

抗酸菌の酸性 phosphatase 活性について

金 井 興 美

国立予防衛生研究所結核部 (部長 室橋豊穂)

受付 昭和 39 年 1 月 9 日

ACID-PHOSPHATASE ACTIVITY OF MYCOBACTERIA

Koomi KANAI*

(Received for publication January 9, 1964)

Acid-phosphatase activity of various types of mycobacteria was examined using p-nitrophenyl phosphate as substrate, particularly with respect to intensity, optimal pH, and stability to heating.

Test strains of mycobacteria were 8 strains of *M. tuberculosis*, 2 of *M. bovis*, 9 of *M. kansasii* including *M. balnei*, 4 of Schotochromogen, 5 of Nonphotochromogen, 5 of *M. avium*, 2 of *M. fortuitum*, 1 of *M. phlei*, and 1 of *M. smegmatis*. The reaction was conducted in the mixture of 4 ml of 0.1 M of acetate buffer, 0.1 ml of 0.5 % p-nitrophenyl phosphate solution, and 0.5 ml of bacillary suspension. After incubation at 40°C for 1 hour, the reaction was stopped by adding 0.5 ml 1 N NaOH and the color of liberated p-nitrophenol was developed simultaneously. The optical density of the supernatant of this reaction mixture was measured by Coleman spectrophotometer set at 420 m μ with the control tube added with 1 N NaOH at 0 time. From the standard curve, the absolute amount (mcg) of liberated p-nitrophenol was calculated. For the heat-inactivation test, the tube of bacillary suspension was immersed into water bath maintained at designed temperature. After 10, 20 and 30 minutes, a portion of the suspension was pipetted out and its 0.1 ml was put into the tubes where other constituents for the reaction had already been arranged in the optimal pH. Bacillary suspension was prepared mostly from the growth on the slants of Ogawa glycerol egg medium. The amount of bacilli needed for the reaction must be more than 10 mg in semi-dried weight.

For the examination of optimal pH, the reactions with the same amount of bacilli were conducted in 11 different pH ranging from 3.5 to 6.5 (10 acetate buffer solutions and 1 maleic acid buffer solution). Regarding the amount of liberated p-nitrophenol in the tube of the highest reaction intensity as 100, a pH curve of the activity was pictured by dotting % activity in each pH for each type of mycobacteria. They are shown in Fig. 1. Concerning heat-inactivation test the amount of p-nitrophenol liberated by pre-heating bacilli was regarded as 100, and an inactivation curve was pictured by % activity in 10, 20 and 30 minutes for each temperature (Fig. 2 and 3). Basing upon these results, a simplified type-classification table for mycobacteria was presented as a tentative plan as Table 2.

M. tuberculosis and *M. bovis* can be easily separated from other types of mycobacteria by their high activity at pH 6.0 to 6.5, and slight activity at pH 5.0, and no activity at pH 3.5. *M. kansasii* is also easily differentiated from other types by its high activity at any pH and also by its remarkable heat-stability at 70°C and 80°C. Other three types of "atypical myco-

* From Department of Tuberculosis, National Institute of Health, Kamiosaki-Chojamaru, Shinagawa-ku, Tokyo, Japan.

bacteria" (Nonphotochromogen, *M. avium*, and Schotochromogen) are distinct from others in that they have optimal pH in the range from 3.5 to 4.0. However, the classification among these three types is not so easy, and we must take account of the activating phenomenon at 60°C for 10 minutes in *M. avium* and the inactivation at 70°C in *M. avium* and nonphotochromogen. *M. fortuitum* has a particular pH curve which appears like a combination of tendency of *M. phlei* and that of nonphotochromogen, and the activity is perfectly inactivated at 70°C for 10 minutes. *M. phlei* has a high activity in a relatively narrow range of pH level centering on pH 5.0, but it is rather stable against heating at 70°C.

This table should be further made precise and modified by examination of more strains, but it will be of some help to the work of type-classification of mycobacteria in combination with other test methods.

As the collateral findings of this work, the following two facts were made clear; the enzymatic activity of this kind can not express the difference in virulence between H37 Rv and H37 Ra, and this enzyme of H37 Ra is a "particulate enzyme".

