

ペルオキシダーゼによる活性 INH の変化について

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 35 年 12 月 17 日

緒 言

1957 年 Tirunarayanan,¹⁾ Hedgecock²⁾ らは INH 耐性結核菌にペルオキシダーゼ活性が低下消失していることを報告し、さらに 1959 年 Tirunarayanan³⁾ は INH がペルオキシダーゼによつて非活性化される事実を報告している。

INH 耐性結核菌の酵素作用、INH の生体内代謝等に関しては現在各方面から種々の研究がなされ、いろいろ論議されているところである。著者も INH 耐性と結核菌ペルオキシダーゼ活性との関係についてすでに報告^{4)~6)} してきたが、本研究では活性 INH がペルオキシダーゼによつて受ける変化について 2, 3 の実験を行なつたのでその成績を報告する。

実 験

〔実験 I〕 ペルオキシダーゼによる INH の非活性化について

(実験材料および方法)

表 1, 2 に示すごとく、各種濃度 INH 含有液体培地に、各種濃度のペルオキシダーゼ、ヘミン、カタラーゼを入れたさいの INH 感受性鳥型結核菌竹尾株の菌発育状態を調べた。

液体培地は血清を除いた Proskauer-Beck の培地を用いた。(アスパラギン 5.0 g, 第一磷酸カリ 5.0 g, 硫酸カリ 0.5 g, グリセリン 20 cc, 蒸留水 1,000 cc, 40% NaOH で pH 7.0 に修正後クエン酸マグネシウム 1.5 g を加えて 120°C 20 分滅菌後使用。)

培養期間は 3 週間とした。

ヘミンは第一化学薬品、ペルオキシダーゼは Horseradish より抽出せるもので Nutritional-Biochemicals Corporation, カタラーゼ (牛肝カタラーゼ) は東京化成工業の各製品を使用した。ヘミン水溶液は Autoclave で滅菌、ペルオキシダーゼ、カタラーゼの水溶液は Seitz の濾過器で濾過したものを加えた。

(実験結果)

1) ペルオキシダーゼによる活性 INH の変化

表 1 に示すごとく INH 20 γ /cc 含有培地では、ペルオキシダーゼ 3 γ /cc の存在で INH 感受性菌が

十分発育するのを認めた。なお培養終了後、培養液中の INH の残存の有無を調べるため Schmiedel⁷⁾ の直立拡散法を用いて活性 INH 濃度を調べたが、菌の発育良好なるものの培養液中の活性 INH は全く残存していないことを知った。

表 1 INH, Peroxidase, 含有培地上における INH 感受性鳥型竹尾株の発育状態

INH γ /cc \ ぺルオキシダーゼ γ /cc	0	5	10	20	40
0	+	-	-	-	-
0.1	+	-	-	-	-
0.5	+	±	±	±	-
1.0	+	+	±	±	-
3.0	+	+	+	+	-

+ : 菌の発育良好なるもの
± : わずかに菌膜を形成するもの
- : 菌の発育を認めないもの

表 2 INH, Haemin, 含有培地上における INH 感受性鳥型竹尾株の発育状態

INH γ /cc \ ヘミン γ /cc	0	5	10	20
0	+	-	-	-
5	+	+	-	-
10	+	+	+	+
20	+	+	+	+

+ : 菌の発育良好なるもの
- : 菌の発育を認めないもの

2) ヘミンによる活性 INH の変化

表 2 に示すごとく INH 20 γ /cc 含有培地では、ヘミン 10 γ /cc の存在で INH 感受性菌が十分発育するのを認めた。

3) カタラーゼによる活性 INH の変化

INH 20 γ /cc 含有培地にカタラーゼ 0, 10, 20, 50, 100 γ /cc を加え INH 感受性菌を培養したが、いずれの培地にも菌の発育を認めえなかつた。

〔実験 II〕 各種微生物のペルオキシダーゼ活性と INH 分解能について

(実験材料および方法)

表3に示す微生物34株について培養液中のINH分解能を調べた。

B. Coli はINH 2 γ /cc 含有佐々木氏無蛋白培地⁸⁾ (食塩 5.0 g, 第一磷酸カリ 2.0 g, 硫酸マグネシウム 0.1 g, 炭酸アンモニウム 1.0 g, グリセリン 20 cc, 蒸溜水 1,000 cc) に5日間培養した。

