

# 結核菌ペルオキシダーゼについて (続報)

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 9 月 6 日

## 結 言

1957 年 Tirunaryanan<sup>1)</sup>, Hedgecock<sup>2)</sup>らは, I NH 耐性結核菌において, ペルオキシダーゼ活性の低下があることを報告し, 著者<sup>3)</sup>もこの問題について 2, 3の知見を報告した。本研究においては, ペルオキシダーゼ活性の検査が, I NH 耐性を判定することに応用できるか否かについて検討し, さらに継代によるペルオキシダーゼ活性の変化, またペルオキシダーゼ反応により生じた黒色物質の性質等についての知見を報告する。

## 実 験

〔実験 1〕 I NH 耐性菌の対照培地および I NH 含有耐性培地上におけるペルオキシダーゼ活性の差違について

実験方法: 直接法による耐性検査で得た菌について, 対照培地および I NH 含有耐性培地 (いずれも 3% 第一磷酸カリ含有小川培地) に発育せる菌集落につき, ペルオキシダーゼ活性をしらべた。ペルオキシダーゼ活性は, 先の報告<sup>3)</sup>に述べたごとく被酸化物として Ca-techol を用いた。すなわち 2% Catechol 水溶液と, その半量の 0.3% 過酸化水素水を混じて試薬を作成し, 反応は試薬で培地上の菌集落を浸して行つた。ペルオキシダーゼ活性の判定は 24 時間後に行い, 菌集落が黄褐色, 茶褐色, 黒色を示すものを陽性とし, 呈色しないものを陰性とした。

実験結果: 同一患者から分離した菌でも, 対照培地上のペルオキシダーゼ活性と耐性判定に用いる I NH 含有培地上のペルオキシダーゼ活性は必ずしも一致せず, この分布状態により, 次の 6 型にわけた。

- I 型 対照培地, 耐性培地とも陽性の場合
- II 型 対照培地は陽性, 耐性培地は陰性の場合
- III 型 対照培地は陽性, 耐性培地において陽性集落と陰性集落が混在する場合
- IV 型 対照培地, 耐性培地とも陽性集落と陰性集落が混在している場合
- V 型 対照培地において陽性集落と陰性集落が混在するが, 耐性培地において陰性集落のみよりなる場合
- VI 型 対照培地, 耐性培地とも陰性の場合

耐性度の高い株においては, 各種濃度 I NH 含有培地上においてもペルオキシダーゼ活性の差がみられる例もあるが, 本研究における耐性培地上のペルオキシダーゼ判定は, その菌の最高濃度 I NH 含有培地で発育したところの判定である。

各種 I NH 耐性菌 153 例をこの分類によつてわけたものが表 1 である。すなわち 0.1 γ 耐性菌は対照培地, 耐性培地とも陽性を示しているもの (I 型) が多く, また 100 γ 耐性菌は 両培地とも, 陰性を示すもの

表 1 I NH 耐性菌の対照培地と耐性培地上におけるペルオキシダーゼ活性の差違による分類

● ペルオキシダーゼ陽性  
○ ペルオキシダーゼ陰性

型	各種 I NH 耐性菌 (例数)		0.1γ	1 γ	10 γ	100γ	計
	対照培地	耐性培地					
I	●	●	56	31	2	0	89
II	●	○	4	3	5	4	16
III	●	●	2	3	2	1	8
IV	○	●	3	3	0	1	7
V	○	○	0	2	2	1	5
VI	○	○	2	4	7	15	28

(VI 型) が多い。そしてその間に II 型から V 型までの対照, 耐性培地上におけるペルオキシダーゼ活性の違つた型が存在している。とくに III 型, IV 型, V 型に属する 20 例は同一培地上にて陽性集落と陰性集落がはつきりとわかれて混在している例である。そして, このような混合型は 0.1 γ, 1 γ 耐性株に多い傾向がみられた。

〔実験 2〕 継代による結核菌ペルオキシダーゼ活性の変化について

実験方法: ペルオキシダーゼ陽性および陰性菌, 各 10 例を I NH を含有していない 3% 小川培地に 4 週間ごとに 7 代継代してその活性の変化をみた。

ペルオキシダーゼ陰性 I NH 耐性菌については 7 代継代後, 間接法<sup>4)</sup>にてその耐性検査を行つて耐性度の

変化もしらべた。

実験結果：ペルオキシダーゼ陽性菌（いずれもINH感受性で、黒色を示す強陽性のもの）の10例中8例は7代継代後も強陽性を続けているが、2例は弱陽性（黄褐色）となりその活性の低下を認めた。

