

Amino Acids Effective for Toxin Production by Clostridium difficile Strains

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/2297/8404

Clostridium difficile の毒素産生に有効なアミノ酸

金沢大学医学部微生物学講座 (主任: 中村信一教授)

蓮 池 徹

(平成4年11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*) の毒素 (トキシンA, トキシンB) 産生に有効なアミノ酸について3菌株を用いて合成培地にて検討した. 18種類のアミノ酸を含む培地を基礎合成培地 (basal defined medium, BDM) として使用した. 各アミノ酸欠損 BDM を使用することにより, 十分な毒素産生にはバリン, システイン, トリプトファン, プロリン, メチオニン, イソロイシン, ロイシンが必須であることが分かった. また, これら必須アミノ酸の中でシステインは還元剤として働いていることが分かった. 上記7種類の必須アミノ酸に残り11種類のアミノ酸を1種類ずつ加えた培地における菌の増殖を測定することにより, グリシン, スレオニンが増殖を促進することが分かった. 増殖促進に有効な量は基礎濃度 (BDM における濃度) で十分であった. VPI 10463 株を用い, 7種類の必須アミノ酸のみを含む合成培地およびさらにグリシンおよびスレオニンを添加した合成培地 (minimal amino acid-defined medium, MADM) における毒素産生を検討した結果, 後者の方が前者より良好であった. 6種類の必須アミノ酸 (バリン, トリプトファン, プロリン, メチオニン, イソロイシン, ロイシン) の量を増量した時, 産生毒素量はアミノ酸の増量と共に増加し, アミノ酸量を基礎濃度の5倍に増量した時, 毒素量は最高値に達した. また, イソロイシンが特に毒素産生に有効であった. さらに, 有毒 *C. difficile* 20菌株の毒素産生を変法ブレイン ハート インフュージョン (modified brain heart infusion, m-BHI), BDM, バリン, トリプトファン, プロリン, メチオニン, イソロイシン, ロイシンを BDM の6倍量に含む MADM (6-fold MADM, 6×MADM), イソロイシンのみを BDM の6倍量に含む MADM (isoleucine-6-fold MADM, 6×I-MADM) にて検討した. 上述の3種の合成培地の中では6×MADM が最も毒素産生に有効であった. 毒素産生に優れた m-BHI と6×MADM を比較すると, 被験20株中13株では両培地で同程度の毒素産生が認められ, 6×MADM は毒素産生には良好な培地であることが示された. m-BHI および6×MADM におけるトキシンA, トキシンBの産生性の関連性を統計学的に解析した結果, 両毒素の産生は平行関係にあることを示された. 以上の結果は, *C. difficile* の毒素産生に必須のアミノ酸の種類は他のクロストリジウム菌種の場合に比べると, はるかに少ないことを示している. さらにトキシンA, トキシンBの産生は同一の機構により制御されていることを示唆している.

Key words *C. difficile*, toxin A, toxin B, amino acid, defined medium

Clostridium difficile (*C. difficile*) は偽膜性大腸炎, 一部の抗生物質関連下痢症の原因菌であり, 本菌の産生するトキシンA, トキシンBが主原因因子と考えられている^{1,2}. トキシンA, トキシンBは類似した生物活性を示すが, トキシンAは結核腸管試験陽性であることからエンテロトキシン, トキシンBはサイトトキシン活性が極めて高いことからサイトトキシンと称されている³.

抗生物質関連下痢症は当然のことながら抗生物質投与と関連する腸炎であり, 偽膜性大腸炎もまた抗生物質投与後に発症する場合が多い⁴. これら *C. difficile* 腸炎の治療にはバンコマイシン, メトロニダゾールが用いられるが, 健康人の糞便を注腸投与することも有効な治療法である⁵. *C. difficile* は, その頻度は低いながらも健康成人の腸内細菌叢として存在している^{6,7}. しかしながら, 健康成人においては, 糞便にはトキシンA, トキシンBいずれの毒素も検出されない^{8,9}. 以上のことは,

正常腸内細菌叢が *C. difficile* の増殖・毒素産生を抑制している事を示している. *C. difficile* 腸炎発症機序の観点からみるならば, 正常細菌叢の乱れが *C. difficile* の増殖・毒素産生を引き起こし, 腸炎が発症すると考えられる. 正常細菌叢の *C. difficile* の増殖・毒素産生抑制機構については種々考えられるが, 一つの重要な因子として各種栄養素の競合を挙げることができる.

C. difficile の毒素は培養後期に産生される¹⁰ことから孢子形成が毒素産生に関係していると考えられているが, 最近 Kamiya ら¹¹は孢子形成時期に一致してトキシンBが合成され, 培地中に放出されることを明らかにした. しかしながら, 毒素産生の制御機構は不明である. 毒素産生の制御機構の解明には成分の分析が困難な複合培地は不適であり, 成分が規定されている, 単純かつ毒素産生に優れた合成培地の開発が望まれている.

Abbreviations: BDM, basal defined medium; *C. botulinum*, *Clostridium botulinum*; *C. difficile*, *Clostridium difficile*; *C. perfringens*, *Clostridium perfringens*; *C. tetani*, *Clostridium tetani*; CU, cytotoxic unit; EC-5, Eagle's minimal essential medium supplemented with 5% fetal calf serum; ELISA, enzyme-linked

以上の観点から本研究では、栄養素の中で重要な役割を演じているアミノ酸に関し、*C. difficile* の毒素産生に及ぼす影響について検討した。

材料および方法

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菌株を用いた。これら菌株の中で、バージニア ポリテクニ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, S.P. Borriello 博士 (Clinical Research Centre, Harrow, UK) より分与された菌株 B-1 株, 著者の研究室で抗生物質関連下痢症患者から分離した KZ 1647 株を主に使用した。

II. 培地

Haslam ら¹⁰⁾のアミノ酸, ビタミン, 蓮池ら¹¹⁾のミネラル, 0.2% グルコースを含む培地を基礎合成培地 (basal defined medium, BDM) とした (表 1)。BDM 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・グルコース溶液の 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% NaHCO₃ 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 H₂ 10%, CO₂ 10%, N₂ 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。他の合成培地も BDM 作製法に準じて作製した。

毒素産生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 (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, USA) に Na₂HPO₄ を 0.2% の割に添加した培地 (modified brain heart infusion, m-BHI)⁹⁾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。

III. 植菌および培養

1. 毒素産生の検討

植菌のための前培養菌液としては, 毒素産生条件の検討には BDM 16時間培養菌液, 多数の菌株の毒素産生の検討には肝片加肝ブイオン 16時間培養菌液を用いた。いずれの場合にも, 培養菌液の 10⁻³ 希釈液 0.1ml を 10ml の被験培地に植菌した。希釈, 植菌はすべて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, 培養菌液を HV フィルター (日本ミリポアリミテッド) にて濾過滅菌し, 毒素の測定に供した。なお培養期間中, 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, OD₅₆₀) を測定することにより菌の増殖を測定した。OD₅₆₀ の測定は培養 24, 30, 36時間, 2, 3, 4, 5 日目に行っ

Table 1. Composition of basal defined medium (BDM)

