

結核ワクチンに利用される BCG 亜株の ミコール酸分析と多様性

Mycolic acids analysis and diversity of *Mycobacterium bovis* BCG substrains used in tuberculous vaccine

藤原 永年*, 山本 三郎**
FUJIWARA Nagatoshi and YAMAMOTO Saburo

The acid-fast bacteria contain *Mycobacterium tuberculosis* that are pathogenic to humans. A common feature of the acid-fast bacteria is that they are rich in lipids, and mycolic acid is representative lipid distributed in the cell wall. *M. bovis* BCG is the only available tuberculosis (TB) vaccine. In this study, it was analyzed the mycolic acids in BCG daughter strains. The subclasses were detected by using thin-layer chromatography (TLC). The molecular species were assigned by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). We established the protocol of mycolic acid analysis. The diversity was clarified by comparison of mycolic acid in BCG daughter strains. These results make it possible to discuss the features, biosynthesis, and host responses of mycolic acid, and promote better understanding of the relationships between structure and function in lipids.

1. 緒言

結核はネアンデルタール原人の化石にまで遡ることができる人類最古の感染症で、今なお甚大な被害をもたらしている。結核の起原菌である結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) は R. Koch により 1882 年に発見され、それ以降、人類との長い戦いの歴史がある。世界保健機関 (WHO) が認める唯一の結核ワクチンである BCG ワクチンは、フランス・パスツール研究所の A. Calmette と C. Guérin がウシの結核性乳腺炎から分離した強毒ウシ型結核菌 (*Mycobacterium bovis*) を 1908 年から 13 年間で、231 代にわたって繰り返し継代培養して病原性を失った馴化菌株である。この弱毒化 *M. bovis* の接種により、結核感染に対する免疫記憶が誘導されることが明らかとなり、Bacille de Calmette et Guérin の頭文字をとって *M. bovis* BCG 株と名付けられた。

BCG 株は 1920 年代から結核ワクチン株として世界各国に分与され、14 株以上の亜株 (娘株) が存在する (図 1)。分与時期による亜株の細菌学的な形質の違いが指摘され、1926 年以前の早期分与株はオリジナル BCG 株に近いと考えられている¹⁾。

結核菌や BCG 菌を含む抗酸菌は、細胞表層が強固で多量の脂質分子に覆われていることが特徴である。その中で、ミコール酸は天然では希な長鎖分

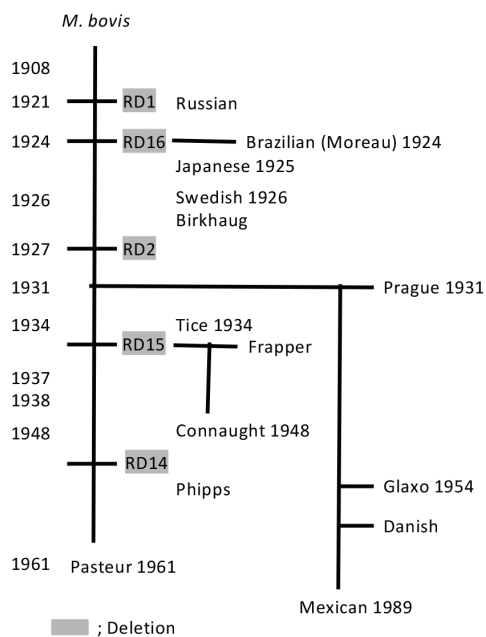


図 1 BCG 亜株の世界各国への分与時期

* 食物栄養学科 教授, ** 国立感染症研究所ハンセン病研究センター 客員研究員

岐脂肪酸として、抗酸菌に広く分布する特筆すべき脂質分子である。ミコール酸には、菌種特異的に修飾基の異なるサブクラスが存在し、炭素鎖長が 80 超にも及ぶことから、菌体からの抽出・精製や構造解析は極めて困難である。

本研究では、BCG 亜株のミコール酸解析を行う過程でミコール酸のサブクラス同定・構造解析の手法を確立した。また、BCG 亜株におけるミコール酸の多様性から感染性や抗原性といったワクチン効果への関連性について考察したので報告する。

