



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ホスファチジルイノシトールマンノシドの免疫化学的研究(II) : Mycobacterium intracellulareに属する菌のリン脂質について
Author(s)	佐々木, 昭雄; 有馬, 純
Citation	北海道大学免疫科学研究所紀要, 39, 16-23
Issue Date	1979-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26519
Type	departmental bulletin paper
File Information	39_P16-23.pdf



ホスファチジルイノシトールマンノシドの 免疫化学的研究 (II)

Mycobacterium intracellulare に属する菌の
リン脂質について

佐々木昭雄 有馬 純

(北海道大学免疫科学研究所細菌感染部門)

(昭和 53 年 10 月 31 日受付)

ホスファチジルイノシトール (PI, 2 分子の脂肪酸基を含む) に 1~6(x) 分子のマンノースと 0~2(y) 分子の“余分の”脂肪酸が結合したホスファチジルイノシトールマンノシド (y アシル PIM_x) は、結核菌リン脂質の主成分である¹⁻⁴⁾ が、各種のコクサチリアおよびこれらと近縁な一部の菌にも見出されている⁵⁾。我々は結核菌リン脂質抗原の活性因子を確認するため、結核菌 H₃₇Rv 株のリン脂質画分より 6 種の PIM_x 成分を単離精製し⁶⁾、6 成分すべてが一見少しずつ違った血清学的活性を示すこと⁷⁾、これらの間には複雑な交差反応性があること⁸⁾を明らかにした。そこで、もし結核菌にのみ特有な PIM_x 成分が存在すればそれが真の結核菌リン脂質抗原であろうと考え、各種コクサチリアおよびこれらと近縁な菌のリン脂質を薄層クロマトグラフィーで分析した⁹⁾。しかし、調べた範囲でのすべての菌のリン脂質は類似のクロマトグラムを示し、いずれの場合も主成分は結核菌由来のモノあるいはジアシル PIM₂ に相当していた。薄層上の移動度のみで成分を同定することはできないので、前報¹⁰⁾ においては調べた菌種の中で結核菌から一番遠いと考えられているプロピオニバクテリアの一菌株について、そのリン脂質主成分を精製し、化学的および血清学的同定を試みた。すると、この成分は薄層クロマトグラム上モノアシル PIM₂ に相当するスポットを示したが、マンノースも“余分の”アシル基も含まず、抗 PIM₂ 血清と反応せず、脱アシル後の水解でイノシトールのみが検出されたことから、PI と同定された。

一方、各種コクサチリアのリン脂質は結核菌リン脂質とはほぼ同じ薄層クロマトグラムを示したが、*Mycobacterium intracellulare* に属する一部の菌で少し変わったクロマトグラムを示す群が見出された。そこで今回は、この菌種に属する種々の菌株のリン脂質について薄層クロマトグラムを比較し、ついで変わったクロマトグラムを示した一菌株のリン脂質を部分精製し、化学的および血清学的性質を調べた。

材料と方法

菌体: 供試菌株は表-1 に示した 58 株で、略号 31~36 は以前より当部門で保存していた株、51~55 と 1~20 (8 は欠番) は帯広畜産大学の清水亀平次教授より、61~72, 81~89 および 91~97 は島根医科大学の斎藤肇教授より、分与された株である。菌株の血清型は、Schaefer の新しい命名法¹¹⁾ に従った。この血清型による分類は *M. avium*, *M. intracellulare* および *M. scrofulaceum* の 3 つの菌種にまたがっているため、表-1 中の血清型 1~3 に属する 6 株 (略号 61~63 と 1~3) は *M. avium* である。血清型 4~20 はすべて *M. intracellulare* で、*M. scrofulaceum* (血清型 41~43) は含まれていない。略号 34 と 14 (P 39), 35 と 12 (P 42), 63 と 3 (6195) は、入手経路が違っただけで、同じ株名の菌である。

表-1 使用菌株名とリン脂質の収率

略号	菌株名	血清型	アセトン 乾燥菌量 (mg)	リン脂 質 量 (mg)	収率 (%)
31	P 2		123	5	4.1
32	P 7		42	1	2.4
33	P 25		58	1.5	2.6
34	P 39	14	158	4	2.5
35	P 42	12	215	13.5	6.3
36	P 47		222	15	5.3
51	A-1	8	100	6.5	6.5
52	B 11-2	8	86	3	3.5
53	C-14	8	65	2.5	3.8
54	8	8	73	4	5.5
55	4-14 A	10	36	1	2.8
61	B 92	1	258	16	6.2
62	14141-4395	2	145	8.5	5.9
63	6195	3	155	9.5	6.1
64	1 M	4	204	12	5.9

