

原 著

リポソーム（人工膜）の形で与えられたレシチンの
抗酸菌発育支持効果．感染の部分的モデルとして

近 藤 瑩 子・鈴 木 健 之・金 井 興 美

国立予防衛生研究所結核部，技術部，細菌 I 部

受付 昭和 58 年 3 月 10 日

UTILIZATION BY MYCOBACTERIA OF LECITHIN GIVEN IN A FORM OF LIPOSOMES

Eiko KONDO*, Kenji SUZUKI and Koomi KANAI

(Received for publication March 10, 1983)

Phosphatidylcholine (lecithin) given in a form of lecithin-cholesterol liposomes supported the growth of mycobacteria including tubercle bacilli in a synthetic minimum medium. The liposomes can be in close proximity to mycobacterial cells, and lecithin molecules were degraded so that released fatty acids were incorporated into bacterial lipids. Liposomes-mycobacteria interaction as described above was discussed as a partial model of the phagocyte-parasite interaction at the cell membrane level.

Keywords: Tubercle bacilli, Liposomes, Synthetic medium, Culture, Electron microscopy

キーワードズ: 結核菌, リポソーム (人工生体膜), 合成培地, 培養, 電顕観察

はじめに

結核菌を含め病原抗酸菌はマクロファージを宿主とする細胞内寄生菌であり，食胞内で増殖・生残することはよく知られているが，この特殊な環境で何を栄養源として発育するかについてはいまだ報告がない。一方私たちは自己の形態学的，生化学的アプローチから，細胞内抗酸菌と食胞膜との密接な相互作用が，感染の当初における過程と帰結を支配する重要因子であることを示してきた¹⁾。そして，食細胞膜の主要構成りん脂質としてレシチンがあり，そのレシチンはまた，結核菌の分離培養に欠かせない卵黄の主成分のひとつであることに関心をもった。結核菌の発育支持物質としてレシチンやスフィンゴミエリンに注目した研究はこれまでに二，三の報告をみるが²⁾³⁾，私たちはレシチンをコレステロールとともにリポソームの形で用い，結核感染の部分的モデルとして *in vitro* の培養実験を

施した⁴⁾。なお，今回はリポソームと菌との接触については電顕的観察を，またレシチンの分解・利用については標識化合物を用いて検討した。その成績を報告する。

実験材料と方法

抗酸菌: *Mycobacterium tuberculosis* として H₃₇Rv R-KM, *M. bovis* として BCG と Ravenel R-KM, そして *M. phlei* を用いた。菌液は精製水を媒液として手振法で調製した。

培地: 上記の菌株の継代保存は Sauton 合成培地を用いている。リポソーム添加による発育実験では，Hart⁵⁾ らの半合成液体培地 (Casamino acid, 0.25g; クエン酸ソーダ・2H₂O, 0.15g; MgSO₄・7H₂O, 0.06g; Na₂HPO₄・12H₂O, 0.25g; KH₂PO₄, 0.10g, アスパラギン, 0.03g; グリセリン, 0.25ml; 精製水 100ml) を完全培地とし，このなかから casamino acid,

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

クエン酸ソーダ、グリセリンを除いた制限培地を基礎培地とした。基礎培地にリポソームを添加してその発育支持効果を観察した。

リポソームの調製：レシチン、コレステロール、ジセチルホスフェイトを1.0:0.75:0.1のモル比でクロロホルム・メタノール(2:1)で溶解したあと、丸底コルベン中で減圧によって溶媒をとばし、コルベン底に脂質膜をつくった。レシチン量80mgの場合にはこれに0.15M KCl溶液10mlを加え、更に100メッシュの硝子粉末を適量添加してからコルベンを軽く振って脂質を分散させた。分散液は超音波処理して半透明なりポソーム懸濁液とした。

試薬：卵黄レシチン、ジセチルホスフェイトは Nutritional Biochemical Corporation (Cleveland, Ohio) から、他のレシチン分子種は Sigma (St. Louis, Mo.) から購入した。卵黄レシチン、大豆レシチン、肝レシチン以外は2つの構成脂肪酸が同一のラウリン酸(C_{12:0})、ミリスチン酸(C_{14:0})、パルミチン酸(C_{16:0})、ステアリン酸(C_{18:0})あるいはオレイン酸(C_{18:1})より成る合成品である。コレステロールは標準試薬のものを用いた。標識レシチンとしては[1-¹⁴C]-di-palmitoyl lecithin を Amersham, England より購入した。

