

Clostridium difficile  
の毒性産生に及ぼすStreptococcus  
faecalisの増強作用

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	<a href="http://hdl.handle.net/2297/9092">http://hdl.handle.net/2297/9092</a>

## Clostridium difficile の毒素産生に及ぼす Streptococcus faecalis の増強作用

金沢大学医学部小児科学教室 (主任: 谷口 昂教授)

本 家 一 也

(昭和58年10月14日受付)

Clostridium difficile の毒素産生に及ぼす一般腸内菌, 特に Streptococcus faecalis の共存の影響をしらべた。透析膜を隔てて C. difficile と被検菌を培養する透析培養を brain heart infusion broth を用いて行い, 産生される C. difficile の毒素の活性を細胞毒性試験により検定した。好気条件における Str. faecalis との透析培養で C. difficile の毒素産生は著しく促進されたが, 他の被検菌との透析培養では, そのような現象はみられなかった。次に, Str. faecalis 培養上清 (1~3 日間培養) を brain heart infusion broth に 4:6 の割合に加えて C. difficile を培養し, 毒素産生に及ぼす影響を検討した。Str. faecalis の培養上清の pH, 酸化還元電位, hexose 量は培養 3 日間を通じてほぼ同じであったが, 3 日間培養上清を加えたときのみ, C. difficile の毒素産生は対照に比し有意に高まった。しかし, Str. faecalis 培養上清を加えたときの C. difficile の増殖は抑制された。また, Str. faecalis 3 日間培養上清の PM 10 (AMICON) を加えたときの C. difficile の増殖は抑制された。また, Str. faecalis 3 日間培養上清の PM 10 (AMICON) を加えたときにも毒素産生は対照に比し有意に高まった。

以上の結果より, Str. faecalis の培養上清中に C. difficile の毒素産生能を増強させる因子が存在し, 透析性の低分子物質である可能性が示唆された。

---

**Key words** Clostridium difficile, Toxin production, Streptococcus faecalis, Intestinal bacteria.

---

Clostridium difficile が抗生剤投与による偽膜性大腸炎 (Pseudomembranous colitis 以下 PMC と略) の主な原因菌であり, C. difficile の産生する細胞障害性毒素により本疾患が引き起こされることは, 今日, 一般に認められている<sup>1)~4)</sup>。又, 抗生剤投与による PMC 以外の下痢症においても, その糞便中に C. difficile の毒素が, かなりの頻度で検出されるとの報告<sup>2)5)</sup>や, 新生児の壊死性腸炎の 20 例中 5 例に C. difficile の毒素が検出されたとの報告<sup>6)</sup>がみられるようになり, PMC 以外のこれら腸炎においても, C. difficile の関与が問題となってきている。

C. difficile は抗生剤投与による腸炎患者の糞便中に限らず健康人, とくに新生児及び乳児の糞便から高頻度に分離される<sup>7)8)</sup>。そして, これら健康人から分離される C. difficile の過半数は毒素産生株である<sup>9)</sup>。この常在菌ともいえる C. difficile を原因菌とする腸炎

の発症に関して, 種々の要因が考えられているが, 抗生剤投与による腸内正常細菌叢の崩壊も, その一つに挙げられている<sup>9)</sup>。PMC では通常糞便中から多数の C. difficile が分離され, 多量の毒素も検出されるが, 健康人糞便から毒素産生能の強い C. difficile が多数分離されても, 毒素は検出されない<sup>9)</sup>。このことから, 腸管内における C. difficile の増殖だけでなく, 毒素産生に対しても, 一般腸内菌がどのようにかかわっているかを明らかにすることが重要と思われる。

一方, PMC 発症頻度の高いリンコマイシン投与時, 腸内に Streptococcus faecalis が異常増殖することから, Str. faecalis と PMC を含めた本薬剤による腸管系副作用との関連が注目されていた<sup>10)</sup>。

そこで, 著者は本研究で, C. difficile の毒素産生に及ぼす一般腸内菌の作用を Str. faecalis を中心に in vitro で検討した。

---

Enhanced Toxin Production of Clostridium Difficile by Streptococcus Faecalis. Kazuya Honke, Department of Pediatrics (Director: Prof. N. Taniguchi), School of Medicine, Kanazawa University.

## 材料および方法

## 1. 被検菌株

試供菌株には金沢大学医学部微生物学教室（西田尚紀教授）より分与を受けた *C. difficile* ATCC 17859 を使用した。

その他の菌株は健康人糞便より分離した以下のものを使用した。

*Streptococcus faecalis* 3 株, *Streptococcus faecium* 1 株, *Klebsiella pneumoniae* 2 株, *Klebsiella oxytoca* 1 株, *Escherichia coli* 3 株, *Enterobacter cloacae* 1 株, *Lactobacillaceae* 2 株, *Bifidobacterium* 2 株, *Bacteroidaceae* 2 株。

これら細菌の同定は常法により行った。

## 2. 使用培地

増殖培地及び毒素産生培地として Brain Heart Infusion (BHI) (以下 BHI と略) broth を用いた。

3. *C. difficile* の毒素産生に及ぼす細菌の作用の検討

透析膜を隔てて *C. difficile* と他の細菌を培養し, *C. difficile* の産生毒素価を測定することで検討した。

透析膜には, Visking seamless cellulose tubing (pore size 15 Å) を使用した。透析培養装置は, 伊藤ら<sup>11)</sup>の用いたものを一部修正し, 図 1 に示す装置を作り使用した。即ち, 透析膜の内側及び外側に BHI broth をそれぞれ 12 ml, 26 ml 入れ 121°C, 15 分間蒸気滅菌後, 流水で急速冷却し, *C. difficile* と被検菌の一夜培養液を 0.1 ml ずつ, それぞれ内液相と外液相に接種し, 4 日間, 37°C で何ら嫌氣的操作を加えることなく静置培養した。又, 水素置換法による嫌氣培養を併せて行った。培養後, 内液相, 即ち *C. difficile* の培

