

Title	結核菌cord factorに対する抗体の特性と抗cord factor抗体を用いた結核の血清学的迅速診断に関する研究
Author(s)	藤原, 永年
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.11501/3169553">https://doi.org/10.11501/3169553</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

博士論文

結核菌 cord factor に対する抗体の特性と抗 cord factor 抗体を用いた結核の血清学的迅速診断に関する研究

平成11年11月

藤原 永年

博士論文

結核菌 cord factor に対する抗体の特性と抗 cord factor 抗体を用いた結核の血清学的迅速診断に関する研究

平成11年11月

藤原 永年

## 目 次

ページ

諸言		1
本論		
第1章	ELISA 法による抗 cord factor 抗体の検出	3
第2章	マウスにおける抗 cord factor 抗体の作製とその性質	4
第3章	抗 cord factor 抗体投与による cord factor 誘導マウス実験的肉芽腫形成の制御	9
第4章	家兎における抗 cord factor 抗体の作製とその性質	12
第5章	結核患者血清中の抗 cord factor 抗体の性質	18
総括		22
結論		23
謝辞		24
引用文献		25



## 緒言

結核をはじめとする抗酸菌感染症の研究は、Robert Koch による結核菌の発見以来今日に至る 110 余年の間著しい発展を遂げたが、菌体外毒素を産生する一般細菌の病原性発現機構とは異なり、複雑な細胞性免疫反応に基づく病変形成機序は現在でも未解明な点が多い。第二次世界大戦後、結核は抗結核薬の世界的普及により着実に減少傾向を示していたが、最近その減少化傾向が鈍化し、特に HIV/AIDS 合併症、多剤耐性結核菌の出現、集団感染事例の増加等、改めて結核の深刻さが問題視され、即ち再興感染症として結核が甚大な脅威となっている。新興・再興感染症対策として、世界保健機関 (WHO) は 1993 年に「結核非常事態宣言」を発表し、日本でも厚生省は 1999 年に「結核緊急事態宣言」を発表した。このような状況の中で結核対策における世界的戦略として結核の簡便な迅速診断法の開発、新規薬剤の開発、新規ワクチンの開発が急務であり、筆者は特に結核の迅速診断法についての研究を行った。

結核の診断は、患者検体中に抗酸菌を証明することが基本 (病原体診断) であり、喀痰塗抹標本を抗酸性染色により抗酸菌を検出するか、或いは培養により抗酸菌を検出することにより診断が確定する。前者は菌数の少ないときには検出が困難であり、後者は分離培養に長期間 (約 8 週間) を要し、確定診断が遅延し、その結果、結核医療に支障を来している。また、実際には結核菌を検出できない (喀痰への排菌のない) 排菌陰性患者が結核患者全体の半数を超えており、最近開発された PCR 法<sup>1)</sup> は排菌陽性患者について迅速診断が可能となりつつあるが、精度・再現性等に問題があり、排菌陰性患者に対する診断法としてはまだ十分とは言えない。

抗酸菌の特徴は菌体表層にワックス様の脂質を多量に含み、したがって色素に染色され難く、一旦染色されると酸によっても脱色され難い "抗酸性" を呈することである。この疎水性に関与する菌体表層の構成成分はミコール酸を始めとする各種脂質である。ミコール酸は天然では非常にまれな $\alpha$ 位に分岐鎖、 $\beta$ 位に水酸基を持つ長鎖脂肪酸であり、特にトレハロースに 2 分子のミコール酸がエステル結合した cord factor (trehalose 6,6'-dimycolate, TDM) は、その毒性に加え、免疫薬理学的な各種生理活性について研究が進められている<sup>2-7)</sup>。このように疎水性の強い脂質成分は、一般細菌が産生する水溶性タンパク質と異なり、免疫反応を誘導する抗原物質や生体調節物質としては馴染み難い構築成分であるが、このような性質が結核や抗酸菌感染症の発症や病変の進展に寄与していると考えられる。筆者らはこの cord factor に対する抗体 (IgG 及び IgM) が結核または非結核性抗酸菌症患者に特異的に出現し、排菌陽性のみならず排菌陰性患者にも高率に上昇していることを見だし、cord factor を抗原とした ELISA 法により抗体を検出し、結核などの抗酸菌症の血清学的診断法として開発中である<sup>8-10)</sup>。Cord factor を抗原とする ELISA 法は抗原が全ての抗酸菌の菌体表層に存在すること、さらに疎水性が強くマイクロプレートに固相化したとき安定であることから日常臨床においても実施可能である。また、排菌陰性患者血清においても約 70-75%の陽性率を示し、遺伝子診断法では 20%以下であることを考慮す

ると抗酸菌症の診断方法として非常に有用であると思われる知見を得た<sup>11)</sup>。

本研究では、これら菌体表層脂質成分に焦点を当て、その代表的な構成成分である cord factor に対する抗体を実験動物（マウス及び家兎）で作製し、その性質を解析した。さらに結核及び非結核性抗酸菌症患者血清中の抗 cord factor 抗体が認識するエピトープの解析を行い、より高感度で特異性の高い血清学的迅速診断法の開発を目的として種々の検討を行なった。

## 本論

### 第1章 ELISA 法による抗 cord factor 抗体の検出

#### 材料および方法

精製した抗原糖脂質あるいはミコール酸メチルエステルをヘキサンに溶解し、マイクロプレート（ポリスチレン製, Falcon 3915, Becton Dickinson and Co., USA）の各 well に 0.63-40  $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$  を加え、常温で overnight 放置して自然乾燥させ各抗原をコートした。ブロッッキングは 0.05% Tween-20 を含むリン酸緩衝液 (PBS-T) 300  $\mu\text{l}$  を加えて 1 時間以上放置したのち、吸引により緩衝液を除去した。各 well に PBS-T で希釈した血清 50  $\mu\text{l}$  を加え 1 時間反応させた。PBS-T で 3 回洗浄したのち、二次抗体として peroxidase 標識抗ヒト（マウス, ウサギ）IgG (IgM) 抗体 500 倍希釈液 50  $\mu\text{l}/\text{well}$  を加え 1 時間反応させた。さらに、PBS-T で 3 回洗浄して基質として o-phenylenediamine 1 mg/ml 溶液 (0.1 M citrate, 0.2 M NaHPO<sub>4</sub>, 0.04% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 50  $\mu\text{l}/\text{well}$  を加えて 10 分間反応させて発色後、6 N HCl 50  $\mu\text{l}$  で反応を停止させ、マイクロプレートリーダーで波長 492-630 nm の吸光度を測定することによって抗体濃度を定量した<sup>8)</sup>。

#### 結果および考察

本 ELISA 法により結核患者血清中に存在する抗 cord factor 抗体微量測定系が確立できた。

特に、抗 cord factor 抗体の微量定量法として結核患者血清の場合、血清希釈倍率 160 倍, cord factor 抗原 2.5  $\mu\text{g}/\text{well}$  で陽性判定に良好な結果が得られた。また、cord factor 以外のミコール酸含有糖脂質あるいはミコール酸メチルエステルを抗原として用いた場合も同様に抗体価が測定できること、さらにマウス、家兎における抗 cord factor 抗体の定量も二次抗体を anti-mouse, anti-rabbit IgG (IgM) に変更することによって同様に測定できることから、以降の実験系における assay 法として採用した。

ELISA の系において疎水性の強い cord factor を抗原として用いることは、従来の水溶性タンパク質を用いた抗原抗体反応と異なる点である。

#### 小括

結核菌を始めとする類縁抗酸菌の菌体表層脂質成分として普遍的に含まれるミコール酸含有糖脂質 cord factor を抗原とした ELISA 法による抗 cord factor 抗体の抗体量を測定する系を確立した。本 ELISA 系は、従来のタンパク質を用いた抗原抗体反応とは異なり、抗原として疎水性の強い糖脂質を用いることが特徴である。

## 第2章 マウスにおける抗 cord factor 抗体の作製とその性質

### 第1節 *Rhodococcus ruber* 由来 cord factor の単離精製

#### 材料および方法

*Mycobacterium* を始め *Nocardia*, *Rhodococcus* 等の類縁抗酸菌には菌体表層成分として普遍的にミコール酸が存在するが、菌種によりその炭素鎖長等の構造が異なっている<sup>12, 13)</sup>。そこで *R. ruber* R-1 株を培養し、Folch の方法<sup>14)</sup> に準じて、加熱滅菌後に遠心集菌した菌体に chloroform/methanol (2:1, by vol.) 混合溶媒を加えて超音波処理し、蒸留水を加えて2層分配により crude lipid を得た。さらに薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いて各種展開溶媒系で移動度の違いから cord factor, GM, MM を単離精製した。単離精製した cord factor, GM, MM はソフトイオン化質量分析法 (FAB/MS)、ガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリー等により分析した<sup>15)</sup>。

#### 結果および考察

*R. ruber* R-1 株から単離精製して得られる cord factor は、 $\alpha$ 位に C<sub>12</sub> または C<sub>14</sub> の分岐鎖を有し炭素鎖長 C<sub>46</sub> のモノエンを中心とする C<sub>44</sub> - C<sub>48</sub> の分子種からなるミコール酸を含んでいた。また、*R. ruber* R-1 株を培養する際に単一炭素源として glucose や mannose 等を用いることにより、cord factor 以外のミコール酸含有糖脂質 glucose monomycolate (GM) 及び mannose monomycolate (MM) も産生された<sup>15)</sup>。これらミコール酸含有糖脂質は、結核菌に比べ炭素鎖長が約 1/2-2/3 であり、マウスに対する致死毒性も低く、取り扱いも容易なことから、実験材料として最適であった。

### 第2節 マウスにおける抗 cord factor 抗体の作製

#### 材料および方法

*R. ruber* R-1 株より単離精製した cord factor を全量の 3.2%となるように Freund's incomplete adjuvant (Difco Laboratories, Mich., USA) と等量の PBS 存在下に 0.2% Tween-80 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka) を含む生理食塩水に浮遊させ、テフロン製ピストンホモジナイザーで water-in-oil-in-water (w/o/w) ミセルを調製し<sup>16)</sup>、ICR 系マウス (6-8 週齢, 雄) に腹腔内投与した。

