

95

学位申請論文

ブドウ球菌エンテロトキシンに関する研究

山田 澄夫



ブドウ球菌エンテロトキシンに関する研究

— エンテロトキシン A, B, C, D, E の  
精製, 精製毒素の免疫学的・物理化学的性状  
, ならびに, 食中毒および自然界由来黄色ブ  
ドウ球菌の本毒素産生能とその型別 —

山 田 澄 夫

才 I 章

序 文

才 II 章

材 料 お よ び 方 法

才 III 章

実 験 成 績

I.

エ ン テ ロ ト キ シ ン の 精 製

1. エ ン テ ロ ト キ シ ン A の 精 製

2. エ ン テ ロ ト キ シ ン B の 精 製

3. エ ン テ ロ ト キ シ ン C<sub>2</sub> の 精 製

4. エ ン テ ロ ト キ シ ン D の 精 製

5. エ ン テ ロ ト キ シ ン E の 精 製

II.

エ ン テ ロ ト キ シ ン の 免 疫 学 的 お よ び 物 理 化 学 的 性 状

1. 精 製 毒 素 の 免 疫 学 的 特 異 性

2. 精 製 毒 素 の 物 理 化 学 的 性 状

3. エ ン テ ロ ト キ シ ン の heterogeneity

4. 加 熱 に よ る 毒 素 活 性 の 変 化

III.

食 中 毒 , 健 康 人 糞 便 お よ び 鼻 前 庭 , 調 理 人 手 指 お よ び 市 販 食 品 由 来 黄 色 ブ ド ウ 球 菌 の 本 毒 素 産 生 能 と そ の 型 別 .

才 IV 章

考 察

- I. エンテロトキシンの精製について
- II. 毒素性状について
- III. 毒素産生黄色ブドウ球菌の分布と  
本菌食中毒発生との関連について

オ Ⅶ 章 結 論  
カ Ⅷ 章 文 献



## 第 I 章 序 文

ブドウ球菌エンテロトキシン(以下  $E_{nt}$  と略)は黄色ブドウ球菌(以下ブ菌と略)が食品または培養基中で増殖する際に産生さる、菌体外に分泌さるる代謝産物の一つであり、ブ菌食中毒においてヒトに悪心、嘔吐、下痢を起す原因物質である<sup>35)</sup>。  $E_{nt}$  は免疫学的差異により A<sup>20)</sup>, B<sup>6)</sup>, C<sup>9)</sup>, D<sup>22)</sup> および E<sup>10)</sup> に型別されており、さらに他の型の存在<sup>12)</sup> も示唆されてゐる。

ブ菌食中毒は  $E_{nt}$  を含んだ食品をヒトが摂取すると、2~5時間の短かい潜伏期ののちに生ずる急性中毒で、ボツリヌス食中毒とともに毒素型食中毒の代表的なものである<sup>5)</sup>。

本食中毒は、わが国において腸炎ビブリオ食中毒に次いで、常に2番目に多い発生を示してゐるが、本症は一過性に経過し、比較的軽症で致命率も極めて低いため軽視さるるがちである。しかしながら、ブ菌はヒト、動物そ

の他に、これらを取り巻く環境に広く分布してゐるため、食品は絶えず本菌汚染の機会にさらされておき、食生活の違いに関係なく文明諸国においても極めて高い発生を示してゐる。また、他の細菌性食中毒が食品衛生意識の向上とともに減少してゐるのに対し、ブ菌食中毒は軟次増加の傾向さえ認められており、本食中毒の確実な診断と予防対策は公衆衛生上重要な課題となつてゐる。

本食中毒の発生に際しては、その汚染源および汚染経路を明らかにするたため、推定原因食品、患者の吐物や便、あるいは調理人ならびに食品関係者の手指、鼻咽頭から分離したブ菌のフーリ<sup>125)</sup>またはコアグラーゼ型別<sup>126)</sup>による疫学調査が実施されてゐるのが現状である。しかし本食中毒の確実な診断は原因物質であるEntを証明することである。特に、ブ菌が増殖してすでにEntが産生されてゐるような食品が、加熱調理された場合は、その食品からの菌の検出は不可能であり、この

ようなものが原因食品となつた。たゞ食中毒においては、食品からの Ent の検出が原因究明の唯一の手段となる。

Ent の証明には推定原因食品の乳劑、あるいはその他の検査材料から分離したブ菌の培養上清をサルヤネエに経口投与して、嘔吐発現の有無により判定する動物実験法があるが<sup>39, 106)</sup>、この方法は感度が低く、個体差も大きいため微量の Ent を検出することは困難である。そこで多くの場合、特異抗 Ent 血清を用いたゲル内沈降反応<sup>21, 46, 86, 109, 119)</sup>、逆受身赤血球凝集反応<sup>101)</sup>、radioimmunoassay<sup>18, 34, 65, 88)</sup> などの血清学的検出法が採用されてゐる。

血清学的検出法による Ent の証明には型特異性の高い抗血清は欠くべからざるものである。そのためには高度に純化した精製 Ent が免疫原として必要である。また、毒素を純粋な型で単離、精製することは毒素分子の構造と毒性、抗原性および酵素作用などの活性との関連性や生体内における毒素の作用機序を

明らかにするためにも必要である。

Ent の精製は、一部の大学および研究所（主として米国）でしか行なわれておらず<sup>9, 16, 22, 27, 44, 53, 61, 93, 97, 99, 112-113</sup>、我が国におけるブ菌食中毒発生に際して実施されてゐる Ent の証明は、こゝろ研究機関から分与された抗血清に頼つてゐるのが現状である。また、ブ菌の産生する Ent 量は少なく、しかも毒素産生条条件下で同時に多くの菌体外物質を産生するため<sup>86</sup>、精製操作は繁雑で、大きな労力を必要としてゐる。さらに、得られた毒素は必ずしも高純度化されてゐるとは限らず<sup>109</sup>、精製法の相違による性状の差も指摘されてゐる<sup>90</sup>。したがって、全その Ent を効率のよい簡単な精製法で、しかも高純度の毒素を多量に得ることができる精製法の確立と特異抗 Ent 血清の作成は、ブ菌食中毒の確実な診断、疫学調査および、毒素分子レベルでの毒作用を解明するため極めて重要な課題であろう。

Ent はいづれの型も単一なポリペプチド鎖

から成るタンパクであり、特異催吐活性を有  
 することが報告されてゐる<sup>9, 44, 61, 94</sup>。また、  
 活性発現には毒素分子の立体構造が必要  
 であり<sup>11</sup>、さらに、Ent A および B のアミノ  
 酸配列の比較から、両毒素に認められる共通  
 部分の配列が催吐活性基を意味するものであ  
 るうことが示唆されてゐる<sup>11, 13, 14</sup>。このよう  
 に、Ent はその物理・化学的性状や生物活性  
 に関して、血清型間に顕著な差が認められず  
 、さらに自然界に分布する菌の Ent 産生能  
 が特定の型に限定されないことも報告されて  
 いる<sup>52, 54, 64, 110, 120, 124</sup>。これに反し、菌食中毒  
 で最も高頻度に検出されるのは、我が国のみ  
 ならず諸外国においても Ent A である<sup>19, 48-49, 64,  
 82, 98, 101</sup>。この矛盾する問題点を解明すること  
 は、菌食中毒および Ent 研究に携わってゐ  
 る者々に課せられた極めて重要な研究課題  
 である。

そのためには、同一精製法で得た精製毒素  
 の物理化学的性状、加熱、酸-アルカリおよ

び、タンパク分解酵素などに対する毒素の安定性、生物活性基と抗原決定基の決定、および、毒素と生体内レセプターとの相互作用などの毒素学的追求が必要である。また、*in vitro*でのEnt産生とその制御機構解析という細菌生理学的見地からの検討や、ブ菌が生存し、かつ増殖する食品中における他の微生物、食品の基質や水分活性、温度、湿度などのEnt産生に及ぼす影響を明らかにすることも、本食中毒の予防対策に重要な手がかりを与えるであろう。さらに、自然界に広く分布するブ菌のEnt産生能と型別などのより詳細な生態学的研究も本食中毒予防対策をたてる上で必要不可欠なことからである。こゝまごになさゝまごいるEntの物理化学的性状に関する研究の大部分は、毒素産生量が多く、比較的精製の容易なEnt B について行なわれているにすぎず(28-30, 32-33, 37, 51-59, 76, 96, 103, 117)、その他の型のEntに関する解析はほとんどなさゝまごいといふことも過言ではなからう。

そこで、著者はブ菌食中毒の研究に不可欠である精製毒素と型特異抗血清を得るために、Ent A ~ E のいづれについても簡易でしかも高純度の毒素を得ることができうる精製法の確立を試みた。さらに得られた精製毒素、特にブ菌食中毒で主役を演じている Ent A の物理化学的性状を検討した。

Ent を含んだ食品は加熱調理後も食中毒の原因となり得ることから、この食中毒で極めて重要な問題である毒素活性と熱処理の関係を検討した。また、汚染源としての自然界に分布するブ菌の Ent 産生能および型別を詳細に検討し、食中毒由来ブ菌のそれと対比することによって、毒素産生ブ菌の分布と本菌食中毒発生の関連性の解析を試みた。

## 第二章 材料および方法

使用菌株； Ent A の産生には Friedman が報告した *Staphylococcus aureus* 13 N-2909 を、

大阪府立大学農獣医学部坂口玄二博士より分  
 与えられたもの、Ent B および C<sub>2</sub> の産生には F.  
 D. A. ( Food Drug Administration ) の C. P. Casman 博  
 士より分与えられた S. aureus C-243 および 493  
 を用いた。Ent D の産生には 1969 年東京都内  
 で発生したブ菌食中毒の推定原因食品から検  
 出した S. aureus 1151, Ent E の産生には Berg-  
 doll ら<sup>10)</sup> が報告した S. aureus FRI 326 を, F.  
 D. A. の R. W. Bennett 博士の好意により分与えら  
 れたものを用いた。

食中毒由来株は 1969 ~ 74 年にかけて東京都  
 内で発生した 103 事例のブ菌食中毒の原因食  
 品から検出された 103 株である。

自然界由来株は, ブ菌が検出されたものの  
 うち 1 検体より各 1 株を任意に選んだもので  
 , 健康人の糞便由来 98 株, 鼻前庭由来 99 株,  
 食品調理人の手指由来 96 株, および市販のサ  
 ラダ, 弁当類, 和・洋菓子などの調理済み食  
 品由来 99 株の合計 392 株である。

毒素産生培地; Ent 産生培地としては,



Kato ら<sup>68)</sup> が報告した 4% NZ-amine type NAK (Schiffeld Chemical Norwich, N. Y., U. S. A.) に塩酸チアミンおよびニコチン酸を 10 l に 0.1 g および 5 mg の割合で加えた半合成培地を  $\frac{1}{4}$  N NaOH で pH 7.0 に調整後, 115C, 15 分高圧滅菌したものを用了。

培養方法; Ent 精製の出発材料を得るために用了培養は, 上記精製用菌株 1 白金耳を 500 ml の培地の入った 1 l コルベシに接種し, 振とう培養装置 (高崎科学機器 KK) を用い, 35 C, 24 時間, 100 strokes/min で振とう培養して seed culture とした。さらに, その 5 ml を 500 ml の培地の入った 1 l コルベシに接種し, 同一条件で 24 または 48 時間培養した。

抗粗毒素および抗精製 Ent 血清の調整; 抗粗 Ent 血清は後記精製過程の Amberlite CG-50 画分 (100  $\mu$ g protein/ml) にホルマリンを 0.1% の割合に加え, 37 C, 48 時間反応後, Freund's complete adjuvant (Difco) の等量と混合し, その 1 ml を 1 週間を隔て 4 回ウサギ (体重 2.5 Kg

1) 筋肉内に接種した。さらに追加免疫として、ホルマリン未処理のものを adjuvant と混合し、その 1 ml を 1 週間を隔て 4 回ウサギに筋注射し、最終接種後 7 日目に全採血し、常法により血清を分離したものである。

特異抗 Ent A ~ C および E 血清は、精製標品を同様に adjuvant と混合し、その 1 ml を 1 週間を隔て 6 回ウサギに筋注射し、さらに追加免疫として adjuvant を含まないものを 1 ml ウサギ皮下に接種し、最終接種後 7 日目に全採血して得たものである。また、特異抗 Ent D 血清は部分精製毒素を同様に処理して得た血清を、非 Ent 画分をリガンドとして CNBr-activated Sepharose 4B にカッピングさせたゲルを用いて、アミノテトラヒドロマトグラフィーで精製したものである<sup>14)</sup>。

Reference Ent とその抗血清； 米国の F. R. I. ( Food Research Institute ) の M. S. Bergdoll 博士 および F. D. A. の C. P. Casman 博士 と R. W. Bennett 博士 より分与された Ent A ~ E とその抗血清

を reference として用いた。

タンパクの測定と定量； Ent の精製過程におけるタンパクの測定は分光光度計（島津製作所，UV 210）による 280 nm の吸収により，その定量は牛血清アルブミン溶液を標準液として Lowry 法<sup>71)</sup> に準じて行なった。

Ent の定量； 特異抗 Ent 血清と精製毒素を用いて Oudin 法<sup>60)</sup> により各型の標準検量線を作成し，用時，これと対比して Ent 量を測定した。

ゲル内沈降反応（以下ゲル沈と略）； 精製過程における Ent の検出は reference 抗 Ent 血清を用い，寺山<sup>109)</sup> が改良した 5  $\mu$ g/ml の Ent を検出できるスライドゲル沈により，精製毒素の免疫学的特異性と純度は特異抗 Ent 血清と抗粗毒素血清を用い，Ouchterlony<sup>79)</sup> のゲル沈により検討した。

$\alpha$  溶血毒の測定；  $\alpha$  溶血毒（以下  $\alpha$ -HL と略）活性は各フラクションの 5 ml を生理食塩水で 2 倍段階希釈し，おのおの 1% うさぎ血

球液を 0.5 ml 加え, 37 C, 1 時間反応後完全溶血を示す最高希釈倍数で表わした。

Ent の催吐活性; 各精製過程における Ent 画分をカニクイサル (Macaca irus, 体重 2kg) に経口投与または静脈内接種し, 嘔吐発現の有無により判定した。

催吐活性の中和試験; 最終標品 (5  $\mu$ g/ml) の 1.0 ml と対応する未希釈抗血清および他の型の抗血清 1.0 ml を各型別に混合し, 37 C, 3 時間反応させた。さらに 5C に一夜放置後, そのものをカニクイサルに静脈内接種して, 嘔吐発現の有無により抗血清による催吐活性の中和を判定した。

イオン交換体および Sephadex ゲル; 陽イオン交換体である Amberlite CG-50 type 1 (オルガノ製), CM セルロース (carboxymethyl cellulose, Brown. Co.) および CM-Sephadex C-25 (Pharmacia, particle size 40 ~ 120  $\mu$ ) は NaOH - HCl 処理後, リン酸緩衝液 (以下 PB と略) で平衡化した。陰イオン交換体である DEAE セルロース (diethyl-

aminoethyl cellulose, Brown. Co.) は HCl-NaOH 処理後, 0.05M グリシン-NaOH 緩衝液 (以下 GB と略), pH 9.5 で平衡化した。ゲル 3 過に用いた Sephadex G-50, 75 および 100 (Pharmacia, fine, particle size 40 ~ 120  $\mu$ ) は精製水で膨潤後, PB で平衡化した。

ゲル電気泳動; ポリアクリルアミド・ジスチルス電気泳動は 7.5% 濃度のポリアクリルアミドゲルを用い, pH 4.3 での泳動は Reisfeld ら<sup>85)</sup> の方法により  $\beta$ -アラニン酢酸緩衝液 (pH 4.3), pH 9.4 での泳動は Davis ら<sup>38)</sup> の方法により トリス-グリシン緩衝液 (pH 8.3) を用いて行った。

SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分子量測定は Weber と Osborn の方法<sup>118)</sup> に準じ, 既知分子量タンパク (non-enzymatic protein molecular weight markers, Schwarz/Mann, Orangeburg, N.Y.) を標準として測定した。

泳動後のゲルは 1% アミドシュワルツ 10 B (Me-

rock) - 1% 酢酸溶液で染色し, 7% 酢酸溶液と脱色装置 (Destainer, Pharmacia) を用い脱色した。

ゲル3過による分子量測定; Andrews<sup>3)</sup>の方法により上述の既知分子量のタンパクを標準として, Sephadex G-75 および 50 によるゲル3過で測定した。

Isoelectric focusing<sup>74)</sup>; 毒素の等電点分画は pH 3 ~ 10 および pH 6 ~ 8 の carrier ampholyte (LKB) と 0 ~ 50% のショ糖勾配を作成し, isoelectrofocusing apparatus (110 ml 用, LKB 社製) を用い, 4C, 300-900V, 48時間通電した。通電後, 1 ml ずつ分画し, 各画分につきタンパク量, Ent 含量, および pH 値 (20C) を測定した。

超遠心分析; 分析用超遠心器 (日立, 282 型) を用いて行なった。沈降定数 ( $S_{20,w}$ ) はシングルセルを用い, 2 試料の  $S_{20,w}$  を同時に測定する場合はマルチローターを用いシユリーレン光学系で測定した。また, 分子量は

1 ~ 3 % の精製毒素をマルチチャンネルセルを用い、沈降平衡法による干渉光学系により推定した。

アミノ酸分析； アミノ酸組成は110°C, 24 - 72時間、酸加水分解後アミノ酸分析器（日本電子, JCL-6AH）を用いて決定した。トリプトファン含量は加水分解しない試料を分光光度計を用いた方法<sup>50)</sup>で測定した。

核酸、炭水化物および脂質の検出法； 最終標品（1,000 µg/ml）にふくまれる核酸はOD<sub>260</sub>とOD<sub>280</sub>の比により推定し<sup>67)</sup>、炭水化物はAnthrrom反応<sup>95)</sup>、脂質はSudan black反応<sup>107)</sup>により分析した。

タンパク分解酵素による活性の変化； 最終標品（100 µg protein/ml）1 ml にトリプシン（Difco, 1:250）を0.1 ml 加え、37°C, 3時間反応させ、さらに5°Cに一夜放置した。その後、これをOuchterlonyのゲル沈およびOudin法により、その血清学的反応性の変化を検討した。

加熱による毒素活性の変化； 0.05Mリン酸緩衝生理食塩水， pH 7.2に溶解した各毒素溶液（Ent量：50  $\mu$ g/ml）の1 mlずつを小試験管に分注し，パラフィルムで密栓後，60 C，80 C，100 Cに調整した恒温槽中で5時間加熱処理した。各温度で15分，30分，1時間，2時間，3時間，4時間，5時間加熱処理した試料を，対応する抗血清加寒天をふくんだ3本のOudin tubeに0.3 mlずつ入れ，30 C，48時間反応後，沈降帯の長さを測定した。対照として，加熱しない試料を0.3 mlずつ5本のtubeに分注し，同様に処理した。

活性の変化は無加熱対照に対する加熱処理した試料の沈降帯移動度の減少率で表わした。

被検菌株のEnt型別法； 型別用抗原Entは以下のごとく調整した。100 mlの毒素産生地が入った500 mlコルベンに被検菌株の普通寒天平板培養菌を1白金耳接種し，Entの精製に際して用いた培養法に準じて48時間振と



う培養した。この培養液を 14,000 rpm, 20 分間遠心し, その上清を 50% カ-ボワツクス 20 M (polyethylen glycol 20,000 G) で原液の  $\frac{1}{50}$  に透析濃縮した。

Ent の型別は濃縮液を抗原として, 特異抗 Ent A ~ E 血清に対するスライドゲル沈により, 沈降線形成の有無を検討した。次いで, 沈降線を形成したものは, その型の抗血清と対応する精製毒素との反応で形成される沈降線と, 被検試料との間で形成される沈降線の融合を確認した上で Ent 型を決定した。

## 才三章 実験成績

### I. Ent の精製

#### 1. Ent A の精製

Step I : S. aureus 13 N-2909 の 48 時間培養後の遠心 (14,000 rpm) 上清 20 l に精製水を 80 l 加え, こ水をリン酸で pH 5.6 に補正した。

この中に  $0.005\text{ M PB}$ ,  $\text{pH } 5.6$  で平衡化した Amberlite CG-50 (乾燥重量  $80\text{ g}$ ) を加え, 室温で 2 時間穏かに攪拌し, Ent A をバッチ法で樹脂に吸着させた。次に, 樹脂を自然沈澱させ, 上清を吸引除去した。非特異的に樹脂に吸着した物質を除くため, ガラススリター上で約 2 $\ell$  の精製水で樹脂を洗浄した後, 樹脂をカラムにつめ, カラムクロマトグラフィーを行なった (Fig. 1)。溶出には  $0.5\text{ M NaCl}$  加  $0.5\text{ M PB}$ ,  $\text{pH } 6.2$  を用いた。この溶液で溶出する大きな画分はサルへの経口投与により催吐活性を示し, スライドゲル沈によっても Ent A を含有することが確認された。この過程による回収率は約 70% であった。

培養上清 20  $\ell$  ずつ 4 回, step I の操作を行なう。得た各 Ent 画分を集め, 精製水に透析して脱塩後, 限外 3 過膜 (Hollow Fiber, DC 2, Amicom) で約  $\frac{1}{20}$  量に濃縮した。

Step II : 濃縮した step I の画分を  $0.01\text{ M PB}$ ,  $\text{pH } 5.6$  に 48 時間透析後,  $\text{pH } 5.6$  に補正した。こ

小を同一緩衝液で平衡化したCMセルロースを支持体としたカラムクロマトグラフィーにより分画した。溶出は0.01M PB, pH 5.6, 0.07M PB, pH 6.8 および 0.2M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  の各溶液を用いた stepwise 法で行なった。その結果, Fig. 2 に示したごとく大部分のタンパクは0.07M PB, pH 6.8で溶出し, この画分はサルに対する催吐活性を示した。この操作過程における回収率は約60%であった。この画分を精製水に24時間透析後凍結乾燥した。

Step III: 0.05M PB, pH 6.5に溶解したstep IIの凍結乾燥試料をSephadex G-75によりゲル3過した。その結果, Fig. 3にみられるごとく試料は1つの大きなピークとそれに続く小さなピークの2画分に分画された。サルへの経口投与による催吐活性は前の大きな画分に存在し, この画分は特異抗Ent A血清および抗粗Ent A血清に対するOuchterlonyのゲル沈において, おのおの1本の沈降線を形成し, 小はreference Ent Aとその抗血清が形成する

沈降線と完全に融合した (Fig. 4)。この画分を最終標品とし、精製水に透析後凍結乾燥した。

以上の3過程により99%以上純化した精製毒素を380 mg得ることができ、全体の回収率は約36%であった。

## 2. Ent B の精製

Step I : *S. aureus* C-243 の24時間培養後の遠心上清 (3l) を Ent A と同様に処理して、Amberlite CG 50 カラムクロマトグラフィーを行った (Fig. 5)。スライドゲル沈で Ent B が確認された画分を集め、精製水に透析して脱塩した。

Step II : Step I の Ent 画分を 0.02M PB, pH 6.2 に透析後, pH 6.2 に補正した。これを同一緩衝液で平衡化した CM セルロースにより分画した。Fig. 6 にみられるごとく, Ent B は 0.02M PB, pH 6.2 と 0.07M PB, pH 6.2 とによる linear gradient elution により, 3画分に分画された。

こゝらの画分はそれぞれ画分で免疫した抗血清との Ouchterlony のゲル沈において、それぞれ単一の沈降線を形成し、それらは互いに融合した。さらに、それらの系における沈降線は reference Ent B とその抗血清が形成する沈降線とも完全に融合した (Fig. 7)。こゝらの3画分を集め、精製水に透析後凍結乾燥した。

Step III: 0.05M PB, pH 6.5 に溶解した step II の凍結乾燥試料は Sephadex G-100 のゲル3過により、1つの大きなピークを示した (Fig. 8)。この画分は抗粗 Ent B 血清に対する Ouchterlony のゲル沈で1本の沈降線を形成し、サルに対する催吐活性も有していた。この画分を最終標品として、精製水に透析後凍結乾燥した。

以上の3過程による回収率は約40%であった。

### 3. Ent C<sub>2</sub> の精製

Step I : *S. aureus* 493 の 24 時間培養後の遠心上清 (10 l) を Ent A と同様に処理して Amberlite CG 50 を用いたバッチ法により毒素を樹脂に吸着させた後、カラムクロマトグラフィーを行なった。Fig. 9 に示すごとく、Ent C<sub>2</sub> が確認された画分は同時に多量の  $\alpha$ -HL を含んでいた。この画分を集め精製水に透析して脱塩した。

Step II : Step I の画分を 0.03M PB, pH 5.6 に 24 時間透析後、pH 5.6 に補正した。これを同一緩衝液で平衡化した CM-Sephadex C-25 により分画した。溶出には 0.03M PB, pH 5.6 と 0.1M PB, pH 5.6 を用い、モル濃度の linear gradient elution により行なった。その結果、一つの大きな画分が溶出したが (Fig. 10)、抗粗 Ent C<sub>2</sub> 血清に対する Ouchterlony のゲル沈で分画番号 50 ~ 65 は 2 本、66 ~ 80 は 3 本の沈降線を形成した。また、いすれの画分も多量の  $\alpha$ -HL を含んでいた。分画番号 50 ~ 65 を集め、精製水に透析した。

Step III : Step II の画分を 0.05M GB, pH 9.5 に 24 時間透析後, pH 9.5 に補正した。こめを Ent と  $\alpha$ -HL の分別に適切な方法である DEAE セルロースクロマトグラフィーにより分画した。溶出は NaCl 無添加 GB, pH 9.5 と 0.3 M NaCl 加 GB, pH 9.5 とによる linear gradient elution によった。Fig. 11 に示すごとく,  $\alpha$ -HL は素通り画分に, Ent は 0.02~0.13 M NaCl 濃度で溶出する画分に存在した。Ent 画分を精製水に透析して脱塩後凍結乾燥した。

Step IV : 0.05M PB, pH 6.5 に溶解した step II の凍結乾燥試料は Sephadex G-75 のゲル 3 過により, 1 つの大きなピークを示した (Fig. 12)。この画分は抗粗 Ent C<sub>2</sub> 血清に対する Ouchterlony のゲル沈で 1 本の沈降線を形成し, サルに対する催吐活性も示した。この画分を最終標品として, 精製水に透析後凍結乾燥した。

以上 4 過程による回収率は約 10% であった。

#### 4. Ent D の精製

Step I : *S. aureus* 1151 の 48 時間培養後の遠心上清 (20 l) を Ent A ~ C と同様に処理して Amberlite CG50 クロマトグラフィーを行った (Fig. 13)。血清学的に Ent が確認された画分を集め、精製水に透析後、限外ろ過膜 (UM10, Amicom) で  $\frac{1}{10}$  量に濃縮した。

Step II : 濃縮した Ent 画分を Ent A と同様に処理して、CMセルロースを用いて分画した (Fig. 14)。Ent D は 0.07M PB, pH 6.8 で溶出したが、この画分は多量の  $\alpha$ -HL を含んでいた。

Step III : Step II の画分を精製水に透析後、さらに 0.05M GB, pH 9.5 に透析し、Ent C<sub>2</sub> と同様に DEAEセルロースによる Ent と  $\alpha$ -HL の分別を試みた。Fig. 15 にみらゆるごとく、 $\alpha$ -HL は素通り画分に、Ent D は 0.3M NaCl 加 GB, pH 9.5 で溶出した。この画分は  $\alpha$ -HL を含んでいたが、Ouchterlony のゲル沈において抗粗 Ent D 血清に対してなお 2 本の沈降線を形成した。



Step IV : Step III の画分を 0.05M GB, pH 9.5 に 48 時間透析して脱塩後, 再び同一緩衝液で平衡化した DEAE セルロースを用いて分画した (Fig. 16)。溶出は NaCl 無添加 GB, pH 9.5 と 0.3 M NaCl 加 GB, pH 9.5 を用いた食塩濃度の linear gradient elution により行った。Ent は 0.03~0.15 M NaCl で溶出したが, この画分は抗粗 Ent D 血清に対する Ouchterlony のゲル沈で 2 本の沈降線を形成した。この画分を精製水に透析後凍結乾燥した。

Step V : Step IV の凍結乾燥試料 (100 mg) を 0.05M PB, pH 6.5 に溶解後, Sephadex G-75 によりゲルろ過した。Fig. 17 にみらゆるごとく, 1 つの大きなピークを示し, この画分は Ouchterlony のゲル沈で 2 本の沈降線を形成し, この操作によっても夾雑物の除去はできなかつた。この画分を精製水に透析後凍結乾燥した。

Step VI : Step IV の凍結乾燥試料 (50 mg) を 6M 尿素加 0.05M PB, pH 6.8 に溶解し, 24 時間同

一緩衝液に透析した。こゝを同一緩衝液で平衡化した Sephadex G-75 によりゲルろ過した。その結果、3つの画分に分画されたが (Fig. 18), Ent D は前の2つの画分に、夾雑物は3つの画分に存在した。Ent 画分を精製水に透析後凍結乾燥した。

