

原 著

人型結核菌株間における抗原性糖脂質の分布と  
virulence への寄与に関する研究

藤 原 永 年

大阪市立大学医学部細菌学教室

受付 平成9年2月3日

受理 平成9年2月17日

DISTRIBUTION OF ANTIGENIC GLYCOLIPIDS AMONG *MYCOBACTERIUM*  
*TUBERCULOSIS* STRAINS AND THEIR CONTRIBUTION TO VIRULENCE

Nagatoshi FUJIWARA\*

(Received 3 February 1997/Accepted 17 February 1997)

Tuberculosis is a chronic disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* infection. The major pathological changes are immunologically hypersensitive granuloma formation due to the local proliferation or infiltration of immune cells. However, the mechanism for the development of the disease has not been fully understood. The first step of infection is intracellular survival in the phagocytic cells and this process has been reported to be regulated by cell surface glycolipid virulence factors. As genetical heterogeneity of *M. tuberculosis* among strains has been reported recently based on DNA fragmentation pattern, I have examined the distribution of cell surface glycolipids (cord factor, sulfolipids and penta acyl trehaloses) among the virulent (*M. tuberculosis* H37Rv and *M. tuberculosis* Aoyama B) and avirulent (*M. tuberculosis* H37Ra) strains by two dimensional thin-layer chromatography of silica gel. Seven characteristic glycolipid components of the virulent strains were detected and separated by thin-layer chromatography of silica gel. Each glycolipid was identified by fast-atom-bombardment mass-spectrometry (FAB/MS) analysis of the intact lipid and gas-chromatography mass-spectrometry (GC/MS) analysis of the fatty acid or the carbohydrate moiety. As the result, molecular weight ( $m/z$  1,200-3,000) of each glycolipid was determined clearly by FAB/MS analysis. The structure of fatty acids (C16-C40) or mycolic acids (C76-C88) were determined by GC/MS analysis. Cord factor (TDM, trehalose 6,6'-dimycolate) and trehalose 6-monomycolate (TMM) showed strong granuloma forming activity, but other glycolipids practically did not. On the other hand, cord factor and trehalose 6-monomycolate showed phagocytosis inhibition (but showed promotion in the presence of complement) and marked inhibition of phagosome-lysosome fusion, while sulfolipids showed strong phagocytosis promotion and marked inhibition of phagosome-lysosome fusion. Penta acyl trehaloses showed phagocytosis

\* From the Department of Bacteriology, Osaka City University Medical School, Asahimachi 1-4-54, Abeno-ku, Osaka, 545 Japan.

promotion but no effect on phagosome-lysosome fusion. Cord factor and trehalose 6-monomycolate existed ubiquitously among virulent and avirulent strains, while sulfolipids and penta acyl trehaloses were detected in only virulent strains (*M. tuberculosis* H37Rv and *M. tuberculosis* Aoyama B). These results indicate that the existence of these toxic glycolipids contributes to the virulence of *M. tuberculosis*, profoundly. It is suggested that these glycolipids play an important role as virulence factors in the early stage of infection and expression of pathogenicity.

**Key words:** *Mycobacterium tuberculosis*, glycolipid, granuloma, phagosome-lysosome fusion, virulence factor

キーワード：結核菌、糖脂質、肉芽腫、貪食、毒性因子

## 緒言

結核菌を始めとする抗酸菌感染症の発病機構は、Robert Koch による結核菌の発見<sup>1)</sup>以来、“cord factor”の発見を経て今日に至る110余年の間著しい発展を遂げたが、菌体外毒素を産生する一般細菌の病原機構とは異なり、複雑な細胞性免疫反応にもとづく病変の形成は現在でも明確には解明されていない。一方、今世紀前半まで減少傾向を示していた結核は最近その減少化傾向が鈍化し始め、特に HIV 合併症として再び重要視されつつあるばかりでなく、さらに抗結核剤に対する耐性菌の出現は改めて結核の深刻さを示しているが、新しい抗結核薬の開発において細胞内に寄生する菌に対して十分な抗菌性を期待するためにも、結核感染の免疫学または分子病理学的機構の解明は極めて重要と考えられる。われわれは cord factor を始めとする細胞表層糖脂質を中心に、強毒株および弱毒株における分布を調べ、どのような成分がどのような機構で結核菌の virulence に関与するのかを検討してきたが、今回いずれもトレハロースを糖鎖として含有する種々の糖脂質を強毒株より単離し、化学構造を推定した上で各々の virulence factor としての性質を解析して、感染・発病への寄与について考察した。

結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) を始めとする Mycobacterium, Nocardia, Rhodococcus 属の特徴は、抗酸性に染色されることと、細胞表層が強い疎水性を示すことであるが、これら菌体表面の性質に寄与する成分はミコール酸を始めとする種々の脂質分子である。このうちミコール酸含有糖脂質として特に cord factor (TDM, trehalose 6,6'-dimycolate)<sup>2) 3)</sup> は、その毒性に加え免疫薬理学的な各種生理活性についての研究が進められ、肉芽腫形成能<sup>4) 5)</sup>、抗腫瘍活性<sup>6) ~ 8)</sup>、アジュバント活性<sup>9)</sup>、種々のサイトカイン誘導能<sup>10) ~ 12)</sup>、protein kinase C の活性化<sup>13)</sup> さらに走化性因子誘導

能<sup>14)</sup> 等が報告されてきたほか、最近では各菌種によるミコール酸の炭素鎖長や分子種の違いから、抗原性を始めとする種々の生理活性と構造との関係が注目されつつある<sup>6) 10) 15)</sup>。

また一方、人型結核菌はゲノム解析の結果、DNA の restriction fragment length polymorphism (RFLP) パターンに著しい多形性が見られることおよび菌株 (患者分離株および保存株) によりその感染性・病原性が異なることが指摘されており<sup>16) 17)</sup>、本菌が感染したときに最初に宿主食細胞と反応すると考えられる細胞表層脂質成分について、その組成を強毒株と弱毒株で比較することは病原因子解析には必須である。そこで、人型結核菌強毒株 *M. tuberculosis* H37Rv 株と *M. tuberculosis* Aoyama B 株および弱毒株 *M. tuberculosis* H37Ra 株の3菌株の糖脂質およびリン脂質組成を2次元薄層クロマトグラフィーと質量分析を組み合わせて比較し、その分布を明らかにした。その結果、強毒株には弱毒株に含まれない特徴的な糖脂質が存在し、今回、強毒株 *M. tuberculosis* Aoyama B 株から7種類の糖脂質を単離精製し、同定を行った。また、これら糖脂質について感染性・病原性と関わりの深い各種生理活性、すなわちマウスに対する毒性、肉芽腫形成能および人末梢血食細胞の貪食機能について比較検討し、感染における virulence factor としての役割を考察した。

