

## 第56回総会特別講演

## 結核菌菌体成分の免疫化学，特に免疫増強活性を中心に

東 市 郎

北海道大学免疫科学研究所化学部門

受付 昭和 56 年 9 月 9 日

The 56th Annual Meeting Special Lecture

IMMUNOCHEMISTRY OF TUBERCLE BACILLI,  
WITH SPECIAL REFERENCE TO ADJUVANT ACTIVITY

Ichiro AZUMA\*

(Received for publication September 9, 1981)

Tubercle bacilli have been shown to have various biological activities. Especially, the immunoadjuvant activity was known by so-called "Freund's complete adjuvant". In this lecture, I have reported the adjuvant activity of the cell-wall skeleton of tubercle bacilli and its clinical application to cancer immunotherapy. The chemical synthesis and immunological properties of low molecular weight adjuvants related to bacterial cell-wall skeletons were also described.

We have shown that chemical structure of cell-wall skeleton (CWS) of tubercle bacilli, such as BCG, was shown to be "mycolic acid-arabinogalactan-mucopeptide". The details of biochemical and immunological properties of BCG-CWS were examined. Oil-treated BCG-CWS was shown to have potent adjuvant and antitumor activities in experimental tumor systems such as: suppression and regression of syngeneic transplantable tumor, prevention of carcinogenesis and the restore of the depressed immune function to normal level in tumor-bearing animals. BCG-CWS was applied to the treatment of patients with lung cancer and acute myelogenous leukemia. Significant prolongation of survival period of cancer patients was observed by the immunotherapy with BCG-CWS in addition to conventional therapy, compared to the control group which was treated with conventional therapy alone. We have also found that the cell-wall skeleton of *Nocardia rubra* had more advantages than BCG-CWS as cancer immunotherapeutic agent. The efficacy of *N. rubra*-CWS as immunotherapeutic agent is now being examined by randomized control clinical trials in patients with lung cancer, leukemia and gastro-intestinal cancer.

In 1974, Ellouz and her coworkers have reported that the minimum adjuvant-active subunit of bacterial cell-wall was N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (MDP). We have chemically synthesized various MDP analogs and derivatives and their immunological properties were examined in detail with special reference to the relationship between the chemical structure and adjuvant activity. MDP and its analogs were shown to have potent adjuvant activity, however, they have no antitumor activity in any transplantable tumor system. Among the MDP derivatives, we have found that 6-O-mycoloyl-N-acetyl-muramyl-L-seryl-D-isoglutamine and methyl ester of 6-O-quinonyl (-QS<sub>10</sub>)

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

-N-acetylmuramyl-L-valyl-D-isoglutamine were active as cancer immunotherapeutic agent in transplantable tumors in syngeneic mice and guinea pigs.

The above results clearly suggested that tubercle bacilli and related substances are very important materials for the study of immunology and also for the treatment of malignant diseases.

## はじめに

結核菌は細菌学的に「抗酸菌」の別名をもつミコバクテリアに属し結核症の起因菌としてのみならず、生化学的に「ミコール酸, mycolic acid」と呼ばれる $\alpha$ -分岐を有する総炭素数80の $\beta$ -オキシ酸を含み、また免疫学的に細胞性免疫の研究素材として極めて重要なことは周知の事実である。

特に近年、癌の免疫療法が広く癌治療に応用され、弱毒ウシ型結核菌 *Mycobacterium bovis* BCG が広くヒト癌の免疫療法に用いられるにいたり、結核菌のもつ特異的な生化学的、免疫学的性状が再び注目されるようになった。特に結核菌のもつ免疫学的活性のうち、「免疫応答の強化活性」については現在免疫学の重要な主題の一つであり、幅広い研究が展開されつつある。

本講演において、結核菌の菌体成分の多様な生物活性のうち、特に細胞壁骨格のアジュバント活性、抗腫瘍活性を中心に述べ、さらにこれら細胞壁骨格の活性サブユニットの化学合成に関する最近の知見を、私共の研究を中心に述べる。

### 1. 結核菌のアジュバント活性

結核死菌を鉱物油に浮遊させたいわゆる「Freund の完全アジュバント」は強い免疫増強活性（アジュバント活性）を有することが知られている<sup>1)</sup>。アジュバント活性因子として、wax D, コードファクター、水溶性アジュバント、PPD, RNA 画分など多くの結核菌菌体成分が知られている。1971年私共<sup>2)</sup>は結核菌の主たるアジュバント活性因子として細胞壁骨格部分を精製し、その生化学的、免疫学的性状を明らかにした。結核菌、特に BCG 細胞壁骨格は強いアジュバント活性を有するとともに強い抗腫瘍活性を有することが私共によつて見出され、ヒト癌の免疫療法剤としての有用性も明らかにされた。

### 2. 結核菌細胞壁骨格 (CWS) の化学構造

一般に細菌細胞壁は共通構造（ムコペプチド）と特殊構造から構成される。共通構造は後述するようにムコペプチド画分であり、一方、特殊構造は各細菌によつて異なり、それぞれ特異な蛋白質、脂質、多糖体から構成される。

結核菌細胞壁（図1）は菌体の最外層を形成し、他の細菌細胞壁と同様、超音波処理、フレンチプレス、ガラ

スピーズ法などの物理的方法で破碎した後、遠心分画によつて全細胞壁画分が得られる。全細胞壁画分は電顕的観察では典型的な細胞表層構造を示すが、生化学的には50~60%の蛋白質や遊離脂質を含む。これら遊離脂質や蛋白質は界面活性剤、蛋白分解酵素、有機溶媒処理により容易に除去され、精製細胞壁が得られる。私共は精製細胞壁画分を全細胞壁画分と区別するため、「細胞壁骨格」(cell-wall skeleton; CWS と略す)と名付けた<sup>3)</sup>。結核菌をはじめとして種々のミコバクテリアから得られるCWS 画分は、共通構造のムコペプチドのほか特殊構造としてミコール酸（脂質）とアラビノガラクトン（多糖体）を含む（図2）。ミコール酸はミコバクテリアに特有の超高級脂肪酸（炭素数70~84）であり、分子内にC<sub>22</sub>, またはC<sub>24</sub>の $\alpha$ -分岐と $\beta$ 位に水酸基を有する。ミコール酸はミコバクテリア共通の抗原多糖体であるアラビノガラクトンの非還元性末端のD-アラビノースにエステル結合しており、ムコペプチドはアラビノガラクトンに磷酸エステル結合していることが示唆されている。ムコペプチドの基本構造として、L-Ala-D-Glu-meso Dpm-D-Ala のテトラペプチドとN-アセチルグルコサミン $\beta$ -1,4-N-グルコリルムラミン酸のアミノ二糖がサブユニットとして固定されており<sup>4)5)</sup>、ムコペプチドにはD-Ala $\rightarrow$ meso Dpm, meso Dpm $\rightarrow$ meso Dpm の分子内架橋が2:1の比で存在し、細胞表層構造の強固性を保っている<sup>6)</sup>。ミコバクテリアと分類上類縁関係にあるノカルジア、コリネバクテリアのCWSもミコバクテリアと基本的に同様の化学組成を有する（表1）。ただ構成ミコール酸の総炭素数が異なり、ミコバクテリアのミコール酸が前述したようにC<sub>70</sub>-C<sub>84</sub>、ノカルジアのノカドミコール酸がC<sub>34</sub>-C<sub>66</sub>、コリネバクテリアのコリノミコール酸がC<sub>28</sub>-C<sub>38</sub>であるが、いずれも $\alpha$ -分岐と $\beta$ 位に水酸基を有する。さらにムラミン酸のN置換基がミコバクテリア、ノカルジアではグリコール酸残基であるのに

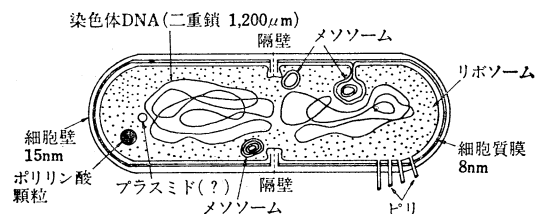


図1 ミコバクテリアの微細構造模式図 (福土主計博士原図)

