

微生物の呼吸に対するオーレオマイシン、クロロマイセチン及びストレプトマイシンの作用

岡山大学医学部微生物学教室 (指導: 村上 栄教授)

川 井 潔
松 本 豊 治
本 松 格 史
秋 山 健 二

〔昭和 34 年 12 月 25 日受稿〕

緒 論

多くの阻害剤は細菌の発育に対してと同様に呼吸に対しても、これを阻害する効果をもつ。

抗生物質も細菌の発育に対して阻害効果をもつ以上、呼吸にも阻害作用をもつのではないかと考えられるのは当然である。

しかしてこの微生物の呼吸に対する阻害実験としてはストレプトマイシンについて¹⁾⁻⁵⁾は必ずしも一定した成績は得られて居らず、オーレオマイシン⁶⁾については僅かに *E. coli*, *Lactobacillus arabinosus* についての報告があるにすぎない。クロロマイセチン⁷⁾についても Smith の報告がみられる程度である。

筆者はこの三種の抗生物質につき *E. coli* と *Shigella flexneri 2a* の二菌種を用いてその呼吸系に対する阻害効果を再検討した。又抗生物質と菌体との接触時間の差により阻害効果が如何様に変るかということをも明らかにすることも阻害実験を試みる場合の基本的問題であると考え、その点に就いてやや詳細に検討したので以下に報告する。

実験材料及び実験方法

供試菌: 教室保存の *Shigella flexneri 2a* と, *E. coli communis*.

細菌浮游液: 上記の菌を普通寒天平板培地に 37°C 18時間培養後集菌し M/50 磷酸緩衝液 (pH 7.2) にて2回遠沈洗滌後、同一組成の緩衝液に再浮游し、Pulfrich 比色計にて所定の濁度とした。

呼吸活性: ワールブルグ検圧計にて常法に従つて行なつた。

基質及び抗生物質: 基質はすべて再蒸留水に溶解、終濃度 M/100 となるように調整し、pH は 7.2に修正して用いた。オーレオマイシン (AM) は日本レダリー株式会社製造の結晶塩酸オーレオマイシン末を、クロロマイセチンは市販のクロロマイセチン末を

ストレプトマイシンは同じく市販の結晶硫酸デヒドロストレプトマイシンを使用した。

実験成績

第1節 基質呼吸に対する効果

数種の基質について、抗生物質と菌液との

第 1 表 基質呼吸に対する抗生物質の影響 (*Sh. flexneri 2a*)

抗生物質 基質 濃度	オーレオマイシン					クロロマイセチン					ストレプトマイシン		
	200γ /ml	100	50	20	0	200	100	50	20	0	200	20	0
グルコース	100μl	120	134	144	145	142	144	140	141	140	158	150	140
ビルビン酸	96	117	121	140	141	140	143	141	141	142	162	158	141
グルタミン酸	70	78	88	72	93	81	91	98	96	98	63	64	63
アスパラギン酸	81	94	100	112	113	96	109	113	115	113	118	116	113

菌液2.0cc (湿菌量10mg), 基質0.3cc (終濃度10⁻²M), 抗生物質0.3cc, 全量3.0cc, M/50磷酸緩衝液, pH 7.2, 37.5°C, 1hr. (自己呼吸の補正なし)

preincubation の時間を15分として、その呼吸阻害の様子を検討した。赤痢菌 (Sh. flexneri 2a) の場合 AM は第1表の如き何れの基質に対しても高濃度では呼吸阻害を示し 200 γ /cc でグルコース24.6%, ビルビン酸22.0%, グルタミン酸23.5%, アスパラギン酸16.0%であった。

100 γ /cc ではやや阻害度がおち、50 γ /cc では阻害度はずつと減少した。CM は高濃度 (200 γ /cc) でもグルコースとビルビン酸に対しては殆んど影響がなくアミノ酸であるアスパラギン酸とグルタミン

酸に対してのみ、軽度阻害を示した。しかしその阻害も 50 γ /cc 以下ではみられなかつた。SM は表記のどの基質に対しても全く阻害効果はなく、軽度呼吸促進効果を示したにすぎなかつた。

E. coli についても抗生物質と菌液との15分 preincubation で AM は赤痢菌と同様、100 γ /cc 以上で強い呼吸阻害を示し第2表の如き基質について、200 γ /cc でグルコース75.0%, ビルビン酸77.0%, アスパラギン酸71.0%, グルタミン酸68.0%の阻害があつた。

第2表 基質呼吸に対する抗生物質の影響 (E. coli)

