

hypersensitivity-like lesions and foreign-body granulomas in euthymic and athymic mice, regardless of preimmunization with mycobacteria and cord factor/TDM. However, preimmunized mice challenged with cord factor/TDM developed more severe lesions than unimmunized mice. At the active lesion, it was found cc-chemokines (i.e., monocyte chemoattractant protein 1 and macrophage inflammatory protein 1) attracting monocytes, proinflammatory cytokines (i.e., interleukin [IL]-1 and tumor necrosis factor [TNF]- $\alpha$ ), and immunoregulatory cytokines (i.e., IL-12 and interferon [IFN]- $\gamma$ ). The inflammatory and cytokine responses were augmented in immunized mice challenged with cord factor/TDM. These results implies that cord factor/TDM can induce both foreign body-type (nonimmune) and hypersensitivity-type (immune) granulomas by acting as a nonspecific irritant and T-cell-dependent antigen, and both nonimmune and immune mechanisms participate in granulomatous inflammation induced by mycobacterial infection [13, 24].

Neovascularization/angiogenesis is required for the progression of chronic inflammation [25]. Although the mechanism of inflammatory neovascularization in tuberculosis remains unknown, cord factor/TDM augments vascular endothelial growth factor (VEGF) production from neutrophils and macrophages, and induces neovascularization in the local granulomatous tissue induced by cord factor/TDM [26, 27]. Apoptosis contributes to the host defense against infection with intracellular bacterial pathogens, and can influence disease progression [28]. Cord factor/TDM also induces atrophy of the thymus and spleen via the apoptotic process, which is closely linked to granuloma formation [29, 30]. Cytokine responses to mycobacterial cord factor/TDM orchestrate the complex event, including granulomatous inflammation, angiogenesis, apoptosis, and probably host defense (Table 2 and Figure 4). Although the sensitivity and specificity are insufficient, mycoloyl glycolipids are employed as an antigen for serodiagnosis of mycobacterial disease, including tuberculosis [31-34].

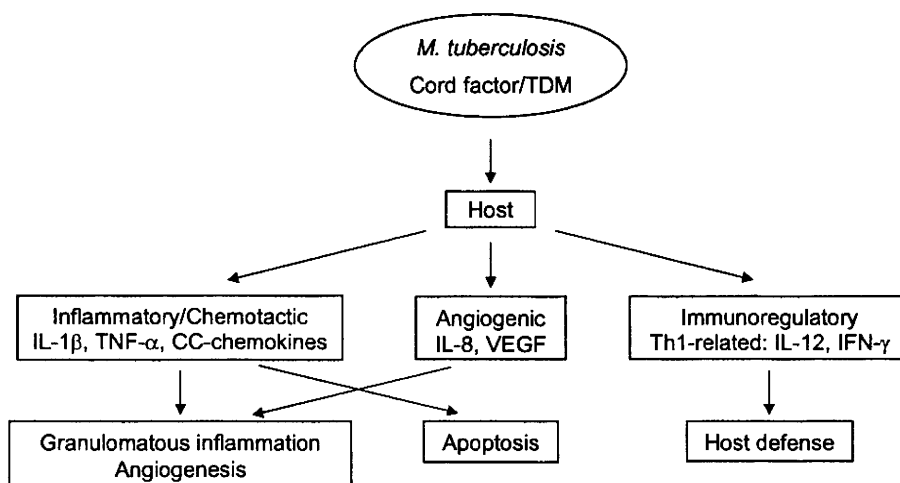


Figure 4. Orchestration of host defense against mycobacterial cord factor/TDM.

Therefore, cord factor/TDM plays a critical role in the pathogenesis of tuberculosis, and is a pleiotropic molecule against the host and participates in the pathogenesis of tuberculosis.

Recently, it is clarified that the modification of mycolic acids influences the pathogenicity in addition to bacterial morphology. The deletion of the proximal cyclopropane ring of  $\alpha$ -mycolic acid or of methoxy- and keto-mycolic acids in *M. tuberculosis* results in a significant attenuation in growth when mice were infected [6-8, 35].

In addition to other mycoloyl glycolipids, GMM, mannose-6-monomycolate (MMM), and fructose-6-monomycolate (FMM) are characteristic components of mycobacteria, and those structures are composed of mycolic acid attached to a single glucose, mannose, and fructose residues at C6 position, respectively [36]. These mycoloyl glycolipids are synthesized when cultivating with each carbon source. GMM shows stronger granuloma-forming and chemotactic activities compared to MMM and FMM [37], although the activity of cord factor/TDM and TMM is more potent. GMM is recognized by CD1b-restricted T cells as antigen [20, 38]. Because this antigenic GMM is synthesized by pathogenic mycobacteria that use host-derived glucose, the immune response against GMM might be distinguished from ubiquitous, but innocuous, environmental mycobacteria.

## Sulfolipid (SL)

Mycobacterial SLs are classified into three types by the number of attached short acyl chains. SL-1 is the predominant and SL-2 and 3 are intermediate type. The structure of SL-1 was identified as 2-palmitoyl(stearoyl)-3-phthioceranyl-6,6'-bis-hydroxyphthioceranyl-trehalose-2'-sulfate (Figure 3) [39-42]. The presence of SLs is specific for virulent mycobacteria against humans, and is considered to be one of the virulence factors. Several studies have demonstrated the significant relationship between SL-1 and virulence, such as the amount of SL-1 biosynthesis in virulent strains, and the inhibition of phagosome-lysosome fusion in macrophages by SL-1. SL-1 modulates superoxide release and secretion of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  by blocking activation of human macrophages and neutrophils [43-45]. In contrast to these studies, it has been reported that *pks2* disruption and SL-1 deficiency do not significantly affect the replication, persistence, and pathogenicity of *M. tuberculosis* in mice, guinea pigs, or cultured macrophages [46, 47]. The pathogenicity of SL-1 is controversial. SL-1 cannot induce granulomatous inflammation, but rather inhibits granulomatous inflammation and release of TNF- $\alpha$  induced by cord factor/TDM [48]. SL-1 could contribute to virulence at early stage of mycobacterial infection by counteracting the immunopotentiating effect of cord factor/TDM. On the other hand, it is reported that SL-3, 2-palmitoyl(stearoyl)-3-hydroxyphthioceranyl-trehalose-2'-sulfate, is mainly recognized by CD1b-restricted T cells as a lipid antigen. The other tetra-acylated and tri-acylated SLs (SL-1 and -2) were unable to stimulate the di-acylated SL (SL-3)-specific T cell clones, and implied that immunogenic SL-3 are not generated inside the antigen presented cells [49].

SLs of *M. tuberculosis* have been implicated in the virulence of this organism by inhibiting the phagosome-lysosome fusion in macrophages, thus probably promoting the intracellular survival of *M. tuberculosis*, but the pathogenic role remains controversial. The gene, *pks2*, responsible for SL synthesis was identified and disrupted [50]. The *pks2* mutant defective in an early step in SL biosynthesis, had no obvious growth defect in infected mice. By contrast, a strain lacking MmpL 8, a transporter of SL in *M. tuberculosis*, was highly

attenuated for growth in a mouse model of tuberculosis [46]. Although initial replication rates and containment levels of the MmpL 8 mutant were identical, compared with the wild type, a significant attenuation of the mutant strain in time-to-death was observed. Early in infection, differential expression of cytokines and cytokine receptors revealed that the mutant strain less efficiently suppresses key indicators of a Th1-type immune response, suggesting an immunomodulatory role for SLs in the pathogenesis of tuberculosis [51].

## Glycopeptidolipid (GPL)

The GPLs are produced by MAC, *M. scrofulaceum*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, and *M. smegmatis*. The polar GPLs produced by MAC species are of particular interest because of their serotype-specific antigenicity [12]. Structurally, GPLs contain a tetrapeptide-amino alcohol core, D-phenylalanine-D-*allo*-threonine-D-alanine-L-alaninol, with an amido-linked 3-hydroxy or 3-methoxy C26-C34 fatty acid at the *N*-terminal of D-Phenylalanine [52]. The D-*allo*-threonine and terminal L-alaninol are further linked with 6-deoxy-talose and 3,4-di-*O*-methyl rhamnose, respectively. This GPL core is common to all serotypes and exhibits an antigenicity [10]. The serotype-specific GPLs are further glycosylated with a variable haptenic oligosaccharide at 6-deoxy-talose. At present, 31 distinct serotype-specific polar GPLs have been identified biochemically, and the complete structures of 15 GPLs are defined (Table 3) [12, 53]. The standard technique to classify MAC strains has been employed serologic typing based on the oligosaccharide residue of the GPL. More recently, the biosynthetic pathway of various haptenic oligosaccharide is explored and the genes encoding the pathways have been identified and characterized [54-56]. GPL present on the cell wall is considered to be influenced the colony morphology. Changes in the MAC colony phenotype are spontaneously occurred from smooth to rough type, and this is due to a mutation lacking GPL [57-59].

