

結核菌の食塩水抽出液のマウスに 対する毒性について

第 2 報

抽出液の毒性に対する Streptolysin S, 酵素類,
Adrenaline 等の影響について

金沢大学結核研究所薬理部 (主任: 伊藤 亮教授)

岡 野 務

(受付: 昭和38年9月14日)

緒 言

吉村等¹⁾は前回報告で, Sauton 培地に培養した人型または牛型結核菌の濃厚食塩水浮遊液の遠心上清液 (以下食塩水抽出液または単に抽出液とも呼ぶ) が静脈内注射によって, マウスにショック様の急激な中毒症状を起こすことを実証し, 更に抽出液の理化学的検査や中毒動物の病理検査の所見等から, 抽出液中の毒性因子が, サルモネラ菌類等における Endotoxin のように, 結核菌の菌体外表層物質に由来したも

のであって, その生体に対する侵襲拠点は血管系ではなからうかと述べたのである. これに引続いて著者は, 結核菌の食塩水抽出液の毒性作用に対する Streptolysin S (St-S), リボ核酸 (RNA), 消化酵素類, Adrenaline 及び抗ヒスタミン剤等の諸種物質の影響を検索して, 毒性因子の化学的性状や作用機点に関して甚だ興味ある知見を得た. ここにその成績を報告する.

実 験 方 法

実験の方法はすべて前回報告¹⁾の記載に従った.

1. 菌 株

使用した菌株は人型結核菌青山B株である. Sauton 培地50ml を入れた多数のコルベン (内容100ml) に結核菌を移植して 37°C で培養し, 約2週間後に培養液面に発育した菌体を実験に供した.

2. 結核菌の食塩水抽出液の調製

Sauton 培地に約2週間培養した結核菌々膜を濾紙上に集め, 洗浄した後, 濾紙間に圧搾して水分を吸除し秤量する. 所要量の結核菌体を乳鉢にとり, これに菌体 1 gm に対して 5 ml の割に 0.85% 食塩水を滴加しつつ室温でよく研磨し, なるべく均等な菌浮遊液をつくる. この菌浮遊液を 4,000 R.P.M., 10分間遠心し, 上清液を更に 10,000 R.P.M. (10,500g), 30分間の遠心

を2回行って, 最後に淡黄色, 少々不透明の遠心上清液すなわち食塩水抽出液を得る.

3. 動 物

体重11-17gmの健康雄DD系マウスを用いた. 毒性試験には, 結核菌の食塩水抽出液をマウス尾静脈内に注射した. 動物の観察期間は1週間とした. 抽出液のマウスに対する中毒作用は, 前回報告に詳述されている通りであって, 毒性の強さを症状によって次のように分類した.

(a) 注射直後, 逃走, 跳躍等の不安状態に続いて臥位となり, 更に後肢あるいは全身の強直性痙攣を起して短時間内に死亡したもの (+D).

(b) 前項の諸症状を呈したが死亡するまでに至らずして回復したもの (+).

(c) 中毒症状の軽微なもの(±).

(d) 全く異常を呈しなかったもの(-).

4. 試 薬.

(a) Streptolysin S. 岡本等²⁾の方法で, 溶血性連鎖球菌の1%リボ核酸加ブイオン培養液から分離された精製 St-S 標品(溶血限界濃度=1:2×10⁷).

(b) リボ核酸ソーダ(Sodium ribonucleate, Merck).

(c) 酵素. Papain (Merck), Trypsin (Grübler), Pepsin, 1:1,000 (Difco), β -Glucosidase (Nutritional

Biochemicals Co.), α -Amylase (石津), β -Amylase (Nutritional Biochemicals Co.), Erepsin (東京化成)及び Lipase (東京化成).

(d) Adrenaline (第一製薬)及び Ephedrine (大日本製薬).

