

グルクロン酸曹達処理ツベルクリンよりとり出されたる 一結晶性物質 (IGLT) について

羽 鳥 順 子・佐 野 元 子・羽 鳥 弘

結核予防会結核研究所 (指導 湯沢健児所長)

受付 昭和 36 年 1 月 24 日

第 30 回生化学会総会において著者らはツベルクリン (以下「ツ」と略す) 反応の変調とアルデヒド化合物との関係について報告した¹⁾。

これによると各種アルデヒド化合物処理「ツ」は「ツ」反応を変調せしむることを観察した²⁾。

すなわち、その「ツ」反応はあるものは減弱し、あるものは不変、あるものは増強した。

この中でたまたまグルクロン酸曹達により処理されたツベルクリン (GLT と略す) は旧ツベルクリン (OT と略す) に比し、「ツ」反応減弱し、また結核モルモットに対するアレルギーショック死を阻止することを知つた³⁾。

よつて結核モルモットを 2 群に分ち、おのおのについて GLT と OT により脱感作実験を行なつた⁴⁾。この成績は、(1) 両群ともに「ツ」反応 (100 倍濃度) は減弱または消失することを認めた。(2) 肉眼的解剖所見: GLT 脱感作群および OT 脱感作群は非脱感作群に比し軽度であつた。また GLT 脱感作群は OT 脱感作群に比し、さらに病変が軽度であることを認めた。(3) 定量培養成績: 動物体内の生菌数を肺および脾について検討した。これによると解剖所見に平行して脱感作群はともに対照群に比し集落数少なく、とくに肺においてその傾向著明であつた。また GLT 群は OT 群に比し、さらに集落数が少なかつた。(4) 脱感作処置経過中における実験動物の体重増加およびその他一般症状: GLT 群が OT 群より良好であつた。(5) 病理組織学的所見: GLT 群の病変は対照群と OT 群との中間のような病変像を示した。

さらにこの GLT に Phenylhydrazine を加えて、生じた非結晶性沈澱をもつて結核モルモットを脱感作した⁵⁾。この成績は、(1) 皮膚における「ツ」反応 (100 倍濃度) は消失した。(2) 血液所見に及ぼす副作用は認められなかつた。(3) 剖検: 肉眼的所見は脱感作群において対照群よりも軽度な病変を示した。(4) 臓器内結核菌定量培養成績は脱感作群に生菌数が少なかつた。(5) 組織学的所見: 門脈リンパ腺および脾臓の所見においては脱感作群が対照群より軽度であり、脾臓においては溶血

像が認められた。

著者らはこの成績に関心をもち、今回は Phenylhydrazine の構造式に類似した構造式を有する Isonicotinylhydrazine (INH と略す) を GLT に働かせて一種の結晶体 (IGLT と仮称する) を得たので報告する。

IGLT の 製 法

GLT 10 cc, INH 200 mg, 酢酸ソーダ 100 mg をよく混和して、水浴中で約 2 時間加温し、室温 10°C に 24 時間放置し、20% エチルアルコール 10cc を加えてよく混和し、4°C に 48 時間放置後、6,000 rpm 1 時間遠沈し、上清 2/3 を除き、沈澱を含む残り 1/3 を 1,500 rpm 30 分間遠沈し、沈澱を蒸留水で 1,500 rpm 30 分間遠沈して 3 回洗つたのち凍結乾燥する。収量約 1 mg。

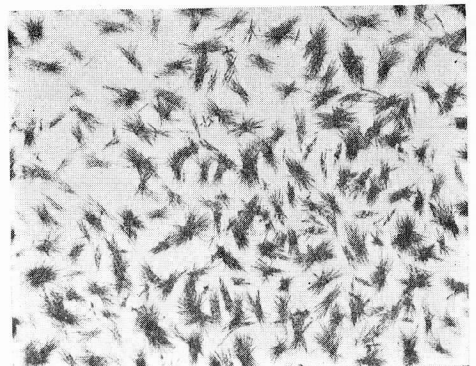
凍結乾燥条件: 多岐管型乾燥器を用いて、1 Amp 2 cc の液量を -20°C に凍結したのち、真空度 10^{-2} mm Hg, 乾燥時間 4 時間、最終加温温度 40°C で乾燥した。

