

酵素標識免疫法によるヒト型結核菌および近縁菌群の検出

その他（別言語等）のタイトル	Detection of Mycobacteria by Enzyme Immunoassay.
著者	馬 娟, 菊池 慎太郎
雑誌名	室蘭工業大学研究報告. 理工編
巻	46
ページ	1-7
発行年	1996-11-08
URL	http://hdl.handle.net/10258/594

酵素標識免疫法によるヒト型結核菌および近縁菌群の検出

その他（別言語等）のタイトル	Detection of Mycobacteria by Enzyme Immunoassay.
著者	馬 娟, 菊池 慎太郎
雑誌名	室蘭工業大学研究報告. 理工編
巻	46
ページ	1-7
発行年	1996-11-08
URL	http://hdl.handle.net/10258/594

酵素標識免疫法によるヒト型結核菌および近縁菌群の検出†

馬 娟・菊池慎太郎

Detection of Mycobacteria by Enzyme Immunoassay.

Juang MA and Shintaro KIKUCHI

Abstract

An enzyme immunoassay using antiserum against fatty acid synthetase I (FAS- I ; a malonyl-CoA-dependent, acyl carrier protein (ACP)-requiring system) from an avirulent mycobacteria, *Mycobacterium smegmatis*, was examined for detection of cells of this genus. The antiserum was cross-reactive with virulent and avirulent species of mycobacteria such as *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG and *M. phlei*, respectively. Only a weak reactivity was, however, observed with *Nocardia* sp. possessing both FAS- I and FAS- II (fatty acid synthetase II ; an acetyl-CoA-dependent, ACP-requiring system), and no cross-reactivities were found with bacteria like *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* having only FAS- II . These results suggested that virulent and avirulent *Mycobacterium* sp. could be detected and identified specifically by the immunoassay method using the enzyme-labeled antiserum against FAS- I .

1. はじめに

mycobacteria 属細菌はグラム陽性の桿菌で、*Mycobacterium segmatis* や *M. phlei* のように土壌中に存在するものから、ヒト型結核菌 *M. tuberculosis* やらい（癩）菌 *M. leprae* に代表される病原菌にいたるまで自然界に広く分布し、それらの共通の性質である抗酸染色性にちなんで抗酸菌と総称されている。"

抗酸菌の中でも特にヒト型結核菌は、かつては世界的にも脅威とされていたが、その後の抗生物質の発見やイソニコチン酸ヒドラジド (INH) などの化学療法剤の発展に伴って一時は感染者も減少の傾向にあった。しかし 1996 年の世界保健機構 (WHO) の発表によれば、中国、インド、および東南アジア諸国をはじめとする諸地域においては、今日でもなお毎年八百万人以上の新たな感染者が出ているとも報告されている。

他方、ヒト型結核菌の検出・同定は主として上述の抗酸染色やその他の細菌学的、生化学的方法

(脚注) † 本研究の一部は日本科学協会・笹川研究助成によって実施したものである。

本研究の概要は日米共同薬科学研究会において発表した。

によって行われているが、²⁾ これらの方法は繁雑であると同時に実施者の技術的熟練も要求され、さらには *mycobacteria* 属と近縁にある *Nocardia* 属や *Corynebacterium* 属との区別がしにくいなどの欠点があり、科学的には必ずしも満足できる方法ではない。このような観点から、簡便でかつ特異的な抗酸菌検出法の開発と確立が待たれている状況にあるが、近年、感度および特異性に優れることから「酵素標識抗体法 (Enzyme Immunoassay, EIA)」^{3), 4)} を利用する試みが数多くなされるに至り、例えば抗酸菌 DNA 伸長酵素を抗原とする抗体をプローブとして用いる方法、⁵⁾ あるいは抗酸菌細胞外殻の 68 k Da 熱ショックタンパク質を抗原とする抗体をプローブとして用いる方法⁶⁾ などが報告されている。しかし残念ながら、これらはいずれも *mycobacteria* 属に近縁の抗酸菌とも反応し、あるいは時として抗酸菌以外の細菌とも交叉性を示すなどの特異性に乏しいものであった。

以上を踏まえて本研究においては、ヒト型結核菌をはじめとする *mycobacteria* 属細菌に個有のタンパク質を検索し、これを抗原とする抗体をプローブとして用いる酵素標識抗体法による簡便で特異的な病原抗酸菌の検出について検討した。

