

健康者および結核患者の血清における らい菌フェノール性糖脂質の糖鎖と同じ構造を 持つ二糖および単糖に対する抗体の存在について

藤原 剛*¹・和泉 眞蔵*²

THE PRESENCE OF THE ANTIBODIES TO THE MONOSACCHARIDE
AND DISACCHARIDE WITH THE SAME STRUCTURES TO THOSE
OF THE PHENOLIC GLYCOLIPID I OF *Mycobacterium leprae*
IN HEALTHY AND TUBERCULOSIS SERA

Tsuyoshi FUJIWARA*¹ and Shinzo IZUMI*²

I. はじめに

1982年にHunterら¹⁾によってらい菌からフェノール性糖脂質(PGL I)が単離、構造決定されて以来その血清学的性質が多くの研究者によって研究されてきた²⁻⁶⁾。特に糖鎖の化学合成が成功した事³⁻⁶⁾によって多数の血清試料を詳細に検討することが可能になった。その結果PGL Iの糖鎖、特に三糖全体を合成し、血清アルブミン(BSA)に結合させた合成抗原(NT-P-BSA)⁴⁾がらい菌の感染を血清学的に診断するための道具としてきわめて有効であることが明らかになり^{4,7,8)}、現在ではこの合成抗原を用いたELISAやセラチン粒子凝集法が実用化されている⁸⁾。

しかしこの方法は健康者血清に対して数%の偽陽性を示し^{4,7)}、この点を改善する必要がある。合成抗原を用いた研究の過程でフェノール性糖脂の糖鎖のうちで非還元末端の糖である3,6-di-O-methyl- β -D-glucopyranoseがその特異性の決定に重要な役割を果たしていることが明らかになっている⁹⁾。しかしそれ以外の二つの糖2,3-di-O-methyl- α -D-rhamnopyranoseと3-O-methyl- α -D-rhamnopyranoseに対する抗体も存在し、これが偽陽性の原因となっている可能性があるのでこの点について検討をした。

II. 結果と考察

1. 抗原の合成

PGL Iの糖鎖の部分構造に対する抗体を検出するために還元末端からそれぞれ一糖残基ずつ順次結合させた単糖(IM-P-BSA)、二糖(ID-P-BSA)および三糖抗原(NT-P-BSA)を用いて種々の由来の血清について血清学的活性を調べた。このうちIM-P-BSAとNT-P-BSAについては既報⁴⁾にしたがって合成した。

平成3年5月23日受理 奈良大学自然科学教室*¹・国立多摩研究所*²

Institute for Natural Science, Nara University*¹ and National Institute for Leprosy Research*².