抗生物質 濃度 基質	オーレオマイシン					クロロマイセチン					ストレプトマイシン		
	200 γ /ml	100	50	20	0	200	100	50	20	0	200	20	0
グルコース	34 μ l	82	120	131	135	133	134	136	136	135	168	158	141
ビルビン酸	29	69	118	137	138	138	139	139	139	138	143	140	135
グルタミン酸	23	41	68	70	72	54	69	70	72	72	56	71	77
アスパラギン酸	26	48	80	90	90	72	81	90	91	90	71	88	92

菌液2.0cc (湿菌量5mg), 基質0.3cc (終濃度 $10^{-2}M$), 抗生物質 0.3cc, 水を加えて全量 3.0cc M/50 磷酸衝液, pH 7.2, 37.5°C, 1hr (自己呼吸の補正なし)

50 γ /cc 以下ではその呼吸阻害も殆んど表われなかつた。CM は E. coli の場合と同様 200 γ /cc でグルコース、ビルビン酸に対しては阻害なくアミノ酸のグルタミン酸、アスパラギン酸に対しては軽度阻害を表わした。しかし 100 γ /cc 以下では阻害効果は極めて少なかつた。SM はグルコース、ビルビン酸ではむしろ呼吸促進を示したが、アスパラギン酸、グルタミン酸に対しては 200 γ /cc で軽度の阻害を示したことは、赤痢菌の場合と異つてやや注目すべき事実と思われた。

第2節 抗生物質 Preincubation の時間と阻害率との関係

次にビルビン酸を基質にして、赤痢菌 (Sh. flexneri 2a) と E. coli 各々につきこれ等抗生物質 (AM, CM, SM) の呼吸阻害がその抗生物質と菌液との preincubation の時間でどのような影響を受けるかを検討してみた。

即ち赤痢菌 (Sh. flexneri 2a) については、AM による呼吸阻害は第3表の如く 200 γ /cc 濃度でも 100 γ /cc 濃度でも preincubation の時間に関わりなく同時添加でもほとんど同じ効果が表われた。

しかし 50 γ /cc 以下では例え preincubation の時間を1時間にしても呼吸阻害は表われなかつた。

第3表 抗生物質 Preincubation 時間と阻害率との関係 (Shigella flexneri 2a)

添加時間 濃度	7/cc	60分前	45分前	15分前	同時
	μ l				
オマ	200	106	108	108	112
イー	100	118	117	119	125
レン	50	136	141	140	135
オン	20	137	138	139	139
	0	140	140	140	140
クイ	200	97	99	135	134
ロセ	100	131	128	134	135
ロチ	50	136	137	139	136
マン	20	138	137	137	138
	0	138	138	138	138
スマ	200	154	151	150	152
スト	20	151	145	141	143
レン	0	140	140	140	140
ブント					

菌液2.0cc (湿菌量10mg) 基質、ビルビン酸 0.3cc (終濃度 $10^{-2}M$), 抗生物質 0.3cc, 水を加えて全量3.0cc, pH 7.2, 37.5°C, 1hr.

CM については第3表の如く 200 γ /cc 濃度で40分~1時間の preincubation ではじめて少しづつ阻害が表われるに到り、15分の preincubation では阻害は表われなかつた。即ち CM は preincubation

の時間の長短により、阻害度に差がでてくることが分つた。しかし 100 γ /cc 以下では preincubation が 1 時間に及んでもほとんど阻害は起り得なかつた。

SM は試みた如何なる濃度においても例え 60 分間 preincubation を行なつても阻害を表わさなかつた。

E. coli についても同様のことを試みたが第 4 表の如く、AM は 200 γ /cc 濃度でつよい呼吸阻害を表わし、約 75.0% で、主室に菌液と一緒に入れて preincubation した時間の如何に拘らず、阻害度は殆んど同じで基質ピルビン酸と同時に添加した場合でさえ殆んど同程度の阻害であつた。

第 4 表 抗生物質 Preincubation 時間と阻害率との関係 (E. coli)

	添加時刻	60分前	45分前	15分前	同 時
	濃度				
オ マ イ レ シ ン	γ /cc	μ l			
	200	31	26	30	33
	100	71	69	68	69
	50	120	119	116	118
	20	130	131	128	131
0	132	132	132	132	
ク イ ロ セ ロ チ マ ン	200	88	92	136	135
	100	119	129	134	133
	50	130	131	130	129
	20	134	134	135	135
	0	135	135	135	135
ス マ イ レ シ ン ブ ト	200	148	147	144	140
	20	138	133	135	135
	0	132	132	132	132

菌液 2.0cc (湿菌量 10mg), 基質・ピルビン酸 0.3cc (終濃度 $10^{-2}M$), 抗生物質 0.3cc, 水を加えて全量 3.0cc, pH 7.2, 37.5°C 1hr.

