結核菌とストレプトマイシン

代居 康 敬 飯 田 一 郎

九州大学医学部細菌学教室 (主任 戸田教授)

〔受付: 6 月 5 日, 1951 年〕

緒 言

ストレプトマイシンが結核菌の発育分裂を阻止し、又実験結核、臨床結核に対する優秀なる治療剤であることは広く認められる所である。然るに実地にストレプトマイシンを用いた場合、かなりの高率に結核菌の耐性獲得が現われ、このことが結核に対するストレプトマイシン治療の大きな、障碍となつてゐる。この耐性ということが如何なる機序に依て起るかを知りこの障碍を除くためには、先ず如何なる機序によつてストレプトマイシンが結核菌に作用するかを究明しなければならない。現在ストレプトマイシンは、ペニシリンとは著しく異つて、菌の物質代謝の上に著明な影響を與えるものと考えられている。私達は試験管内で耐性菌を作り、これと非耐性菌の物質代謝に及ぼすストレプトマイシンの影響を比較研究し耐性獲得の機序の一端を解明しようとして以下の実験を行つた。

第一章 実験方法

使用菌は 青山 B 株 ソートン 培養 2~3 週のものを用いた。ストレプトマイシン (以下 STM) 耐性菌は、ソートンに 0.5 r/cc より継代毎に増量的に STM を加えて青山 B 株を培養し 7~8 代にして 200 r/cc の STM 加ソートン培地に発育する様になつた菌の 2~3 週培養のものを用いた。

Warburg 検圧計を用い、種々の基質酸化に要する酸素吸収量を 15 分毎に 3~4 時間測定した。

1) 被験静止菌液——上述の如きソートン培地培養菌を濾過し滅菌蒸溜水にて 3 回洗滌して培地成分を除き瑪瑙乳鉢にて 40 mg/cc の菌体懸濁水を溶媒として作り容器主室に 0.5 cc (20 mg) 宛入れる。

2) 基質液——各種炭水化物、アミノ酸、脂肪酸を 0.025 M 又は 0.1 M 水溶液となし、その 0.5 又は 0.1 cc を容器側室に入れ、コック開放 37.5°C にて 15 分間振盪後、コック閉鎖し、基質液を菌液に加え測定を開始する。

3) 緩衝液——Soerensen 磷酸緩衝液 (M/15)。pH = 7.0, 2 cc

以上に蒸溜水を加えて各容器とも総量 4 cc とする。容器内炭酸ガス吸収槽には 20 % 苛性カリ水溶液 0.2 cc を入れる。実験は総て 37.5°C にて行つた。

脱水素の測定には Thunberg の法を用いた。

1) 被験静止菌液——Warburg 法による実験の際と同様にして調製し 40 mg/cc を 0.5 cc (即ち 20 mg) を用いる。

2) 基質液——Warburg 法による実験の際と同様。

3) 緩衝液——Soerensen 磷酸緩衝液 (M/15)。pH 7.0 1 cc

4) 色素液——M/2000 メチレン青水溶液 0.5 cc

上記の 1) 2) を両脚 Thunberg 管の一脚に 3) 4) を他脚に入れ、直ちに真空ポンプにて排気し、真空度 0.4~0.8 mmHg とし 37.5°C の恒温槽に浸し両液を混合色素の完全脱色までの時間を測定した。

第二章 実験成績

第一節 炭素代謝

第 1 表に示す如き種々の炭水化物について、その酸化及び脱水素反應に及ぼす STM の影響を驗した。基質は総て 0.025 M, 0.5 cc とし、耐性菌、非耐性菌ともに 40 mg/cc を 0.5 cc 用いた。酸化は Warburg 検圧計により酸素吸収量を測定し、脱水素酵素反應は Thunberg 管により、メチレン青完全脱色までの時間を測定した。

糖代謝の中間産物中、その酸化が STM に依て阻害されるものはフマルと林檎酸のみである。耐性菌においては酸化も脱水素反應も STM に依て阻止されないのみならず、却つて促進されるものもかなり認められる。

次に同様に Warburg の検圧計を用いて 0.025 M の焦性葡萄糖 0.5 cc と 0.025 M の林檎酸 0.1 cc との混合物の酸化及び、それに及ぼす STM の影響を檢すると第 1 図に示す如くなる。使用菌は前実験と同様であり添加 STM 量は 500 r/cc 0.5 cc である。非耐性菌においてはこの混合物の酸化は 120 分以後、飛躍的に増加し

YOSUE Yashitaka IIDA Ichiro: Department of Bacteriology, Faculty of Medicine, Kyushu University.

