

総 説

細菌細胞壁成分による炎症  
類上皮細胞肉芽腫を中心に (後編)

田 中 渥

島根医科大学生化学

受付 昭和 57 年 7 月 7 日

EPITHELIOID GRANULOMA FORMATION BY A BACTERIAL  
CELL WALL CONSTITUENT (PART 2)

Atsushi TANAKA\*

(English summary was already published in the part 1 of this report)

**第 3 章 MDP によるマクロファージの活性化**

一般に類上皮細胞肉芽腫形成に遅延型アレルギーは大きな役割を演じている。類上皮細胞肉芽腫からはリンフォカインが検出されており、おそらく、リンフォカインは類上皮細胞肉芽腫形成に大きな役割を果たしていると考えられる。ところが、上記のように、リンフォカインが発生しないと思われる条件で、典型的な類上皮細胞肉芽腫が MDP により形成された。このことは、MDP そのものがリンフォカインのような役割を演じていることを示唆した。

リンフォカインはマクロファージを活性化することが知られている<sup>51)</sup>。MDP が同様にマクロファージを活性化するかどうかが調べたところ、以下のように、確かに活性化することがわかった。*in vitro* の実験では、すべてハートレイ・モルモットに 20 ml の鉱物油を腹腔注射し、4 日後に洗い出した腹腔浸出細胞、あるいはそれからプラスチック表面に付着させて調製したマクロファージを用いた。

MDP はマウスの網内系マクロファージの貪食能を増強した(図17)<sup>52)</sup>。種々の MDP 誘導体を用いて調べたところ、アジュバント活性構造を有する誘導体のみがマクロファージを活性化した<sup>53)</sup>。

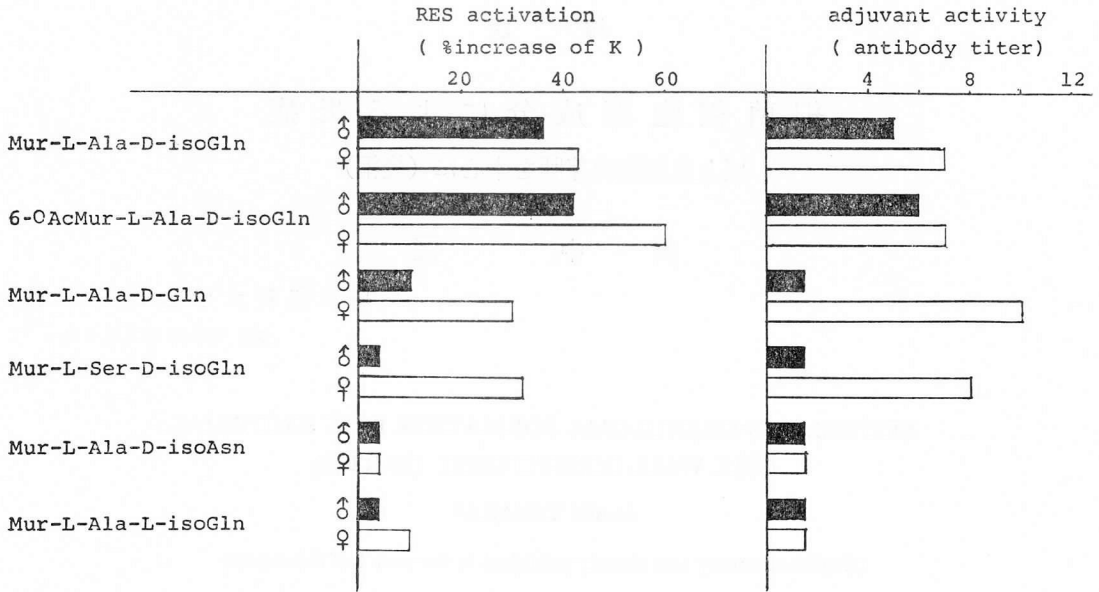
次に、MDP のマクロファージ活性化は、リンパ球を

介したものでどうかを調べるため、いくつかの *in vitro* の系を用いた。まず、MDP はリンフォカイン中の MIF (macrophage migration inhibition factor) と同様に、正常モルモットの腹腔浸出マクロファージの遊走を効果的に阻止することがわかった<sup>54)</sup>(図18)。この場合もアジュバント活性構造を有する MDP 誘導体のみが遊走を阻止した<sup>55)</sup>(図19)。マクロファージ遊走の阻止はマクロファージ活性化のあらわれと考えられているので、この結果はマウス網内系貪食試験と同じ結果である。この MDP による遊走阻止は、マクロファージ中からリンパ球を 0.1% 以下になるように除去しても、また、抗リンパ球抗血清を用いても全く影響を受けなかつた。このように、MDP によるマクロファージの活性化に、リンパ球は関与していないことが強く示唆された。

このことは更に次のマクロファージ付着 (attachment)、伸展 (spreading) 試験でも確かめられた。マクロファージはガラス表面やプラスチック表面に付着しやすいが、Mackness はマクロファージが活性化されると、その付着と伸展が更に強められることを報告し、これらがマクロファージ活性化の指標になりうることを示した。この指標を用いて調べたところ、MDP はマクロファージの付着と伸展を増強することがわかった<sup>56)</sup>(図20A)。また、MDP の構造と付着、伸展の増強の間には密接な関係があり、アジュバント活性構造のみがマクロファージを活性化することがわかった<sup>57)</sup>(図20B)。また、リンパ球を

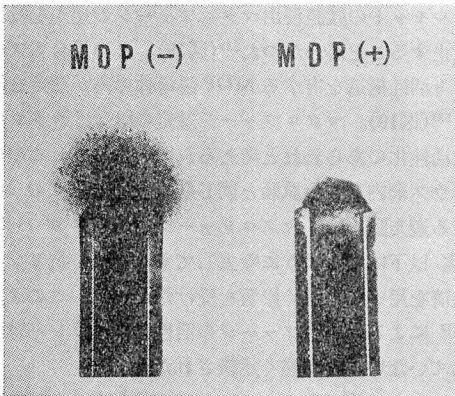
\* From the Department of Biochemistry, Shimane Medical University, 89-1, Shioji-cho, Izumo-shi, Shimane 693, Japan.

CORRELATION BETWEEN ADJUVANT ACTIVITY AND RES ACTIVATION



MDP とその類似体 (100  $\mu$ g/0.2 ml PBS) をマウスの腹腔と尾静脈からほぼ同時に投与し、24時間後に Biozzi らの方法に従って、カーボンクリアランスを行ない細網内皮系の活性化を測定し、%活性で示した。アジュバント活性は卵白アルブミンに対する流血抗体価を測定し図に示している。

図17 MDP とその類似体によるマウス細網内皮系活性化とアジュバント活性との関係



MDP(+): MDP(10  $\mu$ g/ml) 添加  
MDP(-): MDP 非添加

図18 MDP によるマクロファージの遊走阻止試験

注意深く除いても、MDP によるマクロファージの伸長の増強に影響はみられなかつた<sup>9)</sup>。

マクロファージ活性化をはかる生化学的指標として、ペントースリン酸分路を経由するグルコース酸化の上昇とグルコサミンの取り込みの上昇がある。MDP はこの2つの生化学的指標で測つてもマクロファージを活性化し、かつ、その活性化はMDPのアジュバント活性構造に依存していることがわかつた<sup>58)</sup>。マクロファージの活性化という言葉は、本来 Mackness によりはじめて用いられた。彼は、L. monocytogenes に対する殺菌力を有す

