

## 第55回総会シンポジウム

## 免疫からみた結核菌

座長 東 市 郎

北海道大学免疫科学研究所

受付 昭和55年6月27日

## The 55th Annual Meeting Symposium

## IMMUNOLOGICAL ASPECTS OF TUBERCLE BACILLI

Chairman: Ichiro AZUMA\* (Institute of Immunological Science, Hokkaido University)

Reporters: Ken-ichi YAMAMOTO (Institute of Immunological Science, Hokkaido University)

Yoshihiro YAMAMURA (National Toneyama Hospital)

Atsushi TANAKA (Shimane Medical University)

Tadamitsu KISHIMOTO (Osaka University Medical School)

Takeshi OGURA (Osaka University Medical School)

(Received for publication June 27, 1980)

In this symposium, the immunological aspects of tubercle bacilli were presented and the usefulness of tubercle bacilli as the materials for immunological study was discussed.

Dr. Yamamoto has studied on the mechanism of anti-tuberculosis protection in mice. When BCG cell walls which consist of adjuvant (BCG-CWS) and antigens (protein), were injected intravenously into mice as an oil-in-water emulsion, pulmonary granuloma were produced, and a close relationship was found between the degree of granuloma formation and protection against aerosol challenge with tubercle bacilli.

Dr. Yamamura and his group have clearly shown that experimental cavity formation in rabbits was due to the cell-mediated immune response of host to tubercle bacilli (and tubercle protein). The protein and lipid fractions were purified from mycobacterial cells and the cavity was produced by the injection of the mixture of above protein (antigen) and lipid (adjuvant) fractions but not by each alone in rabbits. The biochemical and immunological mechanisms of experimental cavity formation in rabbits were investigated in detail.

The adjuvant activity and adjuvant-polyarthritogenicity were the characteristic biological activities of tubercle bacilli. Dr. Tanaka has reviewed the recent advance in these fields. Especially the details of N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (MDP) which was established to be the minimum adjuvant-active subunit of bacterial cell walls were summarized. MDP has also been shown to have adjuvant-polyarthritogenicity in rats.

Dr. Kishimoto has reported the selective suppression of anti-DNP IgE antibody response by preimmunization of mice with DNP-conjugated mycobacterial cells, and the selective IgE suppression was shown to be due to the induction of DNP-reactive IgE class-specific suppressor T cells. Furthermore, he has obtained similar results by the administration of antigen (DNP or ovalbumin)-conjugated 6-O-mycoloyl derivative of MDP. These results suggest the possibility of immunotherapy of allergic diseases.

\* From Institute of Immunological Science, Hokkaido University, Kita-ku, Sapporo, Hokkaido 060 Japan.

Recently, the antitumor activity of BCG was shown in experimental tumor systems and human cancer. Dr. Ogura has presented the experimental and clinical results in experimental tumor systems and human lung cancer using BCG cell-wall skeleton (BCG-CWS). BCG-CWS was shown to be effective statistically for the prolongation of survival period of patients with lung cancer. The adjuvant activity on killer T cells and macrophage activation was considered to be immunological bases of anti-tumor activity of BCG-CWS.

As shown in this symposium, tubercle bacilli are very interesting and useful materials for the study of immunology.

## は じ め に

座 長 東 市 郎

結核症に対する化学療法による結核患者の減少と共に「結核病学」に対する若い研究者の認識も低下しつつあるように思われる。しかし近年、結核菌に関する生化学的、免疫学的研究は多大な進歩をとげ、新たな生物活性が見出されると共に結核菌の重要性も再認識されようとしている。結核菌は細菌学、生化学、免疫学の上から表1に示すような特色を有している。本シンポジウムにおいて結核菌が現代免疫学の進歩に果たした役割を中心に、結核菌の有する研究材料としての多面性が明らかにされた。

結核感染および防御に関する研究は単に細菌感染モデルとしての基本的問題のみならず、*in vivo*における細胞性免疫の実験モデルとして極めて重要な意義を有している。山本健一博士はマウスにおける毒力結核菌の経気道感染モデルと種々の菌体成分を用いて結核菌の感染防御機構に非特異的および特異的免疫が関与していること、更にマクロファージ(肉芽腫形成)およびT細胞がエフェクター細胞として重要な役割を果たしていることを明らかにした。

表1 結核菌の多様性

- |                                    |          |
|------------------------------------|----------|
| A. 細菌学的特色                          |          |
| 結核症の起因菌                            | } 感染論の展開 |
| 細胞内増殖                              |          |
| 細胞性免疫—ツ反応, 肉芽腫形成, 空洞形成             |          |
| B. 生化学的特色                          |          |
| 多量の特異的な脂質を含む—抗酸性ミコール酸              |          |
| C. 免疫増強活性とアジュバント関節炎誘起活性            |          |
| Freund の完全アジュバント, ロウD, 細胞壁, MDP など |          |
| D. 他疾患治療への応用                       |          |
| アレルギー疾患の治療—抑制性T細胞の誘導               | } 免疫制御   |
| 癌の免疫療法—マクロファージ, キラーT細胞の活性化         |          |
|                                    |          |

結核性空洞形成の機構も細胞性免疫を基盤としていることが、山村雄一教授ら刀根山病院グループによつてウサギにおける実験的結核空洞のモデルで明らかにされ、いまや結核病学の古典的研究として有名であるが、その後刀根山病院グループによつて更に詳細な免疫化学的研究が継続された。前田秀夫博士によつて述べられる空洞形成に関する最近の成績は細胞性免疫を基盤とする疾患モデルの一種として現代免疫学から改めて説明されるであろう。

結核菌が極めて強い免疫増強作用(アジュバント活性)を有することは「Freund の完全アジュバント」をはじめとしてあまりにも有名であるが、結核菌菌体成分のアジュバント活性因子としてロウD, 細胞壁骨格が明らかにされ、特にムコペプチド部分が重要な役割を果たしていることが報告された。1974年, Adam らは細胞壁骨格の構成成分のうち、N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (MDP) がアジュバント活性構造最小単位であることを明らかにした。結核菌のもつ興味ある生物活性の一つとして「アジュバント関節炎誘起能」がある。アジュバント関節炎の発症機序はまだ充分に明らかにされていないが、結核菌のもつ免疫アジュバント活性が何らかの関与をなすものと考えられ、結核菌—宿主の相互関係を考えるうえで興味ある材料であり、これらの問題点が田中渥博士によつて述べられた。

結核菌の免疫アジュバント活性を利用したアレルギー疾患の治療に関する基礎的研究が岸本忠三博士らによつて報告された。生体における免疫応答は種々のT細胞のサブセットによつて制御されているが、岸本博士らは結核菌に抗原を共有結合させ、マウスに前処置することにより、IgG 抗体産生に影響を与えず IgE 抗体産生のみを制御する IgE クラス特異的抑制性 T 細胞を誘導することに成功した。更に結核菌細胞壁、6-O-mycoloyl-MDP をアジュバントとして用い同様の結果を得ている。以上

の成績は結核菌の免疫アジュバント活性を巧みに利用した「免疫応答の制御」に関する1例である。

結核菌の生物活性のうちで最近注目されているものに抗腫瘍活性がある。現在癌の免疫療法剤として BCG 生菌が広く用いられているが、私共は BCG 生菌より精製した細胞壁骨格が極めて安定で副作用の少なく、かつ優れた抗腫瘍活性を有することを見出した。BCG 細胞壁

骨格は種々の実験腫瘍系およびヒト癌に対し癌免疫療法剤として明らかな抗腫瘍活性を示した。その後 BCG と分類上類縁の *Nocardia rubra* から精製した細胞壁骨格が BCG 細胞壁骨格と同等以上の生物活性を有することが見出された。これらの成績は小倉博士によつて要約された。

## 1. 感染論からみた結核菌

北海道大学免疫科学研究所 山 本 健 一

結核菌が宿主に寄生するための諸条件が満たされて、いわゆる感染が成立すると、その後に引き続いて宿主と結核菌の間に、それまでになかつた新しい環境を互いにもつことになり、動的で多彩な出来事が次々に起こる。それは結核菌のもつ生物学的活性によつて展開される免疫アジュバント活性、肉芽腫形成を含む感染防御活性、ツベルクリン反応惹起、血中抗体産生、結核空洞形成、抗腫瘍活性といった特徴のある諸現象として広く知られている。これらは結核菌の感染と同時に必然的に始まる免疫のメカニズムの動き、すなわち結核菌の特異的な抗原刺激に対する宿主の応答とその情報の記憶を獲得することによつて成立するものである。このように感染論は免疫を離れて論ずることはできないし、両者の接点は再感染において鮮やかに浮上してくる。

ところで、実験結核症においては使用される *in vitro* 培養菌およびその菌体画分の活性物質が必ずしも実際に感染に際して宿主で作用している物質の姿を忠実に反映しているか否かは疑問の点が多い。また感染に継起する免疫を感染の全体像から分離して解析することは困難である。これらの点を考慮して、我々はあらかじめ BCG あるいは結核菌体画分で感作して後に感染を行なうという形から言えば再感染論になるが、このような実験結果に基づいて感染論にできるだけアプローチせざるをえないと考えるのである。

以下、私たちが今までに実験結核の仕事をしてきた中から結核の感染論を考えるうえで役に立つと思われるいくつかの仕事を紹介してみようと思う。

### I. 感染の *in vitro* での解析の試み

感染が宿主体内に入つた寄生体の増殖であると一応規定して、*in vitro* での結核菌の増殖が *in vivo* のそれをどのように反映するかを調べた。細胞内寄生を特徴とする結核菌を静注感染させたモルモットの脾細胞培養を行ない、その間の感染菌増殖率から *in vivo* の増殖を推定しようと試みた。種々の毒力の結核菌 (H<sub>37</sub>Ra および INH 耐性菌を含む) および BCG の Dubos 培地10日培養の