We have demonstrated the availability of serodiagnosis of MAC pulmonary diseases using the GPL and GPL core antigens and have also shown that the levels of GPL and GPL core antibodies reflect disease activity [60-62]. GPL is one of the immunologically active molecules characteristic of MAC, and serotype-specific GPLs participate in the pathogenesis and immunomodulation in the host [63, 64]. It has been reported that the GPL core seems to play a role in suppression of mitogen-induced blastogenic response in spleen cells [65]. In addition, the immunomodulating activity of GPL on macrophage functions is serotype-dependent [66]. The serotype 4 GPL promotes phagocytosis and inhibits phagosome-lysosome (P-L) fusion, whereas the GPLs of serotypes 9 and 16 exhibit no effect on phagocytosis and P-L fusion. The serotype 8 GPL shows concomitant stimulation of both phagocytosis and P-L fusion. Because GPL core, but not oligosaccharides, is common in all serotypes, the oligosaccharide of GPL may be involved in the mechanism of inhibition of P-L fusion, which is mediated through mannose receptors of macrophages [67]. The serotype 4 GPL inhibited lymphoproliferative response to mitogens [64]. Thus, host responses to GPLs vary with the MAC serotype. It is reported that the uptake by and growth in macrophages of a MAC mutant inactivated the gene of GPL synthesis pathway by transposon insertion were decreased [68]. The pathogenicity of GPL may comprise both a common peptide core and an

oligosaccharide elongated from 6-deoxy-talose. GPL is a pleiotropic molecule and participates in the pathogenesis of MAC disease. Elucidation of the structure-activity relationship of GPL is required to better understand the pathogenesis.

## Phenolic Glycolipids (PGL)

The glycosylated phenolphthiocerol dimycocerosates, so-called phenolic glycolipid (PGL) is produced by a limited group of mycobacterial species, and most of them are pathogenic for humans [69]. PGL is distributed in *M. leprae* as a unique antigen, and inhibits the lymphoproliferative responses and suppress monocyte oxidative responses [70-72]. It has also shown that disruption of PGL synthesis results in loss of virulent phenotype without significantly affecting bacterial load during disease in experimental models using mice and rabbits, and loss of PGL was found to correlate with an increase in the release of the pro-inflammatory cytokines, TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-12 in vitro [73, 74].

A PGL purified from *M. leprae* has been used as antigen in an enzyme-linked immunosorbent assay. Antibodies directed against the lipid were detected in sera of leprosy patients but not in sera from uninfected controls or patients infected with other mycobacteria, including *M. tuberculosis*. The antibody response distinguished between the *M. leprae* lipid and the structurally related PGL from *M. kansasii*. Similar to serodiagnosis of MAC disease using GPL, this assay based on PGL antigen has considerable potential as a specific serodiagnostic test for infection with *M. leprae* [75-78].

## Phosphatidylinositol Mannoside (PIM), Lipomannan (LM), and Lipoarabinomannan (LAM)

PIMs and their multiglycosylated counterparts, LM and LAM, are complex lipoglycans that are found ubiquitously in the envelopes of all mycobacterial species. Their structures originate from a phosphatidyl-*myo*-inositol (MPI) anchor, which is mannosylated to generate LM and further arabinosylated to give LAM [79]. LM is the biosynthetic precursor of LAM. The non-reducing termini of the arabinosyl side chains can be substituted by capping motifs, and LAM classified into three families. LAM from slow growing mycobacteria bearing mannose caps, *i.e.* mono- or ( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2)-di- or tri-mannoside units, are designated as ManLAM. In contrast, LAMs from fast growing mycobacteria capped by phospho-*myo*-inositol units and not capped at all, are termed PILAM and AraLAM, respectively [80]. LAM and LM exhibit a broad spectrum of immunomodulatory activities, including the ability to modulate the production of macrophage-derived Th1 pro-inflammatory cytokines, most commonly TNF- $\alpha$  and IL-12. ManLAM from *M. tuberculosis* is involved in the inhibition of phagosome maturation, apoptosis and IFN- $\gamma$  signaling in macrophages and IL-12 secretion of dendritic cells (DCs). ManLAM contributes an immunosuppressive effect to the persistence of slow-growing mycobacteria in the humans. In contrast, PILAMs are able to induce the release of a

variety of proinflammatory cytokines. Recently it is reported that LMs from both pathogenic and nonpathogenic mycobacterial species, independent of their origin, are potent stimulators of TNF- $\alpha$ , IL-8, and IL-12, and activate macrophages via Toll-like receptor (TLR)-2 [81-83]. The ManLAM/LM balance might be important to host immune responses against mycobacteria. In addition, LAM-based vaccine for tuberculosis is currently under investigation using experimental guinea pig models [84].

PIM is composed of a phosphatidylinositol and mannose moieties. PIMs have 4-6 mannoses and the third and fourth of them are acylated in some cases. PIM<sub>2</sub> containing two mannoses is highly immunogenic and a main component of mycobacterial cell walls. Several biological functions have been recently attributed to PIM. PIM<sub>2</sub> are shown to recruit natural killer T cells, which play a role in the local granulomatous response [85, 86]. PIM activates cells via TLR-2 [87]. PIM<sub>6</sub> as well as ManLAM from *M. leprae* and *M. tuberculosis* are presented by antigen-presenting cells in the context of CD1b [19]. The phosphatidylinositol moiety plays a central role in the process of PIM and ManLAM binding to CD1b proteins.

## Concluding Remarks

Mycobacterial glycolipids are pleiotropic molecules and play a key role in both microbes and hosts acting as structural components of cell walls and immunologically active substances. A better understanding of mycobacterial glycolipids helps us to develop novel diagnostics, therapeutics, and prophylactics for mycobacterial diseases.

## Grant Support

This work was supported by the grants from Ministry of Health, Labour and Welfare (Emerging and Re-emerging Infectious Diseases), Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan, and Japan Health Sciences Foundation.

## References

- [1] R. Koch. (1884). *Aetiologie der Tuberkulose*. Mitt. k. Gesundheitsamt, 2, 1-88.
- [2] WHO. (2007). WHO report 2007 Global Tuberculosis Control Surveillance, Planning, Financing. [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/2007/pdf/full.pdf](http://www.who.int/tb/publications/global_report/2007/pdf/full.pdf).
- [3] M. Daffe and P. Draper. (1998). The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv. Microb. Physiol.*, 39, 131-203.
- [4] K. Kaneda, S. Imaizumi and I. Yano. (1995). Distribution of C22-, C24- and C26-alpha-unit-containing mycolic acid homologues in mycobacteria. *Microbiol. Immunol.*, 39, 563-570.
- [5] K. Kaneda, S. Imaizumi, S. Mizuno, T. Baba, M. Tsukamura and I. Yano. (1988). Structure and molecular species composition of three homologous series of alpha-mycolic acids from *Mycobacterium* spp. *J. Gen. Microbiol.*, 134, 2213-2229.

- [6] M. S. Glickman, J. S. Cox and W. R. Jacobs, Jr. (2000). A novel mycolic acid cyclopropane synthetase is required for cording, persistence, and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Cell.*, 5, 717-727.
- [7] V. Rao, F. Gao, B. Chen, W. R. Jacobs, Jr. and M. S. Glickman. (2006). Trans-cyclopropanation of mycolic acids on trehalose dimycolate suppresses *Mycobacterium tuberculosis* -induced inflammation and virulence. *J. Clin. Invest.*, 116, 1660-1667.
- [8] E. Dubnau, J. Chan, C. Raynaud, V. P. Mohan, M. A. Laneelle, K. Yu, A. Quemard, I. Smith and M. Daffe. (2000). Oxygenated mycolic acids are necessary for virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Mol. Microbiol.*, 36, 630-637.
- [9] Y. Yuan, Y. Zhu, D. D. Crane and C. E. Barry, 3rd. (1998). The effect of oxygenated mycolic acid composition on cell wall function and macrophage growth in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.*, 29, 1449-1458.
- [10] G. O. Aspinall, D. Chatterjee and P. J. Brennan. (1995). The variable surface glycolipids of mycobacteria: structures, synthesis of epitopes, and biological properties. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 51, 169-242.
- [11] P. J. Brennan and H. Nikaido. (1995). The envelope of mycobacteria. *Annu. Rev. Biochem.*, 64, 29-63.
- [12] D. Chatterjee and K. H. Khoo. (2001). The surface glycopeptidolipids of mycobacteria: structures and biological properties. *Cell Mol. Life Sci.*, 58, 2018-2042.
- [13] K. Kobayashi and T. Yoshida. (1996). The immunopathogenesis of granulomatous inflammation induced by *Mycobacterium tuberculosis*. *Methods*, 9, 204-214.
- [14] M. S. Glickman and W. R. Jacobs, Jr. (2001). Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: dawn of a discipline. *Cell*, 104, 477-485.
- [15] D. G. Russell, H. C. Mwandumba and E. E. Rhoades. (2002). *Mycobacterium* and the coat of many lipids. *J. Cell. Biol.*, 158, 421-426.
- [16] P. J. Brennan. (2003). Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)*, 83, 91-97.
- [17] E. M. Beckman, S. A. Porcelli, C. T. Morita, S. M. Behar, S. T. Furlong and M. B. Brenner. (1994). Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted alpha beta+ T cells. *Nature*, 372, 691-694.
- [18] D. B. Moody, S. A. Porcelli, S. A. Porcelli and R. L. Modlin. (2003). Intracellular pathways of CD1 antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.*, 3, 11-22.
- [19] P. A. Sieling, D. Chatterjee, S. A. Porcelli, T. I. Prigozy, R. J. Mazzaccaro, T. Soriano, B. R. Bloom, M. B. Brenner, M. Kronenberg, P. J. Brennan and et al. (1995). CD1-restricted T cell recognition of microbial lipoglycan antigens. *Science*, 269, 227-230.
- [20] D. B. Moody, M. R. Guy, E. Grant, T. Y. Cheng, M. B. Brenner, G. S. Besra and S. A. Porcelli. (2000). CD1b-mediated T cell recognition of a glycolipid antigen generated from mycobacterial lipid and host carbohydrate during infection. *J. Exp. Med.*, 192, 965-976.
- [21] Y. Natsuhara, S. Oka, K. Kaneda, Y. Kato and I. Yano. (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.