菌体脂質分析：α[1-¹⁴C]-di-palmitoyl lecithin の0.5μCiを10mlの共栓遠沈管にとり、よく溶媒をとばしたのち、非標識の dipalmitoyl lecithin を800μg/ml に含むリポソーム(レシチン、コレステロール、ジセチルホスフェイト、1:0.75:0.1)の25μlを加え、更に菌液の50mg/ml(Hart 限定培地中)の0.5mlを添加して37°Cにインキュベイトした。一定時間後に100°Cで10分間加熱して殺菌した。クロロホルム・メタノール(2:1)の2mlを加え、1昼夜室温において脂質を抽出した。抽出液の下層の20μlを活性化した

(110°C, 1時間)シリカゲル60(E. Merck, Darmstadt, Germany)の薄層にスポットし、りん脂質の同定にはクロロホルム:メタノール:水(65:25:4)で展開、中性脂肪の同定のためにはヘプタン:エーテル:醋酸(90:10:1)で展開した。各脂質成分への標識の%分布は放射活性のスキニングパターンより計算した。

電子顕微鏡観察：超薄切片作成のためにはBCGのSanton上11日培養菌を用いた。この50mg/mlの0.8mlとリポソーム懸濁液の100μlを混合して37°Cに4時間インキュベイトした。反応混液に10% Ficolの10mlを加え、9,000rpm 10分間0°Cで遠沈し、菌体へ未附着のliposomesを除いた⁶⁾。cell pelletは10mM Tris bufferで洗滌し、よく冷やした固定液(1% OsO₄ 2容と2.5% グルタルアルデヒド1容を混じた0.1M Na-cacodylate 緩衝液, pH7.4)の1mlを加え、30分後には遠沈して上清を捨て、新鮮な同固定液を加えて水冷しながら24時間ずつ2度、計48時間固定した。ペロナール緩衝液で洗滌後、1.5%寒天を45~50°Cに保って加え、スライドグラス上で細片とした。以下の操作は常法に従ってgraded ethanolで脱水し、Epon 812に包埋した。超薄切片はLKB Ultratome 8800型で薄切し、重染色して観察に供した。ネガティブステイニングはInoueら⁷⁾の方法に従った。電子顕微鏡はHitachi H-500型を使用し75kVで撮影した。

実験成績

培養実験：基礎培地を5mlずつ中試験管に分注し、リポソーム懸濁液を50μlずつ加えた。リポソーム作成には構成脂肪酸を異にする各種のレシチン分子種を用い、レシチン量として培地5mlあたり400μgとした。培地には雑菌汚染防止のためカナマイシンを100μg/mlの濃度に加え、H₃₇Rv R-KM(カナマイシン耐性株)

Table 1. Supporting Effects of Lecithin-Cholesterol Liposomes for the Growth of Tubercle Bacilli (H₃₇RvR-KM) in a Synthetic (Minimum) Medium

Incubation weeks	Basal medium (MgSO ₄ ·7H ₂ O, Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O, KH ₂ PO ₄ , Asparagin) with below-indicated additional ingredients							
	None	Liposomes, lecithin of which is					Liver lecithin	Casamino acid Trisodium citrate Glycerol (Complete medium)
		di-C ₁₂	di-C ₁₄	di-C ₁₆	di-C ₁₈	di-C _{18:1}		
2	-	+	+	+	-	+	-	+
3	-	+++	+++	++	+	+++	+	++
4	-	+++	+++	++	+	+++	+++	++++

Each medium was dispensed into test tubes in an amount of 5 ml.

Inoculum size was 10⁻⁴ mg per tube.

The degree of growth is described arbitrarily by the symbols -, +, ++, +++ and ++++ on the basis of the macroscopical appearance of submerged growth.