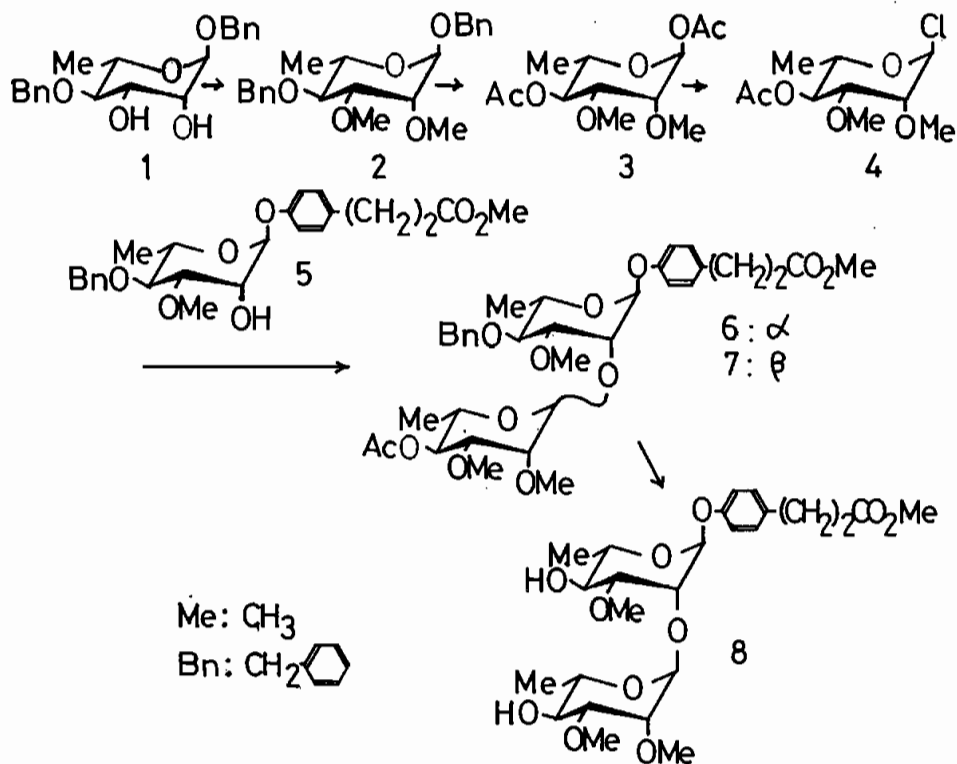


図-1. ID-Pの合成経路

ID-Pの合成経路を図-1に示す。即ちbenzyl 4-O-benzyl- α -D-rhamnopyranoside (1) をdimethylformamide (DMF) 中BaOとBa(OH)₂の存在下にCH₃I でメチル化し2をえた。つづいて2をpalladium/carbonを触媒にして加水素分解で脱ベンジルし、つづいてこれをアセチル化して3を得た。収率はほぼ定量的であった。3をtoluene-trimethylsilyl chloride (10:3) 中で封管を用いて120℃で加熱しクロル化して4を得た。このクロル化反応はかなり起こりにくく6時間を要したが、生成物は比較的安定で6時間後でもごく少量の分解物しか認められなかった。そこで反応生成物を活性炭処理しただけでそれ以上の精製はせず次の縮合反応に用いた。

4と、既報⁴⁾によって合成した5をsilver triflateと1,1,3,3-tetra-N-methylureaの存在下でdichloromethaneの中で一夜攪拌したところで、シリカゲルTLC (benzene-acetone 4:1) でR_f 0.36の主生成物6とR_f 0.33の副生物7が認められた。両者をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分別し[α]_D, NMRによって構造を決定した。両者のNMRは、互いに良く似ており6も7も4と5の縮合した(1→2)結合の二糖であることを示したが、アグリコンのフェニルプロトン、アノメリックプロトン、メトキシプロトンなどに違いがあり互いにアノメリックエピマーであることを示唆した。6の[α]_Dは-43.2°、7の場合は-3.5°で6は α

体であり7はβ体である事を明瞭に示した。この反応ではα体とβ体の比は約3：1でα体に選択性がかかり保持されていた。これは3,6-di-O-methylglucoseのperacetateの場合そのクロライドを同一の条件下で縮合させた場合のα体とβ体の量比(約4：1)に近い数値であった。収率は合わせて約55.1%でKoenigs-Knorr反応としてはかなり良い数値であった。一般にハライドの2位がエーテルで隣接基関与がない場合ハライドは非常に不安定になり収率が悪くなるうえに立体選択性もなくなる事が分かっているが⁹⁾この場合クロライドはプロマイドよりも安定なため、収率、選択性ともに良くなったものと考えられる。6を脱アセチル化し、つづいて脱ベンジルして目的の二糖、ID-P(8)を得た。8の構造はNMRにおいては5.55ppm($J_{1,2}$ 1.99Hz)と5.20ppm($J_{1,2}$ 1.67Hz)に二つのアノメリックシグナルを示した事によってα結合の二糖であることを確認した。NMRスペクトルの他のシグナルも8が所期の化合物ID-Pであることを強く支持した。合成されたID-Pはこれをhydrazine monohydrate中で攪拌してヒドラジッドに変換した後acyl azide法¹⁰⁾でBSAに結合させて二糖複合体ID-P-BSAを得た。この複合体は1molのBSA当たり32.5mmolのID-Pを含んでいた。

