

抗結核剤の人型結核菌感性株ならびに 耐性株のカタラーゼ作用に及ぼす影響

中 野 保 二
山 崎 雪 夫

石川県中央病院
金大医学部日置内科

受付昭和31年7月11日

緒 言

1897年 Hahnが初めて結核菌のカタラーゼ作用について報告し、1920年頃から結核菌の人型、牛型、鳥型、冷血動物型の諸型におけるその作用の強弱度、菌の培養日数に伴う推移、至適温度、至適 pH、菌の発育速度とカタラーゼ作用との関連等に関する幾多の文献が見当るのである。さらに SM・PAS・INAH等の抗結核剤が発見せらるるや、直ちにこれら薬剤の結核菌カタラーゼ作用に及ぼす影響が主として鳥型菌を対象として、一部は牛型、特定の場合に人型の結核菌を使用して観察せられた。その中でも顕著な事実として INAHは著しく結核菌カタラーゼ作用を抑制するが、SM・PASはほとんど影響しないことが注目せられている。われわれは更に一步すすめて、しからば SM・PAS・INAHに耐性たる人型結核菌のカタラーゼ作用は如何になつていのかを調査し、さらに他種抗結核剤が如何なる影響を及ぼすものであるかを研究することは結核の化学療法を進めてゆく上に基礎となるものとして不可欠であると信じ、本研究を行つたものである。

実験方法

使用菌株は人型 $H_{37}Rv$ 株および $H_{37}Rv$ 株の SM・PAS・INAH に耐性を完全に示すものにして、伝研より分与されたるものをそれぞれの抗結核剤を含む岡・片倉培地に継代培養したるものにして、耐性の度合いはいずれも $100\gamma/ml$ に耐性なるものを使用した。

カタラーゼ測定には Warburg 検圧計を使用した。すなわち主室には菌液 2.0cc ならびに抗結核剤溶液 2.0cc を、側室には H_2O_2 を、中央小室には 20% KOH 0.2cc を容れ、対照として同量の H_2O_2 液による酸素発生量を藤田・児玉氏法により測定するために 1% H_2SO_4 1.0 cc, 10% $KMnO_4$ 0.1cc を主室に入れ、混和して発生する酸素量を測定した。

測定には次の順序をとつた。すなわち $37.5^\circ C$ の恒温に達せしめて15分後に検圧計の栓を閉鎖し、次いで側室

内 H_2O_2 を傾斜により主室内に流入せしめ、以後10分間毎に酸素の発生量を測定した。この際特に中央小室の KOH 液が主室内に流入しないように注意した。使用せられた菌液・薬液ならびに H_2O_2 液はすべて磷酸緩衝生理的食塩水によつてその pH を 7.2 とした。その理由とするところは pH 7.2 においてそのカタラーゼ作用は最も著しく発現されるからである。 H_2O_2 の濃度は 0.05M に調製した。測定値は mm^3 で表わした。

実験成績

I) SMの $H_{37}Rv$ 株ならびに PAS 耐性株・INAH 耐性株のカタラーゼ作用に及ぼす影響

a) SMの $H_{37}Rv$ 株のカタラーゼ作用に対する影響
菌量 4.0mg

容器番号	I	II	III	IV	V	VI
KOH	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
H_2O_2	0.2		0.2		0.2	
菌液	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
磷酸緩衝生理的食塩水		0.2		0.2	2.0	2.2
SM	2.0	2.0	2.0	2.0		
SM濃度	m/100	m/100	m/1000	m/1000		
30分	28.0 38.0	-10.0	28.5 39.5	-11.0	26.5 38.5	-12.0
60分	28.5 40.5	-14.0	26.5 41.0	-14.5	25.5 41.5	-15.5

SMの m/100, m/1000 および SMの含まれない場合の酸素消費量すなわち呼吸量と発生酸素量とを合計したカタラーゼ作用による酸素量はいずれもほとんど差異がなく、したがつて SMは $H_{37}Rv$ 株のカタラーゼ作用に対してなんらの影響を与えるものではないことが知りえられる。なお30分値と1時間値とを比較するに後者において僅微ながら大なることは、30分より1時間に至る間、その作用が継続していることを示すものである。

以上の如く SMは PAS 耐性菌に対してそのカタラーゼ作用を増加せしめること著しく、30分間値について比

b) SMのPAS耐性株カタラーゼ作用に及ぼす影響
菌量 3.8mg

容器番号	I	II	III	IV	V	VI
K O H	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
H ₂ O ₂	0.2		0.2		0.2	
菌液 磷酸緩衝生理的食塩水	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
S M		0.2		0.2		2.2
S M濃度	m/100	m/100	m/1000	m/1000		
30 分	21.0 V 46.0	-25.0	16.0 V 39.0	-23.0	-0.5 V 21.0	-20.5
60 分	0 V 52.0	-52.0	-8.5 V 43.5	-51.0	-21.0 V 25.5	-46.5

