

第46回総会特別講演

II. 結核感染における感作と防御の機構

国立予防衛生研究所結核部 金井興美**

The 46th Annual Meeting Special Speech

II. THE MECHANISM OF SENSITIZATION AND RESISTANCE
IN TUBERCULOUS INFECTION, WITH PARTICULAR
REFERENCE TO THE INVOLVEMENT OF
THE LYSOSOMAL SYSTEM*

Koomi KANAI

Acid phosphatase activity of mouse lungs was elevated in response to tuberculous infection. This elevation was accelerated when the mice had been immunized with BCG. "In vivo grown tubercle bacilli" were separated from infected mouse tissue by a mechanical means, and they were found to be coated with host acid phosphatase. These findings were interpreted to be the result of lysosome-bacillus interaction during the process of tuberculous infection. Lysosomal components were obtained as a Triton-lysate of the lung and spleen granular fractions of infected mice. Incubation of tubercle bacilli with the components resulted in the bacilli gaining lysosomal acid phosphatase activity, whereas the phosphatase activity specific for the bacilli decreased with simultaneous reduction of viability.

A large-molecular mycobactericidal fraction associated with cathepsin and acid phosphatase activities was separated from the detergent-extracts by gel-filtration on Sephadex G-150 column. The mycobactericidal activity was expressed only in the acidic environment below pH 6.0, and the activity was reduced when the amount of bacilli exposed to the fraction was increased. The latter observation appeared compatible with the finding that the mycobactericidal activity was removed from the fraction by absorbing with heat-killed tubercle bacilli. Heating of the fraction at 100°C and pH 5.6 for 10 min destroyed completely both enzymatic activities, but the mycobactericidal activity remained unaffected.

A further attempt was made to compare the mycobactericidal fraction of the spleen and lung lysosomal components between normal and tuberculous mice. The results indicated that the yield of spleen mycobactericidal fraction increased after infection in terms of tissue weight and more markedly in terms of organ, and that the fraction was highly active in reducing viable counts in acidic buffer environment. As for the corresponding fraction of the lungs, the rate of infection-induced increase was not so marked as the previous case; besides the fraction was much less active even in the higher protein concentration than the spleen sample. These observations were compatible with the finding that tubercle bacilli could multiply and persist more freely in the lungs than in the spleen. In addition, it was demonstrated that tubercle bacilli exposed *in vitro* to the spleen antimycobacterial fraction were less infective when they

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

** 現所属：山梨県立衛生研究所

were injected into mice. When the fraction was obtained from "BCG-stimulated" animals, it showed antimycobacterial activities. The corresponding fraction from normal animals did not. By further fractionation, the complex was separated into 5 subfractions; hydrophobic protein, phospholipid, neutral fat, free fatty acid and water-soluble peptide fractions. The antimycobacterial activities were attributed to the last two subfractions. The corresponding subfractions from the inactive complex of normal animals were also antimycobacterial.

Combination of Gomori stain for acid phosphatase at pH 5.0 and Ziehl-Neelsen stain revealed the association of the *in vivo* bacilli with membranous tissue components with Gomori-positive reaction products and some of the bacilli themselves stained black. Such observations were never obtained with *in vitro* grown bacilli. When the *in vitro* grown bacilli were incubated with lysosomal components separated from the mouse tissue, the surface of the bacilli showed a strong affinity to the lysosomal components, and *in vitro* tests demonstrated that the enzymatic activities of the bacilli changed into the pattern of the *in vivo* bacilli. The water-soluble peptide fraction and the free fatty acid fraction were found responsible for lowering the activities of tetrazolium-reduction and acid phosphatase specific for the bacilli.

Lipid analysis was conducted of the sample of *in vivo* bacilli. The 90% acetone extract contained sphingomyelin as the major phospholipid, the neutral lipids including cholesterol in 20%, and free fatty acids such as palmitic, stearic and linoleic acids. The 90% acetone-insoluble residue was further extracted with chloroform-methanol (2:1, v/v). From this extract, sphingomyelin and lecithin were demonstrated only in a slight amount, instead cardiolipin was detected as the major phospholipid. Tuberculostearic acid was present in 25% of the constituent fatty acids of the phospholipid fraction. Cholesterol was still detected, but mostly as the ester. These results, together with those described before, suggest that the 90% acetone treatment could remove the major portion of host-originated lipids associating with the bacilli grown *in vivo* and the chloroform-methanol extracted mostly the components proper to the bacilli. Interesting was an additional observation that the ratio of lecithin to sphingomyelin and the ratio of cholesterol to its ester decreased in the bacillus-associated host lipids, probably as the result of the host-parasite interaction.

These observations and the collateral experiments led us to a view that the lysosomal membrane might be a site of the host-parasite interaction, and that a change in the orientation of membrane components caused by infection or allergic reaction produces a situation that the intracellular bacilli might come into contact with such antibacterial molecules. However, other possibilities were also considered.

Our experiences were then extended to a model experiment to test Burnet's theory for induction of delayed sensitivity that bacterial antigenic determinants must be incorporated into the lipoprotein surface of macrophage. The reconstituted or reaggregated membrane was prepared *in vitro* by dialysing the combined SDS extracts of lysosomal fraction of the guinea pig spleen and tubercle bacilli against Tris-NaCl buffer containing $MgCl_2$ in 20 mM. Guinea pigs immunized with this material were sensitized to react to PPD and showed some grade of resistance to tuberculous infection.

Finally, discussion was made to make each separated observation mutually associated and to form an acceptable whole picture of tuberculous infection.

この数年、私どもの研究室で行なってきた仕事は、この標題の意味する大きな広りのうちの、ごく限られた一面にすぎないが、そのような側面が結核感染の全体像の

中で占める位置について、はじめに知る必要がある。

感染を宿主と菌との相互関係としてみてゆく場合、そのいずれの個体も、組織あるいは細胞に始まって、細胞

下の構築物、そして分子のレベルにいたるまで次第に小さな単位に分画でき、それらのさまざまな組合せで実験系をつくることが可能である。また、菌側の因子を考える場合、その死菌から出発して、あくまで物質面で分析をすすめる方法と、他方、それに生菌のもつ機能面を加味して、宿主細胞への働きかけをことさらに重視する立場もあろう。私どもがこれまで試みたいいくつかのアプローチのうち、今回報告する仕事は、宿主細胞のもつ膜構造のひとつ、ライソゾームと感染菌との関係を中心としたものである。感染が食菌現象をその出発点として進行するものである以上、菌体表面と食細胞の膜系との交渉は、感染の生物学、生化学、そして免疫学の研究対象として、最も基本的なものであるに違いない。したがって、結核感染学も新しい言葉を用いれば、まさにエクトバイオロジーのきわだった一分野であり、この機会に、私どものこれまでの仕事を整理要約し、それを現今における結核感染学の知見と関連づけて論じた。

