

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3編 Sauton 変法培地から得られた PPDs とグルクロン酸ナトリウム (NaG)  
 との結合物 (PPDs-G) の製法とその性状について

武田育子・石館守三

東京生化学研究所

受付 昭和 47 年 5 月 19 日

BINDING OF PPDs WITH D-GLUCURONIC ACID\*

Part III. Preparation and Properties of D-glucuronic Acid Bound  
 PPDs(PPDs-G) using PPDs from Modified Sauton Medium

Yasuko TAKEDA and Morizo ISHIDATE

(Received for publication May 19, 1972)

In the previous papers, the authors reported that PPDs from Sauton medium chemically combined with sodium glucuronate (NaG) under physiological conditions and that PPDs from modified Sauton medium would be preferable to that from Sauton medium, since physicochemical properties and tuberculin potencies of the former PPDs are invariable from Lot to Lot.

In order to prepare PPDs-G in homogeneous and reproducible state, we made PPDs from modified Sauton medium, and react them with NaG by similar method as described in part I, and obtained PPDs-G. This paper presents the method of preparation of PPDs-G and its physicochemical and biological properties.

A mixture of PPDs and NaG (containing  $5\mu\text{C}$  of  $6\text{-}^{14}\text{C}\text{-NaG}$ ) in the ratio of 1 to 5 by weight in 0.2 M phosphate buffer of pH 7.2 with a small amount of antiseptic were incubated at  $38\sim 40^\circ\text{C}$  for 110~120 hours. The reaction mixture was then dialyzed against distilled water for 30 hours. Dialysate was condensed using Sephadex G 100 and applied to a column of Sephadex G 75. As seen in Fig. 1, elution curve of NaG was found to coincide with the first peak of PPDs, while by chromatography of a mixture of NaG and PPDs, the former could be completely separated from the latter. This suggests that PPDs combines with NaG. By calculation of NaG/PPDs in each fraction tube, it was found that the amount of NaG which was combined with PPDs would be at about 2~3% by weight of PPDs.

Physicochemical properties of PPDs-G were as follows:

- (a) PPDs-G showed a little smaller value than PPDs in nitrogen content.
- (b) PPDs-G showed 2 bands in disc electrophoresis, using Tris-Glycin buffer of pH 8.6, one of which had a larger electrophoretic mobility than that of PPDs itself (Fig. 2). Isoelectric point of PPDs-G was estimated to be about 3.5~3.7 by electric focusing in pH gradients (Fig. 3).
- (c) The reduction of basic amino acids content was observed in PPDs-G by amino acid analysis (Table 1).

Biological properties of PPDs-G were as follows:

- (a) By tuberculin skin test, no significant difference was observed between the potencies

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

of PPDs and PPDs-G.

(b) The tuberculous guinea pigs were injected with either PPDs or PPDs-G. The number of dead animals in the group injected with PPDs-G seemed to be smaller than that in the group injected with PPDs (Table 2).

(c) An attempt has been made by our coworkers to use PPDs-G as therapeutic agent against tuberculosis by combining them with chemotherapeutic agents. Preliminary study on the clinical effect is now under way.

We further examined physicochemical properties of PPDs preparations from modified Sauton medium by measuring the contents of nitrogen, sulfur, sugar, nucleic acids, or by ultracentrifugal analyses. As shown in Table 3, it was assumed that PPDs was not a pure substance as yet, but there was slight difference in physicochemical properties from Lot to Lot.

## 緒 言

第1編<sup>1)</sup>において著者らは、Sauton 培地から得られる PPDs と NaG とを生理的条件下に反応させて PPDs-G を得ることを報告した。性状において均一かつ再現性のある PPDs-G を得るためには、均一な PPDs を出発物質としなければならない。しかしながら、すでに第2編<sup>2)</sup>に述べたように、Sauton 培地から得られる PPDs は培養 Lot. により物理化学的性状が異なり、また培養濾液単位量当りの収率が低いのにに対し、アスパラギンを倍量添加した Sauton 変法培地（以下変法培地と略す）から得られる PPDs は培養 Lot. によるばらつきが少なくほぼ均一な性状を示し、収率も比較的高く、さらに、「ツ」皮内反応力価においても原培地より得られる PPDs のそれと比較して有意の差が認められないことが明らかになった。

