

洗滌結核菌のクエン酸溶液中 Tuberculin 產生現象に関する研究

第 12 報

Citrate-Tuberculin から分離された Tuberculin 蛋白の 生物学的活性についての吟味

金沢大学結核研究所薬理製剤部 (主任：伊藤 亮教授)

細 川 孝 一
木 越 茂

(受付：昭和32年6月21日)

緒 言

前回藤原は⁽¹⁾洗滌結核菌をクエン酸溶液中に浸漬して得られる所謂“Citrate-Tuberculin”(CIT)⁽²⁾を原料として、Tuberculin (T) 活性物質の分離を試みて遂に硫酸分劃法によつて CIT から 3つの蛋白分層 (Am-I-, Am-II-及び Ac-Fraction) を分離したのであるが、その生物学的性状についての検索で、H₂ 菌感染結核モルモットに対する T 皮膚反応試験では Am-I-Fraction が最も強力な T 皮膚反応惹起力を示し、o-Aminophenol Azo-Tuberculin のほぼ

2 倍に匹敵する T 活性を有することを報告した。

一般には T 感作動物に対する皮膚反応惹起力による T 活性の比較実験では、動物感作に使用した抗原の相違や動物の感作の程度等が皮膚反応の結果に大きく影響するとせられているのであるが⁽³⁾、私たちは今回上記 3 蛋白分層を以つて諸株結核菌を接種した感作モルモットに対する皮膚反応試験を行つて各蛋白分層の生物学的性状の差異関係を相互に比較検討した。

実験材料及び方法

1) Tuberculin Protein Fraction.

T 標品としてさきに藤原が人型結核菌青山 B 株の洗滌菌体から作られた CIT を原料として分離した Am-I-, Am-II-及び Ac-Fraction を使用。各 Fraction 10mg を 0.1N NaOH の少量添加によつて滅菌生理的食塩水 10ml に溶解せしめたものを T 原液として氷室に保存し、必要に臨んで該原液を生理的食塩水で適宜希釈して用いた。

2) 菌株

動物感作に使用した結核菌は、人型菌 2 株 (H₂, 青

山 B) と牛型菌 2 株 (BCG, No. 10) で、何れも Sauton 培地に培養。

3) 動物感作

上記 4 株の結核菌について、各菌株ごとに夫々 2—4 週間 Sauton 培養から菌体を取り、食塩水 (H₂, 青山 B, 牛型 No. 10) 又は流動パラフィン (BCG) で菌浮游液を作り、菌量 0.2mg (湿量) に相当する菌浮游液を体重 400gm 前後の健康白色モルモットの鼠蹊部皮下に接種した。而してこれら動物はすべて菌接種後 3 週以後に皮膚反応試験に使用した。

4) T皮膚反応比較試験

上記3 Fraction のT活性を比較するには Am-I-Fraction を規準としてこれと Ac-或は Am-II-Fraction との力価の比較を同一動物について次の様に行つた。

比較しようとする2 T標品について夫々の原液から

生理的食塩水で適宜の稀釈液列を作り(稀釈液 0.1ml 中にT蛋白 0.0002—0.005mg を含有), それら2稀釈液列の各0.1ml 宛を同一モルモットの一方の側腹部に同時に皮内注射を行つた。注射後24及び48時間目に皮内反応の大きさ(発赤, 浸潤)を測定した。

結 果

第1表は人型結核菌 H₂ 感染の結核モルモットに対する, Am-I-, Am-II-及びAc-Fraction のT活性を相互に比較したT皮膚反応試験の成績を示したものである。

この成績から, Am-I-Fraction と Ac-Fraction との比較試験では Am-I-Fraction の0.001 mg と Ac-Fraction の0.005mg とが皮膚反応惹起力に於てほぼ相匹敵すること, 一方 Am-I-Fraction と Am-II-Fraction の比較試験では Am-I-Fraction の0.001mg が Am-II-Fraction の0.002mg と同効であることが明かである。即ち3 Fraction のT活性の比較関係がほぼ Am-I: Am-II: Ac = 5: 2: 1 であると言える。

第2表は青山B株接種のモルモットに対する3 Fraction のT活性についての比較試験の成績を示したものであるが, ここでも3 Fraction がT皮膚反応惹起力に於て第1表と全く同一の力価関係を示すことが実証された。

第3, 第4表は夫々牛型結核菌 No. 10並びに BCG 株を以つて感作したモルモットに対するT蛋白 Fraction の効力比較試験の成績表であつ

て, 牛型結核菌を接種した何れの動物群に於ても亦 Am-I-Fraction がT活性では最強で, Am-II-Fraction 之に次ぎ, Ac-Fraction は最も弱く, 而もその力価の比較関係も前記人型結核菌接種モルモットと同一の成績であつた。ここで特に注目すべきは, 人型結核菌から得た精製T蛋白が牛型結核菌で感作された動物に対しても強大なT活性を示し, 而も, T活性の異つた3つのT蛋白 Fraction の力価関係が人型結核菌接種動物群に於て得られたと全く同じ関係にあるということである。

第5表はBCG接種モルモット群中, 極めて高いT感作度を示した動物に於ける3 Fraction のT皮膚反応試験の成績である。即ち Am-I-Fraction の0.002mg の注射によつて動物は著大な皮膚反応を呈したのであるが, この場合でも, Am-I-, Am-II-及びAc-Fraction の相互の力価関係は感作度のより劣つた動物群で得られた上述の試験成績と全く同一の関係を示した。

考 按

T皮膚反応の人体に於ける実地応用上の目的が結核感染者と非感染者の鑑別を主眼としていることは言を俟たない処であつて, この為, 使用Tが個体の感作抗原として使用した結核菌株の種類によつて影響されることなくすべての場合に等しく反応力を発揮しうるものであること即ち生物学的特異性のないことが第一条件とし

