

BCG 再接種モルモットの肺の細胞顆粒分画からの  
抗結核菌物質の分離とその性状

III. 水解酵素含有複合体より尿素による抗菌因子の  
分離, ことに正常動物との比較

金井興美・近藤瑩子

国立予防衛生研究所結核部

受付 昭和44年8月13日

SEPARATION AND PROPERTIES OF MYCOBACTERICIDAL  
COMPONENTS FROM THE LUNG GRANULAR FRACTION  
OF BCG-REVACCINATED GUINEA PIGS\*

III. Urea-Extraction of the Active Principle from the Complex  
Material Associated with Hydrolases, Particularly in  
Comparison with Normal Guinea Pigs

Koomi KANAI and Eiko KONDO

(Received for publication August 13, 1969)

The lysosome-rich fraction was separated from normal and BCG-revaccinated guinea pig lungs and was extracted with 0.1% Triton X-100. The extracts were fractionated by gel-filtration on Sepharose 2B column using 0.05M acetate buffer of pH 5.6 (Fig. 1). The first protein peak associated with acid phosphatase and cathepsin activities from BCG-animals (Fraction A) was found to be mycobactericidal, but the corresponding fraction from normal animals was not. These fractions were then treated with 2M urea and the extracts were fractionated by gel-filtration on Sephadex G-150 column (Fig. 2). Fraction A from BCG animals was divided into 2 protein peaks a and b by urea-treatment, the latter being separated from acid phosphatase activity. This small-molecular protein fraction was not obtained from normal animals.

Table 1 demonstrates the summarized data of the mycobactericidal effects of those subfractions on *H<sub>37</sub>Rv* tubercle bacilli suspended in 0.05M acetate buffer of pH 5.6. The bacilli of 0.1 mg per ml were exposed to each sample of indicated protein concentrations. The urea-released Fraction b was found to be active in killing tubercle bacilli, but it required more amount of protein and longer exposure time to express its mycobactericidal activity than Fraction A and Fraction a. In the environment of pH 7.4, the activity of each fraction was reduced. Fraction b was, however, more active than Fraction a at this pH (Table 2). A curious observation was that, though Fraction A of normal animals was not mycobactericidal, its 90% acetone-soluble moiety was highly active in this respect just as the corresponding sample from BCG-animals of our previous report. It might be possible to suggest that the 90% acetone-soluble substance is a "created" mycobactericidal fraction.

\* From the Department of Tuberculosis, National Institute of Health, Kamiosaki, Shinagawa-ku, Tokyo 141 Japan.

When Fraction A of the normal animals was added to the corresponding fraction of the BCG-animals, the activity of the latter was reduced, which indicates a possible competition between the two fractions with respect to the contact with the bacilli. Fraction b appeared to be a small-molecular protein and it was heat-stable at 100°C and pH 5.6. However, lysozyme of the similar properties was not mycobactericidal in the same experimental conditions and in a much higher concentration (Table 4).

前報告<sup>1)</sup>において、私達は BCG 再接種モルモット肺の蔗糖ホモジネイトより、lysosome 含有率の高い細胞顆粒画分を遠心分離し、その Triton X-100 抽出液を Sepharose 2B を用いてゲル濾過することによつて、水解酵素活性を伴つた巨大分子の画分を得た。そして結核菌に対する殺菌作用も、この画分のみ検出されることをまず見出した。本論文においては、この複合体より尿素を用いて抗菌因子を分離する方法を述べ、さらに正常動物を素材とした場合の観察についても報告し、これまでの研究のもつ意義について論考した。