一定菌数を静注、その直後から14日まで日を追つて肺、肝、脾およびリンパ節の生菌数の推移を小川培地還元培養でしらべたのが図1である。他方、感染直後、5日目、10日目の脾について別に細胞浮遊液をカバーガラス上で培養し24および72時間の菌増殖率を菌染色像から求めたのが図2である。両図を対比すると、臓器内での菌増殖と脾細胞共存下の *in vitro* の増殖の傾向はおおよそ平行し、BCG、H<sub>37</sub>Ra および INH 耐性菌など弱毒菌は両者での増殖の低いことが示された。そして毒力菌の *in vitro* の増殖率は感染直後が高度で、感染後10日となり免疫が恐らく介入する時期で低くなる傾向がみられ、感染の経過を考察するうえで興味がある。このことは結核死菌免疫モルモット脾細胞共存下の同様な結核菌増殖率をしらべ、明らかに抑制されていたことから、この方法が *in vitro* で免疫の程度を推定する方法<sup>1)</sup>として興味あるのみならず感染菌の動態を知る手がかりを与えるものと思われる。

### II. 結核感染防御における免疫と感染の経路

感染に継起する免疫応答が感染菌のその後の増殖を左右していることは明らかであるが、それを明確にすることは難しい。そこで実験的には再感染の形をとり、しかも液性抗体の感染推移への影響は全くないとは言えないが一応細胞性免疫とのかかわり合いで考えることにする。

あらかじめ oil-treated BCG cell wall をマウスの静脈あるいは皮下に接種4週後に、それぞれ経気道および静脈に *M. bovis*, Ravenel の感染を行ない、肺内生菌数の推移と生存日数から感染における免疫の影響をしらべた。結果は図3に示した。経気道感染に対しては大量の BCG cell wall が肺に到達する静注群においてのみ防御効果が示された。また静注感染に対しては皮下免疫群は14日以降生菌数の低下がみられ、生存日数では静注免疫群と大差はなかつた。大量の静注感染菌が散布される初期では皮下免疫による効果はみられず、後期で感染菌のもたらす免疫効果も加わつて静注免疫群とほぼ同様な防御が示されたものと思われる。

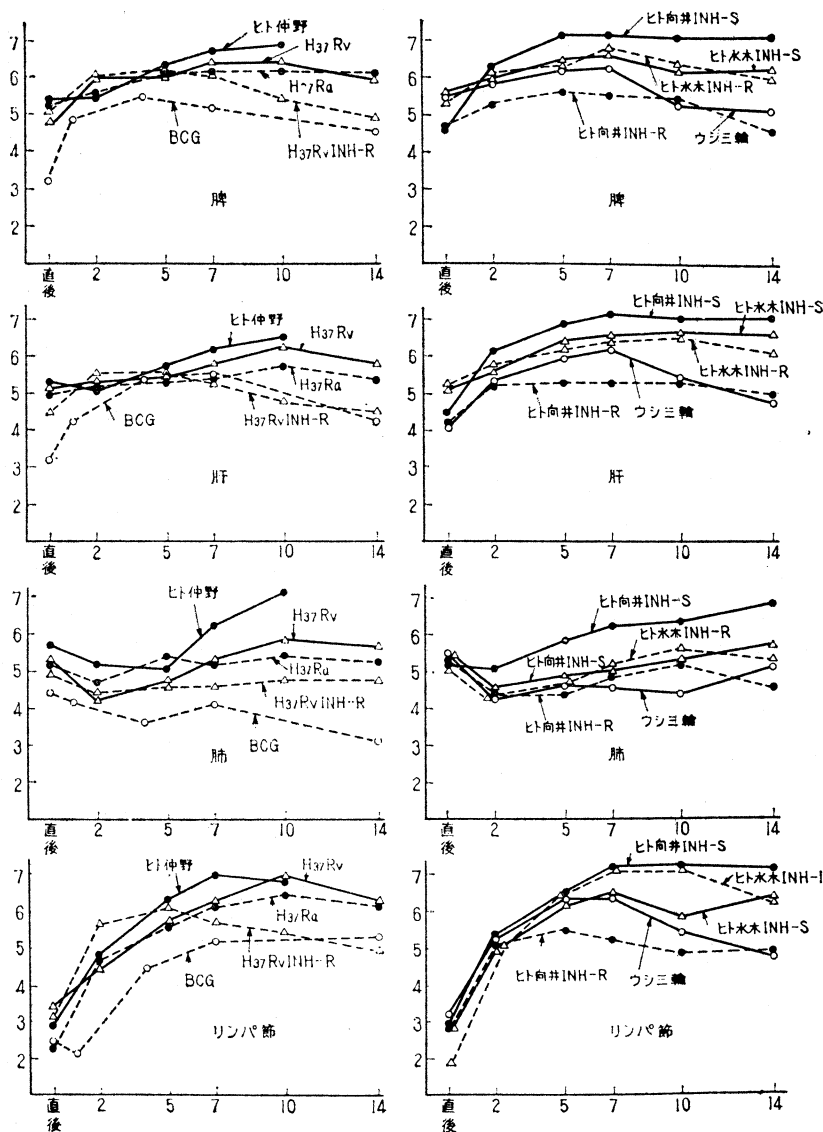


図 1 モルモット各臓器内の菌数の消長

ところで経気道感染の場合、特に感染菌の侵入部位である肺の細胞の免疫状態が重要な因子である<sup>2)</sup>。BCG cell wall の静注免疫群のみが肺細胞の macrophage migration inhibition 活性を示し、感染防御も平行してみられる。この場合、この静注群に抗リンパ球血清投与を行ない肺細胞の MI 活性の低下を起こさせると、感染防御の低下も惹起しえた。また、BCG cell wall 静注免疫マウスに特異抗原である PPD あるいは BCG protoplasm の静注によつて肺における感作細胞の刺激を行なうと恐らく macrophage の活性化を強めることによると思われる感染防御の増強がみられるのである。

### III. 感染防御における肉芽腫の意義

結核感染の経過で形成される肉芽腫つまり結核結節は生体が結核菌に打ち勝つ能力を得たことを明らかに示すものであることは古くから知られている。実験的に我々は BCG cell wall ワクチン静注によつて活性化マクロファージの集積とみなされる肺肉芽腫を形成し、これが経気道感染防御に重要な役割を演ずることを明らかにした。この肺肉芽腫は BCG cell wall がアジュバント物質と結核特異抗原を含むものであるから、アジュバント物質の直接作用によつて形成されるものとアジュバントと抗原による細胞性免疫の機序が介入して形成されるものが考えられる。

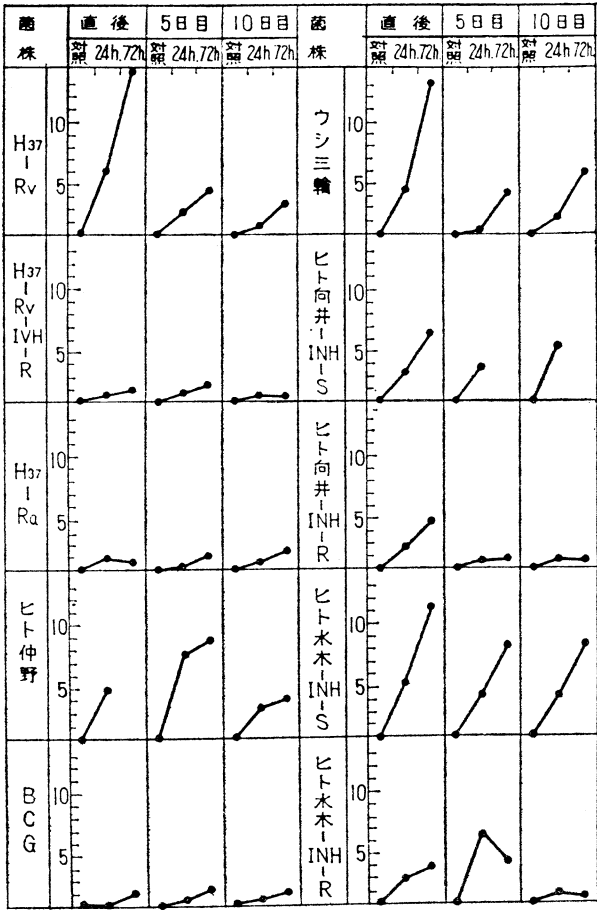


図2 脾細胞培養における各菌株の菌数の消長

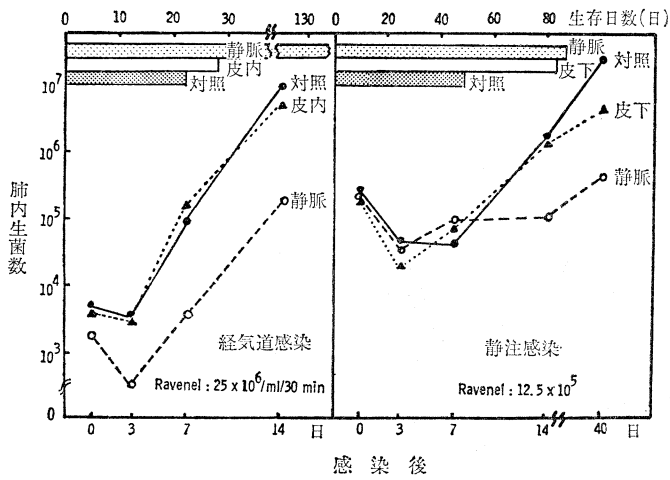


図3 結核感染防御における BCG cell wall 免疫経路と感染経路の影響

表1 C57BL/6 と C<sub>3</sub>H/He マウスにおける 6-O-mycoloyl-MDP と PPD 混合物による肺肉芽腫形成と *Mycobacterium bovis*, Ravenel の経気道感染防御効果の比較 (免疫後1週目に感染を行なった場合)

