

第 67 回総会シンポジウム

IV. 結核菌菌体成分の生化学と免疫学

— 研究の現状と将来展望 —

座長 東 市 郎 (北海道大学免疫科学研究所)

受付 平成 4 年 7 月 9 日

シンポジスト

1. 結核菌抗原蛋白質と関連蛋白質
永井 定 (大阪市立大学医学部附属刀根山結核研究所)
2. コードファクターと関連糖脂質
矢野 郁也 (大阪市立大学医学部細菌学教室)
3. ムラミルジペプチド (MDP) および合成関連化合物の免疫活性
東 市郎 (北海道大学免疫科学研究所)
4. 結核菌菌体成分の抗腫瘍活性
片岡 哲朗・山本 三郎・山本十糸子・徳永 徹 (国立予防衛生研究所)

The 67th Annual Meeting Symposium

BIOCHEMICAL AND IMMUNOLOGICAL STUDIES ON CELLULAR
COMPONENTS OF TUBERCLE BACILLI

Chairman : Ichiro AZUMA *

Symposists :

1. Antigenic Proteins and Their Related Proteins of Mycobacteria : Sadamu NAGAI (Toneyama Institute for Tuberculosis Research, Osaka City University Medical School)
2. Cord Factor and Related Glycolipids : Ikuya YANO (Department of Microbiology, Osaka City University Medical School)
3. Immunological Properties of Muramyldipeptides (MDP) and Related Synthetic Compounds : Ichiro AZUMA (Institute of Immunological Science, Hokkaido University)
4. Antitumor Activity of Mycobacterial DNA : Tetsuro KATAOKA, Saburo YAMAMOTO, Toshiko YAMAMOTO and Tohru TOKUNAGA (National Institute of Health Tokyo)

(Received for publication July 9, 1992)

Recently, the biochemical and immunological studies on the cellular components of

* From the Institute of Immunological Science, Hokkaido University, Kita-15, Nishi-7, Kita-ku, Sapporo 060 Japan.

tubercle bacilli were extensively carried out by the support of molecular biology and basic immunology. In this symposium, recent advances in these fields, especially the antigenic protein of tubercle bacilli, biological activities of cord factor (trehalose dimycolate, TDM), immunopotentiating activity of muramyldipeptide (MDP) and antitumor activity of DNA were reported.

In last decade, a variety of antigenic proteins of mycobacterial cells and culture filtrate were purified and their amino acid sequences were determined by using molecular gene technology. Dr. Nagai reviewed the biochemical and immunological properties of MPB 70, 12 kDa protein, α antigen and 65 kDa protein.

Cord factor (trehalose-6,6'-dimycolate, TDM) has been purified from pathogenic tubercle bacilli as a toxic glycolipid. Recently, several biological activities including immunoadjuvant activity of TDM were reported and a variety of TDM related compounds were chemically synthesized. Dr. Yano summarized his recent results on the chemical polymorphism of TDM and trehalose monomycolate (TMM) and their biological activities such as toxicity, activation of alveolar macrophages, antitumor activity, cytokine induction, etc.

It is well known that tubercle bacilli are potent immunostimulant and immunoadjuvant activities of the several cellular components of mycobacterial cells such as cell-wall skeleton (CWS), TDM, DNA fraction and muramyldipeptide (MDP) were extensively examined. MDP was reported to be the minimal adjuvant-active subunit of CWS and several hundred MDP derivatives and related compounds for the immunostimulants were chemically synthesized. Dr. Azuma and his group developed MDP derivative, MDP-Lys(L18), as a cytokine inducer. MDP-Lys(L18) induces several cytokines such as IL-1, IL-6, TNF, CSF, etc. and was shown to be effective for the restoration of decreased number of leukocytes and platelet in the cancer patients who were treated with cancer chemotherapy and radiation therapy. The detailed mechanism of action of MDP-Lys(L18) was also discussed.

The antitumor activity of cellular components of tubercle bacilli is well established in experimental tumor systems and clinical trials. Dr. Kataoka and his associates reported that DNA fractions (MY-1) of tubercle bacilli was a candidate of cancer immunotherapeutic agent. By the biochemical analysis of MY-1 and chemical synthesis of related oligonucleotide, Dr. Kataoka's group developed synthetic oligo-DNA nucleotides having the stimulating activity of NK cell function. The future aspects of the biochemical and immunological studies on mycobacterial fractions were also discussed.

Key words : Antigenic Protein, Cord Factor (TDM), Muramyldipeptide (MDP), DNA

キーワード : 抗原タンパク, コードファクター (TDM), ムラミルジペプチド (MDP), DNA

結核菌菌体成分に関する生化学的, 免疫学的研究は, ここ 10 年間に飛躍的進展を示した。その背景に分子生物学, 基礎免疫学など周辺科学に因るところが大きい, 同時に結核菌のもつ学問的興味がいかに奥深いものであるかを示すものであるともいえる。私は本学会第 61 回総会で「結核菌菌体成分の免疫」と題するシンポジウムを企画し, 結核菌菌体成分の免疫化学的研究について総括を行ったが, 近年のこの分野の進歩は目覚ましいものがある。さらに昨年度の本総会において, 徳永徹博士

会によって行われたシンポジウム「結核研究における遺伝子工学の応用」において結核菌研究における分子生物学の応用が明瞭に示され, 結核菌研究の一面が浮き彫りにされた。

本シンポジウムは結核菌菌体成分として結核菌抗原タンパク, コードファクター, ムラミルジペプチド (MDP) を中心とするアジュバント活性物質, 結核菌菌体成分の抗腫瘍活性物質に焦点を当て, わが国におけるこの分野の第一線の研究者に最近の進歩を総括してい

ただいた。

ツベルクリンタンパクを中心とする結核菌および関連細菌のタンパクの構造およびその抗原エпитープが明らかにされ、熱ショックタンパクとの関連も明らかにされ、ツベルクリンタンパク研究は新世紀を迎えつつある。コードファクターについても、矢野教授らを中心とする最近の研究ではアジュバント活性のみならず結核症の診断抗

原としての役割も明らかにされつつある。MDPの研究は結核菌菌体成分の生体防御機構への臨床応用が合成化学物質レベルで可能となり、画期的な段階を迎えつつある。さらに結核菌菌体成分の抗腫瘍活性については多彩な展開があるが、合成DNAによる新しい方向性について報告された。

1. 結核菌抗原蛋白質と関連蛋白質

大阪市立大学医学部附属刀根山結核研究所 永井 定

F. Seibertにより開発されたPPD¹⁾は、結核感染診断薬としてのみならず、免疫学研究においても、抗原として繁用されてきた。しかしそれに含まれる抗原性物質の解析、特に蛋白質成分について輪郭が見えはじめたのは10年あまり前のことに過ぎない。蛋白質についての分析と精製、モノクローン抗体作製技術の開発をはじめとして、ELISAなどの鋭敏な抗体価測定法、およびこれらに関連した技術、試薬、機器などの進歩が年を追うにつれて爆発的な展開を見せ、その結果、培養ろ液内分泌蛋白質のみならず、ミコバクテリア菌体内蛋白質の構造解析や大腸菌における発現、他の細菌蛋白質との遺伝子的関連、宿主細胞との関係など、広範な分野において知見が得られるようになった。細胞壁の破壊や毒力菌の取扱いが容易でないミコバクテリア、特に*in vitro*の培養ができない*Mycobacterium leprae*は、開発された新たな手法にとっては、まさに格好な対象であった。

すでに検討されたミコバクテリア抗原性蛋白質は多数であり、その各個についてここに詳述することはできない。先に第61回総会シンポジウムにおいて、演者は「結核菌ツベルクリン蛋白質」について当時の成果を述べた²⁾。今回は、ミコバクテリア菌種に特異なもの、構造あるいは作用について特記すべきもの、抗原性が強い蛋白質に注目して概略を述べることにする。

*M. bovis*に特異であり、しかも多量に培地中に分泌される蛋白質は、BCG東京株で見つけられたMPB70(22kDa)³⁾である。この菌種特異性が高いために、*M. tuberculosis*に対する抗血清による同定法⁴⁾で見落とされていたという経緯がある。この蛋白質の分泌量はBCG菌株によって大差があるが^{5) 6)}、分泌量が少ないBCG菌株も含めて*M. bovis*すべての菌株にMPB70の産生が認められ、一方他のミコバクテリア菌種では皆無であった⁷⁾。最近のPCRによる解析では、*M. microti*を除く*M. tuberculosis complex*のすべてにMPB70の遺伝子は存在するとされたので⁸⁾、分泌の段階に特異的な差があるのかもしれない。MPB64

(26kDa)も、主要分泌蛋白質でありながら、MPB70と同じようにBCGの菌株により産生能が異なるために、その産生がほとんどないBCG菌株に対する抗血清を使う検索法では見落とされてきたものである。このMPB/MPT64は*M. bovis*および*M. tuberculosis*に特異な分泌蛋白質である⁹⁾。

12kDa蛋白質(BCG-a, MPB/MPT57)は、BCG菌体による感作、モノクローン抗体の分離、その抗体によるアフィニティー精製という手法により得られた最初のみコバクテリア蛋白質である¹⁰⁾。どのミコバクテリア菌種の培養ろ液にも見られるが、遺伝子解析によれば、分泌型蛋白質に特有なシグナル・ペプチドがない。低分子であることから、培地内への移行が容易なのだろう¹¹⁾。この12kDa蛋白質の遺伝子構造には大腸菌のGroESに類似の構造があり、熱ショック蛋白質(HSP)の一員と考えられる^{12) 13)}。MPB70, MPB/MPT64とともに比較的耐熱性であるため、加熱滅菌を経たPPDにおいても見られる主成分の一つである。しかし、12kDa蛋白質は抗原性は全く乏しく、PPDにかわる皮内反応抗原ではない。

ミコバクテリア菌体により感作された動物から得られたモノクローン抗体は、菌体内蛋白質に対するものが多く^{14) 15)}菌種特異な蛋白質についての報告は希であるが、Avi-3(27kDa)は*M. avium*に特異な蛋白質としてアフィニティー精製分離され¹⁶⁾、アミノ酸配列も決定された¹⁷⁾。

蛋白質の遺伝子的解析は、その一次構造の決定を容易にしたばかりでなく、分泌型の蛋白質の遺伝子配列には、成熟蛋白質として分泌されるもののN-末端に先立って、20から40ほどのアミノ酸からなるシグナル・ペプチドの配列があることがわかった。このことがミコバクテリア蛋白質で見出されたのは α 抗原(30kDa)が最初である¹⁸⁾。この蛋白質は*M. tuberculosis*の非加熱培養ろ液から分離精製されたものであり¹⁹⁾、後のantigen 6⁴⁾およびMPB/MPT59, antigen 85B²⁰⁾に相当する。

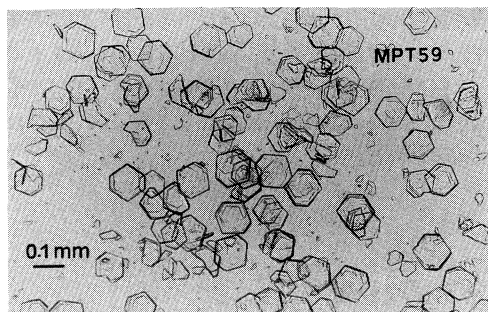


図1 *M. tuberculosis* α 抗原蛋白質 (MPT59) の硫酸による結晶

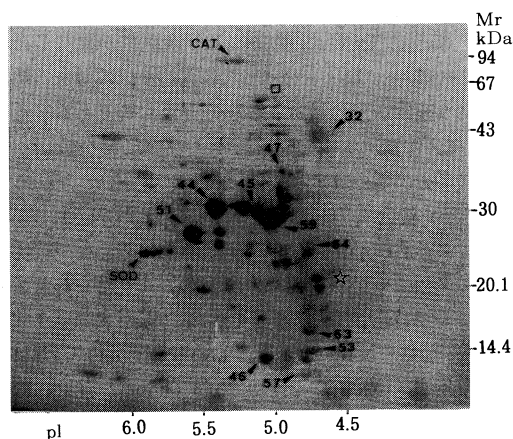


図2 *M. Tuberculosis* H 37 Rv ソートン培地 5 週培養液中の蛋白質の二次元電気泳動像 (O'Farrell 法による)