Step VII: Step IV の凍結乾燥試料 (100 mg) を pH 3 ~ 10 の carrier ampholyte を用いて, isoelectric focusing により分画した。Fig. 19 に示すごとく, Ent D は分画番号 48 ~ 90 に存在し, Ent およびタンパク含量のピークは pH 7.7 であつた。一方, 夾雑物は分画番号 50 ~ 100 に存在し, ピークは pH 9.0 であつた。Ent 画分を集め, 精製水に 72 時透析後凍結乾燥した。

Step V ~ VII の凍結乾燥試料を部分精製毒素として以後の実験に供した。

## 5. Ent E の精製

Step I: *S. aureus* FR1326 の 24 時間培養後の遠心上清 (20 l) を Ent A ~ D と同様に,

Amberlite CG 50 を用いて処理した ( Fig. 20 ) 。  
Ent 画分を集め、精製水に透析して脱塩した。

Step II : Step I の画分を Ent A と同様に  
CM セルロースを用いて分画した ( Fig. 21 ) 。  
0.07M PB, pH 6.8 で溶出する大きなタンパク画分  
は Ent E と多量の  $\alpha$ -HL を含んでいた。この画  
分を精製水に透析した。

Step III : 上記画分を Ent C<sub>2</sub> の step III と同  
様に処理して DEAE セルロースによる Ent と  $\alpha$ -  
HL の分別を計った ( Fig. 22 ) 。 Ent E は 0.3 M  
NaCl 加 GB, pH 9.5 で溶出し、一方、 $\alpha$ -HL は Ent  
C<sub>2</sub> および D の場合と同様に素通り画分に存在  
した。Ent 画分は抗粗 Ent E 血清に対する Ou-  
chterlony のゲル沈でなお3本の沈降線を形成  
した。

Step IV : Step II の Ent 画分を 0.05M GB, pH  
9.5 に透析して脱塩後、再び DEAE セルロースに  
より分画した ( Fig. 23 ) 。 NaCl 無添加 GB, pH  
9.5 と 0.3 M NaCl 加 GB, pH 9.5 とによる linear gradi-

ent elutionにより, Ent E は  $0.03 \sim 0.15M$  NaCl 濃度で溶出した。この画分は抗粗 Ent E 血清に対する Ouchterlony のゲル沈で1本の沈降線を形成し, かつ, 催吐活性を有していた。この画分を集め, 精製水に透析して脱塩後, 凍結乾燥した。

Step V: Step IV の凍結乾燥試料を  $0.05M$  PB, pH 6.5 に溶解後, Sephadex G-75 によりゲルろ過した (Fig. 24)。Ent E は大きな画分に存在し, サルに対する催吐活性を有し, 免疫学的にも単一であった。この画分を最終標品とし, 精製水に透析後凍結乾燥した。

以上の5段階による回収率は約5%と極めて低かった。

## II. Ent の免疫学的および物理化学的性状

### 1. 精製毒素の免疫学的特異性

各型の精製標品 ( $100 \mu g/ml$ ) は特異抗 Ent A ~ E 血清に対する Ouchterlony のゲル沈で,

対応する抗血清とのみ沈降線を形成し、異なった型の抗血清とは沈降線を形成しなかった (Fig. 25)。

また、催吐活性中和試験においても、各型の精製標品 (2.5  $\mu$ g / サル) の催吐活性は対応する抗血清によ、そのみ特異的に中和さゆ、サルは嘔吐を示さなかつた。これに対し、他の型の抗血清には中和さゆず、サルは接種後 1 ~ 2 時間で典型的な嘔吐を起した (Table 1)。

## 2. 精製毒素の物理化学的性状

凍結乾燥した精製毒素は雪のように白いつワツワツした綿アメ状の吸湿性の物質で水および塩類溶液に溶解性であった。

精製毒素は紫外部吸収スペクトルにおいて、277 nm に極大吸収、250 nm に極小吸収をもち、いずれも典型的な  $\lambda$  シンパラのパターンを呈し、285 nm 付近に肩を示した (Fig. 26)。

また、 $OD_{260}$  と  $OD_{280}$  の比は Ent A では 1.93、B

では 2.04,  $C_2$  では 2.67, D では 1.52, E では 1.51 であることから核酸の存在は否定された。さらに, 各毒素とも Anthrom および Sudan black 反応において陰性を示し, 炭水化物および脂質を含んでいないことが確認された。

Ent A および B のシユリ-レンパターンは各時間において左右対称であり, 分子の均一性を示し (Fig. 27, 28), その  $S_{20w}$  は 2.71 S, および 2.68 S であった。

Sephadex G-75 のゲルろ過法により Ent A の分子量は 26,000 (Fig. 29), Ent B は G-50 のゲルろ過により 29,000 と推定された。また, Ent  $C_2$ , D および E も G-50 のゲルろ過で Ent B と同様の位置に溶出し, その分子量も約 29,000 と推定された。Ent A (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) は 1% SDS と 0.1% 2ME (2-メルカプトエタノール) 処理後の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で 1本のバンドを形成し (Fig. 31), その分子量は 27,000 (Fig. 32), さらに, 部分比容を Schantzら<sup>94)</sup> が報告した 0.732 とした場合

合, 沈降平衡法により 30,000 と推定された。

Ent A, B および C<sub>2</sub> は isoelectrofocusing で血清学的に同一な, 異なった等電点 (pI) を示すいくつかの画分に分離された。すなわち, Ent A は pH 6.5, 7.0, 8.0 にピークを (Fig. 33), B は pH 7.62, 8.35, 8.70 に (Fig. 34), C<sub>2</sub> は pH 6 付近, 6.55, 6.70, 8 付近にピークを示した (Fig. 35)。最も多くの Ent 量を含んだ pH 値 - Ent A では 7.0, B では 8.35, C<sub>2</sub> では 6.70 - がその毒素の等電点と推定された。また, Ent D の等電点は 7.70 と推定された (Fig. 19)。

各毒素はトリプシン処理後も, その血清学的反応性の変化は認められず抵抗性であった。また, 部分精製 Ent D に含まれる夾雑物もトリプシンに消化されなかった。

Ent A のアミノ酸組成を Table 2 に示した。上記分子量測定から, その分子量を 27,800 としたとき, Ent A は 214 個のアミノ酸残基を含んでいることが示された。アミノ酸残基別

では比較的少量のリジン, アスパラギン酸, グルタミン酸およびチロシンを含んでいた。

### 3. Emt の heterogeneity

免疫学的にも単一で, 超遠心分析でも分子の均一性を示した精製 Emt A ~ C<sub>2</sub> および E は, pH 4.3 のディスク電気泳動で単一のバンドを形成したが, pH 9.4 の泳動では 2 ~ 4 本のバンドを形成するところが観察された (Fig. 36)。そこで, アルカリ側のディスク電気泳動における Emt の分離像が夾雑物の存在あるいは分子サイズの変化または荷電の差によるものか否かを検討した。

Emt A の pH 9.4 のディスク電気泳動後のゲルを 2mm 間隔に切断し, その切断ゲルを特異抗 Emt A と 1% special nobel agar (Difco) を等量混合した血清加寒天に埋没し, 単一拡散試験 (single diffusion test) を行なう。結果, Fig. 37 に示すごとく, バンドの濃淡に比例した沈降輪を形成した。次に, Emt A (5mg) を 1 ml の



0.05M PB, pH 6.5 と 0.05M GB, pH 9.5 に溶解し, 各溶液に 48 時間, 5C で透析後, 2 試料を同時に超遠心分析した結果, 2 つのシュリーレンパターンは各時間において左右対称, 同型であり (Fig. 38), その  $S_{20w}$  も差がなかった。さらに, Hedric-Smith 法<sup>55)</sup> を応用して 3 ~ 10% のゲル濃度における pH 9.4 のディスク電気泳動を行なった場合の  $E_{mt} A$  の 2 つのバンドの移動度を測定した。Fig. 39 に示すごとく, 2 つのバンドの各ゲル濃度 - 移動度直線は平行であった。

Isoelectrofocusing で得た  $E_{mt} A$  の pI 7.0 と 6.5 画分 (21 と 22) を pH 9.4 および 4.3 でディスク電気泳動を行なった結果, pH 9.4 の泳動では pI 7.0 は移動度の小さい濃いバンド, pI 6.5 は移動度の大きい薄いバンドに相当する位置に, それぞれ 1 本のバンドを形成し, 混合したものは 2 本のバンドを形成した。一方, pH 4.3 の泳動では, 各画分および混合したものは同一位置に 1 本のバンドを形成した (Fig. 40)。

#### 4. 加熱による毒素活性の変化

精製 Ent A ~ C<sub>2</sub> ( 50  $\mu$ g/ml ) および A ~ E の Amberlite CG 50 画分 ( 50  $\mu$ g/ml, 以下粗毒素と略 ) の 60, 80, 100 C 加熱による血清学的反応性の変化を Fig. 41 ~ 44 に示した。

精製 Ent A は 60 C, 3 時間で 50%, 5 時間で 60%, 80 C では 3 時間で 30%, 5 時間で 50%, 100 C では 1 時間で 35% 失活し, 2 時間で完全に失活した。一方, 粗毒素 A は 60 C では 1 時間で 50%, 5 時間で 80%, 80 C では 3 時間で 35%, 5 時間で 50%, 100 C では 1 時間で 50% 失活し, 2 時間で完全に失活した ( Fig. 41 )。

精製 Ent B と粗毒素 B の加熱による活性の変化を Fig. 42 に示した。精製毒素は 60 C では 1 時間で 10%, 5 時間で 20%, 80 C では 1 時間で 35%, 3 時間で 55%, 100 C では 10 分で 35%, 30 分で 70% 失活し, 80 C, 4 時間および 100 C, 1 時間で完全に失活した。粗毒素は 60

C では 1 時間で 30% , 3 時間で 40% , 5 時間で 50% , 80 C では 10 分で 50% , 2 時間で 80% , 100 C では 10 分で 53% , 30 分で 85% 失活し , 80 C , 4 時間および 100 C , 1 時間で完全に失活した。

精製  $\text{Emt C}_2$  も Fig. 43 にみうけるごとく , A および B の場合と同様に粗毒素より耐熱性であった。精製毒素は 60 C では 1 時間で 10% , 3 時間で 20% , 5 時間で 30% , 80 C では 1 時間で 10% , 3 時間で 12% , 5 時間で 25% , 100 C では 30 分で 25% , 2 時間で 50% 失活し , 100 C , 3 時間で完全に失活した。こゝに対し , 粗毒素は 60 C では 1 時間で 25% , 3 時間で 50% , 5 時間で 55% , 80 C では 1 時間で 20% , 3 時間で 30% , 5 時間で 50% , 100 C では 30 分で 35% , 1 時間で 60% , 2 時間で 90% 失活し , 100 C , 3 時間で完全に失活した。

粗毒素 D および E の加熱による活性の変化を Fig. 44 に対比して示した。粗毒素 D は 60 C では 1 時間で 30% , 2 時間で 50% , 5 時間で

80%, 80°Cでは1時間で20%, 3時間で30%, 5時間で70%, 100°Cでは10分で30%, 30分で70%失活し, 100°C, 1時間で完全に失活した。一方, 粗毒素 E は 60°Cでは1時間で10%, 5時間で30%, 80°Cでは30分で40%, 2時間で55%, 5時間で80%, 100°Cでは30分で50%失活し, 100°C, 1時間で完全に失活した。

Ent A, C<sub>2</sub>およびDは80°Cよりも60°Cで早く不活性化し, 60°C加熱により細菌の凝集反応に類似した分子の凝集様現象が観察された。そこで, 精製 Ent A (30 μg/ml) を 60°C, 1, 2, 3, 4, 5 時間加熱後の各試料を, 80°C, 40分再加熱した時の血清学的反応性の変化を検討した結果, Fig. 45 に示すごとく, 20-45%の活性の復元が認められた。また, 再加熱したものは60°Cでみられた凝集様現象が消失し, 透明を呈した。

Ⅲ. 食中毒, 健康人糞便, 鼻前庭, 調理人手指および市販食品由来細菌の Ent 産生能と

## その型別

疫学的および細菌学的に典型的なブ菌食中毒と診断された事例の原因食品から検出したブ菌の Ent 産生能およびその型別結果を Table 3 に示した。103 株のうち 95 株 (92.2%) が A ~ E の Ent を産生したが、8 株は Ent を検出、証明できなかった。こゝら陽性株のうち、Ent A 関連株 (A 単独株と他の型との混合株) が最も多く 64 株 (62.1%) であった。次に Ent C 関連株が 30% (29.1%)、Ent D 関連株が 22 株 (21.3%) で、Ent B を産生したものはわずか 6 株 (5.8%)、Ent E 産生株は 1 株のみであった。

市販食品、健康人鼻前庭および糞便、調理人手指から検出したブ菌 392 株の Ent 産生能およびその型別結果を Table 4 に示した。各種材料由来別ブ菌の Ent 産生株の割合は、鼻前庭由来株 66.7%、糞便由来株 69.4%、調理人手指由来株 70.8%、食品由来株 70.7% といす

小も高い陽性率を示し、全体では272株(69.4%)がEntを産生した。こゝろ産生株のEnt型別は栽培による顕著な差は認められなかった。全体的にはEnt C 関連株が169株(43.1%)で最も多く、次いで、Ent A 関連株が111株(28.3%)、Ent D 関連株が60株(15.3%)、Ent B および E 産生株は28株(7.1%)および2株であった。

食中毒と自然界由来株の結果を対比した場合、特徴的なことはEnt C 単独産生株が自然界由来Ent産生株では272株中109株(40.1%)と高率であるのに対し、食中毒由来株では96株中16株(16.8%)と低率であり、逆にEnt A 単独産生株は自然界由来株では44株(16.2%)であるが、食中毒由来株では39株(41.1%)と高率であったことである。また、食中毒および自然界由来Ent産生株とも混合型はA、C、Dのいづれか2つあるいは3つの組み合わせのもの(A・C、A・D、C・D、A・C・D)が多いが、Bとの混合のものは極めて少なく、

自然界由来株であつた10株，食中毒由来株では1株もなかつた。

## 才 IV 章 考 察

### I. Ent の精製について

Ent の精製を容易にするには比活性の高い粗標品を出発材料として用いることが重要で、そのためには高単位の Ent を産生し、Ent 以外のソシバウの産生の少ない菌株を選択することである。Ent の産生量は型により異なる<sup>87)</sup>、Ent B は至適条件では 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以上の毒素を産生するため、少量の培養上清から簡単な方法で多量の精製毒素を得ることが可能で、すでに全アミノ酸配列まで明らかにされて<sup>57-59)</sup>いる。これに対し、Ent A, D および E は 1~5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  あるいはそれ以下の産生量で、しかも分別困難な他の物質を多く産生するため、その精製は容易でなく、複雑な操作に

よる損失も大きく、絶収を多量に得ることは至難をきわめた。さしやえ、こゝらに関する研究は Ent B に比して極めて少なく、Ent D にいたってはその性状すら明らかでない。

著者ら<sup>109, 111)</sup>は Ent A の精製を Chu ら<sup>27)</sup>が用いた *S. aureus* 100 を用いて試みたが、この株の毒素産生量は  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  と少ないため、精製には多量の培養上清が必要で、しかも数回の精製操作によっても Ent 以外の夾雑物を除去することができず、収量も微量であった。今回、Ent A の精製に用いた菌株は  $10 \sim 15 \mu\text{g}/\text{ml}$  の毒素を産生し、しかも他の物質を産生しない変異株<sup>45)</sup>であるため、わづかる段階だけの簡単な操作で多量の精製毒素を得ることができた。同様な成績も Schantz ら<sup>94)</sup>、Robertson ら<sup>90)</sup>、品川ら<sup>99)</sup>により一部報告さしてゐる。こゝらの結果は用いる菌株の重要性を示すものであり、研究報告のほとんどない Ent D および E も産生のよい菌株の選択によつて精製が容易となり、その性状を明確にすることができ



よう。

他方, ジフテリヲ菌 PW 8 株は 0.5g/l に及ぶ毒素を産生するため<sup>8)</sup>, すでに活性フラグメントの単離とその作用機序が明らかである<sup>3)</sup>。この事実も, 用いる菌株の選択がタンパク毒素の精製および毒素学的研究に際して大きな比重を占めてゐることを物語るものであらう。

次に重要な課題は毒素の変性を生じない, 効率のよい精製法の開発であらう。Ent の精製法で最初に向題となるのは, 毒素産生量が少ないため精製に際して多量の培養上清が必要であることから, その中に含まれる Ent の濃縮である。

Ent の濃縮にはトリクロル酢酸, エタノールなどによる沈澱法<sup>7-8, 4)</sup> やカーボワックス 20 M 透析による方法<sup>3, 16-17, 27, 6)</sup> が用いられてゐたが, 前者は毒素の変性を生じ易く, 後者は多大な労力と時間を要する。そこで, 著者は培養上清中の Ent A ~ E の濃縮を Schantz ら<sup>9)</sup>

が開発した Amberlite CG 50 を用いた バッチ法により行なった結果, この操作による回収率は 60 ~ 75 % と高率であることを確認した。したがって, この方法は全々の Ent 精製のオ一段階に適用しうるものと確信する。また, Roberm ら<sup>89-90)</sup> は培養上清中の Ent A および C<sub>2</sub> の濃縮を QAE-Sephadex A-50, 品川ら<sup>91)</sup> は CM-Sephadex C-50 を用いたバッチ法により行ない, 高い成果を示している。このような結果も培養上清中の Ent の濃縮にイオン交換体を用いたバッチ法が適切な方法であることを裏づけるものがあるう。

Ent は濃縮後, 1~2 回の CMセルロースクロマトグラフィーおよび Sphadex のゲルろ過の組み合わせにより精製されるが, Ent のおおよかな等電点の差と各毒素の精製法を確立した研究者の違いによって操作法も異なる。ここに述べた CMセルロースクロマトグラフィーの結果は, 全々の Ent はその等電点の差に左右されることなく, 0.01M PB, pH 5.6 で吸着

し、 $0.07M$  PB, pH 6.8 で溶出さしめることを示すものであった。また、Sephadex によるゲルろ過はカーボワックスによる濃縮が用いられた場合には、塩地成分を除くために有効な方法であることが示さしめられている<sup>3, 16, 27)</sup>。これに対し、A ~ E の精製において得られたゲルろ過の成績は、バッチ法が用いられた場合には Schantz ら<sup>93-94)</sup>、品川ら<sup>99)</sup>、柴田ら<sup>99)</sup> の成績でも一部みられるごとく、ゲルろ過の顕著な有用性を示すものではないことがうかがわれた。

Ent の精製過程で最も大きな障害となったのは共同研究者である寺山<sup>109)</sup>、Igarashi<sup>61)</sup> が指摘しているごとく、Ent 産生のよい条件のもとで同時によく産生さしめる  $\alpha$ -HL の分別であった。著者は最初、Ent C<sub>2</sub> および E の精製を Avana ら<sup>3)</sup>、Borja ら<sup>17)</sup> の方法に従いがい試みたが、最終標品から完全に  $\alpha$ -HL を除去することはできなかった。そこで、著者は Ent C<sub>2</sub>, D, E の精製において、Igarashi<sup>61)</sup> が報告した  $\alpha$ -HL の分別に有効な方法である pH 9.5 での DEAEセルロ

ースクロマトグラフィーを応用した。その結果、 $E_{nt}$ 画分から $\alpha$ -HLを完全に除くことができ、このクロマトグラフィーの適切さを確認した。同様に、品川ら<sup>99)</sup>も $E_{nt}$  A, C<sub>2</sub>の精製で、 $\alpha$ -HLを除くのにこの方法が好適であることを追試確認している。

得られた精製 $E_{nt}$  A ~ C<sub>2</sub>およびEは免疫学的にも、物理化学的にも単一であり、また、いづれの毒素も催吐活性中和試験において、その免疫学的特異性が確認された。その結果、既知あるいは未知の $E_{nt}$ はFig. 46に示した操作法で精製可能であることが推定された。

また、 $\alpha$ -HL非産生株は1) Amberlite CG 50を用いたバッチ法による培養上清中の $E_{nt}$ の濃縮、2) CMセルロースクロマトグラフィー、3) Sephadexによるゲルろ過の3段階で、また、 $\alpha$ -HL産生株はこの過程にDEAEセルロースクロマトグラフィーを導入した4段階で精製可能である。この方法は、 $E_{nt}$  Aの精製をChung<sup>27)</sup>が5過程、Schamitzら<sup>94)</sup>が4過程で、 $E_{nt}$  Bの精

製を Bergdoll<sup>7)</sup> が 7 過程, Frea<sup>44)</sup> が 4 過程  
 で, Ent C<sub>1</sub> および E の精製を Borja<sup>5)</sup> が 5 過  
 程<sup>16)</sup> および 6 過程<sup>17)</sup> で, Ent C<sub>2</sub> の精製を Avena  
 ら<sup>3)</sup> が 4 過程で行なったのに比して, 操作は  
 より簡単で,  $\alpha$ -HL を完全に除去でき, しかも  
 能度が高いことが確認された。また, 脱塩,  
 濃縮および分子ふるい効果をかねた限外ろ過  
 膜を有用に駆使するならば, Sephadex のゲルろ  
 過の省略により, Ent はあすか 2 ~ 3 段階だ  
 けの操作で精製可能である。さらに, 得られた  
 毒素は毒素分子の構造と活性との関連およ  
 び毒素の作用機序解析などの研究に充分対応  
 できるものである。

著者もまた, Ent D を単離, 精製することは  
 できなかった。しかし, 等電点分画法およ  
 び尿素を用いたゲルろ過でも分画不可能なト  
 リアシン抵抗性のタンパク夾雑物は, ボツリ  
 スス毒素で毒性成分の安定化や保護物質とし  
 て重要な役割を果たしている無毒成分が明らか  
 にさ小していること<sup>91)</sup>, この物質と類似の

作用を有し、かつ全ての Ent D 産生株に共通のものであるか否かの検討は、毒素の精製とともに今後の極めて興味ある重要な研究課題であろう。

## II. 毒素性状について

ここに示した精製毒素の物理化学的性状に因する結果は、用いた精製法の適切さを如実に物語るものであった。また、Chu ら<sup>27)</sup>、Schamtz ら<sup>93)</sup>、Avena ら<sup>3)</sup>、Borja ら<sup>16-17)</sup>の成果との間におおむね差を認めるが、精製法の相違が Ent の物理化学的性状に及ぼす影響を説明しうる程の差ではないと考えられる。さらに、本食中毒で主役を演じている Ent A の物理化学的性状は他の型と顕著な差がないことが確認された。今後、この毒素の全アミノ酸配列および立体構造決定などのより進んだ毒素学的追求による検討が必要であろう。

今回の研究により、Ent の 2 つの特性を明

うかにし得た。あるいは、その一つは免疫学的に単一で、超遠心分析でも分子の均一性を示す精製毒素が、デンプン電気泳動<sup>4, 16, 66, 93)</sup>や isoelectrofocusing<sup>23, 25, 42, 75, 94, 105)</sup>により血清学的に同一で、しかも催吐活性を有するいくつかの画分に分画されると、この Ent の heterogeneity に関する知見であり、その2は加熱に対する A ~ E の毒素の安定性に関する評価である。

得られた精製毒素は isoelectrofocusing において、Ent A および B は3画分、C<sub>2</sub> は4画分に分画された。Isoelectrofocusing における Ent の heterogeneity は、すでに A では Schantz<sup>94)</sup>, Robert<sup>75)</sup>, B では Chang<sup>23)</sup>, Spero<sup>105)</sup>, Metzger<sup>25)</sup>, C<sub>2</sub> では Chang<sup>25)</sup>, Dickie<sup>42)</sup> が観察しており、彼らはこの現象が毒素分子を構成するアミノ酸残基の不安定なアミド基の加水分解 (deamidation) によるものであると論じている。しかしながら、著者は精製 Ent A ~ E が pH 9.4 のデンプン電気泳動において、血清学的に

同 - な 2 ~ 4 本のバンドを形成し、これが isoelectrofocusing の分画パターンと類似することを認められた。そこで、2 つの heterogeneity の関連性を精製 Ent A で検討した結果、pH 9.4 のディスク電気泳動の 2 本のバンドは、isoelectrofocusing の 2 つの大きな画分 (pI 6.5 と 7.0) に相当することを実証した。さらに、超遠心分析、Hedrick-Smith 法により、この現象が荷電の状態を異にする charge isomer に起因するであろうことを明らかにした。したがって、Ent の heterogeneity は毒素分子自体が charge isomer シンパルであるために生じるもので、全ての Ent に共通した一般的特性であろうと考える。そのゆえ、Ent B の CMセルロースフロマトグラフィーで観察された類似の現象 (Fig. 6, 7) を柴田<sup>97)</sup> が同 - 菌株、Chang<sup>24)</sup> が S-6 株から得た毒素でも一部認められていることから、この heterogeneity は菌株の差によるものでなく、Ent B 本来の性質に起因するものであることを強く示唆するものである。



一般的に、粗毒素は精製毒素より耐熱性であることが報告されてゐるが<sup>11)</sup>、ここで得られた成績は逆に、精製毒素は粗毒素より加熱熱に対して安定であった。

精製 Ent A は 60 C, 20 分で 50% 失活し, 100 C, 2 時間で完全に不活化した。この成績は Chu<sup>27)</sup> の報告とは著しい差を示すものであったが, Schantz<sup>94)</sup> の結果とはよく類似してゐた。また, 精製 Ent B および C<sub>2</sub> の結果は, Schantz<sup>93)</sup>, Avema<sup>3)</sup> の報告とあつかひな差を認めた。これらの差が何に起因するかは明らかでないが, Ent の耐熱性は毒素濃度, 溶媒などに左右されることが指摘されてお<sup>36, 41, 56, 60, 63, 83-84, 92)</sup>、この点の再検討も今後の重要な課題であらう。

粗毒素 A ~ C<sub>2</sub> の 80 および 100 C 処理による血清学的反応性の変化は, Denmy<sup>40)</sup>, Hilker<sup>56)</sup>, Humber<sup>60)</sup>, Fung<sup>47)</sup> が毒素を加熱後、サルヤネ<sup>2</sup>に投与して、嘔吐発現の有無により生物活性の変化を判定した成績とよく一

致してゐた。このことは、血清学的反応性が Ent の催吐活性の指標となり得ることを示すものであり、今後この反応性を利用することにより、各型の毒素の催吐活性についてより多くの知見を得ることが可能であると思われる。

粗毒素 A ~ E を用いた加熱処理実験の結果、同一濃度および溶媒を用いた条件下での Ent の各温度に対する安定性は毒素型によつてかなり異なることを初めて明らかにし得た。すなわち、80 および 100 C では Ent A および C<sub>2</sub> が最も安定であり、B および E は最も早く失活する傾向にあった。これに対し、60 C では B および E が最も安定で、次いで C<sub>2</sub>、D、A の順であった。このように、本食中毒の 90% 以上をしめる Ent A、C、D が高温で比較的安定であることは、食品微生物学および毒素学的に極めて興味ある事である。

さらに、本研究で明らかにされた熱処理による Ent の極めて特異的な現象は、Ent A、

C, D が 80 C より 60 で早く不活化し, しかも 60 C 加熱後, 80 C, 40 分の再加熱により 20 ~ 45 % の活性の復元が認められたことである。このような特異的な熱安定性は Ent B, E では認めなかった。一方, Jamlang さん<sup>63)</sup>, Satterlee さん<sup>92)</sup> は Ent B が 100 C より 70 または 80 C で早く不活化することとを, Fung さん<sup>49)</sup> は B および C<sub>1</sub> の加熱後の活性の復元を一部報告してゐる。Satterlee さんは, この現象は Ent と溶媒中の肉タンパクが結合して複合体を形成すること起因するものであるとしてゐる。しかしながら, 今回この特異的な熱安定性が粗毒素のみならず精製毒素においても認められたことは, この特性もまた毒素自体の性質であり, かつ食中毒予防対策に際して, この特性を考慮に入らざる必要性がある。

また, この特異的な熱安定性は, あでにブドウ球菌毒素<sup>2)</sup>, ウェルシエ菌ホスホリパーゼ C<sup>26, 102)</sup>, 腸炎ビブリオ溶血毒<sup>129)</sup> などのある種のタンパクでも認められており, 毒素活

性と構造との関係を解析するうえで重要視され、多大な成果を示している。それと同様に、Entのこの現象も温度差による立体構造の変化、すなわち、低温度（60℃）でのタンパク分子の集合（aggregation）と高温度（80℃）での再加熱による分子の解離（dissociation）によるものであるように思われる。

一方、タンパク毒素に関する物理学的、化学的、生物学的特性とその構造的特徴を関連づけることはタンパク化学的見地から極めて興味ある問題である。それゆえ、Entのheterogeneityと特異的な熱安定性という2つの特性を明らかにしたことは大きな意義を有していると言えよう。

