

小児下痢症より分離されたColiformsのEnterotoxin 産生に関する研究

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/2297/8714

小児下痢症より分離された Coliforms の Enterotoxin 産生に関する研究

金沢大学医学部小児科学教室 (主任代理: 谷口 昂助教授)

渡 部 礼 二

(昭和53年3月22日受付)

本論文の要旨は、昭和51年第3回日本小児栄養発育研究会および昭和52年第80回日本小児科学会総会において発表した。

1967年、SmithとHalls¹⁾は、ブタの急性下痢症の原因として分離した大腸菌から Enterotoxin を証明して以来、人の下痢症の一部に大腸菌の Enterotoxin 産生株が関与していることが判り、臨床細菌学においても注目されることとなった。

我々の教室でこれまで多数の幼若乳児遷延性下痢症を経験し²⁾、これらの一部の患児で検索した上部腸管に大腸菌や Klebsiella を中心とした Coliforms が異常増殖している事実をみとめ、高橋ら³⁾が報告した、元来生理的にほとんど生息していない所に菌が増殖している事は異常であり、更に対象が幼若乳児であるが故に宿主への影響が大なることは想像に難くない。西田は⁴⁾、これらの知見に基き、上部腸管の Coliforms の異常増殖を抑制することを主眼とした治療的研究成果を報告した。

その幼若乳児遷延性下痢症の上部腸管で増殖している Coliforms は、1) 病原大腸菌、2) Enterotoxin 産生菌、3) 下部腸管よりの上行菌等の可能性が考えられる。そこで2)の上部腸管で増殖していた Coliforms の Enterotoxin 産生の有無と併せて、小児の急性下痢症の糞便を中心として、そこに Enterotoxin 産生の Coliforms がどれだけの頻度で検出されるか検索を始めた。

既に著者らは⁵⁾⁶⁾、小児の下痢症より分離した Coliforms の一部に皮内反応による血管透過性因子陽性株 (易熱性 Enterotoxin 産生株) をみとめ報告したが、今回は更に多くの小児の下痢症 (急性下痢症、白痢、病原大腸菌性腸炎、幼若乳児遷延性下痢症) および成人の重症下痢症における十二指腸液と糞便から分離した Coliforms の Enterotoxin を検索したので報告する。

対象および方法

1) 対象と使用菌株 (表1)

対象は小児急性下痢症79例 (Hemolytic-Uremic syndrome 1例を含む)、白痢9例、病原大腸菌性腸炎12例、幼若乳児遷延性下痢症4例、成人重症下痢症3例の十二指腸液および糞便から、変法ドルガルスキー培地 (日水) と DHL 培地 (日水) にほぼ純培養的に分離した大腸菌95株および Klebsiella 12株で、1検体につき1コロニー釣菌し、被検菌とした。

また、いわゆる毒性大腸菌 H-10407 (バングラディッシュの重症下痢患者から分離した Enterotoxin 産生の大腸菌で、国立予防衛生研究所、坂崎利一博士より分与をうけた。) と大腸菌標準株 K-12 および非下痢症小児の十二指腸液および糞便より分離した10株の大腸菌と Klebsiella 1株を control として用い計120株を検索した。

2) Enterotoxin の調製

毒素産生用培地は Evans ら⁷⁾ のカザミノ酸を主とし

表1 対象

positive control		E. coli	H-10407
negative control		E. coli	K-12
小児急性下痢	79株	E. coli	71株
		Klebsiella	8株
白痢	9株	E. coli	8株
		Klebsiella	1株
病原大腸菌性腸炎			12株
幼若乳児遷延性下痢	4株	E. coli	1株
		Klebsiella	3株
成人重症下痢	3株	E. coli	3株
健康小児	11株	E. coli	10株
		Klebsiella	1株

Studies on enterotoxin production of Coliform organisms isolated from infantile diarrhea. Reiji Watanabe, Department of Pediatrics (Director: Prof. N. Taniguchi), School of Medicine, Kanazawa University.

た培地を用いた。500 ml のコルベンに 80 ml ずつ分注線栓し、115°C 15 分間滅菌後使用に供した。

あらかじめ前培養した菌を白金耳で毒素産生用培地に接種し、37°C 18 時間振盪培養 (60 ~ 70rpm) 後、4°C 12,000G 15 分間遠心し、その上清を pore size 0.45 μ m のフィルター (Sartorius-Membranfilter GmbH) で濾過した。その濾液を 90% 飽和の硫酸で塩析し、4°C 12,000G 15 分間遠心した後、0.01M pH7.2 の phosphate-buffered saline 0.8 ml で溶解、同じ buffer を用いて 4°C 18 時間透析し、これを Enterotoxin 調製液とした。Enterotoxin 調製液は使用まで -20°C にて保存した。

3) Enterotoxin の検出法

a) 皮内反応による血管透過性試験法 (以下 PF テストと略す)

