

Clostridium difficileの毒素産生とその毒素原性

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/2297/8845

Clostridium difficile の毒素産生とその毒素原性

金沢大学医学部微生物学教室 (主任: 西田尚紀教授)

金沢医科大学老年病学教室 (主任: 関本 博教授)

高 晶 学

(昭和55年6月30日受付)

Clostridium difficile は、1935年、Hall と O'Toole¹⁾ によって、新生児の便中よりはじめて分離され、新生児の下痢や便潜血陽性等の症状がこの菌の毒素によるものかもしれないと報告された。しかし、その後、分離方法の困難さのためか、その存在は報告されなかった。近年、抗生物質の開発、使用とともに、抗生物質使用患者がしばしば下痢を主症状とする偽膜性大腸炎を合併することが報告され^{2)~4)}、しかもその便中に、C.difficile によると思われる毒素が証明された。この毒素液を実験動物に注射することにより、人間と同様な偽膜性大腸炎を発症せしめることが認められ^{5)~9)}、一躍、臨床細菌学上、脚光をあびるようになってきた。そのため、分離用培地、毒素産生用培地などの検討も、盛んにおこなわれるようになってきた。George 等は¹⁰⁾、1978年、cycloserine, cefoxin, フラクトース、及び卵黄を含む CCFA と名付けた C.difficile の選択培地を考案し、以来、糞便よりの分離が容易になった。また、C.difficile の毒素産生には、George 等は¹¹⁾、Chopped - meat - glucose 培地 (CMG 培地)、また、Bartlett 等^{12)~13)}、及び Larson 等¹⁴⁾は、Brain Heart Infusion 培地 (BHI 培地) が最適と報告している。さらに、Rolfe 等は¹⁵⁾、この2種の培地とともに、Proteose peptone No. 3 を含む培地も同程度に有効であるとし、また培養については、嫌氣的 (N₂80%, CO₂10%, H₂10%) 環境下での培養が良いと報告している。

著者は、本論文において、特に嫌氣的培養操作を用いないで、普通の好氣的培養下で、C.difficile の毒素産生に充分適する培地について検討したので報告する。またこの培地を用いて、偽膜性大腸炎患者、抗生

物質使用中の患者、及び健康人の糞便より分離した、C.difficile の各株の毒素産生能を、従来から用いられている CMG 培地、及び BHI 培地による毒素産生とを比較検討し、さらに、症状と、毒素産生との関連についても検討した。

材料及び方法

I. 使用菌株

C.difficile ATCC17859 株を用いて毒素産生の至適培養条件を検討した。その他、以下の菌株について、毒素原性を検討した。A 群; 抗生物質投与による偽膜性大腸炎患者糞便から分離した菌株。No.51,53,55,57 の計4株。B 群; 抗生物質投与により下痢を生じたが、内視鏡的、病理組織学的に偽膜性大腸炎を認めなかった患者糞便から分離した菌株。No.59, 74, 77 の計3株。C 群; 抗生物質投与を受けたが、下痢その他の胃腸症状を全く呈さなかった患者糞便より分離された菌株。No.80, 82, 84, 86 の計4株。D 群; 健康成人糞便より分離した菌株。No.78, 101, 102, 103, 104, 105, 110 の計7株。No.78 は、No.53 と同一の患者より分離されたもので、偽膜性大腸炎が完全に治癒して、2ヶ月後の糞便中より分離されたものである。この時、患者は抗生物質の投与をうけていなかった。No.53 を除いた A, B, C 群の菌株、および D 群の No.73 の菌株は、東京都養育院の島田博士、No.53 は東京女子医大の清水博士より供与されたものであり、D 群の菌株は、著者らが分離したものである。A 群~D 群の菌株はいずれも、C.difficile 分離用の CCFA 培地を用いて分離したものであり、同定は、VPI Anaerobe Laboratory Manual に従っておこなった。

Toxin production and toxigenicity of Clostridium difficile. Satoru Takabatake, Department of Bacteriology, (Director: Prof. S. Nishida) School of Medicine, Kanazawa University and Department of Gerontology, (Director: Prof. H. Sekimoto) Kanazawa Medical University.

