Kekkaku Vol. 49, No. 8

第 49 回 総 会 特 別 講 演

結核感染における Cord Factor の意義

加 藤 允 彦

大阪大学微生物病研究所結核病理学部門
国立療養所刀根山病院

受付 昭和 49 年 6 月 18 日

SIGNIFICANCE OF CORD FACTOR IN PATHOGENESIS OF TUBERCULOSIS

Masahiko KATO*

(Received for publication June 18, 1974)

Tuberculosis in man and laboratory animals is characterized by progressive wasting symptoms. As a causative agent of such intoxication signs in tuberculous infection, H. Bloch has reported the existence of a peculiar lipid toxin possessing a characteristic delayed toxicity for mice in petroleum-ether-extract of virulent *Mycobacterium tuberculosis*. Since the solvent extracted-bacilli have lost the property to grow in culture medium in forming "cords", this toxic lipid was named as "cord factor". The chemical structure of cord factor was subsequently identified as a 6, 6′-dimycoloyl-α, α'-D-trehalose.

In a series of investigations on the biochemical mechanism of the toxic property of cord factor, it has been noted that cord factor induces, either *in vivo* or *in vitro*, a marked swelling and fragmentation of mitochondrial membranes and a functional damage of membrane-associated electron transport and coupling of respiration and phosphorylation specifically between coenzyme Q·cytochrome *b* complex and cytochrome *c* (coupling site II). These results suggested that cord factor accelerates the multiplication of tubercle bacilli *in vivo* by impairing the cellular energy metabolism and thus interferring with the development of the overall defense mechanisms in host tissues.

To verify this proposed hypothesis, an antibody which precipitates cord factor and neutralizes its toxicity was prepared in mice and rabbits by the vaccination with cord factor-methylated bovine serum albumin (MBSA) complex. Active immunization with cord factor-MBSA complex protected mice against both cord factor toxicity and infection with virulent tubercle bacilli. The multiplication of tubercle bacilli in lungs and spleen of vaccinated mice was supressed 10^2 to 10^3 lower than that in non-vaccinated mice. Histopathological changes in the lungs of vaccinated mice were minimal. This infection-protecting effect of cord factor-MBSA complex was specific for tuberculous infection among a number of experimental infections with a variety of cytopathogenic bacteria.

Serum of cord factor-MBSA-vaccinated rabbits contained an immunoglobulin M (IgM) class antibody which demonstrates a precipitin reaction with the aqueous emulsion of cord factor. Passive transfer of the immune serum protected mice against cord factor-toxicity and infection

* From the Department of Tuberculosis Research II, Research Institute for Microbial Diseases, Suita, Osaka 565 and the Research Institute of Tuberculosis, Toneyama Hospital, Natonal Sanatorium, Toyonaka, Osaka 560 Japan.

with virulent tubercle bacilli. However, sera of mice and rabbits vaccinated with live BCG or infected with virulent human *M. tuberculosis* $H_{37}Rv$ did not react with cord facter. Human sera of the cases of active, convalescent or pneumonectomized pulmonary tuberculosis did not demonstrate the precipitin reaction with cord factor, indicating that the precipitin antibody to cord factor is not associated with the infection with *M. tuberculosis*.

The above data indicate that cord factor promotes the *in vivo* multiplication of tubercle bacilli and plays a key role in the pathogenesis of tuberculosis.

I. はじめに

結核症が慢性の衰弱・消耗の症状を特徴とする感染症であることは，結核菌の発見以前から広く世界中で認められていた。感染，発症初期の肺結核患者においては，咳嗽，喀痰，胸痛，呼吸困難のような呼吸器系の諸症状よりも，むしろ疲労，倦怠感，脱力感，るい痩などの全身的な症状を訴えることの方が多いことは，結核診療におけるひとつの常識となつている。そしてこのような全身症状は感染の進展とともに次第に著明になり，肺に広範な難治病巣をもち，持続的に排菌を続けながら悪化の一途をたどる重症肺結核患者の末期にみられる高度のるい痩や，衰弱，消耗の様相をみると，この疾患が古くから「肺癆」あるいは "consumption" という名をもつてよびならわされたことが理解できる。

結核症におけるこのような全身衰弱症状は，結核菌体に含まれる毒素様の成分によつて惹起されるのではないかということが予想されるけれども，結核菌が他の病原微生物における菌体外毒素あるいは菌体内毒素に匹敵する毒性物質を産生するか否かということに関する知見は，1950年代の初めまではほとんどなかつたということができる。むしろ，結核菌はいかなる種類の毒素も産生せず，その病原性は「宿主体内増殖力」によつて規定されるという考え方が定説をなしていた[1]。

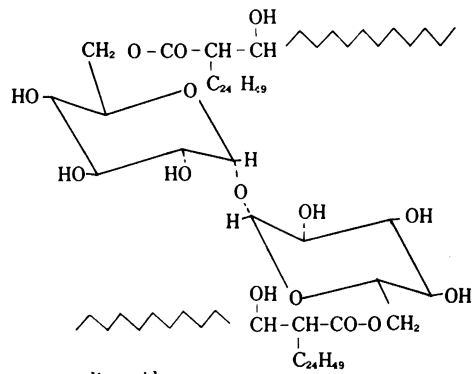
1950年に Hubert Bloch[2] は，有毒結核菌の生菌体を石油エーテルで抽出すると，菌が有毒菌株に特徴的なコード状発育(cord-like growth)を行う性質を失うとともに，石油エーテル中に反復腹腔内注射によつてマウスを漸次衰弱，致死させる一種の毒性脂質が抽出されることを報告した。Bloch はこの毒性脂質が有毒結核菌の菌体表層に存在して，コード状の発育に関与すると考えこのものを cord factor と名付けた。その後，Noll と Bloch[3] は cord factor の抽出と精製の方法を改良し，この物質を化学的に単一な糖脂質として分離することに成功した。1956年には Noll ら[4] によつて，cord factor の化学構造が 6,6′-dimycoloyl-α,α'-trehalose (図1) であることが決定され，この構造式は合成によつて確認された[5]。このようにして，結核菌がマウスに特異な遅延性毒性を示す糖脂質を産生することが確定的となつたが，この物質の毒性の機序や，感染における cord factor の役割に関してはなお不明な点が残されていた。

