Osaka University Knowledge Archive

Title	BCG培養濾液の主成分タンパク質の単離精製と性質，特に遅延型皮膚反応抗原性について
Author(s)	永管，徳子
Citation	大阪大学，1980，博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32437
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

【47】

氏名・(本籍)	永管徳子（ながすがとくこ）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 4811 号
学位授与の日付	昭和55年2月7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	**BCG培養沪液の主成分タンパク質の単離精製と性質，特に遅延型皮膚反応抗原性について**
論文審査委員	(主査) 教授 浜岡 利之 (副査) 教授 岸本 忠三　教授 山之内孝尚

論文内容の要旨

〔目　的〕

遅延型アレルギーの代表的反応であるツベルクリン皮膚反応において，その反応抗原の精製については長年にわたり多くの試みがなされてきたのにかかわらず，単一な標品として純化されたものはない。現在，臨床上診断に用いられている精製ツベルクリンは，化学的にははなはだ粗製のものであり，力価検定を経た標品であってもその生物学的特性は標品ごとに異っている。結核菌由来のツベルクリン皮膚反応抗原性を有するタンパク質を精製純化し，構造一定のものを得ることは，臨床上，ならびに遅延型皮膚反応機構の解明において価値は大きい。

本研究では，精製を困難にする原因の一つとしてあげられる加熱滅菌の処理をはぶき，BCG 培養沪液から，多量に存在する一つのタンパク質成分を精製単離し，その遅延型皮膚反応抗原性について検討した。

〔方法ならびに成績〕

1．BCG 培養沪液からタンパク質(MPB70)の精製：BCG(Tokyo 172)をソートン培地に4週培養し，加熱滅菌することなく菌体を沪別し，沪液について硫安分画，DEAE－セファデックス，DEAE－セファローズ処理をくりかえし，またセファデックスによるゲル沪過を行い，標準条件のディスクゲル電気泳動において，相対易動度0.70 を示すタンパク質バンドを追跡し精製した。精製品の収量は，硫安分画中の総タンパク質量の8.2％にも達した。得られた標品をMPB 70と名付けた。

2．MPB 70の均一性：ディスクゲル電気泳動，SDS 添加ゲル電気泳動ならびに超遠心分析，Ouchterlony 法による沈降線検討において，単一であることが示された。N未端アミノ酸は，ダンシル

化法によればグリシンであった。中性糖は，フェノール硫酸による定量において 0.03 %以下の値を示すので，含有されていないと考える。

3．MPB の分子量：電気泳動法，セファデックスによる分子ふるい，沈降平衡法による測定を行い，15,100とした。

4．組成アミノ酸：塩酸による水解後自動分析計を使用した測定，および吸光法による定量を行った。システイン，トリプトファンは含まれない。

5．MPB 70の加熱に対する安定性：pH 5.0，7.5，8.7 において95℃，30分加熱した後，ディスクゲル電気泳動を行って解析したところ，いずれの pH においても MPB 70の加熱による変性が認められた。

6．MPB 70の皮膚反応抗原性：皮膚反応にはモルモットを用いた。6 種のミコバクテリアの加熱死菌01 mgを，それぞれ流動パラフィン浮遊液としてモルモットの後脚筋肉内に注射し，感作した。感作後 4 週以後に，各群について皮膚反応をしらべた。注射後24，48時間の硬結の直経を測定した。MPB 70のタンパク質量は Kjeldahl 法により算出した。MPB 70は BCG 感作群においてのみ強く反応し，硬結が10mmに達するに要する量は 0.1 μg であった。これに対し人型結核菌 H 37Rv，M.kans kansasii,M.intracellulare,M.phlei 感作群では，16μg の注射でも殆んど反応はおこらなかった。僅かに反応する人型結核菌青山 B 感作群でも，MPB 70は10μg を要した。一方，対照として用いた市販精製ツベルクリン（青山 B から調製した PPD）を反応抗原とした場合は，BCG，人型菌青山 B および H 37Rv それぞれの感作群において同程度の反応を示し，これらの菌種に対する特異性は認められなかった。MPB 70の力価は，市販精製ツベルクリンの約 1/10であった。

7．粗製段階におけるタンパク質画分の皮膚反応抗原性の比較：BCG 培養沪液の硫安80%飽和沈澱画分についてセファデックス G－75ゲル沪過を行い，その画分について，皮膚反応抗原性をしらべた。人型菌 H 37Rv，および青山 B，BCG それぞれによる感作動物群に対し，いずれの画分も同程度に反応を示し，従来の知見と同様に，粗製の段階では菌種特異性は認められなかった。

〔総　括〕

BCG 非加熱培養沪液に多量（総タンパク質量の約10%）に含まれている MPB 70を，比較的簡単な操作のくりかえしにより，各種分析において単一性を示す精製標品を単離した。

MPB 70の遅延型皮膚反応抗原性は，BCG 感作動物群に対してのみ反応する明瞭な特異性を示した。この特異性は，臨床上，BCG 感作の成立の検定に利用することができよう。またその力価は市販 PPD の 1/10であるが，高度に単一性を示す MPB 70を収量よく得られたことは，その構造と生物学的活性との関連性について更に研究を進めることが可能となった。

論文の審査結果の要旨

結核菌由来のツベルクリン皮膚反応抗原性を有するタンパク質を精製純化し，構造一定のものを得ることは，臨床上，ならびに遅延型皮膚反応機構の解明において価値は大きい。

本研究は，精製を困難にしている原因の一つとしてあげられる加熱滅菌処理をはぶき，BCG 非加熱培養沪液から一つのタンパク質成分MPB70を精製単離したものである。

MPB70は培養沪液の総タンパク質の約$\frac{1}{10}$を占め，DEAE セファデックスDEAE セファローズ処理をくり返し，セファデックスゲル沪過を行い，ディスクゲル電気泳動によって相対易動度0.70 の単一バンドとして収量よく純化することができた。収量は80%硫安飽和沈澱画分の総タンパク質量の 8.2%であった。種々の條件下での電気泳動，超遠心分析等でもMPB70は単一であることが示された。分子量は15,100，中性糖は含まれない。N末端アミノ酸はグリシンであった。

遅延型皮膚反応抗原性は6種のミコバクテリアの加熱死菌によって，それぞれ感作したモルモット群についてしらべた。人型結核菌，非定型抗酸菌感作群では殆ど反応はおこらなかったが，BCG 感作群にのみ強く反応し，明瞭な菌種特異性を示した。

MBP70はBCG に特異的であるので，将来BCG ワクチン接種による感作の成立の検定に利用可能と思われる。