

# ブドウ球菌のエンテロトキシンに 関する研究 (第1報)

疫学課 山田 慶子  
前田 博之  
林 英夫

林 由紀子(北大応電研)

ブドウ球菌食中毒は、細菌性食中毒の中で腸炎ピブリオに次いで大きな割合を占めている。その原因物質は、ブドウ球菌の産生するエンテロトキシン(以下Entと略)であり、現在、その抗原特異性によってA, B, C, D, E, Fの6種類存在することが明らかにされているが、そのなかで、Ent Aによっておこる食中毒が非常に多い。

食中毒の原因検索上、毒素そのものを検出することが、より望ましく、その方法について今まで種々の報告がなされている。いずれの方法においても型特異抗血清が必要とされ、そのためには、まず、抗原として用いる毒素を単離精製しなければならない。

そこで、私達は、都衛研でおこなわれた方法<sup>1)</sup>に基いて、Ent Aの精製を試みたので報告する。(中間報告である。)

## I 材料と方法

### 1) 使用菌株

東京都立衛生研究所より分与された *Staphylococcus aureus* 13N-2909<sup>2)</sup> (*Staphylococcus aureus* 100株のEnt A強度産生変異株)

### 2) 培地および培養方法:

毒素産生用培地は、柴田ら<sup>3)</sup>が用いた3%ポリペプトン(大五栄養化学)、3%ラクタルブミン水解物(NBC)、0.001%ナイアシン、および0.0005%チアミンを含む液体培地(PH6.8)である。

この培地250 mlずつを500 ml坂口式振とう培養フラスコに分注したものをもちいた。

培養方法—トリプトソイ寒天培地上の10数コロニーを100 mlのハートインフュージョンブイヨン培地に接種し、37°C、18時間静置培養した(seed culture)。

その25 mlずつを上記の培地の入ったフラスコ32本に接種し、35°C、48時間振とう培養した。

### 3) Ent Aの定性:

各精製過程におけるEnt Aの検出には、都衛研から分与された抗Ent A血清を用い、都衛研で改良されたスライドゲル内沈降反応<sup>4)</sup>でおこなった。

### 4) タンパクの定量:

各精製過程におけるタンパク質の測定は、分光光度計(日立124)を用いて280 nmの吸

取によっておこなった。

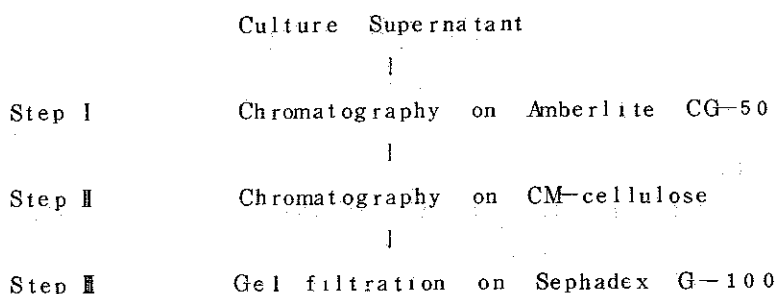
5) ゲル電気泳動：

Reisfeldら<sup>5)</sup>の方法によりPH4.3の条件でPolyacrylamide disc 電気泳動をおこなった。

6) Ent Aの精製：

培養液を連続遠心(14000 rpm)して得られた上清8ℓから精製を始めた。精製の過程を図1に示す。

図 1



Step I

培養上清8ℓを蒸留水で5倍量に希釈し、リン酸でPH5.6に補正する。これに0.005Mリン酸緩衝液(以下PBと略)、PH5.6で平衡化したAmberlite CG-50約200mlを加え、室温で1時間攪拌してEnt Aを吸着させた。(バッチ法)。ついで樹脂を0.005M, PH5.6で洗い(25×45)cmのカラムに充てんし、0.5M NaCl加0.5MPB, PH6.2で溶出した(室温)。

培養上清8ℓずつ2回Step Iの操作をおこなった。

Step II

このEnt A活性画分を集め、0.01MPB, PH5.6で1日透析した(4°C)。透析液は3回かえた。

これを同一緩衝液で平衡化したCM-cellulose, (カラム25×45cm)でカラムクロマトグラフィーをおこなった(4°C)。

0.07MPB, PH6.8で溶出したEnt A活性画分を集め、限界濾過膜PM10(Amicon)で20ml以下に濃縮した。(4°C)

Step III

Step IIの濃縮液を0.01MPB, PH6.5で平衡化したSephadex G-100(カラム15×90cm)にかけてgel濾過をおこない(4°C), Ent A画分を得た。

