

原 著

非定型抗酸菌 *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC)
血清型16型特異ペプチド糖脂質抗原 (GPL) の構造解析とその抗原性

西 川 慶一郎

大阪市立大学医学部細菌学・泌尿器科学教室

STRUCTURE AND ANTIGENICITY OF THE GLYCOPEPTIDOLIPID ANTIGEN OF
MYCOBACTERIUM AVIUM-INTRACELLULARE COMPLEX (MAC) SEROVAR 16

Keiichiro NISHIKAWA*

The characteristic lipids and specific surface antigens which typify serotypes of *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC) serogroup have been examined. The characteristic lipids are recognized as glycopeptidolipid (GPL) antigen consisted of short-chain acylated oligosaccharides linked to long-chain fatty acyl-D-Phe-D-allo Thr-D-Ala-L-alaninol-O-3, 4-di-O-methyl rhamnose 'core'. The lack of information on the properties of GPL antigen from serovar 16 and a large number of patients infected with MAC serovar 16 have prompted an examination of the chemical structures utilizing the analytical techniques of alditol acetates with GC or GC/MS, and making use of FAB/MS and ¹H-NMR to analyze the intact GPLs. The following structure of serovar 16 GPL antigen was proposed with molecular weight: 1933, main fatty acyl component: OH-C32:0, and oligosaccharides:

3-amido (2'-methyl, 3'-hydroxy, 4'-methoxy pentanoyl) 3, 6-dideoxy hexose → 4-O-methyl-L-rhamnose → L-rhamnose → L-rhamnose → 6-deoxy-L-talose

The unique structure may be an important factor in physiological and pathological roles. The GPL antigens were highly reactive in ELISA against sera from rabbits hyperimmunized with MAC strains, indicating its basic antigenicity. The type-specific antigen of serovar 16 was also specifically reactive against sera from patients infected with MAC serovar 16, but invariant core was not. Apparently, the epitope of GPL antigen of serovar 16 was specific oligosaccharides, 3-amido (2'-methyl, 3'-hydroxy, 4'-methoxy pentanoyl) 3, 6-dideoxy hexose. It was found that the ELISA using GPL antigens was particularly useful for the serovar diagnosis of human infections with MAC.

Key words : *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC), Serovar 16, Glycopeptidolipid (GPL), FAB/MS, ELISA

キーワード : *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC), 血清型16型, 特異ペプチド糖脂質抗原, ソフトイオン化質量分析法, 酵素免疫吸着測定法

別刷り請求先:
西川慶一郎
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1-4-54

* From the Department of Bacteriology and Urology,
Osaka City University Medical School, Asahimachi 1-
4-54, Abeno-ku, Osaka 545-0051 Japan.
(Received 27 Oct. 1997/Accepted 19 Dec. 1997)

緒言

近年、抗酸菌が再び感染症の中で重要な位置をしめてきており、非定型抗酸菌による感染症が増加の傾向にある。なかでも *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC) は、ヒトから分離される非定型抗酸菌の70%以上を占めることが明らかにされており¹⁾²⁾、欧米においては最近 AIDS における日和見感染の主要な原因菌として注目されており^{3)~5)}、本邦においても近年増加傾向を認めている⁶⁾。

MAC は Schaefer による凝集反応抗原により20以上の亜種に細分されており、現在までに28種の血清型が報告されている⁷⁾⁸⁾。AIDS においては特定の血清型、特に4型による感染頻度が高く、本邦では血清型1型、4型および16型の分離頻度が多いことなど、血清型とビルレンスの関係が論じられている。しかし、MAC は遅発育菌の中で Runyon 分類第Ⅲ群の菌(非光発色菌 non-photocromogens)に属し、分離培養には長時間を要するため菌種や血清型の同定は困難を極める。

Brennan ら^{9)~11)} は非定型抗酸菌症の疫学的検索の際、薄層クロマトグラフィー (TLC) 等による抗原糖脂質の分析および血清学的診断の必要性を強調しており、血清型特異ペプチド糖脂質抗原 (glycopeptidolipid, GPL) の構造分析が重要であるとして、それらの構造を明らかにしつつある。しかし未だ多くの GPLs の構造は不明であり、構造決定が望まれている。また血清型を凝集反応や TLC プレート上の GPLs の Rf 値のみで決定することは困難な場合があり、ヒトや動物からの分離菌株より GPLs を抽出し分析する方法で血清型決定が行われてきたが、多大な時間を費やすため迅速かつ正確な診断法が望まれていた。

Ikawa ら¹²⁾¹³⁾ は、動物(特にブタ)において従来とは異なり、標準菌より単離精製した GPLs を抗原として用いた ELISA 法による血清型の迅速診断法の有用性を報告しており、ヒトにおける迅速診断法への応用の可能性が示唆されていた。

そこで、MAC のなかで本邦において比較的分離頻度が高く、抗原構造が未だ明らかなでない血清型16型 GPL の構造決定を従来の方法および新たに intact GPL をソフトイオン化質量分析法 (fast atom bombardment mass spectrometry, FAB/MS) で分析し、その糖鎖構造を同定し、ヒトから分離される MAC について、標準菌 GPLs と患者血清を用いた ELISA 法により、血清型16型 GPL を中心に反応性を検討した。その結果、ヒト MAC 感染症において血清型16型 GPL は16型患者血清とのみ特異的に反応することが明らかとなり、ヒトに応用できることが示唆されたので報告する。

実験材料および方法

1. 抗酸菌の培養および GPL の調製

MAC 菌株は ATCC 由来の標準菌を用いた。血清型4型 (ATCC 35767)、血清型6型 (ATCC 35773)、血清型9型 (ATCC 35774)、血清型12型 (ATCC 35762)、血清型14型 (ATCC 35761)、血清型16型 (ATCC 13950)、血清型17型 (ATCC 35763) のそれぞれを 7H₉ broth および Dubos の液体培地で 37℃ 2-3 週間振盪培養し集菌した。集菌後、菌体からクロロホルム:メタノール (2:1, v/v, 20ml/g) で室温で18時間脂質を抽出し、その脂質を 0.2 N 水酸化ナトリウム加メタノールで 37℃、60分間水解し酢酸で pH を修正した。