著者は最近、結核感染に伴う肝・脾組織の酸性 phosphatase 活性上昇について報告し¹⁾、これは網内系細胞の感染に対する反応表現の一つであると論じた。一方、この実験と前後して、ブドウ球菌での知見を参考として、結核菌の毒力と酸性 phosphatase 活性との関係についても検討を行なった。ことに感染という問題に資するには、H37Rv 株と H37Ra 株との間、あるいは Ravenel 株と BCG 株との間の毒力差が、このような酵素活性によって鑑別されるならば、興味があると考えた。しかし、この方向の試みは成功したとは思えなかつた。

そこで、著者は被検菌株を抗酸菌一般にひろげて反応の強さ、至適 pH、耐熱性についても実験し、そこになんらかの生物学的意義を見出だすべく検討を続けたが、その結果は抗酸菌分類の一助になりうるものと考えられた。この間、同様の研究は占部²⁾、戸田門下³⁾によつても行なわれ、抗酸菌分類の補助手段としてすでに報告された。それぞれ活性測定法において同じではないが、acid phosphomonoesterase 活性度の比較という点で共通である。われわれの知見もここに報告して抗酸菌分類の参考に供したい。

実験材料と方法

供試菌：結核菌としては H37Rv, H37Ra, H37Rv IN-HR, H2, H2 SM-R, H2 SM-D (streptomycin 依存株 18 b), H2 INH-R, H2 CM-R (chloramphenicol 耐性株); 牛型菌として Ravenel 株, BCG 株; *M. kansasii* (photochromogen) として P1, P4, P8, P18, P24, P26, 永井株, 岩泉 71 株, *M. balnei*; Schotochromogen として P6, P19, P34, 石井株; Nonphotochromogen として P39, P41, P47, P55, 121326; *M. avium* として Kirchberg, 4121, 名古屋 59, Flamingo, MC; *M. fortuitum* として 335 と 226; それに *M.*

phlei および *M. smegmatis* を用いた。なお、実験の一部に、H37Ra 株生菌より機械的に分画⁴⁾した細胞壁画分、顆粒画分、可溶成分をも用いた。

活性度測定法：緩衝液として 0.1 規定の酢酸 buffer、基質として 0.5% の p-nitrophenyl phosphate (Na 塩)、酵素液として菌蒸溜水浮游液を用いて反応を行なった。40°C で 1 時間水浴後に、1 規定の NaOH を用いて反応を停止せしめ、遊離した p-nitrophenol を発色せしめた。この遠沈上清を 420 *mu* に set した Coleman 光電比色計で比色定量し、標準曲線より絶対量を換算した。このさい 0 時間で NaOH を加えた試験管を対照とした。反応系は、緩衝液 4.0 ml, 基質 0.1 ml, 菌液 0.5 ml, そして反応停止のための 1 N NaOH は 0.5 ml が基本型であつたが、実験に応じて多少修飾された場合もある。ことに菌体画分を用いた場合には、緩衝液 0.8 ml, 画分浮游液 0.1 ml, 基質 0.1 ml を用い、0.1 N NaOH 4 ml を用いて反応を停止せしめた。

耐熱性試験：このためには、反応施行直前菌蒸溜水浮游液を目標温度に維持された水浴に入れ、一定時間ごとにその一部をピペットで吸出し、すでに用意されている反応系中に加えた。

菌液調製：既述の被検菌株は小川鶏卵培地 (原液に 1% に KH_2PO_4 を含む) に継代保存されているものであり、実際的な応用面をも考慮して、このものより直接に蒸溜水菌浮游液を調製して実験に供した。Schotochromogen, Nonphotochromogen, *M. avium* に属する菌株の大部分は、発育培地上に蒸溜水を加えて振盪するのみでよい菌液がつくれ、これにてよく目的を達したが、他の菌株の場合には、水晶球入り丸コルベンを用いる手振法で菌液とした。後述のごとく、人型結核菌、牛型菌、photochromogen, *M. phlei* 以外は活性度はかなり弱いので、反応に必要な菌量は一般に 10~50 mg であるが、

一方、p-nitrophenol 吸光度の標準曲線の直線部分は比較的せまいので、適当な反応の強さを得るためには2種以上の菌量を用いることがときに必要であつた。また、定量的な比較を行なう場合には、Sauton 合成培地上の発育菌膜を吸湿した状態で計量して用いた。

