

ビブリオ科細菌のO抗原（内毒素）リポ多糖の化学的性状と
化学分類に関する研究

乙第33号

1998年

井 口 毅 裕

ビブリオ科細菌のO抗原（内毒素）リポ多糖の化学的性状と
化学分類に関する研究

1998年

井 口 毅 裕

目 次

【 総論の部 】

序 論	1
第一章 浜名湖の病変稚アユより分離された <u>Vibrio anguillarum</u> の 内毒素リポ多糖 (LPS)	10
第一節 <u>V.anguillarum</u> LPS の化学的性状	
1-1-1. LPS の糖組成	11
1-1-2. KDO リン酸の検出	13
1-1-3. LPS 多糖部 (DPS 画分) の分子構築	14
1-1-4. LPS の脂肪酸組成	19
第二節 <u>V.anguillarum</u> LPS の血清学的性状	21
第三節 <u>V.anguillarum</u> LPS の生物活性およびアルカリ処理による LPS の構造変化と生物活性相関	
1-3-1. LPS のリムルス活性	23
1-3-2. LPS の抗腫瘍活性	24
1-3-3. LPS の化学構造に及ぼすアルカリ処理の影響	25
1-3-4. LPS の生物活性に及ぼすアルカリ処理の影響	27
考 察	28
第二章 LPS 多糖鎖の画期的迅速簡便分離法の開発とそのビブリオ科細菌の 化学分類への応用	31

第一節	LPS 多糖鎖の迅速簡便分離法（原法）の改良とその ビブリオ科細菌への応用	
2-1-1.	LPS 多糖鎖の迅速簡便分離法（原法）の改良	32
2-1-2.	<u>V. vulnificus</u> の LPS 多糖部の糖組成に基づく 化学分類	34
2-1-3.	血清学的交叉反応性を示す non-O1 <u>V. cholerae</u> と <u>V. mimicus</u> の LPS 多糖部の糖組成	36
第二節	グラム陰性菌 LPS多糖鎖の画期的迅速簡便分離法の 開発とそのビブリオ科細菌への応用	
2-2-1.	グラム陰性菌 LPS多糖鎖の画期的迅速簡便分離法 の開発	38
2-2-2.	LPS より得られた DPS と迅速簡便分離法で得た Sed. II および Sup. III のゲル濾過	40
2-2-3.	新迅速簡便分離法の腸内細菌とビブリオ科細菌 LPS 多糖部抽出の有効性	45
第三節	LPS 多糖部の糖組成に基づくビブリオ属細菌の化学分類 — 迅速簡便分離法の応用 —	
2-3-1.	<u>V. fluvialis</u> の LPS 多糖部の糖組成に基づく 化学分類	47
2-3-2.	交叉反応性を示す <u>V. fluvialis</u> 都衛研株と予研株 の LPS多糖部の糖組成の検討	50
2-3-3.	<u>V. cholerae</u> O2 ~O161 (non-O1 <u>V. cholerae</u>) の LPS 多糖部の糖組成に基づく化学分類	53
考 察		59

第三章	ビブリオ科細菌 LPSの分子構築	64
第一節	新型病原ビブリオ LPS の化学的、生物学的性状	64
第二節	ビブリオ科細菌 LPSの分子構築	
3-2-1.	ビブリオ科細菌 LPSのドデシル硫酸ナトリウム-	
	ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)	67
3-2-1-a.	<u>V. parahaemolyticus</u> LPS の SDS-PAGE	69
3-2-1-b.	<u>V. anguillarum</u> LPS の SDS-PAGE	71
3-2-1-c.	<u>V. cholerae</u> LPS の SDS-PAGE	72
3-2-1-d.	ビブリオ属細菌 LPS の SDS-PAGE	74
3-2-1-e.	ビブリオ属以外のビブリオ科細菌 LPS	
	の SDS-PAGE	77
3-2-2.	ゲル濾過によるビブリオ科細菌 LPS多糖鎖の解析	78
考察		82
総括		85
謝辞		88

【 実験の部 】

一般事項と全章に関する実験	89
第一章に関する実験	95
第三章に関する実験	99
引用文献	101

総論の部

序 論

ビブリオ科細菌は、Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (第9版)¹⁾において、Family II. Vibrionaceae として記載され、本科には Genus I. Vibrio (20 菌種)、Genus II. Photobacterium (3 菌種)、Genus III. Aeromonas (4 菌種) および Genus IV. Plesiomonas (1 菌種) の4属の細菌が含まれる。これら4つの属のうち、Photobacterium 属細菌は発光魚の共生細菌であるが、他の3属の中にはヒトに対して病原性を示すものが多く含まれる。

古くは、ビブリオ科細菌の中では急性伝染病の原因菌である Vibrio cholerae O1 や、本邦における細菌性食中毒の主要な原因菌である V. parahaemolyticus、創傷感染の原因菌としての V. metschnikovii などがヒトに対して病原性を示すものとして、また、V. anguillarum は魚病の原因菌として知られていた。その後、細菌分類学の発展や感染症原因菌に関する研究の進展によって、上記の菌種以外のビブリオ科細菌の病原性が明らかにされるとともに、それまで認識されていなかったビブリオ科細菌の存在が見出された。昭和57年、厚生省環境衛生局食品衛生課は、それまでに食中毒原因菌として食品衛生上問題とされてきた原因菌に加えて、新たに9種の細菌を食中毒原因菌として追加したが、そのうち6種はビブリオ科細菌、すなわち V. cholerae non-O1 (NAG Vibrio)、V. mimicus、V. fluvialis、Aeromonas hydrophila、A. sobria、Plesiomonas shigelloides であった。さらにその後、ヒトに対して病原性を示す V. hollisae、V. furnissii、V. vulnificus、V. damsela が、また魚病原因菌として V. ordalii がいわゆる新病原ビブリオとして認定された。これらの病原性ビブリオ科細菌は殆どが海水または汽水域に棲息するため、海産魚介類は容易にこれらの菌によって汚染される。このため本邦のように海産魚介類を多く摂取し、しかも生食する食習慣をもつ地域ではこれらの病原性ビブリオ科細菌は食中毒の主要な原因菌として、また輸入生鮮魚介類の汚染や海外旅行者を介した輸入感染症の原因菌として、医学的、食品衛生学的、公衆衛生学的に重要な細菌であ

る。さらに、V. anguillarum や V. ordalii はアユやサケ科魚類、ウナギなどの魚病原菌として、養殖産業上、重要視されている菌種である。

内毒素 endotoxin という言葉 term は、今から106年前の1892年、Pfeiffer 現象や染色液の名で知られる Richard Pfeiffer²⁾ によって初めて用いられた。急性伝染病コレラの原因菌である O1 Vibrio cholerae (O1 コレラ菌) から分離した“菌体結合性の耐熱性毒性物質”

(その化学的本体は本研究の主題であるO抗原リポ多糖に相当する) に対して、菌体から細胞外へ放出される“易熱性の外毒素”(破傷風毒素やジフテリア毒素など)と区別する目的で、エンドトキシン endotoxin (内毒素)と命名したのが始まりである。当初、その化学的本体は不明であったが、その後、グラム陰性菌の菌体(正しくは細胞壁外膜)から Westphal³⁾ の熱フェノール/水法によってリポ多糖(LPS)として分離、精製され、現在ではグラム陰性菌のリポ多糖(LPS)は内毒素の同義語として学術的に用いられている。一方、グラム陰性菌の血清学的特異性は、その菌の耐熱性表面抗原(somatic antigen)、すなわちO抗原によって決定される。このO抗原は、グラム陰性菌細胞表面の最外層に位置する細胞壁外膜の outer leaflet に局在するリポ多糖(LPS)であり、物質的にはその菌の内毒素と同一の菌体成分であることが現在では確立されている。従って、LPSは、O抗原としてグラム陰性菌の血清学的特異性を決定するという重要な役割を担うと同時に、一方では内毒素としての極めて多彩な生物活性を発現する⁴⁾。LPSのもつ代表的な生物活性としては発熱原性、致死毒性、シュワルツマン反応惹起能、エンドトキシン・ショックの誘発など生体にとって不利に作用するものもあれば、一方では抗腫瘍活性、インターフェロン産生誘導、アジュバント活性、非特異的感染防御など生体に有利に作用するものも多く、その発見以来、いつの時代においても常に多くの研究者を魅了し続けてきた。LPSは化学的には、あるいは分子構築の観点から図1に示す如く、大きく、多糖部とリピドAと呼ばれる脂質部の2つの部分から構成されている。リピドAは一般的には β (1→6)結合のグルコサミン2量体と、それにアミドおよびエステル結合した5~7個の高級脂肪酸と、グリコシドおよびエス

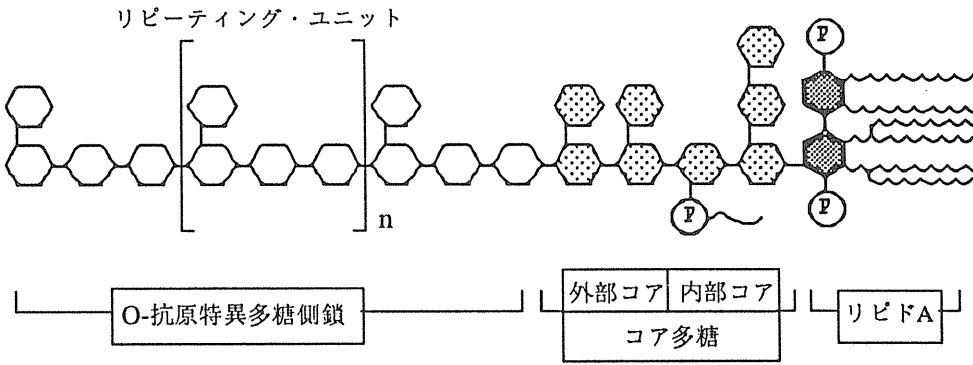


図1 グラム陰性細菌のO抗原リポ多糖（LPS）の構造模式図

テル結合のリン酸で構成される。リピドAはLPSが示すほぼすべての生物活性の活性中心であり、リピドAを構成する脂肪酸の種類と数、リン酸残基の数などは生物活性の発現に大きく影響する。前者の多糖部は、さらにその還元末端がリピドAに接するコア多糖と非還元部分を占めるO抗原特異多糖（O多糖）の2つの部分から構成されている。またコア多糖はリピドAに隣接する内部コアとO多糖に隣接する外部コアの2つの部分に分かれる。リピドAに結合し、10個程度の糖で構成されるコア多糖部は、2-ケト-3-デオキシオクトン酸（KDO）やヘプトースなどLPS特有の構成糖を含み、同一菌種では全く同じ構造か、もしくは極めて類似した構造をもち、また異なる菌種間でも構造類似性が認められる。一方、コア多糖に結合し、LPS多糖部の非還元末端部を構成するO多糖側鎖部では、同一菌種においてもその構造は極めて多種多様であり、このO多糖側鎖部の構成糖の種類とそれらの結合様式の相違がグラム陰性菌のO抗原特異性の違いに反映される。S型グラム陰性菌O多糖側鎖は通常、リピーティング・ユニットと称される3～6個の単糖で構成されたオリゴ糖が反復重合した高分子多糖鎖である。またO多糖側鎖が単一の単糖が重合したホモポリマーで構成されるLPSもいくつかのS型の菌種で見出されている。一方、このO多糖を遺伝的に欠損するLPSを産生する菌はR変異株（R型菌）と呼ばれ、そのLPSはR型LPSと称される。R型LPSはリピドAとコア多糖（その一部をも欠損するものもあ

る)のみで構成され、親株のもっていたO抗原特異性は失われており、R型として同一菌種では共通の抗原性を示し、多くの場合、その病原性も失われる。しかし、化学構造においてはR型LPSに相当する低分子の糖鎖で構成されているにも拘らず、血清学的には明らかにO抗原特異性をもったLPSを産生する菌種が自然界にいくつか見出されている。すなわち、non-enteric mucosal pathogen (非腸管感染型病原菌)と称される Bordetella pertussis、Neisseria gonorrhoeae、N.meningitidis 等⁵⁾の一群の菌である。これらの菌種はヒトに病原性を示すとともに、形態学的、血清学的にも明らかにS型菌としての性状を示す。このようなLPSを、上記のS型およびR型LPSと区別するために特にLOS (lipo oligosaccharide) と呼ぶ研究者たちがいる^{6, 7)}。

ビブリオ科細菌全般の菌種のLPSに関する広範な化学的研究は初めて Hisatsuneの研究グループ⁸⁾によって行なわれ、ビブリオ科に属する全属の代表的菌種のLPSの糖組成が比較検討された。その結果、ビブリオ科細菌では Plesiomonas 属と V.parahaemolyticus O6を除き、多くのグラム陰性菌LPSに共通する構成成分であるKDOが、その検出の常法として用いられる Weissbach の過ヨウ素酸/チオバルビツール酸反応⁹⁾によっては検出されない特徴が見出された。一方、Bradeら¹⁰⁾は、V.cholerae O1 LPSの強酸加水分解産物中にKDO-5-リン酸が存在することを報告した。その後、Kondoら^{11, 12)}は V.cholerae O1と non-O1 V.cholerae O5 LPSについてKDO領域の構造解析を行ない、これらのLPSではKDOはその4位がリン酸で置換され、5位がコアとの結合位置であることを示した。さらに Plesiomonas 属以外のビブリオ科細菌各属の菌種についても同様の構造解析が行なわれ、用いたすべての菌種のLPSはいずれも上記と同じ構造のKDO領域をもっており、通常のグラム陰性菌LPSのそれとは明らかに異なることを明らかにした^{13, 14)}。

ビブリオ属細菌LPSのO多糖側鎖の化学構造に関しては、急性伝染病コレラの原因菌である V.cholerae O1 LPSについて以前から研究が進められ、Kenneら¹⁵⁾とRedmondら¹⁶⁾によってその基本構造につ

き報告がなされた。しかし、長年に亘って V. cholerae O1 の O 抗原を構成する 3 つの抗原因子、すなわち共通抗原因子 A、オガワ抗原因子 B およびイナバ抗原因子 C の LPS O 多糖側鎖上の化学的実体が不明であった。極く最近になって Hisatsune の研究グループ (Hisatsune ら¹⁷⁾、Isshiki ら^{18, 19, 20)}) によりこれら 3 つの抗原因子の化学的実体が解明されるとともに、V. cholerae O1 のオガワとイナバ型 LPS の O 多糖側鎖の全構造が初めて明らかにされた。V. cholerae ではそのほか O3²¹⁾、O140²²⁾、O76²³⁾、O144²⁴⁾ および新型コレラ菌として注目された O139²⁵⁾ などの血清型の LPS で O 多糖側鎖の構造が解明されているが、なお多くの血清型株では不明である。V. parahaemolyticus ではすでに 13 種のすべての O 抗原型の LPS についてその糖組成を中心とした化学的性状が報告されており²⁶⁾、血清型 O12 については LPS 多糖鎖の全構造が解明され²⁷⁾、O12 は前述の LOS タイプの LPS を産生することが化学的に実証されている。ビブリオ属細菌ではこのように、V. cholerae と V. parahaemolyticus を中心として LPS の化学的研究が進展したが、その他の菌種、特にいわゆる新型病原ビブリオとして認定された菌種については、LPS の化学的研究は皆無であった。また、魚病原菌として重要視されている V. anguillarum に関しては、疫学的には多くの研究がなされていくつかの血清型の存在が認められているものの、それらの O 抗原 LPS に関する化学的、血清学的、生物学的研究は殆どなされていない。

前述の如く、グラム陰性菌の O 抗原特異性 (血清型) はその LPS の O 多糖鎖の構造によって決定される。この事実は、LPS 多糖部の糖組成と血清型との間には密接な相関関係が存在することを意味し、同時に、血清型が異なる 2 つの菌株の間での LPS 多糖部の糖組成の異同は、両菌の生化学的、遺伝学的性状の異同をも反映する。従って、LPS 多糖部の糖組成に基づく化学分類は、現在、細菌の分類学の分野で多用される血清学的、生化学的、遺伝学的手法に加える有効な分類手法の一つとなり得る。しかしながら、LPS の抽出・精製には多大の労力と時間を要し、特にフィールドで分離された多数の菌株の LPS の多糖部を分離してその

糖組成に基づく化学分類を実行することは不可能であるため、Kondo and Hisatsune²⁸⁾は、菌体から常法によって LPS を分離、精製することなく、菌体から直接 LPS多糖部を調製する迅速簡便分離法を開発し、この方法を用いて現在約 170種の血清型が知られている non- O1 V. cholerae のうち O2 ~ O41、O44、O68の 42 種の血清型株について LPS 多糖部の糖組成に基づく化学分類を行なった。その結果、上記の 42種の血清型株は 24 種の化学型に分類され、異なる血清型でも同一の化学型に属するものが多く存在することや、これら 42 種類の血清型株の中には V. cholerae O1 と同じ化学型に属するものは存在しないこと、さらにある化学型では LPS 多糖部が低分子の糖鎖で構成される可能性があることなど、多くの知見が得られた。このように、多数の血清型の菌株や、同一の血清型に分類される多数の分離株などについて、LPS 多糖部の糖組成に基づく化学分類を行なうことによって多くの新しい知見を得ることができ、化学分類の有効性が実証された。本迅速簡便分離法（原法）はさらに他のビブリオ属の菌種にも応用が試みられたが、しかし、菌種によってはこの方法では LPS 多糖部が分離できないものが見出され、原法に改良を加えた新迅速簡便分離法の開発が望まれた。

以上述べたビブリオ科細菌 LPSの研究の現状を踏まえ、本研究では以下の目的に沿って実験を行なった。

(1) 浜名湖の病変稚アユから分離した V. anguillarum について、その O 抗原 LPSの化学的、血清学的、生物学的性状を明らかにする。特に、従来不明であった魚病ビブリオ LPSの糖組成と血清型との関連を追究する。

(2) LPS 多糖部の菌体からの迅速簡便分離法（原法）をさらに改良してビブリオ科細菌のみならず、広くグラム陰性菌全般にも応用可能な新迅速簡便分離法の開発を目指す。また新分離法を用いて、多くの血清型が存在する V. vulnificus、V. fluvialis および non- O1 V. cholerae の化学分類の完成をめざす。

(3) ビブリオ科細菌全般にわたって、SDS-PAGE および Sephadex G-50ゲルクロマトグラフィーを用いる degradation study によってそ

の O 抗原 LPS の分子構築を検討し、その特徴を明らかにする。

(注) 本論文で用いた略号を以下に列記する。

1. 一般的略号

ATCC :	American type culture collection
DPS :	degraded polysaccharide
GC/MS :	ガスクロマトグラフィー／マススペクトロメトリー
GLC :	ガスクロマトグラフィー
HVPE :	高圧濾紙電気泳動
LOS :	リポオリゴ糖 (lipooligosaccharide)
LPS :	リポ多糖 (lipopolysaccharide)
NCMB :	National collections of marine bacteria
NIH :	国立予防衛生研究所 (現国立感染症研究所)
O 多糖鎖 :	O 抗原特異多糖鎖
PHI :	受身溶血阻止 (passive hemolysis inhibition)
SDS-PAGE :	ドデシル硫酸ナトリウムーポリアクリルアミドゲル 電気泳動
SRBC :	ヒツジ赤血球 (seep red blood cell)
TBA :	過ヨウ素酸／チオバルビツール酸
TCA :	トリクロル酢酸
TMR :	東京都立衛生研究所

2. 糖質の略号

Abe :	abequose
Ara :	arabinose
Col :	colitose
D-D Hep :	<u>D</u> -glycero- <u>D</u> -manno-heptose

6dGal3N :	3-amino-3,6-dideoxy-galactose
6dGal4N :	4-amino-4,6-dideoxy-galactose
6dGlc3N :	3-amino-3,6-dideoxy-glucose
6dGlc4N :	4-amino-4,6-dideoxy-glucose
Fru :	fructose
Fuc :	fucose
FucN :	fucosamine (2-amino-2,6-dideoxygalactose)
Gal :	galactose
GalN :	galactosamine
GalUA :	galacturonic acid
Glc :	glucose
GlcN :	glucosamine
Hep :	heptose
KDO :	2-keto-3-deoxyoctonic acid
L-D Hep :	<u>L</u> -glycero- <u>D</u> -manno-heptose
Man :	mannose
ManN :	mannosamine
PerN :	perosamine (4-amino-4,6-dideoxymannose)
PerNPro :	N-2-hydroxypropionyl-perosamine
QuiN :	quinovosamine (2-amino-2,6-dideoxyglucose)
Rha :	rhamnose
Rib :	ribose
Xyl :	xylose

3. 脂質の略号

C12:0 :	ドデカン酸 (ラウリン酸)
C14:0 :	テトラデカン酸 (ミリスチン酸)
C15:0 :	ペンタデカン酸
C16:0 :	ヘキサデカン酸 (パルミチン酸)

- C16:1 : ヘキサデセン酸 (パルミトオレイン酸)
- C17:0 : ヘプタデカン酸
- C18:0 : オクタデカン酸 (ステアリン酸)
- C18:1 : オクタデセン酸 (オレイン酸)
- 3-OH C12:0 : 3-ヒドロキシドデカン酸
(3-ヒドロキシラウリン酸)
- 3-OH C14:0 : 3-ヒドロキシテトラデカン酸
(3-ヒドロキシミリスチン酸)

第一章 浜名湖の病変稚アユより分離された Vibrio anguillarum の内毒素リポ多糖 (LPS)

淡水魚および海水魚におけるビブリオ属細菌感染症を「ビブリオ病」といい、その主たる原因菌として Vibrio anguillarum が同定されている。ビブリオ病は、魚類細菌性疾病の中でも最も古くから見出されたものの1つで、魚幹の皮膚や鱗が発赤し、内臓にも出血が起こり斃死に至るという症状からヨーロッパではウナギの Red pest あるいは Red disease として知られている。この Red pest の原因菌をビブリオ属に分類し、ウナギの学名 Anguilla anguilla より V.anguillarum と命名し、報告したのは Bergman²⁹⁾ であった。その後、本菌は、ウナギのみならずサケ科魚類の病原菌として世界的に重要視され、ヨーロッパおよび北米においてサケ、ニジマス、カラフトマスなどで本菌による症例が古くから報告されている^{30, 31, 32, 33)}。一方、我が国においては淡水域の魚のビブリオ病が養殖上の問題となり、その原因菌がビブリオ属の細菌であることが Hoshina³⁴⁾ および斉藤ら³⁵⁾ によって報告された。ついで、Hoshina³⁶⁾ により、その病原菌は V.piscium var. japonicus と命名された。その後、養殖産業上問題となったアユのビブリオ病については、数多くの報告がなされた。アユにおけるビブリオ病は、特に採捕後蓄養中の海産稚アユによく発生し、Muroga and Egusa³⁷⁾ は浜名湖産稚アユ病魚から分離した細菌について検討し、本菌は V.anguillarum であると同定した。V.anguillarum の分類学的・血清学的研究は、古くから進められ、Nybelin³⁸⁾ はインドール産生性と、ショ糖とマンニトール分解性の点から本菌をA、Bの2つの型に分類し、後に Smith³⁹⁾ はC型を追加した。また、我が国では楠田ら⁴⁰⁾ が病魚より分離した菌を生物学的ならびに生化学的性状により淡水由来型、海水由来型および中間型の3つの型に分類した。さらに彼等は、ゲル内沈降反応によってそれぞれの菌の血清学的特異性を明らかにし、3つの型別の妥当性を証明した⁴¹⁾。一方、三淵ら^{42, 43)} は疫学的な観点から浜名湖産稚アユのビブリオ病に関して詳細に検討し、V.anguillarum の血清型をA、B、

C の 3 種類に分類し、これらの血清型と病魚の採捕時期や薬剤感受性との関連性を報告した。

しかしながら、V. anguillarum のこれらの血清型を決定する因子である LPS の化学的性状、特に LPS の O 抗原特異多糖部の糖組成に関する研究は少なく⁴⁴⁾、LPS の糖組成と各血清型との関連性は不明である。またさらに、LPS は内毒素として本菌の魚類に対する病原性に関与している可能性があるが、本菌 LPS の生物活性についてもいまだ明らかにされていない。

以上の不明の点を明らかとするため、本研究では、主に浜名湖産病変稚アユから分離された A、B、C 各血清型の V. anguillarum および NCMB 株より LPS を抽出・精製し、その糖組成と血清型との関連を検討した。さらに、各血清型 LPS の生物活性をリムルス試験と抗腫瘍活性試験によって検討した。また、それら生物学的活性発現の本体であるリピド A の脂肪酸組成も併せ検討するとともに LPS に各種アルカリ処理を施し、それに伴う構造変化と生物活性相関について検討した。

第一節 V. anguillarum LPS の化学的性状

1-1-1. 【 LPS の糖組成 】

表 1 に V. anguillarum の A、B、C 各血清型菌株といずれの血清型にも分類されない菌株、ならびに NCMB 株 LPS の糖組成を Hep 3 モルに対する相対モル比で示した。共通構成糖として、Glc、L-D Hep および GlcN が検出された。これらの糖はほとんどのビブリオ科細菌 LPS に見出される構成糖である⁸⁾。しかし、サルモネラや大腸菌などの腸内細菌および多くのグラム陰性菌 LPS の特異構成成分である KDO は、通常の検出法である Weissbach⁹⁾ の TBA 反応によっては V. anguillarum のいずれの LPS にも検出されなかった。KDO および強酸加水分解により検出される TBA 反応陽性物質については後述する。

上記の共通構成糖以外では、各血清型 LPS の間には明確な糖組成の差

表1 *Vibrio anguillarum* から調製した LPS の糖組成 [mol / 3 mol Hep]

菌株	血清型	Glc	Gal	Fru	Rha	Fuc	Man	Hep	GlcN	GalN	ManN	6d Glc4N	KDO	X
PT-24	A	5.0	0.8	-	-	-	-	3.0	2.3	-	-	-	nd ^{a)}	+
H-47		7.7	0.6	-	-	-	-	3.0	1.4	-	-	-	nd	+
H-103		1.9	0.7	-	-	-	-	3.0	1.6	-	-	-	nd	+
H-107		3.0	1.1	-	-	-	-	3.0	2.7	-	-	-	nd	+
H-124		1.3	0.5	-	-	-	-	3.0	2.4	-	-	-	nd	+
PT-496	B	7.7	-	0.6	-	-	-	3.0	0.8	-	-	1.5	nd	+
PT-514		8.9	-	0.7	-	-	-	3.0	1.1	-	-	1.6	nd	+
H-60		5.2	-	0.6	-	-	-	3.0	0.9	-	-	0.9	nd	+
H-81		6.7	-	0.7	-	-	-	3.0	1.4	-	-	1.1	nd	+
H-88		8.4	-	0.6	-	-	-	3.0	0.9	-	-	1.8	nd	+
PT-213	C	2.8	-	-	0.5	-	-	3.0	1.0	0.1	-	-	nd	+
PB-1		1.3	-	-	0.3	-	-	3.0	0.8	0.1	-	-	nd	+
H-102		5.6	-	-	0.4	-	-	3.0	1.2	0.2	-	-	nd	+
H-132		4.3	-	-	0.4	-	-	3.0	1.2	0.2	-	-	nd	+
H-137	?	0.7	-	-	-	0.1	0.1	3.0	0.7	0.1	-	-	nd	+
NCMB-6		4.3	-	-	1.1	-	-	3.0	1.1	-	2.1	-	nd	+
NCMB-828		5.5	-	-	1.0	-	-	3.0	1.4	-	1.8	-	nd	+

[略語] Glc : グルコース、Gal : ガラクトース、Fru : フルクトース、Rha : ラムノース、Fuc : フコース、Man : マンノース、Hep : ヘプトース、GlcN : グルコサミン、GalN : ガラクトサミン、ManN : マンノサミン、6dGlc4N : 4-アミノ-4,6-ジデオキシグルコース、KDO : 2-ケト-3-デオキシオクトン酸、X : LPS の強酸加水分解産物中に見出された過ヨウ素酸・チオバルビツール酸 (TBA) 反応陽性物質 [脚注] a) nd : 常法による TBA 反応陰性

異が認められた（表1）。すなわち、血清型AのLPSではGalが、血清型BのLPSではFruと6dGlc4Nが検出され、血清型CのLPSではRhaと少量のGalNが検出された。また、A～Cのいずれの血清型にも属さないH-137株LPSは上記のLPSとは全く異なる糖組成を示し、少量のFuc、ManおよびGalNが検出され、最も複雑な糖組成を示した。さらに、2株のNCMB株LPSも共通構成糖の他にRhaおよびManNを含み、他の各血清型LPSと明らかに異なる糖組成を示した。以上の結果、各LPSにおいてその血清型と構成糖との間に明らかな関連が見出された。

1-1-2. 【 KDO リン酸の検出 】

本研究で用いたすべての V. anguillarum の菌株のLPSが、conventionalな加水分解条件下（0.02N 硫酸、100℃、20分）では常法であるWeissbach⁹⁾のTBA反応に陰性を示した。すなわちいずれの菌株のLPSもTBA反応において、その反応液の吸収スペクトルは標準のKDOが示す最大吸収波長（549nm）とは異なり、532nmに最大吸収を示した。しかし、これらすべての菌株のLPSの強酸加水分解（4N-塩酸、100℃、45分）産物ではTBA反応が陽性となり、反応液の最大吸収波長はKDOの場合と同じ549nmを示した。ところがこの加水分解産物中に含まれる物質（X）のHVPEにおける移動度（KDOとの相対移動度 $R_{KDO} = 1.54$ ）はKDOのそれとは明らかに異なり、本物質はKondoら¹³⁾がビブリオ科細菌全体のLPSの強酸加水分解物中に見出した0-phosphoryl-KDO（ X_1 ）および Bordetella pertussis I相菌LPSの強酸加水分解物から分離した5-0-phosphoryl-KDO^{4,5)}の移動度と一致した。V. anguillarum LPSから分離したXをアルカリ性フォスファターゼで処理（炭酸アンモニウム緩衝液、pH 9.6、37℃、16時間）した後、HVPEを行なった結果、Xに相当するスポットは消失し、代ってKDOと同じ移動度をもつ新たなスポットが出現した。すなわち V. anguillarum では、用いたすべてのLPSに常法ではKDOは検出されないものの、代って0-phosphoryl KDOが存在することが示された。

1-1-3. 【 LPS 多糖部 (DPS 画分) の分子構築 】

LPS 多糖部は、LPS の部分加水分解により得られた DPS画分のゲルクロマトグラフィーによって調製することができ、またその溶出パターンと得られた各多糖画分の糖組成から LPS 多糖部の分子構築を知ることができる。通常、大腸菌やサルモネラ属菌などの S 型細菌 LPS から調製した DPS は、Sephadex G-50 ゲル濾過により void volume 付近に溶出されるコアオリゴ糖の結合した O 多糖鎖画分 (Frc. I)、imbibed volume に溶出されるコアオリゴ糖画分 (Frc. III)、および bed volume に溶出される遊離の単糖とリン酸画分 (Frc. IV) の 3 つの画分に分画される。本実験では A、B、C 各血清型菌株と、これらいずれの血清型にも属さない H-137 株および NCMB 株の LPS 多糖部の分子構築を Sephadex G-50 を用いるゲル濾過によって検討した。実験に供した血清型の異なる V. anguillarum の 6 株の DPS は図 2 に示す 4 種類の溶出パターンを示し、前述の糖組成のみならず、血清型の相違による各 LPS 多糖部の分子構築の違いが認められた。Serotype C の H-102 DPS は、前述の大腸菌やサルモネラの DPS の場合と同様に図 2-[A] の溶出パターンを示し、コアに結合した O 抗原多糖鎖画分 (Frc. I)、コアオリゴ糖画分 (Frc. III) および遊離の単糖とリン酸画分 (Frc. IV) の 3 つの画分に分画された。一方、H-60 (Serotype B)、NCMB-6、NCMB-828 の各 DPS は図 2-[B] の溶出パターンを示し、4 つの画分に分画された。その高分子多糖領域にはカラムの void volume 付近と、それよりやや遅れて溶出される 2 つの画分が得られた。H-60 と同じく Serotype B に分類されている PT-514 DPS のゲル濾過パターン (既報⁴⁶⁾) も図 2-[B] と同様のパターンを示している。さらに、Serotype 未知の H-137 の DPS は図 2-[C] の溶出パターンを示し、カラムの void volume 付近に 1 つと、低分子領域に 3 つの計 4 つの画分に分画された。Serotype A の H-103 株 DPS は図 2-[D] に示した最も複雑な溶出パターンを示し、高分子領域に 2 つ、低分子領域に 3 つの計 5 つの画分に分画された。このように、V. anguillarum DPS は血清型の相違によりそれぞれ異なる溶出パターンを