## II 成績および考察

1) 各精製過程の成績を図2, 3, 4に示す。いずれの溶出曲線も、都衛研のそれとほぼ対応され

うる。

2) Step III の大きなタンパクピーク ( Fraction No. 33~49 ) を集め最終精製物として凍結保存した。

16ℓ の培養上清から、およそ 80mg の Ent A 精製毒素を得ることができた。この精製毒素は、ディスク電気泳動で単一なバンドを形成した。また、紫外吸収スペクトルでは、277nm に極大吸収、250nm に極小吸収をもち、典型的なタンパクのパターンを示し、OD<sub>280</sub> と OD<sub>260</sub> の比が 1.8 以上で、核酸はほとんど含まれていないと考えられる。

3) Step I, II の画分のディスク電気泳動では、ほぼ単一なバンドを形成したが、277nm, 250nm にそれぞれ極大極小吸収をもたなかった。OD<sub>280</sub> と OD<sub>260</sub> の比も 1.0 以下でタンパク以外のものが含まれていると考えられる。

### III 今後の課題

都衛研の方法に基いて得た精製毒素 Ent A は、単一なタンパク質であろうと推定できたが、免疫学的に純品であるということを更に確認しなければならない。

Ent A の精製をおこなうにあたり、種々にわたってご教授くださいました東京都立衛生研究所山田澄夫氏に深謝いたします。

### 文 献

- 1) 山田澄夫, 五十嵐英夫, 寺山武 (1976) : 日細菌誌 31, 409-418
- 2) Friedman, M. E., and Howard, M. B. (1971) : J. Bacteriol., 106, 289-291
- 3) 柴田芳実, 森田盛大, 天野保二, 石田名香雄 (1976) : 日細菌誌, 31, 317-322
- 4) 寺山武 (1971) : 日細菌誌, 26, 611-622
- 5) Reisfeld, R. A., Lewis, U. J., and Williams, D. E. (1962) : Nature (London), 195, 281-283

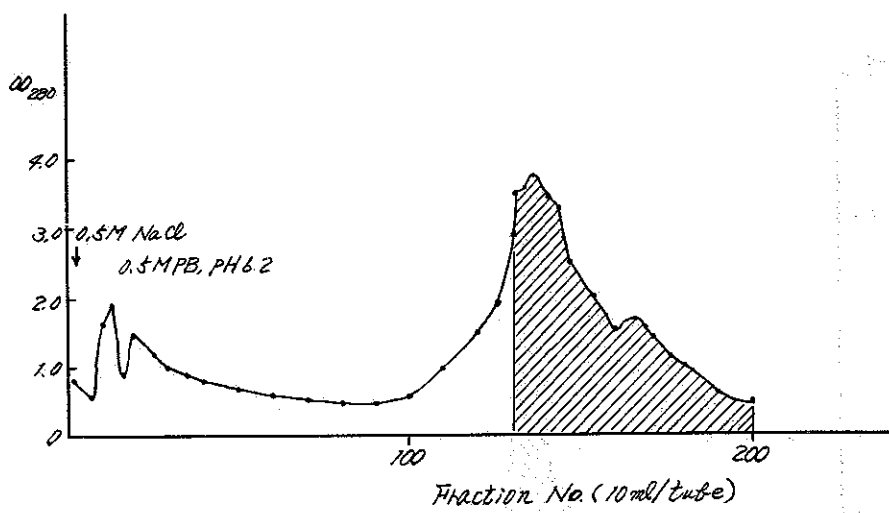


図2 Amberlite CG-50カラムクロマトグラフィー (Step I)

