

氏名(本籍)	山田 澄夫(東京)
学位の種類	獣医学博士
学位記番号	乙第93号
学位授与の日付	昭和51年11月29日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題名	ブドウ球菌エンテロ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——
論文審査委員	(主査) 教授 今井 信実 (副査) 教授 越智 勇一 教授 山田 俊雄

論文内容の要旨

ブドウ球菌食中毒は、黄色ブドウ球菌が産生するエンテロトキシン(以下 Ent と略)を含んだ食品をヒトが摂取することにより生ずる典型的毒素型細菌性食中毒である。本食中毒の原因物質が Ent であることは、すでに1930年代より明らかにされ、現在までに抗原特異性を異にするA, B, C, DおよびEの5型の存在が確認されている。

著者は本毒素の検査体系—特に Ent の検出法の確立—と本食中毒予防の基礎を確立するための研究を行った。以下、各項目別にその概要をのべる。

1. Ent A, B, C, DおよびEの精製

本菌食中毒はわが国のみならず文明諸外国においても高い発生率をしており食中毒発生に際しての確実な診断および疫学調査は公衆衛生上極めて重要な課題となっている。本菌食中毒の最も確実な診断は、推定原因食品中に極めて微量に含まれる Ent を検出することである。微量毒素の検出法としては、型特異的抗 Ent 血清を用いた逆受身赤血球凝集反応や radioimmunoassay などによる抗原—抗体反応が有効であるが、これらの方法を応用するためには極めて高い特異性を持つ抗血清ないし抗体グロブリンが必要である。それにはA~Eの各 Ent を免疫学的に均一な標品までに精製し、それを免疫原として型特異的抗血清を作成することである。

一方、毒素分子の構造と抗原性や毒素活性との関係、毒素の作用機序の解明のためにも精製毒素を得ることが必要である。

これまでにも主として米国の一部の研究所や大学において Ent の精製が試みられてきたが、著者は以下の本毒素産生菌株と精製操作により、A~Eのすべての型の Ent の簡易精製を試み、高純度な精製標品と型特異的抗 Ent 血清を得ることができた。

Ent A~E の産生に用いた黄色ブドウ球菌は、A型に13N-2903, B型にC-243, C型に493, D型に1151, E型に FR1326の各菌株である。毒素産生培地としては、4%NZ-amine 培地を用い、37°C, 24~48時間振とう培養し、その遠心上清を精製の出発材料とした。精製過程における Ent の検出は reference 抗 Ent A~E 血清を用いたスライドゲル内沈降反応と、サルへの経口投与または静脈内接種による嘔吐発現の有無

により、精製標品の純度は後述の各 Ent の Amberlite CG-50 画分（以下粗毒素と略）をウサギに免疫して得た抗粗毒素血清との Ouchterlony のゲル内沈降反応により検討した。

Ent 精製の第1段階では、濃縮操作と部分精製をかねてすべての型に共通に Amberlite CG-50 クロマトグラフィーのバッチ法を用いた。その結果、いずれの場合も多量の培養上清から効率よく Ent を濃縮することが可能であった。

本実験に供したAおよびB産生株は α -溶血毒を産生しないため、Ent A とBの精製では、ついでCM-セルロースクロマトグラフィーと Sephadex G-75 または G-100 のゲルろ過を組み合わせた3段階の操作により、免疫学的に単一の精製標品を得ることができた。この方法による回収率はAでは36%、Bでは40%であった。

一方、培養上清中に多量の α -溶血毒を含む Ent C₂、DおよびEの精製では、上記3段階の操作に、Ent と α -溶血毒の分別方法として DEAE-セルロースクロマトグラフィーを導入した。Ent E の精製では、さらに他のタンパク夾雑物を除去するために DEAE-セルロース再クロマトグラフィーを用いた。その結果、Ent C₂ は4段階、E は5段階で精製標品を得ることができ、その回収率は10%および5%であった。しかしながら、Ent D は DEAE-セルロース再クロマトグラフィー、6M 尿素を用いた Sephadex G-75 ゲルろ過、等電点画分の7段階の操作によってもなお、最終標品から Ent 以外のトリブシン抵抗性のタンパク夾雑物を分別することはできなかった。

各最終標品で免疫して得た抗血清は Ouchterlony のゲル内沈降反応において、抗 Ent A~C₂ および E 血清は対応する精製毒素と粗毒素に対して1本の沈降線を形成し、それらは reference Ent とその抗血清が形成する沈降線と完全に融合した。抗 Ent D 血清は粗毒素に対して2本の沈降線を形成したが、非 Ent 画分をリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィーにより特異性の高い抗血清を作成することができた。