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		
Serine	0.3	Minerals (mg)	
Valine	0.3	KH ₂ PO ₄	900
Isoleucine	0.3	Na ₂ HPO ₄	5,000
Proline	0.3	NaCl	900
Aspartic acid	0.3	CaCl ₂ · 2H ₂ O	26
Leucine	0.4	MgCl ₂ · 6H ₂ O	20
Cysteine	0.5	MnCl ₂ · 4H ₂ O	10
Glutamic acid	0.9	(NH ₄) ₂ SO ₄	40
		FeSO ₄ · 7H ₂ O	4
		CoCl ₂ · 6H ₂ O	1
		NaHCO ₃	5,000
		Glucose (g)	2
		Distilled water (ml)	1,000

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

immunosorbent assay; MADM, minimal amino acid-defined medium; m-BHI, modified brain heart infusion; OD₅₆₀, optical density at 560 nm; PBS, phosphate-buffered saline; 6×I-MADM, isoleucine-6-fold MADM; 6×MADM, 6-fold MADM; T-PBS, Tween 20-added-PBS

た。

2. 発育促進アミノ酸の検討

肝片加肝ブイオン16時間培養菌液の遠心(1,000×g, 15分)洗浄菌液0.1mlを10mlの被験培地に植菌した。操作は混合ガス噴射下で行い、同ガス存在下で37°Cで培養した。培養開始後1時間毎にOD₅₆₀を測定した。

IV. 毒素の測定

1. トキシンA

Redmondら¹²⁾の酵素結合抗体免疫アッセイ(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)に準じ、以下の方法でトキシンAを測定した。まず、Kamiyaら¹³⁾の方法に準じて精製したトキシンAを用い、Ehrlichら¹⁴⁾の方法に従い抗トキシンA抗体を作製した。プロテインAカラム(Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA)により精製した抗トキシンA IgGを0.1M炭酸ナトリウム-炭酸水素ナトリウム緩衝液(pH9.6)に溶解し(10μg/ml)、96穴マイクロプレート イムロン2(Dynatech Lab., Chantilly, USA)の各ウエルに100μl加え、4°Cで一夜静置した。0.05%ツイーン(Tween)20加15mMリン酸緩衝生理食塩水(pH7.2)(Tween 20-added phosphate-buffered saline, T-PBS)で一回洗浄後、1%血清アルブミン(和光, 大阪)加PBS 100μlを各ウエルに加え、37°C, 2時間静置した。T-PBSで2回洗浄後、被験液100μlを各ウエルに加え、37°Cで1時間静置した。T-PBSで2回洗浄後、ペルオキシダーゼ(Sigma, St. Louis, USA)標識抗トキシンA IgG(IgG量は約150μg/ml)をT-PBSで125倍希釈し、各ウエルに100μl加え、37°C, 1時間静置した。T-PBSで2回洗浄後、0.1Mクエン酸緩衝液(pH5.0)にo-フェニレンジアミン(Sigma)(340μg/ml)および過酸化水素(0.008%)を含んだ基質液を100μl加え、室温で30分間反応させた。4.5N硫酸を各ウエルに50μl加え反応を停止させた後、492nmの吸光度をEasy reader EAR340AT(SLT-Labinstruments, Salzburg, Austria)にて測定した。

標準曲線はKamiyaら¹³⁾の方法により精製したトキシンAを用いて求めた。標識抗体の作製はRedmondら¹²⁾の方法によ

た。本法でのトキシンAの測定限界は10ng/mlであった。

2. トキシンB

トキシンBの測定は培養細胞BHK-21/WI-2を用い、マイクロタイター法⁵⁾により行なった。本細胞の培養には5%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。トリプシン処理後、20万個/mlになる様EC-5で調整した。BHK-21/WI-2細胞を96穴マイクロプレート ファルコン3075(Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, USA)の各ウエルに50μl分注し、炭酸ガスが5%になるよう調整された自動炭酸ガス細胞培養装置IT 42(ヤマト科学, 東京)内で37°Cにて培養した。24時間培養後、EC-5を用いて2倍段階希釈した被験試料50μlを各ウエルに添加し、再び培養した。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の逆数を細胞毒性単位(cytotoxic unit, CU/50μl)とした。

3. 試料の濃縮

HVフィルターにて濾過滅菌した培養菌液を透析膜チューブ(Visking, New York, USA)に注入し、結紮した後、ポリエチレングリコール20,000(和光)にて濃縮した。

V. 統計学的検討

トキシンA, トキシンBの関連性の検討は、トキシンAのトキシンBへの回帰方程式を求めることにより行なった。回帰係数の差の検定はF検定で行なった。

成 績

1. 毒素産生に必須のアミノ酸

m-BHIにて400~1,800ng/mlのトキシンA, 2¹²~2¹⁴CU/50μlのトキシンBを産生する*C. difficile* 3菌株(VPI 10463, B-1, KZ 1647株)について、アミノ酸1種類のみを欠損したBDMにおける毒素産生を検討し、毒素産生に必須のアミノ酸を求めた(表2)。

BDMにおける菌の発育は培養24~36時間後に最高に達し、

Table 2. Effect of amino acid deprivation on toxin production by *C. difficile* strains in BDM

Deprived amino acid	<i>C. difficile</i> strains								
	VPI 10463			B-1			KZ 1647		
	Growth ^{a)}	Toxin A ^{b)}	Toxin B ^{c)}	Growth	Toxin A	Toxin B	Growth	Toxin A	Toxin B
Valine	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Cysteine	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Tryptophan	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Proline	+	—	0	+	—	4	—	—	—
Methionine	+	—	4	+	—	3	+	—	1
Leucine	+	230	10	+	—	1	+	—	—
Isoleucine	+	73	7	+	—	4	+	15	5
Other 11 amino acids ^{d)}	+	320	11	+	24	6	+	37	7
		550	12		36	7		47	8
None	+	540	12	+	24	6	+	68	8

^{a)} —, no visible growth; +, the maximum value of OD₅₆₀ during 5 days of incubation (OD_{max}) ≤ 0.2; ++, 0.2 < OD_{max} ≤ 0.4; +++, OD_{max} > 0.4

^{b)} ng/ml. —, less than 10 ng/ml.

^{c)} Log₂CU/50 μl. —, no cytotoxicity.

^{d)} Histidine, glycine, tyrosine, arginine, phenylalanine, threonine, alanine, lysine, serine, aspartic acid and glutamic acid.

0.59~0.69のOD₅₆₀値を示した。また、産生トキシンA、トキシンB量は各々24~540ng/ml, 2⁸~2¹²CU/50 μ lであった。

バリン, システイン, トリプトファン欠損 BDM では3菌株全株において菌の発育は認められず, 当然のことながら毒素産生も認められなかった。プロリン欠損 BDM においては, KZ 1647 株では菌の発育・毒素産生は認められなかった。他の2株においても菌の発育は培養3日目以後によく認められたにすぎず(最高OD₅₆₀値:0.3以下), 毒素についてはトキシンBのみがわずかに検出されたにすぎなかった(2⁴CU/50 μ l以下)。

メチオニン欠損 BDM では菌の発育は速やかに認められ, 培養30~36時間後にOD₅₆₀値は最高に達した。最高OD₅₆₀値(0.29~0.38)はBDMの約1/2であったが, 産生毒素量は極めて低かった。トキシンAは全株で検出されず, トキシンBは全株で検出されたがBDMの1/8(B-1株)~1/256(VPI 10463株)にすぎなかった。

