

原 著

サイクロセリンによる β -アミノイソ酪酸
および β -アラニン代謝阻害

第1報 サイクロセリン治療中患者尿中 β -アミノイソ
酪酸および β -アラニン増加とその機序

安 光 勉

大阪大学医学部第1外科 (主任 曲直部寿夫 教授)

受付 昭和 48 年 2 月 14 日

INHIBITORY EFFECT OF D-CYCLOSERINE ON β -AMINOISOBUTYRIC
ACID AND β -ALANINE METABOLISM*

I. Increase of Urinary Excretion of β -Aminoisobutyric acid and β -Alanine
of Patients with Pulmonary Tuberculosis by Administration of
D-Cycloserine, and Elucidation of Its Mechanism

Tsutomu YASUMITSU

(Received for publication February 14, 1973)

In order to examine change of nucleotides metabolism in surgical stress, urinary excretion of D- β -amino-isobutyric acid (β -AIB) and β -alanine which are metabolites of thymine and uracil, respectively, were determined. Patients with tuberculosis excreted larger amounts of β -AIB and β -alanine. The urinary amounts of these amino acids were decreased 3 days after the surgical operation of lobectomy and then it returned to the original level. This change was in contrast to other surgical operations after which the amino acids increased. This paper clarified the mechanism of the peculiar pattern of urinary excretion of these amino acids of patients with tuberculosis after lobectomy.

Determination of urinary β -AIB and β -alanine was performed by using the method of Yanai and Takao, respectively. Activities of β -AIB : pyruvate and β -alanine : α -ketoglutarate aminotransferase were determined by the methods of Tsujio and Kakimoto et al, respectively. Amounts of D-cycloserine (CS) was determined by absorption at 590 mu of 50% ethanol extraction of paper strip of high voltage paper electropherogram after ninhydrin reaction.

Since large amounts of urinary excretion of β -AIB and β -alanine were observed only in patients with pulmonary tuberculosis, possibility was considered that an antituberculous drug causes the high excretion. Examination of various drugs administered to patients with tuberculosis revealed that the patients under treatment with CS excreted large amounts of these amino acids. Urinary excretion of β -AIB is known to be regulated genetically. The

* From the First Department of Surgery, Osaka University Medical School, Fukushima-ku, Osaka, 553 Japan.

human is classified genetically into high and low excretors and the former lacks β -AIB : pyruvate aminotransferase. The amount of β -AIB in urine of patients under CS treatment was close to that of β -AIB of the high excretors. This suggests that a high excretion of β -AIB in the patients is resulted from inhibition of the metabolizing enzyme by CS. CS was administered to normal subjects and tuberculous patients at 0.5 g per day in two divided dose. β -AIB in the low excretors increased to the level of β -AIB of the high excretors after 2 ~ 6 days. The concentration of β -alanine increased concomitantly. The high levels returned to original ones after withdrawal of the drug. The concentration of β -AIB in the high excretors did not change with the administration of CS. Upon surgical operation of lung tuberculosis the administration of CS was routinely stopped for three days. The above results clearly indicate that the original high concentrations of β -AIB and β -alanine and the decrease after the operation are due to the clinical use of CS. Most reasonable explanation on the effect of CS to increase β -AIB and β -alanine in urine is the result of inhibition of the metabolizing enzymes by CS or its metabolites.

CS at a dose of 20 mg per 100 g of body weight was injected intraperitoneally into rats. The concentrations of β -AIB and β -alanine in rat liver increased remarkably and reached to the maximal level 4 hours after the CS injection. The concentration of CS was highest 30 minutes after the injection, decreased rapidly, and it was not detected 4 hours after the injection. Both the activities of β -AIB : pyruvate and β -alanine : α -ketoglutarate aminotransferases dropped rapidly and were lowest at 2 and 4 hours after the injection. The results support the above explanation.

I. 緒 言

D- β -アミノイソ酪酸 (以下 β -AIB* と略す) は哺乳動物ではチミンに由来し¹⁾, メチルマロン酸セミアルデヒドに分解される。ヒトの尿中 β -AIB の mg クレアチニン当量の排泄量の人口内分布をみると, 10~15 mcg と 100~150 mcg とをそれぞれ山とする 2 峰性の分布²⁾ をし, 前者は「低排泄者」, 後者は「高排泄者」³⁾ とよばれ, 遺伝的に規定されている。すなわち, 楠木ら^{2,4)} によれば, β -AIB 分解酵素は, β -AIB : ビルビン酸アミノ基転移酵素であり, 「高排泄者」はこの酵素を先天的に欠くもので, 日本人ではその頻度が高く, 人口の 36% であるとされている。

β -アラニン**は主としてウラシルに由来し, β -AIB のように分解酵素を欠くことはほとんどないので, マロン酸セミアルデヒドに分解され, したがって β -アラニンの尿中排泄量はきわめて少ない。高尾の報告⁵⁾ では, 健康人は 8 mcg/mg クレアチニン以下で, 約 60% は 1 mcg/

mg クレアチニン以下の排泄量とされている。

著者は外科手術後の尿中 β -AIB および β -アラニンの排泄量を測定し, 外科手術後の核酸代謝の変動をうかがおうと試みた。そのさい, 肺結核患者では, 術前に β -AIB および β -アラニンの尿中排泄量が増大し, 肺切除術を行うと, 術後漸減し, 術後 3 日目後に最低値を示し, のち漸増するという他種の手術時にはみられない特異な変動のパターンを示す例が多かった。この臨床的事実から, 本研究においては, まず結核患者の術前の尿中 β -AIB および β -アラニンの高排泄, および術後の変動のパターンが, 他手術時にはみられない特異的なものであるか否かを確認し, さらにその原因となる機序がいかなるものであるかを見出そうとした。

II. 研究方法

1. 対象および材料

健康人としては大阪大学付属病院, 大阪府立羽曳野病院の職員およびその家族, 結核患者としては羽曳野病院入院患者, 結核以外の患者としては大阪大学医学部第一外科入院患者のそれぞれの早朝空腹時尿または一日尿を採取し, -20°C で保存した。

動物実験には, 体重 150 g 前後のラットを使用した。

健康人および患者が服用したサイクロセリン (以下 CS と略す) は市販の錠剤***, 動物実験および試験管

* β -AIB : D- β -aminoisobutylic acid $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\overset{\text{CH}_3}{\text{C}}-\text{COOH}$

** $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$

*** 明治製薬製

$$\begin{array}{c} \text{N} \\ | \\ \text{H}_2\text{N}-\overset{\text{C}}{\text{C}}-\text{O} \\ | \quad | \\ \text{H}_2\text{C} \quad \text{NH} \\ | \\ \text{O} \end{array}$$

