



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

主論文

NAGビブリオが產生するコレラ毒素様
エンテロトキシンの精製と性状

Purification and some properties of Vibrio cholerae
non-O1 enterotoxin that is identical to cholera
enterotoxin

大阪大學微生物病研究所細菌血清部門
(指導 三輪谷俊夫教授)

山本耕一郎

Koichiro Yamamoto

コレラの病原菌であるコレラ菌 *cholera vibrios* の学名は *Vibrio cholerae*, biotype *cholerae*, and *eltor*? serotype O1 に相当する。生物学的・生化学的諸性状がコレラ菌と一致してい子にもかかわらず、O1群以外の血清群であるため、O1群の診断用血清に凝集しないものを一括して NAG⁺ ブリオ (non-agglutinable vibrios) と呼んでいる。

コレラの下痢発現の機構は、小腸内でコレラ菌が産生するコレラエンテロトキシン（以下コレラ毒素と略）が小腸粘膜上皮細胞のアデニル酸シクラーゼ (adenylate cyclase) を活性化し、細胞内サイクリックAMP⁺ 上昇をすることにより上皮細胞膜の電解質と水の透過性に変化がおきるためであると考えられている [15, 31]。このようなコレラ毒素の生物活性、生化学的特性などは、本毒素が精製されて以来 [16, 27, 32, 37] 詳細に研究されて [15, 31]。

一方 NAG⁺ ブリオは多くの下病症例から分離され、現在では下痢原因菌として広く認められている。NAG⁺ ブリオに対する下痢

症は、コレラに比較して一般に軽度であるといわれているが、中にはコレラと区別し難い臨床症状を呈するものもあり、NAGビグリオもコレラ毒素群のエンテロトキシンを產生する可能性が古くから示唆されて來る[1, 2, 17, 21, 26, 34]。1971年ZinnakarとCarpenter[43, 44]及びOhashiら[29]はそれぞれ NAGビグリオのある菌株はコレラ毒素群の生物活性物質を產生し、かつ抗コレラ毒素血清加ニの活性を部分的に中和することを見出した。またCraigらは[9]環境から分離された NAGビグリオがコレラ毒素と近似して生物活性物質を產生し、これが免疫学的に共通性のあるエンテロトキシンであることをOuchterlony寒天ゲル内沈降反応にて証明した。

また NAGビグリオのエンテロトキシン（以下 NAG毒素と略）の產生がタンパク合成阻害剤であるリンコマイシンによつて著明に増強され、コレラ菌による毒素產生時に見られる現象と一致することが明らかになつた[42]。

しかしながら、NAG毒素の性状がコレラ毒素の種々の性状と同じであるかどうかは、いくつかの試み^[5, 44]にもかかわらず“NAG毒素が高度に精製されて”^{“II” “II”}“ために未だ解明されて”^{“II”}なかつた。

今回の実験ではNAG毒素を高度に精製し、その特性を研究した。その結果、NAG毒素がコレラ毒素と同等の生物学的活性をもち、かつコレラ毒素と同じ免疫学的特性をもっている^{“II”}ばかりでなく、同じサブユニット構造を持つて^{“II”}この毒素であることを明らかにすることができた。

[材料と方法]

菌株：環境由来 V.₁₉cholerae₁₉ E8498 株（スミス型 O344, [35]）は米国ルイジアナ州の淡水中より分離され、CDC の P. Brake 博士より分与をうけた[3, 9]。S7 株 62058 株、WBDSV-101E 株はそれぞれスターク、バングラディッシュ、タイ国において分離された患者由来株で、おの

おの防衛医大神中寛博士、M.I. Hug博士、P. Echeverria博士より今手をうけた。これらのがNAGゼンリオの毒素産生はリンコマイシン(LM)によって増強されることがわかっている^[42]。300 µg/ml リンコマイシン(リンコシン、日本アップジョン製)添加寒天平板上で分離したLM耐性変異株を毒素産生株として用いた。

培養：既報[9]に従って行つた。すなはち一晩37°Cで培養して菌液1.5mlをLM添加CYG培地(カザミ1酸3%，酵母エキス0.3%，K₂HPO₄0.05%，ブドウ糖0.2%，LM 300µg/ml)150ml入りの1リットルRouxゼン内に植菌し、30°C 48時間静止培養を行つた。培養後、培養液に0.02%のNaN₃を添加し、25,000×g, 30分遠心後上清を集め、Na₂-EDTAを0.05%の割合で加え、4°Cで保存した。

皮毛細血管透過性亢進試験(PH試験)

PH試験はCraigの方法[6, 7, 9]に従つた。陰毛紙を毒素液料0.1mlを前に、2剃毛してウサギ背部小鼠頭部に皮内注射した。24時

(1kg)

皮後 5% Evans Blue を体重より 1 ml の割合にて
耳静脈内注射し、1 時間後に毒素検体注射部位に現われる青色斑の直径を測定した。毒素の力価は 4 mm の青色斑を形成する毒素量を 1 Bleeding Dose (BD₄) とした。また階級希釈して被検毒素サンプル 12 1 コレラ抗毒素単位 (AU)/ml [8] の抗毒素を同量加え、同じようにようして皮内注射をし、毒素加抗毒素によると中和されず中和点 (4 mm, 青色斑を形成する毒素濃度) を 1 Limiting Dose (LD) としてコレラ毒素の抗原量を求めた。

受身免疫溶血反応 (PIH)

Tsukamoto らの方法 [40] を従い、コレラ毒素抗原を測定した。0.1 ml の被検毒素サンプルに同量の 2% 羊血球液を加え、37°C で 30 分間反応させた後、アフィニティカラム [2] に精製して抗コレラ毒素抗体液 [20] 0.1 ml を加え 30 分後から 0.1 ml のモルモット補体液と加え、37°C で反応させた。60 分後 1.6 ml の生理食塩水を加え 3,000 rpm 5 分間遠心し、溶血の

度合を上清の420nmでの吸光で測定して.

チャイニーズハムスター・オバリー (CHO)

細胞の形態変化試験

毒素の CHO 細胞形態変化 (円形から三方鐘型に変形) 活性は Honda の方法 [18] にしたがって測定して.

結紮腸管 (ループ) テスト

マウスを用い既報 [39] に従って行った.

0.2 ml の 毒素標品を腹腔してマウス 小腸ループ内に投与し、6 時間後にこのループをとり出し、ループ内に貯留して液の重量 (W mg) とループの長さ (L cm) の比 (W/L) にすり。ループ内の液体貯留の程度を表わして.

