



Title	イソニコチン酸ヒドラチド耐性結核菌のカタラーゼ活性に関する研究
Author(s)	横井, 正照
Citation	大阪大学, 1962, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/28395">https://hdl.handle.net/11094/28395</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

## 【36】

氏名・(本籍)	横井正照
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 305 号
学位授与の日付	昭和 37 年 3 月 26 日
学位授与の要件	医学研究科 病理系 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	イソニコチニ酸ヒドラチド耐性結核菌のカタラーゼ活性 に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 堀三津夫 (副査) 教授 天野恒久 教授 川俣順一

## 論文内容の要旨

## 〔研究目的〕

INH 耐性結核菌では、そのカタラーゼ活性（以下「カ」活性と略記）が低下または消失していることが一般的に認められている。Fisher は結核菌の INH による増殖阻害が Hemin により拮抗されることを、Fisher, Cohn ら、Knox らは INH 耐性結核菌の増殖が Hemin あるいは牛肝カタラーゼの添加によって促進されることを、また Goto らは INH 耐性菌にある種のポルフィリン（以下「ポ」と略記）が減少していることを認めており、Fisher は INH が結核菌の「ポ」代謝を阻害し、INH 耐性菌では「ポ」代謝に劇害があるのでなかろうかと推論している。他方、畠山および戸井田らは、2, 3 の抗酸菌を用いて培養条件によってこれらの菌の INH 耐性株と感性株の間に含有される「ポ」の量および質に著差のないことを確め、また Andrejew らは、カタラーゼ、およびペルオキシラーゼを欠除した INH 耐性結核菌が感性菌と同様にチトクローム a, b, c, を有し、またチトクロームオキシダーゼ活性を示すことを報告している。したがって INH 耐性結核菌のカタラーゼ障害は必ずしも菌の「ポ」代謝障害に起因するとは考え難いので、この点を明らかにしようとして以下の研究を行なった。

## 〔研究方法〕

- 1)  $\delta$ -Aminolevulinic acid ( $\delta$ -ALA) を基質とする「ポ」の生成の検討：「カ」活性陽性の INH 感性結核菌および「カ」活性陰性の INH 耐性結核菌にそれぞれ  $\delta$ -ALA を反応させた後菌の「ポ」含量を測定し、生成物を汎紙クロマトグラフィーで検討するとともにこの菌の「カ」活性を測定した。
- 2) INH 耐性結核菌の「カ」活性賦活におよぼす Hemin の影響の検討：INH 耐性結核菌にアポカタラーゼが存在するとの仮定のもとに、Jensen の *Micrococcus l* 変異株の Hemin 添加によるカタラーゼ生合成に関する研究および Beljanski らの *E. coli* l 変異株の抽出液の Hemin 添加によるカタラーゼの生合成に関する研究に準じて検討を行なった。

3) 種々の条件下におけるミコバクテリヤの「カ」活性増強の検討：実験 1), 2) の結果から INH 感性ミコバクテリヤ [Mycobacterium "Takeo" (MT)] の洗滌菌を用いて「カ」活性の増強条件を検索した後、INH 感性および耐性結核菌についてカタラーゼの形成能を検討した。

