原　著

非定型抗酸菌感染症 *Mycobacterium avium* complex (MAC) の glycopeptidolipid (GPL) 抗原のヒト末梢血単球貪食の促進および殺菌の抑制

南　英利

大阪市立大学医学部細菌学教室

PROMOTION OF PHAGOCYTOSIS AND PREVENTION OF PHAGOSOME-LYSOSOME (P-L) FUSION IN HUMAN PERIPHERAL BLOOD MONOCYTES BY SEROTYPE SPECIFIC GLYCOPEPTIDOLIPID (GPL) ANTIGEN OF *MYCOBACTERIUM AVIUM* COMPLEX (MAC)

Hidetoshi MINAMI*

Mycobacterium avium complex (MAC) is one of the most important opportunistic pathogens co-infected with HIV (AIDS) and a typical intracellular parasitic bacteria similar to *M. tuberculosis*. It is also noticed that *M. avium* infection causes immunosuppression especially in the cellular immunity of host animals, and specific serotype-subspecies such as sero-2, -4 or -8 can be isolated frequently in human infection. Furthermore, the prognosis after infection differs by the serotypes and serotype-4 shows heavy infection in general, while serotype-16 shows rapid improvement. Therefore, we have been interested in the immunomodifying activity of surface glycopeptidolipid (GPL) antigen. However, to date, no information has been available on the virulence factor of MAC related directly with intracellular bactericidal activity. Recently, we have tested the effect of various GPLs purified form MAC complex on phagocytic processes of human peripheral blood monocytes (PBMC). We have used GPL-coated heat-killed staphylococcal cells to be phagocytosed by PBMC, and phagosome-lysosome (P-L) fusion was estimated by the acridine orange staining of fused vesicles including bacteria. It was revealed that the serotype-4, -12 and -17 GPLs showed strong phagocytosis promotion and marked inhibition of P-L fusion, while serotype-9, -13, -16 and -19 GPLs showed neither promotion of phagocytosis, nor inhibition of P-L fusion in phagocytic cells. Serotype-5, -7, -8 and -10 GPLs showed stimulation of both phagocytosis and P-L fusion, concomitantly. These effects may be due to unknown interaction between specific carbohydrate chain of MAC and phagocytic cell membranes, and serotype-4, -12 and -17 GPLs may be one of the possible virulence factors in MAC.

別刷り請求先：
南　英利
大阪市立大学医学部細菌学教室
〒545-8586 大阪市阿倍野区旭町 1-4-54

* From the Department of Bacteriology, Osaka City University Medical School, Asahimachi 1-4-54, Abeno-ku, Osaka 545-8586 Japan.
(Received 9 Jan. 1998／Accepted 15 May 1998)

Key words : *Mycobacterium avium* complex (MAC), Phagocytosis, Phagosome-Lysosome (P-L) fusion, Virulence factor, Glycopeptidolipid (GPL)

キーワーズ : 非定型抗酸菌（MAC），貪食，殺菌，病原因子，ペプチド糖脂質抗原

緒　言

近年，人型結核菌以外の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，AIDS患者の日和見感染症の原因菌として最近10年間で劇的な増加を示しており[1)2)]，非定型抗酸菌の80%以上を占めることで注目されている。AIDS患者では，MACは呼吸器あるいは消化器から侵入し，全身の播種性に感染が広がり，重篤化することがしばしば報告されている[2)]。さらに，抗結核剤をはじめとした種々の化学療法に抵抗性を示し，予後不良とされている[2)3)]。

MACには，細胞表層成分glycopeptidolipid（GPL）抗原の異なる少なくとも28種類の血清型が存在し[4)]，特にMAC 4型菌はAIDS患者から高頻度に分離され，最も病原性が強いとされている[5)6)]。また，4型菌感染により宿主の免疫力が低下すると言われているが，その機構は明らかではない。MACは細胞内寄生性細菌であり，マクロファージに貪食された後もほとんど排除されることなく，食細胞内で増殖し，宿主に対してさまざまな免疫学的影響を及ぼすとされている。一般に，マクロファージは細菌や異物を，endocytosisにより細胞質内に取り込み（phagosome形成），これに引き続いてlysosomeがこれに融合し（phagosome-lysosome融合），酸性下でphagosome内容物を消化してゆくが，MAC感染ではこれら殺菌機構のいずれかの段階で抑制状態となり，殺菌機構が阻害されていると考えられる。

今回，著者らはMACの各血清型と病原性の関係を明らかにするために，13種類の血清型特異的GPL抗原（4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 16, 17および19型GPL）を単離し，ヒト末梢血単球のphagocytosisおよびP-L fusionに及ぼす影響について検討した。

実験材料および方法

1）菌の培養

a）MACの培養

MACの各血清型（4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 16, 17および19）菌株を，glycerol（2m*l*/*l*）およびMiddlebrook ADC Enrichment（sodium chloride-bovine albumin-dextrose-catalase：Becton Dickinson Microbiology Systems）（100m*l*/*l*）を含む，Middlebrook 7H9broth（Difco Laboratories）の液体培地で37℃ 3週間振とう培養し集菌した。

b）*S. aureus* の培養

S. aureus 209PをHeart Infusion Agar（Difco）の平板培地で37℃ 24時間培養し，0.1%gelatin-Hanks液（日水製薬）中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（121℃，20分）にて加熱死菌体とした後，gelatin-Hanks液にて1×10^8 cells/m*l*の濃度に調製した。

2）GPLの単離と精製

MAC菌体から30倍容のクロロホルム：メタノール（2：1，V/V）で脂質を抽出後，0.2N水酸化ナトリウム加メタノールで中で37℃，90分間水解し，アルカリ安定脂質を得た。得られた脂質をSilica gel G薄層クロマトグラフィー（TLC）プレート（20cm×20cm，250cm：Analtech, Inc. USA.）上でクロロホルム：メタノール：水（65：25：4，V/V）を展開溶媒として展開し，各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）にて抽出し単離精製した。なお，各GPLのスポットは，展開したTLCプレートを乾燥後50%硫酸を噴霧して180℃で加熱発色させ，各GPLをRf値および特徴的な呈色反応（黄褐色-黒褐色）にて確認した（Fig. 1）。