ポリアクリルアミド-デンスクーム電気泳動法 (PAGE)

Conventional PAGE は 7% ゲルを用い Davis の方法 [12] に従つた。 SDS-PAGE は Fairbanks らの方法 [14] に従り 7% ゲルを用いドテニル硫酸ナトリウム (SDS) 0.1% を柱下で泳動を行つた。還元処理には 0.1M Dithiothreitol (DTT)

を用い、すへて 100°C 3分の加熱処理後泳動し、
アーマジーブリリアントレーランバグ痕
バンドを染色して。

寒天ゲル内沈降反応

Ouchterlony の方法 [30] により 1% Noble
Agar-PBS にておこなつた。

タンパク痕定量

Lowry 法 [25] により 牛血清アルブミンを
標準タンパク痕として定量して。

標準コレラエンテロトキシン

Ohtomo らの方法 [27] により コレラ菌 569B 株
から精製された市販コレラ毒素(発売元・三光
純薬)を用いた。サブユニット A と B の分離
は Ohtomo らの方法 [28] に従つた。

抗血清

1 回 $15\mu\text{g}$ の毒素標品を 3 週間おきに 4 回筋
肉内に注射し、ウサギを免疫して。但し初回注
射は毒素液と Freund Complete Adjuvant (Difco 製)
を 1:1 の割合で混合乳剤にしてものをと、他の
3 回は Freund Incomplete Adjuvant で混合乳剤に

レウチの免疫原として用いた。最終注射後7日目に採血し、血清を分離し、抗毒素血清として用いた。

カラムクロマトグラフィー

4ml 濾過は4°C のTEAN buffer (50mM Tris-HCl, pH 7.8, 3mM NaNO₃, 1mM EDTA, 0.2M NaCl) で平衡化し Sephadex G-100 (Pharmacia 製), Bio-Gel A-5m (Bio-Rad 製), Sephadex G-75 superfine (Pharmacia 製) 9 4ml カラムを用ひ方々をなす。Sephadex G-100 では15ml ずつ他は5mlずつを分画し, 280nmの吸光度(A₂₈₀)を測定するとともに, 各画分を50-500倍希釈してその12.5%PIHによる毒素抗原を測定した。毒素画分は Amicon PM10 (Amicon 製) によく限外濾過により濃縮した。

結果

水酸化アルミニウム [Al(OH)₃] 12 F3 部分精製

培養土清から毒素を精製する才 1 段階としてユレラ毒素精製用に用いられてる Al(OH)₃ 12 F3 吸着抽出液[38]を行った。培養上清(13.8L)の pH を 5.0 に塩酸で調整し、冰室(4°C)に 0.1% (w/v) の Al(OH)₃ 粉末を加え 6 時間かんやかん搅拌し、その後 18 時間放置した。毒素を吸着した Al(OH)₃ は 8,000 × g, 5 分、遠心で集めた。この段階で毒素活性 98% の Al(OH)₃ が吸着した。

Al(OH)₃ の沈殿を 10 mM フル酸アモニウム液に浮遊させ、スターラーで 20 分間搅拌後、遠心により土清を除去した。この操作を 5 回くり返し、十分に洗浄して Al(OH)₃ は約 50 mL の TEAN buffer pH 8.5 を加えてスターラーで搅拌しながら毒素を抽出し、遠心にて Al(OH)₃ を分離した。Al(OH)₃ の沈殿に対して、同じ抽出操作を合計 6 回繰り返し、毒素を十分に抽出した。集められた抽出液を濃縮するため 50% 飽和

圓形硫安を加え18時間放置し $25,000 \times g$, 20分の遠心で 分離し不沈濁物を少量の TEAN buffer で溶解し、部分精製標品とした。

Sephadex G-100カラム 12±3ゲル通過

部分精製毒素標品を Sephadex G-100カラム ($4 \times 144\text{ cm}$) 12±3ゲル通過を行った(図1)。毒素活性画分を集めPM10を γ 線滅菌した。

Bio-Gel A-5mカラム 12±3ゲル通過

Sephadex G-100カラムで得られたサンプルを Bio-Gel A-5mカラム ($2.3 \times 96\text{ cm}$) でゲル通過を行って三つのE-7が現われた(図2)。PIHはE-3活性はE-3のE-7と一致した。

Sephadex G-75 12±3ゲル通過

Bio-Gel A-5mで得られた活性画分を濃縮し、Sephadex G-75カラム ($2 \times 150\text{ cm}$) でゲル通過した。図3に示すように最初のE-7がPIHのE-7が得られており、最初のE-7が A_{280} のE-7と一致している。#1のPIHのE-7はPIF試験等において生物活性が見られており、遅れて現われるオヌのPIH E-7は

PI試験による生物活性は見られなかつた。このことからオストリコークはコレラ毒素と共に抗原性を有するが生物活性を保持しないコレラジ=ノイド [16] と性状を同じくする物質ではないかと考えられる。オストリコークと濃縮し再度同じカラムでゲル沈過を行ふと、 A_{280} の吸光と PIH のパターンが一致して得られる（図 4）。この活性画分を濃縮し、精製毒素として以下的研究に用ひた。精製全過程の收量と比活性の上昇を表 1 にまとめて。

オストリコーク電気泳動

精製毒素はオストリコーク電気泳動において单一のバンドを示す（図 5）、その移動度はコレラ毒素の移動度 ($R_f = 0.27$) に一致して、コレラ毒素と比較的巾広いバンドを示してお、NAG 毒素のバンドの方からコレラ毒素のバンドよりやせせて泳動させてお。

精製 NAG 毒素の生物学的免疫学的活性

精製 NAG 毒素がコレラ毒素の示す種々の生物活性と同度のものであるかどうかをうなが

これらの力(西コレラ毒素と比較して異なるかどうか)、CHO細胞試験、マウス結膜腸管法PF試験、PIHを用いて調べた。

精製NAG毒素はコレラ毒素と同じく、CHO細胞を形態変化させる活性を示して(図6)。50%のCHO細胞を形態変化させる毒素量はコレラ毒素では4.2 ng/ml NAG毒素の場合は1.3 ng/mlで両毒素はほぼ同等の活性を有している。

マウス・ループ試験により精製毒素がコレラ毒素や他のエンテロトキシンと同じように下痢原性を示すかどうかを調べた(図7)。精製毒素を投与して腸管ループは、投与6時間後腸管腔内に透明な滲出液の著しい貯留が認められ、コレラ毒素投与時と区別しない形状を示した。液体貯留量の最大値(W/L=約280 mg/cm)の50%に相当する液体貯留(W/L=140 mg/cm)を起す毒素量は約70 ngでありコレラ毒素の80 ngに近い値が得られた。