2. 実験材料および方法

使用菌株とその培養

以下の抗酸菌菌株を、それぞれ下記のように培養した。ヒト型結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 1128 株、ウシ型結核菌 *M. bovis* var. BCG ATCC 1228 株は菊池らによって報告された POT 培養法によって培養した。⁷⁾ トリ型結核菌 *M. avium* ATCC 1573 株は、菊池らによって報告された牛血清アルブミン添加ブドウ糖-塩化アンモニウム培地で培養した。⁸⁾ *Mycobacterium smegmatis* ATCC 14468 株、および IFO 13167 株、*M. phlei* 13160 株、*M. rhodochrous* IFO 13164 株、*M. vaccae* 14898 株、および *M. fortuitum* IFO 1315 株は小川培地並びに Sauton 培地によって培養した。*Nocardia corynebacteroides* ATCC 14898 株、並びに *Nocardia* sp. ATCC 14326 株は、酵母エキス-牛心抽出物-N. Z. アミン培地によって培養した。*Corynebacterium xerosis* ATCC 7094 株は、ペプトン-酵母エキス-無機塩類培地によって培養した。対照菌として、Luria-Bertani 培地で培養した大腸菌 (*Escherichia coli* ATCC 11105 株) 及び枯草菌 (*Bacillus subtilis* IFO 3013 株) を使用した。

I 型脂肪酸合成酵素 (Fatty Acid Synthetase Type I, FAS-I) の精製

Mycobacterium smegmatis (オハイオ州立バイオテクノロジーセンター、P.E.Kolattukudy 教授より譲渡された菌株) を、1 mM EDTA および 1 mM DTT を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) (以下、緩衝液 A) に懸濁し、超音波破碎 (133W, 20kHz, 20 分間) した後、10,000xg で 20 分間冷却遠心分離して粗細胞抽出液を調整した。次いで常法に従って粗細胞抽出液に粉末硫酸アンモニウム (以下、Am SO₄) を添加して、35-55 % Am SO₄ 飽和分画を得た。これを緩衝液 A に対して透析、あるいは緩衝液 A で希釈した後、あらかじめ緩衝液 A で平衡化した DEAE-セルロースカラム (カラムサイズ: 2×30cm) に負荷した。溶出は、1 mM DTT を含む 0.25 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) (500ml) と 1 mM DTT を含む 0.7M リン酸緩衝液 (pH 7.5) (500ml) からなる直線濃度勾配によって行っ

た。各溶出画分の I 型脂肪酸合成酵素（以下、FAS- I と省略）活性を以下に記載した方法に従って測定し、高い活性を示す画分を集めた。次いでこの画分に上記と同様に粉末 Am SO_4 を添加して、0-60% Am SO_4 飽和画分を得、さらにこれを Bio-Gel A-5m カラム（カラムサイズ：1.5×90 cm）に負荷してゲル濾過した。溶出は 1 mM DTT を含む 0.5 M リン酸緩衝液（pH 7.5）によって行い、上記と同様に FAS- I 活性を測定して活性ある画分を集め、以下の実験に供した。

I 型脂肪酸合成酵素活性の測定

反応液は以下の組成から成る。すなわち最終容量 1ml 中に 0.1mmol リン酸緩衝液（pH 7.2）、1 μ mol EDTA（エチレンジアミン四酢酸）、1 μ mol DTT（ジチオスレイトール）、10 nmol FMN（フラビンアデニンモノヌクレオチド）、25 nmol アセチル-CoA、25 nmol 2- ^{14}C -マロニル-CoA（比放射活性：0.4 Ci/mol）、250 nmol NADPH（還元型ニコチンアデニンジヌクレオチドホスフェイト）および細胞抽出液（酵素液）を含む。37℃で5分間、反応を行った後、反応液に 10% KOH 溶液を添加して反応を停止し、さらに 90℃で30分間ケン化した。その後、反応液に 6N 塩酸を添加して中和し、ヘキサン抽出画分の放射能を液体シンチレーションカウンターで測定して FAS- I 活性とした。

その他の脂肪酸合成酵素活性の測定

II 型脂肪酸合成酵素（FAS- II）の活性は 25 nmol デカノイル-CoA（ $\text{C}_{10:0}$ -CoA）をプライマーとし、20 nmol 2- ^{14}C -アセチル-CoA（比放射活性：0.4Ci/mol）を縮合単位として既報に従って測定した。⁹⁾ 37℃で20分間反応を行った後、反応液に 10% KOH を添加して反応を停止し、さらに 90℃で30分間ケン化した。その後、反応液に 6N 塩酸を添加して中和し、ヘキサン抽出画分の放射能を液体シンチレーションカウンターで測定して FAS- II 活性とした。脂肪酸伸長酵素（FES）活性および一般細菌脂肪酸合成酵素（GFAS）活性は 25 nmol アセチル-CoA および 20 nmol 2- ^{14}C -マロニル-CoA（比放射活性：0.4 Ci/mol）を縮合単位とする既報¹⁰⁾ の反応系に依って測定した。37℃で20分間反応を行った後、反応液に 10% KOH を添加して反応を停止し、さらに 90℃で30分間ケン化した。その後、反応液に 6N 塩酸を添加して中和し、ヘキサン抽出画分の放射能を液体シンチレーションカウンターで測定して FES あるいは GFAS 活性とした。