実験成績

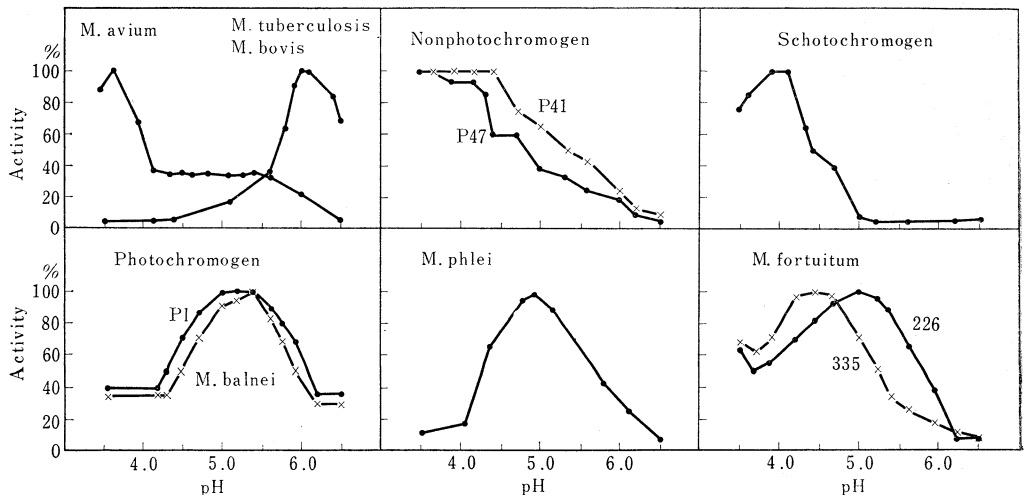
1) 至適 pH についての検討：菌型の分類を酵素活性で行なう場合、量的な基準で行なうよりも、質的な点で鑑別するほうが容易であり、また実際的でもある。この意味で、酸性 phosphatase 活性における至適 pH が菌型ごとに差異があるか否かをまず検討した。pH 3.5 より pH 6.22 にいたる少なくとも10種の0.1 M 酢酸 buffer に、さらに pH 6.5 の0.1 M マレイン酸 buffer を加えて、各 pH における活性をそれぞれ同一菌量を用いて比較した。活性が強すぎて比色定量に不適当であつた場合には、その試験管のみ菌量を減らして再検討し、しかるのち同一菌量による反応値に換算した。最高反応値、すなわち、遊離された p-nitrophenol の mcg 量の最高値を100とした場合の、他の pH における%活性度をもって活性曲線をえがき、Fig. 1 に示した。

この曲線の形を通して各菌型の特徴がある程度とらえられる。ただし、これらの曲線によつて各菌型間の反応の強さを比較することはできない。

以前結核菌の名を冠せられていた *M. bovis*, *M. avium* を、現在の *M. tuberculosis* (人型結核菌) と比較して Fig. 1-a* に示しておるが、*M. tuberculosis* と *M. bovis* は被検10株すべて同一パターンを示し、pH 6.0 近辺に至適域があり、pH 6.5 においても強い反応を示すが、pH 5.0 になれば活性はきわめて弱くなり、抗酸菌中他に類例のない独特なものである。これに反し、

鳥型菌は被検5株とも至適 pH を3.5の近辺にもち、pH 5.0 においては活性はきわめて微弱であり、pH 6.5 においては全く無反応である。この鳥型菌のパターンは Fig. 1-b, Fig. 1-c に示されている Nonphotochromogen, Schotochromogen と同類のものであつて、かつて結核菌の一つと考えられたこの菌型は、むしろ“atypical mycobacteria”の中に入るべきであるという現在の分類法を、上述の所見は支持している。Nonphotochromogen の中には、細部において多少性質の異なるものが入っている観があるが、被検5株は P47 と P41 を両端として、pH 3.5 より pH 6.5 にかけて次第に活性度の落ちるパターンの中におさまつた。Schotochromogen は *M. avium* と Nonphotochromogen の中間的なパターンであるが、このようなパターンの末梢的な差異から、*M. avium*, Nonphotochromogen, Schotochromogen が鑑別できるかという、いまだ検討の余地もあり、さらに菌株をふやして再現性を確認する必要がある。ことに、菌型鑑別の仕事は臨床検査室での実際的要求に応じうるものでなければならないから、*M. tuberculosis* と *M. bovis* は pH 6.0~6.5 で強い反応があり、*M. avium*, Nonphotochromogen, Schotochromogen はそこで反応なく、一方、pH 3.5~4.0 においてはその逆の関係の成立する点のみ重視すべきであろう。しかしいずれにせよ、これら非定型抗酸菌の3菌型は、それらの至適 pH においてすら反応はきわめて弱く、*M. tuberculosis* や *M. bovis* の pH 6.0~6.5 における反応とは比べるべくもない。次に非定型抗酸菌の残り1つである *M. kansasii* (photochromogen) については、Fig. 1-d に *M. balnei* を含めた被検9株の成績を示した。この菌型はかなり特徴の強いものであり、そつて近似の富士山型のパターンをとつた。*M. kan-*