(e) 抗ヒスタミン薬. Diphenhydramine (Benapon, 大日本製薬), Promethazine (Phenergan, 塩野義製薬), Dimenhydrinate (Dramamine, 大日本製薬)及び Chlorhetramine (Solamine, 第一製薬).

実 験 成 績

I. 食塩水抽出液に対する St-S 及びリボ核酸の抗毒作用.

結核菌の食塩水抽出液が試験管内において St-S に対して著明な抗溶血作用を示すことは伊藤, 細川^{3,4)}によって実証された現象であるが, この現象をマウスの生体内において確かめようと試みた吉村等の実験は, はからずも結核菌の食塩水抽出液自体が, マウスに対して強激な毒性作用を有するという全く予期しない新事実発見の端緒となったことは, 前回報告¹⁾に述べられたところである. そこで著者は, 以上2つの現象を考慮に入れながら, マウスの生体内における食塩水抽出液と St-S との作用関係を再検討した結果, 食塩水抽出液の毒性が少量の St-S の添加によって阻止されるという一見甚だ奇異な事象を観察するに至った.

第1表は結核菌の食塩水抽出液の中毒作用に対する St-S 及びこれと化学的にも生物学的にも密接な関係のあるリボ核酸の影響を検した実験成績の1例を示したものである.

この実験では各種濃度の St-S 及びリボ核酸溶液を, 抽出液の1/10容量に加えたもの0.5ml をマウスの尾静脈内に注射した. 尚対照実験では, (a) 抽出液に1/10容量の食塩水を加えたもの0.5ml 及び, (b) St-S 0.5mg を注射した. 各被検液毎にマウス2匹(14-16.5gm)を使用した.

第1表の実験結果を要約すれば, 次の如くである.

(1) 抽出液0.5ml のみの注射を受けた対照

マウスは2匹共激しい中毒症状を呈して死亡した.

(2) 抽出液に St-S を添加した場合の毒性試験では,

(a) St-S, 1, 0.1 及び 0.01mg を添加した抽出液を注射されたマウスはすべて何ら症状を呈することなく正常であった.

(b) St-S 0.001mg を添加した抽出液は, 対照とほぼ同様に強毒性であって, 2匹のマウスの中, 1匹は死亡し, 他の1匹は強い中毒症状を呈したが後回復した.

(3) 抽出液にリボ核酸を添加した場合の毒性試験では,

(a) リボ核酸 5mg を添加した抽出液を注射されたマウスは2匹共正常であった.

(b) リボ核酸 0.5mg を添加した抽出液を注射されたマウスは2匹共中毒死した.

(4) St-S 0.5mg を尾静脈内に注射されたマウスは異常がなかった.

以上の成績から, 適当量の St-S 並びにリボ核酸の添加によって, 食塩水抽出液のマウスに対する毒性が完全に防除されたことが明らかである. しかもここで注目されねばならないことは, St-S とリボ核酸では, その抽出液に對する抗毒効力の強さにおいて格段の差が認められたことである. すなわち, 抽出液0.5ml を完全に解毒するに必要な最小有効量は, St-S では 0.01mg であったのに対し, リボ核酸ではその500倍量の 5mg を要した.

St-S の化学的性状については今日尚確定す

に至っていないのであるが、精製標品についての分析的研究では、その大部分が Polyribonucleotide 構成、すなわちリボ核酸であることが実証されている⁵⁾。しかも溶血活性以外には St-S リボ核酸と天然リボ核酸とを区別する有力な方法手段がわかっていない。従って、これら2つのリボ核酸標品の間、結核菌抽出液に対する抗毒効力に顕著な差異のあることを示した第1表実験成績は St-S の化学的研究に有意義な知見を開発したものと考えられる。著者は更に St-S の溶血活性が容易に熱破壊性であることから、St-S の加熱標品について抗毒試験を行って、St-S リボ核酸の溶血活性と抗毒作用の間の関連性について検討を加えた。第2表の実験は次の4種の資料について、第1表実験と同様の方法で抽出液に対する抗毒作用を比較したものである。

被検資料：

- (a) 非加熱 St-S.
- (b) 100°C, 30分間加熱して溶血活性を失った St-S.
- (c) 非加熱リボ核酸.
- (d) 100°C, 30分加熱リボ核酸.

