

ムラミルペプチドによるモルモット マクロファージの活性化と分化に関する研究

永尾 重喜

鹿児島大学 歯学部 歯科薬理学教室

Activation and Differentiation of Guinea pig Macrophage by Muramyl Dipeptide

Shigeki Nagao

Department of Pharmacology
Kagoshima University Dental School,
8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima 890, Japan

Abstract

Muramyl dipeptide (MDP) is a minimal structure necessary for various biological activities of bacterial cell wall peptidoglycans. MDP induces in guinea pigs the granulomas containing macrophages and epithelioid cells differentiated from macrophages. This suggests that MDP differentiates macrophages into epithelioid cells. This study was undertaken to gain an insight into the mechanism of activation and differentiation of macrophage induced by MDP. For this purpose, the effect of MDP on macrophage DNA synthesis was studied in view of the generally accepted fact that DNA synthesis is decreased when cells differentiate.

Guinea pig peritoneal exudate macrophages actively incorporated ^3H -thymidine into trichloroacetic acid soluble fraction in vitro without macrophage proliferating factors. The incorporation of ^3H -Thymidine was almost completely inhibited by aphidicolin, an inhibitor of DNA polymerase- α and an autoradiograph showed heavy labeling in nuclei of about 20% of macrophage populations. These results indicate that the observed thymidine incorporation reflected a DNA synthesis for replication.

When macrophage was stimulated by MDP, the ^3H -Thymidine incorporation was markedly suppressed while ^{14}C -glucosamine incorporation and production of monokine were increased. The suppression of ^3H -thymidine incorporation by MDP was not due to the decrease in thymidine transport through the cell membrane. An autoradiograph revealed that MDP decreased markedly the number of macrophages whose nuclei were labeled by ^3H -Thymidine. These results indicate that suppression of ^3H -thymidine incorporation by MDP was due to a true inhibition of DNA synthesis. Among the three

tested enzymes involved in DNA synthesis, only thymidine kinase activity decreased progressively in parallel with the decline in ^3H -Thymidine incorporation. Cyclic AMP and PGE_2 , both of which are increased in amount in macrophage by MDP stimulation, suppressed DNA synthesis of macrophage. Phorbol myristic acid (PMA), ionomycin and debutyryl cyclic GMP failed to affect the ^3H -Thymidine incorporation. Inhibitors of cyclic AMP-dependent protein kinase considerably reduced the suppressive effect on ^3H -Thymidine incorporation. These results suggest that cyclic AMP or cyclic AMP-dependent protein kinase might be play an important role in suppression of ^3H -Thymidine incorporation. Concerning various analogs of MDP, a close correlation was observed among the capacities of activating macrophages, suppressing DNA synthesis and inducing epithelioid granuloma formation. These findings suggest that suppression of DNA synthesis by MDP may be induced by macrophage activation and represent an initial event during the differentiation of macrophage for epithelioid cells.

Key words

Bacterial cell wall peptidoglycan, Muramyl dipeptide, Adjuvant activity, Macrophage activation, Epithelioid granuloma.

I. はじめに

医学的知識が乏しかった時代、人類は感染症に悩まされ続けていた。特に、結核症は第二次世界大戦後、抗結核剤が開発されるまで「死の病」として恐れられる国民病であった。先進国は国の威信をかけてこの病の撲滅に努めた。それ故1882年、Robert Kochが結核菌を発見して以来、多くの研究者によって、結核菌に関する種々の研究がなされた。その種々の研究から、1920年代、結核病巣内に蛋白抗原を注射すると、その抗原に対する特異免疫応答が強まることが発見され¹⁾、人類は「結核菌がヒトを殺すだけでなく、用い方によっては免疫アジュバント（免疫助剤）²⁾になる」ことを知り、この現象の解明を始めた。しばらくの間、生菌免疫でなければ免疫応答の増強は生じないと考えられていたが、1940年代、Freundは結核菌死菌体を鉱物油中に浮遊させた、いわゆる「フロイントの完全アジュバント」を完成させた²⁾。

その後、結核菌体からアジュバント活性を有する物質の抽出精製が試みられる過程で、結核菌は他の細菌と比較して多量の脂質を含有し、その含量は乾燥菌体重量の40%以上に達することが明らかにされた。さらに、この脂質中には多くの分枝脂肪酸が含まれており、これは哺乳類の細胞には全く含有されていない結核菌に特異的な脂肪酸であることがわかった。この脂肪酸を含有している成分中に結核菌特有の極めて興味ある生物学的活性を発揮する物質が存在しており、結核菌

が示すアジュバント活性の担い手である Wax D もその脂肪酸を含有する代表的な物質である事が明らかにされた。しかしながら、結核菌アジュバント有効成分の主要な部分はこの脂肪酸部分ではなく、細菌細胞壁ペプチドグリカンであるということが明らかにされた。さらに研究が進み、ムラミルジペプチドがその活性の最少有効成分であることが確定した。1924年、Lewisらが結核菌によるアジュバント活性なるものを報告して50年後のことであった。

本稿を始めるにあたり、前述した部分と若干重複するが、アジュバント開発にたずさわった者としては重要な点なので、IIおよびIIIで結核菌アジュバント物質の本体が明らかにされるまでの研究過程をできるかぎり正確に述べておきたい。

II. 結核菌体中のアジュバント活性物質の分画精製

長い間、結核菌体中のアジュバント活性発現に必要な因子を明らかにすることはできなかった。アジュバント活性とは無関係な研究領域において Anderson, Lederer, Asselineau ら有機化学者は結核菌体中の脂質の研究を行い、特徴的に多量の脂質を含有していることを報告し、さらに菌体脂質の分画を行った。彼らはクロロホルム可溶で熱アセトン不溶画分を Wax D と名付けた³⁾。Raffelはこの画分にアジュバント活性が認められることを見出した⁴⁾。この Wax D 画分は田中らのアセチル化法⁵⁾、Jolles らの遠心法⁶⁾、Ribi

注1) 免疫アジュバントとは抗原に対して特異的な免疫応答を量的、質的に増強あるいは修飾する物質と定義されている。免疫アジュバントには多種多様な物質が知られているが、その中でも結核菌は最も強力なアジュバント物質の1つである。

らの遠心クロマト法⁷⁾により、さらにいくつかの画分に分画された。小谷と田中との共同研究により完全脱脂菌体の BCG 細胞壁 (有機溶媒抽出残渣、Cell Wall Skeleton, CWS) に Wax D と同一構造があることを見出し、彼らはこれを「結合 Wax D」と名付けた⁸⁾。Wax D は結核菌の細胞壁と基本的に同じ構造を持ち、その中に種々の細菌細胞壁と共通の構造部分 (ペプチドグリカン) が含まれていることが判明している (図 1)。図 1 に示すように、アジュバント活性を有する Wax D はミコール酸 (抗酸菌に特徴的な脂肪酸で、とくに結核菌のミコール酸は炭素数 78~88、 α 位で分枝し、 β 位に水酸基を持つ高級脂肪酸) と多糖体 (アラビノースとガラクトースの重合したアラビノガラクトタン) とペプチドグリカンよりなる「複合体」である。結核菌にしかないミコール酸はアジュバント活性発現に必須な構成成分であろうと考えられていた⁹⁾。

プチドグリカンの構造及びペプチドグリカンによる菌属、菌種の分類を精力的に研究されていた小谷教授 (当時大阪大学歯学部細菌学講座) からこれらの物質のアジュバント活性を調べてほしいとの依頼を受けた。予想に反して、ミコール酸等の脂肪酸を含有しないグラム陽性菌の細菌細胞壁成分のいくつかにアジュバント活性が認められた。また BCG および *Mycobacterium smegmatis* の脱脂精製細胞壁から卵白リゾチームなどの酵素処理、あるいは水素添加分解などで得られたアラビノガラクトタンとペプチドグリカンより成る水溶画分にアジュバント活性が認められた。これら二つの事実からミコール酸の必要性は否定された¹⁰⁾。細菌細胞壁ペプチドグリカンとは N-アセチルグルコサミンと N-アセチルムラミン酸の β -1, 4 結合により、交互に連なってできたグリカン鎖がペプチドの橋により網目状に架橋された構造である (図 1)。この強固なペプチドグリカン構造は細菌に特有で、また殆どすべての細菌の細胞壁に共通して存在し袋状になっている。このペプチドグリカン構造がアジュバント活性を示すことが明らかにされたことは、免疫アジュ

Ⅲ. アジュバント活性発現に Wax D の全構造が必要か否か

この問題について長い間検討された。細菌細胞壁ペ

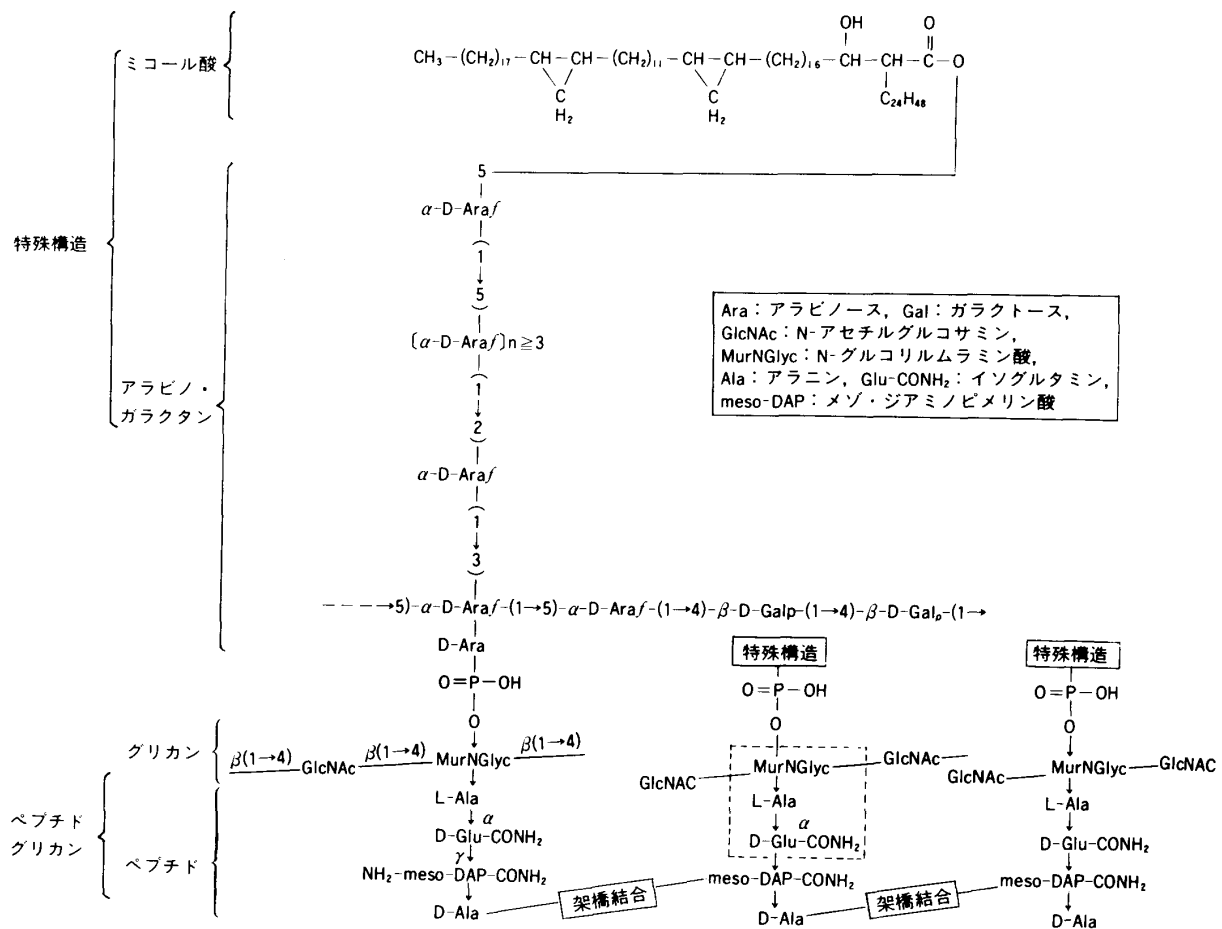


図 1 Wax D の化学構造

バントの研究において特に重要な発見であった¹¹⁾。さらにアジュバント活性の本体（活性中心）を決定するための研究が続けられ、次第に、より低分子の水溶性ペプチドグリカンフラグメントを用いてアジュバント活性の有無が調べられ、アジュバント活性発現に必要な最少有効構造について慎重な検討がなされた。

