

Title	細菌細胞表層構築成分ならびに関連物質のヒト単球に対する遊走刺激作用
Author(s)	小川, 知彦
Citation	大阪大学, 1983, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/33342
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

細菌細胞表層構築成分ならびに
関連物質のヒト単球に対する遊
走抑制作用

小川知彦

(昭和58年1月6日受付)

緒 言

細菌細胞表層構築成分ならびに関連する合成物質が、生体防禦の要めとなる単球-マクロファージ (Mφ) 系の機能を様々に刺激することを示す研究が多数報告されている。すなわち、哺乳動物に寄生性の細菌種から分離した細胞壁、同構築成分ならびに関連する合成標品が、単球の増殖を惹起し¹⁾、固体表面に於ける伸展や付着を増加させ^{2,3)}、遊走を阻止し^{4,5)}、分化を促進し⁶⁾、DNA合成を抑制⁷⁾

あるいは促進し⁸⁾、グルコサミンの取り込み
 を増加させ^{9,10)}、ライソソーム酵素の放出を誘
 導し¹¹⁾、スーパーオキシドアニオンレベル
^{2,12)}ならびにグルコースオキシダーゼレベル¹⁰⁾
 を上昇させ、食作用を刺激¹³⁻¹⁵⁾あるいは抑制し
¹⁶⁾、殺腫瘍作用を亢進し¹⁷⁻²⁰⁾、コラゲナーゼ合
 成を増大させ²¹⁾、さらにモノカイン産生を促
 進する²²⁻²⁵⁾など、まわめて多様な強化ないし調
 節作用を発揮することが報告されている。さ
 らに、上述の単球-Mφ刺激作用の大部分を
 担う最小有効構造単位が、哺乳動物に寄生性
 の細菌種の細胞壁ペプチドグリカン(A群型
 ペプチドグリカン²⁶⁾)に共通する構造である
 N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-
 イソグルタミン(ムラミルジペプチド, MDP
)であることが明らかにされている^{27,28)}。

他方、グラム陰性菌では、細胞壁ペプチド
 グリカンに加えて、細胞表層の外膜成分であ
 るリポ多糖体(LPS)、ならびにLPSが示す
 免疫薬理学的活性の大半を担うリピッドA²⁹⁾部

分がMφに作用して、その貪食能の亢進³⁰⁾、酵素の活性化³¹⁾、感染に対する宿主抵抗性の非特異的な増強³²⁾、抗腫瘍作用の誘導^{33,34)}、さらにリンパ球活性化因子(LAF)³⁵⁾、腫瘍を出血壊死させる因子(TNF)³⁶⁾、顆粒球のコロニ形成を促進する因子(CSA)³⁷⁾、プロスタミノゲン活性化酵素³⁸⁾やプロスタグランジン³⁹⁾を放出させる作用など、多様な刺激作用を發揮することが報告されている。

以上述べた細菌細胞壁ペプチドグリカン(PG)ならびにLPS及びリポドAによるMφの活性化は、宿主と病原菌を始めとする寄生性の細菌の相互作用、いわゆるhost-parasite relationshipを考究する上で見逃すことができない重要な現象と考えられる。ところが、上述の細菌細胞表層物質とMφの相互作用の第一段階と考えられる反応部位への単核-Mφ系細胞の集積に細胞壁PGやLPSがどのように関与するかについては、少なくともこの研究を開始した時点では、報告は皆無であった(観察参照

)⁴²⁾。

本研究では、組織Mφの前駆細胞であるとして一般に考えられている単球(ヒト末梢血由来)⁴²⁾に對する細胞壁およびLPS, 脂多糖に關連する物質の遊走刺激作用を、メンブランフィルター法⁴³⁾を用いて調べた。

材料ならびに方法

1. テスト物質

1) 細胞壁標品

Staphylococcus epidermidis (ATCC 155), Streptococcus mutans (BHT), Lactobacillus plantarum (ATCC 8104), Streptomyces gardneri (ATCC 23911), Rhodococcus rhodochrous (ATCC 184), Mycobacterium smegmatis (ATCC 19420), Nocardia corallina (ATCC 14347), Nocardia corynebacterioides (ATCC 14898)および Nocardia gardneri (IFO 3385)の細胞壁標品は、細菌細胞壁の免疫強化作用について本学口腔細菌学教室と共同研究を実施している横川哉恵博士と河田茂雄氏(大日本製薬KK,

