

参 考 文 献

- (1) Zinsser : J. exper. Med., 34, 495 (1921)
- (2) Zinsser and Parker : J. exper. Med., 37, 275 (1923)
- (3) Zinsser and Müller : J. exper. Med., 41, 159 (1925)
- (4) Zinsser and Tamiya : J. exper. Med., 42, 311 (1925)
- (5) Leidlaw and Dudley : Brit. J. exper. path., 6, 197 (1925)
- (6) Müller : J. exper. Med., 43, 9 (1926)
- (7) Enders : J. exper. Med., 50, 777 (1929)
- (8) Masucci, McAlpine and Glenn : Am. Rev. Tuberc., 22, 669 (1930)
- (9) Renfrew : J. biol. Chem., 89, 619 (1930)
- (10) Chargaff und Anderson : Z. physiol. Chem., 191, 172 (1930)
- (11) Anderson and Roberts : Am. Rev. Tuberc., 22, 664 (1930)
- (12) Maschmann und Küster : Z. physiol. Chem., 193, 215 (1930)
- (13) Heidelberger and Menzel : J. biol. Chem., 127, 221 (1939)
- (14) Sabin and Miller et al : J. exper. Med., 53, 51 (1931)
- (15) Gough : Biochem. J., 26, 248 (1932)
- (16) Hooper, Renfrew and Johnson : Am. Rev. Tuberc., 29, 66 (1934)
- (17) Seibert, Pederson and Tiselius : J. exper. Med., 68, 413 (1938)
- (18) Karjala and Heidelberger : J. biol. Chem., 137, 189 (1941)
- (19) Seibert and Watson : J. biol. Chem., 140, 55 (1941)
- (20) Tennet and Watson : J. Immunol., 45, 179, (1942)
- (21) Courmand and Lester : Proc. 3 Int. Cong. Microbiology, 621 (1939)
- (22) McCarter and Watson : J. Immunol., 43, 85 (1942)
- (23) 戸田 : 日本医学及健康保健, 3328, 678 (昭 18)
- (24) Seibert : Am. Rev. Tuberc., 59, 86 (1949)
- (25) 藤原 : 東北医誌, 30, 363 28, 916 (昭 17. 16)
- (26) 武田 : アレルギー時報, 8, 193 (昭 17)
- (27) 糟谷 : 東京医事新誌, 2973, 787 (昭 11)
- (28) 糟谷 : 結核, 24, 236 (昭 24)
- (29) 斎藤 : 結核, 15, 546 (昭 12)
- (30) 戸田・村田 : 東京医事新誌, 3113, 3195 (昭 13)
- (31) Savin et al. : J. exper. Med., 53, 51 (1931)
- (32) Savin et al. : J. exper. Med., 68, 563 (1938)
- (33) Heilman and Seibert : Am. Rev. Tuberc., 53, 71 (1946)
- (34) 村田 : 結核, 17, 209 (昭 14)

ツベルクリン特にその製法に関する再検討

第 4 報 限外濾過濃縮ツベルクリンの透析実験及びツベルクリンの加熱凝固蛋白体について

京都大学結核研究所第七部(主任 植田教授) 白石 正 雄

(本稿の要旨は昭和 25 年 5 月 5 日第 25 回日本結核病学会総会に於て演述した。)

緒 言

前回¹⁾報告したように、青山 B 株ソートン培地培養 2 週培養液よりつくつた「ツ」は糖質を相当含むが、蛋白を殆ど含まず、皮内反応の 24 時間値は 48 時間値より強く(アルツ型)、致死反応陰性であつたのに反し、菌の発育がすすんで「ツ」中の蛋白が多くなると、24 時間値よりも 48 時間値が強く(ツベルクリン型)なり、致死反応も出現してきた。

従来の諸家の報告では、「ツ」多糖体は非透析性であつて皮膚因子とみられ、「ツ」蛋白体は透析性であつて致死因子(皮膚反応をも含めて)とみられてきた(Maschmann und Küster,³⁾ 糟谷⁴⁾, Seibert and Long⁵⁾)。

他方に於て、Seibert の PPD⁶⁾, Boquet et Sandor の磷タングステン酸「ツ」⁷⁾, Maschmann und Küster のカオリン吸着精製「ツ」³⁾は蛋白性のものであつて、人体の皮内反応に用いられている。戸田、貝原⁸⁾は更に磷脂質にも活性が存すると述べている。要するに皮膚反応物質、致死反応物質に関しては未解決の点が多い。