そこで今回著者らは、変法培地から得られる PPDs と NaG を反応させ両者は化学的に結合することを明らかにし、さらに PPDs-G の物理化学的性状をディスク電気泳動、等電点蛋白分離法、窒素分析、アミノ酸分析等により、また生物学的性状を「ツ」皮内反応力価、結核動物に対する死亡率の観察等によりそれぞれ対応する PPDs の性状と比較検討した。

なお、すでに第2編<sup>2)</sup>では、Sauton 培地由来の PPDs と比較するために変法培地から得られる PPDs の性状のいくつかを報告したが、その後新たな知見が得られたので、それらをも併せて報告したい。

## 実験材料ならびに方法

1) PPDs: 人型結核菌青山B株を変法培地で培養後、培養濾液から<sup>3)</sup>Seibert らの方法<sup>3)</sup>に準じて精製した。

2) PPDs-G の調製: PPDs-G を調製する際に、あらかじめ反応液組成、反応温度、時間等反応条件を検討した結果、PPDs の変性、「ツ」反応力価の低下、反応液の着色等が比較的少なく、かつ再現性のある PPDs-G

を得る反応条件として、PPDs : NaG = 1 : 5 で、防腐剤チメロサル約 0.05% 添加、0.2~0.3 M 磷酸緩衝液 (pH 7.2) 中遮光下に 38~40°C、110~120 時間反応後反応液を透析しセファデックス G 100 で濃縮後、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い、PPDs-G 溶出画分を分取し、脱塩後凍結乾燥する方法が適当であることがわかり、変法培地から得られる PPDs と NaG を上記条件下に反応させて PPDs-G を調製した。

3) PPDs と NaG との結合比の決定: すでに報告したように、PPDs-G 中の NaG 量を化学的に定量することはできないので<sup>4)</sup>、NaG の一部に 6 位 <sup>14</sup>C 標識 NaG を用い、PPDs-G の調製の項に準じて PPDs と反応させ、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における PPDs-G 中の PPDs 量を 280 mμ 吸光度の測定により、NaG 量を液体シンチレーションカウンター（スクレアシカゴ社製マーク I 型）によつて計測された放射能の強さから算出した。PPDs と結合した NaG 量は PPDs 当りの NaG 重量 % で表示した。

4) PPDs-G の物理化学的分析法

a) 窒素分析: デュマ法により PPDs-G 凍結乾燥物の窒素含有量 (%) を測定した。

b) ディスク電気泳動: 第2編<sup>2)</sup>参照。

c) 等電点蛋白分離法: 第2編<sup>2)</sup>参照。

d) アミノ酸分析: PPDs-G を塩酸加水分解後常法により処理し、日立 KLA 3B 型アミノ酸分析計により測定した。なお、対応する PPDs についても同様に分析した。

5) PPDs-G の生物学的検討

a) 「ツ」反応力価の検定: 第1編<sup>1)</sup>に準じて行つた。

b) 結核動物に対する致死作用: 第1編<sup>1)</sup>の方法によつた。

6) 変法培地から得られた PPDs の物理化学的分析

法

- a) 硫黄：PPDs 含有微量硫黄の定量は、動的酸素フラスコ燃焼法による硫黄の微量分析法<sup>4)</sup>によつた。
- b) 糖：アンスロン法により D-グルコース量に換算して測定した。第1編<sup>1)</sup>参照。
- c) 核酸：ジフェニルアミン法により 2-デオキシ D-リボース量に換算して測定した。第2編<sup>2)</sup>参照。
- d) ウロン酸：ナフトレゾルシンピクラート法により

