

下等動物より抗菌物質の探索

第1報 ミミズよりの主として抗結核菌物質の抽出について (その1)

広島大学医学部細菌学教室 (主任 占部教授)

小 島 三 喜 男

(昭和 28 年 9 月 5 日受付)

(この研究の一部は文部省科学研究費によつた。占部)

緒 言

現在広く用いられつつあるいわゆる抗生物質は凡て植物性微生物に由来するものであることは今ここに多言を要しないところであるが他方いまだなお実用の域に達してはいないけれども動物系物質にも多かれ少なかれ抗菌作用のあるものが存在することは古くは Hankin¹⁾ (1890)によつて猫の脾及び淋巴腺からの抽出物について証明され、その後 Vaughn²⁾も脾・大脳・甲状腺及び辜丸組織から殺菌性物質の抽出に成功したという。又最近 Bloom³⁾ は種々の動物の盲腸・胸腺及び脾からの抗脾脱直菌分劃の抽出に成功し Bloom & Blake⁴⁾ は屍組織内にも活性分劃を発見し更に Bloom⁵⁾ は胸腺の蛋白及びプロタミンの枯草菌に対する抗菌作用に関して報告しており、又 Walter⁶⁾ は牛脾から硫酸処理により抽出した正常組織蛋白に抗枯草菌作用のあることを認め、Stahmann⁷⁾ はその活性が蛋白のアミノ酸含量に関係しているかも知れぬことを指摘した。以上のほかに Dubos⁸⁾ は動物組織内における抗結核因子の存在を指摘しており続いて Hirsch & Dubos⁹⁾ は脱脂した牛の腎粉末を酸性エタノールで抽出することによつて得られる結晶性物質が各型結核菌に対して静菌的並びに殺菌的に作用しうること、非病原性抗酸菌には無効であること及びこの物質が化学的精製分析の結果 Spermin であることを報告している。一方藤浪⁹⁾ や浜本¹⁰⁾ は蠅蛆よりの抽出物が創傷に対して治療効果があることを報告しており、田中¹¹⁾ はミミズの煎汁抽出物に解熱作用のあることを認めているがこれらは前者は酵素作用によるものであり後者は Antipyrin, Chinin 等の解熱剤と同様な作用機転によるものであつていずれも如上の直接抗菌作用物質とは自ら別箇のものであることはいう迄もない。

さて私どものところでは年来下等動物、ことにハエ・ウジ・ミミズ等よりの抗菌物質の探索を企て種々追究の歩を進めつつあるのであるが今回はまずそのうちのミミズよりの抗菌物質探索実験の一部について報告したいと思う。

I 実験方法

1) 実験材料

1951 年 10 月呉市上畑町の鼠より採集した体長 10cm

前後のミミズ。

II) 抽出法

(1) 蒸溜水による抽出法：ミミズ 100g を切割排土することなくホモゲナイザーで細砕し重量の約5倍量の蒸溜水 (pH6.6) を加え攪拌器で約1時間充分に攪拌して室温 (<20°C) 下で濾紙をもつて濾過しその淡桃色半透明濾液を直ちに氷室に収め凍結させると沈澱物と透明液層とに分かれる。これを室温下で自然融解させた後遠沈して得られる沈澱物にアセトン・エーテル等量液を加えてよく攪拌し再び遠沈する。その結果得られる管底部の灰褐色沈澱物を抽出物 F₁ と呼び上層部に生じた黒褐色浮游粘液層を別器に移して再び遠沈し上清を捨て自然乾燥させて得られる黒褐色沈澱物を抽出物 F₂ とする。

(2) 重曹水による抽出法：上記(1)における蒸溜水の代りに2%重曹水を用いて処理することにより得られる淡紅黄褐色透明の濾液に等量のアセトンを加えて生じる沈澱物を更に遠沈してアセトン・エーテルで洗滌後再び遠沈する。その結果の灰褐色微砂土状沈澱物を抽出物 F₃ とし、このさいの上清に等量のアセトンを加えて同様に操作することによつて得られる灰褐色粘土状の沈澱物を抽出物 F₄ とする。