内容の大部分は、すでに学術誌に原著として報告済みであるので、本論文においては実験技術や成績の詳細は割愛し、全体としての有機的な連関を主体に記述するつもりである。

1) 研究の発端。感染に伴う組織酸性ホスファターゼ (AP と略) 活性の変化

2群のマウスを用意し、その一方をBCGで免疫した。さらに両群を有毒株を用いて攻撃し、以後各週ごとに肺のホモジネイトをつくつて、その中の感染菌数とAP活性とを追求した。Fig. 1に示した成績のごとく、免疫群においては感染菌の増殖は見事に阻止され、このさいAP活性についての両群の差は、免疫群において活性上昇が時間的に加速されることにあり、上昇のピークの高さの違いは明白でない。このAP活性は細胞内顆粒のひとつライソゾームのマーカー酵素活性であり、感染に伴つて細胞のライソゾームの動員、増量が、細胞数の増加をも含めて惹起していることはすでに文献²⁾⁻⁴⁾の示すところである。また、肝を用いた実験では、結核感染に伴つてAP活性は上昇するが、特異的なグルコース-6-ホスファターゼ(肝実質細胞のマイクロソーム分画に存在する)の活性には変化がない。これらのことは、AP活性の上昇が感染菌に直接関与する網内系細胞に則した現象であることを示唆する。

2) マウス肺で増殖した“in vivo 結核菌”における観察

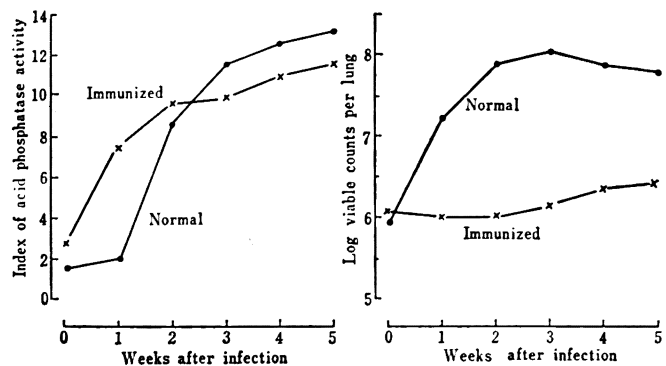
牛型ラブレネル株で強く静注感染し、以

後日を追つて肺滲出液の塗抹標本をみてゆくと、抗酸性染色によつても、菌はマクロハージの中にとりこまれていることが分かる。その数は次第に増し、ついには細胞をこわしてその外部に流出する局面もみられる。また、Gomori法を併用して、AP活性の細胞染色を施行すると、肺マクロハージは数多くのGomori陽性スポット、つまりライソゾームの存在を示し、赤く染まつた菌がそれらの中に混在してみられる。マウスの死亡直前になると、菌はほとんど細胞外に存在し、その菌のあるものは、Gomori陽性である。pH 3.5でのGomori染色によるかぎり、in vitro発育の結核菌は絶対に反応陰性である。次に、こうして感染死にいたるようなマウスの肺材料を多数集め、これよりSegalら⁶⁾、Bekierkunstら⁶⁾の方法に準じて、機械的な方法で“in vivo結核菌”をできる限り純粋に集め、その性状を検討した。

このような標本をZ.N.染色すると、青染する組織由来因子をほとんど含まない抗酸菌の集団を確認できるが、その同じ標本をpH 3.5でのGomori染色を用いて検鏡すると、青黒色の反応陽性菌が同じく反応陽性のスポットをもつた組織片と絡んで存在する。さらにまた、Z.N.染色とGomori染色とを併用して重染色⁷⁾すると、Gomori陽性菌は単に赤く染まつた菌群の一部をなしている。以上のような所見は、ソートン培地上発育のin vitro菌では全くみられない。

in vivoの菌とin vitro菌とをさらに比較観察すると、前者は後者と異なりきわめて親水性であり、90%アセトン、NaOHの殺菌力に対して抵抗力が強く、他方、テトラゾリウム塩還元力が微弱あるいは検出できず、in vitro菌でみられるpH 6.5でのAP活性も弱い。それにかわつて、ライソゾーム由来のものと同pH活性を等しくするカテプシン活性とAP活性とがin vivo菌には強く発現する。また、in vivo菌標本の生菌度は、収穫の都度同じではないが、重量当りの生菌数はし

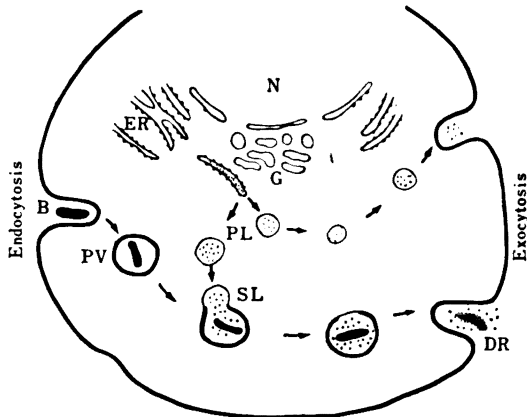
Fig. 1. Elevation of Acid Phosphatase Activity of Mouse Lung Tissue and the Fate of Viable Tubercle Bacilli therein during the Development of Tuberculous Infection



ばしばきわめて低いことがある。

以上のような *in vivo* 菌の性状は、菌体表面がライソゾーム由来の物質で包被され、そのもつ性質が表現されていること、ならびに、その物質の作用による菌自体の性質変化、これら双方の理由によると考えうる。このことは、後述のごとく *in vivo* の菌の脂質分析を通してさらに裏づけられ、また、Fig. 2 に示したような食菌現象の模式図からも理解できるが、その前に、組織よ

Fig. 2. Lysosomes in Phagocytosis (Schematic presentation)



B: Bacillus DR: Digested residue ER: Endoplasmic reticulum G: Golgi apparatus N: Nucleus PL: Primary lysosome SL: Secondary lysosome

Fig. 3. Isolation of Lysosomal Components (Fraction A)

