

2, 3 抗結核剤のアミノ酸代謝に及ぼす影響

第1報 イソニコチン酸ヒドラジッド投与白鼠におけるアミノ酸代謝

松 本 徹 二

大阪大学医学部第三内科学教室 (主任 堂野前 維摩郷教授)

国立大阪療養所 (所長 岩崎 祐治)

受付 昭和 32 年 10 月 26 日

緒 言

イソニコチン酸ヒドラジッド (INH) の大量投与の際に、末梢神経炎の如きビタミン B₆ (VB₆) 欠乏症状を起すことは臨床的にすでに多くの報告がなされている。また INH 投与時に尿中 VB₆ 排泄量の増加することは Vilter^{1) 2) 3)}、谷口⁴⁾により認められた。一方 Bone⁵⁾らは INH 投与動物に Tryptophan を負荷した際、尿中キサンツレン酸 (XA) の増量を報告したが、Rosen⁶⁾は白鼠を VB₆ 欠乏食で飼育した際には、XA の尿中排泄は著明であるが、INH 投与の際には著明でないことを認めた。

最近 INH の臨床的使用量は漸次大量に向う傾向にあるが、著者は INH 大量投与の VB₆ 酵素系に及ぼす影響を検討するため動物実験を試みた。すなわち INH の大量を連日投与した白鼠の肝臓における VB₆ の関与する酵素系として、Tryptophan 代謝、ことに Kynurenine transaminase^{7, 8)} および Tyrosine transaminase^{9) 10)} ^{11) 12)} の活性を健常白鼠のそれと比較検討した。

一方 INH の VB₆ 酵素系に対する阻害については、堂野前、伊藤¹³⁾らは南瓜のグルタミン酸脱炭酸酵素、酒井¹⁴⁾は BCG の Glutamic-aspartic transaminase、山本¹⁵⁾は BCG の Cysteine desulfhydrase、米田^{16) 17)} ¹⁸⁾は大腸菌の Tryptophanase, Arginine decarboxylase、庄司^{19) 20)}は鳥型結核菌のグルタミン酸脱炭酸酵素につきそれぞれ報告しているが、著者は白鼠肝の Kynurenine transaminase および Tyrosine transaminase に及ぼす INH およびその誘導体の影響をも併せて検討したので以下それらの成績を報告する。

実験材料および方法

基本飼料：乳製カゼイン 20g、澱粉 60g、白糖 10g、食塩 2g ビタミン B₁末 0.5g、寒天 2g、バター 10g に水 100cc を加え、重湯煎上でよくまぜ団子となし充分に与えた。

体重 150~200g の雄性白鼠を上記飼料にて飼育し、これを対照群 (I 群)、実験群 (II, III, IV 群) とし、各群 4 匹を用い、II 群には INH 30mg/kg、III 群には 50mg

/kg、IV 群には 70mg/kg を連日大腿部に皮下注射し、対照群には同量の生理的食塩水を注射した。

(1) Tryptophan 負荷試験

INH 投与白鼠の体重が約 20% 減少した際、実験、対照群共に Tryptophan 500mg/kg を大腿部に皮下注射しその 24 時間尿を濃縮して濾紙クロマトグラフィーを行つた。展開剤としてはブタノール 4、醋酸 1、水 1 の比の醋酸ブタノールを使用し一次元、上昇法を用いた。呈色反応としては塩化鉄反応、Nynhydrin 反応、Ehrlich Diazo 反応、Ehrlich Aldehyde 反応および蛍光反応を行つた。

(2) Kynurenine transamination

上記の基本飼料にて白鼠を飼育し、実験動物には INH 50mg/kg を大腿部に連日皮下注射、対照動物には同量の生理的食塩水を大腿部に皮下注射し、約 50 日にて INH 投与白鼠の体重減少および腹部の脱毛症状を認めた上で実験を行つた。

酵素液は脱血死させた白鼠の肝を同量の海砂で磨砕し予め冷却した同量の 0.9%KCl で、1 時間氷室中にて抽出後、3000 回転、30 分間遠心沈澱しその上清を用いた。

実験条件は次の如くである。IM Phosphate Buffer (pH7.5) 0.3ml、酵素液 1.0ml、L-Kynurenine 500 γ /0.5ml、添加物としては α -ケトグルタル酸 (α -KG)、ATP、Pyridoxal (PAL) を適宜添加、対照には、Kynurenine の代りに蒸溜水を用いた。かくて反応液総量を 3.0ml とし 3 時間、37°C にて反応後、20% 三塩化醋酸 3.0ml にて反応停止、その除蛋白濾液 4.0ml につき大谷、本田^{21) 22)} 反応により Kynurenine の定量を行つた。