精製NAG毒素とコレラ毒素の比活性をPF

試験¹²まで比較して。図8に示すように反応曲線は全く一致し、それよりB_{D4}は、NAG毒素 10.6 pg, コレラ毒素 10.2 pgであります。NAG毒素 9.4×10^7 BD₄/mg と 10^7 , コレラ毒素 9.8×10^7 BD₄/mg と 10^7 の生物活性を有する事と認めます。またそれらのLb活性は 17.3 Lb/ μ g, 17.6 Lb/ μ g であります。両毒素の生物活性¹³ 抗原性はきわめて近似の力値を有すること確かめます。

PIH試験¹²でも両者毒は近似の反応曲線を示す(図9)。50%の血球を溶血させた活性は、NAG毒素が 6.6 ng, コレラ毒素が 9.5 ng であります。免疫学的活性についても非常に近い値を示して。

以上の結果を表しまとめて。以上の値をコレラ毒素の活性値とよく一致して。

Ouchtarlong 蛍光ゲル内沈降反応による NAG 毒素とコレラ毒素の異同

精製 NAG 毒素とコレラ毒素との免疫学的活性を蛍光ゲル内沈降反応によつて調べべて、

(図10). 抗コレラ毒血清(図10-A), 抗精製NAG毒血清(図10-B)に付してE8498株をリンコマイシン非存在下で培養して上清濃縮液、精製NAG毒、コレラ毒の三者は一本の沈降線でfusionしており、Spurは見られなかった。このことから、精製NAG毒は、培養上清中に存在するコレラ毒本様物質と同一のモノであり、免疫学的にコレラ毒と同一であることが確認された。

SDS-電気泳動によるサブユニット構造の解剖

精製NAG毒の分子構成を分析するためには、SDS存在下で電気泳動(SDS-PAGE)を行なう。コレラ毒と比較して(図11)。NAG毒は二本のバンドを示し、それぞれコレラ毒のサブユニットA及Bと同じ位置に泳動されて。DTT存在下で置えし泳動を行なうと、サブユニットAに相当するバンドはさらに2つのペルキトバンドに分かれ、それぞれはA₁及B₁ A₂のペルキトの泳動位置と一致し、その分子

サイズ"も一致したことと示すものである。

以上のことからNAG毒素はコレラ毒素と同一の分子構成、すなむちサブユニットAとBとの間は非共有結合で結合 [26, 9, 22] し、サブユニットAはさらに A_1, A_2 のペプチドからなり。 A_1, A_2 両者は SDS結合で結合している [23, 30] ものと考えられる。

患者から分離して NAGセグリオ菌株の產生

するエンテロトキシンとコレラ毒素の異同性

前項に述べた NAG毒素は環境から分離して NAGセグリオ菌株(E8498株)から精製し、エンテロトキシンの成績である。患者分離株(S7株)のエンテロトキシンにつけても精製を試みたところ、同じ方法で毒素を精製することはできなかった。SDS-PAGEで分析すると、S7毒素も E8498 株からの毒素と同様にコレラ毒素のサブユニット A 及び B と同レ^{サブユニット}で形成されておりることはわかつた(図12)。

Ouchterlony寒天ゲル内沈降反応によると、ても

(図13). この毒素は抗コレラ毒素血清(図13-A)抗E8498毒素血清(図13-B)を用いると、コレラ毒素E8498毒素とともに一本の沈降線を形成しLSpunは見られない。また別の患者由来株62058株、WBDV-10IE₁株と部分精製濃縮して標品もこれらの沈降線と完全にfuseする沈降線を形成して。これらの成績は、E8498株、S7株、62058株、WBDV-10IE₁株のNAGセグメントのエンテロトキシンかコレラ毒素と免疫学的に同一であることを示してい。

考察

NAGセグメントからコレラ毒素様のエンテロトキシンと高純度に精製することができます。精製NAG毒素の種々の生物活性値はコレラ毒素とそろめて近い値を示す(表2)。サブユニット構造もコレラ毒素とよく一致し(図11,12)かつQuichatavlong法でコレラ毒素と完全にfuseする一本の沈降線を形成して。これらの成績からNAGセグメントの產生する毒素はコレラ毒

素と同一のものであると結論した。

現在まで NAG ベーリオやコレラ毒素様のエンテロトキシンを產生するといふ報告はあるが [29, 43, 44] いままでのところ精製毒素についての実験報告されておらず、NAG 毒素かユレラ毒素と同一のものであるかどうかは解明されておらずかかる。NAG ベーリオは多くの生物活性物質、たとえば“抗コレラ毒素血清”で中和され、PH 因子 [29] 出血因子 [5, 9, 29] 耐熱性エンテロトキシン様物質 [5, 13] をとて產生することが報告されてる。これらの物質は、ユレラ毒素様エンテロトキシン活性を測定する場合に影響を及ぼす。

Zinnaka ら [44] は NAG ベーリオの培養上清による PH 反応は抗コレラ毒素抗体では十分に中和しきれないので、部分精製することによりコレラ毒素と同じ完全な中和曲線を画くことができたと報告している。今回の実験では NAG ベーリオの產生するユレラ様エンテロトキシンを高純度に精製しており、直接的に NAG

毒素がコレラ毒素と同一のエンテロトキシンであることを証明することである。

また環境由来のNAGビブリオ(E8498株)ばかりでなく下痢患者由来のNAGビブリオ株(57株)も、コレラ毒素と同一のサブユニット²構成され(図12)また同一の抗原性を有する(図13)ことが解明された。これらの結果、本研究に使用したNAGビブリオ菌株のみならず、多くのNAGビブリオがコレラ毒素と同じエンテロトキシンを產生していける可能性を示唆している。

一方、旅行者下痢症や小児下痢、また家畜の下痢症の原因菌と考えられてゐる毒素原性大腸菌の產生する易熱性エンテロトキシン(LT)はコレラ毒素と共通の生物活性、分子構成、酵素活性を有するが、その抗原性[4,33]アミノ酸配列[11,36]などはコレラ毒素と一部分のみ共通である。それはかりでなく、人患者由来の產生するヒトブタ由来株のLTとはその抗原性は部分的に明らかに違ひがある。

と報告されてる [19]。これら LT⁺ の観察結果は今回の NAG ベーブリオのエンテロトキシンが環境由来株も患者由来株も区別なくコレラ毒素と同一の毒素を產生するという事実と一致的である。