1974年、Lederer らはジサッカライドテトラペプチド (N-acetylglucosaminyl-N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-meso-diaminopimeryl-D-alanine) が本活性を有することを報告した¹²⁾。さらに同年、彼らはβ-1, 4結合を切断する酵素やペプチド鎖を切断する種々の酵素を用いて N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (ムラミルジペプチド, MDP) にアジュバント活性があることを見出し、有機化学的手法でこれを合成し、この MDP がアジュバント活性を有する最少有効構造であることを確定した¹³⁾ (図 2)。

他方、小谷らもまた Lederer らの研究とは独立にほぼ同時期に一般細菌の細胞壁と生物活性に関する広範な研究を展開していた¹⁴⁾。主に Streptomyces 属、Staphylococcus 属が産生する細菌細胞壁溶解酵素を用いてペプチドグリカン低分子を分解し、アジュバント活性および種々の生物活性の有無を検討した。最終段階では芝ら合成グループとの共同研究により

MDP を合成し、1975年に Lederer らと同様の結論を発表した¹⁵⁾。即ち、MDP が抗原とフロイント不完全アジュバントとともに油中水型エマルジョンの形でモルモットの足蹠に注射された時、その抗原に対する抗体産生の増強と細胞性免疫（遅延型皮膚反応）が成立した。Wax D の示すアジュバント活性はペプチドグリカン層にあり、その活性中心は図 1 に点線で示すムラミン酸に 2 個のアミノ酸（その 1 つが D 体で哺乳類の構成タンパクに含まれないアミノ酸）が結合したものであることを確立した^{注 2)}。

著者らは小谷らとの共同研究によりアジュバント活性発現のメカニズムを解明すべく、「マクロファージ

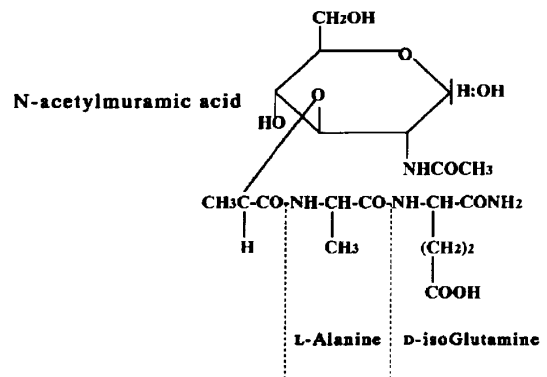


図 2 MDPの化学構造

注 2) MDP はアジュバント活性以外にもペプチドグリカンが示す種々の生物学的活性を有している (表 1、2)。MDP は水溶性で細胞毒性や抗原性を有さないため、免疫・炎症などの生体防御に関する種々の現象のメカニズムを in vitro で解析する際に特に有用な物質であり、また MDP の類似体、誘導体の合成も可能であり、MDP が示す生物学的活性の解析を大いに助けている。

表 1 細菌細胞壁ペプチドグリカンあるいはMDPが有する生物学的活性 (生体内に投与した際に認められる作用)

1. 特異的免疫応答の修飾 (アジュバント活性)
2. 非特異的生体防御反応の増強
3. サイトカイン産生の増強
4. 細網内皮系細胞の活性化
5. 一過性の白血球減少症とそれに続く白血球増多症の誘導
6. 単核球増多症の誘導
7. 実験的自家免疫疾患の誘導
8. 神経薬理作用 (発熱作用, 睡眠作用, 鎮痛作用, 血圧低下作用)
9. 類上皮細胞肉芽腫の誘導
10. 結核菌注射部位での壊死性反応惹起活性^{a)}
11. 遅延型皮膚反応の修飾^{a)}
12. 細菌内毒素 (LPS) 毒性に対する感受性増強作用^{a)}
13. LSPによるサイトカイン産生誘導をprimeする作用^{a)}
14. 血清中の補体成分変動^{b)}
15. 組織病変惹起^{b)}

小谷らのまとめを参考にし改編した^{22,79)}。

a) MDPによって効率よく惹起される反応

b) MDPでは少なくとも効率よくは惹起されない反応

表 2 細菌細胞壁ペプチドグリカンあるいはMDPが有する生物学的活性 (試験管内で認められる作用)

1. 単核球とマクロファージの活性化
2. Bリンパ球の分裂促進
3. Tリンパ球の分裂促進
4. ナチュラルキラー細胞の活性化
5. 好中球の活性化
6. 線維芽細胞の分裂促進
7. 破骨細胞、骨吸収の増強
8. 好塩基球へのヒスタミン取り込み増強
9. 肥満細胞のヒスタミン放出増強^{a)}
10. 血小板からのセロトニン放出増強^{a)}
11. 補体系の活性化^{a)}

小谷らのまとめを参考にし改編した^{22,79)}。

a) MDPでは少なくとも効率よくは惹起されない反応

とMDPとの関わり」に的を絞り研究を行い、いくつかの新しい知見を得たのでそのことについて述べる。

IV. MDPと6-O-アシル誘導体による結核結節（類上皮細胞肉芽腫）形成

結核菌体あるいはMDPに蛋白質抗原を混じてフロイントの油中水型乳剤にしてモルモット足蹠に注射すると、2～3週後に遅延型皮膚反応が成立する。遅延型過敏症が成立する場合、必ず所属リンパ節が腫脹することを経験的に知っていたので、著者らはこのようなリンパ節の腫脹がアジュバント活性発現（特に遅延型過敏症発現）に必要な否か、またMDP単独をフロイントの油中水型乳剤にして投与した場合でもリンパ節の腫脹が生じるのか、さらにその場にどのような細胞が出現してくるかに興味をもった。

一般に、肉芽腫とは種々の炎症細胞、特にマクロファージ、が限局性に何らかの配列を示しながら集まっている状態をいう¹⁶⁾。肉芽腫の中でマクロファージから分化したと考えられる類上皮細胞を、主な構造細胞群とするものが類上皮細胞肉芽腫と呼ばれる¹⁷⁻¹⁹⁾。類上皮細胞肉芽腫を作る疾患には、結核症のように原因がはっきりしているものに加えて、サルコイドーシスやCrohn氏病のように病因が現在でも不明なものがある。結核症の病理組織学的変化を特徴づける類上皮細胞肉芽腫の形成にあずかる化学物質に関する研究は、結核菌のクロロホルム抽出物を用いて結核結節を作っ

た1900年のAuclairのそれにさかのぼる²⁰⁾。以来、数多くの研究が相続いたが、なかでもSabinのフチオン酸を形成因子に擬した研究は歴史的に名高い²¹⁾（表3）。しかし、結核菌より抽出したフチオン酸は類上皮細胞肉芽腫の形成に数mg、時として100mg以上の大用量を必要とすることから、Sabinの研究は過去のものとして省みられなくなり、類上皮細胞肉芽腫が形成される機序もまた不明のままである。そこで、著者らは「類上皮細胞はマクロファージが活性化され分化した細胞である」ことに着目し、「MDPがマクロファージを直接活性化するであろう」との作業仮説を立て、MDPをフロイントの油中水型乳剤にしてモルモットおよびラットの足蹠に注射し、領域リンパ節の病理組織学的変化を調べた。その結果、典型的な類上皮細胞肉芽腫がMDP注射2～3週後に形成された²³⁾。MDPの油中水型乳剤注射によって形成された類上皮細胞肉芽腫は、結核菌死菌の油中水型乳剤注射によって形成されるそれとまったく区別がつかない病理組織像を示した²⁴⁾（図3）。MDPの類上皮細胞肉芽腫形成作用は高い化学構造依存性を示し、MDPのアナログのなかではアジュバント活性を有するもののみが、類上皮細胞肉芽腫を形成することを見出した。たとえば、D-イソグルタミン残基をL-イソグルタミンに置換したステレオアイソマー[MDP(L-isoGln)]、あるいは炭素原子が1個少ないD-イソアスパラギンに置換したアナログ[MDP(D-isoAsn)]は、ともにアジュ

表3 今までに提唱された結核結節形成因子

結核結節形成因子として提唱された物質	提唱した人	提唱された年代	組織像	注射量
クロロホルム抽出物	Auclair	1900 ～ 1930	肺結核の古典的病巣	50～200mg
磷脂質 フチオン酸 (C23～31分枝脂肪酸)	Anderson Sabin	1930 ～ 1940	肉芽腫	5～200mg
合成フチオン酸類似体 (25～27)	Robinson Polgar Cason Ungar	1940 ～ 1950	肉芽腫	2～200mg
Wax D	DeLaunay White	1951 ～ 1960	類上皮肉芽腫	40 μg
MDP分枝脂肪酸複合体	田中 江森 永尾	1980	類上皮肉芽腫	1 μg

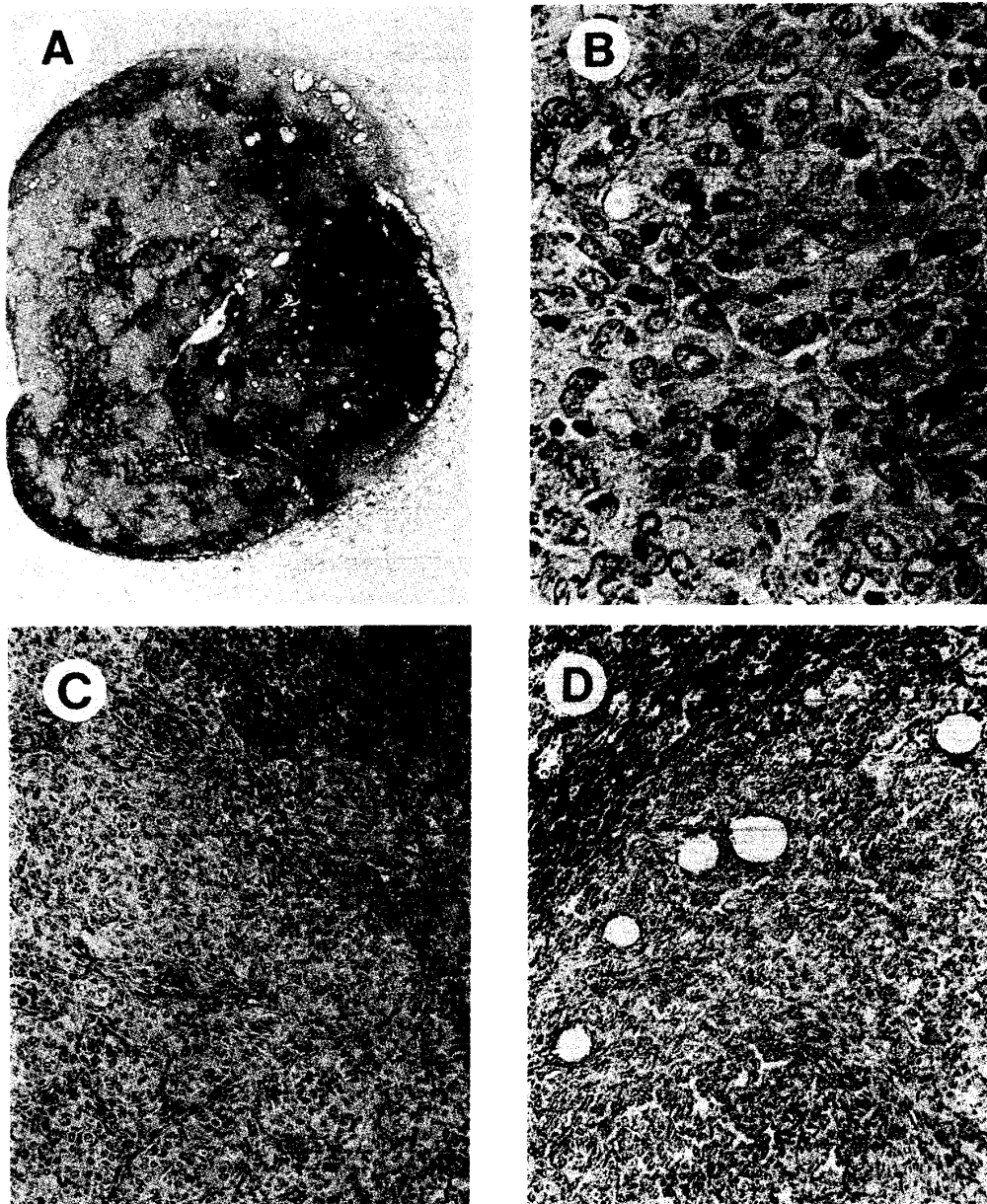


図3 MDPによる類上皮細胞肉芽腫形成能

MDP $0.1\mu\text{g}$ (A)、 $100\mu\text{g}$ (B,C)、結核菌死菌体 $100\mu\text{g}$ (D)を Freund の不完全アジュバントに混じ油中水型乳剤にしてモルモット足蹠に注射し、3週間後に領域リンパ節の病理組織学的変化を調べた。結核菌によって形成される類上皮細胞肉芽腫 (D) とまったく同様な肉芽腫が MDP によって形成された (A、B および C)。A ; $\times 8$ 、B ; $\times 300$ 、C ; $\times 100$ 、D ; $\times 100$ 、ヘマトキシリンエオジン染色 (H. E. 染色)。