総合研)が、小谷らの方法^{44,45)}に従って調製したものの恩恵を受け、実験に供した。Staphylococcus aureus (STA-EMT-P)の細胞壁は平地慶行博士(本学・口腔細菌学教室)から⁴⁶⁾、Streptococcus pyogenes (3型, 0176株)の細胞壁は大國寿士博士(日本医大・微生物学免疫学教室)⁴⁷⁾より、またMicrococcus lysodeikticus (NCTC 2665)の細胞壁は岩田貞子博士(本学・口腔細菌学在籍)より、それぞれ恩恵を受けた(参考のために、A群型の細胞壁PGの基本的な化学構造を図1に示した)。

2) ペアケドグリカン(PG)標品

S. aureusのPGは、細胞壁を10%トリクロル酢酸中で60℃, 12時間処理して非PG部分を除くことによって調製した。L. plantarumのPGでは60℃, 4時間, またS. epidermidisのそれでは室温, 16時間10%トリクロル酢酸による抽出処理を行ない、それ以外の細胞壁より調製したものと、榎川哉恵博士および河田茂雄氏より分与された。さらにS. pyogenesのPGは、大國寿士博

士が熱ホルムアミド法⁴⁸⁾によつて調製したものの鬼手を受けた。

3) S. epidermidis 細胞壁 PG の酵素による溶解産物

SALE (S. aureus lytic enzyme の略, D-アラニルグリニンおよびグリシルグリシンエンドペプチダーゼ)⁴⁹⁾ ならびに M-1 エンド-N-アセチルアラミダーゼ⁵⁰⁾ を用いて調製した(こゝら両酵素の PG に好する作用部位を図 1 に示した)。詳細は別に報告⁴⁹⁾ されているので、要点のみを述べると S. epidermidis 細胞壁 PG を SALE エンドペプチダーゼで処理し、PG 構築単位(ジサッカリド・軸ペプチド)間の架橋結合を切断して溶解した。溶解物をセファデックス G-50/G-25 連結カラムで分画し、PG 構築単位がグリカン鎖を介して結合したジサッカリドペプチドの“ポリマー”である SEPS (図 2a) を分離した。得られた SEPS の一部は、さらに M-1 エンド-N-アセチルアラミダーゼで処理してグリカン鎖をジサッカリド単位まで加水分解し、上記セファデックスカラムで分画

してジサッカリドペフタドの“モノマー”である SEPS-M (図26) を得た。これらの標品は、横川哉恵博士および河田茂雄氏の協力を得て、調製した。

4) 合成ムラミルペフタド

MDP⁵¹⁾ ならびにそのアナログ⁵¹⁾ (図3), さらに MDP のムラミン酸残基の6位の水酸基に種々の直鎖あるいは α -分岐アシル基をエステル結合した6-O-アシル-MDP⁵²⁻⁵⁵⁾ (表1) は、本学理学部化学科・天然物有機化学講座の芝哲夫教授および楠本正一助教より恩恵を受け、実験に供した。

5) LPS およびリポド A 標品

Salmonella enteritidis ならびに Escherichia coli から Boivin 法⁵⁶⁾ あるいは Westphal 法⁵⁷⁾ により調製された市販の LPS (Difco Laboratories, Detroit, Mich, USA) に加えて、河西信彦博士 (昭和大学薬学部・微生物薬品化学教室) より恩恵を受けた標品、すなわち Westphal 法により調製した Pseudomonas aeruginosa (ATCC 7700) 由来の LPS, Salmonella minnesota

(R 595) および P. aeruginosa から Westphal 法によつて得た LPS を酢酸で加水分解することにより分離したリポド A 標品⁵⁸⁾ を実験に供した。

2. ヒト単球遊走刺激作用の検定

1) 標準走化性因子

N-Fォルミル-L-メチオニル-L-ロイシル-L-フェニルアラニン (FMLP)⁵⁹⁾ (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA) は、 10^{-2} M の濃度にエタノールに溶解したものを -20°C に保存した。また LPS 活性化ヒト血清⁶⁰⁾ は、新鮮ヒト血清の 1ml に、E. coli (Serotype O55:B5) (Sigma) 由来の LPS の $200\ \mu\text{g}$ を生理食塩水に溶解したものの 0.1ml を加えて 37°C で 60 分間反応させたものを、 $20,000\times$ g , 4°C , 15 分間遠心し、上清として得た。 56°C , 30 分間加熱して非活性化後、 -20°C に保存した。いずれの走化性因子も使用直前に解凍後、後述する培養液に加えて所要濃度に希釈し、単球に好する遊走刺激作用の検定における陽性対照とした。

