

ヒト初乳中のC.difficile toxinに対する中和活性-1-初乳中の中和抗体

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/2297/8935

ヒト初乳中の *C. difficile* toxin に対する中和活性

〔I〕 初乳中の中和抗体

金沢大学小児科学教室 (主任: 谷口 昂教授)

和田 直 樹

(昭和56年 8月22日受付)

本論文の要旨は, 第83回日本小児科学会総会 (1979, 津) にて発表した

Key words Colostrum, Y1-adrenal cell, *C. difficile* toxin.

Bartlett ら¹⁾は, hamster の clindamycin による腸炎が *Clostridium difficile* の毒素により引き起こされると報告してから, 抗生剤による偽膜性腸炎や, 重症下痢症の一因子として, *C. difficile* の産出する毒素が関与していると言われるようになった²⁻⁸⁾. この毒素は易熱性⁹⁾で, 培養された HeLa^{3,10)}や FL 細胞^{6,8,9,11)}に対し細胞変性を引き起こし, ウサギ皮膚での血管透過性を高め^{9,10)}, De のテスト¹²⁾にて小腸内に液体貯留を引き起こすことが知られるようになった¹³⁾.

一方母乳哺育児に消化管感染症が少ないことは古くから知られた事実であり¹⁴⁻¹⁷⁾, そこには諸種の感染防禦因子が関与していると報告されている¹⁸⁻²⁰⁾. Cunningham²¹⁾の調査でも人工栄養児は母乳栄養児に比し, 全罹患率で約 2.9 倍, 入院を要した頻度で約 8.5 倍と高い値を示した. これらより, 母乳の優秀性が免疫学的に, 感染防禦的に大幅に解明されてきたのであるが, なかでも最近特に母乳中の分泌型 IgA (以下 S-IgA と略す) の役割に興味を持たれ, 諸家の実験より, その S-IgA が *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* 等の細菌毒素に中和能を保持することがわかってきた²²⁻²⁴⁾. そこで本研究は, 偽膜性腸炎患者に高率に検出される *C. difficile* の産生 toxin も母乳で中和されるか否かを検索し, IgA に関しても若干の考察をした.

対象および方法

1. 対象

母乳は分娩 3 日以内の抗生剤投与を受けていない健

康な母親からの初乳を使用した. 検体はすべて採取後 2 時間以内に処理した. すなわち, 室温で 500 x g, 10 分間遠心し, 沈澱した細胞成分, 中間の透明な液 (以後初乳分画と称する), 浮上した脂肪層の 3 層に分離し, 初乳分画を再度 12,000 x g, 20 分間遠心, 上清を -20°C に凍結保存した.

2. 毒素液の作製

偽膜性腸炎の患者より分離された *Clostridium difficile* (ATCC 17859) を金沢大学医学部微生物学教室より分与をうけ, 嫌気性下 (80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂), brain heart infusion broth (BBL Microbiology System, Cockeysville, Md) にて 48 時間培養した. 培養液を 4°C, 12,000 x g, 10 分間遠心し, その上清を径 0.45 μm の membrane filter (Millipore Corp., Bedford, Mass.) に通して菌体成分を除き毒素液とし, 4°C にて保存した.

3. 培養組織細胞での毒素活性の検定

Y1-adrenal, FL, HeLa 細胞は各々 HAM-F12 培地 (白水) に牛血清 (GIBCO) を 12.5%, 牛胎児血清 (GIBCO) を 2.5%, kanamycin (100 μg/ml), 0.08% に重曹を添加して継代培養した. これらの細胞を各々組織培養用プレート (Falcon Plastics) に subculture し 5% の炭酸ガス恒温器にて 18~24 時間培養, 単一層になったところで検定試験 (以後 assay と称する) に供した. 毒素液は pH 7.2, 0.15 Mol の燐酸緩衝生理食塩水 (以下 PBS と略す) にて倍々希釈し, Sack ら²⁵⁾ の行った方法を一部修正して毒素液の効果をみた. つ

Neutralizing Activity against *Clostridium Difficile* Toxin in Human Colostrum. (I) Neutralizing Antibody in Colostrum. Naoki Wada, Department of Pediatrics (Director: Prof. N. Taniguchi), School of Medicine, Kanazawa University.

