腸炎ビブリオの毒素について

植 山 忠 郁

大阪市中央市場検査室

馬 場 威 尾 藤 行 雄

大阪府立大学農学部家畜微生物学教室

[受付: 11 月 12 日, 1964 年]

結 言

腸炎ビブリオについては分離, 同定, 疫学調査等に関して多くの研究がなされ, その分類学的位置もほぼ決定されている現状である。

しかしながら病原性の本態, とくに毒素についての研究報告は極めて少なく, 該毒素は DNA であるとする木村等¹⁾の報告, 及び蛋白様物質であるとする黒屋等²⁾の報告がみられる程度である。

また培養濾液中には毒性物質は存在しないといわれている。

そこで今回我々は一下痢患者から分離した腸炎ビブリオを用いて菌体構成成分としての毒性物質, 及び培養濾液中の毒性物質の抽出を行ったが, 従来の報告とやや異なると思われる結果を得たので報告する。

実験材料, 方法並びに結果

1) 使用菌株

茹蟄によつて激烈なる食中毒症状を示す一患者下痢便より, 純培養状に分離された腸炎ビブリオを用いた。本菌株は Bio type I, Sero type 5 の性状をもっている。

2) 菌体内毒素様物質の分離方法

図 1 に示した様に, 菌は 3% NaCl 加普通寒天培地に 37°C, 20 時間培養し, 反覆洗滌で得られた洗滌菌体为大缶製 French press を用いて 400 kg で破碎し, その遠沈上清を硫酸を用いて塩析を行い 4 分画とした。

この各分画を透析後, マウスに腹腔内接種したところ, C-1 分画すなわち硫酸 0~0.33 飽和迄で析出してくる部分に毒性(致死)を認めた。

次にこの C-1 分画に 0.05 N-HCl を pH 4.7~4.8 になる様に加え, 遠沈後沈澱を蒸溜水に浮游し, 0.1N-NaOH を用い pH 7.0 として溶解し, 上清も同様中和後, 各々の毒性をマウス腹腔内接種でしらべた。

第 1 図 菌体由来毒素様物質の分離操作

この結果 HCl 沈澱部分 (CP) に強い毒性を認めた。

この CP に更に $MnCl_2$ を 0.25 N の割合に加え, 遠沈によつて沈澱部分と上清部分に分け, 沈澱は溶解して各々を透析後マウスに腹腔内接種した。この結果上清部分 (CPS) に毒性を認めた。

次にこの CPS を Calcium phosphate gel を用いて更に

精製を試みた。すなわち CPS 40 ml (0.001M phosphate buffer pH 9.8) に対して, Calcium phosphate gel を 5g 加え, 良く攪拌後 2 時間放置し, 遠沈によって上清を取り, 沈渣は 0.001 M phosphate buffer (pH 6.8) で 3 回反覆洗滌し, 更に 0.005 M, 0.01 M, 0.05 M, 0.1 M, 0.2 M phosphate buffer (pH 6.8) で同様溶出操作を行ったが, 0.001 M で溶出する部分 (CPSS) のみにマウスに対する毒性が認められた。

この CPSS を更に Zone 電気泳動を用いて精製を行った。すなわち, 局方馬鈴薯澱粉を支持体 (7×1.5×30 cm) として, Tris buffer (pH 7.2) を用い, 定電流 2 mA/cm, 200~300 V, 2°C で 25 時間泳動し, 0.5 cm 幅に切断後, 5 ml の生食水で抽出を行い, 各ブロックの抽出液について 280 m μ の紫外部吸収を観察した。

この結果は図 2 に示した様であり, 原点から陽極へ 0~1.5 cm, 及び 3~4 cm の部分に UV 吸収の比較強い部分があり, 各々の毒性をマウス腹腔内接種でみた。その結果原点より陽極へ 3~4 cm の部分 (CT-1) に毒性物質の存在することを認めた。この CT-1 を酸沈澱によって濃縮し溶液の状態に保存した。(0~2°C)

第 2 図 CPSS の Zone 電気泳動

なおこの毒性物質の収量は湿菌量の約 0.06 % であり, またこの物質は凍結乾燥によって毒性の低下を来す様である。

3) 培養濾液中の毒性物質の分離

3 % NaCl, 0.5 % 酵母エキス, 1 % ペプトン水 (pH 7.2) に菌を接種, 37°C, 18 時間振盪培養した。

培養液を 0°C, 10,000 rpm, 60 分遠沈し上清部分を Seitz 濾過を行い, この濾液に硫酸を菌体の場合と同様に加え, 塩析, 透析を行った。

この結果 0.55~0.67 飽和で析出する部分 (F-3) にマウ

スに対する毒性が認められ, この F-3 に更に 0.05N-HCl を pH 4.7~4.8 になる様に加え, 遠沈後, 上清部分 (F-3S) と沈澱部分 (F-3P) を 0.1 N-NaOH を用いて pH 7.0 としマウスに腹腔内接種したところ, F-3S に毒性が認められた。

