

## 原 著

イソニコチン酸ヒドラジドの作用  
機序に関する実験的研究

## 第 2 報 BCG 脱水素酵素に及ぼす影響に就いて

大阪大学医学部第三内科学教室 (主任 堂野前教授)

山 本 実

(昭和 28 年 12 月 25 日受付)

## 緒 言

イソニコチン酸ヒドラジド (INAH) の作用機序に関する実験的研究の一つとして、曩に酒井<sup>1)</sup>は第 1 報において BCG Transaminase に対する阻害作用に就いて報告した。私は同剤の作用機序に就いて、更に進んでその代謝拮抗作用に基く BCG 脱水素酵素に対する影響に就いて実験を行つたので、その成績を報告する。

INAH の脱水素酵素に対する影響に就いては、私達<sup>2)</sup>は、曩に INAH が鳩型結核菌の林檎酸脱水素作用を阻害することを報告したのであるが、INAH が人型及び牛型結核菌に対し特異的に抗菌力を発揮<sup>3)</sup>する点より、酒井が報告したと同様の考えから、BCG 浮游液を酵素材料として実験を行つたのである。

結核菌の脱水素酵素に就いては比較的古くより研究が行われ、川畑<sup>4)</sup>、井田<sup>5)</sup>、櫃田<sup>6)</sup>、柳沢及び大林<sup>7)</sup>、甲谷<sup>8)</sup>等が、Thunberg 法により実験し、乳酸及び焦性葡萄糖の脱水素作用の強いことを認めている。更に山村等<sup>9)</sup>は乳酸脱水素酵素を、又楠瀬等<sup>10)</sup>は琥珀酸及び林檎酸脱水素酵素をそれぞれ無細胞酵素液として抽出した。又最近には Tetrazolium を応用して菌浮游液の還元能力より、生死菌鑑別<sup>11)</sup> 12)、或いは有毒及び無毒菌の鑑別<sup>13)</sup> 14) 等を行おうとする試みが報告されている。

私も BCG の脱水素作用を検するに当り、Thunberg 管を用い無気的条件下で Methylene blue の脱色時間を測定する方法を用いて実験を行つた。

## 実験材料及び実験方法

BCG 浮游液の調製：Sauton 培地に 1~2 週間培養せる BCG を、集菌秤量後、ガラス玉と共にフラスコ振盪法にて均等なる菌液とし、蒸溜水にて 4 回遠心沈澱を行つて洗菌を行い、蒸溜水にて湿菌量 50mg/cc の菌浮游液を作成、その 1cc を実験に供した。

基質溶液その他試薬の調製：基質はいずれも M/10 濃度の水溶液 0.5cc を使用した。乳酸及び琥珀酸は溶解後 2N-NaOH にて中和使用した。林檎酸・グルタミン

酸・焦性葡萄糖・蟻酸はいずれも Na 塩を用いた。

Cozymase (DPN) は酵母より抽出したもの<sup>15)</sup>を M/2 磷酸緩衝液 (pH 7.2) に溶解して実験に供した。

Methylene blue は M/5000 水溶液としてその 0.5cc を使用した。

脱色時間測定法：Thunberg 管の一方に菌浮游液 1cc, M- 磷酸緩衝液 0.3cc (pH 7.2) 及び INAH 0.3cc を加え、他の一方に基質 0.5cc 及び Methylene blue 0.5cc を添加、蒸溜水にて液量合計を 3cc とする。斯して真空ポンプにて 5mm Hg 程度迄脱気し、37°5'C 恒温水槽中に 10 分間放置後、両液を混合、同じく 37.5°C 恒温水槽中にて Methylene blue の褪色する迄の時間を計測した。

## 実験成績

先ず最初 Pyridin 酵素の対象となり得る物質を主とせる各種の基質を用いて、これ等の BCG による脱水素作用に対する INAH の影響を終末 M/100 濃度において検査した。以下 INAH 及びその誘導体の濃度はすべて最終 mol 濃度を以つて表わしている。その成