#### 結果および考察

Cord factor を複数回少量 (30  $\mu$ g/匹) 投与した場合と1回大量 (300  $\mu$ g/匹) 投与した場合における抗 cord factor 抗体の産生量の相違を ELISA 法で測定比較した。1回大量投与では抗体価は上昇しなかったが、5-7 日間隔で頻回少量投与することにより、4-6 週間後に抗 cord factor 抗体価が上昇した (Fig. 1)。このように疎水性の極めて強い cord factor を w/o/w ミセルの形でマウスに頻回少量投与することにより



抗 cord factor 抗体が産生されることが判明した。さらに、同様の方法で GM, MM を抗原としてマウスを免疫し、それぞれの免疫原に対する血清抗体を得た。

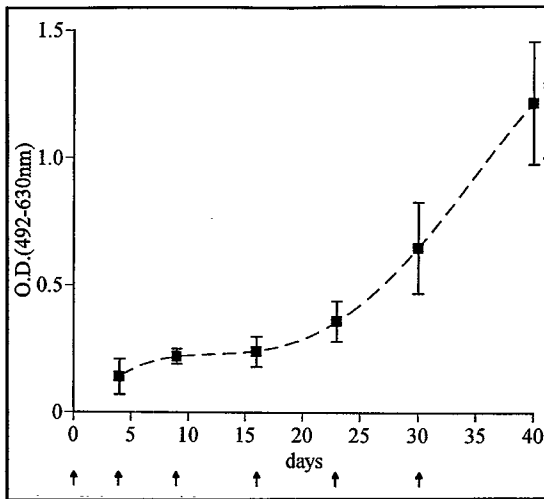


Fig. 1. Time-course of anti-cord factor antibody production in mice by multiple immunization. Mice were injected intraperitoneally at 0, 4, 9, 16, 23 and 30 days. Arrows indicate injection time-points. Test bleeding was done by cardiac puncture. In ELISA, sera diluted 40 times were used as the first antibody and 10  $\mu$ g of cord factor from *R. ruber* was used as antigen. Peroxidase-conjugated anti-mouse IgM+IgG goat antibody was used as the second antibody.

### 第3節 抗 cord factor 抗体の性質

#### 材料および方法

第2節で得られた各血清抗体の反応性を ELISA 法を用いて比較した。

ELISA 抗原として cord factor, GM, MM に加え、各種抗原との反応性を比較するために、*R. ruber* R-1 菌体から chloroform/methanol (2:1, by vol.) で cord factor 等のミコール酸含有糖脂質を抽出除去した残渣（主として細胞壁骨格の arabinogalactan mycolate を含む）を調製した。さらに、*R. ruber*, *Mycobacterium intracellulare* の菌体残渣をアルカリ水解して各種ミコール酸メチルエステルを抽出・精製した。

#### 結果および考察

いずれの糖脂質で免疫した場合でも、血清抗体は cord factor とよく反応し、他の GM, MM を ELISA 抗原とした場合よりも高い抗体価を示したが、各血清抗体は cord factor, GM, MM との間で交差反応を示した (Fig. 2)。したがって、これらの抗体は糖鎖部分を認識するがその特異性は低く、主に疎水性の強いミコール酸部分を認識している可能性が示唆された。

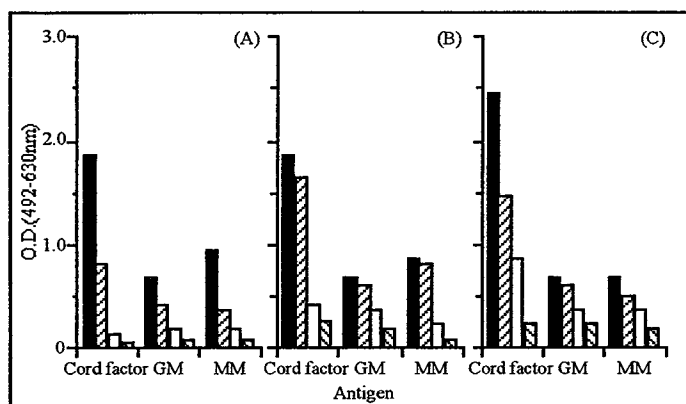


Fig. 2. Antigen-specificity of sera from mice immunized with mycoloyl glycolipids. Sera from mice immunized with cord factor (A), GM (B), or MM (C) were used as the first antibody, and 10  $\mu$ g of cord factor, GM, or MM from *R. ruber* was used as antigen. Each sera were diluted  $\blacksquare$ , 40 times;  $\square$  with diagonal lines, 80 times;  $\square$ , 160 times;  $\square$  with cross-hatch, 320 times. Peroxidase-conjugated anti-mouse IgM+IgG goat antibody was used as the second antibody.

そこで、この点を確認するために、菌体から chloroform/methanol (2:1, by vol.) で cord factor 等のミコール酸含有糖脂質を抽出除去した残渣（主として細胞壁骨格の arabinogalactan mycolate を含む）に対する抗 cord factor 抗体の反応性を調べた。脱脂菌体（残渣）を ELISA 抗原とした場合でも血清抗体は反応し、抗 cord factor 抗体は細胞壁に結合したミコール酸（arabinogalactan mycolate）とも反応することがわかった (Fig. 3)。

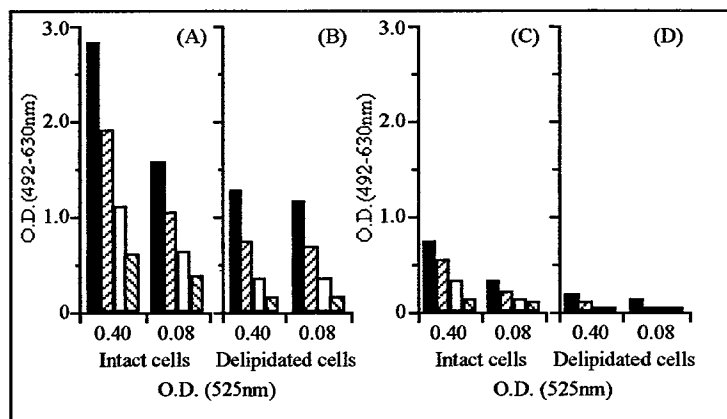


Fig. 3. Reactivity of sera from mice immunized with cord factor against intact or delipidated cells of *R. ruber*. Delipidated cells were prepared as the residues extracted with chloroform-methanol (2:1, by vol.). Intact and delipidated cells were adjusted to 0.4 and 0.08 value of O.D. at 525 nm, and used as antigen. Sera from mice immunized with cord factor (A, B) and control sera (C, D) were used as the first antibody. Sera were diluted  $\blacksquare$ , 40 times;  $\square$  with diagonal lines, 80 times;  $\square$ , 160 times;  $\square$  with cross-hatch, 320 times. Peroxidase-conjugated anti-mouse IgM+IgG goat antibody was used as the second antibody.

さらに、菌体残渣をアルカリ水解して得られたミコール酸メチルエステルとの反応性を比較すると、*R. ruber* 由来のミコール酸メチルエステルとは良く反応したが、炭素鎖長の長い（主に C<sub>80:2</sub>）*M. intracellulare* 由来のミコール酸メチルエステルとの反応性は低かった (Fig. 4)。吸収実験において cord factor の糖部分を構成するトレハロースでは十分に吸収されず (Fig. 5)、抗 cord factor 抗体は炭素鎖長の違いも含めミコール酸部分を主に認識する抗体であると考えられた。この様な長鎖分岐脂肪酸に対する抗体に関しては Kato<sup>17)</sup> による報告以外なく極めてユニークなものである。

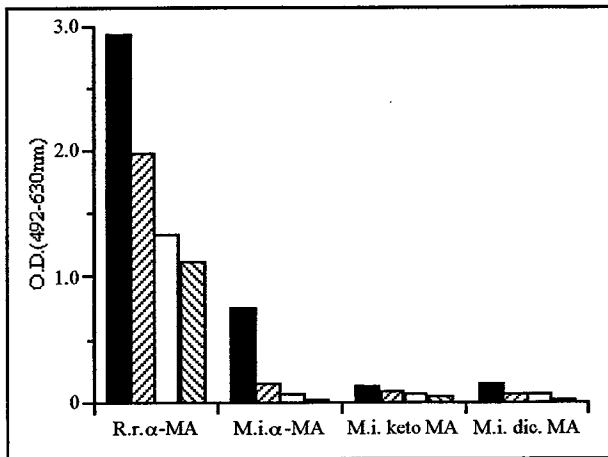


Fig. 4. Antigen-specificity of sera from mice immunized with cord factor against mycolic acid methyl ester. Mycolic acid methyl esters from *R. ruber* and *M. intracellulare* were used as antigens. Sera from mice immunized with cord factor of *R. ruber* were diluted ■, 10 times; ▨, 20 times; □, 40 times; ▩, 80 times, and used as the first antibody. Antigen was  $\alpha$ -mycolic acid methyl ester of *R. ruber* (R.r.  $\alpha$ -MA), or  $\alpha$ - (M.i.  $\alpha$ -MA), keto (M.i. keto MA), dicarboxy (M.i. dic. MA) mycolic acid methyl esters of *M. intracellulare*. The amount of each antigen was 10  $\mu$ g/well. Peroxidase-conjugated anti-mouse IgM+IgG goat antibody was used as the second antibody.

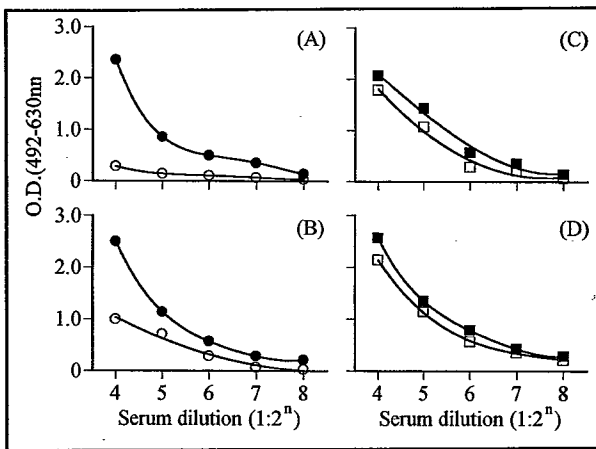


Fig. 5. Failure to absorb cord factor specificity of antibody by trehalose. Anti-cord factor sera (25  $\mu$ l) were incubated overnight with liposomes containing 0.75  $\mu$ mol of cord factor from *R. ruber* (O) or liposomes without cord factor (●) in (A, B). For inhibition by trehalose, anti-cord factor sera were incubated with 0.1 M of trehalose (□) or without trehalose (■) in (C, D). The second antibody was peroxidase-conjugated anti-mouse IgG goat antibody in (A, C), peroxidase-conjugated anti-mouse IgM goat antibody in (B, D). In all experiments, 10  $\mu$ g of cord factor from *R. ruber* was used as antigen.

