

原 著

飼料による食細胞膜脂質の修飾と結核感染

近 藤 瑩 子・金 井 興 美

国立予防衛生研究所結核部・細菌第1部

受付 昭和 56 年 5 月 6 日

MODIFICATION OF THE FATTY ACID PATTERN OF PHAGOCYtic CELL
PHOSPHOLIPIDS AND THE COURSE OF TUBERCULOUS INFECTION
IN MICE FED WITH DIETS DEFICIENT IN ESSENTIAL FATTY ACIDS

Eiko KONDO *and Koomi KANAI

(Received for publication May 6, 1981)

Mice were fed with diets deficient in essential fatty acids for 3 to 7 weeks. Polymorphonuclear leucocytes and macrophages were harvested from their casein-induced peritoneal exudate to be subjected to lipid analysis comparing with the corresponding materials obtained from the mice fed with control diets. As for the distribution pattern of constituent fatty acids of phospholipids, linoleic and arachidonic acids decreased in the mice fed with the deficient diets, and the rate of oleic acid increased. At the same time, tuberculous infection developed in a more exacerbated fashion. The correlation between these two observations was discussed referring to our previous finding that polyunsaturated fatty acids in free form are highly toxic to tubercle bacilli and that phospholipid degradation of the phagocytic cell membrane at areas of close contact with the bacterial surface may release such toxic fatty acids.

緒 言

脂肪摂取と感染抵抗性との関係は結核病学における古典的課題であるが、これまでの発想は栄養と感染という普遍的命題の域をでていないか、あるいは *in vivo* における脂肪酸の抗菌力を漠然と想定したものにすぎなかった¹⁾²⁾。

私たちは結核感染機構に関する一連の研究において、食細胞の膜構造と菌体表層との相互作用に注目^{3)~7)}し、特に膜磷脂質の分解によつて遊離する多価不飽和脂肪酸の抗菌力に関心をいだいてきた⁸⁾⁹⁾。

この見地から私たちは必須脂肪酸(リノール酸)を欠く飼料によつてマウスを飼育し、その際、食細胞磷脂質の脂肪酸構成がどのように修飾され、同時に結核感染過程がいかなる影響をうけるかを検討した。

実験材料と方法

動物: 市販 ddY 系マウスの雄を用いた。実験開始時の平均体重は 25 g である。

飼料: 必須脂肪酸欠損固型飼料 TD 77052 (Teklad Mills, Madison, Wisc.) は Sucrose 68.5%, Casein 20%, Medium chain (C_{8:0}-C_{14:0}) Triglyceride (MCT) 5%, Non nutritive fiber 2%, Mineral mix 3.5%, Vitamin mix 1% の組成から成る。対照飼料 TD 77053 は上記 MCT を corn oil に置き換えたもので、これには主脂肪酸として C_{16:0} 10.8%, C_{18:1} 23.0%, C_{18:2} 39.8%が含まれている¹⁰⁾。

菌: 感染用有毒株として結核菌 H37Rv R-KM株、あるいは牛型抗酸菌 Ravenel R-KM 株を用いた。これらの株はカナマイシン(KM)高度耐性株である。免疫用には BCG を用いた。以上いずれもソートン合成培地上 2

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

週発育菌膜より、水晶球入りコルベンで均等な水浮遊液として静注接種に用いた。

感染: Ravenel R-KM 株 0.25mg を静注し、その後の生存日数を観察するか、あるいは H37Rv R-KM 株 0.05mg を静注後、経時的に動物をサンプリングして肺および脾における感染菌数を測定する方法をとった。後者の場合は肺・脾を摘出してそれぞれホモジネイトとし、それらの10倍希釈系列から KM 100μg/ml 含有小川培地に接種し、4週後の発生集落数より組織内感染菌数を算定した。

食細胞の収獲: 9%カゼイン (Hammersten) の2mlを腹腔内に注射し、多形核白血球の収獲のためには6時間後、マクロファージ収獲のためには3日後に開腹し、腹腔滲出液をヘパリン加 Hanks 液で洗い出した。その洗出液を1,000 rpm 5分遠沈して細胞を集め、更に2回遠沈洗浄後に脂質分析に供した。

