



Title	所謂Citrate-tuberculinの検討
Author(s)	池端, 隆
Description	
Citation	結核の研究, 2, 97-101
Issue Date	1955-03
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/26565">https://hdl.handle.net/2115/26565</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	2_P97-101.pdf



# 所謂 Citrate-tuberculin の検討

池 端 隆

(北海道大學結核研究所細菌部 主任 大原達教授)

## 1. 緒 言

結核菌の発見者 Koch が菌の培養濾液を煮つめて作った old tuberculin は、今日結核の研究並びに実際的な検診に当つて欠くべからざるものとなつて居る。その後作り方に改良を加えて色々なツベルクリン、即ち Neutuberculin (Tuberculin Rest. T.R.), Neutuberculin B.E., Albumosenfreies Tuberculin 等が作られたが、何れも余り顧りみられず、今日では結局最初に作られた旧ツベルクリンが最も多く用いられて居る。尙アメリカに於ては衆知の如く、之を純化精製した PPD が現在用いられつつある。これに関して最近伊藤<sup>1)</sup>が発表した所謂 citrate-tuberculin は各方面の注目をひき、我が国に於ては著者及び武谷、大友<sup>2)</sup>、堂野前、堀他<sup>3)</sup>などがこれを追試検討した。Koch の old tuberculin が菌の培養濾液なるに反し、伊藤の云う citrate-tuberculin は濾液を除いた菌体そのものをクエン酸に沈漬する事により作られたものである。即ち彼によれば、ソートン培地発育の結核菌を無菌的に集めて蒸留水でよく洗滌し、これを 0.1 M のクエン酸溶液中に浸せば medium のクエン酸は 24 時間後に強いツベルクリン活性を獲得すると云う。この現象は興味ある事実ではあるが、同時に又次の如き色々な問題を含んで居る。(i) このツベルクリン活性物質は新たに産生せられたものか或いは単に菌体内の活性蛋白が遊離溶出したに過ぎないものか？ (ii) この活性物質は菌の生死と関係するか否か、云い換えれば菌の代謝過程を必要とするものかどうか？ (iii) この効果はクエン酸に特有なものかどうか？ (iv) そもそも citrate-tuberculin なる名称は適当なものであるか否か？

これ等の点を追求するため、著者は old tuberculin 及び原法に従つて得た citrate-tuberculin の他 2, 3 の被検液を作つて皮膚反応の現われ方を比較し、これを推計学的に検討した。ここに得たる成績を報告し、これについて 2, 3 の考察を加えて見度いと思ふ。

## 2. 実験材料及び方法

**A. 被検液の作り方** 旧ツベルクリン (以下 T と略記) を含めて合計 7 種の被検材料を作り、皮膚反応の成績を比較した。用いた結核菌はすべて青山 B 株で、150 cc のソ-

ートン培地に 90 日間培養したものである。medium は原法の通りクエン酸を用いたものと、比較のため蒸留水を用いたものの 2 種があり、更に菌を殺したものとそのままのもの 2 通りを作つた。作り方の大要は次の如くである。

a) Citrate-tuberculin: 伊藤の原法と全く同様にして作つた。即ちソートン培地に植えた菌を無菌的に集めて蒸留水で 3 回洗滌し、予め滅菌し pH 7 に修正した 0.1 M Citrate 溶液に漬ける。その量は Citrate 溶液 20 cc に対して湿量 4 g の割合とし出来るだけ均等になる様よく振盪する。これを 37°C の孵卵器に 24 時間入れ、菌を除いた後 Seitz E. K で濾した濾液を皮膚反応に用いた (以下この被検液を a と略記する)。

b) a を加熱したもの: 即ち 0.1 M citrate の菌浮游液を 37°C 24 時間孵卵器に置き、100°C 60 分間加熱した後 Seitz で濾す (以下この被検液を b と略記する)。

c) a に於ける citrate の代りに蒸留水を medium としたもの: 中性蒸留水で菌浮游液を作り、前と同様に 37°C 24 時間孵卵器に置いた後 Seitz で濾した濾液である (以下これを c と略記する)。