Fig. 1. Optimal pH for Acid-Phosphatase Activity of Mycobacteria



* 上段左より 1-a, 1-b, 1-c, 下段左より 1-d, 1-e, 1-f.

sasii と *M. balnei* の間にも本質的なパターンの相違はみられないので、この両者の鑑別は発育における温度条件によるべきであろう。また逆にいえば、*M. balnei* が本質的には *M. kansasii* に属することが証明されたわけである。またこの菌型は活性度そのものが非常に強く、結核菌並みである。したがって、至適 pH をはなれた pH 3.5~4.0, 6.0~6.5 においてもかなりの反応がみられ、結核菌と非定型抗酸菌の双方の特徴をもつているといえよう。Fig. 1-e は *M. phlei* であり、パターンにおいて *M. kansasii* に似ているが、pH 3.5~4.0, 6.0~6.5 において活性をほとんど示さない点で区別できる。至適 pH 5.0 における反応はかなり強い。Fig. 1-f に示した *M. fortuitum* は、これも多少性質を異にするものの総称である感があるが、No. 335 と No. 226 の 2 株を検討したところ、図に示したごとく多少のずれはあっても、パターンとしては同一であり、Rapid grower として *M. phlei* に似た pH 5.0 を頂点とする富士山型のパターンを示しつつも、pH 4.0 近辺においてなお反応を示し、その強度は Nonphotochromogen, Schotochromogen に匹敵しうるもので、非定型抗酸菌の性質をかねているといえよう。この菌型の分類上の位置に関して示唆する点がある。*M. smegmatis* に関しては再三の試験にもかかわらず、被検株はいかなる pH においても活性を示さなかつた。

2) 耐熱性に関する研究：抗酸菌の酸性 phosphatase に耐熱性のものがあることは、すでに山村ら⁹⁾によつて

報告されているが、それはいまだ抗酸菌の分類が今日ほどすすんでいなかった時代の所見であるので、ここにあらためて検討を行なつた。加熱前の至適 pH における活性度、すなわち既述の条件での遊離 p-nitrophenol 量を 100 とし、加熱後の%をもつて失活曲線をえがき Fig. 2, Fig. 3 に示した。被検温度は 60°C, 70°C, 80°C である。

井上ら⁹⁾も認めたように、耐熱性のもつとも強いのは

Fig. 3. Temperature Activation and Inactivation of Acid-Phosphatase Activity of *M. Avium*

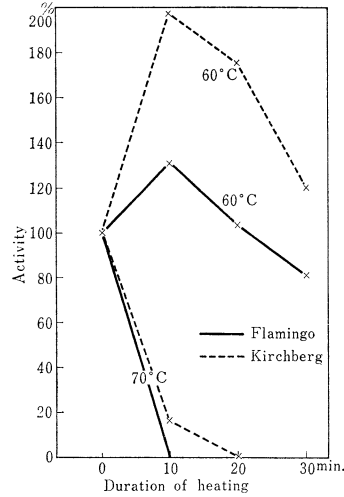
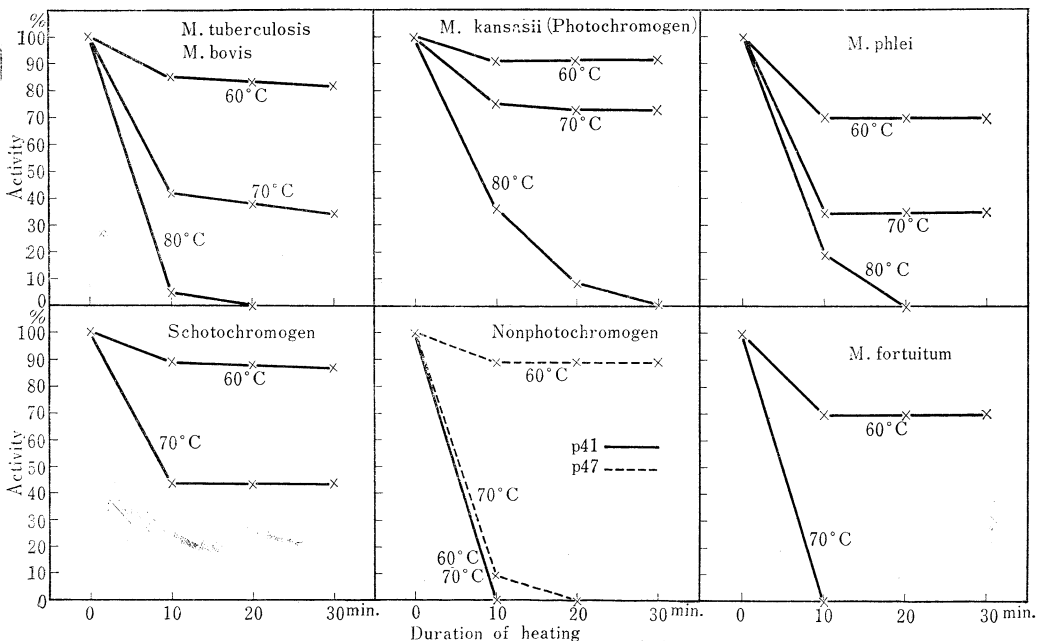


