

O-Aminophenol-Azo-Tuberculin と Old-Tuberculin との比較研究

第1報 動物の皮内反応による青山 B-OT と青山 B-Azo T 並びに BCG-Azo T との比較

国立予防衛生研究所結核部

柳沢 謙・浅見 望・細井正春・土屋皖司

(昭和 26 年 9 月 18 日受付)

I 緒 言

Koch が Tuberculin を発見して以来, Tuberculin の活性因子を純粹に抽出分離する研究が多くの学者によつて屢々成された。そのうちでも Maschman-Küster¹⁾, Seibert^{3,4)}, 粕谷⁵⁾, 桑島⁶⁾, 貝原⁷⁾及び武田等⁸⁾の業績は見るべきものがある。特に米国の Seibert 女史の P. P. D. (Purified Protein Derivative) は化学的には実に精細に研究され、米国では市販品として実用の域にも達せんとしている。しかしながらこれらの研究者による精製法は、分離操作が比較的繁雜である上に、収量及び力価も各 Lot 毎に異つているものが多い。最近岡本・伊藤及び越村^{9,11)}等は Santon 培養の Old-Tuberculin (以下 OT) に Azo 化した O-Aminophenol を加え Diazo 化させて O-Aminophenol-Azo-Tuberculin (以下 Azo T) を分離した。この分離操作は簡單であり、その収量及び力価は常に一定していると報告している。我々も Tuberculin の活性因子の研究の一端として、人型結核菌青山 B 株及び BCG 株の OT より、それぞれの Azo T を分離したので動物の皮内反応による OT と Azo T との比較実験成績についてまず報告する。

II Azo T の分離方法

1) 使用菌株：人型結核菌“青山B”株並びに BCG 株を用いた。

2) 培地及び培養法：Santon 培地に上記の各菌株を移植し、37°C フランキ内で9週間培養した。

3) Azo T の分離：伊藤・越村の方法を追試した。その概要を記せば次の如くである。

培養終了後、殺菌し、濾紙をもつて菌体を別ち、液体を水浴上で 1/5 に濃縮後 Seitz 濾過器をもつて濾過した濾液に NaOH を加えて、アルカリ性となし、NaNO₂ をもつて Azo 化した O-Aminophenol を加えて一夜氷室に静置して充分 Diazo 化させ、N/10 HCl で pH 4.0 とすれば Azo 蛋白は沈澱する。この沈澱を集め N/10 NaOH に溶し、不溶物を除き、再び HCl で集める。操作を数回繰返して精製し、これを NaOH に溶し、約

2 倍量の 70% アルコールに注加して生ずる沈澱を集め、獸腸膜に入れ一夜透析した後、HCl で pH 5.4 とすれば沈澱する。

これを集めて真空乾燥器内で乾した黒褐色の粉末が Azo T である。

4) 収量：この収量は第1表の如くであつた。すなわち培地 1 Liter から青山 B-Azo T は 108mg, BCG-Azo T は 131mg の収得があつた。

第1表 両 Azo T の収量

Azo T の種類	培地量	収量	培地 1 Liter より
青山 B-Azo T	1,250cc	136mg	108mg
BCG-Azo T	1,500cc	196mg	131mg

III モルモットの皮内反応

A 実験方法

1) 使用動物：a) 青山 B 感作群：青山 B 株死菌流動パラフィン乳剤 6mg 筋肉内接種後 6 週以上を経過したもの、b) BCG 感作群：BCG 株生菌 30mg 接種後 6 週以上を経過したもの、この両群とも標準ツベルクリン 2,000 倍稀釈液 0.1cc を皮内注射後 24 時間において 10mm 以上の硬結を呈するもののみを実験に供した。実験は 1950 年の 2 月と 10 月との 2 回行つた。その際におけるツベルクリン反応の強さは第2表の如くであつて、青山 B 感作群では硬結の平均の大きさが 15mm であるのに対し、BCG 感作群では 11mm である。すなわち後者は前者よりもアレルギーの弱い動物であつた。

第2表 使用モルモットの OT によるツベルクリン反応

群別	感作種類	経日 過数	実験時期	使用 頭数	OT による硬結の平均値		
					24時	48時	72時
1	青山 B 感作群	6 週以上	1950— 2	44	15.1	12.7	
2			〃 —10	20	15.7	13.4	9.1

3	BCG 感作群	6	過上	1950—2	17	11.9	11.2
4				—10	14	11.1	8.8 6.2

2) 試料: a) OT は青山 B 株 Sauton 培養の標準ツベルクリン, b) 青山 B-Azo T, c) BCG-Azo T, 各試料は生理的食塩水(phenol を加えない)をもつて稀釈した。

3) 注射量: OT は 2,000 倍稀釈液 0.1cc すなわち 0.05mg, 両 Azo T は 0.1γ

4) 注射方法: 感作モルモットの背部の一侧には OT, 他側対称部には Azo T をそれぞれ 0.1cc ずつ皮内注射した。

5) 判定方法: 注射後 24, 48 及び 72 時間における硬結の横縦径の算術平均を求めた。但し 10 月の実験では発赤の大きさも計測してみた。

B 実験成績

1. Ratio 及び硬結の平均値による比較

青山B感作群及び BCG 感作群を用い, OT に対し青山 B-Azo T 及び BCG-AzoT を注射した場合の硬結による Ratio は第3表の如くであつた。

第3表 OT に対する青山 B-Azo T
及び BCG-Azo T の Ratio

実験 時期	感作群別	青山 B-AzoT				BCG-AzoT			
		頭数	24時	48時	72時	頭数	24時	48時	72時
第1回	1 青山B感作群	21	0.95	0.95		23	0.67	0.64	
	3 BCG 感作群	7	0.71	0.65		10	1.20	0.82	
第2回	2 青山B感作群	10	1.04	1.07	1.17	10	0.85	0.87	0.98
	4 BCG 感作群	7	1.01	0.99	1.11	7	1.19	1.08	1.27

