

ニコチンアミダーゼによる牛型結核菌の新鑑別法

I Cell-free extract のニコチンアミダーゼ

今野 淳・長山 英男

東北大学抗酸菌病研究所 (指導 岡捨己教授)

受付 昭和 34 年 11 月 14 日

牛型結核菌は従来培養基上の性質と動物実験により他の抗酸菌と鑑別されてきた。すなわち人型結核菌との鑑別ではグリセリンを含む結核菌用培地では牛型結核菌は劣性 (Dysgonic) に発育しコロニーが小さく発育が悪いが、人型結核菌は優性 (Eugonic) に発育しコロニーも大きい。また動物に対する病原性では牛型結核菌は海猿にも兎にも病原性が強いが人型菌は兎には弱い。しかし人型菌にも I NH 耐性菌のように Dysgonic に発育するものもあり、また牛型菌でも BCG のように Eugonic に発育しかつ毒性の弱いものもある。

日本では牛型菌による感染が非常に少なく¹⁾ あまり問題とならないが、ヨーロッパでは多く、ドイツ、イギリスなどではいまだに多くの牛型結核菌の感染がみられる。最近の発表²⁾ においてもドイツでは 441 人の結核患者中に 4.5% 牛型結核菌感染を見出だしている。牛型菌を他の抗酸菌から鑑別することは細菌学上重要であるのみでなく、公衆衛生学上も重要な問題である。

今野^{3) 4)} および Konno, Kurzmann and Bird^{5) 6)} は人型結核菌をそのニコチン酸産生を利用して生化学的に他の抗酸菌から鑑別する Niacin-test を発表しているが、抗酸菌のうち牛型結核菌に特異性のある生化学的反応はいまだに見発されていない。

Halpern and Grossowicz⁷⁾ は BCG および *M. phlei* の菌抽出液を用いてグルタミン、アスパラギン、ナイアシンアミドなどを基質として、その Amidase 作用を測定しているが *M. phlei* のニコチンアミダーゼが BCG のそれよりも強いことを認め、Bönicke and Lisboa^{8) 9)} は人型結核菌と牛型結核菌の Emulsion を使用してそのニコチンアミダーゼを比較している。

われわれは種々の抗酸菌の無細胞抽出液を用いそのニコチンアミダーゼ作用を測定し、牛型結核菌がとくにその酵素作用が弱いことを観察した。

方 法

1) 使用菌株

人型菌 7 株 (毒力菌 3 株, I NH 耐性菌 1 株, 弱毒菌 3 株), 牛型菌 8 株 (毒力菌 4 株, I NH 耐性菌 1 株, 弱毒菌 3 株), 鳥型菌 2 株, 非定型抗酸菌 4 株

(この非定型抗酸菌はいずれも光発色性菌 photochromogen¹⁰⁾ で人間に肺疾患を起し、かつその喀痰より続けて培養され、また切除肺よりも同じ菌が培養され、人間に病原性ありとされたものである。Dr. Ernest Runyon, Veterans Administration Hospital, Salt Lake City, Utah, U.S.A. より供与) および非病原抗酸菌 6 株を使用した。

これらの抗酸菌をソートン合成液体培地に表面培養し 3 週後 (非病原抗酸菌は 1 週後), 菌を濾紙にて濾して蒸留水でよく洗滌して用いた。

2) 無細胞抽出液の調整

水でよく洗滌した菌約 10 g を乳鉢に入れ、ほぼ等量 of 海砂とともに機械磨砕を 30 分間行なつて十分 Paste 状にする。そのさい固形炭酸ガスをときどき加えて菌を冷やす。次に冷蒸留水約 50 ml を加えてよく懸濁し、超遠心器にて冷やしたまま 10,000 g で 40 分間遠心沈澱を行なう。

得られる無細胞抽出液はアンモニアを除くため 6°C で 1 夜蒸留水にて透析する。これを酵素液として使用するが、Biuret 法により¹¹⁾ 蛋白の定量を行ない、蛋白量 2 mg を用いる。

3) ニコチンアミダーゼの定量法

菌抽出液蛋白量 2 mg にニコチンアミド 10 μ M を含む磷酸緩衝液 (pH 7.0) 1 ml を加える。37°C にて恒温槽で 3 時間反応させる。Control としては菌抽出液と磷酸緩衝液のみを用いる。ニコチンアミドより生じたアンモニアは Folin の方法により 50°C にて N/50 H₂SO₄ 10 ml の中に蒸留し Nessler 液を加えて、日立分光光度計を用い波長 425 m μ でアンモニアの定量を行なう。