一般に，GPLはTable 1に示すように，炭素数32前後の脂肪酸に，（D）-phenylalanine，（D）-allo-threonine，（D）-alanine，（L）-alaninolの4個のアミノ酸が結合し，さらに3，4-di-O-methyl-rhamnoseが結合したペプチド糖脂質を共通の構造として持ち，このallo-threonineから伸長した糖鎖構造により，各血清型が特異的に決定され（Table 1），一般にはallo-threonineから6-deoxytalose，さらにrhamnoseを経て結合した0から3個の糖で構成されている。

単離精製したGPLは，nitrobenzyl alcohol：triethylene glycol mono-N-butylether（1：1，V/V）をmatrixとして，fast atom bombardment mass spectrometry（JEOL-SX-102）を行い同定した。

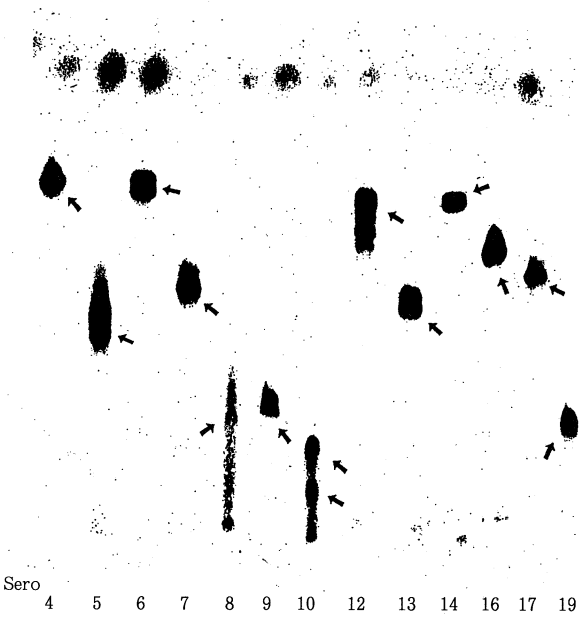


Fig. 1 Thin layer chromatograms (TLC) of glycopeptidolipids (GPL) from 13 serovars. Plate was developed with a solvent system of chloroform–methanol–water (65 : 25 : 4, V/V) and was charred after spraying with 50% H_2SO_4. Arrows on the TLC spots show type specific GPL antigens.

3）単球浮遊液の調製

ヘパリン加採血した健常人末梢血を，同量のLymphoprep Medium（Nycomed Pharma）上に静置し，20℃で1,500rpm 30分間遠心し，単球を含む層を分離した。分離した単球にTris–NH_4Cl bufferを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（FBS）（GIBCO Laboratories），Penicillin G（100U/m*l*），streptomycin（100μg/m*l*）加RPMI 1640 medium（日研生物医学研究所）にて5×10^6 cells/m*l*の濃度に調製した。

4）GPLでコートした*S. aureus*の調製

各GPLはメタノールに溶解し（0.2–25μg/m*l*），*S. aureus*死菌体（1×10^8 cells/m*l*）と混和し，エバポレーターにて溶媒を完全に蒸発させた後，gelatin–Hanks液を加えて60秒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て，GPLでコートした*S. aureus*の浮遊液（1×10^8 cells/m*l* : gelatin–Hanks液）を調製した。

5）GPLでコートした*S.aureus*の貪食

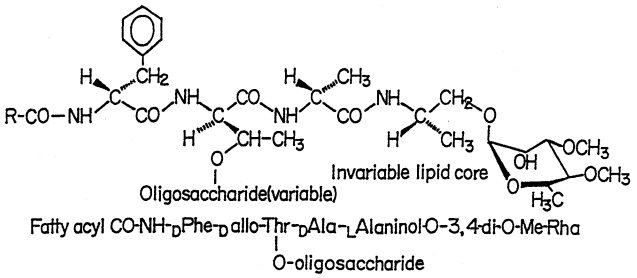
Phagocytosisの実験は，3）のように調製した単球浮遊液（5×10^6 cells/m*l*）200μ*l*をcover slip（13mm，round：三光純薬）上で，37℃，90分間インキュベートした後，RPMI 1640 mediumにて3回洗浄し非付着細胞を除去した。このようにしてcover slip上に付着させた単球に，4）の各GPLでコートした菌体浮遊液（1×10^8 cells/m*l*）を各々200μ*l*ずつのせ，37℃で3時間インキュベートした。インキュベート後，RPMI 1640 mediumで3回洗浄し，単球をメタノールで固定した。乾燥後，methylene blueで染色し，顕微鏡（1000倍）にて無作為に選んだ少なくとも100視野において，単球数および1個の単球に貪食された菌数を数えた（Fig. 2）。PhagocytosisはGorenらの方法に従い，phagocytosis index（PI）で下記のように算出し評価した[8]。

PI＝（貪食された菌の総数/単球の総数）×（菌を貪食している単球の総数/単球の総数）×100

6）GPLでコートした*S. aureus*のphagosome–lysosome fusion（P–L fusion）

P–L fusionの実験は，Ishibashiら[7]，あるいは

Teble 1 A generalized structure applicable to all known glycopeptidolipid (GPL) antigens.



