

ツベルクリン特にその製法に関する再検討

第5報 ツベルクリン中の多糖体劃分及び蛋白体劃分と皮内反応との関係

京都大学結核研究所 第7部 (主任 植田教授)

白石 正 雄

(本稿の要旨は昭和 25 年 9 月 3 日結核研究会講演会及び昭和 26 年 4 月 2 日第 26 回日本結核病学会総会において演述した)

(昭和 26 年 5 月 28 日 受付)

緒 言

既に著者は第 2-4 報¹⁾²⁾³⁾において、「ツ」中の多糖体は透析性を有し、結核海狸皮内反応の 24 時間値「アルツヌ型」に関係し、致死反応と関係なく、蛋白体は 5-9%コロヂウム膜を透析するが、10%膜を透析せず、皮内反応の 48 時間値(ツベルクリン型)及び致死反応と密接な関係を有していることを述べた。今回は稍々強毒人型朝倉株及び稍々弱毒人型青山 B 株の「ツ」多糖体劃分及び蛋白体劃分を分離して、その結核海狸における皮内反応を検討した結果を報告する。

実験方法

1 使用菌株の毒力

第 1 表 朝倉株及び青山 B 株の海狸に対する病原性(皮下接種)

菌 株	海 狸	感 染 菌 量	体 重		肺 臓	肝 臓	脾 臓	臓 節	腎 臓	副 腎	淋 巴 腺				局 所 変 化
			感 染 時	剖 検 時							頸 部	腋 部	後 胸 部	肝 門 部	
朝 倉 株	No. 1 (♀)	1.0 mg	450	480 (+30)	卅	卅	32×17 1.85g	卅	卅	-	-	卅	卅	卅	潰
	2 (♂)	1.0	560	580 (+20)	卅	卅	41×22 3.2	卅	-	+	-	卅	卅	卅	潰
	3 (♂)	1.0	700	740 (+40)	卅	卅	37×20 2.50	卅	-	-	-	卅	卅	卅	-
青 山 B 株	4 (♀)	1.0	620	680 (+60)	卅	卅	30×17 1.00	±	-	±	-	卅	卅	卅	+
	5 (♂)	1.0	520	600 (+80)	卅	-	23×13 0.65	-	-	-	-	卅	卅	卅	+

註 1) 肺、肝、脾、腎における病変をしめす卅は結節数多数 (20個以上)、卅は結節数 5-20個、+は 1-5 個、±は結節に似た病変のあるをしめす、淋巴腺にては卅は小指頭大に腫脹し内容乾酪化しているとき、卅~+ は小豆大に腫脹しているが乾酪化を認めない程度の変化をしめす、局所変化の潰は潰瘍形成をしめす

2) 朝倉株接種海狸 5 頭中 2 頭は寒気のため途中にて斃死した

第 1 報に述べたように朝倉株は昭和 18 年肺結核患者喀痰より分離した当時家兎 (0.01mg 静脈内接種法) 及び海狸 (0.01mg 及び 0.0001mg 皮下接種法) に対して強毒性であつたのであるが、今回青山 B 株とともに各 1mg を海狸大腿皮下に接種し、4 週後剖検に附した。

その剖検所見は第 1 表の如くであつた。すなわち接種後の体重増加の程度、肺臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎等の内臓病変の程度 (結節数、結節の乾酪化の程度、臓器の充血腫脹) 局所変化 (潰瘍形成) 及び局所淋巴腺 (左膝髌) の変化 (大きさ、乾酪化、癒着の程度) よりみて

● 朝倉株は青山 B 株よりも遙に強毒であつた。

2 ツベルクリン中の多糖体劃分及び蛋白体劃分の分離

第 1 図にしめすように朝倉株及び青山 B 株ソートン培地 9 週培養液を 100°C 30 分加熱した後菌濾紙にて濾過して菌体を濾別し、濾液をさらにシヤンペラン L₂ 濾過器にて濾過、10%コロヂウム膜限外濾過法にて 1/10 量に濃縮した³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾。

