Osaka University Knowledge Archive

Title	Demonstration and Partial Characterization of a Bacterial Growth Enhancer in sera
Author(s)	岡山, 加奈
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58108
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【16】

氏　　名	岡　山　加　奈（おか やま かん な）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　２４１４６　号
学位授与年月日	平成22年8月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科予防環境医学専攻
学　位　論　文　名	Demonstration and Partial Characterization of a Bacterial Growth Enhancer in sera （血清内に存在する細菌の増殖促進因子の証明とその特性）
論文審査委員	（主査） 教　授　飯田　哲也 （副査） 教　授　杉本　　央　　教　授　堀口　安彦

論文内容の要旨

〔　目　　的　〕

腸管を感染の場とする病原細菌は、常在細菌や宿主生体側因子と様々な相互作用を持ちながら病原性を発揮すると考えられる。我々は食中毒の病原細菌である腸炎ビブリオの病原性を、培養細胞を用いて検討してきた。この研究過程で、培養細胞用の培地（Dulbecco's modified Eagle's medium）に少量の血清を添加すると腸炎ビブリオの増殖は促進されるが、高濃度で添加すると腸炎ビブリオの増殖は阻害されることに気づき、この腸炎ビブリオの増殖に関与する血清中の因子を明らかにすることを目的とした。

〔　方法ならびに成績　〕

成人ヒト血清、成牛血清、新生児牛血清を用いて、ゲル濾過、イオン交換カラムクロマトグラフィ

一の組み合わせにより部分精製することで、腸炎ビブリオの増殖に影響を及ぼす2つの因子が存在することを見出した。

一つは増殖を抑制する因子である。この増殖抑制因子はSephadex G-100によるゲル濾過クロマトグラフィー、DEAE Sephadex, MonoQ 5/50 GL FPLCカラムによるイオン交換クマトグラフィーにより部分精製した。この増殖抑制因子活性を示す精製標品は、2次元電気泳動で2つのタンパクスポットを示し、これらのN末端アミノ酸配列解析からhemopexinとtransferrinであると同定できた。そこでhemopexin(American Research Products)とtransferrin(Wako)を用い腸炎ビブリオの増殖への影響を検討したところ、増殖抑制因子の本体は病原細菌の増殖に必要な鉄イオンを吸着、除去するapotransferrinであることがわかった。

もう一つの因子は増殖を促進する因子である。検討したヒト、成牛・新生児牛・胎児牛血清すべてに増殖促進活性を認めたが、胎児牛血清は最も促進活性が強かったため胎児牛血清を用いて精製を進めた。この精製には、Sephadex G-25によるゲル濾過クロマトグラフィー、MonoQ 5/50 GL FPLCカラムによるイオン交換クロマトグラフィーそして再度Sephadex G-25を用いた。この増殖促進因子はSephadex G-25による溶出分画から分子量1000Da以上であり、Microcon-3を用いた限外濾過やMALDI-TOFMSの結果から分子量3000Da以下であり、その分子量は1,000-3,000Daと推定された。増殖抑制因子が易熱性であるのに対し、増殖促進因子は60あるいは100℃、30分の加熱においても活性を失わず、耐熱性であった。細菌の増殖因子の1つに鉄イオンが報告されている。そこで部分精製した増殖促進因子の金属元素をICP-MSにより分析したところ、鉄は検出されず、マグネシウムとモリブデンイオンが高濃度に検出された。さらにMALDI-TOFMS、LC-MS/MSやIR分析の結果、増殖促進因子は、マグネシウムとモリブデンを含む糖脂質とペプチドの複合体であると推定された。また、この増殖促進因子の活性は*Vibrio* spp.だけでなく*Escherichia coli*, *Salmonella* spp. *Staphylooccus aureus*といったグラム陰性菌からグラム陽性菌まで幅広く増殖活性を示した。血清中にこのような性状を示す細菌の増殖因子の報告はなく、新規分子の可能性がある。

〔　総　　括　〕

ヒト、牛血清中には細菌の増殖抑制因子と増殖促進因子が存在した。増殖抑制因子は、細菌の増殖に必要な鉄イオンを吸着、除去するapotransferrinであった。増殖促進因子は、分子量1,000-3,000Daのマグネシウムとモリブデンを含む糖脂質とペプチドの複合体であることが示唆された。増殖促進因子は60あるいは100℃、30分の加熱においても活性を失わず、グラム陰性菌からグラム陽性菌まで幅広く活性を示した。血清中にこのような性状を示す細菌の増殖因子の報告はこれまでなく、新規分子と考えられる。

この結果は、培養細胞を用いた感染実験で、血清を添加して実験を行う研究者へ警鐘を促すものである。また、増殖促進因子の特性が明らかになると、この因子をターゲットにしたこれまでとは異なる抗菌薬の開発につながる可能性がある。

論文審査の結果の要旨

食中毒の原因菌である腸炎ビブリオの病原性を培養細胞と血清を用いて検討するうちに、血清が腸炎ビブリオの増殖を抑制あるいは促進することに気付いた。そこで血清内に存在する細菌の増殖を抑制あるいは促進する因子の同定を目的として検討を行った。血清を各種クロマトグラフィーにより精製していくと、腸炎ビブリオの増殖に影響を与える2つの活性分画を得た。一つは、増殖抑制因子で、鉄イオンを除去することのできるapotrnsferrinと同定された。もう一つは、細菌の増殖促進因子であり、分子量1,000-3,000Daのマグネシウムとモリブデンを含む糖脂質とペプチドの複合体であり、新規因子であると考えられた。増殖促進因子は60℃あるいは100℃、30分間の加熱にも活性は安定であり、グラム陰性菌および陽性菌いずれの菌をも増殖させた。

本論文は、感染症の病態に新知見をもたらす可能性を含み学位に値するものと認める。