

## 精製ツベルクリンについて

## 第1報 精製ツベルクリン(H画分)の画分法

新藤三郎・村井勢

指導 東北大学抗酸菌病研究所  
 海老名敏明教授  
 管野巖助教授  
 東北大学農学部  
 梅津元昌教授

受付 昭和34年12月14日

## 緒言

Robert Koch<sup>1)</sup>が旧ツベルクリン(以下OTと略)の結核感染有無に特異反応の示すことを明らかにして以来、その活性因子を求めて多年の研鑽がなされた。

F.B. Seibert<sup>2)</sup>はOTを限外濾過法により濃縮、飽和硫酸アンモニウムで沈澱させて精製ツベルクリンPPD-sを作つた。

Boquet<sup>3)</sup>はOTに燐ウオルフラム酸を加えてできた沈澱物に水酸化バリウム、メタノールを作用させて燐ウオルフラムツベルクリンを作つた。

武田<sup>4)</sup>は80°C以下で1/15量まで濃縮したOTにメタノール4倍量加え、得た沈澱を蒸溜水で溶解、これに20%三塩化醋酸を加えてpH4.0とすると沈澱が生ずる。これをさらに蒸溜水と10%苛性ソーダ少量を加えて溶かし、これを流水で2日、蒸溜水で1日透析したのち凍結乾燥を行ない、灰白色の粉末TA<sub>2</sub>を得た。

戸田<sup>5)</sup>は20~50%三塩化醋酸を適量加えてpH4.0とし、できた沈澱に終末pH7.0~7.2になるように少量のN/10苛性ソーダを加えて適量の蒸溜水に溶解、次にN/10塩酸を滴下沈澱、上清を捨て1日流水、1日蒸溜水で透析後凍結乾燥し、πと名づけた。

岡本<sup>6)</sup>はOTにO-aminophenolをジアゾ化してO-aminophenol-azotuberculinを得た。

これら精製ツベルクリンの力価は約0.1γ前後がOT1:2,000に相当する<sup>7)</sup>。今原液1ccを1gと考えるとOT1:2,000、0.1ccは50γに相当し、精製ツベルクリンはOTの1/500量で等力価を示すほどに精製されたものである。

しかし精製ツベルクリンとOTの皮内反応の優劣ではまだ満足な結果をみていない<sup>8)</sup>。

そこでわれわれはこれらの精製法はあまりに蛋白体にこだわりすぎるのではないか、ツ反は蛋白体のみならずもつと複雑な因子からなるのではないかと考え、次のよ

うな精製法を行ない、1つの興味ある画分を得た。

## われわれの行なつた精製ツベルクリン画分法

## I. 使用したツベルクリン原液

結核菌青山B株をSauton培地に6週間培養後100°C1時間蒸気滅菌、東洋濾紙131号で濾過し、その濾液を使用培地量の1/10量に濃縮したものをツベルクリン原液とした。

## II. 操作法(図1)

抽出は4°Cの氷室で行なつた。

a. ツベルクリン原液400ccにアセトン1,200ccを加え7日間放置、茶褐色シロップ状の沈澱を得る(沈澱A, 上清A')。

b. 沈澱Aを蒸溜水90ccに溶解、終末アルコール濃度80%となるように無水アルコール360ccを加え、4日間放置、灰褐色粉末状の沈澱を得る(沈澱B, 上清B')。

c. 沈澱Bを蒸溜水100ccに溶解、アルコール560ccおよび同量エーテルを加え1昼夜放置、灰褐色粉末様の沈澱を得る(沈澱C, 上清C')。

d. 沈澱Cをクロロホルムで加温洗滌後濾別、灰褐色のかさかさした物を得る(沈澱D, 上清D')。

e. 沈澱Dを蒸溜水150ccで溶解、エチルアルコール850ccを加え、1昼夜放置、アルコール中で白色、大気中で漸次褐色カラメル様となる(沈澱E, 上清E')。

f. 沈澱Eを再びクロロホルムで加温洗滌後濾別、茶褐色のかさかさした固体を得る(沈澱F, 上清F')。

g. 沈澱Fを約20ccの蒸溜水に溶解、終末濃度20%になるように三塩化醋酸を加える。沈澱と上清が完全に分かれるまで放置、濾別、茶褐色の固体を得る。これをアルコールで洗滌後乾燥、淡茶褐色の固体を得る(沈澱G, 上清G')。

