

結核菌培養液液中よりの β -Glucuronidase inhibitorの 分離ならびに性状について

清 谷 克 寛

広島大学医学部細菌学教室 (指導: 松尾吉恭教授)

受付 昭和 56 年 7 月 18 日

緒 言

結核菌その他の細胞内増殖性細菌が宿主食細胞の菌処理機構に抵抗するメカニズムについては、なお全貌が明らかにされているわけではないが、近年多くの知見が積み重ねられている。

Densen and Mandell¹⁾ の総説によると、そのメカニズムは白血球の走化性の阻害^{2),3)}、白血球表面への附着ならびに食食に対する阻害、食食に伴なう一連の酸化的代謝活性亢進の抑制、phagosome と lysosome の融合を阻害することによる脱顆粒現象の阻止^{4)~7)}、lysosome 由来の殺菌性因子に対する抵抗性⁸⁾、phagosome からの回避および殺細胞因子の産生など、宿主食細胞の食作用の全過程に及ぶといっても過言ではない。しかし、その作用機作は細胞内増殖性細菌のすべてについて一様に論ぜられるものではなく、菌および食細胞それぞれの関連によって様々な様相を呈する。

食細胞の殺菌機構に抵抗する結核菌のメカニズムについて、Armstrong ら^{4),5)}および Hart ら^{6),7)}は、電顕的観察により、細胞の脱顆粒現象の阻害を、Jakett ら^{9)~11)}は lysosome 由来酵素の作用に対する抵抗性をあげている。近藤ら^{12)~14)}、および金井ら¹⁵⁾は結核菌と宿主食細胞膜 (食胞膜) のリン脂質ならびにコレステロールとの相互作用について検討を加え、リン脂質よりある種の脂肪酸が遊離すると、これが結核菌に対して殺菌的に作用するとしている。Colwell ら¹⁶⁾は結核菌の水抽出液が食細胞の lysosome- β -glucuronidase の活性を抑制することを報告した。また、田坂ら¹⁷⁾は lysosome 酵素の殺菌機構ならびにその特異な結核乾酪化病巣の成立における役割りを解明することを意図して、結核菌培養液液中に lysosome 酵素活性を修飾する因子の存在を求めて追求したところ、

acid phosphatase をはじめ数種の lysosome 酵素活性に対して阻害作用を示す透析性の低分子物質が結核菌から由来することを見出すとともに、阻害活性物質は一種類にとどまらないことを指摘した¹⁸⁾。

今回著者は、結核菌の培養液液について非透析性の β -glucuronidase 阻害物質の分離を試みたところ、硫酸塩析により沈澱しない分子量約 25,500 のタン白質性の阻害物質の存在を見出したので、その分離・精製ならびに若干の性状について報告する。

実験材料および方法

1. 供試菌株

国立予防衛生研究所より分与されたヒト型結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv 株およびウシ型結核菌 *M. bovis* BCG 株。

2. 供試培地

根本らの変法 Sauton 培地¹⁹⁾ (下表) を用いた。

根本らの変法 Sauton 培地の組成

L-asparagine	8.0 g
Citric acid	2.0 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
Ferric ammonium citrate	50.0 mg
CaCl ₂	66.6 mg
ZnSO ₄	26.7 mg
CuSO ₄	4.14 mg
Co (NO ₃) ₂	1.33 mg
Glycerol	60.0 ml

アンモニア水で pH 6.8-7.0 に調整し、蒸留水で全量 1,000 ml とする。

これを 1 l の三角フラスコに 200 ml ずつ分注して 121°C 15分間高圧滅菌した。

3. 培養液の調製

M. tuberculosis H37Rv 株を上記根本らの変法 Sauton 培地に 37°C で浮上培養し, 3-4 週後にグラスフィルター (GF/B: Whatman) で濾過したものを, 必要に応じてさらにメンブランフィルター (TM4: 東洋化学産業) で濾過した。

4. 酵素活性の測定法

(1) 供試酵素液の調製

1) 正常動物由来の酵素液の調製

主として各種動物由来の貪食細胞の lysosome 酵素を供試した。

モルモット好中球は, Simmons らの方法²⁰⁾に準じモルモット (ハートレー系, ♂, 体重約400g) の腹腔に12%カゼイン-生理食塩水 (pH 7.4) を 12 ml/kg 注入し, 18時間後に屠殺・放血し, 生理食塩水にて腹腔に滲出した好中球を採取した。

モルモット腹腔マクロファージは, Oren らの方法²¹⁾に準じてモルモットの腹腔に1.2%カゼイン-生理食塩水 (pH 7.4) を 30 ml 注入後4日目に腹腔に滲出したマクロファージを採取した。

モルモット肺胞マクロファージは, 正常モルモットを屠殺・放血後, 肺を摘出し, 気管より生理食塩水を注入・洗浄して採取した²¹⁾。

マウス腹腔マクロファージは, CF-1 マウス (4-8週令, ♂) の非刺激腹腔滲出細胞より採取した^{22), 23)}。

ニワトリ好異球は, 近森らの方法²⁴⁾に準じてニワトリ (体重約2kg) の体腔内に, 0.1% グリコゲン-生理食塩水を 100 ml/kg 注入した。48時間後に同量の0.1%グリコゲンを注入し, さらにその8時間後には同量の1%グリコゲンを注入し, 最後のグリコゲン注入8時間後に, ニワトリを屠殺・放血して体腔内に滲出した好異球を生理食塩水にて採取した。

ニワトリマクロファージは, 馬場の方法²⁵⁾に準じて, ニワトリ (体重約2kg) の体腔内に4%ゼラチン-生理食塩水 20 ml を注入し, 48時間後に屠殺・放血して採取した。

ヒト末梢白血球は, 広島赤十字病院血液センターより供与されたヒト濃縮血液より, Clausen の方法²⁶⁾に準じて, 血液4容に対して6%デキストラン-生理食塩水1容を加えて, 37°C 1時間静置後, 上清の plasma 層および buffy coat を採取した。

以上, 採取した細胞は生理食塩水で2-3回遠心洗浄後0.1% Triton X-100 を加え, ラフロンホモジナ

イザーを用いてホモジネートを作成し, 1,500×g 15分間遠心した上清を酵素液として供試した。

なお, lysozyme 活性測定には Oren らの方法²¹⁾に準じて得たモルモット腹腔マクロファージから, de Duve ら²⁷⁾および Carrol らの方法²⁸⁾に準じて部分精製した酵素液を用いた。すなわち, 採取したモルモット腹腔マクロファージを生理食塩水で遠心洗浄後, 最終的に0.25M sucrose を加えてホモジネートとし, 1,000×g 10分間遠心した上清をさらに18,000×g 20分間遠心し, その上清を granule rich fraction とした。この granule rich fraction を0.01M クエン酸に対して透析・可溶化したのちに, CM-sepharose (Pharmacia) を用いるイオン交換クロマトグラフィーで, 0.05M potassium phosphate buffer (pH 7.4) で食塩濃度 0-1 M gradient で溶出, 得られた活性画分を部分精製 lysozyme として供試した。

このほか, 市販の酵素標品として, 牛肝臓由来の β -glucuronidase (Worthington), *Helix pomatia* 由来の β -glucuronidase/arylsulfatase (Boehringer Mannheim), 大腸菌由来の β -glucuronidase (Boehringer Mannheim), 卵白由来の lysozyme (Sigma) および人尿由来の lysozyme (Worthington) をも供試した。

2) 免疫モルモット腹腔マクロファージ由来の β -glucuronidase 調製法

M. bovis BCG (予研株) の生菌 1.2×10^8 個を, モルモット (ハートレー系, ♂, 体重約300g) の大腿部皮下に接種後5週目に, PPD 5 μ g を用いて皮内反応を行い, 48時間後, 発赤の程度により遅延型アレルギーの発現を確認し, 直ちに1.2%カゼイン-生理食塩水 (pH 7.4) を腹腔内に注入して滲出したマクロファージを採取し, Nozawa らの方法²⁹⁾に準じて調製した。すなわち, 腹腔に滲出したマクロファージを10%牛胎児血清加199培地にて採取後, 同培養液にて2-3回遠心洗浄したものをプラスチックシャーレに入れ, CO₂-incubator 内で37°C 2-3時間培養した。ついで, 培養液で細胞面をよく洗い非吸着細胞を除去したのちに, 1mM EDTA 加 PBS(-) を加えて室温に15分間静置し, ラバーポリスマンにて吸着細胞を剥離した。得られた吸着細胞を PBS(-) にて2-3回遠心洗浄後, 0.1% Triton X-100 を加えてホモジネートを作成し, 1,500×g 15分間遠心した上清を酵素液として供試した。

(2) 酵素活性の測定法

1) 酸性加水分解酵素活性の測定

Mead らの方法^{30),31)}に準じて、4-methylumbelliferone 誘導体を用いる螢光比色法で測定した。

反応液組成：0.1 M acetate buffer (pH 5.0) に 0.2 % Triton X-100 を加えたもの。

供試基質：4-methylumbelliferyl (4-MU)- β -D-glucuronide, 4-MU-phosphate, 4-MU-2-acetamide-2-deoxy- β -D-glucopyranoside, および 4-MU- β -galactopyranoside (いずれも Koch Light Laboratories) を無水 ethylene glycol monoethyl ether (methyl cellosolve) に 10 mM になるように溶解して stock solution とし、用時上記反応液にて稀釈し、最終基質濃度が 0.2 mM になるように調整した。

測定法：基質液 100 μ l と酵素液 100 μ l を 37°C で20分間 incubate したのちに、5 mM EDTA 含有 50 mM glycine buffer (pH 10.4) 3.3 ml を加えて反応を停止させ、遊離した 4-MU を螢光比色計 (日立分光螢光度計204型) の $E_{385}F_{450nm}$ で測定した。酵素活性は、p mole/min/ml で表わした。

2) lysozyme 活性の測定

Micrococcus luteus ATCC 4698 の菌浮遊液を基質として用いる Parvy らの方法の一部を修飾して測定した。

反応液組成：0.1 M sodium phosphate buffer (pH 5.5)。

供試基質：*M. luteus* ATCC 4698 (Boehringer Mannheim) を反応液にて 0.1 mg/ml とし、溶解後東洋汙紙 No. 2 で汙過したものを基質液とした。

測定法：基質液 2.5 ml を光電比色計のキューベットに入れ、37°C 1-2分間 preincubate したのちに、酵素液 0.1 ml を加えてよく混和、100-50型分光光度計および200-0510型 10 mm セル循環水式恒温装置 (いずれも日立製) を用いて 37°C で OD_{450nm} の減少率を求めた。酵素活性は Sigma units/mg solid or mg protein として表わした。