//// Ent A活性

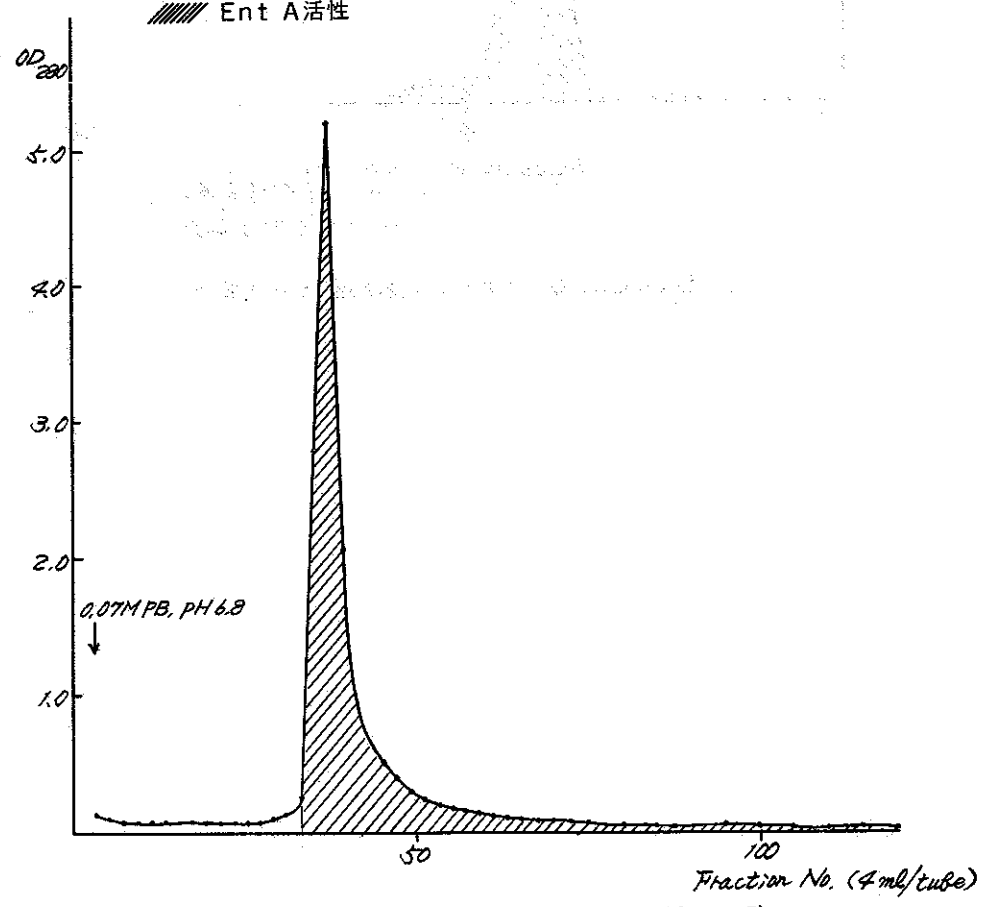


図3 CM-celluloseカラムクロマトグラフィー (Step II)

//// Ent A活性

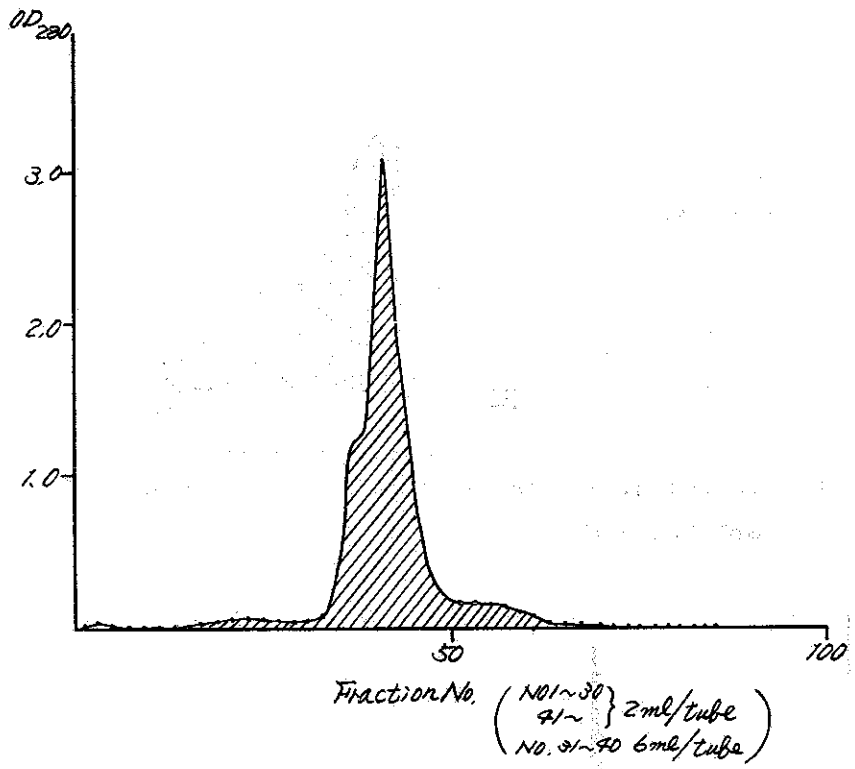


図4 Sephadex G-100ゲル濾過 // Ent A活性