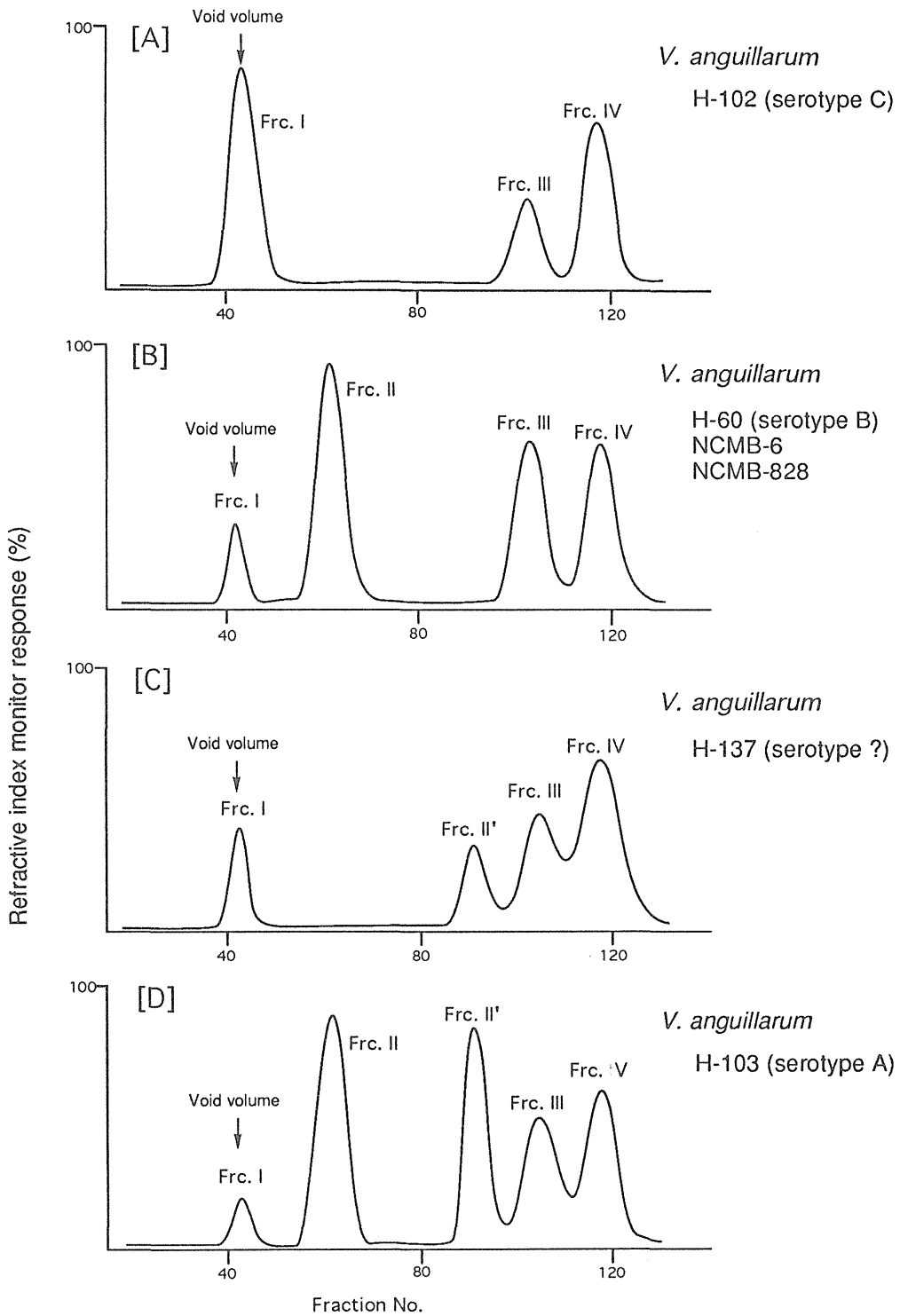


図2 *V. anguillarum* LPS より調製した DPS の Sephadex G-50 ゲルクロマトグラフィー

示し、各血清型間における多糖鎖の分子構築の多様性が示された。

前述した如く、大腸菌やサルモネラ属菌などのS型細菌 LPSから調製した DPSの Sephadex G-50ゲル濾過により溶出される Frc. I はコアオリゴ糖の結合したO多糖鎖画分、Frc. III はコアオリゴ糖画分にそれぞれ相当する。今回検討した各血清型の V. anguillarum の DPSでは Frc. I の他に、図2の [B]、[C]、[D] に示される如く、void volume よりやや遅れて Frc. II と Frc. II' が溶出したが、これらの画分はいずれも LPSの構成糖とほぼ同じ糖組成を示した。従って、Frc. II と Frc. II' は Frc. I と同様、コアオリゴ糖が結合したO多糖鎖画分に相当すると考えられ、Frc. I と Frc. II および Frc. II' の全構成糖から Frc. III の構成糖を除いた糖成分からその LPSのO多糖鎖の構成糖を知ることができる。血清型の異なる V. anguillarum は LPSの構成糖の相違のみならず、そのO多糖鎖の分子構築においてもそれぞれ異なる性状を示した。たとえば、表2に示す如く、H-102 のO多糖鎖は Glc のみからな

表2 Vibrio anguillarum H-102 (Serotype C) から調製した LPS と DPS の Sephadex G-50 ゲルクロマトグラフィーにより得られた各画分および Lipid A の糖組成 [$\mu\text{mol}/\text{mg}$]

	収 率	Glc	Rha	L-D Hep	GlcN	GalN
LPS	1.5 ^{a)}	0.38	0.06	0.10	0.10	0.02
DPS						
Frc. I	46.9 ^{b)}	5.20	—	—	—	—
Frc. III	7.9 ^{b)}	1.18	0.22	0.51	0.15	—
Frc. IV	7.0 ^{b)}	1.49	0.03	0.04	0.06	0.01
O多糖鎖	39.0 ^{b)}	4.02	—	—	—	—
Lipid A	9.0 ^{b)}	—	—	—	0.66	—

[略語] Glc : グルコース、 Rha : ラムノース、 L-D Hep : L-グリセロ-D-マンノヘプトース、 GlcN : グルコサミン、 GalN : ガラクトサミン [脚注] a) アセトン乾燥菌体からの収率 (%, w/w)、 b) LPSからの収率 (%, w/w)

表3 *Vibrio anguillarum* から調製した LPS と DPS の Sephadex G-50 ゲルクロマトグラフィにより得られた各画分および Lipid A の糖組成 [$\mu\text{mol}/\text{mg}$]

菌株	血清型	収率	Glc	Fru	Rha	L-D Hep	D-D Hep	GlcN	ManN	6d Glc4N
LPS										
H-60	B	0.6 ^{a)}	0.34	0.10	-	0.11	-	0.11	-	0.10
NCMB-6		3.1 ^{a)}	0.24	-	0.58	0.04	0.07	0.14	0.20	-
NCMB-828		2.3 ^{a)}	0.42	-	0.54	0.15	0.12	0.20	0.19	-
DPS Frc. I										
H-60	B	4.4 ^{b)}	3.83	-	-	0.04	-	-	-	0.06
NCMB-6		1.2 ^{b)}	3.13	-	0.14	0.03	0.02	0.03	0.07	-
NCMB-828		2.9 ^{b)}	4.34	-	0.03	-	-	-	0.02	-
DPS Frc. II										
H-60	B	22.8 ^{b)}	0.15	-	-	0.05	-	-	-	0.17
NCMB-6		28.5 ^{b)}	0.23	-	0.93	0.11	0.10	0.05	0.48	-
NCMB-828		28.4 ^{b)}	0.24	-	1.03	0.11	0.12	0.06	0.51	-
DPS Frc. III										
H-60	B	11.8 ^{b)}	1.43	-	-	1.30	-	0.07	-	-
NCMB-6		8.6 ^{b)}	0.47	-	0.67	0.14	0.28	0.16	-	-
NCMB-828		15.8 ^{b)}	0.72	-	0.71	0.42	0.39	0.16	0.02	-
DPS Frc. IV										
H-60	B	9.7 ^{b)}	0.28	0.90	-	0.06	-	0.04	-	-
NCMB-6		8.3 ^{b)}	0.12	-	0.34	-	-	-	-	-
NCMB-828		7.1 ^{b)}	0.12	-	0.48	0.03	-	0.02	-	-
O多糖鎖										
H-60	B	15.4 ^{b)}	2.55	-	-	-	-	-	-	0.23
NCMB-6		21.1 ^{b)}	2.88	-	0.40	-	-	-	0.55	-
NCMB-828		15.5 ^{b)}	3.86	-	0.35	-	-	-	0.51	-
Lipid A										
H-60	B	15.4 ^{b)}	-	-	-	-	-	0.78	-	-
NCMB-6		13.7 ^{b)}	-	-	-	-	-	0.42	-	-
NCMB-828		19.2 ^{b)}	-	-	-	-	-	0.62	-	-

[略語] Glc : グルコース、 Fru : フルクトース、 Rha : ラムノース、 L-D Hep : L-グリセロ-D- マンノヘプトース、 D-D Hep : D-グリセロ-D- マンノヘプトース、 GlcN : グルコサミン、 ManN : マンノサミン、 6dGlc4N : 4-アミノ-4,6-ジデオキシグルコース

[脚注] a) アセトン乾燥菌体からの収率(%, w/w)、 b) LPS からの収率(%, w/w)

り、またその収量も極めて多いことから本菌のO多糖鎖はGlcのホモポリマーからなることが推測された。一方、表3に示すH-60 LPSのO多糖鎖はGlcと6dGlc4Nから、また、NCMB-6とNCMB-828 LPSのO多糖鎖はGlcを主成分とし、他にRhaとManNからなることが示された。表4に示すH-137 LPSは前出のO多糖鎖とは異なり、Fucを主成分とし、他にGlc、ManおよびGalNから構成されていた。さらに表5に示すH-103 LPSのO多糖鎖はGlcとGalからなることが示された。

Serotype Bに分類されるH-60株LPSにのみ見出されたFru(表3)は既報のPT-514 LPSと同様⁴⁶⁾、Frc. IVにのみ検出され、弱酸加水分解により容易にLPSから遊離されることが判明した。またいずれの菌株のLPSにおいてもリピドAの構成糖はGlcNのみであった。

表4 *Vibrio anguillarum* H-137 (Serotype ?) から調製したLPSとDPSのSephadex G-50ゲルクロマトグラフィーにより得られた各画分およびLipid Aの糖組成 [$\mu\text{mol}/\text{mg}$]

	収率	Glc	Fuc	Man	L-D Hep	GlcN	GalN
LPS	1.1 ^{a)}	0.24	0.57	0.29	0.40	0.29	0.17
DPS							
Frc. I	16.4 ^{b)}	0.86	1.15	0.72	0.10	—	0.38
Frc. II	8.8 ^{b)}	0.32	0.53	0.31	0.78	0.12	0.14
Frc. III	12.8 ^{b)}	0.48	0.06	0.16	1.08	0.23	0.02
Frc. IV	10.6 ^{b)}	0.09	0.27	0.04	0.22	0.05	—
O多糖鎖	12.4 ^{b)}	0.70	1.62	0.43	—	—	0.50
Lipid A	22.9 ^{b)}	—	—	—	—	0.70	—

[略語] Glc : グルコース、Fuc : フコース、Man : マンノース、L-D Hep : L-グリセロ-D-マンノヘプトース、GlcN : グルコサミン、GalN : ガラクトサミン [脚注] a) アセトン乾燥菌体からの収率 (%, w/w)、b) LPSからの収率 (%, w/w)

表5 *Vibrio anguillarum* H-103 (Serotype A) から調製した LPSと DPS の Sephadex G-50 ゲルクロマトグラフィーにより得られた各画分および Lipid A の糖組成 [$\mu\text{mol}/\text{mg}$]

	収率	Glc	Gal	L-D Hep	GlcN
LPS	0.5 ^{a)}	0.20	0.10	0.17	0.15
DPS					
Frc. I	2.4 ^{b)}	2.64	0.06	0.04	0.03
Frc. II	5.0 ^{b)}	0.12	0.07	0.08	0.03
Frc. II'	23.1 ^{b)}	0.21	0.12	0.15	0.05
Frc. III	6.7 ^{b)}	0.39	0.18	0.27	0.15
Frc. IV	5.4 ^{b)}	0.09	0.02	0.02	0.05
O 多糖鎖	23.8 ^{b)}	2.58	0.07	—	—
Lipid A	43.2 ^{b)}	—	—	—	0.52

[略語] Glc : グルコース、Gal : ガラクトース、L-D Hep : L-グリセロ-D-マンノヘプトース、GlcN : グルコサミン [脚注] a) アセトン乾燥菌体からの収率 (%, w/w)、b) LPS からの収率 (%, w/w)

1-1-4. 【 LPS の脂肪酸組成 】

次に *V. anguillarum* LPS のリピド A 部分を構成する脂肪酸組成を検討した。表6に *V. anguillarum* LPS の脂肪酸組成を 3-OH C14:0 2モルに対する相対モル比で示した。各 LPSの共通構成脂肪酸として C14:0、C16:0、3-OH C12:0、および 3-OH C14:0 が検出された。これらの共通構成脂肪酸の他に PT-24、H-88 LPS を除く LPS に C16:1が、また PT-24、H-137 を除く LPS に C18:1 が検出された。さらに PT-24、H-88、PT-514、および H-137 LPS に C12:0が、また、PT-496 と PT-213 LPS に C18:0がそれぞれ見出された。奇数飽和脂肪酸である C17:0 は PT-496 LPS にしか検出されなかった。各 LPSのうち PT-496 LPS は特に複雑な脂肪酸組成を示し、リピド A 部分の heterogeneity が予想された。また、同一血清型に属する LPS においてもその脂肪酸組成に差

表6 *Vibrio anguillarum* から調製した LPS の脂肪酸組成 [mol / 2 mol 3-OH C14:0]

菌 株	血清型	脂 肪 酸									
		C12:0	C14:0	C16:0	C16:1	C17:0	C18:0	C18:1	3-OH C12:0	3-OH C14:0 ^{a)}	
H-107	A	—	1.7	2.0	0.9	—	—	0.8	0.7	2.0	
PT-24	A	1.2	1.5	0.9	—	—	—	—	0.8	2.0	
H-88	B	1.2	1.6	1.2	—	—	—	0.1	1.2	2.0	
PT-496	B	—	1.9	1.1	1.6	0.3	0.1	0.8	0.5	2.0	
PT-514	B	1.2	1.5	0.7	0.6	—	—	0.1	2.1	2.0	
H-132	C	—	1.7	0.9	1.1	—	—	0.5	0.9	2.0	
PT-213	C	—	1.6	1.3	1.3	—	0.2	1.4	0.7	2.0	
H-137	?	1.2	0.1	1.2	0.2	—	—	—	0.1	2.0	
NCMB-6		—	1.0	0.9	0.9	—	—	0.4	2.0	2.0	
NCMB-828		—	0.7	0.7	0.8	—	—	0.3	2.0	2.0	

[略語] C12:0 ; ドデカン酸、 C14:0 ; テトラデカン酸、 C16:0 ; ヘキサデカン酸、 C16:1 ; ヘキサデセン酸、 C17:0 ; ヘプタデカン酸、 C18:0 ; オクタデカン酸、 C18:1 ; オクタデセン酸、 3-OH C12:0 ; 3-ヒドロキシドデカン酸、 3-OH C14:0 ; 3-ヒドロキシテトラデカン酸 [脚注] a) エステル交換反応後検出されたアミド結合脂肪酸 (その他の脂肪酸はエステル結合脂肪酸)

が認められた。ナトリウムメチラートによるエステル交換反応の結果、これらの脂肪酸のうちすべての LPSにおいて 3-OH C14:0 のみがアミド結合脂肪酸であることが示された。

第二節 V. anguillarum LPS の血清学的性状

前節で述べた如く、各血清型 V. anguillarum の LPSには血清型の違いに対応して LPS の糖組成および LPS多糖部の分子構築にそれぞれ特有のパターンが存在し、各血清型株の LPSの多糖部はそれぞれ異なる構造をもつことが示された。本実験では各血清型の菌体から抽出・精製したLPS を用いてLPS レベルでの血清学的特異性を検討するため、アルカリ処理 LPS で感作したヒツジ赤血球 (SRBC) を用いる受身溶血阻止 (PHI) 試験を行なった。PHI 試験は、LPS 感作 SRBC と対応する血清型菌の全菌抗血清およびモルモット補体からなる溶血系に対し、種々の濃度の LPS をinhibitor として用いて溶血を阻害し、その結果は50%溶血阻止を示す LPS の濃度 (ID₅₀, μg / ml)で表した。この値が低いほど LPSの抗原特異性あるいは各 LPS間の交叉反応原性が高いことを意味する。

表 7 に A、B、C 各血清型およびいずれの血清型にも属さない H-137 株 LPSを用いて行なった PHI 試験の結果を示した。血清型 A (PT-24、H-107)の LPS は、homologous な溶血系 (PT-24 LPS 感作 SRBC / 抗 PT-24 抗血清、すなわち A / 抗 A) に対し、強い溶血阻止を示したが、他の血清型の溶血系、すなわち B / 抗 B (PT-496 / 抗 PT-496) および C / 抗 C (PT-213 / 抗 PT-213) の溶血系に対しては非常に弱い溶血阻止活性しか示さなかった。同様に血清型 B の 2 株 (PT-496、H-88) の LPS は homologous な B / 抗 B の溶血系に対してのみ、また血清型 C の 2 株 (PT-213、H-132) の LPSは homologous な C / 抗 C の溶血系に対してのみ強い溶血阻止活性を示した。一方、A、B、C いずれの血清型にも属さない H-137 LPSではどの血清型の溶血系に対しても高い溶血阻止活性を示さなかった。すなわち A ~ C の各血清型 LPSの間には血清学的

に有意な交叉反応性は認められず、各血清型の LPS はそれぞれ非常に高い血清学的特異性を示し、菌体凝集反応による A～C の各血清型別と LPS レベルでの血清学的特異性との間に、明確な相関性が示された。

表7 *Vibrio anguillarum* LPS の受身溶血阻止試験における50%溶血阻止濃度 [$\mu\text{g/ml}$]

インヒビター (LPS)	血清型	受身溶血系 (LPS感作 SRBC ^{a)} / 抗血清)		
		PT-24 / 抗PT-24 (A / 抗 A)	PT-496 / 抗PT-496 (B / 抗 B)	PT-213 / 抗PT213 (C / 抗 C)
PT-24 H-107	A	0.53 0.16	720 84	570 39
PT-496 H-88	B	310 - ^{b)}	0.24 0.21	57 750
PT-213 H-132	C	740 490	670 370	0.18 0.23
H-137	?	470	250	140

[脚注] a) SRBC : 羊赤血球、 b) - : > 1,000 $\mu\text{g/ml}$

第三節 *V. anguillarum* LPS の生物活性およびアルカリ処理

による LPS の構造変化と生物活性相関

LPS は内毒素として生体および分子レベルで極めて多彩な生物活性を示し、細菌の病原性との関連性が指摘されている。これらの内毒素としての生物活性の指標となるものの1つにリムルステストがある。リムルステストはリムルスライセート [カプトガニ (リムルス) のアメーバ細胞溶解物] と LPS とが反応してゲル化を生じる反応で、極めて微量の LPS を検出することができ、また本活性と LPSの内毒素活性との間には

多くの場合相関が認められる。本実験では V. anguillarum LPS の内毒素活性を表す指標の1つとしてのリムルステストと、LPS のもつ多彩な生物活性のうちの一つである抗腫瘍活性について検討した。これらのLPS のもつ多彩な生物活性発現の本体はリピドAであり、リピドAからの脂肪酸やリン酸の脱離はLPS の生物活性発現に大きな影響を与える。そこでさらに、本実験ではLPS のもつ生体にとって有益な活性をできるだけ損なうことなく弱毒化された LPS を調製する目的で、V. anguillarum LPS から種々のアルカリ処理 LPS を調製し、それらの化学構造と生物活性の変化を検討した。LPS は PT-514 LPS を用い、① 0.25N NaOH で 56 °C、1 時間、② 4.0N NaOHで 100°C、5 時間、③アルカリ性ヒドロキシルアミン (NH₂OH)で 62 °C、3 分間、④ヒドラジン (NH₂NH₂)で100 °C、40時間、および ⑤ナトリウムメチラート (NaOCH₃)で 37 °C、10時間それぞれ処理後、遊離の脂肪酸を除去した後、実験に供した。

1-3-1. 【 LPS のリムルス活性 】

表8に V. anguillarum LPS のリムルステストの結果を示した。対照として病原性大腸菌 Escherichia coli O 111 LPS (Sigma 社製)を用い、さらに V. cholerae NIH 41 (Ogawa)と 569B (Inaba) LPS の内毒素活性とも比較した。E. coli O 111 LPS が 0.1 ng / mlで完全にリムルスライセートのゲル化を起こすのに比べ、V. anguillarum LPS は 0.005 ~0.01 ng/ml の濃度で完全なゲル化を起こし、E. coli O 111 LPS の 10 倍から 20 倍高いリムルス活性を示した。中でも血清型Aの PT-24 LPS と血清型Bの H-88 LPS および MCMB-6、NCMB-828 2 株のLPS はオガワ型コレラ菌 LPSの活性値には及ばないものの、イナバ型コレラ菌 LPSより高い活性を示した。また、他のすべての V. anguillarum LPS もイナバ型コレラ菌と同程度のゲル化活性を示し、本菌のLPS が内毒素としての高い活性を有することが示された。

表8 Vibrio anguillarum LPS のリムルス試験による内毒素（ゲル化）活性

菌 株	血清型	LPS 濃度 [ng/ml]					
		0.0005	0.001	0.005	0.01	0.05	0.10
<u>V. anguillarum</u>							
H-107	A	- ^{a)}	-	± ^{b)}	+ ^{c)}	+	+
H-124		-	-	±	+	+	+
PT-24		-	±	+	+	+	+
H-60	B	-	-	±	+	+	+
H-88		-	±	+	+	+	+
PT-514		-	-	±	+	+	+
H-102	C	-	-	±	+	+	+
H-132		-	-	±	+	+	+
PT-213		-	-	±	+	+	+
H-137	?	-	-	±	+	+	+
NCMB-6		-	±	+	+	+	+
NCMB-828		-	±	+	+	+	+
<u>V. cholerae</u>							
NIH (Ogawa)		±	+	+	+	+	+
569B (Inaba)		-	-	±	+	+	+
<u>S. Typhimurium</u> LT2		-	-	-	±	+	+
<u>E. coli</u> O111		-	-	-	-	±	+

[脚注] a) - : 流動状、 b) ± : 半流動状にゲル化、 c) + : 完全凝固

1-3-2. 【 LPS の抗腫瘍活性 】

V. anguillarum LPS の抗腫瘍活性を測定するため、 ddY 系マウスの腹腔に Ehrlich 腹水型腫瘍を接種し、各血清型 LPSを腫瘍接種の5日前、2日前、2日後、5日後、8日後および11日後にそれぞれ腹腔内に投与し、それらのマウスの平均生存日数で抗腫瘍活性を測定した。

結果を表9に示した。LPS 非投与群の平均生存日数が 15.7 日であるのに対し、LPS 投与群の平均生存日数は 20.6 日～ 54.4 日で明らかな延命効果が認められた⁴⁷⁾。中でも、血清型 A に属する H-107 株 LPS および血清型 B に属する PT-514 株 LPS 投与群では顕著な延命効果が認められた。特に PT-514 LPS 投与群においては腹水型腫瘍を接種後 60 日間生存したマウスが 8 匹中 7 匹、平均生存日数も 54.4 日と他の LPS 投与群と比較して著しい延命効果を示した。

表9 Vibrio anguillarum LPS の Ehrlich carcinoma に対する抗腫瘍活性

菌 株	血清型	60日生存数/ 被検マウス数	平均生存日数 (生存範囲)	P ^{a)}
<u>V. anguillarum</u>				
H-107	A	4/8	45.6 (18-60)	<0.001
H-124		3/8	33.5 (11-60)	<0.02
PT-24		1/8	26.5 (15-60)	<0.05
H-60	B	2/7	38.4 (15-60)	<0.02
H-88		1/8	27.8 (16-60)	<0.05
PT-514		7/8	54.4 (21-60)	<0.001
H-102	C	0/8	20.6 (13-37)	
PT-213		2/8	30.0 (15-60)	<0.02
H-137	?	0/8	23.5 (13-52)	
<u>S. Typhimurium</u> LT2		0/10	18.9 (15-27)	
Control		0/8	15.7 (12-20)	

LPS は腫瘍細胞接種の 5 日前、2 日前、2 日後、5 日後、8 日後、11 日後にそれぞれ 100 μ g を腹腔内に投与した。腫瘍細胞は Ehrlich carcinoma を用い、腹腔内に 5×10^4 cells 接種した。[脚注] a) P : 危険率

1-3-3. 【 LPS の化学構造に及ぼすアルカリ処理の影響 】

V. anguillarum PT-514 LPS の糖組成に対する各アルカリ処理の影響を

検討した。Intact および各アルカリ処理 LPSの糖組成を表 10 に示した。分析値は L-D Hep の含量を3モルとしたときのモル比で示した。Intact LPSは、Glc、Fru、L-D Hep、GlcN、および 6dGlc4N を含み、その構成モル比は 4.1 : 0.7 : 3.0 : 2.7 : 2.9 であった。各アルカリ処理 LPS は Intact LPS に比べて、アミノ糖含量に若干の減少が見られたものの、その他の構成糖のモル比にはあまり変化が認められず、PT-514 LPSの多糖部はこれらのアルカリ処理により、ほとんど変化を受けないことが示された。

表10 *Vibrio anguillarum* PT-514 株から調製した intact LPS と各種アルカリ処理 LPS の糖組成 [mol / 3 mol L-D Hep]

LPS	Glc	Fru	L-D Hep	KDO	GlcN	6d Glc4N
Intact LPS	4.1	0.7	3.0	nd ^{a)}	2.7	2.9
0.25 N NaOH 処理 LPS	3.9	0.8	3.0	nd	1.9	2.1
4 N NaOH "	3.8	0.7	3.0	nd	1.4	1.7
NH ₂ OH "	3.6	0.6	3.0	nd	1.7	1.9
NaOCH ₃ "	4.2	0.7	3.0	nd	2.4	2.4
NH ₂ NH ₂ "	3.9	0.9	3.0	nd	1.5	2.1

[略語] Glc : グルコース、Fru : フルクトース、L-D Hep : L-グリセロ-D-マンノヘプトース、KDO : 2-ケト-3-デオキシオクトン酸、GlcN : グルコサミン、6dGlc4N : 4-アミノ-4,6-ジデオキシグルコース [脚注] a) nd : 過ヨウ素酸・チオバルビツール酸反応陰性

一方、LPSの生物活性に重要な影響を及ぼすリピド A 部分の脂肪酸組成には各種化学処理によって大きな変化が認められた。Intact および各アルカリ処理 LPS の脂肪酸組成を表 11 に示した。分析値は 3-OH C14:0 を2モルとしたときのモル比で示した。PT-514 LPSの構成脂肪酸のうち 3-OH C14:0 のみがアミド結合脂肪酸であり、他はエステル結合脂肪酸であることはすでに述べた。LPS の 0.25N NaOH 処理では C18:1

以外のエステル結合脂肪酸が残存するものの、これらの含量は大幅に低下した。4N NaOH 処理 LPSではさらにエステル結合脂肪酸の C16:0と C16:1 が消失した。NH₂OH、NaOCH₃ 処理 LPS ではアミド結合脂肪酸である 3-OH C14:0 以外の脂肪酸はほぼすべてが失われていた。また、NH₂NH₂処理 LPS はエステル、アミド両結合の脂肪酸がすべて遊離し、多糖鎖のみとなった。以上、LPS のアルカリ処理の強度が増すにつれて、その構成脂肪酸が段階的に失われることが示された。

表11 *Vibrio anguillarum* PT-514株から調製した LPS とその各種アルカリ処理 LPS の脂肪酸組成 [mol / 2 mol 3-OH C14:0]

LPS	脂 肪 酸						
	C12:0	C14:0	C16:0	C16:1	C18:1	3-OH C12:0	3-OH C14:0
Intact LPS	1.2	1.5	0.7	0.6	0.1	2.1	2.0
0.25 N NaOH 処理 LPS	0.8	0.9	0.1	0.5	-	0.9	2.0
4 N NaOH "	0.3	0.9	-	-	-	1.0	2.0
NH ₂ OH "	-	-	-	-	-	0.1	2.0
NaOCH ₃ "	-	-	-	-	-	-	2.0
NH ₂ NH ₂ "	-	-	-	-	-	-	-

[略語] C12:0 ; ドデカン酸、 C14:0 ; テトラデカン酸、 C16:0 ; ヘキサデカン酸
C16:1 ; ヘキサデセン酸、 C18:1 ; オクタデセン酸、 3-OH C12:0 ; 3- ヒドロキシド
デカン酸、 3-OH C14:0 ; 3- ヒドロキシテトラデカン酸

1-3-4. 【 LPS の生物活性に及ぼすアルカリ処理の影響 】

各アルカリ処理による内毒素活性への影響を検討するため、リムルスゲル化反応を行なった。PT-514 Intact LPS のリムルスゲル化活性は前述のように *E. coli* O111 LPS に比べ、10倍程強く、イナバ型コレラ菌と同程度の活性を示した。しかし、アルカリ処理 LPSではその処理条件

の強弱に拘らず、すべてのリムルスゲル化活性は 0.1 ng/ml の濃度においても消失し、リムルスゲル化活性は、リピド A からの脂肪酸の脱離の影響を鋭敏に受けた。

つぎに各種アルカリ処理 LPS の抗腫瘍活性について検討した。前述の如く、PT-514 Intact LPS は、明らかな抗腫瘍活性を示したが、表 12 に示される PT-514 の各化学処理 LPS 投与群は、いずれも有意な延命効果は認められず、少量の脂肪酸の脱離によっても抗腫瘍活性が著しく低下することが明らかとなった。

表12 *Vibrio anguillarum* PT-514 LPS から調製した各種アルカリ処理 LPS の Ehrlich carcinoma に対する抗腫瘍活性

LPS	投与量 (μg /日)	生存日数 (mean \pm SD)	40日生存数/ 被検マウス数
0.25 N NaOH 処理 LPS	100	19.5 \pm 4.3	0 / 6
4.0 N NaOH //	100	20.3 \pm 2.9	0 / 6
NH ₂ OH //	100	18.2 \pm 1.9	0 / 6
NH ₂ NH ₂ //	100	21.2 \pm 3.0	0 / 6
NaOCH ₃ //	100	21.5 \pm 3.5	0 / 6
Control (生理食塩水)		19.3 \pm 1.2	0 / 6

被検標品は腫瘍細胞接種日の5日前、2日前、1日後、3日後、5日後にマウス腹腔内に投与した。腫瘍細胞は Ehrlich carcinoma を用い、腹腔内に 1×10^4 cells 接種した。

考 察

LPS はグラム陰性菌の O 抗原であり、菌の血清学的特異性の決定に重要な役割を担っている。この O 抗原特異性を決定するのは、O 抗原上の O 抗原決定因子に対応する O 多糖である。腸内細菌など多くのグラム陰性細菌と異なり、魚病細菌である *V. anguillarum* ではその LPS に関する研究は少なく、特に浜名湖産病変稚アユより分離された菌株の血清型