Serovar no.	Structure of oligosaccharides
1.	Rha-6·d·Tal
2.	2, 3·di·O·Me·Fuc-Rha-6d·Tal
9.	2, 3·di·O·Me·Fuc-GlcA-2, 3·di·O·Me·Fuc-Rha-6d·Tal
6.	2·O·Me·Fuc-Rha-6d·Tal
4.	4·O·Me·Rha-2·O·Me·Fuc-Rha-6·d·Tal
20.	2·O·Me·Rha-2·O·Me·Fuc-Rha-6·d·Tal
14.	4·Formamido·3, 4, 6·trideoxy·2·O·Me·3·C·Me·Man-2·O·Me·Rha-2·O·Me·Fuc-Rha-6·d·Tal
25.	4·Acetamido·4, 6·dideoxy·2·O·Me·Hex-GlcA-2·O·Me·Fuc-Rha-6·d·Tal
8.	4, 6·(1' Carboxyethylidene)·3·O·Me·Glc-Rha·6·d·Tal
21.	4, 6·(1' Carboxyethylidene)·Glc-Rha-6·d·Tal
12.	4·(2' Hydroxy)·propionamido·4, 6·dideoxy·3·O·Me·Glc-4·O·Me·Rha-Rha-Rha-6·d·Tal
17.	4·(2' Me)·(3' Hydroxy)·butyramido·4, 6·dideoxy·Glc-4·O·Me·Rha-Rha-Rha-6·d·Tal
16.	3·(2' Me)·(3' Hydroxy)·(4' Methoxy)·pentanoylamido·3, 6 dideoxy Hex-4·O·Me·Rha-Rha-Rha-6·d·Tal
19.	3, 4·di·O·Me·GlcA-2, 4·di·O·Me, 3·C·Me·6·d·Hex-Rha-Rha-6·d·Tal

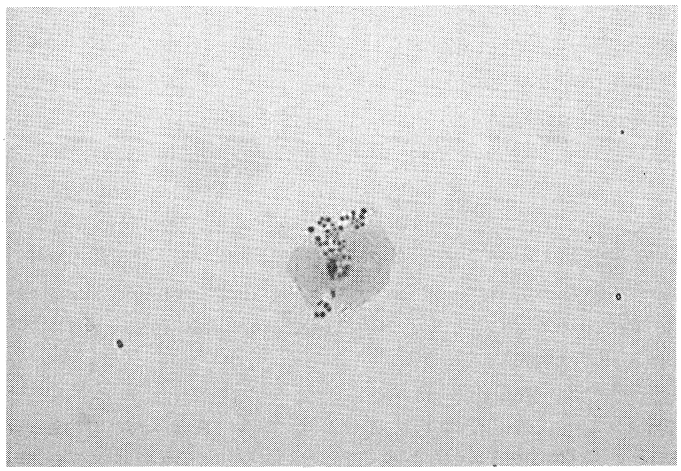


Fig. 2 Micrograph of methylene blue-stained monocytes. Monocytes were incubated with serovar 4 GPL-coated *S. aureus* at 37℃ for 3 hr. (×1000)

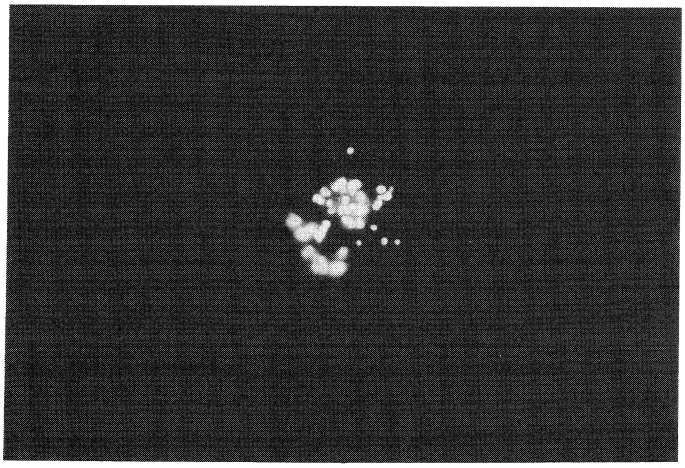


Fig. 3 Fluorescence micrograph of acridine orange-stained monocytes. Monocytes prelabelled with acridine orange were incubated with serovar 4 GPL-coated *S. aureus* at 37℃ for 3 hr. Serovar 4 GPL-coated *S. aureus* were stained with acridine orange, indicating the diffusion of the lysosome marker dye into *S. aureus* containing phagosomes. (×1000)

Goren ら[8] および Miyazaki ら[9] の方法に準じ，一部変更して行った。上記5）と同様にして cover slip 上に付着させた単球（5×10^6 cells/m*l*）に，PBS（日研生物医学研究所）で5μg/m*l* に調製した acridine orange（SIGMA Chemical Company）を加え，37℃で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。このようにして，acridine orange で標識した単球に，各 GPL でコートした *S. aureus* 浮遊液（1×10^8 cells/m*l*）をのせ，37℃ 3時間インキュベートした後，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520nm）を用い，無作為に選んだ少なくとも100視野において，acridine orange に染色された菌数を数えた（Fig. 3）。P-L fusion は fusion index（FI）を下記のように算出して評価した。

FI＝（P-L fusion をおこした菌の総数/単球の総数）×（P-L fusion をおこした単球の総数/単球の総数）×100

引き続いて，単球をメタノールで固定し，乾燥後 methylene blue で染色し，方法5）と同様に単球数および菌数を数え，PI を算出した。さらにこれらから，単球内に貪食された菌のうち，lysosome fusion を受けた菌がどの程度残っているかを知るために，PI に対する FI の比 FI/PI を算出し，細胞内殺菌力の指標とした。なお，FI/PI は GPL をコートしていない時を100％として表現し，各 GPL 濃度において比較して評価した。

結　果

1）GPL の貪食に及ぼす影響

各血清型 GPL でコートした *S. aureus* 加熱死菌体を，ヒト末梢血単球と3時間インキュベートし，各血清型 GPL の，単球による貪食に及ぼす影響について調べたところ，Fig. 4 に示すように，各血清間で貪食能に顕著な差があることが判明した。血清型 4, 5, 7, 8, 10, 12 および17型 GPL でコートした *S. aureus* 菌体の貪食は，濃度依存的に促進された。そのなかでも特に，血清型 4, 5, 7, 12および17型 GPL により単球の貪食能は，著明な促進を認めた。そのほかの血清型 6, 9, 13, 14, 16および19型 GPL では貪食の促進は認められなかった。また，特に血清型 4, 7, 8, 9, 10, 17および19型は，*S. aureus* 死菌体にコートした GPL では，25μg/m*l* という高濃度においては逆に若干抑制することが認められた。これは，GPL の単球に対する細胞毒性によるものと推測された。

