

## ツベルクリン反応に関する研究

## 第 1 編

消化並びに化学的変性に依るツベルクリン  
抗原性の変化について

岡山大学医学部公衆衛生学教室 (主任: 大田原一祥教授)

専攻生 三 島 四 郎

〔昭和 34 年 8 月 7 日受稿〕

## 目 次

第 1 章 緒 論	ン反応の変化
第 2 章 実験材料及び実験方法	第 2 節 亜硝酸ナトリウム処理によるツベルクリン反応の変化
第 1 節 実験材料	第 3 節 ホルマリン添加に依るツベルクリン反応の変化
第 2 節 実験方法	第 4 節 トリプシン消化によるツベルクリン反応の変化
第 1 項 ツベルクリン反応	第 5 節 ペプシン消化に依るツベルクリン反応の変化
第 2 項 沃度沃度加里処理法	第 4 章 総括並びに考按
第 3 項 亜硝酸ナトリウム処理法	第 5 章 結 論
第 4 項 ホルマリン処理法	文 献
第 5 項 トリプシン消化法	欧文抄録
第 6 項 ペプシン消化法	
第 3 章 実験成績	
第 1 節 沃度沃度加里処理に依るツベルクリン	

## 第 1 章 緒 論

ツベルクリン反応の本態に関しては古来より数多くの研究<sup>1)</sup>が行なわれている。即ち, Löwenstein & Pick<sup>2)</sup>, Boquet & Sandor<sup>3)</sup>等はツベルクリン反応の活性因子は Polypeptide 又は分子の小さい蛋白性のものであらうと考えた。又ツベルクリン活性度の本態が主としてツベルクリン蛋白であると云う事実は F. B. Seibert<sup>4)5)6)</sup>に依り述べられている。

ツベルクリンの活性因子が蛋白質ならば化学的<sup>7)</sup>に蛋白質中のアミノ酸の遊離基に変化を与える場合、又チロジン基に化学的にハロゲン分子を導入した場合に、その活性度の減少することは当然予想されるところである。

此の方面の研究については武谷<sup>8)</sup>氏等のホルマリン<sup>9)10)11)12)13)</sup>及び亜硝酸<sup>14)15)</sup>に依る遊離アミノ酸を減少させた場合のツベルクリン反応の減弱度に関する業績がある。

著者は本研究に於いて遊離チロジン基に沃度を導入した場合、又ホルマリンに依りアミノ基をメチレン化した場合、或は亜硝酸に依りアミノ基の水酸化を行なつた場合に於いてツベルクリン反応の減弱する事に依りツベルクリン反応の活性因子の本態を明らかにしようと試みた。

又消化に依る抗原性の変化については Löwenstein<sup>2)</sup>等の業績があるが著者は純度の高い蛋白分解酵素として結晶トリプシンを用いてツベルクリンを消化した場合及び濃厚ペプシンで消化した場合に於いて消化時間と抗原性の変化との関係を定量的に研究し蛋白分解酵素に依つて抗原性の減少する事実より、ツベルクリン反応に於ける活性因子としてツベルクリン蛋白が主役を演ずることを確認しようとして実験を行い興味ある成績を得たので茲に報告する。

## 第2章 実験材料及び実験方法

### 第1節 実験材料

1) 実験動物 実験動物としては体重 2 kg 前後の白色成熟家兎を用いた。理研製 B. C. G. 2.5 mg を注射し 6 週間後に使用した。

2) ツベルクリン液 理研製旧ツベルクリンを使用した。

### 第2節 実験方法

#### 第1項 ツベルクリン反応

旧ツベルクリンの10%液をつくり剃毛した家兎背部皮内に 0.1 cc 注射し24時間後の発赤面積をプランメーターを以て測定した。

#### 第2項 沃度沃度加里処理法

予備実験としてツベルクリン蛋白に結合し得る限界の沃度沃度加里量を定める為に試験管にツベルクリン原液 0.2 cc, 10%水溶性澱粉 2 滴生理的食塩水若干を加え、之に 1/10 N. 沃度沃度加里液を少量加えると液は最初は無色であるが次第に添加量を増し 0.8 cc に達すると蛋白と結合しない過剰の遊離沃度に依つて藍色を呈するに至る。此の結果に基き沃度沃度加里添加の限界値を 0.8 cc として以下の実験を行なつた。即ち 4 本の試験管を用意し各試験管にツベルクリン原液 0.2 cc 宛を加え、第2試験管に10%沃度沃度加里 0.2 cc, 第3試験管に 0.4 cc, 第4試験管に 0.8 cc を加えたる後、各試験管に生理的食塩水を加えて全量を 2.0 cc とし、各管液の 0.1 cc 宛を剃毛せる家兎背部皮内に注射して型の如くツベルクリン反応を行なつた。