表3 各種微生物のペルオキシダーゼ活性とINH分解能

微生物		Peroxidase	INH分解能
Coli	B. Coli. Comm. 5株	-	-
	B. Lactis. Aerog. 5株	-	-
	B. Acid. Lact. 5株	-	-
Proteus Vulgaris. 4株		-	-
B. Subtilis. 3株		-	-
B. Pyocyanus. 6株		-	-
Candida	Albicans	+	-
	Tropicalis	+	-
	Stellatoidea	+	-
	Krusei	+	-
Mycobact. Avium INH 5 γ 耐性		+	-
Mycobact. Avium INH 100 γ 耐性		-	-

Proteus vulgaris, B. subtilis, B. pyocyanus の各菌株も B. coli と全く同じく培養した。

Candida の各菌株はINH 2 γ /cc 含有サブローブイオンに2週間培養した。

Mycobacterium avium (竹尾株) の2株はINH 2 γ /cc 含有の血清を除いた Proskauer Beck の培地に3週間培養した。

以上の各種微生物を培養後、培養液中のINH濃度の変化を Schmiedel⁷⁾ の直立拡散法によつて測定した。なお対照実験として、各実験とも、微生物の接種していないINH 2 γ /cc 含有の各培地を用い同じくINH濃度の変化を測定した。

また各種微生物のペルオキシダーゼ活性は被酸化物としてカテコールを用いてこれを検した。すなわち2%カテコール水溶液と、その半量の0.3%過酸化水素水で試薬を作成し、Candida, Mycobacteria は直接固型培地上の集落を試薬で浸して反応を行ない、他の腸内細菌等については、普通寒天培地よりpH 7.0の磷酸緩衝

液上に掻きとつて作られた菌浮遊液について反応を行なつた。菌集落が茶褐色から黒色に呈色するものを陽性、呈色しないものを陰性とした。

(実験結果)

表3に示すごとく実験を行なつた34株ともINH分解能をもつ株は認められなかつた。すなわち各種微生物のペルオキシダーゼ活性の有無にかかわらず、本方法によつてはINHを分解しえなかつた。

[実験 III] 血中活性INH濃度と血清ペルオキシダーゼ反応との関係について

(実験材料および方法)

血中活性INH濃度測定:

肺結核患者33例にINHをPro Kilo 5 mg 経口投与後4時間後の血清中の活性INH濃度を、Schmiedel⁷⁾の直立拡散法により測定した。

血清ペルオキシダーゼ反応陽性度の測定:

上記患者について、血清ペルオキシダーゼ反応を行なつてその陽性度を数値で表わした。

- ① 試験管にpH 7.5の磷酸緩衝液2cc入れる。
- ② 被検血清0.5ccを加える。
- ③ 2%カテコール水溶液1.5ccを加える。
- ④ 0.3%過酸化水素水1.5ccを加えて全量5.5ccとする。
- ⑤ 1時間37°C放置後、褐色に呈色せる程度を光電比色計にかけて測定を行なう。

⑥ ブランクは被検血清0.5ccにpH 7.5の磷酸緩衝液5.0ccを加えて全量5.5ccにしたものを使用する。なお上記実施①②までの操作を行なつたのち、20% H₂SO₄あるいは1% KCN 水溶液0.5ccを加えてさらに上記③以後の呈色反応を行なつたが全く呈色しなかつたので、この呈色反応は酵素によるものと考えられ、これをブランクとして使用するべきであるが、血清の稀釈液が硫酸や靑酸の影響により濁濁するので試薬の入っていない血清稀釈液をブランクとした。

⑦ 光電比色計による測定は、波長500 $m\mu$ を使用し、ブランクを100%の透過率目盛に合致し被検液の透過率を読み、別に作成した標準グラフの透過率から被検液のペルオキシダーゼ反応陽性度を測定した。

標準グラフの作成:

あらかじめ既知のペルオキシダーゼ濃度(0.1, 0.5, 1.0, 2.0 γ /cc)の水溶液を作る。標品ペルオキシダーゼは「実験I」に使用せるもの、すなわちHorseradishより抽出せるペルオキシダーゼでNutritional Biochemicals Corporationの製品を使用した。そして各濃度のペルオキシダーゼの水溶液について上記測定法と同じ方法で呈色反応を行なつた。なおこのさいのブランクは蒸溜水とした。標準グラフは大体原点を通る直線となつた。