を決定する O 抗原多糖部の糖組成に関する研究は本研究が最初のものである。浜名湖産稚アユより分離した A、B、C 各血清型 V. anguillarum では、同じ血清型に属する複数の菌株の LPS はすべて同じ糖組成をもち、菌の血清型に対応して、それぞれの LPS の糖組成に特有のパターンが存在することが示された⁴⁸⁾。一方、A、B、C のいずれの血清型にも分類されていない H-137 株や NCMB 株 LPS の糖組成はこれら 3 つの血清型 LPS のそれとは全く異なっていた。さらに LPS を用いた PHI 試験によって、LPS レベルにおいても菌体凝集反応と一致した明瞭な抗原特異性が認められた。これらの成績は本菌の菌体および LPS レベルにおける血清学的特異性と LPS の糖組成との関連性あるいは対応性を明確に示すものであった。V. anguillarum の血清型分類についてはこれまでにいくつかの報告がなされ、凝集反応、ゲル内沈降反応、間接赤血球凝集反応などにより、Johnsen⁴⁹⁾、絵面ら⁵⁰⁾、楠田ら⁴¹⁾ はいずれも本菌を 3 種類の血清型に分類している。しかし、その後 Kitao ら⁵¹⁾ は A、B、C の 3 血清型に加え D、E、F の新血清型の存在を報告しており、今後、さらに血清型の細分化が予想される。本研究で示した LPS の糖組成の相違、ならびに PHI 試験による血清学的性状においても、徳島で分離された PT 株および浜名湖産病変稚アユから分離した H- 株、PB- 株はいずれも A～C の 3 種類に分類されたが、H-137 株と NCMB 株は A～C の血清型菌株 LPS とは明らかに異なる性状を示し、これらの菌株は、A～C 以外の血清型に属するものと思われる。各血清型の V. anguillarum の分布は、保菌病魚の採捕時期、採捕場所により異なることが明らかとなっており、従来の生化学的診断法に加え、LPS の糖組成に基づく分類は本菌の分類のみならず感染経路の解明に重要な手掛かりを与えるものと思われる。また、血清型の相違により、V. anguillarum の薬剤感受性も異なることが三淵ら⁴³⁾ により報告されており、血清型の明確な診断は、養殖魚のピブリオ病治療および予防のための散布薬剤の選択の一助となると考えられる。

V. anguillarum LPS に共通した化学的特徴の 1 つとして、弱酸加水分解によって KDO は遊離されず、強酸加水分解によって KDO-リン酸が

検出されることが挙げられる。KDO-リン酸は Plesiomonas 属を除くすべてのビブリオ科細菌の LPS に共通して存在し、さらにビブリオ属を構成する Vibrio、Aeromonas、Photobacterium 各属のいくつかの菌種の LPS では KDO は KDO-4-リン酸として存在し、V.anguillarum NCMB-6 と NCMB-828 株 LPS においても同様であることが報告されている¹³⁾。従って、本研究で用いた他の菌種においても KDO は KDO-4-リン酸として存在することが強く示唆された。このことはまた、ビブリオ科細菌では V.anguillarum も含め、共通して腸内細菌 LPS とは異なる構造の内部コア (KDO 領域) をもつことを強く示唆している。

LPS の極めて多彩な生物活性は、その内毒素活性の本体であるリピド A の脂肪酸組成が重要な役割を担う。V.anguillarum LPS のリピド A では、糖組成に認められたような血清型との関連性は認められず、非常に Heterogeneous な脂肪酸組成を示した。しかし、いずれのリピド A においても共通して腸内細菌リピド A におけると同様、3-OH C14:0 がアミド結合脂肪酸として検出され、そのバックボーンは GlcN から成るため、一般的なグラム陰性菌リピド A の基本構造⁵²⁾ をもつものと考えられる。

V.anguillarum LPS は、リムルス試験において内毒素としての高い生物活性を示した。また、LPS の代表的な生物活性であるマイトジェン活性やアジュバント活性においても A、B、C 各血清型の V.anguillarum LPS は対照として用いた S.Typhimurium LPS と同程度の活性を示すことが報告されている⁵³⁾。さらに抗腫瘍活性試験においても各 LPS 投与群は有意の差で延命効果が認められ、中でも PT-514 LPS 投与群で顕著な延命効果が認められた⁴⁷⁾。しかし、これらの活性は LPS のアルカリ処理による脂肪酸の遊離とともに失われ、他の菌種の LPS と同様、V.anguillarum LPS の活性発現にはリピド A の脂肪酸が不可欠であることが示された。

第二章 LPS 多糖鎖の画期的迅速簡便分離法の開発とその ビブリオ科細菌の化学分類への応用

前章で述べた如く、グラム陰性菌の O 抗原型（血清型）とその LPS 多糖側鎖の糖組成との間には明らかな相関が認められ、また菌種によってはその菌種に特異的な構成糖を含むものも知られている。すなわち、グラム陰性菌の分類の一手段として、LPS 多糖部の糖組成に基づく化学分類（chemotaxonomy）が有用であると考えられる。LPS 多糖鎖は LPS を弱酸により部分加水分解した後、ゲル濾過によって分離することができるが、このためには先ず最初に菌体から LPS を抽出・精製する必要がある。LPS の抽出・精製には、前述の如く、多量の菌体の培養と危険を伴う高温のフェノール／水抽出、さらに長時間の超遠心分離の反復による精製など、多大の時間と労力を要する。従って、抽出・精製した LPS を用いて多数の野外および患者分離株や多種類の O 抗原型をもつ多くの菌株について、LPS 多糖部の糖組成に基づく化学分類を実施することは事実上不可能である。この問題の解決のため、Kondo ら⁵⁴⁾ は O1 Vibrio cholerae の菌体から LPS を分離精製することなく直接 LPS 多糖鎖を分離する迅速簡便法を開発した。すなわち、加熱死菌体の熱稀酢酸抽出物をアセトン／水 2 : 1 および 7 : 1 で順次沈殿分画して得られた画分のうち、7 : 1 のアセトン／水沈殿画分に LPS 多糖鎖が、またその上清に LPS の加水分解によって遊離した糖成分が含まれ、これら両画分の糖組成がその菌の LPS 多糖部の糖組成と定性的に一致することを示した。本法は non-O1 V. cholerae 42 株および O1 V. cholerae の野外および患者分離株に応用され、初めて non-O1 V. cholerae の LPS 多糖部の糖組成に基づく化学分類が実施されると同時に、従来の生化学的、血清学的同定法によっては疑陽性的性状を示す O1 V. cholerae の同定に極めて有効な手段であることが示された。このように、菌体から直接 LPS 多糖鎖を分離するこの迅速簡便法（原法）は V. cholerae に対して極めて有効であったが、その後、本法を V. cholerae 以外のビブリオ科細菌に応用した場合、菌種によっては得られた標品中に LPS 多糖部以外

の夾雑物が多量に混入する場合や、LPS 多糖鎖が全く分離できないなどの問題が生じた。このため本章では、前述の迅速簡便法（原法）をビブリオ科全体の菌種に応用できるように改良し、その改良法を用いて、いくつかのビブリオ科細菌の LPS多糖部の糖組成に基づく化学分類を試みた。さらに、ビブリオ科のみならず広くグラム陰性菌全般の菌種においても菌体から直接、しかも可能な限り短時間のうちに夾雑物の混入の少ない LPS多糖鎖を調製できる新たな迅速簡便分離法を開発し、それによって現在知られている全 O 抗原型（血清型）株の non- O1 V.cholerae と V.fluvialis の化学分類を行なった。

第一節 LPS 多糖鎖の迅速簡便分離法（原法）の改良と そのビブリオ科細菌への応用

2-1-1. 【 LPS 多糖鎖の迅速簡便分離法（原法）の改良 】

前述の如く、Kondo ら⁵⁴⁾ によって開発された LPS 多糖鎖の迅速簡便分離法（原法）は V.cholerae に対しては極めて有効であったが、同じビブリオ科細菌である V.mimicus、V.vulnificus、V.fluvialis などの病原ビブリオでは原法によって LPS 多糖鎖を分離することは不可能であった。このため本実験では主に上記 3 菌種を用いて、それらの LPS 多糖鎖を調製するために原法の改良を行なった⁵⁵⁾。図 3 に示した如く、用いた菌種の世代時間を考慮して培地には 1.5% 食塩加ハートインフュージョン培地（800 ml）を用い、培養時間も原法の 6 時間から 16 時間に延長した。さらに LPS 多糖鎖を効率よく抽出するために、稀酢酸による部分加水分解条件を検討した結果、10% 酢酸中で 100℃、90 分間の加水分解が至適条件であることが明らかとなった。この菌体の稀酢酸抽出液は原法と同様に、蒸発乾固後、アセトン/水 2:1 および 7:1 によって順次沈殿分画した。得られた各標品（Sed. I、Sed. II、Sup. III）の構成糖を分析した結果、Sed. I と Sed. II はともに LPS 多糖鎖の構成糖を含むが、GC および GC/MS による分析では、中性

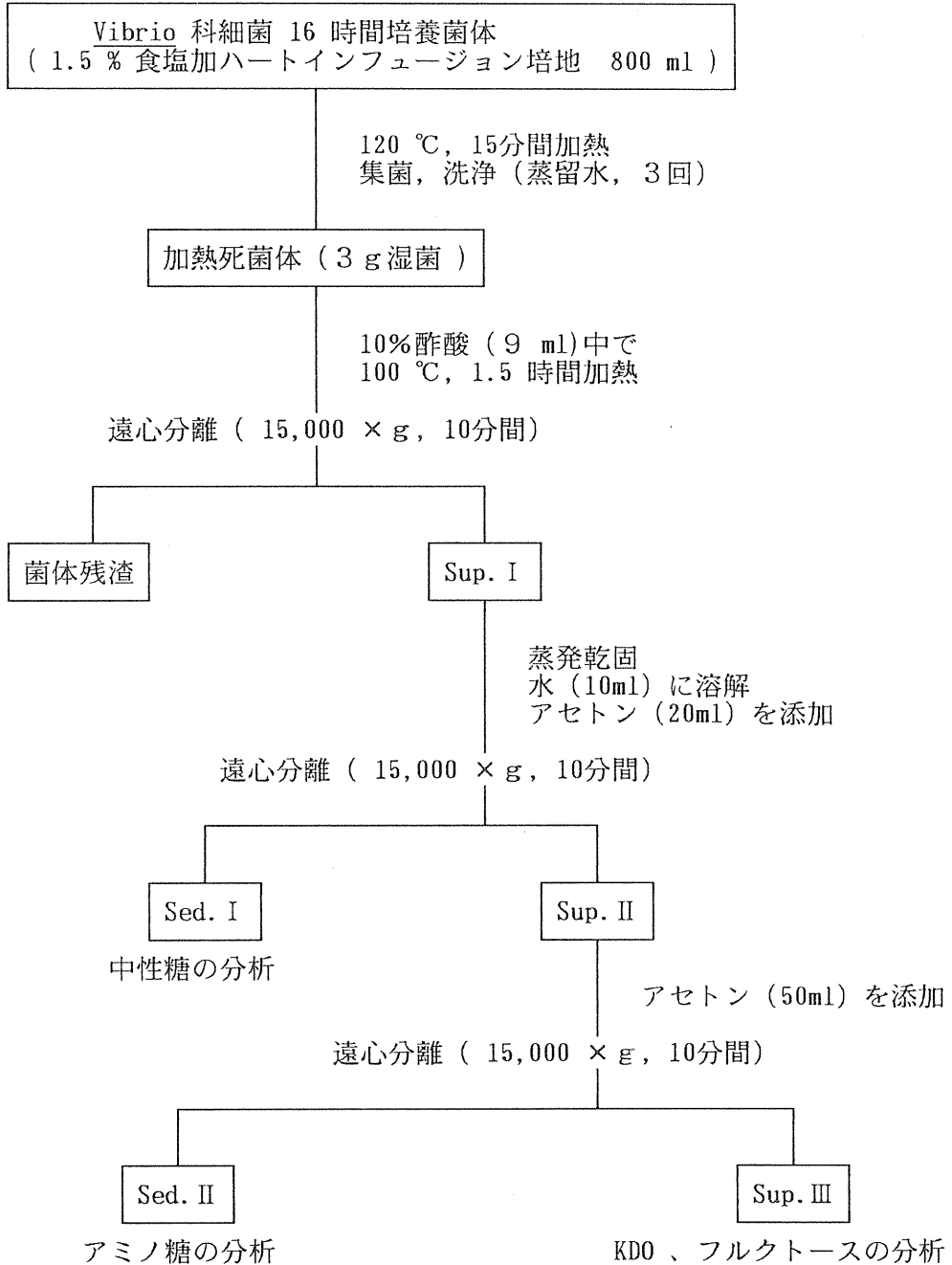


図3 Vibrio 科細菌の菌体から LPS多糖鎖を分離する迅速簡便法 (改良法)

糖は Sed. I、アミノ糖は Sed. II を用いて分析することにより、糖成分以外の不純物による妨害が少ないことが示された。さらに Sup. III には遊離の単糖が検出された。すなわち、本改良法によって得られた Sed. I と Sed. II および Sup. III にこれらの菌種の LPS 多糖部の構成糖が含まれ、菌体より抽出・精製した LPS の部分加水分解によってリピド A を除去した LPS 多糖部の糖組成と一致することが明らかとなった。

本改良法により V. fluvialis、V. vulnificus および菌体凝集反応において non-O1 V. cholerae と共通抗原性を示す V. mimicus の LPS 多糖鎖を調製し、その糖組成に基づく化学分類、および LPS 多糖部の糖組成と血清学的交叉反応原性との関連を検討した結果を以下に述べる。ただし V. fluvialis に関しては、本研究において新たに開発した迅速簡便法によって、そのすべての O 抗原型株について化学分類を行なったので、本章第二節に後述する。

2-1-2. 【 V. vulnificus の LPS 多糖部の糖組成に基づく 化学分類 】

V. vulnificus は経口感染または創傷感染を起こし、特に肝疾患や糖尿病など基礎疾患のある患者では、敗血症による高い致死率を示すため恐れられている海水ビブリオであり、現在、Shimada and Sakazaki⁵⁶⁾ により 7 種の血清型に分類されている。表 13 に V. vulnificus の 7 種の血清型株の LPS 多糖部の糖組成に基づく化学分類を示した。

各血清型菌株の LPS 多糖部はそれぞれの血清型に対応して、各々異なる糖組成を示し、化学型もまた 7 種に分類された。共通構成糖として、L-D Hep、Glc、GlcN が検出された。この他に、化学型 II の菌株には Man、化学型 III の菌株には Gal と GalN、化学型 IV の菌株には Gal、化学型 V の菌株には Fuc、化学型 VI の菌株には GalN、および化学型 VII の菌株には Fuc と Rha が認められ、それぞれ異なる糖組成を示した。複数の同一血清型菌株においても、各菌株の由来とは無関係にこれらの LPS 多糖部の糖組成は定性的には同じであった。V. vulnificus では、

表13 *Vibrio vulnificus* より迅速簡便分離法 (改良法) で調製した LPS 多糖部の糖組成 [$\mu\text{g} / \text{g}$ of wet cells]

化学型	血清型	菌株	L-D Hep	Glc	Gal	Man	Fuc	Rha	GlcN	GalN	A1?	KDO
I	O1	D 3383	180.3	187.7	—	—	—	—	30.0	—	70.4 7.4 10.4 37.0	nd ^{a)}
		ATCC 27562	215.6	157.2	—	—	—	—	11.0	—		nd
		1655-80	123.4	491.4	—	—	—	—	6.8	—		nd
		Kitasato	98.4	128.2	—	—	—	—	5.6	—		nd
II	O2	D 3894	99.4	103.2	—	98.0	—	—	27.6	—	—	nd
		D 7232	126.8	210.6	—	141.2	—	—	32.4	—	—	nd
III	O3	E 240	107.2	129.6	97.2	—	—	—	11.2	24.8	—	nd
		A 1402	96.6	166.0	42.8	—	—	—	24.2	17.8	—	nd
IV	O4	1115-80	182.2	136.2	93.8	—	—	—	7.6	—	73.6	nd
		C 4123	149.2	252.6	7.0	—	—	—	10.6	—	9.6	nd
V	O5	E 571	161.2	118.8	—	—	62.6	—	43.2	—	72.4	nd
		1705-80	158.0	234.6	—	—	74.8	—	43.0	—	37.6	nd
VI	O6	91-81	128.4	174.0	—	—	—	—	14.8	54.8	342.4	nd
VII	O7	1338-80	103.2	24.8	—	—	54.8	62.2	60.6	—	180.2	nd

[略語] L-D Hep : L-グリセロ-D- マンノヘプトース、Glc : グルコース、Gal : ガラクトース、Man : マンノース、Fuc : フコース、Rha : ラムノース、GlcN : グルコサミン、GalN : ガラクトサミン、A1? : 未同定アミノ糖、KDO : 2-ケト-3- デオキシオクトン酸 [脚注] a) nd : 過ヨウ素酸・チオバルビツール酸反応陰性

前述の V. anguillarum LPS で認められたと同様に、各血清型とそれらの LPS多糖部の糖組成の間に明瞭な相関が認められた。以上の構成糖の他に血清型ⅡとⅢ以外の血清型の LPS多糖部に未同定アミノ糖（A1?）が検出された。この未同定アミノ糖は GC / MS 分析の結果、2-amino-2,6-dideoxy-hexose の一種であることが示された。KDO は他の多くのビブリオ科細菌におけると同様に、常法による検出法では検出されなかった。

2-1-3. 【 血清学的交叉反応性を示す non- O1 V. cholerae と V. mimicus の LPS多糖部の糖組成 】

V. mimicus はかつて non- O1 V. cholerae に分類されたこともあり、これら両菌種は種々の生化学的性状ならびに DNA homology 等において、近縁関係にあることが示され、両菌種間で血清学的交叉反応性をもつものも多い。島田と坂崎は V. cholerae O37と V. mimicus M64、V. cholerae O44と V. mimicus M37、V. cholerae O68 と V. mimicus M70 などが血清学的に交叉反応性を示すことを報告している⁵⁷⁾。そこで本実験ではこれらの菌株の LPS多糖部の糖組成を比較し、LPS レベルで両菌の類似性を検討した。表 14 に示した如く、血清学的に交叉反応性を示す V. cholerae O37と V. mimicus M64、および V. cholerae O68 と V. mimicus M70 はそれぞれ定性的に全く同一の糖組成を示した。V. cholerae O44 と V. mimicus M37 は O44の LPS多糖部に Man が検出される以外は同一の糖組成を示した。またすべての V. mimicusの LPS多糖部には O1 と、多くの non- O1 V. cholerae LPS の構成糖である Fru が存在し、これら両菌種が LPS多糖部の糖組成に基づく化学分類学的見地においても近縁関係にあることが示された。KDO は常法ではいずれの菌株からも検出されなかった。

表14 血清学的に交叉反応性を示す non-O1 *Vibrio cholerae* と *Vibrio mimicus* より迅速簡便分離法 (改良法) で調製した LPS 多糖部の糖組成 [$\mu\text{g} / \text{g wet cells}$]

菌 株	L-D Hep	Glc	Fru	Gal	Man	GlcN	GalN	ManN	A1?	KDO
<i>V. cholerae</i> O37	340.3	1426.7	260.0	—	—	57.4	—	—	1190.0	nd ^{a)}
<i>V. mimicus</i> M 64	319.0	1199.1	226.0	—	—	37.5	—	—	495.2	nd
<i>V. cholerae</i> O44	192.3	170.1	420.0	17.4	116.3	69.4	—	tr ^{b)}	63.9	nd
<i>V. mimicus</i> M 37	199.5	173.7	40.0	86.8	—	76.0	—	tr	46.3	nd
<i>V. cholerae</i> O68	90.4	134.5	158.0	62.0	—	154.6	283.9	—	—	nd
<i>V. mimicus</i> M 70	122.4	107.8	98.0	52.4	—	114.0	178.0	—	—	nd

[略語] L-D Hep : L-グリセロ-D- マンノヘプトース、Glc : グルコース、Fru : フルクトース、Gal : ガラクトース、Man : マンノース、GlcN : グルコサミン、GalN : ガラクトサミン、ManN : マンノサミン、A1? : 未同定アミノ糖、KDO : 2-ケト-3- デオキシオクトン酸 [脚注] a) nd : 過ヨウ素酸・チオバルビツール酸反応陰性、 b) tr : 1 $\mu\text{g} / \text{g}$ 湿菌以下

第二節 グラム陰性菌 LPS多糖鎖の画期的迅速簡便分離法の 開発とそのビブリオ科細菌への応用

2-2-1. 【 グラム陰性菌 LPS多糖鎖の画期的迅速簡便分離法 の開発 】

前節では V. cholerae の菌体から直接 LPS 多糖鎖を調製するために Kondo ら⁵⁴⁾ によって開発された迅速簡便法（原法）を、他のビブリオ科細菌にも応用できるよう改良すると共に、それを用いたビブリオ科細菌のLPS 多糖部の糖組成に基づく化学分類への応用について述べた。本法はビブリオ科細菌のみならず腸内細菌を主とした他のグラム陰性菌にも応用されたが、それらのある菌種では本改良法によってもなお、他の菌体成分の混入や LPS多糖鎖の抽出収率の低さなど、若干の問題が残ることが明らかとなった。これらの問題を解決すべく本節では広くグラム陰性菌全般の菌種に応用し得る、LPS 多糖鎖の画期的迅速簡便分離法を開発した⁵⁸⁾。

従来の方法（原法、改良法）では共に、菌体の熱稀酢酸抽出物から直接アセトン沈殿による分画によって LPS多糖鎖を調製した。この方法は多くのビブリオ科細菌に対しては十分に有効であったが、しかし、他のグラム陰性菌においては LPS以外の菌体成分の混入によって満足できる LPS 多糖鎖標品を調製することができなかった。そこで新しく開発された方法では以下に述べる如く、まず菌体の熱稀酢酸抽出液から TCAの添加により LPS成分以外の夾雑物（蛋白および核酸）を除去した後、LPS 多糖鎖の分画を試みた。図4にグラム陰性菌からの LPS多糖鎖の迅速簡便分離法を示した。まず、ハートインフュージョン液体培地(1,000 ml)で16時間振盪培養した被検菌を120℃、15分間加熱殺菌した後、遠心分離により集菌し、菌体を蒸留水で3回洗浄した。得られた湿菌の3gを10%酢酸9 mlに懸濁し、100℃、1.5時間加熱した後、遠心分離によって熱稀酢酸抽出液を得た。その抽出液に氷冷下40% (w/w) TCA 1 mlを加え、さらに氷冷下30分間攪拌した。生じた沈殿 (Sed. I)

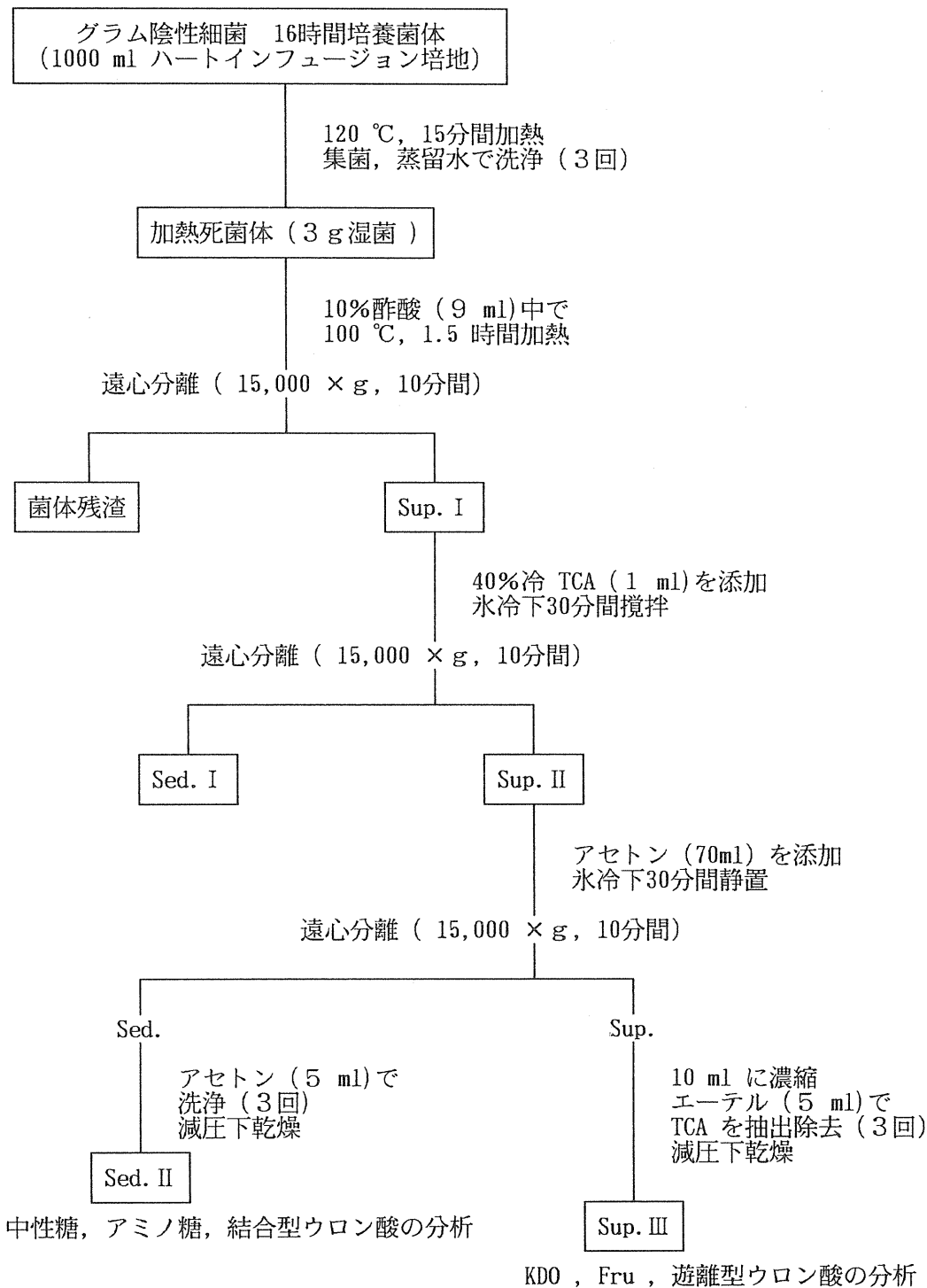


図4 グラム陰性細菌の菌体から LPS多糖鎖を分離する新迅速簡便分離法

を遠心分離により除去し、その上清には 70 ml のアセトンを加え、氷冷下 30 分間静置後生じた沈殿を遠心分離し、アセトンで洗浄後乾燥して標品 (Sed. II) とした。その遠心上清は減圧下、10 ml まで濃縮し、ジエチルエーテルを用いて TCA を抽出除去後、蒸発乾固させ標品 (Sup. III) とした。

S. Typhimurium LT2 株を用いて新たに開発した迅速簡便分離法によって得られた各画分の化学組成を、LT2 株より抽出精製した LPS の部分加水分解によって分離した LPS の多糖画分 (DPS)、すなわち、LPS の多糖部と部分加水分解によって遊離した糖を含む画分のそれと比較して表 15 に示した。蛋白質、全糖質含量は重量%で、糖組成は L-D Hep 3 モルに対する各構成糖のモル比で示した。冷 TCA の添加により沈殿した Sed. I はほとんど糖成分を含まず、多量の蛋白質 (91.5 %) を含んでいた。一方、Sed. II では蛋白質含量は低く (3.0 %)、DPS に類似した化学組成であった。従って、TCA による除蛋白操作により夾雑物としての蛋白は、ほぼ完全に除去されたことが示された。Sed. II は DPS の構成糖をすべて含み、それらの構成モル比は KDO を除き、DPS におけるそれとほぼ一致していた。Sup. III には糖成分としては KDO のみが検出され、他の LPS の構成糖は含まれていなかった。

2-2-2. 【 LPS より得られた DPS と迅速簡便分離法で得た Sed. II および Sup. III のゲル濾過 】

次に本迅速簡便分離法で得られた Sed. II および Sup. III が、菌体から常法により分離、精製した LPS から得られた DPS 画分に相当するものであるかどうかを検討するため、これら各画分の Sephadex G-50 ゲルクロマトグラフィーを行なった。図 5 に LPS より調製した DPS と Sed. II、Sup. III のゲルクロマトグラムを示した。DPS はゲル濾過により 3 つの画分に分画された。void volume 付近に LPS の全多糖鎖 (O 多糖 - コア多糖) に相当する Frc. I が、次いでコア多糖画分に相当する Frc. II が、さらに bed volume にリン酸および遊離の単糖画分に相当す

表15 *Salmonella Typhimurium* LT2 の LPS および DPSと新迅速簡便分離法で調製した各画分 (Sed. I、Sed. II と Sup. III) の化学組成の比較 [mol / 3 mol L-D Hep]

	収率	全糖 ^{a)}	蛋白質 ^{a)}	Abe	Rha	Man	Gal	Glc	L-D Hep	KDO	GlcN
LPS	1.5 ^{b)}	49.0	1.5	7.0	7.7	7.0	7.8	1.5	3.0	3.0	3.2
DPS	70.6 ^{c)}	60.5	5.4	5.3	8.3	8.1	8.1	2.4	3.0	2.4	1.1
Rapid method											
Sed. I	1.3 ^{d)}	4.7	91.5	—	—	tr ^{e)}	tr	tr	—	—	—
Sed. II	0.4 ^{d)}	71.0	3.0	2.8	9.4	8.8	8.6	3.6	3.0	0.2	0.8
Sup. III	1.2 ^{d)}	4.8	11.4	—	—	—	tr	tr	—	+	tr

[略語] Abe : アベクォース、Rha : ラムノース、Man : マンノース、Gal : ガラクトース、Glc : グルコース、L-D Hep : L-グリセロ-D- マンノヘプトース、KDO : 2-ケト-3- デオキシオクトン酸、GlcN : グルコサミン

[脚注] a) 全糖と蛋白質含量 (%, w/w)、 b) アセトン乾燥菌体からの収率 (%, w/w)、 c) LPSからの収率 (%, w/w)、 d) 湿菌からの収率 (%, w/w)、 e) tr : 0.01 以下

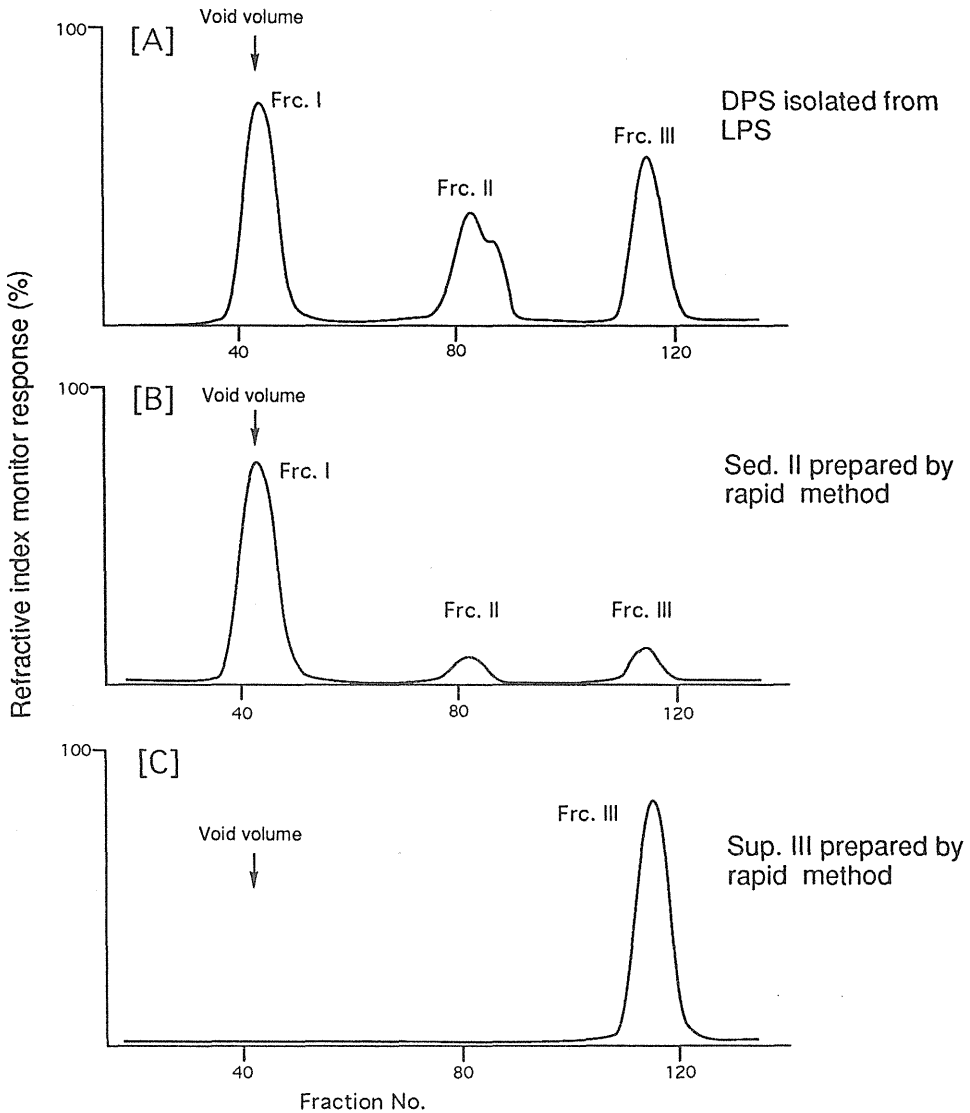


図5 *Salmonella* Typhimurium LT2 LPS から調製した DPS と新迅速簡便分離法により得た Sed II と Sup III の Sephadex G-50 ゲルクロマトグラフィー

