

Mycobacterium bovis の弱毒化と cord factor による マウス肺肉芽腫炎症病変形成能の関連

The attenuation of virulence in *Mycobacterium bovis* and the relationship with
the granuloma formation induced by cord factor in mouse lungs

藤原 永年 *

Nagatoshi Fujiwara

The existence of mycolic acid is one of the feature in acid-fast bacteria. The mycolic acid is α -acyl β -hydroxy fatty acid, and is related with the acid-fast staining and cord forming. The mycolic acids are divided subclasses by modifying group, for examples, α -, methoxy-, and keto-mycolic acid. It is considered that mycolic acid is reflected to the virulence and pathogenesis. In this study, it is clarified the heterogeneity of mycolic acid subclasses in *Mycobacterium bovis*. The BCG parent strains, *M. bovis* B10 and *M. bovis* Ravenel produced α -, methoxy-, and keto-mycolic acids. The ratio of subclasses is strain-specific. Although the B10 and Ravenel strains produced α - \geq methoxy- $>$ keto-mycolic acid, the keto-mycolic acid was abundant in *M. bovis* BCG strains (Russian and Japanese strains). Moreover, the Connaught strain deleted the methoxy-mycolic acid. Cord factor is trehalose-6,6'-dimycolate, and induces lung granulomatous lesions in mice by intravenous injection. The cord factor of BCG-related strains induced less granulomatous lesions, compared to that of *M. tuberculosis*. The body weight of mice decreased after cord factor injection. The lesions reflect the patterns of mycolic acid subclasses.

1. 緒言

結核菌を始めとする抗酸菌は、細胞表層がミコール酸を含むワックス様の脂質成分に富むことが最大の特徴であり、これら脂質分子により色素に染色され難く一旦染色されると脱色され難い抗酸性を呈する。また、細胞表層脂質成分は宿主と最初に出会う分子であり、タンパク質分子と異なる疎水性分子であるが、宿主免疫応答を惹起して抗酸菌感染症の発症や病変形成に寄与していることが想定される。Cord factor (trehalose 6,6'-dimycolate, TDM) は抗酸菌に偏在するミコール酸含有糖脂質であり、単一脂質分子として多彩な免疫薬理的活性を持つ。構成ミコール酸は炭素鎖長や修飾基の異なるサブクラス (α -, methoxy-, keto-ミコール酸) が存在し、菌種によりサブクラスの種類及びその含有比率が異なっている。近年、結核菌遺伝子解析からミコール酸生合成に関与する遺伝子群がいくつかクローニングされ、それら欠損株の病原性や抗酸性への影響が報告されており、ミコール酸の構造修飾が宿主免疫応答の制御因子として重要であることが示唆されている¹⁾。

一方、唯一の結核ワクチン株であるBCG株は、パスツール研究所から世界各国に配布された時期により14種類以上の亜株が存在する²⁾。亜株によりワクチンの有効性が異なると考えられ、世界保健機構 (WHO) はRussian, Japanese, Danish株を標準株として提案している。これらBCG亜株間のミコール酸組成は不均一であり、cord factorも亜株により構成ミコール酸の異なった構造となっている。

本研究では、cord factorをマウスに投与すると結核類似性の肺肉芽腫炎症病変を形成することに着目し、BCG関連株のミコール酸組成の違いによる宿主免疫応答を比較検討することを目

* 食物栄養学科 教授

的とした。

2. 方法

2.1 W/o/wミセルの作製

Mycobacterium tuberculosis AoyamaB, *Mycobacterium bovis* B10, *M. bovis* Ravenel, *M. bovis* BCG Russian, *M. bovis* BCG Japanese, *M. bovis* BCG Connaught株の各死菌体からForch法に準じてcord factorを精製した。また、アルカリ加水水解により得られたミコール酸メチルエステルを薄層クロマトグラフィー (TLC) で展開し、ミコール酸サブクラスを検出した。W/o/wミセル 100 μ l当たり乾固させた150 μ gのcord factorを3.2 μ lのFreund's incomplete adjuvant (FIA) に完全溶解させ、同量のリン酸緩衝液 (PBS) を加えて混和した。さらに93.6 μ lの0.2% Tween 80/生理食塩水を加えて液量を調整した。テフロンホモジナイザーで20回 grindすることによりミセル化した³⁾。