### Ⅲ. 毒素産生菌の分布と本菌食中毒発生との関連について

菌食中毒が漸次増加の傾向にあることは、食品が高頻度に菌に汚染されていること

を意味するものである。また、自然界に広く分布する全てのブドウ菌が Ent 産生能を有し、食中毒の原因となりうるならば、生態系と食中毒で検出されるブドウ菌の Ent 産生能とその型には密接な関係があるはずであり、その検討はブドウ菌食中毒の予防対策に重要な手がかりを与える点で意義があるといえよう。

そこで、食中毒由来 103 株および自然界由来 392 株の Ent 産生能およびその型別を試みた。その結果、食中毒由来の Ent 産生株中 89 株 (93.7%) は Ent A, C, D のいずれかを産生し、そのうち 64 株 (71.9%) は A 関連株であった。このような傾向は 113 株中 88 株 (77.9%) が A を産生するという英国での Wiemeke<sup>(20)</sup> の報告、米国での Casman<sup>(19)</sup>、大阪での品川<sup>(9)</sup>、その他 Simcovicova<sup>(10)</sup>、Jarvis<sup>(6)</sup> の調査結果とよく一致した。また、103 株中 8 株は Ent を検出、証明できなかったが、これは A ~ E 以外の毒素を産生するか、あるいは産生量が少ないために証明されなかったものである。

う。

一方、食中毒と関係のない動物やヒト、食品由来菌の Ent 産生能およびその型別について、すでに Olsson<sup>78)</sup> および 加藤<sup>69)</sup> は乳房炎由来株の 27.8%、29% が Ent A ~ C のいずれかの毒素を産生することを報告している。また、加藤<sup>70)</sup> はドブネズミ由来株の 6.3%、Hallander<sup>54)</sup>、Wiemeke<sup>120)</sup>、Zaks<sup>124)</sup> はヒト臨床由来株の 38.3%、43.0%、73.6% が Ent 産生能を有し、さらに、Wiemeke<sup>120)</sup> および Payne<sup>82)</sup> は食品由来株の 24.6%、62.5% が A ~ E のいずれかの毒素を産生することを確認している。これらに比して、著者らの成績はいずれの由来株も高率 (66.7~70.8%) に Ent を産生した。この差は検出法の相違によるものであろうと考えられるが、いずれの報告においても自然界由来株は Ent C 産生株が多いことは一致していた。

自然界および食中毒由来 Ent 産生株の毒素型別は、Simcovicova<sup>101)</sup>、Gilbert<sup>48-49)</sup>、Wien-

eke<sup>120)</sup>, Payne ら<sup>82)</sup>, Casman ら<sup>19)</sup> の報告と同様に必ずしも同一でなく, その関連性は確認できなかった。現在までに, この矛盾を説明するにこのでる確証はほとんど得られまいが, この肉題を解決する可能性を秘めた報告もある。例えば, Troller<sup>115-116)</sup> は Ent A と B の産生が食品の水分活性の差によって著しく異なることを示唆し, Silverman ら<sup>72-73)</sup> は Ent A と B の毒素産生代謝機構の相違を指摘している。また, Spero ら<sup>104)</sup> は Ent A ~ C をトリブリン処理した場合, B および C はそのポリプロテド鎖にキ裂を来たし, "nicked molecules" を生じるが, A は全く抵抗性であるという興味深い結果を示した。さらに, 著者は Ent A, C, D が高湿度で比較的安定で, かつ特徴的な熱安定性を有することを確認した。このような結果は, 細菌食中毒の実態を考慮に入れらるならば, 極めて重要な意味を含んでいるといえよう。また, 無毒のジフテリウム菌がテンプレートターゲにより毒素産生能を獲得す

ることが示さ小ていゝることく<sup>125)</sup>、自然界由来の非 Ent 産生株が毒素産生を獲得するか否かの細菌遺伝学追求も、興味ある今後の研究課題であるう。

他方、Gilbert ら<sup>48)</sup> はブ菌食中毒の原因食品 9 検体のブ菌量は  $7.5 \times 10^5 \sim 9 \times 10^9$  /g であるが、Ent 量は  $0.02 \sim 0.09 \mu\text{g/g}$  と少量であったことを報告してゐる。彼らの成績は  $1 \mu\text{g}$  以下の Ent を検出できる方法で、こゝら問題を追求し、ブ菌食中毒の実態の正確な把握と解析を試みる必要性があることを示唆するものである。この意味から、Ent の精製法の確立と特異性の高い抗血清の作成は重要な意義を持つてゐるといゝえよう。

## オ V 章 結 論

1) Staphylococcus aureus 13 N-2909 (Ent A), C-243 (Ent B), 493 (Ent C<sub>2</sub>), 1151 (Ent D), FR I326 (Ent E) を用いて、



4% NZ-amime 培地培養上清を出発材料として Ent の精製を試み以下の成績を得た。

Ent A および B は Amberlite CG 50, CM セルロースクロマトグラフィーと Sephadex のゲルろ過の組み合わせにより, Ent C<sub>2</sub> と E はこのろ過程に DEAE セルロースクロマトグラフィーを導入することにより免疫学的および物理化学的に単一な標品を得ることができた。しかし, Ent D はこの組み合わせのほか、等電点分画および尿素を用いた Sephadex のゲルろ過によっても, Ent 以外のタンパク質雑物を除去できなかった。

A ~ E の最終標品のサルに対する催吐活性は対応する抗血清によつてのみ特異的に中和さし、異なる型の抗血清には中和さし、各標品の免疫学的特異性が確認さした。

したがつて、得られた Ent A ~ C<sub>2</sub> および E はより高度に純化さした精製 Ent であると結論さし。また, Ent は Fig. 46 に示した同一操作法によつて精製可能であることが推定さ

した。

2) 得られた精製毒素の物理化学的性状を検討し、次の成績を得た。

Ent A ~ E は 277 nm に極大吸収、250 nm に極小吸収をもつ典型的なタンパクの吸収スペクトルを呈し、核酸、炭水化物、脂質を含まなかった。また、各毒素ともトリプシンに対して抵抗性であった。

Ent A と B のシユリ-レンパターンは各時間において左右対称を呈し、その  $S_{20w}$  は 2.71 S, 2.68 S であった。Ent A の分子量は Sephadex のゲル3過法で 26,000, SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で 29,000, 沈降平衡法で 30,000 と推定された。Ent B ~ E の分子量は Sephadex のゲル3過法で約 29,000 と推定された。Isoelectrofocusing により、Ent A と B は3画分、Ent C<sub>2</sub> は4画分に分画された。各毒素の等電点は、A では 7.0, B では 8.35, C では 6.70, D では 7.70 と推定された。

各毒素は pH 4.3 のゲル電気泳動では単一

18 バンドを形成し、一方、pH 9.4 の泳動では複数のバンドを形成した。また、この複数のバンドは血清学的に同一で、しかも isoelectrofocusing で得られた画分に相当することが確認され、さらにこれが charge の差によって生ずる charge isomer であることを明らかにした。

Ent A は 214 個のアミノ酸残基から構成されることが推察された。

以上の結果から、Ent は分子量 26,000 ~ 30,000、沈降定数 ( $S_{20w}$ ) 2.7S 前後のいくつかの異なる等電点を有するトリプシン抵抗性の charge isomer の混合物であると結論される。また、Ent D は他の型の毒素と同様の物理化学的性状を有するものであることが初めて明らかにされた。

3) 60, 80, 100C, 各 5 時間の加熱に対する精製 Ent A ~ C<sub>2</sub> および粗毒素 A ~ E の安定性を血清学的反応性を指標として検討した結果、以下の成績を得た。

精製 Ent A は 60C, 3 時間, 80C, 5 時間

, 100C, 1.25 時間で 50% 失活し, 100C, 2 時間で完全に失活した。粗 Ent A は 60C および 100C, 1 時間, 80C, 5 時間で 50% 失活し, 100C, 2 時間で完全に失活した。

精製 Ent B は 60C, 5 時間で 20%, 80C, 3 時間および 100C, 20 分で 50% 失活し, 80C, 4 時間および 100C, 1 時間で完全に失活した。粗 Ent B は 60C, 5 時間, 80C および 100C, 10 分で 50% 失活し, 80C, 4 時間および 100C, 1 時間で完全に失活した。

精製 Ent C<sub>2</sub> は 60 および 80C, 5 時間で 25 ~ 30% 失活, 100C, 2 時間で 50% 失活し, 100C, 3 時間で完全に失活した。粗 Ent C<sub>2</sub> は 60 および 80C, 4 時間, 100C, 50 分で 50% 失活し, 100C, 3 時間で完全に失活した。

粗 Ent D は 60C, 2 時間, 80C, 4 時間, 100C, 20 分で 50% 失活し, 100C, 1 時間で完全に失活した。

粗 Ent E は 60C, 5 時間で 30%, 80C, 1.5 時間, 100C, 30 分で 50% 失活し, 100C, 1 時

間で完全に失活した。

また、60℃加熱後の精製 Ent A は 80℃再加熱により、20～45%の活性の復元が確認された。

以上の成績から、精製毒素は粗毒素よりも耐熱性であり、各毒素の加熱に対する安定性は毒素型によって異なると結論される。また、Ent A, C, D が高温で比較的安定であること、およびこの毒素の特異的な安定性、すなわち 80℃より 60℃で早く不活性化し、再加熱により活性の復元が認められることが注目された。

4) 食中毒、健康成人糞便および鼻前庭、調理人手指および市販食品由来細菌の Ent 産生能と型別を試み、以下の成績を得た。

食中毒由来 103 株の産生 Ent 型は A 型 39 株、C 型 16 株、A・C 型 11 株、A・D 型 11 株、D 型 9 株、B 型 6 株、A・C・D 型 2 株、A・C・E 型 1 株および不明なもの 8 株であった。

自然界由来 392 株のうち 272 株 (69.4%) が

Ent 産生株であり、その産生 Ent 型は C 型 88 株、A 型 59 株、A・C 型 21 株、D 型 20 株、A・D 型 18 株、B 型 16 株、C・D および A・C・D 型 各 8 株、B・C および B・D 型 各 3 株、A・B および A・B・D 型 各 2 株、C・E および A・C・E 型 各 1 株であった。

したがって、食中毒由来株は Ent A 産生株、自然界由来は各種材料とも Ent C 産生株が主体であり、食中毒と生態系の細菌の Ent 型別分布は必ずしも同一でない結論される。

終りに臨み、終始御懇篤なる御指導と御板閲を賜わった東京都立衛生研究所微生物部長 養壽 浩博士に深甚の謝意を表します。

## 参考文献

- 1) Andrews, P. (1964) : Biochem. J., 91, 222-232.
- 2) Arrhenius, S. (1907) : Immunochemistry, The Macmillan Co., New York.
- 3) Avena, R. M. and Bergdoll, M. S. (1967) : Biochem., 6, 1474-1480.
- 4) Baird-Parker, A. C. and Joseph, R. L. (1964) : Nature (London), 202, 570-571.
- 5) 辺野喜正夫, 善養寺浩 (1972) : 新細菌性食中毒, 東京, 南山堂.
- 6) Bergdoll, M. S., Surgalla, M. J. and Dack, G. M. (1959) : J. Immunol., 83, 334-338.
- 7) Bergdoll, M. S., Sugiyama, H. and Dack, G. M. (1959) : Arch. Biochem. Biophys., 85, 62-69.
- 8) Bergdoll, M. S., Sugiyama, H. and Dack, G. M. (1961) : J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng., 3, 4-50.
- 9) Bergdoll, M. S., Borja, C. R. and Avena, R. M. (1965) : J. Bacteriol., 90, 1481-1485.
- 10) Bergdoll, M. S., Borja, C. R., Robbins, R. N. and Weiss, K. F.

- (1971) : *Infect. Immun.*, 4, 593-595.
- 11) Bergdoll, M. S., 坂口玄二 (1972) : 村田良介, 逢坂昭, 大橋誠編, シンパル毒素, 上, 370-391頁, 東京, 講談者サイエンス.
- 12) Bergdoll, M. S., Robbins, R. N., Weiss, K. F., Borja, C. R., Hung, I-Y. and Chu, F. S. (1972) : Editor; J. Teljaszewicz, *Staphylococci and Staphylococcal Infection*, p390-396, Polish Medical Publishers.
- 13) Bergdoll, M. S. and Robbins, R. N. (1973) : *J. Milk Food Technol.*, 36, 610-613.
- 14) Bergdoll, M. S., Hung, I-Y. and Schantz, E. J. (1974) : *J. Agr. Food Chem.*, 22, 9-13.
- 15) Blair, J. E. and Williams, R. E. (1961) : *Bull. W. H. O.*, 24, 771-780.
- 16) Borja, C. R. and Bergdoll, M. S. (1967) : *Biochem.*, 6, 1467-1473.
- 17) Borja, C. R., Fanning, E., Hung, I-Y. and Bergdoll, M. S. (1972) : *J. Biol. Chem.*, 247, 2456-2463.
- 18) Bukovic, J. A. and Johnson, H. M. (1975) : *Appl. Microbiol.*, 30, 700-701.



- 11) Casman, E. P. ( 1958 ) : Publ. Hlth. Rep., 73, 599-605.
- 20) Casman, E. P. ( 1960 ) : J. Bacteriol., 79, 849-856.
- 21) Casman, E. P. and Bennett, R. W. ( 1965 ) : Appl. Microb., 13, 181-189.
- 22) Casman, E. P., Bennett, R. W., Dorsey, A. E. and Issa, J. A. ( 1967 ) : J. Bacteriol., 94, 1875-1882.
- 23) Chang, P-C. and Dickie, N. ( 1971 ) : Biochem. Biophys. Acta., 236, 367-375.
- 24) Chang, P-C., Dickie, N. and Thatcher, F. S. ( 1971 ) : Can. J. Microbiol., 17, 296-297.
- 25) Chang, P-C., Yano, Y., Dighton, M. and Dickie, N. ( 1971 ) : Can. J. Microbiol., 17, 1367-1372.
- 26) Chu, H. P. ( 1949 ) : J. Gen. Microbiol., 3, 255-273.
- 27) Chu, F. S., Thadhani, K., Schantz, E. J. and Bergdoll, M. S. ( 1966 ) : Biochem., 5, 3281-3289.
- 28) Chu, F. S. ( 1968 ) : J. Biol. Chem., 243, 4342-4349.
- 29) Chu, F. S. and Bergdoll, M. S. ( 1969 ) : Biochem. Biophys. acta., 194, 279-286.
- 30) Chu, F. S., Crary, E. and Bergdoll, M. S. ( 1969 ) : Biochem., 8, 2890-2896.

- 31) Collier, R. J. and Cole, H. A. (1969) : Science, 164, 1179 - 1190.
- 32) Collins-Thompson, D. L., Aris, B. and Hurst, A. (1973) : Can. J. Microbiol., 19, 1197 - 1201.
- 33) Collins-Thompson, D. L., Hurst, A. and Kruse, H. (1973) : Can. J. Microbiol., 19, 1463 - 1471.
- 34) Collins, W. S., Johnson, A. D., Metzger, J. F. and Bennett, R. W. (1973) : Appl. Microbiol., 25, 774 - 777.
- 35) Dack, G. M., Cary, W. E., Woolpert, O. and Wiggers, H. J. (1930) : J. Prevent. Med., 4, 167 - 174.
- 36) Dack, G. M. and Surgalla, M. J. (1953) : Food Technol., 8, 307 - 317.
- 37) Dalidowicz, J. E., Silverman, S. J., Schantz, E. J., Stefaney, D. and Spero, L. (1966) : Biochem., 5, 2375 - 2381.
- 38) Davis, B. J. (1964) : Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, 404 - 427.
- 39) Denny, C. B. and Bohrer, C. W. (1963) : J. Bacteriol., 86, 347 - 350.
- 40) Denny, C. B., Tan, P. L. and Bohrer, C. W. (1966) : J. Food Sci., 31, 762 - 767.
- 41) Denny, C. B., Humber, J. Y. and Bohrer, C. W. (1971) :

- Appl. Microbiol., 21, 1064-1066.
- 42) Dickie, N., Yano, Y., Robern, H. and Starric, S. (1972)  
: Can. J. Microbiol., 18, 801-804.
- 43) Donnelly, C. B., Leslie, J. E., Black, L. A. and Lewis,  
K. H. (1967) : Appl. Microbiol., 15, 1382-1386.
- 44) Frea, J. I., McCoy, E. and Strong, F. M. (1963) :  
J. Bacteriol., 86, 1308-1313.
- 45) Friedman, M. E. and Howard, M. B. (1965) : J. Bacteri-  
ol., 106, 289-291.
- 46) Fung, D. Y. C. and Wagner, J. (1971) : Appl. Microbiol.,  
21, 559-561.
- 47) Fung, D. Y. C., Steinberg, D. H., Miller, R. D., Kurantrick, M. J.  
and Murphy, T. F. (1973) : Appl. Microbiol., 26, 938-942.
- 48) Gilbert, R. J., Wieneke, A. A., Lanser, J. and Simkovicova,  
M. (1972) : J. Hyg. Camb., 70, 755-762.
- 49) Gilbert, R. J., (1974) : Postgraduate Med. J., 50, 603-611.
- 50) Goodwin, T. and Morton, R. A. (1946) : Biochem. J. 40, 628.
- 51) Haines, W. C. and Harmon, L. G. (1973) : Appl. Microbiol.,  
25, 436-441.
- 52) Hájek, V. and Maršálek, E. (1973) : Zentralblatt für

- Bacteriologie , Parasiten Kunde, Infections Krankheit  
und Hygiene. I. Abt. : Orig., 223, 63-70.
- 53) Hallander, H. O. (1966) : Acta. Path. et Microbiol.  
Scandinav., 67, 117-132.
- 54) Hallander, H. O. and Kövlof. B. (1967) : Acta. Path.  
Microbiol. Scand., 71, 359-375.
- 55) Hedrick, J. L. and Smith. A. J. (1968) : Arch. Biochem.  
Biophys., 126, 155-164.
- 56) Hilker, J. S., Heilman, W. R., Tan, P. L., Denney, C.  
B. and Bohrer, C. W. (1968) : Appl. Microbiol., 16, 308-310.
- 57) Hung, I-Y. and Bergdoll, M. S. (1970) : J. Biol.  
Chem., 245, 3493-3510.
- 58) Hung, I-Y. and Bergdoll, M. S. (1970) : J. Biol.  
Chem., 245, 3511-3517.
- 59) Hung, I-Y. and Bergdoll, M. S. (1970) : J. Biol.  
chem., 245, 3518-3525.
- 60) Humber, J. Y., Denney, C. B. and Bohrer, C. W. (1975) :  
Appl. Microbiol., 30, 755-758.
- 61) Igarashi, H. (1972) : Jap. J. Microbiol., 16, 483-491.
- 62) Jaenicke, R. (1967) : J. Polymer Sci., Part C, 16, 2143-2160.

- 63) Jamlang, E. M., Bartlett, M. L. and Snyder, H. E.  
(1971) : Appl. Microbiol., 22, 1034-1040.
- 64) Jarvis, A. W. and Lawrence, R. C. (1970) : New Zealand Med. J. 72, 328-335.
- 65) Johnson, H. M., Bukovic, J. A. and Kauffmann, P. E.  
(1973) : Appl. Microbiol., 26, 309-313.
- 66) Joseph, R. L. and Baird-Parker, A. C. (1965) :  
Nature (London), 207, 663-664.
- 67) Kalckar, H. M. (1941) : J. Biol. Chem., 137, 575-585.
- 68) Kato, E., Khan, M., Kuvovich, L. and Bergdoll, M. S.  
(1969) : Appl. Microbiol., 14, 966-971.
- 69) 加藤英一, 浜田輔一, 久米常夫, 村瀬信雄 (1974)  
: 第77回日本獣医学会.
- 70) 加藤英一, 湯村嘉子, 浜田輔一, 森實, 高橋孝則,  
尾上洋一, 高橋武夫 (1973) : 第75回日本獣医学会.
- 71) Lowry, O. H., Rosenbrought, W. J., Farr, A. L. and  
Randall, R. J. (1951) : J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- 72) Markus, Z. H. and Silverman, G. J. (1960) : J. Bact-  
eriol., 97, 506-512.
- 73) Markus, Z. H. and Silverman, G. J. (1970) : Appl.

- Microbiol., 20, 492-496.
- 74) 松尾雄志, 塚尾武 - (1967) : 蛋白·核酸·  
酵素, 12, 737-747.
- 75) Metzger, J. F., Johnson, A. D. and Collins II, W. S.  
(1972) : Biochim. Biophys. Acta., 257, 183-186.
- 76) Metzger, J. F., Johnson, A. D., Collins II, W. S.  
and McGann, V. (1973) : Appl. Microbiol., 25, 770-773.
- 77) Metzger, J. F., Johnson, A. D. and Spero, L. (1975)  
: Infect. Immun., 12, 93-97.
- 78) Olson, J. C., Casman, E. P., Baer, E. F. and Stone,  
J. E. (1970) : Appl. Microbiol., 20, 605-607.
- 79) Ouchterlony, Ö. (1949) : Acta. Path. Microbiol.  
Scand., 26, 507-515.
- 80) Oudin, J. (1952) : Methods Med. Res., 5, 335-378.
- 81) Parker, W. H. and Williams, A. W. (1896) : J.  
Expt. Med. 1, 164-174.
- 82) Payne, D. N. and Wood, J. M. (1974) : J. Appl. Bact., 37,  
319-325.
- 83) Read, R. B. and Bradshaw, J. G. (1966) : Appl. Micro-  
biol., 14, 130-132.

- 84) Read, R. B. and Bradshaw, J. G. (1966) : J. Dairy Sci., 49, 202-203.
- 85) Reisfeld, R. A., Lewis, U. J. and Williams, D. E. (1962) : Nature (London), 195, 281-288.
- 86) Robbins, R., Gould, S. and Bergdoll, M. S. (1974) : Appl. Microbiol., 28, 946-950.
- 87) Robern, H., Stavric, S. and Dickie, N. (1974) : Experientia, 15, 1087-1089.
- 88) Robern, H., Dighton, M., Yano, Y. and Dickie, N. (1975) : Appl. Microbiol., 30, 525-529.
- 89) Robern, H., Stavric, S. and Dickie, N. (1975) : Biochim. Biophys. Acta., 393, 148-158.
- 90) Robern, H., Stavric, S. and Dickie, N. (1975) : Biochim. Biophys. Acta., 393, 159-164.
- 91) Sakaguchi, G., Ohishi, I., Kozaki, S., Sakaguchi, S. and Kitamura, M. (1974) : Jap. J. Med. Sci. Biol. 27, 95-99.
- 92) Satterlee, L. D. and Kraft, A. A. (1969) : Appl. Microbiol., 17, 906-909.
- 93) Schantz, E. J., Roessler, W. G., Wagman, J., Spero,

- L., Dummery, D. A. and Bergdoll, M. S. (1965) :  
Biochem., 4, 1011-1016.
- 94) Schantz, E. J., Roessler, W. G., Woodburn, M. J.,  
Lynch, J. M., Jacoby, H. M., Silverman, S. J., Gorman,  
J. C. and Spero, L. (1972) : Biochem., 11, 360-366
- 95) Scott, T. A. and Melvin, E. H. (1953) : Anal. Chem.,  
25, 1656-1661.
- 96) Shambaugh III, G. E. and Blumenschen, G. R. (1974) :  
Infect. Immun., 9, 384-390.
- 97) 柴田芳美, 金鉄三郎, 高山和子, 森田盛  
大, 藤宮芳章, 天野保二, 石田夜香雄  
(1974) : 秋田県微生物科学研究年報, 18, 61-66.
- 98) 坂川邦汎 (1974) : 日細菌誌, 29, 336-344.
- 99) 坂川邦汎, 国田信治, 阪口玄二 (1975) :  
日細菌誌, 30, 683-692.
- 100) Silverman, S. J., Knoff, A. R. and Howard, M. (1968) :  
Appl. Microbiol., 16, 1019-1023.
- 101) Simkovicova, S. J. and Gilbert, R. J. (1971) : J. Med.  
Microbiol., 4, 19-30.
- 102) Smith, L. D. and Gardner, M. V. (1949) : Arch.



- Biochem., 25, 54-60.
- 103) Spero, L., Jacoby, H. M., Dalidwicz, J. E. and Silverman, S. J. (1971): Biochim. Biophys. Acta., 251, 345-354.
- 104) Spero, L., Warren, J. R. and Metzger, J. F. (1973): J. Biol. Chem., 248, 7289-7294.
- 105) Spero, L., Warren, J. R. and Metzger, J. F. (1974): Biochim. Biophys. Acta., 336, 79-85.
- 106) Surgalla, M. J., Bergdoll, M. S. and Dack, G. M. (1953): J. Lab. Clin. Med., 41, 782-790.
- 107) Swahn, B. (1952): Scand. J. Clin. Lab. Invest., 4, 98-103.
- 108) 寺山武, 五十嵐英夫, 潮田弘, 坂井真紀, 善養寺浩 (1970): 日細菌誌, 25, 200-201.
- 109) 寺山武 (1971): 日細菌誌, 26, 611-622.
- 110) 寺山武, 五十嵐英夫, 潮田弘, 善養寺浩 (1972): 食衛誌, 13, 549-554.
- 111) 寺山武, 五十嵐英夫, 潮田弘, 善養寺浩 (1973): 日細菌誌, 28, 276.
- 112) 寺山武 (1974): 日細菌誌, 29, 329-335.
- 113) 寺山武, 山田澄夫, 五十嵐英夫, 潮田弘,

- 善養寺浩 (1974) : 都立紀研研究年報,  
25, 9-15.
- 114) 寺山武, 山田澄夫, 五十嵐英夫, 船葉美  
佐子, 潮田弘, 坂井千三, 善養寺浩.  
投稿中.
- 115) Troller, J. A. (1971): Appl. Microbiol., 21, 435-439.
- 116) Troller, J. A. (1972): Appl. Microbiol., 24, 440-443.
- 117) Warren, J. R., Spero, L. and Metzger, J. F. (1974)  
: Biochim. Biophys. Acta., 359, 351-363.
- 118) Weber, K. and Osborn, M. (1969): J. Biol. Chem., 244,  
4406-4412.
- 119) Weirether, J., Lewis, E. E. Rosenwald, A. J. and  
Lincoln, R. E. (1966): Appl. Microbiol., 14, 284-291.
- 120) Wiemeke, A. A. (1974): J. Hyg. Camb., 73, 255-262.
- 121) Yotis, W. W., Catsimpools, N., Bergdoll, M. S. and Schantz,  
E. J. (1974): Infect. Immun., 9, 974-976.
- 122) 山田澄夫, 五十嵐英夫, 寺山武 (1976) :  
日細菌誌, 31, 409-419.
- 123) Yamada, S., Igarashi, H. and Terayama, T. (1976) :  
投稿中

- 124) Zak, C., Jeljaszewicz, J. and Stochmal. I (1972) :  
Editor ; J. Jeljaszewicz , Staphylococci and Staphylococcal  
Infection , p 526 - 528 , Polish Medical Publishers.
- 125) Zabriskie, J. B. (1970) : Microbiol Toxins (ed, S. J.  
Ajl et al ), Vol. 1, p 213 . Academic.
- 126) Zen-Yoji, H., Terayama, T., Bemoki, M. and Kuwa-  
hara, S. (1961) : Jap. J. Microbiol., 5, 237-247.
- 127) Zen-Yoji, H., Terayama, T., Bemoki, M. and Kawahara,  
S. (1961) : Jap. J. Microbiol., 5, 367-374.
- 128) Zen-Yoji, H., Terayama, T., Bemoki, M. and Kuwa-  
hara, S. (1962) : Jap. J. Microbiol., 6, 59-68.
- 129) Zen-Yoji, H., Kudoh, Y., Igarashi, H., Ohta, K.,  
Fukai, K. and Hoshimo, T. (1975) : In Proceedings  
of the First International Congress of IAMS, Edited  
by Hasegawa, T., 4, p263, Science Council of Japan.

