

Title	赤血球ゴースト融合法により培養細胞内へ注入された抗フラグメントA抗体による細胞内でのジフテリア毒素の中和
Author(s)	山泉, 克
Citation	大阪大学, 1979, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32370
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について〈/a〉をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

[41]

氏名・(本籍)	山 泉 克
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 4468 号
学位授与の日付	昭和54年1月31日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	赤血球ゴースト融合法により培養細胞内へ注入された抗フラグメントA抗体による細胞内でのジフテリア毒素の中和
論文審査委員	(主査) 教授 岡田 善雄 (副査) 教授 深井孝之助 教授 豊島久真男

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

生体物質の機能を最も直接的に調べようと思えば、生きている細胞内へ分離、精製された物質を注入してその効果をみる方法が考えられる。我々はこの目的のために外来性物質を内包した赤血球ゴーストをHVJを使って受容細胞と融合する方法 (Ghost fusion method) を開発してきた。この方法で受容細胞内へ注入された生体物質が、そこにおいてその活性を保持しうるのでどうかをジフテリア毒素のフラグメントA部分に対する抗体 (抗フラグメントA抗体) を予め細胞内へ注入することにより、次に培地中に加えられたジフテリア毒素からその細胞を保護できるかどうかで調べてみた。なお、ジフテリア毒素 (分子量62,000の単純タン白) のフラグメントA (N端側分子量22,000の部分) はNAD:EF2-ADP-ribosyl transferase活性がありEF2を失活させる事により、タン白合成を阻害し、従って細胞致死作用を持つ事が知られている。

〔材料と方法〕

受容細胞としては、ヒト由来FL細胞を使い、10%牛血清を含むEagle's MEMで培養した。抗体は次の4種を使用した。i) 非特異的抗体、ii) 抗フラグメントA抗体、iii) 抗ジフテリア毒素抗体、iv) 抗リシン抗体。いずれの抗体も免疫家兎より採取した血清からIgG分画を分離したものを使用した。i) の抗体は一部をクロラミンT法により [¹²⁵I] でラベルした。

ゴーストの調製は赤血球を低張液に対して透析するgradual hemolysis法を使った。

抗体による細胞への影響は、処理を施してから1週間後に見られるコロニー数で判定した。

〔成 績〕

- 1) ゴースト中に取り込まれる抗体の濃度は、透析バッグ中での初期濃度の約33%であり、そのうち約80%はゴースト中空に存在する。
- 2) 抗フラグメントA抗体はゲル内沈降反応及び培養液中ではジフテリア毒素と反応できない。
- 3) 抗フラグメントA抗体を予め細胞内へ注入しておけば、次に培地にジフテリア毒素を加えても、その細胞は死なず、しかも正常に分裂して、コロニーを形成する事ができる。

〔総 括〕

今回の実験結果より次の事が明らかとなった。

- 1) ジフテリア毒素は細胞内へ侵入した後少なくともフラグメントA部分が抗体と反応できる形で存在する。
- 2) 細胞内でも注入された抗体はその活性を保持しており、抗原—抗体反応生成物は細胞に毒性を及ぼさない。
- 3) 細胞をジフテリア毒素から保護するためには、約1万個の特異的抗フラグメントA抗体を細胞内へ注入しておかなければならない。
- 4) ゴーストを用いる細胞内注入法は、将来、細胞生物学の各分野において有用な方法となりうる。

論文の審査結果の要旨

山泉君は高分子物質を生きている細胞内に注入する新しい方法を開発した。赤血球ゴースト内に高分子物質を封印したのちHVJを用いて細胞と融合させる方法である。彼はこの方法を用いて抗ジフテリアAフラグメント抗体を予め注入した細胞はジフテリア毒素に抵抗性を獲得することを証明した。

この結果は、①ジフテリア毒素はAフラグメントをBフラグメントで包み込んだ構造をしているが、細胞内に侵入するとAフラグメントが露出してくること、②抗体は細胞質中でもその特異性を維持すること、③この赤血球ゴースト法は有効な高分子注入法であることを証明している。

以上博士論文として価値ある研究と認められる。