そこで著者は，cord factor のマウスに対する遅延性毒性の機序を明らかにするとともに，この物質が結核感染において果たす役割を解明することを目的として，以下に述べる一連の研究を行つた。

II. Cord factor の作用機序

Noll と Bloch の方法[3]によつてヒト型結核菌 $H_{37}Rv$ 株から分離，精製した cord factor を，Bayol F や Drakeol 6 VR のような鉱物油に溶解して，5～10 μg ずつ2日おきに反復してマウスの腹腔内に注射するか，あるいは10～100 μg を1回腹腔内に注射すると，いずれの場合にもマウスの体重は注射の翌日から持続的に減少し，注射後 1～2 週間の間に高度の衰弱，消耗の症状を示して死亡する。精製 cord factor の平均体重 20 g のマウス

Fig. 1. Chemical Structure of Cord Factor of *Mycobacterium tuberculosis* (Noll, Bloch, Asselineau and Lederer, 1956)



meromycolic acid

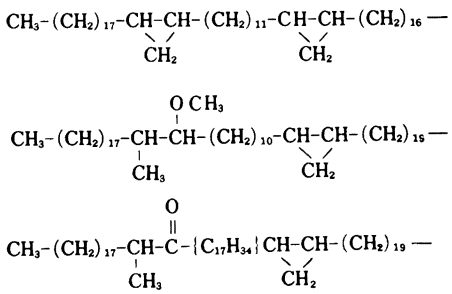
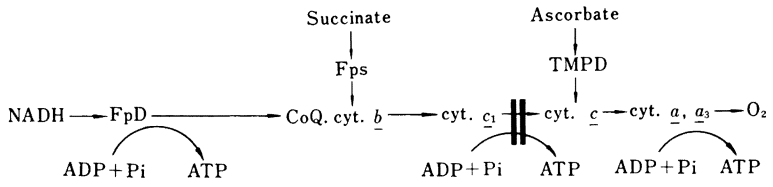


Fig. 2. Site of Functional Damage Induced by Cord Factor in Mitochondria Either *In Vivo* or *In Vitro*



NADH : Reduced nicotinamide adenine dinucleotide ; Fps : Succinate dehydrogenase ; FpD : NADH dehydrogenase ; TMPD : *N, N, N', N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine, CoQ : Coenzyme Q ; Pi : Inorganic phosphate.

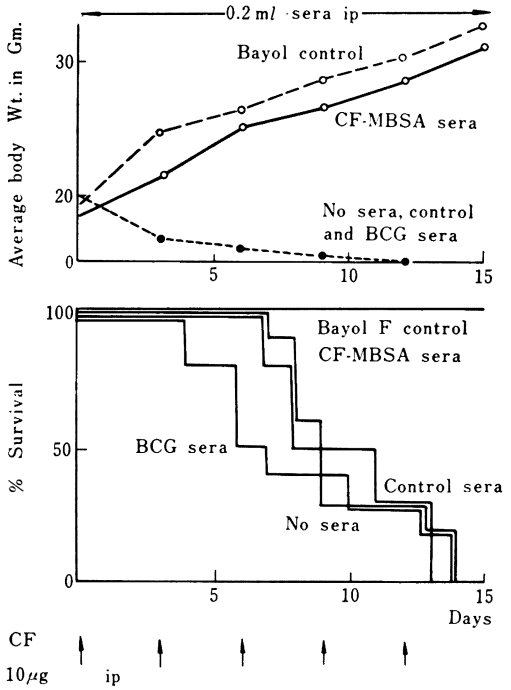
(Random-bred dd 0 stock, 大阪大学実験動物センター)における50%致死量(LD_{50})は50 μgである[6]。マウスにおけるこのようなcord factor中毒死の様相は，マウスの実験的結核感染において感染死が起こる時期の症状，あるいはさらにヒトにおける重症肺結核の末期症状に酷似している。

このようなcord factorの毒性の機序を追求する端緒となつたのは，S. P. Martin一派による結核感染モルモットにおける呼吸酵素系代謝異常の研究であつた。すなわち，Chaudhuri と Martin[7]はヒト型有毒結核菌を感染したモルモットの腎臓皮質のホモジネートを酵素材料として，コハク酸・ネオテトラゾリウム還元酵素活性を測定し，感染の進展に伴つてこの酵素活性が次第に低下することを報告した。著者ら[8][9]は，cord factor中毒マウスの肝ホモジネートにおいても，コハク酸あるいは還元型ニコチンアミド・アデニン・ジヌクレオチド(NADH)に共役する種々の基質(リンゴ酸，乳酸，α-グリセロリン酸)によるテトラゾリウム色素の還元活性が低下することを認め，結核感染における呼吸酵素系の代謝異常がcord factorによつて惹起されることを明らかにした[10]。結核菌体脂質を系統的に分画して，それぞれの画分の阻害活性を検討すると，コハク酸・ネオテトラゾリウム還元酵素活性を低下させる作用は，cord factorと結合脂質(firmly bound lipids)の画分にだけ認められる[11]。最近，結合脂質中に含まれる有効物質は，cord factorと構造的に近似したtrehalose monomycolateであることが明らかにされた[12]。

つぎにcord factorがマウス肝細胞内呼吸酵素系のどの部位を阻害するのかという点を明らかにするために，コハク酸酸化酵素系を構成する各酵素分節の活性に対するcord factorの阻害作用を検討した。その結果，これらの酵素活性のうち，還元型コエンチームQ・チトクロームc還元酵素(reduced coenzyme Q-cytochrome c reductase)の活性だけがcord factorの注射によつて特異的に低下し，コハク酸脱水素酵素(succinate dehydrogenase)，コハク酸・コエンチームQ還元酵素(succinate-coenzyme Q reductase)およびチトクローム酸化酵素(cytochrome oxidase)の活性は，cord factor中毒マウス肝においても正常値を維持することを明らかにした[13]。すなわち，cord factorは*in vivo*で細胞内呼吸酵素系を，コエンチームQ・チトクロームbコンプレックスとチトクロームcの間で特異的に阻害すると考えられる(図2)。

コハク酸・チトクロームc還元酵素活性の低下は，結核菌を感染したマウスの肝ホモジネートにおいても，感染後週をおつて認められる[14]。酵素活性の低下が著明になり，感染死が起こる4週後に，マウスの肺内で増殖した結核菌を分画遠心によつて集め，この菌体をマウスの静脈内に注射すると，やはり肝細胞の呼吸酵素活性はチト

Fig. 3. Effect of Serum of Rabbits Vaccinated with Cord Factor-MBSA Complex on the Toxicity of Cord Factor in Mice



Mice injected with no sera, control rabbit sera and BCG-vaccinated rabbit sera served as controls.