## 実験材料および方法

### 1. 結核菌の培養および粗脂質の調製

人型結核菌 *M. tuberculosis* H37Rv 株 (強毒株)、*M. tuberculosis* Aoyama B 株 (強毒株) および *M. tuberculosis* H37Ra 株 (弱毒株) を、Sauton 培地にて4-6週間37℃で静置表面培養した。培養終了後、121℃、20分間加熱滅菌し、濾紙で濾過して菌体を集菌した。その菌体を超音波破碎して脂質を抽出し、蒸留水と chloroform/methanol (4:1, 3:1 および 2:1, v/v) によつ

て2層分配し、chloroform/methanol層を回収後、濃縮乾固して粗脂質とした<sup>18)</sup>。

## 2. 2次元薄層クロマトグラフィー

粗脂質はフィンガープリントを得るためシリカゲル薄層プレート (Uniplatc, 20×20cm, 0.25mm: Analtec, Inc., Delaware, U.S.A.) を用いて2次元薄層クロマトグラフィーを行った。粗脂質を200 $\mu$ g スポットし、2種類の2次元展開溶媒系; solvent 1 [1次元展開に chloroform/methanol/water (65:25:4, v/v), 2次元展開に chloroform/methanol/acetone/water (80:12:15:4, v/v)], solvent 2 [1次元展開に chloroform/methanol/water (100:14:0.8, v/v), 2次元展開に chloroform/methanol/acetone/water (50:2.5:60:3, v/v)], で展開し、リン脂質は Dittmer 試薬で、糖脂質は Anthrone 試薬でそれぞれ検出した。

## 3. 糖脂質の単離精製

各糖脂質は極性、酸性度等の違いにより各種展開溶媒系を組み合わせて分離し、薄層クロマトグラフィー (TLC) 上、単一のスポットになるまで繰り返し精製純化した。なお、用いた展開溶媒系は solvent 3, chloroform/methanol/acetone/acetone/acetone (80:20:6:1, v/v), solvent 4, chloroform/methanol/acetone/acetone (90:10:6:1, v/v), solvent 5, chloroform/methanol/water (90:10:1, v/v)<sup>19)</sup>, solvent 6, benzene/methanol/acetone (95:1:1, v/v) であり、TLC プレートを展開後、ヨードで発色させ各画分をゲルと共にかきとり、カラムにつめて chloroform/methanol (4:1, 3:1, 2:1, v/v) で溶出した。

## 4. 糖脂質の構造解析

各糖脂質をメタノール性 0.2N 水酸化ナトリウム溶液で90℃, 1時間弱アルカリ水解し、あらかじめ平衡化しておいた陽イオン交換樹脂 DOWEX 50W-X8 (The Dow Chemical Company, U.S.A.) を加えて pH2.0 以下の酸性にした。陽イオン交換樹脂を除去後、hexane を加えて2層分配し、水層部分を回収・濃縮後、TLC を用いて各種標準品と Rf 値を比較することにより糖部分を分析した。hexane 層から脂肪酸を回収・濃縮乾固後、ジアゾメタンを加え、室温で1時間反応させて脂肪酸メチルエステルとした。TLC 分析は展開溶媒系 solvent 7, hexane/diethyl ether (80:20, v/v) を用いて行った。さらに、N, O-Bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka) により TMS 誘導体とした。これら脂肪酸メチルエステル、TMS 誘導体をガスクロ

マトグラフィー (GC), ガスクロマトグラフィー/マススペクトロメトリー (GC/MS) を用いて詳細に分析した<sup>20)21)</sup>。Intact な糖脂質は fast-atom-bombardment mass-spectrometry (FAB/MS) 分析し<sup>22)</sup>, 疑似分子イオンから intact な糖脂質の各分子量を測定した。

## 5. 肉芽腫形成能および毒性試験<sup>5)</sup>

各糖脂質300 $\mu$ g/匹をホモジナイザーにとり、溶媒を留去した後、全量の3.2%となるように Freund incomplete adjuvant (Difco Laboratories, Mich., U.S.A.) と等量の phosphate buffer saline (PBS, pH7.0) 存在下0.2% Tween-80 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka) を含む生理食塩水に浮遊させ、テフロン製ピストンホモジナイザーで water in oil in water ミセルに調製した。

調製したミセル200 $\mu$ l/匹 (300 $\mu$ g/匹) を ICR マウス雄4週齢の尾静脈より投与し、体重の経時変化を調べ、7日目の肺、脾臓における肉芽腫形成能を下記に示した臓器インデックスで評価した。

臓器インデックス = (臓器重量/体重) × 100

## 6. 貪食活性におよぼす影響<sup>23)24)</sup>

### (1) *Staphylococcus aureus* 菌体の調製

*S. aureus* 209P を Heart infusion agar (Difco Laboratories, Mich., U.S.A.) の平板培地で37℃, 24時間培養し、0.1% gelatin-Hanks 液にかき取り浮遊液とした。この *S. aureus* 浮遊液をオートクレーブで121℃, 20分間加熱滅菌した後、gelatin-Hanks 液にて  $1 \times 10^8$  cells/ml に調製した。

### (2) 人末梢血由来単球の調製

ヘパリン加採血した健康人末梢血を同量の Lymphoprep Medium (NYCOMED PHARMA AS, Oslo, Norway) 上に重層し、20℃, 1,500 $\times$ g で30分間遠心し、単球を含む層を分離した。Tris-NH<sub>4</sub>Cl buffer を分離した単球に加えて、混入した赤血球を溶血させ、0.1% gelatin-Hanks 液にて3回洗浄した後、10%非働化 foetal bovine serum (Gibco Inc., New York, U.S.A.), penicillin G (100 U/ml), streptomycin (100g/ml) 加 RPMI 1640 medium (Nissui Seiyaku, Tokyo) にて  $5 \times 10^6$  cells/ml に調製した。

### (3) 糖脂質でコートした *S. aureus* の調製

各糖脂質を hexane 或いは isopropanol に溶解 (0.2-5 $\mu$ g/ml) し、*S. aureus* 死菌体  $2.5 \times 10^7$  cells/ml と混和して、エバポレーターにて溶媒を完全に留去させた後、gelatin-Hanks 液を加えて1分間ソニケーション

し、さらにボルテックスミキサーにて十分攪拌し、糖脂質でコートした *S. aureus* の浮遊液 ( $2.5 \times 10^7$  cells/ml : gelatin-Hanks 液) とした。

(4) 糖脂質でコートした *S. aureus* の phagocytosis  
単球浮遊液 ( $5 \times 10^6$  cells/ml) 200  $\mu$ l を cover slip 上で 37°C, 90 分間インキュベートした後, RPMI 1640 medium にて 3 回洗浄し, 非附着細胞を除去した。cover slip 上に附着させた単球に各濃度の糖脂質をコートした *S. aureus* の浮遊液 ( $2.5 \times 10^7$  cells/ml : gelatin-Hanks 液) を 200  $\mu$ l ずつのせ 37°C, 3 時間インキュベートした。RPMI 1640 medium で 3 回洗浄し, 単球を methanol で固定した。自然乾燥後, methylene blue で染色し, 顕微鏡 (1000 倍) 下で無作為に選んだ 200 視野の単球数および貪食された菌数を数えた。

phagocytosis は下記に示した phagocytic index (PI) で評価した。

$$PI = (\text{貪食された菌の総数/単球の総数}) \times (\text{菌を貪食している単球の総数/単球の総数}) \times 100$$

(5) 糖脂質でコートした *S. aureus* の phagosome-lysosome fusion (P-L fusion)