Test material	ug/ml	Migration index (%)				
		20	40	60	80	100
Mur-L-Ala-D-isoGln	+ 0.1	●●●				
	1.0	●●●				
	10	●●●				
Mur-L-Ser-D-isoGln	+ 10	●●●				
Mur-L-Ala-D-Glu	+ 10	●●				
AcMur-L-Ala-D-isoGln	+ 10	●●●				
Mur-Gly-D-isoGln	± 10		●			
Mur-L-Ala-L-isoGln	- 10					●●
Mur-L-Ala-D-isoAsn	- 10					●●●
Mur-L-Ala-L-Gln	- 10					●●●
Mur-L-Ala-D-Gln	± 10				●●	
Tetrapeptide	- 10					●●

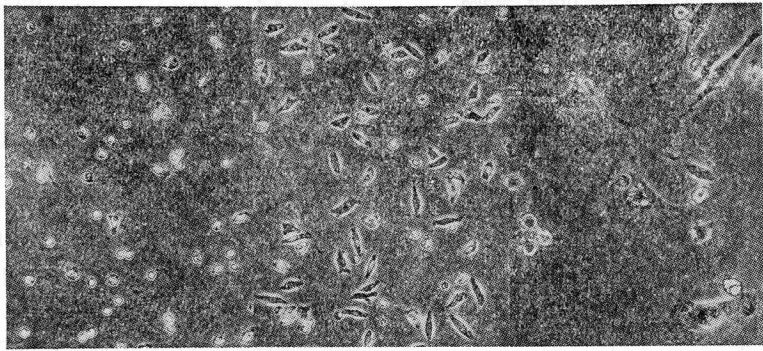
+: Active as adjuvant  
-: Inactive as adjuvant

それぞれ24時間培養し、遊走面積を測定し、図は%遊走値で示す。黒丸は各実験の平均値を示す。

図19 MDP およびその類似体のマクロファージ遊走阻止に及ぼす影響

ようになってきたマクロファージを活性化マクロファージと呼んだ<sup>59)</sup>。最近、マクロファージの活性化という言葉が多く研究者によりあまりにも安易に使われすぎ、少し混乱があることが指摘された<sup>59)</sup>。著者も確かにマクロファージの本来の働きは生体防御であるから殺菌力あるいは抗腫瘍細胞性の増強が最も信頼できる指標と考えた。L. monocytogenes に対する感染防御力の増強は、in vivo におけるマクロファージの殺菌力の増強によること

Macrophage spreading increased by MDP



Control  
x 100

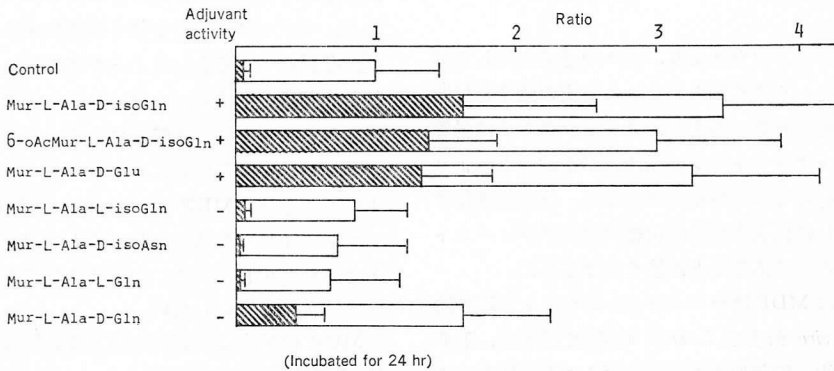
MDP 10 µg/ml  
x 100

MDP 10 µg/ml  
x 400

マクロファージ(1×10<sup>6</sup>個)を培養液に懸濁し、35mmの培養皿で24時間培養し、軽く洗浄した。

図20A MDPによるマクロファージの伸展

EFFECT OF MDP AND ITS ANALOGS ON MACROPHAGE ATTACHMENT AND SPREADING (GUINEA PIG)

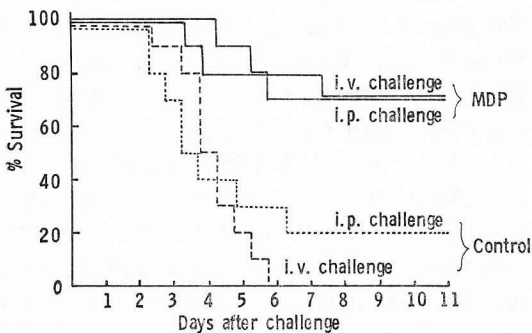


(Incubated for 24 hr)

マクロファージを MDP およびその類似体 (10 µg/ml) 添加後、24時間培養し軽く洗浄した後、器壁附着細胞数と伸展細胞数を測定した。図は、

$\% = \frac{\text{実験群}}{\text{コントロール(非添加群)}}$  以示す。

図20B MDP およびその類似体のマクロファージ伸展と付着能増強に及ぼす影響



MDP 100 µg をエマルジョンの形で腹腔注射後、4日目にリステリアを腹腔(ip)あるいは静脈内(iv)に注射した。

図21 マウスリステリア感染防御に及ぼすMDPの効果

がわかっている。著者らは MDP がマウスの *L. monocytogenes* に対する感染防御力を高めることを見出した(図21)。更に MDP はヌードマウスの生存日数を有意に延長し、臓器内菌数を有意に低下させることを観察した(図22)。これらのことは、生体内で MDP は T 細胞の関与なしにマクロファージを“真の意味で”活性化することを示す。このことは、Mackness らが明らかにした有名な現象、つまり [細胞内寄生性細菌に対する感染防御で主役を演じる活性化マクロファージの活性化は、リンパ球を介して行なわれる] ということ以外に、リンパ球を介さないでより原始的に、細菌細胞壁のアジュバント構造により直接に行なわれる経路もありうることを示唆している。このことについてより詳しくは、他に述べた<sup>60)</sup>。更にこれらのことは、ヌードマウスの方が感染初

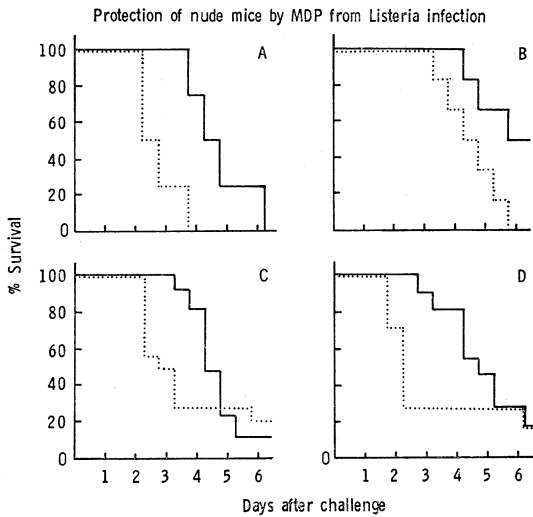


図21参照。

図22 ヌードマウスへのリステリア感染防御に及ぼす MDP の効果

期には、正常ヘテロマウスより、種々の感染に対して抵抗性が大きいというよく知られている事実の機序を説明していると考えられる。つまり、ヌードマウスでは腸管内細菌によるマクロファージの活性化が正常マウスより強く起こっていることが知られているが、その活性化はおそらく MDP に代表される細菌細胞壁のアジュバント活性構造によるのであることが強く示唆された。

以上のように MDP はマクロファージをリンパ球の関与なしに、*in vivo* および *in vitro* の系で機能的、形態学的、生化学的、細菌学的に活性化することが明らかにされた。