a) 多糖体の分離

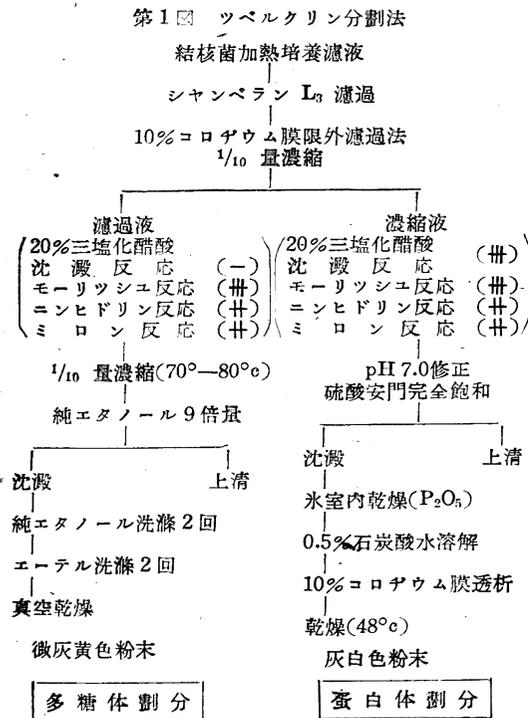
コロヂウム膜通過液は 20%三塩化醋酸による沈澱反応陰性であつて、モーリッシュ反応強陽性、ニンヒドリン反応及びミロン反応共に陽性であつて、これを 70°C-80°C の水浴上にて 1/10 量に濃縮し、

9倍量の純エタノールを加えると白色沈澱を生じた。翌日上清を傾瀉後、沈澱物を純エタノール、エーテルにて各2回洗滌したのち、真空乾燥し、さらに硫酸乾燥器中にて充分乾燥し、微灰黄色粉末をえた。

b) 蛋白質の分離

上記限外濾過法による濃縮液は、そのpHを7.0に修正したのち、硫酸安門を完全に飽和し、生じた白色沈澱を遠心、上清をすて、氷室内にて無水磷酸(P₂O₅)にて乾燥した。こゝに褐色固形物質と硫酸安門結晶の混合物をえたので、0.5%石炭酸水5ccに溶解し、10%コロヂウム膜嚢に納めて6日間透析して硫酸安門の除去を計つた。ついで透析嚢内容と電気定温器(48°c)内にて乾燥し、さらに硫酸乾燥器中に納めて完全に乾燥し、灰白色粉末をえた。現在収量はなお思わしくないので鋭意増収方法を考案中である。

ここにえた両菌株の各割分について、N含有量(マイクロキエルダール法)、20%三塩化醋酸沈澱反応、呈色反応(ニンヒドリン反応、ミロン反応、アダムキウイツ反応、ビュレット反応、キサントプロテイン反応、モーリッシュ反応、カルバゾール反応、ヂフェニルアミン反応、塩酸フロログルシン反応、塩酸オルシン反応)を検した(第2表)。



3 結核海狸皮内反応

海狸3頭(体重400—500g)にフランクフルト株1mgを皮下接種11日及び37日に、上記両菌株の「ツ」多糖体割分0.1, 0.01, 0.001, 0.0001mg(各0.1cc)を両背

側皮内に注射し、3, 6, 24, 48時間値を観察した(第3表)。

蛋白質割分は同様F株1mg接種海狸3頭に、感染後23日及び72日に0.01, 0.001, 0.0001, 0.00001mg(各0.1cc)を両背側皮内に注射し、3, 6, 24, 48時間値を観察した。なお対照として正常海狸3頭に両株蛋白質(0.001mg), 多糖体(0.01mg)を皮内に注射し、3, 6, 24, 48時間値を観察した(第4表)。