蛋白量 150 μ g, 一次元: 等電点電気泳動, 二次元: SDS-電気泳動, クマジーブルー染色後さらに銀染色。
スポットの数字: MPT ナンバー, CAT: カタラーゼ, SOD: スーパーオキシディスムターゼ。
□: 65 kDa antigen の位置, ☆: MPB 70 の位置。

すなわち、培養液中内に見出される蛋白質は菌体内から漏出したものばかりではなく、ミコバクテリアにおいても積極的な分泌がなされているということが判明した。(図1. α 抗原の硫酸による結晶)

さらに、詳細な構造比較が可能となったため、予想外に相互の近似性があることなどがわかった。 α 抗原は、ろ液内蛋白質の 70 % も占めると考えられたが¹⁹⁾、抗血清で測定されたこの量には、少なくとも 4 つの近似構造を持つ蛋白質 (α 抗原ファミリー) が含まれることがわかり²¹⁾²²⁾、その内の 2 つ (31 kDa, MPT 44, antigen 85 A, および 31.5 kDa, MPT 45, antigen 85 C) も全アミノ酸配列が決定され²³⁾²⁴⁾、残る 1 つ (27 kDa, MPT 51) についても検討されている。 α 抗原はミコバ

クテリア菌種に特異な蛋白質であり、したがって *M. kansasii*²⁵⁾、*M. leprae*²⁶⁾²⁷⁾ にも α 抗原は存在し、これらの近似構造が解析されている。これらの近接した相対分子量 (Mr, kDa) を示す蛋白質の同定には二次元電気泳動²⁸⁾が有用であり、*M. tuberculosis* H37Rv のソートン培養 5 週のろ液蛋白質を展開したものを図 2 に示す。

この α 抗原ファミリーにはなお一つの特性がある。それは宿主細胞のファイブロンネクチンとの結合能である²⁷⁾²⁹⁾³⁰⁾。この分泌型の抗原を介して菌が定着することになるか、あるいは多量の分泌により定着を阻止することになるのかは不明であるが、宿主との免疫的関連に何らかの役割を担っているものと思われる。特に T 細胞が分泌するファイブロンネクチンとの結合は、遅延型アレルギーの発現に関与していると思われる³¹⁾。

ミコバクテリア遺伝子断片をファージを使って大腸菌遺伝子に組込ませ、このライブラリーから特定の蛋白質に対するモノクローン抗体で検索選別、その蛋白質の DNA 配列を決定するという手法³²⁾は、いわゆる 65 kDa antigen の構造解析で威力を発揮した^{33)~35)}。この蛋白質はミコバクテリア菌種に広く見出される菌体内蛋白質である。そのアミノ酸配列は、*M. tuberculosis* と *M. bovis* BCG との間には相違がなく、*M. leprae* とは 95 % の一致であった³⁶⁾。

抗原としても強い活性を持つものとして注目された 65 kDa antigen であるが、その存在がミコバクテリアに止まらず、大腸菌にも類似の構造のものが見出されたことは、特異性の面からみれば、抗原としての価値は薄らいだ。しかしそのモノクローン抗体による反応が他菌種の 'Common antigen' や大腸菌の GroEL 蛋白質 (HSP) でもみられ、事実 *M. smegmatis* において熱感受性の蛋白質 (HSP) として認められたことから、再び注目を浴びるところとなった³⁷⁾。*M. tuberculosis* について熱やストレスに対する増減を調べると、すでに現在知られている DnaK, GroEL, GroES 相当の 70 kDa, 65 kDa, 12 kDa 蛋白質以外にも、90, 28, 20, 15 kDa の HSP 存在がみられた³⁸⁾。HSP は通常の生育温度でも必須であるが、熱ショックや膜透過の時に蛋白質の高次構造の形成や維持を助ける機能を持つ介添え蛋白質 (シャペロン) とも考えられている。上記の *M. tuberculosis* の HSP の熱ショック対応は一樣ではないので、いくつもの機構が組合っているものと思われる。生命維持に基本的な役割を持つ蛋白質として引き続き活発な検討がなされるだろう。

多くのミコバクテリアの蛋白質が分離精製され、その構造解析もなされたが、なお PPD にかわる強い抗原性を持ち、しかも菌種特異性が高い蛋白質の探索は続いている。この点から見れば、古く antigen 5⁴⁾ とされた

38 kDa 蛋白質 (Pab³⁹), MPT 47) は特筆に値する。この蛋白質の量は多くはなく、分泌型特有のシグナル・ペプチドを持つとされているにもかかわらず培養が進まない間は培地中にみられる量は少ない⁴⁰⁾。しかし精製されたこの蛋白質の皮内反応抗原性は PPD の活性を説明し得るほどの強さである。精製されたものに糖の含有がみられる⁴¹⁾ので、原核生物では珍しい糖蛋白質ということになる。さらになおリポ蛋白質とする報告⁴⁰⁾もあるが、やがてその強い抗原性の根拠が解明されよう。

分泌型である α 抗原の特色を利用し、この DNA に他の蛋白質のエピトープ DNA をつなぎ、投与した BCG ワクチンからその抗原を分泌させようとする試みがなされた。実際には、*M. kansasii* の α 抗原 C-末端の DNA に HIV-1 の B 細胞エピトープの塩基配列をつなぎ、BCG ワクチン株に導入、この形質転換 BCG がこのウイルス蛋白質のエピトープを融合した *M. kansasii* の α 抗原を分泌することが証明された⁴²⁾。BCG が持つアジュバント効果とともに、抗原が絶え間なく産生分泌されるわけであり、今後の研究進展が期待される。

文 献

- Seibert FB, Glenn JT. Tuberculin purified protein derivative. Preparation and analyses of a large quantity for standard. Am Rev Tuberc. 1941; 44: 9-25.
- 永井 定: 結核菌ツベルクリン蛋白質 (第 61 回総会シンポジウム「結核菌菌体成分の免疫」座長: 東 市郎), 結核. 1986; 61: 547-549.
- Nagai S, Matsumoto J, Nagasuga T. Specific skin-reactive protein from culture filtrate of *Mycobacterium bovis* BCG. Infect Immun. 1981; 31: 1152-1160.
- Janicki BW, Chaparas SD, Daniel TM, et al. A reference system for antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. Am Rev Respir Dis. 1971; 104: 602-604.
- Miura K, Nagai S, Kinomoto M, et al. Comparative studies with various substrains of *Mycobacterium bovis* BCG on the production of an antigenic protein, MPB70, Infect Immun. 1983; 39: 540-545.
- 永井 定: ミコバクテリアに特異な抗原性蛋白質の研究, 結核. 1989; 64: 585-591.
- 芳賀伸治, 高橋 宏, 後藤義孝, 他: BCG を含む *M. bovis* を認識する単クローン抗体を用いた ELISA 法, 結核. 1990; 65: 654-656.
- Cousins SD, Wilton SD, Francis BR. Use of DNA amplification for the rapid identification of *Mycobacterium bovis*. Vet Microbiol. 1991; 27: 187-195.
- Harboe M, Nagai S, Patarroyo ME, et al. Properties of proteins MPB 64, MPB 70, and MPB 80 of *Mycobacterium bovis* BCG. Infect Immun. 1986; 52: 293-302.
- Minden P, Kelleher PJ, Freed JH, et al. Immunological evaluation of a component isolated from *Mycobacterium bovis* BCG with a monoclonal antibody to *M. bovis* BCG. Infect Immun. 1984; 46: 519-525.
- Yamaguchi R, Matsuo K, Yamazaki A, et al. Immunogenic protein MPB 57 from *Mycobacterium bovis* BCG: molecular cloning, nucleotide sequence and expression. FEBS Letters. 1988; 240: 115-117.
- Baird PN, Hall LMC, Coates RM. A major antigen from *Mycobacterium tuberculosis* which is homologous to the heat shock proteins groES from *E. coli* and the htpA gene product of *Coxiella burnetii*. Nucleic Acids Res. 1988; 16: 9047.
- Shinnick T, Plikaytis BB, Hyche AD, et al. The *Mycobacterium tuberculosis* BCG-a protein has homology with the *Escherichia coli* GroES protein. Nucleic Acids Res. 1989; 17: 1254.
- Engers HD. Results of a WHO-sponsored workshop on monoclonal antibodies to *Mycobacterium leprae*. Infect Immun. 1985; 48: 603-605.
- Engers HD. Results of a WHO-sponsored workshop to characterize antigens recognized by mycobacterium-specific monoclonal antibodies. Infect Immun. 1986; 51: 718-720.
- Abe C, Saito H, Tomioka H, et al. Production of a monoclonal antibody specific for *Mycobacterium avium* and immunological activity of the affinity-purified antigen. Infect Immun. 1989; 57: 1095-1099.
- Yamaguchi R, Matsuo K, Yamazaki A, et al. Cloning and expression of the gene for the Avi-3 antigen of *Mycobacterium avium* and mapping of its epitopes. Infect Immun. 1992; 60: 1210-1216.
- Matsuo K, Yamaguchi R, Yamazaki A, et

- al. Cloning and expression of the *Mycobacterium bovis* BCG gene for extracellular α antigen. *J Bacteriol.* 1988 ; 170 : 3847-3854.
- 19) Yoneda M, Fukui Y. Isolation, purification, and characterization of extracellular antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Am Rev Respir Dis.* 1965 ; 92 : 361-370.
 - 20) Wiker HG, Harboe M, Nagai S, et al. MPB 59, a widely cross-reacting protein of *Mycobacterium bovis* BCG, *Int Archs Allergy appl Immun.* 1986 ; 81 : 307-314.
 - 21) Wiker HG, Stetten K, Nagai S, et al. Evidence for three separate genes encoding the proteins of the mycobacterial antigen 85 complex. *Infect Immun.* 1990 ; 58 : 272-274.
 - 22) Nagai S, Wiker HG, Harboe M, et al. Isolation and partial characterization of major protein antigens in the culture fluid of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 1991 ; 59 : 372-382.
 - 23) Borremans M, DeWit L, Volckaert G, et al. Cloning, sequence determination, and expression of a 32-kilodalton-protein gene of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 1989 ; 57 : 3123-3130.
 - 24) Content J, De la Cuvelierie, De Wit L, et al. The genes coding for the antigen 85 complexes of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG are members of a gene family : cloning, sequence determination, and genomic organization of the gene coding for antigen 85-C of *M. tuberculosis*. *Infect Immun.* 1991 ; 59 : 3205-3212.
 - 25) Matsuo K, Yamaguchi R, Yamazaki A, et al. Cloning and expression of the gene for the cross-reactive α antigen of *Mycobacterium kansasii*. *Infect Immun.* 1990 ; 58 : 550-556.
 - 26) Mendonca-Lima L, Content J, Van Heuverswyn H, et al. Nucleotide sequence of the gene coding for the 85-B antigen of *Mycobacterium leprae*. *Nucleic Acids Res.* 1991 ; 19 : 5789.
 - 27) Thole JER, Schoeningh R, Janson AAM, et al. Molecular and immunological analysis of a fibronectin-binding protein antigen secreted by *Mycobacterium leprae*. *Mol Microbiol.* 1992 ; 6 : 153-163.
 - 28) O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol chem.* 1975 ; 250 : 4007-4021.
 - 29) Abou-Zeid C, Ratliff TL, Wiker HG, et al. Characterization of fibronectin-binding antigens released by *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun.* 1988 ; 56 : 3046-3051.
 - 30) Abou-Zeid C, Garbe T, Lathigra R, et al. Genetic and immunological analysis of *Mycobacterium tuberculosis* fibronectin-binding proteins. *Infect Immun.* 1991 ; 59 : 2712-2718.
 - 31) Godfrey HP, Feng Z, Mandy S, et al. Modulation of expression of delayed hypersensitivity by mycobacterial antigen 75 fibronectin-binding proteins. *Infect Immun.* 1992 ; 60 : 2522-2528.
 - 32) Young RA, Bloom BR, Grosskinsky CM, et al. Dissection of *Mycobacterium tuberculosis* antigens using recombinant DNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985 ; 82 : 2583-2587.
 - 33) Mehra V, Sweetser D, Young RA, et al. Efficient mapping of protein antigenic determinants. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986 ; 83 : 7013-7017.
 - 34) Shinnick TM. The 65-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol.* 1987 ; 169 : 1080-1088.
 - 35) Thole JR, Keulen WJ, DeBruyn J, et al. Characterization, sequence determination, and immunogenicity of a 64-kilodalton protein of *Mycobacterium bovis* BCG expressed in *Escherichia coli* K-12. *Infect Immun.* 1987 ; 55 : 1466-1475.
 - 36) Shinnick TM, Sweetser D, Thole J, et al. The etiologic agents of leprosy and tuberculosis share an immunoreactive protein antigen with the vaccine strain *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun.* 1987 ; 55 : 1932-1935.
 - 37) Shinnick TM, Vodkin MH, Williams JC, et al. The *Mycobacterium tuberculosis* 65-kilodalton antigen is a heat shock protein which corresponds to common antigen and to the *Escherichia coli* GroEL protein. *Infect*

