

ツベルクリン特にその製法に関する再検討

第6報 菌株、培養容器、培養濾液滅菌前のPH修正、濃縮温度に関する知見補遺

京都大学結核研究所第七部(主任 植田 教授)

白石 正 雄

(昭和 26 年 7 月 10 日受付)

緒 言

著者はさきに第1報¹⁾及び第3報²⁾においてツベルクリンの製法に関して培養基、培養日数、濃縮温度、濾過操作等を吟味した。今回は培養菌株の産生「ツ」力価の比較、培養容器、培養液滅菌前のPH修正、濃縮温度の異なる製法及び濃縮操作の「ツ」力価に及ぼす影響等について検討したので、ここに追加報告する。

第1章 実験方法

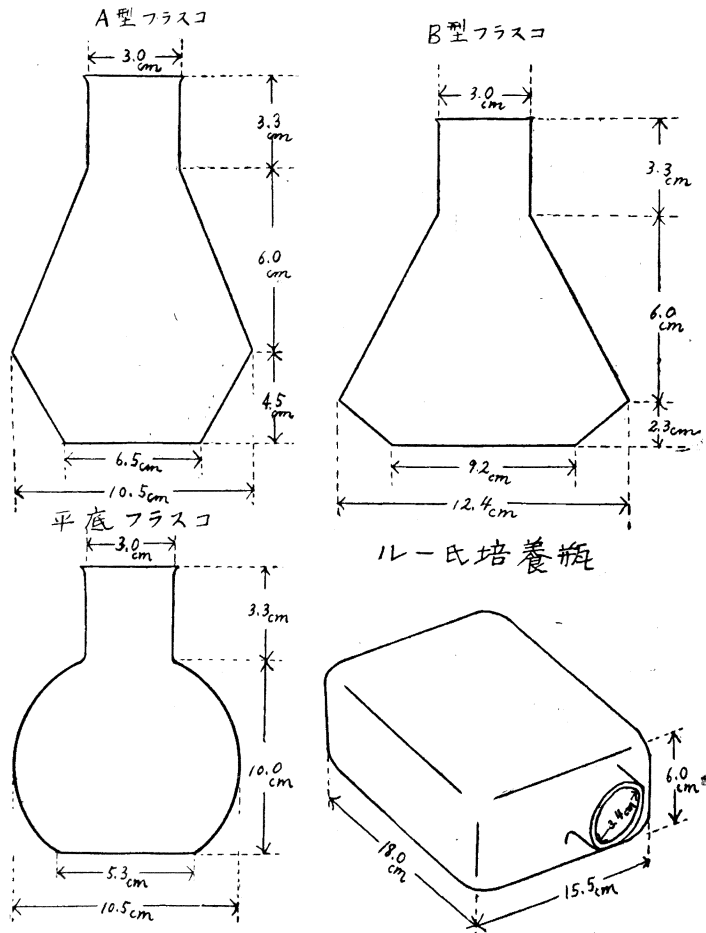
1. 培養菌株及びその産生「ツ」の力価測定

人型朝倉株、フランクフルト(F)株及び青山B株、B

CGの4株を用いた。培地はいずれもソートン培地(起始PHはBCGのみは7.2, 他は6.8)であつて、朝倉株及び青山B株は9週培養, F株及びBCGは3月培養であつた。各培養液を100°C 30分加熱後滅菌濾紙にて菌体を濾別し, 70°—80°C水浴上にて1/10量に濃縮し「ツ」をつくつた。各菌株「ツ」の50倍及び500倍稀釈液0.1ccをF株1mg皮下接種海狸3頭(2頭は感染79日, 1頭は188日)の両背側皮内に注射し, 6, 24, 48時間値(硬結を伴つた発赤)を測定した(第1表)。

2. 各種の培養容器よりつくつた「ツ」の力価測定

第1図 培養容器



第1図に示すように、自家考案のフラスコ2種(A型及びB型)、平底フラスコ及びルー氏培養瓶計4種(同種コルベン各4個)合計16個のフラスコにソートン培地(PH6.8)250cc宛を分注滅菌した。これに青山B株ソートン培地3週培養の小指頭大菌塊を1個宛静かに浮べて37°Cにて7週間培養した。100°C 30分加熱後滅菌濾紙にて菌体を濾別し、菌体の水分を濾紙にて充分吸取り、硫酸乾燥器中にて乾燥後化学天秤にて秤量した。