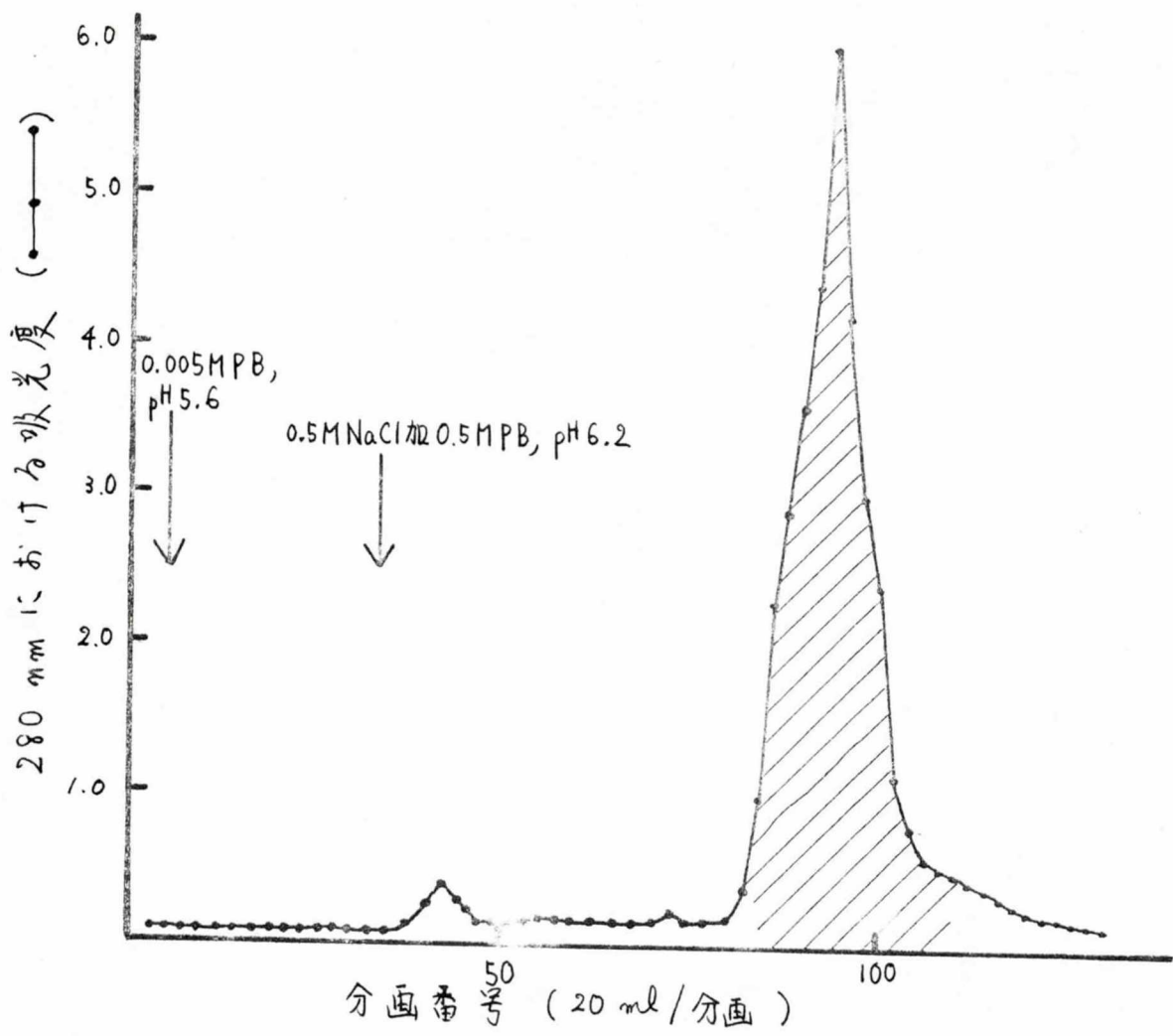


図1. インテロトキシンAのAmberlite CG-50クロマトグラフィー  
 カラムサイズ, 2.5×45cm; 流速, 70 ml/時間;  
 // // // //, インテロトキシン画分.

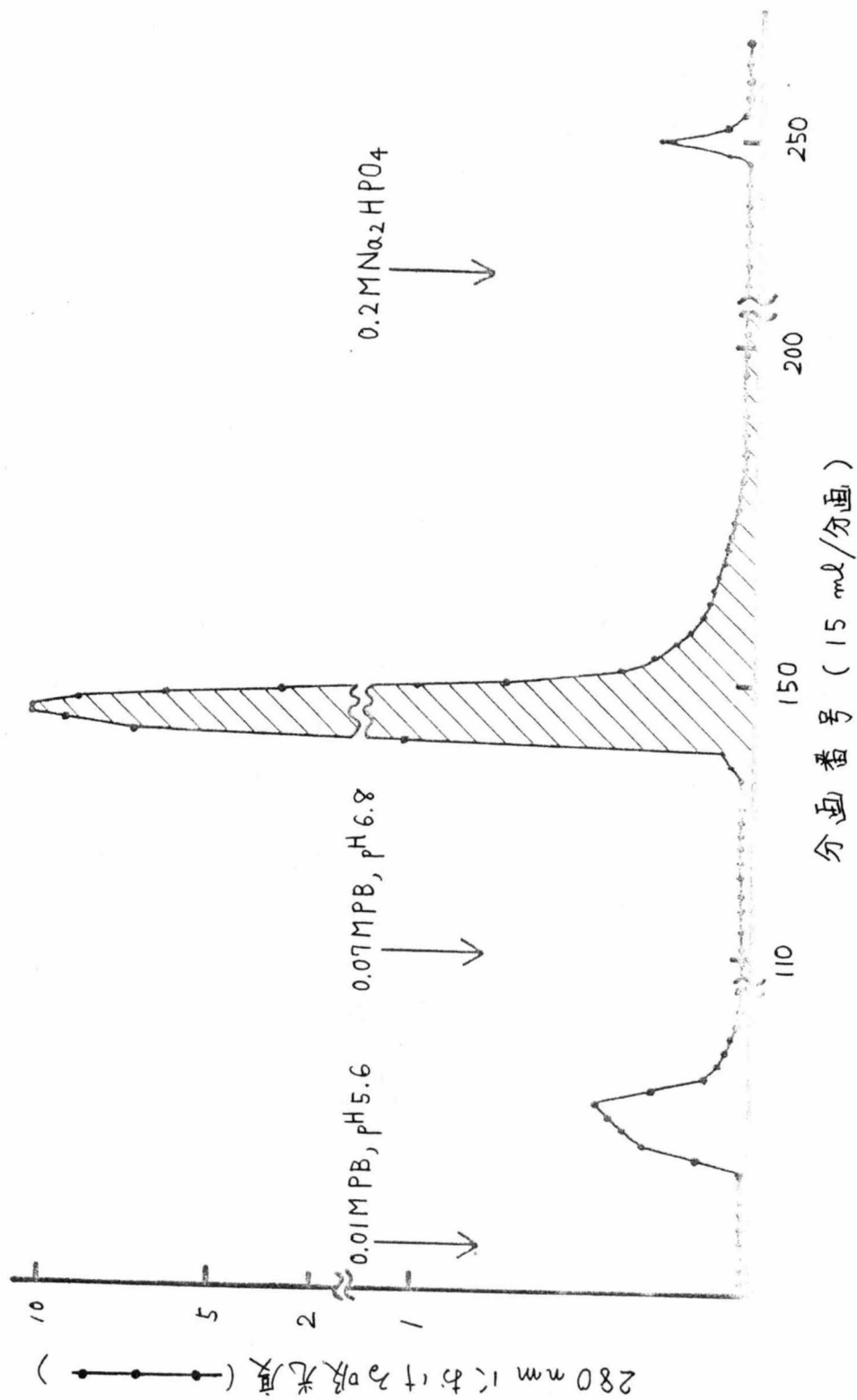


図2. インテロトキシンのCM-セルロース70マトグラフィー

カラムサイズ, 2.5 x 90 cm; 流速, 100 ml/時間; / / / / / , インテロトキシンの画分.

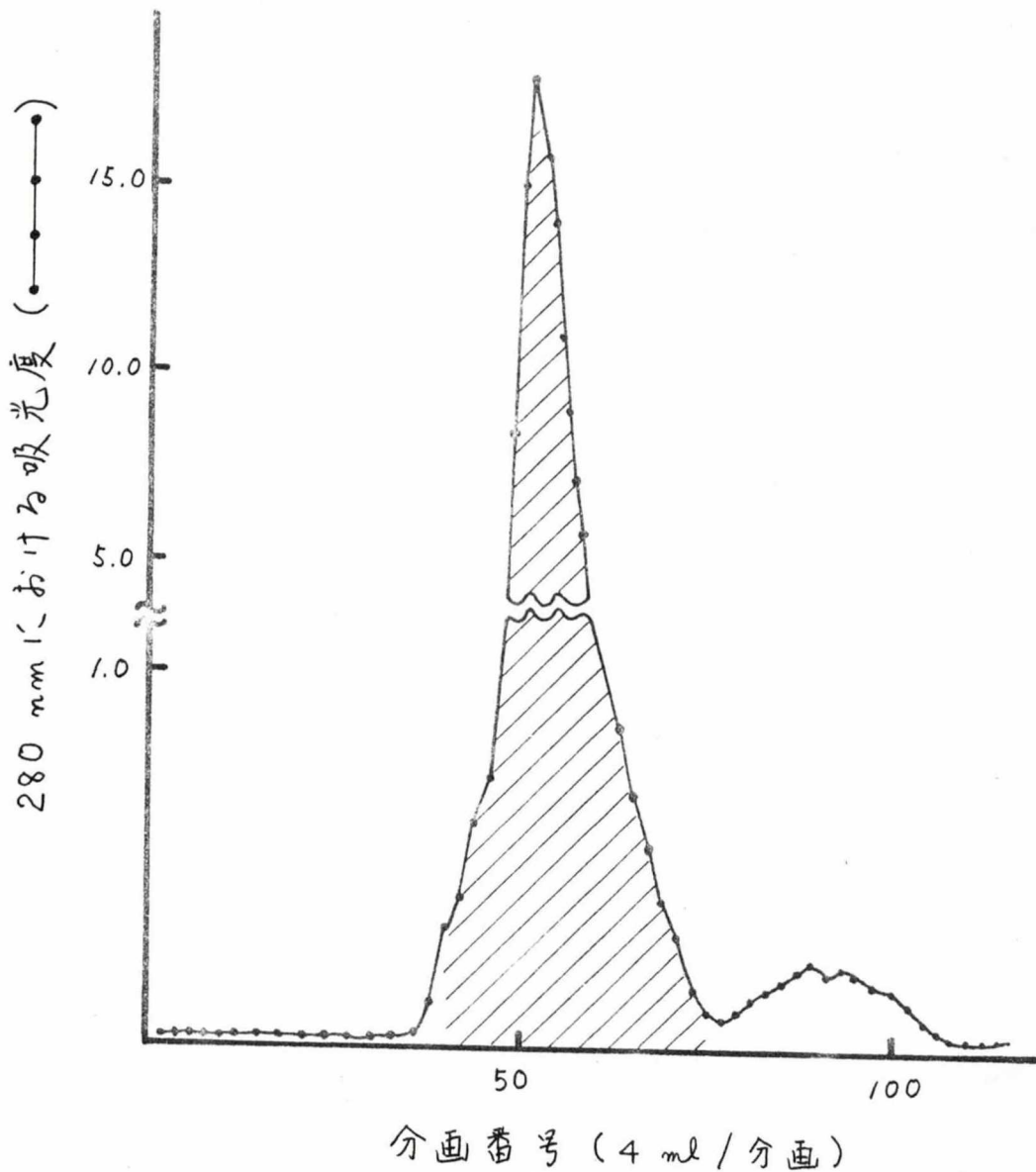


図3. インテロトキシシンAの Sephadex G-75 によるゲル3過  
 カラムサイズ, 1.5 x 90 cm; 流速, 20 ml/時間,  
 // // // // //, インテロトキシシン画分.

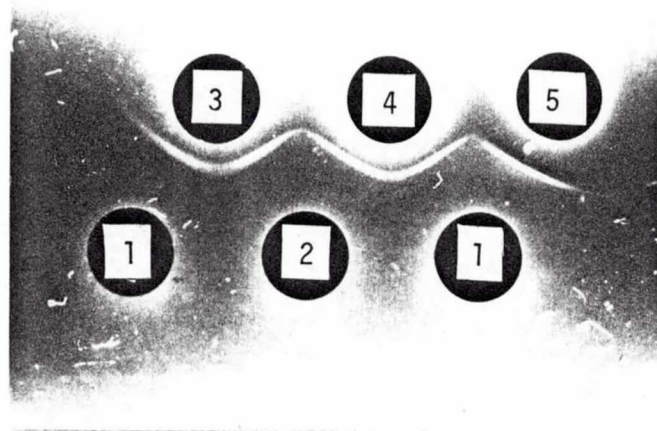


図4. 精製エンテロトキシンAのゲル内沈降反応.

- 1, 精製毒素 ; 2, reference エンテロトキシンA;  
3, 抗粗毒素A血清 ; 4, reference 抗毒素A血清 ;  
5, 特異抗エンテロトキシンA血清.

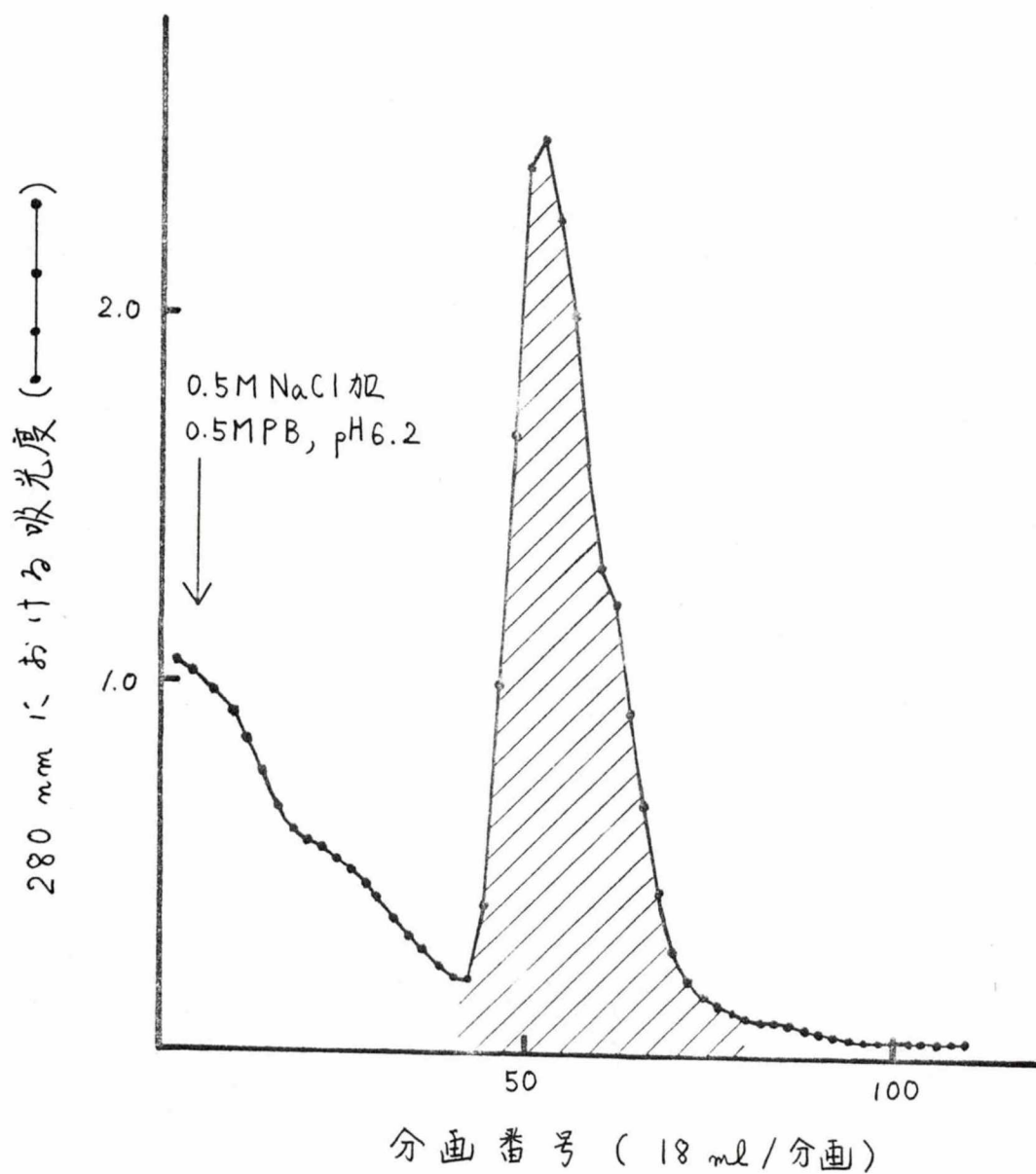


図5. エンテロトキシンBのAmberlite CG-50クロマトグラフィーカラムサイズ, 2.5 x 45 cm; 流速, 130 ml/時間; // // // // //, エンテロトキシン画分.



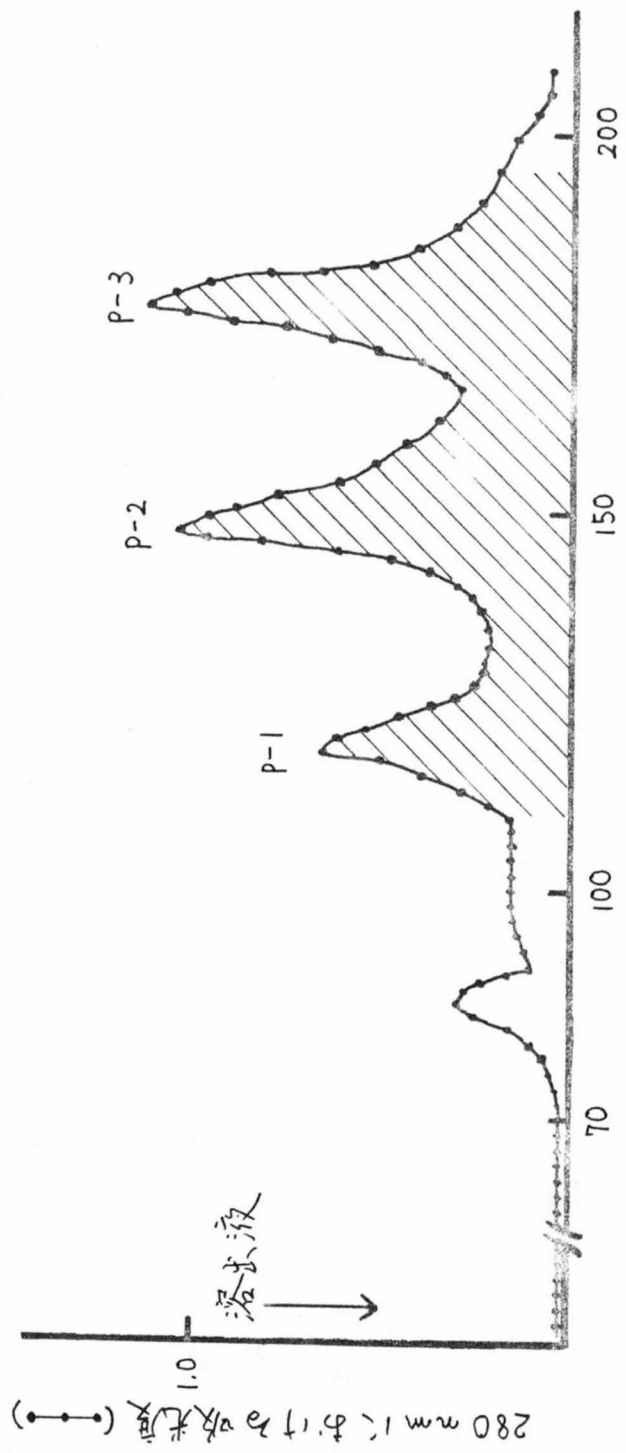


図6. インテロキシンBのCM-セルロース70マトグラフィー  
 カラムサイズ, 2.5 x 45 cm; 溶出液, 0.02MPB, pH6.2 (400 ml)と  
 0.07MPB, pH6.2 (400 ml); 流速, 40 ml/時間; //////////////, インテ  
 ロキシン画分.

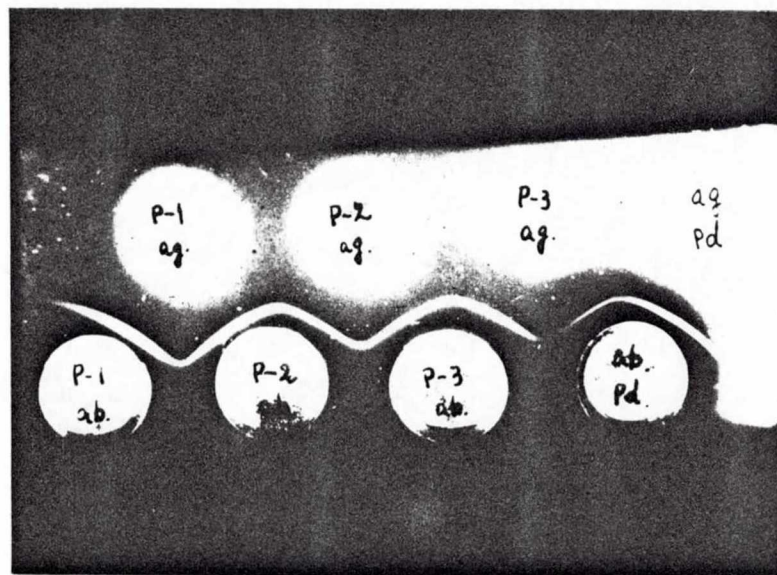


図7. インテロトキシンBのCM-セルロースろ過グラフィーにおいて得られた画分(P-I~III)のゲル内沈降反応.

P-1 ag, P-I画分 ; P-2 ag, P-2画分 ; P-3 ag, P-3画分 ;  
 ag Pd, reference インテロトキシンB ; P-1 ab, 抗P-1血清 ;  
 P-2 ab, 抗P-2血清 ; P-3 ab, 抗P-3血清 ; ab Pd,  
 reference 抗毒素B血清.



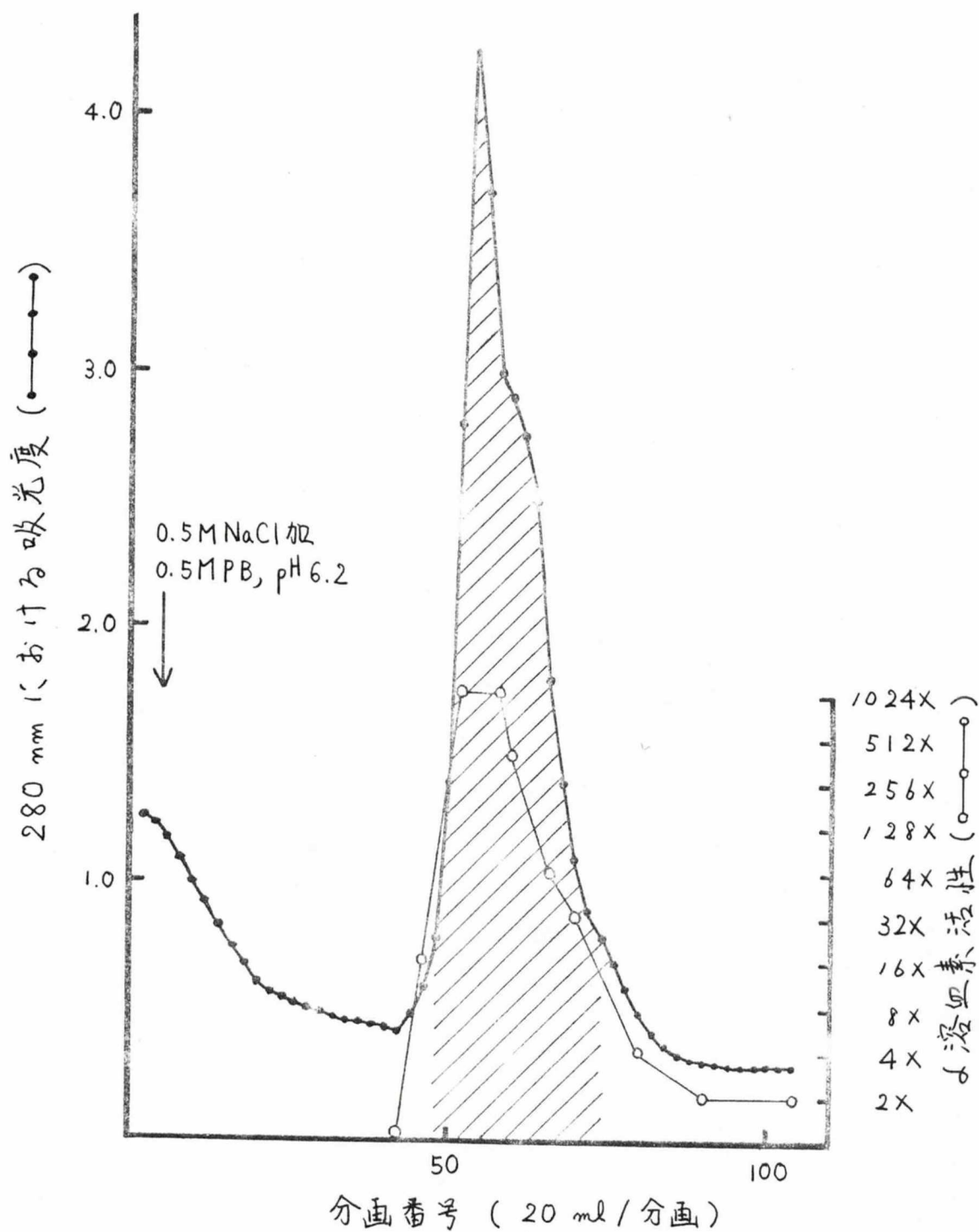


図9. インテロトキシンC<sub>2</sub>の Amberlite CG-50クロマトグラフィー  
 カラムサイズ; 2.5 x 45 cm; 流速, 150 ml/時間;  
 // // // // //, インテロトキシン画分.

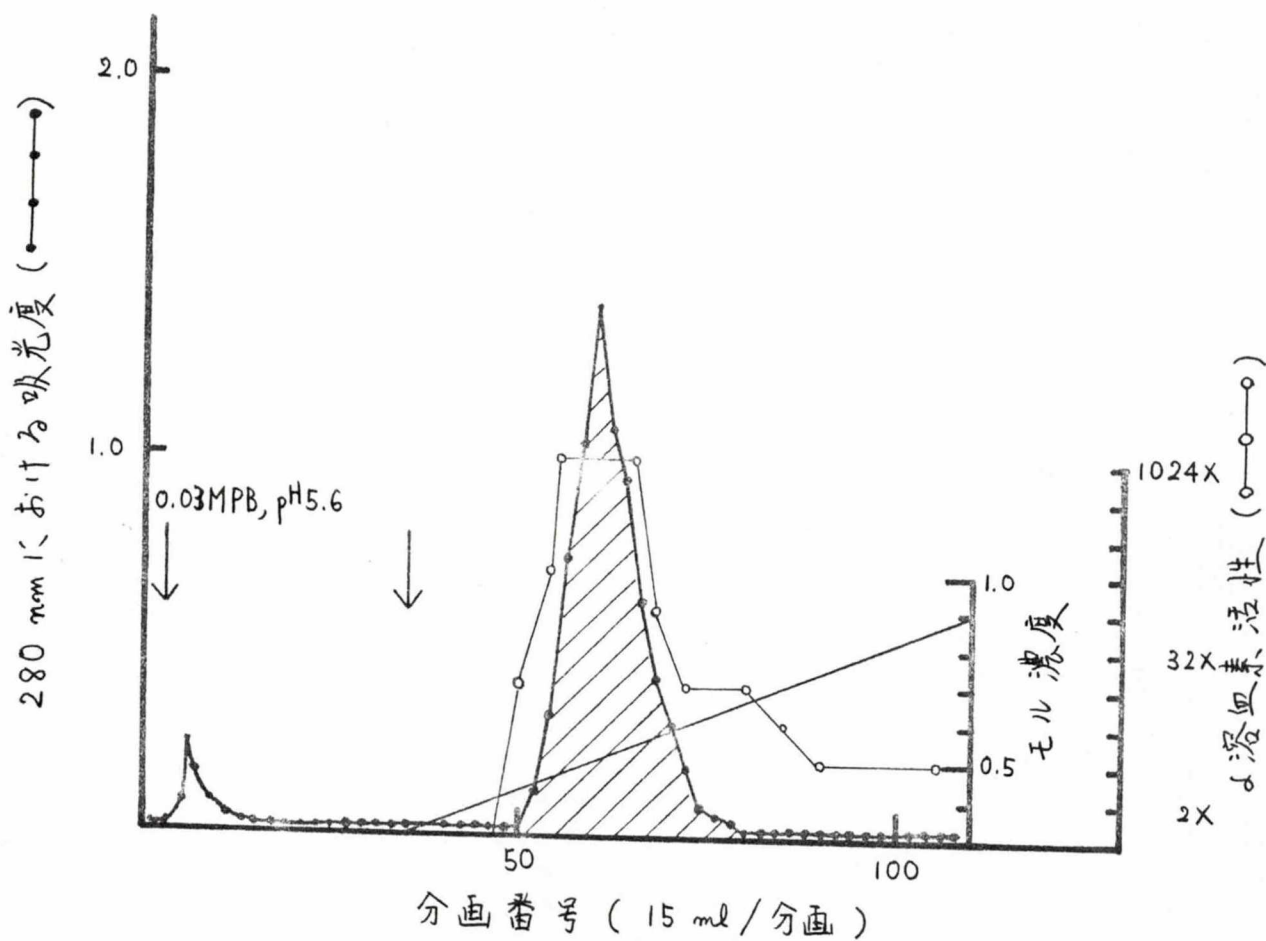


図 10. エンテロトキシン C<sub>2</sub> の Sephadex C-25 クロマトグラフィー  
 カラムサイズ, 1.5 x 30 cm; 溶出液, 0.03 MPB, pH 5.6  
 (400 ml) と 0.1 MPB, pH 5.6 (400 ml); 流速, 15 ml/時間;  
 // // // // //, エンテロトキシン画分.

