

原

著

Clostridium difficile toxin 起因性下痢症における 細胞内情報伝達機構と消化吸收障害の検討

—— Cholera toxin 起因性下痢症と対比して ——

新潟大学医学部第三内科学教室（主任：朝倉 均教授）

中 澤 俊 郎

Study of Intracellular Signal Transduction and of Digestion and Absorption
Disturbance in Clostridium Difficile Toxin-Induced Diarrhea
— Comparison with Those in Cholera Toxin-Induced Diarrhea —

Toshiro NAKAZAWA

*The Third Department of Internal Medicine,
Niigata University School of Medicine
(Director: Prof. Hitoshi ASAKURA)*

The mechanism of diarrhea induced by Clostridium difficile (CD) toxin is not fully understood although that by Cholera toxin is sufficiently done. Present experiment aims to clarify its mechanism.

Male Wistar rats weighing about 200 g were used, and CD toxin were injected into the lumen of ligated jejunal loops. First, time course study of histological examination and measurement of fluid accumulation in the ligated loops were carried out from 2 to 10 hours after CD toxin exposure. Second, we studied the changes of the activities of microvillus membrane enzymes and intestinal absorption rates of oligopeptides. Third, we studied the changes of activities of two intracellular mediators, protein kinase C (PKC) which is activated by diacylglycerol, and inositol 1-4-5-trisphosphate (IP₃) which releases Ca⁺⁺ from endoplasmic reticulum. Diacylglycerol and IP₃ are produced by receptor mediated-inositolphospholipid turnover.

Reprint requests to: Toshiro NAKAZAWA,
The Third Department of Internal Medicine,
Niigata University School of Medicine,
Ichibancho, Asahimachi-dori, Niigata City,
951, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町
新潟大学医学部第三内科学教室

中澤 俊郎

Luminal fluid accumulation steadily increased from 2 to 10 hours after CD toxin exposure. Slight damage in villus tips was observed 2 hours after exposure, and the change became more severe with time. Leucine aminopeptidase (LAP) activity was significantly decreased at 2 hours. The absorption rates of peptides were markedly decreased in toxin treated rats as compared with control rats using the jejunal perfusion method. Activity of PKC was significantly increased at 30 minutes, and that of IP_3 was also increased 1 hour after CD toxin exposure. In addition, PKC antagonist, staurosporin, inhibited the toxin induced-fluid accumulation. Calmodulin antagonists, trifluoperazine and chlorpromazine, also inhibited it.

These results indicate that CD toxin increased inositolphospholipid turnover with subsequent activation of PKC and IP_3 in epithelial cell. Then inositolphospholipid turnover and Ca^{++} mobilization possibly play a synergistic role in inhibition of LAP and peptide carrier protein synthesis. Consequently inhibition of LAP synthesis and disturbance of peptide absorption may partly contribute to the CD toxin induced diarrhea.

Key words: clostridium difficile toxin, digestion and absorption disturbance, intracellular signal transduction, brush border membrane enzyme, inositolphospholipid turnover
クロストリディウム ディフィシルトキシン, 消化吸収障害, 細胞内情報伝達機構,
刷子縁膜酵素, イノシトールリン脂質代謝回転

緒 言

感染性下痢症のうち Cholera toxin (以下 CT) による小腸分泌性下痢の発症に adenylate cyclase-cAMP 系の関与がすでに証明されており¹⁾, ひきつづく cAMP dependent kinase (以下 A-kinase) の活性化が刷子縁膜酵素 alkaline phosphatase (以下 ALP) の産生および分泌を亢進させている²⁾³⁾. 一方, 近年広範囲スペクトラム抗生物質の開発により注目を集めている Clostridium difficile toxin (以下 CDT) は偽膜性腸炎や急性出血性腸炎の起因物質と考えられており⁴⁾⁵⁾, ウサギにおける実験モデルでも toxin による粘膜組織の損傷による腸管粘膜の透過性亢進が下痢の病態を修飾していると考えられている⁶⁾.

しかし, CDT 陽性例のなかには肉眼的に腸炎を伴わない下痢の発症例も認められており⁷⁾, CDT 起因性下痢症の病態には未だ不明な点が多い. 今回この下痢の病態解明を目的としラットにおいて toxin 投与後早期の組織障害の比較的軽微な小腸粘膜を対象とし, CT 下痢モデルと対比して実験を行った. すなわち, CDT 起因性下痢の発症において細胞内情報伝達系としてイノシトールリン脂質代謝産物である inositol 1, 4, 5-trisphosphate (以下 IP_3) と protein kinase C (以下 PKC) 活性お

よび細胞内 Ca^{++} 動員の関与などに注目し, その後の細胞応答として刷子縁膜酵素の変動とこれによる栄養素の消化吸収障害の関与について検討したので報告する.

方 法

体重 180~200 g の Wistar 系雄性ラットを使用し, 24時間禁食後ペントバルビタール 50 mg/kg の腹腔内注射により麻酔し, 腹部正中切開により開腹後 Treitz 靱帯直下空腸に約 12 cm の結紮ループを作製した. 細菌性毒素の注入方法は CT 群で精製コレラトキシン (Sigma) を 50 mM Tris HCl buffer (pH 8.0) に 20 μ g/ml の濃度で溶解し, 2 μ g/cm intestine の割合で腸管ループに注入した. この control 群には toxin 溶解液である tris buffer のみを注入した. CDT 群には CDT KZ 1645 5×2^{19} cytotoxicity unit/ml を 1 ml ループ内に注入した. この control 群として, toxin 溶解液である生理食塩水のみを注入した. 各群とも経時的に断頭屠殺し, 以下の実験に供した.

1. 腸管内腸液量と組織学的変化

1) 経時的に摘出したループ内に生理食塩水 10 ml を灌流し回収液量より腸管内貯留液量を算出した.

2) Haematoxylin-Eosin 染色により組織傷害の程度を経時的に検討した.