内の実験には CS の純末*** を使用した。

2. β -AIB および β -アラニン定量法

a. 尿中の β -AIB および β -アラニン定量法

矢内ら²⁾ および高尾ら³⁾ の方法に準じて行つた。すなわち 1 mg クレアチニン (アルカリ性ピクリン酸法により測定) を含む早朝空腹時尿, または 1 日尿の 1,000 分の 1 を, 1×3 cm カラムのアンバーライト IR-120×8 H⁺ 型 100~200 メッシュに通し, 10 ml の水で洗つたのち, 2 M ピリジン 6 ml で溶出した。溶出液を室温で減圧乾固のち, 残渣を 0.1 ml の水でとかし, うち 10 mcI を用いて高圧濾紙電気泳動法で展開した。すなわち, 30×50 cm の東洋濾紙 No. 51 を用い, β -AIB および β -アラニンの標準物質それぞれ 5, 10 mcg とともに 100 v/cm で, ピリジン:酢酸:水 (1:10:189) pH 3.4 の緩衝液で 25 分間泳動した。濾紙を乾燥後 0.25% ニヒドリンのアセトン:酢酸 (8:2) 液に浸し, 100°C で 5 分間加熱し, 発色させた。 β -AIB および β -アラニンの分画を 50% エタノール 5 ml で抽出し, それぞれ 570 m μ , 590 m μ の吸光度で比色定量した。

b. ラット肝内の β -AIB および β -アラニン定量法

ラット肝 2g を 5% トリクロール酢酸 20 ml でホモジネートし, 遠沈ののち上清を 1×5 cm カラムのアンバーライト IR-120 H⁺ 型 100~200 メッシュに通し, 15 ml の水で洗つたのち, 10 ml の 2 M ピリジンで溶出した。溶出液を減圧乾固し, 残渣を 0.1 ml の水に溶かし, その 10 mcI を高圧濾紙電気泳動法を用いて尿中の定量法に準じて測定した。

3. ラット肝内の CS 定量法

CS を注射したラットの肝内 β -AIB および β -アラニンを前述の方法で測定したとき, CS は β -アラニンよりさらに陰極側にニヒドリン陽性分画として泳動される。そこで, β -AIB, β -アラニンの測定と同時に CS の分画を 4 ml の 50% エタノールで抽出し, 同時に泳動した 5 mcg の CS 標準物質を用い, 590 m μ の吸光度で比色定量した。本法での CS の回収率は 76±6% であつた。

4. β -AIB: ピルビン酸および β -アラニン: α -ケトグルタル酸アミノ基転移酵素活性測定法

a. 酵素材料

以下のすべての操作は, 0~4°C で行つた。体重 150g 前後のラット肝を 5 倍量の 0.01 M 磷酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) でホモジネートし, 30 分後 12,000×g で 20 分間遠沈し, その上清を β -AIB: ピルビン酸アミノ基転移酵素として使用した。

体重 150g 前後のラット肝を 10 倍量の 0.01 M 磷酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) でホモジネートし, 30 分後 12,000×g で 20 分間遠沈した。この上清に固型硫酸を加え, 55% 飽和とし 30 分後遠沈した。この上清に固型

硫酸を加え, 70% 飽和とし, 30 分後遠沈し, β -AIB: ピルビン酸アミノ基転移酵素を除き, さらにこの上清に固型硫酸を加え, 80% 飽和とし, 30 分後遠沈した。この最後の沈殿物を少量の 0.01 M 磷酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) で溶かし, β -アラニン: α -ケトグルタル酸アミノ基転移酵素として使用した。

b. β -AIB: ピルビン酸アミノ基転移酵素活性測定法
辻尾⁴⁾ の測定法に準じて, 反応はメチル ¹⁴C- β -AIB 0.05 mc mole (比放射能 4.9×10⁵ dpm/mc mole β -AIB), ピルビン酸ナトリウム 1 mc mole, コハク酸およびメチルマロン酸セミアルデヒド 10 mc mole, および前記酵素 0.1 ml で行つた。CS の阻害実験にはそれぞれの濃度の 0.1 ml を加えた。緩衝液は 0.2 M 硼酸-硼酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.8) を用い, 反応総量は 0.6 ml とした。37°C で 20 分間インキュベートし, 10% トリクロール酢酸 0.5 ml で反応をとめ遠沈した。その上清を 0.5×1 cm カラムのアンバーライト IR-120 H⁺ 型 100~200 メッシュに通し, 漏出液および 1 ml での水洗液を採取し, これに Bray 液 10 ml を加え, 液体シンチレーションカウンターで測定した。本法においては, 反応した β -AIB 量とレジンより 1 M ピリジン 1 ml で溶出される未反応の β -AIB との間に stoichiometry が成立した。

c. β -アラニン: α -ケトグルタル酸アミノ基転移酵素活性測定法⁷⁾

前記酵素 0.2 ml, 0.2 M 硼酸-硼酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.8) 0.2 ml, β -アラニン 10 mc mole, α -ケトグルタル酸 10 mc mole を加え, 反応総量を 0.7 ml とし, 37°C で 60 分インキュベートした。CS の阻害実験には, それぞれの濃度の 0.1 ml に, 酵素 0.2 ml, 硼酸緩衝液 0.2 ml を加え, 37°C で 10 分間あらかじめインキュベートし, のち β -アラニン 10 mc mole, α -ケトグルタル酸 10 mc mole を加え, 反応総量は 0.7 ml とし, さらに 60 分インキュベートした。10% トリクロール酢酸 0.5 ml で反応をとめ, 遠沈後上清を 1×2 cm カラムのアンバーライト IR-120 H⁺ 型に通し, 水洗後 2 M ピリジン 6 ml で溶出した。溶出液を減圧乾固し, 残渣を 0.1 ml の水に溶かし, うち 10 mcI を高圧濾紙電気泳動法を用いて, pH 3.4 の緩衝液で, 東洋濾紙 No. 51 を用いて, 3 kV, 30 分泳動した。濾紙を乾燥後, ニヒドリン発色させ, 50% エタノール 5 ml で抽出し, 生成グルタミン酸量を同時に泳動した標準物質と 570 m μ の吸光度で比色定量した。