脂質の抽出と分析: 細胞はクロロホルム・メタノール (CM) 2:1 で一晚脂質を抽出した。抽出液の下層を1% KCl、次いで0.5% KCl (メタノール・水 50:50) で洗浄したのち、溶媒をとばして乾燥した。得られた脂質は再び少量の CM 2:1 に溶かし、110℃ 1時間で活性化した Silica gel G の薄層上にスポットし、クロロホルム・メタノール・水 (65:25:4) で展開し、個々の磷脂質を分画した。

脂肪酸組成の定量のためには磷脂質をメタノリシスし、Shimazu GCIC 装置でガスクロマトグラフィーを行なった。使用したカラム (2.25 m×3 mm) は 25% diethylene glycol succinate でcoat した Chromosorb W または 2.5% SE-30 で coat した Chromosorb W である。カラム温度 180℃、窒素ガス流量 36 cc/min、圧力 1.75 kg/cm² であった。

成 績

食細胞の脂質: 必須脂肪酸欠損飼料投与 (EFA・DD) あるいは対照飼料投与 (3週) 群それぞれ25匹ずつのマウスから9%カゼイン誘出6時間で多形核白血球を得た。収量は前者が 4.6×10⁸、後者から 7.6×10⁸ 個の細胞が

得られた。総脂質量は4.7mg と5.5mg であった。マクロファージの誘出にはおのおの15匹ずつのマウス (飼料投与7週) を使用した。カゼインを腹腔内注射後3日目の収獲ではマクロファージが76%と78%を占めていた。収量は 5.5×10⁷ と 6.0×10⁷ 個で、総脂質量は 2.5mg と 3.0mg 得られた。

多形核白血球、マクロファージのいずれも磷脂質として主成分はホスファチジルエタノールアミン (PE)、レシチン (PC)、スフィンゴミエリン (Sph) であり、中性脂肪ではコレステロールおよびトリグリセライドであった。またカゼインで誘出しているのも、マクロファージにはコレステロールエステルが存在した¹¹⁾。これら脂質組成において EFA-DD マウスからのものは、対照とほとんど変わるところはなかつた。

食細胞膜磷脂質中の脂肪酸組成: EFA-DD 群においては3週で既に多形核白血球中の脂肪酸組成は変化を来した (Table 1)。PE, PC いずれにおいてもリノール酸は著しく減少し、対照動物 PE において含有量の高いアラキドン酸も減少した。これらにかわり、PE, PC のいずれにおいてもオレイン酸が増加した。飼料投与7週後に収獲した腹腔マクロファージでは (Table 2)、PE および PC におけるアラキドン酸の減少が目立つた。また、特に PC においてオレイン酸が増加した。更に C₂₂ の不飽和脂肪酸と、C_{20:1-3} が増加した。マクロファージ収獲の3週前に BCG の 1mg を静注しておいたマウスからのものにおいても、脂肪酸組成の変動は似かよっていた (Table 3)。なお、これらマウスの脾の磷脂質中の脂肪酸組成も、飼料による影響においてはほとんど上記食細胞のそれとかわるところはなかつた。ただ飼料の違いにかかわることなく、BCG 接種によつて総脂質中の中性脂肪の量が激減したのが特徴であった。

必須脂肪酸欠損飼料投与 (EFA-DD) による結核感染への影響: 実験 1) 各群10匹よりなる2群のマウスを用意し、一方には EFA-DD を、他方には対照飼料を与えて飼育した。いずれの飼料もマウスは1日に平均 3.5 g 前後を摂取した。これらの飼料投与はマウス平均体重 25 g のときから開始し、感染時までの6週間いずれの群に

Table 1. Fatty Acid Pattern in Phosphatidylethanolamine and Phosphatidylcholine of Peritoneal Polymorphonuclear Leucocytes of Mice Fed with Essential Fatty Acids (EFA)-deficient or Control Diets