P-L fusion は, cover slip に附着させた単球 ( $5 \times 10^6$  cells/ml) に PBS で 3  $\mu$ g/ml に調整した acridine orange (SIGMA Chemical Co., Louis, U.S.A.) を加え, 37°C, 15 分間反応させた後, RPMI 1640 medium (抗生物質を含まない) で 3 回洗浄した。acridine orange で標識した単球に, 各糖脂質をコートした *S. aureus* の浮遊液 ( $2.5 \times 10^7$  cells/ml : gelatin-Hanks 液) を 200  $\mu$ l ずつのせ 37°C, 3 時間インキュベートした。その後, RPMI 1640 medium で 3 回洗浄し自然乾燥させた。P-L fusion は, 蛍光顕微鏡 (波長 550nm) を用い, 無作為に選んだ 200 視野の単球数および acridine orange に染色された菌数を数えた。P-L fusion は下記に示した fusion index (FI) で評価した。引き続き単球を methanol で固定し, 自然乾燥後 methylene blue で染色し, 単球数および貪食された菌数を数え PI を算出した。

$$FI = (\text{P-L fusion をおこした菌の総数/単球の総数}) \times (\text{P-L fusion をおこした単球の総数/単球の総数}) \times 100$$

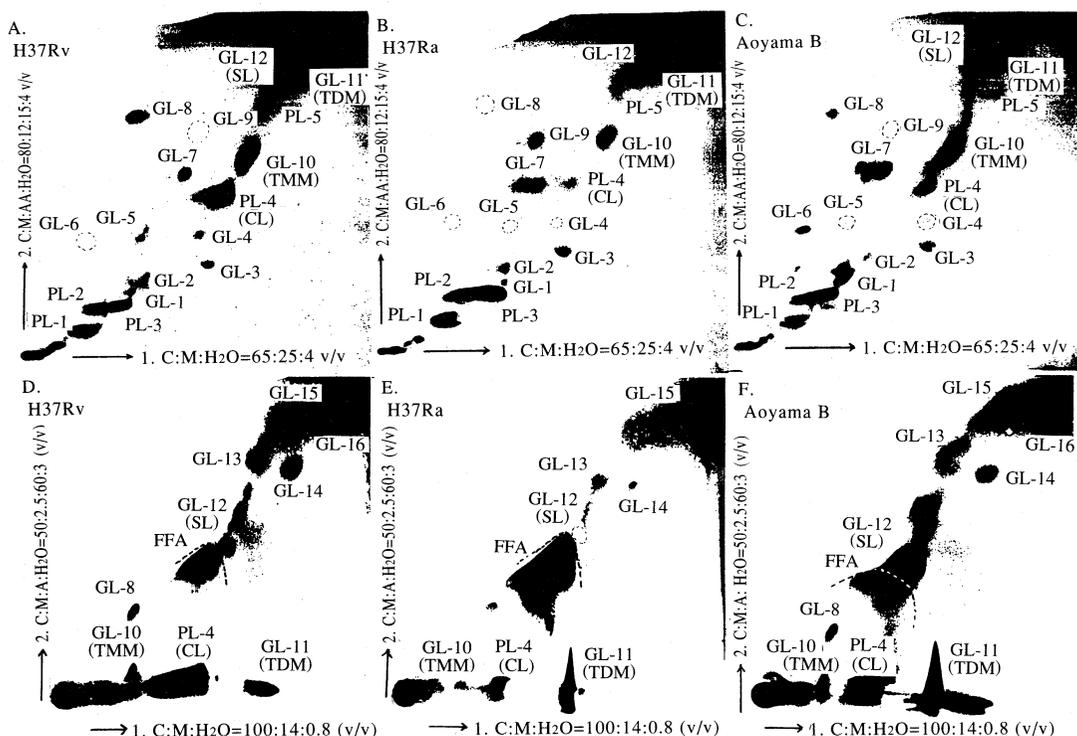


図1 2次元 TLC による人型結核菌 3 菌株間における脂質組成の比較  
(A, D: *M. tuberculosis* H37Rv, B, E: *M. tuberculosis* H37Ra, C, F: *M. tuberculosis* Aoyama B)

表1 人型結核菌3菌株間におけるリン脂質および糖脂質の分布の比較

Phospholipids		PL				
Strain	1	2	3	4	5	
H37Rv	○	○	○	○	○	
Aoyama B	○	○	○	○	○	
H37Ra	○	○	○	○	○	

PL-1, 2: phosphatidylinositolmannoside  
 PL-3: phosphatidylethanolamine  
 PL-4: diphosphatidylglycerol (cardiolipin)

Glycolipids		GL															
Strain	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
H37Rv	○	○	○	○	○	×	○	○	×	○	○	○	○	○	○	○	
Aoyama B	○	○	○	×	×	○	○	○	×	○	○	○	○	○	○	○	
H37Ra	○	○	○	×	×	×	○	×	○	○	○	×	○	○	○	×	

PL-1: di acyl trehalose 2'-sulfate (SL 3)  
 PL-8: tri acyl trehalose 2'-sulfate (SL 2)  
 PL-10: trehalose 6-monomycolate (TMM)  
 PL-11: trehalose 6,6'-dimycolate (TDM)  
 PL-12: tetra acyl trehalose 2'-sulfate (SL 1)  
 PL-16: penta acyl trehalose (PAT)

## 結 果

## 1. 2次元 TLC による人型結核菌強毒株および弱毒株3菌株の脂質組成の比較

3菌株の脂質組成を2次元 TLCで分析し、その結果を図1に示した。また各菌株のリン脂質および糖脂質の分布を表1にまとめた。結核菌に特徴的なリン脂質は図1 A-Fに示すように主なものが5種類存在し、TLC上のRf値と発色を既知の標準品と比較してPL-1およびPL-2はphosphatidylinositolmannoside, PL-3はphosphatidylethanolamine, PL-4はdiphosphatidylglycerol (通称cardiolipin)と同定された。これらの成分は*M. tuberculosis* H37Rv, *M. tuberculosis* Aoyama Bおよび*M. tuberculosis* H37Ra株の3菌株に共通に存在し、その量比も菌株による違いは認められなかった。

一方、糖脂質については2系列の展開溶媒系で計16のスポットが確認され、3菌株を比較すると結核菌に特有のtrehalose 6-monomycolate (TMM)(GL-10)およびTDM (GL-11)はすべての菌株に存在していたが、その含量が異なり強毒株の*M. tuberculosis* H37Rv株と*M. tuberculosis* Aoyama B株に多く含まれ、弱毒株の*M. tuberculosis* H37Ra株では少なかった。また、*M. tuberculosis* H37Rv株ではGL-6およびGL-9が、*M. tuberculosis* Aoyama B株ではGL-4, GL-5およびGL-9が、*M. tuberculosis* H37Ra株ではG