第 1 表 (A)

BCG による各種基質脱水素作用に及ぼす  
INAH (M/100) の影響

菌	>30'
菌 + INAH	>30'
乳 酸 + 菌	5'
乳 酸 + 菌 + INAH	10'
林 檎 酸 + 菌	9'
林 檎 酸 + 菌 + INAH	13'
葡 萄 糖 + 菌	5'
葡 萄 糖 + 菌 + INAH	13'
ヒスチジン + 菌	12'
ヒスチジン + 菌 + INAH	14'
琥 珀 酸 + 菌	20'
琥 珀 酸 + 菌 + INAH	13'

第 1 表 (B)

B C G による各種基質脱水素作用に及ぼす  
I N A H (M/100) の影響

菌	>30'
菌 + I N A H	>30'
乳酸 + 菌	13'
乳酸 + 菌 + I N A H	23'
蟻酸 + 菌	13'
蟻酸 + 菌 + I N A H	25'
エタノール + 菌	10'
エタノール + 菌 + I N A H	22'
グルタミン酸 + 菌	12'
グルタミン酸 + 菌 + I N A H	25'
焦性葡萄糖 + 菌	13'
焦性葡萄糖 + 菌 + I N A H	20'

續は第1表(A)及び(B)に示した如くで、乳酸・林檎酸・葡萄糖・蟻酸・エタノール・グルタミン酸・焦性葡萄糖を基質とせる場合には、I N A H による脱色時間の遅延は比較的著明であるが、Histidin を基質とした際にはそう著明ではなく、琥珀酸の場合には却つて短縮されるのを認めた。I N A H が琥珀酸脱水素酵素を阻害しないことは、鳥型結核菌を用いた私達の実験でも認められたし<sup>2)</sup>、又 Aronson 等<sup>16)</sup>は B C G についても同様の成績を報告している。この点は非常に興味深いと考える。

次に I N A H の濃度を更にうすめて、脱色時間に対する影響を検してみた。第2表は、乳酸脱水素作用に対する影響をみた成績であるが M/500 迄は確実に脱色時間を遅延せしめているが、M/1000 ではその遅延は誤差範囲で顕著とはいえない。

第3表は林檎酸及び葡萄糖を基質とした際の同様の実験成績である。林檎酸を基質とせる際には、M/1000 にてなお確実に脱色時間の遅延を認めたが、葡萄糖の場合には M/500 では確実であつたが、M/1000 では著明な脱色時間の遅延を認めなかつた。

第4表は蟻酸・エタノール・グルタミン酸・焦性葡萄糖

第 2 表

B C G の乳酸脱水素作用に及ぼす I N A H の影響

菌	>30'
菌 + I N A H (M/100)	>30'
乳酸 + 菌	8'
乳酸 + 菌 + I N A H (M/100)	25'
乳酸 + 菌 + I N A H (M/200)	16'
乳酸 + 菌 + I N A H (M/500)	14'
乳酸 + 菌 + I N A H (M/1000)	10'
乳酸 + 菌 + I N A H (M/2000)	12'

第 3 表

B C G の林檎酸及び葡萄糖脱水素  
作用に及ぼす I N A H の影響

菌	>30'
菌 + I N A H (M/500)	>30'
林檎酸 + 菌	12'
林檎酸 + 菌 + I N A H (M/500)	27'
林檎酸 + 菌 + I N A H (M/1000)	21'
葡萄糖 + 菌	11'
葡萄糖 + 菌 + I N A H (M/500)	20'
葡萄糖 + 菌 + I N A H (M/1000)	13'

酸を基質にした際の同様な実験成績を示したものであつて、蟻酸の場合には M/500 にて既に脱色時間の遅延を認めないのに対し、エタノール・焦性葡萄糖の場合には M/500 迄、グルタミン酸の場合には M/1000 にてなお脱色時間の遅延せしめられるのが認められた。以上の如く I N A H による Methylene blue 脱色時間の遅延状態は基質により異なることが証明せられた。

