

Pyrazinamide の生体内運命に関する研究

—肝ホモジェネイトによる Pyrazinoic acid の生成について—

青木 隆一・西尾和比古・伊藤 文雄

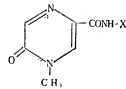
大阪大学医学部第三内科教室 (主任 堂野前維摩郷教授)

受付 昭和 32 年 2 月 22 日

緒 言

さきに、著者ら^{1,2)}は Pyrazinamide (以下 P Z A と略) 投与患者尿より Paperchromatography を用いて Pyrazinoic acid (以下 P. acid と略) 以外にもなお、同誘導体と考えられるモール塩陽性の数コスポットを発見した。これらのうち、80%エタノール水を溶媒とした時に R.f. 値 0.8 附近の物質を結晶の形で単離することに成功した。該物質は、元素分析、赤外線分析ならびに紫外線吸収スペクトル等の諸検査成績より次図の如き構造式を有する物質を推定した。

P I 物質 (X 未確定基)



一方、Allen ら³⁾は、苛性カリで加水分解すれば P Z A は容易に P. acid になることを応用して血中濃度ならびに尿中排泄量を定量し、P Z A は生体内でも容易に P. acid になり、この反応は恐らく酵素化学的分解であろうと示唆している。著者らも前報に述べたように P Z A は酵素化学的脱アミド反応を受けて P. acid となることを推定した。in vitro における本反応を実証した報告に未だ接しないので、以下 in vitro における P Z A の脱アミド反応に関する研究成績を報告する。

実験材料ならびに方法

酵素材料としては、白鼠および家兔を失血致死せしめ速やかに開腹後、肝臓を摘出秤量しその切片を直ちに予め氷冷しておいた 2 倍量の生理的食塩水中に投入して、Potter-Elvehjem の法により氷冷しながらホモゲナイズした。直ちにガーゼ 2 枚にて濾過したものを粗酵素液として以下の実験に供した。

緩衝液としては、最終濃度 M/15 磷酸緩衝液 (pH 7.2) を用いた。P Z A および P. acid は、それぞれ三共株式会社および第一製薬株式会社各研究所より分与された純品を実験の都度新しく所定の濃度に水溶液としたものを使用した。

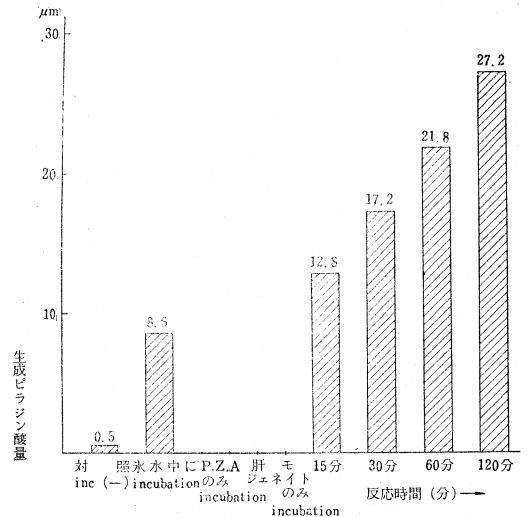
実験方法は、比較的嫌気的条件下として Thunberg 管を用い吸引器で 5mmHg まで脱気して実験した。好氣的条

件としては、Warburg 検圧装置を用いて空气中で振盪した。両条件ともそれぞれ 37°C にて 2 時間まで incubate した後、最終濃度 5% 三塩化酢酸にて反応を停止して東洋濾紙 No. 6 で濾過した。これらの濾液を Allen ら³⁾の変法により 20% モール塩 (硫酸第一鉄アンモン) 弱酸性溶液にて発色させ、フィルター 460mμ を用いて光电比色した。検量基準線は、その都度作成し換算に供した。なお P Z A のみにても高濃度ではモール塩にて微かな発色を認めるが、この場合にはその値を差引いたものを P. acid の量とした。

実験成績

家兔肝ホモジェネイトを酵素材料とし、100μM の P Z A を基質として嫌氣的条件下で反応せしめた成績を図 1 に示した。反応時間が 15 分から 120 分になるにつれて生成

