

第 47 回 総 会 特 別 講 演

結核菌体成分 Wax D により引き起こされる生体反応の解析

田 中 渥

九州大学医学部 胸部疾患研究施設

受付 昭和 47 年 7 月 10 日

The 47th Annual Meeting Special Speech

ANALYSES OF BIOLOGICAL RESPONSES TO WAX D,
A COMPONENT OF TUBERCLE BACILLI*

Atsushi TANAKA

(Received for publication July 10, 1972)

Tubercle bacillus and its adjuvant-active component, wax D, are known to produce a typical epithelioid granuloma and an adjuvant arthritis in animals. Two different derivatives of wax D were prepared: AD 6 and a polysaccharide portion of wax D. AD 6 was prepared by acetylating wax D and subsequently fractionating it by silicic acid column chromatography. AD 6 was found to be active as adjuvant. However, it possesses neither antigenicity nor toxicity nor anti-complementary activity nor adjuvant arthritis-inducing capacity. The polysaccharide portion was prepared by saponifying wax D. This was found to be antigenic but avoid of an adjuvant effect. None of these substances could produce the adjuvant arthritis or epithelioid granuloma, when injected alone. However, when they were injected together, the adjuvant arthritis and epithelioid granuloma could be induced. These results suggest that both the adjuvant effect and antigenicity may be required for the development of these changes in tissue. An alternative interpretation was also discussed.

In sensitization of mice with sheep red blood cells, the addition of adjuvant-active substances to the sensitizing antigen resulted in a highly significant increase in the size of plaques developed by spleen cells as measured by Jerne's plaque technique. The increase in plaque size was found to be a good measure for the adjuvant effect of substances as represented by mycobacterial adjuvants, because the phenomenon was specific for the adjuvant effect, highly reproducible, sensitive and can be performed with a limited number of mice.

The mode of action of immunological adjuvants was studied, using the 'plaque size' technique and purified mycobacterial adjuvants, wax D and AD 6. Data were obtained which suggest that wax D does not act directly on antibody-forming cells but on their precursors, causing the generation and/or proliferation of a special precursor cell designated as X'. Memory cells generated in the presence of wax D were found to 'memorize' its adjuvant effect, while normal memory cells generating by the stimulation of antigen alone were refractory to the adjuvant effect. Thus, wax D caused a generation of a special memory cells designated as Y'. It was thus strongly suggested that a special cell line X'-Y'-Z' is generated and/or

* From the Research Institute for Diseases of the Chest, Faculty of Medicine, Kyushu Univ. Meinohama, Fukuoka 814 Japan.

proliferated in the animal bodies which received the mycobacterial adjuvants along with antigen.

いとぐち

結核菌が引き起す種々の生体反応あるいは障害作用は、最終的には結核菌がもっている物質によつて引き起されるといえるであろう。そのような物質の中で、コード因子や Wax D (リポ多糖体) は代表的なものであろう。なぜなら前者は加藤らが明らかにしたように、結核菌の病原性に直接関係すると思われる毒作用をもっているし¹⁾、後者は安平らが明らかにしたように、結核結節の類上皮細胞巢形成を行う成分だからである²⁾。

Wax D は類上皮肉芽腫を含む典型的結核結節を作るが、それ以外に毒性、アジュバント活性 (以下ア活性と省略)、アジュバント関節炎誘起能等著明な生物活性をもっている³⁾ (表1)。われわれはこれらの諸性質のなかで、ア活性 (ある抗原の抗原性を質的および量的に高める性質) に注目した。そして Wax D を精製し、化学的に修飾して、ア活性のみを有する形、あるいは抗原性のみを有する形にすることができた。そしてこれらを組合せることによつて、類上皮細胞巢形成作用およびアジュバント関節炎誘起能の解析を行い、一方精製アジュバントを用いて、ア活性そのものの作用様式を調べた。

著者はすでに昨年の本誌に³⁾、Wax D を中心としたわれわれの仕事をもとめて発表しているのので、それと重なる部分ではできるだけ簡単に述べるにとどめ、それ以後明らかにされた問題に焦点をあわせることにしたい。

ア活性のみを有する Wax D 誘導体 (AD6) の調整

Wax D をアセチル化し、珪酸カラム・クロマトグラフィにより7画分を得た⁴⁾⁵⁾ (図1)。これらの画分の

Table 1.

	Tubercle bacilli	WaxD	AD6
Antigenicity	+	+	Immediate
			Delayed
Antigenic competition	+	+	-
Toxicity (Cytotoxicity, body wt, peritonitis, cord factor)	+	+	-
Arthritogenicity	+	+	-
Epithelioid granulomatogenicity	+	+	-
Anti-complementary effect	+	+	-
Protein adsorption	+	+	-
Macrophage stimulation	+	+	+
Adjuvant activity	+	+	+

なかで AD6 と呼ぶ画分は Wax D が本来もっている種々の生物活性を失い、ア活性のみを有している (表1)^{6)~15)26)~29)}。

つまり AD6 は物質としてのみならず、作用の点からも高度に精製されたアジュバントであるといえる。したがつて次のような場合、菌体全体を使う Complete Freund's adjuvant よりすぐれている。

(1) 目的とする抗原が弱いか量が少ないとき。(結核菌体をアジュバントとして使えば、抗原せりあい現象による抑制効果のため、免疫は成立しにくい。たとえば 1 μg の卵白アルブミンでモルモットを免疫するとき、結核菌をいろいろ異なつた量用いても感作は成立しなかつたが、AD6 を用いると、動物は強く卵白アルブミンに対して感作された⁸⁾¹⁶⁾。