〔実験成績〕

- 1)  $\delta$ -ALA を基質とする「ポ」の生成：INH 感性および耐性 BCG をグリセリン肉汁培地にそれぞれ 2 週間培養し、菌膜を無菌的に洗滌した後  $5\mu\text{mole}/\text{ml}$  の  $\delta$ -ALA 溶液 (磷酸緩衝液, PH 7.0, M/50) を菌膜下に注入し 24, 48, 72 時間毎に集菌して菌体中「ポ」量を早野、戸井田らの方法により測定したのに、両菌株とも経時的な「ポ」量の増加を示し、72 時間測定時には菌体中に 0 時間の約 10 倍の「ポ」量が蓄積されていることを認め、またこれらの菌の「カ」活性を Warburg 検圧法で測定したのに、感性菌に著明な「カ」活性の増強を証明しえず、また耐性菌に「カ」活性の出現を認めることはできなかった。さらに両菌株から抽出した「ポ」を Nicholas らの方法に準じてペーパークロマトグラフィーを行ったのに、その大部分は Coproporphyrin であり、他に 2, 3 の Rf 値の小さい赤色蛍光斑を認めたが、感性菌、耐性菌の間に質的な相異を認めることはできなかった。また INH 感性および耐性人型結核菌 H37Rv 株の洗滌菌による ALA を基質とする「ポ」形成についても両株間に著差を認めず、またこの条件での「ポ」形成は INH によって阻害されなかった。
- 2) INH 耐性結核菌の「カ」活性賦活におよぼす Hemin の影響：Warburg 容器中で INH 耐性 BCC (15 mg/ml), Hemin (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), CoA (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を磷酸緩衝液 (PH 7.0 M/50) 2 ml 中に混じ 37°C で振盪した後、菌の「カ」活性を測定したのに、4 時間の振盪後にも「カ」活性は認められなかった。また INH 耐性 BCG を Potter-Elvehjem 型ホモヂナイザーで磨碎した後、Hemin と CoA を添加して同様な実験を行ったが、感性 BCG 磨碎菌液の示す「カ」活性を超える「カ」活性は測定されず、この条件では INH 耐性 BCG の「カ」活性の賦活は認められなかった。
- 3) 種々の条件下におけるミコバクテリヤの「カ」活性の増強：INH 耐性結核菌の「カ」活性が菌になんらかの処置をほどこすことによって増強しうるか否かを探索するためにまずははじめに MT について「カ」活性の増強条件を探究し、その結果を他のミコバクテリヤに試み次の結果を得た。
  - イ) MT を磷酸緩衝液中で好気的に振盪するとその「カ」活性は増強する。
  - ロ) MT の洗滌菌の「カ」活性の増強は  $\delta$ -ALA,  $\gamma$ -Aminobutyric acid ( $\gamma$ -ABA), その他一群のアミノ化合物, Hemin, Yeast extract などとともに好気的条件下で振盪すること (前処置) によって促進され、他の一群のアミノ化合物 DL- $\alpha$ -Amino-butyric acid ( $\alpha$ -ABA), L-Cysteine, L-Cystine などは「カ」活性の増強に、または「カ」活性に阻害的に作用する。しかし MT の「カ」活性の増強に促進的に作用した  $\delta$ -ALA および  $\gamma$ -ABA は同菌の Benzoic acid 酸化酵素の適応形成にも促進的に作用し、「カ」活性の増強に阻害的に作用した  $\alpha$ -ABA は Benzoic acid 酸化酵素の適応形成にも阻害的に作用することが確かめられたので、これらのアミノ化合物が MT の「カ」活性増強におよぼす影響はカタラーゼの形成にのみ特異的とは考えられない。
  - ハ) 無核酸条件で前処置を行った場合には菌の「カ」活性の増強は全く認められない。
  - ニ)  $\delta$ -ALA,  $\gamma$ -ABA, yeast extract 混液の前処置による菌の「カ」活性の増強は Streptomycin (SM),

Chloramphenicol(CM) により阻止され、また 8-Azaguanine の阻害をうける。 Hemin 前処置による「カ」活性の増強も SM によって阻止される。

- ホ)  $\delta$ -ALA, Yeast extract を混じて前処置を行うことによって増強されたMTの「カ」活性は非前処置菌の「カ」活性と全く同様に種々のカタラーゼ阻害剤の影響をうける。
- ヘ) 以上のロ), ハ), ニ), ホ), の結果は前処置による MTの「カ」活性の増強は菌によるカタラーゼの生合成に起因することを示している。
- ト) MT の INH 耐性株は「カ」活性を保持しており、好適条件でカタラーゼを適応的にさらに形成する。
- チ) *Mycobacterium*607, *Mycobacterium Phlei* の洗滌菌も  $\delta$ -ALA,  $\gamma$ -ABA, yeast extract, クエン酸鉄アンモニ混液で前処置を行うと著明な「カ」活性の増強を示すが、BCG, H37Rv 株については同様条件で感性菌の「カ」活性の増強、あるいは耐性菌の「カ」活性の出現を認めえず、また上記混液との前処置時間を 36 時間に延長しても感性菌の著明な「カ」活性の増強、耐性菌の「カ」活性の出現を認めることはできなかった。

