

## 精製ツベルクリン (PPDs) とグルクロン酸ナトリウムとの結合

## 第2編 培地組成による PPDs の物理化学的性状と力価について

武田育子・石館守三

東京生化学研究所

受付 昭 47 年 1 月 19 日

## BINDING OF PPDs WITH D-GLUCURONIC ACID\*

## Part II. Effects of the Culture Medium on the Physicochemical Properties and Potencies of PPDs Preparations

Yasuko TAKEDA and Morizo ISHIDATE

(Received for publication January 19, 1972)

In part I, the authors reported the preparation of D-glucuronic acid bound PPDs (PPDs-G), and its physicochemical and biological properties. In preparing PPDs-G, we found that PPDs showed different physicochemical properties among various lots of culture filtrates, and the fact suggests that the combining ratio of PPDs with NaG might vary with PPDs preparations. We therefore examined the culture conditions of tubercle bacilli and the method of preparation of PPDs in order to prepare PPDs-G in homogeneous and reproducible state, and found that modified Sauton medium, which contained twice the amount of asparagine in Sauton medium, was favourable for the preparation of PPDs.

This paper presents physicochemical properties and potencies of PPDs obtained from Sauton and modified Sauton media.

Fig. 3 shows elution curves of PPDs Lot No. 1~No. 10 by column chromatography on Sephadex G 50 or G 75. As seen in this figure, PPDs from Sauton showed two different elution patterns (A or B) according to Lot No, but those from modified Sauton showed similar elution pattern irrespective of Lot No. Physicochemical properties of PPDs preparations before and after chromatography were listed in Table 1.

PPDs which showed elution patterns of A or C contained a small amount of polysaccharide or nucleic acid. Therefore slight difference was observed in physicochemical properties before and after chromatography. On the other hand, PPDs which showed elution pattern of B contained about 20% of polysaccharide and 1.5% of DNA (as 2-desoxy D-ribose), and could be separated into two different fractions, B-I and B-II.

The homogeneity of various PPDs preparations described above was examined by disc electrophoresis and ultracentrifugal analysis. An almost single band was observed with each sample in disc electrophoretic pattern, as shown in Fig. 4. Sedimentation analysis using synthetic boundary cell resulted in sharp and symmetrical pattern which suggested the homogeneity of each sample, as seen in Fig. 5. In this connection, molecular weight of each sample was calculated by the method of sedimentation equilibrium and estimated A, B-I, B-II, and C to be 19,000, 45,000, 20,000, 25,000, respectively. Isoelectric point of each sample was estimated to be 3.7~4.1 by electrofocusing method using carrier Ampholyte, as shown in

\* From the Tokyo Biochemical Research Institute, Takada 3-chôme, Toshima-ku, Tokyo 177 Japan.

Fig. 6. According to amino acid analysis, as seen in Table 2, there was slight difference among B-I, B-II and C in amino acid content except glutamic acid and proline.

As illustrated in Table I, B-I fraction contained polysaccharide component in 50% of its amount. Using the acid hydrolysate of B-I as test material, we examined the sugar component by paper chromatography, high voltage electrophoresis and gas chromatography, and found that it was mainly composed of D-glucose to D-mannose ratio of about 9:1. Moreover, we suspected that polysaccharide of B-I would not merely a contaminant but be combined with tuberculo-protein.

Furthermore, we compared the tuberculin potencies of various PPDs preparations with that of standard PPDs 15~25 by measurement of the induration of sensitized guinea pigs 24 hours after injection. As shown in Table 3, no significant difference in potency was observed among PPDs preparations. The experimental results thus obtained lead to the conclusion: PPDs obtained from modified Sauton medium would be preferable to that from Sauton medium, since the tuberculin potencies of the former PPDs are invariable from Lot to Lot.

## 緒 言

第1編において著者らは、PPDs とグルクロン酸ナトリウム (NaG) は生理的条件下に化学的に結合し、結合物 (PPDs-G) を得ることを報告した<sup>1)</sup>。

PPDs-G 調製時の反応条件 (反応液組成, 反応温度, 時間等) をさらに検討するため, 新たに Sauton 培地で培養して PPDs を精製し, これに NaG を作用させ, 反応液をセファデックス G 50 を用いるカラムクロマトグラフィーに付したところ, その溶出曲線は第1編に示した溶出パターンとは趣きを異にすることが分かった。そこで著者らは, Sauton 培地から得られる PPDs は培養 Lot によつてその性状に差異がみられるのではなかろうかと推察した。すでに Sauton 培地から得られる PPDs の窒素および糖含有量が培養 Lot によつて異なるとの報告は 2, 3 みられるが<sup>2,3)</sup>, 今回著者らもこの事実に接したので, PPDs をさらにセファデックス G 50 を用いて分画し, その物理化学的諸性状の詳細を検討した。

一方, Sauton 培地から得られる PPDs は培養濾液単位当りの収量が低い。培地組成において pH が弱アルカリ性になるにつれてツベルクリン (「ツ」と略記) 活性物質の収量が増加するという報告はすでにみられるが<sup>4)</sup>, Lind<sup>5)</sup>, Magnusson<sup>6)</sup> は Sauton 培地へのアスパラギン添加量を増加するとその培養濾液から得られる PPDs 量が増大することを報告した。さらに Sauton 培地組成の部分的変更によつて得られる PPDs の収量, 力価等に関する報告<sup>7)8)</sup> に基づき, われわれは PPDs の収率がよくかつ培養 Lot によらず性状の均一な PPDs を得ることを目的とし, Sauton 培地に 2 倍量のアスパラギンを添加したいわゆる Sauton 変法培地 (以下変法培地と称す) で培養後精製した PPDs の物理化学的性状ならびに