各標品の免疫学的特異性をゲル内沈降反応と催吐活性中和試験で検討した結果、各標品は対応する抗血清とのみ沈降線を形成し、その催吐活性は特異的に中和された。逆に、他の型の抗血清とは沈降線を形成せずその活性も中和されなかった。

以上の結果から、既知あるいは未知の Ent は簡易化した同一精製法- α -溶血毒非産生株は、1) Amberlite CG-50 を用いたバッチ法による培養上清中の Ent の濃縮、2) CM-セルロースクロマトグラフィー 3) Sephadex G-75 ゲルろ過の3段階、 α -溶血毒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段階一で高純度な精製標品を得ることが可能であると推定された。

2. 精製毒素の物理化学的性状

精製毒素の物理化学的性状、酸・アルカリおよびタンパク分解酵素などに対する安定性、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は、タンパク化学的見地から極めて興味ある問題であり、しかも毒素の作用機序を明らかにする重要な手がかりを与えるであろう。現在までに、これら研究の大部分は産生量が多く、精製の容易な Ent B についてなされているに過ぎず、他の型の毒素についての研究は極めて少ない。本菌食中毒事例で最も高頻度に検出される Ent 型がAであるという事実を考慮に入れるならば、Ent A の性状の検討は極めて重要な意味を持っているといえる。

著者は前項でのべた Ent 精製法により得た精製標品、特に本菌食中毒で主役を演じている Ent A の物

理化学的性状を明らかにするとともに、他の型の毒素についても検討を加えた。

精製 Ent A は 250nm に極小吸収、277nm に極大吸収を持ち、核酸、脂質および炭水化物を含まないトリプシン抵抗性の単純タンパクであった。精製毒素のシュリーレンパターンは3時間、経時的に測定しても左右対称で毒素分子の均一性が示され、その S_{20w} は 2.71S、分子量は Sephadex G-75 ゲルろ過法で 26,000、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で 27,000、沈降平衡法で 30,000 と推定された。精製毒素は isoelectrofocusing により血清学的に同一な pH7.0 と pH6.5 の2つの大きな画分と pH8.0 の小さな画分に分画された。最大の Ent 画分を示した pH7.0 を本毒素の等電点 (I_p) とした。アミノ酸分析の結果、精製毒素は 214 個のアミノ酸残基から成り立っていると推定された。各アミノ酸残基数は、アスパラギン酸34、グルタミン酸25、ロイシン22、リジン21、スレオニン、グリシン、チロシン各15、バリン13、セリン、イソロイシン各10、フェニールアラニン8、アラニン7、アルギニン6、ヒスチジン5、トリプトファン4、プロリン3、メチオニン1であった。

精製 Ent B は 250nm に極小吸収、277nm に極大吸収を持ち、核酸、脂質および炭水化物を含まないトリプシン抵抗性の単純タンパクであった。精製毒素のシュリー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、2.68S、分子量は Sephadex G-50 ゲルろ過法で 29,000 と推定された。精製は isoelectrofocusing において、血清学的に同一な pH7.62、pH8.35、pH8.70 の3画分に分画され、pH8.35 を本毒素の等電点とした。

精製 Ent C₂ と E も 250nm に極小吸収、277nm に極大吸収を持ち、核酸、脂質および炭水化物を含まない単純タンパクであった。両毒素ともその分子量は Sephadex G-50 ゲルろ過法で 29,000 と推定された。精製 Ent C₂ も isoelectrofocusing において、pH6.55 と pH6.70 の2つの大きな画分および pH6.0 と pH8.0 の2つの小さな画分に分画され、pH6.70 を本毒素の等電点とした。

精製 Ent A~C₂ および E は pH4.3 でのディスク電気泳動において単一なバンドを形成したが、pH9.4 での泳動では 2~4 本のバンドを形成することを認めた。pH9.4 での泳動で分画される複数のバンドは血清学的には同一で、しかも isoelectrofocusing で得られた画分に相当することを Ent A で実証した。この複数のバンドは、超遠心分析および Hedrick-Smith 法による分析結果から、毒素分子の分子サイズの違いによって生じるものでなく、Charge の差を異にする charge isomer に起因するものであると推定された。

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った等電点を有するトリプシン抵抗性の charge isomer タンパクであろうと結論された。Ent D は完全には精製されなかったが、本毒素も他の型の毒素と同様の物理化学的性状を有する分子量約 29,000、等電点 7.70 前後のトリプシン抵抗性の単純タンパクであろうことが初めて推察された。

