

³²P 標識菌による結核菌の毒力に関する研究第3報 マウス体内における注入結核菌体の処理排泄におよぼす
菌体脂質の役割について

山 村 好 弘

国立療養所刀根山病院 (院長 渡辺三郎)
(指導 九州大学医学部医化学教室山村雄一教授)

受付 昭和33年2月19日

実験方法

表1 ³²P 標識結核菌の加熱死菌および脱脂菌
体浮遊液の調製法培地 1 cc に 10~15 μ c の割に ³²P のリン酸塩を加えた
Sauton 培地に培養せる結核菌

恒温槽中にて60°C 1時間加熱滅菌

濾過十分に水洗

菌塊 濾液

計量めのう乳鉢で磨砕
0.25cc中に湿菌量0.5mgを
含む菌体浮遊液を調製

実験に使用

100倍量のエタノール・エー
テル(1:1)混液で0°C 48時
間抽出3回
3,000回転15分遠沈

沈渣 (菌体) 上 清

計量めのう乳鉢で磨砕
0.25cc中に乾燥菌量0.125mg
を含む菌体浮遊液を調製

実験に使用

100 倍量のクロロフォルム
で0°C 48時間抽出3回

濾 過

菌体 濾液

wax C, wax D, cord factor
をエーテルにとかし, その
中にこれら lipid の4倍量
の脱脂菌を加う水浴上で加温攪拌しなが
らエーテルを気化

計量めのう乳鉢で磨砕

0.25cc中に乾燥菌量0.125
mgを含む菌体浮遊液を
調整

実験に使用

計量めのう乳鉢で磨砕
0.25cc中に乾燥菌量0.125
mgを含む菌体浮遊液を調
製

実験に使用

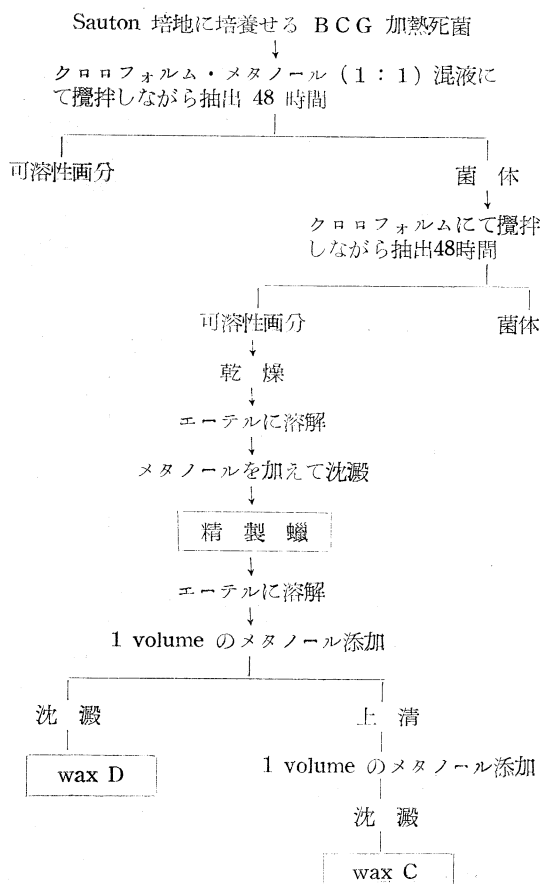
さきにわれわれは結核菌の毒力を究明する1つの手段として、各種結核菌の ³²P 標識加熱死菌を使用し、これをマウスの体内に注入してマウスの全身および肝からの ³²P の消失を指標として、これらの菌が in vivo でどのように食菌処理排泄されるかを観察した。そして毒力菌は死菌でも、非毒力菌にくらべて、生体内でゆるやかに処理排泄されることをみとめ第2報¹⁾で報告したが、このことから毒力菌の菌体中には、宿主体内で白血球に食菌されたときに消化処理されにくい菌体成分の存在することが考えられる。