「ツ」力価を検討した。その結果, 変法培地からの PPDs の収率は Sauton 培地の場合と比較して約 5~7 倍で, かつ得られた PPDs の物理化学的性状はほぼ均一であり, 「ツ」皮内反応においても力価に差がないことが明らかにになった。

## 実験材料ならびに方法

1) PPDs: 人型青山 B 株結核菌を Sauton または変法培地に 8 週間培養し, 得られた培養濾液を加熱滅菌後 Seibert らの方法<sup>9)</sup> に準じて精製した。凍結乾燥によつて得られた PPDs をセファデックス G 50 または G 75 を用いるカラムクロマトグラフィーにより分画し透析後凍結乾燥した。

2) 化学分析: 窒素はデュマ法, 総ヘキソース量はアンスロン法, また核酸量はジフェニールアミン法によつてそれぞれ測定した。(第1編参照)

3) アミノ酸分析: PPDs 5 mg を定沸点塩酸 2.0 ml に溶解し, 封管中  $110^{\circ}\text{C} \pm 1.5^{\circ}\text{C}$ , 24 時間加水分解した。分解物は常法により処理した後, 日立 KLA 3 B 型アミノ酸分析計により測定した。

4) 超遠心分析: Spinco E 型を使用し, 沈降平衡法によつた。なお PPDs の分子量は Archibald 法<sup>10)11)</sup> により概算した。

5) ディスク電気泳動: Ornstein, Davis ら<sup>12)13)</sup> の方法に準じて行なつた。すなわち内径 5 mm × 長さ 8 cm のガラス管にポリアクリルアミドゲルを作成し, トリス-グリシン緩衝液 pH 8.3 で 200 volts, 3~4 mA/管, 約 90 分間泳動し, 泳動後アミドブラック 10 B 染色し約 1.5% 酢酸溶液で通電して脱色, PPDs の泳動図を得た。

6) 等電点蛋白分離法: Vesterberg, Svensson ら<sup>14)</sup>

の方法に準じて、キャリヤーアンフォライト pH 3~10 または 3~6 を用い、試料を充填して 300~700 volts, 24~72 時間通電した。等電点に達した PPDs を溶出し、各フラクションの pH ならびに 280 m $\mu$  における吸光度を測定して PPDs の等電点を推定した。

#### 7) PPDs 中の糖の分析

a) アンスロン法で糖を多量に含む PPDs B-I 画分について、1N 硫酸溶液で 90°C, 5 時間加水分解し、常法により BaCO<sub>3</sub> で硫酸を除去し試料を調製した。

b) 濾紙クロマトグラフィー：糖の検出には主として、*p*-アニシジン試液<sup>15)</sup>、アンモニア性硝酸銀試液<sup>16)</sup>、Elson-Morgan<sup>16)</sup> 試液を用い、展開溶媒には *n*-ブタノール：ピリジン：水=6:4:3<sup>17)~20)</sup>を用いた。標準糖試料として、グルコース、マンノース、ガラクトース（アルドヘキソース類）、フラクトース（ケトヘキソース）、アラビノース、キシロース（ペントース類）、2-デオキシシリボース（デオキシペントース）、グルコサミン、ガラクトサミン（アミノ糖類）、N-アセチルグルコサミン（N-アセチルアミノ糖）、グルクロン酸、ガラクチュロン酸（ウロン酸類）等を用いた。

c) 高圧濾紙電気泳動：中性糖を硼酸錯化合物の形成を利用して高圧濾紙電気泳動を行なつて分離する方法で、Consden<sup>21)</sup>、麻生<sup>22)</sup>、Fosterら<sup>23)24)</sup>の方法に準じて行なつた。すなわち 0.05 M 硼酸緩衝液 pH 9.1 を用い、800 volts, 21~23 mA, 120 分間氷冷下で泳動した後、*p*-アニシジン発色法により検出した。

d) ガスクロマトグラフィー：PPDs 加水分解物を、アンバーライト CG 120 (H 型) 次いでアンバーライト CG 4 B (CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup> 型) を通過せしめて、中性糖、アミノ糖類を集め、NaBH<sub>4</sub> で還元してポリオール体とした後、F<sub>3</sub>CCOOH によりトリフルオロアセチル化合物に誘導してガスクロマトグラフィーを行なつた（田村、今成らの方法<sup>25)~27)</sup>）。ガスクロマト装置は島津 GC-IC 型、検出器は HFID, 2%×F 1105 (ガスクロム P) 1.8m×4 mm カラムを用い、検出温度はカラム内 140°C, 注入部 200°C, キャリヤーガスとして N<sub>2</sub> 70 ml/分にて測定した。なお標準糖試料液として、(1) フコース、リボース、アラビノース、キシロース、マンノース、グルコース、ガラクトース各 60  $\mu$ g/ml, (2) 2-デオキシシリボース、キシロース、マンノース、グルコース 1:2:2:5 の各試料液をあらかじめガスクロマトグラフィーに付して保持時間および各糖ピークの面積比を測定して糖の同定ならびに定量を行なつた後、PPDs B-I 画分加水分解物の糖の分析を行なつた。