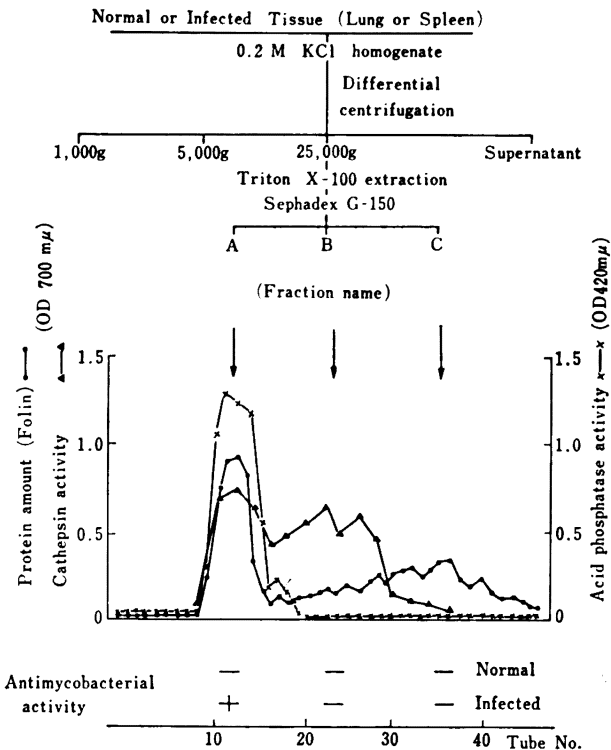


Fig. 4. Test System for Antimycobacterial Activity

- 1) Bactericidal test :

0.05 M acetate buffer pH 5.6	1.8 ml
Test sample	0.2 ml
1 mg/ml H ₉₇ Rv	0.2 ml
	37°C, 4 hr
	Glycerol egg medium
- 2) Bacteriostatic test :

D'Arcy Hart medium	0.4 ml
Test sample	0.1 ml
0.1 mg/ml H ₉₇ Rv	0.1 ml
	37°C, 2 wks
- 3) Inhibition of enzymatic activities :
 - a) Tetrazolium (TTC) reduction
 - b) Acid phosphatase activity at pH 6.5

り分離したライソゾーム分画と *in vitro* 発育菌とを、試験管内で混合インキュベイトしたモデル実験の結果を示したい。

3) 分離ライソゾーム分画の試験管内発育結核菌に及ぼす影響

正常あるいは感作動物 (マウスまたはモルモット) の肺あるいは脾を実験材料として、Fig. 3 に示すような方法で、ライソゾーム分画を Fraction A として分離した。この分画は AP 活性、カタプシン活性のピークと一致する巨大分子蛋白分画であるが、後述のごとく、生体膜に特有な脂質をも含んでおり、水解酵素活性をもつた膜由来分画とみなしうる。

まず、Triton 抽出物の段階でこれを *in vitro* 菌に作用せしめ、そのあと、処理菌を Gomori 染色すると、菌のディメンジョンにおいて青黒色に染まり、*in vivo* 菌と類似の所見を呈する。このことは、水解酵素活性を示すライソゾーム由来成分が、菌体に強い親和性をもっていることを示している。同様のことが、Fraction A を用いた場合にも確認でき、さらにまた、この処理菌の性状を調べると、TTC 反応が極度に減弱し、カタプシン活性を獲得し、菌自体の AP 活性は減弱すると同時に、ライソゾーム由来の AP 活性が表現された。これらすべての所見は、さきにみた *in vivo* 菌の特徴そのものであり、感染菌とライソゾームとの交渉が、感染個体内で現実に行進する可能性を、*in vitro* のモデル実験から強く支持していることになる。

Fraction A の抗菌力は、酵素活性阻害作用のみでなく、Fig. 4 に示す試験法によつて、殺菌力ならびに静菌力が認められる。しかも、こうした抗菌力は、感作あるいは感染動物由来の Fraction A においてはるかに強く、さらに加えて、核あるいはミトコンドリアを主要成分と

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 37C.

Table 2. Characteristics of Mycobactericidal Activity of Fraction A

- 1) Active in acidic environment
- 2) Active at 37°C, but not at 4°C
- 3) Absorbed with heat-killed tubercle bacilli
- 4) Require more dose against more amount of bacilli
- 5) Heat-stable at 100°C for 10 min, though enzymatic activities were destroyed
- 6) Active against *Brucella abortus*
- 7) Hemolytic activity
- 8) Neutralized with
 - basic protein such as protamin
 - bovine serum
 but not with
 - 25,000 g supernatant
 - Fraction B and C from lysosomal components

する細胞分画由来の Fraction A には弱く、ライソゾームを主体とする分画由来のものに強いという、きわだつた観察が得られている (Table 1)。殺菌力の性格について検討した結果は Table 2 に総括したが、この成績より、殺菌力を示す本態は耐熱性であつて、水解酵素そのものでなく、酸性環境でのみ有効であつて、その殺菌力は有効因子が菌体表面に付着したのち、はじめて発揮されることが示唆されている。Brucella abortus にも有効であるので、結核菌のみに特異的でなく、また塩基性蛋白、血清で中和されるが、組織ホモジネイトの 25,000 g 遠沈上清や、ライソゾーム分画の Triton X-100 抽出液のゲル濾過分画、Fraction B や Fraction C (Fig. 3) によつては中和されない。

次に、Fraction A を構成する各溶出液について、その抗菌性を、殺菌力、そして菌体あるいは菌膜分画の AP 活性に対する阻害作用について比較観察した。その成績は Fig. 5 に示してあるが、抗菌力はいずれの面においても Tube No. 22 をピークとして、その前後の溶出液では弱まり、それら抗菌力の表現は、ほぼ平行して観察された。菌の AP 活性はその膜構造にあることが知られているが、上の成績は、殺菌力の機序として、Fraction A の菌膜に対する作用を考へうる一つの根拠を呈出している。

Fig. 5. Antimycobacterial Activity of Each Eluate of Fraction A Obtained from Infected Mouse Spleen

