

# 本邦の産婦より得られた初乳の大腸菌Enterotoxinに対する中和抗体活性

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	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8859">http://hdl.handle.net/2297/8859</a>

# 本邦の産婦より得られた初乳の大腸菌 Enterotoxin に対する中和抗体活性

金沢大学医学部小児科学教室 (主任: 谷口昂教授)

中 村 英 夫

(昭和55年9月26日受付)

新生児期あるいは幼若乳児期においていったん発症した下痢はしばしば重篤な経過をとり、ときには死の転帰をとることすらある。我々の教室では昭和44年～50年の間に、幼若乳児遷延性下痢症の38例を経験し、そのうち16.4%にあたる6例が死亡した<sup>1)</sup>。そして、これら幼若乳児遷延性下痢症38例のうち37例(97%)が人工栄養児であり、母乳栄養児がわずかに1例のみであったことは、極めて注目に値する事実であった。人工栄養児より母乳栄養児の方が下痢症の発生頻度が明らかに少いことは従来よりよく知られているが、それは母乳、特に初乳中の種々の感染防御因子が明らかにされるにつれ説明されるようになった<sup>2)</sup>。その中でも特に重要とされるのが初乳中IgAであり、ウイルスや大腸菌をはじめとする細菌に対する特異的中和抗体の存在はよく知られている<sup>3)~7)</sup>。

一方、小児期の下痢の原因の一つとして近年注目を集めている Enterotoxin 産生大腸菌が新生児期の下痢症の一部に関与しているのではないかという推測がある<sup>8)~10)</sup>。しかし、これらの報告には栄養法が母乳であったのか人工栄養であったのかは記載されていない。初乳及び初乳中IgAが、大腸菌 Enterotoxin に対し中和抗体をもっているか否かは極めて興味ある問題とおもわれる。著者は本研究において、122人の健康産婦から得た初乳乳清及び、さらに4人の初乳より分離精製したIgAと、大腸菌 Enterotoxin との中和反応を、Y<sub>1</sub> mouse adrenal cell assay を用いて試みた。

## 対象および方法

### 1) 毒素液の作製

Enterotoxin 産生大腸菌として、バングラディッシュの重症下痢症患者から分離された大腸菌 H-10407 (国

立予研の坂崎利一博士より分与)を用いた。大腸菌 H-10407 を Evans ら<sup>11)</sup>の毒素産生用培地に接種し、37℃、18時間振温培養した後、4℃、12,000rpm、20分遠心し、その上清を0.45m $\mu$ のミリポアフィルターを通し、それを毒素液とした。毒素液は検定までの間、-80℃に凍結保存した。なお、陰性対照として大腸菌標準株 K-12 を用いた。

### 2) Enterotoxin 活性の検定

Sack ら<sup>12)</sup>の行った方法を一部修正して行った。即ち、国立予研の坂崎利一博士より分与をうけた Y<sub>1</sub> マウス副腎細胞 (Ad-Y<sub>1</sub>-O) を、10%仔牛血清、100 $\mu$ g/ml のカナマイシンを加えたイーグル培地に継代培養した。この Y<sub>1</sub> マウス副腎細胞を組織培養用プレート Microtest (Falcon) に subculture し、単一層となった時点で毒素液 0.05 ml を 37℃、5分間接触させ、洗浄したのち、同じイーグル培地に 37℃、18時間培養し細胞形態の変化より判定した。

### 3) 初乳乳清の採取

昭和52年より2年間の間に金沢赤十字病院に入院した見かけ上健康な産婦122人より、分娩後3日以内にそれぞれ約10mlの母乳を採取し、4℃、15,000rpm、30分間遠心後、中間の透明な液を採取し、それを初乳乳清とした。なお、各産婦は少くとも周産期に下痢を認めておらず、期間中病棟内に下痢の流行はなかった。また、各乳清中のIgA濃度はSingle radial immunodiffusion法(トリバルチゲンIgA)で測定した。

### 4) 初乳IgAの精製

加藤<sup>13)</sup>の行った方法を一部修正して用いた。即ち、初乳乳清による中和試験で陽性であったもののうちの4例より得た初乳乳清を、43%硫酸で塩析し、それを4

Neutralizing Activity Against Escherichia Coli Enterotoxin in Colostral Specimens from Lactating Japanese Women. Hideo Nakamura, Department of Pediatrics (Director: Prof. N. Taniguchi), School of Medicine, Kanazawa University.

