



Title	NAGビブリオが産生するコレラ毒素様エンテロトキシンの精製と性状
Author(s)	山本, 耕一郎
Citation	大阪大学, 1982, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/33274
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	山本 耕一郎
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 5621 号
学位授与の日付	昭和 57 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	NAG ビブリオが産生するコレラ毒素様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 松田 守弘 教授 岡田 善雄

論文内容の要旨

〔目的〕

コレラ菌以外の *Vibrio cholerae* である NAG (ナグ) ビブリオが、腸管感染症の原因菌として頻繁に分離されることから、この菌のもつ病原性が近年世界的に問題となっている。さらに、コレラにおける下痢発現因子であるコレラ毒素と類似の生物活性を示し、かつこのコレラ毒素と共に抗原性をもつエンテロトキシン (腸管毒素) を NAG ビブリオが産生していることが報告されている。しかし、NAG ビブリオの産生するエンテロトキシン (以下、NAG 毒素と略) の性状が、コレラ毒素の性状と全く同じであるかどうかは、NAG 毒素がいまだ精製されていないために未解決のままであった。

今回の研究は、NAG 毒素を高度に精製し、その性状コレラ毒素の性状と比較することを目的とした。

〔方法ならびに結果〕

リンコマイシンがコレラ毒素及び毒素原性大腸菌の易熱性エンテロトキシン産生能を高めることが報告されているが、NAG 毒素の産生能も増強することも確認した。300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ リンコマイシン添加カザミノ酸-酵母エキス-K₂HPO₄-グルコース培地を用いて、アメリカ合衆国ルイジアナ州の湖水から分離された NAG ビブリオ E 8498 株を 48 時間静置培養し、その遠心上清を出発材料とした。上清の pH を 5.0 に低下させ、0.1% の水酸化アルミニウム粉末を加え、一晩よく攪拌し、毒素を水酸化アルミニウムに吸着させた。これを遠心沈殿により上清を除去し 0.2 M NaCl 添加 50 mM Tris-塩酸緩衝液 pH 8.5 で毒素を抽出した。抽出液を 50% 飽和硫酸アムモニウム法によって濃縮したのち、抗コレラ毒素抗体を用いた受身血球溶血反応 (PIH) でコレラ毒素と共に抗原物質を追跡しながら、Sephadex

G-100, Bio-Gel A-5m, Sephadex G-75の各カラムでのゲルろ過によって精製標品を得た。精製NAG毒素はディスク電気泳動で単一のバンドとして泳動し、その泳動距離は、標準に用いた精製コレラ毒素の泳動距離と一致した。

コレラ毒素が示す生物活性、すなわち(1)チャイニーズハムスター-オバリー(CHO)細胞の形態変化(2)マウス結紮腸管における液体貯留(3)ウサギ皮膚毛細血管透過性亢進(PF)の各活性のいずれをもNAG毒素は示し、それらのタンパク重量当りの比活性はコレラ毒素の比活性とほとんど同じであった。また抗コレラ毒素が精製NAG毒素及びコレラ毒素及びコレラ毒素のPF活性を同程度に中和し、PIHでもきわめて近似した反応曲線を示すところから、抗原的にも両毒素はきわめて近い物質であることが考えられた。次に、精製NAG毒素とコレラ毒素それぞれに対する抗血清を作製し、両毒素の免疫学的特異性を寒天ゲル内沈降反応を用いて調べた。どちらの抗血清を用いても、コレラ毒素とNAG毒素は共通の一本の沈降線でfuseし、spurは見られなかった。

両毒素の分子構成をSDS-ディスク電気泳動を用いて調べた結果NAG毒素はコレラ毒素のsubunit A及びBと同じ位置にバンドを示した。またDTT還元後泳動するとsubunit Aにあたるバンドはコレラ毒素のA₁, A₂タンパクの位置に分かれた。これらの結果から、両毒素が同じ分子量のsubunitで構成されていることがわかった。

環境由来株のみでなく患者由来のNAGビブリオのエンテロトキシンについても検討を加えた。68株中、特にエンテロトキシン活性の強かった3株について調べた。その一株S7株の毒素を同様の方法で精製し、SDS-ディスク電気泳動を行ったところ、E8498株のNAG毒素と同じようにコレラ毒素と同じ分子量のsubunitから構成されていることが確認できた。

コレラ毒素と上記二種の精製NAG毒素、及び別の患者由来NAGビブリオ2株の精毒素標品を用いて寒天ゲル内沈降反応を行った。これらの標品は抗コレラ毒素血清、抗E8498株NAG毒素血清いずれを用いた場合にも、単一の沈降線がすべてfuseし、spurは見られなかった。これらの結果から患者由来株の中にもコレラ毒素と同一の毒素を產生している菌株があることがわかった。

[総括]

1. NAGビブリオからコレラ毒素様エンテロトキシンを精製した。
2. この精製NAG毒素は生物学的性状、免疫学的特異性、及び分子構成ともコレラ毒素と区別できなかった。
3. 環境由来、患者由来いずれも、調べた4株のNAGビブリオが产生するNAG毒素はコレラ毒素と免疫学的に同一のものであった。
4. 以上の成績から、少くとも精査した4株のNAGビブリオの产生するコレラ株毒素はコレラ毒素と同一のものであると結論した。

論文の審査結果の要旨

NAG ビブリオの產生するエンテロトキシンの物理化学的、生物学的性質を、コレラ毒素との比較の上で明らかにすることは NAG ビブリオ下痢症の解明に不可欠と考えられてきた。

著者はこのエンテロトキシンを初めて精製し、その生物活性、免疫学的特性、及びその分子構成ともコレラ菌の出す毒素と同一のものであることを見いだした。

以上の結果は NAG ビブリオ研究において画期的なものであり NAG ビブリオの疫学、診断、予防等に貢献するところすくなくないものと認める。