以上によつて得られた物質 (IGLT) について次のごとく、その化学的性状ならびに生物学的性状を検討した。

化学的性状

結晶形は図 1 にみられるごとく針状結晶で灰褐色を呈し、分解点は 285°C であつた。

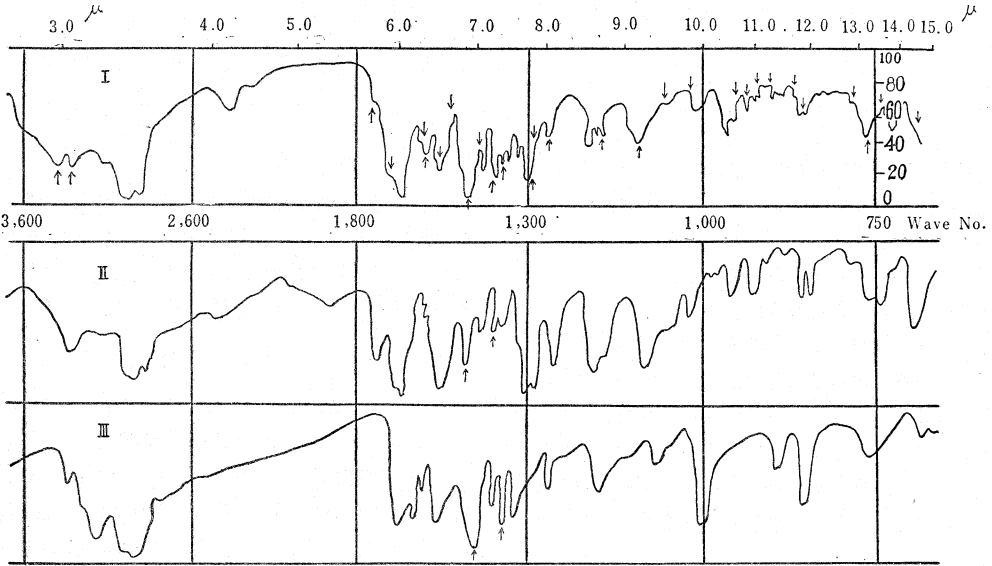
図 1



溶解性についてはピリジンに溶解し、水、メチルアルコール、エチルアルコール、エーテル、石油エーテル、アセトン、イソプロピルアルコール、クロロホルム、ベンゼン、正ヘキサン、氷酢酸には不溶性である。

赤外線スペクトル分析の結果は図2のごとくであった。なお従来のINHならびにU. S. A. Pat. No. 2,712,021のINH-グルクロン酸化合物の赤外線スペクトル像を併わせて掲載した。

図2 I : IGLT d.p. 285°C II : グルクロン酸 + 2分子INH d.p. 232°C III : INH d.p. 170°C



生物学的性状

I 強毒人型菌 H₃₇Rv 株に対する試験管内発育阻止作用。

II モルモットの実験結核症に及ぼす作用をINHを対照として比較実験した。

I 試験管内抗菌作用

A. 低濃度試験管内抗菌作用

[実験材料および実験方法]

1. 培地：1% 小川培地⁶⁾
2. 菌液：Sauton 培地に 21 日間培養の H₃₇Rv 株を 0.1 mg/cc として、その 0.1 cc (生菌量 15×10³) を各培地に接種した。
3. 検体溶液：秤量された 3 mg の IGLT につき 0.2 cc のピリジンを滴下して溶解し、さらに加温した滅菌蒸留水をもつて各濃度に希釈した。INH は秤量後滅菌蒸留水をもつて 10 γ/cc に希釈し、両検体溶液を30分間蒸気滅菌した。INH はさらに滅菌蒸留水をもつて各濃度に希釈した。

