

原 著

Mycobacterium avium complex (MAC) 血清型特異的
glycopeptidolipid (GPL) のヒト単球 phagocytosis および
phagosome-lysosome fusion に及ぼす影響

竹垣 嘉訓

大阪市立大学医学部細菌学教室・泌尿器科学教室

EFFECT OF SEROTYPE SPECIFIC GLYCOPEPTIDOLIPID (GPL)
ISOLATED FROM *MYCOBACTERIUM AVIUM* COMPLEX (MAC)
ON PHAGOCYTOSIS AND PHAGOSOME-LYSOSOME FUSION
OF HUMAN PERIPHERAL BLOOD MONOCYTES

*Yoshinori TAKEGAKI

*Department of Bacteriology and Urology, Osaka City University Medical School

Mycobacterium avium complex (MAC) is a typical intracellular parasite similar to *M. tuberculosis* and is one of the most important pathogens that coinfects AIDS patients. Attention has been focused on *M. avium* infection causing immunosuppression of hosts. Specific serotype-subspecies such as 1, -4 or -8 serotypes can be isolated frequently in humans infected with HIV. Furthermore, the prognosis after infection differs depending on the serotype. Serotype-4 in general shows unfavourable prognosis, while serotype-16 yields rapid recovery. Therefore, we have been interested in the immunomodifying activity of the surface glycopeptidolipid (GPL) antigen. However, no information has been available to date dealing on the virulent factor of MAC that is directly related with intracellular bactericidal activity. Recently, we have tried to test the effect of various GPLs purified from MAC 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 fusion (P-L fusion) was estimated by the acridine orange staining of fused vesicles and bacteria. Results showed strong promotion of phagocytosis and marked inhibition of P-L fusion by serotype-4 GPL, while neither promotion of phagocytosis nor inhibition of P-L fusion in phagocytic cells were shown by serotype-16 GPL. Serotype-8 GPL showed concomitant stimulation of both phagocytosis and P-L fusion. These effects may be due to some unknown interaction between specific carbohydrate chain and organella membranes and serotype-4 GPL may be one of the

*〒545-0051 大阪府大阪市阿倍野区旭町1-4-54

*1-4-54, Asahi-machi, Abeno-ku, Osaka-shi, Osaka
545-0051 Japan.

(Received 15 Mar. 1999/Accepted 4 Oct. 1999)

possible virulent factors in MAC. Comparison with known possible virulent factors such as trehalose 6,6'-dimycolate (TDM), trehalose 6-monomycolate (TMM), glucose 6-monomycolate (GM) or sulfatide was also reported.

Key words : *Mycobacterium avium* complex (MAC), Glycopeptidolipid (GPL), Phagocytosis, Phagosome-lysosome fusion

キーワード : *Mycobacterium avium* complex (MAC), Glycopeptidolipid (GPL), 貪食, 食胞-リソソーム融合

緒 言

結核をはじめとする抗酸菌感染症は、今なお感染症の中で重要な位置を占めており、さらに近年、人型結核菌以外に非定型抗酸菌による感染症が増加の傾向にある。中でも *Mycobacterium avium* complex (MAC) は、AIDS 患者に合併し、予後に影響を与える日和見感染症として注目されている¹⁾²⁾。MAC は、細胞表層成分である glycopeptidolipid (GPL) の抗原性の違いに基づき、少なくとも 28 種の血清型に分類されるが³⁾、AIDS においては特定の血清型、特に 1, 4, 8 型による感染頻度が高く⁴⁾、また 4 型の合併例が最も予後不良といわれており、血清型と病原性の関係が注目されている。また、MAC は細胞内寄生性細菌であり、単球および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細胞内で増殖し⁵⁾、宿主に対してさまざまな免疫学的影響を及ぼすことが知られている^{6)~10)}。MAC がマクロファージによる殺菌作用を免れ、細胞内で生きながらえる機序についての仮説はいくつかあるが、その実態はいまだ不明な点が多い。また、これらのマクロファージに対する抗殺菌作用は、MAC の血清型によって差があることが知られている。

今回、MAC の血清型間における病原性の違いに、MAC の各血清型を特異的に決定する細胞表層成分である GPL が関係しているのではないかと考え、GPL のヒト単球による貪食および phagosome-lysosome fusion (P-L fusion) に及ぼす影響について検討した。比較する GPL として、AIDS 末期患者から最も高頻度に分離され、最も予後が悪いといわれている 4 型、比較的高頻度に分離されるが病原性は 4 型に比べて弱いとされている 8 型、および比較的薬剤に反応しやすく予後は良いとされている 16 型について検討した。

また、cord factor; trehalose 6,6'-dimycolate (TDM) および sulfatide は、以前より結核菌の病原因子として知られているが、P-L fusion に及ぼす影響に関しては、ともに抑制するという報告が散見され、いまだ一定の見解が得られていない。そこで今回、GPL

