

## 抗酸菌の Acetyl-Naphthylamine Esterase 活性

東村道雄・水野松司・村田浩

国立療養所中部病院

受付 昭和 46 年 5 月 13 日

## ACETYL-NAPHTHYLAMINE ESTERASE ACTIVITY OF MYCOBACTERIA\*

Michio TSUKAMURA, Shoji MIZUNO and Hiroshi MURATA

(Received for publication May 13, 1971)

Käppler<sup>1)~3)</sup> and other several investigators<sup>4)~6)</sup> reported that determination of esterases activity in mycobacteria is useful for differentiation of mycobacteria. Käppler<sup>1)</sup> reported that both esterases activity were shown in *M. tuberculosis*, *M. bovis* and *M. phlei*, none in *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. fortuitum* and *M. smegmatis*, and the alpha-esterase was always shown in *M. avium* and the Battey bacilli but the beta-esterase varied from strain to strain in these organisms. Recently, Käppler<sup>2)3)</sup> reported on the esterases activity of various mycobacterial species proposed recently as new species, using one (or two) representative (s) for each species. His results suggested that the determination of these enzymes be useful for differentiation of mycobacteria. Thus, the purpose of the present study is to make a more extensive study on the usefulness of the determination of esterases activity for the taxonomy of mycobacteria.

## Methods

The methods used by Käppler<sup>1)</sup> were applied to the present study, but commercial products of acetyl-alpha- or beta-naphthylamines (Tokyo Kasei Co., Tokyo) were used as substrates, though Käppler used those prepared in his laboratory.

The presence of naphthylamines were shown by the Riegler's reagent, in which p-nitro-aniline was used as a component.

## Results

The results obtained are shown in Tables 2 and 3. The results were in most cases in agreement with those of Käppler<sup>1)~3)</sup>, but some discrepancies were observed. The following conclusions were obtained.

## Conclusion

- 1) *M. tuberculosis* and *M. bovis* show a strong alpha-esterase activity and a weak beta-esterase activity.
- 2) *M. kansasii* and *M. marinum* show no alpha-esterase but a weak or moderate beta-esterase activity.
- 3) Both *M. scrofulaceum* and *M. gordonae* (tap water scotochromogens) show strong alpha- and beta-esterases activity.
- 4) *M. avium* and *M. intracellulare*, which are pathogenic for human and animals, show

\* From the National Sanatorium, Chubu Chest Hospital, Obu, Aichi-Prefecture 474 Japan.

strong alpha- and beta-esterases activity, whereas *M. nonchromogenicum*, *M. novum*, *M. terrae* and *M. triviale*, which are nonpathogenic, are heterogeneous in respect to the esterases activity and show usually a negative reaction in alpha-esterase activity and a weak or moderate beta-esterase activity. *M. gastris*, a nonpathogen, shows no activity of both esterases.

5) Group IV is divided into the following subgroups in respect to the esterases activity.

a) *M. phlei*, *M. thermoresistibile* and *M. chitae* show a weak or moderate activity of both esterases.

b) *M. fortuitum*, *M. abscessus*, *M. vaccae*, *M. parafortuitum* and *M. aurum* usually show a negative reaction in alpha-esterase activity, but a positive reaction in beta-esterase activity.

c) *M. smegmatis*, *M. thamnophaeos* and *M. rhodesiae* show a negative reaction in both esterases activity.

d) *M. borstelense* shows a moderately positive reaction in alpha-esterase activity and a strongly positive reaction in beta-esterase activity.

6) The test of esterases activity seems to be useful for the differentiation of species of the genus *Gordona*, a genus recently proposed as a new genus and taxonomically closely related to the genus *Mycobacterium*.