#### 第3項 亜硝酸ナトリウム処理法

試験管 5 本を用い各試験管に旧ツベルクリン原液を各 0.2 cc 宛採り、次いで生理的食塩水を第1試験管には加えず、第2試験管には 0.6 cc, 第3試験管には 1.4 cc を加え、次に 10%亜硝酸ナトリウムを第1試験管に 1.4 cc, 第2試験管に 0.8 cc, 第3試験管に 0.56 cc, 第4試験管に 0.28 cc, 第5試験管には加えず、次で各試験管に蒸溜水を総量 1.6 cc となる如く加え24時間室温に放置後24時間流水中で透析を行つた。透析後再び生理的食塩水を用いて24時間再透析後生理的食塩水を添加し各試験管の液量を総量 2.0 cc としてツベルクリン反応を行なつた。

#### 第4項 ホルマリン処理法

各種濃度のホルマリンがツベルクリンの抗原性に及ぼす影響を検する為に試験管 4 本に旧ツベルクリン原液を 0.2 cc 宛入れ、次に 27% のホルマリンを

第1試験管には添加せず対照とし、第2試験管に 0.88 cc, 第3試験管に 0.22 cc, 第4試験管に 0.04 cc を添加したる後生理的食塩水を加えて各試験管の液量を 1.6 cc とした。

ホルマリンの反応速度の比較的遅いのを考慮に入れて各試験管を 5 日間室温に放置し充分ホルマリンを作用せしめたる後残余のホルマリンを除去する為に24時間透析を行い更に等張とする為に生理的食塩水を外液として24時間再透析し、次で全量を 2.0 cc となる様に生理的食塩水を添加し、此の液を用いてツベルクリン反応を行つた。

#### 第5項 トリプシン消化法

旧ツベルクリン原液 0.2 cc を生理的食塩水 1.4 cc にとかしたものを試験管 5 本に分注、之に持田製トリプシン 10,000 単位を 5 cc の滅菌磷酸緩衝液に溶解して其の 0.5 cc 即ち 1,000 単位を添加した後ツベルクリン反応を行つた。即ち注射前 7 時間、1 時間、40 分及び 20 分の各時間上記トリプシン液を添加して 37°C の恒温槽に保存作用せしめたる後取り出して反応を試みた。

対照としては注射直前にトリプシン液を添加したもののについて反応を行つた。

#### 第6項 ペプシン消化法

旧ツベルクリン原液 0.2 cc に生理的食塩水 1.4 cc 及び 1/100 規定塩酸 0.2 cc を加えたものに石津製濃厚ペプシン 20 mg を加え第5項トリプシン消化法に於て述べたと同様に注射前 7 時間、1 時間、40 分及び 20 分の各時間恒温槽に保存作用せしめたる後取り出して之に 1/100 規定苛性曹達 0.2 cc を加えて中和したる後ツベルクリン反応を行なつた。

## 第3章 実験成績

### 第1節 沃度沃度加里処理に依るツベルクリン反応の変化

第1表(1)及び第1図に示す如くツベルクリン反応の2回実験の平均値は第1試験管(沃度沃度加里を添加せざるもの)では 7.6 cm<sup>2</sup>, 第2試験管(沃度沃度加里 0.2 cc 添加)は 4.8 cm<sup>2</sup>, 第3試験管(0.4 cc 添加)は 2.0 cm<sup>2</sup>, 第4試験管(0.8 cc 添加)は 1.3 cm<sup>2</sup> であつた。