(2) ア活性のメカニズムを調べるとき、特にア活性と Wax D がもっている他の生物活性との関連性について調べたいとき。(たとえば Burnet¹⁷⁾ をはじめ多くの人々は、アジュバント注射局所の granuloma を重視している。たしかにアジュバント注射局所におけるある種の細胞性の変化がア活性に重要ではあろう。しかし、AD6 は注射局所に granuloma あるいは炎症性腫脹を起さないのので、注射局所の granuloma 内の大部分の細胞性変化はア活性とは関係ないと思われる。その他ア活性発現と抗補体作用¹⁸⁾、抗原性¹⁹⁾²⁰⁾、毒性²¹⁾等を結びつける報告は多い。しかし AD6 はこれらの生物作用をもっていないので、これらの性質は結核菌が示す特有のア活性とは直接には関係ないとわれわれは考えている⁸⁾⁹⁾²²⁾。)

(3) 遅延型過敏症や実験自己免疫疾患の組織学的、病理学的変化の意義づけのとき。(たとえば実験自己免疫疾患の誘起に際しては、通常臓器抗原は Complete

Fig. 1. Structural Formula of Wax D and Acetyl Wax D

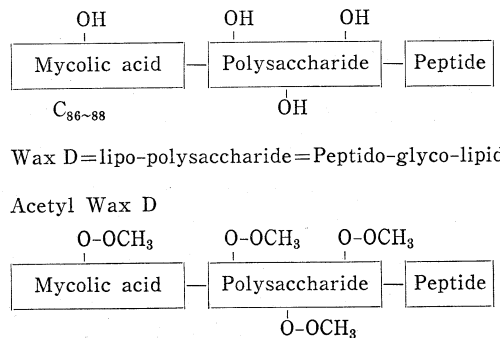
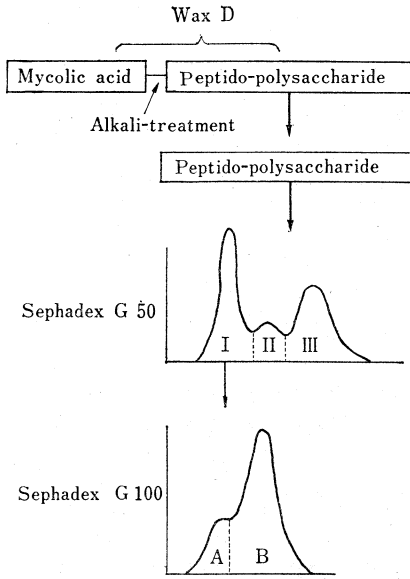


Fig.2. Fractionation of the Peptido-polysaccharide Portion of Wax D



Freund's adjuvant とともに注射される。ところが Complete Freund's adjuvant を注射するとそれだけで全身に granulomatosis が生じることがわかっている²³⁾。またコード因子の毒性は細胞を破壊する²⁴⁾。

(4) 人体応用のとき。

(5) Wax D あるいは結核菌が示す生体反応を解析したいとき。(たとえば類上皮細胞巢形成能やアジュバント関節炎誘起能の解析)

AD 6 の長所, 短所, 使い方について具体的なことは「免疫実験操作法 (免疫学会編)」に述べている。ここでは AD 6 が上記 (5) の目的に用いられた場合についてさらに詳しく取り上げることにする。

抗原性のみを有する Wax D 誘導体の調整

Wax D はペプチド多糖体の骨格にミコール酸がエステル結合したものである (図1)。

このエステル結合は温和なけん化によつて簡単に切れ、水に溶けるペプチド多糖体部分が分離できる。これを図2に示すように Sephadex G 50 により3つの画分に分画した。分子が大きいほうから Fraction I, II, III と呼ぶことにする。Fraction I はさらに Sephadex G 100 により IA と IB に分けられた。これら各画分は遅延型および即時型過敏症に関する抗原性をもっており、抗原性の強さは I > II > III である²⁴⁾²⁵⁾ (表2)。しかしこれらの画分は全くア活性を示さなかつた。即時型過敏症に関する抗原決定基は α-D-Arabinofuranoside を含む Oligo-糖と思われ²⁶⁾²⁷⁾、ペプチド部分は関係してないようである。遅延型過敏症に関する抗原部分については後

Table 2. Dissociation of Adjuvant Activity and Antigenicity of Wax D

	Adjuvant activity	Antigenicity		
		Immediate	Delayed*	
AD 6	+	-	-	
Wax D	Peptido-polysaccharide	I < A	+++	+++
		B	++	+
		II	+	±
	III	±	-	

*The delayed reaction contains no reaction to PPD.

Table 3. Formation of Epithelioid Granuloma (Yasuhira et al.)

	Sensitized	Not sensitized
Tubercle bacilli	++	+
Wax D	+++	+
Peptido-polysacch.	-	-
AD 6	-	-
AD 6+Pept.-Polys.	++	+
IB	-	-
AD 6+IB	-	-
II	-	-
AD 6+II	++	+

Investigated in rabbit lung.

に述べる。このように I, II, III 画分は Wax D の抗原性のみを取り出した形の物質といふことができる。

これらの Wax D 誘導体を用いて、次に述べるように類上皮細胞巢形成およびアジュバント関節炎誘起について調べた。

類上皮細胞巢形成

結核菌成分のなかで、類上皮細胞巢形成にあずかっているのは、Wax D であることが安平らによつて明らかにされた²⁾。著者らは安平らとの共同研究により以下のようなことを明らかにすることができた。結果は表3に示されている。Wax D を兔肺または皮下に注入すると典型的な類上皮細胞巢形成がみられるが、上記 Wax D 誘導体 AD 6 のみあるいはペプチド多糖体部分 (Fraction I, II, III) のみを注入しても、全く類上皮細胞巢の形成はみられなかつた。つまり Wax D のア活性あるいは抗原性だけでは類上皮細胞巢は現れない。ところが両者つまり AD 6 とペプチド糖部分を混ぜて注入すると典型的な類上皮細胞巢がみられた。ペプチド多糖体部分の代りにその subfraction である Fraction II を用いても同様の結果が得られた。しかし Fraction I ではそのような作用はみられなかつた。