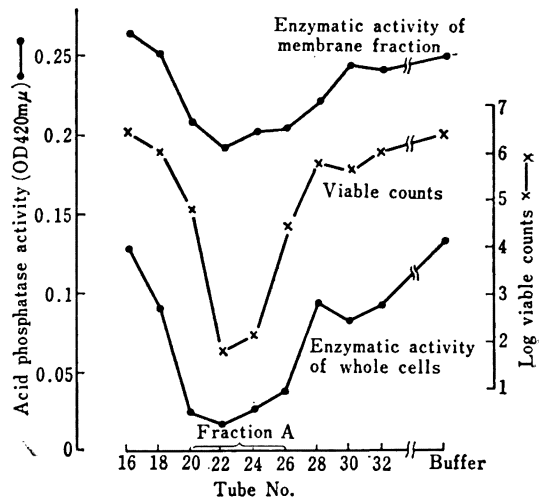


Fig. 9. Chemical Fractionation of Fraction A

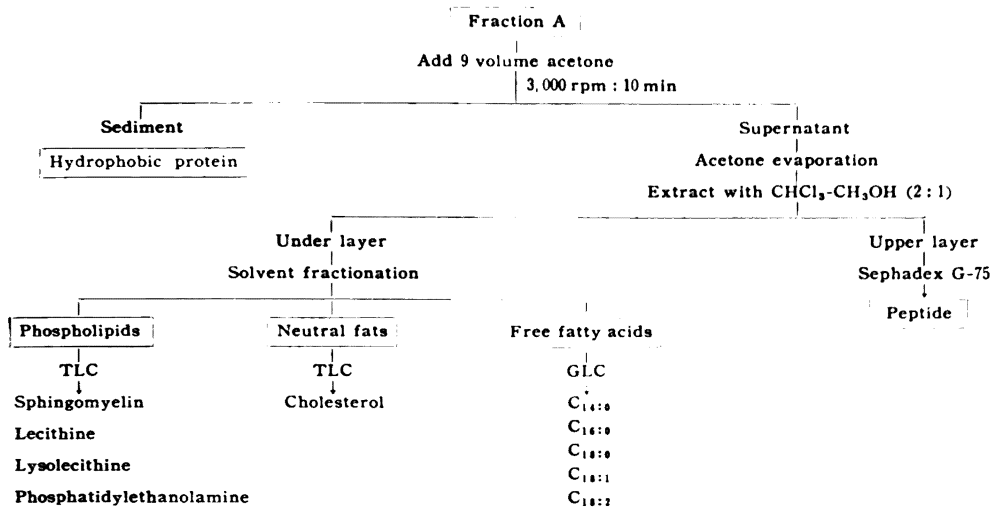


Table 3. Antimycobacterial Activity of Fraction A from 25,000g Sediment and of its Chemical Components

Test samples	Concentration		Antimycobacterial activity			
	mcg as protein per ml*	OD 420 mμ**	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					+	

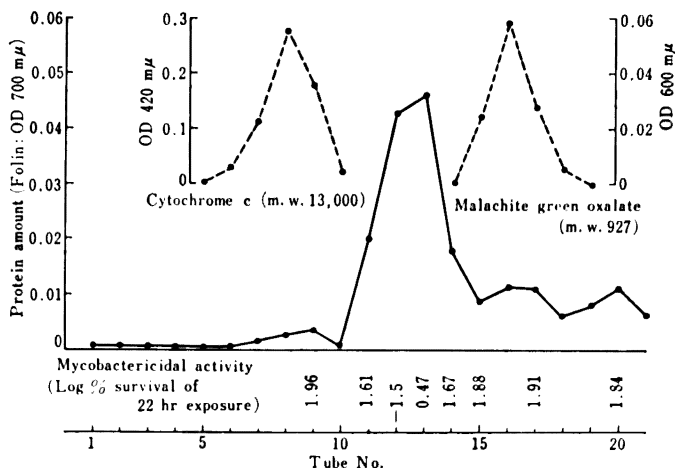
* Tyrosine-estimation by Folin test. } The final concentration was 9/10 of the indicated one in the bactericidal test and 1/5 in the bacteriostatic test.
 ** Approximately 100 to 300 mcg per ml.
 Other symbols are the same as those in Table 1.

4) Fraction A の分画

次に、Fraction A をさらに分画して、活性物質を求めることにする。まず Fleischer⁹⁾の方法で90%アセトン抽出を行ない、脂質を主成分とする可溶部と、不溶性の疎水性蛋白とに分けた。可溶部はアセトンをとばしてから、再びクロロホルム・メタノール(2:1)を4倍量加えて抽出した。その上層(水・メタノール層)は、これを Sephadex G-50 でゲル濾過して一つのペプタイ

ド分画を得た。下層(メタノール・クロロホルム層)は溶媒分画して、中性脂肪、磷脂質、遊離脂肪酸の3分画に分け、それぞれ TLC, GLC 等で分析すると、コレステロール、スフィンゴミエリン、レシチン、パルミチン酸、オレイン酸、リノール酸を主成分とすることが分かり、Fraction A は、生体膜に由来する可能性がいつそう高まった(Fig. 9)。そこで、上述の5つの小分画について抗菌力を比較検討すると、抗菌力を示すものは水溶性ペプタイドと、遊離脂肪酸の分画のみであった。磷脂

Fig. 10. Fractionation by Gel filtration on Sephadex G-75 of Water-Soluble Peptides Liberated from Fraction A by Chloroform-Methanol (2:1) Treatment



質は多少発育促進の効果を示した。ところで、このように Fraction A を化学的な意味での小分画に分けると、本来殺菌効果を示さなかつた正常動物由来の Fraction A から、同様に活性のある水溶性ペプチドと遊離脂肪酸が得られた (Table 3)。この理由と意味づけについては、別に検討する。

水溶性ペプチドについては、Fig. 10 に示すゲル濾過のパターンより、分子量 3,000~4,000 のものと推定されるが、収量に限度があるので、現在までその詳細な分析が得られていない。この分画は、Fraction A をエーテル処理、尿素処理、あるいは酸性で 37°C においてインキュベートしても遊離する。ライソゾーム分画由来の Fraction C (Fig. 3) にアルコールを 50% に加えて

Table 4. Effects of the Free Fatty Acids on Viability and Enzymatic Activities of Tubercle Bacilli

Fatty acids	Mycobactericidal activity	Inhibition of enzymatic activities	
		Acid phosphatase activity	Tetrazolium salt-reducing activity
C ₈	—	—	—
C ₁₀	—	—	—
C ₁₂	≡	≡	+
C ₁₄	≡	≡	+
C ₁₆	+	+	≡
C ₁₈	—	—	+
C _{18:1}	≡	≡	≡
C _{18:2}	≡	≡	≡

Condition :

Environment 0.05 M acetate buffer (pH 5.6)