Zinnaka ~~と~~ Carpenter [43] や Ohashi ら [29] は 1972 年 12 NAG ベーブリオが アジア型 コレラ菌の產生するコレラ毒素と生物学的、免疫学的に類似のエンテロトキシンを產生すると初めて報告したが、本論文はこの推定を直接的に証明したものと見える。

また Kaper ら [22] も最近 NAG ベーブリオの染色体上にコレラ菌の毒素遺伝子と近似の遺伝子をもつて報告している。今回の実験結果は、Kaper らの報告 [22] と全く一致している。NAG ベーブリオもコレラ菌と同一のエンテロトキシンを產生するという今回の実験結果からみると NAG ベーブリオとコレラ菌 *cholera vibrios* から区別する必要はないと考えられる。

今回高純度に精製された E8498 株の NAG 毒素はコレラ毒素と同程度の生物活性を有しており、NAG ベーリオによる下痢の発現に関与しうる可能性は十分考えられます。E8498 株が環境由来株であることから毒素原性を持つ NAG ベーリオが環境中に多数生息しており、潜在的な病原菌として存在することを示唆しています。

一方すべての NAG ベーリオがコレラ毒素様の毒素で、たとえ患者分離株であっても產生していないわけでは無いことから多数報告されてます [9, 22, 29, 37]。Spiro と Daniel [37] は NAG ベーリオの 56% の株で実験動物に下痢を起こしてから、コレラ毒素様のエンテロトキシンを產生する株は 18% のみであり、と報告しています。これらのことは NAG ベーリオによる下痢発症において、コレラ毒素と同一のエンテロトキシンの事をうなづかせていますが、たとえば細胞毒性もしくは致死性因子 [3] 出血性因子 [5, 9] 耐熱性エンテロトキシン (ST) [5, 13] もしくは

抗コレラ毒素で中和される毛細血管透過性因子(PF) [9]や未知の下痢原因因子などとか関与していける可能性もありうることを示してい

る。

まとめ

NAGčeアリオの環境分離株(E8498)をリシコマイシン存在下で培養し大量のコレラ毒素様エンテロトキシンを産生させ、この毒素と水酸化アルミニウムに pH 5で吸着させ pH 8.5で抽出し、Sephadex G-100, BioGel A-5m, Sephadex G-75のカラム上にマトリクスフィルターにより高純度に精製した。精製毒素はチャニーズハムスター・オバリー (CHO) 細胞試験、マウス結膜腸管ループ試験、受身免疫溶血試験においてコレラ毒素と同程度の比活性を示して、またディスク電気泳動においてコレラ毒素と同一の移動度を示し、SDS-ディスク電気泳動でもコレラ毒素のサブユニット構造すなわちサブユニット A および B と同一分子

構造を示して。

抗コレラ毒素血清、抗精製NAG毒素血清を用ひて Ouchterlony寒天ゲル内沈降反応を行ふと、精製毒素はコレラ毒素と免疫学的に同一であることを示して。

患者から分離した数株のNAGセアブリオから得られたNAG毒素標品もコレラ毒素と免疫学的に完全にfuseし、コレラ毒素と同じ抗原性を有することがわかつて。

これらの結果からNAGセアブリオの菌株にはコレラ毒素と生物学的、免疫学的、分子構成上同一の毒素と產生するかあると結論して。

謝辞。

本研究に当り終始御指導下さいまして三輪谷俊夫教授、竹田美文助教授、本田武司博士に深く感謝いたします。また種々の御協力を乞ひて大阪大学微生物病研究所、細菌血清部、および菌種保存施設の方々に感謝いた

えします。特に毛細血管透過性亢進試験につけて御指導と御助言をいたいたる二二・三一九州立大学教授 J. P. Craig 博士に感謝します。

1. Aldova, E. et al., 1968. J. Infect. Dis. 118:25-31.
2. Bhattacharya, S. et al., 1971. Appl. Microbiol. 22:1159-1161.
3. Blake P. ^{et al}, 1980. New Eng. J. Med. 302:305-309.
4. Clements, J. D. and R. A. Finkelstein., 1979. Infect. Immun. 24:760-769.
5. Ciznar, I. et al. 1977. Zentralbl. Bakteriol. Hyg. I Abst. Orig. A 239:493-503.
6. Craig, J. P., 1965. Nature 207:614-616.
7. Craig ,J. P., 1971. In Microbial Toxins Vol. II A. pp.189-254, Academic Press, New York.
8. Craig, J. P., 1978. Develop. Biol. Standard. 41:415-422.
9. Craig, J. P. et al. 1981. Infect. Immun. 34: 90-97.
10. Cuatrecasas, P. et at. 1973. Biochemistry, 12:4253-4264.
11. Dallas, W. S. and S. Falkow, 1980. Nature 288:499-501.
12. Davis, B. J., 1964. Ann. N.Y. Acad. Sci., 121:404
13. Draskovicova, M. et al. 1977. Zentralbl. Bakteriol. Hyg., I. Abst. Orig. A 237:65-71.
14. Fairbanks, G., 1971. Biochemistry, 10:2606-2617.
15. Finkelstein, R. A. 1973. Crit. Rev. Microbiol. 2:553-623.
16. Finkelstein, R. A. and J. J. LoSpalluto, 1972. J. Infect. Dis. 121:Suppl., S63-S72.
17. Goodner et al., 1966. East Pakistan Med. J. 10:1-9.
18. Honda , T. et al. 1976. Infect. Immun. 14:1028-1033.
19. Honda, T. et al., 1981. Infect. Immun. 34:337-340.
20. Honda, T. et al., 1981. J. Clin. Microbiol., 13:1-5.
21. Hughes, J. M. et al. 1978. Ammals Int. Med. 88:602-606.
22. Kaper, J. B. et al., 1981. Infect. Immun. 32:661-667.
23. Lai, C. Y. et al., 1976. J. Infect. Dis. Suupl. 133:S23-S30.
24. Lonnroth, I. and J. Holmgren, 1973. J. Gen. Microbiol. 76: 417-427.
25. Lowry, O. H. et al. 1951. J. Biol. Chem. 193:265-275.