体重 1.5kg 前後の白ウサギの背中の中毛を前日に小動物用バリカンで刈り、実験に供した。各 Enterotoxin 調製液をそれぞれ 2.5cm の間隔をあけて 0.1 ml ずつ皮内接種した。18 時間後、2% Evans-blue 生食水を 3 ml/kg 静注した。3 時間後屠殺し、皮膚を剥離し、更に皮下組織をていねいに除去した後、青変部および硬結部の短径と長径を測定し、それぞれの平均値を記録した。判定基準は即ち、3 (+) は青変部および硬結部が共に 10mm 以上のもの、2 (+) は青変部が 10mm 以上で硬結部が 5 ~ 9mm のもの、1 (+) は青変部が 5 ~ 9mm で硬結部が 1 ~ 4mm のものとし、同一菌株で少なくとも 2 回 2 (+) 以上の反応があり、常に 1 (+) 以上の反応を示すものを陽性と判定した。

De らの方法⁹⁾を改変し施行した。体重 2.0 ないし 2.5kg の雄ウサギを 2 日前より絶食とし、水だけはそのまま与えた。ループに注入する毒素液は、Enterotoxin 調製液を使用した。

b) ウサギ腸管結紮ループ法

Thiopental Na の静脈麻酔下で開腹し、回腸と虫垂の結合部より 30cm 吻側で最初の結紮を行ない、それより更に 5cm 吻側で結紮し、その場所を起点として 10cm のループをつくり、各ループ間に 5cm の間隔をもうけて、順次吻側に向かってループを作製した。それらのループに Enterotoxin 調製液 1.0 ml ずつ注入した後、腸管を腹腔に戻し、腹膜、筋層、皮膚をそれぞれ縫合した。約 18 時間後屠殺し、再び開腹、腸管をとり出して各ループ毎に切り離し、その重量を計量し長さ当りの重量比を算出し、2.0 以上を陽性とした。

4) 抗毒素血清の作製

下痢症患者より分離し PF テストで陽性反応を示した 2 株 (SE58, SE60) と、いわゆる毒性大腸菌 H-10407 の Enterotoxin 調製液を用いて作製した。