濃度が低くなるにつれてこの阻害度は減少した。しかし何れも preincubation の時間に関係なく同じであつた。

これに反して CM は preincubation の時間によつて効果が異なり 200 γ /cc 濃度では 40 分~60 分 preincubation で約 35% の阻害が見られたが 15 分の preincubation では阻害は殆んどなかつた。即ちここにおいても CM は preincubation の時間の長短により、阻害程度に差が表われることが分つた。膜の滲透力の差が想像されるわけである。しかし 100 γ /cc 以下では如何なる preincubation の時間においても殆んど阻害効果は見られなかつた。

SM は第 4 表の如くピルビン酸基質の場合、高濃

度 (200 γ /cc) で preincubation が 1 時間に及んでも全く阻害を起さずむしろ促進の傾向を表わした。

総括及び考案

各種抗生物質の作用機作の究明に當つて、先づ行われるのは、その呼吸に対する阻害効果についてであり、多くの阻害剤が微生物の呼吸に対して阻害効果をもつことを考えれば当然のことであろう。しかして前述の様に微生物の呼吸に対する各種抗生物質の影響に関しては、今迄に多くの報告がみられるが、筆者等は教室保存の Sh. flexneri 2a と E. coli communis についてオーレオマイシン、クロロマイセチンとストレプトマイシンを相互の関連において検討し、且阻害実験の場合の基本的問題である抗生物質と菌体との preincubation の時間と阻害率との関係をも検討してみた。先づ AM については Karp & Snyder⁸⁾ が発疹チフスリケッチャのグルタミン酸酸化を 100~300 γ /cc で阻止する事を報告し AjL⁹⁾ は E. coli Lactobacillus arabinosus について、この静止菌の醋酸、C₄-ヂカルボン酸、ピルビン酸、 α -ケトグルタル酸、グリシン、グルタミン酸、アスパラギン酸の基質呼吸が阻害されると報じている。矢部⁹⁾ 等も E. coli と Micrococcus pyog. var. aureus についてその呼吸阻害効果を報告しているが、筆者等の場合にも AM は赤痢菌 (Sh. flexneri 2a) と E. coli のグルコース、ピルビン酸、アスパラギン酸、グルタミン酸呼吸に対して 100~200 γ /cc の濃度において、強い阻害効果を示した。しかしこの阻害度は赤痢菌の方が弱く代謝上の何らかの差異を暗示する。

両菌共 50 γ /cc 以下ではその強い呼吸阻害効果も極めて弱くなつた。AM がこのように強い呼吸阻害効果をもつことは極めて特異的で CM においては 200 γ /cc の高濃度でもグルコース、ピルビン酸の呼吸が両菌共に阻害を受けず、アミノ酸であるグルタミン酸、アスパラギン酸呼吸のみ僅かに阻害を受けたが、100 γ /cc では既にその阻止効果も殆んど消失した。AM と比べて大きな違いであり、その作用機構の差を十分伺わせる。Smith⁷⁾ 等は 45 の酵素系について CM の影響を調べたが、静止細胞、生活細胞何れの呼吸も直接阻害することなく phosphorylation を通じて行なわれる炭水化物の利用能も蛋白の分解にも作用せず、唯脂肪分解の阻害を暗示する如き esterase の活性が阻害されるのを見た報告しているが、筆者の場合そのアミノ酸 (グルタミン酸、アス

パラギン酸)呼吸のみが阻害を受けるという結果を得た。しかしこの点については更に広汎な研究が必要と思われる。

SM については赤痢菌の場合、何れの基質呼吸も全く阻害を受けずむしろ促進される傾向があり、E. coli の場合はグルコース、ピルビン酸は僅かに、促進されたが、グルタミン酸とアスパラギン酸の呼吸は、やや阻害を受けて、赤痢菌と E. coli の菌体の代謝上の差を暗示した。Geiger³⁾ は E. coli の静止状態の呼吸について、窒素を含まない炭素源を基質とした時は、SM による呼吸阻害はみられないが、アスパラギン酸を基質とする時は明らかに呼吸阻害がみられるといつており、この結果は筆者等の場合と一致している。これ等の結果を直接その抗生物質の作用機作と関連づける事はできないが、AM と CM と SM を相互に比較的にみる時に AM は両菌に対し共に強く呼吸を阻害し CM, SM とは趣を異にしており、CM は呼吸阻害効果はずつと落ちるがグルタミン酸、アスパラギン酸呼吸の阻害が両菌共に表われた。それに反して SM は E. coli においてのみグルタミン酸、アスパラギン酸呼吸を阻害した。そしてその呼吸阻害力は AM, CM, SM の順に弱くなる。

