

# 精製ツベルクリンに関する研究

## 第1報 限外用濾過膜の検討

国立予防衛生研究所結核部（部長 柳沢謙）

浅見 望・細井 正春

（昭和 29 年 7 月 30 日受付）

### 1 緒言

ツベルクリンの濃縮方法としては、(A)加熱蒸発による法、(B) Sharples 等の超遠心器による法及び (C) 限外濾過による法等がある。旧ツベルクリンの製造には Koch 以来この A 法によつて濃縮が行われているが、精製ツベルクリンの製造には活性因子であるところの蛋白質の変性をできるだけ避けるため、B 法及び C 法による濃縮法が採用されている。限外濾過によつて濾過性病毒の分離を行つたのは Elford<sup>1)</sup> 及び Cox<sup>2)</sup> 等であり、わが国においても、矢追等<sup>3)</sup> の詳細な追試がある。しかしこの膜は平面であるため濾過面積が少ないので、病毒の分離の場合のように、液の少ないものに應用されるけれども、ツベルクリン等のような大量液の濃縮には不便である。ここにおいて Seibert<sup>4)</sup> は Alundam 製の円筒に限外濾過膜をつけて、ツベルクリンの濃縮を行つた。その後 Quigley<sup>5)</sup> によつてこの Alundam 管による限外濾過膜の種々な検討がなされた。

Seibert がはじめ限外濾過に用いたニトロセルローズの濃度は 12% 醋酸溶液であるが、その後<sup>6)</sup> 11% 及び 9% と漸次濃度を稀めている。また Jensen<sup>8)</sup> 等は 7% のものを、Doig<sup>9)</sup> は 13% のものを用いている。しかしいずれの報告にもニトロセルローズの品質については殆んど記載がない。ただ Seibert<sup>10)</sup> は Charles Cooper 会社以外のものはこの目的に適しないと言っている。わが国においても最近戸田<sup>11)</sup> 及び倉金<sup>12)</sup> 等によつてツベルクリンの限外濾過による精製法が発表されているが、膜についての詳細な記載を見ない。

われわれも精製ツベルクリンの限外濾過による濃縮を行うため、市販のコロヂウムを求めて実験を開始したのであるが、市販コロヂウムの純度が悪いため良質の膜を得ることができなかつた。ところが某綿火薬会社の好意によつて、数種のニトロセルローズを入手し、これが検討を行い、初期の目的を達することができたのでその大要を報告する。

### II 実験材料及び実験方法

#### 1 濾過円筒

この実験に使用した濾過管は径 30 mm, 高さ 100 mm,

厚さ 2 mm の素焼の白色円筒であつて、その表面積は約 100 cm<sup>2</sup> である。これが通水量は製品によつて多少の相違はあるが、160 mm Hg で 1 時間平均、約 700 cc (660 cc~840 cc, 5本の平均) であつて、かなり目は細かいものである。

#### 2 結核菌培養濾液

人型結核菌青山 B 株を Sauton 培地に 6 週間培養した後、100°C 1 時間加熱滅菌したものを、濾紙で菌体を除き、この濾液をさらに Seitz で濾過したものを供試した。

#### 3 N の定量

試料 1 cc に 10% 三塩化醋酸の同量を加え、約 30 分氷室に放置後 3,000 回 r.p.m. 5 分遠心した沈澱の水分を充分除いたものについて Micro Kjeldahl 法によつて N 量を測定した。

#### 4 還元量の定量

Hagedorn-Jensen 法によつて加水分解前及び n-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で 5 時間加水分解したものについて還元量を測定し、両者の差を多糖体量とした。

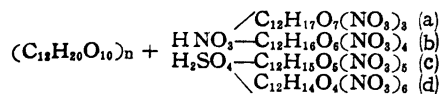
#### 5 動物による力価試験

限外濾過法によらないで常法によつて濃縮した OT の 1:2,000 を標準液として用い、これに限外濾過による濃縮液では 1:2,000, 濾過液では 1:100 に稀釈し、各試料毎に感作モルモット 3 匹ずつに、ラテン法格法によつて交叉して皮内注射し、24 及び 48 時間後における反応の比を求めた。

### III 実験成績

#### 1 ニトロセルローズの各種類について

ニトロセルローズはセルローズを硝酸でニトロ化した硝酸エステルであるが、製造の条件によつて、-NO<sub>2</sub> の割合で次のように種々なものができる。



このうち a, b に属する硝化度の低いものが限外濾過膜に使用するのに適する。また同じ硝化度のものでも、分子の重合の長いものと、短いものとあり、それによつ

て性状も違ってくるので、日本工業規格(J.I.S. K 6703, 1951)においてはこの性状を規定している。今回われわれはT会社のもの4種とA会社のもの1種を入手した。それらのJ.I.S.による性状は第1表のようである。表中のHとはN量 11.5~12.2%のもの、LとはN量が10.7~11.5%のものである。粘度とは一定溶剤に製品を溶解し、この溶液を一定の円筒に入れ、規定のBallが落下するに要する時間(秒)をいい、この値の大きいもの程、セルローズ分子の連鎖が長いものである。

