

アントラニール酸の結核菌発育に及ぼす影響について

鏡山 松樹・間嶋 正男

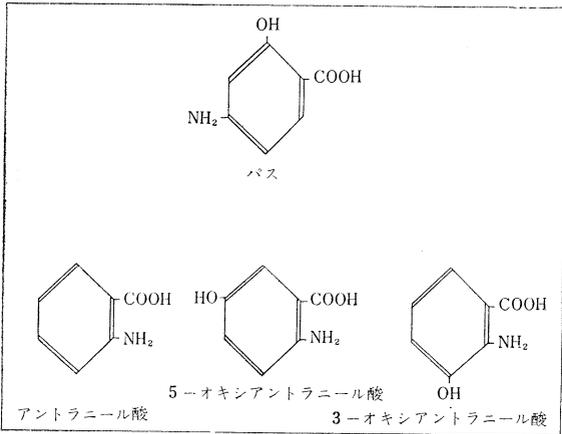
健康保険星ヶ丘病院

受付 昭和 35 年 9 月 3 日

まえがき

代表的なアミノ酸の 1 つであるトリプトファンの中
間代謝物のアントラニール酸¹⁾は図 1 に示すように化学
構造が PAS に近似しており、動物体内でアントラニ
ール酸より生成される 5-オキシアントラニール酸はさら
に PAS に近似の構造をもっている。以上の理由に
よりアントラニール酸は結核菌に対して抗菌的に働く可
能性が考えられる。以上の理由から次のような実験を行
なった。

図 1



実験方法および成績

I. 培養試験

1) アントラニール酸 (以下ア酸と略記す) を表 1 に
示すような濃度に添加した pH 7.0 および pH 6.0 の
デュボス培地を用い、小川培地に 2 週間培養した人型
結核菌 H37Rv 株を各試験管 10⁻²mg 宛接種した。な
おア酸添加後の培地はア酸の分解を避けるためザイツの
濾過器により濾過滅菌し加熱はしていない。成績は pH
7.0 では表 1 に示すように 3 週間培養では 500 γ /cc
で完全に発育を阻止し、1 週間目では 125 γ /cc です
でに発育阻害を示す。pH 6.0 では表 2 に示すようにさ
らに作用が強く、3 週間培養では 250 γ /cc で完全に発
育阻止、1 週間目では 62.5 γ /cc で発育阻害を示す。

上記の実験においてア酸の添加量がかなり高濃度であ

表 1 人型結核菌 H37Rv 株の発育に及ぼす
アントラニール酸の影響

判定日 薬剤濃度	pH 7.0 デュボス培地				pH 6.0 デュボス培地			
	1 W	10日	2 W	3 W	1 W	10日	2 W	3 W
	1,000 γ /cc	-	-	-	-	-	-	-
750	-	-	-	-	-	-	-	-
500	-	-	-	-	-	-	-	-
250	-	+	+	+	-	-	-	-
125	-	+	+	+	-	-	-	+
62.5	+	+	+	+	-	+	+	+
31	+	+	+	+	+	+	+	+
12.5	+	+	+	+	+	+	+	+
0	+	+	+	+	+	+	+	+

表 2 各種アミノ酸の結核菌発育に及ぼす影響
(pH 7.0, デュボス培地)

薬 劑 種 類	菌 株 濃 度 γ /cc	鳥型竹尾株		人 型 H37Rv株	
		チロジン	200	+	+
	500	+	+	+	+
	1,000	+	+	+	+
トリプト ファン	200	+	+	+	+
	500	+	+	+	+
	1,000	+	+	+	+
チスチン	200	+	+	+	+
	500	+	+	+	+
	1,000	+	+	+	+
ヒスチジン	200	+	+	+	+
	500	+	+	+	+
	1,000	+	+	+	+
対 照		+	+	+	+
判 定 日		3 日	5 日	10 日	2 週