II. 毒素産生用培地

0.1% Na-thioglycollate を含む培地を毒素産生基礎培地とし、以下の Peptone、および糖について検討した。被験 Peptone; Tryptose (Difco Laboratories, Detroit, Mich., U.S.A.), Proteose peptone (Difco), Proteose peptone No. 2 (Difco), Proteose peptone No. 3 (Difco), Casitone (Difco), Neopeptone (Difco), Bacto-peptone (Difco), Casamino acids (Difco), Mikuni peptone (Mikuni, Tokyo, Japan), Polypeptone (Daigo, Osaka, Japan), Polypeptone S (Daigo), Trypticase peptone (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, Md., U.S.A.), NZ case (Sheffield Chem., New York, N.Y., U.S.A.). 被験糖; フラクトース, グルコース, メレチトース, マニトール, キシロース及びマンノース。被験糖は、10 ml の基礎培地に、ザイツ濾過器で滅菌した 10% 溶液を加えて、最終濃度 0.5% になる様に加えた。なお対照として、Brain Heart Infusion 培地 (BHI; BBL Microbiology Systems), Chopped - meat - glucose 培地 (CMG)¹⁶⁾ を用いた。

III. 菌の接種方法及び培養方法

各菌株を、10 ml の Fluid Thioglycollate Medium (FTG; Nissan Co., Tokyo, Japan) 中で、18 時間、37°C で培養後、さらに再度、FTG 中に接種しなおし、37°C、8 時間培養後、各 0.2 ml を各々の被験培地 10 ml へ接種した。著者の培地に関しては、Na-thioglycollate の添加以外、嫌気状態には留意せず、静置培養を行った。しかし、BHI 培地、CMG 培地は、嫌気状態 (N₂80%, CO₂10%, H₂10%) で培養した。培養はいずれの培地においても、37°C で 7 日間行った。

IV. 培養濾液の調整

培養濾液は、各々の培養液を 10,000 回転、5 分間遠心後、その上清を取り、毒素液とした。

V. マウス致死毒素量の検討

C. difficile の毒素量の定量を、マウス致死毒素量により検討した。毒素液は、0.02% の gelatin-phosphate 希釈液 (pH 6.5) にて、順次 2 倍希釈し、各毒素液につき、1~2 匹のマウス尾静脈に、各 0.25 ml 注射し、注射後、48 時間内の死亡の有無について観察し、MLD/ml をもとめた。

成 績

I. 毒素産生に対する各種 Peptone の影響

Tryptose, Proteose peptone No. 3, Proteose peptone, Proteose peptone No. 2 など、計 13 種類のおおの Peptone について、1.5% Peptone 加基礎培地を作製し、滅菌後、別に滅菌したグルコース、あるいはフラクトースを最終濃度 0.5% になる様に添加し、煮沸、急冷後、C. difficile ATCC17859 培養菌液を接種、37°C 1 週間培養後、その毒素産生を検討した (Table 1)。その結果、Tryptose, Proteose peptone No. 3, Proteose peptone の 3 種の Peptone がこの菌の毒素産生に良好なことがわかった。また、毒素価が、1024 MLD/ml 以上を示す培地は、いずれも、培養液 pH は、6.0 以上であった。逆に、グルコースを添加した NZ case、及び Polypeptone 加基礎培地、またフラクトースを添加した NZ case、及び Polypeptone 加基礎培地では、培養液 pH は、6.0 以下を示し、毒性は 8 MLD/ml 以下と低い値を示した。Bacto-peptone, Casamino acids 加基礎培地では、菌の発育が悪く、毒素の産生も低かった。以上の結果、以下の実験では、Peptone として、Tryptose と Proteose peptone を用いて検討した。

II. 毒素産生に対する各種糖の影響

1.5% の Tryptose、及び Proteose peptone 加基礎培地に、フラクトース及びグルコースをはじめとする分解陽性糖計 6 種の糖を各々 0.5% 添加し、その毒素産生に及ぼす影響を検討した (Table 2)。表のごとく、他の糖に比べて、フラクトース及び、グルコース加基礎培地において、高い毒素産生が認められた。培養液 pH は、いずれの糖添加培地においても、6.0 以上であった。また菌の発育は、フラクトースの存在下において最も良好で、グルコース、マンノース、メレチトース、マニトール、キシロースの順に低下した。以上の結果、以下の実験において、糖として、フラクトース、及びグルコース、Peptone として、Tryptose を用いた。

