

Cycloserine の抗菌作用に対する DL- α -Alanine の拮抗について第 1 報 Cycloserine の各種細菌発育阻止作用に及ぼす DL- α -Alanine の影響

溝 端 久 夫

大阪大学医学部第三内科学教室 (主任 堂野前維摩郷教授)

大阪府立羽曳野病院 (院長 堂野前維摩郷博士)

受付 昭和 32 年 10 月 4 日

緒 言

広スペクトル抗生物質の 1 つである Cycloserine (D-4-Amino-3-Isoxazolidone¹⁾, 以下 CS と略) は, 広くグラム陽性および陰性菌に有効であるのみならず, 結核菌に対しても抗菌力を有し, 臨床的にも結核症や尿路感染症等に使用されている。

著者は CS がその化学構造上 Serine, Alanine 等に関連を有する点より, CS の静菌作用に対する各種アミノ酸およびビタミン等の影響について実験を行い, 結核菌 (人型 H₃₇Rv 株, BCG, 鳥型竹尾株) および Pseudomonas aeruginosa, Bacillus subtilis, Escherichia coli に対する CS の試験管内発育阻止力に対し, DL- α -Alanine が一定濃度範囲内において拮抗することを認めためたので, その成績を報告する。

実験材料および方法

結核菌は人型菌 H₃₇Rv 株, BCG, 鳥型菌竹尾株を使用し, 5% 人または家兔血清および, Albumin 加 Kirchner 培地 (pH7.2) に最終濃度 0.05mg/ml 湿菌量となるように調製した菌液を接種培養し, 2 週間後に判定した。

一般細菌としては Pseudomonas aeruginosa HM 株, Bacillus subtilis NRRL 558 株, Escherichia coli UK T-B 株および E. coli K-12 株 (以上は大阪大学微生物病研究所および同医学部生化学教室より分与を受けた) を使用し, 37°C で一昼夜継代培養せるものを最終濃度 0.05mg/ml (湿菌量) 宛 Uschinsky 培地 (pH 7.2) に接種培養し, 24~48 時間後に菌発育の有無を判定した。

実 験 成 績

I) 人型結核菌 H₃₇Rv 株を用いた実験

(1) 各種物質の影響

まず各種アミノ酸を添加して影響をみた。すなわち, Glycine, DL- α -Alanine, DL- β -Alanine, DL-Valine, L-Leucine, DL-Isoleucine, DL-Serine, DL-Threonine, L-Asparagine, L-Sodium Aspartate, L-Sodium Glutamate, DL-Phenylalanine, L-Tyrosine, L-Cysteine, L-Cystine, DL-Methionine, L-Arginine-HCl, L-Lys-

ine-HCl, L-Proline, L-Histidine-HCl および DL-Tryptophan の 21 種のアミノ酸について, CS 10 γ /ml を加えた培地に, それぞれ最終濃度 10 γ /ml および 100 γ /ml となるように調製した溶液を添加した。なお難溶性の物質は懸濁液として添加した。

その成績は表 1 の如く DL- α -Alanine を添加した場合にのみ, 対照と同程度の菌発育を認めた。

表 1 CS の結核菌発育阻止作用に及ぼす DL- α -Alanine および他のアミノ酸の影響

培地 5% 人血清加 Kirchner (pH7.2)

菌株 H₃₇Rv 接種菌量 最終濃度 0.05mg/ml (湿菌量)

対	照	++
CS (Cycloserine) 10 γ /ml		--
CS 10 γ /ml + Glycine	(10 γ /ml 100 γ /ml)	--
CS 10 γ /ml + DL- α -Alanine	(10 γ /ml 100 γ /ml)	+ ++
CS 10 γ /ml + DL- β -Alanine	(10 γ /ml 100 γ /ml)	-- --
CS 10 γ /ml + DL-Serine	(10 γ /ml 100 γ /ml)	-- --
CS 10 γ /ml + DL-Serine	(500 γ /ml 1000 γ /ml)	-- --

