

BCG 再接種モルモット肺の細胞顆粒画分から

抗結核菌物質の分離とその性状

IV. 膜の構成因子としての性格

金井 興 美・近 藤 瑩 子

国立予防衛生研究所結核部

受付 昭和 45 年 3 月 10 日

SEPARATION AND PROPERTIES OF MYCOBACTERICIDAL
COMPONENTS FROM THE LUNG GRANULAR FRACTION
OF BCG-REVACCINATED GUINEA PIGS*

IV. Characteristics as the Components of the Membrane Structure

Koomi KANAI and Eiko KONDO

(Received for publication March 10, 1970)

Fifteen BCG-vaccinated guinea pigs were revaccinated by intravenous injection of BCG. One week later the lungs were removed and collected to give 100 g as a starting material. The same amount of the lungs were also obtained from 25 normal guinea pigs. The pooled lungs were homogenized using 0.2 M KCl and differential centrifugation was made to obtain sediments at 1,000 g, 5,000 g, 25,000 g and the supernatant. The 25,000 g sediment was extracted with 0.2 M KCl containing Triton X-100 in 0.1%. The extract was fractionated by gel-filtration on Sepharose 2 B column, and the eluates of the first protein peak associated with acid phosphatase activity and cathepsin activity was pooled and named as Fraction A. Fraction A was then added with 9 times as much as acetone and centrifuged to separate sediment (hydrophobic proteins) and the supernatant. The supernatant, from which acetone was removed by flash-evaporator, was then shaken with chloroform-methanol (2:1) in a separatory funnel. The water layer was condensed and subjected to gel-filtration on Sephadex G-75 to separate proteins of small-molecular weight. On the other hand, the chloroform layer was separated and washed twice with 50% methanol containing KCl in 0.5% and then it was evaporated to make a residue. The residue was dissolved into 5 ml of chloroform-methanol (2:1) and added with 50 ml acetone to be left to stand at 4°C overnight. The resulting precipitate (phospholipid fraction) was separated and the supernatant was dried in vacuum to produce a residue. The residue was dissolved in 10 ml of methanol. This was extracted with heptane first in alkaline pH to get neutral fat fraction and then in acidic pH to obtain free fatty acid fraction.

Antimycobacterial activity of these separated components was examined by observing bactericidal effect in the environment of 0.05 M acetate buffer of pH 5.6 and also bacteriostatic effect in semi-synthetic culture medium of pH 7.0. The results indicated that the 25,000 g sediment from BCG-animals was the only cell fraction which was antimycobacterial in the given conditions. The corresponding cell fraction from the normal lungs was inactive. The

* From the Department of Tuberculosis, National Institute of Health, Kamiosaki, Shinagawa-ku, Tokyo 141 Japan.

same was true with Fraction A. However, when Fraction A was further fractionated into 5 components as above, the free fatty acid fraction and the water-soluble proteins were highly active irrespective of their origin normal or BCG-stimulation.

On the other hand, thin layer chromatography revealed that Fraction A contained sphingomyeline and cholesterol in a large amount. Basing upon these findings, discussion was made that Fraction A is membrane components originated from the lysosomal system, and that the antimycobacterial activity of BCG-animal Fraction A must be understood as a modified membrane structure whose antimycobacterial components become exposed on the surface so that the bacilli can be in contact with them.

私たちは、BCGの再接種を受けたモルモットの肺より細胞顆粒画分を分離し、このものの Triton X-100 による抽出液をゲル濾過することによつて水解酵素活性を伴つた複合体として抗結核菌物質を得た¹⁾。しかし、これより有効因子が 90% アセトン可溶成分として分離され、また一方、高濃度尿素処理によつて複合体より遊離してくる低分子蛋白分画にも、強い抗菌力の存在することが分かつたとき²⁾、この2つの所見の矛盾しない解釈が新たに要求された。

また 90% アセトン可溶の抗菌因子が、本来抗菌活性を示さなかつた正常動物由来の複合体からも分離され、他方、尿素処理による低分子蛋白分画が BCG 動物の複合体からのみ得られたことも³⁾、問題が抽出物質のレベルだけで単純に解決されるものでないことを示唆した。

この論文で報告する実験は、これら多様な所見について、一つの統一した解釈を与えるものであり、そしてまた、抗菌物質が生体膜由来のものであり、その所在が膜の全体的な構図の中で具体的に把握されるとき、抽出物の生物学的意味が正しく理解できることを論じた。