アスパラギナーゼの定量は基質を L-アスパラギンにして上と同一条件で測定した。

4) pH によるニコチンアミダーゼ活性の変化

pH 5.0 より 10.0 までの緩衝液を用いた。pH 5.0 はクエン酸ソーダおよび塩酸による緩衝液, pH 6.0 より 8.0 までは磷酸塩緩衝液, pH 9.0 および 10.0 は硼酸-苛性ソーダ緩衝液を用い、ニコチンアミダーゼ活性を測定した。

5) 熱に対するニコチンアミダーゼの抵抗性

これらの抗酸菌の無細胞酵素液を 60°C 15 分間および 100°C 15 分間水浴上にて加熱することによりニコチンアミダーゼ活性の変化をみた。

6) 保存に対するニコチンアミダーゼの安定性

菌抽出液を -20°C にて 2 カ月間保存したのち、そのニコチンアミダーゼ活性を新鮮抽出液のときの活性と比較した。

7) ニコチンアミダーゼの定性法

ニコチンアミダーゼの定量は鑑別の目的のためには複雑すぎるので簡便な定性法を試みた。ソートン合成液体培地に表面培養した抗酸菌約 1 g をネスレル陰性になるまで水で洗ったのち同量の海砂とともに 20 分間乳鉢でよく磨砕する。10 ml の蒸溜水を加え 3,000 r. p. m. で 30 分間遠心する。その上清を酵素液として用いる。その 1 ml にニコチンアミド 1 μM を含む pH 7.0 の磷酸緩衝液 1 ml を加え 37°C に 6 時間放置する。Control としては前と同じく菌抽出液と磷酸緩衝液とのみを用いる。3 時間後 Nessler 試薬 0.5 ml を加えその色調の変化をただちに判定する。

8) アンモニアの定性、定量には Russel のインドフェノール法¹²⁾を用いてもよい。

結 果

1) ニコチンアミダーゼに対する pH の影響 (表1, 図1)

H₃₇Ra, BCG, p-8 および M.607 について pH を 5.0 より 10.0 に変えてそれぞれの pH におけるニコチンアミダーゼ活性を測定したが、H₃₇Ra, p-8 および M.607 は pH 6.0~9.0 の広い領域にわたって活性を示した。至適 pH は 7.0~8.0 で両者の間にはほとんど差をみない。BCG のみはいずれの pH においてもニコチンアミダーゼ活性はほとんどみられなかった。

2) ニコチンアミダーゼに対する加熱の影響 (表2)

抗酸菌の無細胞抽出液を 60°C 15 分間加熱すると H₃₇Ra および M.607 のニコチンアミダーゼはそれぞれ

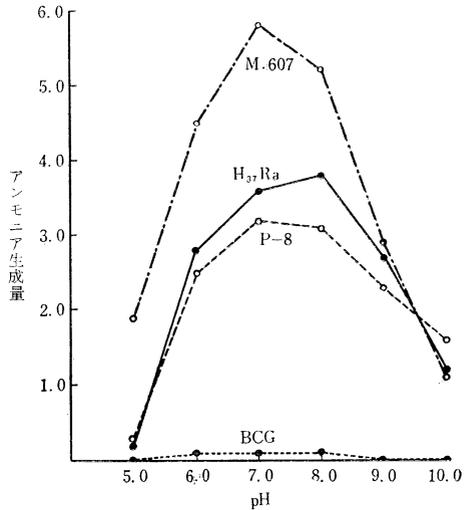
表1 抗酸菌のニコチンアミダーゼ活性に対する pH の影響

(基質: Nicotinamide 10 μmole)
(Incubation: 37°C 3 hr.)

	株	pH					
		5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0
アンモニア生成量	H ₃₇ Ra	0.2	2.8	3.6	3.8	2.7	1.2
	BCG (Japan)	0	0.1	0.1	0.1	0	0
	p-8	0.3	2.5	3.2	3.1	2.3	1.6
	M.607	1.9	4.5	5.8	5.2	2.9	1.1

図1 抗酸菌のニコチンアミダーゼに対する pH の影響

(Nicotinamide 10 μmole)



