

原 著

結核菌の糖脂質パターン：亜型分類の補助手段

戸井田 一郎・山本 節子・柄谷 和宏

結核予防会結核研究所

受付 平成元年4月17日

GLYCOLIPID-PATTERNS OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*
AS AN AID FOR SUB-TYPING

Ichiro TOIDA*, Setsuko YAMAMOTO and Kazuhiro KARAYA

(Received for publication April 17, 1989)

Total lipids were extracted from *Mycobacterium tuberculosis* with chloroform-methanol (2 : 1), applied on a silica-gel thin-layer plate, and developed with chloroform-methanol-acetone (90 : 10 : 5). Glycolipids were detected by spraying Anthrone-reagent and heating. Strain H37Rv of *M. tuberculosis* showed four Anthrone-positive spots, namely trehalose-monomycolate, unidentified glycolipid, trehalose-dimycolate and GL-Rv, and strain H37Ra showed only two spots corresponding to trehalose-monomycolate and trehalose-dimycolate. (Fig. 1) Other 4 laboratory-stock strains of *M. tuberculosis* showed glycolipid-pattern identical with either of these two patterns.

One hundred and fifty-eight strains of *M. tuberculosis*, isolated clinically from tuberculosis patients, were classified into 7 types according to their glycolipid-pattern. (Fig. 2) Twenty-seven strains contained one more Anthrone-positive spot other than those of strain H37Rv. Pattern II was most frequently observed (60 strains), and then pattern I (33 strains), VI (29 strains), IV (13 strains), V (9 strains), VII (8 strains), and III (6 strains). Pattern I corresponded to that of strain H37Ra and pattern VI corresponded to that of strain H37Rv.

Glycolipid-pattern did not correlate to clinical features of patients from whom the bacilli had been isolated.

A glycolipid, which moved to just under the solvent front, was a new glycolipid which has been found by us and designated as GL-Rv. Chemical structure of GL-Rv was clarified by us as trehalose-polyacyl derivatives (no mycolic acid as the acyl residue) (Reference 9). Glycolipid-pattern was very stable and reproducible for each strain of *M. tuberculosis*. The procedure is very simple and does not require any special instruments. Glycolipid-pattern of *M. tuberculosis* may be very useful as a complementary method for the sub-typing of *M. tuberculosis*.

* From the Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association, 3-1-24, Matsuyama, Kiyose-shi, Tokyo 204 Japan.

Key words : *Mycobacterium tuberculosis*, Sub-typing, Glycolipids, Thin-layer chromatography

キーワードズ : ヒト型結核菌, 亜型分類, 糖脂質, 薄層クロマトグラフィー

1. はじめに

単一菌種である *Mycobacterium tuberculosis* が、いくつかの亜型に分類できることは広く認められている。例えば、イギリスの結核患者から分離された結核菌は、インドの患者から分離された結核菌よりも毒力・病原性が高い¹⁾ ことなども、亜型の存在の証拠の一つとしてあげることができよう。

亜型の分類は、例えば、再発のときの菌が初発のときの菌と同じかどうかの判断や、集団発生が疑われるときの感染源の確定など、理論的立場のみならず、臨床や結核対策などの実地面からも重要な問題であるが、結核菌の亜型分類は、他の菌種の場合ほど容易ではない。

Mycobacterium 属のうちでも *M. avium-intracellulare* や *M. scrofulaceum* では、血清凝集反応を利用して亜型に分類することができ、Schaefer の方式²⁾ に準じて広く実施されている。しかし、*M. tuberculosis* の場合は、自然の凝集が強いために血清凝集反応を利用することは不可能である。

ファージによるタイピングが最も有望で、実際にも利用されているけれども、菌株特異性を示すファージの種類が限られていることや、*M. tuberculosis* が固型培地上で孤立したコロニーを作って均一なローンを作りにくいなどの技術的な難点のために、なお問題点を残している³⁾。現状では、決定的な一つの方法を求めようとするよりは、それ自体補助的であっても、いくつかの性状を組み合わせて亜型分類を試みるのが現実的であるように思われる。