Table 2. Supporting Effects of Lecithin-Cholesterol Liposomes for the Growth of Tubercle Bacilli (*H₃₇RvR-KM*) in a Synthetic Basal Medium

Basal Medium	Additional ingredients	Yield of growth at 6 weeks as total N (μg)
MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.06 g Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O 0.25 g KH ₂ PO ₄ 0.1 g Asparagin 0.03 g Distilled water 100 ml	Liposomes (8 mg as lecithin)	
	consisting of	
	di-C ₁₄ lecithin	427
	di-C ₁₆ lecithin	420
	di-C ₁₈ lecithin	110
	egg yolk lecithin	800
	soy bean lecithin	208
	(Complete medium)	
	[Casamino acid 0.25 g Trisodium citrate 0.15 g Glycerol 0.25 ml]	4,544
	(Basal medium)	
	None	60

Inoculum size: 2×10^{-2} mg per 100 ml medium.

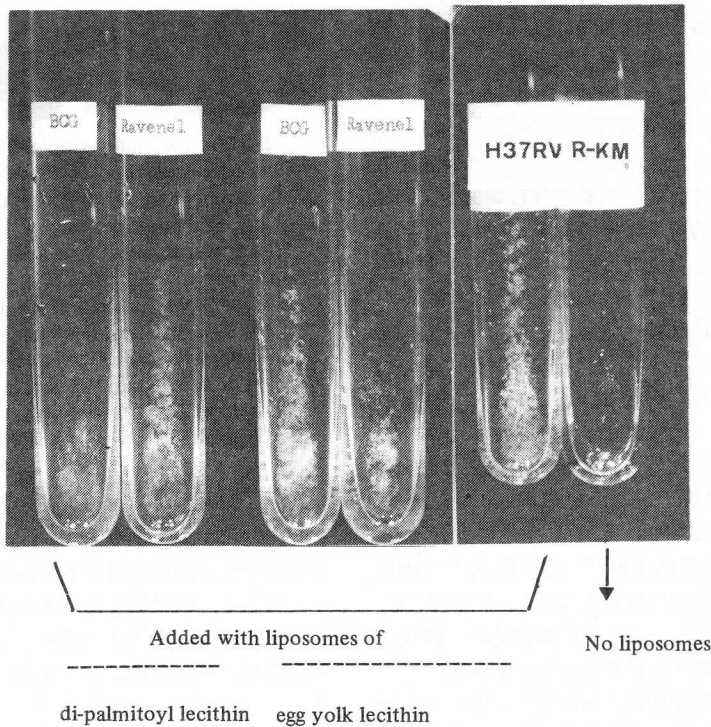


Fig. 1. Appearance of submerged growth of mycobacteria in liposomes-containing basal medium (MgSO₄·7H₂O, Na₂HPO₄·12H₂O, KH₂PO₄, asparagin, distilled water).

Note: This photograph of culture tubes was taken by placing them in slant position to make the observation of submerged growth easier.

を 10^{-4} mg 接種した。37°Cでインキュベイトし、相対的な発育度を肉眼的に比較した。4週までの発育成績を Table 1 に示した。

基礎培地のみでは4週後において肉眼的な発育は全くみられなかったが、リポソーム添加培地においては3週以後程度の差はあれ、培地底に深部発育がみられた。生体にもっとも普遍的な脂肪酸であるパルミチン酸、ステアリン酸を含むレシチンよりも、生体には稀なラウリン酸、ミリスチン酸を含むレシチンの方が発育支持効果はよかった。しかし一方、不飽和脂肪酸であるオレイン酸を含む合成レシチンやアラキドン酸の多い肝レシチンは、より効果的であった。しかしながらこれらの発育はこの時点が限度であったのに比べて、完全培地では6週後まで旺盛な発育が続いて、培地表面に菌膜を形成する状況となって大きな差異がみられた。

Table 2 は同一目的の実験であるが、200mlのコルベンに培地 100ml を分注し、 2×10^{-2} mg 菌量を接種して6週後の発育量をマイクロケルダール法によるN量として測定比較した。ステアリン酸含有レシチンの効果が特に悪いことは前回同様であり、一方、卵黄レシチンの発育支持効果は一番すぐれていた。いずれにせよ、この定量的、客観的発育量によって、基礎培地におけるものの数倍から10倍量の菌生育がリポソーム添加によって得られることが明らかとなった。