26. McIntyre, O.R. et al. 1966. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 14:412-418.
27. Ohtomo, N. et al., 1974. In Proceedings of the 9th Joint Conference of the US-Japan Cooperative Medical Science Program, Cholera Panel. Dept. of State Publ. 8762, p132-142.
28. Ohtomo, N. et al. 1976. J. Infect. Dis. 133:Suppl. S31-S40.
29. Ohashi, M. et al., 1972. Jap. J. Med. Sci. Biol. 25:179-194.
30. Ouchterlony, O. 1969. Acta. Pathol. Microbiol. Scand. 26: 507-515.
31. Richards, K. L. and S. D. Douglas, 1978. Microbiol. Rev., 42:592-613.
32. Richardson, S. H. et al., 1970. Infect. Immun. 1: 546-554.
33. Kunkel, S. L. and D. C. Robertson, 1979. Infect. Immun. 25: 586-596.
34. Singh, S. J. and S. C. Sanyal, 1978. Ann. Soc. Belg. Med. Trop., 58:133-140.
35. Smith, H. L. Jr. 1979. J. Clin. Microbiol. 10:85-90.
36. Spicer, E. K. et al. 1981. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 78: 50-54.
37. Spira, W.M. and R.R. Daniel, 1981. In Proceedings of the 14th Joint Conference on cholera, US-Japan Cooperat. Med. Sci. Program, Japan cholera Panel, Toho University, Tokyo.
38. Spyrides, G. J. and J. C. Feeley, 1970. J. Infect. Dis. 121: Suppl. S96-S99.
39. Takeda, Y. et al., 1979. Infect. Immun., 25:978-985.
40. Tsukamoto, T. et al., 1980. J. Clin. Microbiol., 12:768-771.
41. van Heyningen, S. 1976. J. Infect. Dis. Suppl. 133:S5-S13.
42. Yamamoto, K. et al., 1981. FEMS Microbiol. Letters, 12:245-248.
43. Zinnaka, Y. and C. C. J. Carpenter, 1972. Johns Hopkins Med. J. 131:403-411.
44. Zinnaka, Y. et al., 1973. Proceedings of the 8th Joint Conference on Cholera, US-Japan Cooprat. Med. Sci. Program, Japan cholera Panel, NIH, Tokyo , p116-123.

図1. Sephadex G-100 カラムゲル通過 12±3 N
AG毒素の溶出パターン

○—○ 280 nm 12±3 吸收.
●---● PIH 12±3 溶血活性 (420 nm 12±3 吸收)

図2. Bio-Gel A-5m カラム 12±3 N AG毒素
の溶出パターン

○—○ 280 nm 12±3 吸收.
●---● PIH 12±3 溶血活性 (420 nm 12±3 吸收)

図3. Sephadex G-75 カラムゲル通過 12±3
NAG毒素の溶出パターン

○—○ 280 nm 12±3 吸收.
●---● PIH 12±3 溶血活性 (420 nm
(12±3 吸收))

図4. Sephadex G-75 カラム 12±3 NAG毒
素の再ゲル通過

○—○ 280 nm 12±3 吸收.
●---● PIH 12±3 溶血活性 (420 nm
(12±3 吸收))

図5. NAG毒素のテヌスク・ゲル電気泳動像

A.コレラ毒素

B.精製NAG毒素

図6.チャイニース・ハムスター・オベリー(CHO)細胞試験におけるNAG毒素の反応曲線

○; コレラ毒素

●; 精製NAG毒素

投与量は CHO細胞培養液に加えた毒素の最終濃度 (ng/ml). 毒素投与後 18 時間目に希釈錐化して 113細胞の割合を測定.

図7.マウスを用いた結紮腸管(L-L⁺)試験

○; コレラ毒素

●; 精製NAG毒素

値は平均値 ($n=5$) + or - S.E.

図8. ウサギPF試験_{12±3} BD₄とLbの測定。

BD₄測定；コレラ毒素(○---○)精製NAG
毒素(●---●)のPF反応曲線。

Lb測定；1AU/mlの抗コレラ毒素を同量加
え反ときのコレラ毒素(△---△)
精製NAG毒素(▲---▲)のPF反
応曲線。

いずれの場合も毒素を0.1ml皮内注射後
24時間目に色素を静注し、1時間後に毒素
投与部に観察される青色斑の直径。
(8ヶ所の平均)。

図9. 受身免疫溶血反応(PIH)_{12±3} 反応曲線。

コレラ毒素(○---○)精製NAG毒素(●---●)

12±3 溶血度(420nmによる吸光)。

投与量は標品0.1ml中の毒素量(ng)

図10. 精製 NAG 毒素 コレラ 毒素の寒天ゲル内沈降反応

1. V. cholerae, E8498株培養上清 5,000倍濃縮液.
2. 精製 NAG 毒素.
3. コレラ 毒素
4. 抗コレラ 毒素
5. 抗精製 NAG 毒素血清.

図11. 精製 NAG 毒素の SDS-ペーパー電気泳動像.

- (1), (3) コレラ 毒素
- (2)(4) 精製 NAG 毒素
- (5)(6) コレラ 毒素サブユニット A
- (7)(8) コレラ 毒素サブユニット B.
- (2)(4)(6)(8) DTT 過元処理.

図12. 患者由来株S7株からの精製NAG毒素

9 SDS-デンスケ電気泳動像

(1)(3) コレラ毒素

(2)(4) 精製 NAG毒素 (S7)

(3)(4) DTT 還元処理

図13. 患者由来株S7株, WBDV-101E₁株,

62058株のNAG毒素による塞舌ル内降
降反応

(1) コレラ毒素

(2) 精製 E8498 株毒素

(3) 精製 S7 株毒素

(4) 部分精製 WBDV-101E₁ 株毒素

(5) 部分精製 62058 株毒素

(A) 抗コレラ毒素血清

(B) 抗精製 E8498毒素血清

Purification of NA₁ enterotoxin

Fraction	Total Volume (ml)	Total Protein activity (BD ₄)	Specific activity (BD ₄ /mcg)	Relative activity	Yield of PR activity
Crude toxin	26	385	5.6 x 10 ⁸	1.5 x 10 ⁶	1
Sephadex G-100 column eluate	9.3	42	1.2 x 10 ⁸	2.6 x 10 ⁶	1.7
Bic-Gel A-5m column eluate	2.0	4.2	1.0 x 10 ⁸	2.5 x 10 ⁷	1.8
1st Sephadex G-75 column eluate	1.0	3.0	9.9 x 10 ⁷	3.5 x 10 ⁷	2.3
2nd Sephadex G-75 column eluate	1.2	0.7	6.4 x 10 ⁷	9.4 x 10 ⁷	6.3

100
1

表 2

Biological and immunological activities of
cholera and NAG toxins

ASSAY	CHOLERA TOXIN	NAG TOXIN
CHO cell assay (50% elongation)	4.2	1.3 ng/ml
Mouse loop test (W/L=140 mg/cm)	80	70 ng
Rabbit skin (PF) test (BD ₄)	10.2 (9.8 × 10 ⁷)	10.6 pg 9.4 × 10 ⁷ BD ₄ /mg
P I H (50% hemolysis)	56.8 (17.6)	57.8 ng 17.3 Lb/ug)
	9.5	6.6 ng

图 1.