実験成績

第2表にしめすように朝倉株及び青山B株の「ツ」蛋白質のN量はそれぞれ16.607%, 16.656%, 多糖体のN量はそれぞれ0.565—0.042%, 0.866%であつた。蛋白質は20%三塩化醋酸沈澱反応陽性、ニンヒドリン反応、ミロン反応、キサントプロテイン反応及びアダムキウイツ反応陽性、ビュレット反応疑陽性、モーリッシュ反応陰性であつたが、カルバゾール反応、ヂフェニルアミン反応、塩酸フロログルシン反応及び塩酸オルシン反応陽性であつた。多糖体は20%三塩化醋酸沈澱反応陰性、モーリッシュ反応及びカルバゾール反応強陽性、ヂフェニルアミン反応陽性、塩酸フロログルシン反応及び塩酸オルシン反応陽性、ニンヒドリン反応、ミロン反応及びキサントプロテイン反応は陰性であつた。多糖体及び蛋白質各割分稀積液0.1cc宛を結核海狸の皮内に注射した直後、局所は稍々充血した水泡をつくり、周辺は蒼白であつたが、次第に水泡は扁平化拡大した。30分後には直径10—11mmの円形蒼白な水泡となり、中央に小さい発赤を伴うていた。これはImmediate or Early Reactionと考えられる。1½時間後には水泡直径11—12mmとなり、2時間後より急速に水泡の発赤度を増し、3, 6, 24, 48時間と逐次反応の大きさ、浮腫硬結の度を増した。これがDelayed Reactionと考えられる。

第3表より明らかなように、結核感染11日及び37日における多糖体の皮内反応はともに3時間後既に発赤相当大となり、6—24時間値が最大となり、48時間後には殆んど吸収せられ陰性になつた。すなわち多糖体の皮内反応はアルツス型反応であつた。また稍々強毒な菌株の朝倉株の多糖体の反応は弱毒青山B株のそれより強かつ、持続時間は長くあつた。

第4表より明らかなように、結核感染23日及び72日における蛋白質の皮内反応も同様3時間後相当強い発赤となつたが、反応は24—48時間値が最大となり、反応は96時間後あるいはさらに数日を徑て漸く吸収せられ陰性になつた。すなわち蛋白質の皮内反応は明らかにツベルクリン型反応であつた。しかし多糖体とは反対に、朝倉株の蛋白質の反応は青山B株のそれより僅かに強いかという程度であつて、多糖体程著明な差違を認めなかつた。多糖体と蛋白質の皮内反応の強さの比は大約1:100であつた。対照動物にては両割分ともに3時間値が4—

第2表 「ツ」多糖体分割及び「ツ」蛋白質体分割の化学的性状

「ツ」多糖体 割 分	ミル クダ クロ ル キ エ 法 N%	20 醋反 % 酸 沈 三 塩 化 濃 度 応	モ ー リ ッ ッ シ ユ 応	カ ル バ ゾ ー ル 応	ア フ エ ニ ル ア 応	ニ ン ヒ ド リ ン 応	ミ ロ ン 応	ア ツ ビ レ ッ ト 応	キ サ ン ト ア ロ ン 応	塩 酸 フ ロ ロ グ レ ッ ト 反 応	塩 酸 シ ン ク ロ グ レ ッ ト 反 応	塩 酸 オ ル シ ン ク レ ッ ト 反 応
朝倉株「ツ」 多 糖 体	0.565— 0.042%	—	卅	卅	+	—	—	—	—	卅	卅	卅
青山 B 株「ツ」 多 糖 体	0.866%	—	卅	卅	+	—	—	—	—	卅	卅	卅

5 mm 程度の発赤であつたが24—48時間後殆んど陰性になつた。

考 按

既に報じたように Maschmann und Küster の「精谷」等によつて「ツ」多糖体は非透析性の皮膚因子 (Hautstoff, α-Stoff), 蛋白質は透析性の致死因子 (Tod-Stoff, β-Stoff) とされた。しかし前報の如く, 多糖体は透析性であり, 蛋白質は5—9%コロヂウム膜を透析する低級蛋白質とこれらのコロヂウム

「ツ」蛋白質体分割	ミル クダ クロ ル キ エ 法 N%	20 醋反 % 酸 沈 三 塩 化 濃 度 応	モ ー リ ッ ッ シ ユ 応	カ ル バ ゾ ー ル 応	ア フ エ ニ ル ア 応	ニ ン ヒ ド リ ン 応	ミ ロ ン 反 応	ア ツ ビ レ ッ ト 反 応	キ サ ン ト ア ロ ン 反 応	塩 酸 フ ロ ロ グ レ ッ ト 反 応	塩 酸 シ ン ク ロ グ レ ッ ト 反 応	塩 酸 オ ル シ ン ク レ ッ ト 反 応
朝 倉 株「ツ」 蛋 白 体	16.607%	卅	—	+	+	+	+	+	±	+	+	+
青 山 B 株「ツ」 蛋 白 体	16.656%	卅	—	+	+	+	+	+	±	+	+	+