- Immun. 1988 ; 56 : 446-451.
- 38) Young DB, Garbe TR. Heat shock proteins and antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun. 1991 ; 59 : 3086-3093.
- 39) Andersen AB, Ljungqvist L, Olsen M. Evidence that protein antigen b of *Mycobacterium tuberculosis* is involved in phosphate metabolism. J Gen Microbiol. 1990 ; 136 : 477-480.
- 40) Young DB, Garbe TR. Lipoprotein antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. Res Microbiol. 1991 ; 142 : 55-65.
- 41) Espitia C, Mancilla R. Identification, isolation and partial characterization of *Mycobacterium tuberculosis* glycoprotein antigens. Clin exp Immunol. 1989 ; 77 : 378-383.
- 42) Matsuo K, Yamaguchi R, Yamazaki A, et al. Establishment of foreign antigen secretion system in mycobacteria. Infect Immun. 1990 ; 58 : 4049-4054.

2. コードファクターと関連糖脂質

大阪市立大学医学部細菌学教室 矢野郁也

はじめに

結核菌をはじめとする抗酸菌細胞壁の最も大きな特徴は、天然では疎水性の極めて強い長鎖分枝脂肪酸である“ミコール酸”を含む点である。これらの細胞壁脂質成分は、多糖体アラビノガラクトナンエステルとして抗酸菌表層の物理化学的性質（抗酸性や疎水性）を特徴づけているばかりでなく、コードファクター (trehalose 6, 6'-dimycolate, TDM と略す) の構成成分として宿主細胞に対しても種々さまざまな活性を示し、マウス致死毒

性をはじめとして免疫薬理学的にも、アジュバント活性、肉芽腫形成能、マクロファージ活性化能、抗腫瘍性、非特異的感染防御抵抗増強能等の活性が報告されてきた。

コードファクターは元来、人型結核菌の強毒株が液体培地表面培養したときにコード状に配列し、その表層から石油エーテル抽出により得られる物質に対して名づけられた名称で、マウスに対する致死毒性を示したことから、結核菌の産生する唯一の毒性成分と考えられたが (Bloch ら)¹⁾、その後類似のミコール酸含有糖脂質は、非病原性抗酸菌はもちろんのこと、*Nocardia* や

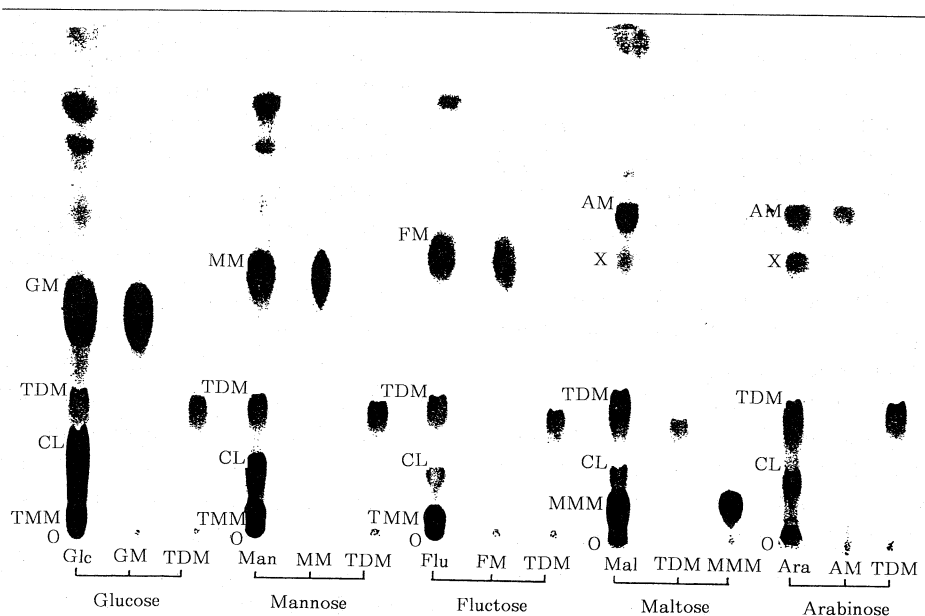


Fig. 1 Thin-layer Chromatograms of Various Mycoloyl Glycolipids (MGLs) Synthesized by *N. rubra*-M-1

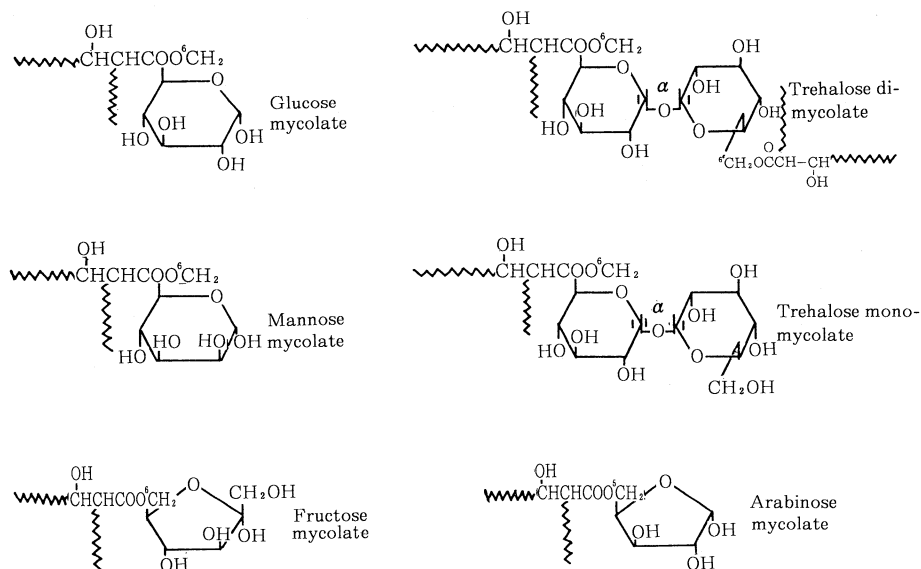


Fig. 2 Mycolic Acid-Containing Glycolipids (MGLs) Synthesized by *N. rubra* (MA = C₃₆~C₅₀)

Rhodococcus 等近縁の各種放線菌細胞壁にも広く分布することが明らかとなっており、毒性の解析にとどまらず、むしろ免疫反応に関連した各種生理活性の研究に好適な材料となってきた。

われわれは、人型結核菌を含む各種の *Mycobacterium* をはじめとして土壌放線菌に属する *Nocardia* や *Rhodococcus* 等近縁細菌からコードファクター (trehalose 6, 6'-dimycolate) をはじめさまざまなミコール酸含有糖脂質を単離して、その親水性部分 (糖鎖) および疎水性部分 (ミコール酸) の構造を明らかにするとともに、それらが生体防御反応にどのように寄与しているかを、主としてマウスおよびラットにおける肉芽腫形成能を中心に検討してきた^{2)~5)}。

a. ミコール酸含有糖脂質 (MGL) の多様性：一般に遅発育性および迅速発育性 *Mycobacterium* 属の各菌種は trehalose dimycolate (TDM) および trehalose monomycolate (TMM) を含むが、菌種によっては glucose monomycolate (GM) その他未知の MGL を含有する⁴⁾⁵⁾。いずれも菌種によりミコール酸の構造が異なり C₅₀ 程度のものから、C₈₈ 以上の長鎖のものまで極めて多岐にわたる。*Nocardia* (または *Rhodococcus*) の一群は、各種単糖を唯一の炭素源として培養したときに TDM および TMM 以外に糖部分の異なる glucose monomycolate (GM), mannose monomycolate (MM), fructose monomycolate (FM) および arabinose monomycolate (AM) 等を

産生する (Fig. 1 および Fig. 2)。

b. MGL の W/O/W ミセル投与によるマウス肉芽腫形成能：上記の C₄₄ より長鎖のミコール酸を含む TDM や GM および TMM は、W/O/W ミセルとしてマウス尾静脈より投与すると、7~14 日で肺・脾および肝臓に顕著な肉芽腫を形成するが³⁾、MM, FM および AM にはこのような活性がなく、糖部分の構造に特異性が認められた (Fig. 3)。また肉芽腫形成活性はミコール酸部分の構造によっても変動し、長鎖のものほど活性が大きかった (Fig. 4)。

c. MGL 特に cord factor の毒性：すでに Bloch ら¹⁾、および Kato ら⁶⁾ により報告されて以来、cord factor をオイルミセルとしてマウス腹腔内に投与したときマウスは腹膜炎症状を発症するとともに顕著な体重減少をきたし、致死毒性を示すことが知られている。ミコール酸の構造の異なる TDM のマウスに対する毒性を体重減少を指標としてしらべたところ、毒性はミコール酸の炭素数と並行し、*Mycobacterium* 中でも特に人型結核菌の TDM が最も強力であった (Fig. 5)。また TDM と比べて TMM の毒性は低く、さらに > GM > MM > FM > AM の順に毒性が低下した。毒性の発現に長鎖のミコール酸が必要なこと、また特定の糖部分の構造の重要性が示唆される (Table 1)¹⁰⁾。

d. MGL の抗腫瘍性：MGL 特に cord factor とその類縁糖脂質が抗腫瘍性を示すことは既知のとおりであるが、われわれは毒性の弱い *Nocardia* の MGL の

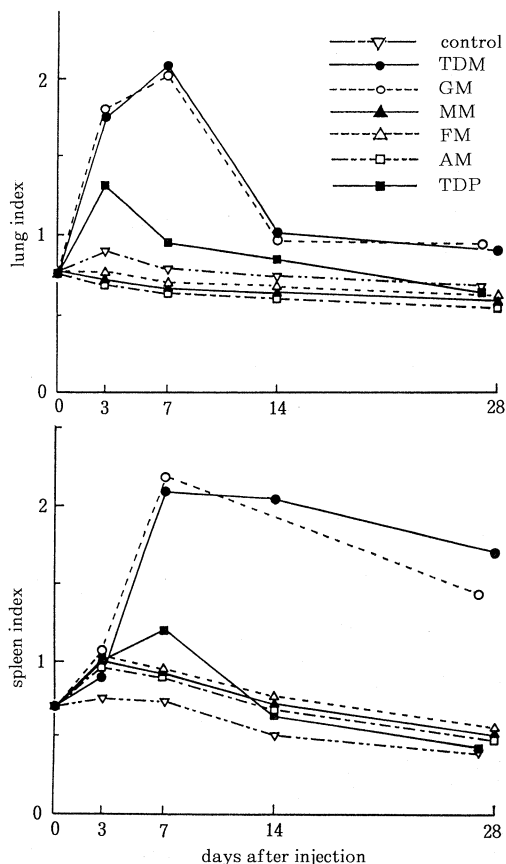


Fig. 3. Time Course for Granuloma Formation by Various Carbohydrate-containing Mycoloyl Glycolipids from *N. rubra* (*Rhodococcus ruber*)