4. 実験術式：検体溶液の濃度は両検体ともに 0.001, 0.005, 0.01, 0.1 γ/cc で、各培地に注加し、菌液を接種し、37°Cに培養、3 週および 6 週後に発育状

態を判定した。

[実験成績]

表 1 に示すごとく、両検体ともに 0.001, 0.005, 0.01 γ/cc の濃度においては 3 週および 6 週ともに対照と同様な発育を示した。0.1 γ/cc において 3 週後は両検体ともに発育抑制を示したが、6 週後 IGLT においては依然発育阻止を示していたが INH では 45, 49 コロニーの発育を示した。

B. 高濃度試験管内抗菌作用

[実験材料および実験方法]

1. 培地：1% 小川培地
2. 菌液：1% 小川培地に 18 日間培養した H₃₇Rv 株 0.1 mg/cc の 0.1 cc を各培地に接種した。
3. 検体溶液：低濃度検体溶液製法と同様。
4. 実験術式：検体溶液を通減倍数希釈した。その含有濃度は両検体ともに 0.01, 0.05, 0.1, 1, 5, 10 γ/cc を各培地に注加し、また希釈溶媒の影響を調べるために

表 1

検体	濃度 週	濃度				
		0	0.001	0.005	0.01	0.1 γ/cc
I N H	3	+++	+++	+++	+++	0 0
	6	+++	+++	+++	+++	45 49
I G L T	3	+++	+++	+++	+++	0 0
	6	+++	+++	+++	+++	0 0

ピリジン 1/1,200 cc を含む水溶液を培地に注加し、全培地に菌液を接種し、37°C に培養、2 週および 4 週後に発育状態を判定した。

〔実験成績〕

表 2 に示すごとく、両検体ともに 10, 5, 1, 0.1 γ/cc の濃度においては 2 週および 4 週ともに発育抑制を示し、0.05 γ/cc の濃度において 2 週後は両検体ともに抑

制したが 4 週後において INH は依然 発育阻止を示したが、IGLT では発育を示した。0.01 γ/cc の濃度では 2 週後両検体ともに発育を示したが IGLT における発育が INH におけるよりもわずかに少なかった。

IGLT の溶媒の影響を調べるために注加した、溶解時最高濃度のピリジン培地においては対照と同様な菌発育を示した。

表 2

検体	濃度 週	濃度										ピリジン 1 cc 1,200			
		0	0.01		0.05		0.1		1		5		10 γ/cc		
INH	2	卍	+	卍	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	卍
	4	卍	卍	卍	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	卍
IGLT	2	卍	+	卍	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	卍
	4	卍	卍	卍	卍	卍	0	0	0	0	0	0	0	0	卍

II 実験結核症に及ぼす作用

〔実験方法〕

1. 実験動物：100倍「ツ」反応陰性、体重 550 g 前後の白色モルモット ♀ 29 匹を使用した。

2. 使用菌種および接種方法：乾燥 H₃₇Rv 菌を滅菌蒸留水均等浮遊液 0.02 mg/cc とし、その 0.5 cc を右下腹部皮下に接種した。

3. 検体：IGLT ならびに INH で両検体の含有濃度をそれぞれ 5 mg/cc とした。IGLT ははじめ微量のピリジンで溶解し、以後生食液で稀釈した。INH は蒸留水で稀釈した。

4. 実験方式：結核モルモットを対照 9 匹、IGLT、INH 群各 10 匹に分け、菌接種後 3 週より両検体を

隔日に両腋窩に交互に注射した。その量は INH の Subeffective Dose⁷⁾ をとり、両検体ともに 1 回に 1 mg (0.2 cc) を 6 週間にわたって注射した。

