

原 著

非定型抗酸菌 *Mycobacterium avium-intracellulare* complex
血清型 4 型および 16 型特異ペプチド糖脂質抗原のヒト末梢血
単核細胞幼若化反応に対する抑制作用

福 井 淳 一

大阪市立大学医学部細菌学教室・泌尿器科学教室

SUPPRESSIVE EFFECT OF GLYCOPEPTIDOLIPID FROM
MYCOBACTERIUM AVIUM-INTRACELLULARE COMPLEX
SEROVAR 4 AND 16 ON BLASTOGENESIS OF
HUMAN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS

Jun-ichi FUKUI*

Mycobacterium avium-intracellulare complex (MAC) consists of 28 serotypes. Co-infection of several specific serotype strains with the advent of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) has been dramatically increasing in the past fifteen years, although the reason for this fact is not clearly understood. Since the cell surface lipid components of MAC impaired the capacity of human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) to proliferate, some particular glycopeptidolipid (GPL) with serologically specific carbohydrate chains are supposed to inhibit blastogenesis and to affect the immune response in MAC infection. In this study, we have investigated the effect of serovar 4 and 16 GPLs on the human PBMC function and cell mediated immunity. As the result, it was demonstrated that the percentage of viable cells was decreased prominently after the incubation of PBMC with the serovar 4 GPL. Blastogenic responses of PBMC to stimulation with the purified protein derivatives (PPD) were inhibited by the presence of GPL dose-dependently. In the case of stimulation with anti-CD3 antibody (a-CD3 Ab), blastogenic response of PBMC was suppressed markedly by GPL at the concentration of 175 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Flow-cytometric analysis demonstrated that the expression of interleukin-2 receptor alpha on a-CD3 Ab-stimulated T lymphocyte was markedly inhibited in the presence of GPL. Enzyme-linked immunosorbent assay showed that the production of interleukin-2 by a-CD3 Ab-stimulated PBMC was reduced dose-dependently after the incubation of PBMC with GPL. In these results, there was no remarkable difference between serovar 4 and serovar 16 GPLs. These results indicate that serovar 4 and 16 GPLs inhibit the cell mediated immunity and serovar 4 GPL can affect the viability of PBMC.

別刷り請求先：
福井 淳一
大阪市立大学医学部細菌学・泌尿器科学教室
〒545-0051 大阪市阿倍野区旭町1丁目5番7

* From the Department of Bacteriology and Urology,
Osaka City University Medical School, 1-5-7 Asahi-
machi, Abeno-ku, Osaka 545-0051 Japan.
(Received 7 Oct. 1997/Accepted 31 Oct. 1997)

Key words : *Mycobacterium avium-intracellulare* complex, Glycopeptidolipid, lymphoblastogenesis, IL-2, IL-2 receptor α

キーワード : 非定型抗酸菌, ペプチド糖脂質抗原, リンパ球幼若化反応, インターロイキン2, インターロイキン2レセプターアルファ

序 文

結核をはじめとする抗酸菌感染症は第二次世界大戦後順調に減少してきたが、近年世界的にその減少傾向が鈍化し再び増加に転じたところも認められている。1980年代より結核菌以外の類似抗酸菌である非定型抗酸菌のうち *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC) 感染症が HIV 感染症の晩期合併症として欧米を中心に著増し¹⁾、特に血清型4型菌については、合併頻度が高く化学療法剤に対する感受性が極めて低いことから、予後への影響が憂慮されている²⁾。

一方、MAC菌の日見病原性とその感染機構については未知の点が多いが、MAC菌体脂質がリンパ球幼若化反応を抑制することより、MAC菌体に特異的な脂質が細胞性免疫の抑制に関与するのではないかと考えられている³⁾。同様に血清型特異的糖鎖構造を有するペプチド糖脂質 glycopeptidolipid (GPL) が細胞性免疫に対して血清型特異的に影響する可能性が考えられる。そこで本研究では血清型4型および16型 GPL を単離精製し、これをヒト末梢血単核球に加えて培養し、細胞性免疫反応への影響を検討した。

研究材料および方法

1. 菌の培養

MAC菌の培養は Middle brook 7H9 培地に glycerol およびアルブミンを加えた 7H9 broth 液体培地で行い、American Type Culture Collection より入手した MAC 標準菌株血清型4型および血清型16型を37℃で約3週間振盪培養した。

