

結核菌ペルオキシダーゼについて

友 田 恒 典

大阪医科大学臨床病理学教室（指導 平井金三郎教授）

受付 昭和33年5月2日

緒 言

酸化酵素の1つであるペルオキシダーゼは過酸化水素の存在で種々の化合物を酸化する酵素であり、1855年Schönbeinによつて発見され Linossierによりペルオキシダーゼと命名され、さらに Raundnitz, Loewによりカタラーゼと異なる酵素であることが明らかにされた¹⁾。

結核菌のペルオキシダーゼについては、わが国では戸田、占部²⁾が報告し、カタラーゼについても Fujita, Kodama³⁾, 戸田⁴⁾, 占部⁵⁾らの報告があり、おののその存在を証明している。

近來結核菌の代謝過程や酵素作用に関する研究の急速の進歩により、沢山の基礎的知識が得られた。一方化学療法の進歩により薬剤耐性菌とその酵素作用の研究が進められて、Middlebrookら^{6)~8)}が INH 耐性菌のカタラーゼ活性の低下消失を認めた一連の報告以来、これに関する研究が多くなされた。

しかし薬剤耐性菌のペルオキシダーゼ作用に関するこれららの研究はほとんどなく、最近 Tirunarayanan⁹⁾, Hedgecock¹⁰⁾らによつて報告されたにすぎない。

本研究においては、結核菌ペルオキシダーゼを種々の被酸化物を用いてこれを証明し、ついで薬剤耐性菌とペルオキシダーゼ活性の関係をカタラーゼ活性とともに検討し、さらに菌体内顆粒との関係をしらべた。

実験材料および方法

検査材料は結核患者喀痰より分離した結核菌を用いた。すなわち直接法により SM, PAS, INH の 0, 1, 10, 100 γ/cc を含有する小川培地（3% 第一燐酸カリ含有卵培地）にて薬剤耐性検査を行つた菌、183例を使用した。なお INH については 0.1 γ 耐性をも検した。薬剤耐性度判定は各濃度耐性培地に繁殖した最高の濃度をもつて耐性度としたものである。

実験方法

1) 被酸化物別による結核菌ペルオキシダーゼ活性について

次の各種の被酸化物を用いて、ペルオキシダーゼ陽性である同一株についてその活性の反応速度、呈色度を比較検討した。すなわち 2% Catechol, 0.1% Pyrogallol, 1% 3・4 Dioxypyrenylalanine, 2% Benzidine

の各水溶液および 2% Guajac アルコール溶液を用いた。検査にさいして以上の各溶液に 0.3% 過酸化水素水を半量の割に混じて試薬を作成し、これを用いて直接培地上の菌を浸しその呈色状態を検した。また別に培地集落上より搔きとつた菌を 0.2 M 酢酸緩衝液(pH 5.0)の中に入れた菌浮遊液にても同様の検査を行つた。

2) 各種薬剤感受性菌および耐性菌とペルオキシダーゼ、カタラーゼ活性の関係について

ペルオキシダーゼ活性は、被酸化物として 2% Catechol 水溶液を用い、0.3% 過酸化水素水との割合は上記の通りで、反応は試薬で培地上の菌集落を浸して行つた。このさい試薬を培地斜面上に発育せる菌の下半分のみに作用させ上半分は、のちに行うカタラーゼ活性判定のために残しておいた。ペルオキシダーゼ陽性集落の呈色は反応後 15 分くらいでおこりはじめ、褐色より黒色となり、早いものは 3 時間後には完全に黒色となるが、判定は 24 時間後に行い、ペルオキシダーゼ陽性度をその呈色度により次の 3 段階にわけた。

強陽性(++) 黒褐色あるいは黒色となるもの

中等度陽性(+) 茶褐色となるもの

弱陽性(+) 黄褐色となるもの

陰性(-) 呈色しないもの

以上のごとくペルオキシダーゼ判定にさいしては集落の呈色度により決められた。同一培地上における呈色度が均一であるものと、そうでないものすなわち陽性集落と陰性集落がはつきりと識別しうるものと認めた。すなわち黒い集落と白い集落が混合して存在している場合であるがこの例については別に報告する。以下の成績は同一培地上における各集落の呈色度が均一であるもののみについて検討したものである。カタラーゼ活性の測定は、30% 過酸化水素水と 10% Tween 80 水溶液の等量で培地上の集落を浸して発泡の状態をみた。このさい先に行つたペルオキシダーゼ反応試薬を捨て新たにカタラーゼ試薬を加え先に残しておいた斜面培地上の上半分の集落にて観察した。しかし発泡はペルオキシダーゼ試薬を作用した集落からもなお発生しているものも認めた。カタラーゼ陽性度の判定は次の 3 段階にわけた。

