

# AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

小児科 (1987.09) 28巻10号:1177～1181.

[感染症 臨床のための先端知識]  
細菌トキシンの測定

室野晃一

## A. 診断・検査法の進歩

### 10. 細菌トキシンの測定

室野 晃一\*

#### はじめに

細菌感染症において、その病態が形成されるうえで菌が産生するトキシンが中心的役割をなしていることが多い。これまで多数の毒素が発見、また研究されているが、その重要な意義の1つとしてジフテリア毒素、破傷風毒素のようにそのトキソイドワクチンや抗毒素血清が開発され、これらの疾患の予防や治療に大きく貢献したことがあげられる。

最近の毒素研究は分子レベルでの仕事に及んでいるが、一方細菌トキシンを臨床材料から容易に検出・測定する方法が開発され、実際の診療の場において有用なものとなっている。多数ある細菌毒素のなかで、そのトキシンだけで病像を説明できるかあるいは密接に関連しているものは数えるほどである。こういった原因毒素を検出・測定することは、その疾患の診断に不可欠であるばかりでなく、治療、疫学、感染予防にも重要である。

ここでは、こうした臨床と密接に関連があり、また最近注目されている細菌毒素を中心に、私たちが考案した exfoliative toxin の簡易検出法も含め、日常診療に利用可能と思われる検出法・測定法を紹介しながら稿を進めていくことにする。

\* Koichi MURONO 名寄市立総合病院小児科、  
医長

〔連絡先〕 〒096 名寄市西7条南7丁目  
名寄市立総合病院小児科

### I. 黄色ブドウ球菌エンテロトキシン

黄色ブドウ球菌による食中毒の原因として古くから知られている毒素である。エンテロトキシンには血清学的に異なる A, B, C1, C2, D, E の6つの型があることが知られている。

この毒素の検出法であるが、生物学的方法としてはサルの胃内に投与して嘔吐を誘発する方法が最も確実である。この他にネコの胃内あるいは静脈内に投与して嘔吐をおこすかどうかをみる方法があるが、血清型によってその作用の強さに違いがある。こうした方法は生物活性を直接反映しているものの、信頼できる結果を得るには1つの試料につき多数の動物を使用しなければならないこと、動物を容易に入手できない、費用がかかりすぎるなどその使用に限界があり、実用にはそぐわない。

そこで、この毒素に対する特異抗血清を利用した免疫学的方法がいろいろ考案されている。そのなかで食物中から直接検出できる方法として利用されているものをあげると、microslide assay, double-gel immunodiffusion assay, ラテックス凝集反応があり、さらに感度が優れている radioimmunoassay (RIA), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) がある。ラテックス凝集反応はエンテロトキシン検出用キット (SET-RPLA 生研、デンカ生研) として市販されている。また、最近ではモノクローナル抗体を利用して RIA, ELISA に応用した検出法<sup>1)</sup>も考案されている。

### II. 黄色ブドウ球菌表皮剝脱毒素 (exfoliative toxin: ET)

このトキシンによって惹起される staphylococcal scalded skin syndrome (SSSS) は小児に特有の疾患で、限局型の水疱性膿痂疹 (bullous impetigo) から全身性の表皮剝脱を呈する乳幼児の toxic epidermal necrolysis (TEN), 新生児期の Ritter 氏病まであり、日常診療で遭遇する機会が比較的多い。この毒素の発見のきっかけとなったのは、Melish ら<sup>2)</sup> が SSSS の患者から分離した黄色ブドウ球菌を生後5日以内の新生仔マウスに

接種したところ、ヒトと同様の表皮剥脱を呈することを証明した報告である。

その後、数多くの研究者たちによってこの原因外毒素である ET が分離・精製され、2つの血清型の異なる ET-A, ET-B が存在することが分っている。ET の性状に関する最新の論文<sup>9)</sup>によれば ET-A は分子量 30,000, ET-B は 29,500 で、等電点はそれぞれ 7.0, 6.95 であり、ET-A の遺伝子制御はクロモソーム、ET-B のそれはプラスミドとされている。

