

ツベルクリン劃分に関する研究

第2報 ツベルクリン劃分の化学的性状並びに
生物学的活性の加熱による変化

九州大学医学部細菌学教室(主任 戸田 忠雄 教授)

大友 信也

(昭和 29 年 8 月 5 日受付)

ツベルクリン中の各劃分が通常行われる加熱操作による滅菌によつて如何に変化するかを調べるために、結核菌の同一 Lot の培養濾液を等分し、一部を非加熱部とし、他を加熱部として 100°C 2 時間の加熱を施し、この両部について低温アルコール沈澱法による分割を行つて、それぞれから 3 種蛋白、2 種多糖体を分離した²⁾。前報においてこれら劃分の収量の面から検討を行つたが、今回これらの劃分につき化学的性状及びツ活性を調べたのでこの結果を報告し、これによつて両部の劃分を比較してツベルクリン劃分の加熱による影響について考察したいと思う。

実験材料及び実験方法

材料は前報において述べたところの人型菌並びに BCG 培養濾液の非加熱部より分離した蛋白 A, B, C 及び多糖体 I, II 並びに加熱部より分離した蛋白 hA, hB, hC 及び多糖体 hI, hII を用いた。いずれも凍結乾燥を施した。

化学分析法

1) 窒素量: micro Kjeldahl 法によつた。

2) 核酸量: Dische の Diphenylamine 反応³⁾を用いた。この反応で生じた青色調を 610 m μ のフィルターを附して光電比色計で測定した。標準曲線は精製 DNA (註) を用いて作り、これに基づいて劃分の DNA 含有量を求めた。

(註) 今回の実験ではミノファーゲン製を使用した。

このものはミノファーゲン研究部の分析によれば、N=11.47%, P=7.43%, N/P=1.54 であつた。

3) 炭水化物量: Carbazol 反応を用いて測定した。赤色調を 530 m μ のフィルターを附して光電比色計で測つた。標準曲線は精製ブドウ糖を用いて作り、これに基づいて劃分の炭水化物含量を求めた。なお Carbazol 反応は、核酸の糖部分にも反応するので、劃分の核酸量によつて炭水化物量の補正を行つた。

ツ活性測定法

人型青山 B 株の死菌流バラ乳剤で感作したモルモットを用い、次の 2 方法で活性を調べた。

1) 等重量の劃分を注射した。

2) 係数 6.25 を用いて各劃分の N 量から純蛋白量を

求め、この同じ量を注射した。

いずれもモルモット皮内に 0.1 cc 注射し、24, 48 時間後の発赤を計測しその平均値を求めた。

実験結果

I 各劃分の化学的性状

1) 非加熱部劃分の性状

第 1 表においてみられる如く、人型菌非加熱培養濾液から分離した劃分では、蛋白 A は N 量が大体 7% 内外で割合少なく、炭水化物が非常に多く 20~40% 含まれていて、一種の糖蛋白であることが知られる。蛋白 B は 12~14% の N 量を持ち、A よりは相当少いが或程度の炭水化物を含んでいる。又蛋白 C の N 量は B と同程度又はそれより多く 14~15% であり、炭水化物量は Lot によつていくらか異なるが、一般的に 3 蛋白劃分中最も少なく 2% 内外である。核酸含量は 3 つの劃分ともいずれも 1~0.3% 以下であり、この分割法で培養濾液より分離したものには核酸含量が非常に少ないことがわかる。これからみると 3 種蛋白劃分中ではツ活性の面は別として蛋白 C が最も不純物の少ない形であると思われる。一方多糖体では、I は炭水化物がその約 70% 内外を占めていて、なお 4~5% の N を含んでいる。II の N 量は 1% 以下であり、99% 以上は全て炭水化物である。核酸は I, II とともに殆んど含まれていない。すなわち多糖体 II は非常に純粋な劃分であるといえよう。

BCG 培養濾液からのものでは、人型菌のそれとやや異なるようである。この場合の蛋白 A は 10~12% の N, 9~15% の炭水化物という組成であつて、やはり糖蛋白ではあるが、蛋白と糖量との比率が人型菌の A と大分異なる点である。次に蛋白 C は、11~14% の N 量を持つているが、人型菌の C と異なるところは、炭水化物量及び核酸量の多い点であり、それぞれ 7% 及び 9% 程度見出されるのである。又多糖体 II は N を全く含まず、炭水化物がそのすべてであり、最も純粋な多糖体である。

2) 非加熱部劃分と加熱部劃分との比較

同じ第 1 表に掲げた成績について比較を行う。

人型菌の場合、

蛋白 hA: 蛋白 A にくらべ N 量やや少なく、反対に炭水化物量が多い。この差は Lot 2 のものでは殊に著し

TABLE 1. Comparison of chemical constituents of fractions from unheated and heated culture filtrates.