(以下他のアミノ酸については省略)

判定 2 週間培養, -- 増殖を認めず

+ 僅かに増殖

+ 管底に増殖

++ 表面管壁まで増殖

次に脂肪酸およびプリン, ビリミジン塩基として, Sodium Pyruvate, α -Keto-Glutaric acid, Oxalacetic acid, Sodium Lactate, Sodium Propionate, Sodium Acetate について検討したが, いずれも影響がなく, また Hypoxanthine, Xanthine, Uracil, Thymine, Guanine-HCl および Adenine も拮抗現象を示さなかつた。

さらに核酸についても実験を行つたが, リボ核酸, デスオキシリボ核酸ともに影響なく, Glutathion, Glycylglycine, D-Glucosamine-HCl も検討したが, CS による菌発育抑制は回復されなかつた。

なお糖質については, Glucose, Galactose, Mannose, Saccharose, Trehalose, Laevulose, Sucrose, Inositol の

影響を、鳥型菌竹尾株を用い検討したが拮抗現象を認めず、また Sodium Fumarate, Sodium Malate, Sodium Succinate, Sodium Formate も同様に影響を示さなかつた。

ビタミン類については Vitamine B₁, Vitamine B₂, Vitamine B₆, Pyridoxal-HCl, Pyridoxamine, Vitamin B₁₂, Nicotinic acid, Nicotinamide, Folic acid, Ca-Pantothenate, Biotin, p-Aminobenzoic acid および L-Ascorbic acid について検討したが、このうちアスコルビン酸のみが 100 γ /ml の添加により菌発育を認め、CS の静菌作用に影響を与える如き観を呈した。

アスコルビン酸の抗結核菌作用については、Myrvik²⁾らの報告にもある通り、本実験においては 500 γ /ml で H₃₇Rv 株の発育を抑制したが、この抗菌濃度以下の 100 γ ~250 γ /ml の添加により拮抗現象が認められた。

(2) CS と DL- α -Alanine との拮抗について

上述の如く各種アミノ酸のうち DL- α -Alanine のみが CS と拮抗することを見出したので、さらに以下の如く各種条件について検討した。

表2はCSとDL- α -Alanineとの量的関係を示した成績であるが、CS 10 γ ~50 γ /ml の濃度範囲において約1/2量のDL- α -Alanineの添加により、CSの静菌作用が消費されるのを認めた。なお本実験条件下ではCS濃度75 γ /ml以上においては、大量のDL- α -Alanineの添加を行つても何等影響を示さなかつた。

表2 CSの結核菌発育阻止作用に及ぼすDL- α -Alanineの影響

培地5%人血清加 Kirchner (pH7.2)
菌株H₃₇Rv接種菌量 最終濃度0.05mg/ml (湿菌量)

DL- α -Alanine γ /ml	Cycloserine γ /ml									
	0	5	10	15	20	25	50	75	100	500
0	+	+	-							
5		+	+	±		-				
10	+	+	+		+				-	
15		+		+	+	+				
20	+		+	+	+	+	-		-	
25				+		+	±	-		
50		+	+		+	+	+		-	
75			+	+	+	+			-	
100	+		+		+		+	-	-	-
500										-

2 週間培養判定, -…発育を認めず
±…僅かながら発育らしきもの
+…管底~表面に発育を認む

(3) Transamination との関係

次にDL- α -Alanineのかわりに焦性葡萄糖ソーダとアスパラギン酸ソーダまたはグルタミン酸ソーダの α -Alanine合成反応系を添加した。すなわち培地中の窒素源であるアスパラギンを除いた Kirchner 培地で実験したが、いずれも菌発育を認めなかつた。

(4) CS-DL- α -Alanine 拮抗現象に対するVB₆, ATPの影響

表3に示した如く Pyridoxine 塩酸塩または Pyridoxal 塩酸塩および ATP の添加は結核菌の発育に何等影響を示さないが、CS-DL- α -Alanine 拮抗系に Pyridoxine 塩酸塩および ATP を添加すると、前記の拮抗濃度範囲がCS 10 γ ~100 γ /mlまで拡大されるのを認めた。