5. 観察方法

体重測定：菌接種後毎週 1 回全動物の体重測定を行なった。

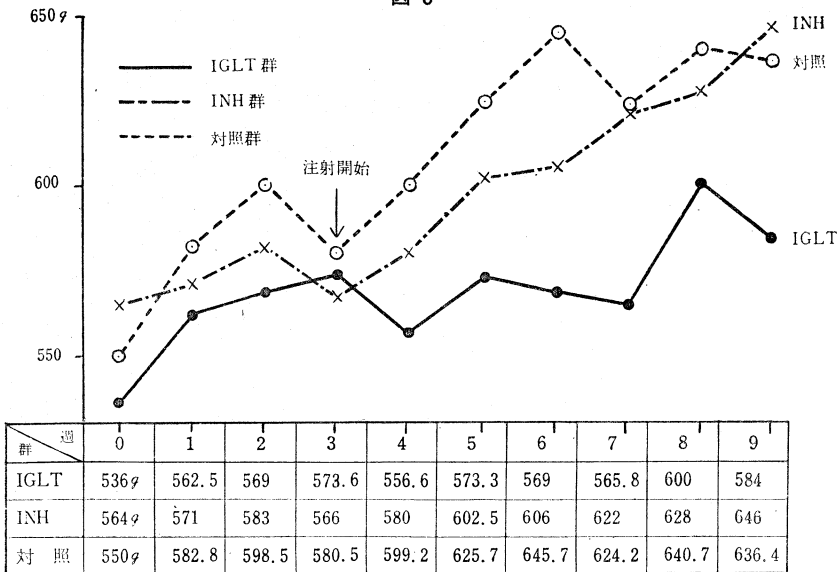
「ツ」皮内反応の施行と測定：菌接種直前、接種後 3 週、注射後 3, 5 週目に 100 倍「ツ」皮内反応を施行した。測定は硬結によった。

剖検：注射後 6 週目に行なった。剖検時に内臓所見の観察を行なうとともに脾の重量測定を行なった。

臓器定量培養⁸⁾：肺、脾の結核菌定量培養を小川の方法に準拠して行なった。

〔実験成績〕

図 3



1. 体重の変化：図 3 に示すごとく，菌接種時の平均体重は，約 550 g で感染後 3 週まで 3 群の平均体重は 570 g であった。注射開始時期以後は対照群ならび

に I N H 群は増加を示したが I G L T 群は増加が少なく，減少するときもあり，4 週目よりやや増加し，剖検時にはまた減少して 584 g であった。

表 3 100 倍 ツ 反 応 推 移

対 照 群				I N H 群				I G L T 群			
番号	菌接種後 3 週	6 週	8 週	番号	菌接種後 3 週	注射後 3 週	5 週	番号	菌接種後 3 週	注射後 3 週	5 週
25	mm mm 12 × 12	15 × 17	12 × 14	14	mm mm 14 × 15	15 × 20	14 × 19	2	mm mm 10 × 11	12 × 15	11 × 15
27	13 × 15	13 × 18	11 × 14	15	14 × 20	12 × 17	15 × 16	3	12 × 12	12 × 19	9 × 11
28	14 × 15	15 × 18	14 × 16	17	15 × 18	15 × 20	13 × 20	4	14 × 16	15 × 21	12 × 14
29	17 × 17	15 × 20	13 × 16	18	18 × 18	15 × 22	11 × 11	6	15 × 17	11 × 14	15 × 22
33	17 × 17	16 × 19	13 × 17	19	11 × 13	15 × 20	16 × 20	7	10 × 12	9 × 11	10 × 12
34	16 × 17	19 × 23	15 × 20	20	10 × 10	13 × 20	15 × 17	12	11 × 11	6 × 9	6 × 7
36	11 × 12	17 × 21	14 × 17	21	10 × 10	15 × 22	15 × 22				
				22	14 × 11	15 × 18	12 × 14				
				23	11 × 13	12 × 17	12 × 16				
				24	17 × 13	15 × 18	12 × 17				
平均	14.3 × 15	15.7 × 19.4	13 × 13.6	平均	13.4 × 14	14.2 × 19.4	13.5 × 17.2	平均	12 × 13	10.8 × 15	10.5 × 13.5

