



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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	甲 田 一 馬
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 4 0 6 6 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ゝ、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ィ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 $0.2 \mu\text{g}$ を皮内注射して 48 時間後に $10\text{mm} \times 10\text{mm}$ 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 & 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, 菌体を磨碎し, 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 ($\mu\text{g} / 0.1\text{ml}$) 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 $100\mu\text{g} / 0.1\text{ml}$ 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も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重要な情報を提供した点、注目に値する成績である。