赤痢菌の栄養要求に関する研究

(II) ニコチン酸類似化合物の赤痢菌発育に及ぼす影響

中山 英男^{*1)} ・ 元 木 義 信

山口県衛生研究所 (所長 芳野俊五博士)

[受付: 7 月 25 日・1960 年]

前報¹⁾で述べた様に赤痢菌特に *Sh. flexneri*, *Sh. boydii*, *Sh. sonnei* に属する菌株の多くはその発育に NiA^{*2)} を必要とする。一般に発育因子と化学構造上類似している化合物が細菌の発育阻止作用を呈することのあることは PABA と Sulfonamide の関係が明らかになつて以来³⁾ 広く知られるに至つた。NiA 類似化合物のうち Pyridine-3-sulfonic acid は NiA の代謝拮抗物質として細菌の発育に阻止的に作用することが知られている⁴⁾。NiA の類似物質は NiA の生合成またはその作用を阻止することにより抗菌力を示すと考えられる。このことより NiA を必要とする細菌即ち NiA の生合成過程が不能な菌株に対しては NiA の生合成能力をもつ菌株より以上にこれら類似化合物は強い抗菌力を示すのではないかと考え一連の実験を行なつた。

供試した NiA 類似化合物としては 3-Acetyl pyridine, Pyridine-3-sulfonic acid, α -Picolinic acid および INAH の 4 種である。今回は NiA 要求および非要求性の赤痢菌株および *E. coli* 1 株を被検菌としてこれら類似化合物の発育におよぼす影響について検討した。この結果これら類似化合物のうち Pyridine-3-sulfonic acid のみが赤痢および大腸菌に対し発育阻止作用を示し、また 3-Acetyl pyridine は NiA の活性をある程度代用しうるとの成績を得たので報告する。

尚本論の概要は第 116 回ビタミン B 研究委員会の席上で公表した⁴⁾。

実験材料と方法

使用菌株: 赤痢菌としての ① NiA を必要とするものとして *Sh. sonnei* I に属する標準株, Strain 1196 および分離株を ② NiA を必要とせず基礎培地のみでよく発育する菌株の代表として *Sh. flexneri* 3a に属する 1 株の分離菌をそれぞれ使用した。また大腸菌としては *E.*

coli O-20 標準株を用いた。これら菌株は普通寒天斜面に 37°C 24 時間培養したものより接種菌を調製した。

試験用培地: Davis Mingioli の培地^{5,6)} を改変したブドウ糖, 無機アンモン, 無機塩類よりなる合成培地を使用した。試験管中の培地は最終 5 cc となる様に用いた。培地調製の実際, 添加物の添加法, 菌発育程度の測定等はすべて前報¹⁾ に準じて行つた。

供試 NiA 類似化合物: 3-Acetyl pyridine, Pyridine-3-sulfonic acid, α -Picolinic acid および INAH の 4 種の化合物を使用した。前 3 者は NBC 製のもの, 後者はイソニアジッドを用いた。供試化合物の化学構造は図 1 に示した。これらはいずれも 10⁻²M/l の割合に蒸水にとかし 10 lb 10 分間高圧滅菌し, 用いたのぞんで滅菌水で最終濃度の 10 倍になる様に稀釈しその 0.5cc あてを分注使用した。NiA, NAA^{*3)} 等もこれら化合物と同様に調製した。

実験成績

〔I〕 NiA 要求株に対する NiA 類似化合物の作用

1) Pyridine-3-sulfonic acid の作用: *Sh. sonnei* I 分離株に対する Pyridine-3-sulfonic acid の作用は図 2 に示した。本菌株は NiA または NAA を基礎培地に添加

NAKAYAMA Hideo and MOTOKI Yoshinobu: Nutritional Studies in Genus *Shigella*. (II) Growth Activities of Niacin Analogous to the Certain Strains of *Sh. flexneri*, *Sh. sonnei* and *Escherichia coli*. Yamaguchi Prefectural Research Institute of Health, Yamaguchi, Japan.—Jap. J. of Bact., 16 (2), 98-102, 1961.