表 4

実験群	海猿番号	局所変化	左膝囊腺	左ソケイ腺	右膝囊腺	右ソケイ腺	後胸骨腺	後腹膜腺	門脈腺	気管腺	肺臓	肝臓	脾臓	脾重量 (g)
対照群	25	K	-	-	⊕	+	+	+	⊕	⊕	+	⊕	⊕	2.4
	27	K	-	-	⊕	+	-	+	+	⊕	+	-	⊕	3.2
	28	K	⊕	-	⊕	⊕	+	+	⊕	⊕	⊕	+	⊕	3.3
	29	K	-	-	⊕	⊕	+	+	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	3.9
	33	G	-	-	⊕	-	+	-	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	3.4
	34	K	+	-	⊕	+	+	+	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	2.5
	36	K	-	-	⊕	-	+	⊕	⊕	⊕	⊕	+	⊕	2.0
I N H 群	14	N	-	-	⊕	±	-	-	⊕	+	⊕	⊕	+	0.9
	15	N	-	-	⊕	±	-	-	⊕	+	+	+	+	1.2
	17	N	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	1.0
	18	K	-	-	⊕	-	+	+	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	3.4
	19	N	-	-	⊕	-	-	-	-	-	-	+	+	1.1
	20	K	-	-	⊕	-	-	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	3.0
	21	K	-	-	⊕	+	-	+	⊕	⊕	+	+	⊕	1.5
	22	K	-	-	⊕	-	-	+	⊕	⊕	+	⊕	⊕	1.4
	23	N	-	-	⊕	+	-	⊕	⊕	-	-?	⊕	-	1.2
24	N	-	-	⊕	-	-	-	⊕	⊕	+	+	+	1.5	
I G L T 群	2	N	-	-	⊕	-	-	-	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	2.1
	3	G	+	-	⊕	-	+	+	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	3.3
	4	K	-	-	⊕	+	+	⊕	⊕	⊕	+	+	+	1.5
	6	K	+	-	⊕	-	-	+	-	+	-	-	+	1.3
	7	K	-	-	⊕	+	-	+	⊕	⊕	+	+	+	1.2
	12	N	-	-	⊕	-	-	+	⊕	⊕	-	+	+	1.4

注：K：瘰癧 G：潰瘍 N：癒痕 ⊕：乾酪化を示す。

2. モルモットの自然斃死数：結核菌感染より9週後までの観察期間中，自然斃死した動物数は対照に2匹，IGLT群に4匹，INH群にはなかつた。

3. 「ツ」皮内反応の変動：表3に示すごとく，感染直前は全動物陰性で，感染後3週目の硬結の平均の大きさは対照群 14.3×15 mm，INH群 13.4×14 mm，IGLT群 12×13 mm で注射後3，5週目の大きさはINH群 14.2×19.4 mm，13.5×17.2 mm。IGLT群 10.8×15 mm，10.5×13.5 mm で同時期の対照群 15.7×19.4 mm，13×13.6 mm の大きさと大差なく，全動物とも 10×10 mm 以上の大きさのままであつた。