著者は「ツ」を蛋白画分と糖質画分とにわけて皮内反応を実施吟味せんとし、まず限外濾過濃縮「ツ」について透析実験を行つた。さらに「ツ」作製の際培養液の加熱によつて凝固析出する蛋白体の活性についても検討した。

実 験 方 法

1 限外濾過濃縮法及び透析実験

青山B株ソートン培地3月培養濾液を10% コロデウム膜限外濾過法にて $\frac{1}{4}$ 量に濃縮し、濃縮液を5%及び10%コロデウム膜透析実験に付した。限外濾過膜には10%コロデウム膜の層をシヤンペラン型 I_3 (松風)濾過管の外面につくつた。⁹⁾¹⁰⁾即ち、下記10%コロデウム液に濾過管の素焼部を浸漬して直ちに取出し、先端を上向きにしながら、速かに廻転し可及的均等な膜面をつくらせた。

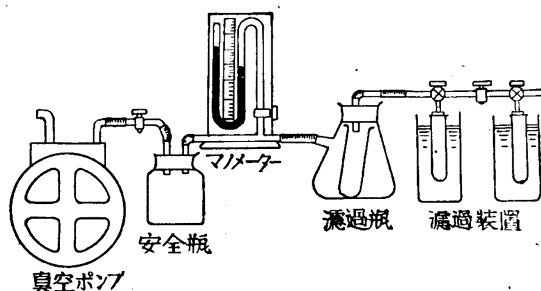
エーテルアルコールが蒸発乾燥したのち0.5%石炭酸水中に貯蔵し、使用にのぞみ流水にて静かに清洗し濾過装置に取附けた。濾過装置は第1図に示すように、真空ポンプ、安全瓶、濾過瓶を厚肉ゴム管にて連結し、その間にマノメーターを挿入した。濾過瓶の先に三方活栓を2個有する厚質硝子管を連結、各活栓部に上部濾過管を取附けた。培養濾液は一旦シヤンペラン I_3 濾過管にて濾過して菌体を除いたのち、目盛容器に収めた。この中に濾過管が浸る。真空ポンプにて限外濾過時マノメーターの示圧は15~30mm Hgを呈していた。

5%及び10%透析膜は乾燥固形コロデウムa瓦、エーテル(95—a)cc、無水エタノール5cc(a=5又は11)¹¹⁾¹²⁾の組成のコロデウム液より夫々つくつた。エーテルは米国Squibb会社又はMallinkrodt会社製のものをを用いることが出来た。このような透析嚢内に限外濾過濃縮液又はその通過液10ccを入れ、これと等量の0.5%石炭酸水中に浮べて氷室内で1週間透析した。外液に移行した物質を呈色反応(モーリツシュ反応、ニンヒドリン反応、ミロン反応、アダムキウィツ反応)及び20%三塩化醋酸沈澱反応にて確め、又内外液の夫々0.1cc宛を結核海猿(フランクフルト株1mg皮下接種25日後)3頭の皮内反応に供した。また0.3cc宛を同様結核海猿2頭の皮下に注射して致死反応を検した。特に蛋白体の透析の有無は1週間透析後にも三塩化醋酸沈澱反応にて検討した。さらにツベルクリン中の成分の透析コロデウム膜濃度(%)を知るため、コロデウムa瓦、無水エタノール5cc、エーテル(95—a)cc(a=5, 6, 7, 8, 9, 10)の組成のコロデウム液より透析膜をつくつて、嚢内に青山B株ソートン培地9週培養液より70—80°C加熱濃縮法にてつくつた「ツ」原液を各10cc宛収め、同様透析実験に供した。1週間氷室内にて透析後外液のモーリツシュ反応及び20%三塩化醋酸沈澱反応によつて多糖体及び蛋白体の透析の有無を検し、その外液0.1ccを結核海猿(フランクフルト株1mg皮下接種2月後)3頭の皮内反応に供し、0.5cc宛を同様にして感染せしめた結核海猿2頭の皮下に注射して致死反応を検した。