*1) 山口県立女子短期大学, 山口県立医科大学微生物学教室

*2) NiA=Nicotinic acid

*3) NAA=Nicotinamide

図 1 被検化合物

図 2 *Sh. sonnei* (I) 分離株の Pyridine-3-sulfonic acid による発育阻止と NiA, NAA 添加の影響
24 hours Incubation

Molar concentration of Pyridine-3-sulfonic acid

*1) 縦軸は以下 Light Transmission Per Cent を示す

*2) 以下の図においても特に示さぬ限り同様

しないと発育せず従つて基礎培地に NiA 10^{-4} M/l および 10^{-6} M/l を添加あるいは NAA 10^{-4} M/l, 10^{-6} M/l を添加し更に Pyridine-3-sulfonic acid の 10^{-3} ~ 10^{-7} M/l を同時添加してその発育におよぼす影響をしらべた。即ち NiA, NAA いずれを添加した場合にも、また 10^{-4} , 10^{-6} M/l いずれの濃度を用いた場合にも Pyridine-3-sulfonic acid は 10^{-3} , 10^{-4} M/l で菌の発育を完全に阻止し 10^{-6} , 10^{-7} M/l では何の影響もおよぼさない。従つて Pyridine-3-sulfonic acid の発育阻止作用は同時に存在する NiA または NAA によつて影響をこうむらない。48

図 3 *Sh. sonnei* (I) 標準株に対する Pyridine-3-sulfonic acid の作用と NiA, NAA 添加の影響
24 hours Incubation

Molar concentration of Pyridine-3-sulfonic acid

図 4 *Sh. sonnei* (I) 標準株に対する α -Picolinic acid の作用と NiA, NAA 添加の影響
24 hours Incubation Molar Concentration of α -Picolinic acid

時間培養時の所見は 24 時間培養時のそれと全く一致した。*Sh. Sonnei* I 標準株 strain 1196 を用いた場合の Pyridine-3-sulfonic acid の作用は図 3 に示した。即ち分離株の場合と同様に Pyridine-3-sulfonic acid は 10^{-3} ~ 10^{-4} M/l で発育を阻止し、 10^{-5} M/l より濃度の少い時は影響をおよぼさない。ただ NiA 10^{-4} M/l 同時添加時には NiA 10^{-6} M/l 同時添加時よりも Pyridine-3-sulfonic acid 10^{-6} M/l 存在下ではわずかに良好な発育を示している。

2) 3-Acetyl pyridine の作用: *Sh. sonnei* I 標準株の発育におよぼす 3-Acetyl pyridine の作用を上と同様 NiA, NAA 添加培地で検したが 3-Acetyl pyridine は $10^{-3} \sim 10^{-7}$ M/l の存在では NiA または NAA による本菌の発育に何らの影響を与え得なかつた(成績省略)。

3) α -Picolinic acid の作用: *Sh. sonnei* I 標準株の同一培地中における発育におよぼす α -Picolinic acid の作用は図 4 に要約した。即ち 24 時間培養では NiA, NAA 添加の別, またはそれらの濃度によつて一定の影響を受けないが α -Picolinic acid は 10^{-6} , 10^{-7} M/l の濃度では菌の発育に阻的に作用する。高濃度下ではかえつて影響を与えない。しかしこれらの阻止作用は 48 時間培養では見られない。

4) INAH の影響: *Sh. sonnei* I 分離株に対する INAH の作用を検討した。しかし INAH は $10^{-3} \sim 10^{-7}$ M/l の範囲では菌の発育は影響を受けない。(成績省略)