われわれは、*M. tuberculosis* の糖脂質の研究中に、*M. tuberculosis* の H37Rv 株と H37Ra 株とが異なる糖脂質パターンを示すことを認めた⁴⁾。さらに、*M. tuberculosis* の種々の研究室保存株および臨床分離株について検討したところ、これらは7通りの糖脂質パターンに分類できることが明らかになった。この糖脂質パターンによる *M. tuberculosis* の分類は、*M. tuberculosis* の亜型分類の補助手段の一つとして有用であると考えられるので報告する。

2. 方法および材料

a) 菌株と培養

研究室保存株としては、*M. tuberculosis* の H37Rv, H37Ra, Schachat, Yamamoto, Kurono および

Aoyama B の6株を用いた。これらの菌は、ソートン液体合成培地に 37°C で通常3週間、実験によっては10日ないし6週間表面培養した。

臨床分離株は、当研究所付属病院で入院または通院で治療中の結核患者から分離され、発育速度、コロニー性状、色素産生、ナイアシン・テスト、薬剤感受性などによって *M. tuberculosis* であることが確認された158株を用いた。これらの菌は、分離に用いられた3%小川鶏卵培地からソートン液体合成培地に継代し、少なくとも3代の継代を繰り返して安定した発育がえられるようになってから実験に用いた。実験用の菌は、ソートン培地に 37°C で3週間培養した。

b) 脂質の抽出

菌をろ過によって収穫し、十分に水洗したのち、半乾燥状態の菌に菌重量の約20倍容のクロロホルム:メタノール(2:1)を加え、室温で時々振とうしながら一夜抽出した。ろ過後、ろ液に0.2容の生理的食塩水を加えて穏やかに混和、一夜低温室に放置した。クロロホルム層を乾固し、秤量したのち20 mg per ml にクロロホルムに溶解した。

c) 薄層クロマトグラフィー

全脂質のクロロホルム溶液の10 μ l をシリカゲル薄層プレート(0.25 mm 厚, Merck 社)に添加し、クロロホルム:メタノール:アセトン(90:10:5)で展開(約10 cm)した。プレートを乾燥したのち、アンスロン試薬を噴霧し、110°C で約10分加熱した。アンスロン陽性の赤紫色のスポットは糖脂質の存在を示し、これらのスポットをマークした。

アンスロン試薬は、0.1 g のアンスロンと2.0 g のチオ尿素を200 ml の66%硫酸に溶かして調製し、褐色瓶に保存した。

3. 結 果

a) *M. tuberculosis*, H37Rv 株と H37Ra 株との糖脂質パターン

H37Rv 株と H37Ra 株の全脂質の糖脂質パターンを Fig. 1 に示した。H37Rv では、4つのアンスロン陽性のスポットが認められ、これらは移動度の低い順に、trehalose-monomycolate, 未同定の糖脂質, trehalose-dimycolate, およびわれわれが新たに発見し GL-Rv と名付けた糖脂質⁴⁾であることを確認した。H37Ra は、trehalose-monomycolate および treha-

