

原 著

Mycobacterium avium Complex のマクロファージ
Respiratory Burst Triggering 活性

— 特にその菌体表層に表現されているリガンドの性状 —

富岡 治明・斎藤 肇・佐藤 勝昌
山本 由香里・内田 方子・山田 義貴

島根医科大学微生物・免疫学教室

受付 平成元年1月10日

MACROPHAGE RESPIRATORY BURST-TRIGGERING ACTIVITY OF TRANSPARENT
AND OPAQUE COLONIAL VARIANTS OF *MYCOBACTERIUM AVIUM* COMPLEX

Haruaki TOMIOKA*, Hajime SAITO, Katsumasa SATO,
Yukari YAMAMOTO, Masako UCHIDA and Yoshitaka YAMADA

(Received for publication January 10, 1989)

The two types of colonial variants of *Mycobacterium avium* complex, SmT (smooth, transparent, irregular) and SmD (smooth, opaque, dome-shaped) variants, were examined for their triggering activity for macrophage ($M\phi$) respiratory burst, based on chemiluminescence (CL). SmD variants elicited an intense CL from zymosan A-induced $M\phi$ s in a dose-dependent manner, although SmT variants induced much lower $M\phi$ CL. The $M\phi$ s could steadily phagocytose SmT variants, although the phagocytizing rate was considerably lower compared to the case of SmD variants. Treatments of SmD variants with Tween 80, pronase and some endoglycosidases such as α -amylase, cellulase, dextranase and pectinase, heating (100°C, 15 min), and delipidation by $CHCl_3$ -methanol extraction resulted in a marked reduction in the $M\phi$ CL-triggering activity of the SmD variants. Thus, the $M\phi$ CL-triggering ligand(s) seems to possess glycolipoprotein-like moieties. Tween 80-treatment of SmT variants, which is known to deprive the polysaccharide outer layer specific to the colonial variants, failed to recover the $M\phi$ CL-triggering activity of SmT variants. Therefore, the remarkably reduced $M\phi$ CL-triggering ability of the SmT variants may be caused by the extremely lowered expression of the $M\phi$ CL-triggering ligands rather than by masking of the CL-triggering ligands by SmT-specific outer layer.

Key words : *Mycobacterium avium* complex,
Colonial variants, Macrophage, Respiratory
burst, Chemiluminescence

キーワード : *Mycobacterium avium* コンプレックス,
集落変異株, マクロファージ, 化学発光, 呼吸爆発

* From the Department of Microbiology and Immunology, Shimane Medical University, Izumo, Shimane 693 Japan.

はじめに

Mycobacterium avium complex (MAC) には, SmT (平滑, 扁平, 不整, 透明), SmD (平滑, ドーム状, 円形, 不透明) 並びに RG (粗糙, 不整, 不透明) の集落 variants が存在し¹⁾²⁾, これらの集落変異は菌のビルレンスの変異をも伴い³⁾⁴⁾, マウスに対するビルレンスは SmT \approx RG > SmD であることが知られている⁴⁾.

そこで, われわれは, この点を SmT および SmD variants の宿主マクロファージ (M ϕ) との相互作用の観点から解明することを企図して, M ϕ のこれら variants との接触および貪食に伴う呼吸爆発の様相を, 特にその化学発光を指標として検討したので以下報告する。

材料と方法

1. 供試菌: *M. avium* complex N-235, N-257, N-260, N-275 および N-279 の各菌株の SmT 並びにその 7H10 寒天平板上数代継代することによってえられた SmD variants を 7H10 寒天平板上 7~10 日培養し, その蒸留水による菌浮遊液を洗浄後 Handy sonic (Model UR-20 P; トミー精工) で 15 秒間超音波処理したものを 1,000 rpm, 5 分間遠心により粗大菌塊を除去後, さらに 15 秒間超音波処理することによって可及的均等な菌浮遊液を調製した。なお, 供試菌液中の菌数は Middlebrook 7H10 寒天平板上での colony forming unit (CFU) 計測法により算定した。

また化学的処理菌体は 10,000 rpm, 20 分遠心洗浄により集菌することによって, 処理前の菌数の減少を可及的少なくするよう努める一方, 実験によっては定量的塗抹標本 (ゼラチンコートしたスライドガラスに 10 μ l の菌液を径 9 mm の円に塗抹し, Ziehl-Neelsen 染色した) について菌数を算定した。