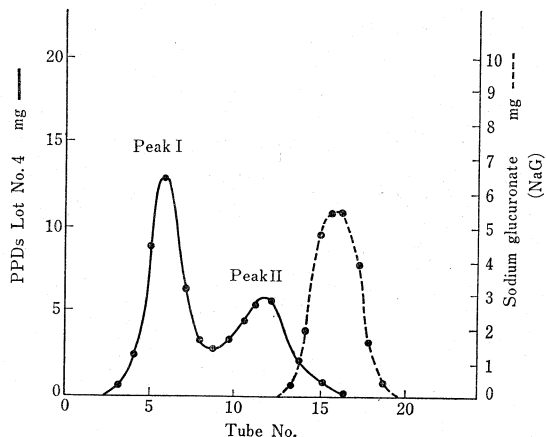
8) PPDs の「ツ」力価の検定：国際標準 PPDs と等力価の予研 PPDs No. 15~25 を用い、死菌感作モルモットに皮内接種し、接種後 24, 48 時間の発赤の大きさを各種 PPDs 検体によるそれらと比較検討した。

## 実験結果

1) Sauton 培地から得られた PPDs のセファデックス G 50 を用いるカラムクロマトグラフィーにおける溶出曲線

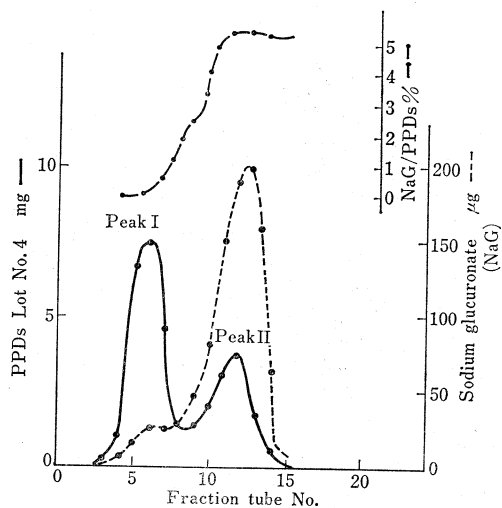
緒言に述べたように、著者らは PPDs-G を調製する

Fig. 1. Chromatography of a Mixture of PPDs and NaG



A mixture of 50 mg of PPDs and 20 mg of NaG was applied to a Sephadex G 50 column (2.0×27 cm). Elution was carried out with 1/45 M phosphate buffer of pH 7.2. The flow rate was about 15 ml per hour and effluent fractions of 4.7 ml were collected. Amount of PPDs in each fraction tube was measured from optical density at 280 m $\mu$  and that of NaG was estimated by naphthoresorcin picric acid reaction.

Fig. 2. Chromatography of PPDs Treated with NaG



A mixture of 30 mg of PPDs Lot No. 4 and 60 mg of NaG containing 3  $\mu$ C of 6-<sup>14</sup>CNaG in 0.2 M phosphate buffer of pH 7.2 was incubated at 37°C for 96 hours. The reaction mixture was dialysed against dist. water, and was applied to a Sephadex G 50 column (2.0×26 cm). Elution conditions were the same as indicated in Fig. 1. Amount of NaG in each fraction tube was estimated by <sup>14</sup>C radioactivity.

さいに、培養 Lot により PPDs と NaG との反応生成物のセファデックス G 50 を用いるカラムクロマトグラフィーにおける溶出曲線が異なることを認めた。すなわち図1には PPDs Lot No. 4 (窒素含有量 12.28%, 糖 20.1%) と NaG との混合溶液のセファデックス G 50 カラムによる溶出曲線を示し、図2には同一Lotの PPDs と NaG との反応生成物の溶出曲線をそれぞれ示したが、図1と図2とを比較して明らかなように、PPDs と NaG との反応生成物では NaG は PPDs の第2ピークと一致して溶出しており、第1編に述べたように PPDs と NaG との結合が認められた。しかしながら、今回の溶出曲線では、PPDs の主溶出画分は図1、図2においていずれも第1ピークであり、NaG は第2ピークとのみ結合が認められた。そこで PPDs の溶出パターンが第1編に述べた Lot No. 1~Lot

No. 3 の場合とは異なる点に着目し PPDs Lot No. 5 (窒素含有量 10.09%, 糖 19.0%), Lot No. 6 (12.64%, 糖 18.4%) に関して検討したところ、Lot No. 4 の場合と同様な溶出パターンが得られた。したがって図3に示したように、Sauton 培地から得られた PPDs においては培養 Lot により溶出パターン A または B を示すと推

Fig.3. Chromatography of Various PPDs Preparations

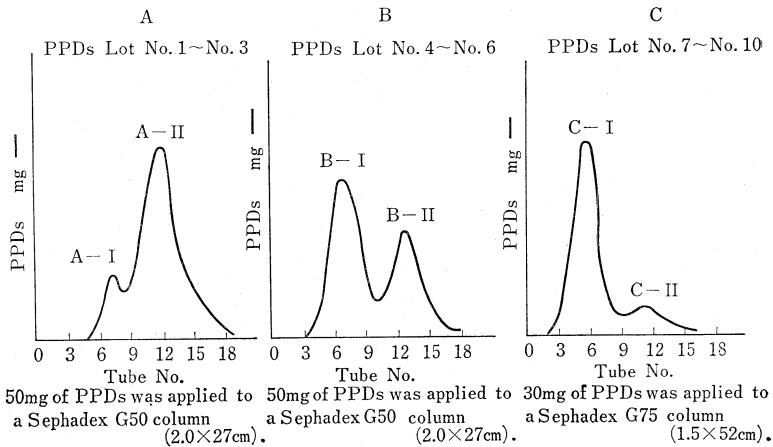


Table 1. Physicochemical Properties of PPDs Preparations  
—Before and after chromatography—