図 1 家兔肝ホモジェネイトによる Pyrazinamide の分解

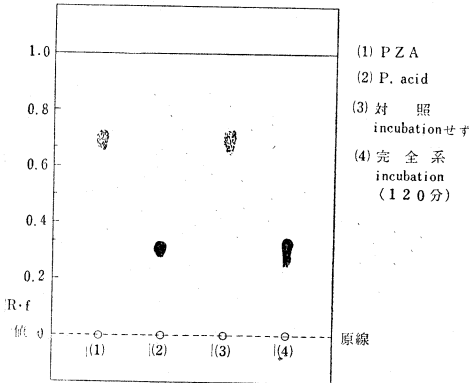


P. acid 量は漸次増加するが、P Z A のみを incubate しても分解は認められない。なお流水中あるいは氷水中に incubate しても、ある程度反応は進行するが、別報⁵⁾の如く鳥型結核菌竹尾株にても同様の現象が認められた。

これらの濾液につき行つた Paperchromatogram は図 2 の如くである。濾紙は東洋濾紙 No. 50 を用い溶媒は 80

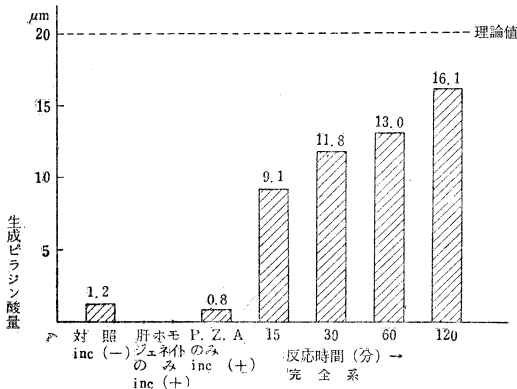
%エタノール水、室温(15°Cないし20°C)にて上昇法で8~12時間展開後風乾し、20%塩酸弱酸性モール塩水溶液で発色させた。図2に示した如く生成物としてはP. acidを証明するのみで、本条件下ではPZA分解によりP. acidのみが生成したものと考えられる。

図2 Paperchromatogram



ついで白鼠の肝ホモジェネイトを用いて同様の実験を行い、図3に示した如くほぼ同様の成績を得た。すなわち、15分から120分へと反応時間が増すにつれて生成P. acid量は増加して、2時間で約16μM(80%)が分解されることを認めた。さらに前述のPaperchromatographyにより検討した結果、残存PZAと生成P. acidのスポットのみを認めた。

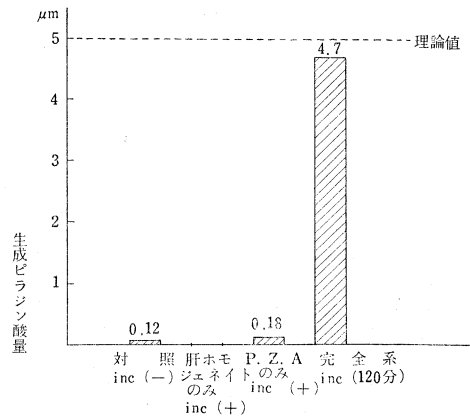
図3 白鼠肝ホモジェネイトによるPyrazinamideの分解



次に好氣的条件下で Warburg 検圧装置を用い、全量5μMのPZAを基質として反応させた場合の成績を図4に示した。酵素材料としては家兎および白鼠の肝ホモジェネイトを用い、酸素消費量を測定した後P. acid量を定量した。肝ホモジェネイトの組織呼吸は、PZAおよび生成P. acidにより僅かに促進されることが認められた。本反応停止後、これらの濾液につきP. acidの定量を行つた結果、対照として incubate しなかつたものに比して完全反応系ではPZAは4.7μM(約95%)が2時間で分解され、PaperchromatographyによりP. acid

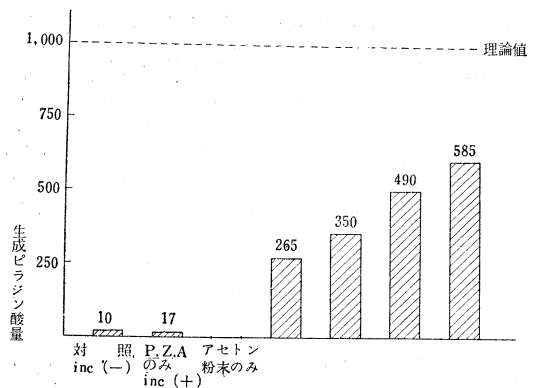
のみの生成を認めた。すなわち、肝ホモジェネイトによる本反応には酸素消費を伴わないことが認められた。