2.2 マウスへのcord factor投与

C57BL/6マウス (7週齢, 雌) に、各菌体から精製したcord factor含有w/o/wミセル300 μ g/200 μ l/匹を尾静脈より投与した。コントロールとしてcord factorを含まないw/o/wミセルのみを同様に投与した。投与後は、個体を識別して経時的な体重変化を観察した。マウスは投与後4, 7, 14日目に各2-3匹ずつ剖検し、血清採取と肺を摘出した。各臓器の組織をHE染色して、組織学的な変化を観察した。

2.3 ELISA法によるTumor necrosis factor (TNF)- α , Interleukin (IL)-1 β の定量

摘出した肺をホモジナイザーで破碎し、PBSを500 μ lずつ加えて遠心分離した。その上清中のサイトカインを DuoSet (R&D SYSTEMS, MN, USA) を用いたELISA法で定量した。Capture antibodyを1% BSA/PBS (pH 7.2-7.4) で希釈し、100 μ lを96穴マイクロプレートに加え、4 $^{\circ}$ Cで一晩固相化した。1% BSA/PBSで1-2時間ブロッキングし、適宜希釈した検体およびstandard (0-2,000 pg/ml) 100 μ lを各wellに加え、2時間室温で静置反応した。洗浄後、detection antibodyを100 μ l加え、1.5時間室温で静置反応した。洗浄後、horseradish peroxidase conjugated-streptavidin 100 μ lを添加し、30分間室温で静置反応した。洗浄後、H₂O₂とtetramethylbenzidineの混合液を基質溶液として100 μ l添加し、30分間室温で発色反応させ、1 mol/L-硫酸 50 μ lで反応を停止した。各wellの吸光度 (A₄₅₀) を測定し、標準曲線から各検体のTNF- α およびIL-1 β 量を算出した。

3. 結果

各抗酸菌から単離精製したcord factorをTLCで展開し、純度を確認した。また、各BCG亜株から抽出、メチルエステル化したミコール酸のサブクラス分布をTLCで比較検討した (Fig. 1)。B10とRavenel株は、 α -, methoxy-, keto-ミコール酸の3つのサブクラスが存在した。BCG亜株のうちRussian, Japanese株が親株のB10株と同様のミコール酸サブクラスであったが、Connaught株はmethoxy-ミコール酸が欠失し、 α -, keto-ミコール酸のみであった。また、B10株ではmethoxy-ミコール酸の含量が最も多く、Ravenel株では α -ミコール酸の含量が多かった。BCG亜株3株についてはすべてketo-ミコール酸の含量が最も多く、各菌株でサブクラス組成、及び含量の差異が明らかとなった。

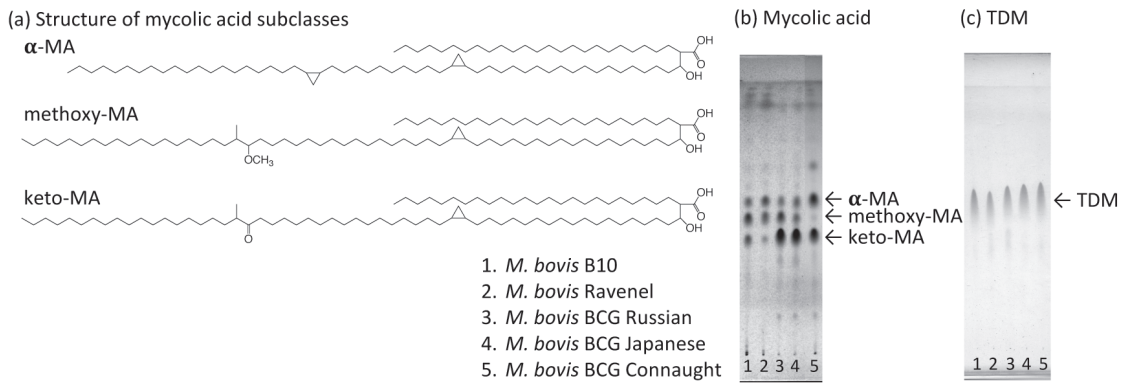


Fig. 1 Structure of mycolic acid subclasses (a) and TLC patterns of mycolic acids (b) and cord factors (c). The developing systems are hexane/diethylether, 90:15 by vols, 3 runs (b) and chloroform/methanol/water, 90:10:1 by vols (c).