Dannenbergr は結核菌感染巣でマクロファージが未熟類上皮細胞を経て、類上皮細胞へと分化するに従い、

bactericidal な細胞免疫が高まることを報告している³⁰⁾。Mackness はこのようなマクロファージが獲得する細胞免疫は非特異的で、感作リンパ球と抗原との接触を介して獲得されることを明らかにした³¹⁾。

Alexander らは lymphoma cell に対するマクロファージの細胞障害性を調べ、正常マクロファージから 2~3 の条件で 'armed' マクロファージとなり、'armed' マクロファージは抗原しげきにより、非特異的細胞障害性を示す 'activated' マクロファージに変化すると報告した³²⁾。

つまり Mackness も Alexander も、多少の相違があるが、マクロファージは抗原しげきを介して、非特異的殺菌作用あるいは細胞障害作用を有する activated Macrophage へ分化するといっている。

われわれのデータを少し詳しくながめると、表 2 からわかるように、結核菌感作家兔に AD 6 と Fraction II を混ぜて注入すると、典型的な類上皮細胞形成がみられるが、感作家兔に抗原のみ、つまりペプチド糖部分のみを注入しても細胞巣形成はみられなかつた。したがって結核結節内の類上皮細胞の発生は、結核菌特有抗原による単なるアレルギー反応だけでは起らず、同時に AD 6 の添加を必要とする。AD 6 が要求される理由は、AD 6 のア活性、つまり強い感作の過程が必要であるか、あるいは AD 6 中の代謝されにくいミコール酸が要求されるかのどちらかであろう。安平は結核結節の類上皮細胞巣が「超遅延型反応」を伴うことを指摘した³³⁾。また Sarcoidosis における Kveim テストにみられる典型的な類上皮細胞巣も同様に長期にわたって存在するし、Zirconium や Beryllium により引き起される典型的な類上皮細胞巣も長期にわたり存在する³⁴⁾。これらは抗原と感作リンパ球との反応は必要条件ではあるが十分条件ではなく、さらにそれ以外に強い感作が局所で繰り返行われているという条件、あるいは代謝されにくいものが存在しているという条件が必要であることを示しているように感ぜられる。今後この問題をもつとはつきりさせたい。

アジュバント関節炎誘起能

結核菌をラッテに注射すると関節炎を起すことが Pearson によつて見出され、アジュバント関節炎と名づけられた³⁵⁾。これが人間のリウマチ関節炎や Reiter 氏病に似ていることから、その後この方面の研究者の関心をひき、多くの研究がなされてきた。この実験関節炎は結核菌成分のなかで、Wax D により引き起されることが明らかにされ、また遅延型過敏症を基盤として発症することもわかつた。しかし何が抗原となるのか、抗原は結核菌由来か、組織由来か、わかつていなかつた。われわれは 10 年近く Pearson らと共同研究を行つてきたが、その間 AD 6 がアジュバント関節炎を引き起さない

Table 4. Induction of Adjuvant Arthritis (Koga et al.)

Inoculum (mg)	Arthritis		Delayed skin reaction to: (mm)	
	Incidence	Score	IA 10 μ g	PPD 10 μ g
IA 0.02	1/6	4.0	8.3(+)	0 (-)
AD6 0.2	0/6	0	0 (-)	0 (-)
IA 0.02 } AD6 0.2 }	6/6	13.7	13.0(+)	0 (-)
II 0.2 } AD6 1.0 }	0/8	0		0 (-)
III 0.2 } AD6 1.0 }	0/8	0		0 (-)

+ : Induration

ことを明らかにした¹⁵⁾。

最近、研究室の古賀は AD 6 あるいはペプチド多糖体部分単独注射では関節炎は起らないが、両者を混ぜて注射すると、100% 発症することを見出した(表 4)。つまり Wax D により引き起されるアジュバント関節炎は、Wax D のア活性のみあるいは抗原性のみでは引き起されないが、それらの作用をもつている物質を混ぜると引き起される。この点類上皮細胞巣形成の場合と似ている。ただ、抗原として働くペプチド多糖体の各画分のうち、Fraction I のみが発症能力を有し、II, III は AD 6 と組合せてもアジュバント関節炎を起すことはできなかつた(表 4)。PPD に AD 6 を混ぜて注射すると、ラッテは PPD に対する強い遅延型皮膚反応を示したが、Fraction I に対する反応は陰性で、関節炎も全例マイナスであつた。Fraction I (IA あるいは IB) に AD 6 を混ぜてラッテを感作すると、Fraction I に対する遅延型皮膚反応が陽性となり、PPD に対しては陰性で、全例に関節炎が起つた。このことは結核菌の典型的な抗原である PPD はアジュバント関節炎の抗原ではないこと、PPD 以外に遅延型過敏症を起す抗原として Wax D のペプチド多糖体部分が存在すること、そしてそれが関節炎を起す抗原であることを示していると思われる。

アジュバント関節炎を引き起す処置 (Wax D あるいは結核菌体の注射) をしたあと、Fraction I による皮膚反応を何回か行くと関節炎が起りにくくなること、また関節炎が起つているときは皮膚反応は陰性化するが、その前後は陽性であることが観察されている。このことは、関節炎が起つている局所に結核菌あるいは Wax D が運ばれ、そこで Fraction I を抗原とするアレルギー反応が起ることが、関節炎の発症のメカニズムであることを示唆しているように感ぜられる。Fraction I はペプチドが結合している多糖体であるが、即時型過敏症を起す強い抗原性をもつている²⁶⁾²⁷⁾²⁸⁾。これが、モルモットおよびラッテを用いた皮膚反応およびマクロファ-