2. GPLの抽出および精製

培養後オートクレーブにて滅菌し遠心分離にて沈殿させた菌体を、20倍量 (w/v) のクロロホルムとメタノール (2:1, v/v) 混合溶媒中で、超音波ホモゲナイザー (Branson Sonic Power Co.) により十分破碎した。菌体重量の30倍に相当する容量の溶媒に懸濁後、少量の水を加えて分液ロート内で2層分配し、下層の溶解脂質を濃縮乾固させ総脂質とした。

総脂質を0.5 N NaOH 含有メタノールにより弱アルカリ水解 (37℃, 1時間) した後、少量の酢酸を添加し pH を中性とした。再び2層分配し有機溶媒層を濃縮乾固して得られたアルカリ安定脂質を20cm×20cmのシリ

カゲル薄層クロマトグラフィープレート (TLC plate)(UNI-PLATE; Analtech, Delaware, NJ) 上でクロロホルム:メタノール:水 (60:16:2, v/v/v) の混合溶媒にて展開した。

展開後に50%硫酸を噴霧し3-4分間180℃に保つと GPL のバンドが黄金色を呈して出現することを目印にし、スポット位置を確かめるとともに、調整用にはヨード蒸気で発色位置を確認後 TLC plate からシリカゲルごと GPL を回収し、少量のシリカゲルカラムを通してクロロホルム:メタノール (2:1, v/v) の混合溶媒で抽出した。以上の精製はサンプルが TLC plate 上で単一バンドになるまで繰り返された。

3. 質量分析による GPL の同定

精製単離した GPL (10 μ g) はニトロベンジルアルコール:トリエチレングリコールモノ-N-ブチルエーテル (1:1, v/v) をマトリックスとして JEOL-SX-102A型二重収束高分解能質量分析計 (日本電子) により fast atom bombardment-mass spectrometry を行い、各血清型特異 GPL の分子量および糖の結合位置を同定した。

4. GPL のコーティング

エタノールに溶解した血清型4型および16型 GPL (0.10・25・35 μ g/well) を96穴マイクロプレート (Falcon; Becton Dickinson and Co., Lincoln Park, NJ) に加え、クリーンベンチ内で約5時間室温乾燥させコーティングした。1 well 当たりのエタノール量を統一し対照はエタノールのみとした。

5. 末梢血単核細胞 (PBMC) 浮遊液の調製

ツベルクリン反応陽性健康人5人から得られたヘパリン化末梢静脈血を Hanks 液にて倍数希釈し、Ficoll (Lymphoprep; NYCOMED) を用いた遠心分離により PBMC を回収した。PBMC は非働化10%ヒト血漿含有 RPMI 1640液に浮遊させた。

6. 細胞培養

細胞培養は CO₂ incubator (5% CO₂, 37℃) にて行った。

7. 細胞毒性の検討

4型および16型 GPL を8穴マイクロプレート (Falcon) にコーティングし、PBMC 浮遊液 (5×10⁵/ml, 500 μ l/well) を加えて3日間培養した。GPL 濃度は0 (エタノールのみ), 50, 125, 175 μ g/ml とし培養後

trypan blue 染色により生細胞数をカウントした。

8. リンパ球幼若化反応

リンパ球刺激は、MAC 菌蛋白 Purified Protein Derivatives (PPD) および抗 CD3 抗体 (Becton Dickinson) の添加により行い、PPD は国立予防衛生研究所芳賀伸治先生より寄贈していただいた。刺激濃度を決定するにあたり、刺激物質の純度を考慮のうえ数種類の濃度を検討し、GPL 非存在下に対象者全員の PBMC を刺激した。すなわち各個体差の影響を軽減しかつ十分な反応が得られる最低刺激濃度および刺激時間を設定した。

その結果 PPD 刺激の系では刺激濃度 $100\mu\text{g/ml}$ にて抗生剤存在下 7 日間培養する条件 (PBMC $5 \times 10^4/\text{well}$, $200\mu\text{l}/\text{well}$)、抗 CD3 抗体刺激の系では刺激濃度 $0.06\mu\text{g/ml}$ にて 3 日間培養する条件 (PBMC $1 \times 10^5/\text{well}$, $100\mu\text{l}/\text{well}$) がそれぞれ最適と考えられた。PBMC は GPL と 2 時間前培養後それぞれの系で刺激され培養終了 18 時間前に ^3H -thymidine を添加しハーベストした。取り込まれた放射性活性を液体シンチレーションカウンターにて測定 (count/minute) し、平均土標準誤差を求めた。