#### 第4節 抗 cord factor モノクローナル抗体の作製とその性質

##### 材料および方法

マウスを cord factor で免疫して得られた抗 cord factor ポリクローナル抗体の免疫学的特性が確認できたので、より詳細な解析をするため、モノクローナル抗体の作製を試みた。BALB/c マウスに 30  $\mu$ g の cord factor を w/o/w ミセルの形で 6 回投与し抗体産生を確認したのち、マウス脾細胞を取り出し、45% ポリエチレングリコール 4,000 (Merck, Darmstadt, Germany) を用いてミエローマ細胞 P3/X63-Ag8(X63) と細胞融合させハイブリドマクローンを作製し、限界希釈法にて抗 cord factor モノクローナル抗体 (moAb) 産生細胞をクローニングした<sup>18-20)</sup>。

##### 結果および考察

得られた moAb は cord factor, GM, MM さらに *R. ruber* 由来のミコール酸メチルエステルと反応する抗 cord factor ポリクローナル抗体と同様の性質を有することが確認できた (Fig. 6)。

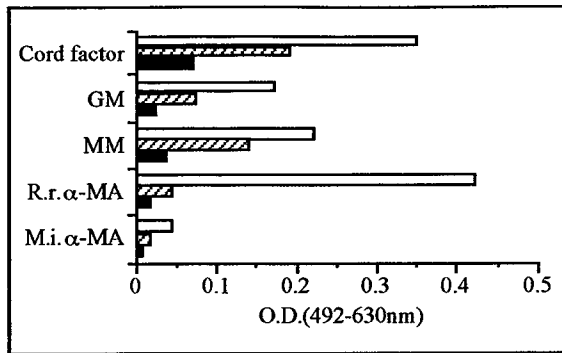


Fig. 6. Reactivity of monoclonal and polyclonal anti-cord factor antibody to various mycoloyl glycolipids and  $\alpha$ -mycolate. MoAb (IgM) was compared with polyclonal IgM and IgG antibody. MoAb and sera from mice immunized with cord factor (polyclonal antibody) diluted 128 times were used as the first antibody, and peroxidase-conjugated anti-mouse IgM or IgG goat antibody was used as the second antibody. Ten  $\mu$ g of cord factor, GM, MM, or  $\alpha$ -mycolate from *R. ruber* (R.r. $\alpha$ -MA) and *M. intracellulare* (M.i. $\alpha$ -MA) was used as antigen. Columns show □, moAb (IgM); ▨, polyclonal anti-cord factor IgM antibody; ■, polyclonal anti-cord factor IgG antibody.

### 小括

マウスに cord factor を w/o/w ミセルの形で頻回少量投与することにより、糖脂質に対する抗体を産生させることができた。本抗体は、cord factor の糖部分であるトレハロースよりも、脂質部分であるミコール酸を強く認識する抗体であった。さらに、同様の性質を有する抗 cord factor モノクローナル抗体を作製した。

### 第3章 抗 cord factor 抗体投与による cord factor 誘導マウス実験的肉芽腫形成の制御

#### 材料および方法

マウスに cord factor を w/o/w ミセルの形<sup>21)</sup>で尾静脈より単独投与することにより、肺、脾臓、肝臓において結核性肉芽腫に類似する異物性肉芽腫が形成される<sup>4-6)</sup>。Cord factor 誘導肉芽腫形成の制御に抗 cord factor 抗体がどのように影響するかについて検討するため、ICR 系マウスに cord factor 200  $\mu$ g のみ、cord factor 200  $\mu$ g に moAb 300  $\mu$ l (30 ng) を添加後1時間インキュベートしたものをそれぞれ w/o/w ミセルの形で尾静脈より投与した。対照として w/o/w ミセルのみを投与した。1週間後に各臓器重量を測定し、体重との比を Organ Index として算出した<sup>21)</sup>。また、moAb の投与時期による影響についても検討した。さらに、炎症性サイトカインである interleukin-1 (IL-1) およびマクロファージに対する走化性因子 (chemotactic factor) について moAb 投与による影響を調べた。

#### 結果および考察

Cord factor および moAb 投与から1週間後に各臓器重量を測定し、体重との比を Organ Index として算出したところ、3種類の臓器において cord factor のみを投与した場合に比べ、moAb を添加投与した場合は明らかに肉芽腫形成を抑制した。特に肺、脾臓において有意な抑制効果が認められた (Fig. 7)。また、毒性(病原性)の指標である体重減少についても cord factor を単独投与したマウスに比べて moAb を同時に投与した群において、明らかに体重減少が抑制された (Table 1)。次に moAb の投与時期を検討した。Cord factor 投与後30分または12時間後に moAb を投与した場合は、肺における肉芽腫形成は抑制されたが、4日後では肉芽腫形成の抑制が殆ど認められなかった (Fig. 8)。

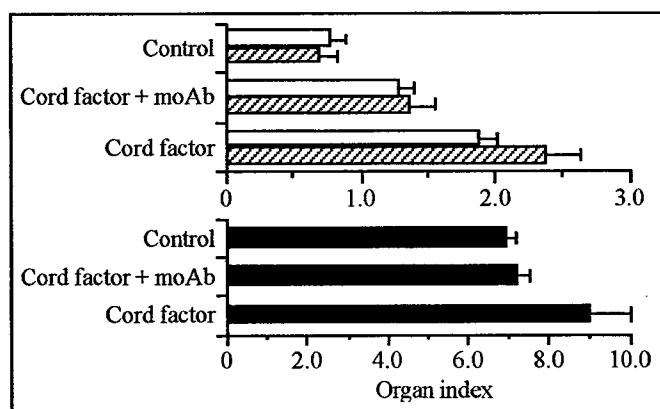


Fig. 7. Suppression of moAb on granuloma formation in lungs, spleen, and liver. ICR mice were injected with w/o/w micelles containing cord factor (200  $\mu$ g), cord factor (200  $\mu$ g) plus moAb (300  $\mu$ l) or saline (200  $\mu$ l; control). After 7 days, each organ was excised and granuloma formation was evaluated by the calculation of organ indices. Columns show  $\square$ , spleen;  $\text{▨}$ , lungs;  $\blacksquare$ , liver. Bars indicate mean  $\pm$  SD (n=5).

Table 1. Effect of anti-cord factor monoclonal antibody on body weight reduction induced by cord factor

	w/o/w control	cord factor (200 µg)	cord factor (200 µg) + moAb (300 µl)	cord factor (300 µg)	cord factor (300 µg) + moAb (300 µl)
body weight (g)	28.4±0.8	22.8±2.1	26.8±0.8	20.3±0.9	24.1±1.6

Mice (5 mice per group) were injected with cord factor alone (200 or 300 µg) or cord factor plus moAb (300 µl). Body weight was measured 7 days after injection. In w/o/w control, w/o/w micelles without cord factor were injected into mice. Data represents mean ± SE.

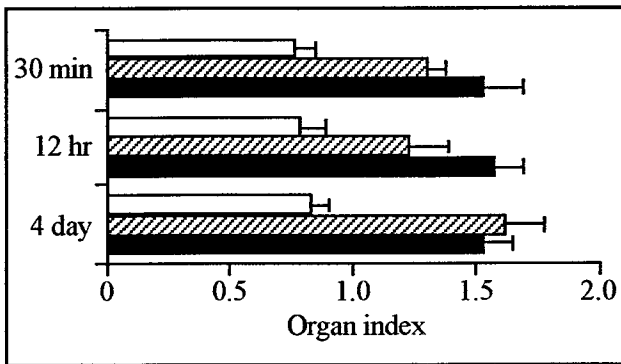


Fig. 8. Early intervention by moAb inhibits granuloma formation in lungs. The 300 µl of moAb was administered intravenously 30 min, 12 hr, and 4 days after injection of cord factor (200 µg). Granuloma formation in lungs was examined 7 days after cord factor injection. Columns show □, control; ▨, cord factor plus moAb; ■, cord factor. Bars indicate mean ± SD (n=5).

Cord factor 誘導実験的マウス肉芽腫炎症モデルにおいて、炎症性サイトカインである interleukin-1 (IL-1) が病変活動期に誘導されることが報告されている<sup>22, 23)</sup>。Cord factor を投与した場合、病変局所の IL-1 活性は肉芽腫形成の極期である 7 日目に顕著に上昇していたが、moAb を cord factor と同時投与することにより IL-1 活性の上昇は認められず、cord factor を含まないコントロールと差はなかった (Fig. 9)。また、肉芽腫形成活性を示すミコール酸含有糖脂質は投与初期にマクロファージに対する走化性因子 (chemotactic factor) を誘導することも報告されているが<sup>14)</sup>、moAb を cord factor と同時に投与することにより投与後 1 日目に上昇する chemotactic activity が抑制された (Fig. 9)。

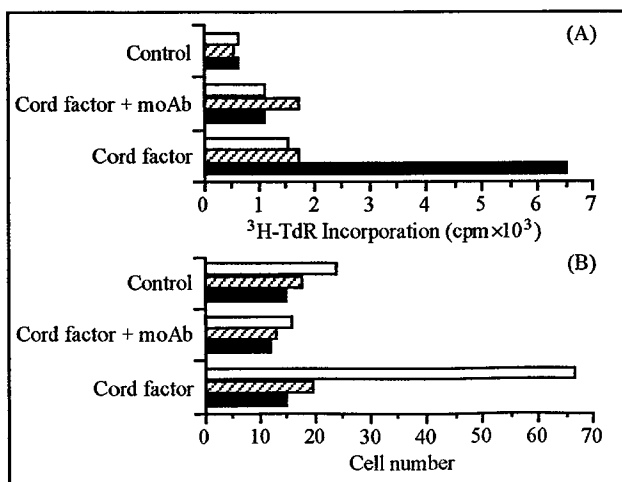


Fig. 9. Suppression by moAb of IL-1 and chemotactic bioactivities of lungs in mice challenged with cord factor. W/o/w micelles containing 200 µg of cord factor were injected into mice intravenously, followed by the injection with 300 µl of moAb or saline. The lungs were excised 1 (□), 4 (▨), and 7 (■) days after cord factor injection and single cell suspensions were prepared. After incubation for 24 hr, the supernatants were assayed for IL-1 activity (A) and chemotactic activity (B).



