

原 著

結核菌の生育に及ぼすリゾレシチンの作用

近藤 瑩子・金井 興美

国立予防衛生研究所結核部, 細菌第一部

受付 昭和 57 年 4 月 8 日

EFFECTS OF LYSOLECITHIN ON THE GROWTH OF
TUBERCLE BACILLI IN VITRO

Eiko KONDO* and Koomi KANAI

(Received for publication April 8, 1982)

In a series of our study on tuberculous infection at the cell membrane level, we have been concerned with a possibility that free fatty acids released from membrane phospholipids may have an opportunity to act on the bacilli as a nutrient or a growth-inhibitor depending on their molecular species, amounts or the environmental conditions. As an extension along the line of study, this paper reports the effects of lysolecithin, another degradation product of phospholipids, on the growth of tubercle bacilli in vitro.

The effect was examined by adding various molecular species of lysolecithin to liquid media of a minimum composition to which tubercle bacilli had been inoculated. It was found that the effect is different depending upon the kind of constituent fatty acid; e.g. stearoyl-lysolecithin is growth-supportive but myristoyl-, palmitoyl- and oleoyl-lysolecithin are bactericidal at a concentration of 0.2 mM. Experiments with 1-[¹⁴C]-palmitoyl-lysolecithin revealed that tubercle bacilli can split it to release 1-[¹⁴C]-free fatty acid and utilize it for the biosynthesis of bacterial phospholipids.

From these and other collateral experiments, it was suggested that tubercle bacilli were killed in the presence of lysolecithin by their own activity to degrade it releasing fatty acids toxic to them.

緒 言

私たちは、細胞膜レベルにおける結核感染の問題に関心をもち、形態学的そして生化学的な手法によつて研究を行なつてきた^{1)~5)}。

焦点のひとつは、宿主細胞膜の構成脂質あるいはその分解産物が、結核菌の生育と分裂増殖に及ぼす影響と、そのことが *in vivo* で現実に起こりうる感染条件の検討であつた。

そしてこうした一連の研究の中心をなすものは、膜りん脂質に由来する長鎖脂肪酸の動態であるが、本報告は

同じくりん脂質の分解産物のひとつであるリゾ体が、*in vitro* における結核菌の生育にどのような影響を及ぼすかを検討したものである。

材料と方法

菌株と菌液の調製: H₃₇RvR-KM 株の Sauton 培養菌を使用した。培養 2 週前後の菌を濾紙上に集め、水でよく洗滌し、重層した濾紙にはさんで水をきり、湿重量をはかつて水晶球コルベンにいれ、少量ずつよく冷やした水を加えつつ適宜の菌濃度の水浮遊液とした。

培地: Na₂HPO₄·12H₂O, 0.25 g; KH₂PO₄, 0.1 g;

* From the Department of Tuberculosis, National Institute of Health, 2-10-35, Kamiyosaki, Shinagawa-ku, Tokyo 141, Japan.

アスパラギン, 0.03 g; 水 100 ml を 120°C で 20 分滅菌し, 冷却してから別に滅菌した $MgSO_4$ の 60 mg/ml を 1 ml 添加した。pH は 6.8 となる。この処方 は Hart の培地⁶⁾ からカシトン, クエン酸ソーダ, グリセロールをぬいたもので以後限定培地と記載する。

リゾレシチン (LPC): Sigma 製, *L*- α -リゾホスファチジルコリンで, α 位の脂肪酸はそれぞれミリストイル, パルミトイル, ステアロイル, オレオイルであり, いずれも合成品で Grade 1 の 98~99% に精製された標品である。必要量が 0.1 ml 中に存在する水溶液をつくり (ステアロイル LPC のみは溶解に加熱を要する), 上記限定培地に添加する。