第1表 各種炭水化物の酸化に及ぼす STM の影響

Reaction Strain Substrate	Oxydation		Dehydrogenation	
	非耐性菌	耐性菌	非耐性菌	耐性菌
葡 萄 糖	—	促進	+	促進
グ リ セ リ ン	—	—	+	—
焦 性 葡 萄 酸	—	—	—	—
枸 櫞 酸	—	促進	±	±
琥 珀 酸	—	促進	—	—
フ マ ー ル 酸	+	+	±	±
林 檎 酸	+	+	—	—
乳 酸	促進	促進	促進	促進
キ シ ロ ー ゼ	—	—	—	—

備考：+=STM 添加により反応が阻止されるもの
 —=STM 添加により反応が阻止されないもの
 促進=STM 添加により反応が却つて促進されるもの

第1図 焦性葡萄糖、林檎酸混合物酸化に及ぼす STM の影響

ており、焦性葡萄糖、林檎酸各個の酸素吸収量の相加値以上の値を示している。これは恐らく林檎酸が脱水素されてオキザル醋酸を生じこれと焦性葡萄糖とが縮合反応を起して Krebs の廻路に入つたためであると考えられる。然してこれは STM 添加に依り阻害を受ける。耐性菌においては、非耐性菌における如き酸素吸収値の飛躍的な増加は認められず、又 STM 添加によつて著しい曲

線の変化を認めない。即ち耐性菌においては、Krebs の廻路に入らないと考えるのが妥当の様である。従て、耐性菌における焦性葡萄糖々化は脱炭酸に依りアセトアルデヒドを経て醋酸に酸化されるものと考えられる。

次に同様に 0.025 M の焦性葡萄糖 0.5 cc と、0.025 M のフマル酸 0.1 cc の混合物の酸化に及ぼす STM の影響を見ると第2図に示す如くなる。STM 添加量は矢張り 500 r/cc 0.5 cc である。この場合も、非耐性菌にて STM を添加せぬ際は酸素吸収値の非常な増加が見られる。これはフマル酸がフマラーゼにより加水されて林檎酸となりこれが更に脱水素されてオキザル醋酸を生じ焦性葡萄糖と縮合反応を超して Krebs の廻路に入つたためであると考えられる。これは矢張り STM に依て阻害される。耐性菌においては、この混合物の酸化は STM にて殆んど阻害を認められない。焦性葡萄糖の酸化はフマル酸にて、かなり賦活されている。従つて、耐性菌の場合は次の如き反応が起つていると考えられる。

第2図 焦性葡萄糖、フマル酸混合物酸化に及ぼす STM の影響

次に同様に 0.025 M の焦性葡萄糖 0.5 cc と 0.025 M のアスパラギン酸 0.1 cc との混合物の酸化に及ぼす

STM の影響を見ると第 3 図の如くなる。添加 STM 量は同様 500 7/cc である。これも同様に STM を添加せざる場合の非耐性菌によるこの混合物の酸化は 120 分以後非常な増加を示している。これは、アスパラギン酸が酸化的アミノ基脱を受けてオキザル醋酸を生じ、これが焦性葡萄糖酸と縮合を起したためであろう。この反応も STM に依て阻害されている。