即ちツベルクリン反応面積は添加された沃度沃度加里の濃度の増加と併行して縮少することを認めた。

第1表 各種蛋白変性剤添加に依るツベルクリン反応の変化

(1) 沃度沃度加里 (%)

例数 \ 濃度	0	1	2	4
1	9.1	5.2	1.6	1.3
2	6.0	4.4	2.3	1.2
平均値	7.6	4.8	2.0	1.3

(単位 cm<sup>2</sup>)

(2) 亜硝酸ナトリウム (規定)

例数 \ 濃度	0	0.5	1.0	1.5	2.8
1	6.2	2.3	1.5	1.1	1.0
2	8.5	4.0	3.2	1.0	0.6
平均値	7.4	3.2	2.4	1.1	0.8

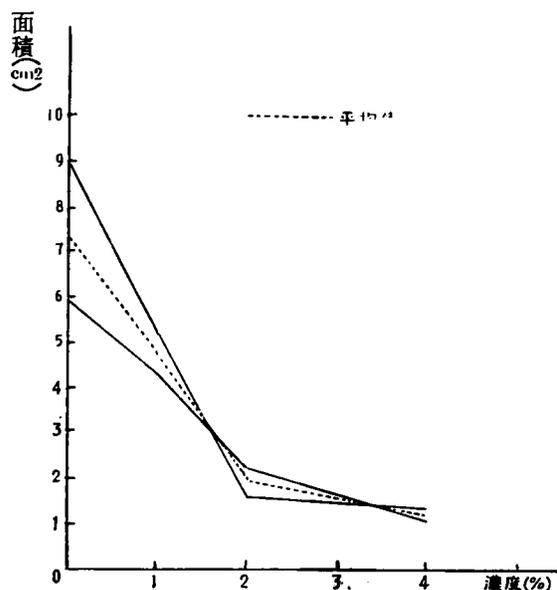
(単位 cm<sup>2</sup>)

(3) ホルマリン

例数 \ 濃度	0	1	5	20
1	6.0	5.3	4.0	2.0
2	8.5	7.2	4.5	2.2
平均値	7.3	6.3	4.3	2.1

(単位 cm<sup>2</sup>)

第1図 沃度沃度加里添加に依るツベルクリン反応の変化

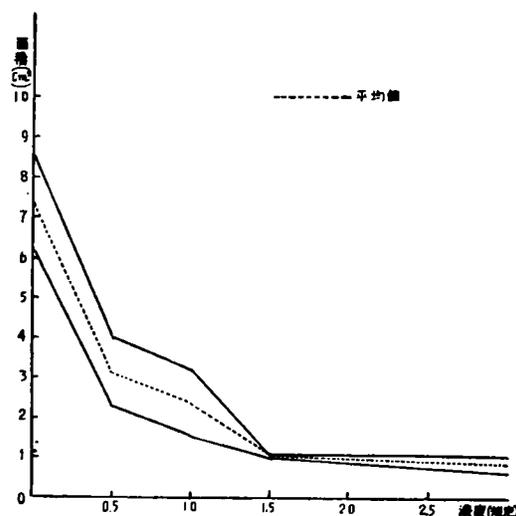


第2節 亜硝酸ナトリウム処理によるツベルクリン反応の変化

第1表(2)及び第2図に示す如く10%亜硝酸ナト

リウム添加に依るツベルクリン反応面積の変化は対照は 7.4 cm<sup>2</sup>, 第2試験管 (0.5 規定) は 3.2 cm<sup>2</sup>, 第3試験管 (1.0 規定) は 2.4 cm<sup>2</sup>, 第5試験管 (2.8 規定) は 0.8 cm<sup>2</sup> であつた。即ちツベルクリン反応面積は添加された亜硝酸ナトリウムの濃度の増加に併行して縮少することを認めた。