d) c を加熱したもの: 但し 37°C の孵卵器に 24 時間置かず、菌浮游液は直ちに 100°C 60 分間加熱して Seitz で濾過した (以下これを d と略記する)。

e) 菌を紫外線照射によつて殺した後 a と同様にして作つた Citrate-tuberculin: 菌を殺すにはこれを水晶玉入りコルベンに入れ少量の蒸留水を加えつつ振盪して均等にした後、シャーレに移して、紫外線 (島津製高圧水銀燈 A 型 600 W) を照射する。照射時間は 1 時間半、距離は 40 cm 離れた。照射終わればこれを再び秤量し、a と同じ濃度になる様 0.1 M citrate に浮游する。以後の操作は a と全く同じである (以下これを e と略記する)。

f) 中性水加熱菌体抽出液: この場合のみ菌は人型菌 H<sub>2</sub> 株を用いた。即ち菌を大量培養してアルコール、エーテルで脱脂乾燥し、粉末状になつた菌を乳鉢で磨砕しつつ、100 倍量の中性蒸留水で乳劑とする。これを振盪しながら 100°C 30 分宛 3 回重盪煎で加熱し、更にコツホ蒸気釜に入れて 100°C 30 分宛 2 回加熱浸出する。これを 37°C の孵卵器に一夜放置した後 Seitz で濾過して菌体を除き、得られた澄明な濾液を被検液とした (以下これを f と略記する)。

このものは我々の教室に於て日常沈降反応用及び補体結合反応用抗原として用いている所のものである(文献4, 5参照)

**B. 定量培養** 各被検液作製の操作過程に於て、生菌数がどれ位減じたか、又この生菌数の多少が被検液の皮内反応能力と如何なる関係にあるかを知るために、小川培地を用いて次のものに就き型の如く定量培養を行った。

- i) ソートン培地から集め蒸溜水にて洗滌した菌
- ii) 上記の被検液作製に当つて最終的に濾別された菌、即ち 0.1 M Citrate 溶液又は中性蒸溜水に浮遊せしめ 37°C 24 時間孵卵器に置いた菌
- iii) 紫外線照射後の菌

**C. 皮内反應實施法**

皮膚反応は動物の数を節約するためと実験上の諸誤差を除くためラテン方格法に従つて行つた。即ち動物の皮膚を傷つけない様出来るだけ広く毛を刈り、各行、各列に同じ被検液が並ばないように方陣を作つて接種するのであるが、被検液は全部で7種あつて一度に接種する事は不可能であるから、ツベルクリンを含む任意の4種宛を組み合わせ、5回に分けて皮膚反応を比較した。従つて用いた海豚は計5頭で、BCG 100 mg (3頭) 及び 1 mg (2頭) を皮下接種した後何れも 40 日を経たものである。接種量は1箇所 0.1 cc 宛、判定は発赤に重点をおき、48 時間後に縦横の直径をキャリパーで測りその平均 (mm) を求めた。

**3. 實驗成績**

**實驗 1. a, d, f 及び T の比較 (第 1 表)**

これはツベルクリンを対照として、原法による Citrate-tuberculin と菌体抽出液との力価を比較した実験で

第 1 表 a, d, f 及び T の比較

f	d	T	a	9×12	7×7	7×6	0
a	T	f	d	7×7	1×1	8×7	8×8
d	f	a	T	4×4	11×13	7×8	9×10
T	a	d	f	8×8	7×9	1×1	11×12

Tr=41.5 Ta=20.0 Tr=25.0 Ta=22.5

ラテン方格法の變動分析表

要因	平方和	自由度	分散	分散比
列間	7.8125	4-1=3	2.6041	0.51
行間	14.8125	4-1=3	4.9375	0.28
處理間	70.8125	4-1=3	23.6041	1.36
誤差	103.5000	(4-1)(4-2)=6	17.2500	
合計	169.9375	4 <sup>2</sup> -1=15		