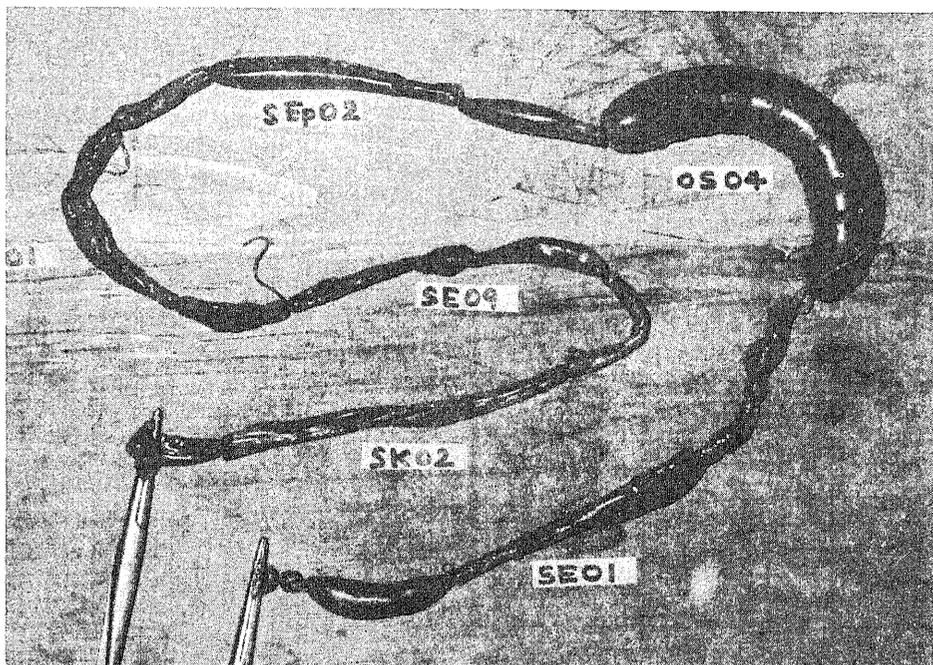


写真 1

OSO4: H-10407

表 2 P F テスト結果

No	菌 株	1st	2nd	3rd	判定	備 考	No	菌 株	1st	2nd	3rd	判定	備 考
1	H-10407	3+	3+	3+	P	毒性大腸菌	42	SE09	3+	1+	3+	P	小 児 急 性 下 痢
2	K-12	-	-	-	N	標 準 株	43	SE11	3+	3+	3+	P	
3	SE08	-	-		N	健 康 小 児	44	SE12	-	-	-	N	
4	SE29	-	-		N		45	SE13	-	-	-	N	
5	SE30	-	-		N		46	SE18	-	-		N	
6	SE31	-	-		N		47	SE21	1+	-		N	
7	SE34	-	-		N		48	SE22	-	-		N	
8	SE35	-	-		N		49	SE23	-	-		N	
9	SE36	-	-		N		50	SE24	1+	-		N	
10	SE39	-	-		N		51	SE25	2+	1+	2+	P	
11	SE41	-	-		N		52	SE26	2+	-	-	N	
12	SK03	1+	-		N		53	SE27	-	-		N	
13	DE02	-	-		N		54	SE28	-	-		N	
14	SE07	-	-		N		55	SE32	3+	2+	1+	P	
15	SE14	-	-		N		56	SE40	-	-		N	
16	SE15	-	-		N	57	SE42	-	-		N		
17	SE16	-	-		N	58	SE43	-	-		N		
18	SE17	-	-		N	59	SE50a	3+	2+	1+	P		
19	SE19	-	-		N	60	SE52	-	-		N		
20	SE20	-	-		N	61	SE53	3+	3+	3+	P		
21	SK05	-	-		N	62	SE54	-	-		N		
22	DE01	1+	1+	1+	N	63	SE55	2+	3+		P		
23	SEp02	-	-	-	N	病 原 大 腸 菌 性 腸 炎	64	SE57	3+	3+		P	
24	SEp03	1+	-	-	N		65	SE58	3+	3+	3+	P	
25	SEp04	1+	-	-	N		66	SE59	-	-		N	
26	SEp05	-	-		N		67	SE61	3+	3+		P	
27	SEp06	-	-		N		68	SE63	3+	3+		P	
28	SEp62	3+	3+		P		69	SE64	3+	3+		P	
29	SEp116	-	1+		N		70	SE65	-	-		N	
30	SEp117	-	-		N		71	SE66	-	-		N	
31	SEp118	-	-		N		72	SE67	-	-		N	
32	SEp119	-	-		N		73	SE68	-	-		N	
33	SEp120	-	-		N		74	SE69	3+	3+	3+	P	
34	SEp121	-	-		N		75	SE70	-	-		N	
35	SE10	-	-		N	幼 若 乳 児 遷 延 性 下 痢	76	SE71	1+	2+	-	N	
36	DK01	2+	2+	3+	P		77	SE72	-	-	-	N	
37	DK02	-	-		N		78	SE73	-	-		N	
38	DK04	3+	1+	3+	P		79	SE74	-	-		N	
39	SE33	-	-		N	成 人 重 症 下 痢	80	SE75	-	2+	-	N	
40	SE38	-	-		N		81	SE76	-	1+		N	
41	SE60	3+	3+	3+	P		82	SE77	-	-		N	
							83	SE78	-	-		N	
							84	SE80	3+	3+		P	

No	菌株	1st	2nd	3rd	判定	備考	No	菌株	1st	2nd	3rd	判定	備考
85	SE81	-	2+	-	N		103	SE98	-	2+	1+	N	
86	SE82	-	-	-	N		104	SE99	-	-	-	N	
87	SE83	-	1+	-	N		105	SE100	-	1+	-	N	
88	SE84	-	-	-	N		106	SE101	-	-	-	N	
89	SE85	-	1+	1+	N		107	SE102	-	-	-	N	
90	SE86	-	-	-	N		108	SE103	-	1+	1+	N	
91	SE87	-	-	-	N		109	SE104	-	-	-	N	
92	SE88	-	-	-	N		110	SE105	-	-	-	N	
93	SE89	1+	1+	-	N		111	SE106	1+	3+	3+	P	
94	SE90	-	-	-	N	小児	112	SK01	-	-	-	N	小児
95	SE91	-	-	-	N	急性下痢	113	SK02	3+	2+	2+	P	急性下痢
96	SE92	-	-	-	N		114	SK04	-	-	-	N	
97	SE93	-	-	-	N		115	SK06	-	-	-	N	
98	SE94	-	-	-	N		116	SK08	2+	1+	1+	N	
99	SE95	3+	3+	-	P		117	SK10	-	-	-	N	
100	SE96	-	-	-	N		118	SK11	-	-	-	N	
101	SE96a	3+	2+	-	P		119	SK16	-	-	-	N	
102	SE97	-	-	-	N		120	DK03	-	-	-	N	

S: 糞便由来 D: 十二指腸液由来 E: 大腸菌
 Ep: 病原大腸菌 K: Klebsiella P: Positive N; Negative

Enterotoxin 調製液と incomplete-Freund adjuvant を 1 : 1 の割合で emulsion を作製し、その 1.0 ml を体重約 3.0kg の白ウサギの足蹠皮内に接種し、その後 4 日間隔で 7 回 Enterotoxin 調製液だけを 0.7 ml ずつ足蹠皮内に接種し、最終接種の 2 週間後に全採血した。血清を分離し、2.0 ml ずつ分けて -20°C にて保存した。