濾液量を秤量して培養液蒸発量を求め、70°—80°C水浴上にて濃縮して「ツ」をつくつた。その100倍及び500倍稀釈液にて結核海狸(F株1mg皮下接種)3頭の皮内反応を検した(第2表)。

各コルベンの形状³⁾は第1図に示す通りであるが、A型、B型及び平底フラスコの三者は容量500ccである。又ルー氏培養瓶は容量1500ccである。従つて分注後の液面上空間部は前三者は250cc、ルー氏培養瓶は1250ccである。各フラスコ中の液面最大面積はA型と平底とは相等しく88.25

cm², B型はその約1.5倍 (120.76cm²), ルー氏培養瓶は約3倍(279.0cm²)である。

3. 培養液の加熱滅菌前PHを種々に修正してつくつた「ツ」の力価測定

青山B株及び朝倉株をそれぞれソートン培地に9週間培養し、滅菌濾紙にて菌体を濾別してえた非加熱培養濾液(PH4.2)を四等分して一つはPHを4.2のままとし、他の三者は1N NaOH溶液にてPH7.0, 8.5, 10.0に修正したのち100°C 30分加熱した。この加熱によるPHの変動を朝倉株培養濾液についてみたところ、PH4.2のものは4.2のまま、PH7.0のものは6.0に、PH8.5のものは7.8に、PH10.0のものは9.0に移動していた。またPH4.2及び7.0の培養濾液中に淡黄色乃至白色沈澱を生じていた。PH10.0の濾液中には沈澱は生じなかつたが、液の色調は淡黄色より黄褐色に変化していた。生じた沈澱を濾別し、各濾液を70°-80°Cの水浴上にて1/10量に蒸発濃縮したのち、いずれもPH7.0に修正し濾過、防腐剤マーズオンを一万倍に加えて保存した。濃縮の際のPH変動を朝倉株についてみたところ、PH4.2のものは4.2のまま、PH6.0になつていたものは4.8に、PH7.8になつていたものは5.2に、PH9.0になつていたものは8.0に移動していた。

上記の如くにしてつくつた各「ツ」原液の100倍及び500倍稀釈液を以てF株1mg皮下接種した結核海狸9頭について皮内反応を検討した(第3表)。

4. 濃縮温度の異なる製法にてつくつた「ツ」の力価測定

「ツ」は青山B株及び朝倉株ソートン培地5-9週培養よりつくつた。濃縮温度の比較としては100°Cと70°-80°Cの比較は既に第1報に報告したので、今回は低温45°-55°Cにおける減圧濃縮法、5°-10°Cにおける限外濾過濃縮法と70°-80°Cの水浴上における蒸発濃縮法の三者を比較した(第4表)。

減圧濃縮法は25-60mmHgの減压下、45°-55°Cのヒマシ油浴⁴⁾上にて蒸発した気体を流水下に冷却した減圧フラスコ内で凝結させ、一部これを通過した気体はマンメータとの間に挿入した塩化カルシウム管及び硫酸洗滌瓶中に捕捉した。限外濾過濃縮法は第4報⁵⁾の通りである。

各「ツ」の50倍及び500倍稀釈液0.1ccを以て結核海狸皮内反応に供した。

第2章 実験成績

第1表にしめすように朝倉株及び青山B株9週培養、F株及びBCG3月培養よりつくつた各「ツ」の50倍及び500倍稀釈液の結核海狸皮内反応6, 24, 48時間値を比較してみたが、各菌株間に有意の差は認められなかつた。

次に第2表に「ツ」産生用培養容器の比較成績を示した。A型フラスコは発育菌量最も多くして、蒸発液量最も少

第1表 結核菌株の産生「ツ」力価比較

「ツ」	50倍液			500倍液		
	6°	24°	48°	6°	24°	48°
朝倉株「ツ」 (9週培養)	14x14 15x16 14x15	14x12 15x14 14x14	13x10 13x13 10x10	9x9 9x9 9x9	7x7 12x11 9x9	6x6 7x7 7x7
青山B株「ツ」 (9週培養)	13x12 10x10 12x12	12x10 13x12 14x14	9x8 11x11 9x9	9x9 8x8 8x8	5x5 8x7 10x10	5x5 4x4 7x7
F株「ツ」 (3月培養)	12x12 14x13 12x13	13x11 14x13 12x12	11x10 11x11 7x9	9x9 10x10 —	10x10 11x11 9x9	8x6 8x8 9x9
BCG「ツ」 (3月培養)	11x11 13x13 12x11	12x14 15x17 16x15	15x15 15x16 12x12	10x10 9x11 —	7x7 13x13 12x12	8x8 13x13 12x12