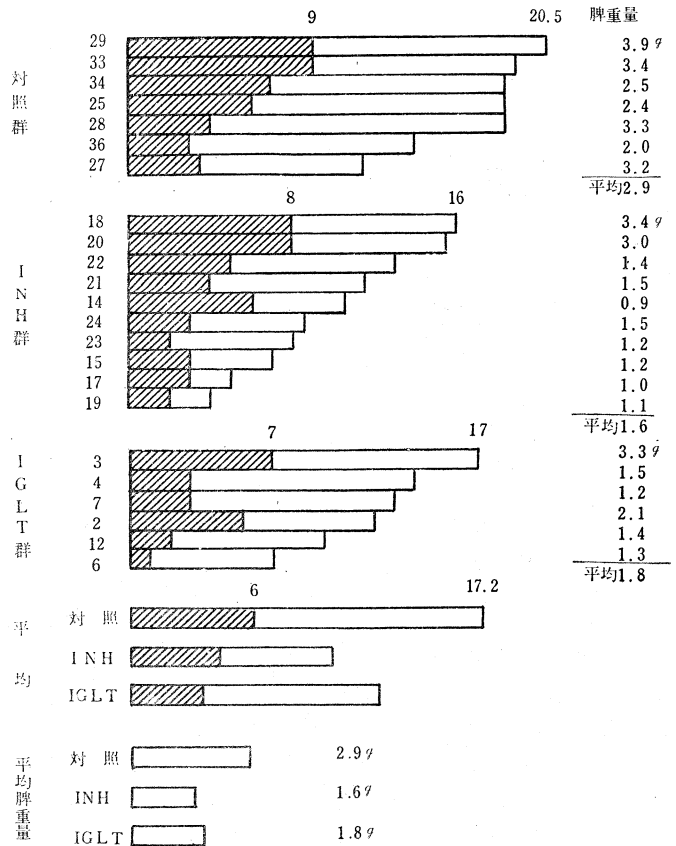
4. 剖検：注射後6週目の肉眼的解剖所見は表4に示すごとく，対照群はいずれも高度の病変を示した。リンパ腺病度はIGLT群では右膝髌腺を除くほかはINH群と同様であり，IGLT群の右膝髌腺の病変は対照群と同様であつた。

臓器病変はIGLT群がINH群より軽度であつた。3群の臓器およびリンパ腺病変のヒストグラムは図4に示すごとく，IGLT群のリンパ腺病変の平均はINH群よりやや重かつたが，臓器病変の平均はやや軽度であつた。

脾重量の平均は対照群 2.9 g，INH群 1.6 g，IGLT群 1.8 g であつた。

5. 臓器内結核菌定量培養成績：表5に示すごとく，

図4 肉眼的剖検所見ヒストグラム



肺，脾の各群の平均集落数はIGLT群においてはINH群よりやや多かつたが対照群よりははるかに少なかつた。

表5 臓器定量培養成績 (臓器 1 mg の結核菌コロニー数 6週判定)

対 照 群			I N H 群						I G L T 群											
海 豚 番 号	肺			脾			海 豚 番 号	肺 10 mg より			脾 10 mg より			海 豚 番 号	肺			脾		
	1	2	平均	1	2	平均		1	2	平均	1	2	平均		1	2	平均	1	2	平均
25	19	12	15.5	41	33	37	14	0.8	0.4	0.6	11.8	13.4	12.6	2	7	2	4.5	44	41	42.5
27	6	8	7	60	58	59	15	0	0	0	1.6	1.6	1.6	3	30	32	31	49	51	50
28	82	90	86	121	102	111.5	17	2.2	2.5	2.4	0.5	0.6	0.6	4	4.8	3.7	4.3	19	11	15
29	16	26	21	55	47	51	18	1	4	2.5	21	31	26	6	0	0	0	0.4	0.2	0.3
33	5	4	4.5	27	36	31.5	19	0	0	0	0	1	0.5	7	0.3	0.4	0.4	25	23	24
34	24	22	23	17	7	12	20	0	0	0	12	12	12	12	0.2	0.4	0.3	3.3	3.1	3.2
36	0	0	0	2	3	2.5	21	2.5	2.2	2.4	15	13	14							
							22	0.5	1.1	0.8	20	20	20							
							23	0	0	0	0.2	0	0.1							
							24	0	0	0	6	1	3.5							
平均	22.4			43.5			平均	1.1			9.4			平均	6.8			22.5		