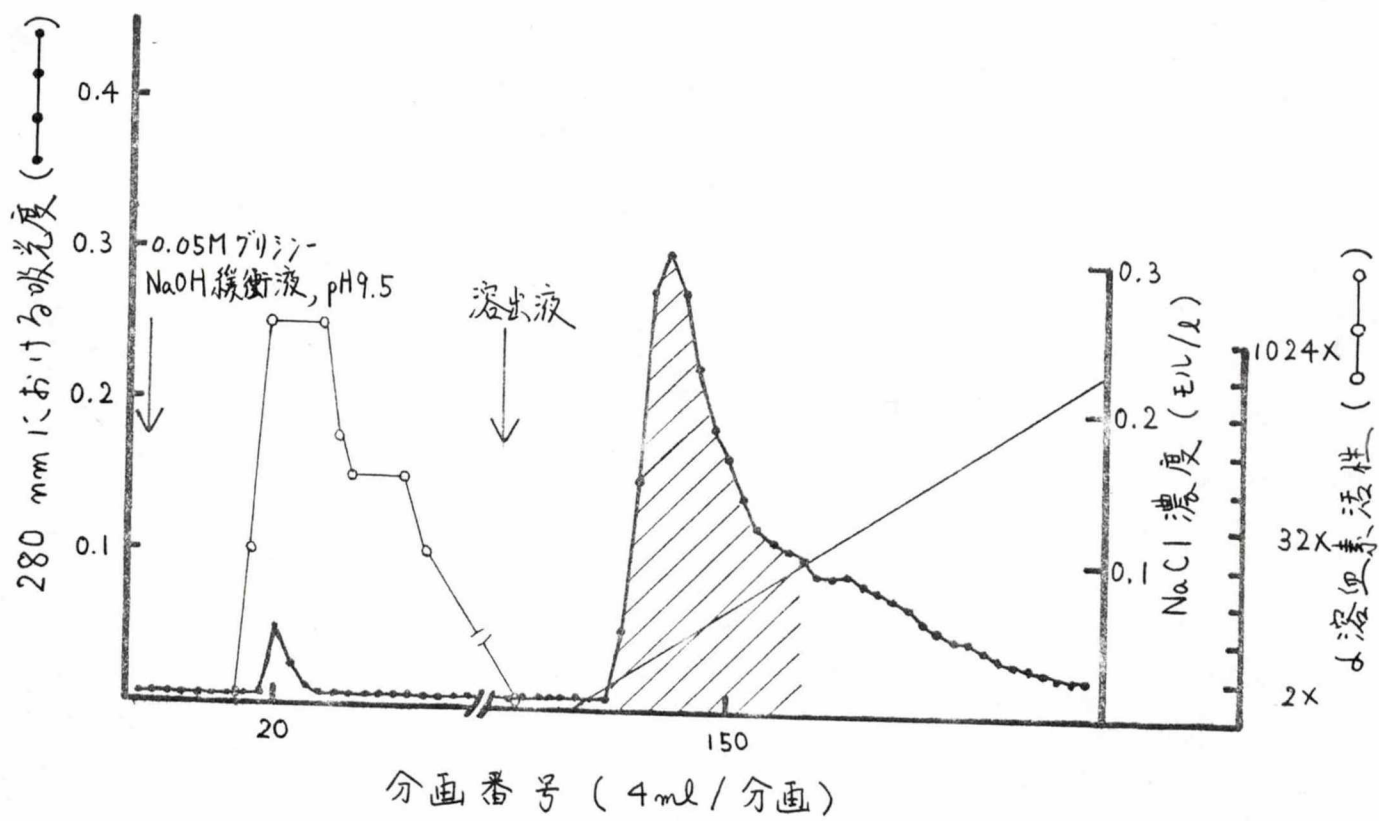


図11. エンテロトキシン<sub>G2</sub>のDEAE-セルロースクロマトグラフィー  
 カラムサイズ, 1.5 x 30 cm ; 溶出液, 0.05Mグリシン-  
 NaOH緩衝液, pH 9.5 (150 ml) と 0.3M NaCl 加グリシン-  
 NaOH緩衝液, pH 9.5 (150 ml) ; 流速, 45 ml/時間 ;  
 // // // //, エンテロトキシン画分.

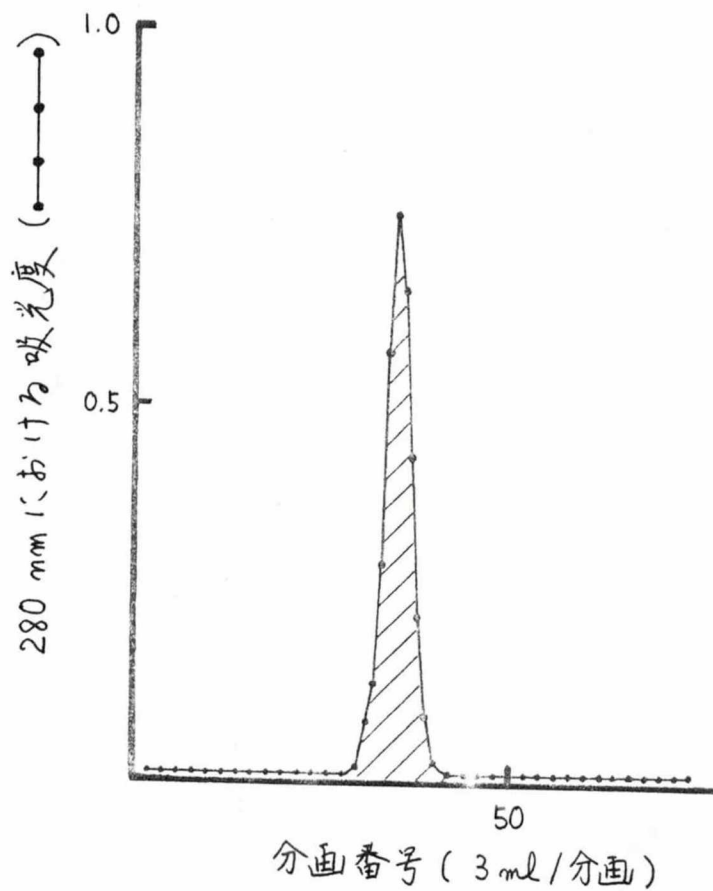


図12. インテロトキシン $C_2$ の Sephadex G-75 によるゲル3過  
 カラムサイズ, 1.5 x 90 cm ; 溶出液, 0.05Mリン酸  
 緩衝液, pH 6.5 ; 流速, 10 ml/時間 ; // // // ,  
 インテロトキシン画分.



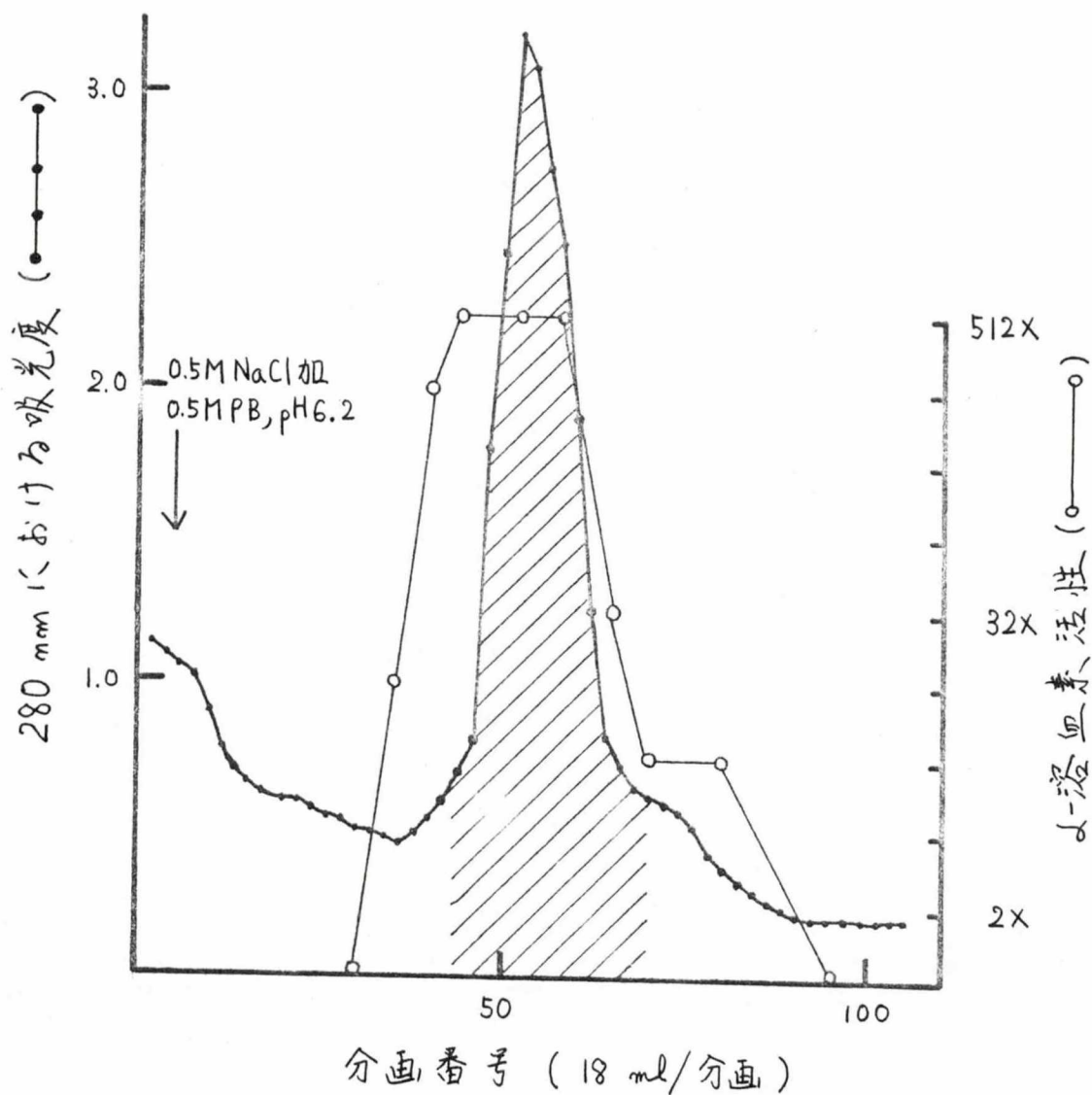
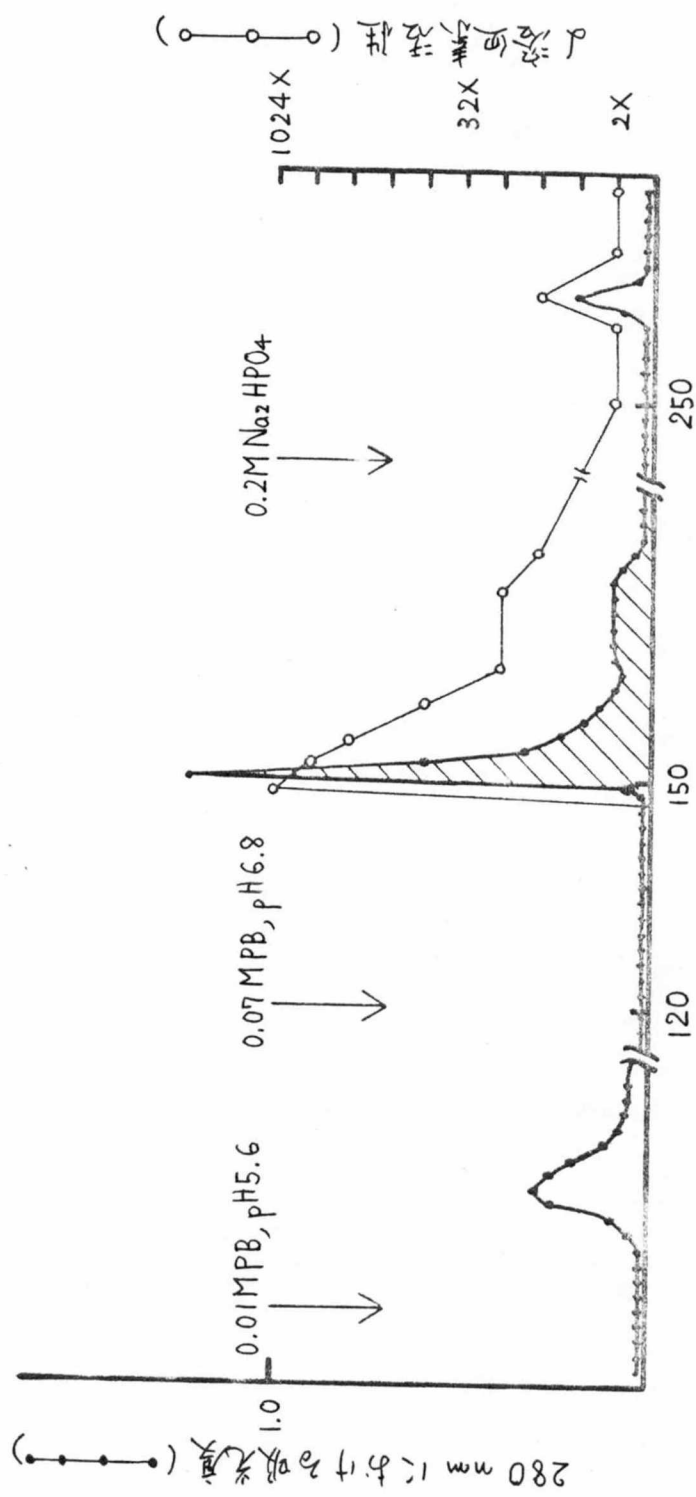


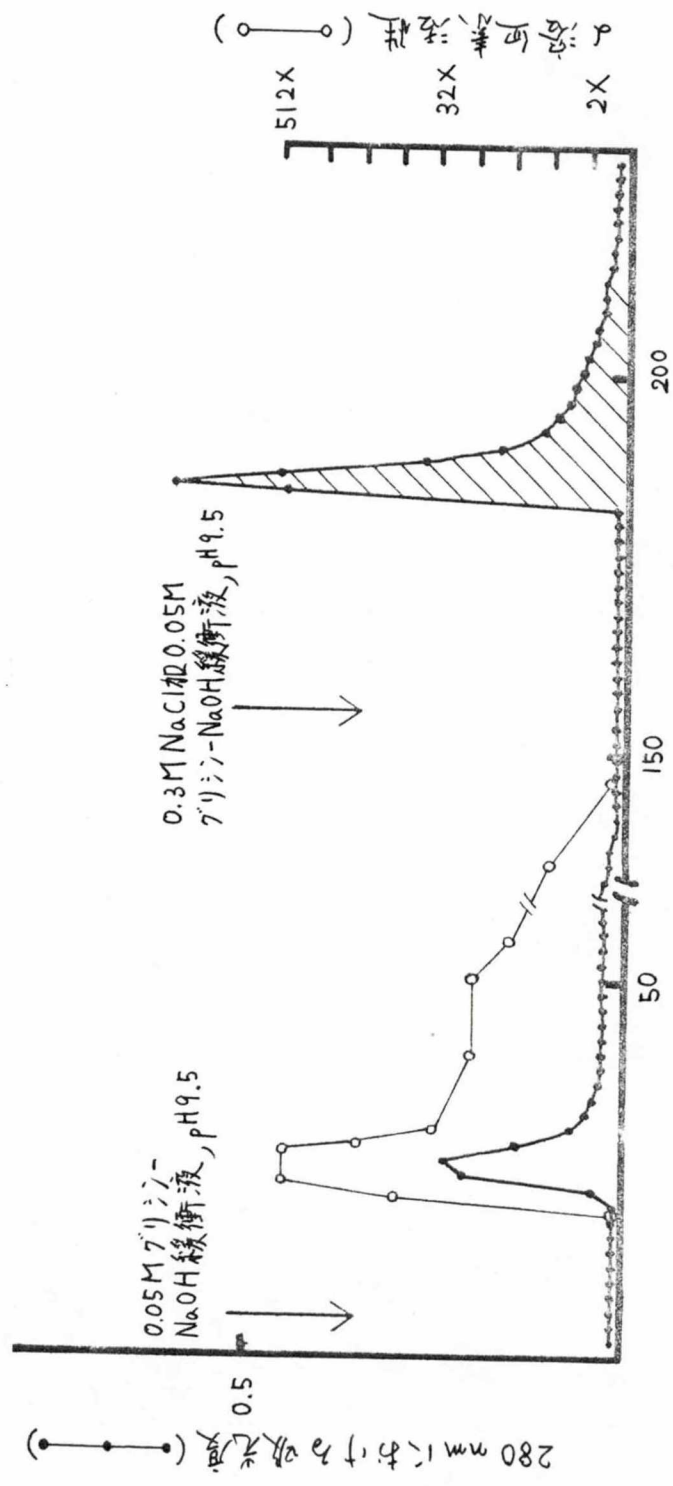
図13. インテロトキシシンDのAmberlite CG-5072マトグラフィー  
カラムサイズ, 2.5 x 45 cm; 流速, 140 ml/時間;  
////, インテロトキシシン画分.





分画番号 (10 ml / 分画)

図14. エンテロトキシンDのCM-セルロースクロマトグラフィー  
 カラムサイズ, 2.5×45 cm; 流速, 90 ml/時間;  
 |||||, エンテロトキシン画分.



分画番号 (10 ml / 分画)

図15. エンテロトキシンの DEAE-セルロースクロマトグラフィー

カラムサイズ, 2.5 x 45 cm ; 流速, 30 ml / 時間 ;

//////, エンテロトキシン画分.

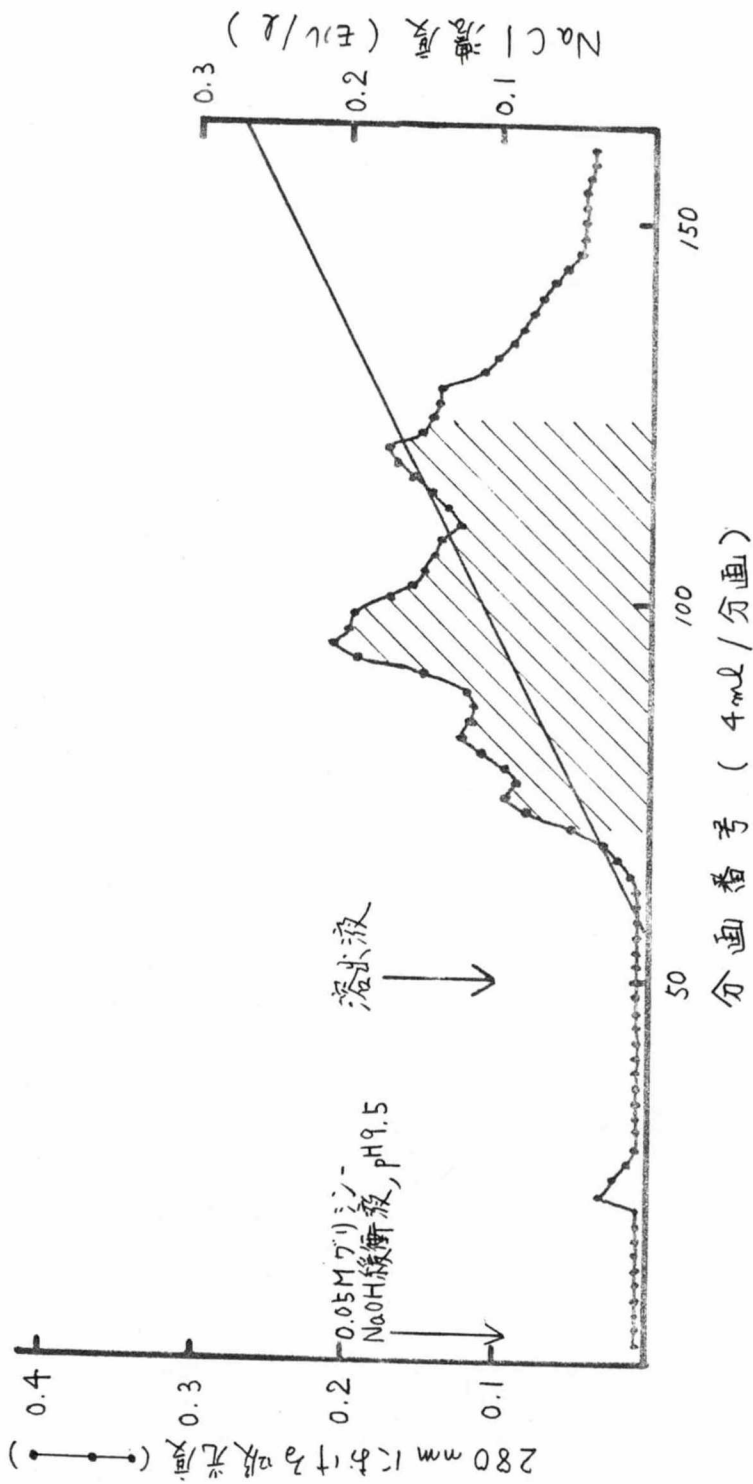


図16. インテロトキシノDのDEAE-セルロース再クロマトグラフィー

カラムサイズ, 1.5 x 30 cm ; 溶出液, 0.05 M グリシン-NaOH 緩衝液, pH 9.5 (250 ml) と 0.3 M NaCl 加 0.05 M グリシン-NaOH 緩衝液, pH 9.5 (250 ml) ; 流速, 30 ml / 時間 ; // // // //, インテロトキシノ画分.

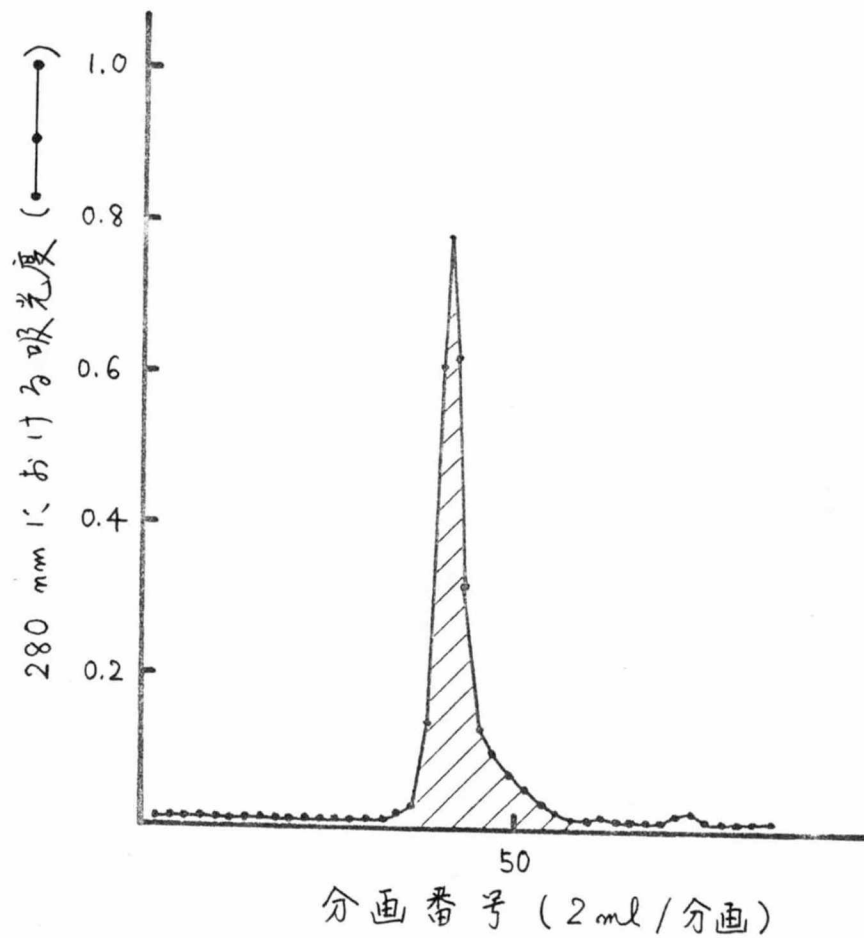


図17. インテロトキシニンDの Sephadex G-75 によるゲル3過  
 カラムサイズ, 1.5 x 90 cm ; 溶出液, 0.05 M リン酸  
 緩衝液, pH 6.5 ; 流速, 5 ml / 時間 ; // // // // // ,  
 インテロトキシニン画分 .

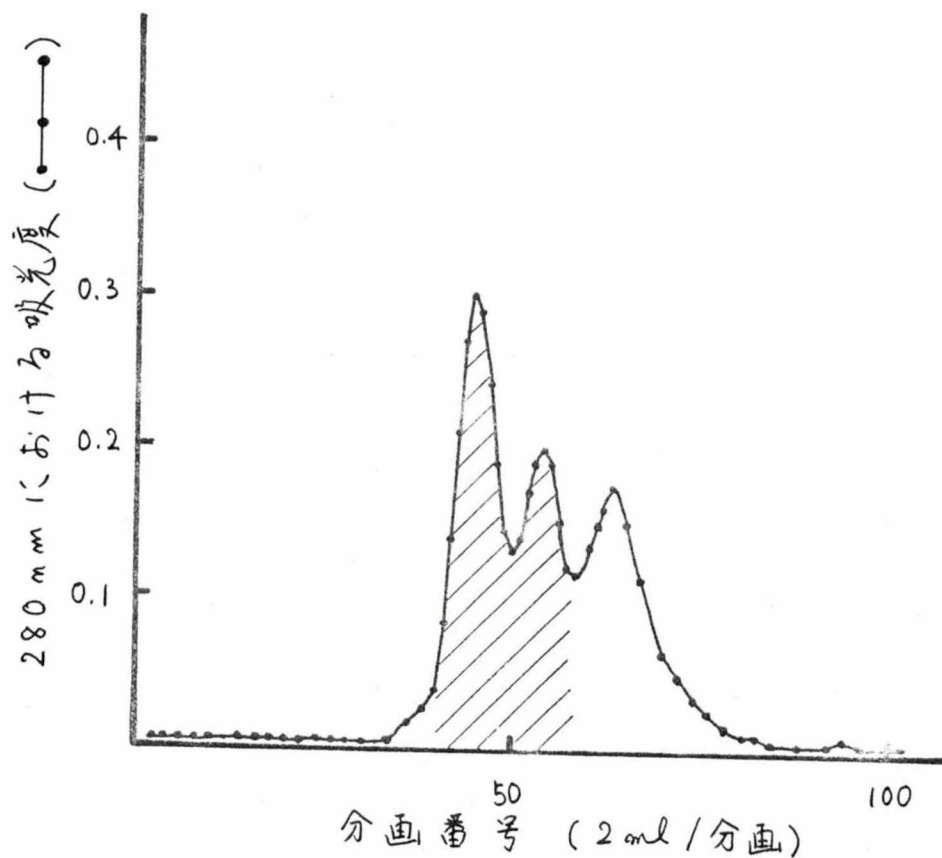


図18. インテロトキシンDの6M尿素処理後の Sephadex G-75  
によるゲルろ過

カラムサイズ, 1.5 × 90 cm ; 溶出液, 6M尿素加  
0.05Mリン酸緩衝液, pH 6.8 ; 流速, 5ml/時間 ;  
//////, インテロトキシン画分.

