

第72回総会会長講演

わが国における結核免疫学の発展

— 結核菌菌体成分の免疫活性を中心に —

東 市 郎

北海道大学免疫科学研究所

The 72nd Annual Meeting President Lecture

BIOCHEMICAL AND IMMUNOLOGICAL PROPERTIES OF THE
FRACTIONS OF TUBERCLE BACILLI

Ichiro AZUMA*

In 1954, Dr. Yuichi Yamamura and his coassociates, National Sanatorium Toneyama Hospital, has reported the formation of experimental tuberculous cavity in rabbits. This work was a milestone of the researches in the field of cellular immunology. In 1960, I have started my scientific carrier in Kyushu University Medical School as the post-graduate student under the guidance of Prof. Yamamura. Since then, I have worked on the field of biochemical and immunological properties of tubercle bacilli. The arabinose mycolate, polysaccharides, cell-wall skeleton (CWS) and trehalose dimycolate (TDM) were purified from tubercle bacilli and their Chemical structures and biological activities were investigated in detail in our laboratory.

In 1971, we have reported that adjuvant active principle of tubercle bacilli was a CWS fraction, and the details of chemical structure and adjuvantity of mycobacterial CWS were investigated in our research group. The application of BCG-CWS to cancer immunotherapy was also studied. In 1974, Prof. E. Lederer and his coworkers, University of Paris, have reported that *N*-acetyl muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (MDP) was the minimum adjuvant-active structure of bacterial cell wall. We have synthesized several hundreds of MDP derivatives and selected, MDP-Lys(L18), romurtide, as the candidate of cytokine inducer for the clinical application. Romurtide is applied in cancer patients for the recovery of the number and functions of monocytes, neutrophils and platelets. These results suggest that the tubercle bacilli, especially, CWS and related synthetic MDP derivatives, are effective for the potentiation of host resistance against infectious diseases and cancer.

Key words : Tubercle bacilli, Cell-wall skeleton (CWS), Adjuvant activity, Muramyl dipeptide (MDP), Cytokine inducer

キーワードズ : 結核菌, 細胞壁骨格, アジュバント活性, ムラミルジペプチド, サイトカイン誘発剤

別刷り請求先 :

東 市郎

北海道大学免疫科学研究所

〒060-0815 札幌市北区北15条7丁目

* From the Institute of Immunological Science Hokkaido University, N-15, W-7, Kita-ku, Sapporo 060-0815 Japan.

(Received 10 Dec. 1997)

はじめに

私が故山村雄一先生（当時九州大学医学部医化学講座）のもとで結核菌研究に着手したのは1960年であった。当時は生化学の興隆期であり、酵素化学シンポジウム、毒素シンポジウムなど活発な活動をみせており、結核化学シンポジウム（現在の実験結核研究会）もスタートしたばかりであった。また日米医学協力プログラムも1964年にスタートしており、私はこれら研究会を通してわが国における結核菌研究の最も実質的な発展に参画することが出来た。そしてそれらは世界の結核菌研究をリードするものでもあった。山村雄一先生は戦後の結核菌研究、特に結核免疫および結核菌の生化学的研究において、常に世界的に先導的立場をとりつづけられた。ここでは、戦後のわが国における結核菌の菌体成分の生化学と免疫学に関する研究について、私の個人的な経験をもとにくつかの例をとりあげたい。

I. 実験的結核性空洞形成実験の持つ意義

1954年、山村先生をはじめとする国療刀根山病院の研究グループは、ウサギを用いる実験的空洞形成に関する研究成果をはじめて報告した。以後精力的に研究がすすめられ、これらの成果は *Adv. Tuberc. Res.* (1958) に総括されている。山村先生らの結核性空洞形成実験の結論は、従来結核生菌によって引き起こされると考えられていた結核性空洞が死菌（および菌体成分）によって誘導可能であり、その基盤が結核菌タンパクに対する細胞性免疫反応であることを明らかにしたことである。細胞性免疫に関する免疫研究の初期の成果として M. Chase 教授の細胞移入実験（1942年）と、J. David 教授のマクロファージ遊走阻止因子（MIF）の発見（1966年）が挙げられる。山村先生の成果もそれに匹敵する研究とおもわれる。しかも、これら細胞性免疫に関する歴史的研究がすべて結核菌を用いて行われたことは意義深い。