3) cathepsin D 活性の測定

ヘモグロビン (TypeI, Sigma) を基質として測定した。すなわち、酵素液 0.5 ml に 8%ヘモグロビン液 0.25 ml と 1 M formate buffer (pH 3.0) 0.25 ml とを加えて 45°C 60分間 incubate したのち、3% TCA 5 ml を加えて反応を停止させ、1,500 \times g 10分間遠心した上清液について、Lowry らの方法³²⁾に従って遊離 tyrosine を定量した³³⁾。

5. 酵素阻害活性の測定法

前項4の「酵素活性の測定法」と同様の手順で行った。すなわち、各基質液に酵素活性測定時に用いる酵素液の1/2量と、それと同量の β -glucuronidase inhibitor 液を混合してその酵素活性を測定し、これを inhibitor (+) activity とした。 β -glucuronidase inhibitor 液の代わりに inhibitor の溶解に用いた buffer を同量加えたものの活性を inhibitor (-) activity とし、下式によって阻害率(%)を算定した。

$$\text{阻害率(\%)} = \left(1 - \frac{\text{inhibitor (+) activity}}{\text{inhibitor (-) activity}}\right) \times 100$$

β -glucuronidase inhibitor の阻害活性は、モルモット好中球由来の β -glucuronidase (100 p mole/min/ml) に対して、用いる inhibitor のタンパク量をウシ血清アルブミンを standard として Lowry らの方法³²⁾で測定し、その阻害率(%)を logit 表にプロットして得られる直線から 50% 阻害率 (50% inhibition dose, 50% ID) を求め、これを β -glucuronidase inhibitor の 1 単位とした^{34)~37)}。

6. β -glucuronidase inhibitor の分離

(1) 硫酸塩析

培養液に固型硫酸を70%飽和 (472 g/l) になるように添加、氷室内で攪拌し、析出した沈澱物を14,000 \times g 30分間遠心して集め、沈澱物は 0.02 M Tris-塩酸 buffer, pH 8.0 (以下 0.02 M Tris-Cl, pH 8.0) に対して透析溶解した。上清についてはブタノール処理を行った。

(2) ブタノール処理

培養液の70%飽和硫酸上清を Morton らの方法³⁸⁾に準じてブタノール処理した。すなわち、氷室内で攪拌しながら n-ブタノールを20% (v/v) になるように加えて30分-1時間静置し、ブタノール層と70%飽和硫酸を含む水層の境界面に形成される油膜様物を1,500 \times g 15分間遠心して集め、これを 0.02 M Tris-Cl (pH 8.0) に対して透析溶解し、ブタノール処理-境界層とした。

(3) イオン交換クロマトグラフィー

内径 2.5 cm, 長さ 40 cm のカラムに DEAE-sepharose CL-6B (Pharmacia) を詰め、0.02 M Tris-Cl (pH 8.0) にて平衡化したのちに、ブタノール処理境界層のイオン交換クロマトグラフィーを行った。まず 0.2 M NaCl 加 0.02 M Tris-Cl (pH 8.0) で stepwise に溶出したのち、0.2-1 M NaCl gradient で溶出を行い 3 ml ずつ分画した。各分画液について透析脱塩後、

モルモット好中球由来の β -glucuronidase 活性に及ぼす阻害活性を測定した。得られた阻害活性画分をブールし、再び透析脱塩後 Diaflo membrane PM-10 (Amicon) を用い、窒素ガス圧 3-4 kg/cm² 下で加圧限外濃縮したものを β -glucuronidase inhibitor の粗標品とし、以後の実験に供した。

7. β -glucuronidase inhibitor の物理化学的性状

(1) pH の影響

β -glucuronidase inhibitor の一定量を取り、0.02 M GTA buffer (pH 2-10)³⁹⁾—下表—に対して48時間透析処理したのも、再び 0.02 M Tris-Cl (pH 8.0) に対して48時間透析してもとの pH に戻したものについて阻害活性を測定した。

0.02 M GTA buffer の組成

3, 3-dimethylglutaric acid	3.20 g
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	2.42 g
2-amino-2-methyl-1, 3-propanediol	2.10 g

溶解後、NaOH および HCl にて所定の pH (2-10) に調整し、蒸留水にて全量を 1,000 ml とし使用する。

(2) 加熱の影響

60°C, 80°C および沸騰水中で10分間加熱処理後、急冷したものについて阻害活性を測定した。

(3) 酵素処理の影響

1) トリプシン処理

β -glucuronidase inhibitor を蒸留水に対して透析後、タンパク質量を 1 mg/ml に調整した。トリプシン (Type III, Sigma) を 0.04 M Tris-Cl (pH 8.0) に溶解して 2 mg/ml 液とし、その1容に同量の β -glucuronidase inhibitor 液を加えて 37°C 60分間処理を行った。

2) DNase および RNase 処理

DNase (Type I, Sigma) および RNase (Type I-A, Sigma) を 0.2 M acetate buffer (pH 5.0) に溶解して 2 mg/ml とし、同量の β -glucuronidase inhibitor 液を加えて 37°C 60分間処理を行った。なお、RNase 液はあらかじめ 100°C 5分間加熱したものを使用した。

(4) 除脂質処理の影響

20%ブタノール処理を行い、1,500 × g 15分間遠心後ブタノール層を除去し、水層を透析して除脂質処理の影響をみた。

(5) 除核酸処理の影響

β -glucuronidase inhibitor 液に 1 M MnCl₂ を 1/20 容加えて攪拌後、1,500 × g 15分間遠心した上清を透

析し、除核酸処理の影響をみた。

8. β -glucuronidase inhibitor の阻害活性に及ぼす各種塩類の影響

あらかじめ蒸留水に対して透析した β -glucuronidase inhibitor を種々の塩溶液で稀釈して阻害活性を測定した。用いた塩溶液は、NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂, MgSO₄, Na₂SO₄, (NH₄)₂SO₄ および NH₄Cl の8種類で、それぞれ0.05, 0.1および0.2 M 溶液を用いた。

9. 等電点分画

Polybuffer 交換体 PBE 94 と Polybuffer 74 (いずれも Pharmacia) を用いるクロマトフォーカシング法により、 β -glucuronidase inhibitor の等電点を推定した⁴⁰⁾。

PBE 94 を 0.025 M imidazole-HCl buffer (pH 7.4) で平衡化し、同じ buffer に対して透析した β -glucuronidase inhibitor のクロマトフォーカシングを行った。Polybuffer 74 (pH 4.0) で pH 7.4 から 4.0 まで溶出を試み、さらに 0.1 N HCl にて溶出を行い、3 ml ずつ分画した。各分画液毎に pH を測定し、透析脱塩後阻害活性を測定した。

10. 分子量の測定

Sephadex G-75 によるゲル濾過法で行った。すなわち、内径 1.5 cm 長さ 100 cm のカラムに Sephadex G-75 を詰め、0.5 M NaCl 加 0.02 M Tris-Cl (pH

Mycobacterium tuberculosis H37Rv

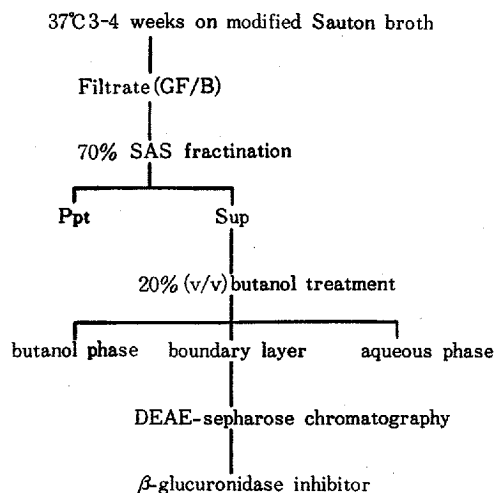


Fig. 1. Purification procedure for β -glucuronidase inhibitor from unheated culture filtrate of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

8.0) で平衡化したのちに、同じ緩衝液に対して透析したβ-glucuronidase inhibitor を添加し、溶出液を1.5 ml ずつ分画した。標準タンパク質としては、分子量測定用標準タンパク質キット (Boehringer Mannheim) を用い、ウシ血清アルブミン (MW: 68,000), 鶏卵アルブミン (MW: 45,000), キモトリプシンノーゲン A (MW: 25,000) およびチトクローム c (MW: 12,500) の溶出パターンと比較して、β-glucuronidase inhibitor の分子量を推定した。

実験成績

1. β-glucuronidase inhibitor の分離

M. tuberculosis H37Rv 株の非加熱培養液よりのβ-glucuronidase inhibitor の分離は、モルモット好球菌由来のβ-glucuronidase に対する阻害活性を指標として以下の手順に従って行った。

その概略は Fig. 1 に示す通りである。

(1) 硫酸塩析

培養液の70%飽和硫酸塩析の結果、培養液中の総阻害活性の3%が沈澱画分に回収されるのみで、大部分は上清に残って塩析されなかった。上清について、さらに硫酸飽和度を100%にまであげたが、活性画分をこれ以上沈澱画分に回収することはできなかった。

(2) ブタノール処理

培養液中に多量に存在するであろう脂質の影響を考え、70%飽和硫酸上清を20%ブタノールで処理した。

その結果、ブタノール層と70%飽和硫酸を含む水層との境界面に油膜様物が生じ (Fig. 2a), これは1,500 × g 15分間の遠心により、両層の境界面にコンパクトな disc 状となり比較的容易に回収することができた。

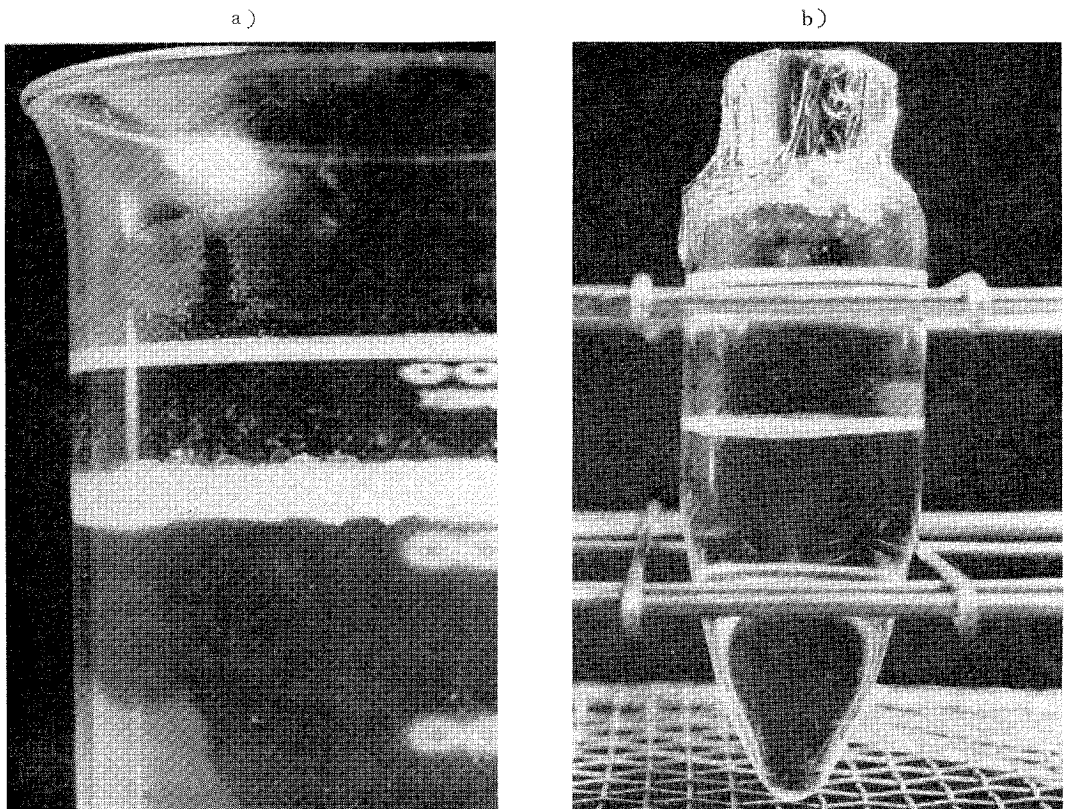


Fig. 2. Oily educts appeared at boundary layer between butanol and aqueous phases.
a) before centrifugation,
b) after centrifugation, boundary layer was packed tightly between two phases.

