

## ツベルクリン劃分に関する研究

第3報 結核菌々体より加熱によつて抽出される  
ツベルクリン蛋白について

九州大学医学部細菌学教室(主任 戸田忠雄 教授)

大友 信也

(受付 昭和 29 年 9 月 9 日)

先に結核菌培養濾液の非加熱部並びに加熱部より同一方法でツベルクリン劃分を分離し、兩部の劃分の収量、化学的性状、ツ活性の面を比較して、ツに対する加熱の影響を調べたが、この実験中、通常の滅菌法で行われるところの培養液を菌体と共に加熱する処理を施した場合、この濾液からの蛋白 hC の収量及び核酸含量は、培養液の Seitz 濾液を加熱したものからの hC に比べ非常に多いことを知つた<sup>1)</sup>。このことから菌体を加熱する時には、それから多量の核酸を含んだツ蛋白が抽出されることが予想されたのである。結核菌体から、ツ活性を有する蛋白が抽出されるということは既に多くの研究者によつて発表されているが、単なる加熱による抽出実験は少なく、又これで得られたツ蛋白をさらに劃分して、ツ濾液中の 3 種蛋白との関係の如何について調べた実験はない。今回この関係を明らかにするため、先に予想された事実に基いて実験を行つたのでここに報告する。

## 実 験

材 料：10週間培養の人型青山B株結核菌(Lot 17)及び5及び7週間培養のBCG(Lot 5及び10)を用いた。いずれもグルタミン酸ソーダ使用ソートン培地での生菌である。培養液と濾別した生菌は、濾紙上にて蒸溜水で充分洗滌した。用いた溶媒は蒸溜水と、1:2.5稀釈ソートン培地(以下この報ではこれをソートンと略す)の2種で、2.5倍にソートンを稀釈したのは、結核菌の8—10週間培養時の培地組成に近くしたためである<sup>2)</sup>。いずれもHCl及びNaOHでそのpHを適当な範囲に変えた。

方 法：抽出の場合の菌量と溶媒量との関係及び種類の溶媒で得られた抽出蛋白の収量の比較は、次のような規準によつた。洗滌生菌は湿つた状態のまま秤量し、又別にこの菌を得た培地濾液量を測り、この両者から濾液 1 l 当りの菌量を求める。溶媒は、使用菌量に相当する濾液量の  $\frac{1}{4}$ 、又は  $\frac{1}{8}$  量を用いた。抽出蛋白量はすべて、濾液 1 l 当りの菌体から得られた量に換算した。このことにより、濾液からの劃分量と、抽出蛋白量との関係を一致させた。例えば培養濾液が 5 l でこれからの湿

菌量が 400 g の場合、濾液 1 l 当りの菌量は 80 g である。100 g の菌を使用して得られた抽出蛋白量を a g とすれば、濾液 1 l 当りの菌からの抽出量は  $\frac{80}{100}a$  g である。表中 mg/l と記したが、この l は上の意味の濾液量である。

抽出は、菌を溶媒中に浮遊させた状態で、100°C、2時間加熱して行つた。加熱後菌体を濾別し、更にSeitz濾過を行い、前報で行つた<sup>1)</sup> Seibertの低温アルコール沈澱法<sup>4)</sup>で劃分した。ただしこの度の実験では限外濾過による濃縮は行わなかつた。得られたものを、劃分法に関連させて蛋白 xA, xB 及び xC と仮称する。又この抽出法では多糖体の収量は非常に少なかつたので、この点は報告中から除外した。劃分は数度沈澱、溶解を繰返して精製し、透析後凍結乾燥を行つた。

化学性状の検査では、窒素量を micro kjeldahl 法で、核酸量を Dische の Diphenylamine 法<sup>5)6)</sup>、又炭水化物量を Carbazole 法<sup>5)6)</sup>を応用してそれぞれの蛋白劃分について測定した。方法の要は前報<sup>2)</sup>に述べたので省略する。

ツ活性の検査は、人型結核死菌の流パラ浮游液で感作したモルモットの皮内反応で行つた。接種は蛋白劃分の等重量を 0.1 cc ずつ注射し、48時間後の発赤径平均を表に示した。