尚、control として接種前に一部採血し、血清分離後 -20°C にて保存した。

5) Enterotoxin の中和試験

Enterotoxin 調製液 0.1 ml と抗毒素血清 0.01 ml と混和し、30 分間 37°C incubate 後、その 0.1 ml を PF テストの被験液とした。

control として、免疫前の血清との混和液および 0.01M pH7.2 phosphate-buffered saline を用いた。

研究成績

1) PF テスト (写真 1)

被検 120 株の PF テストの成績は一括して表 2 に示した。

即ち、positive control として用いたいわゆる毒性大腸菌 H-10407 は常に 3 (+) の陽性反応を示した。一方、negative control として用いた大腸菌標準株

K-12 と健康小児由来の大腸菌 10 株と Klebsiella 1 株はすべて陰性であった。

次に下痢症由来の分離株についてみると、小児急性下痢症の 79 株中 18 株は陽性反応を呈し、その内訳は大腸菌が 71 株中 17 株、Klebsiella は 8 株中 1 株が陽性であった。

白痢由来の分離株 9 株はいずれも陰性であった。

病原大腸菌性腸炎由来の 12 株中 1 株 (044K74) は陽性反応を呈した。

次に成人の重症下痢症患者由来の大腸菌 3 株中 1 株は陽性反応を示した。

2) ウサギ腸管結紮ループ法 (写真 2)

被検株とその成績は表 3 に示した。即ち PF テスト陽性株の 5 株 (H-10407, SK02, SE09, SE58, SE60) と、PF テスト陰性株の 3 株 (K-12, SEp02, SE01) 計 8 株について試みたが陽性反応 (W/L ratio > 2) を示したのは H-10407 だけで、他の 7 株はいずれも陰性であった。

3) Enterotoxin の中和試験

H-10407, SE58, SE60 の抗毒素血清を用いて、当該菌の毒素中和反応および、交叉中和反応を行ない、表 4 のごとき成績を得た。

即ち、H-10407, SE58, SE60 の各 Enterotoxin 調製液は H-10407 の抗毒素血清によって PF 活性は失活

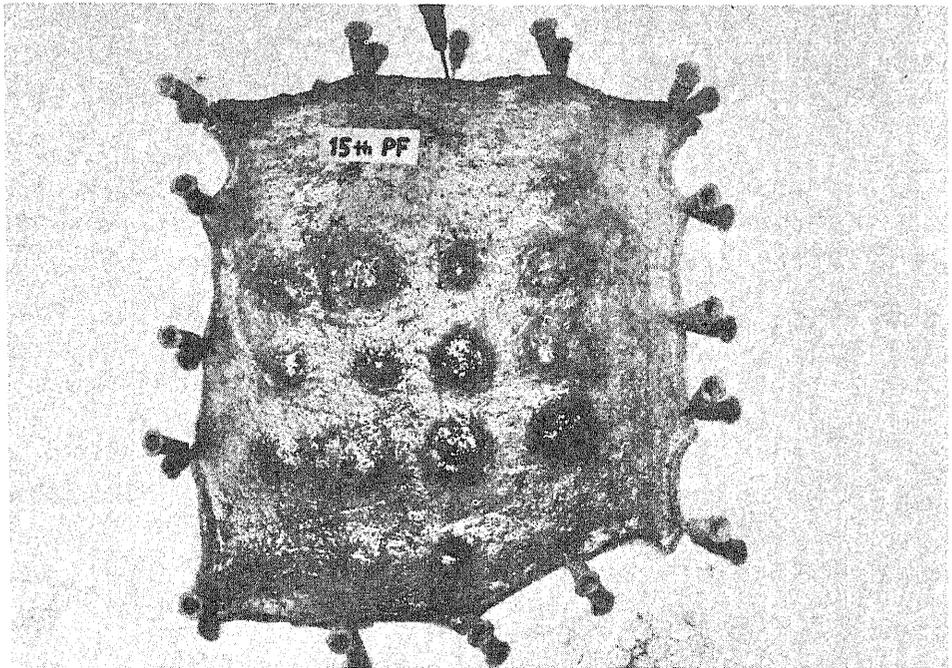


写真 2

表 3 腸管結紮ループ法

菌 株	重 さ g	長 さ g	W / L
H-10407	37.5	12.0	3.13
K-12	2.9	8.0	0.39
SEp02	3.5	7.5	0.47
SE09	2.5	10.5	0.23
SE58	1.7	7.0	0.24
SE60	2.4	10.0	0.24
SK02	2.6	10.5	0.25

表 4 中和試験 (PF テスト)

菌 株	抗血清		
	H-10407	SE58	SE60
H-10407	N	-	-
SE58	N	-	-
SE60	N	-	-

N: 中和
-: 中和されず

した。しかし、SE58、SE60の抗毒素血清ではいずれの組合せでも、PF活性は失活しなかった。

考 按

大腸菌のEnterotoxinに関する研究は、前述したごとく1967年SmithとHalls¹¹⁾によってブタの流行性腸炎が大腸菌のEnterotoxinに起因することを証明したのに始まる。

