

第53回総会特別講演

II. ミコバクテリアと細胞性免疫

山 村 雄 一

大阪大学医学部第3内科

受付 昭和53年8月21日

The 53rd Annual Meeting Special Lecture

II. MYCOBACTERIA AND CELLULAR IMMUNITY

Yuichi YAMAMURA*

(Received for publication August 21, 1978)

It has been shown that mycobacterial cells including tubercle bacilli were very useful tool for the study on cellular immunology. In this review, I summarize the results of our immunological study on tubercle bacilli.

1. Experimental cavity formation in rabbits. We have clearly shown that experimental tuberculous cavity was produced by the intrathoratic injection of heat-killed mycobacterial cells suspended in mineral oil. Recently it was also shown that the intrathoratic injection of mycobacterial protein antigen together with potent adjuvant substance such as BCG cell-wall skeleton emulsified in Freund's incomplete adjuvant produced experimental cavity in rabbits.

2. Tuberculin active peptide (TAP). TAP purified from the defatted cells of mycobacteria and nocardia was shown to be low molecular weight (<10,000 dalton) and stable. The specificity of TAP in skin-reaction is almost similar with that of PPDs.

3. Cancer immunotherapy with BCG cell-wall skeleton (CWS).

BCG-CWS was shown to have principal chemical structure of "mycolic acid-arabinogalactan-mucopeptide" complex, and the adjuvant activity of BCG-CWS was examined in detail. We have also shown that oil-attached BCG-CWS had potent anti-tumor activity in transplantable tumors in syngeneic mice, rats and guinea pigs. BCG-CWS stimulated the depressed T cell function to normal level in tumor-bearing host. The incidence of carcinogenicity with chemical carcinogens in mice, rats and rabbits was inhibited by the administration of BCG-CWS. BCG-CWS is now being used as immunotherapeutic agent for the treatment of human malignant diseases especially in the patients with lung cancer and leukemia.

4. Synthetic peptidoglycan subunits.

The minimum adjuvant-active subunit of bacterial cell-wall was established to be N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (MDP). MDP was shown to have adjuvant activity, but no antitumor activity. 6-O-Mycoloyl-MDP showed potent adjuvant activity on cellular immune response and antitumor activity in transplantable tumor in syngeneic mice. It was also found that the immunization with DNP-6-O-Mycoloyl-MDP induced the IgE specific suppressor cells which did not affect on the production of IgG class antibody to DNP.

* From Osaka University Medical School, Fukushima-ku, Osaka 553 Japan.

私どものミコバクテリアと細胞性免疫に関する研究はこの1枚のスライド(写真)に始まったといつてよい。このスライドは初めてウサギの肺に人間のそれによく似た空洞をつくることに成功した、その空洞である。

今から4年前、第49回日本結核病学会が砂原会長主宰の下に開かれたとき、「結核病学の未来」と題するいくつかの特別講演が企画され、私もその演者の1人選ばれた。このとき私は結核菌に関する基礎的研究の重要性を強調し、結核菌の示す免疫学的活性は他の微生物と比べて格段に興味深く、特に“細胞性免疫”の研究に欠くべからざるものであることを述べた。その意味で今回の山本会長主宰の本学会で特別講演者の1人選ばれたことは、まことに光栄であると感じるとともに責任もまた重大であると思う。

結核菌を含むミコバクテリアが近年の免疫学の進歩、特に細胞性免疫の機構の解明に大きな役割を果たしてきた。

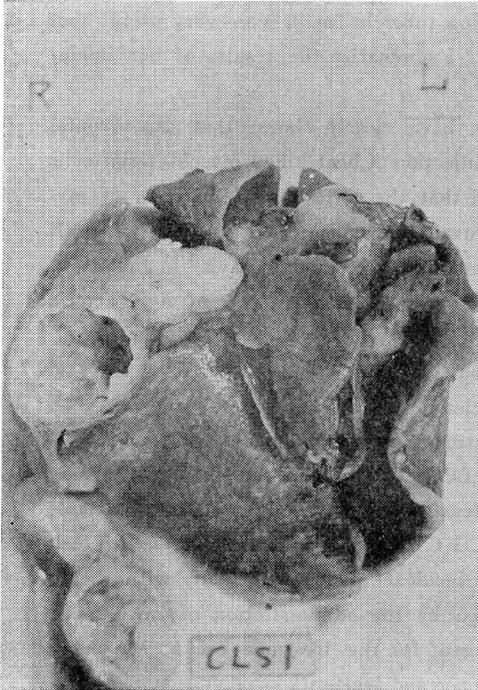


写真 ウサギにおける実験的結核性空洞

表 結核菌の免疫学的活性

- | |
|----------------------|
| 1. 免疫アジュバント活性 |
| 2. 感染防御活性 |
| 3. ツベルクリン反応 |
| 4. 血中抗体 蛋白, 多糖体, 燐脂質 |
| 5. 結核空洞形成 |
| 6. 実験的アジュバント関節炎 |
| 7. 抗腫瘍活性 |