略号	菌株名	血清型	アセトン 乾燥菌量 (mg)	リン 脂質量 (mg)	収率 (%)
65	2 M	8	152	11.5	7.6
66	47 M	9	90	4	4.4
67	HH 3	4	132	5	3.8
68	HH 12 A	8	152	12.5	8.2
69	P 165 A 3	9	190	10	5.3
70	Bat 176	16	190	10	5.3
71	Bat 340	14	200	10	5.0
72	P 41	17	311	10	4.2
81	P 23	8	436	35	8.0
82	322-1	8	177	5	2.8
83	277-1	8	289	13.5	4.7
84	Ueda	8	176	9	5.1
85	Tasaka 1	8	124	5.5	4.4
86	HH 13 C 3	8	100	4	4.0
87	E 1181 B	8	144	6.5	4.5
88	H 4539 A	8	142	9	6.3
89	3 M	8	200	15	7.5
91	T-301-1	9	351	17	4.8
92	Bat 362	9	199	10	5.0
93	Kusuda	9	122	6	4.9
94	Kanamori	9	166	6.5	3.9
95	1353	9	281	16	5.7
96	186 C-1	9	404	22	5.4
97	328	9	220	12.5	5.7
1	ATCC 15769	1	156	8	5.1
2	ATCC 17941	2	307	17.5	5.7
3	6195	3	191	10.5	5.5
4	13528-1079	4	157	10	6.4
5	4443-1237	5	136	9	6.6
6	34540	6	150	10	6.7
7	Manten 157	7	153	8	5.2
9	6450-204	9	182	13.5	7.4
10	1602-1965	10	211	15	7.1
11	14186-1424	11	97	5.5	5.6
12	P 42	12	182	10	5.5
13	Chance	13	172	11.5	6.7
14	P 39	14	168	8.5	5.1
15	Simpson	15	258	15.5	6.0
16	ATCC 15987	16	197	12	6.1
17	Comell	17	185	10	5.4
18	Melnick	18	153	5	3.3
19	Darden	19	137	6	4.4
20	P 40	20	185	13	7.0

菌はすべて小川の培地に13~21日間培養し、通常は試験管10~20本分の、リン脂質を粗分画したC-14株の場合は100本分の、菌体を白金耳で集めてアセトンを入れた50ml共栓遠心管中に移し、室温で1日以上放置して殺菌した後、マグネチック・スターラーによるかくはん抽出を1日間ずつ3回繰返し、残渣を減圧乾燥してアセトン乾燥菌体とした。

リン脂質の抽出精製と薄層クロマトグラフィー: リン脂質は前報¹⁰⁾と同様の方法でアセトン乾燥菌体より沸騰メタノールで抽出し、Folchの2相分配と熱アセトン処理により精製した。

薄層クロマトグラフィーは、脂質を10mg/mlの濃度にクロロホルム・メタノール・水86:14:1 (Folchの溶媒)に溶解して、その5 μ lをシリカゲルHの活性化していないプレート(20×20cm)にスポットし、前報^{6,7)}と同様にして行なった。

リン脂質の粗分画: 微粒子のシリカゲルであるQUSO G 32を使用した分取用遠心クロマトグラフィー (IVAN SORVALL 社製)により、リン脂質の分画を行なった。

Folchの溶媒でゲル化したシリカをSORVALL GLC-1形遠心機を使用して3,000回転7分の遠心により、内径8mm長さ65mmのガラスカラムに充填した。試料は100mg/mlの濃度にFolchの溶媒に溶解し、ポリエチレンの多孔性円柱を使用してカラム1本につき50 μ lずつ添加し、クロロホルム・メタノール・水70:20:3で3,000回転10分間展開した後、ゲル柱をカラムより押し出し、風乾した。同一条件で22本のゲル柱を作り、その中2本については重クロム酸ナトリウムを飽和した50%硫酸を噴霧・加熱してクロマトグラムを作り、それを基準にして残り20本のゲル柱をほぼ4等分し、分離された脂質成分を移動度の順に4つの群に分けた。切断されたゲル柱を各群ごとにプールして土壤脱水用遠心管に移し、クロロホルム・メタノール・水60:35:8で脂質を溶出し、溶媒を減圧で除いた後、Folchの2相分配と熱アセトン処理により、リン脂質を回収した。

脂肪酸、マンノースおよびイノシトールの分析: リン脂質5~6mgを2.5mlのクロロホルム・メタノール4:1に溶解し、50 μ lの4規定NaOH水溶液を加えて室温5分間強くかくはんした後、氷冷し、0.5mlのメタノールと0.7mlの水を加えてよく混合、軽く遠心して2相に分けた。脂肪酸メチルエステルを含む下相は、1.5mlのメタノール・水1:1で2回、1mlのメタノール・0.1M食塩水1:1で1回洗浄した後、減圧乾固し、n-ヘキサンに溶解してガスクロ分析に供した。脱アシル物を含む上相

