



|              |                                                                                                                                                 |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | Mycobacteria菌体内酵素タンパク質による遅延型皮膚反応                                                                                                                |
| Author(s)    | 松本, 潤二郎                                                                                                                                         |
| Citation     | 大阪大学, 1974, 博士論文                                                                                                                                |
| Version Type |                                                                                                                                                 |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/31332">https://hdl.handle.net/11094/31332</a>                                                             |
| 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。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

[19]

|             |                                                        |
|-------------|--------------------------------------------------------|
| 氏 名・(本籍)    | まつもと じろう<br>松 本 潤 二 郎                                  |
| 学 位 の 種 類   | 医 学 博 士                                                |
| 学 位 記 番 号   | 第 3 1 4 3 号                                            |
| 学位授与の日付     | 昭 和 49 年 5 月 10 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 | <b>Mycobacteria 菌体内酵素タンパク質による<br/>遅延型皮膚反応</b>          |
| 論 文 審 査 委 員 | (主査)<br>教 授 山 村 雄 一<br>(副査)<br>教 授 堀 三 津 夫 教 授 北 川 正 保 |

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

結核感染動物が示す遅延型皮膚反応において、この反応と抗原構造との関係は明らかでない。これを解明するには、単一成分にまで精製された皮膚反応抗原を、その構造解析に十分な量だけ得ることが先ず必要である。皮膚反応のみを精製の指標とした従来の方法とは異なり、本研究では、Mycobacteria 菌体から酵素活性を指標として高度に精製した数種の酵素タンパク質について遅延型皮膚反応抗原性を調べ、そのタンパク構造との関係を知ろうとした。

〔方法ならびに成績〕

**実験動物およびその感作と皮膚反応** モルモットの後肢筋肉内に Mycobacterium smegmatis ATCC 607 (M. 607 と略記)、または、Mycobacterium phlei の加熱死菌 0.5mg、4 週後にさらに 0.5mg を流動パラフィン浮遊液として注射して感作し、感作後 6 週から 20 週のモルモットについて皮膚反応を調べた。注射後 24 時間と 48 時間における硬結の縦横径を測定した。

**精製ツベルクリン (PPD) の調製** 比較に用いた PPD は Seibert らの方法に準じて、M. 607 および M. phlei 菌の培養液から調製した。

**酵素の精製と純度** M. 607 菌からは短鎖アシラーゼ、長鎖アシラーゼ、フマラーゼを精製した。これらは菌体からの抽出液を硫酸分画、セファデックスによるゲル濾過、DEAE・セファデックスやハイドロキシアパタイトによるクロマトグラフィー、調製のディスク電気泳動などにより高度に精製されたものである。短鎖アシラーゼ、長鎖アシラーゼはディスク電気泳動および超遠心分析において単一、フマラーゼは粗抽出液に対する比活性が約 700 倍のものを使用した。

M. phlei 菌からは L-乳酸酸素添加酵素を武森らの方法に従って結晶化し、5 回再結晶したものを使用した。この菌からもフマラーゼを精製した (比活性約 420 倍)。比較に用いた豚心筋からのフマラーゼは、Massay の方法で調製、再結晶したものである。

**L-乳酸酸素添加酵素の各種処理** M. phlei 菌から大量に結晶として得られる L-乳酸酸素添加酵素については、次の各処理を行った。すなわち、120℃、30 分間の加熱処理、また、100℃、15 分の加熱により変性させた同酵素について 37℃、20 時間反応させたトリプシンあるいはナガーゼによる処理、5 M グアニジンと 0.1 M メルカプトエタノール中で解離させた後さらにカルボキシメチル化して安定なものにしたサブユニット化の三つである。

**タンパク量の測定** 牛血清アルブミンを標準として、Lowry らの方法で測定した。

**感作に使用した菌種と同じ菌からとりだした酵素タンパク質の皮膚反応抗原性** M. 607 菌で感作したモルモットに対して、同菌から精製した三つの酵素は、0.8 μg/0.1 ml のタンパク量で明瞭なツベルクリン型の皮膚反応を示し、対照の PPD と同様に、注射後 5 時間頃にあられ始めた硬結は、24 時間頃にピークに達し、48 時間後でもほぼ同じ大きさを持続した。このことは、M. phlei 菌感作モルモットに対して、同菌由来の二つの酵素および PPD を皮内注射した場合も同様であった。

**皮膚反応抗原の種特異性** 感作に使用した菌とは異なる菌種からとり出した酵素タンパク質による皮膚反応、すなわち交叉反応性は、いずれの場合も明らかに弱く、菌の種類による特異性が明瞭に認められた。非感作モルモットに対しては、いずれの酵素も全く反応を示さず、豚心筋からのフマラーゼは、いずれのモルモットに対しても反応を示さなかった。

**L-乳酸酸素添加酵素の各種処理による、遅延型皮膚反応への影響** 加熱処理およびサブユニット化は、皮膚反応抗原性に影響しなかったが、ナガーゼおよびトリプシン処理により、皮膚反応活性は低下した。

#### [総 括]

1. Mycobacteria 菌体から酵素活性を指標として精製したタンパク質が、遅延型皮膚反応の抗原となり得ることを示した。すなわち、M. 607 菌感作のモルモットにおいて、同菌から抽出精製した三種の酵素タンパク質により、いずれも遅延型皮膚反応がおこった。M. phlei 菌感作モルモットに対して、同菌由来の二種の酵素は、ともに遅延型皮内反応の抗原となった。
2. 感作に用いた菌とは異なる菌種からとり出した酵素による皮膚反応は、いずれも非常に弱く、種特異性が認められた。
3. L-乳酸酸素添加酵素の皮膚反応抗原性は、加熱変性やサブユニット化によつては影響されなかったが、タンパク分解酵素処理によって低下した。
4. 大量に結晶として得られる L-乳酸酸素添加酵素を抗原として用いて、タンパク構造と遅延型皮膚反応との関連を追求し得る可能性を示した。

## 論文の審査結果の要旨

結核感染動物が示す遅延型皮膚反応において、この反応と抗原構造との関係は明らかでない。本論文は、この問題を解明する上での重要な情報を提供している。即ち、単一成分にまで精製された皮膚反応抗原を、構造解析に十分な量だけ入手するための一つの着想として、酵素活性を精製の指標として用い、2種の *Mycobacteria* 菌体から5種の酵素タンパク質を高度に精製し、それらが加熱死菌感作の動物に対して遅延型皮膚反応を惹起し得ることを示した。

なかでも、*M. phlei* 菌から大量に結晶として得られる L-乳酸酸素添加酵素を皮膚反応抗原として用いて、タンパク構造と遅延型皮膚反応との関係を追求しうる道を拓いたことは注目するに値すると思われる。