尚この実験に使用した食塩水抽出液の毒性は第1表実験のものよりやや弱く、その0.5mlはマウスに強い中毒症状を起こしたが致死せしめるには至らなかった。第2表の実験成績から明らかのように、非加熱 St-S は前回実験と同様に0.01mgまで抽出液を完全に無毒化する程度の抗毒効果を示し、0.001mgでは試験4匹中1匹に中毒症状があらわれたが他の3匹は正常であった、という結果であった。一方加熱 St-S では、0.1mgまでは非加熱標品と同等の抗毒効果を示したのであるが、0.01mgではマウス2匹中1匹に中毒症状があらわれた。また0.001mgでは3匹のマウスは何れも中毒症状を起こしたのであった。以上の結果から加熱 St-S の抗毒効果は非加熱 St-S に比してやや劣るかという感じである。しかし他方リボ核酸の場合には、加熱及び非加熱標品の両者共5mgで有効、0.5mgで無効の成績であって、この成績と

比較すると加熱 St-S の抗毒効力は、加熱によって幾分減弱したようではあるが尚リボ核酸より遙かに強大であることがわかる。このことは St-S の強力な抗毒作用がその溶血活性と直接関連性はないが、St-S リボ核酸と天然リボ核酸との間には化学構造上何か重大な違いのあることを示唆したものである。

II. 食塩水抽出液に対する酵素の影響。

蛋白分解酵素4種 (Pepsin, Trypsin, Papain, Erepsin), Lipase, 及び糖類分解酵素3種 (α -及び β -Amylase, β -Glucosidase) を用いて、結核菌の食塩水抽出液の毒性が酵素によって如何なる影響を受けるかを検索した。

実施法：酵素作用の実験に用いた反応液の組成は次の如くであった。

- (a) Pepsin.—抽出液 2.0ml, 酵素液 0.2ml 及び N/10 HCl 0.2ml を混和し、37°C, 1時間放置した後、N/10 NaOH で中和し、更に食塩水を追加して全量を 4.0 ml とした。
- (b) Papain.—抽出液 2.0ml, 酵素液 0.2ml, 2M Cysteine 溶液 0.2ml 及び M/15 磷酸緩衝液 (PB) (pH7.0) 1.6ml を混和し、37°C, 1時間放置。
- (c) Trypsin.—抽出液 2.0ml, 酵素液 0.2ml 及び PB (pH7.8) 1.8ml を混和し、37°C, 1時間放置。
- (d) Erepsin.—抽出液 2.0ml, 酵素液 0.2ml 及び PB (pH7.6) 1.8ml を混和し、37°C, 1時間放置。
- (e) α -及び β -Amylase.—抽出液 2.0 ml, 酵素液 0.2ml 及び PB (pH7.0) 1.8ml を混和し、37°C, 1時間放置。
- (f) β -Glucosidase.—抽出液 2.0ml, 酵素液 0.2ml 及び M/2 酢酸緩衝液 (pH 4.1) 1.8ml を混和し、37°C, 1時間放置。
- (g) Lipase.—抽出液 2.0ml, 酵素液 0.2ml 及び PB (pH7.0) 1.8ml を混和し、37°C, 1時間放置。

これらの資料は 37°C, 1時間の処置を行っ

た後、直ちにその 1.0ml (抽出液 0.5ml に相当) をマウスの尾静脈内に注射した。尚付表の成績に記載しなかったが、どの酵素もそれ自体は使用した最大量を単独に静脈内に投与してもマウスに対し全く作用がなかった。

