

原 著

表面活性剤 Triton WR-1339 を用いた結核感染の修飾

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・細菌第1部

受付 昭和58年8月19日

MODIFICATION OF THE DEVELOPMENT
OF EXPERIMENTAL MOUSE TUBERCULOSIS
BY ADMINISTRATION
OF A NON-IONIC DETERGENT TRITON WR-1339

Eiko KONDO*, Kenji SUZUKI and Koomi KANAI

(Received for publication August 19, 1983)

A non-ionic detergent of Triton WR-1339 (oxyethylated tert. octyl phenol polymer) modified the course of experimental mouse tuberculous infection as to prolong their survival time. Though it is not lytic to red blood cells and the lysosomes, this detergent exert a subtle effect on the biomembrane as evidenced by cold-shock experiment of haemolysis. This means that Triton WR-1339 has a strong affinity to the biomembrane, if not lytic. Electron-microscopy demonstrated that BCG organisms ingested into macrophages were within the phagosome which appeared to be filled with the detergent. Discussion was made from these observations that the detergent may inhibit the interaction between mycobacteria and the phagosomal membrane by intervening between them thus making the progress of infection delayed.

Key words: Triton WR-1339, Mouse, Tuberculosisinfection, Phagolysosome, Electronmicroscopy

キーワード: トライトン WR-1339, マウス, 結核感染, ファゴライソゾーム, 電顕観察

緒 言

非イオン性の表面活性剤である Triton WR-1339 (polyoxyethylene ethers) がそれ自体抗菌力がないにもかかわらず、これを動物に投与すると結核感染防御効果を発揮することが報告され¹⁾、更にその作用機序がマクロファージレベルにあることが示唆され²⁾てから30年になる。

その後、この表面活性剤がライソゾーム内に蓄積されること (トリトソーム)³⁾、また他の細胞内感染症 (Leishmania donovani) にも有効であることが見出されたが⁴⁾、感染防御機構に関する説明ははまだ明らかではない。この間の研究史については既に筆者らは総説⁵⁾の中で紹介した。

一方、私たちは、結核感染成立の初段階として、マクロファージに取り込まれた結核菌と食胞膜との相互

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

作用に関して形態学的、生化学的アプローチで研究を続けてきたが、その過程の中で Triton WR-1339 のもつ生物学的作用に再度興味をもつに至った。研究の焦点をこのものが食胞膜・菌間の相互作用に対する干渉剤として働く可能性に置いて検討した。

実験材料と方法

動物：市販 ddY 系マウスの雄を用いた。10匹ずつを、おがくずを敷いたアルミケージ中に入れ、固型飼料と水とで飼育した。

菌：*M. tuberculosis* として H37Rv, H37RvR-KM, *M. bovis* として Ravenel R-KM, BCG を用いた。ソートン合成培地上の発育菌膜より菌液を調製した。

表面活性剤：Triton WR-1339 (Oxyethylated tert. octyl phenol formaldehyde polymer) は Winthrop-Stearns Inc. の製品である。なお、対照として同じく非イオン性の表面活性剤である Triton X-100, Tween 80 と、更に Sodium deoxycholate を実験の一部において用いた。

感染臓器からの菌分離：臓器内結核菌の定量培養のためには感染菌として H37Rv R-KM 株を用いた。接種小川培地に KM を 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に加えておくことと雑菌の汚染を防ぐことができ、且つ臓器乳剤のアルカリ処理を省くことが可能となって操作が容易となる。

感染臓器は摘出後、精製水によってそれらを乳鉢中で10倍ホモジネイトとし、これを出発材料として10倍希釈系列をつくった。適当と推定される2～3の希釈段階のものを0.1 ml ずつ小川培地の3本に接種し、4週後の発生集落数より組織内感染菌数を算出した。

ライゾゾーム分画の調製：マウス肝のワーリングブレンダーによる0.35 M シュークロースホモジネイトから分別遠沈によって15,000 g, 20分の沈澱を得、これを粗ライゾゾーム分画として用いた。その方法の詳細は別紙⁶⁾にゆずる。

