

精製「ツベルクリン」について

金沢大学医学部日置内科教室(主任 日置教授)

倉 金 丘 一

Kyūchi Kurakane

(昭和28年11月5日受附)

(本報告はこれを昭和26年第24回日本細菌学会並びに昭和27年2, 6月文部省
科学研究費総合研究結核研究委員会において発表した)

緒 論

「ツベルクリン」の精製について長年力を致せるものに Seibert があることは余りにも周知の事実である。吾邦においても近年これが追試を試み、或る程度同一力価のものを製し得るに至つた。例えば九大細菌学教室製^πの如きがそれである。又その中には新たな工夫においてなされたものも一、二存する。岡本氏等^πの OA-Azotuberculin, 武田氏^πの T'A の如きである。

Seibert 氏等は当初限外濾過法により「ツベルクリン」活性物質の精製に志したが、少なく共最初濾過に長時間を要し、その分離には可成苦心を払つたかようである。

偶々著者においても精製「ツベルクリン」を獲得するの要に迫られ、近年これが実験に従事し來つたが、その結果著者創意の迅速限外濾過装置を使用し、従つて又全操作を迅速に運ぶことが何ら活性物質の取得に損失を生ぜず、優に略々一定の力価を有するものを分離し得ることを可能ならしめることを知り得たのでここに一括してその経緯を發表せんとする。

なお著者の限外濾過装置と類似せる装置については最近 Heckly and Watson^πが Amer. Rev. Tuberc. 誌上にこれを發表したが、著者の工夫はこれと全く無関係に行われたもので、戸田忠雄教授の視察談によれば Seibert も「ツ

ベルクリン」精製には近頃迅速濾過がその一要諦であることを述べていたそうである。

又重ねて Seibert^πの研究によれば「ツ」反応蛋白質にも A, B, C 夫々種類があり、これ又材料とせし菌株により量的に相違するものらしいが、著者の人型結核菌株を使用した成績ではその精製「ツベルクリン」は主としてC蛋白質に相当するものようである。更に本研究によれば後述する如く一旦蛋白質分割を分離したる後主として多糖類を沈澱せしめたるに、この分割中にも皮膚反応物質の存することが知られた。仮に痕跡の精製「ツベルクリン」が混入するとしてもN量から換算して力価が高過ぎる。実に本分割中には一切の蛋白質反応が痕跡若しくは皆無であつた(従つて Seibert のいう A, B はこれを認め得なかつた)。但し本物質は更に精製を続け含窒物を何ら有せざるに至る時は消失する。さりとて本物質を含窒物なりと断定することは無論早計であるが、蛋白質分割以外に斯様な皮膚反応惹起物質が存し得ることは既に Kallós^π, 糟谷^{π, π}等が指摘している所である。著者の認めたる物質と後者等の唱える物質との異同は遽かに明らかではないが、少なく共糟谷氏の挙げた力価よりも遙かに高い力価のものを得ることに一応注目すべきで、ここにこれを付記して後々の批判を俟つことにする。

実 験

A. 「ツベルクリン」の精製

a) 材 料

1. 培 養 液

Sauton 培地を使用す。但し同培地の組成分たる「アスパラギン」を等量の「グルタミン酸ソーダ」を以て代用した。

2. 菌 株

人型結核菌 H₂ 株を用う。

3. 培 養

500c.c. 細口瓶に前記培養液 250c.c. 宛を分注し、100°C, 30分, 3回蒸気滅菌に付す。而うして培養瓶夫々に予め同培養液に8~10週培養せる菌体の一部を渦巻白金耳にて3白金耳ずつ約菌浮遊せしめたる後、瓶を傾斜し 37°C の恒温室に10~12週静置した。後悉々「ツベルクリン」を製造するに際して或る時はその儘、或るは 100°C, 1時間蒸気滅菌し、濾紙にて粗大菌体を除去、次いで松風製 Reichel 型細菌濾過器を用いて無菌ならしめ、その濾液を「ツベルクリン」の製造に供す。

b) 限外濾過装置

1. 限外濾過管

限外濾過管の作製は略々 Seibert⁹⁾ の記載せる方法に準じた。即ち些かその詳細を記すに次の如くである。

「エーテル、アルコール」に予め溶解せる「コロデオ」を平皿に注いで薄層となし、送風乾燥器を用い溶媒を完全に蒸発せしめて無色靱性の皮膜をつくらしめる。次いでこれを細片となし、10%「コロデオ」水醋酸液を用意、これに水洗乾燥せし Chamberland B 型濾過器 (2.4 × 20cm) を單に浸漬して全表面に「コロデオ」を附着せしめ、気泡の附着せざることを確めた後引上げて垂直に保持し、濾過管の下端より余滴が落ちざるに至り直ちに到立して、室温に約20分間静置、乾燥した。膜面に指を軽く触れても殆んど圧痕を止めざるに至り、30~40°C に保つた蒸溜水中に4~5時間浸漬、後膜面の醋酸を除去する目的を以て吸引ポンプに接続して蒸溜水を一晝夜通過せしめた。

