

原 著

健康人尿中の結核菌発育抑制因子の研究

—— 採集方法と活性との関係 ——

京都大学結核胸部疾患研究所

大島 駿作, 西田 正行, 辻 周介

ミドリ十字中央研究所

森本 和郎

甲南大学理学部

小木 時夫, 北野 敏, 西田 敏弘

代本 明美, 桑田 蕃, 渡辺 熙

正常動物の体液中に著明な結核菌発育抑制作用を有する低分子物質が存在することは、辻—伊藤の Chamber 法^{1,2)} による実験の結果明らかとなった。本物質は健康人の尿^{3,4)}、血清^{5,6)}、正常動物の血清^{5,6)} 及び臓器^{7,8)}中に存在し、免疫動物においても特に量的増加を認めなかった⁹⁾。従って結核感染に対する生体の自然抵抗力に関連する物質と考えられる。

著者は健康人尿を実験材料として結核菌発育抑制因子を追究し、著明な活性を示すペプチドの分離に成功した^{10,11)}。しかし、本物質の収量が微少なためその化学構造を決定するには至っておらず、その生物化学的重要性の故に、更に実験を進めて活性因子の全貌を明かにしたいと考えている。従って化学構造決定に必要な量の試料を得るため、多量の尿を処理出来る実験方法について研究したので、その成績を以下記述する。

〔実験材料及び実験方法〕

尿の採集

昭和43年9月より昭和45年7月に至る期間、主として陸上自衛隊及び大阪市内各種工場の労務者より尿を

採集した。尿 1500ℓ を1ロットとし、各ロット毎に番号を附して実験に用いた。

活性炭カラムクロマト

粒状活性炭（和光純薬社製）を用い、10×100cm のカラムを作製、醋酸活性化した。各カラム宛尿 3000ℓ について吸着操作を行った後、蒸留水 5ℓ、5%醋酸 5ℓ を用いて洗滌した。次で20%醋酸 10ℓ を用いて溶出、溶出液を減圧乾固した。

メタノール抽出

50g の材料に 2ℓ のメタノールを加え、約60分間攪拌後 2°C で一夜静置した。これを遠沈して得た上清を一度減圧下で乾固した後、再び 2ℓ のメタノールを加えて上記と同様の抽出操作を行った。

陰イオン交換樹脂によるカラムクロマト

Amberlite CG 400 (Amberlite 社製、200~400メッシュ)を用いて 10×50 cm のカラムを作製し、OH⁻型として使用した。通常1ロット当り1本のカラムを必要とした。試料吸着後、水洗、2N 塩酸 3ℓ で溶出 a, b 及び c の3分割を得た。各分割を迅速に減圧乾固し、次段階の実験材料とした。

陽イオン交換樹脂によるカラムクロマト

Dowex 50W×8 (Dow 社製、200~400メッシュ)を用いて 2.4×26 cm のカラムを作製し、H⁺型として使用した。5~6g の試料を水約 50ml に溶解、吸

着, 水洗の後 1.5 N 塩酸 3ℓ, 4N 塩酸 1ℓ を用いて逐次溶出した結果, A, B, C, D, E 及び F の 6 分割を得た。各分割は減圧乾固後, 低温下に保存した。

抗菌試験

試料は水溶液とし, 蒸留水を用いて倍数希釈列を作製した(通常1:1~1:32の6本, 必要に応じて更に低濃度のものを追加した)。

これに等量の10%牛血清アルブミン(Armour社製)添加キルヒナー培地(2倍濃度)を加えて試験培地として使用した。試験菌としては Sauton 培地培養の人型結核菌株 H37 Rv, 牛型結核菌株 RM 及び BCG, 鳥型結核菌株鳥京及び Mycobacterium phlei を用いた。試験方法はすべて Slide Culture Method¹²⁾ によった。

Mycobacterium を除く他の細菌及び糸状菌に対する抗菌試験も上記と同様試料の倍数希釈列に2倍濃度のブイヨン或は葡萄糖ブイヨンを等重添加した培地を用い, Coleman(Model 9) の比濁計で250単位の濃

度にした各菌液を1滴(約0.05 ml)を滴加して試験した。試験菌としては *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Nocardia asteroides*, *Sporotrichum schenckii*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhosa*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus albus*, *Staphylococcus aureus* 及び *Sarctina lutea* を使用した。