以外に、抗酸菌に特徴的な細胞表層糖脂質成分である TDM, trehalose 6-monomycolate (TMM), glucose 6-monomycolate (GM) および 2, 3, 6, 6'-tetra-acyltrehalose 2'-sulphate (sulfatide) についても同様に検討し、GPL と比較した。

実験材料および方法

1. MAC の培養

菌株は ATCC 由来の標準菌を用いた。MAC の各菌株を、glycerol (2 ml/l) および Middlebrook ADC Enrichment (sodium chloride-bovine albumin-dextrose-catalase: Becton Dickinson Microbiology Systems) (100 ml/l) を含む Middlebrook 7H9 broth (Difco Laboratories) の液体培地で 37°C 3 週間振盪培養し集菌した。

2. GPL の単離と精製

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、0.2 N 水酸化ナトリウム加メタノール中で 37°C, 60 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 (TLC) プレート (20×20 cm, 250 μm: Analtech, Inc.) 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、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、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°C で加温発色させ、各 GPL の 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)。

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

一般に、GPL は、Fig. 2 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-methylrhamnose 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 から伸びた糖鎖構造により、各血清型が特異的に決定される。4型 GPL は末端より、4-O-methylrhamnose, 2-O-methylfucose, rhamnose, 6-deoxytalose の4個の糖で構成されている。8型 GPL は末端より、4,6-(1'-carboxyethylidene)-3-O-methylglucose, rhamnose, 6-deoxytalose の3個の糖で構成されている。16型 GPL は3-(2'-methyl-3'-hydroxy-4'-methoxy pentanoylamido) 3,6-dideoxyhexose, 4-O-methylrhamnose, rhamnose 2分子, 6-deoxytalose の5個の糖で構成されている。

3. 単球の調整
ヘパリン採血した健常人末梢血を、同量の Mono-Poly Resolving Medium (ICN Biomedical Japan Co. Ltd.) 上に静置し、20℃で1500rpm 30分間遠心し、単球層を分離した。分離した単球を0.1% gelatin-Hanks 液にて3回洗浄した後、10%非働化 foetal bovine serum (GIBCO Laboratories), penicillin G

(100U/ml), streptomycin (100 μ g/ml) 加 RPMI 1640 medium (日研生物医学研究所) にて 5×10^6 cells/ml の濃度に調整した。

4. MAC 死菌体の食食

MAC 菌体を60℃で60分間加熱し、死菌体とした後、gelatin-Hanks 液で3回洗浄し、 1×10^8 cells/ml: gelatin-Hanks 液の濃度に調整した。一方、同様にして得られた菌体からクロロホルム:メタノール (2:1, V/V) にて細胞表層の脂質を除去した脱脂菌体も 1×10^8 cells/ml: gelatin-Hanks 液の濃度に調整した。調整した単球浮遊液 (5×10^6 cells/ml) 200 μ 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、上記の菌体浮遊液 (1×10^8 cells/ml) を各々200 μ l ずつ乗せ、37℃で1, 3, 6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、Ziehl-Neelsen 染色 (TB Quick Stain Kit; BBL Microbiology Systems) し、顕微鏡 (1000倍) で単球に食食された菌数を数えた。

5. GPL で coating した *S. aureus* の食食

GPL はメタノールに溶解し (0.2~25 μ g/ml), *S. aureus* 死菌体 (1×10^8 cells/ml) 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1分間 sonication し、さらに voltex にて十分攪拌し、GPL で coating した *S. aureus* の浮遊液 (1×10^8 cells/ml: gelatin-Hanks 液) とした。上記方法4. と同様にして cover slip 上に付着させた単球 (5×10^6 cells/ml) に、GPL で coating (0.2~25 μ g/ml) した *S. aureus* 浮遊液 (1×10^8 cells/ml) を200 μ l 乗せ、1, 2, 3, 4時間インキュベートした。インキュベート後、RPMI 1640 medium にて3回洗浄した後、メタノールで単球を固定した。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、1視野当たりの単球数、および、1個の単球に食食された菌数を数えた¹¹⁾。結果は10サンプルの平均値とした。

6. GPL で coating した *S. aureus* の phagosome-lysosome fusion (P-L fusion)

P-L fusion の実験は、Ishibashi ら¹²⁾ あるいは

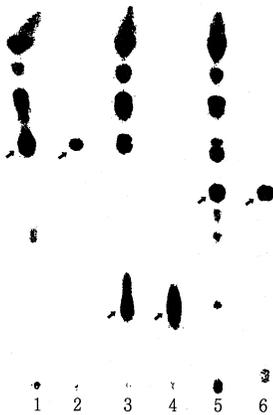


Fig.1 Thin layer chromatography (TLC) of alkali stable lipids isolated from three MAC serovars. (1) Serovar 4 crude lipid, (2) Serovar 4 GPL, (3) Serovar 8 crude lipid, (4) Serovar 8 GPL, (5) Serovar 16 crude lipid, and (6) Serovar 16 GPL. Development of samples was undertaken in chloroform:methanol-water (65:25:4, V/V) and visualized after treatment with 50% H_2SO_4 . Arrows indicate specific types of GPL.