2) テスト物質

テスト物質ならびに標準走化性因子は、2%
ウシ血清アルブミン (Sigma) と 20 mM N - α -
ヒドロキシエチルピペラジン- N - α -エ
タンスルフォニック酸 (HEPES) (Sigma) を含む Gey's
均衡塩類溶液 (Gibco Laboratories, Grand island, N.Y., USA)

61) (Gey's BSA) 7 容とセラゲン加ヴェロナール
緩衝液 (pH 7.0) 5 容とを混合した培養液 (Gey's BSA - GVB⁺⁺, pH 7.0) に、所定の濃度に溶解あ
るいは浮遊させ、検定に供した。

3) ヒト単核細胞

Böyum の方法⁶²⁾ にしたがって準備した。すな
わち健康成人の正中及静脈よりヘパリンナト
リウム注射液 (小玉 KK, 東京) を溶けたポ
ラスチック注射器を用い、静脈血を採取した
(ヘパリンの濃度は 20 単位/ml 血液)。ヘパリ
ン血の 1 容にリン酸塩緩衝生理食塩水 (PBS
, pH 7.0) の 3 容を加えて稀釈したものを、Ficoll
- Paque 液 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) 上に
重層し、室温で $400 \times g$, 35 分間遠心した。単
球に富む画分を PBS で洗浄後、Gey's BSA に所定

の細胞濃度とほりように浮遊させた。このように調製した細胞浮遊液では、軍球が全細胞に好んで占め子割合は20%前後であった。また全細胞の95%以上が生細胞であることをトリパンブルー排除テストにより確かめた。

4) 遊走の検定

48穴孔化チエニバー (Neuro Probe, Cabin John, Md., USA) を用いて実施した^{63, 64)}。すなわち、Gey's BSA-GVB⁺⁺に溶解ないし浮遊した25 μ lのテスト標品、標準走化性因子ありいは対照培養液をチエニバーのbottom plateの凹み(下室)に満たし、ついで孔径5 μ m、厚さ約10 μ mのポリカーボネートメンブランフィルター (Neuro Probe) およびシリコン製がスケットを装着した。ついでtop plateを取り付け、各凹み(上室)に細胞浮遊液の50 μ lずつを加えた。培養は5%CO₂-95%空气中で所定時間行なった。培養終了後、メンブランフィルターを取りはずし、Falkら⁶³⁾の方法にしたがって、Diff-Quick (国際試薬KK, 神戸)の固定液、染色液IおよびIIに30秒間

がつ殺して細胞を固定、染色した。このメン
 グラニフィルターをスライドガラス上で風乾
 した後、immersion oil (日本光学工業KK, 東京
)を滴下し、カバーガラスをかけて密封した
 。下室に接していたフィルター面をX100対物
 レンズとX10接眼レンズを装着した光学顕微
 鏡を用いて検鏡し、接眼レンズに取り付けた
 一辺5mmの正方形グリッド内にみられる遊走
 単球細胞数を、無作為に選んだ20グリッドに
 ついて数えた。フィルター下面まで遊走した
 単球の一視野当たりの平均数(数えた細胞数
 の総計 $\times 0.6$ [一視野は12グリッドに相当する
 。])をテスト標品と加えた培養と無添加の
 対照培養とについて算出し、比較した。検定
 は各テスト標品の各用量ごとに行ない
 、平均値と標準誤差(S.E.)を求めた。

5) 単球の遊走促進が分化作用によるものか
 どうかの検討

Zigmond と Hirsch⁶⁵⁾ のチェッカーボード分析の
 記述を参考にし、Gey's BSA に種々の濃度に浮遊

ないし溶解したテスト標品を走化チェンバーの上室、下室あるいは両室に容れ(表2参照)、テスト標品の濃度勾配が単球の遊走にどのように影響するかを調べることにより検討した。

