

INH 耐性菌のカタラーゼ活性に関する研究

第 I 報 抗酸性菌のカタラーゼ活性に関する基礎実験

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 3 月 30 日

緒 言

細菌カタラーゼに関する研究は、古く Gottstein¹⁾, Hahn²⁾, Sieber³⁾, Jensen⁴⁾ らによりなされていたが、当時は抗酸性菌のカタラーゼに関する探究は、比較的少なかった。このため戸田⁵⁾は、諸種抗酸性菌のカタラーゼについて基礎的研究を行い、抗酸性菌は、他の細菌とことなり菌体外カタラーゼのないこと等の重要な諸事実を発表した。さらに占部⁶⁾は、定性、定量両法を用い抗酸性菌の培養条件、保存温度等の菌体内カタラーゼに及ぼす影響につき詳細な検討を加えた。戸田ら⁷⁾によると人型、牛型結核菌は、鳥型結核菌にくらべカタラーゼ作用弱く、さらに鳥型は、冷血動物結核菌、人類系、鼠類系抗酸性菌および抗酸性雑菌に比してカタラーゼ作用が弱いといわれ、カタラーゼ反応を各型結核菌とその他抗酸性菌の鑑別に資することができるとした。近年、Middlebrook⁸⁾が、Isonicotinic acid hydrazid (INH と略) に耐性を生じた結核菌は、カタラーゼ活性が減弱ないし消失することを発表し、その後これに関する多くの研究業績が相ついで報告されている。これより先、Middlebrook⁹⁾, Mitchison¹⁰⁾, Morse¹¹⁾, Karlson¹²⁾ らはモルモットに対し INH 耐性菌の毒力が減弱することを報告しており、INH 耐性菌の毒力の減弱とカタラーゼ活性消失の関連は多くの学者の研究対象となつている。しかしながら文献を渉猟すると INH 耐性菌のカタラーゼの問題は耐性度、毒力との相互関係、あるいはカタラーゼ消失の機序に研究が、集中されている傾向にあり、カタラーゼ反応に及ぼす諸条件の研究については比較的少ない^{13, 14)}。前記の如く INH 耐性菌のカタラーゼ活性と毒力、耐性度との相互関係、あるいはカタラーゼ活性消失の機序といった研究も重要にして興味ある問題であることは論を俟たないが、抗酸性菌一般のカタラーゼ活性の問題をふりかえり、その一環として INH 耐性菌のカタラーゼ活性消失について基礎的研究をこころみるのもまた必要なことであると考えられる。かかる見地から、著者は INH 耐性菌をふくめた抗酸性菌の培養日数、菌量によりカタラーゼ活性が、いかに影響されるか、また各菌株の計測時における酸素発生時間的消長等につき若干の知見を得たので報告する。

I 実験方法

(1) 供試菌株

KH₁ 原株、KH₁ SM 10 万 γ 耐性株、KH₁ INH 100 γ 耐性株、AvT 株 (鳥型菌)、No. 10 株 (抗酸性雑菌) の 6 株。SM 10 万 γ および INH 100 γ 耐性株は、いずれも試験管内で KH₁ 原株より分離した耐性菌を単個菌培養したものである。各菌株とも 1% 小川培地に培養継代した。

(2) カタラーゼ活性の測定方法

全菌株とも Warburg 検圧計をもつて過酸化水素を分解して発生した酸素量を定量的に、測定する。容器は円錐状器を用い、主室に菌液 1 cc と緩衝液 1.5 cc、側室に 0.2 mole H₂O₂ 0.3 cc、副室に 20% NaOH 0.3 cc、対照としては側室に緩衝液 0.3 cc を入れる。緩衝液は pH 7.4 の磷酸緩衝液を用いる。37°5' C の水槽中で振盪し、10 分後に内容を混和し、混和後それぞれ 5 分、10 分、15 分、20 分、30 分、40 分に発生した酸素量を測定する。

II 実験成績

(1) 測定時間とカタラーゼ活性との関係

カタラーゼ活性の指標となる発生酸素量の測定時間別増加は、いかなるカーブをえがくか、菌株特異的な発生酸素量の増加曲線がえられるか否かを、培養後 2 週、3 週、4 週の各菌株について観察した。菌量は 5 mg とする。