Käppler<sup>1)</sup> は抗酸菌の  $\alpha$ -および  $\beta$ -acetyl-naphthylamine-esterases 活性を測定し、*M. tuberculosis*, *M. bovis* および *M. phlei* は両者とも (+), *M. avium* および Group III Battey 型は  $\alpha$ -esterase (+) で、 $\beta$ -esterase は菌株により不定、Group II は不定、Group IV は  $\beta$ -esterase のみ (+), *M. kansasii*, *M. smegmatis*, *M. fortuitum* および *M. marinum* は両者ともに (-) であると報告した。その後、Käppler<sup>2)3)</sup> は多くの抗酸菌の esterase 活性を測定して、esterase 測定が抗酸菌の区分に有用であると述べているが、使用菌株数

が各菌種について1株または2株であるので、さらに多数の菌株について系統的な研究を行なうことが望ましいと思われる。本報は、これを目的として行なわれた。

なお Käppler のほかに、Cann & Wilcox<sup>4)</sup>, Nakayama & Takeya<sup>5)</sup> および Nakayama<sup>6)</sup> は esterase zymograms が Group IV 抗酸菌の同定に有用であることを報告している。

#### 実験方法

使用した菌株は表に示す通りで、これらの菌株の大部

Table 1. Expression of Esterase Activity

Concentration of alpha-naphthylamine	Colouring	Description	Concentration of beta-naphthylamine	Colouring	Description
0~2.5 $\mu\text{g/ml}$	No colouring	—	0~2.5 $\mu\text{g/ml}$	No colouring	—
5	Doubtful	—	5	Doubtful	—
10	Faintly violet	+	10	Faintly pink	+
20~30	Violet	++	20~30	Pinkish	++
40~50 or more	Strongly violet	+++	40~50 or more	Reddish	+++

The method used is as follows

1) Mix 0.5 ml of bacterial suspension (\*1), 0.5 ml of phosphate buffer (\*2) and 0.5 ml of substrate solution (\*3), and incubate at 37°C for 4 hours (at 28°C for *M. marinum* and *M. borstelense*).

2) Add 1.0 ml of acetate-acetic acid buffer (\*4) and 1.0 ml of the Riegler reagent (\*5), and observe the colour. For colouring of the standard alpha- or beta-naphthylamine solutions, substitute the standard solution for the substrate solution. The concentrations shown in table are not final concentrations but those of the standard solution.

(\*1) Bacterial suspension, 20 mg moist weight/ml saline.

(\*2) 0.132 M phosphate buffer (pH 6.6).

(\*3) A=0.03 M acetyl-alpha- or beta-naphthylamine solution in 96% ethanol. B=1% Tween 80 solution. The substrate solution is a mixture of 1 volume of A and 3 volumes of B.

(\*4) 1 M sodium acetate-acetic acid buffer (pH 4.5).

(\*5) For preparation of the Riegler reagent, add 1 g of p-nitro-aniline in 20 ml of distilled water, add then 3 ml of concentrated HCl and dissolve by heating. To this, add 160 ml of warm water. After cooling, add 20 ml of a 2.5% NaNO<sub>2</sub> solution. The reagent is prepared at every experiment.

Table 2. Alpha- and Beta-esterases Activity of Various Species of the Genus *Mycobacterium* and the Genus *Gordona*

Species	No. of strains tested	Percentage of strains showing the positive reaction*	
		Alpha-esterase	Beta-esterase
<i>M. tuberculosis</i>	10	10	10
<i>M. bovis</i>	10	10	10
<i>M. microti</i>	1	1	1
<i>M. kansasii</i>	20	3	20
<i>M. marinum</i>	18	3	16
<i>M. scrofulaceum</i>	20	20	20
<i>M. gordonae</i> (tap water scotochromogens)	28	28	28
<i>M. avium</i>	15	15	15
<i>M. intracellulare</i>	29	29	29
<i>M. nonchromogenicum</i>	39	10	27
<i>M. novum</i>	20	3	19
<i>M. terrae</i>	15	1	11
<i>M. triviale</i>	22	9	22
<i>M. gastri</i>	8	0	1
<i>M. flavescens</i>	9	8	9
<i>M. thermoresistibile</i>	10	10	10
<i>M. chitae</i>	4	4	4
<i>M. phlei</i>	15	15	15
<i>M. diernhoferi</i>	1	1	1
<i>M. abscessus</i>	10	0	10
<i>M. borstelense</i>	28	28	28
<i>M. fortuitum</i>	15	1	15
<i>M. rhodesiae</i>	13	0	0
<i>M. parafortuitum</i>	6	1	6
<i>M. aurum</i>	38	11	36
<i>M. vaccae</i>	7	0	7
<i>M. thamnopheos</i>	2	0	0
<i>M. smegmatis</i>	15	0	2
" <i>M.</i> " <i>rhodochrous</i>	6	0	0
<i>G. bronchialis</i>	25	0	24
<i>G. rubra</i>	10	2	10
<i>G. terrae</i>	10	9	8
<i>G. aurantiaca</i>	4	0	4

\* The term "positive" means the presence of 10 µg/ml or more of alpha- or beta-naphthylamine.

