

原 著

## 実験的結核感染組織における脂質変化

## 1. マウス肺組織ならびにマクロファージにおける観察

近藤 瑩子・金井 興美

国立予防衛生研究所結核部・同細菌第1部

受付 昭和50年5月28日

STUDIES ON LIPID COMPOSITION OF EXPERIMENTALLY  
PRODUCED TUBERCULOUS LESIONS1. Observations in Granulomatous Mouse Lungs and  
Alveolar Macrophages Separated therefrom

Eiko KONDO\* and Koomi KANAI

(Received for publication May 28, 1975)

With the progress of tuberculous infection in mice, the lung weight increased due to the formation of numerous granulomatous lesions. During the 5 week course of infection, the total lipid amount extractable by chloroform-methanol (2:1, v/v) from the organ increased continuously up to 3 fold level. Per cent distribution of each lipid in the extract was determined by thin-layer chromatography. Cholesterol esters were the only lipid that showed a marked increase in per cent distribution. A temporary change was that phospholipids decreased but triglycerides increased in the first week of infection. An explanation was given to this observation that polymorphonuclear leucocytes may have been the dominant cell population at this early stage of tuberculous lesions. As will be known from the succeeding paper, this cell type was as halt as the macrophage in the amount of total lipids and phospholipids, but twice as much in triglyceride content.

A cell population whose main cell type was mycobacteria-ingesting macrophages was obtained from the tuberculous mouse lungs by glass-bead column method. Chemical analyses of this material comparing with normal and granulomatous lung homogenates suggested that the changes of lipid composition in the tuberculous lungs were the reflection of those in infected macrophages.

著者らは、感染マウス肺の肉芽組織から *M. bovis* (Ravenel 株) を機械的に分離収獲し、その精製菌体の脂質分析からいわゆる“in vivo 菌”の特徴を検討してきた。得られ成績のひとつには、in vitro 発育菌体からは検出されないコレステロールが、とくにエステル型として組織由来菌に多量存在することであつた<sup>1)</sup>。in vivo 結核菌におけるコレステロールの存在は、すでに Youngner と Noll<sup>2)</sup> によつて観察されており、

Asselineau<sup>3)</sup> によつてそれが宿主由来であり、菌体表面に吸着されたものと解釈された。私たちの成績も<sup>1)</sup>、コレステロールならびにそのエステル型が、菌体とかなり近接した状態で存在することを示唆するものであつた。このような脂質が宿主由来とすれば、それは感染にともなう組織の脂質変化を反映している可能性もあり、ことに、マクロファージとの関係が考慮されるべきであらう。こうした見地から、表題の研究を計画した。

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

### 実験材料及方法

動物: 市販 dd 系マウスの雄, 体重 18 g 前後のものを使用した。

菌株: *M. bovis* (Ravenel 株) を用い, ソートン合成液体培地上の菌膜より精製水浮遊液を調製して感染に用いた。

感染: 尾静脈より静注感染をした。

感染菌の消長の追求: 精製水による組織ホモジネイトをつくり, その一連の 10 倍希釈系列を小川培地に接種する定量培養法によつた。

感染肺より硝子親和性細胞の収獲: 頸部切断によつて採血して動物を殺し, 肺を摘出した。缺で小片となし, これをさらに 100 メッシュのステンレス製の篩の上でスパーテルで軽くつぶし, Hanks 液 (ヘパリン加) で洗い出して濾液を集めた。これを 1,000 rpm 5 分で遠沈して得た沈渣は, 再浮遊してさらに遠沈洗浄し, 20% に血清を含む PBS の 25 ml に浮かべた。これを 100 メッシュの硝子ビーズのカラム (2.5×15 cm) にかけて, 下降する液の流出直前にカラム両端をパラフィルムで閉じ, 37°C, 30 分水平位でインキュベイトした。ここでカラムを垂直位に戻し, PBS と EDTA-buffer<sup>5)</sup> で洗浄した。次に硝子ビーズをカラムからビーカーに移し, EDTA-buffer を加えて軽く振盪し, 硝子ビーズに吸着していた硝子親和性細胞をふりだした。これを 1,000 rpm 5 分で遠沈し, 集めた細胞は PBS で洗浄した。

脂質の抽出: Folch らの方法<sup>4)</sup>によつて, 20 倍量 (W/ml) のクロロホルム・メタノール (2:1) で抽出し, 1/4 量の 1% KCl 水溶液と 0.5% KCl-50% メタノール溶液で洗浄後, 殺菌を要するものはシャンペラン L3 を通し, 溶媒をロータリーエバポレーターまたは N<sub>2</sub> でとばして脂質を乾固した。

脂質の分画: あらかじめ 105°C, 30 分加熱して活性化したシリカゲル G (Merck) の薄層に脂質の 1 mg ずつを 1 cm 前後の長さにはスポットし, ヘキサン・エーテル・酢酸 (90:10:1) またはヘプタン・エーテル・酢酸 (90:10:1) でプレートを 10~15°C に保つて展開し, コレステロールエステル, トリグリセライド, コレステロール, 燐脂質等をヨード蒸気で位置を確かめたのち, そのゲルを吸引しながらかきとり, 溶媒 (クロロホルムまたはクロロホルム-メタノール) で抽出し, 乾燥した。燐脂質はクロロホルム・メタノール・水 (65:25:4) で展開し分画した。

