めた。

本研究に当り終始御指導御鞭撻を戴いた岡見工場長, 研究所長 桑田 智博士, 第四部長渡辺 厚博士ならびに研究員荒蒔義知博士に謹謝する。また hydroxymethylpyrimidine を戴いた第一部長松川泰三博士および xanthurenic acid を提供下さった大阪市立大学教授目博士に深謝し, 本研究を発表する機会を与えられた山崎試験課長に厚く御礼申し上げる。

武田薬品工業株式会社大阪工場試験課

U.D.C. 577.164.13:547.853.3

9. 新谷 茂, 川島 實: Hydroxymethylpyrimidine とビタミン B₆ との関係 (第5報)

Saccharomyces carlsbergensis における Hydroxymethylpyrimidine の
抗ビタミン B₆ 作用について

Shigeru Shintani and Minoru Kawashima: On the Relationship between
Hydroxymethylpyrimidine and Pyridoxine. V. The Antipyridoxine
Activity of Hydroxymethylpyrimidine in the Growth of
Saccharomyces carlsbergensis.

(Osaka Factory and Research Laboratory, Takeda Pharmaceutical Industries, Ltd.)

Antipyridoxine action of 2-methyl-4-amino-5-hydroxymethylpyrimidine (OMP) was observed with microorganisms. Growth inhibition of *S. carlsbergensis* (IFO 0565) in Atkin medium by OMP was examined by turbidimetry and it was found that its minimum inhibitory concentration was 16 γ /cc. when pyridoxine was added to the medium and 400 γ /cc. when such addition was not made. This has made it clear that the growth inhibitory action of OMP is competitively antagonized by pyridoxine in a certain range of concentrations. It was concluded that OMP was responsible for the allergic side-effects caused by the continuous administration of thiamine.

(Received August 22, 1955)

第 3, 4 報で hydroxymethylpyrimidine (OMP) が VB₆ の代謝拮抗物質であることをラットにおける諸実験から明らかにしたが, 代謝拮抗物質の選別判定に用いられる微生物の増殖抑制実験によりさらに OMP と VB₆ の拮抗型式を検討した。

実験方法および結果 1) OMP による増殖抑制菌の検索 種々の乳酸菌について OMP の増殖抑制作用を検討してその抑制を受ける微生物の検索を行つたところ, 一般に VB₆ の微生物学的検定に用いられている *S. carlsbergensis* に対して著しい抑制作用を認めた。そこで本菌 (IFO 0565) を用い, Atkin の合成培地でその発育を抑制する OMP の最小有効濃度をしらべた。なおこの場合 Rabinowitz¹⁾ が *S. carlsbergensis* は培地中の VB₁ 存在の有無により VB₆ に対する要求性が異なることを報告しているので, 本実験においても培地に VB₁ を

Table I. Atkin's Media (for pyridoxine assay)

Glucose	10 g	FeCl ₃	500 γ
Sodium citrate	2 "	MnSO ₄ ·4 H ₂ O	500 "
Casein hydrolysate (Difco)	1 "	Inositol	5,000 "
Citric acid	400 mg	Ca pantothenate	500 "
KH ₂ PO ₄	110 "	Thiamine-HCl	50 "
KCl	85 "	Biotin	1.6 "
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	25 "	in 100 cc. (D. S.)	
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	25 "		

1) J. C. Rabinowitz, E. E. Snell: Arch. Biochem. Biophys., **33**, 472(1951).

加えた場合と加えない場合との OMP による阻害活性の差をも検討した。用いた Atkin 培地の組成は Table I に示す。増殖の程度は 37°, 24 時間培養後の Coleman Junior Spectrophotometer (650 mμ) による濁度で測定した。その結果明らかにその最小有効濃度に差が見られ (Table II), VB₁ を加えた場合には 16 γ, 加えない場合には 400 γ で発育抑制作用が認められた。

Table II. Minimal Effective Concentrations of Hydroxymethylpyrimidine to the Growth Inhibition of *S. carlsbergensis* in Media with and without Thiamine

Pyridoxine γ/cc.	OMP γ/cc.	Medium	
		with thiamine	without thiamine
1×10 ⁻²	1×10 ⁴	—	—
"	2×10 ³	—	—
"	4×10 ²	—	—
"	8×10	—	+
"	1.6×10	—	+
"	3.2	+	+
"	6.4×10 ⁻¹	+	+
"	1.28×10 ⁻¹	+	+
"	2.5×10 ⁻²	+	+
"	5.0×10 ⁻³	+	+

2) VB₆ による回復実験 次に VB₁ 添加培地を用いて, その OMP による増殖抑制が VB₆ によつて回復されるかどうかを種々の OMP 濃度で実験し, その拮抗型式を検討した。その結果は OMP の cc 当り 50, 100 および 500 γ 添加による増殖抑制効果がいずれも VB₆ の添加量が漸次多くなるに従い, 回復されることを知つた (Fig. 1)。その VB₆ による 50% 増殖回復濃度と OMP 添加量を比較すると Table III に示すように, 50~100 γ の間に競り合い拮抗の関係が存在する。

Fig. 1.

The Reversal Effect of Pyridoxine against the Growth Inhibition caused by Various Amount of Hydroxymethylpyrimidine to *S. carlsbergensis* in the Atkin's Media supplemented with 2 γ of Pyridoxine and 50 γ of Thiamine per 200 cc.

