

Purification and Properties of Intracellular Toxin A of Clostridium difficile

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8459

正 誤 表

金沢大学十全医学会雑誌 第102巻 第4号 536-543 (1993)

冠循環における血管作用性小腸ペプチドと
アセチルコリンの相互作用

— 摘出血管標本による検討 —

金沢大学医学部内科学第二講座（主任：竹田亮祐教授）

新 井 芳 行

	誤	正
536ページ	和文抄録 6行目 …を行った。雑種成熟イヌ <u>両性</u> 14頭、…	…を行った。雑種成熟イヌ <u>雄および雌</u> 14頭、…
537ページ	左段下から3行目 …の成熟イヌ <u>両性</u> (n=14) を用	…の成熟イヌ <u>雄および雌</u> (n=14) を用
540ページ	左段11行目 …がグアノシン三 <u>磷酸</u> 結合蛋白質 右段8行目 …される。今回の著書の実験では、	…がグアノシン三 <u>リン酸</u> 結合蛋白質 …される。今回の著書の実験では、

金沢大学十全医学会雑誌 第102巻 第4号 506-513 (1993)

Clostridium difficile 菌体内トキシンAの精製とその性状

金沢大学医学部微生物学講座（主任：中村信一教授）

孟 筱 琦

	誤	正
513ページ	英文抄録タイトル部分 2行目 … -J. Juzen Med Soc., <u>102, 00-00</u> (1993)	… -J. Juzen Med Soc., <u>102, 506-513</u> (1993)

Clostridium difficile 菌体内トキシンAの精製とその性状

金沢大学医学部微生物学講座 (主任: 中村信一教授)

孟 筱 琦

Clostridium difficile (*C. difficile*) VPI 10463 株を用い、菌体内トキシンAを、サイログロブリン アフィニティークロマトグラフィー、2回のモノ Q-高速タンパク液体クロマトグラフィー (Mono Q-fast protein liquid chromatography, Mono Q-FPLC) により高度精製した。変法ブレイン ハート インフュージョン培養菌液から得られた菌体の超音波処理上清液を出発材料とした。上記上清液中のトキシンA (菌体内トキシンA) は、4℃でサイログロブリン カラムに結合し37℃で溶出された。赤血球凝集 (hemagglutination, HA) 活性は素通り画分では高かったが (2°赤血球凝集単位 (HA unit, HAU)/50μl)、37℃で溶出された菌体内トキシンA画分では低かった (2°HAU/50μl)。しかし、温度溶出画分を透析することにより HA 活性は 2°HAU/50μl に上昇した。1回目の Mono Q-FPLC において、緩やかな NaCl 濃度勾配 (0-0.4M) で溶出を行い、菌体内トキシンAと HA 活性物質を分離した。更に2回目の Mono Q-FPLC を行い、HA 活性を有しない菌体内トキシンAの高純度精製標品を得た。精製菌体内トキシンAの分子量は、未変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動では 580kDa であり、また、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動上の主バンドは 240kDa であった。精製菌体内トキシンAの細胞毒性、マウス致死毒性およびウサギ結紮腸管液体貯留活性における最小有効量はそれぞれ 0.83ng, 8.7ng, 5μg であった。HA 活性は 1.5μg の毒素を用いても検出されなかった。精製菌体内トキシンAと菌体外トキシンAは、ゲル内沈降反応において抗菌体内トキシンA血清および抗菌体外トキシンA血清と反応し、融合する一本の沈降線を形成した。抗菌体内トキシンA血清および抗菌体外トキシンA血清は共に、菌体内トキシンAおよび菌体外トキシンAの細胞毒性、マウス致死毒性、結紮腸管液体貯留活性を同程度の力価で中和した。また、両血清は菌体外トキシンAの HA 活性を同程度に中和した。以上の結果は、トキシンAは HA 活性陰性の形で菌体内で産生され、菌体外へ放出される時、あるいは培養液中で HA 活性が活性化される可能性を示唆している。

Key words *Clostridium difficile*, toxin A, intracellular toxin A, purification, hemagglutination

Clostridium difficile (*C. difficile*) は偽膜性大腸炎および一部の抗生物質随伴性下痢症の原因菌である¹¹⁻⁵⁾。本菌はトキシンAおよびトキシンBの2種類の毒素を産生する⁶⁾⁻⁹⁾。このうち腸管毒性を有するトキシンAが上記疾病発症の際の最も重要な病原因子であると考えられている¹⁰⁾。

トキシンAの分子量は未変性状態で 400-600kDa、変性状態で 200-250kDa であることが報告されている^{6)-9), 11), 12)}。また、トキシンAは腸管毒性の他に、細胞毒性、マウス致死毒性、赤血球凝集 (hemagglutination, HA) 活性、血管透過性亢進活性などの生物学的活性をもつことが知られている⁶⁾⁻¹²⁾。これらの知見は全て、培養液中に放出されたトキシンA (菌体外トキシンA) を対象にして得られたものであり、これまで菌体内に存在するトキシンA (菌体内トキシンA) に関する研究は行われていない。従って、菌体外トキシンAと菌体内トキシンAの間に分子構成上の相異があるのか、また菌体内トキシンAは上述の活性に関して活性型の状態で存在するのかなど不明のままである。

菌体外トキシンAは HA 活性を有するが、近年培養濾液中に

HA 活性をもたない変異型トキシンAも存在することが示唆されている¹³⁾。このことは菌体内トキシンAにおいては、少なくとも HA 活性に関しては不活性型で存在する可能性を示している。

上記諸点を明かにすべく、本研究では菌体内トキシンAを精製し、その性状を検討した。

材料および方法

I. 使用菌株と培養

C. difficile VPI 10463 株を使用した。毒素産生用培地としてブレイン ハート インフュージョン (brain heart infusion, BHI) (Becton Dickinson Microbiology System, Cockeysville, Md., USA) に Na₂HPO₄ を 0.2% の割合に添加した培地 (modified BHI, m-BHI)^{14), 15)}を用いた。肝片加肝ブイオンで18時間培養した菌液 1ml を 1,000ml の m-BHI (計 4 本使用) に植菌後、嫌気ジャーに入れ、37℃にて2日間嫌気培養した。