は、下相の洗液とプールして Dowex 50-H (200~400 メッシュ) で中和し、アンモニア水 1 滴を加えて減圧乾固した。これを 0.5 ml の水に溶解し、0.5 ml の 2 規定硫酸を加えて封管中 100° 5 時間加水分解し、Dowex 1 X-8 (炭酸型) で硫酸イオンを除いて減圧乾固し、100 μ l の TMS-PZ (東京化成) に溶解してトリメチルシリル化し、マンノースとイノシトールのガスクロ分析に供した。

分析は、柳本ガスクロマトグラフ G 80 FP 型により前報⁶⁾の方法に従って行なった。

血清反応：ウサギ抗 H-7 (ジアシル PIM₂) および抗 H-3 (ジアシル PIM₆) を使用したガラス板法凝集反応 (Microflocculation test) は、前報¹²⁾と同様に行なった。

実験結果

リン脂質の薄層クロマトグラム

ソートン培養結核菌 H₃₇Rv 株から抽出分離した全リン脂質画分 H-T は図-1 左端のように薄層クロマトグラム上 12 個のスポットを示し、我々はこれらのスポットに下から順に H-1~H-12 と名づけた。スポットの濃度からみて一番量の多い成分は H-7 であり、以下 H-6、H-12、H-3、H-2 の順に次第に量が少なくなり、その他

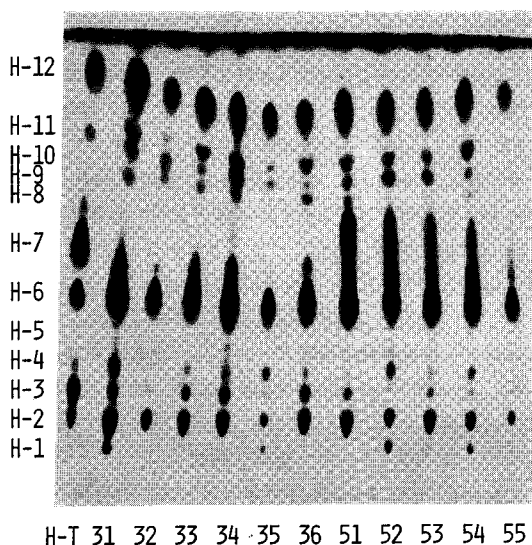


図-1 *M. intracellulare* リン脂質の薄層クロマトグラム

下の番号は表-1 の番号を示す。

プレート：シリカゲル H 20×20 cm

試料：100 μ g (5 μ l)

展開：CHCl₃-MeOH-H₂O 60:35:8, 45 分間

検出：クロム硫酸、加熱

は微量成分である。これと比較して小川培地で発育した菌株からのリン脂質の場合、H-7 に相当するスポットの濃度は明らかに低く、一番濃度の高いスポットは H-6 に相当し、次いで H-12 であり、その他のスポット濃度は菌株により多少変動するが、明らかに H-12 相当スポットの濃度より低かった。この現象は、図-1 の左側に示した *M. intracellulare* に属する 6 株 (表-1 の略号 31~36) のみならず、我々が調べた約 100 株の結核菌を含むほとんどすべてのミコバクテリアのリン脂質に共通して見られた。唯一の例外は図-1 の右側に示した略号 51~54 の *M. intracellulare* 4 株で、H-8 に相当するスポット濃度がかなり高いことが特長であった。しかし、略号 55 の菌株ではこの特長は見られなかった。

そこで *M. avium*-*M. intracellulare* complex の血清型による分類とこの特長との関連を調べるため、まず血清型既知の略号 61~72 の菌株についてリン脂質の薄層クロマトグラムを比較した。図-2 に示したように、血清型 8 の 2 菌株 (略号 64 と 68) と、血清型 9 の菌 2 株中一方のみ (略号 69) とで、H-8 に相当するスポット濃度が高い傾向が見られた。次に、血清型 8 の 9 菌株について調べた成績は図-3 のようになり、3 菌株 (略号 81, 82, 84) では明らかに H-8 および H-9 に相当するスポット濃度が高く、その他の菌株においても H-8 相当スポットの濃度が高い傾向が見られた。一方、図-4 に示した血清型 9 の 7 菌株では、特に H-8 相当スポットの濃度が高い傾向は見られなかった。血清型 1~20 の菌株についてリン脂質薄層クロマトグラムを比較した成績を図-5 a, b に示した。今回調べた範囲では、血清型 8 の他に血清型