2）GPL の P-L fusion に及ぼす影響

単球による貪食の後続いて起こる P-L fusion に対

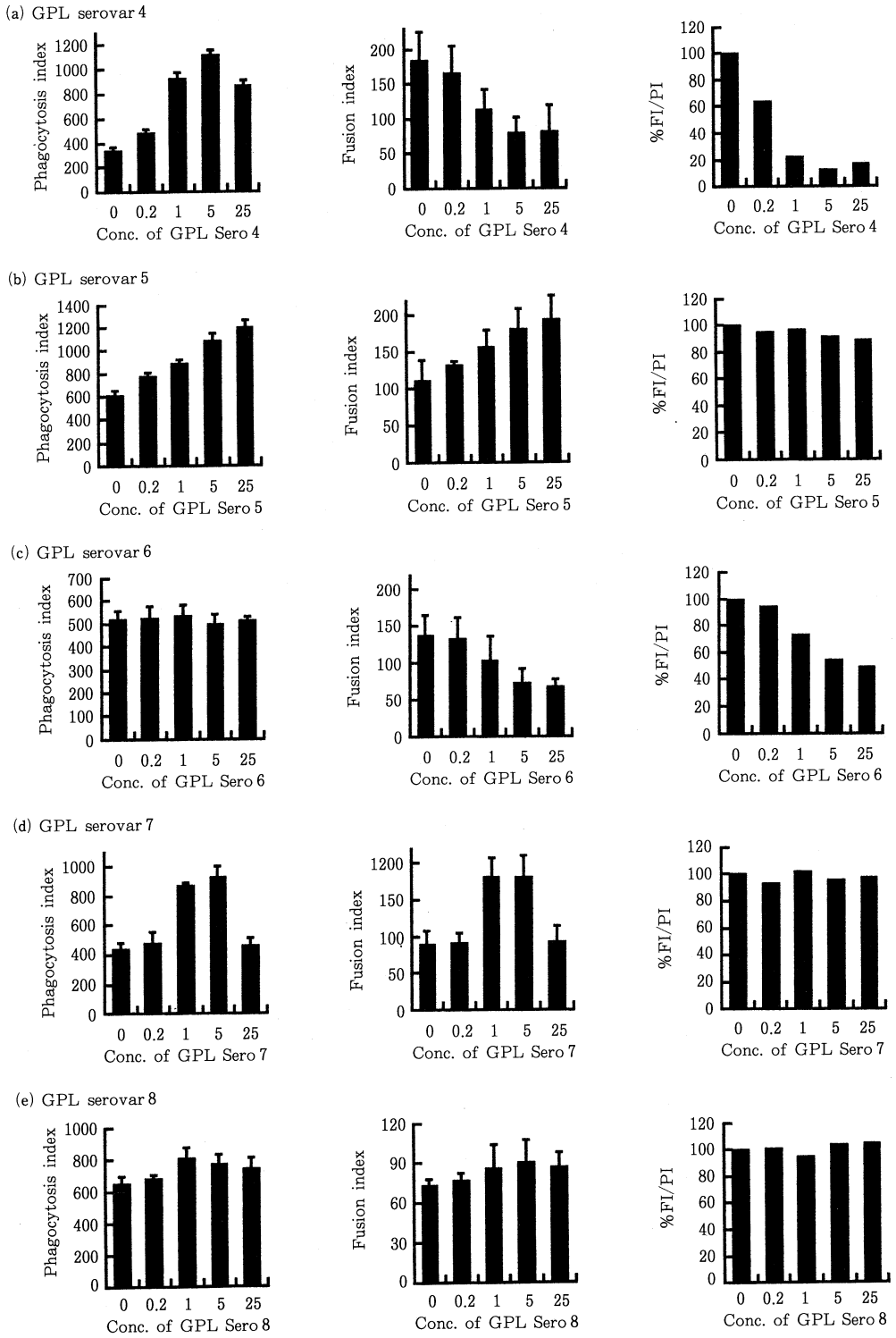
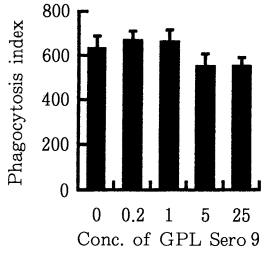
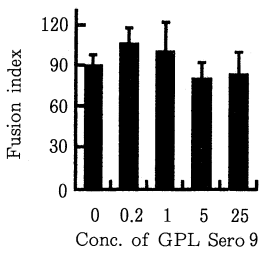
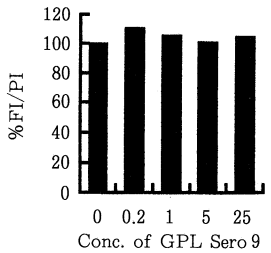


Fig. 4 Effect of 13 serovars GPL-coated *S. aureus* on phagocytosis index (PI), fusion index (FI) and FI/PI by human monocyte. Serovars are (a) serovar 4, (b) 5, (c) 6, (d) 7, (e) 8, (f) 9, (g) 10, (h) 12, (i) 13, (j) 14, (k) 16, (l) 17 and (m) 19. Coated-bacteria were incubated with human monocyte at 37℃ for 3 hr. The values represent mean±S.E. Continued on the followed pages.

