

学位論文題名

豚由来 *Mycobacterium avium* complex の  
病原性に関する研究

—特に菌体表層の glycopeptidolipid を中心として—

学位論文内容の要旨

結核菌の均等浮遊培養液を調製する目的で、多くの研究者は界面活性剤 Tween 80 を培地内に 0.05～1% 添加している。しかしながら、Tween 80 の結核菌を含めた *M. avium* complex (MAC) の発育、特に菌体組成に及ぼす影響についての詳細は明らかでない。MAC の菌体表層には、透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察できる網目状の線維様構造物 (FMN) があり、これは glycopeptidolipid (GPL) で組成されている。この FMN の立体構造、その機能、形成因子については明らかでない。他方、MAC の *in vivo* での病原性評価には、マウスがよく利用されるが、菌の接種方法、接種菌量、マウスの系統などに病原性の程度が異なり、その評価に困難をもたらしている。特にマウスでは、MAC に対する感受性が遺伝子により支配されていることから、実験に当たってはその系統の選択が重要とされている。筆者は、上記の点を明らかにする目的で、豚由来の MAC を用い、以下の研究を行った。

第 1 章では、界面活性剤 Tween 80 の MAC に対する発育および菌体組成に及ぼす影響について、種々の濃度の Tween 80 添加 (0.05, 0.5, 5, 50 mg/ml) および無添加液体培地で培養した MAC の菌数と比濁値を検索し、菌体を TEM と走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察した。同時に、Tween 80 が MAC 細胞壁の透過性を亢進するか否かについて、Tween 80 の存在下と非存在下における 5 種類の抗結核薬の活性亢進作用を指標に、液体培地を用いて検討した。その結果、培地中の Tween 80 添加濃度が 0.5 mg/ml 以上では、静菌的な発育阻害に加え、菌体の伸長化や膨化が認められた。さらに、5 mg/ml 以上では、菌体細胞壁の主要構成脂質である GPL 量が顕著に減少するとともに、生化学的性状試験 (硝酸塩還元能、ウレアーゼ反応、アリルスルファターゼ反応) において本来陰性であるべき性状が、疑陽性あるいは陽性へと変化した。Tween 80 は、菌の発育を阻害しない濃度 (0.05 mg/ml) でも、ストレプトマイシン、カナマイシン、リファンピシンなど細胞質内に作用点をもつ薬剤の活性を顕著に亢進した。他方、イソ

ニアジドやエタンプトールなど細胞壁に直接作用する薬剤に対しては、活性の亢進作用は認められなかった。これらの所見は、液体培地に添加した Tween 80 が、MAC の細胞壁に直接作用し、細胞壁の透過性を亢進させる作用を持つことを示唆した。

第 2 章では、液体培地中に添加した Tween 80 の、MAC 菌体表層の主要構成脂質である GPL 量、および菌体表層の GPL より組成される FMN の形成に及ぼす影響について検討した。同時に、FMN の形成に MAC の血清型、プラスミド DNA の有無および培養培地の種類が関与するか否かを調査した。Tween 80 無添加液体培地で培養した *M. avium* S-139 株より GPL を精製し、この GPL に対する抗血清を家兎を用いて作製した。種々の濃度の Tween 80 添加液体培地で培養した S-139 株を抗原とする、抗血清に対する抗体価の推移を凝集反応により観察した。Tween 80 の培地内添加濃度の増加 (0, 0.05, 0.5, 5, 50mg/ml) とともに、凝集抗体価は減少 ( $\times 128$ ,  $\times 64$ ,  $\times 16$ ,  $\times 4$ ,  $< 4$ ) した。SEM を用いて Tween 80 添加および無添加 N-GP 液体培地で培養した MAC を観察したところ、Tween 80 の培地内添加濃度の増加とともに、菌体表層の FMN の形成が阻害された。特に、Tween 80 0.5mg/ml 以上の添加濃度では FMN の形成は全く観察されなかった。Tween 80 無添加と 0.05mg/ml 添加液体培地で培養した菌では、線毛様の線維が菌体表層より数本発現して分岐するとともに、菌体間を比較的粗に架橋していた。この線毛様の線維は、既に報告されているような菌体表層に密着して網目状の模様として観察される FMN を形成する線維とは、その大きさ、発現様式、架橋構造の点で異なり、既報の FMN とは異なるタイプの FMN であった。FMN の直径は、観察した株間で若干異なり 20~40nm であった。FMN の形成は、MAC の血清型やプラスミド DNA の有無には影響されず、培養培地の種類によって大きく影響を受けた。以上の成績より、一定の培地内添加濃度以上では Tween 80 は MAC 菌体表層の GPL 量を減少させるとともに、GPL より組成される FMN の形成を阻害することと、FMN の形成は培養培地の種類により影響されることが明らかとなった。