## 実 験 結 果

BCG について行つた結果を Table 1 及び 2 に、人型菌での結核を Table 3 に示した。

## 1) BCG よりの抽出蛋白

溶媒として pH 8.2 に修正した蒸溜水及びソートンを用いた場合の結果を Table 1 に示した。抽出蛋白の収量は、両溶媒においてどちらも、xA, xB は非常に少ないが、xC は蒸溜水の場合に極めて多いことがみられる。蒸溜水中での加熱抽出蛋白 xA, xB 及び xC と、加熱濾液よりの蛋白 hA, hB 及び hC それぞれのツ活性を同時注射によつて調べたが、表にみられるように、抽出蛋白は、濾液蛋白よりやや弱いがしかし相当強いツ活性を有していることがわかる。

次に、溶媒の蒸溜水、ソートンを共に pH 8.2 及び 6.0

**TABLE 1** Comparison of proteins extracted by heating from 5-week-old BCG cells in different solvents.

Solvent	Distilled water, pH 8.2			1:2.5 diluted Sauton, pH 8.2			Culture filtrate			
							unheated	heated with bacilli		
Protein	xA	xB	xC	xA	xB	xC	C	hA	hB	hC
Yield mg/1	*3	1	41	* 2	2	6	"23	"7	23	62
Potency mm	§10.8	14.1	13.3					§11.7	14.3	14.2

\* Milligram of protein extracted from bacillary cells harvested from one litre of culture medium.

" Milligram of protein isolated from one litre of culture filtrate.

§ Average diameter of erythemas in millimetre caused by injection of two gammas of protein in guinea pigs sensitized with human tbc. bacilli.

**TABLE 2** Comparison of proteins extracted by heating from 7-week-old BCG cells in different solvents.

Solvent	Distilled water				1:2.5 diluted Sauton				Culture filtrate	
	pH 8.2		6.0		8.2		6.0		unheated	heated with bacil.
Protein	xA+xB	xC	xA+xB	xC	xA+xB	xC	xA+xB	xC	C	hC
Yield mg/1	* 5	42	10	14	12	30	28	1	" 59	120
N %	9.0	8.7	7.0	12.2	7.7	11.9	7.5		13.9	12.5
DNA %	1.0	7.4	15.1	10.4	6.5	17.1	18.4		9.1	11.6
Carbohydrate %	30.8	8.5	29.2	9.1	49.1	7.4	16.9		7.0	6.7

\* Milligram of protein extracted from bacillary cells harvested from one litre of culture medium.

" Milligram of protein isolated from one litre of culture filtrate.

**TABLE 3** Comparison of proteins extracted by heating from 10-week-old human tubercle bacilli in different solvents.

Solvent	Distilled water				1:2.5 diluted Sauton				Culture filtrate with Seitz pad	
	pH 8.8		5.4		8.8		5.4		unheated	heated
Protein	xA+xB	xC	xA+xB	xC	xA+xB	xC	xA+xB	xC	C	hC
Yield mg/1	* 7	211	7	201	13	149	11	69	" 136	146
N %		13.2		12.9		12.5		8.6	13.1	13.5
DNA %		23.4		24.0		25.0		34.4	< 0.5	< 0.5
Carbohydrate %		7.1		7.3		5.6		9.2	2.2	1.4
Potency mm	§	11.5		11.3		11.5		11.4	§ 13.5	12.0

\* Milligram of protein extracted from bacillary cells harvested from one litre of culture medium.

" Milligram of protein isolated from one litre of culture filtrate.

§ Average diameter of erythemas in millimetre caused by injection of five gammas of protein.

の2通りにしたものによる結果を Table 2 に示した。この場合は、蒸留水では、アルカリ性で xC が非常に大量に、xA+xB は少なく、又酸性では xA+xB がやや

多く、反対に xC は著しく少なく抽出される。一方ソートンでは、アルカリ性ではやはり xC が相当多く、同時に xA+xB もある程度抽出される。しかるに酸性では xC

は殆んど得られず、 $xA+xB$  が著明に多量抽出された。即ち  $xA+xB$  の抽出は酸性ソートンによるのが適当であり、又  $xC$  の抽出はアルカリ性蒸溜水によるのが最も効果的であることがわかる。