結 果

1. 実験条件の吟味

標準走化性因子互用性、単球の遊走刺激作用の検定に適した条件(細胞濃度、刺激因子の濃度および反応時間)について検討を加え、以下の結果を得た。

1) FMLPおよびLPS活性化血清の単球遊走に対する至適刺激濃度

単球遊走に対する刺激作用を調べる際に陽性対照として汎用されているFMLP (Schiffmann 59) ならびにLPS活性化血清 (Snyderman 60) を種々の濃度で 5×10^6 個/ml (上室にお

ける最終細胞密度，以下本文，四表ともに同じ)の細胞浮遊液に90分間作用させた検定の結果が図4に示されている。FMLPは、 $10^{-8}M$ 濃度(下室での最終濃度，以下同じ)で最も高い単球遊走刺激作用を示し(図4A)，またLPS活性化血清は8倍あるいは16倍希釈の濃度で最も強い効果を示した(図4B)。以後の検定では、 $10^{-8}M$ 濃度のFMLP，10倍希釈のLPS活性化血清を陽性対照とすることとした。

2) 細胞濃度

図5は $10^{-8}M$ 濃度のFMLPおよび10倍希釈のLPS活性化血清を種々の細胞密度の細胞浮遊液に作用させ、遊走に及ぼす影響を90分間培養して調べた結果を示す。いずれの標準走化性因子による場合にも、細胞密度を 5×10^6 個/mlとした検定系において最も高い値が得られ、しかもテスト標品を加えない対照(Gey's BSA-GVB⁺⁺のみ)における単球遊走がほとんど認められないことが判ったので、以後の検定では細胞密度は 5×10^6 個/mlとすることとした。

3) 培養 (反応) 時間

$10^{-8}M$ 濃度の FMLP および 10 倍稀釈の LPS 活性化血清による単球の遊走促進と培養時間との関係を調べた結果を図 6 に示した。FMLP を作用させた場合には、フィルター下面に到達する単球数は培養 90 分まで培養時間とともに増加し、以後 (120 分間まで) プラットーに達した。一方、LPS 活性化血清による単球の遊走促進の程度は、60 分間までは時間の経過とともに急激に、以後は徐々に増加する傾向を示した。ちなみに Gey's BSA-GVB⁺⁺ 対照における単球の遊走は、時間の経過とともにわずかに増加した。以上の実験結果と Folk ら⁶³⁾ の記載とを総合判断して、以後の検定における培養時間は 90 分間とした。

2. 細菌細胞壁標品の単球遊走刺激作用

図 7 に示すように、M. lysodeikticus を除き、供試した 12 菌種のうち 11 菌種の細胞壁が、 $0.1 \sim 100 \mu g/ml$ の用量で、強弱の差はあるが、単球の遊走を高める明確な作用を示した。最も強

遊走刺激作用を示す細胞壁の濃度が菌種によつて異なるために（例えば S. aureus 細胞壁で $10 \mu\text{g/ml}$, L. plantarum では $1 \mu\text{g/ml}$ が至適濃度であった）、菌種別の作用の強弱の比較は単純ではないが、総合的にみて N. collarina 細胞壁では作用が弱く、S. aureus のそれがいち最も強力であった。さらに、ミコニル酸を含む菌種（Mycobacteria, Nocardia および Rhodococcus に属する菌種）の細胞壁の単球遊走刺激活性とその他の菌種のそれとの強さの間には、ミコニル酸の有無や含量と相関するような差異は認められなかった。

3. 細胞壁とペプタドグリカン (PG) の単球遊走刺激作用の比較

S. aureus, S. epidemidis, S. pyogenes および L. plantarum の4菌種について細胞壁とPGをペアーにして、単球に打する遊走刺激作用を比較した（図8）。いずれの菌種についてもPG部に明確な刺激作用が認められた。しかしこれらの活性は杆状する細胞壁に比べて概して弱いようである。

った。

4. 細胞壁ペクチンガラクトンの酵素による溶解産物の単球遊走刺激作用

図9に *S. epidermidis* 細胞壁 PG を SALE エンドペクチナーゼ処理して得た PG 構築単位のいわゆる“ポリマー”である SEPS (図29) ならびに SEPS を M-1 エンド-N-アセチルグルコサミナーゼ処理して得た PG 構築単位のモノマー, SEPS-M (図26) の単球遊走に対する刺激作用が、出発材料とした細胞壁および PG のそれと対比して、示されている。SEPS のみならず SEPS-M が、至適用量を考慮に入れると、細胞壁や PG よりも強い刺激作用を呈することが判る。すなわち細胞壁および PG が $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ の用量で最も活性を示すのに対して、SEPS, SEPS-M はともに $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の用量で、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ の細胞壁や PG にまさる単球遊走促進作用を示した。この所見は、細胞壁や PG を酵素処理して水溶性としても、単球遊走刺激作用は保持されるのみならず、作用の発現が効率的になることを示