ペルオキシダーゼ陰性INH耐性菌10例の継代によるペルオキシダーゼ活性の変化と7代継代後の耐性の変化は表2に示すごとく、100%耐性ペルオキシダーゼ陰性菌4例は継代後も陰性を続け、耐性度にも変化はないが、INH耐性度の低いものにはペルオキシダーゼ活性が陽性化し、また耐性度も低下していることを認めた。

表2 INH耐性ペルオキシダーゼ陰性菌の継代によるペルオキシダーゼ活性および耐性度の変化

症例	継代前		7代継代後	
	ペルオキシダーゼ	耐性度 $\gamma/cc$	ペルオキシダーゼ	耐性度 $\gamma/cc$
1	-	100	-	100
2	-	100	-	100
3	-	100	-	100
4	-	100	-	100
5	-	10	-	10
6	-	10	+	1
7	-	1	-	1
8	-	1	+	感受性
9	-	0.1	-	0.1
10	-	0.1	+	感受性

〔実験3〕ペルオキシダーゼ反応により生じた黒色物質の種々なる溶媒に対する態度について

実験方法：ペルオキシダーゼ反応により生じた黒色物質を表3に示す各種の溶媒に溶解するか否かを検した。すなわち小試験管にこれら各種溶媒を少量入れそれに黒色を呈した菌集落を混入すると溶解する場合は溶媒が茶褐色に呈色するが、溶解しない場合は溶媒は着色しない。

実験結果：表3に示すごとくこの黒色物質は有機溶媒、有機酸、無機酸等には全く溶解せず、ただアンモニア、苛性ソーダ液のごとき塩基にのみ溶解しやすいことを認めた。

考 案

Middlebrook<sup>5)</sup>はINH耐性結核菌のカタラーゼ活性を対照培地上とINH含有培地上に発育した菌について比較し、対照培地でカタラーゼ陽性、INH含

表3 ペルオキシダーゼ反応により生じた黒色物質の溶解性

溶 媒	溶 解 性
醋 酸	溶 解 せ ず
水 醋	〃
エタノール	〃
メタノール	〃
アセトン	〃
石油ベンゼン	〃
石油エーテル	〃
ベンツオール	〃
クロロホルム	〃
硫 酸	〃
塩 酸	〃
水	〃
苛性ソーダ液	溶 解 す る
炭酸ソーダ液	〃
アンモニア	〃

有耐性培地でカタラーゼ陰性を「Mixed」といつた。すなわち感受性菌とカタラーゼ陰性の耐性菌の混在である。また対照培地、耐性培地ともカタラーゼ陽性の場合を「special mixed」といつた。すなわち感受性菌とカタラーゼ陽性の耐性菌の混在であるといっている。

Van Liew<sup>6)</sup>、鈴木<sup>7)</sup>らもINH耐性結核菌の対照培地および耐性培地におけるカタラーゼ活性の差違について報告し、臨床的に耐性検査の応用に関して述べている。

以上のことが本研究にて行つたペルオキシダーゼ活性についても考えられる。すなわち直接法によるINH耐性検査のさい、INHを含有していない対照培地とINHを含有している耐性培地上に発育せる菌のペルオキシダーゼ活性は必ずしも同一でない。すなわちその菌株の中には種々なる耐性度を有するものが含有されているのであるからペルオキシダーゼ活性も違うのは当然である。とくにペルオキシダーゼ反応は培地上の集落別にて陽性、陰性をはつきりと区別しうる点、カタラーゼ反応とくらべてこの変化は明らかに認められる利点がある。本研究にては対照、耐性培地上のペルオキシダーゼ活性の差違をくらべて6型にわけた。最高濃度耐性培地発育菌株でペルオキシダーゼ陰性でも対照培地で陽性のももあり(II型)、またIII、IV、V型のごとく同一培地にて陽性、陰性集落の混在している例においても対

照培地と耐性培地でペルオキシダーゼ活性の分布が異なっている。このことから考え耐性検査を行わないで、INH を含有していない対照培地上でのみペルオキシダーゼ検査を行つてINH耐性の有無を推定する場合、ペルオキシダーゼ陽性の場合にはINH感受性のこともあり、耐性菌の存在している場合も考えられるのである（INH感受性菌は先の報告<sup>3)</sup>にて述べたごとく全例がペルオキシダーゼ陽性を示している）。一方、対照培地で陰性の場合、あるいは陽性集落と陰性集落が混在している場合は著者の成績から考え少なくとも0.1 $\gamma$ 以上のINH耐性菌があることが推定しようと思われるのである。（培養期間は4～8週間のもの）

次にペルオキシダーゼ陽性および陰性菌をINHを含有していない3%小川培地に継代することにより、その活性の変化をしらべた。細菌の酵素活性は継代により、またその培地の性質により変化をきたすことは当然考えられることである。INH耐性菌の継代による試験管内耐性の変化とカタラーゼ活性の変化について、Manten<sup>8)</sup>らは10 $\gamma$ INH耐性菌を継代し耐性不変のものはカタラーゼ陰性を続け、耐性の低下したものの多くにおいてカタラーゼ活性が陽性化したと報告している。

