

結核免疫に関する研究 第1報

人型結核菌々體蛋白の免疫學的性狀に関する研究

第1篇 人型結核菌々體蛋白の分離に就て

金澤大學結核研究所細菌免疫部 (主任 柿下教授)

藏 尙 之

(受付昭和24年9月20日)

Hisayuki Kura : -Immunological Studies in Tuberculosis. Report I. Studies on the immunological Properties of the Protein of Human Tubercle Bacilli. Part I. Separation of the Protein of Human Tubercle Bacilli.

緒 言

結核免疫の成立に死菌を以てするや、或は生菌を用ふるやの問題に關しては、古くより、死菌は免疫力極めて微弱にして、生菌を以てしては、毒力復歸の憂なき能はず、依つてかゝる缺點を排除し強力なる免疫發現の途を講ずるべく各種の研究が行はれてゐる。

近時化學に立脚せる免疫學の發達に伴ひ、菌體に化學的或は物理的操作を加へ、理學的性質の異なる物質、主として、類脂體、蛋白質、含水炭素の三者を分離し、其の各に就て、免疫學的研究が行はるゝに至つた。

かくの如き菌體構成有機成分は病原菌が病原性を發揮するに當り、種々なる役目を荷つてゐると考へられ、之等の成分の本態を究むることは、總ての傳染病の病機を明かにするため必要なるのみならず、治療及び豫防手段を講ずるに當つて重要な論を俟たない。

従來菌體の處理方法として、自家融解作用を利用して、水を以て浸出せるもの、物理的操作を加へて機械的に抽出せるもの、或は化學藥劑又は消化酵素を以て處理せんとするもの等がある。而して、結核菌類脂體に關しては米國に於ける Anderson¹⁾一派の廣範にして而も系統的な研究があるが、蛋白質に關しては、比較的早くより其の研究に着手せられてゐるが、今日尙目醒しい進歩はない様である。

結核菌々體抽出物の化學的分析的研究として、Ruppel²⁾は乾燥結核菌より、核蛋白、核酸其の他を分離し、Weyl³⁾は結核菌體を、アルカリで處理し、酸を加へて生ずる沈澱を核蛋白と考へ、Levine⁴⁾も脱脂菌體から核酸の性質を有する物質を得てゐる。

Zinsser, Parker⁵⁾は結核菌、チフス菌其の他の菌體を乾燥磨碎し、アルカリ性の水で抽出し、更に醋酸及び苛性曹達を以て、種々の pH となし沈澱を生ぜしめ、所謂殘餘抗原につき、皮膚反應實驗を試み、又 Toenniessen⁶⁾ Petroff⁷⁾等は菌體のアルカリ又は酸浸出液に醋酸を加へて有効蛋白を得た。Coghil⁸⁾は室溫にて、冷エーテルを以て脂肪を除き、更に室溫にて、蒸溜水を以て浸

出し、醋酸、苛性曹達に依る沈澱、溶解を繰返し、白色の粉末を得た。尙5%の食鹽水で2週間以上時々振盪しながら抽出し、遠心分離せる上澄液を透析した後に、硫酸アムモンで飽和沈澱せる水可溶性蛋白を得てゐる。次に残りの菌體を0.5%苛性曹達で抽出し、醋酸で蛋白を沈澱せしめ、アルカリ可溶性蛋白を得た。

吾が國に於ては、長瀬⁹⁾はチフス菌等につき、平井¹⁰⁾は大腸菌につき、牛圓¹¹⁾はチフス菌其の他につき、弱アルカリで菌體を浸出し、醋酸其の他を以て弱酸性となし、核蛋白を分離して實驗に供してゐる。

以上の如く、菌體蛋白の分離には、蒸水、酸及びアルカリ等が用ひられ、之等を以て抽出すれば、可溶性蛋白質が得られ、次に、酸、アルカリに依る沈澱溶解を繰返して、精製核蛋白を得てゐる。

私は結核菌々體蛋白の免疫學的意義を究明すべく、各種條件の下に、結核菌體より蛋白を分離し、岩崎教授¹²⁾に依つて考案せられた「アツオトメーター」を用ひて、 N_2 量を測定し、抽出法を比較し、菌體蛋白分離の諸條件を決定せるを以て、其の大様を此處に報告する次第である。