第3図 焦性葡萄糖，アスパラギン酸混合物酸化に及ぼす STM の影響

第2表 各種アミノ酸の酸化に及ぼす STM の影響

Reaction	Oxydation		Dehydrogenation	
Strain	非耐性菌	耐性菌	非耐性菌	耐性菌
Substrate	非耐性菌	耐性菌	非耐性菌	耐性菌
アスパラギン	±	—	+	+
グルタミン酸	+	—	+	+
ソニ	—	—	—	—
グリコロール	+	+	+	±
β-アラニン	+	—	±	—
フエニール	+	—	+	—
アラニン	+	—	+	—
アスパラギン酸	+	+	+	+
グルタミン酸	+	+	+	+
ベプトン	+	—	+	促進

備考: + = STM 添加により反応が阻止されるもの
 - = STM 添加により反応が阻止されないもの
 ± = STM 添加により反応が阻止される程度が極めて僅小のもの
 促進 = STM 添加により反応が却つて促進されるもの

第二節 窒素代謝

第2表に示す如く種々のアミノ酸について，その酸化

及び脱水素反應に及ぼす STM の影響を驗した。基質は總て 0.025 M, 0.5 cc であり供試菌その他の條件は第 1 表の場合と同様である。一般にアミノ酸の酸化は STM 阻害を受ける。耐性菌ではアスパラギン, グルタミン酸ソーダ, α -アラニン, フェニールアラニン等のアミノ酸やペプトンの酸化は, STM による阻害を受けない。又脱水素反應においても, 非耐性菌は, 總て STM による阻害を受けるが, 耐性菌における, α -アラニン, フェニールアラニン等の脱水素反應は阻害を受けない。

次に 0.1 M の α -アラニン 0.5 cc と 0.1 M のアスパラギン酸 0.5 cc との混合物の酸化をみると第 4 図の如くなる。添加 STM 量は、500 γ /cc を 0.5 cc 用い実験条件は第 1 図に示した実験と同様である。非耐性菌においては 180 分以後、急激に酸素吸収量が増加しており、これは STM 阻害を受ける。これは α -アラニン、アスパラギン酸から酸化了的アミノ基脱に依り夫々焦性葡萄糖、オキザル醋酸が生じて来て、縮合を起すためである。

即ち次式の如き反應が起ると考えられる。

第4図 アスパラギン酸, α -アラニン混合物酸
化に及ぼす STM の影響

耐性菌においては、この様な酸素吸収の急激な増加は

第3表 各種脂肪酸の酸化に及ぼす STM の影響

Reaction		Oxydation		Dehydrogenation	
Substrate	Strain	非耐性菌	耐性菌	非耐性菌	耐性菌
醋酸	酸	—	—	促進	促進
酪酸	酸	±	—	—	—
オレイン酸	酸	—	—	—	—
ステアリン酸	酸	—	—	—	—

備考: ±=STM 添加により反応が阻止される程度が極めて僅小のもの
 —=STM 添加により反応が阻止されないもの
 促進=STM 添加により反応が却って促進されるもの

認められず、又 STM を添加した方が幾分か酸素吸収量が高い様である。いずれにせよ 240 分の酸素吸収は 25 cmm 前後であり、非耐性菌にて STM を添加せざる場合の 52 cmm と比べて約半分の値を示すに過ぎない。

第三節 脂肪酸代謝

第3表に示す如き種々の脂肪酸につき、その酸化及び脱水素反応に及ぼす STM の影響を検した。基質は総て 0.025 M 0.5 cc であり、菌その他の条件は第1表と同様である。

表に示す脂肪酸はその酸化を脱水素反応も、ともに STM によつて阻害されない。醋酸脱水素反応は耐性菌も非耐性菌も、ともに STM 添加によつて却って促進されている。

又、醋酸、ステアリン酸、オレイン酸等を酸化させる場合 (0.025 M 0.5 cc を用いる)、これに 0.025 M のアスパラギン酸 0.1 cc を添加すると、酸化が大いに賦活される。而してこの反応は STM 添加によつて阻害を受ける。

第三章 総括及び結語

STM 非耐性結核菌及び耐性結核菌について Warburg 検圧法により各種基質酸化を測定し、又 Thunberg 法によつて脱水素酵素を測定して次の如き結果を得た。

