OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	毒素原性大腸菌の産生する耐熱性エンテロトキシンの精製と性状
Author(s)	竹田, 多恵
Citation	大阪大学, 1979, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32486
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【25】

氏名・(本籍)	竹田多恵
学位の種類	医学博士
学位記番号	第4740号
学位授与の日付	昭和54年10月27日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	毒素原性大腸菌の産生する耐熱性エンテロトキシンの精製と性状
論文審査委員	(主査) 教授 三輪谷俊夫 (副査) 教授 天野恒久 教授 川俣順一

論文内容の要旨

〔目的〕

1971年にGorbachらによって初めてヒトの毒素原性大腸菌感染症が報告された。本菌による感染は，コレラと臨床的には鑑別困難な激しい下痢と脱水症状を主症状とする。東南アジアなどの発展途上国においては，下痢性疾患の原因菌としての本菌の重要性が明らかにされている。わが国においても，流行・汚染地区から帰国する旅行者の中から本菌が多数分離されている。本菌は易熱性(LT)と耐熱性(ST)の二種類のエンテロトキシンを産生するが，そのうちLTについては，その物理化学的，免疫学的性状や作用機作についての研究が進展している。一方，STは最近，Alderete and Robertsonがブタ由来毒素原性大腸菌からSTの分離精製を報告したが，その純度にはまだ疑問が残っていて，その性状は明確でない。本研究では，ヒト由来の毒素原性大腸菌からSTを高純度に精製し，その性状を解析することを目的とした。

〔方法ならびに成績〕

患者由来ST産生株Escherichia coli 53402 A−1をCAYE培地(2%casamino acid, 0.6%yeast extract, 0.25%NaCl, 0.871%K_2HPO_4およびMg^{2+}, Mn^{2+}, Fe^{3+}を含む微量塩溶液)で24時間振とう培養した培養上清を出発材料とした。STの活性測定は，生後2−3日の乳のみマウスを用いた。胃チューブを用いてサンプルを胃内投与し，3時間後の腸管内液体貯溜量を，(腸管重量)/(残りの体重)比(FA ratio)で表わした。FA ratioが，0.09以上を示すのを陽性とみなした。精製の途上，濃縮には真空ロータリーエバポレーターを用い，透析には分子量1,000以下をcut offする特殊透析膜を使用した。精製過程を以下順を追って述べる。(1)培養上清に0.5mg/mlの硫酸プロタミンを添加して，まず除核

酸を行った。ＳＴは可溶画分に100％回収された。(2)Amicon PM-10 membraneで限外沪過を行った。ＳＴは沪液中に97％回収された。(3)DEAE－セルロースを用いたイオン交換カラムクロマトグラフィーを行った。STは0.2－0.3Mの食塩濃度で溶出された。(4)ハイドロキシルアパタイトカラムクロマトグラフィーを行うと，ＳＴは未吸着画分に回収された。(5)Bio-Gel P－10によるゲル沪過を行った。(6)ゲル沪過で得られた画分をエタノール分画すると，90％エタノール濃度ででもなおＳＴは可溶画分に回収された。ＳＴが脂溶性物質であることが示唆された。この時点でポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動により純度の分析を行うと，pH9.5，７％ゲル濃度の泳動条件では，ST活性に一致してStains-allで青色に染まる核酸様物質が検出された。coomassie brilliant blueで染色されるバンドは何ら検出されなかった。しかし，電気泳動条件を種々検討すると，この核酸様物質とＳＴとは分離可能であることがわかった。pH8.0，14％ゲル濃度の泳動条件が最も分離効果の良いことがわかった。なおSTはcoomassie brilliant blueでもstains-allでも染色できなかった。(7)(6)で得られた標品をpH8.0，14％ゲル濃度の条件で調製用ポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動を行い，核酸様物質を分離除去した。

以上の精製により，最終標品は精製率約316倍，回収率約12％となった。最終標品の最少有効量は2.5ngであった。セファデックスG－100による分子量測定の結果，STの分子量は約4,000であった。Ampholineによる等電点測定の結果，STのpIは3.9であった。紫外部の最大吸光波長は約275nmであった。Lowryらの方法でSTが発色すること等からもSTは低分子のペプタイドであることが示唆された。なおSTは100℃，10分の加熱では失活せず，100℃，２時間でも10％の活性が保存されていた。pH変動にも比較的安定で，pH１，pH12でなおそれぞれ50％，25％の活性が保存されていた。

〔総　括〕

(1)硫酸プロタミン処理，Amicon PM－10による限外沪過，DEAE－セルロースカラムクロマトグラフィー，ハイドロキシルアパタイトカラムクロマトグラフィー，Bio-Gel P-10ゲル沪過，90％エタノール分画，調製用ポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動によって順次ＳＴを精製した結果，最終で精製率が約316倍，回収率が約12％であった。(2)精製STの最少有効量は2.5ngであった。(3)分子量は約4,000であった。(4)等電点はpH3.9であった。(5)紫外部最大吸光波長は275nmであった。(6)100℃，10分の加熱に対して安定で，pH変動にも比較的安定であった。

論文の審査結果の要旨

毒素原性大腸菌の産生するエンテロトキシンのうち解析の困難であった低分子の耐熱性ＳＴが本研究で高純度に精製されその性状が明らかになった。分子量は約4,000，等電点約pH3.9，最大吸収波長275nm，総窒素量約8.3％を含む低分子ペプタイトである可能性が示唆された。現在までＳＴの検定法としては乳のみマウスの系しか認められていないが，本研究により，物質レベルで検定できる道を開いた。