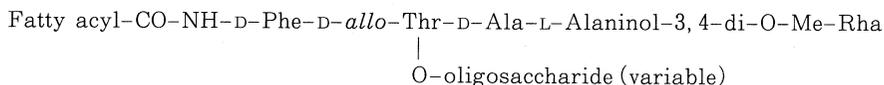


Fig.2 Common structure of glycopeptidolipid (GPL) antigen in MAC.

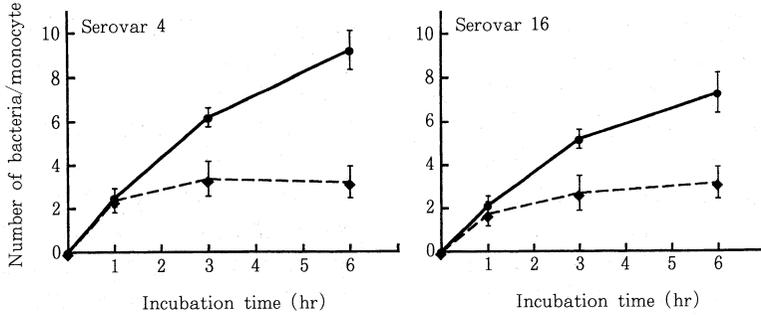


Fig. 3 Time-course for phagocytosis of intact (●) and delipidated (◆) MAC serovar 4 and 16 by human monocytes. Each point represents mean \pm S.E. (n=10)

Miyazaki ら¹¹⁾の方法を一部変更して行った。上記方法4.と同様にして cover slip 上に付着させた単球 (5×10^6 cells/ml) に、PBS (日研生物医学研究所) で $5 \mu\text{g/ml}$ に調整した acridine orange (SIGMA Chemical company) を加え、 37°C 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、GPL で coating ($0.2 \sim 25 \mu\text{g/ml}$) した *S. aureus* 浮遊液 (1×10^8 cells/ml) を乗せ、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、1視野当たりの単球数および acridine orange に染色された菌数を数えた。引き続き、単球をメタノールで固定し、乾燥後 methylene blue 染色し、方法5.と同様に単球数および菌数を数えた。P-L fusion は fusion index (FI) で評価し、さらに phagocytic index (PI) に対する fusion index の比 FI/PI についても評価した。

$$\text{PI} = \frac{\text{食食された菌の総数/単球の総数}}{\text{菌を食食している単球の総数/単球の総数}} \times 100$$

$$\text{FI} = \frac{\text{P-L fusion を起こした菌の総数/単球の総数}}{\text{P-L fusion を起こした単球の総数/単球の総数}} \times 100$$

7. TDM, TMM, GM および sulfatide で coating した *S. aureus* の食食および P-L fusion

TDM, TMM, GM は *Rhodococcus terrae* 70012 株菌体より、また sulfatide は *Mycobacterium tuberculosis* Aoyama B 株菌体より抽出精製したものを使用した。TDM, TMM, GM および sulfatide に

ついても、GPL と同様の方法で食食、P-L fusion および FI/PI について評価した。ただし、これらの糖脂質は2-プロパノールに溶解させたものを用いた。

結 果

1. MAC 菌体および菌体から脂質を除去した脱脂菌体の単球による食食

まず、GPL の食食に及ぼす影響を調べる前に、MAC 菌体表面の脂質が食食に関係していることを確認するために、MAC 血清型4型菌および16型菌について、intact な死菌体および菌体から脂質を除去した脱脂菌体をヒト末梢血単球に食食させた。Fig. 3 にその経時的变化を示す。MAC 血清型4型菌および16型菌は、ともに1~6時間で経時的に顕著に食食されたが、菌体から脂質を除去すると、食食は著しく阻害された。また、6時間のインキュベートにて、血清型4型菌は16型菌に比べて、より活発に食食される傾向を示した ($0.01 < p < 0.05$)。そこで、MAC 血清型間において特異的に異なる最も特徴的な細胞表面成分 GPL 抗原が、単球による食食に影響を及ぼしているのではないかと考え、MAC 各血清型菌体表面の脂質から GPL を単離し、その食食に及ぼす影響について調べた。