るため、培地の pH に変化をきたす可能性が考えられ、
pH の変化は菌の発育に影響を与えることは衆知の事実
である。この点を精細に研究したがデュボス培地では

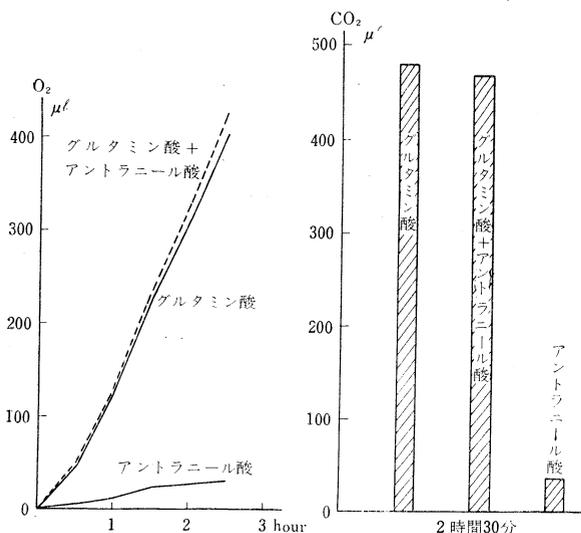
1,000 γ/cc の濃度にア酸を添加した場合でも無添加の場合に比し pH の変化は全く認められなかつた。

次にア酸の添加量が他の抗生物質や化学療法剤の発育阻止量に比し高濃度であるため、上記の濃度ではア酸にかぎらず他のアミノ酸でも培地の組成に影響を与え発育を阻害するおそれが考えられるため、試みにチロジン、トリプトファン、チスチン、ヒスチジン、の4種のアミノ酸添加して培養実験を試みたが、表3に示すように

表3 鳥型結核菌竹尾株の発育に及ぼすアントラニール酸の影響

薬剤濃度	pH 7.0 デュボス培地		pH 6.0 デュボス培地	
	3日	5日	3日	5日
1,000 γ/cc	+	+	-	-
750	+	+	-	-
500	≡	≡	-	+
250	≡	≡	+	≡
125	≡	≡	≡	≡
62.5	≡	≡	≡	≡
31	≡	≡	≡	≡
12.5	≡	≡	≡	≡
0	≡	≡	≡	≡

図2 鳥型結核菌生菌のグルタミン酸代謝に及ぼすアントラニール酸の影響 (pH 7.0)



実験条件

菌液：鳥型菌生菌 30 mg/cc の Suspension 1.0 ml
 基質：2/200M グルタミン酸 0.5 ml (10 μ M)
 アントラニール酸 (1.5 mg/cc) 1.0 ml (終末濃度 500 γ/cc)
 pH 7.0 M, 2 phosphate buffer 0.3 ml
 50% KOH 0.1 ml (CO₂ 測定 vessel には側室に 3NH₂SO₄ 0.2 ml)
 水を加えて全量 3.1 ml とし
 37.5°C 空气中で反応
 それぞれの Control を引く

1,000 γ/cc の濃度でも人型結核菌 H37Rv および鳥型結核菌竹尾株の発育に対し阻害作用を認めなかつた。

したがって本実験において示された成績はア酸に特異の抗菌作用といえる。以上の成績からア酸は人型結核菌 H37Rv 株に対し抗菌作用があり、弱酸性で作用の増強することが判明した。

2) ついで上述と同様の方法で鳥型結核菌竹尾株に対するア酸の作用を試験した成績は表2に示すとおりで培養5日後判定で pH 6.0 では 750 γ/cc で完全に発育阻止、pH 7.0 では同濃度で強く発育阻害を示す。

以上の成績により、鳥型結核菌竹尾株もまたア酸により発育阻止されることが分かる。

動物体内でア酸より生成され、PAS に近似の構造を有する 5-オキシアントラニール酸¹⁾ の抗菌作用も試験したが、該酸は培地中で比較的速やかに酸化分解され、強く褐色に着色し該酸自身の抗菌試験は困難であつた。

II 酵素学的実験

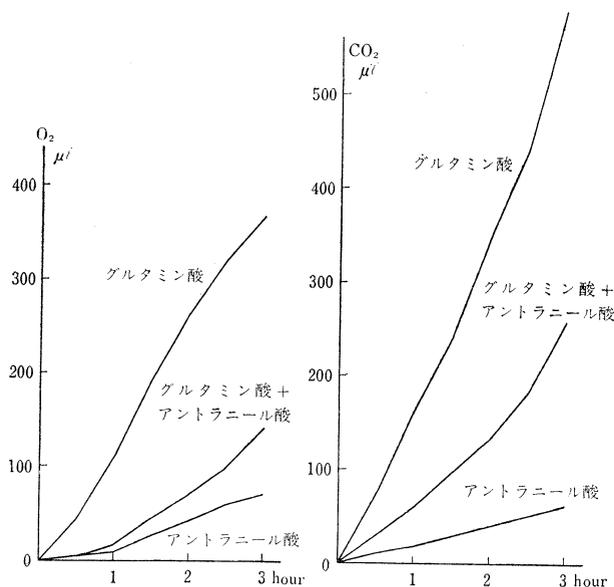
アントラニール酸の抗菌機作を解明するため鳥型結核菌竹尾株を使用して各種物質の代謝に対するア酸の影響を試験したところ、該酸は竹尾株のグルタミン酸およびアスパラギン酸の代謝を阻害することを見出だした。