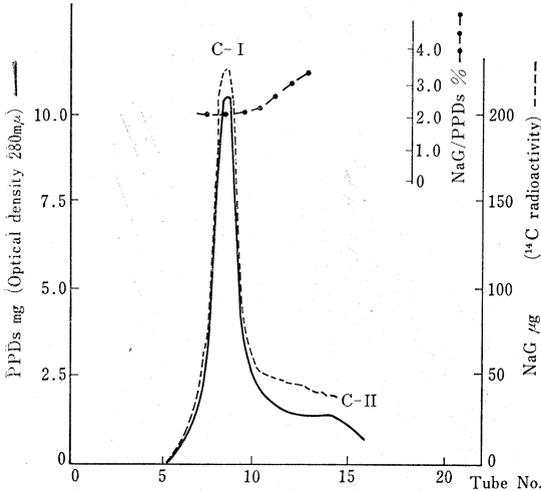
NaG に換算して測定した。第1編<sup>1)</sup>参照。

e) ヘキソースとペントース：Dische らによるシステイン硫酸法<sup>5)</sup>に従つた。すなわち、D-グルコース、D-アラビノースを標準糖とし、吸光度 414 m $\mu$ -380 m $\mu$ , 390 m $\mu$ -424 m $\mu$  の差からそれぞれヘキソース、ペントース量を算出した。また発色 48 時間後の色調の変化から定量する方法<sup>6)</sup>も行つた。

f) 超遠心分析：第2編<sup>2)</sup>では、変法培地から得られた PPDs Lot No.8 について沈降平衡法を用いて分子量を 25,000~27,000 と推定した。今回 PPDs のアミノ酸組成と関連し、培養 Lot. により PPDs の分子量が異なるか否かを検討するために、沈降速度法により沈降係数  $S_w^{20}$  を求めた。すなわち、0.1 M 塩化カリウム含有 1/30 M 磷酸緩衝液 (pH 7.3) に 0.3%, 0.15% になるように PPDs を溶解し、20°C, 56,000 rpm, 16 分間隔で撮影した。

g) ゲル濾過法による分子量の推定：2.5 $\times$ 100 cm カラムにセファデックス G 200 または G 100 を充填し、ブルーデキストラン 2,000 (ファルマシア社製) を標識試料として、PPDs の溶出量から分子量を推定した。あらかじめ分子量既知の数種混合試料溶液を用いて溶出量と分子量との関係を探っておいた。なお、溶出量と分子量との関係は Andrew<sup>7)</sup> および Determann<sup>9)</sup> の方法によつた。

Fig. 1. Chromatography on a Sephadex G 75 Column of PPDs Treated with NaG



30 mg of PPDs Lot. No.7 from modified Sauton medium and 150 mg of (NaG+5  $\mu$ C of 6-<sup>14</sup>C NaG) in 0.2 M phosphate buffer of pH 7.2 with a small amount of antiseptic were incubated at 39°C for 110 hours. Reaction mixture was then dialyzed against distilled water. Dialysate was condensed using Sephadex G 100 and was applied to a column (0.9 $\times$ 48 cm). Elution was carried out with 1/45 M phosphate buffer of pH 7.2. The flow rate was about 5 ml/ per hour and effluent fraction of 2.1 ml/ was collected.

- : PPDs mg/fraction tube
- ..... : Bound NaG  $\mu$ g/tube
- .-.- : Bound NaG/PPDs/tube

実験結果

1) 変法培地から得られる PPDs と NaG との結合 PPDs Lot. No.7 (N : 14.72%) 30 mg と NaG+6-<sup>14</sup>C-NaG 150 mg を反応させて得られた生成物のセファデックス G 75 を用いるカラムクロマトグラムを図1に示した。溶出パターンから明らかなように、主溶出画分は C-I(第2編<sup>2)</sup>参照)のみであり、NaG の溶出曲線も C-I に完全に一致していた。さらに、PPDs-G 中の NaG と