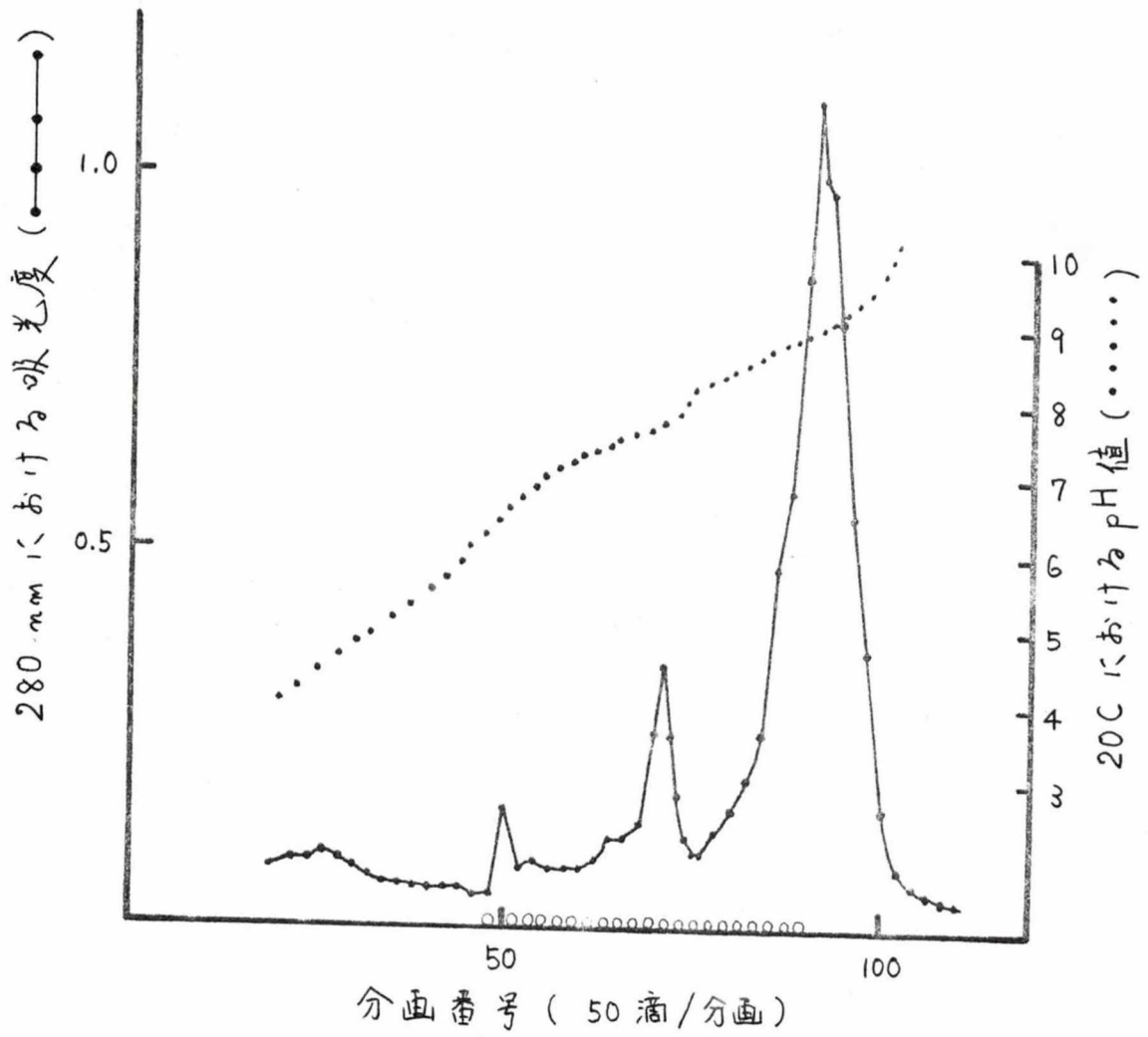


図 19. インテロトキシシン D の等電点分画  
 ○○○, インテロトキシシン画分.

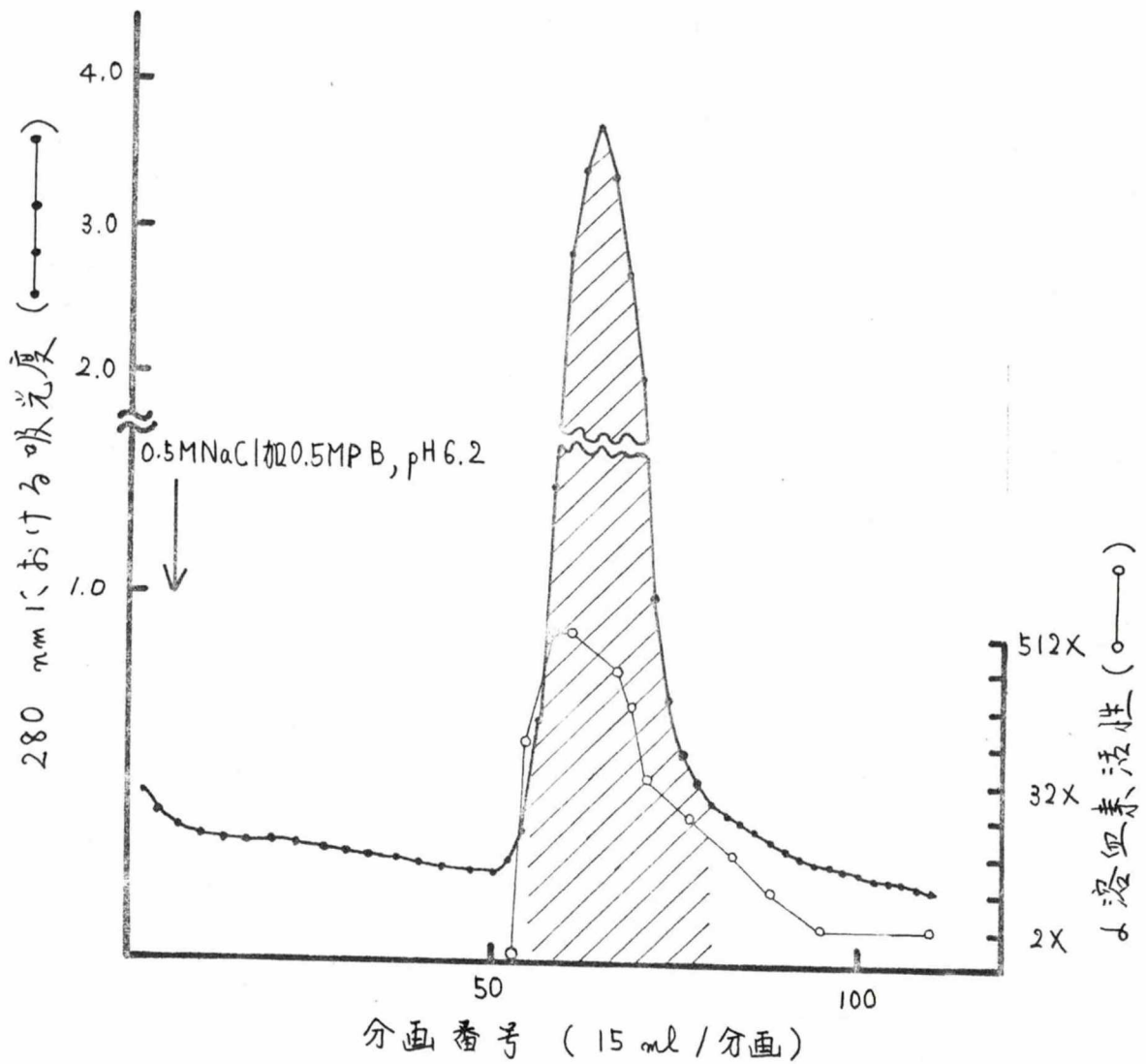


図20. エンテロトキシンEのAmberlite CG-50クロマトグラフィー  
カラムサイズ, 2.5 x 45 cm ; 流速, 157 ml / 時間 ;  
//////, エンテロトキシン画分.

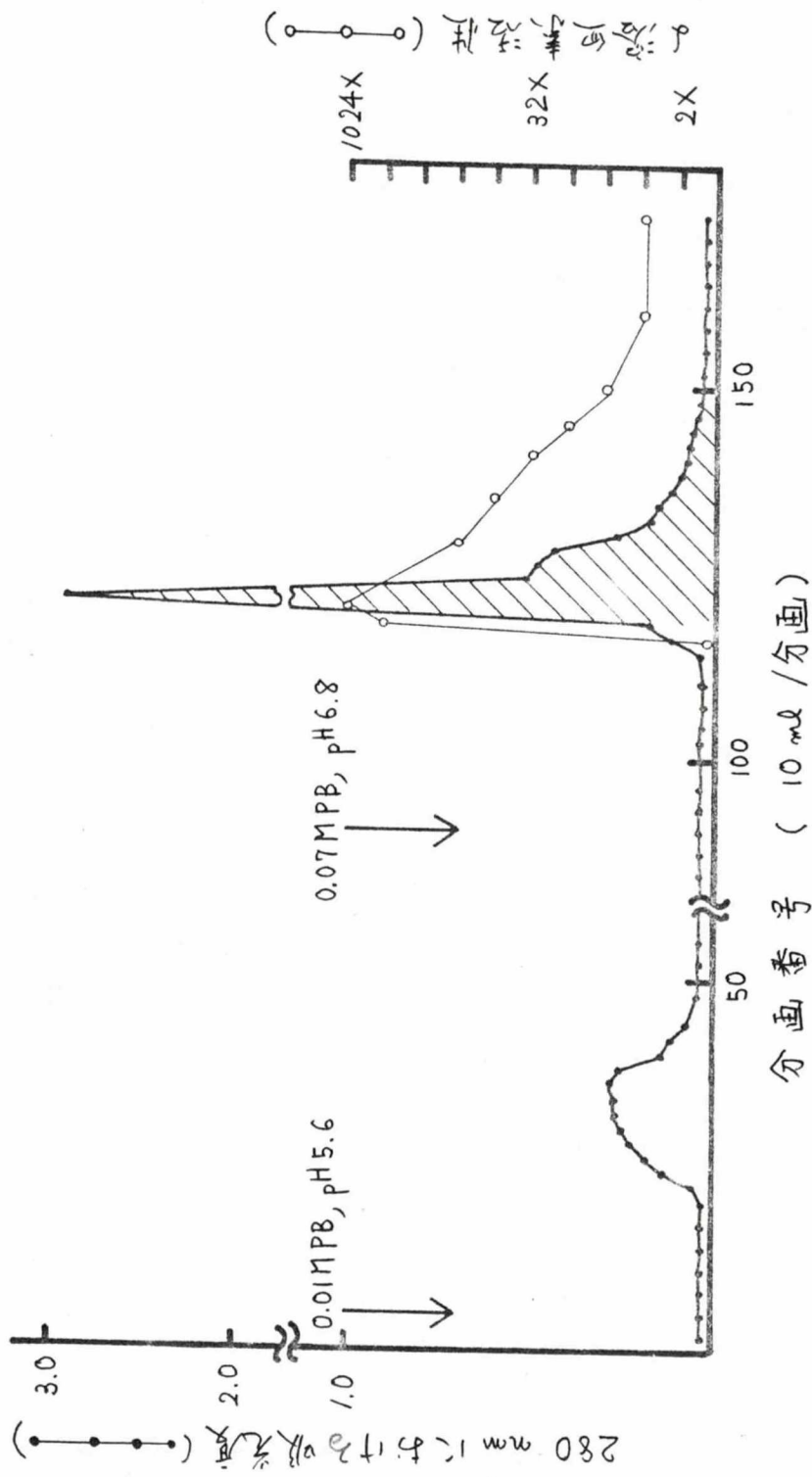


図21. インテロトキシンのCM-セルロースクロマトグラフィー  
 カラムサイズ, 2.5 x 83 cm ; 流速, 127 ml / 時間; // // // ,  
 インテロトキシンの画分.



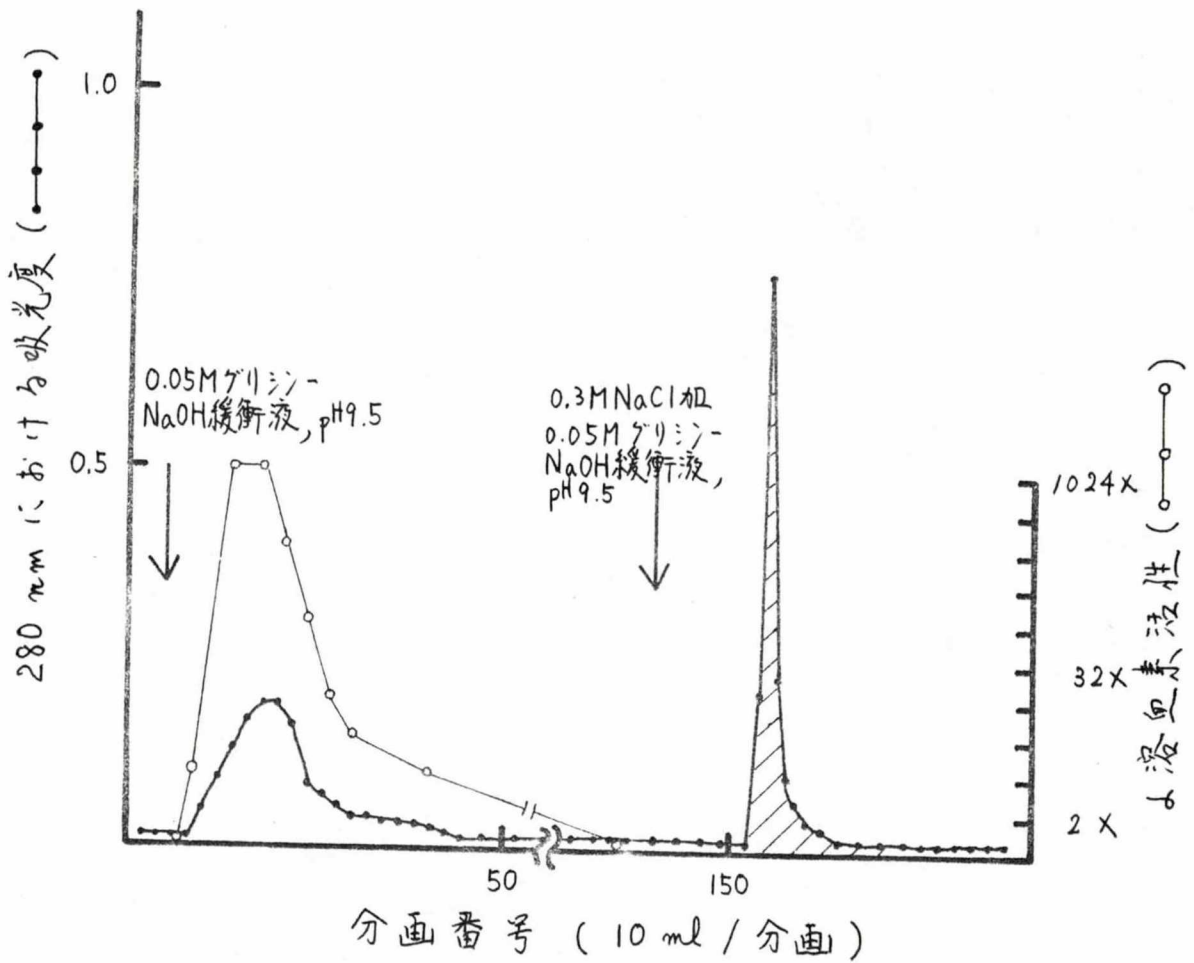


図22. インテロトキシシンEのDEAE-セルロースクロマトグラフィー  
 カラムサイズ, 2.5 × 45 cm ; 流速, 70 ml / 時間 ;  
 // // // // , インテロトキシシン画分.

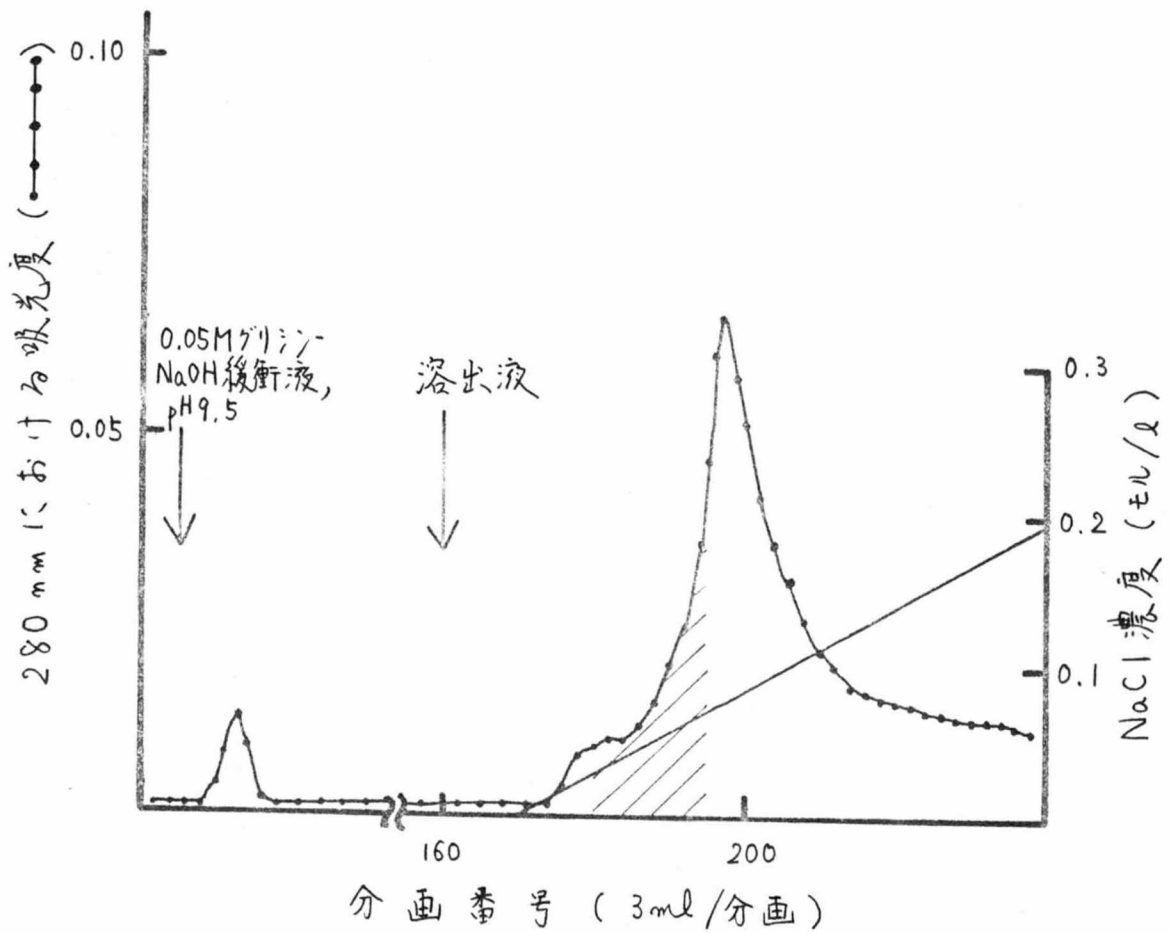


図 23. エンテロトキシンEのDEAE-セルロース再クロマトグラフィー  
 カラムサイズ, 1.5 × 30 cm ; 溶出液, 0.05Mグリシン-NaOH  
 緩衝液, pH 9.5 (200 ml) と 0.3M NaCl 加 0.05Mグリシン-NaOH  
 緩衝液, pH 9.5 (200 ml) ; 流速, 40 ml/時間 ;  
 //, エンテロトキシン画分.

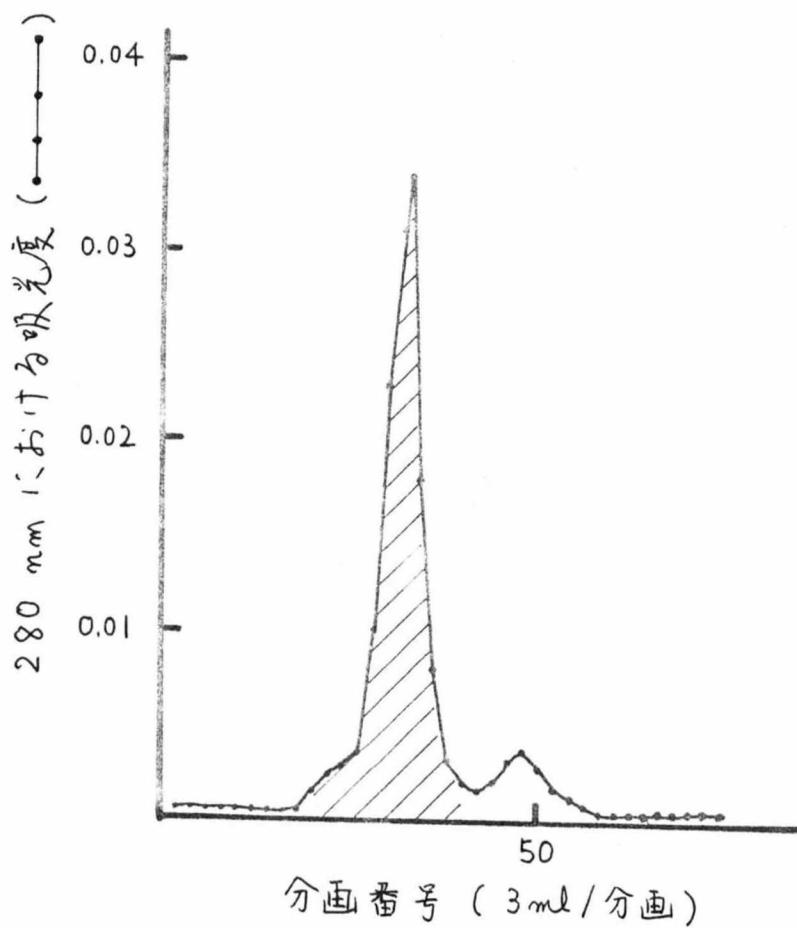


図24. インテロトキシシンEの Sephadex G-75 によるゲル3過  
 カラムサイズ, 1.5 × 90 cm ; 溶出液, 0.05Mリン  
 酸緩衝液, pH6.5 ; 流速, 10 ml / 時間 ;  
 //, インテロトキシシン画分.

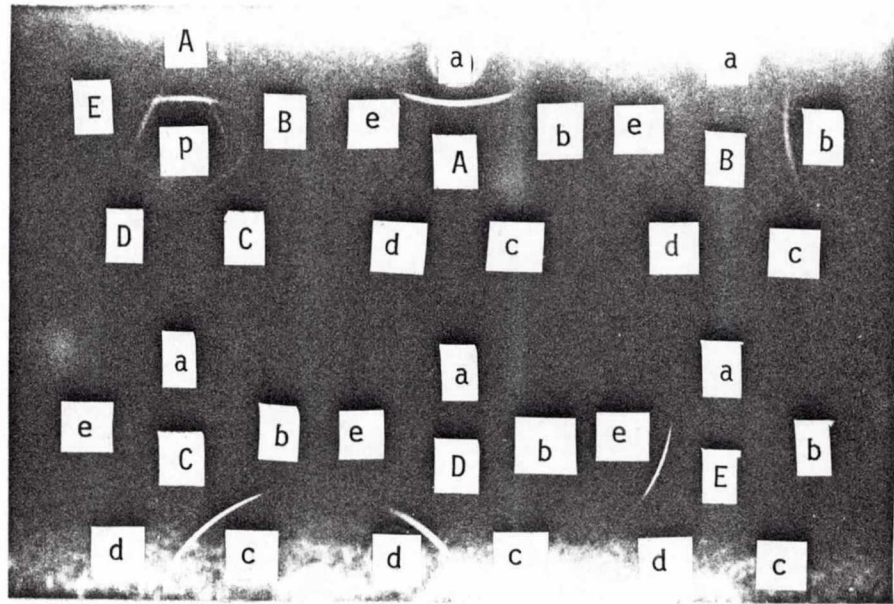


図25. 精製エンテロトキシンA~Eのゲル内沈降反応.

- |                          |                             |
|--------------------------|-----------------------------|
| A, 精製EntA,               | a, 特異抗EntA血清.               |
| B, 精製EntB.               | b, 特異抗EntB血清.               |
| C, 精製EntC <sub>2</sub> . | c, 特異抗EntC <sub>2</sub> 血清. |
| D, 部分精製EntD.             | d, 特異抗EntD血清.               |
| E, 精製EntE.               | e, 特異抗EntE血清.               |
|                          | P, 特異抗EntA~Eプール血清.          |

表1. 精製エテロトキシンA~Eの催吐活性中和試験成績

精製エテロトキシン	投与量 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	特異抗エテロトキシン血清				
		A	B	C	D	E
A	2.5	0/2 <sup>**</sup>	1/1	1/1	1/1	1/1
B	2.5	1/1	0/1	1/1	1/1	1/1
C	2.5	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1
D <sup>*</sup>	2.5	2/2	2/2	2/2	0/2	1/1
E	2.5	1/1	1/1	1/1	1/1	0/2

\* , 部分精製毒素 ; \*\* , 呕吐を示したカド頭数/供試カド頭数 .

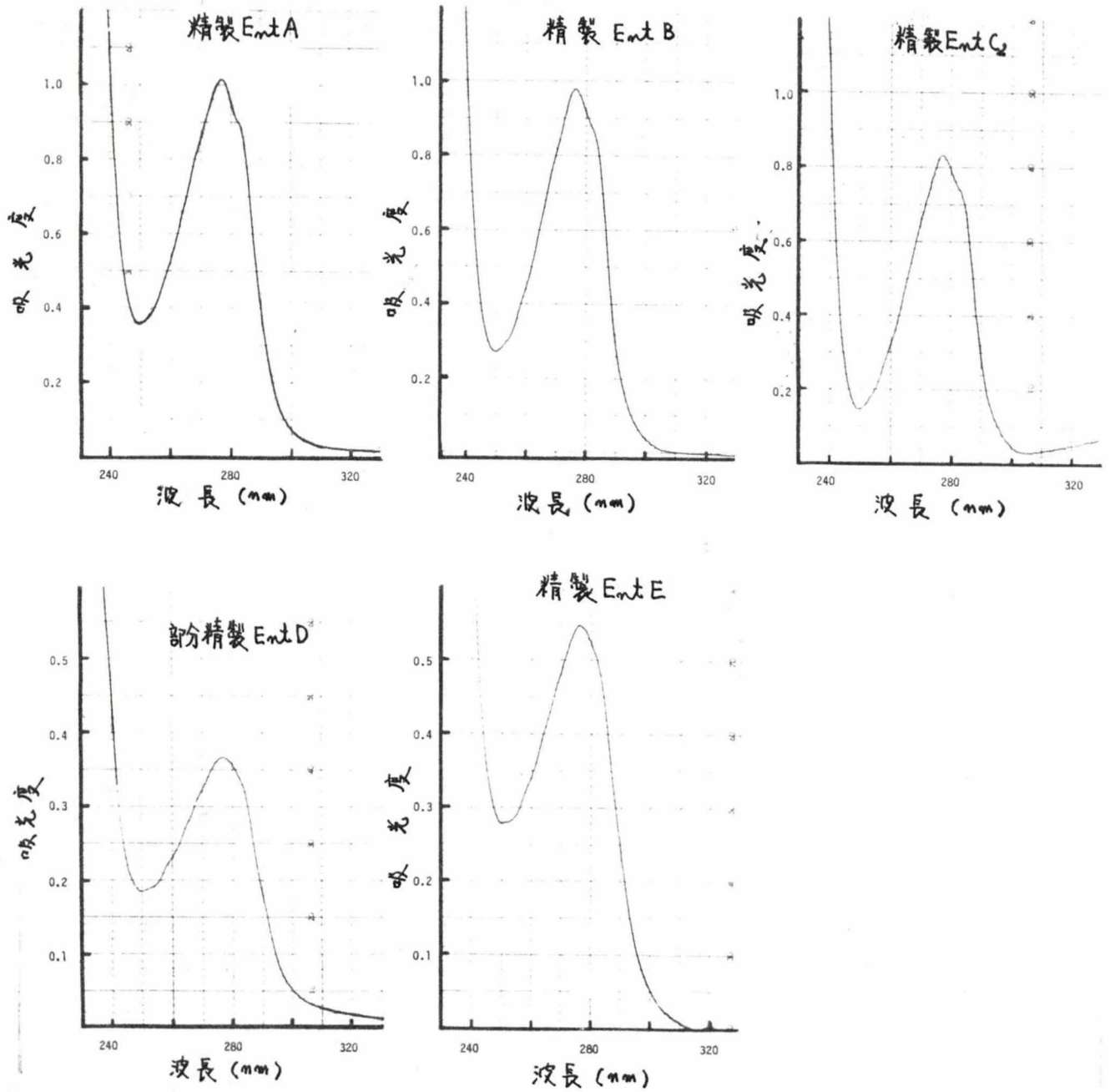


図26. 精製エンテロトキシンA, B, C, Eと部分精製エンテロトキシンDの紫外吸収スペクトル

毒素濃度, 精製EntA~Cは 1,000  $\mu\text{g/ml}$ , 部分精製EntDと精製EntEは 500  $\mu\text{g/ml}$ ; 溶媒, 0.05Mリン酸緩衝液, pH6.5.