まり各々12 μ l の毒素希釈液を microplate 上で均一層になった各々の組織培養細胞に接種し、5分後、培養細胞をPBSで洗浄、同じHAM-F12培地で5% CO₂下、18~24時間培養を続け、倒立顕微鏡でその形態変化を観察した。

4. 初乳中 IgA 濃度測定と抗ヒト初乳 IgA 血清

初乳分画中のIgA濃度はsingle radial immunodiffusion法(Tri-Partigen-IgA, Hoechst)で、2度の測定の平均値をとって決定した。抗ヒト初乳IgA家兎血清は、以前当教室の加藤²⁹⁾が作製したものを使用した。

5. 中和活性の測定

初乳分画の *C. difficile* toxin に対する中和活性は、Y1-adrenal cell assay にて測定した。つまり、各々25 μ l の初乳分画は、50%の細胞変性を引き起こす最大希釈濃度50% tissue culture infective dose (以下TCID₅₀と略す)の3倍の強度を持つ *C. difficile* toxin 12 μ l と37°C下、60分間 preincubation したあと均一層になっているY1-adrenal cell に5分間接触させた。この assay はくり返し2度施行し、50%細胞変性を阻止し得た時、その初乳検体を中和活性陽性とし(+)で表現した。一方変性阻止が出来なかった検体は、中和活性陰性とし(-)で表現した。中和活性陽性検体は、抗ヒト初乳IgA家兎血清と37°C、60分間前処理して同様の assay を行い、中和活性の消失があるか否かについて検索した。コントロールとしてはPBSを使用した。

成 績

1. *C. difficile* toxin の培養細胞反応試験

Y1-adrenal cell は *C. difficile* toxin に接触する

と、培養細胞の形態学的変化が生じた。毒素液との反応は4~6時間後より出現し、18~24時間後には最大となった。又 *E. coli* enterotoxin に接触した時の反応に類似し、48時間観察しても不可逆性のものであった。*C. difficile* toxin がFLやHeLa細胞に対し変性を引き起こすことが知られているので、Y1-adrenal cell とFLやHeLa細胞と比較検討した。その結果、*C. difficile* toxin に対する細胞反応、形態変化、変性効果を引き起こすまでの時間ともに、3者の培養細胞間には有意な変化はなかった(Table 1)。又、56°C、30分間加熱後の toxin は、これら3者の細胞に対する変性効果を失った。

2. 初乳の *C. difficile* toxin に対する中和活性

Y1-adrenal cell assay にての中和活性試験で、158検体中37例(23.4%)が中和活性を保持していた。初乳中のIgA濃度は、中和活性陽性検体では、26~1725 mg/dl に亘り、平均270 \pm 65.6 (standard error)、陰性検体では10~2010 mg/dl、平均266.5 \pm 32.5 mg/dl を示し、統計学的に陽性群と陰性群の間に有意な差は見られなかった(Fig 1)。又、陽性検体各々につき2倍希釈系列を作製し同様に assay してみた。細胞の50%変性を阻止する初乳の最大希釈倍数を中和活性1 unit とすると、1 unit の中和活性を示す初乳中のIgA濃度は2.3~862.5 mg/dl と分散しており、IgA濃度と中和活性の強度には相関性がなかった(Table 2)。さらに抗ヒト初乳IgA家兎血清と中和活性陽性初乳分画を、37°C、60分間 preincubation 後、同様の assay を行ったところ、全例において中和活性は消失した(Table 3)。

Table 1. Effect of *C. difficile* toxin on Y1-adrenal, HeLa, and FL cell lines.