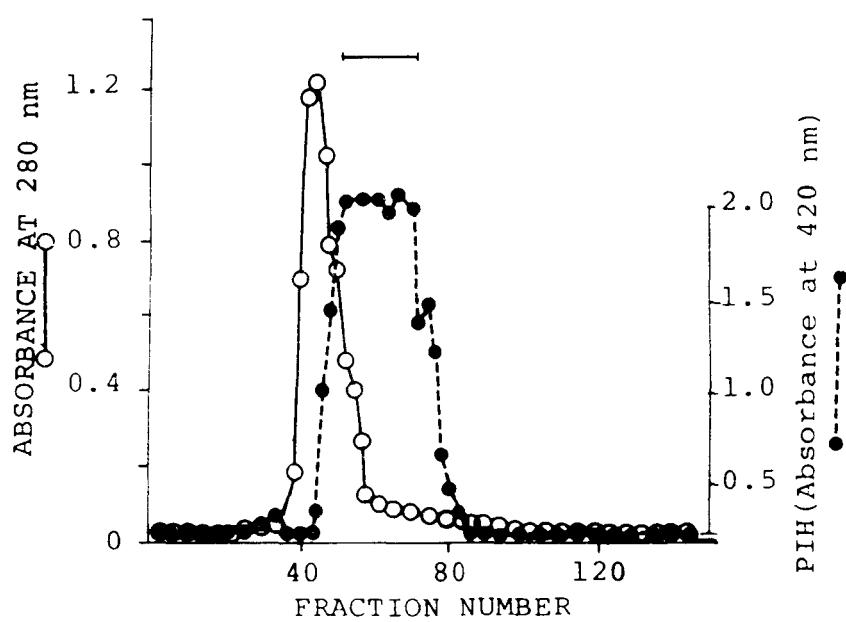
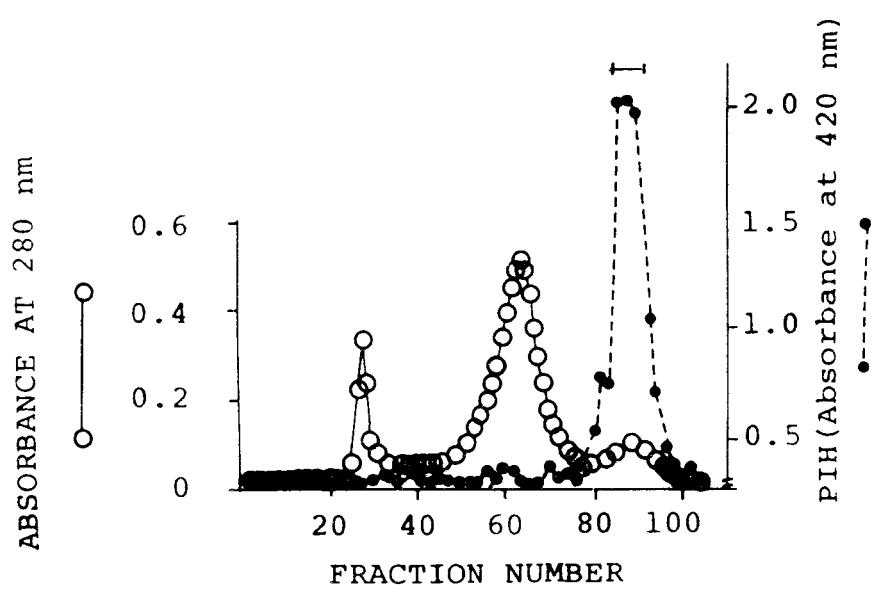


图2.



3.

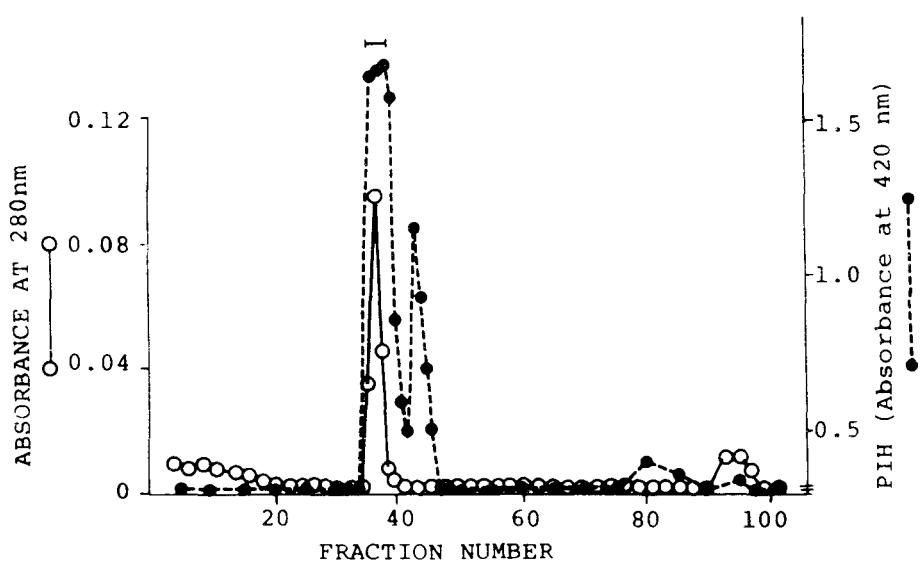


图4.

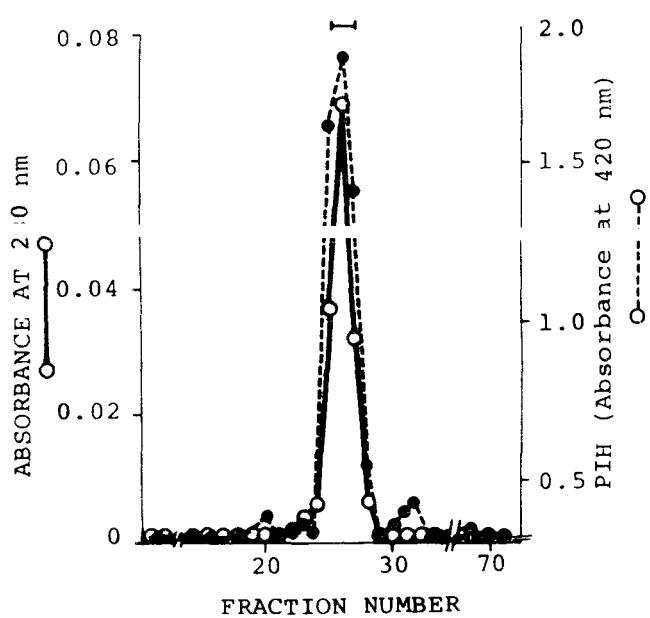


図5.