れ対照と比べて、16% しか活性を示さない。また 100°C 15 分ではほとんど全部酵素活性が破壊されることを示している。

表2 抗酸菌のニコチンアミダーゼ活性に対する加熱の影響

(基質: Nicotinamide 10 μmoles)
pH 7.0

株		60°C 15 min.	100°C 15 min.	対 照
H ₃₇ Ra	NH ₃ formed (μmole)	0.6 (16.2%)	0.1 (2.7%)	3.7 (100%)
M.607		1.1 (16.1%)	0.2 (2.9%)	6.8 (100%)

3) ニコチンアミダーゼの保存に対する安定性 (表3)

新鮮な抽出液のニコチンアミダーゼ活性を測定し、次にそれを 2 カ月間 -20°C に冷蔵保存しておき、そのニコチンアミダーゼ活性を新鮮時の活性と比較した。H₃₇Ra は 2 カ月後 70% の活性を示し p-8 は 85% の活性を示し、ニコチンアミダーゼ活性は -20°C に保存しておけばほぼ安定であることを示している。

4) 種々抗酸菌の無細胞抽出液のニコチンアミダーゼ活性 (表4, 図2)

種々の抗酸菌 27 株のニコチンアミダーゼを 10 μM のニコチンアミドを加えて測定した。人型結核菌 7 株は 3.2~4.4 μM のアンモニアを生成した。このアンモニア生成は菌の毒力または INH の耐性には関係がなく、毒力菌 H₃₇Rv, 無毒菌 H₃₇Ra も、また H₃₇Rv INH-R 菌もほとんど同じニコチンアミダーゼ活性を示した。牛型結核菌 8 株はいずれもニコチンアミダー

表3 抗酸菌のニコチンアミダーゼに対する保存期間の影響

(基質: Nicotinamide $10 \mu \text{mole}$ 37°C 3 hr.)

株	新鮮抽出液 NH ₃ (μmole)	2ヵ月保存液 NH ₃ (μmole)
H ₃₇ Ra	3.7 (100%)	2.6 (70.3%)
p-8	3.3 (100%)	2.4 (84.8%)

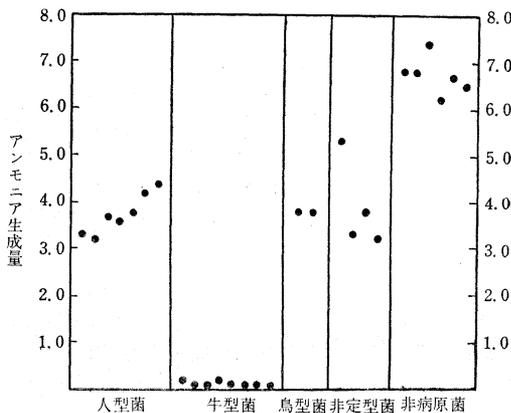
ゼ活性がほとんどなく、毒力菌 Vallée, Ravenel, 弱毒菌 BCG および INH耐性の Ravenel, INH-R などいずれもわずかに 0.1 ~ 0.2 μM のアンモニアを生成したにすぎなかつた。

鳥型結核菌 2 株はいずれも 3.8 μM のアンモニアを生成した。病原性非定型抗酸菌 4 株は 3.2 ~ 5.3 μM のアンモニアを生成した。非病原性抗酸菌の 6 株ニコチンアミダーゼはいずれも強く 6.2 ~ 7.4 μM のアンモニアを生成した。これは牛型菌の 60 倍以上、人型菌、鳥型菌、非定型抗酸菌の約 2 倍のニコチンアミダーゼ活性である。

5) ニコチンアミダーゼの定性による牛型菌の鑑別法 (表4)

抗酸菌を海砂とともに 磨碎し 3,000 r. p. m. で遠心沈澱したのち、上清 1 ml に 1 μM のニコチンアミドを加え 37°C 6 時間 Incubate した。それに Nessler 試薬を 0.5 ml 加えると人型菌、鳥型菌、非定型抗酸菌はただちに黄色 (+) に変化する。非病原抗酸菌は黄橙色ないし橙色 (++) に変化する。これに対し牛型菌のみは色に変化しない。この Nessler 試薬による反応は試薬添加後ただちに判定しなければならぬ。時間がたつと牛型菌でも黄色に変化してくる。

図2 抗酸菌抽出液のニコチンアミダーゼ活性 (Nicotinamide 10 μmole)



Russel のインドフェノール法¹⁾によつてアンモニアを定性しても牛型菌は反応しない。

6) 抗酸菌の無細胞抽出液のアスパラギナーゼ (表5)

