

精製ツベルクリンに関する研究

第2報 三塩化醋酸と硫酸安門とによる精製法の比較

浅見 望・細井 正春

国立予防衛生研究所結核部 (部長 柳沢 謙)

受付 昭和 31 年 8 月 20 日

I 緒 言

Seibert¹が最初に人体の皮内反応に用いた精製ツベルクリンは、培養濾液を限外濾過によつて濃縮し、これに三塩化醋酸を加えた沈澱物である。これを PPD (Purified Proteine Derivative) と名付けた。その後、Jensen²、Doig³、Wong⁴、Green⁵、武谷⁶、武田⁷らによつてこれが追試および変法が行われている。次いで Seibert⁸は限外濾過の濃縮液に硫酸安門を加え半飽和沈澱物を分離した。これは先きの PPD に比べ、核酸および炭水化物量が少なく、かつ力価も強く、比較的安定であつた。これを PPDs (Purified Proteine Derivative satisfactory) と名付けた。彼女はこの PPDs を大量に製造し、現在米国で市販に供されているものも、このものと思われる。硫酸を用いて精製物を得ているのは、武田⁹および Bevilacqua¹⁰らである。また、三塩化醋酸と硫酸とを併用して精製法を行つているのは、Vásárhelyi¹¹および Prigge¹²らである。この他、Bretegh¹³はズルフォサリチール酸を用い、岡本¹⁴らはオルトアミノフェノールを用いている。さらに Seibert¹⁵は醋酸とアルコールによつて、A、B、C 蛋白質を分離した。これらは電気泳動による易動度よりみるも比較的単一の蛋白質であるといわれている。しかし、その分離操作が複雑なため、他者による追試は少ない。ただ、最近大友¹⁶がこの追試を行つているにすぎない。このようにツベルクリンの精製法には種々な方法があり、また、分離された物質の化学的性状および活性等は必ずしも同一ではない。われわれは大量の精製ツベルクリンを製造する予備試験として、まず、三塩化醋酸と硫酸とによる精製法の比較検討を行つたので、その大要を報告する。

II 実験方法

1. 培養濾液

人型結核菌青山 B 株をソートン培地に移植し、Lot 2 では 6 週間、Lot 3 および 4 では 10 週間培養したのち、殺菌することなく、濾紙で菌体を除き、濾液に滅菌水を加えて培養前の培地量としたものを培養濾液とした。

2. 限外濾過管

第 1 報¹⁷の方法によつた。すなわち、100×30mm の素焼円筒にニトロセルローズの H20 秒を氷醋酸で 7% 溶液とし、これより膜を作つた。この濾過管 5 本の通水量は 70mmHg で 1 時間 615cc であつた。

3. N および還元量

N 量は micro Kjeldahl 法により、還元量は Hagedorn-Jensen 法によつて、加水分解後の試料について定量した。

4. 動物による力価試験

現在検定に使用中の感作動物を用いた。すなわち、青山 B 株の死菌流動パラフィン 6 mg 接種のもの 3 ないし 6 匹ずつを用い、1 側には OT の 2,000 倍稀釈液、対側には各試料の 0.25 および 0.5 γ をおのおの 0.1cc ずつ皮内注射し、24 および 48 時間後における硬結の大きさを測定した。

5. 人体による力価試験

大多数が BCG 被接種者で、少数の自然感染者を含む学童集団を用い、前膊屈側の 1 側には OT 2,000 倍稀釈液、他側には各試料の 1 定量 (0.05, 0.1 および 0.2 γ) をおのおの 0.1cc ずつ皮内注射し、48 時間後に判定した。判定には柳沢、前田¹⁸らの方法に従い Sign test をも加えた。

