

人尿に於ける抗結核菌性因子の研究

〔第1編〕 粗製材料に関する研究

京都大学結核研究所 病態生理学部（教授 辻 周介）

大 島 駿 作

（受付 昭和33年9月30日）

（本論文の要旨は第13回日本結核病学会近畿地方学会及び第32回日本結核病学会総会にて報告した）

第1章 緒 言

我々は、結核菌に対する生体の防衛力に関する系統的な研究の結果、正常動物の体液の低分子成分中に明かに結核菌発育抑制作用の存在することを *in vivo* にも又 *in vitro* にも証明し得た。此の結果を更に化学的に追究する目的で行った実験の中、こゝには尿を材料として行つた実験成績に就て報告する。けだし尿は体内にて透析された体液の低分子成分と考えられるからである。

古来尿路に於ける結核性疾患は、比較的自然治癒の傾向が強いと言われている。H. Dold¹⁾はこの事実に基いて、人尿の結核菌発育に及ぼす影響力を試験した結果、健康人尿がかなり著明な結核菌発育抑制力を保持している事を発見した。その後 K.B. Björnesjo は、結核患者尿及び健康人尿の結核菌発育抑制因子に就て更に詳しい検討を加え、健康人尿中の活性因子は、結核患者尿中で特に著明に増量するものではないこと、及びその性質は揮発性でなく、セロファン膜を容易に透過し、電気透析により陽極側に移動し、エタノールを除く多くの有機溶媒に不溶性であり、pH 酸性側で著しい活性を有し、活性炭に吸着され得ることを報告した。併し彼の検索した限りでは、健康人尿中に含有されていると思われるいかなる物質の化学的性質にも該当せず、終にその活性因子の本体に就ては究明出来なかつた^{2,3,4,5,6)}。これとほぼ同様の報告が我が国でも森田⁷⁾によつて行われている。彼

はその報告中に紫外線照射により、又超音波をあてることにより抗菌活性が減弱したと報告した。その後 Q. Myrvik⁸⁾は Björnesjo が追求した活性因子の本体をアスコルビン酸又はその誘導體と考えるとよく実験結果と一致すると考え、アスコルビン酸を大量投与した人尿の結核菌発育抑制力が増大することから、活性因子の本体はアスコルビン酸又はその誘導體ではなからうかとの推定を下している。

以上の如く、健康人尿中に結核菌発育抑制因子が含有せられ得ることに関しては、殆んど疑問の余地は無いのであるが、果してそれが如何なる物質であるかに就ては尚検討を要するのである。

私は、種々の方法によつて人尿を分割して、抗菌性物質を抽出、分離、精製すべく実験を重ねた結果、可成り満足すべき結果を得たので、これらの実験内容に就て逐次詳述したいと考えるが、本篇に於ては先ず予備実験の意味で、粗製材料に就て検討した結果を記述する。

第2章 実験材料及び実験方法

1) 実験材料

健康人尿を清潔な容器にプールし、低温（50°C 以下）、低圧（20mm Hg. 以下）下に濃縮、乾固し、これに蒸溜水を原尿量の1/64だけ加えて充分振盪、攪拌した後、沷紙により沷過したものを「粗製材料」として実験に使用した。

2) 実験方法

上述の実験材料を使用して、尿中の抗結核性

因子の各種ミコバクテリウムに対する抗菌力を試験し、次に抗菌性因子の物理化学的諸性質、即ち熱安定性、透析性、溶解性、酵素による影響、及び化学的定性反応を試験し、その結果濾紙培養法を考案して抗結核菌性因子の抽出実験を行った。実験方法の詳細に就ては各章で詳述する。

第3章 S.C.M.による抗菌試験

1) 実験方法

先に述べた如く調製した粗製材料、(64倍濃縮尿)の H37R_v 菌, H37R_a 菌, BCG 菌, 鳥京菌に対する抗菌力を、辻・山本の石油ベンゼン法⁹⁾による S.C.M. を用いて試験した。

粗製材料 1cc を蒸留水によつて順次倍数稀釈した一列の試験管列を作り、その各試験管に 2 倍濃度に調製したキルヒナー原液を 1cc 宛加え、更に各試験管に 0.3cc の血清アルブミン(栄研製)を加えた。これと別に対照として粗製材料稀釈液の代りに蒸留水を用いた試験管列を作つた。