クローム c 還元の段階で低下した[14]。したがつて結核感染によつて惹起される呼吸酵素活性の低下は，宿主組織内で増殖した結核菌 (*in vivo* grown tubercle bacilli) の菌体成分 —cord factor— によつて起こると考えられる。

このように呼吸酵素活性の低下した肝ホモジネートからミトコンドリアを分離して，その機能的および形態学的変化を追求すると，ミトコンドリアの呼吸とリン酸化反応の比活性の低下に伴つて，蛋白量およびリン脂質量で表わされるミトコンドリアの量的減少と，ミトコンドリアフラグメントの増加が認められた[15]。電子顕微鏡的には，肝細胞内のミトコンドリアの膜構造は，cord factor の注射によつて著明に膨化，崩壊し，クリステ (cristae) の膨化と消失が認められる[16]。これらの成績から，cord factor は *in vivo* で細胞内ミトコンドリアの膜構造に障害を与え，その構造を崩壊させるとともに呼吸とリン酸化反応の機能を低下させると考えられる。

このような cord factor の作用を *in vitro* の反応系でより直接的に証明するために，cord factor をエーテルに溶解したのちエタノールと水を等量加え，減圧，加温下に有機溶媒を除去することによつて cord factor の均等な水エマルジョンを作つた[17]。このものをミトコンドリアに *in vitro* で作用させると，ミトコンドリアの膨化と部分的崩壊[18]に伴つて，コハク酸経路および NADH 経路の呼吸とリン酸化反応が，cord factor の濃度と接触時間に比例して低下することが観察された[17]。この場合の阻害の部位は，*in vivo* の場合と同様に共役部位Ⅱ (coupling site Ⅱ，図2) に特異的であつた。また，cord factor と *in vitro* で接触したミトコンドリアにおいても，膜構造の変化が認められた。すなわち，ミトコンドリアの内膜は著明に膨化，断裂の像を示し，内膜粒子 (inner-membrane spheres) が膨化，崩壊した基底構造から脱離する像が観察された[19]。

以上の成績から，cord factor は *in vivo* および *in vitro* においてミトコンドリア膜を直接障害し，その膨化，崩壊を惹起するとともに，膜構造の "integrity" に依存する呼吸とリン酸化反応の活性を，共役部位Ⅱにおいて特異的に阻害すると結論される。このようなミトコンドリアの構造と機能の変化は，cord factor と同様の毒性を示す合成類似物質にはすべて認められる[20]。しかしながら，毒性を欠くミコール酸，アセチル化 cord factor および無毒の合成類似体には，ミトコンドリアの構造と機能を障害する作用が全く認められない[20]。したがつて以上述べたミトコンドリアの膜構造の崩壊と，酸化的リン酸化反応の阻害が，cord factor の毒作用の機序の，少なくともひとつであると考えられる。

III. Cord factor の感染における役割

Cord factor が宿主細胞内ミトコンドリアの構造と機能を *in vivo* および *in vitro* で障害するという実験事実から，この毒性脂質が結核感染において演ずる役割をつぎのように推定した。すなわち，マクロファージ内に取込まれた結核菌体表層の cord factor は，菌体周辺のミトコンドリアに構造的，機能的変化を惹起する。そのために，結核菌を取り囲む細胞内環境におけるミトコンドリアの呼吸と ATP 産生の持続的な低下が起こり，phagosome 膜の新生や水解酵素の合成などの抗菌機序の発現が抑制される。その結果，結核菌の増殖に有利な環境が生れ，菌の増殖に伴つて上記の cord factor の作用はより広い細胞内環境に広がつて，感染の進展をうながすと考えられる。

この推論を実態的に立証し，cord factor の結核感染における意義を明らかにするためには，cord factor の毒性を中和する抗体を作り，この抗体が *in vivo* で cord factor の毒性を中和するときに，結核生菌による感染の経過がどのように修飾されるかということを検討するべきである。そこで研究のつぎの段階として，抗 cord factor 抗体を産生させる方法の開発を行つた。

ヒト型有毒結核菌の cord factor ($C_{186}H_{366}O_{17}$) の分子量は3,000以下であり，しかも抗原活性の弱い糖脂質であるために，従来この物質には抗原性の全くないことが認められていた[2]。また cord factor は水に不溶であるために，このものを適当な蛋白に結合させることも困難であつた。しかしながら，前項に述べた方法[17]によつて cord factor の均等な水エマルジョンを作ることが可能になつたことから，抗原活性をもつ cord factor-蛋白結合物を作ることもできるようになつた。著者は cord factor とコンプレックスを作る適当な蛋白を種々検索する途上で，井上と野島[21]による抗カルジオリピン抗体産生の成績を参照する機会を得た。すなわち，カルジオリピンはレシチンを補助脂質として，メチル化牛血清アルブミン (methylated bovine serum albumin, MBSA) とコンプレックスを作り，この抗原で免疫することによつて，ウサギ血清中に高力価の抗カルジオリピン抗体が産生される。この方法を cord factor に応用し，cord factor と MBSA を 1 : 3 の割合に混合して 2℃ に1夜静置すると架状の沈降物が生成されることを認めた[22]。U-^{14}C-酢酸ソーダを含む培地で培養した $H_{37}Rv$ 菌体から，^{14}C-標識 cord factor を抽出，精製し，このものを MBSA に加えて作つた沈降物について定量を行うと，このコンプレックスは cord factor と MBSA を 10 : 1 の割合に含んでいる[22]。中性糖脂質である cord factor が MBSA とどのような機序でコンプレックスを作るのかという点は明らかではないが，ミコール酸やアセチル化 cord factor が MBSA とは結合しないことから，cord factor 分子中のトレハロースの水酸基が，コンプレックス形成になんらかの役割を果していることが推定