III. 毒素産生に対する糖濃度の影響

II の実験において検討した 6 種の糖のうち、フラクトース、及びグルコースが毒素産生に最も有効であると思われたので、そのおおの糖について、至適濃度を決定するためにこの実験を行った (Table 3)。菌の増殖は、フラクトース添加培地の方が各濃度において、グルコース添加培地よりもやや良好であった。グルコースは 0.5% で 1024 MLD/ml と最高の致死毒性を示した。しかし、0.75%, 1%, 1.5% では、0.5% の場合に比べて、菌の増殖状況はほぼ同程度であるのに、それぞれ、8, 8.4 MLD/ml と低い致死毒性しか示さなかった。この 0.75%, 1%, 1.5% では、

Table 1. Effect of peptone on toxin production

Peptone	Toxicity (MLD/ml) in the medium containing 0.5% of	
	Glucose	Fructose
Tryptose (Difco)	512	1024
Proteose pep. No. 3 (Difco)	512	1024
Proteose peptone (Difco)	1024	512
Proteose pep. No. 2 (Difco)	256	512
Casitone (Difco)	512	256
Mikuni peptone (Mikuni)	128	256
Polypeptone S (Daigo)	8	256
Trypticase peptone (BBL)	128	128
Bacto-peptone (Difco)	64	128
Neopeptone (Gifco)	64	64
Casamino acids (Difco)	16	32
NZ case (Sheffield Chem.)	4	8
Polypeptone (Daigo)	0	0

Basal medium : Peptone 1.5%, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.0%, Yeast extract 0.4%,
Na-thioglycollate 0.1%.

Strain used : Clostridium difficile ATCC 17859.

Table 2. Effect of sugar on toxin production

Sugar	Toxicity (MLD/ml) in the medium containing 1.5% of	
	Tryptose	Proteose peptone
Fructose	1024	512
Glucose	512	512
Melezitose	64	256
Mannitol	128	32
Xylose	128	8
Mannose	64	32
No sugar	8	8

Basal medium : Sugar 0.5%, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.0%, Yeast extract 0.4%,
Na-thioglycollate 0.1%.

Strain used : Clostridium difficile ATCC 17859.

いずれも培養液 pH は 6.0 以下であった。フラクトースの場合も、ほぼグルコースの場合と同じ結果を示し、その 0.5% 濃度が 1024 MLD/ml で最高の致死毒性を示し、pH に関しても同じ結果を示した。以上の結果より、フラクトース、及びグルコースの濃度は、0.5% が至適と思われた。

IV. 毒素性に対する Tryptose peptone の濃度の影響

各種濃度の Tryptose peptone 加基礎培地に、0.5% の割に、フラクトース、またはグルコースを添加し、Tryptose peptone の毒素産生における至適濃度を検討した (Table 4)。フラクトースを添加した時、

Tryptose peptone 濃度が、1.5%、2.0%、3.0% のいずれにおいても、1024 MLD/ml と、最高の致死毒性を示した。一方、グルコースを添加した時は、Tryptose peptone の濃度が 2.0% ののみ、1024 MLD/ml の致死毒性を示した。以上より、Tryptose peptone の濃度として、2.0% を用いることにした。また、フラクトースがグルコースより、Tryptose peptone の各濃度に対して比較的安定した毒素産生を示したので、糖としては、0.5% フラクトースを用いることとした。以上の結果より、2% Tryptose peptone、0.5% フラクトース加基礎培地 (以下、TYF 培地と呼ぶ) が、毒素産生に最も有効な

Table 3. Effect of sugar concentrations on toxin production

Sugar concentration (%)	Bacterial growth (OD560)	pH	Toxicity (MLD/ml)
Glucose	0.25	0.64	128
	0.50	1.00	1024
	0.75	1.04	8
	1.00	1.04	8
	1.50	0.98	4
Fructose	0.25	0.67	128
	0.50	0.95	1024
	0.75	1.22	8
	1.00	1.21	4
	1.50	1.21	0

Basal medium : Tryptose 2.0%, Yeast extract 0.4%, Na₂HPO₄ · 12H₂O 1.0%.
Strain used : Clostridium difficile ATCC 17859.

Table 4. Effect of tryptose peptone concentrations on toxin production

Tryptone concentration (%)	Toxicity (MLD/ml) in the medium containing 0.5% of	
	Fructose	Glucose
0.5	256	128
1.0	256	256
1.5	1024	512
2.0	1024	1024
3.0	1024	256

Basal medium : Yeast extract 0.4%, Na₂HPO₄ · 12H₂O 1.0%, Na-thioglycollate 0.1%.
Strain used : Clostridium difficile ATCC 17859.