(Fig. 2b)。このブタノール処理境界層に70%飽和硫酸上清中の総阻害活性の62%、培養濾液中のその61%が移行することが認められた。

(3) イオン交換クロマトグラフィー

境界層を 0.02 M Tris-Cl (pH 8.0) に対して透析溶解後、DEAE-sepharose によるイオン交換クロマトグラフィーを行った。

その結果は、Fig. 3 に示すように NaCl 濃度 0.3 M により溶出してくる OD_{280nm} の吸収ピークに一致し

て境界層中の69%、培養濾液中のその42%の阻害活性が認められたので、これを β -glucuronidase inhibitor の粗標品とした。

以上、培養濾液からの β -glucuronidase inhibitor の分離の成績をまとめて Table 1 に、また各分画過程の阻害活性を logit 表にプロットして Fig. 4 に示した。

それぞれの分画の50% ID は培養濾液が 42.0 μ g, 70%飽和硫酸塩析の沈澱が 580 μ g, 同じく上清が 7.5

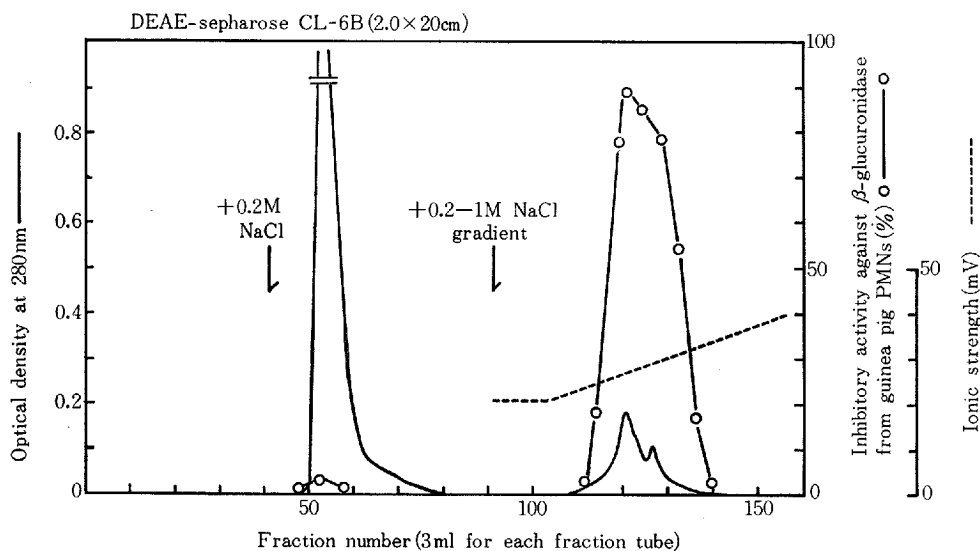


Fig. 3. Pattern of DEAE-sepharose ionexchange chromatography for β -glucuronidase inhibitor

Table 1. Purification of β -glucuronidase inhibitor

	Total protein (mg)	50% ID (μ g* ¹)	Total activity (units* ²)	Specific activity (units per mg of protein)	Purification (fold)	Yield (%)
Culture filtrate	3,234	42.0	77,000	23.8	1.00	100
70% SAS fractionation						
-precipitate	1,290	580	2,224	1.7	0.07	3
-supernatant	570	7.5	76,000	133	5.59	99
20% butanol treatment						
-boundary layer	118	2.5	47,200	400	16.81	61
-aqueous phase	166	35.0	4,743	28.6	1.20	6
β -Glucuronidase inhibitor	26	0.8	32,500	1,250	52.50	42

*¹ 50% Inhibition dose: μ g of protein measured with Lowry's protein assay.

*² One arbitrary unit denotes the dose of sample exhibiting 50% inhibition against 100 p mole/min/ml of β -glucuronidase activity from guinea pig PMNs.

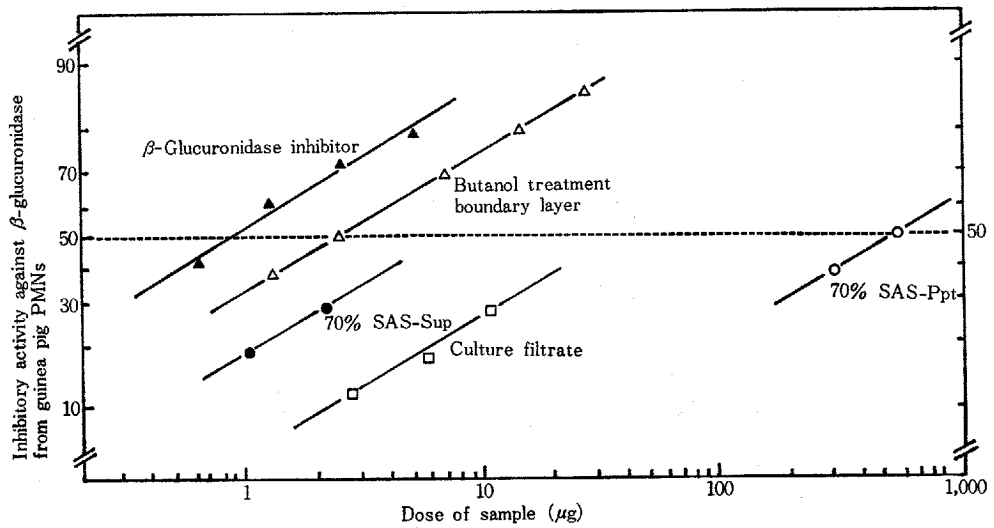


Fig. 4. Inhibitory activity of β -glucuronidase inhibitor at various purification steps.

μg . 境界層が $2.5 \mu\text{g}$. β -glucuronidase inhibitor 粗標品が $0.8 \mu\text{g}$ であり、出発材料に比較して比活性で約53倍の上昇が認められた。

2. β -glucuronidase inhibitor 産生に及ぼす培養期間の影響

培養後10週目まで2週目毎に任意のフラスコ4本ずつを取り出し、培養液を2本ずつプールして、ブタノール処理境界層中のタンパク質量ならびに阻害活性を測定し、 β -glucuronidase inhibitor 産生の時間的経過を検討した。タンパク質量および阻害活性はフラスコ1本当たりの値として Fig. 5 に示した。

すなわち、タンパク質量は菌が菌膜を形成する2週後まで急激に増加し、それ以後暫時一定の値を保つ

が、4週以降再び急上昇がみられた。これはおそらく菌の自己融解によるものと思われる。

これに対して阻害因子は、2週目まではほとんど産生されないが、4-6週目にかけて急激にその産生量が増加し、6週以降 plateau に達した。これらにともなって、50% ID は培養4週目以降 $2.0 \mu\text{g}$ 前後のほぼ一定の値を示した。

Table 2. Physicochemical properties of β -glucuronidase inhibitor

Treatment	β -Glucuronidase inhibition activity (units)	
	Not-treated	Treated
60°C 10 min		174
80°C 10 min	174	174
100°C 10 min		174
pH 2.0		389
4.0		389
6.0	389	389
8.0		389
10.0		389
Trypsin(1mg/ml, 37°C 60min)	270	0
DNase(")	167	200
RNase(")	167	192
n-Butanol (20% v/v)	502	431
1 M MnCl_2	502	570

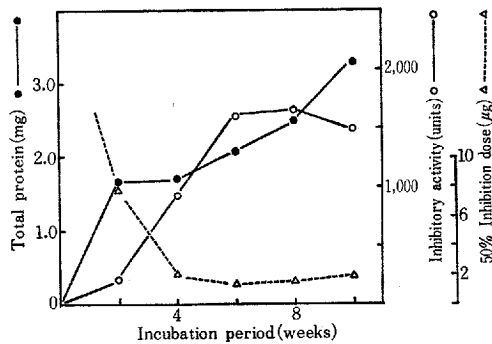


Fig. 5. Time course of β -glucuronidase inhibitor production by *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

3. β -glucuronidase inhibitor の物理化学的性状

β -glucuronidase inhibitor の活性に及ぼす種々の因子の影響については、Table 2 にまとめて示した。

すなわち、阻害活性は 60°C, 80°C および 100°C 10分間の加熱、pH 2-10 の広い範囲で安定であり、DNase および RNase 処理によっては影響を受けないが、トリプシン処理によっては完全に失活した。また、ブタノールによる除脂質処理によって阻害活性の14%が失なわれるが、MnCl₂ による除核酸処理に対しては安定であった。