III. 研究成績

1. 外科手術後の尿中 β -AIB および β -アラニン量の変動

a. β -AIB および β -アラニン量の術前日差変動

Table 1. Daily Variation of the Concentration of Urinary β -Aminoisobutylic Acid

Normal	Days of urine collection			Patient	Days of urine collection			Patient	Days of urine collection		
	1	2	3		1	2	3		1	2	3
1	0	0	0	1	0	0	0	16	0	0	0
2	4	3	0	2	13	9	4	17	35	33	15
3	6	6	1	3	20	18	12	18	49	45	20
4	8	6	6	4	27	22	16	19	128	105	76
5	10	6	6	5	125	118	109	20	150	138	125
6	10	6	6	6	165	149	141	21	50	43	41
7	12	11	9	7	231	212	183	22	68	63	60
8	12	12	9	8	16	8	6	23	68	64	57
9	14	10	8	9	36	31	27	24	92	72	67
10	17	17	17	10	15	14	9	25	113	98	93
11	42	36	36	11	16	8	6				
12	50	44	33	12	16	14	9				
13	140	125	111	13	39	29	29				
14	148	148	133	14	73	66	62				
15	170	150	118	15	126	102	83				

The number in the table represents the amount of β -AIB (mg/day)

Patient 1.....7 lung cancer, 8,9 gastric ulcer, 10.....15 gastric cancer, 16.....25 pulmonary tuberculosis.

Table 2. Daily Variation of the Concentration of Urinary β -Alanine

Normal	Days of urine collection			Patient	Days of urine collection			Patient	Days of urine collection		
	1	2	3		1	2	3		1	2	3
1	2	2	1	1	0	0	0	11	9	6	3
2	4	2	2	2	4	4	2	12	10	7	3
3	4	3	2	3	5	4	0	13	14	14	13
4	5	4	2	4	9	5	4	14	16	13	9
5	9	8	4	5	9	8	5	15	16	16	11
6	10	8	4	6	1	0	0	16	23	14	13
7	11	4	4	7	9	8	5	17	44	37	37
8	11	8	7	8	4	4	3	18	52	37	32
9	12	8	5	9	9	8	7	19	76	66	57
10	14	10	6	10	11	9	8	20	78	63	48

The number in the table represents the amount of β -alanine (mg/day).

Patient 1.....5 lung cancer, 6,7 mitral stenosis, 8,9,10 gastric cancer, 11.....20 pulmonary tuberculosis.

(Table 1, 2)

健常人 15 例を日を異にして3日採尿して、尿中 β -AIB の排泄量を測定してみると、1日 0~170 mg 排泄され、個人差は大であるが、同一個人においては比較的一定していた。次に、肺癌、胃潰瘍、胃癌、肺結核などの疾患群 25 例について測定すると、排泄量は1日 0~231 mg の間にあり、日差変動は比較的少なく、健常人、上記疾患患者いずれについても、高排泄者群ではほぼ 50 mg、低排泄者群ではほぼ 20 mg 以内であった。

尿中 β -アラニンの排泄量は、健常人 10 例を日を異にして3日採尿して測定すると、1日最大 14 mg (mg クレアチニン当量では 15 mcg) 以下の低い排泄量であつ

た。疾患群では、肺結核患者に排泄量が高い例が多くみられた。しかし日差変動は健常人では 8 mg 以内、疾患群では 30 mg 以内であった。

b. β -AIB の術後変動

肺結核患者に対する肺切除術 11 例中 8 例において、術前排泄量から術後日差変動をこえて減少し、術後 3 日目前後に最低値を示し、以後漸増し、1ないし 2 週目にほぼ術前値に復するという変動がみられた。(Fig. 1)

他方、非結核性肺炎患(肺癌、気管支腺腫、気管支拡張症など)に対する肺切除術では、変化の少ないもの、3日目前後にやや増大するもの、少し減少しているものがあり、一定の傾向はみられなかつた。(Fig. 2)

Fig. 1. Urinary Excretion of β -AIB in Patients with Pulmonary Tuberculosis before and after Operation

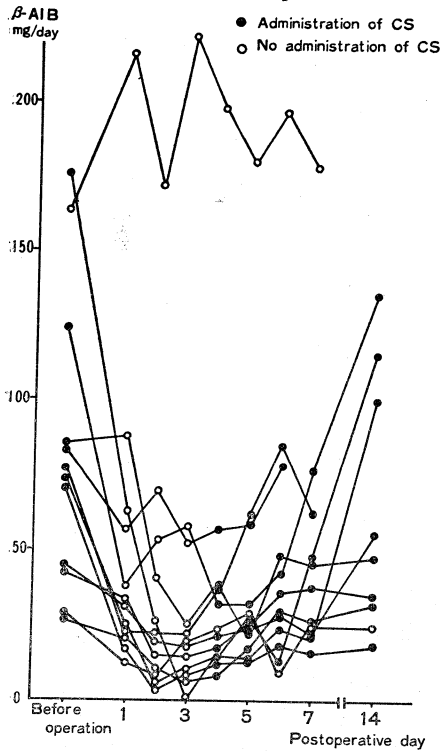


Fig. 2. Urinary Excretion of β -AIB before and after Abdominal Surgery

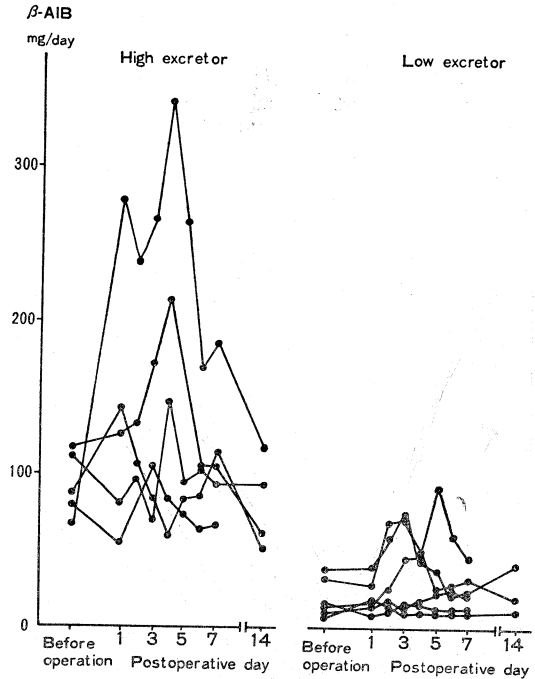
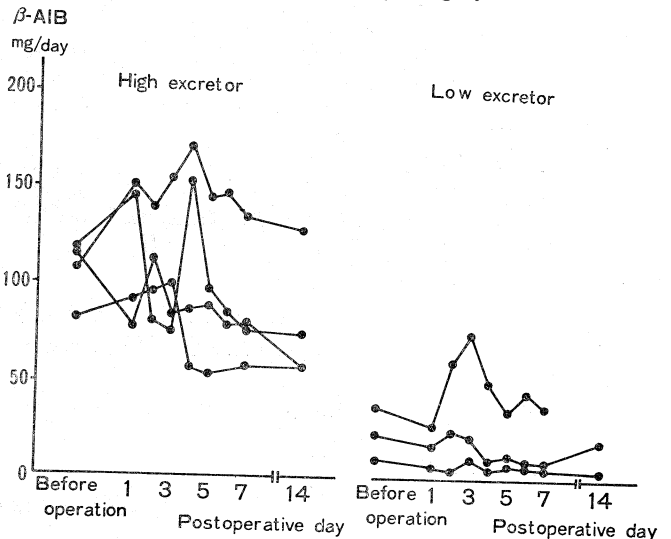