しかるに最近 Bloch らは毒力結核菌を石油 エーテルで抽出することにより、その抽出物中に、in vivo で白血球の遊走を阻害し、また少量を反復注射することによりマウスを致死せしめる物質の分離に成功し、このものを cord factor と命名している^{2~4)}。またこの毒性物質は Anderson の菌体脂質分画法にしたがって結核菌の脂質を分画すると、クロロフォルム可溶性画分中の wax C または wax D 中に存在することを見出しており^{5, 6)}、そしてこの物質が trehalose 6-6' dimycolate なることを決定している^{7) 8)}。また Spitznagel も同様な毒性物質を毒力結核菌のモノクロールベンゼン抽出物中に見出しており⁹⁾、Bloch らは、この抽出物中には cord factor がふくまれていることを報告している¹⁰⁾。しかしながら、非毒力菌の人型結核菌 H₃₇Ra 株や鳥型菌からはこれらの毒性物質は分離されておらない。

著者の実験においても、毒力菌が非毒力菌にくらべて死菌でも宿主体内で消化処理されにくいということは、毒力菌の脂質中にふくまれるこれらの毒性物質がなんらかの役割を演じているのではないかと考えられる。したがって前回と同様の方法にて ³²P 標識菌を使用し、毒性物質をふくむ脂質を除去した脱脂菌体あるいは脱脂菌体に毒性物質の cord factor, あるいは cord factor をふくむと考えられる毒力菌の wax C, wax D を coat した菌体がどのようにマウス体内で処理排泄されるかを測定して in vivo における菌体の消化処理排泄におよぼす菌体脂質の役割について観察したのでここに報告する。

使用動物は第2報で述べたごとく、生後6～8週の体重15 g 前後のマウスの純系 NA-8 株の雄を、使用菌は有毒人型結核菌 $H_{37}Rv$ 株、無毒人型結核菌 $H_{37}Ra$ 株、有毒牛型結核菌三輪株、BCG、Mycobacterium 607、鳥型菌竹尾株および獣調株（以下 $H_{37}Rv$ 、 $H_{37}Ra$ 、牛三輪、BCG、M. 607、鳥型菌竹尾株および獣調株と略）の ^{32}P 標識 $60^{\circ}C$ 、1時間加熱死菌である。これらの菌を表1に示すように Anderson の方法¹¹⁾にしたがつて、アルコール・エーテル(1:1)で48時間3回抽出した。そしてこれらの菌を乾燥させたのち、めのうの乳鉢で磨砕して、蒸留水で均等な菌体浮遊液を作成した。さらにこのアルコール・エーテル(1:1)で抽出した菌体をクロロフォルムで48時間3回抽出して、脂質を除去したのち同様に蒸留水で菌体浮遊液を作成した。さらにアルコール・エーテル(1:1)混液、ついでクロロフォルムで脱脂した菌体に、Bloch の方法²⁾にしたがつて cord factor, wax C, wax D を coat した。すなわち Bloch より送られた cord factor および表2に示す方法で、BCG 加熱死菌より抽出された wax C および wax D を 5 cc のエーテルに溶解し、菌

表2 実験に使用した wax C, wax D の抽出法



体とこれら脂質との重量比が 4:1 になるように菌体をエーテル中に加え、恒温槽で加温振とうしながらエーテルを気化させて、これらの脂質を菌体に coat した。そしてこれら脂質で coat した菌体をめのうの乳鉢で磨砕して蒸留水で菌体浮遊液を作成した。

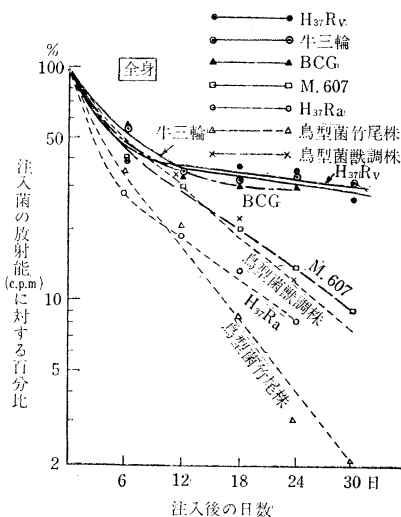
そして、この①アルコール・エーテル(1:1)混液で脂質を除去した菌体浮遊液、②さらにクロロフォルムで脂質を除去した菌体浮遊液および、③この菌体に cord factor および wax C, wax D を coat させた菌体浮遊液の乾燥菌量 0.125 mg (湿菌量 0.5 mg に該当、約 5,000 c.p.m. の放射能を有す)をふくむ菌液を、1群約 20 匹のマウスのおおのの尾静脈より注入し、5～7 日ごとに 2 匹ずつ全身および肝に存在する ^{32}P を測定した。測定法は第2報¹⁾において述べたとき方法である。そして注入された菌体がマウスの体内でどのように処理排泄されるかを観察した。