2. 材料と方法

(1) 菌株

本研究で使用した BCG 亜株とその由来を表 1 にまとめた。各菌株は 7H11 寒天培地 (10% Middlebrook OADC サプリメント, 0.5% glycerol 添加, Becton Dickinson, NJ, USA) で 37°C、2 週間培養した。また、比較菌株としてヒト結核菌 (*M. tuberculosis* H37Rv, Erdman 株)、ウシ結核菌 (*M. bovis* B10, Ravenel 株) の死菌体を使用した。

表 1 菌種・菌株の由来

No.	strain	ATCC No.	synonym	備考
1	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	ATCC 25618		矢野郁也博士より死菌体として分与
2	<i>M. tuberculosis</i> Erdman			矢野郁也博士より死菌体として分与
3	<i>M. bovis</i> B10			矢野郁也博士より死菌体として分与
4	<i>M. bovis</i> Ravenel			矢野郁也博士より死菌体として分与
5	<i>M. bovis</i> BCG Russian	ATCC 35740		
6	<i>M. bovis</i> BCG Brazilian (Moreau)		Brazil	
7	<i>M. bovis</i> BCG Japanese	ATCC 35737		
8	<i>M. bovis</i> BCG Swedish			
9	<i>M. bovis</i> BCG Birkhaug			
10	<i>M. bovis</i> BCG Danish	ATCC 35733	Denmark	
11	<i>M. bovis</i> BCG Glaxo	ATCC 35741		
12	<i>M. bovis</i> BCG Mexican	ATCC 35738		
13	<i>M. bovis</i> BCG Tice	ATCC 35743	Chicago	
14	<i>M. bovis</i> BCG Montreal	ATCC 35735	Frappier	
15	<i>M. bovis</i> BCG Connaught	ATCC 35745	Toronto	
16	<i>M. bovis</i> BCG Phipps	ATCC 35744	Philadelphia	
17	<i>M. bovis</i> BCG Australian	ATCC 35739		
18	<i>M. bovis</i> BCG Pasteur	ATCC 35734		

(2) 菌体からのミコール酸抽出

各菌体を 10% 水酸化カリウム溶液または 10% Tetrabutylammonium Hydroxide Solution (TBAH, Fujifilm, Tokyo) に懸濁して、95°C、16 時間以上、アルカリ加水分解した。冷却後、6 M 塩酸で酸性に戻し、蒸留水とヘキサン或いはクロロホルムを加えて二層分配した。ミコール酸を含む有機層を別ガラスチューブに回収し、遠心エバポレーターで濃縮乾固した。(トリメチルシリル) ジアゾメタン溶液 (2.0 M in Hexanes, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) でメチルエステル化してミコール酸メチルエステル画分を得た。

(3) ミコール酸サブクラスの検出

ミコール酸メチルエステル画分の薄層クロマトグラフィー (Thin-Layer Chromatography, TLC) を実施した。TLC には、Silicagel G (Uniplate; 20 by 20 cm, 250 μm; Analtech, Inc., Newark, DE, USA) を用い、展開溶媒系はヘキサン:ジエチルエーテル (90:15, vol/vol) 或いはベンゼンで各3回展開し

た。検出は、20%硫酸/エタノールをTLCプレート表面全体に噴霧し、180°Cで含有物が完全に黒化するまで焼き切り、ミコール酸メチルエステルをスポットとして検出した。ミコール酸メチルエステルを精製する場合は、TLCプレートにサンプルを帯状に滴下し、展開後にTLCを密閉容器に入れ、ヨウ素で飽和させて黄色に変色したミコール酸画分に目印を付けた。ドラフト内でヨウ素を十分に風乾除去した後、予め目印を付けた画分のシリカゲルを掻き取り、試験管内でクロロホルム抽出した。遠心分離でシリカゲルを除いた上清を回収し、濃縮乾固した。展開したTLCプレート上で単一スポットが得られるまで繰り返し精製した。

(4) ミコール酸の質量分析

精製したミコール酸メチルエステルをマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析装置 (matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometer, MALDI-TOF/MS, UltrafleXtreme, Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) を用いて質量分析した。濃縮乾固した精製ミコール酸メチルエステルをクロロホルムで 1 mg/ml に調製し、ターゲットプレート上にマイクロシリンジで 1 μ l 添加した。拡がるのを防ぐため、小まめに乾燥させながらスポット添加した。風乾後、マトリックスとしてクロロホルム:メタノール/1:1 (vol/vol) で 10 mg/ml に調製した 2,5-dihydroxy benzoic acid (DHB, 東京化成株式会社) を 1 μ l 追加した。ターゲットプレート上でサンプルと均一になるようにマイクロシリンジの先でよく混和した。MALDI-TOF/MS は加速電圧 20 kV, Reflector Positive モードで測定した。