酸性ホスファターゼ活性の測定：0.1Mの醋酸バッファ (pH 4.1) を 0.8 ml, 0.5%の P-nitrophenol phosphate 0.1 ml, 被検酵素標本 1 ml の混合系を 40°C で 60分間インキュベートし、0.5 M NaOH を 2 ml 加えて反応を停止、同時に遊離した p-nitrophenol を発色せしめた。OD 420 m μ で吸光度を Coleman 分光光度計で測定し、標準カーブより遊離した p-nitrophenol の量 (μM) を測定した。0 時間で NaOH を加えたものをブランクとした。

電子顕微鏡観察：50匹の ddY 系マウスを先ず 2 群に分け、一方に saline 中 BCG を 10 mg/ml に含む suspension を 2 ml 腹腔内に注射した。他方は 5% の濃度に Tritone WR-1339 を含む saline で BCG を 10 mg/ml に懸濁させたものの 2 ml を腹腔内注射した。各群の10匹ずつは注射後15時間後に、また残りの15匹

ずつは4日後にそれぞれ腹腔滲出細胞収獲の対象とした。腹腔細胞は氷水中でよく冷やしたヘパリン加ハンクス液で洗い出し、100メッシュのふるいで濾過後1,000 rpm 5分で遠沈してあつめた。更にハンクス液で洗浄後電顕材料とした。切片作成のための固定および脱水の過程は Hirsch と Fedorko の法⁷⁾を多少修飾したもので基本的にかかわるところはない。固定液は2%オスミック酸と5% (v/v) グルタルアルデヒド-4%パラホルムアルデヒド (0.3 M Cacodylate buffer, pH 7.4) との等量 (v/v) 混液を使用した。冷やした固定液中に3分おいて遠沈後、新鮮な固定液と交換し、50分水冷下で固定した。遠沈してあつめた細胞ペレットは0.15 M cacodylate buffer で洗浄し、0.25%ウラニルアセテート (0.1M Veronal buffer, pH 6.8) で30分ブロック染色した。脱水はアルコール系列で行ない、n-BGE(QY-1)で置換した。包埋は低粘性の ERL 4206 エポキシ樹脂を用いる串田の法⁸⁾に従った。超薄切は LKB-8800 型で行ない、2%ウラニルおよび0.2%水酸化鉛溶液にて二重染色し、H-500型 (日立) にて観察と撮影を行なった。

成 績

1) 致死感染マウスに対する延命効果：体重20gのマウスを10匹ずつの3群 (A, B, C) とし、これらを一様に Ravenel R-KM の 0.5 mg で静注感染した。C 群を無処置対照群とし、A 群は感染後4日目より、B 群は感染前2日より、それぞれ感染18日に至る期間、Triton WR-1339 の2%生食水溶液を0.2 ml ずつ腹腔内注射した。A 群は18日目に死亡しはじめたために9回、B 群は13回注射を続けた。Fig. 1 に示すように、C 群においては18日から22日の間に全動物が死亡し、累積死亡曲線は直線をなした。一方、A 群、B 群においては明らかな延命効果が認められ、殊にB 群の平均生存日数はほぼ48日で、C 群のその倍以上となった。

Table 1 も10匹ずつ4群の動物を用いた同様の実験であるが、Triton WR-1339 に対する比較対照として Tween 80 注射群ならびに BCG 免疫群を用意した。感染は H37Rv 株の 11.6×10^6 生菌単位数を静注し、うち1群はその3週前に BCG 1 mg の腹腔内注射で免疫し、他の2群にはこの時点から出発して毎日、6日間、上記表面活性剤のいずれかの1%生食水溶液を0.25 ml ずつ腹腔内注射した。各群の30日生存率 (%) を示したのが Table 1 である。同じく非イオン性の表面活性剤である Tween 80 は感染防御効果を示さなかったが、Triton WR-1339 は少なくともこの時点において BCG に近い効果を示した。