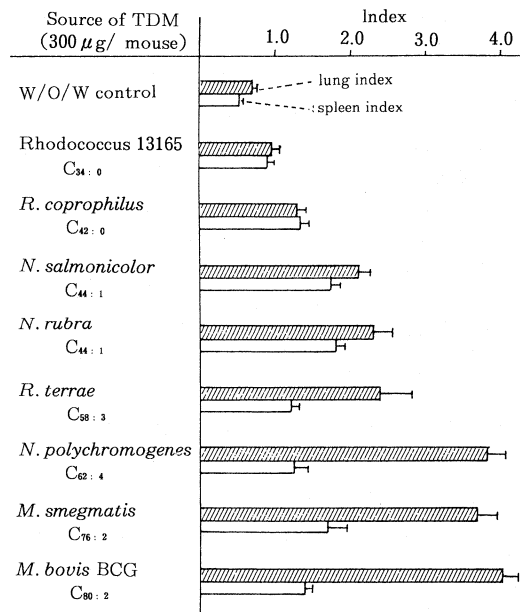


Fig. 4. Granuloma Forming Activity of Various Trehalose Dimycolate (TDMs) Differing in Mycolic Acid Structure in Lungs or Spleen in Mice

抗腫瘍効果を Sarcoma-180 または Meth-A fibrosarcoma のような固型腫瘍退縮活性でしらべたところ、TDM や GM には顕著な活性がみられたにもかかわらず、MM, FM, AM 等には認められず、ここでも糖部分の重要性が明らかとなった。またこれらの糖脂質は投与方法によっても抗腫瘍性に差があり、多量単独投与よ

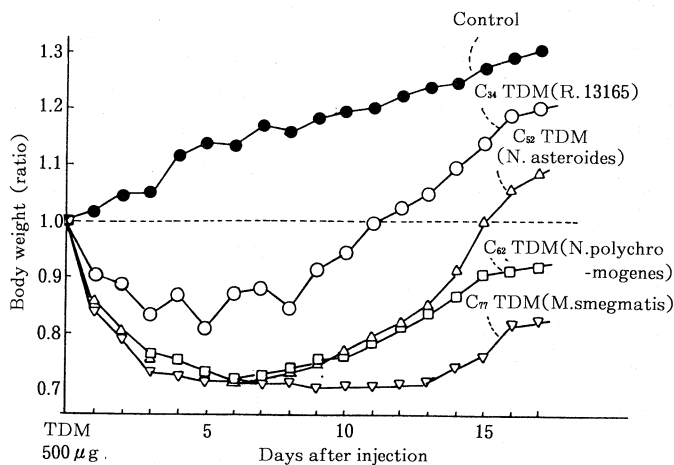


Fig. 5. Toxicity of Various Trehalose Dimycolate (TDMs) Differing in Mycolic Acid Structure in Mice

Table 1. Virulence of *R. equi* strains Containing Different Types of Mycolic Acid in Mice after Intraperitoneal Injection

Strain ^{a)} (Type of mycolic acid)	Body weight (g)	Liver index ^{b)}	Mortality rate	No. of granuloma ^{c)}
Control	26.2±1.3	5.6±0.2		
JCM 1312 (I)	24.3±1.8	7.4±0.6	0/5	4.4± 1.5
JCM 1311 (I)	24.7±0.9	6.5±0.5	0/5	5.6± 1.9
120 (I)	23.2±1.6	6.7±0.3	0/5	4.8± 2.8
128 (I)	22.3±1.8	6.8±0.3	0/5	4.3± 2.9
11 (II)	23.5±1.8	7.0±0.4	0/5	7.6± 4.9
21 (II)	22.7±1.6	7.5±0.8	0/5	23.4± 7.4 ^{e)}
24 (III)	19.3±2.6 ^{d)}	10.7±1.9 ^{d)}	2/5	227.8±36.8 ^{e)}
26 (III)	19.5±2.6 ^{e)}	12.9±1.9 ^{e)}	0/5	135.0±53.8 ^{e)}
33 (III)	16.3±0.4 ^{e)}	10.3±0.9 ^{e)}	5/5	274.0±26.3 ^{e)}
GL5 (III)	17.8±2.6 ^{e)}	12.1±2.0 ^{e)}	3/5	232.0±33.2 ^{e)}
GL6 (III)	16.5±3.7 ^{d)}	9.9±1.1 ^{d)}	3/5	146.4±36.6 ^{e)}

a) The exact number of each strain of bacteria injected into mice ranged from 5.0×10^8 to 8.8×10^8 and control mice were given saline.
b) Liver weight/body weight $\times 100$.
c) Total number in 10 fields under $\times 100$ microscope.
d) Significantly different ($P < 0.05$) from the result of JCM 1312.
e) Significantly different ($P < 0.01$) from the result of JCM 1312.
Group (I) : shorter chain mycolic acid group (C30~38) (less toxic)
Group (II) : intermediate chain length group (C36~42) (intermediate)
Group (III) : longer chain mycolic acid group (C40~50) (highly toxic)

Table 2. Antitumor Effect of Trehalose Dimycolate (TDM) from *N. rubra* against Sarcoma-180 and Meth-A

Tumor	Group	Tumor weight ^c (g)	Inhibition ratio(%)
Sarcoma-180	Control	3.130±0.786	0.0
	w/o/w ^a	2.599±0.395	17.0
	TDM ^b	0.331±0.071 ^d	89.4
Meth-A	Control	4.869±0.582	0.0
	w/o/w ^a	5.600±0.627	-15.0
	TDM ^b	1.800±0.290 ^e	63.0

a : w/o/w, water/oil/water control
b : Ten doses of 25 μ g/10g body weight
c : Average±standard error of eight mice
d : $P < 0.01$ versus control by *F*-test
e : $P < 0.05$ versus control by Student's *t*-test

Table 3. Antitumor Effect of Various Glycolipids from *N. rubra* against Sarcoma-180

Glycolipids ^a	Dose	Inhibition ratio(%)
TDM	30 μ g $\times$ 10	92.5 ^b
GM	30 μ g $\times$ 10	56.8 ^b
MM	30 μ g $\times$ 10	-12.0
FM	30 μ g $\times$ 10	32.0
TDM	300 μ g $\times$ 1	-34.0

a : TDM, trehalose dimycolate ; GM, glucose mycolate ; MM, mannose mycolate ; FM, fructose mycolate
b : $P < 0.01$ versus w/o/w control by *F*-test

りも少量頻回投与が、明らかに強力な腫瘍退縮効果を示した⁷⁾ (Table 2 および Table 3)。

e. *In vivo* におけるサイトカインの誘導：結核感染における免疫応答は、マクロファージの活性化に始まり空洞形成に至るまで、極めて多彩な段階をたどると考えられるが、IL-1 や TNF および IFNs の産生が各種

免疫反応を調節している可能性は極めて大きい。*In vivo* で MGL で priming したのち LPS で刺激したマウス腹腔マクロファージの TNF α 、IFN および IL-1 等のサイトカイン産生能は TDM と GM で顕著に促進されたが、MM、FM および AM では効果が認められなかった^{4) 7) 8)} (Table 4 および Table 5)。

f. *In vitro* におけるマクロファージの活性化：TDM をはじめ一般に MGL は化学的にも疎水性が高く、水溶性溶媒への拡散が困難であるが、microtiter

Table 4. TNF-priming Activity of Various Glycolipids with or with out Eliciting with Lipopolysaccharide

Priming agent	Dose	Eliciting with LPS ^a	TNF activity ^b
w/o/w cont.	0.2ml×10	—	<4
		+	<4
<i>N. rubra</i>			
TDM	30 μg ×10	—	<4
		+	391866
GM	30 μg ×10	—	<4
		+	313912
MM	30 μg ×10	—	<4
		+	14462
FM	30 μg ×10	—	<4
		+	19
<i>R. equi</i>			
GM	30 μg ×10	—	<4
		+	350
<i>R. terrae</i>			
GM	30 μg ×10	—	<4
		+	9090
<i>C. parvum</i>	3mg × 1	+	16962

a : Lipopolysaccharide of *E. coli*(100 μg) was injected intravenously
b : Dilution of serum which showed 50% cytotoxicity on L-929 cells

plate に展着させた MGL にマウスの腹腔マクロファージを加えてインキュベートして活性化することにより、コロニー刺激因子 (CSF)⁴⁾ (Fig. 6) や走化性因子 (CF)⁹⁾ (Fig. 7) および PGE₂ や PGF₁・α, leucotriene C₄ 等プロスタノイドの産生を促進することが明らかとなった。また O₂⁻ 産生の増大が認められたことからマクロファージの刺激伝達系の解析を行ったところ、

MGL 刺激後短時間で inositol phosphate レベルの上昇および diglyceride の増加が認められ、PKC 関与の細胞内刺激伝達系の可能性が見いだされた。

g. 細胞内増殖因子 mRNA の発現：肉芽腫形成の最も特徴的な組織変化は短期間における著しい細胞増殖と浸潤であるがその機構は明らかでない。これを解明するための一つとして TDM 投与後核内遺伝子群 mRNA の発現について検討した。その結果 TDM 投与後 1～12 時間で肉芽腫形成に先立ち c-fos, c-jun および c-myc 等細胞内増殖因子 mRNA の発現がみられた。この活性は肉芽腫形成高反応系マウスの臓器 (肝, 脾および肺) に強く, また肉芽腫形成能の高い TDM や GM 等の糖脂質投与時に顕著な発現がみられた。

以上の結果をまとめて Table 6 に示すが, これらの成績から, TDM をはじめとする MGL は結核感染時に蛋白質抗原とともに宿主に作用して種々の免疫反応を修飾するとともにさらに免疫反応を介して生体に不利な反応 (病原性等) を示したり, また一方で細胞性免疫や抗体産生系を刺激して結核菌感染に対する防御機能を高めることによって生体に有利に働くなど, ミコール酸や糖部分の構造と密接な関連のもとに極めて多彩な生理活性を示すものと考えられる。今後関連分野の進展とともに, これら細胞壁糖脂質による生体防御反応の調節機構の解明に興味が持たれる。

文 献

1) Bloch H. Studies on the virulence of tubercle bacilli. Isolation and biological properties of a constituent of virulent organisms. J Exp Med. 1950 ; 91 : 197-217.

Table 5. Induction of IFN and TNF in Mice Sera Primed with GaGM Prepared in Liposomes, BCG, and *P. acnes* by Elicitation with LPS^{a)}

Priming substance	From	Dose/ mouse	Route	Priming period (days)	IFN (IU/ ml)	TNF (ED ₅₀) ^{b)}	Spleen index (mean±S.E.)
GaGM	Liposomes	300 μg	i.v.	14	5,001	262,259 ^{c)}	2.17±0.51 **
GaGM	Liposomes	300 μg	i.p.	14	2,497	128,975	1.67±0.42 **
— ^{c)}	Liposomes	—	i.v.	14	<160	<40	0.56±0.48
BCG ^{d)}	—	1mg	i.v.	14	12,501	384,364	2.74±0.48 **
<i>P. acnes</i>	—	10mg	i.p.	10	3,750	134,196	1.42±0.12 **

a) IFN and TNF were assayed in mice sera collected 2 hr after eliciting by 25 μg of LPS (*E. coli* 0111 : B4) dissolved in saline on primed mice.
b) ED₅₀, serum dilution 50% cytotoxic on L-929 cells.
c) Liposomes without GaGM.
d) BCG and *P. acnes* were dissolved in saline.
e) Significant difference from liposomes without GaGM value, ** P<0.01.