II. 結核菌の菌体成分の構造と生物活性

1) 抗原多糖

従来より結核菌の皮内反応抗原については、後述するように Seibert の精製ツベルクリン（PPD）をはじめとし、主としてタンパクが検討されたが、多糖抗原の役割については十分に明らかにされていなかった。

結核菌多糖に関する研究は1948年の Stacey らの研究にさかのぼるが、結核菌菌体の主要な多糖の系統的な研究は私どもによって1966年頃より行われた。結核菌菌体中に含まれる主要な多糖として、細胞壁骨格の構成成分である arabinogalactan および細胞質に含まれると考えられる arabinomannan, mannan, glucan が精

製され、それぞれの基本構造が示された。特に arabinogalactan および arabinomannan は結核菌感作モルモットに対しアナフィラキシー反応およびアルサス型皮内反応を示すとともに、抗血清に対し反応性を示した。しかし mannan および glucan はほとんど抗原性を示さなかった。一方、積田らは arabinomannan に脂肪酸が結合したり多糖が血球凝集反応の抗原となることを見出したが、その構造の詳細は Brennan らにより明らかにされ、免疫抑制活性を有することが示唆された。

2) コードファクター

コードファクター（Trehalose Mycolate, TDM）は1950年 Bloch 博士らによって疫学性結核菌の毒力因子として報告されたが、その後、免疫活性を含むその多彩な生物活性によって注目されている。私がパリ大学に留学した際、故 Lederer 教授は「コードファクターが最も面白い結核菌菌体成分だともう。一生の研究テーマとなるとおもいますよ」と言われた。TDM は私が山村先生の教室で最初に手掛けたテーマであり、現在に至るまでつけているテーマでもある。私は毒力結核菌のみならず、他のミコバクテリアからも TDM を分離精製し、ミコバクテリア共通の糖脂質であることを明らかにした。またミコール酸部分の構造がそれぞれ異なることを報告した。さらにノカルジヤ、コリネバクテリアより分離された TDM の構造、生物活性についても検討した。TDM の研究についてはわが国では故加藤允彦（阪大微研）によってその毒性発現の機作が研究された。近年に至り矢野郁也（大阪市大）らにより TDM 抗体の診断上の意義など、新しい展開がなされている。本総会の教育講演で、矢野教授はそれらの成果を総括された。最近、私どもは西沢（徳島文理大）との共同研究で104種の立体異性体の合成コリノミコール酸を含む TDM のモデル物質を化学合成し、TDM のミコール酸部分の立体配置（2R, 3R）、（2S, 3R）、（2R, 3S）、（2S, 3S）と免疫アジュバント活性、毒性との相関を検討している。

III. 結核菌細胞壁の構造、アジュバント活性と抗腫瘍活性

1) ミコール酸とアラビノースマイコレート

結核菌の菌体成分の生化学的特性の1つは多量の脂質を含むことである。特にミコール酸とよばれる総炭素数80前後の超高級分岐オキシ酸は、結核菌をはじめとするミコバクテリアを特徴付けるものとして古くから注目されていた。ミコール酸の生化学的研究はすでに1930年代にエール大学の Anderson らによって始められ、1950～60年代にパリ大学の Lederer のグループによって詳細

