Osaka University Knowledge Archive

Title	大腸菌KI抗原の性状について
Author(s)	北島, 博之
Citation	大阪大学, 1981, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32703
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

【10】

氏名・(本籍)	北島博之
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 5206 号
学位授与の日付	昭和56年3月25日
学位授与の要件	医学研究科 病理系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**大腸菌K1抗原の性状について**
論文審査委員	(主査) 教授 天野 恒久 (副査) 教授 深井孝之助 教授 三輪谷俊夫

論文内容の要旨

〔目 的〕

近年，新生児学の発展と共に，新生児期における重篤な感染症としての髄膜炎が大きな問題となってきている。その原因菌は，大腸菌K1株とB群溶連菌が主体であって，新生児期にしか罹患せず，死亡するか，重い後遺症を残す。一方，1957年Barry等が大腸菌K235L^+OC^+(O1：K1：HNM)の培養沪液からN-アセチルノイラミン酸のホモポリマーであるコロミン酸を分離して以来，このシアル酸含有分子とK1抗原との関連性が追求されてきたが現在なお不明である。そのためK1抗原の精製とその性状解明を目的とした。

〔方法ならびに成績〕

1．K1抗原の精製：大腸菌K235株を用いて，120ℓのトリプチケースソイブイヨン，及び80ℓの合成培地の対数増殖終末期の培養上清を出発材料とした。培養時のpH低下による抗原の変性を防ぐため，リン酸緩衝液をかなり高濃度に加えた。上清は除菌沪過した後，ダイセルDUY-40メンブランにより約160倍に濃縮し，セバーグ法による除蛋白，セファローズ2Bによるゲル沪過，DEAEセルロースによるイオン交換クロマト，ハイドロキシルアパタイトによる吸着クロマトした後，再びセバーグ法による除蛋白セファロース2B及び4Bによるゲル沪過を行なって活性の強い分画を分離精製した。カラム操作は全て4℃で行い，その間pHは6.8～7.4の間に保つようにした。

2．活性測定法：Ewing等の方法に従い使用菌株の生菌，及び2時間煮沸菌を用いて，家兎免疫抗血清を作製した。抗原精製途上において，正常家兎血清により，抗原自身が一部分解されることがわかり，その原因物質を除くためと，低い抗体価の抗血清しかできないので抗体を濃縮する意味もか

ねて，抗体を硫安分画，セファデックスG-200のゲル沪過にて精製することにより，殆んどの抗K1抗体を含むIgM分画を以後のK1活性測定に使用した。K1活性の測定は，抗原による直接生菌凝集反応阻止をもって調べた。

3．抗原解析：K1活性を有する分画は，大きさや成分に少々分布の広がりをもつので，大きさは，やや小さいが，成分的に最も均一だと思われる分画を分子量測定した。超遠心法によると$S_{20.w.}$＝10.5s，沈降平衡法によると（分比容0.62）約43万となる。シアル酸が約95％，蛋白質がアミノ酸分析からすると約5％，その他に微量のアミノ糖としてグルコサミンとガラクトサミンを含み，中性糖は殆んどない。又，微量のリン酸が検出される。サーモライシン，プロナーゼ，トリプシン，キモトリプシンなどのプロテアーゼ処理や，8M尿素，6Mグアニジン塩酸を用いたゲル沪過でも，K1活性は保持されているが蛋白質は完全には除去出来なかった。

定量沈降反応を行うと，抗体がIgM分画にあたるためであろうが抗原過剰域においても沈降量の著しい減少はみられない。K1抗原は至適域において，約95％のK1凝集素を沈降せしめることがわった。酸性処理（pH 1.5，20℃，3時間）の蛋白質を含むフラグメント(A-ps)も，K1抗原と同じシアル酸量を含む抗原量で，ほぼ同じく凝集素を沈降させうる。又，K1抗原精製途上において，K1抗原よりは小さく，蛋白質を含まないシアル酸含有分画（これは殆んどがシアル酸で，微量のアミノ糖とリン酸を含む）が分離される(K1-2)が，これは$S_{20.w.}$＝3.5sで沈降平衡法によると分子量が約5.3万である。これとよく似た，分子サイズのものがアルカリ処理（pH 12.3，4℃，48時間），アルカリヒドロキシアミン処理（pH 10.0，室温，2時間），DNaseの挾雑酵素処理により生ずるが，これらの分画も定量沈降反応を行うと，約88％の凝集素を沈降せしめるが，直接凝集阻止法によるK1活性は1/50～1/100まで低下している。

K1抗原を4℃蒸留水に反復透析すると内液はpH 4.0位になるが，これをゲル沪過すると蛋白とシアル酸を含む分画(D-ps)と，シアル酸ポリマーのみを含む分画（コロミン酸よりは少し大きい分画）(D-s)とが得られる。D-psは定量沈降でシアル酸量に対しては，K1と同じ位の抗体をおとすが，K1凝集素は7/8位沈降させる。直接凝集阻止は1/500に減少している。

一方，D-s分画もK1と反応する抗体の1/3位しか沈降させないし，K1凝集素は殆んど沈降させない。直接凝集阻止能は全然ない。尚，この分画は，ゲル沪過パターンは均一である。これが変性により生ずる時，K1活性の大部分は消失する。又，酸処理後シアル酸のみよりなる分画はこのD-sよりは少し大きい。

4．免疫原性：家兎に対して弱いながら免疫原性をもつのは，現在のところK1抗原と酸性処理による蛋白を含むシアル酸含有分画の二つが明らかにされている。

5．シアル酸リン酸の存在：蛋白質を含まないシアル酸含有分画を0.05N, HCl酸性下で80℃，30分，加水分解し，シアン酸モノマーの画分をDowex-1のカラムで分画すると，リン酸の結合しているシアル酸が同定された。

〔総　括〕

1．K1抗原を中性域で精製した。

2．K1 抗原は多量のシアル酸を含有する糖タンパク質である。

3．免疫原性及び菌体直接凝集阻止能には蛋白質との結合が必要であろうと推定される。

論文の審査結果の要旨

新生児髄膜炎の病原体である大腸菌 K1 型菌の K1 抗原の高分子量のものは従来の研究において分離されていなかったし，その抗原の assay 法にも問題点があった。

著者は初めてK1 型生菌のK1 抗体による凝集反応を抑制しうる分子量約50万の Glycoprotein を精製することに成功し，それがK1 抗体産生能のあること，種々の方法による分解産物の抗体結合能を通じて，K1 凝集原活性の大部分はポリシアル酸連鎖〔(2α→8)，分子量 2.7 万〕間の特殊な結合とポリシアル酸連鎖と蛋白との間の結合にあることを明らかにした。

本研究はK1 型大腸菌による髄膜炎の病理機転の研究とワクチン製造とへの端緒となるものである。