ロイシン欠損 BDM, イソロイシン欠損 BDM ではいずれの菌株についても培養2日目以後に菌の発育が認められた。最高OD₅₆₀値はロイシン欠損 BDM では3菌株共に培養5日目(OD₅₆₀値:0.21~0.28), イソロイシン欠損 BDM では培養2~3日目(OD₅₆₀値:0.25~0.30)であった。トキシンB産生は, ロイシン欠損 BDM ではVPI 10463, B-1株において認められ, その値は各々BDMの1/4および1/32, イソロイシン欠損 BDM では3株全株に認められ, その値はBDMの1/4(B-1株)~1/32(VPI 10463株)にすぎなかった。トキシンAはトキシンB値が2⁸CU/50 μ l以上の時にのみ検出された。ロイシン欠損培地においてはVPI 10463株でのみトキシンAが検出され, 産生量はBDMの1/2以下であった。また, イソロイシン欠損培地においてはVPI 10463, KZ 1647株でトキシンAが検出されたが, BDMと比較した時, 各々BDMの場合の1/7以下, 1/4以下にすぎなかった。他の11種類のアミノ酸欠損 BDM における菌の発育・毒素産生は3株共にBDMとほぼ等しい値を示した。

以上の結果, バリン, システイン, トリプトファン, プロリン, メチオニン, ロイシン, イソロイシンがC. difficileの毒素産生に必須のアミノ酸であることが分かった。

II. 発育促進アミノ酸

アミノ酸として上述の毒素産生に必須のアミノ酸7種類および他の11種類中の1種類ずつを加えた合成培地(各アミノ酸量はBDMと同量)における菌の発育を, VPI 10463, B-1, KZ 1647株を用いて検討し, 菌の発育に有効なアミノ酸を求めた。本実験においては肝片加肝ブイオン16時間培養菌液を遠心洗浄した後, その0.1mlを10mlの各培地に植菌した。その後37 $^{\circ}$ Cで培養を行い, 一時間毎にOD₅₆₀値を測定した。

本実験条件ではBDMにおいては3株共培養9時間後にOD₅₆₀値は最高値(0.81~0.87)を示した(表3)。また, 必須アミノ酸のみを含む場合, 3株共培養14時間後にOD₅₆₀値は最高値(0.49~0.75)に達した。

グリシンあるいはスレオニンを添加した場合, VPI 10463, B-1株では発育は明らかに促進され, 最高OD₅₆₀値は, 特にスレオニンを添加した時増加し, また培養10~12時間後に最高値に達し, 必須アミノ酸のみの場合に比べ短い培養時間で最高値に達した。KZ 1647株の場合, グリシン, スレオニン添加培地においても最高OD₅₆₀値の顕著な増加はみられなかったが, 最高

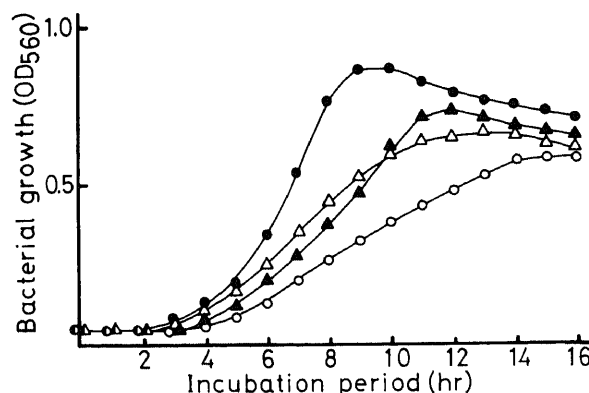


Fig. 1. Effect of glycine and threonine on the growth of *C. difficile* strain VPI 10463 in essential amino acid-defined medium. Amino acid supplemented: ○, none; △, glycine (100 mg/l); ▲, threonine (200 mg/l); ●, BDM.

Table 3. Effect of amino acid supplement on the growth of *C. difficile* strains

Medium ^{b)}	Amino acid supplemented	Maximum OD ₅₆₀ value during incubation period in <i>C. difficile</i> strain ^{a)}		
		VPI 10463	B-1	KZ 1647
BDM		0.85	0.87	0.81
Essential amino acid-defined	None	0.60	0.49	0.75
	Glycine	0.70	0.66	0.78
	Threonine	0.76	0.81	0.79
	Other 9 amino acids ^{c)}	0.56-0.61	0.43-0.51	0.76-0.80

^{a)} A 0.1-ml portion of washed 16-hr liver broth culture of each strain was inoculated into 10 ml of each medium. The bacterial growth reached the maximum level in 10 to 14 hr of incubation period.

^{b)} BDM consists of 18 amino acids (see Table 1). Essential amino acid-defined medium consists of valine, cysteine, tryptophan, methionine, proline, leucine and isoleucine.

^{c)} Histidine, glycine, tyrosine, arginine, phenylalanine, lysine, serine, aspartic acid and glutamic acid.

OD₅₅₀ 値に達する培養時間は10~11時間であり、必須アミノ酸のみの場合に比べ菌の発育は促進された。他の9種類のアミノ酸については明確な発育促進効果は認められなかった。VPI 10463株の増殖曲線を図1に示した。図から分かる様にグリシンは特に増殖速度促進に、スレオニンも増殖速度促進と共に、先述の如く増殖量増加に有効であることが分かった。グリシン、スレオニンをBDMに含まれている量(グリシン, 100mg/l; スレオニン, 200mg/l)の2倍量に増量した時、その効果の増加は認められなかった。逆にグリシン、スレオニンを各々50mg/l, 100mg/lに減量した時、わずかながら増殖促進効果は減少した(成績略)。

以上の結果より、以下に用いる培地においてはグリシン、スレオニン量を各々200mg/l, 400mg/lとした。

Ⅲ. 必須アミノ酸量と毒素産生

1. システイン量

システインは還元作用を有するので、その還元作用が菌の増殖・毒素産生に重要とも考えられる。そこで、システインの代りに還元剤としてチオグリコール酸ナトリウムを添加したBDMにおける毒素産生を、VPI 10463, B-1, KZ 1647株を用いて検討した(表4)。システインを含むBDMとシステインの代りにチオグリコール酸ナトリウムを含むBDMにおける菌の発育は共に最高OD₅₅₀値0.4以上であった。また、産生毒素B量はほぼ同程度であった。したがって、システインは還元剤として働いていることが分かった。以下に用いる培地には、還元剤として働く最適濃度である500mg/l(0.05%)のシステインを添加した。

2. 他の必須アミノ酸量

システイン以外の6種類の必須アミノ酸(バリン, トリプトファン, プロリン, メチオニン, ロイシン, イソロイシン)の量をBDMに含まれている量を基礎濃度とし、2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10倍量に増量した場合の毒素産生をVPI 10463株を用いて検討した(図2)。

グリシン・スレオニン非添加の場合、トキシンA値は各アミノ酸濃度が基礎濃度では0.44mg/mlであったが、2倍量に増量した時1.42mg/mlに増加した。3~8倍量に増量してもトキシンA量の増加は認められずほぼ等しい値(1.50~1.42mg/ml)を示し、9, 10倍量ではトキシンA量はむしろ減少した。トキシンB値はアミノ酸濃度が基礎濃度では2¹⁵CU/50μlであったが、2倍量に増量した時、2¹⁶CU/50μlに増加した。3~9倍量に増量してもトキシンB量の増加は認められず等しい値(2¹⁵CU/50μl)を示した。

グリシン・スレオニンを添加した場合、グリシン・スレオニン非添加に比べトキシンB値に関しては増加は認められなかったが、トキシンA値に関しては著しい増加が認められた。トキシンA値はアミノ酸濃度が基礎濃度では1.02mg/mlであったが、アミノ酸の増量と共に増加し、5倍量に増量した時3.36