較するに m/100 SMの存在において2倍以上の数値を示すことは注目すべき事実であろう。これは m/1000 S Mの場合においても対照たる SMを含まない場合の21.0 mm³ に比し39.0mm³ と2倍に近い数値が示された。30分と1時間とのそれぞれの数値をみるに、後者においてその数値の増大しあることが認められる。

c) SMのINAH耐性株カタラーゼ作用に及ぼす影響
菌量 6.2mg

容器番号	I	II	III	IV	V	VI
K O H	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
H ₂ O ₂	0.2		0.2		0.2	
菌液 磷酸緩衝生理的食塩水	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
S M		0.2		0.2		2.2
S M濃度	m/100	m/100	m/1000	m/1000		
30 分	-9.0 V 2.0	-11.0	-7.0 V 3.0	-10.0	-5.0 V 2.0	-7.0
60 分	-12.0 V 5.0	-17.0	-10.0 V 5.5	-15.5	-10.0 V 5.0	-15.0

INAH耐性株のカタラーゼ作用は極めて僅微なものに過ぎないことが明らかであり、SMがその作用に対しなんらの影響を与えておらず、60分値は30分値の約2倍量を示した。

II) PASのH₃₇Rv株ならびにSM耐性株、INAH耐性株のカタラーゼ作用に及ぼす影響

すなわちPASがH₃₇Rv株のカタラーゼ作用に対して及ぼす影響は顕著なものではないが、やや増加させることは明らかであり、みかけ上の酸素発生にはほとんど差異がなく、カタラーゼ作用の増進するのはPAS添加による菌の呼吸増加すなわち酸素消費量の大きなることが大いに関与しているわけである。さらに m/100 PAS添加の場合において60分値の30分値より減少せるは、この際菌の酸素消費量が大きく、発生酸素量を越えるためと

a) PASのH₃₇Rv株のカタラーゼ作用に及ぼす影響
菌量 4.0mg

容器番号	I	II	III	IV	V	VI
K O H	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
H ₂ O ₂	0.2		0.2		0.2	
菌液 磷酸緩衝生理的食塩水	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
P A S 量		0.2		0.2		2.2
P A S 濃度	m/100	m/100	m/1000	m/1000		
30 分	25.5 V 36.5	-13.0	25.0 V 34.0	-11.0	20.5 V 29.0	-8.5
60 分	15.0 V 35.0	-20.0	15.0 V 32.5	-17.5	15.0 V 30.0	-15.0

考えられる。

b) PASのSM耐性株カタラーゼ作用に及ぼす影響
菌量 4.0mg

容器番号	I	II	III	IV	V	VI
K O H	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
H ₂ O ₂	0.2		0.2		0.2	
菌液 磷酸緩衝生理的食塩水	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
P A S 量		0.2		0.2		2.2
P A S 濃度	m/100	m/100	m/1000	m/1000		
30 分	26.0 V 33.0	-7.0	28.0 V 35.0	-7.0	26.0 V 33.5	-7.5
60 分	19.0 V 35.0	-16.0	22.5 V 36.0	-13.5	23.0 V 35.0	-12.0

以上の成績はPASは m/100にても m/1000にてもSM耐性株のカタラーゼ作用に対して特別に著しい影響を与えるものでないことを示している。

c) PASのINAH耐性株カタラーゼ作用に及ぼす影響
菌量 7.5mg

容器番号	I	II	III	IV	V	VI
K O H	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
H ₂ O ₂	0.2		0.2		0.2	
菌液 磷酸緩衝生理的食塩水	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
P A S 量		0.2		0.2		2.2
P A S 濃度	m/100	m/100	m/1000	m/1000		
30 分	-3.5 V 4.0	-7.5	-3.0 V 5.0	-8.0	-4.0 V 4.5	-8.5
60 分	-9.0 V 5.0	-14.0	-8.0 V 7.0	-15.0	-9.0 V 5.5	-14.5