実験結果

(1)脂質を除去しない各種有毒、無毒結核菌の加熱死菌を注入した場合のマウス体内からの菌体の処理排泄

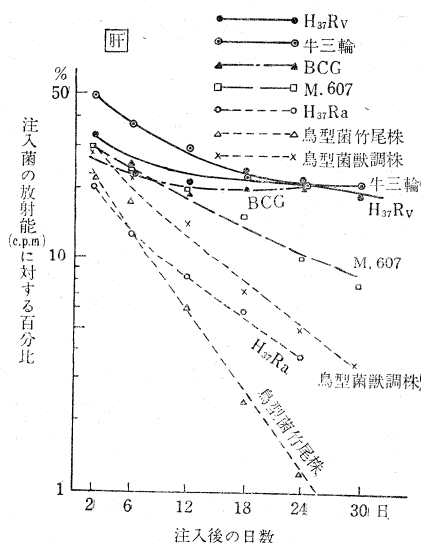
いま比較に便利のように脂質を除去しない ^{32}P 標識各種有毒、無毒結核加熱死菌の湿量 0.5mg をマウスの尾静脈より注入した場合の、マウスの全身および肝からの ^{32}P の消失を図示すると、図1、2のごとくである。

図1 各種 ^{32}P 標識結核菌の加熱死菌湿量0.5mgをマウスの尾静脈から注入した場合の全身からの ^{32}P の消失



この場合についてはすでに第2報で報告した。この図から明らかなごとく、毒力菌および BCG を注入した場合は、他の無毒菌にくらべて ^{32}P のマウス体内からの消失はゆるやかであり、したがって毒力菌は死菌でも、非毒力菌にくらべてマウス体内でゆるやかに処理排泄されることが推定される。

図2 各種 ^{32}P 標識結核菌の加熱死菌湿量 0.5mg をマウスの尾静脈から注入した場合の肝からの ^{32}P の消失



(2) アルコール・エーテル (1:1) で菌体脂質を除去した各種結核加熱死菌を注入した場合、マウス体内からの菌体の処理排泄

表1の方法にしたがつて、前述の加熱死菌からアルコール・エーテル (1:1) 混液で脂質を除去した菌体の乾燥量 0.125mg (湿菌量 0.5mg に該当) をふくむ菌体浮遊液を、マウスの尾静脈から注入した場合のマウスの全身および肝からの ^{32}P の消失を示すと、図3~4のごとくである。この図から明らかなごとく、この場合

図3 ^{32}P 標識 60°C 1時間加熱死菌をアルコール・エーテル (1:1) で処理して乾燥量 0.125mg をマウスの尾静脈から注入した場合の全身からの ^{32}P の消失

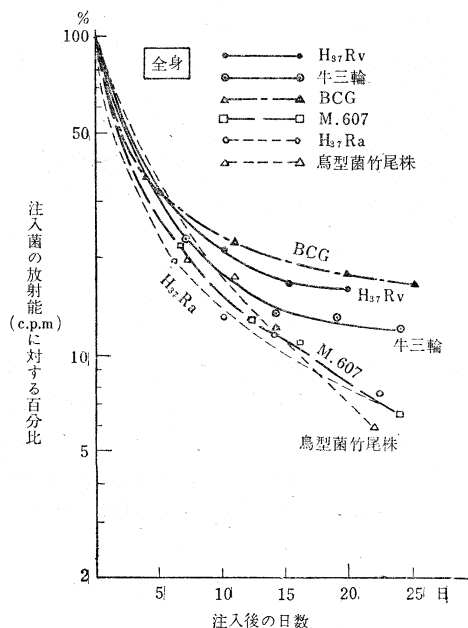
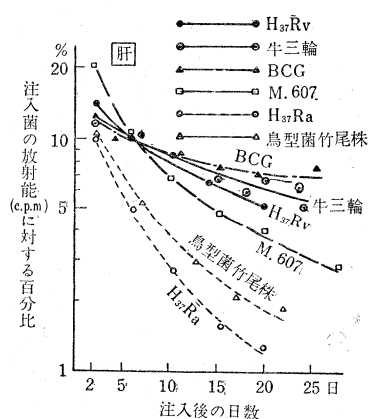