| PPDs Lot No.          |                           |        | Nitrogen content % | Total hexose % | Nucleic acid % | UV <sub>max</sub> mμ | Solubility       |                  |
|-----------------------|---------------------------|--------|--------------------|----------------|----------------|----------------------|------------------|------------------|
|                       |                           |        |                    |                |                |                      | Buffer           | Dist. water      |
| Before chromatography | PPDs from Sauton medium   | No. 1  | 12.71              | 1.5            | 0.2            | 275~280              | soluble          | soluble          |
|                       |                           | No. 2  | 13.80              | 3.2            | 0.1            | 275~280              | soluble          | soluble          |
|                       |                           | No. 3  | 13.74              | 2.2            | 0.1            | 275~280              | soluble          | soluble          |
|                       |                           | No. 4  | 12.28              | 20.1           | 1.5            | 255~260              | slightly soluble | slightly soluble |
|                       |                           | No. 5  | 10.09              | 19.0           | 1.4            | 255~260              | slightly soluble | slightly soluble |
|                       |                           | No. 6  | 12.64              | 18.4           | 0.9            | 255~260              | slightly soluble | slightly soluble |
|                       | PPDs from modified Sauton | No. 7  | 14.72              | negligible     | 1.3            | 255~260              | soluble          | slightly soluble |
|                       |                           | No. 8  | 14.42              | negligible     | 1.7            | 255~260              | soluble          | slightly soluble |
|                       |                           | No. 9  | 14.64              | negligible     | 0.7            | 270~280              | soluble          | slightly soluble |
|                       |                           | No. 10 | 14.54              | negligible     | 0.5            | 270~280              | soluble          | slightly soluble |
| After chromatography  | No. 3 A-II                |        | 13.88              | 1.0            | 0.1            | 275~280              | soluble          | soluble          |
|                       | No. 4 B-I                 |        | 6.74               | 52             | 1.8            | 255~260              | slightly soluble | slightly soluble |
|                       | No. 4 B-II                |        | 14.14              | 1.1            | 0.3            | 275~280              | soluble          | soluble          |
|                       | No. 5 B-I                 |        | 6.97               | 55             | 1.7            | 255~260              | slightly soluble | slightly soluble |
|                       | No. 5 B-II                |        | 14.25              | 1.0            | 0.3            | 275~280              | soluble          | soluble          |
|                       | No. 7 C-I                 |        | 14.41              | negligible     | 1.6            | 255~260              | soluble          | slightly soluble |
|                       | No. 8 C-I                 |        | 14.48              | negligible     | 1.9            | 255~260              | soluble          | slightly soluble |

察された。

## 2) 変法培地から得られた PPDs のセファデックス G 75 による溶出曲線

培養濾液単位重量当りの PPDs 収率の高い変法培地から得られた PPDs Lot No. 7~Lot No. 10 についてそれぞれセファデックス G 75 を用いるカラムクロマトグラフィーを行なった結果、図 3 に示したようにいずれもほぼ第 1 ピークのみからなる溶出パターンを示した。すなわち図の溶出パターン C にみられるように、培養 Lot により溶出パターンに差異は認められず、変法培地から得られた PPDs では性状が近似していると推察された。最近変法培地による PPDs に関してセファデックス G 100 を用いた溶出パターンが藪<sup>8)</sup>により報告されたが、セファデックス G 75 を用いた著者の溶出パターンと完全に一致している。なお PPDs の分画に当たり、セファデックス G 50 または G 75 を使用したが、PPDs に対する両者の分子フルイ効果には大差はなかった。

## 3) Sauton ならびに変法培地から得られた PPDs の物理化学的性状

表 1 に各種 PPDs に関して、セファデックス G 50 または G 75 を用いるカラムクロマトグラフィー前後の各画分の性状をまとめた。溶出曲線 A を示す PPDs Lot No. 1~No. 3 は、いずれも糖、核酸含有量が少なくほぼ蛋白質から構成されていると推察され、主溶出画分 A-II の性状とほとんど変わらない。溶出曲線 B を示す PPDs Lot No. 4~No. 6 は、糖、核酸含有量がいずれも高く、分画により B-I は糖 50%，核酸 (2-デオキシ糖として) 2% 弱を含有するのに対し、B-II は糖、核酸をほとんど含有せず蛋白質の性状を示した。溶出曲線 C を示す PPDs Lot No. 7~No. 10 は糖含有量が低く、分画により C-I は核酸をやや多く含有するほかはほぼ蛋白質からなることが分かった。以上の結果は UV の極大吸収にもみられ、すなわち核酸含有量ほぼ 0.9% 以上では 255~260 m $\mu$  に極大吸収を示し、280 m $\mu$  まで幅広いピークを示すのに対し、蛋白質の性状を主として示す場合には 275~280 m $\mu$  に鋭いピークがみられた。

次に PPDs および各画分の均一

性をディスク電気泳動ならびに超遠心分析によつて検討した。ディスク泳動図を図 4 に示した。溶出曲線 A および C を示す PPDs あるいは画分には単一の強いバンドがみられたのに対し、B を示す PPDs Lot No. 5 にその B-II 画分を加えると明らかに 2 本のバンドがみられ、したがって B-I、B-II 画分の等電点あるいは分子量の相違が推察された。分子量および均一性についてはさらに超遠心分析を行なった。合成界面セルを使用した沈降図型は図 5 にみられるように、各 PPDs とも鋭い対称図型を示しほぼ均一と推察された。Archibald 法<sup>10)11)</sup>を用い沈降平衡法によりそれぞれの分子量を概算すると、A : 19,000, B-I : 45,000, B-II : 20,000, C : 25,000 と推定された。

次に等電点蛋白分離法により各 PPDs の等電点を推定した。図 6 には通電後溶出したアンフォライン溶液における pH と 280 m $\mu$  における吸光度とを各 PPDs について示した。この図からそれぞれの等電点を推定すると、A : 4.05, B-I : 4.13, B-II : 3.69, C : 3.70 となり、いずれも 3.7~4.1 近辺に存在することが分かった。PPDs