次に TLC プレート (Uniplate, 20×20cm, 0.25mm: Analtec, Inc., Delaware, U. S. A.) 上でクロロホルム:メタノール:水 (60:16:2, v/v) を展開溶媒として展開し、ヨード蒸気にさらして発色させた後、GPL を TLC プレートから回収しクロロホルム:メタノール (2:1, v/v) で抽出単離した。展開したスポットは風乾後50%硫酸を噴霧して180℃で加温発色し、各標準 GPL の Rf 値を呈色反応(黄褐色-黒褐色)にて確認した。

2. GPL の糖組成の分析

抽出単離した GPL を 2 M 3 フッ化酢酸中で 80℃ 60分-120℃ 2時間の間で条件を変え水解し、NaBH₄ または NaBD₄ で 25℃ 14時間還元後、無水酢酸または重水素置換無水酢酸およびピリジン (1:1, v/v) 中でアセチル化し、生じた alditol acetate を 1.8 m キャピラリーカラム TM-2380 (Spelco, Bellefonte, PA) を固定相としたガスクロマトグラフィー (GC)、ガスクロマトグラフマスマスペクトロメトリー (GC/MS) にかけて 150-220℃ (1℃/min) の昇温分析により同定した。なお GC/MS に関しては化学イオン化法 (Chemical ionization, CI) および電子衝撃イオン化法 (Electron impact, EI) を用いて検討した。

3. GPL の脂肪酸の分析

抽出単離した GPL を 0.5% 塩酸メタノールに溶解し、100℃ 3時間加熱してメチルエステル化した。脂肪酸メチルエステルは GC/EI/MS にかけて 170-250℃ (1℃/min) の昇温分析により同定した。

4. GPL の全体構造の分析

抽出単離した GPL (1-2 μg) を 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 matrix とし、JEOL-SX-102型二重収束高分解能質量分析計 (Tokyo, Japan) を用い intact のまま FAB/MS 分析により同定した。

5. GPL の NMR 分析

抽出単離した GPL を重水素置換メタノールで溶解洗浄後濃縮乾固し、重水素置換クロロホルム：重水素置換メタノール (1:1, v/v) に溶解後、Nicolet NT-360 を用い ^1H -NMR 分析により同定した。

6. β -elimination 法による不完全 GPL の調製

抽出単離した GPL をエタノールに溶解し 1N-NaOH, D_2O および NaBH_4 を加え 60°C 14 時間水解し酢酸で中和し濃縮乾固後、クロロホルム：水 (1:1, v/v) に溶解し 1400 G, 10 分間遠心後クロロホルム層より不完全 GPL を抽出した。なお構造は FAB/MS により同定した。

7. 標準菌免疫家兎血清の調整

Good ら¹⁴⁾の方法に従い各血清型標準死菌を 525nm で OD 0.3 になるようにリン酸緩衝生理食塩水に浮遊し、各 0.2ml-1.0ml ずつ計 5 回、2 羽の家兎耳静脈に接種し凝集価が血清稀釈 320 倍以上の力価となったことを確認した後採血した。

8. ELISA 法による血清抗体価の測定

ELISA は Yanagihara ら¹⁵⁾の方法に従って行った。

すなわち MAC の標準菌から抽出単離した GPLs をエタノールで 0.1mg/ml となるように溶解し、各 well に $25\mu\text{l}$ または $10\mu\text{l}$ ずつ入れ一晩 4°C で風乾させた。次に標準菌で免疫した家兎血清または臨床分離菌より抽出した GPL の TLC, GC および FAB/MS 分析により血清型 16 型と診断された感染患者血清を Tween-20 加リン酸緩衝液で稀釈後 $50\mu\text{l}$ ずつ各 well に加え 37°C 30 分間反応させ 2 次抗体 (抗兎 IgG 抗体, 抗ヒト IgM 抗体および抗ヒト IgG 抗体, 500 倍稀釈) を $50\mu\text{l}$ 加え、

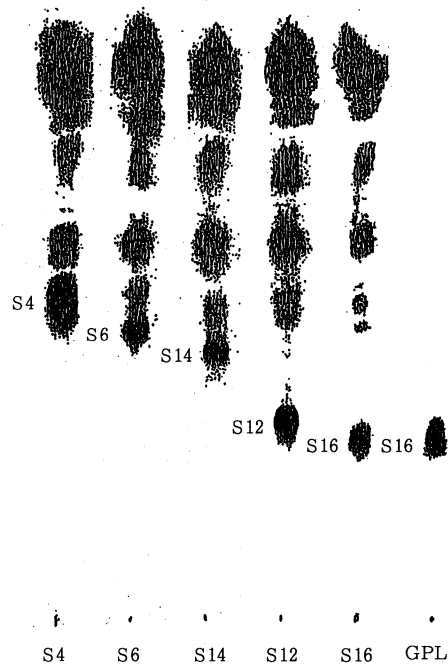


Fig. 1 Thin layer chromatograms (TLC) of alkali stable lipids from some serovars in MAC. Plate was developed with a solvent system of chloroform-methanol-water (60:16:2, v/v) and was charred after spraying with 50% H_2SO_4 . Numbers on the TLC spots show type specific glycopeptidolipid antigens.

