

INH 耐性菌のカタラーゼ活性に関する研究

第2報 臨床材料より得たINH耐性菌について

豊原希一

結核予防会結核研究所 (所長 隈部英雄)

受 付 昭 和 32 年 7 月 5 日

緒 言

著者は第1報で¹⁾, KH₁INH 100 γ 耐性菌のカタラーゼ活性が常に消失していることを報告した。今回は患者喀痰より分離したINH耐性菌30株のカタラーゼ活性を Warburg 検圧法によつて定量的に測定し, カタラーゼ活性と耐性度, 菌集落型, 生菌数との関係や分離菌株中にふくまれるSM耐性菌の影響について検討を加え, 知見を得たので報告する。

I 実験方法

(1) 供試菌株および耐性度

INH使用中の患者の喀痰から分離した結核菌30株のINHに対する耐性度を1%小川培地を用い間接法によつて検査し, 一方薬剤を含まざる対照培地に発育した培養4週の菌を用いて各耐性株のカタラーゼ活性を測定した。INH濃度は培地 1cc あたり 0.01, 0.1, 1, 10, 100 γ とし菌の発育しえたINH最高濃度をもつて耐性度とした。

(2) カタラーゼ活性の測定

Warburg 検圧計を用い, H₂O₂ の分解によつて発生する酸素量を定量的に測定する。第1報の結果に基き, 菌量は 5mg とし, H₂O₂ の濃度, 計測時間およびその他の条件は第1報と同様にした。

II 実験成績

供試菌株のカタラーゼ活性, 耐性分布, 菌集落型, 生菌単位を表1に掲げる。

(1) 供試菌株の耐性度別度数分布 (表2)

供試菌30株をINHに対する耐性度別に分類し, 度数分布表をつくると表2のようになる。

表2 供試菌株のINH耐性度別度数分布

耐性度 (γ)	0.01	0.1	1	10	100	計
菌株数	3	5	7	12	3	30

(2) INH耐性菌の耐性度別カタラーゼ活性の計測時間による変動 (図1)

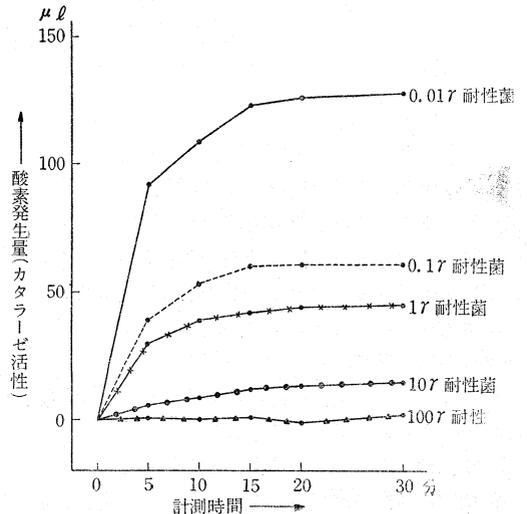
各耐性株の酸素発生量を耐性度別に平均しその計測時

表 1

菌株	菌型	生菌単位 ($\times 10^4$)	カタラーゼ活性 (酸素発生量30分値) μl	INH耐性分布						
				0	0.01	0.1	1	10	100	γ
Y. K.	S	98	2.21	[Bar chart]						
K. S.	R	105	149.41	[Bar chart]						
T. M.	R	3	1.07	[Bar chart]						
I. T.	S	48	4.18	[Bar chart]						
A. S.	S	450	13.57	[Bar chart]						
O. U. I.	Rs	2	2.07	[Bar chart]						
H. S.	R	200	-0.02	[Bar chart]						
M. N.	R	110	2.15	[Bar chart]						
I. M.	R	10	6.45	[Bar chart]						
K. U.	S	300	8.16	[Bar chart]						
I. Y.	R	188	20.20	[Bar chart]						
A. J.	R	206	68.51	[Bar chart]						
Y. C.	R	173	165.89	[Bar chart]						
A. M. I.	Rs	38	3.28	[Bar chart]						
K. S.	R	300	14.01	[Bar chart]						
A. Y.	R	66	-3.66	[Bar chart]						
A. G. I.	R	200	117.61	[Bar chart]						
N. M.	S	31	23.55	[Bar chart]						
F. K.	SR	85	35.86	[Bar chart]						
A. G. II	S	270	153.49	[Bar chart]						
O. U. II	S	1,000	116.14	[Bar chart]						
A. M. II	S	16	4.76	[Bar chart]						
I. S.	S	132	14.50	[Bar chart]						
O. H.	S	1,000	6.44	[Bar chart]						
O. T.	Rs	1,000	8.60	[Bar chart]						
T. T.	R	450	15.86	[Bar chart]						
S. K.	R	108	12.66	[Bar chart]						
T. S.	S	800	10.10	[Bar chart]						
F. S.	R	7	183.00	[Bar chart]						
K. C.	R	400	34.41	[Bar chart]						