第 3 表

F株感染 11 日後の結核海鼠における「ツ」多糖体の皮内反応

多 糖 体	注 射 量	3 時 間 値 mm			6 時 間 値 mm			24 時 間 値 mm			48 時 間 値 mm		
朝 倉 株 多 糖 体	0.1 mg	11×11	11×11	10×10	18×18	12×11	14×14	17×19	13×15	16×17	12×13	—	—
	0.01 "	7×8	8×7	7×8	10×10	9×8	7×7	12×12	4×4	7×7	6×6	—	—
	0.001 "	6×6	6×6	6×6	6×6	6×6	5×5	4×4	3×3	—	—	—	—
	0.0001 "	4×4	5×5	5×5	4×4	5×5	4×4	3×3	—	—	—	—	—
青 山 B 株 糖 体	0.1mg	11×11	11×11	10×11	15×15	12×12	14×14	8×8	6×5	9×8	—	—	—
	0.01 "	8×8	9×10	8×8	9×10	10×11	9×8	12×11	5×5	7×7	—	—	—
	0.001 "	6×6	6×6	6×6	7×7	8×8	6×6	4×4	—	—	—	—	—
	0.0001 "	4×4	5×5	5×5	4×4	5×5	5×5	3×3	—	—	—	—	—

F株感染 37 日後の結核海鼠における「ツ」多糖体の皮内反応

多 糖 体	注 射 量	3 時 間 値 mm			6 時 間 値 mm			24 時 間 値 mm			48 時 間 値 mm		
朝 倉 株 多 糖 体	0.1 mg	12×11	16×17	12×12	12×13	16×17	13×15	15×16	19×18	14×13	6×6	13×13	7×7
	0.01 "	8×8	12×12	10×10	9×10	12×12	10×10	12×11	14×12	9×9	4×4	10×10	4×4
	0.001 "	5×5	9×9	7×7	5×5	9×9	8×8	6×6	7×9	5×5	—	6×6	—
	0.0001 "	3×3	6×6	5×5	3×3	6×6	5×5	4×4	4×4	3×3	—	3×3	—
青 山 B 株 糖 体	0.1 "	10×10	10×10	10×10	10×10	12×12	11×11	7×8	10×10	6×6	—	5×5	—
	0.01 "	8×8	8×8	7×7	8×8	10×10	8×8	4×4	4×4	4×4	—	3×3	—
	0.001 "	5×5	5×5	5×5	6×6	6×6	5×5	—	—	—	—	—	—
	0.0001 "	—	3×3	—	4×4	3×3	3×3	—	—	—	—	—	—

正常海狼における「ツ」多糖体の皮内反応(対照)

多糖体	注射量	3 時 間 値 mm	6 時 間 値 mm	24 時 間 値 mm	48 時 間 値 mm
朝倉株多糖体	0.01 mg	5×5 — —	— — —	— — —	— — —
青山株多糖体	0.01 "	4×4 — —	— — —	— — —	— — —

第 4 表

F株感染 23 日後の結核海狼における「ツ」蛋白質の皮内反応

蛋白質	注射量	3 時 間 値 mm	6 時 間 値 mm	24 時 間 値 mm	48 時 間 値 mm
朝倉株蛋白質	0.01 mg	11×11 9×9 11×11	15×15 15×15 13×13	27×23 21×17 21×23	26×26 16×16 19×15
	0.001 "	9×9 7×7 9×9	12×13 12×11 10×10	18×18 13×13 13×15	17×18 10×10 7×7
	0.0001 "	6×6 5×5 7×7	10×11 8×8 8×8	10×10 9×9 8×9	7×7 5×5 5×5
	0.00001 "	4×4 3×3 5×5	8×8 6×6 6×6	7×6 6×9 6×6	4×4 3×3 3×3
青山株蛋白質	0.01 "	12×12 9×9 11×11	14×15 12×13 12×13	27×24 19×19 21×19	32×29 16×17 17×17
	0.001 "	9×9 7×7 9×9	12×13 10×10 9×10	17×19 10×10 12×12	12×11 10×10 7×8
	0.0001 "	7×7 5×5 7×7	10×11 7×7 7×8	10×10 7×7 8×9	7×7 5×5 5×5
	0.00001 "	5×5 3×3 5×5	8×9 6×6 6×6	6×6 5×5 6×6	4×4 3×3 3×3

