

精製ツベルクリンに関する研究

第3報 PPDsの大量製造およびその物理化学的性状

細井正春・浅見望

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

精製ツベルクリンの製造に関しては、米国における Seibert の PPDs を始め、英国 (PPD), 独乙 (GT), デンマーク (PPD), フランス (I P_{4s}) 等の研究が早くから行われ、広く実用化されている。一方、わが国においても種々の精製法が研究され、戸田らの π , 武田の T A₂, 伊藤・越村らの AzoT 等があるが、いずれもいまだ実用に供されていない現況にある。この原因は各研究者が精製方法の改良および製品の化学的均一性に主眼をおき、OT に対応した皮膚反応の検討がなされていないためと思われる。これがためには同一ロットの精製ツベルクリンを大量製造することが必要である。

Seibert¹⁾ は 1941 年、ロング培地 733 I に人型結核菌 DT を培養し、その濾液から限外濾過、半飽和硫酸沈澱法によつて 104.4g の PPDs を分離し、これを用いて各種の実験を行つている。

われわれはさきに²⁾、2つの精製法の検討を行つた結果、力価の強いのは硫酸半飽和沈澱によるもので、Seibert のいわゆる PPDs に相当するものであつた。故に今回は、約 300 l のソートン培養濾液から約 60g の PPDs を得たので、その製法および物理化学的性状についてここに大要を報告する。

II 実験方法

1. 使用菌株および培地

人型結核菌青山 B 株をソートン培地に培養した。ソートン培地の総量は 303.2l、これを約 1 l の培養瓶に 300cc ないし 400cc あてそれぞれ分注したものに上記菌株を培養し、約 8 週間 37°C で培養した。培養は約 100 l ずつ 3 回に分けて行い、1954 年 11 月 3 日殺菌のものを No. 9、1955 年 1 月 14 日のものを No. 10、同年 2 月 21 日のものを No. 14 とした。このうち No. 10 は家畜衛生試験場のフラン室を借用した。

2. 限外濾過管

限外濾過に用いた円筒は 4.5×13cm の素焼円筒 30 本、これにニトロセルローズ H20 秒 (J I S)³⁾ の 10% 氷醋酸溶液より濾過膜を附し、氷室内で限外濾過を行つた。

3. 蛋白窒素および還元量

蛋白窒素はネスラー氏法⁴⁾による比色により、還元量は Somogyi 氏法⁵⁾により、加水分解後の試料について定量した。

4. 含水度の測定

Abderhalden 法により、試料を 5 mm 以下の減圧下で 60°C 3 時間乾燥後秤量し、前後の重量から算出した。

5. 電気泳動

日立 HT-B 型電気泳動装置を用い、電気泳動研究会の標準操作法に準じて泳動を行つた。すなわちマイクロセルを用い、試料濃度 1.5%, m/20 磷酸緩衝液, pH 7.8, イオン強度 0.144, 電圧勾配 8v/cm, 温度 17°C において泳動した。易動度の計算は、易動距離 d (cm), セルの断面積 s (cm²), 試料の比電導度 k (mho), 電流 i (ampere), 泳動時間 t (second) とすれば、易動度 γ は次式で求められる。 $\gamma = \frac{d}{t} \cdot \frac{i}{ks}$ (cm²/volt sec) 次に引伸器で原板を拡大し、各成分の峰の間の最低点から基線上に垂線を下ろし、泳動図を各成分および δ , ε 峰に分け重量法を用いて各成分の百分率を求めた。

$$\frac{\text{(考える成分の面積)}}{\text{(全面積)} - (\delta \text{ または } \varepsilon \text{ 峰の面積})} \times 100$$