強陽性(++) 発泡が加えられた試薬の表面をこえて
もありあがるもの

中等度陽性(+) 発泡が試薬の表面をおおうもの

弱陽性(+) 発泡が試薬表面の一部あるいはわずかに集落上に認めるもの
陰性(-) 発泡のおこらないもの
なお判定はカタラーゼ試薬反応後5分後とした。

各耐性菌とこれら酵素作用の消長を検討するさい、いずれもその最高濃度のところで増殖した菌について反応を行いその耐性度と酵素の関係をしらべたものである。

3) ベルオキシダーゼ反応後の陽性集落と陰性集落より得た菌をそのまま塗抹標本を作成、また松本・長尾氏法¹¹⁾によりこの両者の菌体を別々に碎解したのち、同じく塗抹標本を作成、光学顕微鏡下にて観察した。

実験成績

種々の被酸化物による結核菌ベルオキシダーゼ活性の結果は次の通りである。

Catechol: 呈色反応は反応後10分くらいより始まり30分後には茶褐色を呈し12時間後には黒色となる。

Pyrogallol: Catecholと同様呈色反応は早くおこり茶褐色となるが試薬自体が自然酸化され呈色される傾向が強かつた。

3・4 Dioxypyrenylalanine: 反応速度はおそらく1時間後にわずかに黄褐色化を認め24時間後には褐色化を呈したが黒褐色にまではならなかつた。

Benzidine: 1時間後に黄色化を認め24時間後には黄褐色化を呈するにいたつた。

以上いずれも培地集落上に直接反応を試みる方が菌浮遊液にて行う場合よりも呈色度は強く、反応もすみやかであつた。

Guajacは菌浮遊液にては、淡青色を示すが、アルコール溶液および試薬自体が黄色のため培地上での反応には不適と思われる。

各種薬剤感受性および耐性菌とベルオキシダーゼ、カタラーゼ活性については次の3群にわけて耐性度と酵素活性の関係をしらべた。

A) INH感受性菌(SMおよびPASにも感受性)
B) INH感受性であるが、SMあるいはPASに耐性のある菌
C) INH耐性菌

A) INH感受性菌の両酵素活性の関係は図3に示すごとく30例全例において両酵素とも陽性でまたその活性度もほとんどすべてが強陽性および中等度陽性を示していた。

B) INH感受性でSMあるいはPASに耐性である菌とこれら酵素との関係は図1、図2に示すごとく耐性度とベルオキシダーゼ活性、カタラーゼ活性との間に何の関係も認められえなかつた。すなわちSM耐性菌36例中ベルオキシダーゼは全例に陽性で、カタラーゼは2例を除いて34例が陽性を示している。同じ

くPAS耐性菌についても15例全例がベルオキシダーゼ、カタラーゼとともに陽性を示している。かくのごとくSMあるいはPAS耐性菌には感受性菌との間に両酵素活性の差はないことを認めた。

図1 SM耐性菌のベルオキシダーゼ、カタラーゼ

	● ● ○ ○ ● ● ○ ○ ● ○ ○ ○ ● ○ ○ ○ ● ○ ○ ○	● ○ ● ○ ● ○ ○ ○ ○ ○	● ○ ● ○ ● ○ ○ ○ ○ ○
#	● ● ○ ○ ● ● ○ ○ ● ○ ○ ○ ● ○ ○ ○ ● ○ ○ ○	● ● ○ ○ ● ○ ○ ○ ● ○ ○ ○ ● ○ ○ ○	● ○ ● ○ ● ○ ● ○ ○ ○
+	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	● ○ ○ ○ ● ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	● ○ ● ○ ○ ○ ○ ○
-		○	○
陽性度 SM耐性	1γ	10γ	100γ

図2 PAS耐性菌のベルオキシダーゼ、カタラーゼ

	● ○ ● ○ ● ○ ○ ○	● ○ ● ○ ● ○ ● ○	● ○ ● ○ ● ○ ● ○
#	● ○ ● ○ ● ○ ● ○	● ○ ● ○ ● ○ ● ○	● ○ ● ○ ● ○ ● ○
+	○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○
-			
陽性度 PAS耐性	1γ	10γ	100γ

C) INH耐性菌102例とこれら酵素との関係は図3表1におのの示すごとくその耐性程度の高くなるにつれてベルオキシダーゼ活性およびカタラーゼ活性が低下

図3 INH感受性菌およびINH耐性菌のペルオキシダーゼ、カタラーゼ

	● ペルオキシダーゼ	○ カタラーゼ		
#	●●●●●○○○○○	●●●●●○○○○○	●●●●●	
*	●●●●●○○○○○	●●●●●○○○○○	●●●●●	
+	●●●●○○○○○	●●●●●○○○○○	●●●●●	
-				
陽性度 INH	感性	0.1γ 1γ 10γ 100γ		
		耐性		