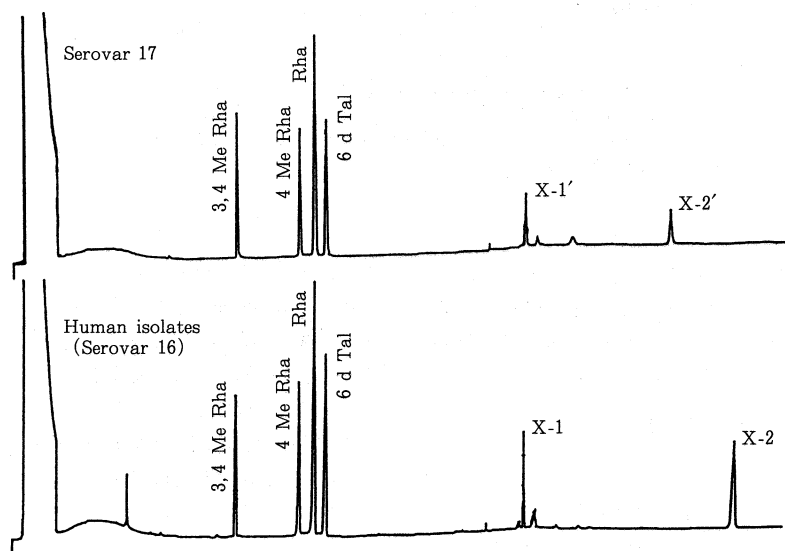


Fig. 2 Gas chromatograms (GC) of alditol acetates of GPLs from MAC serovar

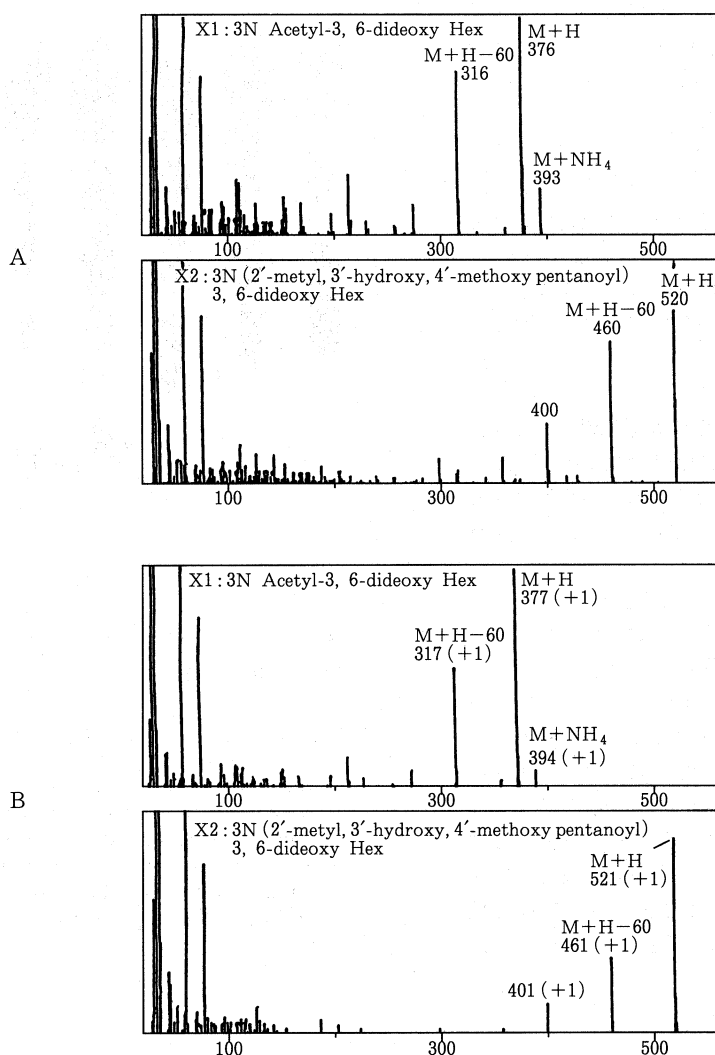


Fig. 3 GC/CI/MS of alditol acetates of MAC serovar 16 GPL antigen.

A: reduced by NaBH_4 and acetylated by $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{O}$

B: reduced by NaBD_4 and acetylated by $(\text{CD}_3\text{COO})_2\text{O}$

Ionization by NH_3 gas.

さらに45分間反応後基質 ($0.2\text{N Na}_2\text{HPO}_4 + 0.1\text{M}$ クエン酸 + O -フェニレンジアミン $10\text{mg} + \text{H}_2\text{O}_2$ $10\mu\text{l}$) を $50\mu\text{l}$ 加え ELISA Reader (コロナ MTP-100) にて吸光度 (OD: $492\text{--}630\text{nm}$) を測定した。

結 果

1. TLC パターン

GPL は脂肪酸, ペプチドおよび糖鎖よりなり血清型で糖鎖構造は異なる。TLC 上は糖鎖の極性の違いにより種々の R_f 値を示し, R_f 値により血清型の推測が可

能であるが, R_f 値が近似するものでは一種の溶媒のみでは血清型の同定は困難であった (Fig. 1)。

2. 血清型16型 GPL の構造同定

1) 血清型16型 GPL の糖組成

(1) GC 分析の結果

血清型16型 GPL を水解後アセチル化し生じた alditol acetate を GC で分析したところ (Fig. 2), モル比 $1:1:2$ で共通糖成分である 3, 4-di-O-methyl rhamnose, 6-deoxy talose, rhamnose のピークが検出され, 2 倍量の rhamnose を含むことが明らかと

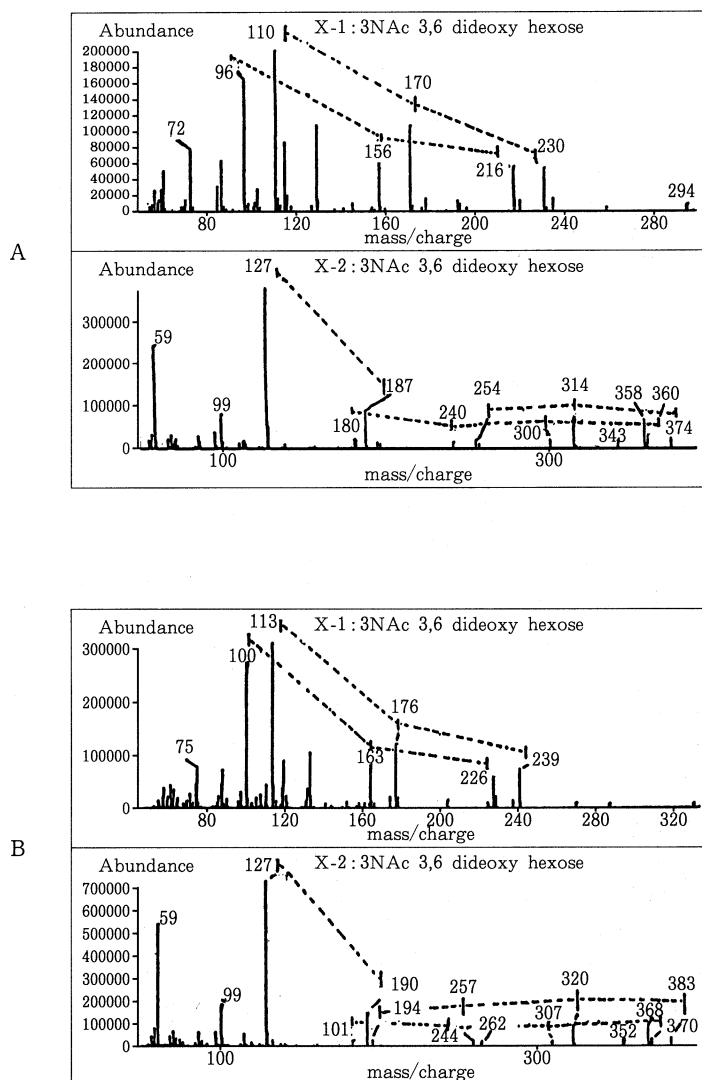


Fig. 4 GC/EI/MS of alditol acetates of MAC serovar 16 GPL antigen.