| マウス                 | 実験群                      | 投与量 (μg) <sup>b</sup> | Lung index (免疫後1週目) | 経気道感染後3週目の肺における <i>M. bovis</i> , Ravenel の生菌数 |
|---------------------|--------------------------|-----------------------|---------------------|------------------------------------------------|
| C <sub>3</sub> H/He | 1) 6-O-mycoloyl-MDP+PPD  | 300+300               | 1.67±0.57           | 2.7±2.0(×10 <sup>6</sup> )                     |
|                     | 2) 6-O-mycoloyl-MDP      | 300                   | 1.27±0.18           | 1.4±0.6                                        |
|                     | 3) PPD                   | 300                   | 0.69±0.12           | 38.0±4.9                                       |
|                     | 4) 対照 w/o/w              | —                     | 0.57±0.03           | 59.6±11.0                                      |
| C57BL/6             | 5) 6-O-mycoloyl-MDP+PPD  | 300+300               | 1.42±0.09           | 3.3±1.5                                        |
|                     | 6) 6-O-mycoloyl-MDP      | 300                   | 1.41±0.16           | 5.1±2.3                                        |
|                     | 7) PPD                   | 300                   | 0.87±0.09           | 49.5±8.3                                       |
|                     | 8) 対照 w/o/w <sup>a</sup> | —                     | 0.87±0.03           | 48.7±17.0                                      |
|                     |                          |                       | 1) vs 2) p<0.02     | 2) vs 4) p<0.001                               |
|                     |                          |                       | 2) vs 4) p<0.001    | 5) vs 8) p<0.01                                |
|                     |                          |                       | 6) vs 8) p<0.001    | 6) vs 8) p<0.01                                |
|                     |                          |                       | 5) vs 8) p<0.001    |                                                |

a : エマルジョンの油の最終濃度は3.2%。

b : 各群10匹の5週齢のマウスに静脈内に注射。

表2 C57BL/6 と C<sub>3</sub>H/He マウスにおける 6-O-mycoloyl-MDP と PPD 混合物による肺肉芽腫形成と *Mycobacterium bovis*, Ravenel の経気道感染防御効果の比較 (免疫4週後に感染を行なった場合)

| マウス                 | 実験群                      | 投与量 (μg) <sup>b</sup> | Lung index (免疫後4週目) | 経気道感染後3週目の肺における <i>M. bovis</i> , Ravenel の生菌数 |
|---------------------|--------------------------|-----------------------|---------------------|------------------------------------------------|
| C <sub>3</sub> H/He | 1) 6-O-mycoloyl-MDP+PPD  | 300+300               | 0.66±0.04           | 47.6±17.4(×10 <sup>6</sup> )                   |
|                     | 2) 6-O-mycoloyl-MDP      | 300                   | 0.66±0.03           | 61.2±15.8                                      |
|                     | 3) 対照 w/o/w              | —                     | 0.57±0.03           | 110.9±24.6                                     |
| C57BL/6             | 4) 6-O-mycoloyl-MDP+PPD  | 300+300               | 0.78±0.04           | 3.3±0.1                                        |
|                     | 5) 6-O-mycoloyl-MDP      | 300                   | 0.67±0.01           | 94.5±22.0                                      |
|                     | 6) 対照 w/o/w <sup>a</sup> | —                     | 0.59±0.01           | 204.0±77.6                                     |
|                     |                          |                       | 2) vs 3) p<0.001    | 4) vs 6) p<0.001                               |
|                     |                          |                       | 4) vs 5) p<0.001    | 4) vs 5) p<0.001                               |
|                     |                          |                       | 5) vs 6) p<0.001    | 1) vs 3) 0.02>p>0.01                           |

a : エマルジョンの油の最終濃度は3.0%。

b : 各群10匹の7週齢のマウスに静脈内に注射。

そこで、この2種類の肉芽腫の感染防御効果をしらべた。まず BCG cell wall のアジュバント物質の最小有効単位の N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (MDP) にミコール酸をつけた mycoloyl-MDP の w/o/w エマルジョンの静注を行なうと表1に示すごとく、BCG cell wall 静注の肺肉芽腫形成反応に low responder の C<sub>3</sub>H/He マウス<sup>3)</sup> でも high responder の C57BL/6 マウスと同程度に mycoloyl-MDP 静注1週後でのみ肺肉芽腫形成と *M. bovis*, Ravenel の経気道感染に対する防御が認められた。この肉芽腫は short lasting で、しかも T cell の関与を要しないことは胸腺切除、X線照射、骨髓細胞移入の B マウスにおいても形成されることから明らかである。次に感作 T cell 関与の肉芽

腫について述べると、我々は BCG cell wall 静注肉芽腫形成は細胞性免疫の機序が関与している証拠を既に報告している<sup>4)</sup>。例えば B マウスでは明らかに肉芽腫形成は低下する。このアジュバントと特異抗原による肉芽腫形成のモデルとして mycoloyl-MDP+PPD を w/o/w エマルジョンとして静注した結果は表2に示した。前述の mycoloyl-MDP 単独による肉芽腫がほぼ低下した4週では BCG cell wall 肉芽腫形成 high responder の C57BL/6 マウスのみが肉芽腫形成と経気道感染に対する防御を示し、low responder の C<sub>3</sub>H/He マウスでは両反応がみられなかつた。このような細胞性免疫の機序が関与する肺肉芽腫は長く続き、感染菌に対しまず活性化マクロファージが対応し、その間に感染菌と T cell と

の interaction でマクロファージの活性化が増強され感染防御がもたらされたものと思われる。また、BCG cell wall ワクチンと BCG 生菌接種後4ないし28週に4週の間隔でマウスにおける肺肉芽腫形成と経気道感染に対し肺内生菌数でしらべた感染防御との関係をみた結果、初期では肺肉芽腫形成の高度な BCG cell wall の防御がすぐれ、その後、肺肉芽腫形成が依然として高く維持される BCG cell wall 群の感染防御と肺肉芽腫形成がやや劣る BCG 生菌群の感染防御とに差がなくなることが明らかにされた。この事実は免疫の初期では BCG cell wall ワクチンのアジュバント物質の含量からいつても、この群で肺肉芽腫が早期に作られ活性化マクロファージの集積が効率よいため感染防御が強力に発現されることになるが、免疫後一定期間を経ると BCG 生菌群でも BCG cell wall 群でも感作T細胞と感染菌を介しての活性化マクロファージの増強が主力となることを示唆していると思われる。

最後に、結核の感染免疫を考えるうえで、我々は同じ細胞内寄生菌のリスレリヤのそれから得た知識に負うところはなほ多い。例えば感染防御に働く活性化マクロファージの誘導は感作T細胞と特異抗原の相互作用という特異性がからんでいるが、誘導された活性化マクロファージの抗菌作用は非特異的で、BCG cell wall 免疫

マウスでリスレリヤ感染阻止がみられる事実もリスレリヤ実験結果から理解される1例である。しかし、結核とリスレリヤでかなり様相を異にしている点もある。例えばリスレリヤ免疫が細胞性免疫に移行した時期についての感染防御の場合、生菌免疫の顕著な防御効果は結核と対比しても慎重に検討する必要がある。

以上、結核菌感染では必然的に起こる免疫応答によって結核菌の増殖に大きな影響が及び、感染の帰転が左右されることが充分に理解されよう。

上述の実験について、北海道大学免疫科学研究所の有馬純、加藤一之、柿沼光明、奥山春枝、東市郎、米国 NIH, Rocky Mountain Laboratory の Dr. E. Ribí, Dr. R. L. Anacker の皆様のご協力を深謝します。

## 文 献

- 1) Arima, J. and Yamamoto, K.: Compt. rend. Soc. Biol., 154 : 1700, 1960.
- 2) 山本健一: 結核, 51 : 453, 1976.
- 3) Yamamoto, K. and Kakinuma, M.: Microbiol. Immunol., 22: 335, 1978.
- 4) 加藤一之他: アレルギー, 28 : 392, 1979.

## 2. 空 洞 形 成 と 細 胞 性 免 疫

国立療養所刀根山病院 前田秀夫, 山村好弘, 小川弥栄  
富野郁子, 田原留之助, 鈴木末宏

山村らは人間の肺結核によく似た空洞を、実験的に動物の肺に形成する方法を見出した。そしてこの方法を用いて研究を行ない、これらの空洞が、肺内に注射された結核菌と、宿主との間の結核性免疫反応の結果形成されることを明らかにした<sup>1)</sup>。その理由を列記すると次のとおりである。1) 空洞は、結核菌の生菌のみならず死菌を肺内注射しても形成され、その際ツベルクリン反応(以下「ツ」反応と略記)も陽性となる。2) あらかじめ結核菌で感作した動物を用いると、更に高率に、迅速に空洞が形成される。3) 結核菌を肺内に注射した後、tuberculin active peptide (TAP) の頻回注射を行なつて減感作すると空洞形成は抑制される。そのさい TAP および PPD を抗原とする皮内反応 および 肺胞マクロファージ(以下  $M\phi$  と略記)の遊走阻止反応も陰性となる。しかし、結核菌の多糖体に対する血清抗体価には影響を認めない<sup>2)</sup>。またイムラン、6-メルカプトプリン、コーチゾン、抗淋巴球血清等を投与しても空洞形成は阻止される。生菌を用いた場合には、化学療法と免疫抑制剤を併用することにより空洞形成を抑制できるが、化学

療法のみでは空洞形成を阻止できない<sup>3)</sup>。4) 結核菌で感作した動物からの免疫血清を移行しても空洞形成や「ツ」反応には影響を認めない。このような結果から、空洞形成には結核菌と宿主との間の細胞性免疫反応が重要な役割を演じており、血清抗体による液性の免疫反応はほとんど関与していないように思われる。

今回は菌体成分を用いて空洞形成を行なつた場合の各菌体成分の役割、空洞形成にいたる肺病巣の酵素活性の推移、リンホカインの関与について、細胞性免疫を中心に述べる。

### 実験方法および実験成績

#### 1. 菌体成分による空洞形成と細胞性免疫

さきに山村らは結核菌体中から Folch の方法<sup>4)</sup>でリポ蛋白を抽出し、この物質が最も強い空洞形成能を持つていることを報告した<sup>1)</sup>。我々もこの物質 3 mg を兎の肺内に注射することによって、6週後に86%の割合で巨大空洞が形成されることを認めた。そこでこのリポ蛋白を Sephadex LH-20 column chromatography によつてリビ