1) ソートン培地に培養した鳥型結核菌竹尾株の四日菌を生理的食塩水で3回洗菌、湿菌量 30mg/cc の蒸溜水懸濁液としたものを酵素液とし、基質として、L-グルタミン酸 10 μ M を使用、ア酸は終末濃度 500 γ/cc となるように添加、燐酸緩衝液で pH 7.0 に調整、ワールブルグ検圧計を使用温度 37.5°C 空气中で反応せしめ酸素消費を測定、反応終了後側室の 3N 硫酸を流入せしめることにより炭酸ガスの放出量を測定した。成績は図2に示すとおり酸素消費量、炭酸ガス放出量ともに大なる影響を与えず、ア酸自身もほとんど分解されない。

2) 次に同条件で pH のみをグルタミン酸炭酸酵素の至適 pH 5.5 とした成績は図3に示すとおりで、ア酸添加によりグルタミン酸の酸化は著明に抑制され、副室における 50% 苛性カリの添加の有無により直接時間的に測定した炭酸ガス放出もまた著明に抑制されることを見出だした。この実験中 pH 5.5 の酸性条件では、ア酸自身もまた蓄²⁾の報告と異なり、かなり酸化とともに脱炭酸されることが判明した。

3) 同条件で基質をアスパラギン酸に変えても pH 5.5 では図4に示すとおり同様の抑制

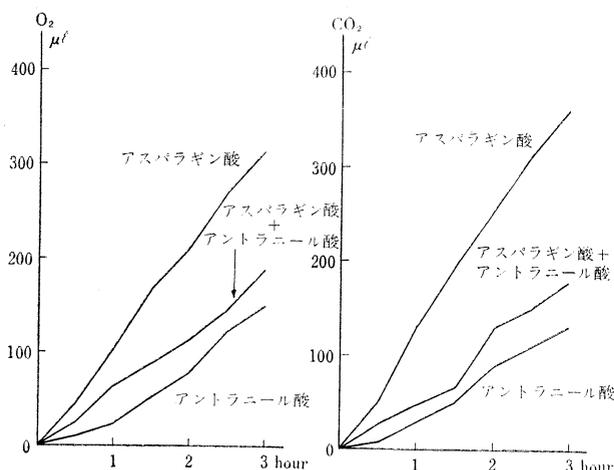
図3 鳥型結核菌のグルタミン酸代謝に及ぼす
アントラニール酸の影響 (pH 5.5)



実験条件

菌液：鳥型菌生菌 30 mg/cc の Suspension 1.0 ml
 基質：2/100 M グルタミン酸 0.5 ml (10 μM)
 アントラニール酸 (1.5 mg/cc) 1.0 ml (終末濃度 500 γ/cc)
 pH 5.5 M/2 phosphate Buffer 0.3 ml
 50 % KOH 0.1 ml (CO₂ 測定 vessel には入れず)
 水を加えて全量 3.1 ml とし
 37.5°C 空气中で反応
 それぞれの Control を引く。

図4 鳥型結核菌のアスパラギン酸代謝に及ぼす
アントラニール酸の影響 (pH 5.5)



実験条件

菌液：鳥型菌生菌 30 mg/cc の Suspension 1.0 ml
 基質：2/100 M アスパラギン酸 0.5 ml (10 μM)
 アントラニール酸 (1.5 mg/cc) 1.0 ml (終末濃度 500 γ/cc)
 pH 5.5 M/2 phosphate Buffer 0.3 ml
 50 % KOH 0.1 ml (CO₂ 測定 vessel には入れず)
 水を加えて全量 3.1 ml とし
 37.5°C 空气中で反応
 それぞれの Control を引く。

を示した。

4) 鳥型結核菌を洗菌後アセトン乾燥菌としたのち 10 mg/cc の蒸留水懸濁液としたものを酵素液とし、L-グルタミン酸 10 μM を基質とし pH 5.5 で同様に反応せしめたところ、図5に示すように酸化はほとんどなく脱炭酸のみ著明であり、脱炭酸はこの場合もア酸によりかなり著明に抑制されることが分かった。以上によりア酸は鳥型結核菌竹尾株のグルタミン酸脱炭酸酵素を阻害するものと思われる。またアセトン乾燥菌は、pH 5.5 でも生菌と異なりほとんどア酸を分解しない。