III 実験成績

1. 分離法

この実験は 3 回に分けて行つた。すなわち、Lot 2 では培養濾液 17,000cc を 2 分し、1 は三塩化醋酸により、他は硫酸によつて精製した。Lot 3 および 4 はやや大量の濾液について、両法を別々に精製した。すなわち、Lot 3 は 47,500cc、Lot 4 は 48,000cc の培養濾液を用いた。ここには Lot 2 による分離法を記す。

a) 細菌濾過

培養濾液 19,250cc のうち、1 分の 2,250cc は加熱殺菌後、常法に従つて OT を作つた。残りの 17,000cc は加熱することなく、これにトリオール 50cc とクロロフォルム 10cc とを加え、5 日間室温におき、ときどき振盪した。次いで、Seitz を通し、さらに、Schamberan L3 で濾して無菌とした。この濾液 1cc を小川培地 10 本に培養し 6 週

後まで観察したが、集落の発生は認めなかつた。

b) 限外濾過

細菌濾過後の濾液を限外濾過管5本を用い、5~10°Cの冷室で130mmHg圧をもつて吸引して濾過した。濃縮液が約2 lになつたとき、m/30 磷酸塩緩衝液 2,500ccを加えて、再び濾過を続け、はじめの濾液量の約1/50の340ccまで濃縮した。限外濾過には約4日を要した。濃縮液は濾紙で濾し、2分して次の実験に供した。

c) 三塩化醋酸による沈澱

濃縮液170cc (はじめの培地3,500ccに相当)に新調した50%三塩化醋酸18.7cc (終末5%)を加え、一夜氷室に静置後、遠沈した沈澱を5%三塩化醋酸で3回洗い、最後にアルコールおよびエーテルで洗い、乾して542mgの乾物を得た。これを Seibert に従い PPD と称する。

d) 硫酸による沈澱

濃縮液170ccに硫酸安門の飽和液 (アンモニア水でpH 7.0に修正)の等量を加え、一夜氷室に静置したのち、遠沈した沈澱を、緩衝液90ccに溶し、再び硫酸を加えて半飽和とする操作を全部で7回繰返し、最後の沈澱を緩衝液50ccに溶し、流水中で3日、蒸溜水で2日間透析したのち、アルコールおよびエーテルで洗い、乾して438mgの乾物を得た。これを Seibert に従い PPDs と称する。

2. 収量および化学的性状

各試料の収量および化学的性状は表1の如くである。

表1 収量および化学的性状

ツベルクリンの種類	Lot No.	培養濾液量 (cc)	収 量		N %	還元量 %
			実量 (g)	mg/l		
PPD	2	8,500	0.542	64.9	12.8	6.6
	3	47,500	8.693	183.0	13.0	10.2
PPDs	2	8,500	0.438	51.5	13.0	6.1
	4	48,000	2.210	46.0	13.5	7.5

培養濾液1 lからの収量は Lot 2ではPPD 64.9mg, PPDs 51.5mgであつて後者がやや少ない。また、Lot 3と4とを比べるとPPDは183mg, PPDsは46mgであつて、その差は著明である。なお、PPDをLot 2と3とで比較すると後者は前者の約3倍であり、PPDsではLot 2と4とほぼ等しい収量であつた。これよりみるにLot 3の発育が良好であつたものと思う。

N量は4試料とも13%前後であつて、その差は少ないが、一般にPPDsはPPDに比し、N量はやや多かつた。還元量はLot 2では両者とも6%, Lot 3では10.2%, Lot 4では7.5%であつて、これら各試料間の差は僅かであつた。

3. 動物による力価試験

OT 50γ (2,000倍稀釈液) に対し、各試料0.25および0.5γを用いた場合の成績は表2の如くである。各試料と

表2 動物による力価試験

注 射 量 (γ)	ツベルクリンの種類	Lot No.	Ratio	
			24	48
0.25	PPD	2	0.74	0.70
		3	0.89	0.96
	PPDs	2	0.86	0.76
		4	1.01	1.06
0.5	PPD	2	0.98	0.87
		3	0.99	1.05
	PPDs	2	1.07	0.96
		4	1.09	1.14