次に、各抗酸菌由来cord factorを尾静脈より投与したマウスの肺肉芽腫炎症病変形成と炎症性サイトカインの発現について検討した。経静脈的にcord factor含有w/o/wミセルを投与すると、肺の血管系にトラップされ肉芽腫形成を伴う炎症病変を誘発した。コントロールのw/o/wミセルのみを投与したマウスでは、目立った変化は観察されず正常であった。最初に結核菌AoyamaB株とBCG亜株であるBCG Japanese株由来cord factorを投与したマウスについて比較検討した。どちらも経時的に肉芽腫炎症病変が観察されたが、AoyamaB株の方がBCG Japanese株よりも顕著であった。肺における肉芽腫炎症病変形成は炎症性サイトカインTNF- α およびIL-1 β の発現量と関連し、AoyamaB株に有意に多く発現していることがわかった (Fig. 2)。さらに、BCG亜株について検討すると、BCG Connaught株では、BCG亜株の中で最

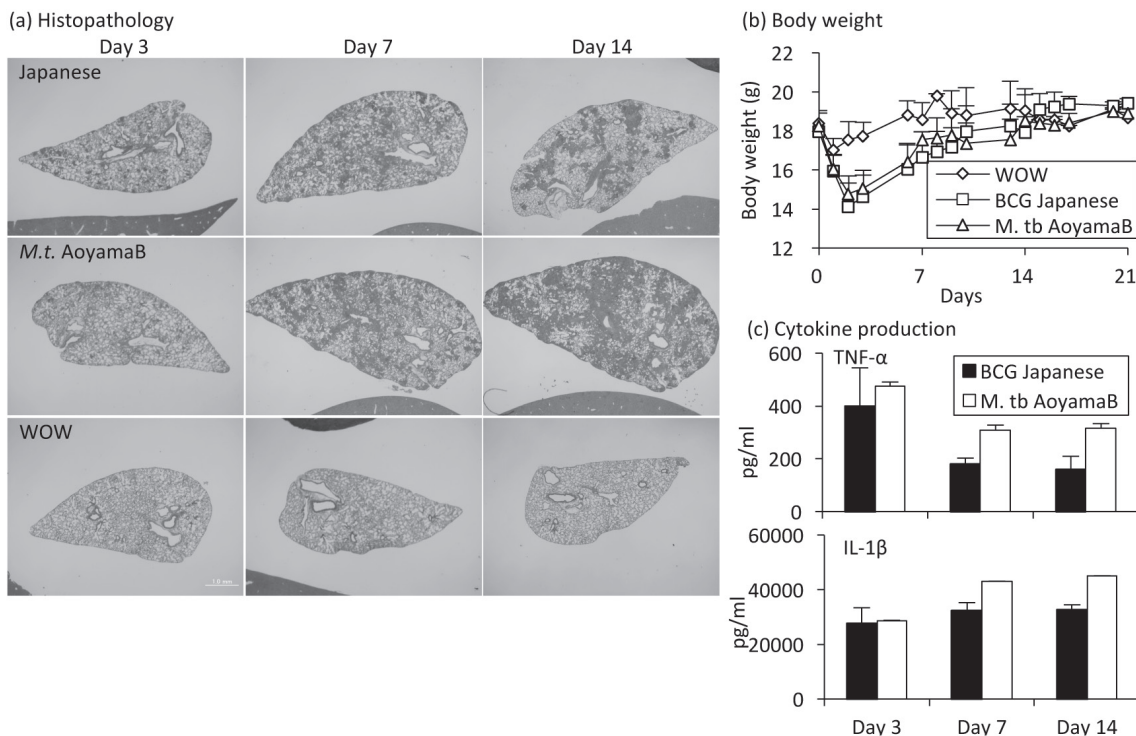


Fig. 2 Histopathology, body weight and cytokine production of mice injected with 300 μ g TDM from *M. tuberculosis* and *M. bovis* BCG Japanese.

