

鳥型結核菌の SM 耐性獲得に及ぼすピリドキサミンの抑制に関する知見補遺 第 2 報

近 田 嘉 人

名古屋大学医学部山田内科教室 (主任 山田弘三教授)

受付 昭和 34 年 6 月 5 日

(III) ピリドキサミン (PAM) による SM 耐性獲得抑制機作と B₆ 酵素系について

序 言

細菌のアミノ酸代謝が抗菌機作と密接な関係があることが最近明らかとなり、とくに結核菌にとつて、これが物質代謝中もつとも重要であることが分かってきた。結核菌の SM 感性菌と耐性菌とのアミノ酸代謝に関する比較研究としては、Peterson¹⁾、Pauletta²⁾、片山³⁾、齊藤^{4) 5)} 等わずかし報告されていないが、これらの報告によれば、両株の間のアミノ酸の要求性および合成能力にかなりの差があるのではないかと考えられる。私は第 1 報において、PAM による SM 耐性獲得抑制作用を遺伝学的面より追求する一方、PAM の酵素活性型である PAM-磷酸が PAM とほぼ同様な、あるいはそれ以上の抑制作用をもつことを知った。そこで私は、PAM の抑制作用の機作を、PAM-磷酸が関与するいわゆる B₆ 酵素系の反応の中に見出させるのではないかと考え、さらには SM 耐性発現機作および SM の作用機作の手がかりが得られるのではないかと考え、PAM による SM 耐性抑制菌と SM 感性菌、耐性菌との間の Transaminase, Decarboxylase, Racemiasse, Desulfhydrase 等 B₆ 酵素について比較検討を行なつた。

実験材料ならびに実験方法

A. Glutamic-Oxaloacetic-Transaminase

供試菌株は鳥型結核菌竹尾株の SM 感性菌、SM1,000 γ /cc 以上耐性菌および PAM による SM 耐性獲得抑制菌 (教室松永より譲渡さる) の 3 菌株である。この菌株を Sauton 培地に 5 日間増菌後アセトン乾燥菌を調製し、これを M/10 磷酸緩衝液 (pH 7.8) にて 50 mg/cc の均等菌浮游液として酵素材料とした。実験方法は Colorimetric Method⁶⁾ により行なつた。すなわち、50 mg/cc 酵素材料 0.25 cc, M/10 アスパラギン酸 0.25 cc, M/10 α -ケトグルタル酸 0.25 cc, M/10 磷酸緩衝液 (pH 7.8) 3 cc を Thunberg 管に入れ、5

mmHg 程度まで脱気後、37°C 2 時間半恒温槽にて反応せしめ、100% トリクロール醋酸 0.1 cc を用いて除蛋白と同時に反応を停止させる。次にクエン酸アニリン 0.1 cc を加え 37°C 20 分恒温槽中にて反応後、さらに 2-4 デイニトロフェノールヒドラジンの塩酸溶液 0.5 cc を加え 37°C 5 分間恒温槽中にて反応させる。これに水飽和トルエン 2 cc を加え強く振盪し 5 分間遠沈後上清 1 cc を取出し、KOH アルコール溶液 3 cc にて発色させる。これをベックマン比色計により 490 m μ にて比色し、前もつて Pyruvic Acid の標準曲線を作成し、これより生成した Pyruvic Acid を測定して G-O-T 活性を比較検討した。

B. l-Glutamic Acid Decarboxylase

実験材料は同様酵素材料を使用し、実験方法は、Manometric Method^{7) 8)} により、反応系はアセトン乾燥菌浮游液 (40 mg/cc) 1 cc および Mcilvene (pH 5.0) 緩衝液 1 cc を主室に、M/10 l-Glutamic Acid 0.5 cc を側室に、8 N-H₂SO₄ 0.2 cc を副室に入れ 38°C 恒温槽にて振盪し、5 分間ごとに 30 分まで炭酸ガスの発生量を検圧法により測定した。