で、12,000rpm,10分間遠心した。その沈渣に0.2M NaCl-0.1M Tris-HCl Buffer pH 8.0 (以下トリス緩衝食塩水で4℃,48時間透析し,3,000rpm,15分間遠心して得られた上清をあらかじめトリス緩衝食塩水で平衡化したSephadex G-200カラム( $\phi 3.5 \times 90$  cm)で上行法によりゲル濾過を行った。OD280m $\mu$ における第1ピークをプールし,コロジオンバッグで濃縮した後,0.01M 燐酸カリ緩衝液pH 8.0で4℃,48時間透析し,3,000rpm15分間遠心し得られた上清をあらかじめ0.01M 燐酸カリ緩衝液pH 8.0で緩衝化したDEAEセルロースカラム( $\phi 2.0 \times 28$  cm)に吸着させ,pH 8.0で一定のまま,モル濃度のみを0.01M,0.05M,0.3Mの燐酸カリ緩衝液で階段溶出法を行った。OD280m $\mu$ で測定し,0.05Mで溶出されたピークをプールし,凍結乾燥したのち,-80℃に保存した。

純度の判定には,抗初乳IgA血清,抗IgG血清,抗IgM血清によるOuchterlony testを行い,抗初乳IgA血清とのみ反応することを確認した。また,大腸菌Enterotoxinとの中和反応を行う際には,pH 7.2の燐酸緩衝食塩水(以下PBSと略す)1mlで溶解し,Lowry法<sup>14)</sup>で濃度を測定したのち使用した。

#### 5) 兎抗ヒト初乳IgA血清(抗初乳IgA血清)の作製

数人の産婦より得た初乳IgAを1.5mlの食塩水に溶解し,等量のFreund's complete adjuvantとともに家兎の手掌,足蹠および全身の皮下,筋肉内に注射し,その後2週間隔で3回同じ方法により効果注射を行い,最終注射後10日目に採血した。

#### 6) 初乳乳清及び初乳IgAによる大腸菌Enterotoxinの中和反応

初乳乳清及び分離精製したIgAのおおのをpH 7.2のPBSで倍々稀釈し,等量の標準毒液1単位(測定法は後述する)を加え,37℃,1時間incubateした。その後,この混合液0.05mlを単一層となったY<sub>1</sub>マウス副腎細胞に37℃,5分間接触させ,Enterotoxin活性の検定の際に行ったのと同じ操作後,細胞変性出現の有無で初乳乳清及び初乳IgAの大腸菌Enterotoxinに対する中和活性を判定した。

### 成 績

#### 1) 培養細胞反応性試験(Y<sub>1</sub> mouse adrenal cell assay)

Y<sub>1</sub>マウス副腎細胞を用いて,Enterotoxin産生大腸菌H-10407の産生したEnterotoxinに対する細胞の形態学的反応を観察した。

即ち,写真1はEnterotoxin接触前の副腎細胞であ

り,正常な細胞形態を示していた。次に毒液を37℃,5分間接触させることにより写真2にみる如く,ほとんどの細胞がまるく変性し,細胞変性をきたすことを確認した。陰性対照としての大腸菌K-12の培養上清を細胞に接触させても,細胞形態に変化を認めなかった。

また,初乳乳清,初乳IgA及びPBS(pH 7.2)のそれぞれを単独で細胞に接触させてみたがいずれも細胞の形態学的変化を示さなかった。

#### 2) 毒素活性の検定

Enterotoxin産生大腸菌H-10407の毒液をpH 7.2のPBSにて倍々稀釈し,細胞に接触させたのち単一層の細胞の50%以上を変性させ得る最大稀釈値(CPED<sub>50</sub>:50% cytopathic effective dose)を求めた。その結果,表1の如く16倍稀釈値がCPED<sub>50</sub>となった。そこで次の初乳乳清及び初乳IgAによる中和試験には,CPED<sub>50</sub>の4倍の濃度(4CPED<sub>50</sub>)を用い,これを1単位/0.05mlの標準毒液とした。

#### 3) 初乳乳清及び初乳IgAによる大腸菌Enterotoxinの中和試験

122人の産婦の初乳乳清のうち37人(30.3%)にEnterotoxin中和活性を有することがわかった。(表2)また,Enterotoxin中和活性陽性の初乳乳清中のIgA濃度は373 $\pm$ 420mg/mlであり,Enterotoxin中和活性陰性の初乳乳清中のIgA濃度は280 $\pm$ 393mg/mlであり,両者の間に有意差を認めなかった。(P>0.05)

次に,Enterotoxin中和活性陽性の初乳乳清のうちの4検体より得られた初乳IgA(A-D)につき,中和試験を行った。(表3)その結果,Aは2.4mg/ml,Bは0.2mg/ml,Cは2.7mg/ml,Dは2.0mg/mlというIgA濃度で1単位のEnterotoxin活性を中和し,細胞変性を阻止した。

