

## 抗酸菌とくに非定型抗酸菌のカタラーゼ活性について

佐藤光三・佐竹央行

東北大学抗酸菌病研究所（指導 海老名敏明教授）

受付 昭和 36 年 7 月 22 日

## 緒 言

抗酸菌のカタラーゼ活性については 1926 年以来戸田<sup>1)</sup>、占部<sup>2)</sup>、広木<sup>3)</sup>により種々の基礎実験が行なわれ、カタラーゼ活性は牛型菌がもつとも弱く、ついで人型菌で鳥型菌はやや強く、非病原性抗酸菌はきわめて強いこ

とが知られている。

1958 年 O. Schweiger ら<sup>4)</sup>は種々の条件下において人型菌、牛型菌および自然界抗酸菌のカタラーゼ活性を定量的に測定し、種々の温度と pH におけるカタラーゼ活性値より人型および牛型菌の毒力菌を人型および牛型の無毒力菌、自然界抗酸菌より分類しうることを述べ

Table 1  
Catalase Activity of Mycobacteria at Various pHs

| Strain                           |                           | pH 1        | pH 7 | pH 10 |    |
|----------------------------------|---------------------------|-------------|------|-------|----|
| Human                            | H <sub>37</sub> Rv        | +           | ++   | +     |    |
|                                  | H <sub>37</sub> Ra        | -           | ++   | -     |    |
|                                  | 1 F                       | -           | +    | -     |    |
|                                  | Aoyama B                  | -           | ±    | -     |    |
| Bovine                           | D 4                       | -           | +    | -     |    |
|                                  | Miwa                      | -           | +    | -     |    |
|                                  | BCG-Phipps                | -           | +    | -     |    |
|                                  | BCG-Yoken                 | -           | +    | -     |    |
|                                  | YOK                       | -           | +    | -     |    |
|                                  | 3 2 6                     | -           | ±    | -     |    |
| Avian                            | 1 1 7 5 5                 | -           | +    | -     |    |
|                                  | 4 1 1 0                   | -           | +    | -     |    |
|                                  | A 71                      | -           | +    | -     |    |
| Atypical<br>acid-fast<br>bacilli | Photochromo-<br>genic     | No. 1       | +    | ++    | ++ |
|                                  |                           | No. 8       | +    | ++    | ++ |
|                                  |                           | No. 16      | -    | ++    | ++ |
|                                  | Non-photo-<br>chromogenic | Ueda        | -    | +     | ±  |
|                                  |                           | 1 0 0 6 1 6 | -    | ±     | -  |
|                                  | Scotochromo-<br>genic     | No. 6       | +    | ++    | ++ |
|                                  |                           | Mieke       | +    | ++    | ++ |
|                                  | Rapid grower              | M. balnei   | -    | ++    | +  |
| Yamamoto                         |                           | -           | ++   | ++    |    |
| Saprophytic                      | Soil No. 3                | -           | +    | +     |    |
|                                  | M. fortuitum              | -           | ++   | ++    |    |
|                                  | M. Takeo                  | -           | ++   | ±     |    |
|                                  | M. phlei                  | -           | ++   | ++    |    |

た。1960年 G.P.Kubica ら<sup>5)</sup> は一定条件下で各種抗酸菌のカタラーゼ活性について定性試験を行ない、人型菌、牛型菌を他の抗酸菌より分類する手段として有効な方法であると報告している。われわれは種々の pH, 温度下において抗酸菌のカタラーゼ活性を定性することにより抗酸菌を分類しうるかどうか、人型菌、牛型菌の毒力菌を無毒力菌より大別しうるかどうか検討し若干の知見を得たので報告する。

### 実験方法

#### 1) 使用菌株

表 1 に示すごとく人型菌、牛型菌、鳥型菌、非定型抗酸菌、自然界抗酸菌計 26 株について実験した。

各菌株とも 1% 小川培地 4 週間培養のものを使用した。

#### 2) pH とカタラーゼ活性との関係

1% 小川培地斜面より 2 白金耳 (3 mg の標準白金耳) の菌をとり buffer 0.5 cc の中に入れ、懸濁 20 分間放置後 10% Tween 80 と 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の 1:1 混合液 0.5 cc を静かに加えて発泡の状態を観察した。各菌株とも pH 1, 7, 10 において室温で定性した。pH 7 の場合は 1/15 mol phosphate buffer 使用, pH 1, 10 の場合は 1/15 citrate buffer を使用した。

#### 3) 温度とカタラーゼ活性との関係

2) と同様に 2 白金耳の菌を pH 7.0, 1/15 mol phosphate buffer 0.5 cc に入れた菌懸濁液を恒温槽に 20 分間入れたのち 10% Tween 80 と 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1:1 混合液を静かに加え発泡の状態を観察した。温度は室温, 50°C, 58°C, 60°C, 68°C, 70°C, 80°C において定性した。2), 3) とも中試験管を用いて実験した。