3. 結果

(1) 抗酸菌由来ミコール酸解析法の確立

難溶性であるミコール酸の菌体からの抽出・精製・分析には、疎水性の特徴を活かした取り扱いが必要になる。まず、菌体からアルカリ加水分解により脂肪酸画分を抽出し、ヘキサンやクロロホルム等の有機溶媒で抽出した。濃縮乾固してトリメチルシリルジアゾメタンでメチルエステル誘導体にした。TLC で各種展開溶媒系を組み合わせるサブクラスに分離することが出来た。アルカリ加水分解については 10%水酸化カリウム溶液、10%TBAH のどちらで実施しても、得られるミコール酸画分に差異はなかった。また、ヘキサン、クロロホルムでの抽出については、クロロホルム抽出の方がミコール酸メチルエステル以外の不純物が TLC 上、多く含まれていた (data not shown)。ヒト結核菌、ウシ結核菌由来のミコール酸メチルエステル標準品との移動度 (Rf 値) の比較でサブクラスの同定が可能になった。ミコール酸分子種は MALDI-TOF/MS で m/z を検出し、ミコール酸サブクラスの推定構造式 (図 2) と質量数の一致から同定した。これらの結果を

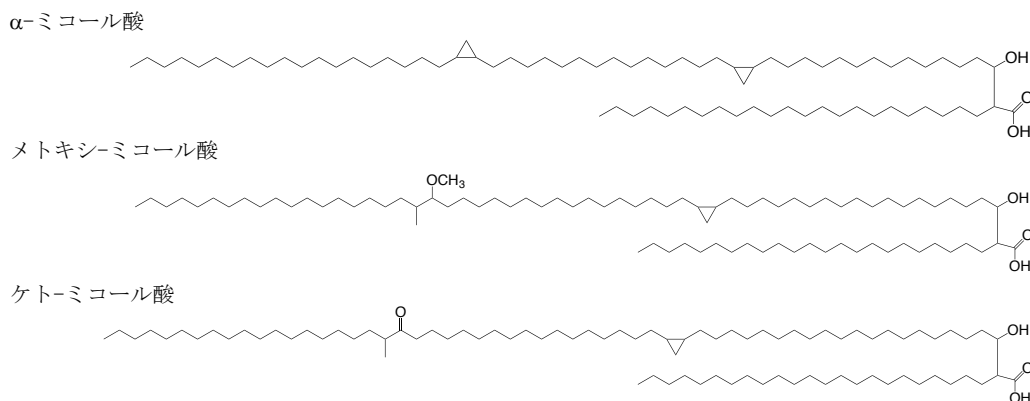


図 2 ミコール酸サブクラスの推定構造式

基に、抗酸菌由来のミコール酸解析を可能にしたプロトコルを完成させ、図3に示した。

ミコール酸の抽出

1. 菌体約 200 mg (湿重量) をネジ付ガラス試験管に取り、10%水酸化カリウム溶液 (エタノール/水, 1:1, vol/vol) 或いは 10% tetrabutylammonium hydroxide (TBHA in methanol) 1 ml を追加
2. 95°Cのヒートブロックで 16 時間以上反応
3. 自然放冷後、6 M 塩酸で酸性化
4. 蒸留水 1 ml、ヘキサン或いはクロロホルム 6 ml を加えてよく振り、二層分配
5. ヘキサン層 (上層) 或いはクロロホルム層 (下層) をパスツールピペットで回収
6. 濃縮乾固 (遠心エバポレーター或いは窒素気流下)
7. ヘキサン/メタノール混液 (19:1, vol/vol) 1 ml を加えて溶解
8. (トリメチルシリル) ジアゾメタン (2.0 M ヘキサン溶液) 10 μ l を添加
9. 室温で 30 分以上静置し、メチルエステル化
10. 濃縮乾固 (遠心エバポレーター、窒素気流下)