菌培養試験: 中性洗剤, さらにクロム硫酸でよく洗滌した滅菌中試験管に, 別途乾熱滅菌した綿栓を付ける (乾熱中綿栓からの溶出脂肪酸による汚染を防ぐため)。ここに上記限定培地の 5 ml を分注する。LPC 各濃度水溶液のそれぞれ 0.1 ml を添加し, さらに 10^{-1} mg/ml の菌液を 0.1 ml 接種する。以後経時的に一定量をくみ出して 10 倍希釈系列をつくり, その 0.1 ml を小川培地上で 37°C に培養し, 3 週以後のコロニー数から生菌数消長を追求した。

菌のリゾレシチナーゼによる LPC の分解: 1- $[^{14}C]$ -パルミトイル LPC (Amersham, England) の 0.5 μ Ci を 10 ml の滅菌試験管にとり, 溶媒をよくとばして乾燥する。ここに 1,000 μ g/ml の非標識のパルミトイル LPC を 25 μ l 加える。菌は Hart 完全培地⁶⁾ の均等浮遊液 50 mg/ml とし, その 0.2 ml を加えた。37°C で 60 分あるいは 5 時間インキュベートし, 100°C 10 分加熱後に 0.8 ml のクロロホルム-メタノール (CM) 2:1 を加え, 1 晩放置して脂質を抽出した。2 層に分かれるので, 下層の 5 μ l ずつを 100°C, 1 時間で活性化した 2 枚の silica gel 60 (E. Merck, Darmstadt Germany) の薄層板にスポットし, $CHCl_3-CH_3OH-H_2O$ (65:25:4) と, そして一方は heptane-ether-acetic acid (90:10:1) で展開した。残存する LPC の量, 分解遊離した脂肪酸量あるいはとりこまれ生合成されたとみられる菌体脂質量のスポットをスキャンした。スキャンングチャートはコピーしてスポットの紙重量から各標識脂質量の百分率を算定した。

成 績

1) 結核菌の生育に及ぼす各種 LPC の作用: 分子種を異にする各種 LPC を, 5 ml の限定培地に 100 μ g/ml の濃度に加え, ここに $H_{37}RvR-KM$ 株の 10^{-1} mg/ml を 0.1 ml 接種して 37°C で培養した。経時的に菌数の消長をみると (図 1), LPC を含まない限定培地中では生菌数はやや下降したが, 殆んど一定のレベルで生存をつづけた。ここにステアロイル-LPC が添加されると常

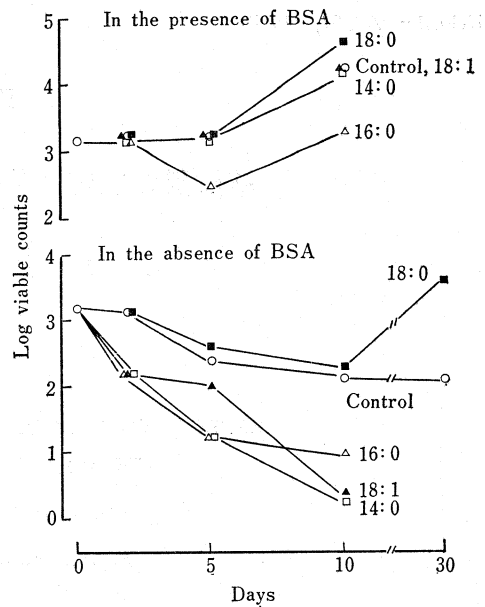


Fig. 1. Effects of various molecular species of lysolecithin (100 μ g/ml) different in constituent fatty acid on the growth of *M. tuberculosis* ($H_{37}RvR-KM$) in a minimum medium with or without BSA.

