

Kanamycin の作用機序に関する実験的研究

第 1 報 鳥型結核菌による安息香酸, ナイアシンおよびマロン酸の 適応的酸化におよぼす Kanamycin の影響について

林 昭

大阪大学医学部第三内科学教室 (主任 堂野前維摩郷教授)

受付 昭和 35 年 12 月 27 日

緒 言

Kanamycin (以下 KM と略) は、梅沢ら^{1)~3)}により *Streptomyces kanamyceticus* より分離せられた新抗生物質で、グラム陽性、陰性菌に広く抗菌力を有し、ことに *Mycobacteria* にも有効であることが認められている。最近 KM は、動物実験^{4)~14)}においても、臨床実験^{15)~18)}においてもその有効性が証明され、種々の急性および慢性感染症の治療にも用いられているが、なかんずく、肺結核症の臨床実験^{19) 20)}においては Streptomycin (以下 SM と略) に比すべき治療効果が実証されている。

しかるに本剤の作用機序に関しては、まだ報告に接しない。著者は、この点に関する一連の実験的研究を SM と比較して行ってきたが、今回は鳥型結核菌による安息香酸、ナイアシンおよびマロン酸の適応的酸化におよぼす KM の影響を、とくに SM および KM にそれぞれ感性および耐性株を用いて検討したのでその成績を報告する。

実験材料および実験方法

以下の実験には鳥型結核菌 (竹尾株) を用いた。SM 耐性菌 (2,000 $\mu\text{g/ml}$ 以上) は、本学微生物病研究所竹尾結核研掘研究室より分与を受け、KM 耐性菌 (2,000 $\mu\text{g/ml}$ 以上) は、KM 含有 Dubos 液体培地に継代培養して得た菌を使用した。これらの株をグリセリン・ブイヨン培地に 37°C、4 日間培養し、集菌後、生理的食塩水にて 3 回洗菌、湿菌量約 20 mg/ml になるごとく生理的食塩水に再浮遊させたものを酵素材料とした。

緩衝液としては、最終 M/15 磷酸緩衝液 (pH 7.0) を使用した。

基質としては、安息香酸、ナイアシンおよびマロン酸をそれぞれ 2~5 μM 使用した。また、KM 硫酸塩は明治製菓より、SM 硫酸塩は協和醸酵より供与せられたものを用いた。

上述の材料を 37°C、30 分間 Preincubation せるの

ち、ワールブルグ検圧法を用いて 5 時間にわたり酸素消費量を測定した。

実験成績

1. 鳥型結核菌による安息香酸の適応的酸化におよぼす KM の影響

図 1 に示すごとく、鳥型結核菌による安息香酸の適応的酸化は、KM 最終 100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度にて完全に阻害されるが、菌の自家呼吸への影響はほとんど認められない。