Phospholipids	Diet	% distribution of fatty acids										
		14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:1-3	20:4	22:uns.	others
PE	EFA-deficient	8.7	9.1	1.5	9.3	32.3	5.7	ND	5.7	22.1	ND	5.6
	Control	10.5	10.1	ND	11.9	15.8	17.8	ND	trace	30.5	ND	3.4
PC	EFA-deficient	8.2	32.7	5.5	6.0	36.7	3.8	ND	1.3	3.0	0.2	2.6
	Control	7.5	39.7	2.0	8.7	16.3	16.4	ND	trace	5.7	1.5	2.2

PE: Phosphatidylethanolamine, PC: Phosphatidylcholine, ND: Not detected

Table 2. Fatty Acid Pattern in Phosphatidylethanolamine and Phosphatidylcholine of Induced Peritoneal Macrophages of Mice Fed with Essential Fatty Acids (EFA)-deficient or Control Diets

Phospho-lipids	Diet	% distribution of fatty acids										
		14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:1-3	20:4	22:uns.	others
PE	EFA-deficient	3.8	14.8	ND	33.9	10.1	ND	ND	ND	11.3	12.9	13.2
	Control	4.1	21.0	ND	29.7	4.8	1.7	ND	ND	19.5	10.6	8.6
PC	EFA-deficient	trace	25.5	1.4	10.9	27.5	3.2	1.5	8.2	3.8	18.0	ND
	Control	2.5	36.7	0.1	18.6	11.1	8.0	0.5	ND	12.5	7.6	2.4

PE : Phosphatidylethanolamine, PC : Phosphatidylcholine, ND : Not detected

Table 3. Fatty Acid Pattern in Phosphatidylethanolamine and Phosphatidylcholine of Induced Peritoneal Macrophages from BCG-vaccinated Mice Fed with Essential Fatty Acids (EFA)-deficient or Control Diets

Phospho-lipids	Diet	% distribution of fatty acids										
		14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:1-3	20:4	22:uns.	others
PE	EFA-deficient	4.5	20.2	ND	34.9	5.2	3.8	0.9	1.5	3.6	24.4	1.0
	Control	3.3	17.6	ND	36.9	7.4	6.2	ND	ND	21.9	2.5	4.2
PC	EFA-deficient	trace	36.0	ND	12.3	25.5	ND	ND	ND	6.4	14.1	5.7
	Control	2.3	37.9	ND	17.5	12.6	9.5	ND	0.9	12.5	6.7	ND

PE : Phosphatidylethanolamine, PC : Phosphatidylcholine, ND : Not detected

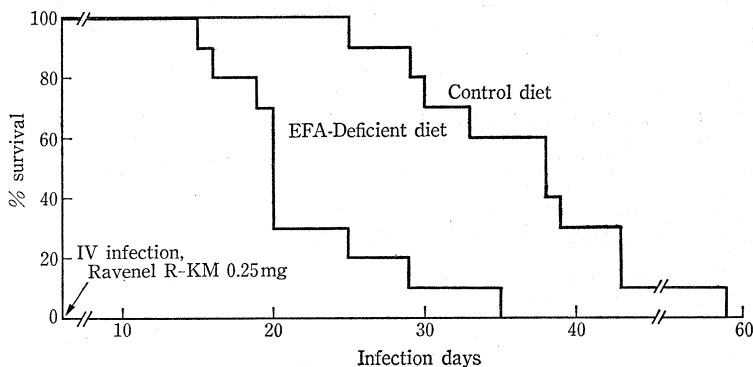


Fig. 1. Time-course observation of % survival in two groups of tuberculous mice fed with essential fatty acid (EFA)-deficient diets or control diets.