ミコール酸サブクラス同定

1. クロロホルムに溶解し、薄層クロマトグラフィーで展開して確認
2. 展開溶媒; ヘキサン:ジエチルエーテル (90:10, vol/vol) 或いはベンゼンで 3 回展開

ミコール酸分子種同定

1. 精製ミコール酸 1 mg/ml 溶液をターゲットプレートに 1 μ l 添加
2. マトリックス DHB 10 mg/ml を 1 μ l 追加して混和
3. MALDI-TOF/MS 測定 (Reflector Positive モード, 加速電圧 20 kV)
4. 推定構造式と質量数の一致から分子種を算出

図3 抗酸菌由来ミコール酸解析プロトコル

(2) BCG 亜株由来ミコール酸サブクラスの解析

図3のプロトコルに従い、BCG 亜株の菌体からミコール酸画分を抽出した。ヒト結核菌、ウシ結核菌を指標として TLC を実施し、ミコール酸サブクラスの偏在性を検討した (図4)。早期分与株 5 株は、ヒト、ウシ結核菌と同様に、 α -、メトキシ-、ケト-ミコール酸が検出された。全ての後期分与株 9 株は、メトキシ-ミコール酸が欠失していた。また、各ミコール酸サブクラスのスポットに濃淡があり、TLC の各スポットを Image-J で解析して組成比を算出した (図5)。ヒト結核菌のミコール酸サブクラスの含量は、 α >>メトキシ>ケトであったが、BCG 亜株はケト>> α =メトキシであった。全ての BCG 亜株のケト-ミコール酸含量は約 60%であり、組成比はヒト結核菌と大きく異なることが特徴であり、菌種特異的であった。