第3及び4表は酵素処置抽出液についての毒性試験の成績である。第3表の Pepsin 消化実験の成績は、0.01—1 mg の Pepsin で 37°C, 1 時間処置することによって、抽出液の毒性が完全に失われてしまったことを示している。Pepsin 0.001mg では毒性に認むべき変化がなかった。また第4表の実験から次の結果が得られた；

- (1) Trypsin, Papain 及び Erepsin 等の蛋白消化酵素は 1 mg の大量でも抽出液の毒性に殆んど影響を与えなかった。
- (2) 抽出液の毒性は α -及び β -Amylase や β -Glucosidase の如き糖分解酵素(1mg) によって不活性化されることはなかった。
- (3) 抽出液は Lipase 0.1—1mg によって完全に不活性化され、0.01mg によって毒性は著しく減弱した。

以上の実験成績から結核菌の食塩水抽出液の毒性が Pepsin 及び Lipase の 2 酵素によって容易に破壊されることが明らかとなったのであって、これによって抽出液の活性因子が化学的に少なくとも蛋白質性及び脂質性の 2 成分から構成されていることが推想される。

考

細菌の Endotoxin に関する研究は、特にサルモネラ菌類を中心として近年目覚ましい進歩をきたし、その結果 Endotoxin が細菌の菌体外表面層物質 (Extracellular surface components) に属するもので、化学的には脂質、蛋白質、糖類の複合体からなっており、また血管障害や糖代謝異常に関する薬理学的研究によって毒素作用が交感神経作働性 (adrenergic) であること等が明らかとなってきている^{6,7,8}。

結核菌では従来菌体外表面層物質に関しては殆

III. 抽出液の毒性に対する Adrenaline, Ephedrine 及び抗ヒスタミン剤の影響。

吉村等は前回報告¹⁾において、抽出液のマウスに対する中毒症状が急性でショック様症状であり、しかも抽出液の血管内投与によってのみ現われることや、中毒動物の病理所見等から、抽出液の作用拠点が血管性ではなからうかと論じている。この考察に基づいて著者は Adrenaline, Ephedrine 及び 4 種の抗ヒスタミン剤 (Diphenhydramine, Promethazine, Dimenhydrinate, Chlorhetramine) の抽出液に対する影響を検索して、第5表に示したように、はなはだ興味ある成績を得た。第5表の実験では体重 11gm のマウス及び抽出液 0.15 ml (致死量以下でしかも有効中毒量) を用いた。先づ前処置として薬剤をマウスの腹腔内に注射し、一定時間後に抽出液を尾静脈内に投与して中毒症状の発現経過を観察した。

表示の如く、対照群のマウスはすべて抽出液 0.15ml の尾静脈内注射によって中毒症状を呈したのに対し、抽出液投与 6 分前に Adrenaline 0.05mg を腹腔内注射した動物は 4 匹共全く中毒症状を現わさなかった。また抽出液投与 5 分前に Ephedrine 0.5mg を与えた動物群では、8 匹中 5 匹は中毒症状を呈したが他の 3 匹は異常がなかった。一方 4 種類の抗ヒスタミン剤は何れも 0.5mg 投与によっても抽出液の中毒症状発現に対し少しも阻止的影響を示さなかった。

察

んど知られていないのであるが、前回吉村等¹⁾は、結核菌々体から食塩水抽出によって菌体外表面層物質と考えられる有毒成分を実証し、さらに化学的検査や生体作用に関する知見等から、この抽出液の毒性因子が Endotoxin と類似した性状のものであることを指摘した。著者が本研究で得た実験成績のうち、

(1) 酵素による消化試験で、抽出液の毒性が Pepsin 及び Lipase によって不活性化されたことは活性因子が蛋白質及び脂質を含んだ

複合体であることを示唆するものであり、また一方、

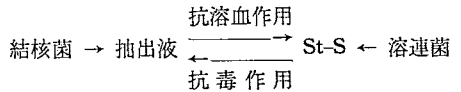
(2) 抽出液のマウスに対する中毒作用が、微量の Adrenaline によって極めて有効に阻止できたこと、のみならず Ephedrine もまた Adrenaline より幾分効力は弱いが阻止的效果を示したことは、中毒動物の病理所見として内臓血管の拡張、充血が唯一の変化として認められた事実ともあわせ考えて、中毒作用の原因が自律神経性の血管障害に基づくものであることを示すものと考えられる。しかも、