総括および考案

「ツ」にアルデヒド化合物を働かせた報告は Fernbach, Rullier⁹⁾ (1924) が「ツ」にホルマリンを作用させて「ツ」反応が減弱することを認め、戸田 (1944)¹⁰⁾ も 0.3~0.5 % ホルマリンを加えた「ツ」の皮膚反応減弱を認めた。武谷ら (1951)¹¹⁾ は「ツ」精製蛋白質 π をホルマリンで処理し、「ツ」反応を減弱せしめた。

「ツ」にグルクロン酸を作用せしめた報告は前記した湯沢らの報告³⁾ があり、羽鳥 (1959)¹²⁾ は人間における OT ならびに GLT の皮膚反応について検討した。その結果、健康者、結核患者ともに GLT の皮内反応は OT のそれに比して減弱または消失するのを認めた。

また「ツ」有効成分の精製化、結晶化は Seibert (1940)¹³⁾ をはじめ戸田ら (1943)¹⁴⁾、武谷 (1954)¹⁵⁾、山村ら (1959)¹⁶⁾、槽谷ら (1960)¹⁷⁾ が検討中である。その結晶化は一部成功したとの報告もある。

Mayer ら (1958)¹⁸⁾ は稀釈「ツ」と SM、または INH を混合して 37°C に 15 日間放置した物質による実験結核症への影響を調べた。その結果、「ツ」と INH を混合したものによる成績が「ツ」に SM を混合したものによるよりも好成績であつたと報告している。

GLT と INH とがいかなる結合をするかはまだ不明であるが、石館教授の好意による赤外線スペクトル像によればグルクロン酸に INH 2 分子が結合した物質の赤外線スペクトル像に類似しており、このものかまたはこれに類似するものかと考えられる。因みに前者は熔融点 (分解点) は 285°C、後者は 232°C である。なお後者については U.S.A. Pat. No. 2,712,021 の文献¹⁹⁾ による。

Passedout ら (1955)²⁰⁾ は INH と Glucuronolactone より Glucuronolactone isonicotinyl hydrazone (INHG と略す) を合成し、同時に同系統の Sodium glucuronate isonicotinyl hydrazone (INHG-Na) を合成した。

これらは次のごとき化学的性状をもっている。

薬品名	融点または分解点	水溶解性
INHG	170~174°	可溶
INHG-Na	154~155°	易溶
(INH)	170~173°	易溶)
(IGLT)	285°	不溶)

両者の結核菌発育最低阻止濃度は大藤ら²¹⁾ (1956) によれば H₃₇Rv 株 0.1 mg 血清加 Kirchner 培地 4 週で 0.2 γ /cc、五味ら (1959)²²⁾ によれば H₃₇Rv 株 0.1 mg Dubos Albumin 培地 3 週で 0.25 γ /cc であり、熊井ら²³⁾ (1959) によれば H₂ 株 0.01 mg 1 %

小川培地で 0.05 γ /cc では 2 週まで抑制し、3 週より発育を示した。

以上いずれも INH が INH の誘導体よりも抗菌力の強いことを示している。

IGLT は INH、INHG および INHG-Na とはその色、結晶形、熔融点、水溶解性等において全く異なつた性質を有する新物質にして、単に「ツ」に INH、INHG ならびに INHG-Na また INH とグルクロン酸とを処理しても IGLT は得られなかつた。

IGLT による結核モルモットへの作用を Subeffective Dose の INH を対照として実験した結果、剖検肉眼的所見は臓器病変において IGLT 群は INH 群より軽度の病変を示し、リンパ腺病変においては IGLT 群は右膝髌腺を除く他の所見は INH 群とほぼ同様であり、IGLT 群の右膝髌腺は対照群と同様に重かつた。