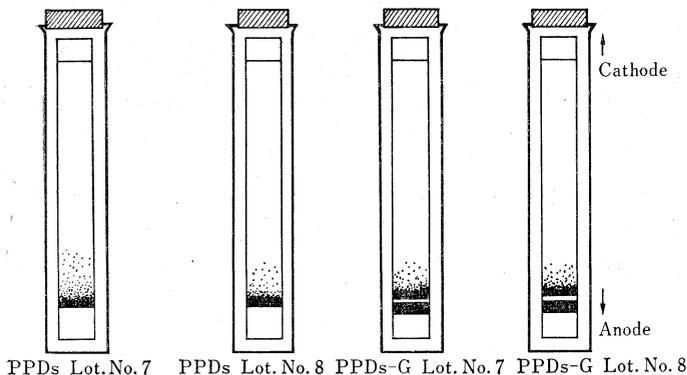
PPDs 比を各フラクションについて求めるとほぼ 2~3 : 100 を示した。次に同上の反応条件で、PPDs Lot. No.8 (N : 14.42%) と NaG を反応させた結果、図1と同様な結果が得られ、PPDs-G の再現性が認められた。

2) PPDs-G の物理化学的性状

PPDs Lot. No.7 および Lot. No.8 と NaG から得られた PPDs-G 凍結乾燥物の窒素含量はそれぞれ 13.78%, 13.69% であり、対応する PPDs のそれより 0.8~0.9% の減少がみられた。この結果から、PPDs と NaG との化学的結合が推察される。

次に PPDs-G の均一性ならびに等電点を推定するために、ディスク電気泳動、等

Fig. 2. Disc Electrophoresis of PPDs and PPDs-G using Polyacrylamide



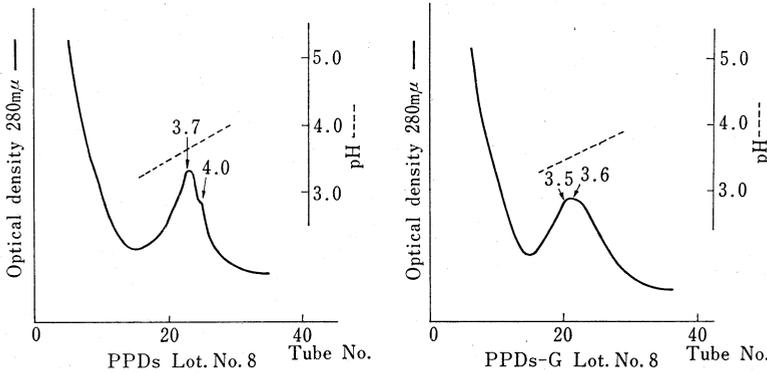
Conditions : Tris-Glycin buffer of pH 8.3, 25°C, 200 volts, 3 mA/tube, 90 min. Amido black 10 B staining.

電点蛋白分離法を行つた。PPDs Lot. No.7 およびその PPDs-G の移動度を比較した結果図 2 にみられるように、PPDs-G では PPDs より移動度の大きいバンドとほぼ同じ移動度を示す計 2 本のバンドがみられ、PPDs と NaG との化学的結合が示唆された。しかし、PPDs-G と推察されるバンドはやや幅広く、PPDs と NaG との結合比にはややばらつきがあるように思われた。等電

点蛋白分離法を用いて両者の等電点を比較したところ、図 3 に示したように、PPDs Lot. No.8 では 3.7 と推定され、その PPDs-G ではほぼ 3.5 と推定された。しかしながら、PPDs-G では pH 3.5~3.7 の範囲にやや幅広いピークを示した。

次に PPDs と PPDs-G のアミノ酸組成を比較した。表 1 に PPDs Lot. No.8~No.10 および PPDs-G(PPDs

Fig. 3. Isoelectric Point of PPDs and PPDs-G by Electrofocusing in pH Gradients



Conditions: Carrier Ampholyte: pH 3.0~6.0, 700 volt, 48 hours, PPDs or PPDs-G: Lot. No.8, 3~5 mg, Ampholine column: 110 ml, 1.8 ml/tube

