



Title	ヒト由来およびブタ由来の毒素原性大腸菌の産生する易熱性エンテロトキシンの物理化学的および免疫学的性状の異同について
Author(s)	辻, 孝雄
Citation	大阪大学, 1983, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33301
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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名・(本籍)	辻	孝	雄
学 位 の 種 類	医	学	博 士
学 位 記 番 号	第	5 9 9 6	号
学位授与の日付	昭和 58 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	ヒト由来およびブタ由来の毒素原性大腸菌の産生する易熱性エンテロトキシンの物理化学的および免疫学的性状の異同について		
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 井上 公蔵		

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

毒素原性大腸菌 (enterotoxigenic *Escherichia coli*, ETEC) の産生する易熱性エンテロトキシン (LT) とコレラエンテロトキシン (CT) との部分的共通抗原性が既に報告されている。本研究では、ヒト由来の ETEC の産生する LT (LTh) とブタ由来の ETEC の産生する LT (LTp) の精製標品を得て、CT, LThおよびLTpの物理化学的、生物学的性質を比較検討することを目的とした。

〔方 法〕

精製：LThは、旅行者下痢患者から分離した *E. coli* 536— 5, LTpは、ブラジル Pestana de Castro博士より分与された *E. coli* 0-149-26 およびブタ由来の Ent プラスミッドを組み込んだ *E. coli* WT-1 から、それぞれ精製した。

精製方法は、いずれも Clements and Finkelsteinの方法に準じた。

CTは、市販の精製標品 (コルトックス, 化血研) を用いた。

抗血清の調製：adjuvantと等量の精製毒素溶液 (20 μ g) を混合し家兔に皮下注射し抗血清を得た。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動, 等電点の測定法, ゲル内沈降反応, アミノ酸組成の決定は常法に従った。

生物活性の測定：Chinese, Hamster, Ovary細胞の形態変化テスト (CHO cell assay) とウサギ皮膚血管透過性充進試験 (PFテスト) により測定した。

抗血清による中和試験：一定量の毒素と階段希釈した抗血清を混ぜ、37℃, 1時間反応させた後、

生物活性を測定し、中和力価を定めた。

〔結果と考察〕

精製標品LTp, LThおよびCTは、ポリアクリルアミドディスク電気泳動で単一のバンドを示したが、それぞれ移動度は異っており、 $CT > LTh > LTp$ の順であった。等電点は、 $CT : 6.8$, $LTh : 7.5$, $LTp : 8.1$ であった。

一般に、CTとLTは、AとBの2種類のsubunitより構成され、A subunitは、 A_1 と A_2 fragmentsから成ると考えられている。そこで各毒素のsubunitの分子量をSDSポリアクリルアミドスラブ電気泳動により比較した結果、A subunitは、3毒素ともほぼ同じであったが、 A_1 fragmentでは、 $LTp > LTh \cong CT$, A_2 fragmentでは、 $LTp < LTh \cong CT$ であった。一方、B subunitでは、 $LTh > LTp \cong CT$ であった。また、アミノ酸組成を比較したところ、CTとLTの相違に比べ、LThとLTpの相違はわずかであった。

次に、免疫学的に3者を比較するため各抗毒素血清を用いてゲル内沈降反応を行った結果、お互いにspurを形成し、3者が免疫学的に各々一部異なることが明らかになった。また、抗血清による毒素の生物活性に対する中和力価の測定でも、homologousの中和度に比べ、heterologousの中和度は低い値を示した。この結果からも3者が免疫学的に異なることが示唆された。さらに、ヒトおよびブタ由来株各6株についてゲル内沈降反応で免疫学的異同を調べた結果、由来動物が同じであれば、1本のfuseする沈降線が形成され、由来動物の種が同じであれば免疫学的に同じ抗原性を持つLTを產生することがわかった。

次に、生物活性を比較した。CTは、A subunitに切れ込みが入り、 A_1 と A_2 fragmentsに切れた形(nicked)で分泌される。しかし菌体内から得たLTは、ニックの入らない状態(unnicked)にあり、trypsin消化することによりニックの入った状態になる。そこで、unnicked LTとtrypsin処理したLT(nicked)およびCT(nicked)の生物活性を、CHO cell assay, PFテストで比較した。CHO cell assayでは、nicked LT, unnicked LTおよびCTの活性はほぼ同程度であった。PFテストではunnicked LTとnicked LTの活性の差は顕著にみられ、unnicked LThとunnicked LTpは、ほぼ同等の活性を示したが、nicked LT, CTの活性に比べ $1/20 \sim 1/200$ 程度の活性を示すにすぎなかった。

〔総括〕

- 1) ヒトおよびブタ由来のETECの產生するLTh, LTpを高純度に精製し、LTにはLTp, LThの2種類があることを見出した。
- 2) CT, LTh, LTpは、ディスク電気泳動で移動度に差がみとめられ、等電点は $CT : 6.8$, $LTh : 7.5$, $LTp : 8.1$ であった。
- 3) CT, LTh, LTpのsubunitの分子量を比較した結果、 $A : CT \cong LTh \cong LTp$, $A_1 : LTp > CT \cong LTh$, $A_2 : LTp < CT \cong LTh$, $B : LTh > CT \cong LTp$ であった。
- 4) 免疫学的比較：ゲル内沈降反応及び抗血清による中和試験から、3者の抗原性は、一部共通、一部異なることが明らかになった。

5) 生物活性の比較: CHO cell assayでは3者ほぼ同等の活性を示した。PFテストでは, nicked LTとCTの生物活性に比べ, unnicked LTの活性は, 顕著に低く, 1/20~1/200であった。

論文の審査結果の要旨

毒素原性大腸菌は, 旅行者下痢症のみならず近年では国内発生下痢症の重要な原因菌をして注目されている。本論文では, 毒素原性大腸菌の産生する易熱性エンテロトキシン (LT) を種々の生物学的, 免疫学的性状について詳細に解析し, ブタ由来の毒素原性大腸菌の産生するLTとヒト由来の毒素原性大腸菌のLTでは, その性状が異なること, つまり, LTには2種類存在していることを初めて明らかにした。

この成績は, 毒素原性大腸菌による下痢症の発症機構の理解, 診断および予防等に関する今後の研究に寄与し, 博士論文にふさわしいものとする。