h. 上清G'に4倍容のアセトンを加えただちに遠心分離、上清を除き沈澱物を蒸溜水20ccに溶解、4倍容のアセトンを加え再び遠心分離、できた沈澱をエーテ

図1 精製ツベルクリン画分法

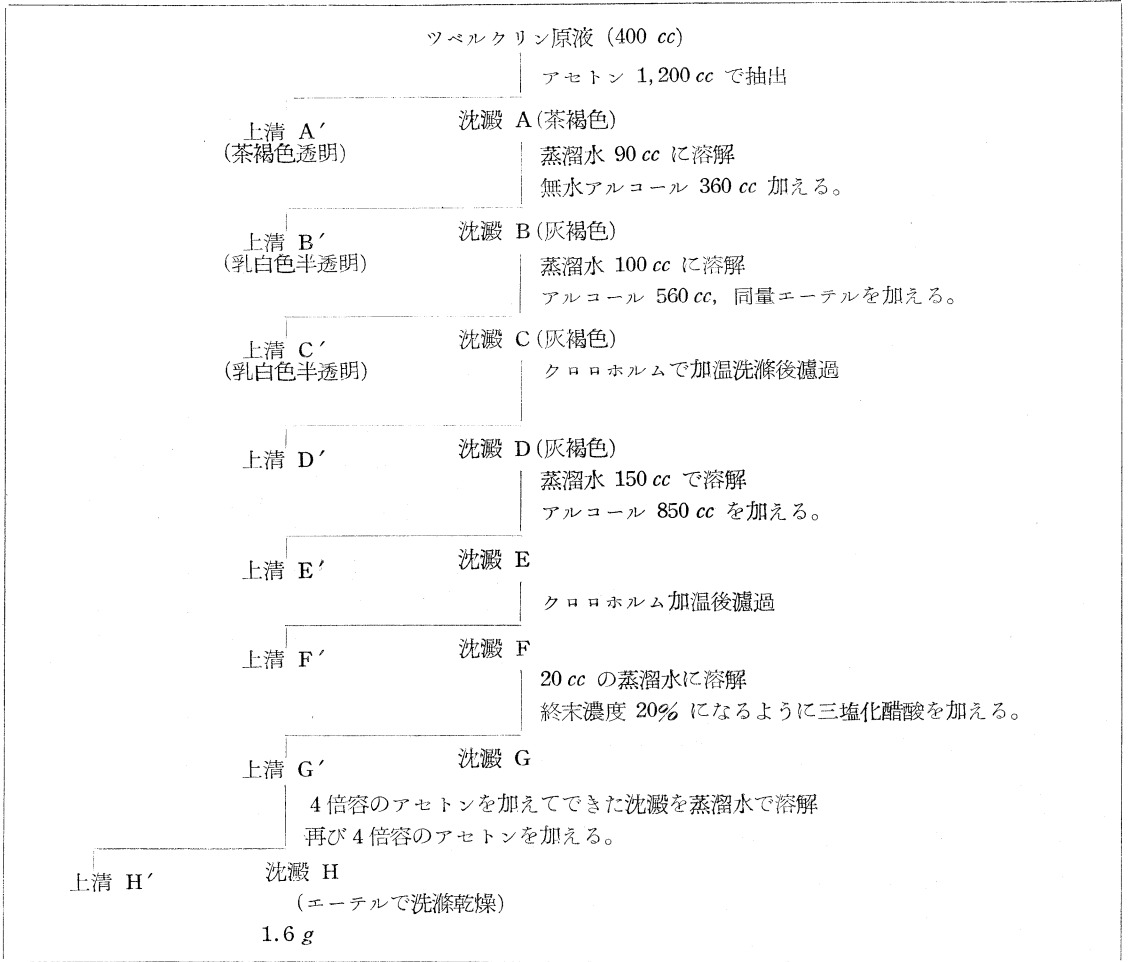
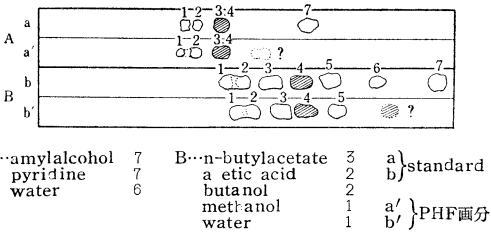


