

## Mycobacteria にたいする Sulfonamides 及び Homosulfamine

## の呼吸阻害作用に関する研究 III

## 呼吸阻害の意義

東村道雄・橋本正

国立療養所大府荘 (荘長: 勝沼六郎博士)

(昭和30年9月2日受付)

第1報に示されている様に sulfonamides (S剤) の呼吸阻害作用については多数の報告がある。しかしこれらの呼吸阻害が発育阻止に関係していることを示した文献は極めて少ない。SEVAG and SHELBURNE<sup>1)</sup> は *Streptococcus pyogenes* を使用して sulfanilamide mg 当り  $6.43 \times 10^7$  cocci の条件で O<sub>2</sub> 吸収が 64% 阻害され、同時に増殖も阻止されたと述べている。その他には S 剤の呼吸阻害と発育阻止の具体的関係について述べた報告は殆んど見当たらない。そして sulfanilamide 量乃至 S 剤の量を減少しても同比率で発育阻止が可能かどうかを検討することが望ましいと思われる。しかし菌量を減じると Warburg 法で呼吸の測定が不能であるし、また SEVAG<sup>2)</sup> によれば O<sub>2</sub> 吸収測定のみでは呼吸阻害を見逃すことがあると云われる。事実吾々の第2報に述べた様に *Mycobacterium avium* の場合でも Warburg 法により認められる O<sub>2</sub> 吸収の阻害より picric acid を水素受容体として観察する方法の方が鋭敏に呼吸阻害を認め得た。この方法は既述の利点を有するので、この方法により呼吸阻害が発育阻止に関係するかどうかを検討した。(homosulfamine については既報した<sup>3)</sup>)。

## 実験材料及び方法

使用菌株は前報と同様に sulfathiazole (ST) 高感性の *Mycobacterium avium* 獣調株である。S 剤の代表として mycobacteria に最も作用の強い ST を使用した。ST は吉富製薬提供の Sulzol-S 実験用 (aminophenyl-sulfamino-thiazole-N<sup>+</sup>-dextrose-sodium sulfonate) を使用した。実験に使用した菌液は第2報と同様に調製した。菌量は湿菌量(乾燥菌量はその 20%) で示した。発育阻止の観察は 2ml を規準とする Sauton 培地 (pH 7.0, asparagine の代りに sodium glutamate 使用) 倍數稀釈法により対照同様の菌膜形成を阻止する最小濃度を最小菌膜形成阻止濃度と記載した。接種菌量の viable counts は Sauton agar plate で算定した。呼吸阻害の観察は東村<sup>4,5,6)</sup>により picric acid を水素受容体として観察した(第2報参照)。阻害度は E<sub>0</sub> を対照の吸光度 (picric acid 還元量), E を ST 添加時の吸光度

として、阻害度 =  $(1 - E/E_0) \times 100\%$  として表した。その他については実験成績の各項に述べる。

## 実験成績並に考察

(1) 菌量一定の場合の sulfathiazole (ST) 量と呼吸阻害度の関係。

第1表 菌量一定の場合の Sulfathiazole 量と阻害度の関係

Sulfathiazole 濃度 μg/ml	阻 害 度 $(1 - \frac{E}{E_0}) \times 100\%$
250	81
125	74
62.5	62
0	0

菌液 10 mg/ml .....1.0  
M/15 Phosphate buffer, pH 7.3 .....1.0  
0.4% Picric acid .....1.0  
M/10 Glucose .....1.0  
Aq. or Sulfathiazole 液 .....1.0  
37°C 12 時間後 Acetone 5 ml 添加後濾過、濾液の吸光度を Leitz の Rouy-Photometer, filter 550 mμ で測定。