2. GPL の食食および P-L fusion に及ぼす影響

4, 8 および16型 GPL で coating した *S. aureus* を、各々、単球と3時間インキュベートして比較したところ、Fig. 4 に示すように、4型および8型 GPL で coating した *S. aureus* はともに、GPL の濃度が $5 \mu\text{g/ml}$ まででは、GPL の濃度依存的に食食は促進され、GPL $5 \mu\text{g/ml}$ で食食は control に比べて約2倍に促進された。一方、16型 GPL で coating した *S. aureus* では、食食に特に影響は認められなかった。

単球による食食の後に続いて起こる P-L fusion に

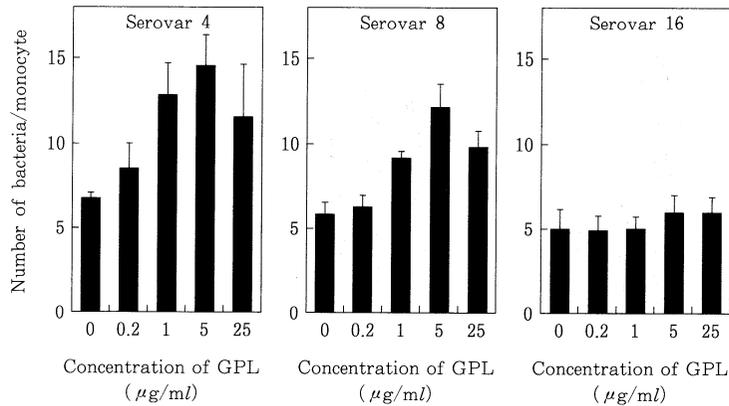


Fig. 4 The effect of GPL on phagocytosis of *S. aureus* by human monocytes. *S. aureus* (1×10^8 /ml) were coated with GPL derived from MAC serovar 4, 8 and 16 and incubated with human monocytes for 3hr. The values represent mean \pm S.E. (n=10)

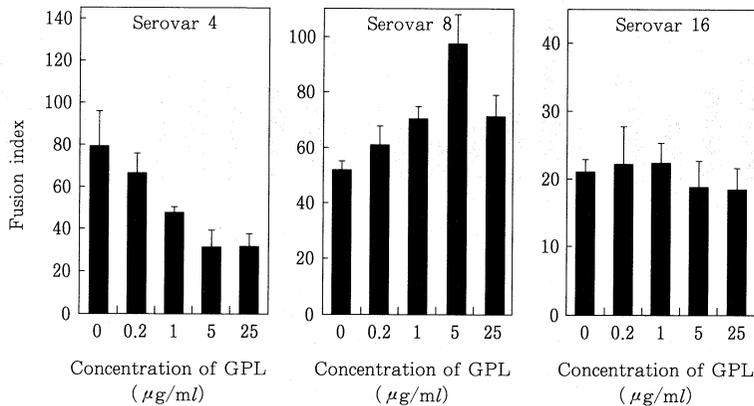


Fig. 5 The effect of GPL on P-L fusion of human monocytes. *S. aureus* (1×10^8 /ml) were coated with GPL derived from MAC serovar 4, 8 and 16 incubated with human monocytes for 3hr. And the fusion index was calculated. (See materials and methods) The values represent mean \pm S.E. (n=10)

対して、各血清型 GPL の及ぼす影響について調べたところ、Fig. 5 に示すように、4 型 GPL で coating した *S. aureus* では、GPL の濃度依存的に fusion index (FI) は低下し、GPL 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では control に比べて FI は 1/2 以下に低下した。しかしながら、8 型 GPL で coating した *S. aureus* では、逆に GPL の濃度が 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ までは、GPL の濃度依存的に FI は上昇し、GPL 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では control に比べて FI は約 2 倍に上昇した。一方、16 型 GPL で coating した *S. aureus* では、FI

は control に比べて特に有意な変化は認められなかった。

以上の結果より、*S. aureus* の菌体表面に coating した 4 型 GPL は、単球に貪食された後、P-L fusion を顕著に抑制したが、逆に 8 型 GPL は P-L fusion を促進させる作用が認められた。また、16 型 GPL は P-L fusion に影響を及ぼさなかった。

次に、GPL の貪食および P-L fusion に及ぼす影響を FI/PI によって評価すると、Fig. 6 に示すように、4

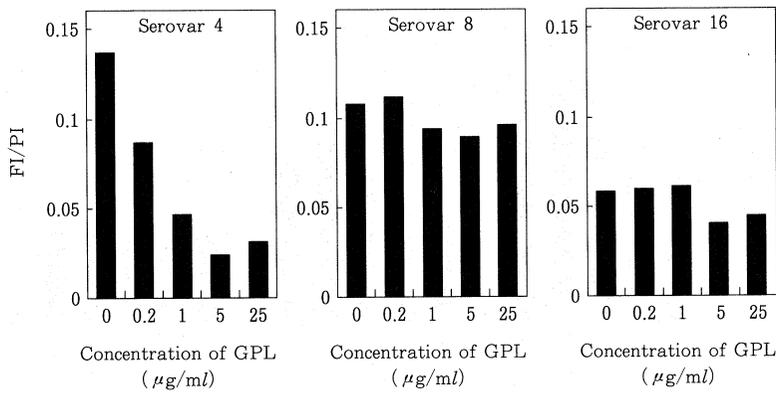


Fig. 6 Comparative FI/PI ratio induced by GPL of MAC serovar 4, 8 and 16.