バント活性を欠き、また、類上皮細胞肉芽腫形成能も示さなかった (表4)。

さて、MDP は油中水型乳剤として注射された場合には類上皮細胞肉芽腫形成作用を示すが、水溶液としての注射ではこの様な活性をまったく示さない²⁶⁾。この事実と関連して、MDP は蛋白抗原とともに油中水型乳剤としてモルモットに投与すると抗原に対する遅延型過敏症を誘導する作用を示すが、水溶性としての投与では無効であることが知られていた (表5)^{26, 27)}。

しかし、図4で示すように MDP のムラミン酸残基の6位に総炭素原子数30の α -分枝脂肪酸を結合した6-O-(2-テトラデシルヘキサデカノイル) MDP (B30MDP) は MDP とは異なり、油を含まない投与媒体 (たとえば、リン酸塩緩衝食水) を用いた場合にも強い遅延型過敏症誘導作用を示した²⁶⁻²⁸⁾。次いで、種々の6-O-アシル MDP の類上皮細胞肉芽腫形成能を調べた (図4、表5)。表5に示すように B30MDP、6-O-(2-ドコシルテトラコサノイル) MDP (B46MDP)、

表4 MDP および MDP 関連物質の生物活性

テ ス ト 物 質	<i>in vitro</i>		<i>in vivo</i> (フロイント型)	
	Mφ 活性化	DNA合成 抑制	アジュバント 活性 ^a	類上皮肉芽腫 形成能 ^b
MurNAc-L-Ala-D-isoGln	+	+	+	+
MurNAc-L-Ser-D-isoGln	+	+	+	+
MurNAc-D-Ala-D-isoGln	+	+	+	+
MurNAc-L-Val-D-isoGln	-	-	-	-
MurNAc-L-Ala-D-Gln	±	±	±	±
MurNAc-L-Ala-D-Glu	+	+	+	+
MurNAc-L-Ala-L-isoGln	-	-	-	-
MurNAc-L-Ala-L-Gln	-	-	-	-
MurNAc-L-Ala-L-isoAsn	-	-	-	-
MurNAc-L-Ala-D-isoGln-L-Lys	+	+	+	+
MurNAc-L-Ala-D-isoGln-L-Lys-D-Ala	+	+	+	+
Peptidoglycan fragment	+	+	+	+
Peptidoglycan	+	+	+	+
purified cell walls	+	+	+	+

- a) テスト物質と抗原をフロイント不完全アジュバントに混じ、モルモット足蹠に注射し、2週後に皮内反応を行い、アジュバント活性の有無を調べた。
 b) テスト物質をフロイント不完全アジュバントに混じ、モルモット足蹠に注射し、2～3週間後領域リンパ節の重量と類上皮細胞肉芽腫形成能^bを調べた。

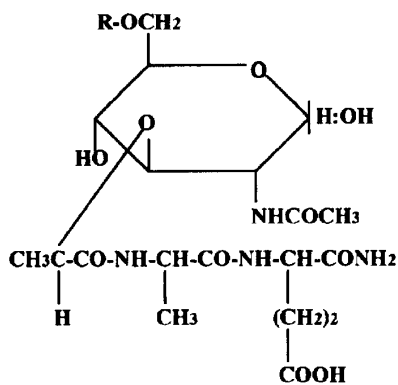
表5 MDPならびにその6-O-アシルMDPの生物活性

テ ス ト 物 質	<i>in vitro</i>		<i>in vivo</i> (水溶液)	
	Mφ 活性化	DNA合成 抑制	アジュバント 活性 ^a	類上皮肉芽腫 形成能 ^b
PBS	-	-	-	-
MDP	+	+	-	-
L18MDP	+	+	-	-
L30MDP	+	+	±	-
B30MDP	+	+	+	+
B30MDP (D-isoAsn)	-	-	-	-
B46MDP	+	+	+	+
BH48MDP	+	+	±	±
BH48MDP(L-isoGln)	-	-	-	-
BH48MDP (L-isoAsn)	-	-	-	-
N-MycMDP	+	+	+	+

- a) テスト物質と抗原を0.1% Tween 80添加リン酸塩緩衝食水に浮遊させモルモット足蹠に注射し、2週後に皮内反応を行い、アジュバント活性の有無を調べた。
 b) テスト物質を0.1% Tween 80添加リン酸塩緩衝食水に浮遊させモルモット足蹠に注射し、2～3週間後領域リンパ節の重量と類上皮細胞肉芽腫形成能^bを調べた。
 L30: 炭素原子数30個の直鎖脂肪酸、B30: 炭素原子数30個のα-分枝脂肪酸、B46: 炭素原子数46個のα-分枝脂肪酸、BH48: 炭素原子数48個のα-分枝-β-ヒドロキシ脂肪酸、N-Myc: ノカルドミコール酸

6-O-(3-ヒドロキシ-2-ドコシルヘキサコノイル) MDP (BH48MDP) とそのアナログ、あるいは天然α-分枝脂肪酸 (ノカルドミコール酸、総炭素原子数40～48個) をムラミン酸残基の6位に結合した6-O-アシル MDP のリン酸塩緩衝食水あるいは懸濁液をモルモットの足蹠に注射すると、これらの6-O-α-分枝アシル MDP がいずれも強い類上皮細胞肉芽腫

形成能を發揮し、なかでも B30MDP が特に強い作用を示した²⁵⁾ (表5、図5)。しかし、α-分枝脂肪酸 (B30) と MDP との単なる混合物はまったく肉芽腫形成能を示さなかった²⁵⁾。さらに総炭素原子数30の直鎖脂肪酸を MDP のムラミン酸残基の6位に結合させた6-O-トリコンタニール MDP (L30MDP) は、油中水型乳剤としての投与では遅延型過敏症誘導アジュ



MDP and its 6-O-acyl derivatives

Compound	R-
MDP	H-
L18MDP	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ CO-
B30MDP	$\begin{array}{l} \text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13} \\ \text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13} \end{array} \text{CHCO-}$
BH48MDP	$\begin{array}{l} \text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{CH}(\text{OH}) \\ \text{CH}_3(\text{CH}_2)_{21} \end{array} \text{CHCO-}$

図4 MDPと6-O-Acyl MDPの化学構造

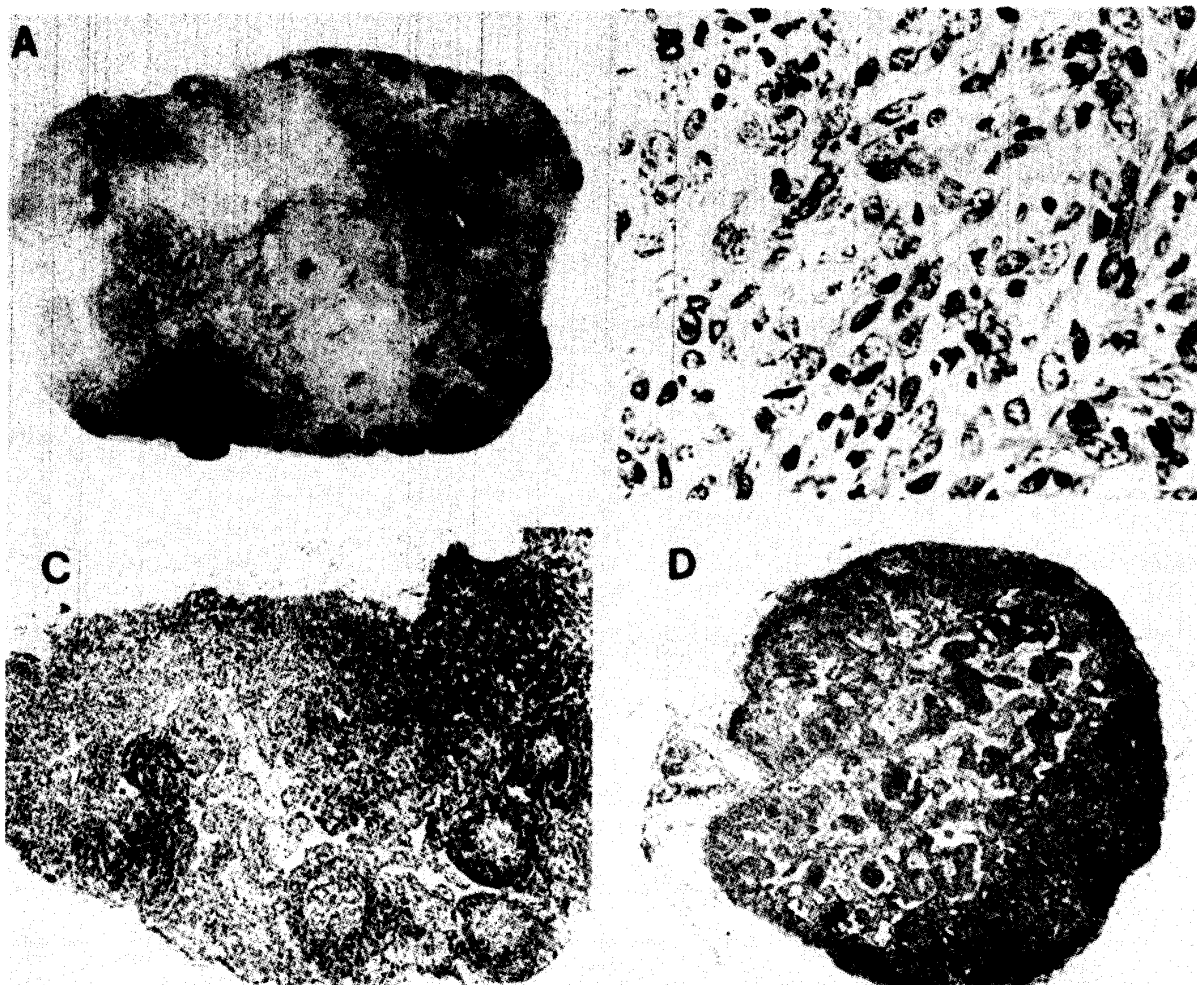


図5 6-O-アシル MDP による類上皮細胞肉芽腫形成能の比較

B30MDP 1 μ g (A,B)、BH48MDP (D-iso Asn) 100 μ g (C) あるいは L30MDP 100 μ g (D) をリン酸塩緩衝生食水を媒体としてモルモット足蹠に注射した。2週間後、領域リンパ節における類上皮細胞肉芽腫形成の有無を調べた。B30MDP は1 μ g で典型的な類上皮細胞肉芽腫を形成したが、BH48MDP (D-iso Asn)、L30MDP は100 μ g 投与しても不活性であった。A ; $\times 15$, B ; $\times 400$, C ; $\times 60$, D ; $\times 30$, (H.E.染色)。

バント活性を示すが、水を媒体としての投与では不活性であり、かつ類上皮細胞肉芽腫形成能も欠いていた²⁵⁻²⁸⁾。またアジュバント活性を示さない B30MDP

(D-iso Asn)、ならびに BH48MDP (L-iso Gln)、BH48-MDP (D-iso Asn) は、いずれも類上皮細胞肉芽腫を形成しなかった。すなわち、6-O-アシル MDP

についても、遅延型過敏症を誘導するアジュバント活性と類上皮細胞肉芽腫形成能との間に、化学構造に関して相関が認められた²⁵⁻²⁸⁾。

V. MDP による類上皮細胞肉芽腫の形成機序

異物肉芽腫の形成に免疫反応は関与しないが、類上皮細胞肉芽腫（結核結節）の形成については、免疫反応、特に細胞性免疫が深く関わっているとする研究が多く¹⁷⁻¹⁹⁾、免疫反応が除外される条件下での類上皮細胞肉芽腫の形成を確認した研究は著者らの研究以外には見当たらない。MDP はハプテン（抗原エピトープ）としては機能するが、それ単独では免疫原性を示さないことが知られている²⁹⁾。この事実は、MDP による類上皮細胞肉芽腫の形成は感作リンパ球の関与を要しないことを推測させる。そこで、新生仔胸腺摘出後、抗リンパ球血清で処理して完全に遅延型反応を抑制したラット、あるいは先天的に胸腺（Tリンパ球）機能を欠如しているヌードラットに油中水型乳剤とした MDP を注射し、類上皮細胞肉芽腫が形成されるかどうかを調べた。図6および7で示すようにいずれのラットにおいても、MDP 注射2週後の領域リンパ節に正常ラットと同様な広範かつ典型的な類上皮細胞肉芽腫が MDP によって形成された^{30, 31)}。すなわち、Tリンパ球の関与なしにも類上皮細胞肉芽腫が形成されることが実験的に証明された。