人においては1971年、Sackら⁹⁾がカルカッタにお

けるコレラ様重症下痢患者由来の大腸菌から、コレラ毒素様のEnterotoxinを産生することを証明した。これと相前後して、DuPontら¹⁰⁾もベトナムにおけるアメリカ人の急性下痢症から同様にEnterotoxin産生の大腸菌を証明した。これらの報告を契機としていわゆる毒性大腸菌の関心は高まり、単にコレラ様の重症下痢症だけでなく、小児や旅行者の下痢症の原因としても極めて重要なことが報告されるに至っている。

またKlipsteinら¹¹⁾はスプルー患者の上部腸管から

分離した *Klebsiella* と *Enterobacter* から Enterotoxin の存在を証明している。

そもそも大腸菌の Enterotoxin の毒素原性は、染色体外因子の Plasmid の支配下であり、大腸菌以外のグラム陰性桿菌にも伝達可能なことが証明され^{12)~14)}、*Klebsiella*, *Enterobacter* をはじめ *Citrobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Yersinia*, および *Pseudomonas* から Enterotoxin が証明されている^{11) 5) 16)}。

大腸菌の Enterotoxin は、現在熱安定性を異にする2種の toxin の存在が知られている。一つは 60°C 30分加熱で失活する易熱性 (LT) であり、もう一つは熱に安定な耐熱性 (ST) である¹⁷⁾。大腸菌が上部腸管内で増殖する際、これらの一方、あるいは両方が産生されると、小腸粘膜の上皮細胞に作用し、Adenyl-Cyclase-cyclic-AMP system を介して下痢をひきおこすとされている^{18)~20)}。

Enterotoxin の検出法としては LT, ST を包括し、Enterotoxin 本来の作用である液体貯留因子をみるウサギ腸管結紮ループ法^{8) 17)}、LT の血管透過性因子 (PF) をみる皮内反応法⁷⁾、同様に LT の細胞反応を利用した培養細胞法 (Mouse adrenal cells^{21) 22)}、Chinese hamster ovarian cells²³⁾、Rat epididymal fat cells^{19) 20)}、Mouse thymocytes²⁴⁾) および ST のみを検出する Suckling mouse^{25) 26)}、などがある。

我々は皮内反応による PF テストと一部のものについてウサギ腸管結紮ループ法を用いた。前者は Evans ら^{7) 27)}の精力的な一連の研究があり、実験成績の信頼性の高いことなどから、彼らの方法を一部修正して行なった。PF テストの判定の際、大橋ら²⁸⁾の指摘する通り、屠殺後皮膚を剥離し、裏面から観察した方が、より正確で硬結もよくわかった。

一方、我々は De ら⁸⁾の方法に従ってウサギ腸管結紮ループ法を試みた。当初は不慣れのため開腹中に死亡することもあったが、手技に慣れる内に比較的短時間に、確実に遂行することができるようになった。

しかし、我々の分離した PF テスト陽性株がウサギ腸管結紮ループ法では全く反応しなかった。従って嚴格には PF テスト陽性株と腸管結紮ループ陽性株が、直ちに同じものであると断定することはさしひかえたいが Finkelstein²⁹⁾は PF テストの Enterotoxin の最少反応量が 0.000015 ~ 0.00006g であるのに対し、液体貯留因子つまり腸管結紮ループ法では 0.2g でやっと反応すると述べている如く、bioassay としての Enterotoxin 検出感度は、PF テストの方がはるかに優れている。今後我々は、大量の培養濾液から得た

Enterotoxin 調製液を更に濃縮操作を加え、腸管結紮ループ法を再検討したいと考えている。

また、一度に出来る検体数においても、腸管結紮ループ法ではせいぜい 5 ~ 6 検体であるのに対し、PF テストでは一度に 20 ~ 30 検体出来る利点がある。

坂崎³⁰⁾や工藤³¹⁾らの推奨している培養細胞法は、PF テストと同様 ST の検出は出来ないが、LT の検出法として広く利用されているものであり、我々も現在、国立予防衛生研究所より Y-1 mouse adrenal cell の分与をうけ検討中である。

Enterotoxin の免疫学的特徴として、大腸菌の Enterotoxin (LT) はすべて免疫学的に同一と考えられており、またコレラ毒素とも抗原関係があり、コレラ抗毒素血清によって中和されることが知られている^{27) 32) 33)}。

我々が試みた毒素中和試験では、いわゆる毒性大腸菌 H-10407 の抗毒素血清は、いずれの菌株の毒素活性をも中和させたが、我々の分離株の抗毒素血清は、当該菌の毒素活性すら中和することが出来なかった。おそらく我々の分離株の毒素量では、中和しえるだけの充分な力価の抗毒素血清が得られていないためと考えられ、腸管結紮ループ法の再検討と平行し、高濃度の Enterotoxin を得べく検討中である。