注: 感作モルモット 5~6匹使用

も0.25γでははなはだ弱かつた。次いで各試料の0.5γをOTと比較するに、24時間後のRatioではPPDはLot 2が0.98, Lot 3が0.99であつて、OTとほぼ等しいが、PPDsはLot 2が1.07, Lot 3が1.09であつて、OTよりかなり強かつた。次ぎに、24時間と48時間におけるRatioを比較するに、Lot 2では再試料とも24時間値が大きく、Lot 3および4では、逆に48時間値が大きかつた。これは動物の感作度の差によるものと思われる。要するに、動物においては、PPDよりもPPDsが強く反応した。

4. 人体による力価試験

OT 50γに対し、各試料の種々なる量を用いた場合の成績は表3の如くである。すなわち、Lot 2では両試料とも0.1γを用いた際のRatioを見るにPPDは0.89, PPDsは0.97である。また、Sign test についてみるもPPDは-0.42, PPDsは-0.03であつた。すなわち、PPDはPPDsよりもやや弱かつた。次ぎに、Lot 3と4とを比べると、PPDでは0.2γがOTとほぼ等しくPPDsでは0.1γがほぼ等しかつた。このように同一Lotを用いた場合も、また、別々のLotを用いた場合においても、PPDsはPPDよりも力価はかなり強かつた。また、各試料0.1γを用いた場合の硬結触知率をみるに、PPDはOTとほぼ同数であるが、PPDsはOTよりもはるかに多かつた。二重発赤形成数においても、PPDsがPPDよりも多い傾向であつた。

IV 考 案

われわれは精製ツベルクリンの大量製造を行うに当り、その予備試験としてまず、精製法の検討を行つた。その結果、分離操作は三塩化醋酸による法が簡単であり、硫酸による法はやや繁雑であつた。しかし、収量は前者によるPPDが後者によるPPDsよりも多かつた。また、これらの化学的性状を比較するのに両者に大差は認められなかつた。Seibert¹⁹⁾のPPDはN11~27%, 炭水化物20~27%であるが、われわれのものの炭水化物

表3 人体による力価試験(48時間判定)

Lot No.	「ツ」の種類	注射量(γ)	検査員	Ratio	Signtest	区分	性		硬結		二重発赤数
							実数	%	実数	%	
2	PPD	0.1	74	0.89	- 0.42	S	67	90.1	11	15.3	0
						T	65	85.0	9	12.5	0
	PPDs	0.1	74	0.97	- 0.23	S	70	94.0	5	6.9	1
						T	66	89.0	14	19.5	1
3	PPD	0.1	106	0.97	- 0.24	S	94	88.5	17	16.0	4
						T	85	78.3	18	17.0	3
		0.2	78	0.99	- 0.01	S	74	95.0	21	27.0	3
						T	71	91.8	21	27.0	9
4	PPDs	0.05	148	0.97	- 0.24	S	138	95.2	26	17.5	3
						T	127	86.0	20	13.5	5
		0.1	164	1.04	- 0.02	S	156	95.0	65	39.5	4
						T	149	90.5	73	44.5	7
		0.2	158	1.13	+ 0.41	S	141	89.2	22	13.9	2
						T	140	88.5	27	17.1	3

注:SはStandard OT 1:2,000 TはTested.