ことがわかったので、以下の実験には、この培地を用いた。

V. 毒素産生に対する金属イオンの影響

Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ の各種イオンの、*C. difficile* の毒素産生に及ぼす影響を検討したが、何らの影響も及ぼさなかった。

VI. 毒素産生に対する培養温度の影響

TYF 培地の至適温度を決定するためにこの実験を行った (Table 5)。表のごとく、37℃で最高の致死毒性を示し、それ以下の温度では明らかに、致死毒性の低下を示した。従って、至適培養温度は37℃として、以下の実験を行った。

VII. 毒素産生に対する培養期間の影響

TYF 培地を用いて、静置培養における、*C. difficile* の毒素産生と培養時間の関係を検討した (Table 6)。培養1日目ですでに毒素が認められ、培養7日目に最高に達し、培養14日まで低下しなかったが、培養21日目には著明に低下した。

VIII. 毒素産生に対する培養気相条件の影響

TYF 培地を用いて、非嫌氣的又は嫌氣的培養条件における1週間培養後の毒素産生を検討した (Table 7)。菌の増殖は、非嫌氣的、嫌氣的培養、いずれの場合でも大きな差異は認められなかったが、毒素産生は、非嫌氣的培養において、最も良好であった。培養液 pH は嫌氣的培養においては、 H_2 存在下を除き、より酸性に傾むいた。

IX. 各種培地における *C. difficile* ATCC17859 の毒素産生

Table 8 のように、TYF 培地、及び従来より *C. difficile* の毒素産生用培地として報告されている Chopped-meat-glucose 培地 (CMG 培地)、Brain Heart Infusion 培地 (BHI 培地) を用いて、非嫌氣的、及び N_2 80%、 CO_2 10%、 H_2 10% の嫌氣的条件下にて、3日間、および7日間培養し、各々の毒素産生について検討した。TYF 培地では明らかに非嫌氣的静止培養の方が、毒素産生は良好であり、逆に、

Table 5. Effect of incubation temperature on toxin production

Incubation temperature (°C)	Bacterial growth (OD560)	pH	Toxicity (MLD/ml)
30	0.57	6.21	32
37	1.09	6.47	512
42	1.16	6.52	256

Medium: Tryptose 2.0%, Yeast extract 0.4%, Fructose 0.5%, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 1.0%, Na-thioglycollate 0.1%.
Strain used: *Clostridium difficile* ATCC 17859.

Table 6. Effect of incubation period on toxin production

Incubation period (Day)	Bacterial growth (OD560)	pH	Toxicity (MLD/ml)
1	0.94	5.78	32
3	0.95	6.08	64
5	1.00	6.15	256
7	1.05	6.30	1024
14	1.17	6.45	1024
21	1.38	6.60	256

Medium: Tryptose 2.0%, Yeast extract 0.4%, Fructose 0.5%, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 1.0%, Na-thioglycollate 0.1%.
Strain used: *Clostridium difficile* ATCC 17859.

CMG 培地, BHI 培地では嫌氣的条件での培養方法が良好であった。また培養期間に関しては、いずれの培地においても7日間培養で十分であることがわかった。以下の実験では、2% Tryptose peptone, 0.5% フラクトースを含む TYF 培地を用いて、37℃、7日間培養にて、C. difficile の毒素産生を検討した。

X. 異った由来の C. difficile の毒素産生

様々な糞便より分離された18株の、C. difficile の毒素産生を、従来より、本菌の毒素産生に使用されている CMG 培地, BHI 培地, そして、今回考案した TYF 培地を用いて、検討した (Table 9)。CMG 培地及び BHI 培地は、方法の項で述べた嫌氣的条件下で、また TYF 培地は非嫌氣的静置培養で、37℃、7日間培養した。検討した18株中11株に毒素産生を認めた。内視鏡的及び病理学的に偽膜性大腸炎と診断された患者から得られた A 群は全株に、毒素産生が認められた。抗生物質投与後、下痢症状を呈したが偽膜性大腸炎を認

めなかった B 群は3株中1株に毒素産生が認められた。抗生物質投与後も、何らの胃腸症状も呈しない患者由来の C 群は4株中1株に毒素産生が認められた。健康成人の D 群では、7株中5株に毒素産生が認められた。毒素産生の有無に関しては、BHI 培地, CMG 培地、及び TYF 培地では全く同じ結果を示した。しかし毒素産生量に関しては、各培地間に明らかに差が認められ、TYF 培地では11株中9株 (82%) において、他の培地と同等もしくはより良好な毒素産生を示した。