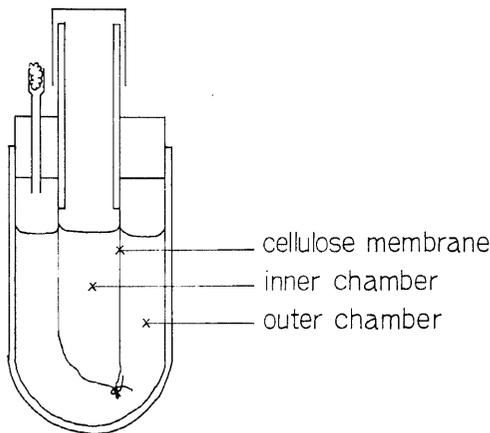


Fig. 1. Schema of Dialysis Co-culture System used in this work.

養液を 4°C で, 10,000 回転, 5 分間遠心し, その上清を pore size 0.45 μm の membrane filter (Millipore) でろ過滅菌し培養上清を作製した。これを毒素液とし後述の方法で毒素価を測定した。

対照としては, 両液相に *C. difficile* を培養した時の内液相より得られた毒素液を用いた。

4. *C. difficile* の毒素産生に及ぼす各種細菌の培養上清の作用の検討

BHI broth に各種細菌の培養上清を加えて *C. difficile* を培養し, その産生毒素価を測定した。即ち, 被検細菌の一夜培養液を BHI broth 30 ml 中に 0.1 ml 接種し, 37°C で一定期間培養した後, 10,000 回転, 5 分間遠心し, pore size 0.45 μm の membrane filter (millipore) でろ過滅菌し, 細菌の培養上清を作った。その培養上清を BHI broth と種々の割合で混合し, 全体で 10 ml の培養液を作り, 100°C, 10 分間煮沸後, 流水で急速冷却し, その中に *C. difficile* の一夜培養液を白金耳を用いて 1/300 ml 接種し, 37°C で 4 日間, 嫌氣的操作を加えず静置培養した。この *C. difficile* の培養液を 4°C で, 10,000 回転, 5 分間遠心し, その上清を pore size 0.45 μm の membrane filter (Millipore) でろ過滅菌し, これを毒素液とし後述の方法で毒素価を測定した。なお, 各種細菌の培養上清に代え, BHI broth 及び蒸留水を加えて *C. difficile* を培養したときに得られた毒素液を対照とした。

## 5. 細菌培養上清の低分子画物の作製

DIAFLO ultra filtration membrane (AMICON) の YM 10 と ultra filtration cell (AMICON) を用いた限外ろ過により細菌培養上清の分子量 10,000 以下の分画液を作った。

## 6. 細菌培養上清の pH, 酸化還元電位(以下 Eh と略), hexose 含有量の測定

pH, Eh は pH meter (日立) と ORP 複合電極 (堀場) を使って測定した。hexose 含有量はシステイン硫酸法<sup>12)</sup>により測定した。

7. *C. difficile* の増殖と毒素産生に及ぼす細菌培養上清の作用の検討

本節 4 にある方法で BHI broth に細菌培養上清を加えて *C. difficile* を培養し, 1 日毎に 4 日間, 生育度と培養上清の毒素価を測定した。生育度は, 島津製光電比色計を用い OD 560 で測定した。対照としては, *C. difficile* を BHI broth にて培養したときの生育度と培養上清の毒素価を用いた。

## 8. 毒素価の測定方法

*C. difficile* の産生する毒素価は, 本毒素の培養細胞に対する cytopathic effect (以下 CPE と略) を利用して測定した。使用した培養細胞は, 金沢大学がん研

究所ウイルス部門（波田野基一教授）より分与を受けた HeLa 細胞を用いた。この細胞の培養には、HAM-F 12 培地（日水）に馬血清（GIBCO）12.5%，牛胎児血清（GIBCO）2.5%，硫酸ゲンタマイシン（Schering）100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，重曹 0.2 w/v% の割合で加えたものを用いた。毒素価の測定は，継代培養中の HeLa 細胞をブローナーゼ処理後， $2 \times 10^6$  cells/ml に調整し，micro test plate（Nunc, Denmark）の各 well に 50  $\mu\text{l}$ （ $1 \times 10^4$  cells/well）あて分注し，炭酸ガス培養器（池本理工）内で，5% 炭酸ガス下，37°C，24 時間培養した後，*C. difficile* の産生した毒素液の磷酸緩衝生理食塩水（pH7.2, 0.15M）による 2 倍段階希釈液を 25  $\mu\text{l}$  ずつ各 well に添加し，添加後 21 時間の HeLa 細胞の CPE の有無を観察することで行った。判定はすべての細胞が円形化するときまでを陽性とし，その時の毒素液の希釈倍数を 2 を底とした対数に直し，これを毒素価とした。

## 成 績

### 1. *C. difficile* の毒素産生に及ぼす細菌の作用

はじめに *C. difficile* の毒素産生に及ぼす作用を好気性菌 6 菌種 11 株，嫌気性菌 6 菌種 6 株の腸内菌について透析培養法を用いて検討した。細菌 1 株について最低 2 回以上の実験を行った。