II. 菌体内粗抽出液の作製

培養菌液 (4,000ml) を 7,000xg, 20分間遠心し、沈渣 (菌体)

平成5年6月22日受付, 平成5年7月6日受理

Abbreviations: A₂₈₀, absorbance at 280 nm; *C. difficile*, *Clostridium difficile*; CU, cytotoxic unit; CU₅₀, median cytotoxic unit; EC-5, Eagle's minimal essential medium supplemented with 5% fetal calf serum; fr, fraction number; Gal, galactose; GlcNAc, N-acetylglucosamine; HA, hemagglutination; HAU, HA unit; LD₅₀, median lethal dose; m-BHI, modified brain heart infusion; MLD, minimal lethal dose; Mono Q-FPLC, Mono

を 0.05M Tris-HCl 緩衝生理食塩水 (pH7.0) (Tris-HCl-buffered saline, TBS) にて 2 回洗浄遠心後, TBS 60ml に懸濁した。菌懸濁液を超音波発生装置 UR-200P (トミー精工, 東京) にて 20kc, 180W の条件下で 7.5 分 (1.5 分, 5 回) 処理することにより菌体を破砕した。菌体破砕液は 12,000xg, 30 分間遠心し, 上清液をメンブランフィルター マイレクス-GV (孔径 0.22 μ m) (日本ミリポア, 米沢) で濾過し菌体内粗抽出液とした。

Ⅲ. サイログロブリン アフィニティー クロマトグラフィー (thyroglobulin affinity chromatography, TGAC)

Krivan ら¹⁴ の方法によった。ウシ サイログロブリン (thyroglobulin, TG) (Sigma, St. Louis, Mo., USA) 溶液 (5mg/ml) 50ml とアフィゲル 15 (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Ca., USA) 10ml を 4℃ で一夜反応させた後, 1×10cm のカラムに充填した (TG カラム)。TBS にて洗浄・平衡化した TG カラムに 4℃ にて試料 (60ml) を添加後, 30ml の TBS でカラムを洗浄した。次いで TG カラムを 37℃ へ移し, TBS で吸着タンパクを溶出した (温度溶出)。溶出液は 5ml ずつ分取し, 280nm における吸収 (absorbance at 280 nm, A_{280}), 細胞毒性および HA 活性を測定した。 A_{280} はバイオミニ紫外吸収モニター AC-5100 (アトー, 東京) により測定した。

Ⅳ. モノ Q-高速タンパク液体クロマトグラフィー (Mono Q-fast protein liquid chromatography, Mono Q-FPLC)

Mono Q-FPLC は高速タンパク液体クロマトグラフ (fast protein liquid chromatograph) (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden) に装着したモノ Q HR5/5 (Mono Q HR 5/5, Mono Q) カラム (Pharmacia LKB Biotechnology) を用いて行った。試料をメンブランフィルター マイレクス-GV にて濾過し, カラムに添加した。0.02M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) でカラムを洗浄後, 0-0.4 M NaCl の直線濃度勾配法 (流速 0.5ml/min) により溶出を行った。溶出液は 0.5ml ずつ分取し, A_{280} , 細胞毒性および HA 活性を測定した。

Ⅴ. 菌体外トキシン A の精製

菌体外トキシン A の精製は, Kamiya ら¹² の方法に従い, 透析培養菌液を出発材料とし, TGAC, Q セフアロース FF (Pharmacia LKB Biotechnology)-FPLC, Mono Q-FPLC により精製した。

Ⅵ. タンパク定量

Bio-Rad タンパク アッセイ キット (Bio-Rad Laboratories) を用いて, タンパク定量を行った。標準タンパクとしてウシ血清アルブミン (和光純薬, 大阪) を用いた。

Ⅶ. ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)

未変性 PAGE, ドデシル硫酸ナトリウム-PAGE (sodium dodecyl sulfate-PAGE, SDS-PAGE) は Kamiya ら¹² の方法により行った。未変性 PAGE には 4-15% グラジエントゲルを用い, 試料を 8mA で 30 分間泳動後, 125V, 18 時間泳動した。分子量マーカーは HMW キット E (Pharmacia LKB Biotechnology) を用いた。SDS-PAGE には 5% ゲルを用いた。試料の選

元は等量の 10% β -メルカプトエタノール溶液を添加後, 3 分間煮沸することにより行った。試料を 15mA で 30 分間泳動後, 30mA, 2.5 時間泳動した。分子量マーカーは SDS-PAGE スタンダード High (Bio-Rad Laboratories) を用いた。泳動後, ゲルはシルバー ステイン キット (Bio-Rad Laboratories) にて銀染色を行った。なお電気泳動にはラビタス・二連スラブ電気泳動装置 AE-6220 型 (アトー) を用いた。

Ⅷ. 生物活性測定

1. 細胞毒性

Nakamura ら¹⁶ の方法に従い, BHK-21/WI-2 細胞を用いて細胞毒性を測定した。培養液として 5% (v/v) ウシ胎児血清 (大日本製薬, 大阪) 加イーグル最小必須培地 (日水, 東京) (Eagle's minimal essential medium supplemented with 5% fetal calf serum, EC-5) を用いた。EC-5 を用い, 細胞数が 2×10^5 個/ml になる様調製した BHK-21/WI-2 細胞浮遊液を 96 穴マイクロプレート ファルコン 3075 (Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, N.J., USA) の各穴に 100 μ l 分注し, 5% 炭酸ガス存在下で 37℃ にて培養した。24 時間培養後, EC-5 で 2 倍段階希釈した試料 50 μ l を各穴に加え, 更に 48 時間培養した。穴中の全ての細胞を円形化させる試料の最高希釈倍数の逆数を細胞毒性単位 (cytotoxic unit, CU)/50 μ l とした。細胞毒性の 50% 有効量 (median cytotoxic unit, CU_{50}) は, 同一試料の希釈系列の細胞毒性を 6 回測定し, Kärber の式¹⁷ により計算して求めた。