Table 1. Effect of Various Vaccines on Cord Factor Toxicity

Vaccine*	Adjuvant	Route of vaccination	Protection (no. of survivors/no. tested at 14 days)**	
			Expt 1	Expt 2
Cord factor-MBSA	+	Subcutaneous	9/10	13/15
Cord factor-MBSA	+	Footpad	10/10	14/15
Cord factor-MBSA	−	Subcutaneous	1/10	1/15
Cord factor-MBSA	−	Footpad	0/10	ND†
Cord factor-MBSA	−	Intravenous	5/10	8/15
Cord factor only	+	Subcutaneous	0/10	ND
MBSA only	+	Subcutaneous	1/10	ND
Cord factor + BSA	+	Subcutaneous	2/10	2/15
Mycolic acid + MBSA	+	Subcutaneous	0/10	2/15
Acetylated cord factor + MBSA	+	Subcutaneous	0/10	ND
Methyl 6-mycoloyl α-D-glucopyranoside-MBSA	+	Subcutaneous	1/10	0/15
6,6′-Dimycoloyl sucrose-MBSA	+	Subcutaneous	0/10	ND
Live BCG	−	Intravenous	0/10	2/20
None	−		1/10	0/15

* All vaccines except BCG were injected twice a week for 3 weeks with or without Freund's incomplete adjuvant by the designated route of vaccination. BCG (1.5×10^7 viable units) was vaccinated intravenously 4 weeks before the test of cord factor toxicity.

** Cord factor toxicity was tested by injecting mice with 10 μg of cord factor at 2-day intervals for 14 days.

† Not done.

される。またcord factorは牛血清アルブミン(BSA)とはコンプレックスを作らないことから，メチル化によつて疎水性をましたMBSAが，水相に均等に分散したcord factorと疎水結合によつて結合する結果沈降物の形成を導くという可能性も考えられる。

このcord factor-MBSAコンプレックスを水に分散し，Freundのincomplete adjuvantと混和して，マウスの皮下に週2回，3週間にわたつて免疫し，最終免疫注射後1～2週たつてからcord factor 10 μgを反復腹腔内に注射すると，cord factorの毒性に対する著明な抵抗性の発現が認められた[22]。この場合，cord factor-MBSAコンプレックスをアジュバントとともに皮下または足蹠に免疫することが，cord factor毒性を中和する効果の発現に必須の条件であつて，cord factorまたはMBSAをそれぞれ単独でアジュバントとともに用いた場合は無効であつた。またMBSAをBSAで置換えた場合や，cord factorをミコール酸，アセチル化cord factor，あるいは6,6′-dimycoloyl-sucroseやmethyl 6-mycoloyl-α-D-glucopyranosideのような合成類似体に変えたものを用いてマウスを免疫しても，cord factor毒性を中和する能力は附与されない（表1）[22]。

以上の成績から，cord factor-MBSAコンプレックスで免疫することによつてcord factor毒性に対する抵抗性を獲得したマウスの血清中に，毒性を中和する抗体が産生されたと考えられる。この点を実証するために，cord factor-MBSA抗原で免疫したウサギの血清をマウスの皮下に連日注射した。このマウスにcord factor 10 μgの反復腹腔内注射を行うと，cord factor-MBSA抗原によつて能動的に免疫したマウスの場合と同様に，cord factor毒性に対する著明な抵抗性が認められた（図3）[22]。

Cord factor-MBSA抗原で免疫したウサギの血清にcord factorの水エマルジョンを加えることによつて，免疫血清中にcord factorと沈降反応を示す抗体が証明される（表2）[22]。表3に示すように，この沈降抗体はcord factor-MBSAで免疫したマウスおよびウサギの全抗血清中に証明されるが，無処置およびBCG免疫動物の血清中には証明されない。

抗cord factorウサギ血清に種々の量の^{14}C-標識cord factorを添加し，沈降物中のcord factor量と抗体量を定量することによつて，定量沈降曲線を求めると図4に示すような成績が得られた。この沈降反応の等量域にお

Table 2. Precipitation of Cord Factor with Cord Factor-methylated Bovine Serum Albumin (MBSA)-Vaccinated Rabbit Serum

Sera from:	Serum dilution*						
	2×	20×	40×	80×	160×	320×	GGB**
CF-MBSA-vaccinated	##	##	##	+	+	+	−
BCG-vaccinated	±	−	−	−	−	−	−
Non-vaccinated	±	−	−	−	−	−	−

* Serum volume: 0.25 ml, diluted with 0.2 M glycine buffer (pH: 7.4) containing 0.1% gelatin**.
Cord factor: 100 μg/0.05 ml. 0 to 2° for 7 days.

Table 3. Production of Anti-cord Factor Precipitin Antibody in Mice and Rabbits with Cord Factor-MBSA Complex

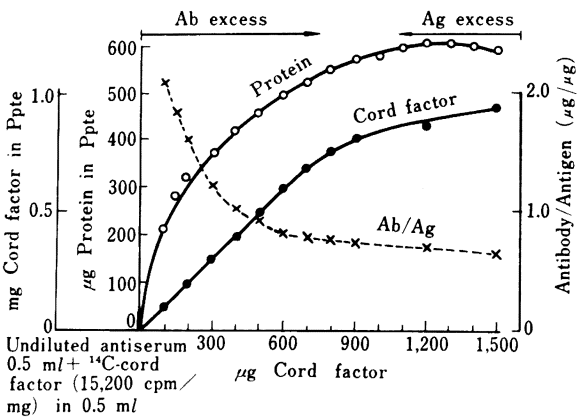
Animal	Vaccine	No. of animals with antibody/no. tested	Antibody titer by precipitation*
Mice	Cord factor-MBSA complex	9/ 9	1 : 320 (±) 1 : 80
			1 : 160 1 : 80
			1 : 160 1 : 40
			1 : 160 1 : 40
			1 : 80
Mice	Live BCG	0/10	No precipitate with undiluted sera
Mice	None	0/20	No precipitate with undiluted sera
Rabbits	Cord factor-MBSA complex	15/15	1 : 640 (±) 1 : 320 1 : 80
			1 : 320 1 : 160 1 : 80
			1 : 320 1 : 160 1 : 80
			1 : 320 1 : 160 1 : 40
			1 : 320 1 : 160 1 : 40
Rabbits	Live BCG	0/ 4	1 : 2 (±)
			1 : 1
			1 : 1
			1 : 1
Rabbits	None	0/ 5	1 : 1
			1 : 1
			1 : 1
			1 : 1
			1 : 1

* The last dilution of serum which gives 1+ or ± precipitin reaction.

