

方が合理的である。

5 結 論

我々は実験的結核症の廿日鼠、天竺鼠等に、ストレプトマイシン、プロミン、ネオプロミン、ダイアゾン、プロミゾール、ローザフェーフエの中性脂肪、ウスニツク酸等を注射により或いは経口投与により、種々の期間投与して剖検し、臓器、淋巴腺、菌接種局所中の結核菌数を定量培養により検査し、次の様な結果を得た。

(1) スト投与に於ては臓器中の菌数は病変の差の表われる前に既に短期間の投与に於ても差が表われる。又病変では差として表われない様な場合でも菌数に於ては差として表われる。

(2) スト投与では臓器中の結核菌数の増加の傾向ある場合には増菌を阻止し、更に減少せしめるし、臓器中の菌の減少の傾向にある時期では菌減少の傾向に拍車をかける。

そして対照との間の差を著明にする。尙臓器だけではなく所属淋巴腺や菌接種局所に於ても同様な事を証明した。

(3) ストレプトマイシン以外の薬物に於てはプロミ

ンの廿日鼠、6週投与に於てのみ総ての臓器で菌の減少を見たがストの場合に比して差は僅かである。又天竺鼠の実験では返つて菌の増加をみた。又其の他の薬物に於ては臓器の1つ或いは2つに於て菌の減少を見たものもあるが対照との差は僅かである。

(余等の研究に用いたストレプトマイシンは一部 G. H. Q. サムズ准将より恵与されたものであり、一部は厚生省より配給を受けたものである。又プロミン、ネオプロミン、ダイアゾン、プロミゾールウスニツク酸、ローザフェーフエの中性脂肪は東大医学部薬学科の石館教授及び同柴田助教授より恵与されたものである。又薬理研究会より研究費の補助を受けた。誌上を借りて感謝する次第である。(25. 5. 2)

文 献

- 1) 岡、柳沢等：日本臨牀結核、7, 47, 1948.
- 2) Feldman & Hinshaw: Amer. Rev. Tbc., 51, 582, 1945.
- 3) 岩崎、小川：結核、24, 177, 1949.
- 4) 柳沢、梅沢等：臨牀、2, 419, 1949,
- 5) 小川：結核、24, 97, 1949.

パラミノサリチル酸の結核菌酸化 酵素系におよぼす影響

国立療養所刀根山病院 (院長 渡辺三郎 博士)
大阪市立医科大学刀根山研究室(主任渡辺三郎教授)

山 村 雄 一 安 立 妙 子

〔本論文の要旨は第 25 回日本結核病学会総会において発表せり。〕

第 1 章 緒 言

Lehman は、Bernheim によつて報告せられた病原性結核菌の呼吸が、安息香酸及びサリチル酸を添加することによつて、著しく増加する事実に注目して⁽¹⁾、主とし

て安息香酸及びサリチル酸の誘導体 50 数種について、結核菌の発育抑制作用を検し、パラミノサリチル酸(PAS と略記す)が、最も強い阻止作用をあらわすことを報告した。⁽²⁾

その後 PAS の結核菌発育阻止作用に関する記験管内実験は Lehman,⁽²⁾ Youmans⁽³⁾等及び Edstlake⁽⁴⁾等によつて行われ、主として人型又は牛型結核菌が著明な

発育阻止作用を受けることが明らかにされ、また Youmans⁽³⁾ Ragaz⁽⁵⁾ 等及び Feldmann⁽⁶⁾ 等によつてモルモット又は廿日鼠の実験的結核症において PAS が抗結核作用をあらわすことが明らかにされた。臨床的応用に関しては既に多数の報告がある。しかしその作用機作については、最初 Lehman が結核菌の呼吸において安息香酸またはサリチル酸に対する拮抗的作用を想像しているにすぎない。

さきにわれわれはストレプトマイシンの結核菌酸化酵素系に及ぼす影響を検討して、結核菌の適応現象に対して不可逆的阻害をあらわすことを明らかにした。⁽⁷⁾ 又結核菌の酸化酵素系に対する諸種の薬剤の影響を検討分類することによつて、酵素化学的に抗結核剤の作用機作を明らかにする可能性を示した。⁽⁸⁾ 次にこの方法に従つて PAS の結核菌の酸化酵素系に及ぼす影響を検討した。

第2章 実験方法

実験方法は既に発表したわれわれの方法⁽⁷⁾⁽⁸⁾ に従つた。すなわち酵素液としては鳥型結核菌(竹尾株)の均等な生理的食塩水浮游液を用いた。すなわちグリセリン寒天培地上に3乃至5日間培養した菌苔を、白金耳を用いて無菌的に、メノウ乳鉢中に採集し、生理的食塩水を加えて十分に磨砕し、1cc 中約 10mg (乾燥菌量) を含む均等浮游液とした。