な構造研究が行われ、ミコール酸はその構造上から α , β , γ など数種のグループに分類されることが構造研究から明らかにされている。

このようにミコバクテリアに特徴的なミコール酸の存在様式については、i) TDM, ii) glycerol monomycolate, iii) ロウ D などのエステル型糖脂質として存在することが明らかにされた。その後私どもはヒト型結核菌青山 B 株の結合脂質より、ミコール酸がアラビノースの5位の水酸基にエステル結合した糖脂質断片(アラビノース-5-マイコレート)を分離した。さらに、この糖脂質断片は細菌細胞壁の部分構造をなすものであること、細菌細胞壁の融解産物と考えられるロウ D 画分においても同様の存在様式が認められることが見出された。ミコール酸の90%以上は、先に述べた存在様式で細菌細胞壁の主要な構成成分として抗酸性染色に重要な役割を果たしている可能性が示唆されている。

2) 結核菌細胞壁の構造

結核菌の細胞壁の構造については小谷ら, Lederer ら, 三崎ら, 筆者らによって詳細に検討され、これらの成績から基本構造が確定された。先に述べたように、ミコール酸が、ミコバクテリアの抗原多糖の一種であるアラビノガラクトランのペプチドグリカンと、リン酸エステル結合およびグリコシド結合している可能性が示唆されている。ミコバクテリアのペプチドグリカンの特徴的なことは、ムラミン酸のアミノ基がグリコリル化されていることであり、同様の結果はミコバクテリアの近縁細菌であるノカルジアにおいても認められ、これら細菌細胞壁の構成成分は、細菌分類の生化学的手法として広く用いられるに至った。一方、K. Takayama らは、INH によるミコール酸の、エタンプトールによるアラビノガラクトランの生合成阻害を明らかにし、これら抗結核剤の作用機作の一端を示した。

3) 結核菌細胞壁骨格の免疫アジュバント活性

1942年、J. Freund によって結核死菌と鉱物油中に浮遊させたいわゆる「Freund の完全アジュバント、FCA」がきわめて強い免疫増強活性(アジュバント活性)を有することが報告されて以来、その活性因子について R. G. White, S. Raffel らによりロウ D 画分であるとされた。しかし1970年私どもによりミコバクテリアの最も重要なアジュバント活性因子が細菌細胞壁骨格であり、その構造のうちでも特にペプチドグリカン部分がアジュバント活性発現に最も重要な役割を果たすことが明らかにされた。結核菌細胞壁骨格は結核死菌と同様に血中抗体産生のみならず、細胞性免疫の誘導に対しても強いアジュバント活性を示した。

4) BCG-CWS と N-CWS の抗腫瘍活性

BCG を中心とするミコバクテリアのアジュバント活性を、生体防御機構への強化に応用しようとする研究は、フランスの G. Mathé, UCLA の D. Morton らを中心に急性白血病、悪性黒色腫に対し試みられた。その後、ほとんどすべての腫瘍に対し BCG 生菌単独、または従来の癌治療法との併用療法としてその有効性が検討され、一部の腫瘍において有効性が認められた。これら BCG と癌免疫療法に関する研究を通して、Biological Response Modifier (BRM) の概念が確立され、BRM の癌治療薬としての臨床評価は randomized controlled trial による患者の生存率の延長を指標とするべきであるとの合意が得られた。

BCG が強い免疫増強活性を有することは周知のことであるが、その副作用および免疫力の低下した癌患者に対して生菌を使用することの危険性を考慮し、癌免疫療法に有効な菌体成分の開発が進められた。その結果、BCG-細胞壁骨格(CWS)、そのペプチドグリカン、水溶性アジュバント(WSA)、DNA 画分、ムラミルジペプチド(MDP)誘導体、コードファクター(TDM)誘導体、特に BCG-CWS の癌免疫療法剤としての有効性について私どもにより詳細に検討された。

