

結核性肺病巣に於ける脱水素酵素系の組織化学的並びに生化学的研究, 特に TCA-サイクルを中心として

〔第2篇〕 結核肺に於ける脱水素反応阻害因子に関する検討

京都大学結核研究所外科療法部 (主任 教授 長石忠三)

生 嶋 宏 彦

(受付 昭和33年8月26日)

目 次

緒 言
第1章 研究材料並びに研究方法
第2章 研究成績
第1節 各種阻害剤による影響

第2節 結核菌菌体脂質による影響
第3節 各種化学療法剤による影響
第3章 総括並びに考按
結 論

緒 言

一般に酵素は、高分子の複雑な有機触媒であり恐らく蛋白様物質からなるものであろうといわれている。それであるから、蛋白質の変性を惹き起すようなあらゆる物理的或いは化学的因子によつて著しく影響される。^{1) 5) 6) 7)}

脱水素酵素に於いてもその例外ではなく、当然これ等諸因子によつて阻害を受けるものと考えねばならない。

物理的因子には加熱、機械的刺戟、紫外線照射等が考えられ、化学的因子としては、各種の化学的薬剤特に重金属塩又は所謂アルカロイド試薬のような蛋白沈澱剤等が、酵素反応に対して強い阻害剤であるとされている。

肺に於ける脱水素反応阻害の問題を検討するにあつて、これ等阻害因子の影響に就いても、一応検討する必要があることは勿論である。

更に結核菌の菌体成分の中、脂質劃分は、菌の毒力、抗酸性、結核アレルギー化、結節形成、乾酪化等の結核症に特異的な性質に就いて、特に重要な役割を演じていると考えられている。^{2) 3)} 即ち、結核性病変に於いて特異的である結核結節の形成は、結核菌菌体脂質中の磷脂質によつて惹起されるといわれ、又生体に対して極めて毒力が強く、12 μg でマウスを致死

せしめる Bloch 等の所謂 cordfactor は、菌体脂質クロロホルム可溶性劃分の蠟の中に存在するといわれている。これ等は結核菌の毒力とその菌体脂質が密接な関係にあることを物語っていると共に、その毒力は何らかの機転に於いて組織を死に至らしめる力を持っていることを示している。このことから、結核菌の脂質が脱水素反応阻害作用を有するか否かを検討する必要を認め、その各劃分に就いても実験的に比較検討した。

又、各種化学療法剤の結核菌に対する作用機作に関する研究が近年各方面で行われつつあり、これ等の研究の結果、その作用機作はすべて明らかにされたとはいえず、結論は将来に期待される状態にあるとしても、基礎的な研究成績に就いては多くの興味ある報告がなされている。^{4) 8) 9)} 中でも Streptomycin 等が、菌体中の TCA-サイクルに於ける酸化還元反応の一部を阻害するという事実は、極めて興味深い成績である。即ち、最近肺結核に対する切開排膿療法の発展と共に、肺組織に直接高濃度の化学療法剤が撒布される事実から、肺組織に対しても当然何らかの影響があるものと考えねばならない。そこで、これ等化学療法剤が直接肺組織に対しても同様の阻害作用を表すものか否かを検討する必要がある。

反応環境による影響に就いては、第1篇で述べた成績により理解されるところであるので本篇では省略する。

第1章 研究材料並びに研究方法

研究材料は、すべて健常なマウスの肺を使用した。マウスは16gm前後の純系マウス（雄雌を問わず）を用い、撲殺後直ちに肺及び腎を剔出し、以下の諸実験に供した。

研究方法は、何れも10%組織懸濁液を作成し、基質として焦性ブドウ酸、 α -ケトグルタル酸、コハク酸及びリンゴ酸を用い、基質混液中に薬剤或は菌体脂質を入れ、それぞれ至適条件