L-4, GL-5, GL-6, GL-8, GL-12およびGL-16がそれぞれ欠損していた。GL-12は*M. tuberculosis* Aoyama B株および*M. tuberculosis* H37Rv株に含まれていたが、*M. tuberculosis* H37Ra株には存在しなかった。これ以外にもGL-16は*M. tuberculosis* Aoyama B株と*M. tuberculosis* H37Rv株の強毒株にのみ存在し、*M. tuberculosis* H37Ra株では確認できなかった。このように3菌株で比較すると、糖脂質組成に差があり、共通して含まれるTDMやTMMについてもその含量が異なり、また、強毒株にのみ多く含まれる特徴的な糖脂質が存在した。

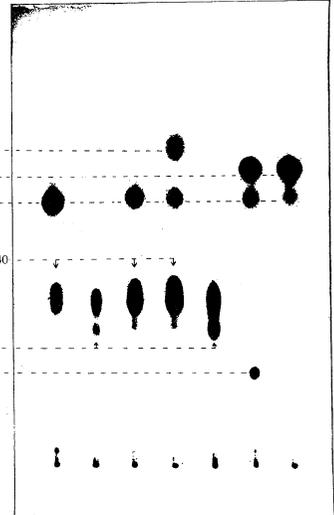
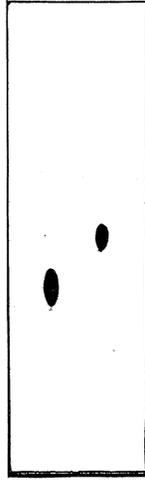
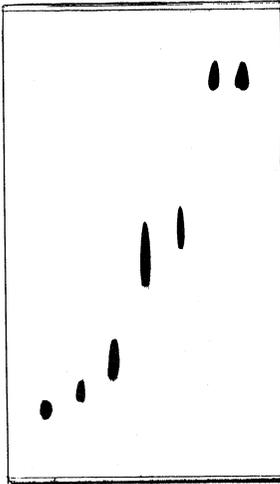
2. *M. tuberculosis* Aoyama B株からの糖脂質の単離

強毒株に特徴的な7種類の糖脂質をsolvent 3-solvent 6の展開溶媒を組み合わせることによって*M. tuberculosis* Aoyama B株から単離精製した(図2)。これらの糖脂質を弱アルカリ水解後得られる親水性成分(糖)および疎水性成分についてFAB/MSおよびGC/MS等の質量分析を組み合わせて構造解析した結果(Fujiwara et al., in preparation), TDMとTMMに加えて3種類のsulfolipid (SL)と2種類のpenta acyl trehalose (PAT)であることが明らかとなった。図2の左から単離したsulfolipid 3 (SL 3), TMM, sulfolipid 2 (SL 2), sulfolipid 1 (SL 1), TDM, penta acyl trehalose 2 (PAT 2)およびpenta acyl

Chloroform/Methanol/Acetone/  
Acetic acid=90/10/6/1

Benzene/Methanol/  
Acetone=95/1/1

Solvent:Hexane/Diethyl ether=80/20



SL 3 SL 2 TDM PAT 1  
TMM SL 1 PAT 2

PAT 2 PAT 1

SL 3 TMM SL 2 SL 1 TDM PAT 2 PAT 1

図2 *M.tuberculosis* Aoyama B株から分離した糖脂質のTLC

図3 糖脂質の構成脂肪酸のTLC

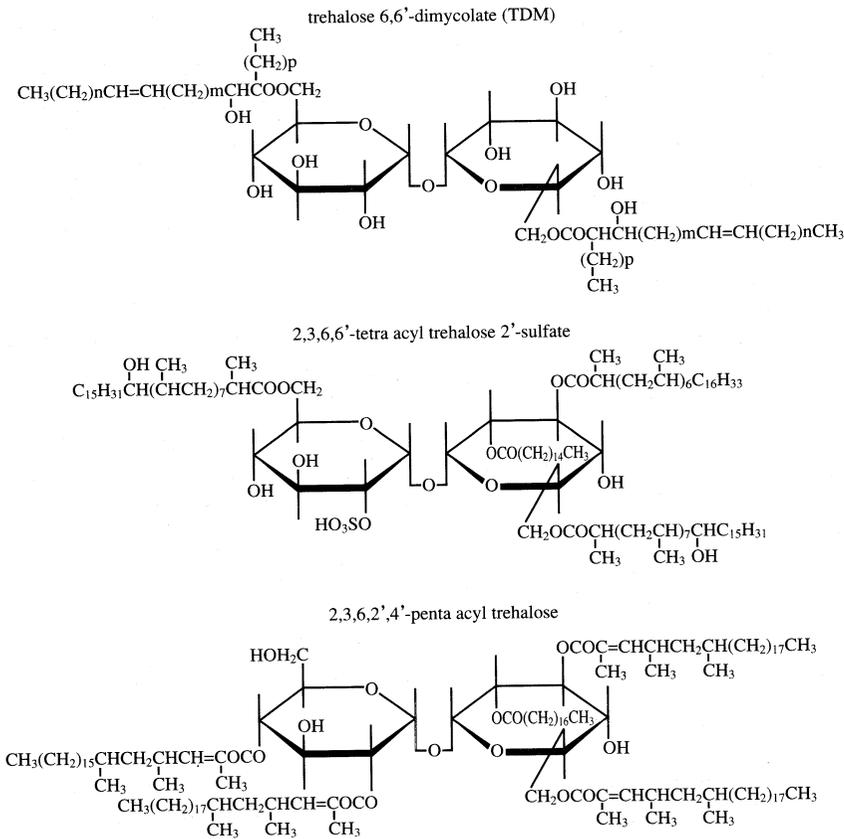


図4 主要トレハロース含有糖脂質の構造

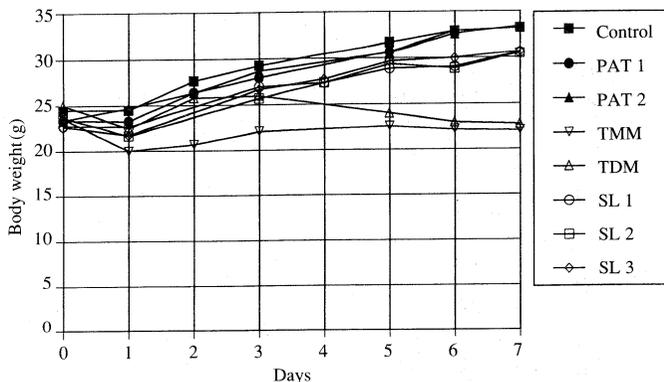


図5 トレハロース含有糖脂質投与後のマウスの体重変化

trehalose 1 (PAT 1) を示し、図1のスポットと対応させると、GL-1はSL 3、GL-8はSL 2、GL-10はTMM、GL-11はTDM、GL-12はSL 1、GL-16はPAT 1、PAT 2に相当した。なお、SL 2、SL 3およびTMMについては、solvent 3の展開溶媒で繰り返し精製し、TDMとSL 1の分離はsolvent 4の酸性溶媒で混合画分を分取した後、solvent 5の中性溶媒で展開することにより精製した。PAT 1およびPAT 2は非常に低極性であり、solvent 6の溶媒を使用して単離した。