次に,初乳乳清及び初乳IgAと抗初乳IgA血清とを37℃,60分incubateした後,中和試験を行い中和活性が全て失活したことを確認した。

### 考 察

我々が腸菌Enterotoxinに関する研究を始めるに至った直接の契機は,我々がかつて経験した多数の幼若乳児遷延性下痢症の患児の上部腸管に大腸菌やKlebsiellaを主としたColiformsが異常増殖している事実を認めたことにある<sup>11,12,13)</sup>即ち,Enterotoxinの下痢発現の場が大腸ではなく小腸であることを考えると,これら上部腸管に異常増殖したColiformsがEnterotoxin産生菌として下痢発現に関与している

ことが考えられたからである。そして、これらの症例のほとんどが人工栄養児であったこと、及び、治療乳として母乳が最適であったことを考え合わせると、母乳が Enterotoxin に対し防衛的或いは抑制的に働いているのではないかと推測させられた。

大腸菌 Enterotoxin に関する研究は、1967 年 Smith と Halls<sup>19)</sup> ソブタの急性下痢症の原因として分離した大腸菌からコレラ様の Enterotoxin を証明したことはじまる。以来、ヒトの下痢症においても大腸菌の一部に Enterotoxin 産生菌が関与している

ことがわかってきた。今日まで世界各地より Enterotoxin 産生菌検出の報告があり<sup>20)・25)</sup> 小児下痢症においても極めて重要な位置を占める様になった。我々も先般本邦における小児急性下痢症から分離した大腸菌の 40% に Enterotoxin 産生菌を検出した<sup>26)</sup>。

大腸菌 Enterotoxin には熱安定性を異にする 2 種類の毒素、即ち、易熱性毒素 (heat-labile enterotoxin, LT) と耐熱性毒素 (heat-stable enterotoxin, ST) とがある。このうち LT は分子量約 102,000 の蛋白で抗原性を有し、菌株にかかわらず免疫学的に同一であ

表 1 毒素活性の検定

毒素液の希釈系列						C P E D <sub>50</sub>	
原	× 2	× 4	× 8	× 16	× 32		× 64
+	+	+	+	+	-	-	2 <sup>-4</sup>

+ : 細胞変性 >50%  
+ : 細胞変性 <50%

表 2 初乳乳量による大腸菌 Enterotoxin に対する中和試験

	中和活性陽性	中和活性陰性
No. (%)	37/122 (30.3)	85/122 (69.7)
乳清 IgA 濃度 (mg/ml)	373 ± 420.0	280 ± 393.7

表 3 精製 IgA による大腸菌 Enterotoxin に対する中和試験

Sample (IgA 濃度)	IgA の希釈系列							
	原	× 2	× 4	× 8	× 16	× 32	× 64	× 128
A (4.85 mg/ml)	-	-	+	+	+	+	+	+
	(2.4mg/ml)							
B (3.45 mg/ml)	-	-	-	-	-	+	+	+
	(0.2mg/ml)							
C (10.7 mg/ml)	-	-	-	+	+	+	+	+
	(2.7mg/ml)							
D (7.96 mg/ml)	-	-	-	+	+	+	+	+
	(2.0mg/ml)							

+ : 細胞変性 >50%  
- : 細胞変性 <50%

\* : 1 単位 of Enterotoxin 活性を抑制する各 IgA の最大希釈濃度

ることがわかっている<sup>28)</sup>。LT は細胞膜のレセプターと結合し細胞膜中の adenylyl cyclase を活性化させ、細胞膜中の adenylyl cyclase を活性化させ、細胞内の cyclic AMP 濃度を上昇させる<sup>29)</sup>。この cyclic AMP の上昇は小腸粘膜細胞では電解質の転送異常を来たし下痢を引き起こすし、一方、マウスの副腎細胞においては形態変化をおこすことが知られている。今回、我々が検定法として用いた Y<sub>1</sub> mouse adrenal cell assay はこの性質を利用した方法である<sup>30)</sup>。LT の assay には、このほか同じ tissue culture で Chinese hamster ovary cell を用いる方法<sup>31)</sup>、ウサギ腸管結紮ループ法<sup>32)33)</sup>、ウサギの皮内反応による血管透過性試験法<sup>11)</sup>などがある。我々はいずれの方法も試みてみたが、比較的簡便で一度に多くの検体を検定でき、かつ感度の高いこと、しかも再現性に優れていることより Y<sub>1</sub> mouse adrenal cell assay がもっとも有用であると考えられた。