次に抗生物質と菌体との接触時間と呼吸阻害率の関連であるがピルビン酸基質で検討した結果では、AM の強い呼吸阻害は基質と同時に添加でも1時間 preincubation を行なつた後、基質を添加したものでも殆んど変りがなく AM の滲透性の強さが伺われた。CM については同時添加ではほとんど起らない阻害効果が40~60分前添加 preincubation では阻害が表われるようになり、preincubation の時間の長短により、阻害度が異なつてくることが判明し CM 使用の場合注意しなければならない事と考える。しかして AM も CM もこうして 100~200 γ /cc ではじめて阻害をみるのであるが、50 γ /cc 以下では如何に preincubation の時間が長くても呼吸阻害効果は表われない。AM も CM もその発育阻止濃度

は低く 10 γ /cc 前後で十分であるが、呼吸阻害は、100 γ /cc~200 γ /cc という高濃度にならぬと表われぬ。この点の解明は難かしいが、一般に抗生物質の作用機作は多面的と考えられている故、発育ということに対しては、低濃度において、代謝系への一寸した干渉によるだけで可能であるが、呼吸系に障碍を引き起す為には、このような高濃度が必要なのであろう。しかし SM は 200 γ /cc という高濃度でも全く呼吸阻害を示さず、赤痢菌 (Sh. flexner 2a) E. coli のピルビン酸基質呼吸では例え1時間の preincubation を行なつても全く無効であつた。この点は SM の作用機作の特異性を伺わせる。しかし、E. coli のグルタミン酸、アスパラギン酸呼吸には高濃度 (200 γ /cc) で阻害を認めることができ、これは興味ある点であるが菌種による代謝性状の差異の表われでもあるとも考えられ、この解明は、更に詳細な酵素化学的検討に俟たねばならない。

結 論

1. グルコース、ピルビン酸、グルタミン酸、アスパラギン酸を基質とする呼吸に対し、AM は 100~200 γ /cc で極めて強い阻害効果を表わす。AM と菌体との preincubation の時間は阻害率に殆んど影響を与えない。

2. CM は高濃度で僅かにグルタミン酸、アスパラギン酸の呼吸阻害を示す。而して CM と菌体との preincubation 時間がその阻害率に影響を与える。

3. SM は高濃度 (200 γ /cc) で E. coli のグルタミン酸、アスパラギン酸呼吸を僅かに阻害するにすぎない。Sh. flexneri 2a の基質呼吸は、全く阻害しない。しかして SM は基質と同時に添加でも1時間菌体と preincubation を行なつても殆んどその結果に変りはない。

終りに臨み終始御懇篤なる御指導を賜つた恩師村上教授に深甚なる謝意を表し、併わせて御協力下さつた教室員各位に感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Benham, R. S.: Science, 105, 69, 1947.
- 2) Henry, J. Henry, R. T. Housewright, R. D. and Berkmann, S.: J. Bact, 56, 527, 1948.
- 3) Geiger, W. B.: Arch. Biochem, 15, 227, 1947.
- 4) Bernheim, F. and Fitzgerald, R. T.: Science, 105, 435, 1947.
- 5) Bernheim, F. and Fitzgerald, R. T.: Science, 105, 417, 1947.
- 6) AjL, S. T.: Bact Rev., 17, 32, 1953.
- 7) Smith, G. N. Worrel, C. S. & Swanson, A. L.: J. Bact, 58, 803, 1949.

- 8) Karp, A. & Snyder, T. C.: Proc. Soc. Expt. Biol. Med. 79, 216, 1952. 9) 矢部等: 岡山医学会雑誌, 70, 2547, 1958.

A Comparative Study on the Effect of Aureomycin, Chloromycetin, and Streptomycin on the Bacterial Respiration

By

Kiyoshi Kawai,
Toyogi Matsumoto,
Kakushi Honmatsu,
Kengi Akiyama

Department of Microbiology, Okayama University Medical School
(Director: Prof. Dr. Sakae Murakami)

This experiment was performed to investigate the effect of aureomycin, chloromycetin, and streptomycin upon the oxidation of several substrates by *Sh. flexneri* 2a and *E. coli* communis.

The results are as follows:

1) A level of 200 γ /ml aureomycin markedly inhibits the oxygen uptake with substrates such as glucose, pyruvate, glutamate, and aspartate. The inhibitory rate has no relation to the preincubation time of a mixture of aureomycin and a cell suspension.

2) A high concentration (200 γ /ml) of chloromycetin slightly inhibits the oxidation of amino acids such as glutamate and aspartate. The inhibitory rate has a relation to the preincubation time of a mixture of chloromycetin and whole cell suspensions.

3) A level of 200 γ /ml streptomycin slightly inhibits the oxidation of glutamate and aspartate by *E. coli*, but it does not affect the oxidation of glucose and pyruvate by this organism.

The oxidation of proposed substrates by *Sh. flexneri* 2a is not also prevented by streptomycin.

Even though streptomycin is added to the original cell suspension before the substrates and preincubated for an hour, the results are the same.