以下において、各 C. difficile と臨床的所見との関連について検討した。抗生物質の投与をうけている11人の患者より分離された11株の C. difficile (A, B, C 群) のうち、偽膜性大腸炎を呈した A 群は、4株すべてに毒素産生が認められ、偽膜性大腸炎を呈しなかった B, C 群は、7株中わずか2株にしか、毒素産生が認められず、抗生物質投与をうけている患者においては、

Table 7. Toxin production under different gas conditions

Gas condition	pH	Toxicity (MLD/ml)
Aerobic	6.15	1024
N ₂ 90%, H ₂ 10%	5.90	128
N ₂ 80%, CO ₂ 10%, H ₂ 10%	6.05	128
CO ₂ 90%, H ₂ 10%	5.72	64
H ₂ 100%	6.25	32

Medium : Tryptose 2.0%, Yeast extract 0.4%, Fructose 0.5%, Na₂HPO₄ 12H₂O 1.0%, Na-thioglycollate 0.1%.
Strain used : Clostridium difficile ATCC 17859.

Table 8. Toxin production of C. difficile ATCC 17859 in different media

Medium	Incubation condition	Lethal toxicity (MLD/ml) in culture supernatant fluid incubated for	
		3 days	7 days
TYF	Aerobic	256	1024
	Anaerobic*	128	128
CMG	Aerobic	128	256
	Anaerobic	256	512
BHI	Aerobic	16	16
	Anaerobic	256	256

*.....Incubation condition : N₂ 80%, CO₂ 10%, H₂ 10%.

偽膜性大腸炎の発症と、糞便中に存在する *C. difficile* の毒素産生とは密接な関係が認められた。

また、No. 57 と No. 78 の株は、同一患者の便より分離されたもので、No. 57 は偽膜性大腸炎発症中に、No. 78 は偽膜性大腸炎が治癒して 2 ヶ月後に、再び糞便中より分離されたものであるが、No. 57 は、TYF 培地にて 512 MLD/ml の致死毒性を示したのに対して、No. 78 はいずれの培地でも致死毒を産生しなかった。No. 78 を含む D 群の 7 株は、抗生物質の投与をうけていない健康成人の糞便より得られたものである。No. 78 以外の 6 株は、被験成人 40 人中 6 人の糞便より分離されたものであり、*C. difficile* を有する割合は 15% であった。いずれも、糞便 1g あたりの *C. difficile* 数は $10^2 \sim 10^8$ 台の菌数を示した。また総菌数は 10^{11} 台を示した。6 株のうち、5 株に毒素産生が認められ、しかも、その毒素原性は、偽膜性大腸炎の 4 株に比して、同等もしくは比較的高い値を示した。

考 察

近年、リンコマイシン、クリンダマイシンなどの各種抗生物質使用後に、下痢を主症状とする偽膜性大腸炎がしばしばみられることが報告され⁶⁷⁾、その原因として、患者糞便中より分離される *C. difficile* が産生する毒素が最も疑わしいものとされ、偽膜性大腸炎患者よりの *C. difficile* の分離や、糞便中の毒素量の定量、

及び実験的に、*C. difficile* に毒素を産生させ、その毒素の生物学的及び生化学的性状の検討が盛んに行なわれている^{61)3)-15,18)}。

この研究において、まず *C. difficile* に、より有効な毒素産生をもたらす培地について検討した。従来より、*C. difficile* の毒素産生用培地としては、BHI 培地¹²⁾¹⁴⁾、CMG 培地¹¹⁾、Proteose peptone 培地¹⁹⁾など、様々な培地が使用されている。Rolfe 等は¹⁵⁾、従来より様々な使用されている培地を使用して、その毒素産生について、細胞毒性を指標に、同一条件でその優劣を検討したが、CMG 培地、BHI 培地、及び彼等が考案した 3% の Proteose peptone を含む培地が、ほぼ同様の毒素産生を示し、他の培地に比して、優秀であるとし、毒素産生用培地として、嫌氣的にこれ等の培地を使用する方が良いと述べている。しかし著者はこの研究において、毒素産生用培地として、TYF 培地を考案し、好氣的静置培養にて、今回検討した *C. difficile* の 11 株の毒素産生株のうち、9 株に、CMG 培地、BHI 培地よりも高い毒素産生を示した。嫌氣性菌の培養において、好氣的静置培養の方がより有効であることは、一見奇異な現象に思える。Onderdonk 等は²⁰⁾、*C. difficile* の毒素産生に及ぼす環境の変化について検討し、培地が環元状態から酸化状態に変化する時、細胞から毒素を放出すると述べている。著者の成績では、好氣的静置培養において、菌の増殖は、様々な嫌