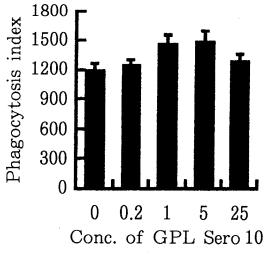
(f) GPL serovar 9

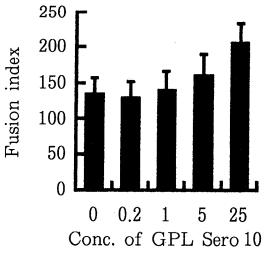


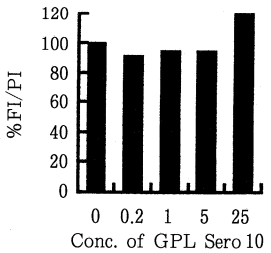




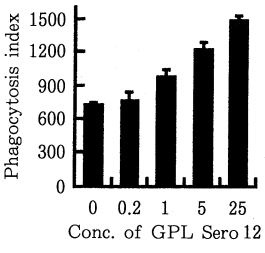
(g) GPL serovar 10

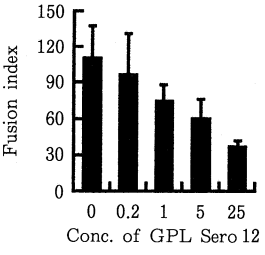


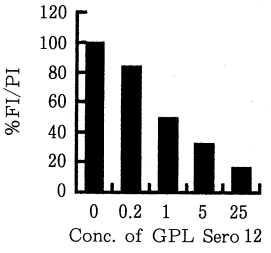




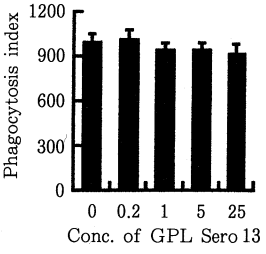
(h) GPL serovar 12

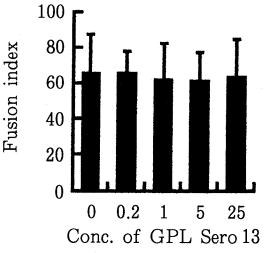


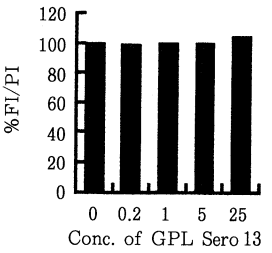




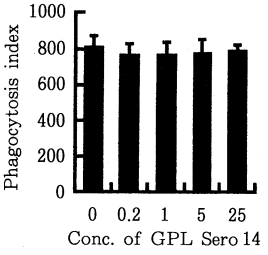
(i) GPL serovar 13

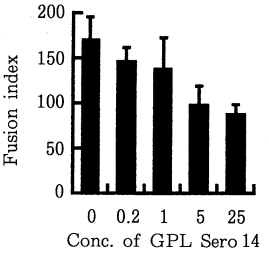


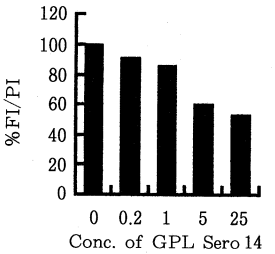


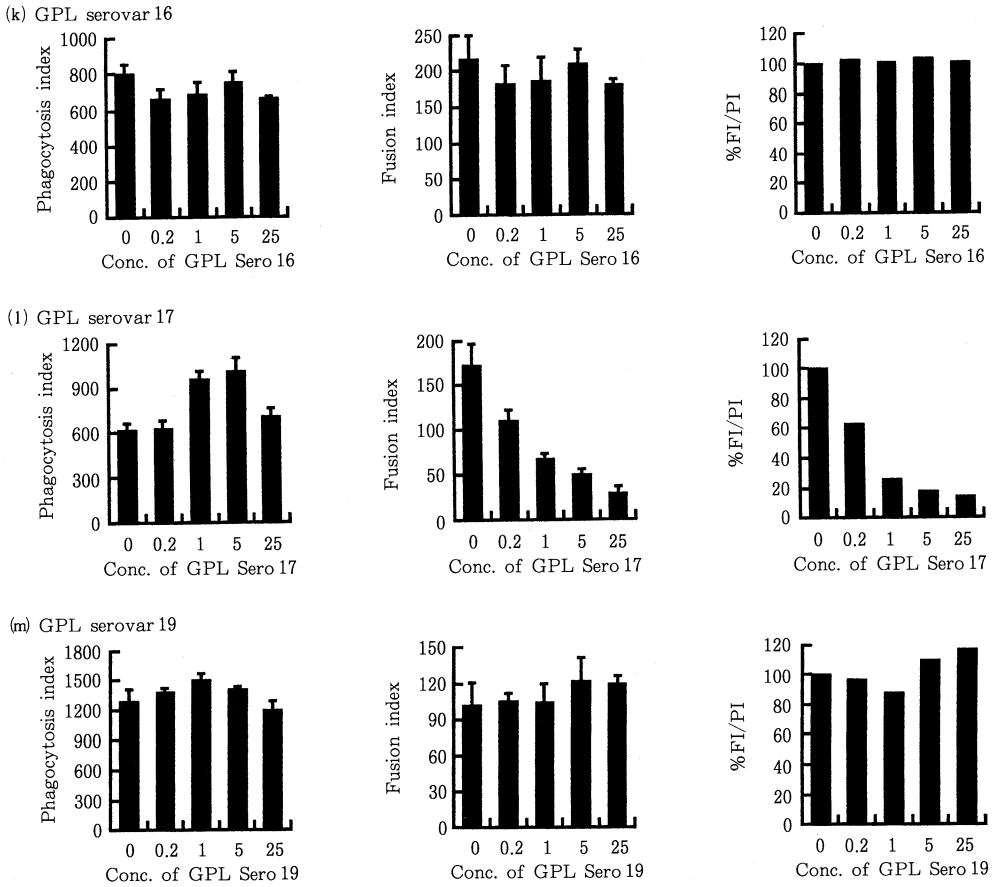


(j) GPL serovar 14









して，各血清型GPLの及ぼす影響について調べた。各血清型GPLでコートした*S. aureus*菌体を，acridine orangeで標識した単球と3時間インキュベートしたところ，Fig. 4に示すように，血清型4，6，12，14および17型GPLにおいて濃度依存的にP-L fusionが抑制され，そのなかでも血清型4，12および17型では，GPL 25μg/mlではコントロールに比べてFIは1/2以下に低下することが認められた。