### 考 察

肉芽腫の定義の中で、時に“修飾された”あるいは“活性化された”マクロファージの集積という表現がとられる<sup>1)~3)</sup>。マクロファージの modification, maturation, activation, stimulation, differentiation 等の言葉は、類上皮細胞肉芽腫と関連して使われる場合、組織レベルでの形態的な観察により使われることが多い。たとえば、Lurie は結核結節内のマクロファージは、“activate”されている理由として、細胞内小器官の発達、菌破壊力の増大をあげ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ染色を活性化の指標とした<sup>61)</sup>。Turk もマクロファージと活性化マクロファージと類上皮細胞の間の差は、活性化の程度の違いと考え、電顕的に三者を区別した<sup>62)</sup>。Allison らは連鎖球菌の細胞壁がマクロファージを刺激し<sup>63)</sup>、肉芽腫を作ること、カラゲランのコロイドはマクロファージの活性化と肉芽腫形成の両方を引き起こすが、そのカルシウム塩は両方を引き起こさないことなどから、これら両者の間の関連性を示唆している<sup>64)</sup>。しかし、これらの肉芽腫は類上

皮細胞肉芽腫ではない。一方、Allison はエンドトキシンはマクロファージを活性化するが、肉芽腫を作らないと述べている<sup>63)64)</sup>。このように、類上皮細胞肉芽腫形成とマクロファージの活性化との関連性については、注目されているが、類上皮細胞肉芽腫形成に関連してマクロファージの活性化の重要性が明確に示されたことはあまりない。

著者らは第 1 章に述べたように、MDP の類上皮細胞肉芽腫形成能はそのアジュバント活性構造に依存することを見出した。また第 3 章で、この構造がリンパ球の関与なしにマクロファージを活性化することを、種々の形態学的、生化学的、細菌学的、機能的指標を用いて明らかにした。MDP のアジュバント活性構造がリンパ球の関与なしにマクロファージを活性化することは、最近国内外の研究者により確認された<sup>6)</sup>。これらの結果をまとめると表 1 のようになる。MDP のアジュバント活性、類上皮細胞肉芽腫形成能、マクロファージ活性化能の間に密接な平行関係があることが明らかである。言い換えると、マクロファージを強く活性化するのが類上皮細胞肉芽腫をつくるということが出来る。これは、類上皮細胞肉芽腫の形成に、マクロファージの強い活性化が要求されることを強く示唆している。したがって、MDP がリンパ球の関与なしにマクロファージを活性化できるということは、MDP がアレルギー (T, B 細胞由来のリンフォカイン) の関与なしに類上皮細胞肉芽腫を作りうることを意味している。何故活性化が重要であるかについては次章で考察したい。

MDP は極少量で広範な類上皮細胞肉芽腫をつくり、*in vitro* で極低濃度でマクロファージを強く刺激する。一方、高濃度でも MDP は細胞に対する毒性 (トリパンブルー排除試験による) を示さない。MDP の実験をしていて印象的なことは、MDP はこのような生体細胞に対して傷害作用や毒性を示さないのに、不思議にマクロファージの方が極少量の MDP と直接接するだけで、*in vitro* 試験でみられたように、激しく“興奮”し、*in vivo* では生体は結核菌に対するのと同じように、ものすごい組織反応により対応するという点である。あたかも、マクロファージは MDP を直接“認識”し、大変なやつが浸入してきたと“考えて”、生体全体に“連絡”して総力をあげて対応しているような感じがする。(“認識”という言葉を使つたのは、MDP は細胞を傷害するわけではないのに、マクロファージの方が激しく反応するという以外に、その反応はたとえば MDP 中の D-イソグルタミンが D-イソアスパラギンに置き換えられるだけで、もう全く消失してしまう程 MDP の特殊な立体構造に厳格に依存しているという事実を重視したからである。) 上記のような感じをもちながら、MDP は細菌細胞壁に共通に存在し、哺乳動物体内には存在しないこと、一方、

メチニコフの名著「メチニコフ炎症論」が示すように、マクロファージは生体防御で最も原始的、基本的な細胞であることを考えると、MDP に対するこのマクロファージの反応は細菌に対する哺乳動物の炎症反応の一つの原点を示しているように思える。

要 約

MDP はマクロファージを強く活性化した。活性化はリンパ球の存在に依存しておらず、MDP のアジュバント活性構造に依存して起こった。したがって、第1章の成績と考えあわせると、類上皮細胞肉芽腫形成因子はマクロファージを強く活性化する物質であることが強く示唆された。したがって、MDP のマクロファージ活性化にリンパ球は不必要であることは、MDP の類上皮細胞肉芽腫形成にアレルギー反応は不必要であるという第2章の結論を支持する。

第4章 MDP によるマクロファージの DNA 合成抑制

上に少しふれたように、MDP はマクロファージに対し細胞障害性を発揮せず、却つてMDP をマクロファージに加えて数日培養すると、しばしばマクロファージの数の増加がみられた。したがって、MDP はマクロファージの分裂を高めるのかもしれないと考え、調べたところ、結果はむしろ逆であつた。マクロファージの数を数えるときには、あらかじめシャーレをよく洗った後、底に付着しているマクロファージを数えていたので、見かけ上MDP は対照に比べ、マクロファージの数を増したようにみえたのであつた。実際には、MDP はマクロファージの付着力を増強しただけであつた。

MDP を *in vitro* の系でマクロファージに加え、<sup>3</sup>H-チミジンと一緒に培養24時間後に、トリクロロ酢酸不溶部への放射能活性の取り込みを測ると、表2に示されるように、対照のマクロファージは活発に<sup>3</sup>H-チミジンを取り込み、この取り込みはMDPの添加により著しく減

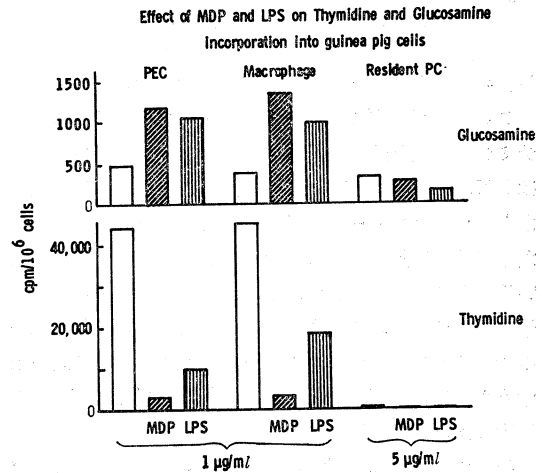
表2 モルモット腹腔浸出細胞への<sup>3</sup>H-チミジン取り込みに及ぼすMDPの効果

Effect of MDP on [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation by guinea pig PEC *in vitro*

	<sup>3</sup> H-TdR incorporation (cpm/10 <sup>6</sup> cells)
Control	44,177 ± 730
MDP (1 μg/ml)	3,247 ± 93