Table 5. Dissociation and Reconstitution of the Activities

	Adjuvant effect	Anti-genicity	Adjuvant arthritis induction	Epithelioid granuloma formation
Wax D	+	+	+	+
AD 6	+	-	-	-
Pept. -Polys.	-	+	-	-
AD6+Pept. - Polys.	+	+	+	+

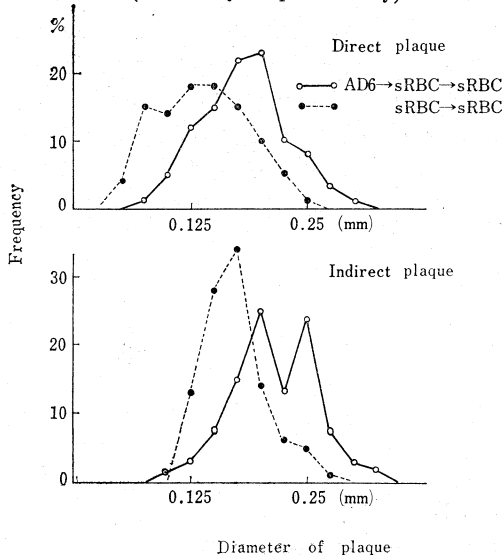
ジ遊走阻止テストにより、遅延型過敏症に関する抗原となりうる事が示されたことは興味がある。抗原決定基が多糖体部分にあるのか、ペプチド部分にあるのか、その両者にまたがるのかを決めるのは今後の問題である。

以上の成績を簡単にまとめると表5のようになる。類上皮細胞巣形成とアジュバント関節炎誘起が全く同じメカニズムによるとは考えにくい、表5のように、似ている点もある。これらの成績はある物質が示すある生物活性や障害性を調べる場合、その物質を化学的に修飾すれば、解析のために有益なデータが得られることがあることを示す一つの例であると思われる。

細胞レベルにおける Wax D のア活性の作用様式

ある抗原に結核菌あるいは Wax D を混ぜて動物を感作すると、抗体産生が増強することはよく知られている事実である。われわれは羊血球を抗原としてマウスを感作し、Jerne のプラク法により抗体産生細胞を調べ、Wax D アジュバントは抗体産生細胞の数を増加させるのみならず、1 コの細胞あたりの免疫能力(抗体産生量かあるいは抗体の質に関する)を強めることをすでに報告した¹¹⁾。つまり Wax D はプラクの数および平均直径を増大させた(図3)。

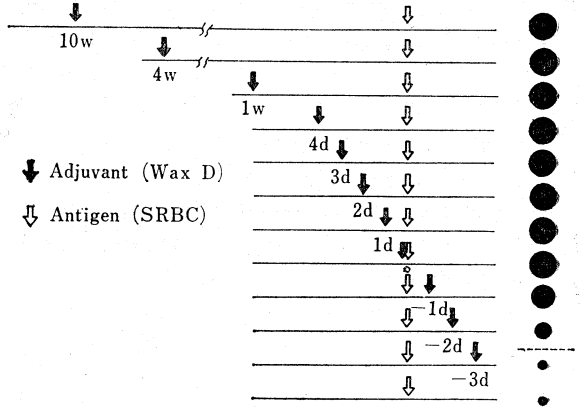
Fig. 3. Frequency Distribution of Plaque Size (Secondary resp. 4th day)



このアジュバントによる抗体産生細胞のプラクの平均直径の増大という現象は、アジュバントに特異的に起り、鋭敏で、再現性があるので、ア活性の測定手段としてすぐれていることがわかった。このことについて具体的なことは「免疫実験操作法(日本免疫学会編)」に述べている。以下この方法でアジュバントの作用様式を調べた結果について述べる。

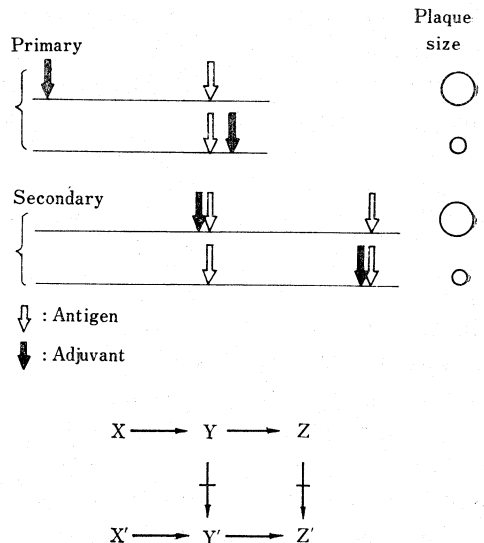
Wax D の水浮遊液を羊血球と混ぜてマウスに注射すると、プラクの平均径の増大がみられたが、Wax D のみをあらかじめ注射して、その後いろいろの時期に(1~70日後)羊血球を注射しても、プラク径の増大がみられた(図4)。このことは Wax D のア活性を反映する変化が生体内に長く残ることを示す。ところが抗原しげき後1ないし2日目に Wax D を注射すると、プラク

Fig. 4. Effect of Wax D Injected before or after Antigen Injection on Plaque Size



The large solid circle represents the enlargement of plaque size, the small solid circle represents the normal plaque.

Fig. 5.



