

は許されないと思ふが、併乍ら従來の「ビ」測定法が不備である事が明白となつた。

一般病原細菌（肺炎球菌、デフテリー菌等）の「ビ」と同じやうな考へ方で、結核菌の夫を表はす様に工夫すべきか、それとも結核菌独得の「ビ」の概念を必要とするか。將來に俟つべき問題である。

尙臓器内の生結核菌を可及的定量的に分離培養するには苛性曹達等の藥劑による前処置は可及的避けた方がよく、止むを得ない場合には NaOH の濃度を1%に止むべきである。

（其の3） ツベルクリンに関する研究

ツベルクリン特にその製法に関する再検討

（続報）「ツ」の多糖体劃分及び蛋白体劃分と皮内反應との關係

白石正雄

（本稿の要旨は昭和25年9月3日結核研究会講演会及び第26回日本結核病学会に於て演述した）

緒言

既に著者は前報に於て、^{1) 2) 3)}「ツ」多糖体は透析性を有し、結核モルモット皮内反應の24時間値（アルツス型）に關係し、致死反應と關係なく、蛋白体は5~9%コロヂウム膜を透析するが、10%膜を透析せず、皮内反應の48時間値（ツベルクリン型）及び致死反應と密接な關係を有することを述べた。今回は強毒人型菌朝倉株及び弱毒人型菌青山B株の「ツ」多糖体劃分及び蛋白体劃分を分離して皮内反應を検した結果、上述の知見を確認しえたので報告する。

實驗方法

1 「ツ」多糖体劃分及び蛋白体劃分の分離法

第1図にしめすように、強毒人型朝倉株ソートン培地8週培養液（培地原液量 700c.c.）を滅菌濾紙にて菌体濾別、濾液をさらに Chamberland L₃ Filter にて濾過後 10% Collodion 膜限外濾過法にて 1/10量に濃縮した。

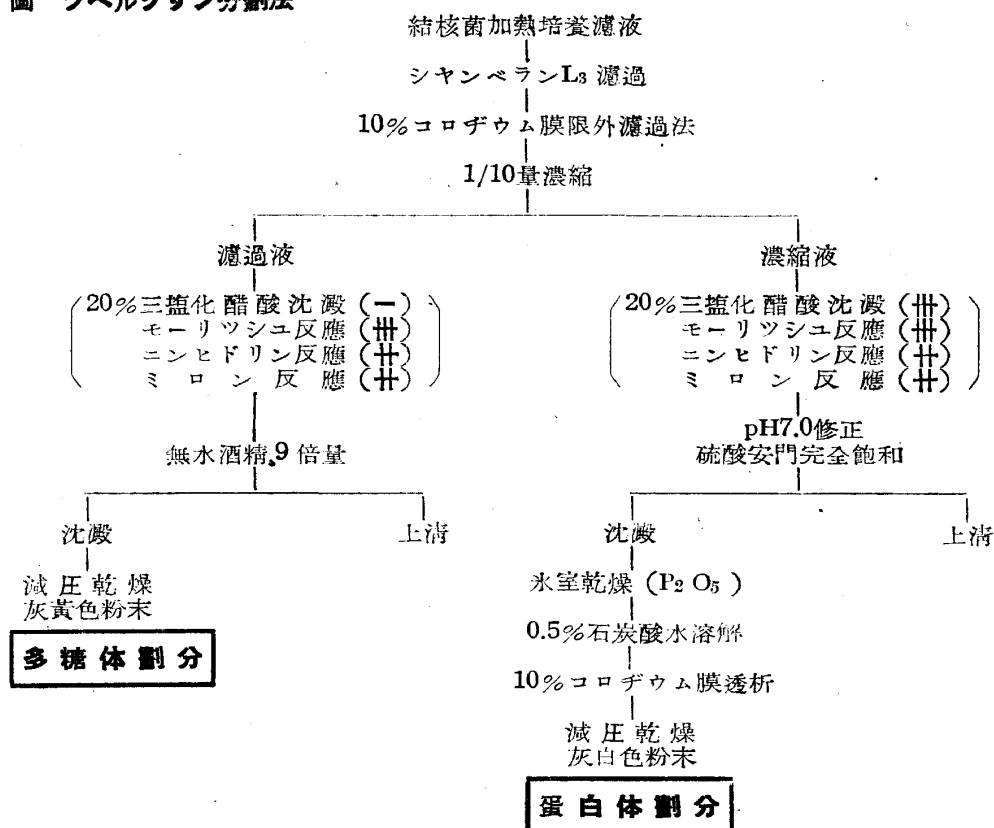
a) 多糖体劃分の分離

コロヂウム膜通過液は20%三塩化醋酸による沈澱反應陰性、モーリツシュ反應強陽性、ニンヒドリン反應中等度陽性、ミロン反應中等度陽性であつて、その45c.c.に9倍量の純酒精を加えると白沈を生じ、翌日上清を上傾後、減圧乾燥、更に電氣定溫器中にて充分乾燥し、微灰黃色粉末 5.0mg を得た。このものはモーリツシュ反應強陽性、三塩化醋酸による沈澱反應は陰性であつた。青山B株にてはソートン培地3月培養（培地原液量200c.c.）の培養濾液を上記同様限外濾過法にて 1/4量に濃縮し、その通過液10c.c.より上記同様にして酒精沈澱をつくり、之を乾燥して微灰黃色粉末 2.7mg をえた。