Fig. 3. Urinary Excretion of β -AIB before and after Pulmonary Surgery



胃癌、胃潰瘍などの開腹術例では、術後漸増し、3日目前後にピークに達し、以後漸減して前値にもどるといふ、肺結核の術後とは反対のパターンを示す例が多くみられた。(Fig. 3)

c. β -アラニンの術後変動

肺結核患者では、術前高排泄を示す例が多く、肺切除術後は β -AIB の変動のパターンと同じように、9例中6例で日差変動をこえて減少し、術後3日目前後に最低値となり、以後漸増するというパターンを画いた。(Fig. 4)

なお肺結核以外の手術群では、排泄量も少なく、一定の変動のパターンを見出すことはできなかった。

2. CS 服用肺結核患者の尿中 β -AIB および β -アラニン量

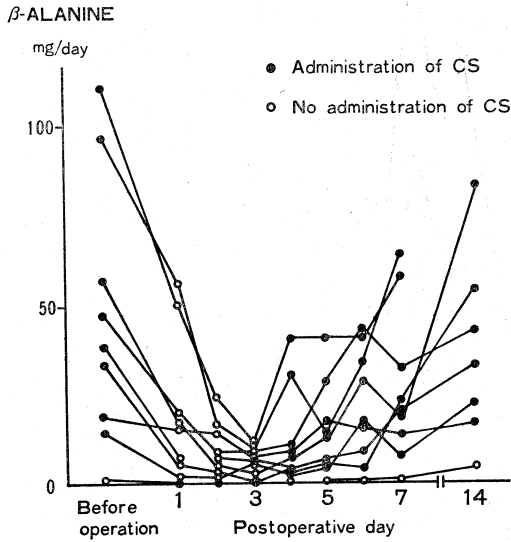
結核患者の術後、 β -AIB および β -アラニンの尿中排泄量のパターンに特異な変化がみられたので、肺結核患者の多数例について、これらアミノ酸の尿中排泄量を測定した。

結核患者 149 例について検討すると、 β -AIB の「高排泄者」は 75 例 (50%) で、健常人のそれ (36%) よ

り頻度が高く、 β -アラニンの排泄量 15 mcg/mg クレアチニン以上は 46 例で、尿中排泄量の増加が明らかとなった。そこで抗結核剤による影響を考え、抗結核剤の服用種類別に検討した結果、CS 服用者と非服用者の間に排泄量の差が見出された。すなわち、 β -AIB 排泄は、CS 非服用者 95 人ではほぼ 50 mcg/mg クレアチニンを谷とする 2 峰性の山を示す分布をし、50 mcg/mg クレア

チニン以上の「高排泄者」は33人(35%)であつたが、CS服用者54人では低排泄者群が減少し、高排泄者は42人(78%)と増加した。しかし最大排泄量はCS服用

Fig. 4. Urinary Excretion of β -Alanine in Patients with Pulmonary Tuberculosis before and after Operation



者、非服用者の間にはほとんど差は認められなかつた。(Fig. 5)

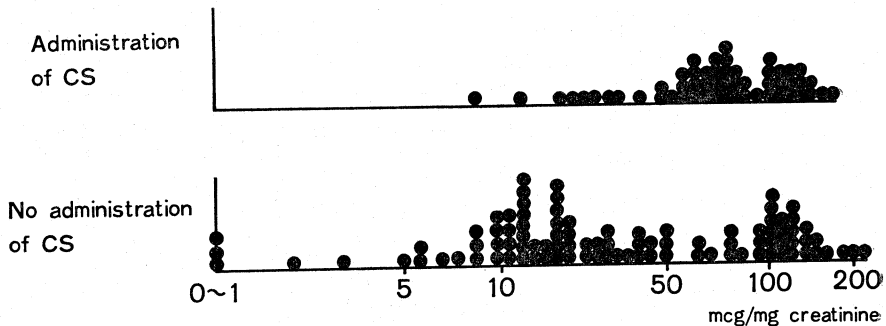
β -アラニン は CS 非服用者 95 人のうち排泄量が 1 mcg/mg クレアチニン以下の測定不能例が 23 例 (24%) あり、測定しえたものでは平均 9 mcg/mg クレアチニンであるのに対し、CS 服用者 54 例では測定不能例はなく、平均 39 mcg/mg クレアチニンであり、CS 服用者群に β -アラニンの増量がみられた。(Fig. 6)

以上から CS 服用による影響が考えられたので、前述の Table 1, Table 2 について再検討すると、Table 1 の 21~25, Table 2 の 16~20 の結核患者のそれぞれ 5 例は CS の連日服用者で、 β -AIB では 21 を除き他の 4 例は 50 mcg/day 以上で、 β -アラニンでは 5 例とも 15 mcg/day 以上を示し、CS 服用者に排泄量の増大がみられた。

3. CS 服用による尿中 β -AIB および β -アラニンの変化

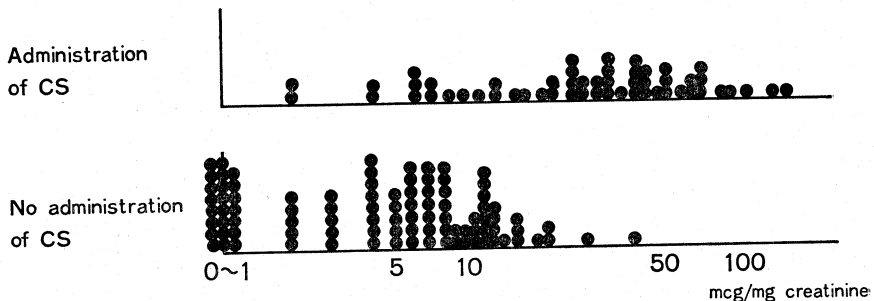
術前 CS を服用していた肺結核患者の術後尿中 β -AIB および β -アラニン排泄量の変化は CS によるものである可能性を確かめるため、健康人 3 人、肺癌患者 1 人および肺結核患者 5 人の計 9 人に CS 1 日量 0.5g を朝夕

Fig. 5. Effect of CS on β -AIB Excretion



Each black circle in the table represents the amount of β -AIB (mcg/mg creatinine) for each subject.