2. 合成抗原に対する抗体の検出

人血清中に存在する三種の合成抗原に対する抗体をELISAを用いて調べた(表-1)。

表-1. 合成抗原の種々の血清に対する反応性

血清	例数	陽性数及び陽性率		
		NT-P-BSA	ID-P-BSA	IM-P-BSA
らい	33	23 (69.7)	22 (66.7)	15 (45.5)
結核	15	1 (6.7)	11 (73.3)	9 (60.0)
健康者	60	5 (8.0)	29 (48.3)	22 (36.7)

()は陽性率を示す。

この場合らい感染の血清診断は主としてIgMクラスについて行なわれているので本実験でもperoxidaseの標識抗体は抗IgM抗体を用いた。血清は健康者60例、らい患者33例および結核患者15例である。

NT-P-BSAに対してはらい患者血清で69.7%、結核患者で6.7%、健康者で8.0%の陽性率でこれまで報告されたデータとよく一致した。^{7,8)}この事は実験が正常に行なわれている事を示している。ID-P-BSA及びIM-P-BSAに対してはらい患者ではそれぞれ66.7%、45.5%、結核患者ではそれぞれ73.3%、60.0%と高い陽性率を示した。NT-P-BSAは結核患者や健康者の血清に対して非特異的に反応する率は表-1から8%以下である。従ってID-P-BSAやIM-P-BSAに対する高い陽性率は、NT-P-BSAの非特異的な反応によるのではなく、らい菌のPGLの糖鎖の一部、例えばO-(2,3-di-O-methyl- α -L-rhamnopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-3-O-methyl- α -L-rhamnopyranose (ID-P-BSAの糖鎖と同じ)に対応する抗体が健康者にも結核患者にも存在していることを意味している。一方らい菌のPGL Iを持つ人、即ちらい菌の感染を受けた人が健康者や結核患者の中にこれ程高率に存在するとは考えられない。従ってID-P-BSAやIM-P-BSAに陽性の血清を持つ人はID-P-BSAやIM-P-BSAの糖鎖と同じ構造

を持つ物質を抗原として持っている可能性が高い。この事は表-1の実験でNT-P-BSAに対して陽性を示した健康者の5例の血清がいずれもID-P-BSAもIM-P-BSAにも高い活性を示したことから支持される。

この考えを証明するためにNT-P-BSAとIM-P-BSAに陽性を示した血清の内かららい患者血清6例、結核患者血清2例についてNT-P-BSAとID-P-BSAを用いたゼラチン粒子凝集法で吸収試験を行なった。即ちテスト血清をID-P-BSAまたはNT-P-BSAで感作したゼラチン粒子で吸収しID-P-BSAまたはNT-P-BSAを抗原として、残存する血清学的活性を凝集法によって測定した。結果を表-2に示す。テストした血清の全例でID-P-BSAに対する活性はすべてID-P-BSAで強く吸収されたが、NT-P-BSAでは全く吸収されなかった。