9. IL-2 receptor α および Human Lymphocyte Antigen-DR (HLA-DR) 発現および IL-2 産生の検討

PBMC と GPL を 2 時間培養した後に抗 CD3 抗体にて 20 時間刺激し、T リンパ球上に発現する IL-2 receptor α および HLA-DR 発現量を flow cytometry により定量した。

培養 PBMC は培養後 PBS (pH 7.4) で洗浄し、Fluorescein 結合抗 CD3 抗体 (Becton Dickinson)、Phycoerythrin 結合抗 CD25 抗体 (Becton Dickinson) および抗 HLA-DR 抗体 (Becton Dickinson) にて染色後 1% Formaldehyde により固定し、Facsan (Becton Dickinson) にて解析した。

また IL-2 濃度は培養上清を滅菌フィルターに通した後、免疫酵素抗体法 (Quantikine; Research and Diagnostic Systems) により測定した。

10. 統計学的検討

結果の統計解析は paired Student's *t* test (両側検定) により危険率 5% 未満をもって統計学的有意差とみなした。

結 果

1. GPL の単離

精製単離した GPL は、TLC plate 上 4 型および 16 型特有の Rf 値を示し、50% 硫酸噴霧後 180°C 加熱にて GPL 特有の黄金色を呈した。Positive fast atom bombardment-mass spectrometry では、いずれも