注: 耐性分布はコラムの幅によつて示される

図1 INH耐性菌の耐性度別カタラーゼ活性の計測時間による変動



間による変動をみると図1の如くなる。0.01 γ 耐性菌はかなり高いカタラーゼ活性を示し3株の平均酸素発生量は15分でほぼ最高値に達し、30分計測値で、128 μ lに達する。しかし第1報に示した培養4週のKH₁I NH₁ 感性菌の30分値が、180 μ lであつたのとくらべると0.01 γ 耐性でもすでにある程度カタラーゼ活性が減弱している。次に0.1 γ 耐性菌5株の平均酸素発生量は、30分計測値で61.6 μ lで0.01 γ 耐性菌に比し、カタラーゼ活性は約半になる。次に1 γ 耐性菌7株の平均酸素発生量は30分値45.9 μ lで0.1 γ 耐性菌のカタラーゼ活性と大差ない。また10 γ 耐性菌12株の平均30分値は14.5 μ lでそのカタラーゼ活性は1 γ 耐性菌の約半に減弱する。最後に100 γ 耐性菌3株の平均30分値は2.5 μ lである。KH₁I NH₁ 100 γ 耐性菌は負を示したが、この程度の差は実験誤差と考えられるので臨床材料から得られたINH 100 γ 耐性菌は試験管内で分離されたKH₁I NH₁ 100 γ 耐性菌と同じくカタラーゼ活性は消失していると考えられる。0.01 γ 耐性菌の30分カタラーゼ活性を100とし、耐性度別にカタラーゼ活性の比率をみると0.1 γ , 1 γ , 10 γ , 100 γ 耐性菌の順にそれぞれ48, 36, 11, 2となる。しかし各耐性度相互のカタラーゼ活性の差の有意性を統計的に検定すると表3のようになる。表から分るように0.01 γ 耐性菌

表3 耐性度別カタラーゼ活性の差の有意性の検定

比較菌株の耐性度	カタラーゼ活性の差の有意性の検定
0.01 γ と 0.1 γ	P > 0.1
0.01 γ と 1 γ	P > 0.1
0.01 γ と 10 γ ※※	P < 0.01
0.01 γ と 100 γ ※	P < 0.05
0.1 γ と 1 γ	P > 0.7
0.1 γ と 10 γ	P > 0.1
0.1 γ と 100 γ	P > 0.2
1 γ と 10 γ	P > 0.1
1 γ と 100 γ	P > 0.3
10 γ と 100 γ	P > 0.6

※ 5%以下の危険率で有意 ※※ 1%以下の危険率で有意

と10 γ 耐性菌のカタラーゼ活性の差は1%以下の危険率で有意であり、0.01 γ 耐性菌と100 γ 耐性菌との差は5%以下の危険率で有意であるが、他の耐性度の菌株を相互に比較するといずれもその差は有意でない。(危険率5%) 次にカタラーゼ活性を計測時間別変動でみると0.1 γ および1 γ 耐性菌ではその発生酸素量が測定時間15分でほぼ最高になる点は0.01 γ 耐性菌と同様であるがそのカーブは0.01 γ 耐性菌にくらべゆるやかである。また10 γ 耐性菌のカタラーゼ活性は非常に減弱しており100 γ 耐性菌との間に著しい差はみとめられない。

(3) 耐性度とカタラーゼ活性との相関関係

前項では耐性度別にカタラーゼ活性の平均値を求めて

比較したが本項では各菌株の耐性度とカタラーゼ活性との相関性を検討した。両者の関連性をみるには各菌株の生菌単位の影響を考慮しなければならないと思われる。したがって生菌単位を考慮せざる場合の耐性度とカタラーゼ活性、生菌単位とカタラーゼ活性および耐性度と生菌単位との相関係数をそれぞれ求め最後に生菌単位の影響を除いた耐性度とカタラーゼ活性との純相関を求めその有意性を統計的に検定した。なお図上カタラーゼ活性は酸素発生量30分値、生菌単位は湿菌量10⁻⁴mg中の生菌数の対数をもつて示し、各菌株の耐性度はその耐性分布により横軸上適当な位置に挿入した。