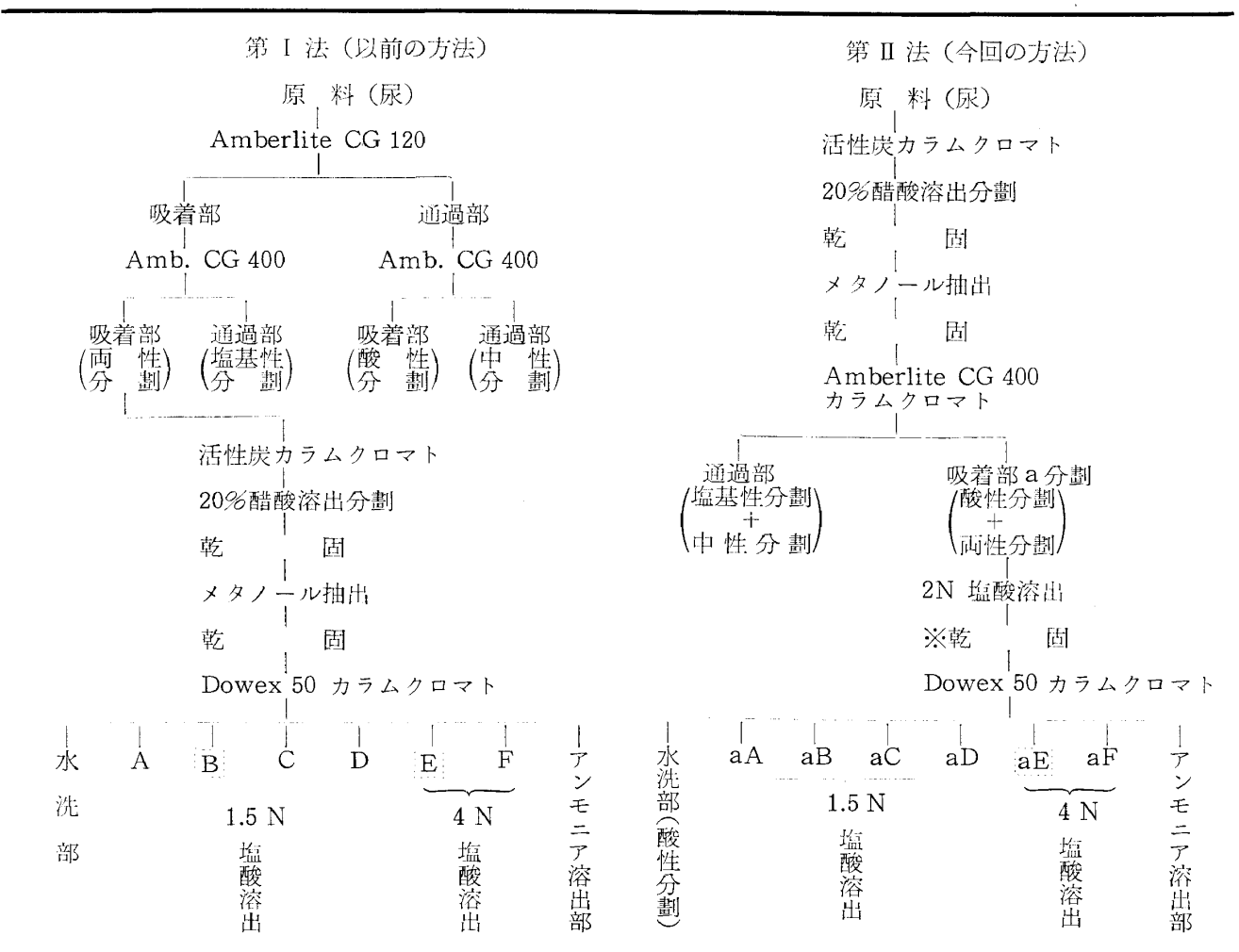
紫外線吸光度測定

抗菌因子精製の過程で得た各分割については UV レコーダー(LKB社製 253 mμ)で連続的に紫外線吸光度を記録した。更に必要に応じてベックマン型分光光度計(島津社製)を用いて手動で UV 吸光度の測定を行った。

薄層クロマト

各分割についてはシルカゲル薄層クロマトを行った。溶媒としては主としてブタノール, 醋酸, 水(4:2:1)及びブタノール, ピリジン, 醋酸, 水(30:20:6:24)を用い, 上昇法でクロマトを行った。呈色反応として