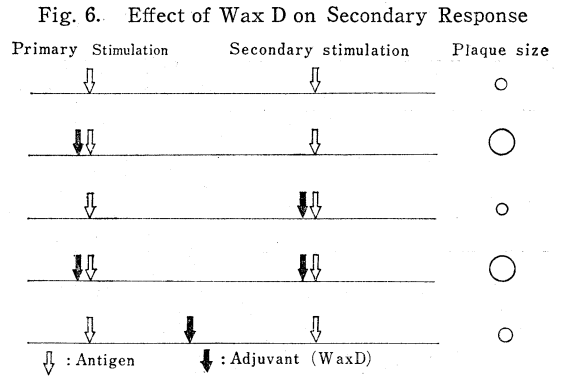
の平均径はだんだん小さくなり、抗原しげき後 3 日目にアジュバントを注射すると、もう径の増大はみられなかった (図 4)。この際プラクの測定は通常抗原しげき後 4~6 日目に行っている。このことは、平均径が大きくなるのは、Wax D が抗体産生細胞に直接働きかけるのによるのではなく、抗原しげき以前あるいは同時に行われた Wax D 注射によって生体内に引き起された変化によるのであることを示している。

そのような生体内に長く残る、ア活性を反映する変化として、(1) Wax D が抗原しげきのときまでそのまま生体内にとどまる可能性、(2) Wax D のア活性を反映する液性因子ができる可能性、(3) Wax D により細胞群に変化が起きている可能性が考えられた。その後 (3) の可能性が大きいことが、以下のように主に細胞移入実験により明らかにされた。

ここで、免疫担当細胞群に何が起つているかを推定するため、便宜上 Sercarz の X-Y-Z モデルを借用する (X-Y-Z モデルが Sercarz がいつている意味で正しいかどうかは別問題として)。そうすれば図 5 に示されているように、アジュバントによつてプラクの平均径が大きくなる事実は、普通より大きなプラクを作る細胞 (Z') がふえるか新しく出現するためだと考えられる。上記のように抗体産生が始まりかけた時期に Wax D を注射しても効果はないから、Wax D による Z→Z' の転換は起らないと表現できるであろう。

次に免疫記憶細胞 (Y) に対する Wax D の効果を調べるため、初回抗原しげきとともにアジュバントを用いる場合と、二次抗原しげきとともにアジュバントを用いる場合、プラク径がどうなるかを調べた。結果は図 5, 6 に示されているように、初回抗原しげきのとき Wax D を用いれば、二次しげきは抗原単独しげきのみでプラク径は大きくなったが、初回しげきを抗原単独で行えば、二次しげきのときアジュバントを使つてもプラク径の増大はみられないことがわかった。つまりアジュバント存在下に発生した記憶細胞は抗原しげきのみならず、ア活性も同時に '記憶' しているが、初回しげきが抗原のみによつて行われた場合発生する正常の記憶細胞は、ア活性をもはや受けつけないと表現されるような結果である。したがつてこのことは、初回しげきにアジュバントを使用することにより、特殊な (ア活性を '記憶' した) 記憶細胞 Y' が発生したこと、アジュバントにより Y→Y' の転換は行われなことを示唆している (図 5)。

つまり記憶細胞や抗体産生細胞のレベルでは、アジュバントにより特殊な記憶細胞 Y' や産生細胞 Z' への転換は行われなことを示していると思われる。とすれば、Y' は Wax D により発生する特殊な前駆細胞 X' から転換す



ると考えるのが一番自然に思われる (図 5)。

はたしてアジュバントにより、そのような特殊な前駆細胞 X' が出現するのかどうかを調べるため、近ごろよく行われる細胞移入実験を行った。

レ線照射マウス (recipient) に正常脾細胞を羊血球とともに静注し、数日後 recipient の脾細胞について、プラク法を行うと、正常の大きさのプラクが出現した (図 7)。ところがあらかじめ Wax D を donor マウスに注射し、1 週後それから取り出された脾細胞をよく洗つて、羊血球とともにレ線照射 recipient に静注すると、recipient の脾細胞は大きなプラクを作つた (図 7)。また Wax D を注射された donor の血清中には、プラク径を増大させる因子は見つからなかつた。これらのことは Wax D により donor の脾臓中に、特殊な前駆細胞 X' が増殖出現していることを強く示唆する。つまりこの結果は、Wax D をあらかじめ注射することによつて引き起される、ア活性を反映する生体内の変化は、上記の 3 つの可能性の 3 番目、つまり細胞レベルでの変化であることを強く示唆している。

donor マウスに Wax D と羊血球をあらかじめ注射しておき、1 週後にその脾細胞をとり出し、羊血球とまぜて同様にレ線照射 recipient に静注すると、この場合も recipient の脾細胞は大きなプラクを作つた。このことは donor の脾臓中に Y' が出現しているという上記の成績を再確認したものと見える。

Fig. 7. Adoptive Cell Transfer (Spleen cells)

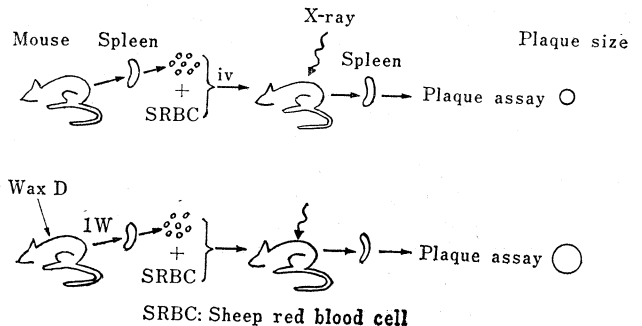


Fig. 8. Adoptive Cell Transfer (Thymus and marrow cells)

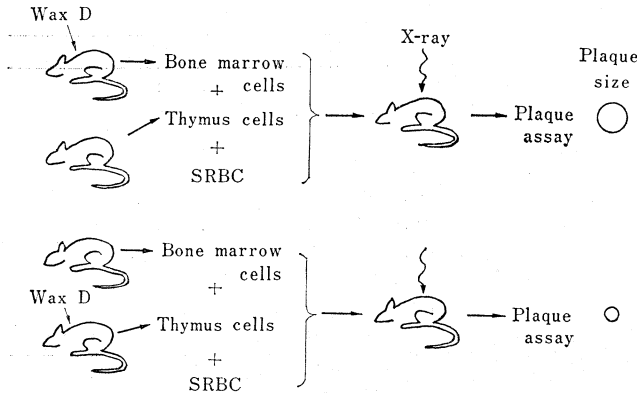
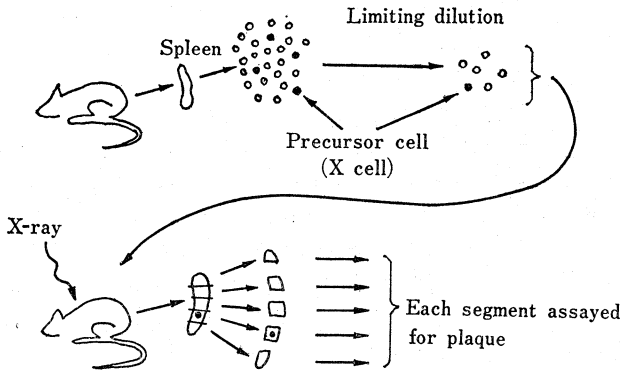