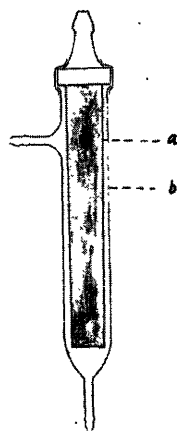
かかる方法によつて得られた限外濾過管は「コンゴ」赤を全く通過せしめてはならない。又 50mmHg の陰圧にて吸引する時、1時間に約 500cc の蒸溜水を通過せしめるものを以て適當とした。斯くて一旦作製せる濾過管は一には「コロデオ」膜面に微生物の發生することを避け、又一には徒らにその乾燥することを防ぐ目的を以て常に 1% 石炭酸水中にこれを保存した。

2. 限外濾過管用外套管

次いで前記限外濾過管に著者創意の外套管を裝備する。即ち外套管は直径 3cm, 長さ 22cm の吸引試験管の管底に径 8mm の細管を接続せるもので、側管は外套管内空気の排気管、後者は濾液補給管の役をなす(図 1 参照)。

この外套管に濾過管を収めた後、両者を外側より「ゴムチューブ」にて気密に持続した。これにより限外濾過管の膜面を保護すると共に、その全表面を終始有効に使用し、冷却能率を大にし、且つは最終的に被濾液の容積を極めて少量に迄濃縮することを以て目的とするものである。

附 図 1



a …限外濾過管

b …限外濾過管用外套管

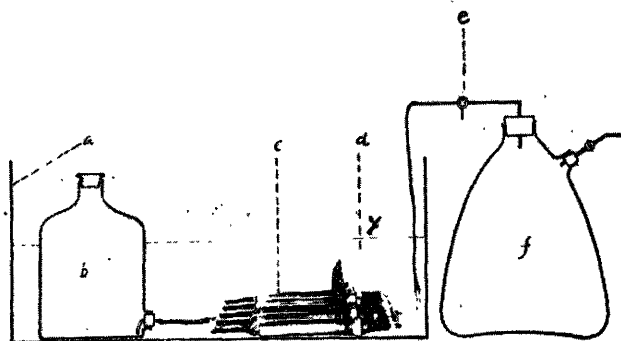
3. 同装置の運 転

外套管を装着した限外濾過管は使用に際し排気管を上方に向けて数本並列に置き、限外濾過管の濾過液排出口並びに外套管の補給管及び排気管を夫々分枝硝子管にて接続し、濾過液排出口は途中に三方括栓を有する眞