脂質の同定・定量: 薄層クロマトグラフィーで展開した脂質の同定には, コレステロールおよびそのエステルに Zlatkis 試薬, 燐脂質に Dittmer 試薬とニンヒドリン試薬をそれぞれ使用した。また, コレステロールとそのエステルの定量には, それぞれの薄層上のスポットの

ゲルをかきとり, それにまず酢酸エステルを加え, さらに過塩素酸と *o*-フタルアルデヒド試薬を加えて赤紫色を発色せしめ, その吸光度を 550 m $\mu$  で測定して定量した。以上の反応用の試薬としてコレステロール・B・テスト・ワコーを用いた。トリグリセライドの定量には, 燐脂質と完全に分離した薄層上のスポットのゲルをかきとり, まずこれに水酸化カリウムを加えて鹼化し, グリセリンを遊離させ, 緩衝液で pH 6.0 としてメタ過ヨウ素酸ナトリウム液で酸化する。生じたホルムアルデヒドをアセチルアセトンとアンモニアに反応させ, 発生した 3,5-diacetyl-1,4-dihydrolutidine の黄色色素溶液を 410 m $\mu$  で比色定量した。以上の反応試薬としてトリグリセライド・テスト・ワコーを使用した。燐脂質量は King 法によつて燐を定量し, それを 25 倍した値を記載した。

### 実験成績

感染組織における脂質変化: 30 匹のマウスに *M. bovis* (Ravenel 株) 0.25 mg を静注し, その後週ごとに 5 匹ずつを殺して肺組織の感染菌数と, コレステロール, コレステロールエステル, トリグリセライド, 燐脂質の消長を追求した (Fig. 1, 2)。この感染は 4~5 週間後で動物が死か生に分かれた微妙なかり方であつたが, 感染菌数の消長もその時点でピークをなした。肺の全脂質量も感染にともなつて増量した。その中における各脂質

Fig. 1. Changes of Lung Weight, Lung Viable Count and Total Lipid Amount during the Development of Tuberculous Infection

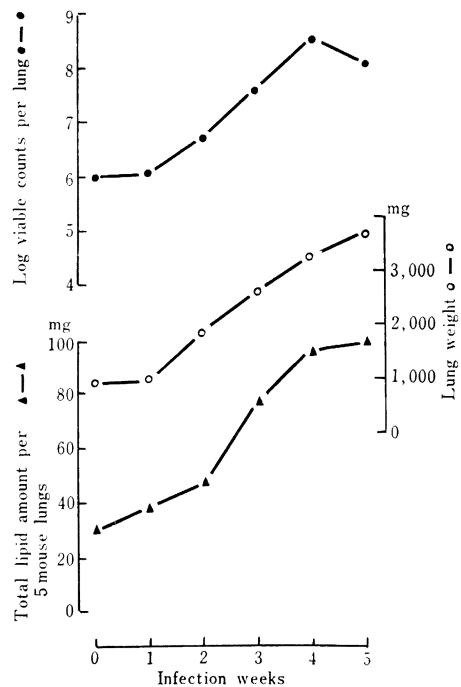
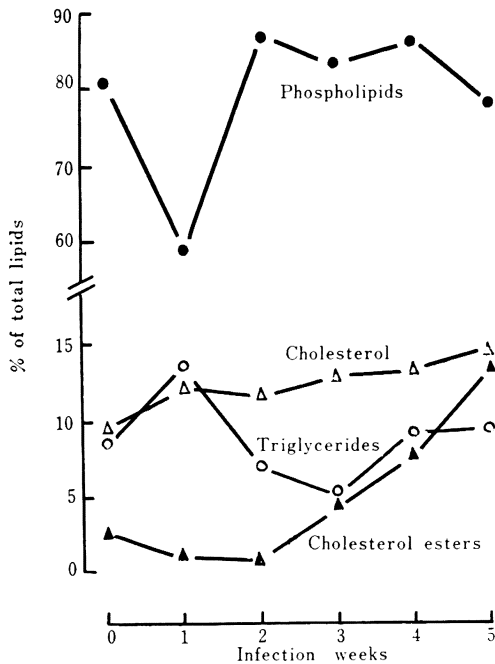


Fig. 2. Changes of Lipid Distribution in the Mouse Lungs during the Development of Tuberculous Infection



の百分率をみると、燐脂質は感染1週目に減少したが、以後出発時の率に戻つてほぼそれを維持した。トリグリセライドは逆に、感染1週目に上昇して以後減少したが、感染が頭打ちになるとともに回復の傾向がみられた。他方、コレステロールは全期間中ほぼ一定の百分率を示したが、そのエステル百分率は感染とともに上昇した。したがつて感染の進展にともなつて百分率でも上昇を示すのは、コレステロールエステルのみであつた。