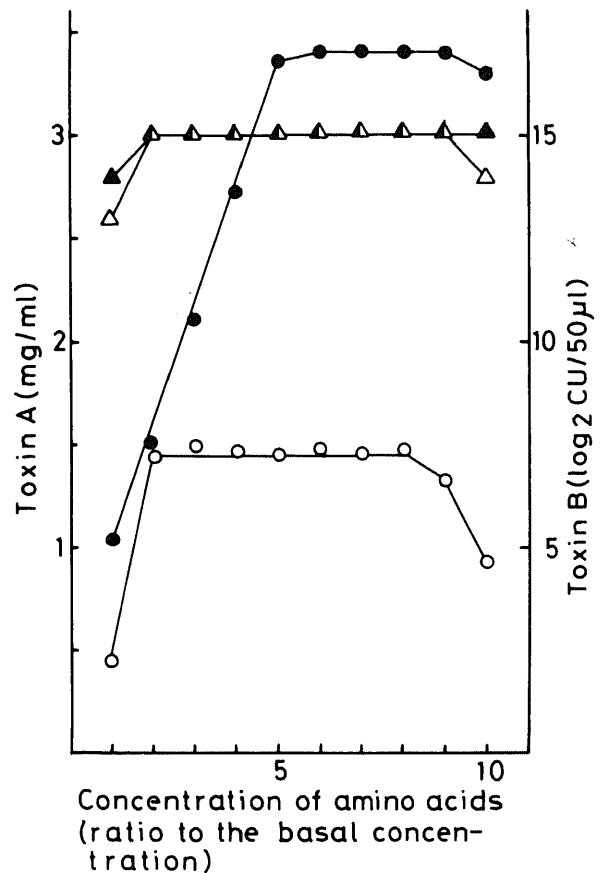


Fig. 2. Effect of amino acid increment on the toxin production by *C. difficile* strain VPI 10463. Basal concentrations of amino acids (mg/l): tryptophan, 100; methionine, 200; valine, 300; isoleucine, 300; proline, 300; leucine, 400. ○, △, essential amino acid-defined medium; ●, ▲, essential amino acid-defined medium supplemented with glycine (200 mg/l) and threonine (400 mg/l) (minimal amino acid-defined medium, MADM). ○, ●, toxin A; △, ▲, toxin B.

Table 4. Comparison of cysteine and sodium thioglycolate for toxin B production by *C. difficile* strains

Strain	BDM containing			
	Cysteine (0.05%)		Sodium thioglycolate (0.1%)	
	Growth ^a	Toxin B (log ₂ CU/50 μl)	Growth	Toxin B (log ₂ CU/50 μl)
VPI 10463	+++	12	+++	12
B-1	+++	6	+++	4
KZ 1647	+++	7	+++	6

^a Refer to the footnotes of Table 2.

mg/ml にまで増加した。6 倍量以上に増量してもトキシン A 値の増加は認められず、10 倍量に増量した場合トキシン A 値はやや減少した。

以上の結果、発育促進に有効なグリシン、スレオニン毒性産生においても有効なアミノ酸であることが分かった。また、バリン、トリプトファン、プロリン、メチオニン、ロイシン、イソロイシンの量を BDM の 5 倍量に含む培地が毒素産生に有効なことが分かった。なお、グリシン・スレオニンを含まない場合、グリシン・スレオニンを含む場合、いずれにおいてもアミノ酸の増量にかかわらず菌の発育の変動は少なく最高 OD₅₅₀ 値は前者においては 0.25~0.30、後者においては 0.45~0.50 であった。

以上の結果に基づき、以下の実験においては、培地 1,000ml あたり、グリシン 200mg、スレオニン 400mg、システイン 500mg、バリン 300mg、トリプトファン 100mg、プロリン 300mg、メチオニン 200mg、ロイシン 400mg、イソロイシン 300mg (グリシン、スレオニン以外は BDM に含まれている量) のアミノ酸を含む合成培地を最小必須アミノ酸合成培地 (minimal amino acid -defined medium, MADM) として使用した。また、バリン、トリプトファン、プロリン、メチオニン、ロイシン、イソロイシンの 6 種類のアミノ酸量を MADM の 6 倍量に含む培地を 6 倍増量 MADM (6-fold MADM, 6×MADM) として用いた。

次いで、上述の 6 種類のアミノ酸の中で、いずれのアミノ酸の増量が毒素産生に最も有効であるかについて検討した (表 5)。

トリプトファン、プロリン、メチオニン、ロイシンを 6 倍量に増量してもトキシン A、トキシン B 共にその産生量の増加はみられなかった。しかしながら、バリン、イソロイシンを増量した時、トキシン A、トキシン B 共に明らかに増加した。特にイソロイシンを増量した時、トキシン A、トキシン B 共に 6×MADM と同じ値を示した。即ち、6×MADM の毒素産生促

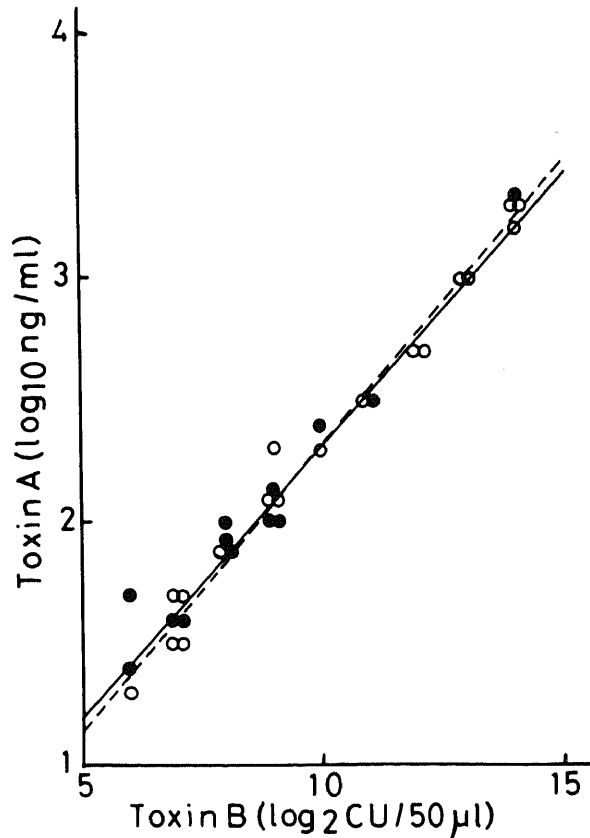


Fig. 3. Correlation between productivities of toxins A and B in m-BHI (○) and 6×MADM (●). —, m-BHI; the regression equation is $Y=0.23X-0.01$ and the coefficient of correlation r is 0.99 ($p<0.01$, $n=18$). ---, 6×MADM; the regression equation is $Y=0.22X+0.14$ and the coefficient of correlation r is 0.98 ($p<0.01$, $n=13$).

Table 5. Effect of increase of a single amino acid on toxin production by *C. difficile* strain VPI 10463 in the minimal amino acid-defined medium (MADM)

Medium	Amino acid increased ^{a)}	Concentration (mg/l)	Amount of toxin produced	
			Toxin A (ng/ml)	Toxin B (log ₂ CU/50 μl)
MADM ^{a)}	None		980	14
	Valine	1,800	1,480	15
	Tryptophan	600	980	14
	Proline	1,800	1,000	14
	Methionine	1,200	900	14
	Leucine	2,400	640	13
	Isoleucine	1,800	1,960	15
6×MADM ^{b)}			1,960	15

^{a)} Amino acid composition of MADM: valine 300, tryptophan 100, proline 300, methionine 200, leucine 400, isoleucine 300, glycine 200, threonine 400 and cysteine 500 mg per 1,000 ml.

