The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	毒素フラグメントを用いた破傷風抗毒素血清の抗体構成に関する研究
Author(s)	原, 徹
Citation	大阪大学, 1978, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32118
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【2】

氏名・(本籍)	原(はら)　徹(とおる)
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 4133 号
学位授与の日付	昭和53年2月2日
学位授与の要件	医学研究科 病理系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**毒素フラグメントを用いた破傷風抗毒素血清の抗体構成に関する研究**
論文審査委員	(主査)教授 松田 守弘 (副査)教授 川俣 順一　教授 天野 恒久

論文内容の要旨

〔目　的〕

破傷風の病原因子であり且つ防御抗原である破傷風毒素蛋白(分子量約16万)は，最近，無毒の，二つの相補的なフラグメントα およびβ (frag. α，分子量約53,000; frag. β，分子量約 107,000)に可逆的に解離され，それらが抗原活性を保持したまま，毒素分子に再構成できる十分 native なかたちでとり出すことができるようになってきた。

本研究の目的は，これらの相補的なフラグメントを,さらに蛋白分解酵素で処理することによってサブフラグメントを単離し，精製毒素,フラグメント,サブフラグメントを用いた解析によって破傷風毒素の抗原特異性を明らかにし，これを基礎として破傷風抗毒素抗体の抗体構成を明確にし，さらに常用ウマ抗毒素吸収血清抗体構成に検討を加え，抗毒素抗体組成に変化をもたらさない，非特異的抗体除去法を案出するとともに，毒素の各抗原決定基に対する抗体量を指標として破傷風抗毒素血清標準化法の確立へと応用することにある。

〔方法および結果〕

1) トリプシン処理による毒素フラグメントのサブフラグメントの単離精製：毒素は菌体抽出液から精製，mild にトリプシン処理し，DTT で還元，尿素で解離後，lmM DTT, 2M尿素の存在下で Ultrogel AcA 44のゲル濾過によって frag. αおよびβを単離精製した。Frag. αの場合と異なり，frag. βは，トリプシン消化 (frag. β: 酵素，100：1，pH 8.5，37℃，2時間) に抵抗性を示す，分子量約5万 (SDS-ゲル電気泳動法による) の，farg. βとゲル内沈降反応で，部分的に共通な抗原特異性を示すサブフラグメント (frag. β-1) が得られた。このことは，破傷風毒素に

は，frag. α，β-1 および frag. β-2（frag. βの frag. β-1 以外の部分）によって担われている少くとも3種の抗原決定基が存在していることを示している。Frag. βをトリプシンで消化後，その硫安濃縮物を frag. α，βの精製と同条件でゲル濾過することにより frag-β-1 を単離精製 できた。

2）毒素，毒素フラグメント，サブフラグメントによるウマ抗毒素血清の解析：これらの精製抗原を用いた定量沈降反応法による解析の結果，抗毒素血清は，anti-α，anti-β-1，および anti-β-2 を含むが，それ以外に，毒素分子で沈降できるが，単離された frag. αやβ では沈降することができない，第4の抗毒素抗体（anti-γ と命名）を含むこと，従って，破傷風毒素分子には，上述の3種の抗原決定基の他に，毒素分子の形をとったときにのみ見出される，いわゆる"conformat dependent" な第4の抗原決定基（γ）が存在することが明らかとなった。Anti-α，anti-γ含量は血清標品により著しく変動した。

3）従来の方法によって非特異的抗体を吸収した常用ウマ抗毒素血清の抗体構成：常用抗毒素血清から，培地に過剰のダルタミン酸ソーダを添加して毒素産生を極度に抑制して得た培養濾液によって非特異抗体を吸収した血清は，吸収前に比べて，anti-α 抗体が，標品によって著しく減少していることがわかった。

4）非毒素産生菌の分離とその抗原を用いたアフィニティカラムによる，常用抗毒素血清からの非特異的抗体の簡単な除去法：破傷風毒素産生機構の遺伝学的解析の途上，アクリジン色素等の処理によって分離できた非毒素産生株は，その培養濾液が，毒素だけを含まず，それ以外は，毒素産生親株と同様の抗原構成をもつことがわかったので，この抗原をリガンドとしたアフィニティカラムを素通りさせることによって，抗毒素抗体構成に変化を与えることなく，非特異的抗体だけを除く簡単な方法を確立することができた。

5）毒素フラグメントを用いた Radial immunodiffusion 法による各抗毒素抗体含量の簡単な定量法：定量沈降反応法によって測定した各抗毒素抗体含量既知の血清を用いて Radial immunodiffusion によって，毒素，毒素フラグメント，サブフラグメントを目盛り，これらの抗原を用いて，同法によって簡単に少量の未知抗毒素血清の各抗体含量を測定することができた。

〔総　括〕

破傷風毒素の相補的なフラグメントの一つ frag. β からそのサブフラグメント frag. β-1 を 単離精製し，精製毒素，frag. α，β，β-1 を用いてウマ抗毒素血清を解析した結果，破傷風毒素の抗原特異性を明らかにした。これらの結果を基礎として，抗毒素血清標品における抗毒素抗体構成を解析し，従来の方法と異なり，抗毒素抗体構成に変化をもたらさない，常用ウマ抗毒素血清からの，非特異的抗体の除去法を案出した。破傷風抗毒素血清標準化の方法として，毒素フラグメントを用い，Radial immunodiffusion 法を応用した簡単な各抗素素抗体含量測定法を開発した。

論文の審査結果の要旨

破傷風抗毒素については，従来，系統的な研究は行われていなかった。本研究は，破傷風毒素，その相補的なフラグメントおよびサブフラグメントを用いて，この毒素の4種類の抗原決定基の対応関係を明確にし，これにもとづいて，はじめて系統的に，破傷風抗毒素の抗体構成を解析し，得られた知見の実用的応用をも行った。

これらの点，本研究は，破傷風毒素および抗毒素に関し極めて，新しい重要な知見を加えたものであり，関連分野の研究の進歩にも寄与するところ大であると思われる。