2) Triton WR-1339 の感染菌増殖抑制効果：20匹ずつ体重32gの2群の ddY マウス雄を用意し、その一方には感染前2日より2% Triton WR-1339 溶液の0.2

mlを腹腔内に週6回投与した。感染はH37Rv-KM 0.05 mg/mlの0.1 mlの尾静脈接種とした。感染時、2日後、1、2、3週後に両群それぞれ4匹ずつを無作為に取り出して殺し、肺および脾を秤量後2匹分をまとめて10倍量の水を加えて乳鉢中でホモジナイズした。その10倍希釈系列をKMを100 μg/mlを含む小川培地に接種し、4～6週後のコロニー数より肺および脾内の生菌数を算定した。結果はFig. 2に示すとおりである。両群とも肺においては感染1週目までの生菌数は減少するがその後対照群では2週目までに約100倍の増加を示した。しかし、Triton WR-1339投与群では、生菌数はその1/10以下であった。3週目には対照群がほぼ平衡に達し、一方Triton WR-1339群が徐々に増殖を続けたので両者の間の差が縮まっている。一方、脾においてはTriton WR-1339群の生菌数は下まわってはいるものの両者の間に大きな差はみられな

った。

3) 生体膜に対するTriton WR-1339の作用：マウス肝より得た粗ライソゾーム分画を、5mMにMgCl₂を含む0.25Mシュクロースに浮遊せしめた。これを小試験管に3 mlずつ分注し、420 mμでの吸光度(濁度)を測定すると0.75であった。これらの試験管にTriton X-100, Sodium deoxycholate, Triton WR-1339, Tween 80をそれぞれ0.5, 0.1, 0.05, 0.01%になるように加え、濁度の変化をみたあと、15,000 g, 20分の遠沈上清をとってその酸性ホスホターゼ活性を測定した。以上の実験成績をTable 2にまとめた。これによれば、Triton X-100とSodium deoxycholateのみがライソゾームの膜を溶解し、その内容物である水解酵素をリリースすることを示している。したがって、Triton WR-1339にはTriton X-100やSodium deoxycholateによって代表されるような膜溶解作用はない

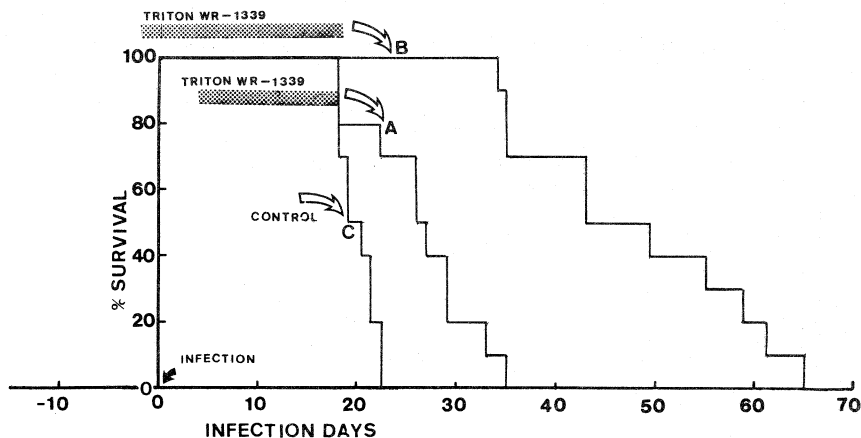


Fig. 1. Triton-induced prolongation of survival days in the mice infected intravenously with 0.5 mg of *M. bovis* (Ravenel strain).

Note : Triton WR-1339 was administered intraperitoneally each time in an amount of 0.2ml of 1% solution ; 9 doses in Group A and 13 doses in Group B during the indicated period.

Table 1. Comparison of % 30 Days Survival among the Groups of Mice Infected Intravenously with 11.6×10⁶ VU of H37Rv Tubercle Bacilli and with or without Pretreatment by BCG or Non-Ionic Detergents

Treated with	% 30 days survival
None	0
BCG 1 mg, 3 wks before infection	100
Tween 80*	10
Triton WR-1339*	90

* Injected ip with 0.25ml of 1% solution daily for 6 successive days starting from 3 weeks before infection.