も強い肉芽腫炎症病変形成が認められ、親株であるB10株とRavenel株と同程度であった。BCG Russian株とBCG Japanese株では減弱化していることがわかった (Fig. 3)。

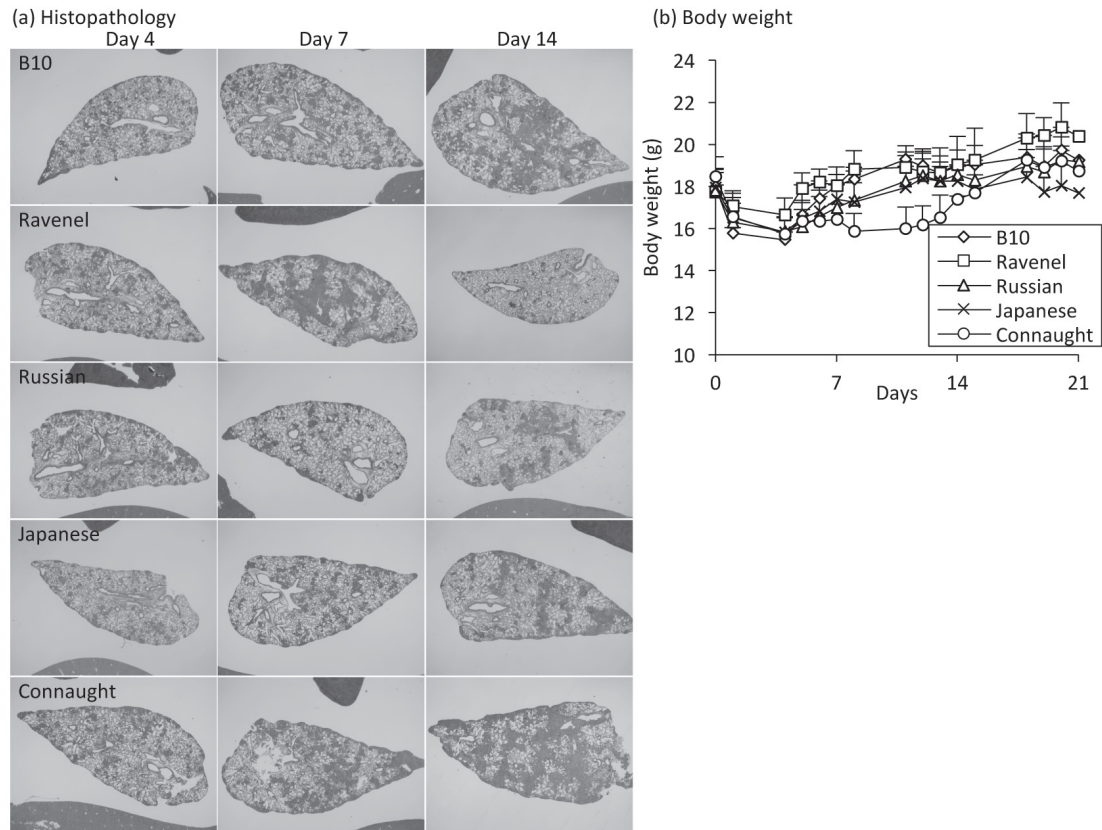


Fig. 3 Histopathology and body weight of mice injected with 300 µg TDM from *M. bovis* BCG strains.