実験方法及び材料

1) 実験動物：BCG 1mg をもつてまず皮下接種し、3 週後静脈内に BCG 0.1 mg を再注射して、その 1 週後に剖検して腫大した肺を摘出した。15 匹より 100 g の材料を得た。他方、正常モルモット 25 匹より肺を集めて 105 g を得た。

2) 組織分画法 これまでの報告¹⁾⁻³⁾と本質的に変わるところはないが、0.25 M の蔗糖溶液に変えて、0.2 M KCl 溶液を媒質とし、ワーリングブレンダーを使用して 7~8 倍のホモジネイトを調製した。これより冷凍遠心機を用いた分別遠沈によつて、1,000 g 10 分による核分画、5,000 g 20 分によるミトコンドリア分画、さらに 25,000 g 20 分によつて酸性ホスハターゼ活性の強い "lysosome-rich" 分画をそれぞれ 1 回洗浄、沈渣として収獲した。

3) Fraction A の分離：沈渣としての細胞画分を、

Triton X-100 を 0.1% に含む 0.2 M KCl で抽出し、Sephadex 2B のカラム (2.5×33 cm) にかけて、pH 7.4 の β -buffer (2-mercaptoethanol を除いた⁴⁾) で溶出した。酸性ホスハターゼ活性、カテプシン活性のピークと一致する最初の蛋白分画をプールして Fraction A とした。

4) Fraction A の分析：プールされた Fraction A に 9 倍量のアセトンを加えた。30 分室温に放置してから軽く遠沈して、上清と沈渣とに分けた。上清からはアセトンを減圧蒸留して除くと、油水親性の微細な粒子の懸濁液が得られるので、この濃縮液 20 ml にクロロホルム・メタノール (2:1) 混合液 100 ml を加えて、分液漏斗中でクロロホルム層と水層とに分け、取り出した水層にはクロロホルム・メタノール (2:1) 100 ml を加えて同様に処置する。2 回の操作で得られたクロロホルム層は合して、0.5% に KCl を含む 50% メタノール 40 ml で 2 回洗浄した。クロロホルム層は減圧蒸留でクロロホルムをとばし、その残渣はクロロホルム・メタノール (2:1) 液 5 ml に溶かし、50 ml のアセトンを加えて 4°C に 1 晩放置した。析出した沈殿 (磷脂質分画) を遠沈して集めた。上清は溶媒をとばしたのち 10 ml の温メタノールに溶かし、N/100 NaOH (F=1.0064) で滴定して中和後、さらに過剰の NaOH を加えてから、ヘプタン 10 ml で 2 回抽出した (中性脂肪分画)。抽出液はメタノールで 1 度洗浄し、その洗液ははじめのメタノール層と合し、1 N HCl で酸性に変えて、これをヘプタンで抽出した (脂肪酸分画)。各分画とも溶媒を除去し、乾燥して標品とした。

また、はじめの 90% アセトン可溶部分をクロロホルム・メタノール (2:1) で振盪したさい、分液漏斗中の水相は蛋白反応陽性である。これを濾別して Flashevaporator で濃縮し、同時に残存するクロロホルムとメタノールをとばしてから 0.05 M 酢酸緩衝液 (pH 5.6) に 1 晩透析した。内容液を Sephadex G-75 のカラムにかけて、上述の緩衝液を用いてゲル濾過すると、小分子量の蛋白分画を得た。他方、はじめの 90% アセトン沈殿物

は、きわめて疎水性の水不溶性蛋白であつて、Sodium dodecyl sulfate (SDS), あるいは尿素で一部可溶化でき、ゲル濾過で分画が可能であるが、抗菌力と関係のある分画はでてこなかつたので、その詳細は省略する。

5) 薄層クロマトグラフィーによる脂質の分析: 磷脂質および中性脂肪の薄層クロマトグラフィーには、シリカゲル G (Merck) を使用し、磷脂質には試料 100 mcg をスポットしクロホルム・メタノール・水 (65:25:4) を、中性脂肪のためには試料 200 mcg 使用して石油エーテル・エーテル・酢酸 (80:30:1) を展開溶媒とした。