(3) INH およびその誘導体の健常白鼠肝抽出酵素による Kynurenine 分解に対する影響。

前記方法と同様にして調製した健常白鼠肝抽出酵素を使用し、上記と同様の反応条件にて実験を行つた。INH およびその誘導体としては Isonicotinic acid hydrazide Na-methansulfonate (IHMS)、Isonicotinic acid hydrazide Na-glucuronate (INHG)、N-Isonicotinyl-N'-o-carboxybenzylidene hydrazine (INH-CBA)、N-Isonicotinyl-N'- α -carboxyethylidene hydrazine

(I P N) をそれぞれ $0.3ml$ (終末濃度 $10^{-3}M$) を加え Kynurenine 分解に対する各薬剤の態度を検討した。

(4) Tyrosine 負荷試験

I N H 投与白鼠, 対照白鼠に Tyrosine $1g/kg$ を懸濁水溶液にして大腿部に皮下注射し24時間尿を採取, 濃縮して濾紙クロマトグラフィーを行つた。展開剤としてブタノール4, 醋酸1, 水1の比の醋酸ブタノールを使用し, 一次元, 上昇法を行つた。呈色反応としては Pauly Diazo 反応, Millon 反応, Nynhydrin 反応, 塩化鉄反応を行つた。

(5) Tyrosine transamination

Kynurenine transamination の場合と同様 I N H 投与白鼠肝を同量の海砂で磨碎し, 3倍量の M/15 Phosphate Buffer (pH 7.2) にて氷室中で1時間抽出, 3000回転, 30分間遠心沈澱し, その上清を酵素液として使用した。

反応条件は次の如くである。基質として L-Tyrosine あるいは Homogentisic acid それぞれ $2\mu M/0.5ml$, 添加物として ATP, PAL, α -KG を適宜加え M/10 Phosphate Buffer (pH 7.2) 中にて, Warburg 検圧計により $37.5^{\circ}C$, 1時間反応を行い酸素消費を検討した。

Tyrosine の定量は Udenfriend²³ 法, Homogentisic acid の定量は Briggs²⁴ 法によつた。

(6) I N H およびその誘導体の 健常白鼠肝抽出酵素による Tyrosine 分解に対する影響。

上記 I N H およびその誘導体を終末濃度 $10^{-3}M$ に添加し, Tyrosine 分解に対する態度を上記同様 Warburg 検圧計, Udenfriend 法にて検討した。

実験成績

基本飼料にて飼育した対照群 (I 群) の体重は著明に増加するが, I N H 投与の II, III 群においては I 群に比し体重の増加率が少なく, かつ長期投与により減少の傾向を示した。I 群および II 群においては VB₆ 欠乏症状はほとんど認められないが, II 群中2例に長期投与の際腹部脱毛, 亢奮状態がみられた。III 群および IV 群においては長期投与の際ほとんど全例に脱毛, 亢奮, 狂燥状態が認められ, IV 群は 3~5 週間にて死亡した。

(1) Tryptophan 負荷試験

Tryptophan を負荷した I N H 投与白鼠尿において, XA, 3-Hydroxykynurenine, Kynurenine に相当する Spot を認めたが, 対照白鼠に負荷した場合にはこれらの Spot を認めなかつた。

(2) Kynurenine transamination

表1の如く, I N H 投与白鼠肝酵素活性は対照に比し 62% の活性低下を示し, ATP, PAL の添加により無添加時活性の 139% (対照は 25%), α -KG 添加で 73% (対照は 27%), ATP + PAL + α -KG 添加で 172%