(i) 培養 2 週後の各菌株についての観察

図 1 にみる如く、No. 10, KH₁, KH₁ SM 10 万 γ 耐性菌は測定開始後 5 分で、その酸素発生量はほとんど最大となり 10 分以後の変動は僅少である。AvT の酸素発生量は、5 分以後も直線的な増加をつづけ 10 分でほとんど最大値となり、その後の変動は僅かである。これに対し、KH₁ INH 100 γ 耐性菌は全くカタラーゼ活性を示さず酸素発生量は常に負である。

(ii) 培養 3 週後の各菌株についての観察

図 2 にみる如く No. 10 は 2 週培養と同じく、5 分でほとんど最大値に達し、以後はごく僅かの変動のみをみとめるにすぎない。AvT も 2 週培養と同じく、10 分でほとんど最大値となり、その後の変動は僅少である。これに対し

図1 測定時間とカタラーゼ活性との関係
培養2週目の菌株についての観察

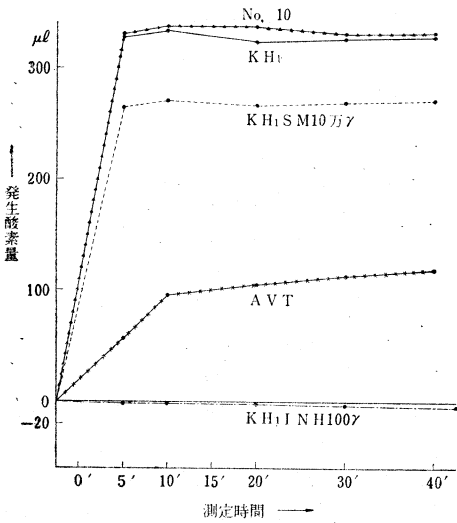
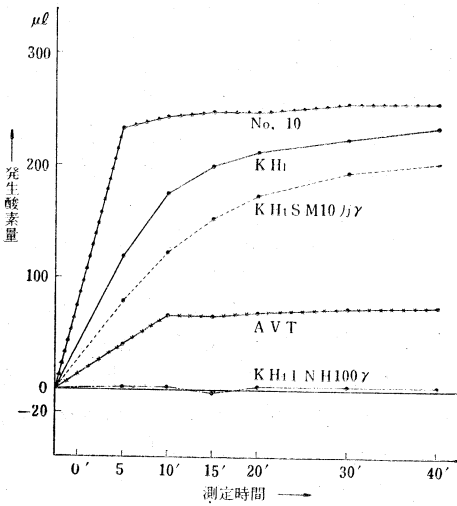


図2 測定時間とカタラーゼ活性との関係
培養3週目の菌株についての観察

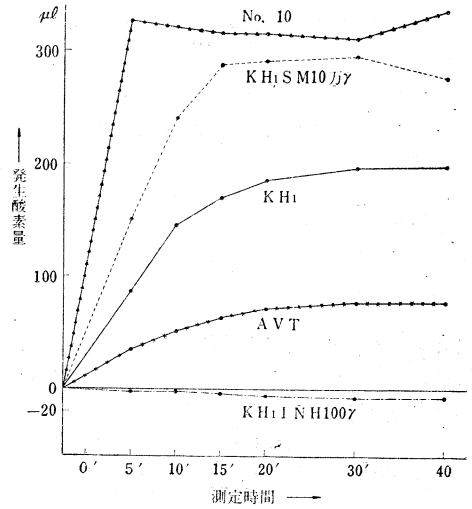


KH₁およびKH₁SM 10万 γ 耐性菌は5分以後も増加をつづけ酸素発生曲線は20分以後になり漸くゆるやかとなる。またKH₁INH 100 γ 耐性菌のカタラーゼ活性は2週と同じくほとんど全く認められない。

(iii) 培養4週後の各菌株についての観察

図3にみる如く、No. 10のカタラーゼ活性は、2, 3週培養と同じく、5分でほとんど最大値に達し、それ以後の変動は微少である。AvTは5分以後もその酸素発生量にわずかながらの上昇がみられる。KH₁およびKH₁SM 10万 γ 耐性菌は15分までは、急速な上昇を示す。この傾向はKH₁SM 10万 γ 耐性菌に特にいちじるしい。これに対しKH₁INH 100 γ 耐性菌は、2, 3週培養の菌と同じくカタラーゼ活性を全く示さない。