Cell line ^a	Morphological change ^b										TCID ₅₀ ^c
	In toxin concn :										
	2 ⁰	2 ¹	2 ²	2 ⁴	2 ⁶	2 ⁸	2 ⁹	2 ¹⁰	2 ¹¹	In PBS	
Y1-adrenal	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	2 ⁸
HeLa	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	2 ⁹
FL	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	2 ⁸

^aCells were subcultured onto 96-well microplates. Monolayers were obtained by seeding 10⁴ cells per well in growth medium for 24 h of incubation at 37°C in a humidified environment of 5% CO₂ in air. Then, each 12 μ l sample was applied into these monolayer cells in the microplate.

^bTitration was carried by serial twofold dilutions in PBS. +, >50% cytopathic effect; -, <50% cytopathic effect.

^cCells were observed for morphological changes after 18 to 24 h of application of the toxin for 5 min. The titer was reciprocal and is expressed as *C. difficile* toxin in a final concentration of 1 TCID₅₀.

inverted microscope

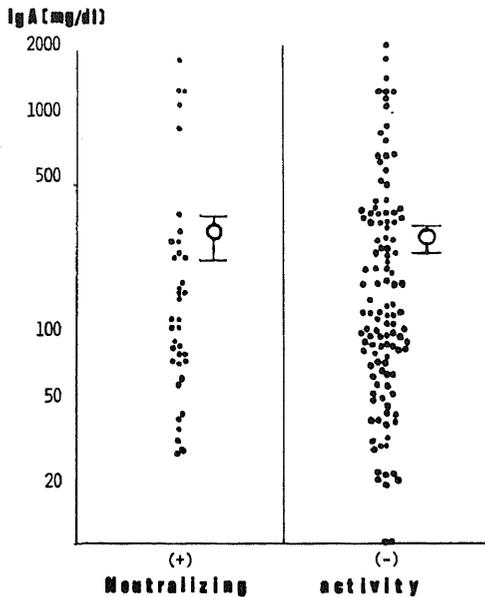


Fig. 1. IgA concentration and neutralizing activity against *C. difficile* toxin in colostrum. The samples which reduced the cytopathic effect of toxin on Y1-adrenal cells to less than 50% were considered to have neutralizing activity against the toxin. (+) represents neutralizing activity-positive samples, while (-) represents neutralizing activity-negative samples. \bar{O} indicates the geometric mean value and its standard error. The difference of IgA concentrations between two groups was statistically not significant, as evaluated by Student t test ($p > 0.5$).

考 察

1977年 Larsonら²⁷⁾は、偽膜性腸炎の疾患患者の便中に、培養組織細胞に対し cytopathic effect を示す toxin が存在すると報告した。翌年になって、この toxin は *C. difficile* の産出するものと判明し、本患者の原因としてとりたゞされるようになった¹⁻⁸⁾。*C. difficile* は毒素産生株と非産生株があり、成人よりも乳児の糞便から高率に分離される^{28,29)}。また新生児にも毒素産生性の *C. difficile* が存在するので壊死性腸炎の原因としても検討されている³⁰⁻³⁵⁾。

母乳哺育児が人工栄養児に比して極度に腸管系の感染症が少ないのは周知の事実である^{21,36)}。母乳、特に初乳中には数多くの細菌やウイルスに対する感染防禦因子が含まれており¹⁸⁻²⁰⁾、新生児は自らの能動免疫と初乳による受動免疫により感染から自己を守っている。

Table 2. Concentration of IgA in samples having neutralizing activity against *C. difficile* toxin.

Cases	Neutralizing activity unit ^a	Concentration of IgA (mg/dl)	Ratio. ^b
1	2 ⁰	69	69
2	2 ⁰	141	141
3	2 ¹	30	15
4	2 ¹	54	27
5	2 ¹	70	35
6	2 ¹	76	38
7	2 ¹	100	50
8	2 ¹	279	140
9	2 ¹	338	169
10	2 ¹	1253	627
11	2 ¹	1725	863
12	2 ²	38	10
13	2 ²	40	10
14	2 ²	58	15
15	2 ²	80	20
16	2 ²	80	20
17	2 ²	82	21
18	2 ²	100	25
19	2 ²	108	27
20	2 ²	136	34
21	2 ²	150	38
22	2 ²	212	53
23	2 ²	220	55
24	2 ²	249	62
25	2 ²	1248	312
26	2 ³	26	3
27	2 ³	34	4
28	2 ³	104	13
29	2 ³	146	18
30	2 ³	819	102
31	2 ³	1080	135
32	2 ⁴	80	5
33	2 ⁴	156	10
34	2 ⁵	76	2
35	2 ⁵	108	3
36	2 ⁵	203	6
37	2 ⁵	246	8

^aReciprocal of the highest twofold dilution of the colostrum specimen abolishing the cytopathic effect of *C. difficile* toxin.