空用肉厚「ゴム」管にて大型吸引瓶に、外套管の補給管は「ゴム」管にて濾液補給瓶に接続した。排気管に接続せる分枝硝子管の他端には短

き「ゴム」管を附し、「ピンチコック」にて閉じた。次いで濾液補給瓶に培養濾液を満したる後排気管の「ピンチコック」を緩めると濾液は外

附 図 2



a …水 槽 b …濾液補給瓶 c …限外火過管
d …排 気 管 e …三方括栓 f …吸 引 瓶

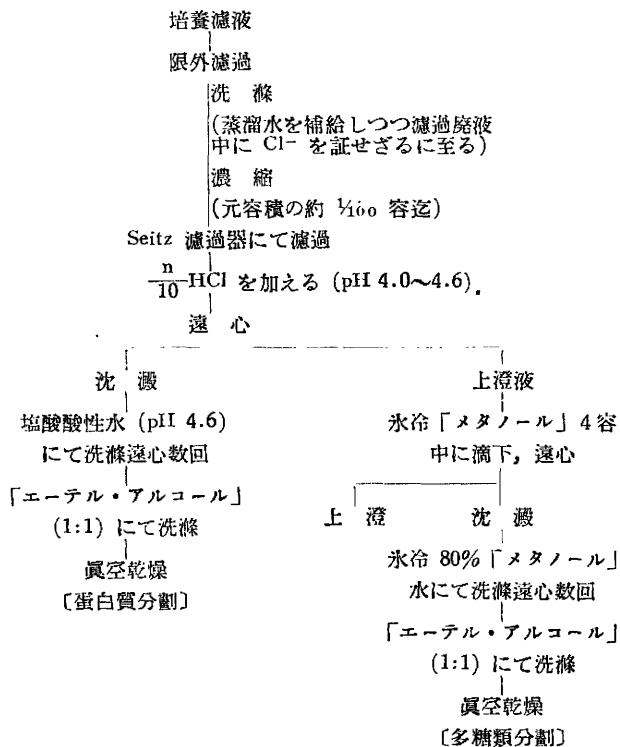
套管内に浸入し、外套管内の空気が排気管より駆逐される。濾液が外套管内及び排気管内をも充すに至れば「コック」を閉じる。斯くて吸引瓶を水流「ポンプ」にて陰圧とすれば培養濾液の限外濾過が行われ、濾液の補給は濾過によって生じた外套管内の陰圧により補給瓶の位置如何に不拘全く自動的に行われる。なお、吸引瓶及び限外濾過管との間に装備せる三方栓は精製操作の項で述べる如く、限外濾過排出液の一部を取り出しClの検査をする目的で取り付けられた(図2参照)。

c) 精製操作

前記結核菌培養濾液に食塩を1%の割に加え(時には更に精製石炭酸を0.5%に加えたこともあつた)、約50mmHgの陰圧で上述限外濾過管を通じ自動的に濾過した。この間濾過管は外套管と共に0~5°Cの氷水中に置かれた。最後に濾液が濃縮されて辛うじて外套管を充すに至れば蒸留水を補給して濾過を継続し、濾過液中にClを証明せざるに至り、蒸留水の補給を断つて、遂に元容積の約1/100容に迄濃縮した。濃縮液は更に念のためSeitz濾過器を用いてこれを濾過し、次いで左記別表の如き操作の下に処理して夫々の分割を得た。

蛋白質分割と記されたものが求める精製「ツベルクリン」である。

d) 精製「ツベルクリン」の收得量



加熱及び非加熱培養濾液より得たる精製「ツベルクリン」の収得量は第1表の如くである。

第1表： 精製「ツベルクリン」の収得量

培養濾液の処理	lot No.	収得量 mg/l	備考試料
加熱	1	171	1 l.
	2	152	1 l.
	3	155	1 l.
	4	270	2 l.
	5	400	4 l.
	6	515	3.5 l.
非加熱	1'	65	2 l.
	2'	14	1 l.

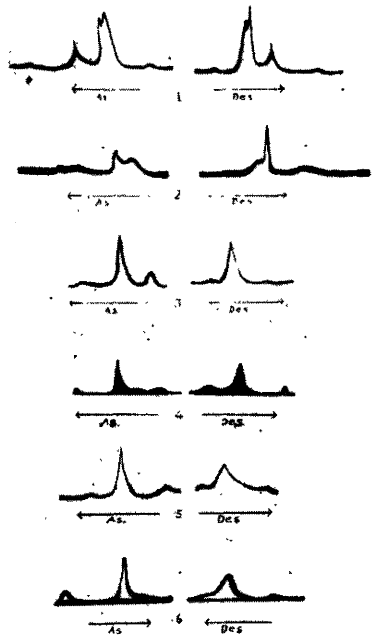
収得量の差は培養濾液中の精製「ツベルクリン」含有量よりもむしろ処理すべき濾液の量に関するものが甚だ大で、その量小なるときは比較的少量に物質が濾過膜面に吸着せられることによるものである。即ち濾液材料はこの装置では4立以上であることが望ましく、その量では400mg/lを容易に得られる。而も非加熱培養濾液からは明らかに加熱培養濾液に比して少量しか得られない。加熱に際し菌体内より「ツ」物質が多量に培養液中に移行することは近時多くの人の認める所である。

B. 精製「ツベルクリン」の化学的性状

a) 電気泳動法による精製度の追及

実験方法

附 図 3
各種「ツベルクリン」の電気泳動図



- 1 : 培養濾液
- 2 : 限外濾過濃縮液
- 3 : 精製「ツベルクリン」(著者)
- 4 : π (結核研究班業績集(10)より転載)
- 5 : TA₂ (同上)
- 6 : Protein C (Seibert (5)より転載)

この目的には日立製作所製 チセリウス装置 (Type IIT-A) を使用した。

各材料は予め次の如く処理した。

培養濾液は予め中性となしたる後約 1/20 容に逐減圧濃縮し、下記緩衝液を外液として水室内で透析した。

限外濾過濃縮液は前者同様に透析後緩衝液にて蛋白濃度 2% になる如く稀釈した。

精製「ツベルクリン」は緩衝液を用いて溶解し 1.5% とし、透析は行っていない。

透析条件 :

1/20mol 磷酸緩衝液, pH 8.0, μ=0.1,

透析膜, セロハン紙.