3. Ent の加熱に対する安定性

Ent は耐熱性毒素であるため、本毒素を含んだ食品は加熱調理後も、本菌食中毒の原因食品となり得ると考えられている。したがって、本毒素の耐熱性に関する問題は、食品衛生上極めて重要である。しかしながら、Ent A~E の加熱処理による毒素活性の変化の差を比較検討した成績はほとんど得られていないのが現状である。

本菌食中毒の予防の立場から極めて重要な問題である毒素活性と熱処理の関係を、得られた精製 Ent A

～C₂ および粗毒素A～Eを用いて検討した。加熱温度は60C, 80C および 100C とし、各5時間加熱処理による毒素の抗原性の経時的変化を特異抗血清を用いた Oudin 法により推定した。各毒素は 50μg を0.05M リン酸緩衝食塩水、pH7.2 に溶解し、所定の温度で加熱した。

精製 Ent A は 60C, 3時間, 80C, 5時間, 100C, 1.25時間で50%失活し, 100, 2時間で完全に失活した。粗毒素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。粗毒素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時間で完全失活した。

精製 Ent C₂ は 60C および 80C, 5時間で25～30%, 100C, 2時間で50%失活し, 100C, 3時間で完全に失活した。

粗毒素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。

粗毒素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。

以上の結果から、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考えられた。Ent A, C₂ D が高温で比較的安定であることは、後述のごとく本菌食中毒原因食品から検出される黄色ブドウ球菌はこれらの型の毒素を産生するものが多い成績から、食中毒発生との関係上特に注目された。

Ent A, C₂ およびDは 80C より 60C で早く不活化され、A および C₂ では粗毒素のみならず精製毒素においてもこの現象が観察された。この現象が一部の細菌タンパク毒素で認められている加熱温度差によるタンパク分子の立体構造の変化によるものか否かを、精製 Ent A を用い、加熱一再加熱の実験系で検討した。その結果、60C, 1, 2, 3, 4および5時間加熱した各試料は 80C, 40分の再加熱により20～45%の活性の復元が認められた。60C で加熱された試料は微細絮状物を形成して混濁したが、再加熱により絮状物は消失して透明となった。Ent A, C₂ およびDで認められるこの特異的な熱安定性は、低温度 (60C) でのタンパク分子の集合 (aggregation) と高温 (80C) での再加熱による分子の解離 (dissociation) によるものであることが推察され、この特性は本毒素の活性と構造との関係を解析するうえで重要な手がかりを与えるものであることが強く示唆された。

4. 毒素産生性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

本菌食中毒は、他の細菌性食中毒が食品衛生意識の向上にともない減少しているのに対し、漸次増加の傾向が認められている。このことは食品が高頻度に黄色ブドウ球菌に汚染されていることを意味するものである。ヒト、動物その他これらを取り巻く環境に広く分布するすべての黄色ブドウ球菌が 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本菌の Ent 産生能とその型別には密接な関係があるはずであり、その検討は本菌食中毒の予防対策に重要な手がかりを与えるであろう。

以上の理由から、食中毒由来黄色ブドウ球菌と自然界由来黄色ブドウ球菌の Ent 産生能とその型別を行った。

供試菌株として、1969～74年にかけて東京都内で発生した103事例の本菌食中毒の原因食品から検出した食中毒由来103株、自然界由来株は各材料より本菌種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株および市販食品由来99株、計392株である。Entの検出は、上記菌株の4% NZ-amine 培養上清を $1/50$ に濃縮したものを抗原液とし、本研究で作成した特異抗 Ent A~E血清を用いて $5\mu\text{g/ml}$ の本毒素を検出できるスライドゲル内沈降反応により行った。

食中毒由来103株中97株がA~Eのいずれか、もしくは数種の Ent を産生した。その Ent 型はA型39株、C型16株、A・CおよびA・D型各11株、D型9株、B型6株、A・C・D型2株、A・C・E型1株であった。

自然界由来株は392株中272株(66.4%)が Ent 産生株であった。各種材料由来株の産生 Ent 型は、健康人糞便由来株ではC型35株、A・C型9株、AおよびD型各6株、A・D型5株、B型4株、C・E、A・C・DおよびA・C・E型各1株、鼻前庭由来株ではC型19株、A・C型13株、A型9株、B、DおよびC・D型各5株、A・C・D型3株、B・DおよびA・B・D型各2株、A・B、A・DおよびA・B・C型各1株、調理人手指由来株ではC型29株、A型11株、B型7株、A・C型6株、A・D、C・DおよびA・C・D型各3株、DおよびB・C型各2株、A・BおよびB・C・D型各1株、食品由来株ではC型26株、A型18株、A・D型7株、DおよびA・C型各6株、A・C・D型4株、B型2株、C・D型1株であった。