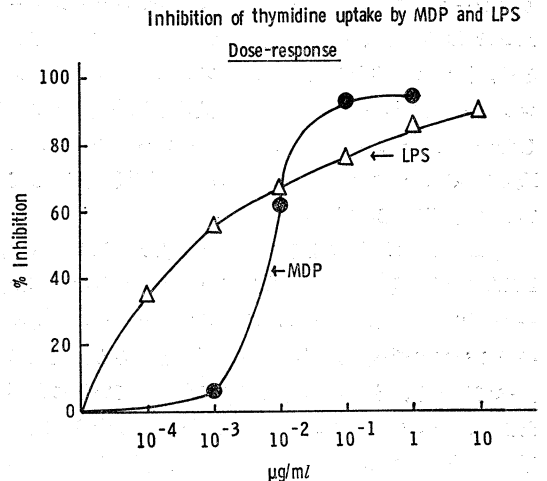
腹腔浸出細胞 1 × 10<sup>6</sup> 個を199メディウム 2ml に懸濁し、MDP 添加または非添加後24時間培養し、<sup>3</sup>H-チミジン 1 μCi を添加後更に24時間培養後、TCA 不溶画分への<sup>3</sup>Hの取り込みを示す。数字は、平均値 ± 標準偏差を示す。

少することがわかつた。常在マクロファージはチミジンを取り込まなかつた。図23に示されているように、この現象は腹腔浸出細胞と精製マクロファージで同程度に起こり、リンパ球ではみられないので、以後主に腹腔浸出細胞を用いて、マクロファージにみられるこの現象を追究した。このことは、この現象も活性化と同様、リンパ球の関与なしに行なわれることを示唆している。また、同時に測つたグルコサミンの取り込みは、MDP により却つて上昇しているため、この現象はマクロファージの傷害によるものではないと思われる。また、図24に示されているように、この現象はMDPに用量依存的に起こり、10 ng/ml の濃度で50%以下の取り込み減少が起こ



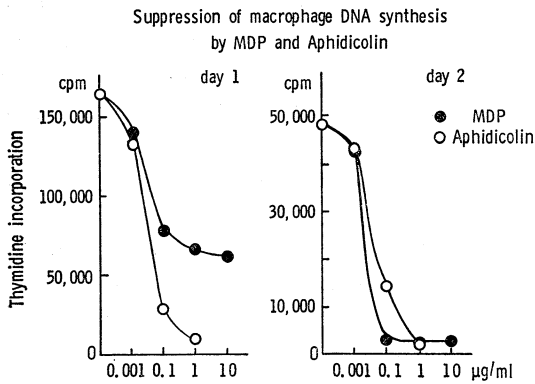
実験条件：表2参照。

図23 モルモットの腹腔細胞へのチミジンとグルコサミンの取り込みに及ぼすMDPとLPSの効果



実験条件：表2参照。

図24 種々の濃度のMDP, LPSのチミジン取り込みに及ぼす影響



実験条件：表2参照。

図25 種々の濃度のMDPおよびアフィディオコリンのチミジン取り込みに及ぼす影響

る。エンドトキシンも同様の作用を示した。

ここでまず問題になるのは、マクロファージへの $^3\text{H}$ -チミジンの取り込みが真のマクロファージの増殖あるいはDNAの複製を反映しているかという点である。何故なら、マクロファージは*in vitro*では、組織由来の特殊な抽出液の添加なしには増殖しないと一般に認められているからである<sup>65)</sup>。また、リンパ球では細胞膜の巨大分子にチミジンが取り込まれることがあるとの報告もあるので、チミジンのマクロファージ細胞内への取り込みをすぐさま細胞の増殖あるいはDNAの複製と結びつけるわけにはいかない<sup>66)</sup>。

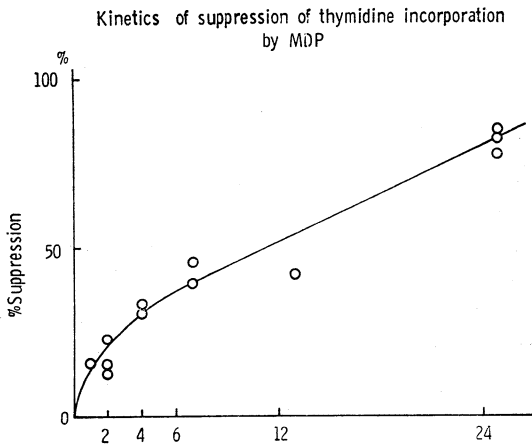
それです、Thanhauser-Schmidtの方法でチミジンは大部分DNAに取り込まれることを確認した。しかし、DNAへの取り込みはDNA修復をあらわしているかもしれない。このことを確かめるために、アフィディオコリンを用いた。アフィディオコリンは真核細胞のDNA-ポリメラーゼ $\alpha$ を特異的に抑制し、このDNA-ポリメラーゼ $\alpha$ はDNAの複製を行なっていることが知られている<sup>67)</sup>。図25に示されるように、アフィディオコリンはマクロファージの $^3\text{H}$ -チミジンの取り込みを95%抑制した。したがって、マクロファージ酸不溶画分へのチミジンの取り込みは、マクロファージのDNAの複製を反映していることが明らかになった。

次に、このMDPによるチミジンの取り込みの減少は、DNA複製の真の抑制を反映しているかどうかを調べた。一つの可能性として、MDPはマクロファージの細胞膜のチミジンの通過を抑制している可能性がある。実際に調べてみると、膜の透過性は却って高まっていることがわかり、チミジンのDNAへの取り込みの減少は、膜の透過抑制のためではないことがわかった。次に、MDPがDNA合成の前駆体の合成を高めたために、希釈された可能性がないかを検討した。そのため、 $^{14}\text{C}$ -標識性酸を培養液に加えて放射能のDNAへの取り込みを測つたと

ころ、MDPにより取り込みが増加することはなかった。したがって、MDPによりDNA合成前駆体の合成が増加したため、“hot”のチミジンが希釈され、見かけ上チミジンの取り込みが減少したわけではないことがわかった。最近、東大永野博士らとの協同研究により、MDPはマクロファージのDNAポリメラーゼ $\alpha$ に直接作用しないが、MDPにより活性化されたマクロファージのDNAポリメラーゼ $\alpha$ が強く抑制されることがわかった。したがって、MDPによるマクロファージのDNAへのチミジンの取り込みの減少は、マクロファージDNA複製の真の抑制であると考えられる。

次に、MDPによるDNA複製抑制のメカニズムについて検討した。すでにMDPはマクロファージに働いて、プロスタグランジン $\text{E}_2$ を遊離させること<sup>68)</sup>、プロスタグランジン $\text{E}_2$ はリンパ球やマクロファージに働いてそのDNA合成を抑制することが知られている<sup>69)</sup>。したがって、MDPにより刺激されたマクロファージがプロスタグランジンを放出し、それにより二次的にマクロファージのDNA合成が抑制される可能性が考えられた。実際に外から加えられたプロスタグランジンは、マクロファージDNAへのチミジンの取り込みを抑制した。しかし、プロスタグランジンによる抑制は、MDPによる抑制より時間的に遅れて起こり、また、プロスタグランジンの抑制剤であるインドメサシンの添加は、MDPによるDNA合成抑制に何の影響も与えなかった。したがって、MDPによりマクロファージから放出されたプロスタグランジンによるDNA合成抑制は、少なくとも反応の初期には起こらないといえる。マクロファージはチミジンを培養液中に放出し、このチミジンは細胞の増殖を抑制することが知られている<sup>81)</sup>。この可能性を含め、何かMDPによりマクロファージから放出されるモノカインが、二次的にマクロファージDNA合成抑制を引き起こしている可能性を検討した。MDPと腹腔細胞を2時間培養後、よく洗い、更に24時間培養した上清のなかには、マクロファージDNA合成を抑制する作用は全くみられなかった。したがって、MDPによるマクロファージDNA合成抑制は、そのような二次的遊離物質によるのではなく、MDPによるマクロファージの直接の刺激により、その引金が引かれるのであろうと考えられる。このことは、MDPとマクロファージの接触は、1時間ですでにDNA合成抑制は測定可能になることによつても支持される(図26)。細胞の刺激には、しばしば $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ が関係するが、MDPによるマクロファージDNA合成抑制にこのようなイオンは関係しないこともわかった。