表1 H画分の化学的組成

	N (%)	P (%)	多糖体 (%)
H·Fr	0.998	1.07	72.09

図2 H画分に含まれる多糖体のペーパークロマトグラフ



I. 化学的組成 (表1, 図2)

H画分は灰褐色の粉末で水に溶けやすく、窒素成分は micro-Kjeldahl 法により 0.998%, 磷成分は Liebig 法により 1.07%, 多糖体は 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で 10 時間煮沸し、十分に加水分解が行なわれたのち、Hagedorn-Jensen 法で 72.09% であった。なおこの多糖体は溶媒 (Solvent) に amyralcohol-pyridine-water (5:3:2)<sup>9)</sup>, および n-butylacetate-acetic-butanol-methanol-water (3:2:2:1:1)<sup>10)</sup> を用い、発色剤 (indicator) に aniline hydrogen phthalate 試薬<sup>11)</sup> を用い、一次元法による paperchromatography で galactose, glucose, mannose, xylose, rhamnose と fucose の位置と思われるところに赤紫色に展開するものを確かめた。

II. 生物学的性状

H画分を生理的食塩水で 50 γ/0.1 cc, 30 γ/0.1 cc, 10 γ/0.1 cc と稀釈し、結核菌青山 B 株の死菌流動パラフィン 6 mg/cc, 2 cc で感作したモルモットを 3 群に分け、1 群 (3 匹) の背部左右 4 カ所に H画分 50 γ/0.1 cc と OT 1:2,000 を、2 群 (3 匹) の背部左右

で洗滌後乾燥、灰褐色の粉末を得た (沈澱 H)。

以上の操作でツベルクリン原液 400 cc より H画分 (H·Fr) 1.6 g を得た。

H画分の化学的組成および生物学的性状

表 2 OTとH・Frの力価比較

a : H・Fr 50 $\gamma$   $\times$  OT 1 : 2,000

動物番号	24 時間 値		48 時間 値	
	旧ッ 2,000倍	H・Fr 50 $\gamma$	旧ッ 2,000倍	H・Fr 50 $\gamma$
♂ 9	右 10 $\times$ 10 右 14 $\times$ 14	左 27 $\times$ 32* 左 26 $\times$ 26*	右 11 $\times$ 12 右 15 $\times$ 20	左 15 $\times$ 17 左 25 $\times$ 27*
♂ 15	右 11 $\times$ 14 右 12 $\times$ 12	左 17 $\times$ 18 左 17 $\times$ 17	右 10 $\times$ 11 右 14 $\times$ 11	左 14 $\times$ 15 左 16 $\times$ 14
♂ 20	右 13 $\times$ 13 右 14 $\times$ 14	左 6 $\times$ 7 左 24 $\times$ 29	右 11 $\times$ 12 右 15 $\times$ 16	左 17 $\times$ 22 左 27 $\times$ 25
ratio $\left(\frac{H\cdot Fr}{OT}\right)$	1.6		1.4	

\* 潰瘍形成

b : H・Fr 30 $\gamma$   $\times$  OT 1 : 2,000

動物番号	24 時間 値		48 時間 値	
	旧ッ 2,000倍	H・Fr 30 $\gamma$	旧ッ 2,000倍	H・Fr 30 $\gamma$
♂ 14	右 11 $\times$ 11 右 13 $\times$ 13	左 20 $\times$ 25 左 20 $\times$ 22	右 15 $\times$ 13 右 12 $\times$ 13	左 12 $\times$ 12 左 16 $\times$ 20
♂ 13	右 12 $\times$ 12 右 13 $\times$ 14	左 10 $\times$ 18 左 16 $\times$ 20	右 11 $\times$ 11 右 15 $\times$ 15	左 14 $\times$ 14 左 20 $\times$ 21
♂ 16	右 3 $\times$ 5 右 7 $\times$ 7	左 5 $\times$ 6 左 6 $\times$ 7	右 0 $\times$ 0 右 5 $\times$ 5	左 6 $\times$ 6 左 5 $\times$ 5
ratio $\left(\frac{H\cdot Fr}{OT}\right)$	1.3		1.2	

c : H・Fr 10 $\gamma$   $\times$  OT 1 : 2,000

動物番号	24 時間 値		48 時間 値	
	旧ッ 2,000倍	H・Fr 10 $\gamma$	旧ッ 2,000倍	H・Fr 10 $\gamma$
♂ 3	左 14 $\times$ 14 左 14 $\times$ 14	右 15 $\times$ 15 右 15 $\times$ 15	左 14 $\times$ 14 左 12 $\times$ 12	右 11 $\times$ 11 右 12 $\times$ 12
♂ 5	左 12 $\times$ 12 左 12 $\times$ 12	右 9 $\times$ 9 右 10 $\times$ 10	左 10 $\times$ 10 左 12 $\times$ 12	右 6 $\times$ 6 右 7 $\times$ 7
♂ 10	右 14 $\times$ 14 右 15 $\times$ 15	左 10 $\times$ 9 左 10 $\times$ 10	右 7 $\times$ 7 右 11 $\times$ 12	左 7 $\times$ 7 左 10 $\times$ 10
♂ 12	右 12 $\times$ 12 右 12 $\times$ 12	左 10 $\times$ 10 左 9 $\times$ 9	右 10 $\times$ 10 右 10 $\times$ 10	左 8 $\times$ 7 左 11 $\times$ 11
♂ 8	左 11 $\times$ 11 左 10 $\times$ 10	右 8 $\times$ 8 右 10 $\times$ 10	左 11 $\times$ 11 左 11 $\times$ 11	右 2 $\times$ 2 右 5 $\times$ 5
ratio $\left(\frac{H\cdot Fr}{OT}\right)$	0.8		0.7	