ある。被験液接種の配列及び成績は第 1 表に示した通りで、これから變動分析表を作り検定して見ると、5% の危険率で處理間には有意の差がないと云える。即ち a, d, f, T の 4 者の間には力価の差を認め得なかつた。従つて citrate を用いる代りに蒸溜水を用いて加熱しても同様な結果が得られると云つてよい。尙 d と f は菌の處理上大体同じものであるが、f の方がより高度に菌体成分 (主として polysaccharide) が抽出されたと考えられるだけに、発赤の平均も前者の 20 mm に対し後者は 41.5 mm を示している。但しこの差は上述の如く本質的な差ではない。この実験に用いられた海豚は BCG 100 mg 接種のもので、ツベルクリン濃度は 20 倍である。

**實驗 2. a, c, f 及び T の比較 (第 2 表)**

實驗 1 に於ける蒸溜水加熱の代りに単に蒸溜水に浮遊せしめただけでもツベルクリン活性が得られるかどうかを調べたものである。變動分析表を作つて検定して見ると、a, f, T 3 者の間には實驗 1 の如く有意な差を認めないが、被験液 c と他の 3 者の間には明らかな差を認める。即ち予期した如く、菌を単に蒸溜水に 37°C 24 時間浮遊しただけでは、濾液中にツベルクリン活性物質が現われず、このものには全く皮膚反応を惹起する能力が認められなかつた。使用動物は 100 mg の BCG を接種したものである。

第 2 表 a, c, f 及び T の比較

f	a	T	c	7×8	6×6	7×7	0
c	T	f	a	0	7×7	11×10	10×8
a	f	c	T	8×8	9×13	0	5×6
T	c	a	f	5×5	0	10×8	1×1

Tr=31.0 Ta=32.0 Tr=24.5 Tc=0

ラテン方格法の變動分析表

要因	平方和	自由度	分散	分散比
列間	17.0468	4-1=3	5.6822	0.93
行間	19.2968	4-1=3	6.4322	1.06
處理間	163.4218	4-1=3	54.4739	8.99
誤差	36.3437	(4-1)(4-2)=6	6.0572	
合計	236.1093	4 <sup>2</sup> -1=15		

$D \geq \sqrt{8 \times 6.0572 \times 5.99} = 17.726$

**實驗 3. a, b, f 及び T の比較 (第 3 表)**

菌の蒸溜水浮遊液を単に加熱しただけでも十分な皮膚反応を起し得る事が分つたので、この実験では菌の citrate 浮遊液を加熱した場合、更に力価が上昇するか否かを調べた。その結果は第 3 表の如く處理間には有意な差が認められない。即ち citrate に 24 時間浸しただけで菌の活性因

第3表 a, b, f 及び T の比較

f b T a	0	0	0	10×8
a T f b	0	0	7×9	10×7
b f a T	7×7	9×8	4×5	6×6
T a b f	0	7×12	7×9	9×11

Tr=26.5 Tb=23.5 Tr=6 Ta=23.0

ラテン方格法の變動分析表

要因	平方和	自由度	分散	分散比
列間	88.8125	4-1=3	29.6041	3.63
行間	56.3125	4-1=3	18.7708	2.29
処理間	64.8125	4-1=3	21.6041	2.64
誤差	49.0000	(4-1)(4-2)=6	8.1666	
合計	259.9375	4 <sup>2</sup> -1=15		

子は十分抽出されたものと考えられ、これを更に加熱しても力価の上昇は起らない。又 citrate の代りに水を以て抽出した場合も (f) 力価は変らない。使用海痕は BCG 100 mg 接種のものである。

実験4. b, d, f 及び T の比較 (第4表)

ツベルクリンを対照として、加熱した場合に於ける medium (citrate と蒸溜水) の比較をしたものである。此の実験では、1%の危険率で b と f の間、及び d と T の間には有意な差異が認められなかつたが、b 及び f とツベルクリンの間及び d と f の間には有意な差異が認められた。この事から見ると、熱を加える限り medium は citrate であつても単なる蒸溜水であつても成績に変わりはない。即

第4表 b, d, f 及び T の比較

f b T d	11×12	10×12	0	1×1
d T f b	1×1	0	7×7	7×6
b f d T	7×9	10×14	8×7	4×4
T d b f	3×3	1×1	12×10	12×10