2. M ϕ の化学発光測定法: C3H/He (MAC 感染抵抗性系統) マウスより採取した zymosan A (1 mg/マウス i.p. 注射後 4~5 日) 誘導腹腔 M ϕ (2.5×10^6 /ml) を 10 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethansulfonic acid (HEPES) 並びに 0.1 mM luminol 加 Hanks 液 (pH 7.4) に浮遊, これに MAC 菌体 ($8 \times 10^7 \sim 2 \times 10^9$) を添加した系 (1 ml) を 37°C の恒温槽中に保ち, 10 分間にわたって M ϕ よりの化学発光 (CL) を ATP lumicounter (Model ATP-237, 東洋科学産業) で測定した。

3. M ϕ の MAC 貪食能: 化学発光計測後の M ϕ 細胞を Hanks 液で 5 回洗浄後, 10% ウシ胎児血清加 RPMI 培地 (1 ml) に浮遊させ, 14 mm 径のプラスチックシートを入れた culture well (16 mm) に加え,

5% CO₂ フラン器中で 37°C, 30 分間保つことによつて調製した M ϕ モノレイヤーの Ziehl-Neelsen 染色標本を鏡検して M ϕ 内の菌数を計測した。

結 果

1. SmT 及び SmD variants による誘起 M ϕ CL
MAC N-260 株の両集落 variants により誘起される M ϕ CL は, Fig. 1 に示すように SmD variant では 6.3×10^8 /tube の添加によつて著しい増大がみられたのに対して, SmT variant では 8.5×10^8 /tube の添加によつてもその増大はほとんどみられなかった。

Fig. 2 は, M ϕ CL 測定系における菌の添加量を変えた場合に誘起される CL の成績を示したものである。

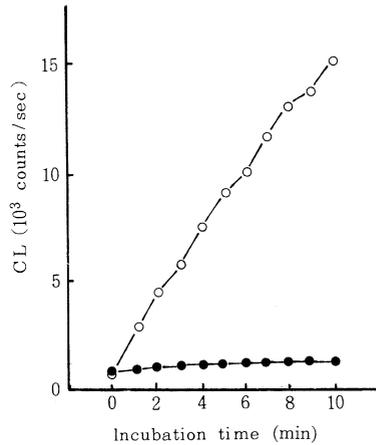


Fig. 1. M ϕ CL induced by SmD and SmT variants of MAC N-260 strain.

○, SmD variant (6.3×10^8 /tube); ●, SmT variant (8.5×10^8 /tube).

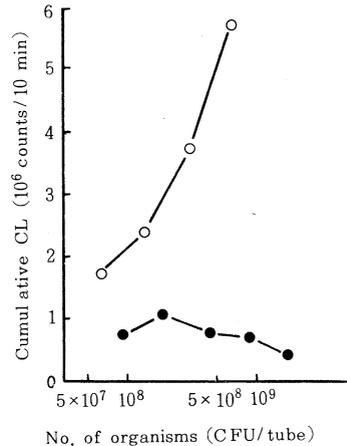


Fig. 2. M ϕ CL induced by varying doses of SmD and SmT variants of MAC N-260 strain.

○, SmD variant; ●, SmT variant.

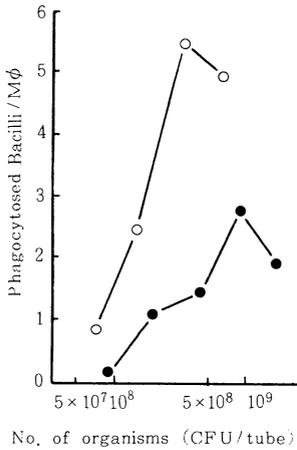


Fig. 3. Phagocytosis of SmD and SmT variants of MAC N-260 strain by Mφs during 10-min incubation for CL measurement. ○, SmD variant; ●, SmT variant.