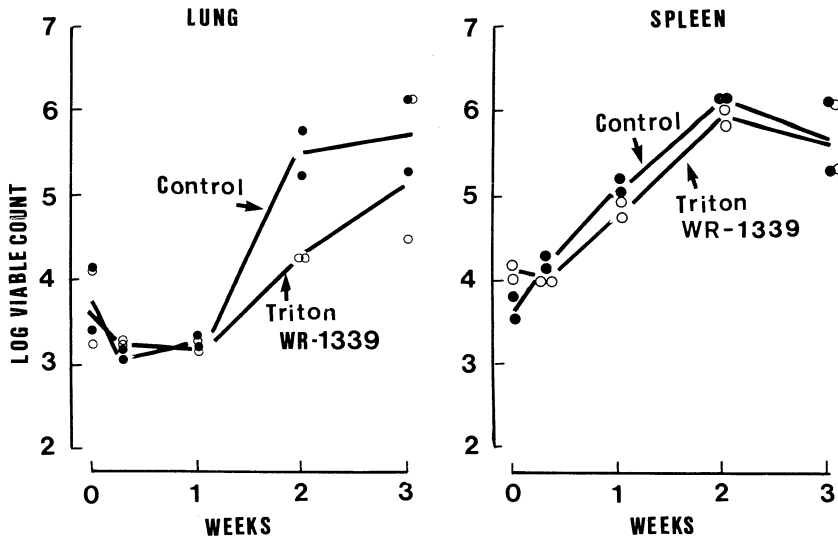


Fig. 2. Effect of Triton WR-1339 on the fate of H37RvR-KM in the lung and spleen of mice.

Table 2. Lytic Effect of Detergents on Lysosomal Fraction and Release of Acid Phosphatase Activity

Concentration of detergent (%)	Turbidity of lysosomal suspension (OD 420 m μ)	Detergent-released acid phosphatase activity* at pH 4.1
Triton X-100		
0.5	0.45	1.05
0.1	0.47	1.10
0.05	0.5	1.08
0.01	0.66	0.45
Sodium deoxycholate		
0.5	0.14	1.05
0.1	0.25	1.00
0.05	0.34	1.05
0.01	0.58	0.09
Triton WR-1339		
0.5	0.68	0
0.1	0.68	0
0.05	0.68	0
0.01	0.73	0
Tween 80		
0.5	0.66	0
0.1	0.66	0
0.05	0.68	0
0.01	0.68	0
Control (Without detergent)	0.75	0

Note: Lysosomal fraction was obtained from mouse liver.

* μ M p-nitrophenol liberated at 40 C for 60 min by 1 ml supernatant from p-nitrophenyl phosphate.

ことが証明された。

しかし、Triton WR-1339 が生体膜に対して全く影響がないわけではなく、それは Lovelock と Rees⁹⁾ による赤血球の冷ショック実験を実施すると明らかになった。馬血球を0.16Mの食塩水で遠沈洗浄してから10%に再浮遊する。これに Triton WR-1339 または Tween 80 を加えて、それぞれ10倍稀釈系列を形成するようにした。37°C に1時間インキュベイトしてから2.4Mの食塩水を等量加え、更に37°C に5分放置してから10分間水冷した。これらの試験管の遠沈上清をとって吸光度 (OD=530 m μ) を測定し、標準グラフから溶血%を算出した。その成績が Fig. 3 である。Tween 80 とは対照的に Triton WR-1339 はその濃度に応じて溶血作用を示した。

4) 電子顕微鏡的観察: Fig. 4 と 5 に代表させたように腹腔内に投与された Triton WR-1339 は滲出細胞のうち、マクロファージの中のみみられる円形で明るい均質な空胞 (TS) に相当するものと推定される。空胞はその中に微細で電子密度のより高い不定形の物質を極めて疎に分散せしめている。その像は Armstrong と Hart⁷⁾ が Triton WR-1339 の精製標品 Macrocydon を用いて培養細胞でみたものとはほぼ一致している。また、空胞は表面膜と同質に見える限界膜をもつので、Triton は食胞の中に取り込まれたものと考えられる。Triton と同時に投与された BCG 菌体の切片も空胞中にしばしばみられる。こうした空胞は多形核白血球の中では全くみられない。もうひとつ特徴的なことは、このような明るい空胞を多数もつマクロファージには、同時により高い電子密度をもつ lipoidal droplets (油滴) もまた数多く観察される。しかし、核、ミトコンドリア、粗面小胞体、その他の細胞内オルガネラに