Table I. Characters of nitrocellulose used

No.	Manufacturer	Kinds	Nitrogen %	Viscosity	Residual acidity	Ignition point
1	T	H 1/4	11.80	0.25	0.020	181 °C
2		H 1/2	11.80	0.5	0.019	181
3		H 20	11.78	20	0.010	182
4		L 100	10.97	100	0.015	181
5	A	Not Known	/	/	/	/

Table II. Water permeability of the membrane prepared from the nitrocellulose of varying concentration

Kinds	%	Time for dissolved	Water permeability 30min.	Characters of the membrane	
H 1/4	7	immediate	83 cc	thin	fragile
	10	Ca 1 hrs.	91	slightly thick	"
	13	Ca 3 days	99	"	"
H 1/2	7	immediate	144	thin	fragile
	10	Ca 3 hrs.	118	slightly thick	slightly hard
	13	Ca 4 days	53	thick	"
H 20	7	Ca 2 days	167	thick	hard
L 100	7	Ca 5 "	195	thick	hard
Product of A Co.	7	Ca 3 days.	215	slightly thick	slightly hard
	10	Ca 3 "	108	"	hard
	13	Ca 4 "	53	thick	"

## 2 限外濾過膜の調製

### 1) ニトロセルローズの溶解

Quigley<sup>5)</sup>及び Jensen<sup>8)</sup>等の方法を検討しつつ次のように行つた。

乾燥した各種ニトロセルローズを共口瓶に入れ、次で氷醋酸(純正化学、特級品)が7, 10及び13%の割合になるように加え、更にニトロセルローズ量の1/4のK<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(これは膜の強度を増すため)を加え栓を施し、1日数回手をもつて瓶をゆるく廻転して、溶解するまでこれを続ける。これが溶解に要するおよその時間は第2表のようである。すなわち、H 1/4及びH 1/2等では7%ならば即時、10%になると、1~3時間、13%では、3~4日も要した。またH 20及びL 100の7%も比較的溶け難く3~5日を要した。A社のもののJ.I.S.によ

る性状は不明であるが、これが溶解性からすればほぼH 1/2に相当する日時を要した。さてニトロセルローズが完全に溶解してから不溶物を除くためガラスフィルター(G3)を通過したものを瓶中に密栓して貯えた。栓が不十分であると吸水して液が濁るから注意を要する。なおH 20及びL 100等は粘度が大きいため7%以上の高い濃度は調製しなかつた。

### 2) 限外濾過膜の作製

濾過管に硝子管の付いたゴム栓を施し、吸引瓶に連結

してよく水洗し、水より引上げ軽く吸引して大部分の水分を除き、残つた水滴は清潔なガーゼで拭き、60mmHgに吸引して、瓶との間の活栓を閉ぢたまま、濾過管を各種ニトロセルローズの溶液中に静かに入れ、液がゴム栓の所まで浸つたなら活栓を開いて、60mmHgで30秒吸引し、次で活栓を閉ぢてから静かに引上げ、残余の液を落し、円筒を廻転して、液が一様の厚さに着いた所を見計らつて、手速く蒸溜水中に入れる(この操作が技術的に一番むずかしいところである)。次で5~6分すれば濾過管の表面に膜が凝固してきてくるので、活栓を開いて常圧となす。このまま一夜流水中で洗滌し、次で醋酸の酸性が

なくなるまで蒸溜水を通過させる。これらの膜は乾くと亀裂を生じ易いので2%石炭酸液中に浸して保存する。

このようにして作つた各膜の通水量は第2表のようである。すなわちH 1/4の7%では83cc、10%では91cc、13%ではさらに多く、99ccとなり、濃度が高くなるに従つて通水量も多くなつてはいるが、その差は少ない。次にH 1/2では7%が144cc、10%が118cc、13%は前者の約半量の53ccとなり、濃度が高くなるに従つて通水量は少なくなつてはいる。またH 20とL 100の7%では前2者の7%に比し、通水量は多くなつてはいる。

最後にA社のものでは濃度の高いもの程通水量は少なくなつてはいる。次に各種ニトロセルローズの7%液の通水量を比較してみるのに、各製品の粘度の小さいものは通水量も少なく、粘度が増すに従つて通水量も多くなつ

