

人尿に於ける抗結核菌性因子の研究

〔第2編〕 精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32回日本結核病学会総会及び第14回日本結核病学会近畿地方学会にて報告した）

第1章 緒 言

健康人尿より調整した粗製材料を用いて行った抗結核菌性因子に関する研究結果は前編¹⁾で詳述した。即ち抗菌性因子は熱に安定であり、セロファン膜を容易に透過し、水及び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、2種以上の物質より成立っていることが明かとなつた。しかし、この抗菌性因子に就て化学的同定を行う為には、更にその純粋化が必要である。そこで私は粗製材料を原料として、出来るだけ純粋に抗菌性因子を分離、抽出することを試みてみた。本編に於ては先ず抗菌性因子の精製過程に就て検討を加え、更にかくして精製された物質に就て2～3の検討を行ったのでここに報告する。

第2章 実験材料及び実験方法

1) 実験材料

前編¹⁾で述べた粗製材料及びメタノール抽出材料を用いて精製実験を行った。

2) 実験方法

実験材料に就て活性炭による吸着、濃縮実験、有機溶媒による精製、及びイオン交換樹脂による分割等種々の精製実験を行った。詳細に就ては各章で述べる。

第3章 活性炭による吸着

1) 実験方法

醋酸処理した約100gの植物性活性炭を、径

15cmの漏斗に、厚さ2～3cmになるように流し込み、充分蒸溜水で洗滌した後、粗製材料約10ccを活性炭層を通して吸引濾過した。続いて蒸溜水1～1.5ℓを流して、硝酸銀による白濁がその濾液に証明出来なくなる迄洗滌した。以上の濾液を集めて「濾過部」と呼ぶ。次に20%醋酸水、7%アモニア水、純メタノールを溶出剤として、夫々約1ℓを炭層を通じて吸引濾過した。これを各種溶出剤に対する「溶出部」と呼ぶ。濾過部及び溶出部は夫々別の容器に入れて、完全に乾固する迄減圧濃縮操作を行った。その後正確に10ccの蒸溜水に溶解したものを原液として倍数稀釈を行った試験管列を作り、これに就て抗菌試験を行った。抗菌試験は蒸溜水により倍数稀釈した濾過部及び溶出部試料1ccに予め2倍濃度に調整してあるキルヒナー原液1ccを加え、更に0.3ccの栄研製血清アルブミンを添加した培地を作り、辻・山本²⁾の結核菌石油ベンゼン浮游液によるS. C. M.を行った。約10日間培養の後、結核菌の発育程度を染色検鏡して判定し、各試料の菌発育阻止濃度から、試料の有する抗菌力の程度を判定した。結核菌発育判定規準は次の通りである。

- +++：菌の発育旺盛で、集落が重り合い、網目状をしているもの。
- ++：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。

第 1 表 活性炭に吸着された抗菌性因子の溶出実験成績

		抗 菌 試 験									定 性 反 応			
		×32	×16	× 8	× 4	× 2	× 1	×1/2	×1/4	×1/8	ビウレツト 反 応	ミロン 反 応	アダムキ ーヴィツ 反 応	シツフ 反 応
溶 出 部	20 % 醋 酸 水	—	—	—	—	—	—	—	++	+++	+	+	+	—
	7 % アムモニア水	—	—	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	—	+	—	—
	純 メ タ ノ ール	—	—	—	+	++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	—
過 部		—	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—	—	—	+
対 照		—	—	—	—	—	++	+++	+++	+++	+	+	+	+

H37R_v菌、キルヒナー培地、10日間培養

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表に示す如く活性炭による吸着部（溶出部）には H37 R_v 菌に対する強い抗菌力があるに反して、過部には殆ど抗菌力が無かつた。即ち抗菌性因子はほぼ完全に活性炭に吸着されたものと思われる。又溶出剤として用いた3種類の試薬中、20%醋酸水が最も完全に抗菌性因子を溶出した。これは対照として粗製材料を用いて行つた抗菌試験の結果と比較して明かである。

この醋酸溶出液に就て種々の定性反応を行つて見ると、ビユーレツト反応陽性、アダムキーヴィツツ反応陽性、ミロン反応陽性、ニンヒドリン反応陽性、モーリッシュ反応陽性で、尚多数の物質が混在していることが想像された。