古く Freund がミコバクテリアの加熱死菌を water in oil の状態で鉱物油に浮遊させたいわゆる「 Freund の完全アジュバント」の強力な細胞性免疫誘導作用を見出したことや、結核感染の実験モデルが未だに細菌感染における細胞性免疫の機構を知るうえで重要視されていることは、この間の事情を物語っている。

すなわちミコバクテリアという細菌はその免疫学的活性、特に細胞性免疫にかかわる性質によつて特徴づけられている。その著明な性質を一括して示したのが表である。この表から分かることは細胞性免疫の研究にはミコバクテリアは優れた材料となることである。

私はここに過去30年間にわたつてテーマとしてきた結核菌を中心とするミコバクテリアの菌体成分の免疫学的研究について、特にこれらの菌体成分が細胞性免疫応答において果たす役割について私どもの成績を中心として記す。

1. 結核性空洞の成因

私どもは1953年ウサギやモルモット肺内に鉱物油に浮遊させた結核死菌を直接投与することにより、容易かつ高率に人間のそれに似た結核性空洞が形成されることを見出した。この空洞の形成は動物をあらかじめ死菌で感作しておくことにより空洞の形成時期を早め、空洞の生成率を100%近くに高めることができる。

あらかじめ死菌で感作した動物の肺内に結核菌由来の蛋白を私どもの方法で注入しても空洞の形成が認められ、リボ蛋白のみでも空洞の形成が認められる。しかし多糖体や脂質には空洞形成作用が認められず、空洞形成のメカニズムとして蛋白が抗原となつて作用する遅延型アレルギー(細胞性免疫)が主役を演ずるものであることを見出した。

この空洞の形成はツベルクリン活性を持つ蛋白やペプチドを繰り返し動物に静注することにより遅延型アレルギーを抑制すると阻止され、肉芽の形成に止まつてしまう。

更に蛋白成分と強力な細胞性免疫誘導作用をもつ菌の細胞壁スケルトンを混合して肺内に投与することによつて、空洞の形成が認められた。

2. ツベルクリン活性因子

周知のように結核菌培養濾液中のツベルクリン活性因子は蛋白であり、Seibert らによつて精製された PPD および PPDs はその代表的なものである。しかし最近の蛋白質化学の手法を用いて結核菌培養濾液中には60種以上の抗原性蛋白の存在が確認されている。

私どもはツベルクリン活性因子が耐熱性で酸やアルカリ処理に対して比較的抵抗性があることから蛋白が活性因子であつても高次構造を必要とするものでなく、比較

的簡単な一次構造を持つペプチドであると考え、結核菌の脱脂菌体より0.1N塩酸によりツベルクリン活性ペプチド(TAP)の抽出を行ない、その精製、構造研究を行なつてきている。

このペプチド(TAP)の特徴は分子量が比較的小さく安定しており、免疫原性をほとんど示さず、反応原性のみを示すことである。またかなりの特異性を示し、ヒト型、ウシ型結核菌を皮内反応を用いて区別することは困難であるが、非定型抗酸菌や *M. smegmatis*, *M. phlei* など他のミコバクテリア、ノカルジアなどと結核菌との区別は明確に行なうことができる。

私どもは更にミコバクテリア培養濾液、菌体から多糖体抗原(アラビノガラクトサンおよびアラビノマンナン)を精製し、その化学構造についても明らかにした。これらミコバクテリアの多糖体抗原は全くツベルクリン活性を示さず、アルサス型皮内反応のみを示し、感作モルモットに静注するとアナフィラキシーショックを引き起こす作用を有している。

3. 細胞壁の構造と免疫学的活性

結核菌を初めとして類縁のミコバクテリア、ノカルジアの菌体は種々の強い免疫学的活性を有している。特に「Freundの完全アジュバント」で知られるアジュバント活性(免疫増強活性)やラットに対するアジュバント関節炎の誘起活性、結核菌を含む細菌感染に対する防御作用などがある。このような種々のミコバクテリアの特徴的な免疫活性の大半がミコバクテリアの菌体の細胞壁画分に局在していることが私どもによつて明らかにされた。

ミコバクテリアの細胞壁の精製とその生化学的性状の解明は私どものグループも含めて、多くの研究者の長年にわたる地道な研究によつて行なわれ、細胞壁スケルトン(cell-wall skeleton, CWS)の基本構造は“ミコール酸-アラビノガラクトサン-ムコペプチド”複合体であり、各部分の化学構造の詳細も明らかにされている。

CWSは特に細胞性免疫を誘起、増強する強い作用を持つており、遅延型アレルギーの誘起作用や結核菌 airborne 感染防御作用、結核性空洞の誘起増強作用、腫瘍細胞に対する細胞性免疫の誘導など、T細胞を強く分化増殖させる作用を示す。