す。

5. 合成 MDP の単球遊走刺激作用

つぎに、細菌細胞壁の種々の免疫調節作用を担う最小構造単位でありことが知られており、合成 MDP の単球遊走刺激作用を検討した。

図 10 に示すように、SEPS や SEPS-M と同様、0.1 mg/ml の用量をピークとする明確な単球遊走刺激作用が認められた。他方、種々の免疫薬理作用を欠くことが別の研究⁶⁶⁾で明らかにされている MDP の 5 種のアナログ、すなわち図 3 に示すように MDP の D-isoGln 残基を L-isoGln, D-isoAsn, D-Gln, D-Glu あるいは L-Glu にかえたもの [それぞれ MDP(L-isoGln), MDP(D-isoAsn), MDP(D-Gln), MDP(D-Glu) および MDP(L-Glu)] では、単球遊走刺激作用は全く認められなかった。すなわち MDP が示す単球遊走刺激作用が、MDP が保持する他の免疫薬理作用についてと同様、厳しい活性・構造相関を示すことが明らかになった。

6. 6-0-アシル-MDP の単球遊走刺激作用

免疫調節の1つとして薬理作用の一部にあってMDP自体より強い活性を示すことが別の研究^{9, 67, 68)}で知られており、6-0-アシル-MDP (表1) の単球遊走刺激作用をMDPのそれと比較した実験成績を図11に示した。6-0-オクタデカノイル-MDP (L18-MDP), 6-0-(2-テトラデシルヘキサデカノイル)-MDP (B30-MDP) ならびに6-0-(3-ハイドキシ-2-ドコシルヘキサコサノイル)-MurNAc-L-Ser-D-isoGln (BH48-MDP (L-Ser)) のいずれにも明確な単球遊走刺激作用が認められた。この活性を示す用量は、MDPの0.01 μ g ならびに0.1 μ g (20.3 p.mole ならびに203 p.mole) 相当であったが、これら至適用量における単球遊走促進の程度は、MDPのそれと比較して弱いものであった。

7. S. epidermidis 細胞壁ならびにMDPの単球遊走促進作用の4エッカード法による解析

上述した細菌細胞壁ならびにMDPによると

ト単球の遊走の促進が、単球の方向性を付けた
 ない運動、すなわちランダム運動の促進 (Chemotaxis) によるものか、あるいは走化性、すな
 わち作用因子の濃度勾配に方向づけられた反
 応であるかを判定するために、ケックカーボ
 ード分析⁶⁵⁾を行なった。すなわち上室 (細胞
 浮遊液を容れた凹み) にもテスト物質を入れ
 、上下空間に種々の濃度勾配を作った場合に
 フィルム一面まで遊走する単球数を算え、
 下室のみにもテスト物質を入れた際にみられる
 それと比較した。その結果、表 2 および表 3
 に例示するようなる組み合わせで、S. epidermidis 細
 胞壁あるいは MDP と走化ケックカーボードの上室、
 下室あるいは両室に容れた場合、両空間に濃
 度勾配のない条件、すなわち表中の斜線で囲
 んだ部分では遊走の促進はほとんど認められ
 ず、上室に対する下室の濃度勾配が大まくと
 りに従って、上室に容れた単球が細胞壁ある
 いは MDP の濃度勾配に方向づけられて遊走す
 ることを明確に示す成績が得られた。すなわ

を供試した作用物質による単球の遊走の促進が、これらの物質の走化活性を主とするものであることを強く示唆する結果が得られた。

8. LPS および リポド A の単球遊走刺激作用

図 12 に示すように、S. enteritidis, E. coli および P. aeruginosa から Westphal の温フェーリール・水抽出法⁵⁷⁾ で得たリポ多糖 (LPS-W) とともに Boivin のトリクロル酢酸抽出法⁵⁸⁾ で得たリポ多糖 (LPS-B), 計 5 標品は、いづれも 0.1 から 100 mg の用量の範囲では単球遊走を有意に促進する作用を示さなかった。一方、S. minnesota および P. aeruginosa 由来の LPS を酢酸で加水分解して分離したリポド A 標品は、LPS とは異なり、明確な遊走刺激作用を発揮した。すなわちこれらリポド A 標品のピーク用量は 1~10 mg/ml であり、細胞壁関連物質のそれと比べるとかなり低い用量で活性を発現することが示された。