においても体重増加傾向を維持したが、EFA-DD 群は対照群よりも常に多少体重は下まわつて、飼育4週後の感染時において前者は33g、後者は35gであつた。Ravenel R-KM 0.25mg の静注感染8日後、対照群では更に36.5gまで体重は増加したが、EFA-DD 群ではこのとき既に平均5gの体重減少を示した。しかし以後、両群とも体重減少を続け、全身症状の悪化とともに斃死動物がでて、感染後の平均生存日数はEFA-DD 群が21.9日、対照群は35.3日となつた(Fig. 1)。

実験 2)それぞれ40匹よりなる4群のマウスを用意し、そのうち2群にはEFA-DDを、残り2群には対照飼料を与えた。4週飼育後、それぞれの1群にのみBCGを1mg静注し、更に3週間飼育を続けた。ここで各群

の15匹ずつに9%カゼイン 2ml をipしてマクロファージ収獲材料とした。残りのマウスは4群ともH37Rv R-KM株0.05mgで静注感染し、以後、各群の肺および脾における感染菌数の消長を追つた。成績をFig. 2, 3に示した。各時点における菌数は4匹ずつの平均である。

Fig. 2は非免疫群における菌数消長であるが、いずれの臓器内においても、感染12日までは飼料の違いによる影響はみられていないが、それ以降、感染菌数がピークに達する前後においてはEFA-DD群において生菌数は上まわつて消長した。Fig. 3はBCG接種動物における場合で、いずれの飼料群でも感染防御効果は感染菌の増殖抑制という形でよく表現されたが、感染後期においてEFA-DD群の菌数消長は多少対照群を上まわる傾向

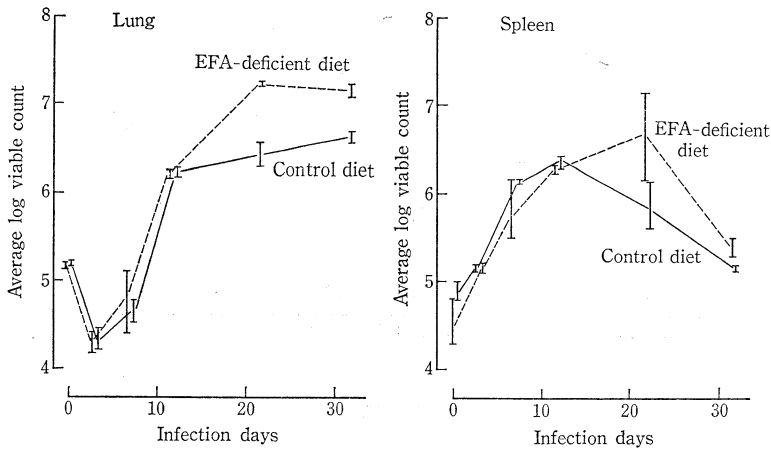


Fig. 2. Fate of virulent tubercle bacilli (H37RvR-KM) in the lung and spleen of mice fed with essential fatty acids (EFA)-deficient or control diets.

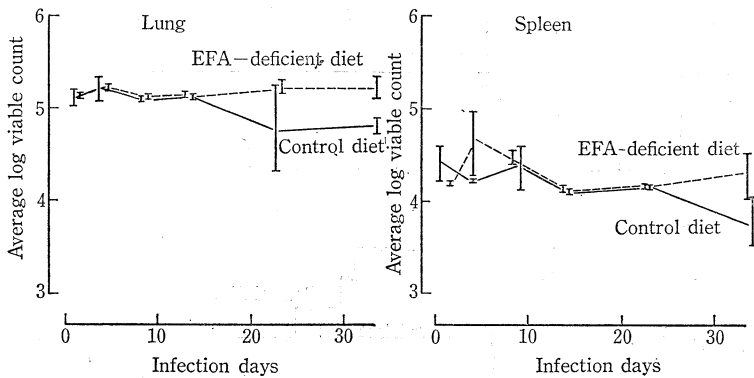


Fig. 3. Fate of virulent tubercle bacilli (H37RvR-KM) in the lung and spleen of BCG-vaccinated mice fed with essential fatty acids (EFA)-deficient or control diets.