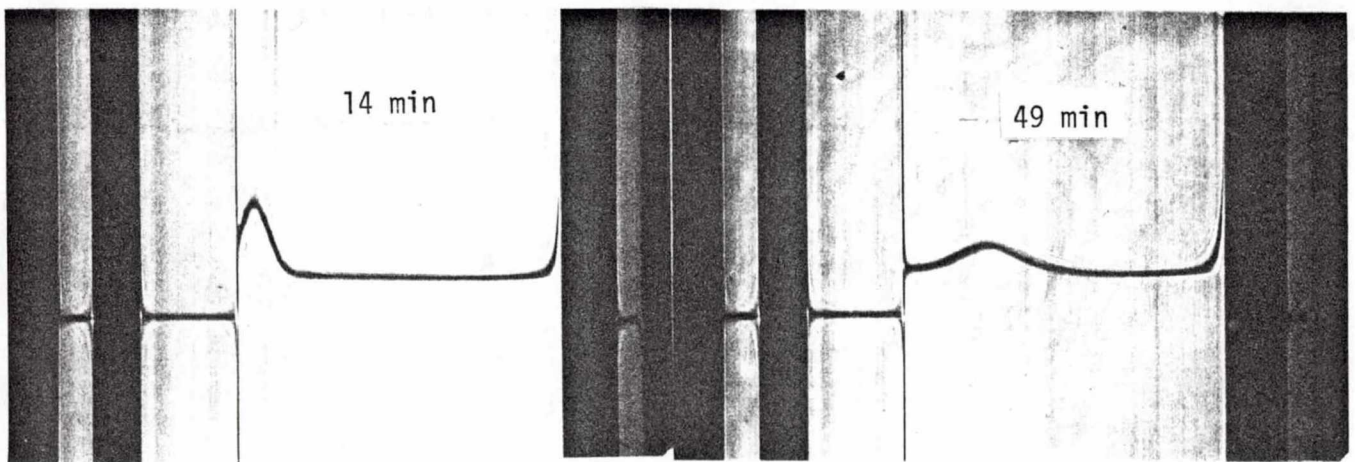


図27. 精製エンテロトキシンAのシュリーレンパターン

毒素濃度, 5 mg/ml ; 溶媒 ; 0.05Mリン酸緩衝液, pH6.5 ;  
 回転数, 60,000 rpm ; 測定温度, 25°C ; シュリーレン角度,  
 75° ,

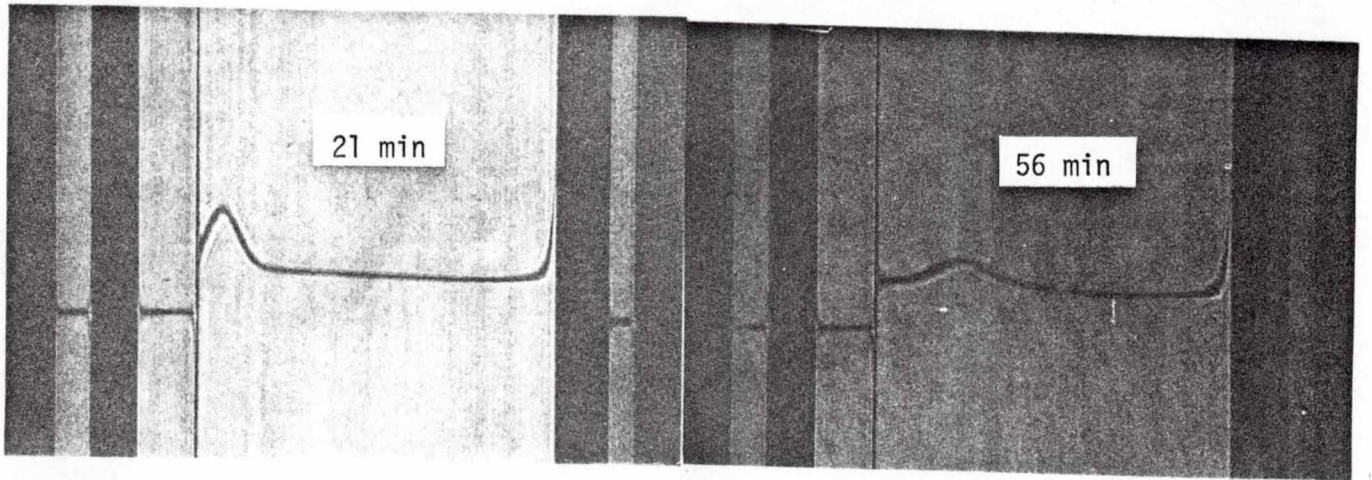


図28. 精製エンテロトキシンBのシュリーレンパターン

毒素濃度, 5 mg/ml ; 溶媒, 0.05Mリン酸緩衝液, pH6.5 ;  
回転数, 58,000 rpm ; 測定温度, 22C ; シュリーレン角度,  
75° .



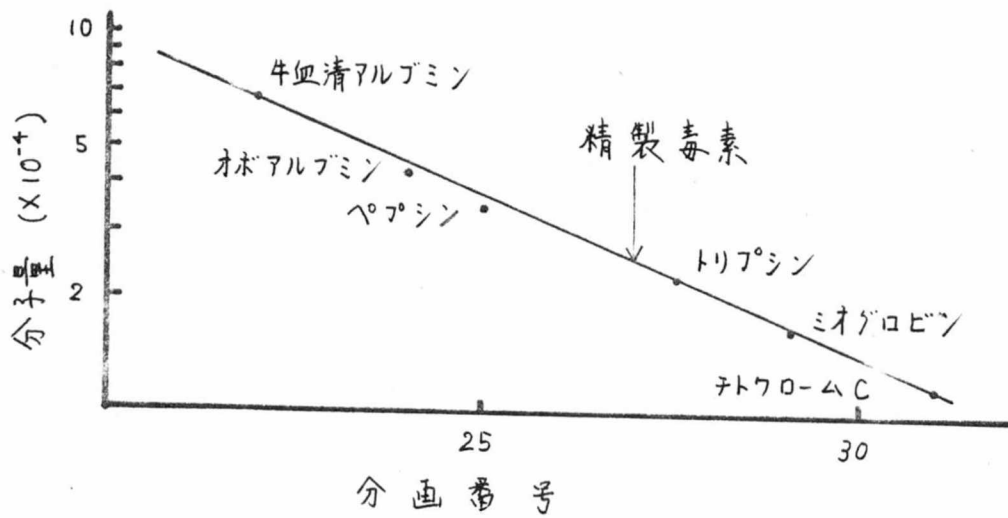


図29. Sephadex G-75 のゲル3過による精製エンテロトキシンAの分子量測定。  
 カラムサイズ, 1.5 x 90 cm ; 溶出液, 0.05M リン酸緩衝液, pH 6.5 ; 流速, 10 ml/時間。

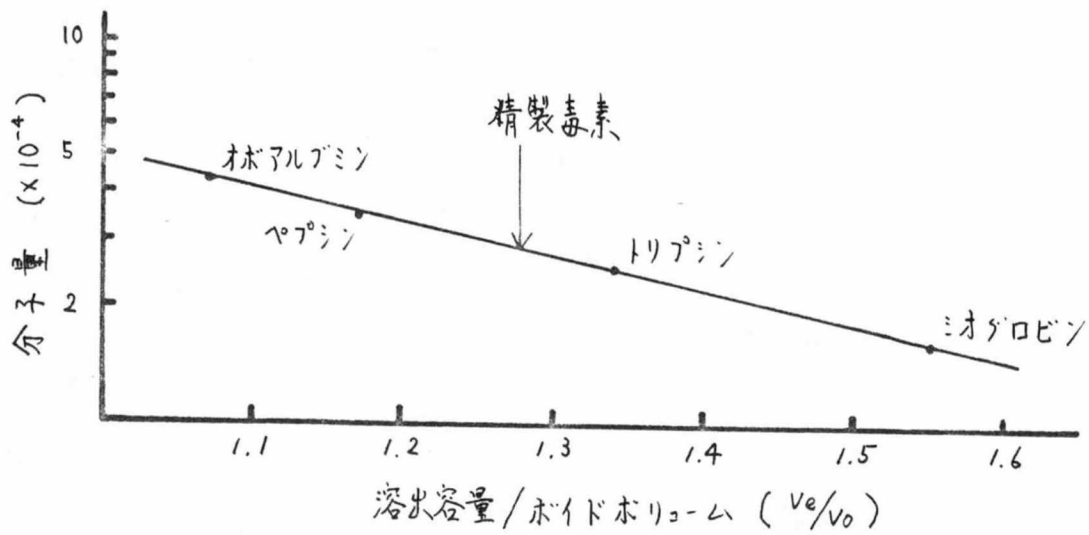


図 30. Sephadex G-50 のゲル3過による精製エンテロトキシン B の分子量測定

カラムサイズ,  $1.6 \times 83$  cm ; 溶出液, 0.05M リン酸緩衝液, pH 6.5 ; 流速, 8 ml / 時間.

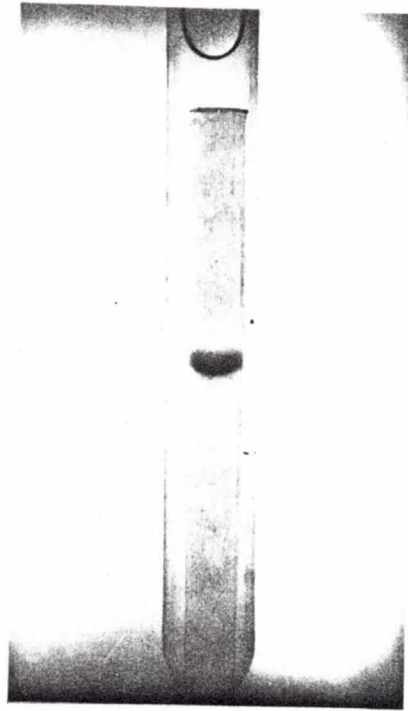


図31. 精製エンテロトキシンAのSDS-ポリアクリルアミド-ゲル  
電気泳動像

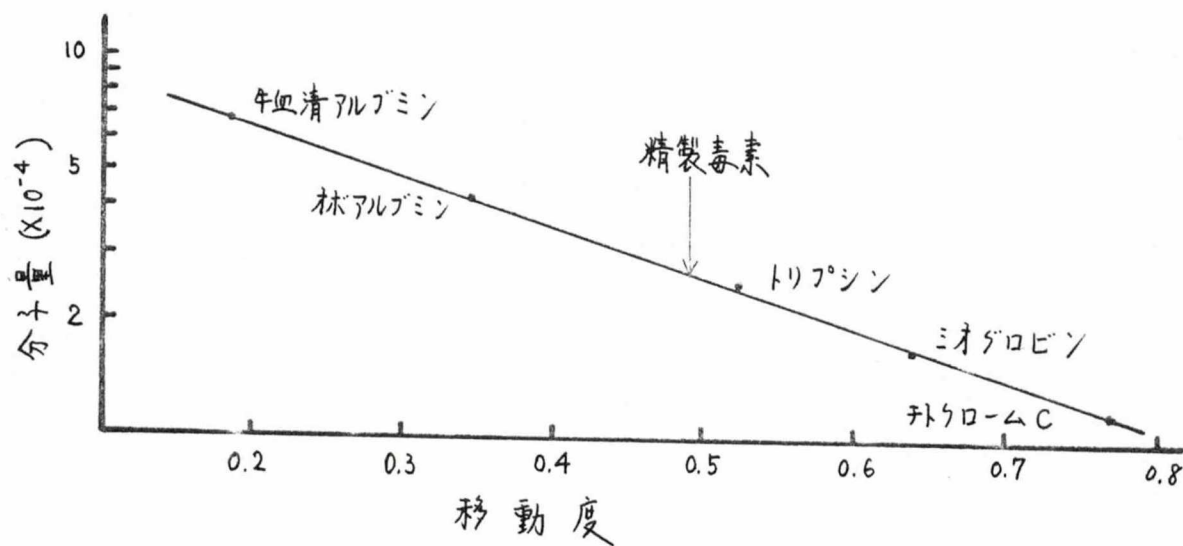


図32. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による精製エンテロトキシンAの分子量測定

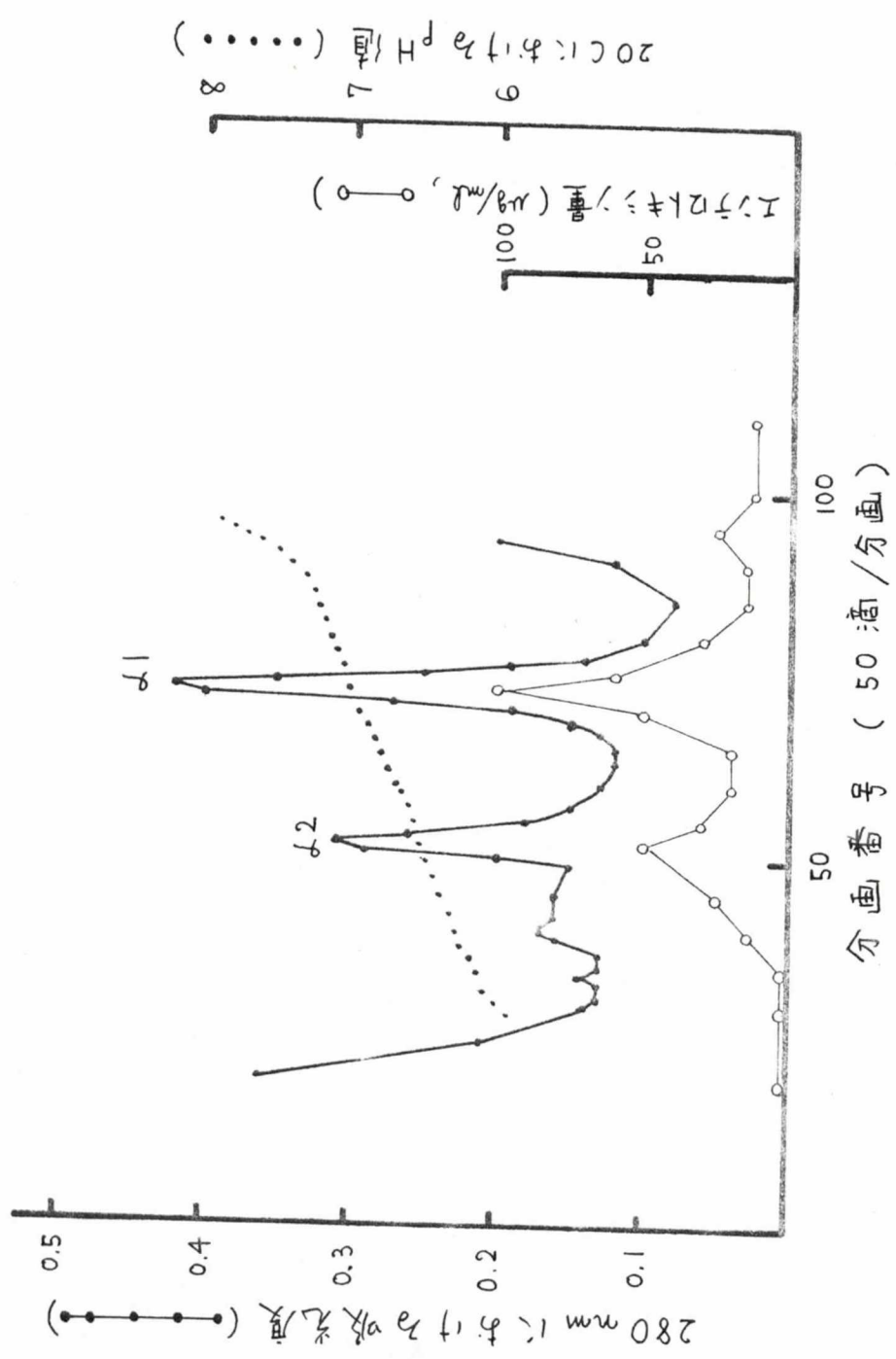


図33. インテロトキシシンAの等電異分画

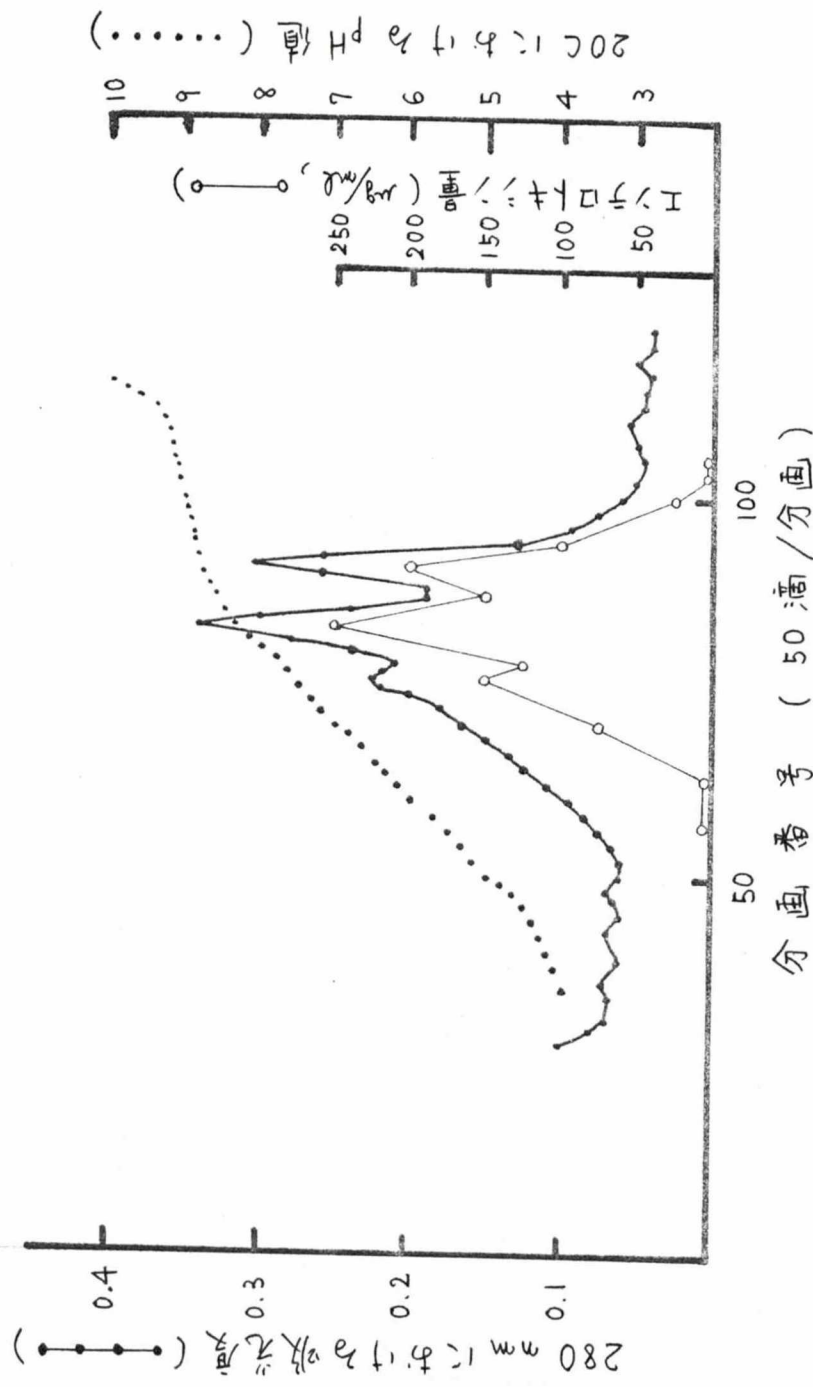


図34. インテロキシンBの等電異分画

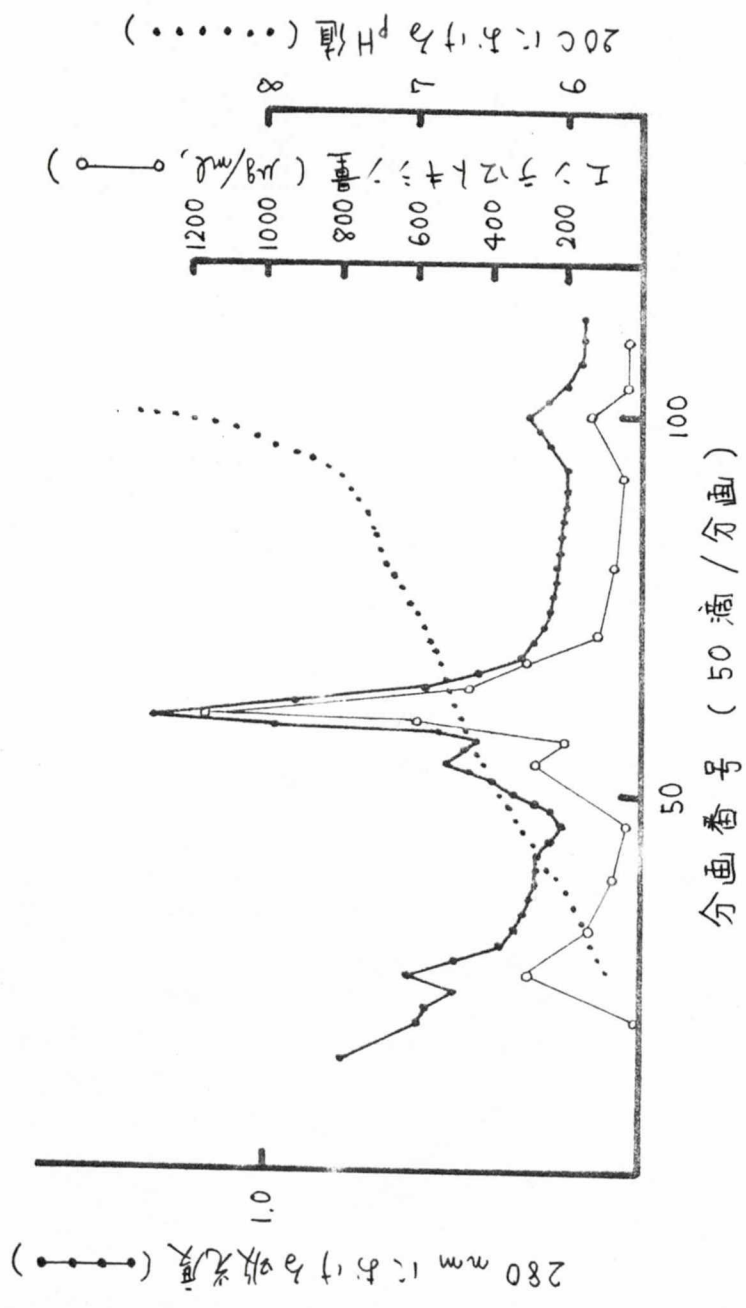


図35. インテロトキシン C<sub>2</sub> の等電点分画

表2. 精製エンテロトキシンAのアミノ酸組成

アミノ酸残基	アミノ酸量 (mmol/mg)	アミノ酸残基数* (残基/モル)	残基率(%)
アスパラギン酸	1220.9	33.9 ( 34 )	15.9
スレオニン	528.6	14.7 ( 15 )	7.0
セリン	365.5	10.1 ( 10 )	4.7
グルタミン酸	882.0	24.5 ( 25 )	11.7
プロリン	92.2	2.6 ( 3 )	1.4
グリシン	552.7	15.4 ( 15 )	7.0
アラニン	278.2	7.3 ( 7 )	3.3
システイン/2			
バリン	454.5	12.6 ( 13 )	6.1
メチオニン	14.7	0.4 ( 1 )	0.5
イソロイシン	348.8	9.7 ( 10 )	4.7
ロイシン	772.6	21.5 ( 22 )	10.3
チロシン	529.4	14.7 ( 15 )	7.0
ε-ニールアラニン	272.5	7.6 ( 8 )	3.7
ヒスチジン	186.3	5.2 ( 5 )	2.3
リジン	771.1	21.4 ( 21 )	9.8
アルギニン	227.0	6.3 ( 6 )	2.8
トリプトファン**		3.7 ( 4 )	1.9
合計		214	100.1

\* 分子量 27,800 とした場合の計算値

\*\* Goodwin 法により決定



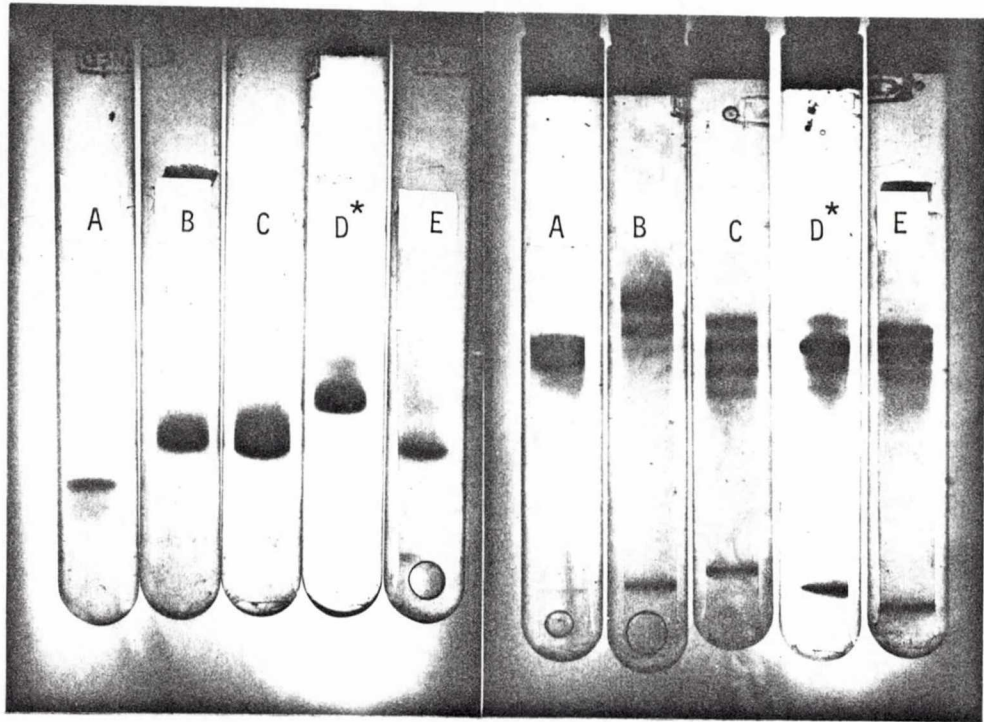


図36. 精製エンテロトキシンA~Eの pH4.3 および pH9.4 における  
ディスク電気泳動像

＊, 部分精製エンテロトキシンD.

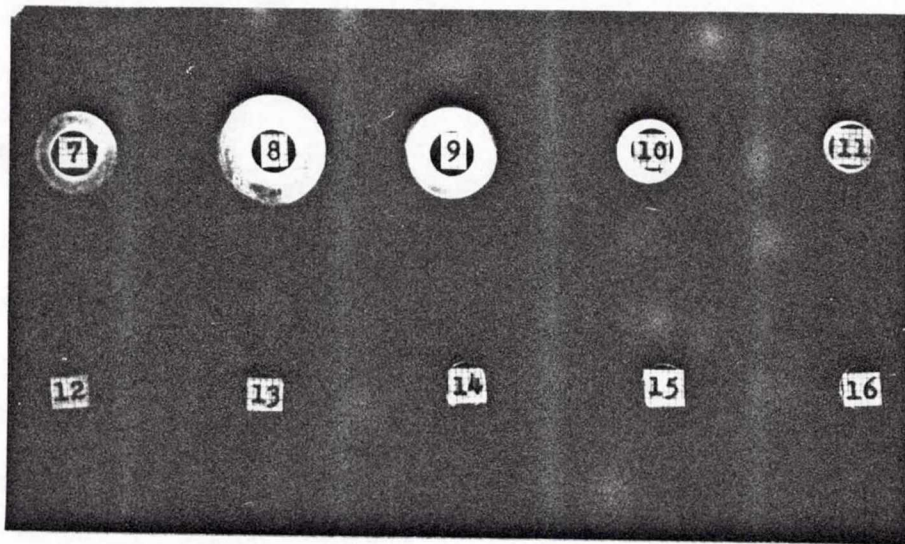


図37. 精製エンテロトキシンAのディスク電気泳動 (pH9.4) 後のカットゲルを  
 特異抗エンテロトキシンA血清加寒天に埋没した時の免疫拡散像

7~16, カットゲル番号 ; 7~11が2本のバンドの位置に  
 相当する。

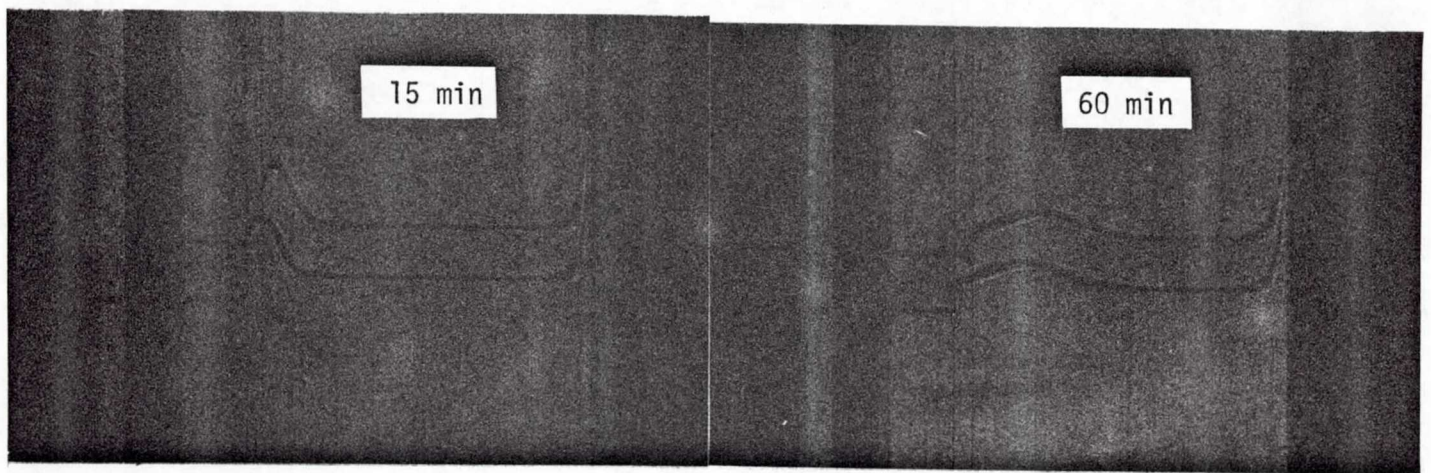


図38. 2つの異なる pH 溶液における精製エンテロトキシンAの  
シリ-レンパターン

毒素濃度, 5mg/ml ; 溶媒, 0.05M リン酸緩衝液, pH 6.5  
(上のシリ-レン) および 0.05M グリシン-NaOH 緩衝液, pH 9.5 (下の  
シリ-レン) ; 回転数, 40,000rpm ; 測定温度, 23C ;  
シリ-レン角度, 75°.