透析時間, 24時間.

泳動条件 :

緩衝液は透析に使用せるものと同じ,

マイクロセル使用,

電圧及び電流. 150V, 9mA,

水槽温度, 5°C,

泳動時間, 45分間.

実験結果

原料とせし培養濾液そのものは無論多峰性で種々な成分よりなつたが、上記の如き精製を加うに従い、漸次純化した。斯くて最後に得た蛋白分劃は単一な峰を形成するが易動度殆んど 0 に近い少量の多糖類と易動度の大きい微量の

核酸をなお含有した。

暫らくこれ以上の精製は避け難いものである。参考迄に掲げた Protein C, α_2 , γA_2 等のそれを併せ掲げるに全く同等に近いことが知られる。

b) 化学的性状

斯くして得られたる蛋白質分割は未だ無晶形塊状の沈澱物で、その色は暗褐色である。その脱色は色々試みたが容易ではない。但し空気に触れしめず乾燥するときは表面の褐変化を大いに防止し得る。

少量の「アルカリ」を介して蒸留水に溶解せしめ、1%水溶液となせば褐色透明に溶解し、蛋白沈澱剤(Sulfosalicyl 酸、三塩化醋酸、燐タングステン酸、ピクリン酸)にて再び帯褐灰白色の沈澱物となる。Ninhydrin, Millon, Biuret, Xanthoprotein, Adamkiewitz, Neubauer Rhode, Pauli 等すべて蛋白質の呈色反応を呈する。

N 含有量 10.5% (Mikro-Kjeldahl 法), Molisch 反応は僅微に陽性を呈し, P を 0.4% に検出した (Embden 法)。

C. 精製「ツベルクリン」の力価

実験方法

前記精製物質一但し種々なる lot のものを使用—を 0.5% 石炭酸加生理的食塩水に溶解し、0.1~0.2 γ がその 0.1c.c. に含有せらるるが如くした。又対照としては吾邦子研より特に分譲を受けた標準「ツベルクリン」2000 倍稀釈液 (lot No. 24) を使用した。

被接種者としては過去2カ年以内に B. C. G. を接種せる者を除外した。

皮膚反応実施方法は一般に準じ特に述べる要はない。

判定方法は注射後48時間における各反応を計測、発赤10耗以上を陽性とし、標準液と各材料との発赤比 (Ratio) を柳沢氏等¹¹⁾の第3法により求めた。

実験成績

48時間後における Ratio について見るに第2表の如くである。「ツベルクリン」の力価検定方法の中、柳沢等¹²⁾の提唱する人体皮内反応による力価試験において Ratio の合格範囲が 0.90

第2表： 精製「ツベルクリン」の力価

lot	Ratio	
	0.1 γ	0.2 γ
1	0.97	1.07
2	0.96	1.07
3	0.99	1.07
4	0.88	1.06

~1.10 であることを考慮すれば著者の得た精製「ツベルクリン」は 0.1 γ において、標準「ツベルクリン」2000 倍稀釈液 0.1cc と等力価

であると断言するも可成りと信ずる。

〔附〕

所謂多糖類分割中の「ツ」反応類似反応惹起物質について

我々の得た多糖類分割の中、或る lot は含窒量 0.4% (Micro-Kjeldahl 法) で、その 0.2 γ が標準「ツベルクリン」2000 倍稀釈液 0.1cc と等力価であつた。而して更に精製操作を反覆する時は次第に含窒量は減少し、同時に生物学的力価は低下するが、含窒量と力価とは必ずしも比例しないことは第3表の如くである。故に我々が観察した「ツ」反応類似反応惹起物質は特定の含窒物か或いはそれ以外のものか未だ明らかでない。