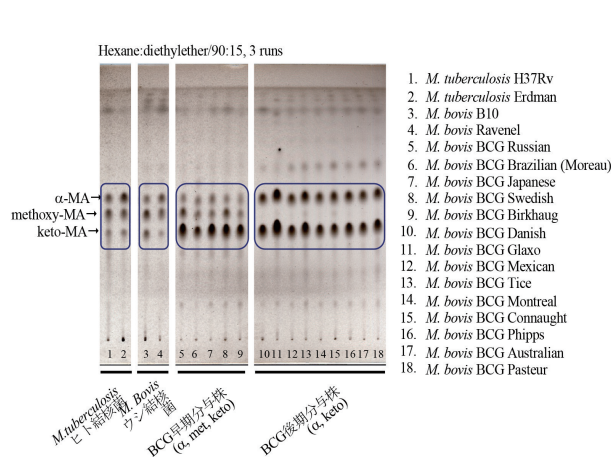


図4 各菌株由来ミコール酸サブクラスの TLC 比較

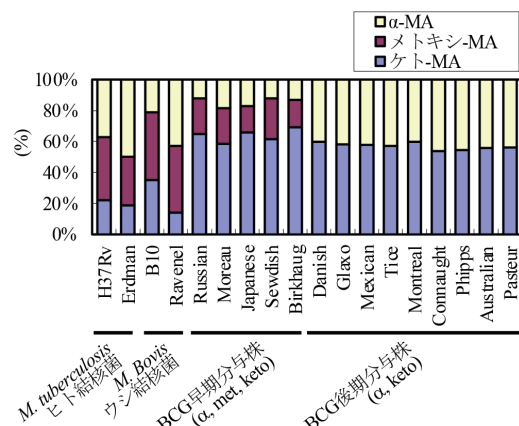


図5 各菌株由来ミコール酸サブクラスの組成比

(3) BCG 亜株由来ミコール酸サブクラスの分子種同定

TLC で繰り返し精製純化したミコール酸サブクラスを MALDI-TOF/MS で分析した。ターゲットプレート上に各サンプルを載せ、マトリックスである DHB を追加・混和して乾固した。Reflector Positive モードで測定すると、ミコール酸メチルエステルのピークは m/z ; $[M+Na]^+$ として推定構造式と一致した質量数が検出され、ミコール酸分子種が同定できた。WHO が BCG ワクチンの reference reagents (RRs) に採択した Japanese 株、Danish 株、Russian 株²⁾と BCG 亜株の親株である Bovis B10 株を代表株として、各ミコール酸サブクラスの MALDI-TOF/MS スペクトラムを図 6 に示した。同様の手法で全 BCG 亜株についてミコール酸サブクラスの分子種を同定し、その分布を表 2、3、4 にまとめた。各ミコール酸分子種ではメインのピークを中心に前後炭素鎖長 2-4 程度の幅で分布していた。 α -ミコール酸は C78:2 と C87:1 を中心とした 2 つのクラスターが存在し、早期分与株は C87:1 を中心とした 1 つのクラスターのみで、主に後期分与株に 2 つのクラスターが存在した。ヒト結核菌は後期分与株のミコール酸分子種の分布に近いことがわかった。メトキシ-、ケト-ミコール酸の分子種についてはヒト結核菌、ウシ結核菌、メトキシ-ミコール酸欠失株以外の BCG 亜株間で大きな差異はなかった。