(i) 生菌単位の影響を考慮せざる場合の耐性度とカタラーゼ活性との相関関係(図2)

図2 カタラーゼ活性と耐性度との相関図

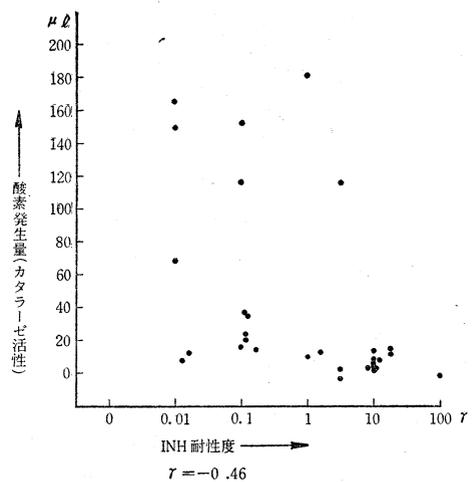


図2にみる如く耐性度が上昇するにつれてカタラーゼ活性は小さくなる。低度耐性菌のカタラーゼ活性のばらつきは比較的大きいが10 γ 以上耐性菌の酸素発生量は常に20 μ l以下である。両者の相関係数は-0.46で5%以下の危険率で有意である。すなわち両者は明らかに逆相関の関係にあり耐性度が上昇するにつれてカタラーゼ活性は減少すると考えられる。

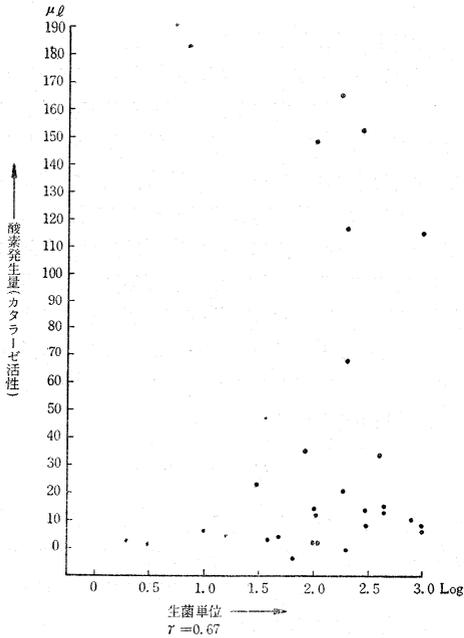
(ii) 生菌単位とカタラーゼ活性との相関関係(図3)

図3をみると生菌単位が大きい菌株はカタラーゼ活性も大きいようにみえる。両者の相関係数は0.67となり1%以下の危険率で有意である。すなわち両者は明らかに順相関の関係にあり生菌単位が大きくなるにつれてカタラーゼ活性も大となるといえる。

(iii) 耐性度と生菌単位との相関関係(図4)

耐性度とカタラーゼ活性は有意の逆相関を示し、かつ生菌単位とカタラーゼ活性は有意の順相関を示すことを知つたが耐性度とカタラーゼ活性が逆相関を示したのは耐性度の高い菌株ほど生菌単位が小さいためではないかということが疑われる。このため図4の如き耐性度と生