5) 類似化合物単独の作用: *Sh. sonnei* 標準株に対して Pyridine-3-sulfonic acid, 3-Acetyl pyridine, α -Picolinic acid, INAH を各単独に $10^{-3} \sim 10^{-8}$ M/l 添加すると Pyridine-3-sulfonic acid, α -Picolinic acid, INAH の 3 者では菌は全く発育しないが 3-Acetyl pyridine 10^{-4} M/l 以上になるとその濃度がこくなるにつれて菌も良好な発育を示す。即ち 3-Acetyl pyridine は NiA 活性をある程度代用する。これらの成績は図 5 に示した。

図 5 NiA 類似化合物の NiA 活性
(*Sh. sonnei* (I) 標準株, Strain 1196)
48 hours Incubation

Molar Concentration of Niacin Analogous Tested

〔Ⅱ〕 NiA を要求しない菌株に対する NiA 類似化合物の作用

1) *Sh. flexneri* 3a の場合: *Sh. flexneri* 3a 分離株は

前報¹⁾ に示した様に全株共基礎培地のみで良好な発育を示す。従つて本菌では NiA 類似化合物の作用は基礎培地のみに菌を培養した場合とこれに NiA または NAA を添加した場合の 2 つにわけて試験した。成績は図 6 A, B に示した。基礎培地のみの場合 $10^{-3} \sim 10^{-7}$ M/l の濃度範囲では 3-Acetyl pyridine, INAH, α -Picolinic acid の 3

図 6 *Sh. flexneri* 3a (分離株) の場合
(A) NiA 類似化合物の作用 (基礎培地のみの場合)
48 hours Incubation

Molar Concentration of Three Niacin Analogous

(B) Pyridine-3-sulfonic acid の作用
(NiA 存在下)

Molar Concentration of Pyridine-3-sulfonic acid

者は認め得る発育促進又は阻止作用を示さないが Pyridine-3-sulfonic acid のみは 10^{-4} M/l でのみ完全発育阻止作用を呈する。Pyridine-3-sulfonic acid を各等モルの NiA と同時に $10^{-3} \sim 10^{-7}$ M/l 添加した場合は同図 B に示した様に NiA は Pyridine-3-sulfonic acid の阻止作用を緩和し得なかつた。

2) *E. coli* O-20 の場合: 4 種の類似化合物の O-20 標準株におよぼす影響について図 7 に示す成績を得た。いずれも NiA, NAA を添加せず基礎培地中での成績である。即ち菌の発育の様子は *Sh. flexneri* 3a を用いた場

図 7 Pyridine-3-sulfonic acid, α -Picolinic acid, 3-Acetylpyridine, INAH の *E. coli* O-20 に対する作用

24 hours Incubation

Molar Concentration of Niacin Analogous

合とほぼ等しく α -Picolinic acid, 3-Acetyl pyridine, INAH の 3 者は菌の発育に何らの影響をおよぼさない。Pyridine-3-sulfonic acid のみは 24 時間培養では $10^{-3} \sim 10^{-4}$ M/l の範囲で 48 時間培養では 10^{-3} M/l においてのみ発育を阻止した。

考 案

NiA 類似化合物の赤痢菌および大腸菌の発育におよぼす影響について研究した。供試赤痢菌としては NiA 要求株としては *Sh. sonnei* I に属する菌株を、非要求株としては *Sh. flexneri* 3a に属する菌株をえらんだ。*Sh. sonnei* I に属する供試菌は NiA または NAA 10^{-6} M/l 以上の濃度では 24 時間培養ですべてに最高発育を示す。即ち NiA を必須発育因子とする。使用した NiA 類似化合物としては Pyridine-3-sulfonic acid, 3-Acetyl pyridine, α -Picolinic acid, INAH の 4 種である。これらのうち α -Picolinic acid と INAH の 2 つは実験した範囲の条件下では赤痢菌、大腸菌共に発育を阻止せずまた NiA 活性も代用し得なかつた。ただ *Sh. sonnei* I 標準株の NiA, NAA 添加時における発育が α -Picolinic acid の低濃度 ($10^{-6} \sim 10^{-7}$ M/l) でわずかに抑制される成績をえているが原因は現段階では説明しがたい。後述の 3-Acetyl pyridine の NiA 活性のあることよりみると NiA 活性は 3 位のカルボキシル基が重要な意味をもち 2 位または 4 位の側鎖のついた NiA 類似物質は NiA