Table 2  
Catalase Activity of Mycobacteria at Various Temperatures

| Strain                     |                                | Room temperature | 50°C | 58°C | 60°C | 68°C | 70°C | 80°C |   |
|----------------------------|--------------------------------|------------------|------|------|------|------|------|------|---|
| Human                      | H <sub>37</sub> R <sub>V</sub> | ++               | ++   | +    | +    | -    | -    | -    |   |
|                            | H <sub>37</sub> Ra             | ++               | +    | -    | -    | -    | -    | -    |   |
|                            | 1 F                            | +                | +    | -    | -    | -    | -    | -    |   |
|                            | Aoyama B                       | ±                | +    | -    | -    | -    | -    | -    |   |
| Bovine                     | D <sub>4</sub>                 | +                | +    | ±    | -    | -    | -    | -    |   |
|                            | Miwa                           | +                | +    | -    | -    | -    | -    | -    |   |
|                            | BCG-Phipps                     | +                | +    | -    | -    | -    | -    | -    |   |
|                            | BCG-Yoken                      | +                | -    | -    | -    | -    | -    | -    |   |
|                            | YOK                            | +                | +    | -    | -    | -    | -    | -    |   |
|                            | 3 2 6                          | ±                | ±    | -    | -    | -    | -    | -    |   |
| Avian                      | 1 1 7 5 5                      | +                | +    | +    | +    | +    | +    | -    |   |
|                            | 4 1 1 0                        | +                | +    | +    | +    | +    | ±    | -    |   |
|                            | A <sub>71</sub>                | +                | ±    | -    | -    | -    | -    | -    |   |
| Atypical acid-fast bacilli | Photochromogenic               | No. 1            | ++   | ++   | ++   | ++   | ++   | ++   | - |
|                            |                                | No. 8            | ++   | ++   | ++   | ++   | ++   | ++   | - |
|                            |                                | No. 16           | ++   | ++   | ++   | ++   | ++   | ++   | - |
|                            | Non-photochromogenic           | Ueda             | +    | +    | +    | +    | +    | ±    | - |
|                            |                                | 1 0 0 6 1 6      | ±    | ±    | ±    | ±    | -    | -    | - |
|                            | Scotochromogenic               | No. 6            | ++   | ++   | ++   | ++   | ++   | ++   | - |
|                            |                                | Mieke            | ++   | ++   | ++   | ++   | +    | ++   | - |
|                            | Rapid grower                   | M. balnei        | ++   | ++   | ++   | ++   | ++   | ++   | - |
| Yamamoto                   |                                | ++               | ++   | ++   | ++   | +    | -    | -    |   |
| Saprophytic                | Soil No. 3                     | +                | +    | +    | +    | -    | -    | -    |   |
|                            | M. fortuitum                   | ++               | ++   | ++   | ++   | ++   | ++   | -    |   |
|                            | M. Takeo                       | ++               | ++   | +    | +    | -    | -    | -    |   |
|                            | M. phlei                       | ++               | ++   | ++   | ++   | ++   | ±    | -    |   |

## 4) カタラーゼ活性判定の方法

発泡の状態を 10% Tween と 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 等量混合液添加後 20 分間観察した。発泡の状態は表には下のごとき判定基準で記載された。

- 泡が全く発生しないまたは表面に数コの泡が発生
- ± 表面に一層程度の泡発生
- + 表面に層をなして泡発生 (泡の層 3 mm 以内)
- ++ 表面に層をなして泡発生 (泡の層 3 mm 以上)

## 実験成績

表 1 に示すごとく pH 1 において人型菌, 牛型菌, 鳥型菌の中で H<sub>37</sub>R<sub>v</sub> のみ + で他は - であつた。atypical acid-fast bacilli では photochromogenic strain の No. 1, No. 8, scotochromogenic strain の No. 6, 三池株が pH 1 で + で他は -, 自然界抗酸菌はすべて - であつた。pH 7 では各菌株ともカタラーゼ陽性であつたが人型菌の H<sub>37</sub>R<sub>v</sub>, H<sub>37</sub>R<sub>a</sub>, photochromogenic strain, scotochromogenic strain, rapid grower, 自然界抗酸菌がとくに強陽性であつた。pH 10 においても人型菌, 牛型菌, 鳥型菌の中で H<sub>37</sub>R<sub>v</sub> のみ + で他は - であつた。atypical acid-fast bacilli, 自然界抗酸菌では pH 10 ではほとんどカタラーゼ陽性で 100616 のみが - であつた。温度とカタラーゼ活性との関係は表 2 に示した。