6) 抗菌力試験: a) 殺菌力試験——0.05 M の酢酸緩衝液 (pH 5.6) 1.8 ml に被検サンプルの一定量を溶かし、あるいは懸濁し、100°C 5分で滅菌した。これに H 37 Rv 株のソートン培養菌膜より調製した 1 mg/ml 精製水菌液 0.2 ml を加え、4時間、あるいは1昼夜インキュベイトしてから、その連続 10 倍希釈系列をそれぞれ 0.1 ml ずつ小川培地に接種した。発生集落数を対照緩衝液浮遊液のそれと比較して殺菌効果とした。b) 静菌力試験——D'Arcy Hart の半合成培地 (pH 7.0)⁶⁾ を 0.4 ml 小試験管に分注し、これに殺菌力試験に用いた被検サンプル溶液、あるいは懸濁液を 0.1 ml 加え、さらに 0.1 mg/ml の菌液を 0.1 ml 加えた。37°C で2週間インキュベイトし、その発育を観察記録した。一般に被検物質が水溶性でない場合は、テフロンホモジナイザーで均等な懸濁液として用いた。使用濃度は Folin 反応によるチロジン推定量によつたが、脂質の場合は、重

量または OD 420 m μ による比濁によつて表示した。

実験成績

組織の遠沈沈渣分画を再浮遊して行なつた抗菌テスト成績を Table 1 に示した。ここで用いた実験条件に関するかぎり、殺菌効果も、静菌効果も、BCG 動物の 25,000 g 沈渣に集中していた。40 mcg/ml の蛋白量、pH 5.6 の酢酸緩衝液環境、4時間の暴露時間によつて生菌数を 1/100 以下におとし、また 8 mcg/ml の濃度で D'Arcy Hart 培地に含まれるとき、菌の肉眼的発育を全く許さなかつた。正常動物由来の相当分画には、こうした効果は全く認められなかつた。Table 2 は 25,000 g 沈渣より得た Fraction A ならびにその構成成分の抗菌力を示したものである。BCG 動物由来の Fraction A は殺菌効果、静菌効果ともに発揮し、正常動物由来の Fraction A は同一条件で効果は全くなかつた。この点で、Fraction A は 25,000 g 沈渣の抗菌力をそのまま表現しているとみてよからう。

しかしそれぞれの Fraction A の構成成分を個別的に調べてみると、脂肪酸分画と水溶性蛋白分画に強い殺菌力、静菌力とが認められ、しかも、こうした分離標本に関するかぎり、正常動物由来のものも全く同様に有効であつた。水溶性蛋白分画はこれを Sephadex G-75 のカラムにかけてゲル濾過し、その溶出液をそのまま殺菌力試験に用いて、殺菌力が蛋白ピークとはほぼ一致することを認めた (Fig.)。しかし、詳細にみるならば、この蛋白分画は殺菌力に関していまだ均一な分子の集りとは

Table 1. Antimycobacterial Activity of Tissue Cell Fractions from Guinea Pig Lungs Normal or BCG-stimulated

Tissue cell fractions		mcg as protein per ml*	Antimycobacterial activity		
			Reduction of viability at pH 5.6 and 4 hr exposure**	Growth in semi-synthetic medium of pH 7.0***	
BCG-stimulated	Starting homogenate	67	1.52	+	
	Sediment at	1,000 g	74	1.45	+
		5,000 g	62	0.31	+
		25,000 g	40	-0.1	-
	Supernatant	72	1.76	+	
Normal	Sediment at	1,000 g	78	1.92	+
		5,000 g	75	1.63	+
		25,000 g	68	1.68	+
	Supernatant	84	1.70	+	
Control buffer		0	2.0		
D'Arcy Hart medium				+	

* Tyrosine-estimation by Folin test. The final concentration was 9/10 of the indicated one in the bactericidal test and 1/5 in the bacteriostatic test.

** Log $\frac{\text{Viable counts of sample-treated suspension}}{\text{Viable counts of control-buffer suspension}} \times 100$.

*** Growth in D'Arcy Hart medium after 2 week incubation at 37°C.

Table 2. Antimycobacterial Activity of Fraction A from 25,000 g Sediment and of its Chemical Components

