

コレラ菌が産生するHemagglutininとその分布について

内村真佐子 三瓶 憲一 小岩井健司 七山 悠三

Distribution of the Hemagglutinins Produced by *Vibrio cholerae*

Masako UCHIMURA, Kenichi SANBE, Kenji KOIWAI and Yuuso NANAYAMA

Summary

Investigation of the distribution of hemagglutinins(HA) produced by *Vibrio cholerae* revealed that all classical and El Tor vibrios examined produced cell associated HA and the cell associated HAs were classified into five HA patterns.

Vibrio cholerae produced soluble HA which agglutinated with human A erythrocytes transiently in early log phase growth.

I はじめに

El Torコレラ菌が、ヒト・ニワトリなど数種の動物の赤血球を凝集する性質があることは以前から知られており、Finkelsteinらは¹⁾この性質を利用して簡単にclassicalとEl Torコレラ菌が区別できることを報告している。

一方、近年細菌の定着因子に関する研究が多数行なわれており、毒素原性大腸菌が産生するHemagglutinin(HA)は菌の小腸粘膜への定着に関与することが、すでに報告されている。^{2,3)} Jonesらは^{4,5)}1976年、コレラ菌は*in vitro*でウサギ小腸 brush borderに付着し、その反応は、D-MannoseあるいはL-Fucoseにより阻害されることを報告した。又Jonesらはその報告の中で、コレラ菌がL-Fucoseにより阻害されるヒト赤血球凝集反応を示すことから、HAと小腸粘膜付着能との間に関連があることを示唆している。更にFinkelsteinらは⁶⁾部分精製したコレラ菌 solubleHA (コレラLectin)を用い、このHAが、*in vitro*ではウサギ肝臓へ、そして*in vivo*では幼若ウサギ腸管へのコレラ菌付着を阻止することを報告している。

このように、古くからコレラ菌の生物型鑑別の一手段として用いられているコレラ菌HAは、コレラ発症の機構に含まれる種々の因子のうちの一つとして、その詳細な性状や機能の解明に興味を持たれている。そこで我々は、コレラ菌が生産するHAの分布を明らかにすることを目的として、1978年以後にヒト及び河川から分離したEl Torコレラ菌及び実験室保存コレラ菌について、HAの産生能を調べたので、その結果を報告する。

II 材料及び方法

(1) 菌株：試験に用いた菌株とその由来をTable 1に示す。1978年以後に分離されたEl Torコレラ菌のうち、CVC-11 CVC-12a, CVC-12bの3株は河川由来であり、残りの5株はヒト由来である。

Table 1. *Vibrio cholerae* strains, characteristics and origins.

Biotype	Strain	Serotype	Source
Classical	VC 100	Ogawa	India 1961
	VC 154	Ogawa	India 1957
	NIH 41	Ogawa	India 1940's
El Tor (preserved)	59729	Ogawa	Philippine 1968
	3661	Ogawa	Mecca 1930
	NCTC 6563	Inaba	India 1930
	Ubon 13	Ogawa	Ubon 1959
El Tor (fleshly isolated)	CVC 1	Inaba	ToKyo 1978
	CVC 14	Inaba	Chiba 1980
	CVC 13	Inaba	Chiba 1980
	79-514	Ogawa	Tokyo 1979
	80-61	Ogawa	Tokyo 1980
	CVC 11	Inaba	Chiba 1979
	CVC 12a	Inaba	Chiba 1979
CVC 12b	Inaba	Chiba 1979	

(2) 培地及び Buffer：コレラ菌の培養に用いた培地は、Trypticase soy broth (BBL), Trypticase soy agar (BBL), Heart infusion broth (栄研化学), Heart infusion agar (栄研化学), CFA broth 及び CFA agar である。Bufferは KRT⁴⁾を用いた。

(3) 培養方法：50mlの培地を入れた三角フラスコ(500 ml)に、約 10^6 コ/mlになるようにコレラ菌を接種し、30°Cで

振とう培養した。培養液を経時的に採取し、1200 g 30分間遠心分離後、上清については、soluble HAの測定を行ない、菌体については、600 nmで吸光度0.2になるようにKRTで調整した後、cell associated HAを測定した。寒天培地では、37°C16時間培養後、菌を少量のKRTに浮遊させ遠心分離し、菌体を600nmで吸光度0.2に調整した。