第 4 表

B C G の蟻酸・エタノール・グルタミン酸及び  
焦性葡萄糖脱水素作用に及ぼす I N A H の影響

菌	>30'
菌 + I N A H (M/500)	>30'
蟻酸 + 菌	14'
蟻酸 + 菌 + I N A H (M/500)	15'
蟻酸 + 菌 + I N A H (M/1000)	14'
エタノール + 菌	7'
エタノール + 菌 + I N A H (M/500)	18'
エタノール + 菌 + I N A H (M/1000)	9'
グルタミン酸 + 菌	15'
グルタミン酸 + 菌 + I N A H (M/500)	25'
グルタミン酸 + 菌 + I N A H (M/1000)	19'
焦性葡萄糖 + 菌	7'
焦性葡萄糖 + 菌 + I N A H (M/500)	14'
焦性葡萄糖 + 菌 + I N A H (M/1000)	9'

次に乳酸を基質として I N A H の脱水素作用阻害に及ぼす Cozymase の影響を検してみた。その成績は第5表の(A)(B)及び(C)に示した如くである。これ等の Cozymase (DPN) は 50γ にて脱水素酵素の助酵素たり得ることを確め得た標本である。

第5表(A)は M/100 の I N A H による脱色時間の遅延に対する Cozymase の影響をみた成績であるが、表に示した如く、I N A H による脱色時間の遅延は Cozymase の添加により或程度減弱せしめられる。しかしながら完全には恢復せず、しかも Cozymase は極めて大量を必要とする。第5表(B)は同じく M/500 の I N A H を使用した際の成績である。この際には Cozymase 15mg

第 5 表

INAH の BCG 乳酸脱水素作用  
阻害に及ぼす Cozymase の影響

(A)

菌	>30'
菌 + INAH (M/100)	>30'
乳酸 + 菌	8'
乳酸 + 菌 + INAH (M/100)	25'
乳酸 + 菌 + INAH + DPN (20mg)	15'
乳酸 + 菌 + INAH + DPN (15mg)	15'
乳酸 + 菌 + INAH + DPN (10mg)	15'
乳酸 + 菌 + INAH + DPN (5mg)	13'

(B)

菌	>30'
菌 + INAH (M/500)	>30'
乳酸 + 菌	10'
乳酸 + 菌 + INAH (M/500)	13'
乳酸 + 菌 + INAH + DPN (15mg)	9'
乳酸 + 菌 + INAH + DPN (10mg)	9'
乳酸 + 菌 + INAH + DPN (5mg)	12'

(C)

菌	>30'
菌 + INAH (M/1000)	>30'
乳酸 + 菌	10'
乳酸 + 菌 + INAH (M/1000)	15'
乳酸 + 菌 + INAH + DPN (20mg)	10'
乳酸 + 菌 + INAH + DPN (15mg)	13'
乳酸 + 菌 + INAH + DPN (10mg)	15'
乳酸 + 菌 + INAH + DPN (5mg)	16'

或いは 10mg を用いた時には INAH の影響が完全に消滅されるのが認められた。第 5 表(C)は同じく M/1000 の INAH を用いた場合であるが、この場合にも Cozymase 20mg の添加により INAH の作用は完全に消失せしめられることが認められた。

第 6 表は 100γ/cc INAH 耐性 BCG 浮游液を酵素源として使用した成績である。本耐性菌は漸次高濃度の INAH を含有せる培地に継代培養することによつてつくられた株である。

表に示した如く、乳酸・林檎酸・葡萄糖及びグルタミン酸を基質として使用したのであるが、いずれの場合にもその脱色時間は感受性菌の場合に比し遙かに長時間を要する。この脱色時間に対する INAH の影響も、M/100 についてみても、実験の時により不定であり、ある場合には延長又ある場合には短縮するのが認められた。