そこで血清中のペルオキシダーゼ反応陽性度と血中 I N H 濃度との関係について検討を加えた。健康人血清ペルオキシダーゼ反応陽性度は著者の方法によると 0.3 γ から 2.2 γ/cc の間に存在していた。血清カタラーゼ値については古くから研究があり、また現在膀胱機能検査の一つとしても応用¹⁸⁾されているが、血清ペルオキシダーゼ反応の問題についてはほとんど報告がない。本報告で行なつた血清ペルオキシダーゼ反応陽性物質については血清中の Catechol を酸化する酵素および鉄成分等も関係していることが考えられるから、なおまだ真のペルオキシダーゼ値とはいえない。また各疾患時における血清ペルオキシダーゼ反応陽性度についても、さらに検討中である。本研究で行なつた血清ペルオキシダーゼ反応陽性度と血中 I N H 濃度との関係をみると、血中 I N H 濃度の高いもの数例には、血清ペルオキシダーゼ反応陽性度が低いものも認められたが、血中 I N H 濃度の低い例では、血清ペルオキシダーゼ反応陽性度の高いものも低いものもあり、明らかな関係は認めえなかつた。

以上 I N H の非活性化の問題について、試験管内、および生体内にて活性 I N H がペルオキシダーゼによつて受ける変化について考察を加えたが、I N H 代謝とペルオキシダーゼ活性の問題、とくに生体内の活性 I N H の変化については今後なお多く検討される必要が残されていると思う。

結 語

ペルオキシダーゼによる I N H の非活性化について実験を行なつた。

1) 試験管内実験において I N H はペルオキシダーゼ、ヘミンによつて非活性化され、カタラーゼによつては非活性化されなかつた。

2) 各種微生物 34 株を I N H 含有液体培地に培養して、培養液中の I N H 分解能を調べたが、ペルオキシダーゼ陽性株、陰性株とも I N H 分解能をもつている株を認めることができなかった。

3) 肺結核患者 33 名について I N H を体重 pro kilo 5 mg 経口投与 4 時間後の血清中 I N H 濃度と

血清ペルオキシダーゼ反応との関係について調べたが、一定の関係は認めなかつた。

稿を終るにのぞみ、御指導、御校閲を賜つた恩師平井金三郎教授に深謝いたします。

文 献

- 1) Tirunaryanan, 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) Tirunaryanan, M.O., & Vischer, W.A. : Nature, 183 (No. 4662) : 681, 1959.
- 4) 友田恒典 : 結核, 33 : 674, 841, 昭33.
- 5) 友田恒典 : 大阪医科大学雑誌, 19 : 252, 昭34 ; 19 : 500, 昭35.
- 6) 友田恒典他 : 呼吸器診療, 15 : 367, 昭35.
- 7) Schmiedel, A. : Beitr. Klin. Tbk., 119 : 206, 1958.
- 8) Sasaki, T. : Biochem. Ztschr., 59 : 432, 1914.
- 9) Fischer, M.W. : Am. Rev. Tuberc., 69 : 469, 1954.
- 10) Fischer, M.W. : Am. Rev. Tuberc., 69 : 797, 1954.
- 11) Barry, V.C., et al. : Am. Rev. Tuberc., 71 : 785, 1955.
- 12) Knox, R., et al. : Nature, 175 (No. 4468) : 1085, 1955.
- 13) Youmans, A.S., & Youmans, G.P. : Am. Rev. Tuberc., 72 : 196, 1955.
- 14) Youmans, A.S., & Youmans, G.P. : Am. Rev. Resp. Dis., 81 : 929, 1960.
- 15) 貝田勝美他 : 結核, 33 (増刊号) : 259, 昭33.
- 16) 五味二郎他 : 結核研究の進歩, 24 : 94, 昭34.
- 17) 金井次郎他 : 結核, 34 : 520, 昭34.
- 18) 築山義雄 : 日本臨床, 17 : 249, 昭34.
- 19) 沖中重雄他 : 結核, 36 : 27, 昭 36.