Lot No. and Strain	Nature of filtrate	Fraction	Nitrogen %	DNA %	Carbohydrate %
2	Unheated Seitz-filtrate	Protein A	7.7	<0.5	36.3
		" B	14.1	<0.3	7.3
		" C	14.0	<0.5	13.1
Human	Heated with bacilli	Protein hA	<3.0	<1.0	70.4
		" hB	14.7	<1.0	5.8
		" hC	13.1	7.2	13.5
5	Unheated paper-filtrate §	Protein A	12.5	<0.5	8.4
		" B	7.5		
		" C	10.7		
BCG	Heated paper-filtrate §	Protein hA	5.8	<0.3	15.6*
		" hB	14.3		4.5
		" hC	11.6		
10	Unheated paper-filtrate §	Protein A	10.2	<0.3	14.2
		" B	11.8	<0.3	4.5
		" C	13.9	9.1	7.0
		Polysac. II	0.0		106
BCG	Heated paper-filtrate §	Protein hA	3.0	<0.5	46.0
		" hB	13.2	<1.0	3.0
		" hC	12.5	11.6	6.7
		Polysac. h II	0.0		110
15	Unheated Seitz-filtrate	Polysac. I			79.0
		" II	0.7		99
Human	Heated Seitz-filtrate	Polysac. h I			68.0
		" h II	1.3		99
16	Unheated Seitz-filtrate pH 7.0	Protein A	6.9	<1.0	18.0
		" B	11.2	<1.0	2.3
		" C	15.2	<0.3	1.3
		Polysac. I			67.0
Human	Heated at pH 7.0 Seitz-filtrate	Protein h ₁ A	6.7	<1.0	24.0
		" h ₁ B	12.3	<1.0	5.1
		" h ₁ C	14.5	<0.3	1.7
		Polysac. h ₁ I			71.0
Human	Heated at pH 9.0 Seitz-filtrate	Protein h ₂ A	6.0	<1.0	33.8
		" h ₂ B	12.7	<1.0	6.7
		" h ₂ C	13.7	<0.3	1.4
17	Unheated	Polysac. I	4.8		
Human	Heated	Polysac. h I	3.9		

§ Filtered by filter paper.

* Not corrected from the carbohydrate content of DNA.

DNA contents of polysaccharide-fractions were all negligible small.

く、あたかもその半ば以上の部分が置換したかにみえる。核酸量はAと変らない。

蛋白 hB:すべての Lot を通じて、この hB の N 量は B のそれよりやや多く、hA や hC の場合と逆の変化がみられる。核酸量は B と殆んど変わらず、炭水化物量は B との間に定まった差を認め得ない。

蛋白 hC:この N 量は C よりやや少なく、炭水化物量には大差がみられない。核酸量において、seitz 濾液の加熱部からの hC は C と同じく極めて少ないが(Lot 16)、菌体とともに加熱した濾液よりの hC は 7.2% であり、同じ Lot の非加熱部から C の 0.5% (Lot 2) に比し著るしく多い。

多糖体については I, II と hI, hII との間に著明の差は認められない。

Lot 16 において濾液 pH をアルカリ性に変えて加熱を行う試みを行い、分離した劃分を h₂ とした。これら劃分の性状を非加熱部 r 及び加熱部 h₁ のそれと比較すると、核酸量に関してのみ 3 蛋白ともすべて差がみられないが、他の N 量、炭水化物量においては、3 蛋白とも r と h₁ との差より、r と h₂ の差の方が大きいことが認められる。

なお以上の結果は BCG の場合においても全く同じ傾向がみられる。

II 各劃分のツ活性の比較

(1) 等重量接種の場合

結果を第 3 表に示した。等重量当りの劃分のツ活性は、蛋白では B > C > A 及び hB > hC > hA の順であつて、非加熱部劃分と加熱部劃分との順序の相違はみられない。それぞれの劃分を比べると、A > hA, B > hB, C > hC であり、すべて加熱部劃分は相応する非加熱部劃分より力価が劣つている。

多糖体劃分は元来ツ活性弱く、蛋白劃分の 5 倍量程度の接種で反応を呈する。I 及び hI は、24 時間後には 1/5 量の蛋白 C よりやや弱い程度のかんりの発赤を現わし、中には弱い硬結をも認めたが、48 時間後には著しく反応が減退した。又 II 及び hII の反応は、24 時間後には極めて弱い発赤を現わし、48 時間後はさらに減退した。中には全く消失した例もあつた。硬結はこの劃分では全く認められなかつた。

(2) N 量を基にした等純蛋白量による場合

結果は第 4 表(略)に示した如く、この場合は A > B > C 及び hA > hB > hC の順であつた。又 r 部と h 部との比較では(1)と同じく A > hA, B > hB 及び C > hC であつた。

考 按

今回行つた実験では Seibert のアルコール沈澱法に

TABLE 2. Comparison of skin reactions with fractions from unheated and heated culture filtrates.