各糖脂質の構成脂肪酸についてのTLCパターンを図3に示した。さらにGC/MSおよびFAB/MSにより分子種組成を構造解析した結果(Fujiwara et al., in preoacration)から、TDMとTMMはC76-C88のミコール酸( $\alpha$ , methoxy, keto)がトレハロースにエステル結合したものであること、3種類のSLは硫酸基がトレハロースに結合し、C40のフチオセラン酸、C40のハイドロキシフチオセラン酸、さらにC16またはC18の直鎖脂肪酸がアシル基としてそれぞれ4個、3個、2個エステル結合したものであると考えられた。また、2種類のPATはトレハロースにC25:1-C27:1のフチエノン酸、C27:0の3-ハイドロキシフチオン酸、C16またはC18の直鎖脂肪酸が合計5個アシル基としてエステル結合したものであると考えられた。単離精製できた7種類の糖脂質の基本的な構造式を図4に示した。

3. マウスに対する毒性および肉芽腫形成能

マウス尾静脈より各糖脂質300 $\mu$ gをwater in oil in water ミセルにして投与した際の体重の経時変化を毒性の指標として図5に示した。TDMおよびTMMの投与では1週間以上にわたり顕著な体重増加の抑制が認められ、明らかな毒性が示された。SL 1、SL 2および

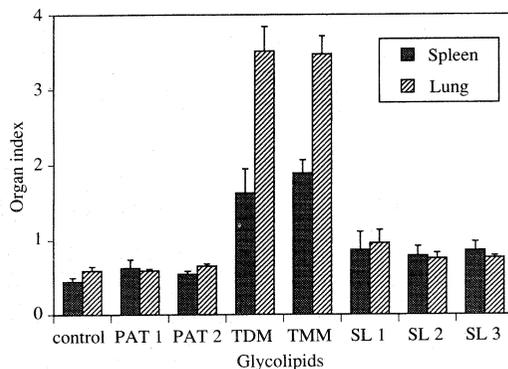


図6 トレハロース含有糖脂質投与によるマウス肉芽腫形成

SL 3も対照と比べて軽度ながら体重増加の抑制が認められたが、PAT 1およびPAT 2では体重増加の抑制は全く認められなかった。

各糖脂質投与後、7日目の肺・脾臓における肉芽腫形成能を図6に示して比較した。この結果は各臓器重量の変化と体重の変化を反映した結果となり、TDMおよびTMMでは対照に比べて脾臓で約4倍、肺で約6倍の極めて高い臓器インデックスの上昇が認められた。これら臓器インデックスの上昇が単球を中心とする各臓器実質細胞数の増加を反映していることはすでに報告したとおりであり<sup>9) 14)</sup>、浮腫による重量の増加でないことは確認した。