Fig. 9. Transfer of a Limiting Dilution of Spleen Cells



羊血球に対するマウスの抗体産生は胸腺依存細胞 (T cell) と骨髄依存細胞 (B cell) の協同作用によることが最近はつきりしている⁸⁶⁾⁸⁷⁾。

アジュバントをあらかじめ注射されたマウスから T cell を取り出し、これに正常マウスの B cell を混ぜて recipient に移入してやると、recipient 脾細胞が作るプラクの平均径は正常であるが、アジュバントをあらかじめ注射した donor マウス由来の B cell と、正常マウス由来の T cell を組合せると大きなプラクができることがわかった (図8)。

最近核酸アジュバントが T cell に働くという成績⁸⁸⁾ や反対に B cell に働くという報告⁸⁹⁾ が出されているが、結核菌アジュバントについては、そのア活性を反映する変化は B cell に起っている、つまり X' は B cell 中に出現しているといえよう。しかし、最近のわれわれの実験によるとその変化は T cell を通して起っているようである⁴⁰⁾。

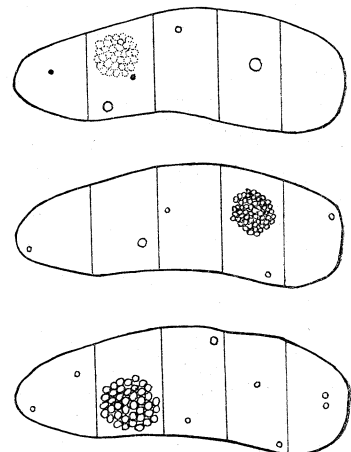
以上をまとめると、抗原単独しげきでは、X-Y-Z により表される正常の免疫担当細胞が増殖動員されるが、アジュバントが存在すると、それ以外に大きなプラクを作る X'-Y'-Z' cell line が増殖動員されるということになる。

次にそのような X' の1つ1つを取り出すような実験を行った。

上記細胞移入実験で、recipient に静注される donor の脾細胞の数を少なくして、ちょうど1~2コの前駆細胞が recipient の脾臓に到達し、定着し、増殖するように移入脾細胞の数を調節した (図9)。その結果図10に示されるように recipient の脾臓中には1コの前駆細胞から分裂増殖した細胞がコロニー状に限局して発生することがわかった。そしてある1つのコロニーに属するプラク群はその大きさや性状 (プラクの縁がはつきりしているか、ぼんやりしているか) が非常に似ているということ、コロニーが変わればその中のプラクの大きさや性状は異なるということがわかった。これらの結果は、Cunningham⁴¹⁾、Nossal ら⁴²⁾、Bosma ら⁴³⁾の結果とあわせて考えるとき、このコロニーはクローンであることを強く示唆している。つまり X-Y-Z あるいは X'-Y'-Z' cell lines はクローン性をもっていることがわかった。

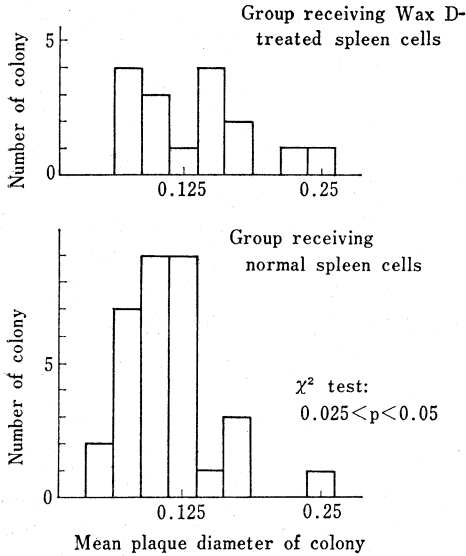
正常マウスと Wax D を注射されたマウスから、このようなクローンを多数取り出してみると、図11に示されるように、Wax D 使用によつて、大きなプラクを作るクローンの出現の頻度が高められていることがわかった。しかし、同じ図11のデータからわかるように、正常脾細胞からも、たつた1コではあるが、大きなプラクを作るクローンが出現した。このことは、アジュバントにより多数出現すると思われる X' は正常のリンパ組織の中にも存在するが、アジュバントが存在すれば、通常の前駆細胞 X に比べ、より強く増殖するような前駆細胞

Fig. 10. Clonal Nature of Plaque Formation



- 1) Localization
- 2) Homogeneous in size
- 3) Homogeneous in appearance

Fig. 11. Distribution of Mean Plaque Diameter of Each Colony



であることを示唆しているように思われる。あるいは大きなプラクを作る細胞のほうが、アジュバントが存在すれば、存在しないときより、より強く分裂増殖する性質があるのであつて、X' というある特殊な細胞集団があるのではないのかもしれない。

Wax D は図 1 に示されているようにミコール酸-糖-ペプチド複合体である。これら各成分は生体内には存在しない特殊な物質である。Wax D のア活性が発揮されるためには、これら各成分はすべて必要で³⁾、同時に糖部分はある程度の大きさをもつていなければならぬが³⁴⁾、OH 基のような小さい化学構造は活性には関係ない³⁵⁾。つまり特有な化学構造とある大きさ、ひと言いでいえば、分子の特有な‘形’が活性には要求されるように思われる²²⁾。