2. 刷子縁膜酵素の検計

CT 群では腸液量が最高に達した6時間目の腸粘膜を対象とし、CDT 群では組織学的変化の軽微な2時間目の腸粘膜を対象とした。

各時間毎に空腸粘膜をスライドガラスにより掻きとり Kessler の方法⁸⁾ に準じて絨毛刷子縁膜を分離精製した。すなわち粘膜に 2mM Tris-HCl 50mM mannitol buffer pH7.1 を加えて15分静置後 4℃ 3,000×g にて30分間遠沈した。この上清を再び 4℃ 27,000×g にて30分間遠沈したのち上清を捨て pellet を上記 buffer に再び浮遊させ、Potter-Elvehjem homogenizer にて homogenize した。これを再度 4℃ 27,000×g にて30分間遠沈しこの pellet を絨毛刷子縁膜分画とした。

各刷子縁膜酵素活性の測定は ALP が Fujita の方法⁹⁾、leucine aminopeptidase (以下 LAP) が Bella らの方法¹⁰⁾、disaccharidase が Dalquist の方法¹¹⁾ により行い、また蛋白の定量は Lowry 法¹²⁾ により行った。

3. CDT 群におけるオリゴペプチドの灌流実験

CDT 群において LAP 活性の低下が認められた toxin 投与後2時間目の腸管ループを対象とし、Chung らの方法¹³⁾ により in vivo にて還流実験を実施した。灌流させたペプチドは 10mM Gly-Gly, 2mM Leu-Gly, 2mM Leu-Gly-Gly, および 2mM Ala-Ala-Ala-Ala であり、これらを 19ml/hr のスピードにてループ内に灌流し、substrate の吸収率を検討した。この際 non-absorbable marker には ¹⁴C labelled polyethylene glycol を使用しアミノ酸分析には HITACHI 835 amino acid analyzer を用いた。また、アミノ酸吸収率の算出は Silk らの方法¹⁴⁾¹⁵⁾ によった。

4. 細胞内情報伝達物質の検計

CT 群ではヤマサ(株)のcAMP assay kit を使用し粘膜をスライドガラスにより掻き取り 6% TCA 10ml とともに Potter-Elvehjem homogenizer により homogenate を作製し 1,200×g にて15分間遠沈した後、succinyl 化し radioimmunoassay により cAMP 濃度を測定した。

CDT 群では摘出した腸管粘膜をスライドガラスにより掻き取り液体窒素にて凍結後-80℃にて保存し以下の方法により抽出後測定に供した。

PKC は Takai らの方法¹⁶⁾ に準じ、100mg wet wt. に 50mM Tris/HCl pH7.5 の中に 5mM EDTA, 10mM EGTA, 0.3% (w/v) β-mercaptoethanol, 10mM benzamidine, 50μg/ml phenylmethylsulphonylfluoride を加え、Potter-Elvehjem homogenizer にて homogenize

後 100,000×g 60分間 4℃にて遠沈しこの上清を測定に用い、Amersham 社製 PKC radioimmunoassay にて PKC 濃度を測定した。

IP₃ は、Palmer らの方法¹⁷⁾ に準じ、100mg wet wt. に 2% (w/v) perchloric acid を加え、Potter-Elvehjem homogenizer にて homogenize 後 2,000×g 15分間 4℃にて遠沈しこの上清を 1.5M KOH/60mM HEPES buffer にて pH7.5 に滴定後、再度 2,000×g 15分間 4℃にて遠沈しこの上清を用いた。測定は、Amersham 社製 IP₃ radioimmunoassay により IP₃ 濃度を測定した。また、蛋白の定量は Lowry 法¹²⁾ によった。

さらに、PKC の阻害物質である staurosporin¹⁸⁾ による下痢の抑制実験を追加した。200nM staurosporin 1ml を CDT 投与直前に腸管ループ内に注入、control には生食を使用し、CDT 投与後10時間目の腸液量を比較検討した。

5. Calmodulin 拮抗物質による下痢抑制実験

最後に細胞内情報伝達に細胞内 Ca⁺⁺ が関与していることを証明する目的で2種類の calmodulin antagonist により下痢の抑制実験を実施した。使用した calmodulin antagonist は trifluoperazine (以下 TFP) と chlorpromazine (以下 CPZ) であり、TFP は 10mg/kg/hr の速度で持続静注し、CPZ は各時間毎に 1mg/kg を筋注した。各時間における腸管内腸液量の測定にて下痢の抑制効果を判定した。

成 績

1. toxin 投与後の腸管内貯留腸液量

CT 投与群では腸管内腸液量は3時間目より有意に増加し、6時間目で最高の 83.0±2.5 μl/cm loops に達し、以後漸減した (Fig. 1-A)。

CDT 投与群では腸液量は6時間目より有意に増加し、10時間目で 318.5±41.2 μl/cm loops に達した (Fig. 1-B)。

組織学的には CT 群では腸液量が最高に達した6時間目においても特に変化は認められなかった。これに対し CDT 群では、2時間目では絨毛先端の傷害が軽微であったが、4時間目より絨毛上皮の脱落、間質への炎症細胞浸潤や出血が経時的に増強した。さらに、6時間目および10時間目には上皮の脱落が高度となり、筋層内および漿膜下層にまで出血がおよんでいた¹⁹⁾。

2. 刷子縁膜酵素の検計

CT 群で腸液量が最高に達した6時間目の腸粘膜を対象とすると、toxin 投与群と control 群の間に各酵素

Time course of fluid accumulation in jejunal loop
after administration of Cholera toxin

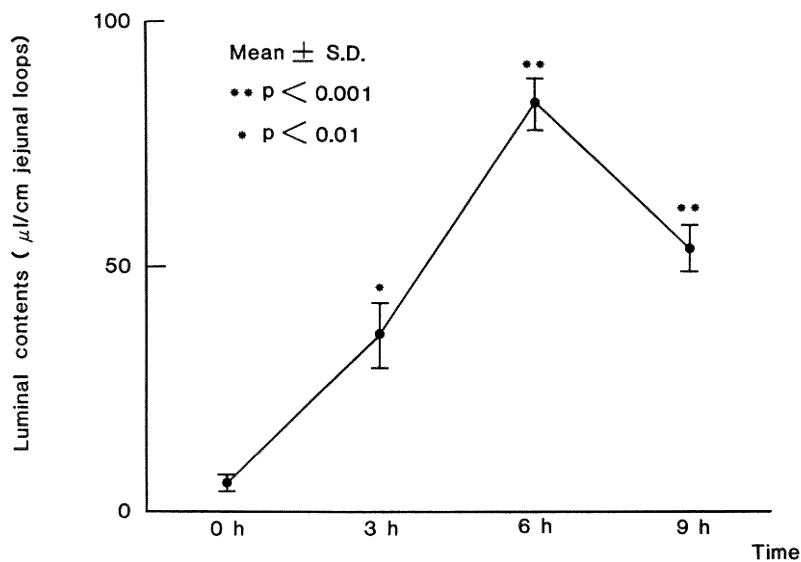


Fig. 1-A

Time course of fluid accumulation in jejunal loop
after administration of Clostridium difficile toxin