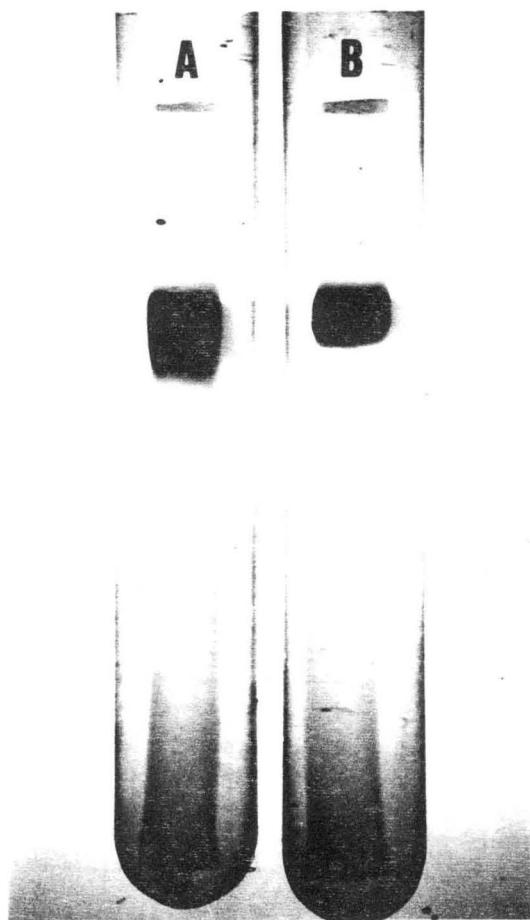


図6.

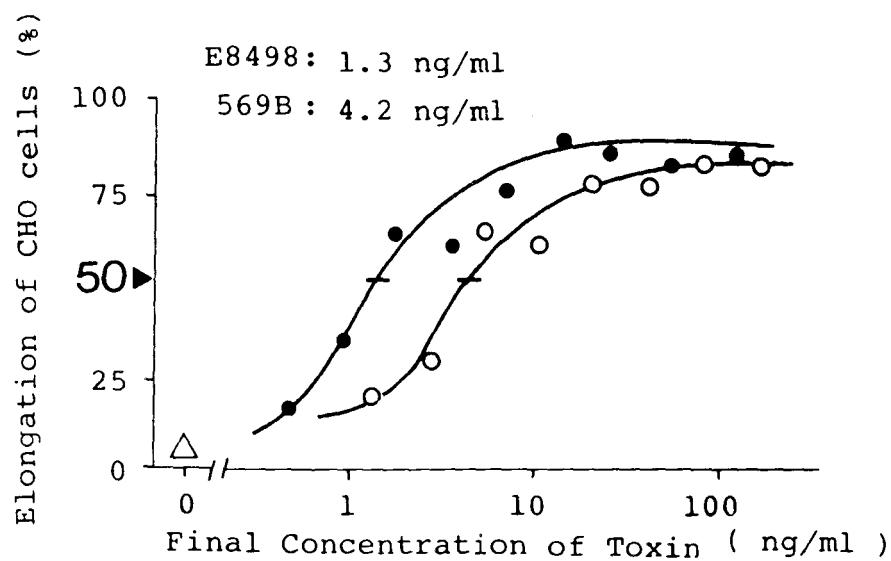
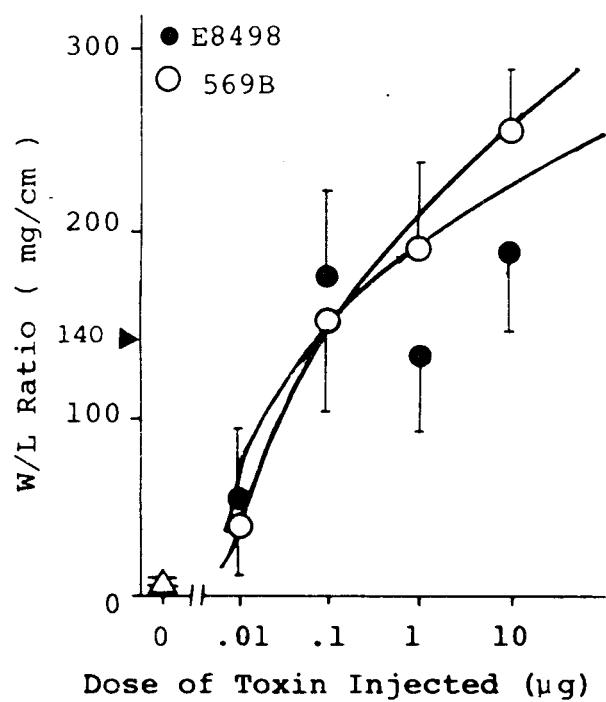
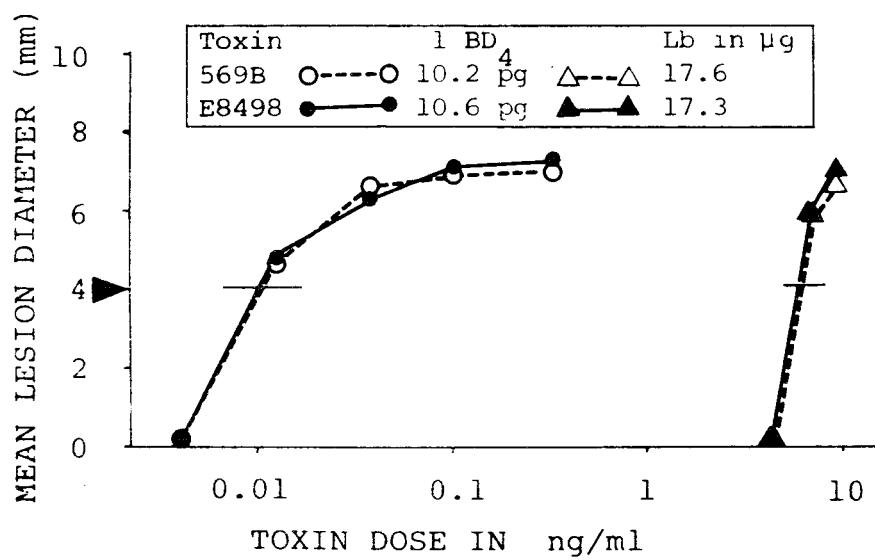


圖7.