分の同定については前に記載した<sup>7)</sup>。

α-Acetyl-naphthylamine esterase (以下 α-esterase と略称) および β-acetyl-naphthylamine esterase (以下 β-esterase と略称) の測定法は次の通りである。

1. 菌液: 被検株を1%小川培地で37°Cに培養し(*M. borstelense* および *M. marinum* は28°C), 発育した菌を白金耳でとつて滅菌生理食塩水に浮遊させ, あらかじめ測定した比濁曲線を利用して, 湿菌量 20 mg/ml の菌液を作つた。菌液の作製にさいしては, 白金耳でと

Table 3. Alpha- and Beta-esterases Activity of Various Species of the Genus *Mycobacterium* and the Genus *Gordona*

Species	Number of strains showing reaction*							
	Alpha-esterase				Beta-esterase			
	-	+	†	‡	-	+	†	‡
<i>M. tuberculosis</i>				10	10			
<i>M. bovis</i>				10	10			
<i>M. microti</i>			1		1			
<i>M. kansasii</i>	17	3			16	4		
<i>M. marinum</i>	15	3			2	5	9	2
<i>M. scrofulaceum</i>		2	7	11	3	13	4	
<i>M. gordonae</i> (tap water scotochromogens)		5	15	8	3	18	7	
<i>M. avium</i>			1	14			13	2
<i>M. intracellulare</i>			1	28	1	5	23	
<i>M. nonchromogenicum</i>	29	9	1		12	12	12	3
<i>M. novum</i>	17	2	1		1	8	5	6
<i>M. terrae</i>	14		1		4	6	4	1
<i>M. triviale</i>	13	5	4			12	3	7
<i>M. gastri</i>	8				7	1		
<i>M. flavescens</i> (ATCC 14474)	1						1	
<i>M. flavescens</i> #				8				8
<i>M. thermoresistibile</i>		1	9			1	9	
<i>M. chitae</i>		3		1		3		1
<i>M. phlei</i>		4	11			13	2	
<i>M. diernhoferi</i>				1				1
<i>M. abscessus</i>	10						4	6
<i>M. borstelense</i>		3	11	14				28
<i>M. fortuitum</i>	14	1				5	10	
<i>M. rhodesiae</i>	13				13			
<i>M. parafortuitum</i>	5	1				1	3	2
<i>M. aurum</i>	27	9	2		2	7	10	19
<i>M. vaccae</i>	7						3	4
<i>M. thamnopheos</i>	2					2		
<i>M. smegmatis</i>	15					13	2	
" <i>M.</i> " <i>rhodochrous</i>	6				6			
<i>G. bronchialis</i>	25				1	3	21	
<i>G. rubra</i>	8			2			8	2
<i>G. terrae</i>	1	1	3	5	2	4	1	3
<i>G. aurantiaca</i>	4					4		

\* As to the criteria of the reaction of esterases activity, refer to Table 1.

# These strains were identified in this laboratory, but it was found in this study that, unlike the strain ATCC 14474 (type) of *M. flavescens*, these show a strongly positive alpha-esterase activity.

つた菌を試験管壁にこすりつけて菌を均一化した。

菌の培養日数は, Group IV では7日, Group I, II, III は2~3週, 結核菌は3週とした。*M. intracellulare* の中には発育の遅いものがあるので, このような菌では

培養日数を4週とした。

2. 磷酸緩衝液: Sørensen 磷酸緩衝液 (0.132 M) pH 6.6 を使用した。

3. 基質液

(a)  $\alpha$ -esterase 測定用基質液: N-acetyl- $\alpha$ -naphthylamine (M. W. 185.2) を 96% ethanol に溶解して、0.03 M 液とする(氷室に保存すれば4週使用可能)。別に 1% Tween 80 液を作り、前者1容と後者3容を合わせて基質液とする。

(b)  $\beta$ -esterase 測定用基質液: N-acetyl- $\beta$ -naphthylamine (M. W. 185.2) を 96% ethanol に溶解して、0.03 M 液とする。この液1容と 1% Tween 80 液3容を合わせて基質液とする。