Fig. 6. Effect of CS on β -Alanine Excretion



Each black circle in the table represents the amount of β -Alanine (mcg/mg creatinine) for each subject.

2回にわけて5~9日間服用させ、経日的に早朝空腹時尿で、 β -AIB および β -アラニンの排泄量を測定した。 β -AIB においては、「高排泄者」ではCS服用後も排泄量の変化はみられず、「低排泄者」はCS服用とともに排泄量が増大し、3~6日後にピークに達し、服用中止とともに漸減し、前値にもどつた。(Fig. 7)

β -アラニンについては、健康人3人および肺結核患者5人の計8人について測定すると、服用前2~16 mcg/mg クレアチニンの尿中排泄量が服用とともに増大し、2~7日の間に40~130 mcg/mg クレアチニンに及ぶピークに達し、服用中止とともに漸減し、前値にもどつた。(Fig. 8)

なお1日尿量あたりについても測定し、同様の結果を得たので、CS服用によるクレアチニン量の変化ではないことを確認した。そこで前述の Fig. 1, Fig. 4 について再検討すると、●はCS服用、○は非服用を示してい

るが、○—○は術前、術後もCSを服用しなかつた例で、 β -AIB では2例、 β -アラニンでは1例の全例に減少のパターンはみられなかつた。●—○—●はCSの術前服用、術当日から術後3日まで服用中止、術後4日目から服用を再開した例で、 β -AIB については9例中8例、 β -アラニンについては8例中6例に明らかな減少のパターンがみられた。

また、CSを服用すると、 β -AIBの高排泄者の頻度が増加するが、最大排泄量はCS服用の有無にかかわらず等しいこと、服用前からの β -AIBの「高排泄者」すなわち β -AIB分解酵素を遺伝的に欠損しているヒトにはCSの影響がないことから、CSが β -AIB分解酵素を阻害しているという可能性が推定された。 β -アラニンについても同様の機作が類推された。

4. CS腹腔内投与のラット肝内 β -AIB、 β -アラニン、CSおよび酵素活性に及ぼす影響

Fig. 7. Effect of CS on β -AIB Excretion

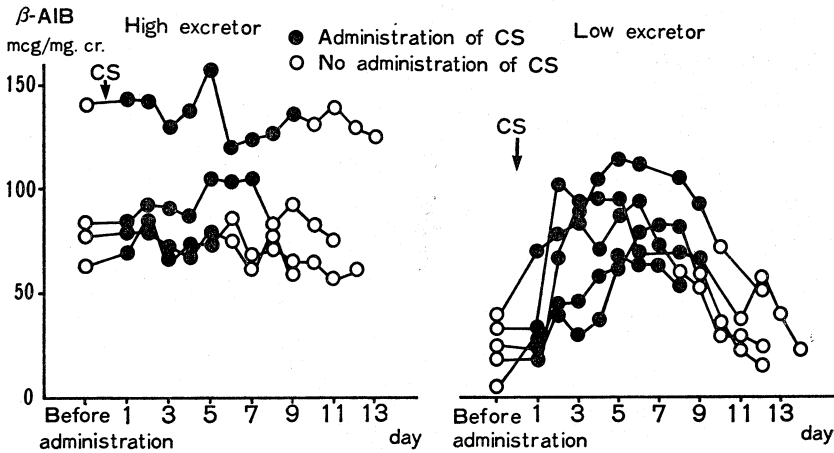


Fig. 8. Effect of CS on β -Alanine Excretion

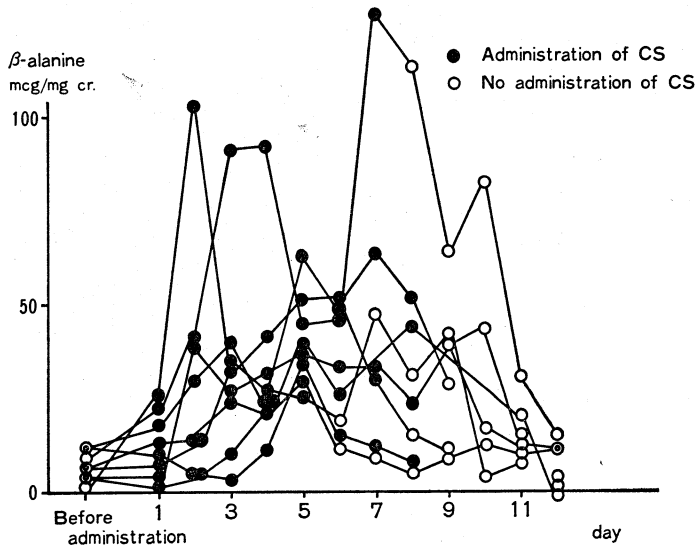
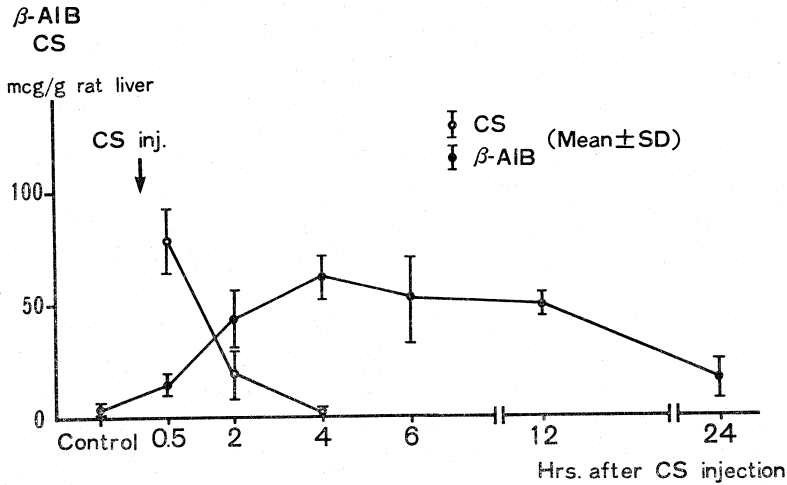
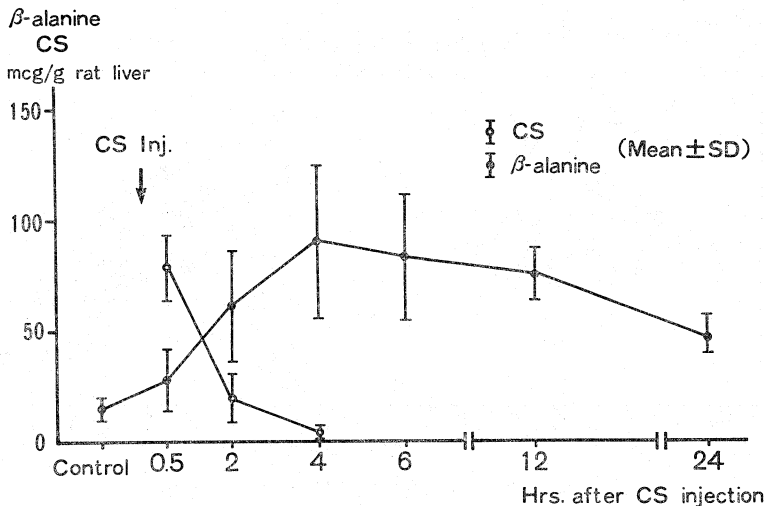