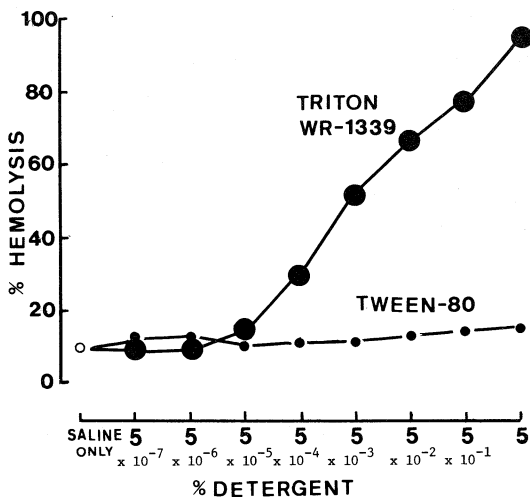


Fig. 3. Reduced resistance to cold shock hemolysis by Triton WR-1339.

は特に異常と思われる像はみられず、退行変性的な証拠はなかった。細胞表面は比較的なめらかで、偽足や絨毛突起は少ないが、標本作製中のレトラクションの可能性は除外できない。Fig. 6 は Triton 投与なしの対照動物から得られたマクロファージであって、前述のような明るくまろい空胞はみられない。図の下方に菌を取り込んだ食胞がみられるが、食胞内の電子密度はより高く、また不定形である。

菌についてみると、「トライトン食胞」にあるものも、細胞質中に存在するものも、殆んどが intact な形態をもっていた。「トライトン食胞」内では菌は単個あるいは数個、時には数多くのグループをなして存在する。菌体は空胞膜に近接し、それを圧迫しているようにみえる像が少なくないが、両者の間には明るい空隙が常にみられて、その局所における菌、あるいは食胞膜の変性などもみられなかった。一方、対照動物のマクロファージ内においては、Fig. 6 と 7 にみられるように菌表面と食胞膜との密着像がしばしば観察された。しかし、これらの形態学的観察は腹腔内投与後の早期の一時点に限られているので現象の存在を示すにとどまり、その消長についての知見は得られていない。

考 察

Triton WR-1339 の結核感染に対する防御効果は新知見ではないが、今回の成績によって更に明快な形で再確認された。実験はここに記載されたものの外にも実施されているが、いずれも延命効果は歴然であるものの致死経過を免れるということはみられない。この意味で、これまで単純に防御効果と呼んでいたものの内容について再考慮する必要がある。肺における菌の増殖抑制効果もみられて、これによって延命効果が招来されることも説明の一部となろうが、おそらく菌に対する直接の効果でないことはこれまでの文献の指摘するところである。

ライソゾーム分画を用いた水解酵素のリリース現象と、赤血球の冷ショック低抗性を指標とした時、Triton WR-1339 が生体膜を溶解せしめる作用はないが、その構造に何らかの修飾を与えていることが本実験から推定できた。Triton WR-1339 が膜のコレステロールやレシチンを部分的に抽出する効果を指摘する文献¹⁰⁾ もあり、今回の成績との関連が注目されよう。

以上、これまで得られた知見の再確認をふまえて、私たちは電顕的観察を実施し、Triton WR-1339 の生物活性について新しい理解を試みた。観察材料作成にあたり、結核菌は固定が非常に難しいので、低粘性の樹脂を使用する串田の法⁸⁾ をとくに取り入れた。