MoAb 投与による肉芽腫形成の抑制及び IL-1, chemotactic factor の誘導抑制に関する機序は明らかではないが、2つの可能性が考えられる。第1は cord factor と moAb が結合することにより cord factor の活性部位が隠ぺいされ宿主炎症応答が抑制されたため、即ち抗体により cord factor の生物活性が中和され、最終的に肉芽腫形成が抑制された可能性、第2の可能性は、cord factor と moAb が免疫複合体を形成することにより宿主における抗原処理機能が修飾され、すみやかに食細胞に貪食、その後異物処理されるという考えである。第2の可能性については補体活性化に関する検討を要するが、cord factor が補体結合能を有することを筆者らは既に確認している。

抗酸菌感染症の最も特徴的病変はマクロファージ、類上皮細胞及び単核球を中心とした免疫担当細胞の局所的浸潤、増殖を主体とした慢性肉芽腫性炎症であり、肉芽腫性炎症の発生や制御機構には細胞性免疫が深く関与しており、細胞性免疫の反応を介して乾酪性肉芽腫や空洞形成に至るものと考えられている。抗 cord factor 抗体が cord factor の毒性及び肉芽腫形成能を始めとする各種生物活性に抑制（中和）的に作用することは細胞性免疫の発現調節に抗体産生系（液性免疫）が関与する可能性を示唆している。細胞性免疫は1型ヘルパー T 細胞 (Th1)、液性免疫は2型ヘルパー T 細胞 (Th2) に依存し、Th1 と Th2 は拮抗制御している<sup>24)</sup>。さらに、肉芽腫炎症の早期（誘導期）には Th1 優位、後期（消褪期）には Th2 優位であること<sup>25, 26)</sup> を考慮すると、肉芽腫炎症に細胞性及び液性免疫応答が正と負の制御機構を発揮していることが想定される。

## 小括

マウスにおける抗 cord factor モノクローナル抗体を用いて cord factor 誘導実験的肉芽腫形成に対する影響を調べた。Cord factor 投与の初期に抗体を投与することにより、毒性及び肉芽腫形成は抑制された。また、肉芽腫形成に関与している IL-1, chemotactic factor の活性も抑制された。これらの結果から、結核性肉芽腫に類似する cord factor 誘導肉芽腫が抗 cord factor 抗体により抑制されたことは、抗体（液性免疫）により各種生物活性を調節することが可能であることを示唆した。

## 第4章 家兎における抗 cord factor 抗体の作製とその性質

### 第1節 *M. tuberculosis* 及び *M. avium* 由来各種糖脂質抗原の単離精製

#### 材料および方法

*R. ruber* 由来糖脂質の単離精製に準じ、結核菌 *M. tuberculosis* と非結核性抗酸菌 *M. avium* からそれぞれ cord factor を単離精製した。また、*M. tuberculosis* から特徴的な糖脂質として trehalose monomycolate (TMM) 及び cord factor と同様にトレハロースを含有する 2,3,6,6'-tetraacyl trehalose 2'-sulfate (SL) も単離した。

*M. tuberculosis* 由来 cord factor (MTB-cord factor) と *M. avium* 由来 cord factor (MAC-cord factor) の化学的構造はミコール酸サブクラスが異なっており、MTB-cord factor は  $\alpha$ -、メトキシ、ケトミコール酸を構成成分としているが、MAC-cord factor は  $\alpha$ -、ケト、ジエステルミコール酸からなっている<sup>13)</sup>。今回、MTB-cord factor のミコール酸メチルエステルを TLC で各種溶媒系を用いて分離した。

#### 結果および考察

*n*-hexane:diethyl ether (90:15, by vol.) および benzene を組み合わせて繰り返し展開することにより、MTB-cord factor 由来ミコール酸メチルエステルのサブクラスが明瞭に分離できた。FAB/MS 分析の結果、 $\alpha$ -ミコール酸は  $C_{78}$  を中心に  $C_{76} - C_{84}$ 、メトキシミコール酸は  $C_{85}$  を中心に  $C_{83} - C_{87}$ 、ケトミコール酸は  $C_{87}$  を中心に  $C_{85} - C_{89}$  までの分子種からなっていた。単離精製できた糖脂質およびミコール酸サブクラスの TLC パターン (Fig. 10)、FAB/MS (Fig. 11) 及び構造式 (Fig. 12) を示した。

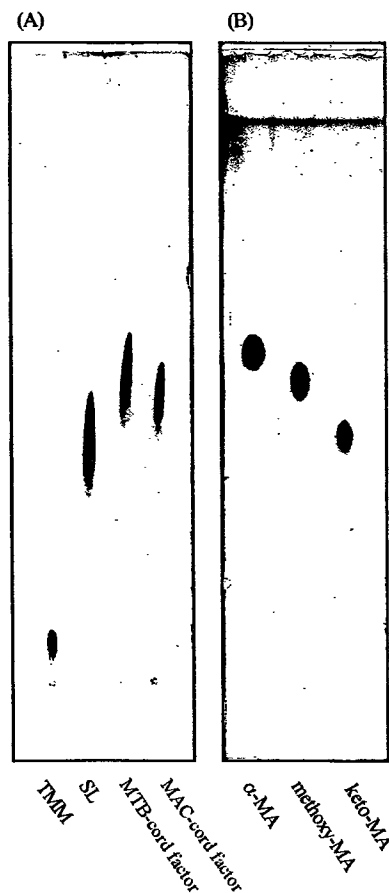


Fig. 10. TLC patterns of glycolipids and mycolic acid methyl esters. TMM, trehalose-6-monomycolate isolated from *M. tuberculosis*; SL, sulpholipid (2,3,6,6'-tetraacyl trehalose 2'-sulfate) isolated from *M. tuberculosis*; MTB-cord factor, cord factor isolated from *M. tuberculosis*; MAC-cord factor, cord factor isolated from *M. avium*;  $\alpha$ -MA,  $\alpha$ -mycolic acid methyl ester of MTB-cord factor; methoxy MA, methoxy mycolic acid methyl ester of MTB-cord factor; keto MA, keto mycolic acid methyl ester of MTB-cord factor. The developing solvents were (A), chloroform:methanol:acetone:acetic acid (90:10:6:1, by vol.); (B), benzene.

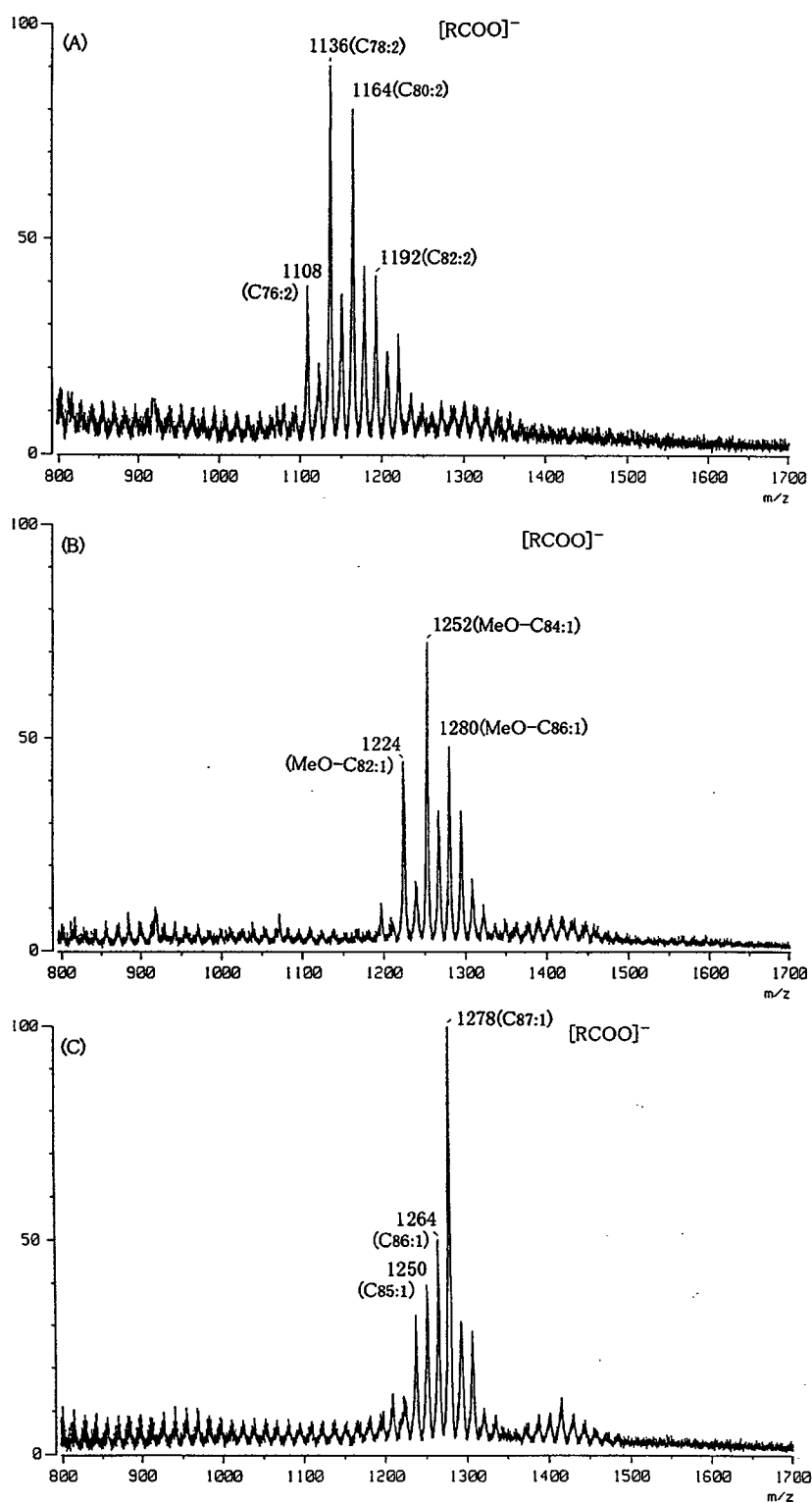


Fig. 11. Negative FAB/MS spectra of  $\alpha$ -, methoxy and keto mycolic acids from *M. tuberculosis*. Mass spectra were recorded with a JMS-SX102A double focusing mass spectrometer. (A),  $\alpha$ -mycolic acid; (B), methoxy (MeO-) mycolic acid; (C), keto mycolic acid.