2. HA 活性

Krivan ら¹⁸ の方法に準じ HA 活性を測定した。ウサギ赤血球を 0.1 M NaCl 加 0.05 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.2) により 3 回洗浄遠心後, 1.5% (v/v) 赤血球浮遊液を調製した。試料 50 μ l を 96 穴マイクロプレート グライナー 650101 (C. A. Greiner und Sohne, Nürtingen, Germany) にて上記緩衝液で 2 倍段階希釈した後, 各穴に赤血球浮遊液 50 μ l を加え, 4℃, 3 時間反応させた。完全凝集像を示した試料の最高希釈倍数の逆数を HA 単位 (HA unit, HAU)/50 μ l とした。

3. マウス致死毒性

ddy 系マウス (オス, 体重 18-20g) (日本エスエルシー, 静岡) の腹腔内に 0.015 M リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) で 2 倍段階希釈した試料を 0.5ml 注射し, 3 日後の生死を観察し, 最小致死量 (minimal lethal dose, MLD) あるいは 50% 致死量 (median lethal dose, LD_{50})/ml を求めた。 LD_{50} 測定の際には一群 6 匹のマウスを使用した。

4. 腸管毒性

De ら¹⁹ の方法に準じ, ウサギ ループテスト (結紮腸管試験) を行った。体重 2.5-3.0kg の日本白色在来種ウサギ (北陸実験動物, 金沢) を 24 時間絶食させた後, チオペンタール麻酔下で開腹し, 小腸回首部より小腸を約 50cm 上行した部位から順に約 10cm の長さに腸管を結紮し, 一羽当り 5-8 個の結紮腸管を作製した。各結紮腸管内に試料 1.0ml ずつを注入した後, 開腹部を縫合した。試料注入 16 時間後にウサギを屠殺し, 結紮腸管内の貯留液量 (ml) を測定した。貯留液量を結紮腸管の長さ (cm) で除した値が 1.0 以上を示す場合をループテスト陽性とした。

Q-fast protein liquid chromatography; ND, not detected; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; PBS, phosphate-buffered saline; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-PAGE; TBS, Tris-HCl-buffered saline; TG, thyroglobulin; TGAC, thyroglobulin affinity chromatography

K. 抗血清の作製と精製

タンパク濃度 20–40 μ g/ml の精製トキシン A に、終濃度 0.4% となるようにホルマリンを添加し、37 $^{\circ}$ C にて 48 時間保温しトキソイドを作製した。トキソイド 0.5ml と等量のフロイント完全アジュバント (Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA) の乳濁液を 1 週間間隔で 3 回ウサギの大腿筋肉内に注射し、更にその 1 週間後より、トキソイド 0.5ml と等量のフロイント不完全アジュバント (Difco Laboratories) の乳濁液を 1 週間間隔で 4 回注射した。最終注射 1 週間後に採血し抗血清を得た。抗血清は、アフィゲル プロテイン A MAPSII キット (Bio-Rad Laboratories) により IgG 抗体を分取し毒素中和試験に用いた。

X. ゲル内沈降反応

PBS にて作製した 1.5% アガロース (ナカライテスク, 京都) 溶液 2ml を 76 \times 26mm のスライドガラス上に注ぎ、固化した後に、直径 4mm の孔を 3–4mm 間隔で作し、抗原 (40 μ g/ml) 25 μ l あるいは抗血清 25 μ l を注入した。湿箱に入れて 37 $^{\circ}$ C, 48 時間静置後ターマシーブルー R-250 (ナカライテスク) で染色した。

XI. 毒素中和試験

1. 細胞毒性中和試験

8 CU を示すトキシン A 溶液 50 μ l と、EC-5 培地により 2 倍段階希釈した抗血清 50 μ l とを混合し室温で 30 分間静置後、混合液 50 μ l の残存細胞毒性の有無を調べた。抗血清の中和力価は 4CU を完全に中和した抗血清の最大希釈倍数とした。

2. HA 活性中和試験

8HAU を示すトキシン A 溶液 25 μ l と、TBS により 2 倍段階希釈した抗血清 25 μ l とを混合し室温で 30 分間静置後、混合液 50 μ l の残存 HA 活性の有無を調べた。抗血清の中和力価は 8HAU を完全に中和した抗血清の最大希釈倍数とした。

3. マウス致死毒性中和試験

16MLD/ml のトキシン A 溶液 0.75ml と、PBS により 2 倍段階希釈した抗血清 0.75ml とを混合し室温で 30 分間静置後、混合液 0.5ml の残存マウス致死毒性の有無を調べた。一群 2 匹のマウスを使用した。抗血清の中和力価は 4MLD を完全に中和した抗血清の最大希釈倍数とした。

4. 腸管毒性中和試験

20 μ g/ml のトキシン A 溶液 0.75ml と、PBS により 2 倍段階希釈した抗血清 0.75ml とを混合し室温で 30 分間静置後、混合液 1ml のループテストにおける残存活性の有無を調べた。抗血清の中和力価はトキシン A 10 μ g を完全に中和した抗血清の最大希釈倍数とした。

成 績

1. 菌体内トキシン A の精製

1. TGAC

菌体内粗抽出液 60ml を用い TGAC を行った (図 1)。TG カラムを素通りした画分であるフラクション番号 (fraction number, fr) 2–13 には高い A_{280} 値 (>1.0), 細胞毒性 (2^{15} CU/50 μ l) および HA 活性 (2^9 HAU/50 μ l) が検出された。温度溶出された最初の fr19 には 2^{11} CU/50 μ l の細胞毒性が検出されたが、HA 活性は 2^9 HAU/50 μ l と著しく低かった。Fr 19–22 は温度溶出画分として Mono Q-FPLC に供するため、0.02M Tris-HCl 緩衝液 (pH7.5) にて透析脱塩した。透析後、HA 活性は 2^9 HAU/50 μ l に上昇した。