Table 9. Production of toxin in different media by *C. difficile* strains

Group*	Strain	Lethal toxicity (MLD/ml) in 1 week culture supernatant fluid of		
		BHI#	CMG	TYF
A	51	32	64	256
	53	32	8	32
	55	128	64	512
	57	16	64	512
B	59	0	0	0
	74	0	0	0
	77	1024	512	128
C	80	0	0	0
	82	0	0	0
	84	0	0	0
	86	64	256	256
D	78	0	0	0
	101	256	128	1024
	102	32	128	128
	103	4	16	16
	104	256	64	1024
	105	0	0	0
	110	16	128	32

*Refer to materials and methods.

.....BHI and CMG were incubated anaerobically, and TYF aerobically.

気培養に比して劣っておらず、培地中に、十分でかつ適当な環元物質を含んでおれば、非嫌気的培養においても、菌の発育は抑制されず、しかも毒素産生も抑制されないとされた。また、毒素の細胞内から培地中への放出には、むしろ有用に作用すると思われた。

C. difficile の毒素産生に及ぼすpH変化の影響については、多くの研究者達により検討されており^{15),20)~22)}、毒素は、pH 6.0~7.0 前後で最も安定し、pH 4.0~5.0、またはpH 8.0~9.0 に変化すると、失活すると述べている。著者の実験では、Table 7 に示したごとく、非嫌気的培養と、嫌気培養とに、毒素産生に差が認められるのは、嫌気培養においては、pHが、6.0 以下になる傾向があるため、毒素の失活が幾分か生ずることがその原因の1つと考えられる。また毒素産生用培地の糖として、グルコースよりフラクトースがより有効であったことは、グルコースの発酵が普通、フラクトースに比べて、酸の産生が早く多いことにより、培地pHの低下をひきおこしやすいことと、関連があると思われる。

培養期間に関しては、多くの研究者達は、2~7日間と、様々に行っている。Bartlett 等は¹⁸⁾、C. difficile の培養を継続し、培養細胞中と、培養濾液中の、毒素量について検討しているが、24~48時間では、細胞内に毒素量が多く、逆に、72~98時間経過すると、細胞外の培養液中に毒素量が多く存在することを報告している。著者は、TYF 培地にて、1日目から21日目まで培養し、培養濾液中の毒素量をマウス致死毒にて検討したが、1日目より次第に毒素量が増し、7日目、14日目で最高の値を示したが、彼等の述べているように、細胞内から細胞外への毒素の放出の時間的経過と、ほぼ一致した傾向を示した。以上のことにより、毒素産生のためには、少くとも培養時間は、5日以上必要があると思われる。

次に、偽膜性大腸炎と抗生物質の関連について、及び患者より分離されたC. difficile の毒素産生について、今回糞便中より分離された17株を使用して、BHI 培地、CMG 培地、及びTYF 培地を用いて検討した。抗生物質服用により、偽膜性大腸炎を生じた患者より分離されたC. difficile の4株にすべて、マウス致死毒性が認められ、逆に抗生物質を使用しながら偽膜性大腸炎を生じなかった患者由来の7株のうち、わずか2株に毒性が認められたにすぎなかった。従って、C. difficile の毒素産生と偽膜性大腸炎発症との間には、密接な関連があると思われた。Bartlett 等も¹⁹⁾、リンコマイシン服用による偽膜性大腸炎患者4人のすべての便に、細胞毒性が認められ、逆にリンコ

マイシンを服用して、単に下痢症状しか呈さなかった患者54人中、わずか1人の便にしか細胞毒性が認められないこと、及び、偽膜性大腸炎患者の糞便中より高頻度にリンコマイシン耐性のClostridiaが分離され、これがC. difficile であると報告している。