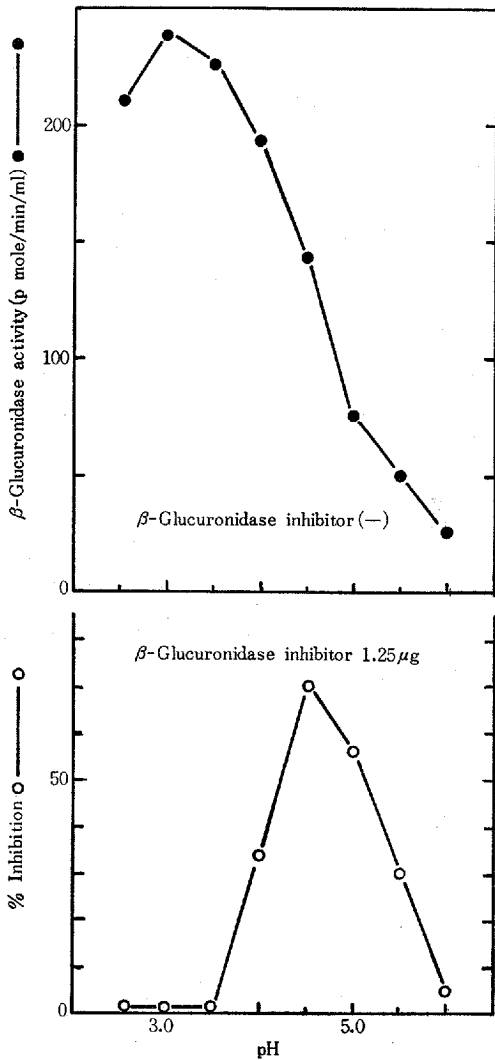


Fig. 6. Effect of pH on the activity of β -glucuronidase inhibitor

4. β -glucuronidase inhibitor 活性の至適 pH

モルモット好中球由来の β -glucuronidase に対する β -glucuronidase inhibitor の阻害作用を pH 2.5-6.0 の範囲で測定した。反応液として 0.02 M GTA buffer に 0.2% Triton X-100 を加えたもの (各 pH) を用い、その成績は Fig. 6 に示した。

β -glucuronidase の酵素活性の至適 pH は pH 3.0 附近にあるのに対し、inhibitor の活性は pH 4.0-5.5 の比較的せまい pH 域にのみみられ、pH 4.5 において最も著明であった。

5. β -glucuronidase inhibitor の阻害機構

4-MU- β -D-glucuronide の 0.05, 0.1 および 0.2 mM を基質として β -glucuronidase inhibitor 添加群と非添加群について、それぞれのモルモット好中球由来 β -glucuronidase 活性を測定して、 β -glucuronidase inhibitor の阻害機構を検討した。その成績は Table 3 に、またこれを double reciprocal plot 法で Fig. 7 に示した。

添加・非添加両群のいずれも 1/s 軸上、-3.0 で交わる non-competitive pattern を示すことがわかった。

Table 3. Kinetics of β -glucuronidase inhibitor on β -glucuronidase activity

S (mM)*1	V (p mole/min/ml)*2		
	Control	β -Glucuronidase inhibitor	
		0.48 μ g	0.96 μ g
0.05	38.3	23.9	18.3
0.10	60.6	41.9	32.1
0.20	103.6	67.6	52.0

*1 S : 4-MU- β -D-glucuronide

*2 V : β -Glucuronidase activity

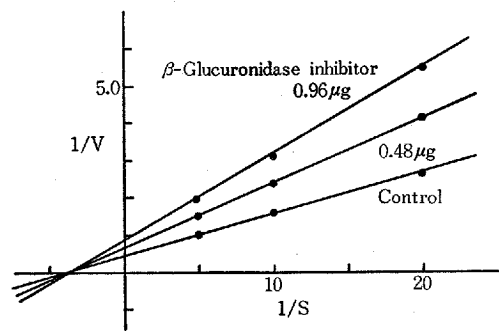


Fig. 7. Kinetics of β -glucuronidase inhibitor on β -glucuronidase activity (Double reciprocal plot).

6. β-glucuronidase inhibitor の活性に及ぼす塩類の影響

Fig. 8 に示すように、用いた8種類の塩溶液全てにおいて0.05 Mでβ-glucuronidase inhibitor 活性の抑制効果が認められた。NaCl, KCl および NH₄Cl ではその抑制効果は比較的穏和であるのに対し、CaCl₂, MgCl₂, MgSO₄, (NH₄)₂SO₄ および Na₂SO₄ では顕著であった。

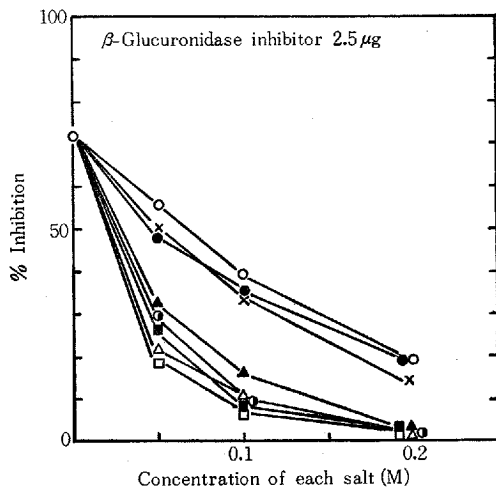


Fig. 8. Effect of each salt on inhibitory activity of β-glucuronidase inhibitor.

Symbols: NaCl (○), KCl (●), MgCl₂ (△), CaCl₂ (▲), MgSO₄ (□), Na₂SO₄ (■) (NH₄)₂SO₄ (⊙), NH₄Cl (×).

活性測定時と同じ条件下で、各塩類溶液の0.05 M添加時のイオン強度 (mV) をコンダクティビティメーター (エムエス) を用いて測定すると、NaCl: 6.0 mV, KCl: 6.0, MgCl₂: 7.0, MgSO₄: 6.0, CaCl₂: 6.5, Na₂SO₄: 7.0, (NH₄)₂SO₄: 7.5, NH₄Cl: 6.5 で、非添加の場合の4.5 mV に比していずれも1.5-3.0 mV 高い値を示したものの、イオン強度と抑制効果の強さとの間には相関関係は認められなかった。

7. 等電点分画

PBE 94 と Polybuffer 74 を用いたクロマトフォーカシング法におけるβ-glucuronidase inhibitor の溶出パターンを Fig. 9 に示した。

その結果、pH 7.4-4.0の間では活性画分は溶出されなかった。そこで、0.1 N HCl による溶出を試みたところ、二つの OD_{280nm} 吸収ピークが検出され、おかれて溶出するピークに一致して活性が認められ

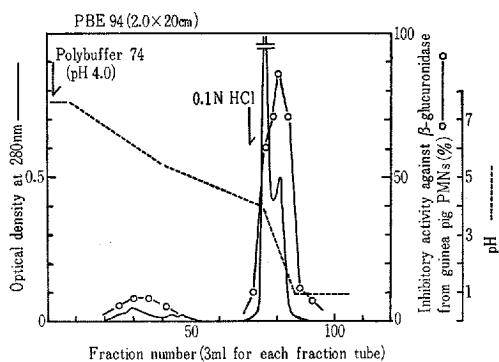


Fig. 9. Chromatofocusing pattern of β-glucuronidase inhibitor

た。このさいの pH より本 inhibitor の等電点は pH 2.5 附近と推定された。

8. 分子量の測定

β-glucuronidase inhibitor の分子量は、Sephadex G-75 のゲル濾過法により約25,500と計算された (Fig. 10)。

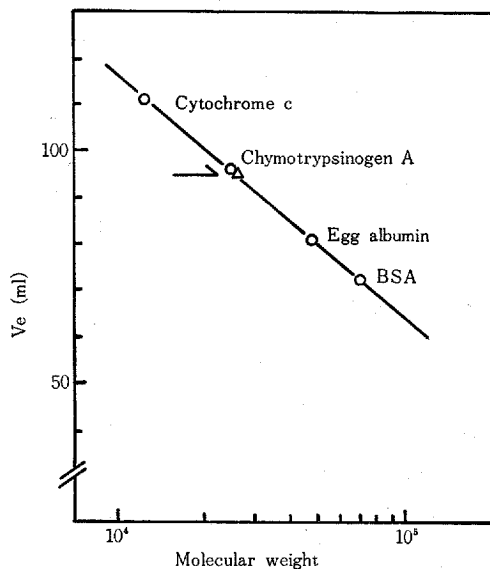


Fig. 10. Estimation of molecular weight of β-glucuronidase inhibitor by gel filtration on Sephadex G-75.

9. 各種 lysosome 酵素に対するβ-glucuronidase inhibitor の作用

由来を異にする各種酵素活性に及ぼすβ-glucuro-

Table 4. Relative activity of β -glucuronidase inhibitor

Enzymes	Source*1	50% ID (μ g)
β -Glucuronidase	Guinea pig-PMNs	0.9
	-PM ϕ	0.75
	-AM ϕ	0.8
	Mouse -PM ϕ	36.0
	Domestic fowl-PMNs	>41.6
	-M ϕ	>41.6
	<i>Helix pomatia</i> (Boehringer Mannheim)	>41.6
<i>E. coli</i> (Boehringer Mannheim)	>41.6	
Human-PBL	>41.6	
Beef liver (Worthington)	>41.6	
Acid phosphatase N-Ac- β -glucosaminidase β -Galactosidase	Guinea pig-PMNs, Human-PBL and Domesitc fowl-PMNs	>41.6
Lysozyme	Guinea pig-PM ϕ Egg white (Sigma) Human urine (Worthington)	>41.6
Cathepsin D	Guinea pig-PMNs	>102

*1 Abbreviations—PMNs: Polymorphonuclear leukocytes, PM ϕ : Peritoneal macrophages, AM ϕ : Alveolar macrophages, PBL: Peripheral blood leukocytes.

nidase inhibitor の影響をまとめて Table 4 に示した。

(1) β -glucuronidase に対する阻害作用

β -glucuronidase inhibitor はモルモット好中球, 腹腔マクロファージおよび肺胞マクロファージ由来の β -glucuronidase に対しては, 50% ID がそれぞれ 0.9, 0.75および 0.8 μ g で, ほぼ同程度に強く阻害するが, マウス腹腔マクロファージ由来の酵素に対しては, 50% ID は 36 μ g で, その阻害の程度は弱く, 大腸菌, *Helix pomatia*, ニワトリ好異球およびニワトリマクロファージ由来のそれに対しては阻害効果は全く認められなかった。

これに対して, ヒト末梢白血球と牛肝臓由来の β -glucuronidase に対しては, いずれもある阻害率 (前者では40-50%, 後者では20-30%) で plateau に達したため, 50% ID を求めることはできなかった (Fig. 11)。

(2) その他のlysosome 酵素に対する阻害作用

β -glucuronidase inhibitor は, モルモット好中球, ヒト末梢白血球, ニワトリ好異球由来の他の lyso-

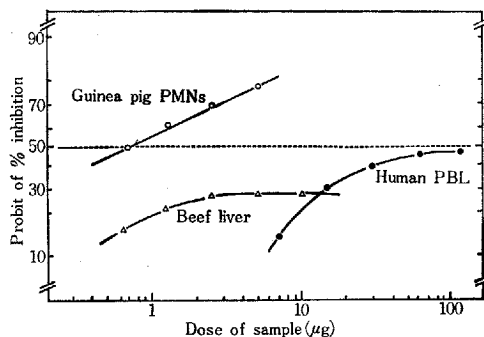


Fig. 11. Activity of β -glucuronidase inhibitor against β -glucuronidase from human peripheral blood leukocytes (PBL) and beef liver.

some 酵素 (acid phosphatase, N-Ac- β -glucosaminidase, β -galactosidase) に対しては全く阻害効果を示さなかった。また, モルモット腹腔マクロファージ, 卵白あるいはヒト尿由来の lysozyme およびモルモット好中球由来の cathepsin D に対しても阻害効果は全く認められなかった。

Table 5. Inhibitory activity of β -glucuronidase inhibitor against β -glucuronidase from guinea pig peritoneal macrophages immunized with *Mycobacterium bovis* BCG

Immunization*1	Skin reaction (mm)*2	% Adherence (adherent cells/PEC)	β -Glucuronidase activity (p mole/min/10%adherent cells)	50% ID (μ g)
+	15.8 \pm 0.29	79.6	8,976 \pm 1,615	0.34
-	0	23.8	12,791 \pm 2,878	0.35

*1 Guinea pigs were injected subcutaneously with 1.2×10^6 viable cells of *Mycobacterium bovis* BCG (Japanese strain).