(4) 赤血球液：クエン酸ナトリウム存在下で採取した血液を3回洗浄後、packed cellを1%濃度に希釈し用いた。responder ニワトリ赤血球は、5羽のニワトリのうち最も高いsoluble HA価を示したものをを用いた。ヒトA型赤血球は、volunteer より採血し、実験はすべて同一個体から得た血球液で行なった。

(5) HA活性の測定：HA活性は、Jonesらの方法⁴⁾に従い測定した。600 nmで吸光度0.2に調整したコレラ菌液あるいは培養上清を、マイクロタイタープレート(Nunk社製)中で25 μ lの定量ダイルターを用い系列希釈した。次に1%赤血球を25 μ l加え攪拌した後、室温に30分から1時間放置し判定した。糖による血球凝集阻害実験は、同様に検体を系列希釈した後、1 mg/ml濃度のL-Fucose

あるいは10mg/ml濃度のD-Mannoseを25 μ l加えた後に1%血球液を加えた。希釈液はすべてKRTを用いた。

III 結果

(1) HA産生用培地の検討：コレラ菌は、菌体に附着しているHA (cell associated HA) と菌体外に放出するHA(soluble HA)を産生する。cell associated HAは、ニワトリ、ヒトA型、ヒトO型などの赤血球を凝集する。一方soluble HAはヒトの血球はわずしか凝集せず、一部のニワトリ(responder)赤血球をよく凝集する性質がある。

我々は、classical コレラ菌VC154株及びEl Tor コレラ菌CVC-11株を用い、培地によるHA産生状況の比較を行った。soluble HAは、Heart infusion broth, Trypticase soy brothでよく産生されたが、CFA brothでは高いHA価は得られなかった。cell associated HAは、どの培地を用いた場合でも、菌体当りの活性はほぼ同程度であった。(Fig 1)一方、寒天培地を用いた場合、VC154株はほとんどcell associated HAの産生を認めなかった。