H₃₇Ra, BCG および M. 607 の 3 株のアスパラギナーゼをみるとアスパラギン 10 μM を基質とした場合 H₃₇Ra は 7.6 μM , BCG は 7.2 μM , M. 607 はやや多く 8.2 μM のアンモニアを生成する。人型菌と牛型菌の間にはアスパラギナーゼ活性の差は全然認められなかつた。

考 案

抗酸菌の無細胞抽出液のニコチンアミダーゼは比較的広い領域の pH にわたつて活性があり、pH 6.0 ~ 9.0 において相当の活性が認められたが、もつとも活性の強かつたのは pH 7.0 および 8.0 であつた。ただし BCG はいずれの pH においてもニコチンアミダーゼの活性は認められなかつた。

Oka²⁾ は yeast extract のニコチンアミダーゼについて pH 5.0 から 9.0 までの間に活性があるが、pH 7.0 が至適であるといつている。われわれのものは抗酸菌の extract で菌は異なるがいずれ広い領域の pH にわたつて活性が認められている。加熱に対しては不安定で 60°C 15 分間の加熱ですでに 85% 以上の活性が失われ 100°C 15 分間ではほとんど完全に失活する。しかし低温の保存に対しては抵抗が強く -20°C 2 ヵ月の保存で 20 ~ 30% しか活性が低下せず低温に保存すれば、大体安定していると思われる。

次にもつとも重要なのは種々の抗酸菌の無細胞抽出液のニコチンアミダーゼ活性の比較であるが、牛型結核菌のみその毒力または INH 耐性に関係なく著しく活性が低く人型菌、鳥型菌、非定型抗酸菌の 1/30 以下であり、また非病原抗酸菌の 1/60 以下であることは注目すべきことである。このニコチンアミダーゼ活性は牛型菌にのみ低く、他の型の菌は毒力に関係なくいずれも高い。それゆえニコチンアミダーゼを測定することにより牛型菌が生化学的に鑑別されることになる。またこのニコチンアミダーゼ活性は菌を海砂とともに乳鉢で磨碎し超遠心せず普通の 3,000 r. p. m. で遠心しその上清を使つてアンモニアの生成を肉眼的に比色し、ニコチンアミダーゼ活性を定性的に測定を行なつても牛型菌は定性的に鑑別できる。このさいアンモニアを蒸溜しないで Nessler 試薬を加えてニコチンアミダーゼ定性を行なうときはただちに判定しなければならぬ。時間がたつと牛型菌でも黄色に発色してくる。Russel の方法ではこのようなことは認められないし、またアンモニアを蒸溜して Nessler 試薬を加えればこのようなことはない。菌を磨碎せず菌の懸濁液を使用して Bönicke⁸⁾ は牛型菌

表4 種々抗酸菌抽出液のニコチンアミダーゼ活性
(pH 7.0 37°C 3 hr.)

型	株	基質 Nicotinamide (μ mole)	アンモニア 生成量 (μ mole)	定性反応	
				Nicotinamide (μ mole)	ネスレル 反応
人型結核菌	H ₃₇ Rv	10	3.3	1	+
	H ₃₇ Rv INH-R	10	3.2	1	+
	H ₃₇ Ra	10	3.7	1	+
	R ₁ Rv	10	3.6	1	+
	Aoyama B	10	3.8	1	+
	H ₂	10	4.2	1	+
	JH16Ra	10	4.4	1	+
牛型結核菌	Vallée	10	0.2	1	-
	Ravenel	10	0.1	1	-
	Ravenel INH-R	10	0.1	1	-
	B-4228-3	10	0.2	1	-
	B-4228-4	10	0.1	1	-
	B C G (Japan)	10	0.1	1	-
	B C G (Copenhagen)	10	0.1	1	-
	B C G (Paris)	10	0.1	1	-
鳥型結核菌	4110	10	3.8	1	+
	4121	10	3.8	1	+
非定型抗酸菌	P-1	10	5.3	1	+
	P-8	10	3.3	1	+
	P-16	10	3.8	1	+
	P-22	10	3.2	1	+
非病原抗酸菌	M. 607	10	6.8	1	+
	M. smegmatis	10	7.4	1	+
	M. ranae	10	6.2	1	+
	Guinea pig I	10	6.7	1	+
	Guinea pig II	10	6.5	1	+
	M. phlei	10	6.8	1	+

- 対照と同じ色 + 黄色反応 ++ 橙色反応

表5 抗酸菌抽出液のアスパラギナーゼ活性
(pH 7.0 37°C 3hr.)