に对照を上まわり, 1 カ月を過ぎるころには菌塊片が観察できるようになった。しかし, その後の菌の増殖には限度がある。一方, ミリストイル, パルミトイル, オレオイル-LPC の添加によると, いずれも 10 日目までに生菌数は 1/100, 1/1,000 までに減少した。この抗菌活性は 5% に BSA を添加することによつて中和され, いずれも旺盛な増殖を開始し, 1 カ月経つころには多数の菌塊片がみとめられた。限定培地に BSA のみを添加した対照も増殖度は他と同じくぐまじかつた。

2) 結核菌生育に及ぼす LPC 濃度の影響: オレオイルとステアロイル-LPC をそれぞれ 4, 8, 16, 32, 64, 128 μ g/ml の濃度に 5 ml の限定培地に加え, $H_{37}RvR-KM$ の 10^{-1} mg/ml を 0.1 ml 接種して 37°C で培養し, 生菌数の消長を追つた (図 2)。オレオイル-LPC における殺菌効果も, ステアロイル-LPC の生育支持効果もともに 32, 64, 128 μ g/ml の高濃度において顕著であつた。この LPC の効果の dose response は接種菌を *M. phlei* としても観察され, ミリストイル-LPC では殺菌効果を, ステアロイル-LPC では発育支持効果が発揮された (図 3)。

3) 接種菌量と LPC の殺菌効果: 100 μ g/ml にミリストイルあるいはステアロイル-LPC を含む 0.9 ml の限定培地に $H_{37}RvR-KM$ の 50 mg/ml, 5 mg/ml, 0.5 mg/ml の 0.1 ml ずつを接種し, 37°C にインキュベートして一定時間ごとに 0.05M 醋酸バッファの 4 ml を加え, さらに 1 時間インキュベートし, その 10 倍希釈系

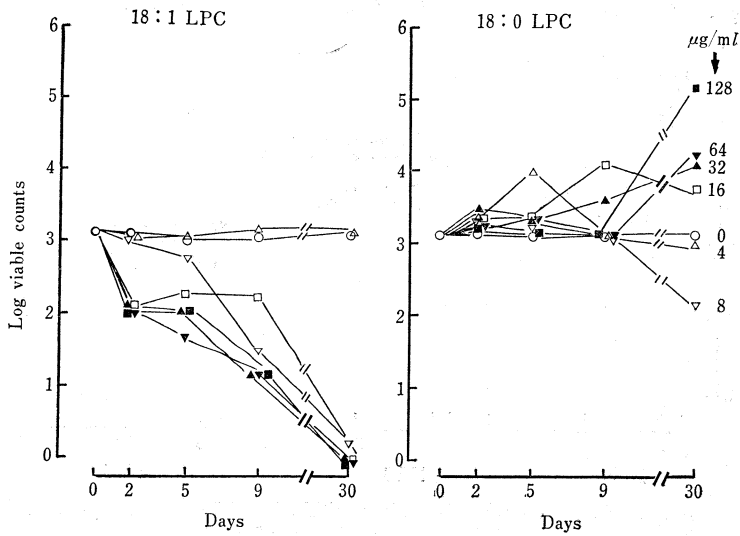


Fig. 2. Effects of oleoyl (18:1)- and stearoyl (18:0)-lysophosphatidylcholine (LPC) on the growth of tubercle bacilli (*H₃₇RvR-KM*).