4. 酢酸緩衝液: 1 M 酢酸 Na · 酢酸緩衝液 (pH 4.5) を用いる。

5. Riegler 試薬: 20 ml の蒸留水に 1 g の p-nitroaniline を加え、さらに 3 ml の濃 HCl を加えて加熱溶解する。これに 160 ml の熱水を加える。上記の液を冷却した後、2.5% NaNO<sub>2</sub> 水溶液 20 ml を添加する。この試薬は毎回新調する。

6. 標準液:  $\alpha$ -naphthylamine および  $\beta$ -naphthylamine 水溶液で、次の濃度の液を用いる。0, 2.5, 5, 10, 20, 30, 40, 50  $\mu$ g/ml。

実施方法

菌液	0.5 ml
磷酸緩衝液	0.5 ml
基質液	0.5 ml

以上を混合して、37°C (*M. marinum* および *M. borstelense* は 28°C) のフラン器に4時間保つ。対照には、菌液の代りに生食水を用いる。

4時間後、試験管をとりだして、

酢酸緩衝液	1.0 ml
Riegler 試薬	1.0 ml

を添加する。

$\alpha$ -esterase または  $\beta$ -esterase が陽性であれば、acetyl- $\alpha$ - または  $\beta$ -naphthylamine が分解されて遊離の  $\alpha$ - または  $\beta$ -naphthylamine が生じるので、これが酢酸緩衝液の存在のもとで Riegler 試薬と反応して赤紫色ないし赤色の呈色を示す。

標準液の発色には、 $\alpha$ - または  $\beta$ -naphthylamine 液を基質液の代りに用い、菌液を生理食塩水に代えて同様に操作し発色させる。判定は試験添加後、ただちに行なう。しかし少々放置しても色調は変わらない。

判定基準は表1に示した。表1の濃度は標準液中の  $\alpha$ - または  $\beta$ -naphthylamine 濃度を示すもので、系の終末濃度ではない。

また便宜上 (+) または (-) の2つに区分する場合には、次の基準によつた。

標準液の濃度 0~5  $\mu$ g/ml に匹敵する色調の場合 (-)  
標準液の濃度 10  $\mu$ g/ml 以上に匹敵する色調の場合 (+)

使用した試薬: acetyl- $\alpha$ - または  $\beta$ -naphthylamine (東京化成, 東京),  $\alpha$ - または  $\beta$ -naphthylamine (N-1-naphthylacetamide または N-2-naphthylacetamide) (片山化学, 大阪), Tween 80 (片山化学, 大阪)。

なお Kappler<sup>1)</sup> は acetyl- $\alpha$ - または  $\beta$ -naphthylamines を自家製造して用いているが、われわれは上記のように、東京化成の製品を用いた。また Kappler<sup>1)</sup> の論文中に Riegel 試薬とあるのは、Riegler 試薬の誤りであり、同論文中 Nitraniline とあるのは p-nitro-aniline である(Kappler 私信)。

#### 実験結果および考察

成績は表2および表3に一括した。

Kappler<sup>1)</sup> の1965年の報告には、*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. avium*, *M. phlei*, *M. fortuitum*, *M. thamocephalus* および *M. smegmatis* の成績が記載されているが、われわれの結果は *M. fortuitum* を除いてほしい Kappler と同一であつた。次いで Kappler<sup>2)3)</sup> は最近種々の菌種についての成績を発表しているが、この報告では大部分の菌種について1株だけしか実験されていない。われわれの成績と Kappler<sup>2)3)</sup> の成績をみると次の相違点がみられる。

(i) Kappler は *M. scrofulaceum* 2株について検して  $\alpha$ - および  $\beta$ -esterase とともに (-) としているが、われわれの成績では20株全株が  $\alpha$ - および  $\beta$ -esterase (+) である。

(ii) Kappler は *M. nonchromogenicum* (*M. terrae* Tsukamura), *M. novum*, *M. tarrae* (Wayne) の1株ずつを検して、前2者は  $\alpha$ - および  $\beta$ -esterase とともに (-), *M. terrae* は  $\beta$ -esterase (+) で両者異なるとしている。しかし、われわれの成績では、被検菌株数はそれぞれ39, 20, 15株で、3菌種とも esterase 活性についてはまちまちで菌株差が大きく、esterase 活性でこれらを区別することはできないと思われた。