上述のように、MDPによるマクロファージDNA合成抑制とマクロファージへのグルコサミンの取り込みは同時に起こる(図23)。種々のMDPおよびその関連物質



MDP (10 µg/ml) の添加群と非添加群にモルモット腹腔浸出細胞  $1 \times 10^6$  個を懸濁した後、チミジンの取り込みを測定した。測定の前1時間前に  $^3\text{H}$  チミジンを添加した。図は、

$$\% \text{抑制} = \left(1 - \frac{\text{MDP 添加群 cpm}}{\text{Control 群 cpm}}\right) \times 100 \text{ を示す。}$$

図26 MDP によるチミジン取り込み阻止の Kinetics

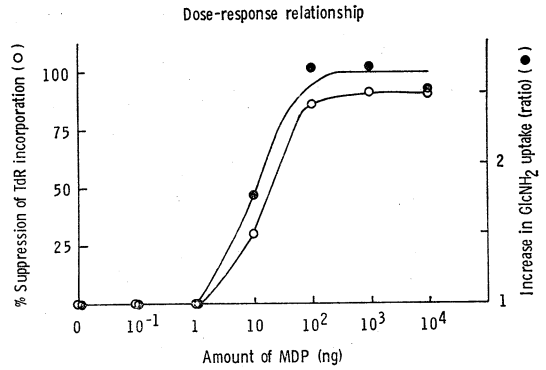


図28 MDP の種々の濃度によるチミジン取り込み抑制とグルコサミンの取り込みの関係

MDP によるマクロファージ DNA 合成抑制はマクロファージ活性化の一部分現象であることを示しているように思われる。

考 察

通常マクロファージは、L-cell の培養上清<sup>70)</sup>、炎症組織の浸出液<sup>71)</sup>、リンフォカイン<sup>72)</sup>等を加えなければ *in vitro* で増殖しない。したがって、モルモット腹腔浸出マクロファージ組織液を加えなくても、活発にチミジンを取り込み、この取り込みは DNA の複製を反映していることは、新しい知見である。

この DNA 複製が MDP により著明に抑制された。Hadden も MDP がマクロファージの増殖を抑制することを報告しているが<sup>73)</sup>、彼の場合、リンフォカインをあらかじめ培養液に加えておかないと抑制が起こらず、インドメサシンでこの抑制はなくなるので、プロスタグランディンを介した現象であると述べているので、我々の観察した現象と違った点がある。

この DNA 合成が MDP、およびその関連物質により著明に抑制され、その抑制がマクロファージ活性化と平行することがわかった。このことは、マクロファージ活性化の一部分現象として、DNA 合成の抑制が起こることを示唆する。徳永らも MDP によるマウスの骨髄性白血病細胞 (MI 細胞) のマクロファージへの分化の問題を調べ、マクロファージの活性化と分化の間に関係があることを示唆している<sup>82)</sup>。

リンパ球が刺激されると DNA 合成の増加が起こることはよく知られているので、マクロファージが刺激されると DNA 合成の抑制が起こるということは、理解しにくい感じがする。しかし、次のことを考えると納得できる。

Cline らは未分化 blast cell が promonocyte, monocyte, immature macrophage, mature macrophage と分化するに従って、細胞の DNA 合成能が次々と低下することを報告した<sup>74)</sup>。一般に、分化した細胞の DNA

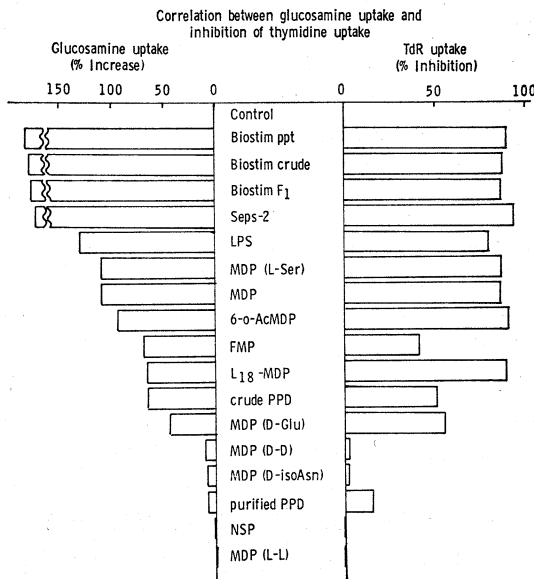


図27 MDP とその類似体によるチミジンの取り込み抑制とグルコサミンの取り込み増強との間の相関性

について調べた結果、図27に示されるように、MDP による DNA 合成抑制とグルコサミンの取り込み上昇との間には、きれいな平行関係があることがわかった。また、図28に示されるように、DNA 合成抑制を起こす MDP の濃度と、グルコサミン取り込み増強を起こす濃度はよく一致した。グルコサミンの取り込み上昇はマクロファージ活性化の指標であるから、このような結果は、

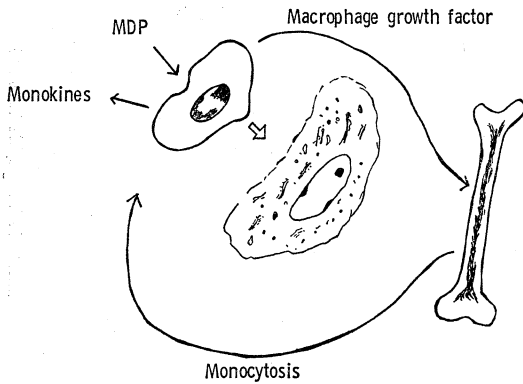


図29 MDP による類上皮細胞肉芽腫内のマクロファージの活性化と分化およびマクロファージの集積の想像模式図

合成が低下することはよく知られている。一方、Adams は BCG により引き起こされたマクロファージから類上皮細胞への変化は、形態的に詳しく観察した結果、分化であると考えた<sup>1)</sup>。同様に、MDP が生体内でマクロファージに働いた場合も、マクロファージは蛋白質合成の細胞内オルガネラが発達した類上皮細胞となるので、形態的に考えた場合、MDP はマクロファージを分化させると考えられる。機能的にみても、マクロファージは MDP の刺激により、*L. monocytogenes* に対する殺菌能という新しい機能を獲得するのであるから、MDP はマクロファージを分化させると考えてよからう。因みに結核結節中の類上皮細胞は、結核菌に対する殺菌能をもつようになっていることが知られている<sup>1)2)</sup>。

表 1 に示されているように、MDP のマクロファージ活性化作用と類上皮細胞へ分化させる能力は平行している。したがって、MDP によるマクロファージの活性化は分化の始まりであると考えらるなら、マクロファージの活性化に伴って、DNA 合成の低下が起こることはよく理解できる。最近、長野らはマクロファージ活性化を起こすインターフェロンが、マウスの骨髄性白血病細胞  $M_1$  細胞をマクロファージへ分化させ、同時に増殖を抑制することを報告した<sup>75)</sup>。加藤らはマクロファージを活性化させるエンドトキシンが、L-cell 培養上清添加培養液中で増殖するマウスマクロファージの増殖を抑制することを報告した<sup>76)</sup>。我々は大腸菌のエンドトキシンおよび肺炎桿菌の糖蛋白はマクロファージを活性化し、DNA 合成を抑制し、油中水型エマルジョンの形で注射されると、類上皮細胞肉芽腫をつくることを最近観察した。