Exposure 4 hr

Temperature 37°C

Concentration : dose of bacilli

Bactericidal test, 20 μg : 0.1 mg

Inhibition test, 100 μg : 20 mg

大部分の蛋白を沈殿せしめ、その上清を Sephadex G-50 でゲル濾過すると、上と同じ Tube No. にのみ Folin 陽性分画が現われる。以上の観察を文献的⁹⁾に考察すれば、このペプチドは Fraction A を構成する膜成分の一部としてのグリコペプチドであろうと推定し、今後の分析をすすめるつもりである。

遊離脂肪酸に関しては、純品を用いてその抗菌力を調べると、Table 4 に総括した成績から分かるように、殺菌作用と菌に対する酵素活性阻害作用に関して、不飽和脂肪酸であるオレイン酸、リノール酸がことさらに活性が強い。飽和脂肪酸のラウリン酸、ミリスチン酸も殺菌力は強いが、Tetrazolium 塩還元能を阻害する活性の弱いこと、そして、Fraction

A に含まれる量が少ない (Table 5) という理由から、Fraction A の抗菌性の問題からはずしてよいように思われる。

以上のごとく、Fraction A の抗菌力がそこに含まれるペプチド、遊離脂肪酸であり、そうして分離された形では、由来が正常動物でも感染動物であっても活性は同じであつた。しかし、Fraction A という、もとの大きな複合体の形においては、感染動物由来のものがはるかに活性が強いという事実は、どのように説明されるか。まず第 1 に、感染動物における含有量の増大が考えられるであろう。そして、第 2 に、膜構造としての Fraction A 構成因子の構造変化を考え、抗菌因子の膜表面への露出といった可能性もあろう。第 3 には、感染動物や免疫動物に特有な第 3 の物質を考えうる。私どもはいまだにこれらの質問に直接答える知見をもちあわせていないが、次項の観察は間接的ながら示唆に富むものであろう。

Table 5. Free Fatty Acids in Fraction A of Guinea Pig Lungs

Fatty acid	Normal	BCG-stimulated
C ₁₄	2.56%	2.52%
C ₁₆	30.15	29.10
C _{16:1}	5.58	6.58
C ₁₇	0.86	0.80
C ₁₈	8.35	8.34
C _{18:1}	30.74	29.70
C _{18:2}	15.22	15.57
C ₂₀	0.30	0.37
C ₂₁	—	0.51
C ₂₂	—	2.74
Nonidentified minor acids	5.99	3.75

Table 6. Activation of Fraction A (Lysosomal Components) Obtained from Normal Guinea Pig Lungs by Various Enzymatic Treatment

Sample to be treated	Treatment	Antimycobacterial activity of the treated components (Fr. A)					
		Enzymes	µg/ml	pH	Time	Temperature	Viable counts per mg after 4 hr exposure at 37°C in pH 5.6 buffer
Fraction A (Lysosomal components)	Phospholipase A (100°C, 5 min heated)	100	5.6	20 min	37°C	<1 × 10 ²	—
	Phospholipase C	500	7.4	20 min	37°C	76 × 10 ⁴	—
	Neuraminidase	100	5.6	60 min	37°C	48 × 10 ⁵	+
	Pepsin	100	3.5	60 min	37°C	23 × 10 ⁵	—
	Trypsin	500	7.4	30 min	37°C	20 × 10 ⁶	+++
	Lipase	100	7.4	30 min	37°C	20 × 10 ⁶	—
	None		5.6	5 min 3 days	100°C 4°C	10 × 10 ⁶	—
	None		5.6	5 min 3 days	100°C 37°C	9 × 10 ⁶	+
	None		5.6	3 days	37°C	3 × 10 ⁶	—
	None		7.4	3 days	37°C	44 × 10 ⁶	+++
None	Phospholipase A (100°C, 5 min heated)	100	5.6	20 min	37°C	20 × 10 ⁶	++
	Phospholipase C	500	7.4	20 min	37°C	34 × 10 ⁶	+++
	Neuraminidase	100	5.6	60 min	37°C	19 × 10 ⁶	+++
	Lipase	100	7.4	30 min	37°C	24 × 10 ⁶	+++
	0.05 M acetate buffer of pH 5.6					22 × 10 ⁶	+++

Note: Each treating system was a 1 ml mixture in acetate buffer (0.05 M, pH 5.6) or in 1.15 M phosphate buffer of pH 7.4. After treatment, the mixture was added with 4 ml of the acetate buffer and sterilized at 100°C for 10 min; 2 ml of which was used for bactericidal test inoculating 0.2 mg of H₃₇Rv tubercle bacilli, and 0.1 ml of which was added to 0.4 ml of D'Arcy Hart medium and inoculated with 0.01 mg of the same strain.

5) Fraction A の抗菌機序に関する 2, 3 の知見

Table 6 に示した成績は、数回行なつたこの種の実験の一つであるが、正常動物由来 Fraction A を種々な酵素で処理し、その結果として抗菌性が表現されるか否かをみたものである。表にみられるように、ホスホリパーゼAによつて処理された場合のみ、Fraction A に強い抗菌力が現われた。しかし、Fraction A より分離した磷脂質分画をホスホリパーゼAで処理した場合には、この分画の殺菌力上昇はごくわずかにすぎなかつた。この一見矛盾した成績は、酵素処理の結果発生した抗菌物質としての遊離脂肪酸が、複合体としての Fraction A の中に組み込まれ、しかも菌と接触しうる状態にあることの重要性を示唆する。

Fig. 11 に示した成績は、これまでのように殺菌試験における菌暴露時間を4時間にとどめず、48時間にわたつて殺菌効果を観察して、正常動物、感染動物由来の Fraction A を比較したものである。この成績をみると、正常動物由来の Fraction A も、長時間菌に与えるならば、終局的には強い抗菌力を発揮している。しかし、別の実験によつて、正常動物の Fraction A のみを単独に48時間インキュベイトしてから、これを菌に与えても、

その殺菌力は処理前のものと比べてそれほど強くない。つまり、正常動物由来の Fraction A は、菌表面に長時間付着している間にも、構造上の変化を来し、その

Fig. 11. Comparison of Mycobactericidal Activity of Fraction A between Normal and Infected Animal Origin