- [22] I. Yano, I. Tomiyasu, K. Kaneda, Y. Kato, Y. Sumi, S. Kurano, N. Sugimoto and H. Sawai. (1987). Isolation of mycolic acid-containing glycolipids in *Nocardia rubra* and their granuloma forming activity in mice. *J. Pharmacobiodyn.*, 10, 113-123.
- [23] K. Kaneda, Y. Sumi, F. Kurano, Y. Kato and I. Yano. (1986). Granuloma formation and hemopoiesis induced by C36-48-mycolic acid-containing glycolipids from *Nocardia rubra*. *Infect. Immun.*, 54, 869-875.
- [24] H. Yamagami, T. Matsumoto, N. Fujiwara, T. Arakawa, K. Kaneda, I. Yano and K. Kobayashi. (2001). Trehalose 6,6'-dimycolate (cord factor) of *Mycobacterium tuberculosis* induces foreign-body- and hypersensitivity-type granulomas in mice. *Infect. Immun.*, 69, 810-815.
- [25] J. R. Jackson, M. P. Seed, C. H. Kircher, D. A. Willoughby and J. D. Winkler. (1997). The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. *FASEB J.*, 11, 457-465.
- [26] I. Sakaguchi, N. Ikeda, M. Nakayama, Y. Kato, I. Yano and K. Kaneda. (2000). Trehalose 6,6'-dimycolate (Cord factor) enhances neovascularization through vascular endothelial growth factor production by neutrophils and macrophages. *Infect. Immun.*, 68, 2043-2052.
- [27] N. Saita, N. Fujiwara, I. Yano, K. Soejima and K. Kobayashi. (2000). Trehalose 6,6'-dimycolate (cord factor) of *Mycobacterium tuberculosis* induces corneal angiogenesis in rats. *Infect. Immun.*, 68, 5991-5997.
- [28] L. Y. Gao and Y. A. Kwai. (2000). The modulation of host cell apoptosis by intracellular bacterial pathogens. *Trends Microbiol.*, 8, 306-313.
- [29] Y. Ozeki, K. Kaneda, N. Fujiwara, M. Morimoto, S. Oka and I. Yano. (1997). In vivo induction of apoptosis in the thymus by administration of mycobacterial cord factor (trehalose 6,6'-dimycolate). *Infect. Immun.*, 65, 1793-1799.
- [30] N. Hamasaki, K. Isowa, K. Kamada, Y. Terano, T. Matsumoto, T. Arakawa, K. Kobayashi and I. Yano. (2000). In vivo administration of mycobacterial cord factor (Trehalose 6, 6'-dimycolate) can induce lung and liver granulomas and thymic atrophy in rabbits. *Infect. Immun.*, 68, 3704-3709.
- [31] R. Maekura, M. Nakagawa, Y. Nakamura, T. Hiraga, Y. Yamamura, M. Ito, E. Ueda, S. Yano, H. He, S. Oka and et al. (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.
- [32] E. Julian, L. Matas, A. Perez, J. Alcaide, M. A. Laneelle and M. Luquin. (2002). Serodiagnosis of tuberculosis: comparison of immunoglobulin A (IgA) response to sulfolipid I with IgG and IgM responses to 2,3-diacyltrehalose, 2,3,6-triacyltrehalose, and cord factor antigens. *J. Clin. Microbiol.*, 40, 3782-3788.
- [33] Y. Fujita, H. Ogata and I. Yano. (2005). Clinical evaluation of serodiagnosis of active tuberculosis by multiple-antigen ELISA using lipids from *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo 172. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 43, 1253-1262.
- [34] K. R. Steingart, M. Henry, S. Laal, P. C. Hopewell, A. Ramsay, D. Menzies, J. Cunningham, K. Weldingh and M. Pai. (2007). Commercial serological antibody detection tests for the diagnosis of pulmonary tuberculosis: a systematic review. *PLoS Med.*, 4, e202.

- [35] V. Rao, N. Fujiwara, S. A. Porcelli and M. S. Glickman. (2005). *Mycobacterium tuberculosis* controls host innate immune activation through cyclopropane modification of a glycolipid effector molecule. *J. Exp. Med.*, 201, 535-543.
- [36] S. Ueda, N. Fujiwara, T. Naka, I. Sakaguchi, Y. Ozeki, I. Yano, T. Kasama and K. Kobayashi. (2001). Structure-activity relationship of mycoloyl glycolipids derived from *Rhodococcus* sp. 4306. *Microb. Pathog.*, 30, 91-99.
- [37] I. Matsunaga, S. Oka, N. Fujiwara and I. Yano. (1996). Relationship between induction of macrophage chemotactic factors and formation of granulomas caused by mycoloyl glycolipids from *Rhodococcus ruber* (*Nocardia rubra*). *J. Biochem.* (Tokyo), 120, 663-670.
- [38] Y. Enomoto, M. Sugita, I. Matsunaga, T. Naka, A. Sato, T. Kawashima, K. Shimizu, H. Takahashi, Y. Norose and I. Yano. (2005). Temperature-dependent biosynthesis of glucose monomycolate and its recognition by CD1-restricted T cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 337, 452-456.
- [39] J. D. Mougous, C. J. Petzold, R. H. Senaratne, D. H. Lee, D. L. Akey, F. L. Lin, S. E. Munchel, M. R. Pratt, L. W. Riley, J. A. Leary, J. M. Berger and C. R. Bertozzi. (2004). Identification, function and structure of the mycobacterial sulfotransferase that initiates sulfolipid-1 biosynthesis. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 11, 721-729.
- [40] M. B. Goren, O. Brokl, B. C. Das and E. Lederer. (1971). Sulfolipid I of *Mycobacterium tuberculosis*, strain H37RV. Nature of the acyl substituents. *Biochemistry*, 10, 72-81.
- [41] M. B. Goren. (1970). Sulfolipid I of *Mycobacterium tuberculosis*, strain H37Rv. I. Purification and properties. *Biochim. Biophys. Acta*, 210, 116-126.
- [42] M. B. Goren. (1970). Sulfolipid I of *Mycobacterium tuberculosis*, strain H37Rv. II. Structural studies. *Biochim. Biophys. Acta*, 210, 127-138.
- [43] L. Zhang, D. English and B. R. Andersen. (1991). Activation of human neutrophils by *Mycobacterium tuberculosis*-derived sulfolipid-1. *J. Immunol.*, 146, 2730-2736.
- [44] M. Kato and M. B. Goren. (1974). Synergistic action of cord factor and mycobacterial sulfatides on mitochondria. *Infect. Immun.*, 10, 733-741.
- [45] M. J. Pabst, J. M. Gross, J. P. Brozna and M. B. Goren. (1988). Inhibition of macrophage priming by sulfatide from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.*, 140, 634-640.
- [46] S. E. Converse, J. D. Mougous, M. D. Leavell, J. A. Leary, C. R. Bertozzi and J. S. Cox. (2003). MmpL8 is required for sulfolipid-1 biosynthesis and *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 100, 6121-6126.
- [47] C. Rousseau, O. C. Turner, E. Rush, Y. Bordat, T. D. Sirakova, P. E. Kolattukudy, S. Ritter, I. M. Orme, B. Gicquel and M. Jackson. (2003). Sulfolipid deficiency does not affect the virulence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv in mice and guinea pigs. *Infect. Immun.*, 71, 4684-4690.
- [48] Y. Okamoto, Y. Fujita, T. Naka, M. Hirai, I. Tomiyasu and I. Yano. (2006). Mycobacterial sulfolipid shows a virulence by inhibiting cord factor induced granuloma formation and TNF-alpha release. *Microb. Pathog.*, 40, 245-253.
- [49] M. Gilleron, S. Stenger, Z. Mazorra, F. Wittke, S. Mariotti, G. Bohmer, J. Prandi, L. Mori, G. Puzo and G. De Libero. (2004). Diacylated sulfoglycolipids are novel