C. d-Glutamic Acid Racemiasse^{4) 9) 10)}

同様酵素材料を用い、実験方法は、Manometric Method により酵素吸収を測定した。反応系はアセトン乾燥菌浮游液 (30 mg/cc) 1 cc, M/5 d-Glutamic Acid 0.5 cc, 蒸溜水 0.5 cc を 37°C 恒温槽にて 3 時間振盪後、5 分間沸騰水に浸して反応停止後その上清 0.2 cc と蒸溜水 0.8 cc を主室に、2% Glucose Bouillon (pH 7.8) に 24 時間培養した E. Coli の湿菌量 30 mg を M/10 磷酸緩衝液 1 cc に均等溶解した菌液 1 cc を側室に、20% KOH 0.2 cc を副室に入れ、検圧的に酵素吸収を比較検討した。

D. Cysteine Desulfhydrase

同様酵素材料を用い、実験方法^{11) 12)} は Conway の装置を用い、反応液からアンモニアのみ分離し Russell の方法により比色定量した。すなわち反応系はアセトン乾燥菌浮游液 (50 または 75 mg/cc) 1 cc, Cysteine (5 μ M) 0.5 cc, グルコース (10 μ M) 0.1 cc を M/15 磷酸緩衝液 (pH 6.9) で 5 cc にし、37°C 1 時間 30 分

好氣的に反応させる。次に反応液 0.5 cc を取出し Conway 装置の外皿に加え、ついで炭酸カリ飽和液 1 cc を加えずばやく蓋をする。このさい、蓋のすり合せ部分に水硝子をぬつて外氣と遮断する。中皿にはアンモニアの吸収液として 0.01 N-H₂SO₄ 2cc を加えておく。蓋をしたのちに外皿の液をよく混じり 24 時間室温に放置し翌日中皿を取出し内液を完全に試験管に移し洗液とともに全量 3 cc とする。この試験管を水中につけて十分に冷しながら、よく冷えた試薬、すなわち 0.003 M 塩化第一マンガン溶液 2 滴、アルカリ性フェノール溶液 2 cc、次亜塩素酸 1 cc を加え、静かに攪拌してから 5 分間沸騰水につける。冷却後蒸留水で 10 cc に稀釈し 625 m μ でベックマン比色計で測定した。

実験成績

A. 表1に示すごとく、PAMによるSM耐性抑制菌はSM感性菌およびSM耐性菌とほとんどGOT活性に差をみなかったが、わずかに第20継代菌において、SM耐性菌とは大差はないが、感性菌に比較するとやや活性が強いように思われた。また反応系にSMを加えた場合のGOT活性の影響を検討したが、表2に示すごとくSMによる阻害は3菌株ともにほとんどみられなかった。

表1 鳥型結核菌のGOT活性

| 継代数 | 菌株 | $\mu M/cc/hr$ | | | |
|-----|----|---------------|---------------------|--------------------|------|
| | | SM | PAMによるSM耐性抑制菌 | | SM |
| | | 感性菌 | PAM 100 γ/cc | PAM 10 γ/cc | 耐性菌 |
| 16 | | 0.77 | 0.70 | 0.84 | 0.71 |
| 20 | | 0.58 | 0.93 | 1.18 | 0.99 |
| 47 | | 1.55 | 1.88 | 1.41 | 1.10 |

表2 鳥型結核菌のGOT活性

| 継代数 | SM 添加 | 菌株 | $\mu M/cc, hr$ | | | |
|-----|-------|----|----------------|---------------------|--------------------|------|
| | | | SM | PAMによるSM耐性抑制菌 | | SM |
| | | | 感性菌 | PAM 100 γ/cc | PAM 10 γ/cc | 耐性菌 |
| 40 | (-) | | 1.55 | 1.55 | 1.57 | 1.41 |
| | (+) | | 1.75 | 1.54 | 1.57 | 1.42 |
| 47 | (-) | | 1.53 | 1.72 | 1.39 | 1.44 |
| | (+) | | 1.57 | 1.79 | 1.31 | 1.38 |