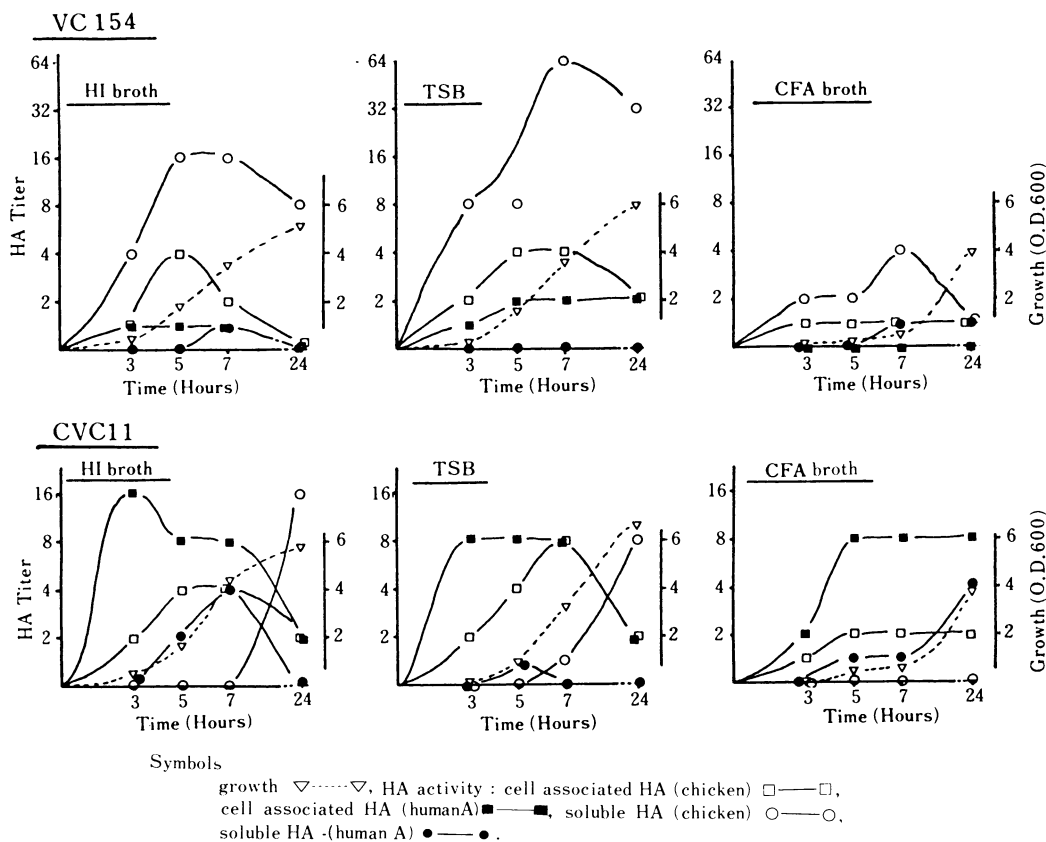


Fig.1 HA production of *V. cholerae* in various medium

これらの結果に基づいて、以後の実験には Trypticase soy brothを用いた。

(2) HA の分布 : classical コレラ菌3株, 実験室保存

El Tor コレラ菌4株及び新鮮分離 El Tor コレラ菌8株のHA産生状況を調べた。菌は, Trypticase soy broth 中, 30°Cで11時間振とう培養し, 経時的に cell associated HA価及び soluble HA 価を測定した。(Table 2)

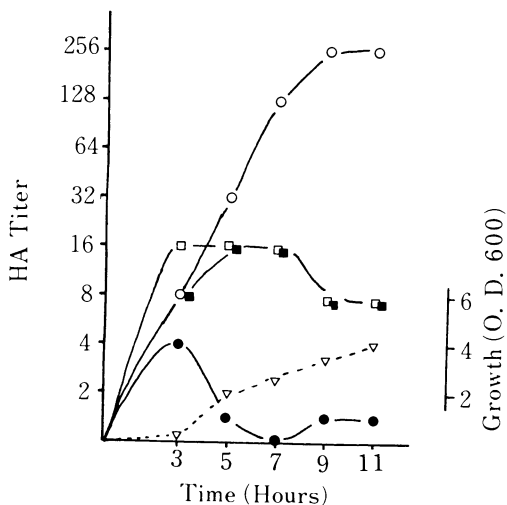
Table 2. Distribution of cell associated and soluble HA produced by *Vibrio cholerae*

V. cholerae biotype	No. of strains tested	No. of HA positive strains		
		cell associated	soluble HA	
			H A	Hu ^a
classical	3	3	1	2
El Tor (preserved)	4	4	4	2
El Tor (freshly isolated)	8	8	7	8

a. Human type A erythrocytes.
b. Chicken erythrocytes.

すべての株は cell associated HA を産生し, ヒト及びニワトリ赤血球に対しほぼ同程度のHA価を示した。このHAは, log phaseの初期から検出され, 11時間にわたる培養の間, 菌体当りの凝集価はほぼ同程度であった。一方 soluble HAは, classical コレラ菌1株, 保存 El Tor コレラ菌2株, 新鮮分離菌1株で検出されなかった。これらの soluble HAが検出されなかった4株のうち, 保存 El Tor 菌1株は培地中で十分発育していたが, 他の3株は発育が悪く, 11時間振とう培養後, 培養液の吸光度(600 nm)はそれぞれ0.8, 0.5, 0.3であった。classical コレラ菌3株及び保存 El Tor 菌4株では, soluble HAは, log phase初期から検出された。新鮮分離 El Tor 菌では, log phase初期からHA産生が見られたのは4株のみで, 3株は, log phase中期以後にHAが検出された。これらの responder ニワトリ赤血球でのみ検出できる soluble HAに加えて, 我々は, ヒトA型赤血球を用いて培養上清のHA活性を調べた。その結果, 15株中12株に, ヒトA型赤血球を凝集する soluble HAを検出した。responder ニワトリ赤血球に対するHA価は, 菌の発育と共に増加するのに比べ, ヒト赤血球に対するHAは, 培養の初期に一時的に検出され, その価は1倍から8倍と低く, 菌株により差があった。(Fig 2)