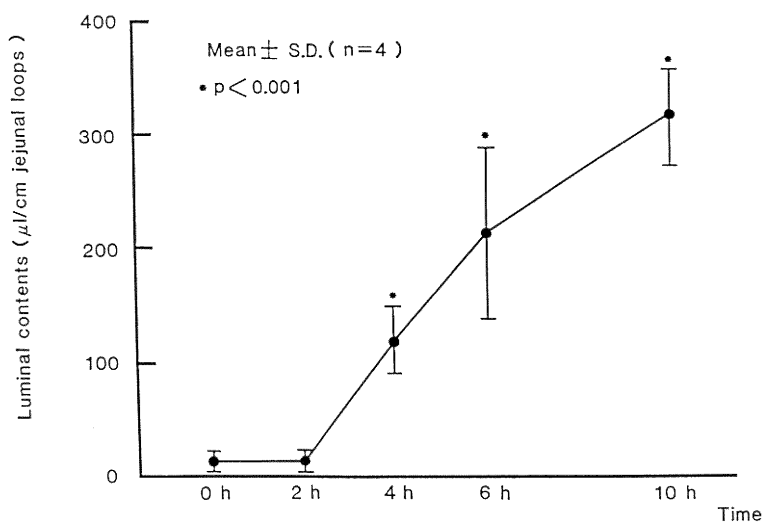


Fig. 1-B

Fig. 1 Toxin 投与後の腸管腔内腸液量の経時的推移

Activities of four microvillus membran enzymes of rat jejunum 6 hours after administration of Cholera toxin

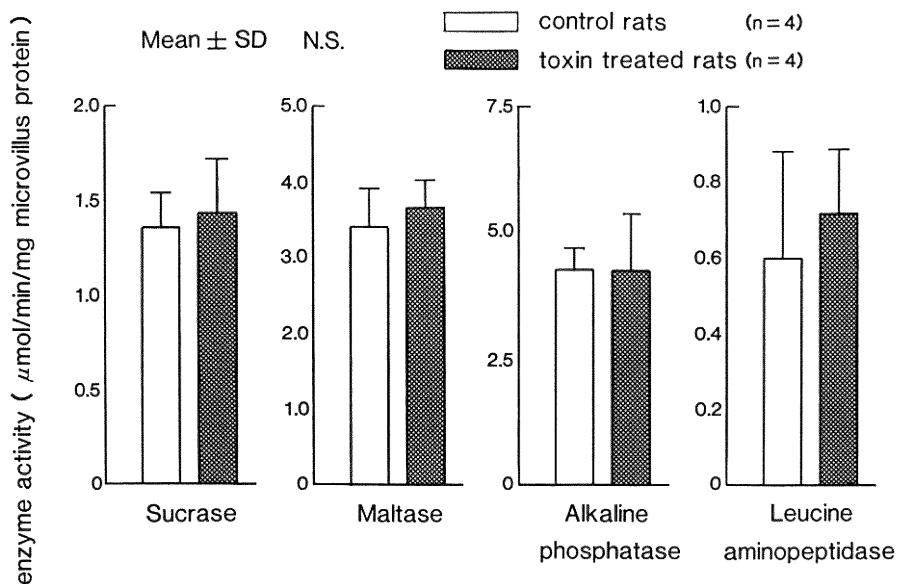


Fig. 2-A

Activities of four microvillus membrane enzymes of rat jejunum 2 hours after administration of Clostridium difficile toxin

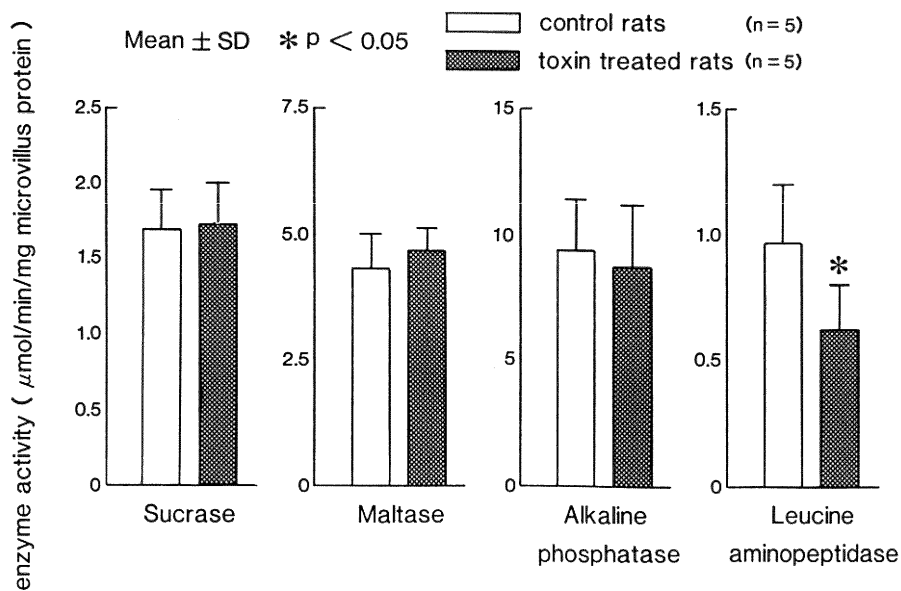


Fig. 2-B

Fig. 2 Toxin 投与後の刷子縁膜酵素活性

とも有意な変化は認められなかった (Fig. 2-A). CDT 群では組織学的変化の軽微な 2 時間目の腸粘膜を対象としたが, ALP, maltase, sucrase 値に有意な変化は認められなかったものの, LAP 値は control 群で $0.97 \pm 0.23 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ of microvillus protein であるのに対し, toxin 処理群で $0.63 \pm 0.19 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ of microvillus protein と有意な低下を示した (Fig. 2-B).