*2 Five weeks after immunization with BCG, skin reaction was performed using 5 μ g of PPDs and the diameter of erythema was measured.

10. BCG 免疫モルモット腹腔マクロファージの β -glucuronidase 活性に対する β -glucuronidase inhibitor の阻害作用

BCG 免疫モルモットの腹腔滲出細胞より得た吸着細胞の β -glucuronidase 活性を 100 p mole/min/ml に調整後、 β -glucuronidase inhibitor による活性阻害を測定し、正常モルモットより同様に処理して得た吸着細胞のそれと比較検討した。その結果は Table 5 に示した。

得られた腹腔滲出細胞数は非免疫群において圧倒的に多いが、吸着細胞数では両群間に差はなく、全腹腔滲出細胞中に占める吸着細胞の割合は免疫群79.6%、非免疫群23.8%であった。また、吸着細胞数 1×10^7 個当りの β -glucuronidase 活性は免疫群 8,976 p mole/min/ml、非免疫群 12,791 p mole/min/ml で非免疫群の方がやや高い傾向にあった。しかし、 β -glucuronidase inhibitor による阻害の受け方は、免疫群の50% ID が 0.34 μ g、非免疫群のそれが 0.35 μ g で両群間に有意差は認められなかった。

考 察

酵素阻害物質を微生物の培養液中に探索する試みは各方面で活発に行なわれている。梅沢⁴¹⁾、青柳⁴²⁾、⁴³⁾らの研究グループは、1965年以来この方面の研究を精力的におし進め、現在までに非病原性の *Streptomyces* および *Actinomyces* の各菌株の培養液中より数多くの酵素阻害物質を分離・精製している。

そのうち、lysosome 酵素に限ってみると、leupeptin^{36), 44) - 46)} は cathepsin B を、antipain^{47), 48)} は cathepsin A および B を、chymostatin^{49), 50)} は cathepsin A, B および D を、pepstatin^{51) - 53)} は cathepsin D を、isoflavonoid^{54), 55)} は β -galactosidase を、elastatinal⁵⁶⁾ はヒトおよびイヌ顆粒球の elastase

をそれぞれ阻害することが明らかにされている。また、Ohmura ら⁵⁷⁾はヒト顆粒球の elastase を阻害する elasin をそれぞれ異なる *Actinomyces* から見出し出している。

しかし、結核菌に限らず細胞内増殖性細菌の培養液から lysosome 酵素に対する阻害物質を分離したという報告は、Colwell らがヒト型結核菌199株の水抽出液がモルモット腹腔マクロファージ由来の β -glucuronidase 活性を阻害するが、ラット由来の β -glucuronidase およびモルモット由来の lysozyme や alkaline phosphatase に対しては阻害効果を示さないことを明らかにした論文¹⁹⁾および著者らが以前に同じヒト型結核菌 H37Rv 株より分離し、Mixed paracrystal tuberculo-protein-glycoprotein (MCTP-GP) と名付けた因子が、モルモット好中球由来の acid phosphatase, N-Ac- β -glucosaminidase, N-Ac- β -galactosaminidase, β -glucuronidase, β -galactosidase および α -glucosidase を阻害することを明らかにした論文¹⁷⁾以外には未だ接していない。

そこでヒト型結核菌 *M. tuberculosis* H37Rv 株の非加熱培養液より、 β -glucuronidase inhibitor の分離を試みた。今回分離した β -glucuronidase inhibitor は、培養液の70%飽和硫酸上清を20%ブタノールで処理することにより、ブタノール層と水層の境界面に形成される油膜様境界層中に回収されるタンパク質性の物質である。培養液を硫酸塩析しないで直接ブタノール処理を行ったのでは油膜様物質の形成はみられないのみならず、阻害活性は水層中に残存することから、70%飽和硫酸塩析とブタノールとの相互作用により、培養液中の他の物質と共に境界層に形成されてくるものと考えられた。このさいブタノール処理はMorton らの原法³⁸⁾とは異なり、70%飽和硫酸塩析の上清について直接行った結果、遠心する時に水層がク

クションの役目を果して境界層の回収を容易にした。

回収された β -glucuronidase 阻害活性画分は、DEAE-sepharose によるイオン交換クロマトグラフイーにより部分精製後、SephadexG-75 によるゲル濾過法で分子量約25,500と推定された。またその等電点はクロマトフォーカシング法によって pH 2.5 附近であることが示された。

本 inhibitor の物理化学的諸性状は一括して Table 2 に示したが、pH 2-10 の広い範囲内で安定、DNase および RNase 処理によっては阻害活性は影響を受けないが、トリプシン処理によっては完全に失活すること、および波長 340 nm-190 nm の間での OD スキャンニングにより、OD₂₇₅₋₂₈₀nm と OD₂₂₀nm 附近に吸収を有し、芳香族アミノ酸を含むタンパク質特有の吸収パターンを示すことなど、阻害活性の本態がタンパク質性物質であることが示唆されたが、分子量が25,000前後であるにもかかわらず、100°C 10分間の加熱に安定でかつ pH 2.5 附近の等電点を有し、しかも硫酸塩析されないなど特異な一面を示した。

また、MnCl₂ 処理による除核酸処理によっては影響を受けなかったが、20%ブタノール処理により除脂質を行くと、阻害活性の14%が失なわれた。この点については表には示さなかったが、トリプシン処理以外のその他の処理法におけると同様に、ブタノール処理においても50% ID の低下は認められていないことから、ブタノール処理によりタンパク質の一部がブタノール層に移行したことが総阻害活性を計算する段階で活性の収量低下として表現されたものと考えられる。

一方、 β -glucuronidase inhibitor 精製の過程において、DEAE-sepharose よりの溶出に 0.2-1 M NaCl gradient を用い、各溶出液について阻害活性を測定したところ、全く阻害活性は認められず、高イオン強度下における阻害活性の抑制の可能性が示唆されたので、以後は各分画液毎に透析脱塩後阻害活性を測定するという方法をとった。

この高イオン強度下における阻害活性の低下に関して、数種類の塩溶液についてその解析を試みたところ、用いた全ての塩溶液 0.05 M で阻害活性の低下がみられ、その程度は MgSO₄, MgCl₂, Na₂SO₄ および (NH₄)₂SO₄ などに著明であったが、イオン強度と直接的な相関関係は認められなかった。Wang ら⁵⁸⁾ および Dean⁵⁹⁾ は、高濃度食塩存在下 (0.65 M) では β -glucuronidase 活性が増強されることを、逆に Cashman ら⁶⁰⁾ は食塩濃度 0.15 M で同酵素活性は完

全に阻害されることを報告している。今回用いた塩溶液の濃度 (0.05-0.2 M) 下では β -glucuronidase 活性に対する影響はほとんど認められなかった。したがって、用いた塩類イオンが β -glucuronidase inhibitor の作用発現の調節に何らかの関与をしているものと考えられる。

生細胞中の lysosome 内の pH について Sprick⁶¹⁾ は *M. tuberculosis* および *M. smegmatis* の菌体表面を標示色素で染色して、マウスあるいはモルモットの単球および好中球に貪食させて測定した結果、phagolysosome 内の pH は4.7-5.5であったと報告している。Ohkuma ら⁶²⁾ は、フルオレスセイン (FITC) とデキストランとを結合させた FITC-dextran を細胞に取り込ませて励起光 495 nm での蛍光強度の変化をもとに、マウス腹腔マクロファージの lysosome 内の pH を 4.75 ± 0.06 と算出している。著者ら¹⁷⁾ はすでに、結核菌培養液から得られる MCTP-GP の lysosome 酵素に対する阻害効果は、各々の酵素の至適 pH とは無関係に pH 5.0-5.5 でもっとも強いことを明らかにし、MCTP-GP の感染宿主の phagolysosome 内での lysosome 酵素作用への干渉の可能性を示唆している。今回の成績によると β -glucuronidase inhibitor はモルモット好中球、腹腔および肺胞マクロファージ由来の β -glucuronidase 活性を強く阻害し、その阻害活性は pH 4.0-5.5 の比較的せまい pH 域でのみみられたことは lysosome 内の pH が酸性に保たれていることと関連して非常に興味がある。モルモット好中球由来の β -glucuronidase 活性の至適 pH は今回の成績から3.0と算出されており、pH が中性にむかうにつれて活性は低下の傾向を示すことと考え合わせると、lysosome 内の pH、 β -glucuronidase 活性の至適 pH および β -glucuronidase inhibitor 活性の至適 pH の3者の関係から lysosome 内では、本 inhibitor の阻害効果は相対的により強く現われていることが示唆される。

本 inhibitor の阻害機構はモルモット好中球由来の β -glucuronidase に対して non-competitive であることから、由来の異なる他の酵素についても阻害効果がみられるか否かを検討したが、モルモット好中球および腹腔マクロファージ由来の他の lysosome 酵素 (acid phosphatase, N-Ac- β -glucosaminidase, β -galactosidase, cathepsin D および lysozyme) やモルモット以外の動物および大腸菌由来の β -glucuronidase 活性に対しては全く阻害効果を認めなかった。

この点は、MCTP-GP が、由来の異なる多種類の酵素に対して阻害的に作用し、多価 inhibitor 的な様相を示したのとは対照的であった。Prabhakaran ら⁶³)も、同一基質特異性を有する β -glucuronidase であっても、哺乳動物由来の lysosome 酵素と、大腸菌由来の酵素とではその至適 pH が異なり、特異的な阻害剤である D-saccharic acid-1, 4-lacton および galactosaccharic acid 等に対する反応性も異なることを示している。