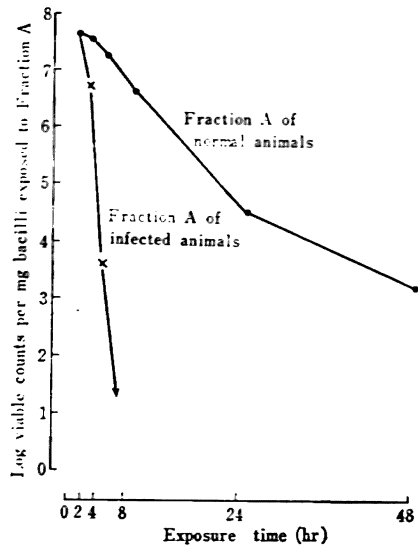
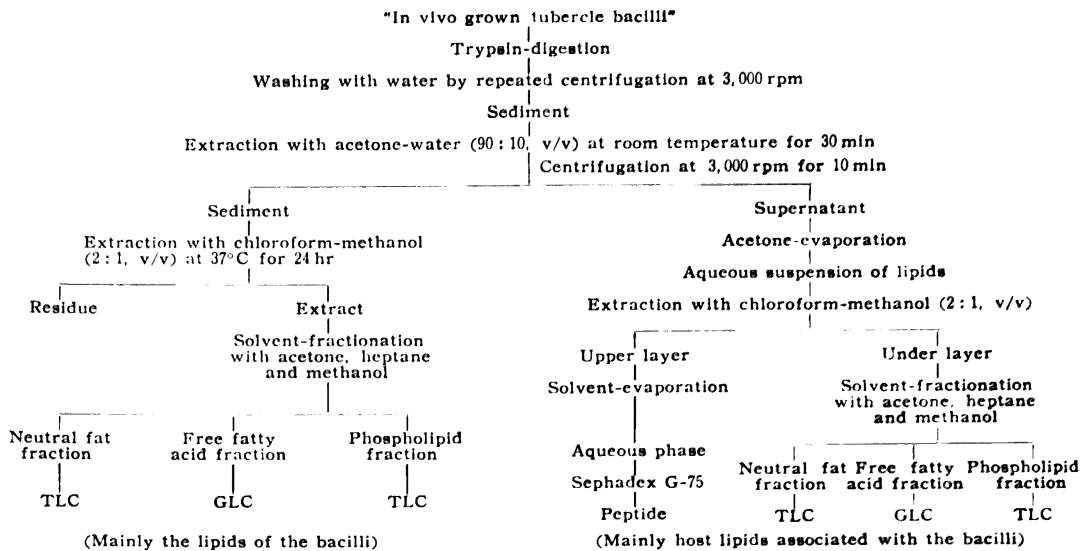


Fig. 12. Flow Chart for Lipid Analysis of "In Vivo Grown Tubercle Bacilli"



結果殺菌力が現出してくると理解される。そのような Fraction A の性状変化というものは、感染動物や免疫動物においてはすでに生体内において出来上がっており、それゆえ、それを分離して用いれば、そのまま短時間の接触で抗菌力を発揮することになる。

また、感染動物由来の Fraction A は、正常動物由来のものと比較して、非常に凝集しやすい状態にあり、このことは、やはり、Fraction A を構成する膜由来複合体の表面性状の変化を示すものであろう。菌体表面と Fraction A との相互交渉は次の in vivo 菌の脂質の仕事からも示唆が得られる。

6) In vivo 菌の脂質分析とその成績の意味

Fig. 12 は in vivo 菌の脂質分析の1例を示しているが、前に述べたように、in vivo 菌標本は、菌それ自体とその表面に緊密に付着している組織由来、ことに、ライソゾーム由来の宿主膜成分との双方から構成されている。したがって、脂質分析もその点を考慮してなされた。

まず 90% アセトン水で抽出し、さらに Fraction A の脂質分析を行なったと同じ方法で抽出物を分画すると、磷脂質、中性脂肪、遊離脂肪酸、そして水溶性ペプチドが得られた。TLC, GLC によつて分析すると、Fraction A との違いとして、スフィンゴミエリンとの比較において、常にレシチンの量の減少していること、また、コレステロールのかかなりの部分がエステルに転化していることが特徴的であつた。アセトン不溶の残渣は、クロロホルム:メタノール(2:1)で抽出してから、同様に分画・分析すると、いまだ宿主由来のものが少量検出できるが、興味あることは、このさい得られるコレ

ステロールはほとんど脂肪酸エステルに形であつた。このことは、エステル化が、菌体表面あるいはそれに非常に近いところで起こっていることを示唆しており、Host-parasite interaction を脂質分子のレベルでとらえる一つの材料を供している。この問題に関しては現在さらに実験が進行中である。

in vivo 菌標本より得られた遊離脂肪酸、ペプチドの抗菌力に関しては、Fraction A 由来のものと同様である。

また、菌自体の脂質成分については、これまでのところ、in vitro の結核菌に特徴的であるマイコール酸、フチオセロール、ディマイコセロセイト、ツバクロステアリン酸が同定されており、現在さらに研究が進行中である。

7) ツベルクリン型感作の成立機序に関する仮説とモデル実験

ツベルクリン反応の発現機序に関しては、近年 MIF と呼称される mediator の発見によつて、知見の拡大がみられたが、他方、感作の機序に関しては、従来 2, 3 の仮説があるのみで、実証的な研究に乏しい。私たちは、これまで行なつてきた研究より、結核感染における菌と、ライソゾームを含めた宿主細胞膜構造との密な関係に注目し、同時に、マクロハージの表面リポ蛋白膜への菌抗原の組み込みを、遅延型感作の前段階と考える Burnet の仮説¹⁰⁾に同調し、次のごときモデル実験を行なった。詳細は独立した論文として報告の予定であり、まだ、予報的段階を出ないことをつけ加えておく。

組織(モルモットの脾)のホモジネイトより型のごくライソゾーム分画を収穫し、これを SDS を用いて可

Table 7. Production of Various Reaggregates of SDS-solubilized Components of Guinea Pig Spleens and Tubercle Bacilli in a Separate or Combined System

Source material	SDS-solution		Centrifugation at 25,000g for 20 min after 5 day dialysis against Tris-NaCl buffer containing MgCl ₂ in 20 mM			
	ml	Protein (μg as tyrosine/ml)	Supernatant		Sediment (Reaggregate)	
			ml	Protein (μg/ml)	Resuspended in buffer (ml)	Protein (μg/ml) (Sample name)
H ₃₇ Ra tubercle bacilli	18	280	18	122	10	15 A
ISS 25,000g pellet	18	250	18	160	10	38 B
ISS 5,000g pellet	25	230	25	170	10	17 D
ISS 25,000g pellet H ₃₇ Ra tubercle bacilli	12 6	374 420	18	260	10	82 C
ISS 5,000g pellet H ₃₇ Ra tubercle bacilli	17 8	336 420				
NS 25,000g pellet H ₃₇ Ra tubercle bacilli	6 3	366 420	9	280	10	88 F
NS 5,000g pellet H ₃₇ Ra tubercle bacilli	13 5.8	330 420				