く、産生「ツ」の力価は最強であつた。B型フラスコ、ルー氏培養瓶の発育菌量、「ツ」力価は之に次ぎ、平底は若干劣つていた。

第2表 ツベルクリン産生用培養フラスコの比較

フラスコの種類	A型	B型	平底	ルー
平均発育菌量	1.9387g	1.7010g	1.6606g	1.8031g
平均蒸発液量	52.5cc	63.5cc	60.7cc	69.7cc
産生「ツ」力価	100倍	100倍	100倍	100倍
	500倍	500倍	500倍	500倍
24°	22x20 16x15	15x14 14x13	17x16 15x13	14x12 12x11
48°	15x14 14x13	11x9 10x9	14x13 12x12	8x8 8x8

第3表より明らかなように、青山B株及び朝倉株ソートン培地9週培養の非加熱培養濾液をPH4.2, 7.0, 8.5, 10.0としてつくつた各「ツ」の50倍, 100倍, 500倍稀釈液の皮内反応力価の差は僅少であつた。

第3表 加熱滅菌前培養濾液PH修正の「ツ」力価に及ぼす影響

青山B株「ツ」	PH7.0			PH8.5			PH10.0		
	50倍	100倍	500倍	50倍	100倍	500倍	50倍	100倍	500倍
修正前 平均値	12	10	5	16	13	9	7	8	7
修正後 平均値	13	10	4	17	13	7	8	7	5
	差 d=0			差 d=-0.3			差 d=-0.7		
朝倉株「ツ」	修正前 平均値			修正前 平均値			修正前 平均値		
	13	12	8	14	12	9	14	12	7
	修正後 平均値			修正後 平均値			修正後 平均値		
	14	12	8	15	13	8	16	12	8
	差 d=0.3			差 d=0.3			差 d=1		

第4表にしめすように、青山B株及び朝倉株ソートン培地9週培養の70°-80°C濃縮「ツ」、減圧濃縮「ツ」、限外濾過濃縮「ツ」の力価は、70°-80°C「ツ」の力価を1.00としてしめすと、減圧濃縮「ツ」の力価は0.45、限外濾過「ツ」の力価は0.56であつた。すなわち70°-80°C「ツ」は最強、限外濾過「ツ」はこれに次ぎ、減圧濃縮「ツ」は最も弱かつた。

第4表 濃縮温度の異なる「ツ」製法の比較

	70-80°C濃縮 ¹⁾		減圧濃縮 ²⁾ (45-55°C)		限外濾過濃縮 ³⁾ (5-10°C)	
	50倍	500倍	50倍	500倍	50倍	500倍
青山B株 ソートン	17x17	11x10	13x13	7x7		
	24 ¹⁾ 14x13	6x6	12x12	4x4		
	48 ¹⁾ 15x15	7x7	8x8	4x4		
	11x11	3x3	3x7	3x3		
朝倉株 ソートン	18x17	11x11			17x17	12x12
	24 ¹⁾ 20x20	13x13			18x17	12x12
	48 ¹⁾ 14x13	10x9			11x10	8x7
	17x17	11x11			15x15	8x8
朝倉株 ソートン	16x15	9x9	15x14	6x6	12x12	7x7
	24 ¹⁾ 18x18	10x9	16x15	8x8	12x12	7x7
	48 ¹⁾ 13x13	4x4	9x9	4x4	8x8	4x4
	16x16	8x8	12x12	4x4	10x10	4x4
初値	1.00		0.45		0.56	

次に加熱濃縮による力価の影響は皮内反応の24時間値、48時間値いずれに表われるかを第5表にしましたが、朝倉株4%グリセリンブイオン「ツ」の非濃縮「ツ」よりも濃縮「ツ」のほうが、48時間値にて著明に強くあつた。

