

(14)

氏名(生年月日)	タケ 竹	ウチ 内	サトシ 聰
本 籍			
学 位 の 種 類	博士 (医学)		
学位授与の番号	乙第1468号		
学位授与の日付	平成 6 年 4 月15日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当 (博士の学位論文提出者)		
学位論文題目	<b>Salmonella typhi Vi 抗原の簡易な検出法に用いる Vi-逆受身ラテックス凝集反応試薬の研究</b>		
論文審査委員	(主査) 教授 内山 竹彦 (副査) 教授 香川 順, 林 直諒		

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 〔目的〕

感染症の原因菌を迅速に正確に診断することは重要である。本研究では尿中から腸チフス菌の Vi 抗原を簡便に検出するための Vi-逆受身ラテックス凝集反応 (Vi-RPLA) 試薬の調製と検査法について検討した。

#### 〔方法〕

本試薬を開発するにあたり、① Vi 抗原の精製、②精製抗 Vi IgG の調製、③ Vi-RPLA の調製、④検査法、⑤本試薬の特異性、⑥再現性、⑦検出感度を本検査法と coagglutination (COAG) 試験法および ELISA 法について比較検討した。

#### 〔結果〕

1. Vi 抗原は乾燥菌体より PBS で抽出し、DNA・RNA および蛋白質分解酵素処理後、エタノール・セタブロン沈澱法を 2 回繰り返すことにより、O 抗原を含まない精製 Vi 抗原が得られた。

2. アジュバントを用いて 2 回免疫後、さらに精製 Vi 抗原を 1~2 回静脈投与してのみ得られた高力価の抗 Vi 血清を硫酸で塩析後、精製 Vi 抗原をホルミル・セルロファインにカップリングさせた吸着体を用いてのアフィニティークロマトグラフィー法により精製が可能であった。

3. 精製抗 Vi IgG 100 $\mu$ g/ml PBS 1 容に、1%ラテックス (IMMUTEX H2002R) 溶液 1 容を混合・攪拌して 37°C60 分感作した後、希釈液 (0.5%ゲラチン・1%BSA・0.1%NaN<sub>3</sub>加 PBS) に懸濁・攪拌して 37°C30 分処理し、2 回 PBS で遠心洗浄し、2 容の希釈

液に懸濁して 4°C に保存した。

4. 検査時に希釈液で 10 倍にし、V 型プレートを用いたマイクロタイター法の、一昼夜放置後の凝集像で判定した。

5. Vi 抗原を持った *S. typhi* Ty2w 株および *C. freundii* 5396/38 株の菌液では 10<sup>5</sup>個/ml 以上の菌数で検出可能であり、Vi 抗原を持たない *Salmonella* 14 種、*Shigella* 4 種、*E. coli* 3 菌株の 10<sup>8</sup>個/ml でもすべて陰性であった。

6. 調製時の異なる精製抗 Vi IgG から 2 ロット試作し、精製 Vi 抗原液を検体として実施した時、両者共に 0.781ng/ml 以上の濃度で検出され再現性があった。

7. 検出感度は精製 Vi 溶液では、0.781ng/ml 以上、菌液では 10<sup>5</sup>個/ml 以上で ELISA 法と同じ感度を示し、COAG 試験法よりは 100 倍高い感度があった。

#### 〔考察〕

今回開発した Vi-RPLA 試薬によるラテックス凝集反応法は ELISA 法と同等の検出感度があった。手技も簡便で安価にできることを考えると腸チフス保菌者のスクリーニングにも役立つのみならず、IgM・IgG・IgA などの測定でも、対応する精製抗体を本ラテックスに感作すれば測定への応用が可能と思われる。

#### 〔結論〕

本 Vi-RPLA 試薬の検出感度は、精製 Vi 抗原溶液では 0.781ng/ml であり、Vi 抗原を持った菌液では 10<sup>5</sup>個/ml で実験室内での検体では、特異性・再現性もあり

ELISA 法と同程度の感度の良い結果が得られた。

## 論文審査の要旨

チフス性疾患、特に腸チフスは開発途上国では流行が多発しており、原因菌 *Salmonella typhi* の簡便安価でかつ迅速正確な検出が必要とされる。本論文で著者は *S. typhi* Vi 抗原に対する抗体をラテックスに吸着させてマイクロプレートにて Vi 抗原を検出する逆受身ラテックス凝集反応法を開発した。その結果、Vi 抗原は 0.781ng/ml 以上、*S. typhi* 菌液に換算すると  $10^5$  個/ml 以上という微量で検出が可能となった。学術上価値ある研究である。

### 主論文公表誌

*Salmonella typhi* Vi 抗原の簡易な検出法に用いる Vi-逆受身ラテックス凝集反応試薬の研究

東京女子医科大学雑誌 第64巻 第2号  
102-111頁 (平成6年2月25日発行) 竹内 聡

### 副論文公表誌

- 1) Enteropathogenicity and enterotoxigenicity of human enteropathogenic *Escherichia coli* (人腸病原大腸菌の腸病原性と腸毒素発生力). *Jpn J Med Sci Biol* 27(1) : 19-33 (1974). 坂崎利一, 田村和満, 中村明子, 倉田 毅, 合田 朗, 竹内 聡
- 2) Effectiveness of immunization with single and multi-component vaccines prepared from a common antigen (OEP), protease and elastase toxoids of *Pseudomonas aeruginosa* on protection against hemorrhagic pneumonia in mink due to *P. aeruginosa* (緑膿菌によるミンクの出血性肺炎防御におけるプロテアーゼおよびエラスターゼ・トキシドと OEP の単独および混合ワクチンの免疫効果). *Jpn J Exp Med* 48(2) : 111-133 (1978) 本間 遜, 阿部千代治, 棚元憲一, 平尾 豊, 森原和之, 続木博茂, 梁川 良, 本多英一, 青井 陽, 藤本 胖, 御領政信, 今関信夫, 野田 寛, 合田 朗, 竹内 聡, 石原丈之
- 3) Protection against hemorrhagic pneumonia of mink by *Pseudomonas aeruginosa* multi-component vaccine (緑膿菌の多価構成成分ワクチンによるミンクの出血性肺炎に対する防御). *Jpn J Exp Med* 49(3) : 199-207 (1979) 青井 陽, 野田 寛, 梁川 良, 本間 遜, 阿部千代治, 森原和之, 合田 朗, 竹内 聡, 石原丈之
- 4) Common protective antigen between *Pseudomonas aeruginosa* and *Vibrio cholerae* (緑膿菌とコレラ菌の共通防御抗原). *Jpn J Exp Med* 49(5) : 383-390 (1979) 山本章博, 本間 遜, 合田 朗, 石原丈之, 竹内 聡
- 5) Comparison of the effects of a multi-component vaccine and a formalin-killed cell vaccine on protection against enzootic of hemorrhagic pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa* in mink (緑膿菌によるミンクの地方病の出血性肺炎に対する多価構成成分ワクチンとホルマリン死菌ワクチンの防御効果での比較). *Zbl Bakt Hyg, I Abt Orig A249* : 413-417(1981) 阿部千代治, 本間 遜, 野田 寛, 梁川 良, 森原和之, 続木博茂, 竹内 聡