Table III. Findings of ultra-filtration through various membranes

Kinds	%	(1) Time for filtration	Protein nitrogen (mg/dl)		Carbohydrate content(2) (mg/dl)		Potency (3)	
			Concentrated solution	Filtrate	Concentrated solution	Filtrate	Concentrated solution (b)	Filtrate (c)
H <sup>1/4</sup>	7	Ca 1.5 days	15.7	40.0	68	770	0.60	1.07
	10	" 2.5	39.2	16.5	256	770	0.78	1.15
	13	" 2	51.0	1.6	427	590	0.96	0.73
H <sup>1/2</sup>	7	" 2	21.3	24.9	96	745	0.84	1.10
	10	" 2.5	50.1	3.3	347	495	0.98	1.06
	13	" 3	51.8	1.0	446	340	0.97	0.73
H 20	7	" 2	52.1	3.6	299	595	0.98	0.76
L 100	7	" 2.5	60.1	2.0	279	525	1.00	0.63
Product	7	" 1	30.2	15.7	113	765	0.71	1.08
oi	10	" 2.5	49.9	5.9	324	620	0.85	1.08
A Co.	13	" 3	53.2	1.3	470	225	0.99	0.52
Control solution			52.5		730		Standard solution (a)	

Note: (1) Time required for the concentration of 1,500 ml culture filtrate to 90 ml.

(2) The difference in the amount of glucose content prior to and after completion of hydrolysis.

(3) Readings were made 24 hours after injection:

(a) Standard solution—Control solution. (1: 2,000)

(b) Concentrated solution—1: 2,000

(c) Filtrate—1: 100

ている。また膜の厚さは粘度の大きい製品程厚くなり、同一製品では濃度の高いもの程厚くなっている。さらに膜の強さもほぼ厚さに比例している。なお膜孔の大きさと均一性を調べるため、コンゴローート及び卵アルブミンの溶液を通したが、いずれの膜においてもこれらの物質は通過しなかつた。

### 3 培養濾液の濾過試験

#### 1) 濾過方法

20 l の培養濾液を 1,500 cc ずつ 13 分に別ち、その各 1 分ずつを 1,000 cc のビーカーに移し、1 l の吸引ビンに連結した濾過管（膜をつけたもの）をこの培養濾液中に入れ、170 mm Hg 圧で、15°C 以下の室温で（本実験は 11 月下旬）濾過を実施した。操作中濾液には少量のトルオールを加えて防腐した。このようにして各試験液とも 90 cc まで濃縮した。これは培養濾液の約  $\frac{1}{16.7}$  に相当する。なお 1,500 cc が 90 cc までに濃縮されるに要した時間は第 3 表に示したように、大体において濃度の高いもの程多くの日数を要してゐるが、製品の粘度とはあまり関係がないようである。濾過液は重蒸煎上で 90 cc に濃縮した。また 1 分は濾過膜を用いず、そのまま常法によつて加熱濃縮して 90 cc とし、対照液 (O T) として使用した。

#### 2) 各濾過膜による蛋白質及び多糖体の残存量

まず濾過液中に出てくる蛋白 N 量が 5 mg/dl 以上の

ものは H<sup>1/4</sup> の 7 及び 10%, H<sup>1/2</sup> の 7%, A 社の 7 及び 10% 等である。これと反対に濃縮液の中で対照液とほぼ等しい蛋白 N 量を残存しているのは H<sup>1/4</sup> の 13%, H<sup>1/2</sup> の 10 及び 13%, H20 及び L100 の 7% 並びに A 社の 13% 等である。故にこれら 7 種類の膜はツベルクリン蛋白の大部分を通さない事になる。次に濃縮液中の還元量が少ないのは H<sup>1/4</sup>, H<sup>1/2</sup> 及び A 社等の各 7% と H<sup>1/4</sup> の 10% の 4 種であり、その他の膜では 300 mg/dl 以上の還元量を残存している。濾過液では丁度これと逆になつてゐるが、各膜の数字の差異は比較的少ない。これは低分子の糖類及び還元性物質等がこれらの各膜を通過するためと思われる。

#### 3) 濃縮液及び濾過液の力価試験

対照液の 1:2,000 を標準液として、濃縮液では 1:2,000、濾過液では 1:100 のものを感作モルモットに皮下注射後 24 時間における反応の比較は第 3 表のようである。すなわち濃縮液中の Ratio が 0.95 以上を示したものは、H<sup>1/4</sup>, H<sup>1/2</sup> 及び A 社の 13%, H<sup>1/2</sup> の 10% 並びに H 20 及び L 100 の 7% 等である。これは蛋白 N 量が 50 mg/dl 以上のもののみであつて、蛋白 N 量と力価とはよく比例した。また濾過液においても、前者と逆に Ratio が 0.70 以下を示したものは H<sup>1/4</sup>, H<sup>1/2</sup> 及び A 社の 13% 並びに H 20 及び L 100 の 7% 等であつて、H<sup>1/2</sup> 10% を除く他は濃縮液の力価の高い