Cord factor投与後のマウス体重にも変動がみられ、投与直後にはすべてのマウスにおいて一時的な体重減少を認めたが、w/o/wミセルのみを投与したマウスでは減少度合いが低く、すぐに回復した。上述の肉芽腫炎症病変形成の程度によって回復に要する期間に差を認めたが、全てのマウスにおいて21日目には元の体重に回復していた (Fig. 2, 3)。

4. 考察

肉芽腫炎症病変には単核球系白血球やそれに由来する類上皮細胞、多核巨細胞の浸潤が認められ、肉芽腫炎症病変形成の開始・持続に炎症性サイトカインが大きく関与していると考えられる。本研究で肺肉芽腫炎症病変の形成と炎症性サイトカインであるTNF- α やIL-1 β の発現量について経時的に比較したところ、肉芽腫炎症病変の形成度合いに比してTNF- α 産生量はcord factor投与後3日目に最大となり、その後は減少傾向にあった。一方、IL-1 β は14日目まで徐々に増大していたことから、TNF- α は投与後初期の肉芽腫炎症病変形成段階に多く発現し、IL-1 β は炎症反応の進行を通して持続的に発現しているものと考えられた。TNF- α は主に活性化マクロファージから産生されるサイトカインであるのに対し、IL-1 β は単球をはじめ樹状細胞や好中球、リンパ球等多様な細胞から産生されるサイトカインであり、肉芽腫炎症病変形成の各段階における集積、浸潤細胞の違いが反映されていると考えられた。

BCG亜株による肉芽腫炎症病変形成能の差異をミコール酸組成の観点から考察すると、keto-ミコール酸を多く含むRussian株とJapanese株がB10株とRavenel株に比べ肉芽腫炎症病変が減

弱化しており、 α -ミコール酸を多く含むConnaught株がRussian株とJapanese株に比べ肉芽腫炎症病変形成が強かった。これらの結果から、keto-ミコール酸や α -ミコール酸はmethoxy-ミコール酸に比べ、より宿主細胞への抗原認識に関連していると考えられた。肉芽腫炎症病変形成機序を解明するためには、亜株間でのTNF- α やIL-1 β 等のサイトカイン発現と肉芽腫炎症病変形成の関連を今後検討する必要がある。

結核菌の宿主感染において、感染後に活動性結核へ進行するか否かは結核菌の病原因子と宿主因子の相互作用によると考えられる。結核の感染防御機構は主に細胞性免疫と遅延型過敏反応の誘発が中心となっている。結核菌由来ミコール酸は従来の主要組織適合抗原 (MHC) クラス I, II と異なるCD1分子拘束性T細胞により認識されることが報告されており⁴⁾、脂質分子による細胞性免疫の活性化といった宿主免疫応答の惹起が想定される。本研究では、ミコール酸含有糖脂質cord factorにおけるミコール酸組成の違いにより宿主免疫応答に差異を生じることが明らかとなった。最近、mincle分子がcord factorのレセプターであることが報告されているが、mincle分子は本来糖関連レセプターである⁵⁾。本研究のミコール酸サブクラスによる差異は、mincle分子以外のCD1分子も含めた未知レセプターの関与も示唆され、脂質分子を中心とした宿主免疫応答や病原性の解明、ワクチン効果の評価に有用な知見であると考えられる。

5. 参考文献

1. Rao, V., N. Fujiwara, S.A. Porcelli, and M.S.Glickman, *Mycobacterium tuberculosis* controls host innate immune activation through cyclopropane modification of a glycolipid effector molecule. *J. Exp. Med.* 201:535-43. 2005.
2. Behr, M.A., CG--different strains, different vaccines? *Lancet Infect. Dis.*, 86-92. 2002.
3. Yamagami, H., T. Matsumoto, N. Fujiwara, T. Arakawa, K. Kaneda, I. Yano, and K. Kobayashi, Trehalose 6,6'-dimycolate (cord factor) of *Mycobacterium tuberculosis* induces foreign body- and hypersensitivity-type granulomas in mice. *Infect. Immun.*, 69:810-15. 2001.
4. Porcelli, S.A., B.W. Segelke, M. Sugita, I.A. Wilson, M.B. Brenner, The CD1 family of lipid antigen-presenting molecules. *Immunol. Today*, 19(8):362-68. 1998.
5. Ishikawa. E., T. Ishikawa, Y.S. Morita, K. Toyonaga, H. Yamada, O. Takeuchi, T. Kinoshita, S. Akira, Y. Yoshikai, S. Yamasaki, Direct recognition of the mycobacterial glycolipid, trehalose dimycolate, by C-type lectin Mincle. *J. Exp. Med.*, 206(13):2879-88. 2009.