類上皮細胞肉芽腫が結核症を特徴付ける病変の1つ

（結核結節）となる理由について、結核症ではツベルクリンアレルギーに代表される遅延型過敏症が高いレベルで成立することにその理由を求める向きが多い³²⁾。しかし、上述の所見から、結核菌ではこの菌に特有なミコール酸（ α -分枝（ β -ヒドロキシ）高級脂肪酸）と細胞壁ペプチドグリカンとの結合物が細菌細胞表面部に存在しているという他の菌種では見られない化学的特性が、結核結節形成の原因の一つとなっている可能性を強く示唆している。

VI. MDPによる in vitro でのマクロファージ活性化

MDP が類上皮細胞肉芽腫を形成することを見出したと相前後して in vitro の系で MDP がマクロファージを活性化することを見出した。1970年代、免疫学は長足の進歩を遂げ、新しい理論、概念、あるいは手法が生まれ続けていた。免疫に関与する細胞群が容易に培養できるようにもなり、in vitro での解析ができるようになった。マクロファージの活性化という概念は、Mackness が結核菌あるいはその他の食細胞内寄生性の細菌に対する殺菌作用が、充進したマクロファージを「活性化マクロファージ」と呼んだことにその起源が求められる³³⁾。このマクロファージの殺菌能の充進は、リンパ球の産生するリンフォカインによってもたらされると考えられていた。即ち、1970年代の終わり頃まで、マクロファージはリンフォカインによってのみ活性化されると信じられていたのである³⁴⁻³⁶⁾。著

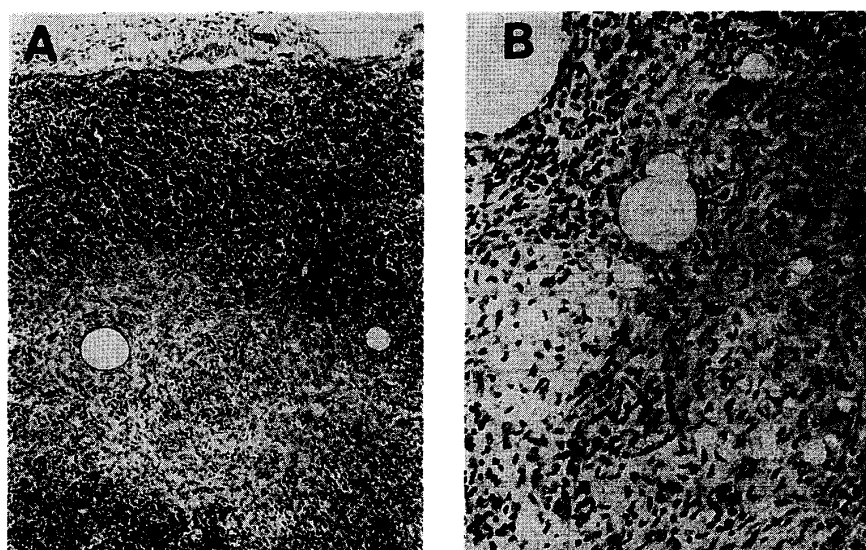


図6 新生仔胸腺摘出後、抗リンパ球で処理されたラットにおける MDP の類上皮細胞肉芽腫形成能
MDP 100 μ g を Freund の不完全アジュバントに混じ油中水型乳剤にしてラット足蹠に注射し、3 週後に領域リンパ節の病理組織学的変化を調べた。領域リンパ節に典型的な類上皮細胞肉芽腫が形成された。A ; $\times 86$, B ; $\times 220$, (H.E. 染色)

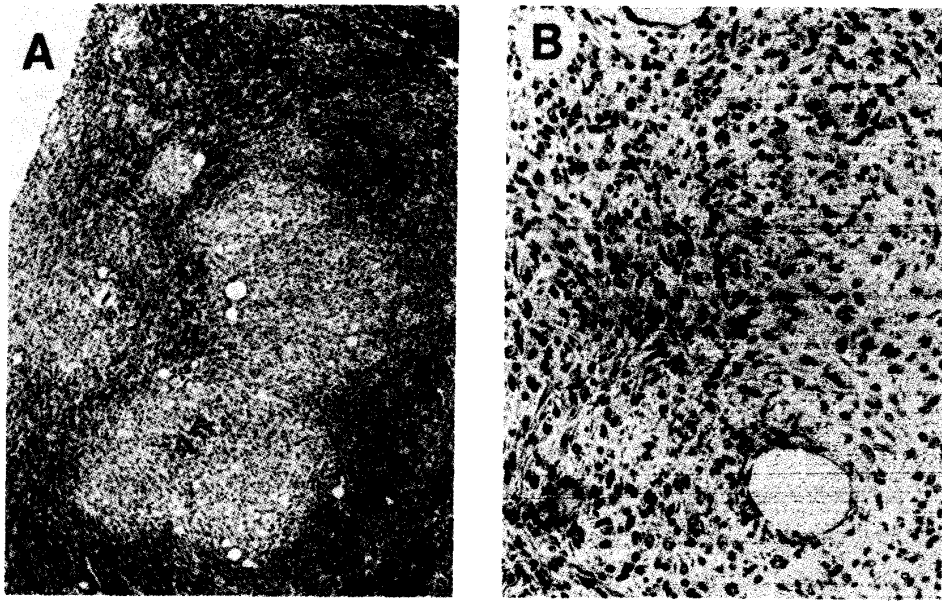


図7 ヌードラットにおける MDP の類上皮細胞肉芽腫形成能

MDP 100 μ g を Freund の不完全アジュバントに混じり油中水型乳剤にしてヌードラット足蹠に注射し、3 週後に領域リンパ節の病理組織学的変化を調べた。領域リンパ節に典型的な類上皮細胞肉芽腫が形成された。A ; $\times 50$ 、B ; $\times 200$ (H.E.染色)

者らは「細菌細胞壁成分が感作リンパ球の関与なしにマクロファージを活性化する」という作業仮説のもとに、モルモット腹腔浸出マクロファージからリンパ球を完全に除去した *in vitro* の条件下で MDP をマクロファージに作用させた。その結果、MDP で刺激されたマクロファージはリンフォカインで活性化された場合とほぼ同様な変化を示した。即ち、マクロファージ遊走阻止 (図 8、9)^{37, 38)}、器壁への付着および伸

展の増加 (図10)^{39, 40)}、¹⁴C-グルコサミンの取り込み増加⁴¹⁾、 O_2^- の生成亢進⁴²⁾などマクロファージの様々な機能がリンパ球の関与なしに MDP により直接高められた。マクロファージがリンパ球の関与なしに活性化されるということを示すことができた。その事がいかに重要であったかは、その後多くの追試がなされたことから理解して頂けると思う⁴³⁻⁴⁵⁾。また、Lederer、小谷らの努力によって水溶性で、抗原性の



図8 MDP によるモルモット腹腔浸マクロファージの遊走阻止反応

10%牛胎仔血清添加 TC199培地に MDP 10 μ g を添加された場合と添加しなかった場合におけるガラス毛細管からのマクロファージの遊走を調べた。MDP 10 μ g 添加群ではマクロファージの遊走阻止が観察された。

テスト物質	μg/ml	Migration index (%) ^{a)}					アジュバンド活性 ^{b)}
		20	40	60	80	100	
MurNAc-L-Ala-D-isoGln (MDP)	0.1		●●●●				+
	1.0		●●●●				+
	10		●●●●				+
MurNAc-L-Ser-D-isoGln	10		●●●●				+
MurNAc-L-Ala-D-Glu	10		●●				+
MurNAc-L-Ala-L-isoGln	10					●●	-
MurNAc-L-Ala-D-isoAsn	10					●●●●	-
MurNAc-L-Ala-L-Gln	10					●●●●	-
MurNAc-L-Ala-D-Gln	10			●●●●			±
L-Ala-D-isoGln-L-Lys-D-Ala	10					●●	-

図9 MDP および MDP アナログによるモルモット腹腔浸出マクロファージの遊走阻止反応とアジュバンド活性の関連方法は図8に示した。

a) (テスト物質添加群での遊走面積 / 非添加群での遊走面積) × 100

b) タンパク抗原とともに油中水型乳剤としてモルモットに投与した際の抗体産生増強ならびに遅延型皮膚反応誘導作用を指標とした。

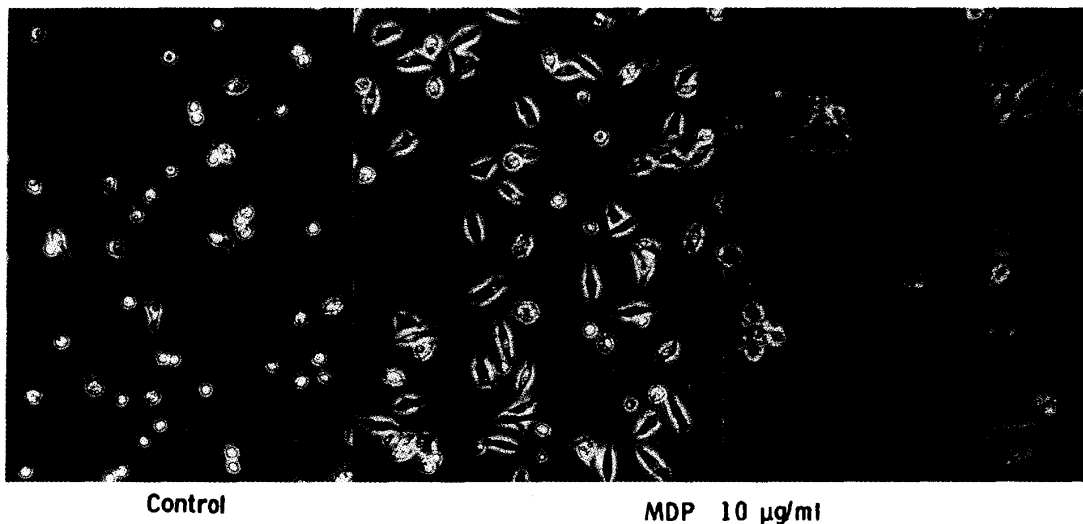


図10 MDPによるモルモット腹腔浸出マクロファージの器壁への付着と伸展増強作用
マクロファージを10%牛胎仔血清添加TC199培地にMDP10 μgを添加し24時間培養後の付着と伸展の増強を示す。
A; コントロール群 (×75)、B; MDP添加群 (×75)、C; 同前、強拡大 (×400)

ないMDPの開発がなされていたからこそ、このような研究ができたことを強調しておきたい。

前述したように、マクロファージにMDPを作用させた時器壁への付着進展が増し、一見、マクロファージが増殖しているように見えたので、³H-チミジンを添加したところ、MDP刺激によってDNA合成が逆に抑制されることを見出した⁴⁶⁾。

VII. MDPによるマクロファージの活性化に伴うDNA合成の抑制

一般に、血中に存在するモノサイト・マクロファ-

ジは最終分化細胞 (Terminal cell) であるからマクロファージ増殖因子を添加しないかぎり、in vitroでDNAを合成することはないと考えられていた⁴⁷⁾。しかし、著者らは流動パラフィンで刺激して得られたモルモット腹腔浸出マクロファージに関する限り、これらの因子を添加することなしに、³H-チミジンを10%トリクロル酢酸 (TCA) 不溶画分に取り込むことを見出した⁴⁶⁾。もし、マクロファージに取り込まれたチミジンがDNA合成に利用されているなら、これは従来の考えとは異なる事実である。そこで、取り込まれたチミジンの細胞内での局在を Schmidt-Thann-

hauser-Schneider の変法にしたがって検討した。取り込まれた ^3H -チミジンの85%以上が TCA 不溶で、加熱過塩素酸 (PCA) 可溶画分に見出された (表6)。この所見は、取り込まれた ^3H -チミジンが DNA 画分に存在していることを示している。さらに、オートラジオグラフィーによる観察の結果も、細胞核が強くラベルされ、 ^3H -チミジンは細胞核 DNA に取り込まれていることを示した⁴⁶⁾ (図11)。この際、マクロファージの細胞核のラベリングの状態は高率かつ均一であり、DNA 複製時のパターンのそれと一致し、取り込まれたチミジンが DNA の修復ではなく、複製に利用されていることが強く示唆されたので、次に複製であるかどうかを調べた。真核細胞の DNA 複製は DNA ポリメラーゼ α によって担われている^{48, 49)}。そこで DNA ポリメラーゼ α の特異的な阻害剤であるアフィディコリンで5分間処理したマクロファージについて調べたところ、 ^3H -チミジンの TCA 不溶画分への取り込みはアフィディコリンの用量に依存して抑制された⁵⁶⁾ (図12)。またマクロファージに ^3H -チミジンを数秒間取り込ませた後、DNA 複製の指標である Okazaki フラグメントの形成を調べたところ、このフラグメン