第 3 章では、マウス感染モデルを作出する目的で、ddY 系マウスを使い、接種経路の差が病態に及ぼす影響を比較した。*M. avium* S-139 株 0<sup>8</sup> 個を尾静脈内、鼻腔内、胃内に接種し、9 週間観察した。その結果、いずれの接種経路においても感染・発症が成立した。尾静脈内接種では、肺全域に密に分布する微小結節病変とその融合したと考えられる中等大以上の結節が、肝臓と脾臓では腫大と膿瘍を伴う結節病変が形成されたが、鼻腔内接種では肺および気管気管支リンパ節、胃内接種では腸間膜リンパ節に病変が限局し、接種経路により病変の発生状態が異なっていた。病理組織学的検索では、肺、肝臓、脾臓、リンパ節に病変が認められたが、これらの病

変は類上皮細胞結節形成を特徴としていた。

第4章では、Tween 80添加培地でMACを培養し、人為的に菌体のGPL量を減少させると同時に、FMNの形成を阻害させた菌を作出した。これらの菌についてBALB/c系マウスに対する病原性を検討したところ、Tween 80を高濃度（5 mg/ml）に添加した培地で培養した菌を接種された群のマウスでは、無添加培地で培養した菌に比べて、菌接種後の1日の脾臓内生菌数が著しく少なかった。しかし、接種後21日ではTween 80の有無にかかわらず、いずれの培地で培養した菌でも、脾臓内生菌数はほぼ等しかった。Tween 80添加培地で培養した菌を接種されたマウス群における、接種後1日と21日の間の脾臓重量増加率は、Tween 80の添加濃度の増加に反比例して減少した。また、接種後21日における脾臓の組織病変の程度は、Tween 80濃度の高い培地で培養した菌を接種された群ほど弱かった。脾臓で形成された病変は、いずれの接種菌においても類上皮細胞結節を示していた。接種実験に用いたS-139株は125M daltonのプラスミドDNAを保有していた。このプラスミドDNAが培地中のTween 80により脱落するかどうかと接種したマウス体内で脱落するかどうかについて検討した。プラスミドDNAはTween 80の添加濃度の高低にかかわらず保持されていたばかりでなく、本菌接種マウスの脾臓病変部からの再分離菌でも検出された。この結果、本研究に用いた*M. avium* S-139株の保有するプラスミドDNAは、病原性には関与していないと判断された。以上の所見は、MACのGPLあるいはFMNが病原性発現に重要な役割を果たすことを示唆している。

以上、著者は界面活性剤のTween 80が、MACのGPL量を減少させるとともに菌体表層のGPLより組成されるFMNの形成をも阻害することを明らかにした。さらに、新たに作出したマウス感染モデルを用いて、MAC菌体表層のGPLおよびFMNの病原性との係わりについて検討し、これらが外界の有害物質に対する防御壁として機能するのみならず、菌の病原性を発現するための因子として重要な役割を担っていることを確認した。

以上の研究成果は、豚や人で見られる非定型抗酸菌症の発症に関する、いまだに不明な病原因子の解明に有用な知見を提供するものと思われる。

## 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 板 倉 智 敏  
副 査 教 授 波 岡 茂 郎  
副 査 教 授 杉 村 誠  
副 査 教 授 橋 本 信 夫

申請者は、界面活性剤の Tween 80が*M. avium* complex (MAC) の発育や病原性に及ぼす影響について研究を行い、本論文をまとめた。その内容は以下の4つに要約される。

1. Tween 80は、培地内添加濃度が0.05mg/mlで、MACの膜透過能を亢進させ、さらに、0.5mg/ml以上で菌の発育を静菌的に阻害し、菌体の伸長化や膨化を引き起こすとともに、菌体細胞壁の主要構成脂質である glycopeptidolipid (GPL) の量を減少させた。
2. MAC 菌体表層の GPL 量および GPL を主成分とする線維様構造物 (FMN) の形成は、培地内の Tween 80添加濃度により大きく影響をされることを免疫化学的および形態学的に明らかにした。
3. MAC の ddY 系マウスにおける異なった接種経路 (尾静脈内、鼻腔内、胃内) による病態を比較検討した。肉眼的には、尾静脈内接種では肺、肝臓、脾臓などに、鼻腔内接種では肺および気管気管支リンパ節、胃内接種では腸間膜リンパ節に病変が限局し、接種経路により病変の発生状況が異なっていた。病理組織学的検索では、病変は類上皮細胞結節形成を特徴としていた。
4. GPL 量を減少させると同時に、FMN の形成を阻害させた菌を Tween 80添加培地を用いて作出し、これらの菌について BALB/c 系マウスに対する病原性を検討した。その結果、菌体の GPL 量が少なく、かつ FMN の形成程度の弱い菌を接種したマウス群ほど組織病変の程度は弱かった。

以上のように、申請者は Tween 80が、MAC の GPL 量を減少させるとともに FMN の形成をも阻害すること、さらに、菌体の GPL および FMN が病原性の発現と密接に関与することを明らかにした。これらの知見は非定型抗酸菌症の発症に関する、病原因子の解明に大きく寄与する。よって審査員一同は、正木俊一郎氏が博士 (獣医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。