Tr=41.5 Tb=36.5 T<sub>f</sub>=7 Ta=10.5

ラテン方格法の變動分析表

要因	平方和	自由度	分散	分散比
列間	1.1718	4-1=3	0.3906	0.06
行間	37.6718	4-1=3	12.5572	2.06
処理間	233.4218	4-1=3	77.8072	12.80
誤差	36.4687	(4-1)(4-2)=6	6.0781	
合計	308.7343	4 <sup>2</sup> -1=15		

$D \geq \sqrt{8 \times 6.0781 \times 13.7} = 25.809$

ち熱によつて菌体から有効成分が溶出して来る事が問題であつて、medium 自体にはそれ程の意義はない様である。尚使用動物は BCG 1 mg 接種のものであるが、この場合、旧ツベルクリンによる発赤は b 及び f によるものに比較して小さいと云う結果を得た。BCG 100 mg を接種した動物では、実験 1, 2, 3 の如くツベルクリンとこれ等被検液の間に差を見なかつたのであるが、抗体がより少ないと思われる 1 mg 接種海痕に於て差異が認められた事は更に検討を要するものと思われる。

実験5. a, b, e 及び T の比較 (第5表)

この実験では citrate-tuberculin 調製上菌の生死が力価に影響を与えるかどうか、又ツベルクリン濃度を濃くすれば前実験に於ける差が無くなるか否かを調べた。故に

第5表 a, b, e 及び T の比較

b e T a	5×5	7×7	13×13	9×8
a T b e	8×9	9×10	8×6	10×10
e b a T	7×7	7×7	4×5	14×15
T a e b	14×13	7×6	11×10	8×8

Tb=27.0 Te=34.5 Tr=50.5 Ta=28.0

ラテン方格法の變動分析表

要因	平方和	自由度	分散	分散比
列間	15.50	4-1=3	5.16	1.49
行間	4.37	4-1=3	1.45	0.41
処理間	88.37	4-1=3	29.45	8.51
誤差	20.76	(4-1)(4-2)=6	3.46	
合計	129.00	4 <sup>2</sup> -1=15		

$D \geq \sqrt{8 \times 3.46 \times 5.99} = 12.88$

ツベルクリンは7倍のもの、使用動物は前実験と同じく BCG 1 mg 接種のものを用いた。第5表に示された如く、a, b, e 相互間には 5% の危険率で有意な差が認められない。即ち菌を紫外線で殺した後 citrate-tuberculin を作つても、生きたまゝの場合と変わりなく、又加熱と云う操作を加えても力価に変わりはない。この事から考えると citrate-tuberculin は菌の生死と関係がなく、唯菌体成分の溶出が問題となるものと見做し得る。云い換れば、citrate-tuberculin には菌の代謝と云う過程を必要としない。従つて、citrate-tuberculin の有効因子は citrate によつて新たに産生されたものではなく、菌体に含まれている活性因子が単に遊離溶出したに過ぎないものと考えられる。又この実験で T は他の 3 者に比し発赤が大きかつたが、この差は推計学的に有意で、7倍と云う濃度では他より力価の強い事が示された。

### 實驗 6. 菌処置後の培養成績 (第 6 表)

培養 4 週後に colony を計算して第 6 表の如き結果を得た。これによつて見ると結核菌は 0.1 M citrate 24 時間作用によつて多少生菌数を減ずる程度で、余り死なない事

第 6 表 處置菌の培養成績

菌の處置法	稀釋	平均コロ ニ=數
操作前	10 <sup>-1</sup>	47.5
0.1 M Citrate 處理 (37°C 24 時間)	10 <sup>-1</sup>	27.0
中性蒸溜水處理 (37°C 24 時間)	10 <sup>-1</sup>	35.0
紫外線照射	10 <sup>-1</sup>	19.0

が分る。尙紫外線を照射した場合、菌が少量ならば直ちに死滅するのであるが、我々が用いた様な大量の場合には 1 時間照射してもなほ 0.03% 程度の生菌が認められた。

