The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Vibrio metschnikoviiの産生する溶血毒素の精製，性状，　およびその溶血作用機序の解析
Author(s)	三宅，眞実
Citation	大阪大学，1989，博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36072
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

【29】

氏名・(本籍)	三宅眞実（みやけまさみ）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 8599 号
学位授与の日付	平成元年3月24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	***Vibrio metschnikovii*** **の産生する溶血毒素の精製，性状，およびその溶血作用機序の解析**
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〕

*Vibrio*属菌は，その多くが人に対して病原性をもつことが知られており，特に，*V. cholerae* 01（コレラ菌），*V. parahaemolyticus*（腸炎ビブリオ）のように，腸管感染症の原因菌が多く含まれているのが特徴である。現在，これら腸管感染原因菌の共通の病原因子の一つとして，エンテロトキシンの他に溶血毒素が考えられているが，各種*Vibrio*属菌の産生する溶血毒素間には，免疫学的類似性が存在するものが何種類か認められているほか，ある菌種の溶血毒素産生性が他の菌種に移動するか，あるいは過去において移動してきた可能性が示唆されており，腸管感染症と*Vibrio*属菌を考えた場合，溶血毒素の分子レベルでの解析が望まれている。我々は，感染性下痢症の起因菌として*V. metschnikovii*を分離したが，この菌は培養上清中に強い溶血活性を示し，菌の産生する溶血毒素と病原性の関連性が示唆された。このため本研究では，この臨床分離株の産生する溶血毒素を精製し，その性状を明らかにするとともに，広く，*Vibrio*属菌の産生する溶血毒素の性状を理解するために，毒素による溶血作用機序の解析も試みた。

〔方法〕

毒素の精製：*V. metschnikovii*の臨床分離株MIT 1を，Brain heart infusion broth培地で37℃，7時間培養し，遠心上清の酸沈澱で得た粗毒素から，Phenyl－Sepharose CL 4B（1次）→Pheny 1－Sepharose CL 4B（2次）→Mono Q の各カラムを用いて精製を行った。精製の指標として，ウシ血球に対する溶血活性を測定した。

毒素の性状：電気泳動，抗毒素抗体の作製，免疫ゲル内沈降反応，その他の毒素の性状に関する実験，

および乳のみマウス試験，ウサギ皮膚毛細血管透過性亢進作用試験は，常法に従った。

溶血作用機序の解析：毒素による溶血作用機序はウサギ血球を用いて解析した。糖，二価金属イオンによる溶血阻害実験は，溶血活性測定系に阻害剤を共存させて行った。毒素と血球膜との結合は，イムノブロット法にて解析した。毒素を作用した血球膜の電子顕微鏡写真は，negative染色した検体について，透過型電子顕微鏡で観察した。血球の体積増加は，Sysmex E－4000で測定し算出した。

〔成績〕

毒素の精製：上記の方法で精製した毒素は，電気泳動で一本のバンドを示し，その位置に一致して溶血活性が検出できた。培養上清に比べ活性は4900倍に上昇し，活性の回収率は約18%であった。

毒素の性状：精製毒素は，SDS一電気泳動で分子量5万を示し，等電点はpI 5.1であった。精製毒素は乳のみマウス腸管で液体貯留を引き起こす他，ウサギ皮膚毛細血管透過性亢進作用（PF活性）を持っており，この毒素が病原因子として働く可能性が示唆された。精製毒素は60℃，5分間の加熱で活性が完全に失われる易熱性毒素であった。

溶血作用機序：(1)毒素による溶血は，二価金属イオンや，分子量約500を越える糖によって阻害された。これらの阻害剤の存在下でも，毒素は血球と結合することができ，これら阻害剤は毒素と血球の結合後の過程を阻害していることがわかった。特に糖による阻害は，毒素と血球の結合後を，抗膠質浸透圧性に阻害していることがわかった。(2)毒素による溶血は温度依存性で，4℃では溶血はまったく起こらなかった。4℃で毒素と反応させた血球を毒素を含まない反応液に移すと，37℃でも溶血は起こらず，毒素と血球の結合は温度依存性であることがわかった。4℃で毒素と血球が結合できないことはイムノブロット法でも確かめられた。(3)血球を毒素で一定時間，37℃で反応させると，毒素を洗い去っても溶血は阻止できなかった。しかもこの血球は，洗浄後4℃で反応を続けても溶血を起こし，溶血の，いわゆるlysis stepは温度非依存性であることがわかった。(4)溶血を阻害する二価イオンであるNi^{2+}の存在下で毒素処理した血球を洗浄後，毒素，Ni^{2+}共に存在しない反応液中で，37℃，あるいは4℃でさらに反応させたところ，37℃では血球は完全に溶血したが，4℃では約10%しか溶血しなかった。この結果から，毒素による溶血過程には，毒素と血球の結合stepと血球のlysis stepの間に，温度依存性の，膜障害stepというべき過程が存在していることがわかった。(5)毒素処理した血球をSDS一電気泳動し，イムノブロット法で毒素を検出すると，毒素は血球膜上でtetramer（4量体）を形成していることがわかった。(6)毒素のtetramer形成は，溶血を阻害する糖であるデキストランや，一部の二価イオンでは阻害されなかったが，Ni^{2+}を含む別の一群の二価イオンで阻害されていた。この結果と，(4)に示した結果を考え合わせると，毒素による膜障害はtetramer形成と一致して起こり，Ni^{2+}など一部のイオンは，このtetramer形成一膜障害stepを阻害すると考えられた。(7)毒素処理した血球は，溶血に先立ち，その体積が増加することがわかった。この体積増加は，毒素と血球の結合が完了してから起こり始めた。(8)電子顕微鏡で，膜上で，毒素がリング状のporeを形成しているのが確認できた。

以上の結果，毒素による溶血過程は，(i)温度依存性結合step，(ii)温度依存性膜障害step，(iii)温度非依存性lysis stepの3段階に区別でき，膜障害は毒素によるpore形成に一致して起こること，血球のlysisは血球内外の膠質浸透圧差によるものであることがわかった。

〔総括〕

1. *Vibrio metschnikovii* の産生する溶血毒素を高度に精製した。
2. この毒素が病原因子として働く可能性が強く示唆された。
3. 毒素による溶血過程は，(i)温度依存性結合 step，(ii)温度依存性膜障害 step，(iii)温度非依存性 lysis step，の3段階に区別できることがわかった。
4. 毒素による膜障害は，毒素が膜に pore を形成することで引き起こされ，膠質浸透圧差により水が血球内へ流入した結果，血球は膨満し，ついには溶血が起こることが示唆された。

論文の審査結果の要旨

腸管感染原因菌の産生する溶血毒素は，病原因子として直接的，あるいは間接的に働きうると考えられており，このような溶血毒素の分子レベルでの性状の解析が望まれているがまだ明らかにされていない。

本論文では，腸管感染原因菌と考えられる *Vibrio metschnikovii* の病原因子を検討し，この菌の産生する溶血毒素を初めて分離精製した。また，この溶血毒素の溶血作用機序解析も行っており，タンパク毒素による血球溶血作用の一様式を明らかにしている。得られた結果は，他の溶血毒素の作用機序解析を行うために示唆深いものであり，溶血作用機序解析に有用な実験系を確立したものとして評価できる。

本論文は博士論文として価値あるものと考える。