ける抗体と抗原の重量比が約1.0であること，および後述するように抗 cord factor 抗体は主としてウサギ血清の免疫グロブリン M (IgM) 画分に産生される点を考慮すると，この沈降反応においては抗体の存在下に cord factor がミセルを作つて，抗体の周囲に沈降物を形成するのではないかと考えられる。Cord factor と抗血清の間の沈降反応は，血清を 2-メルカプトエタノールで処理することによつて完全に消失する。

結核菌の cord factor のほか，ジフテリア菌の産生する cord factor (6,6′-dicorynomycoloyl-α, α′-D-trehalose[23]) も抗 cord factor 血清と沈降反応を呈するが，ミコール酸，アセチル化 cord factor，6,6′-dimycoloyl sucrose, methyl 6-mycoloyl-α-D-glucopyranoside および 6, x-di-(3′-acetoxy, x-methoxymycoloyl)-N-acetyl-D-glucosamine などの cord factor の誘導体や合成類似体は，cord factor に対する抗血清とは反応しない。このことは，cord factor 分子中の抗原性決定基がその糖部分，すなわちトレハロースであることを示唆すると考えられる。この点を確かめるために，種々の糖による沈降反応の阻止作用を検討すると，cord factor と抗血清の間の沈降反応は α-D-trehalose によつて特異的に阻止されることが明らかにされた（図5)。ミコール酸には沈降反応阻止活性が認められない。

Fig. 4. Quantitative Precipitin Reaction between Cord Factor and Anti-cord Factor Rabbit Serum



Cord factor-抗体結合物を *in vitro* でマウス肝ミトコンドリアに作用させると，このものにはミトコンドリアの膨化，崩壊を惹起する作用も，酸化的リン酸化反応を阻止する作用も全く認められない（図6，表4)。すなわち，cord factor は抗体と結合することによつて，*in vivo* の毒性が中和されるとともに，ミトコンドリアの構造と機能に対する *in vitro* の障害作用をも失う。この成績は，前項で述べたように，cord factor の毒性の生化学的機序が，ミトコンドリアの酸

Table 4. Effect of Cord Factor and Cord Factor-anti-cord Factor Complex on Mitochondrial Oxidative Phosphorylation

Substrate	Cord factor concentration (μg/mg protin)[a]	Cord factor		Cord factor-anticord factor complex	
		Oxidation rate (nanoatoms oxygen/min/mg protein)	P/O	Oxidation rate (nanoatoms oxygen/min/mg protein)	P/O
Succinate+ rotenone	0	210	1.93	205	1.99
	25	200	1.58	208	1.95
	50	186	1.24	212	1.91
	100	172	1.03	206	2.00
Pyruvate+ malate	0	72	2.96	68	3.01
	25	65	2.45	70	2.98
	50	42	2.03	70	3.02
	100	33	1.78	69	3.01

[a] Mitochondria were preincubated 15 min at 20° with or without cord factor and cord factor-anticord factor complex (equivalent to the designated levels of cord factor) before addition to the assay medium.

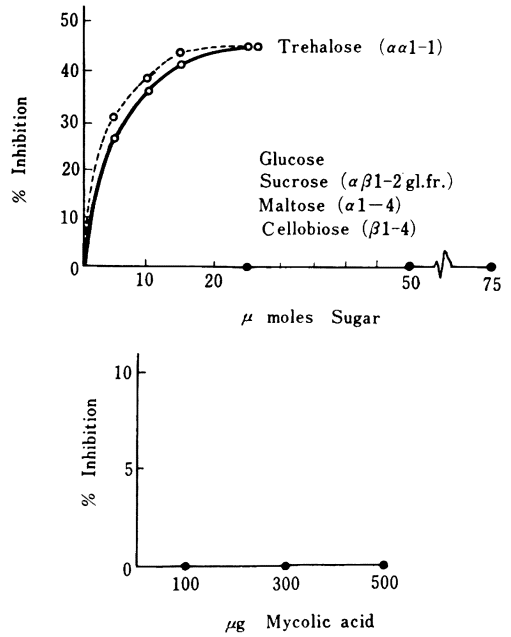
The reaction medium contained in a final volume of 2.0 ml : 100 to 125 mM sucrose, 4 mM Tris-hydrochloride (pH 7.4), 15 mM potassium phosphate (pH 7.4), 20.5 μM cytochrome *c*, 2.5 mM adenosine diphosphate (ADP), 30 mM glucose, 0.5 mg hexokinase, 5 mM $MgCl_2$, 4 mM KF, 10 mM substrate, and 3 to 6 mg of mitochondrial protein. The reaction system with succinate as substrate contained 100 nM rotenone in addition to the above components. Oxygen uptake was measured at 25° for 15 to 20 min.