これから分かるように、SmD variant では用量依存性に CL の誘起がみられたのに対して、SmT variant では $8.5 \times 10^7 \sim 1.7 \times 10^9$ /tube の添加ではその誘起がほとんどみられなかった。

このように SmT variant の Mφ CL 誘起活性が SmD variant のそれに比べて極めて低いことは上述した MAC N-260 株のみならず N-235, N-257 および N-275 株でも同様に認められるところであった。

なお、データには示さなかったが、こうした SmT, SmD 菌による CL triggering 活性の差異は、C3H/He マウスよりの Mφ のみならず C57BL/6 (感受性系統) マウスよりの Mφ でもみられたが、Mφ CL の程度は前者が後者に比べて大きいことが分かった。

Fig. 3 は、Fig. 2 の実験に用いた Mφ の SmT および SmD 両 variants に対する食能を示したものである。すなわち、SmD variant では Mφ CL 系への菌の添加量依存性に食能菌数の増加がみられ、この増加パターンは Mφ CL のそれとよく符合するものであったが、SmT variant でも SmD variant に比べるとその程度こそ低かったが添加菌数に依存した食能菌数の増加がみられた。したがって、SmT variant における Mφ CL 誘起能の極めて低いという現象は単に菌の Mφ への被食性の欠如に起因したものではないと考えられる。

2. N-260 SmD variant の菌体表層に表現されている Mφ CL triggering ligand の性状

Fig. 4 は SmD 菌体を諸種の物理・化学的処理を行った場合の Mφ CL 誘起活性に及ぼす効果を示したものである。これから分かるように HCHO 処理では著変はみられなかったが、100°C、15 分の加熱、pronase 消化、クロロホルム・メタノール (2:1) 抽出によって活

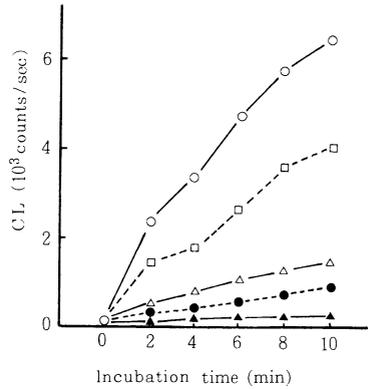


Fig. 4. Effects of some physical and chemical treatments of MAC N-260 SmD variant on its Mφ CL-triggering activity.

○, Untreated; □, formalin treatment (3%, 2 hr); △, heating (100°C, 15 min); ●, pronase digestion (0.8 mg pronase P/ml, 37°C, 2 hr); ▲, delipidation (CHCl₃-methanol extraction). Intact or treated organisms were added to the incubation mixture at a density of 3×10^8 /tube.

性の著しい低下がみられた。

次に、各種の endoglycosidase 処理を行った SmD 菌体での Mφ CL は Fig. 5 に、また Tween 80 (1%) 処理によるそれは Fig. 6 に示した。すなわち、cellulase, pectinase, α-amylase 並びに dextranase の各処理によってその著しい低下が、また chitinase や isoamylase 処理によって中等度の低下がみられたが、hyaluronidase, pullulanase 並びに laminarinase 処理ではその低下はみられなかった。他方、Tween 80 処理によっては Mφ CL 誘起活性は 50% 程度低下がみられた。

以上の成績から、MAC N-260 SmD variant の菌体表層に表現されている Mφ CL triggering ligand は、glycolipoprotein 様の moiety を有するものように思われる。

3. SmT variant の Mφ CL 誘起活性欠損機構

Fig. 7 に示すように、Mφ CL 測定系に SmT 並びに SmD variants の混合菌液を添加した場合の Mφ CL は SmD 菌体のみを添加した場合におけるよりもやや低下の傾向がみられたに過ぎず、したがって SmT variant における低 CL 誘起能が SmT variant の菌体あるいは、その分泌成分による Mφ CL の阻害作用によるものであるという可能性は少ないものように思われる。

SmT variant の菌体表層には多糖体よりなる外層が存在するという報告がある⁵⁾。Fig. 6 に示したように、これを破壊・除去することが知られている Tween 80 (S. Naik, Wadsworth Center for Laboratories

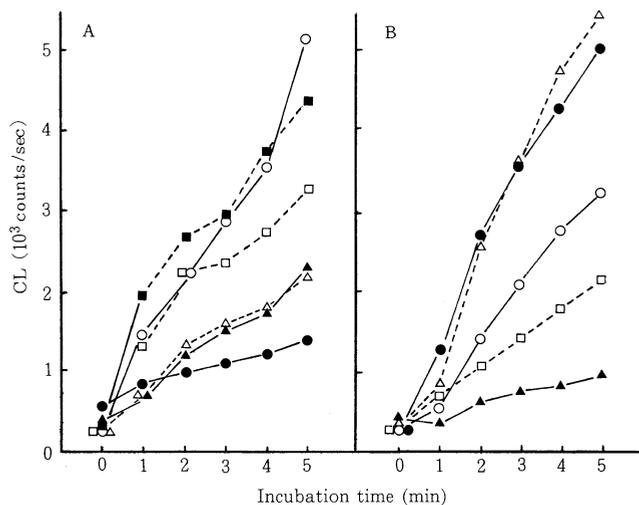


Fig. 5. Effects of treatments of SmD variant of MAC N-260 with various endoglycosidases on its M ϕ CL-triggering activity.