4. 人末梢血食細胞の貪食活性におよぼす影響

結核菌を始めとする抗酸菌は、人末梢血食細胞による貪食を受けやすいが細胞表層脂質を除去することにより貪食され難くなる。そこで単離した各糖脂質をコートし

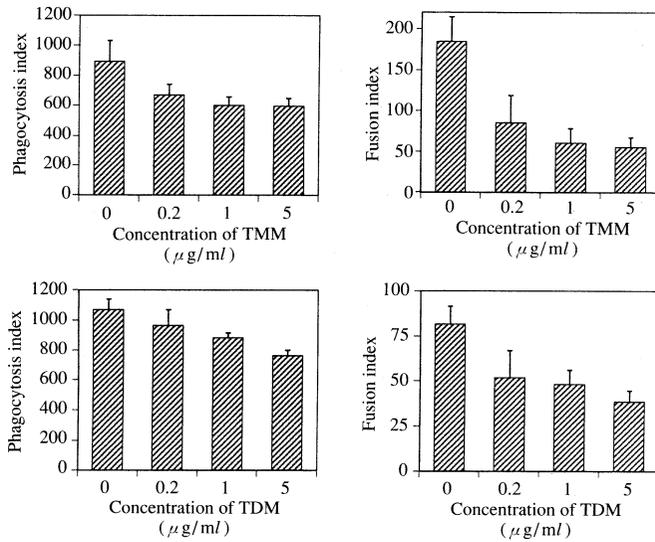


図7 TMM および TDM の人末梢血単球貪食活性におよぼす影響

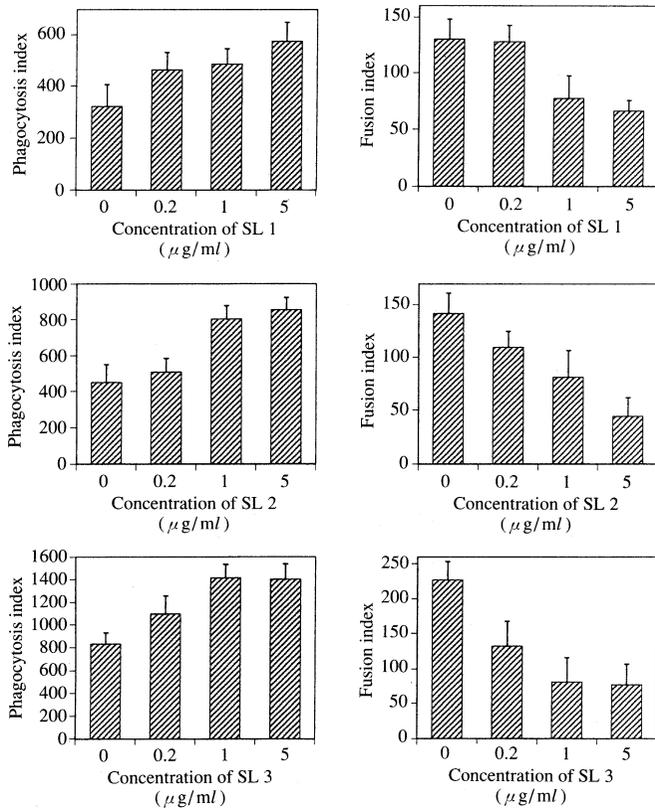


図8 SL 1, SL 2 および SL 3 の人末梢血単球貪食活性におよぼす影響

た *S.aureus* 死菌体を人末梢血単球とインキュベーションして貪食させ、貪食に与える影響を調べた結果、TDM

および TMM は図7に示したように濃度依存的に phagocytosis を抑制し、P-L fusion を抑制することが分

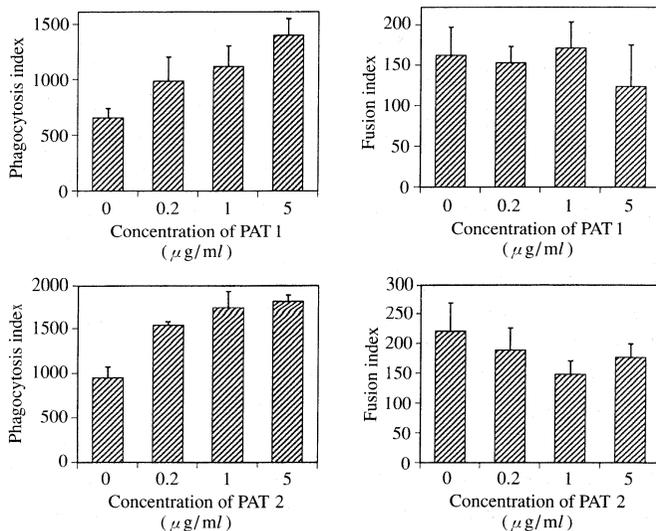


図9 PAT 1およびPAT 2の人末梢血単球貪食活性におよぼす影響

表2 トレハロース含有糖脂質の病原因子としての活性

	mycoloyl trehalose		acyl sulfotrehalose			polyacyl trehalose	
	TDM	TMM	SL 1	SL 2	SL 3	PAT 1	PAT 2
Toxicity in mice	+	+	±	±	±	-	-
Granuloma Formation	+	+	±	±	±	-	-
Phagocytosis (in the Complement)	↓	↓	↑	↑	↑	↑	↑
Phagosome-Lysosome Fusion	↓	↓	↓	↓	↓	→	→
Virulence Factor	+	+	+	+	+	±	±

かった。これに対してSL 1, SL 2およびSL 3は図8に示したように、すべて同様に、濃度依存的に phagocytosis を促進し、P-L fusion を顕著に抑制した。また、PAT 1およびPAT 2も図9に示したように phagocytosis を促進したが、P-L fusion には影響しなかった。実際にFI/PI比をとるとSLは非常に低い値となり、貪食に与える影響として、菌が細胞内に侵入し、侵入後も殺菌機構から逃れる確率を高めることが分かった。毒性、肉芽腫形成能および貪食活性に与える影響について表2にまとめた。

考 察

今回用いた人型結核菌 *M. tuberculosis* H37Rv株 (強毒株), *M. tuberculosis* Aoyama B株 (強毒株) および *M. tuberculosis* H37Ra株 (弱毒株) は人に対して病原性が異なっており、病原因子と考えられる細胞表面の糖脂質成分の分布について2次元 TLCの結果から考

察した。

リン脂質の分布については菌株間で差がなく、また、検出できた5種類のリン脂質のうちいちばん多量に含まれていたのは diphosphatidylglycerol (通称 cardiolipin) であった。このようにリン脂質の種類が少なく分布に差がないことから、菌株間でリン脂質の virulence への影響に差はないものと考えられた。次に、糖脂質組成については菌株間で顕著な差があり、今回確認できた糖脂質のスポットは計16種類であった。全体的な糖脂質の分布を見てみると、16種類のうち9種類は3菌株共通に存在しており、その他の菌株間で差がある7種類の糖脂質に注目してみると、弱毒株 *M. tuberculosis* H37Ra株の糖脂質の欠損が強毒株に比べて多いことが分かった。TDMとTMMは抗酸菌に共通して含まれており、その含量は菌株によって異なっていたが、これらの構成成分であるミコール酸については、3菌株すべてに炭素鎖長 C76-C88 の  $\alpha$ , methoxy, keto の3種類

のサブクラスが存在しており<sup>21) 26)</sup>、構成ミコール酸組成に差は認められなかった。

次に、弱毒株には含まれず強毒株に特徴的に多く含まれる糖脂質の存在が明らかとなり、これら糖脂質と結核菌の virulence との関わりについて興味をもたれた。そこで、強毒株の *M. tuberculosis* Aoyama B株から糖脂質の単離精製を行ったところ、種々の展開溶媒系を組み合わせるにより7種類の糖脂質が分離できた。質量分析を中心にこれら糖脂質の構造を解析した結果、大きく分けて3つのグループからなっており、3菌株に共通して含まれる TDM と TMM 以外に3種類の SL と2種類の PAT の存在が確認された<sup>26) 27)</sup>。これらの構造を比較してみると、糖はすべてトレハロースで共通しており、各糖脂質を特徴づけているのは脂肪酸であることが分かった。

TDM と TMM に含まれるミコール酸は  $\alpha$  位に C26 の側鎖があり<sup>26)</sup>、立体的に大きな空間を占めることが予想されるのに対して、SL は硫酸基をもつことから酸性糖脂質であるが、アシル基として C40 のフチオセラン酸とヒドロキシフチオセラン酸のような多メチル分枝脂肪酸を含んでいることが特徴である。また、PAT はアシル基として5個の脂肪酸をもち、C25:1-C27:1 のフチエノン酸のようなやや短鎖の多メチル分枝脂肪酸を含むことが特徴である。

次に、これら糖脂質の virulence との関わりについて生理活性として毒性、肉芽腫形成能および貪食活性に与える影響を検討した。肉芽腫形成能については、対照に比べて TDM および TMM は 4-6 倍の顕著な臓器インデックスの上昇が認められた。これは、ミコール酸の分子構造により立体的に細胞膜内で非常に大きな空間を支配し、細胞膜障害性が強いため異物性肉芽腫の形成に関わる細胞に強い刺激を与えて食細胞増殖や活性化・分化を引き起こすためと考えられる。

矢野らはミコール酸分子種の異なる各種 TDM のマウスにおける肉芽腫形成能について炭素鎖長が長いものほど顕著な肉芽腫形成能があること、さらにミコール酸分子種がほぼ同じで構成糖の異なる fructose mycolate, mannose mycolate, arabinose mycolate は trehalose dimycolate, glucose mycolate に比べて肉芽腫形成能が極めて低いことを報告しており<sup>28)</sup>、肉芽腫形成能にはミコール酸の分子構造に加えて、糖部分の構造特異性も密接に関わっていることが示された。SL の毒性および肉芽腫形成能は非常に低かった。また、SL 1, SL 2 および SL 3 で顕著な差は認められず、アシル基の数による違いは明らかにできなかった。

SL は糖としてトレハロースをもっているが、アシル基がミコール酸に比べ炭素鎖長が約2分の1であり、し

かも側鎖がメチル側鎖のみであるため立体構造が TDM や TMM に比べて小さいことにより、膜への perturbation が低く肉芽腫形成能が低下するものと考えられた。さらに、PAT はアシル基の炭素鎖長がミコール酸の約4分の1であり、最も活性は低かった。SL と PAT はアシル基以外にも硫酸基の有無が大きな差であるが、硫酸基の存在は肉芽腫形成能に余り大きな影響はないものと考えられた。