好気条件での透析培養において *C. difficile* の産生毒素価は *Str. faecalis* との培養で対照  $3.67 \pm 1.53$  (mean  $\pm$  S. D.) と比べ  $9.67 \pm 0.82$  と著しく高かった。この現象は今回検索した *Str. faecalis* 3 株全てでみられた。しかし，他の 11 菌種ではこのような現象はみられなかった。（図 2）

一方，嫌気条件での透析培養においては，*E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Bacteroidaceae* との培養で毒素価はそれぞれ， $5.66 \pm 1.37$ ,  $5.00 \pm 0.58$ ,  $4.50 \pm 0.58$ ,  $5.00 \pm 0.82$ ,  $6.50 \pm 0.58$  と対照  $9.90 \pm 0.99$  と比べ低かった。*Str. faecalis*

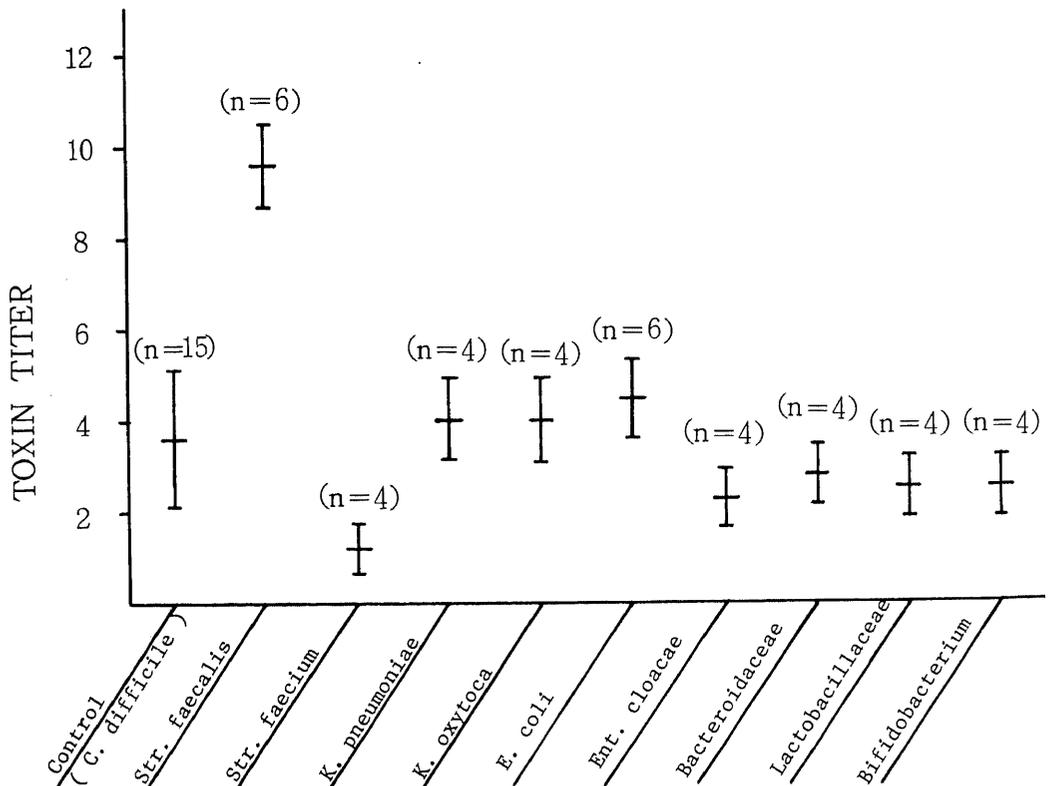


Fig. 2. Toxin production of *C. difficile* ATCC 17859 in the dialysis co-cultures with other organisms in aerobic condition.

(The results were expressed as the means  $\pm$  1S. D. of toxin titers.)

との培養では毒素価は  $10.86 \pm 0.38$  と対照とほとんど差はみられなかった。(図3)

## 2. C. difficile の毒素産生に及ぼす細菌培養上清の作用

次に C. difficile の毒素産生に及ぼす細菌培養上清の作用を Str. faecalis の3日間培養上清を用いて検討した結果、BHI broth に30%~40%の割合で、その上清を加えたとき高い毒素価が得られた。そこで、以後40%の割合で Str. faecalis の1日~3日間培養上清、E. coli の1日~3日間培養上清、K. pneumoniae の3日間培養上清、および Str. faecalis、E. coli の3日間培養上清の分子量10,000以下の分画液をそれぞれ加えて検討した。

Str. faecalis の培養上清添加培地における C. difficile の産生する毒素価は1日間培養上清  $3.00 \pm 0.82$  (mean  $\pm$  S. D.), 2日間培養上清  $4.25 \pm 0.83$ , 3日間培養上清  $5.27 \pm 0.88$  であり、BHI broth の対照  $4.38 \pm 0.52$  と比べ、3日間培養上清を加えた場合 C.

difficile の産生毒素価は有意 ( $p < 0.05$ ) に高かった。また、Str. faecalis の3日間培養上清の分子量10,000以下の画分液を加えた培地における C. difficile の産生毒素価も  $5.25 \pm 0.50$  と BHI broth の対照と比べ、有意に ( $p < 0.05$ ) に高かった。その他の細菌培養上清添加時には、毒素価は対照との間に有意差はみられなかった。(図4)