これらは IGLT の結核動物に対する非特異的作用によるものであるか否かを IGLT の化学的性状の究明と実験動物の組織学的所見により目下検討中である。

結 論

GLT に INH を働かして一結晶体を得た。よつてこの物質の化学的ならびに生物学的性状について検討した。

化学的性状：灰褐色、針状結晶で分解点は 285°C であり、ピリジンに溶解し、他の多くの有機溶媒には溶解しなかつた。

生物学的性状：1) 強毒人型菌株 H₃₇Rv に対する試験管内発育阻止作用を 1 % 小川培地を用いて検討した結果、最低発育阻止濃度は 0.05 γ /cc と 0.1 γ /cc の間であり、INH に近い阻止濃度を示した。2) 結核モルモットに対する作用：Subeffective Dose の INH を対照として比較実験した結果、(i) 「ツ」反応の消失は認めなかつた。(ii) 剖検、肉眼的所見、臓器病変は IGLT 群が INH 群より軽度であつた。リンパ腺病変は IGLT 群は右膝髌腺の病変を除き、他は INH 群と同様であつた。(iii) 臓器内結核菌定量培養成績は肺、脾ともに IGLT 群は INH 群よりその集落数がやや多かつたが対照群よりはるかに少なかつた。

謝 辞

稿を終るにあたり、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜つた湯沢所長、御校閲を賜つた岩崎研究部長、大林副部長、御援助を賜つた統木科長、岩井科長、松崎、豊原、青木、工藤(賢)、高原(誠)の諸先生に心から感謝いたします。

またグルクロン酸の御恵与ならびに赤外線スペクトルの成績について種々御配慮と御教示を賜わつた東大薬学部長石館教授ならびに谷村薬学士あわせて終始御協力を賜わつた内山ハナ子氏、松沢那賀子氏に心から感謝いたします。

本研究は第107回日本生化学会関東支部例会において発表した。

文 献

- 1) 湯沢他：第30回生化学総会報告，昭32.
- 2) Ramon : Comp. Rend. Soc. Biol., 86 : 661, 711, 813, 1922.
- 3) 湯沢他：第45回日本結核病学会関東地方会報告，昭33.
- 4) 湯沢他：第4回グルクロン酸研究会報告，昭33.
- 5) 羽鳥(弘)：結核，35 : 123, 昭35.
- 6) 小川(辰)・佐波：結核，24 : 13, 昭24.
- 7) Karlson & Feldman : Am. Rev. Tbc., 68 : 75, 1953.
岩崎(竜)：結核研究の進歩，28 : 76, 昭35.
- 8) 小川(辰)：結核，24 : 19, 昭24.
- 9) Fernbach & Rullier : Comp. Rend. Acad. Sci., 178 : 251, 1924.
- 10) 戸田：結核菌とBCG，65，昭19.
- 11) 武谷・三淵：科学，22 : 145, 昭27.
- 12) 羽鳥(弘)：結核，34 : 411, 昭34.
- 13) Seibert : J. Biol. Chem., 133 : 593, 1940.
Seibert & Fabrizio : Am. Rev. Tbc., 66 : 314, 1952.
- 14) 戸田他：日本医学及健康保険，3328 : 678, 昭18.
- 15) 武谷：医学と生物学，20 : 254, 昭26.
：Jap. Med. Jour., No. 1572 : 2419, 1954.
- 16) 山村：Proc. of Jap. Academy, 35 : 295, 1959.
：胸部疾患，3 : 421, 昭34.
- 17) 槽谷他：蛋白質構造討論会報告，昭35.
- 18) Meyer et al. : Rev. de la Tbc., 5 : 5, 1958.
- 19) Tenenbaum : Chem. Abst., 5570, 1956.
- 20) Passedout et al. : Rev. de la Tbc., 17 : 784, 1953.
- 21) 大藤他：治療，38 : 637, 昭31.
- 22) 五味他：結核研究の進歩，24 : 94, 昭34.
- 23) 熊井他：呼吸器診療，14 : 287, 昭34.