表6 モルモットの流動パラフィン刺激腹腔マクロファージの各画分への ^3H チミジンの取り込み

		^3H チミジン取り込み (CPM) 平均値 \pm 標準偏差 (n=3)
マクロファージ		115,493 \pm 11,524
TCA 不溶画分		110,591 \pm 12,637
TCA 可溶画分		3,946 \pm 402
加熱 PCA 可溶画分		102,007 \pm 9,461
加熱 PCA 不溶画分		2,500 \pm 493

1×10^7 個のマクロファージを TC 199 培地 10ml に浮遊させ、 $5 \mu\text{Ci}$ の ^3H チミジンを添加後、24時間培養した。マクロファージを回収し、Schmidt-Thannhauser-Schneider の変法を用いて DNA 画分 (TCA 方法、加熱 PCA 可溶画分) を得た。

トの形成が認められた⁵⁰⁾。このようにしてマクロファージに取り込まれた ^3H -チミジンが DNA 複製に利用されていることが確認された。

それに反して、MDP によって活性化されたマクロファージでは、生活力 (viability) あるいはモノカイン産生能等々が増加しているが、DNA への ^3H -チミジンの取り込みは逆に用量依存的に著明に抑制され

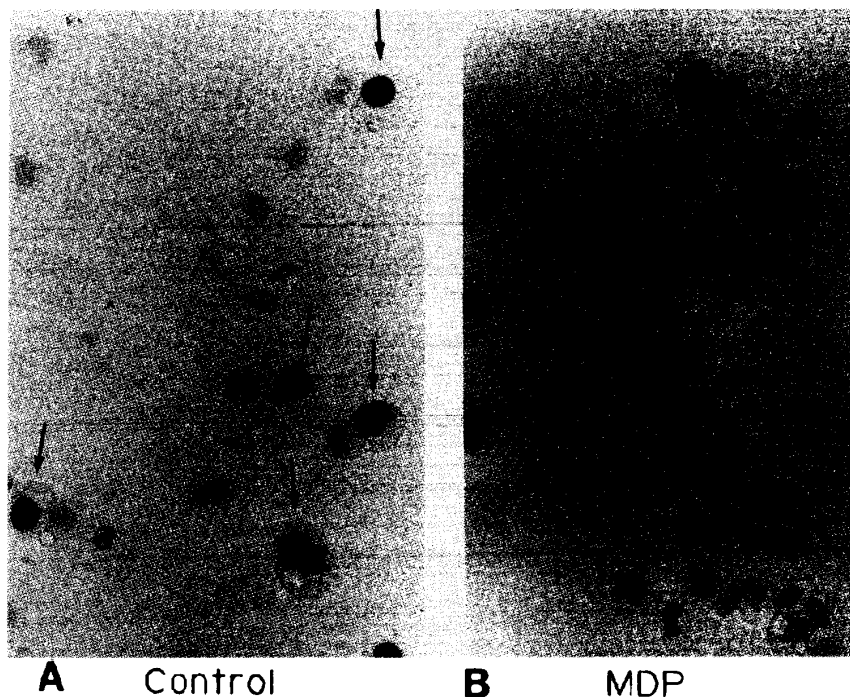


図11 モルモット腹腔マクロファージのオートラジオグラフィー

マクロファージに ^3H チミジンを加えて24時間培養後、常法に従ってオートラジオグラフィーを行った。

A ; MDP 非添加対照培養、B ; MDP $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 添加培養。

MDP 非添加培養群 (A) には ^3H チミジンでラベルされたマクロファージがみられる。矢印はラベルされたマクロファージを示す。一方、MDP 添加群 (B) にはラベルされたマクロファージはまったくみられない。

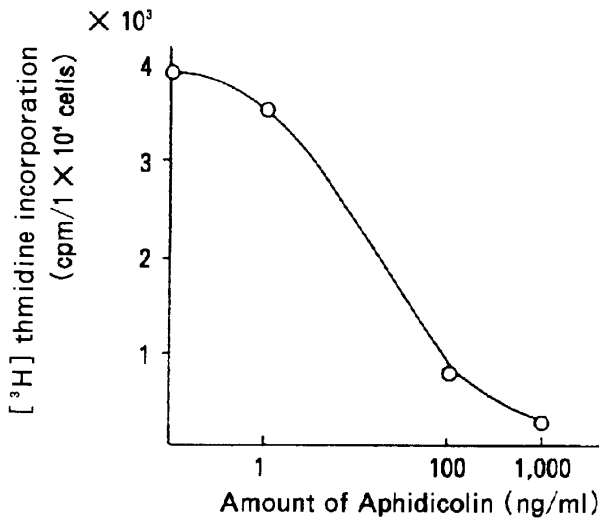


図12 モルモット腹腔浸出マクロファージへの³Hチミジン取り込みに対するアフィデコリンの抑制作用
10%牛胎仔血清添加 TC199 培地でマクロファージに横軸に示す濃度のアフィデコリンを5分間反応させた。³Hチミジンを加え、20時間後に10% TCA不溶画分への³Hチミジンの取り込みを測定した。データは平均値を示す。(n=3)。

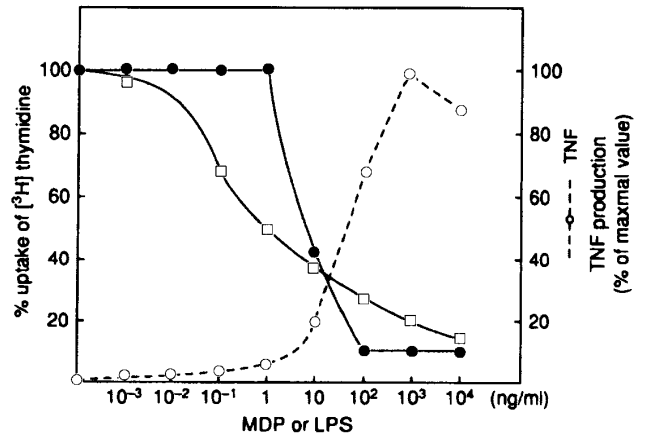


図13 モルモット腹腔浸出マクロファージへの³Hチミジン取り込みに対する MDP の抑制作用
マクロファージを10%牛胎仔血清添加 TC199 培地中で MDP (●) あるいは参考標品として用いた *E. coli* (O127 : B8) LPS-W (□) と24時間反応させた。³Hチミジンを加え、さらに24時間培養後、TCA不溶画分への取り込み値を測定した。
%取り込み = (テスト物質添加群での cpm / テスト物質非添加対照群での cpm) × 100
(...○...) は MDP 刺激による TNF 産生を示す。

ることを見出した(図13)。そこで、マクロファージを MDP と一定時間培養後、蔗糖密度勾配遠心法によって DNA ポリメラーゼ画分を得、DNA ポリメラーゼ α および β の動態を調べた。MDP の添加により活性化されたマクロファージでは DNA 複製に関与する DNA ポリメラーゼ α 活性が減少していた⁵⁰⁾(図14)。しかし、DNA の修復に関与する DNA ポリメラーゼ β 活性には MDP 添加の影響は見られなかった(図14)。さらに MDP 添加群では Okazaki フラグメントの生成もまったく認められなかった⁵⁰⁾。ちなみに、図14にみられるように MDP 添加群では DNA 合成が24時間後にすでに著明に減少しているが、DNA ポリメラーゼ α 活性の減少は48時間後に初めて認められた。このような現象は他の細胞でも観察されるが、その理由は不明である⁵¹⁾。なお、MDP を DNA ポリメラーゼ画分に直接作用させた対照実験では、酵素活性への影響はまったく認められなかった⁵⁰⁾。以上の結果は、MDP 処理によってマクロファージの DNA 複製の抑制が起こることを示唆している。

最近、著者らはこの問題をもう少し解明したいと考え、J774-1 (macrophage cell line) を用いて実験を行っている。その結果、³Hチミジンの取り込み抑制は Thymidine kinase の特異的な活性低下によるこ

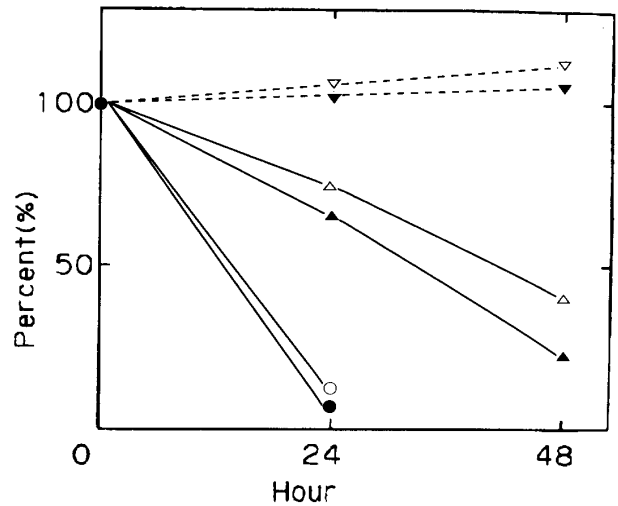


図14 モルモット腹腔浸出マクロファージの DNA 合成および DNA ポリメラーゼレベルへの MDP 抑制作用の時間的推移
[*E. coli* (O127 : B8) LPS-W を参考標品として用いた。] ○および●、MDP あるいは LPS 添加した際の DNA 合成の変化。△および▲、MDP あるいは LPS 添加による DNA ポリメラーゼ α レベルの変化を、▽および▼、同じく DNA ポリメラーゼ β レベルの変化を示す。MDP および LPS の用量は、10 μg/ml。縦軸には、テスト物質非添加対照の各時間でのレベルを100とした値が目盛られている。

と (Immunology, in press.)⁸⁰⁾ (図15)、さらに、Thymidine kinase の活性低下はこの酵素の mRNA の発現低下によること、また菌体成分で活性化されたマクロファージは G₁ 期で停止し S 期に移行しなくなる等々を見出した。今後、どのような機序で Thymidine kinase 活性が、特異的に抑制されるのかを明らかにしなければならない。細胞周期に関与している因子 (RB 蛋白、E2F およびサイクリン等) の動態を検討するために秋山教授ら (鹿児島大学医学部腫瘍研究施設) と共同研究を開始したところである。

VIII. MDP によるマクロファージ DNA 合成抑制に関与するシグナル伝達

分子量「500」にも満たない MDP が、マクロファージに対してこれほど激しく作用することから、研究者なら誰しもレセプターの存在を明らかにしたいと考えるのはごく自然のことである。しかしながら、MDP のレセプターに関する報告はあるが、まだ確定されるに至っていない⁵²⁻⁵⁴⁾。著者らも MDP のレセプターの有無を解析したいと考え予備実験をおこなった。フコースと特異的に結合するレクチン [*Ulex europaeus* (UAE-1)] を用いた実験により、リンフォカインレセプターと MDP レセプターとは競合しないことを報告している⁵⁵⁾が、詳細については未だ手をつけていない。最近、レセプター解析に関する新しい方法がいくつか開発されているが、「費用と成果」を考えるとなかなか手が出せないでいる。(従来行なわれている蛋白質に対するレセプター解析の手法ではうまくいかないように思われる。) それゆえ、著者らはレセプター以後のシグナル伝達について調べた。マクロファージ内の cyclic AMP 濃度の上昇と DNA 合成抑制は密接に関連することがわかった⁵⁶⁾。MDP および LPS によって cyclic AMP の分解酵素の酵素活性が低下し、その結果、細胞内 cyclic AMP の濃度が上昇し、cyclic AMP 依存性プロテインキナーゼ (A kinase) が活性化されること、他方、MDP によってマクロファージの細胞内カルシウムイオン濃度には変化が生じないこと、また細胞内カルシウム濃度を上昇させるようなイオノマイシン等々を作用させても³Hチミジンの取り込みはまったく影響を受けないこともわかった (B. B. A in press)⁸¹⁾