(3) 醋酸水による抽出法：上記(1)における蒸溜水の代りに3%醋酸水を用いて処理することによつて得られる螢光色透明液に等量のアセトンを加えて以下(2)と同様にして得られる沈澱物の底部 1/3 を占める黒褐色粘土状のものを抽出物 F₅ とし更にこの際の上清に等量のアセトンを加えることによつて得られる淡褐色粘土状沈澱物を抽出物 F₆ とよぶ。

(4) 硫酸水による抽出法：2.5%硫酸水を用いて(3)に準じて操作すると収量の大きい白色微砂粉状沈澱物が得られる。これを抽出物 F₇ とする。

(5) 酒精による抽出法：上記(1)における蒸溜水の代りに84%酒精を約5倍量加え 50 日間 <20°C の室温に放置した後その浸漬液を濾過し 60°C 温槽中で溶媒を減圧縮去し約 1/100 に濃縮すると飴状濃縮物が得られる。これを抽出物 EA とする。

(6) 石油ベンゼンによる抽出法：(5)における酒精の代りに石油ベンゼンを用いて得られる濃縮物を抽出物

EB とする。

Ⅲ) 供試菌並びに移植菌量

(1) 一般菌：大腹菌・腸チフス菌・脾脱疽菌・枯草菌及びブドウ球菌(209P)のブイオン 24 時間培養液 1 白金耳量を生塩水 2cc に加え平等浮游液としたものの 1 白金耳量。

(2) 抗酸菌：人型結核菌 Frankfurt 株(人型菌), 鳥型結核菌 A62 株(鳥型菌) 及びスメグマ菌の卵培地上それぞれ 4 週, 2 週及び 1 週培養菌よりの 1mg/cc 生塩水平等浮游液 1 滴 (1/4 針)。

Ⅳ) 抗菌価測定法

(1) 一般菌について：抽出物 F₁ より F₇迄はその 0.03g 宛を 10cc 宛のブイオンに加えて懸濁液とし 100°C 30分 3 回滅菌しこれより出発してブイオンによる倍数稀釈液 3cc 宛を作り供試菌液を前記量宛移植後血温 24 時間培養し混濁発現の有無乃至程度をよみとり且つそれらよりの寒天平板培地への還元培養をも行つて移植菌の生死を追求する他に混濁が雑菌の迷入によるものでないことをも確かめた。その他に前記の各懸濁液 1cc を寒天培地 9cc に添加し平板としこれに供試菌液を前記量平等に塗抹し血温 24 時間保つた後集落発生の有無をも検査した。

次に抽出物 EA 及び EB については 0.1g 宛を 10cc のブイオンに溶かし 100°C 1 時間滅菌したものを原液としこれより出発して上記と同方式に従つて検討した。

(2) 抗酸菌について：抽出物 F₁~F₄ は 0.3% に同 F₅ は 0.6% にまた F₆, F₇ は 1% にそれぞれ懸濁せしめた Kirchner 原液(この際 Kirchner 液の pH 値には変動なし) 2.7cc 宛を各別に試験管 3 本に分注し, うち各 1 本は 100°C 30 分 1 回, 他の各 1 本は同 2 回, 残余の各 1 本は同 3 回間歇滅菌した後凡てに牛血清 0.3cc ずつを加えたものに前記の供試抗酸菌液を所定量ずつ添加移植し 37°C に保ち人型結核菌は 4 週及び 8 週後に, 鳥型結核菌では 3 週後に又スメグマ菌では 1 週後にそれぞれ発育の有無乃至程度を検し同時に還元培養をも行つて菌の生死を確かめた。