今回、抗生物質服用の患者とは別に、健康人の糞便より、マウスの致死毒性を示す、C. difficile が分離された。Larson¹⁴⁾、George²³⁾ 等も同様な報告を行っている。しかし、下痢、腹痛などの消化器症状を全く示さない健康人の糞便より毒素原性の強いC. difficile が分離されることは、一見不思議な現象の様にみえる。Hall and O'Toole が¹¹⁾1935年、正常新生児の胎便中から40%に、C. difficile を分離してしまい、あまり関心ももたれていなかったこの菌も、選択培地の考案とともに、最近、健康人の糞便中より分離する努力が盛んになさられている。現在では、正常腸内細菌叢の1つとしての地位を得た感すらある。Sutter 等は¹¹⁾、正常人137人中4人より、糞便1gあたり $10^2 \sim 10^3$ 個と、低い菌数ながらも分離している。著者も、1gあたり $10^2 \sim 10^6$ 個程度の菌数のC. difficile を、40人中6人に認めた。将来、選択培地の改良により、この菌の検出率はより高くなることが予想されるが、現在の方法では、C. difficile は健康人において、10%内外存在すると思われる。このように、10%内外の健康人腸管に、毒素産生を示すC. difficile が存在し、しかも何らかの偽膜性大腸炎を含む消化器症状を呈しないのは、成人の腸内細菌叢は、糞便1gあたり 10^{11} 個程度の細菌よりなり、たとえ、毒素産生株であっても、 $10^2 \sim 10^6$ 個程度の菌数では、他の優勢な腸内細菌の存在により、その毒素産生が抑制されているためであると考えられる。一方、Dabard 等が⁶⁾推論したごとく、抗生物質使用により、抗生物質感受性の正常腸内細菌叢が乱され、C. difficile の毒素産生に拮抗的に作用していた腸内細菌が減少することにより、抗生物質非感受性の、毒素産生能を有するC. difficile が、その病原性を発揮すると考えるのが妥当であろう。抗生物質を使用しながらも偽膜性大腸炎を発症せしめない患者由来の、C. difficile には、無毒株が多いことも、その説明になりうると考えられる。

C. difficile が、細胞毒のみならず致死毒性を示すことは、Hall and O'Toole が¹¹⁾、この菌を最初に分離し、その毒性を検討した時に報告している。彼等は、モルモットと、家兎を用いて実験を行っている。今回、著者はC. difficile の毒素産生をマウス致死毒を指標として、この実験を行ったが、培養濾液の尾静脈内への注射により、彼等が実験に使用した動物と全く同じ

症状を呈した。

結 論

C. difficile の毒素産生用培地として、新しい培地、TYF 培地を考案した。この TYF 培地は従来の他の毒素産生用培地よりも、高い毒素産生を示し、しかも、好氣的静止培養の方が、嫌気培養よりも、良い結果を示した。

この培地を用いて、抗生物質投与をうけている患者より分離された 11 株の、*C. difficile* の毒素産生を検討した。その結果、偽膜性大腸炎と診断された患者由来の 4 株は、いずれも高い毒素産生が認められ、一方、偽膜性大腸炎を呈しなかった 7 株のうち 5 株は、非毒素産生株であった。従って、抗生物質投与をうけている患者の *C. difficile* の毒素産生能と、偽膜性大腸炎の発症は、密接な関係があると思われる。

さらに、健康人の糞便からも、毒素産生を示す *C. difficile* を分離したが、これらの菌が偽膜性大腸炎を含む消化器症状を全く示さないのは、他の優性な正常腸内細菌群の存在によるものと思われる。

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜りました西田尚紀教授、及び本研究の機会をおあたえ下さいました関本博教授に深謝するとともに、本研究を当初より御指導、御教示頂いた金沢大学微生物学教室中村信一助教授、また協力して頂いた教室員各位に心より謝意を表します。さらに、菌株の分与をうけた東京都養育院の島田博士、東京女子医大の清水博士に感謝いたします。

