



Title	毒力人型結核菌（H37Rv株）細胞外蛋白抗原の分離、精製及精製抗原の免疫学的性状について
Author(s)	福井, 良雄
Citation	大阪大学, 1962, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/28508
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)	福井良雄
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 349 号
学位授与の日付	昭和 37 年 10 月 30 日
学位授与の要件	医学研究科 病理系 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	毒力人型結核菌 (H37Rv 株) 細胞外蛋白抗原の分離、精製及 精製抗原の免疫学的性状について
論文審査委員	(主査) 教授 堀三津夫 (副査) 教授 天野恒久 教授 山村雄一

論文内容の要旨

〔目的〕

結核菌がその培養濾液中に多様な蛋白抗原を産生することはすでによく知られた事実である。従来この培養濾液中の蛋白画分については幾多の研究が行われ、この画分とツベルクリン活性との間に密接な関連性のあることが立証された。しかし、その反面、大多数の研究が、加熱培養濾液から得た変性蛋白質をその対象としてとりあげていたために、結核菌細胞外蛋白のもつ本来の抗原性状およびその構成についてはほとんど明かにされておらず、また、その免疫学的、生物学的意義もなお未解決のまま残されている。本研究の目的は結核菌培養濾液中に存在する種々の蛋白抗原をその免疫学的活性を損うことなく分離、精製し、その抗原の免疫化学的性状を明らかにすることによって、結核菌抗原分析における可溶性蛋白抗原の意義を理解するとともに、結核菌感染および防禦免疫における蛋白抗原の役割を解析するに当っての手掛りを得ることにある。

〔実験方法〕

毒力人型結核菌 (H37Rv) 株の Sauton 変法培地 3 週間培養を、濾紙および Seitz 濾過器で濾過して得た非加熱無菌培養濾液 200ℓ を出発材料とし、このなかに含まれる蛋白画分 (160 μg/ml) を、硫酸分別沈澱 (0~30, 30~50, 50~80%)、澱粉を支持体とする Zone-electrophoresis, DEAE-Cellulose, hydroxylapatite による Columnchromatography を順次用いることによって、分画かつ精製した。精製過程における各画分、特に粗蛋白標品の 80 重量%以上を占める 50 %以下飽和硫酸沈澱画分中の蛋白画分について、化学的性状 (N-Kjeldahl-Nessler 法, P-Fiske-Subbarow 法, 核酸-Warburg-Christian 法糖-Scoot 法), 物理的性状 (超遠沈像, 電気泳動像, 相律溶解度曲線) および免疫化学的性状 (重層沈降法, 寒天ゲル内拡散沈降法および定量沈降法によって解析) を指標にして、その精製度、抗原特異性の異同などを検討した。

〔実験成績〕

- 1) 硫安分別沈澱, Zone-electrophoresis 併用による蛋白画分の分離および精製標品の性状
 - a) 硫安 0~30, 30~50%飽和沈澱画分はそれぞれ 2つ, 50~80%画分は 3つの分離峰をもつ分域電気泳動像を示し, これらの峰に相当する segment から, 溶出, 泳動を繰返すことによってほぼ单一の泳動像を示す 7つの画分を得た。これらはそれぞれ mtp-1, -2(0~30%) : mtp-3, -4(30~50%) : mtp-5, -6, -7(50~80%) と名付けられた。
 - b) mtp-2 を除く他の画分はいずれも沈降原性をもち, 特に mtp-1, -3, -4 は粗蛋白画分抗血清に対し Ouchterlony 法ではそれぞれほぼ单一の沈降線を形成した。またこれらは易熱性で, 70°C 10 分間の加熱により沈降原性の完全な消失を認めた。
 - c) Ouchterlony の寒天ゲル内拡散沈降法によって, mtp-1, および mtp-3 は同一の抗原特異性をもつが mtp-4 はこれらと全く異なることを知るとともに mtp-5, -6, -7 画分中には, それぞれ特異な抗原の存在することを示唆し得た。
 - d) mtp-1, -2, -3, -4 の 4 標品は, 電気泳動的にほぼ单一で, 14.4~15.9 %の N, 1.08~4.69 %の糖および微量の核酸, P を含み, 280mμ で最大の吸収を示した。また, mtp-1, -3 はそれぞれ超遠沈像でもほぼ单一であることが明らかにされた。電気泳動易動度と沈降定数は -6.12 (mtp-1), -9.17(-2), -5.87(-3), -16.45(-4) × cm²·volt⁻¹·sec⁻¹ × 10⁻⁵ および 2.83(mtp-1), 2.88(-3), 8.50(-4) (S₂₀ × 10⁻¹³ cm, sec⁻¹) であった。