る Frc. III が順次溶出された。一方、本迅速簡便分離法で得られた Sed. II のゲル濾過では、DPS のそれと同様に 3 つの画分に分画され、それぞれの溶出位置は DPS より得られた Frc. I、Frc. II および Frc. III と一致していた。しかし DPS の場合と異なり、Frc. II および Frc. III の収量は非常に少なく、これに対し、Frc. I (LPS の全多糖側鎖すなわち

O多糖-コア多糖画分)が多量に得られた。Sup. IIIのゲル濾過ではFrc. IとFrc. IIは得られず、Frc. IIIのみが溶出した。

これら各画分の収率と糖組成を表16に示した。DPSとSed. IIのそれぞれのFrc. Iからは、KDOを除き、LT2 LPS多糖部の構成糖が検出され、Abe、Glc、GlcNの含量に差は認められるものの非常に類似した糖組成を示した。両Frc. IではLT2 LPSのコア多糖のみの構成糖であるL-D HepとGlcNに加え、O多糖側鎖を構成するリピーティング・ユニットの構成糖であるAbe、Rha、Man、GalおよびGlcが高含量含まれており、この画分がLT2 LPSのコア多糖に結合したO多糖側鎖であることが示された。またDPSとSed. IIのそれぞれから得られたFrc. IIでは、両者とも同じ糖組成をもち、主にLT2 LPSのコア多糖の構成糖であるL-D Hep、Glc、Gal、GlcNを含み、上記リピーティング・ユニットの構成糖の含量は非常に少量であった。すなわち、Frc. IIは極少量の短いO抗原多糖鎖をもつLT2 LPSのコア多糖であることが示された。一方、DPSから得られたFrc. IIIにはLPSの部分加水分解によって遊離したKDOのみが検出されたが、Sed. IIから得られたFrc. IIIにはKDOはほとんど検出されなかった。この画分は少量ながらSed. IIに混在していたLPS成分以外の低分子菌体成分であった。KDOはSup. IIIのゲル濾過により得られたFrc. IIIに検出された。以上の結果、新たに開発した迅速簡便法によって調製したSed. IIにはLPSのコア多糖に結合したO多糖側鎖、すなわちLPSの全多糖鎖とコア多糖が含まれ、Sup. IIIには部分加水分解によって遊離したLPSの構成糖が含まれることが明らかとなり、Sed. IIとSup. IIIの糖組成がLPSの全多糖部の糖組成に相当することが示された。また、Sed. IIとSup. IIIは菌体から直接、簡便な方法で分離した試料であるにもかかわらず、LPS以外の菌体成分の混入が極めて少なく、これら両画分はLPS多糖部の分析試料として優れたものであった。

S. Typhimurium LT2の乾燥菌体10g(湿菌量100g)から標準法であるWestphalの熱フェノール/水法³⁾によって得られるLPSの収量は150mg(収率:乾燥菌体の1.5%)で、これからさらに酢酸加水分解

表16 *Salmonella Typhimurium* LT2 の DPS と新迅速簡便分離法により調製した Sed. II および Sup. III の Sephadex G-50 ゲルクロマトグラフィーにより得られた各画分の糖組成 [mol / 3 mol L-D Hep]

		収率	Abe	Rha	Man	Gal	Glc	L-D Hep	KDO	GlcN
Frc. I from	DPS	32.1 ^{a)}	23.1	36.2	45.2	39.5	7.6	3.0	nd ^{e)}	1.2
	Sed. II	61.7 ^{b)}	11.3	33.7	42.8	34.4	18.8	3.0	nd	0.5
Frc. II from	DPS	21.3 ^{a)}	0.4	0.9	1.1	3.6	2.6	3.0	nd	0.7
	Sed. II	9.4 ^{b)}	0.2	0.7	0.9	3.0	3.0	3.0	nd	0.5
Frc. III from	DPS	16.3 ^{a)}	—	—	tr ^{d)}	tr	tr	—	+	+
	Sed. II	1.2 ^{b)}	—	—	tr	tr	tr	—	tr	—
	Sup. III	30.6 ^{c)}	—	—	—	—	—	—	+	—

[略語] Abe : アベクオース、Rha : ラムノース、Man : マンノース、Gal : ガラクトース、Glc : グルコース、L-D Hep : L-グリセロ-D- マンノヘプトース、KDO : 2-ケト-3- デオキシオクトン酸、GlcN : グルコサミン [脚注] a) DPS からの収率 (%, w/w)、 b) Sed. II からの収率 (%, w/w)、 c) Sup. III からの収率 (%, w/w)、 d) tr : 0.01 以下、 e) nd : 過ヨウ素酸・チオバルビツール酸反応陰性

と Sephadex G-50ゲル濾過によって分画される LPSの全多糖側鎖（O多糖-コア多糖）部の収量は、34.0 mg（収率：LPSの 22.7%）であった。一方、本迅速簡便法による Sed. IIの収量は 400 mg（収率：湿菌の 0.4%）で、この画分の Sephadex G-50ゲル濾過によって得られる LPS の全多糖側鎖部の収量は 246.8 mg（収率：Sed. IIの 61.7%）であった。これは上述の Westphal 法の場合の O多糖-コア多糖部の収量 34.0 mgに比較すると、約 7.3倍量の O多糖-コア多糖部が調製できることが明らかとなった。以上の結果から、この迅速簡便法は、これによって得られる LPS多糖側鎖部の収量の点においても非常に優れていることが示された。

2-2-3. 【 新迅速簡便分離法の腸内細菌とビブリオ科細菌 LPS 多糖部抽出の有効性 】

さらに本迅速簡便分離法の有効性を確認するため、腸内細菌科に属する S. Typhimurium、Escherichia coli、Shigella flexneri、Yersinia enterocolitica、ビブリオ科に属する Plesiomonas shigelloides およびビブリオ属の 5 菌種の合計 10 菌種について、本迅速簡便分離法を応用して得られた Sed. II と Sup. III の両画分の糖組成とこれらの菌種から常法により調製した LPS の糖組成とを比較検討した。Sed. II の収量は菌種により大きく異なり、3 g の湿菌あたりビブリオ科細菌で 3.2～11.9 mg、腸内細菌では 25.4～69.1 mg であった。Sed. II の収率は、長鎖のリピーティング・ユニットをもつ S. Typhimurium や E. coli では高く、ビブリオ属細菌、特に多糖鎖部が極めて短い（後述）V. vulnificus や V. parahaemolyticus のそれは低く、その抽出収率には LPS 多糖鎖部の分子量が大きく影響した。表 17 に本迅速簡便分離法により上記 10 菌種の菌株から調製した LPS 多糖部の糖組成を示した。上段の数値は、湿菌 1 g あたりの糖重量 (μg) を、また、下段 () 内のそれは各菌株から抽出・精製した LPS の糖含量 (% w/w) を示したものである。いずれの菌株においても本法により調製した標品の分析結果

表17 グラム陰性細菌から新迅速簡便分離法により得た LPS多糖部 (Sed. II と Sup. III) の糖組成と、常法により得た LPS の糖組成

	Glc	L-D Hep	Gal	Rha	Fru	D-D Hep	Abe	Man	KDO	Uronic acid	GlcN	GalN	ManN	QuiN	PerN	6dGal 4N	6dGlc 4N	6dGal 3N	AS1	AS2
<u>S. Typhimurium</u> LT2	150.5 ^{a)} (2.2) ^{b)}	147.3 (5.1)	360.5 (11.3)	360.5 (10.2)	- (-)	- (-)	98.0 (8.4)	371.0 (10.2)	170.0 (5.7)	- (-)	31.5 (5.6)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)
<u>E. coli</u> O111	145.5 (7.6)	61.7 (6.9)	238.6 (8.4)	201.8 (7.6)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	158.0 (6.5)	- (-)	164.1 (10.1)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	11.6 (0.7)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)
<u>Sh. flexneri</u> RN-3	570.2 (8.0)	112.9 (8.4)	63.4 (1.7)	992.7 (6.0)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	145.2 (5.0)	- (-)	455.4 (9.3)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)
<u>Y. enterocolitica</u> O9	651.0 (17.2)	409.5 (9.6)	136.5 (4.1)	- (-)	- (-)	150.5 (4.1)	- (-)	- (-)	134.0 (4.2)	- (-)	19.3 (5.5)	75.3 (6.2)	- (-)	- (-)	124.3 (1.6)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)
<u>Pl. shigelloides</u> O39	82.5 (2.9)	90.0 (6.1)	70.5 (3.0)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	97.5 (5.9)	78.5 (3.7)	121.5 (10.0)	118.5 (6.5)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	36.0 (1.1)	- (-)	62.6 (1.2)
<u>V. cholerae</u> O1 NIH 41	231.0 (3.5)	153.0 (8.5)	- (-)	- (-)	164.0 (4.4)	- (-)	- (-)	- (-)	nd ^{c)} (nd)	- (-)	48.0 (4.9)	- (-)	- (-)	118.5 (1.4)	231.9 (11.4)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)
<u>V. cholerae</u> O3 4715	196.8 (18.8)	119.0 (5.3)	85.0 (2.0)	- (-)	92.0 (3.4)	292.4 (4.9)	- (-)	- (-)	nd (nd)	- (-)	27.9 (4.7)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	193.8 (3.6)	- (-)
<u>V. fluvialis</u> 308-77	118.0 (17.3)	7.2 (0.9)	121.3 (3.4)	- (-)	- (-)	114.6 (2.3)	- (-)	- (-)	nd (nd)	90.8 (4.2)	242.6 (5.7)	- (-)	8.4 (0.7)	364.8 (12.8)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)
<u>V. vulnificus</u> ATCC 27562	125.0 (1.6)	225.4 (12.2)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	nd (nd)	- (-)	27.9 (3.2)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)
<u>V. anguillarum</u> PT-514	282.7 (5.7)	105.6 (5.7)	- (-)	- (-)	110.9 (1.0)	- (-)	- (-)	- (-)	nd (nd)	- (-)	12.8 (2.6)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	10.5 (1.4)	- (-)	- (-)	- (-)

[略語] Glc : グルコース、L-D Hep : L-グリセロ-D- マンノヘプトース、Gal : ガラクトース、Rha : ラムノース、Fru : フルクトース、D-D Hep : D-グリセロ-D- マンノヘプトース、Abe : アベクォース、Man : マンノース、KDO : 2-ケト-3- デオキシオクトン酸、GlcN : グルコサミン、GalN : ガラクトサミン、ManN : マンノサミン、QuiN : キノボサミン、PerN : ペロサミン、6dGal4N : 4-アミノ-4,6- ジデオキシガラクトース、6dGlc4N : 4-アミノ-4,6- ジデオキシグルコース、6dGal3N : 3-アミノ-3,6- ジデオキシガラクトース、AS1 と AS2 : 未同定アミノ糖 [脚注] a) 湿菌 1 g あたりの糖重量 (μg)、b) ()内の数値は常法により調製した LPSの糖含量 (% , w/w)、c) nd : 過ヨウ素酸・チオバルビツール酸反応陰性

とLPSのそれとは定性的には完全に一致し、本法がビブリオ科細菌のみならず、腸内細菌にも広く応用できることが明らかとなった。

第3節 LPS 多糖部の糖組成に基づくビブリオ属細菌の化学分類 — 迅速簡便分離法の応用 —

2-3-1. 【 V. fluvialis のLPS 多糖部の糖組成に基づく化学分類 】

本研究で、新たに開発されたLPSの多糖鎖の新迅速簡便分離法を下痢原性ビブリオV. fluvialisのLPS 多糖部の糖組成に基づく化学分類に応用した。従来、我が国における V. fluvialis および V. furnissii の血清型別は、国立予防衛生研究所（予研、現国立感染症研究所）と都立衛生研究所（都衛研）においてそれぞれ独自になされ、予研は01～028の28種類、都衛研は03を除く01～020の19種類に分類していた。しかし、その後、本菌の血清型別上の混乱を防ぐため、また international use を目的として両研究所の血清型別が統合され、35種類の血清型別に再分類された⁵⁹⁾。すなわち、都衛研で型別された19種の血清型のうち、予研で型別された01～028のいずれかの血清型と共通抗原性を示すものは予研の型別に従った血清型とし、また、それらのいずれとも共通抗原性を示さない都衛研の血清型は新血清型として029～035に分類された。これらの新血清型と予研および都衛研の旧血清型との対応を表18に示した。本実験ではビブリオ科細菌の化学分類の観点から、これら新たに分類された35種類の血清型菌株から新迅速簡便分離法によりLPS多糖部を調製し、その糖組成を中心とする化学的性状を比較検討した。また、新たに同一血清型に分類された予研由来と都衛研由来の両菌株についても同様に検討した。

表19に V. fluvialisの全血清型株のLPS多糖部の糖組成を示した。V. fluvialisの35種の血清型はLPSの多糖部の糖組成に基づき、21種類の化学型に分類された。これらの化学型のうち、I、IV、V、VIIIおよびIXには複数の血清型が属するが、それ以外の化学型にはそれぞれ1

表18 *Vibrio fluvialis* の新血清型別に対応する国立
 予防衛生研究所由来株と都立衛生研究所由来株

O 血清型		
統合された 新血清型	新血清型に対 応する予研株 ^{a)}	新血清型に対 応する都衛研株 ^{b)}
O 1	NIH O 1	TMR O 17
O 2	NIH O 2	—
O 3	NIH O 3	TMR O 13
O 4	NIH O 4	TMR O 20
O 5	NIH O 5	TMR O 11
O 6	NIH O 6	—
O 7	NIH O 7	TMR O 1
O 8	NIH O 8	—
O 9	NIH O 9	—
O 10	NIH O 10	TMR O 16
O 11	NIH O 11	TMR O 12
O 12	NIH O 12	—
O 13	NIH O 13	TMR O 7
O 14	NIH O 14	—
O 15	NIH O 15	—
O 16	NIH O 16	—
O 17	NIH O 17	TMR O 14
O 18	NIH O 18	TMR O 8
O 19	NIH O 19	—
O 20	NIH O 20	TMR O 4
O 21	NIH O 21	—
O 22	NIH O 22	—
O 23	NIH O 23	—
O 24	NIH O 24	—
O 25	NIH O 25	TMR O 19
O 26	NIH O 26	—
O 27	NIH O 27	—
O 28	NIH O 28	—
O 29	—	TMR O 2
O 30	—	TMR O 5
O 31	—	TMR O 6
O 32	—	TMR O 9
O 33	—	TMR O 10
O 34	—	TMR O 15
O 35	—	TMR O 18

[略語] a) 予研(NIH) : 国立予防衛生研究所(現国立
 感染症研究所)、 b) 都衛研(TMR) : 都立衛生研究所

表19 新迅速簡便分離法により調製した LPS 多糖部の糖組成に基づく *Vibrio fluvialis* の全血清型菌株の化学分類

[µg/g of wet cells]

化学型	血清型	L-D Hep	D-D Hep	Glc	Gal	Rha	Fuc	Man	Fru	GlcN	GalN	ManN	QuiN	PerN	GalUA	TBA
I	O 2	17.5	100.9	127.2	-	-	-	-	-	1.2	-	-	-	-	72.1	nd ^{a)}
	O 15	32.5	8.0	219.8	-	-	-	-	-	7.8	-	-	-	-	96.3	nd
	O 23	2.3	3.0	770.6	-	-	-	-	-	2.2	-	-	-	-	48.0	nd
	O 25	6.3	1.6	126.1	-	-	-	-	-	1.5	-	-	-	-	80.2	nd
	O 31	5.5	344.3	193.6	-	-	-	-	-	1.6	-	-	-	-	65.2	nd
II	O 30	14.3	11.4	451.5	-	-	-	-	-	19.4	58.2	-	-	-	59.5	nd
III	O 21	10.7	4.7	162.8	-	-	-	-	-	3.8	37.6	-	-	-	55.8	41.0 ^{b)}
IV	O 1	6.4	30.1	22.6	8.4	-	-	-	-	5.0	-	-	-	-	23.2	nd
	O 24	9.8	94.6	75.9	92.1	-	-	-	-	134.7	-	-	-	-	36.7	nd
	O 34	5.9	155.2	273.3	59.2	-	-	-	-	1.5	-	-	-	-	54.7	nd
	O 35	9.4	17.7	259.3	141.5	-	-	-	-	1.6	-	-	-	-	69.3	nd
V	O 14	2.5	34.2	29.2	21.7	-	-	-	-	1.3	90.1	-	-	-	47.0	nd
	O 16	53.9	39.9	459.0	55.4	-	-	-	-	12.7	25.0	-	-	-	61.0	nd
	O 20	2.2	186.2	43.2	68.3	-	-	-	-	12.1	3.6	-	-	-	26.5	nd
	O 28	4.5	88.8	501.4	50.0	-	-	-	-	1.8	174.9	-	-	-	44.8	nd
VI	O 6	35.0	41.4	197.2	78.6	-	-	-	-	1.3	3.0	-	27.8	-	107.7	nd
VII	O 4	75.1	139.4	180.0	133.0	-	-	-	-	20.4	-	2.4	29.8	-	55.2	nd
VIII	O 3	34.3	20.0	259.4	-	49.6	-	-	-	4.5	10.6	-	-	-	54.7	nd
	O 9	147.1	199.2	238.7	-	235.4	-	-	-	6.2	4.3	-	-	-	132.5	nd
IX	O 5	76.4	9.6	172.0	16.0	259.5	-	-	-	4.0	81.0	-	-	-	88.1	nd
	O 7	20.3	114.8	123.5	63.5	46.0	-	-	-	1.5	1.0	-	-	-	55.0	nd
	O 12	11.0	121.7	108.8	59.8	38.3	-	-	-	10.7	9.9	-	-	-	93.9	nd
	O 29	6.4	101.4	357.2	32.4	58.4	-	-	-	48.0	37.0	-	-	-	47.0	nd
X	O 33	55.6	62.3	135.6	70.0	765.6	-	-	-	67.2	-	-	-	-	13.2	nd
XI	O 10	33.7	32.9	206.5	300.0	90.5	-	-	-	2.0	-	29.5	-	-	200.6	47.7 ^{b)}
XII	O 11	5.0	33.3	30.0	17.6	-	10.0	-	-	1.5	2.5	-	-	-	26.6	nd
XIII	O 8	21.7	101.6	130.5	84.6	77.5	82.0	-	-	2.0	-	-	-	-	102.8	nd
XIV	O 13	28.8	177.3	404.1	270.3	189.2	202.2	-	-	23.0	-	-	17.1	-	138.9	nd
XV	O 27	19.6	82.0	505.7	37.8	111.9	138.4	-	-	97.6	80.7	-	-	-	31.4	nd
XVI	O 26	51.2	87.4	113.2	-	-	-	42.8	-	251.2	-	-	-	-	39.7	nd
XVII	O 18	183.3	196.0	234.5	127.9	-	-	54.6	-	9.9	-	-	-	-	118.0	132.0 ^{b)}
XVIII	O 19	76.9	42.0	95.7	14.5	-	-	16.7	-	5.1	5.9	-	32.8	14.2	65.8	nd
XIX	O 32	7.0	77.7	61.0	103.2	137.4	-	61.7	-	5.2	3.4	-	-	-	33.2	nd
X X	O 17	60.6	90.3	118.0	54.9	-	-	360.0	890.2	58.1	-	-	-	-	80.0	nd
XXI	O 22	11.1	197.3	259.6	33.3	-	150.2	-	266.0	33.7	3.3	-	-	-	52.6	nd

[略語] L-D Hep : L-グリセロ-D- マンノヘプトース、D-D Hep : D-グリセロ-D- マンノヘプトース、Glc : グルコース、Gal : ガラクトース、Rha : ラムノース、Fuc : フコース、Man : マンノース、Fru : フルクトース、GlcN : グルコサミン、GalN : ガラクトサミン、ManN : マンノサミン、QuiN : キノボサミン、PerN : ペロサミン、GalUA : ガラクトロン酸、TBA : 過ヨウ素酸・チオバルピツール酸反応陽性物質 [脚注] a) nd : 過ヨウ素酸・チオバルピツール酸反応陰性、b) KDO として定量

種類のみ血清型が分類された。全血清型菌株の LPS 多糖部の共通構成糖として、L-D Hep、D-D Hep、Glc、GlcN と GalUA が検出された。これらの構成糖のうち、全血清型の LPS 多糖部に D-D Hep と GalUA が共に検出される菌種はビブリオ科細菌では現在知られている限りでは V. fluvialis と V. furnissii のみ^{8, 60)} であり、両菌種は、血清学的性状のみならず、これらの糖の存在の有無により他の類縁ビブリオと明確に区別された。イナバ因子 C をもつことにより O1 コレラ菌イナバ型株と交叉反応性を示す V. fluvialis O19 の LPS 多糖部には、O1 コレラ菌イナバ型の LPS 多糖部におけると同様に PerN と QuiN のペア⁶¹⁾ が検出された。KDO は両菌種のいずれの血清型株にも検出されず、KDO の見掛け上の欠損は一部の例外を除いてビブリオ科細菌全般に共通した分類学上の一指標となり得るといふ従来の見解を裏付ける結果であった¹³⁾。 V. fluvialis O21、O10、O18 の LPS 多糖部には TBA 反応陽性物質が検出されたが、いずれも HVPE において KDO とは異なる移動度を示した。これらの物質のうち、O18 に検出された物質は、HVPE において V. parahaemolyticus O7 と O12 LPS に検出された⁶²⁾ 2-keto-3-deoxy-D-threo-hexonic acid と同じ移動度を示した。従って、V. fluvialis O18 LPS 多糖部から検出される TBA 反応陽性物質は 2-keto-3-deoxy-D-threo-hexonic acid である可能性が示唆された。

2-3-2. 【 交叉反応性を示す V. fluvialis 都衛研株と予研株の LPS 多糖部の糖組成の検討 】

凝集反応と凝集素吸収試験において交叉反応性を示し、新血清型別によって同一血清型に分類された都衛研と予研由来株の LPS 多糖部の糖組成を表 20 と表 21 に示した。表 20 に示した 8 種類それぞれの血清型に属する両研究所由来株の LPS 多糖部はいずれも定性的に同一の糖組成をもち、同じ化学型に分類された。また、それぞれの血清型に属する 2 株の LPS 多糖部の糖組成は、定量的にも非常に類似しており、両株の LPS は同じ構造の O 多糖鎖をもつと思われた。一方、表 21 に示す

表20 同一血清型に分類された *Vibrio fluvialis* の国立予防衛生研究所および都立衛生研究所由来株から新迅速簡便分離法により調製した LPS 多糖部の糖組成 —その1— [$\mu\text{g/g}$ of wet cells]

○血清型	化学型	L-D Hep	D-D Hep	Glc	Gal	Rha	Fuc	Man	Fru	GlcN	GalN	ManN	QuiN	GalUA	TBA
○ 1															
NIH ^{a)} - 1	IV	10.4	72.3	386.2	27.0	—	—	—	—	1.4	—	—	—	36.0	nd ^{c)}
TMR ^{b)} -17	IV	7.0	89.4	462.8	79.1	—	—	—	—	1.0	—	—	—	53.2	nd
○ 4															
NIH - 4	VII	12.0	89.2	225.6	59.4	—	—	—	—	188.4	—	1.5	34.3	35.3	nd
TMR -20	VII	25.0	56.1	143.8	38.0	—	—	—	—	132.4	—	3.7	42.5	33.4	nd
○ 5															
NIH - 5	IX	13.3	12.0	270.8	6.0	277.5	—	—	—	30.2	215.7	—	—	37.0	nd
TMR -11	IX	6.6	3.2	409.8	2.0	79.2	—	—	—	39.1	76.8	—	—	50.0	nd
○ 7															
NIH - 7	IX	22.0	166.9	144.0	118.4	41.0	—	—	—	32.9	25.8	—	—	66.0	nd
TMR - 1	IX	9.6	74.4	64.8	59.6	46.0	—	—	—	54.4	44.2	—	—	49.2	nd
○ 13															
NIH -13	XIV	6.9	72.7	228.0	204.2	110.8	137.3	—	—	116.8	—	—	11.2	37.7	nd
TMR - 7	XIV	9.0	66.6	225.6	120.6	61.2	75.6	—	—	177.4	—	—	18.7	43.1	nd
○ 17															
NIH -17	XX	24.6	67.8	282.8	30.4	—	—	389.8	517.0	144.9	—	—	—	33.3	nd
TMR -14	XX	32.0	58.9	122.0	35.0	—	—	280.3	740.0	139.1	—	—	—	35.2	nd
○ 18															
NIH -18	XVII	37.9	76.7	219.4	44.4	—	—	7.4	—	1.7	—	—	—	27.4	63.0
TMR - 8	XVII	22.8	34.2	84.6	21.0	—	—	3.2	—	1.1	—	—	—	18.5	64.5 ^{d)}
○ 20															
NIH -20	V	2.2	186.2	43.2	68.3	—	—	—	—	12.1	3.6	—	—	27.3	nd
TMR - 4	V	21.6	139.8	126.6	41.4	—	—	—	—	4.0	1.2	—	—	34.3	nd

[略語] L-D Hep : L-グリセロ-D- マンノヘプトース、D-D Hep : D-グリセロ-D- マンノヘプトース、Glc : グルコース、Gal : ガラクトース、Rha : ラムノース、Fuc : フコース、Man : マンノース、Fru : フルクトース、GlcN : グルコサミン、GalN : ガラクトサミン、ManN : マンノサミン、QuiN : キノボサミン、GalUA : ガラクツロン酸、KDO : 2-ケト-3- デオキシオクトン酸、TBA : 過ヨウ素酸・チオバルビツール酸反応陽性物質 [脚注] a) NIH : 国立予防衛生研究所 (現国立感染症研究所)、 b) TMR : 東京都立衛生研究所、 c) nd : 過ヨウ素酸・チオバルビツール酸反応陰性、 d) KDO として定量

表21 同一血清型に分類された *Vibrio fluvialis* の国立予防衛生研究所および都立衛生研究所由来株から新簡易分離法により調製した LPS 多糖部の糖組成 -その2- [$\mu\text{g/g}$ of wet cells]

O 血清型	化学型	L-D Hep	D-D Hep	Glc	Gal	Rha	Fuc	GlcN	GalN	ManN	GalUA	TBA
O 3												
NIH ^{a)} - 3	VIII	34.6	28.6	622.9	—	113.4	—	16.4	1.5	—	50.3	nd ^{c)}
TMR ^{b)} -13	XII	14.1	33.2	65.0	97.2	—	86.0	1.6	84.7	—	22.3	nd
O 10												
NIH -10	XI	16.5	5.5	214.2	201.0	98.4	—	106.6	—	3.5	38.5	52.7 ^{d)}
TMR -16	X	6.0	8.3	187.2	177.0	100.7	—	159.7	—	—	36.2	nd
O 11												
NIH -11	XII	10.5	115.0	350.5	62.8	—	53.4	1.6	15.0	—	58.5	nd
TMR -12	V	10.0	88.1	124.8	44.4	—	—	2.1	1.6	—	48.0	nd
O 25												
NIH -25	I	6.3	1.6	126.1	—	—	—	1.5	—	—	80.2	nd
TMR -19	XXII	24.3	5.5	198.4	—	27.7	—	24.6	—	—	69.0	nd

[略語] L-D Hep : L-グリセロ-D- マンノヘプトース、D-D Hep : D-グリセロ-D- マンノヘプトース、Glc : グルコース、Gal : ガラクトース、Rha : ラムノース、Fuc : フコース、GlcN : グルコサミン、GalN : ガラクトサミン、ManN : マンノサミン、GalUA : ガラクトロン酸、TBA : 過ヨウ素酸・チオバルビツール酸反応陽性物質 [脚注] a) NIH : 国立予防衛生研究所 (現国立感染症研究所)、b) TMR : 東京都立衛生研究所、c) nd : 過ヨウ素酸・チオバルビツール酸反応陰性、d) KDO として定量

如く、O3、O10、O11およびO25の4種の血清型のそれぞれに属する2株間では、LPS多糖部の糖組成に差が認められた。O3の2株ではGal、RhaおよびFuc、O10ではManNとTBA反応陽性物質、O11ではFuc、O25ではRhaの有無によりそれぞれ異なる化学型に分類され、これら同一の血清型に属する由来の異なる2株は一部血清学的特異性を共有するものの、それぞれ独自の特異性をもつことが示唆され、さらに糖代謝における生化学的性状も異なっていた。特にO25に属する都衛研由来株(TMR-19)は、前述の21種類のいずれの化学型とも異なる、新しい化学型であった。

2-3-3. 【 V.cholerae O2～O161 (non-O1 V.cholerae)の
LPS多糖部の糖組成に基づく化学分類 】

non-O1 V.cholerae は、急性伝染病コレラの原因菌であるO1 V.cholerae の抗血清に凝集せず、NAG (non-agglutinable)ビブリオとも呼ばれる。本菌はO1 V.cholerae と同一の形態学的、生化学的性状を示すが、急性伝染病コレラの原因菌とはならず、従来は散発的または集団下痢症の原因菌と見做されてきた。しかし、1992年10月頃から発生したインド亜大陸を中心とするコレラ大流行の原因菌として V.cholerae O139 が同定され⁶³⁾、従来の医学的、細菌学的常識を破って、non-O1 V.cholerae にもO1 V.choleraeと同様に、コレラの原因菌となるものがあることが知られるようになった。O139以外の non-O1 V.cholerae は本邦においては、主に海外旅行者や輸入生鮮魚介類による輸入感染症の原因菌として注目されている。本菌は血清学的にはO2からO155までの154種類に分類されることが報告されているが⁶⁴⁾、その後さらに新たな血清型が見出されており、現在170以上の血清型に分類されている。すでに Kondo ら²⁸⁾はO2～O41、O44、O68の42種の non-O1 V.cholerae について LPS多糖部の糖組成に基づく化学分類を行ない、これら42種の血清型は24種の化学型に分類されることを示した。本研究ではこれら42種以外の入手可能なすべての non-O1

V. cholerae から、本研究によって開発された新迅速簡便分離法により LPS 多糖部を調製し、コレラ菌全体の LPS 多糖部の糖組成に基づく化学分類の確立を目指した。

V. cholerae O2 ~ O161 の全血清型菌株より迅速簡便分離法で得た LPS 多糖部の糖組成に基づく化学分類を表22に示した。160 種類の血清型は LPSの多糖部の糖組成に基づき、113 種類の化学型に分類された。9 種類の血清型菌株が含まれる化学型 1 をはじめとして複数の血清型で構成される化学型が 23 種類あり、それ以外の化学型にはそれぞれ 1 種類のみ血清型が対応した。全血清型菌株の LPS多糖部の共通構成糖として L-D Hepと Glc が検出された。また、多くの血清型株に検出される GlcN と Fru を含まないものはそれぞれ 12 化学型 (14 血清型、全体の 8.7 %) および 45 化学型 (58 血清型、全体の 36.0 %) に見出された。KDO はいずれの血清型にも検出されず、KDO の検出法である TBA 反応に陽性を示すものが 17 化学型 (17 血清型、全体の 10.6 %) に見出された。しかし、これらの TBA 反応陽性物質は、HVPE においていずれも KDOとは異なる移動度を示し、KDOとは異なる物質であることが明らかにされた。

non-O1 V. cholerae の LPS多糖部の化学的特徴の一つとして、表23 に示す如く、多種の 2-、3-または 4-amino-6-deoxyhexose が検出された。なかでも 2-amino-6-deoxyhexoseの検出率は高く、2-amino-2,6-dideoxyglucose (QuiN) は 67 種 (41.6 %) の血清型菌株から、また 2-amino-2,6-dideoxygalactose (FucN) は 34 種 (21.1 %) の血清型菌株から検出された。この他、3-amino-3,6-dideoxyglucose、3-amino-3,6-dideoxygalactose および 4-amino-4,6-dideoxymannose (PerN) がそれぞれ 14 血清型 (8.7 %)、2 血清型 (1.2 %)、4 血清型 (2.5 %) から検出された。これらのアミノ糖は単独または種々の組み合わせで見出され、このことが non-O1 V. cholerae の血清型の多様性を反映しているものと思われる。