^bConcentration of IgA in colostrum per Neutralizing activity unit.

母乳に含まれる抗細菌因子としては、分泌型IgA、Lactoferrin、Lactoperoxidase、補体、細胞成分、Lysozyme等がある。特にIgAは多量に存在し、その約80%が分泌型IgA、残りの20%が血清型IgAである。これらは分娩後数日間で急速に低下し、以後は一定の値をつづける³⁷⁾。しかし母乳の分泌量が高まるために、乳児が一日に摂取するIgAの総量としては、ほぼ

Table 3. Inhibition of neutralizing activity in colostrum against *C. difficile* toxin.

Preincubation with	Colostrum (25 μ l)	Anti-IgA antibody (25 μ l)	Rabbit serum (25 μ l)	PBS (25 μ l)
Colostrum (25 μ l)	-	+	-	-
Anti-IgA antibody (25 μ l)	+	+	+	+
Rabbit serum (25 μ l)	-	+	+	+
PBS (25 μ l)	-	+	+	+

The mixture of mutual combinations among an equal volume (25 μ l) of every positive colostrum, anti-IgA antibody, normal rabbit serum and PBS was preincubated for 60 min. at 37°C. Then, these mixtures further incubated with 12 μ l of *C. difficile* toxin (3 \times TCID₅₀) for 60 min. at 37°C were inoculated to Y1-adrenal cells in miniculture.

Rounding response of Y1-adrenal cells was determined 18 to 24 hr. after inoculation; +=>50% rounded cells, -=<50% rounded cells.

一定である。そして分泌型 IgA の腸管における局所免疫機序については、Walker ら³⁸⁾が antiseptic paint と表現しているように、腸管粘膜表面を被い、細菌が上皮細胞へ定着するのを妨げている。この研究では、抗生剤により引き起こされた偽膜性腸炎の患者より分離した *C. difficile* を培養し、その上清液を *C. difficile* toxin の一つのモデルとして使用した。この toxin は易熱性で FL や HeLa 細胞のような培養細胞に対し、形態学的変化を引き起こす。Table 1 で示したように Y1-adrenal cell もこの toxin と接触すると FL や HeLa 細胞と同様の形態学的変化を引き起こし、その反応時間や強度に関して、3 者の細胞間にはほとんど差異がなかった。そこで初乳の *C. difficile* toxin に対する中和活性の検定は、*C. difficile* toxin が引き起こす Y1-adrenal cell の形態学的変化を、初乳分画が阻止し得るかどうかで判定した。本研究においては、23.4% に母乳中の中和活性を見出したが、このことは日本人産婦の約 1/4 は、分娩以前に *C. difficile* toxin 又は、それと共通抗原性のある蛋白に強度の差こそあれ感作されていると推定できる。中村ら³⁹⁾は、健康産婦の初乳より IgA を抽出し、その IgA にて毒素原性大腸菌 (H10407) の毒素を中和できると Y1-adrenal cell assay にて見出し、Stoliar ら²⁰⁾も同様の結果を得た。そこで著者は、初乳の *C. difficile* toxin に対する中和活性の中心が IgA に依存すると推定し、抗ヒト初乳 IgA 血清で初乳分画を前処置し同様に検索すると、その保有していた中和活性は完全に失活した。158 例中の初乳中 IgA 濃度は、最低 10~最高 2010 mg/dl と分散しており、1 unit の中和活性を示す濃度は、2.3~862.5 mg/dl とかなりのばらつきを示した。これらの結果より、IgA 濃度と中和活性の強度間には、有意な相関性がなかった。