化的リン酸化反応の阻害であることを裏付けると考えられる。

以上のように，cord factor-MBSA コンプレックスで免疫することによつて，cord factor の毒性を *in vivo* および *in vitro* で中和する抗体を作ることができたので，cord factor-MBSA 抗原で免疫したマウス，および抗 cord factor ウサギ血清を反復注射したマウスに有毒結核菌を感染した場合に，抗 cord factor 抗体が結核感染をどのように修飾するかを検討した[24]。

図7に示すように，cord factor-MBSA 抗原で免疫したマウスは，結核感染に対して BCG 免疫マウスと同程度の抵抗性を示す。免疫マウスの肺および脾内生菌数レベルは，対照マウスのそれに比べて 10^2～10^3 低く，肉眼的および顕微鏡的にみた肺の結核性病変も軽度であつ

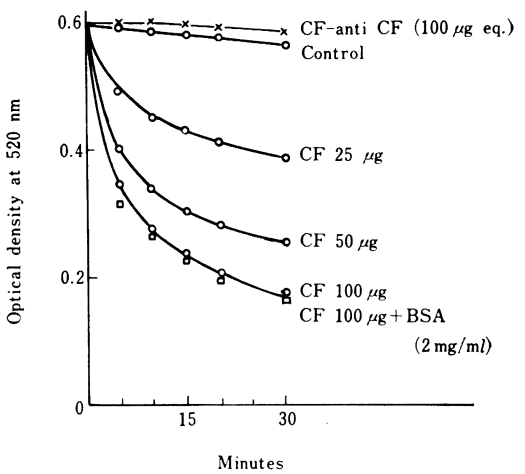
Fig. 5. Inhibition of Precipitin Reaction between Cord Factor and Anti-cord Factor Serum by Trehalose



—○— : Measured by radioactivity counting using ^{14}C-labeled cord factor as test antigen.

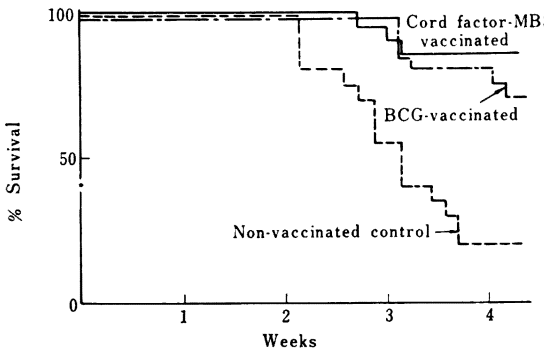
·····○····· : Measured by antibody determination. Antiserum 0.25 ml + Cord factor 500 μg.

Fig. 6. Effect of Cord Factor-anti-cord Factor Complex on Mouse Liver Mitochondria *In Vitro*



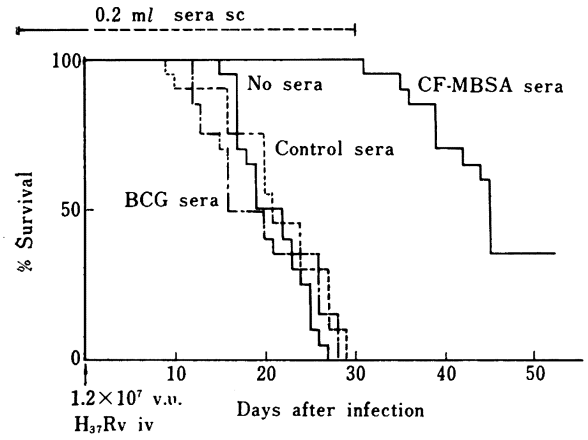
The test medium contains in 3.0 ml : 0.154 M KCl + 0.02 M Tris-HCl (pH 7.4), 0.6 mg mitochondrial protein and cord factor (CF) or cord factor-anti-cord factor complex (equivalent to 100 μg of cord factor).

Fig. 7. Effect of the Vaccination with Cord Factor-MBSA Complex on Survival of Mice Infected with Virulent *Mycobacterium Tuberculosis* $H_{37}Rv$



4.0×10^7 viable units of $H_{37}Rv$ were inoculated intravenously into mice. 20 mice in each group.

Fig. 8. Effect of Anti-cord Factor Rabbit Serum on the Survival of Mice Infected with Virulent *Mycobacterium Tuberculosis* $H_{37}Rv$



20 mice in each group.

た。

Cord factor 毒性に対する中和効果の場合と同様に，このような感染防御効果の発現には，Cord factor-MBSA 抗原をアジュバントと混合して免疫することが必須の条件であつて，アジュバントを使用しない場合，あるいはアジュバントを用いても cord factor あるいは MBSA 単独で免疫した場合は無効であつた。さらに MBSA を BSA で置換えたり，cord factor をミコール酸，アセチル化 cord factor，あるいは種々の合成類似体に変えた場合にも感染防御効果は認められない。すなわち，cord factor 毒性が中和される場合にだけ感染防御効果が発現する。

また，cord factor-MBSA 抗原による感染防御効果は結核感染に特異的であつて，リステリア，ブルセラおよびサルモネラによるマウス実験的感染症には，本抗原による免疫は全く無効であつた。

そこでつぎには cord factor-MBSA 抗原で免疫したウサギから抗 cord factor 血清を分離し，この血清がマウスの実験的結核症に対して感染防御効果を発揮するか否かを検討した。

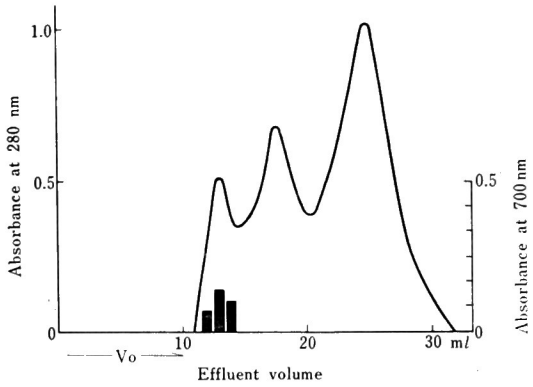
図8は，cord factor に対する沈降抗体価 160 倍～320 倍の抗血清を感染1週間前から皮下に注射し，有毒結核菌の静脈内接種後は週3回抗血清の注射を続けた場合のマウスの生存曲線を示す。無処置ウサギおよび BCG 免疫ウサギの血清を注射した感染マウスが，血清注射を行わず結核菌を感染した対照マウスと同様の経過をたどつて，約4週間以内に全数感染死するのに対して，cord factor-MBSA 免疫ウサギの抗血清を注射した群においては，有毒結核菌の大量静脈内接種に対して全マウスが 30 日間生残した。30 日目に抗血清の注射を中止するとこの群のマウスは次第に死亡するが，感染 60 日後においてもなお 40% のマウスが生残している。すなわち抗 cord factor 血清の注射によつて cord factor の毒性が中和されている期間は結核感染は抑制されると考えられる。抗 cord factor 血清の感染防御作用は結核感染に特異的であつて，リステリア，ブルセラおよびサルモネラによる感染には無効であつた[24]。また抗血清を連続投与することによつて，肺内結核菌の増殖は cord factor-MBSA 抗原による能働免疫の場合と同様に抑制される[24]。