第1表に示す条件で picric acid を水素受容体とする方法で呼吸阻害を観察すると、菌量一定の場合は ST 量に比例して阻害が増加する。

(2) 菌量と ST の呼吸阻害との関係

種々の ST 量について菌量を変えて呼吸阻害を観察すると、一定の ST 量については呼吸の阻害度は菌量と逆比例した。即ち、菌量が大であると呼吸阻害を認めるために大量の ST を要した。Warburg 法の場合には呼吸阻害が認められても大量の菌を使用するので、大量の ST を必要とした。そして菌量を小とした場合果して少量の ST で呼吸阻害が起るかどうかは不明であつた。しかしここで用いた方法によると比較的少量で観察可能である。例えば第2表に示す条件では(作用時間が長いため無菌操作を行う。第2報参照)、僅か 100 mcg/ml の ST 量で相当の呼吸阻害を観察できる。この条件では湿菌量 0.2 mg/ml の際に 72% の呼吸阻害が起つたことを示している。従つて発育阻止が起る可能性が考えら

れる。尚菌量が増すと呼吸阻害が認められぬばかりでなく適に ST 添加により呼吸の促進が起つた (第 2 表)。

第 2 表 Sulfathiazole の Picric acid 還元阻害作用と菌量の関係

菌量 mg/ml (対照)	$E_0$	$E$ Sulfathiazole 100 µg/ml	阻害度 $(1 - \frac{E}{E_0}) \times 100\%$	
6.4	0.425	0.456	-7%	M. avium Glycerine bouillon 8日培養菌 基質： 1-Glutami- nate (M/100) 37°C, 19時間
3.2	0.260	0.292	-12%	
1.6	0.114	0.143	-25%	
0.8	0.092	0.076	17%	
0.4	0.086	0.046	46%	
0.2	0.046	0.013	72%	
0.1	0.041	0.013		

第 3 表 Sulfathiazole の in vitro 発育阻止作用と菌量との関係 (菌膜形成の阻止を指標とした)

接 種 菌 量	接 種 Viable counts	最小菌膜形成阻止濃度	小 発 育 延 遅 濃 度
300 µg	$4.5 \times 10^6$	50 µg/ml	3.2 µg/ml
30 "	$4.5 \times 10^5$	25 "	1.6 "
3 "	$4.5 \times 10^4$	6.3 "	0.8 "
0.3 "	$4.5 \times 10^3$	1.6 "	0.025 "

抗菌力は 2 ml を標準とする Sauton 培地倍數積法により、菌膜形成の阻止を指標として 3°C, 10 日後に判定した。

(3) 菌量と発育阻止の関係

次に菌量と発育阻止の関係を観察すると、第 3 表の通りとなる。即ち、菌量が大となると発育阻止に大量の ST を必要とする。この関係は前の呼吸阻害と菌量の関係に似ている。そして湿菌量 300 mcg/2 ml, 即ち 0.15 mg/ml では発育阻止に ST 50 mcg/ml を要している。この値は第 2 表の呼吸阻害が菌量 0.2 mg/ml で 72% に達したのと比較すると、発育阻止を呼吸阻害で説明し得る様にもみえる。しかし呼吸阻害の観察条件と発育阻止の異れとが異なるので可及的等しい条件で比較した。

(4) 呼吸阻害と発育阻止の関係

Buffer 培地 (M/15 phosphate buffer, pH 7.8 にその 10 分の 1 量の 3% glycerine bouillon を添加し、更に picric acid を 0.1% の割合に添加したもので pH を固定した条件で、かつ呼吸阻害の観察条件に類似の条件で、菌量と ST 量の関係を観察した。その結果は第 4 表の通りやはり菌量により発育阻止に要する ST 量は著しく相異なる。更に第 5 表の実験を行つた。これは Sauton 培地を使用する通常の方法では接種菌量が小さいので発育阻止と picric acid 還元阻止の関係が知り難いので大量の接種菌量を用いて、発育と picric acid 還元をたいする ST 量の関係を同時に観察しようと試みた。発育に接種菌量が大であるので一応菌膜形成を目標とした。その結果は第 5 表の通り、24 時間後に picric