さて新生児の壊死性腸炎の終末段階に Clostridia が関与しているとの報告がある³⁰⁻³⁵⁾。虚血、ガス、enterotoxin による coagulation, necrosis, 動物実験による事実、これらすべてが壊死性腸炎に対する Clostridia の関与を示唆するものである。それ故、母乳栄養児の壊死性腸炎が、軽症ですむ一つの要因として、初乳中の *C. difficile* toxin に対する中和活性の存在が、大いに役立っていると思われる。

結 論

ヒト健康産婦の分娩後 3 日以内の初乳を使用して、Y1-adrenal cell assay にて Clostridium difficile toxin に対する中和抗体活性を検索し、次の結果を得た。

1. 初乳検体 158 例中 37 例 (23.4%) に、中和活性を認めた。このことより日本人産婦の約 4 人に 1 人は、分娩以前に *C. difficile* toxin 又は、それと共通抗原性のある蛋白に感作されていると推定できた。

2. Y1-adrenal cell は、FL や HeLa 細胞と同様に *C. difficile* toxin に対し cytopathic effect を引き起こし、その反応時間や形態学的変化、及び反応強度に差がなかったため、*C. difficile* toxin の検出には十分使用できると考えられる。

3. 中和活性陽性検体は、その中和活性を抗ヒト初乳 IgA 家兎血清にてすべて失活された。これは、初乳中の中和活性の大部分は、IgA によっていることを示唆した。

4. 中和活性陽性検体の IgA 濃度は 26~1725 mg/dl に亘り、平均 270.1 \pm 65.6 S.E. 陰性検体では、10~2010 mg/dl、平均 266.5 \pm 32.5 mg/dl を示した。又、1 unit の中和活性を示す IgA 濃度は 2.3~862.5 mg/dl とかなりのばらつきを示した。これらより、中和活性の強度と IgA 濃度には有意な差がないことがわ

かった。

この成績は *C. difficile* toxin が関与する下痢症に対し、初乳の多大な貢献を意味し、母乳哺育児の胃腸管系の疾患が、人工栄養児より少ない一つの要素になっていると思えた。