(対照は 28%) の賦活をそれぞれ認めた。

(3) I N H およびその誘導体の 健常白鼠肝抽出酵素による Kynurenine 分解に対する影響

表2に示す如く, I N H および IHMS は Kynurenine 分解に対し高度の阻害を示したが, 他の誘導体の阻害は両者に比し低率であつた。

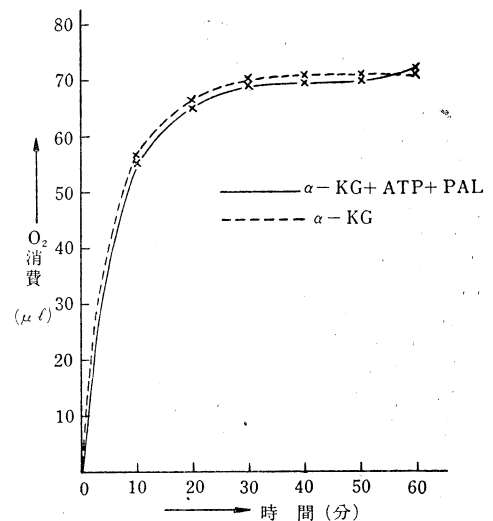
(4) Tyrosine 負荷試験

Tyrosine を負荷した I N H 投与白鼠尿においては, 濾紙クロマトグラフィーにより Tyrosine に相当する Spot およびその他 1~2 の Spot を認めたが, 対照白鼠においてはこれらの Spot を認めなかつた。なお両者共 Homogentisic acid に相当する Spot は証明されなかつた。

(5) Tyrosine transamination

図1に示す如く, 対照白鼠肝抽出酵素では α -KG の

図1 健常白鼠肝抽出酵素による Tyrosine の分解 (酸素消費による)



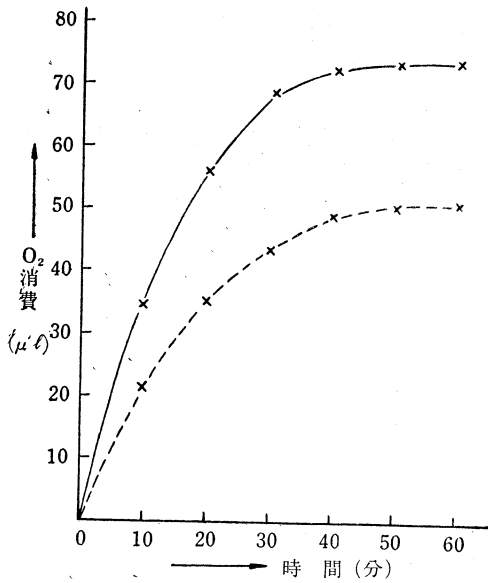
ATP 500 γ / 0.2ml, PAL 200 γ / 0.2ml.
 α -KG 1mg / 0.2ml

みの添加, α -KG, ATP, PAL 三者添加の場合でもほとんど同程度の酸素消費を示し, 反応終了後 Tyrosine の定量を行つたところ, 表3に示す如く両者共 100% の分解を示した。

I N H 投与白鼠においては図2に示す如く, ATP, PAL, α -KG 三者の添加によりほぼ理論値近くの酸素消費を示し, かつ Tyrosine 分解も 100% を示すが (表3), α -KG のみの添加では酸素消費は約 $50\mu l$ にすぎず, かつ Tyrosine は約 65% の分解しか示さない (表3)。なお ATP, PAL 添加および無添加の場合には対照動物と同様ほとんど酸素消費を示さず, Tyrosine 分解もほとんど認められなかつた (図2, 表3)。

次に Homogentisic acid を基質とした際の酸素消費について検討したところ, I N H 投与白鼠, 対照白鼠共に

図2 INH投与白鼠肝抽出酵素による Tyrosine の分解 (酸素消費による)



ATP 500 γ /0.2ml, PAL 200 γ /0.2ml.
 α -KG 1mg/0.2ml.

表1 INH投与白鼠肝抽出酵素による Kynurenine 分解

	Kynurenine 分解量 (γ)	
	対 照	INH投与白鼠
無 添 加	258 γ	98 γ
ATP (1mg) + PAL (200 γ)	325 γ	254 γ
α -KG (500 γ)	327 γ	170 γ
ATP + PAL + α -KG	351 γ	267 γ

表2 健常白鼠肝抽出酵素による Kynurenine 分解 に対する INHおよびその誘導体の影響

INHおよびその誘導体	阻 害 %
INH	70 ~ 81 %
IHMS	61 ~ 71 %
INH G	24 ~ 40 %
INH-CBA	28 ~ 48 %
IPN	25 ~ 39 %

図3に示すようにほぼ同程度の酸素消費を示し、反応終了後 Homogentisic acid の定量を行ったところ両者共100%の分解を示した。

(6) INH およびその誘導体の 健常白鼠肝抽出酵素

表3 INH投与白鼠, 对照白鼠肝抽出酵素による Tyrosine 分解 (Tyrosine 定量による)

添 加 物	対 照		INH投与白鼠	
	分解量 (μ M)	分解率 (%)	分解量 (μ M)	分解率 (%)
—	0.1	5.0	0.15	7.5
α -KG	2.0	100.0	1.30	65.0
ATP + PAL	0.2	10.0	0.24	12.0
α -KG + ATP + PAL	2.0	100.0	2.00	100.0