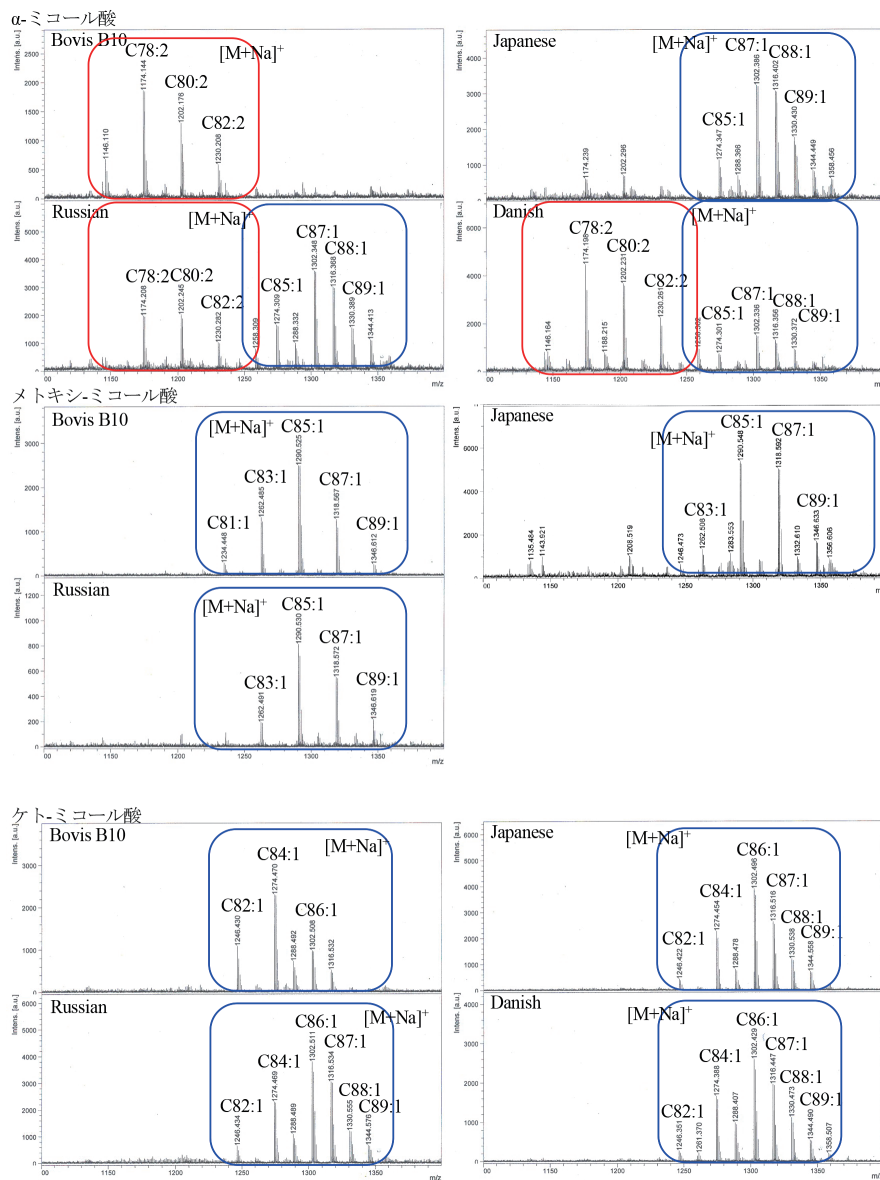


図 6 ミコール酸サブクラス MALDI-TOF/MS 解析

表2 菌種、菌株による α -ミコール酸分子種の多様性

subclass of mycolic acid	Total carbon number of keto-mycolic acid															
	76:1	77:1	78:1	79:1	80:1	81:1	82:1	83:1	84:1	85:1	86:1	87:1	88:1	89:1	90:1	91:1
	1246	1260	1274	1288	1302	1316	1330	1344	1358							
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv		○					◎	○	◎	○	△					
<i>M. tuberculosis</i> Erdman		△						○	○	○	◎	△	△			
<i>M. bovis</i> B10		○						◎	○	○	○					
<i>M. bovis</i> Ravenel									○	△	◎			△		
<i>M. bovis</i> BCG Russian						△		○	△	◎	○	△	△			
<i>M. bovis</i> BCG Brazilian (Moreau)						△		○	△	◎	○	○	△			
<i>M. bovis</i> BCG Japanese						△		○	△	◎	○	△	△			
<i>M. bovis</i> BCG Swedish						△		○	△	◎	○	○	△			
<i>M. bovis</i> BCG Birkhaug						△		○	△	◎	○	○	△			
<i>M. bovis</i> BCG Danish						△		○	○	◎	○	○	△		△	
<i>M. bovis</i> BCG Glaxo						△		○	△	◎	○	○	△		△	
<i>M. bovis</i> BCG Mexican						△		◎	△	◎	○	△	△			
<i>M. bovis</i> BCG Tice						△	△	◎	△	◎	○	△	△			
<i>M. bovis</i> BCG Montreal						△		○	△	◎	○	○	△		△	
<i>M. bovis</i> BCG Connaught						△	△	◎	△	◎	○	△	△		△	
<i>M. bovis</i> BCG Phipps						△	△	◎	△	◎	○	△	△		△	
<i>M. bovis</i> BCG Australian						△		○	△	◎	○	○	△		△	
<i>M. bovis</i> BCG Pasteur						△	△	○	△	◎	○	○	△		△	

◎; high (>80%), ○; middle (30-80%), △; low (<30%)(compare to the main peak in the cluster)

表3 菌種、菌株によるメトキシ-ミコール酸分子種の多様性

subclass of mycolic acid	Total carbon number of methoxy-mycolic acid															
	76:1	77:1	78:1	79:1	80:1	81:1	82:1	83:1	84:1	85:1	86:1	87:1	88:1	89:1	90:1	91:1
	1234	1262	1290	1318	1332	1346	1360									
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv						△	○		◎		○				△	
<i>M. tuberculosis</i> Erdman							○		◎		◎	○	△			
<i>M. bovis</i> B10					△		○		◎		○		△			
<i>M. bovis</i> Ravenel							△		◎	△	○	◎	△		△	
<i>M. bovis</i> BCG Russian							△		◎		○		△			
<i>M. bovis</i> BCG Brazilian (Moreau)							△		◎		◎		○			
<i>M. bovis</i> BCG Japanese							△		◎		◎	△	○			
<i>M. bovis</i> BCG Swedish							△		◎		◎		○			
<i>M. bovis</i> BCG Birkhaug							○		◎		◎		○			
<i>M. bovis</i> BCG Danish																
<i>M. bovis</i> BCG Glaxo																
<i>M. bovis</i> BCG Mexican																
<i>M. bovis</i> BCG Tice																
<i>M. bovis</i> BCG Montreal																
<i>M. bovis</i> BCG Connaught																
<i>M. bovis</i> BCG Phipps																
<i>M. bovis</i> BCG Australian																
<i>M. bovis</i> BCG Pasteur																

◎; high (>80%), ○; middle (30-80%), △; low (<30%)(compare to the main peak in the cluster)