これら蛋白の化学的性状をみると、 $N$ 量はいずれも、相当する濃液蛋白のそれより少なく、炭水化物量はすべてに多くみ出された。後者は特に  $xA+xB$  劃分中に非常に多い。DNA 量は、濃液 A, B 蛋白には殆んどみられない<sup>2)</sup>のに、この場合の抽出蛋白にはすべて非常に多く含有されていることがわかる。又この DNA は、アルカリ性より酸性溶媒による抽出蛋白中に、又蒸溜水よりソートンによるものの方に多くみられる。

## 2) 人型菌よりの抽出蛋白

前と同じく両溶媒を用い、pH をそれぞれ 8.8 及び 5.4 として使用した。結果は Table 3 に示したが、これには同時に劃分した濃液蛋白 C 及び hC についても記した。

$xA+xB$  はいずれの場合も非常に少ないが、蒸溜水による場合は更に少ないようである。 $xC$  の収量は極めて多く、その殆んどの場合が濃液からの C 又は hC の収量に優っている。しかも BCG におけると同じく、ソートンによるより蒸溜水による方が多く、又酸性よりアルカリ性の方が多く抽出される。

化学性状の面では、 $xC$  の  $N$ 量は濃液からの C 及び hC のそれよりすべてやや少なく、炭水化物量はすべてに多い。特異的なことは、やはり DNA 量であつて、C 及び hC にはどちらも 0.5% 以下しかみ出されぬに反し、 $xC$  ではすべて 20% 以上含有されていることがみられる。又人型菌の場合も、BCG のときと同じく、DNA はアルカリ性より酸性での  $xC$  中に多く、蒸溜水よりソートンによるものに多量みられる。

ツ活性は、濃液蛋白 C よりやや劣るが、hC とは殆んど等しい強い活性を有していることがわかる。等重量による検査結果からみると、これらの力価は大体  $C > hC \cong xC$  の順であることが知れるが、この場合は、 $N$ 量と DNA 量との関係について考慮しなければならないであろう。この点については後述する。

## 考 按

まえがきにおいて述べたように、結核菌々体からツ活性を有する蛋白を得る試みは相当古くから行われていた。Heiderberger 及び Menzel<sup>7)</sup> は H37 の脱脂菌粉末を種々のアルカリ溶液で抽出し、数種類のツ蛋白を得ている。Grönwall<sup>8)</sup> は BCG より NaOH で抽出し PPD とほぼ等しい力価をもつ蛋白をとつた。又 Corper 及び Cohn<sup>9)10)</sup> は、人型結核菌をトルオール等の有機溶剤を添加した緩衝液に浸すときは、時日と共に多量のツ蛋白が遊離することを報告している。Choucroun<sup>11)</sup> は人

型死菌粉末を流動パラフィン抽出により  $N=6.58\%$  の感作能のある蛋白を取り、Heckly 及び Watson 等は人型菌を磷酸塩<sup>12)</sup>及び硼酸塩<sup>13)</sup>緩衝液で抽出を行い、これに塩化カルシウム処理を加えることにより核酸含量の非常に少ないツ蛋白を得ている。又 Baldwin と共同実験者等<sup>14)</sup>及び Seibert と共同実験者等<sup>15)</sup>はともに人型菌に尿素を作用させて C 型蛋白に類する、但し多糖体含量の多いツ蛋白を分離している。以上は皆相当特殊な溶媒ないし操作を行つているが、これらとは別に、Wong 及び Ouyang<sup>16)</sup> は人型菌を用い、 $100^{\circ}\text{C}$ 、3 時間したのから三塩化醋酸洗滌法で  $N=13.27\%$  の蛋白を得、これの活性は、濃液蛋白のそれと等しいと報告している。又 Seibert 及び共同研究者等<sup>17)</sup>は、培養濃液を傾瀉して、菌体 (H37 等) の残つているコルベン中に蒸溜水を加えて加熱し、核酸及び多糖体含量の非常に多いツ蛋白を得ている。又及び武谷の共同実験で<sup>18)</sup>、伊藤のいわゆる Citrate tuberculin<sup>19)</sup> を検討し、結核菌は殆んどの溶液に浸した場合ツ蛋白を遊離し、これを加熱したときは更に多く、しかも加熱後の洗滌菌からは全く遊離がみられないことを明らかにした。

一方、このようなツ蛋白を抽出する試み以外に又、結核菌々体から核蛋白質を分離するという研究も種々なされている。Chargaff 及び Saidel<sup>20)</sup> は鳥型菌より pH 8.3 の硼酸塩緩衝液で核蛋白を抽出し、Jones<sup>21)</sup> は Cetavlon を用いて分離している。又前に述べた Heckly 及び Watson<sup>12)</sup> の実験では、Ca 洗滌物は殆んど核蛋白であることが示されている。