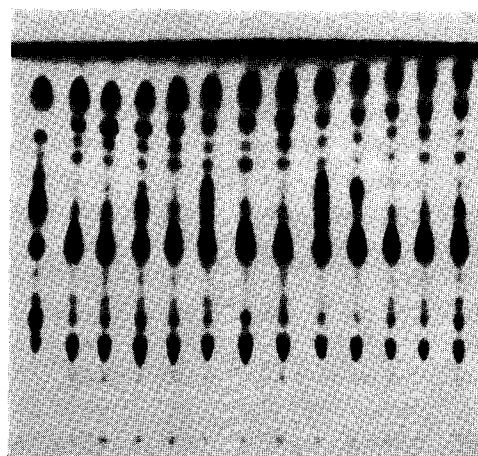
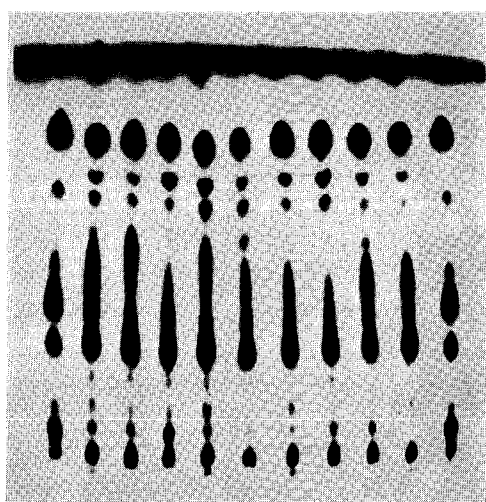


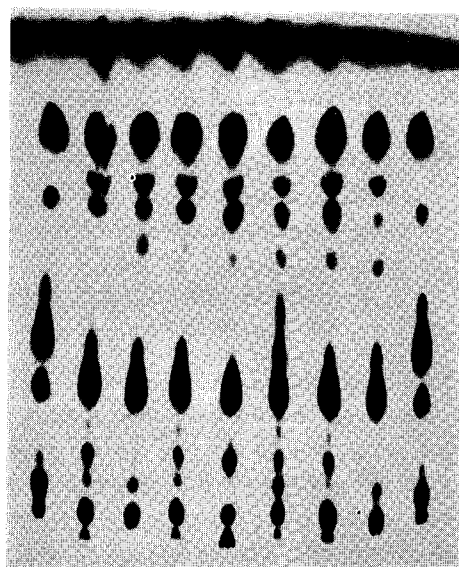
図-2 血清型既知菌株のリン脂質薄層

クロマトグラム



H-T 81 82 83 84 85 86 87 88 89 H-T

図-3 血清型8の菌株のリン脂質薄層
クロマトグラム

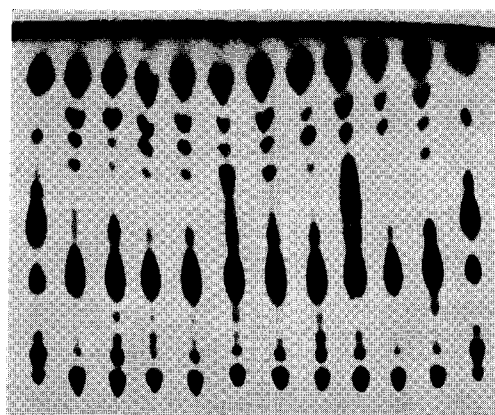


H-T 91 92 93 94 95 96 97 H-T

図-4 血清型9の菌株のリン脂質薄層
クロマトグラム

5の1菌株にも H-8 と H-9 に相当するスポット濃度が高い傾向が見られたが、*M. avium* を含むその他の血清型の菌株にはこの傾向は見られなかった。

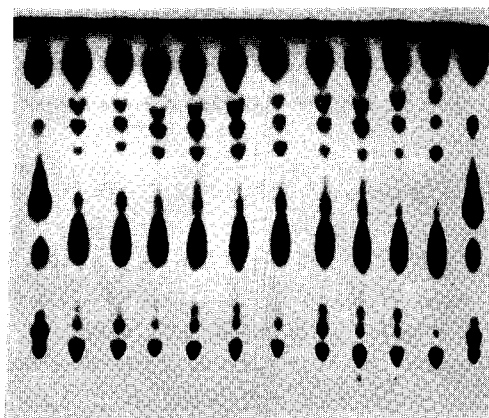
各菌株について、使用した菌体のアセトン乾燥重量、リン脂質量、およびこれから計算したリン脂質の収率を表-1に示した。菌株により多少の変動は見られたが、