ET の検出法について述べる。生物学的方法は、先にふれたように Melish<sup>2)</sup> が報告した方法が標準的である。すなわち、生後 5 日以内の新生仔マウスに致死菌数の 100 分の 1 ( $10^6 \sim 10^7$  個) の黄色ブドウ球菌を皮下接種して 12~16 時間後に指で皮膚を軽く擦過して表皮剥脱をみる、いわゆる Nikolsky サインの有無をもって ET 産生をみる方法である。もう 1 つは hairless mouse を用いる方法で、その homozygote では生後 1 カ月でも  $10^8$  個の黄色ブドウ球菌の皮下接種でも Nikolsky サインを認める。こうした生物活性を直接確かめる方法は臨床症状をよく反映した優れた方法であるが、動物を用いなければならず、実際の日常診療における検査法としては適さない。そこで、ET に対する抗血清を利用した免疫学的方法がこれまでにこなわれている。

Kondo ら<sup>4)</sup> は抗 ET-A, ET-B 血清を加えた寒天平板をつくり、接種した黄色ブドウ球菌が毒素産生菌であるとその発育したコロニーの周囲に halo が形成されることをもって臨床分離株に応用した。Arbuthnott ら<sup>5)</sup> は double diffusion method と radial-immunodiffusion method を用いて、ET を定性的・定量的に測定する方法を報告した。また、Piemont ら<sup>6)</sup> は electrosyneresis method による臨床分離株への応用を報告している。筆者<sup>7)</sup> は Kondo らの方法に準じて ET-A, ET-B をそれぞれ精製し、これらでウサギを免疫した抗血清の IgG 分画をラテックス粒子にコーティングした試薬を作製し、これを黄色ブドウ球菌の培養上清とスライドガラス上で混和してその凝集の有無によって ET を検出する方法を考案した。この方法は

従来の double diffusion method より約 100 倍検出感度に優れ、臨床分離株に応用したところ、その検出成績は新生仔マウスによる方法と一致し、double diffusion method より鋭敏に ET-A, ET-B も型別できた。

SSSS 患者から分離された黄色ブドウ球菌について ET 産生性を調べる臨床的意義としてはまず、黄色ブドウ球菌が鼻・咽頭、皮膚などに常在することがあり、起炎菌としての意味づけに不可欠である。また全身型の TEN の場合、種々の部位から黄色ブドウ球菌が分離されることが多く、focus を見当づけるためにもすべての菌について ET 産生をみる必要がある。また、SSSS の新生児収容施設内での集団発生の報告<sup>8)</sup> もあり、院内感染対策を考えるうえでもフェージ型のみならず ET 検索にも及ぶ必要がある。さらに、小児ではまれであるが予後の悪い薬剤による TEN との鑑別にも有用である。

ET を簡便・迅速に検出するラテックス法は、日常の臨床細菌検査法としてこれから大いに期待できるものと思われる。

### III. Toxic shock syndrome toxin-one (TSST-1)

トキシックショック症候群 (toxic shock syndrome : TSS) は 1977 年 Todd ら<sup>9)</sup> が、7 人の子供 (8~17 歳) に発熱、低血圧、猩紅熱様発疹、浮腫、腎不全、肝障害など共通した症状がみられ、そのうち 1 人が死亡するという、これまでにない重篤な疾患として報告したのが最初である。その原因として、これらの患者の鼻・咽頭、気管粘膜、化膿病巣の膿よりフェージ I 群の黄色ブドウ球菌が分離され、この菌の産生する外毒素であることが推測された。その後、この TSS と同様の臨床症状を示す疾患が若い女性の間が多発し、疫学的調査がおこなわれたところ、月経期にタンポンを使用していることとの相関が認められ、さらに多数の患者の腔より黄色ブドウ球菌が分離され、この疾患の原因として新たな黄色ブドウ球菌外毒素の研究が進んだ。

Schlievert ら<sup>10)</sup> は TSS 患者由来の黄色ブドウ

球菌より、分子量 22,000, 等電点 7.2 の外毒素 pyrogenic exotoxin C (PEC) を精製した。この毒素は TSS 患者からの分離株に有意に産生をみ、精製 PEC はウサギに対して発熱作用を示し、エンドトキシン感受性を高める、リンパ球幼若化作用、IgM 合成抑制などの生物活性を有することから TSS の原因毒素であるとした。

一方 Bergdoll ら<sup>11)</sup> は、TSS 患者由来の黄色ブドウ球菌より、サルに対して嘔吐と下痢を示すエンテロトキシン様の毒素 (分子量 20,000, 等電点 6.8) を精製し、enterotoxin F と名づけた。この毒素も TSS の患者からの分離株に有意にその産生をみたため、やはり TSS の原因毒素としての可能性を示唆した。しかし、その後、この毒素はサルに対して嘔吐作用が確認できなかったので名称は toxic-shock toxin (TST) に変更された。