のもとに反応せしめ、第1篇で述べた方法により比色定量した。

第2章 研究成績

第1節 各種阻害剤による影響

肺組織の脱水素反応に於いて、従来他の臓器或いは細菌類で阻害剤とされているものの中、弗化ソーダ、ウレタン、モノヨード醋酸及び過酸化水素に就いてその影響を比較検討した。得た成績は第10表の通りである。尙、表に示す数値はすべて10%組織懸濁液 10cc 中の formazan の量である。

第10表 阻害剤による影響

基 質	阻害剤 濃度	モノヨード醋酸			ウ レ タ ン			弗 化 ソ ー ダ			過 酸 化 水 素			対 照
		0.001M	0.005M	0.01M	0.05M	0.1M	0.5M	0.005M	0.01M	0.05M	0.1%	0.5%	1%	
焦 性 ブ ド ウ 酸		28.0	6.0	0	29.0	9.0	0	27.0	10.0	0	30.0	20.0	0	30.0
ク エ ン 酸		19.0	0	0	19.0	8.0	0	20.0	11.0	0	21.0	9.0	0	22.0
α -ケトグルタル酸		31.0	9.0	0	30.0	5.0	0	31.0	14.0	0	32.0	20.0	0	33.0
コ ハ ク 酸		39.0	20.0	5.0	37.0	15.0	0	39.0	21.0	0	41.0	25.0	0	41.0
リ ン ゴ 酸		18.0	6.0	0	18.0	7.0	0	20.0	8.0	0	17.0	10.0	0	20.0

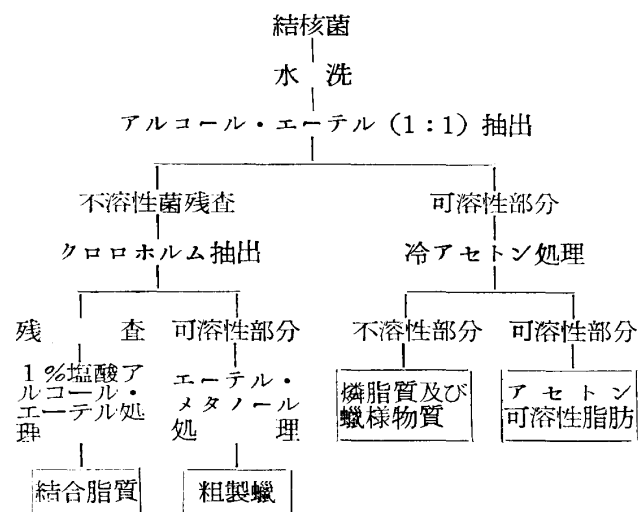
その結果、基質の如何を問わずすべての場合に於いて脱水素反応を阻止している。即ち、阻止濃度は弗化ソーダ 0.01M、ウレタン 0.1M、モノヨード醋酸 0.005M、過酸化水素 0.5% であり、モノヨード醋酸が最も強い阻害作用を有している。但しコハク酸に於いては他の基質と異なり、このモノヨード醋酸 0.01M に於いても完全には阻害を受けていない。

第2節 結核菌菌体脂質による影響

結核菌菌体脂質が肺組織の脱水素反応に対して直接如何なる影響があるかを、その各劃分に就いて比較検討した。

菌体脂質の分劃法は、Anderson の原法に従つて第11表のように分離した。生菌を用い、菌種は人型結核菌 H37Rv 株である。即ち、アルコール・エーテル可溶性アセトン可溶性劃分（ア

第11表 結核菌菌体脂質の抽出法



(Anderson の原法による)