#### 〔総括〕

- 1) INH 耐性結核菌の「カ」活性の消失または減弱は一般にその「ポ」代謝の障害にもとづくと考えられているが、著者は「カ」活性陰性の INH 耐性結核菌が  $\delta$ -ALA を基質として「ポ」を形成し、しかもこの形成は INH によって阻害されないことを見出した。このようにしてえられた「ポ」は INH 感性結核菌あるいは  $\delta$ -ALA で処置した感性菌から抽出された「ポ」と質的に差異はなく、「ポ」含量の顕著に増加した INH 耐性菌にも「カ」活性の出現は認められなかった。さらに著者らもまた、INH 耐性 BCG にも感性 BCG と同様にチトクローム a, b, c が存在することを確かめた。これらの成績は INH 耐性結核菌の「カ」活性の消失をその「ポ」代謝の障害のみで説明することがきわめて困難であることを示している。
- 2) Jensen はアポカタラーゼをもつ *Micrococcus* の 1 変異株を Hemin と CoA とで処置すると「カ」活性が増強することから CoA がアポロカタラーゼと Hemin の結合を触媒するとしており、また Beljanski らはアポカタラーゼをもつ *E. Coli* の 1 変異株の抽出液に Hemin を添加するとカタラーゼが形成されることを報告しているので、著者は INH 耐性 BCG の洗滌菌およびその磨碎菌を用いて同様な実験を行ったが「カ」活性の出現を認めることはできなかった。さらにまた INH 耐性菌の磨碎菌浮遊液に「カ」活性をもつ感性菌の磨碎菌浮遊液を加え、これに Hemin、または Hemin と CoA を添加して反応させたが、この場合にもカタラーゼが合成された証左をうることができなかった。これらの成績は INH 耐性結核菌のカタラーゼの欠損が Protohemin とアポカタラーゼの結合の障害に基くとは考え難いことを示している。
- 3) 主として MT を用いて、この洗滌菌によるカタラーゼの生合成について検討を行い、次の結果を得た。  
I) 洗滌菌を適当な条件で処置することにより菌の「カ」活性は増強する。ことに  $\delta$ -ALA,  $\gamma$ -ABA の存在下に好適的に振盪して前処置を行った菌の「カ」活性は著しく増強されるが、これらのアミノ化合物の影響はカタラーゼの形成にのみ特異的であるとはいえない。

Ⅱ) 前処置による洗滌菌の「カ」活性の増強は無酸素条件では全く認められず CM, SM, 8-Azaguanine によって阻害され、前処置によって増強した菌の「カ」活性は非前処置菌のそれと全く同様なカタラーゼ阻害剤の作用をうける。これらの成績は前処置による菌の「カ」活性の増強がカタラーゼの適応形成に起因していることを示している。

Ⅲ) MT についてえられた「カ」活性増強の条件は *Mycobact. Takeo* の INH 耐性株, *Mycobact. 607*, *Mycobact. Phlei* に対してもよく適合する。しかし BCG, H37Rv 株を用いた場合には同様な条件下でも「カ」活性の増強を確認しえず、また両菌株のINH耐性株を用いた場合には「カ」活性の増強は全く認めることができなかった。この原因については全く不明であり、その解明はなお今後の検討にまたねばならない。

4) 以上 3 つの実験成績から、INH 耐性結核菌の「カ」活性の欠除は菌のポルフィリン代謝の障害にもとづくとするよりは、むしろアポカタラーゼのなんらかの障害に起因すると考えたい。

### 論文の審査結果の要旨

イソニコチニン酸ヒドラチド (INH) 耐性結核菌の特徴ある性質の一つとして菌のカタラーゼ「カ」活性が低下または消失していることがあげられる、しかしその機構はなおほとんど究明されておらず、Fisher は INH 耐性結核菌の「カ」活性の欠除はそのポルフィリン「ポ」代謝の障害に起因すると推論し、Knox Cohn et al., Goto & Katsunuma, らの成績もこれを支持しているが、他方竹尾結核研究部の畠山、また戸井田ら、Andrejew et al., らの成績は上記の仮説に疑問をあたえるものであり、著者はこの問題の解明に資する目的で、