この2つの毒素は Bonventre ら<sup>12)</sup>、Igarashi ら<sup>13)</sup> によって、分子量 24,000, 等電点 7.0 の同一物質であることが証明され、呼称も toxic shock syndrome toxin-one (TSST-1) と命名されるに至った。しかし、この TSST-1 そのもので TSS と同様の多彩な臨床症状をおこすかどうかはいまだはっきりせず、今後検討の余地がある。

さて、TSST-1 の検出法であるが、Igarashi ら<sup>13)</sup> はこの毒素に対する抗血清から特異免疫グロブリンを分離してラテックス粒子に感作してつくった試薬を用いる逆受身ラテックス法を考案し、これはキット (TST-RPLA 生研、デンカ生研) として市販されている。わが国においては TSS の報告例はまだ少ないが、小児例の報告<sup>14)</sup> もあり、今後この疾病を考慮した注意深い診療が必要であるとともに、多くの臨床分離黄色ブドウ球菌に対して TSST-1 の産生性についても検討すべきであろう。

#### IV. 毒素原性大腸菌エンテロトキシン

通常、健康人の腸内細菌叢を構成する大腸菌が下痢の原因菌の1つとして認識されたのは、その大腸菌が特定の血清型に属していたことによる。それらは、pathogenesis の違いにより病原性大腸菌 (enteropathogenic *E. coli*)、組織侵入性大腸菌

(enteroinvasive *E. coli*)、毒素原性大腸菌 (enterotoxigenic *E. coli*) の3つに分けられる。小児の下痢症の原因のなかで毒素原性大腸菌が重要であるとの報告<sup>15)</sup> も数多くなされるようになり、その存在は無視できないものとなっている。わが国ではこれまでのところ小児に限っての報告はまだ見当たらないが、今後、小児科臨床医の関心と検査法の一般的普及によってその重要性が認識されると思われる。

毒素原性大腸菌は2種類の毒素エンテロトキシンを産生する。1つは 60°C・10 分の加熱で失活する易熱性エンテロトキシン (heat-labile enterotoxin: LT) で、もう1つは 100°C・10 分の加熱でも失活しない耐熱性エンテロトキシン (heat-stable enterotoxin: ST) である。LT はその性状がコレラトキシンに類似しており、分子量約 28,000 の A サブユニットと分子量 11,000 の B サブユニットが 1:5 の割合で融合して構成されている。B サブユニットが細胞膜のレセプターである GM<sub>1</sub> ガングリオシドに結合し、酵素活性をもつ A サブユニットがアデニレートサイクラーゼを活性化させ、細胞内のサイクリック AMP の濃度が上昇し、それが腸管内の多量の水分泌を促すとされている。一方、ST には STh と STp の2種類があり、ともに分子量 2,000 前後の低分子ペプチドである。その作用機序は細胞膜結合のグアニレートサイクラーゼ活性を促進することでやはり腸管の分泌を増加させるといわれているが、その詳細な機序は不明である。

これら2つのエンテロトキシンの検出法であるが、LT についてはその性状がコレラトキシンに類似しているため、その検査法が多数応用されている。生物学的方法としては、ウサギの結紮腸管ループ試験、ウサギ皮膚毛細血管透過性亢進試験、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞や Y1 副腎細胞の形態変化を調べる方法などがある。免疫学的方法では、抗血清を利用した免疫溶血反応、受身免疫溶血反応、逆受身赤血球凝集反応、逆受身ラテックス凝集反応、Elek 法を改変した微研法<sup>16)</sup> の他、固相 RIA 法、ガングリオシド酵素免疫測定法 (GM-ELISA) や DNA コロ

ニーハイブリダイゼーション法がある。また、最近では多数の菌について簡単に LT 産生菌をスクリーニングできる膜フィルター法も報告<sup>17)</sup>されている。これらのうち逆受身ラテックス凝集反応法と微研法は検査用キットが市販されている。一方 ST の検査法としては、生後 2～3 日の乳飲みマウスの胃内に投与して 3～5 時間後に開腹し腸管内の液体貯留を測定する生物学的方法が最も確実である。ST はハブテンで高力価の抗体が得られないため、抗血清を利用した免疫学的測定法は困難であった。しかし、最近 ST に対するモノクローナル抗体を利用した ELISA 法<sup>18)</sup>が開発され、臨床検査室での使用が可能になるものと思われる。