A : \circ , control (untreated); \blacksquare , hyaluronidase (500 units/ml, pH 7.0, 37°C, 2 hr); \square , isoamylase (50 units/ml, pH 7.2, 40°C, 2 hr); \blacktriangle , dextranase (10 units/ml, pH 5.0, 40°C, 2 hr); \triangle , α -amylase (50 units/ml, pH 7.2, 40°C, 2 hr); \bullet , cellulase (10 units/ml, pH 4.0, 30°C, 2 hr).

B : \circ , Control (untreated); \triangle , laminarinase (0.5 units/ml, pH 5.0, 40°C, 2 hr); \bullet , pullulanase (1 unit/ml, pH 5.0, 30°C, 2 hr); \square , chitinase (5 units/ml, pH 6.5, 37°C, 2 hr); \blacktriangle , pectinase (50 units/ml, pH 4.0, 25°C, 2 hr). Organisms were added to the incubation mixture at the density of 1×10^9 /tube.

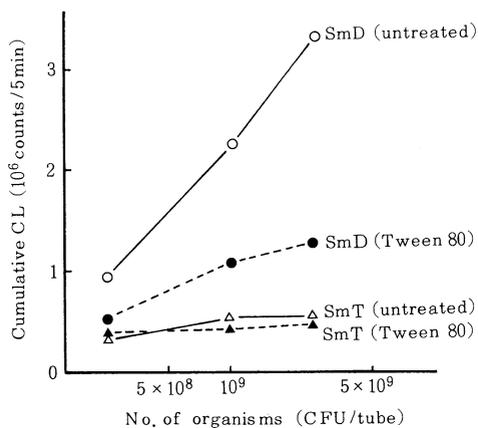


Fig. 6. Effect of Tween 80-treatment (1%, 37°C, 6 hr) on M ϕ CL-triggering activity of SmD and SmT variants of MAC N-260 strain.

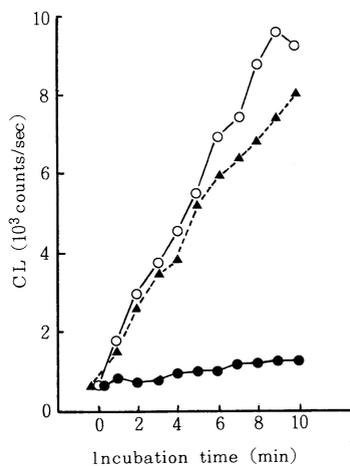


Fig. 7. Change in the M ϕ CL in response to SmD variant by the addition of SmT variant. \circ , SmD variant (3×10^8 /tube); \bullet , SmT variant (4×10^8 /tube); \blacktriangle , SmD variant (3×10^8 /tube)+SmT variant (4×10^8 /tube).

and Research, USA, よりの私信)で菌体を処理しても、またデータには示さなかったが、諸種の endoglycosidase (α -amylase, isoamylase, dextranase, cellulase, pectinase, chitinase, hyaluronidase, pullulanase, laminarinase), HCHO, pronase あるいは加熱 (100°C, 15分) 処理しても SmT variant の M ϕ CL 誘起活性の回復はみられなかった。他方、SmT variant を脱脂処理した場合、約5倍に及ぶ M ϕ CL 誘起活性の亢進がみられたが、これとても非処理の SmD 菌体の活性の 1/8 に過ぎなかった。

考 察

如上の成績より、MAC の SmD および SmT variants をマウス腹腔 M ϕ の培養系に加えた場合、前者では強い M ϕ CL を誘起したのに対して、後者は極めて軽微であることが分かった。このことは宿主 M ϕ は SmD variant との相互作用によっては強い呼吸爆発が誘起されることにより、酸素依存性の殺菌のメカニズムの発動が効率よく行われる^{6)~8)} のに対して、SmT variant ではその発動は極めて不十分であることを示唆しているものと思われる。著者らは、別途に行った実験で、両集落 variants をマウスの腹腔 resident M ϕ に貪食させて培養した場合、M ϕ 細胞内で SmT variant は SmD variant に比べて顕著な増殖を示すことを観察している(未発表)が、このことは上述した考え方で、ある程度説明しうるのはなかろうか。また、この実験成績は、ひいては SmT variant と SmD variant のマウスに対するビルレンスの差異に係わる問題のように考えられる⁹⁾¹⁰⁾。