その後私どもは BCG-CWS の成績を基礎に、類縁細菌のミコバクテリア、ノカルジア、コリネバクテリアの CWS の抗腫瘍活性とアジュバント活性についてスクリーニングを重ね、*Nocardiarubra* (その後 *Rhodococcus lentifragmentus* AN-115 と分類された) の CWS 画分 (*Nocardia rubra*-CWS; N-CWS) を選択した。N-CWS の化学構造は基本的には BCG-CWS と同様である。これら BCG-CWS および N-CWS の癌免疫療法剤として実験腫瘍系に対しても、1) 同系移植腫瘍系に対する腫瘍生着阻止活性と退縮活性、2) 自家癌系における腫瘍片の自家移植阻止活性および腫瘍退縮活性、3) 転移阻止活性、4) 自然発癌、化学発癌の阻止活性、などがマウス、ラット、モルモット、ウサギなどの実験系において明らかにされるとともに臨床応用も試みられ、肺癌、胃癌、白血病などの患者に対し、延命効果が認められた。最近に至り、林昭(前大阪府母子医療センター)は BCG-CWS を用いるヒト癌の免疫療法について検討し、BCG-CWS を投与し、患者の血清中のサイトカイン(特にインターフェロン- γ)値の上昇が認められる場合、BCG-CWS を用いる免疫療法の有効性と患者予後を予測するのに有用であることを示唆した。さらに肺癌Ⅲ期の患者に外科手術後直ちに BCG-CWS による免疫療法を行い、患者の QOL を延命にきわめて有効であることを示した。

瀬戸内海の久野島は1927~45年に至る間、旧日本軍

によって毒ガス工場が設けられていた。西本教授(広島大・医・二内)は1952年以来毒ガス工場従業員に関する観察を続け、毒ガス障害者において広島県の一般男子に比べて約4倍近い肺癌発生を認めている。西本幸男らはこれら high risk グループに対し BCG-CWS, N-CWS の投与によって発癌率が CWS 非投与群の約半分に低下し発癌の免疫学的予防が可能であることを報告した。また中元ら(近畿中央病院)は N-CWS を自然気胸患者55例に投与し、54例に治療効果を認めた。これら有効例に再発は認められず、N-CWS が気胸患者の治療にも有効であることが示された。

IV. ムラミルジペプチド (MDP) および合成関連化合物の生物活性

1) MDP の生物活性

1974年、E. Lederer ら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*-acetyl-muramyl-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 標品を用いて明らかにした。

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。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。MDP を抗原とともに Freund の不完全アジュバント (FIA) に油中水アジュバントとして動物に投与すると、FCA に匹敵するアジュバント活性を示す。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、細菌細胞壁骨格は多糖や脂質の特殊構造と、さらに分子内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。

2) MDP の感染防御活性

すでに BCG-CWS など細菌細胞壁成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、L. Chedid らは 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、経口いずれの投与径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並行せず、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、ステアロイル MDP 誘導体、MTP-PE、ムラブタイトなどの MDP 誘導体が開発された。

3) ステアロイル-MDP 誘導体の開発と感染防御活性

私どもは MDP のアシル誘導体を中心に、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、ステアロイル MDP 誘導体、*N*^ε-MDP-*N*^ε-stearoyl-L-lysine [MDP-Lys(L18)] (ロムルチド) を選抜した。

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、C₁₆~C₁₈ 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。上記ステアロイル MDP 誘導体は感染抵抗性が多形核白血球 (polymorphonuclear leukocyte; PMN) に依存すると考えられる大腸菌、ブドウ球菌、緑膿菌、カンジタ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。両ステアロイル 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 MDP-Lys(L18) の免疫低下宿主における感染抵抗性の増強能も明らかにした。

4) MDP-Lys(L18) を用いる粘膜免疫増強作用

MDP およびその誘導体の生物学的作用に関する報告の多くは、非経口投与時の作用に関するものであるが、MDP およびその誘導体が経口投与においてもアジュバント作用を示すことも明らかにされた。