ものと同一であつて、濾過液中の蛋白 N 量も  $5\text{mg/dl}$  以下である。

すなわちこれら各膜はツベルクリン中の活性蛋白を通過せしめない、ただ濾過液の蛋白 N 量が  $10\text{mg/dl}$  以上のものの力価が N 量とは必ずしも平行していない。しかしこのことを究明するためにはさらに稀釈倍数をかえて行うことによつて比較的正しい価が得られるであろう。但しそれは本実験の目的でないから別の機会にゆずることとする。

#### IV 総括

濾過用の容器について Jensen 等は腎型の磁製品を用い、Seibert<sup>4)</sup>、Quigley<sup>5)</sup>等は、Alundam の  $127 \times 45 \times 2\text{mm}$  の円筒を用い、倉金<sup>12)</sup>はシャンペラン B 型の細菌濾過管を用いている。われわれは米国の Norton 製 Alundam ( $100 \times 30\text{mm}$ ) を入手したので、これを見本として業者に製作させたが、Alundam の代りに素焼の円筒を作つてきた。これを実際に使用してみるとやや目が細かすぎる。例えば米国の Alundam 管の通水量は、 $160\text{mmHg}$  圧で 1 時間  $1,300\text{cc}$  であつたが、われわれの使用したものは約  $700\text{cc}$  で前者の約半分量しか通水しなかつた。また大きさも Seibert 等の記載のものよりもやや小さいので、濾過面積も狭くなつてゐる。故に今後は大きさもやや大きく、目もやや粗なものに切替ふる予定である。

従来濾過性病毒の研究に用いられている限外濾過膜のコロチウムは外国製のものでなければ使用できないと考えられていたようである。勿論病毒を濾過する場合のように孔の大きさを細かく問題とするものにおいては、一定の純品を用いる必要があるであろうが、ツベルクリンのように蛋白分子のかなり大きなものの濾過には、われわれの実験からすれば国産品のニトロセルローズを用いて充分目的を達することができる。今回 T 会社の好意によつて  $\text{H}^{1/4}$ 、 $\text{H}^{1/2}$ 、 $\text{H}20$  及び  $\text{L}100$  等 4 種類のニトロセルローズを入手し、氷醋酸を用いて 7、10 及び 13% の溶液の膜を作つて行つた実験では、 $\text{H}^{1/4}$ 、 $\text{H}^{1/2}$  の 13%、

$\text{H}^{1/2}$  の 10% 並びに  $\text{H}20$ 、 $\text{L}100$  の 7% 等を用うればツベルクリン中の活性蛋白を通過せしめないことがわかつた。しかし実際に膜の調製上及びでき上つた膜の強度等を考慮に入れた場合、 $\text{H}20$  秒の 7% 氷醋酸溶液が最適であると思う。なお濾過条件 (圧、温度、吸着、pH) 等については今後検討する考である。

#### V 結言

ツベルクリンの濃縮のための限外濾過膜としてはニトロセルローズの  $\text{H}20$  秒 (J.I.S.) の 7% 氷醋酸溶液が最適であつた。

稿を終るに臨み、常に御指導下さいました柳沢部長、また限外濾過用ニトロセルローズを分与され、さらに詳細な分析を行つて下さつた大成化工株式会社、都築工場長の御好意を深謝する。

#### 文 献

- 1) Elford, W.J.: Brit. J. Exp. Path., 10, 126. (1929)
- 2) Cox, H.R. & R.R. Hyde: Am. J. Hyg., 16, 667 (1932)
- 3) 矢追・中原: 実験医学雑誌, 19 卷, 1753(1935)
- 4) Seibert, F.B.: J. Biol. Chem., 78, 345(1928)
- 5) Quigley, J.J.: Am. J. Hyg., 20, 218 (1934)
- 6) Seibert, F.B. & J.T. Glenn: Am. Rev. Tbc., 44, 9(1941)
- 7) Seibert, F.B.: Am. Rev. Tbc., 59,86 (1949)
- 8) Jensen, K.A., G.B. Bindeslev, S. Möller, A. Hansen & P. Lind: Tubercle, 19, 386(1938)
- 9) Doig, A.T., G. Gemmill, G.G. Kayne, F.V. Linggood, H.J. Parish & J.S. Westwater: Brit. Med. J., 1, 992 (1938)
- 10) Seibert, F.B.: Am. Rev. Tbc., 30, 713(1934)
- 11) 戸田忠雄・武谷健二・神中実: 結核研究委員会細菌科会報告, (1953)
- 12) 倉金丘一: 十全医学会雑誌, 55, 1170 (1953)