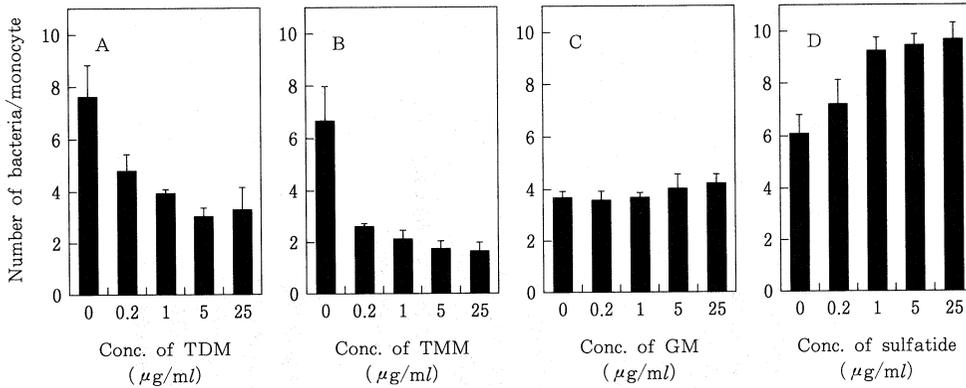


Fig. 7 The effect of TDM, TMM, GM and sulfatide on phagocytosis of *S. aureus* by human monocytes. *S. aureus* (1×10^8 /ml) were coated with TDM (A), TMM (B), GM (C) and sulfatide (D) and incubated with human monocytes for 3hr. The values represent mean \pm S.E. (n=10)

型 GPL で coating した *S. aureus* では、PI は上昇するが、逆に FI は低下するので、FI/PI は GPL の濃度依存的にさらに著明に低下した。一方、8 型 GPL では、PI は 4 型 GPL と同様に上昇するが、FI もそれに平行して上昇するので、FI/PI はほぼ一定となった。また、16 型 GPL では、PI、FI とも特に影響を及ぼさなかったため、FI/PI もほぼ一定となった。

3. TDM, TMM, GM および sulfatide の貪食および P-L fusion に及ぼす影響

抗酸菌に特徴的な細胞表層糖脂質成分である TDM, TMM, GM および sulfatide の、単球による貪食および P-L fusion に及ぼす影響について調べた。Fig. 7 に示すように、TDM および TMM で coating した *S. aureus* では、ともに TDM および TMM の濃度依存的

に貪食は抑制されたが、GM で coating した *S. aureus* では、貪食に特に影響は認められなかった。また、sulfatide で coating した *S. aureus* では、sulfatide の濃度依存的に貪食は促進された。

Fig. 8 に示すように、TDM および TMM で coating した *S. aureus* では、ともに TDM および TMM の濃度依存的に FI は低下したが、GM で coating した *S. aureus* では、FI に特に有意な差は認められなかった。また、sulfatide で coating した *S. aureus* では、sulfatide の濃度依存的に FI は低下した。以上の結果より、TDM, TMM および sulfatide はともに P-L fusion を顕著に抑制したが、GM は P-L fusion に対して特に影響を及ぼさなかった。

同様に FI/PI にて評価すると、Fig. 9 に示すように、

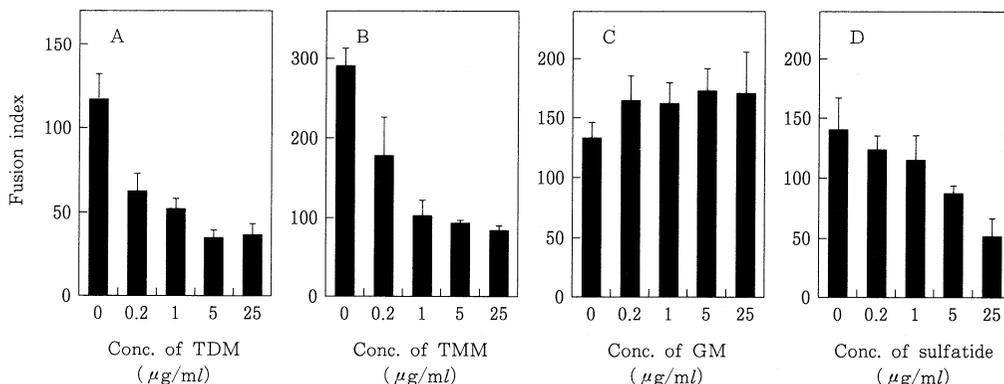


Fig. 8 The effect of TDM, TMM, GM and sulfatide on P-L fusion of human monocytes. *S. aureus* (1×10^8 /ml) were coated with TDM (A), TMM (B), GM (C) and sulfatide (D) and incubated with human monocytes for 3hr. And the fusion index was calculated. (See materials and methods) The values represent mean \pm S.E. (n=10)