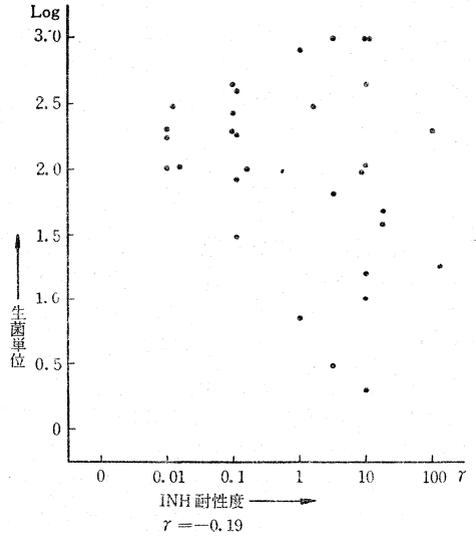
図3 生菌単位とカタラーゼ活性との相関図



菌単位との相関図をつくり検討した。両者の相関係数は-0.19となり危険率5%で有意でない。すなわち耐性度の高い菌株ほど生菌単位が小さいという関係はみられない。

(iv) 生菌単位の影響を除去した場合の耐性度とカタラーゼ活性との純相関
カタラーゼ活性には生菌単位の影響を無視することが

図4 I N H耐性度と生菌単位との相関図



できないことを知ったので(i) (ii) (iii) から生菌単位の影響を除いた場合のカタラーゼ活性と耐性度との純相関を求めたところ、相関係数は-0.45となり5%以下の危険率で有意である。すなわち生菌単位の影響を除いても耐性度とカタラーゼ活性とは逆の相関関係にあることを知った。

(i) カタラーゼ活性と集落型との関係(表4)

I N H耐性菌の固形培地上の集落型にはS型が比較的多くみられるがS型とR型の菌株でカタラーゼ活性に差があるか否かを検討した。(表4)酸素発生量は表4に示

表4 菌集落型とカタラーゼ活性

カタラーゼ活性(μl)		集落型							計
		0 ~ 5	5 ~ 10	10 ~ 20	20 ~ 40	40 ~ 80	80 ~ 160	160以上	
R	型	5 (29.4)	2 (11.7)	3 (17.9)	2 (11.7)	1 (5.9)	2 (11.7)	2 (11.7)	17 (100)
S	型	4 (30.8)	2 (15.4)	3 (23.0)	2 (15.4)	0 (0)	2 (15.4)	0 (0)	13 (100)

()は%

すように7階級とし、各階級に入るR型、S型の菌株数および百分率を求めた。R型は17株、S型は13株あるがカタラーゼ活性の大小別にみるとR型およびS型の分布は統計学的に有意の差をみとめない。すなわちカタラーゼ活性が大きい菌はR型が多いとか活性の小さい菌はS型が多いという関係はみられない。なお両型の平均酸素発生量はR型47.4μl、S型30.3μlであり、両者間に有意の差をみとめない。

(5) 供試菌株のSM耐性(表5)

供試菌株はI N H耐性と同時にSM耐性を測定した。SMに対する耐性培地はSMの濃度が培地1ccあたりそれぞれ0.5γ, 1γ, 10γ, 100γ, 1000γになるようにし菌の

表5 供試菌株のI N H耐性とSM耐性との相関表

I N H耐性(γ)	SM耐性(γ)					Σ
	0.5	1	10	100	1000	
0.01		1	2			3
0.1	1	2		1	1	5
1			2	1	4	7
10	2	1	5		4	12
100	1		2			3
Σ	4	4	11	2	9	30

發育しえたSM最高濃度をもつて耐性度とした。同一菌

株のINH耐性とSM耐性ととの相関表は表5に示す通りである。表から分るように同一菌株のINH耐性とSM耐性との間には有意の相関関係はみとめられない。すなわちINH耐性が低い株はSM耐性も低いとか逆にINH耐性が高い株はSM耐性も高いという関係はみられない。

