

Title	腸炎ビブリオの抗原性に関する研究 : 可溶性抗原免疫血清の血清学的性状について
Author(s)	岡田, 正
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/28904
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名・(本籍)	岡田正 おかだ まさし
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 879 号
学位授与の日付	昭和 41 年 3 月 28 日
学位授与の要件	医学研究科病理系 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	腸炎ビブリオの抗原性に関する研究 —可溶性抗原免疫血清の血清学的性状について—
論文審査委員	(主査) 教授 藤野恒三郎 (副査) 教授 芝 茂 教授 天野 恒久

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

細菌の性格を明らかにするに当っては、その生理・生化学的面と同時に抗原性をつまびらかにする必要がある。腸炎ビブリオ *Vibrio parahaemolyticus* は食中毒の原因として重要な地位を占めているにもかかわらず抗原性については残された問題が多い。

腸炎ビブリオの血清学的分類に関しては、厚生省・腸炎ビブリオ性食中毒の検査要領に O 群別法と K 抗原の型別法の二方法が示されているが、昭和 37 年はじめて提示されて以来毎年変更があり、O 群別法に関しては群相互間の類属反応が強く出るため、現在では K 抗原の型別法のみが実際に応用されているに過ぎない。わたくしは O 群パイロット菌株を用いて可溶性抗原の部分的精製を試み、群特異性抗 O 血清の作製並びに腸炎ビブリオに広く共通する抗原物質の特異性と分布状態について研究を行った。

〔方法並びに成績〕

(1) 材 料

腸炎ビブリオ O 群パイロット菌株は坂崎(予研)より、他の腸炎ビブリオ 127 株は大城(兵庫県衛研)より分与をうけた。他種ビブリオとしては National Collection of Type Cultures より分与をうけた Gardner and Venkatraman II・III・V・VI 及び坂崎より分与をうけた Heiberg のビブリオ属菌 6 株を用いた。

(2) 可溶性抗原の抽出並びに部分的精製法

3%食塩・肉エキスイ寒天培地に 37°C 18 時間培養した腸炎ビブリオ O 群パイロット菌株を 4%食塩水に懸濁して菌浮遊液を作り、ガラス玉を混じて 18 時間振盪した後、遠沈上清の 80% 硫酸飽和沈

澱物をM/100磷酸 Buffer pH 7.0 に溶解・透析を行なった。更にこの溶液に冷アセトンを最終濃度60%になるよう添加して生じた沈澱物を Buffer に溶解・透析した後、DEAE-Cellulose Column Chromatography を行ない、0.35M 食塩 M/100 磷酸 Buffer により溶出される活性部分を集めて、更に80%硫酸飽和後沈澱物を Buffer に溶解・透析してこれを可溶性抗原とした。

(3) 可溶性抗原免疫血清の作り方

各O群パイロット菌株より抽出し、部分的に精製した可溶性抗原を免疫原として Freund の Incomplete adjuvant を用いて家兎を免疫し、O-1 に対してえた抗血清を抗O-1血清とし、以下O-2・O-3……についてえたものを抗O-2血清・抗O-3血清……とした。

(4) Gel 内沈降反応

Ouchterlony の方法を用いた。Gel 化物質として Difco Bact-Agar (寒天濃度0.7%) を0.15M 磷酸 Buffer pH 7.0 に溶かしたものをを用いた。

(5) 定量凝集反応

凝集原としては腸炎ビブリオ及び他種ビブリオの生菌及び100°C 1時間加熱死菌菌液を用いた。稀釈液は腸炎ビブリオでは3%食塩水、他種ビブリオでは0.5%食塩水を用いた。反応は50°Cの湯ぶねに一夜、その後氷室に8時間静置した後凝集鏡を用いて判定した。