Fig. 9. β -AIB and CS in the Rat Liver after CS InjectionFig. 10. β -Alanine and CS in the Rat Liver after CS Injection

腹腔内に体重 100g あたり 20mg の CS を投与したラット計 47 匹および対照 20 匹 (いずれも体重 150g 前後) の肝内 β -AIB, β -アラニンおよび CS の濃度および酵素活性を測定した。

CS は投与後速やかに増量し, 投与後 30 分で, 79 ± 15 mcg/g ラット肝となり, のち次第に減少し, 投与後 4 時間ではきわめて少量となつた。(Fig. 9, 10)

β -AIB は, 対照の 5 ± 3 mcg/g ラット肝が, 投与後 4 時間で, 62 ± 10 mcg となりピークに達し, 以後漸減した。(Fig. 9)

β -アラニンにおいてもほぼ同様の変化が得られた。すなわち, 対照の 15 ± 5 mcg/g ラット肝が, 投与後 4 時間で 91 ± 35 mcg と増量した。(Fig. 10)

酵素活性は, 主として β -AIB: ピルビン酸アミノ基転移酵素について測定したが, 投与後 30 分で速やかに

活性が著明に低下し, 4 時間後まで持続し, 以後次第に活性が回復するが, 24 時間後もなおかなり低かつた。(Fig. 11)

β -アラニン: α -ケトグルタル酸アミノ基転移酵素活性は, 2 時間後に阻害が認められ, 4 時間後にもなおかなりの活性阻害が認められた。(Fig. 12)

5. 試験管内の CS による酵素活性阻害 (Table 3)

β -AIB: ピルビン酸アミノ基転移酵素活性で, CS は最終濃度 $1/6 \times 10^{-8}$ M で 12%, $1/6 \times 10^{-2}$ M で 61%, $1/6 \times 10^{-1}$ M で 96% 阻害した。

β -アラニン: α -ケトグルタル酸アミノ基転移酵素活性では, CS 最終濃度 $1/7 \times 10^{-8}$ M で 40%, $1/7 \times 10^{-2}$ M で 64%, $1/7 \times 10^{-1}$ M で 99% の阻害を示した。

CS は β -AIB: ピルビン酸および β -アラニン: α -ケトグルタル酸アミノ基転移酵素活性を *in vivo* で強く阻

Fig. 11. Effect of CS Injection on β -AIB : Pyruvate Transaminase Activity in the Rat Liver

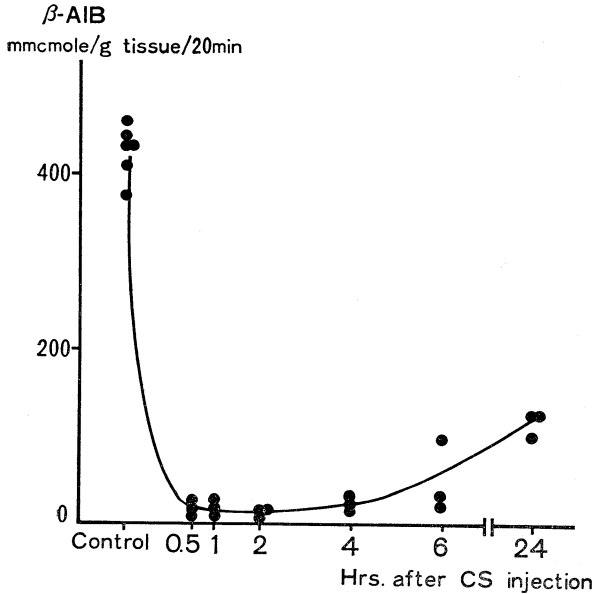


Fig. 12. Effect of CS Injection on β -Alanine : α -Ketoglutarate Transaminase Activity in the Rat Liver

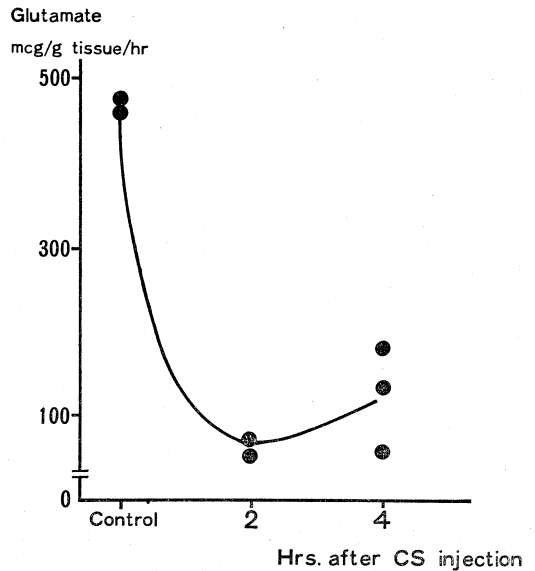


Table 3. Effect of CS on Enzyme Activity

Final concentration of CS (M)	% inhibition (β -AIB transaminase)
$1/6 \times 10^{-3}$	12
$1/6 \times 10^{-2}$	61
$1/6 \times 10^{-1}$	96

Final concentration of CS (M)	% inhibition (β -alanine transaminase)
$1/7 \times 10^{-3}$	40
$1/7 \times 10^{-2}$	64
$1/7 \times 10^{-1}$	99