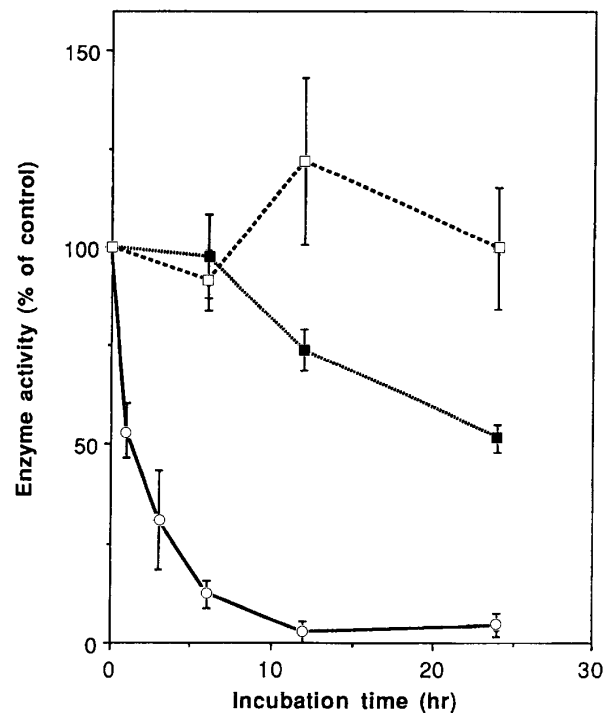


図15 S 期特異的酵素活性におよぼす LPS 効果の経時的変化
マクロファージに LPS (2 μg/ml) 添加後、一定時間培養し、細胞内の DNA ポリメラーゼ α (…■…), チミジンキナーゼ (—○—) およびチミジン合成酵素 (…□…) の活性を測定した。活性値はコントロールとの比 (%) で示した。

表7 ³Hチミジン取り込みと細胞内c-AMP濃度におよぼす種々の物質の効果

テスト物質	用量	Hチミジンの取り込み c-AMP濃度	
		(%)	(%)
None	—	100	100
LPS	1 μg/ml	11	208
dibutyl cAMP	100 μM	9	N.D.
dibutyl cGMP	100 μM	105	N.D.
cholera toxin	1 μg/ml	11	297
pertussis toxin	10ng/ml	91	108
theophylline	1 mM	9	234
papaverine	100 μm	13	252
IBMX	100 μM	22	218
isoproterenol	500 μM	21	271
PGE ₂	1 μm	16	274
TPA	100 μM	102	101
ionomycin	10 μM	102	93

a) J774-1細胞 (5 × 10⁵ cells/ml) にテスト物質を添加し、20時間培養後、³Hチミジン (0.5 μCi) を添加し、30分後 TCA 不溶画分のチミジンを測定した。(コントロール値は92,058 ± 3,851 dpm)。表の数値はコントロール比 (%) で示した。

b) J774-1細胞 (1 × 10⁷ cells/ml) にテスト物質を添加し、6時間後の細胞内サイクリック AMP 量を測定した。(コントロール値は12.4 ± 0.8 pmol/10⁶ cells)。表の数値はコントロール比 (%) で示した。種々のテスト物質でマクロファージを刺激したが、秒、分単位での細胞内の cAMP の増加がみられなかった

(表7)。MDP や LPS によって活性化されたマクロファージの cyclic AMP 分解酵素活性がどのような機序で低下するのか、また Thymidine kinase 活性の低下に、A kinase がどのように関与しているのか、まだ解明されていない。さらに、表7で示すように細胞内 cyclic AMP 濃度を上昇させ、A kinase を活性化させる物質は DNA 合成を抑制させるが、しかし、モノカイン産生は増強されなかった。MDP および LPS によるマクロファージの活性化および分化には A kinase が関与した情報伝達経路以外のメカニズムが存在するのかもしれない。今後明らかにしなければならないことが山積みされているように思われる。

IX. マクロファージ活性化、DNA 合成抑制および類上皮肉芽腫形成の関連性

種々の MDP のアナログや誘導体、細菌細胞壁、ペプチドグリカン、およびペプチドグリカンを酵素で分解して得た産物のマクロファージに対する刺激作用を、グルコサミンの取り込み増強、モノカイン産生増強およびチミジンの取り込み抑制を指標として測定し、その結果を類上皮細胞肉芽腫形成作用、あるいは免疫アジュバント活性とともに表4、5に示した。グルコサミンの取り込み、およびモノカイン産生を増加させるテスト物質はチミジンの取り込みを抑制し、他方、グルコサミンの取り込みおよびモノカイン産生を増加させないテスト物質はチミジンの取り込みにも影響を与えなかった(表4)。同様な活性構造相関は類上皮細胞肉芽腫形成能およびアジュバント活性についても認められた(表4)。

一般に、より分化している細胞の DNA 合成は未分化細胞のそれよりも低い⁵⁷⁾。単球-マクロファージ系の細胞についても、モノブラスト→プロモノサイト→単球→マクロファージと分化するにしたがって、DNA 合成能は次第に低下することが知られている(図16)⁵⁸⁾。

MDP により活性化された単球あるいはマクロファージは、活性化の表現として DNA 合成を低下させ、その複製に要するエネルギーを節約して殺菌能、あるいはその他の機能を高め、さらに類上皮細胞への分化に振り向けるのではないだろうか？とすれば、DNA の合成抑制は単球・マクロファージから類上皮細胞へと分化する最初のステップということになる。ここで類上皮細胞肉芽腫が形成されるための要件がどのようなものかをもう一度まとめてみたい。その要件の一つは、マクロファージの活性化であろう。マクロファージ活性化作用を持たない MDP アナログを加えた油中水型乳剤を注射した場合には、マクロファージの単なる集積、あるいは小さな異物肉芽腫が作られるに過ぎないが、マクロファージを活性化する MDP およ

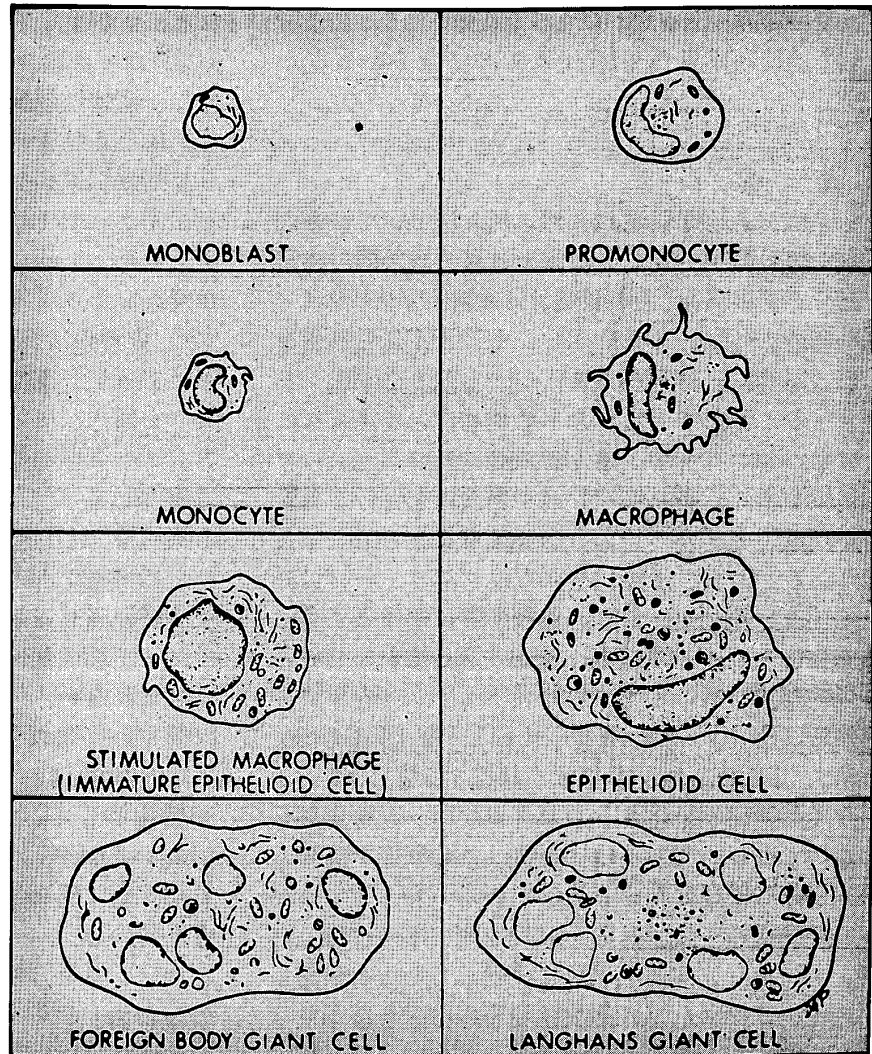


図16 マクロファージ分化に伴う形態変化 Adamsら. Am. J. Pathol. 76: 17-48.1974を参考にした。Giant cellはいくつかの活性化されたマクロファージが融合した多核細胞である。

びそのアナログの油中水型乳剤の注射で形成される肉芽腫は、質的にも量的にも変化を遂げ、その大きさが飛躍的に増大するとともに類上皮細胞肉芽腫となる(表4)。このように、マクロファージ活性化と類上皮細胞肉芽腫形成との間には密接な関連性がみられる。さらに、類上皮細胞肉芽腫形成因子に要求される条件のもう一つは、それがマクロファージに作用する局所に一定時間とどまり、容易には代謝されにくい性質を持っていることではないかと考えられる。MDP および MDP 誘導体を用いた実験結果もその推論を支持しているように思われる。すなわち、MDP は水溶性の形で注射すると速やかに注射局所から失われるが、油中水型乳剤の形では容易には拡散しないこと、 α -分枝脂肪酸と結合させた 6-O-アシル MDP も油中水型乳剤とした MDP と同様、容易に拡散あるいは代謝されず持続的にマクロファージを刺激することによって、類上皮細胞肉芽腫を形成するのではなかろうか(表5)。

X. 考 察

アジュバント活性発現のメカニズムについては未だ明らかではないが、今までの研究結果を総合的に推察すると、アジュバント活性を有する物質がマクロファージを持続的に刺激して活性化し、モノカインの産生を高めると同時に、マクロファージから類上皮細胞へと分化させることがアジュバント活性発現には重要なことではないのだろうか。類上皮細胞は核のユークロマチン領域が多く、盛んにタンパク質合成を行い、大量かつ多種類のモノカインおよび酵素を産生していると考えられる。他方、活性化されたマクロファージは効率よく抗原を貪食し、かつ、免疫応答に適するように抗原を修飾する。その結果、領域リンパ節をはじめとする免疫臓器において十分なサイトカイン存在下で T リンパ球に効率よく抗原を提示するような「反応の場」、すなわち、「免疫応答を効率よく誘導する場」をアジュバントで活性化・分化されたマクロファージが提供しているのではないだろうか。今後、この問題を実証していかなければならないと思っている。今、アジュバント活性発現のメカニズムを直接解明するのは難しいので、アジュバント活性発現に関与していると推測しているマクロファージの活性化発現の機序を解明することが、本研究を進める早道かもしれない。それ故、MDP によるマクロファージ活性化に関して解明を要する問題点について述べておきたい。MDP によるマクロファージの活性化は厳しい化学構造依存性を示す。

この事実は、マクロファージがムラミルペプチドの構造を何らかの機序によって「認識」していることを推測させる。分子量「500」にも満たない MDP がこれほど激しい反応を示すことからレセプターの存在を推測したい。「結合なきものに作用なし」と考えている。しかし、現在までのところ、マクロファージがどのようにして MDP 構造を特異的に認識するかについての確定した見解はない。IV で述べたようにレセプターに関する報告⁵²⁻⁵⁴⁾はあるが、その多くが「マウスマクロファージ」を用いて研究が行われている点に問題があるように思われる。著者らは MDP によるマクロファージ活性化には動物種差があり、マウスマクロファージは MDP によって活性化されないことを報告している^{59, 60)}。著者らは、モルモット腹腔浸出マクロファージと MDP とのごく短時間の接触によって、マクロファージが生化学的、形態学的変化を生じる事実から、MDP はマクロファージの細胞膜(レセプター)を刺激し、情報伝達機構を活性化し、種々の代謝活性に変化を生じさせるのではないかと推測している。このような情報伝達機構として、cyclic AMP 依存性プロテインキナーゼ(A kinase)と Ca^{++} 依存性プロテインキナーゼ(C kinase)をはじめとする種々のキナーゼが関与したタンパク質リン酸化反応が知られている⁶¹⁻⁶⁵⁾。著者らは MDP によるマクロファージ活性化に伴い DNA 合成抑制が発現される過程で A kinase の関与を報告している^{56) 81)}が、これは MDP によるマクロファージ活性化全体に当てはまるものではない。VIII で述べたように細胞内 cyclic AMP 濃度を上昇させる物質は MDP や LPS 以外にも知られているが、それらの物質は MDP や LPS のようにモノカインの産生を増強させることはできなかった。それ故、マクロファージ活性化には他の情報伝達系が関与しているのかもしれない。(マクロファージ活性化を DNA 合成抑制という側面からみれば、A kinase が関与している可能性が示唆されたということにとどめておきたい。)一般論として、A kinase の活性増強と Thymidine kinase の活性低下がどのような機序で関連しているのか大いに興味があるところであり解析を進めたいと考えている。