セトン可溶性脂質), アルコール・エーテル可溶性アセトン不溶性劃分(燐脂質及び蠟様物質), アルコール・エーテル不溶性クロロホルム可溶

第12表 菌体脂質による影響

基 質	脂 質 濃 度	アセトン 可溶性脂質		磷脂質及び 蠟様物質		粗 製 蠟		結 合 脂 質		牛 脂		対 照
		0.1mg	1mg	0.1mg	1mg	0.1mg	1mg	0.1mg	1mg	0.1mg	1mg	
焦 性 ブドウ酸		30.0	26.0	31.0	29.0	32.0	27.0	32.0	29.0	32.0	30.0	32.0
ク エ ン 酸		20.0	17.0	21.0	20.0	20.0	17.0	21.0	20.0	21.0	19.0	21.0
α-ケトグルタル酸		32.0	24.0	32.0	28.0	32.0	25.0	32.0	29.0	33.0	29.0	33.0
コ ハ ク 酸		39.0	35.0	40.0	37.0	40.0	35.0	40.0	38.0	40.0	38.0	40.0
リ ン ゴ 酸		21.0	15.0	20.0	17.0	20.0	15.0	20.0	19.0	21.0	20.0	21.0

(単位 μg)

性劃分(粗製蠟)及びアルコール・エーテル不溶性クロロホルム不溶性劃分(結合脂質)に大別した。これ等に就いてのそれぞれの成績は第12表に示す通りである。脂質そのものの対照としては牛脂を用いた。基質混液に加えた脂質の量はすべて 1mg 及び 0.1mg である。

この成績によると、結核菌菌体脂質は何れも若干の阻害作用を有しているもののようであり、アセトン可溶性脂質及びクロロホルム可溶性蠟が最も強く、同程度の阻害作用を示し、次いで磷脂質及び蠟様物質とから成つているアセトン不溶性脂質であり、結合脂質は対照に比較して殆んど差が認められない。菌体脂質の対照とした牛脂の場合に於いても、脂質を全く加えない対照に比較して若干の差違が認められる点注目される。尚、特に基質の如何による差違は認められず、ただクエン酸に於いては、比較的脂質による影響を受け難いような結果が出ている。

第3節 各種化学療法剤による影響

Streptomycin (以後 SM と略す), Para-aminosalicylic acid (以後 PAS と略す), Isonicotinic acid hydrazide (以後 INH と略す) 及び Penicillin に就いて、これ等化学療法剤が、直接肺組織に対して如何なる影響があるかを脱水素反応の面から観察し、これ等が脱水素反応阻害因子となり得るか否かに就いて検討した。その成績は第13表に示す通りである。この結果、各化学療法剤は高濃度に於いては肺組織脱水素反応に対し阻害作用を有することが解つた。即ち、SM は焦性ブドウ酸及びコハク酸を基質とした場合に特に阻害が認められ、PAS では、特にコハク酸脱水素反応に阻害作用を示し、INH では、基質による差違はなくすべての場合の反応に阻害的影響を示している。Penicillin は低濃度では対照と差はなく、

第13表 化学療法剤による影響

基 質	濃 度	SM				PAS				INH				Penicillin				対照
		1 μg	10 μg	100 μg	1000 μg	1 μg	10 μg	100 μg	1000 μg	1 μg	10 μg	100 μg	1000 μg	1 μg	10 μg	100 μg	1000 μg	
焦 性 ブドウ酸		33.0	31.0	27.0	25.0	33.0	33.0	32.0	29.0	34.0	33.0	29.0	27.0	33.0	33.0	32.0	27.0	33.0
クエン酸		20.0	20.0	19.0	16.0	22.0	21.0	20.0	17.0	21.0	22.0	21.0	17.0	21.0	20.0	18.0	15.0	21.0
α-ケトグルタル酸		31.0	30.0	30.0	27.0	32.0	31.0	31.0	26.0	33.0	31.0	26.0	25.0	31.0	32.0	29.0	24.0	32.0
コハク酸		41.0	39.0	35.0	29.0	41.0	40.0	35.0	30.0	40.0	39.0	38.0	36.0	40.0	40.0	36.0	31.0	41.0
リンゴ酸		21.0	21.0	19.0	17.0	20.0	21.0	17.0	15.0	20.0	19.0	15.0	14.0	21.0	20.0	17.0	13.0	21.0

(単体 μg)