Fig. 1 は深部発育の状況を培地を斜面として上方から写したものである。菌は粗な菌塊として存在するが、パルミチン酸、ステアリン酸を含むレシチンの場合には、菌塊は比較的密で固い印象をうけた。このリポソームを含む液体培地は外見はオパレスセントであるが、菌の生育がすすむにつれて透明度がすすむ。

電子顕微鏡観察：私たちの使用したリポソームはネガティブステイニングでみると、径 0.2μ から 1μ の vesicle が主体であり (Fig. 2, A), それらを菌液 (BCG) に加えると、一部は菌体の周辺にあつまり、菌体表面に接して存在するかにみえる (Fig. 2, B)。そうした vesicle は時間とともに菌体周辺で融合し、菌体は融合リポソームの中にうずもれた形状になる (Fig. 2, C, D)。過剰のリポソームを除去したのちに超薄切片で両者の接触の状況を見ると、Fig. 2, E, F に示すように、リポソームはその膜構造の一部で菌体表面にかなり密接に存在することがわかる。

脂質分析：上記の発育実験において、リポソームは単に菌発育に好適な物理化学的環境を与えるものであるか、あるいは私たちが推定するように、実際にレシチンを菌体脂質として利用しているか否かを検討するために、標識レシチンによる脂質分析実験 (実験材料と方法) を行なった。H37Rv R-KM, BCG, Ravenel R-KM, そして *M. phlei* をそれぞれ [14 C]-dipalmitoyl lecithin の 0.5μ Ci を含む基礎培地中で4週間

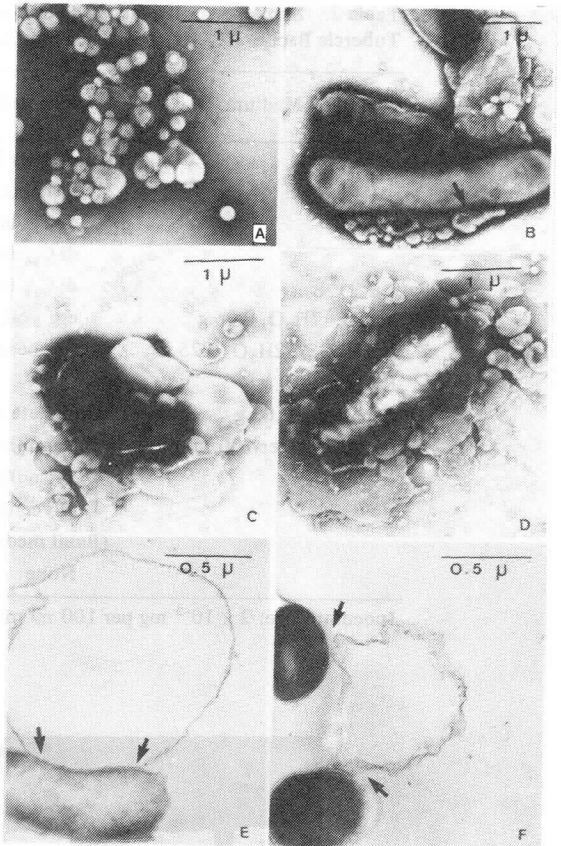


Fig. 2. Electron microscopic pictures of dipalmitoyl lecithin-cholesterol liposomes and *M. bovis* (BCG) cells. A: Liposomes alone (Negative staining) B: 1-hr incubation mixture of liposomes and BCG cells (Negative staining). Arrow shows a liposome in close proximity to a BCG cell. C, D: Overnight incubation mixture of liposomes and BCG cells (Negative staining) Liposomes around a bacterial cell are confluent and deformed. E, F: 4-hr incubation mixture of liposomes and BCG cells (Ultrathin sections). Arrows show the sites of contact between liposomes and a bacterial cell.

