

Title	クロストリジウム・ディフィシルの産生するサイトトキシンの精製と性状について
Author(s)	加藤, 隆弘
Citation	大阪大学, 1986, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35235
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

氏名・(本籍)	か 加	とう 藤	たか 隆	ひろ 弘
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	7204	号	
学位授与の日付	昭和61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	クロストリジウム・ディフィシルの産生するサイトトキシンの精製 と性状について			
論文審査委員	(主査) 教授 三輪谷俊夫 (副査) 教授 井上 公蔵 教授 松田 守弘			

論 文 内 容 の 要 旨

(目 的)

近年、抗生物質随伴性下痢症あるいは偽膜性腸炎患者の糞便中に組織培養細胞に対して強い致死活性を示し、しかも抗Clostridium sordellii抗体で特異的に中和される毒性物質が存在することが示され、1978年、Larsonらは、この細胞致死毒を産生する病原体がClostridium difficileであることを証明した。その後、この細菌は少なくとも2種類の毒素(エンテロトキシンとサイトトキシン)を産生することが明らかになり、前者のエンテロトキシンはわれわれの教室をはじめ諸家によりその精製方法が確立され、その物理化学的および生物学的特性が明らかにされている。しかし一方、サイトトキシンに関しては、満足しうる精製方法が確立されておらず、この毒素の病態における役割も不明であった。本研究ではサイトトキシンを高度に精製し、その物理化学的および生物学的性状を明らかにすることを目的とした。

(方 法)

毒素の精製：岐阜大学上野一恵教授より分与を受けた、AB-PC投与後偽膜性腸炎と診断された患者糞便中より分離された毒素産生能の高い菌株であるC. difficile 280を用いた。0.2% Na₂HPO₄添加Brain Heart infusion培地にて37℃、5日間静置培養し、その遠心上清を出発材料とし、DEAE-Sephadex A-25▶Hydroxyapatite▶Bio-Gel A-0.5 m▶Phenyl-Sephadex CL-4B▶Mono Qの各カラムを用いて精製を行った。

精製はChinese hamster ovary (CHO) 細胞に対するCytopathic effectを毒素活性の指標にして行った。

ポリアクリルアミドディスクゲル電気泳動、SDS-ポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動、ポリアク

リルアミドゲル等電点電気泳動，ゲル内沈降反応およびアミノ酸組成は定法に従って行った。

酵素処理による毒素活性への影響：各酵素を用いて37℃，4時間の処理を行ない，残存する毒素活性を測定した。

抗血清の作製：Freundのcompleteおよびincomplete adjuvantと等量の精製毒素を混和し，家兎の皮下に注射し，高力価の抗血清を得た。

(成 績)

精製毒素はポリアクリルアミドディスクゲル電気泳動，ポリアクリルアミドゲル等電点電気泳動でのおの単一のバンドとして泳動し，その位置に一致して毒素活性が認められた。等電点は6.6（エンテロトキシン5.2）であった。

Sephadex G-200によるゲル濾過ではその分子量は約260,000と推定された。

SDS, DTT存在下で100℃，7分間加熱し，SDS-ポリアクリルアミドゲルスラブ電気泳動を行ったところ，分子量約50,000の位置に単一バンドとして泳動した。

精製毒素は易熱性であり，60℃，10分の加熱にて，その毒素活性は完全に失活した。

プロナーゼ，トリプシン処理によって，毒素活性は完全に失活した。一方リパーゼでは失活しなかった。

この精製毒素のアミノ酸分析およびその他の化学分析の結果，Asp, GluおよびGlyに富んだ単純蛋白質であることがわかった。

サイトトキシンは 7×10^4 個/mlのCHO細胞に対しては9 ngで全ての細胞に対して，変性致死作用が認められた。マウス致死作用，乳飲みマウス腸管液体貯留作用は900 ngの毒素量でも認められなかった。

精製サイトトキシンは抗サイトトキシン血清とはオクタロニーのゲル内沈降反応で1本の沈降線を形成するが，抗エンテロトキシン血清とは沈降線は形成しなかった。また精製エンテロトキシンに関しても，抗エンテロトキシン血清とは1本の沈降線は形成するが，抗サイトトキシン血清とは沈降線を形成しなかった。このことよりサイトトキシンとエンテロトキシンは免疫学的に異なることが示唆された。

(総 括)

1. Clostridium difficileの産生するサイトトキシンを高度に精製した。
2. サイトトキシンは物理化学的，生物学的および免疫学的性状から，エンテロトキシンとは明らかに異なる蛋白毒素であることを証明した。

論文の審査結果の要旨

クロストリジウム・ディフィシルは偽膜性腸炎あるいは抗生剤随伴性下痢症の起因菌として注目されている。本論文ではクロストリジウム・ディフィシルの産生するサイトトキシンを世界で初めて高純度に精製し，その物理化学的，生物学的および免疫学的性状を明らかにした。

この成績はクロストリジウム・ディフィシルによる偽膜性腸炎あるいは抗生剤随伴性下痢症の発症機

構および診断などに関する今後の研究に寄与し、博士論文にふさわしいものとする。