ISS: Immunologically stimulated spleens. NS: Normal spleens

Table 8. Experimental Design to Vaccinate Guinea Pigs with Various Reaggregate Samples as Shown in Table 1

Experimental group	Number of animals	"Antigen"	Amount of vaccination(ml)				Skin-reactions in mm to intradermal injection of 2 μg PPD (Reading at 48 hr)
			1st	2nd	3rd	4th	
			2 days	3 days	10 days		
			sc	sc	sc	ip	
1	5	A	0.25	0.25	0.25	1.0	0. 5. 6. 3. 5
2	5	B	0.25	0.25	0.25	1.0	6. 0. 8. 7. 4
3	5	C	0.25	0.25	0.25	1.0	18. 22. 27. 27. 23
4	5	A	0.25	0.25	0.25		0. 0. 0. 0. 15
			B	0.25	0.25	0.25	
5	5	D	0.25	0.25	0.25	1.0	0. 0. 0. 0. 0
6	5	E	0.25	0.25	0.25	1.0	0. 5. 4. 0. died
7	5	F	0.25	0.25	0.25	1.0	4. 12. 0. 0. 4
8	5	G	0.25	0.25	0.25	1.0	13. 16. 0. 0. 0
9	5	H ₃₇ Ra living cells, 0.01 mg once, sc					16, 18, 23, 22, 19
10	5	Non-immunized control					0, 0, 4, 0, 3

sc: Subcutaneous injection ip: Intraperitoneal injection. Skin test was conducted 10 days after the last vaccination.

Table 9. Protection in the Vaccinated Guinea Pigs against Subcutaneous Challenge with 0.005 mg of H₃₇Rv Tubercle Bacilli as Revealed by Viable Counts in the Spleen, Spleen Weight and Tubercles

Group No.	Number of animals	"Antigen" for vaccination	Spleen observations						
			Average weight (g)	Viable counts (Colonies number/10mg)			Tubercle formation		
2	5	B	1.0	430.	350.	27.	450.	530	+
3	5	C	0.86	0.	0.	0.	0.	0	-
7	5	F	1.4	210.	37.	10.	170.	760	+
9	5	H ₃₇ Ra	1.0	2.	2.	4.	1.	1	-
10	5	None	1.3	1200.	7.	53.	100.	2300	++

The vaccination-challenge interval was 4 weeks. Autopsy was made 4 weeks after the challenge.

溶化する。感染動物由来のものはこのあと細菌濾過器を通す。このものを Sephadex G 150 を通してゲル濾過し、高分子部分のみをブールする。他方、H₃₇Ra 株、あ

るいは BCG を硝子粉末を用いて菌体破壊し、これより SDS を用いて抽出液を得、上と同様にして濾過器を通し、ゲル濾過して高分子溶出液をブールした。こうして

Fig. 13. Cytogenesis in Tuberculous Infection (According to Yasuhira, Mackness, North and Dannenberg)

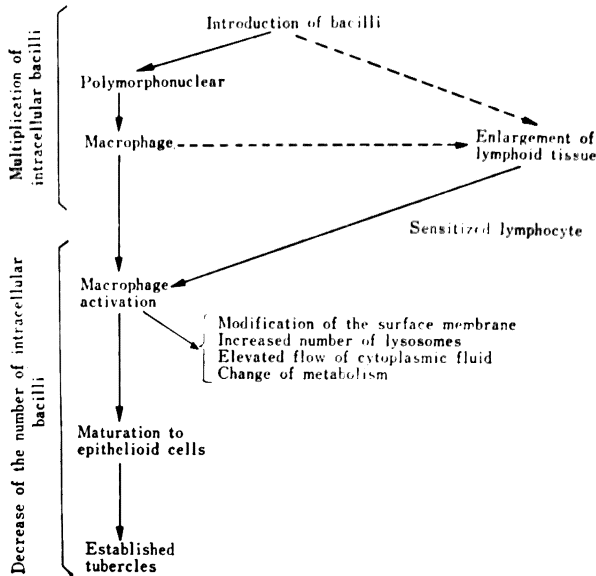
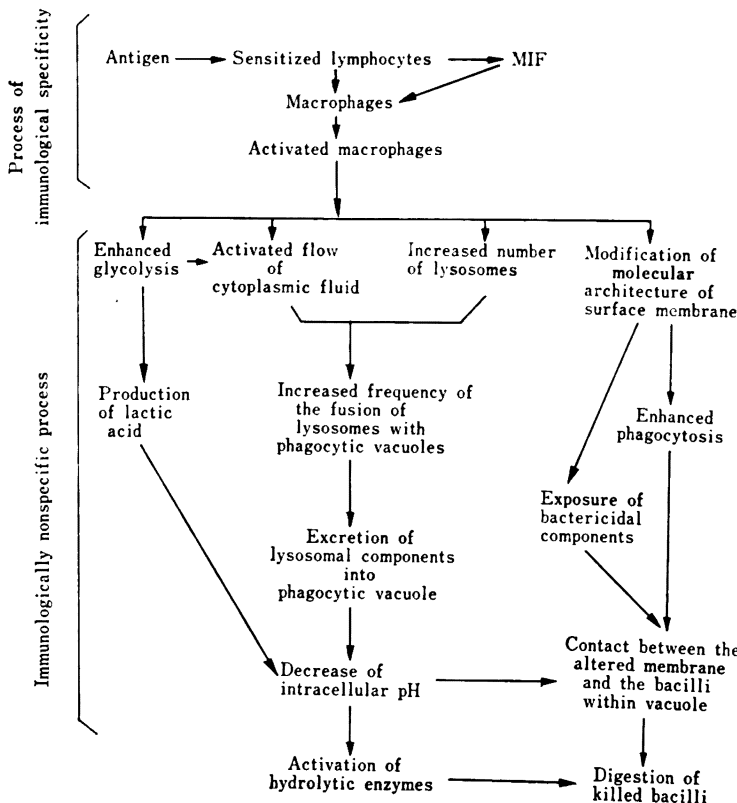