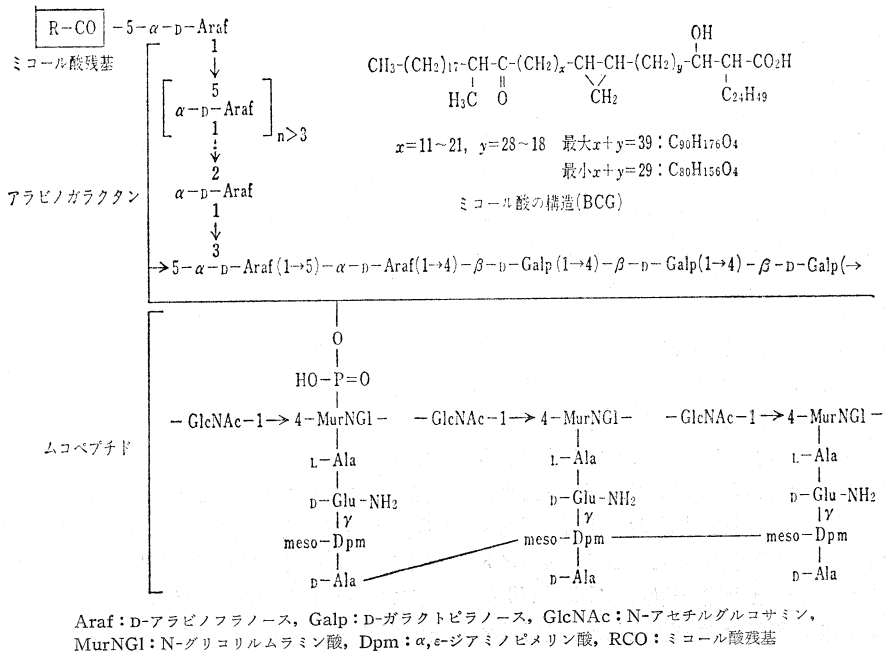


図 2 BCG-CWS の基本構造

表 1 ミコバクテリア, ノカルジア, コリネバクテリアの細胞壁骨格構成成分

属	ミコール酸 ( $\alpha$ 分岐, $\beta$ -オキシ酸)	多糖体	ムコペプチドサブユニット (構成最小単位)
ミコバクテリア ( <i>Mycobacterium</i> )	1) 炭素数 $\text{C}_{70}\text{-C}_{84}$ 2) $\alpha$ 分岐 $\text{C}_{22}\text{H}_{45}, \text{C}_{24}\text{H}_{49}$ 3) $\beta$ -OH	アラビノガラクトタン D-アラビノース D-ガラクトース	1) Ala-Glu-Dpm-Ala 2) N-Acetylglucosaminyl- $\beta$ -1, 4-N-glycolylmuramic acid
ノカルジア ( <i>Nocardia</i> )	1) 炭素数 $\text{C}_{34}\text{-C}_{66}$ 2) $\alpha$ 分岐 $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{-C}_{16}\text{H}_{33}$ 3) $\beta$ -OH	アラビノガラクトタン D-アラビノース D-ガラクトース	1) Ala-Glu-Dpm-Ala 2) N-Acetylglucosaminyl- $\beta$ -1, 4-N-glycolylmuramic acid
コリネバクテリア ( <i>Corynebacterium</i> )	1) 炭素数 $\text{C}_{23}\text{-C}_{38}$ 2) $\alpha$ 分岐 $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{-C}_{16}\text{H}_{33}$ 3) $\beta$ -OH	アラビノガラクトタン D-アラビノース D-ガラクトース	1) Ala-Glu-Dpm-Ala 2) N-Acetylglucosaminyl- $\beta$ -1, 4-N-acetylmuramic acid

対し, コリネバクテリアでは酢酸残基であることが特徴的である<sup>7)</sup>.

### 3. BCG 細胞壁骨格 (BCG-CWS) のアジュバント活性

上記ミコバクテリア CWS 画分は, *in vivo* および *in vitro* においてアジュバント活性, 非特異的感染防御活性, 肉芽腫形成, 抗腫瘍活性など多彩な生物活性を示す。特にアジュバント活性および抗腫瘍活性については私共

により詳細に検討された<sup>7)-9)</sup>.

CWS 画分のアジュバント活性の発現はアジュバントおよび抗原の投与形態によつて異なる。*In vivo* の実験系において CWS 画分を抗原 (ヒツジ赤血球, ウン血清アルブミン, スルファニルアゾ蛋白など) とともに油中水 (w/o) エマルジョンとして投与すると Freund の完全アジュバント (Freund's complete adjuvant, FCA) の場合と同様強い血中抗体産生, 遅延型アレルギーの誘導が長期間認められる。CWS 画分を生理食塩水浮遊液

とし、抗原（ヒツジ赤血球やT細胞非依存性抗原と考えられる DNP-Lys-Ficoll）とともに投与してもこれら抗原に対する血中抗体産生は認められるが、そのアジュバント活性発現は一過性である。一方 CWS 画分を少量の鉱物油 (Drakeol 6VR) または動物油 (スクワレンなど) で処理し、0.2% Tween 80 含有生理食塩水に水中油 (o/w) 形エマルジョンとしたアジュバントを腫瘍細胞とともに投与すると、これら抗原に対して主として細胞性免疫 (キラーT細胞の誘導) に対しアジュバント活性を示すことが見出された。

特に TNP-mastocytoma P815-X2 細胞を抗原として動物油処理 BCG-CWS とともにマウス腹腔内に免疫し、11日目におけるキラーT細胞と TNP 基に対する抗体産生細胞 (PFC) の生成に対し強いアジュバント活性を示すが、PFC の産生に対しほとんどアジュバント活性を示さないことを見出した。同様に同種および同系細胞障害試験におけるキラーT細胞生成に対するアジュバント活性が見出されている<sup>9)</sup>。また鉱物油処理 BCG-CWS をマイトマイシンC処理 S1509a 腫瘍細胞とともに同系マウス (A/J) の皮下に免疫すると10日後に局所リンパ節や脾に S1509a に特異的なキラーT細胞の産生がみられたが、サプレッサーT細胞の産生は認められなかつた<sup>10)</sup>。

鉱物油処理 BCG-CWS (o/w 形エマルジョン) が主として細胞性免疫応答に対し強いアジュバント活性を示す機構の一つとして、鉱物油処理 BCG-CWS が *in vivo* において主としてT細胞領域を刺激することが明らかにされている<sup>11)</sup>。その際、BCG-CWS に含まれる大量のミコール酸が脂溶性基として鉱物油 (または動物油) に対し強い親和性を発揮するものと考えられる。他のミコバクテリアおよび類縁細菌であるノカルジア、コリネバクテリアの CWS 画分も BCG-CWS と同様のアジュバント活性を示す。特に後述するように、*Nocardia rubra* から精製した CWS は極めて強いアジュバント活性および抗腫瘍活性を示す<sup>7)-9)</sup>。

私共はこれらミコバクテリア、ノカルジア、コリネバクテリアの CWS の基本構造のうちアジュバント活性因子がムコペプチド部分であることを指摘した<sup>2)</sup>。

また、私共はミコバクテリア、ノカルジア、コリネバクテリアの CWS 画分はマウスの T、B リンパ球に対しマイトジェン活性を示すことを見出した。T リンパ球にマイトジェンとして作用する際、少量のマクロファージが要求されることも明らかにした<sup>12)13)</sup>。