實 驗 方 法

本實驗に使用せる結核菌は Sauton 培地に培養せる當教室保存の人型結核菌 H_2 株である。

菌體は Sauton 培養10週後、コッホ釜にて1時間加熱滅菌し、菌體を漏別し、滅菌蒸溜水にて數回菌體を洗滌し、濾紙間に挟み、水分を吸収せしめたるものを濕潤菌として、直ちに使用せり。

脱脂溶媒は、無水アルコール、エーテル(麻醉用)及びクロ、ホルム(麻醉用)を用ひた。

脱脂法は、一部室温にて處置せるも、主として、Soxhlet 脂肪浸出器を使用した。菌體蛋白抽出には、蒸溜水、0.5%食鹽水、0.3%醋酸、 $N/5$ 及び $N/10$ 鹽酸、 N 、 $N/10$ 、 $N/30$ 及び $N/100$ 苛性曹達を用ひた。

抽出法は、約 50cc 容量の三角コルベンに秤量せる菌體を入れ、上記抽出液を加へ、種々の條件の下にて、抽出を行ひ、ザイツ細菌濾過器にて濾過し、其の 1cc をとり、 $NaBrO$ を作用せしめ發生する N_2 を「アツオトメーター」に依り測定して比較検討した。

實 驗 成 績

(1) 結核菌々體蛋白抽出に及ぼす脱脂の影響に就て

結核菌々體成分中に多量のリポイドを含有してゐることは、Hammerschlag¹³⁾、Doan、Sabin、and Forkner¹⁴⁾ Coghill 等の研究に依つても明かな處で、伴等¹⁵⁾は結核菌蛋白の分離に際し、菌體より類脂體を除去する爲入念な検討を行つてゐる。余は次の如き方法に依つて脱脂の影響を比較した。

一定量の乾燥結核菌に、アルコール又はエーテルを加へ、室温にて48時間作用せしめ、濾別後脱脂菌體を $N/10$ 苛性曹達液を以て48時間室温に於て作用せしめ、濾液の N_2 量を「アツオトメーター」にて測定せしに、第1表に示す如く、エーテル脱脂菌は、アルコール脱脂菌或は非脱脂菌に比し最も高い値を示した。此處に於て、4種の脱脂溶媒を用ひて同様に處置して比較せしに、

第2表に示す如く、エーテル脱脂菌よりの N₂ 抽出最も多く、次はアルコール、エーテル等量液を以て脱脂せる菌體より抽出せるものであつた。

第 1 表

乾燥結核菌量	脱脂劑及量	脱脂時間(室温)	抽出液及量	浸出時間(室温)	N ₂ 量(mg%)
0.50g	アルコール(30cc)	48時間	N/10NaOH(20cc)	48時間	13.90
"	エーテル(30cc)	"	"	"	15.40
"	"	"	"	"	11.29

第 2 表

乾燥結核菌量	脱脂劑及量	脱脂時間(室温)	抽出液及量	浸出時間(室温)	N ₂ 量(mg%)
0.40g	アルコール(20cc)	48時間	N/10NaOH(20cc)	48時間	12.7
"	エーテル(20cc)	"	"	"	14.3
"	アルコール(10cc)	"	"	"	13.6
"	エーテル(10cc)	"	"	"	12.9
"	クロ、ホルム(20cc)	"	"	"	12.9

(2) 菌體蛋白抽出に對する濕潤菌と乾燥菌との比較

可及的充分に水分を吸収せる非脱脂菌の 1.5瓦を 2 個のコルペンに分け、一つは濕潤菌のまま 20cc のアルコールを投じ、一つは 60°C にて低溫乾燥し、乳鉢中にて磨碎し、乾燥菌として秤量し、20cc のアルコール中に投じ、兩者共室温にて 48 時間脱脂を行ひ、分離後菌體を乾燥し、次で 20cc の N/10 苛性曹達を以て、60°C の水浴中にて 1 時間浸出を行つた。其の結果は第 3 表の如く、濕潤菌より抽出せるものでは、19.38mg%，乾燥處置せるものでは、12.77mg% である。