Table 1. Cavity-forming Activities of Heat-killed Cells, Lipoprotein, and Subfractions of *Mycobacteria*

| Challenged antigen into lungs                    | Classification of lung lesions* |          |               | Cavity-forming rate(%) | Skin reaction with PPD** |
|--------------------------------------------------|---------------------------------|----------|---------------|------------------------|--------------------------|
|                                                  | Cavitary                        | Necrotic | Granulomatous |                        |                          |
| Heat-killed <i>M. tbc.</i> H <sub>37</sub> Rv    | 6/12                            | 4/12     | 2/12          | 50%                    | 6/7                      |
| Lipoprotein of <i>M. tbc.</i> H <sub>37</sub> Rv | 12/14                           | 2/14     | 0/14          | 86%                    | 1/7                      |
| Lipid fraction                                   |                                 |          |               |                        |                          |
| It***                                            | 0/8                             | 0/8      | 8/8           | 0%                     | 0/6                      |
| Ip                                               | 0/6                             | 1/6      | 5/6           | 0%                     | 0/4                      |
| Protein fraction                                 |                                 |          |               |                        |                          |
| IIIt                                             | 0/6                             | 0/6      | 6/6           | 0%                     | 0/6                      |
| IIP                                              | 0/11                            | 0/11     | 11/11         | 0%                     | 0/9                      |
| Recombination of lipid and protein fraction      |                                 |          |               |                        |                          |
| It+IIIt                                          | 3/11                            | 4/11     | 4/11          | 27%                    | 0/7                      |
| It+IIP                                           | 4/9                             | 5/9      | 0/9           | 44%                    | 0/5                      |

\* The first number is the number of lungs that produced the lesions corresponding to the classification; the second number is the total number of lungs where the lesions were produced.

\*\* The first number is the number of rabbits that showed positive tuberculin hypersensitivity; the second number is the number of rabbits tested. Skin reaction were done with 30μg PPD.

\*\*\* It: lipid fraction of lipoprotein from *M. tbc.* H<sub>37</sub>Rv; Ip: lipid fraction of lipoprotein from *M. phlei*; IIIt: protein fraction of lipoprotein from *M. tbc.* H<sub>37</sub>Rv; IIP: protein fraction of lipoprotein from *M. phlei*.

ッド部と蛋白部に分離した。そして *M. tbc.*, H<sub>37</sub>Rv, *M. phlei* リポ蛋白から分離したリビッド部を It, Ip, 蛋白部を IIIt, IIP とそれぞれ命名した。t は *M. tbc.*, H<sub>37</sub>Rv のリポ蛋白から, p は *M. phlei* のリポ蛋白から分離されたという意味である。そして It, IIIt, Ip, IIP 各単独を兎の肺内に注射しても空洞は形成されなかつたが, It+IIIt, It+IIP のように両者を混合して兎の肺内に注射すると空洞が形成された<sup>5)</sup>(Table 1)。この場合, リビッド部と蛋白部に分離した後混合して注射した場合には, もとのリポ蛋白に比べて空洞形成率を低下する。なお PPD による皮内反応, 角膜反応は, このような菌体成分を用いた場合いずれも陰性であつた。これらの結果から空洞形成と, 「ツ」反応は菌体成分を用いた場合相関しないことが認められた。またリビッド部と蛋白部を混合することにより, 空洞が形成されることから, 空洞形成を行なう抗原は蛋白であり, リビッド部はアジュバントとして蛋白の抗原性を高めているように考えられる。

そこでリビッド部の It を thin layer chromatography にて成分を分析すると cord factor, neutral lipid, free mycolic acid, trehalose monomycolate, cardiolipine, phosphatidyl-ethanolamine, phosphatidyl-glycerol, lyso-phosphatidyl-glycerol, wax D その他未同定の glyco-phospholipid 等多数のリビッドが含まれており, これらのリビッドのどの部分にアジュバント活性が存在するか不明である。そこでアジュバント作用があると考えられる次の物質を使用した。すなわち BCG-cell wall, cord factor, acetylated wax D-6, phosphatidyl-inositol-

oligomannoside, MDP(MurNAc-L-Ala-D-isoGln), MTP (MurNAc-L-Ala-D-isoGln-L-Lys-D-Ala) 各 1.5 mg と蛋白部 IIP 1.5 mg を混じて兎の肺内に注射して, 6 週間に屠殺した。その結果は Table 2 に示すごとく, BCG-cell wall, cord factor と IIP を混じたときのみ空洞が形成され, 他のアジュバント物質と IIP を混じた場合には空洞は形成されなかつた。もちろんリビッド, cell wall, アジュバント物質, IIP 各単独では空洞は形成されなかつた。また皮内反応は PPD, IIP を抗原として用いた場合ほとんどが陰性であつた。ただ BCG-cell wall は微量の蛋白を含むため, PPD による皮内反応は陽性となる。これらの結果から, 現在のところすべてのアジュバント物質が, 菌体蛋白の抗原性を高めて空洞形成を行なうとは限らない。また皮内反応と空洞形成とは異なつた細胞性の免疫反応ではないかと考えられる。

なお cord factor+IIP を注射して空洞形成を行なつた場合, 肺胞 Mφ の遊走阻止反応は IIP を抗原とする場合のみ阻止されたが, PPD では阻止されなかつた (Table 3)。肺胞 Mφ の遊走阻止反応のみが現在のところ空洞形成と相関するようである。

## 2. 空洞形成と肺蛋白分解酵素, Mφ との関係

空洞形成が行なわれる以上, 肺組織が蛋白分解酵素によつて分解され, その結果軟化融解が行なわれるものと考えられる。そこで結核加熱死菌 2.5mg(乾燥量)を前述の方法で, あらかじめ結核死菌で感作した兎および非感作の兎の肺内に注射し, 一定日数ごとに屠殺して, 肺の自己蛋白分解活性を測定すると Fig. 1 のごとくなる。



Table 2. Lung Lesions and Skin Reactions after an Intrapulmonary Injection of Iip Mycobacterial Lipids or Adjuvants

| Challenged antigen into lungs* | Classification of lung lesions** |          |               |       | Skin reaction* |       |
|--------------------------------|----------------------------------|----------|---------------|-------|----------------|-------|
|                                | Cavitary                         | Necrotic | Granulomatous | Scar  | PPD++          | Iip++ |
| BCG-cell walls+Iip             | 4/10                             |          | 6/10          |       | 5/6            | 0/6   |
| Cord factor+Iip                | 3/11                             | 5/11     | 3/11          |       | 0/6            | 2/6   |
| Acetylated wax D-6 + Iip       |                                  |          | 10/11         | 1/11  | 0/7            | 0/7   |
| Phosphatide*** + Iip           |                                  |          | 12/13         | 1/13  | 0/7            | 0/7   |
| MDP+Iip                        |                                  | 1/10     | 9/10          |       | 1/7            | 3/7   |
| MTP+Iip                        |                                  |          | 8/8           |       | 0/5            | 0/5   |
| Iip                            |                                  |          | 11/11         |       | 0/7            | 0/7   |
| BCG-cell walls                 | 1/11                             |          | 10/11         |       | 6/7            | 0/7   |
| Cord factor                    |                                  |          | 0/8           |       | 0/6            |       |
| Acetylated wax D-6             |                                  |          | 10/11         | 11/11 | 0/6            | 0/6   |
| Phosphatide                    |                                  |          | 11/11         |       | 0/6            | 0/6   |

\* Challenge dose into a lung: Iip: 1.5 mg+mycobacterial lipid or adjuvant: 1.5 mg in the mixture, or 3 mg of each substance alone.

\*\* The first number is the number of lung that produced the lesion corresponding to the classification; the second number is the total number of lungs where the lesions were found.

\*\*\* Phosphatidyl-inositol-oligomannoside.

\* The first number is the number of rabbits that showed positive tuberculin hypersensitivity; the second number is the number of rabbits tested.

++ Used dose: 30 $\mu$ g PPD or 100~200 $\mu$ g Iip per 0.1 ml saline.

Table 3. Migration Inhibition Test of Alveolar Macrophages from Rabbits Intrapulmonarily Injected with Cord Factor+Iip, or Cord Factor Alone (Expressed by Migration Index at 48 hours culture)

| Challenged antigen into lungs* | Antigen in culture** |      |
|--------------------------------|----------------------|------|
|                                | PPD                  | Iip  |
| Cord factor+Iip                | 80%***               | 55%  |
|                                | 85%                  | 54%  |
|                                | 82%                  | 59%  |
|                                | 86%                  | 65%  |
|                                | 88%                  | 63%  |
|                                | Mean                 | 84%  |
| Cord factor                    | 86%                  | 103% |
|                                | 103%                 | 118% |
|                                | 91%                  | 113% |
|                                | 130%                 | 168% |
|                                | 79%                  | 83%  |
|                                | Mean                 | 98%  |

\* Challenge dose into a lung: cord factor: 1.5 mg+Iip: 1.5 mg, or cord factor: 3 mg alone.

\*\* Antigen concentration: 30 $\mu$ g of PPD or Iip per ml of culture media.

