Osaka University Knowledge Archive

Title	Mycobacteria菌体から得た結晶蛋白質の遅延型皮膚反応抗原性
Author(s)	甲田, 一馬
Citation	大阪大学, 1977, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/31871
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【35】

氏名・(本籍)	甲田一馬（こうだかずま）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 4066 号
学位授与の日付	昭和52年10月3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	**Mycobacteria菌体から得た結晶蛋白質の遅延型皮膚反応抗原性**
論文審査委員	(主査) 教授 宮井 潔 (副査) 教授 山村 雄一　教授 北川 正保

論文内容の要旨

〔目　的〕

免疫学の急速な進歩に伴い，遅延型アレルギーあるいは細胞性免疫についても，近年広範囲に研究されているが，その反応機構の面にはなお不明な点が多い。

遅延型アレルギーの代表であるツベルクリン反応について，反応機構の解明には，反応抗原として活性のある蛋白質を，充分徹底した精製を行い，その構造をしらべようとすること、，結核菌感染の想定の下に，菌体のどの蛋白質が感作抗原として働くのかを追求することが重要であると考えられる。

本研究は，ツベルクリン皮膚反応のモデルとして，Mycobacteria菌体蛋白質を高度に精製し，精製した蛋白質について遅延型皮膚反応抗原性を調べ，Mycobacteria菌体から得られる蛋白質であればどの蛋白質にもツベルクリン型皮膚反応の抗原としての活性があるのか，また皮膚反応活性が特に強い精製蛋白質が得られないか，について検討を加え，その蛋白質の構造と活性との関係を知ろうとすることを目的として行ったものである。

〔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 Phleiの加熱死菌の流動パラフイン浮遊液を注射して感作し，感作成立後6週から20週のモルモットについて，後述する，PPD-Phlei 0.2μg を皮内注射して48時間後に10mm×10mm以上の反応を示すモルモットを実験に使用した。抗原液は，その0.1mℓを側腹部に皮内注射し，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-Phlei）の調製　皮膚反応活性の比較に用いたPPD-PhleiはSeibertら

がヒト型菌について行った方法に準じ，M. phleiのSauton培地に培養した加熱滅菌培養濾液から硫安分画によって調製した。

蛋白質の測定　抗原として使用した蛋白量は，牛血清アルブミンを標準としてLowryらの方法で測定した値で表わした。

Disc電気泳動　蛋白質精製の指標として，Davisの方法によるPolyacrylamide gelのDisc電気泳動でのバンドのパターンを利用した。

SDS-Polyacrylamide gel電気泳動　Sodium lauryl sulfate(SDS)を含むPolyacrylamide gel電気泳動をWeber & Osbornの方法に従って行い，抗原蛋白質の単一性を確認すると共に，標準品の移動度と，抗原蛋白質の移動度の相対値からsubunitを含む最小分子量を推定した。

Ouchterlonyによる精製蛋白質の純度検定　抗原蛋白質の単一性の検定の手段として，Ouchterlonyによる免疫学的方法を用いた。

N末端アミノ酸の確認　精製蛋白質のN末端アミノ酸をGrayの方法でdansyl化し，Woods & W Wangの方法により，Polyamide thin layer sheetを用いる二次元Thin layer chromatographyによって分析した。

抗原蛋白質の精製と純度　M. Phleiをグリセリン肉汁培地で6日間静置培養した後集菌し，菌体を磨砕し，蒸留水で抽出，除核酸後，硫安濃度65%飽和から90%飽和で沈澱する蛋白分画を集め，DEAE-Sephadex A-50, Sephadex G-75またはSephadex G-100によるchromatographyを組み合せ，Disc電気泳動的にほとんど単一になるまで精製を進め結晶硫安添加法で結晶化し，更に再結晶を繰り返した結果，A. B. C. D. と名付けた4種の蛋白質を結晶状に得た。乳酸酸素添加酵素(LO)は武森らの方法で結晶化し，5回再結晶して使用した。

これら5種類の結晶蛋白質について，AとBとは再結晶を繰り返したが純度の点については，Disc電気泳動とOuchterlony法でわずかに問題が残るが，LOを含めて，CもDも充分に精製された単一な蛋白質であると考えられる。

結晶蛋白質の皮膚反応抗原性　皮膚反応抗原としての強さを，直径10mmの硬結を起すに要する蛋白量(μg/0.1mℓ)で比較すると，PPD-Phleiは0.1以下で充分であるのに，LO;0.4, D;5.5, B;30, A;40となり，Cに至っては100μg/0.1mℓの注射によってもなお反応はみとめられない。非感作モルモットに対してはいずれの蛋白質も全く反応を示さなかった。この皮膚反応はPPD-Phleiを注射した場合と同じ時間経過をたどり，組織学的にもmononuclear cellを主とした遅延型アレルギーに特有な反応が見られた。

〔総　括〕

Mycobacteria菌体の粗抽出液の高飽和硫安分画から，DEAE-Sephadex A-50, Sephadex G-75やG-100によるColumn chromatographyを組み合せて精製を行い，4種の蛋白質を結晶状に得た。

この研究は少量の全菌体で感作した動物を使用した実験であるので，結核菌感染を想定できる。この場合，感作に使用した菌体に含まれている全ての蛋白質に対して，遅延型の感作が成立しているとも考えられる。

これに対して，充分精製結晶化し，単一と考えられる数種の菌体内蛋白質について，皮膚反応抗原としての強さをみた結果，これら蛋白質は血中抗体を作りうるにもかゝわらず，ツベルクリン型皮膚反応抗原活性の強さに種々の程度のものが存在することが明らかとなり，この活性の強さは，これら蛋白質構造の相違によることが示唆される結果を得た。

論文の審査結果の要旨

結核菌感染動物が示す，遅延型皮膚反応の反応機構については，なお不明な点が多い。とくに菌体，あるいは培養沪液の別なく，結核菌由来の蛋白質ならば，すべて皮膚反応抗原性があるのではないか，という考えがあるので，本研究ではそれを明らかにせんとした。

すなわち，Mycobacterium Phlei 菌体より高度に精製し，結晶状に得た蛋白質を皮膚反応抗原として使用した時，乳酸酸素添加酵素のように皮膚反応抗原としての活性をもつものがある一方，極端に活性の弱い蛋白質があることを見出した。このツベルクリン型アレルギーの皮膚反応抗原としての活性の強さは，それら蛋白質構造の差によることを示唆し，この問題を解明する上での重要な情報を提供した点，注目に値する成績である。