F株感染 72 日後の結核海狼における「ツ」蛋白質の皮内反応

蛋白質	注射量	6 時 間 値 mm	24 時 間 値 mm	48 時 間 値 mm
朝倉株蛋白質	0.01 mg	11×11 13×13 13×14	17×17 15×17 20×20	10×11 14×15 17×18
	0.001 "	7×7 7×7 10×10	5×5 8×8 11×11	5×5 6×6 9×9
	0.0001 "	4×4 4×4 8×8	— — 3×3	— — 4×4
	0.00001 "	— — 6×6	— — —	— — —
青山株蛋白質	0.01 "	14×14 10×10 11×11	16×17 13×12 15×15	7×8 10×11 12×12
	0.001 "	8×8 5×5 9×9	5×5 9×9 9×9	3×3 6×6 5×5
	0.0001 "	4×4 — 7×7	— — 3×3	— — —
	0.00001 "	— — 4×4	— — —	— — —

正常海狼における「ツ」蛋白質の皮内反応(対照)

蛋白質	注射量	3 時 間 値 mm	6 時 間 値 mm	24 時 間 値 mm	48 時 間 値 mm
朝倉株蛋白質	0.001 mg	3×3 4×4 —	— — —	— — —	— — —
青山株蛋白質	0.001 "	3×3 — —	— — —	— — —	— — —

膜を通過しない非透析性の高分子の蛋白質を混じていることが分つた。また多糖体が6—24時間値を最大とするアルツ型反応を呈し、蛋白質が24—48時間値を最大とするツベルクリン型反応を呈することは本報にて確認された。これはさきに Fl. B. Seibert⁹⁾によつても認められた。

最近 Heidelberg and Menzel¹⁰⁾によつて結核菌体多糖体が血清反応(沈降反応)の上から Species Specificity を有することが報ぜられた。本実験において朝倉株と青山B株の相違が蛋白質劃分よりも多糖体劃分において一層明確に認められた。このことは上記両氏等の考えを裏書きしたものと見える。この相違は両株の毒力

の相違と並行しているようであるが、菌株数が僅かであるので明確なことはいえない。

Seibert¹⁴⁾は強毒株と弱毒株の「ツ」蛋白のN量を等しくすると皮内反応は同じ力価であると述べているが、著者の実験にても両株の蛋白体N量は大体等しく、海狸結核感染後23日の皮内反応には両菌株の蛋白体間に差違を認めなかつたが、感染72日の皮内反応にて僅かに差違を認めた。かかる点に関して最近 H. Bloch¹²⁾は結核菌培養より索状物質(Cord Factor)を抽出して毒性の存することを報じた。また E. B. Bevilacqua and J. R. Mc Carter¹³⁾¹⁴⁾等が非加熱培養濾液中の蛋白体に毒力と関係ある劃分の存することを述べていることも注目すべきである。

多糖体のN量について戸田教授¹⁵⁾は多糖体を精製してN量が0.0%になると皮内反応もなくなつたと述べている。著者の多糖体ではN=0.042%であつて、精製して色素を除いた白色粉末でもアルツス型反応を呈した。Cournaud and Lester, Es. R. Long¹⁶⁾は結核菌体蛋白体の皮内反応の強さは菌体多糖体の反応の100倍であると述べているが、著者の「ツ」蛋白体と多糖体の皮内反応の強さの比と一致している。

最近 Seibert¹⁷⁾はエタノール分割法によつて、3種の「ツ」蛋白体(A, B, C)及び2種の「ツ」多糖体(I, II)を分離し、特にA, B蛋白体は皮内反応活性度が最も強いことをしめした。これ等はなお今後検討せられねばならぬ点である。