(iii) *M. borstelense* について Kappler は  $\alpha$ -esterase (-),  $\beta$ -esterase (+) としているが、われわれの成績では両者ともに (+) であつた。この場合、Kappler の検した ATCC 株はわれわれも同時に ATCC から受領して検したのに成績が異なつているので、基質の acetyl- $\alpha$ - または  $\beta$ -naphthylamine の差 (Kappler は自家製、われわれは東京化成製) による疑いもある。

(iv) *M. parafortuitum* について Kappler は両者 (-) としているが、われわれの成績では  $\alpha$ -esterase (-),  $\beta$ -esterase (+) であつた。

われわれの成績からは次の結論が得られ、esterases

の測定は抗酸菌の区分に有用な方法の一つと思われた。

### 結 論

(1) *M. tuberculosis* および *M. bovis* は、 $\alpha$ -esterase (卅),  $\beta$ -esterase (+) で両者ともに陽性。*M. microti* (1株のみ) も同じ反応を示した。

(2) Group I の *M. kansasii* および *M. marinum* は、 $\alpha$ -esterase (-),  $\beta$ -esterase (+)~(卅) であつた。

(3) Group II の *M. scrofulaceum* および *M. gordonae* (tap water scotochromogens) は、 $\alpha$ -esterase (卅)~(卅),  $\beta$ -esterase (卅)~(卅) で両者ともに活性が強い。

(4) Group III では病原性の有無によつて多少態度が異なる。病原性の *M. avium* および *M. intracellulare* は、 $\alpha$ -esterase (卅),  $\beta$ -esterase (卅) であり、両者ともに活性が強い。しかし非病原性の *M. nonchromogenicum*, *M. novum*, *M. terrae* および *M. triviale* は一般に esterase 活性が上記の病原性のものより弱く、反応の強さも菌株差が大きい。*M. gastri* は esterase 活性が弱く、両者とも (-) である。

(5) *M. flavescens* ATCC 14474 は  $\alpha$ -esterase (-),  $\beta$ -esterase (卅) であるが、最近われわれが喀痰から分離して同定した菌は、 $\alpha$ -esterase および  $\beta$ -esterase とともに (卅) であつた。

(6) Group IV はおおよそ次の3群に分けることができる。

(a) *M. phlei*, *M. thermoresistibile*, *M. chitae* は  $\alpha$ -esterase (+)~(卅),  $\beta$ -esterase (+)~(卅) で両者

ともに陽性。

(b) *M. fortuitum*, *M. abscessus*, *M. vaccae*, *M. parafortuitum*, *M. aurum* は  $\alpha$ -esterase (-),  $\beta$ -esterase (+)~(卅)。

(c) *M. smegmatis*, *M. thamnopheos*, *M. rhodesiae* は両者ともに (-)。

なお *M. borstelense* は  $\alpha$ -esterase (卅)~(卅),  $\beta$ -esterase (卅) であり、esterase 活性により *M. abscessus* と区別できるように思われた。

(7) *Gordona* 属では "*Mycobacterium*" *rhodochrous* は両者ともに (-), *G. bronchialis* および *G. rubra* は  $\alpha$ -esterase (-),  $\beta$ -esterase (+)~(卅), *G. terrae* は両者ともに (+)~(卅) であつた。*G. aurantiaca* は  $\alpha$ -esterase (-),  $\beta$ -esterase (+) であつた。

### 文 献

- 1) Käppler, W.: Beitr. Klin. Tuberk., 130 : 1, 1965.
- 2) Käppler, W.: Zeitschr. f. Tuberk., 129 : 311, 1968.
- 3) Käppler, W.: Zeitschr. f. Tuberk., 129 : 321, 1968.
- 4) Cann, D.C. and Willax, M.E.: J. Appl. Bacteriol., 28 : 165, 1965.
- 5) Nakayama, Y. and Takeya, K.: Nature, 213 : 504, 1967.
- 6) Nakayama, Y.: Japan. J. Microbiol., 11 : 95, 1967.
- 7) Tsukamura, M.: Tubercle, 48 : 311, 1967.