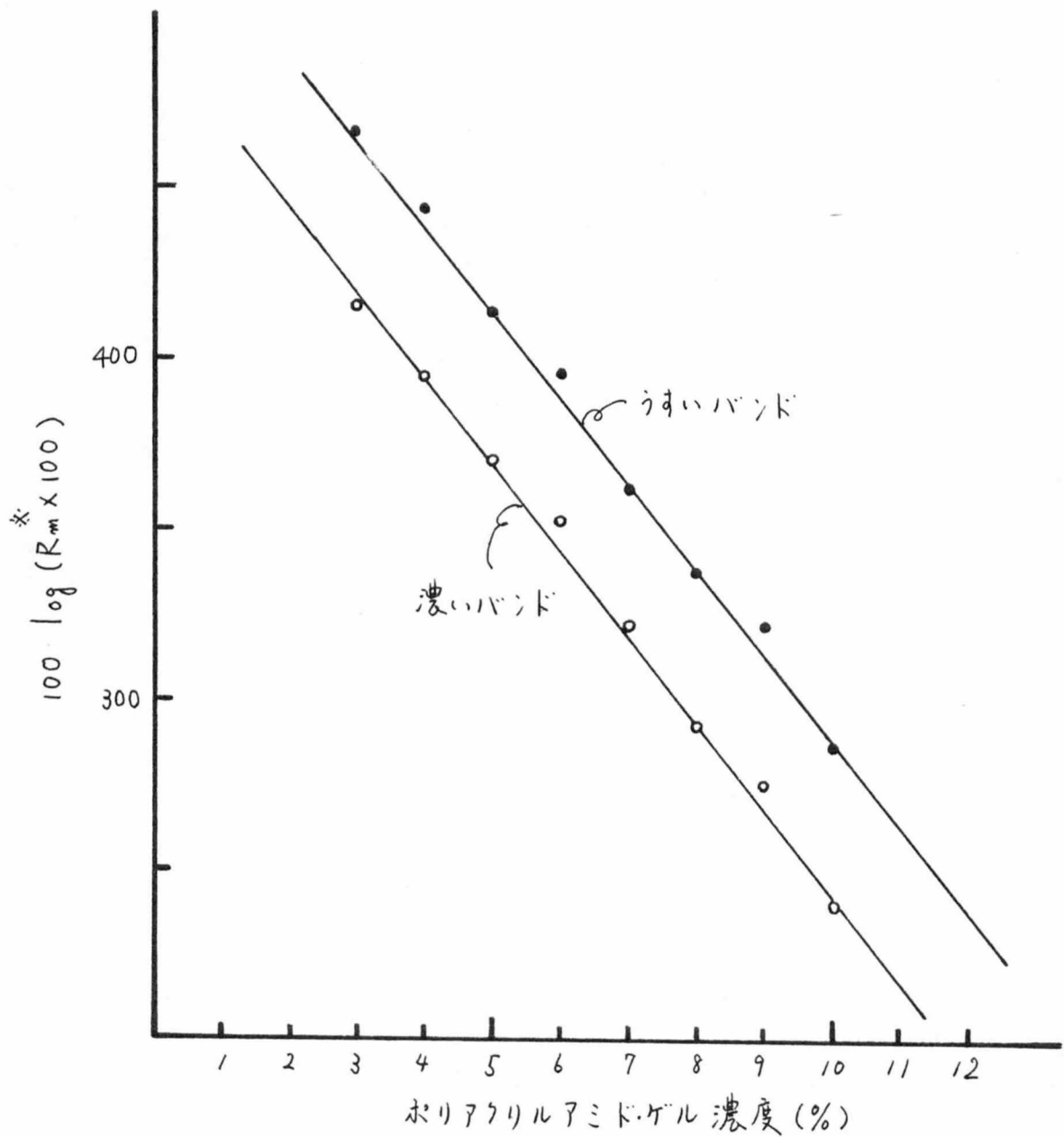


図39. 精製エンテロトキシンAの polyacrylamide ディスク電気泳動 (pH9.4)における2つのバンドの移動度-ゲル濃度グラフ  
 ※  $R_m$ , 被検エンテロトキシンAの移動度

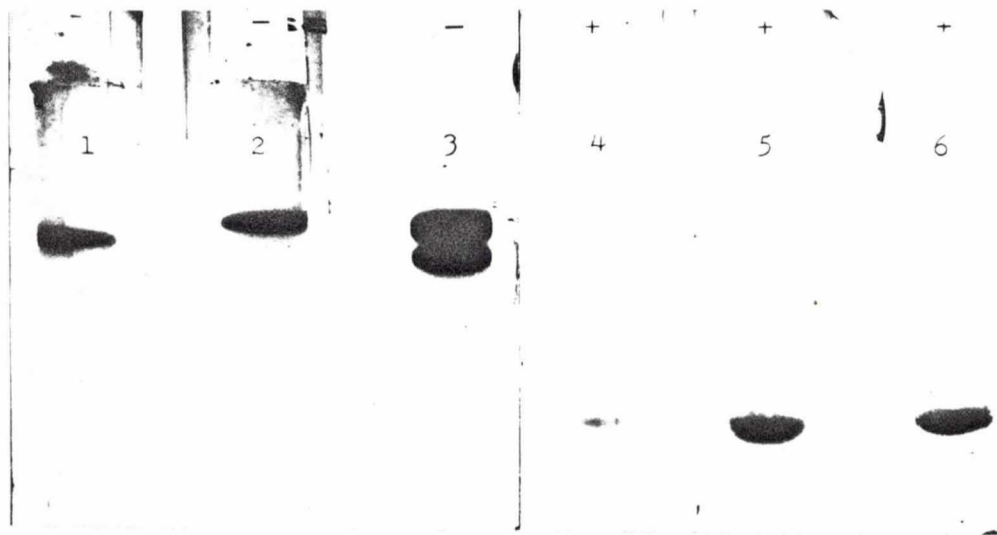


図40. 等電点分画で得られた精製エンテロトキシンA画分(α1, α2)の pH4.3および pH9.4におけるティスラ電気泳動像

1, α2(30 μg/ml)の pH9.4でのティスラ; 2, α1(30 μg/ml)の pH9.4でのティスラ像; 3, α1(50 μg/ml)とα2(50 μg/ml)の混合したものの pH9.4でのティスラ像; 4, α2(30 μg/ml)の pH4.3 ティスラ; 5, α1(50 μg/ml)の pH4.3 ティスラ; 6, α1(30 μg/ml)とα2(20 μg/ml)の混合したものの pH4.3 ティスラ.



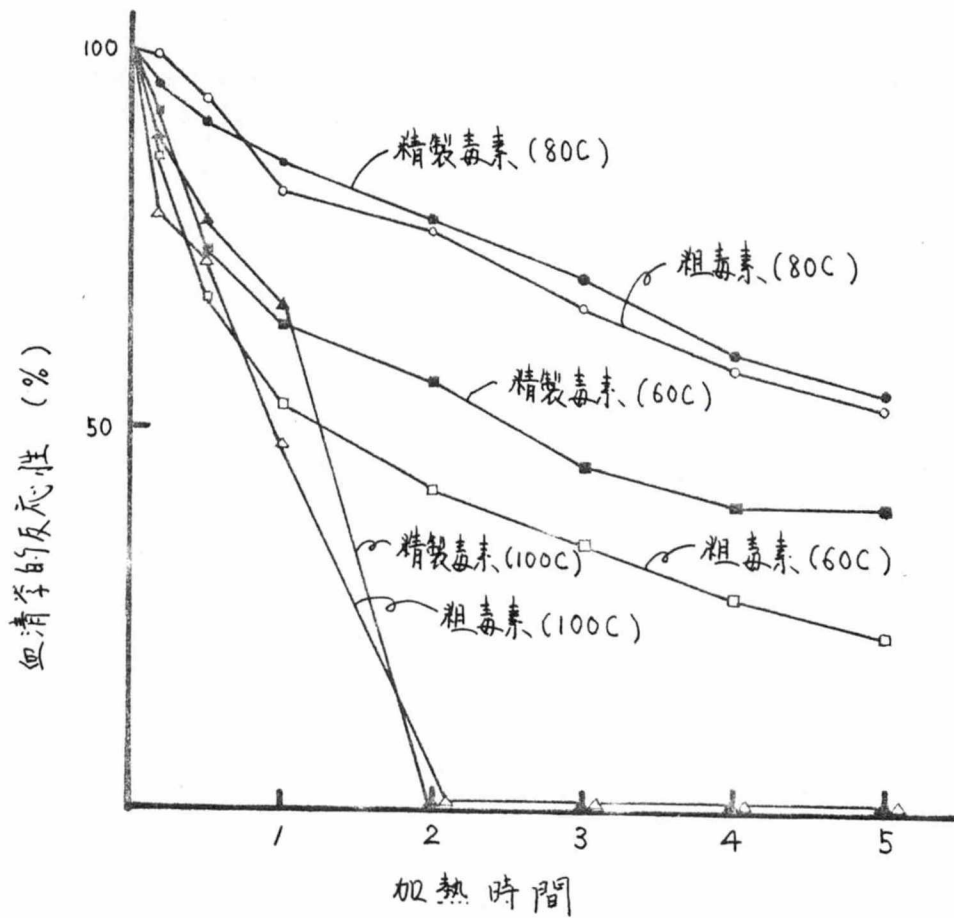


図41. 精製エンテロトキシンAと粗毒素Aの60, 80, 100C加熱による血清学的反応性の変化.

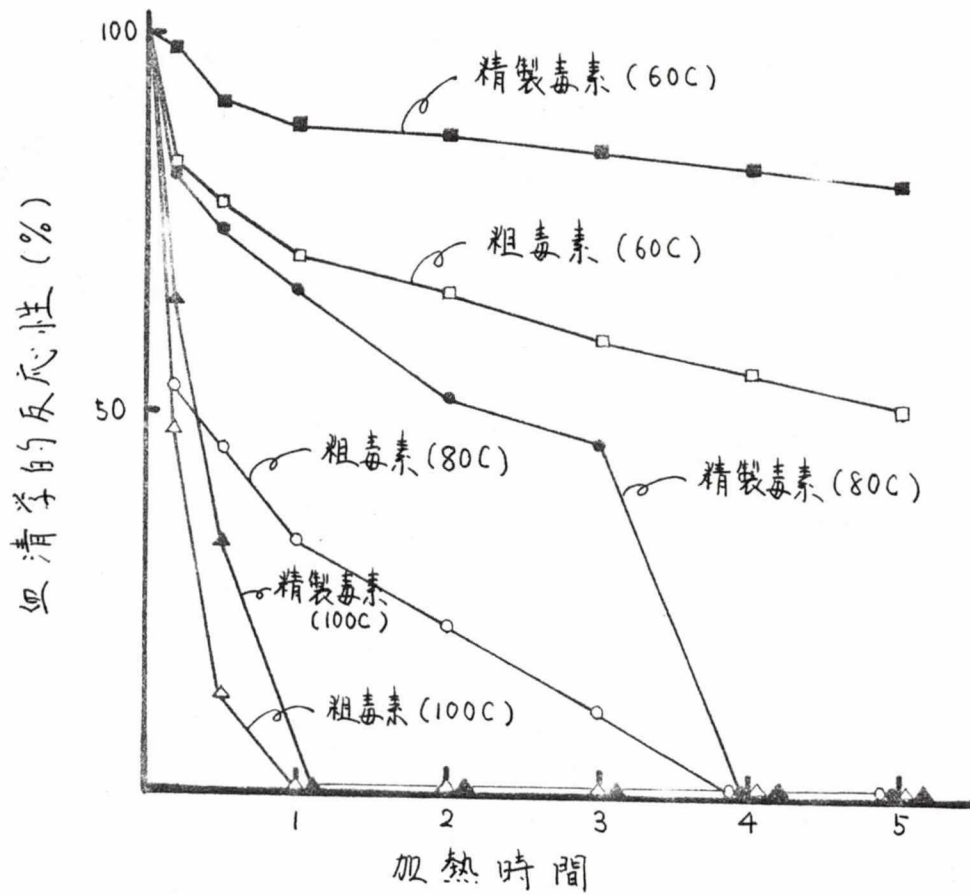


図42. 精製エンテロトキシンBと粗毒素Bの60, 80, 100°C加熱による血清学的反応性の変化

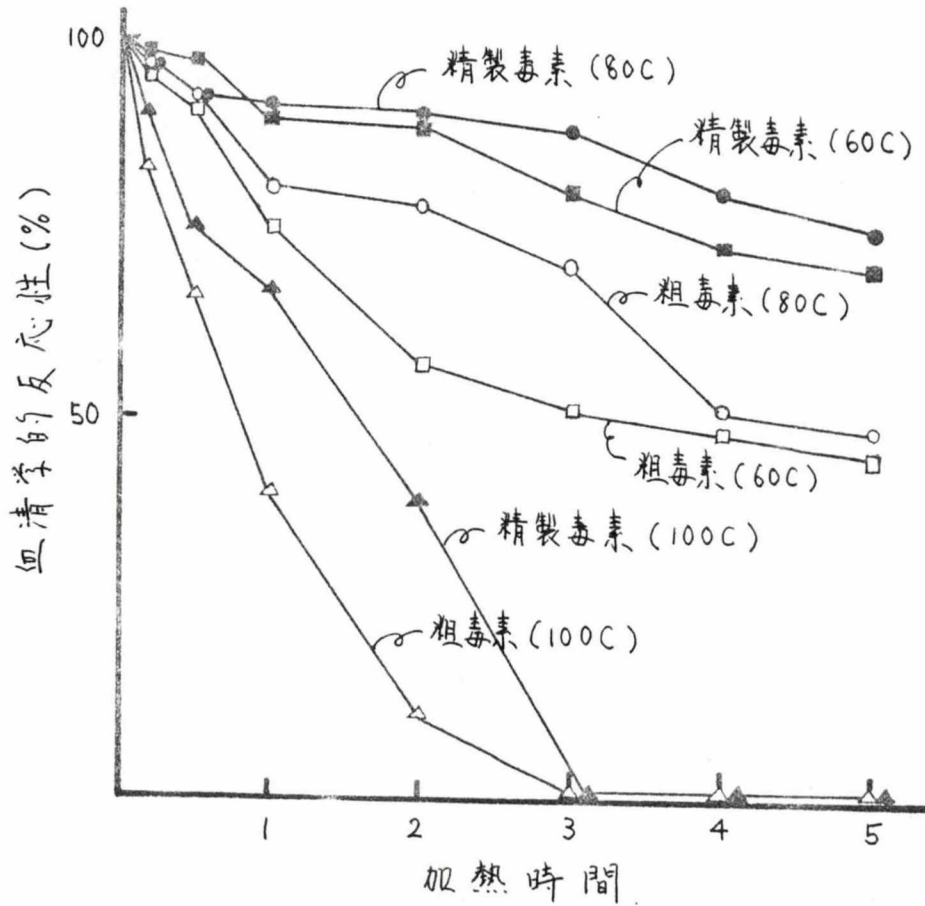


図43. 精製エテロトキシンC<sub>2</sub>と粗毒素C<sub>2</sub>の60, 80, 100C 加熱による血清学的反応性の変化



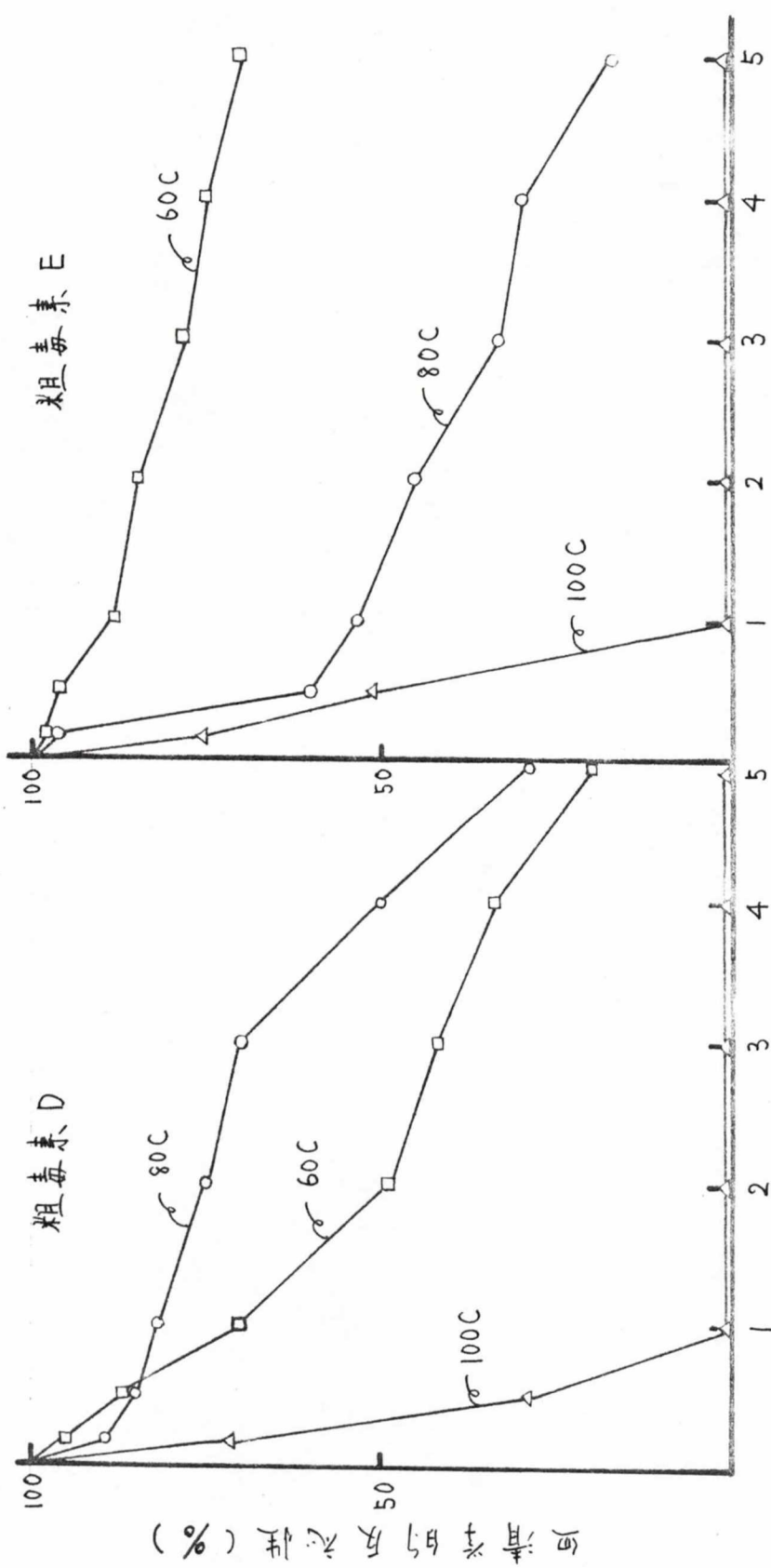


図44. 粗毒素Dおよび粗毒素Eの60, 80, 100C加熱による血清学的反応性の变化

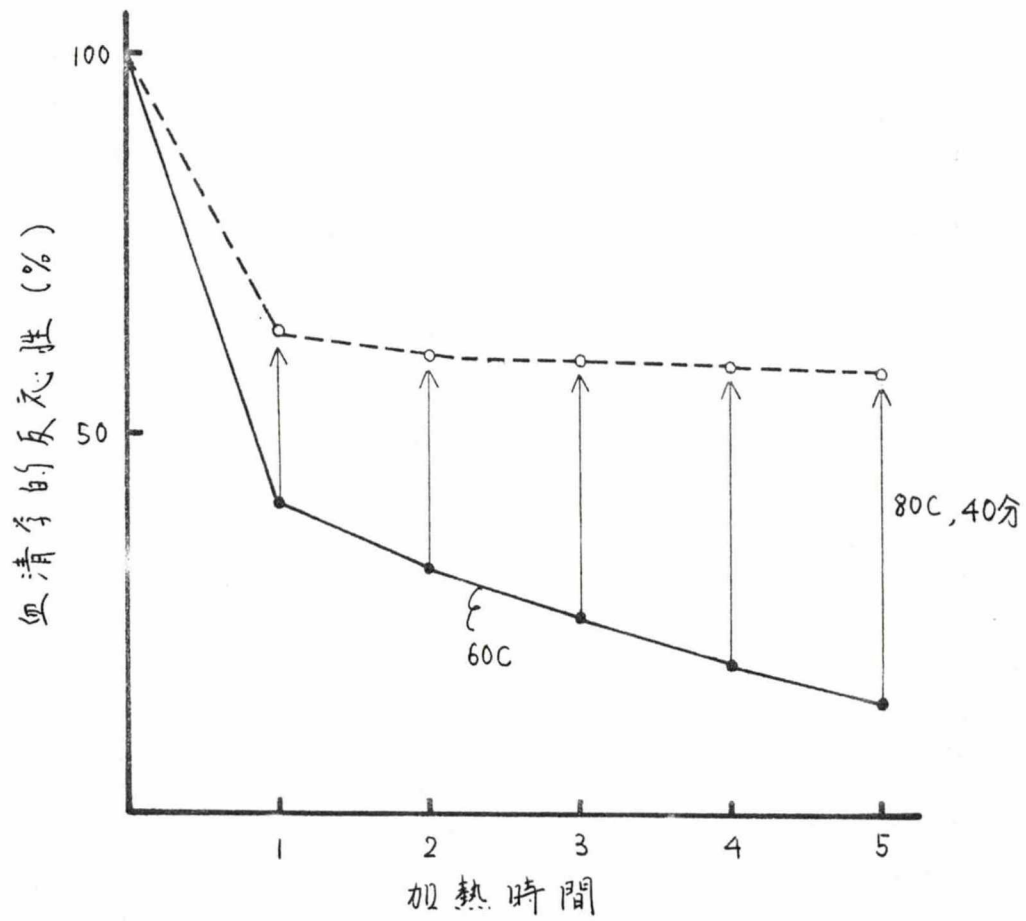


図45. 60C, 1, 2, 3, 4, 5時間加熱処理した精製  
 インテロトキシンAの80C, 40分再加熱による血清  
 学的反応性の復元.

表3. 1969~74年東京都内に発生したブドウ球菌食中毒の推定原因食品から分離した黄色ブドウ球菌の  
 エンテロトキシン産生能と型別

食品別	事例数	エンテロトキシン型										不定型
		A	B	C	D	AC	AD	ACD	ACE			
弁当類	40	13	3	8	3	4	4	1				4
おにぎり	17	6		2	2	2	4					1
パン類	10	4		2		2						2
寿司類	8	3		1	1	1	2					
和菓子	8	4		2	1		1					
洋菓子	7	3	1	1				1				1
ローストチキン	4	1				2					1	
その他	9	5	2		2							
合計 (%)	103	39 (37.9)	6 (5.8)	16 (15.5)	9 (8.7)	11 (10.7)	11 (10.7)	2 (1.9)	2 (1.9)	1 (1.0)	1 (1.0)	8 (7.8)

表4. 自然界由来黄色ゴドウ球菌のエンテロトキシン産生能および型別成績

由来	被検菌株数	エンテロトキシン産生株数 (%)	エンテロトキシン型												エンテロトキシン非産生株数				
			A	B	C	D	AB	AC	AD	BC	BD	CD	CE	ABC		ABD	ACD	ACE	BCD
健康人由来株	99	66 (66.7)	9	5	19	5	1	13	1	2	5	1	2	3					33
鼻前庭由来株	98	68 (69.4)	6	4	35	6		9	5			1		1	1				30
糞由来株	96	68 (70.8)	11	7	29	2	1	6	3	2	3			3		1			28
調理人手指由来株	99	70 (70.7)	18	2	26	6		6	7		1			4					29
合計 (%)	392	272 (69.4)	44	18	109	19	2	34	16	2	2	9	1	1	2	11	1	1	120
			*(16.2)(6.6)(40.1)(7.0)			(12.5)(5.9)			(3.3)			(4.0)							

※ あるエンテロトキシン型を産した株数 / エンテロトキシン産生総株数 (272株) × 100

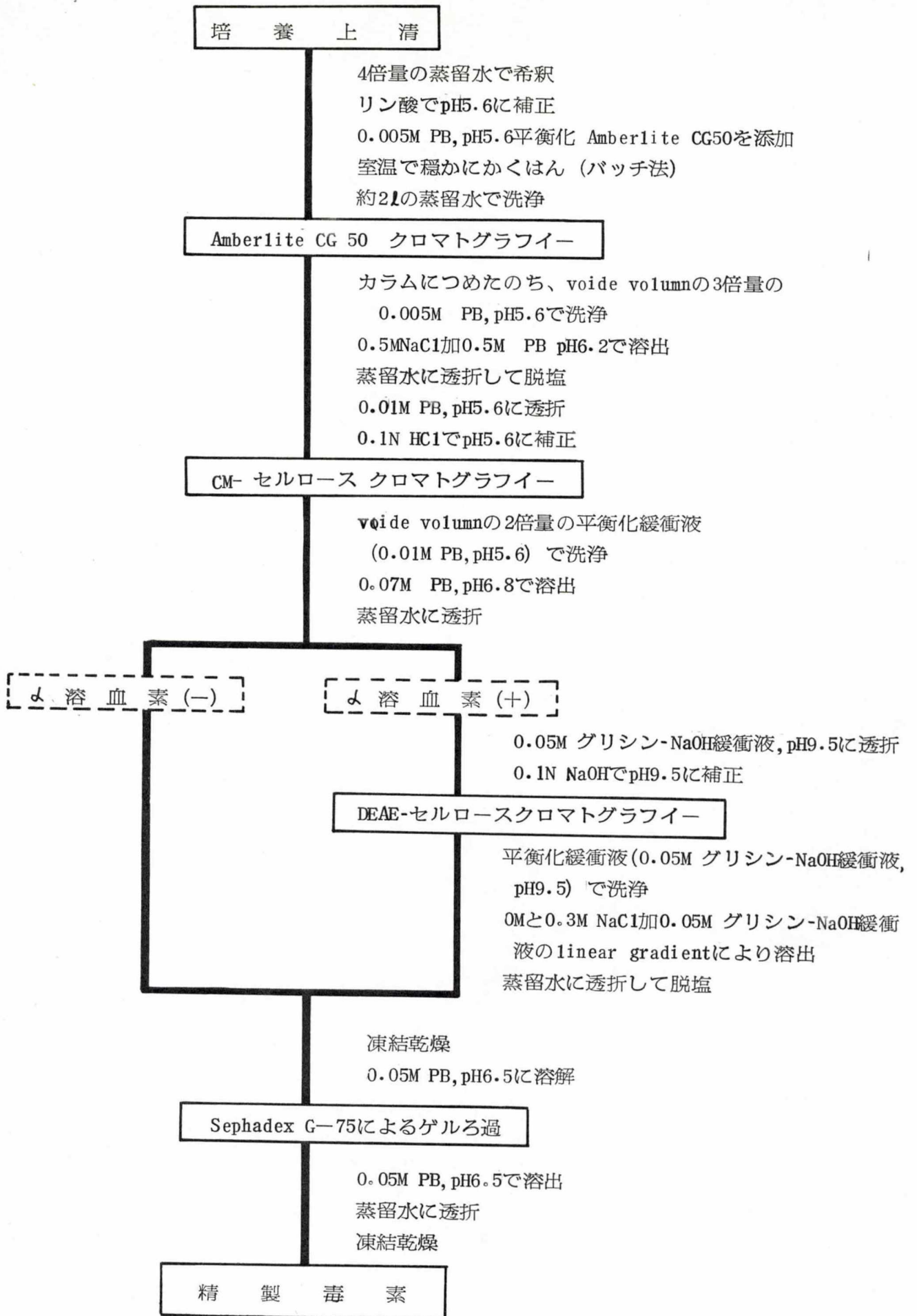


図46. ブドウ球菌エンテロトキシンの精製操作過程