また、従来単に培養濾液の原液をそのまま用いての PF テストや腸管結紮ループ法を行なっている報告があくつかあるが、我々はいわゆる毒性大腸菌 H-10407 を使って試みたが、いずれも反応はみられず、培養濾液の調製、つまり蛋白濃縮といった操作の必要性をみとめた。

ここで、大腸菌の Enterotoxin に関して一つ問題となるのは、毒素原性の低下ないしは無毒素化の現象である³⁴⁾。前述した如く、大腸菌の Enterotoxin 産生性は薬剤耐性因子と同様に plasmid によって伝達されることが実験的に証明されている^{12)~14)}。そのため菌の継代や長期保存によって毒素原性の脱落が当然起り得よう。事実、我々の分離株においても、新鮮な分離当初では、PF テストで陽性反応を示したものが、普通寒天高層培地に 6 ヶ月 ~ 1 年間保存の同一陳旧株について PF テストを行なうと、その反応はほとんどの分離株で弱陽性ないしは陰性化した。このような事実からも、毒素原性株の保存にあたっては、凍結乾燥とか、ゼラチンディスクを用いる等の配慮が必要であろう。我々の Enterotoxin 中和交叉反応の不成立はここに原因しているのかもしれない。

さて、下痢症といわゆる毒性大腸菌の研究は、外国において 1971 年以後報告されるに至ったが、本邦では

小児の下痢から PF テスト陽性株を証明したのは我々が最初であろう。

下痢症からのいわゆる毒性大腸菌の検出率は、表 5 に示すごとく、Gorbach ら³⁵⁾はシカゴの小児下痢症より 82%，Guerrant ら³⁶⁾はブラジルの小児下痢症より 50%，Echeverria ら³⁷⁾はボストンの小児下痢症より 0%，また Gorbach ら³⁸⁾はメキシコへの旅行した学生より 71% (control 15%)，Sack ら³⁹⁾はアパッチ族の小児下痢症より 16%，Rudoy ら⁴⁰⁾はテキサスの小児下痢症より 86% (control 41%)，Nalin ら⁴¹⁾はバングラディッシュの全年令層の下痢症より 55%，Ryder ら⁴²⁾は同じくバングラディッシュの下痢症より 2 才以下は 0%，11 才以上は 56%，そして Wadström ら¹⁵⁾はエチオピアの小児下痢症より分離したグラム陰性桿菌の 37%に Enterotoxin 産生株を証明し、そのうち大腸菌は 38%に検出したと報告している。

我々は白痢を除く小児下痢症より 23%の PF テスト陽性株を検出した。この様に検出率にひらきがあるのは、Enterotoxin の検出法、対象の相違、地域の衛生状態等を考えれば当然の結果であろう。

白痢に関しては、我々の検索した株はいずれも陰性であった。同様に Echeverria ら³⁷⁾と Ryder ら⁴²⁾は、

下痢症のうち reovirus-like agent が関与していたと考えられる子供からはいわゆる毒性大腸菌を検出できなかったと述べている。

病原大腸菌といわれる毒性大腸菌の関係については、現在病原大腸菌診断用として市販されている 20 余種の血清型は、いわゆる毒性大腸菌とは余り関連性がないとされている。

しかし、病原大腸菌に noninvasive 型と invasive 型があり、その下痢発現機構にも不明な部分が多いこと、また 06 など数種の血清型に毒性大腸菌が高頻度に見られること、毒性大腸菌の毒素原性の plasmid 伝達性等のことから、病原大腸菌と毒性大腸菌の分類さえも混乱の域にある。ただ病原大腸菌は経口摂取によって人に下痢を発症させることが出来るが、いわゆる毒性大腸菌はそれ自身原発性腸炎をおこさないが、ウィルス感染等その他の一次的要因が加わった時、小腸内で増殖し腸炎をおこさせる潜在的病原性があるものとされている様である。

Gorbach ら³⁵⁾や Guerrant ら³⁶⁾は病原大腸菌の一部が Enterotoxin 産生株でもあったことを報告しているが、我々も病原大腸菌 044K74 の 1 株が PF テスト陽性株であった。従来、下痢症に関しては病原大腸菌に

表 5 毒性大腸菌の検出率

報告者	検出率	対象	地域	方法	備考
Gorbach, S. L.	82%	children	Chicago	I. L.	
Guerrant, R. L.	50%	children	Brazil	C. H. O. I. L. S. M.	
Echeverria, P.	0%	children	Boston	A. C. I. L.	R. L. A.: 35%
Gorbach, S. L.	72% (15%)	students (travellers) control)	Mexico	P. F. I. L.	
Sack, R. B.	16%	children (Apache)	Alizona	A. C. I. L.	
Rudoy, R. C.	86% (41%)	children control)	Texas	S. M.	
Nalin, D. R.	55%	all age	Bangladesh	C. H. O.	
Ryder, R. W.	0% 56%	under 2yr over 11yr	Bangladesh	A. C.	R. L. A.: 55% R. L. A.: 0%
Wadstom, T.	14%	children	Ethiopia	A. C. P. F. I. L.	