Table 1. Amino Acid Content of PPDs and PPDs-G

	The ratio of each amino acid content to threonine				The number of amino acid/mole of PPDs or PPDs-G				
	PPDs No.8	PPDs-G No.8	PPDs-s No.9	PPDs No.10	PPDs No.8	PPDs-G No.8 $\Delta^{1)}$		PPDs No.10 $\Delta^{2)}$	
Try	—	—	—	—					
Lys	0.7269	0.5986	0.6357	0.7269	10.7	8.8	1.9	10.7	0.0
His	0.2093	0.1456	0.2255	0.2690	3.1	2.1	1.0	4.9	-1.8
Ammonia	2.0320	2.1504	1.6938	2.1506					
Arg	0.6821	0.5717	0.6929	0.7582	10.0	8.4	1.6	11.1	-1.1
CySO <sub>3</sub> H	Trace	Trace	Trace	Trace					
Hy-Pro	None	None	None	None					
Asp	1.7146	1.6752	1.7044	1.6900	25.2	24.6	0.6	24.8	0.4
Thr	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	14.7	14.7	0.0	14.7	0.0
Ser	0.7203	0.7389	0.7356	0.7463	10.6	10.8	-0.2	11.0	-0.4
Glu	2.0077	2.0973	1.9436	1.8701	29.5	30.8	-1.3	27.5	2.0
Pro	0.7987	0.7902	0.8277	1.0031	11.7	11.6	0.1	14.7	-3.0
Gly	1.5987	1.6079	1.5850	1.5574	23.5	23.6	-0.1	22.9	0.6
Ala	2.1189	2.1341	2.1458	2.0542	31.2	31.4	-0.2	30.2	1.0
Cys	Trace	Trace	Trace	Trace					
Val	1.3213	1.2668	1.3546	1.3166	19.4	18.6	0.8	19.4	0.0
Meth	0.2580	0.2341	0.2704	0.2616	3.8	3.4	0.4	3.8	0.0
Ileu	0.8571	0.7097	0.7471	0.7199	12.6	10.3	2.3	10.6	2.0
Leu	1.2959	1.2221	1.3304	1.3003	19.0	17.9	1.1	19.1	-0.1
Nor-Leu	None	None	None	None					
Tyr	0.3167	0.3097	0.3145	0.3249	4.6	4.5	0.1	4.8	-0.2
Phe	0.3893	0.3540	0.4176	0.4091	5.7	5.2	0.5	6.0	-0.3

Left column: the content of amino acid calculated from that of threonine as 1.0000. Right column: the number of each amino acid/mole of PPDs Lot. No.8, molecular weight of which was referred to 25,000.

$\Delta^{1)}$ : PPDs-G Lot. No.8-PPDs Lot. No.8  $\Delta^{2)}$ : PPDs Lot. No.10-PPDs Lot. No.8.

Table 2. Death of Tuberculous Animals by PPDs and PPDs-G

Experiment	I		II		III	
Number of animals	18		30		30	
Average body weight	585 g		664 g		575 g	
Method of infection	INH resistant M. tuberculosis, 1 mg/guinea pig, subcutaneously		M. tuberculosis KURONO strain 0.5 mg/guinea pig, subcutaneously			
Weeks after infection	6		8		6	
Group	A	B	C	D	E	F
Number of dead animals (0~24 hrs.)	4/9	0/9	4/15	2/15	8/15	7/15
Number of dead animals (24~48 hrs.)	0/9	1/9	2/15	0/15	1/15	0/15
Death rate	44	11	40	13.3	60	46.6

## Group :

- A : PPDs Lot No.7 0.5 mg/ml, 0.2 ml/100 g of body weight  
 B : PPDs-G (Lot No.7) 0.53 mg/ml, 0.2 ml/100 g of body weight  
 C : PPDs Lot No.7 0.75 mg/ml, 0.2 ml/100 g of body weight  
 D : PPDs-G (Lot No.7) 0.80 mg/ml, 0.2 ml/100 g of body weight  
 E : PPDs Lot No.8 0.5 mg/ml, 0.2 ml/100 g of body weight  
 F : PPDs-G (Lot No.8) 0.52 mg/ml, 0.2 ml/100 g of body weight

Guinea pigs were infected with M. tuberculosis subcutaneously. Various weeks after infection, the tuberculous animals were injected subcutaneously with PPDs or PPDs-G. The number of dead animals 24 or 48 hours after the injection of each group was calculated.