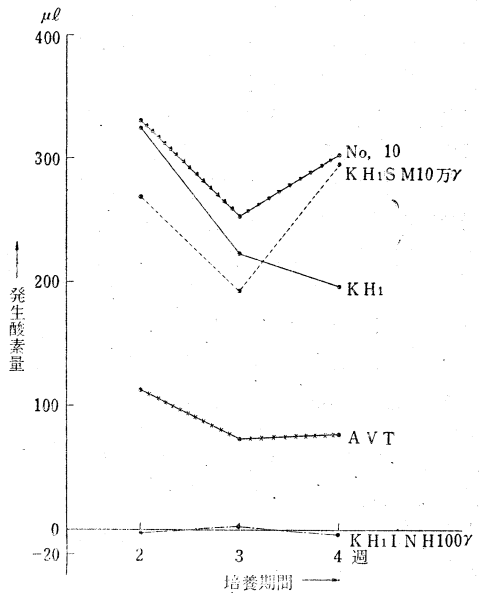
図3 測定時間とカタラーゼ活性との関係
培養4週目の菌株についての観察



(2) 培養期間とカタラーゼ活性との関係

培養期間の違いで、各菌株のカタラーゼ活性に差があるか否かを検討した。培養期間は2, 3, 4週とし、測定時間30分の酸素発生量をもって比較した。これは前項の実験で、測定時間30分でカタラーゼ活性が、ほぼ一定の状態に達することを知ったからである。菌量は5mgとする。図4にみる如くNo. 10は2週培養の菌のカタラー

図4 培養期間とカタラーゼ活性との関係



ゼ活性が最大で、3週は減少し、4週は再び増加する。KH₁SM 10万 γ 耐性株は3週のカタラーゼが最低で4週になると再び増加し、2週培養のカタラーゼ活性よりさらに大である。KH₁は2週培養のカタラーゼ活性が最大で、その後急速に減少し、4週培養のカタラーゼ活

性は、2週培養に比べ約60%まで落ちる。AvTは2週が最大で、その後減少し3週、4週はほとんど差がない。またKH₁INH 100 γ 耐性株の2週、4週培養は、僅かながら正の活性を示すが、いずれも実験誤差範囲と考えてよくKH₁INH 100 γ 耐性株のカタラーゼ活性は消失していると考えられる。次に各菌株別にみると、2週培養ではNo. 10とKH₁が、ほとんど同程度の活性を示し最大で、ついでKH₁SM 10万 γ 耐性菌、AvT、KH₁INH 100 γ 耐性菌の順となる。No. 10、KH₁のカタラーゼ活性を100とすると、KH₁SM 10万 γ 耐性菌78、AvT 34、KH₁INH 100 γ 耐性菌0の比率になる。培養3週では、カタラーゼ活性の強さは、No. 10、KH₁、KH₁SM 10万 γ 耐性菌、AvT、KH₁INH 100 γ 耐性菌の順で、その比率は100:88:77:29:0となる。培養4週ではNo. 10、KH₁SM 10万 γ 耐性菌、KH₁、AvT、KH₁INH 100 γ 耐性菌の順でカタラーゼ活性の比率は、100:98:65:25:0となる。以上各菌株、各週培養のカタラーゼ活性度について、一般的にいえることは、抗酸性雑菌No. 10は常に最大で、KH₁INH 100 γ 耐性菌は培養期間を問わず陰性と考えてよく、培養期間とカタラーゼ活性との間には必ずしも一定の関係をみとめない。

(3) 死菌のカタラーゼ活性

抗酸性菌のカタラーゼ活性は生菌にのみ存在するものか、あるいは死菌としてもある程度の活性がのこるものかという問題について検討を加えた。供試菌株は、培養4週目のKH₁とKH₁INH 100 γ 耐性菌を用い、100°C 30分で加熱死菌とした。生菌、死菌とも菌量10mgとし、Warburg 検圧計で30分計測値をもつて比較した。表1に示す如く、KH₁生菌10mgの30分間の酸素発生量は、256.32 μ l、死菌10mgのそれは-3.00 μ lで生菌は高いカタラーゼ活性を示すが、死菌のカタラーゼ活性は、完全

表1 菌の生死とカタラーゼ活性の関係

菌株	KH ₁	KH ₁ INH 100 γ 耐性菌
生菌	256.32	3.18
加熱死菌	-3.00	3.24

数値は菌量10mg、30分間の発生酸素量(μ l)