- mycobacterial antigens stimulating CD1-restricted T cells during infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Exp. Med.*, 199, 649-659.
- [50] T. D. Sirakova, A. K. Thirumala, V. S. Dubey, H. Sprecher and P. E. Kolattukudy. (2001). The *Mycobacterium tuberculosis pks2* gene encodes the synthase for the hepta- and octamethyl-branched fatty acids required for sulfolipid synthesis. *J. Biol. Chem.*, 276, 16833-16839.
- [51] P. Domenech, M. B. Reed, C. S. Dowd, C. Manca, G. Kaplan and C. E. Barry, 3rd. (2004). The role of MmpL8 in sulfatide biogenesis and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.*, 279, 21257-21265.
- [52] P. J. Brennan and M. B. Goren. (1979). Structural studies on the type-specific antigens and lipids of the *Mycobacterium avium*. *Mycobacterium intracellulare*. *Mycobacterium scrofulaceum* serocomplex. *Mycobacterium intracellulare* serotype 9. *J. Biol. Chem.*, 254, 4205-4211.
- [53] N. Fujiwara, N. Nakata, S. Maeda, T. Naka, M. Doe, I. Yano and K. Kobayashi. (2007). Structural Characterization of a Specific Glycopeptidolipid Containing a Novel *N*-Acyl-Deoxy Sugar from *Mycobacterium intracellulare* Serotype 7 and Genetic Analysis of Its Glycosylation Pathway. *J. Bacteriol.*, 189, 1099-1108.
- [54] T. M. Eckstein, J. T. Belisle and J. M. Inamine. (2003). Proposed pathway for the biosynthesis of serovar-specific glycopeptidolipids in *Mycobacterium avium* serovar 2. *Microbiology*, 149, 2797-2807.
- [55] T. Heidelberg and O. R. Martin. (2004). Synthesis of the glycopeptidolipid of *Mycobacterium avium* Serovar 4: first example of a fully synthetic C-mycoside GPL. *J. Org. Chem.*, 69, 2290-2301.
- [56] J. N. Maslow, V. R. Irani, S. H. Lee, T. M. Eckstein, J. M. Inamine and J. T. Belisle. (2003). Biosynthetic specificity of the rhamnosyltransferase gene of *Mycobacterium avium* serovar 2 as determined by allelic exchange mutagenesis. *Microbiology*, 149, 3193-3202.
- [57] S. T. Howard, E. Rhoades, J. Recht, X. Pang, A. Alsup, R. Kolter, C. R. Lyons and T. F. Byrd. (2006). Spontaneous reversion of *Mycobacterium abscessus* from a smooth to a rough morphotype is associated with reduced expression of glycopeptidolipid and reacquisition of an invasive phenotype. *Microbiology*, 152, 1581-1590.
- [58] J. T. Belisle, K. Klaczkiwicz, P. J. Brennan, W. R. Jacobs, Jr. and J. M. Inamine. (1993). Rough morphological variants of *Mycobacterium avium*. Characterization of genomic deletions resulting in the loss of glycopeptidolipid expression. *J. Biol. Chem.*, 268, 10517-10523.
- [59] T. M. Eckstein, J. M. Inamine, M. L. Lambert and J. T. Belisle. (2000). A genetic mechanism for deletion of the ser2 gene cluster and formation of rough morphological variants of *Mycobacterium avium*. *J. Bacteriol.*, 182, 6177-6182.
- [60] K. Enomoto, S. Oka, N. Fujiwara, T. Okamoto, Y. Okuda, R. Maekura, T. Kuroki and I. Yano. (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.
- [61] S. Kitada, R. Maekura, N. Toyoshima, N. Fujiwara, I. Yano, T. Ogura, M. Ito and K. Kobayashi. (2002). Serodiagnosis of pulmonary disease due to *Mycobacterium avium*

- complex with an enzyme immunoassay that uses a mixture of glycopeptidolipid antigens. *Clin. Infect. Dis.*, 35, 1328-1335.
- [62] S. Kitada, R. Maekura, N. Toyoshima, T. Naka, N. Fujiwara, M. Kobayashi, I. Yano, M. Ito and K. Kobayashi. (2005). Use of glycopeptidolipid core antigen for serodiagnosis of *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease in immunocompetent patients. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 12, 44-51.
- [63] W. W. Barrow, T. L. Davis, E. L. Wright, V. Labrousse, M. Bachelet and N. Rastogi. (1995). Immunomodulatory spectrum of lipids associated with *Mycobacterium avium* serovar 8. *Infect. Immun.*, 63, 126-133.
- [64] H. Kano, T. Doi, Y. Fujita, H. Takimoto, I. Yano and Y. Kumazawa. (2005). Serotype-specific modulation of human monocyte functions by glycopeptidolipid (GPL) isolated from *Mycobacterium avium* complex. *Biol. Pharm. Bull.*, 28, 335-339.
- [65] S. K. Tassell, M. Pourshafie, E. L. Wright, M. G. Richmond and W. W. Barrow. (1992). Modified lymphocyte response to mitogens induced by the lipopeptide fragment derived from *Mycobacterium avium* serovar-specific glycopeptidolipids. *Infect. Immun.*, 60, 706-711.
- [66] Y. Takegaki. (2000). [Effect of serotype specific glycopeptidolipid (GPL) isolated from *Mycobacterium avium* complex (MAC) on phagocytosis and phagosome-lysosome fusion of human peripheral blood monocytes]. *Kekkaku*, 75, 9-18.
- [67] K. Shimada, H. Takimoto, I. Yano and Y. Kumazawa. (2006). Involvement of mannose receptor in glycopeptidolipid-mediated inhibition of phagosome-lysosome fusion. *Microbiol. Immunol.*, 50, 243-251.
- [68] L. Danelishvili, M. Wu, B. Stang, M. Harriff, S. Cirillo, J. Cirillo, R. Bildfell, B. Arbogast and L. E. Bermudez. (2007). Identification of *Mycobacterium avium* pathogenicity island important for macrophage and amoeba infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 104, 11038-11043.
- [69] M. Daffe and M. A. Laneelle. (1988). Distribution of phthiocerol diester, phenolic mycosides and related compounds in mycobacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 134, 2049-2055.
- [70] J. J. Fournie, E. Adams, R. J. Mullins and A. Basten. (1989). Inhibition of human lymphoproliferative responses by mycobacterial phenolic glycolipids. *Infect. Immun.*, 57, 3653-3659.
- [71] V. Mehra, P. J. Brennan, E. Rada, J. Convit and B. R. Bloom. (1984). Lymphocyte suppression in leprosy induced by unique *M. leprae* glycolipid. *Nature*, 308, 194-196.
- [72] M. Vachula, T. J. Holzer and B. R. Andersen. (1989). Suppression of monocyte oxidative response by phenolic glycolipid I of *Mycobacterium leprae*. *J. Immunol.*, 142, 1696-1701.
- [73] M. B. Reed, P. Domenech, C. Manca, H. Su, A. K. Barczak, B. N. Kreiswirth, G. Kaplan and C. E. Barry, 3rd. (2004). A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response. *Nature*, 431, 84-87.
- [74] L. Tsenova, E. Ellison, R. Harbacheuski, A. L. Moreira, N. Kurepina, M. B. Reed, B. Mathema, C. E. Barry, 3rd and G. Kaplan. (2005). Virulence of selected *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in the rabbit model of meningitis is dependent on phenolic glycolipid produced by the bacilli. *J. Infect. Dis.*, 192, 98-106.