A: reduced by NaBH_4 and acetylated by $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{O}$

B: reduced by NaBD_4 and acetylated by $(\text{CD}_3\text{COO})_2\text{O}$

なった。さらに4-O-methyl rhamnoseと2つの未知糖(X-1, X-2)のピークも検出された。水解条件によりX-1とX-2の相対比が変化し、X-1はX-2の水解操作中の副産物でありX-2が本来の未知糖であることが明らかとなった。同時に行った血清型17型GPLのGC分析と比較したところ、末端糖のみが異なることが明らかとなった。

(2) GC/MS分析の結果

alditol acetateを NH_3 を反応ガスに用いてGC/CI/MSで分析したところ (Fig. 3), X-1の $(\text{M}+\text{NH}_4)^+$

は m/z 393, $(\text{M}+\text{H})^+$ は m/z 376に、X-2の $(\text{M}+\text{H})^+$ は m/z 520に検出され、X-1のアセチル化糖の分子量は375, X-2は519と同定された。またX-1とX-2の間には分子量144の差があること、またTLC上のRf値と糖組成が血清型17型GPLに類似することより、低級脂肪酸がN-アシル基として存在すると考えられた。

次にalditol acetateをGC/EI/MSで分析したところ (Fig. 4), X-1は還元末端、非還元末端両側より無水酢酸では60マスずつ、重水素置換無水酢酸では63マスずつの解裂を認めた。このことより3, 6-dideoxy

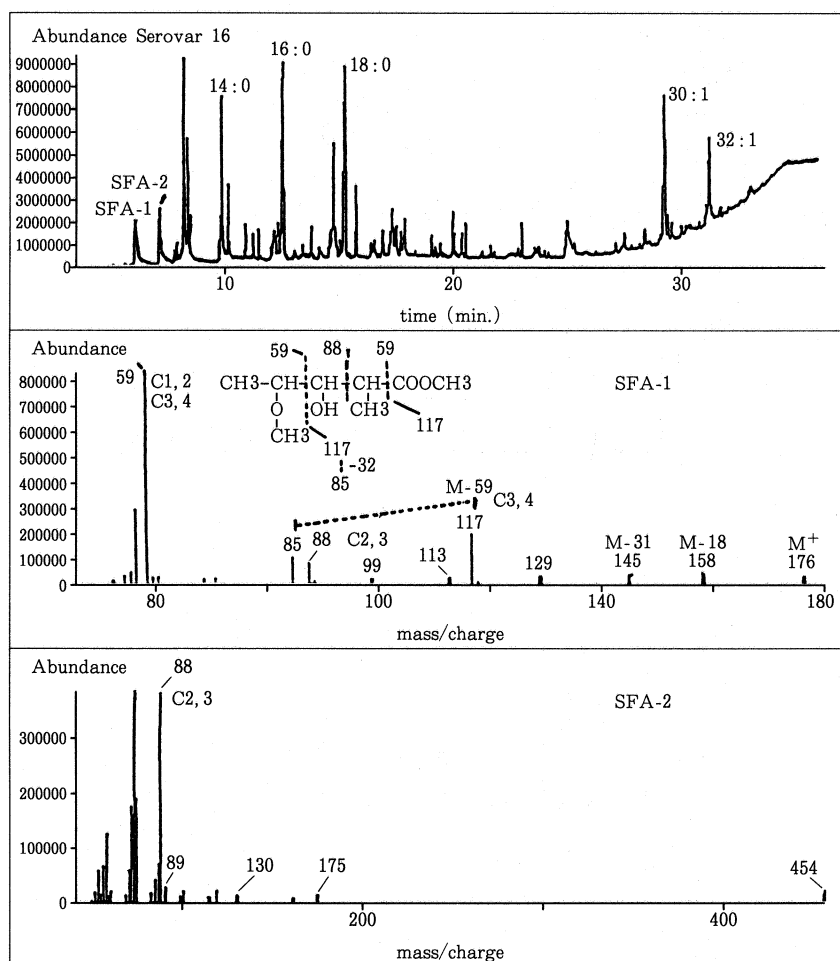


Fig. 5 GC/EI/MS of short-chain fatty acid methyl esters of MAC serovar 16 GPL antigen.

hexose であると考えられた。またアセチル化糖の疑似分子イオン $(M+H)^+$ が 376 であること、また血清型 17 型 GPL に類似することより X-1 は N を含み、C 3 位はアミド結合であると考えられた。また本来の未知糖である X-2 は同様に m/z 187 から 127 へ、 m/z 190 から 127 へ、60 あるいは 63 マスずつの解裂を認めた。このことより X-2 も N-アシルアミド糖で先の N-アシル低級脂肪酸には hydroxy 基が存在することが明らかとなった。また両条件下において m/z 59 が存在することより methoxy 基が存在すると考えられた。

(3) 脂肪酸分析の結果

GC/MS の分析結果より末端糖には低級脂肪酸部分が存在することが明らかとなったため、脂肪酸部分の炭素数を解析するため GPL のメチルエステル化脂肪酸を GC/EI/MS 分析したところ (Fig. 5), C14 より短鎖側

に SFA (short-chain fatty acid) -1 および SFA-2 が検出され、SFA-1 のマスピークより M^+ の m/z 176 が検出され、炭素数 5 の極性低級脂肪酸 ($C_5H_{10}O_4$) であることが明らかとなった。また M-59 の m/z 117 より 32 マス解裂した m/z 85, C 2 と C 3 で解裂した m/z 88 が認められた。このことより末端糖の N-アシル化低級脂肪酸は 2'-methyl, 3'-hydroxy, 4'-methoxy pentanoic acid と考えられた。このことより血清型 16 型 GPL の未知糖は、3-amido (2'-methyl, 3'-hydroxy, 4'-methoxy pentanoyl) 3, 6-dideoxy hexose であると同定された。