III 実験成績

1. 精製法

a) 菌体の除去および細菌濾過

培養および精製は 3 回に分けて行つたが、すべて同一条件で実施しているため、ここでは No. 9 のみについて詳述する。

ソートン培養 300cc あて 314 本、合計 94.2l を培養後、コッホ釜にて 100°C 30 分間滅菌し、濾紙にて菌体を分離し、Seitz にて細菌濾過を行い、この濾液 10l に対して 20~30cc の割にトロールを加えて防腐した。

b) 限外濾過

濾液は前記濾過管 30 本を用い、10°C 以下の冷蔵庫中で 50~100mmHg 圧で吸引して限外濾過を行つた。濃縮が終りに近づいてから、m/30 磷酸緩衝液にて濃縮液を洗滌し、約 2l まで濃縮後 Seitz を通し、1,940cc の濃縮液を得た。限外濾過には 5 日間を要した。

c) 分離法

この濃縮液 1,940cc に、アンモニアで pH を中性にし

硫酸安門の飽和溶液 1,940cc を加え、1 夜氷室中に放置し、沈澱を遠心分離し、これに 1,800cc の磷酸緩衝液を加えて溶解し、再び硫酸の等量を加えて沈澱を行う。この操作を 3 回繰返した後、沈澱を磷酸緩衝液の 600cc に溶解し、流水にて 5 日間硫酸のなくなるまで透析し、その後蒸溜水に 1 昼夜透析したものを、清浄な限外濾過管を用いて 850cc まで濃縮し、これを約 100cc あて数回に分けて凍結乾燥した。

d) 各ロットの混合

以上の如くして得た No. 9, 10 および 14 の凍結乾燥粉末を混合して蒸溜水 600cc に溶解し、Seitz を通して無菌となし、再び無菌的に凍結乾燥を行って PPDs の粉末を得た。これを No. 15 とする。

2. 収量

結核菌培養濾液 303.2l より PPDs を 3 回に分けて精製し、合計 63.3g の収量を得た。これは培地 1l より 209mg の収量になるが、表 1 に示す如く各ロットの収量はまちまちで、1l よりの収量は No. 9 が 320mg, No. 10 は 130mg, No. 14 は 180mg で相当の開きがあつた。

表 1 収量

Lot No.	9	10	14	計(15)
培養量 l	94.2	100.0	109.0	303.2
収量 g	30.1	13.2	20.0	63.3
1l よりの収量 mg	320	132	180	209

3. 化学的性状

PPDs の凍結乾燥粉末は類白色を呈し、水によく溶解する。また、濃厚な溶液は淡褐色を呈する。

粉末の蛋白窒素は 13.6%、含水度は 3.8~4.0%、還元量は 3.24% であつた。

4. 電気泳動

図 1 PPDs の電気泳動図



表 2 電気泳動成績

脚側	易動度*	成分百分率	Seibert の結果*
上	-7.84	7.5	D -8.6
	-7.05	68.9	C -6.1~-7.3
昇	-3.52	20.2	A+B { A -3.4~-3.8 B -5.4~-6.4
	-1.89	3.5	多糖 { I -1.4~-2.0 II -1.4~-1.6
下	-7.84	7.6	D
	-6.64	63.5	C
降	-3.62	22.7	A+B
	-1.51	6.2	多糖

* 易動度 $\times 10^{-5} \text{cm}^2 \text{ volt}^{-1} \text{ sec}^{-1}$

電気泳動の結果は表 2 および図 1 に示す如く、この条件の下においては、4 つの峰が形成され、移動の早いものから易動度および成分の百分率をみれば、最初の峰の易動度 -7.84 は 7.5% を占め、第 2 の峰 -7.03 が 68.9% で全体の大半を占め、第 3 の峰 -3.52 は 20.2%、第 4 の峰は -1.89 で 3.5% を占めていた。下降側では数値がやや前後しているが、ほぼ上昇側と近似値を示した。

IV 総括および考案

人型結核菌青山 B 株のソートン培養 303.2l の濾液から、限外濾過、硫酸安門半飽和沈澱法によつて、PPDs の 63.3g を得たが、3 回に分けて精製を行つた各 Lot の 1l よりの収量はそれぞれ 320mg, 132mg および 180mg でその間には相当の開きがあつた。これは各 Lot における菌の発育の良否によるものと思われる。おのおのの菌量の測定を行つていないので明確なことは判らないが、No. 10 は他の 2 Lot がフラン器中で培養を行つたのに対し、フラン室中において培養を行つており、また、コルベン 1 本に分注した培地量が、他の 2 Lot が 300cc であるのに対し、No. 10 では 400cc あて分注して培養したため、培地量に対する表面積、s/v の関係が異なり、収量に大差をもたらしたものと推察される。