(5) CS-DL- α -Alanine拮抗現象に対するGlycineの影響

Snell³⁾は Pyridoxine 要求株 Streptococcus lactis R を用い、Pyridoxine, α -Alanine と Glycine の相互関係について検討し、 α -Alanine が Pyridoxine の代用となりうることおよび Glycine がこの α -Alanine の代用効果を阻害することを報告している。

著者もCS-DL- α -Alanine 拮抗に対するGlycineの影響について実験を行つたが、その結果は、DL- α -Alanineと共にGlycineを添加すると、相当量のGlycineを添加した場合(約5mg/ml)に、DL- α -Alanineによる拮抗現象が消失するのを認めた。なおこの程度のGlycineによつては菌の発育は著明な影響を受けなかつた。

(6) DL- α -Alanine とDあるいはL- α -Alanine との比較

以上の実験においては α -AlanineのうちDL体を用いたので、D体またはL体のそれぞれの効果をDL体のそれと比較検討した。その結果は、H₃₇Rv株をはじめBCG、鳥型菌竹尾株のいずれの場合も、D体はDL体とほぼ同程度にCSとの拮抗現象を認めたが、L体を用いた時はその効果が前記二者に比して弱く、やや遅れて菌増殖を示した。

II] 鳥型菌竹尾株を用いた実験

次に上述の人型菌H₃₇Rv株におけると同様の実験を鳥型菌竹尾株を用いて行つた。

鳥型菌竹尾株はCS濃度100 γ ~125 γ /mlにて発育を抑制されるので、CS 125 γ /mlに対して種々の濃度のDL- α -Alanineを添加したが、DL- α -Alanine 25 γ /ml以上を加えた場合に拮抗現象が認められた。しかしCS濃度を増加し500 γ /ml以上の高濃度においては、相当量のDL- α -Alanineを添加しても菌発育は認められなかつた。すなわち鳥型菌竹尾株においては、CS濃度100 γ ~500 γ /mlの濃度範囲でDL- α -Alanineによる拮抗現象が認められた。

本拮抗現象に対するPyridoxine塩酸塩およびATP

表3 CSに対する DL- α -Alanine の拮抗に及ぼす Pyridoxine + ATP の影響
 培地 5% 人血清加 Kirchner (pH7.2)
 菌株 H₃₇Rv 接種菌量 最終濃度0.05mg/ml (湿菌量)

対		照		
CS		12.5 γ /ml		-
DL- α -Alanine		100 γ /ml		++
Pyridoxine 100 γ /ml + ATP 100 γ /ml				++
CS	12.5 γ /ml + DL- α -Alanine 12.5 γ /ml			++
"	25 γ + "	25 γ		++
"	37.5 γ + "	37.5 γ		+
"	50 γ + "	50 γ		±
"	75 γ + "	75 γ		-
"	100 γ + "	100 γ		-
CS	12.5 γ /ml + DL- α -Alanine 12.5 γ /ml + Pyridoxine-HCl 12.5 γ /ml + ATP 12.5 γ /ml			++
"	25 γ + " 25 γ + " 25 γ			++
"	37.5 γ + " 37.5 γ + " 37.5 γ			++
"	50 γ + " 50 γ + " 50 γ			+
"	75 γ + " 75 γ + " 75 γ			+
"	100 γ + " 100 γ + " 100 γ			±
CS	25 γ /ml + DL- α -Alanine 25 γ /ml + Pyridoxine-HCl 250 γ /ml + ATP 250 γ /ml			++
"	50 γ + " 50 γ + " 500 γ + " 500 γ			++
"	100 γ + " 100 γ + " 1000 γ + " 1000 γ			+
CS	12.5 γ /ml + Pyridoxine-HCl 12.5 γ /ml + ATP 12.5 γ /ml			-
"	12.5 γ + " 100 γ + " 100 γ			±
"	12.5 γ + " 1000 γ + " 1000 γ			±