インキュベイトし、反応混液から脂質を抽出して分析した。結果は Fig. 3 および Fig. 4 にまとめた。Fig. 3, A は中性脂肪分画の薄層を放射活性をスキャンしたパターンであり、B は同じくりん脂質分画のパターンである。Fig. 4 はこうしたパターンから放射活性の%分布を計算し、その数値によって画いた各脂質の消長である。

これらの成績に示されているように、レシチンは菌との混合系の中で徐々に分解を受け、はじめは脂肪酸が遊離し、中性脂肪にとりこまれるが、放射標識は次第にレシチン以外のりん脂質の中にとりこまれていく。リゾレシチンの生成は比較的少なく、個々のりん脂質のスポットは同定していないが、菌体りん脂質の Rf 値にほぼ相当するものである。

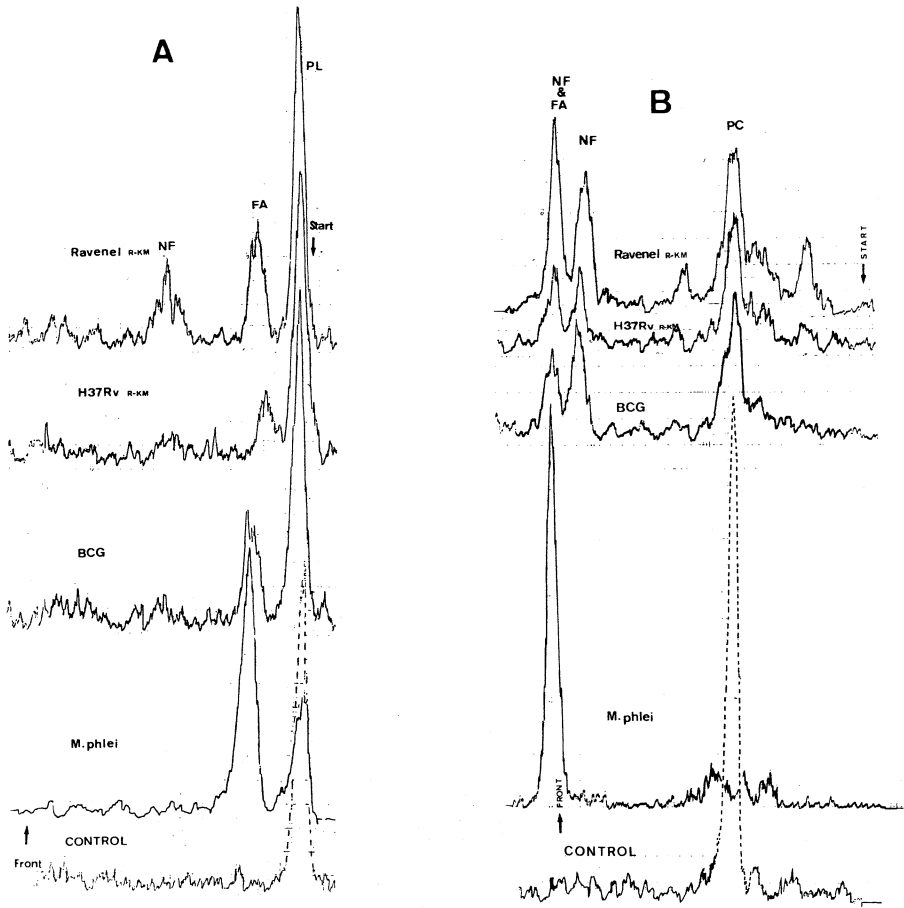


Fig. 3. Degradation of L- α -phosphatidyl di[1- 14 C] palmitoyl lecithin and incorporation of released [14 C] fatty acid in four species of mycobacteria.

Note: Scanning patterns of thin-layer chromatography developed by a solvent system of heptane-ether-acetic acid (90:10:1) in A and of chloroform-methanol-H₂O (65:25:4) in B.