Table 3. Physicochemical Properties of PPDs Preparations from Modified Sauton Medium

	PPDs Lot. No.7	PPDs Lot. No.8	PPDs Lot. No.9	PPDs Lot. No.10
Nitrogen %	14.72	14.42	14.64	14.54
Nucleic acid % (as 2-deoxy D-ribose)	1.3	1.7	0.7	0.5
Hexose % (as D-glucose)				
(a) Anthrone	(a) Not detected	Not detected	Not detected	Not detected
(b) Cysteine-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	(b) Not detected	Not detected	Not detected	Not detected
Pentose % (as D-arabinose)	1.09	0.85	0.75	0.71
Sulfur %	0.74	0.56	0.72	0.92
S-containing amino acid (Methionine) mole/PPDs	Not analyzed	3.8	4.0	3.8
Sedimentation coefficient S <sub>w</sub> <sup>20</sup> × 10 <sup>13</sup>	Not analyzed	1.75	1.75	1.9
UV max. absorption mμ	255~260	255~260	270~280	270~280

Lot. No.8 より調製) のアミノ酸組成を示した。まず、PPDs 間で比較的含量にばらつきが少ないスレオニン量を 1,000 とし、スレオニンに対する各アミノ酸の組成比を求め、次に PPDs Lot. No.8 の分子量を超速心分析法より求めた値すなわち 25,000 とし、同様にしてあらかじめ求めた各アミノ酸に関する PPDs-G/PPDs Lot. No.8, PPDs Lot. No.9/PPDs Lot. No.8, PPDs Lot. No.10/PPDs Lot. No.8 よりそれぞれ PPDs-G ならびに各 Lot. PPDs のアミノ酸数を PPDs 1 分子当りで算出した。その結果、PPDs-G では対応する PPDs に比し塩基性アミノ酸含量の減少がみられたが、PPDs Lot. 間ではプロリン、イソロイシン以外ほとんどアミノ酸量に差が認められなかった。

## 3) PPDs-G の生物学的検討

a) 「ツ」反応力価 : PPDs Lot. No.7 および PPDs-G について、国際標準 PPDs と等力価の予研 PPDs 15-25 と力価を比較した結果、いずれも予研 PPDs と力価に有意の差が認められなかった。したがって PPDs に NaG が結合しても「ツ」反応力価への影響はないと考えられる。

b) 結核モルモットに対する致死作用<sup>10)</sup>

結核モルモットに PPDs Lot. No.7, No.8 およびこれらの PPDs-G を皮下注射した結果、表 2 に示されるように、感染方法、感染後の期間、動物個体差によりばらつきはみられるが、PPDs-G 投与群は PPDs 投与群に比して死亡率の低下の傾向がみられた。

4) 変法培地から得られる PPDs の物理化学的性状について

すでに第2編<sup>2)</sup>において著者らは、変法培地から得られた PPDs の物理化学的性状に触れたが、今回はその後新たに判明した性状を含め表3にまとめた。表にみられるように、窒素含量では Lot. 間にほとんど差がみられなかった。核酸量 (2-デスオキシ D-リボース量) は 0.5~1.7% であり、その量の多少により PPDs の UV 極大吸収波長を異にすることがわかった。糖量は、アンスロン法ではグルコースと発色を異にし、測定できなかった。おそらくヘキソースは存在せず、アンスロンは PPDs 中のトリプトファンと反応して発色したためと考えられる。次にシステイン硫酸法によりグルコース (ヘキソース)、アラビノース (ペントース) と PPDs とを比較すると、PPDs においてはヘキソース量は負となり測定できなかったが、ペントース量はアラビノース量に換算し、0.7~1.0% 含まれていると推察された。しかしながら、発色後の極大吸収波長がアラビノースのそれと完全には一致しなかった事実から、PPDs 中の構成糖はアラビノースのみではないようである。なお、ペントースとして検出された値に核酸由来の 2-デスオキシ D-リボースを含むか否かを検討したが、後者はシステイン硫酸法では発色しなかった。