まず、Triton WR-1339 を取り込んで形成されたものと推定される食胞が、腹腔滲出細胞のうちのマクロファージにのみみられることは興味深い。このことは

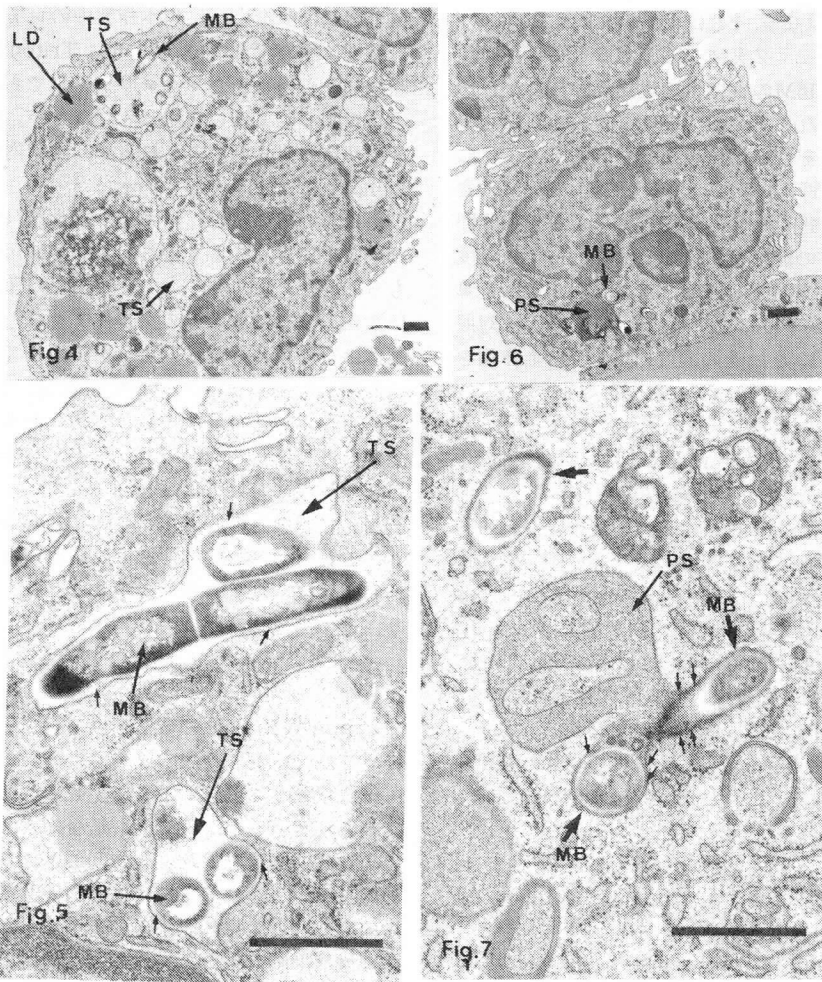


Fig. 4. A macrophage in the peritoneal exudate of mice induced by injection with 2ml of a 5% saline solution of Triton WR-1339 in which BCG organisms were suspended in 10mg/ml. The macrophage is smooth in the surface with few villi and the cytoplasm has many lipoidal droplets (LD) of moderate density and electronlucent vacuoles (tritosomes : TS), probably filled with Triton WR-1339, in some of which mycobacteria (MB) are located. The nucleus, mitochondria, endoplasmic reticulum and cytoplasmic inclusion bodies are typical of macrophages.

Fig. 5. The longitudinal- and cross-sections of BCG organisms (MB) which are located within the phagosome probably filled with Triton WR-1339 (TS). It appears that the detergent intervenes (small arrows) between the mycobacterial cell and the phagosomal membrane.

Fig. 6. and 7. The corresponding situations in the macrophages induced only with BCG organisms. The difference from those in Fig. 4 and 5 is that the phagosome containing mycobacteria (MB) is electron-dense and the mycobacteria appear to be extruding from the phagosome accompanying the tightly-contacting membrane. The bar in each figure shows 1μ.

Tritonの感染防御効果をマクロファージレベルで示した組織培養実験⁷⁾と矛盾せず、また、Triton WR-1339の投与をうけたマウス肝のライソゾーム抽出液が抗結核菌力を示したという報告¹¹⁾とも関連するようみえる。しかし、少なくともこの限られた条件での観察からは、トライトンを取り込んだ細胞、ならびに同時に取り込まれたBCGそれ自体の成行について結論的なことはいえず、観察の時点に関する限り、細胞ならびに菌の形態には変性の傾向は殆んどみられなかった。

私たちのこれまでの研究において、感染組織より機械的に分離した *in vivo* 発育菌は phagosome に由来する脂質や酵素活性を菌体表面に密接に保持しており、殊に正常細胞には少ないコレステロールエステルが異常に増えているなど、両者の相互作用が感染細胞内で生じていると考えられた。これらの想定は細胞分画や人工膜を用いたモデル実験の結果からも支持されており、感染の進展も防御効果もこの食胞膜と菌との相互作用の帰転に由来する可能性を指摘してきた¹²⁾。この相互作用においては、両者の密着状態が重要な条件であることを電顕所見の上からも示唆し¹³⁾、また膜に内在するホスホリパーゼの活性化と、その結果としての膜リン脂質の分解と遊離脂肪酸¹⁴⁾ならびにリゾレシチンの遊離をそれらの抗菌活性の故に重視してきた。