SmD 菌体の物理・化学的、あるいは酵素処理の成績より、SmD 菌体表面に表現されている M ϕ CL triggering ligand は、易熱性で、pronase, endoglycosidase (特に α -amylase, dextranase, cellulase, pectinase) 並びに Tween 80 処理に感受性でクロロホルム・メタノールにより抽出される成分よりなる glycolipoprotein 様の moiety を有するものようであり、さらに endoglycosidase 処理の成績は、 α -1, 4, α -1, 6 あるいは β -1, 4 グルコシド結合を有する糖鎖の重要性を示唆しているものように思われる。

一方、M ϕ CL 誘起能をほとんど持たない SmT 菌体を Tween 80 処理して、その菌体外層を部分的に除いた場合でも、また諸種の endoglycosidase で処理して菌体表面の多糖体に損傷を与えた場合でも、SmT 菌体の低 M ϕ CL 誘起能の回復される傾向は全くみられなかった。したがって、SmT 菌体の M ϕ CL 誘起能が SmD 菌体よりも著しく低い現象は、SmT 菌体に存在する外層によって SmT 菌体上に表現されている CL triggering ligand がマスクされていることに起因した可能性は少

なく、むしろその表現量自体が SmT variant においては SmD variant におけるよりも著しく少ないことによるものと考えられる。また、SmT 菌体の脱脂処理によって多少の M ϕ CL 誘起活性の回復がみられたが、その説明としてこれはあくまでも推察の域を出ないが、リピド層が CL-triggering ligand をマスクする物質として働いている可能性よりは、むしろ native な状態では triggering 活性をもたない何らかの成分がクロロホルム・メタノール処理によって何らかの構造変化を来し、新たな triggering ligand moiety が出現したことによるものではなかろうかと考えられる。

文 献

- 1) McCarthy, C. : Spontaneous and induced mutation in *Mycobacterium avium*, Infect Immun, 2 : 223-228, 1970.
- 2) Woodley, C. L. and David, H. L. : Effect of temperature on the rate of the transparent to opaque colony type transition in *Mycobacterium avium*, Antimicrob Agents Chemother, 9 : 113-119, 1976.
- 3) Moehring, J. M. and Solotorovsky, M. R. : Relationship of colonial morphology to virulence for chickens of *Mycobacterium avium* and the nonphotochromogens, Am Rev Respir Dis, 92 : 704-713, 1965.
- 4) Schaefer, W. B. and Davis, C. L., and Cohn, M. L. : Pathogenicity of transparent, opaque, and rough variants of *Mycobacterium avium* in chickens and mice, Am Rev Respir Dis, 102, 499-524, 1970.
- 5) Rastogi, N. and Frehel, C., Ryter, A., et al. : Multiple drug resistance in *Mycobacterium avium* : Is the wall architecture responsible for the exclusion of antimicrobial agents? Antimicrob Agents Chemother, 20 : 666-677, 1981.
- 6) Johnston, R. B., Jr. : Oxygen metabolism and the microbicidal activity of macrophages, Fed Proc, 37 : 2759-2764, 1978.
- 7) Rosen, H. and Klebanoff, S. J. : Bactericidal activity of a superoxide anion-generating system, J Exp Med, 149 : 27-39, 1979.
- 8) Sasada, M. and Johnston, R. B., Jr. : Macrophage microbicidal activity. Correlation between phagocytosis-associated oxidative metabolism and killing of *Candida* by macrophages, J Exp Med, 152 : 85-98, 1980.

- 9) Gangadharam, P. R. J. and Edwards, C. K. III : Release of superoxide anion from resident and activated mouse peritoneal macrophages infected with *Mycobacterium intracellulare*, Am Rev Respir Dis, 130 : 834-838, 1984.
- 10) Stokes, R. W. and Orme, I. M., and Collins, F. M. : Role of mononuclear phagocytes in expression of resistance and susceptibility to *Mycobacterium avium* infections in mice, Infect Immun, 54 : 811-819, 1986.