\*\*\* Migration Index (%) =  $\frac{\text{Mean area with antigen}}{\text{Mean area without antigen}} \times 100\%$

すなわち非感作の兎では、結核死菌注射後、漸次蛋白分解酵素活性は上昇し、3週目が最高となる。そしてその頃から壊死があらわれ、やがて1~2週おくて空洞が形成されてくる。これに対して、結核菌であらかじめ感作された兎では、急速に蛋白分解酵素活性が上昇して2週で最高となり、壊死があらわれ、その後1週で空洞が形成されて、蛋白分解酵素活性は低下してくる。また肺重量も蛋白分解酵素活性の増減に比例する。そこでこれらの現象がどのような原因で起こっているかを観察するため、非感作兎に結核死菌を注射して3週目の兎に Myrvik の方法<sup>6)</sup>で気管枝を通じて saline を注入し、肺胞 M $\phi$  を洗い出した。対照として正常兎の肺から、同じ操作を行なつて M $\phi$  をとり出し、M $\phi$  数と、N-acetyl-trialanyl-methyl-ester を基質とする酵素活性を比較した。その結果は Table 4 に示すごとく、結核菌を注射した兎では、1匹当たり約4倍の数の M $\phi$  がまた 1M $\phi$  当たり約1.6倍の酵素活性と蛋白質を有していることが判明した。したがって1匹当たり全 M $\phi$  で約6.5倍の酵素活性を示した。これらの結果から、結核菌を注射された兎では、病巣の炎症反応が進行するに従つて、細胞性免疫反応が増強し、感作リンパ球の指令によつて多量の activate された M $\phi$  が病巣に集合してくるように思われる。



の放出による組織の消化が必要なのではないかと考える。特に結核菌は多量のリピッドを含有しており、そのリピッド中にはミコール酸のような消化しにくい物質もあり、これらが  $M\phi$  に傷害を与えるのではないかと考える。

## 結 語

1) 結核性空洞は、結核菌と宿主との細胞性免疫反応の結果形成される。このさい血中抗体はほとんど関与しないように思われる。そして生菌または死菌体を抗原として使用するかぎり、空洞形成とツベルクリンによる皮内反応、角膜反応、肺胞  $M\phi$  の migration inhibition test の陽性度は相関する。2) 菌体成分を用いた場合には、空洞形成と「ツ」反応、角膜反応は相関しないが、肺胞  $M\phi$  の遊走阻止反応とは相関するようである。3) 空洞形成の抗原となるのは菌体蛋白であつて、菌体リピッドがアジュバントとしてその抗原性を高めている。4) 病

巣部にはリンパ球の指令により多量の activate された  $M\phi$  が集中し、蛋白分解酵素活性が上昇する。5) しかし単に  $M\phi$  の集合のみでは空洞は形成されない。菌体の食菌による  $M\phi$  の破壊その他により放出される酵素が、組織の軟化融解を起こすのではないかと考えられる。

## 文 献

- 1) Yamamura, Y.: Adv. Tuberc. Res., 9 : 13, 1958.
- 2) Yamamura, Y. et al.: Am Rev Respir Dis, 109 : 594, 1974.
- 3) Yamamura Y. et al.: Am Rev Respir Dis, 98 : 720, 1968.
- 4) Folch, J. and Lees, M.: J. Biol. Chem., 191 : 807, 1951.
- 5) Maeda, H. et al.: Am Rev Respir Dis, 115 : 617, 1977.
- 6) Myrvik, Q.N. et al.: J. Immunol., 86 : 128, 1961.

## 3. アジュバント活性およびアジュバント関節炎

島根医科大学学生化学 田 中 渥

結核菌はアジュバント活性を有している。つまり蛋白抗原に結核菌を添加して、フロイント型の油中水型エマルジョンの形で注射すると、抗体産生量が増加し、また遅延型過敏症が誘導される。後者は特に結核菌アジュバントの特徴である。もし、抗原を用いないで、結核菌のみをフロイント型エマルジョンの形でラットに注射すると、アジュバント関節炎が誘起される<sup>1)</sup>。これは種々の点で人間の慢性関節リウマチに似ている。

アジュバント活性を荷う最小構造は細胞壁のペプチドグリカンを構成する単位、muramyl dipeptide (MDP) であることが1974年明らかにされた。我々は MDP がアジュバント関節炎を誘起することを最近明らかにすることができた。与えられたテーマはアジュバント活性とアジュバント関節炎であるが、我々は最近 MDP がマクロファージを活性化し、肉芽腫を形成することをも見出し、お互いに関連があるように思われるので、これらも一緒に論じることとする。

### 1. MDP によるマクロファージの活性化

我々は MDP がモルモット、ラット、マウスのマクロファージを活性化することを見出した。モルモットの腹腔浸出マクロファージを用い、MDP の種々の類似体を用いてしらべたところ、アジュバント活性を有する類似体はマクロファージを活性化するが、アジュバント活性を有さない類似体は活性化しなかつた。活性化されたマクロファージはプラスチック面上で伸展することがわかつて<sup>2)</sup>。Fig 1 は各 MDP 類似体によるマクロファージ活性化を伸展するマクロファージの数で表したもの

である。アジュバント活性を有する類似体はマクロファージを伸展させる。つまり、活性することがよくわかる。我々はすでに、グルコサミンのとりこみ、グルコース酸化、マウス網内系食能の増加<sup>3)</sup>、マクロファージの遊走阻止<sup>4)</sup>、等の種々の指標を用い全く同じ結果を得ている。マクロファージが免疫反応、特に遅延型過敏症の誘起に重要な働きをしていることはよくわかつている。したがって、上記の我々の実験結果から、結核菌のアジュバント活性発現に、マクロファージの活性化が重要な役割を演じていることが示唆される。果たしてそうであるか現在検索中である。MDP によるマクロファージの活性化にリンパ球が関与するかどうかは、解明されるべき重要な点である。我々はモルモットの腹腔浸出細胞を用いてこの問題をいくつかの手段を用いて検討した。その結果、MDP はリンパ球の関与なしにマクロファージを(少なくともハートレイおよび JY-1 の腹腔浸出マクロファージを)活性化することがわかつた。Fig 2 は、結核感作モルモット由来マクロファージの伸展を指標として得られた結果である。図から明らかなように MDP はマクロファージを活性化するが PPD は活性化しない。マクロファージに同じ動物由来の感作リンパ球をまぜれば、MDP のみならず PPD も、マクロファージを活性化するようになる。ただし、PPD は一定の潜伏期を経て活性化する。このことは、おそらく MDP は直接に、PPD はリンフォカインを介して、マクロファージを活性化することを示唆している。

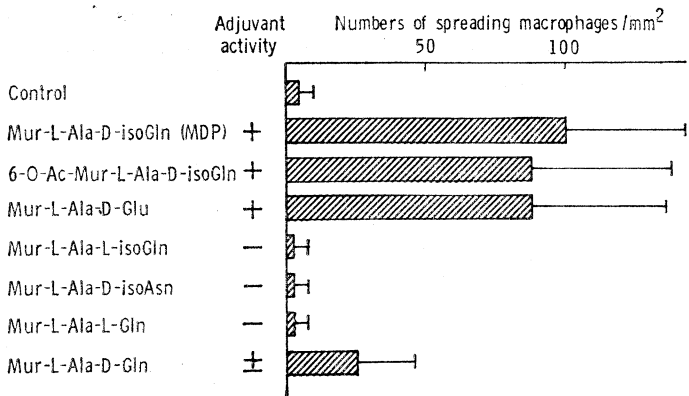


Fig. 1. Effect of MDP and its Analogs on Macrophage Spreading.

Table 1. Relationship among Biological Activities of MDP and its Analogs

|                         | Adjuvant activity | Mφ stimulation |                 | Granuloma formation |
|-------------------------|-------------------|----------------|-----------------|---------------------|
|                         |                   | <i>in vivo</i> | <i>in vitro</i> |                     |
| Acetyl-MDP              | +                 | +              | +               | +                   |
| Mur-L-Ala-D-isoGln(MDP) | +                 | +              | +               | +                   |
| Mur-L-Ser-D-isoGln      | +                 | +              | +               | +                   |
| Mur-L-Ala-D-Glu         | +                 | +              | +               | +                   |
| Mur-L-Ala-D-Gln         | ±                 | ±              | ±               | ±                   |
| Mur-L-Ala-L-isoGln      | -                 | -              | -               | -                   |
| Mur-L-Ala-D-isoAsn      | -                 | -              | -               | -                   |

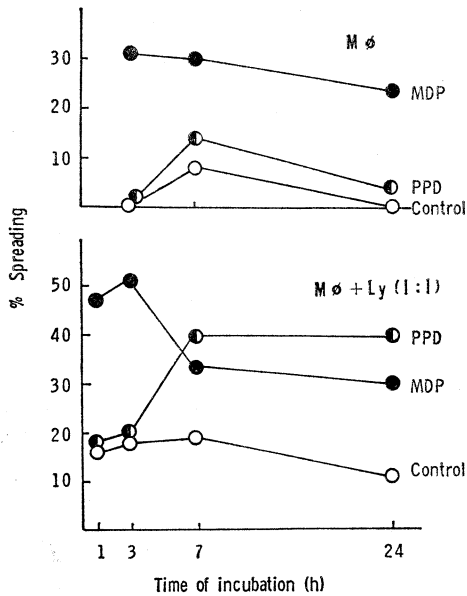


Fig. 2. Difference in macrophage spreading enhancement by MDP and antigen.

2. 類上皮細胞肉芽腫形成

MDP は類上皮細胞肉芽腫をつくることを既に我々は報告した<sup>5)</sup>。MDP 類似体を用いて調べた結果、アジュバント活性を有する類似体のみが肉芽腫を作った (Table 1)。MDP の水溶液は肉芽腫形成能を全く示さなかった。MDP が肉芽腫形成能を示すためには、油中水型 (フロイント型) エマルジョンの形にするか、高級分枝脂肪酸と共有結合により結合させるか、つまりリポドと強く 'associate' させることが必要と思われる。次に重要な点は MDP による肉芽腫形成に T リンパ球は必要でないと思われることである。つまり、MDP は新生時胸腺摘出ラットに無処置対照群と同程度の強い肉芽腫形成を示した。また予備段階であるが、胸腺機能が先天的に欠除しているヌードラットでも同じことが観察された。

3. アジュバント関節炎

従来 MDP はアジュバント関節炎を誘起しないとする報告が日本、フランス、アメリカから出されていた。最近、我々は MDP がアジュバント関節炎を誘起しうることを見出した<sup>6)</sup> (Fig 3)。ところが、新生時胸腺摘出ラットはアジュバント関節炎を発症しなかった (Table 2)。このことは、アジュバント関節炎発症には T リンパ球の関与が必要であることを示している。一方、MDP の抗

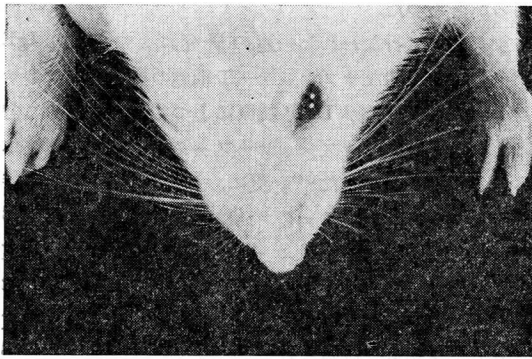


Fig. 3. Adjuvant arthritis induced by MDP.