一方，血清型9，13，16および19型GPLでは各濃度で，P-L fusionには影響を及ぼさなかった。逆に，血清型5，7，8および10型GPLでは，P-L fusionの促進が認められ，そのなかでも血清型5および7型ではコントロールに比べて約2倍近くまで増加するのが認められた。

3）GPLの貪食およびP-L fusionに及ぼす影響；FI/PIによる評価

細胞内殺菌能は食細胞内に取り込まれた細菌が，どのようにP-L fusionを経て，lysosomeの殺菌作用を受けるかによって決定される。Fig. 4に示すように，各血清型GPLについて単球の貪食能（食細胞への取り込み能），P-L fusion能（食細胞内での処理過程）およびそれらを比較したFI/PI比の変動にはさまざまなパターンの違いが認められた。各血清型GPLについて分類すると以下の4つのパターンに分けられる。

(1) PIは上昇し，FIは低下しFI/PIが著明に低下する群。すなわちGPLにより単球の貪食は促進するが，P-L fusionは抑制されFI/PIはさらに著明に低下するもので，これには，血清型4，12および17型GPLが含まれ，それぞれFI/PIの低下がみられる。

(2) PIは一定だが，FIが低下しFI/PIが低下する群。すなわちGPLは単球の貪食に影響を及ぼさないが，P-L fusionは抑制され，FI/PIは中等度の低下を認めるもので，これには血清型6および14型GPLが含まれる。

(3) PIは上昇し，FIも同様に上昇するがFI/PIは一定である群。すなわちGPLにより単球の貪食が促進し，その促進に見合うだけ見かけ上，P-L fusionも同様

に促進を示しているが，実際 FI/PI が一定であることから，GPL は P-L fusion には影響を及ぼしていないと考えられる。これには，血清型 5，7，8 および 10 型 GPL が含まれる。

(4) PI および FI とも一定で，FI/PI も一定である群。すなわち GPL が単球の貪食能ならびに P-L fusion 能に，影響を及ぼさないと考えられる群で，これには血清型 9，13，16 および 19 型が含まれる。

考　察

近年，結核症の減少の鈍化とともに非定型抗酸菌感染症が増加傾向にあり，その中でも MAC が主要な増加原因となっている[1)10)]。一般に，MAC は自然界において，例えば土壌[11)]，水[12)]やハウスダスト[13)]など至るところに存在し，また鳥類[14)]やブタ[15)]などの動物やヒトに感染し，まれに重篤な感染症をもたらす原因となる。特に，ヒトにおける MAC 感染症の初めての報告は，1943年にミネソタでの MAC 呼吸器感染症患者に関するものであり[16)]，これ以後の AIDS の出現までの20数年間は，そのほとんどの症例が呼吸器の感染症であった[17)]。

しかし，AIDS の出現以後[18)]，AIDS 合併日和見感染症として MAC 感染症は急速に増加し[2)]，Hawkins らは AIDS 患者の53%まで達すると報告している[19)]。その症状も以前とは異なり，MAC の進入門戸である初感染巣も呼吸器よりもむしろ消化管が注目され，さらに全身の播種性感染へと進行し重篤化する症例が多く認められる[20)]。また，抗結核剤を始めとするさまざまな化学療法においても治療抵抗性を示すことがほとんどで，難治性で予後不良の症例が多い，と報告されている[2)3)]。

一方，Brennan らは，グラム陰性細菌の Lipopolysaccharides の O 抗原と似た免疫学的性質を持つ，MAC 細胞表層 L1 layer の C-mycoside に属する血清型特異 glycopeptidolipid 抗原（GPL）の構造を解析し，それらのエピトープである糖鎖構造を明らかにした。GPL は lipopeptidyl-O-methyl rhamnose を共通構造として，allo-threonine から伸びた oligosaccharide hapten が，各血清型の特異エピトープとなっている[21)22)]。これまでいくつかの GPL の糖鎖構造が明らかにされてきたが，しかし数多くの血清型 GPL の構造が依然まだ解析されていないのが現状である。

MAC は細胞内寄生性細菌であり，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にも，生存し増殖することが知られている[23)]。この単球あるいはマクロファージによる MAC の貪食の方法については，さまざまな報告がなされている。

Swartz らによれば，マクロファージによる MAC の取り込みには，血清特に補体が重要な役割を果たしているとされ[24)]，また Catanzaro らはオプソニン化しなくてもマクロファージ上の特異的なレセプターと結合して取り込まれ，貪食はそのレセプターにより調節されていると報告している[25)]。Bermudez らは血清の存在の有無にかかわらず，CR 3 や fibronectin などを介して MAC が取り込まれるとしているが[26)]，まだそのメカニズムは十分には解明されていない。

MAC は，マクロファージ内に貪食された後も，宿主の殺菌機構から免れて，生存し続け増殖してゆくとされ，それぞれ各血清型により差があると言われている[23)]。特に AIDS 合併患者よりの分離株はその能力が強いとされている。一般に，マクロファージは外部より進入した異物を phagosome を形成して取り込み，これに引き続いて lysosome がこれと融合し，酵素的にまたは非酵素的に内容物を処理して行くが，MAC はこれらの過程の中で，このような殺菌機構から免れて生存すると考えられる。細胞内でその生存や増殖を支持する機序としては，

(1) マクロファージ内の lysosome 中の水解酵素自体を減少させる[27)]。

(2) いったん phagosome-lysosome fusion が起こったとしても，lysosome の広がりを抑制する[28)]。Frehel らは，MAC 菌体表面に electron-translucent capsule が存在し，水解酵素の菌体への浸透や広がりを妨げるとしている[28)]。

(3) phagosome-lysosome fusion を抑制し，水解酵素の phagosome への移行を抑制する[29)]。Crowle らは，殺菌された貪食胞内では pH の低下はみられるが，殺菌されずにいる貪食胞内では pH の低下が障害されたと報告している[29)]。