すなわち 50°C では BCG 予研株のみカタラーゼ陰性となつたが 58°C では人型菌 H<sub>37</sub>R<sub>v</sub> と牛型菌 D<sub>4</sub> を除くすべての人型菌, 牛型菌はカタラーゼ陰性を示した。68°C では人型菌, 牛型菌のすべてが陰性となつた。鳥型菌 A<sub>71</sub>, non-photochromogenic strain の 100616, 自然界抗酸菌の ± 3 株, 竹尾株は 68°C でカタラーゼ陰性を示したが, atypical acid-fast bacilli および自然界抗酸菌は一般に 70°C でもカタラーゼ活性強陽性のものが多い。鳥型菌 11755, 4110 は 70°C でもカタラーゼ陽性であつた。80°C ではすべての抗酸菌はカタラーゼ陰性であつた。

## 総括および考案

1926 年戸田はわが国においてはじめて抗酸菌のカタラーゼ作用についての基礎的研究を行ない, 非病原性抗酸菌はカタラーゼ作用が強力であり他の抗酸菌より分類可能であることを報告した。また非病原性抗酸菌を用い pH および温度とカタラーゼ活性との関係について調べ, チモテ菌は 75°C でカタラーゼ活性消失することを認め, かつ非病原性抗酸菌は pH 6.4~7.7 でカタラーゼ作用が強いことを報告している。

占部, 広木等も追試かつ検討し戸田と同様の成績を得ている。結核菌のカタラーゼ作用については当研究所, 海老名ら<sup>6)</sup> および石川<sup>7)</sup> は BCG を用いて研究を行

なつている。すなわち BCG のカタラーゼ活性を定量的に測定し, BCG のカタラーゼ活性はその生菌数と平行関係にあり BCG 効力の迅速判定法として有効な方法であることを報告している。1954 年 G. Middlebrook<sup>8)</sup> の報告以来 INH 耐性菌の毒力低下, カタラーゼ活性低下の問題については多くの報告<sup>9)</sup> が行なわれている。毒力とカタラーゼ活性について注目し, O. Schweiger らは Sauton 培地培養の人型菌, 牛型菌, 自然界抗酸菌のカタラーゼ活性を種々の pH, 種々の温度下において定量することにより, 人型毒力菌, 牛型毒力菌を人型無毒力菌, 牛型無毒力菌, 自然界抗酸菌と大別せんと試み, 次の結論を得た。

すなわち「人型毒力菌, 牛型毒力菌, M. phlei は pH 1.2 でカタラーゼ陽性, 人型無毒力菌, 牛型無毒力菌は pH 1.2 でカタラーゼ活性がはつきりしない。人型毒力菌, 牛型毒力菌は 64°C~68°C でカタラーゼ活性消失するが, 人型無毒力菌, 牛型無毒力菌は 58°C~60°C で消失, 自然界抗酸菌は 70°C~88°C で消失する」と。1959 年 M. Nasta<sup>ら</sup><sup>10)</sup> は非定型抗酸菌を O. Schweiger の成績に従つて分類を試みている。1960 年 G. P. Kubica らは定性的に追試実験し pH 7, 温度 68°C でカタラーゼ陰性のものは人型菌, 牛型菌であり, 陽性のものは他の菌型であり分類上有効なものと報告している。われわれの実験では pH 1 で H<sub>37</sub>R<sub>v</sub> はカタラーゼ陽性で他の人型菌, 牛型菌は陰性であり, 人型菌, 牛型菌の中で pH 1 でカタラーゼ陰性のものは無毒力とは結論しがたい。photochromogenic strain に属する No. 1, No. 8, scotochromogenic strain に属する No. 6, 三池株は pH 1 でカタラーゼ陽性であつた。non-photochromogenic strain は pH 7, pH 10 いずれにおいてもカタラーゼ活性が低い傾向が認められた。pH 10 において H<sub>37</sub>R<sub>v</sub> を除いて人型菌, 牛型菌, 鳥型菌はすべてカタラーゼ陰性であり, atypical acid-fast bacilli および自然界抗酸菌では 100616 以外のすべてがカタラーゼ陽性であつた。

温度とカタラーゼ活性との関係をみると, 58°C では H<sub>37</sub>R<sub>v</sub>, 牛型 D<sub>4</sub> 株を除くすべての人型菌, 牛型菌がカタラーゼ陰性となり, 68°C ではすべての人型菌, 牛型菌が陰性となつた。58°C でカタラーゼ陰性のものはすべて無毒力株とはいいがたく, O. Schweiger らの結論とは完全には一致を認めえない。しかし H<sub>37</sub>R<sub>v</sub>, 牛型毒力株 D<sub>4</sub> では 60°C でカタラーゼ陽性であり, 彼らの結論と一致の傾向を認めうる。また G. P. Kubica らは 68°C でカタラーゼ陰性のものは人型菌, 牛型菌であるとしたが, われわれの成績では人型菌, 牛型菌のほか鳥型菌 A<sub>71</sub>, non-photochromogenic strain の 100616, 自然界抗酸菌の竹尾株でも 68°C でカタラーゼ反応陰性の成績を得た。このカタラーゼ定性試験ではすべて培