(6) 成績

- 1 抗O-1血清とパイロット菌株O-1～O-10から抽出した抗原との間に Gel 内沈降反応を行ない、明確な一本の共通沈降線(A)を認めた。これはO-11・O-12及び他種ビブリオでは現われない。また抗O-1血清とO-1との間には共通沈降線(A)のほかにもう一本沈降線が現われるが、これはO-1群特異性を示しO-1以外のパイロット菌株及び他種ビブリオとの間には現われない。更に大城の腸炎ビブリオO-1群～O-10群について調べると、共通沈降線(A)は103株中79株(77%)に認められた。
- 2 抗O-1血清をO-2群パイロット菌株の生菌で吸収すると、この吸収血清は共通沈降線(A)を示さなくなりO-1群菌株の生菌との間に後述するH凝集も認められなくなるが、O-1群菌株の加熱死菌との間の特異的なO凝集価は変わらない。
- 3 抗O-1血清による生菌凝集反応では、O-1・O-2・O-4・O-5・O-6・O-9に対して、1,280～2,560倍のH凝集を示し、O-3・O-7・O-8・O-10に対して160～320倍のH凝集を示すが、O-11・O-12及び他種ビブリオはH凝集を示さない。
- 4 加熱死菌を用いた凝集反応ではO-1に対して2,560倍のO凝集を示したが、O-1以外のパイロット菌株及び他種ビブリオには全く凝集を示さない。また大城の腸炎ビブリオ127株について調べると、O-1群11株はいずれも640～1,280倍のO凝集を示すが、O-1群以外の116株は全く凝集を示さない。
- 5 O-1と全く同じ方法によってえたO-2～O-5の可溶性抗原免疫血清について加熱死菌凝集反応を行なった結果、抗O-2～O-5血清のO群特異性は上記した抗O-1血清のO-1群特異性にみられたと同じく群特異性を示す成績がえられた。

[総括]

- 1 腸炎ビブリオO群パイロット菌株より可溶性抗原を抽出し、部分的に精製した。
- 2 この免疫血清はO群加熱死菌と特異的に反応し、O凝集を示す。
- 3 腸炎ビブリオにはO抗原とは別に広く共通する抗原が存在し、且つH凝集を示すことから、それはH抗原と考える。これは可溶性抗原作製上の指標となる。
- 4 以上の事からO群別用の免疫血清を作製できたと考える。

論文の審査結果の要旨

厚生省統計によれば、39年度食中毒事件のうち、原因の判明したものの約50%は腸炎ビブリオによると決定されている。このように腸炎ビブリオは現在わが国の食中毒の原因菌としてサルモネラを凌ぎ、最も重要な地位を占めており、全国的な研究、調査の結果、この菌の性格がだんだん明らかにされてきたが、抗原性に関しては、まだまだ残された問題が多い。

現在、腸炎ビブリオは10種のO群と32種類のK抗原型に分類されているが、O群別法に関しては群相互間の類属反応が強く出るため、現在ではK抗原の型別法のみが実際に応用されているに過ぎない。実際の食中毒において分離される菌には、既知のK抗原に該当しない未知のK抗原をもつものが続出しており、型別不能の場合も少なくない。従って特異性の高いO血清の作製が緊急かつ重大な問題となっている。

本論文では、腸炎ビブリオのO群パイロット菌株を用いて可溶性抗原の部分的精製法を創案し、これを用いて家兎を免疫するとO群特異性の高い血清が比較的容易に作製しうることを立証している。即ち、腸炎ビブリオを4%食塩水に懸濁して振盪した後、上清について80%硫酸飽和、60%アセトン添加、DEAE cellulose column chromatography, 80%硫酸飽和と化学処理を行なって、えたものをA物質と呼び、これと抗A血清との間でゲル内沈降反応上3本の沈降線が生じるが、それぞれO・K・H抗原によるものであることを証明した。かくして、A物質により、O抗体が産生されることに着目して、O-1からO-10までの各群の抗A血清を作製した結果、O-1からO-5までの5群の抗A血清は極めてO群特異性が高く、又O-6からO-10までの5群の抗A血清では凝集価は高いが、類属反応が出るため、適当な吸収法を応用してO群因子血清を作ることに成功している。

型別不能であった腸炎ビブリオ又は新しく、分離される菌の正しい分類と同定は、この新しい群特異性免疫血清を利用することによって、確実かつ容易となり、腸炎ビブリオの研究に貢献するものと認める。