調製したこれらの培地に、各種ミコバクテリウムの石油ベンゼン浮游液を塗抹、乾燥させたスライドガラスを一枚宛挿入した後、37°C で 7~10日間培養した。菌発育の判定には標本を 10% フォルマリンにて固定滅菌後、チールニールゼン法にて染色、鏡検し、下記の判定規準に従つてその発育程度を分類した。

結核菌発育判定規準は次の通りである。

卍：菌の発育旺盛で、集落が重り合い、網目状をしているもの。

卍：菌の発育良好で、弱拡大 (5 × 10) 検鏡

によりその発育を確認出来るもの。

+：菌の発育微弱で、強拡大 (5 × 90) 検鏡によらなければその発育が確認出来ないもの。

-：菌発育を全く認めないもの。

尚本報告中 S.C.M. を用いた抗菌試験に於ける結核菌発育程度の判定は総てこの規準を適用した。

2) 実験結果

第1表に示す如く、H37R_v 菌及び BCG 菌は何れも原尿の 2 倍濃度でその発育を抑制されているが、鳥京菌及び 607 号菌は相当高濃度に於ても尚発育が認められた。

この実験結果は Björnesjo の実験結果と菌発育抑制濃度に於て多少異つている。即ち彼は濃縮しない人尿を Dubos & Davis の培養液で稀釈して、人型結核菌に就て抗菌試験を行うと、多くの場合原尿の 1/2 倍濃度で菌の発育が抑制されたと報告している。恐らくは材料調製の過程に於て抗菌性因子の損失があつたのか、或は抗菌試験を行う際の培養方法の相違、その他の原因によると思われるが、その損失は例えあつたにせよ軽度と思われたので、以後の実験には総てこの材料を使用した。

第4章 抗菌性因子の物理化学的或は化学的性質

1) 加熱に対する安定性

i) 実験方法

抗菌性因子の加熱処理に対する安定性を試験

第1表 粗製濃縮尿による抗菌試験

菌種	濃度									
	64×	32×	16×	8×	4×	2×	1×	1/2×	1/4×	対照
H37R _v 菌	-	-	-	-	-	±	卍	卍	卍	卍
BCG 菌	-	-	-	-	-	±	卍	卍	卍	卍
鳥京菌	-	+	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
607号菌	-	+	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍

H37R_v 菌, BCG 菌は 10 日間培養

鳥京菌, 607 号菌は 7 日間培養

濃度の表現は濃縮しない原尿の濃度を 1 × とし、各数字は原尿に対する比率を表わしている。

第 2 表 加熱処理による抗菌力の変化

濃度 加熱 処理条件	64×	32×	16×	8×	4×	2×	1×	1/2×	1/4×
100°C 30分	—	—	—	—	+	+	+	+	+
100°C 60分	—	—	—	—	+	+	+	+	+
120°C 60分	—	—	+	+	+	+	+	+	+
加熱せず(ザイツ 過)	—	—	—	—	+	+	+	+	+

対照：+ H37R_v菌, 10日間培養

するため、温度と時間を変えて加熱処理を行った粗製材料に就て抗菌試験を行った。対照としては、ザイツ過器で過減菌を行ったのみの非加熱材料を用いた。

ii) 実験結果

第 2 表に示す如く、H37R_v菌に対する発育抑制力は、100°C 30分加熱処理した材料も、100°C 60分加熱処理した材料も、加熱しなかつた対照材料と比較して、その抗菌力に殆ど差がない。しかし、120°C 60分 (Autoclav) 加熱処理を行った材料では抗菌力の低下が著明であつた。