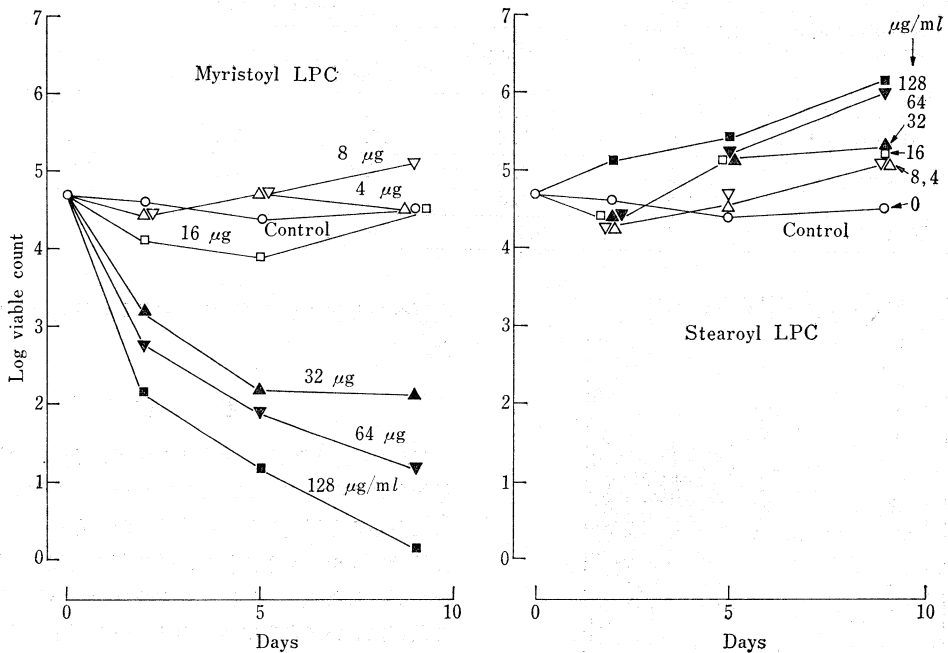


Fig. 3. Contrasting effects of myristoyl- and stearoyl-lysophosphatidylcholine on the growth of *M. phlei*

列をつくつて小川培地に接種した。図4に生菌数の経時的变化を示した。ステアロイル-LPC 溶液中においては生菌数は対照と全く変わることはないが、ミリストイル-LPC 溶液中ではいずれの接種量においても生菌数は減少した。殊に大量 5mg 接種における殺菌効果は著しく、48時間で1/1,000量まで減少した。

4) 菌による 1-[¹⁴C] パルミトイル-LPC の分解: 1-[¹⁴C] パルミトイル-LPC の 0.5 µCi に 50 mg/ml の *H₃₇RvR-KM* を 0.2 ml 添加して標識 LPC 量の変化

をみた (表1)。菌と混合インキュベイトすることによつて、LPC は1時間で76%、5時間で92%分解をうけた。その際の遊離脂肪酸量は標識全脂質中の27%と35%であり、その他は薄層のスキヤニングチャート (図5) にみられるように、いくつかの菌体脂質とみられるピークとしてあらわれている。またそのひとつは LPC がエステル化をうけてレンチンが生成されたとみられる。*M. phlei* の使用では1時間で98%の LPC が分解をうけたが、遊離した脂肪酸量は78%とカウントされ、他の磷

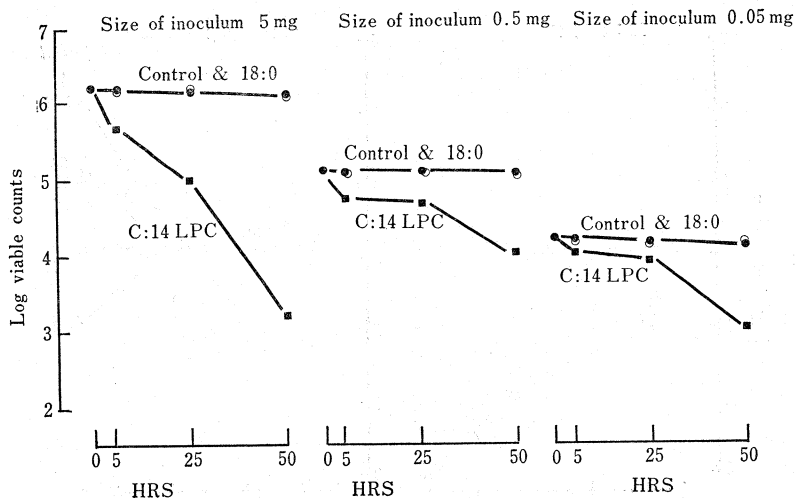


Fig. 4. Bactericidal effects of myristoyl lysolecithin (C:14 LPC) of 100 µg per ml on tubercle bacilli ($H_{37}RvR$ -KM) in relation to the size of inoculum.