菌株、培地、培養期間および精製法が異なれば、その収量に差の生ずるのはいうまでもないが、一般に培養量 1l から 200~500mg の収量があり、Seibert¹⁾ の PPDs は人型菌 D T をロング培地に 8~10 週培養し、その 733l より 107g を得ている。これは 1l 当り 146mg の収量で、われわれの PPDs に比ぶればはるかに少ない。また、各研究者の培地 1l から精製物の収量⁶⁾ をみると、伊藤の O-A-Azo T は 260mg、武田の TA₂ は 377mg、倉金の K P T は 515mg であつて、いずれもわれわれの PPDs よりも収量が多いが、これは化学的成分も異なるためであろう。

蛋白窒素は 13.6% であり、今仮に 6.25 をこれに掛けて蛋白量を計算すると 85.0% となり、約 15% は非蛋白性物質を含むことになる。

電気泳動による結果から、この PPDs には易動度 -1.5 ないし $-7.8 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \text{ volt}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ のおよそ 4 つの成分に分れたが、上昇側で -7.03、下降側 -6.64 の成分が 64~69% を占めており、次で上昇側 -3.52、下降側 -3.62 の成分が 20~23% を占め、あとの 2 つはわずかであつたが、これを Seibert⁷⁾ が非加熱濾液から分離した蛋白 A, B, C および多糖体 I, II の電気泳動結果と比較検討すれば、最も百分率の高い第 2 の成分は、彼女のいわゆる C 蛋白 (易動度 -6.1~-7.3) に相当するものと思われる。しかして第 3 の成分は A 蛋白 + B 蛋白 (A 蛋白は -3.4~-3.8, B 蛋白は -5.4~-6.4) と思われる。また、最も易動度の遅い第 4 の成分は多糖体 I または II

であろう。これはほとんど移動せず δ および ϵ 境界と一部重なっている。この他最も速く移動する第1の成分は上昇側では明瞭な分離をしていないが、下降側では明らかに1成分とみられ、これはD蛋白(-8.6)であろうと思われる。

このPPDsは100°C 30分間加熱した濾液から得られたもので、熱に不安定と言われるA蛋白が少なく、熱に強いC蛋白が多い。このことは Seibert⁸⁾や大友⁹⁾の結果と一致している。

今日まで、わが国の多くの研究者によつて、種々なる精製ツベルクリンが作られているが、その製造量が少ないため、実験の度に Lot が変つてることが多い。このため化学的性状および生物学的性状もその都度異なるので実験成績の不一致をまぬがれなかつた。われわれは今回やや大量にPPDsを分離したので、今後この同一物質について化学的ならびに生物学的性状を検討してゆくつもりである。

V 結 言

われわれは Seibert に従い硫酸安門半飽和沈澱法によつてPPDsを分離した。

1) その収量は培地303.2l から63gであり、これは培地1l から209mgの収量であつた。

2) このものは白色で、蛋白窒素は13.6%であつた。

3) 電気泳動の上から4つの成分に分かれ、その中の最大の峰の易動度は-7.03であり、その百分率は約65%であつた。故にこのものは3つの易動度の異なる蛋白と、多糖類の少量とを含んでいる。

終りに臨み、柳沢部長の御指導と御校閲を謝し、培養に際していろいろ御協力下さつた家畜衛生試験場の山口および川西両技官、また、電気泳動について種々御教示を仰いだ予研血清部市川技官、東大生化学島尾先生等に謝意を表す。

文 献

- 1) Seibert, F.B. & Glenn, J.T.: Am. Rev. Tbc., 44: 9, 1941.
- 2) 浅見 望・細井正春: 結核.
- 3) 浅見 望・細井正春: 結核, 29: 482, 1954.
- 4) Johnson, M.J.: J. Biol. Chem., 137: 575, 1941.
- 5) Somogyi, M.: J. Biol. Chem., 160: 69, 1945.
- 6) 柳沢謙他: ツベルクリン反応, 45, 1955, 金原出版株式会社.
- 7) Seibert, F.B.: Am. Rev. Tbc., 59: 86, 1949.
- 8) Seibert, F.B. & Fabrizio, A.M.: Am. Rev. Tbc., 66: 314, 1952.
- 9) 大友信也: 結核, 29: 356, 1954.