図4 白鼠肝ホモジェネイトによるPyrazinamideの分解(好氣的条件)



さらに白鼠の肝ホモジェネイトより法の如く調整したアセトン乾燥粉末を20mg/mlになるように蒸留水に再浮遊させたものを粗酵素液として使用した。嫌氣的条件下で全量1000γのPZAを添加して2時間まで反応させた成績を図5に示した。2時間で約60%が分解されP. acidを生成していることが認められた。

図5 白鼠肝ホモジェネイトのアセトン粉末によるPyrazinamideの分解



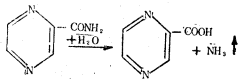
なお家兎および白鼠の腎臓につき肝ホモジェネイトの場合と同様の実験をいろいろと試みたが、いずれもP. acidの生成は全く認められなかつた。

考案

McCune らの報告以来、PZAはINHと併用する時は強力な抗結核作用を示すことが認められた。しかしながらPZAは試験管内ではほとんど抗結核作用を示さない。この矛盾から著者らはPZAが生体内で何か有効な物質に変化する可能性を予測したのであるが、PZA投与患者尿も前述PI物質として単離したのも、ま

たP II物質ならびに P. acidにもいずれも認むべき結核菌発育阻止作用を示さず、生体内で有効な物質に変化する証拠は得られなかった。

一方、Allen ら³⁾のモール塩による血中濃度ならびに尿中排泄量の定量成績は、投与したP Z Aの大部分がP. acidになることを示している。著者ら¹⁾もこの事実を認め、掛見ら⁷⁾をはじめ三宅⁸⁾、川瀬⁹⁾らも同様のことを発表している。今回著者らはこのP Z Aから P. acidへの分解反応を試験管内で試みた結果、家兎および白鼠の肝ホモジェネイトおよび同アセトン乾燥粉末はP Z Aを分解して P. acid を生成する強力な酵素を持っていることを見出した。本反応は酸素消費を伴わず、無気的条件下でも遂行される故に、水解的脱アミド反応(Hydrolytic deamidation) であると考えられる。腎ホモジェネイトには本酵素作用のないことから生体内では P. acid の生成場所として肝臓が大きな役割を果しているものと考えて差支えない。その酵素活性の強力なことからみても生体内ではP Z Aの多くの部分が肝臓で P. acidになるものと考えられる。



したがってP Z Aから上図の如き水解的脱アミド反応により生成された P. acid の代謝産物としては、N-methyl pyrazinoic acid, Pyrazinuric acid (Pyrazinoyl glycerne), Pyrazinoic acid の Glucuronide, 6-Hydroxy-Pyrazinoic acid から同 Pyrazone の生成, 他に Glutamine, Ornithine との Conjugates, ならびに同 Mercapturic acid 物, 等の生成を予想して追及を行っている

が、未だP I物質以外に捕捉確認に至らない。

結 論

1) 家兎および白鼠の肝ホモジェネイトは、in vitro で水解的脱アミド反応により Pyrazinamide より Pyrazinoic acid を生成する。

2) 腎ホモジェネイトには本酵素活性を認めない。

終りに臨み、終始御指導御鞭撻を賜り御校閲下さった恩師堂野前維摩郷教授、河盛勇造助教授に心から感謝致します。

(本研究は、昭和31年5月17日第4回日本化学療法学会総会において発表した)

文 献

- 1) 伊藤文雄他：結核, 31: 180, 1956.
- 2) 山本 実他：Chemotherapy, 5, 15: 1956.
- 3) Allen, W.S. et al. : Anal. Chem., 25: 895, 1953.
- 4) Potter, V.R. & Elvehjem, C.: J. Biol. Chem., 114: 495, 1936.
- 5) 青木隆一他：結核, 投稿中.
- 6) McCune, M. et al. : Jr. of the Conference on the chemotherapy of tuberculosis, 66~71, Feb., 1955. *
- 7) 掛見喜一郎他：第9回日本薬学大会発表.
- 8) 三宅尉進：結核, 31, 増刊号: 270, 1956.
- 9) 川瀬好生：結核, 31, 増刊号: 271, 1956.