(3) 抽出液中毒に対して抗ヒスタミン剤が何れも無効であったことは、抽出液の毒性因子が、組織内貯蔵ヒスタミンを放出して間接的にヒスタミンショックを招来したとする所謂“Histamine releaser”としての見解を否定するものである。

本研究のもう一つの注目すべき成果は、化学

的には齊しく Polyribonucleotide 化合物に属する St-S 及び天然のリボ核酸に、抽出液に対する抗毒作用が実証されたことである。しかも St-S がリボ核酸より遙かに強大な抗毒効果を示したことは、たとえ抗毒作用の原因は明らかでなくとも、両者の化学構造の相違を反映したものと推想される。

最後に、さきに伊藤等³⁾によって実証された抽出液の抗溶血作用と、今回明らかとなった St-S の抗毒作用という2つの阻止現象をここに相対立させて考察する時、



図に示されたように、2つの病原菌（結核菌と溶血性連鎖球菌）の各毒素（抽出液と St-S）が相互に拮抗関係にあることに気がつく。そして自然界における生物相互間の微妙な因果関係に今更の如く驚かすにはおられない。

結

1. Streptolysin S 及びリボ核酸は結核菌の食塩水抽出液のマウスに対する毒性に対して抑制作用を示した:Streptolysin S 0.01mg は抽出液0.5mlの静脈内注射による致死作用を完全に防止した。また Streptolysin S の抗毒作用は加熱によって殆んど減弱しなかった。しかしリボ核酸の抗毒効果は Streptolysin S の1/100—1/500程度であった。

2. 結核菌の食塩水抽出液は Pepsin 及び Lipase 消化によって毒性を失ったが、Trypsin, Papain, Erepsin, α -及び β -Amylase 及び β -Glucosidase 等の酵素作用によって影

論

響を受けなかった。

3. Adrenaline 0.05mg または Ephedrine 0.5mg の腹腔内前処置は、結核菌の食塩水抽出液のマウスに対する中毒作用を防止した。しかし、抗ヒスタミン剤 (Diphenhydramine, Dimenhydrinate, Promethazine, Chlorhetramine) 0.5mg の前処置は無効であった。

本研究の遂行に当って終始御懇切な御援助を賜った吉村政弘助教に対し衷心感謝の意を表す。

本研究は文部省科学研究費の補助を受けた。

文

- 1) 吉村政弘, 等 : 金大結研年報, 21 (下), 231, 1964.
- 2) Okamoto, H. et al. : Jap. Med. Sci., IV. Pharmacology, 14, 99, 1951.
- 3) Ito, R. and Hosokawa, K. : Jap. J. Tuberc., 6, 1, 1959.

献

- 4) 細川孝一 : 金大結研年報, 16 (下), 489, 1958.
- 5) Okamoto, H. : 金大結研年報, 19 (3), 165, 1962.
- 6) Burrows, W. : Ann. Rev. Microbiol., 5, 181, 1951.
- 7) Thomas, L. : Ann. Rev. Physiol., 16, 467, 1954.

- 8) Salton, M. R. J.: The Bacteria, edited by 1960.
Gunsalus, I. C., and Stanier, R. Y., I, 97,

Table 1
Protective effect of streptolysin S and sodium ribonucleate
on the toxicity for mice of saline extract
of *M. tuberculosis* Aoyama B

Material injected intravenously		Dose of St-S or RNA added to saline extract (mg)	Body weight of mice (gm)	Result*
0.5ml of saline extract containing :	Streptolysin S	1	14	-
			15	-
		0.1	14	-
			14	-
		0.01	14	-
	14		-	
	Sodium ribonucleate	5	14	-
			15	+D
		0.5	15	+D
	16		+D	
0.5ml of saline extract		•	15	+D
			16.5	+D
Streptolysin S in saline		0.5	15	-
			15	-

* +D = acutely died from toxic reaction.