次に抽出物 EA 及び EB は Kirchner 原液に 100 倍になるように加え (pH の変動なし) 100°C 1 時間滅菌した後これより出発して Kirchner 原液による倍数稀釈液(各管 2.7cc)をつくり, 各々に牛血清 0.3cc 宛を加えた後如上の供試菌を所定量移植しその後は前出の F₁~F₇ の場合と同様にして観察し成績を読みとつた。なおこの際の対照としては抽出物非添加血清 Kirchner 培地及び EA 及び EB 抽出に当つて使用の各溶媒を 10 倍稀釈になるように各別に加えた Kirchner 原液を 100°C 1 時間処置後その 2.7cc 宛に牛血清 0.3cc 宛を加えたものを充てた。

以上の他に別に 60°C 30 分 3 回間歇滅菌した同種抽

表 1 ミミズ抽出物の抗酸菌発育に対する影響
その 1 抽出物 F₁~F₇ の成績

抽出物	種別	F ₁		F ₂		F ₃		F ₄		F ₅		F ₆		F ₇		対照				
		0.3%		0.3%		0.3%		0.3%		0.6%		1%		1%						
		1 回	2 回	3 回	1 回	2 回	3 回	1 回	2 回	3 回	1 回	2 回	3 回	1 回	2 回	3 回	1 回	2 回	3 回	
人型 F 株	4 週	-	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	8 週	C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
鳥 A 62 型株	3 週	-	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	1 週	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
スメグマ菌	1 週	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	1 週	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

註：記号の分母は管底の、分子は液面の発育の有無程度を、○印は抽出物沈積のため菌の発育の明示出来なかつたこと、()内の記号は還元培養の有無を、又 C は雑菌混生をそれぞれ示す

出物溶液についても上記と同様にして人型菌のみを供試して検討した。

なお Kirchner 原液に 1% の割合に加えられたままで 5 カ月間室温に放置せられた EA 及び EB の抗結核菌作用についても上記に倣つて追究した。

Ⅱ 実験成績

I) 一般菌に対する抗菌作用

表2 ミミズ抽出物の抗酸菌発育に対する影響
その2 抽出物 EA 及び EB の成績

供試菌	抽出物	培養週	種別	稀釈 倍数	酒精抽出物 (EA)					石油ベンゼン抽出物 (EB)							
					加熱 処置					0 (対 照)		0 (対 照)					
					100	200	400	800	1,600	K	AK	100	200	400	800	1,600	K
人型 F 株	4 週	8 週	100°C	1 時間	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
	-				-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
鳥型 A62 株	3 週	1 回	100°C	1 時間	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
	-				+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	
スメグマ菌	1 週				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
人型 F 株	8 週		60°C, 30分 3 回		-	-	C	C	C	+	+	-	-	-	-	-	+

註：1) Kは血清加 Kirchner 培地, AK 及び BK はそれぞれ酒精及び石油ベンゼンを Kirchner 原液に 10% に加えた後 100°C 1 時間処置してから血清を 10% に添加したもの
2) その他は表 1 に準ずる

表3 ミミズ抽出物の抗酸菌発育に対する影響
その3 室温 5 ヵ月保存の EA 及び EB の人型 F 株に対する抗菌作用

供試菌	抽出物	培養週	種別	加熱 処置	稀釈 倍数	0 (対 照)													
						2 × 10 ²	4 × 10 ²	8 × 10 ²	1.6 × 10 ³	3.2 × 10 ³	6.4 × 10 ³	1.28 × 10 ⁴	2.56 × 10 ⁴	5.12 × 10 ⁴	1.024 × 10 ⁵	2.048 × 10 ⁵	K	AK	BK
						人型結核菌 F 株	酒精抽出物 EA	4 週	30分 3 回	60°C	-	-	-	-	-	-	+	+	+
8 週	-	-	-	-	-			-		+	+	+	+	+	+	+	+	+	
石油抽出物 EB	4 週	60°C	-	-	-		-	-		-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	8 週	-	-	-	-		-	-		-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

註：すべて表 1, 2 に準ずる

供試した大腸菌・腸チフス菌・脾脱疽菌・枯草菌及びブドウ球菌に対しては上記いずれの抽出物も殆んど全くみるべき阻止作用を示さなかつた。

II) 抗酸菌に対する抗菌作用

(1) 抽出物 F₁ より F₇ 迄の成績 (表 1 参照)