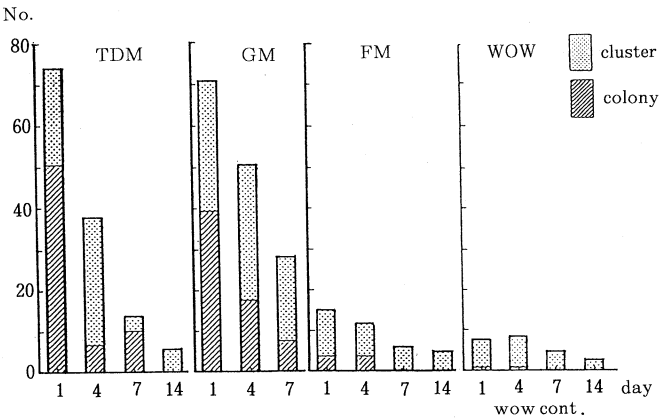


Fig. 6. CSF Activities in Culture Supernatants of Lungs from Mice Injected with Glycolipids. The Clone That consisted of More Than 50 Cells was Counted as a Colony and That with 7 to 50 Cells as a Cluster.

2) Yano I, Tomiyasu I, Kitabatake S, et al. Granuloma forming activity of mycolic acid-containing glycolipids in *Nocardia* and related taxa. *Acta Leprol.* 1984 ; 2 : 341-349.
3) Kaneda K, Sumi Y, Kurano F, et al. Granuloma formation and hemopoiesis

induced by C₃₆₋₄₈ mycolic acid-containing glycolipids from *Nocardia rubra*. *Infect Immun.* 1986 ; 54 : 869-875.
4) Oka S, Natsuhara Y, Kato Y, et al. Structure analysis and macrophage activating ability of mycolic acid-containing glycolipids in Actinomycetales. In Proceeding for 23th Joint Conference on Tuberculosis. The US/Japan Cooperative Medical Science Program, 1988 ; 3-15.
5) Natsuhara Y, Yoshinaga J, Shogaki T, et al. Granuloma-forming activity and antitumor activity of newly-isolated mycoloyl glycolipid from *Rhodococcus terrae* 70012 (Rt. GM-2). *Microbiol Immunol.* 1990 ; 34 : 45-53.
6) Kato M. Site II-specific inhibition of mitochondrial oxidative phosphorylation by trehalose-6, 6'-dimycolate (cord factor) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch Biochem Biophys.* 1970 ; 140 : 379-390.
7) Natsuhara Y, Oka S, Kaneda K, et al. Parallel antitumor, granuloma-forming and tumor-necrosis-factor-priming activities of mycoloyl glycolipids from *Nocardia rubra* that differ in carbohydrate moiety : structure-activity relationships. *Cancer Immunol Immunother.* 1990 ; 31 : 99-106.
8) Fujita T, Sugimoto N, Yokoi F, et al. Induc-

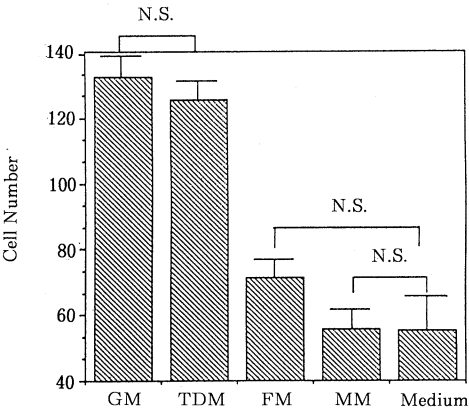


Fig. 7. Comparison of Migration Activity of Culture Supernatants of Macrophages Stimulated with Various Glycolipids. The samples that gave the highest activity in each experiment, as shown in Fig. 1, were re-assayed here, because, the number of migrating cells varied from experiment to experiment. N.S., not significant.

Table 6. Immunomodulating Activities of Various Mycoloyl Glycolipids (MGLs) Differing in Carbohydrate and Mycoloyl Moieties

	TDM(C ₈₀)	TDM(C ₄₄)	TDM(C ₃₂)	GM	MM	FM	AM	control
Toxicity(by body weight loss)	+++	++	-(+)	+	-	-	-	-
Granuloma formation (lungs, spleen and liver)	+++	++	-(+)	++	-	-	-	-
Antitumor activity (<i>in vivo</i>)	+++	++	-	++	-	-	-	-
<i>in vitro</i>)	+++	++	-	++	+(-)	-	-	-
Infection prevention(antibacterial)	+++	++	-	++	-	-	-	-
antiviral)	+++	++	-	++	-	-	-	-
TNF priming (with LPS elicitation)	+++	++	-	++	-	-	-	-
Interferon priming (with LPS elicit)	+++	++	-	++	-	-	-	-
Chemotactic factor generating	+++	++	-	++	-	-	-	-
Colony stimulating factor generating	+++	++	-	++	-	-	-	-
Interleukin- 1 producing	+++	++	-	++	-	-	-	-
O ₂ consumption	+++	++		++	++	++	++	-
O ₂ ⁻ production	+++	++	-	++	++	++	++	-
Diacyl glycerol production		++	-	++	++	++	++	-
IP ₃ liberation		++	-	++	++	++	++	-
Antigenicity	+++	++	++	++	++	++	++	-

tion of interferons (IFNs) and tumor necrosis factor (TNF) in mice by a novel glycolipid trehalose 2, 3, 6'-trimycolate from *Rhodococcus aurantiacus* (*Gordona aurantiaca*). 523-532.

9) Matsunaga I, Oka S, Inoue T, et al. Mycoloyl glycolipids stimulate macrophages to

release a chemotactic factor. FEMS Microbiol Lett. 1990 ; 67 : 49-54.

10) Gotoh K, Mitsuyama M, Imaizumi S, et al. Mycolic acid-containing glycolipid as a possible virulence factor of *Rhodococcus equi* for mice. Microbiol Immunol. 1991 ; 35 : 175-185.

3. ムラミルジペプチド (MDP) および合成関連化合物の免疫活性

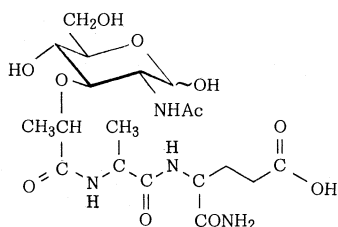
北海道大学免疫科学研究所 東 市 郎

1. はじめに

結核菌が強い免疫増強活性 (アジュバント活性) を有することは周知の事実であるが、そのアジュバント活性因子としてすでにロウ D, 細胞壁骨格, DNA 画分, コードファクター (trehalose-dimycolate, TDM) などが報告されている。さきに筆者ら¹⁾は細胞壁骨格 (cell-wall skeleton, CWS) 画分が最も重要なアジュバント活性因子であること、さらに結核菌をはじめとする細菌細胞壁のアジュバント活性因子がペプチドグリカ

ン部分であることを明らかにした。さらに細胞壁骨格の構成成分のうちペプチドグリカン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を明らかにした。その後、筆者ら²⁾は CWS 画分を用いる癌免疫療法について実験的、臨床的にその有効性を明らかにした。

1974 年、Ellouz ら³⁾は細菌細胞壁の有するアジュバント活性は、ペプチドグリカン構造のうち N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (MDP) であることを天然の細菌細胞壁のペプチドグリカンから精製した MDP および化学的に合成した MDP 標品を用い



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

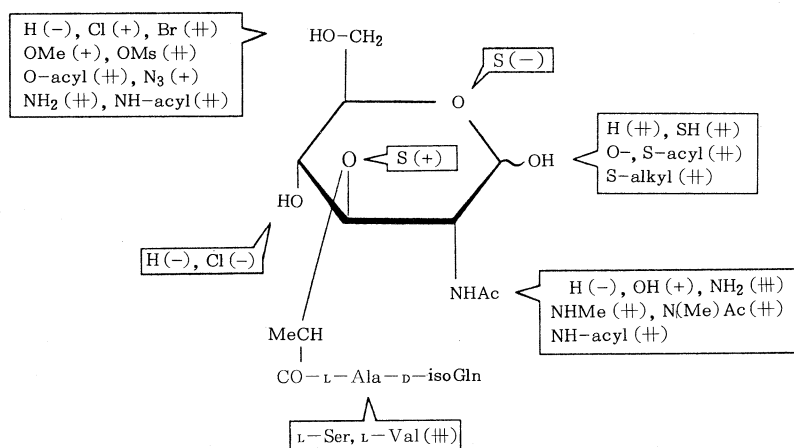


図1 ムラミルジペプチド (MDP) とその関連化合物の構造活性相関

て明らかにした。

2. MDP の生物活性

MDP の発見後、多数の MDP 関連化合物が化学合成され、そのアジュバント活性が検討されたが、その成績は図1に要約される。MDP およびその関連化合物のアジュバント活性以外の生物活性についても検討され、多彩な活性が見出された(表)。MDP を抗原と共に Freund's incomplete adjuvant (FIA) に油中水アジュバントとして動物に投与すると、Freund's complete adjuvant (FCA) に匹敵するアジュバント活性を示す⁴⁾。

一方、MDP を水溶液として用いた場合、そのアジュバント活性の発現はきわめて限られている。この理由として、細菌細胞壁骨格は生物活性を有する多糖や脂質の特殊構造と、さらに交差結合をなす高分子のペプチドグリカンから構成されるのに対し、MDP は分子量 492 の水溶性糖ペプチドであり、水溶液として投与された MDP は容易にかつ速やかに排泄されることに起因することが示唆されている。

MDP 生物活性の中で血中抗体産生、細胞性免疫の誘導などを中心とする免疫応答の増強作用のほかに、ヒト疾患への応用を考えた場合、MDP による宿主の生体防御機構の強化による癌の予防、治療、転移再発の防止、細菌・真菌・ウイルスなどに対する感染の予防・治療などが考えられる。さらに細菌やウイルス、原虫などに対するワクチンの効果の増強や、MDP を結合した新しい合成ワクチンの開発なども試みられている。

1) MDP の親油性誘導体の生物活性

MDP は水溶液として *in vivo* に投与された場合、きわめて速やかに排泄され、後述する細菌に対する宿主の非特異的感染防御能の増強など限られた生物活性のみを示すにとどまり、免疫アジュバント活性に関しても十分な活性を期待するには MDP を Freund 型の油中水エマルジョンとして投与することが必要である。

MDP 誘導体の各種脂肪酸誘導体が数多く合成され、その生物活性が検討された。筆者らは MDP のムラミン酸の C-6 位および C-2 位の水酸基、またはアミノ基に炭素数 2~80 の各種脂肪酸を導入したアシル誘導体を合成し、アジュバント活性、細菌に対する宿主の

表 *In vivo* におけるムラミルジペプチド (MDP) の生物活性

1. 免疫応答調節作用
 - 1) 体液性免疫応答の増強と抑制
 - 2) 細胞性免疫応答の増強
 - 3) ワクチンへの応用
人工ワクチンおよび合成ワクチンへの応用
2. 細網内皮系刺激作用
3. 一過性の白血球減少ならびにその後の白血球増加, 単球増多症誘導
4. インターフェロン誘導因子の作用を高める作用
5. 宿主の自然抵抗性の強化
 - 1) 微生物感染に対する宿主の抵抗性増強
 - 2) 腫瘍の増殖に対する宿主の抵抗性増強
6. 実験自己免疫疾患の誘導
 - 1) 実験アレルギー性脳脊髄炎
 - 2) アジュバント関節炎
 - 3) 睪丸炎
 - 4) ブドウ膜網膜炎
7. 発熱作用
8. 細菌内毒素の毒性に対する感受性を高める作用
9. 睡眠の促進ないし抑制
10. 類上皮肉芽腫形成
11. 結核菌などで感作した局所に出血壊死性炎を惹起する作用

感染防御能の増強活性, 抗腫瘍活性についても検討した。C-6 位または C-2 位に脂肪酸を導入した場合, モルモットでの遅延型アレルギー誘導に対するアジュバント活性はいずれも保持されるが, 血中抗体産生に対するアジュバント活性は導入脂肪酸の鎖長に応じて減少し, とくに炭素数 32, 48, 80 のコリノミコール酸, ノカルドミコール酸, ミコール酸を C-6 位または C-2 位に導入したイシル誘導体では著明な活性の減弱が認められた。