さて、LT が抗原性をもつ以上、それが LT 産生大腸菌の侵襲をうけた母体の腸管粘膜に抗原刺激を及ぼし、その結果母乳中の分泌型 IgA に特異的抗体が産生されるであろうことは十分に予想されることである。分泌型 IgA は in vitro で母乳 B リンパ球により生成される唯一の免疫グロブリンである。腸管内の抗原刺激により感作された B リンパ球が腸管の粘膜下細胞から乳房へ migrate し、抗原に対し特異性をもった分泌型 IgA を生成すると考えられている。

母乳中 IgA の大腸菌 Enterotoxin に対する中和抗体活性について、Stoliar<sup>34)</sup>は最初の報告を行っている。彼らはその実験でグアテマラと北米産婦の母乳を対象にウサギ腸管結紮ループ法により母乳中の IgA fraction に Enterotoxin 中和活性が存在することを示した。我々の今回の実験では、本邦の産婦 122 人中 37 人 (30.3%) の初乳乳清に大腸菌 Enterotoxin に対する中和抗体活性を認めた。Holmgren<sup>35)</sup>は、パキスタンの低栄養産婦では 16 人全部の母乳に大腸菌 Enterotoxin に対する中和抗体活性を認めたが、スウェーデンの産婦の母乳では、大腸菌 Enterotoxin を中和し得たのは 16 人中わずか 1 例のみであったといい、その抗原感作の機会の相違を指摘している。我々の今回の成績は、まさにこの 2 つの国の中間に位置するわけである。本邦における Enterotoxin 産生大腸菌の分離の報告あるいはその汚染度に関する報告は極めて少く<sup>36)</sup>、疫学的にはわずかに我々がかって報告したデータがあるにすぎない<sup>25)37)</sup>。しかし、その研究の中で本邦の小児急性下痢症より分離した大腸菌の 40% に Enterotoxin 産生菌を認めたという結果(これはウサ

ギ皮膚血管透過性試験法によった)や、今回の実験結果をみると、本邦における Enterotoxin 産生大腸菌の汚染度は決して少ないものではないという印象をうける。即ち、我々の知らぬ間に Enterotoxin 産生大腸菌は、プラスミドを介して伝達する<sup>10)38)39)</sup>という特性も手伝って、広く本邦にも分布していたことが推測される。本邦において Enterotoxin 産生菌の検出の報告が少ないのは、その検出法が煩雑でありまだルーチン化されていないことによるものと思われる。しかし、Enterotoxin 産生菌による汚染がこれだけ進んでいるとなれば、下痢症の一病因として、Salmonella や Shigella あるいは classical な病原性大腸菌と同じように検索されるべき時期に来ているのではないだろうか。

一方、今回我々は、DEAE セルロース・カラムクロマトグラフィと Sephadex G-200 ゲル濾過の組み合わせにより、初乳乳清で中和抗体活性の陽性であった 4 例の初乳から純粋に初乳 IgA をとり出した。そして、各々精製された初乳 IgA が Enterotoxin 活性を中和し得ることを示し、その中和抗体活性が初乳 IgA 血清で阻止されることを確認した。即ち、大腸菌 Enterotoxin に対する中和抗体は母乳中 IgA に存在した。この 4 例のうち、A, C, D の 3 例が 2 mg/ml 強の IgA 濃度で 1 単位の Enterotoxin を中和し得たのに比し、B は 0.2 mg/ml の IgA 濃度で中和可能であり、B は他の 3 例より約 10 倍の中和抗体活性を有しており、このことは高度の感作の成立を推定させた。

今回の実験では、抗原としての毒素液が、crude なものであり、初乳中 IgA の大腸菌 Enterotoxin に対する中和抗体が特異的なものであるとはいいい切れない。LT 精製の試みは数多くの研究者によって行われているが、最近 Clements と Finkelstein<sup>40)</sup>は、LT が Bio-Gel に吸着するという特異的な性質をもっていることを利用して、高純度の精製標品を得ることに成功した。今後は精製した LT により、中和抗体の特異性に関する実験をすすめる必要がある。

さて、この中和抗体は受動免疫として新生児に伝達される。分泌型 IgA は antiseptic paint とも称されるが<sup>41)</sup>、大腸菌 Enterotoxin に対する中和抗体活性をもつ初乳 IgA は文字通り新生児の腸管壁を paint して Enterotoxin の侵襲を防ぐわけである。これまで血清型分類による classical な病原大腸菌を原因とする新生児下痢症に対する初乳の有効性は認められているが、今回の実験結果は Enterotoxin 産生大腸菌の関与する新生児下痢症に対しても初乳の有効なことを示唆するものと考えられる。また仮に、前述した幼若乳児