2 ツベルクリン中の熱凝固核蛋白体¹³⁾の分離、化学反応及び結核海猿皮内反応

青山B株ソートン培地9週培養の非加熱培養濾液(pH 4.2及び7.0)各100ccを100°C 30分加熱し、凝固析出した白色沈澱を濾別し乾燥、醋酸水(pH 4.2)にて2回洗滌、さらにエーテルにて2回洗滌、ついで10%苛性曹達液数滴にて溶解し、蒸留水を加えて5ccとし氷醋にてpH 4.2とすると乳白色絮状沈澱を生じてきた。これを遠心、上清をすて、沈澱を氷室内で乾燥(CaCl₂)し、灰白色粉末4.2mgをえた。之を弱アルカリ性にして再溶解、0.5%石炭酸食塩水を加えて4.2ccとした。この溶液についてDische氏Diphenylamine反応¹⁴⁾、モーリツシュ反応、20%三塩化醋酸沈澱反応、塩酸フロログルシン反応、塩酸オルシン反応、Foulger反応、Selivanoff反応を検した。また上記1mg per 1cc液の10倍数稀釈液をつくり、各液0.1cc宛(10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001γ)を結核海猿(フランクフルト株1mg皮下接種82日後)3頭の皮内に注射し、発赤24時間値及び48時間値を測定した。

第1図 限外濾過濃縮装置



実験成績

第1表に示すように、青山B株ソートン培地3月培養濾液の $\frac{1}{4}$ 量限外濾過濃縮液の成分の中、従来非透析性といわれた多糖体は5%及び10%コロデウム膜を共に透析した。蛋白体は5%膜を通過したが、10%膜を通過しえなかつた。かような蛋白体を含まない10%膜透析液の皮内反応は24時間値が48時間値より大であつてアルツス型反応であり、蛋白体を含む5%膜透析液及び嚢内残留液の皮内反応は24時間値が48時間値と大体等しくツベルクリン型反応であつた。致死反応は蛋白体を含まない透析外液にては陰性であつて、蛋白を含む透析嚢内液にては海猿2頭共に相当衰弱しショック症状を呈したが、24時間後回復した。第2表に示すようにコロデウム各濃度(%)膜についての透析実験から多糖体は何れの膜をも通過したが、蛋白体は5%膜より9%膜まで通過し、10%は通らなかつた。また外液の皮内反応の性質をあらわすのに、発赤をR、其の中央に偏したところが出血のため紫色を呈していたから、これをV、更に

その中心の不正縁白色部（おそらく白血球の凝固壊死した部分と考えられる）をWにてしめた。5—9%膜外液のように蛋白を含む液の皮内反応は24—48時間値が最大であつて何れもツベルクリン型であり且つ反応の中心部に白色を伴っていたのに反し、蛋白体を含まないで多糖体を含む10%膜外液は6—24時間値が最大であつてその反応は最強の場合でも発赤とその中央の紫色部を伴っていたのみであつてアルツス型反応であつた。致死反

応は7%, 8%, 9%膜外液にて認められた。ただし8%膜外液にては海猿は致死しなかつたが、24時間後海猿1頭は横倒れとなり、毛が逆立つて殆ど死に瀕していたが、そのうち辛うじて回復したのであつて過敏ショック症状と考えられ、致死反応陽性とみなした。5%膜、6%膜外液にて致死反応の出現しなかつたのは、蛋白体の含量が少なかつたためと考えられる。

次に第3表に示す如く、pH 4.2—7.0の非加熱培

第1表 青山B株ソートン培養限外濾過濃縮液についての透析実験

供 試 液	10%コロザウム膜限外濾過法にて 1/4 量に濃縮した培養濾液							
	5%コロザウム膜				10%コロザウム膜			
透 析 膜	残 留 液		透 析 液		残 留 液		透 析 液	
モーリツシュ反応	冊		冊		冊		冊	
ニンヒドリン反応	冊		冊		冊		冊	
ミロン反応	冊		冊		冊		冊	
アダムキウイツ反応	冊		冊		冊		冊	
三塩化醋酸沈澱	冊		冊		冊		冊	
結核海猿皮内反応	24°	48°	24°	48°	24°	48°	24°	48°
	18×18	15×15	16×16	15×15	22×22	21×21	17×17	8×8
	21×21	20×20	18×18	16×16	23×23	18×18	15×15	8×8
	11×11	20×20	10×10	15×16	32×33	34×34	16×16	11×11