MDP の C-6 位のアシル誘導体では炭素数 2~30 の脂肪酸 (とくにステアリン酸) の導入により MDP と同等以上の感染防御活性が認められたが, C-2 位の

アミノ基に脂肪酸 (ステアリン酸) を導入した MDP の 2-ステアロイルアミノ誘導体では感染防御活性が認められなかった。抗腫瘍活性については, C-6 位にコリノミコール酸, ノカルドミコール酸, ミコール酸やキノン酸 (QS-10) を導入したアシル誘導体にマウス同系移植腫瘍系において活性が認められた。

2) MDP の感染防御活性

i) 細菌感染に対する効果

すでに BCG-CWS など細菌細胞壁画分が細菌感染に対する宿主の非特異的感染抵抗性を増強することが報告されているが, 1977 年 Chedid ら⁵⁾は MDP およびその同族体 22 種についてマウスにおける *Klebsiella pneumoniae* 感染に対する非特異的感染抵抗性の増強活性を検討し, 5 検体に有効性を認めた。これら MDP 同族体は静脈内, 皮下, 筋肉内, 経口いずれの投与経路でも活性を示した。

さらに MDP 同族体のマウスやモルモットにおける血中抗体産生や遅延型アレルギーの誘導を指標としたアジュバント活性と *K. pneumoniae* 感染に対する宿主抵抗性増強活性とは必ずしも平行せず, これら実験系における MDP 同族体の作用機作が異なることが示唆された。その後 MDP 誘導体を中心に抗感染アジュバントの開発に関して多くの研究が行われた。

3. アシルー MDP 誘導体 [MDP-Lys(L18)] の開発

筆者ら⁶⁾⁻⁸⁾は MDP のアシル誘導体 54 種を中心に, STDddY マウスに *Escherichia coli* 77156 株を皮下感染して得られる肺血症型実験モデルを用いてスクリーニングし, 2 種のステアロイル MDP 誘導体, 6-O-stearoyl-MDP (L18-MDP) および N^{α} -MDP- N^{ϵ} -stearoyl-L-lysine [MDP-Lys(L18)] を選抜した (図 2)。

その一連の研究で, MDP のアシル化の際アシル基の炭素数の長さによって *E. coli* 感染に対する感染防御活性が異なり, C_{16} ~ C_{18} の脂肪酸でアシル化した MDP 誘導体に最も強い感染防御活性が認められた。

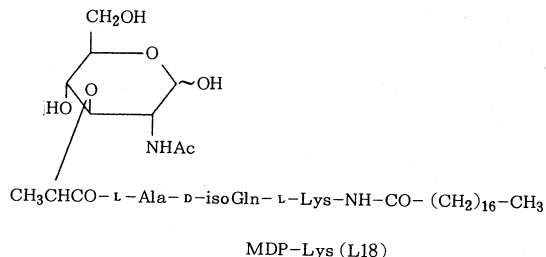
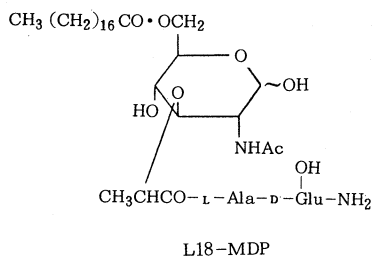


図 2 L18-MDP および MDP-Lys(L18) の化学構造

上記2種のステアロイルMDP誘導体は感染抵抗性が多形核白血球(PMN)に依存すると考えられる大腸菌、ブドウ球菌、カンジダなどに対し有効であったが、感染抵抗性がマクロファージに依存すると考えられるリステリア、サルモネラ感染には無効であった。ステアロイルMDPは上記細菌感染に対し24時間前に投与した場合最も強い活性が示された。さらに免疫低下動物を用いた実験モデルとして加齢動物、サイクロホスファミド処理動物、X線照射動物、コーチゾン処理動物を用いて肺血症型感染または局所感染動物に対するステアロイルMDPの有効性が明らかにされた。

また、化学療法剤との併用実験において、*E. coli*感染に対するセファゾリン、*P. aeruginosa*感染に対するゲンタマイシン、*S. aureus*に対するペニシリン、*C. albicans*に対するアンホテリシンの治療効果はステアロイルMDPとの併用により著しく向上し、両者の相乗効果が認められた。

筆者らはマウスにおける日和見感染モデルを用いてL18-MDPおよびMDP-Lys(L18)の免疫低下宿主における感染抵抗性の増強能を検討した。コーチゾン処理によって免疫能を低下させたBALB/cマウスに*Corynebacterium kutscheri*を感染させるとマウスは感染死するが、感染1日前にアジュバントを投与した場合、正常マウス(コーチゾン非投与)と同様*C. kutscheri*感染に対し抵抗性を示す。とくにMDP-Lys(L18)が強い宿主抵抗性の増強活性を示した。これらステアロイルMDP誘導体の作用機作として多形核白血球の遊走、貪食、過酸化水素産生などの機能亢進があげられる。

1) ウイルス感染に対する効果

筆者ら⁹⁾はMDP-Lys(L18)経鼻投与によってマウスにおけるインフルエンザウイルス感染に対する強い非特異的抵抗性の増強を認めた。C57BL/6マウスにセンダイウイルス感染1日前にMDP-Lys(L18)やL18-MDPを経鼻腔投与すると、センダイウイルスの経鼻腔感染に対して強い宿主抵抗性の増強活性を示す。MDP-Lys(L18)のセンダイウイルスに対する宿主抵抗性の増強活性は経鼻腔投与が最も効果的で、静脈内または腹腔内投与ではその活性が弱い。MDP-Lys(L18)のみの経鼻腔投与によってはインターフェロンの産生は認められないが、MDP-Lys(L18)の経鼻腔投与後センダイウイルスの経鼻腔感染によって肺局所において高力価のインターフェロンの産生が認められた。

さらにこれらMDP-Lys(L18)のサイクロホスファミド投与により免疫能の低下したマウスにおけるヘルペスI型ウイルスに対する感染防御活性についても明らかにされた¹⁰⁾。

2) サイトカイン誘導活性と白血球増多活性

MDP-Lys(L18)は*in vivo*または*in vitro*の系に

において主としてマウスおよびヒト単球系に作用して、IL-1, IL-6, G-CSF, M-CSF, TNF, IFN- γ などを誘導することが明らかにされた¹¹⁾。中島ら¹²⁾¹³⁾はサルにMDP-Lys(L18)を1mgずつ10日間連続投与することにより白血球、とくに好中球、マクロファージおよび単球数の著しい増加が認められることを見出した。さらに血小板数の著しい増加も認められた。またX線照射やシクロホスファミド投与したマウスにおいても低下した白血球数がMDP-Lys(L18)の投与によって速やかに回復することが明らかにされた。これら造血機能に対するMDP-Lys(L18)の作用は、さきに述べたMDP-Lys(L18)によって誘導されたIL-6, G-CSF, M-CSFによるものと推察されている。

3) MDP-Lys(L18)の臨床応用

第I相、第II相試験を経て、MDP-Lys(L18)の臨床応用は化学療法、放射線治療によって減少した癌患者の白血球の回復に応用された。

各種悪性腫瘍患者の癌化学療法および放射線療法による白血球減少に対する後期第II相試験においてMDP-Lys(L18)の白血球減少回復効果が認められ、至適用量は1日200 μ g/manと考えられた。

放射線治療による癌患者の白血球減少に対する効果に関する第III相試験では、イソシンを対照とした無作為比較試験を実施した¹⁴⁾。投与14日目(投与終1日後)の有効率は、MDP-Lys(L18)群が72.3%(32/44)およびイソシン群が54.0%(20/37)であり有意差は認められなかったが、MDP-Lys(L18)群の方が高率であった。

一方そのときの著効率での比較では、MDP-Lys(L18)群が61.4%およびイソシン群が37.8%であり、MDP-Lys(L18)群が有意に優れていた。白血球のみならずMDP-Lys(L18)の投与によって、放射線療法によって減少した血小板数も増加した。また、各種固型腫瘍患者における癌化学療法剤による白血球減少に対してもMDP-Lys(L18)の回復効果が広く確認された^{15)~17)}。

グルタチオンを対照とした無作為比較試験において、種々の癌化学療法剤による白血球減少に対してMDP-Lys(L18)はグルタチオンに比し回復効果が有意に優れていることが明らかにされた¹⁵⁾。また、MDP-Lys(L18)の低用量(20 μ g)を対照とした二重盲検比較試験において対照群の優効率(「有効」以上)は23.2%(13/56)であったのに対し、200 μ g群では50.0%(31/62)と有意に高かった¹⁶⁾。

以上のようにMDP-Lys(L18)は放射線療法において放射線照射を中断することなく治療を行うことが可能であることを示唆しており、また癌化学療法剤使用による白血球減少を速やかに回復させることが可能なことを

示した。さらに興味深いことはMDP-Lys(L18)投与によって好中球, 単球のみならず血小板数の回復も可能なことである。これらの臨床成績は悪性腫瘍患者における放射線治療, 化学療法, 支持療法剤としてMDP-Lys(L18)が臨床上有効なものと考えられる。

4) MDP-Lys(L18)の副作用

第Ⅱ相, 第Ⅲ相試験並びに一般臨床試験において行われた副作用判定において, 704例中, 副作用は275例(39.1%)に認められ, その主なものは発熱(217例)および注射部位反応(96例)であった。症状の内訳では発熱, 悪寒, 戦慄, 全身倦怠感などの全身症状が230件(32.7%)であり, その他食欲不振, 悪心などの消化器症状が13件(1.8%), 発疹, 掻痒感などの皮膚症状が31件(1.8%), 疼痛, 発赤, 紅斑, 硬結などの注射部反応231件(32.8%)などであり, これらの症状の大部分は軽, 中等度であり, 一過性のものではあった。

4. おわりに

MDP-Lys(L18)は生体においてIL-1, IL-6, G-CSF, M-CSF, IFNなどのサイトカインを誘導することにより, 生体の免疫機能の調節を行っており, その際必ずしも過度の免疫反応を誘導しないことも臨床的に明らかにされている。ここに例示したように, MDP-Lys(L18)は減少した好中球, 単球数のみならず血小板数の回復にも有効であり, 担癌患者など二次的免疫不全患者の免疫能改善に重要な役割を果たすものと考えられる。

文 献

- 1) Azuma I, Kishimoto S, Yamamura Y, et al. Adjuvant activity of mycobacterial cell wall. *Jpn J Microbiol.* 1971; 15: 193-197.
- 2) Azuma I. Immunological and biochemical properties of bacterial fractions and related compounds with special reference to BCG cell wall skeleton and *N. rubra* cell wall skeleton. *In: Molecular and Cellular Networks for Cancer Therapy*, Eds Yamamura Y, Azuma I, Excerpta Medica, Tokyo, 1989, 83-104.
- 3) Ellouz F, Adam A, Ciorubar R, et al. Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan subunits. *Biochem Biophys Res Commun.* 1974; 59: 1317-1325.
- 4) Adam A, Lederer E. Muramyl peptides, immunomodulator, sleep factors, and vitamins. *Med Res Rev.* 1984; 4: 111-152.
- 5) Chedid L, Parant M, Lefrancier P, et al. Enhancement of nonspecific immunity to *Klebsiella pneumoniae* infection by a synthetic immunoadjuvant (*N*-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine) and several analogs. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1977; 74: 2089-2093.
- 6) Kusumoto S, Inage M, Shiba T, et al. Synthesis of long chain fatty acid esters of *N*-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine in relation to antitumor activity. *Tetrahed Letts.* 1978; 49: 4899-4902.
- 7) Matsumoto K, Otani T, Une T, et al. Stimulation of nonspecific resistance to infection induced by muramyl dipeptide analogs substituted in the γ -carboxyl group and evaluation of N^α -muramyl dipeptide- N^ϵ -stearoyllysine, *Infect Immun.* 1983; 39: 1029-1040.
- 8) Matsumoto K, Osada Y, Une T, et al. Antinfectious activity of the synthetic muramyl dipeptide analogue MDP-Lys(L18), *In: Immunostimulants: Now and Tomorrow*, Eds Azuma I, Jollès G, Japan Sci Soc Press, Tokyo/Springer-Verlag, Berlin, 1987, 79-97.
- 9) Ishihara C, Hamada N, Yamamoto K, et al. Effects of muramyl dipeptide and its stearoyl derivatives on resistance to Sendai virus infection in mice. *Vaccine.* 1985; 3: 370-374.
- 10) Ishihara C, Iida J, Mizukoshi N, et al.: Effect of N^α -acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl- N^ϵ -stearoyl-L-lysine on resistance to herpes simplex virus type 1 infection in cyclophosphamide-treated mice. *Vaccine.* 1989; 7: 309-313.
- 11) Azuma I. Inducer of cytokines *in vivo*: Overview of field and romurtide experience. *Int J Immunopharm.* 1992; 14: 487-496.
- 12) Nakajima R, Ishida Y, Akahane K, et al. Stimulatory effect of romurtide on hematopoiesis in monkeys. *Arzneim-Forsch/Drug Res.* 1991; 41: 60-65.
- 13) Nakajima R, Ishida Y, Yamaguchi F, et al. Beneficial effect of muroctasin on experimental leukopenia induced by cyclophosphamide or irradiation in mice. *Arzneim-Forsch/Drug Res.* 1988; 38: 986-992.
- 14) 坂本澄彦, 大川智彦, 小川暢也: 癌患者の放射線

療法中白血球減少に対するムロクタシンの治療効果、
新薬と臨床. 1989 ; 38 : 1407~1422.