食中毒由来株は Ent A 産生株が多いのに対して、自然界由来株は各種材料とも Ent C 産生株が多く認められ、食中毒と生態系の黄色ブドウ球菌の Ent 型別分布は必ずしも同一でないことが示された。この違いが本菌食中毒発生にいかなる意味を持つのか、この点に関する今後の検討が本菌食中毒の予防の立場から極めて重要であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

人の細菌性食中毒の一つであるブドウ球菌食中毒は、黄色ブドウ球菌の産生するエンテロトキシン(以下 Ent と略記)を含有する食品を摂取することにより生ずる典型的毒素型細菌性食中毒である。本食中毒の原因物質が Ent であることはすでに1930年代から明らかにされ、現在までに抗原特異性を異にするA, B, C, DおよびEの5型の存在が確認されている。

著者は本毒素の検査体系一特に Ent の検出法の確立一と本食中毒予防の基礎を確立するための研究を行った。以下、その成績の概要を記述する。

1. Ent A, B, C, D および E の精製

本菌食中毒の最も確実な診断は、推定原因食品中に極めて微量に含まれている Ent を検出することである。微量毒素の検出法としては、型特異的抗 Ent 血清を使用して、抗原-抗体反応を実施するのが有効であるが、これらの血清反応を試験するためには著しく高度の特異性を有する抗血清あるいは抗体グロブリンを必要とする。それがためには、A~Eの各 Ent を免疫学的に均一な標品まで精製し、それを免疫原として型特異的抗血清を調製することである。

一方、毒素分子の構造と抗原性や毒素活性との関係、毒素の作用機序の解明のためにも精製毒素を得ることが必要である。

著者は Ent 産生菌株につき Ent 精製のためには、A~Eの各型の Ent の簡易精製を試み、その結果

高純度な精製標品と型特異的抗 Ent 血清を取得することができた。

供試菌株： Ent A 産生株 …… St. aureus 13N-2909
 " B " …… " C-243
 " C₂ " …… " 493
 " D " …… " 1151
 " E " …… " FRI 326

毒素産生培地： 4% NZ-amine 培地を使用し、37°C、24—48時間振とう培養し、その遠心上清を精製用の出発材料とする。

精製過程における Ent の検出には、reference 抗 Ent A~E 血清を用いたスライドゲル沈降反応の試験のほか、サルへの経口投与または静脈内接種による嘔吐発現の有無により判定する。精製標品の純度は各 Ent の Amberlite CG-50 画分（以下、粗毒素と略記）にて家兎を免疫して得た抗毒素血清との Ouchterlony のゲル内沈降反応により検討した。

上記5型の Ent 精製過程では、注目すべき点として、A、Bの各毒素の産生株は、 α -溶血毒素を産生しないため比較的速やかにゲル濾過法などによりこれら A、B 両 Ent を精製できた。すなわち、何れも免疫学的には単一の精製標品として得られた。

一方、培養上清中に多量の α -毒素を含む Ent C₂ D および E の精製ではとくに Ent と α -溶血毒との分別方法として DEAE-セルロースクロマトグラフィーを導入した。結局、Ent C₂ と、Ent E とはそれぞれ4段階か5段階の過程を経て精製標品を得るに至ったが、Ent D のみは7段階の処理に至ってもなおトリプシン抵抗性のタンパク夾雑物を分別することができなかった。

2. 精製毒素の物理化学的性状

精製 Ent A：250nm に極小吸収、277nm に極大吸収を有し、核酸、脂質および炭水化物を含まないトリプシン抵抗性の単純タンパクと見なされ、精製毒素のシュリーレンパターンは3時間、経時的に測定しても左右対称で毒素分子の均一性が示され、その S_{20w} は 2.71S、分子量は沈降平衡法で 30,000 と推定された。精製毒素は isoelectrofocusing により血清学的に同一な pH7.0 と pH6.5 との2つの大きな画分と pH8.0 の小さな画分とに分画された。最大の Ent 画分を示した pH7.0 を本毒素の等電点 (Ip) とした。またアミノ酸分析の結果、精製毒素は214個のアミノ酸基から成立しているものと推定される。

精製 Ent B：250nm に極小吸収、277nm に極大吸収を有し、Ent A 同様に核酸、脂質および炭水化物を含まないトリプシン抵抗性の単純タンパクであった。精製毒素のシュリーレンパターンは各時間において左右対称を示し、その S_{20w} は 2.68S、分子量は29,000と推定される。また等電点は pH8.35 と判定される。