2) 透 析 性

i) 実験方法

抗菌性因子のセロファン膜 (No. 300) に対する透析性を実験する為、粗製材料をセロファン袋に入れ、約20倍量の蒸溜水中で、4°C 72時間透析を行った。その透析外液及び内液を何れも1/20に減圧濃縮して、その各々に就て抗菌試験を行った。

ii) 実験結果

第 3 表に示す如く、透析外液及び透析内液の有する抗菌力は原材料の有する抗菌力と比べて殆ど同様であつた。即ち抗菌性因子はセロフア

第 3 表 抗菌性因子の透析性

	16×	8×	4×	2×	1×	1/2×
透析外液	—	—	+	+	+	+
透析内液	—	—	+	+	+	+
粗製濃縮 材 料	—	—	+	+	+	+

対照：+ H37R_v菌, 10日間培養

ン膜を容易に透過するものと考えられる。

3) 溶 解 性

i) 実験方法

各種有機溶媒に対する溶解性を試験する為、次の様な実験を行った。即ち、一度乾固した材料に約50倍量の有機溶媒を加え、充分振盪、攪拌した後一昼夜放置し、その後濾紙により過して濾液と残渣とに分けた。残渣は濾紙上で更に各々同種の有機溶媒で洗滌した後乾燥せしめた。濾液は、之に洗滌液を加えて減圧下に乾固せしめた後に原材料 1g に対して 10cc の割合で蒸溜水に溶した。これを可溶性部分と呼ぶ。残渣も乾燥させた後、同じ割合で蒸溜水に溶かした。これを不溶性部分と呼ぶ。

有機溶媒としてはメタノール、エタノール、ブタノール、アセトン、エーテル、ベンゼンを使用した。

ii) 実験結果

上述の各溶媒に就て得た可溶性部分と、不溶性部分の両者に就て抗菌試験を行った結果は次の通りである。

第 4 表に示す如く、抗菌性因子は蒸溜水及び

第 4 表 抗菌性因子の溶解性

S.C.M.による抗菌試験 (H37R_v菌)

	可溶性部分	不溶性部分
メタノール	—	+
エタノール	+	+
ブタノール	+	—
アセトン	+	—
エーテル	+	—
ベンゼン	+	—
蒸 溜 水	—	—

対照：+ 10日間培養

メタノールに可溶である。一方ブタノール、アセトン、エーテル、ベンゼンには不溶である。メタノールにも殆ど不溶である。

Björnesjo は尿中抗菌性因子の有機溶媒への溶解性に関し詳しい検討を行い、エタノールのみ可溶性であり、他の溶媒には不溶性であると述べているのであるが、この実験に於ても確に種々の有機溶媒に不溶性であること及びそれらの溶媒よりはエタノールに僅かに溶け易い性質のあることを確認し得た。但し Björnesjo は不幸にしてメタノールに対する溶解性の検討を怠っていたが、皮肉にもメタノールこそは唯一最良の溶媒であることを初めて明かにしたのである。

4) メタノールによる抗菌性因子の抽出

i) 実験方法

粗製材料を一旦乾固した後、純メタノールを加え、充分振盪、攪拌して一昼夜以上放置したものを濾紙で濾過して混濁を除き、その濾液を再び減圧下に乾固し、原尿の64倍の濃度になる様に蒸留水を加えたものを**メタノール抽出材料**と呼ぶ。メタノール抽出材料の有する抗菌力を

粗製材料のそれと比較するため、前述した如く倍数稀釈を行つた試験液に就て、S.C.M.による抗菌試験を行つた。

ii) 実験結果

第5表に示す如く、メタノール抽出材料の有する抗菌力は、粗製材料のそれと比較してほぼ同じである。これは即ち抗菌性因子が、メタノールによつて容易に抽出されたことを示している。

5) 酵素による影響

i) 実験方法

メタノール抽出材料に就て、ペプシン（片山化学工業社製）、トリプシン（ドイツ・メルク社製）、エレプシン（東京化成工業社製）の3種の消化酵素を作用させて、抗菌性因子の活性が変化するかどうかを実験した。即ち、メタノール抽出材料 5cc に対して 0.5g の割合で消化酵素を加え、ペプシンの場合は、pH2、トリプシン及びエレプシンの場合は pH8 に pH を調整し、37°C 24時間放置した後、pH を再び中性に調整したものに就てその抗菌力を比較検討した。対照として酵素を加えず pH のみを pH2 及び pH8

第5表 メタノールによる抗菌性因子の抽出

	64×	32×	16×	8×	4×	2×	1×	1/2×	1/4×
粗製濃縮材料	—	—	—	—	—	+	+	+	+
メタノール抽出材料	—	—	—	—	+	+	+	+	+