第2表 青山B株「ソートン・ツ」の各濃度コロザウム膜透析外液の化学反応、皮内反応及び致死反応

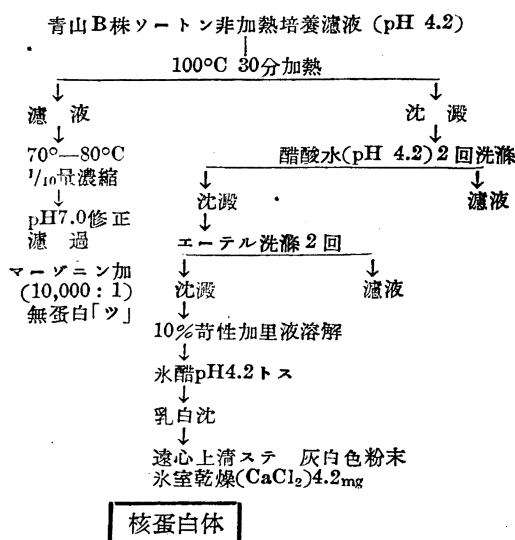
コロザウム濃度	5 %	6 %	7 %	8 %	9 %	10 %	
モーリツシュ反応	冊	冊	冊	冊	冊	冊	
三塩化醋酸 沈 澱	冊	冊	冊	冊	冊	—	
皮 内 反 応	6°	13×10(RV)	15×11(RVW)	18×11(RVW)	13×12(RVW)	18×16(RVW)	11× 9(RV)
		13×10(RV)	16×14(RVW)	16×16(RVW)	16×16(RVW)	17×17(RVW)	13×13(R)
		13×13(RV)	14×14(RV)	14×14(RVW)	14×13(RVW)	16×14(RVW)	13×13(R)
	24°	18×18(RV)	18×18(RVW)	18×18(RVW)	18×18(RVW)	24×17(RVW)	13×18(RV)
		11×11(R)	13×13(RW)	15×15(RW)	15×14(RW)	18×18(RW)	12×12(R)
		13×13(R)	13×12(V)	12×12(V)	7×8(V)	9×9(VW)	5× 5(R)
	48°	10×10(RW)	12×13(RW)	15×13(RW)	14×12(RW)	12×13(RW)	6× 6(R)
	致 死 反 応	0/2	0/2	1/2	0/2(1)	1/2	0/2

(註) R, V, W は皮内反応の性質をしめし、Rは発赤にしてその長径、短径は数値にてしめし、Vは発赤の中心部が壊死出血に陥入り紫色を呈していることをしめし、Wは最中心部に白色斑が生じたことをしめす
致死反応をしめす分数の分母は供試動物数、分子は致死動物数であつて、括弧内は過敏ショック反応にして殆ど致死反応とみなしうるが、24時間後回復した動物数をしめす

養濾液から 100°C 30 分の加熱にて凝固析出した蛋白体は精製した後の化学反応よりみて、明らかに核蛋白体であつた。結核海猿皮内反応は 24 時間値と 48 時間値とは大差なく、ツベルクリン型であつた。反応閾は 1.0—0.1γ といえる。またその 0.5% 石炭酸水溶液を 10% コ

ロザウム囊に収めて透析したが外液は三塩化醋酸沈澱反応陰性、塩酸フロログルシン反応陰性、塩酸オルシン反応陰性であつたから透析性はないと考えられる。核蛋白体の致死反応は後に報告する。

第3表 青山B株培養濾液の加熱凝固蛋白体の吟味



化 学 反 応					
Dische 氏サフェニルアミン反応	+				
モーリツシュ反応	—				
三塩化醋酸沈澱	+				
塩酸フロロアルシン反応	+				
塩酸オルシン反応	+				
フルガー氏反応	+				
セリツノフ氏反応	+				
結 核 海 狸 皮 肉 反 応					
	10γ	1γ	0.1γ	0.01γ	0.001γ
24°	13×13	10×10	5×5	3×3	—
	5×5	4×4	4×4	3×3	—
	8×8	5×5	3×3	3×3	3×3
48°	13×12	6×6	4×4	—	—
	5×5	5×5	4×4	3×3	—
	7×7	3×3	—	—	—