表 1



は、ニンヒドリン反応、パウルリ反応、ヨード呈色反応を行い、又 UV 吸収についても試験した。

〔実験成績〕

1. 採集方法と活性分画 E (aE) の収量

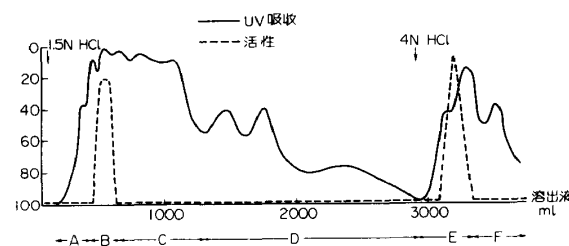
表1は今回行った試料の精製方法(第Ⅱ法)を従来の小規模な精製方法(第Ⅰ法)と比較対照したものである。第Ⅰ法ではイオン交換樹脂処理が先行したため、大型カラム(径10cm, 長さ50cm)を用いてもその容量は各カラム当り10ℓの尿処理が限界であった。そこで第Ⅱ法においては第Ⅰ法の第2段階で行っていた活性炭カラムクロマトを先に実施した。この結果多量の尿処理が可能となったが(1本の活性炭カラムに各300ℓ)、通過速度が遅延せぬ様粒状活性炭を使用したため単位尿量当りの収率は低下して最終分劃の収率は第Ⅰ法の6%強に過ぎなくなった。しかし原尿の処理速度が約30倍速くなったため結果的には収量は第Ⅰ法の1.8倍に達し、1ロット(1500ℓ)当り平均255mgの活性分劃aEを得た。この収率減少の最大原因は表2で明かな如く、第Ⅱ法の前尿→(活性炭カラムクロマト)→メタノール抽出分劃の間に活性約5倍上昇、乾燥重量約1/333に減少、と著明な活性の損失が認められることより、活性炭

粒子が粗大となったため全体として吸着容量が減少したためと考えられる。

又第Ⅱ法においては第Ⅰ法で得た分劃Bに相当する分劃aBに全く抗菌活性を認めなかった。これについては次に述べる。

2. 第Ⅰ法と第Ⅱ法における Dowex 50 カラムクロマトの実験成績の比較

第Ⅰ法 試料4g カラム寸法 2.4×26 cm
Dowex50W×8(200~400メッシュ) Uvicord



第Ⅱ法 試料6g カラム寸法 2.4×26 cm
Dowex50W×8(200~400メッシュ) Uvicord

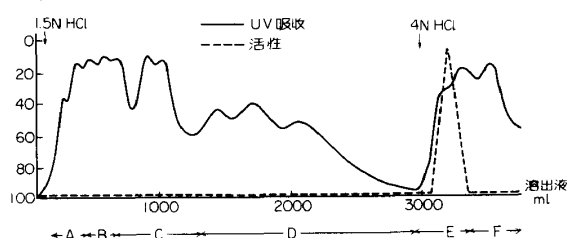


図1 第Ⅰ法と第Ⅱ法における Dowex50 カラムクロマトの実験成績

表2 第Ⅰ法と第Ⅱ法における各分劃の活性と収量

第Ⅰ法			第Ⅱ法		
分劃	収量 乾燥重量 mg/尿ℓ	活性 H37 Rv 菌にたい する最低発育阻止 濃度 mg/ml	分劃	収量 乾燥重量 mg/尿ℓ	活性 H37 Rv 菌にたい する最低発育阻止 濃度 mg/ml
原料(尿)	31,300	20	原料(尿)	31,300	20
両性分劃 (活性炭カラム クロマト)	210	1	(活性炭カラム) メタノール 抽出分劃	94	4
メタノール 抽出分劃	75	0.25	Amb. CG 400 “a”分劃	13.5	0.25
B分劃	5.4	0.011			
E分劃	2.8	0.008	aE分劃	0.17	0.016