表-2 ID-P-BSAに対して陽性を示す血清のID-P-BSA, NT-P-BSAによる吸収試験

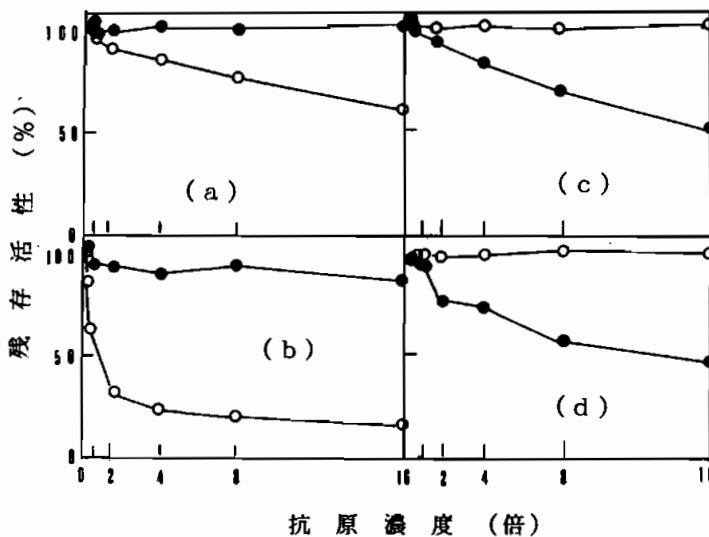
血清	テスト 粒子	吸 収 粒 子		
		なし	ID-P-BSA	NT-P-BSA
らい A	ID-P-BSA	1 2 6	3 2	1 2 6
	NT-P-BSA	< 1 6	< 1 6	< 1 6
らい B	ID-P-BSA	3 2	1 6 _w	6 4 _w
	NT-P-BSA	1 6	1 6	< 1 6
らい C	ID-P-BSA	3 2	< 1 6	3 2
	NT-P-BSA	< 1 6	< 1 6	< 1 6
らい D	ID-P-BSA	3 2 _w	< 1 6	3 2 _w
	NT-P-BSA	1 6	1 6	< 1 6
らい E	ID-P-BSA	5 1 2 _w	1 2 8 _w	5 1 2 _w
	NT-P-BSA	5 1 2	5 1 2 _w	2 5 6
らい F	ID-P-BSA	6 4 _w	1 6 _w	6 4 _w
	NT-P-BSA	1 2 8	1 2 8	6 4 _w
結核 A	ID-P-BSA	6 4	1 6	6 4
	NT-P-BSA	< 1 6	< 1 6	< 1 6
結核 B	ID-P-BSA	1 2 8 _w	3 2 _w	1 2 8 _w
	NT-P-BSA	< 1 6	< 1 6	< 1 6

血清学的活性は陽性を示す最大希釈倍数で示す。添字_wはweak positiveを示す

逆にNT-P-BSAに対する活性はNT-P-BSAでは吸収されるが、ID-P-BSAでは全く吸収されなかった。この事はNT-P-BSAに対する抗体はID-P-BSAを全く認識しないし、ID-P-BSAに対する抗体はNT-P-BSAの部分構造を認識しているのでもない事を強く示す。つまりこの二つの抗原は表-1の実験で強く示されたように、全く別の抗原であることを意味する。これはIM-P-BSAの場合にも当てはまるものと考えられる。

ところでゼラチン粒子によるテストはIgG抗体に対しては感度が低い事が知られている。そこでこの考えを更に確認するためにELISAによる阻害試験を行なった。IgG抗体の場合ID-P-BSAでコートしたプレートの活性はID-P-BSAで約50%阻害されたが、NT-P-BSAでは阻害されなかった。IgM抗体の場合でも同じ結果がより明瞭に認められた(図-2a,b)。NT-P-BSA

図-2. ELISA阻害試験



ID-P-BSA(a,b)またはNT-P-BSA(c,d)でコートしたプレートにID-P-BSAにもNT-P-BSAにも陽性を示す血清を加えて保温した後洗浄し種々の濃度のID-P-BSA (○-○) またはNT-P-BSA (●-●) を加えて保温、洗浄し、残存する活性を酵素標識 IgG(a,c)またはIgM(b,d)抗体を用いて測定した。抗原濃度はプレートに塗布した抗原の濃度 (0.085nM) の倍数で示した。

でコートしたプレートの活性はIgG抗体の場合でもIgM抗体の場合でもNT-P-BSAでは阻害されたがID-P-BSAでは全く阻害されなかった(図-2c,d) これらの実験結果はID-P-BSAを認識する抗体とNT-P-BSAを認識する抗体は全く別の物であるという考えを強く支持している。

また表-1の実験でID-P-BSA、IM-P-BSAに対して高い陽性率を示す結核血清や健康者血清がNT-P-BSAには反応性が非常に低かったのに反してらい患者血清の場合のみNT-P-BSAに高い活性を示したのは、共通の抗原であるID-P-BSAの糖鎖にさらに非還元末端の糖である3,6-di-O-methylglucoseが結合することでらい菌に対する特異性が確保されると考えられる。この事は単クローン抗体を使った実験や、特異性の発現に3,6-di-O-methylglucoseが決定的な役割を果しているという報告³⁾と良く一致する。一方らい菌 (*M. leprae*) や結核菌 (*M. tuberculosis*) の属する抗酸菌 (Mycobacteria) の中で *M. tuberculosis*,¹¹⁾ *M. bovis*,¹²⁾ *M. marinum*,¹³⁾ *M. kasasii*¹⁴⁾ などにはらい菌のPGLと同一のphithiocerol dimycolate