私どもは MDP-Lys(L18) の経口、経鼻、経腸などの粘膜投与によってマウスでのセンダイウイルス、ロタウイルスや細菌感染防御が可能であることを明らかにし

た。これらの結果から、MDP-Lys(L18)は経粘膜的に投与しても宿主の感染抵抗性を増強し得ることが確認され、さらに粘膜局所の防御機構を効果的に充進することが示唆された。MDP-Lys(L18)の経口投与の例にみられるように、ヒトにおいてその経口吸収化が確保されるのであれば、免疫アジュバントの皮下投与時にしばしばみられる副作用の回避や軽減が可能となるばかりでなく、粘膜防御機構を増強することによって、内因性感染を含む重篤な感染症の予防の可能性を示唆するものと考えられる。

5) MDP-Lys(L18)のサイトカイン誘導活性と白血球および血小板増多活性

MDP-Lys(L18)は*in vivo*または*in vitro*の系において、主として単球系に作用してIL-1, IL-6, G-CSF, M-CSF, TNF, IFN- γ などを誘導することがマウス, サル, ヒトなどにおいて明らかにされた。中島らはサルに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線照射やシクロフォ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。

6) MDP-Lys(L18)の癌患者への臨床応用

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数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相試験でその有効性が確認された。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。

以上のようにMDP-Lys(L18)は, 放射線療法や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, 化学療法の支持療法剤としてMDP-Lys(L18)が臨床上有効なものと考えられる。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。

7) 免疫アジュバントによるワクチンの免疫力の増強
ワクチンの開発手段は現代の医学, 分子生物学の発展に伴って多様になっている。そのひとつに遺伝子工学的手法を用いた組み換えワクチンの開発がある。

遺伝子組み換え技術を応用した最初のワクチンがB型肝炎(HB)ワクチンであるが, 高いワクチン効果を得るには免疫アジュバントを併用する必要がある。現在このワクチンはアルミニウムゲル吸着型として市販されているが, アルミニウムゲルはIgE抗原産生の増強, 継続的に使用するとアレルギーを起こしやすくなる等の指摘が以前からあるため, これらに代わるアジュバントの開発が望まれている。私どもは抗原性の低い組み換えワクチンのモデルとしてHBワクチンを選び, BCG-CWS, B30-MDP および MDP-Lys(L18)のアジュバント活性について検討した。アルミニウムゲル吸着型ワクチンと抗原のサスペンションにMDP誘導体(100 μ g/mouse)を混合し, マウスに単回投与して血清中の抗体価を測定した結果, いずれのMDP誘導体も, HB表面抗原に対する血中抗体産生にアジュバント効果が認められ, 特にMDP-Lys(L18)については, アルミニウムゲルよりも高い増強効果が得られた。

8) MDP誘導体の癌転移阻止活性

BCG-CWS および MDP-Lys(L18)が癌細胞に対し癌転移抑制および抗腫瘍免疫を増強することが肺転移性癌細胞(B16-BL6, Colon26-M3.1)および肝転移性癌細胞(L5178Y-ML25)を用いるマウス高転移系を用いて明らかにされた。これら造血機能に対するMDP-Lys(L18)の作用, 感染防御活性や抗癌転移作用, 抗菌物質との相乗作用なども, MDP-Lys(L18)によって誘導されたIL-6, G-CSF, M-CSFなどを介する全身性の免疫ネットワークの強化によるものと推察されている。

おわりに

先に述べたように, 私は大学院生として九州大学医学部医化学教室において山村雄一先生の御指導のもとに「結核菌の菌体成分の生化学と生物活性」を主題として研究者としてのスタートをきった。以後一貫してこの主題を中心に研究を展開してきたが, その成果の一端をここに述べた。結核症は未だに毎年50,000人以上の新規患者発生があり, AIDSなどの急激な蔓延などとともに結核症は再びその重要性が認識されつつある。この会長講

演を故山村雄一先生に献げるとともに多くの共同研究者に深く感謝したい。恩師故山村先生は常に「結核菌は私の初恋の研究テーマ」と言われていたが、結核菌の菌体成分の生化学的研究から出発した私の研究は「免疫強化

剤の開発」へと展開し、感染症や、癌の予防と治療への応用の可能性が示唆されたことに深い感慨を覚えるものである。