図 1 鳥型結核菌による安息香酸の適応的酸化におよぼす KM の影響

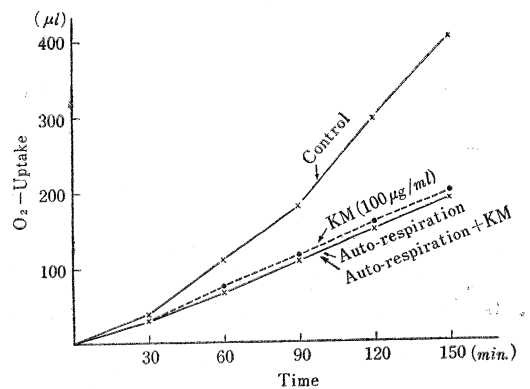


図 2 鳥型結核菌による安息香酸の適応的酸化におよぼす KM の影響

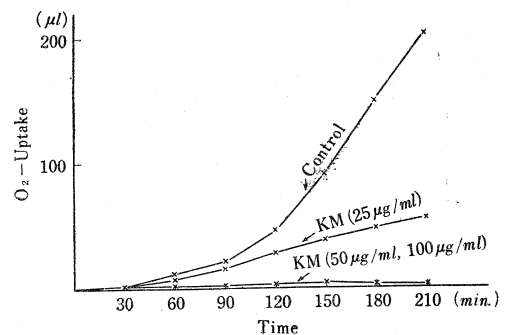
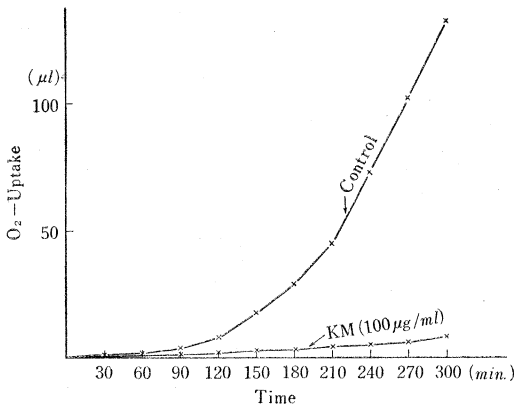


図2のごとく、KM 最終 $50 \mu\text{g/ml}$ 、あるいは $100 \mu\text{g/ml}$ の濃度では、安息香酸の適応的酸化は完全に阻害され、 $25 \mu\text{g/ml}$ では著明な阻害は認められるがその程度は不完全であった。

2. 鳥型結核菌によるナイアシンの適応的酸化におよぼす KM の影響

ナイアシンは、鳥型結核菌により一定の誘導期を経て酸化されるが、この酸化は KM 最終 $100 \mu\text{g/ml}$ の濃度にて完全な阻害を受けることを図3に示した。

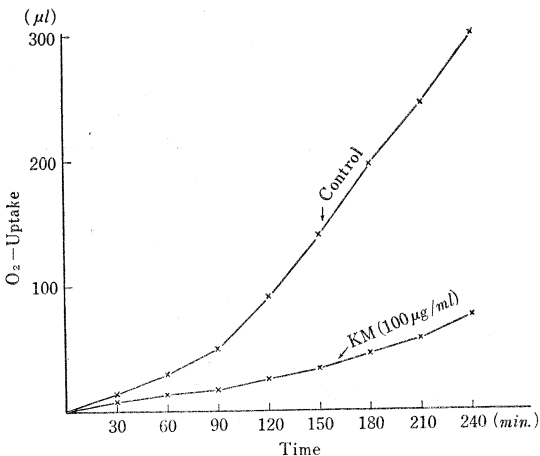
図3 鳥型結核菌によるナイアシンの適応的酸化におよぼす KM の影響



3. 鳥型結核菌によるマロン酸の適応的酸化におよぼす KM の影響

鳥型結核菌によるマロン酸の適応的酸化に対しては、KM は図4に示すごとく、最終 $100 \mu\text{g/ml}$ の濃度にて著明な阻害は認められたが、安息香酸およびナイアシンの場合におけるごとく完全ではなかつた。

図4 鳥型結核菌によるマロン酸の適応的酸化におよぼす KM の影響



4. 鳥型結核菌による安息香酸の適応的酸化過程の中途にて添加せる KM の影響

図5は、鳥型結核菌による安息香酸の適応的酸化過程途上にて添加せる KM の影響を示す。すなわち、鳥型結核菌に安息香酸に対する適応酵素の形成が行われたのちに、最終 $100 \mu\text{g/ml}$ の濃度の KM を添加しても、もはや安息香酸の酸化は阻害を受けなかつた。