次にこの醋酸溶出部に就て、Björnesjö³⁾ が述べた如く、抗菌性因子が特にグリシンと関係があるかどうかについて検討を加える為、醋酸溶出部に就て、アミノ酸定量を行つた。アミノ酸の同定及定量は扇形濾紙によるペーパークロマトグラフィを行つた後、ニンヒドリンで発色させ、デンストメーターによつて発色の程度を概ね5段階に分けて比較したものである。

この結果は第2表の如くであつたが、溶出液中には glutamine, glycine, asparagine が比較的多量に混在していることが判つた。しかしこれらアミノ酸のサンプルを用いて行つた抗菌試験では通常尿中に存在するこれらアミノ酸の濃度

第2表 活性炭よりの醋酸溶出部に含まれるアミノ酸定量実験成績
(扇形ペーパークロマト
グラフィによる)

	第1回	第2回		第3回	
	水解後	水解前	水解後	水解後	水解前
Leucine	1		1	2	1
Tryptophane	0.5		2		1
Methionine+Valine	1		1.5		1
Tyrosine	1	1		1	
Alanine	1.5	1	2	1	1
Glutamine				2	
Glutamic Acid	5		5		5
Glycine	4	2	4.5		4.5
Asparagine		4		4	
Aspartic Acid	4		4.5		5
Serine	1		1		1
Histidine	3		3	1	3
Ornithine	3.5			1	4
Lysine	1	1	1		1
Cystine	1	2	1		1

加水分解: 6 N-HCl 15時間加熱

では抗菌力を認めないと言われているので、これらのアミノ酸が直接抗菌力の原因となつてゐるとは考え難い。

以上の活性炭による吸着実験の成績から、抗菌性因子がよく活性炭に吸着され、而もよく活性を失わずに20%醋酸水により溶出されることが判つたが、この溶出液も未だ多数の介雑物の存在が推定され、純粋な状態であるとは言えなかつた。そこで次に有機溶媒による溶解度の差を利用して、抗菌性因子の精製を試みた。

第4章 有機溶媒による精製

1) 実 験 方 法

前編で述べた如く、抗菌性因子は蒸溜水及び

純メタノールには良く溶けるが、その他の有機溶媒、即ちブタノール、アセトン、ベンゼン、エーテル等には不溶性である。故に濃縮乾固したメタノール抽出材料をこれら不溶性の薬剤で充分洗滌することにより、これら有機溶媒に溶け易いと思われる脂肪及びその分解産物の大部分を取り除くことが可能と考えられる。私はエーテル及びアセトンを用いてメタノール抽出材料を充分洗つてみた。即ち材料（メタノール抽出材料10ccを乾固したもの）に約100ccのエー

テル或はアセトンを混和して、数時間放置後濾過するという操作を3回繰返した後、その残渣（不溶部分）に就て抗菌試験を行つた。

2) 実験結果

結果は第3表の如く、抗菌力の損失は殆んど認められなかつた。しかし、この試料に就ても、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、抗菌性因子に関しては不純であると思われた。

第3表 有機溶媒により洗滌した試料の抗菌試験成績

	64×	32×	16×	8×	4×	2×	1×	½×	½×
エーテル洗滌後	—	—	—	—	+	++	++	++	++
アセトン洗滌後	—	—	—	—	++	++	++	++	++
メタノール抽出材料	—	—	—	—	+	++	++	++	++