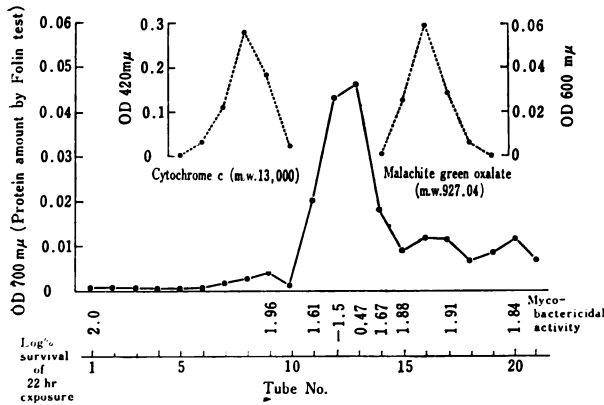
Test samples	Concentration		Antimycobacterial activity			
	mcg as protein per ml*	OD 420 m μ **	Reduction of viable counts after exposure at pH 5.6		Growth in semi-synthetic medium of pH 7.0	
			for 4 hr	for 22 hr		
BCG-stimulated	Fraction A	62		0.85	—	
	Phospholipid fraction	trace	0.1	1.80	+	
	Free fatty acid fraction	0	0.06	-1.74	—	
	Neutral fat fraction	0	0.07	1.93	+	
	Water-soluble peptide	14		-0.06	-0.3	—
	Hydrophobic proteins	65		1.92	+	
Normal	Fraction A	65		1.99	+	
	Phospholipid fraction	trace	0.043	1.88	+	
	Free fatty acid fraction	0	0.04	-1.39	—	
	Neutral fat fraction	0	0.114	1.60	+	
	Water-soluble peptide	15			<-2.0	—
	Hydrophobic proteins	89		2.0	+	
Control buffer	0		2.0	2.0	+	
D'Arcy Hart medium					+	

* Tyrosine-estimation by Folin test.

** Approximately 100 to 300 mcg per ml. } The final concentration was 9/10 of the indicated one in the bactericidal test and 1/5 in the bacteriostatic test.

Other symbols are the same as those in Table 1.

Fig. Fractionation by Gel-Filtration on Sephadex G-75 of Water-Soluble Proteins Liberated from Fraction A by Chloroform-Methanol (2:1) Treatment



いえないであろう。いずれにせよ、その蛋白質は、分子量 13,000 よりもっと小さく、おそらく 4,000 前後のものとして推定しているが、今後標本の収量をあげて検討の予定である。

また Fraction A の脂質について行なつた薄層クロマトグラフィの結果は、発色剤モリブデン酸アンモンによつて、磷脂質は main の 2 コのスポットが得られ、これらはニンヒドリン、Dragendorff 試薬および過ヨード酸-Schiff の試薬とともに陽性でホスホリルコリンを含むことが同定された。Rf 値 0.22 のスポットは、同時に展開したスフィンゴミエリン (Sigma 製、牛の脳か

ら) と等しく、Rf 値 0.33 はレシチンと等しかつた。試料 200 mcg を用いたときには、リゾレシチン (標準, Sigma 製) の位置にも小さなスポットを得た。カルジオリピンの箇所にはごくわずかの発色がみられたのみであつた。中性脂肪は、50% 硫酸の発色で Rf 値 0.54 の 1 スポットが得られた。標準コレステロールは 0.51 で、Rf 値に少しの差はあつたが、Zlatkis 試薬 (Kiliani 反応) によつて、標準と同じ速さで赤色を示すので、コレステロールと推定している。

以上の磷脂質および中性脂肪は BCG 再接種または正常動物 Fraction A のいずれにも main の存在であることを証明し、Fraction A はこれらの脂質によつて膜構造をなしていると思われるが、その組成の比率は、BCG と正常動物で多少異なつていた。すなわち磷脂質重量を 1 としたとき、BCG 動物では脂肪酸 0.53、中性脂肪 0.40、正常では脂肪酸 0.41、中性脂肪 0.66 であり、ことに正常動物のコレステロール含量が BCG 動物由来の膜に比して多いことが注目される。このことは BCG 再接種を受けた動物のライゾゾームの膜構造に変化の起こつていることを推察させる。

考 察

BCG 動物由来の Fraction A に抗結核菌性が認めら

れ、正常動物由来の Fraction A にはそれが検出できなかった点は、前報告²⁾の成績を確認するものである。しかし、本報告の新知見として、Fraction A がレンチン、スフィンゴミエリン、コレステロールを多量に含有し、またカルジオリピンがほとんど抽出されてこない点は、Fraction A が“lysosomal system”に由来する膜成分であることを示している。おそらく Triton X-100 によつて“disaggregate”した膜の構成成分が Sepharose でのゲル濾過のさいに Triton から離れることによつて“Reaggregate”して Fraction A として分取されるのであろう。