第 3 表

濕潤結核菌量	乾燥結核菌量	脱脂劑及量	脱脂時間(室温)	抽出液及量	浸出温度	浸出時間	N ₂ 量(mg%)
1.50g		アルコール(20cc)	48時間	N/10NaOH(20cc)	60°C	1時間	19.38
"	0.493g	"	"	"	"	"	12.77
1.00g		"	24時間	"	37°C	48時間	19.92
"	0.375g	"	"	"	"	"	15.24

次に浸出温度を 37°C 浸出時間を 48 時間とした場合に於ても濕潤菌よりの N₂ 浸出量は乾燥菌よりも多かつた。

(3) 各種抽出液の比較

濾紙にて水分を充分吸収せし濕潤結核菌を Soxhlet 脂肪浸出器にて、アルコール、エーテル等量液を以て 30 時間脱脂を行ひ乾燥せしめたる菌體より前記蒸留水、0.5% 食鹽水、0.3% 醋酸、N/5 及び N/10 鹽酸、N、N/10、N/30 及び N/100 苛性曹達を以て菌體蛋白を抽出比較せり。其の結果は、第 4 表に示す如く、何れの温度に於ても、苛性曹達、鹽酸共に濃度の高い程抽出 N₂ 量

第 4 表

抽出液種類	N ₂ (mg%)		
	抽出温度並時間		
	37°C	60°C	室 温
	24時間	1時間	48時間
蒸 溜 水	2.25	3.17	0.81
0.5% 食鹽水	6.23	3.94	1.18
0.3% 醋 酸	3.41	2.44	2.67
N/10 鹽 酸	6.54	6.37	5.69
N/5 鹽 酸	10.01	17.37	9.22
N/100 苛性曹達	7.41		2.63
N/30 "	14.14	13.75	12.80
N/10 "	29.27	21.13	20.40
N "			50.80

大にして、苛性曹達は鹽酸より優秀である。而して、醋酸、食鹽水、及び蒸溜水等では、かゝる抽出法を用ふる限り其の N₂ 量は極めて少ししか得ることが出来ない。

先に Diens¹⁶⁾ 等及び Johnson and Renfrew¹⁷⁾ はアルカリ性溶媒を用ひて抽出せる蛋白體は蒸溜水を用ひたるものに比し "T" 活性又は補體結合性は弱いと述べてゐるが、余は抽出蛋白體の抗原性の吟味に關しては後篇に譲る。

(4) 浸出温度に依る比較

第4表に於て、室温48時間、37°C 24時間、60°C 1時間を比較するに何れの抽出液を用

ふるも高温に於て N₂ の得量高きを知つた。依つて更に浸出温度と浸出時間の關係を追究し、抽出液を N/10 NaOH とし、温度並に時間を次の6種に分類した。即ち、室温48時間、氷室48時間、37°C 24時間及び48時間、60°C 1時間、60°C 10時間それぞれ浸出を行ひ、其の結果は第5

第 5 表

脱脂菌量	抽出液及量	浸出温度	浸出時間	N ₂ 量 (mg%)
0.40g	N/10NaOH(20cc)	氷 室	48時間	8.70
"	"	室 温	"	15.94
"	"	37°C	24時間	20.40
"	"	"	48時間	34.25
"	"	60°C	1時間	25.33
"	"	"	10時間	64.80

第 6 表

脱脂菌量	抽出液及量	浸出温度	浸出日數	N ₂ 量 (mg%)
0.40g	N/10NaOH(20cc)	室 温	1 日	11.94
"	"	"	2 日	15.76
"	"	"	4 日	29.50
"	"	"	7 日	35.60
"	"	"	14 日	46.10

にて、48時間時々振盪を加へながら浸出を行ひ、次で強力遠心し、其の上澄液をザイツ濾過器にて濾過し、濾液につき N₂ 量を測定するに、第7表に於て示す如く、50.23mg%を得た。之を第1回浸出液とす。次に沈渣に再び 50cc の N/10 苛性曹達を加へ、37°C の孵卵器中にて24時間浸出を行ひ、前同様にして第2回浸出液を得た。かくの如く浸出を繰返し、第3回、第4回の浸出液を得て、其の都度 N₂ 量を測定するに、第2回浸出液より急激に N₂ 量は減少し、第4回浸