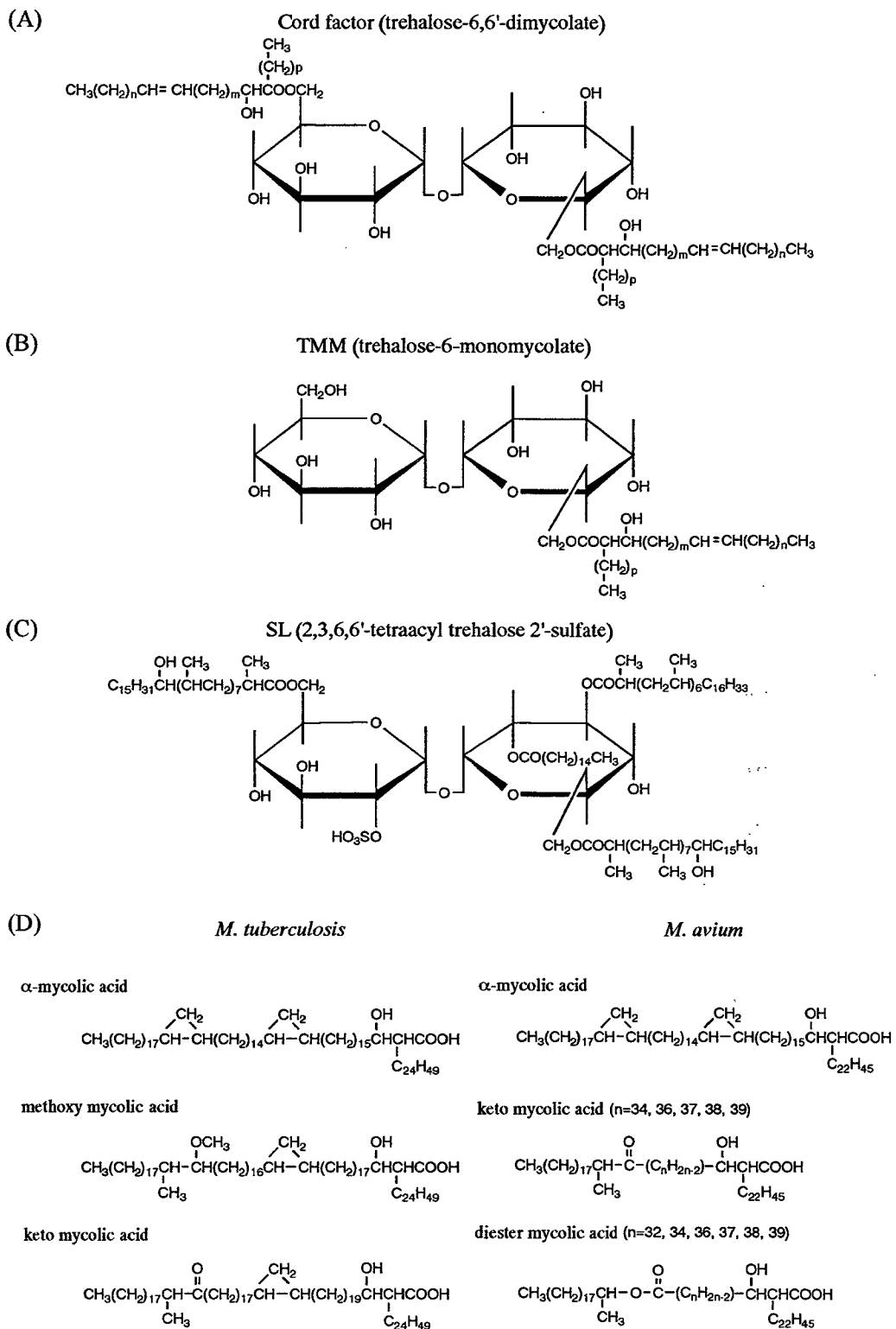


Fig. 12. Chemical structures of glycolipids and mycolic acid subclasses<sup>2,13</sup>. (A), cord factor, (B), TMM; (C), SL; (D), mycolic acid subclasses of *M. tuberculosis* and *M. avium*.

## 第2節 家兎における抗 MTB-cord factor 及び抗 MAC-cord factor 抗体の作製

日本種白色雄性家兎を specific-pathogen free の条件下で飼育し、MTB-cord factor 及び MAC-cord factor をそれぞれ w/o/w ミセルの形で (300  $\mu\text{g}/2\text{ ml}/匹$ ) 1 週間に 1 回の間隔で 4 回背部皮下に感作した。それぞれ抗 cord factor 抗体が産生されたことを確認後、最後に追加免疫した 10 日目に心臓より全採血し、血清抗体を得た。

## 第3節 抗 cord factor 抗体の性質

MTB-cord factor を免疫して得られた血清抗体は MTB-cord factor に高い反応性を示したが、MAC-cord factor には低い反応性しか示さなかった (Fig. 13)。一方、MAC-cord factor を免疫して得られた血清抗体は MAC-cord factor に高い反応性を示したが、MTB-cord factor には低い反応性しか示さなかった (Fig. 14)。したがって、これら 2 種類の血清抗体は homologous な抗原とのみよく反応し、交差反応性が低いことが判明した。さらに、cord factor, TMM, SL は *M. tuberculosis* に特徴的なトレハロース含有糖脂質であるが、MTB-cord factor で免疫して得られた血清抗体は cord factor に比べ、TMM やミコール酸を含まない SL との反応性が低かった (Fig. 15)。

これらの結果からそれぞれの抗 cord factor 抗体は cord factor の構造の違い、即ちミコール酸サブクラスを認識している可能性が示唆された。

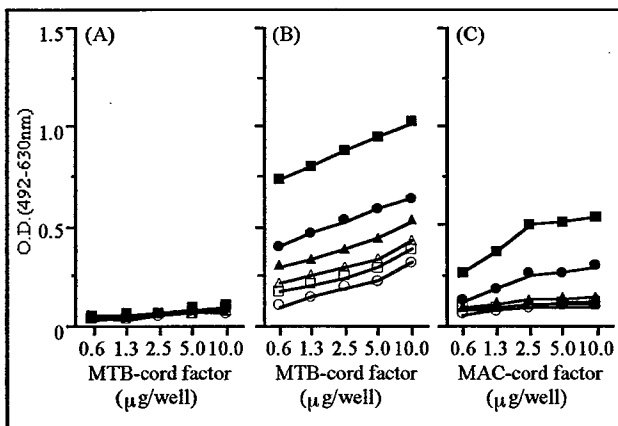


Fig. 13. Cross reactivity of sera from rabbits immunized with MTB-cord factor. MTB-cord factor (A, B) and MAC-cord factor (C) were coated on an ELISA plate. Sera from pre-immunized rabbits (A) and sera from rabbits immunized with MTB-cord factor (B, C) diluted 40 times, ■; 80 times, ●; 160 times, ▲; 320 times, △; 640 times, □; 1280 times, ○, were used as the first antibody. The second antibody was peroxidase-conjugated goat affinity purified antibody to rabbit IgG Fc.

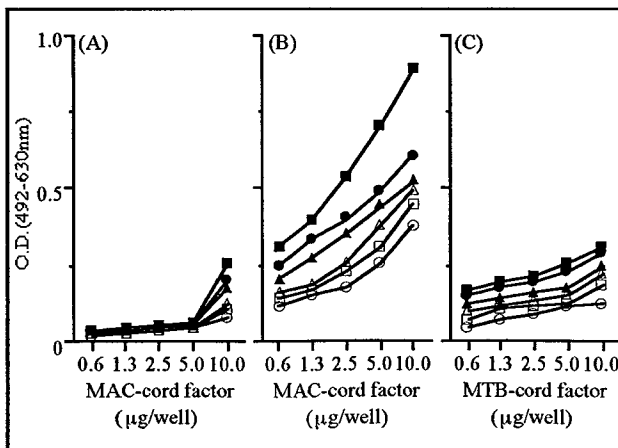


Fig. 14. Cross reactivity of sera from rabbits immunized with MAC-cord factor. MAC-cord factor (A, B) and MTB-cord factor (C) were coated on an ELISA plate. Sera from pre-immunized rabbits (A) and sera from rabbits immunized with MAC-cord factor (B, C) diluted 40 times, ■; 80 times, ●; 160 times, ▲; 320 times, △; 640 times, □; 1280 times, ○, were used as the first antibody. The second antibody was peroxidase-conjugated goat affinity purified antibody to rabbit IgG Fc.

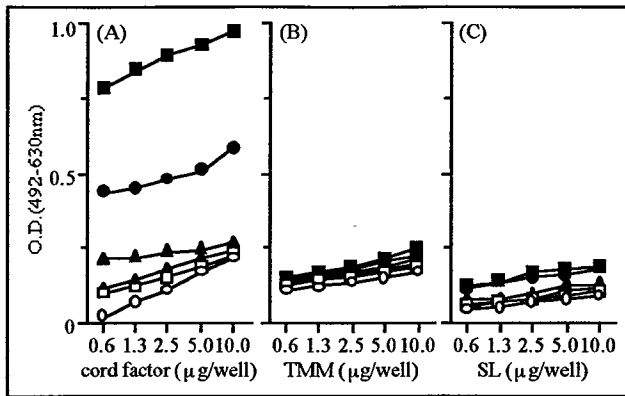


Fig. 15. Antigen-specificity of sera from rabbits immunized with MTB-cord factor against cord factor (A), TMM (B) and SL (C) of *M. tuberculosis* as antigen. Each antigen was coated on an ELISA plate. Sera from rabbits immunized with MTB-cord factor diluted 40 times, ■; 80 times, ●; 160 times, ▲; 320 times, △; 640 times, □; 1280 times, ○, were used as the first antibody. The second antibody was peroxidase-conjugated goat affinity purified antibody to rabbit Ig Gc.