3. CDT 群におけるオリゴペプチド灌流実験

CDT 群において刷子縁膜酵素 LAP 活性の低下が認められたので, toxin 投与後 2 時間目の腸管ループを使用したペプチドの灌流実験を行った. その結果, 10 mM Gly-Gly, 2 mM Leu-Gly, 2 mM Leu-Gly-Gly, および 2 mM Ala-Ala-Ala-Ala の吸収率は control 群では各々 1.90 ± 0.18 , 0.32 ± 0.10 , 0.44 ± 0.10 , $0.91 \pm 0.11 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ mucosa であったのに対し toxin 投与群で 0.90 ± 0.20 , 0.13 ± 0.02 , 0.24 ± 0.04 , $0.65 \pm 0.16 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ mucosa といずれにおいても低下が認められた (Fig. 3).

4. 細胞内情報伝達物質の変動

CT 群で粘膜内 cAMP が前値で $3.9 \pm 0.4 \text{ pmol}/\text{min}/\text{mg}$ mucosal protein であるのに対し, 6 時間目で最高に $8.2 \pm 1.3 \text{ pmol}/\text{min}/\text{mg}$ mucosal protein に達し,

以後漸減した (Fig. 4).

CDT 群では組織傷害の軽微な 2 時間目までの粘膜を対象とし測定した. IP_3 活性は前値で $20.9 \pm 9.0 \text{ pmol}/\text{mg}$ protein であるのに対し, 1 時間目で最高 $82.6 \pm 16.6 \text{ pmol}/\text{mg}$ protein に達し, 2 時間目には低下傾向を認めた (Fig. 5-A).

PKC 活性は前値で $145.0 \pm 6.4 \text{ pmol}/\text{min}/\text{mg}$ of protein であるのに対し, 30 分目ですでに $165.0 \pm 4.4 \text{ pmol}/\text{min}/\text{mg}$ of protein と有意な上昇を認め, 1 時間目にはすでに低下傾向を示した (Fig. 5-B).

さらに, PKC の阻害物質である staurosporin による下痢抑制実験では, control 群の腸液量が $376.0 \pm 40.8 \mu\text{l}/\text{cm}$ loops であるのに対し, staurosporin 投与群では $251.0 \pm 66.9 \mu\text{l}/\text{cm}$ loops と有意な下痢の抑制効果が認められた (Fig. 6).

5. Calmodulin 拮抗物質による下痢抑制実験

CT 群では toxin のみ注入群の腸液量が $281.3 \pm 33.5 \mu\text{l}/\text{cm}$ loops であるのに対し, TFP による前処置群では $106.1 \pm 36.0 \mu\text{l}/\text{cm}$ loops と有意な低下が認められ, CPZ 前処置群でも同様の下痢抑制効果が確認された (Fig. 7-A).