考 察

結核感染における生体レシチンの意義については古くは戸田⁸⁾によってとりあげられ、また三淵²⁾は血清リポ蛋白のもつ結核菌発育促進因子としてレシチンに注目した。この場合、栄養源としてよりも、結核菌発育に対する阻害剤、例えば遊離脂肪酸に対する中和剤としての可能性が問題とされている。Dubos³⁾の研究対象としたスフィンゴミエリンもほぼ同様の発想に基づいている。したがって、これらの研究は私たちが今回目的とした分解・利用という局面と同じではないが、私たちもそうしたレシチンの意義を否定するものではなく、また、リポソームのもつ物理化学的活性の重要性についてはなお研究価値はあると考えている。

リポソームを添加した液体培地は、稀釈した牛乳のようなオパレスセントな外観を呈するが、そこで菌が生育するにつれてそのリポソームによる濁度は減じて

いく。おそらく増殖する菌体周辺にリポソームが吸着されていくためと考えていたが、今回の電顕観察によってもそのことは確認されたものといえよう。これは抗酸菌の表層脂質がリポソームの脂質二重層と疎水性の親和性をもつものと理解している。一方、JonesとOsborn⁶⁾はネズミチフス菌を用いて菌体にリポソームの接触しがたいことを述べており、これらグラム陰性菌のもつ細胞壁(リポポリサッカライドの糖類)の親水性によるものとされる。

上述のような菌と膜との物理的接触を出発点として、膜のレシチンは分解され、少なくとも遊離した脂肪酸は菌にとりこまれて菌体脂質の生合成に利用されることが明らかとなった。この際、レシチンの分解にあたってはホスホリパーゼの活性が期待されるが、それについてはOno and Nojima⁹⁾、Nishijima, Akamatsu and Nojima¹⁰⁾が *M. phlei* においてホスホリパーゼAの存在を証明している。また、レシチンの分解物のひとつと

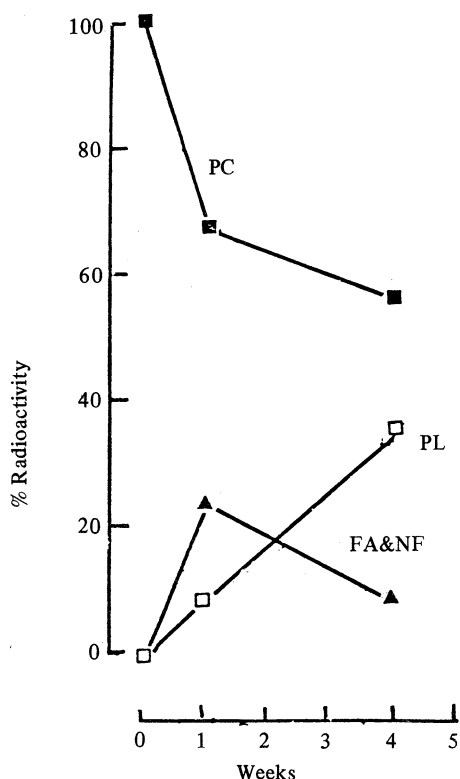


Fig. 4. Degradation by *M. tuberculosis* ($H_37RvR-KM$) of [^{14}C]-dipalmitoyl lecithin and incorporation of released [^{14}C]-fatty acid into mycobacterial phospholipids.

FA — Fatty acids, NF — Neutral fats, PL — Phospholipids, PC — Phosphatidyl choline (lecithin)

してのリゾレシチンの結核菌に対する生物活性については、私たちは最近の実験¹¹⁾によって発育支持と抗菌性の2面があり、構成脂肪酸の種類が重要な意味をもつこと、また、リゾレシチンは結核菌あるいは *M. phlei* 等によってすみやかに分解をうけることを示した。

Fig. 3 で *M. phlei* がレシチンを分解するのみで分解物の利用性に乏しく、病原性の高い菌種である人型あるいは牛型結核菌がその利用度の高い事実は、寄生性との関連で興味深い。

私たちは以前に、菌との混合インキュベートによりレシチンの分解に伴って共存するコレステロールの脂肪酸エステルが生成されることをみとめた⁴⁾が、このコレステロールエステルがとくに抗酸菌の菌体に親和性がつよいことは、私たちは *in vivo* の発育抗酸菌について繰り返し指摘し¹²⁾、その感染論的意義についても検討を加えたことがあった¹³⁾。

以上の諸現象に関して、抗酸菌のホスホリパーゼ、リゾホスホリパーゼ、コレステロールエステル化酵素に加えて、食細胞のホスホリパーゼ、コレステロールエステラーゼなどが重要な意味をもっているが、これ