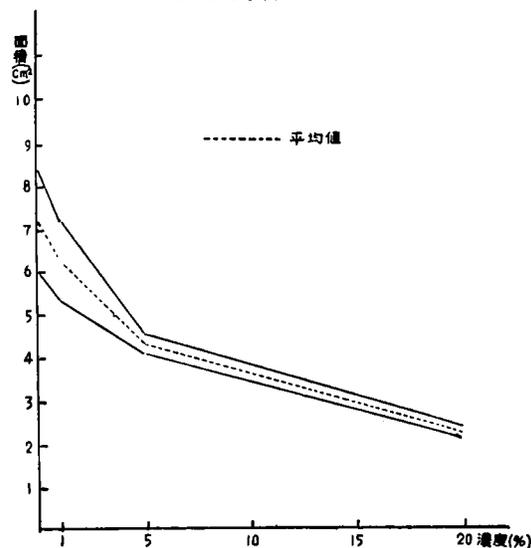
第2図 亜硝酸ナトリウム添加に依るツベルクリン反応の変化



第3節 ホルマリン添加に依るツベルクリン反応の変化

第1表(3)及び第3図の如くホルマリン添加に依るツベルクリン反応面積の変化は次の如くであつた。即ち第1試験管 (対照としてホルマリンを加えぬもの) は 7.3 cm<sup>2</sup> 第2試験管 (ホルマリン 1.0% 添

第3図 ホルマリン添加に依るツベルクリン反応の変化



加)は $6.3\text{ cm}^2$ 、第3試験管(5.0%添加)は $4.3\text{ cm}^2$ 、第4試験管(20%添加)は $2.1\text{ cm}^2$ であつた。

ホルマリン添加ツベルクリンの反応面積は添加ホルマリン濃度の増加に併行して縮少することを認めた。

#### 第4節 トリプシン消化によるツベルクリン反応の変化

第2表(1)及び第4図に示す如くツベルクリンに蛋白消化酵素トリプシンを種々の時間添加作用せしめたる後そのツベルクリン反応面積の変化を求めた結果次の如き成績を得た。第1試験管即ち注射直前にトリプシンを添加したツベルクリン液の反応面積の平均値は $5.6\text{ cm}^2$ であり第2試験管即ち注射20分前にトリプシンを添加作用せしめたものの反応面積は $3.9\text{ cm}^2$ 、第3試験管即ち注射前40分にトリプシンを添加作用せしめたものの反応面積は $2.6\text{ cm}^2$ 、第4試験管即ち注射1時間前にトリプシンを添加作用せしめたものの反応面積は $1.3\text{ cm}^2$ 、第5試験管即ち注射7時間前に添加作用せしめたものの反応面積は $0.6\text{ cm}^2$ とトリプシン添加作用時間の延長とともに反応面積は順次縮少を示した。以上の如く旧ツベルクリンに結晶トリプシンを種々の時間添加作用せしめるときはツベルクリン反応面積は之に併行して縮少することを認めた。

第2表 各種蛋白消化酵素添加に依るツベルクリン反応の変化

##### (1) トリプシン

例数	トリプシン添加後経過時間	直後	20分	40分	1時間	7時間
	1		3.6	3.2	1.9	0.9
2		7.6	4.6	3.3	1.6	0.7
	平均値	5.6	3.9	2.6	1.3	0.6

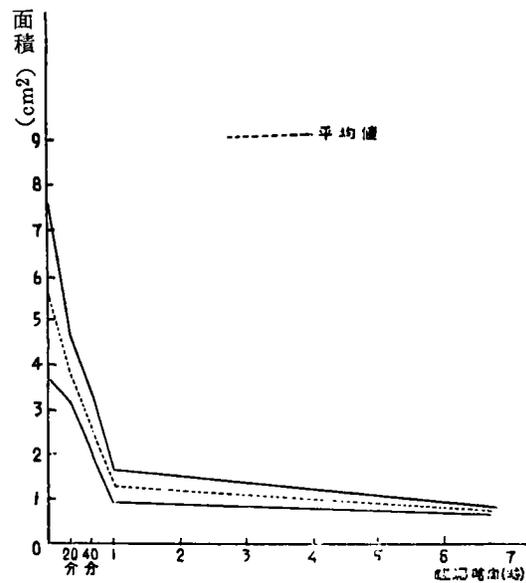
(単位  $\text{cm}^2$ )

##### (2) ペプシン

例数	ペプシン添加後経過時間	直後	20分	40分	1時間	7時間
	1		3.6	3.6	3.5	1.0
2		3.4	2.6	2.5	2.4	1.8
	平均値	3.5	3.1	2.9	1.7	1.3