B. 1-Glutamic Acid Decarboxylase 実験については図1に示すごとく、SM感性菌の炭酸ガス発生量をもつとも少なく、次にSM耐性菌で、SM耐性抑制

図1 1-Glutamic Acid Decarboxylase 活性

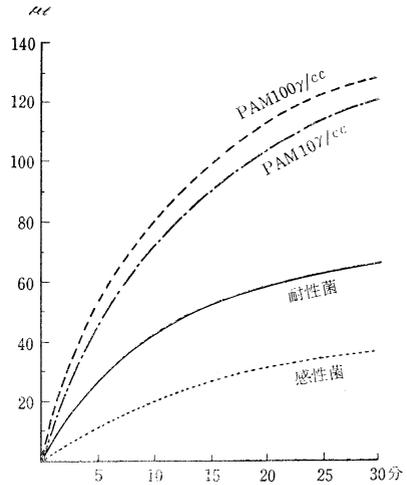
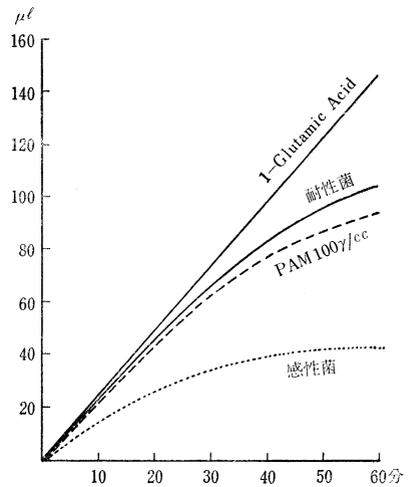


図2 d-Glutamic Acid Racemase 活性



菌は PAM 10 γ/cc , 100 γ/cc 添加例ともに活性が強く、感性菌、耐性菌とは明らかな差を認めた。

C. d-Glutamic Acid Racemase 実験については図2に示すごとく、SM耐性菌に比較して感性菌がラセミ能をもつとも低く、PAMによるSM耐性獲得抑制菌はむしろSM耐性菌に近い活性を示した。

D. Cysteine Desulphydrase については、表3に示す

表3 Cysteine Desulphydrase 活性

| 継代数 | 菌株 | 吸光度数 | | | |
|-----|----|-------|---------------------|--------------------|-------|
| | | SM | PAMによるSM耐性抑制菌 | | SM |
| | | 感性菌 | PAM 100 γ/cc | PAM 10 γ/cc | 耐性菌 |
| 24 | | 0.022 | 0.027 | 0.047 | 0.030 |
| 29 | | 0.040 | 0.031 | 0.032 | 0.027 |

(菌 50mg cc)

表4 Cysteine Desulphhydrase 活性

吸光係数

| 継代数 | 菌株 SM 添加 | SM | | | |
|-----|-------------|--------|-------------------------|------------------------|--------|
| | | SM 感性菌 | PAMによる SM耐性抑制菌 | | SM 耐性菌 |
| | | | PAM 100 γ /cc | PAM 10 γ /cc | |
| 41 | (-) | 0.088 | 0.096 | 0.092 | 0.072 |
| | (+) | 0.085 | 0.097 | 0.092 | 0.092 |

(菌 75mg/cc)

ごとく、一般に活性が低く、継代数、使用菌量によつて活性値に大差を認めず。また表4に示すごとく SM 添加による阻害も不明であつた。

考 察

片山・田中³⁾は SM 耐性株の Asparaginase 活性は感性株より大であると報告し、教室松永¹³⁾は鳥型結核菌竹尾株の培養濾液の paper chromatography 的分析により、PAM による SM 耐性獲得抑制菌は Asparaginase 活性能は、感性株に比較して強いが耐性株よりは弱いと報告している。伊藤¹⁴⁾は鳥型菌により、 α -ケトグルタル酸とアスパラギン酸との間の Transaminase について酵素学的検討を加え、グルタミン酸形成が比較的顕著にみられたと報告している。私の実験結果によれば、3菌株の GOT 活性にとくに有意の差を認めることはできなかつた。細菌のアミノ酸脱炭酸酵素については Gale⁷⁾が詳細に述べている。また Umbreit, Gunsolus¹⁵⁾により細菌の脱炭酸酵素が精製せられ、その補酵素がピリドキサール 5-リン酸であることが証明された。庄司ら¹⁶⁾は鳥型結核菌のアセトン乾燥菌はグルタミン酸を脱炭酸し、 α -アミノ酪酸とする作用を有すると報告している。細菌の脱炭酸酵素は活性が強く、アミノ酸に特異性が高いので、個々のアミノ酸の特異的測定法として有用であるといわれている。私の実験においても、SM 耐性獲得抑制菌は SM 感性菌、耐性菌に比較して明らかに高い脱炭酸活性を示した。