INAH耐性菌のカタラーゼ作用は極めて僅微なものに過ぎないことは、I c) の実験成績の示すところと同様

であり、それはPASの存在によつてもなんらの影響のないことが認められた。

III) INAHのH₃₇Rv株、SM耐性株およびPAS耐性株のカタラーゼ作用に及ぼす影響

a) INAHのH₃₇Rv株カタラーゼ作用に及ぼす影響
菌量 3.3mg

容器番号	I	II	III	IV	V	VI
KOH	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
H ₂ O ₂	0.2		0.2		0.2	
菌液	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
磷酸緩衝生理的食塩水		0.2		0.2	2.0	2.2
INAH量	2.0	2.0	2.0	2.0		
INAH濃度	m/100	m/100	m/1000	m/1000		
30分	-5.0 V 5.0	-10.0	20.0 V 32.0	-12.0	26.0 V 39.0	-15.0
60分	-3.5 V 11.5	-15.0	22.0 V 38.5	-16.0	35.0 V 50.5	-17.5

以上の如くINAHはH₃₇Rv株のカタラーゼ作用を著明に抑制することが知られ、特にm/100とm/1000との場合を比較すると前者において甚だしく強力であることが認められた。

b) INAHのSM耐性株カタラーゼ作用に及ぼす影響
菌量 4.7mg

容器番号	I	II	III	IV	V	VI
KOH	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
H ₂ O ₂	0.2		0.2		0.2	
菌液	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
磷酸緩衝生理的食塩水		0.2		0.2	2.0	2.2
INAH量	2.0	2.0	2.0	2.0		
INAH濃度	m/100	m/100	m/1000	m/1000		
30分	27.5 V 35.5	-8.0	29.0 V 38.5	-9.5	31.0 V 48.0	-17.0
60分	24.0 V 38.0	-14.0	26.0 V 42.5	-16.5	27.5 V 54.5	-27.0

INAHはSM耐性株のカタラーゼ作用を減弱せしめることは明らかであり、m/100にてはm/1000に比しより強力であつたが、H₃₇Rv株において認められた程強力ではなかつた。

INAHはPAS耐性株のカタラーゼ作用に対しても顕著な抑制作用のあることが知られ、特にm/100の場合にはm/1000の場合に比し、一段と強力であつて、対照に比し、約2/3に過ぎなかつた。

c) INAHのPAS耐性株カタラーゼ作用に及ぼす影響
菌量 6.8mg

容器番号	I	II	III	IV	V	VI
KOH	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
H ₂ O ₂	0.2		0.2		0.2	
菌液	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
磷酸緩衝生理的食塩水		0.2		0.2	2.0	2.2
INAH量	2.0	2.0	2.0	2.0		
INAH濃度	m/100	m/100	m/1000	m/1000		
30分	13.0 V 16.0	-3.0	20.0 V 23.5	-3.5	31.0 V 35.0	-4.0
60分	13.0 V 18.0	-5.0	22.0 V 28.0	-6.0	29.0 V 35.5	-6.5

考 察

1952年 J. D. Aronson, S.L. Ehrlich および W. Flagg¹⁾は結核菌有毒株ならびに弱毒株のカタラーゼ作用をFinlayson および Edson の実施した Warburg 検圧法に従つて測定し、弱毒株のカタラーゼ作用は有毒株のそれより少ないことを見出し、INAHが結核菌のカタラーゼ作用を抑制すること、INAHのカタラーゼ作用抑制と毒度との間には明らかな関係が認められないことを報じている。

1954年 G. Middlebrook²⁾はスライド法により、H₃₇Rv, Vallée, Pearson の三株を50γ/ccにINAHを含む溶液内に培養してINAH耐性株を得、これらにつきカタラーゼ作用を検したところ陰性であり、INAH 10γ/cc耐性にして25γ/ccに感性のものではカタラーゼ作用は陽性であり、さらに病原性とカタラーゼ作用との関係についてはある実験条件下ではモルモットに対し、病原性の著しく弱められている菌株ではin vitroにてなんらのカタラーゼ作用を現わさないことを報じている。

わが国においても貝田、杉山、古賀³⁾は同じくスライド法により実験し、同様の結果を報じ、INAH耐性菌のカタラーゼ作用陽性の二株はいずれもその耐性度が20γであつたという。

さらに最近では1955年 L. R. Peiyer および D. Wid-elock⁴⁾はINAH耐性度とカタラーゼ作用との関係をみるに、耐性度の高いものほどカタラーゼ作用は弱くなる傾向がみられるようであるが、これは明瞭な並行関係にあるのではないこと、カタラーゼ作用陰性菌はモルモットに対する毒力が著しく減弱していることを報じている。

興味あるのは1955年 E. Nassase および G.M. Hamilton⁵⁾の報告である。両氏はSM・INAH両者に耐性のある菌の場合はINAH耐性菌中のカタラーゼ陽性率を明確には増加させないと大体結論してさしつかえなく、PAS・INAH両者に耐性の場合をみると、INAH耐性、カタラーゼ陽性菌を伴う傾向を示し、PAS耐性になる