CDT 群においても, これら 2 種類の薬剤によって同

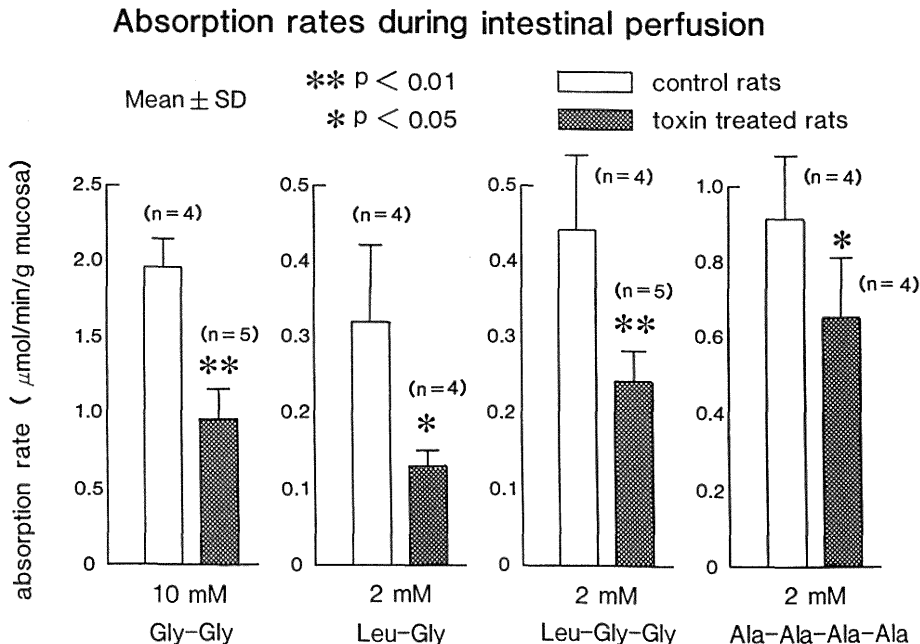


Fig. 3 CD toxin 投与後のペプチド吸収率

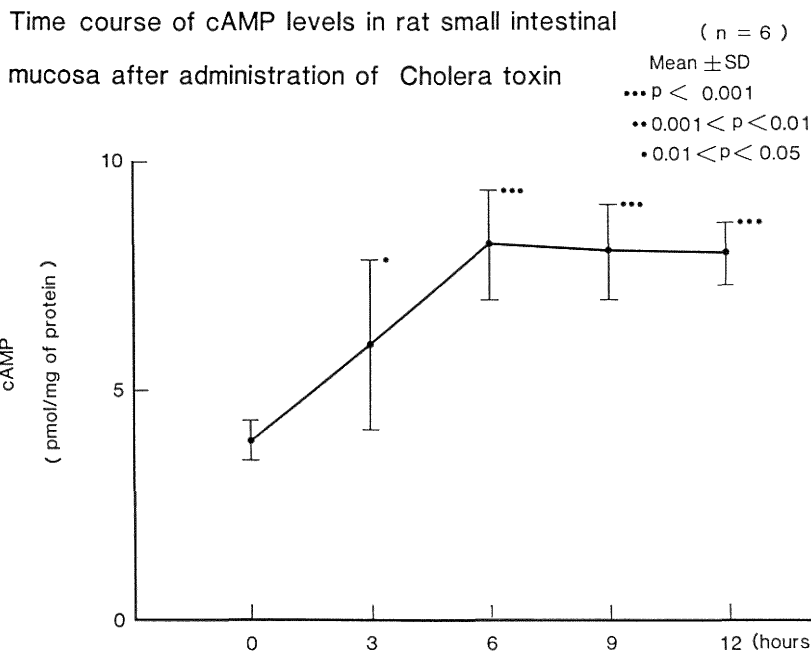


Fig. 4 Cholera toxin 投与後の粘膜内 cAMP 活性の経時的推移

様の下痢抑制効果が認められた (Fig. 7-B)。

考 案

CT 下痢症においては、腸液量の増加と平行し粘膜内 cAMP の活性上昇が認められ、また、adenylate cyclase や calmodulin の活性化阻害物質である TFP や CPZ により下痢の抑制効果が認められたことより、下痢発症における細胞内情報伝達には Sharp ら¹⁾ のいう adenylate cyclase-cAMP 系の賦活化が関与し、それ以後の反応系において細胞内 Ca^{++} の増加が関わっているものと考えられた。また、刷子縁膜酵素のみの検討では、各酵素に有意な変化が認められなかったが、すでに吉岡²⁾ や浜田³⁾ らは、同一モデルにおいて、小腸管腔内 ALP 活性の上昇と管腔側への過分泌に対する、代償性の ALP 合成亢進が起きていることを報告している。今回の検討では、過分泌後の代償された状態のみをとらえている可能性があると思われた。

一方、CDT 下痢モデルにおいては、toxin 投与後 2 時間目の組織学的変化の軽微な小腸粘膜において、刷子縁膜酵素 LAP 活性に選択的な低下が認められた。LAP をはじめ各種の小腸刷子縁膜酵素は細胞内小胞体で合成された後、ゴルジ装置を経由して微絨毛先端部に転送さ

れると考えられており²⁰⁾、CDT 下痢症では LAP 等の刷子縁膜酵素の合成および転送系に何らかの障害が生じたものと考えられる。

また、小腸上皮よりのペプチド吸収はジおよびトリペプチドの多くが膜消化を受けずペプチド輸送担体を介してペプチドのまま細胞内に取り込まれるのに対して、テトラペプチド以上のペプチドは刷子縁膜酵素で膜消化を受けアミノ酸を遊離した後に細胞内に取り込まれることが知られている²¹⁾。CDT 起因性下痢モデルにおいてジおよびトリペプチドばかりかテトラペプチドの吸収率の低下が認められたことは、ペプチド輸送担体の機能異常だけでなく刷子縁膜酵素自体の活性低下の関与を示唆するものであり、これらは刷子縁膜酵素活性の検討結果と一致している。以上より CDT 起因性下痢症の病態においては、LAP 活性等の低下によるペプチドの消化吸収障害が関与しているものと考えられた。

また、CT 下痢症においては cAMP 系の関与が証明されてきている¹⁾ が CDT 起因性下痢モデルにおいてはすでに cAMP 系の関与は否定的であるとされ²²⁾、他の細胞内情報伝達系が関わっているものと考えられている。

これまでイノシトールリン脂質の代謝回転による PKC

Time course of Inositol 1,4,5 Trisphosphate activity in rat small
intestinal mucosa after administration of Clostridium difficile toxin

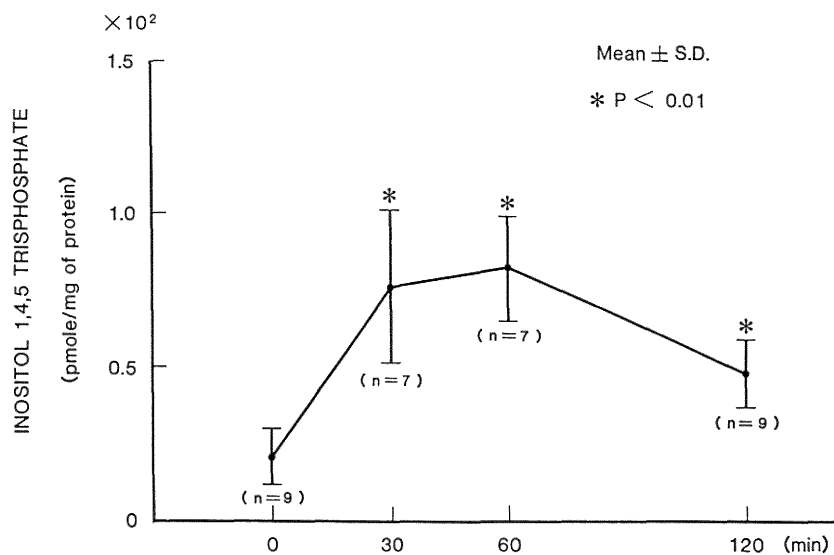


Fig. 5-A

Time course of Protein Kinase C activity in rat small intestinal
mucosa after administration of Clostridium difficile toxin

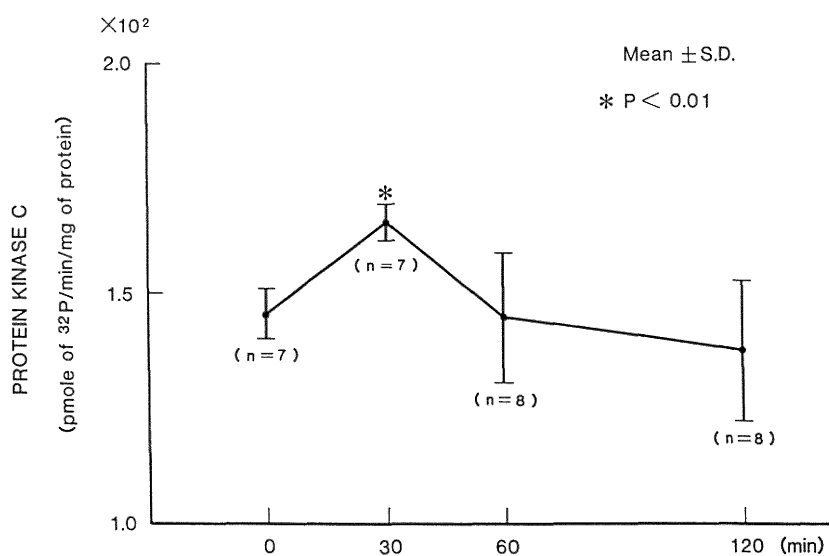


Fig. 5-B

Fig. 5 CD toxin 投与後の粘膜内 IP_3 および PKC 活性の経時的推移

Effect of Staurosporin on fluid accumulation of intestinal loops 10 hours after administration of CDT