### 4. 總括並びに考按

著者は伊藤<sup>1)</sup>の發表した所謂 Citrate-tuberculin について追試すると共に、既に緒言の項に於て述べた色々な疑問を解決する目的から以上の実験を行つた。茲に報告した成績から見ると、伊藤の云う如く、洗滌結核菌を浸した citrate 溶液が皮膚反応惹起能力を獲得する事は疑いない。更に又発赤の大ききで判定した限りに於ては、potency に於て旧ツベルクリンに匹敵するものである事も証明し得られた。然しこのものが Koch の旧ツベルクリンと化学的に同等乃至は類似のものであるか否か、更には皮膚反応惹起能力を直ちに tuberculin activity と解し得るか否か、についてはツベルクリンの定義の問題とも関連して論ずべき重要な問題と考える。ツベルクリンは云う迄もなく単一の組成を持つたものではなく種々なる複雑な有機物の混合である。従つて、今日ツベルクリンの定義に関する学者の意見も可なり区々である様に思われるが、Koch が作つた所謂ツベルクリンの組成を考えて見るに、(i) 結核菌の代謝産物 (ii) 菌体成分 (iii) 培地成分、の 3 者から成つている事は異論のない所であろう。而して著者は、old tuberculin が結核菌の液体培養から菌を除いた濾液を濃縮したものであると云う点に於て、菌の代謝産物を相当重要な因子と見做すべきものと考え度い。勿論菌は長時間の培養経過中に生成死滅するものであるから、融解した菌体成分がこれに加わつて居る事は云う迄もない。然し菌の代謝産物に重きを置いて考えるならば、培養濾液 (これが即ち Koch のツベルクリンであり且多かれ少なかれ結核菌の代謝産物から成るものである) を除いて得られた citrate-tuberculin は orthodox な意味に於けるツベルクリンとは稍趣きを異に

するものと云うべきであろう。とは云え例えば菌体を磨碎して得た物質が Neotuberculin (Tuberculin Rest) と名付けられた如く、ツベルクリンなる名称を結核菌に関係あるすべての物質に与え得るものと解釈するならば、Citrate-tuberculin もツベルクリンである事に間違いなく、これを以てする反応をツベルクリン反応と呼んで少しも差支えない。然し著者はかかる呼び方に異論を唱え度い。要は定義の問題であるがツベルクリンにもつと厳格に解釈すべきものとする。翻つて我が国の厚生省が公示したツベルクリン基準を見るとここでは次の如く定義されて居る。即ち「ツベルクリンは結核菌が發育する時、その液体培地に生成する溶解性物質を稀釈減菌したもので、特異的反應を呈し結核の診断に用いられるものである」と。かくの如くツベルクリンは菌が「發育」する時「生成」されるものと考えたい。この意味から我々はツベルクリンと単なる菌体成分とを區別すべきものとする。後者は名の如く菌体抽出液で菌の生死と関係なく代謝過程を必要としない。従つてツベルクリン基準によれば明らかにこれと區別される。若し然らずして結核菌に関係あるすべての物質をツベルクリンと呼ぶ事にすれば、我々の沈降反應用並びに補体結合反應用抗原も亦ツベルクリンである (これが旧ツベルクリンと種々なる反應に於て異つた成績を示す事は云う迄もない)。かくして菌を各人各様に処理して得た物質をすべてツベルクリンとなし、これ等を以て行く皮膚反應を総てツベルクリン反応とするならば、そうでなくても統一を欠き勝ちだつたこの反應は増々混乱を極め、成績の比較などは全く不可能となるであろう。ツベルクリンにもつと厳格に解釈すべきものとして述べた所以はここにある。結論的に云うならば、ツベルクリンなる名称は Koch の old tuberculin を尊重してこれと同じか又は近い操作によつて得た物質、或いはこれを精製したもの (例えば PPD の如きもの) のみに限り度い。かかる物質は当然上述した厚生省の定義の如く、結核菌の發育途上に於て生成されるもので、(菌体成分が含まれるのは差支えない)、単なる菌体抽出液とは區別されるべきものである。

次に伊藤の云う citrate-tuberculin の本態について考察して見よう。結核菌を 0.1 M の citrate に 24 時間浸ける事によつて medium が皮膚反応惹起能力 (以下敢えて原著者伊藤の云うツベルクリン活性なる言葉を避ける) を獲得する事は事実である。伊藤は citrate の外に succinate, fumarate, malate, oxalate, tartrate, asparagin 等についても同様な実験を行つて弱いながらも同じ効果を認め、この活性は Krebs のクエン酸 cycle に関係あるものと述べて居る。然しこの現象は Krebs の cycle に関係ある物質のみに特有な現象ではなく、単に蒸溜水を加えて