15) 螺良英郎, 仁井谷久暢, 小川暢也, 他 : ムロクタシン
[MDP-Lys (L18)] の白血球減少回復促進効果
に対する第Ⅲ相比較試験—肺癌化学療法施行例—,
Progress in Medicine. 1988 ; 8 : 2427~2442.

16) 古瀬清行, 柳内 登, 桜井与志彦, 他 : 肺癌の癌化
学療法時白血球減少に対するムロクタシン [MDP-
Lys(L18)] の回復促進効果—多施設二重盲検 2 用
量比較試験—, Progress in Medicine. 1989 ; 9 :
631~649.

4. 結核菌菌体成分の抗腫瘍活性 — DNA を中心として —

国立予防衛生研究所 片 岡 哲 朗・山 本 三 郎
山 本 十糸子・徳 永 徹

結核菌菌体が多彩な生物学的活性を有することから、
その抗腫瘍作用についても検討がなされ、すでに 30 数
年前に幾つかの実験成績が発表されている¹⁾²⁾。しかし、
1970 年代はじめにいわゆる“癌の免疫療法”の主役と
して BCG などが脚光を浴びた背景には³⁾、(1) 近交系
実験動物の可移植性同系腫瘍系が確立され、中でも
Zbar らによりモルモットの肝癌において、腫瘍細胞と
BCG との混合接種による腫瘍増殖の抑制⁴⁾、BCG の腫
瘤内投与による腫瘍の退縮⁵⁾、それに随伴して特異免疫
が誘導されるというみごとなモデルが示されたこと、(2)
ほぼ時を同じくして Mathé が小児急性白血病患者に⁶⁾、
Morton が悪性黒色腫瘍患者に⁷⁾ BCG を投与し著効例
を報告したことが挙げられよう。

この後 10 年間ほど、世界的規模で、多種多様なプロ
トコールによりほとんど全種類の腫瘍に対する BCG 療
法が試みられた。現在膀胱癌等に対して依然として用い
られ続けているが、ひところの過大な期待は鎮まり、着
実な研究が行われている現状である。

この間に基礎的研究により、BCG の抗腫瘍作用の機
序の解明が進められた。その結果、RES の活性化など
宿主に非特異的免疫増強をもたらし、宿主—腫瘍の関係
を宿主優位に変えることにより、二次的に特異的抵抗性
の獲得につながるということが分かった⁸⁾。一方、本シ
ンポジウムの内容からも明らかなように、結核菌の有す
る生物学的活性がそれぞれ成分に分けて研究され、抗腫
瘍活性についても Methanol extract residue (MER)、
コードファクターおよび P₃、各種水溶性アジュバント
(WSA) 類などの物質がつぎつぎと取り上げられたが、
臨床においては初期に MER 最近では細胞壁骨格 (CW-
S)、ムラミルジペプチド (MDP) とその誘導体がアジュ
バント療法としてひろく試用された。とくに CWS、
MDP は徳永らによって開発された BCG の DNA 画分
(MY-1) とともに、わが国で発展させられた物質であ
る。

免疫力の低下した担癌患者に、BCG 生菌を投与する
ことに対する危惧は当初から言及されていた。一方 BCG

Table 1. The 45mer Oligonucleotides with Sequence from cDNA of BCG Proteins

Designation	Gene	Nucleotide residue	Base sequence (5'—3')			
BCG-A1		327—371	AACGAGGGGC	ATGACCCGGT	GCGGGGCTTC	TTGCACTCGG CATAG
BCG-A2		694—738	AAAAGAAGTG	GGGTGCCCC	ACGATCACCA	ACGATGGTGT GTCCA
BCG-A3	64 kDa	735—779	TCCATCGCCA	AGGAGATCGA	GCTGGAGGAT	CCGTACGAGA AGATC
BCG-A4	protein	813—857	ACCGATGACG	TCGCCGGTGA	CGGCACCACG	ACGCCACCCG TGCTG
BCG-A5	(Antigen-A,	1145—1189	TATGCGGTTC	GACAAGGGCT	ACATCTCGGG	GTACTTCGTG ACCGA
BCG-A6	2431 bp)	1552—1596	ACGAGACCAC	CATCGTCGAG	GGCGCCGGTG	ACACCGACGC CATCG
BCG-A7		1962—2006	GCCGAGAAGG	TGCGCAACCT	GCCGGCTGGC	CACGGACTGA ACGCT
BCG-A8		2371—2415	ACCGAGAACA	GCCACGCAGT	CGTGTAGGCA	ACCTTTGGCC GCTGT
BCG-M1	MPB-70	1— 45	GGCGATCTGG	TGGGCCCGGG	CTGCGCGGAA	TACGCGGCAG CCAAT
BCG-M2	(492 bp)	151—195	TCGGTGACAG	GAATGTGCGA	GGACCCGGTC	GCGGTGGCGG CCTCG
BCG-M3		410—455	ACGCCGACGT	CGTCTGTGGT	GGGGTGTTCTA	CCGCCAACGC GACGG
BCG-α 1	α-Antigen	348—392	CGACTACAAC	GGCTGGGATA	TCAACACCCC	GGCGTTTCGAG TGGTA
BCG-α 2	(1165 bp)	757—801	GACCCGGCAT	GGGAGCGCAA	CGACCTACG	CAGCAGATCC CCAAG

Table 2. Regression of IMC Tumor in Oligonucleotide-treated CDF 1 Mice

Exp.	Sample	No. of cured mice ^{a)} /No. of mice tested	Tumor weight (mean $\pm$ SD) (g)	Growth inhibition ^{b)} (%)	Student's <i>t</i> test
I	Saline	0/5	1.13 $\pm$ 0.53	0	
	BCG-A 2	0/5	0.82 $\pm$ 0.20	27.0	NS ^{c)}
	BCG-A 4	1/5	0.28 $\pm$ 0.20	75.0	<i>P</i> <0.05
	BCG-A4a	1/5	0.36 $\pm$ 0.26	68.0	<i>P</i> <0.05
	BCG-A4b	0/5	1.18 $\pm$ 0.27	-4.0	NS
II	Saline.	0/7	1.45 $\pm$ 0.85		
	BCG-A 1	0/7	1.27 $\pm$ 0.60	12.4	NS
	BCG-A 3	1/5	0.42 $\pm$ 0.37	71.0	<i>P</i> <0.05
	BCG-A 5	0/7	0.96 $\pm$ 0.41	33.8	NS
	BCG-A 6	0/7	0.62 $\pm$ 0.41	57.2	<i>P</i> <0.05
	BCG-A 7	1/7	0.58 $\pm$ 0.44	60.0	<i>P</i> <0.05
	BCG-A 8	0/7	0.91 $\pm$ 0.44	37.2	NS
	BCG-M 1	0/7	1.00 $\pm$ 0.58	31.0	NS
	BCG-M 3	2/6	0.65 $\pm$ 0.69	55.2	<i>P</i> <0.05
	BCG- α 1	3/7	0.11 $\pm$ 0.16	92.4	<i>P</i> <0.01
	BCG-DNA ^{d)}	2/7	0.28 $\pm$ 0.16	80.7	<i>P</i> <0.01

a) Number of mice in which tumor eventually disappeared.

b) Growth inhibition (%) = (1 - test/control) $\times$ 100.

c) NS, not significant.

d) DNA extracted from BCG by Marmur's method.

の作用機序が細胞レベルで解明されたことから、マクロファージ活性化作用、NK細胞増強作用、インターフェロン (IFN) を筆頭とする各種サイトカイン産生誘発活性などを指標として、種々の菌体成分やその誘導体が単離精製あるいは合成されて検討が続けられている。

われわれも例えば B 30-MDP の抗腫瘍免疫誘導におけるアジュバント効果⁹⁾¹⁰⁾についてなど、いくつかの物質について実験動物腫瘍系、あるいは *in vitro* での検討を行ってきたが、矢野教授、東教授による前出の報告と重複を避けるため、われわれグループが独自に開発し精力的に研究を行っている BCG の DNA に話題をしぼって、最新の知見を紹介することにしたい。

BCG 由来単鎖 DNA (MY-1)¹¹⁾ の免疫学的活性については、その抗腫瘍活性も含めて第 61 回学会総会 (1986 年) のシンポジウムで山本により報告された¹²⁾。その後、臨床試験においてはほとんど毒性の示されないことから、種々の癌患者に対して治療実験も進行中で一部著効例なども認められている¹³⁾¹⁴⁾。一方 *in vivo*, *in vitro* の試験において、IFN- α/β , - γ (マクロファージ活性化因子: MAF) 産生の強力な誘発剤であり、NK 活性の数倍の増強をもたらす作用が知られた¹⁵⁾¹⁶⁾。作用機序解明をめざして、種々検討を重ねている。

活性を担う構造をみつけるために、まず種々のオリゴヌクレオチド (オリゴ DNA) を合成しその構造と活性

Table 3. Augmentation of NK Cell Activity by the Synthetic 45-mer Oligonucleotides

Oligonucleotide	NK activity (% lysis $\pm$ 1.S.D.)
BCG-A 1	6.5 $\pm$ 1.1
BCG-A 2	5.5 $\pm$ 1.0
BCG-A 3	33.4 $\pm$ 5.0
BCG-A 4	42.1 $\pm$ 3.3
BCG-A 5	10.4 $\pm$ 1.9
BCG-A 6	30.4 $\pm$ 4.8
BCG-A 7	32.4 $\pm$ 5.4
BCG-A 8	11.6 $\pm$ 1.9
BCG-M 1	6.1 $\pm$ 1.9
BCG-M 2	9.5 $\pm$ 2.1
BCG-M 3	26.9 $\pm$ 4.6
BCG- α 1	65.6 $\pm$ 9.8
BCG- α 2	10.5 $\pm$ 1.9
Medium alone	5.4 $\pm$ 1.5

BALB/c mouse spleen cells (1×10^7) were incubated with or without 50 μ g of the 13 kinds of 45 mer oligonucleotides in 1 ml RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS at 37C for 20 hr. The cells were assayed for NK cell activity at an E/T ratio of 50.