H-T 1 2 3 4 5 6 7 51 9 10 H-T

図-5 a 血清型1~10の菌株のリン脂質薄層
クロマトグラム

血清型8の菌株として略号51の菌を使用した。



H-T 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 H-T

図-6 b 血清型11~20の菌株のリン脂質薄層
クロマトグラム

これらと薄層クロマトグラムとの間に特に関連は見出されなかった。

リン脂質の粗分画

M. intracellulare C-14 株 (略号 53) を小川培地で 37° 21 日間培養した試験管 100 本より出発し、湿菌 15.42 g、アセトン乾燥菌 3.910 g、メタノール抽出と Folch の 2 相分配で得られた脂質画分 547 mg、熱アセトン処理により精製したリン脂質画分 (I-T) 325 mg を得た。分取用遠心クロマトグラフィーによる脂質の分画は、2 回の予備実験の後、方法の項に記載した操作で行ない、全リン脂質 I-T から 4 画分を得、移動度の小さいから順に I-1~I-4 と名づけた。I-T 94.5 mg を分画し、ゲル柱より

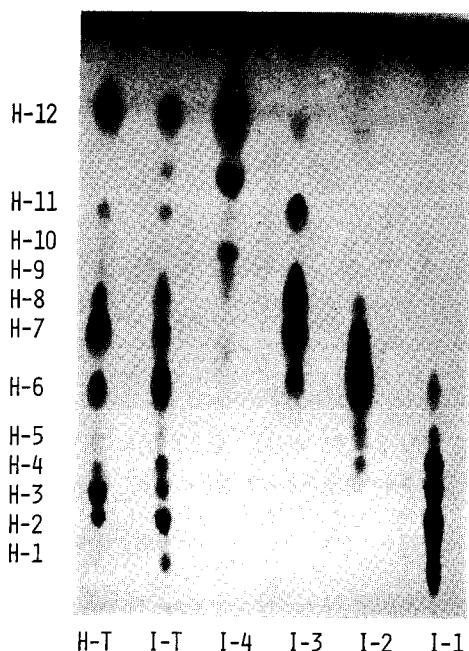


図-6 C-14 株のリン脂質およびその粗分画物の薄層クロマトグラム

溶出した後減圧乾固した段階で4画分合わせて83.5 mg, 2相分配では60 mgと減少したが, アセトン処理では僅かしか損失せず, I-1 16.5 mg, I-2 51 mg, I-3 13 mg, I-4 12 mg 計56.5 mgが回収された。これらリン脂質画分の薄層クロマトグラムを図-6に示した。分画前のI-Tには13個のスポットが検出され, H-Tと較べるとH-11とH-12の中間に新しいスポットが見られた。4画分それぞれは勿論複数個のスポットを示しているし, H-7やH-6に相当するスポットなどは, 2~3画分にまたがって分布している。また, 薄層と遠心の両クロマトグラムで各成分の移動順序は必ずしも一致しないため, H-11相当スポットはI-3画分に, H-10相当スポットはI-4画分に濃縮されていた。しかし, 全体としてはI-T中に含まれるリン脂質成分が移動度の順に粗分画されたといえる。

ガスクロ分析

各リン脂質画分に含まれている脂肪酸をメチルエステルの形で分離し, ガスクロ分析を行なった成績を図-7に示した。比較のため同一条件で行なったH-Tの脂肪酸は, パルミチン酸(C_{16})とツベルクロスチアリン酸(C_{19})が主成分であり, 少量のオレイン酸($C_{18:1}$)も含まれている。今回得られたI-Tの脂肪酸はこれと類似であり, C_{16} と C_{19} に相当するピークが主成分であるが, $C_{18:1}$ に



図-7 脂肪酸メチルエステルのガスクロマトグラム
SE-30 5% on Chromosorb W-AWCS, 60~80
メッシュ, 3 mm×75 cm. 昇温 170°~210°, 毎分 2°
キャリアー: ヘリウム, 毎分 20 ml

相当するピークがH-Tより大きく, その上 C_{16} より少し前に現れる未同定のピークも検出された。これら2種の少量成分はI-3とI-4に濃縮され, I-1とI-2の脂肪酸では C_{16} と C_{19} が主成分で $C_{18:1}$ は微量成分であった。一方, I-3の脂肪酸は C_{16} , $C_{18:1}$, C_{19} が主成分で少量の未同定成分を含み, I-4では未同定, C_{16} , $C_{18:1}$, が主成分で, C_{19} は微量成分であった。

イノシトールとマンノースの検出のために行なったガスクロマトグラムを図-8に示した。H-Tには α 型と β 型の2本に開裂したマンノースとイノシトールのピークが現われ, ピーク面積より両成分の分子比は3.0:1と計算された。これと比較して, I-Tには α および β マンノースとイノシトールの他に, α マンノースよりも前に溶出する β マンノースと同じ位の大きさの未同定ピークが検出された。しかし, このピークはI-1~I-4の全画分に微量成分として検出されたに過ぎない。I-1のクロマト