対照：+ H37R_v菌, S.C.M.10日間培養

第6表 酵素作用による抗菌力の変化

	64×	32×	16×	8×	4×	2×	1×	1/2×	1/4×
メタノール抽出材料	—	—	—	—	+	+	+	+	+
抽出材料+Buffer (pH2)	—	—	—	—	—	+	+	+	+
抽出材料+Buffer (pH8)	—	—	—	—	—	+	+	+	+
抽出材料+ペプシン+Buffer (pH2)	—	—	—	—	+	+	+	+	+
抽出材料+トリプシン+Buffer (pH8)	—	—	—	+	+	+	+	+	+
抽出材料+エレプシン+Buffer (pH8)	—	—	—	—	+	+	+	+	+

対照：+ 培地 pH6.2, H37R_v菌, 8日間培養
pH8.0 Buffer : H₃BO₃-KCl, pH2.0 Buffer : KCl-HCl

に調整して、37°C 24時間放置した後、pHを再び中性にした材料を用いた。

ii) 実験結果

第6表に示す如く、ペプシン、エレプシンは何れも尿の抽出材料の抗菌活性をごく僅か乍ら減弱させた。特にトリプシンの場合、他の2者の場合と比べてこの傾向は著明であるが、それにしても大量の消化酵素による抗菌力の変化としては僅少であつた。

6) 定性反応

粗製材料中には尿素、尿酸を始め種々の塩類や、ペプチド、アミノ酸、糖等の存在が定性反応で証明された。勿論単に人尿を濃縮しただけのものであるから正常尿成分として考えられる物質が証明されるのは当然であるが、通常尿中に検出されない蛋白、糖等の反応も濃縮されている為陽性となる。

第5章 濾紙培養法

先に述べた実験結果より、尿中抗菌性因子の性質が或る程度判明したが、これ等の性質を利用して直接抗菌性因子を分離精製する試みは、Björnesjo 等の実験の結果を考えても失敗に終る公算が大きいことに鑑み、私はペーパークロマトグラフィーの原理を応用して、一つの新しい実験方法を考案した。之を「濾紙培養法」と呼ぶことにする。

1) 実験方法

粗製材料或はメタノール抽出材料0.03ccを一次元ペーパークロマトグラフィー（上昇法）の要領で、蒸溜水を溶媒として2cm×40cmの濾紙（東洋濾紙 No.50）に約20~25cmの高さ迄展開した。これを風乾した後、原点よりフロント迄濾紙を各1cm毎に切断し、この濾紙片を80°C 3時間乾燥滅菌した後、1枚づゝ取出して岡・片倉培地の斜面中央にピンセットを用いて貼布した。各試験管には原点を1としフロントを最終とする一連の番号を記しておく。これら各試験管に結核菌の石油ベンゼン浮游液を0.1ccづゝ、培地斜面全体に行き亘るように注入し、封蝋の後、37°Cで約1ヶ月間培養した。実験結果の

判定は次の如く行つた。

- ++：培地全面及び濾紙片上にも平等に菌の発育が認められたもの。
- +：濾紙片上及びその周辺には菌の発育が認められなかつたが、それ以外の培地表面では旺盛な菌発育が認められたもの。（軽度の発育阻止）
- ：濾紙上のみならず殆ど培地全面に亘つて、菌発育が抑制されたもの。

即ち、濾紙片に抗菌性物質が吸着されていれば、その活性の強さに応じて結核菌の発育は濾紙上及びその周辺部に於て、部分的若くは全面的に抑制されるものと考えられた。

以上の如く濾紙に於ける抗菌性物質の分布を濾紙培養法によつて試験すると共に、同時に同じ試料を展開した濾紙に就て、その化学的成分の分布を検査する為、種々の定性反応を行つた。

2) 実験結果

i) 細菌学的検索

結果は第7表に示す如く、H37R_v菌及びBCG菌に就て行つた実験では、一定のR_fに相当し

第7表 濾紙培養法による実験成績

x	R _f				
	1.0	±	-	++	++
	0.9	++	-	++	++
	0.8	++	++	++	++
	0.7	++	-	++	++
	0.6	+	+	++	++
	0.5	-	-	++	++
	0.4	++	++	++	++
	0.3	++	++	++	++
	0.2	++	++	++	++
	0.1	++	++	++	++
		H37R _v 菌	BCG菌	鳥京菌	607号菌