(単位  $\text{cm}^2$ )

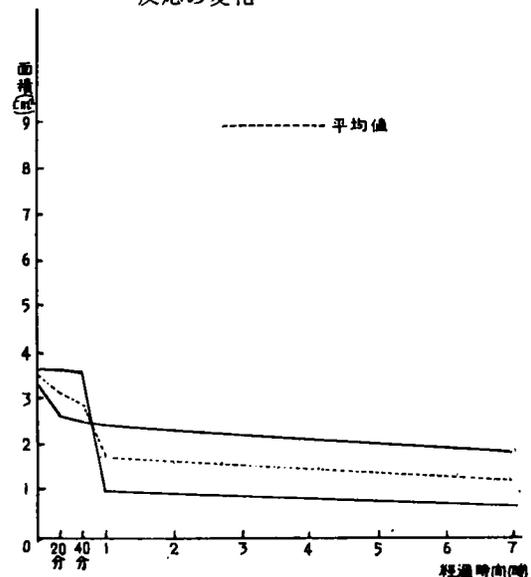
第4図 トリプシン添加に依るツベルクリン反応の変化



#### 第5節 ペプシン消化に依るツベルクリン反応の変化

第2表(2)及び第5図に示す如くツベルクリンに蛋白消化酵素ペプシンを種々の時間添加作用せしめたる後そのツベルクリン反応面積の変化を検して次の如き成績を得た。第1試験管即ち注射直前にペプシンを加えたもののツベルクリン反応面積の平均値は $3.5\text{ cm}^2$ 、第2試験管即ちペプシン添加20分後のもののツベルクリン反応面積は $3.1\text{ cm}^2$ 、第3試験管即ちペプシン添加40分後のもののツベルクリン反応面積は $2.9\text{ cm}^2$ 、第4試験管即ち添加1時間後の

第5図 ペプシン添加に依るツベルクリン反応の変化



もののツベルクリン反応面積は  $1.7 \text{ cm}^2$ 、第5試験管即ち添加7時間後のもののツベルクリン反応面積は  $1.3 \text{ cm}^2$  であつた。

即ち旧ツベルクリンに種々の時間ペプシンを添加作用せしめるとツベルクリン反応は之と併行して減弱をきたした。即ちその反応度は同一ペプシン濃度に於いては添加時間の増大と共に減弱することを認めた。

#### 第4章 総括並びに考按

旧ツベルクリンに蛋白変性剤として沃度沃度加里を添加すれば其の添加濃度の増加に併行してツベルクリン反応面積の縮小が認められる。一般に蛋白に沃度沃度加里を添加する事に依り普通蛋白のチロジン基の沃度化及び其他の基の酸化が行なわれる事は周知のことであるがツベルクリン蛋白に於ても沃度沃度加里添加に依り同様の機序のもとに蛋白変性が起りツベルクリンの反応度は其の添加濃度に比例して減弱するものと考えられる。又逆にツベルクリン反応に旧ツベルクリンのチロジン基の関与することも想定される。

同様にして旧ツベルクリンに10%亜硝酸ナトリウムを添加作用せしむることによりツベルクリン反応度は添加濃度の増大に伴い次第に減弱低下することが認められるが之は蛋白に亜硝酸ナトリウムを添加することにより蛋白のアミノ基が水酸化されることによるもので周知の事実として認められている所であるが、著者の研究に於いても亜硝酸ナトリウムの添加により旧ツベルクリン蛋白のアミノ基が水酸化されてツベルクリン反応度は減弱低下するものと推定される。

又旧ツベルクリンに蛋白消化酵素たるトリプシンを添加する事に依りそのツベルクリン反応度は減弱低下し、又ペプシン添加に依つても同様の現象が認められる。即ち蛋白分解酵素トリプシン及びペプシ

ンはツベルクリン蛋白を分解し、分解されたツベルクリンの反応度は減弱するものと考えられる。

かくの如く各種蛋白変性剤の添加及び蛋白分解酵素トリプシン及びペプシンの添加に依つてツベルクリン反応の減弱する事実はツベルクリン反応に関する主体が蛋白である事を示唆するものと考えられる。