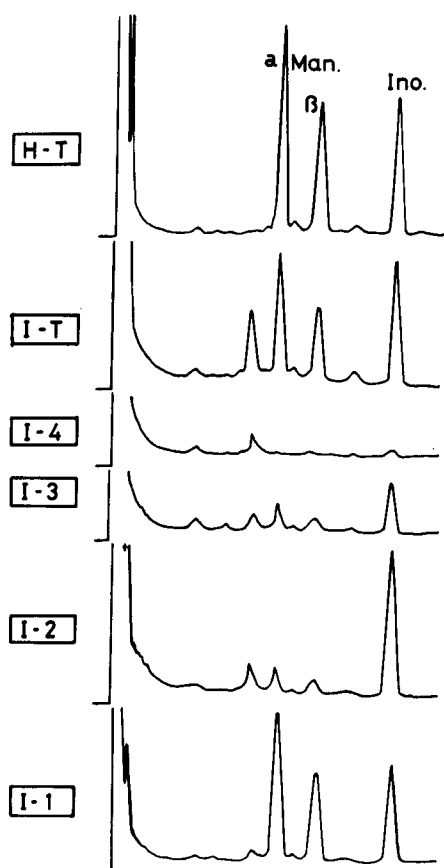


図-8 トリメチルシリル化水解物のガスクロマトグラム

昇温 160°~220°, 毎分 4°。その他の条件は図と同じ

グラムは H-T の場合と類似で、マンノースとイノシトールが約 3:1 の分子比で検出された。I-2 には多量の、I-3 には少量のイノシトールが検出されたが、両画分ともマンノースは微量しか含まず、I-4 はイノシトールもマンノースもほとんど含んでいなかった。

血清反応

図-6 に示した 5 種のリン脂質画分、I-T と I-1~I-4、をそれぞれ結核菌リン脂質のときと同じ濃度でレシチン・コレステロール・スーダン III のテトラヒドロフラン溶液中に溶解してから食塩水浮遊液とし、ウサギ抗 H-7 および抗 H-3 血清との間の反応性を調べた。両抗血清は結核菌由来の 6 種の PIM_x、H-2~H-7、のいずれとも反応するが、抗 H-7 血清はマンノース数の少ない H-6 と H-7 (モノおよびジアシル PIM₂) と強く反応し、抗 H-3 血清はマンノース数の多い H-2 と H-3 (モノおよびジアシル PIM₆) と強く反応する。表-2 に示したよう

表-2 リン脂質画分による凝集反応

反応抗原	血清希釈 (×4~×1,024, 対照)									
ウサギ抗 H-7 血清										
H-7	++	++	++	++	++	++	++	+	-	-
H-3	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
I-T	++	++	++	++	++	+	-	-	-	-
I-4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
I-3	++	++	++	++	++	+	-	-	-	-
I-2	++	++	++	++	++	+	-	-	-	-
I-1	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-
ウサギ抗 H-3 血清										
H-7	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-
H-3	++	++	++	++	++	++	++	+	-	-
I-T	++	++	++	++	++	++	++	+	-	-
I-4	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
I-3	++	++	++	+	-	-	-	-	-	-
I-2	++	++	++	+	-	-	-	-	-	-
I-1	++	++	++	++	++	++	++	+	-	-

に、抗 H-7 血清による反応の抗体価は H-7 が一番高く、2 希釈単位下って I-T、I-2、I-3、さらに 1 単位下って I-1 であり、I-4 は著しく低かった。一方、抗 H-3 血清による反応では I-T と I-1 が H-3 と同じ抗体価を示し、I-2~I-4 はいずれも H-7 よりも低い抗体価しか示さなかった。

考 察

y アシル PIM_x には、x (1~6) と y (0~2) の組合せによって 18 の成分が考えられる。しかし、ソートン培養結核菌 H₃₇Rv 株のリン脂質 H-T には、薄層クロマトグラム上 12 個のスポットが検出されたにすぎず⁶⁾、その中少なくとも 3 個は PIM_x でなく (カルジオリピン、ホスファチジルエタノールアミン、PI)、精製された 6 成分の中の 2 つ (H-4 と H-5) は微量成分であった。精製 6 成分のすべてに一見少しずつ違う血清学的活性が見出された^{7,8)} ことから、PIM_x の免疫化学的解析の一方として、可能な限り多くの PIM_x 成分を単離精製しようと試みている。H-T には微量しか含まれない、あるいは検出されない、血清学的活性をもった成分を多量含む菌種、菌株 (変異株)、または培養条件を薄層クロマトグラム上で見出そうとする試みは、現在までのところ成功してい

ない。Hackett and Brennan¹³⁾は、コリネバクテリアの一菌株で培養時期による PIM_x 組成の変動を報告しているため、我々の使用している培養条件が限られているため、あまり組成の変動が見られない可能性があり、今後もう少し検討を続ける。