考 察

「ツ」成分の透析性に関しては、「ツ」画分を取扱つた多くの研究者により、多糖体は非透析性皮膚因子、蛋白体は透析性致死因子とされてきた。しかしこれ等は大部分組成不均一な動物性の透析膜を使用したためであつた。著者の用いた組成の透析膜にては多糖体は常に透析性をしめし、蛋白体は5—9%膜を透析し、10%膜を通らなかつたのであるから Seibert のいう如くこの蛋白体は相当低分子の蛋白体或はプロテオーズの混合物と考えられる。またモーリツシュ反応陽性の蛋白を含まない10%膜透析外液はアルツス型反応を呈し、致死反応陰性であり、蛋白を含む5—9%膜外液或は囊内残留液はツベルクリン型反応を呈し、致死反応又は過敏ショック反応陽性であつたことは、第2報、第3報の所見と一致するものである。

pH 4.2—7.0 の非加熱濾液の 100°C 30 分加熱によつて凝固析出した蛋白体は相当強いツベルクリン型反応をしめた。このほかに第1報、第3報にのべたように、加熱濃縮後の濾過によつても活性物質が相当失われるのである。他方第2報にのべたように、濃縮によつて「ツ」の力価が強まるのであるから、これらの知見は一見矛盾しているようである。しかし濃縮によつて粘性が増大してくる。Seibert¹⁵⁾、Bevilacqua & McCarter¹⁶⁾、等は加熱による「ツ」変性蛋白分子の出現を等電点法、電気泳動法、超遠心法等によつて確めている。これは第1報の成績から明らかなようにツベルクリン型皮内反応(48時間値)の増強となつてあらわれたものと理解せられる。

結 論

青山B株ソートン培地培養濾液の限外濾過濃縮液或は70°—80°C 加熱濃縮「ツ」の5—10%コロデウム膜透析実

験によつて、従来非透析性皮膚因子といわれた多糖体は透析性を有し、6—24 時間値を最大とするアルツス型反応を呈し、致死反応と関係なく又透析性の致死因子といわれた蛋白体は5—9%コロデウム膜を透析し10%膜を透析せず、低分子の蛋白乃至プロテオーズ級の誘導蛋白体が混じていると考えられた。その皮内反応は24—48 時間値を最大とするツベルクリン型反応及び致死反応乃至過敏ショック反応と密接な関係を有していることが明らかになつた。

非加熱培養濾液 (pH 4.2—7.0) の加熱によつて凝固析出した蛋白体は核蛋白体であつて、相当強いツベルクリン型皮内反応 (反応閾 1.0—0.1 γ) をしめし、10%コロデウム膜を透析しなかつた。

撰筆するに当り、植田教授の御指導、御校閲を深謝す。

文 献

- 1) 白石：結核，25：8，341—343，昭 25. 8. 2) 白石：結核，近日発表。3) Maschmann, E. und Küster, E.: Dent. Med. Wschr., Jg. 57, Nr. 4, 143, 1931.
- 4) 糟谷：結核，13：5，352，昭 10. 5. 渡辺，結核彙報，2，73，昭 15. 5) Seibert, Fl. B. & Long, Es R.: Amer. Rev. Tuberc., 13：404, 1926. 6) Seibert, Fl. B.: Amer. Rev. Tuberc., 44：1, 1, 1941; 44, 1, 9, 1941. 7) Boquet, A et Sandor, G.: Ann. Inst. Pasteur, 57：622, 1936. 8) 戸田：結核菌と BCG. 62. 昭 21. 9) Seibert, Fl. B.: Amer. Rev. Tuberc., 30：713, 1935. 10) Rheinbolt, H.: J. Houben. Die Methoden der Organischen Chemie. Bd. I. Allg. Teil. 466—487, 1925. 11) Calmette, A., Boquet, A. et Nègre, L.: Manuel Technique de Microbiolog. et Serolog., 3 Ed. Masson, 232,

1933. 12) Grabar, P. et De Loureiro, J. A.: Ann. Inst. Pasteur, 63, 159, 1939. 13) Seibert, Fl. B.: Amer. Rev. Tuberc., 17 : 394, 1928. 14) Dische, Z.: Mikrochem., 2, 4, 1930. 15) Seibert, Fl. B.:

Chem. Rev., 34 : 107, 1944. 16) Bevilacqua, E. B. & McCarter, J. R.: J. Exp. Med., 87 : 3, 229, 1948.