^{b)} MADM supplemented with valine, tryptophan, proline, methionine, leucine and isoleucine at concentrations 6-fold higher than those in MADM.

^{c)} Each amino acid was increased up to the concentration 6-fold higher than that in MADM.

進効果はイソロイシンによるものである可能性が示された。MADM に含まれるアミノ酸の中でイソロイシン濃度を6倍に増量した培地をイソロイシン6倍増量 MADM (isoleucine-6-fold MADM, 6×I-MADM) として以下に使用した。

IV. *C. difficile* 菌株の各種合成培地における毒素産生

有毒 *C. difficile* 20菌株の毒素産生性を複合培地 m-BHI, 18種類のアミノ酸から成る BDM, 9種類のアミノ酸から成る 6×MADM, 6×I-MADM を用いて比較検討した。

3種の合成培地を比較すると、被験20株中 KZ 1604, KZ 1748 株を除いた全株が 6×MADM において最も良好な毒素産生を示した(表6)。KZ 1604 株については 6×I-MADM においてトキシンA値が最も高く、KZ 1748 株については BDM においてトキシンA, トキシンB値は最も高かったが、その値は 6×MADM における値とはほぼ等しかった。毒素産生に良好な複合培地である m-BHI と 6×MADM とを比較すると、被験20株中13株(KZ 1607, KZ 1610, KZ 1694, KZ 1613, KZ 1626, KZ 1606, KZ 1604, KZ 1608, KZ 1665, KZ 1602, KZ 1650, KZ 1601, VPI 10463 株)が両培地でほぼ同程度(トキシンB値の差が4倍以内)の毒素産生を示した。6×MADM においてトキシンA, トキシンBが共に検出された菌株は m-BHI にて 2⁷CU/50μl のトキシンB値を示した4株中1株および 2⁸CU/50μl 以上のトキシンB値を示した菌株13株全株、計14株であった。これら14株中4株(KZ 1602, KZ 1650, KZ 1601, VPI 10463 株)では m-BHI と同程度(トキシンB値の差が2倍以内)の毒素が

産生された。残り10株中4株(KZ 1604, KZ 1608, KZ 1698, KZ 1665 株)については 6×MADM におけるトキシンB値は m-BHI の1/4~1/8, トキシンA値も約1/3~1/4であり、比較的高い毒素産生が認められた。6株(KZ 1648, KZ 1625, KZ 1630, B-1, KZ 1748, KZ 1647 株)については、6×MADM における毒素産生性は m-BHI に比べ悪く、トキシンB値は1/16~1/64, トキシンA値は約1/6(KZ 1630 株)~1/20(KZ 1748 株)にすぎなかった。m-BHI においてトキシンAが検出されなかった2株(KZ 1607, KZ 1610 株)、および 6×MADM においてトキシンAが検出されなかった6株(KZ 1607, KZ 1610, KZ 1694, KZ 1613, KZ 1626, KZ 1606 株)について、培養液をポリエチレングリコール20,000を用い濃縮した後にトキシンB値, トキシンA値を測定した。いずれの場合にもトキシンB値が9~11CU/50μl になるまで濃縮した時、96~190ng/ml のトキシンAが検出された。

トキシンAとトキシンBの産生性の関連性の度合いを、トキシンA, トキシンB共に検出されるトキシンB値 2⁶CU/50μl 以上について、トキシンA値 (log₁₀ ng/ml, Y) のトキシンB値 (log₂ CU/50μl, X) との回帰方程式を求めることにより検討した(図3)。m-BHI, 6×MADM いずれの培地においてもトキシンA値とトキシンB値の間には有意の正の相関がみとめられた(それぞれ Y=0.23X-0.01, r=0.99, p<0.01; Y=0.22X+0.14, r=0.98, p<0.01)。また、2つの回帰係数の差の検討を行なったところ、有意の差はなかった(p<0.01)。

Table 6. Toxin production by *C. difficile* strains in different defined media

Strain	Amount of toxin produced in							
	m-BHI ^{a)}		6×MADM		6×I-MADM		BDM	
	A ^{b)}	B ^{c)}	A	B	A	B	A	B
KZ 1607	—	5	—	5	—	4	—	5
KZ 1610	—	5	—	5	—	4	—	5
KZ 1694	18	6	—	5	—	5	—	5
KZ 1613	34	7	—	5	—	5	—	5
KZ 1626	35	7	—	5	—	5	—	4
KZ 1606	52	7	—	5	—	5	—	5
KZ 1604	80	8	24	6	33	6	—	5
KZ 1608	140	9	38	7	30	6	28	6
KZ 1698	180	9	47	6	19	5	15	5
KZ 1648	290	11	19	5	—	3	—	5
KZ 1625	550	12	42	7	29	7	30	6
KZ 1630	540	12	88	8	62	7	23	6
KZ 1665	980	13	320	11	81	9	47	7
B-1	1,100	13	100	9	71	7	55	7
KZ 1748	1,900	14	97	8	75	8	110	9
KZ 1647	1,600	14	130	9	120	9	89	8
KZ 1602	45	7	83	8	28	6	14	5
KZ 1650	130	9	110	9	68	8	26	6
KZ 1601	220	10	240	10	230	10	—	5
VPI 10463	1,900	14	2,000	14	1,960	14	110	9

^{a)} m-BHI, BHI supplemented with 0.2% Na₂HPO₄; 6×MADM, refer to the footnotes of Table 5; 6×I-MADM, MADM supplemented with isoleucine at a concentration 6-fold higher than that in MADM; BDM, basal defined medium.

^{b)} Toxin A (ng/ml); —, less than 10 ng/ml.

^{c)} Toxin B (log₂CU/50 μl).

考 察

C. difficile は偽膜性大腸炎、一部の抗生物質関連下痢症の原因菌である¹⁾。これら C. difficile 腸炎患者糞便中には本菌の産生するトキシンA, トキシンBが存在し、これらの毒素が主病原因子であることが明らかにされている²⁾。トキシンA, トキシンBは主な生物学的活性として共にサイトトキシン活性、致死活性、血管透過性増強活性を有する²⁾¹⁵⁾¹⁶⁾。トキシンAは結紮腸管液体貯留活性(エンテロトキシン活性)を有し、また、トキシンBは極めて強いサイトトキシン活性(トキシンAに比べタンパク当り、約1,000倍)を有する点の特徴である²⁾¹⁵⁾¹⁶⁾。病因的にはエンテロトキシン活性を有するトキシンAの方が重要であることが示されている^{17)~19)}。

C. difficile 腸炎の発症要因として最も重要なものは抗生物質投与であるが、その他便秘、イレウス、結腸癌等が挙げられている³⁾²⁰⁾。これらの要因はいずれも腸内細菌叢に影響を与えるものである。

健康成人の糞便からの C. difficile 分離率は0~13%と報告者により異なる⁵⁾⁶⁾²¹⁾²²⁾。Nakamura ら⁵⁾は20~90歳の健康成人431人を対象として49人(11.4%)から C. difficile を分離(菌数; $10^2 \sim 10^6/g$)した。健康 C. difficile 保菌者の場合、C. difficile 腸炎患者と異なり、その糞便中にはトキシンA, トキシンBは検出されない⁵⁾⁶⁾²¹⁾²²⁾。