図5 鳥型結核菌による安息香酸の適応的酸化途上にて添加せる KM の影響

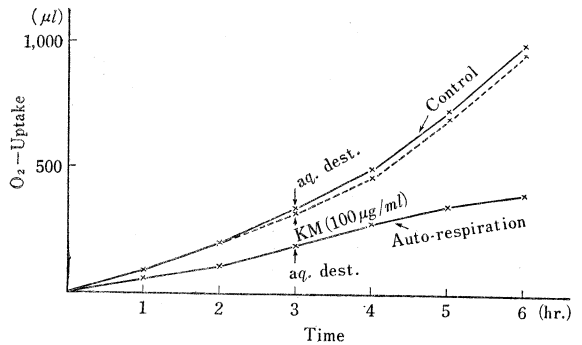
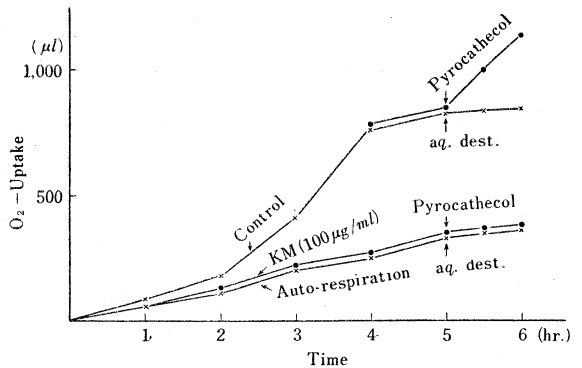


図6 安息香酸の適応的酸化過程途上にてピロカテコールを添加せる場合の KM の影響



また、図6には安息香酸の適応的酸化過程途上にてその逐次適応代謝下位物質であるピロカテコールを添加せる場合の KM の影響を示した。すなわち、鳥型結核菌に安息香酸に対する適応酵素を形成せしめ、 $2 \mu\text{M}$ の安息香酸の酸化がほとんど終了せるのちにピロカテコールを添加すると、KM を添加せざる対照においては誘導期を経ずして著明な酸素消費を示すのに対し、KM を添加せる系においてはほとんど酸素消費を示さなかつた。

なお、図7に示すごとく、KM および安息香酸に一定時間接触せしめた菌は、逐次適応現象を示さぬが、安息香酸のみに接触せしめた菌は、逐次適応代謝物であるピロカテコールを誘導期なしに酸化する。

すなわち、菌に適応酵素を形成せしめたのち KM を添加しても、もはや阻害効果は認められず、また、逐次適応現象をも阻害しないが、適応酵素形成以前に KM を添加すると、適応的酸化も、逐次適応現象もともに阻害

図7 KM および安息香酸に一定時間接触せしめた菌によるピロカテコールの酸化

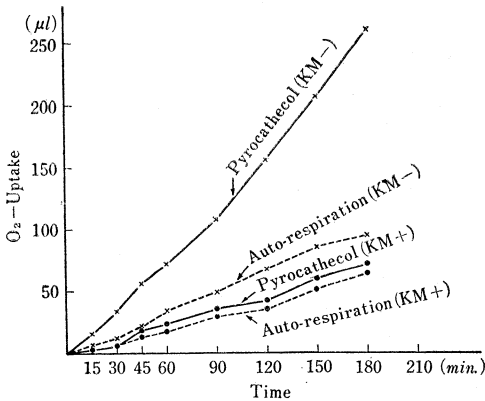


図8 SM耐性鳥型結核菌による安息香酸の適応的酸化に対するKMおよびSMの影響

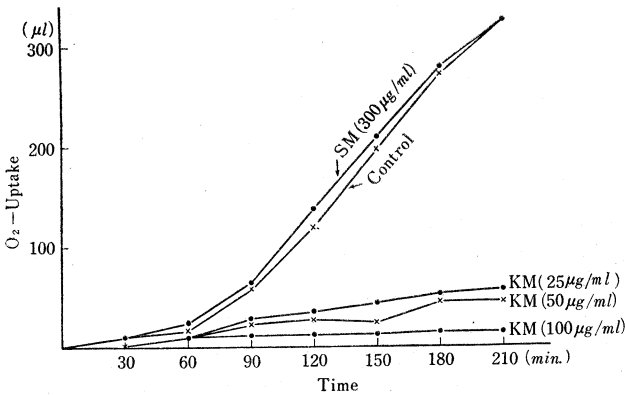
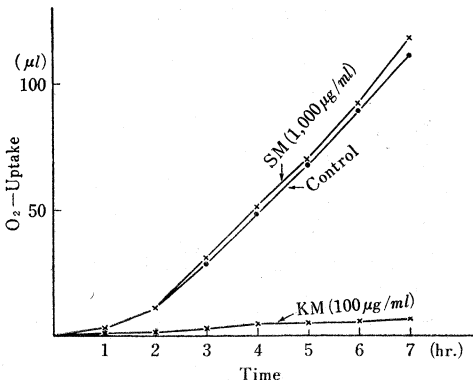