Fig. 4. Disc Electrophoresis of PPDs Preparation

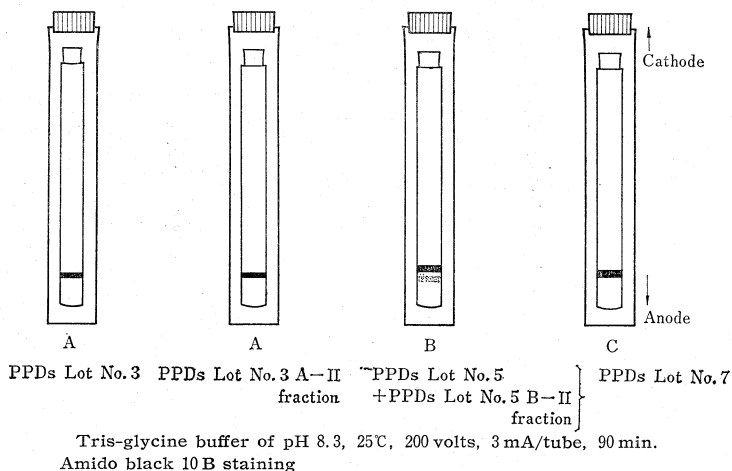


Fig. 5. Ultracentrifuge Patterns from a Run in the Synthetic Boundary Cell

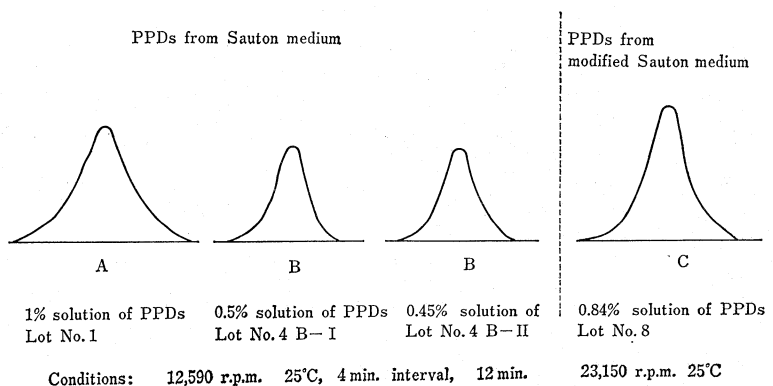
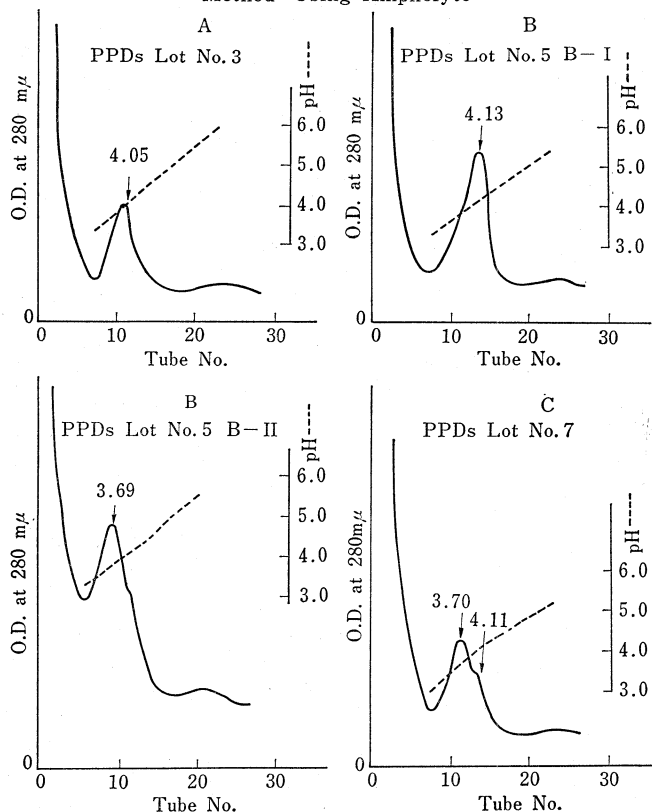


Fig. 6. Isoelectric Point of PPDs by 'Electrofocusing Method' Using Ampholyte



Conditions: Carrier Ampholyte: pH 3.0~10.0, 300 volts, 24 hours  
PPDs preparation: 3~5 mg, Ampholyte column: 110 ml, 1.8 ml/tube

Table 2. Amino Acid Analysis

| Amino acids         | PPDs from Sauton |                | Tuberculin active protein <sup>28)</sup> |           | PPDs from modified Sauton |
|---------------------|------------------|----------------|------------------------------------------|-----------|---------------------------|
|                     | Lot No. 4 B-I    | Lot No. 4 B-II | Protein A                                | Protein C | Lot No. 8                 |
| Try                 | —                | —              | —                                        | —         | —                         |
| Lys                 | 3.91             | 3.11           | 5.2                                      | 3.8       | 4.56                      |
| His                 | 1.16             | 1.24           | 4.3                                      | 3.5       | 1.35                      |
| Arg                 | 4.84             | 4.23           | 5.8                                      | 4.8       | 4.84                      |
| CySO <sub>3</sub> H | —                | —              | —                                        | —         | —                         |
| Asp                 | 12.80            | 12.37          | 8.1                                      | 7.8       | 10.84                     |
| Thr                 | 6.70             | 6.49           | 6.1                                      | 5.1       | 6.72                      |
| Ser                 | 5.17             | 5.59           | 5.7                                      | 3.8       | 4.91                      |
| Glu                 | 8.79             | 12.43          | 22.4                                     | 18.3      | 12.27                     |
| Ala                 | 13.08            | 13.50          |                                          |           | 12.93                     |
| Pro                 | 10.89            | 0.79           | 5.6                                      | 3.8       | 5.34                      |
| Gly                 | 11.22            | 10.90          | 10.40                                    | 7.3       | 10.23                     |
| Cys                 | —                | —              | —                                        | —         | —                         |
| Val                 | 7.40             | 8.64           | 4.7                                      | 6.6       | 8.02                      |
| Ileu                | 4.05             | 5.03           | 8.4                                      | 11.2      | 4.73                      |
| Leu                 | 6.51             | 8.19           |                                          |           | 8.30                      |
| Meth                | —                | 1.12           | 5.1                                      | 4.0       | 1.52                      |
| Tyr                 | 1.63             | 3.27           |                                          |           | 1.91                      |
| Phe                 | 1.91             | 3.11           | 1.9                                      | 3.8       | 2.22                      |