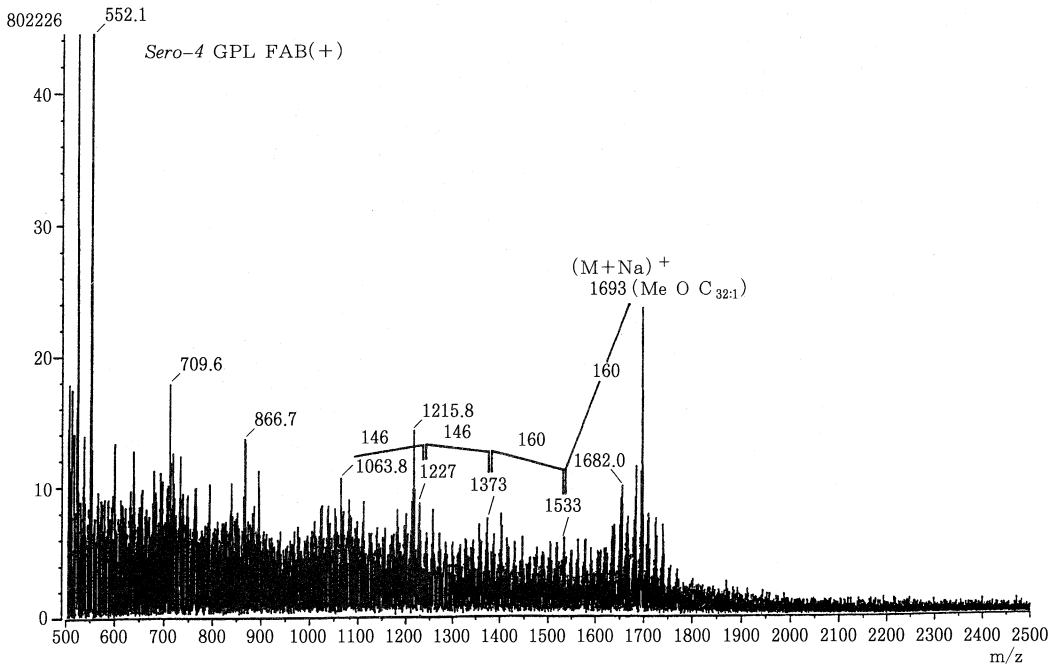


Fig. 1 Positive FAB-MS Spectrum of Glycopeptidolipid from Serovar 4 MAC

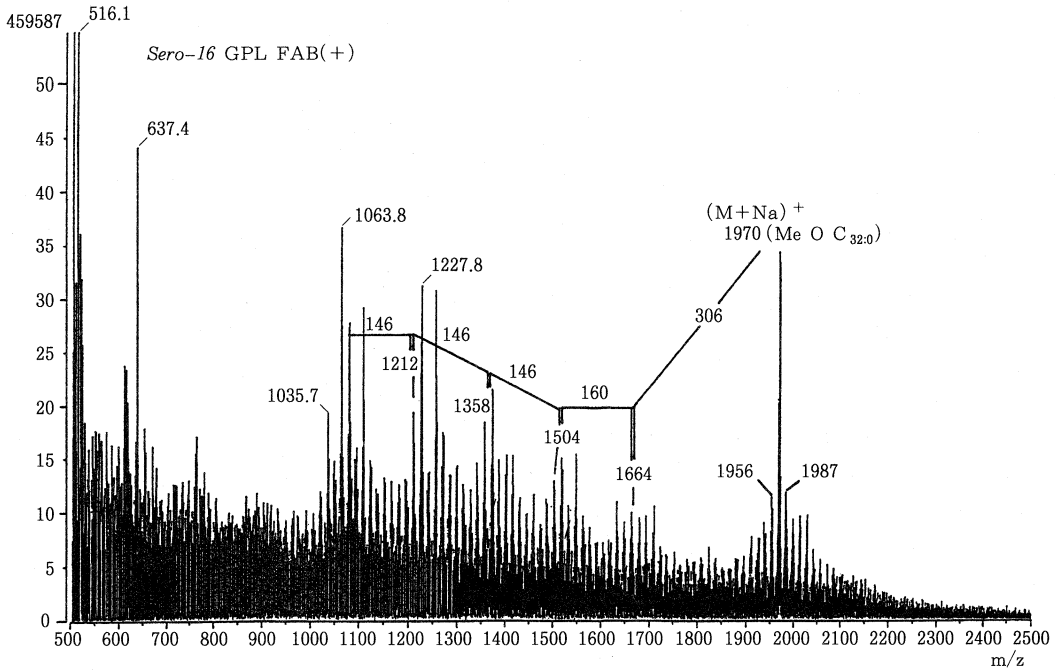


Fig. 2 Positive FAB-MS Spectrum of Glycopeptidolipid from Serovar 16 MAC

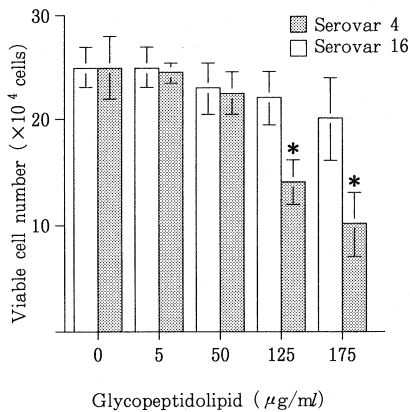


Fig. 3 Effect of serovar-specific GPLs on viable cell number evaluated by trypan blue exclusion test.

Data are expressed as means \pm standard error. (n=5)

*p<0.01 vs. control

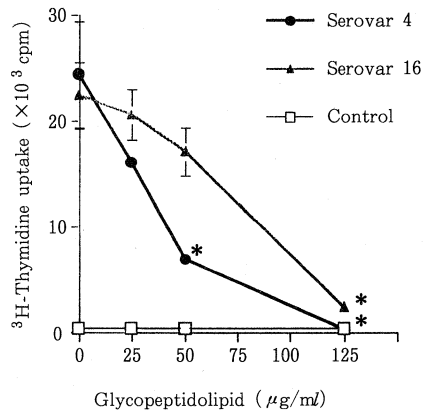


Fig. 4 Effect of serovar-specific GPLs on ^3H -thymidine uptake of PBMC stimulated with PPD.

Control: PBMC was cultured without GPL. Data are expressed as mean \pm standard error. (n=5)

*p<0.05 vs. control

C32メトキシ脂肪酸を含む分子種が中心であり、これに対応する疑似分子イオン $(\text{M}+\text{Na})^+$ は、4型では1693 (Fig. 1), 16型では1970にそれぞれ検出され (Fig. 2), 単離精製した GPL は高純度であると確認された。

4型は 4-O-methyl rhamnose, 2-O-methyl fucose, rhamnose および 6-deoxytalose を糖鎖とし、既知の GPL と構造が一致した¹⁾。16型は 3-(2' methyl-3'-hydroxy-4'-methoxy pentanoyl amido)-3, 6-