図9 SM耐性鳥型結核菌によるナイアシンの適応的酸化に対するKMおよびSMの影響



される。

5. SM 耐性鳥型結核菌による安息香酸およびナイアシンの適応的酸化に対する KM および SM の影響

図8には、SM 耐性菌による安息香酸の適応的酸化に対して、SM は最終 300 μg/ml の濃度では全く阻害効果を示さないが、KM は最終 100 μg/ml の濃度

ではほとんど完全な阻害を示し、50 μg/ml および 25 μg/ml の低濃度でも著明な阻害を示した。

ナイアシンを基質とした場合の成績を図9に示す。すなわち、SM 耐性菌によるナイアシンの適応的酸化は、最終 1,000 μg/ml の濃度の SM によつては全く阻害を受けなかつたが、KM では、わずか 100 μg/ml の濃度にてほとんど完全な阻害を認めた。

6. KM 耐性鳥型結核菌による安息香酸の適応的酸化におよぼす KM および SM の影響

図10に示すごとく、KM 耐性菌による安息香酸の適応的酸化に対し、最終 300 μg/ml の濃度の KM を添加しても阻害は全く認められない。一方、SM によつては、最終 25 μg/ml および 50 μg/ml の濃度で著明な阻害効果が認められ、100 μg/ml では完全に阻害された。

考 案

これまでに、SM の作用機序に関しては種々の報告がある。すなわち、Fitzgerald および Bernheim²¹⁾ は、結核菌による安息香酸の適応的酸化は、微量の SM により阻害されることを報じ、また、山村ら²²⁾ は、SM 耐性菌による上記反応は、SM により阻害されないことを報じた。一方、田中ら²³⁾ は、ナイアシンが鳥型結核菌により適応的に酸化され、この反応は微量の SM により阻害されることを見出した。また、堀尾ら²⁴⁾ は、マロン酸が鳥型結核菌により適応的に酸化され、安息香酸およびナイアシンの場合と同様に SM により阻害されることを報じた。

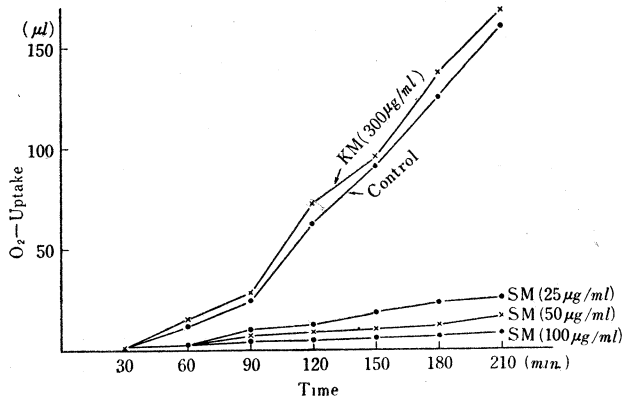
著者は、上記 KM に関する実験を SM と比較しつつ行い、その結果として KM もまた、鳥型結核菌による安息香酸、ナイアシンおよびマロン酸の適応的酸化を著明に阻害することを見出した。また、SM 耐性菌による安息香酸およびナイアシンの適応的酸化は、大量の SM によつて阻害されないにもかかわらず微量の KM により完全な阻害を受ける。逆に KM 耐性菌を用いた場合は、SM により完全に阻害されるが、KM によつては阻害されないことを見出した。また、著者は、KM の作用機序の一端として、逐次適応現象の阻害を見出した。