## 3. 細菌培養上清の pH, Eh, hexose 含有量

Str. faecalis の1日~3日間培養上清は、全て pH が6.00~6.10、Eh が+135 mV~+155 mV、hexose 含有量が200~210  $\mu$ g/ml であった。また、Str. faecalis のそれぞれの上清を混合した培養液は pH が6.40~6.45、Eh が+135 mV~+145 mV であった。

## 4. C. difficile の増殖と毒素産生に及ぼす細菌培養上清の作用

C. difficile の増殖と毒素産生に及ぼす細菌培養上清の作用を Str. faecalis 及び E. coli の3日間培養上清を40%の割合に BHI broth に加えて検討した。こ

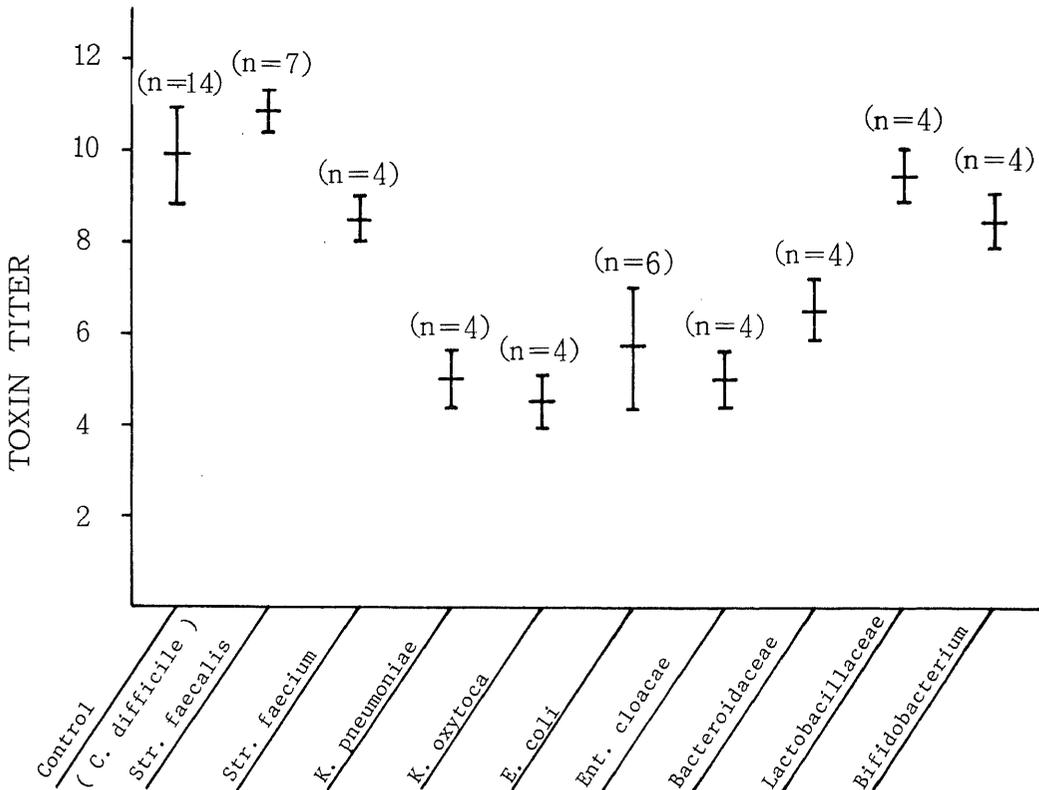


Fig. 3. Toxin production of C. difficile ATCC 17859 in the dialysis co-cultures with other organisms in anaerobic condition.

(The results were expressed as the mean  $\pm$  S. D. of toxin titers.)

の実験は2回行ないその平均を成績とした。

図5に示すように対照に比べ両細菌培養上清を加えた場合、増殖は悪かったが、*Str. faecalis*の培養上清を加えた場合、毒素は早期に培養液中に出現し、毒素価は対照に比べ高くなった。*E. coli*では、培養液中への毒素の出現は対照に比べ遅く、毒素価も低かった。

### 考 察

本研究では、*C. difficile*の毒素産生に及ぼす一般腸内菌の作用を、*Str. faecalis*を中心に *in vitro* で検討した。透析培養法は透析膜で隔てられた相接する2液相間で、膜を通して物質移動を行わせながら微生物を培養する方法<sup>13)</sup>で、2種の微生物の共存培養実験にも応用されているものである。この方法を利用して、両種微生物の相互関係を調べる研究が行われており、たとえば、一方の微生物が他方の要求する栄養因子を分

泌すること<sup>14)</sup>や、一方の微生物が他方の増殖を促進する<sup>14)</sup>といったことが認められている。この透析培養に用いた培養液には、*C. difficile*の毒素産生培地として一般に用いられているBHI broth<sup>15)</sup>を使用した。なお、BHI brothによる*C. difficile*の培養では、好気、嫌気をとわず、培養3日間で上清中の毒素価は最高になり培養1週間まで持続して高い。<sup>16)</sup> このことから培養期間を4日間とした。また、透析膜には分子量10,000以下の物質が比較的容易に通過するとされているVisking cellulose tubing<sup>17)</sup>を使用した。

*C. difficile*と代表的一般腸内菌で透析培養を行った結果、好気条件における*Str. faecalis*と*C. difficile*の共存培養でのみ、*C. difficile*の産生毒素価が著しく高くなる現象がみられた。