#### 実験方法及び材料

基本的にはこれまでの2つの報告<sup>1,2)</sup>と変わる点はない。この報告においては、必要な点は実験成績の項で補足する。

#### 実験成績

1) BCG 再接種モルモットならびに正常モルモットの肺より、細胞顆粒画分の分離。Triton X-100 による抽出。そしてゲル濾過による画分：体重 400g 前後の白色雑系モルモット雄 13 匹を、BCG 5mg を用いて皮下接種し、3 週後さらに BCG 0.1 mg を静注した。1 週後動物を殺して腫大した脾を集め、その 100g を出発材料とした。これを 1l 容量のワーリングブレンダー容器に入れ、CaCl<sub>2</sub> を 3.3mM 含む 0.35M の蔗糖溶液 125 ml を加えて 20 分間ホモジナイズした。さらに CaCl<sub>2</sub> を 3.0mM 含む 0.25M 蔗糖溶液 440 ml を加えて希釈したのち、ガーゼ 3 枚をもつて濾過した。濾液を 3,000 rpm で 10 分間遠沈して細胞破片、核成分を除き、上清を得た。この上清を冷凍遠心機を使用してまず 5,000 g 20 分でミトコンドリアの大部分を沈殿として分け、その上清を 25,000 g 20 分で遠沈して、lysosome の含有度の高い細胞顆粒画分を沈殿として得た。MgCl<sub>2</sub> を 5 mM 含む 0.25M 蔗糖液で一度遠沈洗浄してから、この沈殿を Triton X-100 を 0.1% に含む蔗糖溶液 100 ml を用いて、4°C で 30 分間抽出し、25,000 g 20 分の遠沈上清を抽出液とした。これを流水に対して 80 分間透析してから flashevaporator で 26 ml に濃縮し、Sepharose 2B のカラム (2×38cm) にかけた。

ゲル濾過は 0.05M の酢酸緩衝液 (pH 5.6) を 1 時間 23 ml の速さで流し、溶出液は 5 ml ずつ採取した。それらについて、蛋白質、酸性ホスファターゼ活性、カテプシン活性を前論文<sup>1)</sup>と同じ方法で測定し、Fig. 1 上半のごとき溶出ダイアグラムを得た。

次に正常動物 30 匹の肺 109g を用いて、全く同様の操作を行ない、Fig. 1 下半に示すような成績を得た。

これらいずれの溶出パターンも、前後 2 つの著明な蛋白ピークと、それらの中間を占める水平部分からなる点は、これまでの経験と全く同じであつた。しかし、図に示したように、溶出部分を A, B, C あるいは D と区分してまとめ、その H<sub>37</sub>Rv 株に対する殺菌力を 0.05M 酢酸緩衝液 (pH 5.6) の環境における 37°C 4 時間の暴露で検査すると、BCG 動物由来の Fraction A, B のみが有効であつて、正常動物からの相当画分は全く殺菌力がなかつた。

2) 尿素を用いて Fraction A より抗菌因子の分離：BCG 動物の Fraction A 10 ml (Folin 法を用いたチロ

Fig. 1. Fractionation of Detergent-Extracted Lysosomal Components of Guinea Pig Lungs by Gel-Filtration on Sepharose 2B Column

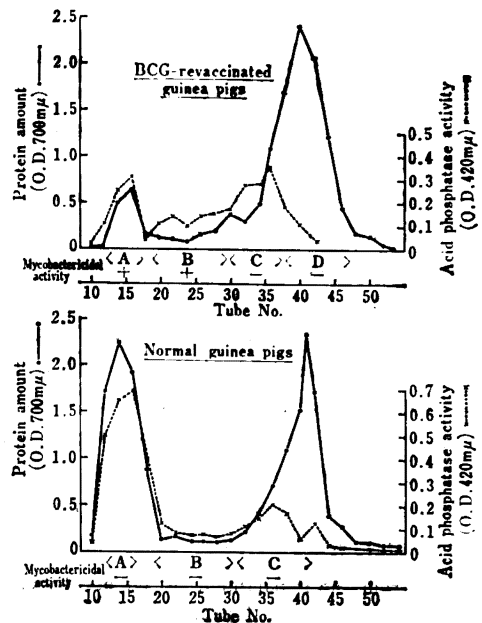
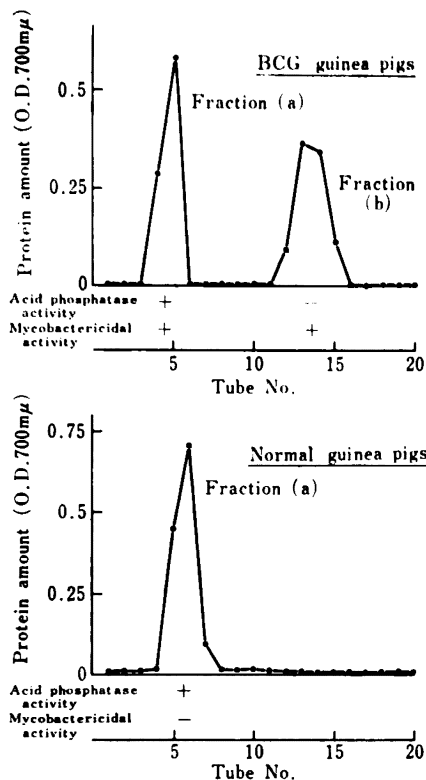