表に示す如く、60°C 10時間浸出せるもの 64.80mg% で最高を示し、37°C 48時間では 34.25mg% 同様に24時間では 20.40mg%、60°C 1時間では 25.33mg%、室温48時間では 15.94 mg%、氷室では僅かに 8.70mg% の N₂ 量を得るに過ぎなかつた。次で同一條件にて、室温浸出日數を1日より2週間に亘り5回検査せしに、第6表に示す如く浸出日數に平行して N₂ の得量を増すことを知つた。

(5) 抽出を繰返すことに依り得らるゝ N₂ 量

脱脂菌 1.0瓦をとり、N/10 苛性曹達 50cc を以て、37°C の孵卵器中

第 7 表

脱脂菌量	抽出液及量	浸出温度	浸出時間	N ₂ 量 (mg%)
1.0g	N/10NaOH(50cc)	37°C	48時間	50.23
沈 渣	"	"	24時間	6.72
"	"	"	"	3.89
"	"	"	"	1.93
0.60g	N/10NaOH(30cc)	室 温	10日間	34.60
沈 渣	"	60°C	1時間	14.71
"	"	"	"	7.18

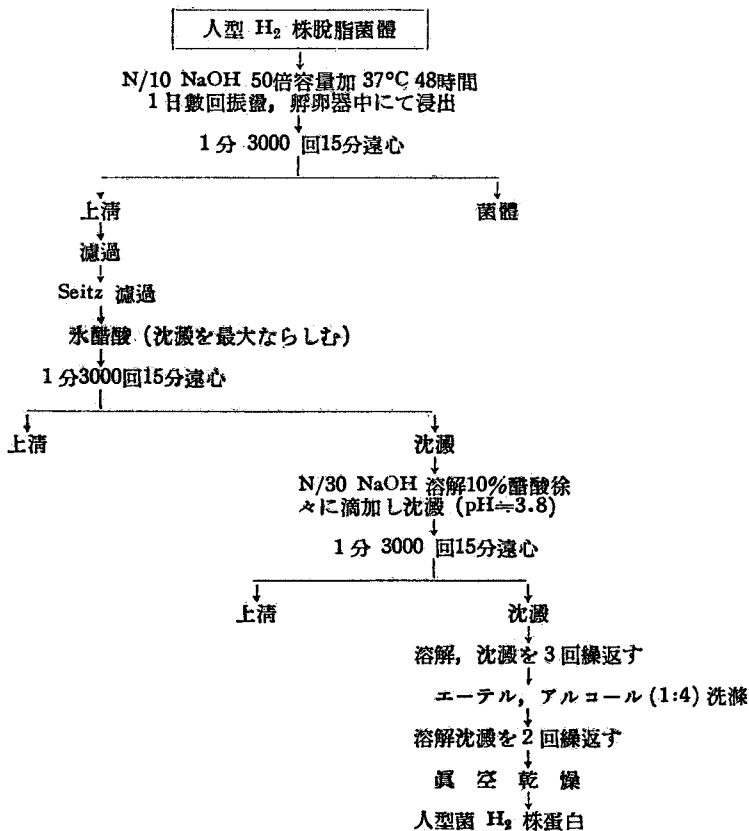
(6) 菌體蛋白の精製法に就て

濕潤菌體を濾紙筒に包み、Soxhlet 脂肪浸出器に挿入し、先づアルコール、エーテル等量液を以て、80°C~85°C の水浴にて、7日間(3日目液を更新し)毎日約10時間宛抽出を行ひ、次にクロホルムを以て、70°C~80°C の水浴にて、3日間毎日10時間宛抽出を行ひて得たる脱脂菌を除濕器中にて乾燥し、乳鉢にてよく磨碎し、白堊狀の輕き粉末を得る。此の脱脂せる乾燥菌に50倍量の N/10 苛性曹達を加へ、振盪を繰返しながら、37°C の孵卵器中にて48時間浸出し、遠心上澄液を濾過後、Seitz 濾過器にて濾過し、黄色透明なる液を得る。之に氷醋酸を加へて沈澱

