The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	腸炎ビブリオの菌体結合性赤血球凝集素の腸管内定着因子としての解析
Author(s)	永山, 憲市
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38149
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	永山憲市（ながやま　けんいち）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　10640　号
学位授与年月日	平成5年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科病理系専攻
学位論文名	**腸炎ビブリオの菌体結合性赤血球凝集素の腸管内定着因子としての解析**
論文審査委員	（主査） 教　授　本田　武司 （副査） 教　授　松田　守弘　　教　授　中田　篤男

論文内容の要旨

（目　的）

腸炎ビブリオは小腸粘膜に定着して増殖し，蛋白性毒素を産生することにより下痢を主症状とする急性胃腸炎を惹起すると考えられている。現在までに，本菌が産生する毒素（TDH／TRH）については詳しい研究がなされているが，菌の定着に関与する因子についてはほとんど解析が成されていない。そこで本研究では腸炎ビブリオの腸管内定着機構の解明を目的として，本菌の持つ菌体結合性赤血球凝集素（cell-associated Hemagglutinin, cHA）について，①cHAの検出，精製と性状，②cHAの定着因子としての機能の解析，さらに③小腸上皮細胞刷子縁に存在するcHA結合タンパク（レセプター）について解析を行った。

（方法ならびに成績）

1）cHAの検出，精製と性状；使用菌株として下痢症患者から分離された腸炎ビブリオ計468株を臨床株として，食品あるいは魚介類から分離された71株を環境由来株として用い，これらの菌株をMarine broth培地で37℃で3時間培養した菌液と1％D－マンノース加7％ヒト赤血球（A型）PBS浮遊液をスライドグラス上で混和し赤血球凝集（HA）活性を観察した。その結果，臨床株ではマンノースによりHA活性が阻害されるMannose-sensitive HA（MSHA）が大多数（75％）を占め，環境由来株のほとんど（88％）がマンノースによりHA活性が阻害されないMannose-resistant HA（MRHA）を示した。そこで臨床株の大多数が示すMSHAについて，詳細な解析を加えた。ヒト赤血球（A型）に対するHA活性を測定し，非常に強いHA活性を示す臨床株KN7044株をMarine broth培地で培養し，遠心集菌したのちホモゲナイザー処理してcHAを菌体からはずし，これを粗材料として各種カラムクロマトグラフィーを用いてcHAを精製した。精製cHAはSDS-PAGEで分子量約29kDと推定され，サブユニット4個からなるテトラマー構造を有する易熱性タンパクであった。また菌体，精製cHAとともにヒト（A，B，O型），ウサギ，ニワトリ赤血球を凝集させた。糖質のHA活性に対する影響を検討すると，D－マンノースとD－グルコースによりHA活性が阻害された。また抗cHAウサギIgGのFab画分は菌体，精製cHAのHA活性を完全に阻害した。ウエスタンブロッティングを行うとKN7044株のcell lysateでは29kDのcHA subunitが見られたが，HA活性を示さない環境由来株BM2－3株のcell lysateには29kDタンパクは検出されなかった。

2）cHAの腸管内定着因子としての解析；（i）ヒト結腸癌由来Caco－2培養細胞定着試験：Caco-2培養細胞と菌体を混合しインキュベート後，ギムザ染色し光学顕微鏡でCaco－2細胞への菌の定着能を観察した。KN7044株

はBM 2 － 3 株に比較して著明にCaco－ 2 細胞に付着した。また種々のHA活性を示す菌株を用いた定着比較試験ではHA活性とCaco－ 2 細胞に付着した菌数の間には正の相関関係が見られた。（ii）ウサギ小腸上皮細胞定着試験：ウサギ小腸口側 1 ／ 3 の粘膜から小腸上皮細胞を単離し，菌体と混合させインキュベート後，位相差顕微鏡で上皮細胞への菌の定着能を観察した。その結果，Caco－ 2 細胞定着試験と同様にKN7044株はBM 2 － 3 株に比較して著明に上皮細胞特に刷子縁（brush border）に付着した。種々のHA活性を示す菌体を用いた定着比較試験でもHA活性と上皮細胞刷子縁に付着した菌数には正の相関関係が見られた。また，D－マンノース，抗cHAウサギIgGのFab画分によるKN7044株菌体の前処理あるいは精製cHAを用いた上皮細胞の前処理によって，KN7044株菌体の上皮細胞刷子縁への付着はD －マンノース，IgG・Fab 画分あるいは精製cHAの濃度に依存して阻害を受けた。

3）ウサギ小腸上皮細胞刷子縁上のcHA結合タンパクの解析；ウサギ小腸口側 1 ／ 3 の粘膜より小腸上皮細胞刷子縁画分を調整した。この刷子縁画分をSDS-PAGE後，電気的にPVDF膜に転写し，精製cHA，抗cHAウサギ血清を用いたcHA特異Immunoperoxidase染色を行ったところ，分子量約17kDの糖タンパクが検出された。さらにウサギ小腸を口側より上 1 ／ 3 ，中 1 ／ 3 ，下 1 ／ 3 に分割し各々別に刷子縁画分を調整して，17kD糖タンパクを検出すると小腸上中部に局在して分布していることが明らかになった。

（総　　括）

腸炎ビブリオの菌体結合性赤血球凝集素（cHA）を分離精製し，性状分析を行った。Caco－ 2 培養細胞，ウサギ小腸上皮細胞を用いた解析から，このcHAは腸炎ビブリオの腸管上皮への定着因子として作用していることが明らかになった。ウサギ小腸上皮細胞刷子縁上のcHA結合物質（レセプター）として17kDの糖タンパクを同定した。このcHA結合タンパクはウサギ小腸内で小腸上中部に局在分布していた。

論文審査の結果の要旨

我が国における細菌性食中毒起炎菌として常に主座を占めている腸炎ビブリオの感染発症機構の研究なかで，本菌が産生する毒素(TDH／TRH）については詳しい研究が成されているが，菌の定着に関与する因子についてはこれまでほとんど解析が成されていなかった。本研究では腸炎ビブリオの持つ菌体結合性赤血球凝集素（cHA）に着目して研究を行い，cHAの分離精製，構造など諸性状の解析を行うとともに，腸管上皮細胞，ヒト腸管上皮培養細胞などを用いた解析からcHAが本菌の定着因子として機能していることを明らかにし，さらに小腸上皮細胞刷子縁上でcHAの受容体として機能している約17kDaの糖タンパクを初めて同定した。以上の結果から，腸炎ビブリオの腸管内定着機構においてcHAが重要な役割を果たしていると考えられる成績が得られた。

本研究は腸炎ビブリオの腸管内定着機構を解明する上において先駆的で大きな意義を有し，学位に値するものと認められる。