Fig. 2. Temperature Inactivation of Acid Phosphatase Activity of Mycobacteria



M. kansasii (photochromogen) であつて、70°C、30 分の加熱後も活性は 70% ほど残っている。80°C 10 分後も 30~40% の活性を示し、この菌型の大きな特徴である。また、70°C 30 分の加熱によつても、多少なりとも活性の残るのは、*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. phlei*, Schotochromogen であり、*M. avium*, Nonphotochromogen および *M. fortuitum* は完全に失活した。Nonphotochromogen の中には 60°C の加熱によつても完全に失活するものがあつたが、これに関してはさらに被検菌株をふやして検討することが、この菌群の不均一性からみて必要であり、また興味もある。さらに注目すべきは、*M. avium* の被検 5 株のうち MC を残した他 4 株が、60°C 10 分の加熱によつて活性の上昇した現象であり、この点もさらに菌株数を増して、できうれば Nonphotochromogen をも含めてひろく検討する必要がある。また、60°C 以下、たとえば 50°C の加熱によつてこのような活性化現象が起こるかを、他の菌型について行なうことも意義があろう。

3) 毒力との関係、H37Rv 株と H37Ra 株との比較：

Fig. 4. Acid-Phosphatase Activity of Two Strains of Tubercle Bacilli Different in Virulence (H37Rv and H37Ra Grown on Sauton's Liquid Medium)

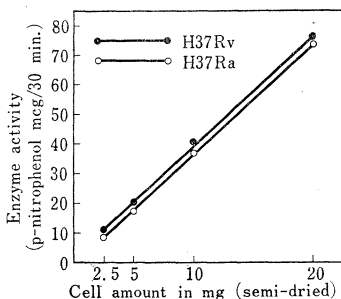


Table 1. Distribution of Acid Phosphatase Activity in the Cellular Components of the Tubercle Bacillus (H37Ra)

Cellular fraction (lyophilized 10 mg)	Acid phosphatase activity (p-nitrophenol) mcg/hr
<i>Particulate material</i>	
Not washed	310
Washed with distilled water	240
Washed with Tween 80 solution	230
<i>Soluble fraction</i>	40
<i>Cell Wall fraction</i>	46

至適 pH から、また耐性からみても、この酵素活性によつて H37Rv と H37Ra とを鑑別することができないので、培養条件を厳密に規定して活性の強さから差異のあるか否かを検討した。Sauton 合成培地上にきわめて近似した膜様発育をなす培養をそれぞれ用意し、その 2 週発育より型のごとく定量的に菌液を調製して反応を施行したが、Fig. 4 に示すごとく、両者の活性はほとんど同じであり、この反応から毒力差を表現することは困難であつた。

4) H37Ra 菌体画分の活性度：H37Ra 株生菌より機械的に分画した顆粒画分、細胞壁画分、可溶成分の凍結乾燥品をそれぞれ 10 mg 用いて反応を施行した。Table 1 の示すごとくこの酵素は“particulate enzyme”であることが証明された。可溶成分、細胞壁画分のもつ弱い活性度は、顆粒画分の混入のためとみるべきであろう。