養 4 週目を使用したので培養日数の影響も考慮すべきものと思われる。

## 結 論

1% 小川培地に 4 週間培養の各種抗酸菌について種々の pH, 種々の温度下においてカタラーゼ活性定性試験を行ない次の結論を得た。

1) 室温 pH 1, および室温 pH 10 において人型菌 4 株, 牛型菌 6 株, 鳥型菌 3 株のうち H<sub>37</sub>Rv を除く 12 株はカタラーゼ反応陰性であった。atypical acid-fast bacilli および自然界抗酸菌は室温 pH 10 においてカタラーゼ反応強陽性または陽性のものが多い。

2) 人型菌, 牛型菌は pH 7.0, 68°C でカタラーゼ反応陰性であった。しかし pH 7.0, 68°C でカタラーゼ陰性のものは人型菌, 牛型菌であるとは断言できない。

3) カタラーゼ定性試験は菌型鑑別上参考になりうるが確実な判定法ではない。

## 参 考 文 献

- 1) 戸田忠雄：日本微生物学会雑誌，20：1867，大15.
- 2) 占部薫：日本微生物病理学雑誌，27：956，昭8.
- 3) 広木彦吉：満州医学雑誌，23：717，昭10.
- 4) Schweiger, O., Román, E., & Soós, I. : Am. Rev. Tuberc., 77 : 146, 1958.
- 5) Kubica, G.P., & Pool, G.L. : Am. Rev. Resp. Dis., 81 : 387, 1960.
- 6) Ebina, T., Kasai, S., Ishikawa, M., Ishikawa, H., Kitamura, M., Kumagai, H., & Matsuda, M. : Sci. Rep. Res. Inst. Tohoku Univ.-C, 1 : 1, 1950.
- 7) Ishikawa, H. : Sci. Rep. Res. Inst. Tohoku Univ.-C, 3 : 35, 1951.
- 8) Middlebrook, G. : Am. Rev. Tuberc., 69 : 471, 1954.
- 9) 海老名敏明・高階二郎：日結，15：833，昭31.
- 10) Nasta, M., & Bogdanescu, V. C. : Bulletin of the International Union against Tuberculosis : 29 : 308, 1959.

### Studies on Catalase Activity of Acid-fast Bacilli. Especially of atypical acid-fast bacilli. Kozo SATO and OKo SATAKE (The Research Institute for Tuberculosis and Leprosy, Tohoku University. Director : Prof. Toshiaki EBINA)

In 1958 Schweiger *et al.* determined catalase activity of acid-fast bacilli quantitatively at different pHs and temperatures, and suggested the possibility of discriminating virulent human and bovine strains from their avirulent variants and saprophytic acid-fast bacilli.

Also Kubica *et al.* in 1960 proved the qualitative catalase activity determination to be an effective method for the classification of the strains.

The present authors discussed the possibility of subgrouping on the basis of catalase activity at different pHs and temperatures.

#### Experimental Method

From 4-week-old cultures on Ogawa's slant\* of 26 strains of human, bovine and avian tubercle bacilli, and atypical acid-fast bacilli, 2 loop-fuls of colonies were taken in 0.5 cc of a buffer solution to prepare homogenous suspen-

sion. After a test tube 17 mm diameter containing the suspension remained standing for 20 minutes at room temperature, 0.5 cc of a 1:1 mixture of 10 per cent Tween 80 and 30 per cent hydrogen peroxide was added and the evolution of bubbles was observed.

Catalase activity was determined at pH 1, 7 and 10 at room temperature and at 50°C, 58°C, 60°C, 68°C, 70°C, and 80°C at pH 7.

The criterion of the degree of evolution of bubbles was as follows :

- no bubbles or several bubbles at surface
- ± barely forming a layer of bubbles at surface
- + a layer of bubbles below 3 mm in height at surface
- ++ a layer of bubbles above 3 mm in height at surface

#### Experimental Results

As shown in Table 1, of the human, bovine and avian strains, H<sub>37</sub>Rv alone was catalase-positive at pH 1 and the others were all catalase-negative.

Among atypical acid-fast bacilli, photochromogenic strains No. 1 and No. 8 and Scotochromogenic strain No. 6 were catalase-positive at pH 1 and the others were negative. Saprophytic

\* Ogawa's egg medium containing 1% potassium dihydrogen phosphate.