以上のように結核菌々体からツ蛋白又は核蛋白を抽出しようとする試みは多数の研究者によつてなされているが、いずれも特別の目的で、特殊な処理で行つていて、そのため濃液中のツ蛋白との関係までは明らかにされていない。前 2 報での実験でみられたところの、菌体を共に加熱した濃液中の hC の量及びこの核酸含量と、菌体蛋白との関係を確めるため今回の実験を行つたのであるが、実験結果においてみられるように、人型菌でも又 BCG でも加熱により、核酸含量の多いしかもツ活性の相当強い C 型と思われる蛋白が多量に抽出されることを明らかにした。

この度の実験においてアルカリ性溶媒において XC が一層多く抽出されるということは、蛋白質の等電点の問題から考えて当然であり、多くの研究者が一般にアルカリ溶液で蛋白を抽出していることとも一致する。又武谷<sup>22)</sup> は、培養終末時の培地 pH が高い時は、これの加熱滅菌濃液より製した OT は、そうでない場合の OT より力価が強いと云つているが、このことも  $xC$  の抽出され方から説明できる。

溶媒の違いで抽出蛋白の質及び量に多少の差異が生ずることについても又考えねばならないだろう。前報で、

加熱によつて  $A \rightarrow hA + hC$  及び  $B \rightarrow hB + hC$  の変化が起ることを示したが、この考えからみると、 $xA + xB$  の収量は蒸溜水よりソートンによる方が多いという事実は、加熱の影響が前者において強く起つていると思われるが、別面溶媒の性状によつて生じた差異とも考えられ、むしろこの方が妥当かもしれない。これら抽出蛋白中の核酸含量が、蒸溜水よりソートンによるものに多くみられることは、核蛋白質及び核酸の溶解性から、又通常使用される抽出液が塩類溶液である点等からみて矛盾しない。しかもこれらは又、アルカリ性より酸性で抽出で多くみられることは、ツ中の核酸は酸性状態で蛋白と結合し核蛋白を形成するという Seibert の実験結果<sup>6)</sup>と一致する。

他方 Heckly 及び Watson は抽出蛋白は唯一種類であり、このことと培養濾液中には3種類の蛋白があるという説との相違は不明であるとし、このことの説明に、培養濾液中の蛋白は、菌体蛋白に酵素作用が加つて数種類に分れたのではないかという推測をのべている。しかしながら、この度の実験結果から考えると、適当な分割法を用うることにより、抽出蛋白は数種類に分離し得るものと思われる。しかしこのことから直ちに彼等の推測迄をも否定することはできないだろう。何故なら、加熱によつて変性し、その性状を変えたかも知れぬが、 $xA + xB$  の収量が  $xC$  のそれに比し余りにも少いからである。この点に変性を伴うことの少い温和な抽出法を用いて調べれば、更に明らかにされ得るであろう。

又抽出ツ蛋白の力価が、培養濾液蛋白又は PPD と殆んど等しいとしばしば云われているが<sup>12)16)17)</sup>、私の分離したものでは、相当する培養濾液蛋白よりやや劣る程度であつた。彼等の抽出蛋白でも、又私の抽出蛋白でもすべて 20% 以上の核酸を含有していることがみられるが、このことと、一方濾液蛋白には殆んど核酸が含まれていないか或いは非常に少いという事実とを考え合せると、これらのツ活性に対してなお検討を加える必要が生じて来るであろう。核酸はツ活性と全く無関係であり、又そのN量は蛋白よりむしろ多いということが判つているが、このような不純物が 20% 以上ある抽出蛋白が、非常に純粋な形である濾液蛋白の力価と同程度であるということは、菌体蛋白中のツ活性に関係ある蛋白部分の活性が、濾液蛋白中のそれより決して劣らぬか、或いはむしろ強いということを意味するものであるが、これの解釈には相当の慎重さを必要とする。一般にモルモットでのツ反応では、蛋白の接種量の差が明瞭に現れ難いという点をも考慮しなければならず、この度の動物における、しかも少数例での実験成績のみでは上の疑問を明らかにし得ない。