その他の KM の作用機序については、なお研究を続けており、その成績は追つて報告する予定である。

結 論

- 1) 鳥型結核菌による安息香酸、ナイアシンおよびマロン酸の適応的酸化は、微量の Kanamycin により著明に阻害される。
- 2) Kanamycin は、逐次適応現象を完全に阻害する。

図 10 KM耐性鳥型結核菌による安息香酸の適応的酸化におよぼすKMおよびSMの影響



3) Streptomycin 耐性鳥型結核菌による安息香酸およびナイアシンの適応的酸化は、大量の Streptomycin により全く阻害されないにもかかわらず、微量の Kanamycin により完全に阻害される。

4) 逆に、Kanamycin 耐性菌を用いた場合には、Streptomycin により阻害されるが、Kanamycin によつては、ほとんど阻害を受けない。

終りに臨み、終始御懇切なる御指導ならびに御校閲を賜わつた恩師堂野前維摩郷教授、伊藤文雄博士、青木隆一博士および本学微生物病研究所須田研究室直野博士に心から感謝致します。なお、Streptomycin 耐性鳥型結核菌竹尾株を分与下さつた本学微生物病研究所竹尾結研研究室の御厚意に感謝致します。

本論文の要旨は昭和33年5月、第33回日本結核病学会総会において発表した。

文 献

- 1) 梅沢浜夫：総合医学，14：988，昭32。
- 2) Umezawa, H., Maeda, M., Yagishita, K., Kondo, S., Okami, Y., Utahara, K., Osato, Y., Nitta, K., and Takeuchi, T. : J. Antibiot., 10 : 181, 1957.
- 3) 梅沢浜夫：日本医師会雑誌，39：713，昭33。
- 4) 柳沢謙・佐藤直行：日本細菌学雑誌，12：857，昭32。
- 5) Yanagisawa, K., and Sato, N. : J. Antibiot., 10 : 233, 1957.
- 6) 柳沢謙・金井興美・立花暉夫：日本細菌学雑誌，12：919，昭32。
- 7) Yanagisawa, K., Kanai, K., and Tachibana, T. : J. Antibiot., 10 : 236, 1957.
- 8) 金井興美・柳沢謙：日本細菌学雑誌，13：1，昭33。
- 9) Kanai, K., and Yanagisawa, K. : Ann. Rep. Jap. Assoc. Tuberc., No. 3 : 72, 1958.
- 10) 柳沢謙・金井興美：日本細菌学雑誌，13：95，昭33。
- 11) Yanagisawa, K., Kanai, K., and Iwasaki, T. : Ann. Rep. Jap. Assoc. Tuberc., No.3 : 82, 1958.
- 12) 川口陽一郎・金井興美・柳沢謙：日本細菌学雑誌，13：204，昭33。
- 13) 柳沢謙：内科，1：412，昭33。
- 14) 柳沢謙：日本医師会雑誌，39：719，昭33。
- 15) 長岐佐武郎：日本医師会雑誌，39：744，昭33。
- 16) 北本治：日本医師会雑誌，39：738，昭33。
- 17) 市川篤二：日本医師会雑誌，39：730，昭33。
- 18) 石山俊次・隅田正一・水谷嘉夫・福地吉雄・沢崎博次・山田充堂・徐慶一郎：日本医師会雑誌，39：742，昭33。
- 19) Bunn, P.A. : 日本医師会雑誌，39：732，昭33。
- 20) 堂野前維摩郷 他：日本臨牀結核，17：525，昭33。
- 21) Fitzgerald, R.J., and Bernheim, F. : J. Bact., 54 : 671, 1947.
- 22) 山村雄一・笹川泰治・安立妙子：医療，3：17，昭24。
- 23) 石下泰堂・田中伸一・茂兼英寿・泉桂三：結核，31：358，昭31。
- 24) Horio, T., and Okunuki, K. : J. Biochem., 41 : 717, 1954.