図3 INH投与白鼠, 对照白鼠肝抽出酵素による Homogentisic acid の分解 (酸素消費による)

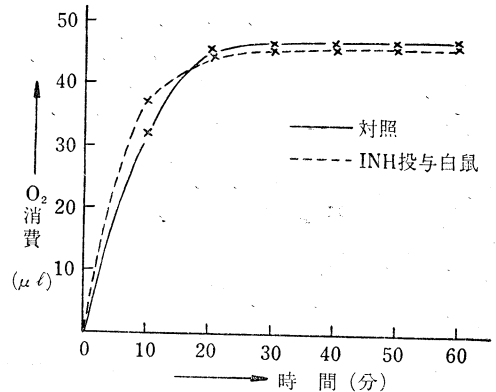
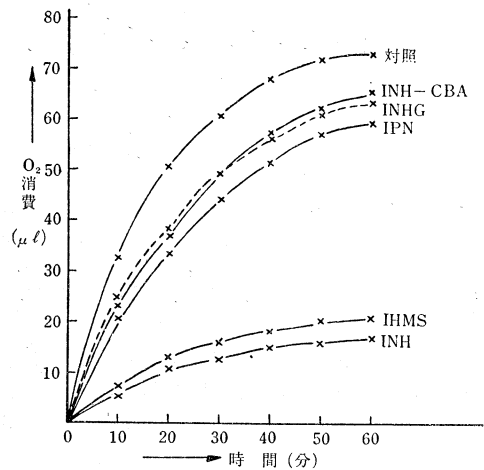


図4 健常白鼠肝抽出酵素による Tyrosine 分解 に対する INHおよびその誘導体の影響 (酸素消費による)



による Tyrosine 分解に対する態度。

図4に示す如く、INHおよびIHMS添加時の酸素消費は少なく、IPN, INH-CBA, INHGの場合は対照と大差なかつた。なお反応終了後 Tyrosine の定量を行ったところ、表4に示す如き阻害率を得た。すなわちINHおよびIHMSは高度の阻害を示すが、他の誘導体

表4 健常白鼠肝抽出酵素による Tyrosine 分解に対するINHおよびその誘導体の影響 (Tyrosine 定量による)

INHおよびその誘導体	阻 害 %
I N H	60 ~ 70 %
I H M S	50 ~ 55 %
I P N	5 %
I N H G	0 %
I N H - C B A	0 %

においては阻害はほとんど認められなかつた。

考 案

INH投与により Vilter^{1) 2) 3)} はVB₆の尿中排泄が増加しVB₆欠乏症を起すことを報告し、INHがPALとの Isonicotinyl hydrazone を形成して排泄されるために組織中のVB₆欠乏が起るといふ仮説を立てている。もしVB₆欠乏になつていならば Lepkovsky²⁵⁾らの報告にある如く、尿中XAの増量が認められる筈である。著者の実験においてもINH投与、Tryptophan 負荷の場合尿中XAの排泄を認めたが、さらにその前段階物質である3-Hydroxykynurenine, Kynurenineの排泄をも証明した。これはKynurenine transaminase 活性の低下により、Kynurenineよりキヌレン酸への道、さらにBraunstein²⁶⁾, Wiss²⁷⁾らの報告の如くキヌレナーゼの補酵素がピリドキサルリン酸であり、Kynurenineよりアントラニール酸、3-Hydroxykynurenineより3-オキシアントラニール酸への道が阻害を受け、相対的にKynurenineの蓄積、さらに核酸化によるXAへの移行がおこつたものと考えられる。

Tyrosineはまずtransaminationによりp-Hydroxyphenylpyruvateに移行しさらにHomogentisic acidを経て完全分解を受ける。さらにp-HydroxyphenylpyruvateよりHomogentisic acidまでの道には現在VB₆が関与する酵素系は認められておらず²⁸⁾、INH投与白鼠肝抽出酵素によるTyrosineの酸素消費がATP, PALの添加により初めて理論値近くなり、かつ、Homogentisic acid以下の酸化的分解において対照と変化が認められないのは、Tyrosine transaminase活性が低下しているものと考えられる。

谷口⁴⁾はINH投与時に尿中に増加するVB₆は主としてPyridoxalであると報告しているが、Pyridoxalの欠乏はこれを補酵素とするアミノ酸のアミノ基転位反応の活性を低下せしめると考えられるので、著者はKynurenine transaminase, Tyrosine transaminaseの活性を検討したところ、INH投与白鼠肝抽出酵素の活性は