A. C.: adrenalcell assay I. L.: ileal loop assay

C. H. O.: Chinese hamster ovary cell assay

P. F.: rabbit skin test S. M.: suckling mouse assay

R. L. A.: reovirus-like agent

主力がおかれていたが、今後は血清型を含め、毒素レベルでの検討も必要になろう。

幼若乳児遷延性下痢症に関して、例数は少ないが、4株中2株に陽性株が検出されたことは何らかの下痢を遷延させる要因として Enterotoxin が働いているのかもしれない。

また、Hemolytic-Uremic syndrome の前駆症状としてみられた血性下痢便より分離した大腸菌 (SE58) より PF テスト陽性株を検出したが、本症の発症機転に Enterotoxin が関与しているのかもしれない。今後は下痢症に限らず、敗血症、髄膜炎、尿路感染症等より起炎菌として分離したグラム陰性桿菌についても Enterotoxin の検索をすすめたいと考えている。

結 論

小児の下痢症と一部成人の重症下痢患者の十二指腸液と糞便より分離した大腸菌と Klebsiella の Enterotoxin を皮膚反応による血管透過性試験 (PF テスト) によって検索し、以下の結論を得た。

- 1) 白痢を除く79例の小児急性下痢症より分離した大腸菌71株中17株(23.6%)および Klebsiella 8株中1株(12.5%)に陽性株をみとめた。
- 2) 12例の病原大腸菌性腸炎より分離した病原大腸菌12株中1株に陽性株をみとめた。
- 3) 9例の白痢より分離した大腸菌8株と Klebsiella 1株はいずれも陰性であった。
- 4) 4例の幼若乳児遷延性下痢症より分離した大腸菌1株は陰性であったが、Klebsiella 3株中2株に陽性株をみとめた。
- 5) 3例の成人重症下痢症より分離した大腸菌3株中1株に陽性株をみとめた。
- 6) 11例の健康小児より分離した大腸菌10株と Klebsiella 1株はいずれも陰性であった。

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲をいただきました前主任教授中島博徳先生、主任代理谷口昂助教授および微生物学教室西田尚紀教授に深謝いたします。

また、菌株分与に御協力いただいた国立予防衛生研究所坂崎利一博士、毒素産生に関して御指導いただいた北陸大学薬学部微生物学教室桐谷和文教授、そして終始直接の御援助をいただいた高橋謙太郎講師と、この研究に多大なる便宜を与えて下さった教室の諸兄に深謝いたします。

なお本研究の一部は、51年度科学研究費補助金(課題番号157251)の援助をうけた。記して感謝の意を表します。

文 献

- 1) Smith, H. W. & Halls, S. : J. Path. Bact., 93,

531 (1967).

- 2) 小泉晶一・南場一郎・高橋謙太郎・正木克治・井上 勝・奥田則彦・加藤真人・佐野三枝子・山本昭・増山 毅・岡本 力・西田直己・佐藤 保・谷口昂・中島博徳 : 小児科, 16, 745 (1975).
- 3) 高橋謙太郎・西田直己・高堂松平・中島博徳 : 日児誌, 78, 663 (1974).
- 4) 西田直己 : 十全医学会誌, 85, 580 (1976).
- 5) 渡部礼二・中村英夫・木谷 洋・西田直己・高橋謙太郎・中島博徳 : 医学と生物学, 93, 35 (1976).
- 6) 渡部礼二・中村英夫・木谷 洋・西田直己・高橋謙太郎・中島博徳 : 日児誌, 81, 932 (1977).
- 7) Evans, D. J. Jr., Evans, D. G. & Gorbach, S. L. : Infect. Immun., 8, 725 (1973).
- 8) De, S. N., Ghose, M. L. & Sen, A. : J. Path. Bact., 79, 373 (1960).
- 9) Sack, R. B., Gorbach, S. L., Banwell, J. G., Jacobs, B., Chatterjee, B. D. & Mitra, R. C. : J. Infect. Dis. 123, 378 (1971).
- 10) DuPont, H. L., Formal, S. B., Hornic, R. B., Snyder, M. J., Libonati, J. P., Sheahan, D. G., LaBrec, E. H. & Kalas, J. P. : N. Engl. J. Med., 285, 1 (1971).
- 11) Klipstein, F. A., Holdeman, L. V., Cortino, J. J. & Moore, W. E. C. : Ann. Intern. Med., 79, 632 (1973).
- 12) Skerman, F. J., Formal, S. B. & Falkow, S. : Infect. Immun., 5, 622 (1972).
- 13) Gyles, C., So, M. & Falkow, S. : J. Infect. Dis., 130, 40 (1974).
- 14) Guerrant, R. L., Dickens, M. D., Wenzel, R. P. & Kapikian, A. Z. : J. Pediat., 89, 885 (1976).
- 15) Wadström, T., Aust-Kettis, A., Habte, D., Holmgren, J., Meeuwisse, G., Möllby, R. & Söderlind, O. : Arch. Dis. Child., 51, 865 (1976).
- 16) Koupal, L. R. & Deibel, R. H. : Infect. Immun., 11, 14 (1975).
- 17) Evans, D. G., Evans, D. J. Jr. & Pierce, N. F. : Infect. Immun., 7, 873 (1973).
- 18) Kantor, H. S., Tao, P. & Wisdom, C. : Infect. Immun., 9, 1003 (1974).
- 19) Evans, D. J. Jr., Chen, L. C., Curlin, G. T. & Evans, D. G. : Nature New. Biol., 236, 137 (1972).
- 20) Hewlett, E. L., Guerrant, R. L., Evans, D. J.

