The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Production, Purification, and Characterization of Botulinolysin, a Thiol-Activated Hemolysin of Clostridium botulinum
Author(s)	Abdul, Haque
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38501
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

【110】

氏　　名	Abdul Haque（アブドゥル ハック）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　11065　号
学位授与年月日	平成6年2月1日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Production, Purification, and Characterization of Botulinolysin, a Thiol-Activated Hemolysin of Clostridium botulinum **（ボツリヌス菌のチオール活性化溶血毒素、ボツリノリジン、の産生、精製、性状および生物学的活性）**
論文審査委員	（主査） 教授　松田　守弘 （副査） 教授　三木　直正　　教授　本田　武司

論文内容の要旨

［目　的］

ストレプトコッカス，バシラス，リステリアおよびクロストリジゥム属の菌の中には，酸素によって容易に活性を失い，チオールで活性化され，コレステロールで阻害を受け，一部共通の血清学的性状および「心臓毒性」をもつ一群（約20）の溶血毒素（thiol-activated hemolysins or cytolysins）が知られている。ボツリノリジンはボツリヌス菌（Clostridium botulinum）が産生する溶血毒素で，この一群の細胞溶解毒素に属すると記載されてきたが，その存在が血液寒天上で発育した菌集落の周りに出来る溶血斑や培養上清に見い出される溶血活性によって知られていただけであり，その性状や毒作用機序も不明であった。そこで本研究では本毒素の産生条件を検討し，至適条件下で産生させた本毒素を精製し，その性状を明らかにし，精製毒素を用いて，その毒作用機序を細胞，臓器および動物レベルで明らかにしようとした。

［方　法］

各型，各種のボツリヌス菌をクックドミート（Difco）を変法した培地で培養し，ボツリノリジン産生至適の菌株C-203 tox，培養条件を決定し，至適条件下での培養上清を精製の出発材料として硫安分画，DEAE-セファローズCL-6Bによるイオン交換クロマトグラフィー，セファデックスG-75によるゲル濾過およびSP-Toyopearl 650Mによるイオン交換クロマトグラフィーを順次行ってボツリノリジンを精製した。精製標品についてSDS-ゲル電気泳動によって分子量，Isoelectric focusingにより等電点を決定，純度を検定し，酸加水分解によってアミノ酸組成を調べた。ボツリノリジンに対するマウスモノクローナル抗体を調製し，中和活性を調べ，イムノブロットに用いた。細胞毒性は，各種動物の赤血球細胞，HelaおよびVero細胞を用い，致死活性はddyマウス，Sprague-Dawleyラットを用いて調べた。臓器レベルでの毒性は，単離した心臓，心房，腎臓，肺，肝臓を灌流して調べた。

［成　績］

C型ボツリヌス菌C-203 tox株は，クックドミート変法培地，37℃16時間で最高の溶血毒素産生2,500〜3,000 HD_{50}/mlを示した。精製毒素は，ウサギ赤血球に対して，2,100HD_{50}/μg蛋白の溶血活性，SDS（−）および

SDS（＋）PAGE での一本の蛋白質バンドを示し，分子量は58,000，pI は8.4であった。アミノ酸分析の結果，この毒素は，Lys，Asp と Asn および Glu と Gln 含量が多く，1／2 Cys は 4 残基をもち，N 末端アミノ酸は検出されなかった。この毒素はウサギ赤血球に対して溶血至適 pH は6.0～7.0で，ウサギ，ヒト，モルモット赤血球に比べ，マウス，ラット，ニワトリ赤血球に対しては低い溶血活性を示した。

HeLa および Vero 細胞に対する毒性は，温度非依存性の初期段階(結合）とそれに続く温度依存性（37℃ではおこるが 0 ℃ではおこらない）細胞膜傷害の段階があり，その細胞溶解は，分子量9,000以上の物質を細胞外液に加えることにより阻止することができ且つウサギ赤血球に対しては 2 ヒット，調べたその他の細胞に対しては 1 ヒットを必要とした。CD_{50}(Vero 細胞にたいする）は120ng/ml, LD_{50}(マウス）は370ng であった。ラットに10,000HD_{50}（5 μg)，1,000HD_{50}(0.5μg）を静脈内注射するとそれぞれは 2 分，15分で死亡させ，100HD_{50}(50ng）では生き残った。ラットにボツリノリジンを静脈内注射すると直ちに動脈圧の低下をおこし，心電図に特異的な変化をおこしたが，高 K 血症にみられる心電図変化はみられなかった。本毒素は単離した肺，腎，肝灌流圧の変化をおこさなかったが，単離心臓では，非常に微量の毒素（1 HD_{50}/ml, 0.5 ng 蛋白/ml）で急速に且つ著明に還流圧が上昇し，鼓動を停止した。単離心房の自発活動には影響がなかった。また，単離大動脈環の張力にも影響しなかった。したがって，中毒動物では心臓の冠状動脈がボツリノリジンの標的臓器で，その痙縮がおこり，急性の血圧低下をおこし，動物を致死させると考えられる。

［総　括］

ボツリノリジンの高度精製標品を得るのにはじめて成功し，その性状を明らかにした。さらにチオール活性化細胞溶解毒素としては，その心臓毒性と考えられていた毒性をはじめて電気生理学的に詳細に解析して，その標的が心臓であり，冠状動脈痙縮による急性の血圧低下が死因となることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

ボツリヌス菌が産生するボツリノリジンは，酸素によって容易に活性を失い，チオールで活性化され，コレステロールで阻害を受け，一部共通の血清学的性状および「心臓毒性」をもつ一群の所謂「チオール活性化溶血毒素」に属すると記載されている。しかし，ボツリノリジンは，その存在が血液寒天上に発育した菌集落の周りに出来る溶血斑や培養上清に見出される溶血活性によって知られていただけで，その性状はもちろん毒作用機序も不明であった。

本研究は，この毒素の高度産生菌株を選定し，毒素産生条件を検討して至適条件下で本毒素を十分量産生させ，精製に適した出発材料を得，種々の精製方法を組合せて，本毒素を高度に精製することにはじめて成功し，その物理的化学的性状を明らかにした。さらに精製毒素を用いて，その毒作用機序を組織培養細胞，単離灌流臓器および動物レベルで解析した結果，本毒素が分子量約10,000の物質を透過させる孔形成毒素で，細胞膜透過性に変化をおこすこと，微量（約 5 ng/ml 灌流液）で心臓に作用し冠動脈の攣縮をおこして致死的心臓障害をおこすことを明らかにした。

以上のように本研究は，ボツリノリジンの生物学的活性に基礎的知見をもたらし，そのボツリヌス感染症における意義，細胞生物学的研究の基礎を与えるもので，十分学位に値するものと認める。