#### 第4節 MTB-cord factorを免疫して得られた抗cord factor抗体のミコール酸サブクラスメチルエステルとの反応性

MTB-cord factorを免疫して得られた血清抗体についてMTB-cord factor由来ミコール酸メチルエステルとの反応性を検討したところ、メトキシミコール酸メチルエステルと最も高い反応性を示し、メトキシ> $\alpha$ ->ケトミコール酸メチルエステルの順に反応性が低下した (Fig. 16)。

抗cord factor抗体がcord factor中のミコール酸を認識すること及びミコール酸メチルエステル自体とも特異的に反応することから、ミコール酸に反応する抗体がcord factorに反応する抗体と同一であるか否かを確認するため、cord factorまたはメトキシミコール酸メチルエステルで前処理(吸収)した血清抗体について各々の抗原に対する反応性を比較した。その結果、cord factorまたはメトキシミコール酸メチルエステルで前処理した血清抗体は未処理のコントロール血清抗体に比べ反応性が低く、cord factorとミコール酸メチルエステルと反応する抗体は(少なくとも一部は)同一抗体でミコール酸を認識していることが分かった (Fig. 17)。

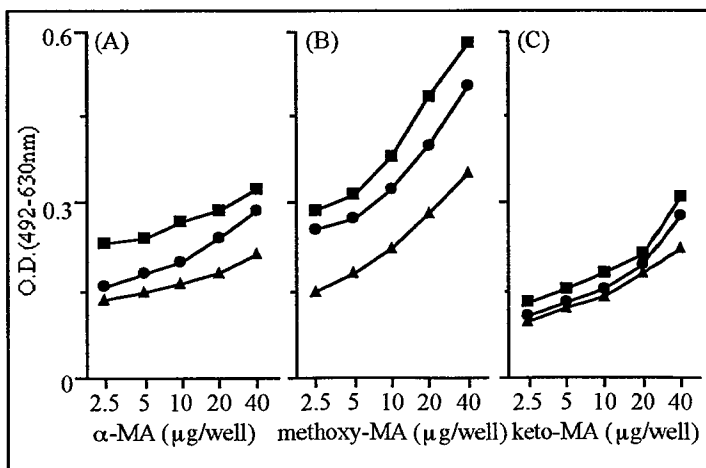


Fig. 16. Antigen-specificity of sera from rabbits immunized with MTB-cord factor against subclasses of mycolic acid methyl ester from *M. tuberculosis*.  $\alpha$ - (A), methoxy (B) and keto (C) mycolic acid methyl esters were coated on an ELISA plate. Sera from rabbits immunized with MTB-cord factor diluted 20 times, ■; 40 times, ●; 80 times, ▲, were used as the first antibody. The second antibody was peroxidase-conjugated goat affinity purified antibody to rabbit Ig Gc.



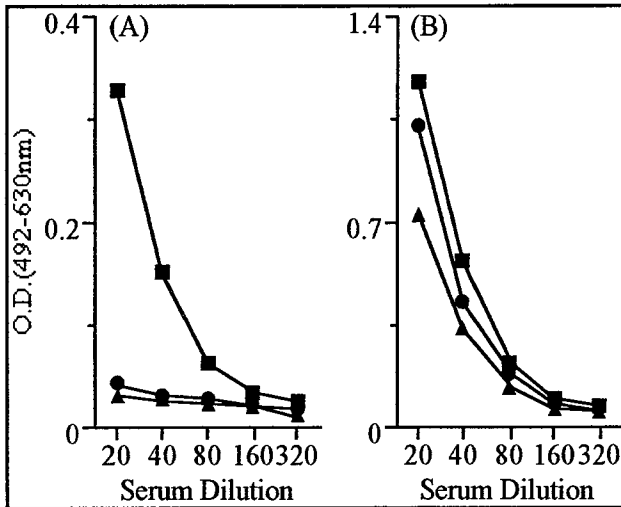


Fig. 17. Absorption study of sera from rabbits immunized with MTB-cord factor. Sera were pre-incubated with MTB-cord factor (10 µg/well), ▲; methoxy mycolic acid methyl ester (60 µg/well), ●; control, ■, on an ELISA plate at 4°C overnight. After pre-incubation, the supernatant (50 µl) of each sera was used as the first antibody. ELISA plates were coated with 60 µg/well of methoxy mycolic acid methyl ester (A) or 10 µg/well of MTB-cord factor (B).

#### 第5節 家兎における抗 cord factor 抗体の免疫グロブリンサブタイプ

家兎を cord factor で免疫して得られた抗 cord factor 抗体は、結核患者血清中で上昇している抗 cord factor 抗体と同様に IgG 抗体が主であった。これに対し、マウスモデル系で作製した抗 cord factor 抗体は IgM 抗体が主であった。このように抗 cord factor 抗体の免疫グロブリンサブタイプが宿主によって異なっている原因については明らかではないが、宿主（種）の違いにより抗酸菌感染における免疫応答が違うことが要因の一つと考えられる。例えば、家兎の抗酸菌感染モデルでは結核患者と同様の肺における乾酪壊死、空洞化の病変形成は可能であるが、マウスでは現在のところこのような病変形成モデルは報告されていない。他方、ヘルパー T 細胞により誘導されるサイトカインの種類等により免疫グロブリンのサブタイプやクラススイッチに影響を与えている可能性も考えられる。

現状において、抗 cord factor 抗体を結核の血清学的診断法へ応用することを考えた場合、家兎が結核患者の抗 cord factor 抗体産生モデルとしてより適当と考えられた。

#### 小括

家兎に MTB-cord factor 及び MAC-cord factor を免疫して得られた抗 cord factor 抗体の反応性を比較した。これら2種類の抗 cord factor 抗体は cord factor におけるミコール酸サブクラスの構造の違いを認識していることが示唆された。特に MTB-cord factor を免疫して得られた家兎血清抗体は結核菌のメトキシミコール酸と最も強く反応した。

## 第5章 結核患者血清中の抗 cord factor 抗体 の性質

### 第1節 抗酸菌由来各種糖脂質抗原との反応性

#### 材料および方法

国立療養所刀根山病院に入院中の排菌陽性結核患者 (TB patients) 32 名、ツベルクリン陽性健康人 10 名の血清について MTB-cord factor, MAC-cord factor 及び *M. tuberculosis* より単離精製した SL, メトキシミコール酸メチルエステルを各々抗原として ELISA 法による抗体価を測定した。抗原濃度については cord factor および SL は 2.5  $\mu\text{g}/\text{well}$ , メトキシミコール酸メチルエステルは 10  $\mu\text{g}/\text{well}$  をプレートにコートし、血清希釈倍率は 160 倍で行なった。

#### 結果および考察

Fig. 18 に示したように、32 名の排菌陽性結核患者血清の MTB-cord factor, MAC-cord factor に対する抗体価を中央値で比較すると、排菌陽性結核患者血清の MTB-cord factor と MAC-cord factor への反応性に有意差 ( $p < 0.05$ ) を認めた。さらに、SL に対する抗体価はきわめて低く、その構成成分であるフチオセラン酸やヒドロキシフチオセラン酸とは反応しないことがわかった。また、結核菌由来ミコール酸サブクラスの 1 つであるメトキシミコール酸メチルエステルとは反応性を示した。これらの結果から、結核患者血清中の抗 cord factor 抗体は cord factor の構造の違い、即ちミコール酸サブクラスの違いを認識している可能性を示唆するものであった。

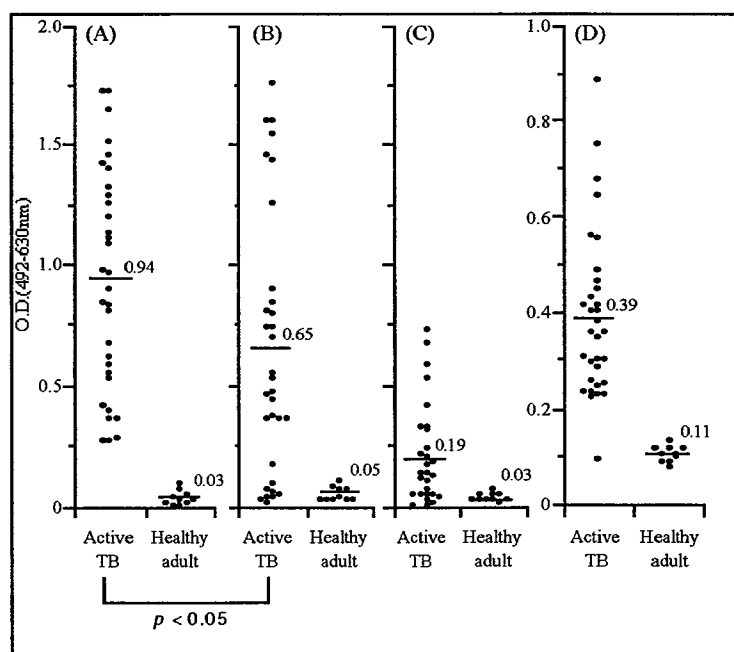


Fig. 18. Levels of sera antibodies against trehalose-containing glycolipids and methoxy mycolic acid in TB patients and healthy adults. Bars and numbers indicate mean titer of each group. Scattergrams show titers against (A) MTB-cord factor, (B), MAC-cord factor, (C), sulfolipid; (D), methoxy mycolic acid methyl ester. Sera of each subject were diluted 160 times, and each well was coated with 2.5  $\mu\text{g}/\text{well}$  (A, B and C) or 10  $\mu\text{g}/\text{well}$  (D) antigen.