(3) L-Fucose, D-MannoseによるHAの阻止: 今までに知られているコレラ菌 cell associated HAには, L-Fucoseによって阻害されるFSHA, D-Mannoseによって阻害されるMSHA及びこれらの糖の影響を受けないHAの三種類がある。⁷⁾今回, 実験に供した15株のうち, FSHA産生株は



Symbols

growth $\nabla \cdots \nabla$
HA activity
cell associated HA (chicken) $\square \text{---} \square$
cell associated HA (human A) $\blacksquare \text{---} \blacksquare$
soluble HA (chicken) $\circ \text{---} \circ$
soluble HA (human A) $\bullet \text{---} \bullet$

Fig.2 HA production of *V. cholerae* strain

CVC 1

2株, MSHA産生株は5株であった。FSHA産生株は2株共保存 El Tor 菌であったが, MSHAは, classical コレラ菌1株, 保存 El Tor 菌1株, 新鮮分離 El Tor 菌3株で産生が見られた。我々は更に, L-Fucose, D-MannoseのHAに対する影響について, ヒトA型及びニワトリ赤血球を用いて調べた。その結果, MSHA及びFSHAの中に, ニワトリ赤血球での反応のみが阻害されるHAと, ヒト・ニワトリ両赤血球に対する反応が阻止されるHAがあることがわかった。すなわち, ヒト及びニワトリ赤血球に対する凝集反応が, D-MannoseあるいはL-Fucoseによって阻害されるかどうかを検討することによって, コレラ菌が産生する cell associated HAを5つの型に分類することができた。(Table 3)

Table 3.

HA patterns of *V. cholerae*
(Cell associated Hemagglutinin)

No. of strains positive for each HA pattern			H A patterns ^a			
Classical	El Tor (preserved)	El Tor (freshly isolated)	D-Mannose		L-Fucose	
			Hu	Ck	Hu	Ck
2	1	5	R ^b	R	R	R
1	1	2	R	S ^c	R	R
0	0	1	S	S	R	R
0	1	0	R	R	S	R
0	1	0	R	R	S	S

a: Erythrocytes tested : Hu, Human A : Ck, Chicken Sugar : D-Mannose 10mg/ml, L-Fucose 1mg/ml
 b: Resistant : HA is not affected by the sugar.
 c: Sensitive : HA is affected by D-Mannose or L-Fucose.

IV 考察

コレラ菌が産生するHAは菌の小腸への定着に関与するのではないかと報告が、いくつかなされている。⁵⁾ すなわちJonesらは、cell associated FSHAが adhesive factorである可能性を示しており、Finkelstein⁶⁾らは、responderニワトリ赤血球を特異的に凝集する soluble HA (コレラ Lectin)が、菌の腸管上皮細胞への付着を仲介することを強調している。しかし、複雑なコレラ菌の小腸粘膜への付着一定着機構の中で、どのようにしてHAが動くのかについては、未だ明らかにされておらず、HAの病因学的役割については確立されていない。

Jonesら及びFinkelsteinらの研究により、コレラ菌が産生するHAには、FSHA,MSHA,糖による阻害を受けないHAの三種類のcell associated HAと、responderニワトリ赤血球に対し特異性を持つ soluble HAの存在が明らかにされてきた。本報では更に、コレラ菌が、ヒトA型赤血球を凝集し、L-Fucose,D-Mannoseによって阻害されない soluble HA (soluble HA-2)を生産することを明らかにした。このHAは、培養の初期に一時的に検出され、今回供試した15株中12株で産生が見られた。しかし未だこの soluble HA-2は単離精製されていないため、Finkelsteinらのコレラ Lectin や cell associated HAとの異同等、詳しい性状については明らかにされていない。ごく最近、Finkelstein⁸⁾らは、コレラ Lectinを精製し、それがHA反応を示すと同時に protease活性を有