+ = recovered from severe toxic reaction.

± = slight degree of toxicity.

- = no toxic symptom.

Table 2
Effect of heating on protective activity of streptolysin S
and sodium ribonucleate on the toxicity of saline
extract of *M. tuberculosis*

Material injected intravenously		Dose of St-S or RNA added to saline extract (mg)	Body weight of mice (gm)	Result	
0.5ml of saline extract		•	12 13 14 15	+ + + +	
0.5ml of saline extract containing :	St-S	1.0	13 14 15	- - -	
		0.1	12 13	- -	
		0.01	12 13	- -	
		0.001	12 13 14 15	- + - -	
	St-S heated at 100°C for 30 minutes	1.0	13 14 15	- - -	
		0.1	12 13	- -	
		0.01	12 13	- +	
		0.001	12 13 13	+ + +	
	RNA	5.0	13 13	+ -	
		0.5	12 13	+ +	
	RNA heated at 100°C for 30 minutes	5.0	13 13	- -	
		0.5	12 13	+ +	
	St-S		1.0	13 14	- -
	RNA		5.0	12 13	- -

Table 3
Effect of pepsin on the toxicity of saline extract
of *M. tuberculosis*

Enzyme	Dose of enzyme* (μ mg)	Body weight of mice (gm)	Dose of saline extract injected intravenously (ml)	Result
Pepsin	100	15	0.5	-
		15	0.5	-
	10	14	0.5	-
		15	0.5	-
	1	14	0.5	-
		15	0.5	-
	0.1	14	0.5	+
		15	0.5	+
Control	•	15	0.5	+
		15	0.5	+

* 2 ml of saline extract were mixed with 0.2 ml of a pepsin solution and 0.2 ml of 0.1 N HCl. The mixture was placed for 1 hour at 37°C, after which time it was neutralized and made up to 4.0 ml with saline. In a control tube the pepsin solution was replaced with saline.

Table 4
Effect of various enzymes on the toxicity of saline extract
of *M. tuberculosis*

Enzyme	Dose of enzyme (μ mg)	Body weight of mice (gm)	Dose of saline extract injected intravenously (ml)	Result
Lipase	100	15	1.0	-
		15	1.0	-
	10	15	0.5	-
		15	0.5	-
	1	14	0.5	\pm
		15	0.5	\pm
15		0.5	\pm	
Trypsin	100	14	0.5	+
		14	0.5	\pm
Papain	100	15	0.5	+
		17	1.0	+D
Erepsin	100	16	0.5	+
		17	0.7	+
α -Amylase	100	16	0.5	+
		16	0.5	+
β -Amylase	100	15	0.5	+
		15	0.5	+
β -Glucosidase	100	16	0.5	+
		17	0.8	+
Control	•	15	0.5	+
		15	0.5	+

The procedures for the enzyme digestion were described in the text.

Table 5
Effect of adrenaline, ephedrine and antihistaminics on the
toxicity of saline extract of *M. tuberculosis*

Agent	Dose of agent injected intraperitoneally (mg)	Time of interval (min)	Dose of saline extract injected intravenously (ml)	Result*	
Adrenaline	0.05	6	0.15	0/4	
Ephedrine	0.5	5	0.15	5/8	
Antihistaminics	Diphenhydramine	0.5	5	0.15	4/4
	Dimenhydrinate	0.5	5	0.15	4/4
	Promethazine	0.5	5	0.15	4/4
	Chlorhetramine	0.5	5	0.15	4/4
Control	•	•	0.15	4/4	

* No. of animals showing toxic reactions/no. of test animals.