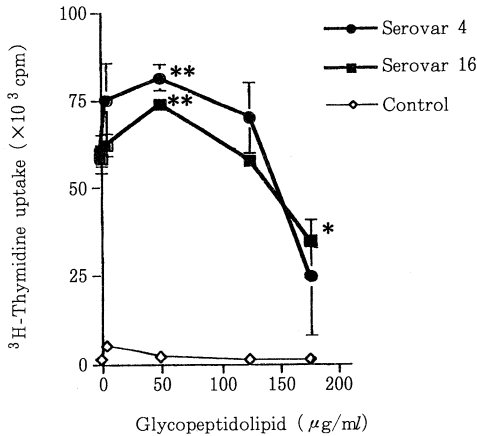


Fig. 5 Effect of serovar-specific GPLs on ³H-thymidine uptake of PBMC stimulated with anti-CD3 antibody. Data are expressed as mean ± standard error. (n=5)
Control: PBMC was cultured without GPL.
*p<0.05 vs. control, **p<0.01 vs. control

dideoxy hexose, 4-O-methyl rhamnose, rhamnose および 6-deoxy talose を糖鎖として含むことが明らかになった。

2. GPL の細胞毒性

GPL を含まない control 培養については、3 日間培養時の全細胞数は培養前とはほぼ同等で著しく減少することはなかったが、4 型 GPL を添加した場合の生細胞数は濃度依存的に減少し、対照と比較して 125 μg/ml 以上の各濃度において統計学的有意差 (p<0.01) を認めた。これに対し 16 型の場合、0 ~ 125 μg/ml の濃度で GPL の影響は軽度であり、対照と比較して統計学的有意差は認められなかった (Fig. 3)。

3. GPL のリンパ球幼若化反応に対する影響

PPD 抗原刺激による幼若化反応に対しては (Fig. 4)、4 型および 16 型いずれの GPL も濃度依存的に抑制し抑制程度は 4 型が 16 型よりも強く対照との比較では 4 型は 50 および 125 μg/ml にて統計学的有意差 (p<0.01) を認め、16 型は 125 μg/ml のみ有意差 (p<0.01) を認めた。

これに対し抗 CD3 抗体刺激の結果は (Fig. 5)、先の

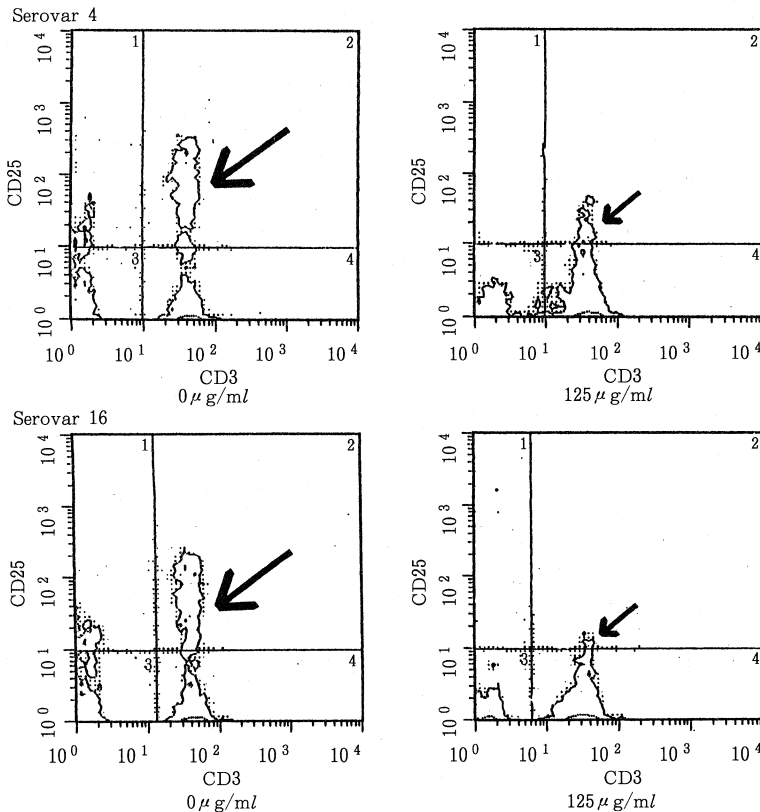


Fig. 6 Effect of serovar-specific GPLs on the expression of interleukin-2 receptor alpha on anti-CD3 antibody stimulated T cells. (n=3)

PPD 抗原刺激の場合とやや異なり、いずれの GPL においても $50 \mu\text{g/ml}$ 以下では ^3H -thymidine の取り込みはやや促進し、GPL を加えずに抗 CD3 抗体刺激のみの場合との比較で有意差 ($p < 0.01$) を認めた。しかし $50 \mu\text{g/ml}$ 以上では逆に抑制的に作用し、16型では $175 \mu\text{g/ml}$ にて有意差 ($p < 0.01$) を認めた。