さきにわれわれは抗結核剤の作用機作を大きく分類して、構成酵素系、適応酵素系または適応現象のいずれかに阻害的に作用するものとしたが、この実験においては構成酵素系の基質としては、コハク酸、酪酸を、適応及び適応酵素系の検討のための基質としては安息香酸の

10 μ M をいずれも苛性ソーダを用いて正確に中和して使用した。ただし適応酵素系の酵素液としては、安息香酸適応菌を用いた。適応菌の調製は、結核菌浮游液をワールブルグ氏検圧計によつて安息香酸の酸化を測定する時と同一組成(菌液 10 部 (10mg/cc)、安息香酸 M/10 溶液 1 部、磷酸緩衝液 (N/10, pH 7.5) 4 部の割)の下に安息香酸と 2 時間以上 37.5°C で共存せしめ、充分適応酵素を産生せしめて、後数回遠心沈澱洗滌を行つて調製した。PAS (ナトリウム塩) は田辺製薬より提供せられた白色結晶を用いた。

測定法はワールブルグ氏検圧計を用いて、結核菌の呼吸、及び基質を加えた時の酸素吸収量の増加を測定し、同時に PAS を添加して、これに及ぼす影響を検討した。容器主室には結核菌浮游液 1.0cc、磷酸緩衝液(N/10 pH 7.5) 0.4cc を入れ、側室には基質 (M/10 溶液 0.1 cc) のみ、または基質と PAS を入れ、一定時間に両者を混じて、温度 37.5°C にて、酸素吸収量を測定した。瓦斯腔は空気を以てみす。発生する炭酸ガスは中央小室に 20% 苛性加里液 0.2cc を入れて吸収せしめた。その他の PAS の結核菌酸化酵素系に及ぼす作用機作の分類法は、すべて山村の既に発表した方法⁽⁹⁾ に準じて行つた。

第3章 PAS の結核菌の構成及び適應両酵素系に及ぼす影響

実験成績は第1表に示す如くであつて、両酵素系共に PAS のかなり大量によつて阻害せられる。しかして安息香酸々化酵素系の方が insensitive で阻害に多量の PAS を要している。

第1表 PAS による結核菌酸化酵素系の阻害
(数値は対照の値を引き去つた酸素吸収量 (Cmm) をあらわす)

酵 素 液		鳥型結核菌(竹尾株)の浮游液				同左安息香酸に対し 37°C で 2.5時間 適応菌液	
培 養 日 数		3 日		5 日		4 日	
菌 量		10.8mg		10.7mg		9.6mg	
基 質		コハク酸 19 μ M		酪 酸 10 μ M		安息香酸 10 μ M	
PAS 添 加 量		-	300 μ M	-	300 μ M	-	500 μ M
酸 素 吸 収 量 (cmm)	30'	105.8	11.4	/	/	57.4	13.3
	60'	176.9	8.6	146.2	0	137.1	52.5
	90'	345.7	17.0	373.6	0	331.4	68.0
	120'	431.4	26.8	531.9	0	/	/

次に以上の PAS による酵素系の阻害が、酵素に対する捕捉的な阻害であるか、基質との拮抗的競争的阻害であるかを明らかにする為、次の実験を行った。すなわち各基質濃度を種々に変化し、これに一定量の PAS を作用せしめ阻害度を測定したところ、第 2 表の如く基質濃度を一定範囲内にて変化せしめても、PAS 量が一定

であれば、その阻害度は一定である。従つて PAS の阻害は基質との拮抗的阻害ではなくて、酵素に対する捕捉的阻害である。また以上の捕捉的阻害は菌に PAS を作用させた後、生理的食塩水を用いて洗滌することによつて除去出来るから可逆的である。結局 PAS は構成、適応両酵素系に対して、可逆的捕捉的阻害をあらわす。

第 2 表 PAS による酵素系の捕捉的阻害

$$\text{但し阻害度 } H = 1 - \frac{\text{基質と PAS を添加した時の酸素吸収量の増加 (Cmm) } O_g}{\text{基質のみを添加した時の酸素吸収量の増加 (Cmm) } O_s}$$

を以てあらわす。

酵 素 液	鳥 型 菌 浮 游 液			鳥 型 菌 浮 游 液			同 圧 安 息 香 酸 適 応 菌		
培 養 日 数	3 日			4 日			4 日		
菌 量	9.8mg/cc			10.3mg/cc			8.4mg/cc		
測定時間(分)	30'			120'			120'		
基 質	コ ハ ク 酸			酪 酸			安 息 香 酸		
基質添加量	49 μ M	30 μ M	10 μ M	40 μ M	30 μ M	10 μ M	40 μ M	20 μ M	10 μ M
PAS添加量	100 μ M			100 μ M			300 μ M		
Os	91.3	127.4	105.4	516.1	511.9	344.6	442.4	467.8	487.9
Og	37.9	52.0	43.7	244.0	251.0	190.3	213.8	234.0	211.0
H	58.5	59.1	58.6	52.8	51.0	65.1	51.7	50.0	56.7