株	基質 (μ mole)	アンモニア生成量 (μ mole)
H ₃₇ Ra	10	7.6
B C G	10	7.2
M. 607	10	8.2

と人型菌のニコチンアミダーゼを比較し両者を鑑別しようとしているが、著者らの経験では菌を磨碎して菌体内酵素を出したほうが処理が煩雑でも結果が確実である。ただしこの方法は感染の危険があるのでできるだけこの危険がないように方法を簡便安全ならしめようと努力している。これらの菌のアスパラギナーゼをニコチンアミ

ダーゼと比較してみると、アスパラギナーゼにおいては人型菌、牛型菌は全く活性が同じであり、非病原抗酸菌はやや活性が強かった。

結 論

ソートン合成液体培地に表面培養した種々の抗酸菌27株を海砂とともに磨碎し、超遠心器で遠心し上清をさらに1夜透析してそれを酵素液としそれにニコチンアミドを加えて、抗酸菌の無細胞抽出液のニコチンアミダーゼ活性を測定した。

1) 抗酸菌のうち、牛型結核菌のみがほとんどニコチンアミダーゼ活性が認められなかったが、牛型菌以外の抗酸菌は活性が高く、人型菌、鳥型菌、非定型抗酸菌は牛型菌の約30倍以上の活性を示し、非病原性抗酸菌は60倍以上の活性を示した。

2) このニコチンアミダーゼ活性は菌の毒力またはINH耐性には関係なく型特異性があり、それゆえこの酵素活性を測定することにより、抗酸菌のうち、牛型結核菌は生化学的に鑑別できる。

3) またこのニコチンアミダーゼ活性は、普通の遠心器を使用してその上清にニコチンアミドを加えてNessler法またはRusselのインドフェノール法による発色を肉眼的に判定することによつても、定性が可能で牛型菌のみ陰性であるが、他の抗酸菌は陽性の結果を示し定性的にも鑑別可能である。

4) 抗酸菌のニコチンアミダーゼはpH 6.0~9.0にわたつて活性を示し、至適pHは7.0~8.0である。また加熱に対しては不安定であるが、低温保存には安定性を示す。

5) 抗酸菌のアスパラギナーゼには牛型菌と他の菌型による差は認められなかつた。

参 考 文 献

- 1) 戸田忠雄：結核菌とBCG, 220, 南山堂, 昭24.
- 2) Urech, von E. : Die Rolle des Typus bovinus und der Eintrittspforte des Tuberkelbakteriums bei des menschlichen Tuberkulose, Tbk. arzt, 11 : 733, 1957.
- 3) 今野淳：抗酸性菌における人型結核菌の鑑別法 (1), (2), 日結 : 17 : 432, 503, 昭33.
- 4) 今野淳：ナイアシンテスト, 結核研究の進歩, 26 : 73, 昭34.
- 5) Konno, K. : New chemical method to differentiate human-type tubercle bacilli from other mycobacteria, Science, 124 : 985, 1956.
- 6) Konno, K., Kurzmann, R., Bird, K.T. & Sbarra, A. : Differentiation of human tubercle bacilli from atypical acid-fast bacilli, I, II, Am. Rev. Tuberc., 77 : 669, 675, 1958 ; III. Am. Rev. Tuberc., 79 : 810, 1959.
- 7) Halpern, Y.S. & Grossowicz, N. : Hydrolysis of amides by extracts from mycobacteria, Biochem. J., 65 : 716, 1957.
- 8) Bönicke, R. & Lisboa, B.P. : Typendifferenzierung der Tuberkulosebakterien mit Hilfe des Nikotinamidase-Testes, Tbk. arzt, 13 : 377, 1959.
- 9) Bönicke, R. & Lisboa, B.P. : Über das Vorkommen von Acylamidasen in Mykobakterien, Zbl. Bakter., 175 : 403, 1959.
- 10) Runyon, E.H. : Veterans Administration National Tuberculosis Association Cooperative study on mycobacteria (correspondence), Am. Rev. Tuberc., 72 : 866, 1955.
- 11) Mehl, J.W. : The biuret reaction of proteins in the presence of ethylene glycol, J. Biol. Chem., 157 : 173, 1945.
- 12) Russel, J.A. : The colorimetric estimation of small amounts of ammonia by the phenol-hypochlorite reaction, J. Biol. Chem., 156 : 457, 1944.
- 13) Oka, Y. : Studies on hydrolytic enzyme of nicotinamide, J. Biochem., 41 : 89, 1954.