#### 4. BCG-CWS の抗腫瘍活性

鉱物油処理 BCG-CWS は上記アジュバント活性を免疫学的基盤としてマウス、ラット、モルモットなどの実験腫瘍系に対し強い抗腫瘍活性を示す。

##### 1) 実験腫瘍系に対する抗腫瘍活性

鉱物油処理 BCG-CWS を Meth A, EL4, melanoma B16, mastocytoma P815-X2 などのマウス可移植腫瘍細胞とともに混合し同系マウスの皮内に投与すると、腫瘍の生着および増殖を抑制し、特異的腫瘍免疫を誘導する<sup>14)</sup>。この実験系を Zbar らは腫瘍の “suppression 実験” と呼び、次に述べる腫瘍の “regression 実験” と区別している。実験腫瘍系を用いる “regression 実験” はあらかじめ動物に移植し、増殖した腫瘍内にアジュバント (BCG-CWS) を投与して腫瘍の退縮および腫瘍免疫の誘導を検討する。Meyer ら<sup>15)</sup>は strain 2 モルモット-line 10 肝癌の同系移植腫瘍系で BCG-CWS の腫瘍内 1 回投与では regression 活性が極めて弱く、regression 活性を効果的に発現するために、鉱物油処理 BCG-CWS にコードファクター (trehalose-6,6'-dimycolate, P<sub>3</sub>) を混合投与することが必要であることを述べている。Ogura ら<sup>16)</sup>も鉱物油処理 BCG-CWS をラット筋力内に投与すると局所リンパ節へのリンパ球のトラッピングは起こるが、BCG 生菌に比してその持続時間は短く、1週間後に活性は消失し、BCG-CWS アジュバント活性を効率よく持続させるためには繰り返し投与することが必要であることを指摘した。Ogura ら<sup>17)</sup>は ACI/N ラットの下肢筋肉内に同系線維肉腫 (AMC 60) を移植し、5日後から5日間隔で 100 μg の BCG-CWS を繰り返し局所投与した結果、局所腫瘍の退縮、局所リンパ節、肺への転移が著しく抑制されることを見出した。また、鉱物油処理 BCG-CWS を局所投与した腫瘍での組織学的検索の結果、肉芽腫様反応が認められている。同様の regression 活性は strain 2 モルモット-line 10 肝癌、その他のマウス可移植腫瘍系においても認められている。

Yoshimoto ら<sup>18)</sup>は ddO マウスの従属内に 3-methylcholanthrene を投与し胸腔に誘発した線維肉腫を胸腔内に移植して作製した実験的癌性胸膜炎に鉱物油処理 BCG-CWS を胸腔内投与して、担癌マウスの生存率が著明に改善されることを見出している。さらに Yoshimoto らは同様の実験モデルを C57BL/6J マウスに benzo(α)pyrene で誘発した扁平上皮癌を用いて作製し regression 活性を認めている。Tokuzen ら<sup>19)</sup>は ICR マウスにおけるメチルコランズレン誘発線維肉腫、SHN マウスにおける自然発生乳癌を用いて自家腫瘍片を BCG-CWS と混合し、皮下に再移植し BCG-CWS の suppression 活性を検討し、鉱物油処理 BCG-CWS が線維肉腫の自家腫瘍片再移植に対し suppression 活性を有することを見出している。

BCG-CWS のこれらの抗腫瘍活性の免疫学的基盤として、さきに述べた BCG-CWS の T細胞やマクロファージに対するアジュバント活性があげられる。

##### 2) 担癌宿主の免疫機能の改善

従来、担癌患者において細胞の機能が低下しているこ

表2 各組織別肺癌患者に対する BCG-CWS による免疫療法の効果

組織型	臨床病期 (日本肺癌学会分類)	50% 生存期間		
		対照群	BCG-CWS 投与群	有意差
全症例	I, II, III, IV	8.5カ月(380)*	13.5カ月(455)*	$p < 0.0001$
小細胞癌	I, II, III, IV	5.5 (41)	11.0 (65)	$p = 0.0008$
大細胞癌	I, II, III, IV	7.5 (23)	11.0 (22)	有意差なし
扁平上皮癌・腺癌	I, II	23.0 (74)	>23.0 (90)**	有意差なし
扁平上皮癌	III, IV	8.0 (141)	12.0 (123)	$p = 0.0005$
腺癌	III, IV	6.5 (101)	12.0 (155)	$p < 0.0001$

\* ( ): 症例数

\*\* 70%の症例が生存

とが明らかにされているが、Kitagawaら<sup>20)</sup>は ddO マウスに Ehrlich 腹水癌の無細胞腹水を投与して低下したヘルパー T 細胞の機能を BCG-CWS 静脈内投与によつて回復させることが可能であることを見出している。また私共<sup>21)</sup>は C57BL/6J マウスに同系腫瘍である melanoma B16 を移植し、19日目に同種抗原である mastocytoma P815-X2 細胞を投与し細胞障害活性を測定した。担瘤マウスにおいてキラー T 細胞の活性は正常動物の約 1/3 に低下するが、鯨物油処理 BCG-CWS の腹腔内 1 回投与または皮内 3 回投与によつてほぼ正常レベルに回復することが見出された。

### 3) BCG-CWS の発癌抑制活性

BCG 生菌がマウスにおける化学発癌を阻止することが見出されているが、鯨物油処理 BCG-CWS もマウス、ラット、ウサギにおける化学発癌を抑制する。Yoshimotoら<sup>22)</sup>は ddO マウスに 3-methylcholanthrene を胸膜腔内投与し、BCG-CWS (100  $\mu$ g) を毎週 1 回、計 10 回皮下投与することにより線維肉腫の発癌率が対照群 (66%) に比し BCG-CWS 投与群 (39%) では有意に低下し、かつ発癌時期も遷延した。Ikegamiら<sup>23)</sup>もマウスに 7,12-dimethylbenzanthracene (DMBA) を皮下投与し、BCG-CWS の発癌予防効果について検討し、DMBA 発癌に対し BCG-CWS 投与によつて C57BL/6J, BALB/c, A/He, DBA/2 マウスにおいて発癌時期の遷延が確かめられたが、C3H/He, BTK マウスにおいては対照群に比し差が認められなかつた。桑村<sup>24)</sup>はドンリュウラットに BCG-CWS を皮下投与することにより 3'-methyl-4-dimethylaminobenzene 投与による肝癌の発癌率が対照群に比し有意に低下することを見出した。Hiraoら<sup>25)</sup>はウサギ気管支内に 4-nitroquinoline-1-oxide と 3-methylcholanthrene を投与し、ヒト肺癌に極めて類似する実験的肺癌を作製したが、BCG-CWS を静脈内投与することにより発癌を抑制することを見出した。

### 5. BCG-CWS を用いるヒト癌の免疫療法

BCG-CWS を用いるヒト癌の免疫療法は 1974 年以来

悪性黒色腫<sup>26)</sup>、肺癌<sup>27)~33)</sup>、白血病<sup>34)~36)</sup>、胃癌<sup>37)</sup>などを中心に行なわれ、特に肺癌については症例も多く、かつ極めて興味深い成績が得られている。鯨物油処理 BCG-CWS を用いるヒト肺癌の免疫療法は次の方法で行なわれている。治療方針として原則的に、手術、放射線療法、化学療法などの一次療法の終了後、BCG-CWS による導入療法と維持療法が行なわれる。導入療法としては手術時腫瘍内投与、ファイバースコープ下気管支腫瘍内投与、癌性胸膜炎に対し胸腔内投与などのほか、上腕、肩部への皮内投与を行なう。その後上腕、肩部への皮内投与で維持療法を行なつた。投与量は、患者の BCG-CWS を用いる皮内反応に対する反応性によつて異なるが、50~400  $\mu$ g を用いる。表 2 に阪大医学部山村内科を中心に 11 施設において行なわれた共同研究の成績を示した<sup>28)</sup>。1974~1976年に鯨物油処理 BCG-CWS を用いる免疫療法の行なわれた 455 例の免疫療法群の予後を、同一施設での 1971~1974年の肺癌症例の治療成績を歴史的対照群として比較したものである。組織型、病期別に比較して、大細胞癌の症例群を除いてそれぞれの免疫療法群において統計的有意に生存期間の延長を認めた。特に注目される成績として、癌性胸膜炎の患者に対し BCG-CWS を胸腔内投与した場合、胸水貯留の阻止、胸水中の悪性細胞の消失などがみられ、患者を比較的早く外来通院により加療することが可能となり、生存期間の延長も認められた。また、ファイバースコープを用いる BCG-CWS の局所投与によつて腫瘍の退縮効果もみられた。

BCG-CWS による癌免疫療法の効果について Yasumotoら<sup>28)</sup>は剖検などによつてさらに詳細に検討し、BCG-CWS の投与によつて血行性転移の防止、担瘤患者の非特異的感染に対する抵抗性の増強などの効果が認められることを報告している。また手術可能症例 (I, II 期) において手術後の転移再発の抑制の可能性も期待されている。

