞子には毒素が存在することが明らかにされている[8][9]．*C. difficile* の毒素は培養1～2日目から産生され，4～5日目に最高値に達することから，本菌の毒素も胞子形成期に産生されると考えられる[10][11]．しかしながら，複合培地を用いた今日までの研究は両者の関係についてはむしろ否定的である[15][47][48]．

本研究において複合培地 m-BHI を用いた成績では，毒素原性と胞子形成には何らの関係も見い出すことは出来なかった．合成培地 G(+)BSM-IP, G(−)BSM-IP を用いた成績では，有毒株についてはサイトトキシン活性は G(−)BSM-IP では G(+)BSM-IP に比べ低かったが，トキシン活性と胞子数の間には関係はみられなかった．しかしながら，G(+)BSM-IP, G(−)BSM-IP における胞子形成を比較した時，無毒株は有毒株に比べ，特に G(−)BSM-IP において良好な胞子形成を示した．以上の結果は有毒株に比べて無毒株のほうが胞子形成能が強い可能性があることを示唆するものであり，更なる研究を要する．

ハムスターに無毒株を投与した後に有毒株を投与すると盲腸炎は発症しない[49]．臨床的には，*C. difficile* 腸炎の再発を繰り返す患者に無毒 *C. difficile* を投与することにより再発を防ぐことができる[50]．これは無毒株のほうが有毒株よりも定着しやすいためと解されているが，菌のいかなる因子が関与しているかは不明である．

本研究で無毒株のほうが有毒株よりも合成培地で胞子形成が良好なことが示された．このことは，より栄養条件が悪い環境下では無毒株の方が胞子を形成しやすいことを意味している．無毒株のこの様な胞子形成の特徴が有毒株の腸管への定着の阻止に関与している可能性がある．この点に関しても更なる研究を要する．

結　　論

C. difficile の胞子形成に及ぼすアミノ酸の影響を5菌株を用いて合成培地にて検討し，更に *C. difficile* の胞子形成と毒素原性について検索し，次の結果をえた．

1．*C. difficile* の胞子形成に必須のアミノ酸はグルコースの有無に関わりなく5株全株において，トリプトファン，バリン，システイン，プロリンであった．更に，グルコース存在下においては2株においてロイシンおよびメチオニン，1株においてロイシン，1株においてメチオニンが必須であった．グルコース非存在下においては4株においてロイシンが必須であった．

2．これらのアミノ酸はまた菌の発育にとっても必須であった．

3．*C. difficile* の胞子形成を促進するアミノ酸はバリン，イソロイシン，プロリン，ロイシンの4種類であり，グルコース存在下ではプロリンが，グルコース非存在下ではイソロイシンが最も有効なアミノ酸であった．

4．上述の4種のアミノ酸を増量した時，菌の発育はほとんど影響を受けなかったが，胞子形成率はアミノ酸の増量と共に上昇し，プロリン，イソロイシンについては各々 500mg/l (グルコース存在，KZ 1626 株)，4,000mg/l (グルコース非存在，VPI 10463 株) の時ほぼ100％の値を示した．

5．代謝脂肪酸の解析の結果プロリン以外の胞子形成促進アミノ酸 (バリン，イソロイシン，ロイシン) およびスレオニン，アラニン，セリンが発酵・利用されうることが示され，発酵・利用されるアミノ酸の全てが胞子形成に有効であるのではなくて，Stickland 反応に関与するアミノ酸のみが有効であることが分かった．

6．グルコース不含イソロイシン (5,000mg/l)・プロリン (600mg/l) 強化合成培地において 1ml 当り 10^5 以上の胞子を形成した菌株は有毒株では20株中5株 (25%) であったが，無毒株では20株中13株 (65%) であった．このことは無毒株のほうが有毒株より胞子形成能が強い可能性を示唆している．

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喪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，御協力を頂きました微生物学教室諸兄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） **Lyerly, 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., Paotosti, A., Gerquetti, M., Babudieri, S., Panichi, G. & Gianfrille, P. M.**: Evidence for cross-infection in an outbreak of *Clostridium difficile*-associated

diarrhoea in a surgical units. J. Med. Microbiol., **26**, 125-128 (1988).

6) **Bartlett, J. G.**: Treatment of antibiotic-associated pseudomembranous colitis. Rev. Infect. Dis., **6** (Suppl. 1), s235-s241 (1984).

7) **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.

8) **Frieben, W. R. & Duncan, C. L.**: Homology between enterotoxin protein and spore structural protein in *Clostridium perfringens* type A. Eur. J. Biochem., **39**, 393-401 (1973).

9) **Nakamura, S., Serikawa, T., Yamakawa, K., Nishida, S. & Sakaguchi, G.**: Sporulation and C_2 toxin production by *Clostridium botulinum* type C strains producing no C_1 toxin. Microbiol. Immunol., **22**, 591-596 (1978).