Racemiasse が細菌に存在することは Ayenger ら¹⁰⁾により報告され、Snell⁹⁾は *Str. faecalis* の増殖には l-Alanine を用いるときにはピリドキサール 5-リン酸の添加が必要であるといっている。鳥型結核菌の報告については少なく、齊藤ら⁴⁾は d-Glutamic Acid および d-Alanine Racemization について実験し、SM 感性菌と SM 耐性菌との間に差を認めなかつたと報告し、さらに d-Glutamic Acid, d-Alanine と鳥型結核菌を作用せしめた上清は、アルカリ培地に発育せる大腸菌により酸化されることを証明した。私の実験においても、アルカリ培地に発育せる大腸菌により酸化された。また PAM による SM 耐性獲得抑制菌のラセミ能活性は、S

M 感性菌よりはやや強く、SM 耐性菌とはほぼ同程度の活性を示した。

Tamiya¹¹⁾は大腸菌生菌浮游液を用い Cysteine Desulphhydrase 実験を行なっているが、鳥型結核菌についてはみるべきものがなく、私の実験結果も3菌株の間に酵素学的有意の差を認めることはできなかつた。

小 括

1) ピリドキサミンによる SM 耐性獲得抑制菌のグルタミン酸脱炭酸酵素活性は、SM 感性菌および SM 耐性菌に比べ、明らかに強い活性を示した。

2) Glutamic Oxaloacetic Transaminase, d-Glutamic Acid Racemiasse, Cysteine Desulphhydrase 実験では3菌株の間にとくに有意の差を認めることはできなかつた。

(IV) 事前に SM 感作をうけた鳥型結核菌の
その後のピリドキサミン添加の影響

序 言

教室山田¹⁷⁾、松永¹⁸⁾により報告された PAM の SM 耐性獲得抑制作用は、培地内に SM と PAM を同時に併用添加したさいに認められたもので、もし SM と PAM が別個に菌株に接触するならば、すなわち SM と接触後に PAM を添加した場合にも、同様に抑制作用があるか否かについては、SM がもつといわれる遺伝子変異効果とも関連のある興味ある問題であろう。また教室山田¹⁹⁾は、B₆ 欠乏が抗体産生の低下をきたし、B₆ 欠乏時の実験的結核症は明らかに軽症であつたと報告している。そこで私は、この点を遺伝学的、免疫学的^{20) 21)}に明らかにするために次の試験管内実験を行なつた。

実験材料ならびに実験方法

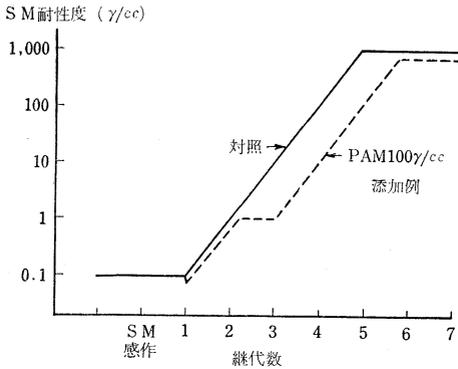
供試菌株は鳥型結核菌竹尾株の SM 感性菌、培地はすべて Sauton 寒天培地を用いた。培地内の薬剤含有濃度は、SM 単独培地では、SM がそれぞれ 0.1, 1, 10, 100, 1,000 γ /cc となるようにし、PAM と SM との併用培地では、SM の上記濃度のほかに PAM をそれぞれ 100 γ /cc の割合に添加した。