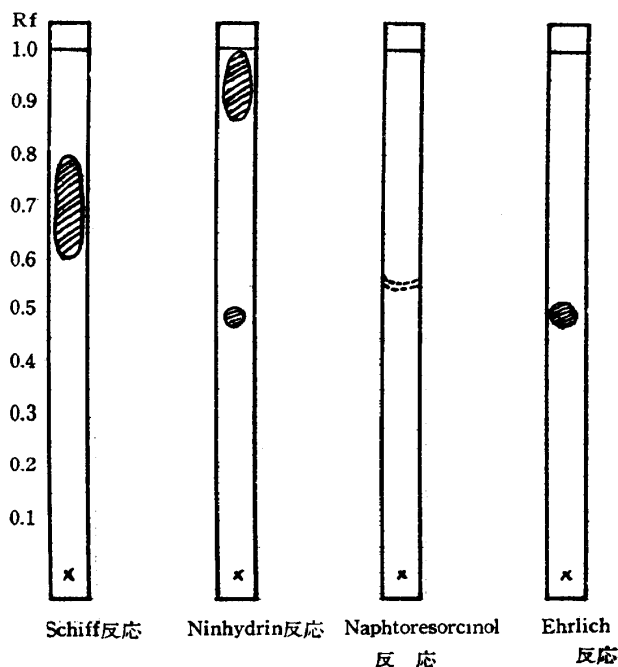
- H37R_v菌：4週間培養
- BCG菌：4週間培養
- 鳥京菌：3週間培養
- 607号菌：10日間培養

て、発育阻止帯が認められた。即ち H37R₆ 菌の場合、菌発育は Rf 0.5 附近とフロントの 2ヶ所に於て抑制されたが、時によつてはフロントに相当する発育阻止帯を欠除していることもあつた。BCG 菌の場合は更に多くの阻止帯が認められた。即ち H37R₆ 菌の場合と同様の Rf 0.5 附近及びフロントの 2ヶ所の他に Rf 0.5 以上の部分に 1~2ヶ所の阻止帯を認める場合が多かつた。一方鳥京菌及び 607 号菌に就て行つた実験では、原点よりフロントに至る何れの部分にも発育阻止帯は認められなかつた。こゝに掲げた表は模式図である。

ii) 化学的検索

培養実験と同時に展開を行つた沱紙に就て、種々の定性反応を行つた結果は第 1 図の如くであつた。

第 1 図 沱紙上に於ける定性反応



即ち図の如く沱紙上には Schiff 反応, Ninhydrin 反応, Naphtoresorcinol 反応等多くの反応が認められ、これら反応陽性の部分が Rf 0.5 附近よりフロント迄の間に重り合つて存在していた。

先に抗菌試験によつて H37R₆ 菌に対する発育抑制が認められたフロント及び Rf 0.5 附近の 2ヶ所に就て更に詳しい検討を加える為次の如き実験を行つた。

先ず常に認められる Rf 0.5 附近に吸着された抗結核菌性因子を大量に得る為、一辺約 40cm の正方形の沱紙 (東洋沱紙 No. 50) を用いて、メタノール抽出材料約 1cc を蒸留水を溶媒として、湿室内で、ペーパークロマトグラフィー上昇法の要領で展開した。約 20~25cm の高さでフロントが達した時、沱紙を乾燥し、Rf 0.5 に相当する部分 (数ヶ所で沱紙を細長く縦に切抜いて行つた定性反応を参考として) を巾 1cm に亘つて切取り、少量の蒸留水中に切取つた沱紙を浸して抽出を行つた。この操作を繰返してメタノール抽出材料 10cc より得た Rf 0.5 に相当する部分の抽出液を一度乾固 (減圧下に) の後改めて 1cc の蒸留水を以て溶解した。乾固した状態では、この物質は茶褐色カルメラ様をした粘調な物質である。

以上の操作により調整された抽出液の示す定性反応は第 8 表の如くであつた。

第 8 表 Rf 0.5 附近の抽出液の定性反応

ビウレット反応 (+)	Amide Linkage あり
ミロン反応 (+)	Tyrosine あり
坂口反応 (+)	Arginin あり
ノイバウエル ロード反応 (+)	Indol 核あり
ニンヒドリン反応 (+)	α-amino-carboxyl, pattern あり
ズルフオサルチル 酸反応 (-)	Protein なし
硫安塩析 (-)	Protein なし
モーリッシュ反応 (+)	還元能力あり