Fig. 2. Fractionation of Urea-Extracts of Fraction A by Gel-Filtration on Sephadex G-150 Column of 1.5×25cm



ジン推定蛋白量 1.8 mg) に、4M の尿素 10 ml を加えて 40°C 30 分抽出した。0.05M の酢酸緩衝液 (pH5.6) に対して一晚透析してから、その内液を flashevaporator で 10 ml の原量にもどした。これの 3,000 rpm 10 分の遠沈上清を 4 回に分割して、1.5×25 cm の Sephadex G-150 のカラムにかけ、上述の緩衝液を用いて 1 時間 27 ml の流速で溶出してゲル濾過した。溶出液は 3 ml ずつ分取してそれらの蛋白量と酵素活性を測定した。Fig. 2 上半の溶出ダイアグラムの示すように、尿素処置によつて Fraction A は Fraction a, b の 2 つの蛋白ピークに分かれ、後者は酸性ホスファターゼ、カタブシン活性をもたない小分子蛋白分画であり、尿素によつて Fraction A より遊離したものと考えられる。

また、正常動物の Fraction A 15 ml を、全く同一操作で尿素抽出して、同じカラムでゲル濾過したところ、Fig. 2 下半に示すように、BCG 動物 Fraction A から得られたような Fraction b は出現せず、酵素活性のある Fraction a のみが得られた。そこで、さらに正常動物 Fraction A 15 ml より、前論文で報告したような 90% アセトン可溶部分と不溶部分とを調製した。これらの分画の H<sub>37</sub>Rv 株に対する殺菌効果を検査し、その成績を Table 1 にまとめて示した。実験条件に関する予備試験から、ある資料に関しては、菌暴露時間の 4 時間を延長し、24, 48 時間をも行なつたが、そのほかの条件はこれまで通りである<sup>2)</sup>。

Table 1. The Mycobactericidal Activity of Various Fractions Obtained from BCG-Stimulated and Normal Guinea Pigs at pH 5.6

Test sample	Concentration as protein (μg/ml)	Mycobactericidal activity: Viable counts per mg bacilli exposed for below-indicated period		
		4	24	48 hr
<b>BCG-vaccinated animals</b>				
Fraction A	4.2	34 × 10 <sup>2</sup>	<1 × 10 <sup>2</sup>	<1 × 10 <sup>2</sup>
Urea-treated	a	27 × 10 <sup>2</sup>	<1 × 10 <sup>2</sup>	<1 × 10 <sup>2</sup>
	b	3 × 10 <sup>2</sup>	<1 × 10 <sup>2</sup>	<1 × 10 <sup>2</sup>
	3.5		33 × 10 <sup>5</sup>	4 × 10 <sup>4</sup>
Urea-residue	14.4	2 × 10 <sup>2</sup>	<1 × 10 <sup>2</sup>	<1 × 10 <sup>2</sup>
Buffer control	0	56 × 10 <sup>5</sup>		23 × 10 <sup>5</sup>
<b>Normal animals</b>				
Fraction A	34.0	73 × 10 <sup>6</sup>	19 × 10 <sup>6</sup>	41 × 10 <sup>5</sup>
Urea-treated	a	52.2	83 × 10 <sup>6</sup>	30 × 10 <sup>6</sup>
Urea-residue		72.0	74 × 10 <sup>6</sup>	48 × 10 <sup>4</sup>
90% acetone	Soluble	28.4	16 × 10 <sup>3</sup>	<1 × 10 <sup>2</sup>
	Residue	62.5	101 × 10 <sup>6</sup>	
Fraction B	24.0	70 × 10 <sup>6</sup>		
Fraction C	22.4	82 × 10 <sup>6</sup>		
Buffer control	0	75 × 10 <sup>6</sup>		22 × 10 <sup>6</sup>

"Mycobactericidal activity" was expressed as viable counts per mg H<sub>37</sub>Rv bacilli exposed to the indicated protein concentration of test sample at 37°C and pH 5.6. All the test samples were used after sterilization at 100°C for 5 minutes.

