



Title	ジフテリア毒素に対する単クローン抗体：毒素の結合と細胞内侵入に対する影響
Author(s)	早川，進
Citation	大阪大学，1984，博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34802
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

氏名・（本籍）	はや 川 すすむ
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 6525 号
学位授与の日付	昭和 59 年 5 月 7 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	ジフテリア毒素に対する単クローン抗体：毒素の結合と細胞内侵入に対する影響
論文審査委員	(主査) 教授 岡田 善雄 (副査) 教授 内田 驍 教授 井上 公蔵

論文内容の要旨

（目 的）

ジフテリア毒素（DT）はDT感受性細胞の受容体に結合した後，細胞質内へフラグメント A（FA）を送りこみ，蛋白質合成を阻害し細胞を死に至らせる。このとき DT のどの部位が細胞表面，膜内，細胞質でどのような働きをしているかを知るため，DT に対する単クローン抗体を作製し，それらと DT 及び培養細胞との相互作用を検討した。

（方法ならびに成績）

ハイブリドーマ作製には SP 2 / 0 - Ag14 を用い，DT 感受性細胞は Vero 細胞を用いた。

DT，CRM45，CRM30，FA はそれぞれ PW 8，C₇（ β 45），C₇（ β 30），C₇（ β 22）を培養し，その培養上清から精製した。

1. 単クローン抗体の作製と精製

（方法）ホルマリン処理した DT で BALB / c マウスを免疫し，その脾臓細胞と SP 2 / 0 - Ag14 細胞をポリエチレングリコールで融合させ HAT 培地で融合細胞を選択した。増殖した細胞の培養液をラジオイムノアッセイでスクリーニングし，抗体活性のある細胞を限界希釈法を用いてクローニングを行なった。得たクローンはプリスタン処理した BALB / c マウスの腹腔に注入し，高濃度の単クローン抗体を含む腹水を得た。単クローン抗体は DEAE セルロース及び DT を結合したセファロース 4 B を用いて精製した。

（結果）14 種の DT に対する単クローン抗体を得た。

2. 単クローン抗体と DT 及び DT フラグメントとの結合性

（方法）¹²⁵I で標識した DT 及び DT フラグメントと精製した単クローン抗体をそれぞれ独立に反応させ，

抗体と結合した DT などを単離し、各々の抗体ごとにまとめ、スラブ電気泳動で検討した。

(結果) 抗体 1～6, 8, 10, 12, 16はDT, CRM45と結合し, CRM30, FAとはしなかった。7はDTとのみ結合した。14, 15はFAと結合した。これらの結果から, 7はDTのC端より1.7万ダルトンまでの部位に, 14, 15はFAに, 他の抗体はN端から3万から4.5万ダルトンの間の部位にそれぞれ抗原決定基が存在することが示唆された。

3. DTと単クローン抗体で処理した細胞の蛋白質合成能の測定

(方法) DTと抗体を反応させた後細胞に加えて一定時間培養し, ^3H -ロイシンを加えて, 1時間標識し, 細胞の蛋白質合成能をみた。一方ではDTを細胞に結合させた後単クローン抗体を反応させ, その後に細胞の蛋白質合成能をみた。

(結果) DTと抗体を先に反応させてから細胞に作用させた時抗体5, 7はDTを中和したが, 2は効果がなかった。一方細胞にDTを結合させた後抗体を作用させると2はDTを中和したが, 7は効果がなかった。

4. DTが細胞に結合する際の単クローン抗体の効果

(方法) ^{125}I -DTと単クローン抗体を反応させた後, 細胞に一定時間作用させ細胞と結合したDTを調べた。一方 ^{125}I -単クローン抗体とDTを反応させた後, 細胞に一定時間作用させ, 細胞と結合した抗体を調べた。

(結果) 抗体2はDTの細胞への結合を阻害しなかったが7は阻害した。又抗体2はDT存在下で細胞と結合したが7は結合しなかった。

5. 細胞に結合したDTに対する単クローン抗体の効果

(方法) ^{125}I -DTと抗体を反応させた後細胞に加え, 一定時間後に細胞と結合した ^{125}I を測定した。又 ^{125}I -DTを細胞と反応させた後, 単クローン抗体の影響を検討した。

(結果) DTのみを細胞に結合させたとき, 1時間後にDT量が最大になるが, 抗体2と共存させると4時間後が最大であった。

細胞と結合した ^{125}I -DTの減少に対して抗体7は影響がなかったが, 2はメチルアミンを作用させたのと同様にDTの減少を抑制した。

(総括)

1. DTに対する単クローン抗体を14種類得た。それらのうち抗体2はDTのN端より3万から4.5万ダルトンの間の部位と, 抗体7はC端から1.7万ダルトンまでの部位と反応した。
2. 抗体7はDT受容体と結合する部位又はその近傍に対する抗体であり, 抗体2はDTが細胞内に侵入するのに必要な部位又はその近傍の抗体であることが示唆された。

論文の審査結果の要旨

本研究はジフテリアトキシンが毒素感受性細胞に侵入する機構を検討するために, 単クローン抗体を作

製した。1つは毒素の受容体結合部位又は近傍と反応し，1つは細胞に結合した後侵入するのに必要な部位又はその近傍の抗体であった。これらのことは、毒素が細胞内に侵入するために少なくとも2つの役割を持つ領域が存在するという考えを支持するデータである。

これらの研究に対して博士号を与えることは適切である。