また、本研究において検討した 160種の血清型のうち、化学型 56、57、および 60 に分類されたものは最も単純な糖組成を示した⁶⁵⁾。す

表22 新迅速簡便分離法により調製した LPS 多糖部の糖組成に基づく non- O1 *Vibrio cholerae* O2 ~ O161 の化学分類 [$\mu\text{g} / \text{g}$ of wet cells]

化学型	血清型	構 成 糖																											
		L-D Hep	D-D Hep	Glc	Gal	Man	Fru	Rha	Fuc	Col	Ara	N1	N2	N3	N4	N5	G1cN	GalN	ManN	QuiN	FucN	PerN	PerN-Pro	6dGlc-3N	6dGal-3N	A1	A2	TBA	
1	O5	90.7	— ^{a)}	111.6	—	—	188.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	105.3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	O8	80.6	—	103.5	—	—	21.6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	81.1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	O9	60.7	—	92.9	—	—	219.2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	160.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	O10	127.7	—	137.4	—	—	187.2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	38.2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	O16	76.4	—	98.9	—	—	122.4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	78.3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	O24	29.4	—	48.3	—	—	189.2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	11.8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	O73	86.4	—	303.5	—	—	119.9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	41.4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	O88	28.9	—	511.6	—	—	80.8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	31.9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	O128	57.0	—	260.4	—	—	91.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	29.8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2	O4	167.6	—	222.0	103.1	—	364.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	50.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	O7	114.1	—	138.5	56.7	—	159.2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	46.3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	O15	121.5	—	174.8	74.2	—	157.2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	27.4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	O30	102.5	—	90.7	36.3	—	227.2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	29.5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	O97	79.5	—	179.1	92.5	—	140.9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	31.8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	O156	32.8	—	84.0	43.8	—	37.7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	9.2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3	O18	127.2	—	188.1	86.1	—	177.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	35.4	—	—	299.7	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	O23	73.8	—	209.1	37.5	—	2392.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	35.3	—	—	89.1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	O41	192.3	—	170.1	17.4	—	420.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	69.4	—	—	25.8	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	O87	82.6	—	117.9	15.3	—	219.3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	20.1	—	—	25.4	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	O109	116.5	—	722.4	84.0	—	90.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	37.4	—	—	252.4	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	O136	151.2	—	378.0	113.4	—	220.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	37.8	—	—	211.7	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4	O35	28.7	—	38.0	13.9	—	154.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	14.3	8.8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	O68	199.7	—	454.0	134.8	—	170.8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	236.3	332.2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	O85	45.3	—	776.4	57.3	—	136.4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	40.4	8.6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	O129	136.6	—	253.8	151.3	—	145.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	251.3	412.4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5	O37	340.3	—	1427.6	—	—	260.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	57.4	—	—	1190.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	O43	152.1	—	249.6	—	—	143.5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	90.1	—	—	313.7	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	O72	130.6	—	793.1	—	—	200.9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	177.9	—	—	126.8	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6	O98	48.1	—	337.8	97.8	—	251.1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	34.6	—	—	—	226.6	—	—	—	—	—	—	—	—
	O133	62.7	—	123.2	58.2	—	91.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	29.1	—	—	—	—	1332.8	—	—	—	—	—	—	—
7	O84	24.4	—	65.3	224.5	—	93.5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	91.9	77.7	—	71.3	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	O86	59.2	—	202.8	458.6	—	44.7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	175.2	140.7	—	135.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
8	O36	180.5	—	235.9	—	—	228.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	79.5	199.4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	O64	111.2	—	498.9	—	—	189.1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	159.5	274.5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	O157	8.8	—	44.6	—	—	122.4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	6.0	11.7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
9	O2	171.5	—	140.1	—	—	216.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2.0	—	—	—	108.0	—	—	—	—	—	—	—	—
	O26	112.9	—	141.3	—	—	157.2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	146.7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	O38	348.4	—	861.8	—	—	267.7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	77.9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10	O119	251.4	—	414.8	—	—	367.5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	53.3	—	—	84.5	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	O120	230.5	—	795.5	—	—	361.3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	517.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
11	O102	124.5	—	331.8	—	96.7	225.5	1658.1	—	—	—	—	—	—	—	—	144.8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	O131	52.4	—	136.5	—	48.6	133.0	56.1	—	—	—	—	—	—	—	—	44.9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
12	O77	118.9	—	455.1	—	1122.2	244.4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	147.2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	O114	321.5	—	536.2	—	—	205.4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	92.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
13	O22	85.5	—	77.5	—	—	230.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	38.3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	O139	201.7	—	536.5	—	—	704.9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	90.2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
14	O99	53.8	—	197.0	—	—	184.7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
15	O75	52.6	—	177.5	—	—	17.5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	116.5	139.1	—	—	50.9	—	—	—	—	—	—	—	—
16	O79	147.2	—	156.4	—	—	165.2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	87.4	18.4	—	—	29.9	—	—	—	—	—	—	—	—
17	O76	190.6	—	250.3	33.5	—	256.9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	31.9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	O144	102.0	—	414.0	210.0	—	156.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	90.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
18	O95	19.9	—	75.5	—	—	253.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	49.9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
19	O20	116.0	—	107.7	—	—	95.5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	26.7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
20	O115	172.7	—	1166.4	—	—	142.1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	58.5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
21	O101	369.4	—	379.0	—	—	80.1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	404.4	64.1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

表22 つづき

化学型	血清型	構 成 糖																																		
		L-D Hep	D-D Hep	Glc	Gal	Man	Fru	Rha	Fuc	Col	Ara	N1	N2	N3	N4	N5	GlcN	GalN	ManN	QuiN	FucN	PerN	PerN-Pro	6dGlc-3N	6dGal-3N	A1	A2	TBA								
22	O104	76.0	-	68.4	-	-	120.0	96.9	-	-	-	-	-	-	-	-	241.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
23	O32	120.6	-	140.7	-	-	324.0	39.5	-	-	-	-	-	-	-	-	103.0	43.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
24	O60	149.8	-	158.3	-	62.5	374.8	789.5	-	-	-	-	-	-	-	-	519.7	296.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
25	O33	97.7	-	119.3	-	317.9	304.0	946.5	-	-	-	-	-	-	-	-	103.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
26	O125	82.8	-	60.6	-	40.4	104.0	-	70.7	-	-	-	-	-	-	-	44.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
27	O45	165.5	-	380.8	-	82.1	96.3	-	150.0	-	-	-	-	-	-	-	29.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
28	O34	108.2	-	114.3	-	-	298.0	-	354.8	-	-	-	-	-	-	-	123.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
29	O83	209.1	-	1290.8	-	-	214.3	-	2009.5	-	-	-	-	-	-	-	73.2	682.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
30	O138	310.4	-	262.7	-	-	204.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	35.8	473.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
31	O94	180.4	-	1425.8	200.6	-	311.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	281.3	-	163.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
32	O110	14.3	-	57.4	7.2	-	107.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	28.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
33	O105	112.6	-	191.5	28.6	-	50.1	-	-	-	-	-	108.3	-	-	-	106.3	-	40.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
34	O65	174.1	-	440.1	190.4	-	127.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	90.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
35	O31	119.0	-	155.8	108.1	-	520.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14.3	8.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
36	O134	23.7	-	102.6	39.5	-	87.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
37	O126	64.1	-	862.8	374.7	-	192.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	49.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
38	O135	143.2	-	405.8	112.8	-	109.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	136.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
39	O27	22.5	-	294.8	141.6	-	356.0	-	-	-	-	-	-	168.9	-	-	74.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
40	O51	111.3	-	307.4	167.3	7.7	51.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	22.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
41	O44	65.8	-	152.9	116.3	116.3	1380.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	127.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
42	O100	101.9	-	212.6	123.2	45.1	204.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	31.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
43	O71	162.5	-	145.7	724.1	-	124.8	-	1002.6	-	-	-	-	-	-	-	141.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
44	O25	193.5	-	241.6	104.5	-	382.4	-	20.5	-	-	-	-	-	-	-	106.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
45	O11	69.3	-	98.2	49.6	-	34.4	246.0	-	-	-	-	-	-	-	-	25.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	O160	23.6	-	77.6	25.0	-	99.1	21.2	-	-	-	-	-	-	-	-	7.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
46	O121	180.3	-	2940.0	172.5	-	333.0	35.3	-	-	-	-	-	-	-	-	66.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
47	O55	22.9	-	218.2	79.4	19.8	51.5	440.2	-	-	-	-	-	-	-	-	95.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
48	O21	82.0	26.9	197.5	-	-	21.0	25.4	-	-	-	-	-	-	-	-	75.9	54.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
49	O96	106.0	531.6	274.2	-	-	300.5	595.0	-	-	-	-	-	-	-	-	206.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
50	O28	182.8	158.4	163.5	26.4	-	720.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	53.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
51	O3	270.2	541.8	447.4	142.5	-	426.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	59.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
52	O89	41.4	20.4	162.0	346.4	-	17.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	120.7	98.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
53	O50	107.3	83.5	467.9	208.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
54	O103	161.8	212.7	554.0	-	-	1516.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	703.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
55	O13	100.9	-	134.7	68.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	O17	128.0	-	183.1	89.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	32.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	O29	119.3	-	150.0	74.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	44.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	O48	121.8	-	276.2	84.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	44.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	O80	277.2	-	534.6	207.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	78.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
56	O57	50.0	-	62.0	49.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	O82	51.9	-	47.8	43.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	O113	147.0	-	546.7	142.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
57	O56	42.6	-	170.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	O78	347.1	-	685.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	48.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
58	O67	364.1	-	540.4	573.2	1316.9	-	2514.1	-	-	-	-	-	-	-	-	545.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	O90	113.5	-	256.3	270.3	737.2	-	1325.1	-	-	-	-	-	-	-	-	313.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
59	O40	255.1	-	314.2	155.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	83.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	O127	13.4	-	20.2	36.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	55.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60	O74	82.3	-	229.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
61	O62	169.8	-	330.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	93.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
62	O108	116.3	-	194.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
63	O107	100.3	-	126.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
64	O118	109.3	-	861.9	87.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	31.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	O161	2.6	-	30.9	7.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
65	O124	35.3	-	200.9	103.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20.0	-	20.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
66	O61	127.3	-	368.3	117.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

表22 つづき

化学型	血清型	構 成 糖																											
		L-D Hep	D-D Hep	Glc	Gal	Man	Fru	Rha	Fuc	Col	Ara	N1	N2	N3	N4	N5	GlcN	GalN	ManN	QuiN	FucN	PerN	PerN-Pro	6dGlc-3N	6dGal-3N	A1	A2	TBA	
67	O14	98.7	-	130.9	-	-	-	211.7	-	-	-	-	-	-	-	-	151.1	-	187.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
68	O6	240.7	-	294.3	256.3	-	-	484.2	-	-	-	-	-	-	-	-	93.1	-	396.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
69	O63	95.5	-	220.1	239.9	19.5	-	52.3	-	-	-	-	-	-	-	-	49.3	-	-	-	8.3	-	-	-	-	-	-	-	
70	O93	112.0	-	1807.5	-	-	-	589.6	-	-	-	-	-	-	-	-	195.7	32.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	O123	176.3	-	374.1	-	-	-	1476.7	-	-	-	-	-	-	-	-	462.8	418.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
71	O92	117.7	-	224.4	-	-	-	50.2	71.4	-	-	-	-	-	-	-	24.4	-	-	-	38.7	-	-	-	-	-	-	-	
72	O39	101.3	-	118.4	-	-	-	360.5	-	-	-	-	-	-	-	-	119.9	576.5	-	-	29.8	-	-	-	-	-	-	-	
73	O91	138.7	-	302.5	-	-	-	399.4	-	-	-	-	-	-	-	-	47.5	-	-	-	67.9	-	-	-	-	1507.1	-	-	
74	O12	116.9	-	159.7	-	43.7	-	268.1	-	198.7	-	-	-	-	-	-	37.5	564.3	-	-	43.6	-	-	-	-	-	-	-	
75	O47	45.6	-	198.6	-	4.5	-	45.4	-	-	-	-	-	-	-	-	2.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
76	O46	207.6	-	495.1	-	17.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	134.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
77	O58	23.0	-	3.7	-	-	-	-	3.3	-	1.4	-	-	-	-	-	33.3	12.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
78	O117	208.6	-	1351.5	-	-	-	766.2	-	-	-	-	-	-	-	-	37.7	761.7	-	-	42.3	-	-	-	-	-	-	-	
79	O52	139.2	-	425.7	138.2	-	-	-	-	-	-	25.4	-	-	-	-	47.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
80	O69	158.5	-	1071.8	114.4	12.7	-	20.3	-	59.1	-	-	-	-	-	-	39.8	42.3	-	-	23.8	-	-	-	-	-	-	-	
81	O42	186.1	-	395.8	-	-	320.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	169.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
82	O70	161.3	-	349.7	-	-	190.1	-	1449.1	-	-	-	-	-	-	-	227.4	-	-	-	452.5	-	-	-	-	-	-	+	
83	O137	45.7	-	386.1	-	-	220.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	22.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
84	O132	151.1	-	544.5	-	-	192.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	43.2	-	-	-	11.6	-	-	-	-	-	-	+	
85	O116	359.8	-	377.2	172.1	-	237.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	558.3	397.8	-	-	121.9	-	-	-	-	-	-	+	
86	O122	150.7	-	432.4	176.8	-	235.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	59.3	-	-	-	28.9	-	-	-	-	-	-	+	
87	O54	31.5	-	138.6	38.9	-	228.0	76.7	-	-	-	-	-	-	-	-	25.1	-	-	-	46.6	-	-	-	-	-	-	+	
88	O130	258.1	-	4185.0	-	104.6	108.0	2650.5	-	-	-	-	-	-	-	-	48.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
89	O49	223.8	-	2837.0	-	184.9	451.8	86.2	2846.0	-	-	-	-	-	-	-	147.3	-	-	-	133.4	-	-	-	-	-	-	+	
90	O59	165.8	-	431.5	-	721.4	983.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	501.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
91	O53	142.3	-	944.1	237.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	108.7	-	-	-	78.7	-	-	+	
92	O66	226.6	-	428.9	1042.0	-	-	828.2	-	930.6	-	-	-	-	-	-	80.4	-	-	-	97.6	-	-	-	-	-	-	+	
93	O81	166.3	-	516.3	-	-	-	362.9	-	142.4	-	-	-	-	-	-	51.6	-	-	-	15.8	-	-	-	-	-	-	+	
94	O19	199.5	-	264.6	-	-	-	661.5	-	-	-	-	-	-	-	-	76.1	-	740.7	-	87.7	-	-	-	-	-	-	+	
95	O106	144.8	-	1563.8	-	-	-	1429.7	-	-	-	909.3	-	-	-	-	57.4	-	-	-	61.2	-	-	-	-	-	-	+	
96	O140-1	218.4	-	377.9	177.8	47.5	234.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	39.9	9.3	-	-	81.3	-	-	35.7	-	-	-	+	
97	O140-2	210.8	-	282.6	-	47.7	334.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21.6	-	-	-	61.8	-	-	29.4	-	-	-	+	
98	O111	14.4	14.4	4192.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	43.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	O112	29.3	-	13.1	58.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	O148	6.6	2.6	84.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
99	O141	69.4	-	208.3	30.4	-	193.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	158.4	-	65.0	-	-	-	-	-	47.7	-	-	+	
100	O142	93.2	-	563.9	-	-	250.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	57.7	-	-	-	-	-	-	-	595.0	-	-	-	
101	O143	3.2	21.1	242.5	14.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
102	O145	218.2	-	372.0	-	-	272.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	208.3	-	-	-	96.0	-	-	-	337.3	-	-	-	
103	O146	4.6	6.9	157.1	-	-	-	41.6	20.7	-	-	-	-	-	-	-	1.6	-	-	-	11.6	11.6	-	-	-	-	-	-	
104	O147	12.3	6.9	845.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8.2	-	-	-	-	-	-	-	
105	O149	1.4	-	185.6	-	-	-	80.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
106	O150	6.8	6.8	94.6	74.4	-	-	-	605.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	233.1	199.4	-	-	-	-	21.1	-	-	-	
107	O151	21.0	14.0	309.3	-	-	-	87.5	-	-	-	-	-	-	-	-	68.4	56.0	-	-	-	-	-	-	169.0	-	-	-	
108	O152	4.0	3.1	31.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	32.9	-	-	-	-	-	-	-	63.0	-	-	-	
109	O153	24.6	16.4	122.9	-	-	-	125.6	-	-	-	-	-	-	-	-	417.7	-	-	-	-	-	-	-	15.5	-	-	-	
110	O154	118.3	27.8	106.1	3.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15.7	-	-	24.4	-	-	-	-	-	-	-	+	
111	O155	7.5	4.0	47.5	2.2	-	-	-	-	8.8	-	-	-	-	-	-	5.3	-	-	-	4.8	-	-	-	-	-	-	-	
112	O158	3.7	-	15.1	-	6.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11.5	-	-	-	7.0	-	-	-	-	-	-	-	
113	O159	21.4	-	96.1	-	-	35.5	338.6	-	-	-	-	-	-	-	-	53.1	-	-	-	29.9	-	-	-	250.9	-	-	-	

[略語] L-D Hep : L-グリセロ-D-マンノヘプトース、D-D Hep : D-グリセロ-D-マンノヘプトース、Glc : グルコース、Gal : ガラクトース、Man : マンノース、Fru : フルクトース、Rha : ラムノース、Fuc : フコース、Col : コリトース、Ara : アラビノース、N1, N2, N3, N4, N5 : 中性糖画分に検出される未同定中性糖、GlcN : グルコサミン、GalN : ガラクトサミン、ManN : マンノサミン、QuiN : キノボサミン、FucN : フコサミン、PerN : ペロサミン、PerN-Pro : N-2-ヒドロキシプロピオニールペロサミン、6dGlc3N : 3-アミノ-3,6-ジデオキシグルコース、6dGal3N : 3-アミノ-3,6-ジデオキシガラクトース、A1, A2 : 未同定アミノ糖、TBA : 過ヨウ素酸・チオバルビツール酸反応陽性物質 [脚注] a) - : 1g 湿重あたり 1µg 以下、b) 2-ケト-3-デオキシ-D-スレオ-ヘキソン酸と同定

57

表23 Non-O1 *Vibrio cholerae* O2 ~O161 の LPS 多糖部における6-デオキシアミノ糖の分布

	アミノ糖	O抗原型 (血清型)	総計
	2-amino-2,6-dideoxyglucose (キノボサミン : QuiN)	O 11 , O 12 , O 13 , O 17 , O 18 , O 19 , O 20 , O 22 , O 23 , O 27 , O 28 , O 29 , O 33 , O 34 , O 37 , O 39 , O 41 , O 43 , O 48 , O 49 , O 53 , O 55 , O 60 , O 65 , O 66 , O 67 , O 69 , O 72 , O 74 , O 76 , O 77 , O 80 , O 81 , O 84 , O 86 , O 87 , O 89 , O 90 , O 91 , O 92 , O 95 , O 99 , O102 , O106 , O108 , O109 , O114 , O115 , O116 , O117 , O119 , O120 , O122 , O131 , O134 , O135 , O136 , O139 , O140-1 , O140-2 , O144 , O145 , O146 , O147 , O150 , O154 , O160 .	67
CT CO	2-amino-2,6-dideoxygalactose (フコサミン : FucN)	O 2 , O 3 , O 6 , O 20 , O 25 , O 26 , O 27 , O 31 , O 34 , O 38 , O 45 , O 54 , O 61 , O 62 , O 70 , O 75 , O 79 , O 83 , O 94 , O 98 , O100 , O101 , O105 , O107 , O108 , O110 , O126 , O132 , O133 , O143 , O146 , O155 , O158 , O159 .	34
	3-amino-3,6-dideoxyglucose (6dGlc-3N)	O 53 , O 75 , O101 , O105 , O110 , O138 , O141 , O142 , O145 , O149 , O150 , O151 , O152 , O159 .	14
	3-amino-3,6-dideoxygalactose (6dGal-3N)	O 91 , O103 .	2
	4-amino-4,6-dideoxymannose (ペロサミン : PerN)	O 76 , O140-1 , O140-2 , O144 .	4

なわち全菌株の共通構成糖である Glc、L-D Hep の他に化学型 56 では Gal、化学型 57 では GlcN、化学型 60 では QuiN を含む 3 種類の糖により構成されていた。これらの LPS 多糖鎖は S 型腸内細菌 LPS の多糖鎖に比べ、比較的短鎖であることが予想され、次章で述べる SDS-PAGE により分子構築を検討した。結果については後述する。

考 察

本章では、グラム陰性細菌の LPS を抽出・精製することなく、菌体から直接迅速簡便な方法によって LPS 多糖鎖を調製する画期的な新迅速簡便分離法の開発と、そのビブリオ科細菌の LPS 多糖部の糖組成に基づく化学分類への応用について述べた。

本研究において新たに開発されたグラム陰性菌 O 抗原 LPS 全多糖側鎖部の画期的な迅速簡便調製法の原理は以下の通りである。図 6 に示す如く、グラム陰性菌の湿菌を 10 % 酢酸に分散して 100℃、1.5 時間加熱すると、菌体の細胞壁外膜中に anchor として強く結合しているリポド A とコア多糖の KDO との間のケトシド結合が切断され、LPS の全多糖側鎖 (O 多糖-コア多糖) 部は菌体から反応液中に可溶性となって遊離する。この 10 % 酢酸加熱抽出液の遠心上清に冷却下 TCA (終末濃度 10 %) を加えて除核蛋白を行ない、その遠心上清に適量のアセトンを添加して溶存する O 多糖-コア多糖部を分画沈殿すれば O 抗原 LPS の全多糖側鎖部が分離できる。すなわち、この方法によってグラム陰性菌の菌体から LPS を常法により長時間かけて抽出、分離、精製することなく、菌体から直接、LPS の多糖鎖のみを迅速簡便に調製できる。以上が本研究によって開発に成功したグラム陰性菌 LPS 多糖鎖の迅速簡便分離法の原理である。

新迅速簡便分離法によって調製した標品は、ゲル濾過とそれによって得られた画分の化学分析により、LPS 多糖部以外の夾雑物 (菌体成分) を殆ど含まず、その糖組成も LPS から調製した LPS 多糖鎖と少なくとも定性的には同じであることが示され、LPS 多糖部の分析試料として十分

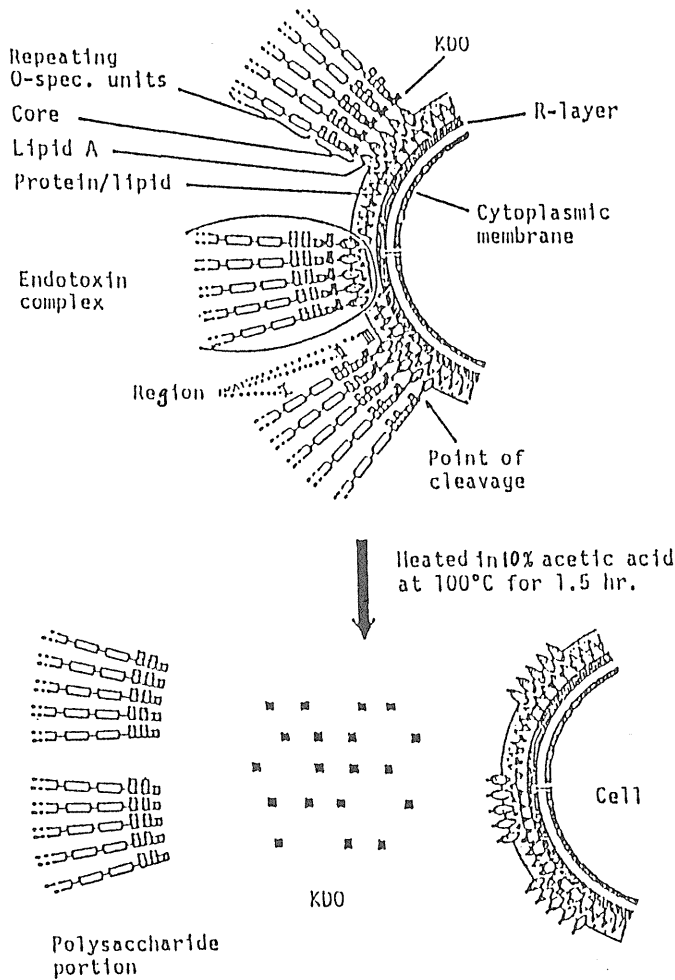


図6 菌体からのLPS多糖部の迅速簡便分離法の原理

に優れた標品であった。従来の、抽出・精製したLPSからLPS多糖鎖を調製する方法では、菌体の大量培養、フェノール/水抽出、超遠心の反復、長時間の透析、凍結乾燥などによるLPSの精製、LPSの加水分解とゲル濾過による多糖鎖の分画など、少なくとも10日以上に亘る作業が必要であった。新しく開発された本迅速簡便法によれば、1リットルの培養液から1日の作業で構成糖の分析に十分な量のLPS多糖鎖を調製することができ、しかも同時に数菌株のLPS多糖鎖を調製することが可能である。この観点から、本法は多数の患者あるいは環境分離株や、多

くのO抗原型に分類される菌種のLPS多糖部の糖組成を分析するにあたって、極めて優れた有効な方法であるといえる。

本簡便法の応用として、V. fluvialis の現在知られている35種類の全血清型と、non-O1 V. cholerae の160種類の血清型のLPS多糖部の糖組成に基づく化学分類を行なった。V. fluvialis の35種類の血清型は21種類の化学型に分類され⁶⁶⁾、異なる血清型でも同じ糖組成のLPS多糖鎖をもつものが見出された。これらの菌株では、LPS多糖鎖を構成する糖の結合様式が異なるものと推察される。また、同じ血清型に分類されているものの、予研と都衛研由来株ではLPS多糖部の糖組成が異なるものが数株見出された。これらの菌株のLPS多糖鎖では、菌株のO抗原特異性を決定する部分は同一の構造をもつが、血清学的特異性に関与しない糖鎖部、例えばコア多糖部の構造が異なるか、または一部の共通構造によって共通抗原性を示すものと思われる。

V. fluvialis LPSの化学的特徴の一つとして、すべての血清型株でD-D HepとGalUAが検出されることが挙げられる⁶⁷⁾。LPS多糖部の構成糖としてこれら2種類の糖が検出されるのは、ビブリオ科細菌ではV. fluvialisとV. furnissiiのみであり⁸⁾、両菌種の類似性が示されると共に、これら両菌種はLPS多糖部の糖組成に基づく化学分類によって、他のビブリオ科細菌と明瞭に区別できることが明らかとなった。

本迅速簡便分離法はまた、non-O1 V. cholerae のLPS多糖部の糖組成に基づく化学分類にも応用され⁶⁵⁾、Kondoら⁵⁴⁾の成績と合わせて現在報告されているnon-O1 V. cholerae のすべての血清型株と、さらにその後新たに見出された血清型株も含めて全血清型non-O1 V. cholerae のLPS多糖部の糖組成に基づく化学分類を完成した。non-O1 V. cholerae のO2～O161の160種類の血清型は113種類の化学型に分類され、この中には、複数の血清型で構成される化学型が23種類あった。これらの化学型に属する血清型のLPSでは、上記のV. fluvialis の場合と同様に、LPS多糖部の糖組成は同じでも血清学的特異性に関与する部分の構造は異なるものと思われる。またO140 (Hakata株)では、Kondoら⁶⁸⁾が報告したと同様にGalとGalNの有無によ

り、同一血清型が2つの化学型に分類され、これらの糖組成はO140の血清学的特異性の決定には関与しないことが示された。O1 V. cholerae LPSのO抗原特異多糖鎖は、D-PerNの $\alpha(1\rightarrow2)$ 結合ホモポリマーとD-QuiNで構成される^{19, 69)}ことが知られている。従って、これらの両糖の存在が、LPSの糖組成に基づくO1 V. choleraeの同定のための大きな指標となっている。本研究においてO76とO144およびO140のLPS多糖部にPerNとともにQuiNが検出された。しかしすでに報告されているように²⁴⁾、O76とO144の両血清型LPSのO多糖鎖はともにL-PerNの $\alpha(1\rightarrow2)$ 結合ホモポリマーであり、さらに両LPS多糖鎖にはO1 V. choleraeには検出されないGalが含まれていた。また、O140 LPS多糖鎖の糖組成もManを含むなどの点で、O1 LPSのそれとは異なっていた。すなわち、160種の血清型のnon-O1 V. choleraeの中には、O1 V. choleraeと同じ化学型に属するものは見出されず、O1 V. choleraeはそれのみで独自の化学型に属することが確認された。FruとGlcNはともにO1 V. cholerae LPSのコアの構成糖であり、その構造も最近解明されている⁷⁰⁾。non-O1 V. cholerae LPSもこれと同じ構造のコアをもつことが予想されたが、Fruはnon-O1 V. choleraeの血清型全体の36%の血清型株では検出されず、また、GlcNの検出されない血清型株も8.7%見出された。さらにFruとGlcNともに検出されないものが全体の8.1%の血清型株で見出された。これら両構成糖の有無に関しては数種の組み合わせが認められ、non-O1 V. cholerae LPSではコアの化学構造においても血清型によって数種のバリエーションがあることが明らかとなった。

本研究では、改良および新迅速簡便分離法を用いて多くの菌種のビブリオ属細菌のLPS多糖部の糖組成に基づく化学分類が行なわれたが、その結果、これらの菌種のLPSに共通する、換言すればビブリオ属あるいはビブリオ科細菌全体に共通する化学的特徴として、常法によってはKDOが検出されないことが挙げられる。すでにHisatsuneら⁸⁾はビブリオ科を構成する各属の代表株のLPSについて同様な報告をしているが、本研究によってさらに多種の菌種において確認された。前述の如く、

ビブリオ科に属するいくつかの菌種の LPSでは、KDO 領域の構造解析が行なわれ、KDOは4位にリン酸基をもち、5位が多糖部との結合位置であることが示されている。本研究で用いた多くの菌種の LPSにおいてもそれらの KDO領域は同様な構造をもつことが強く示唆され、このことはまた、ビブリオ科細菌全体に共通する LPSの化学構造上の一大特徴であると思われる。

以上に述べた如く、本研究で開発された LPS 多糖鎖の新迅速簡便分離法は、ビブリオ科細菌全般の菌種に応用できるとともに、さらに他のグラム陰性菌からの LPS 多糖鎖の分離においても極めて良好な成績が得られた。また本法を non- O1 *V. cholerae* をはじめとして多菌種、多種類の血清型株に応用することにより多くの貴重な知見を得ることができた。本法をさらに多くの菌種に応用することによって、それらの菌種の LPS 多糖部の糖組成に基づく化学分類を完成することが可能となった。

第三章 ビブリオ科細菌 LPS の分子構築

Hisatsune ら⁸⁾は先に、ビブリオ科を構成する全4属の代表的菌種についてそのLPSの糖組成を中心とした化学的特徴を報告した。その結果から、ビブリオ科細菌、特にビブリオ属細菌の中には、LPSの糖組成において、腸内細菌など多くのグラム陰性菌LPSと異なり、高分子の多糖鎖をもたないものがあることが予想された。そこで本研究では、ビブリオ科全体、特にビブリオ属を構成する菌種を中心として、そのLPSの分子構築を検討した。本研究に用いたビブリオ属細菌は、現在 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (第9版)¹⁾に記載されている20種類の菌種(表24参照)のうち、V. splendidus、V. pelagius、V. nigripulchritudo、V. logei、V. gazogenes および V. marinus の6種を除く14菌種と、その後、新病原ビブリオとして新たに種名が認定された V. furnissii、V. ordalii、V. damsela、V. mimicus、V. hollisae およびかつて V. metschnikovii の1生物型として記載された V. albensis の合計20菌種である。本章ではLPSの分子構築を検討するにあたり、まず、従来LPSの性状が報告されていない上記5種の新型病原ビブリオのうち、前章で述べた V. mimicus を除く4菌種からLPSを調製し、その性状を検討した。

