

氏名(本籍)	胡東良(中華人民共和国)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	獣医博甲第78号
学位授与年月日	平成12年3月14日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	岩手大学
学位論文題目	Studies on Molecular Structure and Biological Activities of Staphylococcal Enterotoxin A
審査委員	主査 岩手大学 教授 品川 邦 汎 副査 帯広畜産大学 教授 品川 森 一 副査 岩手大学 教授 松坂 尚 典 副査 東京農工大学 教授 金子 賢 一 副査 岐阜大学 教授 平井 克 哉

論文の内容の要旨

ブドウ球菌エンテロトキシン(以下 SE と略す)はブドウ球菌食中毒の原因毒素で、分子量 25~30 kDa の単純蛋白質である。抗原特異性により、これまで SEA~SEE 型に分けられていたが、近年 SEG~SEI 新型エンテロトキシンが報告されている。これらのうち SEA 型による事例はブドウ球菌食中毒の約 90% を占めている。SEA は食中毒原性活性を示す他に、スーパー抗原として T 細胞増殖活性および多種類のサイトカイン産生誘導活性を有することが知られている。しかし、SEA 分子上におけるこれらの生物活性部位については十分に明らかにされていない。そこで本研究では、SEA 分子上の抗原認識部位、催吐活性部位およびインターフェロン- γ (IFN- γ) 産生誘導活性部位について検討した。

1. SEA 分子上の抗原認識部位の同定

SEA 分子上の抗原認識部位(エピトープ)を同定するために、アミノ酸配列の N 末端側から 20 残基を含むペプチド A-1~12 (A-12 は 13 残基) の 12 種を合成し、さらにそれぞれに対するウサギ抗ペプチド抗体(抗 A-1~12 抗体)を作製した。これらの材料を用いて、抗ペプチド抗体と合成ペプチドおよび SEA との反応性をそれぞれ ELISA 法により調べた。その結果、抗ペプチド抗体は各対応する合成ペプチドおよび SEA に対し特異的に反応を示した。また、ペプチド A-1 (アミノ酸配列 1~20)、A-5 (81~100) および A-8 (141~160) は、抗 SEA 抗体に対し高い反応性を示した。本結

果から、SEA 分子上のエピトープは少なくとも 3 ケ所存在することが考えられた。

2. スンクスに対する SEA の催吐活性の検討

SEA 分子上の催吐作用部位を明らかにするために、最初 SEA の催吐活性をスンクスを用いて検討した。スンクス(体重 40~70 g)に各試料 0.2 ml を経口(*p.o*)または腹腔内(*i.p*)投与し、嘔吐の有無を 3 時間観察した。その結果、経口投与では SEA 16.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ で嘔吐(投与 70~108 分後に 1~4 回嘔吐)が見られ、その ED₅₀ は 32.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ と算出された。他方、腹腔内投与では SEA 1.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ で嘔吐(投与 65~102 分後に 1~4 回嘔吐)が観察され、その ED₅₀ は 3.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。なお、SEA の催吐活性は、抗 SEA 血清により特異的に中和された。また SEA による嘔吐に性差はなく、嘔吐以外、下痢および死亡は全く観察されなかった。以上の結果から、スンクスは SEA に対し高い感受性と特異性を有し、SEA の催吐活性を調べる上、有効であることが分かった。

3. SEA の催吐活性部位の検討

SEA の催吐活性の中和エピトープを調べるため、SEA 投与量 16.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重をスンクスへの投与により検討した。中和試験は、SEA と各抗ペプチド抗体(A-1~12 抗体)を 37°C、1 時間反応後、スンクス腹腔内に投与した。その結果、抗ペプチド抗体 A-1~12 の全抗体と SEA を反応させたものは、4/6 匹が嘔吐を示さず中和された。これに対し、陰性対照の正常ウサギ血清では 6 匹中全てが嘔吐を示した。次に、抗ペプチド抗体 A-1~12 を 3 つのグループに分けて、SEA と混合させたものでは、抗 A-4~9 および A-7~12 抗体と混合したものに対し中和が見られた。さらに、抗 A-4~12 抗体を 3 つのグループに分け中和活性を検討した。抗 A-7~9 抗体と混合させたもので 6 匹中 5 匹(83.3%)が中和され、他のグループでは中和されなかった。また抗 A-7~9 抗体は、それぞれ 2 つの抗体組み合わせた場合および各単一抗体との混合した場合、いずれも中和活性を示したが、これらの 3 つの抗体と混合したものより中和活性は弱かった。本結果から、SEA 分子上のペプチド A-7~9 (121~180 番目のアミノ酸配列)部分は、催吐活性中和エピトープであることが示唆された。