ア活性を有する Wax D は、いわゆる人型結核菌の菌体表面に遊離の状態が存在しているが、人型菌以外の抗酸菌では、遊離の状態ではほとんど存在していない⁴⁵⁾。しかし Wax D がもっている活性構造は、BCG の細胞壁中には結合した状態で存在している。われわれはこれを‘bound Wax D’ とよんでいる⁴⁶⁾。したがつて人型菌は遊離の状態と結合した状態で、他の抗酸菌は主に結合した状態で、アジュバント活性構造をもっていると考えられる。これに関連して、White らは結核菌細胞壁と Wax D の構成成分の類似性を指摘し⁴⁷⁾、山村らは種々の抗酸菌の細胞壁がア活性をもっていることを報告している⁴⁸⁾。

このように抗酸菌の表面にはア活性に関する特有の‘形’の物質がかなりの量存在している。最新号の Proc. Nat. Acad. Sci. によるとフランスの Adam らは小谷

Table 6. Adjuvant Activity of Cell-walls of Various Bacteria

Active	Inactive
BCG	L. plant*
Strept. (A)	S. aureus*
M. lysod.	B. mega.
Strept. CHT	St. lav.
S. mut. AHT	G. Cand.
S. mut. HHT	N. ast.
S. mut. BHT	Odontmy.
C. dyph.	

300 μ g cell walls used
Activity measured by plaque size method

* Active when whole cells were used.

らの方法によつて調整された BCG, M. smegmatis, M. kansasii の脱脂菌膜のリゾチーム消化物から、水溶性のアジュバント活性因子を取り出したことを報告している⁴⁹⁾。糖、アミノ酸の構成は Wax D と非常によく似ているが、ミコール酸をもっていないかわりに分子量は 20,000 とかなり大きい。十分な大きさがあれば、ミコール酸はなくても、糖とアミノ酸が示す異常性 (D-アラビノースと D-アミノ酸) だけで活性は出てくるのであろう。

生体はこれら結核菌表面のアジュバント活性構造の特有な‘形’を‘認識’する手段をもっているのであろう。‘形’が特有であるためには特有な化学構造を必要とし、また‘認識’されるためにはある程度以上大きくないといけないのであろう。生体がこれを‘認識’したなら、有能な抗体産生細胞 (X') がより強く増殖動員されるのであろう。結核菌アジュバントの使用で、モルモットに 7S γ -2 グロブリン産生細胞が発生することも同様のメカニズムによると思われる。

では他の細菌についてはどうであろうか。最近著者らは、小谷らが調製した種々の菌の細胞壁のア活性をプラク法で調べた。表 6 に示されるように 300 μ g でア活性が認められるものと認められないものがあることがわかつた。Wax D も AD 6 も 1 μ g まで活性が認められたことを考えあわせると、結核菌は強いア活性をもっていることが再確認されたといえよう。300 μ g でも活性がみられなかつた細胞壁でも (2 例しか調べてないが) 菌全体では活性がみられた。これはア活性に大きさが関係しているという考え方を支持しているかもしれない。いずれにしろ、他の細菌と比べて、生体は結核菌に強く反応することを再確認した。

また生体は菌表面の特有な‘形’の分子つまりアジュバント活性構造を‘認識’し、菌の種類に従つて程度の差はあるが、X' 系細胞の増殖動員を行うということは一般に種々の菌の感染に際しみられる現象と思われる。

最近上田らとの協同研究で、著者らは AD 6 を注射された無菌マウスの脾細胞も大きなプラクを作りうること

を観察した。このことは、このような‘認識’能力は生体に本来そなわっているもので、感染によりはじめて誘導される能力ではないことを示している。生体がこのような能力をもっていることは、生体が生存のためにきわめて合目的につくられていることを示している。

おわりに

著者は Wax D の多糖体部分の OH 基をアセチル基でおおつても、その特有のA活性のみは残っているという事実から強い印象を受け、一方生体は合目的につくられているという発想を強くもっている。したがって、実験の間口も狭いことも加わって、推論のなかにはかなりひとりよがりの飛躍もあろうかと思われる。多くの方のご批判を期待し、また今後実験を重ねて真実により近い理解を得たいと願っている。

謝 辞

本講演の機会を与えられた占部会長および結核菌体成分の研究の手ほどきと本講演の司会をつとめてくださった山村雄一教授に感謝いたします。また本研究を行う機会とご支援をいただいた杉山浩太郎教授および研究を推進して下さった下記の同僚の研究担当者に感謝の意をあらわし、またいろいろ協力して下さった下記の協同研究者の方々、特に病理学的検索を行って下さった安平公夫教授に感謝いたします

研究担当者：石橋凡雄，古賀敏生，高本正祇，小橋修，斎藤玲子，田中国雄，永尾重喜，篠崎晋輔，萩本伝次，桑野毅，藤原靖生

協同研究者：安平公夫，染谷四郎，上田雄幹，小谷尚三，加藤允彦，武谷健二，C. M. Pearson，村岡静子

文 献

- 1) 加藤允彦：結核，47：93，1972.
- 2) 安平公夫：結核，44：273，1969.
- 3) 田中渥：結核，46：41，1971.
- 4) Tanaka, A.: *Biochim. Biophys. Acta*, 70 : 483, 1963.
- 5) Tanaka, A. and Kitagawa, M.: *Biochim. Biophys. Acta*, 98 : 182, 1965.
- 6) Tanaka, A., Tanaka, K., Tsubone, T., Kuroda, Y. and Sugiyama, K.: *Int. Arch. Allergy*, 28 : 340, 1965.
- 7) Ishibashi, T., Tanaka, A., Sugiyama, K. and Koga, T.: *Experientia*, 27 : 96, 1971.
- 8) Tanaka, A., Ishibashi, T., Sugiyama, K. and Takamoto, M.: *Z. Immun.-Forsch.*, 142 : 303, 1971.
- 9) Tanaka, K., Tanaka, A. and Sugiyama, K.: *Int. Arch. Allergy*, 34 : 495, 1968.
- 10) Shinozaki, S., Tanaka, A. and Sugiyama, K.: *Int. Arch. Allergy*, 35 : 313, 1969.
- 11) Koga, T., Ishibashi, T., Sugiyama, K. and