(1) 結核菌の「ポ」形成と「カ」活性の関係、(2) Hemin とアポカタラーゼの結合、(3) 抗酸菌の「カ」の形成条件、などについて研究をおこない以下の成績をえている。1) 「カ」活性陰性の INH 耐性結核菌でも「カ」活性陽性の感性菌と同様に  $\delta$ -aminoleuulinic acid ( $\delta$ -ALA) から「ポ」を形成し、形成された「ポ」は感性菌と耐性菌との間に質的および量的な差異は認められず、またこのような実験条件で多量の「ポ」を形成したINH 耐性結核菌でも「カ」活性の出現は認められない。なおINH感性および耐性 BCG の顆粒成分にはともにチトクローム a, b, c が証明される。

2) Jensen, Beljanski & Belganski の実験に準じて、「カ」活性陰性の INH 耐性結核菌、またはその磨碎菌に hemin, hemin と CoA, あるいはこれらと「カ」の合成能を有する感性菌の磨碎液を添加して耐性菌の「カ」活性の出現を検討したが、「カ」の生成は認められない。

3) 1), 2) の成績から INH 耐性結核菌の「カ」活性の欠除の主因はむしろアポカタラーゼ障害であろうとの仮定のもとに、主として *Mycobacterium "Takeo"* (MT) の洗滌菌を用いて、「カ」活性増強の好適条件を検索し、以下の成績をえた。

イ) MT の洗滌菌を磷酸緩衝液中で 37°C に好気的に振盪すると、その「カ」活性は増強する。

ロ) MT の洗滌菌の「カ」活性の増強は 1 群のアミノ化合物、ことに  $\delta$ -ALA,  $\gamma$ -aminobutyric acid ( $\gamma$ -ABA), yeast extractなどを菌液に添加して好気的条件下で振盪すること（前処置）によって促進され、また Cysteine,  $\alpha$ -aminobutyric acid など 1 群のアミノ化合物は菌の「カ」作用阻害ないしは「カ」

活性の増強に阻害的に作用する。しかし、 $\delta$ -ALA,  $\gamma$ -ABA などの効果は特異的ではなく、MT 洗滌菌の安息香酸酸化酵素の適応形成にも促進的に作用する。

- ハ) 無酸素条件で前処置を行う場合には MT 洗滌菌の「カ」活性の増強は全く認められない。
  - ニ) 好適条件下での MT 洗滌菌の「カ」活性の増強は Streptomycin, Chloramphenicol により阻止され、また 8-Azaguanine の阻害をうける。
    - ホ) 前処置によって増強された MT 洗滌菌の「カ」活性は非前処置菌の「カ」活性と全く同様に種々の「カ」阻害剤の影響をうける。
    - ヘ) *Mycobacterium 607*, *Mycobacterium phlei* の洗滌菌も好適条件で前処置を行うと「カ」を形成するが、BCG, 人型結核菌 H37Rv 株についてはこれを確認しえない。また H37Rv 株および BCG の INH 耐性株は種々の条件下でも「カ」活性の増強は認められない。
- 以上の成績から、著者は *Mycobact. Takeo*, *Mycobact. phlei*, *Mycobact. 607* ではその「カ」のすくなくとも 1 部は好適条件で適応的に形成されるが、BCG, 人型結核菌ではこれがみられず、INH 耐性結核菌の「カ」活性の欠除はその「ポ」代謝の障害にもとづくとするよりはむしろそのアポカタラーゼになんらかの障害があると結論している。

著者のこの研究は INH 耐性菌の「カ」障害についてひとつの新し見解とその証左を提供したものであり、ひいては結核菌に対する INH の作用機作、ならびに INH 耐性菌の毒力の低下についての今後の研究に資するところがきわめて大きいと考える。