図4 ^{32}P 標識 60°C 1時間加熱死菌をアルコール・エーテル (1:1) で処理して乾燥量 0.125mg をマウスの尾静脈から注入した場合の肝からの ^{32}P の消失



も H_{37}Rv , 牛三輪, BCG を注入した場合は, H_{37}Ra M. 607 および 鳥型菌竹尾株 を注入した場合にくらべて、全身および肝からの ^{32}P の消失はゆるやかである。したがって、この場合もなお毒力菌および BCG は無毒菌にくらべて、生体内で処理排泄されにくいことが推定される。しかし (1) の場合にくらべて、菌株の間の差は小となるように思われる。

(3) アルコール・エーテルついでクロロホルムで脂質を除去した各種結核加熱死菌を注入した場合のマウスの体内からの菌体の処理排泄

(2)のアルコール・エーテル(1:1)混液で処理した菌体

図5 ^{32}P 標識 60°C 1時間加熱死菌をアルコール・エーテル、クロロホルムで処理して乾燥量 0.125mg をマウスの尾静脈から注入した場合の全身からの ^{32}P の消失

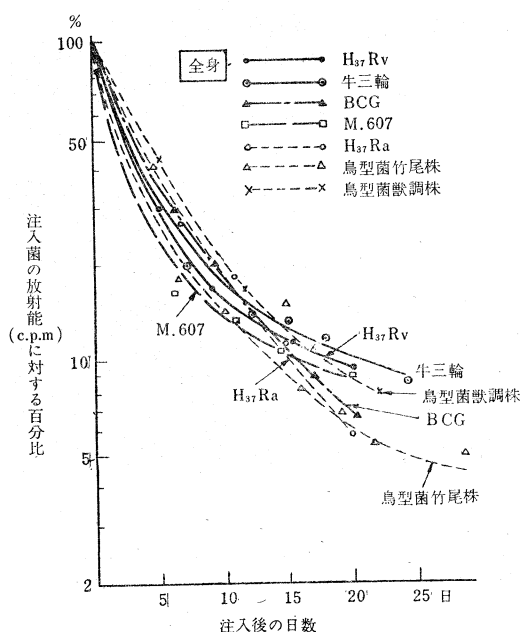
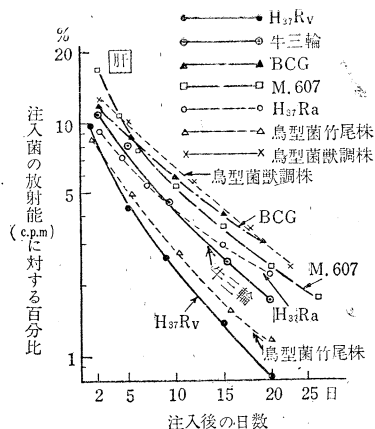


図6 ^{32}P 標識 60°C 1時間加熱死菌をアルコール・エーテル、クロロフォルムで処理して乾燥量 0.125mg をマウスの尾静脈から注入した場合の肝からの ^{32}P の消失



を、さらにクロロフォルムで可溶性の脂質を除去したのち、その菌体の乾燥菌量 0.125mg をふくむ菌体浮遊液をマウスの尾静脈より注入し、全身および肝からの ^{32}P の消失の割合を測定すると、図5および図6のごとくである。この場合は H_{37}Rv 、牛三輪、BCG、 H_{37}Ra 、M.607、鳥型菌竹尾株および獣調株の間には大きな差をみとめなかつた。このことはアルコール・エーテルで抽出したのち、さらにクロロフォルムで可溶性の脂質を除去した加熱死菌を注入した場合には、毒力菌であると非毒力菌であるとを問わず菌体は同じように生体内から処理排泄されることを示している。

いま比較のために、全く脂質を除去しない加熱死菌およびアルコール・エーテル、ついでクロロフォルムで菌体脂質を除去した加熱死菌を注入した場合の、マウスの

表3 各種 ^{32}P 標識結核菌の加熱死菌およびアルコール・エーテル (1:1)、クロロフォルム脱脂菌体をマウスの尾静脈から注入したときの10日以後における全身および肝からの ^{32}P の半減期 (ただし ^{32}P の自然減衰はないものとして計算により補正)