を脂質部分に持ち、互いに良く似た構造の糖鎖を持つPGLが存在することが知られている。これらのことを考えあわせるとらい患者、結核患者、健康に共通に存在する二つの抗原物質はID-P-BSA, IM-P-BSAの糖鎖と同一の糖鎖を持つPGLである可能性が高い。健康者にPGLが存在するのは血清を採取した成人は日本人の場合大部分の人が、*M. tuberculosis*の感染を受けているかBCGを接種しているためと考えられる。この実験では*M. leprae*と*M. tuberculosis*についてのみ考えたがこの二つの抗原物質はMycobacteria一般に存在する可能性が高く、菌体のchloroform-methanol抽出物等を注意深く調べれば、検出できるものと思われる。

III. 実験の部

1. 合成

TLCはsilica gel 60 F-254 (0.25mm) を用いbenzene-acetone (A; 16:1, B; 8:1, C; 4:1, D; 2:1) で展開した。[α]_DはHoriba SEPA 2000旋光計で、NMRはHitachi R-24B (60MHz) で測定した。重要なシグナルのみ記載する。

a. *Benzyl 4-O-benzyl-2,3-di-O-methyl- α -rhamnopyranoside* (2). --- 4gの1をdimethylformamide (32ml) 中で4.9mlのmethyl iodide, 5.04gのbarium oxidおよび1.93gのbarium hydroxideの存在下に約35℃で一晩攪拌した。chloroformで二倍に希釈し不溶物をろ去した。ろ液を水、飽和NaHCO₃、水で順次洗い乾燥、乾固した。これをシリカゲルカラムに添加しchloroform-hexane (1:1) で溶出される部分を集めた (2, 2.36g, 6.34 mmole, 54.5%); Rf 0.66 (溶媒A); NMR (chloroform-*d*): δ 7.3 (10H, Phex₂), 4.88 (1H, d, $J_{1,2}$ 1.5Hz, H-1), 3.4 (6H, s, OMeX₂), 1.25 (3H, d, $J_{5,6}$ 7.5Hz, Rha-Me).

分析. 計算値 (C₁₈H₂₈O₆): C 63.97; H 9.40, 実測値: C 63.82; H 9.65%.

b. *1,4-Di-O-acetyl-2,3-di-O-methyl- α -rhamnopyranose* (3). --- 2.36gの2を30mlのethanolに溶かしpalladium/carbon (5%, 300mg) を加えて、約35℃で一晩攪拌した。palladium/carbonをろ別し、ろ液を濃縮した。これにpyridine-acetic anhydride (1:1, 20ml)を加えて、室温で一晩アセチル化した。得られたアセチル化物はシリカゲルカラムで精製して3をえた (1.73g, 6.2mmole, 98.9%); Rf 0.53 (溶媒B); NMR (chloroform-*d*): δ 6.16 (1H, $J_{1,2}$ 0Hz, H-1), 5.07 (1H, t, $J_{3,4}=J_{4,5}$ 9.8Hz, H-4), 2.13, 3.45 (3HX₂, OA₂), 2.15, 2.08 (3HX₂, OMe), 1.17 (3H, d, $J_{5,6}$ 8.5Hz, Rha-Me).