精製 Ent C₂ および Ent E：精製 B に全く同じ単純タンパクであり、分子量も一致した。精製 C₂ の等電点は6.70と判定される。

以上を総括すると、Ent A、B、C₂ および E は分子量26,000~30,000、沈降定数(S_{20w})は 2.7S 前後の幾つかの異なる等電点を有するトリプシン抵抗性の Charge isomer タンパクであろうと結論された。Ent D は完全に精製されなかったが、本毒素も他の型の毒素と同様の物理化学的性状を有する分子量約29,000、等電点7.70前後のトリプシン抵抗性の単純蛋白であろうことが初めて判明した。

3. Ent の加熱に対する安定性

Ent は耐熱性毒素であるため、本毒素を含んでいる食品は加熱調理後も、本菌食中毒の原因食品となり得ると考えられていた。従って本毒素の耐熱性に関する問題は食品衛生上極めて重要である。しかし Ent A~E の加熱処理による毒素活性の変化の差を比較検討した成績はほとんど得られていないのが現状である。そこで著者は本菌食中毒の予防の立場から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する目的で、今回の精製毒素 Ent A~C₂ および粗毒素 A~E を用いて実験を開始した。すなわち加熱温度は 60°C, 80°C および 100°C とし、各 5 時間加熱処理による毒素の抗原性の経時的変化を特異抗血清を用いた Oudin 法により推定した。なお各毒素は 50 μg を 0.05M リン酸緩衝食塩液 (pH7.2) に溶解し、所定の温度で加熱した。

結果：精製毒素は粗毒素よりも耐熱性であり、また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考えられる。Ent A, C₂, D の 3 毒素が高温度にも比較的安定であるのは、本菌食中毒原因食品から検出される *St. aureus* としてはこれらの型の毒素を産生する菌株が頻発する知見に徴して、食中毒発生との関係上特に注目された。

Ent A, C₂ および D は 80°C よりも 60°C で早く不活化され、A および C₂ では粗毒素のみならず精製毒素においてもこの現象が観察された。この原因としては加熱温度差によるタンパク分子の立体構造の変化によるものか否かを知らうとして、精製 Ent を用いて加熱—再加熱の実験系で検討した。その結果、60°C に 1, 2, 3, 4, および 5 時間加熱した各試料は 80°C, 40 分の再加熱により 20~45% まで活性の復元を認めることになった。

すなわち、60°C で加熱された試料は微細架状物を形成して混濁したが、再加熱によりこの架状物は消失して透明となった。

斯くして、Ent A, C₂ および D において見られるこの特異的な熱安定性は低温度 (60°C) でのタンパク分子の集合 (aggregation) と高温度 (80°C) での再加熱による分子の解離 (dissociation) によるものであることが推察され、この特性は本毒素 (Enterotoxin) の活性と構造との関係を解析する上で重要な鍵となることを示唆している。

4. 毒素産生性黄色ブドウ球菌 (enterotoxigenic *St. aureus*) の分布と本菌食中毒発生との関連

本菌食中毒は、他の細菌性食中毒が食品衛生上の知識向上に伴い漸次減少しているのに拘わらず漸次増加の傾向にあることが認められている。この事実は、食品が高頻度に *St. aureus* に汚染されていることを意味するものである。そこで著者は、改めて食中毒由来のほか、人、動物、その他自然環境由来の本菌につき毒素型別に基く分布を調査したところ、食中毒由来の 103 株中 97 株が A~E のいずれか、もしくは数種の Ent を産生し、しかもその種類は Ent A 型…39 株、C 型…16 株、A・C および A・D 型各 11 株、D 型…9 株、B 型…6 株、A・C・D 型…2 株、A・C・E 型…1 株であった。

一方、自然界由来株は 392 株中 272 株 (59.4%) が Ent 産生株であった。

結局、食中毒由来株には Ent A 産生株が頻出し、自然界由来株は各種材料とも Ent C 産生株を多く含んでいることが判明し、食中毒と生態系の *St. aureus* の Ent 型別分布は必ずしも同一でないことが証明された。

以上、著者は黄色ブドウ球菌の食中毒起因物質としてのエンテロトキンの精製、物理化学的及び免疫学的

性状，また本菌の自然界における分布状況を詳細に観察し，先人の未開拓の分野を徹底的に検討した業績は実地上の食品衛生行政への貢献も少なからず，よって獣医学博士の学位を受けるのに値する知見として認める。