肉芽組織より分離した硝子親和性細胞（感染マクロファージ）の脂質（Table 1）：強毒 *M. bovis* (Ravenel 株) 0.25 mg の静注を受けて3週間後になると、マウス肺には肉眼的にも無数の結節がみられる。こうした肺100匹分から硝子親和性細胞を集めたところ、その収量は7.5

×10<sup>8</sup>コであつた。細胞構成は4% はリンパ球、15% は好中球、49% はマクロファージであり、のこりはこれら細胞の変性崩壊したものと考えられた。抗酸性染色によると、これらの細胞の58% は、数コから数十コに及ぶ抗酸菌をその胞体内に保持していた。たくさんの菌をとりこんだマクロファージは細胞質が大きく腫大していた。このような標本（感染マクロファージと呼ぶことにする）を脂質分析し、感染肺のホモジネイトならびに正常マウス肺のそれとを比較して Table に示した。感染マクロファージ 10<sup>8</sup> コから 3.82 mg の脂質が得られたが、その1/4は燐脂質で、レシチン、スフィンゴミエリン、フォスファチジルエタノールアミンが主成分であつた。コレステロールエステルは総コレステロールの22% を占め、正常肺組織の8.8%、感染肺組織の13% よりはるかに高かつた。他方、トリグリセライドは正常組織に多く、感染組織、感染マクロファージでは顕著な減少がみられた。このような成績は、結核肉芽肺組織の脂質構成が、感染マクロファージによつて代表されることを示している。

考 察

結核感染に対して宿主ははじめ好中球の滲出をもつて反応するが、これはすぐマクロファージによつて置換され、菌はほとんどこの食細胞中にとりこまれることになる。感染1週目においてトリグリセライド含有率が上昇し、燐脂質含有量は減少して、その後の脂質パターンといちじるしく異なつている。このことは、感染初期において肺に滲出する細胞の多くが好中球であるためであろう。次報<sup>9)</sup>で述べるように、カゼイン刺激によつて得たマウス腹腔内の好中球とマクロファージを材料として、それらの脂質を比較すると、好中球は総脂質量と燐脂質含有量が細胞あたりでマクロファージのほぼ半分であり、トリグリセライド含有量は逆に倍である。したがつて、好中球が滲出細胞の主体である感染初期においては、肺脂質パターンはそれ以後とは異なるはずである。

私たちの研究は、はじめに述べたように、感染肺組織

Table. Lipid Content in a Normal or Tuberculous Mouse Lung Homogenate and Glass-adherent Cells Separated therefrom

Material		Yield of lipid (mg)			Molar ratio to phospholipids			
		Total	Phospholipids	Triglycerides	Cholesterol		Cholesterol	
					Free	Ester	Free	Ester
Tuberculous mouse lung	Homogenate (per mouse)	20.8	10.9	1.3	4.3	1.3	0.78	0.15
	Glass-adherent Cells (10 <sup>8</sup> )	3.8	1.0	0.4	0.5	0.25	1.02	0.29
Normal mouse lung homogenate		11.2	3.9	3.0	1.6	0.28	0.83	0.09

より分離したいわゆる“in vivo 菌”が、宿主の脂質、ことにコレステロールエステルを大量にその菌体に保持している観察より出発した<sup>7)</sup>。また、感染の進展にともなつて増量する肺組織のコレステロールエステルは、INH 投与によつて減少すること<sup>7)</sup>から考えても、このエステルは増殖する感染菌に対して動員され、これと交渉をもつたマクロファージに由来すると考えるのが自然であろう。事実、無数の結核結節で充満したマウス肺からガラス親和性細胞を集めると、感染マクロファージが多く、そこからは正常肺組織にみられるより多量のコレステロールエステルが検出された。しかしこのエステル量は総コレステロール中の 22% であり、in vivo 菌の場合には 60~80%<sup>7)</sup>であつたので、コレステロールのエステル化がことに感染菌に近密な部位で起こっている可能性がある。このことは、エステル化が菌とマクロファージの直接的な接触の場で起こるのか、あるいは文献<sup>8)9)</sup>の示すように、菌自体もエステル化に働いていることを

示唆する。これらについては続報で報告する予定である。

#### 文 献

- 1) Kondo, E. et al.: Japan. J. Med. Sci. Biol., 23 : 315, 1970.
- 2) Youngner, J.S. and Noll, H.: Virology, 6 : 157, 1958.
- 3) Asselineau, J.: The Bacterial Lipids, Pub. Herman, Paris: 327p, 1966.
- 4) Folch, J. et al.: J. Biol. Chem., 226 : 497, 1957.
- 5) Rabinowitz, Y.: Blood, 23 : 811, 1964.
- 6) 近藤瑩子・金井興美: 結核 (投稿中)。
- 7) Kondo, E. and Kanai, K.: Japan. J. Med. Sci. Biol., 27 : 59, 1974.
- 8) Razin, S. and Shafer, Z.: J. Gen. Microbiol., 58 : 327, 1969.
- 9) Schubert, K. et al.: Biochim. Biophys. Acta, 176 : 163, 1969.