4カ所に H 画分 30 $\gamma$ /0.1 cc と OT 1 : 2,000 を, 3群 (5匹) の背部左右 4カ所に H 画分 10 $\gamma$ /0.1 cc と OT 1 : 2,000 を皮内注射し, 24 時間, 48 時間後の硬結を測定し, 24 時間値の ratio をみると 1 群で 1.6, 2 群で 1.3, 3 群で 0.8 となり, H 画分の力価は 30 $\sim$ 10 $\gamma$  が OT 1 : 2,000 に相当するものと思われる

(表 2, 図 3)。

また非感作モルモット 5 匹の背部左右 2カ所に H 画分 10 $\gamma$ , OT 1 : 2,000 を注射し, 24 時間, 48 時間後の硬結を測定したがすべて陰性であった。

図 3 OT と H・Fr の ratio のグラフ

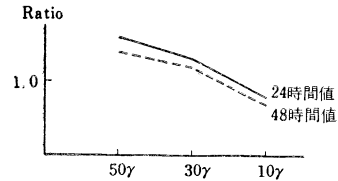


表 3 非感作モルモットに対する OT と H・Fr との皮内反応

動物番号	24 時間 値		48 時間 値	
	H・Fr 10 $\gamma$	旧ッ 2,000倍	H・Fr 10 $\gamma$	旧ッ 2,000倍
♂ 41	右 4 $\times$ 4	左 6 $\times$ 6	右 0	左 5 $\times$ 5
♂ 43	右 6 $\times$ 6	左 8 $\times$ 8	右 0	左 6 $\times$ 6
♂ 45	左 3 $\times$ 3	右 5 $\times$ 5	左 2 $\times$ 2	右 7 $\times$ 7
♂ 53	左 5 $\times$ 5	右 7 $\times$ 7	左 3 $\times$ 3	右 4 $\times$ 4
♂ 42	右 0	左 3 $\times$ 3	右 3 $\times$ 3	左 0

結 論

われわれはツ原液 400 cc にアセトン, アルコール, クロロホルム, エーテル, 20% 三塩化醋酸を加えて H 画分 1.6 g を精製した。このものは N 量 0.998%, 多糖体量 72.09% で, その 30 $\sim$ 10 $\gamma$  の間に旧ッ 2,000 倍に相当する力価があると思われる。

文 献

- 1) Koch, R. : Deut. med. Wochschr., 17 : 1189, 1891.
- 2) a) Long, E.R., & Seibert, F.B. : Amer. Rev. Tuberc., 13 : 448, 1926.
- b) Seibert, F.B., & Munday, B. : Amer. Rev. Tuberc., 25 : 724, 1932.
- c) Seibert, F.B. : Amer. Rev. Tuberc., 30 : 713, 1934.
- d) Seibert, F.B. : Amer. Rev. Tuberc., 44 : 9, 1941.
- e) Seibert, F.B. : Chemical Review, 34 : 107, 1944.
- 3) Boquet, A., & Sandor, G. : Ann. Inst. Pasteur, 57 : 622, 1936.
- 4) 武田徳晴 他 : 結核, 26 : 485, 昭26.
- 5) 武谷健二 他 : 医学と生物学, 20 : 200, 昭26.
- 6) Ito, R., & Koshimura, S. : Jap. J. Med. Sc.

- Biol., 1 : 427, 1948.
- 7) 柳沢謙 : 日本医事新報, 1492 : 24, 昭27.
- 8) Medlar, E.M. : Amer. Rev. Tuberc., 43 : 534, 1941.
- 9) Yoshizawa, Z. : Tohoku J. Exp. Med., 53 : 125, 1950.
- 10) Masamune, H. : Tohoku J. Exp. Med., 55 : 299, 1951.
- 11) Partridge, S.M. : Nature, 164 : 79, 1949.