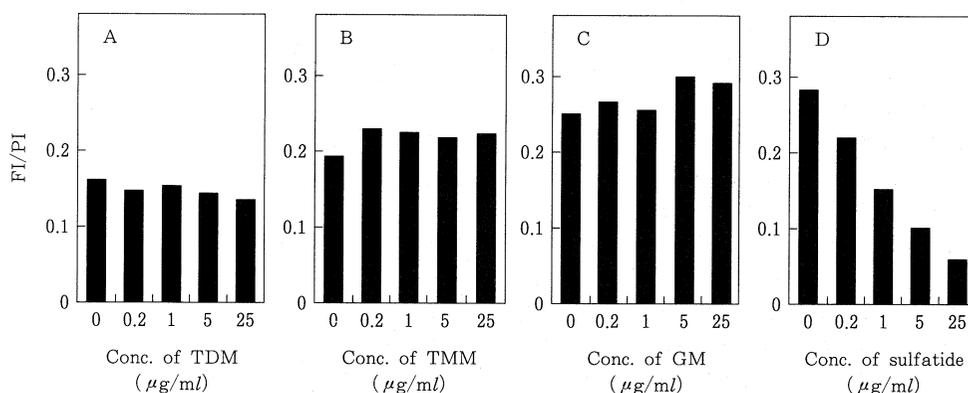


Fig. 9 Comparative FI/PI ratio induced by TDM (A), TMM (B), GM (C) and sulfatide (D).

TDMおよびTMMでcoatingした*S. aureus*では、ともにFIは濃度依存的に低下したが、PIも同様に低下しているため、FI/PIはほぼ一定となった。また、GMは、PI、FIともに影響を及ぼさなかったため、FI/PIも一定となった。一方、sulfatideでは、4型GPLと同様に、PIは上昇するが、逆にFIは低下するので、FI/PIはsulfatideの濃度依存的にさらに顕著に低下した。

考 察

1943年に、ミネソタでMACによる呼吸器感染症患者が初めて報告されて以来、数多くのMAC感染症例が報告されてきたが、AIDSの出現までは、そのほとんどの症例は呼吸器感染症であった。しかしながら、

AIDS患者では、消化管および気管支を初感染巣とし、全身の播種性感染へと進行し重篤化する症例を多く認める¹³⁾。また、抗結核剤をはじめとする種々の化学療法に対しても治療抵抗性を示す場合が多く、治療法も確立されていないのが現状である。

一方、MACは、Schaeferらによれば血清凝集反応により20以上の群に細分されており、現在までに28種の血清型が報告されているが³⁾、ヒトからの分離株には血清型によって偏りがあり、例えば、AIDS患者では1, 4, 8型の分離頻度が高く、特に4型はその50~77%を占めると報告されている⁴⁾。また、血清型により化学療法の奏効性が異なるという報告もあり¹⁴⁾、血清型と病原性の関係が注目されている。

一方、Brennanらは、グラム陰性細菌の Lipopoly-saccharides の O 抗原と同様の免疫学的性質を持つ、MAC 細胞表層 L1 layer の C-mycoside に含まれる血清型特異 glycopeptidolipid 抗原 (GPL) の構造を解析し、その特異な糖鎖構造の性質を明らかにしてきた¹⁵⁾¹⁶⁾。GPL は lipopeptidyl-O-methyl rhamnose を共通の構造として持ち、allo-threonine から伸びた oligosaccharide がエピトープとなり、各血清型が特異的に決定される。

これまでに知られている GPL の免疫活性としては、①血清型 4 型 GPL は、非特異的な mitogen 刺激に対するリンパ球の幼若化反応を抑制する¹⁷⁾¹⁸⁾、②血清型 4 型 GPL およびその lipopeptide fragment は、マクロファージの C3bi 補体レセプターの発現を抑制し、また、マクロファージに対して TNF 産生作用がある¹⁹⁾、などの報告が散見されるのみである。

MAC がマクロファージによる殺菌作用を免れ、細胞内で生きながらえる機序としては、①マクロファージ内に取り込まれた MAC が P-L fusion を抑制し、水解酵素の phagosome への移行を阻害する作用を持つ²⁰⁾²¹⁾、②たとえ P-L fusion が起こっても、菌体表面を覆う electron-translucent capsule が、リソソーム酵素の菌体への浸透を妨げる²²⁾、③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²³⁾、などの機序が報告されている。Frehel ら²⁰⁾は、MAC 生菌およびγ線で殺菌した死菌体ともに、マクロファージの P-L fusion を抑制したことより、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。