の相関を調べることにした^{17)~19)}。MY-1 の分子サイズの分布をみると 45 mer 附近にピークがあるので¹⁷⁾、この大きさのオリゴ DNA を合成することにした。す

Table 4. The 30 mer and 15 mer Oligonucleotide Fragments of BCG-A 4

Designation	Base sequence (5'-3')				
BCG-A 4	ACCGATGACG	TCGCCGGTGA	CGGCACCACG	ACGGCCACCG	TGCTG
A 4 a	ACCGATGACG	TCGCCGGTGA	CGGCACCACG		
A 4 b		GGTGA	CGGCACCACG	ACGGCCACCG	TGCTG
A 4 c	ACCGATGACG	TCGCC			
A 4 d		GGTGA	CGGCACCACG		
A 4 e				ACGGCCACCG	TGCTG
A 4 f	TGACG	TCGCCGGTGA			
A 4 g		TCGCCGGTGA	CGGCA		

Table 5. NK Cell Activation and MAF- and IFN -induction by the 30 mer and 15 mer Oligonucleotides

Oligonucleotide	NK activity (% lysis±S.D.)	MAF activity (% lysis±S.D.)	IFN titer (IU/ml)
BCG-A 4	41.6±1.8	24.2±0.5	256
A 4 a	42.0±3.0	25.0±0.8	256
A 4 b	17.0±1.2	13.2±0.9	16
A 4 c	22.4±2.1	5.6±1.2	<8
A 4 d	14.6±1.7	4.6±0.6	<8
A 4 e	18.8±2.3	5.7±0.7	<8
A 4 f	16.7±1.9	ND ^{a)}	ND
A 4 g	19.6±2.4	ND	ND
BCG-A 2	14.9±1.8	9.2±0.9	16
Medium alone	13.3±2.5	3.3±2.4	<8

a) ND, not done.

BALB/c mouse spleen cells (1×10^7) were incubated with or without 100 μ g of the oligonucleotide in 1 ml of RPMI 1640 medium at 37°C for 20 hr. Then, the cells were assayed for NK cell activity, and the culture supernatants were assayed for MAF and IFN activities.

Table 6. Effect of Anti-interferon Antibodies on the Activation of NK Cells and the Induction of MAF and IFN by BCG-A4a

Antibody	NK activity (% lysis)	MAF activity (% lysis)	IFN activity (IU/ml)
None (BCG-A4a)	58.1	27.4	256
Anti-IFN α/β	8.5	26.1	16
Anti-IFN β	54.2	26.5	128
Anti-IFN γ	57.6	3.2	128
Medium alone	7.4	5.5	<8

BALB/c spleen cells (1×10^7 /ml) were incubated with 100 μ g/ml of BCG-4Aa in the presence of 500 NU/ml of either anti-IFN α/β , anti-IFN β or anti-IFN γ antibody at 37 °C for 20 hr. The cells were harvested and tested for NK cell activity against YAC-1 target cells. MAF activity and IFN titer in the culture supernatants were also tested.

なわち BCG が産生する 65 KDa 熱ショック蛋白²⁰⁾, ツベルクリン活性物質である MPB-70 蛋白²¹⁾, および α 抗原²²⁾をそれぞれコードする cDNA の塩基配列から,

Table 1 に示すように任意の部分を選んで 13 種類のオリゴ DNA を合成した。
これらの抗腫瘍活性を調べると, Table 2 に示すごと

く 6/13 に腫瘍の増殖を阻止する活性がみられた。NK 活性増強作用についても、同じくこれら 6 種が活性を示した (Table 3)。この活性のないオリゴ DNA は、用量を変えても、あるいは E/T 比を上げててもその作用が認められなかったことから、本質的に活性を示す構造と不活性な構造とに分かれることが明らかとなった。

MY-1 の場合と同じく、抗腫瘍活性が IFN 産生誘導活性および NK 増強活性と平行しているのを、以後の解析はこれら *in vitro* の活性を指標として行うこととした。次に Table 4 に示すごとく、活性のある A4 の 5' 側あるいは 3' 側から 30mer の配列を、さらに種々の部位から 15mer の配列を選んで合成しその活性について調べたところ、NK 活性増強、IFN あるいは MAF 産

生誘発能は、A4a が最大で、他では低いか全く認められなかった (Table 5)。IFN に対する抗体を加えて反応させると、MY-1 で示されたと同じく¹⁶⁾、IFN- α 産生の誘発が NK 活性増強につながることを、MAF 活性が IFN- γ によることなどが再確認され (Table 6)、このオリゴ DNA が示す活性が、MY-1 の活性と等しいことが示唆された。

5' 側の 30mer に活性が偏ったことから、この中に活性構造が存在するものと仮定して先の 13 種の合成オリゴ DNA 中で活性の示された 6 種と比較検討した。その結果、6 mer のパリンδροーム配列の有無が、活性、不活性を左右していることが分かった。すなわち、パリンδροーム配列を有するオリゴ DNA は、抗腫瘍活性を有するとともに NK 増強活性を示すことが認められた (Fig.)。このことは、さらに不活性の A2a の中にこのパリンδροーム配列を組み込んで合成して、その活性を調べたところ、A4a とまったく同等の NK 増強活性を示した (Table 7) から確認された。

しかし、詳細に検討してみると、GACGTC の他に AACGTT, AGCGCT, GCGGCC, TCGCGA など活性を示すパリンδροーム配列が見つかった一方で、Fig. の M1 のように ACCGGT, AATATT, GCGCGC といった同じ 6 mer パリンδροーム配列を含むオリゴ DNA でも活性を示さないものも存在した¹⁷⁾¹⁹⁾。

以上の成績から、特定の塩基配列を有する 6 mer パリンδροーム構造が、DNA の生物学的活性の発現に必須であることが明らかとなった。さらにオリゴ DNA の活性の機序について、分子生物学的手法を用いて追求中である。

文 献

- 1) Biozzi G, Stiffel C, Halpern B N, et al.
Effect de l'inoculation du bacille de Carmett

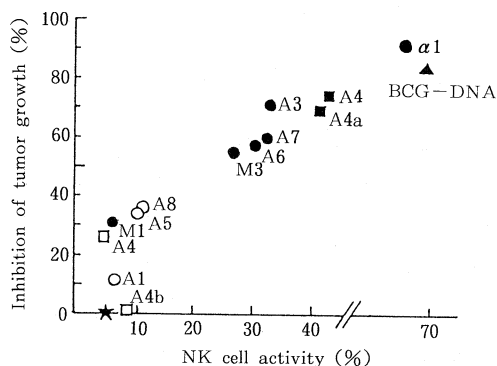


Fig. Correlation between Antitumor Activity and NK Cell-Augmenting Activity induced by the Oligonucleotides

Closed circles and squares (● & ■) represent the Oligonucleotides with palindromic sequences and open circles and squares (○ & □) represent those without a palindromic sequence. For comparison, values obtained by cultivation with DNA fraction extracted from BCG by Marmur's method (▲) and with medium alone (★) are presented.

Table 7. Effect of Introduction of Palindrome Sequence on the NK-Stimulatory Activity of Oligonucleotides

Name	Sequence	NK Activity (% Lysis $\pm$ SD)
Medium		16.6 $\pm$ 2.5
BCG-M2a	TCGGTG CAGGGA ATGTCG CAGGAC CCGGTC	15.4 $\pm$ 2.3
M2a-GAC	 GACGTC	31.0 $\pm$ 4.8
M2a-AGC	 AGCGCT	27.2 $\pm$ 4.0
M2a-AAC	 AACGTT	33.9 $\pm$ 4.1
M2a-ACC	 ACCGGT	19.0 $\pm$ 1.5
BCG-A4a	ACCGAT GACGTC GCCGGT GACGGC ACCACG	35.8 $\pm$ 3.0
A4a-AGC	 AGCGCT	36.4 $\pm$ 2.0
A4a-AAC	 AACGTT	38.4 $\pm$ 1.2
A4a-ACC	 ACCGGT	16.4 $\pm$ 1.8

- Guéin sur la developpement de la tumeur ascitique d'Ehrlich chez la souris. C R Soc Biol. 1959 ; 153 : 987.
- 2) Old LJ, Benacerraf B, Clarke DA, et al. The role of the reticuloendothelial system in the host reaction to neoplasia. Cancer Res. 1961 ; 21 : 1281.
 - 3) Borsos T, Rapp HJ. Conference on the use of BCG in therapy of cancer. NCI Monograph, No. 39 (1973).
 - 4) Zbar B, Bernstein ID, Tanaka T, et al. Tumor immunity produced by the intradermal inoculation of living tumor cells and living *Mycobacterium bovis*(strain BCG). Science. 1970 ; 170 : 1217.
 - 5) Zbar B, Tanaka T. Immunotherapy of cancer : Regression of tumors after intralesional injection of living *Mycobacterium bovis*. Science. 1971 ; 172 : 271.
 - 6) Mathé G. Active immunotherapy. Adv Cancer Res. 1971 ; 14 : 1.
 - 7) Morton D, Eilber FR, Malmgren RA. Immunological factors which influence response to immunotherapy in malignant melanoma. Surgery. 1970 ; 68 : 158.
 - 8) Tokunaga T, Kataoka T, Nakamura RM, et al. Mode of antitumor action of BCG. Gann Monograph Cancer Res, 1978 ; 21 : 59.
 - 9) Kataoka T, Tokunaga T. A synthetic adjuvant effective in inducing antitumor immunity. Jpn J Cancer Res. 1988 ; 79 : 817.
 - 10) Kataoka T, Kinomoto M, Takegawa M, et al. Effect of a synthetic adjuvant for inducing anti-tumour immunity. Vaccine. 1991 ; 9 : 300.
 - 11) Tokunaga T, Yamamoto H, Shimada S, et al. Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization and antitumor activity. J Natl Cancer Inst. 1984 ; 72 : 955.
 - 12) 山本三郎, 島田静雄, 徳永 徹 : 結核菌 DNA 画分の免疫活性, 結核. 1986 ; 61 : 60.
 - 13) 石原和之, 池田重雄, 古江 尚 : 皮膚悪性腫瘍に対する MY-1 の後期第Ⅱ相臨床試験, Skin Cancer, 1990 ; 5 : 458.
 - 14) Ochiai T, Suzuki T, Nakajima K, et al. Studies on lymphocyte subsets of regional lymph nodes after endoscopic injection of biological response modifiers in gastric cancer patients. Int J Immunother. 1986 ; 2 : 259.
 - 15) Shimada S, Yano O, Tokunaga T. *In vivo* augmentation of natural killer cell activity with a deoxyribonucleic acid fraction of BCG. Jpn J Cancer Res. 1986 ; 77 : 808.
 - 16) Yamamoto S, Kuramoto E, Shimada S, et al. *In vitro* augmentation of natural killer cell activity and production of interferon- α / β and- γ with deoxyribo nucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. Jpn J Cancer Res. 1988 ; 79 : 866.
 - 17) Tokunaga T, Yano O, Kuramoto E, et al. Synthetic oligonucleotides with particular base sequences from the cDNA encoding proteins of *Mycobacterium bovis* BCG induce interferons and activated natural killer cells. Microbiol Immunol. 1992 ; 36 : 55.
 - 18) Kataoka T, Yamamoto S, Yamamoto T, et al. Antitumor activity of synthetic oligonucleotides with sequenses from cDNA encoding proteins of *Mycobacterium bovis* BCG. Jpn J Cancer Res. 1992 ; 83 : 244.
 - 19) Yamamoto S, Yamamoto T, Kataoka T, et al. Unique parindoromic sequenses in synthetic oligonucleotides are required to induce IFN aud augment IFN-mediated natural killer activity. J Immunol. 1992 ; 148 : 4072.
 - 20) Thole JER, Keulen WJ, Kolk AHJ, et al. Characterization, sequence determination and immunogenicity of a 64-kilodalton protein of *Mycobacterium bovis* BCG expressed in *Escherichia coli* K12. Inf Immun. 1987 ; 55 : 1466.
 - 21) Radford AJ, Duffield BJ, Plackett P. Cloning of a species-specific antigen of *Mycobacterium bovis*. Inf Immun. 1988 ; 56 : 921.
 - 22) Matsuo K, Yamaguchi R, Yamazaki A, et al. Cloning and expression of the *Mycobacterium bovis* BCG gene for extracellular antigen. J Bacteriol. 1988 ; 170 : 3847.