III 考 案

INH耐性菌のカタラーゼ活性が減弱することはすでによく知られているが²⁾³⁾、耐性度の上昇とカタラーゼ活性の減弱が平行するか否かという点については、必ずしも見解の一致はみられていない⁴⁾⁵⁾。これは各菌株のカタラーゼ活性を個別に定性法によつて比較することが多かつたためと同一菌量におけるINH耐性菌の生菌数の不均等性を考慮することが少なかつたためではないかと思われる。そこで著者はまず供試INH耐性菌30株を0.01 γ 、0.1 γ 、1 γ 、10 γ 、100 γ 耐性菌の5群に分類し、Warburg検圧法を用いカタラーゼ活性を定量的に測定し各群の平均値を求め比較した。カタラーゼ活性は0.01 γ 、0.1 γ 、1 γ 、10 γ 、100 γ 耐性菌の順に減少するが、0.01 γ 耐性菌と0.1 γ および1 γ 耐性菌の間には統計的に有意の差はみとめられなかつた。これに反し0.01 γ 耐性菌と10 γ および100 γ 耐性菌の間には有意の差をみとめた。すなわち10 γ 以上の耐性菌は0.01 γ 耐性菌に比し明らかにカタラーゼ活性が減弱しているといえよう。しかし0.01 γ 耐性菌でも第1報の感性菌にくらべるとそのカタラーゼ活性は減少しておりたとえ低濃度でもINH耐性になるとカタラーゼ活性は阻害されるようである。INH 100 γ 耐性菌は第1報で報告したKH₁INH 100 γ 耐性菌と同様ほとんどカタラーゼ活性は消失していた。次にカタラーゼ活性と生菌単位とは密接な関係があるであろうことは第1報ですでに述べたが今回の実験で両者の相関係数は0.67で1%以下の危険率で有意であることを知つた。すなわち生菌単位が大きければカタラーゼ活性も大きいといえる。耐性度の上昇に伴いカタラーゼ活性が減弱するのは耐性度の上昇に伴う本質的な変化ではなく耐性度が高くなれば生菌単位が小さくなりこのためカタラーゼ活性が減弱するのではないかという疑問がおこつてくる。このため耐性度と生菌単位との相関関係を求めたところ係数-0.19となり危険率5%で有意でないことを知つた。したがつて上述の如き懸念は解消したわけである。さらにカタラーゼ活性、生菌単位、耐性度3つの要因から生菌単位の影響を除いたカタラーゼ活性と耐性度との純相関を求めたところ相関係数は-0.45となり5%以下の危険率で有意である。すなわちカタラーゼ活性の大小を論ずるには生菌数の多少を無視することはできないが生菌数の影響を除いてもなおかつ耐性度の上昇とカタラーゼ活性の減弱は全体的にみて密接な関係をもつと

考えてよい。しかしもちろん個々の菌株についてみると例外もあるからカタラーゼ活性の大小から直ちに耐性度の高低を類推することは危険であろう。

供試菌株中にはINH耐性菌のみならずSM耐性菌も含まれているが、各菌株のINH耐性とSM耐性との間には有意の相関関係はみられずまた第1報で報告したようにSM耐性菌のカタラーゼ活性は感性菌と大差をみとめられないことから供試菌株にはSM耐性菌がふくまれていてもカタラーゼ活性に及ぼす影響は少ないと思われる⁶⁾。INH耐性菌の発育はしばしば劣性で感性菌あるいは他の薬剤耐性菌に比し菌集落がS型を示すことが多いが、S型とR型とではカタラーゼ活性に有意の差をみとめないでS型変異をおこす要因とカタラーゼ活性とは関係ないと考えられる。

IV 結 論

患者の喀痰から分離されたINH耐性菌30株のカタラーゼ活性をWarburg検圧計をもつて定量的に測定し次の知見を得た。なおINH耐性菌の耐性度は0.01 γ 、0.1 γ 、1 γ 、10 γ 、100 γ に分類した。

- (1) INH耐性菌のカタラーゼ活性は0.01 γ 、0.1 γ 、1 γ 、10 γ 、100 γ 耐性菌の順に減少する。しかし0.01 γ 耐性菌と0.1 γ および1 γ 耐性菌の間には統計的に有意の差はみとめられないが0.01 γ 耐性菌と10 γ および100 γ 耐性菌の間には有意の差がみられる。
- (2) 生菌単位とカタラーゼ活性とは1%以下の危険率で有意の順相関を示す。しかしINH耐性度と生菌単位の間には有意の相関関係はみられない。
- (3) カタラーゼ活性とINH耐性度とは生菌単位の影響を除いても5%以下の危険率で有意の逆相関を示す。
- (4) INH耐性菌はS型集落を示すものが比較的に多いがR型集落を示すものとの間にはカタラーゼ活性に有意の差はみられない。

謝辞：直接御指導をいただいた工藤博士、御校閲を賜つた岩崎研究部長、大林研究副部長に深甚なる謝意を表します。

文 献

- 1) 豊原：結核，32：501，1957.
- 2) Cohn M.L.：Am. Rev. Tbc.，70：(4)，641～664，1954.
- 3) Cohn M.L.：Am. Rev. Tbc.，70：(5)，852～874，1954.
- 4) Wolinsky E.：Am. Rev. Tbc.，73：(5)，768～772，1956.
- 5) Peizer L.R.：Am. Rev. Tbc.，72：(2)，246～251，1955.
- 6) Nassau E.：Tubercle，36：(9)，281～282，1955.