文 献

- 1) 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 (1977).
- 2) George, R.H., Symonds, J.M., Dimock, F., Brown, J.D., Arabi, Y., Shinagawa, N., Keighley, M.R.B., Williams, J.A. & Burdon, D.W.: Identification of *Clostridium difficile* as a cause of pseudomembranous colitis. *Br.Med.J.*, **1**, 695 (1978).
- 3) Larson, H.E., Price, A.B. & Honour, P.: *Clostridium difficile* and the etiology of pseudomembranous colitis. *Lancet*, **1**, 1063 - 1066 (1978).
- 4) Totten, M.A., Gregg, J.A., Smith, P.F. & Legg, M.: Clinical and pathological spectrum of antibiotic-associated colitis. *Am.J.Gastroentrol.*, **69**, 311 - 319 (1978).
- 5) Chang, T.W., Bartlett, J.G., Gorbach, S.L. & Onderdonk, A.B.: Clindamycin-induced enterocolitis in hamsters as a model of pseudomembranous colitis in patients. *Infect.Immun.*, **20**, 526 - 529 (1978).
- 6) 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).
- 7) La Mont, J.T., Sonnenblick, E.B. & Rothman, S.: Role of clostridial toxin in the pathogenesis of clindamycin colitis in rabbits. *Gastroenterology*, **76**, 356 - 361 (1971).
- 8) George, W.L., Sutter, V.L. & Finegold, S.M.: Toxigenicity and antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile*, a cause of antimicrobial agent-associated colitis. *Curr.Microbiol.*, **1**, 55 - 58 (1978).
- 9) Rolfe, R.D. & Finegold, S.M.: Purification and characterization of *Clostridium difficile* toxin. *Infect.Immun.*, **25**, 191 - 201 (1979).
- 10) Rifkin, G.D., Fekety, R. & Silva, J., Jr.: Neutralization by *Clostridium sordellii* antitoxin of toxins implicated in clindamycin induced cecitis in the hamster. *Gastroenterology*, **75**, 422 - 424 (1978).
- 11) Chang, T.W., Lin, P.S., Gorbach, S.L. & Bartlett, J.G.: Ultrastructural changes of cultured human amnion cells by *Clostridium difficile* toxin. *Infect.Immun.*, **23**, 795 - 798 (1979).
- 12) De, S.N., Bhattacharya, K. & Sarkar, J.K.: A study of the pathogenicity of strains of bacterium coli from acute and chronic enteritis. *J.Path.Bact.*, **71**, 201 - 209 (1956).
- 13) Ueno, K., Watanabe, K. & Kobayashi, T.: The role of *Clostridium difficile* in antibiotic-associated pseudomembranous colitis. *Modern Media*, **25**, 24 - 36 (1979).
- 14) Royer, P.: Breast feeding and biological development. *Acta Pediat.Scand.*, **67**, 554 - 556 (1978).
- 15) Hambraeus, L.: Proprietary milk versus human breast milk in infant feeding. A critical appraisal from the nutritional point of view. *Pediat.Clin.North Am.*, **24**, 17 - 36 (1977).
- 16) Jelliffe, D.B. & Jelliffe, E.F.P.: Human milk, Nutrition, and the world resource crisis. : *Science*, **188**, 557 - 561 (1975).
- 17) Taylor, B.: Breast versus bottle feeding. *NZ. Med.J.*, **85**, 235 - 238 (1977).
- 18) Chandra, R.K.: Immunological aspects of human milk. *Neurt.Rev.*, **36**, 265 - 272 (1978).
- 19) Goldman, A.S. & Smith, C.W.: Host resistance factors in human milk. *J.Pediat.*, **82**, 1082 - 1090 (1973).
- 20) Welsh, J.K. & May, J.T.: Anti-infective properties of breast milk. *J.Pediat.*, **94**, 1 - 9 (1979).
- 21) Cunningham, A.S.: Morbidity in breast-fed and artificially fed infants. *J.Pediat.*, **90**, 726 - 729 (1977).
- 22) Stoliar, O.A., Pelley, R.P., Green, E.K., Klaus, M.H. & Carpenter, C.C.J.: Secretory IgA against enterotoxins in breast milk. *Lancet*, **12**, 1258 - 1261 (1976).
- 23) Simhon, A., Yolken, R.H. & Mata, L.: S-IgA cholera toxin and Rota virus antibody in human milk. *Acta Pediat.Scand.*, **68**, 161 - 164 (1979).
- 24) Arnold, R.P., Mestecky, J. & Mcghee, J.R.: Naturally occurring secretory immunoglobulin A antibodies to *Streptococcus mutans* in human colostrum and saliva. *Infect.Immun.*, **14**, 355 - 362