対照 : ++ H37R_v菌、S.C.M. 10間培養

第5章 イオン交換樹脂による系統的分割

1) 実験方法

この実験に使用したイオン交換樹脂は次の3種類である。

Amberlite IR-120

Amberlite IR-4B

Amberlite IRA-400

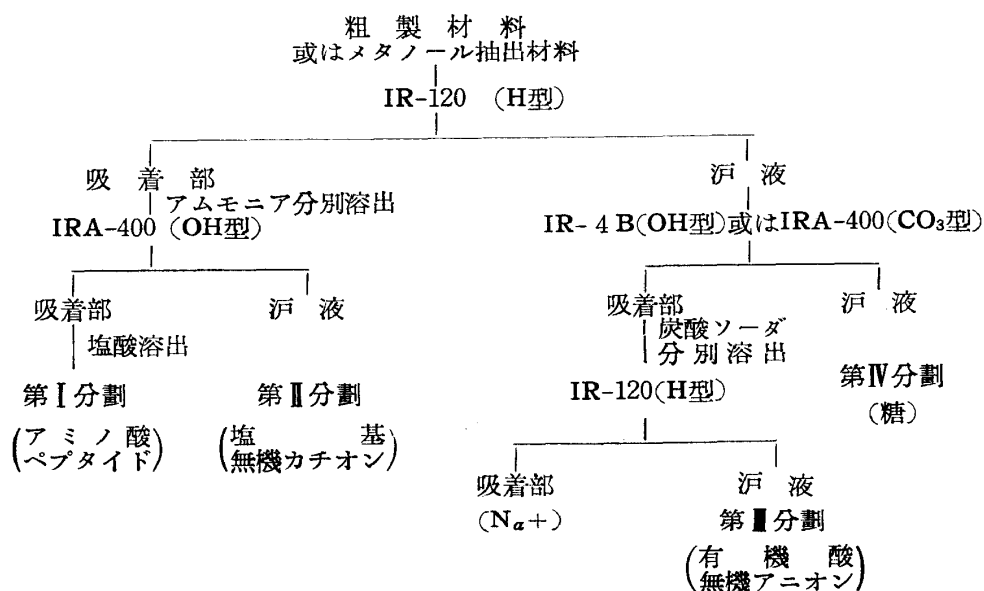
これらイオン交換樹脂を使用した系統的分割

法は次表の通りである⁴⁾。

即ち第4表の如く、第Ⅰ分割はアミノ酸及びポリペプチド、第Ⅱ分割は有機塩基及び無機カチオン、第Ⅲ分割は有機酸及び無機アニオン、第Ⅳ分割は糖を含む分割である。

粗製材料に就て以上の系統的分割操作を行い、Ⅰ～Ⅳの各分割を減圧濃縮操作により乾固し、材料と等量の蒸留水に溶かしたものに就て、夫々抗菌試験及び定性反応を驗した。

第4表 イオン交換樹脂による系統的分別方法



2) 実験結果

粗製材料10ccに就てイオン交換樹脂による系統的分割を実施した結果、Ⅰ～Ⅳの各分割を得た。これら各分割の性状及び定性反応は第5表の如くであつた。

第5表 各分割の性状

	外 観	ニンヒドリン反応	モーリッシュ反応
第Ⅰ分割	褐色、粘調	+	—
第Ⅱ分割	無色結晶性	—	—
第Ⅲ分割	褐色、粘調	—	—
第Ⅳ分割	褐色、粘調	—	+

H37R_r菌, キルヒナー培地, S.C.M. 10日間培養

即ち、各分割の分離は完全とは言えないにしても、概ね理論通りに分割されたものと思われた。

次にこれらの各分割に就て行つた抗菌試験の結果は次表の如くであつた。

第7表 第Ⅰ及び第Ⅲ分割の各種菌株に対する抗菌力

	濃 度	64×	32×	16×	8×	4×	2×	1×	対照
第Ⅰ分割	H37R _r 菌	—	—	—	+	++	++	++	++
	BCG菌	—	—	—	—	++	++	++	++
	鳥 京 菌	—	—	++	++	++	++	++	++
第Ⅲ分割	H37R _r 菌	—	—	—	+	++	++	++	++
	BCG菌	—	—	—	++	++	++	++	++
	鳥 京 菌	—	—	++	++	++	++	++	++

H37R_r菌及びBCG菌は10日間培養, 鳥京菌は7日間培養

S.C.M.

第Ⅰ分割に於ける抗菌力の原因が如何なる物質であるか知る為、この分割に 6N 塩酸を加えて、100°C 15時間加水分解操作を加え、その試料に就て、pH7.0で抗菌試験を行つた。

結果は第8表の如く、加水分解を受けた試料の抗菌力は著明に低下していた。即ち第Ⅰ分割の抗菌力の主因は加水分解操作によつてその活

第8表 第Ⅰ分割加水分解による抗菌力の変化

	64×	32×	16×	8×	4×	2×	1×
加水分解前	—	—	—	+	++	++	++
加水分解後	—	++	++	++	++	++	++

対照：++ H37R_r菌, S.C.M. 10日間培養

第6表 各分割の抗菌試験成績

	64×	32×	16×	8×	4×	2×	1×	対照：++ pH7.0
第Ⅰ分割	—	—	—	+	++	++	++	
第Ⅱ分割	++	++	++	++	++	++	++	
第Ⅲ分割	—	—	—	+	++	++	++	
第Ⅳ分割	++	++	++	++	++	++	++	