IV. 抗 cord factor 抗体の免疫化学的性状[25]

Cord factor-MBSA 抗原で免疫したウサギ血清中に産生される抗 cord factor 抗体が，いずれの免疫グロブリンクラスに属するかを決定するために，抗血清をセファデックス G-200 によるゲル濾過によつて分画し，それぞれの画分に cord factor の水エマルジョンを加えた成績を図9に示した。Cord factor と沈降物を形成する活性は，19S 免疫グロブリン M (IgM) の画分にだけ認められ，7S 免疫グロブリン (IgG) やアルブミン画分は cord factor と反応しない。抗血清から Kekwick の方法[26] によつてグロブリン分画を分離してゲル濾過を行つた場合も，IgM 画分にだけ cord factor と結合して沈降反応を示す活性が認められた。また抗血清に種々の量の cord factor の水エマルジョンを加え，生ずる沈降物を遠心によつて除いた上清のゲル濾過を行うと，加えた cord factor の量に比例して IgM ピークの下降が認められる(図 10)。したがつて，抗 cord factor 抗体は血清の IgM 画分に産生されると考えられる。

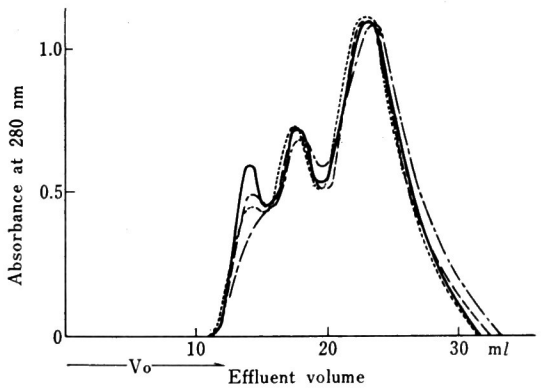
この点をさらに証明するために，cord factor-抗体結合物から抗体を解離させて，その免疫化学的性状を検討した。Cord factor-抗体結合物は酸性条件下では解離しないが，高濃度の塩を含む緩衝液中で部分的に解離す

Fig. 9. Sephadex G-200 Gel Filtration Pattern of Anti-cord Factor Rabbit Serum



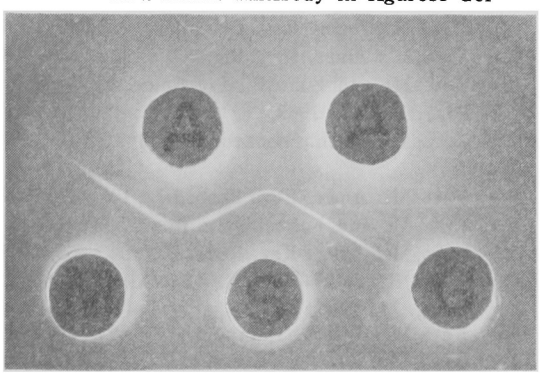
Serum : 0.2 m*l*, Column size : 1.5×30 cm, Serum was filtered with 0.2 M glycine-NaOH buffer (pH 8.0) at a flow rate of 3 m*l*/hr. Vertical bars represent the Folin absorbance at 700 nm of antibody specific to cord factor.

Fig. 10. Sephadex G-200 Gel Filtration Pattern of the Supernatant of Anti-cord Factor Serum after Sedimenting Cord Factor-antibody Complex



Anti-serum : 0.2 m*l*, Amount of cord factor added: ----: 200 μg, ……: 500 μg, —·—·—·—: 1,000 μg

Fig. 11. Immunodiffusion Pattern of Purified Anti-cord Factor Antibody in Agarose Gel



A : Anti-cord factor antibody.
S : Goat anti-rabbit serum.
M : Goat anti-rabbit IgM.
G : Goat anti-rabbit IgG.

る。そこで15%の食塩を含むグリシン緩衝液 (pH 8.0) 中に2℃で1夜静置することによつて，cord factor から解離させた抗体溶液を集めゲル濾過を行うと，IgM領域に単一の蛋白ピークを与えた。この抗体蛋白は，アガロースゲル内沈降反応でウサギ全血清に対する抗血清との間に1本の沈降線を生じ，この沈降線は抗ウサギIgM血清との間の沈降線とフューズする。しかしながら，抗ウサギIgGおよび抗ウサギIgA血清と，抗cord factor抗体との間には沈降線の形成は認められない（図 11)。したがつて，抗cord factor抗体はウサギ血清のIgM画分にだけ産生されると結論される。

IgM 抗体の産生が，MBSA とコンプレックスを作つた cord factor のような糖脂質ハプテンに特異的な現象であるのか，あるいは免疫方法や血清採取の時期を変えることによつて，他の免疫グロブリンに属する抗体を作ることができるのかという点に関しては，将来の検討に待たなければならないと考えられる。

V. 抗 cord factor 抗体と結核感染の関係

以上の成績から，cord factor-MBSA コンプレックスによる免疫の結果，ウサギの血清中の IgM 画分に cord factor と沈降反応を示し，その毒性を *in vivo* および *in vitro* で中和する抗体が産生されること，およびこの抗体によつて結核感染が防御されることが明らかにされた。このような抗体が結核感染に伴つて宿主の血清中に産生され，抗結核免疫になんらかの役割を果たすか否か

Table 5. Serum Precipitin Test to Cord Factor

Serum source	No. of positive tests/no. tested	Precipitin titer*
Mice		
Cord factor-MBSA-vaccinated	12/12	1 : 40-1 : 160
BCG-vaccinated	0/10	
$H_{37}Rv$-infected	0/ 6	
Normal	0/10	
Rabbits		
Cord factor-MBSA-vaccinated	20/20	1 : 40-1 : 320
BCG-vaccinated	0/ 5	
Killed $H_{37}Rv$-injected	0/ 3	
$H_{37}Rv$-infected	0/ 5	
Normal	0/10	
Tuberculosis patients		
Sputum-positive	0/10	
Convalescent	0/ 8	
Pneumonectomized	0/ 5	

* Range of highest serum dilution giving a definite macroscopic precipitation by the addition of the aqueous emulsion of 100 μg of cord factor.