#### 第5章 結 論

1) 旧ツベルクリンに沃度沃度加里を添加作用せしめると其の添加濃度の増大に併行してツベルクリン反応度は減弱低下する。このことはツベルクリン反応に旧ツベルクリン蛋白中の遊離チロジン基の関与する事を推定せしめるものである。

2) 旧ツベルクリンに亜硝酸ナトリウムを添加作用せしめるとその添加濃度の増加に併行してツベルクリン反応度は減弱低下する。

3) 旧ツベルクリンにホルマリンを添加作用せしめると其の添加濃度の増加に併行してツベルクリン反応度は減弱低下する。

4) 旧ツベルクリンに結晶トリプシンを添加作用せしめるとその消化時間に併行してツベルクリン反応度は減弱低下する。

5) 旧ツベルクリンにペプシンを添加作用せしめると其の消化時間に併行してツベルクリン反応度は減弱低下する。

6) 上述の成績よりツベルクリン反応の主体はツベルクリン蛋白に依るものと推定される。

終りにのぞみ種々御懇切な御指導、御校閲を賜つた恩師大田原教授に満腔の感謝を捧げ、併せて有力なる御助言を辱うした緒方助教授に深甚なる謝意を表する。

(本論文の要旨は昭和31年6月16日第470回岡山医学会通常例会に於て発表した)。

#### 文 献

- 1) Koch: Dtsch Med. Wschr., 17, 101, 1891.
- 2) Löwenstein, E.: Hdb. Path. mikroorg 11 abt., 5, 660, 1913.
- 3) Bouquet, A. & G. Sandor: Ann I' Inst. Pasteur 57, 622, 1936.
- 4) Long E. R. & Seibert F. B.: Am. Rev. Tbc. 13, 488, 1926.
- 5) 柳沢 謙: ツベルクリン反応, 33頁, 昭和30年,

- 金原出版株式会社.
- 6) 武谷健二: 科学, 22巻, 3号145頁, 昭和27年.
- 7) 水島三一郎, 赤堀四郎: 蛋白化学, 44頁, 昭和29年, 共立出版株式会社.
- 8) 大塚信夫: 岡山医学会雑誌, 69巻, 4号, 1025頁, 昭和32.
- 9) Brawn. Zeitschr. für Immunitätsf u. exp. Therapie, 46, 78, 1933.

- 10) K. Iwanoff Zeitschr. für Hygiene, 197, 118, 1936. M.: J. Biol. chem. 137, 267, 1941.
- 11) Eisenberg Zentralbl. f. Bakt. Bd 31, 1902. 14) 進藤宙二：ツベルクリン皮内反応の血清学的検討, 22頁, 昭和28年, 医学書院.
- 12) Landsteiner, k. . The specificity of serological reactions, c. c. Thomas, New York. 45, 1945. 15) Baldwin, E. R. & Levene, P. A. : J. Med. Research, 6, 120, 1901.
- 13) Barrone : ESC, Dick, G. F. & Lvman, C.

---

## Studies on the Tuberculin Reaction

### Part 1. on the Changes of Tuberculin Antigen due to Digestive and chemical and Chemical Degeneration.

By

Shiro Mishima

Department of Public Health Okayama University Medical School  
(Director : Prof. Kazuyoshi Ohtawara)

By making protein degenerant and protein digestive enzyme act on old tuberculin the author performed the tuberculin reaction, and obtained the following results.

1. In loading a strong potassium iodide solution to old tuberculin the tuberculin reaction grows weaker along with an increase in the concentration of potassium iodide. This suggests that free tyrodine radical in the old tuberculin protein is involved in the tuberculin reaction.

2. In loading sodium nitrite to old tuberculin the tuberculin reaction likewise grows weaker with increase in the concentration of sodium nitrite

3. In the addition of formalin to old tuberculin the tuberculin reaction is weakened along with increases in the concentration of formalin solution.

4. When crystalline trypsine is made to act on old tuberculin, the tuberculin reaction is weakened along with lapse in the digestion time.

5. When pepsin is made to act on old tuberculin, the tuberculin reaction is likewise weakened along with lapse in the digestion time.

6. From these results it is deduced that the tuberculin reaction is mainly controlled by tuberculin protein.

---