実際、人への結核菌の感染を考えると、結核菌が感染して増殖を始め4-8週間後に細胞性免疫が成立し、宿主側に明らかな炎症反応が現れ、その最も典型的な病変が肉芽腫性炎症である。組織学的には多数の活性化された T-リンパ球やマクロファージの浸潤・増殖からなる増殖性の病変を誘発することであるが、その機構は明らかではない。肉芽腫性炎症は元来、分化の程度の異なるさまざまな T-リンパ球とマクロファージが主体となって緩やかに集合した非特異的な炎症性反応であり、また、菌自体もこの病巣の中心部に集積する傾向があり、肉芽腫反応が強ければ殺菌能が強化される。

しかし、一方では肉芽腫中心のマクロファージの高度の活性化により、組織が乾酪壊死に陥り結核性空洞の形成へと進んでいく。肉芽腫組織周辺は循環血液中から集積してきた T-リンパ球や単球で占められ、これらの細胞が活性化されて産生する TNF, IL-1, INF- $\gamma$  はさらに周辺細胞を刺激し、強く活性化される。このようにミコール酸含有糖脂質は結核感染においてタンパク質抗原とともに細胞性免疫や抗体産生系を刺激して感染に対する防御機能を高めることにより宿主生体に有益に働くが、免疫反応を介してその刺激が強すぎると乾酪壊死を引き起こし、生体に不利に働き病原因子となることも考えられる。例えば、TNF- $\alpha$  や INF- $\gamma$  は活性化マクロファージにより産生され菌の殺菌を導くと言われているが、高濃度では結核の一般的症状である発熱、体重減少、細胞の破壊や乾酪化といった病巣形成に関わっており、過度のマクロファージ活性化は生体にとって不利な反応を引き起こすものと考えられる<sup>29)</sup>。

脂質は基本的に疎水性であり、水溶性タンパク質と異なり水溶性での反応とはなじみ難いが、このように細胞表面脂質成分である糖脂質の投与により肉芽腫が強く形成されることは、糖脂質が直接細胞から細胞へのシグナルとして作用していないとしても、結核感染において各種サイトカインの誘導を惹起し、免疫反応を調節している可能性が示され、感染性・毒性・病原性に関わる重要な因子であることは十分に示唆される。

次に感染初期において、結核菌は単球あるいはマクロファージに貪食され細胞内に取り込まれた後も生存し、増殖し続けることが病巣の形成に必要であるが、そのメ

カニズムについては十分に解明されていない。最近、補体が重要な役割をしていることや<sup>30)</sup>、マクロファージ上の特異的レセプターを介して食細胞内に取り込まれ、貪食はそのレセプターにより調節されていること<sup>31)</sup>などが報告されている。また、Myrvikらは人型結核菌の強毒株(H37Rv)は肺胞マクロファージの phagosome を容易に破壊し細胞質内で増殖するが、弱毒株(H37Ra)は phagosome 内でのみ生存することを報告しており、P-L fusion が促進されるか抑制されるかが病原性の大きな鍵になると考えている<sup>32)</sup>。結核菌はその感染に際して菌体表層に多量に脂質成分が含まれているため貪食されやすく、またいったんマクロファージ内に侵入すればこれら菌側の virulence factor により P-L fusion が抑制され殺菌機構から逃れて感染が成立するものと推察される。一方、結核菌は増殖速度が遅く(分裂に18-24時間を要する)、内毒素や外毒素を産生しないことも特徴であり、感染に際し宿主が即時に反応しないことも感染成立の要因となる。したがって、感染初期においては宿主の反応性と菌の毒力のバランスにより感染の進行が決定されると考えられる。

そこで、今回各糖脂質の食細胞に対する直接的な貪食活性に与える影響<sup>33)</sup>について検討した結果、TDMとTMMは phagocytosis、P-L fusion を共に抑制し、PATは phagocytosis を促進した。また、SLに関しては phagocytosis の促進と P-L fusion の顕著な抑制を示した。さらに、TDMとTMMには補体結合能があり、補体存在下では phagocytosis を促進することも確認されている(安田ら、未発表)。このように各糖脂質が貪食活性に影響を与えることは、結核感染の際にその感染性に寄与する重要な因子となると考えられる。実際に phagocytosis を促進することは、結核菌が細胞内に侵入しやすくすることであり、また、P-L fusion を抑制することは、結核菌が細胞内に侵入した後、宿主生体の殺菌機構から逃れ、細胞内寄生性細菌として増殖することを支持するものである。

以上、このように人型結核菌は遺伝的に極めて不均一で細胞表層脂質成分のみについてもその組成に大差があり、これら糖脂質が感染宿主に対する感染性・病原性に寄与しており、結核菌の virulence の実現に極めて重要な因子であることが示唆された。すでに述べられているように人から分離される結核菌株についても virulence の強さは極めて不均一で、強毒株から弱毒株に至る各種の菌株が得られており、強毒株には強酸性脂質が存在するのに対して弱毒株には存在しないことが指摘されている<sup>34)~36)</sup>。今後さらに糖脂質の分子構造がリンパ球やマクロファージの機能分化誘導に際し、どのようなシグナルを与え、どのような細胞内刺激伝達機構で免疫細胞を

活性化するののかについて検討を行い、結核感染の分子病理学的機構の解明に努めたいと考えている。

## 謝 辞

本稿を終えるにあたり、本研究に対し御懇切なる御指導、御校閲を賜りました恩師大阪市立大学医学部細菌学教室矢野郁也教授に深甚なる謝意を表します。また、御指導、御鞭撻を賜りました岡史朗助教授を始め細菌学教室の先生、諸先輩方に深く感謝致します。

## 文 献

- 1) Koch R: Die Aetiologie der Tuberkulose. Mitt. k. Gesundheitsamt. 1884; 2: 1-88.
- 2) Lederer E: Chemistry of mycobacterial cord factor and related natural and synthetic trehalose ester. The mycobacteria, a source book, part A, Kubica GP and Wayne LG, Marcel Dekker Inc., New York, 1984, 361-377.
- 3) Goren MB: Mycobacterial lipids: Selected topics. Bacteriol Rev. 1972; 36: 33-64.
- 4) Yamamoto K, Kakinuma M, Azuma I, et al.: Relationship of anti-tuberculous protection to lung granuloma produced by intravenous injection of synthetic 6-O-mycoloyl-N-acetylmuramyl-L-ananyl-D-isoglutamine with or without specific antigens. Immunology. 1980; 40: 557-564.
- 5) Kaneda K, Sumi Y, Yano I, et al.: Granuloma formation and hemopoiesis induced by C<sub>36-48</sub>-mycolic acid-containing glycolipids from *Nocardia rubra*. Infect Immun. 1986; 54: 869-875.
- 6) Bekierkunst A, Wang L, Lederer E, et al.: Immunotherapy of cancer with nonliving BCG and fractions derived from mycobacteria: role of cord factor (trehalose-6,6'-dimycolate) in tumor regression. Infect Immun. 1974; 10: 1044-1050.
- 7) Lepoivre M, Tenu JP, Petit JF, et al.: Antitumor activity and hydrogen peroxide release by macrophages elicited by trehalose diesters. J Immunol. 1982; 129: 860-866.
- 8) Orbach-Arbouys S, Tenu JP, Petit JF: Enhancement of in vitro and in vivo antitumor activity by cord factor (6,6'-dimycolate of trehalose) administered suspended in saline.

