胸腺中血清 Ca 低下性成分の研究 (第 1 報) 塩化カルシウム沈でん法による
家兎血清カルシウム低下作用物質の牛胸腺からの分離¹⁾

水谷 彰, 斎藤泰子, 佐藤(旧姓中島)春実, 斎藤正喜
名古屋市立大学薬学部²⁾

The Search for a Hypocalcemic Factor in the Thymus Gland. I. Separation
of Fractions producing Hypocalcemia in Rabbits from Bovine
Thymus Gland by Precipitation with Calcium Chloride

AKIRA MIZUTANI, YASUKO SAITO, HARUMI SATO (née Nakasima)
and MASAKI SAITO

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University²⁾

(Received August 18, 1969)

In order to find if a hypocalcemic factor is present in the thymus gland, ground bovine thymus glands components were extracted with water or a physiological saline solution at pH 8.0.

Several active fractions were obtained from the extracts by precipitation with CaCl_2 , and by addition of acetone to the mother liquid of CaCl_2 -precipitate, or by adjusting the pH of the liquid to the isoelectric point. It is concluded that the active principles may be substances of a non-nucleoprotein nature.

胸腺と骨成長との関係についての報告は多数ある。Fischl, Hardt u. Nordmann, Pappenheimer, Renton u. Robertson, Parc u. Mc. Clure³⁾ らは胸腺剔出によりなんらの影響を認めずと報告しているが Basch, Klose u. Vogt⁴⁾ らは胸腺剔出により骨発育障害を認めている。清成⁵⁾ はこの際骨中 Ca 含有量の減少することを立証した。

Ascher, Zenklusen⁶⁾ は仔牛胸腺抽出物 (Thymocresin) がラットの成長促進 (骨格, 生殖腺) 作用を有するポリペプチド性物質であるとしている。また Nitschke⁷⁾ は仔牛胸腺の酢酸抽出物を家兎に投与して, その血清中の Ca 量が 50% ほど低下したと報告している。Scholtz, Nitzescu⁸⁾ らは実験的に生じさせたラットの上皮小体ホルモン過剰症による血液中 Ca レベル上昇を仔牛胸腺抽出物投与により抑制でき線維性骨炎の回復をきたしたとしている。また緒方らは牛胸腺抽出物が家兎血清 Ca 量を低下させたことを報告⁹⁾ し, その後伊藤, 水谷らはこの抽出物から他の臓器製品にくらべ, リン含量が多いたん白性フラクションを得た。¹⁰⁾ このものは核たん白質ではないかとも考えられる。

今回われわれは胸腺抽出物の有効物質が核たん白質に属するか, または普通のたん白質に属するかを知るため

1) 日本薬学会第89年会で本論文の主旨を発表, 名古屋, 1969 年 4 月。

2) Location: Tanabe-dori, Mizuho-ku, Nagoya.

3) Fischl, *Deutsch. Med. Wschr.*, **1905**, 248; Hardt u. Nordmann, *Klin. Wschr.*, **47**, 814 (1910); Pappenheimer, *J. exp. Med.*, **19**, 319 (1914); Renton u. Vogt, *J. Path. a. Bact.*, **1917**, 21; Parc u. Mc. Clure, *Am. J. Dis. Childr.*, **18**, 317 (1919).

4) Basch, *Jb. Kinderheilk.*, **1906**, 64; **1908**, 68; Klose u. Vogt, *Beit. Klin. Chir.*, **1910**, 74.

5) 清成要平, 日本内分泌, **3**, 1161 (1927).

6) Ascher, Zenklusen, *Biochem. Z.*, **252**, 309 (1932).

7) Nitschke, *Klin. Wschr.*, **1928**, 2080; **1929**, 794; *idem*, *Z. exp. Med.*, **65**, 637 (1929).

8) Scholtz, *Zblatt. exp. Med.*, **85**, 547 (1932); *idem*, *Biochem. Z.*, **259**, 384 (1933); Nitzescu et. Benetato, *Compt. rend. Soc. Biol.*, **111**, 339 (1932).

9) 緒方 章, 伊藤四十二, 薬誌, **64**, 332 (1944).

10) 伊藤四十二, 水谷 彰, 薬誌, **72**, 1468 (1952).