2. Mono Q-FPLC

透析した TGAC 温度溶出画分 (21ml) を Mono Q カラムに添加し、0–0.4M NaCl の直線濃度勾配法で溶出を行った (図 2)。0.24–0.26M NaCl で溶出された A_{280} のピーク (fr30–32) に一致して細胞毒性のピーク (2^{10} – 2^{12} CU/50 μ l) が検出されたが、HA 活性は検出されなかった。一方、HA 活性のピーク (2^9 HAU/50 μ l) は 0.28M NaCl で溶出された fr35 にあり、細胞毒性のピークと HA 活性のピークの解離が認められた。また、0.30–0.31M NaCl で溶出された fr37–39 には比較的高い細胞毒性 (2^6 CU/50 μ l) と HA 活性 (2^3 HAU/50 μ l) が検出された。そ

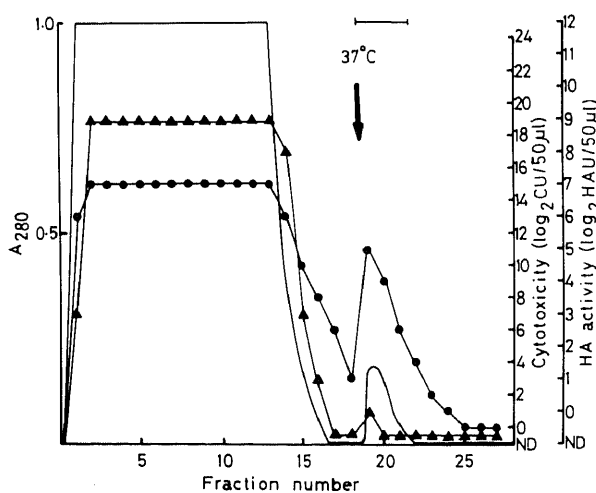


Fig. 1. Thyroglobulin affinity chromatography (TGAC) of a cell extract of *C. difficile* VPI 10463. The cell extract (60 ml) was applied to the affinity column at 4 $^{\circ}$ C and thermal elution at 37 $^{\circ}$ C was performed as indicated (arrowed). Five ml-fractions were collected. —, A_{280} ; ●, cytotoxicity; ▲, HA activity; ND, not detected; —|—, fractions (fr 19–22) applied to first Mono Q-fast protein liquid chromatography (Mono Q-FPLC).

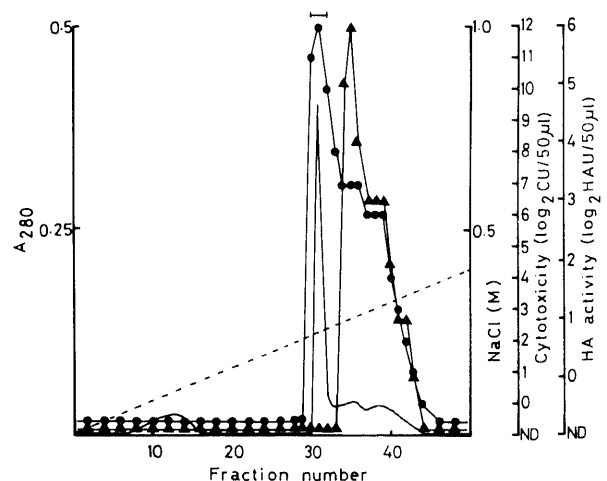


Fig. 2. First Mono Q-FPLC profile of the thermal eluates (fr 19–22) from TGAC. Each 0.5ml was collected. —, A_{280} ; ·····, molar concentration of NaCl; ●, cytotoxicity; ▲, HA activity; ND, not detected; —|—, fractions (fr 30–32) applied to second Mono Q-FPLC.

の後両活性は共に次第に低下し、fr44 以後の画分にはいずれの活性も検出されなかった。

Fr30-32 を 0.02M Tris-HCl 緩衝液 (pH7.5) で透析後、再度 Mono Q-FPLC に供した。

2 回目 Mono Q-FPLC では、単一の A₂₈₀ のピークが 0.24-0.26M NaCl で溶出され (fr30-32)、それに一致して細胞毒性のピーク (2°-2¹²CU/50μl) が検出された (図 3)。HA 活性はいずれの画分においても検出されなかった。Fr30-32 を菌体内トキシンAの最終精製標品とした。

なお、TG 素通り画分の細胞毒性および HA 活性を上述の Mono Q-FPLC で分析したところ、細胞毒性はトキシンA溶出位置 (0.24-0.26M NaCl) には検出されず、トキシンBの溶出位置である 0.46-0.64M NaCl の画分に検出された。また、HA 活性はトキシンA溶出位置より速く、細胞毒性が検出されない画分に溶出された。

3. 精製菌体内トキシンAの収率

精製菌体内トキシンAの収率を表1に示した。4,000ml の培養液より 45μg の精製菌体内トキシンAが得られた。総細胞毒性は 5.43×10⁴CU、比活性は 1.21×10⁶CU/mg であった。精製倍率は細胞毒性で見ると TGAC の段階より 2.69 倍上昇し、収率は 28.7% であった。

II. 菌体内トキシンAの物理化学的性状および生物学的性状

1. 物理化学的性状

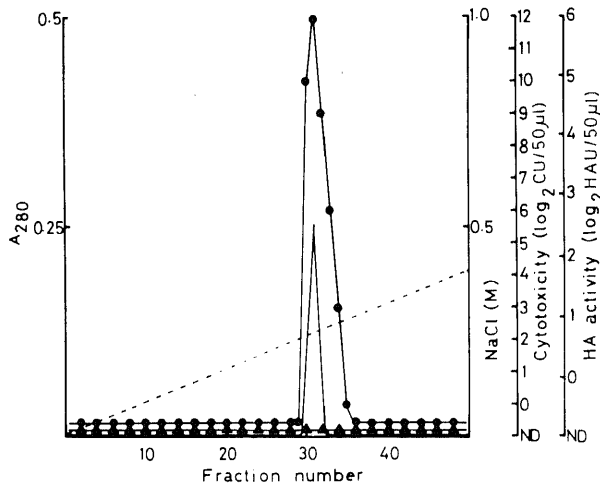


Fig. 3. Second Mono Q-FPLC profile of the cytotoxic fractions (fr 30-32) from the first Mono Q-FPLC. Symbols are the same as those in Fig. 2.