以上より血清型 16 型 GPL の糖鎖構造は、3-amido (2'-methyl, 3'-hydroxy, 4'-methoxy pentanoyl) 3, 6-dideoxy hexose $\rightarrow$ 4-O-methyl-L-rhamnose $\rightarrow$ L-rhamnose $\rightarrow$ L-rhamnose $\rightarrow$ 6-deoxy-L-

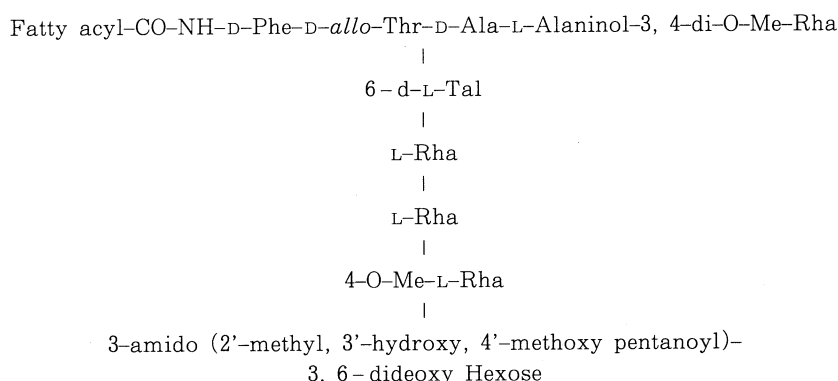


Fig. 6 Proposed structure of MAC serovar 16 GPL antigen.

talose と同定された (Fig. 6)。

2) 血清型16型 GPL の脂肪酸組成

先に行った血清型 GPL の脂肪酸分析より invariant lipid core (脂肪酸, peptido, 3, 4-di-O-methyl rhamnose) の主な脂肪酸組成は C30:1, C32:1 と同定された (Fig. 5)。

3) 血清型16型 GPL の全体構造

血清型16型 GPL を intact のまま negative FAB/MS で分析したところ (Fig. 7), GPL の分子イオンからプロトンが1分子離脱したと思われる $(M-H)^+$ が m/z 1932 に検出され, 糖鎖部分の非還元末端から, まず N-アシルデオキシ糖の解裂により 306 マス少ない m/z 1626 のピーク, 次に 4-O-methyl rhamnose の解裂により 160 マス少ない m/z 1466 のピーク, そして rhamnose の解裂により 146 マスずつ少ない m/z 1320, 1174 のピーク, さらに 6-deoxy talose の解裂により 146 マス少ない 1028 のピークがそれぞれ認められた。このことより invariant lipid core の脂肪酸は OH-C32:0 (一部 C32:1 および C34:0 も含む) であり, 水解後ガスクロマトグラフィーで分析して得た結果と一致した。

4) 血清型16型 GPL の $^1\text{H-NMR}$

血清型16型 GPL を $^1\text{H-NMR}$ 分析したところ (Fig. 8), 脂肪酸ピークが 1.0PPM に, 3 個の O-methyl 基にもとづくピークが 3.2-4.0PPM に, 5 個の糖ピークが 4.4-5.2PPM に認められた。また, 糖ピークのうち 1 個のピークは 2 倍量であることが明らかとなった。この結果は, 糖鎖構造の alditol acetate 分析および FAB/MS による解析で得られた結果と一致した。

3. 血清型16型不完全 GPL の構造

β -elimination 法で糖鎖を離脱した血清型16型不完全 GPL (β -eliminated GPL) は, negative FAB/

MS で分析したところ $(M-H)^+$ が m/z 1028 が検出され, 3, 4-di-O-methyl rhamnose の解裂による m/z 854 が認められた。このことより β -eliminated GPL は invariant lipid core であることが明らかとなった。

4. ELISA 法による MAC の血清型迅速診断

1) GPL と標準菌免疫家兎血清との反応性

単離精製した各 GPL を抗原とし Good らの方法で作成した標準菌免疫家兎血清を用いて血清希釈640倍において ELISA 法で反応性を調べたところ, 血清型 4 型, 9 型, 12 型および 17 型 GPL は homologous な血清とのみ反応し他の血清とはほとんど反応を認めなかった。これに対して今回構造解析した血清型16型 GPL は, 末端糖のみが構造の異なる血清型17型標準菌免疫家兎血清と非常に弱い交差反応を示したが, 他の GPL とは交差反応を示さず高い特異性があることが明らかとなった (Fig. 9)。

2) ELISA 法による患者血清中の抗 GPLs 抗体の測定

臨床分離菌より抽出した GPL の TLC, GC および FAB/MS 分析により血清型16型と診断された患者血清中の GPLs に対する抗体価を調べたところ, IgM 画分では血清希釈320-5120倍のいずれにおいても多くの GPLs に対しほぼ同程度の非特異反応を示し, 血清型の決定は不可能であった。これに対して, IgG 画分では患者血清は血清希釈320-5120倍のいずれにおいても血清型16型 GPL と特異的に反応し (Fig. 10), 血清型が ELISA 法により決定できた。

3) ELISA 法による患者血清の血清型16型 GPL と不完全 GPL の反応性の比較

次に構造の異なる血清型16型 GPL と β -eliminated GPL を, 抗原量を変えて, 血清型16型患者血清と反応させ IgG 抗体価を調べたところ, GPL では $1\mu\text{g}$ でも $2.5\mu\text{g}$ と同様に特異的反応が再現された。しかし

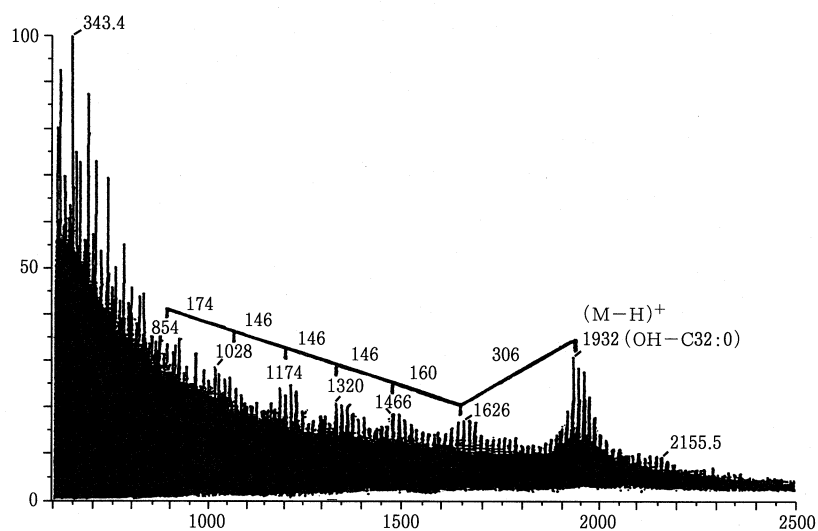


Fig. 7 Negative FAB/MS spectrum of MAC serovar 16 GPL antigen.
[fatty acid component (OH-C32:0)]