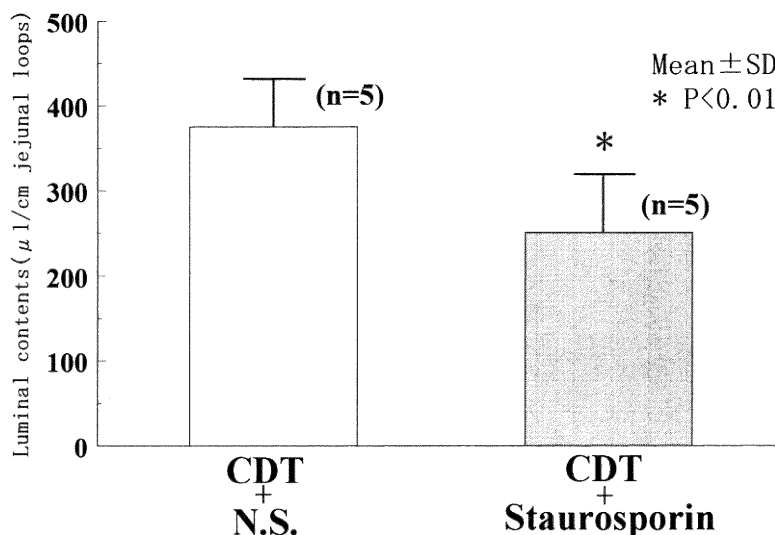


Fig. 6 Staurosporin による下痢の抑制効果

の活性化機構は cAMP 系とのアナロジーにおいて解明が進んできたが、すでに種々の臓器組織においてこの反応系の関与が証明されている²³⁾。消化管においては Chiba ら²⁴⁾ が胃の壁細胞における胃酸分泌において Histamin 刺激による cAMP 系の関与に対し、Acetylcholine や Gastrin 刺激による情報伝達系として細胞膜結合型 PKC 活性の上昇や IP_3 の産生亢進の関与を証明しているが、下部消化管においては、未だこの反応系の関与の報告はみられていない。

今回、CDT 下痢モデルにおいて toxin 投与後早期のラット小腸粘膜において PKC や IP_3 の活性上昇が確認され、さらに PKC の阻害物質である staurosporin による下痢の抑制効果が認められたことより、この下痢の発症に toxin の細胞膜表面レセプター結合後 phospholipase C の活性化とこれに引き続くイノシトールリン脂質の代謝回転の亢進が関わっているものと考えられた。

特にこの反応系においてはイノシトールリン脂質の分解産物である IP_3 により小胞体内から細胞質内へ遊離された Ca^{++} がカルモジュリンに代表される Ca^{++} 受容体を介して PKC の賦活化とともに、これと協同的に働いて、それ以後の細胞応答を遂行しているものと考えられている²⁵⁾。

今回 calmodulin 拮抗物質²⁶⁾である TFP および CPZ 投与で、CDT による下痢の抑制効果が認められたことより、この下痢の病態に Ca^{++} -calmodulin 系も関与し、イノシトールリン脂質代謝系と協同的に下痢の病態を形成していると考えられる。ただしこれらの阻害剤には、それ自体 PKC の活性化因子である phosphatidyl serine に対する阻害作用も存在するとされ、また、これらの Ca^{++} 拮抗剤の作用が細胞外 Ca^{++} の細胞内への流入阻害にあり、これにより toxin の internalization を阻止しているだけである²⁷⁾とする報告もあり、今後さらに検討の必要があると思われる。

CT 下痢モデルにおいても ALP の上昇が A-kinase の基質蛋白質のリン酸化脱リン酸化系に関与している可能性²⁸⁾が示唆されているが、A-kinase 以後の反応系に関する詳しい解析はなされていない。同様に、CDT 下痢モデルにおいても IP_3 により動員された Ca^{++} や PKC とそれ以後の細胞応答の間にいかなる反応系が存在するかは不明である。ただし、これまで PKC によるリン酸化の基質蛋白質は種々の組織において報告がなされている。Takai ら²⁹⁾の報告では、サイトスケレトン蛋白質がこれらの基質となりマイクロチューブス等に微細な形態変化を認めている。これに対し、CDT による細胞内

Effect of Calcium antagonists on fluid accumulation of intestinal loops 6 hours after administration of Cholera toxin

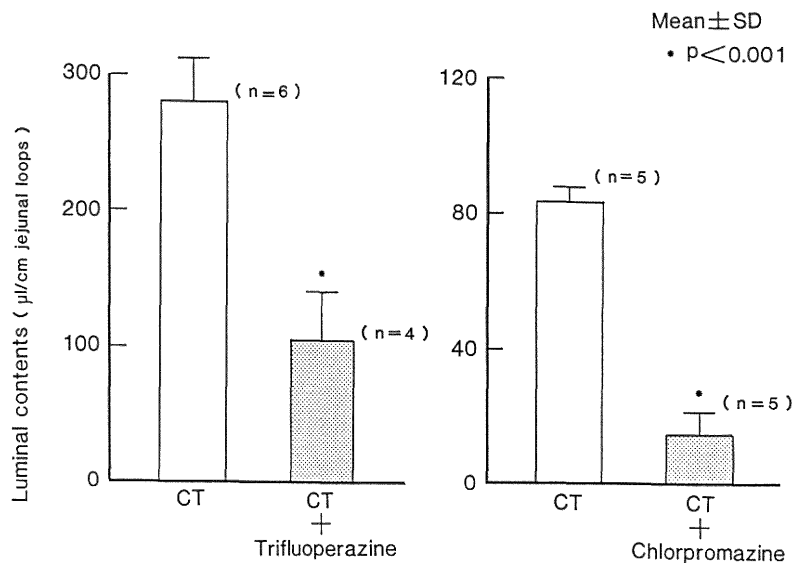


Fig. 7-A

Effect of Calcium antagonists on fluid accumulation of intestinal loops 10 hours after administration of Clostridium difficile toxin