精製菌体内トキシンAを用いて未変性 PAGE を行った (図 4)。菌体内トキシンAは分子量 580kDa の単一のバンドとして泳動され、高度に精製されたことが分かった。SDS-PAGE においては、240kDa の主バンドが検出されると同時に多数の副バンド (26-360kDa) も検出された (図 5)。還元、非還元状態により泳動パターンに明確な差異は認められなかった。

2. 生物学的性状

精製菌体内トキシンAの細胞毒性 (CU₅₀)、マウス致死毒性 (LD₅₀) を示す最小毒素量はそれぞれ 0.83ng, 8.7ng であった。

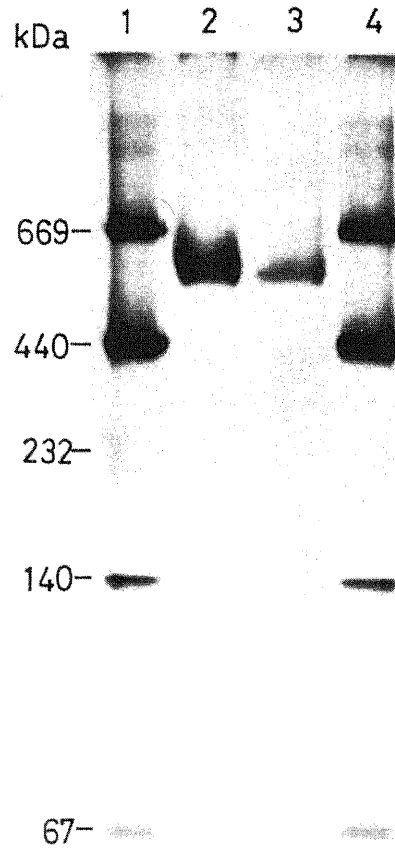


Fig. 4. Analysis of intracellular toxin A by native PAGE. Lanes 1 and 4, molecular weight markers: thyroglobulin (669 kDa), ferritin (440 kDa), catalase (232 kDa), lactate dehydrogenase (140 kDa), bovine serum albumin (67 kDa); lane 2, purified intracellular toxin A (4 μg); lane 3, purified intracellular toxin A (1 μg).

Table 1. Purification yield of intracellular toxin A of C. difficile

Step	Volume (ml)	Protein (mg/ml)	Total protein (mg)	Cyto-toxicity ^{a)} (CU/50μl)	Total cytotoxicity (CU)	Specific activity (CU/mg)	Fold purification	Percentage yield
Sonication	60	3.6	216	1.16×10 ⁵	1.39×10 ⁸	6.44×10 ⁵	—	—
TGAC	21	0.020	0.420	4.50×10 ²	1.89×10 ⁵	4.50×10 ⁵	1.00	100
First Mono Q	3	0.042	0.126	1.81×10 ³	1.09×10 ⁵	8.65×10 ⁵	1.92	57.7
Second Mono Q	1.5	0.030	0.045	1.81×10 ³	5.43×10 ⁴	1.21×10 ⁶	2.69	28.7

^{a)} Cytotoxicity to BHK-21/WI-2 cells.

ループテストにおいては、1 μ g では全く反応がなかったが、5 μ g では陽性となった。貯留液は血性であった。

菌体内トキシンAのHA活性は1.5 μ g でも陰性であった。

Ⅲ. 菌体内トキシンAの免疫学的性状

1. ゲル内沈降反応

精製菌体内トキシンAと菌体外トキシンAに対する抗血清を

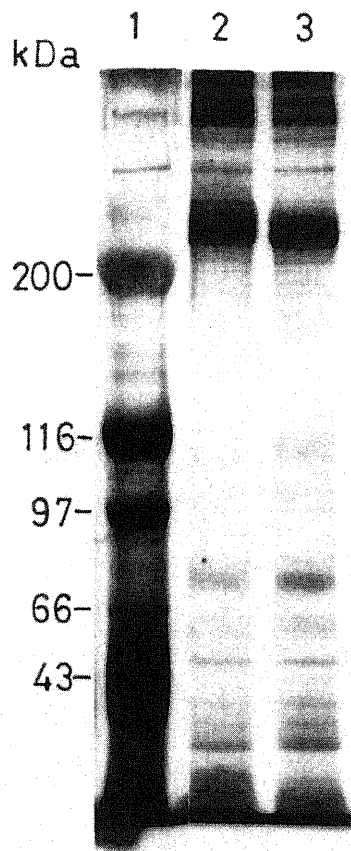


Fig. 5. Analysis of intracellular toxin A by SDS-PAGE. Lane 1, molecular weight markers: myosin (200 kDa), β -galactosidase (116 kDa), phosphorylase B (97 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), hen egg white ovalbumin (43 kDa). Purified intracellular toxin A (2.5 μ g) was reduced by β -mercaptoethanol (lane 3) or non-reduced (lane 2) prior to the electrophoresis.

用いてゲル内沈降反応を行った。いずれの抗血清を用いても菌体内トキシンAと菌体外トキシンAは融合する一本の沈降線を形成した(図6)。

2. 毒素中和試験

抗菌体内トキシンA抗体は菌体内トキシンAおよび菌体外トキシンAの細胞毒性、マウス致死毒性、腸管毒性をほぼ同程度(中和力価, 1:128-1:256)に中和した(表2)。抗菌体外トキシンA抗体も抗菌体内トキシンA抗体と同様、両毒素の上述の生物活性をほぼ同程度(1:128-1:256)に中和した。また、両抗血清は共に、菌体外トキシンAのHA活性に対する中和能を有し、しかも中和力価は同程度(1:16)であった。