流動パラフィン結核加熱死菌ワクチンの研究

(第三報) 人体接種のツベルクリン反応陽転効果に就いて

国立予防衛生研究所結核部(部長 柳沢 謙)

金井 興美・橋本 達一郎・関 又 蔵

I 緒 言

我々は第一、第二報に於て流ベラ死菌ワクチンの安全性、免疫効果を動物実験の上から研究し、先人の観察を追試確認し得たのであるが、人体接種例に関しては Hensel (1) が奇形児にラノリン混入の結核死菌を注射して、ツベルクリンアレルギーの惹起と局所の膿瘍を観察した以外最近迄報告がなかつたので我々は先ず此のワクチンの陽転効果に関して研究を行つた。第一報、第二報の成績にみる如く、乱切法、乱刺法接種では局所障害は少なく免疫効果が得られる事を考え、更に慎重を期する為、菌株は BCG を用いた。その後、岡(2) の報告も見聞するに及んで殆ど同一成績を得た事を知つた。

II 研究 方法

A) 研究対象

新潟県下某小学校に翌年入学すべき 6~7 歳の児童のうち 2000 倍旧ツベルクリン稀釈液の 0.1cc 皮内接種後 48 時間判定で発赤 4mm 以下を示す者を選び、このうちから更に以前に BCG ワクチンの接種を受けた事のある者を除外した。これらの対象を約 50~60 人ずつの三群 A, B, C に分割した。

B) 接種用ワクチンの製法

① A 群接種用ワクチン。結核予防会製 80mg/cc の濃厚 BCG 液体ワクチン。

② B 群接種用ワクチン。ソートン合成液体培地上 37°C で 15 日発育の BCG 菌膜を濾斗上の濾紙に集め 20 枚の濾紙を重ねた中央に入れて吸湿したのち秤量し、100 個の 9mm 直径の水晶球を入れた 1 立の硬質平底丸型コルベンに入れて手振法により、媒液として落花生油を少量加えつつ 80mg/cc の濃厚ワクチンを調製した。以上はすべて滅菌器具を用い、無菌操作によつた。出来上つたワクチンは 100°C 1 時間で加熱滅菌した。

③ C 群接種用ワクチン。B 群接種用ワクチンと同一菌を用い、全く同方法で調製した。但し媒液として流動パラフィンを用いた。

C) 接種方法

乱切法を用いた。即ち左右両側の上膊外側に夫々 2 個の 8mm×8mm の十字を乱切した。方法は種痘の場合と同じく、まずワクチンをランセットで乱切部位に塗布してから乱切し、あとで再びワクチンを塗布した。

D) ツベルクリンアレルギーの追求

各ワクチン接種後惹起するツベルクリンアレルギーの検査を接種後 1 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ月、12 ヶ月目の 4 回にわたつて行つた。2000 倍稀釈旧ツベルクリンを 0.1cc 左前膊内側皮内に注射し 48 時間後の判定に依つた。猶 1 ヶ月、3 ヶ月目には同時に他側の前膊に 100 倍稀釈旧ツベルクリンによつても同方法で検査した。

E) 反応の判定

48 時間後発赤の長短径を mm で測定しその算術平均を以て発赤の大きさとなした。二重発赤の場合はその外側の発赤の長短径を測定した。又反応の強弱を更に明確に記載するため発赤に伴う浮腫についても同方法で検査した。

III 研究 成績

a) 局所変化

1 ヶ月後の接種局所は A 群に於ては乱切線上に僅の痂皮形成を発見し、時に膿を示すものがあつたが、膿瘍、潰瘍を発見することはなかつた。B 群、C 群に於ては障害は更に少なく、多くの者は乱切線上に白色の痕跡をみる程度であつた。3 ヶ月後には各群の被検者はすべて完全に治癒して跡を発見するのも困難であつた。

b) ツベルクリンアレルギーの経過

第 1 表に示されたところは発赤の大きさによつて各群夫々の人員を分類しその百分率を出したものである。

第 1 図は第 1 表により発赤の大きさ 10mm 以上をツベルクリン反応陽性とし、2000 倍稀釈旧ツベルクリンを使用した際の各群の陽転率の経過を 1 年間にわたつて図示したものである。第 1 表をみると、A 群即ち生菌 BCG ワクチンの乱切法による陽転率は第 1 ヶ月目に最高であつて 87.1% を示し、その後次第に下降したが 6 ヶ月後も 65.8% であり、1 年後には約 50% となつた。それ