遷延性下痢症に Enterotoxin 産生菌が関与している  
と想定した場合、その患児のほとんどが人工栄養児で  
あったことは今回の実験結果からうなづけるものとい  
えよう。今後、Enterotoxin 産生菌に対する疫学的調  
査が行われることにより、これらの私見は解明される  
ものと思われる。

### 結 論

122 人の健康産婦の初乳乳清及び 4 人より分離精製  
した IgA の大腸菌 Enterotoxin に対する中和抗体活  
性を検索し、次の結果を得た。検定法として Y<sub>1</sub> mouse  
adrenal cell assay を用いた。

- 1) 122 人の初乳乳清のうち 37 人 (30.3%) の初乳  
乳清は大腸菌 Enterotoxin の細胞変性作用を中和  
し得た。
- 2) 初乳乳清で中和活性陽性であったうちの 4 人よ  
り分離精製した初乳 IgA は全て大腸菌  
Enterotoxin の細胞変性作用を中和し得た。

この成績は、初乳中 IgA に大腸菌 Enterotoxin に  
対する中和抗体が存在することを示し、また、本邦に  
おける Enterotoxin 産生大腸菌の汚染度が少くない  
ことを示している。さらにこの成績は、Enterotoxin  
産生菌の関与する新生児下痢症に対し、初乳のはたす  
役割の大きいことを示唆するものと思われた。

稿を終るにあたり、御指導と御校閲をいただいた主任教授  
谷口昂先生および細胞培養に関して御指導いただいた本学が  
ん研ウイルス部波多野基一教授ならびに菌株とマウス副腎細  
胞分与に御協力下さった国立予防衛生研究所坂崎利一博士に  
深謝いたします。

また終始直接の御援助をいただいた高橋謙太郎前講師、西  
田直己助手と、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。

### 文 献

- 1) 西田直己 : 乳児遷延性下痢症の細菌学のおよ  
び治療的研究。金沢大学十全医学会雑誌, 85, 580 -  
595 (1976)
- 2) Goldman, A. S. & Smith, C. W. : Host  
resistance factors in human milk, J. Pediat. 82,  
1082-1090 (1973)
- 3) Sabin, A. B. & Fieldstell, A. H. :  
Antipoliomyelitic activity of human and bovine  
colostrum and milk, Pediatrics, 29, 105-115  
(1962)
- 4) Michaels, R. H. : Studies of antiviral factors  
in human milk and serum, J. Immunol., 94, 262  
-271 (1965)
- 5) Kenny, J. F., Boesman, M. I. & Michaels, R. H.  
: Bacterial and viral coproantibodies in breast-  
fed infants, Pediatrics, 39, 202-213 (1967)
- 6) Michaels, J. G., Ringerback, R. & Hottenstein,  
S. : The antimicrobial activity of human  
colostral antibody in the newborn, J. Infect.  
Dis., 124, 445-448 (1971)
- 7) Gindrat, J. J., Gothefors, L., Hanson, L. A. &  
Winberg, J. : Antibodies in human milk against  
E. coli of the serogroups most commonly found  
in neonatal infections, Acta Pediat. Scand., 61,  
587-590 (1972)
- 8) Boyer, K. M., Petersen, N. J., Farzaneh, I.,  
Pattison, C. P., Hart, M. C. & Maynard, J. E. : An  
outbreak of gastroenteritis due to E. coli 0142  
in a neonatal nursery, J. Pediat., 86, 919-927  
(1975)
- 9) Ryder, K. M., Wachsmuth, I. K., Buxton, A. E.,  
Evans, D. G., DuPont, H. L., Masou, E. & Barrett,  
F. F. : Infantile diarrhea produced by heat-  
stable enterotoxigenic Escherichia coli, N. Engl.  
J. Med., 295, 849-853 (1976)
- 10) Guerrant, R. L., Dickens, M. D., Wenzel, R. P.  
& Kapikian, A. Z. : Toxigenic bacterial  
diarrhea; nursery outbreak involving multiple  
bacterial strains, J. Pediat., 89, 885-891 (1976)
- 11) Evans, D. J., Evans, D. G. & Gorbach, S. L. :  
Production of vascular permeability factor by  
enterotoxigenic Escherichia coli isolated from  
man, Infect. Immun., 8, 725-730 (1973)
- 12) Sack, D. A. & Sack, R. B. : Test for  
enterotoxigenic Escherichia coli using Y<sub>1</sub>  
adrenal cells in miniculture. Infect. Immun., 11,  
334-336 (1975)
- 13) 加藤彰一 : 分泌型  $\gamma$ A 免疫グロブリンに関す  
る研究, 第 1 編初乳  $\gamma$ A 免疫グロブリンの性状。日兒  
誌, 74, 459-472 (1970)
- 14) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. &  
Randall, R. J. : Protein measurement with the  
Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-  
275 (1951)
- 15) 高橋謙太郎, 西田直己, 高堂松平, 中島博徳 :  
いわゆる乳児非特異性腸炎の腸内細菌叢について \* 上  
部腸管と下部腸管の比較検討。日兒誌, 78, 663 -  
668 (1974)