- Jr. & Greenough, W. B. : *Nature*, 249, 371 (1974).
- 21) Donta, S. T., Moon, H. W. & Whipp, S. C. : *Science*, 183, 334 (1974).
- 22) Sack, D. A. & Sack, R. B. : *Infect. Immun.*, 11, 334 (1975).
- 23) Guerrant, R. L., Brunton, L. L., Schnaitman, T. C., Rebhun, L. I. & Gilman, A. G. : *Infect. Immun.*, 10, 320 (1974).
- 24) Zenser, T. V. & Metzger, J. F. : *Infect. Immun.*, 10, 503 (1974).
- 25) Dean, A. G., Ching, Y.-C., Williams, R. G. & Harden, L. B. : *J. Infect. Dis.*, 125, 407 (1972).
- 26) Giannella, R. A. : *Infect. Immun.*, 14, 95 (1976).
- 27) Evans, D. G., Evans, D. J. Jr. & Gorbach, S. L. : *Infect. Immun.*, 8, 731 (1973).
- 28) 大橋 誠 : タンパク毒素上 (村田, 逢坂, 大橋, 鈴木, 田宮, 船津) 479頁, 東京, 講談社, 1972.
- 29) Finkelstein, R. A. & LoSpalluto, J. J. : *J. Infect. Dis.*, 121, S63 (1970).
- 30) 坂崎利一・田村和満 : *臨床と細菌*, 4, 81 (1977).
- 31) 工藤泰雄 : *モダンメディア*, 22, 399 (1976).
- 32) Sack, R. B., Jacobs, B. & Mitra, R. : *J. Infect. Dis.*, 129, 330 (1974).
- 33) Smith, N. W. & Sack, R. B. : *J. Infect. Dis.*, 127, 164 (1973).
- 34) Raska, K. & Raskova, H. : *Lancet*, 12, 1300 (1976).
- 35) Gorbach, S. L. & Khurana, C. M. : *N. Engl. J. Med.*, 287, 791 (1972).
- 36) Guerrant, R. L., Moore, R. A., Kirschenfeld, P. M. & Sande, M. A. : *N. Engl. J. Med.*, 293, 567 (1975).
- 37) Echeverria, P., Blacklow, N. R. & Smith, D. H. : *Lancet*, 2, 1113 (1975).
- 38) Gorbach, S. L., Kean, B. H., Evans, D. G., Evans, D. J. Jr. & Bessudo, D. : *N. Engl. J. Med.*, 292, 933 (1975).
- 39) Sack, R. B., Hirschhorn, N., Brownlee, I., Cash, R. A., Woodward, W. E. & Sack, D. A. : *N. Engl. J. Med.*, 292, 1041 (1975).
- 40) Rudoy, R. C. & Nelson, J. D. : *Am. J. Dis. Child.*, 129, 668 (1975).
- 41) Nalin, D. R., McLaughlin, J. C., Rahaman, M., Yunus, M. & Curlin, G. : *Lancet*, 2, 1116 (1975).
- 42) Ryder, R. W., Sack, D. A., Kapikian, A. Z., McLaughlin, J. C., Chakraborty, J., Rahman, A. S. M. M., Merson, M. H. & Wells, J. G. : *Lancet*, 1, 659 (1976).

A b s t r a c t

Escherichia coli and *Klebsiella*, which were isolated from duodenal juices and stools of 104 infants and children with diarrhea, 3 adults with severe diarrhea and 11 healthy children, were tested for production of enterotoxin by the rabbit skin test.

Enterotoxigenic strains were found in 18 of the 79 infants and children with acute diarrhea, in one of the 12 children with diarrhea due to enteropathogenic *Escherichia coli* and in two of the 4 infants with the protracted diarrhea. In adults with severe diarrhea, enterotoxigenic strain was found in one of the 3 cases. However, none of the 9 infants with "Hakuri" (diarrhea due to reovirus-like agents infection) and of the 11 controls had evidence of enterotoxigenic bacterial infection.

These studies suggest that enterotoxigenic strains can possibly be one of the causes of diarrhea in Japanese children.