考 察

現在抗酸菌の生化学的分類法は長足の進歩⁶⁾をとげ、いくつかの手技を組み合わせれば菌型鑑別はそれほど困難な仕事ではなくなつた。著者が酸性 phosphatase 活性を通してみた抗酸菌の菌型も、すでに分類整理されて

Table 2. A Tentative Plan for Type-Classification of Mycobacteria by Acid-Phosphatase Activity

Mycobacteria	Optimal pH	Relative activity at below-indicated pH			Resistance to heating for 10 min. at below-indicated temperature	
		3.5	5.0	6.5	60°C	70°C
<i>M. tuberculosis</i>	6.0	—	+	≡	(Residual activity %)	
<i>M. bovis</i>					80~100	40~50
Atypical						
Photochromogen	5.3	≡	≡	≡	90~100	70~80
Scotochromogen	4.0	+	—	—	80~100	40~50
Nonphotochromogen	3.5~4.0	≡	+	—	0~100	0
<i>M. avium</i>	3.5	+	±	—	Stimulated	0
<i>M. fortuitum</i>	4.4, 5.0,	+	≡	—	70~80	0
<i>M. phlei</i>	5.0	+	≡	+	70~80	30~40
<i>M. smegmatis</i>	—	—	—	—	—	—

いる体系を修飾する新味はないが、逆に考えればこの酵素活性によってもこれまでの分類体系の妥当性が示唆されたことになる。そこで試みに、以上の実験結果の“key point”をおさえて、簡単な分類鑑別表を作製してみると Table 2 のごとくなる。M. tuberculosis と M. bovis に関しては、このものが pH 6.5 においても強い活性を示すことによつて容易に他から鑑別され、あえて耐熱性検討の要もないであろう。photochromogen は pH 3.5, 5.0, 6.5 のいずれにおいても強い活性を示し、また他と比べて圧倒的に強い耐熱性によつてこれも鑑別容易である。Schotochromogen, Nonphotochromogen, M. avium は pH 3.5 における弱い活性が共通であり、これらの間の鑑別は耐熱性を参考とすべきであるが、さらに 60°C 10 分加熱による活性現象がみられれば M. avium に属する。しかしこの現象がみられなくても、M. avium を否定することにはならないであろう。前述のごとく、これら3群に関しては株数をまして検討を続ける必要がある。M. fortuitum と M. phlei とは反応の強さのみでは現実的な鑑別はむずかしく、pH 曲線と耐熱性の検討が必要である。M. smegmatis は被検株は1つであるが、これに関するかぎり菌量を増しても活性は全くみられなかつた。これも株数を増してさらに検討したいところである。

井上ら³⁾は 85°C に安定な酸性 phosphatase 活性を基質として phenolphthalein diphosphate を用いて測定し、これを M. kansasii においてのみ証明した。占部らは pH 6.4 で β -glycerophosphate を用いて実験し、ひろく抗酸菌一般について検討しているが、これらの報告において共通なことは、反応時間をきわめて長く要す

ることである(3~24時間)。これは彼らがそれぞれの菌型における至適 pH を用いていないこと、また基質に対する感度が弱いことによるのかもしれない。活性の強さによるのみの菌型鑑別は、菌量、菌の培養条件等に影響されやすいので、至適 pH, 耐熱性、基質の種類等を加味して、質的な差異から行なうのが望ましいのではなからうか。

結 論

p-nitrophenol phosphate を基質として、抗酸菌の酸性 phosphatase 活性を比較検討し、至適 pH, 耐熱性、活性の強さにおける各菌型の特徴を記載した。その成績は、この酵素活性が抗酸菌鑑別の一助になりうることを示唆するものである。また、結核菌 H37Ra 株についての実験は、この酵素が“particulate enzyme”であることを証明した。

室橋部長の御校閲、ならびに本研究部抗酸菌室の御援助に感謝する。

文 献

- 1) 金井興美：本誌，投稿中。
- 2) 占部薫 他：胸疾，7：753，1963
- 3) 戸田忠雄：第16回日本医学会総会学術講演集 II：91，1963。
- 4) Kanai, K.・Youmans, G. P. : J. Bacteriol., 80 : 607, 1960.
- 5) 山村雄一 他：日本臨床，12：1050，1954。
- 6) 今野淳：日本臨床，20：1736，1962。