Amino acid content:  $\mu$  mole. %

が等電点沈殿を起こしやすいことおよびキャリアアンフォライトの pH 下限と PPDs の等電点が接近している等の理由から、この方法による正確な等電点の推定は困難と思われる。なお B-I, B-II 画分について分子量ならびに等電点の結果を考えると、分子量は B-II のほうが小さく等電点は B-II のほうが酸性側にある事実から、ディスク電気泳動における 2 本のバンドの移動度の大きい画分は B-II と推察される。

#### 4) PPDs のアミノ酸組成

溶出曲線 B を示す PPDs Lot No. 4 の B-I, B-II 画分ならびに C を示す PPDs Lot No. 8 に関して塩酸加水分解物のアミノ酸分析を行なった。表 2 に各アミノ酸組成を  $\mu$  mol % で示した。B-I, B-II を比較すると、プロリン含有量に差がみられ、またグルタミン酸量は B-I < B-II であるが、その他のアミノ酸量にはほとんど差がみられなかつた。グルタミン酸量の差異は、両画分の等電点ならびにディスク電気泳動の結果をよく説明している。Lot No. 8 のアミノ酸組成は全体として B-I, B-II とほぼ同様であつた。以上の結果から、Sauton 培地、変法培地のいずれで培養しても得られた PPDs のアミノ酸組成には大きな差異は認められないことが分かつた。なお今回のアミノ酸分析では、シスチン、システイン酸が検出されなかつた。

#### 5) Sauton 培地から得られた PPDs の糖分析

すでに PPDs の物理化学的性状の項で述べたように、PPDs B-I 画分の糖含有量は 50% であつた。そこで B-I を 1N 硫酸を用いて加水分解した後、分解産物中の糖の種類および構成比を検索した。ペーパークロマトグラフィーでは、種々の標準糖試料を用いて検討した結果、図 7 に示すようにグルコースを主とし、少量のマノースが検出された。上記構成糖の Rf 値が近似していたので、硼酸による錯化合物の形成を利用して分離する高压濾紙電気泳動を行なった結果、グルコースの移動度 1.0 に対しマノース 0.71 を示し両者の存在は明らかになつた。次に構成糖の比率ならびに微量成分を検出する目的でガスクロマトグラフィーを行なった。図 8 に B-I 加水分解物のガスクロマトグラムを示したが、標準糖試料につき保持時間ならび濃度とピークの面積比との関係をあらかじめ確認して行なつた結果、グルコース：マノース=9：1 と推定され、微量成分として、フコース、キシロース、リボース、2-デスオキシリボース等が検出された。これらは総量でも糖全体の数 % 以下であり、PPDs 中の多糖体または混在する核酸に由来するかは不明である。

次に B-I の糖部分は蛋白質と結合しているか否かに

Fig. 7. Determination of Polysaccharide Component in PPDs by Paper Chromatography

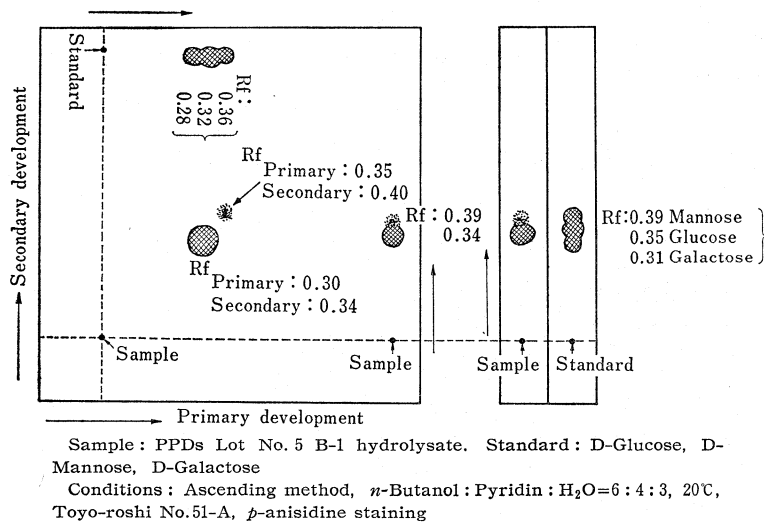
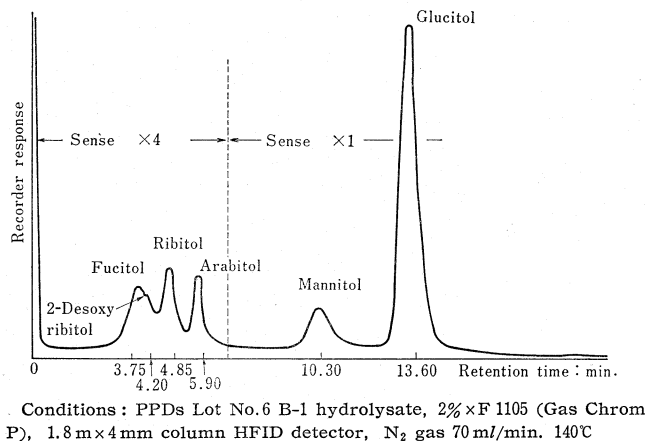