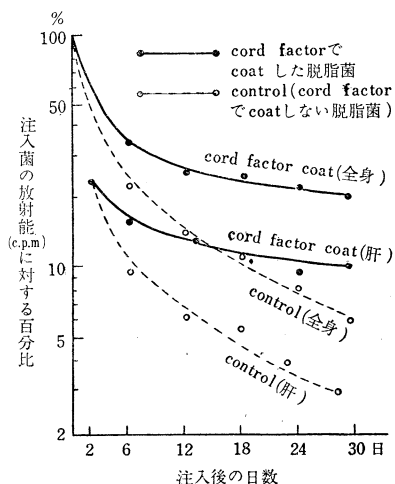
菌 体	加 熱 死 菌		アルコール・エーテル (1:1)、クロロフォルム脱脂菌	
	全身	肝	全身	肝
H_{37}Rv	47日	57日	11.5日	5.5日
牛 三 輪	45	25.5	12	7.5
B C G	31.5	54	10	10
H_{37}Ra	10.5	10.5	7	11.5
M.607	9.5	16.5	15.5	10
鳥型菌竹尾株	6	5	12.5	8
鳥型菌獣調株	8.5	9	9.5	8.5

全身および肝からの ^{32}P の消失の半減期を表示すると、表3のごとくである。この場合は、第2報で詳述したごとく、注入10日以後で、 ^{32}P の消失が安定して一定の値となつたときの値で示してあり、また ^{32}P の自然減衰は計算により補正した値を示してある。このように脂質を除去しない菌体では、毒力菌は非毒力菌にくらべて、明らかにマウスの体内からの ^{32}P の半減期が長く、したがって消化処理排泄されにくい、脂質を除去すると ^{32}P の半減期はほぼ等しくなり、同じように消化処理されることが考えられる。ゆえに、毒力菌の脂質中には、マウスの体内で菌体の消化処理を遅延せしめるような毒性物質の存在することが推定される。

(4) cord factor および wax C, wax D で coat した加熱脱脂菌体を注入した場合の、マウス体内からの菌体の処理排泄

さらに(3)のアルコール・エーテル、ついでクロロフォルムで脱脂した菌体に、Bloch より送られた cord factor および表2の方法で BCG 加熱死菌より抽出された wax C, wax D を coat してその乾燥菌量 0.125mg をふくむ菌体浮遊液をマウスの尾静脈より注入した場合の、マウスの全身および肝からの ^{32}P の消失を示すと、図7、8のごとくである。この場合 cord factor を coat

図7 cord factor で coat した ^{32}P 標識 H_{37}Rv 脱脂菌の乾燥量 0.125mg を注入した場合のマウスの全身および肝からの ^{32}P の消失



した菌体は H_{37}Rv の加熱死菌の脱脂菌体を使用し、また wax C, wax D を coat した菌体は鳥型竹尾株の脱脂菌体を使用している。この図から 明らかのごとく、cord factor で coat した菌体を注入した場合は、coat しない脱脂菌にくらべ、マウスの全身および肝からの ^{32}P の消失はゆるやかであり、また wax C, wax D を coat した菌体では全身ではあまり大きな差をみとめないが、肝では coat しない脱脂菌を注入した場合にくらべて、

図8 wax C, wax D で coat した ^{32}P 標識鳥型竹尾株脱脂菌乾燥量0.125mgを注入した場合のマウスの全身および肝からの ^{32}P の消失