第5表 濃縮操作の「ツ」力価に及ぼす影響の再吟味

朝倉株4%グリセリンブイオン53日培養						
	非濃縮 ¹⁾		70-80°C濃縮 ²⁾ (固体300)		70-80°C濃縮 ³⁾ (固体70)	
	50倍	500倍	50倍	500倍	50倍	500倍
6°	17x16	9x9	17x16	15x14	18x17	14x13
	15x13	15x14	14x13	13x12	16x16	11x9
	13x12	13x12	15x12	14x12	16x14	9x8
	13x13	11x10	13x12	13x12	16x14	13x12
	11x11	11x11			12x13	10x9
24°	18x18	9x8	18x18	16x15	17x17	14x13
	11x11	8x8	13x13	13x12	17x17	10x10
	13x13	7x5	19x17	11x10	17x17	8x7
	16x15	9x8	17x17	15x15	16x15	9x9
	13x13	9x9			17x15	11x10
48°	7x7	6x6	12x11	11x10	12x11	4x4
	9x9	3x3	12x11	6x6	7x12	6x6
	12x11	4x4	12x12	7x6	11x11	5x5
	8x8	4x4	16x16	12x10	14x14	8x8
	10x10	4x4			14x14	7x7

第3章 考 按

「ツ」は結核菌の増殖期に旺盛に産生せられる外、培養経過と共に自己融解によつても産生せられることはすでに述べた。⁷⁾ 又菌株⁸⁾、菌型⁹⁾、毒力¹¹⁾12)13)14)15)16)によつて「ツ」力価の差違が認められるという。これに反対する人もある。第1表の成績では朝倉株、F株、青山B株、BCGの「ツ」力価に差は認められなかつたが、F株BCGは3月培養であつて、相当自己融解による「ツ」が加つていたと考えられる。

「ツ」産生用培養容器としてはA型フラスコが最優秀とみられるが、他の型のフラスコは僅かにこれに劣る程度であつた。培地表面積、液面上空間部は「ツ」産生に大した影響を及ぼさないのではないかとみられる。

結核菌培養濾液の加熱前PHを種々に修正して100°C30分加熱すると、「ツ」活性を有する核蛋白を析出するこ

とは前回報告した⁷⁾。しかし第3表よりわかるように、いずれの修正「ツ」の間にも力価の著しい懸隔は認められなかつた。しかしPHを4.2よりもつと酸性にするか或いは加熱時間をもつと長くしていたら更に大量の核蛋白が析出し、力価にその差違が表われたかも知れない¹⁰⁾。

濃縮温度を異にした三製法のうち、70°-80°Cの加熱濃縮「ツ」の力価が最も強く、限外濾過濃縮「ツ」、減圧濃縮「ツ」の順であつた。すなわち高温又は減圧にして蒸発を旺盛にすると、力価が減弱すると考えられる。

次に加熱濃縮(70°-80°C)「ツ」の力価が非濃縮「ツ」よりも大であることは第1報で述べたが、第5表にみるように、48時間値が著明に強くなつているのである¹⁰⁾。Seibert²⁾によれば加熱「ツ」中には変性蛋白(分子量16,000)が出現し、不変性蛋白(分子量34,000)と電気泳動速度は等しいが等電点が異なるという。すなわち斯る変性蛋白の出現が「ツ」の粘性を大にして力価に影響を及ぼすものと考えられる。第6表にW. Ostwald 粘度計¹¹⁾を用いて青山B株及び朝倉株ソートン培地培養よりつくつた非濃縮培養濾液及び70°-80°C濃縮「ツ」の比粘度(specific Viscosity)を測定した値をしめした。加熱濃縮によつて粘度が著明に増大したことは明らかであつた。

第6表 「ツ」の濃縮と粘度との関係

「ツ」	青山B株ソートン培地 9週培養		朝倉株ソートン培地 9週培養	
	非濃縮 ¹⁾ /10量濃縮「ツ」	非濃縮 ¹⁾ /10量濃縮「ツ」	非濃縮 ¹⁾ /10量濃縮「ツ」	非濃縮 ¹⁾ /10量濃縮「ツ」
η sp	0.0568	0.8324	0.0560	0.9400