## 結 語

人型結核菌及び BCG の洗滌生菌を、それぞれアルカリ性又は酸性とした蒸溜水及び 2.5 倍稀釈ソートン培地中で加熱することにより、ツ蛋白を抽出する実験を行つた。加熱抽出濾液より低温アルコール沈澱法で3種の蛋白劃分を分離したが、この法は、培養濾液から蛋白 A、B 及び C、又は hA、hB 及び hC の分離する法と同じである点から、これら抽出蛋白を  $xA$ 、 $xB$  及び  $xC$  と仮称する。

1)  $xA + xB$  蛋白は酸性ソートンによる加熱で多く、又  $xC$  蛋白はアルカリ性蒸溜水によるのが最も多く抽出された。一般的に  $xC$  より  $xA + xB$  は非常に少かつた。人型菌よりの  $xC$  抽出量は、培養濾液よりの C 又は hC の収量に優ることが多かつた。

2) 両溶媒からの抽出蛋白は  $xA$ 、 $xB$ 、 $xC$  とも、それに対応する濾液蛋白 A、B、C 又は hA、hB、hC より、すべて N 量をやや少なく、炭水化物量を相当多く含んでいる。又濾液蛋白には DNA が極めてわずかに見出されるが、抽出蛋白中にはすべて、非常に大量の DNA が含まれている。

3) 抽出蛋白のツ活性は、 $xA$ 、 $xB$  及び  $xC$  とも、それぞれ対応する濾液蛋白の活性より、すべてやや弱いか、或いは殆んど同程度の強さを有している。

以上の結果より、菌体と共に加熱した結核菌培養濾液からの hC は、Seitz 濾液を加熱したものからの hC より、その収量がいちじるしく多く、又核酸含量が多いという原因を明らかにした。又同時に、通常の OT 及び精製ツ蛋白中に見出される多量の核酸の由来をも明らかにした。

終始御懇篤なる御指導を賜つた戸田忠雄教授並びに武谷健二助教授に厚く感謝する。  
本研究には文部省科学研究費の援助を受けた。

## 文 献

- 1) 大友信也：結核，29巻，9号，昭29。
- 2) 大友信也：結核，29巻，12号，昭29。
- 3) 貝原守一・杉山浩太郎：福岡医誌，36，614，昭18。
- 4) Seibert, F.B.: Am. Rev. Tuberc., 59, 86, 1949.
- 5) Dishe, Z.: Mikrochemie, 8, 4, 1930.
- 6) Seibert, F.B.: J. Biol. Chem., 133, 593, 1940.
- 7) Heiderberger, M. and Menzel, A.E.O.: J. Biol. Chem., 104, 655, 1934.
- 8) Grönwall, A.: Upsala läkaref förh., 52, 227, 1947.
- 9) Corper, H.J. and Cohn, M.L.: Am. Rev. Tuberc., 48, 443, 1943.
- 10) Corper, H.J. and Cohn, M.L.: Am. Rev. Tuberc., 50, 81, 1944.

- 11) Choucroun, N. : *Am. Rev. Tuberc.*, 56, 203, 1947.
- 12) Heckly, R.J. and Watson, D.W. : *Am. Rev. Tuberc.*, 61, 798, 1950.
- 13) Heckly, R.J. and Watson, D.W. : *Am. Rev. Tuberc.*, 64, 602, 1952.
- 14) Baldwin, R.W., Gilbert, G.A., Iland, C.N. and Jones, A.S. : *Bioch. Biophy. Acta*, 10, 402, 1953.
- 15) Seibert, F.B. and Fabrizio, A.M. : *Am. Rev. Tuberc.*, 66, 314, 1952.
- 16) Wong, S.C. and Ouyang, C. : *Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med.*, 45, 845, 1940.
- 17) Seibert, F.B., Crumb, C. and Seibert, M.V. : *J. Am. Chem. Soc.*, 72, 2678, 1950.
- 18) 大友信也・武谷健二 : 九六結研紀要, 昭29. 掲予
- 19) Ito, R. : *Am. Rev. Tuberc.*, 67, 526, 1953.
- 20) Chargaff, E. and Sidel, H.F. : *J. Biol. Chem.*, 177, 417, 1949.
- 21) Jones, A.S. : *Bioch. Biophy. Acta*, 10, 607, 1953.
- 22) 武谷健二 : 未発表