今回、著者は、MAC に特有な細胞表層成分であり、各血清型に特異的な GPL に注目し、GPL のヒト単球による貪食および P-L fusion に及ぼす影響について検討した。その結果、4 型および 8 型 GPL で coating した *S. aureus* で貪食は促進されたが、16 型 GPL では貪食に特に影響を及ぼさなかったことより、各血清型間における貪食の差に、GPL が関与している可能性が示唆された。一般に、マクロファージによる異物識別の機序に、異物表面の疎水性による機序があげられ、細菌の疎水性と貪食されやすさとは相関するといわれている。今回用いた GPL 間における疎水性の違いは、薄層クロマトグラフィーの結果より、最も疎水性が強いのが 4 型 GPL、次に 16 型 GPL、最も疎水性が弱いのが 8 型 GPL と考えられる。しかし、この疎水性の違いは、今回示した各 GPL の貪食に及ぼす影響の違いを説明することはできず、その機序は不明である。また、同様に何故 4 型 GPL は P-L fusion を抑制し、8 型 GPL では P-L fusion が促進されたのかを説明することはでき

ない。今回の実験に用いた糖脂質の中で、P-L fusion の促進を認めたのは 8 型 GPL だけであったが、8 型 GPL の糖鎖の末端には 4,6-carboxyethylidene 基があり、酸性糖脂質となっている。このユニークな酸性基が P-L fusion に影響を及ぼしている可能性があり、今後の検討が必要と思われる。さらに、今回の研究で最も興味深い結果は、GPL が単球の P-L fusion に影響を及ぼし、しかも各血清型間で顕著な差が認められたことである。特に、最も病原性が強い 4 型菌より得られた GPL で特異的に貪食の促進と P-L fusion の抑制作用が認められたことは、MAC が単球およびマクロファージに貪食された後も排除されることなく増殖し、宿主に対してさまざまな免疫学的影響を及ぼしながら病原性を示すという過程を考えると、MAC の血清型間における病原性の違いに GPL の貪食および P-L fusion に及ぼす作用が関与している可能性を示唆するものと考えられた。

さらに今回、GPL と比較するために、抗酸菌に特徴的な細胞表層糖脂質成分である TDM, TMM, GM および sulfatide についても同様に単球の貪食と P-L fusion に及ぼす影響について検討したところ、TDM と TMM はともに貪食および P-L fusion を抑制したが、GM は貪食、P-L fusion のいずれにも影響せず、また sulfatide は 4 型 GPL と同様に貪食の促進と P-L fusion の抑制作用を示した。このうち、TDM は、肉芽腫形成能²⁴⁾、抗腫瘍活性²⁵⁾、種々のサイトカイン誘導能²⁶⁾ 等さまざまな免疫薬理学的活性を持ち、以前より結核菌の病原因子として知られており、P-L fusion に関しては抑制するという報告が散見されるが、いまだ一定の見解は得られていない。Spargo ら²⁷⁾によると、*Nocardia asteroides* より単離した cord factor (TDM) は、intact な状態で P-L fusion を抑制するが、trehalose あるいは mycolic acid 単独では、この抑制作用は認められないと述べている。sulfatide もまた以前より結核菌の病原因子として知られているが、Goren ら²⁸⁾によると、*M. tuberculosis* H37Rv より単離した sulfatide は、マクロファージを sulfatide で直接刺激した後に yeast を貪食させた場合、および sulfatide で coating した yeast を貪食させた場合、ともに P-L fusion の抑制が認められたと報告している。今回の実験では、*M. tuberculosis* Aoyama B より単離した sulfatide で、P-L fusion の抑制とともに貪食の促進作用も認められたが、これは、MAC 血清型 4 型 GPL で認められた作用と同様の結果であり、4 型 GPL の病原性に及ぼす影響を考える上で興味ある結果と思われた。

以上、MAC 血清型特異的 GPL の、ヒト単球による貪食および P-L fusion に及ぼす影響について検討し、

血清型間における病原性の差に GPL が関与している可能性が示唆された。今後、実際にこのような GPL 存在下における食細胞内の抗酸菌が、いかに細胞内殺菌機構から逃れ得るかについて検討する必要があると考えている。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、本研究に対しご懇切なるご指導、ご校閲を頂きました恩師矢野郁也教授に深甚なる謝意をささげるとともに、ご指導、ご鞭撻を賜りました宮崎由子博士に深く感謝の意を表します。また、本研究にご協力頂いた細菌学教室の先生方、第3生化学教室市原宏介教授、泌尿器科学教室前川正信前教授および泌尿器科学教室岸本武利教授と泌尿器科学教室の先生方に厚く感謝致します。