以上の実験成績より INAH が乳酸・林檎酸・葡萄糖・

第 6 表

100γ/cc INAH 耐性 BCG の各種基質  
脱水素作用に及ぼす INAH の影響

	第 1 回	第 2 回	第 3 回
菌	>120'	>120'	>90'
菌 + INAH (M/10)	>120'	>120'	>90'
乳酸 + 菌 <sup>1</sup>	40'	50'	50'
乳酸 + 菌 + INAH (M/10)	100'	>120'	/
乳酸 + 菌 + INAH (M/50)	70'	120'	45'
乳酸 + 菌 + INAH (M/100)	38'	90'	40'
乳酸 + 菌 + INAH (M/500)	/	/	35'
林檎酸 + 菌	90'	55'	80'
林檎酸 + 菌 + INAH (M/10)	>120'	>120'	/
林檎酸 + 菌 + INAH (M/50)	110'	>120'	>90'
林檎酸 + 菌 + INAH (M/100)	100'	120'	65'
林檎酸 + 菌 + INAH (M/500)	/	/	60'
葡萄糖 + 菌	50'		
葡萄糖 + 菌 + INAH (M/100)	35'		
グルタミン酸 + 菌	>90'		
グルタミン酸 + 菌 + INAH (M/100)	>90'		

蟻酸・エタノール・グルタミン酸・焦性葡萄糖等の脱水素作用を阻害することは確実であるが、問題は INAH が真にこれ等の脱水素酵素自体を阻害するかどうかという点である。米田<sup>17)</sup>は私達<sup>2)</sup>が昨年報告した鳥型結核菌の林檎酸脱水素作用の阻害に関する実験を批判して、これは Transamination が阻害される結果蔞醋酸が蓄積し、その為に恰も林檎酸脱水素酵素が阻害される如く見えるのだと述べた。成程かかる考えも成立する。

しかしながら上述の成績からみても、乳酸・林檎酸及びグルタミン酸の脱水素産物は、Transamination に関係はあるが、その他の基質の脱水素産物は何等関係あるとは考えられず、この点からも INAH は脱水素酵素自体に働くものと考えたのであるが、なおこの点を確実にすべく青酸カリの影響を検してみた。第 1 報においてのべた如く、M/20 青酸カリは蔞醋酸-Asparagin 酸 Trans-

第 7 表

INAH の BCG 林檎酸脱水素作用  
阻害に及ぼす KCN の影響

菌	>30'
菌 + INAH (M/100)	>30'
菌 + KCN (M/20)	>30'
林檎酸 + 菌	10'
林檎酸 + 菌 + KCN	13'
林檎酸 + 菌 + INAH	17'
林檎酸 + 菌 + KCN + INAH	15'

amination を殆んど 100% 阻害する。ところが第7表に示した如く、M/20 青酸カリは BCG の林檎酸脱水素作用に左程著明な影響を与えない。もし前述の如き理論が成立するのなら、この脱水素作用は当然 INAH と同程度に阻害されなくてはならない。一方実験成績は INAH 添加により青酸カリ単独に比して脱色時間は遅延し、この際 INAH により遅延せしめられた脱色時間は青酸カリの添加により却つて少し短縮される如き傾向を示した。以上の如き考えより INAH はこれ等の脱水素酵素そのものを阻害するものと考えて差支えない。

次に私は INAH の誘導体である N-Isonicotinyl-N'-glucosyl hydrazine (INGH) 及び N-Isonicotinyl-N'-isopropyl hydrazine (INPH) の両剤の各種基質脱水素作用に対する作用を検してみた。

第8表は両剤の作用を各 M/100 において INAH と比較した成績である。表に示した如くいずれの基質を用いた際にも脱色時間の遅延は INAH が最も強く、INGH 及び INPH の作用は基質によつて異なる。