Table 2. Induction of Arthritis by MDP

|                                          |       |
|------------------------------------------|-------|
| — (Difco FIA)                            | 0/14  |
| MDP (Difco FIA)                          | 11/18 |
| MDP (Difco FIA) neonatally thymectomised | 0/16  |
| MDP (Difco FIA) + ovalbumin              | 0/8   |
| MDP (Arlacel A + Drakeol)                | 0/26  |

Table 3. Requirement for MDP Activity

| Activity of MDP       | Antigen | T cells | Lipid |
|-----------------------|---------|---------|-------|
| Macrophage activation | —       | —       | —     |
| Granuloma formation   | —       | —       | +     |
| Arthritis induction   | —       | +       | +     |
| Adjuvant activity     | +       | +       | +     |

原性は今のところ見つけられていない。このことは、アジュバント関節炎発症に自己抗原が関係していることを示唆しているように思われる。

### まとめ

結核菌が示す主な生物活性の中で、マクロファージ活性化、肉芽腫形成、アジュバント関節炎誘起、アジュバント活性発現等の活性を荷う最小構造は MDP である。これら諸活性の発現と、抗原、Tリンパ球、リビド等の要求性を簡単にまとめると Fig. 3 のようになる。

終わりに、この仕事を担当して下さった教室の諸兄弟、江森浩三先生、貴重なサンプルを頂いた小谷尚三教授、芝哲夫教授、楠本正一博士、種々の援助を頂いた田中健蔵教授、岩井和郎博士、岩田康博士、小橋修博士、太田房雄博士、井上勝美博士に深謝いたします。

### 文 献

- 1) Pearson, C.M.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 91: 95, 1956.
- 2) Blanden, R.V.: J. Reticuloendothel. Soc. 5: 179, 1968.
- 3) Tanaka, A. et al.: Infect. Immun., 24: 302, 1979.
- 4) Nagao, S. et al.: Infect. Immun., 24: 308, 1979.
- 5) Tanaka, A. and Emori, K.: Am. J. Pathol., 98: 733, 1980.
- 6) Nagao, S. and Tanaka, A.: Infect. Immun., In press.

## 4. 結核菌およびムラミルペプチドを利用した IgE 抗体産生の制御

大阪大学医学部 岸 本 忠 三

免疫応答は種々の機能を異にする Tリンパ球サブセットにより調節されている。即時型アレルギーの原因となる IgE 抗体の産生もこの例外ではなく、Tリンパ球により調節されている。特に IgE 抗体の産生においては我々は以前に IgE クラスに特異的なヘルパー T 細胞が存在し、この免疫グロブリンの Isotype に特異的な Tリンパ球が IgE 抗体産生に大きな役割を果たしている可能性を示唆した<sup>1)</sup>。IgE クラスに特異的なヘルパー T 細胞が存在するならば当然 IgE クラスに特異的なサブレッサー T 細胞も存在することが予想され、IgE 抗体の産生はこれら IgE クラスに特異的なヘルパーとサブレッサーのバランスによつて調節されていると考えられる。

IgG 抗体の産生に効果を示す結核菌アジュバントは、IgE 産生を増強せずむしろ抑制的に働く場合が多い。そこで我々は結核菌が T 細胞の機能を介して IgE 抗体産生を選択的に抑制するのではないかと考え、これを実験的に検討した。はつきりとわかつた抗原決定基として

DNP 基を結核菌に導入し (DNP-Tbc)、これをマウスに前投与しておき、2週間後に DNP-卵白アルブミン (DNP-OA) でこのマウスを免疫し、抗 DNP IgG, IgE 抗体の産生を誘導することを試みると図 1 に示すごとく

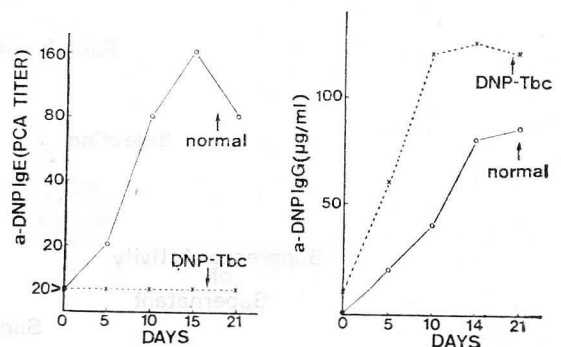


図 1 DNP 結核菌前投与による抗 DNP IgE 抗体産生の選択的抑制

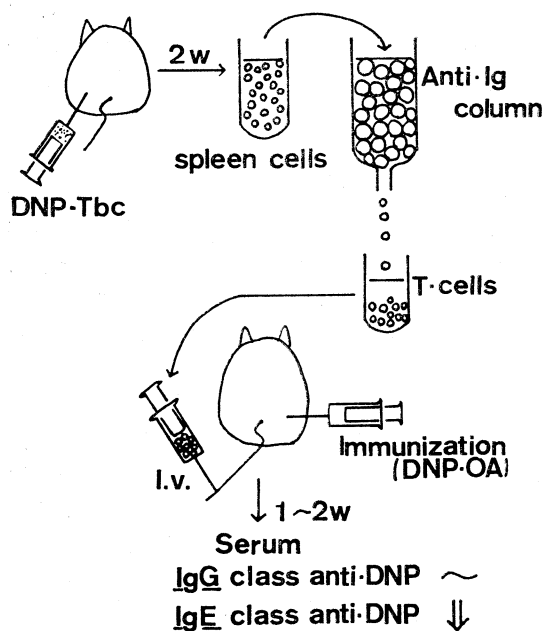


図2 DNP-Tbc 感作T細胞の移入によるIgE 抗体産生の選択的抑制

DNP-Tbc を前投与しておくことにより抗 DNP IgE 抗体の産生誘導が完全に抑制されることが明らかとなった。しかるに抗 DNP IgG 抗体の産生は全く抑制されなかつた<sup>2)</sup>。図2に示すように DNP-Tbc を投与されたマウスの脾細胞から T 細胞を精製しこれを正常マウスに投与し、DNP-OA で免疫すると抗 DNP IgE 抗体の産生が抑制されることから、DNP-Tbc 投与による抗 DNP IgE 抗体産生の選択的抑制は IgE クラスに特異的なサプレッサー T 細胞が誘導された結果であることが

明らかとなつた。

引き続いて行なわれた一連の研究によつてこの IgE クラスに特異的なサプレッサー T 細胞の機能は、このサプレッサー T 細胞が DNP 抗原によつて刺激されることによつて遊離するサプレッサーファクターによつて媒体されることがわかつた<sup>3,4)</sup>。更に、この IgE クラスに特異的なサプレッサーファクターは抗原特異性をもたず、H-2 の抗原決定基を有し、その標的細胞は IgE B 細胞であることが明らかとなつた。このことは IgE 産生 B ハイブリドーマによつて、このファクターの活性が吸収されることから確認された。

このファクターの性状を明らかにすることは、IgE 産生を抑制する物質の開発にもつながるものである。そこで我々は大量にこのファクターを作る方法として細胞融合法を導入した。すなわち IgE 抗体産生を抑制するサプレッサー T 細胞を何ら機能をもたず増殖を続けている T-リンホーマ細胞株を融合して、増殖しつつサプレッサーファクターを分泌するハイブリッド細胞を作ることを試みたわけである。図3に示すような方法によりハイブリッド細胞を作成し、多くのハイブリッドクローンをスクリーニングし、IgE 産生を抑制するサプレッサーファクターを分泌するクローンを洗い出した<sup>5)</sup>。このクローンの産生するファクターを用いてその性状を解析し、このファクターは H-2<sup>d</sup> の抗原決定基を有し、分子量約 53,000 であり、IgE B 細胞上にはこのファクターに対するアクセプターが存在することが明らかにされた。

以上述べたように DNP 基を結核菌に導入し、これでマウスを免疫することによつて DNP 基に特異的に IgE 抗体産生を選択的に抑制するサプレッサー T 細胞が誘導される。したがつて当然考えられることは、あるアレル