## 第2節 結核患者血清と MAC 感染症患者血清の cord factor との反応性

### 材料および方法

代表的な結核患者血清と結核既往症のない MAC 感染症患者血清<sup>27)</sup> の MTB-cord factor 及び MAC-cord factor に対する反応性を血清希釈倍率、抗原量を変化させて比較した。次に、結核患者血清検体で MTB-cord factor に対する抗体価の高かった 10 名の結核患者血清と 5 名の健常人について MTB-cord factor 由来ミコール酸メチルエステル及びパルミチン酸メチルエステルに対する反応性を比較した。

### 結果および考察

結核患者血清は MTB-cord factor に高い反応性を示したのに対し MAC-cord factor には低い反応性しか示さなかった。他方、MAC 感染症患者血清は MAC-cord factor に高い反応性を示したのに対し MTB-cord factor には低い反応性しか示さなかった (Fig. 19)。

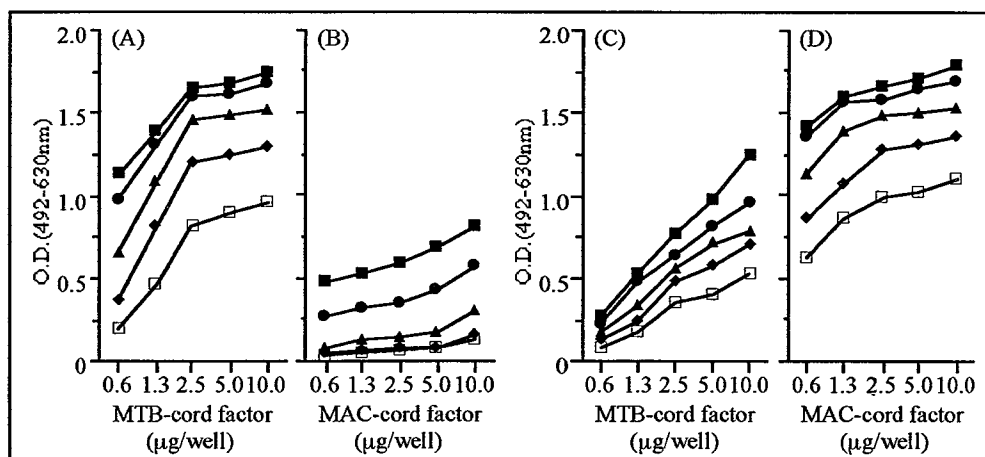


Fig. 19. Reactivity against cord factor of sera from a TB patient (A, B) and a MAC-infected patient (C, D). Sera were diluted 40 (■), 80 (●), 160 (▲), 320 (◆) or 640 (□) times.

この結果は血清抗体が cord factor の構造の違いを認識している可能性を示唆し、次に結核患者血清検体で MTB-cord factor に対する抗体価の高かった 10 名の結核患者血清と 5 名の健常人について MTB-cord factor 由来ミコール酸メチルエステル及びパルミチン酸メチルエステルに対する反応性を比較した (Fig. 20)。また、血清希釈倍率、抗原量を変化させて反応性を比較検討した (Fig. 21)。家兎で作製した MTB-cord factor 抗体と同様にすべての結核患者血清は MAC-cord factor の構成成分としては存在しない MTB-cord factor 中のメトキシミコール酸メチルエステルと最も高く反応し、ミコール酸以外のパルミチン酸メチルエステルに対しては殆ど反応しなかった。

さらに、吸収実験の結果 (Fig. 22) から cord factor のミコール酸を認識する抗体とミコール酸自体と反応する抗体が (少なくとも一部が) 同一のものであることも分かった。

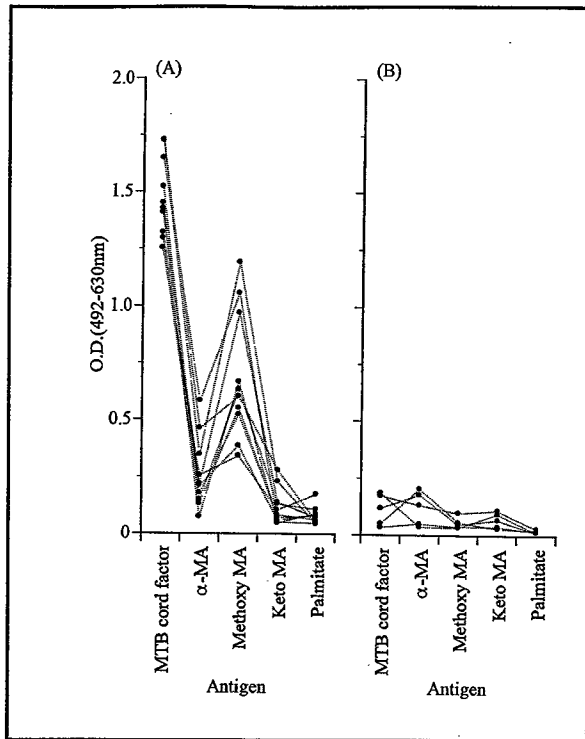


Fig. 20. Comparison of antigen-specificity of sera from TB patients against MTB-cord factor and  $\alpha$ - ( $\alpha$ -MA), methoxy (Methoxy MA), keto (Keto MA) mycolic acid methyl ester subclasses isolated from MTB-cord factor and palmitic acid methyl ester. Sera of 10 TB patients (A) and 5 healthy adults (B) were diluted 160 times, and each antigen concentration was 2.5  $\mu$ g/well (MTB-cord factor) or 10  $\mu$ g/well (mycolic acid subclasses and palmitic acid methyl ester).

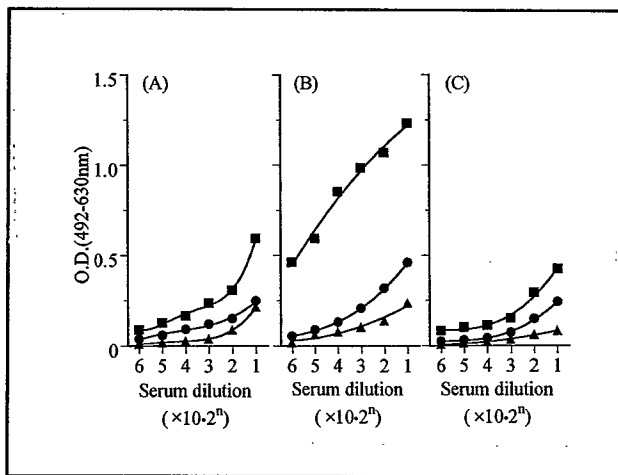


Fig. 21. Dose-kinetic study of sera from a TB patient against mycolic acid subclasses as antigens. The subclass was (A)  $\alpha$ -MA; (B) Methoxy MA; (C) Keto MA. Each antigen concentration was 10  $\mu$ g/well,  $\blacksquare$ ; 5  $\mu$ g/well,  $\bullet$ ; 2.5  $\mu$ g/well,  $\blacktriangle$ .

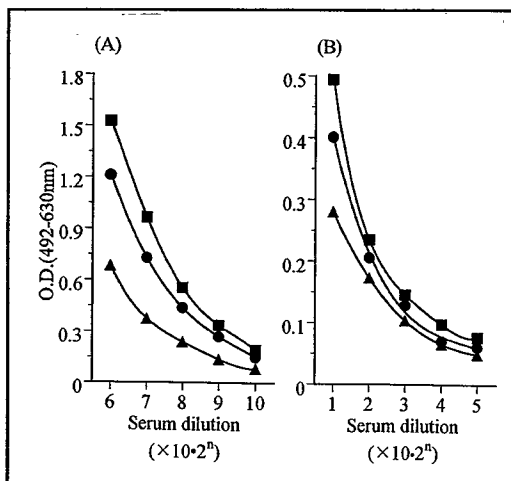


Fig. 22. Absorption study of sera from a TB patient. The concentration of each antigen was (A) 10  $\mu$ g/well (MTB-cord factor); (B) 60  $\mu$ g/well (Methoxy MA). Non-absorbed sera,  $\blacksquare$ ; Pre-treated sera with Methoxy MA (60  $\mu$ g/well),  $\bullet$ ; Pre-treated sera with MTB-cord factor (10  $\mu$ g/well),  $\blacktriangle$ .

## 小括

結核患者に検出される抗 cord factor 抗体について MTB-cord factor 及び MAC-cord factor との反応性を調べたところ、家兎を免疫して得られた抗 cord factor 抗体と同様の性質を有することが分かった。結核患者血清が MAC 菌には含まれないメトキシミコール酸を強く認識することは、結核と非結核性抗酸菌症の鑑別診断にも有用である可能性が示唆された。

結核の確定診断は抗酸菌を検出することが基本であるが、これら病原体診断は検出感度、検査期間の点で問題があり、診断の遅れが結核治療に支障を来している。また、結核患者のうち半数以上は（喀痰への排菌のない）排菌陰性患者であり、これら結核患者に対する迅速診断法の開発が望まれている。本研究は、抗酸菌に普遍的に含まれる糖脂質成分である cord factor を用いた血清学的迅速診断の開発を目的に行なった基礎研究である。

筆者は、cord factor に対する抗体が結核または非結核性抗酸菌症患者に特異的に出現し、排菌陽性患者のみならず排菌陰性患者にも高率に上昇していることを見だし、cord factor 抗体を用いた結核の血清学的迅速診断に応用すべく種々検討を行った。まず、抗 cord factor 抗体の微量測定系としての ELISA 法を開発した。疎水性の強い cord factor 抗原を、従来の水溶系での抗原抗体反応に応用した点が特徴である。これにより抗 cord factor 抗体の特性を明らかにする assay 系が確立できた。

次に、抗 cord factor 抗体を実験的にマウス、家兎を用いて作製することを試み、その特性を明らかにした。その結果、抗 cord factor 抗体は cord factor の構成成分である天然では非常にまれな長鎖分岐脂肪酸、すなわちミコール酸を認識していることがわかった。さらに、詳細に検討したところ、ミコール酸のサブクラスにより抗 cord factor 抗体の反応性が異なることから cord factor におけるミコール酸サブクラスの構造の違いを認識していることも明らかになった。

一方、マウスにおける cord factor 投与による肉芽腫形成能に関して、これら抗 cord factor 抗体が及ぼす影響は肉芽腫形成に抑制的に働くことが明らかになった。従来、結核感染においては細胞性免疫が深く関与していると指摘されているが、肉芽腫形成において抗体産生系（液性免疫）がこれら細胞性免疫の発現調節に関与している可能性を示唆するものであった。

実験動物で作製した抗 cord factor 抗体の反応性から明らかになった特性をもとに、結核患者に検出される抗 cord factor 抗体について MTB-cord factor 及び MAC-cord factor との反応性を調べたところ、抗 cord factor 抗体はミコール酸サブクラスを認識し、特に結核患者血清が *M. avium* 菌には含まれないメトキシミコール酸を強く認識することが確かめられた。これらの結果は、結核と非結核性抗酸菌症の鑑別診断にも応用できる可能性を示唆するものであった。

本研究での知見をもとに、結核の血清学的迅速診断法として糖脂質である cord factor を抗原とした ELISA キットを開発し、結核の体外診断薬として近日中に発売される予定である。排菌陽性結核患者については陽性率 90-95%、排菌陰性結核患者についても陽性率 70-75%であり、結核の迅速診断法として日常臨床での実施が可能であり、感度・特異性においても非常に有用であると考えられた。