次に、著者らの研究によって「分枝脂肪酸と MDP の結合物」が類上皮細胞肉芽腫を形成し、この類上皮細胞肉芽腫形成には、必ずしもリンパ球の関与を必要としないことを示した。このことはミコール酸と MDP 複合体が結核症における類上皮細胞肉芽腫形成に関与する因子であることを示唆していると考えられ

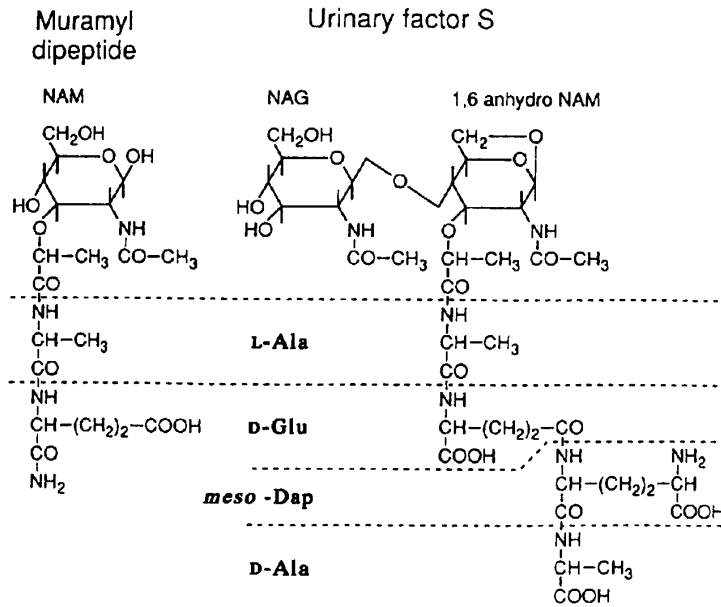


図17 ムラミルジペプチドと Urinary factor S の化学構造

る。すなわち、著者らの分枝脂肪酸-MDP 結合物を結節惹起構造とする報告は、結核結節形成因子に関して過去100年間対立した「化学物質説」と「免疫反応説」に一定の結論を出したといえるのではないだろうか。今後の課題は、類上皮細胞肉芽腫形成機序のより詳細な解明にある。マクロファージを MDP で刺激すると、TNF (パイロジェン)、マクロファージ成長因子、インターロイキン1、インターロイキン6、インターロイキン8、線維芽細胞増殖因子、プロスタグランジン E₂、コラゲナーゼ、プラスミノゲン活性化因子等々が放出されることが報告されている⁶⁶⁻⁶⁸⁾。これらの因子やその他の未知の因子、さらには細胞間の相互作用等が類上皮細胞肉芽腫の形成に関与していると考えられる。今後、明らかにしなければならないことが山積みされているように思われる。

モルモットおよびモルモットマクロファージを研究に用いたことは大変幸運だったと回想しているが、モルモットはマウスのように近交系が多種類存在しないので細胞マーカーの解析が進んでいないことがネックとなって、Tリンパ球とマクロファージの相互作用を詳細に研究できない。マウスおよびヒトの場合、種々の細胞マーカーの解析が進んでいると同時に、末梢血や臓器(組織)からマクロファージ、Tリンパ球およ

びBリンパ球等を得、長期間の in vitro 培養が可能であり、また多数 cell line も存在している。他方、モルモットではこのような長期間の primary culture が不可能であり、また cell line も皆無である。それ故、アジュバント活性発現メカニズムに関する研究を in vitro でこれ以上進められないことは残念である。

鹿児島に赴任してからは MDP および LPS が示す免疫薬理学的副作用に関する研究をしている。そのことを述べたいが、まだ十分にそのメカニズムが解明されていないので、後日このような機会があれば、その時に述べさせていただきたい。最後に MDP にめぐり会えたことは大変幸運であったと感じており、アジュバント物質の開発に心血を注がれた先輩各位に心から感謝いたします。

XI. おわりに

著者の研究についてはすべて述べたが、最後に、日本での研究の立ち遅れが痛感される MDP 類縁構造物質が示す脳神経系に対する薬理学的研究について述べておきたい。

1982年、Krueger らはヒト尿中に微量含有されている睡眠物質を精製し、その物質が図17のような化学組成(N-アセチルグルコサミニル-1, 6-アンヒドロN-

注3) 本物質の分離精製がいかに大変であるかを述べておきたい。1971年 Pappenheimer らは25匹のヤギから6ℓの脳脊髄液を得て精製したが、分子量が1000以下のグリコペプチドであることを知りえたのみであった。また、15,000羽のウサギの脳から調製しようと試みたが精製にいたらなかった。1980年 Krueger らは「5トン」の人尿より精製し、30 μgの本物質を得ることに成功した。

アセチルムラミル-L-アラニル-D-グルタミニル-meso-ジアミノピメリル-D-アラニン) であると報告し、Urinary factor S と名付けた⁶⁹⁾。

本物質は注3で述べるように生体内にはごく微量しか存在しないが、驚いたことに細菌細胞壁ペプチドグリカンに特徴的な成分であるムラミン酸、ジアミノピメリン酸およびD体のアミノ酸を含んでいた⁷⁰⁾。本物質は睡眠を抑制されたヤギ、ヒツジ、ウサギ等の脳や脳脊髄液 (cerebrospinal fluid) 中に認められる睡眠物質が矢状静脈洞 (Sagittal sinus) を介して血中に入った後、尿中に排泄されるものと考えられる。一般に高等動物のタンパク質はL体のアミノ酸によって構成されているが本物質はD体のアミノ酸2個を含有している。本物質が生体内で合成されているのか、あるいは細菌細胞壁ペプチドグリカンが再利用されているのかは不明であるが、高等動物の中樞神経系で重要な役割を果たしている化学物質が、ヒトとは所属する生物界をまったく異にしている原核生物である細菌のペプチドグリカンと化学組成を共有していることを示唆する興味深い事実である。すぐに合成ムラミルペプチドを用いて睡眠作用が調べられた。ウサギ脳室内注射で Urinary factor S (5mg/kg) よりも大量のムラミルペプチド (75mg/kg) の投与量を必要としたが、やはり徐波睡眠作用を示した⁷⁰⁻⁷²⁾。以上述べた事実を踏まえて Pappenheimer は、哺乳動物自身が検出限界以下のきわめて微量のムラミン酸を含むペプチドを合成できないならば、Urinary factor S は腸管から吸収された細菌産物に由来することになる。それゆえ、この睡眠物質は必須アミノ酸あるいはビタミンと同様な物質と考えることを提言している⁷¹⁾。また、ムラミルペプチド研究の先駆者である Lederer も同様な提言をしている。彼はムラミルペプチドを食物あるいは腸内細菌叢に由来する微量物質であり、健康保持 (免疫機能および睡眠) に必須な物質として「ビタミン」のカテゴリーに加えることを提言している⁷²⁾。ムラミルペプチド=ビタミン説についてある程度理解していただいたと思う。他方、MDP がセロトニンレセプターに結合するという報告⁷³⁾もあり、ムラミルペプチドの薬理作用 (血圧下降、体温上昇、睡眠等) を研究している Mašek らはムラミルペプチドのこれらの作用はムラミルペプチドが serotonergic partial agonist として働くという視点から説明できるのではないかと提言している⁷⁴⁻⁷⁶⁾。

筆者らは非力のためにこの方面の研究に自らが取り組む十分な知識、経験を持ち合わせないことを残念に

思うが、将来展開が期待されるこの領域の研究にとりかかる方が現われることを祈りつつ筆を置く。

文 献

- 1) Lewis, P. A. & Loomis, D.: The formation of anti-sheep hemolyticamboceptor in the normal and tuberculous guinea pig. J. Exp. Med. 40, 503-515, 1924
- 2) Freund, J.: The mode of action of immunologic adjuvant. Adv. Tuberc. Res. 7, 130-148, 1956
- 3) Goren, M. B. & Brennan, P. J.: Mycobacterial lipids: Chemistry and biologic activities., In; Tuberculosis, G. P. Youmans, Ed., 63-193, W. B. & Saunders Co., Philadelphia, 1979.
- 4) Raffel, S., Arnaud, L. E., Dukes, C. D. & Huang, J. S.: The role of the "wax" of the tubercle bacillus in establishing delayed hypersensitivity. II. Hypersensitivity to a protein antigen, egg albumin. J. Exp. Med. 90, 53-72, 1949
- 5) Tanaka, A. & Kitagawa, M.: Fractionation and characterization of wax D, a macromolecular peptidoglycolipid of *M. Tuberculosis*, I. Biochemical investigations of human strain H₃₇Ra. Biochem. Biophys. Acta. 98, 182-193, 1965
- 6) Jolles, P., Samour, D. & Lederer, E.: Analytical studies on wax D, a macromolecular peptidoglycolipid fraction from human strain of *Mycobacterium tuberculosis*. Arch. Biochem. Biophys. 1 (suppl.), 283-289, 1962
- 7) Azuma, I., Ribic, E. E., Meyer, T. J. & Zbar, B.: Biologically active components from mycobacterial cell walls. I. Isolation and composition of cell wall skeleton and component P₃. J. Natl. Cancer Inst. 52, 95-101, 1974
- 8) Kotani, S., Kitaura, T., Hirano, T. & Tanaka, A.: Isolation and chemical composition of the cell walls of BCG. Biken. J. 2, 129-141, 1959
- 9) White, R. G., Bernstock, L., Johns R. G. S. & Lederer, E.: The influence of components of *M. tuberculosis* and other Mycobacteria upon antibody production to ovalbumin. Immunology 1, 54-66, 1958

- 10) Adam, A., Ciorbaru, R., Petit, J-F. & Lederer, E.: Isolation and properties of macromolecular, water-soluble, immunoadjuvant fraction from the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A) 69, 851-854, 1972
- 11) 小谷尚三：細菌細胞壁ペプチドグリカンおよびその構築単位の生物的活性特に免疫強化作用. 生化学48, 1081-1107, 1976
- 12) Adam, A., Ciorbaru, R., Ellouz, F., Petit, J. F. & Lederer, E.: Adjuvant activity of monomeric bacterial cell wall peptidoglycans. Biochem. Biophys. Res. Commun. 56, 561-567, 1974
- 13) Ellong, F., Adam, A., Ciorbaru, R. & Lederer, E.: Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives. Biochem. Biophys. Res. Commun. 59, 1317-1325, 1974
- 14) Kotani, S., Watanabe, Y., Shimono, T., Kinoshita, F., Narita, T., Kato, K., Stewart-Tull, D. E. S., Morisaki, I., Yokogawa, K. & Kawata, S.: Immunoadjuvant activities of Peptidoglycan subunits from the cell walls of *Staphylococcus aureus* and *Lactobacillus plantarum*. Biken. J. 18, 93-103, 1975
- 15) Kotani, S., Watanabe, Y., Kinoshita, F., Shimono, T., Morisaki, I., Shiba, T., Kusumoto, S., Tarumi, Y. & Ikenaka, K.: Immunoadjuvant activities of synthetic N-acetylmuramyl peptides or-amino acids. Biken. J. 18, 105-111, 1975
- 16) 岩井和郎：類上皮細胞肉芽腫の形成をめぐって—他の肉芽腫性疾患との関連の下に—。結核 51, 293-301, 1976
- 17) Adams, D. O.: The granulomatous inflammatory response. Ann. J. Pathol. 84, 164-192, 1976
- 18) Epstein, W.L.: Granulomatous hypersensitivity. Prog. Allergy 11, 36-89, 1976.
- 19) Boros, D. L.: Granulomatous inflammation. Prog. Allergy 24, 183-267, 1978
- 20) Auclair, J.: La sclerose pulmonaire d'origine tuberculeuse. Arch. de Med. Exper. 12, 189-202, 1900
- 21) Sabin, F. R.: Cellular reactions to fractions isolated from tubercle bacilli. Phys. Rev. 12, 141-165, 1932
- 22) Takada, H. & Kotani, S.: Immunology of the bacterial cell envelope., 119-152, John Wiley and Sons Ltd., Chichester, 1985
- 23) Emori, K. & Tanaka, A.: In : Granuloma formation by a synthetic bacterial cell wall fragment. Infect. Immun., 19, 613-620, 1978
- 24) Tanaka, A. & Emori, K.: Epithelioid granuloma formation by a synthetic bacterial cell wall component. Muramyl dipeptide (MDP). Am. J. Pathol. 98, 733-748, 1980
- 25) Emori, K., Nagao, S., Shigematsu, N., Kotani, S., Tsujimoto, M., Shiba, T., Kusumoto, S. & Tanaka, A.: Granuloma formation by muramyl dipeptide associated with branched fatty acids, a structure probably essential for tubercle formation by *Mycobacterium tuberculosis*. Infect. Immun. 49, 244-249, 1985
- 26) 辻本雅哉：6-O-アシルムラミルジペプチドの細胞性及び体液性免疫強化作用を実用することを目的とした基礎的研究. 大阪大学歯学雑誌 26, 63-83, 1981
- 27) Tsujimoto, M., Kotani, S., Shiba, T. & Kusumoto, S.: Adjuvant activity of 6-O-acylmuramyl dipeptides to enhance primary cellular and humoral immune responses in guinea pigs.: Dose-response and local reactions observed with selected compounds. Infect. Immun. 53, 517-521, 1986
- 28) Kotani, S., Tsujimoto, M., Koga, T., Nagao, S., Tanaka, A. & Kawata, S.: Chemical structure and biological activity relationship of bacterial cell walls and muramyl peptides. Federation Proceedings 45, 2534-2540, 1986
- 29) Audibert, F., Heymer, B., Gros, C., Schleifer, K.H., Seidl, P.H. & Chedid, L.: Absence of binding of MDP, a synthetic immunoadjuvant, to anti-peptidoglycan antibodies. J. Immunol. 121, 1219-1222, 1978
- 30) Nagao, S., Ota, F., Emori, K., Inoue, K. & Tanaka, T.: Epithelioid granuloma induced by muramyl dipeptide in immunologically deficient rats. Infect. Immun. 34, 993-999, 1981