第 4 表 Sulfathiazole の in vitro 発育阻止作用と菌量との関係 (Buffer 培地 4 ml + 菌液 1 ml)

接 種 菌 量	最小菌膜形成阻止濃度 (5 日後判定)
20 mg/5 ml	625 µg/ml
0.2	0.1

第 5 表 Sulfathiazole の発育阻止作用と Picric acid 還元阻止作用の関係

Sulfathiazole 濃 度	37°C, 24 時間後の Picric acid 還元	37°C, 5 日後の菌膜形成
2,500 µg/ml	-	-
1,250	-	-
625	+	+
313	+	+
160	+	+
80	+	+
40	+	+
20	+	+
10	+	+
0	+	+

Sauton 培地.....4.0 菌液, 10 mg/ml.....1.0  
ピクリン酸液, 0.4%.....0.5

\*.....菌膜形成はないが、明かに増殖が認められる

acid 還元を認めた領域では、後に多少とも発育を認め、呼吸阻害と発育阻止とは密接な関係があると考えられた。しかし picric acid 還元が阻害されなくても後で発育が部分的に阻害される領域があるので、呼吸阻害が発育阻止の原因のすべてであるとは云えない様に思われる。従つて他の原因の併存が考えられ、やはり PABA の利用阻害に由来する核酸形成阻害が共同作用していると考えるのが妥当と思われる<sup>7,8,9,10</sup>。

しかし以上の事実から呼吸阻害は ST の発育阻止の原因のすべてではないにしても、発育阻止に関して役割を演じていることが十分想像されると思われる。

(注) 酵素量と呼吸阻害の関係

同一菌量でも picric acid 還元酵素系の活性度 (酵素量) が異なると S 剤による阻害度も異なる。湿菌量 1 mg にたいして 6-sulfanilamide-2,4-dimethylpyrimidine (SD) 1 mg を加える場合、その菌の picric acid 還元能が 6.5 mcg/h/mg (湿菌量 1 mg が 1 時間に 6.5 mcg の picric acid を picramic acid に還元する) の際は、SD 添加によりその菌の picric acid 還元作用は 15% 充進したが、同還元能が 2.5 mcg/h/mg の時は picric acid 還元は SD 添加により 7% 阻害された。

(5) 呼吸阻害と拮抗物質

WOOD-FILDES (1940) 及びその後の研究者により S 剤の作用機作は PABA の利用阻害による purine 体形成阻害とされているので<sup>7,8,9,10</sup>, PABA, folic acid 及び coenzyme F (Co-F) の添加の影響を観察した。また adenosine triphosphate (ATP), adenylic acid,

第 6 表

被 検 物 質	<i>M. avium</i> 湿菌量 20 mg/ml			<i>M. avium</i> 接種湿菌量 20 $\mu$ g (Sauton 培地 2ml 当り)	
	被 検 物 質 添 加 量 $\mu$ g/ml	被 検 物 質 添 加 に よ る PA* 還 元 作 用 の 増 加	ST† による PA 還 元 阻 害 に 対 す る み か け 上 の 恢 復	被 検 物 質 添 加 量 $\mu$ g/ml	ST の 発 育 阻 止 に 対 す る 拮 抗 作 用 (ST 濃 度 $\mu$ g/ml)
PABA	200	—	—	100	卅 (>500)
	100			10	卅 (>500)
	10			1	卅 (128)
	1				
Folic acid	200	—	—	100	卅 (32)
	10			卅 (16)	
Co-F	1000(?)	—	—	50(?)	+
ATP	200	—	—	20	± (2)
Adenylic acid	200	—	—	100	± (2)
	100				
DPN	500	卅	卅	80	—
	250				
	125				
	63				
Cytochrome C	32	+	+	40	—
	50			50	—