表4 菌種、菌株による β -ミコール酸分子種の多様性

subclass of mycolic acid	Total carbon number of β -mycolic acid																	
	76:2	77:2	78:2	79:2	80:2	81:2	82:2	83:2	83:1	84:2	85:1	86:2	86:1	87:1	88:1	89:1	90:1	91:1
	1146	1174	1188	1202	1216	1230	1244	1246	1258	1274	1286	1288	1302	1316	1330	1344	1358	
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	○		◎		○		○											
<i>M. tuberculosis</i> Erdman	○		◎		○		○											
<i>M. bovis</i> B10	○		◎		○		○											
<i>M. bovis</i> Ravenel	○		◎		○		○		○									
<i>M. bovis</i> BCG Russian			○		○					○		△	◎	○	○	△		
<i>M. bovis</i> BCG Brazilian (Moreau)										○		△	◎	○	○	△		
<i>M. bovis</i> BCG Japanese					△					○		△	◎	○	○	△		
<i>M. bovis</i> BCG Swedish			△		△		△			○		△	◎	○	○	△		
<i>M. bovis</i> BCG Birkhaug					△					○		△	◎	○	○	△		△
<i>M. bovis</i> BCG Danish	△		◎	△	○		○		△	△		○	○	○	△			
<i>M. bovis</i> BCG Glaxo			◎		◎		○		○									
<i>M. bovis</i> BCG Mexican	△		◎		○		○		◎		△	◎	○	△				
<i>M. bovis</i> BCG Tice	△		◎		○		○		○		△	◎	○	△			△	
<i>M. bovis</i> BCG Montreal	△		◎		○		○		○		△	◎	○	△			△	
<i>M. bovis</i> BCG Connaught	△		◎		○		△		◎		△	◎	○	△				
<i>M. bovis</i> BCG Phipps	△		◎		○		△		○		△	◎	○	△				
<i>M. bovis</i> BCG Australian	△		○		○		△		○		△	◎	○	○			△	
<i>M. bovis</i> BCG Pasteur	△		◎		○		△		○		△	◎	○	○			△	

◎; high (>80%), ○; middle (30-80%), △; low (<30%)(compare to the main peak in the cluster)

4. 考察

結核菌や結核ワクチン株である BCG 菌を含む抗酸菌は、他の細菌と比べ大きな相違点として、脂質画分に富み乾燥重量の約 40% 含まれることである。特に、ミコール酸分子は抗酸菌に特徴的で、16S rRNA による相同性による遺伝子解析手法が近年の主流である新種提案においても、ミコール酸の存在が抗酸菌の必須条件となっている³⁾。また、ミコール酸は CD1d 分子を介した新たな宿主免疫応答機序が明らかになり、抗酸菌感染症においても重要な分子である⁴⁾。本研究では、ミコール酸解析に焦点を当て小スケールでの確に解析できるプロトコルを完成した。脂質抽出は、基本的にはアルカリ加水分解と Forch 法に準じた疎水画分の分取である。TLC の Rf 値からミコール酸サブクラスを同定し、推定構造式と MALDI-TOF/MS による質量数の一致から分子種構造まで解析できる。一般的に汎用されるガスクロマトグラフィー (GC) や液体クロマトグラフィー (HPLC) を利用した報告はあるが⁵⁾⁶⁾、GC, GC/MS の場合は、ミコール酸メチルエステル分子が長鎖で分子量も大きく、気化が難しい。カラム限界温度を考慮して、*Rhodococcus*, *Nocardia* 属などの短鎖ミコール酸を発現している類縁抗酸菌由来ミコール酸分析に有効であるが、*Mycobacterium* 属菌が発現する炭素鎖長 80 超のミコール酸分析には検出条件が厳しい。また、HPLC, HPLC/MS の場合は、検出のための誘導体化が必要であり、分子種を分離できる分解能のカラム条件設定が困難である。近年、脂質分子を分析する疎水性適応カラムが開発されつつあるが、未だ分解能が十分ではない。現状として、ミコール酸分析においては GC に比べても分解能が劣っていることは否めない。本研究では、詳細な分子種の同定に MALDI-TOF/MS による分子種別のピーク検出が最適であると考えた。一般的に、MALDI-TOF/MS は分子の構造によってイオン化の傾向に違いがあり、ピーク強度に定量性を求めることは難しいと考えられる。しかしながら、ミコール酸の分子種同定に特化すれば、分子種の相違は炭素鎖長の微細な構造相違であり、イオン化強度による分子種の定量化は可能と考え、表 2-4 において分子種の多様性を議論した。BCG 亜株のミコール酸は、主要分子種の前後に炭素鎖長が偶数個だけ異なる分子種が分布していた。脂肪酸の伸張が炭素数 2 個ずつ付加する生合成機序と一致する結果であった。