即ち、この抽出液中には尚多数の物質の混在することが推定された。又、この様な方法によつて抽出を行つても、その収量が甚だ少いたため試料の純化、抽出には適当でないことが判つた。

以上の沱紙培養法による実験結果からは、人尿中の H37R₆ 菌に対する抗菌性因子としては 2 種以上の異つた物質が存在し得ることが推定されたに止まり、化学的同定の域に達することは到底不可能と考えられた。

第 6 章 : 考 按

健康人尿中の抗結核菌性因子に就て私の行つ

た実験では、此の因子は H37R₆ 菌及び BCG 菌に対して特に活性を示し、鳥京菌及び 607 号菌に対しては比較的活性を示さなかつた。この事實は伊藤¹⁰⁾が先に *in vivo* の実験で得た体液の低分子成分の抗菌作用とよく一致する結果である。

更に粗製材料中に含まれる活性因子は、恐らくはかつて Björnesjo や Dold 等が研究した尿中の抗菌性因子と同一のものを含むであろうことが推定されるが、又之等の成績と一致しない点もある。例えば Dold は加熱によつて抗菌力が増加する点から、この物質は正常尿中の尿素に由来するシアン化合物であろうと推定しているが、私の実験では熱安定性は強いが、長時間の加圧・加熱によつては活性が反つて減弱するのを認め、Dold の仮定は成立しないと考えられる。又 Björnesjo の述べたエタノール易溶性なる性質は私の場合には適合しないのみならず、メタノール溶解性に比してエタノールにはむしろ難溶性と考えられる程度のものであつた。但し、其の他の有機溶媒には甚だ不溶性であるという点ではよく一致している。この様な実験成績の幾分の喰違ひは、この抗菌性物質が単一のものでなく、2 種以上の物質の混在であると考えたと必ずしも不思議ではない。この事は沔紙培養法を用いることにより確められた。従来ともすれば一元的に考えられて来た抗菌性因子が、2 種類以上の抗菌性物質の混合であることを沔紙上のスポットの分離によつて確認されたのである。従つて Myrvik が Björnesjo の実験成績の中から抗菌性因子の有する性質を要約してただ一種類の物質、即ちアスコルビン酸がその本体であろうと考えたことは早計であるばかりでなく、そのメタノール難溶性という性質からも事實にそわないことは既に Björnesjo も指

摘したところである。兎に角抗菌性物質が2 種以上混在していることは、その化学的同定を困難にした主因であり、今後更に検討を要するゆえんである。

第7章 結 論

健康人尿の濃縮粗製材料に就て、その中に含まれる結核菌発育抑制因子の追求を行つた結果、此の因子は H37R₆ 菌及び BCG 菌に対し著明な発育抑制力を有し、加熱に対して比較的安定であり、セロファン膜を容易に透過し、水及び純メタノールに易溶性であるが、他の有機溶媒には不溶性であり、消化酵素による影響を殆ど受けない。又沔紙培養法という新法を用いた結果からすると、此の活性因子は2 種、或はそれ以上の物質より成立つているものと推定されるが、その物質の本体は不明である。

文 献

- 1) Dold, H., : Zeitschrift für Hygiene u. Infektionskrankheiten (1957) **127**, 304.
- 2) Björnesjo, K.B., : Acta Tuberc. Scandinav., (1951) **25**, 425.
- 3) Björnesjo, K.B., : Acta Tuberc. Scandinav., (1951) **25**, 447.
- 4) Björnesjo, K.B., : Acta Tuberc. Scandinav., (1951) **25**, 457.
- 5) Björnesjo, K.B., : Acta Tuberc. Scandinav., (1952) **27**, 116.
- 6) Björnesjo, K.B., : Acta Tuberc. Scandinav., (1952) **27**, 123.
- 7) 森田満寿治 : 産婦人科の進歩, (1954) **6**, 335.
- 8) Myrvik, Q., : Am. Rev. Tuberc., (1954) **69**, 406.
- 9) 辻周介, 他 : Jap. J. Tuberc., (1954) **2**, 238.
- 10) 辻周介, 他 : Am. Rev. Tuberc., (1957) **76**, 90.