Table 1. Degratation of 1-[^{14}C]-palmitoyl lysolecithin by mycobacteria

Mycobacterial strain	Incubation hours	% Radioactivity			
		Lysolecithin	Other phospholipids	Free fatty acids	Neutral fats
<i>M. tuberculosis</i> ($H_{37}RvR$ -KM)	1	23.9	33.3	27.2	15.6
	5	7.8	40.2	35.4	16.6
<i>M. phlei</i>	1	1.7	7.4	77.7	13.2
	5	1.5	16.0	57.8	24.7
None	5	100	0	0	0

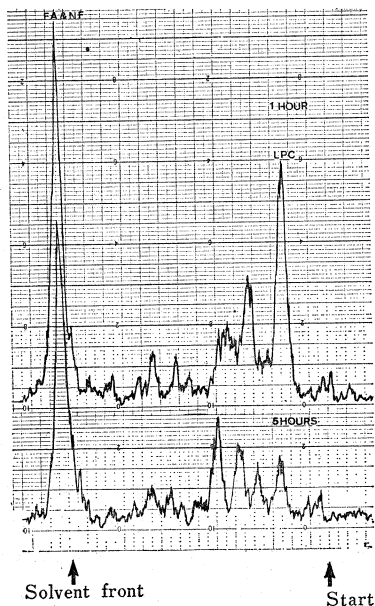


Fig. 5. Degradation of 1-[^{14}C]-palmitoyl lysolecithin by tubercle bacilli ($H_{37}RvR$ -KM 10mg) and incorporation of released 1-[^{14}C]-fatty acids into other lipids. LPC...lysolecithin, PL...phospholipids, FA...free fatty acids, NF...neutral fats

脂質へのとりこみは $H_{37}RvR$ -KM の場合より少なかった。

考 察

1953年三淵^{7,8)}は、血清リポプロテイン中の磷脂質が結核菌の増殖を支持し、これはレシチンの作用によるものであらうと示唆した。その後私たちも極めて限定された培地にレシチンを添加し、結核菌の増殖を支持することを報告した⁹⁾。しかし、レシチンを用いた人工膜と菌の共存においてさらにホスホリパーゼ A_2 を添加せしめると、レシチンを構成する脂肪酸の分子種によつて殺菌効果をもたらすこともみとめた¹⁰⁾。私たちはこの抗菌現象をホスホリパーゼ A_2 によつて分解遊離した脂肪酸の効果と解釈してきた。脂肪酸は遊離の形で、殊に酸性の環境において結核菌に対し強い抗菌効果をもつものがある¹¹⁾。その活性は分子種によつて異なるが、ホスホリパーゼ A_2 添加によつて得られた抗菌活性の成績がこれと平行していたためである。レシチンから脂肪酸が遊離する際に生ずるリゾレシチンは脂肪酸同様強い表面活性物質として知られているので、今回の報告は、分子種の異なる数種の合成リゾレシチンについての抗菌活性を比較

するとともに、その機構について考察を加える。

各種リゾレシチン中ステアロイル-LPC のみは菌の増殖を支持し、他のミリストイル-, パルミトイル-, オレオイル-LPC のいずれも殺菌効果を示した。

LPC 添加なしの限定培地中では菌は生残はつづけても増殖しえない状態にあり、ここに LPC が添加されたときにみられる菌数の増加は LPC の組成が栄養源として菌にとりこまれて生育を支持することが予想される。事実、LPC は菌によつて分解をうけ、その一部はいくつかの磷脂質への転換がみとめられた(図5)。またそのひとつはエステル化をうけたレシチンともみられ、これが菌を増殖しやすい環境としている可能性もある⁷⁻⁹⁾。