- 16) 小泉晶一, 南場一郎, 高橋謙太郎, 正木克治, 井上勝, 奥田則彦, 加藤貞人, 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 : 幼若乳児の遷延性下痢症<sup>々</sup>その臨床的特徴と治療について. 小児科, 16, 745 - 755 (1975)
- 17) 中島博徳, 高橋謙太郎, 小泉晶一, 西田直己 : 幼若乳児遷延性下痢症の成因に関する考察. 小児科臨床, 29, 1216 - 1225 (1976)
- 18) 中島博徳, 高橋謙太郎, 小泉晶一, 西田直己 : 乳児の遷延性下痢症. 日本医事新報, 2731, 10 - 16 (1976)
- 19) Smith, H. W. & Halls, S. : Studies on *Escherichia coli* enterotoxin. J. Path. Bact., 93, 531 - 543 (1967)
- 20) Gorbach, S. L. & Khurana, C. M. : Toxigenic *Escherichia coli*; a cause of infantile diarrhea in Chicago. N. Engl. J. Med., 287, 791 - 795 (1972)
- 21) Guerrant, R. L., Moore, R. A., Kirschenfeld, P. M. & Sande, M. A. : Role of toxigenic and invasive bacteria in acute diarrhea of childhood. N. Engl. J. Med., 293, 567 - 573 (1975)
- 22) Echeverria, P., Blacklow, N. R. & Smith, D. H. : Role of heat-labile toxigenic *Escherichia coli* and Reovirus-like agent in diarrhea in Boston children. Lancet, 2, 1113 - 1116 (1975)
- 23) Sack, R. B., Hirschhorn, N., Brownlee, I., Cash, R. A., Woodward, W. E. & Sack, D. A. : Enterotoxigenic *Escherichia coli*-associated diarrheal disease in Apache children. N. Engl. J. Med., 292, 1041 - 1045 (1975)
- 24) Rudoy, R. C. & Nelson, J. D. : Enteroinvasive and enterotoxigenic *Escherichia coli*; occurrence in acute diarrhea of infants and children. Am. J. Dis. Child., 129, 668 - 772 (1975)
- 25) Wadstom, T., Aust-Kettis, A., Habte, D., Holmgren, J., Meeuwisse, G., Mollby, R. & Soderlind, O. : Enterotoxin-producing bacteria and parasites in stools of Ethiopian children with diarrheal disease. Arch. Dis. Child., 51, 865 - 870 (1976)
- 26) 渡部礼二, 中村英夫, 木谷洋, 西田直己, 高橋謙太郎, 中島博徳 : 下痢症患児より分離された Coliforms の Enterotoxin 産生に関する研究. 日児誌, 81, 932 - 939 (1977)
- 27) Smith, H. W. & Gyles, C. L. : The relationship between two apparently different enterotoxins produced by enteropathogenic strains of *Escherichia coli* of porcine origin. J. Med. Microbiol., 3, 387 - 401 (1970)
- 28) Dorner, F., Jaksche, H. & Stockl, W. : *Escherichia coli* enterotoxin; purification, partial characterization, and immunological observations. J. Infect. Dis., 133, 142 - 156 (1976)
- 29) Evans, D. J., Chen, L. C., Curlin, G. T. & Evans, D. G. : Stimulation of adenylyl cyclase by *Escherichia coli* enterotoxin. Nature New Biol., 236, 137 - 138 (1972)
- 30) Donta, S. T. : Detection of heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin with the use of adrenal cells in tissue culture. Science, 183, 334 - 336 (1974)
- 31) Guerrant, R. L., Brunton, L. L., Schnaitman, T. C., Rebhun, L. I. & Gilman, A. G. : Cyclic adenosine monophosphate and alteration of Chinese hamster ovary cell morphology; a rapid, sensitive in vitro assay for the enterotoxins of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. Infect. Immun., 10, 320 - 327 (1974)
- 32) De, S. N., Ghose, M. L. & Sen, A. : Activities of bacteria-free preparations from *Vibrio cholerae*. J. Path. Bact., 79, 373 - 380 (1960)
- 33) Evans, D. G., Evans, D. J. & Pierce, N. F. : Differences in the response of rabbit small intestine to heat-labile and heat-stable enterotoxins of *Escherichia coli*. Infect. Immun., 7, 873 - 880 (1973)
- 34) Stoliar, O. A., Green, E. K. & Carpenter, C. C. : Secretory IgA Against enterotoxins in breast-milk. Lancet, 1, 1258 - 1261 (1976)
- 35) Holmgren, J., Hanson, L. A., Carlson, B., Lindblad, B. S. & Rahimtoola, J. : Neutralizing antibodies against *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* enterotoxins in human milk from a developing country. Scand. J. Immunol., 5, 867 - 871 (1976)
- 36) 大橋誠, 善養寺浩 : 大腸菌エンテロトキシン. 日本細菌学雑誌, 32, 455 - 468 (1977)
- 37) 渡部礼二 : 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