1) 炭素代謝について見ると

i) 六炭糖は、三炭糖、焦性葡萄糖と次第に酸化されて来るが、この焦性葡萄糖酸化は現在では Krebs の輪行が主要な経路とされている。STM は焦性葡萄糖が Krebs の輪行に入ることを妨げる。即ち、焦性葡萄糖～オキザル醋酸縮合を阻害する。

糖代謝の中間産物の中その酸化が STM に依て阻害されるものはフマル酸 林檎酸のみである。この事は結

局、焦性葡萄糖～オキザル醋酸縮合反応阻害を裏付けるものと考えられる。

ii) 耐性菌は Krebs の輪行を通らない様である。従つて耐性菌における焦性葡萄糖々化は脱炭酸に依り、アセトアルデヒドを経て醋酸に酸化されるものと考えられる。

iii) 醋酸の酸化は耐性菌も非耐性菌も STM に依て阻害されない。即ち、共に Szent-Györgyi の中間通傳体を経て、CO₂ と H₂O になる様である。

iv) 耐性菌において、フマル酸は焦性葡萄糖の酸化を賦活する。これについて一つの反応を推定した。

非耐性菌にはこの反応は STM で阻害される。耐性菌は阻害を受けない。

非耐性菌においても同様に焦性葡萄糖々化はフマル酸に依て、大いに賦活されるが STM で非常な阻害を受ける。それで非耐性菌では次の様な酸化型式が考えられる。

然し、非耐性菌においては、耐性菌における如き反応が起つていないとは断定し得ない。

2) 窒素代謝について見ると、

i) 一般にアミノ酸酸化は STM 阻害を受ける。耐性菌の場合は阻害されないか、又は軽度の阻害しか受けない。

ii) 非耐性菌において α-アラニン、アスパラギン酸混合物は、3 時間以後次第に酸化が盛になる。然して、これは STM で抑制される。これは α-アラニン及びアスパラギン酸から酸化的アミノ基脱に依てそれぞれ焦性葡萄糖、オキザル醋酸が生じて来て、縮合を起すためであると考えられる。

耐性菌では、この反応は認められない。

3) 脂肪酸代謝について見ると

i) 醋酸、n-酪酸、ステアリン酸、オレイン酸の酸化は STM 阻害を受けない。

ii) アスパラギン酸は醋酸、ステアリン酸、オレイン酸の酸化を賦活する。そして STM で阻害を受ける。これも矢張り縮合反応の阻害と考えられる。

終りに、戸田教授の御指導と御校閲を深謝する。

文 献

- 1) E. L. Oginsky, P. H. Smith, and W. W. Umbreit: J. bact., 58, 747, 761, 769, 1949.
- 2) F. Bernheim: J. Bact. 41, 387~395, 1941.
- 3) E. H. Williston and G. P. Youmans.: Am. Rev. Tbc., 59, 3360, 1949.
- 4) K. S. Howlett Jr., J. B. O'conner, J. F. Sa-

dusk Jr. W. E. Swift, Jr. and F. A. Beard-
sley: Am. Rev. Tbc., 59, 402, 1949.

- 5) E. L. Oginsky. P. H. Smith and M. Solorovsky: J. Bact., 59, 29, 1950.
- 6) G. P. Youmans and W. H. Feldman: J. Bact. 51, 608, 1946.
- 7) C. I. Randles: J. Bact., 60, 627, 1950.
- 8) 須田正巳: 科学, 21, 106, 1951.
- 9) 山村雄一: 酵素化学の進歩(第2集), 270, 1950.

Comp. Rutin

-KOWA-

本劑の特長

黄芩・黄連・大黃含有

- 1 血管脆弱の恢復作用が大
- 2 血圧降下作用や自覺症の改善が著明
- 3 高純度結晶を使用し、連用しても副作用は殆んど無い
- 4 量産化成功により価格は低廉 (文献贈呈)

高 血 壓 ・ 腦 溢 血 ・ 予 防 治 療 劑

—包装の價格—		
末	25g	880円
	100g	1200円
錠	80錠	120円
	100錠	850円

複合ルチン

コーワ

製造元 興服産業株式會社

販賣元

株式會社

中村瀧商店

東京・日本橋本町三