- Int Archs Allergy appl Immunol. 1983; 71: 67-73.
- 9) Azuma I, Kishimoto S, Petit JF, et al.: Adjuvanticity of mycobacterial cell walls. Jpn J Microbiol. 1971; 15: 193-197.
  - 10) Natsuhara Y, Oka S, Yano I, et al.: Parallel antitumor, granuloma-forming and tumor-necrosis-factor-priming activities of mycoloyl glycolipids from *Nocardia rubra* that differ in carbohydrate moiety: structure-activity relationships. Cancer Immunol Immunother. 1990; 31: 99-106.
  - 11) Fujita T, Sugimoto N, Yano I, et al.: Induction of interferons (INFs) and tumor necrosis factor (TNF) in mice by a novel glycolipid trehalose 2,3,6'-trimycolate from *Rhodococcus aurantiacus* (*Gordona aurantiaca*). Microbiol Immunol. 1990; 34: 523-532.
  - 12) Roach TIA, Barton CH, Blackwell JM, et al.: Macrophage activation: Lipoarabinomannan from avirulent and virulent strains of *Mycobacterium tuberculosis* differentially induces the early genes c-fos, KC, JE, and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ . J Immunol. 1993; 150: 1886-1896.
  - 13) Sueoka E, Nishiwaki S, Fujiki H, et al.: Activation of protein kinase C by mycobacterial cord factor, trehalose 6-monomycolate, resulting in tumor necrosis factor- $\alpha$  release in mouse lung tissues. Jpn J Cancer Res. 1995; 86: 749-755.
  - 14) Matsunaga I, Fujiwara N, Yano I, et al.: Relationship between induction of macrophage chemotactic factors and formation of granulomas caused by mycoloyl glycolipids from *Rhodococcus ruber* (*Nocardia rubra*). J Biochem. 1996; 120: 663-670.
  - 15) Ridell M, Wallerstrom G, Minnikin DE, et al.: A comparative serological study of antigenic glycolipids from *Mycobacterium tuberculosis*. Tubercle and Lung Disease. 1992; 73: 101-105.
  - 16) Takahashi T, Kazumi Y, Abe C, et al.: Restriction fragment length polymorphism analysis of epidemiologically related *Mycobacterium tuberculosis* isolates. Microbiol Immunol. 1993; 37: 289-294.
  - 17) Chaicumpar K, Fujiwara N, Yano I, et al.: Studies of polymorphic DNA fingerprinting and lipid pattern of *Mycobacterium tuberculosis* patient isolates in Japan. Microbiol Immunol. 1997; 41(2): 107-119.
  - 18) Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J Biol Chem. 1959; 226: 497-509.
  - 19) Dhariwal KR, Dhariwal G, Goren MB: Observations on the ubiquity of the *Mycobacterium tuberculosis* sulfatides in mycobacteria. Am Rev Respir Dis. 1984; 130: 641-646.
  - 20) Carlier J P, Sellier N: Gas chromatographic-mass spectral studies after methylation of metabolites produced by some anaerobic bacteria in spent media. J Chromatogr. 1989; 493: 257-273.
  - 21) Kaneda K, Naito S, Kusunose M, et al.: Determination of molecular species composition of C<sub>26</sub> or longer-chain  $\alpha$ -mycolic acids in *mycobacterium* spp. by gas chromatography-mass spectrometry and mass chromatography. J Clin Microbiol. 1986; 24: 1060-1070.
  - 22) Hartmann S, Minnikin DE, Portaels F, et al.: Fast atom bombardment mass spectrometry of mycobacterial phenolic glycolipids. Biol Mass Spectrom. 1994; 23: 362-368.
  - 23) Miyazaki Y, Oka S, Yano I, et al.: Stimulation and inhibition of polymorphonuclear leukocytes phagocytosis by lipoamino acids isolated from *Serratia marcescens*. FEMS Immunol Med Microbiol. 1993; 6: 265-272.
  - 24) Miyazaki Y, Oka S, Yano I, et al.: Stimulation of phagocytosis and phagosome-lysosome fusion by glycosphingolipids from *Sphingomonas paucimobilis*. J Biochem. 1995; 118: 271-277.
  - 25) Kaneda K, Imaizumi S, Yano I: Distribution of C<sub>22</sub>-, C<sub>24</sub>- and C<sub>26</sub>- $\alpha$ -unit-containing mycolic acid homologues in Mycobacteria. Microbiol Immunol. 1995; 39(8): 563-570.
  - 26) Daffe M, Papa F, David HL, et al.: Glycolipids of recent clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*: chemical charac-

- terization and immunoreactivity. *J Gen Microbiol.* 1989; 135: 2759-2766.
- 27) Daffe M, Lacave C, Kaneele G, et al.: Polyphthienoyl trehalose, glycolipids specific for virulent strains of the tubercle bacillus. *Eur J Biochem.* 1988; 172: 579-584.
- 28) Yano I: Structure analysis and granuloma-genic activities of mycolic acid-containing glycolipids in acid-fast bacteria. *Kekkaku.* 1988; 63: 191-204.
- 29) Falcone V, Bassey EB, Collins FM, et al.: Differential release of tumor necrosis factor- $\alpha$  from murine peritoneal macrophages stimulated with virulent and avirulent species of mycobacteria. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1994; 8: 225-232.
- 30) Swartz RP, Naai D, Yeager H Jr, et al.: Differences in uptake of mycobacteria by human monocytes: a role for complement. *Infect Immun.* 1988; 56: 2223-2227.
- 31) Schlesinger LS: Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. *J Immunol.* 1993; 150: 2920-2930.
- 32) Myrvik QN, Leake ES, Wright MJ; Disruption of phagosomal membranes of normal alveolar macrophages by the H37Rv strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *Am Rev Respir Dis.* 1984; 129: 322-328.
- 33) Spargo BJ, Crowe LM, Crowe JH, et al.: Cord factor ( $\alpha, \alpha$ -trehalose 6, 6'-dimycolate) inhibits fusion between phospholipid vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 737-740.
- 34) Good R C: Opportunistic pathogens in the genus *Mycobacterium*. *Ann Rev Microbiol.* 1985; 39: 347-369.
- 35) Middlebrook G, Dubos RJ, Pierce C: Virulence and morphological characteristics of mammalian tubercle bacilli. *J Exp Med.* 1947; 86: 175-187.
- 36) Bloch H: Studies on the virulence of tubercle bacilli. Isolation and biological properties of a constituent of virulent organisms. *J Exp Med.* 1950; 91: 197-218.