Fig. 14. Hypothesis for the Mechanism of Resistance to Tuberculous Infection



得られた抽出液は、当然膜の細分化したものであるが、これらは、Mg⁺⁺ を含んだバッファーに対して透析すると、再凝集してもとの膜構造を再現し、透析膜内部に沈殿として現われる。このさい、宿主由来、菌由来のものを混合して透析すれば、起源を異にする2つの膜構造のモザイクが得られ、宿主膜構造中に菌の膜抗原が組み込まれたものが得られると想定した。得られた沈殿物をモルモットに注射して、感作発生と防御力とを調べたが、Table 7, 8, 9 に示すような成績となり、われわれの想定を支持するがごとき結果である。しかし、ほぼ同一条件で実験を繰り返しても、その成立感作の程度は時には強く、時には弱く、実験条件をさらに検討して固定する必要がある。

8) 結核感染防御の総合的理解

結核感染で代表されるような慢性感染の防御機構は、その各局面を捉えた場合、それらが総合されて合理的な全体像を形成されなければならない。それは、一個人、一研究室の研究成績だけをもつてしては、不可能であり、また危険でもある。Fig. 13, 14 はこの数年主として米国の研究者によって発展せしめられた知見と解釈に、私どもの成績を導入して結核感染成立の過程を模式的に表現したものである。

結核菌の侵入に対してまず多形核白血球の反応があり、それが早急にマクロファージに置換される。菌はこの細胞に食菌されて空胞内に存在し、表面膜の一部であつたこの食菌空胞の限界

膜、ならびに、そこに融合したライソゾームの一重膜と生物学的に意味のある相互交渉をもつと考えられる。さらに、ライソゾームより空胞内に放出された水解酵素その他の物質が、菌体表面と接触するであろうことは推察される。このような状況下でも、一般細菌のごとく容易に崩壊することなく、増殖かつ生残しうる結核菌であるので、これをマウスの肺より直接分離し、その性状を検査することによつて逆に、宿主個体内での細胞と菌との交渉を推察できたわけである。すでに述べたように、細胞内での菌と細胞膜構造との関係の結果、リポ蛋白質層としての膜の中に菌物質が組み込まれ、かくして、“self”より“non-self”に変わった膜構造によつて、感作リンパ球の発生が誘発される可能性は、Burnetの仮説を待つまでもない。かくして感作リンパ球が出現すると、このものはなんらかの機序で今度は逆にマクロハージを刺激し、その分裂増殖を促し、また、これを活性化すると考えられている。ここで初めて、マクロハージは結核菌と対決しうる状態となり、菌増殖の頭うち、減少が招来され、細胞自体は上皮様細胞に成熟する。以上が、現今における結核感染に対する初期 cytotogenesis と防御効果との関係である。感作動物においては再感染に対してより急速にこのような cytotogenesis が起こり、菌数増加の著しくなる以前に防御体制が完了すると説明される。

そこで、マクロハージの活性化とは何かという問題について、Fig. 14 にまとめてみた。この図の中に示す相互関係については、まだ憶測の域を出ないものが多いが、今後の研究をすすめるうえでの作業仮説として、また、本報告の知見の意味を考察する目的で、あえて呈出したものである。

謝 辞

本報告を終わるにあたり、この機会をお与え下さいました総会長北本教授、理事長岩崎博士、そしてまた、座長の戸田博士に心から感謝の意を表します。

長年結核感染の仕事が続けてくることのできましたのは、予研の柳沢所長、室橋部長をはじめ、多くの先輩、同僚のご指導、ご協力によることは今さら申しあげるまでもありませんが、とくに日米医学協力計画結核部会を通して、岩崎博士、砂原博士、堀博士、山村博士、染谷博士、その他多くの方たちから研究上のご援助、ご助言をいただきましたこと、厚くお礼申しあげます。

研究実施に当たっては、協同研究者の近藤瑩子博士、福田健一氏のご協力に負うことが大きく、記して謝意を表します。

文 献

- A) 本報告の資料となつた既発表の原著
- 1) Kanai, K.: Japan. J. Med. Sci. Biol., 20 : 73, 1967.
 - 2) Kanai, K.: Japan. J. Med. Sci. Biol., 20 : 401, 1967.
 - 3) Kanai, K.: Ann. New York Acad. Sci., 154 : Art 1, 177, 1968.
 - 4) Kanai, K.: Japan. J. Med. Sci. Biol., 21 : 103, 1968.
 - 5) Kanai, K. and Kondo, E.: Japan. J. Med. Sci. Biol., 21 : 405, 1968.
 - 6) Kanai, K. and Kondo, E.: Japan. J. Med. Sci. Biol., 21 : 415, 1968.
 - 7) Kanai, K. and Kondo, E.: Japan. J. Med. Sci. Biol., 22 : 131, 1969.
 - 8) Kanai, K. and Kondo, E.: Japan. J. Med. Sci. Biol., 22 : 309, 1969.
 - 9) Kanai, K. and Kondo, E.: Japan. J. Med. Sci. Biol., 23 : 295, 1970.
 - 10) Kanai, K. and Kondo, E.: Japan. J. Med. Sci. Biol., 23 : 303, 1970.
 - 11) Kondo, E. et al.: Japan. J. Med. Sci. Biol., 23 : 315, 1970.
 - 12) Kanai, K. et al.: Japan J. Med. Sci. Biol., 23 : 327, 1970.
 - 13) 金井興美・近藤瑩子：結核，44 : 211, 昭 44.
 - 14) 金井興美・近藤瑩子：結核，44 : 217, 昭 44.
 - 15) 金井興美・近藤瑩子：結核，44 : 351, 昭 44.
 - 16) 金井興美・近藤瑩子：結核，45 : 171, 昭 45.
 - 17) 金井興美・近藤瑩子：結核，45 : 440, 昭 45.
- B) 文中の引用文献
- 1) 永井克孝：自然，No. 12 : 71, 1970.
 - 2) Thorbecke, G. J. et al.: J. Histochem. Cytochem., 9 : 392, 1961.
 - 3) Allison, M. J. et al.: Am. Rev. Resp. Diseases, 91 : 713, 1965.
 - 4) Saito, K. and Suter, E.: J. Exptl. Med., 121, 727, 1965.
 - 5) Segal, W. and Bloch, H.: Am. Rev. Tuberc., 75 : 495, 1956.
 - 6) Bekierkunst, A. and Artman, M.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 105 : 605, 1960.
 - 7) Hart, D'Arcy, P. and Young, M. R.: Stain Technol., 44 : 11, 1969.
 - 8) Fleischer, S. et al.: J. Cell Biol., 32 : 193, 1967.
 - 9) Goussault, Y. and Bourrillon, R.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 40 : 1404, 1970.
 - 10) Burnet, M.: Cellular Immunology, Melbourne University Press, 1969.