10) **Rolfe, R. D. & Finegold, S. M.**: Purification and characterization of *Clostridium difficile* toxin. Infect. Immun., **25**, 191-201 (1979).

11) **Lonnroth, I. & Lange, S.**: Toxin A of *Clostridium difficile*: production, purification and effect in mouse intestine. Acta Pathol. Microbiol. Scand., **91**, 395-400 (1983).

12) **Haslam, S. C., Ketley, J. M., Mitchell, J., Stephen, J., Burdon, D. W. & Candy, D. C. A.**: Growth of *Clostridium difficile* and production of toxins A and B in complex and defined media. J. Med. Microbiol., **21**, 293-297 (1986).

13) 蓮池 徹, 神谷 茂, 沖野善則, 川辺清光, 孟 筱琦, 中村信一: *Clostridium difficile* の毒素産生用合成培地の緩衝系, グルコース濃度の検討. 医学と生物学, **123**, 249-254 (1991).

14) **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 antibody in sera of young and elderly adults. Microbiol. Immunol., **25**, 345-351 (1981).

15) **Nakamura, S., Yamakawa, K., Izumi, J., Nakashio, S. & Nishida, S.**: Germinability and heat resistance of spores of *Clostridium difficile* strains. Microbiol. Immunol., **29**, 113-118 (1985).

16) **Kamiya, S., Yamakawa, K., Ogura, H. & Nakamura, S.**: Effect of various sodium taurocholate preparations on the recovery of *Clostridium difficile* spores. Microbiol. Immunol., **31**, 1117-1120 (1987).

17) **Holdeman, L. V., Cato, E. P. & Moore, W. E. C.**: Anaerobe Laboratory Manual, 4th ed., p134-136, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, 1977.

18) **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).

19) **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).

20) **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).

21) **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).

22) **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).

23) **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).

24) **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).

25) **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).

26) **Kujiper, E. J., Oudbler, J. H., Stuifbergen, W. N. H. M., Jansq, A. & Zanen, H. C.**: Application of whole-cell DNA restriction endonuclease profiles to the epidemiology of *Clostridium difficile* induced diarrhoea. J. Clin. Microbiol., **25**, 751-753 (1987).

27) **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).

28) **Ionesco, H.**: Initiation de la germination des spores de *Clostridium difficile* par le lysozyme. C. R. Acad. Sci. (D) (Paris), **287**, 659-661 (1978).

29) **Raibaud, P., Ducluzeau, R., Dubos, F., 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).

30) **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).

31) **Kamiya, S., Yamakawa, K., Ogura, H. & Nakamura, S.**: Recovery of spores of *Clostridium difficile* altered by heat or alkali. J. Med. Microbiol., **28**, 217-221 (1989).

32) 沖野善則, 神谷 茂, 蓮池 徹, 川辺清光, 孟 筱琦, 生駒小百合, 中村信一: グルコース添加・非添加合成培地における *Clostridium difficile* の胞子形成. 医学と生物学, **123**, 295-299 (1991).

33) **Fuchs, A. R. & Bonde, G. J.**: The nutritional requirements of *Clostridium perfringens*. J. Gen. Microbiol., **16**, 317-329 (1957).

34) **Sebald, M. & Costilow, R. N.**: Minimal growth requirements for *Clostridium perfringens* and isolation of auxotrophic mutants. Appl. Microbiol., **29**, 1-16 (1975).

35) **Whitmer, M. E. & Johnson, E. A.**: Development of improved defind media for *Clostridium botulinum* serotypes A, B, and E. Appl. Environ. Microbiol., **54**, 753-759 (1988).

36) **Hawirko, R. Z., Naccarato, C. A., Lee, R. P. W. & Maeka, P. Y.**: Outgrowth and sporulation studies on *Clostridium botulinum* type E: influence of isoleucine. Can. J. Microbiol., **25**, 522-527 (1979).

37) **Muhammed, S. I., Morrison, S. M. & Boyd, W. L.**: Nutritional requirements for growth and sporulation of *Clostridium perfringens*. J. Appl. Bacteriol., **38**, 245-253 (1975).

38) **Perkins, W. E. & Tsuji, K.**: Sporulation of *Clostridium botulinum* II. Effect of arginine and its degradation products on sporulation. J. Bacteriol., **84**, 86-94 (1962).

39) **Foster, J. W. & Heiligman, F.**: Mineral deficiencies in complex organic media as limiting factors in sporulation of aerobic bacilli. J. Bacteriol., **57**, 613-615 (1949).

40) **Buono, F., Testa, R. & Lundgren D. G.**: Physiology of growth and sporulation in *Bacillus cereus* I. Effect of glutamic and other amino acids. J. Bacteriol., **91**, 2291-2299 (1966).

41) **Donnellan, Jr. J. E., Nags, E. H. & Levinson, H. S.**: Chemically defined, synthetic media for sporulation and for germination and growth of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol., **87**, 332-336 (1964).