という点について検討した。

表5に示すように，実験動物レベルではBCG生菌による免疫，ヒト型有毒結核菌による感染あるいは死菌感作のいずれによつても，血清中に抗cord factor沈降抗体は産生されない。また結核患者血清について，排菌陽性例，回復期の菌陰性例，および外科手術によつて結核病巣を切除した例などの種々の病期に，抗cord factor抗体の有無を検討したけれども，いずれの場合にも抗体の存在を証明することはできなかつた[24]。すなわち，沈降抗体に関する限りにおいては，結核感染に抗cord factor抗体は関与しないと考えられる。

VI. おわりに

本研究の目的は結核臨床におけるひとつの観察事実，すなわち結核患者における慢性，進行性の消耗症状の原因を明らかにし，そしてこのような感染による衰弱，消耗の過程を防御する方法を追求することであつた。

結核菌が産生する毒性糖脂質“cord factor”の化学構造が6,6′-dimycoloyl-α,α'-D-trehaloseと同定され，この物質がマウスに遅延性の致死毒作用を示すという事実を出発点として，その毒性の機序を追求した。その結果，cord factorが*in vivo*で宿主細胞内ミトコンドリアの膜構造を崩壊させるとともに，呼吸とリン酸化反応活性を阻害することを明らかにした。さらにcord factorの水エマルジョンを用いる*in vitro*の系で，ミトコンドリアにおける生化学的病変の部位を追求し，cord factorがミトコンドリア内膜の膨化と断裂を惹起し，電子伝達と共役リン酸化反応を共役部位IIにおいて特異的に阻害することを証明した。

このようなミトコンドリアにおける生化学的病変が，結核感染においてどのような役割を演ずるかを明らかにするために，cord factor-MBSAコンプレックスを抗原として抗cord factor抗体を作り，この抗体がcord factor毒性を*in vivo*および*in vitro*で中和するとともに，有毒結核菌による感染に対する抵抗性をマウスに付与することを認めた。

以上の成績から，cord factorは結核菌の感染経過中に*in vivo*で産生され，宿主細胞の呼吸とリン酸化反応の代謝障害を惹起することによつて細胞機能の低下を来し，組織内における結核菌の増殖と感染の進展を促進すると考えられる。

謝辞

本研究は著者が昭和27年以来在職した国立療養所刀根山病院において行つたものである。この期間を通じて，刀根山病院のすべての職員の方々から常に暖いご協力を頂き，研究の場を与えて頂いたことに対して心から感謝の意を表したい。また終始研究の道標を示しご鞭撻を賜わつた大阪大学医学部山村雄一教授に深謝の意を表する。共同研究者として，また研究の先達として長年のご援助を頂いた九州大学胸部疾患研究所田中渥博士，青森県立中央病院福士主計博士，大阪市立大学刀根山結核研究所楠瀬正道博士，Dr. E. Lederer, Institute de Chimie des Substances Naturelles, Gif-sur-Yvette, およびDr. J. Asselineau, Centre de Recherche de Biochimie et de Génétique Cellulaires, Toulouse, Franceに心から感謝する。

第49回日本結核病学会総会に，本講演の機会を与えて下さつた砂原茂一総会長，結核病学会プログラム委員会の諸先生および日本結核病学会会員の各位，司会の労をおとりくださつた大阪大学微生物病研究所堀三津夫教授に厚くお礼申しあげる。

文献

1) Rich, A. R.: The pathogenesis of tuberculosis, C. C. Thomas, Springfield, Ill., 2nd ed.
2) Bloch, H.: J. Exp. Med., 91 : 197, 1950.
3) Noll, H. and Bloch, H.: J. Biol. Chem., 214 : 251, 1955.
4) Noll, H., Bloch, H., Asselineau, J. and Lederer, E.: Biochim. Biophys. Acta, 20 : 299, 1956.
5) Gendre, T. and Lederer, E.: Bull. Soc. Chim. France, 1478.
6) Kato, M. and Tanaka, A.: Amer. Rev. Resp. Dis., 96 : 460, 1967.
7) Chaudhuri, S. N. and Martin, S. P.: J. Exp. Med., 98 : 99, 1953.
8) Kato, M., Miki, K., Matsunaga, K. and Yamamura, Y.: Amer. Rev. Tuberc. Pulm. Dis., 77 : 482, 1958.
9) Kato, M., Kusunose, M., Miki, K., Matsunaga, K. and Yamamura, Y.: Amer. Rev. Resp. Dis., 80 : 535, 1959.
10) Kato, M.: Amer. Rev. Resp. Dis., 93 : 411, 1966.
11) Kato, M.: Amer. Rev. Resp. Dis., 93 : 421, 1966.
12) Kato, M. and Maeda, J.: Infect. Immunity, 9 : 8, 1974.
13) Kato, M.: Amer. Rev. Resp, Dis., 94 : 388, 1966.
14) Kato, M.: Amer. Rev. Resp. Dis., 94 : 395, 1966.
15) Kato, M.: Amer. Rev. Resp. Dis., 98 : 260, 1968.
16) Kato, M., and Fukushi, K.: Amer. Rev. Resp. Dis., 100 : 42, 1969.
17) Kato, M.: Arch. Biochem. Biophys., 140 : 379, 1970.
18) Kato, M.: Amer. Rev. Resp. Dis., 100 : 47, 1969.
19) Kato, M. and Fukushi, K.: in manuscript.
20) Kato, M.: Amer. Rev. Resp. Dis., 98 : 668, 1968.
21) Inoue, K. and Nojima, S.: Biochim. Biophys. Acta, 144 : 409, 1967.
22) Kato, M.: Infect. Immunity, 5 : 203, 1972.
23) Senn, M., Ioneda, T., Pudles, J. and Lederer, E.: Eur. J. Biochem., 1 : 353, 1967.
24) Kato, M.: Infect. Immunity, 7 : 9, 1973.
25) Kato, M.: Infect. Immunity, 7 : 14, 1973.
26) Kekwick, R. A.: Biochem. J., 34 : 1248, 1940.