らについては私たちは既に一連の総説^{14)~16)}の中で詳述しているので割愛したい。今回の培養実験は感染マクロファージの食胞膜と、そこにとりこまれた結核菌との密な接触の可能性を示唆する人工膜モデルであるが、リボソームの形としてのレシチンを菌が分解し、その分解物を自己の脂質合成に利用するという所見のみでは、宿主細胞内での菌の栄養源の証拠として不十分であろう。しかし、今回のような極めて制限された *in vitro* の条件でもなお菌の発育が支持されたことは、感染の部分的モデルとしての意義が少なくない。なお、最近レシチンやコレステロールがそらい菌やらい菌の培養の試みに用いられている^{17)~19)}。

稿を終えるにあたり、標識化合物実験操作の指導をいただいた当所技術部、前放射能室長駒井知好博士に謝意を表す。

結 語

- 1) レシチンはリポソーム (人工膜) の形で合成限定培地に加えると、結核菌 (抗酸菌) の発育を支持した。
- 2) 添加リポソームは菌体と近接して存在することが電顕的に観察された。
- 3) レシチン分子は菌内に存在する酵素で分解をうけ、その際遊離する脂肪酸は菌体脂質にとりこまれた。
- 4) 以上は食細胞膜と細胞内結核菌との相互作用の部分的モデルを想定して計画されたものである。

文 献

- 1) 近藤瑩子：組織脂質の動態よりみた結核感染，結核，54：499，1979。
- 2) 三淵一二：結核菌の深部発育に関する研究，結核，28：448，1953。
- 3) Dubos, R.J.: The effect of sphingomyelin on the growth of tubercle bacilli, J Exptl Med, 88：73，1948。
- 4) 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。
- 5) Hart, D.P., Gordon, A.H. and Jacques, P.J.: Suggested role of lysosomal lipid in the contrasting effect of "Triton WR-1339" and dextran on the tuberculous infection, Nature, 223：672，1969。
- 6) Jones, N.C. and Osborn, M.J.: Interaction of *Salmonella typhimurium* with phospholipid vesicles, J Biol Chem, 252：7398，1977。
- 7) Inoue, K., Suzuki, K. and Nojima, S.: Morphology of lipid micells containing lysolecithin, 81, 1097, 1977。

- 8) Toda, T.: Studien über die Lezithinase der Bakterien und über die Frage der Bakteriolyse der säurefesten Bazillen in der Lezithineemulsion, Zbl Bakteriol, 117:489, 1930.
- 9) Ono, Y. and Nojima, S.: Phospholipases of the membrane fraction of *Mycobacterium phlei*. Biochim Biophys Acta, 176:111, 1969.
- 10) Nishijima, M., Akamatsu, Y. and Nojima, S.: Purification and properties of a membrane-bound phospholipase A from *Mycobacterium phlei*, J Biol Chem, 249:5658, 1974.
- 11) 近藤瑩子・金井興美: 結核菌の生育に及ぼすリゾレシチンの作用, 結核, 57:513, 1982.
- 12) Kondo, E. et al.: Analysis of host-originated lipids associating with "in vivo grown tubercle bacilli, Japan J Med Sci Biol, 23:315, 1970.
- 13) Kondo, E. and Kanai, K.: A suggested role of a host-parasite lipid complex in mycobacterial infection, Japan J Med Sci Biol, 29:199, 1976.
- 14) 近藤瑩子・金井興美: 結核感染における宿主脂質 I. リン脂質, 結核, 56:1, 1981.
- 15) 近藤瑩子・金井興美: 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.
- 16) 近藤瑩子・金井興美: 結核感染における宿主脂質 III. 長鎖脂肪酸と結核菌, 56:109, 1981.
- 17) 中村昌弘: リポゾームの無細胞液体培地における鼠らい菌増殖促進効果, 日本らい学会雑誌, 51:40, 1982.
- 18) Kato, L., Kim, S.L. and Ishaque, M.: *In vitro* cultivation of mycobacteria in cholesterol lecithin media from lepromas of rats infected with *Mycobacterium leprae*-murium, Intern J Leprosy, 46:176, 1978.
- 19) Kato, L.: Cholesterol, a factor which is required for growth of mycobacteria from leproma tissues, J Leprosy, 46:133, 1978.