考 察

結核菌に対して抗菌作用のある物質は多数報告されているが、いずれも生体に対しては異物と考えられる薬物であるが、ア酸は古くより大阪大学生化学教室において研究され、トリプトファンの正常代謝物であることは衆知の事実である。われわれのア酸研究⁴⁾とほぼ同じころ、辻¹⁵⁾は体液の抗菌作用を生体防衛機構の面から研究し、体液中のアミノ酸またはポリペプチド分画および有機酸分画に有力な抗菌物質が含まれていることを報告している。ア酸は辻の報告した低分子の抗菌物質に包含されるか否かは不明であるが、生体内の各種の物質と協力して生体の防衛機構を形成しているものと思われる。以上の点より考え、生理的物質であるア酸の結核菌に対する抗菌作用は興味深い。

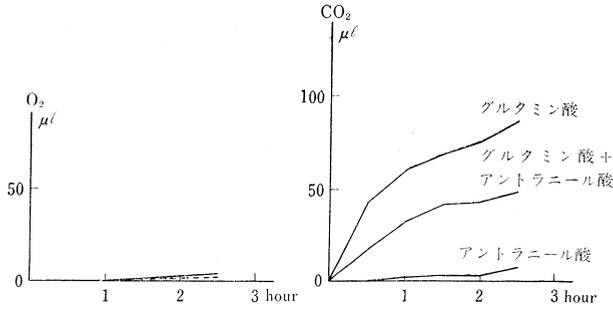
最近 Nakazawa⁶⁾は α-Hydroxy-γ-oxo-1-Norvarine の抗結核菌作用についての報告があるが本物質が正常代謝産物でないにしてもアミノ酸の抗菌作用に関する研究として興味があり、今後次々にかかる物質の見出だされることが考えられる。

ア酸が結核菌のアミノ酸代謝を抑制する事実についてもまだ報告がない。われわれは pH 5.5 でグルタミン酸およびアスパラギン酸代謝、主として脱炭酸が強く抑制されることを見出だした。グルタミン酸およびアスパラギン酸の代謝阻害はア酸の抗菌機作の重要な1つであろう。

結 論

1) アントラニール酸は人型結核菌 H37Rv 株の発育を pH 7.0 のデュボス培地では 500 γ/cc、pH 6.0 では 250 γ/cc の濃度で完全に阻止する。

図5 鳥型結核菌の Aceton 乾燥菌のグルタミン酸代謝に及ぼすアントラニール酸の影響 (pH 5.5)



実験条件

酵素液: Aceton 乾燥鳥型菌 10 mg/cc の Suspension 1.0 ml
 基質: 2/100 M グルタミン酸 0.5 ml (10 μM)
 アントラニール酸 (1.5 mg/cc) 1.0 ml (終末濃度 500 γ/cc)
 pH 5.5 M/2 phosphate Buffer 0.3 ml
 50% KOH 0.1 ml (CO₂ 測定 vessel には入れず)
 水を加えて全量 3.1 ml とし
 37.5°C 空気中で反応
 それぞれの Control を引く。

2) アントラニール酸は鳥型結核菌竹尾株の発育を pH 7.0 のデュボス培地では 750 γ/cc で強く阻害, pH 6.0 のデュボス培地では同濃度で完全に発育を阻止する。
 3) アントラニール酸は鳥型結核菌竹尾株のグルタミン酸およびアスパラギン酸代謝, 主として脱炭酸を阻害する。

本論文の要旨は第 16 回日本結核病学会地方会 (昭和 33 年) および第 31 回日本生化学会総会 (昭和 34 年) において報告した。

文 献

- 1) 市原 碩: 蛋白質及びアミノ酸の生化学, 232~233, 南条書店, 昭23.
- 2) 山村 雄一: 結核菌の生化学, 142, 共立出版社, 昭30.
- 3) 薮 勇: 大阪大学医学雑誌, 7: 703, 昭30.
- 4) 鏡山・間嶋: 第 16 回日本結核病学会近畿地方会 (昭33) 発表; 結核, 33: 317, 昭33 (抄録).
 鏡山・間嶋: 第 31 回日本生化学会 (昭34) 発表; 生化学, 30: 861, 昭34 (抄録).
- 5) 辻 周介: 結核, 33 (増刊号): 1, (昭33).
- 6) K. Nakazawa: Am. Rev. Resp. Dis., 81: 924, 1960.