Fig. 8. Gas Chromatography of PPDs Hydrolysate



関して検討した。すなわち構成糖がアルドヘキソースであることが明らかになったので、等電点分離法を用いてB-Iをキャリアアンフォライト pH 3~10 のアルカリ側に添加した後通電した。pH 4 近辺に達した蛋白部分のみを分取した後透析して蔗糖を除去し、セファデックス G 100 またはポリエチレングリコール 6,000 にて濃縮後、セファデックス G 75 を用いるカラムクロマトグラフィーを行ない、各溶出フラクションについて蛋白量を 280mμ における吸光度、糖量をアンスロン法によりそれぞれ測定した結果、溶出フラクションの蛋白部分と糖部分は完全に一致し、しかも両者の存在比はほぼ 1:1 を示した。以上の結果から、B-I 中の糖部分は多糖体として蛋白部分となんらかの結合をしており、単に混入しているのではないと推察された。

#### 6) 各種 PPDs の「ツ」皮内反応力価の検定

表 3 は PPDs Lot No. 3, Lot No. 5 の B-I, B-II, および Lot No. 7 について死菌感作モルモットに対する「ツ」皮内反応を予研 PPDs No. 15~No. 25 と比較したものである。その結果それぞれ 1% の危険率で力価に有意の差が

Table 3. Tuberculin Skin Test of PPDs Preparations

| Guinea pig No. | Right side (mm)     |                |                    | Left side (mm)      |                     |                |
|----------------|---------------------|----------------|--------------------|---------------------|---------------------|----------------|
|                | Standard PPDs 15~25 | PPDs Lot No. 3 | PPDs Lot No. 5 B-I | Standard PPDs 15~25 | PPDs Lot No. 5 B-II | PPDs Lot No. 7 |
| 24 hrs         |                     |                |                    |                     |                     |                |
| No. 1          | 15.5                | 16.0           | 15.0               | 15.5                | 14.0                | 15.5           |
| No. 2          | 15.0                | 16.0           | 16.0               | 15.0                | 15.5                | 16.0           |
| No. 3          | 15.0                | 16.0           | 16.0               | 15.0                | 15.5                | 16.0           |
| No. 4          | 16.0                | 14.0           | 16.0               | 15.0                | 14.0                | 15.5           |
| No. 5          | 13.0                | 14.0           | 13.0               | 14.0                | 14.0                | 14.5           |
| 48 hrs         |                     |                |                    |                     |                     |                |
| No. 1          | 15.5                | 15.0           | 15.5               | 15.0                | 14.0                | 15.0           |
| No. 2          | 15.5                | 16.0           | 16.0               | 13.0                | 15.0                | 14.0           |
| No. 3          | 13.5                | 15.0           | 14.0               | 14.0                | 14.0                | 14.0           |
| No. 4          | 15.0                | 14.0           | 15.0               | 15.0                | 14.0                | 15.0           |
| No. 5          | 13.0                | 15.0           | 13.0               | 14.0                | 14.0                | 13.5           |

Standard PPDs: YOKEN No.15~No.25, potency ratio of 1.0 Dose: 0.1 ml of PPDs solution (1.0 μg/ml)/guinea pig

認められず、また動物間にも有意の差が認められなかつた。したがって Sauton 培地あるいは変法培地で培養した場合にも、得られた PPDs の「ツ」反応力価には差がないことが分かつた。

## 考 察

今回著者らは、Sauton 培地ならびに変法培地から得られた PPDs 10 Lots について物理化学的諸性状および力価を検討した結果を報告した。Sauton 培地から得られた PPDs Lot No. 1~No. 6 では培養 Lot により溶出曲線 A または B を示すことが分かつたが、常に A, B いずれかの溶出曲線しか示さないか否かについては今回の例数から結論することはできない。また同一菌株、同一培地組成にもかかわらず、なぜ産生される PPDs の性状が一定にならないかについても現在のところ不明である。

PPDs Lot No. 4~No. 6 はいずれもセファデックス G50 によるカラムクロマトグラフィーにおいて B-I, B-II を与えたが、B-I, B-II の物理化学的諸性状の中で窒素含有量、多糖体および核酸含有量ならびに分子量はそれぞれ Seibert ら<sup>28)</sup> による A 蛋白、C 蛋白と類似している。そこで、それぞれについてアミノ酸組成を比較したところ、表 2 に示したように塩基性アミノ酸量は A 蛋白 > B-I, C 蛋白 > B-II であり、アスパラギン酸量は A 蛋白 < B-I, C 蛋白 < B-II であり、したがって A, C 蛋白は B-I, B-II よりも等電点が中性付近にあると推察された。他のアミノ酸量においても A 蛋白と B-I, C 蛋白と B-II にかなり差異が認められた。したがって A, C 蛋白と B-I, B-II との間には化学的類似性はないと考えられる。

B-I の「ツ」皮内反応力価と化学的性状に関して表 3 に B-I と標準 PPDs の力価との間に有意の差が認められなかつたことを示したが、「ツ」活性部分は「ツ」の多糖体にあるのではないことを考えると、多糖体を 50% 含む B-I がほぼ蛋白質からなる B-II, A-II と力価において差がみられないことは興味ある事実であろう。著者らは B-I の多糖体は蛋白部分となんらかの結合をしていると推察したが、「ツ」皮内反応における多糖体部分の役割はそれが蛋白部分と結合している場合には分子量も増大し蛋白部分の持つ「ツ」活性に補助的役割を担うのではなからうかと推察される。このことは、Seibert らの A 蛋白が B, C 蛋白に比して「ツ」反応活性が高いという報告とも合うように思われる。