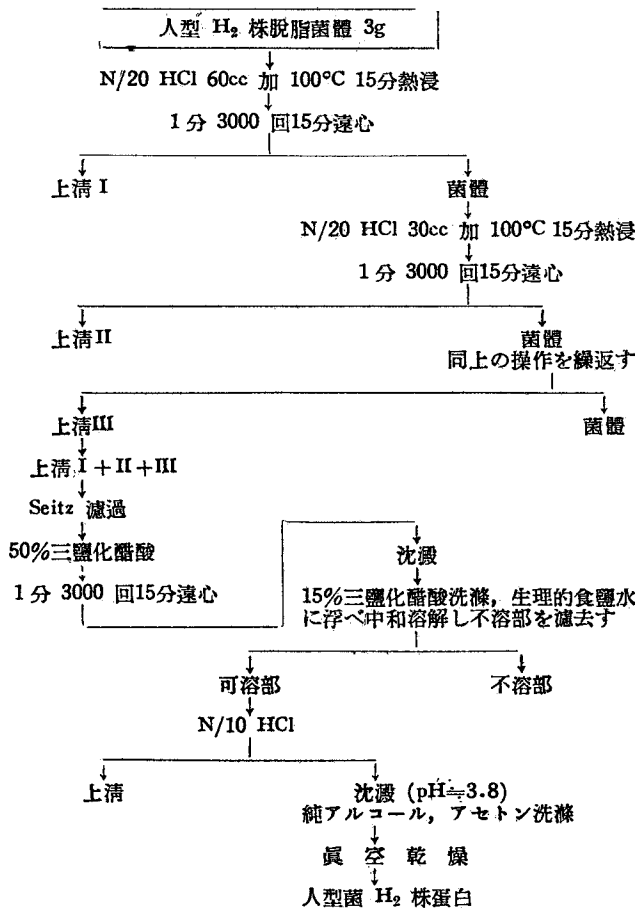
出液では僅かに 1.93mg% を得るに過ぎない。

次に前回と同じ方法を室温にて10日間浸出を行ひ、更に 60°C 1時間浸出を2回繰返した。其の結果第1回浸出液にて 134.60mg%。第2回 14.71mg%、第3回 7.18mg% と漸次 N₂ 量の減少するを知つた。

第 8 表



第 9 表



を最大ならしめ、遠心上澄液を除き、沈澱に N/30 苛性曹達を加へ溶解せしめ、更に 10% 醋酸を徐々に滴加し、pH ≒ 3.8 にて沈澱を繰返すこと 3 回、沈澱をエーテル、アルコール (1:4) を以て洗滌し、前向様の溶解、沈澱を 2 回繰返し、遠心分離し、眞空乾燥装置にて恒量となるまで乾燥せり。

尙石井¹⁹⁾は牛型結核菌につき、アルコール、エーテルで脱脂を施し、N/20 鹽酸を以て 100°C 30分熱浸を繰返して、三鹽化醋酸を以て有効成分の分割を行ひ、森谷¹⁹⁾は人型結核菌 F 株を用ひて、脱脂を行はず、そのまゝ N/20 鹽酸を以て、100°C 15分熱浸を繰返し蛋白フラクションを抽出せり。余は人型結核菌 H₂

株を以て前記方法に依り脱脂せる菌體につき、石井、森谷等の方法に依り、結核菌々體蛋白の精製を行へり。其の術式は第 8, 9 表に示せり。

第 10 表

反 應	抽 出 法	
	N/10 NaOH	N/20 HCl
Hellersche Probe	+	+
Sulfosalcilsäureprobe	+	+
Pikrinsäure probe	+	+
Xanthoprotein reaktion	+	+
Millonsche Reaktion	+	+
Biuret reaktion	+	+
Reaktion von Molisch	+	+
N ₂ (mg%)	13.5	11.2

(7) 余の抽出せる菌體蛋白の性状

前節に於て述べた如く、N/10 苛性曹達及び N/20 鹽酸を以てそれぞれ菌體蛋白を分離精製し、淡褐色の粉末を得た。本物質を N/10 苛性曹達の少量を加へたる生理的食鹽水にて 0.1% の溶液となし、蛋白反應並に N₂ を定量せり。其の結果は第 10 表に示す如く、何れの抽出液に依るも精製菌體蛋白溶液は 7 通りの蛋白定性反應は總て陽