考 察

C. difficile の産生するトキシンAは腸管毒性を有する点から、本菌による下痢症・偽膜性大腸炎発症の際の最も重要な病原因子であると考えられている¹¹⁾。トキシンAの精製は従来酸沈澱、ゲル濾過、陰イオン交換クロマトグラフィー法、電気泳動法等の組み合わせにより行われてきた⁶⁾⁻⁹⁾²⁰⁾²¹⁾。近年 Krivanら¹⁸⁾はトキシンAがハムスター腸管上皮細胞膜、ウサギ赤血球膜およびウシサイログロブリンのガラクトース α -1-3 ガラク

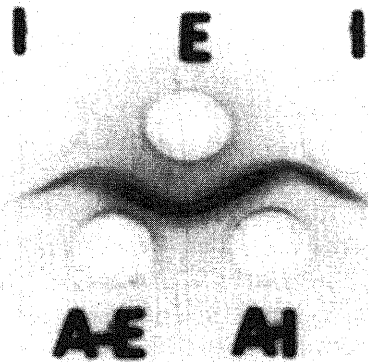


Fig. 6. Double immunodiffusion test of the intracellular and extracellular toxin A. I, intracellular toxin A (1 μ g); E, extracellular toxin A (1 μ g); A-I, anti-intracellular toxin A serum (25 μ l); A-E, anti-extracellular toxin A serum (25 μ l).

Table 2. Ability of the antisera to neutralize the biological activities of *C. difficile* toxin A

Biological activity	Toxin A	Neutralization titer ^{a)}	
		Anti-intracellular toxin A	Anti-extracellular toxin A
Cytotoxicity	Intracellular	1 : 256	1 : 128
	Extracellular	1 : 256	1 : 256
Mouse lethality	Intracellular	1 : 256	1 : 128
	Extracellular	1 : 256	1 : 256
Loop response	Intracellular	1 : 256	1 : 128
	Extracellular	1 : 128	1 : 128
HA activity ^{b)}	Extracellular	1 : 16	1 : 16

^{a)} The highest dilution of antiserum which neutralized cytotoxicity (4CU), mouse lethality (4 MLN), loop response (10 μ g), and HA activity (8 HAU).

^{b)} The intracellular toxin A has no HA activity.

トース β 1-4 N-アセチルグルコサミン (galactose α 1-3galactose- β 1-4 N-acetylglucosamine, Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc) 糖鎖に特異的に結合することを報告した。この結合は温度依存性でありトキシン A は 4°C で結合し 37°C で解離する。トキシン A のこのような性質を利用して、トキシン A の簡便な精製法として TGAC 法が開発され¹¹、さらに TGAC と陰イオン交換カラムクロマトグラフィーを組み合わせるにより高度精製トキシン A が得られることが明らかにされた¹²。これらの報告は、いずれも培養液中のトキシン A (菌体外トキシン A) に関するものであるが、本研究においては、これらの報告に準じ、TGAC 法、Mono Q-FPLC により菌体内トキシン A の精製を行った。

菌体内粗抽出液の TGAC の溶出パターンは菌体外トキシン A の場合とかなり異なっていた。即ち、菌体外トキシン A の場合、素通り画分には HA 活性が見られず、温度溶出画分には細胞毒性 (トキシン A) のピークに一致して高い HA 活性が見られるのであるが^{11,12}、本研究における菌体内トキシン A の場合、上述の菌体外トキシン A の場合と逆に、素通り画分に高い HA 活性が見られ、温度溶出画分には極めて弱い HA 活性が、トキシン A のピークに一致して検出されたにすぎなかった。トキシン A のウシ サイログロブリン、ウサギ赤血球への結合は、それらが有する Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc を介するものである点から考えると、ウシ サイログロブリンに結合能を有するトキシン A が極めて弱い HA 活性しか示さなかったことは、一見矛盾しているように思われる。この点に関しては以下の如くに考えられる。トキシン A が TG カラムに結合する場合に必要な結合部位の数は、HA 活性を示すために必要な結合部位の数より少なく、理論的には前者においては 1ヶ、後者では 2ヶが最小限トキシン A の表面に存在することが必要である。即ち、TGAC 温度溶出画分中の菌体内トキシン A 分子は TG への結合には十分であるが、HA 活性を示すには不十分な程度に Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc との結合部位が分子表面に現れているものと思われる。以上の考えは、TGAC で得られた菌体内トキシン A 画分の HA 活性は透析により上昇したことにより支持される様に思われる。この菌体内トキシン A の HA 活性増強の機構として、脱塩によるイオン強度の低下により菌体内トキシン A の立体構造が変化し上記 Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc との結合部位のいくつかが活性化の状態となり HA 活性が上昇した、あるいは透析により HA 活性抑制物質が除去された等が考えられる。

TGAC 素通り画分の HA 活性は非常に高かったが、この HA 活性物質を Mono Q-FPLC で分析した結果、HA 活性物質はトキシン A とは無関係であった。このことは C. difficile は菌体外トキシン A とは別の HA 活性物質を主に菌体内に有していることを示している。

著者は Mono Q-FPLC における溶出条件について、まず菌体外トキシン A の場合に用いられている 0-1 M NaCl 濃度勾配法 (流速 1ml/min)¹²を試みた。この時、菌体内トキシン A の細胞毒性と HA 活性のピークに若干の解離が認められた (データ未掲載)。そこで、本研究では緩やかな 0-0.4 M NaCl 濃度勾配法 (流速 0.5ml/min) で溶出を行ったところ、細胞毒性と HA 活性のピークを明確に分離することができた。即ち、HA 活性が陰性の細胞毒性ピーク (fr30-32) に全細胞毒性の 90% 以上が回収された。更に fr30-32 について Mono Q-FPLC を行ったと

ころ、HA 活性は全画分において陰性であり高い細胞毒性ピーク (最高値 2^{12} CU/50 μ l; fr31) のみが検出された。以上の結果、HA 活性を有しない菌体内トキシン A を高度精製することができた。しかしながら、1回目の Mono Q-FPLC において、細胞毒性と HA 活性が共に存在する画分が存在し、かつ、両活性は同時に減少した。このことは、菌体内のトキシン A の主成分は HA 活性陰性であるが HA 活性を有すトキシン A もまた存在する可能性を示唆している。