Table III. Relation between the Concentration of Hydroxymethylpyrimidine added to the Media and the Concentration of Pyridoxine Necessary for 50% Maximal Growth of *S. carlsbergensis*

OMP concn. added to the medium (γ/cc.)	PIN concn. for 50% growth (γ/cc.)
50	0.0113
100	0.0251
500	0.2280

考察および結論 OMP が *S. carlsbergensis* の増殖を抑制し, しかもその効果が VB₁ の存在において著しいことを見出した。またその抑制が VB₆ によつて回復され一定の範囲内が競り合い拮抗関係が存在することを明らかにした。このことは OMP の抗 VB₆ 作用に対する微生物学的裏付けと考える。

殆んど代謝拮抗がそうであるように, OMP が VB₆ の構造類似体であることは第 1 報で示した。小池²⁾ は tyrosine decarboxylase 系において pyridoxal phosphate と OMP phosphate との間に拮抗的阻害の事実

2) 小池: 生化学 5, 528(1954)。

を見出し, OMP の抗作用についての酵素学的裏付けを行つた. 従つて OMP は動物体内で磷酸エステル化され, そのエステル化されたものがアミノ酸デカルボキシラーゼの蛋白部分と pyridoxal phosphate との結合を妨げることが推定される. この点においても 4-desoxy pyridoxine と類似するようである³⁾.

著者らは 3 報にわたつて, 動物ならびに微生物による OMP の抗 VB₆ 作用を実証した.

INAH および thiosemicarbazide もまた OMP とよく似た痙攣作用を示し, しかも前者は VB₆ によつて増強⁴⁾ あるいはある濃度では抑制され⁵⁾, 後者については pyridoxamine のみが抑制効果をもつことが知られている⁶⁾. それらがいずれも微生物において VB₆ との拮抗関係が存在することがそれぞれ Boone ら⁷⁾ および Dewey ら⁸⁾ によつて見出されている. そしてまた, 動物に極度の VB₆ 欠乏を起させるとそれらとよく似た痙攣を起すという報告もある⁹⁾. これらの関係から VB₆ と痙攣との間に密接な関係の存在することがうかがわれる. しかし著者は上記物質による痙攣がいずれも短時間の潜伏期間に VB₆ が欠乏して起るとは考えない. むしろ第 2 報で述べたように, 痙攣の本態への生体内生成過程に VB₆ が関与しているという推論が最も妥当であると考えられる.

また一方, 抗 VB₆ 作用をもつ OMP が VB₁ のピリジン部であることは興味深い. VB₁ の副作用については既に多くの臨床家や研究者らによつて報告されている. それらの報告における症状には大量投与によるショック反応と考えられるもの¹⁰⁾ と, 連続投与によるアレルギー様皮膚反応^{11,12)} と思われる副作用に別けられるようである. 前者については NNR¹³⁾ にも警告され, VB₁ に cholinesterase 阻害作用¹⁴⁾ や tetraethylammonium 類似の神経節破壊作用¹⁵⁾ があることが見出されている. 後者については未だその原因についての研究報告を見ないが, その症状が VB₆ 欠乏による皮膚炎に似ていること, VB₆ が欠乏すると皮膚炎を起し易くなり, VB₆ が蕁麻疹その他のアレルギー症状に効果があること¹⁶⁾, そしてまた OMP が VB₁ の加水分解によつて容易に生成される事実¹⁷⁾ などを考え合せ, OMP が VB₁ の連続投与によるアレルギー様副作用の本体であろうと推論される.

いずれにしても以上の事柄は臨床的にも, また生物学的にも興味ある関連事実である.

本研究に際し終始御指導御鞭撻を賜つた岡見工場長, 研究所長桑田 智博士, 第四部長渡辺 厚博士ならびに研究員荒蒔義知博士に謹謝する. また hydroxymethylpyrimidine を戴いた第一部長松川泰三博士に深謝する. なお本研究を発表する機会を与えられた山崎誠試験課長に厚く御礼申し上げる.

武田薬品工業株式会社大阪工場試験課, 同研究所

- 3) W. W. Umbreit, J. G. Waddell: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. **70**, 293(1949).
- 4) 阿多, 田中, 磯, 白谷: 科学 **22**, 587(1952).
- 5) R. H. Reilly et al.: J. Am. Med. Assoc. **152**, 1337(1953).
- 6) R. E. Parks, Jr., G. W. Kidder, V. C. Dewey: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. **79**, 287(1952).
- 7) I. U. Boone, K. T. Woodward: Ibid. **84**, 292(1953).
- 8) V. C. Dewey, G. W. Kidder, R. E. Parks, Jr.: J. Gen. Microbiol. **6**, 181(1952).
- 9) H. Chick, M. M. Elsadr, A. N. Warden: Biochem. J. (London), **34**, 595(1940).
- 10) E. L. Stern: Am. J. Surg., **39**, 495(1938).
- 11) C. L. Laws: J. Am. Med. Assoc. **117**, 176(1941).
- 12) L. Schiff: Ibid. **117**, 609(1941).
- 13) NNR: 449(1953).
- 14) B. Miuz: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. **63**, 280(1946).
- 15) S. K. Wolfson: Federation Proceedings **13**, 418(1954).
- 16) 井上: 理研彙報 **21**, 493(1942); **22**, 305(1943).
- 17) 渡辺: 本誌 **59**, 133(1939).