抗血清の作成

抗血清の作成はニュージーランド白色家兔（雄）を免疫動物として以下のように行った。すなわち、精製 FAS- I（15mg-タンパク質/ml）を等容の Freund 完全アジュバントと混合して十分に乳化した後、家兔背部の数カ所に初回免疫した。次いで、十日後に、2 回目の免疫（追加免疫）を行った。なお以後の追加免疫においては Freund 完全アジュバントに代えて、Freund 不完全アジュバントを用いた。2 回目の免疫後、14日ごとに3回目および4回目の追加免疫を行った。最終免疫後、10日目に心臓から採血し、血清を調整した後、常法に従ってオクタローニー二重拡散法によって抗体価を検定した。¹¹⁾

I 型脂肪酸合成酵素の固定化

FAS- I の固定化は CNBr-activated Sepharose 4B を固相として行った。すなわち 1 g の CNBr-activated Sepharose 4B 樹脂を 1 mM 塩酸中で15分間膨潤した後、1 mM 塩酸によって数回洗浄、さらに 0.5 M NaCl-0.1M 酢酸緩衝液で洗浄した。他方、0.5 M NaCl-0.1M 炭酸水素ナトリウム緩衝液 8ml に *M. smegmatis* 粗抽出液 4 ml を加え、これを前述のごとく処理したセファロースゲルに加えて 4 °C で一夜静かに攪拌した。次いで、樹脂をグラスフィルター上で洗浄した後、1 M エタノールアミン (pH 8.0) を加えて、室温で2時間処理し過剰活性基をブロックした。その後さらに 0.5M NaCl- 0.1 M 炭酸水素ナトリウム緩衝液 (pH 8.3) と 0.5 M NaCl- 0.1 M 酢酸緩衝液で洗浄し、固定化抗原として実験に供した。

抗 FAS- I 免疫グロブリンの酵素標識

1ml の 0.3 M 重炭酸ナトリウム溶液 (pH 8.1) に 20 mg のペルオキシターゼを溶解し、これに 0.1 ml のジニトロフルオロベンゼン-アルコール溶液を加えて室温で攪拌した。これに常法に従って 0.08M の過ヨウ素酸ナトリウムおよび 0.16 M エチレングリコールを加えてペルオキシターゼを活性化した。その後、活性化ペルオキシターゼ溶液に約 5 mg の免疫グロブリン (IgG) を加えて標識し、セファデックス G-150カラムによって酵素標識 IgG を精製した。

3. 実験結果と考察

mycobacteria 属固有タンパク質の検索

微生物の脂肪酸合成酵素 (系) はそのプライマー依存性やアシルキャリアタンパク質 (ACP) 要求性に従って、マロニル- CoA 依存性 ACP 要求性脂肪酸合成酵素 (I 型脂肪酸合成酵素、FAS)、およびマロニル-CoA 依存性 ACP 非要求性脂肪酸伸長酵素系 (一般細菌脂肪酸合成酵素系、GFAS) とに大別されるが、各種の微生物細胞におけるこれらの脂肪酸合成酵素の分布と脂質合成への関与については未だ十分には知られていない。これに基づき各種微生物細胞、すなわち *Mycobacterium* 属、および細菌学的、生化学的にそれと近縁の *Nocardia* 属と *Corynebacterium* 属、ならびに対照としての大腸菌と枯草菌におけるこれら脂肪酸合成酵素の分布について検討した。表1に示すように、ヒト型結核菌 (*M. tuberculosis*)、ウシ型結核菌 (*M. bovis* BCG)、トリ型結核菌 (*M. avium*) などの検討したすべての *Mycobacterium* 属菌株において特徴的に I 型脂肪酸合成酵素 (FAS- I) は極めて高い活性を示し、他方この属との近縁にある *Nocardia* 属、*Corynebacterium* 属および対照菌菌株においてはほとんど活性を示さないか、あるいは全く示さなかった。このような特徴的な活性の分布は FAS- I 以外の脂肪酸合成酵素 (系) においては認められず、この酵素が *Mycobacterium* 属に固有の酵素であることが示唆された。

Table. Fatty Acid Synthetases in Microorganisms.