そもそも「ツ」多糖類が皮膚反応能力を欠くということは諸家^{13, 14)}の多く一致せる所である。我々の得た分割中には Seibert の Protein A, B の混在や緒論で述べた糟谷の β -Substance, Kallós の β -Tuberkulin の如き含窒素物の混在をも一応考慮せねばならないが、含窒量より見るにその力価は余りにも高く、少なく共蛋白の混入からは説明され難い。而も実験 lot においてはすべての蛋白反応は皆無に近かつたのである。又糟谷⁹⁾の phenol 性活性因子はその 1 γ が「ツベルクリン」2000 倍稀釈液 0.1cc と等力価であつたといひ、著者の得たるものとは力価が遙かに懸絶している。しかし目下その本体を把握するには至らず、この種結論を導くには頗る慎重を要するを以て著者の観察した所を仮に暫くその儘誌して將來の参考に資することとする。

第3表： 含量と力価との関係

分 割	接種量 γ	含 量		標準「ツベルクリン」2000 倍希釈液 0.1cc に対する Ratio
		γ	%	
所謂多糖 類分割	0.2	0.0012	0.6	0.73
		0.0008	0.4	0.99
		0.0	0.0	0.39
精製「ツ」	0.1	0.01	10.5	0.97

結 論

1. 著者は人型結核菌 H₂ 株の「ソートン」培地培養濾液より Seibert の限外濾過法を踏襲し、但し独特の外套管を使用することにより「ツベルクリン」活性因子の精製を試みた。

2. 本法は濾過能率を大いに高め、従つて操作迅速にして、又そのことが略々一定せる高力価の製品を得ることに幸した。

3. なお著者の所謂多糖類分割中に該分割が

些かの蛋白反応を呈せざりしにも不拘比較的強く「ツ」反応類似の皮膚反応を惹起し得ることを認めた。

欄筆するに当り終始御懇篤な御指導並びに屢々発表の機会を賜わつた恩師日置教授並びに電気泳動に際し御便宜を賜わりたる本学石川病理学教室各員に対し深甚の謝意を表す。

引 用 文 献

- 1) 貝原守一その他：「ツベルクリン」の本態に関する研究。福岡医学雑誌，36，597，1943。
- 2) H. Okamoto, : The preparation and properties of the o-Aminophenol azo-tuberculin derivative, Jap. Med. J., 3, 31, 1950.
- 3) 武田徳晴外2名：精製「ツベルクリン」蛋白に関する研究。(第2報)「精製ツ」の簡易精製法について。日本細菌学雑誌，6，369，1950。
- 4) R. J. Heckly and D. W. Watson, : An improved ultrafiltration apparatus, Amer. Rev. Tuberc., 63, 718, 1951.
- 5) F. B. Seibert, : The isolation of three different proteins and two polysaccharides from tuberculin by alcohol fraction. Their chemical and biological properties, Amer. Rev. Tuberc., 59, 87, 1949.
- 6) P. Kallós und G. Hoffmann, : Über Darstellung und chemische Eigenschaften eines aus der Nährbouillon von Tuberkulosekulturen isolierten biologisch wirksamen Körpers β-Tuberkulin, Biochem. Z., 266, 132, 1933.
- 7) I. Kasuya, : On the differentiation of B. C. G. inoculated and naturally infected individuals with polysaccharide and polypeptide fraction of tuberculin, Jap. Med. J., 3, 353, 1950.
- 8) 構谷伊佐久その他：非蛋白性ツベルクリン活性因子の研究。文部省科学研究費，総合研究結核委員会報告，昭和28年7月11日。
- 9) F. B. Seibert, : The chemical composition of the active principle of tuberculin, XI. An improved and simplified method for making a standard undenaturated tuberculin of any desired strength and a method of chemical assay, J. Biol. Chem., 78, 345, 1931.
- 10) 文部省科学研究費結核研究班業績集，第1輯，ツベルクリンに関する研究。
- 11) 柳沢謙・浅見望：ツベルクリンの力価試験に関する研究，第2報，人体の皮内反応による力価試験の検討に用いる発赤の Ratio の計算方法。結核，27，62，1952。
- 12) 柳沢謙・浅見望：ツベルクリンの力価試験に関する研究，第3報，人体の皮内反応による力価試験。結核，27，113，1952。
- 13) M. Stacey and P. W. Kent, : Polysaccharides of mycobacterium tuberculosis, Advances in Carbohydrate Chemistry, 3, 311, 1948.
- 14) F. B., Seibert, : Constituents of Mycobacteria, Ann. Rev. Microbiology, IV, 35, 1950.