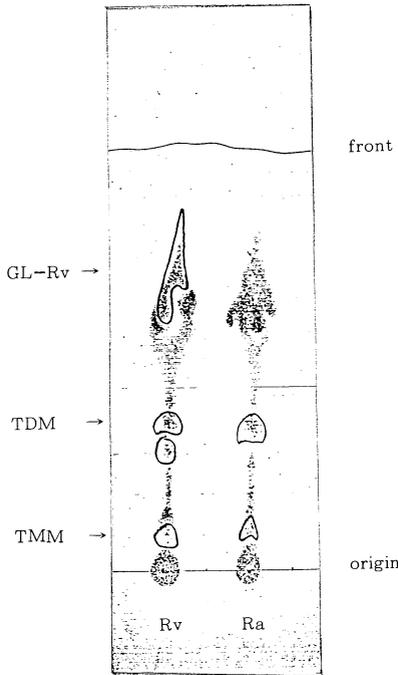


Fig. 1. Glycolipid Patterns of Strains H 37 Rv and H 37 Ra of *M. tuberculosis*

lose-dimycolate に相当する 2 つのアンスロン陽性のスポットのみを示した。

H37Rv および H37Ra はともに最初 American Mycobacterial Culture Collection (Trudeau Institute, Saranac Lake, New York) から分与を受けたもので、当研究所の数人のスタッフによってそれぞれ違った条件下で維持されてきたものであるが、どの継代株を用いても、すべて同一の糖脂質パターンが得られた。また、これら両株の糖脂質パターンは培養日数によって影響されず、10日から6週の間いろいろな時期に収穫された菌は、いずれも同一のパターンを示した。ソートン培地のグリセロールを等モルのグルコースに置き換えた変法ソートン培地で菌を培養した場合にも、全脂質の収量には違いがみられたが、糖脂質のパターンには変化はなかった。

b) 薬剤耐性と糖脂質パターン

H37Rv を種々の抗結核薬剤を含有する培地に継代を繰り返して、ストレプトマイシン、カナマイシン、カプレオマイシン、ツベラクチノマイシン、サイクロセリン、リファンピシン、イソニアジド、パラアミノサリチル酸、エタンブトール、およびエチオナミドのそれぞれに耐性を示す変異株を *in vitro* で選択した。これら薬剤耐性変異株は、薬剤感受性の親株と同一の糖脂質パターンを

示した。

c) 研究室保存株の糖脂質パターン

検討した 6 株のうち、H37Rv, Kurono, Aoyama B は同じ糖脂質パターンで 4 つのアンスロン陽性スポットを示し、H37Ra, Schachat, Yamamoto は 2 つのアンスロン陽性スポットからなる同一の糖脂質パターンを示した。これら 6 株のうち、H37Rv, Schachat, Kurono および Yamamoto の 4 株は強毒株であり、H37Ra および Aoyama B の 2 株は弱毒ないし無毒株である。

d) 臨床分離株の糖脂質パターン

検討した 158 株の *M. tuberculosis* は、149 株がかくたん、3 株が膿胸の膿、2 株が胸膜浸出液、1 株がリンパ節生検材料、2 株が切除肺、1 株が尿から分離されたものである。

これら臨床分離株の糖脂質パターンは、Fig. 2 に示したように 7 つのパターンに分類できた。パターン III, IV, VII では、H37Rv にみられた 4 つのアンスロン陽性のスポットのほかに、trehalose-dimycolate のスポットと GL-Rv のスポットの間に、他のスポットとは色調が異なって鮮紅色を呈するスポットが認められた。GL-Rv のスポットは、パターン V, VI, VII の 46 株 (29.1%) に認められた。Trehalose-monomycolate および trehalose-dimycolate に相当する 2 つのスポットは、すべての菌株に認められた。

パターン I は H37Ra の、パターン VI は H37Rv のパターンにそれぞれ相当する。

臨床分離株 *M. tuberculosis* 158 株のうちで、最も頻度の高かったのはパターン II の 60 株 (38.0%)、続い

	PATTERN I (Ra)	II	III	IV	V	VI (Rv)	VII	
front					0	0	0	GL-Rv
			0	0			0	
	0	0 0	0	0 0	0	0 0	0 0	TDM
origin	0	0	0	0	0	0	0	TMM
No. of Strains	33	60	6	13	9	29	8	
%	20.9	38.0	3.8	8.2	5.7	18.4	5.1	
TOTAL 158								