この F-3S に $MnCl_2$ を 0.25 N の割合に加え, 遠沈後透析し, 上清部分 (F-3SS) と沈澱部分 (F-3SP) をそれぞれマウスに接種した結果, F-3SP に毒性が認められた。なおこの F-3SP の数量は 8 mg/l であった。

4) 菌体由来毒性物質 (CT) の性状

CT は凍結乾燥直後においては毒性の低下はほとんど認められないが, 凍結乾燥後 -5~0°C に保存しておくで漸次失活する様である。

マウスに対する MLD は 15 g のマウスにおいて, 約 100~200 μ g であり腹腔内接種で 10~18 時間で斃死し, 全て下痢症状を伴い, 培養所見は小腸内に水様液を充満し, 腸は膨隆腫大している。なおその他の肉眼的著変は認められない。

次に化学的性状では Biuret 反応陽性, Molisch 反応陰性, Orcin-HCl 反応陰性, Diphenylamine 反応陰性, paper electrophoresis において BPB 染色陽性, Sudan III 脂肪染色陰性であった, また総 N 量をインドフェノール法で測定した結果は 7.85 % であった。

また CT の 24 時間水解物 (6N-HCl, 105~110°C) を paper chromatography にかけてみると, Asp, Meth, Arg, Hist, Lys, Cystine, Prol, Oxypol, Phenylala, Ala, Leu, Val, Tyro, Gly, Threo, Ser, Glut. acid, の 17 種のアミノ酸が検出され, $N-H_2SO_4$, 100°C, 6 時間水解においては単糖類は検出されなかった。

耐熱性については 60°C, 30 分加熱で毒性がなくなり, UV 吸収においては 280 m μ に吸収極大を認めた。

なおトリプシン消化によっても失活する様であるが, 供試マウスの数が少なかったため確実とは云いがたい。

濾液由来毒性物質の性状についてはまだしらべておらず, ただ Biuret 反応陽性, Molisch 反応陰性という結果を得ただけである。

5) 菌体由来 (CT), 濾液由来 (FT) の毒素様物質の比較。

CT, FT の相違点をみると硫酸塩析において CT は 0~0.33 飽和で析出し, FT は 0.55~0.67 飽和で析出してくる。

また, HCl pH 4.7~4.8 の等電点沈澱では CT は沈澱部分に, FT は上液部分にそれぞれ毒性物質が存在する。

$MnCl_2$ の 0.25 N の濃度においては CT は析出せず

上液部分に、FT は沈澱部分に毒性が存在する。

更に CT, FT の赤外線吸収におけるスペクトルを比較すると、 3000 cm^{-1} , 1750 cm^{-1} , 1275 cm^{-1} の各部分にそれぞれ吸収の差異が認められた。

考 察

菌体由来毒性物質は多くの点からその大部分が蛋白質によつて構成されていることは確かであるが、N量の点から核酸、多糖体、脂質以外の不明の物質を含んでいるようである。

濾液由来毒性物質については精製していないので云々できないが、硫酸塩析、塩酸等電点沈澱、塩化マンガノ除核酸、及び赤外線吸収スペクトルからみて、菌体由来のそれとは明らかに異質のものと思われ、HCl pH 4.7~4.8 で沈澱しないところから、いわゆる envelope substance と考えられる。

総 括

1) 菌体及び濾液からマウスに対して毒性を有する物質を抽出し、菌体由来毒性物質の MLD は $200\text{ }\mu\text{g}$ 以下

であつた。

2) 両物質は紫外部吸収において $280\text{ m}\mu$ で吸収極大を示し、Biuret 反応、BPB 染色陽性であるところから白様物質と考えられる。

3) 両物質の塩及び酸に対する沈澱性は相反しており、赤外線吸収スペクトルにおいても両物質の吸収に差異が認められた。

終りに臨み多大の御援助を戴いた当教室、大村公一、永野勝己、宮田義人専攻生に感謝する。尚本論文の要旨は昭和 38 年 8 月、第 62 回日本獣医公衆衛生学会（近畿）、及び昭和 38 年 10 月、第 20 回日本公衆衛生学会総会に於て発表した、又本研究は文部省科学研究費総合研究、好塩菌の研究班より研究費の補助を受けた。

文 献

- 1) 木村義民・他：日本細菌学会総会演説抄録（第 35 回、1962 年）、日本細菌学雑誌、17(7)、646、1962.
- 2) 黒屋政彦・他：日本細菌学雑誌、18(1)、57、1963.

Studies on the Toxic Substance of *Vibrio Parahaemolyticus*

Tadaiku UHEYAMA, Tsuyoshi BABA and Yukio BITO

Department of Animal Microbiology, College of Agriculture, University
of Osaka prefecture, Sakai City, Osaka, Japan

Toxic substance was isolated from the cell and culture filtrate of *Vibrio parahaemolyticus* through ammonium sulfate fractionation, hydrochloric acid precipitation, manganese chloride precipitation and zone electrophoresis.

These substance was positive in Biuret reaction and BPB staining and showed the absorbtion of maximum in $280\text{ m}\mu$, while negative in sugar and nucleic acid reaction

These facts strongly suggest this substance to be protein like.