(註)

$$\text{比粘度 } \eta_{sp} = \eta_{rel} - 1 = \frac{d \cdot t}{d_0 \cdot t_0} - 1$$

η_{rel}……相対粘度 t, t₀……W. Ostwald 粘度計

の二標線間の落下時間

d, d₀……比重

結 論

1. 朝倉株、青山B株、F株及びBCGの産生「ツ」の力価の間に著しい相違は認められなかつたが、培養日数による「ツ」産生量の増加を考慮に入れると菌株による「ツ」力価の相違があるかも知れない。なお今後の検討を要す。

2. 「ツ」産生用培養容器としては比較した4種の容器のうちA型フラスコが最優秀であつた。培地表面積、液面上空間部は発育菌量、「ツ」産生量に大した影響を及ぼさぬと考えられる。

3. 非加熱培養濾液のPHを種々に修正してから100°C30分加熱し、加熱濃縮しても「ツ」力価に著明な影響を及ぼさなかつた。PHをもつと低くするか又は加熱時間を長くしたら力価の相違をみたかも知れない。

4. 濃縮温度を異にしてつくつた製法では70°-80°C

加熱濃縮「ツ」、限外濾過濃縮「ツ」(5°-10°C)、減圧濃縮「ツ」(45°-55°C)の順に力価が弱くなった。すなわち高温又は減圧にして蒸発を過度にすると力価が减弱するとみられる。

5. 加熱濃縮の結果「ツ」の粘度が著しく増大し皮内反応の48時間値が増強した。これは変性蛋白が出現したためと考えられる。

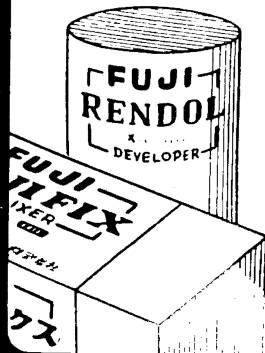
撰筆するに当り植田教授の御指導、御校閲を深謝す。

文 献

- 1) 白石：結核，25巻，7号，295，昭25.
- 2) 白石：結核，26巻，6号，268，昭26.
- 3) 戸田・高木・山田・小林・伊勢・西木：日本臨床4巻，4号，4頁，昭和21，4.
- 4) Steinkopf, W.: Houben Methoden d. Org. Chemie. Bd 1, Allg. Teil. 575-580, 1926.
- 5) W. Gattermann-Wieland: Praxis d. Org. Chemikers. 26 Aufl. 26, 1940.
- 6) 白石：結核，26巻，8号，367，昭26.
- 7) 白石：結核，27巻，2号，92，昭27.
- 8) H. J. Corper & C. Clark: Amer. Rev. Tuberc., 54: 401, 1946.
- 9) 渡辺：結核彙報2号，73頁，昭15.9：結核の細菌学及免疫学210(富倉書店)昭18.
- 10) J. H. Lewis & Fl. B. Seibert: J. Immunol., 20: 201-220. 1931.
- 11) A. Calmette & De Potter: Ann. Inst. Pasteur. 40: 353. 1926.
- 12) Van Deirse: C. R. Soc. Biol., 132: 358, 1939
- 13) R. Laporte: 132: 420, 1939.
- 14) A. Saenz & G. Canetti: C.R. Soc. Biol., 133: 33, 1940.
- 15) Borrel, Boez & Coulson: Ann. Inst. Pasteur 37: 394. 1928.
- 16) Fl. B. Seibert: Amer. Rev. Tuberc., 24: 149, 1933.
- 17) Fl. B. Seibert: Amer. Rev. Tuberc., 17: 394, 1928.
- 18) H. J. Corper & M. L. Cohn: Tubercle 31: 122-130. 1950.
- 19) 佐藤：抗酸菌病研究雑誌2巻，2号，37頁，昭22.
- 20) Fl. B. Seibert: Chem. Rev. 34: 107, 1944
- 21) 呉・小寺：化学実験学，第二部3巻(河出書房)103-141，昭16.
- 22) H. Standinger：有機膠質化学(吉岡甲子郎訳)58頁(東洋書館)昭21.

富士X-レイフィルム

“富士X-レイフィルム”は増感紙感度に重点を置いて製造されていますから胸部撮影に最高の性能を発揮します。



“レンドール”(富士X-レイフィルム用現像剤)

使用液：2,000 c.c

“フジフィットクス”(富士酸性硬膜定着剤)

使用液：4,000 c.c



富士フィルム