性にして、N₂ 量は精製菌體蛋白にあつても、NaOH を抽出液として使用せし場合は、HCl を用ひる場合に優ることを知つた。

總括並に結論

余は結核菌々體蛋白の免疫學的性狀を研究せんが爲先づ菌體蛋白分離法に就て、「アツオトメター」に依つて測定し得る N_2 量を目標として、抽出條件に對し色々の吟味を加へ、次の様な結果を得た。

(a) 結核菌菌體蛋白の分離には、脱脂菌を以て處置する方が非脱脂菌を以てするよりも抽出が容易である。

(b) 脱脂溶媒として、エーテルはアルコール及びクロ、ホルムに優さる。

(c) 菌體は濕潤状態に於て處理する方がよい。

(d) 蛋白抽出に使用すべき溶媒はアルカリが最も良く、 $N/10$ 苛性曹達を以て適當と考へる。

(e) 抽出温度並に期間は、 $37^{\circ}C$ 48時間又は室温 1 週間以上抽出するを要する。

(f) $37^{\circ}C$ 48時間の抽出に依つて殆ど大部分の菌體蛋白を得るので、残渣につき抽出を繰返す要はない。

(g) 抽出能力と温度との關係は極めて密接にして、温度を高めることに依り、抽出能力は高まる。

(h) 脱脂菌に對し、 $N/10$ 苛性曹達を以て $37^{\circ}C$ にて、又 $N/20$ 鹽酸を以て $100^{\circ}C$ に於て各分離精製せる蛋白につき、蛋白反應、Molisch 反應を検するに何れも陽性にして、其の窒素量前者は 13.5%、後者は 11.2%であつた。

以上の結果から余は結核菌々體蛋白の分離方法を次の如く決定した。

濕潤菌體に重量の約50倍容量のアルコール、エーテル等量液を加へ、ソックスレット装置に依り充分脱脂し、次で $N/10$ NaOH を脱脂菌量の50倍容量加へ、時々振盪しながら、 $37^{\circ}C$ 48時間もしくは、室温 ($15^{\circ}C \sim 20^{\circ}C$) にて1週間以上浸出し、次で菌體を濾別し、ザイツ濾過器にて濾過せる濾液を醋酸にて沈澱せしめ、更に $N/30$ NaOH 及び10%醋酸を以て溶解沈澱を3回以上繰返して精製し、乾燥して精製結核菌々體蛋白を得た。

文 獻

- 1) Anderson : Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe, 1939.
- 2) Ruppel, W. G., : Zschr. f. physiol. Chem., 1898/99, 26, 218.
- 3) Weyl, T., : Deut. med. Wschr., 17, 256, (1891).
- 4) Levine, P. A., : J. med. Reseach, VI : 251, (1904).
- 5) Zinsser, H. and Parker, J. T., : J. exp. Path. 1925, 6, 197.
- 6) Toeniessen, E., : Deut med. Wschr., 1924, 50, 629.
- 7) Petroff, S. A., : Amer. Rev. Tuberc., 7, 412, (1923).
- 8) Coghill : J. of Biol. Chem., Vol. 70, 1926.
- 9) 長瀬 : 實驗醫誌, 14, 396, (昭和5年).
- 10) 平井 : 日本微生物病理學雜誌, 第24卷, (昭和5年).
- 11) 牛岡 : 十全醫學會雜誌, 39卷, 2141, (昭和9年).
- 12) 岩崎 : 十全醫學會雜誌, 42卷, 9 號, 第1報, 第2號, (昭和12年).
- 13) Hammerschlag : Cent. f. Klin. Med., 1891.

- 14) Doan, Sabin, and Forkner, : J. Exp. Med., Vol. 52, 1936.
- 15) 伴, 志賀 : 日本病理學雜誌, 35卷, 1—6號.
- 16) Diens, L. Schoenheit, E. W. and Schriff, LD., : Am. Rev. Tbc., 1925, II, 151.
- 17) Johnson and Renfrew : Am. Rev. of Tbc., Vol. 18, 1928.
- 18) 石井 : 實驗醫學會雜誌, 1172頁, (昭和15年).
- 19) 森谷 : 日新醫學, 第36卷, 第1號, (昭和24年).