また 4 型 GPL においても ^3H -thymidine の取り込みは減少したが、この点は先に検討した viability への影響が強く表生細胞数が減少したためではないかと考えられた。

以上より、GPL は PPD 抗原刺激だけではなく抗 CD3 抗体刺激に対してもリンパ球幼若化反応を抑制することが明らかとなった。

4. IL-2 産生および IL-2 receptor α と HLA-DR 発現に対する GPL の影響

抗 CD3 抗体刺激による CD3 陽性細胞中の IL-2 receptor α の発現については、GPL 50 および $125 \mu\text{g/ml}$ 存在下で receptor 発現量が対照と比べて明らかに抑制

される傾向が認められた。すなわち GPL $125 \mu\text{g/ml}$ の場合、4 型については対照の 7% まで抑制され、16型については対照の 10.3% まで抑制された。しかし血清型間の明らかな差異は認められなかった (Fig. 6)。

また、抗 CD3 抗体刺激による HLA-DR 発現は GPL 50, $125 \mu\text{g/ml}$ において軽度抑制される傾向が認められた。すなわち GPL $125 \mu\text{g/ml}$ の場合、4 型については対照の 30% まで抑制され、16型については対照の 38% まで抑制された。しかし血清型による明らかな差異は認められなかった (Fig. 7)。

抗 CD3 抗体刺激による IL-2 産生量は、4 型および 16 型のいずれにおいても $125 \mu\text{g/ml}$ 以下の範囲で産生が抑制されたが、この場合も血清型間の差異は認められなかった (Fig. 8)。

考 察

MAC は 3 種類の類縁性の高い抗酸菌 *M. avium*, *M. intracellulare* および *M. scrofulaceum* を含み血

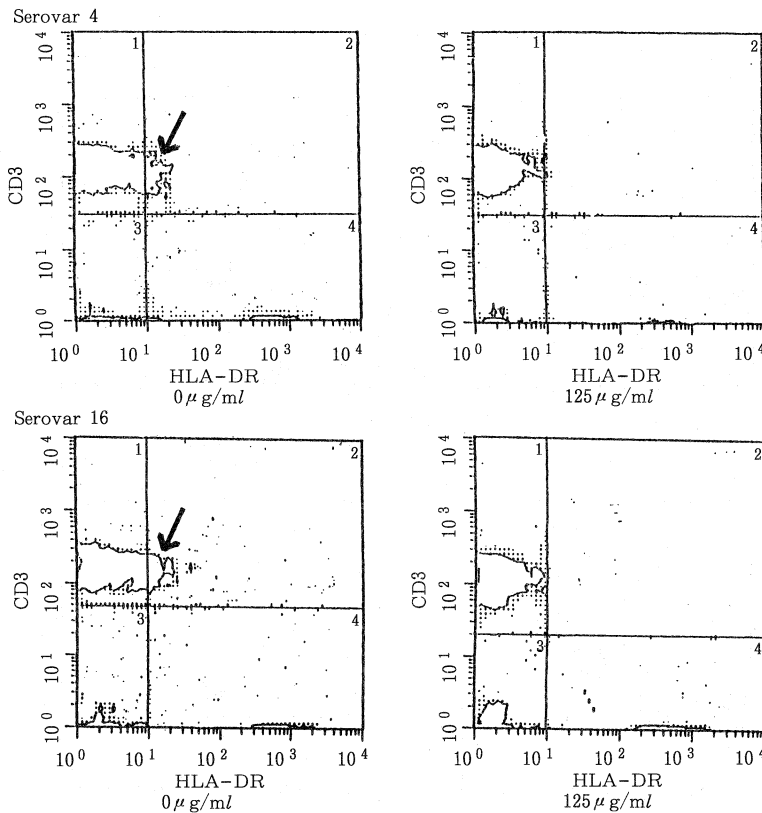


Fig. 7 Effect of serovar-specific GPLs on the expression of HLA-DR on anti-CD3 antibody stimulated T cells. (n=3)

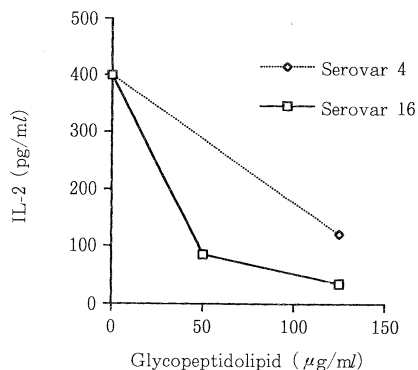


Fig. 8 Effect of serovar-specific GPLs on interleukin-2 production by anti-CD3 antibody stimulated PBMC. (n=3)