は彼女のものより少なかった。これは酸濃度を彼女は10%, われわれは5%を用い, また, 酸沈澱物を彼女は直ちにエーテルで洗っているが, われわれは三塩化醋酸で3回も洗っているため, 蛋白以外の物が少なくなつたものと思われる。PPDs はほぼ彼女の分離したものに近似しているようである。次に, OTに対する力価を比較するに, PPDは弱く, PPDs はやや強かつた。先述の如く, この両者のN量には大差はないにもかかわらず, 力価に著しい相違のあるのは, 一つにはPPDは酸を用いているため, 操作中蛋白の変性をきたし易いの反し, PPDs では塩析によつて分離しているので, 蛋白を害することが少ないためと思われる。他方, PPDは活性および非活性の全蛋白が含まれ, PPDs は活性の強い蛋白が多く含まれているためと考えられる。今回は電気泳動による検索は行わなかつたが, 今後この方面の検査も行い, 蛋白の種類を調べたいと思う。それ故にN量をもつて力価を判定することははなはだ危険である。戸田ら²⁰⁾もPPDs, IP_{4s}, TA₂, πおよびπT等5種の製品を同一培養濾液から同時に精製した場合でも, 力価はいずれも等しいが, 化学的純度においてはPPDsが最も優れていると言っている。要するに精製ツベルクリンを大量に製造する場合, たとえ操作がやや複雑であり, 収量もやや少なくとも, 力価の強いPPDsの方がPPDよりもよいと思われる。なお, 精製操作はできるだけ短時間に, しかも低温において行うことは蛋白の変性を防ぐ上において重要な条件である。

V 結 言

結核菌の非加熱培養濾液を限外濾過法によつて濃縮し

たものに, 三塩化醋酸または硫酸を加えて分離したPPDとPPDsとを比較し, 次のことを結言する。

1. 分離操作は三塩化醋酸による法が硫酸による法よりも簡単であつた。
2. 収量はPPDがPPDsよりもやや多かつた。
3. 力価はPPDsがPPDよりもかなり強かつた。すなわち, 人体による力価試験では, OT 2,000倍に対し, PPDは0.2γ, PPDsは0.1γがほぼ等力価であつた。
4. これらの点から大量製造には化学的に純粋で, 力価の強いPPDsを分離すべきものと思う。

終りに臨み, 御指導御鞭撻を賜つた柳沢部長ならびに室橋博士に謝意を表する。

文 献

- 1) Seibert, F.B.: Am. Rev. Tbc., 30: 713, 1934.
- 2) Jensen, K.A., G. Bindslev, S. Müller, A. Hansen & P. Lind: Tubercle, 19: 386, 1938.
- 3) Doig, A.T., G. Gemmill, G.G. Kayne, F.V. Linggood, H.J. Parish & J.S. Westwater: Brit. Med. J., 1: 992, 1938.
- 4) Wong, S.C. & I.K.C. Chu: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 39: 423, 1938.
- 5) Green, H.H.: Vet. J., 102: 267, 1946.
- 6) 武谷健二: 医学と生物学, 20: 200, 1951.
- 7) 武田徳晴・河西 信・青木良雄: 日本細菌学雑誌, 6: 369, 1951.
- 8) Seibert, F.B. & J.T. Gleen: Am. Rev. Tbc.,

- 44: 9, 1941.
- 9) Takeda, Y. & S. Watanabe: J. Biochem., 34: 385, 1941.
- 10) Bevilacqua, E.B. & J.R. McCater: J. Exp. Med., 87: 229, 1948.
- 11) Vásárhelyi, J. & B. Gözsy: Z. Imm. Exp. Therapie, 97: 255, 1940.
- 12) Prigge: Schweiz. med. Wochshr., 63, 1945.
- 13) Bretey, J., A. Lamensans: Compt. Rend. Seau: L'Acad. Scien., 232: 188, 1950.
- 14) Okamoto, H.: Japan Med., 3: 31, 1951.
- 15) Seibert, F.B.: Am. Rev. Tbc., 59: 86, 1949.
- 16) 大友信也: 結核, 29: 9, 1954.
- 17) 浅見 望・細井正春: 結核, 29: 482, 1954.
- 18) 柳沢 謙・前田道明他: 結核の臨床, 3: 47, 1955.
- 19) Seibert, F.B. & F. Du Four: Am. Rev. Tbc., 58: 363, 1948.
- 20) 戸田忠雄他: 結核, 30, 特別号, 14, 1955.