## 結論

1. 結核菌を始めとする類縁抗酸菌の菌体表層脂質成分として普遍的に含まれるミコール酸含有糖脂質 cord factor を抗原とした ELISA 法による抗 cord factor 抗体の抗体量を測定する系を確立した。本 ELISA 系は、従来のタンパク質を用いた抗原抗体反応とは異なり、抗原として疎水性の強い糖脂質を用いることが特徴である。
2. マウスに cord factor を w/o/w ミセルの形で頻回少量投与することにより、糖脂質に対する抗体を産生させることができた。本抗体は、cord factor の糖部分であるトレハロースよりも、脂質部分であるミコール酸を強く認識する抗体であった。さらに、同様の性質を有する抗 cord factor モノクローナル抗体を作製した。
3. マウスにおける抗 cord factor モノクローナル抗体を用いて cord factor 誘導実験的肉芽腫形成に対する影響を調べた。Cord factor 投与の初期に抗体を投与することにより、毒性及び肉芽腫形成は抑制された。また、肉芽腫形成に関与している IL-1, chemotactic factor の活性も抑制された。これらの結果から、結核性肉芽腫に類似する cord factor 誘導肉芽腫が抗 cord factor 抗体により抑制されたことは、抗体（液性免疫）により各種生物活性を調節することが可能であることを示唆した。
4. 家兎に結核菌 *M. tuberculosis* 由来 cord factor 及び非結核性抗酸菌 *M. avium* 由来 cord factor を免疫して得られた抗 cord factor 抗体の反応性を比較した。これら 2 種類の抗 cord factor 抗体は cord factor におけるミコール酸サブクラスの構造の違いを認識していることが示唆された。特に結核菌 *M. tuberculosis* 由来 cord factor を免疫して得られた家兎血清抗体は結核菌のメトキシミコール酸と最も強く反応した。
5. 結核患者に検出される抗 cord factor 抗体について *M. tuberculosis* 由来 cord factor 及び *M. avium* 由来 cord factor との反応性を調べたところ、家兎を免疫して得られた抗 cord factor 抗体と同様の性質を有することが分かった。結核患者血清が MAC 菌には含まれないメトキシミコール酸を強く認識することは、結核と非結核性抗酸菌症の鑑別診断にも有用である可能性が示唆された。

## 謝辞

本論文を執筆するにあたり、本研究に対し御懇切なるご指導・ご校閲を賜りました恩師 大阪大学微生物病研究所・大阪大学薬学部 本田武司 教授に深甚なる謝意を表します。

本論文をご審査いただきました大阪大学薬学部 那須正夫 教授、西原力 教授、山元弘 教授に心より感謝いたします。

本研究に対しご指導・ご鞭撻を賜りました恩師 大阪市立大学医学部 矢野郁也 名誉教授、大阪市立大学医学部 小林和夫 教授に深く感謝いたします。また、大阪大学微生物病研究所 細菌感染分野、大阪市立大学医学部 細菌学教室の諸先生、諸先輩の方々を始め、全ての共同研究者、論文共著者の皆様に感謝いたします。

研究上さまざまな面でご助力いただきました吉富製薬株式会社の関係諸氏に感謝いたします。

## 引用文献

- 1) Inuma, Y., Ichiyama, S., Yamori, S., Oohama, J., Takagi, N., Hasegawa, Y., Shimokata, K., and Nakashima, N. 1998. Diagnostic value of the amplicor PCR assay for initial diagnosis and assessment of treatment response for pulmonary tuberculosis. *Microbiol. Immunol.* **42**: 281-287.
- 2) Asselineau, C., and Asselineau, J. 1978. Trehalose-containing glycolipids. *Prog. Chem. Fats other Lipids.* **16**: 59-99.
- 3) Bekierkunt, A. 1984. Adjuvanticity of mycobacteria and their glycolipid components, wax D and cord factors, p. 761-786. *In* Kubica, G. P., and Wayne, L. G. (eds), *The Mycobacteria: A Sourcebook Part B*, Dekker, M., New York.
- 4) Yano, I., Tomiyasu, I., Kitabatake, S., and Kaneda, K. 1984. Granuloma forming activity of mycolic acid-containing glycolipids in *Nocardia* and related taxa. *Acta Leprologica.* **2**: 341-349.
- 5) Natsuhara, Y., Oka, S., Kaneda, K., Kato, Y., and Yano, I. 1990. Parallel antitumor, granuloma-forming and tumor-necrosis-factor-priming activities of mycoloyl glycolipids from *Nocardia rubra* that differ in carbohydrate moiety: structure-activity relationships. *Cancer Immunol. Immunother.* **31**: 99-106.
- 6) Natsuhara, Y., Yoshinaga, J., Shogaki, T., Sumi-Nishikawa, Y., Kurano, S., Kato, Y., Kaneda, K., Oka, S., and Yano, I. 1990. Granuloma-forming activity and antitumor activity of newly isolated mycoloyl glycolipid from *Rhodococcus terrae* 70012 (Rt. GM-2). *Microbiol. Immunol.* **34**: 45-53.
- 7) Beckman, E. M., Porcelli, S. A., Morita, C. T., Behar, S. M., Furlong, S. T., and Brenner, M. B. 1994. Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted  $\alpha\beta^+$  T cells. *Nature* **372**: 691-694.
- 8) He, H., Oka, S., Han, Y., Yamamura, Y., Kusunose, E., Kusunose, M., and Yano, I. 1991. Rapid serodiagnosis of human mycobacteriosis by ELISA using cord factor (trehalose-6,6'-dimycolate) purified from *Mycobacterium tuberculosis* as antigen. *FEMS Microbiol. Immunol.* **76**: 201-204.
- 9) Maekura, R., Nakagawa, M., Nakamura, Y., Hiraga, T., Yamamura, Y., Ito, M., Ueda, E., Yano, S., He, H., Oka, S., Kashima, K., and Yano, I. 1993. Clinical evaluation of rapid serodiagnosis of pulmonary tuberculosis by ELISA with cord factor (trehalose-6,6'-dimycolate) as antigen purified from *Mycobacterium tuberculosis*. *Am. Rev. Respir. Dis.* **148**: 997-1001.
- 10) Kawamura, M., Sueshige, N., Imayoshi, K., Yano, I., Maekura, R., and Kohno, H. 1997. Enzyme immunoassay to detect antituberculous glycolipid antigen (anti-TBGL antigen) antibodies in serum for diagnosis of tuberculosis. *J. Clin. Lab. Anal.* **11**: 140-5.
- 11) 前倉亮治, 横田総一郎, 小倉剛. 1998. 特集・臨床 抗酸菌感染症の進歩. 分子呼吸器病 (先端医学社). **2**: 347-352.
- 12) Kaneda, K., Naito, S., Imaizumi, S., Yano, I., Mizuno, S., Tomiyasu, I., Baba, T., Kusunose, E., and Kusunose, M. 1986. Determination of molecular species composition of C<sub>30</sub> or longer-chain  $\alpha$ -mycolic acids in *Mycobacterium* spp. by gas chromatography-mass spectrometry and mass chromatography. *J. Clin. Microbiol.* **24**: 1060-1070.
- 13) Minnikin, D. E., Minnikin, S. M., Parlett, J. H., Goodfellow, M., and Magnusson, M. 1984. Mycolic acid patterns of some species of *Mycobacterium*. *Arch. Microbiol.* **139**: 225-231.
- 14) Folch, J., Lees, M., Sloane, Stanley, G. H. 1959. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**: 497-509.

- 15) Matsunaga, I., Oka, S., Fujiwara, N., and Yano, I. 1996. Relationship between induction of macrophage chemotactic factors and formation of granulomas caused by mycoloyl glycolipids from *Rhodococcus ruber* (*Nocardia rubra*). *J. Biochem.* **120**: 663-670.
- 16) Yamamoto, K., Kakinuma, M., Kato, K., Okuyama, H., and Azuma, I. 1980. Relationship of anti-tuberculous protection to lung granuloma produced by intravenous injection of synthetic 6-O-mycoloyl-N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine with or without specific antigens. *Immunology* **40**: 557-564.
- 17) Kato, M. 1972. Antibody formation to trehalose-6,6'-dimycolate (cord factor) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* **5**: 203-212.
- 18) Köhler, G., and Milstein, C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* **256**: 495-497.
- 19) Kolk, A.H.J., Ho, M., Klatser, P.R., Eggelte, T.A., Kuijper, S., Jonge, S.D., and Leeuwen, J.V. 1984. Production and characterization of monoclonal antibodies to *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* (BCG) and *M. leprae*. *Clin. Exp. Immunol.* **58**: 511-521.
- 20) Harlow, E., and Lane, D. 1988. Monoclonal antibodies. p. 139-244. *In* Harlow, E., Lane, D. (eds), *Antibodies: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- 21) Yamamoto, K., Kakinuma, M., Kato, K., Okuyama, H., and Azuma, I. 1980. Relationship of anti-tuberculous protection to lung granuloma produced by intravenous injection of synthetic 6-O-mycoloyl-N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine with or without specific antigens. *Immunol.* **40**: 557-564.
- 22) Matsunaga, I., Oka, S., Inoue, T., and Yano, I. 1990. Mycoloyl glycolipids stimulate macrophages to release a chemotactic factor. *FEMS Microbiol. Lett.* **67**: 49-54.
- 23) Kasahara, K., Kobayashi, K., Shikama, Y., Yoneya, I., Soejima, K., Ide, H., and Takahashi, T. 1988. Direct evidence for granuloma-inducing activity of interleukin-1. *Am. J. Pathol.* **130**: 629-638.
- 24) Orme, I.M., Roberts, A.D., Griffin, J.P., and Abrams, J.S. 1993. Cytokine secretion by CD4 T lymphocytes acquired in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Immunol.* **151**: 518-25.
- 25) Romagnani, S. 1997. The Th1/Th2 paradigm. *Immunol Today* **18**: 263-266.
- 26) Kobayashi, K., Nakata, N., Kai, M., Kasama, T., Hanyuda, Y., and Hatano, Y. 1997. Decreased expression of cytokines that induce type 1 helper T cell/interferon-gamma responses in genetically susceptible mice infected with *Mycobacterium avium*. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **85**: 112-116.
- 27) Enomoto, K., Oka, S., Fujiwara, N., Okamoto, T., Okuda, Y., Maekura, R., Kuroki, T., and Yano, I. 1998. Rapid serodiagnosis of *Mycobacterium avium-intracellulare* complex infection by ELISA with cord factor (trehalose 6,6'-dimycolate), and serotyping using the glycopeptidolipid antigen. *Microbiol. Immunol.* **42**: 689-696.