表-1の略号 61 以降の菌株は、血清型既知のものであったが、豚腸間膜より分離された^{14,15)} 略号 51~55 の菌株は、リン脂質分析の後で血清型を知らされ、H-8 相当スポット濃度の高い略号 51~54 の菌株は血清型 8 で、そうでない略号 55 の菌株は血清型 10 であった。従って、今回 H-8 スポット濃度が高い傾向を示した 17 菌株中 15 菌株が血清型 8 に属していた。血清型 9 の 10 菌株中 1 菌株 (略号 69) のみが同じ傾向を示したことから、この菌株の血清型が間違っている可能性と、通常のクロマトグラムを示す菌株でも、まだ分っていない培養条件の変動で、上記の傾向を示すようになる可能性とが考えられる。同じ傾向を示した血清型 5 は 1 菌株しか調べていないので、この血清型の特長とは決められないが、血清型 8 の場合、調べられた 15 菌株のすべてが同じ傾向を示し、この血清型の菌の特長といえる。この群の菌のリン脂質代謝経路が他の菌のものとは違っている可能性が考えられるが、基本的には同じ代謝経路をもっているが他の菌とは至適培養条件が違うために変わってくる可能性も考えられる。ここでも培養条件によるリン脂質組成の変動を再検討する必要がある。

我々は以前 PIM_x の 6 成分を精製するための材料として、確実に高い血清学的活性を示す毒力結核菌 H₃₇Rv 株を使用した⁶⁾。しかし、結核菌以外の菌からも同様の PIM_x 成分が得られるのなら、発育の速い、無毒菌を使う方が有利である。種々のミコバクテリアおよびこれらと近縁な一部の菌のリン脂質が類似の薄層クロマトグラムを示した⁹⁾ので、前報¹⁰⁾では調べた菌の中で結核菌から一番遠いプロピオニバクテリアのリン脂質を化学的および血清学的に分析し、H-6 相当スポットを与える主成分は、結核菌のときとは違ってモノアシル PIM₂ ではなく、PI であること、マンノース含量の高い成分はほとんどないことを知った。そこで今回は、ぐっと結核菌に近づいて、上述の少し変わった薄層クロマトグラムを示す *M. intracellulare* C-14 株のリン脂質を分析した。前回はシリカゲルカラムクロマトグラフィーを繰返して主成分のみを精製したが、少量成分を含む粗分画物についても PIM_x の含量と組成についての大きな知見を得ることができた。そこで今回は、一部の成分の精製を目的とせず、操作が比較的簡単な分取用遠心クロマトグラフィーによる粗分画を行なった。

4 画分 I-1~I-4 のガスクロマトグラムおよび血清反応の成績から、各画分の組成について次のことが判明した。(1)主に H-1~H-4 に相当するスポットを含む I-1 には、マンノース 3 分子以上含む PIM_x 成分が存在する。(2)H-6 と H-7 相当スポットを含む I-2 は、少量の PIM₂ と多量の PI を含む。(3)H-7~H-9 相当スポットを含む I-3 には、PIM₂ と PI が少量ずつ含まれる。(4)移動度の大きなスポットを含む I-4 には、PIM_x はほとんどない。

プロピオニバクテリアとは違って、今回の菌のリン脂質には明らかに数種の PIM_x 成分が含まれていた。しかし、その量とくに PIM₂ の量は比較的少ない。ソートン培養結核菌 H₃₇Rv 株と、小川培地で発育した *M. intracellulare* C-14 株との間に見られたリン脂質組成の差が、菌株によるのか培養条件によるのかはまだ明らかでない。

ミコバクテリアはその表層の脂質含量が極めて高く、増殖も遅いため、通常の静置表面培養では菌令の揃った材料が得がたいといわれている。我々がソートンおよび小川の培地で調べた限りでは、培養日数によるリン脂質組成の変動はあまり明らかでなかった。現在、菌令による変動の有無をさらにはっきり調べるため、操作の簡単な BCG を使用して、BSA を添加したカザミノ酸培地¹⁶⁾による振とう培養を試みている。ソートン培地で充分発育した BCG は、結核菌 H₃₇Rv 株とはほぼ同じリン脂質薄層クロマトグラムを示し、H-7 と H-6 相当スポットの濃度はほぼ同じであった。一方、振とう培養菌の場合、培養日数が少ないときには H-7 および H-3 相当スポットの濃度が著しく低く、培養日数と共に次第に濃度が高くなっていく傾向が見られた。しかし、この傾向は少量の菌体を使用して得られた薄層クロマトグラムによる予備的成績であり、さらに多量の菌体を使用して化学的および血清学的に確認しようと試みている。