害した。しかし体重 100g あたり 20 mg の CS の腹腔内投与時の CS の肝内濃度は、最高時では 6×10^{-4} M であり、この濃度では、*in vitro* ではほとんど阻害はみられず、しかも投与した CS がラット肝内できわめて低い濃度まで減少した投与後 4 時間で肝内 β -AIB および β -アラニンは最高濃度に達することから、阻害には CS 以外に CS からの代謝物質の関与が推定された。CS からの代謝物質については次報で報告する。

IV. 考 案

1. 外科手術後の尿中 β -AIB および β -アラニン量の変動について

従来より β -AIB の1日尿中排泄量または 1mg クレアチニン当量の尿中排泄量は個人差は大であるが、ある個人については比較的一定している²⁾³⁾とされている。自験例でも同一個人について異なつた3日の排泄量をみ

ると、健常人、患者群とも高排泄者群では 50 mg、低排泄者群では 20 mg 以内の変動であつた。

β -アラニンの代謝については詳細な研究はみられない。健常人および肺結核以外の疾患患者では、著者の測定した範囲では1日排泄量は 14 mg 以下 (mg クレアチニン当量では最大 15 mcg) で、38 例中 30 例は高尾の報告⁵⁾ のように 8 mcg 以下であつた。また日差変動は少なく、CS を服用しないものでは 8 mg 以下、CS を連日服用したもので最大 30 mg であつた。これらの変動の幅をこえて、手術時の肺結核患者には、特異なパターンが多くみられたが、これは CS を術前服用していたものが、術後休業し術後 4 日目より服用を再開するために生じたものであることを知つた。主として肺結核患者の術後変動を検討した昭和 41 年前後の大阪府立羽曳野病院での手術患者に CS 服用者が多かつたことが、この術後の特異な変動を発見する動機となつた。

腹部手術後の術後の変動は Levey⁶⁾ が 1963 年に 7 例報告したが、1日 $1,000 \sim 2,000$ mg ときわめて多量の排泄増加があると発表した。著者の測定例では、最大 340 mg であつて、Levey の報告と排泄量が大きく違つたが、術後排泄量が增大する例がやはり多かつた。この増加機作については、手術侵襲、手術部位あるいは絶食などの影響が考えられるが、いずれにしてもヌクレオチドの合成の増加あるいは DNA の分解が関与しているであろうし、これらの点についてはなお今後の検討を要する。 β -AIB の「高排泄者」ではその尿中排泄量は「高排泄者」はその分解酵素活性を遺伝的に欠いているので直接チミンからの代謝を反映しうると考えられるが、

「低排泄者」では β -AIB の分解の面も考慮する必要がある。したがって肺結核以外の外科手術後の β -AIB の変動については、高排泄者と低排泄者にかけて検討した。しかしこれまでのところ、術後変動について、高、低排泄者の間には著明な差は見出せなかつた。

2. CS による種々の酵素の阻害について

従来より CS は主としてグルタミン酸：アラニンアミノ基転移酵素（いわゆる GPT）、およびグルタミン酸：アスパラギン酸アミノ基転移酵素（いわゆる GOT）を中心にビタミン B₆ 系酵素阻害作用を有することが報告されてきた。すなわち、グルタミン酸：アスパラギン酸アミノ基転移酵素において、青木¹⁰ は CS 10^{-2} M で 70～90%、Barbieri¹¹ は 2×10^{-3} M で 43% の阻害を報告した。グルタミン酸：アラニンアミノ基転移酵素においては、Barbieri¹¹ は 10^{-3} M で 7～58%、Porfirieva¹² は 300 mg/kg のラット経口投与後 1 時間で 40% の阻害を報告した。著者は 200 mg/kg をラット腹腔内に投与し、6 時間後の肝および血中の GOT、GPT を測定したが、肝内 GOT、GPT にやや低下傾向がうかがわれたが、対照にくらべ著明な差は認められなかつた。これと同時に測定した β -AIB：ピルビン酸および β -アラニン： α -ケトグルタル酸アミノ基転移酵素活性は著明に低下していたので、CS 投与による酵素阻害は少なくとも *in vivo* では β -AIB：ピルビン酸アミノ基転移酵素の阻害の方が、GOT、GPT 阻害より強いと考えられる。

その他、青木¹³ はグルタミン酸脱炭酸阻害を報告した。また Dann¹⁴ は 6.5×10^{-4} M で、 γ -アミノ酪酸： α -ケトグルタル酸アミノ基転移酵素が 95% 阻害されることを報告し、ラット脳内 γ -アミノ酪酸の増量を示し、CS の副作用との関係を示唆したが、脳内増量にはラット体重 100 g につき 600 mg という大量投与を要した。著者がラット体重 100 g あたり 20 mg を腹腔内に投与したときの肝内および脳内 γ -アミノ酪酸を高圧濾紙電気泳動法を用いて測定したが、肝内 γ -アミノ酪酸は、対照で 18 匹平均 2.9 mcg/g ラット肝であつた。投与後 2 時間の 6 匹平均では、16.5 mcg/g ラット肝と増量を示したが、 β -AIB、 β -アラニンの増加量に比べて少なかつた。またこのときの脳内 β -AIB、 β -アラニンおよび γ -アミノ酪酸についてはほとんど増量は認められなかつた。 γ -アミノ酪酸は、CS が合成酵素のグルタミン酸脱炭酸酵素と分解酵素の γ -アミノ酪酸： α -ケトグルタル酸アミノ基転移酵素の両者を阻害するためかもしれない。

3. CS の作用と副作用との関係について

CS の抗菌力の作用機序は、L-アラニンラセミ化および D-アラニン重合の阻害にある^{15,16}とされている。 β -AIB：ピルビン酸および β -アラニン： α -ケトグルタル酸アミノ基転移酵素阻害と抗菌作用との関係について

は不明である。CS の臨床使用のさい、ふらつき、頭痛、さらには痙攣という副作用があり、服用を中止せざるをえないときがある。これまで、原因不明の痙攣発作をきたした症例に、高 β -アラニン、 γ -アミノ酪酸および β -AIB 尿をみたという報告¹⁷があり、 β -アラニンあるいは γ -アミノ酪酸と痙攣との関係が注目されるが、著者が測定した例では 101 mcg/mg クレアチニンという高 β -アラニン尿をみた例にほとんど副作用がみられず、 β -アラニンあるいは β -AIB の尿中排泄量と副作用の間には直接的な関係はみられなかつた。しかし、さらに今後は重篤な副作用の例を検討することが必要と考えられる。