4. SEA の IFN- γ 産生誘導活性部位の検討

SEA 分子上の IFN- γ 産生誘導活性部位を検討するために、1) C57BL/6 マウス脾細胞と SEA および各ペプチド 12 種を各々 37°C、72 時間培養し、培養上清中の IFN- γ の産生量を ELISA 法により測定した、2) 各ペプチドとマウス脾細胞を 1 時間反応させた後、SEA を添加し、IFN- γ 産生量を測定した(競合結合試験)。3) SEA と抗ペプチド血清を 37°C、1 時間反応させた後、IFN- γ 産生量を調べた(中和試験)。その結果、SEA による IFN- γ の産生量は SEA 量を増加することにより増大し、濃度依存性が認められた。また、いずれのペプチドも IFN- γ 産生は認められなかった。競合結合試験では、ペプチド A-9 は SEA に対し高い競合抑制を示し、ペプチド量を増加することにより、その抑制率は増大し、濃度依存性が見られた。この他に、ペプチド A-5 および A-10 も、低い抑制効果が見られた。抗ペプチド抗体による中和試験では、抗 A-1 および抗 A-9 抗体による中和活性が最も高く、この他に抗 A-7、抗 A-8 および抗 A-10 抗体にも抑制効果が見られた。特に、抗 A-9 抗体による中和は、SEA に対する競合抑制試験結果と一致して見られた。これらの結果から、SEA 分子上の A-9 部

位（アミノ酸配列 161~180）は IFN- γ 産生誘導活性部位として重要であると推察された。また、SEA のアミノ酸配列 1~20、121~160 および 181~200 部位は、SEA の IFN- γ 産生誘導活性に関する中和エピトープを含んでいることが考えられた。

本研究では、SEA の催吐活性試験としてunksが有効であることを明らかにし、本実験動物を用いてSEA分子上の121~180残基部位が催吐活性の中和エピトープであることを示唆した。またSEA分子上には少なくとも3つのエピトープを有することを明らかにし、さらにIFN- γ 産生誘導活性部位としてはアミノ酸配列161~180残基部位が主であり、この他1~20、121~160および181~200残基部位も関与していると考察された。以上の成績から、SEA分子上の121~180残基部位は嘔吐活性およびIFN- γ 産生誘導活性として重要であることが明らかになった。

審 査 結 果 の 要 旨

ブドウ球菌食中毒の原因毒素であるブドウ球菌エンテロトキシン(以下SEと略す)は、抗原特異性により、これまでSEA~SEI型(F型を除く)に分けられており、その分子量は25~30kDaの単純蛋白質である。これらのうちSEA型による事例は、本菌食中毒の約90%を占めている。他方、SEAは食中毒原性活性を示す他に、スーパー抗原としてT細胞増殖活性および多種類のサイトカイン産生誘導活性を有することも明らかにされている。しかし、SEA分子上におけるこれらの生物活性部位については十分に明らかにされていない。

そこで本研究では、SEA分子上の抗原認識部位、催吐活性部位およびインターフェロン- γ (IFN- γ)産生誘導活性部位について検討し、いくつかの新知見を得た。

1. SEA分子上の抗原認識部位の同定

SEA分子上の抗原認識部位(エピトープ)を同定するために、アミノ酸配列(N末端側)に順じて20残基を含むペプチドA-1~12(ただしA-12は13残基)の12種を合成し、これに対するウサギ抗ペプチド抗体(抗A-1~12抗体)を作製した。これらの材料を用いて、抗ペプチド抗体と合成ペプチドおよびSEAとの反応性をELISA法で調べた。その結果、抗ペプチド抗体は各対応する合成ペプチドおよびSEAに対し特異的に反応を示し、またペプチドA-1(アミノ酸配列1~20)、A-5(81~100)およびA-8(141~160)は、抗SEA抗体に対し高い反応性を示した。

本結果から、SEA分子上のエピトープは少なくとも3ヶ所存在することが考えられた。

2. unksに対するSEAの催吐活性の検討

SEA分子上の催吐活性部位を明らかにするために、まず最初に、SEAの催吐活性をunksを用いて検討した。unks(体重40~70g)に各試料0.2mlを経口(*p.o*)または腹腔内(*i.p*)投与し、嘔吐の有無を3時間観察した。その結果、*p.o*ではSEA 16.7 μ g/kgで嘔吐(投与70~108分後に1~4回嘔吐)を示し、そのED₅₀(50%嘔吐量)は32.4 μ g/kgと算出された。他方、*i.p*ではSEA 1.7 μ g/kgで嘔吐(投与65~102分後に1~4回嘔吐)

を示し、その ED₅₀ は 3.1 μg/kg であった。さらに、SEA の催吐活性は、抗 SEA 血清により特異的に中和され、しかも SEA による嘔吐に性差はなく、嘔吐以外、下痢および死亡は全く観察されなかった。