に, Carter, Hall¹¹⁾らの核たん白分離法に若干の検討を加えることにより非核たん白性の活性画分を分離したので報告する。

実験の部

実験材料 成熟去勢雄牛の胸腺を屠殺後 2 時間以内に実験に供した。

実験方法 I. 抽出および分画操作——a) 実験 1, 2 および 3 ではミンチした胸腺に 2 倍量の水を加え, 1N HCl で pH 8.0 に保ちながら氷冷下 2 時間攪拌したのち篩過した。抽出液に CaCl_2 溶液を終濃度 0.1—0.6% になるよう滴加して放置, 沈殿を遠心分離して集め水道水, ついで蒸留水に対して透析し, 透析膜内液にアセトンを 50% 濃度に加え, 沈殿を遠心分離後アセトン乾燥粉末とするか, またはさらに CaCl_2 による沈殿, ついで透析の操作をくり返してアセトン乾燥粉末を得た。

一方 CaCl_2 溶液にとけたものはそのまま, または 1N HCl で等電点 (pH 5 付近) に調整してアセトンを加えて沈殿させ, アセトン乾燥粉末とした。

b) 実験 4 および 5 では抽出溶媒を水に代えて生理食塩水を用いた。実験 4 ではシアンソーダ, クエン酸ソーダを最終濃度 0.001M になるように加えたが, 実験 5 ではクエン酸ソーダを加えないで他は同じにして抽出した。

c) a), b) で得られたアセトン乾燥粉末をさらに生理食塩水で抽出し, 抽出液を蒸留水に対し透析し, 透析膜内液をそのまま凍結乾燥するか, またはアセトンを加えて沈殿させ, アセトン乾燥粉末とした。

II. 効力検定——健康な成熟雄家兎 (体重 2.5 kg 前後) 6 匹を 1 群とし, 試験前日より絶食させて用いた。I により得た各画分を用量約 1 mg/0.5 ml/kg (例外; YS-A は 2.46 mg/kg, Table I 参照; 3-C は 2 mg/kg, Table

Chart 1. Extraction of Each Fraction from Bovine Thymus Gland
(Experiment 1 and 3)

11) Carter, R.O., Hall, J.L., *J. Am. Chem. Soc.*, **62**, 1194 (1940).

12) Clark-Collip, *J. Biol. Chem.*, **63**, 461 (1925); Kramer-Tisdall, *ibid.*, **47**, 475 (1920); **48**, 223 (1921).

II 参照) 耳静脈内に注射し, 注射前および注射後 4, 5, 6 時間に採血し血清中 Ca 量を測定し, 注射前に対する低下率を求め, 3 回のうちの最大低下率を示した値の 6 匹平均値を, 対照の生理食塩水注射 (0.5 ml/kg) 群の最大低下率の平均値との差の有意性を検討し, 5% 以下の危険率で有意性が認められるものを有効とした。

なお Ca の定量は Clark-Collip 法 (Kramer-Tisdall¹²⁾ 法の変法) により行なった。また一部の画分について家兎血液中の白血球数の変動を注射前 2, 4, 6 時間後にしらべた。白血球の測定は白血球を Türk 氏液で染色し, Bürker-Türk 計算盤を用いて計数した。

結果および考察

実験 1

Chart 1 における CaCl_2 濃度 0.1% による沈殿につぐ透析操作を 2 回繰返して行なった場合, 透析膜内液中の沈殿のアセトン乾燥粉末と, その場合の上澄み液にアセトンを 50% の割に加えて得られた沈殿のアセトン乾燥粉末とを合した画分を YS-A (収率: 1%) とした。

CaCl_2 0.1% で析出した沈殿を除いた母液は 1N HCl で pH 5.2 に調整し, アセトンを 50% 濃度に加え, 析出した沈殿のアセトン乾燥粉末は画分 YS-B (収率: 1.9%) とした。

画分 YS-A, YS-B をそれぞれ生理食塩水で再抽出し, 抽出液を蒸留水に対して透析後, 凍結乾燥し画分 YS-A・P (原腺体に対する収率: 0.4%) および YS-B・P (前同: 0.7%) とした。これらの画分の収量と収率を Table I に示した。

また Table I の右側半分には効力試験の結果が示してある。Table I からわかるように CaCl_2 濃度 0.1% で析出した沈殿およびその生理食塩水抽出画分に効力が認められ, 母液から得られた画分には効力がないかまた

TABLE I. Yield of Each Fraction extracted with Dist. Water from Bovine Thymus Gland, and Hypocalcemic Activity in Rabbits