Lot No.	No. of		Inj. dosis	Average diameter of erythemas in mm with							
	g.	p.		Unheated			Heated				
				Prot. A	Prot. B	Prot. C	Prot. hA	Prot. hB	Prot. hC		
5	7	2	γ	13.4	15.4	15.0	12.8	15.2	13.0		
2	7	2		14.4	16.1	15.4	3.6	13.9	13.1		
16	5	5		10.0	14.3	12.6	8.9	12.5	12.2		
	5	0.4	γ	Prot. C (Lot 17)			Prot. hC (Lot 17)				
		2		Polys. I (Lot 17)		Polys. II (Lot 15)		Polys. hI (Lot 17)		Polys. hII (Lot 15)	
				12.6±	6.5-	12.9±	12.3±	1.6-	12.6±		
				9.2±	4.2-	13.5±	9.6±	0.0-	12.0±		

All strains were human type tubercle bacilli except BCG of Lot 5.

Diameter of above three groups are 48-hour readings and in the last group, top rows are 24-hour readings and bottom rows are 48-hour readings.

#, ±, - indicate the grades of indurations.

TABLE 3. Comparison of skin reactions with protein-fractions from unheated and heated culture filtrates (Lot 16), given in equivalent dosages based on the nitrogen contents.

Protein-fract.	A	B	C	hA	hB	hC
Nitrogen %	6.9	11.2	15.2	6.7	12.3	14.5
Protein %	42.5	69.8	94.7	41.8	76.7	91.0
Inj. dosis	γ 0.36	0.22	0.16	0.37	0.20	0.17
Aver. diamet. of erythema in 5 g. p.	mm 13.8	12.2	10.7	11.4	10.3	8.3

よつて割分を分離し、これらの種々の性状を比較することによつて、ツに対する加熱の影響を調べたのであるが、一面又彼女の分割法に対する追試の意味をも兼ねているので、ここにまず彼女等の分離したものと比較を試みる。この分割法によつて得られた割分の化学的性状についての総括的な報告はあまり発表されていないようであるが、断片的な報告によると、H37よりの蛋白Aは、N=4.1%、DNA=1.1%、Carbohyd.=60.8%、蛋白Cは、N=13.3%、DNA=0.35%、Carbohyd.=2.7%⁵⁾、又別のH37よりの蛋白C(原著では第1割分)はN=15.1%、多糖体I(第4割分)はN=5.3%、多糖体II(第5割分)はN=0.02%⁶⁾となつている。又活性の面では常にAが最も強く、Bが中間でCが一番弱いと報告されている¹⁾。これらの報告における結果と、今回私の分離した非加熱部割分の性状とをくらべると、その化学分

析値並びにツ活性の面で全く同種類のものであることが知られる。

次に人型菌の蛋白割分と、BCGの蛋白割分とでは、その化学的性状に多少の相違を見ることが出来る。蛋白Aはそのどちらも多糖体を多く含んだ糖蛋白であるが、両型菌の割分で、Nすなわち蛋白質と炭水化物の量的割合が相当異つている。又蛋白Cにおける核酸含量では、人型菌のCが殆んど含んでいないのに反し、BCGのCは非常に多くの核酸を含有している。前報において述べた如く、BCG濾液の分割の際には、蛋白C及でhCは相当粘稠な状態で沈殿することを認めたが、これらに常に高度の核酸量が含まれていることから考えると、この粘稠性は核酸ないしは核蛋白のためであろうと思われる。このように両型菌の割分間に質的な差異が存するのは、菌型の相異に基くものであろう。

ツベルクリンに対する加熱の影響をみるために、非加熱部割分と加熱部割分との性状について考察を加えてみる。

まず蛋白割分中の核酸含量は、濾液そのものの加熱では全く変化しないと考えられる。しかしながら、通常の滅菌操作における如く培養液を菌体とともに加熱した時のみhC中に多くなる(Lot 2)。Lot 10における如く、濾紙による濾液中にはなお菌体ないし菌屑が相当存在すると考えられる場合にもhC中の核酸は多い。前報において、菌体とともに加熱した時はhCの量が非常に多くなり、これは共存していた菌体からの抽出蛋白であろうと述べたが、このhC中の核酸もやはり抽出された菌体蛋白に由来するものと考えられる。このことから、結核菌体からは、熱処理によつて、核酸含量の多い菌体ツ蛋白が抽出されることが考えられるのであつて、この詳細については次報で述べる予定である。