対照のそれに比し低活性化しているのを認めた。

INHおよびその誘導体の作用機作については今日なお明らかではないが、酒井¹⁴⁾, 山本¹⁵⁾, 庄司^{19) 20)}らはINHのVB₆酵素系に対する阻害効果につき実験を行い、これらの阻害はINHがPyridoxalとHydrazoneをつくることによるものとの推察を行つている。しかし著者の実験ではINH誘導体もある程度の阻害効果を示し、この際、IHMSだけはINHと同程度の阻害を認めた。これらの成績は上記諸氏の推論と必ずしも合致しないので、INHおよびその誘導体のVB₆酵素系に対する阻害機序については今後なお検討を要するものと考えらる。

結 論

(1) INH大量連続投与白鼠において体重減少、脱毛、亢奮、狂燥等の症状発現を認めた。

(2) INH大量連続投与白鼠にTryptophanを負荷した際、尿中にXA, 3-Hydroxykynurenine, Kynurenineの排泄増加を認めた。

(3) INH大量連続投与白鼠肝抽出酵素のKynurenine transaminase, Tyrosine transaminaseは対照のそれに比し低活性化し、 α -KG, ATP, PALの添加により活性の賦活を認めた。

(4) INHおよびその誘導体は健常白鼠肝抽出酵素のKynurenine分解に対し直接阻害を示した。なおこの際INHおよびIHMSは高度の阻害を示した。Tyrosine分解に対してはINHおよびIHMS以外はほとんど阻害が認められなかつた。

稿を終るに臨み終始御懇切なる御指導御校閲を賜りました堂野前教授、御校閲を賜りました阪大生化学市原碩教授、御指導御鞭撻戴きました伊藤文雄博士、阪大生化学坂本幸哉助教授、和知勲氏、貴重な試薬を恵与された和歌山医大生化学古武彌人教授、実験協力者宇野鶴子氏に対し深甚なる謝意を表します。

この論文の要旨は昭和31年10月第11回国立病院療養所総合医学会、昭和31年11月第14回日本結核病学会近畿地方会、昭和32年4月第32回日本結核病学会総会において報告した。

文 献

- 1) Vilter, R.W.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 85: 389, 1954.
- 2) Vilter, R.W.: J. Lab. Clin. Med., 42: 335, 1953.
- 3) Vilter, R.W.: J. Am. Med. Assn., 156: 1549, 1954.
- 4) 谷口: ビタミン, 12: 65, 1957.
- 5) Boone, I.U., et al.: J. Lab. Clin. Med., 46:

- 549, 1955.
- 6) Rosen, F. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 88: 243, 1955.
- 7) 伊藤: Med. J. Osaka Univer., 3: 285, 1952.
- 8) 阪越: 未発表
- 9) Knox, W.E., and LeMay-Knox, M. : Biochem. J., 49: 686, 1951.
- 10) Cammarata, P. S. and Cohen, P.P. : J. Biol. Chem., 187: 439, 1950.
- 11) Bert, N. La Du, Jr., and Greenberg, D.M. : J. Biol. Chem., 190: 245, 1951.
- 12) 米谷: 大阪大学医学雑誌, 8: 61, 1956.
- 13) 堂野前・河盛・伊藤他: 最新医学, 7: 643, 1952.
- 14) 酒井: 結核, 29: 161, 1954.
- 15) 山本: 結核, 29: 195, 1954.
- 16) 米田: 生体の化学, 4: 176, 1953.
- 17) Yoneda, M., Kato, N. and Okajima, J. : Nature., 170: 803, 1952.
- 18) Yoneda, M. and Asano, N. : Science., 117: 277, 1953.
- 19) 庄司・山上: 結核, 増刊号, 121, 1954.
- 20) 庄司・山上・森: 日本結核病学会近畿地方会, 昭和29年.
- 21) 大谷・本田: 大阪医学会雑誌, 37: 1, 1938.
- 22) 今井: 大阪医学会雑誌, 37: 39, 1938.
- 23) Udenfriend, S. and Cooper, J. : J. Biol. Chem., 196: 227, 1952.
- 24) Briggs, A.P. : J. Biol. Chem., 51: 453, 1922.
- 25) Lepkovsky, S. and Nielson, N. : J. Biol. Chem., 144: 135, 1942.
- 26) Braunstein, A.E., Coryachenkova, E. V. and Pashkina, T.S. : Biokhimiya., 14: 163, 1949.
- 27) Wiss, O. : Z. Physiol. Chem., 293: 106, 1953.
- 28) Uchida, M., Suzuki S. and Ichihara, K. : J. Biochem., 41: 41, 1954.