以上の成績は mtp-1, -3, -4 が, かなり精製された蛋白抗原標品であることを示しているが, それらになお少量含まれる混在成分を除く目的で, さらに Columnchromatography による精製を試みた。

- 2) Columnchromatography による mtp-1, -3, -4 の精製および精製標品の性状
 - a) phosphate buffer (PH 7.0 および 6.8) 0.001M から 0.2M にわたる gradient elution によって, mtp-1, -3 は DEAE Cellulose, mtp-4 は hydroxylapatite の Column で, それぞれ 1つの主峰と 2つの副峰よりなる溶出像を示した。
 - b) 主峰部分の recolumnchromatography を行い, 80~90 %の収量で, それぞれ单一の溶出像を示し, N含量 16.2~16.9 %の単純蛋白質と思われる標品を得た。またこれらには, 電気泳動的に精製した標品中に微量含まれる耐熱性抗原の存在は認めず, 特に mtp-1, -3 は, Ouchterlony 法のみならず Oakley 法によっても, 粗蛋白画分抗血清に対し完全に单一の尖鋭な沈降線を形成した。また, この標品で家兔を免疫することにより粗蛋白抗原に対し单一の沈降線を与える抗血清を得た。
 - c) mtp-1, -3, -4 抗原の各種 Mycobacteria 細胞外蛋白中における分布を検討した結果, 少くとも試供菌株 (20株) の範囲内では, 菌型におけるその性状および分布に一定の規則性のあることを認めた。またいわゆる非定型抗酸菌に mtp-1, -3 の Cross reacting material が存在することも明らかにした。

〔総括〕

硫安分別沈澱, Zone-electrophoresis および Columnchromatography を併用することにより, 毒力人型結核菌非加熱培養濾液から従来できなかった蛋白抗原の単離に成功し, かつその一部を高度に純化することができた。また細胞外蛋白抗原分析上における指標としての意義を, これら精製抗原およびそれに対する特異抗血清を用いて検討し, 興味ある知見を得た。

論文の審査結果の要旨

結核菌培養液中に見出される蛋白については多くの研究があるが、その免疫学的、生物学的意義に関する重要な諸問題の多くは現在なお未解決のまま残されている。それは一面、従来における大多数の研究が加熱培養液から得た蛋白質をその対象として取りあげていたためでもあるが、また他面、従来用いられた蛋白分離法に幾多の欠陥があり変性あるいは他の成分の大量混在が避けられなかつたことによるものと考えられる。いいかえれば、結核菌細胞外蛋白の研究においては、まずその分離、同定といった基礎的問題から再検討する必要があり、またここにこの研究における第一の問題点があるものといえよう。

著者は、このような観点から、人型結核菌培養液中に存在する種々の蛋白抗原をその免疫学的活性を損うことなく分離精製する方法について詳細な吟味を行うとともに、さらに単離された蛋白標品についてその免疫化学的性状および抗原構造の解析を試み、次に要約するがごとき結果を得た。