他方、本 inhibitor はヒト末梢白血球およびウシ肝臓由来の β -glucuronidase に対しては、それぞれある一定の阻害率で阻害活性が plateau に達し、partial inhibition pattern を示した。これに類した現象は、Constantopoulos ら⁶⁴)もみており、suramin の阻害効果がラット肝臓由来の β -glucuronidase に対しては 0.5 mM で、同 N-Ac- β -glucosaminidase, α -および β -galactosidase に対しては 0.1 mM で plateau に達し、それ以上の高濃度では逆に活性が低下することを報告している。Colwell ら¹⁶)は、結核菌の水抽出液の β -glucuronidase 阻害作用について、結核菌の実験感染に対して強い感受性を示すモルモット腹腔マクロファージ由来の β -glucuronidase は阻害されるが、結核菌に対して感受性の低いラット由来のそれは阻害されないことから、阻害を受ける酵素の種特異性と結核菌に対する感受性について言及している。今回著者が分離した β -glucuronidase inhibitor も、Colwell ら¹⁶)の成績と同様にモルモット由来の β -glucuronidase 活性を強く阻害したことから、結核菌の培養液液中より分離した著者の inhibitor は、Colwell らが結核菌の菌体抽出液中にみいだした β -glucuronidase 阻害活性物質と本態を一にする可能性が考えられる。

他方、*M. bovis* BCG 予研株で免疫したモルモットの腹腔滲出細胞中の吸着細胞について、本 inhibitor による阻害を非免疫モルモット由来のそれと比較検討したところ、免疫群では遅延型過敏症反応陽性で、腹腔滲出細胞中に占める吸着細胞の割合が高く、 β -glucuronidase はむしろ非免疫群のそれに比して低いことなど、免疫群由来のマクロファージはいわゆる活性化されたものと考えられる⁶⁵)にもかかわらず、 β -glucuronidase inhibitor による阻害には両群間に有意差を認めなかった。このさい、腹腔滲出細胞をプラスチックシャーレに吸着させて得た細胞を enzyme source とした結果、50% ID が 0.35 μ g と、腹腔滲

出細胞そのものを enzyme source とした場合の 0.75 μ g (Table 4) と比較して約 2 倍も阻害活性が強く表現されていた。これらのことから、 β -glucuronidase 以外の他の細胞成分が用いた酵素液中に混在し、それが β -glucuronidase inhibitor 活性に影響を及ぼす一つの要因となったのかも知れない。

感染初期において、宿主体内に侵入した菌は、侵入局所に遊走・集積された食細胞に貪食されて食胞内に取り込まれる。このようにして形成された食胞は引き続いて lysosome と融合して phagolysosome を形成する。また異物貪食に伴って解糖や呼吸の促進など一連の代謝に変化が起き、その結果生じた superoxide anion (O_2^-) をはじめとする活性酸素群も食胞内に放出され、lysosome 内の他の殺菌性物質とともに殺菌的に作用する。殺菌された菌は protease をはじめとする lysosome 内の水解酵素群の作用で消化・分解されて細胞外に排泄される。

しかし、全ての細菌が一様にこのような過程を経て処理されるのではなく、このような一連の宿主食細胞の殺菌機構に抵抗して、食胞内に生残し、あるいはその中で増殖を続けることのできるものもある。これらの菌は一括して細胞内増殖性細菌と呼ばれ、このような機能を持たない他の菌とは区別して考えられている。

すなわち、その機構として、あるものは phagosome と lysosome の融合を阻害し、あるものは lysosome 由来の殺菌作用に抵抗し、またあるものは phagosome を抜け出すことにより、細胞内増殖を続けるものと解されている^{1), 66})。

結核菌は代表的な細胞内増殖性細菌である。Kanai⁶⁷) および Kanai ら⁶⁸)は、動物組織内で増殖した結核菌は、その菌体表面に宿主由来の acid phosphatase およびその他の lysosome 由来の成分を保持していることを示して、菌が食細胞の phagosome 内に取り込まれていたことを示唆した。

Armstrong ら^{4), 6})、および Hart ら^{6), 7}) は両者の相互作用を電顕的に観察して、強毒菌は、phagosome と lysosome との融合を阻害していることを明らかにした。他方、Smith ら⁹)の報告にもあるように、マクロファージでは結核菌を取り込んだ phagosome と lysosome の融合が阻害されているが、同じ標本中に混在する好中球では両者の融合が頻繁にみられているなど、その細胞内増殖性の機構解明にはなお不明な点が残されている。

正常マクロファージ内では増殖可能な結核菌も、活

性化マクロファージ内では増殖が抑制されるといわれている。マクロファージの活性化は、リンホカインによって誘導されることが示されているが、活性化マクロファージにどのような機能亢進が生じて殺菌にまで至るのかについての生化学的な説明はなされていない^{70)~79)}。これまでに活性化マクロファージの lysosome 酵素群の量的な増加をその一つにあげて数多くの研究者による検討がなされてきたが^{16), 80)~91)}、いまだ明確な説明はなされていないのが現状である。食細胞の lysosome 酵素群は、殺菌された菌の消化・分解処理に関与するものと解され、ある種の菌に対する lysozyme 以外には、lysosome 酵素が直接的に殺菌に関与する可能性はうすいと考えられている⁹²⁾。

しかし特異な感染・発病の経過をとる結核菌については、ある種の lysosome 酵素活性を阻害することが、菌の細胞内増殖に有利な条件を賦与する可能性もなお否定できない。ヒトの先天性 β -glucuronidase 欠損症においてはデルマトン硫酸(コンドロイチン硫酸 B)、ヘパラン硫酸などの glycosaminoglycan の蓄積が認められ⁹³⁾、Avila ら⁹⁴⁾はこれら glycosaminoglycan は低 pH で、lysosome 酵素活性を阻害すると報告している。実験的にラットに trypanosomacidal drug である suramin を投与すると、glycosaminoglycan および sphingolipid の蓄積が認められることが知られているが⁶⁴⁾、蓄積される glycosaminoglycan はヘパラン硫酸およびデルマトン硫酸で、これら glycosaminoglycan の体内での分解には iduronate sulfatase, β -glucuronidase および hyaluronidase の3種の酵素が与っているとされている。また、この論文の中で、Constantopoulos ら⁶⁴⁾は *in vitro* における suramin の lysosomal enzyme 阻害作用についても言及し、L-iduronate sulfatase, hyaluronidase および β -glucuronidase の他にも α -L-iduronidase, haparan N-sulfatase, acid phosphatase などを non-competitive に阻害することを明らかにしている。Goren ら⁹⁵⁾は、phagosome と lysosome の融合を阻害する強毒結核菌側の因子は特異な硫酸糖脂質 sulfalipid I であることを指摘している。これらの報告より勘案すると、今回著者がモルモット由来の代表的 lysosome 酵素である β -glucuronidase 活性を non-competitive に強く阻害する因子を結核菌培養液中に見出したことは、結核菌の細胞内増殖機構の一端を解明する一つのアプローチを示唆するものと考えられる。

結 語

Mycobacterium tuberculosis H37Rv 株の培養液より、モルモット由来の β -glucuronidase 活性を阻害する因子 (β -glucuronidase inhibitor) を分離し、その性状について検討した結果、以下に示す所見を得た。

1. β -glucuronidase inhibitor は、*M. tuberculosis* H37Rv 株の培養液の70%飽和硫酸塩析の上清の、20%ブタノール処理により、ブタノール層と70%飽和硫酸を含む水層との境界面に形成される油膜様物中に移行し、DEAE-sepharose によりタンパク質性因子として分画された。

2. モルモット好中球由来の β -glucuronidase 活性に対する β -glucuronidase inhibitor の阻害活性は、培養液のそれと比較して比活性で約53倍の上昇がみられ、50% inhibition dose は約 0.8 μ g であった。

3. β -glucuronidase inhibitor は、Sauton 培地での浮上培養法では、37°C 4週間培養頃から大量に培養液中に認められるようになり、6週目以降10週目頃までほぼ一定のレベルを保った。

4. 本 inhibitor の阻害活性は、100°C 10分間の加熱および pH 2-10 の広い範囲で安定であり、DNase, RNase によって影響を受けないが、トリプシン処理により完全に失活した。除脂質処理(20%ブタノール処理)および除核酸処理(1M $MnCl_2$ 処理)に対してもおおむね安定であった。

5. 阻害機構は、モルモット好中球由来の β -glucuronidase に対しては non-competitive で、その至適 pH は4.5附近にあった。

6. β -glucuronidase inhibitor の阻害活性は、高イオン強度下(0.05M NaCl)で抑制されるが、同様の阻害活性の抑制効果は、他の塩溶液(0.05M)を用いた場合にもみられ、その程度は NaCl, KCl および NH_4Cl では比較的緩徐であったのに対して $MgSO_4$, $MgCl_2$, $CaCl_2$, $(NH_4)_2SO_4$ および Na_2SO_4 では強かった。

7. クロマトフォーキング法によると、本 inhibitor の等電点は pH 2.5 附近と推定された。

8. 本 inhibitor の分子量は、約25,500と推定された。

9. β -glucuronidase inhibitor は、モルモット由来の β -glucuronidase に対してのみ強い活性阻害を示すが、モルモット由来の他の lysosome 酵素(acid

phosphatase, N-Ac-β-glucosaminidase, β-galactosidase, lysozyme および cathepsin D) およびモルモット以外の動物(ニワトリおよびカタツムリ)と大腸菌由来のβ-glucuronidase 活性には全く阻害作用を認めなかった。ただし、ヒト末梢白血球およびウシ肝臓由来の酵素に対しては、部分的阻害パターンを示した。

10. BCG 生菌免疫モルモット由来のβ-glucuronidase に対しても正常動物由来のそれと同様に強い阻害作用を示した。

謝 辞

稿を終るに臨み、終始御懇切な御指導と御校閲を賜りました恩師松尾吉恭教授に深甚なる感謝の念を捧げます。また、田坂博信助教授、加藤雅史助手ならびに広島大学医学部細菌学教室員各位の御助言に厚く御礼申し上げます。リソゾーム酵素活性の測定にあたって便宜をおはかり頂いた本学医学部法医学教室の小嶋亨教授ならびに同教室員各位に深謝いたします。