\* PA = Picric acid      † ST = Sulfathiazole, 1 or 2 mg/ml

diphosphopyridine nucleotide (DPN) 及び cytochrome C の添加の影響を併せて観察した。PABA は片山化学製, folic acid は武田製, Co-F は名大生化学勝沼信彦氏より分与されたもので, 表中の(?) は供与物をそのまま秤量使用したことを示す。ATP は sodium salt で和光純薬製, adenylic acid は Nutritional Biochemicals 製, DPN も同製(95% 純), cytochrome C は L. Light 製を使用した。その結果は第6表の通りで, 発育阻止に拮抗した PABA, folic acid 及び Co-F は呼吸阻害に拮抗しなかつた(秋葉教室の山田も PABA が大原菌にたいする S 剤の呼吸阻害に拮抗しなかつたと述べている<sup>11)</sup>)。ATP 及び adenylic acid は呼吸阻害, 発育阻止の何れにも作用なく, 一方 DPN 及び cytochrome C はみかけ上は ST の picric acid 還元阻害に拮抗する様にみえたが, 発育阻止には全く拮抗しなかつた。しかしこの両者は単独で生菌の picric acid 還元作用を亢進するが, この亢進した picric acid 還元作用も略同率で ST により阻害されるので, 呼吸阻害に本当に拮抗するのではない。従つて発育阻止に拮抗しないのも当然と思われる。

PABA が呼吸阻害に拮抗しないことは問題になる。そして PABA 自体が呼吸阻害作用を有するものなのでその評価は簡単にできないと思われる。(PABA は picric acid 還元も著明に阻害する)。吾々は予め PABA と数時間 incubate した菌を実験に用いてみたが阻害度の減少は認めなかつた。しかし Sauton 培地に PABA /mcg/ml, picric acid 400 mcg/ml を添加して常法通りの稀釈検定を行つてみると発育の回復と同時に picric acid 還元の回復も認められた。従つて所謂静止菌の状態では呼吸の回復が不能であるとも解される。即ち, PABA 利用による purine 体形成の回復が呼吸酵素の増加から呼吸阻害の回復に通じるのかもしれない。この

場合呼吸阻害の発育阻止にたいする意義は主因ではなく副因と考えられるが, 何れにしても発育阻止に無関係ではないと既述の(1)–(4)の実験から考える。

#### 結 論

*Mycobacterium avium* の生菌を使用し, picric acid を水素受容体とする方法で sulfathiazole の発育阻止作用と呼吸阻害作用との関係を追求した。その結果, 発育阻止も呼吸阻害もともに菌量と密接な関係があり, 呼吸阻害が認められた。そして呼吸阻害と発育阻害とが併行して観察された。

呼吸阻害作用は sulfathiazole 乃至 sulfonamides の作用機作の主体ではないかもしれぬが, 発育阻止に関与しているものと想像される。

御指導を受けた院長 勝沼六郎博士と名大第一内科 日比野進教授に感謝の意を表する。

#### 文 献

- 1) SEVAG, M. G., & SHELBURNE, M.: J. Bact., 43: 421-445, 447-462, 1942.
- 2) SEVAG, M. G.: Advances in Enzymology, 6: 33-127, 1946.
- 3) 東村, 橋本: 本誌, 2: 180-184, 1952.
- 4) 東村: 医学と生物学, 33: 59-62, 1954.
- 5) 東村: *ibid.*, 33: 270-273, 1954.
- 6) 東村: *ibid.*, 34: 111-115, 1955.
- 7) BUCHANAN, J. M.: J. Cell. and Comp. Physiol., 38 (suppl. 1): 143-171, 1951.
- 8) BROWN, G. B.: *ibid.*, 38 (suppl. 1): 121-141, 1951.
- 9) SHIVE, W.: *ibid.*, 38 (suppl. 1): 203-226, 1951.
- 10) GOTTS, J. S., & CHU, E. C.: J. Bact., 64: 537-546, 1952.
- 11) 秋葉: 化学療法の実現, 南江堂, 東京, 1950. (p. 65-83).