ところが正常動物由来の Fraction A は抗菌性を発揮しなかつた事実にもかかわらず、そこから分離された脂肪酸分画と水溶性蛋白分画は、BCG 動物由来のそれと同じく、殺菌作用、静菌作用を示した。このことは Fraction A の抗菌性が単に抽出された物質のレベルからだけでは説明されず、そのものの所在が、膜の全体的な構図の中で認識され、それによつて菌との接触の可能性が考慮されてはじめて理解されるであろう。たとえば前報告²⁾で BCG 動物の Fraction A からのみ尿素処理によつて抗菌性の水溶性低分子分画の遊離してくることを報告したが、このことは正常動物には存在しないものが BCG 動物にあることを意味するのではなく、BCG 動物由来の“lysosomal system”の膜構造が、尿素処理によつてそうした蛋白分画を離しやすい状態にあると考えるべきであろう。具体的にいうならば、BCG 再接種による菌の直接的な作用、あるいはアレルギー反応を介した間接的作用によつて、おそらく食細胞の“lysosomal system”の膜構造が修飾され、その結果、菌と接触する面に抗菌物質の露出する可能性が生ずるのではなからうか。

Brown⁶⁾, D'Arcy Hart⁷⁾らはマクロハージの食菌空胞中の抗酸菌の態度を観察し、むしろ lysosome との交渉の多い場合に菌の増殖が強いことを報告し、そのあと、その同じ研究グループ⁶⁾が、ラッテ肝の分離ライソゾームの 90% アルコール分画に抗結核菌のあることを認めて、これを一つの“Paradox”として報告している。この“Paradox”は抗菌性の本態をライソゾームに含まれ、そこから食菌空胞に放出される物質に求めないで、その修飾された膜構造と菌との直接的な接触に求めることによつて説明可能となるのではなからうか。しかし、こうした立場での形態学的研究は、実験上の困難さもあつてか現在まだ見当たらない。

私たちはこれまで感染マウスの脾においても、Frac-

tion A を分離し、これを酸性環境、37°C でインキュベートすること、あるいはエーテル処理、またあるいは尿素処理によつて、低分子の水溶性蛋白を離し、このものの抗菌性を証明してきたが⁶⁾、これもその分子量からみてモルモット肺から得たものと同種のものであろう。Fraction A の抗菌力が、この種の蛋白質によるものか、脂肪酸によるものか、あるいは双方とも関与するかは今後の問題である。

総 括

BCG 再接種によつて腫大したモルモットの肺より、“lysosomal”分画を集め、このものの Triton X-100 抽出液を Sepharose 2B のカラムでゲル濾過して、水解酵素活性をもつ巨大分子分画を得た。この物質は結核菌に対して、酸性緩衝液環境で殺菌力、中性培地で静菌力を示したが、正常動物由来のそれは抗菌力はなかつた。しかし、この複合体をさらに分画して、疎水性蛋白、燐脂質、遊離脂肪酸、中性脂肪、そして水溶性小分子蛋白等それぞれの分画に分けたところ、水溶性蛋白と脂肪酸分画に抗菌力が認められ、これら抽出物に関するかぎり、正常動物由来のものも同じく抗菌力があつた。スフィンゴミエリン、レンチンおよびコレステロールの証明されることにより、Fraction A は膜の“Reaggregate”であることが示唆され、また、その抗菌力は、そこから抽出される抗菌物質の存否によるよりは、それが菌との接触の可能性をもちうるような膜構造中での所在形式と関係していると考察した。この立場から、結核感染によつて修飾されるであろう食細胞“lysosomal system”の膜は、今後の研究の主題であると考えられる。

本研究実施にあつては、日米医学協力計画結核専門部会からの研究費に負うところが大きい。記して謝意を表す。

文 献

- 1) 金井興美・近藤瑩子：結核，44：217，昭44。
- 2) 金井興美・近藤瑩子：結核，44：351，昭44。
- 3) Kanai, K. and Kondo, E. Japan. J. Med. Sci. Biol., 22：309，1969。
- 4) Rottem, S., Stein, O. and Razin, S. : Arch. Biochem. Biophys., 125：46，1968。
- 5) D'Arcy Hart, P., Gordon, A.H. and Jacques, P.J. Nature, 223：672，1969。
- 6) Brown, C.A., Draper, P. and D'Arcy Hart, P. : Nature, 221：658，1969。
- 7) D'Arcy Hart, P. : Science, 162：686，1968。