表2 KH₁INH 100 γ 耐性菌の菌量とカタラーゼ活性との関係

菌量(mg)	1	5	10
測定時間			
5'	0	-3.28	2.82
10'	-2.15	-3.29	3.06
15'	0	-3.28	0.06
20'	1.78	-3.29	1.62
30'	4.60	-3.30	3.18

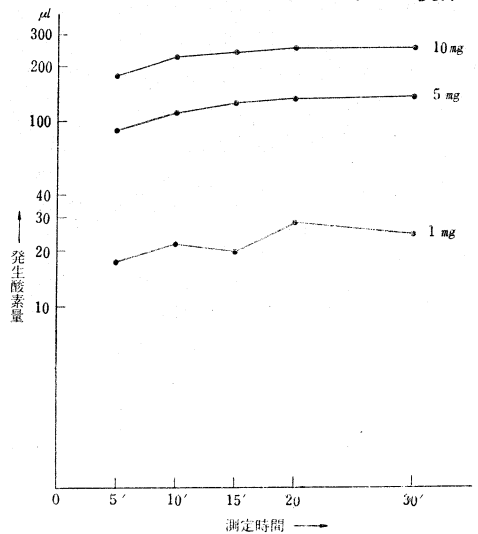
数値は30分間の発生酸素量(μ l)

に消失している。またKH₁INH 100 γ 耐性菌の生菌の酸素発生量は、3.18 μ l、死菌のそれは3.24 μ lで両者間に差は認められず、いずれの場合にもカタラーゼ活性は、消失していると考えられる。以上の成績から、カタラーゼ活性は加熱死菌では消失することを知つた。

(4) 菌量とカタラーゼ活性との関係

次に、カタラーゼ活性が、生菌量に一次的に比例するか否かを検討した。供試菌株はKH₁およびKH₁INH 100 γ 耐性菌とし、それぞれ1mg、5mg、10mg菌量のカタラーゼ活性をみた。まずKH₁についてみると、図5に示す如く5mg菌量のカタラーゼ活性は、10mg菌量の

図5 KH₁生菌量とカタラーゼ活性との関係



カタラーゼ活性の1/2で測定時間別にみても、常に平行している。しかし、1mg菌量のそれは、前二者のカタラーゼ活性の測定時間別変動に、必ずしも平行せず、15分計測値は特に低い。次にKH₁INH 100 γ 耐性菌の菌量とカタラーゼ活性との関係をみると、表2に示す如く、両者間には、なんらの関係も認められない。またこの表から5 μ l~4 μ l程度の差は実験誤差と考えてよいと思われる。菌量は理論的には、生菌単位に比例すると考えられるので、KH₁のみでなく他の抗酸性菌でも、同一菌株のカタラーゼ活性と生菌単位とは、高い相関性をもつと思われる。

III 考 察

INH耐性結核菌のカタラーゼ活性が、いかなる機序で消失するかは、いまなお不明であり、重要な研究課題であるが、本研究においては、この点についてはふれず、INH耐性結核菌を他の抗酸性菌と同列におき、主として培養条件、菌の生死、菌量と抗酸性菌のカタラーゼ活性が、いかなる関係にあるかを検討した。Jacobsonにより動植物組織には、過酸化水素を特異的に分解す