結 論

種々のミコバクテリアからのリン脂質は類似の薄層クロマトグラムを示したが、*M. intracellulare* に属する一部の菌において、下から 8 番目のスポット濃度が高い傾向が見られた。*M. avium*-*M. intracellulare* complex に属する 58 菌株のリン脂質を調べ、17 菌株においてこの傾向が見られた。15 菌株は Schaefer の血清型 8 に属し、これは調べられた血清型 8 の菌株のすべてであった。残りは、調べられた血清型 9 に属する 10 菌株中の 1 株と、1 株しか調べていない血清型 5 の菌であった。

血清型 8 に属する C-14 株のリン脂質を分取用遠心ク

ロマトグラフィーにより粗分画し、化学的および血清学的に調べて次の成績を得た。

1. 薄層クロマトグラム上移動度の小さい成分には、マンノース 3 分子以上を含む、血清学的活性をもった PIM_x が存在する。

2. 移動度が中程度の成分には、多量の PI と少量の PIM₂ が含まれる。

3. 移動度の大きい成分には PI も PIM_x もほとんどない。

以上の成績から、PIM_x 組成に関して *M. intracellulare* は結核菌 H₃₇Rv 株とプロピオニバクテリアとの中間に位置すること、血清型 8 に属する菌で濃度の高い、リン脂質薄層クロマト上、下から 8 番目のスポットは、PIM_x ではないことが判明した。

本研究を行なうに当たり、菌株を分与下さった帯広畜産大学清水亀平次教授、島根医科大学斎藤肇教授、また、菌の培養と薄層クロマトグラフィーにご協力下さった大里光子、立花キヨの皆さんに、心からお礼申し上げます。

文 献

- 1) Pangborn, M. C.: Ann. N. Y. Acad. Sci., **154**, 133 (1968).
- 2) Goren, M. B.: Bacteriological Reviews, **36**, 33 (1972).
- 3) Alving, C. R.: In "The Antigens, vol IV" (edited by Michael Sela) p. 56 (1977) Academic Press, New York.
- 4) 佐々木昭雄: 脂質の化学, 284 頁 (1974), 日本生化学会編, 生化学実験講座 3, 東京化学同人.
- 5) Brennan, P. J. and Lehane, D. P.: Lipids, **6**, 401 (1971).
- 6) Sasaki, A.: J. Biochem., **78**, 547 (1975).
- 7) 佐々木昭雄, 山本健一, 高橋義夫, 樽松三郎, 永山能為: 結核の研究, **34**, 56 (1974).
- 8) 佐々木昭雄: 結核, **50**, 321 (1975).
- 9) Sasaki, A. and Arima, J.: Jap. J. Tuberc. Chest Dis. **20**, 1 (1976).
- 10) 佐々木昭雄, 立花キヨ, 有馬 純: 免研紀要, **37**, 8 (1977).
- 11) Wolinsky, E. and Schaefer, W. B.: Int. J. Systematic Bact., **23**, 182 (1973).
- 12) 佐々木昭雄, 立花キヨ, 有馬 純, 永山能為, 西出鬼一郎, 柴田正弘: 免研紀要, **36**, 17 (1976).
- 13) Hackett, J. A. and Brennan, P. J.: Biochem. J., **148**, 253 (1975).
- 14) 宮下 司, 谷地田俊介, 奈良 博, 清水亀平次, 小野威: 日獣会誌, **25**, 76 (1972).
- 15) Yachida, S. and Shimizu, K.: Jap. J. vet. Sci., **35**, 459 (1973).
- 16) Fukui, Y., Hirai, T., Uchida, T. and Yoneda, M.: Biken J., **8**, 189 (1965).

Immunochemical Studies on Phosphatidylinositol Mannosides II

Partial characterization of phospholipids from *Mycobacterium intracellulare*

Akio SASAKI and Jun ARIMA

Some *Mycobacterium intracellulare* showed a little different thin-layer chromatograms of phospholipid from those of most mycobacteria: a spot corresponding to H-8 was more dense. In order to correlate the dense spot with Schaefer's seroagglutination types of mycobacterial strains designated "*M. avium* complex", phospholipids from 58 strains were chromatographed. Seventeen strains showed the different chromatograms. Of these, 15 strains were classified as serotype 8, and these were all of the strains with this serotype tested. Remaining two were; one of the 10 strains with serotype 9, and one of the one strain with serotype 5.

A phospholipid fraction obtained from *Mycobacterium intracellulare*, strain C-14 (serotype 8), was partially fractionated by centrifugal chromatography, and characterized by chemical and serological analysis. PIM_x components with more than 3 mannose residues did exist in a chromatographically slow-moving fraction. A little PIM₂ and much PI were detected on a middle fraction, and essentially no inositol-containing lipid was detected on a fast-moving fraction. In terms of the PIM_x composition, *M. intracellulare* was located between *M. tuberculosis*, strain H₃₇Rv, and *Propionibacterium*.