がみられた。

考 察

必須脂肪酸欠損飼料を用いて、その生理学的意義を検討した仕事は既に膨大であるが、食細胞磷脂質の脂肪酸構成への修飾を検討し、同時に感染に対する影響をみた研究はほとんど見当たらない。

一般にこの種の実験においては、EFA-DDの投与期間は大変長く、少なくとも数カ月に及ぶのが普通である。しかし私たちはそれによつて動物の全身症状に影響を来さない程度にとどめ、しかも食細胞の膜磷脂質の変化を来す条件を求めて数週の投与期間としたわけである。

結果としても、EFA-DD 3週投与後、多形核白血球においては既にリノール酸と、リノール酸を生合成の前駆体とするといわれる¹²⁾アラキドン酸が激減し、オレイン酸や $C_{20:1-3}$ の脂肪酸が増加した。またマクロファージにおいては C_{22} の不飽和脂肪酸が増加した。このよ

うな脂肪酸組成の変化については、Hayashida と Portman (1960)¹³⁾ のラット肝におけるミトコンドリア、Zibof と Hsis (1972)¹⁴⁾ のラットの皮膚、Odutygs (1977)¹⁵⁾ のラット脳等における成績とよく一致している。

このことは EFA-DD 投与の影響が多種類の体細胞へ共通のものであり、食細胞に特異的なものでないことを示唆している。

したがって食細胞におけるこのような脂質変化を、直ちに感染増悪の原因に結びつけることはできないが、感染菌に直接的な交渉をもつ宿主細胞が食細胞であることから、私たちはこの成績に一層関心を高めている。特にこれまでの形態学的観察^{6,7)}、生化学的研究³²⁻⁵⁾から、私たちは食細胞の膜構造と菌との密な接触、それにひき続く膜磷脂質の分解、その結果遊離する抗菌力の強い多価不飽和脂肪酸の役割に注目してきた^{6,7)}に、今回の成績を矛盾なく理解できる。

更に私たちは感染菌が抗菌の不飽和脂肪酸に暴露され

るとすれば、むしろ食細胞の崩壊とその膜の自己分解に際してであろうと推察している。本研究においても、感染菌数の消長に差のできたのは感染ピークの前後からであり、特に大菌量接種による斃死実験において、EFA-DD飼育群と対照飼料群との間に生存日数の顕著な差が表現された。この場合はマウス死亡の原因となる肺の広範な病変において、多形核白血球の浸潤と壊死とが極めて著明である。このことは宿主細胞の自己犠牲による抗菌現象ともいえる。

結核菌に抗菌力の強い脂肪酸は飽和酸ではC_{12:0}（ラウリン酸）、C_{14:0}（ミリスチン酸）、そして他は多価不飽和酸であるが¹⁶⁾、生体内、ことに燐脂質の構成脂肪酸における分布を考えると、問題となるのはオレイン酸（C_{18:1}）、リノール酸（C_{18:2}）、アラキドン酸（C_{20:4}）である。オレイン酸に比して後者2つの多価不飽和脂肪酸ははるかに抗菌力が強いので、これらが減少してオレイン酸が増加するとすれば、総合的な脂肪酸の抗菌力は低下することになる。しかし遊離の長鎖脂肪酸の抗菌力はその量と、環境のpH、そして血清蛋白等の中和物質の存在を免れた条件を必要とし、これらの条件が満足されないときは逆に発育支持に傾くことにもなる²⁾。この二重の方向性を考慮すれば、本研究でみられたEFA-DDの感染増悪への影響は決して小さいものではないと思われる。

以上は脂肪酸の菌への直接作用を論じたのであるが、他方、燐脂質の脂肪酸構成は膜の流動性を変化せしめ、膜に内在する各種の酵素活性にも影響を与える¹⁷⁾。またアラキドン酸は生理活性の強いプロスタグランジンの生合成の出発材料として重要である¹⁸⁾。これらが食細胞のみならずリンパ球を介して感染に影響をもつことも否定できない。Høilundら(1970)¹⁹⁾はEFA-DDラットでは骨髓や胸腺皮質等のリンパ系組織で小リンパ球の数の減少することを指摘している。