148.



149.

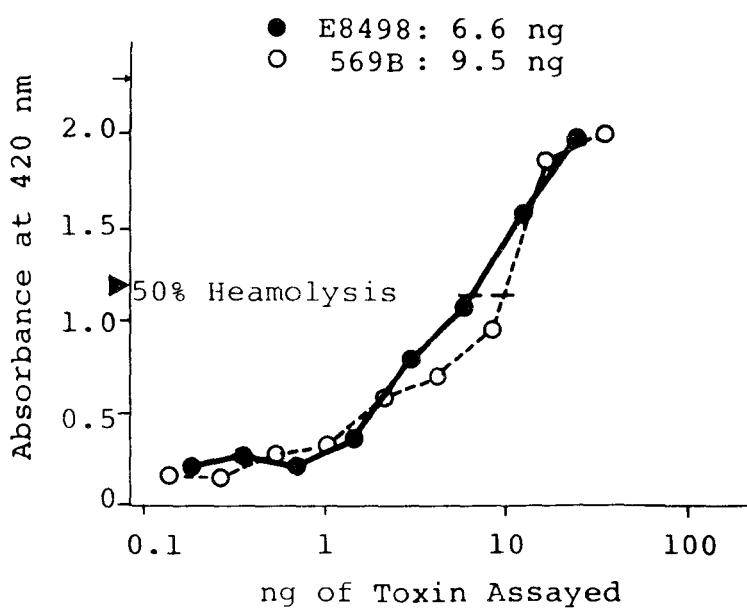
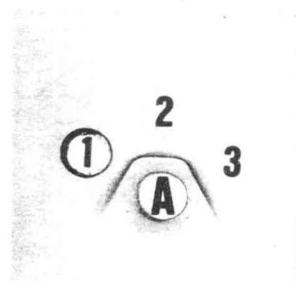


図10

A.



B.

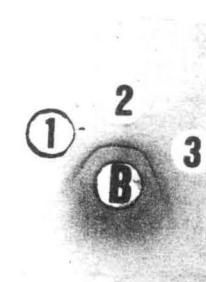


図 11.

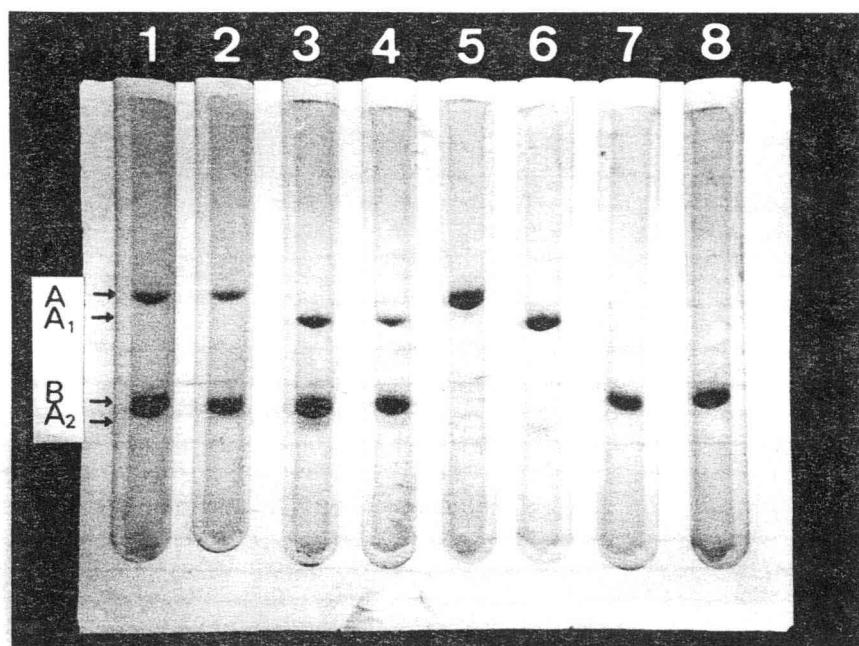
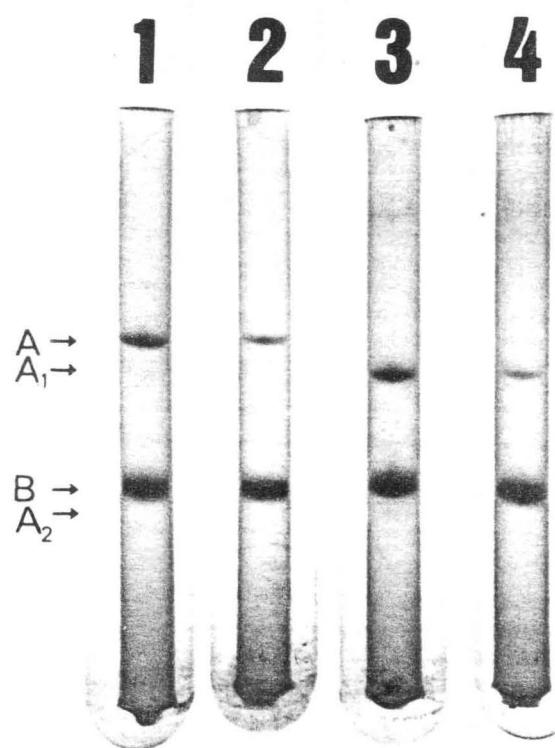
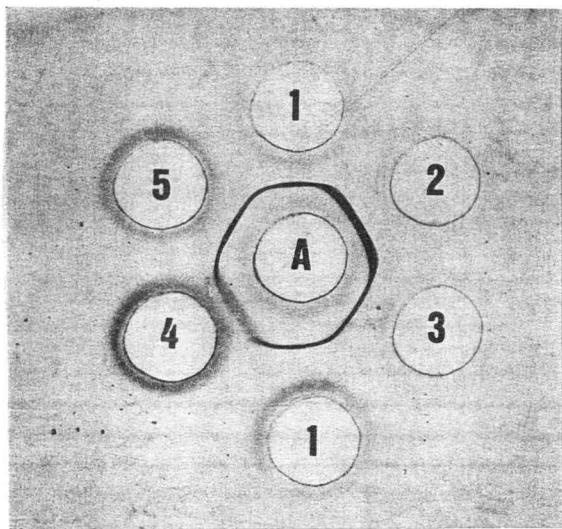


図 12.



A



B