私は次のように考えたい。マクロファージは MDP 構造に接すると、増殖から分化へ代謝のスイッチを切り換える。増殖するためのエネルギーを止めて、それを強い

活性化、つまり殺菌能をもつ細胞への分化の道を歩き始めるために振り向ける。

さて、ここで類上皮細胞肉芽腫形成におけるマクロファージ活性化の意味を考えたい。第 3 章では、マクロファージが MDP により活性化されることが、類上皮細胞肉芽腫形成に必要な過程であるという考えを述べた。マクロファージが活性化されると、どのようにして類上皮細胞肉芽腫形成が起こるのであろうか。MDP がマクロファージに働くと、マクロファージ生長因子、プロスタグランジン  $E_2$ 、インターロイキン I、パイロジェン、コラゲナーゼ、線維芽細胞増殖因子、プラスミノゲン活性化因子等が放出されることがわかっている<sup>6)68)</sup>。これらと MDP により発生する未知の無数の因子が類上皮細胞肉芽腫形成のため、マクロファージの増殖、集積に役立つと考えられる。

類上皮細胞肉芽腫の中で、類上皮細胞は増殖するとよく記載されている。実際、類上皮細胞肉芽腫の中では細胞の分裂像がしばしばみられる。Spector は、類上皮細胞が分裂する像を示した<sup>46)</sup>。しかし、著者は上記の実験結果から、図 29 のようなことが MDP による類上皮細胞肉芽腫内で起こっているのだらうと想像している。MDP により活性化されたマクロファージは、DNA 合成を止めて、より強い細胞へと分化を始め、同時に種々の因子を出す。このうちマクロファージ生長因子は骨髄を刺激し、小谷らが示したように、単球増多を引き起こす。骨髄から肉芽腫のある場所に新しく到着した単球は、しばらく分裂しているが、MDP と接すると直ちに活性化され DNA 合成を止める。

## 要 約

MDP はモルモット腹腔浸出マクロファージの DNA 複製を強く抑制した。この抑制はマクロファージ活性化に伴って起こる現象であることが示唆された。おそらく、MDP によるマクロファージの強い活性化はより強い細胞への分化の始まりと思われる。

## 第 5 章 MDP による関節炎と壊死性炎の誘起

MDP はアレルギー反応の関与なしに類上皮細胞肉芽腫を形成すること、マクロファージの活性化が類上皮細胞肉芽腫形成に重要であることを述べてきた。この章では、動物の種の違いにより、また、ある特殊な条件下で、MDP は類上皮細胞肉芽腫以外の特別な炎症を引き起こすことを簡単に付け加える。

### 1. MDP によるアジュバント関節炎の誘起

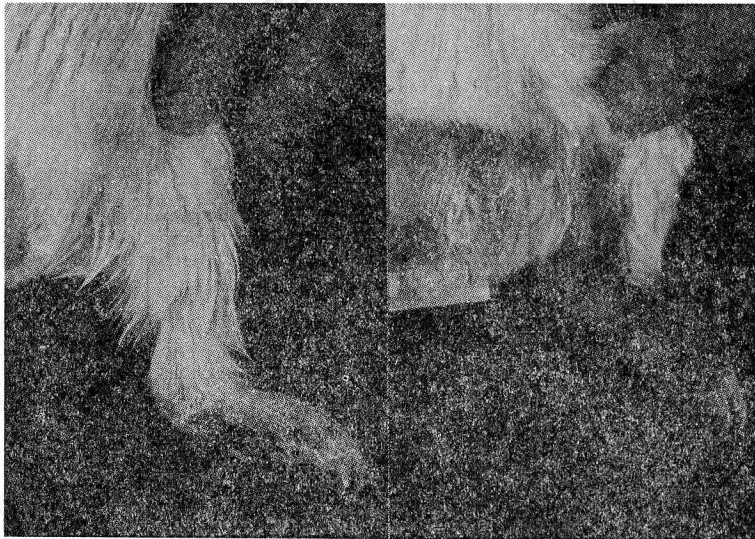
1956 年、Pearson は結核菌を油中水型エマルジョンの形でラットに注射すると、人間の慢性関節リウマチによく似た慢性関節炎が誘起されることを見出し、アジュバント関節炎とよんだ<sup>77)</sup>。著者および古賀、小橋らは





WKA ラット♀ (8~10週) の足うらに、MDP (エマルジョン) を注射。4週間観察した。写真は、注射後3週間目の関節炎を示している。

図30 MDP によって誘起されたラットのアジュバント関節炎



モルモットに結核菌 ( $H_{37}Rv$  死菌)  $100 \mu\text{g}$  を油中水の型で足うらに注射し、4週後に MDP  $100 \mu\text{g}/0.1 \text{ ml}$  PBS を皮内に注射した。図は MDP 皮内注射直前と24時間後を示す。

図31 結核菌注射局所の MDP による壊死性炎

ペプチドグリカンが誘起に必要な構造であることを見だしてきた<sup>78)</sup>。種々のペプチドグリカンの酵素分解物を調べた結果、MDP を2個含み、それに2個のアミノ糖と3個のアミノ酸が結合しているペプチドグリカン断片が、誘起に必要な最少構造であり、アジュバント活性発現の最小有効構造、MDPは関節炎誘起のための構造としては不十分であると報告された<sup>79)</sup>。しかし、著者らはMDPが関節炎誘起能をもっていることを最近見出した<sup>80)</sup>

(図30)。病理学的検索においても、関節の組織像はアジュバント関節炎の像を示した。興味あることは、第2章に述べられたように、MDPは正常ラットとT細胞欠除ラットの両者に、類上皮細胞肉芽腫を形成したが、正常ラットのみがアジュバント関節炎を発症し、T細胞欠除ラットにおいては全例関節炎が誘起されなかつた点である。MDPによる類上皮細胞肉芽腫形成にはT細胞は関与しないが、アジュバント関節炎誘起にはT細胞の存在

が必要であると思われる。アジュバント関節炎の発症の機序ははつきりしないが、自己免疫疾患の可能性があると考えられている<sup>78)</sup>。同じ物質が同じ個体で異なつた機序により、特徴のある2つの異なつた炎症を引き起こすことは興味のあることである。

2. MDP による壊死性炎の誘起

MDP に抗原性があるかどうかを調べる実験の途中で、MDP は以下のような激しい壊死性炎を引き起こすことを見出した。結核菌(100 μg)を油中水型エマルジョンの中に入れて、モルモットの足うらに注射し、約1カ月後リン酸緩衝液の中に溶かした MDP(100 μg) を皮内に注射すると、24時間後に図31に示されるような激しい腫脹、浸出、壊死、潰瘍を伴つた炎症が結核菌注射局所の足に起こつた。組織を調べると、足うら、局所リンパ節の肉芽腫部分に広範な壊死および血管炎がみられた。壊死の程度および炎症腫脹の強さは、皮内反応に用いられた MDP の量に依存して増強した (図 32)。この壊死性炎には結核菌による準備注射と MDP による惹起注射 (皮内注射

あるいは静脈注射) の両者が必要で(表 3)、両注射の間隔は少なくとも3週間以上、6週間以内でないところないことがわかつた(表 4)。また、惹起注射の有効性は MDP のアジュバント活性構造に依存した(表 5)。この反応の機序は全くわからない。準備注射と惹起注射の両者が必要であることはシュバルツマン反応に似ているが、注射間隔(表 4)、注射に必要な物質(表 5)、今のところモルモットにおいてのみ観察され、ウサギ、ラットでは起きないことなど、かなり違つた点もみられる。MDP は最近感染治療薬、抗腫瘍剤として臨床使用の試みがな