そこで、*Str. faecalis*培養上清中に透析膜を通過して*C. difficile*の毒素産生に促進的に働く物質が存在

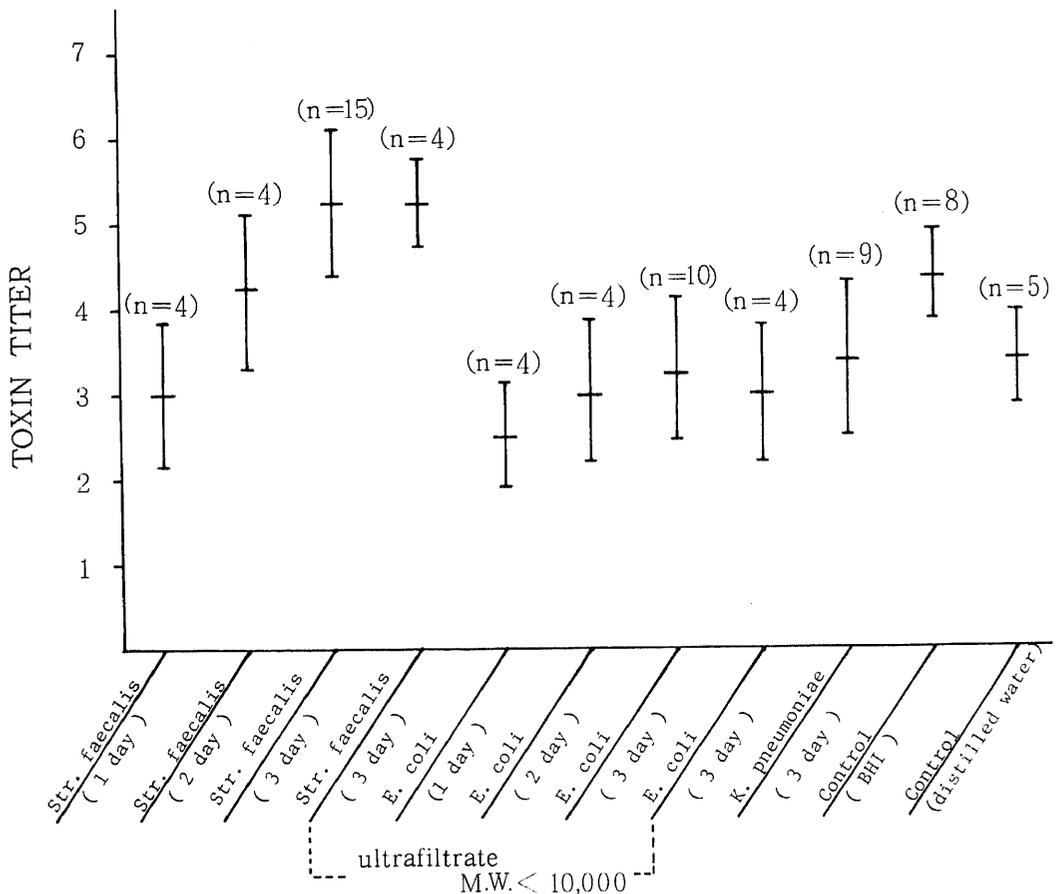


Fig. 4. Toxin production of *C. difficile* ATCC 17859 in the brain heart infusion broth containing the culture filtrates of indicated bacteria or the ultrafiltrate of culture supernatant. (The results were expressed as the means  $\pm$  1 S. D. of toxin titers.)

するのではないかと考え、さらに実験を行った。はじめに C. difficile の毒素産生に及ぼす Str. faecalis 培養上清の作用を経時的に検討したところ、Str. faecalis の 1 日～3 日間培養上清のうち、3 日間培養上清を加えたとき高い毒素価が得られた。毒素産生には培養液の pH, Eh, 組成、温度が大きく影響する<sup>16)</sup> が、1 日～3 日間培養上清の pH, Eh, hexose 量はほとんど差がなく、また、それら上清を加えた培養液の pH, Eh もほぼ同じであった。このことから、Str. faecalis の培養上清中には、C. difficile の毒素産生を促進する何んらかの因子が存在すると考えられた。培養上清の推定分子量が 10,000 以下の画分で同様の実験を行ったところ、3 日間培養上清を用いた時と同様に高い毒素価が得られたことから、この因子は分子量 10,000 以下の物質であり、透析培養において透析膜を通過し C. difficile の毒素産生に促進的に作用したのではないかと考えられた。

次に、Str. faecalis 培養上清がどのような機序によって C. difficile の毒素産生を促進するのかを調べ

た結果、Str. faecalis の培養上清は C. difficile の増殖を活発にすることで毒素産生を促進しているのではないことが判かった。

Genus Clostridium の代表である Clostridium perfringens の場合、毒素産生は菌の増殖には関係なく、孢子形成期にのみ起こることが知られている<sup>18)</sup>。C. difficile の場合も、菌がさかんに増殖しても毒素産生の弱いことがあり<sup>19)</sup>、C. difficile も Genus Clostridium の性質上、やはり孢子形成期に毒素を産生するものとするれば、Str. faecalis 培養上清は C. difficile の孢子形成を活発にすることで毒素産生を促進するのかも知れない。

C. difficile は抗生剤投与による PMC の主な原因菌であることは、今日一般に認められている<sup>17)</sup>。本菌は健康人からも分離され<sup>7)8)</sup>、腸内常在菌ともいえる細菌であるが、抗生剤投与などをきっかけとして腸炎を発症させる。いわば、C. difficile を原因菌とする腸炎は、内因性感染症ともいえるものである。