BCG-CWS を用いる癌免疫療法の副作用として皮内局所投与の潰瘍形成、胸腔内、腫瘍内投与の際発熱などがみられたが、BCG 生菌投与の際認められたアナフィラ

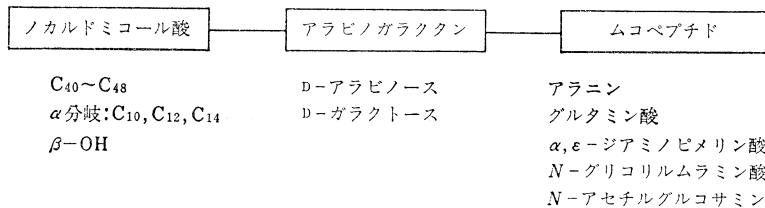


図3 *Nocardia rubra* 細胞壁骨格の基本構造

キナー，肝障害などの重篤な副作用は認められなかつた。

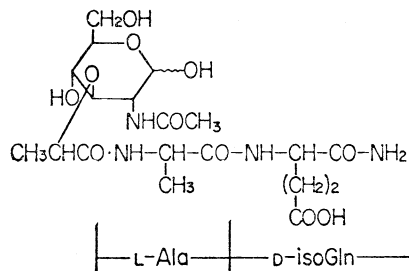
6. *Nocardia rubra* の細胞壁骨格

私共は BCG-CWS のアジュバント活性および抗腫瘍活性に関する研究から他の関連細菌細胞壁についても検討し，特に *Nocardia rubra* の細胞壁骨格部分のアジュバント活性に注目し，その検討を行なつた。

BCG の類縁菌である *Nocardia rubra* の細胞壁骨格 (*N. rubra*-CWS) は BCG-CWS と同様の基本構造を有し，ノカルドミコール酸，アラビノガラクトン，ムコペプチドから構成される (図3)。 *N. rubra*-CWS のアジュバント活性も BCG-CWS のそれと質的に極めて類似し，キラーT細胞，ヘルパーT細胞，マクロファージなどに強いアジュバント活性を示す。またT，B細胞にマイトジェンとして作用し，T細胞に作用する際少量のマクロファージを要求する<sup>13)</sup>。

鉱物油処理 *N. rubra*-CWS はマウス同系可移植腫瘍系，実験的発癌抑制，ヒト癌の免疫療法に強い抗腫瘍活性を示した<sup>39)~42)</sup>。 *N. rubra*-CWS 自家癌腫瘍片の再移植に対しても強い suppression 活性を示す。マウス自家癌に鉱物油処理 *N. rubra*-CWS を腫瘍内投与することにより担癌動物の延命が認められた<sup>43)</sup>。 strain 2 モルモットに移植した line 10 肝癌に鉱物油処理 *N. rubra*-CWS を繰り返し腫瘍内投与すると，腫瘍の退縮と特異的腫瘍免疫の誘導が確かめられた。

鉱物油処理 *N. rubra*-CWS の発癌予防効果についてもマウス，ラット，ウサギなどで検討された。ACI/N ラットに benzo(α)pyrene を投与した場合，対照群において71.4%の肺癌の発生がみられたのに対し，100μgの鉱物油処理 *N. rubra*-CWS を7回皮下投与した群においては48.0%の発癌率に止まり，かつ発癌時期の遷延も認められた<sup>44)</sup>。 Hirao ら<sup>55)</sup>は実験的ウサギ肺癌発生に対する鉱物油処理 *N. rubra*-CWS の効果について検討し，鉱物油処理 BCG-CWS の場合と同様， *N. rubra*-CWS の静脈内投与によつて完全にウサギ肺癌の発生が抑制されることを見出した。 Nagasawa ら<sup>46)47)</sup>は鉱物油処理 *N. rubra*-CWS が高率に乳癌を発症する SHN マウスに投与し，乳腺DNA合成や血清中のプロラクチン値を低下させ，かつ乳癌の発癌率を抑制することを見出した。さら



N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (MDP)

図4 細菌細胞壁のアジュバント活性最小構造単位

に DMBA をラットに投与して発生する乳癌が *N. rubra*-CWS の投与によつて抑制されることも明らかにしている。

私共<sup>48)</sup>は *N. rubra*-CWS に関する製剤学的研究を行ない，鉱物油の代わりにスクワレンまたはスクワランで処理した *N. rubra*-CWS と同等の抗腫瘍活性を見出しており， phase I 臨床治験でその副作用が極めて弱いことが明らかにされ<sup>49)</sup>，現在肺癌，白血病，消化器癌を中心にヒト癌におけるランドマイズドトライアルが試みられつつある。 *N. rubra*-CWS の抗腫瘍活性の免疫学的基盤としてBCG-CWS と同様 *N. rubra*-CWS の有するキラーT細胞およびマクロファージ活性化に対するアジュバント活性が重要な役割を果たしていることが明らかにされている<sup>50)51)</sup>。

7. ムラミルジペプチドおよび関連化合物

さきに述べたようにミコバクテリア，ノカルジア，コリネバクテリアの細胞壁骨格の構造単位のうち，ムコペプチド部分がアジュバント活性発現に最も重要な役割を果たしていることが私共によつて示唆された<sup>2)</sup>。

一般に結核菌細胞壁のムコペプチドの基本構造は図2に示すようにムラミン酸，グルコサミンからなるアミノ二糖とテトラペプチドのサブユニットから構成されている。

1974年 Ellouz ら<sup>52)</sup>は細菌細胞壁のムコペプチドのアジュバント活性最小構造単位が N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン (MDP) (図4) であることを見出した。彼女らは GlcNAc-MurNAc などのアミ

ノ二糖, L-Ala-D-isoGln- $\alpha$ ,  $\epsilon$ -meso Dpm-D-Ala などのムラミン酸を含まないペプチド類や GlcNAc-MurNAc-L-Ala などアジュバント活性を示さないことを報告した。私共<sup>53)</sup>は合成標品を用いて MurNAc-L-Ala-D-isoGln, MurNAc-L-Ala-D-isoGln-L-Lys-D-Ala などのムラミルペプチド, ムラミルテトラペプチドなどがアジュバント活性を示すが, L-Ala-D-isoGln-L-Lys-D-Ala, L-Ala-D-isoGln-L-Lys, MurNAc-L-Ala などのムラミン酸を欠くペプチドやムラミルアミノ酸が, アジュバント活性を欠くことを明らかにした。さらに私共は MDP がモルモットにおいて ABA-N-アセチル-チロシン, 細菌  $\alpha$ -アミラーゼ (BaA) に対する遅延型アレルギーの発現や BaA, DNP-Lys-Ficoll, ヒツジ赤血球に対する血中抗体産生に対してもアジュバント活性を示すこと, またヘルパー T 細胞に対しても活性を有することを明らかにした。

MDP の化学構造とアジュバント活性の相関について私共を中心に多くの研究がなされた。

1) ムラミン酸残基

MDP のアジュバント活性発現にムラミン酸残基が必須であり, ジペプチド (またはテトラペプチド) のみではアジュバント活性を有しないことが明らかにされた。私共<sup>53)</sup>は MDP が pH 11.0 以上のアルカリ性でラクチルペプチドに分解することから MDP および MurNAc-L-Ala-D-isoGln-L-Lys-D-Ala のアルカリ分解生成物と考えられる lactyl-L-Ala-D-isoGln, lactyl-L-Ala-D-isoGln-L-Lys-D-isoGln のアジュバント活性についても検討したがいずれも陰性であった。Adam ら<sup>54)</sup>は MDP を  $\text{NaBH}_4$  で還元して得られるムラミントールジペプチドや norMurNAc-L-Ala-D-isoGln がアジュバント活性を示さないことを明らかにした。

私共は長谷川ら (岐阜大農) との協同研究により種々の糖構造を有する糖ペプチドのモルモットにおける ABA-チロシンに対する遅延型アレルギー発現へのアジュバント活性について検討し, MDP における糖構造とアジュバント活性の相関関係に次の結論を得た。

A) 糖骨格<sup>55)56)</sup>

a) 糖部分は cyclitol では代用できず, 環状糖残基が必要であり, かつ pentose では代用できず hexose であることが必要。

b) lactyl dipeptide の結合位置は C-3 位の水酸基に限られる。lactyl 基は D 型であることが必須。

c) 糖の configuration は天然に多量に存在する D-gluco-form (ムラミン酸), D-manno-form, D-galacto-form であればよい。