42) **Holdeman, L. V., Cato, E. P. & Moore, W. E. C.**: Anaerobe Laboratory Manual, 4th ed., p79-106, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, 1977.

43) **Barker, H. A.**: Fermentation of nitrogenous organic compounds. *In* I. G. Gunsalus & R. Y. Stanier (eds.), The Bacteria, volume I, p151-207, Academic Press, New York, 1961.

44) **Nishida, S. & Nakagawara, G.**: Relationship between toxigenicity and sporulating potency of *Clostridium novyi*. J. Bacteriol., **89**, 993-995 (1965).

45) **Sebald, M. & Schaeffer, M. P.**: Toxigenes et sporulation chez *Clostridium histolyticum*. C. R. Acad. Sci. (Paris) (Group B), **260**, 5398-5400 (1965).

46) **Sanada, I. & Nishida, S.**: Isolation fo *Clostridium tetani* from soil. J. Bacteriol., **89**, 626-629 (1965).

47) **Ketley, J. M., Mitchell, T. J., Haslam, S. C., Stephen, J., Candy, D. C. A. & Burdon, D. W.**: Sporogenesis and toxin A production by *Clostridium difficile*. J. Med. Microbiol., **22**, 33-38 (1986).

48) **Ketley, J. M., Haslam, S. C., Mitchell, T. J., Stephen, J., Candy, D. C. A. & Burdon, D. W.**: Production and release of toxins A and B by *Clostridium difficile*. J. Med. Microbiol., **18**, 385-391 (1984).

49) **Wilson, K. H. & Sheagren, J. N.**: Antagonism of toxigenic *Clostridium difficile* by nontoxigenic *C. difficile*. J. Infect. Dis., **147**, 733-736 (1983).

50) **Deal, D., Borriello, S. P., Barclay, F. E., Welch, A., Piper, M. & Bonnycastle, M.**: Treatment of relapsing *Clostridium difficile* diarrhoea by administration of a non-toxigenic strain. Eur. J. Clin. Microbiol., **6**, 51-53 (1989).

Effect of Amino Acids on the Sporulation of *Clostridium difficile* Strains

Yoshinori Okino, Department of Bacteriology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920
—J. Juzen Med Soc., **101**, 68—78 (1992)

Key words *C. difficile*, sporulation, amino acid, fermentation, toxigenesis

Abstract

The effect of amino acids on the sporulation of *Clostridium difficile (C. difficile)*, which is the cause of pseudomembranous colitis and some cases of antibiotic-associated diarrhea, was examined using 5 strains in a synthetic medium with or without 0.2% glucose. Amino acids tested were histidine, tryptophan, glycine, tyrosine, arginine, phenylalanine, methionine, threonine, alanine, lysine, serine, valine, isoleucine, proline, aspartic acid, leucine, cysteine and glutamic acid. By using each amino-acid-deficient synthetic medium, it was revealed that, for sufficient sporulation to occur, tryptophan, valine, cysteine and proline were essential in all 5 strains independent of the presence of glucose. In addition, in the presence of glucose, leucine and methionine were essential in strains VPI 10463 and KZ 1647, leucine in strain KZ 1748, and methionine in strain KZ 1630; in the absence of glucose leucine was essential in all strains except VPI 10463. These amino acids were also essential for bacterial growth, and no amino acid was essential only for sporulation. When the amounts of each amino acid were increased by 10 times those of the basal synthetic medium (BSM), valine, isoleucine, proline and leucine were effective on the sporulation. The most effective amino acids were proline in the presence of glucose and isoleucine in the absence of glucose, respectively, in all 5 strains. When the relationship between sporulation and the amount of proline and isoleucine was examined using strains KZ 1626 and VPI 10463, respectively, sporulation rate reached 100% at the concentration of 500 mg/l of proline or 4,000 mg/l of isoleucine. By analysing fatty acid products using a

gaschromatograph in the culture containing each amino acid at a concentration 10 times that of BSM, it was revealed that all of the enhancing amino acids except proline, threonine, alanine and serine might be fermented. Furthermore, the relationship between sporulation and toxigenesis of *C. difficile* strains was examined using brain heart infusion supplemented with 0.2% Na_2HPO_4 (modified brain heart infusion, m-BHI) and BSM containing isoleucine and proline at the high concentrations of 5,000 mg/l and 600 mg/l (BSM reinforced with isoleucine and proline, BSM-IP), respectively. No relationship between them was found with m-BHI. However, in the BSM-IP without glucose, the number of strains producing spores 10^5 or more/ml were 5 (25%) of 20 toxigenic strains and 13 (65%) of 20 nontoxigenic strains. These results suggest that amino acids used as an oxydant or reductant in Stickland reaction could enhance sporulation, and that nontoxigenic strains might be stronger in sporulation potency than toxigenic strains.