Material g	Fraction	Yield		Dose		% decrease Mean $\pm$ S.E. ^{c)}
		g	% ^{a)}	mg/kg	Soluble portion mg ^{b)}	
600 ^{d)}	YS-A	6.2	1.0	2.5	1.39	11.5 $\pm$ 0.5 ^{**e)}
	YS-B	11.35	1.9	5.0	2.46	3.2 $\pm$ 1.7
5 ^{f)}	YS-A・P	2.0	40.0(0.4)	1.0	0.85	11.3 $\pm$ 0.5 ^{**e)}
5 ^{f)}	YS-B・P	2.0	40.0(0.76)	1.0	0.94	7.9 $\pm$ 2.0
1000 ^{d)}	T-1-A	6.9	0.7			
	T-1-B	12.7	1.27			
	T-1-C	2.2	0.2			
	T-1-D	9.6	0.96			
	T-1-E	13.5	1.35			
	T-1-F	9.3	0.93			
	T-1-G	4.3	0.43			
5 ^{f)}	T-1-B・R	3.5	70.0(0.9)	1.0	0.60	8.9 $\pm$ 1.5
2.2 ^{f)}	T-1-C・R	0.15	6.8(0.02)	1.0	0.75	8.9 $\pm$ 1.5
5 ^{f)}	T-1-D・R	0.75	15.0(0.14)	1.0	0.83	6.2 $\pm$ 1.2
5 ^{f)}	T-1-E・R	1.6	32.0(0.43)	1.0	0.82	10.1 $\pm$ 1.4 ^{*g)}
430 ^{d)}	T-2-A	18.9	4.4			
	T-2-B	9.3	2.2			
	T-2-C	2.0	0.5			
10 ^{f)}	T-2-A・R	2.2	22.0(0.97)	1.0	0.79	13.2 $\pm$ 0.9 ^{**e)}
5 ^{f)}	T-2-B・R	3.9	78.0(1.72)	1.0	0.68	5.6 $\pm$ 1.0
	Control (0.9% NaCl solution)			0.5 ml/kg		6.5 $\pm$ 0.7

a) Values in parentheses show percentage yield to starting materials.

b) Saline soluble portion of the dose expressed in milligrams of each sample per 0.5 ml solution.

c) standard error

d) starting materials

e) **significant level, probability <0.01

f) acetone dry powder (crude)

g) *significant level, probability <0.05

Fig. 1. Effect of Each Sample Injection on the Number of Circulating Leucocytes in Rabbits

—○—: YS-A·P; —●—: YS-B·P; —○—: control,

アセトン粉末とし、そのうち画分 (1), (2), (3) を合して T-1-A および (4), (5) を合して T-1-B とした。アセトン粉末 T-1-B, T-1-C, T-1-D および T-1-E の生理食塩水抽出物のアセトン粉末はそれぞれ T-1-B·R, T-1-C·R, T-1-D·R および T-1-E·R とした。

これらの画分の収量関係を Table I に示した。Table I の効力試験の結果からわかるように、等電点で析出した T-1-B·R, CaCl₂ により析出した沈殿 T-1-C·R および T-1-D·R はいずれも用量 1 mg/kg で効力が弱いかまたはなかったが、T-1-E·R のみは同用量で低下率 10.1% となって有効であった。

画分 T-1-C·R は CaCl₂ 濃度が 0.5—0.6% で析出した沈殿で、実験 1 の画分 YS-A·P の CaCl₂ 濃度 0.1% にくらべて、濃度がかかなり高いためかえって沈殿が不完全になってしまったのではないと思われる。

画分 T-1-D·R は T-1-E を得る操作途中、透析を行なった場合の沈殿物で Ca 活性はなかった。

実験 3

実験 1 に準じて分別を行なった。腺体の水抽出液を CaCl₂ 濃度 0.1% (pH 7.0) とし、析出した沈殿を水道水、ついで蒸留水に対して透析し、透析膜内液を CaCl₂ 濃度 0.1% とし、沈殿を同様に透析し、透析中に析出した沈殿は捨て、透析膜内液はアセトン濃度 50% として析出する画分を T-2-A (YS-A に相当) とした。第 1 回目の CaCl₂ 0.1% 沈殿母液は 1N HCl で pH 5.2 に調整し、アセトンを 50% 濃度に加え析出した沈殿をアセトン乾燥粉末 T-2-C とした。第 2 回目の CaCl₂ 沈殿母液は pH 5.0 に調整し、沈殿をアセトン乾燥粉末 T-2-B とした。T-2-A および T-2-B を生理食塩水で抽出して得られた各画分のうち T-2-A·R, では 13.2% とかなり強い Ca 活性を認めたが、T-2-B·R は無効であった。