- [75] D. B. Young and T. M. Buchanan. (1983). A serological test for leprosy with a glycolipid specific for *Mycobacterium leprae*. *Science*, 221, 1057-1059.
- [76] D. B. Young, S. Dissanayake, R. A. Miller, S. R. Khanolkar and T. M. Buchanan. (1984). Humans respond predominantly with IgM immunoglobulin to the species-specific glycolipid of *Mycobacterium leprae*. *J. Infect. Dis.*, 149, 870-873.
- [77] S. M. van Beers, S. Izumi, B. Madjid, Y. Maeda, R. Day and P. R. Klatser. (1994). An epidemiological study of leprosy infection by serology and polymerase chain reaction. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.*, 62, 1-9.
- [78] S. Izumi, T. Fujiwara, M. Ikeda, Y. Nishimura, K. Sugiyama and K. Kawatsu. (1990). Novel gelatin particle agglutination test for serodiagnosis of leprosy in the field. *J. Clin. Microbiol.*, 28, 525-529.
- [79] S. W. Hunter and P. J. Brennan. (1990). Evidence for the presence of a phosphatidylinositol anchor on the lipoarabinomannan and lipomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.*, 265, 9272-9279.
- [80] J. Nigou, M. Gilleron and G. Puzo. (2003). Lipoarabinomannans: from structure to biosynthesis. *Biochimie.*, 85, 153-166.
- [81] D. N. Dao, L. Kremer, Y. Guerardel, A. Molano, W. R. Jacobs, Jr., S. A. Porcelli and V. Briken. (2004). *Mycobacterium tuberculosis* lipomannan induces apoptosis and interleukin-12 production in macrophages. *Infect. Immun.*, 72, 2067-2074.
- [82] V. J. Quesniaux, D. M. Nicolle, D. Torres, L. Kremer, Y. Guerardel, J. Nigou, G. Puzo, F. Erard and B. Ryffel. (2004). Toll-like receptor 2 (TLR2)-dependent-positive and TLR2-independent-negative regulation of proinflammatory cytokines by mycobacterial lipomannans. *J. Immunol.*, 172, 4425-4434.
- [83] C. Vignal, Y. Guerardel, L. Kremer, M. Masson, D. Legrand, J. Mazurier and E. Ellass. (2003). Lipomannans, but not lipoarabinomannans, purified from *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium kansasii* induce TNF-alpha and IL-8 secretion by a CD14-toll-like receptor 2-dependent mechanism. *J. Immunol.*, 171, 2014-2023.
- [84] Y. Watanabe, E. Watari, I. Matsunaga, K. Hiromatsu, C. C. Dascher, T. Kawashima, Y. Norose, K. Shimizu, H. Takahashi, I. Yano and M. Sugita. (2006). BCG vaccine elicits both T-cell mediated and humoral immune responses directed against mycobacterial lipid components. *Vaccine*, 24, 5700-5707.
- [85] M. Gilleron, C. Ronet, M. Mempel, B. Monsarrat, G. Gachelin and G. Puzo. (2001). Acylation state of the phosphatidylinositol mannosides from *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette Guerin and ability to induce granuloma and recruit natural killer T cells. *J. Biol. Chem.*, 276, 34896-34904.
- [86] I. Apostolou, Y. Takahama, C. Belmont, T. Kawano, M. Huerre, G. Marchal, J. Cui, M. Taniguchi, H. Nakauchi, J. J. Fournie, P. Kourilsky and G. Gachelin. (1999). Murine natural killer T(NKT) cells [correction of natural killer cells] contribute to the granulomatous reaction caused by mycobacterial cell walls. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 96, 5141-5146.
- [87] B. W. Jones, T. K. Means, K. A. Heldwein, M. A. Keen, P. J. Hill, J. T. Belisle and M. J. Fenton. (2001). Different Toll-like receptor agonists induce distinct macrophage responses. *J. Leukoc. Biol.*, 69, 1036-1044.

## 13 結核菌

### 【病原体の特性, BSL】(表1)

結核は古代から人類を脅かしてきた感染症であるが、未だ制圧されていない。結核菌既感染者は全世界で約20億人(日本:2,500万人)、年間新規患者数は880万人(日本:2.6万人)、罹患率(対人口10万人)は140(日本:20.6)、年間死亡者数は200万人(日本:0.23万人)であり、現在においても甚大な健康被害を提供している。病変部位により、肺結核、肺外結核、粟粒(全身播種性)結核に分類される。

結核菌は *Mycobacterium* 属(抗酸菌)に属し、非運動性、芽胞や莢膜を形成しない好気性グラム陽性桿菌(長さ:2~4  $\mu\text{m}$ 、幅:0.3~0.6  $\mu\text{m}$ )である。ゲノムサイズは約4.4 MbでGC比65.6%である。遺伝学的にきわめて近縁の *M. bovis*、*M. africanum* や *M. microti* とともに結核菌群 *Mycobacterium tuberculosis complex* を形成している。結核菌群は生化学的にナイアシンを産生することで、非結核性抗酸菌やらい菌等の他の抗酸菌と区別される。抗酸菌細胞壁は脂質に富むため(乾燥菌量の10~40%、細胞壁の20~60%)、通常のグラム染色法では染色されにくく、Ziehl-Neelsen法や蛍光等の特殊染色(抗酸性染色)によって染色される。しかし、いったん染色されると塩酸等でも脱色されにくいことから抗酸菌(acid-fast bacilli)と呼ぶ。細胞壁糖脂質、特に、ミコール酸(mycolic acid)は染色性や細胞壁の疎水性に最も関与している。菌体表層の強い疎水性のため、乾燥、凍結や酸・アルカリ、消毒剤等に強い抵抗性を示し、宿主体内外で長期間にわたり生存する。

発育には適度の酸素(20%)を必要とし、炭酸ガス(5%)は発育を促進させる。しかし、嫌気状態でも完全に死滅することなく、休眠状態

(dormancy)として生存する。37~38°Cを発育至適温度とし、至適pHはpH6.8~7.0である。固形培地として、小川培地やLowenstein-Jensen培地等の卵培地、あるいは、Middlebrook 7H10や7H11培地が使用されるが、遅発育性であり(倍加時間:16~18時間)、コロニーの肉眼的な検出に2~3週間以上を要する。遅発育性は検体培養による結核の診断を遅らせる一因となる。小川培地表面では「ロウ状」の光沢を持ったR型コロニーを形成し、乳白色~淡黄色の色調を呈する。界面活性剤を加えずに液体培地に培養した場合、培地表面に肉眼的にコード状に発育する(cord形成)。

喀痰に含まれる結核菌の飛沫核(空気)感染により、結核はヒト-ヒト感染伝播する。結核菌は病原性の高い細菌であり、わずか数個の菌を吸入することで感染が成立する。感染しても発病は生涯を通じて約10%で、90%は感染した結核菌が休眠状態で宿主体内に残存する(persister)。

結核菌は外毒素や内毒素を産生せず、その病原性は宿主感染防御機構から逸脱して細胞内生存や増殖をすること、遅延型過敏反応を誘導することにより表現される。結核菌は細胞内寄生菌であり、宿主マクロファージに貪食された後、殺菌されずに増殖する。マクロファージ内では食胞体(ファゴゾーム)内に留まるが、ファゴゾームとリソゾームの融合(ファゴリソゾーム融合)を阻害することで、細胞内殺菌機構から逸脱する。

すべての結核菌株はBSL-3である。

感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律等の一部を改正する法律(改正感染症法)では、結核菌は特定病原体等に指定され、四種病原体等に、多剤耐性結核菌は三種病原体等に分類されるので、管理・取扱いに際し、同法を遵

表 1 結核菌の特徴

細胞内寄生性	ファゴリソゾーム融合を阻害し、マクロファージ内ファゴソーム中で生存
遅発育性	倍加時間 16~18 時間 コロニー形成に 2~3 週間以上
細胞壁	脂質に富み（乾燥菌量の 10~40%、細胞壁の 20~60%）、抗酸性を呈する 種々の環境や化学物質に抵抗性を示す
運動性	非運動性、芽胞非形成性、莢膜なし
遺伝子	ゲノムサイズ約 4.4 Mb, GC 比 65.6%
感染形式	エアロゾル：飛沫核（空気）感染
好気性	発育には酸素を要求し、酸素分圧の高い肺等で増殖 酸素が枯渇しても死滅せず、休眠状態となる
病態	慢性炎症、肉芽腫形成、乾酪壊死、空洞形成、線維化

表 2 結核菌曝露に対する応急措置、及び事故対応

バイオセーフティレベル	BSL-3	
感染経路	結核菌を含む飛沫核（空気）感染	
応急処置	針刺し・怪我	血液を絞り出し、流水で洗浄後、傷口を消毒
	皮膚	流水で洗浄後、消毒
	口	うがい
	眼	流水あるいは滅菌生理食塩水で洗浄
	鼻	鼻腔洗浄
感染事故対応	応急処置と施設管理者への報告、医療機関を受診	
緊急投薬	なし	
有効な薬剤	発病予防にはイソニアジド（INH）投与、INH 耐性菌の場合、リファンピシン（RIF）投与	
経過観察	定期健診による胸部 X 線撮影検査 結核菌特異抗原による末梢血 interferon- $\gamma$ 遊離試験 ツベルクリン皮内反応検査 経過観察、曝露後 2 年間	
臨床症状	針刺し・外傷局所では感染部位の炎症、所属リンパ節の腫脹 症状は 2 週間以上持続する咳嗽、喀痰や発熱が最も多く、その他、全身倦怠、血痰、胸痛、体重減少、寝汗や食欲低下等	

表 3 結核菌感染に対する予防措置

ワクチンの接種	BCG ワクチン	
特異免疫 反応試験	TST	ツベルクリン皮内反応（Mantoux） 48 時間後判定：遅延型皮内反応
	IGRA：QFT	末梢血細胞 IFN- $\gamma$ 産生・遊離試験（IGRA, QuantiFERON <sup>®</sup> ）： <i>in vitro</i> 抗原；ESAT-6, CFP-10
発病予防内服	感染曝露が確認された場合、INH（300 mg/日、6~9 ヶ月）投与、INH 耐性菌 の場合、リファンピシン（RIF）投与	
滅菌法	使用した器具はオートクレーブ 121℃、30 分による滅菌	
消毒薬	アルコール類、フェノール類、アルデヒド類による消毒	