- (1976).
- 25) **Sach, D.A. & Sach, R.B.**: Test for enterotoxigenic *Escherichia coli* using Y1-adrenal cells in miniculture. *Infect. Immun.*, **11**, 334 - 336 (1975).
- 26) 加藤彰一: 分泌型 γ A 免疫グロブリンに関する研究, 第1編: 初乳 γ A 免疫グロブリンの性状. *日児誌*, **74**, 459 - 472 (1970).
- 27) **Larson, H.E., Parry, J.V., Price, A.B., Davies, D.R., Dolby, J. & Tyrrell, D.A.J.**: Undescribed toxin in pseudomembranous colitis. *Br. Med. J.*, **1**, 1246 - 1248 (1977).
- 28) **Hall, I.C. & O'toole, E.**: Intestinal flora in newborn infants. *Am. J. Dis. Child.*, **49**, 390 - 402 (1935).
- 29) **Rietra, P.J.G.M., Slaterus, K.W., Zanen, H.C. & Meuwissen, S.G.M.**: Clostridial toxin in faces of healthy infants. *Lancet*, **2**, 319 (1978).
- 30) **Kliegman, R.M.**: Neonatal necrotizing enterocolitis. Implications for an infectious disease. *Pediat. Clin. North Am.*, **26**, 327 - 344 (1979).
- 31) **Bradley, J.M., Szawatkowski, M., Noone, P., Howard, F.M. & Flynn, D.M.**: Clostridia in necrotising enterocolitis. *Lancet*, **18**, 389 - 390 (1978).
- 32) **Kosloske, A.M., Ulrich, J.A. & Hoffman, H.**: Fulminant necrotizing enterocolitis associated with clostridia. *Lancet*, **11**, 1014 - 1016 (1978).
- 33) **Stoll, B.J., Nahmias, A.J., Wickliffe, C., Brann, A.W., Jr., Dowell, V.R., Jr. & Whaley, D. N.**: Bacterial toxin and neonatal necrotizing enterocolitis. *J. Pediat.*, **96**, 114 - 115 (1980).
- 34) **Kliegman, R.M., Fanaroff, A.A., Izant, R. & Speck, W.T.**: Clostridia as pathogens in neonatal necrotizing enterocolitis. *J. Pediat.*, **95**, 287 - 289 (1979).
- 35) **Cashore, W.J., Peter, G., Lauermann, M., Stonestreet, B.S. & Oh, W.**: Clostridia colonization and clostridial toxin in neonatal necrotizing enterocolitis. *J. Pediat.*, **98**, 308 - 311 (1981).
- 36) **Larsen, S.A., Jr. & Homer, S.R.**: Relation of breast versus bottle feeding to hospitalization for gastroenteritis in a middle-class U.S. population. *J. Pediat.*, **3**, 417 - 418 (1978).
- 37) **Ogra, S.S. & Ogra, P.L.**: Immunologic aspects of human colostrum and milk. I: Distribution characteristics and concentrations of immunoglobulins at different times after the onset of lactation. *J. Pediat.*, **92**, 546 - 549 (1978).
- 38) **Walker, W.A. & Hong, R.**: Immunology of the gastrointestinal tract. *J. Pediat.*, **83**, 517 - 530 (1973).
- 39) 中村英夫, 木谷 洋, 和田直樹, 渡部礼二, 西田直己, 高橋謙太郎: 初乳 IgA の大腸菌 Enterotoxin に対する中和抗体活性. *日児誌*, **82**, 836 (1978).

Neutralizing Activity against Clostridium Difficile Toxin in Human Colostrum (I) Neutralizing Antibody in Colostrum Naoki Wada, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 - J. Jusen Med. Soc., 90, 696-702 (1981)

Key words: Colostrum, Y1-adrenal cell, *C. difficile* toxin

Abstract

Human colostrum specimens were obtained from 158 Japanese postpartum women within the first 3 days of delivery. All samples of colostrum were defatted by centrifugation to use in the neutralizing assay for *C. difficile* toxin. The neutralizing activity of colostrum against *C. difficile* toxin was evaluated with Y1-adrenal cells in miniculture.

The results obtained were as follows;

1. The Y1-adrenal cell line was as sensitive to *C. difficile* toxin as FL or HeLa cell line, exhibiting similar morphological change and time course of cytopathic effect.
2. The cytopathic effect of *C. difficile* toxin on Y1-adrenal cells was significantly attenuated when the toxin was preincubated with colostrum; 37(23.4%) of 158 colostrum samples were test-positive.
3. The neutralizing activity of colostrum samples was lost when the samples were preincubated with anti-human colostrum IgA.
4. The concentration of IgA in the 37 test-positive colostrum samples ranged from 25 to 1725 mg/dl (average; 270 ± 65.6 standard error), while from 10 to 2010 mg/dl (average; 266.5 ± 32.5 mg/dl) in the remaining test-negative samples. The IgA concentration in one unit of neutralizing activity ranged from 2.3 to 862.5 mg/dl. These results suggest that the concentration of IgA in the colostrum is not parallel to the neutralizing activity of the colostrum against *C. difficile* toxin.