9. リポド A の単球遊走刺激作用の化学的解析

リポド A によるヒト単球の遊走の促進がリ

レポート A の濃度勾配に方向づけられた遷化性によ
 るものかどうかを、S. minnesota 由来のレポート
 A を供試して検討した結果が表 4 に示されて
 いる。遷化キエンバーの上下両室間に濃度勾
 配のなす斜線で囲んだ部分においても、単球
 の遊走がたかま、ていすることを示す所見が得
 られた。すなわち、レポート A による単球遊走
 の促進は、上室と下室間のレポート A の濃度勾
 配に方向づけられた遊走の促進を必ずしも反
 映せず、ユニフォーム運動の促進、すなわち (Chemo-
 kinesis) による部分が少なくなることが示唆さ
 れた。

考 察

本研究では、まず供試した 12 菌種の細菌細
 胞壁標品のうち、M. lysodeikticus のそれを除く 11
 菌種の細胞壁が、補体の供給源としての新鮮
 血清を加える条件下で、すなわち直接的に

トト単球の遊走を促進すること明らかにされた。これら細胞壁の単球遊走活性には菌種による強弱の差が認められたが、この差は細胞壁PGの免疫調節作用の強さに時として影響を与えることが知られている^{69~71)}。ニコール酸の有無や含量とは無関係であった。

ついでPG加水分解酵素(SALEやM-1酵素)を *S. epidemidis* 細胞壁PGに作用させて得た水溶性画分、すなわちPG構築単位のいわば“ポリマー”のみならず、モノマーが発見材料である細胞壁やPGに与える単球遊走刺激作用を示すこと、さらに細菌細胞壁が示す多様な免疫薬理作用の多くと同様、A群型のペフサドグリカンの要めの部分を模して合成したMDPが細胞壁PGの単球遊走刺激作用を担う最小構造単位であることが明らかにされた。ちなみに、MDPが明確な単球遊走刺激作用を発揮するという事実は、そのPG構造の一部にMDP構造を保有する *M. lysodeicticus* の細胞壁が単球遊走活性を欠くとの所見と一見矛盾する。同様の矛盾

は、抗原特異の免疫強化作用等によって認められている^{45, 72, 73)}。 M. lysodeikticus の Pg では D-グルタミン酸残基の α -カルボキシル基にグリシンが結合していること (図1参照) が関係している可能性が考えられるが、今後の検討課題といえよう。なお高田らによつて、6-O-アミル-MDP のむしろものは MDP 自体より M ϕ を刺激する活性が強いことが報告されているが⁹⁾、ヒト単球遊走刺激作用についてはむしろ逆の結果が得られた。

細胞壁, Pg, 酵素による溶解産物, MDP を供試した検査を通じて、しばしば刺激作用が最も強い至適用量の存在が認められた。細胞壁と Pg の最適用量は $1 \sim 100 \mu\text{g/ml}$ の範囲にあり、一方水溶性の SEPS, SEPS-M および合成ムラミルジペアチドのそれは 0.01 乃至 $0.1 \mu\text{g/ml}$ であり、両者の間に大きな差が認められた。これらの結果は、単球刺激作用の発現に当たっては作用因子の化学乃至分子構造のみならず分子の大きさが単球遊走刺激作用の発現に

大まなかがわりをもつことを示唆している。

緒言でも述べたように、細菌細胞壁ならびに関連物質の単球-Mφの遊走に対する作用を調べた研究報告としては、やはり吉田とHassonの日本医学協力結核専門部会での報告⁴⁰⁾があるのみである。彼らは、MDPが $0.01 \mu\text{g/ml}$ を最適量として、BALB/cマウスの腹腔滲出Mφに対して走化活性を発現したか、Hartley系モルトの腹腔滲出Mφに対しては作用しなかったと述べている。上記報告の記述からは実験条件の詳細は明らかでないが、細胞壁ならびに関連物質の単球-Mφの遊走に対する刺激作用を研究するに当たっては、供試する細胞が由来する動物の種差や細胞の生理状態が結果を左右する要因として考慮されねばならないと考えられる。