る酵素の存在することが証明され、Loew が、この酵素をカタラーゼと名づけて以来、Willstätter, Euler らの研究により酵素精製法は著しく進歩した。1937年 Sumner, Dounce は、ウシの肝臓カタラーゼを結晶として分離したが、その後多数の動物組織のカタラーゼが相次いで結晶状に分離され、さらに1948年 D. Herbert, J. Pinsent は細菌カタラーゼの分離について報告している。細菌カタラーゼのこまかい化学的差異については、いまなお開拓されていない点が極めて多いようであるが、菌株によりある程度の質的差異はあるものと思われる。本実験においても、測定時間とカタラーゼ活性との関係を見ると、培養各週とも No. 10 と AvT の酸素発生曲線は概ね平行している。また KH_1 と KH_1 SM 10万 γ 耐性菌のそれも、概ね平行している。これは、No. 10 と AvT および KH_1 と KH_1 SM 10万 γ 耐性菌のカタラーゼが、それぞれ質的に類似していることを示すことによると考えられる。戸田⁷⁾ は鳥型菌は人型菌よりカタラーゼ活性が強いといっているが、本研究では、鳥型菌 AvT は人型菌 KH_1 あるいは、 KH_1 SM 10万 γ 耐性菌より、はるかに活性度が弱く約半分であつた。また人型菌は抗酸性雑菌に比し、そのカタラーゼ活性は弱い、大差はない。これらの点は先人の報告と一致しないが、分離後の菌株の新旧等も関係するものと思われる。いずれにしろ発育速度のはやい菌株ほどカタラーゼ活性がつかよとは必ずしもいえない。培養2週および4週目の KH_1 I NH 100 γ 耐性菌は酸素発生を全く示さず、むしろ逆に僅かながら負の値を示している。また3週培養の菌株は、15分計測値をのぞき僅かながら酸素を発生しているが、この程度の差は実験誤差と思われるので、結局 I NH 100 γ 耐性菌のカタラーゼ活性は、いかなる時期でも消失していると考えてよいだろう。次に加熱死菌のカタラーゼ活性は、全く消失していることを知つた。酵素は一般に熱には弱いものであるから、死菌という条件よりも加熱という条件がよりつよく影響しているのではないかということも考えられる。自然死菌による実験を本研究では行わなかつたが、占部は自然死菌のカタラーゼ活性も消失していることを報告している⁶⁾。カタラーゼ活性と菌量との関係を見ると菌量 5mg と 10mg の酸素発生量は各測定時間ともよく比例し、後者は前者の2倍量になつているが、1mg の場合は、前二者の酸素発生曲線と完全に平行しているとはいえない。恐らくこの差は実験誤差によるものと思われ、計測の場合菌量があまりに少ないのは一考の余地があろう。

IV 結 論

Warburg 検圧法により、 KH_1 感性菌、 KH_1 I NH 100 γ 耐性菌、 KH_1 SM 10万 γ 耐性菌、鳥型菌 AvT、抗酸性雑菌 No. 10 以上5株のカタラーゼ活性に関する基礎

実験を行い、次の如き知見を得た。

- (1) KH_1 I NH 100 γ 耐性菌のカタラーゼ活性は培養期間を問わず、常に消失している。
- (2) KH_1 と AvT は培養2週のカタラーゼ活性が最大で、その後減少するが、No. 10 と KH_1 SM 10万 γ 耐性では培養期間とカタラーゼ活性との間には一定の関係がみられなかつた。
- (3) 酸素発生量を計測時間別にみると各菌株とも培養期間が短いほど短時間で最大値に達する傾向があり20分以後の変動はほとんどない。
- (4) カタラーゼ活性の大小を、比較すると、抗酸性雑菌 No. 10 が最大で、人型菌 KH_1 および KH_1 SM 10万 γ 耐性菌が、これにつき、ついで鳥型菌 AvT、 KH_1 I NH 100 γ 耐性菌の順序となる。
- (5) 加熱死菌のカタラーゼ活性は消失している。
- (6) 菌量とカタラーゼ活性は、概ね比例関係にあるが、菌量がすくなくすぎると実験誤差が、大きくなる危険がある。

稿を終るにあたり、御校閲を賜つた岩崎先生、大林先生、ならびに直接御教示を賜つた工藤先生に深甚なる謝意を表します。

文 献

- 1) Gottstein: Virchow Archiv., Bd. C XX X III. 1893.
- 2) Hahn: Münch. med. Wochschr., Vol. 14, 1897.
- 3) Sieber: Z. Physiol. Chemie., 1901.
- 4) Jensen: Zentralblat. f. Bak. II abt. Bd. 18, 1907.
- 5) 戸田: 日本微生物誌, 20巻, 大正15.
- 6) 占部: 日本微生物学病理学雑誌, 27巻, 8号, 昭8, 7.
- 7) 戸田・占部: 東京医事新誌, 956~968, 2891号, 昭9. 8. 11, 1~6.
- 8) Middlebrook, G.: Am. Rev. Tbc., 69: 471, 1954.
- 9) Middlebrook, G., Cohn, M.L.: Science, 118: 297, 1953.
- 10) Mitchison, D.A.: Brit. M.J., 1: 128, 1954.
- 11) Morse, W.C. et al.: Am. Rev. Tbc., 69: 464, 1954.
- 12) Karlson, A.G. et al.: Proc. Staff Meet. Mayo Clinic, 27: 373, 1952.
- 13) Noumayr, R.B. et al.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 89: 468~471, 1955.
- 14) 中山瑛一: 九大結研紀要, 2, No. 1: 1~22, 30, 9.