なお、本論文の要旨は第54回日本細菌学会総会(1981年、福岡市)において発表した。

参 考 文 献

- 1) Densen, P. and Mandell, G. L.: Phagocyte strategy vs. microbial tactics. Rev. Infect. Dis., 2, 817-838, 1980.
- 2) Allgöwer, M. and Bloch, H.: The effect of tubercle bacilli on the migration of phagocytes *in vitro*. Amer. Rev. Tuberc., 59, 562-566, 1949.
- 3) Bloch, H.: Studies on the virulence of tubercle bacilli: Isolation and biological properties of a constituent of virulent organisms. J. Exp. Med., 91, 197-218, 1950.
- 4) Armstrong, J. A. and Hart, P. D' Arcy: Response of cultured macrophages to *Mycobacterium tuberculosis* with observations on fusion of lysosomes with phagosomes. J. Exp. Med., 134, 713-740, 1971.
- 5) Armstrong, J. A. and Hart, P. D' Arcy: Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. Reversal of the usual nonfusion pattern and observations on bacterial survival. J. Exp. Med., 142, 1-16, 1975.
- 6) Hart, P. D' Arcy, Armstrong, J. A., Brown, C. A. and Draper, P.: Ultrastructural study of the behavior of macrophages toward parasitic mycobacteria. Infect. Immun., 5, 803-807, 1972.
- 7) Hart, P. D' Arcy and Armstrong, J. A.: Strain virulence and the lysosomal response in macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*. Infect. Immun., 10, 742-746, 1974.
- 8) Brown, C. A., Draper, P. and Hart, P. D' Arcy: Mycobacteria and lysosome: a paradox. Nature, 221, 658-660, 1969.
- 9) Jackett, P. S., Aber, V. R. and Lowrie, D. B.: Virulence and resistance to superoxide, low pH and hydrogen peroxide among strains of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Gen. Microbiol., 104, 37-45, 1978.
- 10) Jackett, P. S., Aber, V. R. and Lowrie, D. B.: Virulence of *Mycobacterium tuberculosis* and susceptibility to peroxidative killing system. J. Gen. Microbiol., 107, 273-278, 1978.
- 11) Kanefusa, F.: Effect of lysozyme on *Mycobacteria*. Microbiol. Immunol., 24, 1151-1162, 1980.
- 12) 近藤螢子, 金井興美: 結核感染における宿主脂質 I. リン脂質. 結核, 56, 1-9, 1981.
- 13) 近藤螢子, 金井興美: 結核感染における宿主脂質 II. コレステロール. 結核, 56, 41-48, 1981.
- 14) 近藤螢子, 金井興美: 結核感染における宿主脂質 III. 長鎖脂肪酸と結核菌. 結核, 56, 109-115, 1981.
- 15) 金井興美, 近藤螢子: 結核感染における宿主脂質 IV. 補遺とまとめ. 結核, 56, 257-262, 1981.
- 16) Colwell, C. A., Hess, A. R. and Tavaststjerna, M.: Mononuclear cells from animals of divergent susceptibility to tuberculosis. I. Enzyme studies. Amer. Rev. Resp. Dis., 88, 37-46, 1963.
- 17) 田坂博信, 加藤雅史, 清谷克寛, 松尾吉恭: 結核菌由来糖タンパク質のリソゾーム酵素に対する阻害作用. 結核, 54, 261-264, 1979.
- 18) 清谷克寛, 田坂博信, 加藤雅史, 松尾吉恭: Tuberculo-inhibitory factor (TIF) の精製法の再検討. 日細誌, 34, 443, 1979.
- 19) 根本 久, 島山英夫, 柚木弘之, 近藤保夫, 滝島英一: ツベルクリン製造法の検討 II. 培地の再

- 検討. 家畜衛試研究報告, 53, 14-17, 1965.
- 20) Simmons, S. R. and Karnovsky, M. L.: Iodination ability of various leukocytes and their bactericidal activity. *J. Exp. Med.*, 138, 44-63, 1973.
 - 21) Oren, R., Farnham, A. E., Saito, K., Milofsky, E. M. and Karnovsky, M. L.: Metabolic patterns in three types of phagocytizing cells. *J. Cell Biol.*, 17, 487-501, 1963.
 - 22) Stossel, T. P. and Cohn, Z. A.: Phagocytosis, in "Methods in immunology and immunochemistry V", ed. by Williams, C. A. and Chase, M. W., Academic Press, New York-San Francisco-London, 261-301, 1976.
 - 23) Stuart, A. E., Habeshaw, J. A. and Davidson, A. E.: Phagocytes *in vitro*, in "Handbook of experimental immunology", ed. by Weir, D. M., Blackwell Scientific Publications, London, 31.1-31.30 1978.
 - 24) 近森憲助, 藤盛 健, 山田正興: ニワトリ腹腔浸出好異球の簡易調製法. 免疫実験操作法Ⅶ, 日本免疫学会編, 1979-1983, 1978.
 - 25) 馬場 威: ニワトリのマクロファージ採取法. 免疫実験操作法B, 日本免疫学会編, 915-916, 1975.
 - 26) Clausen, J. E.: Migration inhibitory effect of cell-free supernatants from tuberculinstimulated cultures of human mononuclear leukocytes demonstrated by two-step MIF agarose assay. *J. Immunol.*, 110, 546-551, 1973.
 - 27) de Duve, C., Pressman, B. C., Gianetto, R., Wattiaux, R. and Appelmans, F.: Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissue. *Biochem. J.*, 60, 604-617, 1955.
 - 28) Carrol, S. F. and Martinez, R. J.: Purification and properties of rabbit alveolar macrophage lysozyme. *Infect. Immun.*, 24, 460-467, 1979.
 - 29) Nozawa, R., Sekiguchi, R. and Yokota, T.: Stimulation by conditioned medium of L-929 fibroblasts, *E. coli* lipopolysaccharide and muramyl dipeptide of candidacidal activity of mouse macrophages. *Cell. Immunol.*, 53, 116-124, 1980.
 - 30) Mead, J. R., Smith, J. N. and Williams, R. T.: Studies in detoxication. 67. The biosynthesis of the glucuronides of umbelliferone and 4-methylumbelliferone and their use in fluorimetric determination of β -glucuronidase. *Biochem. J.*, 61, 569-574, 1955.
 - 31) 高野達哉: リソゾーム膜の分画と微量酵素測定法. 蛋白質核酸酵素, 別冊, 生体膜実験法上, 220-229, 1974.
 - 32) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275, 1951.
 - 33) Barrett, A. J. and Heath, M. F.: Lysosomal enzymes, in "Lysosomes-a laboratory handbook", ed. by Dingle, J. T., North-Holland Publishing Company, Amsterdam-New York-Oxford, 19-145, 1977.
 - 34) Treffers, H. P.: The linear representation of dosage-response curves in microbialantibiotic assays. *J. Bact.*, 72, 108-114, 1956.
 - 35) Aoyagi, T. and Mizuno, D.: A rapid antibacterial test for *Mycobacteria* using a reverse T type of tube in rocked culture. *J. Gen. Microbiol.*, 20, 180-183, 1959.
 - 36) Aoyagi, T., Miyata, S., Nanbo, M., Kojima, F., Matsuzaki, M., Ishizuka, M., Takeuchi, T. and Umezawa, H.: Biological activities of leupeptins. *J. Antibiotics*, 22, 558-568, 1969.
 - 37) Kobayashi, Y., Okahata, S., Tanabe, K. and Usui, T.: Use of logit paper in determination of superoxide dismutase activity in human blood cells. *J. Immunol. Meth.*, 24, 75-78, 1978.
 - 38) Morton, R. K.: Separation and purification of enzymes associated with insoluble particles. *Nature*, 166, 1092-1095, 1950.
 - 39) 萩原秀昭, 宮崎 香, 松尾雄志, 山下仁平, 堀尾武一: クロマチンに結合している2種のプロテアーゼの性質と役割. 蛋白質核酸酵素, 25, 434-446, 1980.
 - 40) Sluyterman, L. A. AE. and Elgersma, O.: Chromatofocusing: isoelectric focusing on ion exchange columns. I. General principles. *J. chromatogr.* 150, 17-30, 1978.
 - 41) 梅沢浜夫: 微生物がつくる特異酵素阻害物質. 蛋白質核酸酵素, 16, 20-31, 1971.

- 42) 青柳高明：微生物がつくるペプチド性蛋白分解酵素阻害物質。蛋白質核酸酵素，別冊，微生物のつくる生理活性ペプチド，241-256，1976。
- 43) 青柳高明：酵素阻害物質。共立全書224，共立出版，東京，1978。
- 44) Aoyagi, T., Takeuchi, T., Matsuzaki, A., Kawamura, K., Kondo, S., Hamada, M. and Umezawa, H.: Leupeptins, new protease inhibitors from actinomycetes. *J. Antibiotics*, 22, 283-286, 1969.
- 45) Kondo, S., Kawamura, K., Iwanaga, J., Hamada, M., Aoyagi, T., Maeda, K., Takeuchi, T. and Umezawa, H.: Isolation and characterization of leupeptins produced by actinomycetes. *Chem. Pharm. Bull.*, 17, 1896-1901, 1969.
- 46) Kawamura, K., Kondo, S., Maeda, K. and Umezawa, H.: Structures and synthesis of leupeptins Pr-LL and Ac-LL. *Chem. Pharm. Bull.*, 17, 1902-1909, 1969.
- 47) Suda, H., Aoyagi, T., Hamada, M., Takeuchi, T. and Umezawa, H.: Antipain, a new protease inhibitor isolated from actinomycetes. *J. Antibiotics*, 25, 263-266, 1972.
- 48) Umezawa, S., Tatsuta, K., Fujimoto, K., Tsuchiya, T., Umezawa, H. and Naganawa, H.: Structure of antipain, a new Sakaguchi-positive product of streptomycetes. *J. Antibiotics*, 25, 267-270, 1972.
- 49) Umezawa, H., Aoyagi, T., Morishita, H., Kunitomo, S., Matsuzaki, M., Hamada, M. and Takeuchi, T.: Chymostatin, a new chymotrypsin inhibitor produced by actinomycetes. *J. Antibiotics*, 23, 425-427, 1970.
- 50) Tatsuta, K., Mikami, N., Fujimoto, K., Umezawa, S., Umezawa, H. and Aoyagi, T.: The structure of chymostatin, a chymotrypsin inhibitor. *J. Antibiotics*, 26, 625-646, 1973.
- 51) Umezawa, H., Aoyagi, T., Morishita, H., Matsuzaki, M., Hamada, M. and Takeuchi, T.: Pepstatin, a new pepsin inhibitor produced by actinomycetes. *J. Antibiotics*, 23, 259-262, 1970.
- 52) Morishita, H., Takita, T., Aoyagi, T., Takeuchi, T. and Umezawa, H.: The structure of pepstatin. *J. Antibiotics*, 23, 263-265, 1970.
- 53) Aoyagi, T., Yagisawa, Y., Kumagai, M., Hamada, M., Morishima, H., Takeuchi, T. and Umezawa, H.: New pepstatins, pepstatins BU, PR and AC produced by streptomycetes. *J. Antibiotics*, 26, 539-541, 1973.
- 54) Aoyagi, T., Hazato, T., Kumagai, M., Hamana, M., Takeuchi, T. and Umezawa, H.: Isoflavone phamunosides, inhibitors of β -galactosidase produced by actinomycetes. *J. Antibiotics*, 28, 1006-1008, 1975.
- 55) Hazato, T., Naganawa, H., Kumagai, M., Aoyagi, T. and Umezawa, H.: β -galactosidase-inhibiting new isoflavonoids produced by actinomycetes. *J. Antibiotics*, 32, 217-222, 1979.
- 56) Schiessler, H., Ohlsson, K., Ohlsson, I., Arnhold, M., Brik, Y. and Fritz, H.: Elastases from human and canine granulocytes. II. Interaction with protease inhibitors of animal, plant and microbial origin. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 358, 53-58, 1977.
- 57) Ohmura, S., Ohno, H., Saeki, T., Yoshida, M. and Nakagawa, A.: Elastin, a new human granulocyte elastase inhibitor produced by a strain of streptomycetes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 83, 704-709, 1978.
- 58) Wang, C. C. and Touster, O.: Studies of catalysis by β -glucuronidase. *J. Biol. Chem.*, 247, 2644-2649, 1972.
- 59) Dean, R. T.: Rabbit β -glucuronidase, purification and properties and the existence of multiple forms. *Biochem. J.*, 138, 395-405, 1974.
- 60) Cashman, D. C., Laryea, J. U. and Weissmann, B.: The hyaluronidase of rat skin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 135, 387-395, 1969.
- 61) Sprick, M. G.: Phagocytosis of *M. tuberculosis* and *M. smegmatis* stained with indicator dyes. *Amer. Rev. Tuberc.*, 74, 552-565, 1956.
- 62) Ohkuma, S. and Poole, B.: Fluorescence probe measurement of the intra lysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 75, 3327-3331, 1978.
- 63) Prabhakaran, K., Harris, E. B. and Kirchheimer, W. F.: Absence of β -glucuronidase in *My-*