分析. 計算値 (C₂₂H₂₀O₇): C 52.17; H 7.30, 実測値: C 52.29; H 7.43%.

c. 3のクロル化. --- 650mgの3をtoluene 8mlに溶かし2.4mlのtrimethylsilyl chlorideを加え約100℃で6時間加熱した。tolueneを加えつつ濃縮を繰り返し残存するtrimethylsilyl chlorideを除いた。これをtolueneに再度溶かして活性炭処理を行って4を得た (550 mg, 1.83mmole, 77.8%).

d. *p-(2-Methoxycarbonyl)ethyl phenyl 4-O-benzyl-3-O-methyl-2-O-(4-O-acetyl-2,3-di-O-methyl- α -rhamnopyranosyl)- α - and β -rhamnopyranoside* (6および7). --- 4 (550mg) をdichlorometane (2ml) にとかし、5 (420mg)、1,1,3,3-tetra-*N*-methylurea (550mg) およびsilver triflate (530mg) を加えて、室温で一晩反応させた。chloroformで二倍に希釈して不溶物をろ過した後、飽和NaHCO₃、水で洗い乾固した。これをシリカゲルカラムにかけ1% *t*-butanolを含むbenzeneで先に溶出される画分 (6, 283mg,

0.41mmole, 41.7%)と遅れて溶出される画分(7, 93mg, 0.13mmole, 13.4%)を集めた。

化合物6; $[\alpha]_D^{20} -43.2^\circ$ (c 2.21, chloroform); Rf 0.36 (溶媒C); NMR (chloroform-d): δ 7.45 (5H, CH₂Phe), 7.12 (4H, AB型, O-Phe-CH₂), 5.50 (1H, d, $J_{1,2}$ 1.7Hz, H-1), 5.21 (1H, d, $J_{1,2}$ 1.7Hz, H-1'), 3.68 (3H, s, COOMe), 3.58 (6H, OMeX2), 3.51 (3H, OMe), 3.0-2.4 (4H, m, CH₂CH₂), 2.08 (3H, OAc), 1.28 (3H, d, J 6.3 Hz, Rha-Me), 1.15 (3H, d, J 8.1Hz, Rha-Me).

分析. 計算値 (C₃₄H₄₆O₁₂): C 63.14; H 7.17, 実測値: C 63.24; H 7.06%.

化合物7; $[\alpha]_D^{20} -3.5^\circ$ (c 3.08, chloroform); Rf 0.33 (溶媒C); NMR (chloroform-d): δ 7.42 (5H, CH₂ Phe), 7.14 (4H, AB型, Phe), (1H, d, $J_{1,2}$ 0.7Hz, H-1), 3.71 (3H, s, COOMe), 3.68 (3H, s, OMe), 3.48 (3H, s, OMe), 3.32 (3H, s, OMe), 2.07 (3H, s, OAc), 1.23 (6H, d, J 6.1Hz, Rha-MeX2).

分析. 計算値 (C₃₄H₄₆O₁₂): C 63.14; H 7.17, 実測値: C 63.11; H 7.35%.

e. *p*-(2-Methoxycarbonylethyl) phenyl 3-O-methyl-2-O-(2,3-di-O-methyl- α -*r*-rhamnopyranosyl)- α -*r*-rhamnopyranoside (8). --- 化合物6 (283mg) を5mlのmethanolに溶かし終濃度0.1Mになるようにsodium methoxideを加えて2分間煮沸した。冷後Anmberlite IRI20 (H⁺) で中和し、乾固した。これを2mlのethanolに溶かしpalladium/carbon (5%, 80mg) を加え約35°Cで一晩攪拌した。palladium/carbonを除去し乾固してシリカゲルカラムに添加しbenzene-acetone 1:1で溶出される部分を集めて8を得た (165mg, 0.29mmole, 72.0%) Rf 0.07 (溶媒D); NMR (chloroform-d): δ 7.17 (4H, AB型, Phe), 5.54 (1H, d, $J_{1,2}$ 1.99z, H-1), 5.20 (1H, d, $J_{1,2}$ 1.67Hz, H-1'), 3.73 (3H, s, COOMe), 3.43 (3H, OMe), 3.55 (6H, OMeX2), 3.0-2.5 (4, m, CH₂CH₂), 2.88 (2H, broad, OHX2), 1.33 (6H, Rha-MeX2).

分析. 計算値 (C₂₅H₃₈O₁₁): C 58.35; H 7.44, 実測値: C 58.63; H 7.62%.