(判定基準 表1と同じ)

の添加の影響を、CS濃度500 γ /ml 以上において実施検討してみたが、明瞭な効果を認めえなかつた。

次にアスコルビン酸の影響については、CS 100 γ /ml に対して 100 γ ~1000 γ /ml のアスコルビン酸の添加により、軽度ながら拮抗現象を認めた。

またDおよび L- α -Alanine の本拮抗現象における効果の比較および Glycine の影響については、人型菌H₃₇Rv株におけると同様の傾向を認めた。

III] 一般細菌を用いた実験

まず寒天加合成平板培地でパルプーディスクを用いる方法(Disk-method)を応用し、数種の一般細菌のうちより、比較的単純な合成培地で発育し、明瞭にCS-DL- α -Alanine 拮抗現象を示すものとして、Pseudomonas aeruginosa, Bacillus subtilis および Escherichia coli の3種を選び、以下の如く実験を行い、表4の如き成績を得た。

すなわち Uschinsky 液体培地において、Pseudomonas aeruginosa HM株は400 γ ~500 γ /ml のCS濃度で発育を阻止されるが、CSの10倍量のDL- α -Alanine の添加によりCS濃度600 γ /ml においても明瞭な拮抗現象を認めた。

表4 CSのE. coli 発育阻止作用に及ぼす DL- α -Alanine の影響

培地 Uschinsky (pH7.2)
 菌株 Escherichia coli UKT-B (阪大微研)
 接種菌量 最終濃度0.05mg/ml (湿菌量)

対		照		
CS	25 γ /ml			+
"	50 γ			±
"	75 γ			-
"	100 γ			-
"	125 γ			-
"	150 γ			-
CS	25 γ /ml + DL- α -Alanine 250 γ /ml			+
"	50 γ + " 500 γ			+
"	75 γ + " 750 γ			+
"	100 γ + " 1000 γ			+
"	125 γ + " 1250 γ			-
"	150 γ + " 1500 γ			-

判定24時間 -…増殖を認めず
 ±…僅かに増殖
 +…対照を基準とし同程度増殖

Bacillus subtilis NRRL 558 株では、CS 濃度 25 γ ~50 γ/ml で発育阻止が認められるが、DL- α -Alanine の添加により100 γ/ml のCS 濃度にて菌発育を認めた。

Escherichia coli UKT-B株はCS 50 γ ~75 γ/ml の濃度で発育が抑制せられ、これがDL- α -Alanineを加えることにより100 γ/ml のCS 濃度まで拮抗現象を示した。なお*E. coli* K-12株ではCS 25 γ ~50 γ/ml の濃度で発育を抑制されるが、DL- α -Alanineの添加により100 γ/ml のCS 濃度でも菌の増殖を認めた。

考 案

以上著者はCS が Serine, Alanine らと化学構造上関連を有し、またCS を酸で加水分解すればD(-)-Serine と Hydroxylamine を生ずる^{4, 5)}との報告もあるので、Serine との拮抗を予想して本実験を行ったが、Serine では認むべき影響がなく、DL- α -Alanine とCS との間に明らかに拮抗現象を認めた。本現象は結核菌人型H₃₇Rv株、BCG、鳥型竹尾株のみならず、一般細菌においても認められる点より、CS の広スペクトル抗菌作用と考え合せ、CS の作用機作の本態と関係が深いものと想像される。

また一方 Alanine の前駆物質あるいは代謝産物と考えられる種々の物質では影響がなく、さらに Transamination との関係より Alanine を合成する母質となりうる反応系を添加しても拮抗効果を認めえなかつたことよりCS の存在下においては、これら細菌の菌体内における Alanine の合成が、さまたげられているのではないかと考えている。青木⁶⁾の報告したCS による Transamination の阻害はその一端を示すものと考えられる。他方CS の静菌作用に対するDL- α -Alanine の拮抗がPyridoxine 塩酸塩およびATPの添加により、ある程度増強せられる現象機序については現在なお明らかでない。

