

Title	腸管出血性大腸菌の産生する志賀毒素様毒素に関する研究：毒素の精製，性状解析および検出法の開発
Author(s)	Urirat, Kongmuang
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/35983
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

氏名・(本籍)	ウライラット URIRAT	コンムン KONGMUANG
学位の種類	医	学 博 士
学位記番号	第	8099 号
学位授与の日付	昭和63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	腸管出血性大腸菌の産生する志賀毒素様毒素に関する研究： 毒素の精製，性状解析および検出法の開発	
論文審査委員	(主査) 教授 三輪谷俊夫	(副査) 教授 井上 公蔵 教授 松田 守弘

論 文 内 容 の 要 旨

[目 的]

出血性大腸炎の原因菌として分離された大腸菌0157:H7の産生する志賀毒素様毒素は、これまで数ヶ所の研究室で精製法が工夫されたが、いずれも複雑な手法で収率も悪く毒素の性状も十分明らかになっていない。そこで大腸菌0157:H7について本研究では、(1)簡易な毒素の精製法を確立すること、(2)精製した毒素の性状を明らかにすること、(3)さらには毒素の簡易検出法を工夫し、本菌の分離同定に役立てることを目的とした。

[材料と方法]

1. 毒素の精製：大腸菌0157:H7を変法syncase培地で培養した菌体を超音波破壊したものを出発材料として、DEAEセルロースカラムおよびイムノアフィニティカラムを用いて精製した。
2. 毒素の性状解析：各種電気泳動，ゲル内沈降反応，抗血清の作成，培養細胞毒性試験，マウス致死試験，ウサギ結紮腸管試験等について常法に従って実施した。
3. 毒素の簡易検出法の開発：
 - (1) サンドイッチELISA法：イムノアフィニティカラムで精製した抗毒素抗体をアルカリホスファターゼでラベルしたELISAを開発した。
 - (2) Vero細胞をニトロソグアニジンで処理し，毒素抵抗変異細胞を分離し，親Vero細胞と変異Vero細胞の両方を用いた毒素検出法を開発した。

[結 果]

1. 毒素の精製：

DEAEセルロース及びイムノアフィニティカラムを組み合わせた簡易な方法で回収率62%で毒素が精製できた。

2. 毒素の性状：

精製毒素は、物理化学的、生物学的および免疫学的解析で志賀赤痢菌の産生する志賀毒素と全く区別がつかず同一の性状を有していることがわかった。

3. 毒素の簡易検出法の開発：

E L I S A法ではng/ml, Vero細胞法では25pg/ml以上の毒素を検出することができ、志賀毒素様毒素の検出の特異性も高かった。これらの方法を用い、多くの菌株の志賀毒素様毒素の検出を試みたところ、*S.dysenteriae* type 1および大腸菌0157:H7は全て産生していることがわかった。その他、腸炎ビブリオ、コレラ菌等では産生が認められなかったが、旅行者下痢症から分離された大腸菌のうち約0.53%の大腸菌が本毒素を産生していることが分かった。

[総括]

出血性大腸菌の産生する志賀毒素様毒素の極めて簡易な精製法を確立し、毒素の性状を明らかにした。また、志賀毒素様毒素の簡易な検出法を開発し、臨床的疫学的応用の可能性を示した。

論文の審査結果の要旨

本研究は、腸管出血性大腸菌0157:H7の産生する志賀毒素様毒素の精製法としてイムノアフィニティカラムを工夫し、志賀毒素様毒素の簡易な精製法を確立したものである。この高純度精製毒素について物理化学的、生物学的、生化学的、免疫学的性状を調べ、志賀赤痢菌の産生する志賀毒素と同一の性状を有することを明らかにした。

さらに、微量の志賀毒素様毒素の検出法としてE L I S A法および本毒素耐性変異Vero細胞を用いた手法を開発し、腸管出血性大腸菌の病態の臨床応用も可能な知見を加えたので、学位の授与に十分値するものとする。