表 3 壊死性炎のための準備物質と惹起物質の関係

Injection		Necrotic reaction
Preparatory	Provocative	
H <sub>37</sub> Rv	MDP	+
//	SEPS	-
//	LPS	-
//	PPD	-
SEPS	MDP	-
//	SEPS	-
//	LPS	-
MDP	MDP	-
//	SEPS	-
//	LPS	-

(SEPS : Peptidoglycan fragment)  
Preparatory injection : 100 μg in w/o emulsion  
Provocative injection : 100 or 400 μg, ic or iv

準備注射に結核菌(死菌 H<sub>37</sub>Rv)、SEPS および MDP を 100 μg 油中水エマルジョンの型でモルモット足うらに注射し、4週目に表に示す種々の物質 100 μg で炎症再燃の惹起を行なつた結果を示す。(SEPS とは peptidoglycan fragment で水溶性の物質である。)

Foot pad inflammatory swelling and necrotic reaction by provocative injection of MDP

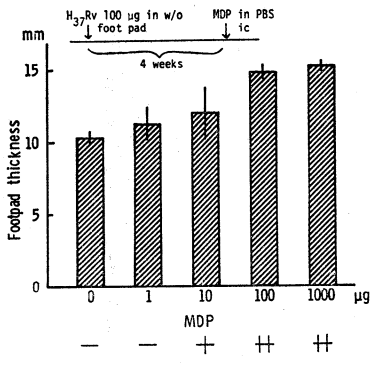


図32 壊死性炎に及ぼすMDPの濃度

表 4 結核菌注射後の PPD に対する遅延型過敏症発現と MDP による壊死発現の時間的關係

Weeks after preparative injection of tubercle bacilli	Reactions elicited by provocative injections of PPD and MDP			
	Skin reaction		Footpad necrotic reaction	
	PPD	MDP	PPD	MDP
1 WK	-	-	-	-
2 WKs	+	-	-	-
3 WKs	++	-	-	+
4 WKs	++	-	-	++
5 WKs	++	-	-	++
6 WKs	++	-	-	+
8 WKs	+	-	-	-

準備注射として結核菌(heat killed H<sub>37</sub>RV)は油中水型エマルジョンの型でモルモット足うらに注射(100 μg/0.2 ml)し、1~8週ごとに PPD と MDP (それぞれ 100 μg/0.1 ml)を皮内に注射した。

表5 壊死性炎惹起と構造との関係

Necrotic foot pad reaction by provocative injection of MDP and its analogs

Provocation	Necrotic reaction
Mur-L-Ala-D-isoGln (MDP) 100 $\mu$ g ic	+
Mur-L-Ser-D-isoGln //	++
Mur-D-Ala-D-isoGln //	-
Mur-L-Ala-D-isoAsn //	-
Mur-L-Ala 400 $\mu$ g iv	-
Mur-D-isoGln //	-

Preparatory injection : TB 100  $\mu$ g w/o emulsion

準備注射は結核菌死菌 100  $\mu$ g 油中水型エマルジョンをモルモット足うらに注射し、4週後に惹起注射として種々の MDP 類似体 (100  $\mu$ g/0.1 ml) を皮内、または Mur-L-Ala, Mur-D-isoGln (400  $\mu$ g/0.4 ml) を足部静脈より投与後、24時間後の準備注射部位の変化の有無を示す。

されている。MDP がアジュバント関節炎、広範な壊死あるいはショックを起こす可能性があることに注意しておく必要がある。

### 要 約

- MDP はアジュバント関節炎を誘起することができる。これにはTリンパ球の関与が必要と思われるので、肉芽腫形成とは違った機序が働いていると思われる。
- MDP はモルモットにおいて、数週間前に注射された結核菌の準備注射の個所に、強い壊死性炎を起こした。これは結核菌による準備注射のあとに、MDP による惹起注射を行なったときのみみられた。

### 全編の考察

本研究で用いられたような合成分枝脂肪酸は結核菌の中にはない。また、分枝脂肪酸が直接(多糖体を介さず)MDP に結合している構造も知られていない。結核結節内で実際に類上皮細胞肉芽腫を作っている物質は、種々の大きさのミコール酸-多糖体-ペプチドグリカン断片であると思われ、B30-MDP ではない。したがって、本研究でなされた仕事は一つのモデル実験に過ぎない。

しかし、複雑な自然現象を分析する一つの有力な手段は、その自然現象を起こす因子をぎりぎりまで単純化することである。そのように単純化され抽象化された因子は、もはやそのままの形では現実には存在しないかも知れない。しかし、そのようなプロセスを通してのみ、現象の最も深い理解と洞察が得られると考えられる。このモデル実験を通して初めて、従来結節を作ることが知られていた粗画分、ロウD、あるいは結核菌細胞壁のなかで、結節形成のために本質的な役割を演じている構造は何か

という問題がほぼ理解できたと言えよう。つまり、B30-MDP あるいは BH48-MDP は結節形成において本質的な役割を演じる構造を指し示していると言える。そのような意味で、分枝脂肪酸-MDP 結合体が結核結節形成因子であると私は考える。一方、種々の *S. epidermidis* のペプチドグリカン断片は、MDP と同様にマクロファージの遊走を阻止し<sup>54)</sup>、伸展を促進し<sup>9)</sup>、エマルジョンの形で、類上皮細胞肉芽腫を形成した<sup>9)</sup>。したがって、これらのペプチドグリカン断片は、考え方のうえで MDP あるいは B30-MDP と現実に結核感染巣に存在するマクロファージを活性化し菌体分解産物との間の橋渡しの役をする。

B30-MDP 結合体は、いわば現実の抽象であるが故に、現実にとどまっていたのでは不可能に近い肉芽腫形成現象の機序についての理解をも可能にした。現実的肉芽腫形成物質であるロウD、細胞壁は抗原性をもっており、この抗原性は自身のアジュバント活性のために強いアレルギー反応を引き起こす。MDP の抗原性は検出できない。これとヌード・ラットなど免疫不全動物との組み合わせは、アレルギー反応をほぼ完全に除外した系を可能にした。この組み合わせにおいて類上皮細胞肉芽腫が形成されたことは類上皮細胞肉芽腫形成は必ずしもアレルギーを必要としないことを初めてはつきりと示した。

必要なことはアレルギー反応ではなくて、マクロファージを強く活性化しする物質である。MDP はマクロファージを強く活性化しする。MDP によるマクロファージ活性化はリンパ球を取り除いても全く影響を受けなかつた。このことは、MDP による類上皮細胞肉芽腫形成に、アレルギーが関与しないことを支持する。

結核菌の中の結節形成に必要な構造は分枝脂肪酸-MDP 結合体で、この結合体はアレルギー反応の関与なしに肉芽腫を形成すると考えられる。したがって、結核結節形成に関しては、私達はひとまず化学説を取りたい。しかし、結核菌による結核結節形成に結核アレルギーが関与していないとは考えられない。

分枝脂肪酸-MDP 結合体は強い免疫アジュバントでもあり、結核菌は多くの抗原をもっている。したがって、非アレルギー的に肉芽腫を形成することができるこのアジュバントは、現実には、抗原をパートナーとして、結核アレルギー成立の原因物質でもあり、このアレルギーを通して産生されるリンフォカインは、二次的に結核結節を強める。このように考えると、結核結節形成因子に関して、過去100年間対立した化学説とアレルギー説は、分枝脂肪酸-MDP 結合物を結節形成構造と認識することにより止揚されると言えよう。しかし、あくまでもリンパ球が関与しない MDP によるマクロファージの活性化が一次的であつて、リンパ球(アレルギー)の関与はその結果として二次的に起こるとするのが私の考