ま と め

必須脂肪酸欠損飼料をマウスに投与し、食細胞膜燐脂質の脂肪酸構成の変化を腹腔渗出細胞において観察した。対照飼料投与マウスのそれと比較し、抗菌活性の強いリノール酸とアラキドン酸量が減少し、オレイン酸量が増加した。これら2群における感染抵抗性を比較したところ、EFA-DDマウス肺および脾における感染菌数は対照群を上まわっていた。また大量菌感染によつて生存日数が短縮され、必須脂肪酸欠損による結核感染抵抗性の弱くなることが認められた。

稿の終りにのぞみ、本研究に御助言、御助力をいただいた国立予防衛生研究所獣疫部の中川雅郎博士、技術部の中沢敏博士、森林教子技官に謝意を表す。

文 献

- 1) 近藤肇子・金井興美: 総説 結核感染における宿主脂質 II. コレステロール, 結核, 56: 41, 1981.
- 2) 近藤肇子・金井興美: 総説 結核感染における宿主脂質 III. 長鎖脂肪酸と結核菌, 結核, 56: 109, 1981.
- 3) Kanai, K. and Kondo, E.: Separation and properties of "in vivo grown tubercle bacilli" associated with the lysosomal membrane, Japan. J. Med. Sci. Biol., 23: 303, 1970.
- 4) Kondo, E. et al.: Analysis of host-originated lipids associated with "in vivo grown tubercle bacilli", Japan. J. Med. Sci. Biol., 23: 315, 1970.
- 5) Kondo, E. and Kanai, K.: Demonstration of cholesterol esterified with polyunsaturated fatty acids in mycobacteria grown in vivo, Japan. J. Med. Sci. Biol., 30: 165, 1977.
- 6) Kanai, K. et al.: Ultrastructural study of mycobacteria in experimentally produced lung lesions of mice, Japan. J. Med. Sci. Biol., 32: 327, 1979.
- 7) Kanai, K. et al.: Electron microscopy of the host-cell parasite relation in experimental mouse tuberculosis, Tubercle, 投稿中.
- 8) Kondo, E. and Kanai, K.: Antimycobacterial activity of lecithin-cholesterol liposomes in the presence of phospholipase A₂, Japan. J. Med. Sci. Biol., 31: 249, 1978.
- 9) Kanai, K. and Kondo, E.: Phospholipase A₂-induced antimycobacterial activity in the membrane fraction obtained from peritoneal exudate cells of guinea pigs, Japan. J. Med. Sci. Biol., 33: 87, 1980.
- 10) Knazek, R. A. and Liu, S. C.: Dietary essential fatty acids are required for maintenance and induction of prolactin receptors, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 162: 346, 1979.
- 11) Kondo, E. and Kanai, K.: A comparative observation on cholesterol ester content of uninduced and induced peritoneal cells, Japan. J. Med. Sci. Biol., 27: 67, 1974.
- 12) Mead, J. F. et al.: Metabolism of essential fatty acids. Incorporation of acetate into arachidonic acid, J. Biol. Chem., 205: 683, 1953.
- 13) Hayashida, T. and Portman, O. W.: Swelling of liver mitochondria from rats fed diets deficient in essential fatty acids, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 103: 656, 1960.
- 14) Zibof, V. A. and Hsis, S. L.: Effect of prostaglandin E₂ on rat skin: Inhibition of sterol ester biosynthesis and clearing of scaly lesions in essential fatty acid deficiency, J. Lipid Res., 13: 458, 1972.
- 15) Odutygs, A. A.: Recovery of brain from deficiency of essential fatty acids in rats, Biochim. Biophys. Acta, 487:1, 1977.
- 16) Kondo, E. and Kanai, K.: The relationship between the chemical structure of fatty acids and their mycobactericidal activity, Japan. J. Med. Sci. Biol., 30: 171, 1977.
- 17) Levin, E. et al.: Mitochondrial changes associated with essential fatty acid deficiency in rat, J. Biol.

- Chem., 228: 15, 1957.
- 18) Scott, W. A. et al.: Regulation of arachidonic acid metabolites in macrophages, J. Exptl. Med., 152: 342, 1980.
- 19) Hoilund, L. J. et al.: Essential fatty acid deficiency in rat. I. Clinical syndrome, histopathology, and hematopathology, Lab. Invest., 23: 58, 1970.