大学十全医学会雑誌, 87, 324 - 332 (1978)

38) Skerman, F. J., Formal, S. B. & Falkow, S. : Plasmid-associated enterotoxin production in a strain of *Escherichia coli* isolated from humans. *Infect. Immun.*, 5, 622-624 (1972)

39) Gyles, C., So, M. & Falkow, S. : The enterotoxin plasmids of *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.*, 130, 40-49 (1974)

40) Clements, J. & Finkelstein, R. A. : Isolation and characterization of homogenous heat-labile enterotoxins with high specific activity from *Escherichia coli* cultures. *Infect. Immun.*, 24, 760-769 (1979)

41) Walker, W. A. & Hong, R. : Immunology of the gastrointestinal tract; Part 1. *J. Pediat.*, 83, 517-530 (1973)



**Neutralizing Activity against Escherichia Coli Enterotoxin in Colostral Specimens from Lactating Japanese Women** Hideo Nakamura, Department of Pediatrics (Director: Prof. N. Taniguchi), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920, Japan. *J. Juzen Med. Soc.*, **89**, 630-638 (1980).

**Abstract** The neutralizing activity against *E. coli* enterotoxin was evaluated in colostrum specimens obtained from 122 healthy postpartum Japanese women. A culture supernatant of *E. coli* H-10407 strain grown in the toxin-producing media of Evans *et al.* had 50% cytopathic effective dose (CPED<sub>50</sub>) on Y<sub>1</sub> mouse adrenal cell monolayer at a sixteenfold dilution and a fourfold concentrate of CPED<sub>50</sub> was chosen as a standard toxin dose in this work. Inhibition assay of colostrum specimens for the toxin effect on Y<sub>1</sub> mouse adrenal cell monolayer was carried out as follows: Cell-free supernatant of colostrum specimen was incubated with an equal aliquot of the standard toxin dose for 60 min at 37°C and then, cytopathic effect of the mixture assessed by Y<sub>1</sub> adrenal cell assay. Colostrum specimens being able to abrogate toxin-inducible cytopathic effect to less than 50% of morphological changes was evaluated as positive for neutralizing activity. Thirty-seven (30.3%) out of 122 colostrum specimens had neutralizing activity against *E. coli* enterotoxin in the experimental condition. There were no significant differences in concentration of colostrum IgA between neutralizing activity-positive (373±420 mg/ml) and -negative (280±393 mg/ml) groups. However, each preparation of colostrum IgA purified from four colostrum specimens with positive neutralizing activity was able to inhibit the cytopathic effect exerted by a standard toxin dose even at concentration of 0.2-2.7 mg/ml, suggesting an important role of colostrum IgA for neutralization of the toxin.

The fact that neutralizing activity against *E. coli* enterotoxin was found in a considerable proportion of colostrum specimens from lactating Japanese women might suggest their possible subclinical exposure to enterotoxin-producing strains of *E. coli* which might be assumed to be unexpectedly more prevailing over this country. However, whether colostrums having neutralizing activity against *E. coli* enterotoxin may exert a beneficial effect in preventing neonates from gastrointestinal infections with enterotoxin-producing strains of *E. coli* remains to be elucidated.