第一節 新型病原ビブリオ LPSの化学的、生物学的性状

表25に V. furnissii、V. ordalii、V. damsela、V. hollisae のLPSの糖組成を示した。Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (第9版)において V. fluvialis の生物型Ⅱに分類されている V. furnissii LPSは、第二章で述べた V. fluvialis O6 (化学型Ⅵ)のLPS多糖部と非常に類似した糖組成であったが、TBA反応陽性物質が検出され、V. fluvialis のいずれの化学型にも属さなかった。このTBA反応陽性物質は、HVPEにより V. fluvialis のLPS多糖部に検出された物質とは異なる物質であることが示された。V. anguillarum の生物型Ⅱに分類

表24 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 第9版に記載されているビブリオ属細菌

1. <u>Vibrio cholerae</u>		Type strain : ATCC 14035
2. <u>Vibrio metschnikovii</u>		NCTC 8443
3. <u>Vibrio harveyi</u>		ATCC 14126
4. <u>Vibrio campbellii</u>		ATCC 25920
5. <u>Vibrio parahaemolyticus</u>		ATCC 17802
6. <u>Vibrio alginolyticus</u>		ATCC 17749
7. <u>Vibrio natriegens</u>		ATCC 14048
8. <u>Vibrio vulnificus</u>		ATCC 27562
9. <u>Vibrio nereis</u>		ATCC 25917
10. <u>Vibrio fluvialis</u>	bioval I	NCTC 11327
	bioval II	
11. <u>Vibrio splendidus</u>	bioval I	ATCC 33125
	bioval II	
12. <u>Vibrio pelagius</u>	bioval I	ATCC 25916
	bioval II	
13. <u>Vibrio nigripulchritudo</u>		ATCC 27043
14. <u>Vibrio anguillarum</u>	bioval I	ATCC 19264
	bioval II	
15. <u>Vibrio fischeri</u>		ATCC 7744
16. <u>Vibrio logei</u>		ATCC 29985
17. <u>Vibrio proteolyticus</u>		ATCC 15338
18. <u>Vibrio gazogenes</u>		ATCC 29988
19. <u>Vibrio marinus</u>		ATCC 15381
20. <u>Vibrio costicola</u>		ATCC 33508

新たに認定されたビブリオ属細菌

- a. Vibrio furnissii for V. fluvialis bioval II
- b. Vibrio ordalii for V. anguillarum bioval II
- c. Vibrio damsela
- d. Vibrio mimicus
- e. Vibrio hollisae

表25 新型病原ビブリオ LPS の糖組成 [%, w/w]

菌 株	Glc	Gal	Fru	L-D Hep	D-D Hep	GlcN	GalN	QuiN	Uronic acid	6d Glc4N	KDO	TBA	X
<u>V. furnissii</u>	3.1	3.0	-	1.5	5.0	4.5	1.7	0.9	5.0	-	nd ^{a)}	2.9 ^{b)}	+
<u>V. ordalii</u>	56.7	1.2	-	11.0	-	4.2	-	-	-	5.7	nd	-	+
<u>V. damsela</u>	5.3	1.7	1.5	2.3	-	2.5	5.9	-	-	-	nd	-	+
<u>V. hollisae</u>	3.4	-	-	9.2	-	9.6	1.0	-	-	-	nd	-	+

[略語] Glc : グルコース、Gal : ガラクトース、Fru : フルクトース、L-D Hep : L-グリセロ-D-マンノヘプトース、D-D Hep : D-グリセロ-D-マンノヘプトース、GlcN : グルコサミン、GalN : ガラクトサミン、QuiN : キノボサミン、6dGlc4N : 4-アミノ-4,6-ジデオキシグルコース、KDO : 2-ケト-3-デオキシオクトン酸、TBA : Weissbach の過ヨウ素酸・チオバルビツール酸反応陽性物質、X : LPSの強酸加水分解産物中に検出される過ヨウ素酸・チオバルビツール酸反応陽性物質 [脚注] a) nd : 非検出、 b) KDOとして定量

される V. ordalii LPS では 6dGlc4N が構成糖として検出され、V. anguillarum の血清型 B と類似した糖組成をもっていた。しかし、本 LPS の糖組成は、V. anguillarum の A、B、C いずれの血清型株および他の血清型不明株の糖組成とも一致しなかった。V. damsela LPS は Fru を含み、V. cholerae および V. mimicus の LPS と類似した糖組成であった。KDO は常法によってはいずれの菌種の LPS から検出されず、また各 LPS の強酸加水分解産物中には HVPE によって KDO-リン酸が検出され、他のビブリオ属細菌の LPS と一致した性状が認められた。LPS の脂肪酸組成では表 26 に示す如く、V. ordalii、V. damsela、V. hollisae の LPS はほぼ一致した組成であったが、V. furnissii LPS ではさらに C12:0、C15:0、C17:0 などが少量検出され、複雑な脂肪酸組成を示した。エステル交換反応の結果、これら 4 種の LPS ではいずれも 3-OH C14:0 のみがアミド結合脂肪酸であることが示された。リムルスゲル化試験においてこれら 4 種の LPS はいずれも 0.01 ng/ml ~ 0.1 ng/ml の濃度で完全なゲル化を生じ、他のビブリオ科細菌と同様、強い内毒素活性が認められた。

第二節 ビブリオ科細菌 LPS の分子構築

3-2-1. 【 ビブリオ科細菌 LPS のドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 】

LPS は基本的には親水性の多糖部分とリピド A と呼ばれる疎水性の脂質部分から構成される高分子両親媒性複合体であり、ほぼすべてのグラム陰性細菌細胞壁中に共通して存在する。しかしながらその分子構築、すなわち化学構造は菌群（科または属）または菌種の相違によりそれぞれ異なっており、また同一細菌においても LPS は均一な分子集団ではなく、生合成の過程に基づく極めて多くの分子種を含む不均一な分子集団である。このような LPS の分子構築および不均一性を調べる手段として SDS-PAGE が多用される。

表26 新型病原ビブリオ LPS の脂肪酸組成 [mol / 2 mol 3-OH C14:0]

菌 株	収率 ^{a)}	C12:0	C14:0	C15:0	C16:0	C16:1	C17:0	C18:1	3-OH C12:0	3-OH C14:0
<u>V. furnissii</u>	35.0	0.1	1.0	0.3	1.8	1.0	0.7	0.2	0.7	2.0
<u>V. ordalii</u>	18.8	-	1.8	-	2.0	0.8	-	0.5	0.8	2.0
<u>V. damsela</u>	11.5	-	0.7	-	0.5	0.7	-	0.2	0.2	2.0
<u>V. hollisae</u>	20.8	-	0.5	-	1.0	0.4	-	0.4	1.0	2.0

[略語] C12:0 ; ドデカン酸、 C14:0 ; テトラデカン酸、 C15:0 ; ペンタデカン酸、 C16:0 ; ヘキサデカン酸、 C16:1 ; ヘキサデセン酸、 C17:0 ; ヘプタデカン酸、 C18:1 ; オクタデセン酸、 3-OH C12:0 ; 3- ヒドロキシドデカン酸、 3-OH C14:0 ; 3- ヒドロキシテトラデカン酸 [脚注] a) LPS からの収率 (%, w/w)

一般に SDS-PAGE では腸内細菌などの典型的 S 型 (Smooth 型) LPS は、高分子領域から低分子領域に亘り、多くの階段状バンドとして泳動される。S 型 LPS にみられるこのような多数のバンドは O 多糖部分を構成するリピーティング・ユニットの数の違いなど、LPS 分子の不均一性を示すものである。一方、その O 抗原多糖側鎖を欠損する R 変異株 LPS では S 型 LPS で認められた階段状のバンドはみられず、低分子領域に 1 ~ 数本のバンドとして泳動されることが知られている。このように SDS-PAGE における泳動像からその LPS の分子構築、すなわちリピーティング・ユニットで構成される高分子の O 抗原多糖側鎖の有無や LPS 分子の大きさ、不均一性などを知ることができる。

グラム陰性菌の多くの菌種の LPS は、前述の如く、リピーティング・ユニットで構成される高分子の O 多糖鎖をもつ。しかし、前節で述べた如く、ビブリオ科細菌のある菌種の LPS から弱酸加水分解によって分離した多糖鎖の分子量は、腸内細菌 LPS より調製した多糖部のそれに比べて非常に小さい。このことはこれらの LPS は化学的には R 型に近い非常に低分子の糖鎖で構成されていることを示唆する。そこで本節では、ビブリオ属を中心に、ビブリオ科を構成するその他の Photobacterium、Aeromonas、および Plesiomonas 属も含めてそれらの LPS の分子構築を SDS-PAGE によって検討した。

3-2-1-a. 【 V. parahaemolyticus LPS の SDS-PAGE 】

V. parahaemolyticus は現在 O1 ~ O13 までの 13 種の O 抗原型が存在することが知られている。これら 13 種の O 抗原型 LPS はいずれも SDS-PAGE において低分子領域に 1 本または数本のバンドとして泳動され (図 7、8)、対照として用いた S 型 LPS である S. Typhimurium LT2 LPS の泳動像とは異なり、むしろ R 変異株である S. Minnesota R595 の LPS のそれに近い泳動像が認められた。従って、V. parahaemolyticus O1 ~ O13 のすべての血清型株は、S 型 colony morphology と明らかな血清学的 O 特異性、およびはっきりした病原性をもつ点で明らかに S 型

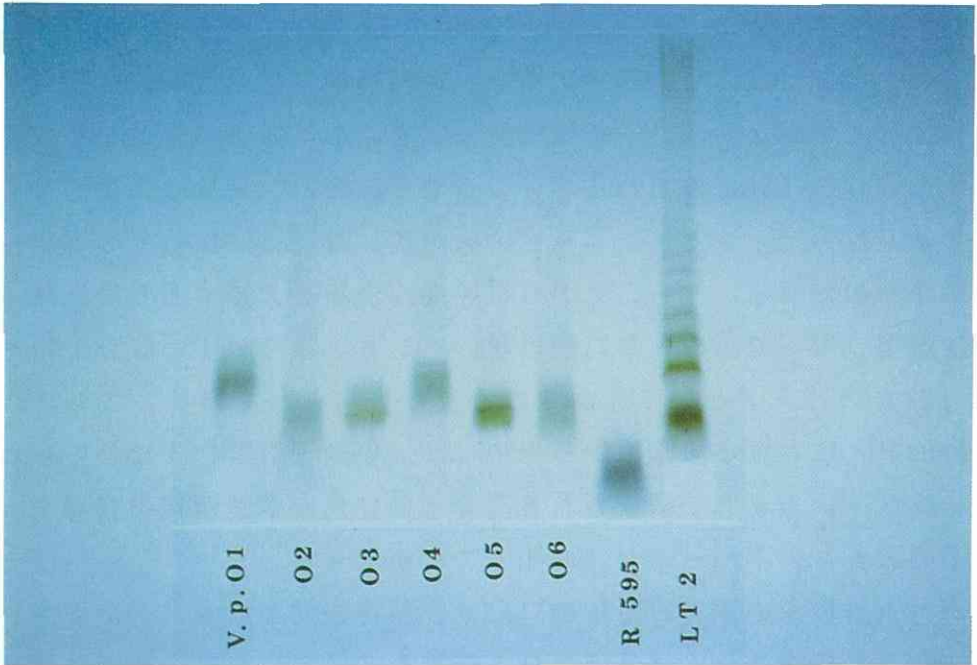


図7 Vibrio parahaemolyticus O1 ~ O6 LPS の SDS-PAGE 像
 V. p. : Vibrio parahaemolyticus
 R595 : Salmonella Minnesota R595 (R 型 LPS control)
 LT2 : Salmonella Typhimurium LT2 (S 型 LPS control)

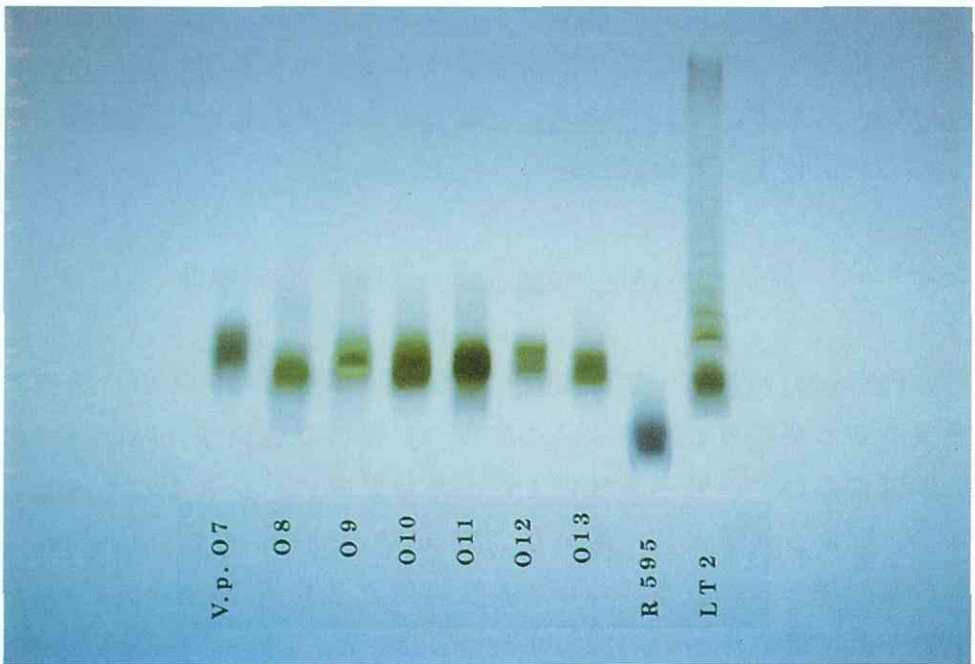


図8 Vibrio parahaemolyticus O7 ~ O13 LPS の SDS-PAGE 像
 V. p. : Vibrio parahaemolyticus
 R595 : Salmonella Minnesota R595 (R 型 LPS control)
 LT2 : Salmonella Typhimurium LT2 (S 型 LPS control)

であるにも拘らず、それらの LPSは通常の S 型 LPSのコアに相当する低分子の糖鎖で構成される LPS、すなわち化学的には R 型 LPS [いわゆる LOS (lipooligosaccharide)] であることが明らかとなった⁷¹⁾。

3-2-1-b. 【 V. anguillarum LPS の SDS-PAGE 】

図 9 に浜名湖産病変稚アユから分離された A、B、C各血清型と NCMB 標準株および血清型不明の V. anguillarum LPS の SDS-PAGE 像を示した。V. anguillarum LPS は血清型の相違によりそれぞれ異なる泳動パターンを示した。血清型 A に属する PT-24 LPSは中分子～低分子領域に亘る淡いブロードなバンドとして泳動され、一方、同じ血清型 A 型に属する H-107株では低分子領域に濃・淡 2本のバンドとして泳動され、同

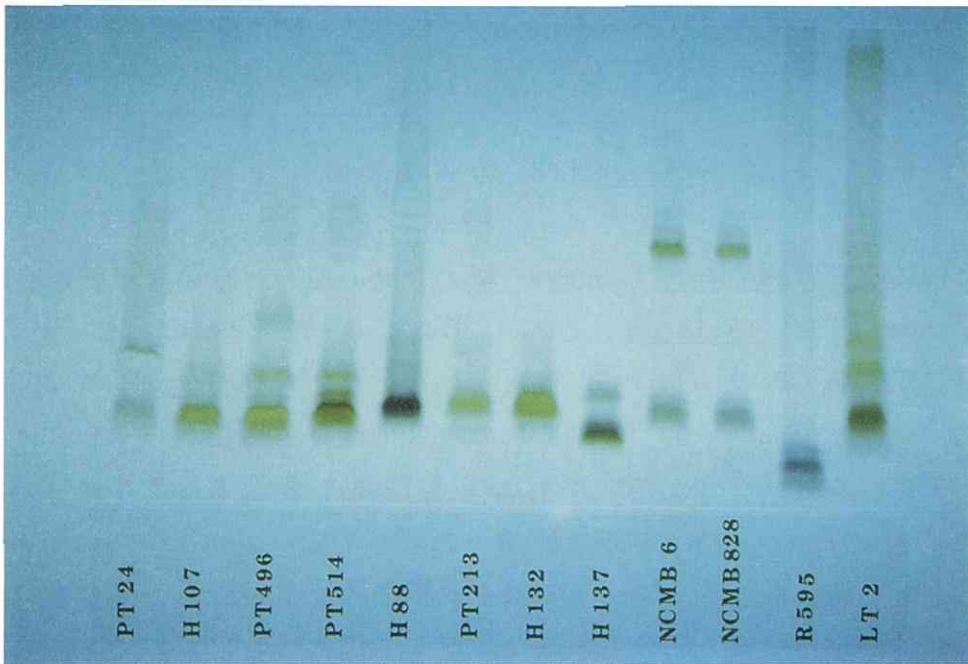


図 9 Vibrio anguillarum LPS の SDS-PAGE 像
 PT 24, H107 ⇒ 血清型 A PT496, PT514, H88 ⇒ 血清型 B
 PT213, H132 ⇒ 血清型 C H107 ⇒ 血清型不明
 R595 : Salmonella Minnesota R595 (R 型 LPS control)
 LT2 : Salmonella Typhimurium LT2 (S 型 LPS control)

一血清型 LPS間でも SDS-PAGE 像に相違が認められた。血清型 B に属する 3 株 (PT-496、PT-514、H-88) の LPS は S 型腸内細菌の LPS に類似した泳動像を示し、特に H-88 LPS は高分子領域から低分子領域にまたがる階段状の多数のバンドを示した。一方、血清型 C に属する 2 株 (PT-213、H-132) の LPS では低分子領域にのみバンドが認められ、両者は類似した泳動像を示した。A、B、C のいずれの血清型にも属さない H-137 LPS は最も低分子領域に主バンドが泳動され、その分子量は他の V. anguillarum LPS に比べ最も小さいことが示された。標準株として用いた NCMB 株 2 株は低分子領域とゲル中央部に泳動される明瞭な 2 本のバンドを示し、他の菌株 LPS とは明確に異なる泳動像を示した。V. anguillarum の LPS は前述の如く、血清型の異なる LPS は各血清型に対応して、それぞれ異なる糖組成をもち、またそれらの多糖鎖はゲル濾過においても異なる溶出パターンを示すことが明らかになったが、SDS-PAGE においても各血清型 LPS の泳動パターンが異なり、これら LPS の分子構築の相違が明確に示された。

3-2-1-c. 【 V. cholerae LPS の SDS-PAGE 】

図 10 に O1 V. cholerae (Ogawa 型、Inaba 型) とその R 変異株、および non-O1 V. cholerae [O3、O5、O140 (Hakata⁷²)] とその R 変異株 LPS の SDS-PAGE 像を示した。O1 V. cholerae の Ogawa 型 (41) と Inaba 型 (569B) の LPS では O 多糖鎖が N-(3-デオキシテトロニル) - α -D-ペロサミンの (1 \rightarrow 2) 結合ホモポリマーで、O140 (Hakata) LPS のそれは N-フォルミル- α -D-ペロサミンの (1 \rightarrow 2) 結合ホモポリマーでそれぞれ構成されている。これらの LPS は SDS-PAGE において高分子領域からゲル中央部にかけての幅広いバンドとして泳動され、高分子のホモポリマーを含む LPS に特有の特徴的な SDS-PAGE 像を示した。一方、その R 変異株 LPS では、O 多糖鎖に由来する幅広いバンドは消失し、低分子領域にのみ数本のバンドとして泳動された。non-O1 V. cholerae O3 の LPS は、4 種類の糖から成るり

ピーティング・ユニットで構成されており、その SDS-PAGE 像は同様な構造の O 多糖鎖をもつ *S. Typhimurium* LT2 LPS のそれに類似して多数のバンドから成る階段状を呈した。non-O1 *V. cholerae* O5 の LPS では上記の各菌株の LPS とは異なり、その R 変異株 LPS と同様に低分子領域にのみ数本のバンドが検出された。従って、O5 LPS は腸炎ビブリオ LPS に類似して、低分子の糖鎖で構成されることが示された。

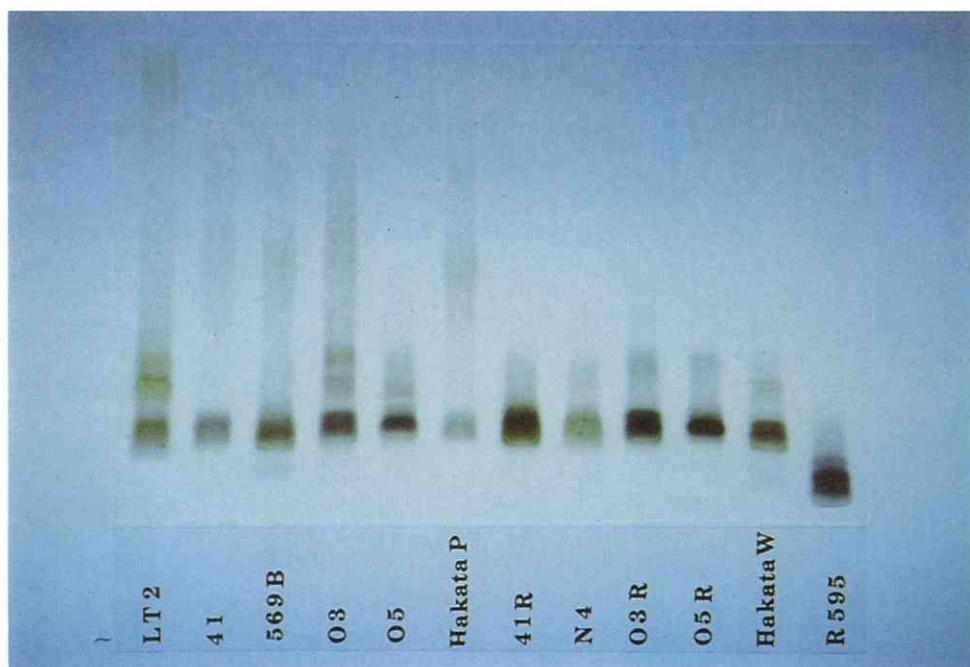


図10 *Vibrio cholerae* LPS の SDS-PAGE 像

41 : *Vibrio cholerae* NIH41 (Ogawa), 569B : *V. cholerae* 569B (Inaba), O3 : *V. cholerae* O3 , O5 : *V. cholerae* O5
 Hakata P : *V. cholerae* O140 (別名 Hakata 株) phenol phase 、
 41R : *V. cholerae* NIH41 R変異株、N4 : *V. cholerae* 569B Tox 101
 TI-N4 、O3R : *V. cholerae* O3 R 変異株、O5R : *V. cholerae* O5
 R 変異株、Hakata W : *V. cholerae* O140 water phase
 R595 : *Salmonella* Minnesota R595 (R型 LPS control)
 LT2 : *Salmonella* Typhimurium LT2 (S型 LPS control)

図11に non-O1 *V. cholerae* O8、O10、O73、O57およびO56株の LPS の SDS-PAGE 像を示した。これらの non-O1 *V. cholerae* は迅速簡便分離法によりその LPS 多糖部の構成糖が最も単純な化学型 1、

56、および化学型57にそれぞれ分類され、その多糖鎖が比較的短いと推測されたものである⁶⁵⁾。上記3種の化学型に属するO血清型は15種存在し、これらのうち本実験に用いた上記5株のLPSは低分子領域に数本のバンドとして泳動され、non-O1 *V. cholerae* R 変異株 LPSと類似した泳動像を示した。この他、non-O1 *V. cholerae* O22、O139などの比較的多種類の糖からなるLPSも SDS-PAGE において低分子量であることが明らかとなっている⁷³⁾。従って、non-O1 *V. cholerae* においても多くの血清型株が低分子量のLPSを産生することが示された。

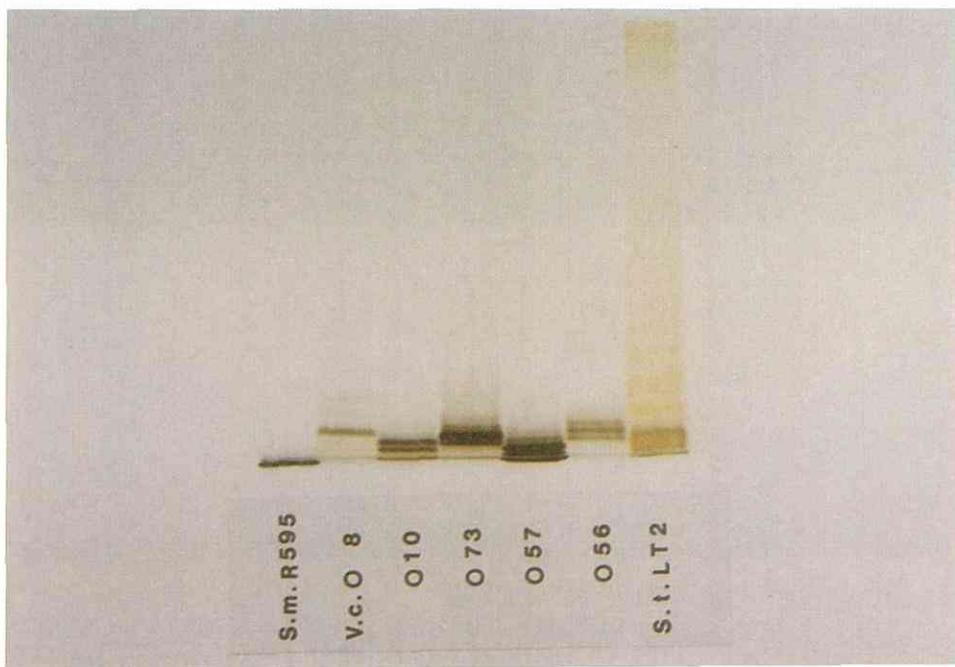


図11 non-O1 *Vibrio cholerae* LPS の SDS-PAGE 像
 V.c. : *Vibrio cholerae*, O 8, O10, O73 ⇒ 化学型1、
 O57 ⇒ 化学型56、O56 ⇒ 化学型57
 S.m.R595 : *Salmonella* Minnesota R595 (R型 LPS control)
 S.t.LT2 : *Salmonella* Typhimurium LT2 (S型 LPS control)

3-2-1-d. 【 ビブリオ属細菌 LPS の SDS-PAGE 】

図 12 に *Vibrio metschnikovii*、*V. harveyi*、*V. natriegens*、*V. vu*

V. vulnificus, V. nereis, V. fischeri, V. proteolyticus、および V. costicola の8種類のビブリオ属細菌 LPSの泳動像を示した。いずれの LPS も LT2 LPS に認められるような高分子領域に ladder 状のバンドは示さず、低分子領域に単一または数本のバンドとして泳動された。これらの LPS はいずれも S型株より分離されたものであるが、V. parahaemolyticus LPS の場合と同様にリピーティング・ユニットで構成される O 多糖鎖をもたず、S型腸内細菌 LPSに比べ、より低分子量であることが示された。V. nereis LPS は、銀染色において他の LPSと異なり、非常に淡い灰色の発色を示した。これは本 LPSの化学構造または化学組成が他の LPSと異なることを示すものである。

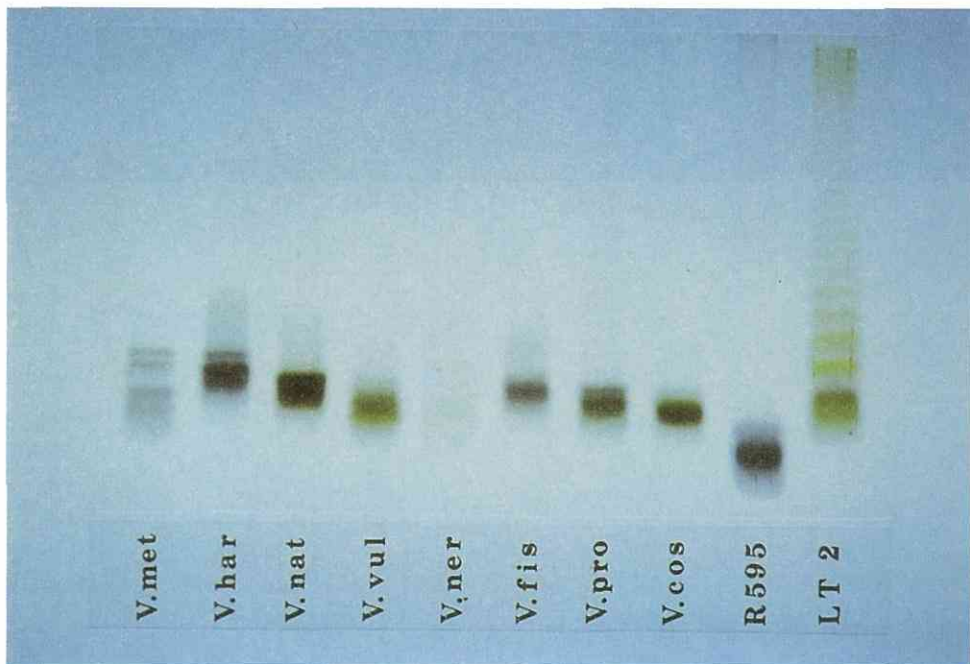


図12 ビブリオ属細菌 LPS の SDS-PAGE 像 (その1)

V.met : Vibrio metschnikovii, V.har : V. harveyi、V.nat : V. natriegens、V.vul : V. vulnificus, V.ner : V. nereis, V.fis : V. fischeri, V.pro : V. proteolyticus、V.cos : V. costicola
R595 : Salmonella Minnesota R595 (R型 LPS control)
LT2 : Salmonella Typhimurium LT2 (S型 LPS control)

図 13 に V. fluvialis、V. furnissii、V. anguillarum、V. ordalii、V. alginolyticus、V. campbellii、V. damsela、V. albensis、V. mimicus、および V. hollisae LPS の SDS-PAGE 像を示した。V. alginolyticus と V. damsela LPS では低分子領域の他にゲル中央部にもブロードなバンドが認められた。V. mimicus LPS は低分子領域からゲル中央部にわたる数段の明瞭なバンドとして泳動され、他のビブリオ属 LPS の SDS-PAGE 像と明瞭に異なる特徴的な泳動像を示した。その他のビブリオ属細菌の LPS は図 12 に示したビブリオ属細菌 LPS と同様に、低分子領域に 1 ～ 数本のバンドとして泳動された。

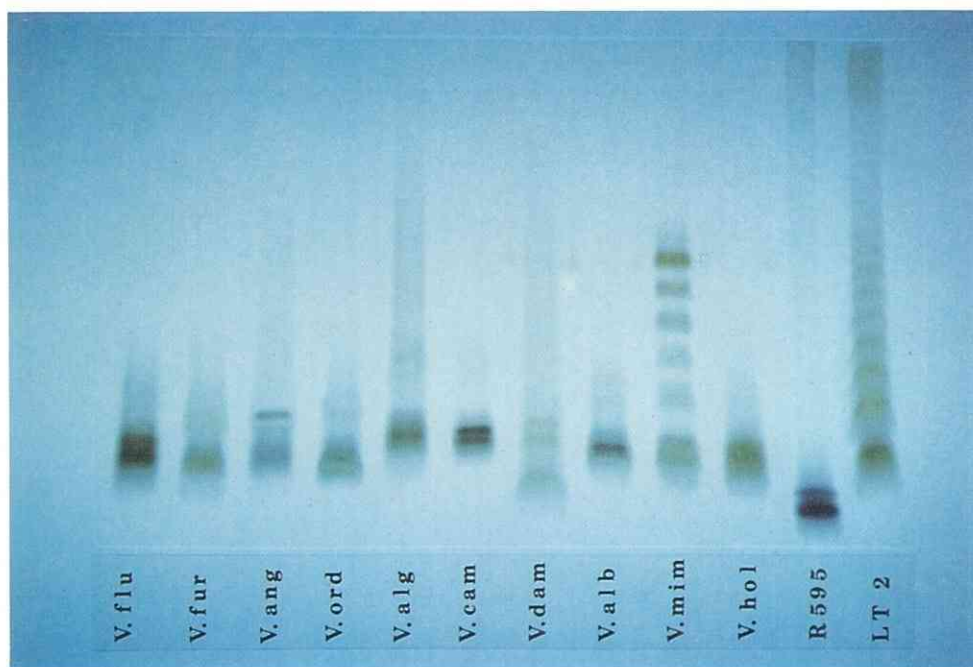


図13 ビブリオ属細菌 LPS の SDS-PAGE 像 (その2)

