



Title	志賀赤痢菌の產生するNeurotoxinの精製と性状
Author(s)	Yano, Tomomasa
Citation	大阪大学, 1981, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/32694">https://hdl.handle.net/11094/32694</a>
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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名・(本籍) **YANO TOMOMASA**  
 学位の種類 医学博士  
 学位記番号 第5225号  
 学位授与の日付 昭和56年3月25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 志賀赤痢菌の產生するNeurotoxinの精製と性状  
 論文審査委員 (主査) 教授 三輪谷俊夫  
 (副査) 教授 天野 恒久 教授 深井孝之助

### 論文内容の要旨

#### [目的]

志賀赤痢菌の產生するNeurotoxinは、動物に対して強力な致死作用を示す蛋白性の毒素である。いくつかの研究グループがNeurotoxinの精製を試み、その作用について報告しているが、十分に精製された標品が現在までに得られていない。本研究ではこのNeurotoxinの精製を試みるとともに毒素の生物作用の解析を行った。

#### [方法ならびに成績]

1. Neurotoxinの精製：*Shigella dysenteriae* RIMD 3101010をBacto-peptone 1%, Yeast extract 0.5%, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1%, Glucose 0.5%を含む液体培地で37°C 24時間振盪培養し、その培養上清を材料としてNeurotoxinの精製を行った。活性の測定にはマウスの致死を利用した。4週令のddY系マウスに検体0.5mlを腹腔内投与し、1週間観察して検体中のNeurotoxinの存在の有無を判定した。培養上清をAmicon PM-10 membraneで限外沪過を行った後、硫酸80%飽和で毒素を沈殿させた。次いでDEAE-cellulose, DEAE-Sephadex A-50, Hydroxylapatiteを用いて順次カラムクロマトグラフィーを行った。その結果最終標品の比活性は8,574 LD<sub>50</sub>/mgで培養上清に比較して約1,429倍上昇した。活性の回収率は3.1%であった。最終標品はPolyacrylamide disc gelでほぼ単一のbandとして泳動し、このbandに一致してマウス致死活性が認められた。部分精製標品に対する抗血清との間に一本の沈降線しか形成されなかった。

精製Neurotoxinの分子量をゲル沪過で調べた結果約40,000であった。SDS-polyacrylamide disc gel電気泳動による解析の結果Neurotoxinが二つの分子サイズの異なるサブユニットから構成される。

成されていることがわかった。

2. Neurotoxinの生物作用：Neurotoxinを腹腔内または静脈内に投与した場合の致死時間と投与量の間には、一定の相関関係が認められた。多量のNeurotoxinを投与しても、マウスが死に至るまでには最低20時間を要した。抗血清によるNeurotoxinのマウスの致死作用の中和実験を行うと、抗血清を同時投与した場合は致死が抑制されたがNeurotoxin投与後6あるいは9時間後では、抗血清が腹腔内あるいは静脈内であってもほとんど致死の抑制が認められなかった。それにもかかわらずマウスを死亡させるのにさらに40時間を要した。毒素は投与後速やかに標的組織（細胞）に到達し抗血清の中和作用がおよばなくなることを示唆している。

#### [総括]

1. *Shigella dysenteriae*の產生するNeurotoxinを精製した。精製標品はPolyacrylamide disc gel電気泳動で単一のbandとして泳動した。部分精製標品に対する抗血清との間に一本の沈降線が形成された。精製標品の比活性は $8,574 \text{ LD}_{50}/\text{mg}$ で培養上清に比べて1,429倍上昇した。活性の回収率は3.1%であった。分子サイズの異なる二つのサブユニットから構成されていることがわかった。
2. Neurotoxinのマウス致死作用と毒素投与量との間には一定の相関関係が認められた。Neurotoxinに対する抗血清によって毒素の致死作用を中和するためには、抗血清を毒素投与直後に投与することが必要で、毒素は投与後速やかに標的組織（細胞）に到達し抗血清の中和作用をうけない状態になることがわかった。

#### 論文の審査結果の要旨

本研究は志賀赤痢菌の產生するNeurotoxinの精製と精製Neurotoxinの物理化学的、生物学的性状を明らかにしたものである。Neurotoxinはすでにその精製法が報告されているが、本研究で明らかにした精製法を用いれば精製Neurotoxinの大量調製が可能で、今後、Neurotoxinの性状や作用機序をさらに詳細に研究するのに寄与する。

本研究ではNeurotoxinの分子量を明らかにし、さらにNeurotoxinが二つの分子サイズの異なるサブユニットから構成されていることも明らかにした。生物学的性状としては、Neurotoxinの投与量とマウスの致死時間の間に一定の相関関係があることを明らかにした。さらに抗毒素血清を用いた実験によってNeurotoxinは投与後速やかに抗毒素血清では中和されない状態になると、それにもかかわらず、致死作用発現には40時間以上という長時間を必要とする証明した。これらの実験成績に基づく本研究は、学位論文として価値あるものと考える。