図1は第I法及び第II法におけるDowex 50カラムクロマトの紫外線吸収及び抗菌活性の分布曲線を示すものである。紫外線吸収曲線に関しては両者の間に著明な相違は認められない。一方抗菌活性については分割Eに両者共略同様に著明な活性を認めたが、分割Bの活性は第I法にのみこれを認めたのみで、第II法の場合、全く活性が欠除していた。この理由については①活性炭カラムの吸着状態の相違②精製過程における塩酸溶液よりの減圧乾固(表1※印、第II法にのみあって、第I法にはこれに該当する操作はない)の際に起る加水分解、などが挙げられる。第I法によって得られる活性分割Bは図2の如く、採集後一度減圧乾固して同条件下にDowex 50カラムで再クロマトすると、活性は100%分割Eの位置に移動し、元の分割Bの位置には全く活性を認めなくなる。一方分割Eについては再クロマトの結果、元と同じ位置に100%活性を証明したことから著者はこれらの現象を、分割B中の活性物質が部分的加水分解を起し、比較的酸に安定で且つ低分子である分割E中の活性物質に変化したものと考ええる。この実験成績より考えて、分割B中の活性物質

は、精製過程中に水解を起し易く、これが第II法の場合分割Eにのみ活性を認めた理由と推定される。

3. 第I法と第II法における分割Eの比較

第II法によって得た分割Eは2～3種類の結晶性物質と褐色粘調な物質の混合物で、ニンヒドリン反応陽性、モーリッシュ反応陰性の分割であり、薄層クロマトによって数個のヨード反応陽性のスポットを認める。

本分割は人型結核菌や牛型結核菌に対してはin vitroで著明な抗菌作用を示し(最低発育阻止濃度 $16\mu\text{g/ml}$)、Streptomycin, PAS及びINH耐性菌にも夫々同様の効果を發揮するが、鳥型菌, *M. phlei* に対する抗菌作用は比較的微弱で、Mycobacterium以外の微生物に対しては $250\mu\text{g/ml}$ の濃度では発育抑制作用を示さない(表3)。

以上の化学的性状及び生物学的性状は第I法で得た分割Eの場合と殆ど同じである。

分割Eは多量のadenineを含んでおり¹³⁾、adenine自身結核菌発育抑制作用を有するが、その作用は微弱(最低発育阻止濃度 $250\sim 500\mu\text{g/ml}$)であるので尿の主抗菌因子は分割Eにおける他の微量物質であると考えられ、その活性の極めて高いことが予想される。現在18,000ℓの尿を第II法に従って処理し、約3gの分割Eを得て、更に主因子と思われる物質を分離精製中であるが、第I法の場合¹⁴⁾と同様、ペプチド様物質を得ている。従って第II法によって得た活性物質も第I法の場合と同一の物質であろうと考えられる。

〔考 按〕

人尿中に著明な結核菌発育抑制作用を有する因子が存在することは1947年 Dold¹⁴⁾ によって報告されたがその本体については今日に至っても尚不明の点が少なくない。Björnesjo¹⁵⁻¹⁹⁾はこの抗菌因子の本体について研究し、或る程度迄その性状を明かにしたが、彼によれば健康人尿中の結核菌発育抑制因子は、低分子の不揮発性