Table 2. The Mycobactericidal Activity of Urea-Extracted Fractions a and b at pH 7.4

Test sample	Concentration as protein ( $\mu\text{g/ml}$ )	Viable counts per mg bacilli exposed for below-indicated period		
		4	24	48 hr
a	22.0	$10 \times 10^8$	$23 \times 10^4$	$3 \times 10^4$
b	35.0	$51 \times 10^4$	$46 \times 10^3$	$2 \times 10^3$
Buffer control	0	$35 \times 10^8$		$70 \times 10^8$

Table 3. Inhibition of the Mycobactericidal Activity of BCG-Animal Fraction A by Normal Animal Fraction A

2 ml mixture sample			Mycobactericidal activity Viable counts per mg bacilli after 4 hr exposure at 37°C and pH 5.6
Buffer (ml)	Normal animal Fraction A (ml)	BCG-animal Fraction A (ml)	
0	1.8	0.2	$42 \times 10^6$
0.9	0.9	0.2	$24 \times 10^6$
1.35	0.45	0.2	$10 \times 10^6$
0	2.0	0	$62 \times 10^6$
1.8	0	0.2	$12 \times 10^6$

ここでまず2つの事実が注目される。第1に、BCG動物の Fraction A から分離された Fraction b に殺菌活性が存在する。しかし、Fraction A と違つてその効果の表現には、蛋白量として、より高濃度が必要であること、また、より長い暴露時間が要求される。第2に、正常動物の Fraction A, B, C いずれにも殺菌活性はなく、また、Fraction A からは、Fraction b は分離されず、Fraction a にも殺菌力はないが、90% アセトン可溶部分に強い殺菌力がある点で、前論文に示した BCG 動物のそれと全く異なるところはなかつた。BCG 動物の尿素抽出遠沈沈渣と Fraction a とは、その出発材料たる Fraction A に匹敵しうる殺菌力を示し、他方、正常動物の尿素抽出残渣も、高濃度と長時間接触によつて殺菌性を発揮した。尿素抽出残渣は酢酸緩衝液にきわめてよく懸濁されて、90% アセトン可溶成分と似た外観を示した。Table 2 は、pH 7.4 において、BCG 動物の Fraction a と b との活性比較を行なつたもので、pH 5.6 における場合とは逆に、Fraction b のほうが殺菌力が強く表現されているが、いずれにせよ、抗菌力は酸性環境においてより強い点は変りない。

3) 正常動物 Fraction A の共存による BCG モルモット Fraction A の殺菌力の減弱: Table 3 に示したように、BCG 動物由来の Fraction A と正常動物由来の Fraction A とを各様に混合して、それぞれに  $H_{87}R_v$  株を  $0.1 \text{ mg/ml}$  になるように接種して殺菌効果を比較検討した。その成績の示すように、正常動物の Fraction A はそれ自体殺菌力はないが、共存することによつて BCG 動物の Fraction A の殺菌力を減弱せしめた。この現象は菌体に対する1つのせりあいによるものと理解される。

4) 卵白リゾチームを用いた抗菌力試験: Fraction b

Table 4. Lack of the Mycobactericidal Activity in Egg White Lysozyme

Lysozyme concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Viable counts per mg bacilli after 4 hr exposure at 37°C and pH 5.6
1,000	$48 \times 10^6$
100	$45 \times 10^6$
10	$26 \times 10^6$
1	$39 \times 10^6$
0	$31 \times 10^6$

は小分子量で、熱に安定である点でリゾチームと似ており、また、BCG 接種を受けたウサギ肺に存在する抗結核性因子がリゾチーム様のものであるという報告<sup>3)</sup>もあるので、卵白リゾチームの抗結核菌性を同一実験条件下で検討したが、殺菌力は認められなかつた (Table 4)。

#### 考 察

水解酵素活性を伴つた巨大分子分画として BCG 動物から分離される Fraction A が、正常動物からも得られたが、それには抗菌力がなく、しかも、前者からは抗菌性の小分子蛋白分画 Fraction b が遊離したのに反し、後者からはそれが得られなかつた。この事実は、特異性となんらかの関係をもちうる殺菌因子としての Fraction b の可能性を示唆する。他方、抗菌力のなかつた正常動物 Fraction A から、90% アセトン可溶分画を分離してその抗菌力を検査すると、それは強い殺菌力を発揮し、前論文で報告したような BCG 動物 Fraction A からのそれと同様であつた。この観察は、90% アセトン可溶部分が、人為的に「つくられた」抗菌物質であるという疑惑を与えるものであろう。したがつて、現在までの知見に関するかぎり、感染に伴つて自然に生産され、菌と対決する物質として Fraction A, Fraction b に今