又hAのN量はAのそれより少なく反対に炭水化物量が多いという事実がみられたが、このことに対して次のように考えることができる。蛋白A割分の如き糖蛋白は加熱処理によつて、変性と同時に蛋白と糖とが部分的に解離し、この蛋白部分はそれ迄結合していたために保つていた溶解性に変化を生じてhC割分となり、一方糖部分は多糖体割分中へ移行したと考えると、上のことが解釈できる。前報で述べたA→hA+hCという変化及びr部よりh部の多糖体量が多いということも、以上の考えによつて理解されると思う。

一方ツ活性についてみると、N量から計算した等蛋白量の接種の場合には、Seibertの云うようにA>B>Cであることが確かめられたが、h部割分でもhA>hB>hC

の順であることが判つた。この事実と、hA, hB 及び hC は化学的にそれぞれ異なつた性状であり、しかも、溶解性において等しいところの A, B 及び C の性状とそれぞれ非常に近似的であるということから考えると、hA 及び hB 劃分は、加熱によつて蛋白 A 及び B が変性、解離を起した際の未解離部分であると思われる。このように、化学性状及びツ活性の面から、前報で量的関係から述べた処の $A \rightarrow hA + hC$ 及び $B \rightarrow hB + hC$ という変化過程が裏付けできるとする。しかしながら又、これら加熱部からの蛋白劃分が非加熱部からのそれに比べ、等 N 量当りの活性が総て劣つているということと、他方 hB の N は常に B の N 量より多いにも拘わらず、その力価はやはり弱いという点とともに考え合せると、この度の実験方法では計測できなかつた変化が生じていることを思わせる。このような変化はツ蛋白中のツ活性に関係ある部分の変性と考えられるのであつて、恐らく蛋白質の分子構造上の問題であろう。

結 語

人型結核菌及び BCG 培養濾液の非加熱部より分離した蛋白 A, B, C 及び多糖体 I, II 並びに加熱部より分離した蛋白 hA, hB, hC 及び多糖体 hI, hII につき化学的性状及びツ活性を調べ、この結果から両部の劃分を比較して、ツベルクリンに対する加熱の影響を検討した。

化学性状の比較では、

- 1) hA は A より N 量やや少なく、炭水化物量は相当多い。DNA 量は変らない。
- 2) hB は B より N 量やや多く、DNA 量、炭水化物量は殆んど変らない。
- 3) hC は C より N 量やや少なく、炭水化物量には大差がない。DNA 量は、Seitz 濾液の加熱部 hC は C と

等しいが、菌体とともに加熱した濾液よりの hC には非常に多い。

4) 両部からの多糖体劃分間には明らかな性状の差は認められない。

5) 濾液をアルカリ性として加熱したものからの劃分の性状はいずれも非加熱部劃分に比し、上記の性状の差が更に大きい。

ツ活性の比較では、等重量当りでも又等 N 量当りでも $A > hA$, $B > hB$, 及び $C > hC$ である。又等 N 量当りでは $A > B > C$ 及び $hA > hB > hC$ であつた。

以上の結果から、ツベルクリンを加熱した際には、前報で劃分の量的関係から予想した変化と同様の、 $A \rightarrow hA + hC + polysaccharide$ 及び $B \rightarrow hB + hC$ という変性、解離が生ずると思われる。なおこの hA, hB はそれぞれ A 及び B の性状と大体相等しいという点から、これら hA 及び hB は、それぞれ A 及び B の未解離部分であると考えられる。又加熱部蛋白劃分のツ活性が、非加熱部のそれ等よりすべて劣つているのは、蛋白質中のツ活性に関係ある部分の変性を思わせるものである。

戸田忠雄教授並びに武谷健二助教授の御指導に深く感謝する。本研究は文部省科学研究費の援助によつて行われた。

文 献

- 1) Seibert, F.B.: Am. Rev. Tuberc., 59, 86, 1949.
- 2) 大友信也: 結核, 29, 9, 1929.
- 3) Dische, Z.: Mikrochemie, 8, 4, 1930.
- 4) Seibert, F.B.: J. Biol. Chem., 133, 593, 1940.
- 5) Seibert, F.B. and Fabrizio A.M.: Am. Rev. Tuberc., 66, 314, 1952.
- 6) Seibert, F.B., Crumb, C. and Seibert, M.V.: J. Am. Chem. Soc., 72, 2678, 1950.