b) 蛋白体劃分の分離

弱毒人型青山B株ソートン培地9週培養（培地原液量400c.c.）を Chamberland L₃ Filter にて濾過したのち、5%コロヂウム膜限外濾過法にて 1/10量に濃縮した。この濃縮液を PH7.0 に修正したのち、硫酸安門を完全に飽和し、生じた白沈を遠心、上清をすて氷室内にて五酸化磷（P₂O₅）にて乾燥した。こゝに褐色固形物質と硫酸安門結晶の混合物をえたので、0.5%石灰酸水 5c.c. に溶解し、10%コロヂウム膜にて6日間透析して硫酸安門を除去した。透析囊内容を電氣定溫器内にて乾燥し、灰白色粉末

第1圖 ツベルクリン分割法



1.3mgをえた。このものの水溶液は三塩化醋酸沈澱反應陽性、ミロン反應陽性、ニンヒドリン反應陽性、モーリツシュ反應は殆んど陰性であつた。朝倉株「ツ」蛋白体はソートン培地10週培養液を濃縮しないで、直ちに硫酸安門完全飽和し、以下同様にしてえた灰褐色粉末1.0mgを皮内反應に供した。

2 結核モルモット皮内反應

モルモット3頭にフランクフルト株1mgを皮下接種した後、11日上記2株の「ツ」多糖体0.1mg (100r)、0.01mg (10r)、0.001mg (1r)、0.0001mg (0.1r)を皮内に注射し、3, 6, 24, 48時間値を観察した。蛋白体は同様F株を接種したモルモット3頭に感染23日、0.01mg (10r)、0.001mg (1r)、0.0001mg (0.1r)、0.00001mg (0.01r)を皮内に注射し、3, 6, 24, 48時間値を観察した。

第1表 「ツ」多糖体の皮内反應 (F株感染11日後)

菌株	注射量	3時間値 (mm)			6時間値 (mm)			24時間値 (mm)			48時間値 (mm)		
朝倉株	0.1 mg	11×11	11×11	10×10	18×18	12×11	14×14	17×19	13×15	16×17	12×13	—	—
	0.01 "	7×8	8×7	7×8	10×10	9×8	7×7	12×12	4×4	7×7	6×6	—	—
	0.001 "	6×6	6×6	6×6	6×6	6×6	5×5	4×4	3×3	—	—	—	—
	0.0001 "	4×4	5×5	5×5	4×4	5×5	4×4	3×3	—	—	—	—	—
青山B株	0.1 "	11×11	11×11	10×11	15×15	12×12	14×14	8×8	6×5	9×8	—	—	—
	0.01 "	8×8	9×10	8×8	9×10	10×11	9×8	11×12	5×5	7×7	—	—	—
	0.001 "	6×6	6×6	6×6	7×7	8×8	6×6	4×4	—	—	—	—	—
	0.0001 "	4×4	5×5	5×5	4×4	5×5	5×5	3×3	—	—	—	—	—

第2表 「ツ」蛋白株体の皮内反応 (F株感染23日後)

菌株	注 射 量	3時間値 (mm)			6時間値 (mm)			24時間値 (mm)			48時間値 (mm)		
朝倉株	0.01 mg	11×11	9×9	11×11	15×15	15×15	13×13	27×23	21×17	21×23	26×26	16×16	19×15
	0.001 μ	9×9	7×7	9×9	12×13	12×11	10×10	18×18	13×13	13×15	17×18	10×10	7×7
	0.0001 μ	6×6	5×5	7×7	10×11	8×8	8×8	10×10	9×9	8×9	7×7	5×5	5×5
	0.00001 μ	4×4	3×3	5×5	8×8	6×6	6×6	7×6	6×6	6×6	4×4	3×3	3×3
青山B株	0.01 μ	12×12	9×9	11×11	14×15	12×13	12×13	27×24	19×19	21×19	32×29	16×17	17×17
	0.001 μ	9×9	7×7	9×9	12×13	10×10	9×10	17×19	10×10	12×12	12×11	10×10	7×8
	0.0001 μ	7×7	5×5	7×7	10×11	7×7	7×8	10×10	7×7	8×9	7×7	5×5	5×5
	0.00001 μ	5×5	3×3	5×5	8×9	6×6	6×6	6×6	5×5	6×6	4×4	3×3	3×3

実験成績

多糖体及び蛋白体各劃分稀釈液0.1c.c.宛注射直後、局所は稍々充血した水疱をつくり、周辺は蒼白であつたが、次第に扁平化し拡大した。30分後には直径10~11mmの円形蒼白な水疱となり、中央は僅かに小さい発赤を伴つていた。即ち Immediate or Early Reaction であつた。1/2時間後には水疱直径11~12mmとなり、2時間後から急速に水疱の発赤度を増し、3, 6, 24時間……と逐次反應の大きさ、浮腫の度を増した。即ち Delayed Reaction であつた。