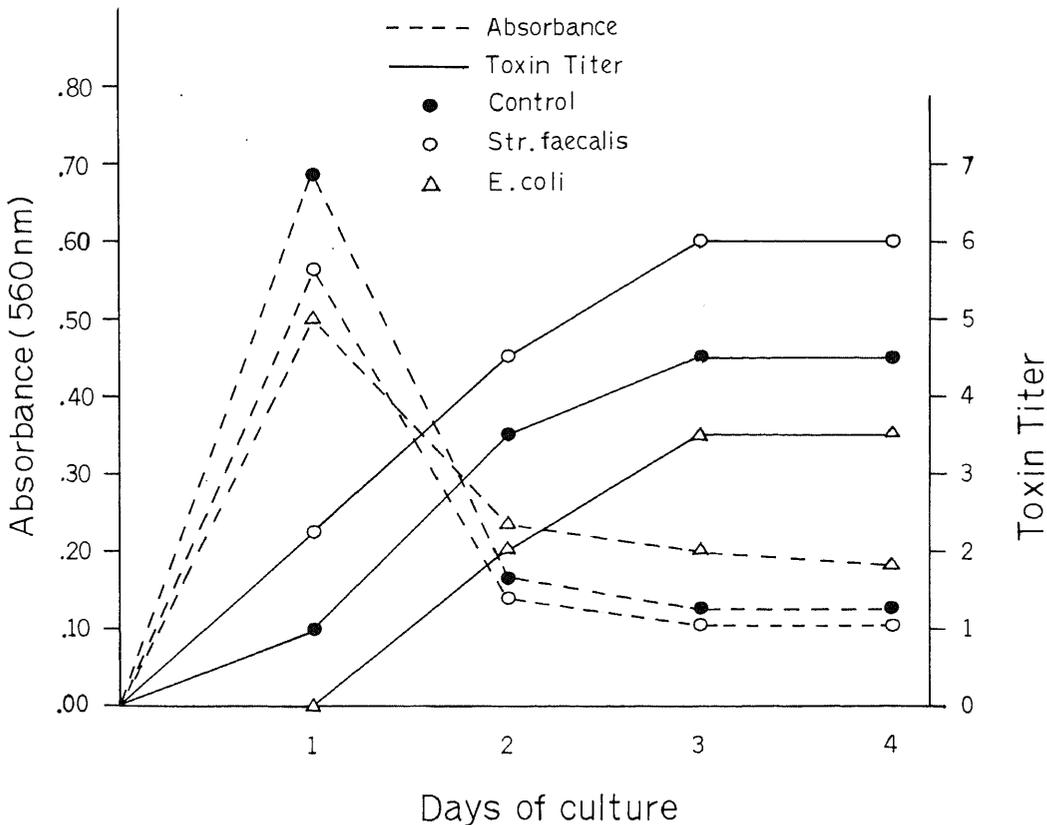


Fig. 5. Growth and toxin production of C. difficile ATCC 17859 in the brain heart infusion broth containing the culture filtrates of indicated bacteria.

この腸炎は *C. difficile* の産生する細胞障害性毒素により引き起こされると考えられている<sup>19)</sup>が、今のところ発症に至る機構は解明されていない。しかし、発症に至る一要因として、従来より抗生剤投与による腸内正常細菌叢の崩壊が考えられている<sup>9)</sup>。すなわち、抗生剤投与によって腸管において菌交代が生じ、*C. difficile* が異常増殖することで腸炎が発症してくるとの考え方である。*C. difficile* の健康保菌者では、多くの場合、糞便中のその菌数は  $10^2$ /g 以下であり糞便中には毒素は検出されない。そして、抗生剤投与による PMC ないし急性腸炎では、その菌数は  $10^6$ /g 以上となっており、多量の毒素が検出される<sup>20)</sup>。また、Bartlett ら<sup>21)</sup>は PMC 患者で糞便中の *C. difficile* の数と毒素量を調べ、両者の間には正の相関がみられると報告している。これらのことは、腸炎発症に腸管内における *C. difficile* の異常増殖が深く関与していることを示すものであるが、一方、健康人において、その糞便中に多数の毒素産生能の強い *C. difficile* が分離されても毒素は検出されないとの報告<sup>8)</sup>がある。また、in vitro では、*C. difficile* の増殖と毒素産生には相関はみられない<sup>16)</sup>。これらのことは、*C. perfringens* の場合にも、みられる現象である<sup>21)~23)</sup>が、腸炎発症には腸管において *C. difficile* が単に増殖するだけでなく、毒素を活発に産生することが重要と思われる。

腸管内において normal flora としての腸内菌が *C. difficile* の増殖あるいは毒素産生にどのようにかかわっているかについては明らかではない。Rolfe ら<sup>24)</sup>は *C. difficile* に対する一般腸内菌の増殖阻止作用を in vitro で調べ、*Str. faecalis* にその作用が最も強かったと報告している。しかし、Lusk ら<sup>25)</sup>によれば、ハムスターにクリンダマイシンを投与して *C. difficile* による腸炎を発症させる実験では、盲腸内においてクリンダマイシン投与前に比べ投与後 *C. difficile* の増加とともに *Str. faecalis* が有意に増加しているという。このことから、in vivo においては *Str. faecalis* が *C. difficile* の増殖を抑制しているとは考えにくく、腸炎発症に何んらかのかたちで促進的に関与していることが考えられる。

今回の in vitro の実験では、*Str. faecalis* は *C. difficile* の毒素産生を促進するとの結果が得られ、これを Lusk らのハムスターの実験にあてはめれば、*Str. faecalis* は腸管内において *C. difficile* の毒素産生に促進的に働き、腸炎の発症をうながしているのではないかと考えられた。