即ち第6表の如く、H37R_r菌に対しては第Ⅰ及び第Ⅲ分割のみが抗菌力を有し、第Ⅱ及び第Ⅳ分割には抗菌力が全く認められなかつた。

更に、この第Ⅰ及び第Ⅲ分割に就て、BCG菌及び鳥京菌の発育に対する抑制力を試験した。

結果は第7表の如くであり、第Ⅰ及び第Ⅲ分割とも BCG 菌に対して発育抑制力を示すが鳥京菌に対しては、H37R_r菌や BCG菌の場合程強い抑制力を示さなかつた。これは前編に述べた粗製材料のこれら菌株に対する発育抑制力の持つ傾向と大体同じである。

性を失うという事実から、ポリペプチドであることが推定された。

第Ⅲ分割の抗菌性因子に就ては、その原因が如何なる物質によるか未だ充分証明出来なかつたが、エーテル醋酸水及びフェノール蟻酸水を溶媒として、ペーパークロマトグラフィー（上昇法）を行い、B.P.B.—アムモニアガスによる検出で2種類以上の酸が含まれている事を知つた。

この分割は、未だこの段階では結晶とならず茶褐色カルメラ様の粘調な物質であり、高分子の有機酸を含んでいるとも思われるが、更に詳しい検討を加える為には純化する必要があると思われる。

第6章 考 按

健康人尿中の抗菌性物質を追求し、出来るだけ純粋な形で取出そうと試みた。その試みは未だ完全に終了はしていなが、活性炭による抗菌性物質の吸着、溶出実験からは、得た材料は不純であつたにせよ、私の追求している抗菌性物質が、フェノール核をもつた芳香族化合物であることを充分疑い得る。

メタノールに可溶であり、他の有機溶媒に不溶であるという性質も、この物質の精製には有用な性質であると考えらる。

次に行つたイオン交換樹脂による系統的分割によつて、抗菌性因子として根本的に異なる2種の物質、即ち有機酸及びポリペプチドの2者が存在することを証明した。勿論、第Ⅰ分割に於てはアミノ酸が、第Ⅲ分割に於ては無機アニオンが混在しているのではあるが、これらが特に著明な抗菌作用を有しないということは、既に Björnesjo⁵⁾ や森田⁶⁾ が証明している。第Ⅰ分割の抗菌力が加水分解によつて著明に減弱するという実験結果も、やはり抗菌力の原因がポリペプチドにあるという推定を裏書きするものではある。第Ⅲ分割に就ては更に抗菌性因子を精製分離して検討を加える必要があると考えられる。しかし何れにせよ2種以上の物質が尿の抗菌力の原因となつていているという事実は過去に於て何人も指摘し得なかつたことであり、甚だ興味深い事実と言うことが出来る。

生体外に取出した材料に就て抗菌性因子の抽出、精製実験を重ねていることが、その操作中に起る材料の変性、特に結核菌の発育に有害な影響を有する分解産物を出現させる可能性があることは前編でも述べたが、之が吟味は、将来抗菌性因子の純粋分離が成功したあかつきに於て可能とならう。

第7章 結 論

- 1) 抗菌性因子は活性炭によりほぼ完全に吸着され、20%醋酸水によつてほぼ完全に溶出される。
- 2) 抗菌性因子はイオン交換樹脂を用いた系統的分割により、アミノ酸、ポリペプチドを含む分割、及び有機酸を含む分割に分れて存在する。
- 3) 更に詳しい検討の結果、抗菌性物質はポリペプチド及び高分子の有機酸であろうと推定される。

文 献

- 1) 第1編.
- 2) 辻周介, 他: Jap. J. Tuberc., (1954) 2, 238.
- 3) Björnesjo, K. B., : Acta Tuberc. Scandinav., (1952) 27, 116.
- 4) 佐竹一夫, : クロマトグラフィー (共立全書, 12) (1955) 56.
- 5) Björnesjo, K. B., : Acta Tuberc. Scandinav., (1951) 25, 447.
- 6) 森田満寿治: 産婦人科の進歩 (1954) 6, 335 .