C. difficile 腸炎の治療には通常バンコマイシンが用いられるが、再発を繰り返す場合、健康成人の糞便の注腸投与が有効であると報告されている⁴⁾。

以上のことは、正常腸内細菌叢の乱れが C. difficile の異常増殖を招来し、産生されたトキシンA, トキシンBが主病原因子として働き、腸炎が惹起されることを示している。一方、腸内細菌叢は C. difficile の増殖・毒素産生を抑制していることを示している。

C. difficile の毒素産生機構については主として孢子形成の観点から検討されている^{23)~25)}。Kamiya ら⁹⁾は極めて少量の栄養型細菌のみを植菌することにより、トキシンBは孢子形成時期に一致して産生され、培地中に放出されることを明らかにした。しかしながら、いかなる物質が毒素産生に影響し、毒素産生を制御するのか全く不明である。この事を解明するには、成分が複雑な複合培地は不適であり、毒素産生のための合成培地の開発が望まれている。

本研究では腸内細菌叢の C. difficile に対する増殖・毒素産生の抑制機構を栄養素の競合の観点から検討すべく、また、毒素産生のための合成培地の開発をも目的として、栄養素の中でも重要な役割を占めているアミノ酸の毒素産生に与える影響について検討した。

本研究ではトキシンAの測定には ELISA を用い、トキシンBの測定には2倍段階希釈法により培養細胞に対するサイトトキシン活性を測定する方法を用いた。培養細胞はトキシンBに対する感受性が極めて高いので、本研究で用いた方法がトキシンB測定には一般的に用いられている²⁾。

まず各種アミノ酸欠損 BDM を用い、C. difficile の毒素産生に必須のアミノ酸を求めた。被験菌株の十分な発育・毒素産生にはバリン, システイン, トリプトファン, プロリン, メチオニン, ロイシン, イソロイシンが必須であった。Haslam ら¹⁰⁾は C. difficile 3菌株を用いて検討し、3菌株とも、著者の成績

と同様、これらのアミノ酸が発育・毒素産生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・毒素産生が認められないアミノ酸は、菌株により相違があるものの、著者の成績ではバリン, システイン, トリプトファン, プロリンであったが、Haslam ら¹⁰⁾の成績ではこれら4種に加うるにメチオニン, ロイシン, イソロイシンであった。さらに、Haslam ら¹⁰⁾の成績では菌株により異なるが、ヒスチジン, チロジン, リジン, グルタミン酸, アラニン, グリシンが菌の発育には必須ではないが毒素産生に必須であったと報告されている。上述の如く必須アミノ酸が異なった理由としては、使用した菌株の相違の他に使用培地の違いが挙げられる。著者の使用した培地と Haslam ら¹⁰⁾の培地との最も大きな相違点は培地 pH である。Haslam ら¹⁰⁾の培地 pH は約9と極めて高く、菌の発育には不適である。

上述の7種類の必須アミノ酸のみを含む培地における菌の発育は不良であったので、各種アミノ酸1種類のみを更に添加した培地における菌の発育を検討し、発育促進アミノ酸を求めた。11種類のアミノ酸の中でグリシン, スレオニンが菌の発育を明らかに促進した。しかしながら、グリシンおよびスレオニンを同時に添加した場合にも相乗作用は認められず、最高 OD₅₆₀ 値は18種類のアミノ酸全てを含んでいる BDM に比べ幾分低かった。1種類のみを添加した場合、その発育促進効果は明確ではなかった残り9種類のアミノ酸が、十分な発育には必要であることを示している。グリシン, スレオニンの発育促進作用は BDM に含まれている量が十分量であった。

7種類の必須アミノ酸量と産生毒素量の量的関係について検討した。これら必須アミノ酸の中でシステインは還元作用を有するところから、嫌気性菌の培養に当っては通常還元剤として用いられている²⁶⁾。本培地においてもシステインは還元剤として必須であることが考えられたので、還元剤としてシステインのかわりにチオグリコール酸ナトリウムを含んでいる BDM における菌の発育・毒素産生を検討した。チオグリコール酸ナトリウム添加 BDM における菌の発育・毒素産生はシステイン添加 BDM と同程度であったことから、BDM においてもシステインは還元剤として働いていることが明らかとなった。還元剤としてシステインを添加する場合0.05%が最適であり、それ以上の濃度は菌の発育に対し抑制的に働くことが知られている²⁶⁾。以上の点からシステイン濃度を0.05%とすることとした。次いで、VPI 10463 株を用いて、残り6種類のアミノ酸の量を BDM に含まれている量の2~10倍に増量し、毒素産生を検討した。

いかなる濃度においてもグリシン・スレオニンを含んでいる方が毒素産生が良好であり、これらの発育促進アミノ酸は毒素産生にも有効であることが分かった。トキシンBの値には差が認められなかったが、これはトキシンBの測定が2倍段階希釈法によっていることに起因するものと思われる。グリシン・スレオニン添加培地における毒素産生量はアミノ酸量を BDM の5倍量に増量した時、最高値に達した。6種類のアミノ酸中、毒素産生に最も有効なアミノ酸を明らかにするため、1種類のみを6倍量に増量した培地における毒素産生を検討した。6種類中バリン, イソロイシン, 特にイソロイシンが毒素産生に有効であり、6種類全てを増量した場合と等しい毒素産生が認められた。

以上の結果、C. difficile の毒素産生のための必須アミノ酸

はバリン, トリプトファン, プロリン, メチオニン, ロイシン, イソロイシンであり, 少なくともグリシン, スレオニンは毒素産生を増強することが分かった. 更に, 必須アミノ酸の中でイソロイシンが毒素産生に特に有効なことが分かった.

Clostridium の中では, 特に *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*), *Clostridium botulinum* (*C. botulinum*), *Clostridium tetani* (*C. tetani*) に関し毒素産生に必須あるいは有効なアミノ酸について研究されている. *C. perfringens* のエンテロトキシンは20種類^{27,28)}, α 毒素産生は19種類のアミノ酸を含む合成培地で産生される²⁹⁾. α 毒素産生に必須のアミノ酸はアルギニン, シスチン, グルタミン酸, グリシン, ヒスタジン, イソロイシン, ロイシン, メチオニン, フェニールアラニン, セリン, スレオニン, トリプトファン, チロジン, バリンの14種類であり, アラニン, アスパラギン酸, リジンは有効なアミノ酸である²⁹⁾. *C. botulinum* A, B型菌の神経毒素産生にはアルギニン, 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種類のアミノ酸が必須である^{30,31)}. *C. tetani* の神経毒素産生には少なくともアルギニン, グルタミン酸, ヒスタジン, イソロイシン, ロイシン, セリン, トリプトファン, チロジン, バリン, リジンの10種類が必須である³²⁻³⁴⁾. *C. difficile* の毒素産生に必須のアミノ酸は, 本研究で示された如く, 6種類にすぎず, 本菌は他の *Clostridium* と比べると極めて少ない種類のアミノ酸存在下で毒素産生が可能であることが示された.

C. difficile の毒素産生にはイソロイシンが特に有効であった. イソロイシンは *C. difficile* の孢子形成を顕著に促進するアミノ酸であり³⁵⁾, また *C. difficile* の毒素は孢子形成時期に産生される^{7,8)} ことを考え合わせると, イソロイシンが本菌の毒素産生の制御に重要な役割を演じている可能性がある.