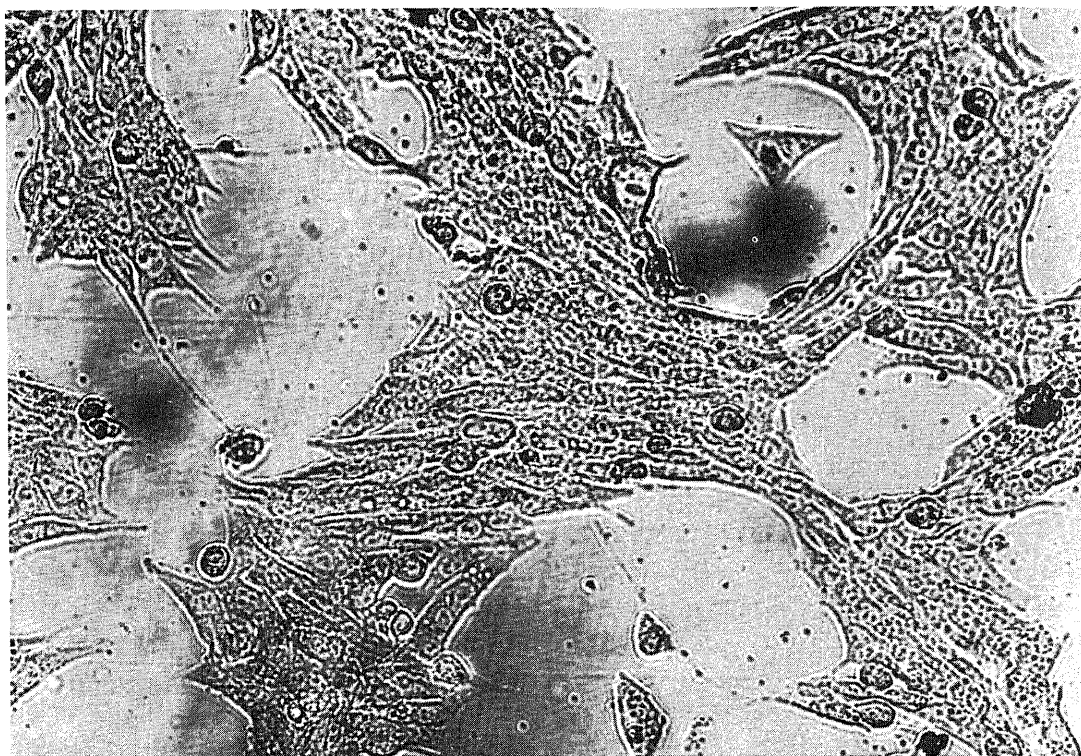


写真1 Enterotoxin 接触前の  $Y_1$  マウス副腎細胞

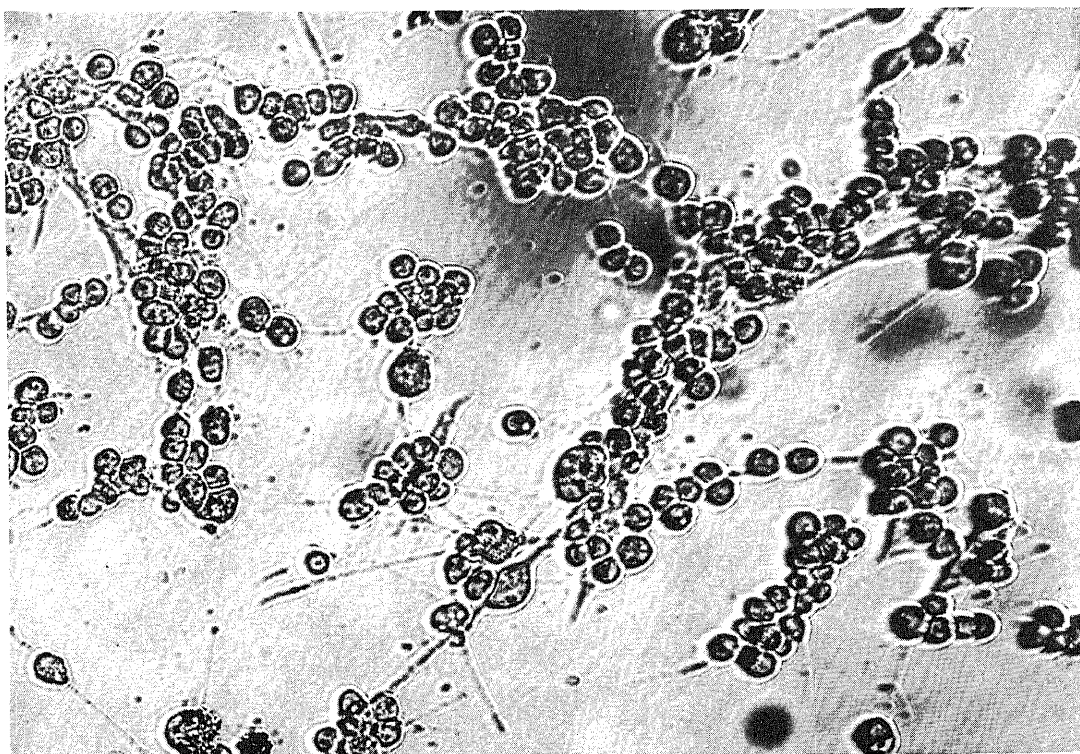


写真2 Enterotoxin 接触後変性をおこした  $Y_1$  マウス副腎細胞