第1表より明かな如く、多糖体劃分の皮内反應は3時間後既に相当大きな発赤となり、6~24時間値が最大となり48時間後には殆んど陰性になつた。即ち多糖体劃分の皮内反應はアルツス型反應であつた。

第2表より明かなように、蛋白体劃分の皮内反應も3時間後相当強い発赤となつたが、反應は24~48時間後最大となり、多糖体より稍々遅く持続した。即ち蛋白体の皮内反應はツベルクリン型反應であつた。多糖体劃分と蛋白体劃分の皮内反應の強さの比は大約1:100であつた。尚、朝倉株と青山B株の各劃分の皮内反應の差違は多糖体劃分の反應に於て極めて明瞭であつた。蛋白体劃分の反應にても同様の差違を認めたが、多糖体程著明ではなかつた。

考 按

既に報じたように Maschmann und Küster⁴⁾、糟谷等⁵⁾によつて「ツ」多糖体は非透析性の皮膚因子 (Hautstoff, α -Stoff)、蛋白体は透析性の致死因子 (Tod-Stoff, β -Stoff) とされた。しかし前報の如く、多糖体は透析性であり、蛋白体は5~9%コロヂウム膜を透析する低級蛋白体とこれ等のコロヂウム膜を通過しない非透析性の高分子の蛋白体を混じていることが分つた。また多糖体劃分が6~24時間値を最大とするアルツス型皮内反應を呈し、蛋白体劃分が24~48時間値を最大とするツベルクリン型皮内反應を呈することは本報にて確認⁶⁾せられた。これはさきに Fl. B. Seibert⁷⁾によつても認められた。

最近 Heidelberg⁸⁾ and Menzel⁹⁾によつて結核菌体多糖体が血清反應(沈降反應)のうゑから Species-Specificity を有することが報ぜられた。本実験に於て朝倉株と青山株の差違が「ツ」蛋白体劃分よりも「ツ」多糖体劃分の皮内反應に於て一層明確に示された。このことは Heidelberg and Menzel 等の考えを裏書するものといえる。Seibert は強毒株と弱毒株の「ツ」蛋白のN量を等しくすると同じ力價であるとのべているが、著者の実験にてモルモット結核感染23日の皮内反應にて両株の蛋白体劃分皮内反應に明かな差違を認めなかつた。多糖体劃分に蛋白体が混在していたとすれば、ツベルクリン型反應にならねばならぬのであるが、多糖体を精製してNをなくすると皮内反應もなくなつたという戸田教授

の報告は次の機会に検討したい。⁹⁾ Cournand and Lester¹⁰⁾等は結核菌体多糖体の皮内反應に早期反應 (Immediate or Early Reaction) とアルツス型反應を認めた。Es. R. Long も之を承認したことは著者の成績とも一致している。尙 Cournand and Lester 等が菌体蛋白体と多糖体の皮内反應の比は100であると述べているが、著者の「ツ」蛋白体劃分と多糖体劃分の皮内反應の強さの比と一致している。

結 論

強毒人型菌朝倉株、弱毒人型菌青山 B株の ソートン培地培養加熱濾液より 10%コロジウム膜限外濾過法にて1/10量濃縮液をつくり、硫酸安門飽和法及び酒精沈澱法によつて蛋白体劃分及び多糖体劃分を分離した。各劃分の結核モルモット皮内反應に於て、注射直後より1½時間後までは蒼白な水疱の中央に僅かに発赤を伴う Immediate or Early Reaction であつた。2時間後より急速に水疱全体の発赤度を増し、Delayed Reaction になり、以後 3, 6, 24時間……と逐次発赤の大きさ、その強さ、浮腫が增強した。多糖体劃分は6~24時間値を最大とするアルツス型反應を呈し、蛋白体劃分は24~48時間値を最大とするツベルクリン型反應を呈した。多糖体劃分と蛋白体劃分の皮内反應の強さの比は、およそ 1:100 であつた。朝倉株と青山 B株の各劃分の皮内反應の差違は多糖体劃分に於て、蛋白体劃分よりも一層明確に認めた。

擧筆に当り植田教授の御指導御校閲を深謝す。

文 献

- 1) 白石：京都大学結核研究所年報、1号、168頁、昭和25.3
- 2) 白石：結核26巻、5号掲載の予定
- 3) 白石：「結核」近日掲載の予定
- 4) Maschmann, E. und Küster, E. : Deutsch. Med. Wschr. Jg. 57, 143, 1497, 1931.
- 5) 渡辺：結核彙報、2号 73, 昭15.9
- 6) Seibert, Fl. B. : Chem. Rev. 34 : 107, 1944.
- 7) Heidelberger, M. and Menzel, A.E.O. : J. Biol. Chem., Vol. 118. 79, 1937.
- 8) Seibert, Fl. B. : J. Immunol., 24 : 149, 1933.
- 9) 戸田：結核菌と BCG. (南山堂) 62頁、昭和22
- 10) Cournand, A. and Lester, M. S. : Third International Congress For Microbiology (New York 1939) Report of Proceedings, P. 621, 1940.