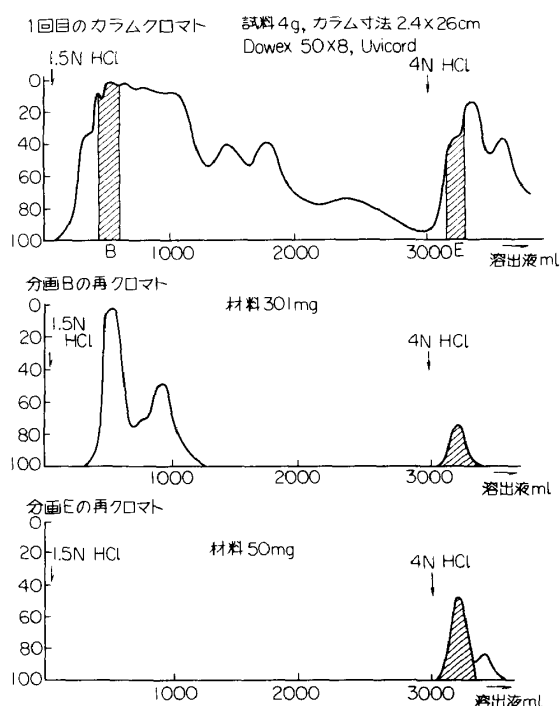


図2 B分割及びE分割の再カラムクロマトの成績

表3 種々の微生物に対する分割 aE の発育抑制作用

微生物	培地	培養方法	最低発育阻止濃度 $\mu\text{g/ml}$
Mycobacterium			
H 37 Rv	キルヒナー	SCM	16
SM 耐性菌	"	"	16
PAS 耐性菌	"	"	16
INH 耐性菌	"	"	16
牛 RM	"	"	16
BCG	"	"	16
鳥 京	"	"	抵抗性
M. phlei	"	"	"
E. coli	ブイヨン	浮游法	抵抗性
Sal. typhosa	"	"	"
B. subtilis	"	"	"
Sh. dysenteriae	"	"	"
St. albus	"	"	"
St. aureus	"	"	"
Sar. lutea	"	"	"
Cand. albicans	葡萄糖ブイヨン	浮游法	抵抗性
Asp. famigatus	"	"	"
Noc. asteroides	"	"	"
Spor. schenckii	"	"	"

抵抗性：分割 aE 250 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で発育抑制を認めなかったもの。

物質で、活性炭に吸着され、電気透析により陽極側に移動し、水、エタノールに可溶性であるが、エタノール以外の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示す。本因子は結核患者尿中で特に増量しないことが明かにされており、この点では自然低抵抗力に關与する一因子という著者の主張と一致している。その後 Myrvik and Weiser²⁰⁾ はこの Björnesjo の報告より尿中の抗結核菌性因子はアスコルビン酸又はその誘導体ではないかと推定し、アスコルビン酸を大量投与した人尿に結核菌発育抑制力が増強するという実験成績より、活性因子の本体はアスコルビン酸又はその誘導体であろうと結論した。しかし Björnesjo²¹⁾ はこの Myrvik らの結論に対し、抗菌因子のメタノール溶解性がアスコルビン酸と異なる点を挙げて反対した。その後著者らは、結核感染に対する生体の防衛機序に關する系統的研究において、所謂 Chamber 法^{1,2)} を用いた体液性抗菌因子につ

いて実験を行い、健康人尿中に著明な結核菌発育抑制作用を有するペプチド様物質の存在を証明し、或る程度迄これを分離精製することに成功した^{10,11)}。本物質は人尿のみならず健康動物の血清や臓器内にも存在するものと推定される¹⁰⁾。先に Dubos and Hirsch は仔牛の胸腺より Thymus peptide を分離し^{22~24)}、その後 Franc は抗結核菌性 ペプチドをミルク中に証明した²⁵⁾。この様に正常動物の体液中に結核菌発育抑制作用を有するペプチドが発見されたが、その活性は著者らが分離したペプチドが最も強力である。従ってその化学構造を決定することは結核感染に対する動物の自然抵抗力の機構解明上極めて重要なことと思われる。

しかし、尿中の微量成分に過ぎないペプチドを自然の形のまま、而も純粋に採集することは、今日の技術をもってしても尚困難であり、その分離操作中若干分解することは止むを得ないものと考えられる。実験成績に示した様に著

者らのペプチドも或る程度水解を受けてかなり低分子化しているが、その抗菌活性に関しては表2に見られる様に殆ど減弱が認められないので、むしろその活性グループの化学構造の決定には好都合であるとも言い得るであろう。

18,000ℓの人尿を処理して約3gの活性分劃aEを得たが、この中に含まれる目的物質は約1/100と推定される。著者らが開発した新しい方法によって更に多量の材料が処理されることにより、近い将来にその本体が明かにされるものと期待している。

〔要 約〕

健康人尿中の結核菌発育抑制物質の中でも最も著明な抗菌活性を有するペプチド様物質を分離精製するため、従来の小規模な分離精製方法に代る新方法について研究した。その結果、活性物質の活性グループを損わないで、従来の方法で得られた分劃Eに相当する活性分劃aEをかなり多量に収獲することが出来た。