表1 各種INH耐性菌のペルオキシダーゼ、カタラーゼ活性

INH耐性	0.1γ	1γ	10γ	100γ
ペルオキシダーゼ	陽性	50	26	1
	陰性	6	8	18
	陽性率	83.3 %	76.5 %	5.3 %
カタラーゼ	陽性	26	24	2
	陰性	10	10	17
	陽性率	72.2 %	70.6 %	10.5 %

消失を示している。

1) 0.1γ INH耐性菌 36例中ペルオキシダーゼは陽性 30例、陰性 6例、陽性率 83.3%，カタラーゼは陽性 26例、陰性 10例、陽性率 72.2%である。

2) 1γ INH耐性菌 34例ではペルオキシダーゼ陽性 26例、陰性 8例、陽性率 76.5%，カタラーゼは陽性 24例、陰性 10例、陽性率 70.6%である。

3) 10γ INH耐性菌 19例ではペルオキシダーゼ陽性 1例、陰性 18例、陽性率 5.3%，カタラーゼは陽性 2例、陰性 17例、陽性率 10.5%である。

4) 100γ INH耐性菌 13例ではペルオキシダーゼ、カタラーゼとも、全例陰性を示した。

以上の事実からペルオキシダーゼ活性は、カタラーゼ活性と同様、INH耐性菌にのみ変化をきたし、INH耐性度の強いほどこれら酵素の活性度の低下消失を認めた。

INH耐性菌 102例におけるペルオキシダーゼとカタラーゼの両者の関係は表2に示した。ペルオキシダーゼ活性

表2 INH耐性菌のペルオキシダーゼ、カタラーゼの相互関係

	カタラーゼ活性			
	#	++	+	-
ペルオキシダーゼ活性	++ (33例)	17	1	15
	++ (12例)	3	0	5
	+(12例)	2	0	5
	- (45例)	0	1	5
				39

陽性 57例中カタラーゼ陽性は 46例で 11例は陰性、そのうちペルオキシダーゼ強陽性 33例中にもカタラーゼ陰性が 2例あつた。この 2例は 0.1γ および 1γ 耐性菌であつた。また、ペルオキシダーゼ中等度陽性 12例中にも、カタラーゼ陰性が 4例あり、これは 0.1γ 耐性菌 2例、1γ 耐性菌 2例である。一方ペルオキシダーゼ陰性 45例中カタラーゼ陰性は 39例で、5例はカタラーゼ弱陽性で 1例はカタラーゼ中等度陽性を示している。この 1例は 10γ INH耐性菌であつた。このように INH耐性菌のペルオキシダーゼ活性とカタラーゼ活性は大体平行するようと思えるが平行しない例も認められた。

次にペルオキシダーゼ陽性および陰性集落より得た菌を上記方法にて観察すると、陽性菌の菌体内顆粒の多くは黒く染まつて認められるに反し、陰性菌の顆粒の多くはそうではなく両者の間に差を認めた。

考案

ペルオキシダーゼによって過酸化水素の存在のもとに酸化されうる物質はかなり多く知られている。すなわち一価 Phenol 類として Phenol, Cresol, α-Naphtol, 二価 Phenol 類として Catechol, Hydroquinone, その誘導体として Guajacol, Adrenaline, 三価 Phenol 類として Pyrogallol 等がある。また他に Benzidine, Guajacon 酸、ヨード水素酸、Phenolphthalein も知られている。これら被酸化物は着色せる物質に酸化されこの着色度によりペルオキシダーゼ活性の強弱を知りうるのである。

結核菌ペルオキシダーゼの証明に戸田²⁾は Guajacon 酸、Phenolphthalein を用いてこれを証明した。実際検査にあたつては最初加えられる試薬が無色であり、ペルオキシダーゼの作用により速やかに着色される鋭敏なものであることが望ましく、この点から結核菌集落のペルオキシダーゼ活性の証明には、黒色になり、反応時間も速い Catechol がすぐれていると思う。他の化合物も変化は認められたが、着色度が明瞭とならなかつ