V. flu : Vibrio fluvialis、V. fur : V. furnissii、V. ang :
V. anguillarum、V. ord : V. ordalii、V. alg : V. alginolyticus、
V. cam : V. campbellii、V. dam : V. damsela、V. alb : V. albensis、
V. mim : V. mimicus、V. hol : V. hollisae
R595 : Salmonella Minnesota R595 (R型 LPS control)
LT2 : Salmonella Typhimurium LT2 (S型 LPS control)

以上に述べた如く、ビブリオ属細菌では V. anguillarum の一部、O1 V. cholerae、non-O1 V. cholerae の一部、V. alginolyticus、V. damsela、V. mimicus などを除き、多くの菌種において腸内細菌など多くのグラム陰性菌 LPS とは異なった非常に低分子の LPS を産生することが示された。これらの菌種ではその菌体は血清学的特異性、colony morphology および病原性において明らかに S 型の性状を示し、またその LPS も S 型 LPS の抽出法であるフェノール/水法により抽出されるが、SDS-PAGE においては R 型に類似した泳動像を示し、非常に低分子の糖鎖で構成されることが明らかとなった。

3-2-1-e. 【 ビブリオ属以外のビブリオ科細菌 LPS の SDS-PAGE 】

図14にビブリオ属以外のビブリオ科細菌、すなわち Photobacterium、Aeromonas および Plesiomonas 各属細菌の LPS の泳動像を示した。Ph. phosphoreum LPS は LT2 LPS と同様の ladder 状のバンドを示した。一方、同属に属する Ph. leiognathi LPS は最も低分子領域に濃い単一のバンドと高分子領域に非常に薄い数本のバンドが認められ、種により明らかに泳動パターンが異なっていた。Aeromonas 属 LPS も、種の相違により明瞭に泳動パターンが異なり、A. hydrophila と A. sobria LPS では低分子領域に数本のバンドが検出された。しかし、A. salmonicida とその subspecies に分類される A. achromogenes、A. masoucida の各 LPS では低分子領域に泳動された 1~2 本のバンドの他に、高分子領域に独立した明瞭なバンドを示し、他のビブリオ属細菌 LPS と性状を異にした。Plesiomonas 属に分類される単一種 Pl. shigelloides LPS は、発色は淡いが ladder 状のバンドを示し、Ph. phosphoreum LPS と同様、リピーティング・ユニットをもった高分子量 LPS であることが示された。

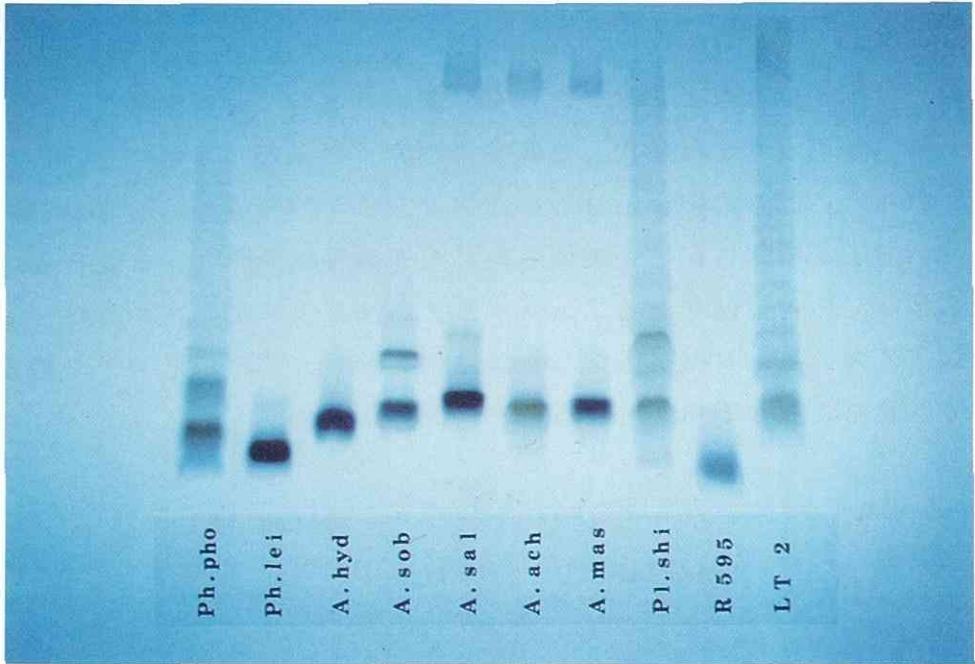


図14 ビブリオ属以外のビブリオ科細菌 LPS の SDS-PAGE 像

Ph.pho : Photobacterium phosphoreum、Ph.lei : Ph. leiognathi、
 A.hyd : Aeromonas hydrophila、A.sob : A. sobria
 A.sal : A. salmonicida subs. salmonicida、A.ach : A. salmonicida
 subs. achromogenes、A.mas : A. salmonicida subs. masoucida、
 Pl.shi : Plesiomonas shigelloides
 R595 : Salmonella Minnesota R595 (R型 LPS control)
 LT2 : Salmonella Typhimurium LT2 (S型 LPS control)

3-2-2. 【 ゲル濾過によるビブリオ科細菌 LPS多糖鎖の解析 】

前項において、ビブリオ属細菌の多くの菌種の LPSは非常に低分子の多糖鎖をもつことが LPSの SDS-PAGE によって示された。しかし SDS-PAGE においては、LPSの移動度はその分子量のみならず LPS分子の荷電の度合いによっても影響を受ける。このため本実験では、SDS-PAGE を行なったビブリオ科細菌のうち、いくつかの菌種の LPSより部分加水分解によってその多糖部 (DPS) を調製し、Sephadex G-50 を用いるゲル濾過によって LPS多糖鎖の分子量を比較検討した。

一般に大腸菌やサルモネラ属菌などの、リピーティング・ユニットで

構成される高分子のO多糖鎖をもつLPSのDPSは、Sephadex G-50ゲル濾過により3つの画分に分画される(図15-[A])。まず、カラムのvoid volumeまたはその付近にコア多糖と結合したO多糖鎖(Frc. I)が、次いでコア多糖(Frc. III)、最後にカラムのbed volumeに部分加水分解により遊離した単糖やリン酸など(Frc. IV)が溶出される。SDS-PAGEにおいて高分子領域からゲル中央部にかけてバンドが検出されたO1 V. cholerae、non-O1 V. cholerae O140 (Hakata)、V. mimicusなどのLPSより調製したDPSも大腸菌やサルモネラ属菌のDPSと同様、ゲル濾過により3つの画分に分画されたが、コア多糖と結合した多糖鎖に相当する画分がFrc. IIとしてFrc. Iよりやや低分子側にシフトして溶出された(図15-[B])。また、Plesiomonas shigelloides、V. anguillarum、V. ordaliiのDPSでも同様に高分子の多糖鎖が得られた。なお後者3株のDPSの場合は図15-[C]に示した如く、コア多糖よりも幾分分子量の大きな画分(Frc. II')も分画された。一方、SDS-PAGEにおいて低分子領域に1本または数本のバンドとして泳動された13種すべての血清型のV. parahaemolyticusおよびV. nereis、V. vulnificus、V. hollisae、V. furnissii、V. harveyiのLPSから調製したDPSでは、図15-[D]に示す如く、2つの画分に分画された。すなわち、カラムのvoid volume付近に溶出される高分子の多糖鎖は得られず、大腸菌などのコア多糖(Frc. III)と遊離単糖(Frc. IV)にそれぞれ相当する分子量の画分が溶出された。この溶出パターンは、O多糖鎖を欠損する大腸菌R変異株であるE. coli K12やO1 V. cholerae R変異株LPSより調製したDPSのそれと同じであった。

表27に上記6菌種の菌株のDPSから得られた2つの画分(Frc. III、Frc. IV)およびリピドAの糖組成を示した。これらの菌種のFrc. IIIでは、リピドAの構成糖であるGlcNとDPS調製時の部分加水分解で遊離した糖(Frc. IVに検出されるV. vulnificusのHep、V. nereisのTBA反応陽性物質、V. parahaemolyticusのGalとウロン酸、V. furnissiiのGalN、TBA反応陽性物質および少量のウロン酸など)以外は、いずれの菌種においてもLPSのそれと類似した糖組成を示した。す

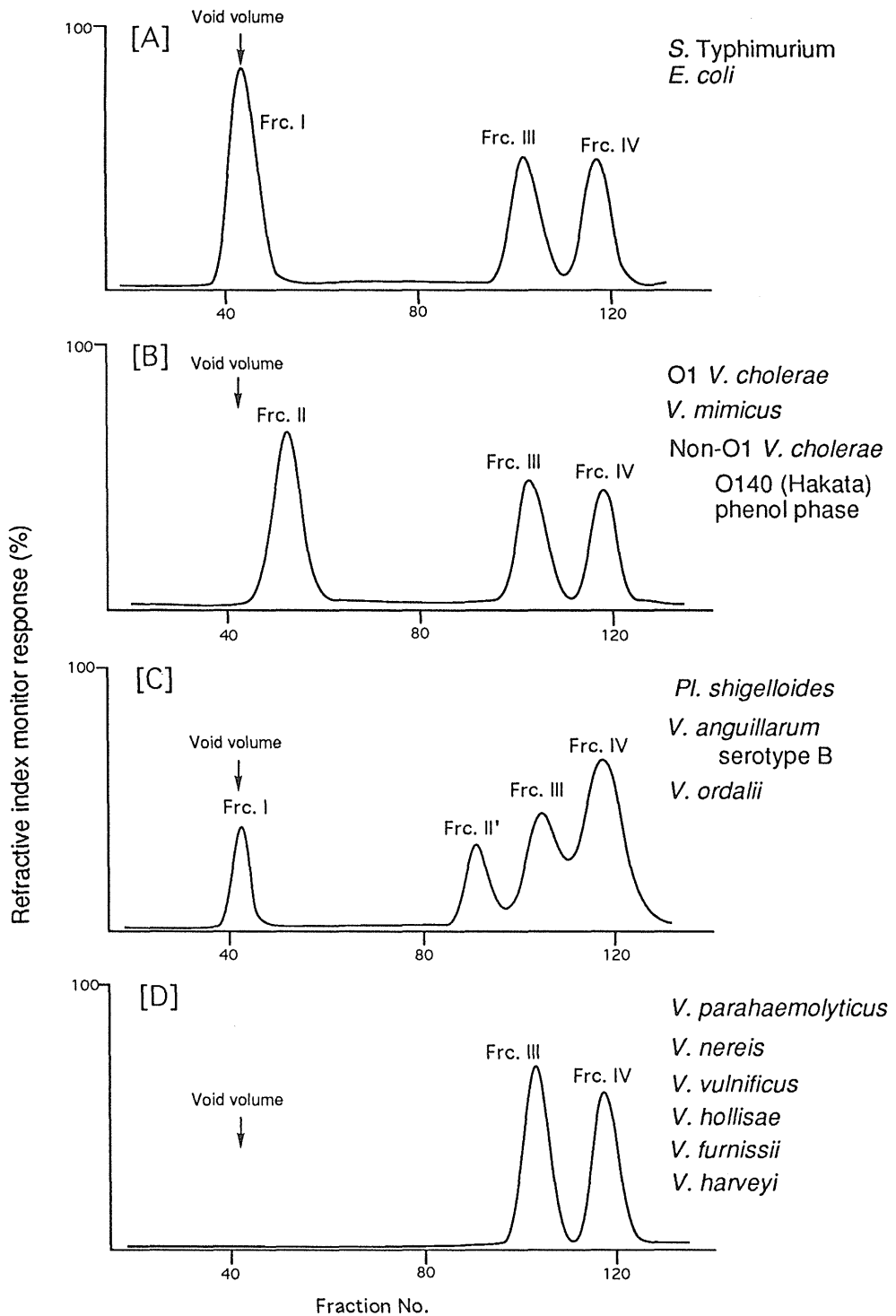


図15 グラム陰性細菌 LPS より調製した DPS の Sephadex G-50 ゲルクロマトグラフィー

表27 低分子量のビブリオ属細菌 LPS とその DPS の Sephadex-G50 ゲルクロマトグラフィーにより得られた各画分ならびに Lipid A の糖組成 [% , w/w]

菌 株	収 率	Glc	Gal	Hep	GlcN	GalN	QuiN	ウロン酸	TBA	全リン	全脂質
LPS											
<i>V. parahaemolyticus</i> O13	1.9 ^{a)}	3.9	3.6	6.5	4.5	-	-	7.9	-	2.9	25.3
<i>V. nereis</i> ATCC 25917	2.6 ^{a)}	6.7	-	4.3	5.1	-	-	3.6	1.8 ^{c)}	3.0	37.4
<i>V. vulnificus</i> ATCC 27562	2.9 ^{a)}	1.6	-	12.2	3.2	-	-	-	-	5.5	33.7
<i>V. hollisae</i> ATCC 33564	1.9 ^{a)}	3.3	-	9.2	9.6	1.0	-	-	-	2.9	20.8
<i>V. furnissii</i> ATCC 35016	2.5 ^{a)}	3.1	3.0	6.5	4.5	1.7	0.9	5.0	2.9 ^{c)}	2.5	35.0
<i>V. harveyi</i> ATCC 14126	3.1 ^{a)}	3.1	0.6	2.6	3.9	2.5	-	4.1	-	4.0	35.0
Frc. III											
<i>V. parahaemolyticus</i> O13	30.0 ^{b)}	10.4	9.4	21.8	-	-	-	18.5	-	1.2	-
<i>V. nereis</i> ATCC 25917	22.9 ^{b)}	16.7	-	14.0	14.5	-	-	20.0	tr ^{d)}	1.6	-
<i>V. vulnificus</i> ATCC 27562	20.7 ^{b)}	6.2	-	36.4	-	-	-	-	-	5.1	-
<i>V. hollisae</i> ATCC 33564	22.9 ^{b)}	8.2	-	26.2	14.2	2.1	-	-	-	tr	-
<i>V. furnissii</i> ATCC 35016	20.6 ^{b)}	11.3	7.8	22.8	-	4.1	1.0	26.2	-	1.3	-
<i>V. harveyi</i> ATCC 14126	32.0 ^{b)}	8.9	1.1	7.8	-	5.0	-	14.1	-	2.7	-
Frc. IV											
<i>V. parahaemolyticus</i> O13	10.6 ^{b)}	-	4.4	-	-	-	-	13.4	-	7.7	-
<i>V. nereis</i> ATCC 25917	21.2 ^{b)}	-	-	-	-	-	-	-	6.3 ^{c)}	3.8	-
<i>V. vulnificus</i> ATCC 27562	8.5 ^{b)}	-	-	0.9	-	-	-	-	-	13.2	-
<i>V. hollisae</i> ATCC 33564	9.4 ^{b)}	-	-	-	tr	-	-	-	-	8.1	-
<i>V. furnissii</i> ATCC 35016	13.4 ^{b)}	-	-	-	-	1.3	-	0.4	1.5 ^{c)}	5.8	-
<i>V. harveyi</i> ATCC 14126	11.0 ^{b)}	-	-	-	-	-	-	-	-	5.3	-
Lipid A											
<i>V. parahaemolyticus</i> O13	44.4 ^{b)}	-	-	-	9.7	-	-	-	-	3.1	51.0
<i>V. nereis</i> ATCC 25917	39.5 ^{b)}	-	-	-	8.3	-	-	-	-	3.6	63.0
<i>V. vulnificus</i> ATCC 27562	29.5 ^{b)}	-	-	-	7.8	-	-	-	-	2.2	69.9
<i>V. hollisae</i> ATCC 33564	26.0 ^{b)}	-	-	-	6.6	-	-	-	-	2.9	53.8
<i>V. furnissii</i> ATCC 35016	44.5 ^{b)}	-	-	-	9.4	-	-	-	-	2.8	69.3
<i>V. harveyi</i> ATCC 14126	30.7 ^{b)}	-	-	-	8.5	-	-	-	-	2.1	58.0

[略語] Glc : グルコース、Gal : ガラクトース、Hep : ヘプトース、GlcN : グルコサミン、GalN : ガラクトサミン、QuiN : キノボサミン、TBA : 過ヨウ素酸・チオバルピタール酸反応陽性物質 [脚注] a) アセトン乾燥菌体からの収率 (% , w/w)、b) LPS からの収率 (% , w/w)、c) KDO として定量、d) tr : 0.1 %以下

なわち、これら6菌種では、菌種によっては部分加水分解によって1～3種の構成糖が失われるものの、Frc. IIIが実質的にはそのLPSの多糖鎖に相当することが示された。従って、SDS-PAGEにおけるLPSの泳動パターンと、そのLPSから調製したDPS画分のゲル濾過における溶出パターンの間には相関関係が認められ、SDS-PAGEにおいて低分子領域に泳動されるLPSはリピージン・ユニットやホモポリマーで構成される高分子のO抗原多糖鎖をもたないことが化学的にも実証された。

考 察

本章では、Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (第9版)¹⁾に記載されたビブリオ属菌種以外に、新たに病原ビブリオとして認定されたいわゆる新病原ビブリオのLPSの性状とともに、ビブリオ科全体の菌種についてLPSの分子構築を検討した。

新病原ビブリオと称される菌種のLPSはいずれも他のビブリオ属細菌のLPSと共通する特徴、すなわち常法によってはKDOは検出されないが、LPS中にはリン酸化されたKDOの存在が認められた。*V. fluvialis*と*V. anguillarum*のそれぞれの生物型IIとしてそれぞれ分類されていた*V. furnissii*と*V. ordalii*のLPSは、生物型IのLPSとは異なる糖組成をもち、これらの菌株はLPSの糖組成の上からも生物型Iとは異なる菌種であることが示された。

SDS-PAGEとLPS多糖部のゲル濾過によってビブリオ科細菌LPSの分子構築を検討した結果、多くの菌種において非常に低分子量の糖鎖で構築されるLPSが存在することが明らかとなった。特にビブリオ属細菌においては本実験に使用した20菌種のうち16菌種が、またnon-O1 *V. cholerae*も血清型によっては低分子のLPSが存在することが示された。腸内細菌などの典型的なS型LPSではリピドAに隣接して10個程度の糖で構成されるコアが存在し、それに結合するO多糖側鎖の構造が血清学的特異性を決定する。コアは同一菌種では血清型の違いに拘らず同じか、または極めて類似した構造をもち、菌の血清学的特異性には

関与しない。一方、O多糖側鎖を欠損する変異株はR変異株と称され、そのLPSはコアのみの糖鎖で構成される。このようなR変異株では一般にrough(粗い)なコロニーを形成し、親株(すなわちS型株)の血清学的特異性が消失するとともに病原性も失われる。しかし、ビブリオ科細菌の多くの菌種では、その菌株がcolony morphology、血清学的特異性、さらに病原性においても明らかにS型細菌としての性状を示すにも拘らず、そのLPSはコアに相当する分子量の糖鎖で構成され、化学的にはR型LPSであった。特に腸炎ビブリオでは13種の血清型LPSのすべてがこのようなR型LPSであり⁷¹⁾、さらに第二章で行なったV. fluvialisとnon-O1V. choleraeのLPS多糖部の糖組成に基づく化学分類の結果から推察される如く、これらの菌種のうちにも多くの血清型株が同様なLPSをもつものと思われる。Kondoら²⁷⁾は腸炎ビブリオO12 LPSの全多糖鎖の構造を解明し、それが8種類10個の糖で構成されるdecasaccharideであることを化学的に実証した。その他の血清型の腸炎ビブリオLPSもO12のそれと同様か、または、さらに低分子の糖鎖で構成され、この低分子糖鎖、すなわち腸内細菌の如き通常のS型菌のLPSのコア多糖に相当する部分の構造の相違が腸炎ビブリオの血清学的特異性に反映されるものと思われる。このように、明瞭な血清学的特異性をもつにも拘らず化学的にはR型のLPSは、研究者によってはLOS(lipooligosaccharide)と称して^{6,7)}、長鎖のO多糖側鎖をもつS型LPSと区別される。LOSタイプのLPSをもつ細菌として、Haemophilus influenzae、Bordetella pertussis、Neisseria meningitidis、N. gonorrhoeae、Chlamydia trachomatisなど、いわゆるnon-enteric mucosal pathogen(非腸管粘膜感染症病原体)と称される一群の病原細菌が報告されている⁵⁾。しかし、ビブリオ科細菌は、ほぼすべてが腸管感染型の病原体(enteric mucosal pathogen)でありながら、その多くの菌種は上記のnon-enteric mucosal pathogenと同様にLOSタイプのLPSをもつことが本研究において初めて見出され、これらの菌種と腸内細菌LPSにおける生化学的または遺伝学的な性状の相違が明らかにされた。腸内細菌などでは多くの場合、R変異を生ずることによ

てその病原性が失われるが、LOS タイプの LPS をもつ腸管感染型病原菌 (enteric mucosal pathogen) の病原性と、その LOS タイプの LPS の構造との関係に大きな興味もたれる。

総 括

グラム陰性菌の LPSは内毒素として多彩な生物活性を示すと同時に、O 抗原として、その O 多糖鎖部の構造がグラム陰性菌の血清学的特異性の決定に関与する。本研究では第一章において、浜名湖の病変稚アユより分離された魚病原菌の一つである V. anguillarum についてその LPS の糖組成と血清型の関連および LPSの生物活性を追究した。V. anguillarum の 3 種の血清型およびこれらに属さない他の 2 つの血清型株の LPS の糖組成は、それぞれ明らかに異なり、本菌の血清型と LPSの糖組成との間に明瞭な相関が認められた。この成績は、病魚または養殖池等から分離された V. anguillarum は、その LPSの糖組成によって血清型を決定することができることを示すものであり、さらに、その他の菌種に関しても従来の生化学的性状や血清学的性状による細菌の分類に加えて、LPS 多糖部の糖組成に基づく化学分類の有用性を示唆するものであった。しかしながら、菌株の大量培養にはじまる LPS の抽出・精製には多大の時間と労力を要し、多数の菌株について、その LPSの糖組成を分析することは事実上不可能である。

そこで本研究では第二章において、少量の菌体から直接 LPS多糖鎖を調製することができる迅速簡便分離法の開発を試みた。すでにコレラ菌に対しては、菌体の熱酢酸抽出液からアセトンによる沈殿分画によって LPS 多糖鎖を調製する簡便法（原法）が開発されているが、この方法ではコレラ菌以外の一部のビブリオ科細菌から LPS多糖鎖を調製できないことが明らかとなった。このため、まずこの原法を改良して広くビブリオ科細菌に応用できる改良法を考案し、それを用いて、V. mimicus、V. vulnificus、V. fluvialis などの菌種について LPS多糖部の糖組成に基づく化学分類を行なった。しかし、この改良法によってもなお LPS多糖鎖を調製できない菌種が見出された。従って本研究においてはビブリオ科細菌のみならず、グラム陰性菌一般に広く適用でき、かつ、その調製標品の純度がより高い新たな LPS多糖鎖の画期的迅速簡便分離法の開発を試みた。S. Typhimurium を用いたモデル実験では、この新迅速簡便分

離法により LPS多糖鎖をほとんど夾雑物を含まない状態で分離することができ、また、菌体の熱酢酸抽出によって LPSから遊離した構成糖も回収することができた。本法を腸内細菌やいくつかのビブリオ科細菌に応用した結果、いずれの菌種においても、本法によって調製した標品と、それらの菌株から抽出・精製した LPSの多糖側鎖部の糖組成は定性的には完全に一致し、本法が広くグラム陰性菌に対して有効であることを実証した。さらに本研究では、上記の新迅速簡便分離法の応用として、V. fluvialis 35 種と non-O1 V. cholerae 160 種のすべての血清型株からそれらの LPS 多糖鎖を分離し、LPS 多糖部の糖組成に基づく化学分類を完成した。その結果、前述の改良法により行なわれた化学分類の結果と合わせて、これらの菌種それぞれに共通する LPS多糖部の化学的特徴と共に、ビブリオ科細菌の全菌種に共通する、他のグラム陰性菌 LPS とは異なる顕著な化学的特徴を明らかにした。

第三章ではビブリオ科細菌 LPS の分子構築を検討した。ビブリオ科細菌、特にビブリオ属の多くの菌種の LPSでは、その糖組成および第二章で行なった LPS多糖部の糖組成に基づく化学分類の結果から、高分子の多糖鎖をもたないことが示唆された。LPS の SDS-PAGE と、LPS より分離した多糖部のゲル濾過により、ビブリオ属の菌種では実験に用いた 20菌種中 16 菌種の LPS ではリピーティング・ユニットで構成される O 多糖鎖をもたないことが示された。またこれらの菌種以外でも、non-O1 V. cholerae の LPSは、血清型によっては同様に低分子の糖鎖で構成されていた。これらの菌種の LPS は、血清学的には明らかに S 型の O 抗原としての血清学的特異性を示すにも拘らず、化学的には腸内細菌の R 型 LPS に相当するものであり、その血清学的特異性はコアに相当する低分子の糖鎖によって決定されることが明らかとなった。このような低分子の糖鎖で構成される LPS、すなわち LOS タイプの LPS は、non-enteric mucosal pathogen である H. influenzae、B. pertussis、N. gonorrhoeae および N. meningitidis などの菌種に特徴的に見出されるものであるが、本研究において、enteric mucosal pathogen であるビブリオ属細菌の多くの菌種にも認められ、その病原性との関連性や

LPS 多糖鎖の生合成に関与する遺伝子レベルの観点から非常に興味もたれる。

以上、本研究によってグラム陰性菌 LPS 多糖鎖の新迅速簡便分離法が開発され、その有効性が実証されるとともに、本法を用いた LPS多糖部の糖組成に基づくビブリオ科細菌の化学分類によってビブリオ科細菌 LPS の多くの興味ある化学的特徴が明らかにされた。近年、細菌の分類や同定にはパルスフィールド電気泳動による泳動パターンや、PCR 法による特定遺伝子の解析などが多用されている。しかし遺伝子産物としての、特にグラム陰性菌の O 抗原決定因子である LPS多糖部の糖組成に基づく化学分類も、グラム陰性菌の分類と同定のために重要な一手段であることが本研究によって示されたものと考えられる。今後、病原グラム陰性細菌の環境および臨床分離株の数はますます増加するものと思われ、これらの分離株の化学的手段による同定や起源の推定において本迅速簡便分離法を応用できるものと期待できる。

謝 辞

本研究を行なうにあたり、終始御懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました恩師 城西大学薬学部 久恒和仁 教授に心より感謝致します。

また、数々の有益な御助言と御指導を賜りました城西大学 近藤誠一 助教授に心より感謝致します。

菌株分与ならびに生物学的試験において御協力をいただきました静岡県立大学 清水忠順 博士に深く感謝致します。

貴重な菌株を御分与していただきました国立感染症研究所 島田俊雄 博士、岡山大学 篠田純男 博士、大阪大学微生物病研究所 三輪谷俊夫、本田武司 両博士、東京都立衛生研究所 工藤康雄、太田建爾 両博士、宮崎大学 青木 宙、北尾忠利 両博士、北里大学 佐々木武二 博士、大阪府公衆衛生研究所 東 逸男 博士に深謝致します。

実験に際し、終始御協力をいただいた城西大学薬学部微生物学教室の諸氏に感謝するとともに GC / MS 分析の労をとられました城西大学機器センターの諸氏に感謝致します。

本論文の作成にあたり、御校閲と御教示を賜りました副査 城西大学 田中 昭 教授、副査 城西大学 森田 豊 教授に深く感謝致します。

実 験 の 部

【 実験の部 】

一般事項と全章に関する実験

1. 【 使用菌株 】

本研究に使用した菌株とその由来、および培養条件を表 E-1と表 E-2に示した。各菌株は振盪培養機、またはジャーファメンターで培養し、120 °Cで 20 分間加熱殺菌した後、連続遠心分離により集菌した。得られた菌体は蒸留水で 3回洗浄した後、アセトン乾燥菌体とした。

2. 【 LPS の抽出と精製 】

LPS は、アセトン乾燥菌体から Westphal ら³⁾のフェノール/水抽出法により抽出した。

アセトン乾燥菌体 (30 g) を 750 ml の 45 % フェノールに懸濁した後、水浴中で 65 °Cに加熱し、Ultra-turax (Janke & Kunkel Labortechnik) を用いて 5分間激しく攪拌した。懸濁液は、氷水中で 10 °Cに冷却した後、遠心分離 (14,000 × g、30分間) により水層、フェノール層および菌層に分離した。水層を分取した後、得られた水層と等容量の 5 % フェノールをフェノール層と菌層に加え、上述と同じ抽出操作を 2回繰り返した。得られた水層は、透析膜 UC36-32-100 (三光純薬株式会社、分画分子量 12,000 ~ 14,000) にて一夜透析し、溶存フェノールを除去した。その内液を遠心分離 (15,000 × g、10 分間) して不溶物を除去し、減圧下にて約 200 ml まで濃縮した。この濃縮液の超遠心分離 (105,000 × g、16 時間) によって得られた沈渣を凍結乾燥し、粗 LPS とした。粗 LPSは、蒸留水に溶解後、超遠心の反復 (105,000 × g、3 時間、6 回) によって洗浄し、精製した。

表 E-1 使用菌株と培養条件 (その1)

菌 株	由 来	培地と培養条件
<u>Vibrio anguillarum</u>		1.5 % 食塩加ブイヨン
PB-1	1	27°C、16 時間 (pH 7.4)
PT-24	2	〃
PT-514	2	〃
PT-213	3	〃
PT-496	3	〃
H-47	4	〃
H-60	4	〃
H-81	4	〃
H-88	4	〃
H-102	4	〃
H-103	4	〃
H-107	4	〃
H-124	4	〃
H-132	4	〃
H-137	4	〃
NCMB-6	4	〃
NCMB-828	4	〃
<u>O 1 Vibrio cholerae</u>	5	ハートインフュージョン培地
NIH-41		37°C、16 時間 (pH 7.8)
<u>Non-O 1 Vibrio cholerae</u>		ハートインフュージョン培地
O 2 ~ O 161	6	37°C、16 時間 (pH 7.8)
<u>Vibrio fluvialis</u>		1.5 % 食塩加ブイヨン
210-73	6	37°C、16 時間 (pH 7.4)
305-77	6	〃
306-77	6	〃
308-77	6	〃
NCTC 11327	6	〃
NCTC 11328	6	〃
<u>Vibrio fischeri</u>		2.0 % 食塩加ブイヨン
NCMB 1143	6	25°C、16 時間 (pH 7.4)
<u>Vibrio costicola</u>		2.0 % 食塩加ブイヨン
NCMB 701	6	27°C、16 時間 (pH 7.4)
<u>Yersinia enterocolitica</u>	6	普通ブイヨン
O 9		28°C、24 時間 (pH 7.0)
<u>Plesiomonas shigelloides</u>	6	1.5 % 酵母添加ハートインフュージョン培地
O 39		30°C、36 時間 (pH 6.0)
<u>Escherichia coli</u>	7	普通ブイヨン
O 111		37°C、16 時間 (pH 7.2)
<u>Shigella flexneri</u>	8	0.0002 % ニコチン酸添加ハートインフュージョン培地
RN-3		37°C、36 時間 (pH 7.2)
<u>Salmonella Typhimurium</u>	9	普通ブイヨン
LT2		37°C、16 時間 (pH 7.2)

[由来] 1 : 青木宙博士 (宮崎大学)、2 : 北尾忠利博士 (宮崎大学)、
 3 : 佐々木武二博士 (北里大学)、4 : 清水忠順博士 (静岡県立大学)、5
 : 大友信也博士 (化学および血清療法研究所・熊本)、6 : 島田俊雄博士
 (国立感染症研究所・東京)、7 : 甲斐明美博士 (都立衛生研究所)、8 :
 岡村 登博士 (東京医科歯科大学)、9 : 吉田昌男博士 (岩手医科大学)。

表 E-2 使用菌株と培養条件 (その2)

菌 株	由 来	培地と培養条件
<u>Vibrio vulnificus</u>		2.0 %食塩加ブイヨン
A-1420	10	27℃、16時間 (pH 7.4)
C-3010	10	〃
C-4123	10	〃
D-3383	10	〃
D-3892	10	〃
D-7232	10	〃
E-240	10	〃
E-571	10	〃
91-81	10	〃
1115-80	10	〃
1338-80	10	〃
1655-80	10	〃
1705-80	10	〃
Kitasato	11	〃
Sangyoidai	11	〃
ATCC 27562	14	〃
<u>Vibrio nereis</u>	10	2.0 %食塩加ブイヨン
ATCC 25917		27℃、16時間 (pH 7.4)
<u>Vibrio campbellii</u>	10	2.0 %食塩加ブイヨン
ATCC 25920		27℃、16時間 (pH 7.4)
<u>Vibrio natriegens</u>	10	2.0 %食塩加ブイヨン
ATCC 14018		27℃、16時間 (pH 7.4)
<u>Vibrio harveyi</u>	10	2.0 %食塩加ブイヨン
ATCC 14126		27℃、16時間 (pH 7.4)
<u>Vibrio mimicus</u>		1.5 %食塩加ブイヨン
ATCC 33653	12	37℃、16時間 (pH 7.4)
Smith 6306	12	〃
M 37	12	〃
M 64	12	〃
M 70	12	〃
<u>Vibrio damsela</u>	12	2.0 %食塩加ブイヨン
2588-80		27℃、16時間 (pH 7.4)
<u>Vibrio hollisae</u>	12	2.0 %食塩加ブイヨン
ATCC 33564		27℃、16時間 (pH 7.4)
<u>Vibrio parahaemolyticus</u>	13	3.0 %食塩加ブイヨン
O1 ~ O13		37℃、16時間 (pH 7.4)
<u>Vibrio proteolyticus</u>	14	2.0 %食塩加ブイヨン
ATCC 15338		27℃、16時間 (pH 7.4)
<u>Vibrio furnissii</u>	14	1.5 %食塩加ブイヨン
ATCC 35016		37℃、16時間 (pH 7.4)
<u>Vibrio ordalii</u>	14	1.5 %食塩加ブイヨン
ATCC 33509		27℃、16時間 (pH 7.4)

[由来] 10: 篠田純男博士 (岡山大学)、11: 東逸男博士 (大阪府公衆衛生研究所)、12: 工藤康雄、太田建爾両博士 (東京都立衛生研究所)、13: 三輪谷俊夫、本田武司両博士 (大阪大学微生物病研究所)、14: ATCC (American Type Culture Collection, Rockvill, U.S.A.) .