## Epithelioid granuloma-evoking agents

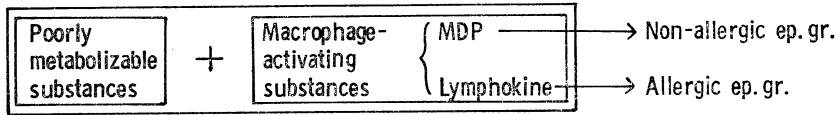


図33 類上皮細胞肉芽腫形成因子

えてある。

話を少し一般化して考えると、図33に示されているように、代謝され難い物質と、マクロファージを活性化する物質とが密接にアソシエートして存在する構造は、類上皮細胞肉芽腫を形成しうる構造と言えよう。この図にはMDPとリンフォカインをかいたが、マクロファージを活性化する物質は数多く知られている。そのなかには生体外にあるものもあれば、生体内に不活化状態で存在するものもある。一方、代謝され難い物質は、脂質に限らない。もつと一般的に言えば、この模式図であらわされている効果を発揮できるような状況があれば、類上皮細胞肉芽腫が形成されるであろうと私は考える。原因不明の類上皮細胞肉芽腫疾患の原因物質を捜すとき、このような考え方をもつておくことは役に立つと思われる。

細菌と哺乳動物との接触により炎症という現象が成立する。繰り返すようであるが、この炎症を分析する一つの有力な手段は、複雑な両者をできるだけ単純化することである。MDPとマクロファージ間の相互作用は、両者を極めて単純化した系の一つと言えよう。今後、マクロファージを更に単純化し、MDPによつてマクロファージ内に引き起こされる現象の分子レベルでの理解ができるよう努力したいと願っている。

## 全編の要約

ほとんどすべての細菌の細胞壁に共通構造として存在するペプチドグリカンの中にアジュバント活性の最小有効構造として含まれているムラミル・ヂペプチド(MDP)は、鉱物油とエマルジョンの形で注射されると、強い類上皮細胞肉芽腫形成能を発揮した。同様に、分枝脂肪酸とMDPとの結合物は強い肉芽腫形成能を示した。結核菌体中には、本質的に分枝脂肪酸-MDP結合物とみなされる構造(ミコール酸-多糖体-ペプチドグリカン)が大量に、結核菌のみに、存在するので、この構造が結核結節形成に要求される構造であると思われる。MDPによる類上皮細胞肉芽腫形成に、アレルギー反応は必要ではない。一般に、類上皮細胞肉芽腫の形成にアレルギー反応は必ずしも必要でなく、必要なことはマクロファージ活性化物質と代謝され難い物質がアソシエートして存在することと思われる。マクロファージの活性化の一環として、マクロファージDNA合成の抑制が起こる。こ

のことは、マクロファージの活性化は分化の始まりであることを示唆する。MDPは類上皮細胞肉芽腫形成以外に、おそらく違つた機序により、アジュバント関節炎と壊死性炎を起こす。

## 謝 辞

この論文にかかわる実験を担当して下さつた永尾重喜、江森浩三、今井勝行、藤木哲郎、久島紘司、富岡美智子、井上勝美の諸兄姉、ならびにご協力をいただいた長野弘博士に心から感謝いたします。また、貴重なサンプルと動物をいただいた小谷尚三教授、芝哲夫教授、楠本正一博士、池上晋博士、井上敦郎博士、野村達二博士、斎藤宗雄博士、加藤昭博士、また、種々の御教示をいただいた武谷健二教授、田中健蔵教授、下山誠教授、岩田康博士、岩井和郎博士にお礼を申し上げます。また、実験の手伝いと原稿の整理を手伝つて下さつた塚原祐子さん、川島由利江さん、矢田智絵子さんに感謝いたします。

(編集上の都合により前編・後編の2編に分けたが、図表・文献は2編にわたる通し番号とした。なお英文抄録は、前編に掲載した。)

## 文 献

- 51) Rocklin, R.E. et al.: Adv Immunol, 29: 59, 1980.
- 52) Tanaka, A. et al.: Biochem Biophys Res Commun, 77: 621, 1977.
- 53) Tanaka, A. et al.: Infect Immun, 24: 302, 1979.
- 54) Nagao, S. et al.: Infect Immun, 24: 308, 1979.
- 55) Yamamoto, Y. et al.: Biochem Biophys Res Commun, 80: 923, 1978.
- 56) Tanaka, A. et al.: Microbiol Immunol, 24: 547, 1980.
- 57) Nagao, S. et al.: Microbiol Immunol, 25: 41, 1981.
- 58) Imai, K. et al.: Biomed Res, 1: 300, 1980.
- 59) North, R. J.: J Immunol, 121: 806, 1978.
- 60) 田中渥他: 感染初期における生体防御(小池聖淳・林薫編, 南山堂, 東京, p. 82, 1979.
- 61) Lurie, M.B.: J Exp Med, 75: 247, 1942.
- 62) Turk, J.L.: Sarcoidosis ed Japan Med Res Found, University of Tokyo Press, p. 147, 1981.
- 63) Davies, P. and Allison, A.C.: Immunobiology of the macrophage, ed Nelson, D.S., Acad Press, Inc,

- New York, p. 428, 1975.
- 64) Page, R.C. et al.: J Reticuloendothel Soc, 15: 413, 1974.
- 65) Goud, Th.J.L.M. et al.: Mononuclear phagocytes in immunity, infection and pathology, Blackwell Scientific Publications, Oxford, p. 189, 1975.
- 66) Strauss, P.R. and Ford, E.: J Supramol Struct 6 Suppl 2.
- 67) Ikegami, S. et al.: Nature, 275: 458, 1978.
- 68) Wahl, S.M. et al.: J Immunol, 122: 2226, 1979.
- 69) Kurland, J.I. et al.: Blood, 52: 388, 1978.
- 70) Stewart, C.C. et al.: J Exp Med, 141: 1114, 1975.
- 71) Adolphe, M. et al.: Nature, 253: 657, 1975.
- 72) Hadden, J.W. et al.: Nature, 257: 483, 1975.
- 73) Hadden, J.W.: Advances in Immunopharmacology, ed Hadden, J., Chedid, L. Mullen, P., Spreafico, Pergamon Press, Oxford, p. 327, 1981.
- 74) Cline, M.J. and Sumner, M.A.: Blood, 40: 62, 1972.
- 75) Nagano, Y. and Saito, H.: Compt Rend Soc Biol, 173: 967, 1979.
- 76) Yokochi, T. et al.: Microbiol Immunol, 25: 31, 1981.
- 77) Pearson, C.M.: Proc Soc Exp Biol Med, 91: 95, 1956.
- 78) 古賀敏生・萱島孝二: 臨床免疫, 10: 788, 1978.
- 79) Koga, T. et al.: Mol Immunol, 16: 153, 1979.
- 80) Nagao, S. and Tanaka, A.: Infect Immun, 28: 624, 1980.
- 81) Stadecker, M.J. et al.: J Immunol, 119: 1738, 1977.
- 82) 徳永 徹: 生体防御の機構 (水野伝一, 武谷健二, 石田名香雄編) 東京大学出版, 東京, p. 199, 1980.