B) 糖部分の化学修飾

a) C-2 位の deamino 化, または C-4, C-6 位のいずれかを deoxy 化すると活性は消失する。

表 3 ムラミルペプチド同族体のモルモットにおける遅延型アレルギー発現に対するアジュバント活性

実験群	アミノ酸残基 X <sup>a</sup>	投与量 ( $\mu\text{g}$ )	皮内反応	
			24時間	48時間
			mm	mm
Exp. I				
1	L-Alanine (MDP)	100	21.3	18.0
2	D-Alanine	100	0	0
3	$\beta$ -Alanine	100	0	0
4	Sarcosine	100	0	0
5	$\alpha$ -Aminoisobutyric acid	100	22.9	20.9
Exp. II				
6	L-Alanine (MDP)	100	21.3	18.6
7	Glycine	100	(11.0)	(5.6)
8	L-Proline	100	13.1	11.6
9	L-Serine	100	23.1	21.6
10	L-Threonine	100	22.4	21.7
11	L-Valine	100	25.2	24.6
12	L-Methionine	100	24.5	20.9
13	L-Glutamic acid	100	20.9	17.5
14	L-Glutamine	100	21.5	20.4
15	L-Lysine	100	14.7	(9.3)
16	L-Arginine	100	20.6	15.9
17	L-Histidine	100	(9.9)	0
18	L-Phenylalanine	100	21.6	20.3
19	L-Tyrosine	100	24.4	20.9
20	L-Tryptophan	100	22.4	19.1
Exp. III				
21	L-Valine	100	21.1	19.8
22	L-Leucine	100	22.4	19.6
23	L-Isoleucine	100	21.3	19.1
24	L-Cyclohexylglycine	100	19.9	15.9
対照群 1 (FIA 中 ABA-チロシン)			0	0
対照群 2 (FIA のみ)			0	0

a : MurNAc-X-D-isoGln

実験法は表 6 参照, ( ) は微弱な発赤を示す。

b) C-1 位は benzylglycoside でもよく,  $\alpha$  または  $\beta$ -anomer でもよい。

c) C-2 位の amino 基に結合している acetyl 基を他の置換基 (stearoyl, methyl) に変換しても活性は認められる。また遊離の amino 基であつてもよく, 水酸基に変換しても活性は認められる。

d) C-6 位の水酸基は amino 基または acylamino 基に変換しても活性は認められる (表 6)。

e) C-6 位を amino 基または acylamino 基としたまま C-2 位の acetamido 基を stearoylamino 基にすると活性は消失する。

2) L-アラニン残基

MDP の L-Ala 残基を L-Ser などの他のアミノ酸残

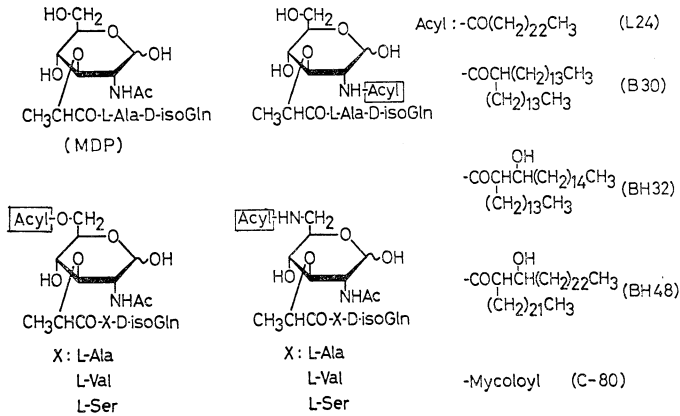


図5 MDP同族体のアシル誘導体

基に置換しても活性を示すことがすでに Adam ら<sup>54)</sup>, Kotani ら<sup>57)</sup>によつて明らかにされたが、私共<sup>58)59)</sup>は L-Ala 残基を他のアミノ酸残基に置換した MDP 同族体22種を化学合成し、そのアジュバント活性をモルモットにおける遅延型アレルギーの実験系を用いて検討した。表3に示すように  $\alpha$ -Aib, L-Ser, L-Val, L-Met, L-Glu, L-Gln などのアミノ酸残基で置換した MDP 同族体は MDP と同等以上のアジュバント活性を示した。一方 Gly, L-His, L-Arg, L-Lys などで置換した MDP 同族体は極めて弱いアジュバント活性を示したにすぎなかつた。一方  $\beta$ -Ala, Sar, D-Ala, D-Val などで置換された MDP 同族体はアジュバント活性を示さない。MurNAc-L-Ala-D-isoGln は MDP と同時に投与すると MDP のアジュバント活性を抑制することも見出されている。以上の結果より私共は、D-アミノ酸残基で置換した MDP は活性を有しない。塩基性アミノ酸残基置換の MDP のアジュバント活性は極めて弱い。また一般に分岐のあるアミノ酸残基 (L-Ser, L-Val, L-Ala など) で置換した MDP 同族体が強いアジュバント活性を有するものと結論した(表3)。

### 3) D-グルタミン酸残基<sup>59)</sup>

MDP の D-isoGln 残基をアミノ酸残基 (D-isoAsn, D-Nle-NH<sub>2</sub>, D-Ala, L-Gln,  $\alpha$ -Abn など) で置換した MDP 同族体にはアジュバント活性は認められなかつた。私共<sup>59)</sup>は MDP の D-Gln 残基における  $\alpha$ ,  $\gamma$  カルボン酸とアジュバント活性との相関を検討するため、MDP の L-Ala 残基を L-Phe, L-Lys, L-Val で置換した MDP 同族体の D-Gln 残基をメチルエステル、酸アミド化しそのアジュバント活性を検討した。D-isoGln の  $\gamma$ -カルボン酸をメチルエステルとすると明らかにアジュバント活性が減少し、 $\alpha$ ,  $\gamma$  ジカルボン酸をメチルエステル化すると活性はさらに減少する。しかし  $\alpha$ ,  $\gamma$  ジカルボン酸をジアミノ化した化合物においてアジュバン

ト活性の著明な低下は認められなかつた。さきに述べたように、MurNAc-L-Lys-D-isoGln は極めて弱いアジュバント活性を示すにすぎなかつたが、その D-Gln 残基の  $\alpha$ ,  $\gamma$  カルボン酸をメチルエステルまたは酸アミド化するとそのアジュバント活性は増強される。興味あることに、MurNAc-L-Lys-D-isoGln の L-Lys 残基の遊離アミノ基をアセチル化することによつてもアジュバント活性の増強が認められる。これらの事実から L-Lys および D-isoGln の遊離アミノ基およびカルボン酸基が相互に何らかの分子内反応を示し、アジュバント活性発現を阻害しているものと想像される。

## 8. MDP のアシル誘導体

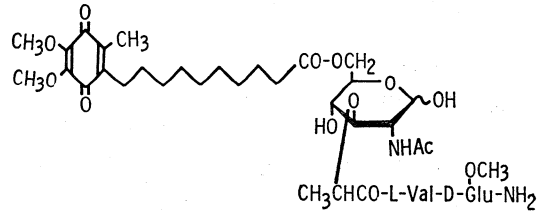
MDP は細菌細胞壁のアジュバント活性発現の最小構造単位として確立されたが、MDP はさきに述べた BCG-CWS, *N. rubra*-CWS や *P. acnes*-CWS, *L. monocytogenes*-CWS などに比してそのアジュバント活性の発現様式が異なり、またいかなる同系移植腫瘍系に対してもそれ単独で抗腫瘍活性を示さない。MDP とこれら CWS との生化学的性状の相違として MDP が分子量 492 の水溶性低分子アジュバントであり、一方 BCG-CWS, *N. rubra*-CWS はミコール酸、アラビノガラクトタン、ムコペプチドから構成される水不溶性高分子である。私共はこれら CWS がアジュバント活性および抗腫瘍活性を発揮するためにはミコール酸がそれ自身アジュバント活性を有しないが、アジュバント活性因子であるムコペプチドに脂溶性を付与し、アジュバント作製の際の物理的要因として大きな役割を果たしているものと推察した。Parant ら<sup>60)</sup>は C-MDP を用いて MDP の生体内運命を検討し MDP 水溶液を静脈内または皮下投与すると30分で約50%、2時間で90%以上の MDP がそのままの形で尿中に排泄されること、MDP を w/o エマルジョンの形で投与すると注射局所により長期にわたり貯留すること