守する。

#### 【実験室のハザード及び予想されるリスク】(表2)

結核菌は飛沫核(エアロゾル)により感染伝播するので、実験室においてはエアロゾルの発生及び吸引に留意する。1979~1999年における実験室感染の原因病原体の中で、結核菌は最も頻度が高かった。針刺し、外傷等により菌が体内に入った可能性のある場合、緊急処置を必要とする。また、有効な抗微生物薬の投与を行う。針刺しや外傷では感染部位の炎症、所属リンパ節の腫脹が生じる。針刺しや外傷に対しては、血液を絞り出し、流水で洗浄後、創部を消毒する。体表面への付着が懸念される場合には流水で洗浄し、可能であれば消毒する。口腔内に入った可能性がある場合には十分にうがいを行う。感染事故対応は、針刺し事故等の場合には応急処置と施設管理者への報告、医療機関の受診を行う。なお、結核予防法は改正感染症法に統合され、結核は二類感染症に位置づけられた。この規程により、結核患者あるいは結核の疑い患者と診断するに足る高度の蓋然性が認められる場合、診察した医師は届出を直ちに行わなければならない。

臨床症状としては2週間以上持続する咳嗽、喀痰や発熱が最も多い。全身倦怠、血痰、胸痛、体重減少、寝汗や食欲低下等を伴うこともある。なお、約20%は自覚症状の有無に関わらず、健康診断で発見される。

本菌の潜伏期間は長く、若年層の一次感染では4~18ヶ月、既感染者の二次感染では長期経過後の発症もある。そのため、感染が懸念される場合、胸部X線撮影検査、感染曝露6~8週間後、結核菌特異抗原による末梢血 interferon- $\gamma$  遊離試験(Quantiferon<sup>®</sup> 陽性:0.35IU/mL以上)やツベルクリン皮内反応検査(陽性、日本:紅斑 $\geq$ 直径10mm以上、欧米:硬結 $\geq$ 直径5mm以上)等を行い、2年間経過観察する。なお、ツベルクリン皮内反応陽性は結核菌感染のみならず、BCG接種や非結核性抗酸菌感染でもみられ、逆に、活動性結核の約25%は陰性である。陰性は真の陰性(結核菌未感染)や偽陰性(結核菌既感染にも

かわらず、陰性)を包含し、偽陰性として、栄養障害、高齢者、免疫疾患、リンパ系悪性腫瘍、副腎皮質ステロイド薬療法、慢性腎不全、サルコイドーシス、HIV感染者(AIDSを含む)や重症結核(播種性)等がある。従って、ツベルクリン皮内反応は結核の補助診断である。ツベルクリン皮内反応陽性は感染防御の指標とならないことも留意する。

#### 【予防法-消毒・滅菌法-】(表3)

結核の予防ワクチンとして、弱毒ウシ型結核菌由来生ワクチンのBCGが汎用されている。乳幼児におけるBCG接種は有効とされているが、成人への効果は疑問視されている。結核菌を扱う業務に従事する前には、結核菌既感染の有無を確認しておくことが望ましい。確認にツベルクリン皮内反応、特に、結核菌特異抗原による末梢血単核細胞 interferon- $\gamma$  遊離試験が推奨される。予防内服にはイソニアジド(INH)が投与される。感染を受けたと判断される場合、INH300mgを1日量として6~9ヶ月投与する。感染結核菌がINH耐性の場合、リファンピシン(RIF)を投与する。

結核菌は熱湯による煮沸10分間で完全に殺菌できるが、オートクレーブ(121 $^{\circ}$ C, 30分)による滅菌が最も望ましい。消毒薬ではアルコール類、フェノール類、アルデヒド類が有効である。滅菌不可能な器具はグルタールアルデヒドに30分以上浸して消毒する。 [大原直也・小林和夫]

#### ◎文献

- 1) 泉孝英監修、富岡洋海編:結核(第4版)、医学書院、2006。
- 2) 光山正雄編:結核、医薬ジャーナル社、2001。
- 3) 小林和夫:マイコバクテリウム(抗酸菌)と感染症。山西弘一監修、平松啓一・中込 治編、標準微生物学(第9版)、pp279-292、医学書院、2005。
- 4) 露口泉夫編:最新医学別冊 新しい診断と治療のABC 41/呼吸器6 結核・非結核性抗酸菌症、最新医学社、2006。
- 5) 四元秀毅・山岸文雄:医療者のための結核の知識(第2版)、医学書院、2005。
- 6) Morens D M et al: *Nature* **430**: 242-249, 2004。
- 7) Stop TB Partnership. <http://www.stoptb.org/>
- 8) 厚生労働省。平成18年結核発生動向調査年報集計結

- 果. <http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou03/06.html>
- 9) World Health Organization. Tuberculosis  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/index.html>
- 10) エイズ予防情報ネット  
<http://api-net.jfap.or.jp/>
- 11) 厚生労働省. 結核・感染症に関する情報.  
<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou.html>
- 12) Centers for Disease Control and Prevention. TB guidelines. Infection contrl.  
[http://www.cdc.gov/tb/pubs/mmwr/Maj\\_guide/infectioncontrol.htm](http://www.cdc.gov/tb/pubs/mmwr/Maj_guide/infectioncontrol.htm)

#### **COLUMN 多剤耐性結核菌 (MDR-TB) と超多剤耐性結核菌 (XDR-TB)**

結核菌においても抗微生物薬耐性が問題となっているが、薬剤耐性結核菌で、INHとRIFに同時耐性菌を多剤耐性結核菌 (Multidrug-resistant TB: MDR-TB)、多剤耐性結核菌でフルオロキノロン耐性、かつカナマイシン、アミカシン、カプレオマイシン等、注射可能薬の少なくとも1剤以上に耐性の菌を超多剤耐性結核菌 (Extensively drug-resistant TB: XDR-TB) という。薬剤耐性、特に、XDR-TBは抗結核化学療法がほとんど無効であり、生命予後も不良である。薬剤耐性結核菌に有効な新規抗結核薬の開発が希求されている。

## ⑥ クリプトバクテリウム *Cryptobacterium* 属

*C. curtum* の1菌種よりなる。ユウバクテリウム様の性状を持つ。嫌気要求度が強い菌である。ヒト歯周ポケットから分離されるが、歯周病との関連は不明である。

## ⑦ エガテラ *Eggerthella* 属

*E. lenta* (従来の *Eubacterium lentum*) の1菌種よりなる。膿瘍、創傷感染部、血液などから混合感染菌の1つとして本菌が分離される。

## ⑧ ホルデマニア *Holdemania* 属

*H. filiformis* の1菌種よりなる。ユウバクテリウム様の性状を持つ。ヒト糞便中から分離される。

## ⑨ モギバクテリウム *Mogibacterium* 属

*M. timidum* (従来の *Eubacterium timidum*)、*M. pumilum*、*M. vescum* など5菌種よりなる。フェニル酢酸塩を産生するのが特徴である。ヒト歯周病患者から分離されるが、本症との関連は不明である。

## ⑩ スラキア *Slackia* 属

*S. exigua* (従来の *Eubacterium exiguum*) と *S. heliotrinireducens* の2菌種よりなる。アトポビウム属、エガテラ属と類似した性状を持つ。ヒト歯周病患者から分離されるが、本症との関連は不明である。(神谷 茂)

# C マイコバクテリウム属 (抗酸菌)

## ① 分類

抗酸菌は分類学的に、真菌(myco-)と細菌(bacterium)の中間に位置する微生物群を意味する。抗酸菌属の分類や同定には、① 発育・増殖速度、集落の性状(形状、色調や光反応性)、② 生化学的性状(代謝・酵素活性、鉄取り込み、食塩耐性、脂質)、さらに、③ 遺伝子解析などが有用である。なお、基準菌種は結核菌 *M. tubercu-*

*losis* である(表 IV-52)。

## ② 疫学

世界の年間総死亡数は約5,800万人、その内訳として、循環器疾患：約1,750万人、感染症：約1,400万人、悪性新生物：約760万人であり、感染症は現在でも全世界の総死亡の約1/4を占め、人類に大きな健康被害を招来している。感染症による死亡(約1,400万人/年)の主要な原因として、急性呼吸器感染症(肺炎など)：376万人、後天性免疫不全症候群(エイズ AIDS：結核の合併を含む)：283万人、下痢性疾患：168万人、結核：141万人、マラリア：89万人や麻疹(はしか)：55万人などがある(表 IV-53)。

抗酸菌感染症には結核 tuberculosis、非結核性抗酸菌 nontuberculous mycobacteria (NTM) 感染症やハンセン病 leprosy (Hansen's disease) などが、現在でも、多くの抗酸菌感染症患者が存在し、人類に甚大な健康被害を与えている。

## ③ 形態・染色性

抗酸菌は桿菌で(0.2~0.6×1~10 μm)細胞壁は脂質に富み、そのため、アニリン色素に難染色性、グラム染色陽性である。いったん染色されると、酸アルコールに脱色されにくい(抗酸性：acid-fastness, 図 IV-53)。なお、“抗酸性”を示す細菌として、抗酸菌 *Mycobacterium* 属、*Nocardia* 属、*Corynebacterium* 属、*Actinomyces* 属や *Rhodococcus* 属があり、抗酸性染色で“赤染桿菌”として観察されるので、注意を要する。