(4) マクロファージ内に取り込まれた MAC が superoxide anion の産生を抑制する[30)]。

以上の 4 つの場合が考えられる。Gangadharam らは，ヒトに感染した場合予後が悪いと言われている血清型 4 あるいは 8 型 MAC が，マクロファージに貪食された場合，比較的化学療法に反応しやすい血清型である 9，12，13，14，16，18および19型菌に比べて，マクロファージのsuperoxide anion の産生が抑制されていると報告しているが[30)]，現在のところまだはっきりとしたメカニズムは明らかになっていない。Frehel らは，MAC 生菌およびγ線処理した MAC 死菌体はともに，P-L fusion を抑制したと報告し[28)] MAC の細胞表層成分あるいは細胞壁成分が P-L fusion の抑制に関与しているのではないかと指摘している。

一方，MAC の細胞壁およびエンベロープは，特異的

Table 2 Virulence Related Characteristics of Mycobacterial Glycopeptidolipids

GPL serovar	Phagocytosis	P-L fusion	FI/PI	Virulence	Specific structure
4	↑	↓	↓↓	◎	4 O Me Rhamnose
5	↑	↑	→		?
6	→	↓	↓	○	2 O Me Fucose
7	↑	↑	→		4N acyl dideoxy Hexose
8	↑	↑	→		carboxyethylidene Hexose
9	→	→	→		2.3 di O Me Fucose Glucuronic acid
10	↑	↑	→		carboxyethylidene Hexose
12	↑	↓	↓↓	◎	4N acyl dideoxy Hexose
13	→	→	→		?
14	→	↓	↓	○	4Formamido trideoxy Hexose
16	→	→	→		3N acyl dideoxy Hexose
17	↑	↓	↓↓	◎	4N acyl dideoxy Hexose
19	→	→	→		3, 4 di O Me Glucuronic acid

で複雑な構造から成り立っており，特にMACに特徴的なGPLが，細胞表層のelectron dense layerの一部分を構成しているために[31]，MACの細胞壁は，薬剤の細胞内への進入を妨げ，ほとんどの抗結核剤が無効になると考えられている[3)31)]。

今回，著者らは13種類の異なったMAC各血清型GPL抗原のヒト末梢血単核球による，貪食およびP-L fusionに及ぼす影響について系統的に調べ，同時にその影響に対するGPLの糖鎖構造の違いについても併せて比較検討を行った。その結果，各血清型を大きく4つのパターンに分類することが可能であった（Table 2）。

(1) 貪食が促進しP-L fusionが抑制される群に，血清型4，12および17型が含まれ，MACが単球およびマクロファージに強く貪食されるものの，その後排除されることなく増殖するため，宿主に対し強いビルレンスを示すものと推測される。この群に共通するGPLの末端糖鎖構造の特徴は，4Nアシル化糖あるいは4-O-メチル化糖であり，この糖鎖構造が単球に対してvirulence factorとして作用する可能性が示唆される。しかし，血清型7型GPLの末端糖鎖構造が4Nアシル化糖であるにもかかわらず，貪食およびP-L fusionの影響が(1)の群に属さないのは4Nアシル化糖および4-O-メチル化糖以外の何らかの構造上の影響があるものと思われる。

(2) 貪食には影響しないもののP-L fusionを抑制する群に，血清型6および14型が含まれ，(1)の群に比べては，やや弱いが宿主に対しビルレンスを示すと思われる。こちらのGPLの末端糖の構造は，特にP-L fusionのみに選択的に影響を及ぼすものと思われる。このことから，GPLの糖鎖構造は，貪食に影響を及ぼす部位とP-L fusionに影響を及ぼす部位は異なっているのではないかと推測される。

(3) 貪食およびP-L fusionともに促進させる群で，血清型5，7，8および10型が含まれるが，FI/PI比は一定であるので貪食の促進に伴って，P-L fusionが見かけ上促進しているだけで，実際にはこの群は貪食の影響が強く反映されているものと考えられる。この中でも，血清型5および7型では，貪食が強く促進しているのに対して，それ以外の血清型8および10型では貪食の促進が緩やかで，影響がかなり弱いものと思われる。特に，8および10型の末端糖鎖構造は，特異的なcarboxyethylidene基をもつ酸性糖脂質で，P-L fusionには影響しないが，貪食に対しては緩やかな促進の影響が推測される。

(4) 貪食およびP-L fusionともに影響を及ぼさない群で，血清型9，13，16および19型が含まれる。特に9および19型は酸性糖脂質であり，貪食およびP-L fusionにはほとんど影響を及ぼさないと考えられる。

Miyazakiらは，*Serratia marcescens*のSerratamolideは，好中球による貪食を抑制することから，貪食には疎水性の程度だけでなく，構造的にカルボキシル基の存在が重要とした[9)]。さらにグルクロン酸を含むglycosphingolipidであるGL-1およびGL-4は，貪食を促進するのに対して，中性glycosphingolipidは貪食促進がみられないことより，貪食促進には，グルクロン酸，特にカルボキシル基の重要性を述べている[9)]。

今回，著者が行った血清型8，9，10および19型GPLは，カルボキシル基を含む酸性糖脂質であり，単球に対して貪食をわずかに促進するか，ほとんど影響しないという結果を得たが，GPLではカルボキシル基以外にも，

coreに近い糖鎖または脂質部分の構造も影響しているのではないか，と考えられる。今後，他の血清型についても同様に検討を加えるとともに，実際に各血清型菌の貪食されやすさ，並びに，細胞内での生存または増殖能の違いについて，比較検討を行う必要がある。

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に深甚なる謝辞を捧げるとともに，深く感謝の意を表します。