を明らかにした。以上の成績はMDPのアジュバント投与の際の物理的要因が極めて重要であることを示唆している。

MDPのアシル誘導体として種々の6-O-アシルMDP誘導体が合成され、その生物活性が検討された。私共<sup>61)-65)</sup>はこれらアシル基に比して極めて大きい分子量を有するミコール酸を用いてMDPおよびMurNAc-Gly-D-isoGln, MurNAc-L-Ser-D-isoGln, MurNAc-L-Val-D-isoGlnのミコイルムラミルジペプチド(図5)を合成し、その免疫学的性状を検討した。6-O-ミコイル-MDPは水不溶、クロロホルムなどの有機溶媒に可溶であり、表6に示す免疫学的性状を示した。特徴的なことはMDPにおいて認められなかつた同種細胞障害試験におけるアジュバント活性とマウス同系移植系において抗腫瘍活性が認められることである。これに対し血中抗体産生(*in vitro*におけるPFC産生)に対するアジ

ュバント活性は、合成に使用したミコール酸の分子量に比例して減弱した。これらのミコイルムラミルジペプチド類のモルモットにおける遅延型アレルギーの発現に対するアジュバント活性はMDP, MurNAc-L-Ser-D-isoGln, MurNAc-L-Val-D-isoGlnの6-O-ミコイル誘導体において認められたが、MurNAc-Gly-D-isoGlnのおよびその6-O-ミコイル誘導体においてはほとんど



quinonyl-MDP-66

図6 キノニル-MDP-66の構造

表4 MurNAc-L-Val-D-isoGlnのメチルエステルおよびキノニル酸(QS<sub>10</sub>)エステルのアジュバント活性と抗腫瘍活性

アジュバント	投与量の単位	アジュバント活性		抗腫瘍活性 <sup>c)</sup>
		遅延型アレルギー <sup>a)</sup>	細胞傷害活性 <sup>b)</sup>	
MurNAc-L-Val-D-Glu-NH <sub>2</sub> OH	100	23.6 mm		0/10
MurNAc-L-Val-D-Glu-NH <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub>	100	24.1		0/10
QS <sub>10</sub> -MurNAc-L-Val-D-Glu-NH <sub>2</sub> OH	100	21.9	24.9%	0/10
QS <sub>10</sub> -MurNAc-L-Val-D-Glu-NH <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub> (キノニル-MDP-66, 図6b参照)	100	24.4	84.0	8/10
対照	100	0	26.9	0/10

a) 表6参照, データは24時間後の皮内反応値。

b) C<sub>57</sub>BL/6J マウスにマストサイトーマ P815-X2 細胞 (10<sup>5</sup>) をアジュバントとともに免疫し, 11日目に免疫脾細胞の細胞傷害活性を Brunner 法で測定。

c) Meth A (10<sup>5</sup>) をアジュバントとともに BAL B/C マウスの皮内に投与した。分子は4週後の移植局所の腫瘍の suppression を認めたマウス数, 分母は使用したマウス数を表す。

表5 6-O-BH48-MDPとキノニルMDP誘導体のline10肝癌に対する抗腫瘍活性

アジュバント	投与量	腫瘍退縮数
QS-10-MurNAc-L-Val-D-Glu-NH <sub>2</sub> (Quinonyl-MDP-66) OCH <sub>3</sub>	400 μg × 4 (2, 5, 8, 15日目投与)	7/7
	100 μg × 4 (3, 5, 8, 15日目投与)	7/7
6-O-BH48-MurNAc-L-Ser-D-isoGln	400 μg × 2 (2, 5日目投与)	4/7
	400 μg × 2 (2, 5日目投与)	3/6
対照群	10%スクワレン × 4 × 2	1/7 0/10

line 10 肝癌 (10<sup>5</sup>) を strain 2 モルモットの皮内に移植し, 10%スクワレンで処理したアジュバントを腫瘍移植局所に2回ないし4回投与, 60日目に腫瘍退縮モルモット数を示す。

表 6 BCG-CWS, MurNAc-L-Ala-D-isoGln (MDP) および MDP 誘導体の免疫活性

生物活性	アジュバント の投与形態	BCG-CWS	MurNAc- L-Ala-D- isoGln (MDP)	6-O- mycoloyl- MDP	Quinonyl- MDP-66
A. アジュバント活性					
1. 遅延型アレルギー (モルモット) ABA-N-アセチルチロシン	w/o	+	+	+	+
2. 同種細胞障害試験 (マウス) <i>in vivo</i>	o/w または PBS	+	-	+	+
<i>in vitro</i>	PBS	+	+	+	
3. 血中抗体産生 (マウス) ヒツジ赤血球 ( <i>in vitro</i> )	PBS	+	±	-	+
細菌 $\alpha$ -アミラーゼ ( <i>in vivo</i> )	w/o	+	+		
DNP-Lys-Ficoll ( <i>in vivo</i> )	PBS	+	+	-	
4. ヘルパー T 細胞 (モルモット)	w/o	+	+	±	
5. マクロファージ (マウス) <i>in vivo</i>	o/w	+			+
B. マイトジェン活性 ( <i>in vitro</i> ) C57BL/6J マウス	PBS	+	±	-	
C. 抗腫瘍活性					
マウス移植腫瘍系	o/w	+	-	+	+
モルモット移植腫瘍系	o/w	+	-	+	+

w/o : 油中水エマルジョン, o/w : 水中油エマルジョン, PBS : PBS 溶液またはサスベンジョン N. rubra-CWS も BCG-CWS と同様活性を示す。

どみられなかつた。特に 6-O-ノカルドミコロイル-MurNAc-L-Ser-D-isoGln が同種細胞障害活性および抗腫瘍活性において強い活性を示した。さらに私共<sup>66)</sup>は MDP の合成脂肪酸エステルについてもそのアジュバント活性と抗腫瘍活性を検討したが、ノカルドミコール酸に最も構造の類似する  $\alpha$ -分岐オキシン酸 (BH48) を MDP にエステル結合させた BH48-MDP が最も著明な抗腫瘍活性を示した。

これら N-アセチルムラミルジペプチドのうち、MDP はウサギに対し明らかな発熱原性を示すが、MurNAc-L-Ser-D-isoGln の発熱原性は極めて弱く、MurNAc-Gly-D-isoGln はほとんど発熱原性を示さなかつた。MDP および MurNAc-L-Ser-D-isoGln の発熱原性は 6-O-ミコロイル化 (特に *Mycobacterium* から精製したミコール酸を用いる) によつて完全に消失する。

さらに私共は MDP 同族体のムラミン酸の 2 位のアミノ基に種々の脂肪酸を酸アミド結合させた誘導体を、また MDP の 6 位の水酸基をアミノ基に置換し、さらに種々の脂肪酸を酸アミド結合させた誘導体 (図 5) を合成し、そのアジュバント活性と抗腫瘍活性を検討した。これら種々の MDP 同族体のアシルアミノ誘導体のうち 2N-BH48-, 6N-BH48-MDP 誘導体が 6-O-BH48-MDP と同程度の抗腫瘍活性を示した。

以上に述べた種々の MDP 同族体の 6-O-アシル, 6-N-アシル, 2-N-アシル誘導体のうち 6-O-BH48-Mur-

NAc-L-Ser-D-isoGln が line 10 肝癌-strain 2 モルモットの同系移植腫瘍系で強い regression 活性を有することが見出された (表 5)。

私共<sup>67)68)</sup>はさきにユビキノン,  $\alpha$ -トコフェロール, ビタミン K などの脂溶性ビタミンおよびこれらの代謝産物など関連化合物が強いアジュバント活性を有することを見出した。特にユビキノンの関連化合物である QS-10 はミトコンドリアにおける電子伝達系や、リソソーム膜に対する作用などユビキノンの作用も保持しているとともに、適度の脂溶性と合成上有利な官能基であるカルボン酸を有していることに着目し、MDP の QS-10 誘導体を合成した<sup>69-71)</sup>。しかし、QS-10-MDP は抗腫瘍活性を示さなかつたので、さらに QS-10-MDP の D-iso-Gln の  $\gamma$ -カルボン酸をメチルエステルとした誘導体を合成した。特に種々の MDP 誘導体のうちでもモルモットに対し最も強いアジュバント活性を示す MDP の L-Val 同族体 (MurNAc-L-Val-D-isoGln) の QS-10 誘導体 (キノニル-MDP-66, 図 6) が同種細胞傷害活性に対し最も強いアジュバント活性と抗腫瘍活性を示した (表 4)。キノニル-MDP-66 は Meth A-BALB/c マウス系のみならず、line 10 肝癌-strain 2 モルモットの同系移植腫瘍系においても極めて強い抗腫瘍活性を示した (表 5)。キノニル-MDP-66 はマウスやモルモットにおける血中抗体産生、遅延型アレルギー誘導に対するアジュバント活性を有するとともにミトコンドリアにおける