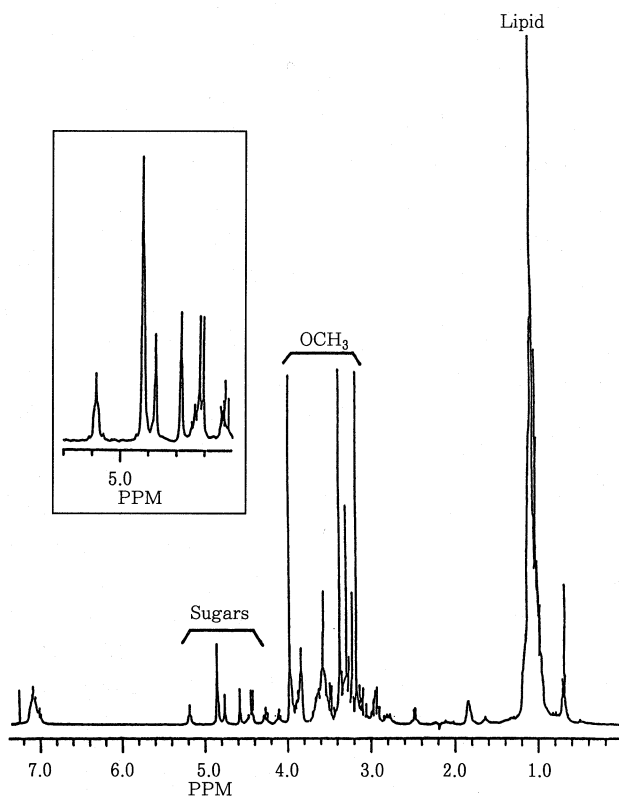


Fig. 8 ^1H -NMR spectrum of MAC serovar 16 GPL antigen.

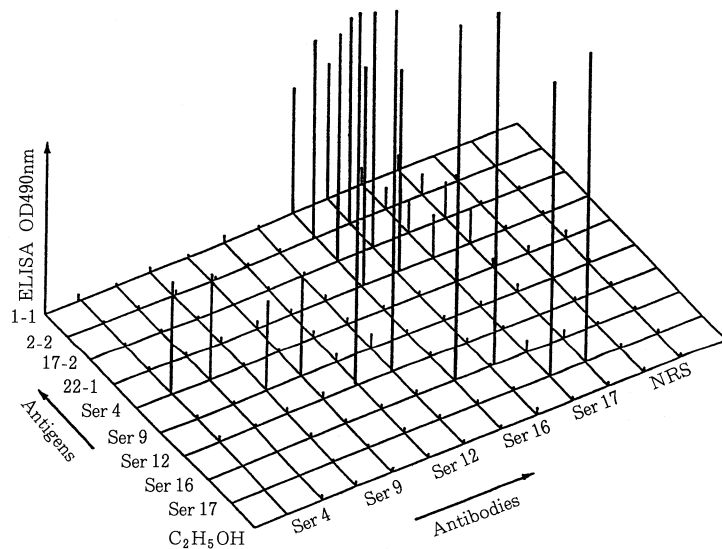


Fig. 9 ELISA demonstrating the reactivity of GPLs from MAC serovar 4, 9, 12, 16, 17 against homologous and heterologous rabbit antisera.

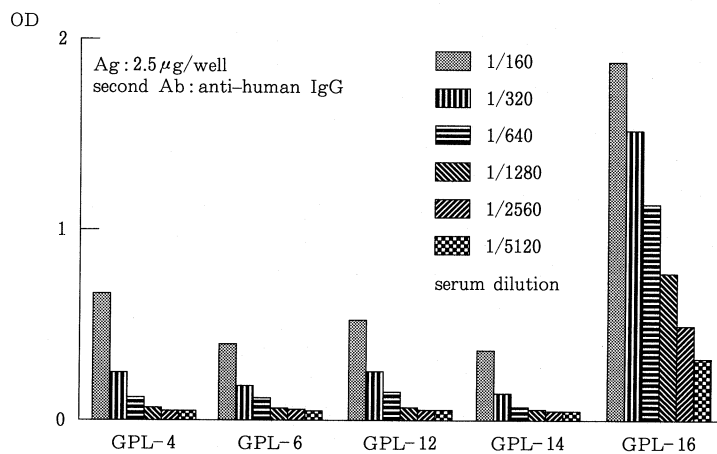


Fig. 10 IgG antibody titers of patients sera excreting MAC serovar 16 against various GPLs.

invariant lipid coreである β -eliminated GPLでは、血清希釈320-5120倍のいずれにおいても反応はほとんど認められず、GPLのエピトープは糖鎖部分であることが明らかとなった (Fig. 11)。

考 察

近年、非定型抗酸菌感染症が AIDS 患者^{3)~5)}、ステロイド長期使用患者、人工透析患者等宿主の抵抗力の低下を伴う患者に増加しており注目されてきている。なか

でも MAC はその主要原因菌であり、一般に難治性であることから本菌種の診断は重要である。MAC は感染宿主の局所的・全身的抵抗力の強弱により分離される血清型に偏りがあり、米国では 8, 16, 4 型¹⁶⁾、本邦では 16, 1, 4 型⁶⁾ が 3 主要血清型であるなど感染頻度に地域性があること、血清型によりビルレンスが異なること、また血清型により化学療法の奏効性が異なる¹⁷⁾ こと等の諸家の多くの報告があり、MAC 感染症においては血清型診断がますます重要と考えられている。

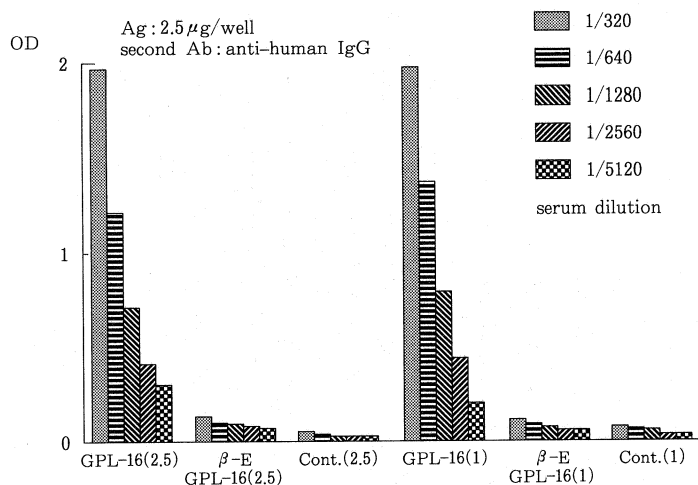


Fig. 11 IgG antibody titers of patients sera excreting MAC serovar 16 against GPL and β -eliminated GPL from serovar 16.