全実験を通じて PAS は基質を添加しない結核菌の内部呼吸に対して殆ど無影響であるが、安息香酸適応菌を酵素液とした時は、若干酸素吸収量を増加せしめた。この事実はわれわれの既に発表した結核菌の「類属化学適応」によると思われる。(9)

第 4 章 PAS の酵素阻害に関する 定量的取扱

田宮教授等(10) は微生物の薬剤による発育阻害作用において定量的取扱を行っているが、この方法と同様に酵素に対する捕捉的阻害の場合を取扱うことが出来る。(8) すなわち酸素吸収量から測定した薬剤の阻害度を H とし、薬剤の濃度を G とし、H を縦軸に、log G を横軸にとると各薬剤により異なる傾斜を示す Sigmoid 型の曲線が得られ、この曲線は一般に

$$H = \frac{G^n}{\phi^n + G^n} \dots \dots \dots (1)$$

であらわされる。ただし n, ϕ はある恒数で大きいさは薬剤の種類、供試菌の種類、及びその他の実験条件(温度、pH, 等)によつて定まり、n>0 で、 ϕ は H=0.5 (阻

害度50%) なる時の薬剤の濃度である。(1) 式をかきかえて

$$\log\left(\frac{H}{1-H}\right) = n \log G - n \log \phi \dots \dots \dots (2)$$

すなわち(1)式の成立つためには $\log\left(\frac{H}{1-H}\right)$ と log G との間には直線関係が成立しなければならない。しかしてその直線の傾斜から n 値を、直線と log G との交点から ϕ 値を求めることが出来る。ここに得られた n 値は(1)式の示すシグモイド曲線の傾斜を示し、 ϕ はその水平位置を示すものですなわち n が大なる程曲線は直立的になり、僅かな薬剤の増加によつて阻害度の著明な増大をきたすことを示し、 ϕ は小なる程低濃度で有効な薬剤である。

いまこの方法に従つて、結核菌の酵素系に対する PAS の捕捉的阻害の場合の n 及び ϕ 値を求めると、第 3 表及び第 4 表の如くであつて、比較のために他の薬剤または酵素毒の値を掲げてある。表によつて明らかな如く PAS の ϕ 値がかなり大で、従つて阻害には高濃度を必要としている。また安息香酸の酸化酵素系の方が ϕ 値が大であり PAS に対して insensitive である。

第3表 構成酵素系における n 及び φ 値

酵素液としてはいずれも鳥型菌グリセリン寒天培養第4日目の菌浮游液を用い、
基質としては酪酸またはコハク酸ソーダ 10^{-4} モルを使用す。

基 質	酪 酸		コ ハ ク 酸	
	PAS	亜 砒 酸	PAS	亜 砒 酸
使 用 薬 剤	PAS	亜 砒 酸	PAS	亜 砒 酸
菌 量	10.7mg	9.8mg	10.8mg	9.8mg
n	1.31	1.95	1.88	1.35
φ	3.16×10^{-5}	1.78×10^{-7}	7.08×10^{-5}	1.58×10^{-7}

第4表 適応酵素系における n 及び φ 値

酵素液としてはグリセリン寒天培養第4日目の鳥型菌の安息香酸適応菌を用い、
基質としては安息香酸ソーダの 10^{-5} モルを使用す。

使 用 薬 剤	PAS	ヒノキチオール	亜 砒 酸	8-オキシ・ヒノリン
菌 量	6.8mg	8.7mg	12.3mg	10.4mg
n	0.96	2.37	1.08	1.66
φ	2.19×10^{-4}	1.58×10^{-7}	1.66×10^{-7}	5.63×10^{-8}

第5章 PASの結核菌の「適応」に対する阻害

PAS の一定量を安息香酸を基質として結核菌を作用せしめた時に添加すると、第5表の如く明らかに酸素吸収の阻害があらわれる。この阻害が徐々に発生されてくる適応酵素（この場合安息香酸々化酵素）のみに対するものであるか、「適応」に対するものも加わっているかを区別しなければならぬ。そのためには第6表に示す如く、結核菌と、安息香酸と、PASを混じて一定時間 37.5°C にて振盪し、後に菌を十分に洗滌して、再び安