文 献

- 1) Guthertz LS, Damsker B, Janda JM, et al. : *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* infections in patients with and without AIDS. *J Infect Dis.* 1989; 160 : 1037-1041.
- 2) Nightingale SD, Byrd LT, Wynne BA, et al. : Incidence of *Mycobacterium avium-intracellulare* complex bacteremia in human immunodeficiency virus-positive patients. *J Infect Dis.* 1992; 165 : 1082-1085.
- 3) Schaefer WB : Serological identification of atypical mycobacteria. *Methods Microbiol.* 1979; 13 : 323-344.
- 4) 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.
- 5) Crowle AJ, Tsang AY, May MH, et al. : Comparison of 15 laboratories and patients-derived strains of *Mycobacterium avium* for ability to infect and multiply in cultured human macrophages. *J Clin Microbiol.* 1986; 24 : 812-821.
- 6) Bermudetz LE : Production of transforming-growth-factor- β by *Mycobacterium avium* infected macrophages is associated with unresponsiveness to interferon gamma. *J Immunol.* 1993; 150 : 1838-1845.
- 7) Bermudetz LE, Wu M, Young LS, et al. : Interleukin-6 antagonizes tumor necrosis factor-mediated mycobacteriostatic and mycobacterial activities in macrophages. *Infect Immun.* 1992; 60 : 4245-4251.
- 8) Denis M, Gregg EO : Recombinant tumor necrosis factor-alpha decreases whereas recombinant interleukin-6 increases growth of a virulent strain of *Mycobacterium avium* in human macrophages. *Immunology.* 1990; 71 : 139-141.
- 9) Tsuyuguchi I, Kawasumi H, Kishimoto S, 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.
- 10) Newman GW, Gan HX, Remold HG, et al. : Survival of human macrophages infected with *Mycobacterium avium-intracellulare* correlates with increased production of tumor necrosis factor- α and IL-6. *J Immunol.* 1991; 147 : 3942-3948.
- 11) 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.
- 12) Ishibashi Y, Arai T : Specific inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages mediated by *Salmonella typhimurium* infection. *FEMS Microbiol Immunol.* 1990; 64 : 35-44.
- 13) Jacobson MA, Hopewell PC, Sande MA, et al. : Natural history of disseminated *Mycobacterium avium* complex infection in AIDS. *J Infect Dis.* 1991; 164 : 994-998.
- 14) Tomioka H, Sato K, Yamada Y, et al. : Susceptibility of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* to various antibacterial drugs. *Microbiol Immunol.* 1989; 33 : 509-514.
- 15) Brennan PJ, 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.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) Tassell SK, Pourshafie M, Barrow WW, et al.: Modified lymphocyte response to mitogens induced by lipopeptide fragment derived from *Mycobacterium avium* serovar-specific glycopeptidolipids. *Infect Immun.* 1992; 60: 706-711.
- 19) 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.
- 20) Frehel C, Chastellier C, Rastogi N, 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.
- 21) Rastogi N, Bachelet M, Carvalho de SJP: Intracellular growth of *Mycobacterium avium* in human macrophages is linked to the increased synthesis of prostaglandine E2 and inhibition of the phagosome-lysosome fusions. *FEMS Microbiol Immunol.* 1992; 89: 273-280.
- 22) Frehel C, Ryper A, David H, et al.: The electron transparent zone in phagocytized *Mycobacterium avium* and other mycobacteria: formation, persistence and role in bacterial survival. *Ann Inst Pasteur/Microbiol (Paris).* 1986; 137B: 239-257.
- 23) Mayer BK, Falkinham JO: Superoxide dismutase activity of *Mycobacterium avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*. *Infect Immun.* 1986; 56: 631-635.
- 24) 矢野郁也: 抗酸菌ミコール酸含有糖脂質の構造と肉芽腫性病変の形成. *結核.* 1988; 63: 797-804.
- 25) Natsuhara Y, Yoshinaga J, Yano I, et al.: Granuloma-forming activity and antitumor activity of newly isolated mycoloyl glycolipid from *Rhodococcus terrae* 70012 (Rt. GM-2). *Microbiol Immunol.* 1990; 34: 45-53.
- 26) Fujita T, Sugimoto N, Yano I, et al.: Induction of interferons (IFNs) 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.
- 27) Spargo BJ, Crowe LM, Crowe JH, et al.: Cord factor (α , α -trehalose 6,6'-dimycolate) inhibits fusion between phospholipid vesicles. *Biochemistry.* 1991; 88: 737-740.
- 28) Goren MB, Hart PD, Armstrong JA, et al.: Prevention of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages by sulfatides of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1976; 73: 2510-2514.