清型により28種の subspecies に分類されている⁴⁾⁵⁾。感染は人畜共通であり、以前はヒトの発症は少なかったが、1980年代前半より AIDS の晩期合併症として MAC 感染症は結核と並んで劇的に増加し²⁾、剖検にて AIDS 患者の約50%に MAC 感染が認められている⁷⁾。

AIDS 患者から分離される血清型には偏りがあり、欧米では *M. avium* に属する1型、4型、8型などが多く、なかでも4型菌の分離は高頻度であり^{7)~9)}、米国における AIDS 患者180例の喀痰培養の結果では、約50%に4型菌が検出されている¹⁾。

MAC 感染における細胞性免疫反応については、感染者のリンパ球幼若化反応の抑制および IL-2 産生能低下¹⁰⁾や、菌体および菌体脂質によるリンパ球幼若化反応の顕著な抑制³⁾などが報告されており、MAC 感染において細胞性免疫反応が低下する原因の一つとして MAC 菌体脂質が重要な役割を演ずると指摘されている。

本研究では菌体表層脂質の一部である GPL について検討し、特に4型および16型 GPL にリンパ球幼若化反応に対する抑制作用が認められ、MAC 感染により惹起される細胞性免疫の抑制には GPL が関与している可能性を示唆した。

ところで、リンパ球幼若化反応に対する GPL の研究は、*M. avium* に属する4型^{11)~14)}および *M. intracellulare* に属する14型¹⁵⁾についていずれもマウス脾細胞に対する concanavalin A および phytohemagglutinin 刺激に対する影響が検討されている。Barrow らは GPL を糖鎖部と糖鎖部以外の β -lipid に分けて検討した結果、抑制活性部位は β -lipid に存在し GPL および糖鎖部には認められなかったと報告している^{12)~14)}。しかし β -lipid の化学構造は MAC 28種す

べてにおいて共通しており、分離頻度の血清型間での偏りや病原性に関する差異の原因を β -lipid に求めることは困難である。むしろ血清型による明らかな構造的差異は糖鎖部分に認められ、糖鎖部分が免疫反応抑制の相違に関与している可能性が高い。

以上の観点から、本実験においては糖鎖構造を含む GPL について検討し、また T リンパ球の刺激物質については既報告において未検討である PPD 抗原および抗 CD3 抗体を検討した。また MAC 感染者において産生が抑制される IL-2¹⁰⁾に与える影響を調べ、IL-2 産生時に T リンパ球上に発現する IL-2 receptor α 鎖 β 鎖 γ 鎖のうち活性化 T リンパ球上に著しく発現する α 鎖および HLA-DR の発現を検討した。

その結果、血清型4型および16型 GPL は PPD 刺激によるヒトリンパ球幼若化反応を抑制し、抗 CD3 抗体刺激の結果では濃度50 μ g/ml においてリンパ球幼若化反応がやや促進されながらも、これより高濃度においては顕著に抑制された。この結果が既報告^{12)~14)}と異なった原因は不明であるが、GPL 精製純度の相違が GPL 濃度の差異として影響した可能性が考えられた。

本検討ではリンパ球幼若化反応の抑制機序は解明されなかったが、GPL は IL-2 産生を低下させ T リンパ球上の IL-2 receptor α および HLA-DR の発現を抑制した。MAC 菌体粗脂質は抗原提示細胞を介して作用する³⁾ことから、同様に本検討においても GPL がモノサイトに影響することで、モノサイトを介して T リンパ球の IL-2 産生が影響された可能性が考えられた。

結 語

1) 非定型抗酸菌 *Mycobacterium avium*-*intracellulare* complex 血清型4型および16型特異ペプチド糖脂質抗原 glycopeptidolipid (GPL) を単離精製し、ヒト末梢血単核細胞 (PBMC) に対する作用を検討した。

2) GPL の PBMC に対する細胞毒性は血清型4型に著しく認められたが、16型では顕著ではなかった。

3) PPD 抗原刺激によるリンパ球幼若化反応は、GPL 0~125 μ g/ml において濃度依存的に抑制された。

4) 抗 CD3 抗体刺激時の ³H-thymidine の取り込みは GPL 50 μ g/ml にて促進され、それ以上の濃度で抑制された。

5) 抗 CD3 抗体刺激時の T リンパ球上の IL-2 receptor α および HLA-DR の発現は GPL により抑制される傾向を示した。また抗 CD3 抗体刺激 T リンパ球の IL-2 産生も GPL の濃度依存的に抑制される傾向がみられた。