	FAS- I ^{a)}	FAS- II ^{b)}	FES ^{c)}	GFAS ^{d)}
<i>M. tuberculosis</i>	++	+	+	-
<i>M. bovis</i> BCG	++	-	++	-
<i>M. avium</i>	++	±	++	-
<i>M. smegmatis</i> (ATCC)	++	++	++	-
<i>M. smegmatis</i> (IFO)	++	++	++	-
<i>M. phlei</i>	++	++	++	±
<i>M. rhodochrous</i>	++	-	±	±
<i>M. vacce</i>	++	-	-	±
<i>M. fortuitum</i>	++	-	-	-
<i>N. coryne- bacteroides</i>	±	-	+	+
<i>N. sp.</i> ATCC 10844	±	-	-	++
<i>C. xerosis</i>	-	±	±	±
<i>E. coli</i>	-	±	-	++
<i>B. subtilis</i>	-	-	-	+

^{a)} fatty acid synthetase I, ^{b)} fatty acid synthetase II,

^{c)} fatty acid elongation system, ^{d)} general fatty acid synthetase

++; very high activity, +; high activity, ±; low activity, -; no activity

固有タンパク質 (FAS- I) の精製

次にこのタンパク質の抗原としての精製を試みた。「実験材料および方法」の項に記載したように FAS- I は硫安分画および数種のカラム・クロマトグラフィーによってタンパク質化学的に純粋に精製され、また詳細は省略するが、ゲル濾過および SDS-電気泳動における標準タンパク質の溶出位置および易動度との比較等から本酵素の分子量は約 1,400 kDa と推定された。

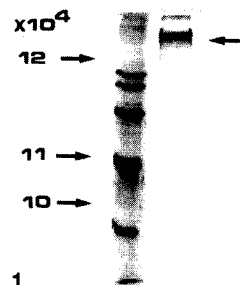


Fig. 1

Slab Gel Electrophoresis of Purified FAS- I. Molecular standards are indicated on the left

抗 FAS- I 血清の反応性

図2に精製酵素 (FAS - I) 標品を、ヘキサエチレンメタアクリレート (HEMA) を支持体として固定化した標品の蛍光免疫法の結果を示した。すなわち、既報⁴⁾に従って調整した FAS- I 抗血清固定化 (HEMA) 標品の超薄切片と *M. smegmatis* 細胞粗抽出液あるいは大腸菌細胞粗抽出液とを、生理的食塩を含むリン酸緩衝液 (PBS) 中で反応させ常法に従って洗浄後、さらに蛍光 (fluoresceinisothiocyanate : FITC) 標識抗家兎 IgG 血清を第二抗体として反応させ、洗浄後に固相面の蛍光分布を蛍光顕微鏡で観察した。図に示すように *M. smegmatis* 抽出液の場合 (図2 (a)) においては切片面に強い蛍光が観察されるのに対して大腸菌抽出液の場合には蛍光はほとんど認められず、FAS- I を抗原とする抗血清が *Mycobacterium* 属およびこれと近縁にある細菌の検出に適当であることが示唆された。

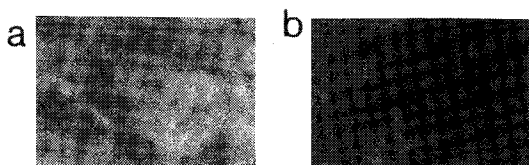


Fig. 2 Immunofluorescent Micrographs of the Polymer Matrix. Cell - free extracts of *M. smegmatis* (a) or *E. coli* (b) were immobilized on the polymer Matrix (HEMA) and stained with FITC - conjugated anti - FAS- I - rabbit serum.

酵素標識抗体による mycobacteria 属の検出

図3 (a) に酵素標識法による抗 FAS- I 血清と mycobacteria 属菌株との反応性を、また図3 (b) にこの抗血清と近縁細菌および対照細菌との交叉性を示した。すなわち、「材料および方法」に記載した方法で調整した固相化抗原 (FAS- I) 懸濁液を酵素 (パーオキシターゼ) 標識した抗 FAS- I 血清と混合し、次いでこれに被検細胞抽出液を加えて反応した。その後、遠心分離して B (bound) - F (free) 分離し、PBSで洗浄後に固相に検出される酵素活性を測定した。本法の原理は「拮抗 (競合) 法」に基づくものであり、従って第二抗体を利用する「サンドウィッチ法」に比較して一般的にその感度 (定量限界) は劣るといわれている。しかし図3 (a) に見られるように、