息香酸を基質として酸素吸収量を測定する。

その結果によると菌は一定の誘導期の後に安息香酸を酸化しているから、PASは「適応」をも阻害するのであり、しかもその阻害は洗滌によつて除去出来るから可逆的である。（もしPASが「適応」を阻害しないとすると、菌は既に安息香酸と一定時間共存していた後であるから、誘導期を要せず直ちに安息香酸の酸化を行う筈である。）しかしてこの条件の下で「適応」を完全に阻害するPAS（ソーダ塩）の最小量は第5表に示す如く $100\mu\text{M}$ (15.3mg)であつて、ストレプトマイシンの同様な実験における 10γ に比し約1500倍を要する。

第 5 表

酵素液としては鳥型菌のグリセリン寒天培養第5日目の菌浮游液（菌量 $10.6\text{mg}/\text{cc}$ ）を用いた。基質は安息香酸 10^{-5}M である。

数値は対照値を引去つた酸素吸収量 (Cmm) である。

PAS 添 加 量		0	$10\mu\text{M}$	$20\mu\text{M}$	$50\mu\text{M}$	$100\mu\text{M}$
反 応 時 間 (分)•	30'	0	0	0	0	0
	60'	17.4	16.8	17.3	17.5	10.5
	120'	127.0	81.0	84.4	78.9	10.0
	180'	334.0	294.9	230.8	119.6	8.8

第6表 酵素液としては鳥型菌のグリセリン寒天培養第4日目の菌浮游液を

A. そのまま2時間 37°C にて振盪

B. 菌浮游液 1cc に対し PAS を 300 μ M の割に添加して2時間 37°C にて振盪後洗滌した菌をそれぞれ用いた。基質は安息香酸 10^{-5} M である。

数値は対照値を引去つた酸素吸収量 (Cmm) である。

酵 素 液		A.	B.
菌 量		11.0mg	10.2mg
反 応 時 間 (分)	15'	5.5	1.9
	30'	26.2	15.4
	45'	53.0	41.1
	60'	106.2	85.0
	90'	225.0	174.0
	120'	381.5	345.6

第7表 各種結核治療剤の作用機作 +は阻害作用をあらわす。

		PAS	ストレプト マイシン	ヒノキチフ ール	亜 砒 酸
構成酵素系に対 する阻害	酵素に対する捕捉的阻害	+ 可逆的	+ -	-	+ 可逆的
	基質(助酵素)との拮抗的阻害	-	-	-	-
「適応」に対する阻害		+ 可逆的	+ 非可逆的	+ 可逆的	-
適応酵素系に対 する阻害	酵素に対する捕捉的阻害	+ 可逆的	-	+ 可逆的	+ 可逆的
	基質(助酵素)との拮抗的阻害	-	-	-	-

第6章 考 按

従来から行つてきた結核治療剤の結核菌酵素系におよぼす阻害作用⁽⁸⁾と PAS のそれを比較すると第7表の如くである。

第7表から明らかな如く PAS は阻害作用がかなり広汎であるが、既に第4表において示した如く ϕ 値が著しく大であり、また第5章において述べた如く適応を抑制する最少有効量もかなり大である。かつその作用はすべて可逆的であるから、かなり多量の PAS が持続的に菌と接触しておらなければ阻害作用があらわれなれないと思われる。また酵素に対する阻害はいずれも捕捉的阻害であつて、Lehman の最初考えたような安息香酸に対する拮抗的阻害はみとめられなかつた。

第7章 結 論

PAS は鳥型結核菌に対して、かなり大量を用いると、酪酸またはコハク酸の酸化酵素系(構成酵素系)及び安息香酸 α 化酵素系(適応酵素系)に対して酵素に対する可

逆的捕捉的阻害をあらわし、また鳥型菌の適応を可逆的に阻害する。

終りに臨み恩師院長渡辺三郎教授、並びに大阪大学理学部、赤堀四郎教授の御指導と御校閲を賜つたことを深謝します。

文 献

- 1) Bernheim; Science, 92 204 (1940)
- 2) Lehman; Lancet, 1 15 (1946)
- 3) Youmans, Raleigh, and Youmans; J. Bact. 54 409 (1947)
- 4) Eastlake, and Barach; Disease of the Chest, July, (1949)
- 5) Ragaz; Schweitzer. Hed Wschr. 78 332(1948)
- 6) Feldman, Karlson and Hinshaw; Am. Rev. The (1949)
- 7) 山村、笹川及び安立・医療、3 (8) 17 (昭24)
- 8) 山村、医療 4 (4) 48 (昭 25)
- 9) 山村、笹川、第2回酵素化学シンポジウム (1949年11月)
- 10) 田宮、柳田、鈴木; ペニシリン 15 (1947)