第 8 表

BCG の各種基質脱水素作用に及ぼす  
INAH, INGH 及び INPH の影響

菌	>60'
菌 + I N A H (M/100)	>60'
菌 + I N G H (M/100)	>60'
菌 + I N P H (M/100)	>60'
乳 酸 + 菌	12'
乳 酸 + 菌 + I N A H	45'
乳 酸 + 菌 + I N G H	40'
乳 酸 + 菌 + I N P H	35'
林 檎 酸 + 菌	30'
林 檎 酸 + 菌 + I N A H	60'
林 檎 酸 + 菌 + I N G H	45'
林 檎 酸 + 菌 + I N P H	50'
葡 萄 糖 + 菌	16'
葡 萄 糖 + 菌 + I N A H	40'
葡 萄 糖 + 菌 + I N G H	21'
葡 萄 糖 + 菌 + I N P H	18'

第9表は乳酸を基質とした際、INGH 及び INPH の濃度をうすめてその影響を検した成績であるが、この場合には INGH 及び INPH 共に M/1000 迄確実に脱色時間を遅延せしめた。

第10表は林檎酸及び葡萄糖を基質にした際の INGH 及び INPH の影響を前と同様に検した成績である。林檎酸の場合には両者ともに M/500 で既に阻害を認めないのに対し、葡萄糖の場合には両者共に M/500 迄脱色時間の遅延を認めた。

第 9 表

BCG の乳酸脱水素作用に及ぼす  
INGH 及び INPH の影響

菌	>30'
菌 + I N G H (M/100)	>30'
菌 + I N P H (M/100)	>30'
乳 酸 + 菌	6'
乳 酸 + 菌 + I N G H (M/100)	16'
乳 酸 + 菌 + I N G H (M/500)	12'
乳 酸 + 菌 + I N G H (M/1000)	10'
乳 酸 + 菌 + I N P H (M/100)	18'
乳 酸 + 菌 + I N P H (M/500)	10'
乳 酸 + 菌 + I N P H (M/1000)	10'

第 10 表

BCG の林檎酸及び葡萄糖脱水素作用  
に及ぼす INGH 及び INPH の影響

菌	>60'
菌 + I N G H (M/100)	>60'
菌 + I N P H (M/100)	>60'
林 檎 酸 + 菌	25'
林 檎 酸 + 菌 + I N G H (M/100)	50'
林 檎 酸 + 菌 + I N G H (M/500)	28'
林 檎 酸 + 菌 + I N G H (M/1000)	25'
林 檎 酸 + 菌 + I N P H (M/100)	40'
林 檎 酸 + 菌 + I N P H (M/500)	25'
林 檎 酸 + 菌 + I N P H (M/1000)	24'
葡 萄 糖 + 菌	15'
葡 萄 糖 + 菌 + I N G H (M/100)	30'
葡 萄 糖 + 菌 + I N G H (M/500)	21'
葡 萄 糖 + 菌 + I N G H (M/1000)	16'
葡 萄 糖 + 菌 + I N P H (M/100)	28'
葡 萄 糖 + 菌 + I N P H (M/500)	20'
葡 萄 糖 + 菌 + I N P H (M/1000)	18'

## 考 按

以上の実験成績より INAH は各種の脱水素酵素作用を明かに阻害するもので、この際その阻害度は基質によつて異なるが、細胞内エネルギー代謝系に係るこれ等脱水素反応に対する態度は INAH の作用点の一つを示すものといひ得る。しかしながら Transaminase に対する作用や第3報に報告する Katalase の場合と同様、脱水素酵素の場合にも INAH, INGH 及び INPH の静止菌に対する阻害作用はそれ等の結核菌発育阻止力とは平行しない。又これ等物質はそれぞれ結核菌発育阻止濃度より遙かに高濃度において始めてその阻害作用を表わす。これ等の点より本阻害作用のみを以つてしては勿論その作用機序の全部を説明し得るものではないが、他の酵素阻害の場合同様、INAH の作用機序の一つとして上述の