後の関心を集中すべきように思われる。また、正常動物の Fraction A が、それ自体抗菌力がないにもかかわらず、BCG 動物のそれと拮抗する事実からすれば、前者が菌体に親和性をもちながら、そこに Fraction b を伴っていないため殺菌力を発揮しえないと説明するのが自然であろう。さらにまた、Fraction b はその抗菌力発揮のために、Fraction A よりも蛋白量としてより高濃度を用いる必要がある、作用時間も長いことが要求されるが、Fraction A の中に、Fraction b の “adjuvant” として、その活性を高め、あるいは “carrier” としてそれを菌体に密着せしめる物質の存在を、今後の研究の作業仮説とすることもできよう。あるいは、Fraction A の中には、Fraction b 以外の抗菌物質の存在を考へてもよい。

しかし、抗菌物質 Fraction b を遊離したあとの、BCG 動物 Fraction A の尿素抽出残渣に強い殺菌力の発現すること、しかも正常動物の Fraction A の尿素抽出残渣にも、弱い抗菌力の検出されること、それらがよく水に懸濁されて 90% アセトン抽出分画に似た外観をもつこと等より、尿素抽出残渣とアセトン抽出分画との抗菌性はむしろ共通部分によるもののように思われる。予備的観察によれば、これらはいずれも強い溶血作用をもち、いわゆる “Unmasked phospholipid” である可能性を考える必要がある。このような生体膜磷脂質の “Unmasking” は膜表面の抗原抗体反応、食菌現象に伴って発生するという観察<sup>4)</sup>、推論<sup>5)</sup>も現在得られており、上述のこの分画が実験条件による「つくられた」抗菌物質であるにしても、やはり1つの重要でもあり、示唆に富む所見として記憶さるべきであろう。最近、D'Arcy Hart ら<sup>6)</sup>は Triton WR-1339 注射によつて、結核感染に対して抵抗力を増強したラットの肝ライソゾーム抽出液に、抗結核菌性の物質の存在を認め、それがリピドである可能性を指摘しているが、実験材料と方法の差はあつても、私達の研究と非常に近いところにあると思われる。

## 結 論

BCG 再接種モルモットならびに正常モルモットの肺の 0.25M 蔗糖ホモジネイトより、lysosome 含有度の高い細胞顆粒分画を集め、その Triton X-100 抽出液を Sepharose 2B によるゲル濾過によつて、水解酵素活性を伴つた巨大分子分画 (Fraction A) を得た。BCG 動物由来のその分画には強い抗結核菌性が検出され、2M の尿素処置によつて水解酵素活性をもたない抗菌性の小分子蛋白分画 (Fraction b) が遊離したが、正常動物の Fraction A には抗菌性はなく、尿素処置によつて小分子蛋白も得られなかつた。他方、正常動物 Fraction A の 90% アセトン可溶分画は、BCG 動物のそれと同様に強い殺菌力を示し、アセトン抽出法は人為的に抗菌物質をつくりだす可能性が示された。Fraction b の抗菌力は 100°C 5 分の加熱に安定であり、殺菌力発現には Fraction A より高い蛋白濃度、長い菌暴露時間を必要とするが、酸性環境依存性は少ない。正常動物 Fraction A はそれ自体抗菌性はないが、BCG 動物 Fraction A と共存すると拮抗し、後者の殺菌力を減弱せしめた。

本研究実施にあつては、日米医学協力計画結核専門部会からの研究費に負うところが大きい。記して謝意を表す。また、本論文の要旨は第 44 回日本結核病学会で発表した。

## 文 献

- 1) 金井興美・近藤瑩子：結核，44：217，昭 44.
- 2) 金井興美・近藤瑩子：結核，44：211，昭 44.
- 3) Oshima, S., Myrvik, Q. N. and Leake, E.: Brit. J. Exptl. Pathol., 42: 138, 1961.
- 4) Dumonde, D. C. et al.: Immunology, 8: 25, 1965.
- 5) Hawiger, J. et al.: Nature, 222: 276, 1969.
- 6) D'Arcy Hart, P., Gordon, A. H. and Jacques, P. J.: Nature, 223: 672, 1969.