## ④ 生物学的性質

抗酸菌 *Mycobacterium* 属は *Mycobacteriaceae* 科に属し、DNA塩基構成の特徴として guanine+cytosine (GC) 含有量(62~70%)が高い。また、偏性好気性、芽胞非形成、非運動性である。増殖倍加時間は菌種により異なるが、2~20時間以上であり、集落形成に2日~8週間を要し、至適発育温度は30~45°Cである。なお、らい菌 *M. leprae* は人工培地における培養は成功していない。

紫外線照射を回避した場合、抗酸菌は環境中で数週間~数か月、生存可能である。加熱処理(65°C以上、30分以上)や紫外線照射(日光曝露を



表 IV-52 抗酸菌のRunyon 分類

分類		菌種名
培養可能菌	遅発育菌	結核菌群 <i>M. tuberculosis</i> <i>M. bovis</i> <i>M. microti</i> <i>M. africanum</i>
		非結核性抗酸菌群 I 群菌 光発色菌 <i>M. kansasii</i> <i>M. marinum</i> <i>M. simiae</i> <i>M. asiaticum</i>
		II 群菌 暗発色菌 <i>M. flavescens</i> <i>M. gordonae</i> <i>M. scrofulaceum</i> <i>M. szulgai</i>
	III 群菌 非光発色菌 <i>M. avium</i> <i>M. intracellulare</i> <i>M. celatum</i> <i>M. haemophilum</i> <i>M. gastri</i> <i>M. genavense</i> <i>M. malmoense</i> <i>M. nonchromogenicum</i> <i>M. shimoidei</i> <i>M. terrae</i> <i>M. trivale</i> <i>M. ulcerans</i> <i>M. xenopi</i>	
	迅速発育菌	IV 群菌 <i>M. abscessus</i> <i>M. fortuitum</i> group <i>M. chelonae</i> group <i>M. phlei</i> <i>M. smegmatis</i> <i>M. vaccae</i>
培養不能菌		<i>M. leprae</i>

表 IV-53 世界における感染症による死亡数(2006)

感染症	死亡数(万人)
全感染症	1,400
急性呼吸器感染症	376
エイズ(結核の合併を含む)	283
下痢性疾患	168
結核	141
マラリア	89
麻疹	55
年間総死亡(参考)	約 5,800

World Health Report 2006, WHO

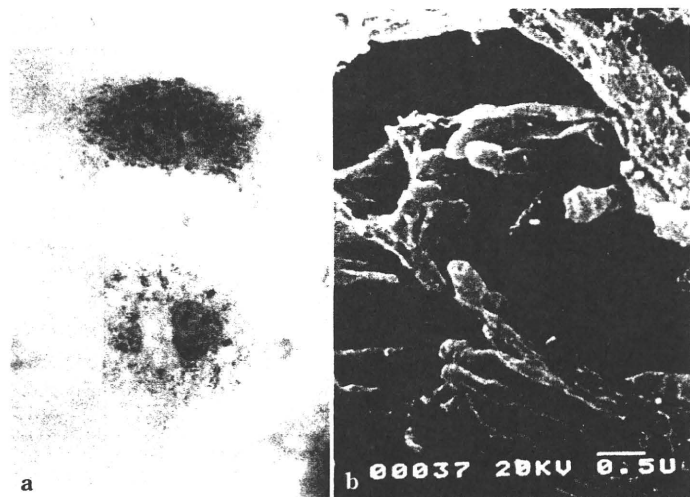


図 IV-53 結核菌の細胞内発育・増殖(a)と走査電子顕微鏡による微細構造(b)

結核菌(赤染桿菌: a)がマクロファージ細胞内で発育・増殖している。

含む)で不活化されるが、凍結や乾燥には抵抗性を示す。

結核菌やらい菌はヒトを含む温熱動物体内でのみ、発育・増殖可能である。他方、NTM は自由世代(free-living)抗酸菌なため、環境に普遍的に存在し、水(自然水や水道水)、土壌、原虫やヒトを含む動物に生息している。また、NTM はヒトや動物における正常細菌叢の構成微生物でないが、無症候性健常者の皮膚、気道、消化管や生殖器系からたびたび分離されることもある。

### 5 分離・同定

#### a 発育・増殖速度および集落の性状

至適発育温度が30~37°C領域の抗酸菌が多く、培養には30°Cと37°Cを施行する必要がある。増殖倍加時間は菌種により異なるが、2~20時間以上であり、固形培地(卵培地：レーヴェンシュタイン・イエンセンLöwenstein-Jensen培地や小川培地、および寒天培地：Middlebrook培地)を用いる。集落形成に8日以上を要する遅発育抗酸菌(slow growers)と7日以内である迅速発育抗酸菌(rapid growers)に大別される。集落の形状は平滑(smooth型)-不正、粗(rough型)など、多様である。なお、人工培地で培養不能ならい菌 *M. leprae* は培養不能抗酸菌に分類される。さらに、集落の性状として、色素産生と光反応性によ

り、光発色菌群 photochromogens(I群)、暗発色菌群 scotochromogens(II群)、非光発色菌群 nonchromogens(III群)、また、迅速発育菌群は色素産生や光反応性にかかわらず、一括して、IV群に分類される。発育・増殖速度および集落性状を加味した抗酸菌のRunyon分類(表IV-52)がある。

#### b 生化学的性状

抗酸菌の代謝・酵素活性に基づく生化学的性状(表IV-54)として、

- ① ナイアシン産生は結核菌に比較的特異的であり、他の抗酸菌ではほとんど陰性である。
- ② ウレアーゼ産生は結核菌群や暗発色菌群で陰性であり、*M. avium* や *M. intracellulare* で陰性である。
- ③ 5%食塩水存在下で耐性(発育・増殖)を示す遅発育菌は *M. trivale* のみ、さらに、ほとんどの迅速発育菌は耐性である。

その他の生化学的性状として、3日培養後のアリルサルファターゼ活性(陽性：*M. fortuitum*群、*M. marinum*、*M. asiaticum*、*M. szulgai*、*M. xenopi*、*M. trivalle* および *M. flavescens*/陰性：結核菌群、MACや *M. kansasii*)、カタラーゼ活性(高活性：*M. kansasii*、*M. trivale*、*M. scrofulaceum*、*M. fortuitum* group や *M. chelonae* group/低活性：結核菌群、MACや *M. ulcerans*)、

表 IV-54 主要な培養可能抗酸菌の表現型

分類	菌種	至適発育温度(°C)	集落形状	色素産生 光反応性	ナイアシン 産生	ウレアーゼ	5%食塩水 耐性	核酸 フローブ	
遅発育菌	結核菌群								
		<i>M. tuberculosis</i>	37	粗(R)	非光発色	陽性	通常、陽性	なし	あり
		<i>M. bovis</i>	37	粗(R)	非光発色	陰性	通常、陽性	なし	あり
	光発色菌群(I)	<i>M. kansasii</i>	35	平滑(S)/粗(R)	光発色	陰性	通常、陰性	なし	あり
		<i>M. marinum</i>	30	平滑(S)/粗(R)	光発色	通常、陰性	陽性	なし	なし
	暗発色菌群(II)	<i>M. gordonae</i>	37	平滑(S)	光発色	陰性	一定しない	なし	あり
		<i>M. scrofulaceum</i>	37	平滑(S)	暗発色	陰性	陽性	なし	なし
	非光発色菌群(III)	<i>M. szulgai</i>	37	平滑(S)/粗(R)	暗発色	陰性	陽性	なし	なし
		<i>M. avium</i>	35~37	平滑(S)/粗(R)	非光発色	陰性	陰性	なし	あり
		<i>M. intracellulare</i>	35~37	平滑(S)/粗(R)	非光発色	陰性	陰性	なし	あり
<i>M. ulcerans</i>		30	粗(R)	非光発色	陰性	一定しない	なし	なし	
迅速発育菌(IV)	<i>M. fortuitum</i>	28~30	平滑(S)/粗(R)	非光発色	陰性	陽性	あり	なし	
	<i>M. chelonae</i>	28~30	平滑(S)/粗(R)	非光発色	通常、陰性	陽性	一定しない	なし	
	<i>M. abscessus</i>	28~30	平滑(S)/粗(R)	非光発色	陰性	陽性	通常、あり	なし	
	<i>M. smegmatis</i>	28~35	平滑(S)/粗(R)	暗発色	陰性	陰性	未報告	なし	
	<i>M. vaccae</i>	30	平滑(S)	暗発色	陰性	陰性	未報告	一定しない	なし

S : smooth型, R : rough型

ピラジナミド分解酵素活性(陽性:ピラジナミド感受性結核菌, MAC, *M. fortuitum* group や *M. chelonae* group/陰性:ピラジナミド耐性結核菌, *M. bovis* や *M. kansasii*)などがある。

ミコール酸などの細胞壁脂肪酸分析(高速液体クロマトグラフィーなど)で, ミコール酸炭素鎖長は菌属に依存し, *Corynebacterium* 属:22~38, *Rhodococcus* 属:34~52, *Nocardia* 属:44~60, *Gordona* 属:48~66, *Mycobacterium* 属:60~90であり, *Mycobacterium* 属のミコール酸炭素鎖は最長である。