C. difficile 20菌株について, BDM (18種類のアミノ酸を含む), 6種類の必須アミノ酸を6倍に増量した合成培地 (6×MADM) (9種類のアミノ酸を含む), イソロイシンのみを6倍に増量した合成培地 (6×I-MADM) (9種類のアミノ酸を含む) における毒素産生を, 複合培地 m-BHI と比較検討した. ほぼ全菌株共に, 3種類の合成培地の中では, 6×MADM において毒素産生が最も良好であった. 即ち, *C. difficile* の毒素産生には本研究で示した9種類のアミノ酸 (システインを含む) で十分であり, 他のアミノ酸は必ずしも必要でないことが分かった. 6×I-MADM および 6×MADM における毒素産生がほぼ等しい菌株が多かったが, 6×I-MADM よりも 6×MADM における方が毒素産生が良好な菌株も存在した. この様な菌株ではイソロイシン以外の必須アミノ酸が毒素産生に特に有効なものと考えられる. 6×MADM における毒素産生を m-BHI における場合と比較すると, 20株中13株ではトキシンB値は4倍以内であり, 本培地に含まれているアミノ酸, およびその濃度が *C. difficile* の毒素産生には極めて良好なことが示された.

m-BHI, 6×MADM においてトキシンB値が 2° CU/50 μ l 以下の場合, 本研究で用いた ELISA ではトキシンAは検出限界以下であったが, 濃縮することによりトキシンAの存在を認めた. 即ち, 有毒 *C. difficile* はトキシンA, トキシンB共に産生することが示された. 遺伝学的には有毒株はトキシンA, トキシンB遺伝子を共に有し, それらは染色体上に近接して存在することが明らかにされている³⁶⁻³⁹⁾. 上に示した如く, 培養液中にトキシンA, トキシンBが共に存在することは, 両トキシン

ン遺伝子の発現が同一機構により行なわれていることを示唆する.

複合培地では産生されたトキシンA量とトキシンB量は正の相関にある⁴⁰⁻⁴²⁾. 本研究で示された如く合成培地においても複合培地の場合と同様, トキシンA量とトキシンB量の間には正の相関が成立することが分かった. 即ち, トキシンA, トキシンBの産生量の制御は, 両培地において同一の機構による可能性が示唆された. 本研究で示された合成培地はアミノ酸組成が単純であり, 毒素産生機構解明のための有効な合成培地であると思われる.

結 論

C. difficile の毒素 (トキシンA, トキシンB) 産生に有効なアミノ酸について3菌株を用いて合成培地にて検討し, 更に新たに考案された合成培地における毒素産生について検討し, 次の結果を得た.

1. *C. difficile* の毒素産生に必須のアミノ酸はバリン, システイン, トリプトファン, プロリン, メチオニン, イソロイシン, ロイシンであった. これらのアミノ酸の中でシステインは還元剤として働いていることが示された.

2. 上記7種のアミノ酸にグリシン, スレオニンを添加した時, 菌の発育は促進された.

3. 7種の必須アミノ酸のみを含む培地と, さらにグリシン・スレオニンを添加した培地 (MADM) における毒素産生を VPI 10463 株を用いて比較した時, 後者の方が毒素産生により良好であった.

4. 必須アミノ酸 (システインを除く) を増量した時, 毒素産生は増加し, MADM においてはアミノ酸濃度を基礎濃度の5倍量に増量した時, 毒素産生は最高値に達した. また, これらの中でイソロイシンが毒素産生に最も有効であった.

5. 必須アミノ酸 (システインを除く) を基礎濃度の6倍に増量した合成培地 (6×MADM) における毒素産生は18種類のアミノ酸を含んでいる合成培地より良好であり, 被験20株中13株において複合培地 (m-BHI) とほぼ等しい毒素産生が認められた.

6. m-BHI, 6×MADM におけるトキシンA, トキシンBの産生は平行関係にあった.

以上の結果は, *C. difficile* の毒素産生に必須のアミノ酸の種類は他のクロストリジウム菌種の場合に比べ, はるかに少ないことを示している. さらに, トキシンA, トキシンBの産生は同一の機構により制御されていることを示唆している.

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衷心より深甚なる謝意を表します. また, 統計学的検討について御指導戴きました本学衛生学講座, 橋本和夫教授に深く感謝致します. さらに, 本研究の遂行にあたり多大な御協力を戴いた微生物学教室の諸先生方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) Goulsdon, S. J. M. & McGovern, V. J.: Pseudomembranous colitis. *Gut*, **6**, 207-212 (1965).
- 4) Tvede, M. & Madsen, J. R.: Bacteriotherapy for chronic relapsing *Clostridium difficile* diarrhoea in six patients. *Lancet*, **1**, 1156-1160 (1989).
- 5) Nakamura, S., Mikawa, M., Nakashio, S., Takabatake, M., Okado, I., Yamakawa, K., Serikawa, T., Okumura, S. & Nishida, S.: Isolation of *Clostridium difficile* from feces and antibody in sera of young and elderly adults. *Microbiol. Immunol.*, **25**, 345-351 (1981).
- 6) Viscidi, T., Willey, S. & Bartlett, J. G.: Isolation rates and toxigenic potential of *Clostridium difficile* isolates from various patient populations. *Gastroenterology*, **81**, 5-9 (1981).
- 7) Rolfe, R. D. & Finegold, S. M.: Purification and characterization of *Clostridium difficile* toxin. *Infect. Immun.*, **25**, 191-201 (1979).
- 8) Lonroth, I. & Lange, S.: Toxin A of *Clostridium difficile*: production, purification and effect in mouse intestine. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, **91**, 395-400 (1983).
- 9) Kamiya, S., Ogura, H., Meng, X. Q. & Nakamura, S.: Correlation between cytotoxin production and sporulation of *Clostridium difficile*. *J. Med. Microbiol.* (in press).
- 10) 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).
- 11) 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).
- 12) Redmond, S. C., Ketley, J. M., Mitchell, T. J., Stephen, J., Burdon, D. W. & Candy, D. C. A.: Detection of *Clostridium difficile* enterotoxin. In G. H. Collins & J. M. Grange (eds.), *Isolation and Identification of Microorganisms of Medical and Veterinary Importance*, p237-250. Academic Press, London, 1985.
- 13) Kamiya, S., Reed, P. J. & Borriello, S. P.: Purification and characterization of *Clostridium difficile* toxin by bovine thyroglobulin affinity chromatography and dissociation in denaturing conditions with or without reduction. *J. Med. Microbiol.*, **30**, 69-77 (1989).
- 14) Ehrich, M., Van Tassel, R. L., Libby, J. M. & Wilkins, T. D.: Production of *Clostridium difficile* antitoxin. *Infect. Immun.*, **28**, 1041-1043 (1980).
- 15) 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**, S11-S20 (1984).
- 16) Sullivan, N. M., Pellet, S. & Wilkins, T. D.: Purification and characterization of toxins A and B of *Clostridium difficile*. *Infect. Immun.*, **35**, 1032-1040 (1982).
- 17) Lima, A. A. M., Lyerly, D. M., Wilkins, T. D., Innes, D. J. & Guerrant, R. L.: Effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in rabbit small and large intestine in vivo and on cultured cells in vitro. *Infect. Immun.*, **56**, 582-588 (1988).
- 18) Libby, J. M., Jortner, B. S. & Wilkins, T. D.: Effects of the two toxins of *Clostridium difficile* in antibiotic-associated cecitis in hamsters. *Infect. Immun.*, **36**, 822-829 (1982).
- 19) Lyerly, D. M., Saum, K. E., MacDonald, D. K. & Wilkins, T. D.: Effects of *Clostridium difficile* toxins given intragastrically to animals. *Infect. Immun.*, **47**, 349-352 (1985).
- 20) Ecker, J. A., Williams, R. G., McKittrick, J. E. & Failing, R. M.: Pseudomembranous enterocolitis-an unwelcome gastrointestinal complication of antibiotic therapy. *Am. J. Gastroenterol.*, **54**, 214-228 (1970).
- 21) Larson, H. E., Price, A. B., Honour, P. & Borriello, S. P.: *Clostridium difficile* and the etiology of pseudomembranous colitis. *Lancet*, **1**, 1063-1066 (1978).
- 22) Borriello, S. P. & Larson, H. E.: Antibiotic and pseudomembranous colitis. *J. Antimicrob. Chemother.*, **7**, (Suppl. A), 53-62 (1981).
- 23) 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).
- 24) 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).
- 25) 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).
- 26) Smith, L. D. S. & Williams, B. L.: *The Pathogenic Anaerobic Bacteria*, 3rd ed., p7-17, Charles C Thomas Publisher, Springfield, 1984.
- 27) Sacks, L. E. & Thompson, P. A.: Clear, defined medium for the sporulation of *Clostridium perfringens*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **35**, 405-410 (1987).
- 28) Labbe, R. G.: Enterotoxin formation by *Clostridium perfringens* type A in a defined medium. *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**, 315-317 (1961).
- 29) Murata, R., Yamamoto, A., Soda, S. & Ito, A.: Nutritional requirements of *Clostridium perfringens* PB6K for alpha toxin production. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, **18**, 189-202 (1965).
- 30) Whitmer, M. E. & Johnson, E. A.: Development of improved media for *Clostridium botulinum* serotypes A, B, and E. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 753-759 (1988).
- 31) Patterson-Curtis, S. I. & Johnson, E. A.: Regulation of neurotoxin and protease formation in *Clostridium botulinum* Okura B and Hall A by arginine. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 1544-1548 (1989).
- 32) Muller, J. H. & Miller, P. A.: Separation from tryptic