表 1 に見られるように人型菌に対しては F₆ 及び F₇ は 1% 濃度において 100°C 30 分 3 回処置後のものでも発育を完全に阻止ししかも F₇ の如きは還元培養全く陰性に終つたからその効果は殺菌的であつたといえる。F₆ も 0.6% の濃度において 100°C 30 分 3 回処置後のものを除けば人型菌の発育を完全に阻止した。但し殺菌的の効果は示さなかつた。F₂, F₃ 及び F₄ は 0.3% の濃度において 100°C 30 分 3 回処置後のもの以外にはすべて多かれ少なかれ静菌作用が見られた。

次に鳥型菌に対しては F₆ が 1% 濃度でしかも 100°C

30 分 1 回処置後のものにおいてのみ静菌的のみならず殺菌的にさえ作用した以外にはすべての抽出物に抗菌作用は見られなかつた。

なおスメグマ菌に対してもいずれの抽出物も全く阻止作用を示さなかつた。

(2) 抽出物 EA 及び EB の成績 (表 2 参照)

この成績は一括して表 2 にかかげた。すなわち人型菌に対しては EA 及び EB の 100°C 1 時間 1 回処置したものではそれぞれ 200 倍及び 400 倍でその発育を完全に阻止したのみならず殺菌的にも作用したのに対して 60°C 30 分 3 回処置した際には抗菌力は更に強く現れ EB は 1,600 倍迄も静菌的のみならず殺菌的にも作用し得た。但し EA では雑菌迷入のためこの点不明に止まつたことは遺憾である。

次に鳥型菌に対しては 100°C 1 時間処置の EA は 200

倍迄又 E_B は 400 倍迄共に發育を完全に阻止したが殺菌的に作用し得たのは E_A 100 倍、 E_B 200 倍にすぎなかつた。

スメグマ菌に対しては両者共に殆んど見るべき抗菌作用を示すことがなかつた。

(3) 室温 5 カ月保存の E_A, E_B による成績(表 3 参照)

前記 E_A 及び E_B を抽出後室温に 5 カ月放置した後 60°C 30 分 3 回間歇滅菌したものの人型菌に対する作用を検討したところ表 3 に示すような成績が得られた。

すなわち表 3 で分るように人型菌に対して E_A, E_B 共に 1,600 倍では完全阻止的のみならず作用期間 8 週間には殺菌的の效果をも示した。更に 3,200 倍では E_A は依然として完全阻止的(但し非殺菌的)に作用したが E_B は作用が少しく落ちて強抑制的の效果の程度にとどまつた。

III 総括並びに考按

以上今回私のミミズより抽出した種々の劃分は供試した限りの一般病原細菌に対しては殆んど全く何ら見るべき抗菌作用を示さなかつたが、抗酸菌殊に人型結核菌に対してはそれぞれ多少にかかわらず抗菌作用をもつてることが分つた。

すなわち蒸留水による抽出物に関しては雑菌混生のため判然たる成績は得られなかつたが重曹水による抽出物 F_3, F_4 には易熱性ながら 300 倍程度で人型菌をやや強く抑制し得る抗菌性が認められたし、醋酸水による抽出物 F_5 及び F_6 はそれぞれ約 170 倍及び 100 倍で完全阻止的(但し非殺菌的)に作用ししかもその作用は耐熱性であることが見られ、更に硫酸水による抽出物(F_7)は 100 倍稀釈で耐熱性の完全静菌作用のみならず殺菌作用をも示し得るものであることが分つたのである。然るに遺憾ながらこれらの抽出物は今回の実験によつて消費しつくされたためにそれらの人型菌に対する最小阻止濃度乃至抗菌価更にはそれらの化学的事項について追究する訳に行かなかつた。この点に関しては更に引き続き新たに同種抽出物を得て検討せられなければならない。