実験 4

腺体を水で抽出する場合、篩過しにくいので Chart 3 に示すように生理食塩水で抽出する方法に変えたが、Table II に示すように効力は CaCl₂ 0.1% 沈殿を水道水、ついで蒸留水に対して透析して得た画分 3-A は用量 1 mg/kg で有効であったが、抽出残渣の CaCl₂ 0.1% 沈殿画分 3-B では同用量で効力がなかった。CaCl₂ 0.1% 沈殿母液と再抽出液の CaCl₂ 0.1% 沈殿母液を合して等電点にして落ちた沈殿 3-C は 2 mg/kg の用量で有効であった。

実験 5

クエン酸ソーダは添加しないで、その他は実験 4 に準じて抽出分画を行なった場合で、生理食塩水抽出液から CaCl₂ 0.5% で析出した沈殿を同様に透析し、ついでアセトン濃度 50% で析出させて得た画分を 6-A (3-A に

は弱いことがわかった。

別に画分 YS-A·P ならびに YS-B·P の家兎血液中の白血球数におよぼす影響は、Fig. 1 からわかるように Ca 活性の認められた画分 YS-A·P では対照に対し 2 時間後に低下し、6 時間後に上昇した。これに対し Ca 活性のなかった画分 YS-B·P では 2, 4 時間ともに上昇、6 時間後にもとにもどり、これら 2 つの画分の白血球に対する作用の様相が明らかに異なることがわかった。

実験 2

Chart 2 に示したごとく CaCl₂ の濃度をいろいろ変えて、もっとも沈殿しやすくかつ活性の高い画分を得る条件を検討した。最初の水抽出液から CaCl₂ 濃度 0.5—0.6% で沈殿した画分のアセトン粉末を T-1-C, 残渣の水抽出液から CaCl₂ 0.3—0.1% 沈殿母液を CaCl₂ 0.2% にして析出した沈殿を T-1-F とした。水抽出残渣を 30% アセトンで抽出を行なった抽出液の CaCl₂ 0.1% (2 回繰返した) の沈殿する画分を T-1-G とした。

CaCl₂ 沈殿母液 (1), (2), (3), (4) および (5) はそれぞれ 1N HCl で等電点 (pH 4.8—5.2) に調整し、沈殿を

Chart 2. Extraction of Each Fraction from Bovine Thymus Gland (Experiment 2)

Chart 3. Extraction of Each Fraction from Bovine Thymus Gland
(Experiment 4 and 5)

TABLE II. Yield of Each Fraction extracted with 0.9% NaCl Solution from Bovine Thymus Gland, and Hypocalcemic Activity in Rabbits

Material g	Fraction	Yield		Dose		% decrease Mean $\pm$ S.E. ^{c)}
		g	% ^{a)}	mg/kg	Soluble portion mg ^{b)}	
600 ^{d)}	3-A	15.2	2.5	10.0	1.0	10.6 $\pm$ 0.6 ^{***e)}
	3-B	0.8	0.1	10.0	1.0	7.4 $\pm$ 1.4
	3-C	5.0	0.8	10.0	2.0	13.5 $\pm$ 1.1 ^{***e)}
500 ^{d)}	6-A	9.7	1.8	10.0	1.0	11.4 $\pm$ 2.2
	6-B	7.0	1.2	10.0	1.0	15.5 $\pm$ 1.5 ^{***e)}
	6-C	5.2	0.9	7.5	1.0	6.1 $\pm$ 0.6
2 ^{f)}	6-A · R	0.138	6.9 (0.12)	1.0	1.0	8.0 $\pm$ 1.1
2 ^{f)}	6-B · R	0.94	47.0 (0.56)	1.0	1.0	15.1 $\pm$ 1.1 ^{***e)}
Control (0.9% NaCl solution)				0.5 ml/kg		6.5 $\pm$ 0.7

a) Values in parentheses show percentage yield to starting materials.

b) Saline soluble portion of the dose expressed in milligrams of each sample per 0.5 ml solution.

c) standard error

d) starting materials

e) ***significant level, probability < 0.01

f) acetone dry powder (crude)

Fig. 2. Leucocyte Activity of 6-B·R (Dose; 0.5 mg/kg Body Weight injected intravenously) in Rabbits

—○—: 6-B·R; ---○---: control

相当), その際の母液を pH 5.2 に調整して得た沈殿を透析後アセトン濃度 50% で析出させて得た画分を 6-B (3-B に相当), pH 5.2 沈殿を透析し, 透析膜内液をアセトン濃度 50% とし, 沈殿をアセトン乾燥して画分 6-C (3-C に相当) とした. 画分 6-A および 6-B を生理食塩水で再抽出して得た画分をそれぞれ 6-A · R および 6-B · R とした.