今回得られた電顕写真に関しては、Triton WR-1339と推定される影像が、菌体と食胞膜との間に介在して明るい間隙をつくり、両者の密着を防止している場面が多かったが、このことは非イオン性表面活性剤としての Triton WR-1339 が膜の脂質層にも菌体表層にも親和性をもつためであろう。これによって両者の接近を防止することは、それらの相互作用の機会を減少せしめることであり、したがって感染の成立と進展を遅延せしめることも説明できる。その意味では従来考えられていたような抗菌的な感染防御現象ではなく、むしろ生体膜に対する一時的な保護物質として働く可能性も考慮すべきであろう。一方、同じく非イオン性の表面活性剤である Tween 80 には防御効果はなく、Triton WR-1339 に関しても構造修飾によって疎水性・親水性のバランスをかえると防御効果でなく感染増悪作用を示すという¹⁰⁾。したがって、ここにおいても感染の進展と抑制とは、膜レベルでの微妙な条件差によっていずれの方向にも容易に転ずることが示唆されている。

結 語

マクロファージを標的細胞とする非イオン性表面活性物質 Triton WR-1339 について、その結核感染防御効果を再確認し、その作用機序については電顕観察を含めた生体膜レベルの実験を行なった。その成績から、Triton WR-1339 が食胞膜と菌との相互作用に干渉す

ることによって、感染の進展を抑制する可能性を考察した。

文 献

- 1) Cornforth, J.W. et al.: Antituberculous effect of certain surface-active polyethylene ethers in mice, *Nature*, 168: 150, 1951.
- 2) Mackaness, G.B.: Artificial cellular immunity against tubercle bacilli, *Am Rev Tuberc*, 69: 690, 1954.
- 3) Wattiany, R. et al.: Influence of the injection of Triton WR-1339 on the properties of rat liver lysosomes, *Ciba Foundation Symposium Lysosomes*, Edited by A U S de Fench and M P Cameron, Little, Brown and Company, Boston, Massachusetts, p. 176, 1963.
- 4) Fulton, J. D.: Treatment of *Leishmania donovani* infections with surface-active agents, *Nature*, 187: 1129, 1960.
- 5) 近藤瑩子・金井興美: 組織脂質の動態よりみた結核感染, II, コレステロール, *結核*, 56: 41, 1981.
- 6) Kanai, K. and Kondo, E.: Further studies on the antimycobacterial principle of mouse lysosomal components, *Japan J Med Sci Biol*, 21: 405, 1968.
- 7) Armstrong, J.A. and Hart, D.P.: Response of cultured macrophages to *Mycobacterium tuberculosis*, with observations of fusion of lysosomes with phagosomes, *J Exptl Med*, 134: 713, 1971.
- 8) Kushida, H.: An improved embedding method using ERL 4206 and Quetol 653, *J Electron Microsc*, 29: 193, 1980.
- 9) Lovelock, J.E. and Rees, R.J.W.: Possible site and mode of action of certain lipotropic macromolecules in tuberculosis, *Nature*, 175: 161, 1955.
- 10) Hart, D.P.: *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages, Effect of certain surfactants and other membrane-active compounds, *Science*, 162: 686, 1968.
- 11) Hart, D.P., Gordon, H.H. and Jacques, D.P.: Suggested role of lysosomal lipid in the contrasting effects of "Triton WR-1339" and dextran on tuberculous infection, *Nature*, 223: 672, 1969.
- 12) 金井興美・近藤瑩子: 組織脂質の動態よりみた結核感染, IV, 補遺とまとめ, *結核*, 56: 257, 1981.
- 13) Kondo, E., Yasuda, T. and Kanai, K.: Electron

microscopic demonstration of close contact between intracellular mycobacteria and the phagosomal membrane, Japan J Med Sci Biol,

35: 197, 1982.

- 14) 近藤瑩子・金井興美：食細胞の脂質分解酵素と結核菌，結核，57：1，1982.