次にミミズの酒精並びに石油ベンゼンによる抽出物についてであるが 60°C 30 分 3 回処置のものでは人型菌に対して、前者は 3,200 倍で完全静菌的に又 1,600 倍迄は殺菌的にも作用し後者は 3,200 倍では強抑制的に又 1,600 倍迄は完全静菌的のみならず殺菌的に迄作用し得た(表 3)がこれらが 100°C 1 時間処置せられるとその抗菌力は $1/4$ 又はそれ以下に低下した(表 2)ことにより見るとこれらの抗菌作用はやや易熱性であるように思われる。その他鳥型菌に対しては抗菌効果が人型菌に対する場合よりかなり劣つたがそれでもそれぞれ 200 倍及び 400 倍迄静菌的に又 100 倍及び 200 倍では殺菌的に作用し得たのに反して、スメグマ菌に対しては殆んど見るべき抗菌作用を示すことがなかつた。

さて Hirsch & Dubos⁹⁾はモルモットの腎が結核菌に侵され難いことに着目し既に牛の腎粉末より酸性エタノール抽出物を得てこれが人型・牛型両結核菌の發育を約 4,000 倍稀釈で阻止し、約 8,000 倍稀釈では抑制するが雑菌性抗酸菌及び数種非抗酸性細菌に対しては殆んど無効であること、15 ボンド 15 分間の処置、室温並びに 38°C 1 カ月間放置にいずれも安定であること及び化学的精製乃至分析の結果この抑制物質は動物組織内に含まれる Spermin であることを認めているが、私の今回のミミズよりの酒精或いは石油ベンゼンによる抽出物も数種非抗酸性細菌並びに雑菌性抗酸菌たるスメグマ菌に対しては殆んど無効であるのに人型菌に対しては抗菌作用を呈し得るといふ点及び室温 5 カ月放置に安定という点においては或いは上記の腎抽出物乃至 Spermin に一脈類似しているようにも思われるが熱によつて抗菌価が近くも低下し、やや熱に不安定である点において Spermin と完全には一致しない物質であつて或いはミミズ特有のものではないかとも考えられる。

結 論

ミミズよりの蒸留水・重曹水・醋酸水・硫酸水・酒精及び石油ベンゼンによる抽出物について管内抗菌作用を検討した結果次のような知見が得られた。

- 1) 非抗酸性病原細菌並びに雑菌性抗酸菌に対しては全く抗菌作用を示さない。
- 2) 醋酸及び硫酸による抽出物は人型結核菌に対してやや見るべき抗菌力を示し、しかもその作用は耐熱性である。
- 3) 酒精及び石油ベンゼンによる抽出物は人型・鳥型結核菌特に前者に対してかなり強い抗菌力を示しその作用は室温放置には比較的安定であるが易熱性であり Spermin とは完全には一致しない。

拙筆するに当り終始御懇篤なる御指導を賜りし恩師占部教授に対し深甚なる謝意を捧げます。

文 献

- 1) Hankin: Proc. Roy. Soc., 48, 93, 1890 (Walter et al.⁶⁾ より引用)
- 2) Vaughn & Mc Clintock: Mel. News, Phila., 63, 701, 1893 (同上)
- 3) Bloom et al: J. Inf. Dis., 80, 41, 1947.
- 4) Bloom & Blake: J. Inf. Dis., 83, 116, 1948.
- 5) Bloom et al: J. Baet., 62, 7, 1951.
- 6) Walter et al: J. Baet., 64, 855, 1952.
- 7) Stahmann et al: J. Biol. Chem., 189, 45, 1951.
- 8) Dubos: Am. Rev. Tbc., 63, 119, 1951.
- 9) Hirsch & Dubos: J. Exp. Med., 65, 191, 1952.
- 10) 藤浪修一: 現代医学, 1: 98, 昭 26.
- 11) 浜本定夫: 戦時中に発表, 医誌に未掲載.
- 12) 田中 護: 北海道医誌, 24: 10, 1949.