4. BCG 細胞壁スケルトン(CWS)による癌の免疫療法

近年癌の免疫療法が世界的に注目され、種々の試みがなされてきたが、なかでもBCG生菌を用いる試みが実験的にも臨床的にも大きな比重を占めている。しかしBCG生菌には副作用、品質管理のうえで大きな問題点が未解決のまま残されており、私どもはBCG生菌に代わるものとしてBCG-CWSを用いる癌の免疫療法に関

する研究を行なつた。BCG-CWSを少量の鉱物油で処理後生食水に水中油の形で浮遊させたアジュバントは同系、自家癌の実験腫瘍系に対し、強い抗腫瘍活性を示す。また担癌宿主における低下した免疫機能、特に細胞性免疫機能を正常レベルに回復させる。更にBCG-CWSの投与により、ウサギ、ラット、マウスなどにおける化学発癌を阻止することも示された。以上の実験腫瘍系におけるBCG-CWSの抗腫瘍活性の免疫学的活性として、BCG-CWSのT細胞に対する強いアジュバント活性が考えられている。BCG-CWSは安定で副作用も低くかつ品質管理も容易である。

BCG-CWSは1974年より肺癌、白血病、悪性黒色腫、消化器癌、子宮頸癌などの免疫療法に用いられ、特に肺癌では500例近い症例があり、統計的に有意な生存期間の延長が認められている。肺癌については癌性胸膜炎に対する胸腔内投与、気管支鏡を用いる腫瘍内投与などによつて好成績が得られている。

BCGと分類学上類縁菌である他のミコバクテリア、ノカルジア、コリネバクテリアの細菌細胞壁もBCG-CWSと基本的に同様の化学構造を有し、かつ抗腫瘍活性を有することが明らかにされた。現在 *Nocardia rubra* の細胞壁がヒト癌の免疫療法に用いられつつある。

5. 合成細胞壁サブユニットの免疫学的活性

さきに述べたようにミコバクテリアの細胞壁のアジュバント活性の活性因子がムコペプチドであることは私どもによつて明らかにされたが、1974年Ellouzらによつて細菌細胞壁のムコペプチドのアジュバント活性最小単位がN-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamineであることが明らかにされた。その後N-acetylmuramyl dipeptide および関連物質が化学的に合成され、そのアジュバントの詳細について検討された。これら水溶性の合成ムラミルアジュバントは油中水型として用いられた場合、Freund完全アジュバントと同様の強いアジュバント活性を示すが、いかなる実験腫瘍系においても抗腫瘍活性を示さなかつた。私どもはN-acetylmuramyl dipeptidesに脂溶性を付与するため結核菌から精製したミコール酸をエステル結合した6-O-mycoloyl-N-acetylmuramyl dipeptidesを化学合成し、そのアジュバント活性および抗腫瘍活性を検討した。このようなミコール酸誘導体は出発物質のN-acetylmuramyl dipeptidesに比し、細胞性免疫反応に対するアジュバント活性が強く認められたが、血中抗体産生に対するアジュバント活性は減弱していることが見出された。このようなアジュバント活性の質的变化は用いられたミコール酸の炭素数の大きさによつても異なる。これら6-O-mycoloyl-N-acetylmuramyl dipeptidesは実験腫瘍系において抗腫瘍活性を示し、合成化合物による癌免疫療法の可能性が示

唆された。

合成ムラミルペプチドのアジュバント活性に関する研究は別の方向からも試みられている。私どもはさきに結核菌を DNP 化し動物に免疫し、その後 DNP-卵白アルブミンのような抗原に対する IgE 抗体産生を調べると、前処置を行なつた動物において IgG 抗体産生は影響されずに IgE 抗体産生は阻止されること、その際サプレッサー T 細胞が出現することを見出した。前処理に用いられた DNP-結核菌の代わりに DNP-ミクロイルムラミルペプチドを用いることによつても同様の現象が証明された。

以上述べたように N-acetylmuramyl dipeptide およびその誘導体の合成、投与により免疫反応に対するアジュバント活性を質的に変化させることが可能であり、私どもはこれを「アジュバント工学」と名づけている。

むすび

——感染の予防、ツベルクリン反応、空洞の形成——

結核病の感染論は免疫学的背景、特に細胞性免疫を抜きにしては成立しない。また逆に免疫学、特に細胞性免疫の研究の材料としてミコバクテリアは最もユニークで興味深い微生物である。結核症の患者は減少しても、ミコバクテリアの免疫学における重要性はいささかも変化しないことであろう。

終わりに、私どもの年来の研究を特別講演として発表する機会を与えて頂きました山本和男会長ならびに会員の皆様に厚く感謝致します。またこの研究は国立療養所刀根山病院、大阪大学理学部芝研究室、大阪大学医学部第3内科、アメリカ合衆国国立衛生研究所 Ribi グループらとの協同研究であります。感謝の意を表します。