

研究題目：腸内大腸菌群の培養に伴うエンドトキシン遊離挙動の定量解析と
その応用

筑波大学 生命環境系 教授 青柳 秀紀

【目的】

エンドトキシンはグラム陰性菌の外膜構成成分の一種で、血中へ混入すると人体に重篤な症状を引き起こす。腸内のエンドトキシンは腸管膜を通じて血中に入り、腸内細菌由来のエンドトキシンが様々な疾患に関与する可能性が指摘されている。一般的に、エンドトキシンは菌体に安定に保持され、菌体外への漏出は溶菌によってのみ生じるとされている。しかしながら、独自に開発したエンドトキシンの高感度、迅速測定法（LAL 固定化ビーズ法）を用い、培養に伴う大腸菌 (*Escherichia coli*) のエンドトキシンの挙動を定量的に解析した結果、増殖に伴い培養液中へのエンドトキシン遊離量が増加し、“溶菌だけではなく、菌体の分裂に伴いエンドトキシンが顕著に遊離する”という新規な現象を見出した。

本申請研究では、この現象の普遍性の有無を明らかにするために、*E. coli* と他のグラム陰性菌のエンドトキシンの遊離特性の定量的な比較解析を試みた。

【方法および結果】

802 培地を用い緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、大腸菌 (*E. coli*) の培養を行い、LAL 固定化ビーズ法を用いて経時的に菌体内と培養液中のエンドトキシン濃度を測定した。また、U.O.D.600 と生菌数も同時に測定した。種々検討した結果、菌種により単位菌体当たりの総エンドトキシン量（菌体内のエンドトキシン+培養液中へ遊離したエンドトキシン）は大幅に異なった。また、総エンドトキシン量に対する遊離エンドトキシン量の割合（遊離率）にも大きな差が見られた。特に、*K. pneumoniae* および *E. coli* で高いエンドトキシンの遊離率が認められた。また、YPD 培地などの種々の異なる培地を用いた場合でも同様の傾向が認められた。

以上の結果より、*E. coli* 以外にも“溶菌だけではなく、菌体の分裂に伴いエン

ドトキシンが顕著に遊離する”タイプのグラム陰性菌が存在することが示された。

一方、*P. aeruginosa* ではエンドトキシンが殆ど遊離しなかった。更に、それぞれの菌株が生成したエンドトキシンの活性炭への吸着性を比較したところ、異なる吸着特性を示すものも認められた。

また、種々の菌株の対数増殖期における培養液中と菌体内のエンドトキシンを抽出、精製後、SDS-PAGE で比較分析した結果、異なる分子量を示すバンドもみられ、生成したエンドトキシンには多様性があることが示唆された。

【参考文献】

上述の研究内容は下記、学会発表をおこなった。

- (1) 大瀧 賀也、青柳 秀紀：LAL 固定化ビーズ法を用いたグラム陰性菌の培養に伴うエンドトキシンの遊離特性の定量的解析（第2報）．第69回日本生物工学会大会講演要旨集 p. 243（2017）．
- (2) 大瀧 賀也、青柳 秀紀：LAL 固定化ビーズ法を用いた種々のグラム陰性菌の培養に伴うエンドトキシンの遊離特性の定量的解析．第5回日本生物工学会東日本支部コロキウム（2017）．ポスター賞受賞