### V. *Clostridium difficile* 毒素

*Clostridium difficile* は抗生剤使用に関連した偽膜性大腸炎の起炎菌として注目されている。小児においては無症候性の児からも分離されることが多く<sup>19)</sup>、病原性としての意義はまだはっきりしていないが、*C. difficile* による乳幼児下痢症の流行なども報告<sup>20)</sup>されている。この菌によっておこる腸炎は産生された毒素が原因であるとされている。*C. difficile* は嫌気性菌で分離・同定がやや困難なこともあり、便中より毒素を直接検出する方法が診断に利用されている。

さて、*C. difficile* は 2 つの毒素を産生することが分っている。1 つは cytotoxin (toxin B) で、もう 1 つは enterotoxin (toxin A) である。両方とも細胞障害活性 (cytotoxicity) があるが、toxin B は toxin A に比べて約 1,000 倍その活性が強い。一方、toxin A にはウサギの結紮腸管に対して液体貯留をおこす作用がある。分子量は toxin A が 440,000～500,000、toxin B のそれは 360,000～470,000 とされている<sup>21)</sup>。

これら 2 つの毒素の検出法・測定法としては、既述したように細胞障害活性をみる方法が確実である。細胞としては WI-38 細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞、HeLa 細胞、Vero 細胞の他、McCoy 細胞などが利用され、これらに検体を加え、おもにその細胞形態の変化 (円形化) を

みることと、抗血清を加えたときにはそれがみられないことで毒素の証明がなされる。しかし、こうした tissue culture assay はどの施設でもおこなえるものではなく、また時間もかかる。そこで、特異抗血清を利用した免疫学的方法として、counter immunoelectrophoresis (CIE) 法、ラテックス凝集法、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法が開発されている。

CIE 法は偽陽性、偽陰性の割合が高く、適さないとの報告もあったが、その判定基準を明確にすることにより、十分利用可能であるとされている<sup>22)</sup>。ELISA 法は toxin A、B とそれぞれ検出することができ、その感度・特異度とも優れた方法<sup>23)</sup>である。ラテックス凝集法<sup>24)</sup>はその手技上、簡単・迅速に検出できる特徴があり、わが国でもエンテロトキシンを検出できるキット (c.d. CHECK-D-1, 三菱化成工業, ダイアヤトロン) が市販されている。

前述したように、小児においては *C. difficile* の病原性としての意義が明確でないこともあり、より多くの下痢症の患者についてこの毒素を検索することが、その疫学的基盤をつくりあげるものと思われる。

### おわりに

臨床と密接に関連があると考えられている、いわばその疾患の原因とみなされている細菌毒素である黄色ブドウ球菌エンテロトキシン、黄色ブドウ球菌表皮剥脱毒素、TSST-1、毒素原性大腸菌エンテロトキシンおよび *C. difficile* 毒素について、その臨床、毒素の性状、そして検出・測定法について概説した。

細菌トキシンを検出・測定する場合、その生物活性をみながら検索を進める必要はあるが、ここに紹介したように免疫学的方法が進歩した今日では、それらを応用した簡易検出法も開発され、日常の診療に十分利用可能と考えられる。