たり、また自然酸化の影響が強かつたりするのでこの種の実験には適さないように思われる。

薬剤耐性結核菌と酵素作用の問題については、1954年 Middlebrook⁶⁾が、INH耐性菌においてカタラーゼ活性の低下消失を認めまた病原性の弱い菌ほどカタラーゼ作用が低下していると報告し、その後これに関する基礎的、あるいは臨床的研究が多くなされている^{12~19)}。INH耐性菌のカタラーゼ活性の測定に関しては発泡法、クエン酸モリブデン酸アンモン比色法、過マンガン酸カリ滴定法、ワールブルグ装置による測定法等が報告されその方法、判定規準により幾分の差はあるが、いずれもINH耐性菌においてその耐性度の高くなるにつれて、カタラーゼの低下消失を認めている。本研究においてもカタラーゼ活性とINH耐性菌の間には大体これらの報告と一致した成績を得た。INH耐性菌のペルオキシダーゼについては、Tirunarayanan⁹⁾はINH耐性菌に、ペルオキシダーゼ活性の定性を行つて、その活性の消失を認めペルオキシダーゼ活性の消失は、カタラーゼ活性の消失よりも先におこり、0.1% INH耐性菌でも陰性となつたと述べている。また Hedgecock¹⁰⁾は Pyrogallol-Peroxidaseを定量し、ペルオキシダーゼ活性はINH耐性度の上昇とともに減少しペルオキシダーゼ活性とカタラーゼ活性の間には一致せる関係があると報告しているが、なお多くの問題が残されている。

本研究結果を検討すると、ペルオキシダーゼ活性もやはりカタラーゼ活性と同様 INH耐性菌においてのみその低下消失を認め、SM、PAS耐性とは関係がないことを知った。INH耐性度との関係については0.1%，1%の耐性では検査数の半数以上が陽性を示し、0.1%と1%耐性菌との間にはあまり差はないが、10%以上の耐性になるとペルオキシダーゼ、カタラーゼ活性ともほとんど陰性を示した。

INH耐性菌におけるペルオキシダーゼとカタラーゼの関係については10%以上に耐性の菌では両者ともほとんど陰性でその間に平行関係が認められたが、0.1%，1%の低濃度耐性では必ずしも両酵素活性の間に平行しない例があることを認めた。

なお上記症例中には含めていないが同一培地上の集落にペルオキシダーゼ陽性と陰性の集落が判然と区別できたものがあつたが、これは同一耐性培地に生えた菌でも必ずしも酵素的に同じ性質をもつているものでないことを示すものであり、発泡法によるカタラーゼ検査や菌浮遊液にて行うペルオキシダーゼ検査では認めえない事実である。

INH耐性菌に関しては、各方面から種々の研究がなされ現在いろいろと論議がなされている。Fischer²⁰⁾²¹⁾はINHは結核菌のポルフィリン代謝を阻止する

と考え、またINH耐性菌のあるものは、ヘミンが発育要素となることを認め、またINH耐性菌にはヘミン合成の障害がおこると述べた。またBarryら²²⁾は血清あるいは粗ペルオキシダーゼあるいは塩化鉄等がINH 100%耐性菌のあるものの発育要素となつたと報告している。またMiddlebrook²³⁾はカタラーゼ陰性INH耐性菌を発育させるために牛肝カタラーゼを加えることを報告している。ペルオキシダーゼもカタラーゼと同様ヘミンを含んだ酵素であり、ヘミンから合成されるかも知れない点、INH耐性菌におけるこれら両酵素活性の消失はINH耐性菌の発育要素と関係があることは想像される。

ペルオキシダーゼ陽性および陰性集落より得た菌の菌体内顆粒の状態について両者の間に差を認めた。結核菌体内の顆粒については、1907年Muchがこれを認めてMuch氏顆粒といわれたがその後の研究によりまた電子顕微鏡的観察等によりこの顆粒も大きさ、性質に種々の相違があり单一のものでないとの報告がなされるにいたつた。また酵素学的にはYamamura²⁴⁾、Kusunose²⁵⁾ Millman²⁶⁾²⁷⁾、Darter²⁸⁾らは顆粒成分の分離をして各種酵素の所在を報告している。耐性結核菌と菌体内顆粒との関係についても研究が進められ、Gupta²⁹⁾は電子顕微鏡的観察により各種薬剤耐性菌に菌体の伸長と不規則化を認め、中村³⁰⁾らも同じく耐性菌の顆粒の変化、とくにINH耐性菌において顆粒数の減少を報告している。菌体内顆粒は酵素を含んだものであり、また耐性菌において変化をうけるものであることがわかりつつあるが、本研究においてはINH感受性菌と耐性菌をペルオキシダーゼ活性の面から眺めて上記のごとく形態学的に差異を認めたものである。