Brennan らは、グラム陰性細菌の Lipopolysaccharides の O 抗原と対比してコロニーの性質とも関連の深い MAC 細胞表層 L_1 layer の 'C-mycoside' に含まれる¹⁸⁾ 血清型特異ペプチド糖脂質抗原 (GPL) の構造が重要であるとしエビトープである糖鎖構造の解析同定を行っている。いずれの糖鎖も O-メチル化糖、デオキシ糖、N-アシル化糖等天然では極めて特異な糖を含むことを報告し、現在までに MAC の 28 種の血清型のうち 13 種の血清型 GPL の糖鎖構造を同定している^{3) 19) ~ 28)}。これにより血清型診断が可能となりつつあるが、しかし未知の血清型 GPL も存在しその糖鎖構造の決定が望まれている。

既知の血清型 17 型 GPL の糖鎖構造が 4-(2'-methyl, 3'-hydroxy) butyramido 4, 6-dideoxy hexose $\rightarrow$ 4-O-methyl-L-rhamnose $\rightarrow$ L-rhamnose $\rightarrow$ L-rhamnose $\rightarrow$ 6-deoxy-L-talose であることを考慮し、未知の血清型 16 型 GPL の構造解析を行い、その構造は主な分子種は分子量 1933 であり、末端糖に低級脂肪酸を持つアミド糖が存在する新しい GPL で糖鎖構造は 3-amido (2'-methyl, 3'-hydroxy, 4'-methoxy pentanoyl) 3, 6-dideoxy hexose $\rightarrow$ 4-O-methyl-L-rhamnose $\rightarrow$ L-rhamnose $\rightarrow$ L-rhamnose $\rightarrow$ 6-deoxy-L-talose と同定された。今後 ^{13}C -NMR, permethylation (perdeuteriomethylation) 法を用いた糖鎖構造の結合位置の検討が必要と考えられる。

後藤ら²⁹⁾は、MAC の GPL 構成脂肪酸は C30 以上の直鎖酸のほか抗酸菌特有の長鎖多メチル分枝酸を含み、さらに 2-hydroxy C32:1 酸を含むことを明らか

にし、血清型 16 型 GPL の脂肪酸組成は C30:1 と C32:1 の含量が高いと報告している。今回の分析の結果では脂肪酸組成は OH-C32:0 (一部 C32:1 および C34:0 も含む) であり一致した。

また GPL を intact のまま FAB/MS 分析することは分子量の決定に必須であるのみならず、そのフラグメントイオンを解析することで糖鎖構造の配列の解析が可能にし、さらに血清型 16 型 GPL のように末端糖が特異構造を持つ場合、血清型診断を迅速かつ容易にする可能性があると考えられた。

Yanagihara ら¹⁵⁾は、MAC 臨床分離菌より抽出した GPL を抗原として用いた ELISA 法にて血清型を検討したところ、TLC の結果と良好な一致を示したと報告している。しかし、この方法は分離菌よりの GPL の抽出に長時間を要するため感染動物から菌を分離することなく血清型診断を行う方法が検討されていた。

Ikawa ら^{12) 13)}は、ブタ MAC 感染症において MAC 標準菌より抽出した GPL を抗原として ELISA 法を行い抗 GPL 抗体価を測定し、その上昇が認められた 14 例中 13 例の分離菌について TLC パターンおよび Schaeffer の凝集反応を行った。その結果両者は良好な一致を示し、この方法は短時間 (4 時間以内) で正確に結果が得られることから、感受性および特異性の両面において満足のいくものであったと報告している。

今回同定した血清型 16 型 GPL は、末端糖として天然では極めて特徴的な構造の 3N-アシルデオキシ糖をもつペプチド糖脂質抗原であることより、ヒト MAC 症において ELISA 法による血清型迅速診断の可能性が示

唆されたため、16型 GPL を中心に検討したところ、16型 GPL は MAC 血清型16型標準菌免疫家兎血清と特異的に反応することが認められた。

そこで血清型16型感染と診断された患者血清と16型 GPL の ELISA 法を行ったところ、IgG 画分では血清稀釈5120倍という高稀釈においても極めて特異性の高い反応を示し、ヒト MAC 感染症においても ELISA 法による血清型迅速診断法の可能性が示唆された。ただし、血清型16型のみが分離された症例の血清抗体の16型 GPL に対する反応性を検討したが ELISA 法では分散が大きく、OD 値の平均を求めることは困難と考えられた。

次にその反応部位を検討するため糖鎖を離脱した β -eliminated GPL を作成し反応性を比較検討したところ、 β -eliminated GPL の反応性は血清稀釈320-5120倍のいずれにおいても非常に弱く、GPL のエピトープはその糖鎖部分にあることが確認された。

血清型16型 GPL のように末端糖が極めて特異な構造をもつ場合にはその反応が非常に特異的であり、今後、症例数を増やし GPL の抗原量および患者血清の稀釈倍率についての検討を行い、cut off 値を設定すれば血清型診断は可能になると考えられる。

以上 MAC の血清型16型 GPL の糖鎖構造の解析同定、さらにその抗原性について報告した。今後、未知の GPLs の糖鎖構造の解析同定および血清型迅速診断法についての検討が必要と思われる。

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、御校閲を頂きました恩師矢野郁也教授および米国コロラド州立大学 P. J. Brennan 教授に深甚なる謝意を捧げるとともに、御指導、御鞭撻を賜りました井川久史博士に深く感謝の意を表します。また、本研究に御協力頂いた細菌学教室の先生方および本学泌尿器科学教室前川正信名誉教授と泌尿器科教室の先生方に厚く感謝致します。