Fig. 2. Glycolipid Patterns of Clinically Isolated Strains of *M. tuberculosis*

てパターン I の 33 株 (20.9%), パターン VI の 29 株 (18.4%), パターン IV の 13 株 (8.2%), パターン V の 9 株 (5.7%), パターン VII の 8 株 (5.1%), パターン III の 6 株 (3.8%) であった。

e) 糖脂質パターンの再現性

同一の全脂質抽出サンプルの繰り返しテストでは、常に同一の糖脂質パターンがみられた。また、同一の菌株を継代し、違った継代代数の菌体から抽出した全脂質サンプルも常に同一の糖脂質パターンを示した。24 例の排菌を繰り返している症例から、時期を隔ててそれぞれ 2 株の菌を分離し、それらの糖脂質パターンを比較した。17 例では同一患者からの 2 つの菌株はそれぞれ同一の糖脂質パターンを示した。残りの 7 例では、2 つの菌株のパターンは一致しなかった。1 回目の分離株がパターン VI で、2 回目の分離株でパターン I を示した例が 2 例、パターン III を示した例、パターン V を示した例がそれぞれ 1 例、1 回目の分離株がパターン VII で、2 回目の分離株でパターン IV, V, VI を示したものがそれぞれ 1 例であった。

f) 糖脂質パターンと臨床指標との関連

M. tuberculosis が検出されたときの臨床指標と、その菌の糖脂質パターンとの関連を検討した。検討した臨床指標は、空洞の有無、病巣の拡がり、病歴の長さ、治療状況、菌の量、細菌学的予後、薬剤耐性の状況である。これら臨床諸指標は、いずれも、分離した菌の糖脂質パターンと関連を示さなかった。1 例として、空洞の有無と糖脂質パターンとの関連を Table に示した。

なお、全脂質抽出物-クロロホルム溶液の色調も糖脂質パターンと関連を示さなかった。

4. 考 察

M. tuberculosis を亜型に分類することは、学問的な

興味からのみでなく、臨床や疫学の立場からも重要な問題であるが、*M. tuberculosis* の特性からくる技術上の難点のために、他の細菌菌種で有効に应用されている血清型分けやフェージ型分けなどの単一の方法では完全に満足できる型分けが困難であり、それ自体は補助的な方法であってもいくつかの方法の組み合わせによってより確実な結果を期待せざるをえないのが現状である。このためには、現在広く利用されているフェージ型分けや低濃度薬剤感受性テストなどのほかに、より多くの補助的な方法の開発が望まれる。

単一菌種のうちの菌株によって糖脂質パターンに違いがあることは、*Mycobacterium* 属の細菌にあっても、例えば、*M. avium-intracellulare* の血清型を規定するのは糖脂質であることが明らかにされており⁵⁾⁶⁾、また、*M. tuberculosis* にあっても Goren ら⁷⁾⁸⁾ は、毒力・病原性の強い菌株では sulfatides の含有量が高く、逆に毒力・病原性の低い菌株では attenuation indicator lipid (AIL) と彼らが名付けた脂質の含有量が高いことを報告している。

われわれは、この報告で、*M. tuberculosis* の研究室保存株・臨床分離株について糖脂質パターンを調べ、7 つの型に分類できることを報告した。このテストは全脂質抽出物の薄層クロマトグラフィーによるもので、高価な機具、特別な熟練を必要とせず、比較的容易に実施することができる。再現性も満足できる程度に十分であると考えられる。同一症例から時期を隔てて分離した 2 株の菌株のパターンが一致しない例が少数あったが、これらの症例はいずれも、病気の経過が非常に長く、種々の治療をうけており、空洞を含む複雑な病変を持ったものであって、実際に複数の菌株が混合して存在している可能性も十分に考えられる。