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、御校閲を頂きました大阪市立大学細菌学教室 矢野郁也教授に謝意を捧げ、また多大な御指導、御鞭撻を賜ったうえ貴重な御協力を頂いた大阪府立羽曳野病院 露口泉夫博士、上田千里博士、同院第一研究室 川澄浩美氏に深甚なる謝意を捧げます。また大阪市立大学泌尿器科学教室 前川正信名誉教授および岸本武利教授に厚く感謝します。

なお、本論文の要旨は第70回日本結核病学会総会(1995年、名古屋)にて発表した。

文 献

- 1) McNeil M, Tsang AY, Brennan PJ: Structure and antigenicity of the specific oligosaccharide hapten from the glycopeptidolipid antigen of *Mycobacterium avium* serotype 4, the dominant *Mycobacterium* isolated from patients with acquired immune deficiency syndrome. *J Biol Chem.* 1987; 262: 2630-2635.
- 2) Horsburgh CR Jr, Selik RM: The epidemiology of disseminated nontuberculous mycobacterial infection in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Am Rev Respir Dis.* 1989; 139: 4-7.
- 3) Tsuyuguchi I, Kawasumi H, Takashima T, et al.: *Mycobacterium avium*-*Mycobacterium intracellulare* complex-induced suppression of T-cell proliferation in vitro by regulation of monocyte accessory cell activity. *Infect Immun.* 1990; 58: 1369-1378.
- 4) Schaefer WB: Serologic identification and classification of the atypical mycobacteria by their agglutination. *Am Rev Respir Dis.* 1965; 92 (Suppl): 85-93.
- 5) Wolinsky E, Schaefer WB: Proposed numbering scheme for mycobacterial serotypes by agglutination. *Int J Syst Bacteriol.* 1973; 23: 182-183.
- 6) Nightingale SD, Byrd LT, Southern PM, et al.: Incidence of *Mycobacterium avium*-*intracellulare* complex bacteremia in human immunodeficiency virus-positive patients. *J Infect Dis.* 1992; 165: 1082-1085.
- 7) Armstrong D, Gold JW, Dryjanski J, et al.: Treatment of infections in patient with the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med.* 1985; 103: 738-743.
- 8) Crawford JT, Bates JH: Analysis of plasmids in *Mycobacterium avium*-*intracellulare* isolates from persons with acquired immunodeficiency syndrome. *Am Rev Respir Dis.* 1986; 134: 659-661.
- 9) Yakus MA, Good RC: Geographic distribution, frequency, and specimen source of *Mycobacterium avium* complex serotypes isolated from patients with acquired immunodeficiency syndrome. *J Clin Microbiol.* 1990; 28: 926-929.
- 10) Tsuyuguchi I, Shiratsuchi H, Okuda Y, et al.: An analysis of in vitro T cell responsiveness in nontuberculous mycobacterial infection. *Chest.* 1988; 94: 822-829.
- 11) Brownback PE, Barrow WW: Modified lymphocyte response to mitogens after intraperitoneal injection of glycopeptidolipid antigens from *Mycobacterium avium* complex. *Infect Immun.* 1988; 56: 1044-1050.
- 12) Tassel SK, Pourshafie M, Wright EL: Modified lymphocyte response to mitogens induced by the lipopeptide fragment derived from *Mycobacterium avium* serovar-specific glycopeptidolipids. *Infect Immun.* 1992; 60: 706-711.
- 13) Pourshafie M, Ayub Q, Barrow WW: Comparative effects of *Mycobacterium avium* glycopeptidolipid and lipopeptide fragment on the function and ultrastructure of mononuclear cells. *Clin Exp Immunol.* 1993; 93: 72-79.
- 14) Barrow WW, Sousa JPC, Davis TL: Immunomodulation of human peripheral blood mononuclear cell functions by defined lipid fractions of *Mycobacterium avium*. *Infect Immun.* 1993; 61: 5286-5293.
- 15) Pourshafie MR, Davis SA, Sonnenfeld G: Cellular interactions of murine immune cells exposed to live *Mycobacterium intracellulare*, its whole lipid extract, and its serovar-specific glycopeptidolipid. *Cell Immunol.* 1994; 155: 11-26.