次に、PPDs は微量の硫黄 (以下 S と略す) 0.56~0.92% (表 3) を含有し、Lot. 間にやや差が認められた。一方アミノ酸分析により、PPDs 1分子中に S 含有アミノ酸としてメチオニン 3.8~4.0 モルの存在が認められたが、システイン酸ならびにシスチンは微量認められたにすぎない。そこで、超遠心分析によつて分子量 25,000 と推定された PPDs Lot. No. 8 につき S 含量とメチオニン量から算出した S 含量を比較すると、それぞれ 0.56%, 0.51% となり、両者はほぼ一致した値を示した。しかしながら、他の Lot. の PPDs では S 含量 0.7~0.9% とやや高く、アミノ酸組成においてはそれぞれ大差がみられないことを考慮すると、分子量が Lot. 間において異なるのではなからうかと推測した。沈降速度法による各 Lot. PPDs の  $S_w^{20}$  は表3にみられるように、1.75~1.9 と小さい値を示し Lot. 間では差がみられなかった。また、ゲル濾過法により分子量を推定する方法では、いずれも予測された分子量すなわち約 25,000 よりかなり高い分子量を示唆する溶出量がみられたが、Lot. 間では溶出量に差がみられなかった。以上の結果から、PPDs Lot. 間において分子量には大差はないと推察された。

### 考 察

著者らは、Sauton 変法培地から得られた PPDs に NaG を作用させると、両者は化学的に結合すること、ならびに結合物 PPDs-G の諸性状について報告した。PPDs-G の調製における再現性は認められたが、性状の

均一性に関してディスク電気泳動ならびに等電点蛋白分離法により検討したところ、いずれもやや幅広いピークを示し PPDs-G 中の PPDs と NaG との結合比にややばらつきがあるように思われた。この点に関しては、PPDs-G の性状が両分析法の測定限界に近いため、今後さらに検討を要するものと考えられる。次に PPDs-G のアミノ酸組成につき対応する PPDs のそれと比較したところ、PPDs-G では塩基性アミノ酸リジン、ヒスチジン、アルギニンにおいてそれぞれ 1.9, 1.0, 1.6 モル減少がみられたが、他のアミノ酸量にはほとんど差がみられなかった。一方、先に 6-<sup>14</sup>C-NaG を用いて PPDs-G を調製した際、PPDs-G 中の NaG と PPDs との結合比は 2~3:100 と推定した。PPDs の分子量を 25,000 と仮定すれば PPDs に結合した NaG は PPDs 1分子当り 3~4 モルとなり、これは PPDs-G における塩基性アミノ酸量の減少の和とほぼ一致する。したがって、PPDs 1分子中の塩基性アミノ酸数すなわち 23~24 コの約 15% と NaG とが結合したことになる。これに関連して、共同研究者谷村ら<sup>11)</sup>は、NaG と卵白アルブミンとの結合物について NaG は卵白アルブミンのリジン 20 コ中 5~7 コと結合しているであろうと報告している。上記球状蛋白質の場合に比べ、PPDs は -S-S- 結合がほとんど存在しない点およびゲル濾過法による分子量と溶出量との直線関係があまり成立しない点から鎖状蛋白質と推察されるので、PPDs-G の調製の項に示したような緩和な反応条件では PPDs の塩基性アミノ酸中約 15% と NaG とが安定な化学結合を有するものと推察される。なお、蛋白質と NaG との化学的結合様式に関しては今後検討して報告したい。

今回得られた PPDs-G の「ツ」反応力価は対応する PPDs のそれと比較して差異がみられなかった。したがって、PPDs において NaG 結合部位は「ツ」活性部位とは異なるかと推察される。また結核動物に対する致死作用では PPDs-G 投与群において死亡率の減少の傾向がみられた。この致死作用は結核に特異的ないわゆるアレルギー反応によるものと考えられるが、その作用機作は明らかではなく、したがって PPDs-G が結核動物に対してどのような致死作用の軽減をもたらしているかは不明である。しかしながら、少なくとも PPDs 中の塩基性アミノ酸の一部の化学的修飾によりこのような作用を示したことは興味もたれる。今後「ツ」反応力価に影響のない範囲で NaG のより多く結合した PPDs-G を調製し結核動物に対する毒性作用等を比較検討する必要がある。