前に INAH耐性の出現した場合はカタラーゼ陰性であった。SM耐性は INAH耐性菌のカタラーゼ作用消失に認むべき影響を与えないが、最初にPAS耐性となつた例の多くではカタラーゼ作用陽性で毒力の強い INAH耐性菌を生ずる傾向があるという。さらに動物実験ではSM・PASに耐性があつてもカタラーゼ作用陰性の菌ではその毒力が減弱していたという。

以上の成績とわれわれの実験成績とを比較考察すると興味ある幾多の事実気付くのである。

まず、われわれは耐性株はいずれもH₃₇Rv株の各抗結核剤に100γ/ml耐性のもを用いたのであるが、INAH耐性株においても僅微ながらカタラーゼ作用の存するのを認めた。この点は Middlebrook の報告とはいくらか異なつてゐるのであるが、これは彼がスライド法という比較的粗なる方法によつて実験し、われわれはWarburg法によつて精密に測定することができたことに起因するものと判断せられるのである。

次にSMのカタラーゼ作用に及ぼす影響についてみるに、H₃₇Rv株のカタラーゼ作用に対してはなんら影響を与えず、PAS耐性株のそれにはかへつて著しい増加をきたし、INAH耐性株に対しなんら影響を与えなかつた。これは Nassase 等がSM・INAH両者に耐性のある菌の共存する場合は、INAH耐性菌中のカタラーゼ陽性率を増加させないとの成績を説明するものではなからうか。それにしてもSMがPAS耐性菌のカタラーゼ作用を増加せしめる事実、SM・PAS両者併用によつてそれぞれに耐性が出現し難いとの事実を十分に説明しつくすものでもちろんにしろ、なんらかの関連性も推想され、今後一段の考究を要するところであらう。

PASはH₃₇Rv株のカタラーゼ作用を増加せしめるが、SM耐性株、INAH耐性株のそれにはなんらの影響を与えるものではない。このことは Nassase 等のPAS耐性出現前に INAH耐性の出現した場合はカタラーゼは陰性であつたとの報告と一致し、これを裏書きするものと言えよう。

INAHはH₃₇Rv株のカタラーゼ作用は極めて僅微な程度までに、SM耐性株のそれもある程度まで、PAS耐性株に対しては顕著に抑制する事実が認められた。このことは INAHとSM、INAHとPASとの併用のさいにそれぞれ耐性菌が生じにくいこと、前者では後者よりも耐性菌が生じ易いが、INAHはSM耐性菌よりもPAS耐性菌のカタラーゼ作用をより強く抑制することと合せ考察すると、そこになんらかの関連性を極めて順当に推測させるものではなからうか。

- 1) H₃₇Rv株およびそのSM・PAS・INAH耐性株のカタラーゼ作用に及ぼす抗結核剤の影響を検圧法によつて測定し興味ある事実をえた。
- 2) INAHに100γ/mlに耐性のH₃₇Rv株に僅微なカタラーゼ作用を認めた。
- 3) SMはH₃₇Rv株カタラーゼ作用に対してはなんら影響を与えず、PAS耐性株にてはm/100添加により約2倍量にまで増加せしめ、INAH耐性株にてはなんらの変化をきたさしめなかつた。
- 4) PASはH₃₇Rv株カタラーゼ作用をやや増加せしめ、SM耐性株にては著しい影響を与えず、INAH耐性株にてはなんらの変化をきたさしめなかつた。
- 5) INAHはH₃₇Rv株のカタラーゼ作用をm/100添加により約1/2程度にまで減少せしめ、SM耐性株に対しては相当に抑制し、PAS耐性株にてはm/100添加にて約1/2にまで抑制することが明らかとなつた。

本文の要旨は昭和31年日本結核病学会総会にて発表した。

文 献

- 1) Aronson, J.D., Ehrlich, S.L., and Flagg, W. : Effects of isonicotinic acid derivatives on tubercle bacilli, Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1952, 80, 259.
- 2) Middlebrook, G. : Isoniazid-resistance and catalase activity of tubercle bacilli, A preliminary report, Am. Rev. Tuberc., 1954, 69, 471.
- 3) 貝田勝美・杉山浩太郎・古賀行雄: 各種薬剤耐性結核菌のカタラーゼ作用に就いて, 結核化学療法委員会報告, 1954.
- 4) Peizer, L.R., and Widelock, D. : The correlation of rate of catalase activity, guinea pig virulence, and isoniazid resistance of tubercle bacilli from specimens of patients under isoniazid therapy, Am. Rev. Tuberc., 1955, 72, 246.
- 5) Nassase, E., and Hamilton, G.M. : Multiple drug resistance and virulence of mycobacterium tuberculosis, Tubercle, 1955, 36, 281.