ご校閲頂きました旭川医科大学小児科吉岡一教授に  
深謝致します。

## 文 献

- 1) Thompson, N.E., Razdan, M., et al.: Detection of staphylococcal enterotoxins by enzyme-linked immunosorbent assays: Comparison of monoclonal and polyclonal antibody systems. *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**: 885—890, 1986.
- 2) Melish, M.E., Glasgow, L.A.: The staphylococcal scalded skin syndrome. Development of an experimental model. *N. Engl. J. Med.*, **282**: 1114—1119, 1970.
- 3) Freer, J.H., Arbuthnott, J.P.: Toxins of staphylococcus aureus. *Pharmacol. Ther.*, **19**: 55—106, 1982.
- 4) Kondo, I., Sakurai, S., et al.: Two serotypes of exfoliatin and their distribution in staphylococcal strains isolated from patients with scalded skin syndrome. *J. Clin. Microbiol.*, **1**: 397—400, 1975.
- 5) Arbuthnott, J.P., Billcliffe, B.: Qualitative and quantitative method for detecting staphylococcal epidermolytic toxin. *J. Med. Microbiol.*, **9**: 191—200, 1976.
- 6) Piemont, Y., Rosamananjara, E., et al.: Epidemiological investigation of exfoliative toxin-producing staphylococcus aureus strains in hospitalized patients. *J. Clin. Microbiol.*, **19**: 417—420, 1975.
- 7) 室野晃一: Staphylococcal scalded skin syndromeの原因となる黄色ブドウ球菌の表皮剥脱毒素(Exfoliative Toxin) 産生と生物学的性状についての研究: 毒素検出用ラテックス試薬の作製と臨床分離株への応用, *日小児会誌*, **91**: 48—57, 1987.
- 8) Curran, J.P., Al-Salihi, F.L.: Neonatal staphylococcal scalded skin syndrome: Massive outbreak due to an unusual phagetype. *Pediatrics*, **66**: 285—290, 1980.
- 9) Todd, J., Fishaut, M., et al.: Toxic-shock syndrome associated with phage group I staphylococci. *Lancet*, **2**: 1116—1118, 1978.
- 10) Schlievert, P.M., Shands, K.N., et al.: Identification and characterization of exotoxin from staphylococcus aureus associated with toxic-shock syndrome. *J. Infect. Dis.*, **143**: 509—516, 1981.
- 11) Bergdoll, M.S., Crass, B.A., et al.: A new staphylococcal enterotoxin F, associated with toxic-shock syndrome. *Lancet*, **1**: 1017—1021, 1981.
- 12) Bonventre, P.F., Weckback, L., et al.: Production of staphylococcal enterotoxin F and pyrogenic exotoxin C by staphylococcus aureus isolates from toxic shock syndrome-associated sources. *Infect. Immun.*, **40**: 1023—1029, 1983.
- 13) Igarashi, H., Fujisawa, H., et al.: Purification and characterization of staphylococcus aureus FRI 1169 and 587 toxic shock syndrome exotoxins. *Infect. Immun.*, **44**: 175—181, 1984.
- 14) 高橋 龍太郎・横山 俊之ほか: Toxic shock syndrome (毒素性ショック症候群) の1例——フェージ型および exotoxin についての検討, *日小児会誌*, **89**: 462—467, 1985.
- 15) Ryder, R.W., Wachsmuth, I.K., et al.: Infantile diarrhea produced by heat-stable enterotoxigenic Escherichia coli. *N. Engl. J. Med.*, **295**: 849—853, 1976.
- 16) Hond, T., Akhtar, Q., et al.: A simple assay to detect Escherichia coli producing heat labile enterotoxin: Results of a field study of the Biken test in Bangladesh. *Lancet*, **2**: 609—610, 1981.
- 17) Vadivelu, J., Lloyd, B.J., et al.: Membrane filter assay for detection of enterotoxigenic Escherichia coli in epidemiological studies. *Lancet*, **1**: 1007—1009, 1986.
- 18) Svennerholm, A., Wikstrom, M., et al.: Monoclonal antibodies against Escherichia coli heat-stable toxin (STa) and their use in diagnostic ST ganglioside GM1-enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, **24**: 585—590, 1986.
- 19) Welch, D.F., Marks, M., et al.: Is Clostridium difficile pathogenic in infants? *J. Pediatr.*, **100**: 393—395, 1982.
- 20) Kim, K., DuPont, H.L., et al.: Outbreaks of diarrhea associated with Clostridium difficile and its toxin in day-care centers: Evidence of person-to-person spread. *J. Pediatr.*, **102**: 376—382, 1983.
- 21) Sullivan, N.M., Wilkins, T.D.: Purification and characterization of toxin A and B of Clostridium difficile. *Infect. Immun.*, **35**: 1032—1040, 1982.
- 22) Rennie, R.P., Elliot, J.M., et al.: Criteria for detection of Clostridium difficile toxin production by counterimmunoelectrophoresis. *J. Clin. Microbiol.*, **20**: 923—926, 1984.
- 23) Laughon, B.E., Viscidi, R.P., et al.: Enzyme immunoassays for detection of Clostridium difficile toxin A and B in fecal specimens. *J. Infect. Dis.*, **149**: 781—788, 1984.
- 24) Shahrabadi, M.S., Bryan, L.E., et al.: Latex agglutination test for detection of Clostridium difficile toxin in stool samples. *J. Clin. Microbiol.*, **20**: 339—341, 1984.