1969年、小野と野島は *Mycobacterium phlei* にホスホリパーゼAを証明し¹²⁾、その後1974年西島¹³⁾らによつて、この酵素の詳細が報じられた。この酵素はホスホリパーゼA₁型で磷脂質を分解すると同時にリゾ磷脂質の活性も示す。今回私達も H₃₇RvR-KM 株においてもその活性をみとめたわけであるが、その反応速度が速やかであることは、菌に対する LPC の発育支持、かつまた殺菌作用のいずれにおいても菌が LPC を分解し、遊離した脂肪酸が作用している可能性が示唆される。一般的に同じ環境の中で大量の菌が接種された場合には増殖が支持されると考えるが、殺菌効果をもつ LPC の存在においては逆に接種菌量の多い方が殺菌効果の高かつたことは、同時に大量の LPC の分解が起こり、その際遊離した脂肪酸が菌に作用したと考えることもできる。この3)の実験において、インキュベイトの途中で pH を酸性にしたのも遊離脂肪酸の活性を高める目的で行なつたものである。

レシチンに由来するこれまでの一連の結核菌の増殖の支持、あるいは殺菌作用の発現に関する実験¹⁾⁴⁾⁵⁾⁹⁾¹⁰⁾は、結核感染における食細胞膜と菌との相互作用を想定したものである。形態学的観察¹⁾によつても、感染組織内で食細胞にとりこまれた菌周辺には食胞膜が存在し、その一部は菌表面と密着している個所もあり、このような接点において、食細胞の、あるいは菌のホスホリパーゼAが活性化をうけ、レシチン、さらにリゾレシチンの分解により遊離した脂肪酸が蛋白等の中和をうけることなしに抗菌活性を発揮しうるものと推察している。

上述のように想定される現象が、現実には起こるとしても、殺菌効果に十分な反応によつてはおそらく食胞膜自体も崩壊を来すにちがいがなく、この意味においては、いわゆる "bidirectional" な反応である。いずれにせよこの報告は、菌自体のもつ酵素が周辺の特定の基質へ働き

かけ、その分解物によつて自滅しうる可能性を示唆するものである。

文 献

- 1) Kanai, K. et al.: An electron microscopy study of intra-cellular mycobacteria in experimental mouse tuberculosis, *Tubercle*, 62: 187, 1981.
- 2) Kanai, K. and Kondo, E.: Review. Chemistry and biology of mycobacteria grown in vivo, *Japan J Med Sci Biol*, 27: 135, 1974.
- 3) Kanai, K. and Kondo, E.: Review. Antibacterial and cytotoxic aspects of long-chain fatty acids as cell surface events: selected topics, *Japan J Med Sci Biol*, 32: 135, 1979.
- 4) 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.
- 5) Kondo, E. and Kanai, K.: Lipolytic enzyme activities of phagocytic cells as affected by the presence of tubercle bacilli, *Kekkaku*, 57: 1, 1981.
- 6) Hart, D'Arcy, P., et al.: Suggested role of lysosomal lipid in the contrasting effects of "Triton WR-1339" and dextran on tuberculous infection, *Nature*, 223: 672, 1969.
- 7) Mifuchi, I.: A study of the submerged growth of *mycobacterium tuberculosis*. III. On the submerged-growth-promoting factor contained in bovine serum and egg yolk, *Kekkaku*, 28: 193, 1953.
- 8) Mifuchi, I.: A study of the submerged growth of *mycobacterium tuberculosis*. IV. On lecithin as a submerged-growth-promoting factor, *Kekkaku*, 28: 448, 1953.
- 9) Kondo, E. and Kanai, K.: An attempt to cultivate mycobacteria in simple synthetic liquid medium containing lecithin-cholesterol liposomes, *Japan J Med Sci Biol*, 29: 109, 1976.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) Ono, Y. and Nojima, S.: Phospholipases of the membrane fraction of *mycobacterium phlei*, *Biochim Biophys Acta*, 176: 111, 1969.
- 13) Nishijima, M. et al.: Purification and properties of membrane-bound phospholipase A from *Mycobacterium phlei*, *J Biochem*, 249: 5658, 1974.