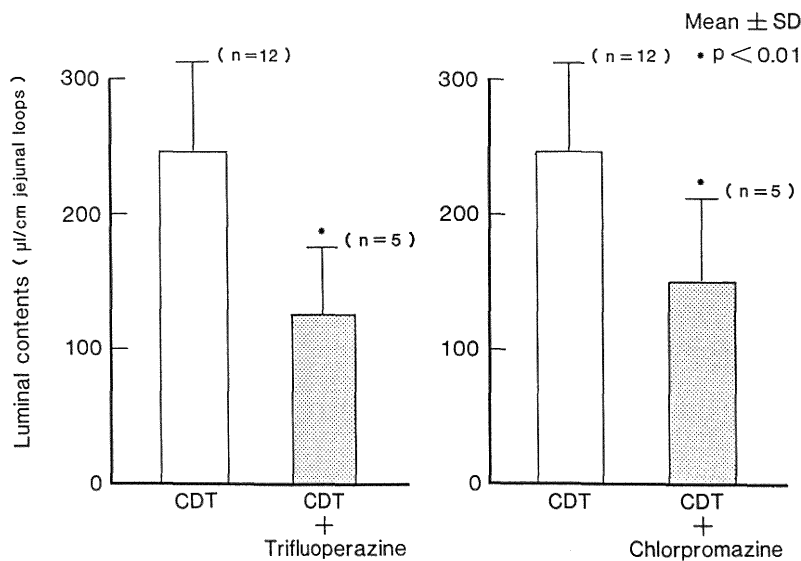


Fig. 7-B

Fig. 7 Calmodulin 拮抗物質による下痢の抑制効果

形態変化には Thelestam と Brönnegard ら³⁰⁾ がヒト線維芽細胞における形態変化としてマイクロフィラメントの破壊とアクチン顆粒の核周囲への集積を来すことを見だしている。また、これら toxin 投与後に生じる初期の形態変化はイノシトールリン脂質代謝回転の亢進により引き起こされ、マイクロフィラメント系の関与する細胞質膜関連機能の喪失に連なり、蛋白の合成障害が起こるものと考えられている³¹⁾。

小腸吸収上皮細胞の管腔側に突出している微絨毛内には20~30本のアクチン線維が配列しており細胞質にもマイクロチュブルスが分布するなど種々の細胞骨格系が秩序正しく構築されている³²⁾。これらの骨格系が CDT 投与後のイノシトールリン脂質代謝回転の亢進により傷害され、さらにこの亢進が内膜系での LAP 等の刷子縁膜酵素の合成やゴルジ装置から刷子縁膜への転送障害またはアミノ酸やペプチド輸送担体の機能障害を引き起こしている可能性があり、これらによるペプチドの消化吸収障害が CDT 起因性下痢症の病態の一部に関与しているとも考えられた。

結 語

1. CT による下痢症では、粘膜内 cAMP の活性上昇が認められ、引き続く細胞内 Ca^{++} の動員が下痢の発症に関与していると考えられた。しかし、刷子縁膜酵素のみの検討では、有意な変化が認められなかった。

2. CDT による下痢症においては、刷子縁膜酵素のうち LAP 活性の低下とオリゴペプチドの消化吸収障害が認められた。

3. CDT による下痢症では、toxin 刺激後にイノシトールリン脂質代謝回転の亢進により、 IP_3 や PKC などの細胞内情報伝達物質の活性上昇が認められ、これに引き続く細胞内 Ca^{++} の動員が下痢の発症に関与しているものと考えられた。

以上より、CDT 起因性下痢症では、イノシトールリン脂質代謝回転の亢進と細胞内 Ca^{++} の動員が協同的に働き、その後の細胞応答として、LAP の合成障害およびオリゴペプチドの消化吸収障害が引き起こされている可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、直接御指導、御校閲をいただきました新潟大学医学部第三内科学教室朝倉 均教授、青柳 豊助教授に謹んで感謝の意を表します。また、CD toxin を御提供いただきました金沢大学

微生物学教室中村信一教授に深く謝意を表します。

参 考 文 献

- 1) Sharp, G.W.G.: Stimulation of intestinal adenylate cyclase by cholera toxin, *Nature* (London), **229**: 266~269, 1971.
- 2) 吉岡政洋: 小腸分泌性下痢における絨毛膜 alkaline phosphatase の役割, *日消誌*, **81**: 1981~1988, 1984.
- 3) 浜田慶城: ラットにおけるコレラトキシン惹起性分泌性下痢の小腸アルカリフォスファターゼの分泌および生合成亢進について, *日消誌*, **84**: 221~228, 1987.
- 4) 山口裕通: 偽膜性大腸炎の発症にはたす *Clostridium difficile* 毒素の役割—特に無菌ラットを用いた実験的研究—, *日消誌*, **83**: 1126~1134, 1986.
- 5) 荒井泰道, 松本純一, 小田島博, 下条 宏, 小杉廣志, 近藤忠徳: 抗生剤による急性出血性大腸炎に関する研究—特に *Clostridium difficile* について—, *日消誌*, **82**: 78~85, 1985.
- 6) Michell, T.J., Ketley, J.M., Haslam, S.C., Stephan, J., Burdon, D.W., Candy, D.C.A. and Daniel, R.: Effect of toxin A and B of *Clostridium difficile* on rabbit ileum and colon, *Gut*, **27**: 78~85, 1986.
- 7) McFarland, L.V., Mulligan, M.E., Kwok, R.Y.Y. and Stamm, W.E.: Nosocomial acquisition of *clostridium difficile* infection, *N. Eng. J. Med.*, **26**: 204~210, 1989.
- 8) Kessler, M., Acuto, O., Storelli, C., Murer, H., Muller, M. and Semenza, G.: A modified procedure for the rapid preparation of efficiently transporting vesicles from small intestinal brush border membranes, *Biochim. Biophys. Acta.*, **506**: 136~154, 1978.
- 9) Fujita, M., Ohta, H., Kawai, K., Matsui, H. and Nakao, M.: Differential isolation of microvillous and basolateral plasma membranes from intestinal mucosa: Mutually exclusive distribution of digestive enzymes and ouabain-sensitive ATPase, *Biochim. Biophys. Acta.*, **274**: 336~347, 1972.
- 10) Bella, A.M., Erickson, R.H. and Kim, Y.S.: Rat intestinal brush border membrane dipeptidyl-aminopeptidase IV: Kinetic properties and substrate