抗生剤投与による腸内細菌叢の変動を調べた多くの報告があるが、*Str. faecalis* は種々の抗生剤投与によっても、ほとんど減少することがなく<sup>26)~28)</sup>、むしろ

PMC の発症頻度の高いクリンダマイシン投与時には増加する<sup>29)</sup>。又、リンコマイシン投与により腸管系副作用のみられた患者では *Str. faecalis* の著しい増加がみられるとの報告や<sup>10)</sup>、クリンダマイシン投与により PMC を発症した患者では健康人に比べ *Str. faecalis* が増加しているとの報告<sup>30)</sup>がある。

以上のことから、ヒトにおける *C. difficile* を原因菌とする腸炎において、*Str. faecalis* は *C. difficile* の毒素産生を促進することで、その腸炎発症に重要な役割りを果たしている可能性が考えられる。

従来より、腸内正常細菌叢が *C. difficile* の増殖を抑えていると考えられているが<sup>9)</sup>、Wilson ら<sup>31)</sup>は、このことをハムスターをモデルに使い証明を試みた。その中で、正常盲腸内容物を投与することで *C. difficile* による腸炎の発症がおさえられるが、この作用は嫌気性グラム陰性菌によるものではないかと述べている。クリンダマイシン投与によるハムスター腸炎で、*Bacteroides* が盲腸内において減少しており<sup>25)</sup>、この仮定は十分に考えられることである。

本研究の一部では、嫌気性菌のうち Bacteroidaceae に *C. difficile* の毒素産生を抑制する現象がみられ、今後、*C. difficile* の増殖及び毒素産生に及ぼす Bacteroidaceae の影響に関しても、さらに検討していく必要がある。

## 結 論

*C. difficile* の毒素産生に及ぼす一般腸内菌の影響を *Str. faecalis* を中心に 12 菌種 17 株について検討した。

① *C. difficile* の毒素産生は好気条件における *Str. faecalis* との透析培養において著しく促進された。

② *Str. faecalis* の培養上清にも *C. difficile* の毒素産生を促進させる作用が認められた。しかし、この作用は *C. difficile* の増殖を促進することによるものではなかった。

③ *Str. faecalis* 培養上清の分子量 10,000 以下の分画に *C. difficile* の毒素産生を促進する作用が認められた。

以上の結果より、*Str. faecalis* の培養上清中に *C. difficile* の毒素産生能を増強させる因子が存在し、透析性の低分子物質である可能性が示唆された。

## 謝 辞

稿を終るにあたり、御指導と御校閲を賜りました谷口昂教授、菌株分子ならびに御教示を賜りました西田尚紀教授、中村信一助教授、また、HeLa 細胞分与をうけた波多野基一教授に深謝いたします。さらに、終始御指導、御協力

をいただきました西田直巳先生ならびに金沢大学小児科学教室員各位に感謝致します。

## 文 献

- 1) Bartlett, J. G., Chang, T. W., Gurwith, M., Gorbach, S. L. & Onderdonk, A. B.: Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing Clostridia. N. Engl. J. Med., **298**, 531-534 (1978).
- 2) Bartlett, J. G., Moon, N., Chang, T. W., Taylor, N. & Onderdonk, A. B.: Role of Clostridium difficile in antibiotic-associated pseudomembranous colitis. Gastroenterology, **75**, 778-782 (1978).
- 3) George, W. L., Sutter, V. L., Goldstein, E. J. G., Ludwig, S. L. & Finegold, S. M.: Aetiology of antimicrobial-agent-associated colitis. Lancet, **1**, 802-803 (1978).
- 4) Larson, H. E., Price, A. B. & Honour, P.: Clostridium difficile and the aetiology of pseudomembranous colitis. Lancet, **1**, 1063-1066 (1978).
- 5) Bartlett, J. G.: Experimental studies of antibiotic associated colitis. Scand. J. Infect. Dis., Suppl. **22**, 11-15 (1980).
- 6) Cashore, W. J., Peter, G., Lauermann, M., Stonestreet, B. S. & Oh, W.: Clostridia colonization and clostridial toxin in neonatal necrotizing enterocolitis. J. Pediatr., **98**, 308-311 (1981).
- 7) Tytgat, F.: Fréquence d'isolement de Clostridium difficile dans les selles de Malades Hospitalisés. Am. Microbiol., **131B**, 11-12 (1980).
- 8) 三川正人: 成人からの Clostridium difficile の分離及び毒素原性並びに抗毒素抗体について. 十全医会誌, **90**, 21-28 (1981).
- 9) Fekety, R., Silva, J., Toshwal, R., Allo, M., Armstrong, J., Browne, R., Ebright, J. & Rifkin, G.: Antibiotic-associated colitis: Effects of antibiotics on Clostridium difficile and the disease in hamsters. Rev. Infect. Dis., **1**, 386-397 (1979).
- 10) Finegold, S. M., Harada, N. E. & Miller, L. G.: Lincomycin: Activity against anaerobes and effect on normal human fecal flora. p 659-667. In G. L. Hobby (ed.), Antimicrobial Agents and Chemotherapy-1965, Am. Soc. Microbiol., Michigan, 1966.
- 11) 伊藤雄太郎・松木 翠・植村定治郎: 清酒醸造菌類の混合培養に関する研究. 農化, **31**, 779-783 (1957).
- 12) 阿武喜美子・瀬野信子: 実験化学講座 (小竹編), 第3版, 422頁, 丸善, 東京, 1967.
- 13) 微生物学実験法 (柳田編), 第1版, 179-180頁, 講談社, 東京, 1975.
- 14) Black, S. H.: Enhanced growth of Bordetella pertussis in dialysis culture. Nature, **209**, 105-106 (1966).
- 15) Rolfe, R. D. & Finegold, S. M.: Purification and characterization of clostridium difficile toxin. Infect. Immun., **25**, 191-201 (1979).
- 16) 高島 学: Clostridium difficile の毒素産生とその毒素原性. 十全医会誌, **89**, 468-478 (1980).
- 17) 小山次郎: 化学実験法 (畑編), 第4版, 311頁, 東京化学同人, 東京, 1967.
- 18) Duncan, C. L., Strong, D. H. & Sebald, M.: Sporulation and enterotoxin production by mutants of Clostridium perfringens. J. Bacteriol., **110**, 378-391 (1972).
- 19) Bartlett, J. G., Onderdonk, A. B., Cisneros, R. L. & Kasper, D. L.: Clindamycin-associated colitis due to a toxin-producing species of Clostridium in hamsters. J. Infect. Dis., **136**, 701-705 (1967).
- 20) 小林とよ子・磯野美登利・渡辺邦友・上野一恵・桜井恒久・蜂須賀喜多男: 抗生剤投与中にみられた偽膜性腸炎と Clostridium difficile. 臨床検査, **24**, 553-557 (1980).
- 21) Yamagishi, T., Serikawa, T., Morita, R., Nakamura, S. & Nishida, S.: Persistent high number of Clostridium perfringens in the intestines of Japanese aged adults. Japan. J. Microbiol., **20**, 397-403 (1976).
- 22) Goudie, J. R.: The nature of a neutralizing substance for Clostridium welchii alpha-toxin in faeces. J. Pathol. Bacteriol., **78**, 17-28 (1959).
- 23) Duncan, C. L. & Strong, D. H.: Ileal loop fluid accumulation and production of diarrhea in rabbits by cell free products of Clostridium perfringens. J. Bacteriol., **100**, 86-94 (1969).
- 24) Rolfe, R. D., Helebian, S. & Finegold, S. M.: Bacterial interference between Clostridium difficile and normal fecal flora. J. Infect. Dis., **143**, 470-475 (1981).
- 25) Lusk, R. H., Fekety, R., Silva, J., Browne, R. A., Ringler, D. H. & Abrams, G. D.: Clindamycin-induced enterocolitis in hamsters. J. Infect. Dis., **137**, 464-475 (1978).
- 26) 老川忠雄: 化学療法と腸内細菌. 日本医師会雑