なお、最近 Mirzoyan<sup>12)</sup> は、「ツベルクリン療法の実論と実際」と題する総説にソ連におけるツベルクリン療法の歴史ならびに化学療法剤との併用による結核治療の現状について述べている。一方今回得られた PPDs-G

を用い、PAS・INA・SM 3者との併用による治療実験が羽鳥ら<sup>13)</sup>によつて現在進行中である。

次に、変法培地から得られる PPDs は培養 Lot. 間ではほとんど性状に差がみられないことが窒素分析、糖、核酸分析、分子量測定、アミノ酸分析等により明らかになった。すなわち上記 PPDs は Sauton 培地由来の PPDs と比較して性状においてばらつきが少ないことがわかつた。その他糖含量が著しく少なくさらにヘキソースをほとんど含まないことが特徴である。この点ヘキソースが糖部分の主成分である Sauton 培地由来の PPDs の「ツ」反応活性と上記 PPDs のそれとの比較は、「ツ」活性に対する糖部分の役割の研究として興味もたれる。PPDs Lot. 間における S 含有量のばらつきとアミノ酸組成ならびに分子量との関係についてはアミノ酸組成、分子量とも Lot. 間に差がみられなかつたので、このばらつきは S 含量測定の誤差範囲内とも考えられる。しかしながら超遠心分析における沈降図型では鋭い単一ピークがみられなかつたことを考慮すると、変法培地から得られる PPDs がまだ単一物質ではないためと推察された。

### 結 論

1) Sauton 変法培地から得られた PPDs と NaG を反応させた結果、PPDs と NaG とは化学的に結合し PPDs-G を得ることがわかつた。

2) PPDs-G の物理化学的性状を、窒素分析、アミノ酸分析、ディスク電気泳動、等電点蛋白分離法等によりそれぞれ検討したところいずれも PPDs と NaG との結合を示唆する結果を得た。

3) PPDs-G と PPDs との「ツ」反応力価には差がみられず、結核動物に対する致死作用では PPDs-G 投与群のほうが PPDs 投与群より死亡率の低下の傾向がみられた。

4) 変法培地から得られた PPDs の物理化学的性状をさらに検討した結果、まだ単一物質ではないようであるが、培養 Lot. 間ではこれらの性状にほとんど差がみ

れなかつた。

5) したがつて上記 PPDs を使用することにより、再現性がありかつほぼ均一な PPDs-G を調製することができるようになった。

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、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-G の「ツ」反応力価の検定にご援助を賜りました国立予防衛生研究所浅見望、片岡哲朗両博士、結核動物に対する PPDs-G の生物学的検討にご協力をいただきました結核予防会結核研究所羽鳥弘、湯沢健児両博士、終始結核菌培養濾液を提供していただきました結核予防会結核研究所の諸氏に深謝いたします。

本研究の要旨は第 45 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) 武田育子・石館守三：結核，47：83，昭 47.
- 3) Seibert, F. B. and Glenn, J. T.: Am. Rev. Tuberc., 44: 9, 1941.
- 4) 木村栄作・繩田喜治・池田陽子：第 39 回有機微量分析シンポジウム，昭 47.
- 5) Dische, Z., Shettles, L. B. and Osnos, M.: Arch. Biochem., 22: 169, 1949.
- 6) Dische, Z.: J. Biol. Chem., 181: 379, 1949.
- 7) Glick, D. and Andrews, P.: Method of Biochemical Analysis, 18: 1, 1970.
- 8) Andrews, P.: Biochem. J. 96: 595, 1965
- 9) Determann, H. and Michel, W. M.: J. Chromatog., 25: 303, 1966.
- 10) 羽鳥 弘・湯沢健児：未発表.
- 11) Tanimura, T. and Ishidate, M.: J. Biochem., 58: 494, 1965.
- 12) Mirzoyan, E. Z.: Teoriya i Praktika Tuberkulino Terapii Tuberkuleza (結核のツベルクリン療法の理論と実際), U. S. S. R., 1970.
- 13) 羽鳥 弘・湯沢健児：未発表.