- specificities of the purified enzyme, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **218**: 156~162, 1982.
- 11) **Dahlqvist, A.**: Method for assay of intestinal disaccharidases, *Analytical Biochemistry*, **7**: 18~25, 1964.
- 12) **Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.**: Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**: 265~275, 1951.
- 13) **Chung, Y.C., Silk, B.A. and Kim, Y.S.**: Intestinal transport of a tetra peptide, L-leucyl-glycylglycylglycine, in rat small intestine in vivo, *Clinical Science*, **57**: 1~11, 1979.
- 14) **Silk, D.B.A., Perrett, D. and Clark, M.L.**: Intestinal transport of two dipeptidases containing the same two neutral amino acids in man, *Clin. Sci. Mole. Med.*, **45**: 291~299, 1973.
- 15) **Silk, D.B.A., Perrett, D., Webb, J.P.W. and Clark, M.L.**: Absorption of two tripeptides by the human small intestine: A study using a perfusion technique, *Clin. Sci. Mole. Med.*, **46**: 393~402, 1974.
- 16) **Takai, Y., Kishimoto, A., Inoue, M. and Nishizuka, Y.**: Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues, *J. Biol. Chem.*, **252**: 7603~7609, 1977.
- 17) **Palmer, S., Hawkins, P.T., Michell, R.H. and Kirk, C.J.**: The labelling of polyphosphoinositides with [³²P] Pi and the accumulation of inositol phosphates in vasopressin-stimulated hepatocytes, *Biochem J.*, **238**: 491~499, 1986.
- 18) **Ederveen, A.G.H. Van Emst-De Vries, S.E., De Pont, J.J.H.H.M. and Willems, P.H.G.M.**: Dissimilar effects of the protein kinase C inhibitors, staurosporin and H-7, on cholecystokinin-induced enzyme secretion from rabbit pancreatic acini, *Eur. J. Biochem.*, **193**: 291~295, 1990.
- 19) 朴 鐘千: Clostridium difficile toxin による実験的出血性腸炎の発生機序に関する研究一特に血小板活性化因子に関する検討一, *日消誌*, **91**: 25~32, 1994.
- 20) **Miura, S., Song, I.S., Morita, A., Erickson, R.H. and Kim, Y.S.**: Distribution and biosynthesis of aminopeptidase N and dipeptidyl aminopeptidase IV in rat small intestine, *Biochim. Biophys. Acta.*, **761**: 66~75, 1983.
- 21) **Adibi, S.A. and Kim, Y.S.**: Peptide absorption and hydrolysis, In: Johnson, L.R. (ed.), *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, Raven Press, New York, 1073~1095, 1981.
- 22) **Hughes, S., Warhurst, G., Turnberg, L.A., Higgs, N.B., Giugliano, L.G. and Drasar, B.S.**: Clostridium difficile toxin-induced intestinal secretion in rabbit ileum in vitro, *Gut*, **25**: 94~98, 1983.
- 23) **Nishizuka, K.**: Studies and perspectives of protein kinase C, *Science*, **223**: 305~312, 1986.
- 24) **Chiba, T., Fisher, S.K., Agranoff, B.W. and Yamada, T.**: Autoregulation of muscarinic and gastrin receptors on gastric parietal cells, *Am. J. Physiol.*, **256**: 356~363, 1989.
- 25) **Kaibuch, K., Takai, Y., Sawamura, M., Hoshijima, M., Fujikura, T. and Nishizuka, Y.**: Synergistic functions of protein phosphorylation and calcium mobilization in platelet activation, *J. Biol. Chem.*, **258**: 6701~6704, 1983.
- 26) **Wrenn, R.W., Katoh, N., Schatzman, R.C. and Kuo, F.**: Inhibition by phenothiazine antipsychotic drugs of calcium-dependent phosphorylation of cerebral cortex proteins regulated by phospholipid or calmodulin, *Life Science.*, **29**: 725~733, 1981.
- 27) **Casper, M., Florin, I. and Thelestam, M.**: Calcium and calmodulin in cellular intoxication with clostridium difficile toxin B, *J. Cell. Physiology.*, **132**: 168~172, 1987.
- 28) **Lucid, S.W. and Cox, A.C.**: The effect of cholera toxin on the phosphorylation of protein in epithelial cells and their brush borders, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**: 1183~1186, 1972.
- 29) **Takai, Y., Kaibuchi, K., Tsuda, T. and Hoshijima, M.**: Role of protein kinase C in transmembrane signaling, *J. Cell. Biochem.*, **29**: 143~155, 1985.
- 30) **Thelestam, M. and Brönnegård, M.**: Interaction of cytopathogenic toxin from clostridium difficile

- with cells in tissue culture, *Scand. J. Infect. Dis., Suppl.* **22**: 16~29, 1980.
- 31) **Pothoulakis, C., Triadafilopoulos, G., Clark, M., Franzblau, C. and Lamont, J.T.**: *Clostridium difficile* cytotoxin inhibits protein synthesis in fibroblasts and intestinal mucosa, *Gastroenterology*, **91**: 1147~1153, 1986.
- 32) **Moosker, M.S., Bonder, E.M., Conzelman, K.A., Fishkind, D.J., Howe, C.L. and Keller, T.C.S.**: The brush border cytoskeleton and integration of cellular function, *J. Cell. Biol.*, **99**: 104~112, 1984.

(平成7年4月27日受付)