- 31) Tanaka, A., Emori, K., Nagao, S., Kushima, K., Kohashi, O., Saitoh, M. & Kataoka, T.: Epithelioid granuloma formation requiring no T-cell function. *Am. J. Pathol.* 166, 165-170, 1982
- 32) Youmans, G.P.: In : *Tuberculosis.*, G.P. Youmans, Ed., 277-284, W. B. Saunders Company, Philadelphia, 1979
- 33) Mackaness, G. B.: The influence for immunologically committed lymphoid cells on macrophage activity in vivo. *J. Exp. Med.* 129, 973-992, 1969
- 34) North, R. J.: The concept of the activated macrophage. *J. Immun.* 121, 806-809, 1978.
- 35) Karnovsky, M. L. & Lazdins, J. K.: Biochemical criteria for activated macrophages. *J. Immun.* 121, 809-813, 1978
- 36) Cohn, Z. A.: The activation of mononuclear phagocytes: Fact, Fancy and Future. *J. Immun.* 121, 813-816, 1978
- 37) Yamamoto, Y., Nagao, S., Tanaka, A., Koga, T. & Onoue, K.: Inhibition of macrophage migration by synthetic muramyl dipeptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80, 923-928, 1978
- 38) Nagao, S., Tanaka, A., Yamamoto, Y., Koga, T., Onoue, K., Shiba, T., Kusumoto, K. & Kotani, S.: Inhibition of macrophage migration by muramyl peptides. *Infect. Immun.* 24, 308-312, 1979
- 39) Tanaka, A., Nagao, S., Imai, K. & Mori, R.: Macrophage activation by muramyl dipeptide as measured by macrophage spreading and attachment. *Microbiol. Immunol.* 24, 547-557, 1980
- 40) Nagao, S., Miki, T. & Tanaka, A.: Macrophage activation by muramyl dipeptide (MDP) without lymphocyte participation. *Microbiol. Immunol.* 25, 41-50, 1981
- 41) Imai, K., Tomioka, M., Nagao, S., Kushima, K. & Tanaka, A.: Biochemical evidence for activation of guinea pig macrophages by muramyl dipeptide. *Biomedical Research* 1, 300-307, 1980.
- 42) Kaku, M., Yagawa, K., Nagao, S. & Tanaka, A.: Enhanced superoxide anion release from phagocytes by muramyl dipeptide or lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* 39, 559-564, 1983
- 43) Adam, A., Souvannavong, v. and Lederer, E.: Non specific MIF-like activity induced by the synthetic immunoadjuvant : N-acetyl muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (MDP). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 85, 684-690. 1978.
- 44) Leclerc, C. and Chedid, L. : Macrophage activation by synthetic muramyl peptides., In : *Lymphokines vol 7.* E. Pick, Ed., 1-21, Academic Press. Inc. 1982.
- 45) Wahl, S. M., Wahl, L. M., McCarthy, J. B., Chedid, L., and Mergenhagen, S. E. : Macrophage activation by mycobacterial water soluble components and synthetic muramyl peptide. *J. Immun.* 122. 2226-2231, 1979.
- 46) Nagao, S. & Tanaka, A.: Inhibition of macrophage DNA synthesis by immunomodulators. I. Suppression of ³H thymidine incorporation into macrophages by MDP and LPS. *Microbiol. Immunol.* 27, 377-387, 1983.
- 47) Goud, Th. J. L. M.: In : *Mononuclear phagocytes in immunity, infection and pathology.*, 189-203, Blackwell scientific publications, Oxford, 1975.
- 48) Ikegami, S., Taguchi, T., Ohashi, M., Oguro, M., Nagano, N. & Mano, Y.: Aphidicolin prevents mitotic cell division by interfering with the activity of DNA polymerase- α . *Nature* 275, 458-460, 1978
- 49) 杉影昭夫、田部一史、吉田松年 : DNA ポリメラーゼ α 、 β 、 γ . 蛋白質、核酸、酵素 28, 242-255, 1983
- 50) Haraguchi, T., Nagao, S., Tanaka, A. & Nagano, H.: Preferential loss of DNA polymerase a following suppression of replicative DNA synthesis of guinea pig macrophages by the immunostimulants muramyl dipeptide or lipopolysaccharide. *J. Leukocyte Biology* 41, 170-176, 1987
- 51) Bhattacharya, P. & Basu, S.: DNA polymerase activities in differentiating mouse neuroblastoma N-18 cells. *Proc. Natl. Acad.*

- Sci. U. S. A. 75, 1289-1293, 1978
- 52) Tenu, J.-P., Roche, A.-C., Yapo, A., Kieda, C., Monsigny, M., and Petit, J.-F.: Absence of cell surface receptors for muramylpeptides in mouse peritoneal macrophages. *Biol. Cell.* 44, 157-164. 1982.
- 53) Silverman, D. H. S., Krueger, J. M. and Karnovsky, M. L.: Specific binding sites for muramyl peptides on murine macrophages. *J. Immunol.* 136, 2195-2201. 1986.
- 54) Dziarski, R. : Demonstration of Peptidoglycan-binding sites on lymphocytes and macrophages by photoaffinity cross-linking. *J. Biol. Chem.* 266, 4713-4718. 1991.
- 55) Homma, Y., Onozaki, K., Hashimoto, T., Miura, S. Nagao, S. and Tanaka, A.: Different Effect of (L)-fucose binding lectin on macrophage migration inhibition caused by guinea pig migration inhibitory factor and synthetic muramyl dipeptide. *Int. Archs Allergy appl. Immunol.*, 65, 27-33, 1981.
- 56) Nagao, S. Ikegami, S. and Tanaka, A.: Inhibition of macrophage DNA synthesis by immunomodulators II. Characterization of the Suppression by muramylpeptide or lipopolysaccharide of ³H-thymidine incorporation into macrophages. *Cell. Immunol.* 89, 427-438, 1984.
- 57) Claycomb, W. C.: Biochemical aspects of cardiac muscle differentiation. *J. Biol. Chem.* 250, 3229-3235, 1975
- 58) Cline, M. J. & Sumnes, M. A.: Bone marrow macrophage precursors. I. Some functional characteristics of the early cell of the marrow macrophage series. *Blood* 40, 62-76, 1972
- 59) Nagao, S., Akagawa, K. S., Yamada, K., Yagawa, K., Tokunaga, T. and Kotani, S.: Lack of response murine peritoneal macrophages to *in vitro* activation by muramylpeptide (MDP) I. Macrophage activation by MDP is species dependent. *Microbiol. Immunol.* 34. 323-335., 1990.
- 60) Nagao, S., Akagawa, K. S., Okada, F., Harada, Y., Yagawa, K. and Tanigawa, Y.: Species dependency of *in vitro* macrophage activation by Bacterial peptidoglycans. *Microbiol. Immunol.* 36, 1155-1171. 1992.
- 61) 塩田 誠、梶川憲雄、西山 馨、西塚三美：受容機構におけるリン脂質代謝と蛋白質リン酸化反応。生体の科学 33, 258-263, 1982
- 62) 四宮博人：細菌内毒素 LPS によるマクロファージ活性化に関する研究：特に細胞内タンパク質リン酸化反応について。日本細菌学雑誌48、373-388、1993.
- 63) 宇井理生、多田周右：Ⅲ. 細菌外毒素による細胞内シグナル制御。第3章 微生物産物による細胞内シグナル制御に関する研究の新しい展開（医学微生物学の新しい展開）加藤延夫編。187-197、菜根出版、東京、1993.
- 64) 中野昌康、斎藤慎二、弥益博美、松浦基博、中野康伸、四宮博人：Ⅲ 細菌内毒素によるマクロファージ内シグナル伝達とその制御。第3章 微生物産物による細胞内シグナル制御に関する研究の新しい展開（医学微生物学の新しい展開）加藤延夫編。187-197、菜根出版、東京、1993.
- 65) 池沢宏郎、中島泉、田口良：V. GPI アンカー蛋白質と細菌の PI-PLC。第3章微生物産物による細胞内シグナル制御に関する研究の新しい展開（医学微生物学の新しい展開）加藤延夫編。187-197、菜根出版、東京、1993.
- 66) Takada, H and Kotani, S.: Muramyl dipeptide and derivatives. In: *The theory and practical application of Adjuvants.* Ed D. E. S Stewart-Tull. p 171-202. John Wiley and Sons Ltd. 1994.
- 67) Chedid, L., Audibert, F. & Tohnson, A. G.: Biological activities of muramyl dipeptide, a synthetic glycopeptide analogous to bacterial immunoregulating agents. *Prog. Allergy* 25, 63-105, 1978
- 68) 小谷尚三、高田春比古：細菌細胞壁ならびに関連する合成標品（ムラミルペプチド）の免疫薬理作用。薬学雑誌 103, 1-27, 1983
- 69) Kruger, J. M., Pappenheimer, J. R. and Karnovsky, M. L.: The composition of sleep-promoting factor isolated from human urine. *J. Biol. Chem.* 257 : 1664-1669. 1982.
- 70) Martin, S. A., Karnovsky, M. L, Krueger, J. M. Pappenheimer, J. R. and Biemann, K.: Peptidoglycans as promoters of slow-wave

- sleep. *J. Biol. Chem.* 259 : 12652-12658. 1984
- 71) Krueger, J. M., Pappenheimer, J. R. and Karnovsky, M. L.: Sleep-promoting effects of muramyl peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79. 6102-6106. 1982.
- 72) Johannsen, L., Kovalzon, V., and Krueger, J. M.: Somnogenic activity of muramyl peptide-derived immune adjuvants. *Int. J. Immunopharmac.* 16. 109-116. 1994.
- 73) Silverman, D. H. S, Wu, H and Karnovsky, M. L.: Muramylpeptide and serotonin interact at specific binding site on macrophages and enhance superoxide release. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 131. 1160-1167. 1985.
- 74) Polanski, M and Karnovsky, M. L.: Serotonergic aspects of the response of human platelets to immune-adjuvant muramyl dipeptide. *J. Neuroimmun.* 37. 149-160. 1992.
- 75) Mašek, K., Kadlecova, O and Petrovicky, P. The involvement of brain structures in the adjuvant effect of muramyl dipeptide.: *Brain research bulletin.* 15. 443-446. 1985.
- 76) Mašek, K : Overview on neuroimmunomodulation and possible role for serotonergic system. In.; *Advances in immunopharmacology.* 4. J. W. Hadden et al. Eds. 41-45. Pergamon press. 1988.
- 77) Pappenheimer, J. R.: Induction of sleep by muramylpeptides (Bayliss-staring memorial lecture 1982) *J. Physiol.* 336 : 1-11. 1983
- 78) Adam, A. and Lederer, E.: Muramyl peptides: Immunomodulators, Sleep factors, and vitamins. *Medicinal. Reserch. Reviews,* 4, 111-152. 1984.
- 79) 小谷尚三VI. 細菌細胞表層成分ならびにその合成対応物の生物学的活性 (細菌学はここまで進んだ) 蜂須賀養悦監修. 130-149. 葉根出版, 東京, 1986.
- 80) Harada, Y., Nagao, S., Nakamura, M., Okada, F. and Tanigawa, Y: Effect of lipopolysaccharide on thymidine salvage as related to macrophage activation. *Immunology.* 84. 1995 (in press)
- 81) Okada, F., Nagao, S., Harada, Y., Xavier, R. M., Nakamura, M., Ishida, T. and Tanigawa, Y.: The role of cAMP in the lipopolysaccharide-induced suppression of thymidine kinase activity in macrophage. *B.B.A.* 1995 (in press)