菌量、接種方法は既述のごとくで、継代第1代は SM 単独培地に上記 SM 感性菌を接種し、5日間培養後、SM 0.1 γ /cc (SM の発育阻止濃度以下) に生えた菌株を、以後 PAM と SM 併用培地に増量的、恒量的に継代培養して、その SM 耐性獲得の状態を観察した。恒量的継代培養のさいの SM 濃度は 0.1 γ /cc とした。

実 験 成 績

図3に示すごとく、対照は第5継代にて SM 1,000 γ/cc に達し、PAM 添加例では1継代遅れて第6継代にて SM 耐性 1,000 γ/cc になり、PAMによるSM耐性獲得の抑制はみられなかった。これは増量的、恒量的いづれも同様傾向を示した。

図3 SM感作後のPAM添加実験



考 察

実験成績で述べたごとく、SMに事前に接触した菌株においては、以後PAMを添加しても、その抑制作用は認められなかった。このさい、継代第1代におけるSM 0.1 γ/cc に生えた菌株の population 構成中、SM 1 γ/cc 以上耐性菌は 10^6 生菌数当り 509.5 Colonie を算えたが、この菌株を以後 SM 未含有培地に継代するも SM 10 γ/cc 以上耐性菌は見出だせなかった。このことは一たん SM により遺伝子型に変異が起こつても、その後の SM 投与がなければ、真の耐性菌(高度耐性菌)が発現しないことを意味している。にもかかわらず、この菌株の耐性発現を PAM により抑制できない事実はいかに説明されるべきであろうか。これを免疫学的に考えると、一度 SM に接触してできた抗体が、PAM の添加によりより刺激されるのではないかと推察される。いづれにしても PAM の抑制作用は、PAM が SM と同時に菌に作用することが必要条件で、一たん SM により遺伝子変異を起こした菌株では PAM の効果も不可能であることを示している。

小 括

PAM による SM 耐性獲得抑制機序は、SM 感性菌が SM と最初に接触する場に PAM が共存することが必要条件で、事前に一度 SM に接触した菌株はそのさい SM 耐性を獲得していなくても、その後の PAM 添加では SM 耐性を獲得することはできない。

総括および考案

私は鳥型結核菌竹尾株の SM 耐性菌より核酸を抽出

し、この抽出核酸を SM 感性菌に感作することによって SM の耐性誘導を認めた。そこでこの抽出核酸感作と併用して PAM を添加した場合の、PAM の核酸による SM 耐性誘導に及ぼす影響を種々実験検討した。核酸感作方法として、既述のごとく培地外、培地内感作を行なつたが、いづれも SM の耐性誘導を認め、PAM 添加例では SM 耐性誘導の抑制をみた。なおこれは耐性菌の population を算定することにより、明らかに耐性誘導および耐性誘導抑制を示した。これら SM 耐性誘導菌、PAM 添加による SM 耐性誘導抑制菌は、15 継代後もそれぞれの SM 耐性を保持していた。また鳥型結核菌は核酸を窒素源としてある程度活用するのではないかと推測される成績を示した。

次に PAM-燐酸添加実験では、PAM 単独添加に比較して、SM 耐性獲得に附燐はより有効的に作用するのではないかと考えられるが、私の実験範囲では、PAM 単独の場合よりやや強い抑制態度を示したが、とくに附燐による差異を認めることはできなかった。

なお PAM による SM 耐性獲得抑制機序を究明する手懸りとして、主なる B₆ 酵素系の反応活性度に求めた。l-Glutamic Acid Decarboxylase, d-Glutamic Acid Racemase においては、感性菌に比べて PAM による SM 耐性獲得抑制菌の活性は高い値を示し、SM 耐性菌とは大差をみなかった。GOT および Cysteine Desulfhydrase 活性については、3 菌株の間に有意の差を認めることはできず、SM による阻害も明らかでなかった。かくのごとく、私の実験においては、PAM の SM 耐性抑制機序と B₆ 酵素系との関連について明らかにすることはできなかった。