3. 【 化学分析法 】

3-1. 【 中性糖の分析 】

試料 3~5 mg を 1 ml の 2 Nトリフルオロ酢酸 (TFA) で 120℃、1 時間加水分解した後、減圧下で蒸発乾固した。残渣を 2 ml の 0.01 M 塩酸に溶解し、Dowex 50 (H⁺) カラムを通過させ、中性糖画分を分取した。中性糖画分は減圧下蒸発乾固させ、Laine ら⁷⁴⁾ の方法に従って、水素化ホウ素ナトリウム (NaBH₄) で還元 (室温、3 時間) した後、完全アセチル化 (無水酢酸 1 ml、100℃、2 時間) してアルジトール・アセテート誘導体とし、表 E-3 に示したプログラム 1 を用いる GLC および GC/MS により分析した。内部標準物質として Xyl を用いた。Fru の分析は、試料 3~5 mg を 1 ml の 5 %酢酸で 100℃、2 時間加水分解し、減圧下に蒸発乾固した後、上述と同じ方法により中性糖画分を分取し、Mawhinney ら⁷⁵⁾ の方法に従い、0-アセチル-0-メチルオキシム誘導体として、上記と同じ条件で GLC および GC/MS により分析した。

表 E-3 ガスクロマトグラフィーおよびガスクロマトグラフィー/マススペクトロメトリーの分析条件

プログラム	カラム	カラム温度	昇温	Injection 温度
プログラム 1	3 %-ECNSSM	160 ~ 190℃	2 °C/min	250 °C
プログラム 2	TABSORB	160 ~ 210℃	2 °C/min	250 °C
プログラム 3	25 %-DEGS	150 ~ 210℃	1 °C/min	250 °C

3 %-ECNSS-M (Support : Uniport HP, 3 mm × 2 m, ガスクロ工業)、
TABSORB (3 mm × 2 m, Regis Chemical Co.)、
25 %-DEGS (Support : Chromosorb WAW DMCS, 3 mm × 2 m, ガスクロ工業)、
キャリアーガス : 窒素、 検出器 : 水素炎イオン化型検出器。

3-2. 【 アミノ糖の分析 】

試料 3~5 mg を 1 ml の 4 M 塩酸で 100℃、8 時間加水分解後、

減圧下に蒸発乾固した。残渣を 2 ml の 0.01 M 塩酸に溶解させた後、Dowex 50 (H⁺) カラムを用いて、アミノ糖画分を得た。アミノ糖は減圧下に蒸発乾固させた後、Lüderitzら⁷⁶⁾の方法に従って、2 ml の炭酸水素ナトリウム水溶液中 20 μ l の無水酢酸で N-アセチル化(室温、1 時間)した後、中性糖の場合と同様に、NaBH₄ で還元後、完全アセチル化して、N-アセチル・アルジトール・アセテートとし、表 E-3 に示したプログラム 2を用いる GLC および GC/MS により分析した。また、PerN の分析は下記の如く行なった。試料 3~5 mg を Redmond⁷⁷⁾の方法に従い、0.5 ml の 10 M 塩酸で 90 °C、15 分間加水分解後、上記と同様に、Dowex 50 (H⁺)カラムによって分画したアミノ糖画分をN-アセチル化、還元、完全アセチル化して N-アセチル・アルジトール・アセテートとし、GLC および GC/MS により分析した。内部標準物質として Man を用いた。

3-3. 【 脂肪酸の分析 】

脂肪酸は、Haeffner ら⁷⁸⁾の方法に従い、試料 5~10 mg を 1 ml の 4 M 塩酸で 100°C、4 時間加水分解後、さらに 4 M 水酸化ナトリウム 1.67 ml (終濃度: 1 M 水酸化ナトリウム)を加え、引き続き 100 °C、2 時間加水分解し、加水分解液を塩酸酸性とした後、クロロホルムにより脂肪酸画分を抽出し、Rietschel ら⁷⁹⁾の方法によりジアゾメタン(0~4 °C、1 分間)でメチルエステルとして表 E-3 に示したプログラム 3を用いる GLC および GC/MS により分析した。内部標準物質としてノナデカン酸メチルエステル(ガスクロ工業)を用いた。

3-4. 【 GC/MS 分析 】

中性糖、アミノ糖および脂肪酸の同定は、GLC における各標準物質の相対保持時間と GC/MS (日本電子 DX-300) により行なった。GC/MS は GLC と同じ条件 (表 E-3) で行ない、Electron Impact Mass Spectrome

try (EI-MS) はイオン化電圧 72 eV で、Chemical Ionization Mass Spectrometry (CI-MS) は反応ガスとしてイソブタンを用いて行なった。

3-5. 【 呈色反応 】

全糖質は Dubois ら⁸⁰⁾ のフェノール/硫酸法、Hep は Osborn⁸¹⁾ のシステイン/硫酸法、全リンは Allen 法の Hisatsuneら⁸²⁾ による変法、蛋白質は Lowry ら⁸³⁾ の方法、KDO は Weissbach and Hurwitz⁹⁾ の TBA法、ウロン酸は Bitter and Muir⁸⁴⁾ のカルバゾール/硫酸法によりそれぞれ定量した。KDO およびウロン酸の呈色反応では、ともに対象糖以外の糖の存在によっても発色するため、反応液の吸収スペクトルを二波長分光光度計 (日立 557型) により測定し、標準物質のそれと比較した。

4. 【 KDO および KDOリン酸 (X) の 検出 】

X の検出には、LPS (5 mg) を 4 N 塩酸 (2 ml) で 100°C、45 分間加水分解後、その遠心上清を蒸発乾固した。残渣は少量の蒸留水に溶解して HVPE を行なった。また同残渣を Drewry ら⁸⁵⁾ の方法に従い、0.05 M 炭酸アンモニウム緩衝液 (pH 9.6, 0.5 ml) 中でアルカリ性ホスファターゼ (8.0 units, Sigma, Type III-R) を使い、37°C、16 時間アルカリ性ホスファターゼ処理を行なった後、同様に HVPE によって分析した。標準として用いた phosphoryl KDO は、Bordetella pertussis I 層菌 LPS の同様な加水分解産物から Dowex 50 (H⁺) と Dowex 1 (酢酸型) を用いるイオン交換クロマトグラフィーにより調製した。

HVPE は、Whatmann No.1 paper 上でピリジン/酢酸/水 (10:4:86、v/v/v) の溶媒系を用い、50 V/cm で 50 分間泳動した。濾紙上での KDO および X の検出は、Warren⁸⁶⁾ の方法に従い、チオバルビツール酸試薬により行なった。

5. 【 LPS の全多糖画分 (DPS画分) の調製 】

LPS の DPS 画分は、Galanos ら⁸⁷⁾ の方法に基づき、LPS を 5 % 酢酸 (10 mg/ml) で 100 °C、2~5 時間リピド A の沈殿を生ずるまで加水分解後、反応液を遠心分離し、その上清を減圧下に蒸発乾固して調製した。また、遠心沈渣は蒸留水で 3 回洗浄した後、凍結乾燥してリピド A 画分とした。得られた DPS 画分は、10 ml のピリジン/酢酸/水 (10:4:1000、v/v/v) に溶解し、遠心分離により不溶物を除去した後、Sephadex G-50 ゲルクロマトグラフィーに供した。

6. 【 ゲルクロマトグラフィー 】

DPS 画分のゲルクロマトグラフィーは、Sephadex G-50 カラム (2.6 × 100 cm、Pharmacia Fine Chemicals) を用い、ピリジン/酢酸/水 (10:4:1000、v/v/v) で 39 ml/hr の流速で溶出し、溶出液は 3 ml ずつ分画した。検出には、示差屈折率計 (島津 RID-6A 型) を用いるとともに、各フラクションの全糖質量および全リン量を測定した。

第一章に関する実験

1. 【 抗血清の調製 】

本研究に使用した菌株に対する抗 O 血清は、Shimada and Sakazaki⁸⁸⁾ の方法に従い、家兎を免疫して調製した。1.5 % 食塩添加ハートインフュージョン培地で 16 時間、至適温度で培養した菌体を滅菌生理食塩水に懸濁し、100 °C、2 時間加熱した後、滅菌生理食塩水で 3 回洗浄した。洗浄菌体は、620 nm における濁度が 1.0 になるように滅菌生理食塩水に懸濁させ、その 0.5 ml、1.0 ml、2.0 ml、4.0 ml をそれぞれ 4 日間隔で家兎に静脈注射した。最終投与から 1 週間後に心臓穿刺により全採血して抗血清を得た。

2. 【 受身溶血阻止試験 】

PHI 試験は Hisatsuneら⁸⁹⁾ の方法に従って行なった。PHI 試験に使用した感作血球は、SRBC packed cell (0.1 ml) に 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のアルカリ処理 (0.25 M 水酸化ナトリウム、56°C、1 時間) LPS⁸⁹⁾ (0.6 ml) を加え、37 °C、30 分間インキュベートして作成した。洗浄液および希釈液としては、0.15 mM 塩化カルシウム、0.5 mM 塩化マグネシウムおよび 0.83 % 食塩を含む 0.25 mM バルビツール酸緩衝液 (pH 7.4) を用いた。

PHI 試験は抗血清 0.1 ml に種々の濃度の inhibitor (LPS) 溶液 0.1 ml を加え、37°C、30 分間インキュベートした後、感作 SRBC 浮遊液 (0.2 ml) とモルモット補体 (10倍希釈液、極東製薬工業) 20 μl を加え、さらに、37 °C、30分間インキュベートした。反応後、1 ml の希釈液を加え、413 nm における吸光度を測定した。抗血清は 100 %溶血を示す最大希釈率のものを使用した。% 溶血阻止は下式により求め、各濃度の inhibitor 溶液の %溶血阻止の値をグラフ用紙にプロットして 50 % 溶血阻止濃度を求めた。対照としては、抗血清を含まない補体対照と inhibitor を含まない溶血対照を用いた。

$$\% \text{ 溶血阻止} = \left[1 - \frac{\text{ABS 413 [S]} - \text{ABS 413 [C]}}{\text{ABS 413 [H]} - \text{ABS 413 [C]}} \right] \times 100$$

ABS 413 [S] : 試料の 413 nm における吸光度

ABS 413 [H] : 溶血対照の 413 nm における吸光度

ABS 413 [C] : 補体対照の 413 nm における吸光度

3. 【 生物活性試験 】

intact LPS および各種アルカリ処理 LPSの生物活性試験は以下の方

法に従い行なった。

3-1. 【 リムルスライセートゲル化活性 】

エンドトキシンプリーの反应用試験管 (10×75mm, 内径 8mm) に *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL) 溶液 (和光純薬) を 0.1 ml ずつ氷冷下分注し、これに注射用蒸留水にて 0.0005 ~ 0.1 ng の範囲で段階希釈した被検液を 0.1 ml ずつ加え、アルミキャップをして静かに混和した後、37 °C で 60 分間静置加温した。加温終了後、試験管を取り出し振動を与えないように注意してゆっくりと 180° 転倒し、内容物が凝固して変形しない場合を陽性 (+)、半流動状にゲル化したものを半陽性 (±)、流動状のものを陰性 (-) と判定した。なお、対照として病原性大腸菌 *Escherichia coli* O111-B4 LPS (Sigma 社製)、または LAL 試薬に添付の *E. coli* UKT-B 株 LPS を用いた。なお、リムルスライセートゲル化活性試験に用いた器具はすべて 180°C、3 日間以上加熱し、エンドトキシンプリーとして使用した。

3-2. 【 抗腫瘍活性試験 】

抗腫瘍活性試験は、Fukushi ら⁹⁰⁾ の方法に従って行なった。Ehrlich 腹水型腫瘍を用いる試験では、ddY 系マウスを用い、腫瘍を 5×10^4 ~ 1×10^5 腹腔内に接種し、各 LPS 100 µg を腫瘍接種の 5 日前、2 日前、2 日後、5 日後、および 11 日後にそれぞれ腹腔内に投与し、その平均生存日数で活性を測定した。

4. 【 LPS の化学処理 】

4-1. 【 弱アルカリ処理 】

LPS の弱アルカリ処理は、Galanos ら⁸⁷⁾ の方法に従い、0.25N NaOH

(5 mg/ml) 中で 56 °C、1時間行なった。反応液は遠心分離 (20,000×g、30 分間) により遊離した脂肪酸を除去した。その遠心上清を 0.25 N HCl で中和後、蒸留水に 16 時間透析し、透析内液を凍結乾燥して弱アルカリ処理 LPS (0.25 N NaOH-LPS) とした。

4-2. 【 強アルカリ処理 】

LPS の強アルカリ処理は、Tanamoto ら⁹¹⁾ の方法に従い、4N NaOH (20 mg/ml) 中で 100°C、5 時間行なった。反応液は 4N HCl を加えて弱酸性とした後、遊離した脂肪酸をクロロホルムで抽出除去し、蒸留水中にて 16 時間透析した。透析内液を凍結乾燥し、強アルカリ処理 LPS (4 N NaOH-LPS) とした。

4-3. 【 ヒドロキシルアミン処理 】

ヒドロキシルアミン処理は、Snyder and Stephens⁹²⁾ の方法に従い、LPS にヒドロキシルアミン試薬 (10 mg/ml) を添加後、63°C、3 分間加熱処理した。反応溶液を塩酸で酸性とした後、クロロホルムにて遊離脂肪酸を抽出除去し、蒸留水に 16 時間透析した。得られた透析内液を凍結乾燥し、ヒドロキシルアミン処理 LPS (NH₂OH-LPS) とした。

4-4. 【 ヒドラジン処理 】

Hase and Rietschel⁹³⁾ の方法に従い、試料を真空下 50 °C、16時間乾燥後、無水ヒドラジン (10 mg/ml) を加え、密封容器中にて 100 °C、40 時間加熱した。反応溶液を蒸留水にて 40 時間透析後、25,000 ×g、20分間遠心し、その遠心上清を凍結乾燥してヒドラジン処理 LPS (NH₂NH₂-LPS) とした。

4-5. 【 ナトリウムメチラート処理 】

ナトリウムメチラートによるエステル交換反応は、Rietschel ら⁷⁹⁾の方法により、LPS を 0.25 N NaOCH₃ (2 mg/ml) で 37 °C、10時間処理した後、反応液を 0.25 N HCl で中和した。遊離した脂肪酸をクロロホルムで抽出除去後、蒸留水で16時間透析し、透析内液を凍結乾燥してナトリウムメチラート処理 LPS (NaOCH₃-LPS) とした。

第三章に関する実験

1. 【 ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 】

LPS の SDS-PAGE は、Laemmli⁹⁴⁾の方法に従って行なった。0.4~4.0 mg/ml の LPS 溶液 100 μ l に 2 % SDS、20 % シュークローズ、1 % 2-メルカプトエタノールおよび 0.001 % プロモフェノールブルーを含む 0.1 M Tris / HCl buffer (pH 6.8) 100 μ l を加え、100 °C、5 分間加熱処理した後、この 10 μ l を SDS-PAGE に供した。泳動用ゲルとしては、14 % アクリルアミド分離ゲルと 4 % アクリルアミド重層ゲルからなるスラブゲル (13.5 cm \times 12 cm \times 1 mm) を用いた。14 % アクリルアミド分離ゲルは、30 % アクリルアミド 9.3 ml、1.875 M Tris / HCl 緩衝液 (pH 8.8) 4.0 ml、2 % SDS 1.0 ml および蒸留水 5.5 ml の混液に 10 % 過硫酸アンモニウム 0.2 ml と N,N,N',N'-tetra-methyl-ethylene-diamine (TEMED) 20 μ l を加えて作成した。4 % アクリルアミド重層ゲルは、30 % アクリルアミド 1.3 ml、0.625 M Tris / HCl buffer (pH 6.8) 2.0 ml、2 % SDS 0.5 ml および蒸留水 6.1 ml の混液に 10 % 過硫酸アンモニウム 0.1 ml と TEMED 10 μ l を加えて作成した。泳動用 buffer には 0.96 M グリシンと 0.5 % SDS を含む 0.125 M Tris buffer (pH 8.3) を用い、30 mA / ゲルの定電流にて約 5時間泳動した。泳動終了後、重層ゲルを除去し、分離ゲルをエ

タノール／酢酸／水 (40:10:50、v/v/v)固定液 (400 ml) に移し、ロータリーシェーカー (TAITEC) を用いて 30 分間振盪した。固定液をアスピレーターにより吸引・除去した後、14 % 過ヨウ素酸／エタノール／酢酸／水 (5:40:5:50, v/v/v/v) 混液 400 ml を注ぎ 5分間振盪した後、蒸留水で各 15 分、6回洗浄した。ゲル上の LPS 成分の染色は、Tsai and Frasch⁹⁵⁾の方法に従い銀染色により行なった。染色には銀染色用試薬キット (第一化学薬品) を使用した。

【 引用文献 】

- 001 Baumann, P. and Schubert, R. H. W. (1984). In : Krieg, N. R. (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1, pp. 516-550. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- 002 Pfeiffer, R. (1892). *Z. Hyg. Infektkr.*, 11, 393-412.
- 003 Westphal, O., Lüderitz, O. and Bister, F. (1952). *Z. Naturforschung*, 7 b, 148-155.
- 004 久恒和仁. (1997). 戸田新細菌学, 天児和暢・南嶋洋一編, 第31版, 210-212.
- 005 Hitchcock, P. J., Leive, L., Mäkelä, P. H., Rietschel, E. T., Strittmatter, W. and Morrison, D. C. (1986). *J. Bacteriol.*, 166(3), 699-705.
- 006 Schneider, H., Hale, T. L., Zollinger, W. D., Seid, R. C., Hammack, C. A. and Griffiss, J. M. (1984). *Infect. Immun.*, 45(3), 544-549.
- 007 Mandrell, R., Schneider, H., Apicella, M., Zollinger, W., Rice, P. A. and Griffiss, J. M. (1986). *Infect. Immun.*, 54(1), 63-69.
- 008 Hisatsune, K., Kondo, S., Iguchi, T., Machida, M., Asou, S., Inaguma, M. and Yamamoto, F. (1982). *Microbiol. Immunol.*, 26(8), 649-664.
- 009 Weissbach, A. and Hurwitz, J. (1959). *J. Biol. Chem.*, 234, 705-709.
- 010 Brade, H. (1985). *J. Bacteriology* 161(2), 795-798.
- 011 Kondo, S., Haishima, Y. and Hisatsune, K. (1991). *Microbiol. Immunol.*, 35(8), 675-680.
- 012 Kondo, S., Haishima, Y. and Hisatsune, K. (1990). *FEMS Microbiol. Lett.*, 68, 155-158.

- 013 Kondo, S., Haishima, Y., and Hisatsune, K. (1992). Carbohydr. Res., 231, 55-64.
- 014 Hisatsune, K., Iguchi, T., Haishima, Y., Tamura, N. and Kondo, S. (1993). Microbiol. Immunol., 37(2), 143-147.
- 015 Kenne, L., Lindberg, B. and Unger, P. (1979). Carbohydr. Res., 68, C14-C16.
- 016 Redmond, J. W. (1979). Biochem. Biophys. Acta, 584, 346-352.
- 017 Hisatsune, K., Kondo, S., Isshiki, Y., Iguchi, T. and Haishima, Y. (1993). Biochem. Biophys. Res. Commun., 190(1), 302-307.
- 018 Isshiki, Y., Haishima, Y., Kondo, S. and Hisatsune, K. (1992). Microbiol. Immunol. 36 (11), 1201-1205.
- 019 Isshiki, Y., Haishima, Y., Kondo, S. and Hisatsune, K. (1995). Eur. J. Biochem., 229, 583-588.
- 020 Isshiki, Y., Kondo, S., Haishima, Y., Iguchi, T. and Hisatsune, K. (1996). J. Endotoxin Res., 3(2), 143-149.
- 021 Chowdhury, T. A., Jansson, P., Lindberg, B., Lindberg, J., Gustafsson, B. and Holme, T. (1991). Carbohydr. Res., 215, 303-314.
- 022 Haishima, Y., Kondo, S. and Hisatsune, K. (1990). Microbiol. Immunol., 34(12), 1049-1054.
- 023 Kondo, S., Sano, Y., Isshiki, Y. and Hisatsune, K. (1996). Microbiology, 142, 2879-2885.
- 024 Sano, Y., Kondo, S., Isshiki, Y., Shimada, T. and Hisatsune, K. (1996). Microbiol. Immunol., 40(10), 735-741.
- 025 Hisatsune, K., Kondo, S., Isshiki, Y., Iguchi, T., Kawamata, Y. and Shimada, T. (1993). Biochem. Biophys. Res. Commun., 196 (3), 1309-1315.
- 026 Hisatsune, K., Kiuye, A. and Kondo, S. (1980). Microbiol. Immunol., 24(8), 691-701.

- 027 Kondo, S., Zähringer, U., Seydel, U., Sinnwell, V., Hisatsune, K. and Rietschel, E. T. (1991). *Eur. J. Biochem.* 200, 689-698.
- 028 Kondo, S. and Hisatsune, K. (1989). *Microbiol. Immunol.*, 33(8), 641-648.
- 029 Bergman, A. M. (1909). *Ber. Kgl. Bayer. Biol. Vers.-Stat. München*, 2, 10-54.
- 030 Haastein, T. and Holt, G. (1972). *J. Fish. Biol.* 4, 33-37.
- 031 Egidius, E., and Andersen, K. (1977). *Aquaculture.* 10, 215-219.
- 032 Ross, A. J., Martin, J. E. and Bressler, V. (1968). *Bull. Off. Int. Epizoot.*, 69, 1139-1148.
- 033 Evelyn, T. P. T. (1971). *J. Fish. Res. Bd. Canada* 28, 517-525.
- 034 Hoshina, T. (1956). *J. Tokyo Univ. Fish.* 42(1), 15-16.
- 035 齊藤 豊, 佐野昭子, 大鶴正満, 神田一男 (1956). *衛生動物*, 7(2), 109-110.
- 036 Hoshina, T. (1957). *J. Tokyo Univ. Fish.* 43(1), 59-66.
- 037 Muroga, K., and Egusa, S. (1967). *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 33(7), 636-640.
- 038 Nybelin, O. (1935). *Medd. Undersökn-anst. Sötvattenfish. Stockholm*, No.8, 62 pp.
- 039 Smith, I. W. (1962). *Scot. Dept. Agr. Fish. Res. Ser. No. 27*, 12 pp.
- 040 楠田理一, 佐古 浩, 川合研児 (1979). *魚病研究*, 13(3), 123-137.
- 041 楠田理一, 川合研児, 佐古 浩 (1981). *Rep. Usa mar. biol. Inst.* 3, 89-95.
- 042 三淵一二, 柳原保武, 清水忠順, 牛山宗弘 (1983). *魚病研究*, 18(1), 19-25.

- 043 三淵一二, 高瀬善行, 柳原保武, 清水忠順 (1983). 魚病研究, 18(1), 27-30.
- 044 Salati, F. and Kusuda, R. (1986). Fish Pathology, 21(3), 193-199.
- 045 Chaby, R. and Szabo, L. (1975). Eur. J. Biochem. 59, 277-280.
- 046 井口毅裕、近藤誠一、久恒和仁. (1989). 日細菌誌., 44(6), 805-812.
- 047 Shimizu, T., Itoh, Y., Mifuchi, I., Iguchi, T., Kondo, S. and Hisatsune, K. (1983). Gann, 74, 279-284.
- 048 久恒和仁、井口毅裕、近藤誠一、稲熊 眞、清水忠順、柳原保武、三淵一二. (1981). 日細菌誌., 36(1), 351.
- 049 Johnsen, G. S. (1977). Aquaculture, 10, 221-230.
- 050 絵面良男、田島研一、吉水 守、木村喬久 (1980) . 魚病研究, 14(4), 167-179.
- 051 Kitao, T., Aoki, T., Fukudome, M., Kawano, K., Wada, Y., and Mizuno, Y. (1983). J. Fish Dis., 6, 175-181.
- 052 Wilkinson, S. G. (1977). In : Sutherland, I. W. (ed.), Surface Carbohydrates of the Prokaryotic Cell, pp. 97-175. Academic Press, New York.
- 053 Shimizu, T., Matsusaka, E., Masuzawa, T., Yanagihara, Y., Mifuchi, I., Iguchi, T., Kondo, S. and Hisatsune, K. (1984). Chem. Pharm. Bull., 32(10), 4165-4169.
- 054 Kondo, S., and Hisatsune, K. (1988). Microbiol. Immunol. 32(9), 907-915.
- 055 Iguchi, T., Kondo, S. and Hisatsune, K. (1989). Microbiol. Immunol., 33(10), 833-841.
- 056 Shimada, T., and Sakazaki, R. (1984). Japan. J. Med. Sci. Biol., 37, 241-246.
- 057 personal communication

- 058 Hisatsune, K., Iguchi, T. and Kondo, S. (1990). *System. Appl. Microbiol.*, 13, 320-326.
- 059 Shimada, T., Kosako, Y., Inoue, K., Ohtomo, M., Matsushita, S., Yamada, S. and Kudoh, Y. (1991). *Curr. Microbiol.*, 22, 335-337.
- 060 Hisatsune, K., Kondo, S., Iguchi, T., Machida, M., Asou, S., Inaguma, M. and Yamamoto, F. (1982). *Microbiol. Immunol.*, 26(12), 1133-1138.
- 061 Kondo, S., Iguchi, T. and Hisatsune, K. (1988). *J. Gen. Microbiol.*, 134, 1699-1705.
- 062 Kondo, S., Zähringer, U., Rietschel, E. T. and Hisatsune, K. (1989). *Carbohydr. Res.*, 188, 97-104.
- 063 Shimada, T., Nair, G. B., Deb. B. C., Albert, M. J., Sack. R. B. and Takeda, Y. (1993). *Lancet*, 341, 1347.
- 064 Shimada, T., Arakawa, E., Itho, K., Okitsu, T., Matsushima, A., Asai, Y., Yamai, S., Nakazato, T., Nair, G. B., Albert, M. J. and Takeda, Y. (1994). *Curr. Microbiol.*, 28, 175-178.
- 065 Kondo, S., Kawamata, Y., Sano, Y., Iguchi, T. and Hisatsune, K. (1997). *System. Appl. Microbiol.*, 20, 1-11.
- 066 Iguchi, T., Kondo, S. and Hisatsune, K. (1993). *Microbiol. Immunol.*, 37(2), 153-157.
- 067 Kondo, S., Iguchi, T. and Hisatsune, K. (1980). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 97, 437-442.
- 068 Kondo, S., Iguchi, T., Haishima, Y., Isshiki, Y. and Hisatsune, K. (1989). *Microbiol. Immunol.*, 33(12), 1045-1052.
- 069 Kondo, S., Ishida, K., Isshiki, Y., Haishima, Y., Iguchi, T. and Hisatsune, K. (1993). *Biochem. J.*, 292, 531-535.
- 070 Kondo, S., Haishima, Y. and Hisatsune, K. (1993). *FEMS Microbiol. Lett.*, 106, 93-98.

- 071 Iguchi, T., Kondo, S. and Hisatsune, K. (1995). FEMS Microbiol. Lett., 130, 287-292.
- 072 Shimada, T. and Sakazaki, R. (1988). J. Appl. Bacteriol., 64, 141-144.
- 073 Isshiki, Y., Kondo, S., Iguchi, T., Sano, Y., Shimada, T. and Hisatsune, K. (1996). Microbiology, 142, 1499-1504.
- 074 Laine, R. A., Stellner, K. and Hakomori, S. (1974). In : Korn, E. E. (ed.), Methods in Membrane Biology, vol. 2, pp. 228-244. Plenum Press, New York.
- 075 Mawhinney, T. P., Feather, M. S., Martinez, J. R. and Barbero, G. J. (1979). Carbohydr. Res., 75, C21-C23.
- 076 Lüderitz, O., Ruschmann, E., Westphal, O., Raff, R. and Wheat, R. (1967). J. Bacteriol., 93(5), 1681-1687.
- 077 Redmond, J. W. (1975). FEBS Lett., 50(2), 147-149.
- 078 Haeffner, N., Chaby, R. and Szabo, L. (1977). Eur. J. Biochem., 77, 535-544.
- 079 Rietschel, E. T., Gottert, H., Lüderitz, O. and Westphal, O. (1972). Eur. J. Biochem., 28, 166-173.
- 080 Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. (1956). Anal. Chem., 28(3), 350-356.
- 081 Osborn, M. J. (1963). Biochemistry, 50, 499-506.
- 082 Hisatsune, K., DeCourcy, S. J. and Mudd, S. (1967). Biochemistry, 6(2), 586-594.
- 083 Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- 084 Bitter, T. and Muir, H. M. (1962). Anal. Biochem., 4, 330-334.
- 085 Drewry, D. T., Gray, G. W. and Wilkinson, S. G. (1971). Eur. J. Biochem., 21, 400-403.

- 086 Warren, L. (1960). *Nature*, 186, 237.
- 087 Galanos, C., Rietschel, E. T., Lüderitz, O. and Westphal, O. (1971). *Eur. J. Biochem.*, 19, 143-152.
- 088 Shimada, T. and Sakazaki, R. (1973). *Japan. J. Med. Sci. Biol.*, 26, 155-160.
- 089 Hisatsune, K., Kondo, S. and Kobayashi, K. (1978). *Japan. J. Med. Sci. Biol.*, 31, 181-184.
- 090 Fukushi, K., Asano, H. and Sasaki, J. (1981). *In* : Yamamura, Y. (ed.), *Proceedings of International Symposium*, pp. 395-398. *Excerpta Medica*.
- 091 Tanamoto, K., Abe, C., Homma, Y. and Kojima, Y. (1979). *Eur. J. Biochem.*, 97, 623-629.
- 092 Snyder, F. and Stephens, N. (1959). *Biochem. Biophys. Acta*, 34, 244-245.
- 093 Hase, S. and Rietschel, E. T. (1976). *Eur. J. Biochem.*, 63, 101-107.
- 094 Laemmli, U. K. (1970). *Nature*, 227, 680-685.
- 095 Tsai, C. M. and Frasch, C. E. (1982). *Anal. Biochem.*, 119, 115-119.