文　献

1) Good RC and Snider DE Jr.: Isolation of nontuberculous mycobacteria in the United States, 1980. J Infect Dis. 1982; 146: 829−833.
2) Good RC: Opportunistic pathogens in the genus *Mycobacterium*. Ann Rev Microbiol. 1985; 39: 347−369.
3) Mizuguchi Y, Udou T and Yamada T: Mechanism of antibiotics resistance in *Mycobacterium intracellulare*. Microbiol Immunol. 1983; 27: 425−431.
4) Saito H, Tomioka H, Sato K, et al.: Identification of various serovar strains of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. J Clin Microbiol. 1990; 25: 1694−1697.
5) Kiehn TE, Edwards FF, Brannon P, et al.: Infections caused by *Mycobacterium avium* complex in immunocompromised patients: diagnosis by blood culture and fecal examination, antimicrobial cusceptibility tests, and morphological and seroagglutination characteristics. J Clin Microbiol. 1985; 21: 168−173.
6) McNeil M, Tsang AY and 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.
7) Ishibashi Y and Arai T: Specific inhibition of phagosome−lysosom fusion in murine macrophages mediated by *Salmonella typhimurium* infection. FEMS Microbiol. Immunol. 1990; 64: 35−44.
8) Goren MB, Vatter AE and Fiscus J: Polyanioic agents as inhibitors of phagosome−lysosome fusion in cultured macrophages: Evolution of an alternative interpretation. J Leukocyte Biol. 1987; 41: 111−121.
9) Miyazaki Y, Oka S, Hotta H, et al.: Stimulation and inhibition of polymorphonuclear leukocytes phagocytosis by lipoamino acids isolated from *Serratia marcescens*. FEMS Immunol Med Microbiol. 1993; 6: 265−272.
10) Sall PM, Shafer RW and Hopewell PC: Exogeneous reinfection with multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* in patients with advanced HIV infection. New Engl J Med. 1993; 328: 1137−1144.
11) Wolinsky E and Rynearson TK: Mycobacteria in soil and their relation to disease−associated strains. Am Rev Respir Dis. 1968; 97: 1032−1037.
12) Goslee S and Wolinsky E: Water as a source of potentially pathogenic mycobacteria. Am Rev Respir Dis. 1976; 113: 287−292.
13) Reznikov M, Leggo JH and Dawson DJ: Investigation by seroagglutination of strains of the *Mycobacterium intracellulare* − *M. scrofulaceum* group from house dusts and sputum in Southeastern Queensland. Am Rev Respir Dis. 1971; 104: 951−953.
14) McDiarmid A: Tuberculosis in wild birds. Rroc R Soc Med. 1964; 57: 480−481.
15) Jorgensen JB, Engbaek C and Dam A: An enzootic of pulmonary tuberculosis in pigs caused by *M. avium*. Ⅱ. Bacteriological studies. Acta Vet Scand. 1972; 13: 68−86.
16) Feldman WH, Davies R, Moses HE, et al.: An unusual mycobacterium isolate from sputum of a man suffering from pulmonary disease of long duration. Am Rev Tuberc. 1973; 48: 272−290.
17) Crow HE, King CT, Smith E, et al.: A limited clinical, pathologic and epidemiologic study of patients with pulmonary lesions associated with atypical acid−fast bacilli in the sputum. Am Rev Tuberc. 1957; 75: 199−202.
18) Gottlieb MS, Schroff R, Schanker M, et al.:

Pneumocyctis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men : Evidence of a new acquired immunodeficiency. N Engl J Med. 1981 ; 305 : 1425−1430.

19) Hawkins CC, Gold JWM, Whimbey TE, et al. : *Mycobacterium avium* complex infections in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Ann Intern Med. 1986 ; 105 : 184−188.

20) Stacey AR : Isolation of *Mycobacterium avium-intracellulare-scrofulaceum* complex from faeces of patients with AIDS. Br Med J. 1986 ; 293 : 1194.

21) Brennan PJ and Goren MB : Structural studies on the type-specific antigens and lipids of the *Mycobacterium avium - Mycobacterium intracellulare - Mycobacterium scrofulaceum* serocomplex. J Biol Chem. 1979 ; 254 : 4205−4211.

22) 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.

23) Crowle AJ, Tsang AY, Vatter AE, et al. : Comparison of 15 laboratory and patient-derived strains of *Mycobacterium avium* for ability to infect and multiply in cultured human macrophages. J Clin Microbiol. 1986 ; 24 : 812−821.

24) Swartz RP, Naai D, Vogel CW, et al. : Differences in uptake of mycobacetria by human monocytes : a role for complement. Infect Immun. 1988 ; 56 : 2223−2227.

25) Catanzaro A and Wright SD : Binding of *Mycobacterium avium - Mycobacterium intracellulare* to human leukocytes. Infect Immun. 1990 ; 58 : 2951−2956.

26) Bermudez LE, Young LS and Enkel H : Interaction of *Mycobacterium avium* complex with human macrophages : Roles of membrane receptors and serum proteins. Infect Immun. 1991 ; 59 : 1697−1702.

27) Katoh M : Studies of lysosomal enzymes in macrophages. Ⅲ. Lysosomal enzyme activities in cultured macrophages infected with some species of mycobacteria. Hiroshima J Med Sci. 1981 ; 30 : 99−107.

28) Frehel C, Chastellier C, Lang T, et al. : Evidence for inhibition of fusion of lysosomal and prelysosomal compartments with phagosomes in macrophages infected with pathogenic *Mycobacterium avium*. Infect Immun. 1986 ; 52 : 252−256.

29) Crowle AJ, Dahl R, Ross E, et al. : Evidence that vesicles containing living, virulent *Mycobacterium tuberculosis* or *Mycobacterium avium* in cultured human macrophages are not acidic. Infect Immun. 1991 ; 59 : 1823−1831.

30) Gangadharam PRJ and Edwards CKⅢ : Release of superoxide anion form resident and activated mouse peritoneal macrophages infected with *Mycobacterium intracellulare*. Ann Rev Respir Dis. 1984 ; 130 : 834−838.

31) McNeil MR and Brennan PJ : Structure, function and biogenesis of the cell envelope of mycobacteria in relation to bacterial physiology, pathogenesis and drug resistance ; some thoughts and possibilities arising from recent structural information. Res Microbiol. 1991 ; 142 : 451−463.