しからは PAM 添加による SM 耐性獲得抑制機序の発端は、いかなる場であるかを検討する意味で、B₆ の抗体産生関与の面より追究した。すなわち、既述のごとく、事前に一度 SM に接触した菌にその後 PAM を添加した場合は、PAM を SM と同時に併用した場合と異なつて SM 耐性獲得を抑制することはできなかった。これは SM のもつ遺伝子変異効果と関連して、B₆ の抗体産生関与の面を考慮することにより一層興味ある問題であると考えられる。以上を総括考案するに、PAM の SM 耐性出現に対する抑制は、菌の培養面のみならず生化学的、遺伝学的、および免疫学的面までも及んでいるものといひらるであろう。

結 論

1) 鳥型結核 SM 耐性菌より抽出した核酸の感作により、感性菌の SM 耐性を誘導しうる。この場合抽出核酸の感作と同時にペリドキサミンを併用添加すると、SM 耐性誘導は抑制される。この耐性誘導菌、耐性誘導抑制菌はそれぞれ安定した SM 耐性を保持する。

2) ピリドキサミンの SM 耐性獲得抑制の機序を、ピリドキサミンの附隣により著しく増強することはできない。

3) ピリドキサミンの SM 耐性獲得抑制機序と B₆ 酵素系との関連については、なお検討を要するが、ピリドキサミンによる SM 耐性獲得抑制菌は、感性菌、耐性菌とは異なつた性格をもつものではないかと推測される。

4) ピリドキサミンの SM 耐性獲得抑制機序として、SM と共存することが必要条件である。

稿を終わるに臨み終始懇篤なる御指導を賜つた恩師山田弘三教授に深く感謝いたします。また種々助言を戴きました松永俊明博士に謝意を表します。なお本研究を行なうにあたり御援助を賜つた名大理学部平田義正教授に厚く感謝いたします。

文 献

- 1) A. Peterson & H. Pope : J. Bact., 64 : 25, 1952.
- 2) G. Pauletta & A. Detraceshi : Bioch. et bioph. acuta, 9 : 271, 1952.
- 3) 片山富男・田中伸一 : 結核, 29 : 427, 昭29.
- 4) 齊藤正敏・田中伸一 : 結核, 31 : 329, 昭31.
- 5) 齊藤正敏・田中伸一 : 結核, 31 : 393, 昭31.
- 6) P. Caband, R. Leeper & F. Wroblewski : Am. J. Clin. Path., 26 : 1101, 1956.
- 7) E.F. Gale : Bioch. J., 39 : 46, 1945.
- 8) 赤堀四郎 : 酵素研究法, 2 : 731, 昭31.
- 9) Snell, E.E. : J. Biol. Chem., 158 : 494, 1945.
- 10) P. Ayenger & E. Robert : J. Biol. Chem., 197 : 1, 1952.
- 11) N. Tamiya : J. Biochem., 41 : 199, 1954.
- 12) 赤堀四郎 : 酵素研究法, 2 : 769, 昭31.
- 13) 松永俊明 : 呼吸器診療, 13 : 685, 昭33.
- 14) 伊藤文雄・管野忠彰 : 結核, 29 : 368, 昭29.
- 15) Umbreit, W. & Gunsolus, I.C. : J. Biol. Chem., 179 : 279, 1949.
- 16) 庄司宏・山上朗 : 結核, 28 : 577, 昭28.
- 17) K. Yamada, T. Matsunaga & K. Kawaguchi : J. Vitaminology, 2 : 193, 1956.
- 18) 松永俊明 : 呼吸器診療, 13 : 256, 昭33.
- 19) 山田弘三・神田鍊蔵・川口幸平 : 名古屋医学, 69 : 233, 昭30.
- 20) 貝田勝美・田中恭之助 : 結核研究の進歩, 24 : 161, 昭34.
- 21) 山田弘三 : ビタミン, 16 : 490, 昭34.