て要請されるわけである。本研究によつて, 人型結核菌青山B株から精製分離された Am-I-Fraction が人型, 牛型何れの菌株で感作された動物であつても, 同じように強力なT皮膚惹起力を示すことが実証されたのであるが, このことは Am-I-Fraction の人体T検査への応用上注目すべき成績というべきである。

結 語

人型結核菌青山B株から得られた Citrate-Tuberculin を原料として分離されたT蛋白分層 (Am-I-, Am-II-, Ac-Fraction) のT皮膚反応惹起力を、4株の結核菌(青山B, H₂, 牛型 No. 10, BCG) を以つて感作した モルモット群について相互に比較検討して次の結果を得た。

1) T皮膚反応惹起力では Am-I-Fraction が最強で、何れの動物群に於ても感作度の高い

動物ではその 0.0001mg でも尚よく強い皮膚反応を惹起せしめる。Am-II-Fraction のT活性は Am-I-Fraction よりやや弱くその約 $\frac{1}{2}$ 程度であり、Ac-Fraction は最も弱く Am-I-Fraction の $\frac{1}{4}$ 程度である。

2) 動物に対するこれら 3 Fraction のT活性の力価関係は接種した菌株の相違や動物の感作度の高低によつて殆んど影響されない。

文 献

1) 藤原紫朗：金大結研年報，14 (下)，325, 1956. 2) Ito, R.: Amer. Rev. Tuberc., 67,

526, 1953. 3) Seibert, F. B., and Dufour, E.: Amer. Rev. Tuberc., 58, 363, 1948.

Table 1

Comparison of skin reactions with different tuberculin protein fractions in guinea pigs sensitized with H₂ strain

Guinea pig no.	Fraction	Dose (r)	Skin reaction (mm)
1	Am-I	0.5	$\frac{10 \times 12}{10 \times 12}$
		1	$\frac{13 \times 15}{13 \times 15}$
	Ac	1	$\frac{8 \times 10}{7 \times 9}$
		2	$\frac{12 \times 13}{11 \times 12}$
		5	$\frac{13 \times 14}{13 \times 14}$
		5	$\frac{13 \times 14}{13 \times 14}$
2	Am-I	1	$\frac{15 \times 17}{9 \times 11}$
		2	$\frac{19 \times 20}{12 \times 13}$
	Am-II	1	$\frac{13 \times 15}{9 \times 10}$
		2	$\frac{14 \times 16}{10 \times 12}$
		2	$\frac{14 \times 16}{10 \times 12}$
		2	$\frac{14 \times 16}{10 \times 12}$

The figures on the top lines in the skin reaction column indicate the 24 hour readings and the figures on the lower lines the 48 hour readings.

Table 2

Comparison of skin reactions with different tuberculin protein fractions in guinea pigs sensitized with Aoyama B strain

Guinea pig no.	Fraction	Dose (r)	Skin reaction (mm)
3	Am-I	0.5	$\frac{13 \times 16}{10 \times 10}$
		1	$\frac{16 \times 16}{13 \times 13}$
	Ac	1	$\frac{12 \times 12}{6 \times 6}$
		2	$\frac{14 \times 17}{10 \times 11}$
		5	$\frac{17 \times 18}{14 \times 14}$
		5	$\frac{17 \times 18}{14 \times 14}$
4	Am-I	0.5	$\frac{10 \times 11}{10 \times 10}$
		1	$\frac{13 \times 15}{12 \times 13}$
		2	$\frac{15 \times 16}{15 \times 15}$
	Am-II	0.5	$\frac{5 \times 7}{5 \times 6}$
		1	$\frac{10 \times 12}{9 \times 12}$
		2	$\frac{14 \times 16}{12 \times 13}$
		2	$\frac{14 \times 16}{12 \times 13}$
		2	$\frac{14 \times 16}{12 \times 13}$

Table 3

Comparison of skin reactions with different tuberculin protein fractions in guinea pigs sensitized with bovine tubercle bacillus, No. 10 strain

Guinea pig no.	Fraction	Dose (r)	Skin reaction (mm)
5	Am-I	1	16 × 16 12 × 15
		2	16 × 17 15 × 19
	Ac	2	10 × 14 11 × 12
		5	15 × 15 14 × 15
		10	16 × 17 16 × 18
6	Am-I	1	15 × 15 15 × 15
		2	16 × 16 15 × 17
	Am-II	1	12 × 13 13 × 13
		2	14 × 15 14 × 15
		5	15 × 18 16 × 17

Table 4

Comparison of skin reactions with different tuberculin protein fractions in guinea pigs sensitized with BCG

Guinea pig no.	Fraction	Dose (r)	Skin reaction (mm)
7	Am-I	1	16 × 19 13 × 14
		2	17 × 18 15 × 20
	Ac	2	13 × 16 5 × 7
		5	18 × 19 12 × 13
		10	22 × 23 16 × 20
8	Am-I	1	13 × 13 12 × 13
		2	14 × 15 12 × 15
		5	16 × 20 15 × 18
	Am-II	1	6 × 7 6 × 6
		2	12 × 13 12 × 12
		5	14 × 17 12 × 14

Table 5

Comparison of skin reactions with different tuberculin protein fractions in guinea pigs sensitized with BCG

Guinea pig no.	Fraction	Dose (r)	Skin reaction (mm)
9	Am-I	0.2	19 × 19 17 × 18
	Ac	0.2	13 × 15 10 × 12
		0.4	15 × 15 13 × 14
		1	18 × 19 17 × 17
10	Am-I	0.2	19 × 19 17 × 17
	Am-II	0.2	15 × 15 12 × 14
		0.4	16 × 17 15 × 16
		0.6	17 × 18 16 × 17