- digests of casein of some acid-labile components essential in tetanus toxin production. *J. Bacteriol.*, **69**, 634-642 (1955).
- 33) Muller, J. H. & Miller, P. A.: Essential role of histidine peptides in tetanus toxin production. *J. Biol. Chem.*, **223**, 185-194 (1956).
- 34) Kaufman, L. & Humphries, J. C.: Studies of the nutritional requirements of *Clostridium tetani* I. A chemically defined medium. *Appl. Microbiol.*, **6**, 311-315 (1958).
- 35) 沖野善則: *Clostridium difficile* の孢子形成に及ぼすアミノ酸の影響. 十全医会誌, **101**, 68-78 (1992).
- 36) Johnson, J. L., Phalos, C., Barroso, L., Roberts, M. D., Lyery, D. M. & Wilkins, T. D.: Cloning and expression of the toxin B gene of *Clostridium difficile*. *Curr. Microbiol.*, **20**, 397-401 (1990).
- 37) Dove, C. H., Wang, S. Z., Price, S. B., Phelps, C. J., Lyery, D. M., Wilkins, T. D. & Johnson, J. L.: Molecular characterization of the *Clostridium difficile* toxin A gene. *Infect. Immun.*, **58**, 480-488 (1990).
- 38) Wren, B. W., Clayton, C. L. & Tabaqchali, S.: Nucleotide sequence of *Clostridium difficile* toxin A gene fragment and detection of toxigenic strains by polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol. Lett.*, **70**, 1-4 (1990).
- 39) McMillin, D. E., Muldrow, L. L., Leggette, S. J., Abdulahi, Y. & Ekanemesang, U.: Molecular screening of *Clostridium difficile* toxins A and B genetic determinants and identification of mutant strain. *FEMS Microbiol. Lett.*, **78**, 75-80 (1991).
- 40) Wren, B., Heard, S. R. & Tabaqchali, S.: Association between production of toxins A and B and types of *Clostridium difficile*. *J. Clin. Pathol.*, **40**, 1397-1401 (1987).
- 41) Lyerly, D. M., Sullivan, N. M. & Wilkins, T. D.: Enzyme-linked immunosorbent assay for *Clostridium difficile* toxin A. *J. Clin. Microbiol.*, **17**, 72-78 (1983).
- 42) Laughon, B. E., Viscidi, R. P., Gdovin, S. L., Yolken, R. H. & Bartlett, J. G.: Enzyme immunoassays for detection of *Clostridium difficile* toxins A and B in fecal specimens. *J. Infect. Dis.*, **149**, 781-788 (1984).

Amino Acids Effective for Toxin Production by *Clostridium difficile* Strains Tohru Hasuike, Department of Bacteriology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., **101**, 954—964 (1992)

Key words *C. difficile*, toxin A, toxin B, amino acid, defined medium

Abstract

The amino acids effective for toxin production (toxin A and toxin B) by *Clostridium difficile* (*C. difficile*), which is the cause of pseudomembranous colitis and some cases of antibiotic-associated diarrhea, were investigated using 3 strains in a defined medium. The defined medium consisting of 18 amino acids was used as a basal defined medium (BDM). By using each amino acid-deficient BDM, it was revealed that, for sufficient toxin production, valine, cysteine, tryptophan, proline, methionine, isoleucine and leucine were essential. It was also revealed that, out of these 7 essential amino acids, cysteine was needed as a reducing agent. By estimating bacterial growth in media consisting of the 7 essential amino acids and each of the remaining 11 amino acids, it was found that glycine and threonine could enhance the bacterial growth. Basal concentrations of these two amino acids, which are those in BDM, were sufficient for the growth enhancement. Media consisting of the 7 essential amino acids, and of these amino acids, glycine and threonine (minimal amino acid-defined medium, MADM) were compared for toxin production by a strain VPI 10463. Results showed that the latter is superior to the former. When amounts of 6 essential amino acids (valine, tryptophan, proline, methionine, isoleucine and leucine) were increased, toxin production was also increased; toxin production reached the maximum level at the concentrations of these amino acids 5-fold higher than the basal concentrations. In addition, it was revealed that, out of these 6 amino acids, isoleucine was the most effective for toxin production. Furthermore, toxin production of 20 toxigenic *C. difficile* strains was examined using modified brain heart infusion (m-BHI), BDM, MADM containing valine, tryptophan, proline, methionine, isoleucine and leucine at concentrations 6-fold higher than those in BDM (6-fold MADM, 6×MADM), and MADM containing isoleucine at a concentration 6-fold higher than that in BDM (isoleucine-6-fold MADM, 6×I-MADM). Out of the 3 different defined media mentioned above, the 6×MADM was the most effective for toxin production. When the 6×MADM was compared for toxin production with m-BHI, which is an excellent complex medium for toxin production, out of 20 strains tested 13 strains produced nearly equal amounts of toxins in both media, indicating that the 6×MADM is fairly excellent for toxin production. By static analysis of correlation between productivities of toxins A and B in m-BHI and 6×MADM, it was demonstrated that both toxins were produced in parallel in amount. These findings indicate that number of essential amino acids for toxin production by *C. difficile* are far less than those in the other clostridial species, and suggest that production of toxins A and B might be regulated by a common mechanism.