変法培地から得られた PPDs は、Lot No. 7~No. 10 については溶出曲線ならびに化学的組成において Lot 間のばらつきはみられなかつた。変法培地から得られた PPDs には培養 Lot 間のばらつきが少ないことはすでに報告されており<sup>29)</sup>、「ツ」反応力価において標準 PPDs との間に有意の差がみられなかつたことを考慮すると、培養 Lot による「ツ」反応力価の再現性ならびに「ツ」反応

特異性において変法培地から得られた PPDs と Sauton 培地から得られた PPDs との間に差異が認められないとすれば、前者のほうが診断用「ツ」としてより好ましいと思われる。なおわれわれが得た PPDs Lot No. 7~No. 9 につき予研において標準 PPDs と「ツ」反応力価を比較検討していただいた結果では、これらの力価に有意の差がみられなかつた。

## 結 論

■ Sauton 培地ならびに変法培地で培養した培養濾液から得られた PPDs について、それぞれ物理化学的性状および「ツ」反応力価を検討した結果、

1) Sauton 培地から得られた PPDs は培養 Lot により異なつた物理化学的性状を示したが、変法培地の場合には均一な性状を示した。

■ 2) Sauton 培地から得られた PPDs をセファデックス G 50 を用いるカラムクロマトグラフィーによつて精製し、超遠心分析、ディスク電気泳動上はほぼ均一な画分を得た。

3) PPDs ならびにその精製画分について窒素、糖および核酸含有量、アミノ酸組成、分子量、等電点等を検討した。

4) PPDs ならびにその精製画分の「ツ」反応力価を標準 PPDs のそれと比較し、力価に有意の差を認めなかつた。

稿を終るに臨み、本研究に対し終始ご指導ならびにご校閲を賜りました東京大学医学部名誉教授秋葉朝一郎博士、結核予防会結核研究所湯沢健児博士、東京生化学研究所長岡田正志博士に感謝の意を表します。また PPDs の「ツ」反応力価の検定ならびにご助言をいただきました国立予防衛生研究所浅見望、片岡哲朗両博士、糖のガスクロマトグラフィーにご協力いただきました東京大学薬学部薬品分析化学教室今成登志男博士にあわせて感謝いたします。

本研究の要旨は第 44 回日本結核病学会総会において発表した。

## 文 献

- 1) 武田育子・石館守三：結核，47：75，昭 47。
- 2) 小杉信之：結核，35：356，昭 35。
- 3) 近藤肇子・浅見望・片岡哲朗：結核，41：151，昭 41。
- 4) Wong, S. C.: J. Bact., 33: 451, 1937.
- 5) Lind, P.: Acta Tuberculosea Scandinavica, 22: 287, 1948.
- 6) Magnusson, M., Kim, H. K. and Bentzon, M. W.: Acta pathol. et Microbiol. Scandinav., 58: 363, 1963.

- 7) Magnusson, M., Kim, H.K. and Bentzon, M. W.: *ibid.*, 59 : 357, 1963.
- 8) Yabu, K.: *Tubercle*, 51 : 437, 1970.
- 9) Seibert, F. B. and Glenn, J. T.: *Am. Rev. Tuberc.*, 44 : 9, 1941.
- 10) Archibald, W. J.: *J. Phys. and Colloid. Chem.*, 51 : 1204, 1947.
- 11) 富田繁 : 化学工業資料, 30 : 68, 昭 37.
- 12) Ornstein, L. and Davis, B. J.: Preprinted by Distillation Products Industries, 1962.
- 13) Ornstein, L.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121 : 321, 1964.
- 14) Vesterberg, O. and Svensson, H.: *Acta Chem. Scand.*, 20 : 820, 1966.
- 15) Mukherjee, S. and Srivastva, H. C.: *Nature*, 169 : 330, 1952.
- 16) Partridge, S. M. and Westall, R. G.: *Biochem. J.*, 42 : 238, 1948.
- 17) Dimler, R. J. and Schaefer, W. C.: *Anal. Chem.*, 24 : 1411, 1952.
- 18) French, D. and Wild, G. M.: *J. Am. Chem. Soc.*, 75 : 2612, 1953.
- 19) French, D. and Knapp, D. W.: *J. Am. Chem. Soc.*, 72 : 5150, 1950.
- 20) Jeanes, A. and Wise, C. S.: *Anal. Chem.*, 23 : 415, 1951.
- 21) Consden, R. and Stanier, W. N.: *Nature*, 169 : 783, 1952.
- 22) 麻生清・浜田茂穂 : 醸工, 33 : 45, 昭 30.
- 23) Foster, A. B. and Bourne, E. J.: *J. Chem. Soc.*, 4311, 1956.
- 24) Foster, A. B. and Bourne, E. J.: *ibid.*, 982, 1953.
- 25) Tamura, Z. and Imanari, T.: *Chem. Pharm. Bull.*, 16 : 1864, 1968.
- 26) 今成登志男・田村善蔵 : 医化学シンポジウム, 第 7 集 : 38, 昭 42.
- 27) Matsui, M., Okada, M., Imanari, T. and Tamura, Z.: *Chem. Pharm. Bull.*, 16 : 1383, 1968.
- 28) Seibert, F. B.: *Am. Rev. Tuberc.*, 59 : 86, 1949.