- cobacterium leprae* and elevation of the enzyme in infected tissues. *Lepr. Rev.*, 49, 203-213, 1978.
- 64) Constantopoulos, G., Reees, S., Cragg, B. G., Barranger, J. A. and Brady, R. O.: Experimental animal model for mucopolysaccharidosis: Suramin-induced glycosaminoglycan and sphingolipid accumulation in the rat. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 3700-3704, 1980.
- 65) David, J. R. and Remold, H. G.: Macrophage activation by lymphocyte mediators and studies on the interaction of macrophage inhibitory factor (MIF) with its target cell. in "Immunobiology of the macrophage", ed. by Nelson, D. S., Academic Press, New York-San Francisco-London, 401-426, 1976.
- 66) 戸田井田一郎: 感染とライソソーム. *感染症* 9, 184-188, 1979.
- 67) Kanai, K.: Detection of host-originated acid phosphatase on the surface of "in vivo grown tubercle bacilli". *Jap. J. Med. Sci. Biol.*, 20, 73-90, 1967.
- 68) Kanai, K. and Kondo, E.: Separation and properties of "in vivo grown tubercle bacilli" associated with the lysosomal membrane. *Jap. J. Med. Sci. Biol.*, 23, 303-314, 1970.
- 69) Smith, C. C., Barr, R. M. and Alexander, J.: Studies on the interaction of *Mycobacterium microti* and *Mycobacterium lepraemurium* with mouse polymorphonuclear leukocytes. *J. Gen. Microbiol.*, 112, 185-189, 1979.
- 70) Mackaness, G. B. and Hill, W. C.: The influence of immunologically committed lymphoid cells on macrophage activity in vivo. *J. Exp. Med.*, 129, 973-992, 1969.
- 71) Patterson, R. J. and Youmans, G. P.: Demonstration in tissue culture of lymphocytemediated immunity to tuberculosis. *Infect. Immun.*, 1, 600-603, 1970.
- 72) Wagner, W. H.: Host-parasite interactions with peritoneal macrophages of mice and rats in vivo and in vitro. *Infect. Immun.*, 12, 1295-1306, 1975.
- 73) Cahall, D. L. and Youmans, G. P.: Conditions for production and some characteristics of mycobacterial growth inhibitory factor produced by spleen cells from mice immunized with viable cells of the attenuated H37Ra strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.*, 12, 833-840, 1975.
- 74) Cahall, D. L. and Youmans, G. P.: Molecular weight and other characteristics of mycobacterial growth inhibitory factor produced by spleen cells obtained from mice immunized with viable attenuated mycobacterial cells. *Infect. Immun.*, 12, 841-850, 1975.
- 75) Cahall, D. L. and Youmans, G. P.: Macrophage migration inhibitory activity of mycobacterial growth inhibitory factor and the effect of a number of factors on mycobacterial growth inhibitory factor activity. *Infect. Immun.*, 12, 851-857, 1975.
- 76) Muraoka, S., Takeya, K. and Nomoto, K.: In vitro studies on the mechanism of acquired resistance to tuberculosis infection. I. The relationship between lymphocytes and macrophages in cellular immunity to tuberculosis infection. *Japan. J. Microbiol.*, 20, 115-122, 1976.
- 77) Muraoka, S., Takeya, K. and Nomoto, K.: In vitro studies on the mechanism of acquired resistance to tuberculosis infection. II. The effects of the culture supernatants of specifically stimulated sensitized lymphocytes on the growth of tubercle bacilli within macrophage. *Japan. J. Microbiol.*, 20, 365-373, 1976.
- 78) Klun, C. L. and Youmans, G. P.: The induction by *Listeria monocytogenes* and plant mitogens of lymphocyte supernatant fluids which inhibit the growth of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages in vitro. *J. Reticuloendothel. Soc.*, 13, 275-285, 1973.
- 79) Klun, C. L. and Youmans, G. P.: The effect of lymphocyte supernatant fluids on the intracellular growth of virulent tubercle bacilli. *J. Reticuloendothel. Soc.*, 13, 263-274, 1973.
- 80) Godol, T., Rese, R. J. W. and Lamvik, J. O.: Lymphocyte-mediated modification of blood-derived macrophage function in vitro: Inhibition

- of growth of intracellular mycobacteria with lymphokines. Clin. Exp. Immunol., 8, 625-637, 1971.
- 81) Turcotte, R., Ormeaux, Y. D. and Borduas, A. G.: Partial characterization of a factor extracted from sensitized lymphocytes that inhibits the growth of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages *in vitro*. Infect. Immun., 14, 337-344, 1976.
- 82) 金井興美：結核感染におけるマクロファージ。2つの生化学的観察。最新医学, 30, 41-50, 1975.
- 83) McGee, M. P. and Myrvik, Q. N.: Hydrolase levels in necrotizing and nonnecrotizing BCG-induced pulmonary granulomas. J. Reticuloendothel. Soc., 20, 187-195, 1976.
- 84) Dannenberg, A. M., Jr., Meyer, O. T., Esterly, J. R. and Kanbara, T.: The local nature of immunity in tuberculosis, illustrated histochemically in dermal BCG lesions. J. Immunol., 100, 931-941, 1968.
- 85) Allison, M. J., Zappasodi, P. and Lurie, M. B.: Metabolic studies on mononuclear cells from rabbits of varying genetic resistance to tuberculosis. II. Studies on cells from BCG-vaccinated animals. Amer. Rev. Resp. Dis., 85, 364-372, 1962.
- 86) Dannenberg, A. M., Jr. and Bennet, W. E.: Hydrolases of mononuclear exudate cells and tuberculosis. I. Exudate characteristics, esterases, proteinases and lipase. Arch. Path., 76, 581-591, 1963.
- 87) Carson, M. E. and Dannenberg, A. M., Jr.: Hydrolytic enzymes of rabbit mononuclear exudate cells. II. Lysozyme: properties and quantitative assay in tuberculous and control inbred rabbits. J. Immunol., 94, 99-104, 1965.
- 88) Saito, K. and Suter, E.: Lysosomal acid hydrolases in mice infected with BCG. J. Exp. Med., 121, 727-738, 1965.
- 89) Mizunoe, K. and Dannenberg, A. M., Jr.: Hydrolases of rabbit macrophages. III. Effect of BCG vaccination, tissue culture and ingested tubercle bacilli. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 120, 284-290, 1965.
- 90) Kondo, E. and Kanai, K.: Phospholipid distribution pattern in uninduced (resident) and casein-induced mouse peritoneal cells. Japan. J. Med. Sci. Biol., 30, 269-273, 1977.
- 91) Katoh, M.: Studies of lysosomal enzymes in macrophages. III. Lysosomal enzyme activities in cultured macrophages infected with some species of mycobacteria. Hiroshima J. Med. Sci., 30, 99-107, 1981.
- 92) Elsbach, P.: Degradation of microorganisms by phagocytic cells. Rev. Infect. Dis., 2, 106-128, 1980.
- 93) Sly, W. S., Quinton, B. A., McAlister, W. H. and Rimon, D. L.: Beta glucuronidase deficiency: Report of clinical, radiologic and biological features of a new mucopolysaccharidosis. J. Pediat., 82, 249-258, 1973.
- 94) Avlia, J. L. and Convit, J.: Physicochemical characteristics of the glycosaminoglycan-lysosomal enzyme interaction *in vitro*. Biochem. J., 160, 129-136, 1976.
- 95) Goren, M. B., Hart, P. D'Arcy, Young, M. R. and Armstrong, J. A.: Prevention of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages by sulfatides of *Mycobacterium tuberculosis*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 73, 2510-2514, 1976.

Isolation and Characterization of β -Glucuronidase Inhibitor from Culture Filtrate of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

Katsuhiko KIYOTANI

Department of Bacteriology, Hiroshima University School of Medicine
(Director: Prof. Yoshiyasu MATSUO)

An inhibitory factor against β -glucuronidase activity was detected in and partially purified as a proteinaceous substance from unheated culture filtrate of *M. tuberculosis* H37Rv.

The active principle was mostly recovered in the boundary layer between the butanol and aqueous phases after treating the supernatant culture fluid with 70% saturation of ammonium sulfate and 20% (v/v) n-butanol. The β -glucuronidase inhibitor was partially purified by ionexchange chromatography on DEAE-sepharose CL-6B column with approximately a 53-fold increase in the specific activity. The molecular weight was estimated to be about 2.55×10^4 by gel filtration on Sephadex G-75, and the isoelectric point about pH 2.5 by chromatofocusing with Polybuffer exchanger (PBE 94). The inhibitor was stable over a relatively wide range of pH (2-10), and resistant to heating at 100°C for 10 min in boiling water, to treatment with nucleases, butanol and manganese chloride, whereas it was sensitive to trypsin.

The inhibitor reduced its activity under the effect of salt solution (0.05 M) such as sodium chloride, potassium chloride, ammonium chloride, calcium chloride, magnesium sulfate, magnesium chloride, ammonium sulfate and sodium sulfate, especially the latter five.

The β -glucuronidase inhibitor acted noncompetitively against β -glucuronidase of PMNs from guinea pigs, with an optimal pH at 4.5. No inhibitory activity was observed on other lysosomal enzymes (acid phosphatase, N-Ac- β -glucosaminidase, β -galactosidase, lysozyme and cathepsin D) from guinea pigs, β -glucuronidase from *Escherichia coli*, domestic fowls and *Helix pomatia*, whereas partial inhibition was observed on β -glucuronidase from human peripheral blood leukocytes and beef liver.

The inhibitor reduced the β -glucuronidase activity from guinea pigs immunized with *M. bovis* BCG in the same degree as that from non-immunized ones.