註: 注射量は OT 0.05mg, Azo T 0.1γ

第1回実験において, 青山 B-Azo T を用いた場合の 24 時間における Ratio は青山B感作群では 0.95 であるのに対し, BCG 感作群は 0.71 であつて, 青山B 感作群

第4表 両群における硬結の大きさの平均値の比較(第2回実験)

感作群別	「ツ」の種類	青山 B-Azo T				BCG-Azo T				
		頭数	「ツ」	24時	48時	72時	頭数	「ツ」	24時	48時
青山B 感作群	10	OT	mm 14.8	mm 12.1	mm 8.4	10	OT	mm 16.6	mm 14.8	mm 10.2
		AT	15.4	12.9	9.6		AT	14.2	12.9	10.0
BCG 感作群	7	OT	10.0	8.1	5.5	7	OT	10.6	8.7	6.7
		AT	10.8	8.3	6.3		AT	13.2	9.8	8.2

註: …AT…Azo T

よりも弱い反応を呈した。また BCG-Azo T を用いた場合には, 青山 B-Azo T の場合と反対の反応を呈し, 青山B感作群では 0.67 であるのに対し, BCG 感作群では 1.20 となつてゐる。また第2回実験の場合も大体において第1回実験と同じような成績である。ただ全体として第2回実験の数値は第1回実験のものに比して大きくなつてゐる点に異のみである。これら2回の実験結果からわかることは, 青山B感作群に対し青山 B-AzoT は強く反応し, BCG-Azo T は弱く反応する傾向が見られ, また BCG 感作群では青山 B-Azo T は弱く, BCG Azo T は強く反応する傾向が見られた。また AzoT の側から見れば, 青山 B-Azo T は両感作群に対する差異は比較的少ないが, BCG-Azo T ではその差異が顕著であつて, BCG 感作群に対し型特異性が明らかに認められた。これらの関係は硬結の大きさの平均値について見ると尙更明らかになつて来る。すなわち第4表の如くである。

IV 総括

伊藤・越村はモルモットに人型結核菌 H_2 株 1mg を注射後1カ月を経過した感作動物を用い, OT と Azo T とを皮内注射した結果, OT 0.1mg ($\frac{1}{1,000}$ 0.1cc)

に対し H_2 -Azo T は 1.0~0.1γ の間がほぼ等力価であつたと報告している。われわれも伊藤・越村の方法によつて人型菌青山B株及び BCG 株の OT から AzoT を分離し, これ等の Azo T と OT との比較を, 青山B感作群及び BCG 感作群について実施したが, 使用動物数が少ない為あまり明瞭な成績は得られなかつた。しかし青山 B-OT 0.05mg ($\frac{1}{2,000}$ 0.1cc) に対し, 両 Azo T 0.1γ を用いた場合においては大体次のような傾向が見られた。

青山 B-Azo T BCG-Azo T

青山B感作群 ほぼ等しい かなり弱い

BCG 感作群 稍く弱い かなり強い

すなわち青山 B-Azo T は両感作群に対する差異は比較的少ないのに反し, BCG-Azo T は青山B感作群には弱く, BCG感作群には強く反応してゐて, 型特異性が顕著に認められた。

V 結 言

青山B感作群及び BCG 感作群に対し, 青山 B-OT と青山 B-Azo T 並びに BCG-Azo T とを皮内注射して比較した結果あまり確実な成績は得られなかつたが大体次の如き傾向を見ることができた。

1) 青山B感作群では、青山 B-OT 0.05mg に対し、青山 B-Azo T 0.1 γ ではほぼ等しく、BCG-Azo T 0.1 γ では稍々弱かった。

2) BCG 感作群では、青山 B-OT 0.05mg に対し、青山 B-Azo T 0.1 γ ではかなり弱く、BCG-Azo T 0.1 γ ではかなり強かった。

3) 故にこれだけの動物実験の成績からすれば、青山 B-Azo T よりも BCG-Azo Tの方がより型特異性を顕著に認められた。

終りに臨み、Azo T の分離方法を直接御指導下さった金沢大学結核研究所、岡本教授及び伊藤助教授の御好意を感謝する。なおこの研究費の一端は総合研究、結核研究委員会の援助によつたので茲に謝意を表する。

文 献

- 1) Maschmann, E. und Küster, E :
Z. physiol. Chem., 193, 215, 1930,
- 2) maschmann, E. und Küster, E :

Z. f. Tbk., 59, 225, 1931.

- 3) Seibert, F. B., Aronson, J. D., Reichel, J.,
Clark, L. T., Long, E.R. and White. W.C.:
Am. Rev. Tuberc., 30, 705, 1934.
- 4) Seibert, F. B. and Gleen, J. T.:
Am. Rev. Tuberc., 44, 9, 1941.
- 5) 粕谷伊佐久：東京医事新誌, 2973, 787, 昭11.
- 6) 桑島謙夫：実験医学, 24, 160, 昭15.
- 7) 貝原守一：福岡医学, 36, 597, 昭 18.
- 8) Takeda, y. and S. Watanabe : J. Biochem., 34,
385, 1941.
- 9) Ito, R. and Koshimura, S. : Japanese Medi-
cal Journal, 1, 427, 1948.
- 10) Ito, R. and Koshimura, S. : Japanese Medical
Journal, 2, 185, 1949.
- 11) Okamoto, H. : Japanese Medical Journal, 3,
31, 1950.