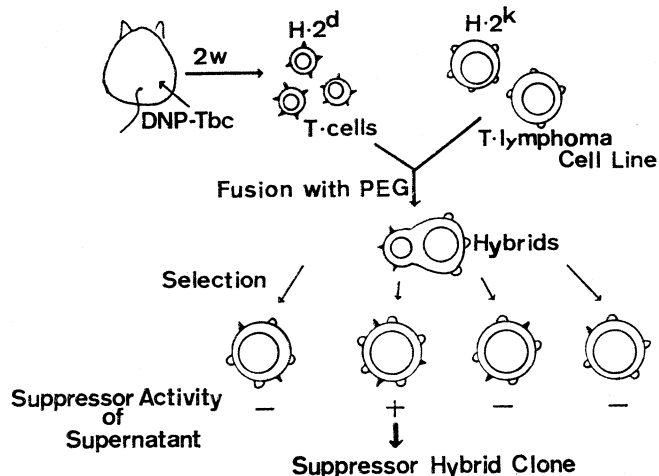


図3 細胞融合法を用いたサプレッサーハイブリッドの作成

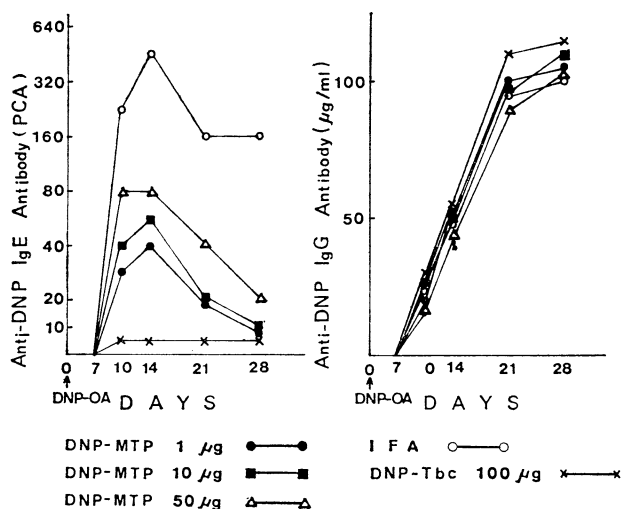


図 4 DNP-ムラミルペプチド前投与による抗 DNP IgE 抗体産生の部分的抑制

ゲンを結核菌に導入してこれを投与すると、このアレルゲンに対する IgE 抗体の産生が抑えられ、アレルギーの有効な治療法となるのではないかとのことである。しかし結核菌そのものをヒトに投与することには問題がある。そこで我々は結核菌のアジュバント効果を示しうる最少単位であるとされているムラミルペプチドを用いてその効果を検討した。すなわちムラミルペプチドに DNP-lysine を導入し、この DNP-ムラミルペプチドを前投与したマウスを DNP-OA で免疫し、抗 DNP IgE 抗体の産生を追跡した。図 4 に示すように DNP-ムラミルペプチドの前投与により有意に抗 DNP IgE 抗体の産生は抑制された。しかしその抑制効果は DNP-Tbc 投与によるほど完全なものではなかつた。

そこで我々はこのムラミルペプチドの IgE 産生に対する抑制効果を更に増強するため、結核菌に特有の脂肪酸であるミコール酸をムラミルペプチドに導入、このミコイル・ムラミルジペプチドに DNP-lysine を導入し(図5)、これをマウスに投与し抗 DNP IgE 抗体産生に対する影響を検討した。DNP-ミコイル・ムラミルトリペプチドの前投与により抗 DNP IgE 抗体産生

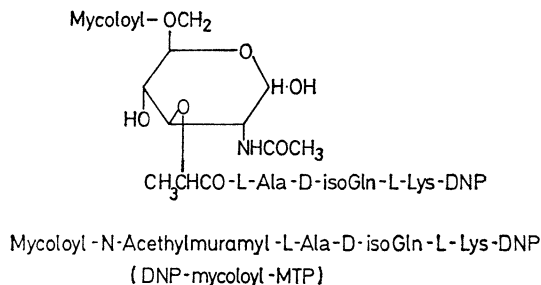


図 5 DNP-ミコロイル・ムラミルトリペプチド (DNP-mycoloyl-MTP) の化学構造

の誘導は完全に抑えられることが明らかとなつた(図6)。更に細胞移入の実験より、DNP-ミクロイル・ムラミルペプチドの投与により IgE クラスに特異的なサブレッサー T 細胞が誘導され、それによつて抗 DNP IgE 抗体の産生が抑制されることがわかつた<sup>6)</sup>。

アレルギーに対する IgE 抗体産生制御のモデルとしてムラミルペプチドに卵白アルブミンを結合し、これをマウスに投与することによって抗卵白アルブミン IgE

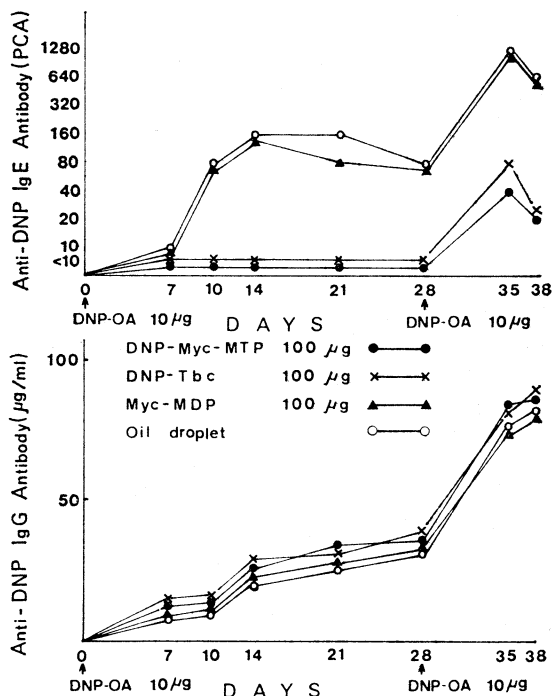


図 6 DNP-ミコロイル・ムラミルトリペプチド前投与による IgE 産生の抑制

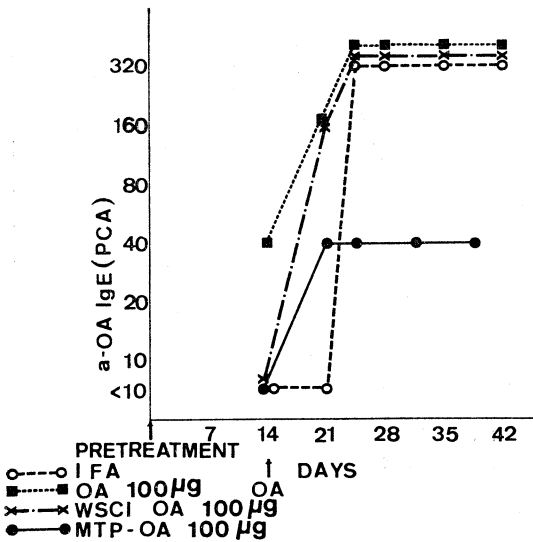


図7 卵白アルブミン・ムラミルペプチド前投与による抗卵白アルブミン IgE 抗体産生の抑制

## 5. BCG-CWS の 抗 腫 瘍 作 用

大阪大学医学部第3内科

小倉 剛, 坂谷 光則  
難波 学, 山村 雄一

### はじめに

癌患者に抗腫瘍効果を誘導する目的で、BCG 生菌を用いる免疫療法が現在もなお広く行なわれており、米国 NCI 発行の国際免疫療法登録簿のプロトコールを治療法別に分類すると、今なお約半数に BCG 生菌が用いられている。これまで、生化学的、物理的に分画された種々の BCG 菌体成分の解析結果からみると、BCG 菌体の免疫賦活効果、抗腫瘍効果発現には菌体の細胞壁が関与していると考えられている。東らは、細胞壁成分を更に蛋白分解酵素処理、有機溶媒処理を行ない、ミコール酸—アラビノガラクトン—ムコペプチド複合体を精製し、これを細胞壁骨格成分、cell wall skeleton (CWS) と名付けた<sup>1)</sup>。CWS は構造的には勿論のこと、「免疫から見た結核菌」としての BCG の免疫賦活活性の中心であり、本シンポジウムでは、この CWS 画分の癌に対する免疫療法効果について、実験腫瘍での成績に加えて、臨床成績をも加えて報告したい。

### 実験腫瘍系での研究

我々は、これまでマウス、ラットの同系腫瘍系を用いて種々の研究を行なってきたが<sup>2)~5)</sup>、今回は、ACI/N ラットと同系腫瘍 AMC-60 線維肉腫での免疫療法効果を検討した成績について述べてみたい<sup>6)7)</sup>。まず BCG-CWS

抗体産生が抑制されるかどうかを検討したところ、図7に示すようにこの化合物の前投与により抗卵白アルブミン IgE 抗体の産生が有意に抑制されること、この抑制もサプレッサー T 細胞の誘導によることが明らかとなった。

このように結核菌、またはそのアジュバント活性をになう合成化合物はアレルギーの有効な治療法開発への道を開くと共に T リンパ球を介しての IgE 抗体産生の制御機構を解析するうえにおいてよいモデルを提供する。

### 文 献

- 1) Kishimoto, T. and Ishizaka, K.: J. Immunol., 111 : 720, 1973.
- 2) Kishimoto, T. et al.: J. Immunol., 117 : 396, 1976.
- 3) Suemura, M. et al.: J. Immunol., 119 : 149, 1977.
- 4) Kishimoto, T. et al.: J. Immunol., 121 : 2106, 1978.
- 5) Watanabe, T. et al.: J. Immunol., 121 : 2113, 1978.
- 6) Kishimoto, T. et al.: J. Immunol., 123 : 2709, 1979.

の免疫療法効果をみるために、腫瘍細胞をラット下肢筋肉内に移植し、100µg の CWS を腫瘍内に反復注入すると、腫瘍の退縮のみならず、リンパ行性、血行性転移の抑制がみられた (Table 1)。移植する細胞数を増やし、移植部腫瘍が CWS の注入で退縮しない条件下で各臓器への転移をみても、リンパ節転移が有意に抑制されており、ラットは担癌の状態で生存期間が延長した。一方、ラット腹腔内に腫瘍細胞を移植し、その後 BCG-CWS を腹腔内へ注入していくと、腹水貯留が阻止され、生存期間も延長した (Table 2)。

通常 BCG 生菌は、マクロファージに対して生化学的、免疫学的な活性化能が強く、これが抗腫瘍活性の主要因であるとされている。

そこで、BCG-CWS を正常ラットの腹腔内に注入して得た腹腔浸出細胞(peritoneal exudate cells, PEC)と腫瘍細胞を混合し、正常ラットの皮下に移植して腫瘍の生着を見るいわゆる Winn テストを行なうと、Table 3 に示すように抗腫瘍効果が認められた。これら *in vivo* での効果を解析するために CWS 活性化 PEC を用いて *in vitro* テストを行なった。PEC と腫瘍細胞を低比率で混合培養し、腫瘍細胞増殖能に対する阻害度をみる cytostasis テストや高比率で <sup>125</sup>I-UdR 標識腫瘍細胞と培養し cytotoxicity テストを行なうと、共に強い活性がマクロファージ画分に存在することが明らかとなった。