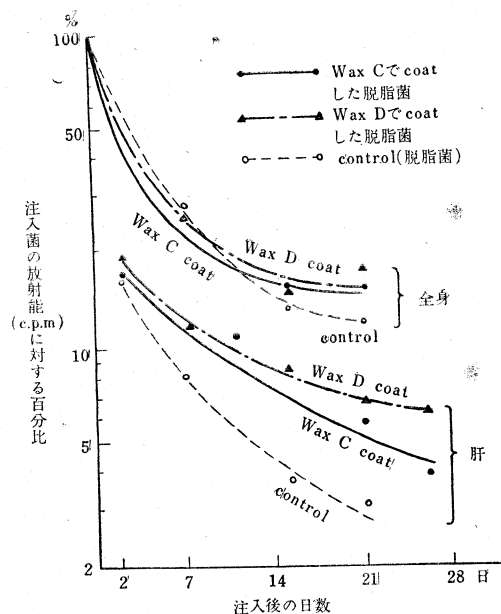
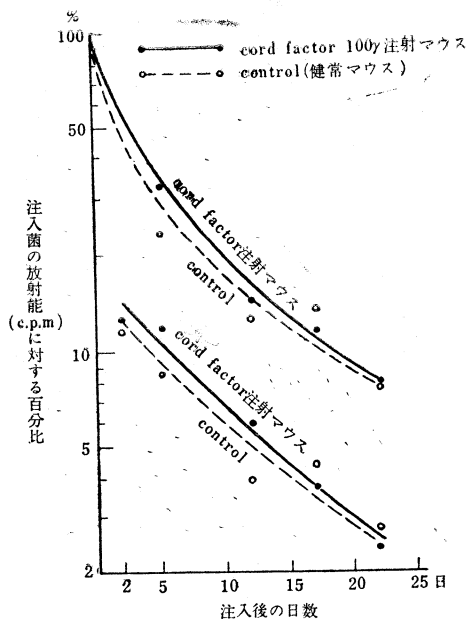


図9 cord factor 100 γ 腹腔内注射マウスおよび健常マウスに ^{32}P 標識鳥型竹尾株の乾燥量0.125mgを注入した場合のマウスの全身および肝からの ^{32}P の消失



^{32}P の消失はゆるやかである。したがってこのように cord factor のごとき 毒性物質、あるいは cord factor をふくむと考えられる wax C, wax D のごとき脂質で菌体を coat すると、マウス体内で消化処理されにくいことが考えられる。

しかしながら、この場合 cord factor で coat した菌体が消化処理されにくいのは、cord factor で菌体を coat したために白血球に食菌消化されにくいのか、あるいはまた菌体に付着している cord factor の毒性のために生体全体が障害をうけてそのためにマウス体内の菌体にたいする処理排泄能力が低下しているために、このような現象がおこっているのか明かでない。

これをたしかめるために次のごとき実験を行つた。すなわち、いま 100 γ の cord factor を 0.1 cc のプロピレングリコールに溶解し、この 0.1 cc ずつを 1 群 20 匹のマウスの腹腔内に注射し同時に、アルコール・エーテル (1:1) ついでクロロフォルムで脂質を除去した鳥型竹尾株の ^{32}P 標識脱脂菌加熱死菌の乾燥菌量 0.125 mg をふくむ菌体浮遊液をこれらのマウスの尾静脈より注入した。また対照として、無処置の健常マウスに同様に ^{32}P 標識脱脂菌浮遊液を注入した。そして、cord factor で障害をうけたマウスおよび障害をうけない健常マウスについて、 ^{32}P の全身および肝からの消失を日数をおつて測定した。この結果を図示したのが図9である。この図から明らかなごとく、cord factor を注射したマウスおよび対照の注射しないマウスの間には、 ^{32}P の体内からの消失速度には大きな差をみとめなかつた。

したがって cord factor を coat した菌体が in vivo で消化処理されにくいのは、cord factor の毒性のためにマウス全体が障害をうけて、間接に処理排泄能力が低下しているためではなくして、cord factor で菌体が coat されているために、白血球等によつて直接に食菌消化されにくいためであろうと考えられる。

考 察

結核菌の侵入によつて、宿主である生体に生ずる病変が結核菌の有する一次毒 (primary toxicity) によるものか、あるいは抗原である結核菌とそれによつて生体内に産生された抗体との反応によるアレルギーによるものであるか、いずれが重要な役割を演じているかは今なお明かでない。しかるに最近 Bloch は、有毒結核菌の脂質中より、cord factor なる 毒性物質の分離に成功している。これらは in vitro で白血球の遊走を阻害し²⁾、少量を反復注射することにより、マウスを致死せしめ^{2) 4)~6)}、また注射によりマウスの結核の病変を増悪せしめる効果を有する¹²⁾ ことが報告されている。また加藤らは、この cord factor をマウスの腹腔内に注射することにより、マウスの肝臓のコハク酸脱水素酵素の活性が低下することをみとめている¹³⁾。著者の実験においても、マウス体内に注入された菌体が白血球等によつて食菌され、生体内で消化処理排泄されるときに、これらの毒性物質を有する有毒結核菌の菌体脂質が、消化処理を遅延せしめる効果を有することがみとめられ、したがってこれらの脂質は毒力菌が生体内で長く生存し、