1000 μg に於いて急に阻害作用を表している。
この場合も基質による差違はみられない。

第3章 総括並びに考按

これ等の諸成績から、肺に於ける脱水素反応阻害因子に就いて考察する。

先ず一般阻害剤に就いて検討した結果、これ等によつて殆んど完全に反応を阻止されることが示された。このことは濃度による差違はあるにしても、これ等の反応が酵素により触媒されているという証拠ともなり、当然のことと解される。

次に結核菌菌体脂質に就いての成績であるが、何れも高濃度に於いてのみ阻害作用を表している。併しながら、菌体脂質各劃分に於いて阻害を表している量が、生体内に於いて想像せられる量に比して遙かに多量であり、0.1mgでは既に何ら阻害を示していない。又、対照として用いた牛脂に於いても若干影響が認められており、基質によつても何ら差違がみられない。これ等の事実からして、果して結核菌菌体脂質が特異的に肺組織脱水素反応に対して直接阻害作用を有するものか否かは疑問である。即ち、生体に於いて表れる、種々の病理学的現象は、アレルギー反応等に伴つた二次的な作用であると理解したい。

次に、化学療法剤に就いての成績であるが、これも脂質の場合と同様高濃度に於いてのみ阻害作用を表している。この成績は、実験方法に改良すべき点、即ち、更に長時間作用せしめる方法等を考慮すべきではあるにしても、一応有意と認めて差支へないものと考ええる。即ち、100 μg 以上では、対照に比して明らかに低値を示し、又基質によつても若干差違が認められることから、これ等薬剤は、高濃度に於いては組織のTCA-サイクルの何れかの反応を阻害するのではなからうかと推定される。

これ等の結果はすべて肺組織懸濁液を用い、試験管内実験で得た成績であるので、生体内での再現性に就いて推論するのは早計であるといわざるを得ない。又、阻害点の解明や阻害作用の本質的な機転に就いては、今後共更に実験を重ね追究せねばならぬ問題であると考ええる。

結 論

肺に於ける脱水素反応の阻害因子を明らかにする目的で、一般阻害剤、結核菌菌体脂質各劃分及び二、三の化学療法剤に就いてその成績を検討した結果以下の結論を得た。

1) 弗化ソーダ、ウレタン、モノヨード醋酸及び過酸化水素に就いてその影響をみた結果、これ等阻害剤は肺組織に対しても完全に脱水素反応を阻止する。

2) 結核菌菌体脂質各劃分に就いて比較検討した結果、菌体脂質特にアセトン可溶性脂質及びクロロホルム可溶性脂質劃分に於いては、肺組織脱水素反応に対し阻害作用を有するもののような成績を得たが、これは菌体脂質の特異的作用とは認め難い。

3) 化学療法剤の場合、何れも高濃度に於いて直接肺組織の脱水素反応に対して阻害作用が認められ、すべて100 μg 以上では対照に比して明らかに影響を表しており、この事実は有意であると考ええる。

文 献

- 1) Baldwin: Dynamic Aspects of Biochemistry, 1947
- 2) 久保久俊他：結核菌体成分に關しての病理組織学的研究，結核，27：619，1952
- 3) 久保久俊他：アセトン可溶性結核脂肪に就いての病理組織学的研究，日病理会誌，41：399，1952
- 4) 笹川泰治：物質代謝から見た抗生物質の作用機作，酵素化学の進歩，5：105，1954
- 5) Sizer: Effects of temperature on enzyme kinetics. Adv. Enzymol., 3: 35, 1943
- 6) Slyke: The kinetics of hydrolytic enzymes and their bearing on methods for measuring enzyme activity. Adv. Enzymol., 2: 33, 1942
- 7) Stearn: Kinetics of biological reactions, with special reference to enzymic Processes. Adv. Enzymol. 9: 25, 1949
- 8) 山村雄一他：パラアミノサリチル酸の結核菌酸化酵素系に及ぼす影響，結核，26：227，1951
- 9) 山村雄一：化学療法剤の作用機作，結核菌の生化学，182，1955