糖脂質のうち、われわれの用いた展開溶媒でフロント

Table Correlation between X-Ray Findings and Glycolipid-Pattern

X-Ray Findings	Glycolipid-Pattern							Total
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
Far-Advanced Cavitary	2	3	0	0	0	5	0	10
Moderately Advanced Cavitary	28 (27.2)	38 (36.9)	3 (2.9)	10 (9.7)	7 (6.8)	10 (9.7)	7 (6.8)	103
Non-Cavitary	2 (5.7)	15 (42.9)	3 (8.6)	2 (5.7)	2 (5.7)	10 (28.6)	1 (2.9)	35
No Abnormal Findings	0	1	0	0	0	0	0	1
Total	32 (21.5)	57 (38.3)	6 (4.0)	12 (8.1)	9 (6.0)	25 (16.8)	8 (5.4)	149*

* Number of strains isolated from sputum of tuberculosis patients. Numbers in parentheses are percentage to the total number.

のすぐ下にまで移動する糖脂質は、われわれが初めて発見・精製してGL-Rvと名付けたもので、その化学構造は片岡ら⁹⁾によって trehalose-polyacyl derivatives であることが証明されている。acyl基としては、ミコール酸は含まれていない。GL-Rvは、*Mycobacterium*属のうちでも、*M. tuberculosis*のみで検出され、*M. bovis*を含めて他の菌種では検出されない。精製したGL-Rvは、マウスに注射したとき、ほとんど毒性を示さなかった。

5. 結 論

ヒト型結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* は、薄層クロマトグラフィーによる糖脂質パターンによって、7つの亜型に分類できる。このテストは簡単に実施でき、再現性もあり、*M. tuberculosis* の亜型分類の補助手段として利用できる。

文 献

- 1) Mitchison, D. A. : The virulence of tubercle bacilli from patients with pulmonary tuberculosis in India and other countries, Bull IUAT, 35 : 287-306, 1964.
- 2) Good, R. C. and Bean, R. E. : Seroagglutination, The Mycobacteria, A Sourcebook, Part 1 (Ed. Kubica, G. P. and Wayne, L. G.), 105-122, 1984 (Marcell Dekker, Inc., New York and Basel).
- 3) Crawford, J. and Bates, J. H. : Phage-typing of mycobacteria, the Mycobacteria, A Sourcebook, Part 1 (Ed. Kubica, G. P. and Wayne, L. G.), 123-132, 1984 (Marcell Dekker, Inc., New York and Basel).
- 4) Toida, I., Yamamoto, S. and Saito, E. : A glycolipid of human tubercle bacilli, Proc. of the Fifteenth Joint Meeting of Tuberculosis Panel, US-Japan Cooperative Medical Science Program, 25-42, 1980.
- 5) Marks, J., Jenkins, P. A. and Schaefer, W. B. : Thin-layer chromatography of mycobacterial lipids as an aid to classification : Technical improvements : *Mycobacterium avium*, *M. intracellulare* (Batty bacilli), Tubercle, 52 : 219-225, 1971.
- 6) Jenkins, P. A., Marks, J. and Schaefer, W. B. : Thin-layer chromatography of mycobacteria, including *Mycobacterium scrofulaceum*, *M. xenopi*, *M. aquae*, *M. gordonae*, *M. flavescens*, Tubercle, 53 : 118-127, 1972.
- 7) Goren, M. B., Brokl, O. and Schaefer, W. B. : Lipids of putative relevance to virulence in *Mycobacterium tuberculosis* : Correlation of virulence with elaboration of sulfatides and strongly acidic lipids, Infect Immun, 9 : 142-149, 1974.
- 8) Goren, M. B., Brokl, O. and Schaefer, W. B. : Lipids of putative relevance to virulence in *Mycobacterium tuberculosis* : Phthiocerol dimycocerosate and the attenuation indicator lipid, Infect Immun, 9 : 150-158, 1974.
- 9) Kataoka, N., Toida, I., Yano, I. et al. : Isolation and characterization of new glycolipids from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, Osaka City Med J, 32 : 1-15, 1986.