2. 血清学

a. ELISA. --- peroxidase標識抗体としてヒト μ 鎖特異マウス抗IgMを用い既報⁷⁾に従って行なった。

b. 吸収試験. ---ゼラチン粒子凝集法によった。50 μ lの試料血清に350 μ lのID-P-BSAまたはNT-P-BSAで感作したゼラチン粒子 (再構用緩衝液で1%にけん濁する。)を加え20分間室温で吸収した後上清を富士レビオ製のU型凝固反応用プレートに移し既報⁸⁾に従って凝集反応を行なった。

c. ELISA阻害試験. ---NT-P-BSAまたはID-P-BSAでコートしたプレート (糖として0.315nM, 50 μ l) にNT-P-BSAにもID-P-BSAにも陽性の血清 (50 μ l, 300倍希釈) を加え37°C, 60分保温した。洗浄後種々の濃度 (0.078-5.04nM) のID-P-BSAまたはNT-P-BSAを加え37°Cで60分保温し洗浄後残存する活性をELISAで測定した。

IV. 謝 辞

本研究は一部奈良大学特別研究費によって行なわれた。深謝する。

文献

1. Hunter, S. W. et al.: Structure and antigenicity of the major glycolipid of *Mycobacterium leprae*. *J. Biol. Chem.*, 257, 15072-15078 (1982).
2. Young, D. B. and Buchanan, T.: A serological test for leprosy with a glycolipid specific for *Mycobacterium leprae*. *Science*, 221, 1057-1059 (1983).
3. Fujiwara, T. et al.: Chemical synthesis and serology of disaccharides and trisaccharides of phenolic glycolipid antigens from the leprosy bacillus and preparation of a disaccharide protein conjugate for serodiagnosis of leprosy. *Infect. Immun.*, 43, 245-252 (1984).
4. Fujiwara, T. and Izumi, S.: Synthesis of the neoglycoconjugates of phenolic glycolipid-related trisaccharide for the serodiagnosis of leprosy. *Agric. Biol. Chem.*, 51, 2539-2547 (1987).
5. Chatterjee, D. et al.: Chemical synthesis and seroreactivity in leprosy of *O*-(3,6-di-*O*-methyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2,3-di-*O*-methyl- α -L-rhamnopyranosyl)-(1 \rightarrow 9)-oxynonanoyl-bovine-serum-albumin—the specific disaccharide-octyl-neoglycoprotein. *Carbohydr. Res.*, 156, 39-56 (1986).
6. Brett, S. J. et al.: Analysis of the major antigenic determinants of the characteristic phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae*. *Clin. Exp. Immunol.*, 56, 89-96 (1984).
7. Chanteau, S. et al.: Comparison of synthetic antigens for detecting antibodies to phenolic glycolipid I in patients with leprosy and their household contacts. *J. Infect. Dis.*, 157, 770-776 (1988).
8. Izumi, S. et al.: Novel gelatin particle agglutination test for leprosy in the field. *J. Clin. Microbiol.*, 28, 525-529 (1990).
9. Paulsen, H.: Advances in selective syntheses of complex oligosaccharides. *Angew. Chem. Internat. Edit.*, 21, 154-224 (1982).
10. Lemiux, R. et al.: The properties of a "synthetic" antigen related to human blood-group lewis a. *J. Am. Chem. Soc.*, 97, 4076-4083 (1975).
11. Daffé, M. et al.: Structure of the major triglycosyl phenol-phithiocerol of *Mycobacterium tuberculosis* (strain caneti). *Eur. J. Biochem.*, 167, 155-160 (1987).
12. Demarteau-Ginsberg, H. and Lederer, E.: Sur la structure chimique du mycoside B. *Biochim. Biophys. Acta*, 70, 442-451 (1963).
13. Ville, C. and Gastambide-Odier, M.: Le 3-*O*-méthyl-L-rhamnose, sucre isolé du mycoside G de *Mycobacterium marinum*. *Carbohydr. Res.*, 12, 97-107 (1970).
14. Fournié, J.-J. et al.: Structural elucidation of the major phenolic glycolipid from *Mycobacterium kansasii*. *J. Biol. Chem.*, 262, 3174-3179 (1987).