脱水素反応阻害を挙げて差支えないものとする。

琥珀酸の脱水素作用を INAH が阻害しないという事実私達以外にも Aronson 等も認めており、琥珀酸脱水素酵素が Pyridin 酵素でない点よりして、私達が始めから唱えている如く、本阻害は拮抗的阻害に因するものと考え得る。

Cozymase が INAH の本阻害作用を消失せしめ得ない点については、酵素構成において INAH との解離度の差によるものとする。

INAH 耐性 BCG の酵素活性の低い点については、Barclay 等<sup>18)</sup>の C<sub>14</sub> を導入した INAH が耐性菌には入りにくい成績からも、細胞膜の透過性の相違ということも考え得るし、又上述した私の実験成績の如き細胞内エネルギー代謝系の阻害を通じて蛋白合成殊に酵素蛋白合成の低下に伴う酵素量の減少或いは酵素活性の低下等種々の可能性が存在し、この点はなお今後の研究に俟たねばならない。又このように酵素活性の低い場合には対照の脱色時間そのものが相当の長時間を要し、且つ上記の細胞膜透過性の変異等により INAH の阻害効果が左右される可能性が強いので、従つて私の実験成績においても耐性菌に就いては、INAH の影響は確定し得なかつた。

#### 結 論

1) INAH は BCG による乳酸・林檎酸・葡萄糖・鱈酸・エタノール・グルタミン酸・焦性葡萄糖の脱水素作用を阻害する。

2) INAH の乳酸脱水素作用阻害は大量の Cozymase の添加によりある程度減弱せしめられる。

3) 100% INAH 耐性 BCG の各種基質脱水素能力は非常に弱い。

4) INGH, INPH も乳酸・林檎酸・葡萄糖脱水素作用を阻害するが、その阻害度は INAH に比して弱い。

稿を終るに臨み、終始御懇切な御指導御校閲を賜つた堂野前教授及び河盛助教授に深く感謝し、直接御指

導を賜つた伊藤文雄博士に深謝する。又種々御教示にあずかつた本学生化学教室内田助教授に厚く感謝する。

なお本研究費の一部は文部省科学研究費によつた。記して謝意を表す。

#### 文 献

- 1) 酒井：結核，29，161，1954.
- 2) 堂野前・河盛・伊藤・山本・酒井・青木・岩山：最新医学，7，643，1952.
- 3) 堂野前・河盛・岩崎・島津・高橋・堀本他：最新医学，7，950，1952.
- 4) 川畑：福岡医科大学雑誌，27，833，1934.
- 5) 井田：実験医学雑誌，23，467，1939.
- 6) 櫃田：大阪医学会雑誌，42，1651，1943.
- 7) 柳沢・大林：第22回日本結核病学会総会，1947.
- 8) 甲谷：第23回日本結核病学会総会，1948.
- 9) 楠瀬・楠瀬・山村：結核，27，72，243，1952.
- 10) 楠瀬・楠瀬：結核，28，34，1953.
- 11) H.S. Willis, H.M. Vandiviere and W.H. Gentry: Am. J. Med. Science, 225, 410, 1952.
- 12) H.M. Vandiviere, W.H. Gentry and H. S. Willis: Am. Rev. Tbc., 66, 95, 1952.
- 13) F. J. Wilson, C. Kalish and C.H. Fish: Am. Rev. Tbc., 65, 187, 1952.
- 14) H. Bloch and H. Nall: J. Exp. Med., 97, 1, 1953.
- 15) S. Williamson, D. E. Green: J.B.C., 135, 345, 1940.
- 16) T.G. Aronson, S. L. Ehrlich and W. Flagg: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 80, 259, 1952.
- 17) 米田：生体の科学，4，176，1953.
- 18) W. R. Barclay, R. H. Ebert and D. Koch-Weser: Am. Rev. Tbc., 67, 490, 1953.