菌体内トキシン A の分子量は 580kDa であり、菌体外トキシン A より 40kDa 大きいことが明らかにされた。このことはデータには示さなかったが菌体内トキシン A と菌体外トキシン A を同時に電気泳動することによっても確認された。この 40kDa に相当する部分はトキシン A が菌体内より菌体外に分泌される際、切断される可能性があるが、ゲル内沈降反応において特異的抗原性を有する部分としては検出できなかった。

菌体外トキシン A の SDS-PAGE による泳動パターンは、他の精製タンパク毒素のパターンと異なり、極めて多くのバンドが出現することが知られている^{12,22,23}。トキシン A の分子構成は主バンドが 240kDa であるところから、ホモダイマーであるとする見解²²と、副バンドを重視して分子量のより小さいサブユニットから構成されているという見解²³があり意見の一致がみられていない。

菌体外トキシン A では SDS-PAGE 上、多数のバンドが見られることについては、その一因としてトキシン A の切断が菌体外への分泌時、あるいは、分泌後培養中に起こることが考えられる。この場合、菌体内トキシン A の SDS-PAGE における泳動パターンはより単純であることが予想される。しかしながら、菌体内トキシン A の SDS-PAGE の泳動パターンは菌体外トキシン A と同様 240kDa の主バンドと多数の副バンドが見られ、上述の考えは否定的であった。

精製菌体内トキシン A の細胞毒性、マウス致死毒性、腸管毒性を引き起こす最小毒量量は菌体外トキシン A¹¹⁻³²とほぼ同程度であり、これらの生物活性に関しては、トキシン A の合成の時点ですでに活性型の状態にあると考えられた。菌体外トキシン A と異なる点は HA 活性が検出されなかったことである。菌体外トキシン A の HA 活性部位は腸管上皮細胞への結合の際に重要な役割を担っていると考えられている¹⁸。菌体内トキシン A は腸管毒性を示す点から腸管上皮細胞への結合部位は HA 活性を示す程でないにしても必要最小限活性型の状態で存在していると思われる。このことは菌体内トキシン A が TG カラムに結合する点からも支持される。

HA 活性中和試験においては血清自体に起因する非特異的反応が認められたので、毒素中和試験には IgG 抗体を用いた。

ゲル内沈降反応では、菌体内・菌体外両トキシン A は一本の融合する沈降線を形成した。毒素中和試験において抗菌体内トキシン A 抗体は、菌体外トキシン A の細胞毒性、マウス致死毒性、腸管毒性を、菌体内トキシン A に対するのと同程度に中和した。以上の結果から、菌体内・菌体外両トキシン A の抗原構造には差異がないものと考えられた。HA 活性を欠く菌体内トキシン A に対する抗体が菌体外トキシン A の HA 活性を中和したことは、菌体内トキシン A 分子中には HA 活性に関与する抗原部位が保持されていることを示唆している。菌体内トキシン A の HA 活性の活性化の機構は今後解明すべき課題として残されている。

結 論

C. difficile VPI 10463 株の菌体の超音波処理上清液より菌体内トキシンAを精製し、その性状を検討し以下の結果を得た。

1. TGAC, 2回の Mono Q-FPLC により菌体内トキシンAを高度に精製することができた。

2. 菌体内トキシンAの分子量は未変性 PAGE では580kDaであり、菌体外トキシンAの分子量より40kDa大きかった。SDS-PAGEにより示される主バンドの分子量は240kDaであった。

3. 菌体内トキシンAの細胞毒性、マウス致死毒性および腸管毒性を示す最小有効量はそれぞれ0.83ng, 8.7ng, 5 μ gであった。HA活性は1.5 μ gの毒素を用いても検出されなかった。

4. ゲル内沈降反応および毒素中和試験上、菌体内トキシンAと菌体外トキシンAの間には差異は認められなかった。

5. HA活性を欠く菌体内トキシンAに対する抗血清も菌体外トキシンAのHA活性を中和した。

以上の結果は、トキシンAはHA活性陰性の形で菌体内で産生され、菌体外へ放出される時、あるいは培養液中でHA活性が活性化される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戴きました恩師中村信一教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究の遂行にあたり御指導激励を戴きました山川清孝講師、神谷 茂講師(現東海大学医学部微生物学教室助教授)はじめ多大な御協力を戴きました微生物学教室各位に心より感謝の意を表します。

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. *New 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. C., Ludwig, S. L. & Finegold, S. M.: Aetiology of antimicrobial agent-associated colitis. *Lancet*, **1**, 802-803 (1978).
- 4) George, R. H., Symonds, J. M., Dimock, F., Brown, J. D., Arabi, Y., Shinagawa, N., Keighley, M. R. B., Alexander Williams, J. & Burdon, D. W.: Identification of *Clostridium difficile* as a cause of pseudomembranous colitis. *Br. Med. J.*, **1**, 695 (1978).
- 5) Keighley, M. R. B., Burdon, D. W., Arabi, Y., Alexander-Williams, J., Thompson, H., Youngs, D., Johnson, M., Bentley, S., George, R. H. & Mogg, G. A. G.: Randomised controlled trial of vancomycin for pseudomembranous colitis and postoperative diarrhea. *Br. Med. J.*, **2**, 1667-1669 (1978).
- 6) Sullivan, N. M., Pellett, S. & Wilkins, T. D.: Purification and characterization of toxins A and B of