4. β -AIB および β -アラニンの尿中排泄増加について

これまで病的状態において β -AIB の排泄量が増大するのは、癌、白血病¹⁸⁻²⁰、放射線被曝²¹、手術後⁹ など細胞破壊が増加しているときが主として報告されている。癌では、自験例でも肺癌 8 例中 4 例、消化器癌 11 例中 6 例、その他悪性腫瘍 6 例中 5 例の計 25 例中 16 例 (64%) に 1 日 50 mg 以上の高排泄をみ、細胞破壊が増加していると考えられるが、 β -AIB の高排泄については分解酵素活性の個体差を十分考慮する必要がある。

β -アラニンでは、これまで排泄増加の報告は少なく、高尾の報告⁵ 以外は、腰椎カリエス²²、甲状腺機能亢進症²³、原因不明の意識消失、痙攣をきたした例¹⁷があるにすぎない。

本研究により CS 服用者は、 β -AIB：ピルビン酸および β -アラニン： α -ケトグルタル酸アミノ基転移酵素活性が阻害され、両アミノ酸が多量に尿中に排泄されることが明らかとなつたが、「低排泄者」に CS を投与すると、「高排泄者」とほとんど等しい β -AIB 排泄量がみられることから、「低排泄者」においても、チミンからの β -AIB の生成量は、「高排泄者」のそれとほぼ同様であることが示唆された。また、「高排泄者」は β -AIB：ピルビン酸アミノ基転移酵素の欠損であることの傍証ともなる。

次に、肺結核患者において定性的ではあるが石原の報告²⁴もあり、CS 以外の原因による β -AIB および β -アラニンの排泄増加のあることが考えられるので、CS を服用しない肺結核患者について検討を加えてみた。 β -AIB 排泄では、Fig. 5 に示すごとく、CS を服用しない 95 人中高排泄者は 33 人 (35%) と健常人のそれ (36%) と同様であつたが、しかし著者が別群の重症のものに限って 1 日尿について測定した肺結核患者 16 例中 9 例 (56%) に β -AIB の高排泄者があり、健常人の頻度よりかなり高かつた。

一方 β -アラニンでは、自験例では健常人は最高で 15 mcg/mg クレアチニン (38 例中 30 例は 8 mcg 以下)

で、平均値は 4.5 mcg/mg クレアチニンであつたが、Fig. 6 に示したように、CS を服用しない者に 15 mcg/mg クレアチニン以上排泄している例が 95 例中 6 例あり、平均値は 6.4 mcg/mg クレアチニンであつた。さらに未治療肺結核患者 25 例中 15 mcg/mg クレアチニン以上の排泄をするもの 4 例、平均値 10.7 mcg/mg クレアチニンであつた。

以上より、肺結核患者での β -AIB および β -アラニンの排泄については、INH その他の CS 以外の抗結核剤の影響あるいは結核そのものの影響も考えられるが、これらの点についてはなお今後の検討を要する。

V. 結 論

1. CS 服用により、 β -AIB および β -アラニンの尿中排泄量が増大する事実を見出した。肺結核患者の術前の高排泄および術後の特異な変動のパターンは、CS 服用の有無によるものであつた。

2. β -AIB および β -アラニンの尿中排泄増加は、CS が β -AIB: ピルビン酸および β -アラニン: α -ケトグルタル酸アミノ基転移酵素活性を阻害するためであることを証明した。

稿を終るに当り、ご懇篤なご指導とご校閲を賜つた武田義章前教授、曲直部寿夫教授、高次神経研究施設佐野勇教授に深甚の謝意を表します。終始直接ご指導ご鞭撻をいただいた高次神経研究施設柿本泰男助教授、第1外科正岡昭講師、脳神経外科魚住徹講師に深く感謝いたします。また、研究にご協力頂いた大阪府立羽曳野病院山本和男院長はじめ諸先生方、高次神経研究施設の諸先生方、第1外科高尾哲人博士はじめ教室員の各位に感謝いたします。

なお本論文の一部は、第 35 回日本結核病学会近畿支部学会、第 45 回日本結核病学会、第 4, 5, 6, 7, 8 回術後代謝研究会において発表した。

文 献

1) Fink, K., Henderson, R. B., Fink, R. M.: J.

Biol. Chem., 197: 441, 1952.

- 2) Yanai, J., Kakimoto, Y., Tsujio, T., Sano, I.: Amer. J. Hum. Gen., 21: 115, 1969.
- 3) Gartler, S. M.: Arch. Biochem. Biophys. 80: 400, 1959.
- 4) Kakimoto, Y., Taniguchi, K., Sano, I.: J. Biol. Chem., 244: 335, 1964.
- 5) Takao, T., Yasumitsu, T., Uozumi, T., Kakimoto, Y., Kanazawa, A.: Nature, 217: 365, 1968.
- 6) 辻尾武彦: 大阪大医誌, 23: 41, 1971.
- 7) Kakimoto, Y., Kanazawa, A., Taniguchi, K., Sano, I.: Biochim. Biophys. Acta., 156: 374, 1968.
- 8) Armstrong, M. D., Yates, K., Kakimoto, Y., Taniguchi, K. and Kappe, T.: J. Biol. Chem., 238: 1447, 1963.
- 9) Levey, S., Woods, T., Abbot, W. E.: Metabolism, 12: 148, 1963.
- 10) 青木隆一: 結核, 32: 544, 1957.
- 11) Barbieri, P., Marco, A., Fuoco, L., Rusconi, A.: Biochem. Pharm., 3: 264, 1960.
- 12) Porfirieva, R. P., Kivman, G. Ya.: Antibiotiki, 12: 1071, 1967.
- 13) 青木隆一: 結核, 32: 418, 1957.
- 14) Dann, O. T., Carter, C. E.: Biochem. Pharm., 13: 677, 1964.
- 15) Strominger, J. L., Ito, E., Threnn, R. H.: J. Am. Chem. Soc., 82: 998, 1960.
- 16) Strominger, J. L.: Fed. Proc., 21: 134, 1962.
- 17) Scriver, C. R., Puschel, S., Davies, E.: New Eng. J. Med, 274: 635, 1966.
- 18) 辻尾武彦: 大阪大医誌, 23: 41, 1971.
- 19) 石原一郎・小林義隆: 医学と生物学, 22: 1, 1952.
- 20) Killman, S. A., Rubini, J. R., Cronkite, E. P., Bond, V. P.: Acta haemat., 25: 81, 1961.
- 21) Rubini, J. R., Cronkite, E. P., Bond, V. P., Flieder, T. M.: Proc. Soc. Biol. Exp. Med., 100: 130, 1959.
- 22) 中村六之介: 生化学, 29: 75, 1957.
- 23) 藺田芳也: 生化学, 29: 80, 1957.
- 24) 石原一郎・小森義隆・横尾百合子: 医学と生物学, 29: 50, 1953.