〔謝 辞〕

本研究を行うに当って技術的援助を頂いた小原保代様に感謝致します。

文 献

- 1) Tsuji, S. and Ito, K., An in vivo method of culturing tubercle bacilli: The chamber method, *Am. Rev. Tuberc.*, **72**: 393~397, 1955
- 2) Tsuji, S., Ito, K. and Oshima, S., The role of humoral factors in native and acquired resistance to tuberculosis, *Am. Rev. Tuberc.*, **76**: 90~102, 1957
- 3) 大島駿作：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, 京結紀要, **7**: 75~81, 昭34
- 4) 大島駿作：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, 京結紀要, **7**: 82~86, 昭34
- 5) 藤田 豊：各種動物血清低分子分劃中の抗結核菌因子に関する研究〔第一篇〕粗材料としての抗菌性因子の研究, 京結紀要, **7**: 7~17, 昭34
- 6) 藤田 豊：各種動物血清低分子分劃中の抗結核菌因子に関する研究〔第二篇〕抗菌性因子の精製及び精製材料による研究, 京結紀要, **7**: 18~31, 昭34
- 7) Nakashima, M., Studies on anti-tuberculous low molecular factors in various organs of rabbits, Part I. Studies on crude materials, *Acta Tuberc. Jap.*, **9**: 36~46, 1959
- 8) Nakashima, M., Studies on anti-tuberculous low molecular factors in various organs of rabbits, Part II. Studies on fractionated purified materials using ion exchange resins, *Acta Tuberc. Jap.*, **9**: 47~60, 1959
- 9) 辻 周介：結核における生体の防衛機序—とくに体液性因子について—, 結核, **33**増: 1~13, 昭33
- 10) Oshima, S., Fujita, Y., Takeoka, A., Nakashima, M. and Tsuji, S., Chemical analysis of the role of humoral factors in native and acquired resistance to tuberculosis, *Am. Rev. Tuberc.*, **78**: 884~898, 1958
- 11) Tsuji, S., Oshima, S., Fujita, Y., Okada, N. and Nakashima, M., Isolation from human urine of a polypeptide having marked tuberculostatic activity, *Am. Rev. Resp. Dis.*, **91**: 832~838, 1965
- 12) Tsuji, S., Yamamoto, H. and Ito, K., An improvement of the slide culture method, *Jap. J. Tuberc.*, **2**: 238~241, 1954
- 13) 大島駿作, 西田正行, 辻周介：健康人尿中の結核菌発育抑制因子の精製, 結核, **45**: 31, (昭45)
- 14) Dold, H., Nachweis tuberkelbazillenfeindlicher Stoffe in normalen Menschen Harn und Untersuchungen über die Natur dieser Stoffe, *Z. Hygiene Infektionskr.*, **127**: 304~315, 1947
- 15) Björnesjo, K. B., On the effect of human urine on tubercle bacilli, *Acta tuberc. scandinav.*, **25**: 425~441, 1951
- 16) Björnesjo, K. B., On the effect of human urine on tubercle bacilli: II. The tuberculostatic effect of various urine constituents, *Acta tuberc. scandinav.*, **25**: 447~456, 1951
- 17) Björnesjo, K. B., On the effect of human urine on tubercle bacilli: III. The solubility of the tuberculostatic factor in organic solvents, and its behavior in dialysis and

- electrodialysis, *Acta tuberc. scandinav.*, **25**: 457~462, 1951
- 18) Björnesjo, K. B., On the effect of human urine on tubercle bacilli: IV. Some attempts to concentrate and purify the tuberculostatic factor, *Acta tuberc. scandinav.*, **27**: 116~122, 1952
- 19) Björnesjo, K. B., On the effect of human urine on tubercle bacilli: V. Experiments with the tuberculostatic factor purified from urine, *Acta tuberc. scandinav.*, **27**: 123~133, 1952
- 20) Myrvik, Q. N., and Weiser, R. S., Studies on the tuberculoinhibitory properties of ascorbic acid derivatives and their possible role in inhibition of tubercle bacilli by urine, *Am. Rev. Tuberc.*, **69**: 406~418, 1956
- 21) Björnesjo, K. B., Tuberculostatic factor in normal human urine, *Am. Rev. Tuberc.*, **73**: 967, 1956
- 22) Dubos, R. J., and Hirsch, J. G., The antimycobacterial activity of a peptide preparation derived from calf thymus, *J. Exp. Med.*, **99**: 55~63, 1954
- 23) Hirsch, J. G., and Dubos, R. J., Chemical Studies on a basic peptide preparation derived from calf thymus, *J. Exp. Med.*, **99**: 65~78, 1954
- 24) Hirsch, J. G., Mechanisms involved in the antimycobacterial activity of certain basic peptides, *J. Exp. Med.*, **99**: 79~88, 1954
- 25) Franc, Z., Antituberculous factors in milk, *Nature*, **182-4639**: 884~885, 1958