なお α -Alanineの異性体のうちDL体、D体、L体ともにCS に対し拮抗効果を示すが、L体はややその作用が弱いようであった。

Glycine の影響については、Snell らが、ある種のVB₆要求乳酸菌がVB₆の代りに α -Alanineを利用し、その際に α -Alanineが大量のGlycineにより拮抗されることを報告しているが、本実験においてもCS-DL- α -Alanine 拮抗に対して大量のGlycineの添加が、DL- α -Alanine による拮抗現象を阻害するのを認めた。

さて、Alanine は生体内に正常状態において存在するものであり、Harper⁷⁾は人血漿中に2.4~7.6mg%, Braun⁸⁾は正常血清中に27 γ/ml 存在すると報告しているが、CS が生体内で抗菌力を発揮する場合も、Alanine はおそらく Reversing factor となるものと考えられる。

次にアスコルビン酸については、アスコルビン酸その

ものが抗結核菌作用を有することがすでに報告されており、今回の実験においてはその菌発育阻止濃度以下でCS の抗菌作用を減弱せしめることを認めたが、その程度はDL- α -Alanine に比して遥かに弱かつた。

かくの如くCS の静菌作用はDL- α -Alanineにより明らかに拮抗されるが、本現象の発現機序ならびにCS の作用機序において占める地位等については、全く不明であり、なお今後の研究に俟たねばならない。

結 論

1) 結核菌(人型H₃₇Rv株、BCG、鳥型竹尾株)および *Pseudomonas aeruginosa* HM 株、*Bacillus subtilis* NRRL 558株、*Escherichia coli* UKT-B株ならびにK-12株において、CS のこれら細菌発育阻止力は一定濃度範囲内にてDL- α -Alanine により拮抗される。

2) 結核菌においては、D-およびL- α -Alanine ともにDL- α -Alanine と同様にCS の抗菌作用に対し拮抗するが、L- α -Alanine の効果は他の二者に比してやや弱い。

3) 結核菌におけるCS-DL- α -Alanine 拮抗現象はPyridoxine 塩酸塩およびATPの添加により僅かながら増強される。

4) 結核菌に対するCS-DL- α -Alanine の拮抗現象は大量のGlycineにより減弱せしめられる。

5) 結核菌においてアスコルビン酸が、軽度ながらCS の抗菌作用を減弱せしめる。

本研究に対して終始御懇篤なる御指導、御校閲を賜わつた恩師堂野前教授ならびに伊藤文雄博士に深甚なる謝意を表するとともに、直接御指導と御鞭撻を戴いた山本実博士に衷心より感謝する。また実験手技について御教示を賜わつた塩野義製薬研究所、西村治雄博士に深謝する。

本論文の要旨は第13回および第14回日本結核病学会近畿地方会において発表した。

文 献

- 1) R.L. Harned, P.H. Hidy & E.K. LaBaw: *Antib. & Chem.*, 5: 204, 1955.
- 2) Q. Myrvik, R.S. Weser, B. Honglum & L.R. Berger: *Am. Rev. Tbc.*, 69: 406, 1954.
- 3) E.E. Snell & B.M. Guirard: *Proc. Nat. Acad. Sc.*, 29: 66, 1943.
- 4) G.M. Conzelman: *Antib. & Chem.*, 5: 444, 1955.
- 5) C.H. Stammer, A.N. Wilson, F.W. Aolly & K. Folkers: *J. Am. Chem. Soc.*, 77: 2346, 1955.
- 6) 青木: 結核, 印刷中.
- 7) H.A. Harper, M.E. Hutchin & J.R. Kimmel: *Pro. Soc. Biol. & Med.*, 80: 768, 1952.
- 8) P. Braun, S. Kisfaludy & M. Dubsy: *Acta Med. Acad. Sci. Hung.* 7: 147, 1955.