



Title	Clostridium difficileの産生するエンテロトキシンに関する研究
Author(s)	檜垣, 恵
Citation	大阪大学, 1982, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33277
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 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

氏名・(本籍)	檜垣恵
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 5611 号
学位授与の日付	昭和 57 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	<i>Clostridium difficile</i> の産生するエンテロトキシンに関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 三輪谷俊夫 (副査) 教授 井上 公藏 教授 岡田 善雄

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

近年、日和見感染症として嫌気性菌感染症が注目されるなかで、リンコマイシン・クリンダマイシンなどの抗生物質療法中に発症する偽膜性大腸炎の起因菌として、*Clostridium difficile* が分離された。この研究では、偽膜性大腸炎の発症機構を明らかにする為、病原性を担っていると考えられる *Clostridium difficile* の産生する毒素の精製を試みた。

〔方法ならびに成績〕

岐阜大学上野一恵教授より分与された strain 280 を用いて、嫌気チェンバー内(N₂90%、CO₂5%、H₂5%)にて18時間 BHI broth に前培養後、0.5% CaCO₃を含む透析 BHI broth 中で37℃ 5日間静置培養した。遠心後得られた培養上清を、分子量5万以下をカットオフする Amicon XM-50 による限外濾過、40%飽和硫酸沈殿の後、50mM Tris-HCl buffer(pH 7.5) に懸濁して、Sephrose CL-6B ゲル濾過カラムクロマトグラフィーによって毒素の精製を行なった。DEAE-Sephadex A-25 カラムクロマトグラフィーにおいて、0-0.6Mの NaCl グラディエントを行なうと、0.1M付近にウサギの結紮腸管ループ法陽性、ウサギの皮膚毛細血管透過性試験陽性、乳のみマウスの腸管内液体貯留、CHO 細胞に対する細胞伸張効果、更にマウスに対する致死活性を示すエンテロトキシン画分が溶出され、これとは別に0.4M付近に CHO 細胞などの組織培養細胞に対する変性致死活性のみを示す画分が溶出された。得られたエンテロトキシン画分を更に、Bio-Gel A-5m, Sephadex G-200 ゲル濾過カラムクロマトグラフィーによって精製を進めた。精製毒素の回収率は1.3%であり、比活性は1,000倍上昇した。得られた精製エンテロトキシンについて、3.5%ポリアクリルアミド(PAA)

ディスク電気泳動を行なうと、一本の蛋白バンドとして泳動され、ディスクの切り出し抽出によって、バンドに一致してのみエンテロトキシン活性が見られたことから、高度に精製されたものと考えられる。精製毒素は60℃20分の熱処理で失活する易熱性タンパク質である。Sephadex G-200ゲル濾過カラムクロマトグラフィ、PAA 3/20グラディエントゲルにおける分子量測定では、それぞれ44万、52万であった。0.1% SDS 9%ポリアクリルアミドスラブ電気泳動を行なうと分子量約20万の位置に泳動され、このバンドは DTT 処理によっても変化しなかった。等電点電気泳動での pI は、5.4であった。

精製エンテロトキシンをウサギに免疫して抗毒素血清を作製し、免疫電気泳動により精製エンテロトキシンの均一性を確認した。

マウスの腹腔内投与による致死活性について、48時間における 1 LD₅₀ は 16ng であった。ウサギの皮膚毛細血管透過性試験では、6 時間後に直径 10mm の青色斑を示す 1 BD₁₀ (10mm blueing dose) は 50ng であり、毒素量を増量した時に観察される 20mm 以上の青色斑を示す場合には、中央に壊死部分が見られた。ウサギの結紮腸管ループ法では、12 時間後に 0.5ml/cm 以上の液体貯留を示す最少有効量は 2,000ng であった。乳のみマウスの腸管内液体貯留では、毒素経口投与 5 時間後の、全腸管の重量と、全体重から全腸管の重量を差し引いた重量の比 (FA ratio) が 0.065 以上を示す最少有効量は 300 ng であった。チャイニーズハムスターオバリー (CHO) 細胞に対して 40% の紡錘化を示す CHO₁₀ は 2 ng であった。以上 5 種類のエンテロトキシン活性は全て、抗エンテロトキシン抗血清で中和され、10,000 倍希釈の抗毒素血清によって 32ng のエンテロトキシンを中和した。

〔総括〕

1) 現在までに、*C. sordellii* の産生する毒素の精製が、マウスに対する致死活性、CHO 細胞、HeLa 細胞、FL 細胞などの組織培養細胞に対する細胞変性効果を指標に試みられてきた。この研究では下痢原性毒素の活性を反映するウサギ結紮腸管ループ法、ウサギの皮膚血管透過性亢進試験、乳のみマウスの腸管内液体貯留の測定法を併用して、組織培養細胞に致死活性を示す毒素とは別にエンテロトキシン活性を示す毒素を見出し、高度に精製しその性状を明らかにした。

2) 従来、*C. difficile* の毒素の中和には抗 *C. sordellii* 抗体が用いられていたが、この研究において、エンテロトキシンに対する特異的中和抗体を得た。

論文の審査結果の要旨

本研究では、抗生物質使用時に発症する偽膜性腸炎の起因菌である *Clostridium difficile* のエンテロトキシンを高度に精製し、その性状を検討すると共に、特異的中和抗血清を作製した。

すなわち、下痢原性疾患としての偽膜性腸炎の病態に関与しているエンテロトキシンの役割を解明し、抗血清を用いて病態の発現が防御できることを証明した。このことは、偽膜性腸炎の病態の解明に極めて重要な知見であり、価値ある業績として高く評価される。