BCG 亜株 14 種類のミコール酸の多様性は、大きく分けて早期分与株 6 株と後期分与株 9 株で 2 つの大きなクラスターが形成された。特徴は、後期分与株がメトキシ-ミコール酸を欠失していることである。BCG のメトキシ-ミコール酸生合成遺伝子の変異に起因していると考えられた。また、ヒト結核菌と比較すると、ミコール酸サブクラスの組成比が異なっており、ヒト結核菌は α -ミコール酸が多いのに対して BCG 亜株はケト-ミコール酸が全体の約 60% で主であった。これらの相違点は、ヒト結核菌が病原性を有し、BCG 株がワクチン株として抗原性や感染性に優れていることへの連関が示唆される。BCG 亜株については、脂質分子に偏在性があり、菌株によって細胞表層成分であるフェノール糖脂質 (PGL) の存否が異なることが報告されている⁷⁾。我々は、本邦で BCG Japanese 株からワーキングセルとして利用されている BCG Tokyo172 のコロニー形態が smooth 型、rough 型の混在で、rough 型は PGL を欠失していること、PGL の脂質部分フチオセラン酸ジマイコセロセート (PDIM) 合成遺伝子 *ppsA* の変異に起因していることを報告している⁸⁾。今後、引き続き、本研究の成果を基礎に、抗酸菌の生化学的特徴、宿主免疫応答や病原性への脂質分子の関わりについて発展させていく必要がある。

参考文献

- 1) Brosch R, Gordon SV, Garnier T, Eiglmeier K, Frigui W, Valenti P, Dos Santos S, Duthoy S, Lacroix C, Garcia-Pelayo C, Inwald JK, Golby P, Garcia JN, Hewinson RG, Behr MA, Quail MA, Churcher C, Barrell BG,

- Parkhill J, and Cole ST: Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 5596-5601. 2007.
- 2) Ho MM, Markey K, Rigsby P, Hockley J, and Corbel MJ: Report of an International collaborative study to establish the first WHO reference reagents for BCG vaccines of three different sub-strains. *Vaccine* 29:512-518. 2011.
 - 3) Fukano H, Kazumi Y, Sakagami N, Fujiwara N, Ato M, Mitarai S, Hoshino Y: *Mycobacterium kiyosense* sp. nov., a scotochromogenic slow-glowing species isolated from respiratory specimens. *Int J Syst Evol Microbiol* 73(6). doi: 10.1099/ijsem.0.005917. 2023.
 - 4) Moody DB, Guy MR, Grant E, Cheng TY, Brenner MB, Besra GS, Porcelli SA: CD1b-mediated T cell recognition of a glycolipid antigen generated from mycobacterial lipid and host carbohydrate during infection. *J. Exp. Med.* 192:965-976. 2000.
 - 5) Stratton HM, Brooks PR, Seviour RJ: Analysis of the structural diversity of mycolic acids of *Rhodococcus* and *Gordonia* isolates from activated sludge foams by selective ion monitoring gas chromatography-mass spectrometry (SIM GC-MS). *J Microbiol Methods.* 35(1):53-63. 1999.
 - 6) Sakallioğlu IT, Maroli AS, Leite AL, Powers R: A reversed phase ultra-high-performance liquid chromatography-data independent mass spectrometry method for the rapid identification of mycobacterial lipids. *J Chromatogr A.* 11;1662:462739. 2022.
 - 7) Chen, JM, Islam ST, Ren H, and Liu J: Differential productions of lipid virulence factors among BCG vaccine strains and implications on BCG safety. *Vaccine* 25:8114-8122. 2007.
 - 8) Naka T, Maeda S, Niki M, Ohara N, Yamamoto S, Yano I, Maeyama J, Ogura H, Kobayashi K, and Fujiwara N: Lipid phenotype of two distinct subpopulations of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin Tokyo 172 substrain. *J Biol Chem.* 286(51):44153-44161. 2011.

謝辞

本研究は、大阪公立大学名誉教授・矢野郁也博士に貴重なサンプルを提供いただいた。研究成果をまとめるにあたり、心より深謝いたします。本研究の一部は、JSPS 科研費 JP20K05899, JP23K06554 の助成を受けたものです。