本研究において、ペルオキシダーゼ陰性INH耐性菌10例を7代継代しその変化を検討したが、7代継代後もペルオキシダーゼ陰性を続けている7例には耐性に変化はなく、ペルオキシダーゼ陽性化した3例はいずれも耐性の低下を認めた。一方INH感受性ペルオキシダーゼ陽性菌10例を継代しその活性の変化をみたが、10例中8例までは強陽性を続けペルオキシダーゼ活性に変化はなかつたが、2例においてその活性が低下してきた。Middlebrook<sup>9)</sup>は陳旧株においては、カタラーゼ活性は陰性を呈すと述べ、また占部<sup>10)</sup>も10～11カ月放置した菌はカタラーゼが陰性となると述べている。Bönickeも培養日数により菌のカタラーゼ活性に変化があることを報告している。本研究にては継代することによつてもペルオキシダーゼ活性に変化をきたすことを認めたものである。

ペルオキシダーゼ反応にて生じたメラニン様物質について種々の溶媒に対する溶解性をしらべた。平井教授<sup>12)</sup>は *Proteus vulgaris* による I-Tyrosin よりのメラニンは塩基、アルコール、氷醋酸、アセトンに溶解し、水、無機酸、エーテル、クロロホルム、ベンゾール等には溶解しがたいと述べ、また四熊<sup>13)</sup>は大腸菌による I-Tyrosin よりのメラニンについてもその溶解性について同一の結果を得ている。すなわち作用せしめたる菌の種類は相異なるもメラニンの母体が同一なときはその溶媒に対する態度も同一であり、メラニンの母体が異なるときは各種の溶媒に対しその溶解度を異にする

ものであるといわれる。本研究にては結核菌ペルオキシダーゼにより Catechol によつて生じたメラニン様黒色物質がアンモニア、苛性ソーダ液等の塩基にのみ溶解し、他の溶媒には溶解しがたいことを認めた。この事実を応用して、ペルオキシダーゼ反応後の結核菌の一定量を一定量の塩基溶媒にとかすことにより、その溶液の着色度を比色することにより、ペルオキシダーゼ活性の肉眼的判定よりも正確なペルオキシダーゼ活性の定量が可能とされるのである。

## 結 語

1) 直接法による耐性検査の結果、INHに0.1 $\gamma$ 以上耐性のあるもの153例について、対照培地およびINH含有耐性培地上での菌集落のペルオキシダーゼ活性の差異をしらべ、その結果6型に分類した。

2) INH感受性および耐性結核菌各10例を3%小川培地上に7代継代しペルオキシダーゼ活性の変化をしらべた。

a) INH耐性ペルオキシダーゼ陰性菌10例中7例はペルオキシダーゼ陰性を続け、耐性度も不変であつたが、3例はペルオキシダーゼ活性が陽性化し耐性度の低下がみられた。

b) INH感受性ペルオキシダーゼ陽性菌10例中8例は継代後もその活性に変化はなかつたが、2例に低下を認めた。

3) ペルオキシダーゼ反応にて生じたメラニン様黒色物質は塩基にのみ可溶性であることを認めた。

稿を終るに臨み、御指導、御校閲を賜つた恩師平井金三郎教授に対し深く感謝の意を表するとともに、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。

## 文 献

- 1) Tirunarayanan, M.O., & Vischer, W.A.: Am. Rev. Tuberc., 75: 62, 1957.
- 2) Hedgecock, L.W., & Faucher, I.O.: Am. Rev. Tuberc., 75: 670, 1957.
- 3) 友田恒典: 結核, 33: 674, 昭33.
- 4) 結核菌検査指針改正案: 臨床病理, 4: 355, 昭31.
- 5) Middlebrook, G., Cohn, M.L., & Schaefer, W.B.: Am. Rev. Tuberc., 70: 852, 1954.
- 6) Van Liew, R.M.: Am. Rev. Tuberc., 76: 1007, 1957.
- 7) 鈴木実: 胸部疾患, 1: 209, 昭32.
- 8) Manten, A., & Wijngaarden, L.J.: Acta Tuberc. Scand., 34: 190, 1957.
- 9) Middlebrook, G.: Am. Rev. Tuberc., 69:

471, 1954.

10) 占部薰：日本微生物病理学雑誌, 27 : 956, 昭8.

11) Bönicke, R. : Beitr. Klin. Tuberk., 117 : 171,

1957.

12) Hirai K. : Biochem. Z., 135 : 299, 1923.

13) 四能清夫：長崎医学会雑誌, 13 : 447昭10.