効力については Table II に示すように画分 6-A の場合, 実際の用量 1 mg/kg で Ca 低下率 11.4% とかなり高いが, 有意にはならなかった. CaCl₂ 0.5% 沈殿母液から得た画分 6-B ないし 6-B · R に強い活性が認められた.

画分 6-B · R の家兎血液中の白血球に対する効果は Fig. 2 に示すように Fig. 1 の YS-A · P と同じ傾向を示した.

以上の実験から CaCl₂ で沈殿させる場合, 0.1% 濃度ではおもに沈殿部分に活性が集まり, 0.5—0.6% 濃度ではむしろ母液に残ることがわかった. クエン酸ソーダは添加しなくても効力に影響がないことがわかった.

胸腺を抽出する場合, 多くは仔牛の胸腺を原料とするが, これは入手が容易でないため, われわれは去勢した成熟雄牛の胸腺が必ずしも退縮変性していないことおよび入手も比較的容易であるのでこれを用いることにした.

したがって一般に行なわれる仔牛胸腺を原料とした場合の製品との異同については問題があるかも知れない. 抽出溶媒として微アルカリ性の水を用いると核たん白が抽出されるため, 抽出物は膨潤して粘稠となり抽出操作が困難であったので, 生理食塩水で抽出する方法に変えたところ操作は容易になったが, 核たん白は 0.9% NaCl 溶液には溶けにくいはずであり, また母液からはほとんどの場合, 等電点 (pH 5 付近) の沈殿を集めたこと, さ

らには生理食塩水で再抽出して透析を行っており、最終的には注射液調製に溶媒として生理食塩水 (pH 8.0) を用いて不溶物を除去しているので、動物に投与されたものはおそらくその主要成分は核たん白とか、小さなペプチドではなく普通たん白質と考えられる。

CaCl_2 で沈殿した画分 (例: YS-A) にも活性が認められたが、上に述べたように核たん白は生理食塩水に溶けにくいのでむしろ CaCl_2 沈殿に吸着あるいは共沈の形で混合してきた非核たん白性の物質に活性があったと解せられる。

クエン酸ソーダの添加については酵素活性を押える目的であったが、添加の有無にかかわらず Ca 活性のある製品が得られたことから活性物質には関与しないと思われる。

伊藤、水谷らが行なった諸臓器水抽出物中、牛胸腺抽出物の pH 5.2 沈殿物が家兎血清 Ca をかなり低下 (皮下注射; 用量 5 mg/kg で 10.25%, 7.5 mg/kg で 12.02%) させ、一方製品の分析値の中で他の諸臓器 (牛の心臓, 脾臓, 血清) 製品にくらべてリン含量が圧倒的に多いと報告しているが、その報告では胸腺を水 (pH 8.0) で抽出しているため製品中にはおそらく核たん白性のものが混じっていたことが考えられる。

白血球増多作用については Ca 活性を有する製品は 2 時間後に減少, 6 時間後に上昇することがわかり、パロチンと似た傾向が認められたが、データが少ないのでさらに検討を要する。

結 語

成熟去勢雄牛胸腺より家兎血清中 Ca 低下性物質を得る際、抽出溶媒として水、生理食塩水のどちらでも有効製品は得られたが、抽出液の処理のしやすさでは生理食塩水の方がよかった。

CaCl_2 濃度 0.1—0.3% の範囲において析出する沈殿は Ca 低下活性を有しているが、 CaCl_2 濃度が 0.5—0.6% では有効物は母液に残り、液の pH を等電点にするか、またはそれにアセトンを加えることにより沈殿することがわかった。また有効成分は生理食塩水に中性付近で可溶性であるなどの結果から求むる成分が核たん白質でなくて普通たん白質であるように考えられる。またクエン酸ソーダの添加はなくてもよいことがわかった。

家兎血液中の白血球数への影響は Ca 低下性物質 (有効画分) の場合、2 時間後に減少, 6 時間後に上昇する傾向があることがわかった。