文 献

- 1) Hall, I. C., & O'Toole, E. : Intestinal flora in new born infants with a description of a new pathogenic anaerobe. *Am. J. Diseases Children*, **49**, 390-402 (1935)
- 2) Frock, J. L., Kleiner, A. S., Stuart Chen, Gainer, R. B., Mohammed Omar, & Anderson, W. : The spectrum of colitis associated with Lincomycin and clindamycin therapy. *J. Infect. Dis.*, **131**, suppl. S108-S115 (1975).
- 3) Rifkin, G. D., Fekety, F. R., Silva, J., & Sack, B. R. : Antibiotic-induced colitis implication of a toxin neutralized by clostridium sordelli antitoxin. *Lancet*, **26**, 1103-1106 (1977).
- 4) Larson, H. E., Parry, J. V., Price, A. B., Davies, D. R., Dolby, J., & Tyrrell, D. A. J. : Undescribed toxin in pseudomembranous colitis. *Brit. Med. J.*, **1**, 1246-1247 (1977).
- 5) Knoop, F. C. : Clindamycin-associated enterocolitis in guinea pigs. Evidence for a bacterial toxin. *Infect. Immun.* **23**, 31-33 (1979).
- 6) Dabard, D., Dubos, F., Martinet, L., & Ducluzeau, R. : Experimental reproduction of neonatal diarrhea in young gnotobiotic hares simultaneously associated with clostridium difficile and other clostridium strains. *Infect. Immun.* **24**, 7-11 (1979).
- 7) McGehee, R. J., Smith, C. B., Wilcox, C., & Finland, F. : Comparative studies of antibacterial activity in vitro and absorption and excretion of lincmycin and clindamycin. *Am. J. M. Sci.* **256**, 279-292 (1968).
- 8) Chang, T., Bartlett, J. G., Gorbach, S. L., & Onderdonk, A. B. : Clindamycin-induced enterocolitis in hamsters as a model of pseudomembranous colitis in patients. *Amer. Society for Microbiol.* **20**, 526-529 (1978).
- 9) George, W. L., Sutter, V. L., & Finegold, S. M. : Clostridium difficile toxin and antimicrobial agent-induced diarrhea. *J. Infect. dis.*, **137**, 854-855 (1978).
- 10) George, W. L., Sutter, V. L., Citron, D., & Finegold, S. M. : Selective and differential medium for isolation of clostridium difficile. *J. Clin. Microbiol.*, **9**, 214-219 (1979).
- 11) 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).
- 12) 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).
- 13) Bartlett, J. G., Chang, T., 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).
- 14) Larson, H. E., Price, A. B., Honour, P., & Borriello, S. P. : Clostridium difficile and the etiology of pseudomembranous colitis. *Lancet*.

- 1, 1063-1066 (1978).
- 15) **Rolfe, R. D., & Finegold, S. M.** : Purification of clostridium difficile toxin. *Infect. Immun.* **25**, 191-201 (1979).
- 16) **Holdeman, L. V., Cato, E., & Moore, W. E. C.** : *Anaerobe Laboratory Manual* 4th ed., Blacksburg.
- 17) **Tadesco, F. J.** : Clindamycin-associated colitis. *Am. J. Dig. Dis.*, **21**, 26-31 (1976).
- 18) **Bartlett, J. G., Moon, N., Chang, T., Taylor, N., & Onderdonk, A. B.** : Role of clostridium difficile in antibiotic-associated pseudomembranous colitis. *Gastroenterology*, **75**, 778-782 (1978).
- 19) **Hafiz, S., & Oakley, C. L.** : Clostridium difficile: Isolation and characteristics. *J. Med. Microbiol.* **9**, 129-136 (1976).
- 20) **Onderdonk, A. B., Lowe, B. R., & Bartlett, J. G.** : Effect of environmental stress on clostridium difficile toxin levels during continuous cultivation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **38**, 637-641 (1979).
- 21) **Marrie, T. G., Faulkner, R. S., Badley, B. W. D., Hartlen, M. R., & Comeau, S. A.** : Pseudomembranous colitis: isolation of two species of cytotoxic clostridia and successful treatment with vancomycin. *CMA J.* **119**, 1058-1060 (1978).
- 22) **Bartlett, J. G., Onderdonk, A. B., & Cisneros, R. L.** : Clindamycin-associated colitis in hamsters: protection with vancomycin. *Gastroenterology*, **73**, 772-780 (1977).
- 23) **George, W. L., Sutter, V. L., Goldstein, E. J. C., Ludwig, S. L., & Finegold, S. M.** : Etiology of antimicrobial agent associated colitis. *Lancet*, **1**, 802-803 (1978).

Toxin Production and Toxigenicity of *Clostridium Difficile* Satoru Takabatake, Department of Bacteriology, (Director: Prof. S. Nishida) School of Medicine, Kanazawa University, and Department of Gerontology, (Director: Prof. H. Sekimoto) Kanazawa Medical University, Kanazawa 920, Japan. *J. Jusen Med. Soc.*, **89**, 468-478 (1980).

Abstract A simple medium for the toxin production of *clostridium difficile* was developed. Our proposed TYF medium, as compared with other media, showed the highest yield of the toxin with most strains tested. Aerobic cultures in the TYF medium were preferable to the anaerobic cultures.

When *c. difficile* strains recovered from the stools of antibiotic-administered patient groups with and without pseudomembranous colitis (PMC) were examined, it was disclosed that all of the four *c. difficile* isolates from the PMC group were toxigenic, whereas five of seven isolates from the non-PMC group were nontoxigenic.