熱しただけでも同じ成績が得られる。この事は実験1に於て明らかに証明された。又実験4に見る如く、熱を加える限り medium が citrate であつても蒸留水であつても力価に変わりはないから、加熱と云う操作によつて菌体から有効成分の溶出して来る事が必要であつて、medium 自体には格別の意義はない様である。即ち medium として特に citrate を用いる必要はない。洗滌菌を 100°C 45 分間加熱した後クエン酸に浸けた場合は citrate-tuberculin 産生能を失う、と伊藤に述べて居るが、これは加熱によつて菌体内有効因子が medium 中に溶出し去つた為と考えるべきであろう。従つて既に有効因子を失つた菌を citrate に浸けてもクエン酸効果が見られないのは当然である。従つて著者の行つた如く紫外線によつて殺菌した場合は所謂クエン酸効果が認められた。然し同時にこの事は、citrate-tuberculin を作る場合菌は生きていても死んでいても力価に変わらない事を示すものである。即ち citrate-tuberculin の活性は菌の代謝と云う過程を必要としない。云い換れば citrate-tuberculin の有効因子は citrate よつて新たに産生されたものではなく、菌体に含まれている活性因子が単に遊離溶出したものに過ぎないと考えられる。而も一方に於て我々の教室に於ける沈降反応用抗原、即ち中性水加熱菌体抽出液が citrate tuberculin と同等又はそれ以上の力価を持つ事を考えると、菌体内の有効因子を抽出する方法でさえあれば、敢えて citrate を用いる必要はなく加熱だけで十分である。約言すれば要するに citrate-tuberculin は菌体抽出液に外ならない。従つてその名称は「citrate 処理菌体抽出液」とでも呼ぶのが至当で、citrate-tuberculin の名は適当でない。ただ紫外線を照射した場合菌は 99.97% まで死滅したが尙 0.03% が生きていたので、citrate-tuberculin の活性が菌の生死と完全に無関係と断ずる事に異論をはさむ者があるかも知れない。然し著者

はこの程度の菌が生きていてもそれだけで皮膚反応を惹起する能力は全くない事を証明した。即ち 0.1 M citrate 20 cc 中に湿量 200 mg 及び 80 mg の菌を浮遊した場合の被検液からは全くクエン酸効果が認められない。尙著者がこの実験に於て 90 日培養と云う古い菌を用いた理由は、伊藤の報告にもある如く、古いもの程 citrate 効果が著しいからである。

以上要するに、結核菌を単に蒸留水に浸けただけでは皮膚反応惹起能力が得られないのであるから(実験2)、citrate が菌体から何か有効因子を溶出させる能力を持っている事を認めるに吝かでないが、これは citrate に特有な現象ではなく加熱と云う操作で十分であり、結局伊藤の云う citrate-tuberculin は菌体抽出液に外ならないものとする。

## 5. 結 論

1) ソートン培地培養の結核菌をよく洗滌して 0.1 M citrate 液に沈漬、24 時間放置すれば、medium は皮膚反応惹起能力を獲得する。

2) この活性因子は菌の生死と関係なく、換言すれば代謝と云う過程を経る事なしに得られる。従つてこの活性因子は citrate によつて新たに形成されたものではなく、菌体から遊離溶出したものと考えられる。この意味に於て所謂 citrate-tuberculin は菌体抽出液に外ならずツベルクリンと云う名は適当でない。

## 引用文献

- 1) Ito, R.: Am. Rev. Tuberc. 67 (4), 526, 1953.
- 2) 武谷・大友: 文部省総合研究結核研究班報告(昭28).
- 3) 堂野前・堀他: 第1回国立大学附置研究所結核談話會
- 4) 大原・中川: 東京醫事新誌. 68 (12), 5, 昭28.
- 5) 大原・池端他: 日本細菌學雜誌に投稿中.