誌, 66, 1054-1064 (1971).

27) 中村英夫・木谷 洋・渡部礼二・西田直巳・高橋謙太郎・中島博徳: シクラシリンおよびアンピシリン経口投与による小児腸内細菌叢の変動. 小児科臨床, 30, 169-176 (1977).

28) 西田直巳・大井 仁・岩城 進・嶋大二郎・和田直樹・本家一也・渡部礼二・小泉晶一・谷口 昂: ST合剤投与時の小児腸内細菌叢の変動について. 治療, 62, 155-159 (1980).

29) Sutter, V. L. & Finegold, S. M.: The effect of antimicrobial agents on human faecal flora. Summer conference of the society for Appl. Bact., p

229-240, London Academic Press, 1974.

30) Lusk, R. H., Fekety, F. R. Jr., Silva, J. Jr., Bonderdorfer, T., Devine, B. J., Kawanishi, H., Korff, L., Nakauchi, D., Rogers, S. & Siskin, S. B.: Gastrointestinal side effect of Clindamycin and Ampicillin therapy. J. Infect. Dis., 135, S111-S119 (1977).

31) Wilson, K. H., Silua, J. & Fekety, F. R.: Suppression of *Clostridium difficile* by normal hamster cecal flora and prevention of antibiotic-associated cecitis. Infect. Immun., 34, 626-628 (1981).

**Enhanced Toxin Production of *Clostridium Difficile* by *Streptococcus Faecalis*** Kazuya Honke, Department of Pediatrics (Director: Prof. N. Taniguchi), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 - J. J. J. Med. Soc., 92, 712-720 (1983)

**Key words:** *Clostridium difficile*, Toxin production, *Streptococcus faecalis*, Intestinal bacteria.

#### Abstract

The present study was performed to examine the effects of intestinal bacteria on the toxin production of *Clostridium difficile*. The latter was cultivated in a brain heart infusion (BHI) broth with one of 12 intestinal bacteria, and separated by a semi-permeable membrane from one another. *C. difficile* was inoculated inside the tube, while each bacterium was outside. After 4 days of culture, toxin content in the culture supernatants of *C. difficile* was titrated by means of its cytopathic effect on cultured HeLa cells. Among 12 bacteria tested, only *Streptococcus faecalis* significantly enhanced the toxin production of *C. difficile*, which occurred in aerobic culture, not in anerobic states. When cultured in the mixed media of 60% fresh BHI and 40% supernatant from the 3-day culture of *S. faecalis*, it enhanced the toxin production of *C. difficile*. YM 10 (AMICON) ultrafiltrate (approximately < M.W. 10,000) of the 3-day culture supernatant of *S. faecalis* also enhanced the toxin production, but none of culture supernatants of the remaining intestinal bacteria did. The application of culture supernatant of *S. faecalis* to the culture media, however, seemed to inhibit the growth of *C. difficile*. These results suggest that the toxin production of *C. difficile* was augmented by dialyzable factors of low molecular weight which might be generated only in the culture media with *S. faecalis*.