- Clostridium difficile*. *Infect. Immun.*, **35**, 1032-1040 (1982).
- 7) Banno, Y., Kobayashi, T., Kono, H., Watanabe, K., Ueno, K. & Nozawa, Y.: Biochemical characterization and biologic actions of two toxins (D-1 and D-2) from *Clostridium difficile*. *Rev. Infect. Dis.*, **6** (Suppl. 1), S11-20 (1984).
 - 8) Lyerly, D. M., Roberts, M. D., Phelps, C. J. & Wilkins, T. D.: Purification and properties of toxins A and B of *Clostridium difficile*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **33**, 31-35 (1986).
 - 9) Lyerly, D. M., Krivan, H. C. & Wilkins, T. D.: *Clostridium difficile*: its disease and toxins. *Clin. Microbiol. Rev.*, **1**, 1-18 (1988).
 - 10) Borriello, S. P., Welch, A. R., Barclay, F. E. & Davies, H. A.: Mucosal association by *Clostridium difficile* in the hamster gastrointestinal tract. *J. Med. Microbiol.*, **25**, 191-196 (1988).
 - 11) Krivan, H. C. & Wilkins, T. D.: Purification of *Clostridium difficile* toxin A by affinity chromatography on immobilized thyroglobulin. *Infect. Immun.*, **55**, 1873-1877 (1987).
 - 12) Kamiya, S., Reed, P. J. & Borriello, S. P.: Purification and characterisation of *Clostridium difficile* toxin A by bovine thyroglobulin affinity chromatography and dissociation in denaturing condition with or without reduction. *J. Med. Microbiol.*, **30**, 69-77 (1989).
 - 13) Kamiya, S. & Borriello, S. P.: A non-haemagglutinating form of *Clostridium difficile* toxin A. *J. Med. Microbiol.*, **36**, 190-197 (1992).
 - 14) Nakamura, S., Mikawa, M., Tanabe, N., Yamakawa, K. & Nishida, S.: Effect of clindamycin on cytotoxin production by *Clostridium difficile*. *Microbiol. Immunol.*, **26**, 985-992 (1982).
 - 15) Nakamura, S., Tanabe, N., Yamakawa, K. & Nishida, S.: Cytotoxin production by *Clostridium sordellii* strains. *Microbiol. Immunol.*, **27**, 495-502 (1983).
 - 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) Kärber, G.: Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Arch. Exp. Path. Pharm.*, **162**, 480 (1931).
 - 18) Krivan, H. C., Clark, G. F., Smith, D. F. & Wilkins, T. D.: Cell surface binding site for *Clostridium difficile* enterotoxin: evidence for a glycoconjugate containing sequence Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc. *Infect. Immun.*, **53**, 573-581 (1986).
 - 19) De, S. N. & Chatterje, D. N.: An experimental study of the mechanism of action of *Vibrio cholerae* on the intestinal mucous membrane. *J. Pathol. Bacteriol.*, **66**, 559-562 (1953).
 - 20) Stephen, J., Redmond, S. C., Mitchell, T. J., Ketley, J., Candy, D. C. A., Burdon, D. W. & Daniel,

- R.: *Clostridium difficile* enterotoxin (toxin A): new results. *Biochem. Soc. Trans.*, **12**, 194-195 (1985).
- 21) Taylor, N. S., Thorne G. M. & Bartlett, J. G.: Comparison of two toxins produced by *Clostridium difficile*. *Infect. Immun.*, **35**, 1032-1040 (1982).
- 22) Rautenberg, P. & Stender, F.: Characterization of immunogenic p230 as the toxin A of *Clostridium difficile*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **37**, 1-7 (1986).
- 23) Lyerly, D. M., Phelps, C. J., Toth, J. & Wilkins, T. D.: Characterization of toxins A and B of *Clostridium difficile* with monoclonal antibodies. *Infect. Immun.*, **148**, 70-76 (1986).
- 24) Aronsson, B., Graustrom, M., Mollby, R. & Nord, C. E.: Enzyme immunoassay for detection of *Clostridium difficile* toxins A and B in patients with antibiotic-associated diarrhoea and colitis. *Eur. J. Clin. Microbiol.*, **4**, 102-107 (1985).

Purification and Properties of Intracellular Toxin A of *Clostridium difficile* Xiao-Qi Meng, Department of Bacteriology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., **102**, 00—00 (1993)

Key words *Clostridium difficile*, toxin A, intracellular toxin A, purification, hemagglutination

Abstract

Intracellular toxin A of *Clostridium difficile* (C. difficile) VPI 10463 was purified to homogeneity by thyroglobulin affinity chromatography (TGAC) followed by repeated Mono Q-fast protein liquid chromatography (Mono Q-FPLC). Cells cultivated in modified brain heart infusion broth were collected and disrupted by sonication. The disrupted cell suspension was centrifuged and the supernatant was used as a starting material. In TGAC toxin A (intracellular toxin A) activities were bound to thyroglobulin column at 4°C and were eluted at 37°C. A high hemagglutination (HA) activity was detected in the TGAC-unbound fraction (2^9 hemagglutination unit (HAU)/50 μ l), but a very low activity in the TGAC-thermal eluate (2^0 HAU/50 μ l). The HA activity of the thermal eluates was markedly increased to 2^5 HAU/50 μ l after dialysis. The dialyzed preparation was submitted to the first Mono Q-FPLC with a 0-0.4 M sodium chloride linear gradient, and the peaks containing cytotoxic and HA activities were separated from each other. A highly purified preparation of intracellular toxin A without HA activity was obtained by the second Mono Q-FPLC. The molecular weight of the purified intracellular toxin A was estimated to be 580 kDa on polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) under non-denaturing conditions: this size was 40 kDa larger than that of extracellular toxin A. A major band of 240 kDa was detected on sodium dodecyl sulfate-PAGE. The minimum doses of the purified intracellular toxin A causing cytotoxicity, mouse lethality and rabbit ileal loop response were 0.83 ng, 8.7 ng and 5 μ g, respectively. The purified intracellular toxin A had no HA activity even at a concentration of 1.5 μ g. In an immunodiffusion test with anti-intracellular toxin A and anti-extracellular toxin A sera, the intracellular and extracellular toxin A showed antigenic identity. Anti-intracellular toxin A and anti-extracellular toxin A sera neutralized the heterologous toxins for cytotoxicity, mouse lethality and loop response at nearly the same titers as did the homologous toxins. Anti-intracellular toxin A serum neutralized HA activity of extracellular toxin A at the same titer as anti-extracellular toxin A serum did. These results suggest that toxin A is produced in the HA-negative form intracellularly but converted to the HA-positive form when released from cells, or after release into the medium.