活性をもたなかつた。NiA 代謝の時にも認め得べき影響を与えぬものと推定される。

一方 3-Acetyl pyridine は供試菌の発育を阻止せず逆にある程度 NiA 活性を示す。即ち単独添加で NiA 要求菌である *Sh. sonnei* I の発育を支持する。しかし NiA 活性は NiA または NAA の活性にくらべると約 $1/10$ に相当し且つ Lagphase は長い。このことは 3-Acetyl pyridine が生体内でおそらく NiA に転換した後に活性をもつ様になることを意味する。

Pyridine-3-sulfonic acid の発育物質としての作用は古くは McIlwain⁹⁾ の報告がある。今回の実験においても Pyridine-3-sulfonic acid は $10^{-3} \sim 10^{-4}$ M/l の濃度では供試した赤痢菌または大腸菌の発育を完全に阻止した。このことは PABA 類似化合物である Sulfanilic acid が抗菌作用をもつ点よりもうなずける。ただ Pyridine-3-sulfonic acid の赤痢菌又は大腸菌に対する発育阻止作用は NiA または NAA 10^{-4} M/l 又は 10^{-5} M/l の添加で少しも緩和されず、またその阻止効果は NiA 要求性と関係がみられなかつた点よりこの物質が NiA の生合成または NiA の利用を阻害するために抗菌力をもつかどうかについては不明である、NiA では緩和し得ないが NiA より代謝上位の化合物即ち Pyridine nucleotide では緩和するのではないかと考えブイオン中での抗菌力もしらべたがやはり有効阻止濃度は 10^{-4} M/l 以上でブイオン成分によつては影響はうけなかつた。これらより Pyridine-3-sulfonic acid の阻止作用は NiA と競り合うのではなくむしろスルホン酸基そのものの抗菌力も考える必要があるのかも知れない。

結 論

1) NiA 類似化合物 4 種即ち 3-Acetyl pyridine, Pyridine-3-sulfonic acid, α -Picolinic acid および INAH の赤痢菌の発育におよぼす作用について研究した。

2) 供試赤痢菌としては NiA を必須発育因子とする菌株の代表として *Sh. sonnei* に属する 2 株を、NiA 非要求株即ち基礎培地のみでよく発育する菌株の代表として *Sh. flexneri* 3a に属する 1 株を用いた。尚比較のため *E. coli* 1 株も用いた。

3) α -Picolinic acid および INAH は共に被検菌株の発育に何らの影響もおよぼさなかつた。

4) Pyridine-3-sulfonic acid は被検全菌株に対し $10^{-3} \sim 10^{-4}$ M/l で発育を完全に阻止した。この阻止作用は NiA 要求性と関係なくまた NiA, NAA 添加等では緩和されなかつた。

5) 3-Acetyl pyridine は NiA 要求菌の発育を支持し NiA 活性をある程度代用し得る成績を得た。

終にのぞみ本研究の機会を与えられ且つご校閲をたまわつた当研究所長芳野俊五博士に厚くお礼を申し上げます。また貴重な化合物を提供していただいた山口県立医科大学微生物学教室林良二教授に感謝の意を表します。

引用文献

1) 中山・川口・元木・日本細菌学雑誌印刷中.

- 2) Woods, D. D. : Brit. J. Exp. Path., 21 : 74, 1940.
- 3) McIlwain, H. , Biochemistry and Chemotherapy, Nature, 151, 270, 1943.
- 4) 林・中山・元木 : 第116回ビタミンB研究委員会記事.
- 5) Davis, B. D. : Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 1949.
- 6) Davis, B. D. Mingioli, E. S. : J. Bact., 60 : 17, 1950.