- 1) 毒力人型結核菌 H37Rv 株非加熱培養液 200ℓ についてその蛋白成分 ($160 \mu\text{g}/\text{ml}$) を硫安分別沈澱 (0~30, 30~50, 50~80 %飽和画分) した結果、培養液蛋白のほぼ大半 (87%) が硫安飽和 50% で沈澱する成分により構成されていることを認めた。
- 2) 各硫安分別画分について澱粉を支持体とする Zone-electrophoresis を行い、それぞれの画分が mtp-1, -2 (0~30%), mtp-3, -4 (30~50%), mtp-5, -6, -7 (50~80%) と名附された蛋白成分よりなることを明らかにした。
- 3) Zone-electrophoresis を繰返すことにより单一の泳動像を示す mtp-1, -2, -3 および -4 を分離することができた。
- 4) mtp-1, -2, -3 および -4 は電気泳動的にはほぼ单一で、14.4~15.9 % の N, 1.08~4.69 % の糖および微量の核酸、燐を含み、 $278 \text{m}\mu$ で最大の吸収を示した。また mtp-1, -3 は超遠心像でもほぼ单一であることが明らかにされた。電気泳動易動度と沈降定数は -6.12 (mtp-1), -9.12 (-2), -5.87 (-3), -16.45 (-4) $\times \text{cm}^2 \cdot \text{volt}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1} \times 10^{-5}$ および 2.83 (mtp-1), 2.88 (-3), 8.50 (-4) ($S_{20} \times 10^{-13} \text{cm}, \text{sec}^{-1}$) であった。
- 4) mtp-2 を除く他の画分はいずれも沈降原性をもち、特に mtp-1, -3, -4 は粗蛋白画分抗血清に対し Ouchterlony の寒天ゲル内拡散沈降法においてそれぞれほぼ单一の沈降帯を形成した。またこれらは易熱性で 70°C 10 分間の加熱により沈降原性の完全な消失を認めた。
- 5) 寒天ゲル内沈降反応解析により、mtp-1 および mtp-3 は同一の抗原性をもつが mtp-4 はこれらと全く異なることを明らかにした。
- 6) 以上の成績から、人型結核菌細胞外蛋白の大半を占める 50 % 飽和硫安沈澱画分が血清学的活性をもつ二種類の主蛋白抗原により構成されているものと推定された。
- 7) 上記の mtp-1, -3, -4 標品は Zone-electrophoresis 上で单一の泳動像を示すが、これらについて Columnchromatography を行った結果、mtp-1, -3 は DEAE cellulose で、mtp-4 は hydroxylapatite でそれぞれ 1 つの主峰と 2 つの副峰よりなる溶出像を示すことを認めた。
- 8) 主峰部分の recolumnchromatography を行ない 80~90% の収量で、それぞれ单一の溶出像を示し、N 含量 16.2~16.9%，核酸、糖、燐などを認め得ない単純蛋白質と思われる標品を得た。これらには Zone-

electrophoresisだけで精製した標品中に微量含まれる耐熱性抗原の存在をほとんど認めず、特にmtp-1, -3はOuchterlony法のみならずOakley法によっても粗蛋白画分抗血清に対し完全に单一の尖鋭な沈降線を形成した。

- 9) これらの最終精製標品で家兎を免疫することにより、粗蛋白抗原に対し单一の沈降帯を与える抗血清を得た。この事実は、使用した蛋白標品が免疫化学的にも高度に純化されていることを立証するものである。
- 10) mtp-1, -3, -4 抗原の各種 *Mycobacteria* 細胞外蛋白中における分布を上記の特異抗血清を用いて検討した結果、少くとも試供菌株（20株）の範囲内では、菌型におけるその性状と分布に一定の規則性の存在することを認め、またいわゆる非定型抗酸菌の細胞外蛋白にmtp-1および-3の cross reacting material (crm) が存在することを明らかにした。

以上、毒力人型結核菌非加熱培養液から従来できえなかった細胞外蛋白抗原の単離に一部成功し、その免疫化学的性状、さらに各種抗酸菌細胞外蛋白との抗原的関連性を明かにした著者の成果は、結核菌細胞外蛋白研究に確固とした足場を提供したのみならず、抗酸菌抗原分析の研究に新しい知見を加えたものと認められる。