結語

- 1) 結核菌ペルオキシダーゼを種々の被酸化物を用いて証明し、その反応度を検討した。被酸化物としては、Catecholがすぐれていた。
- 2) 患者喀痰より分離した薬剤感受性および耐性結核菌183例についてペルオキシダーゼ活性およびカタラーゼ活性をしらべた。
 - a) 薬剤感受性菌は全例ペルオキシダーゼ、カタラーゼとも陽性であつた。
 - b) SMおよびPAS耐性菌もペルオキシダーゼ、カタラーゼとも陽性で感受性菌との間に差は認めなかつた。
 - c) INH耐性菌はその耐性度が高くなるにつれてペルオキシダーゼ、カタラーゼ活性は低下消失を認めた。この両酵素の活性度は多くのものは平行的であるが、耐性度の低い菌において必ずしも平行でないものもみられた。

- 3) INH 耐性ペルオキシダーゼ陰性菌において菌体内顆粒のペルオキシダーゼ活性の低下を認めた。

稿を終るに臨み、御指導、御校閲を賜わつた恩師平井金三郎教授に対し深謝を表するとともに、終始本研究に御協力戴いた大阪阿武山赤十字病院研究室、小山田耕治郎氏に感謝致します。

本研究の要旨は昭和32年11月第17回大阪医科大学医学会総会において発表した。

文 献

- 1) 赤堀四郎：酵素研究法，2：335，昭31。
- 2) 戸田忠雄・占部薰：東京医事新誌，—2981，1361，昭11。
- 3) Fujita, A., & Kodama, T. : Biochem. Z., 232 : 20, 1931.
- 4) 戸田忠雄：日本微生物学会雑誌，20：1867，大15。
- 5) 占部薰：日本微生物病理学雑誌，27：956，昭8。
- 6) Middlebrook, G. : Am. Rev. Tuberc., 69 : 471, 1954.
- 7) Cohn, M.L., Kovitz, C., Oda, U., & Middlebrook, G. : Am. Rev. Tuberc., 70 : 641, 1954.
- 8) Middlebrook, G., Cohn, M.L., & Schaefer, W.B. : Am. Rev. Tuberc., 70 : 852, 1954.
- 9) Tirunarayanan, M.O., & Vischer, W.A. : Am. Rev. Tuberc., 75 : 62, 1957.
- 10) Hedgecock, L.W., & Faucher, I.O. : Am. Rev. Tuberc., 75 : 670, 1957.
- 11) Nagao, S. : Ann. Tuberc., 1 : 12, 1950.
- 12) Peizer, L.R., & Widelock, D. : Am. Rev. Tuberc., 71 : 305, 1955.
- 13) Peizer, L.R., & Widelock, D. : Am. Rev. Tuberc., 72 : 246, 1955.
- 14) Knox, R., Meadow, P.M., & Worssam, A.R.H. : Am. Rev. Tuberc., 73 : 726, 1956.
- 15) Wolinsky, E., Smith, M.M., & Steenken, W. Jr. : Am. Rev. Tuberc., 73 : 768, 1956.
- 16) 貝田勝美・杉山浩太郎・古賀行雄：結核，30：262，昭30。
- 17) 海老名敏明・高階二郎：日本臨牀結核，15：833，昭31。
- 18) Bönicke, R. : Beitr. Klin. TbK., 117 : 171, 1957.
- 19) Meissner, G. : Beitr. Klin. TbK., 117 : 186, 1957.
- 20) Fischer, M.W. : Am. Rev. Tuberc., 69 : 469, 1954.
- 21) Fischer, M.W. : Am. Rev. Tuberc., 69 : 797, 1954.
- 22) Barry, V.C., Conalty, M.L., Denneny, J.M., Gaffney, E.E., & Winder, F. : Am. Rev. Tuberc., 71 : 785, 1955.
- 23) Middlebrook, G. : Am. Rev. Tuberc., 75 : 155, 1957.
- 24) Yamamura, Y., Kusunose, M., & Kusunose, E. : J. Biochem., 42 : 785, 1955.
- 25) Kusunose, M., Nagai, S., Kusunose, E., & Yamamura, Y. : J. Bact., 72 : 754, 1956.
- 26) Millman, I., & Youmans, G.P. : J. Bact., 69 : 320, 1955.
- 27) Millman, I., & Darter, R.W. : Proc. Exp. Biol. Med., 91 : 271, 1956.
- 28) Darter, R.W., & Millman, I. : Proc. Exp. Biol. Med., 95 : 440, 1957.
- 29) Gupta, K.C., & Viswanathan, R. : Am. Rev. Tuberc., 73 : 296, 1956.
- 30) 中村智・打越慶三・林正人・江本俊秀：日本臨牀結核，16：406，昭32。