そして増殖するために、なんらかの役割を演じていることが考えられる。

総 括

著者は、各種結核菌の ^{32}P 標識菌を使用しこの 60°C , 1時間加熱死菌の 1) アルコール・エーテル(1:1)で脂質を除去した菌体, 2) さらにクロロフォルムで脂質を除去した菌体, 3) さらにこの脱脂菌体に cord factor および BCG 加熱死菌より抽出した wax C, wax D で coat した菌体をマウスの体内に注入し, マウスの全身および肝からの ^{32}P の消失を指標として, これらの菌体が, マウスの体内でどのように処理排泄されるかを観察した。その結果, 第2報ですでに報告したが, 全く脂質を除去しない加熱死菌を注入した場合は, 毒力菌は非毒力菌にくらべてマウス体内で消化処理されにくいことがみとめられたが, アルコール・エーテル(1:1)で脂質を除去した菌体でも同様な結果がみとめられた。しかしながら, この場合は毒力菌と非毒力菌との差は, 小となるように思われる。しかるに, さらにクロロフォルムで脂質を除去した菌体を注入した場合は, 毒力菌, 非毒力菌とも, ^{32}P の消失はほぼ等しく, したがって毒力菌, 非毒力菌とも同じように処理排泄されることが考えられる。したがって毒力菌の脂質中に, *in vivo* で菌体の処理排泄を遅延せしめるような物質の存在することが考えられる。

さらに, この脱脂菌に, cord factor および wax C, wax D を coat した菌体を注入した場合は, このような脂質を coat しない菌体を注入した場合にくらべて ^{32}P のマウス体内からの排泄は, ゆるやかであり, したがって毒性物質をふくむ脂質を coat した菌体は *in vivo* で消化処理排泄されにくいことが考えられる。そしてこのような現象は coat された脂質の毒性物質による間接の生体障害によつて生じたのではなくして脂質で coat されることによつて, 白血球に直接食菌消化されにくくなったためであろうと考えられる。

稿を終るに臨み御指導と御援助を賜わつた九州大学医

学部医化学教室山村雄一教授および厚生省国立療養所課関誠一郎博士に深謝する。

本論文の要旨は第12回日本結核病学会近畿地方会(昭和30年10月), 第10回厚生省医務局研究発表会(昭和30年11月), 第1回日本アイソトープ会議(昭和31年8月), 第1回原子力シンポジウム(昭和32年1月), 第16回日本結核病学会近畿地方会(昭和32年11月)および第2回日本アイソトープ会議(昭和33年2月)において発表した。そして1958年9月ジュネーブで開催予定の国連主催の原子力平和利用国際会議に提出される論文の一つとして推せんされた。

文 献

- 1) 山村好弘: 結核, 33: 435, 昭33.
- 2) Bloch, H.: J. Exp. Med., 91: 197, 1950.
- 3) Sorkin, E., Erlennmeyer, H. & Bloch, H.: Nature, 170: 124, 1952.
- 4) Bloch, H., Sorkin, E. & Erlennmeyer, H.: Am. Rev. Tuberc., 67: 629, 1953.
- 5) Noll, H. & Bloch, H.: Am. Rev. Tuberc., 67: 828, 1953.
- 6) Asselineau, J., Bloch, H. & Lederer, E.: Am. Rev. Tuberc., 67: 853, 1953.
- 7) Noll, H. & Bloch, H.: J. Biol. Chem., 214: 251, 1955.
- 8) Noll, H., Bloch, H., Asselineau, J. & Lederer, E.: Biochim. Biophys. Acta, 20: 299, 1956.
- 9) Spitznagel, J.K. & Dubos R.J.: J. Exp. Med., 101: 291, 1955.
- 10) Bloch, H., Defaye, J., Lederer, E. & Noll, H.: Biochim. Biophys. Acta, 23: 312, 1957.
- 11) Anderson, R.J. & Roberts, E.G.: J. Biol. Chem., 85: 529, 1930.
- 12) Bloch, H. & Noll, H.: Brit. J. Exp. Path., 36: 8, 1955.
- 13) Kato, M., Miki, K., Matsunaga, K. & Yamamura, Y.: Am. Rev. Tuberc., 77: 482, 1958.