本結果から、スunks は SEA に対し高い感受性と特異性を有し、SEA の催吐活性を調べる上、有効であることが分かった。

3. SEA の催吐活性部位の検討

SEA の催吐活性中和エピトープを調べるため、SEA (16.7 μg/kg 体重) と各抗ペプチド抗体 (A-1~12 抗体) を一定時間 (37°C、1 時間) 反応後、スunks 腹腔内に投与した。その結果、抗ペプチド抗体 A-1~12 の全抗体と SEA を反応させたものでは、6 匹中 4 匹が嘔吐活性を示さず中和された。これに対し、正常ウサギ血清では 6 匹中全てが嘔吐を示した。次に、抗ペプチド抗体 A-1~12 を 3 つのグループ (抗 A-1~4、抗 A-5~8、抗 A-9~12) に分けて、SEA と混合させたものでは、抗 A-4~9 および A-7~12 抗体の 2 つグループに対し中和が見られた。さらに、抗 A-4~12 抗体を 3 つのグループに分け中和活性を検討した結果、抗 A-7~9 抗体と混合させたものでは 6 匹中 5 匹 (83.3%) が中和され、他のグループでは中和されなかった。また抗 A-7~9 抗体について、それぞれ 2 つの抗体との組み合わせたもの、およびそれぞれ単一抗体と反応させたものでは、いずれも中和活性を示した。

本結果から、SEA 分子上のペプチド A-7~9 (121~180 番目のアミノ酸配列部分) は、催吐活性中和エピトープであることが示唆された。

4. SEA の IFN-γ 産生誘導活性部位の検討

SEA 分子上の IFN-γ 産生誘導活性部位を検討するために、1) マウス (C57BL/6) 脾細胞と SEA および各ペプチド 12 種をそれぞれ 37°C、72 時間培養し、その上清中の IFN-γ の産生量を ELISA 法により測定した、2) 各ペプチドとマウス脾細胞を 1 時間反応後、SEA を添加し、IFN-γ 産生量を測定した (競合結合試験)。3) SEA と抗ペプチド血清を 37°C、1 時間反応後、IFN-γ 産生量を調べた (中和試験)。その結果、SEA を増量することにより IFN-γ の産生量は増大を示し、濃度依存性が認められた。しかし、いずれのペプチドに対しても IFN-γ 産生は認められなかった。競合結合試験では、ペプチド A-9 は SEA に対し高い競合抑制を示し、ペプチドを増量することにより、その抑制率は増大し濃度依存性が見られた。この他に、ペプチド A-5 および A-10 も、低い抑制効果が見られた。抗ペプチド抗体による中和試験では、抗 A-1 および抗 A-9 抗体による中和活性が最も高く、この他抗 A-7、抗 A-8 および抗 A-10 抗体にも中和が見られた。特に、抗 A-9 抗体による中和は、SEA に対する競合抑制試験結果と一致して見られた。

本結果から、SEA 分子上の A-9 部位 (アミノ酸配列 161~180) は、IFN-γ 産生誘導活性部位として重要であることが推察された。また、SEA のアミノ酸配列 1~20、121~160 および 181~200 部位は、SEA の IFN-γ 産生誘導活性に関する中和エピトープを含むことが示唆された。

本研究では、SEA の催吐活性試験としてスunksが有効であることを明らかにし、本実験動物を用いて SEA 分子上の 121~180 残基部位が催吐活性の中和エピトープであることを示唆した。また SEA 分子上には少なくとも 3 つのエピトープを有し、さらに IFN- γ 産生誘導活性部位としてはアミノ酸配列 161~180 残基部位が主であり、この他 1~20、121~200 残基部位も関与していることを認めた。以上の成績から、SEA 分子上の 121~180 残基部位は嘔吐活性および IFN- γ 産生誘導活性として重要であることを明らかにした。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

1. Hu, D-L., Imai, A., Ono, K., Sasaki, S., Nakane, A., Sugii, S. and Shinagawa, K. (1998). Epitope analysis of staphylococcal enterotoxin A using different synthetic peptides. J. Vet. Med. Sci., 60 (9): 993 - 996.
2. Hu, D-L., Omoe, K., Shimura, H., Ono, K., Sugii, S. and Shinagawa, K. (1999). Emesis in *Suncus murinus* induced by peroral and intraperitoneal administration of staphylococcal enterotoxin A. J. Food Prot., 62 (11): 1350 - 1353.
3. Hu, D-L., Omoe, K., Nakane, A., Sugii, S., Ono, K., Sasaki, S. and Shinagawa, K. (1999). Studies on the functional site on staphylococcal enterotoxin A responsible for production of *murinus* gamma interferon. FEMS Immunol. Med. Microbiol., 25 (8): 237 - 244.

既発表学術論文

1. Tsutsumi, K., Kagaya, Y., Hidaka, S., Suzuki, J., Tokairin, Y., Hirai, T., Hu, D-L., Ishikawa, K. and Ejiri, S. (1994). Structural analysis of the chloroplastic and cytoplasmic aldolase-encoding genes implicated the occurrence of multiple loci in rice. Gene. 141: 215 - 220.
2. Shinagawa, K., Ueno, Y., Hu, D-L., Ueda, S., and Sugii, S. (1996). Mouse lethal activity of a HEp-2 vacuolation factor, cereulide, produced by *Bacillus cereus* isolated from vomiting-type food poisoning. J. Vet. Med. Sci. 58: 1027 ~ 1029.