することを報告した。我々が明らかにした soluble HA-2は、コレラ Lectinに先行して、あるいは同時に産生されることから、菌の小腸上皮細胞への付着に関与するかどうかを含めて、このHAがどのような性状を示すのか興味を持たれる。

Hanne⁷⁾らは、classicalコレラ菌4株中2株が、培養初期に一時的にFSHAを産生し、El Torコレラ菌はMSHAを産生することを報告している。今回、我々の実験では、試験を行なったすべての株が cell associated HAを恒常的に産生し、それらのHAは、ヒトA型あるいはニワトリ赤血球凝集反応の、D-MannoseあるいはL-Fucoseによる阻止パターンにより、5種類に分類することができた。Evans⁹⁾らは、病原性大腸菌のHAパターンを5種類に分け、そのI型あるいはII型が、それぞれCFA/I、CFA/IIを産生する毒素原性大腸菌が示すHAパターンに担当することを報告している。

コレラ菌においては、ここに示したHAパターンと colonization factorとの関連は、今後検討されるべき問題である。El Tor菌が産生する cell associated HAが5種類に分類されたことは、むしろ、このHAパターンがコレラ流行時の疫学調査の一手段として有効であることを示唆するものである。

V まとめ

- (1) コレラ菌の cell associated HA 及び soluble HA 産生用培地として、Trypticase soy broth及び Heart infusion broth が優れていた。
- (2) コレラ菌15株は、すべて cell associated HA を産生し、このHAは、D-Mannose、L-FucoseによるヒトA型及びニワトリ赤血球凝集反応阻止パターンにより、5種類に分類された。
- (3) ヒトA型赤血球を凝集する新しい soluble HA(soluble HA-2)を検出した。このHAは15株中12株で検出され、培養の初期に一時的に産生された。

謝 辞

コレラ菌株を御患与下さった、防衛医科大学校細菌学教室神中教授に深謝致します。

VI 文献

- 1) Finkelstein, R. A. and S. Mukerjee. (1963) Hemagglutination: A rapid method for differentiation *Vibrio cholerae* and El Tor vibrios. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 112. 355-

- 2) Evans, D. G., D.J. Evans, Jr, and W.Tjoa. (1977) Hemagglutination of human group A erythrocytes by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from adults with diarrhea: correlation with colonization factor. *Infect. and Immun.* 18. 330-337.
- 3) Jones, G. W. and J. M. Rutter.(1974) The association of K88 antigens with hemagglutinating activity in porcine strains of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 84. 135-144.
- 4) Jones, G. W., G. D. Abrams, and R. Freter. (1976) Adhesive properties of *Vibrio cholerae*: Adhesion to isolated rabbit brush border membranes and hemagglutinating activity. *Infect. and Immun.* 14. 232-239.
- 5) Jones, G. W., and R. Freter. (1976) Adhesive properties of *Vibrio cholerae*: Nature of the interaction with isolated rabbit brush border membranes and human erythrocytes. *Infect. and Immun.* 14. 240-245.
- 6) Finkelstein, R. A., M. Arita, J. L. Clements and E.T. Nelson. (1977) Isolation and purification of an adhesive factor ("cholera Lectin") from *Vibrio cholerae*. In *Proceedings of the 13th Joint Conference of Cholera. US-Japan Cooperative Medical Science Program National Institutes of Health, Bethesda, Md.* p137-151.
- 7) Hanne, L. F. and R. A. Finkelstein. (1982) Characterization and distribution of the hemagglutinins produced by *Vibrio cholerae*. *Infect. and Immun.* 36. 209-214.
- 8) Finkelstein, R. A. and L.F. Hanne. (1982) Purification and characterization of the soluble hemagglutinin (Cholera Lectin) produced by *Vibrio cholerae*. *Infect. and Immun.* 36. 1199-1208.
- 9) Evans, D. J. Jr., D. G. Evans and H. L. DuPout. (1979) Hemagglutination patterns of enterotoxigenic and enteropathogenic *Escherichia coli* determined with human, bovine, chicken, and guinea pig erythrocytes in the presence and absence of mannose. *Infect. and Immun.* 23.336-346.