従来, 抗酸菌属は発育・増殖速度および集落の性状や生化学的性状により分類されてきた。長所として, ①技術的に確立されていること, ②標準化されていること, ③比較的安価であることが挙げられるが, 短所として, ①医療情報提供に際し, 迅速性を欠くこと, ②大量の菌量を要することなどがある。これらの短所に対し, 脂質や遺伝子解析は補完的である。

### C 遺伝子解析

結核菌, *M. bovis* やらい菌の全ゲノム塩基配列が解明され, 病原性の理解, 新規診断方法, 抗菌薬やワクチンの開発, さらに, 分子疫学領域など, 今後の抗酸菌学や抗酸菌感染症の制圧対策に寄与することが考えられる。抗酸菌遺伝子解析法として, 原理的に核酸探索子(プローブ), 核酸塩基配列および核酸増幅法が開発されている。核酸探索子法は抗酸菌を同定する目的で菌種特異的リボソーム RNA (rRNA) に相補的 DNA 探索子を用いる。rRNA は固形および液体培地に培養した抗酸菌から抽出する。所要時間は約2時間である。現在, 入手可能な DNA 探索子は, 結核菌群, *M. avium* complex, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. gordonae*, *M. kansasii* などがある。核酸塩基配列法は正確, 迅速であるが, 欠点として, 高価および熟練を要するため, 限られた施設でのみ用いられている。抗酸菌の16S rRNA が超可変部であり, 菌種により異なることから, 菌種特異的核酸配列を同定に用いる。核酸増幅法は抗酸菌 DNA や RNA をポリメラーゼ連鎖反応 polymerase chain reaction (PCR) で増幅し, 増幅された DNA や RNA を菌種特異的探索子で同定する。さらに, 制限酵素を用いた DNA 指紋法 DNA

fingerprinting, restriction fragment length polymorphism (RFLP) を組み合わせることにより, 感染源の特定など分子疫学領域, さらに, 薬剤耐性抗酸菌の迅速検出にも応用されている。欠点として, 核酸増幅は菌の生死に依存しないこと, さらに, 菌数を表現することが困難, すなわち疾患活動性を反映しないこと, 精度管理(微量核酸の混入, 偽陽性や偽陰性)が困難なことなどがある。

### ⑥ 病原性・感染症

抗酸菌は基本的に外毒素や内毒素非産生性であるが, 例外的に *M. ulcerans* (西アフリカ諸国で猛威を奮っている Buruli 潰瘍の原因菌) が外毒素(マイコラクトン mycolactone, 別名:マクロライド毒素。宿主組織に壊死を惹起する)を産生する。炎症病変や組織傷害は抗酸菌に対する感染免疫応答過程で宿主から産生されるサイトカインをはじめとする生理活性物質に依存している。抗酸菌, 特に, 結核菌の病原性は, ①結核菌を貪食したマクロファージの宿主感染防御機構から逸脱して細胞内生存および増殖すること(細胞内寄生病原体:図IV-53)や, ②遅延型過敏反応を誘導することにより表現される。この病原性の発現には細胞壁成分(ミコール酸糖脂質, リポアラビノマンナン, 細胞壁成分による補体の活性化や熱ショックタンパク質)が関与している。細胞壁表層に存在するミコール酸糖脂質(別名:コード因子)は肉芽腫を誘導する。リポアラビノマンナンはマクロファージ活性化を阻害する一方, マクロファージから腫瘍壊死因子(TNF)- $\alpha$ 産生を促進し, 発熱, 体重減少や組織傷害を惹起する。さらに, インターロイキン interleukin (IL)-10産生を誘導することにより, Tリンパ球活性化を抑制する。細胞壁成分による補体の活性化がオプソニン化を誘導する結果, 結核菌が補体受容体を介してマクロファージに侵入することを促進する。結核菌由来熱ショックタンパク質はヒト由来熱ショックタンパク質と化学的に類似しているため, 宿主成分と交差免疫応答, すなわち, 自己免疫反応を誘発する。

マクロファージに貪食された結核菌は, 食胞体(ファゴソーム)と水解小体(リソソーム)の融合を阻害することにより, 酸性化されず, 食胞体内で生存し続ける(細胞内寄生病原体)。酸性化の抑制

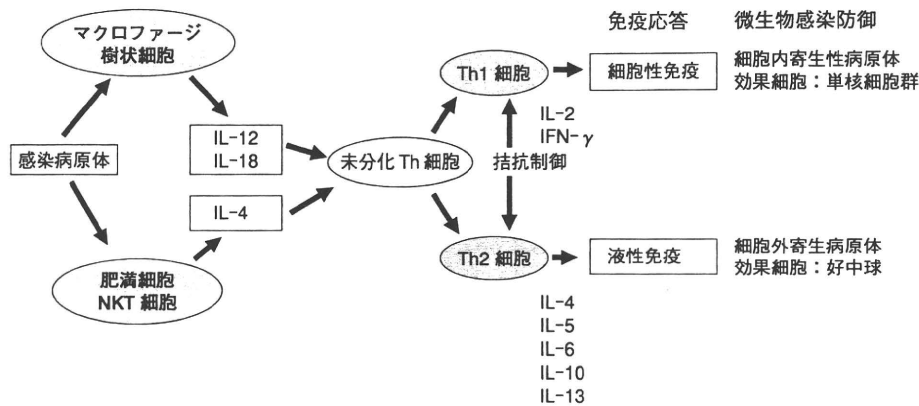


図 IV-54 微生物感染における細胞性および液性免疫応答

には結核菌のウレアーゼやマクロファージの補体やマンノース受容体を介した取り込みが関与している。

抗酸菌は細胞内寄生病原体であり、宿主防御にマクロファージ-サイトカイン-CD4 陽性 1 型ヘルパー T (Th1) 細胞応答系、すなわち、細胞性免疫が貢献している (図 IV-54)。細胞性免疫の起動サイトカインとして、IL-12, IL-18 や interferon (IFN)- $\gamma$  が Th1 細胞分化や活性化など、重要な役割を演じている。しかし、結核菌感染に対する遅延型過敏反応を含む細胞性免疫の発現は抗結核菌防御と組織傷害に貢献、すなわち功罪の二面性 (諸刃の剣) を表現する。また、遺伝的因子として、ヒト第 2 染色体に存在する遺伝子 (*NRAMP1*: natural resistance associated macrophage protein 1, 別名 = *SLC11A1*) が感染防御に関与し、この機能はマクロファージに表現されている。初回の結核菌曝露の場合、宿主の炎症応答は非特異的であり、普遍的な細菌感染に対する炎症応答に類似している。感染約 4~6 週後に乾酪壊死を伴う肉芽腫炎症が生じ、また、結核菌ツベルクリンタンパク質抗原に遅延型過敏反応、ツベルクリン皮内反応が成立する (図 IV-55)。この機序として、病変部において炎症惹起性サイトカイン (IL-1 や TNF- $\alpha$ )、Th1 細胞関連サイトカイン (IL-12, IL-18, IFN- $\gamma$ ) や単球走化性ケモカイン (monocyte chemoattractant protein 1: MCP-1 や macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$ : MIP-1 $\alpha$  など) が産生され、マクロファージの局所的集積 (肉芽腫)、加えて、細胞性免疫 (遅延型過敏反応を含む) が誘導される。結核菌感

染に対する宿主応答は一次感染と二次結核に大別される。

### 1) 一次感染

未曝露宿主が最初に結核菌を吸入した場合に生じるが、細胞性免疫の発現により感染防御が成立し、90% の感染宿主は発病を回避できる。空気感染した結核菌は肺マクロファージに貪食され、マクロファージとともに肺門リンパ節に移行する。未活性化マクロファージは抗菌活性を発揮できず、結核菌はマクロファージ内で発育・増殖、マクロファージを破壊、そして、周囲の未感染マクロファージに感染する。この過程で、肺から血行を介して全身播種性感染に至ることもある。

感染約 4~6 週後、すなわちツベルクリン皮内反応が成立する時期、結核菌により活性化された T 細胞とマクロファージの相互作用により細胞性免疫が発現する。この機序に 3 経路が存在する。第 1 の経路は、Th1 細胞が IFN- $\gamma$  を分泌し、IFN- $\gamma$  はマクロファージを活性化し、活性化マクロファージは抗酸菌に対し殺傷能力を有する反応性窒素化合物 (NO, NO<sub>2</sub> や HNO<sub>3</sub>) を産生し、抗結核菌防御を誘導する。この現象は類上皮肉芽腫の形成にも関連している。第 2 の経路は、CD8 陽性 T 細胞、すなわち細胞傷害性 T 細胞が感染したマクロファージを破壊することにより、結核菌を殺傷する。第 3 の経路は CD4 および CD8 陰性 T 細胞がマクロファージを破壊し、その結果、破壊されたマクロファージは乾酪壊死を伴う肉芽腫を形成する。乾酪壊死病巣に存在する抗酸菌は酸性環境や低酸素のため、発育・増殖が抑制される。最終的に、一次感染病巣は肺実質と肺門リン