電子伝達系に対する作用などユビキノン作用を保持しており、ユビキノンと同様アドリマイシンの心毒性に対する中和作用も有していることが見出された。

以上述べた BCG-CWS をはじめとする種々の免疫アジュバントの免疫活性を表6に示した。BCG-CWS (および *Nocardia rubra*-CWS) は検討した免疫反応系の多くに活性を示すのに対し、MDP, アシル-MDP はそれぞれ特異性を有することは興味深い。

### おわりに

本講演において結核菌の多様な生物活性のうち、細胞壁骨格のアジュバント活性を中心に述べた。私は昭和35年当時九州大学医学部医化学の教授であつた山村雄一先生の許で結核菌菌体成分の生化学的、免疫学的性状を明らかにする目的でこの研究をはじめたのであるが、はからずも細胞壁骨格のアジュバント活性とその癌免疫療法への応用へと発展し、さらに合成免疫アジュバントを用いる免疫制御という新しい研究領域が開拓されつつある。

このように結核菌の生物活性の一つであるアジュバント活性をとりあげてみても、多面的な研究への発展の可能性を秘めており、今更ながら結核菌の研究素材としての奥行きが感じさせられる。

最後に本総会において私共の研究を発表する機会を与えられた今野会長に深く感謝する。本研究は昭和35年以来今日まで、21年間にわたり山村雄一先生(現大阪大学長)の御指導の許に行なわれたものであり、その間、九大医学部医化学、阪大医学部第三内科、阪大理学部芝研究室、岐阜大農学部長谷川研究室、北大免疫科学研究所、国立がんセンター、九州がんセンター、バリ大学理学部生化学教室、アメリカ国立感染アレルギー研究所ロッキー山研究所における多くの共同研究者の多大な御協力を得た。心からの謝意を表する。

### 文 献

- 1) Freund, J.: The mode of action of immunologic adjuvants, *Adv Tuberc Res*, 7:130, 1956.
- 2) Azuma, I. et al.: Adjuvanticity of mycobacterial cell walls, *Jpn J Microbiol*, 15:237, 1971.
- 3) Azuma, I. et al.: Biologically active components from mycobacterial cell walls. I. Isolation and composition of cell wall skeleton and component P<sub>3</sub>, *J Natl Cancer Inst*, 52:95, 1974.
- 4) Azuma, I. et al.: Occurrence of N-glycolymuramic acid in bacterial cell walls. A preliminary survey, *Biochim Biophys Acta*, 208:444, 1970.
- 5) Wietzerbin-Falszpan, J. et al.: Isolation and mass spectrometric identification of the peptide subunits of mycobacterial cell walls, *Biochem Biophys Res Commun*, 40:57, 1970.
- 6) Wietzerbin-Falszpan, J. et al.: Occurrence of D-alanyl-(D)-*meso*-diaminopimelic acid and *meso*-diaminopimelyl-*meso*-diaminopimelic acid interpeptide linkages in the peptidoglycan of *Mycobacteria*, *Biochemistry*, 13:3471, 1974.
- 7) Azuma, I. et al.: Adjuvant activity of mycobacterial fractions. I. Purification and *in vivo* adjuvant activity of cell wall skeletons of *Mycobacterium bovis* BCG, *Nocardia asteroides* 131 and *Corynebacterium diphtheriae* PW8, *Biken J*, 18:1, 1975.
- 8) Taniyama, T. et al.: Adjuvant activity of mycobacterial fractions. II. *In vitro* adjuvant activity of cell walls of mycobacteria, nocardia and corynebacteria, *Jpn J Microbiol*, 18:415, 1974.
- 9) Taniyama, T. et al.: Adjuvant activity of mycobacterial fractions. III. Adjuvant effect of cell wall of *Mycobacterium bovis* BCG on cell-mediated cytotoxicity in mice, *Jpn J Microbiol*, 19:255, 1975.
- 10) Koyama, S. et al.: Effect of *Bacillus Calmette-Guérin* cell wall skeleton on the induction of the cytotoxic and suppressor T cells against syngeneic tumor in the mouse, *Int J Cancer*, 27:829, 1981.
- 11) Ohno, R. et al.: Immune response of regional lymph node to BCG cell-wall skeleton and other immunopotentiators, *GANN Monogr Cancer Res*, 21:109, 1978.
- 12) Azuma, I. et al.: Mitogenic activity of the cell walls of mycobacteria, nocardia, corynebacteria, and anaerobic corynegorms, *Jpn J Microbiol*, 20:263, 1976.
- 13) Sugimura, K. et al.: Macrophage dependency of T-lymphocyte mitogenesis by *Nocardia rubra* cell-wall skeleton, *Microbiol Immunol*, 21:525, 1977.
- 14) Azuma, I. et al.: Antitumor activity of cell wall skeletons and peptidoglycolipids of mycobacteria and related microorganisms in mice and rabbits, *Gann*, 65:493, 1974.
- 15) Meyer, T. J. et al.: Biologically active components from mycobacterial cell walls, *J Natl Cancer Inst*, 52:103, 1974.
- 16) Ogura, T. et al.: Effect of BCG cell-wall skeleton on metastasis of syngeneic tumor in rats with special reference to lymphocyte trapping, *Gann*, 69:311, 1978.
- 17) Ogura, T. et al.: Antitumor activity with cell wall skeleton of BCG in rat syngeneic tumor, *Cell Molecul Biol*, 25:7, 1979.
- 18) Yoshimoto, T. et al.: Experimental immunotherapy of neoplastic pleural effusion with oil-attached BCG cell-wall skeleton in mice, *Gann*, 67:737, 1976.
- 19) Tokuzen, R. et al.: Effect of *Nocardia* and *Mycobacterium* cell-wall skeletons on autochthonous tumor grafts, *Gann*, 66:433, 1975.
- 20) Kitagawa, M. et al.: Host Defense against Cancer and Its Potentiation, D. Mizuno, *et al.*, Tokyo, p. 31, 1975.
- 21) Taniyama, T. et al.: Effect of cell-wall skeleton of *Mycobacterium bovis* BCG on cell-mediated cytotoxicity in tumor-bearing mice, *Gann*, 66:705, 1975.