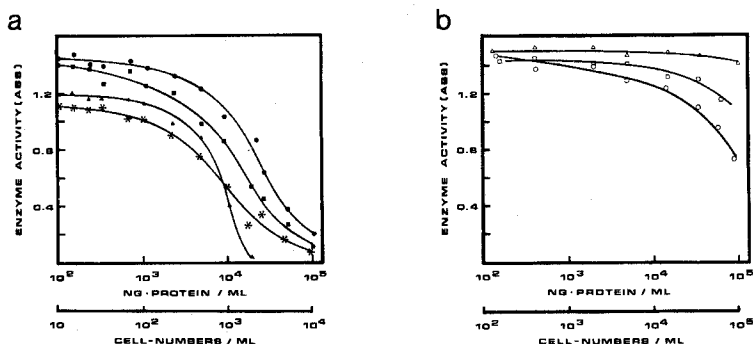


Fig. 3

Enzyme Immunoassay of Bacterial Cells by the Competition Method. The purified FAS-I of *M. smegmatis* was immobilised on Sepharose beads and incubated with peroxidase (POX) - labeled anti - FAS- I - serum and cell - free extracts of *Mycobacterium* sp. (a) or other bacteria (b) . After the " B - F separation , POX -

activities bound on beads were measured. (●) ; *M. smegmatis*, *M. phlei* and *M. avium*, (■) ; *M. tuberculosis* and *M. bovis*, (▲) ; *M. rhodochrous* and *M. fortuitum*, (*) ; *M. vacce*, (△) ; *E. coli* and *B. subtilis*, (□) ; *C. xerosis*, (○) ; *N. corynebacteroides* and *N. sp*

800 - 1000 ng/ml の *Mycobacterium* 属菌株に由来するタンパク質 (10⁷ 細胞/ml に相当) の検出が可能であり、さらにヒト型結核菌 (*M. tuberculosis*) あるいはウシ型結核菌 (*M. bovis* BCG) などの病原性抗酸菌においては 200 - 1000 ng タンパク質/ml (10⁷-10⁸ 細胞/ml に相当) の検出が可能であった。他方、この抗血清は大腸菌 (*E. coli*) あるいは枯草菌 (*B. subtilis*) などの対照菌とは全く反応せず、*Nocardia* 属をはじめとする *Mycobacterium* 属と近縁にある微生物との反応性 (交叉性) も極めて低いものであった (100-500 μg タンパク質/ml : 10⁸ 細胞/ml に相当、図3 (b)) ことから、本法がヒト型結核菌をはじめとする病原性抗酸菌の特異的検出に極めて有効であることが示された。(平成8年6月4日 受理)

謝辞

本研究を遂行するに当たり、多くの助言を頂いた岡本弘美博士 (米国ワシントン大学医学部) に感謝いたします。

参考文献

- 1) C.Ratledge, in "The Biology of the Mycobacteria," Vol. 1, ed. by C.Ratledge and J.Stanford, Academic Press, New York, 1982, pp.9-52.
- 2) L.G.Wayne and G.P.Kubica in "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology," Vol. 2, ed. by P.A.Sneath and J.G.Holt, Williams & Wilkins, 1986, pp. 1435-1457.
- 3) S.Kikuchi, I.Kaetsu, M.Kumakura and M.Suzuki, Zeitschrift fur Naturforschung, 38(c), 812-814 (1983).
- 4) S.Kikuchi and P.E.Kolattukudy, Agricultural Biological Chemistry, 54, 1411-1416 (1990).
- 5) J.W.Zolg, S.Alugupalli and T.Kamala, Journal of Clinical Microbiology, 32, 2801-2807 (1994).
- 6) T.Fifis, Veterinary Microbiology, 40, 35-40 (1994).
- 7) S.Kikuchi, D.R.Raineater and P.E.Kolattukudy, Archives of Biochemistry & Biophysics, 295, 318-326 (1992).
- 8) S.Kikuchi, M.Fukumoto and H.Takahashi, Bioscience, Biotechnology & Biochemistry, 58, 885-888 (1994).
- 9) S.Kikuchi and T.Kusaka, Journal of Biochemistry, 92, 839-844 (1982).
- 10) 菊地愼太郎, 日下喬史, P.E.Kolattukudy, 脂質生化学研究, 35, 367-371 (1993).
- 11) S.Kikuchi, M.Inohara, I.Okamura, Y.Oshima, T.Takeuchi, T.Miura and M.Tatewaki, Bioscience, Biotechnology & Biochemistry, 56, 1434-1438 (1992).