文 献

- 1) Tsukamura M, Kita N, Shimoide H, et al.: Studies on the epidemiology of nontuberculous Mycobacteriosis in Japan. *Am Rev Respir Dis.* 1988; 137: 1280-1284.
- 2) 国立療養所非定型抗酸菌症研究班: 日本における非定型抗酸菌感染症の研究 (国療非定型抗酸菌共同研究班1986年度報告). *結核.* 1988; 63: 493-499.
- 3) McNeil M, Tsang A, Brennan PJ: Structure and antigenicity of 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.
- 4) Young LS, Inderlied CB, Berlin OG, et al.: Mycobacterial infections in AIDS patients, with an emphasis on the *Mycobacterium avium* complex. *Rev Infect Dis.* 1986; 8: 1024-1033.
- 5) Good RC: Opportunistic pathogens in the genus *Mycobacterium*. *Ann Rev Microbiol.* 1985; 39: 347-369.
- 6) 斎藤 肇: “非定型” 抗酸菌. *結核.* 1988; 63: 667-676.
- 7) Schaefer WB: Serologic identification and classification of the atypical mycobacteria by their agglutination. *Am Rev Respir Dis.* 1965; 92 (Suppl): 85-93.
- 8) Wolinsky E, Schaefer WB: Proposed numbering scheme for mycobacterial serotypes by agglutination. *Int J Syst Bacteriol.* 1973; 23: 182-183.
- 9) Tsang AY, Drupa I, Goldberg M, et al.: Use of serology and thin-layer chromatography for the assembly of an authenticated collection of serovars within the *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare-Mycobacterium scrofulaceum* complex. *Int J Syst Bacteriol.* 1983; 33: 285-292.
- 10) Brennan PJ, Souhrada M, Ullom B, et al.: Identification of atypical mycobacteria by thin-layer chromatography of their surface antigens. *J Clin Microbiol.* 1978; 8: 374-379.
- 11) Brennan PJ: Antigenic peptidoglycolipids, phospholipids and glycolipids. In: *The Mycobacteria, A sourcebook Part A.* Kubica GP, Wayne LG, ed. Marcel Dekker Inc., New York and Basel, 1984, 466-489.
- 12) Ikawa H, Oka S, Murakami H, et al.: Rapid identification of serotypes of *Mycobacterium avium-M. intracellulare* complex by using infected swine sera and reference antigenic glycolipids. *J Clin Microbiol.* 1989; 27: 2552-2558.
- 13) 井川久史: 家畜特にブタから分離された非定型抗酸菌 *Mycobacterium avium - intracellulare* (MAI)

- complex の ELISA による迅速同定法に関する研究. 生活衛生. 1990 ; 34 : 76-88.
- 14) Good RC, Beam RE : Seroagglutination. In : The Mycobacteria, A sourcebook Part A. Kubica GP, Wayne LG, ed. Marcel Dekker Inc., New York and Basel, 1984, 110.
 - 15) Yanagihara DL, Barr VL, Knisley CV. et al. : Enzyme-linked immunosorbent assay of glycolipid antigens for identification of Mycobacteria. J Clin Microbiol. 1985 ; 21 : 569-574.
 - 16) McClatchy JK : The seroagglutination test in the study of nontuberculous mycobacteria. Rev Infect Dis. 1988 ; 3 : 867-870.
 - 17) 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.
 - 18) Tereletsky MJ, Barrow WW : Postphagocytic detection of glycopeptidolipids associated with the superficial L₁ layer of *Mycobacterium intracellulare*. Infect Immun. 1983 ; 41 : 1312-1321.
 - 19) Brennan PJ, Mayer H, Aspinall GO, et al. : Structure of the glycopeptidolipid antigens from serovars in the *Mycobacterium avium* /*Mycobacterium intracellulare*/*Mycobacterium scrofulaceum* serocomplex. Eur J Biochem. 1980 ; 115 : 7-15.
 - 20) Brennan PJ : Structure of the typing antigens of atypical mycobacteria : A brief review of present knowledge. Rev Infect Dis. 1981 ; 3 : 905-913.
 - 21) Brennan PJ, Aspinall GO, Nam Shin JE : Structure of the specific oligosaccharides from the glycopeptidolipid antigens of serovars in the *Mycobacterium avium*-*Mycobacterium intracellulare*-*Mycobacterium scrofulaceum* complex. J Biol Chem. 1981 ; 256 : 6817-6822.
 - 22) Camphausen RT, Jones RL, Brennan PJ : A glycolipid antigen specific to *Mycobacterium paratuberculosis*. Structure and antigenicity. Proc Natl Acad Sci. 1985 ; 82 : 3068-3072.
 - 23) Takeo K, Aspinall GO, Brennan PJ, et al. : Synthesis of tetrasaccharides related to the antigenic determinants from the glycopeptidolipid antigens of serovar 9 and 25 in the *Mycobacterium avium*-*M. intracellulare*-*M. scrofulaceum* serocomplex. Carbohydr Res. 1986 ; 150 : 133-150.
 - 24) Camphausen RT, Jones RL, Brennan PJ : Structure and relevance of the oligosaccharide hapten of *Mycobacterium avium* serotype 2. J Bacteriol. 1986 ; 168 : 660-667.
 - 25) Chatterjee D, Aspinall GO, Brennan PJ : The presence of novel glucuronic acid-containing, type-specific glycolipid antigens within *Mycobacterium* spp. J Biol Chem. 1987 ; 262 : 3528-3533.
 - 26) Chatterjee D, Bozic C, Aspinall GO, et al. : Glucuronic acid- and branched sugar-containing glycolipid antigens of *Mycobacterium avium*. J Biol Chem. 1988 ; 263 : 4092-4097.
 - 27) Bozic CM, McNeil M, Chatterjee D, et al. : Further novel amido sugars within the glycopeptidolipid antigens of *Mycobacterium avium*. J Biol Chem. 1988 ; 263 : 14984-14991.
 - 28) McNeil M, Gaylord H, Brennan PJ : N-formylkantsosaminyl-(1-3)-2-O-methyl-D-rhamnopyranose : The type-specific determinant of serovariant 14 of the *Mycobacterium avium* complex. Carbohydr Res. 1988 ; 177 : 185-198.
 - 29) 後藤公吉, 金田研司, 矢野郁也 : 家畜分離非定型抗酸菌 (MAI-complex) の免疫学および生化学的方法による型別に関する研究. 日本細菌学雑誌. 1988 ; 43 : 654-670.