Table 1. Immunotherapeutic Effect of BCG-CWS

| Treatment                                                                                   | No. of rats | Tumor-bearer | Mean tumor weight (g) | Metastases in |                     |       |                     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|--------------|-----------------------|---------------|---------------------|-------|---------------------|
|                                                                                             |             |              |                       | DLN*          | P**                 | lungs | P                   |
| Experiment 1. (Rats were inoculated with $1 \times 10^6$ tumor cells and killed on day 39.) |             |              |                       |               |                     |       |                     |
| None (control)                                                                              | 14          | 14           | 19.2                  | 9             | } 0.00085<br>0.0217 | 10    | } 0.00954           |
| Oil alone, i.t., $\times 6$                                                                 | 11          | 11           | 16.6                  | 5             |                     | 8     |                     |
| BCG-CWS, i.t., $\times 6$                                                                   | 13          | 8            | 10.6                  | 0             |                     | 2     |                     |
| Experiment 2. (Rats were inoculated with $1 \times 10^6$ tumor cells and killed on day 33.) |             |              |                       |               |                     |       |                     |
| None (control)                                                                              | 10          | 10           | 8.6                   | 3             | } 0.00547<br>0.0198 | 9     | } 0.00547<br>0.0198 |
| BCG-CWS, i.t., $\times 5$                                                                   | 10          | 4            | 2.2                   | 0             |                     | 2     |                     |
| BCG-CWS, i.v., $\times 5$                                                                   | 10          | 7            | 9.7                   | 0             |                     | 3     |                     |
| Experiment 3. (Rats were inoculated with $5 \times 10^6$ tumor cells and killed on day 29.) |             |              |                       |               |                     |       |                     |
| None (control)                                                                              | 9           | 9            | 34.8                  | 7             | } 0.0152<br>0.0497  | 5     |                     |
| BCG-CWS, i.t., $\times 5$                                                                   | 9           | 8            | 26.8                  | 1             |                     | 5     |                     |
| BCG-CWS, i.v., $\times 5$                                                                   | 9           | 7            | 42.1                  | 6             |                     | 5     |                     |

In all experiments rats were inoculated with tumor cells on day 0 and treatment with 100 $\mu$ g CWS was started on day 5 and repeated at 5-day intervals.

\* DLN: Draining lymph node (Para-aortic lumbar node). \*\* Fisher's exact probability test.

Table 2. Immunotherapeutic Effect of BCG-CWS

| Treatment            | Survivals on |        |        |
|----------------------|--------------|--------|--------|
|                      | Total rats   | Day 40 | Day 60 |
| BCG-CWS, 100 $\mu$ g | 6            | 3      | 3      |
| BCG-CWS, 500 $\mu$ g | 5            | 4      | 4      |
| None (control)       | 6            | 2      | 0      |

All rats were inoculated with  $1 \times 10^5$  tumor cells on day 0 and treatment with CWS was started on day 1.

Table 3. Winn Test with BCG-CWS Activated PEC

| Treatment for effector cell donor    | Inoculation of tumor cells with tumor cell alone | Tumor take/total rats 16/16 |
|--------------------------------------|--------------------------------------------------|-----------------------------|
| None                                 | PRC, $1 \times 10^7$                             | 11/11                       |
| BCG-CWS 500 $\mu$ g, i.p. $\times 1$ | PEC, $1 \times 10^7$                             | 2/16                        |

A mixture of tumor cells ( $1 \times 10^5$ ) and effector cells were inoculated subcutaneously into the flank of normal rats.

Table 4. Cytostatic Activity of BCG-CWS Activated PEC

| Treatment for effector cell donor | Effector to target cells | Whole PEC | Cytostatic index (%)* |             | P**    |
|-----------------------------------|--------------------------|-----------|-----------------------|-------------|--------|
|                                   |                          |           | P**                   | Macrophages |        |
| None (control)                    | 5 : 1                    | 17.4± 2.1 | ns***                 | 25.0±5.1    | ns     |
|                                   | 10 : 1                   | 34.5± 5.2 |                       |             |        |
| Oildroplets                       | 5 : 1                    | 35.0± 8.7 | ns                    | 38.1±8.0    |        |
|                                   | 10 : 1                   | 58.0±10.2 |                       |             |        |
| BCG-CWS 500μg, i.p. × 1           | 5 : 1                    | 51.8± 5.1 | <0.005                | 55.8±6.7    | <0.005 |
|                                   | 10 : 1                   | 77.5± 4.9 | <0.01                 |             |        |

\* Target cell number :  $1 \times 10^5$  cells.

\*\* Student's *t*-test.

\*\*\*ns : not significant.

Table 5. Cytolytic Activity of BCG-CWS Activated PEC

| Treatment for effector cell donor    | Mean peritoneal cell yield | Effector cells incubated* | Cytolytic index (%)** |        |                | P***   |
|--------------------------------------|----------------------------|---------------------------|-----------------------|--------|----------------|--------|
|                                      |                            |                           | Whole PEC             | P***   | Macrophages    |        |
| None (control)                       | $1.2 \times 10^7$          | PRC $1 \times 10^6$       | 1.2 $\pm$ 1.0         | <0.001 | -4.2 $\pm$ 0.7 | <0.001 |
|                                      |                            | $2 \times 10^6$           | 1.5 $\pm$ 0.4         |        | -4.1 $\pm$ 0.4 |        |
| BCG-CWS 500 $\mu$ g, i.p. $\times 1$ | $3.9 \times 10^7$          | PEC $1 \times 10^6$       | 28.3 $\pm$ 1.0        | <0.001 | 26.1 $\pm$ 1.0 |        |
|                                      |                            | $2 \times 10^6$           | 39.2 $\pm$ 4.4        |        | 35.1 $\pm$ 3.4 |        |

\* Number of peritoneal cells incubated in a tube before adhering macrophages.

\*\* Target cell number,  $1 \times 10^4$  \*\*\* Student's *t*-test.

Table 6. Fifty Percent Survival According to Cell Type and Clinical Staging

| Histological cell type  | Clinical stages | 50% survival months |           | Statistical significance |
|-------------------------|-----------------|---------------------|-----------|--------------------------|
|                         |                 | BCG-CWS             | Control   |                          |
| All cases               | I, II, III      | 13.5(455)           | 8.5(380)  | p<0.0001                 |
| Large cell carcinoma    | I, II, III      | 11.0( 22)           | 7.5( 23)  | NS                       |
| Small cell carcinoma    | I, II, III      | 11.0( 65)           | 5.4( 41)  | p=0.0008                 |
| Squamous cell carcinoma | III             | 12.0(123)           | 8.0(141)  | p=0.0005                 |
| Adenocarcinoma          | III             | 12.0(155)           | 6.5(101)  | p=0.0001                 |
| Surgical resection      | II              | 36.0( 24)*          | 23.0( 18) | p=0.02                   |
| Pleuritis carcinomatosa | III             | 10.0( 32)           | 6.0( 55)  | p=0.016                  |

NS; not significant with Wilcoxon-Gehan test.

\* 75% survival months

Parentheses indicate the number of patients.

(Table 4, 5)。これらの実験効果は、CWS の抗腫瘍効果発現にはマクロファージの活性化が重要な因子であることを示唆している。

臨床的研究

一方、臨床的には、BCG-CWS はまず教室でメラノームを対象に局所注入療法の効果が検討された後<sup>8)</sup>、当時、山村教授主宰のもとに肺癌とその胸膜炎を対象に全国的な規模で治験が行なわれた。治療方針として、まず第一次療法として、その施設で従来行なわれてきた治療方針に沿って化学療法、放射線療法、手術療法など既存の治療法が行なわれた後に、アジュバント免疫療法としてBCG-CWS の追加投与が行なわれた<sup>9)</sup>。1974年から1977年までに組み込まれた患者 455 例の各組織型、各病期の生存率を Cutler の生命分析表をもとに Wilcoxon-Gehan の方法によつて、1971年から1974年まで同一施設で治療した患者380例の生存率と比較検討した。Table 6 に示すように各組織型、病期で有意の生命延長効果がみられた。特に癌性胸膜炎では局所化学療法に続いて CWS の注入を行なうと、胸水貯留阻止、胸水中細胞陰性化に加えて、生命延長効果がみられた<sup>10)</sup>。

おわりに

結核菌が持つ免疫賦活活性の癌免疫療法への導入が図

られてから既に10年以上になろうとしている。この間の流れとして、生菌から有効画分の製剤化への努力が行なわれてきたが、ここに示した BCG-CWS もその一つであり、現在更に BCG に代わるより優れた菌体源として *Nocardia rubra* が取り上げられ<sup>11)-13)</sup>、更に厳密な評価を下すべく randomized 方式による trial が開始されている。

文 献

1) Azuma, I. et al.: J. Natl. Cancer Inst., 52 : 95, 1974.  
2) Azuma, I. et al.: Gann., 65 : 493, 1974.  
3) Ogura, T. et al.: Gann., 69 : 311, 1978.  
4) Masuno, T. et al.: Gann., 70 : 223, 1979  
5) Yoshimoto, T. et al.: Gann., 67 : 737, 1976.  
6) Namba, M. et al.: Gann., 69 : 831, 1978.  
7) Ogura, T. et al.: Cell. Molecul. Biol., 25 : 7, 1978.  
8) Yamamura, Y. et al.: Gann., 66 : 355, 1975.  
9) Yamamura, Y. et al.: Cancer, 43 : 1314 : 1979.  
10) Ogura, T. et al.: Gann. Monogr. Cancer Research, 21 : 143, 1978.  
11) Azuma, I. et al.: Gann., 67 : 733, 1976.  
12) Azuma, I. et al.: Cancer Immunol. Immunother., 4 : 95, 1973.  
13) Ogura, T. et al.: Cancer Research, 39 : 4706, 1979.

ま と め

座 長 東 市 郎

以上各演者によつて明確にされたように、結核菌は結核症の病因菌としてのみならず、現在免疫学の分野にその研究材料として広く応用され、多くの問題を提示している。更に岸本、小倉両博士によつて述べられるように、

アレルギー疾患や癌の治療に貢献する可能性もあり、これらは新しい結核病学の発展応用といえるであろう。

結核菌および結核病学は真に多くの可能性を秘めた夢多き研究分野といえる。