- 22) Yoshimoto, T. et al.: Effect of oil-attached BCG cell-wall skeleton on the induction of pleural fibrosarcoma in mice, *Gann*, 67:441, 1976.
- 23) Ikegami, R. et al.: Prophylactic effect of BCG cell-wall skeleton on the tumor induction by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene in mice: Strain difference, *Gann*, 70:101, 1979.
- 24) 桑村澄夫: 3'-methyl-4-dimethylaminobenzene による肺癌の誘発と宿主の細胞性免疫能の關係に関する研究, *阪市医誌*, 26:145, 1979.
- 25) Hirao, F. et al.: Effect of oil-attached BCG cell-wall skeleton and thymectomy on the incidence of lung cancer and amyloidosis induced by chemical carcinogenesis in rabbits, *Gann*, 69:453, 1978.
- 26) Yamamura, Y. et al.: Immunotherapy of human malignant melanoma with oil-attached BCG cell-wall skeleton, *Gann*, 66:355, 1975.
- 27) Yamamura, Y.: Immunotherapy of Cancer: Present Status of Trials in Human Cancer, W. D. Terry and D. B. Windhost, New York, p. 173, 1978.
- 28) Yamamura, Y. et al.: Adjuvant immunotherapy of lung cancer with BCG cell-wall skeleton (BCG-CWS), *Cancer*, 43:1314, 1979.
- 29) Yasumoto, K. et al.: Immunotherapy of human lung cancer with BCG cell-wall skeleton, *Gann*, 67:787, 1976.
- 30) Yasumoto, K. et al.: Nonspecific adjuvant immunotherapy of lung cancer with cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guérin*, *Cancer Res*, 39:3262, 1979.
- 31) Ogura, T. et al.: Immunotherapy with BCG cell-wall skeleton in patients with neoplastic pleurisy, *GANN Monogr Cancer Res*, 21:143, 1978.
- 32) Sawamura, K. et al.: Immunobiology and Immunotherapy of Cancer, W. D. Terry and Y. Yamamura, New York, p. 409, 1979.
- 33) Hayata, Y. et al.: Immunotherapy for lung cancer cases using BCG and BCG cell-wall skeleton: Primarily intratumoral injection, *GANN Monogr Cancer Res*, 21:151, 1978.
- 34) Kishimoto, S. et al.: Immunotherapy with BCG or its derivatives in acute myelogenous leukemia, *GANN Monogr Cancer Res*, 21:189, 1978.
- 35) Yamada, K. et al.: Chemioimmunotherapy of acute myelogenous leukemia in adults with BCG cell-wall skeleton, *GANN Monogr Cancer Res*, 21:199, 1978.
- 36) Nakamura, H. et al.: Successful immunotherapy with BCG cell-wall skeleton of acute leukemia at an early stage of relapse, *GANN Monogr Cancer Res*, 21:217, 1978.
- 37) Orita, K. et al.: Immunotherapy with BCG and BCG cell-wall skeleton against advanced gastric cancer and colo-rectal cancer, *GANN Monogr Cancer Res*, 21:163, 1978.
- 38) Yasumoto, K. et al.: Immunotherapy of lung cancer and carcinomatous pleuritis, *GANN Monogr Cancer Res*, 21:129, 1978.
- 39) Azuma, I. et al.: Antitumor activity of *Nocardia* cell wall skeleton preparations in transplantable tumors in syngeneic mice and patients with malignant pleurisy, *Cancer Immunol Immunother*, 4:95, 1978.
- 40) Ogura, T. et al.: Association of macrophage activation with antitumor effect on rat syngeneic fibrosarcoma by *Nocardia rubra* cell wall skeleton, *Cancer Res*, 39:4706, 1979.
- 41) Yamamura, Y. et al.: Immunobiology and Immunotherapy of Cancer, W. D. Terry and Y. Yamamura, New York, p. 279, 1979.
- 42) Yamamura, Y. et al.: Agents for Augmentation of Cancer Immunology, E. M. Hersh, et al., New York, p. 71, 1981.
- 43) Tokuzen, R. et al.: Suppression of autochthonous tumors by mixed implantation with *Nocardia rubra* cell-wall skeleton and related bacterial fractions, *Gann*, 69:19, 1978.
- 44) Namba, M. et al.: Effect of *Nocardia rubra* cell-wall skeleton on the induction of lung cancer in ACI/N rats, *Gann*, 70:55, 1979.
- 45) Hirao, F. et al.: Effect of *Nocardia rubra* cell-wall skeleton on the induction of lung cancer and amyloidosis by 3-methyl-cholanthrene in rabbits, *Gann*, 71:398, 1980.
- 46) Nagasawa, H. et al.: Suppression by *Nocardia rubra* cell wall skeleton of mammary DNA synthesis, plasma prolactin level, and spontaneous mammary tumorigenesis in mice, *Cancer Res*, 38:2160, 1978.
- 47) Nagasawa, H. et al.: Inhibitory effect of *Nocardia rubra* cell-wall skeleton on carcinogen-induced mammary tumorigenesis in rats, *Eur J Cancer*, 16:398, 1980.
- 48) Yamawaki, M. et al.: Antitumor activity of squalene-treated cell-wall skeleton of *Nocardia rubra* in mice, *Gann*, 69:619, 1978.
- 49) Yamamura, Y. et al.: Phase I study with cell wall skeleton of *Nocardia rubra* (N-CWS), *Cancer Treat Res*, (in press).
- 50) Masuno, T. et al.: Activation of peritoneal macrophages by oil-attached cell-wall skeleton of BCG and *Nocardia rubra*, *Gann*, 70:223, 1979.
- 51) Ito, M. et al.: Killing of tumor cells *in vitro* by macrophages from mice injected with squalene-treated cell-wall skeleton of *Nocardia rubra*, *Cancer Res*, 41:2925, 1981.
- 52) Ellouz, F. et al.: Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan subunits, *Biochem Biophys Res Commun*, 59:1317, 1974.
- 53) Azuma, I. et al.: Adjuvant activity of mycobacterial fractions. Immunological properties of synthetic N-acetylmuramyl-dipeptides and related compounds, *Infect Immun*, 14:18, 1976.
- 54) Adam, A. et al.: Correlation of structure and adjuvant activity of N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (MDP), its derivatives and analogues. Anti-adjuvant and competition properties of stereoisomers, *Biochem Biophys Res Commun*, 72:339, 1976.
- 55) Azuma, I. et al.: Adjuvant activity of carbohydrate

- analogs of N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine on the induction of delayed hypersensitivity to azobenzenearsonate-N-acetyl-L-tyrosine in guinea pigs, *Infect Immun*, 33 : 834, 1981.
- 56) Azuma, I. et al.: Adjuvant activity of 6-amino-6-deoxy-muramyl dipeptides and their acylamino derivatives on the induction of delayed hypersensitivity to azobenzenearsonate-N-acetyl-L-tyrosine in guinea pigs, *Infect Immun*, 32:1305, 1981.
- 57) Kotani, S. et al.: The effect of replacement of L-alanine residue by glycine, L-serine or D-alanine in an N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine on immunoadjuvancies of molecules, *Biken J*, 20:39, 1977.
- 58) Azuma, I. et al.: Adjuvant activity of N-acetylmuramyl dipeptides for the induction of delayed-type hypersensitivity to azobenzenearsonate-N-acetyl-L-tyrosine in guinea pigs, *Infect Immun*, 29:1193, 1980.
- 59) Kamisango, K. et al.: New analogues of N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine with immunoadjuvant activity, *Bull Chem Pharm*, 29:1644, 1981.
- 60) Parant, M. et al.: Fate of the synthetic immunoadjuvant, muramyl dipeptide (<sup>14</sup>C-labelled) in the mouse, *Int J Immunopharmac*, 1:35, 1979.
- 61) Shiba, T. et al.: Synthesis of 6-O-mycoloyl-N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine with antitumor activity, *Bull Chem Soc Jpn*, 51:3307, 1978.
- 62) Yamamura, Y. et al.: Immunological and antitumor activities of synthetic 6-O-mycoloyl-N-acetylmuramyl-dipeptides, *Proc Japan Acad*, 53:63, 1977.
- 63) Azuma, I. et al.: Adjuvant activity of synthetic 6-O-“mycoloyl”-N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine and related compounds, *Infect Immun*, 20:600, 1978.
- 64) Uemiyama, M. et al.: Adjuvant activity of mycoloyl derivatives of N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine in mice and guinea pigs, *Microbiol Immunol*, 23:831, 1979.
- 65) Azuma, I. et al.: Immunobiology and Immunotherapy of Cancer, W. D. Terry and Y. Yamamura, New York, p. 211, 1979.
- 66) Kusumoto, S. et al.: Synthesis of long chain fatty acid esters of N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine in relation to antitumor activity, *Tetrahed Letts*: 4899, 1978.
- 67) Sugimura, K. et al.: Biomedical and Clinical Aspects of Coenzyme Q, K. Folkers and Y. Yamamura, New York, p. 151, 1977.
- 68) Azuma, I. et al.: The effect of uviquinone-7 and its metabolites on immune response. IV. Chemical structure-adjuvant activity relationship of quinonyl derivatives on humoral immune response, *Intern J Vit Nutr Res*, 48:255, 1978.
- 69) Kobayashi, S. et al.: Synthesis of lipophilic muramyl-dipeptide derivatives and *via*-O-aminoacyl intermediates, *Bull Chem Soc Jpn*, 53:2917, 1980.
- 70) Azuma, I. et al.: Adjuvant and antitumor activities of quinonyl-N-acetylmuramyl dipeptides, *Gann*, 70:847, 1979.
- 71) Saiki, I. et al.: Adjuvant activity of quinonyl-N-acetylmuramyl dipeptides in mice and guinea pigs, *Infect Immun*, 31:114, 1981.