- Tanaka, A.: *Int. Arch. Allergy*, 36 : 233, 1969.
- 12) Yamazaki, S., Koyama, K., Someya, S., Azuma, I. and Yamamura, Y.: *Amer. Rev. Res. Dis.*, 100 : 691, 1969.
- 13) Jollès, P., Migliore, D. and Bonhomme, F.: *Immunol.*, 14 : 159, 1968.
- 14) Bonhomme, F., Boucheron, C., Migliore, D. and Jollès, P.: *Experientia*, 24 : 716, 1968.
- 15) Wood, F. D., Pearson, C. M. and Tanaka, A., *Int. Arch. Allergy*, 35 : 456, 1969.
- 16) Tanaka, A., Tanaka, K., Hagimoto, D. and Sugiyama, K.: *Int. Arch. Allergy*, 32 : 224, 1967.
- 17) Burnet, M.: *Cellular Immunology*, Cambridge and Melbourne Univ. Press, P. 593, 1969.
- 18) Talmage, D. W. and Pearlman, D. S.: *J. Theor. Biol.* 5 : 321, 1963.
- 19) Braun, W. and Nakano, M.: *Adjuvants of Immunity*, S. Karger, Basel, p. 227, 1967.
- 20) Schierman, L. W. and McBride, R. A.: *Science*, 156 : 658, 1967.
- 21) Koga, T., Sugiyama, K. and Tanaka, A.: *Experientia*, 27 : 323, 1971.
- 22) Ishibashi, T., Hagimoto, D., Shinozaki, S., Tanaka, A. and Sugiyama, K.: *Jap. J. Exp. Med.* 41 : 95, 1971.
- 23) Chase, M. W.: *Mechanism of Hypersensitivity*, Little, Brown and Company, Boston, P. 673, 1959.
- 24) 古賀敏生・石橋凡雄・田中渥・杉山浩太郎：九大胸部疾患研究所紀要，13：61，1969.
- 25) 古賀敏生・石橋凡雄・田中渥・杉山浩太郎・小谷尚三・加藤隆正：九大胸部疾患研究所紀要，14：23，1970.
- 26) Tanaka, A., Kohashi, O. and Sugiyama, K.: *Int. Arch. Allergy*, 32 : 208, 1967.
- 27) Tanaka, A., Ishibashi, T. and Sugiyama, K.: *Int. Arch. Allergy*, 32 : 215, 1967.
- 28) Tanaka, A., Hirota, N. and Sugiyama, K.: *Int. Arch. Allergy*, 32 : 349, 1967.
- 29) Ishibashi, T., Fujiwara, Y., Tanaka, A. and Sugiyama, K.: *Int. Arch. Allergy*, 36 : 506, 1969.
- 30) Dannenberg, A. M., Jr., Shima, K., Kambara, T., Meyer, O. T., Esterly, J. R. and Fabrikant, J. I.: *Japan-US Co-operative Medical Science Program*, 第5回シンポジウム，予稿集，p. 189, 1970.
- 31) Mackaness, G. B.: *J. Exp. Med.*, 129 : 973, 1969.
- 32) Evans, R. and Alexander, P.: *Nature*, 236 : 168, 1972.
- 33) Yasuhira, K.: *Acta Pathol. Jap.*, 10 : 419, 1960.
- 34) Shelley, W. B. and Hurley, H. J., Jr.: *Immunological Diseases*, Little, Brown and Co., Boston, p. 722, 1971.
- 35) Pearson, C. M.: *Mechanism of Hypersensitivity*, Little, Brown and Co., Boston, p. 647, 1959.

- 36) Claman, H. N., Chaperon, E. A. and Triplett, R. F.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 122 : 1167, 1966.
- 37) Miller, J. F. A. P., and Mitchell, G. F.: J. Exp. Med., 131 : 675, 1970.
- 38) Cone, R. E. and Johnson, A. G.: J. Exp. Med., 133 : 665, 1971.
- 39) Campbell, P. A. and Kind, P.: J. Immunol., 107 : 1419, 1971.
- 40) Kohashi, O., Tanaka, A., Ishibashi, T. and Sugiyama, K.: unpublished observation.
- 41) Cunningham, A. J.: Aus. J. Exp. Biol. Med. Sci., 47 : 493, 1969.
- 42) Nossal, G. J. V. and Lewis, H.: Immunol., 20 : 739, 1971.
- 43) Bosma, M. and Weiler, E.: J. Immunol., 104 : 203, 1970.
- 44) Koga, T., Ishibashi, T., Sugiyama, K. and Tanaka, A.: Biochim. Biophys. Acta, 158 : 144, 1968.
- 45) White, R. G., Bernstock, L., Johns, R. G. S. and Lederer, E.: Immunol., 1 : 54, 1958.
- 46) Kotani, S., Hashimoto, S., Matsubara, T., Kato, K., Harada, K., Kogami, J., Kitaura, T. and Tanaka, A.: Biken J., 6 : 181, 1963.
- 47) Stewart-Tull, D. E. S. and White, R. G.: J. Gen. Microbiol., 34 : 43, 1964.
- 48) 山村雄一・東一郎・金網史至 : 結核, 47 : 51, 1972.
- 49) Adam, A., Ciorbaru, R., Petit, J. and Lederer, E.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69 : 851, 1972.