第2表の蛋白体の呈色反応から、蛋白体はチロジン、トリプトファン類似のアミノ酸より構成せられているのではないかと考えられる。また糖類の呈色反応、核酸反応¹⁸⁾が陽性であつたから、著者の分離した蛋白体はなお核酸多糖体を随伴していたとみられる。

多糖体のN含有量は僅かであるが、この程度のNにてアミノ糖といえるか否かなお疑問であろう。ペントースより構成せられていることは明らかであるが、ペントースとしては Maxim¹⁹⁾はD-アラビノースを挙げてゐる。しかし著者の多糖体は塩酸フロログルシン反応の色調と直視分光器にて検じた結果²⁰⁾明らかに吸収帯の位置と数かD-アラビノースと異つていたからアラビノースではないと考えられた。なお今後詳細検討する予定である。

結 論

稍々強毒な人型朝倉株、稍々弱毒な人型青山B株のソートン培地加熱培養濾液より、10%コロチウム膜限外濾過法にて $1/10$ 量濃縮液をつくり、硫酸安門完全飽和沈澱法及び酒精沈澱法によつて蛋白体及び多糖体を分離した。各劃分の結核海狸皮内反応において、注射直後より1 $\frac{1}{2}$ 時間後までは蒼白な水疱の中央に僅かに発赤を伴う Immediate or Early Reaction であつた。2時間後より

急速に水疱全体の発赤、硬結浮腫度を増し、Delayed Reaction になり、以後3, 6, 24, 48時間と逐次発赤の程度硬結浮腫が增強した。多糖体は6—24時間値を最大とするアルツス型反応を呈し、蛋白体は24—48時間値を最大とするツベルクリン型反応を呈した。多糖体と蛋白体の皮内反応の強さの比は大約1:100であつた。朝倉株と青山B株の各劃分の皮内反応の差違は蛋白体よりも多糖体においてより著明に認められた。朝倉株と青山B株の蛋白体のN含有量はそれぞれ16.607%, 16.656%, 多糖体のそれはそれぞれ0.565—0.042%, 0.866%であつた。呈色反応より蛋白体はチロジン、トリプトファン様のアミノ酸より成るのではないかと考えられ、また多糖体はペントースより成るが、従来の報告の如きD-アラビノースではないと考えられた。

執筆するに当り植田教授の御懇篤なる御指導御校閲を深謝す。また京大医化学教室明石修三助教授の御助言を深謝す。

文 献

- 1) 白石：結核，25巻，8号341。昭25.8。京大結核研究所年報第1号168—174。昭25.3。
- 2) 白石：結核，26巻，6号268。昭26.6。
- 3) 白石：結核，26巻，8号367。昭26.8。
- 4) 赤堀・林：化学実験学第2部，2巻(河出書房)87。昭15。
- 5) 中川：日新医学，32巻，4号，302。昭18。
- 6) Asheshov. I. : J. Bact., 25 : 293, 339, 1933.
- 7) Mashmann, E. und Küster, E. : Deut. Med. Wschr., Jg. 57 : 143 und 1497, 1931,
- 8) 渡辺：結核彙報，2号，73，昭15, 9。
- 9) Seibert, Fl. B. : Chem. Rev., 34 : 107, 1944.
- 10) Heidelberger, M. & Menzel. A. E. O. : J. Biol. Chem., 118 : 79, 1937.
- 11) Seibert, Fl. B. : J. Immunol., 24 : 149, 1933.
- 12) Bloch, H. : J. Exp. Med., 91 : 2, 197, 1950.
- 13) Bevilacqua, E. B. & Mc Carter. J. Exp. Med., 87 : 3, 229, 1948.
- 14) Mc Carter & Bevilacqua, E. B. : J. Exp. Med., 87 : 3, 245, 1948.
- 15) 戸田：結核菌とBCG(南山堂)62, 昭22.
- 16) Cournaud A. & Lester, M. S. : Third International Congress For Microbiology(New York 1939). Report of Proceedings. 621, 1940.
- 17) Seibert, Fl. B. : Amer. Rev. Tuberc., 59 : 1. 86, 1949,
- 18) Dische. Z. : Biochem. Z., 189, : 77, 1927.
- 19) M. Maxim : Biochem. Z., 223 : 404-407, 1930.
- 20) 柴田雄次：分光化学(前編)35. 昭14(裳華房)