細菌細胞壁およびMDPと同様、多少の免疫調節作用を示すことが知られているLPSはそれ自体は不活性であったが、LPSの免疫生理作用の発現に中心的な役割を演じるリポドA

を分離して検定に供したところ、明確なヒト
単球遊走刺激性が認められた。最近、Verghese
と Synderman は⁴¹⁾、血清無添加の条件下で、LPS
に抵抗性の C3H/HeJ ならびに C57BL10/ScCR マウ
スの腹腔滲出 Mφ は *E. coli* や *S. minnesota* 由来の LPS
の作用によってランダム運動の亢進による遊
走促進 (Chemokinesis) を示すが、LPS に感受性の C3
H/HeN および C57BL10/SN マウスの腹腔滲出 M
φ では遊走の亢進は認められず、またリポド
A 標品に C3H/HeJ Mφ の遊走を誘導する活性が
みられたと報告している。ヒト末梢血単球を
供試した本研究では、LPS による遊走の促進
は観察されなかったが、リポド A 標品は明確
な単球遊走の促進をもたらすこと、かつ彼ら
の所見と一致して、リポド A による遊走促進
に Chemokinesis が関与していることが示された。
ちなみに現在芝教授の研究室で、サルモネラ
のリポド A 部分を模して3種類におよぶグル
コサミンジサッカリドのアシルならびにフォ
スホリル誘導体が合成されているが、著者

はこれら合成品の恵与を受け、ヒト単球の遊走に対する作用を調べた。その結果これら標品のあふものがLPSより調製したリポドAに匹敵する単球遊走促進作用を示すことが明らかになったがこれらの成績については別に報告する(未発表)。

細菌細胞壁ならびにLPSが補体系を活性化することはよく知られているが、著者の研究は反流系に補体の供給源としての新鮮血清を加えない条件の下で実施されたものである。したがって補体の活性化に伴う走化因子の生成が結果に影響を与える可能性は除外される。ちなみに、河崎は、細菌細胞壁ならびにSEPSはヒト補体系を別経路(時として古典経路をも介して)により活性化するが、SEPS-MならびにMDPにはこのような作用を検出できなかったと報告している⁷⁴⁾。この結果も、SEPS-MやMDPの単球遊走刺激作用が単球やその他の細胞が保持するかも知れない補体成分⁷⁵⁾の活性化と走化因子の生成によるかもしれない

という可能性を除外するもの云々。

ともあれ、抗原特異的ではなく、非特異的な生体防禦機構の発現に重要な役割を担う単球-Mφ系細胞を反応部位に集積させる作用物質としての細菌細胞壁は、補体の存在する条件下では補体の活性化に伴う走化性因子の生成を介しても作用し、また補体の存在しない条件下では単球(Mφ)の走化性を直接的に誘導する " Chemotaxin " と云えらる。

他方、LPSは直接的な単球遊走刺激作用は欠くが、補体を活性化して走化因子を産生する " Chemotaxigen " であり、加えてそのリポドA部分には単球(Mφ)の遊走を直接たかめる作用が保持されていることが判明した。ちなみに、LPSのリポドAは単球に作用して、リポポリサッカライドの一種である単球走化性因子 (MCF, monocyte chemotactic factor) を産生するとの報告⁷⁶⁾もある。すなわち細菌細胞の表層を構築する免疫薬理学的活性物質である細胞壁ヤコ4ドグリカンおよびLPSは、様々な機

序によつて単球-マφ系細胞を反応部位に集積させる作用を發揮すると考えられる。

ともあれ、本研究で得られた知見は、細胞壁PGやLPSの免疫薬理作用に新しい一項目をつけ加えたものといえよう。

総 括

種々のグラム陽性菌の細胞壁、ペプチドグリカン (PG), S. epidermidis PGを酵素処理して得た水溶性のPG構築成分、PGの構築単位の一部を模して合成したN-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン (MDP), その6-0-アシル誘導体、つまりにグラム陰性細菌細胞壁の外膜成分であるリポ多糖体 (LPS) およびそのリポドA部分を供試して、ヒト末梢血単球の遊走に好する作用を、48穴走化キエニバーを用いるメンブランフィルター法により調べ、次の結果を得た。

1. M. lysodeikticus を除く 11 菌種の細菌細胞壁標品のすべてが、強弱の差はあるが、球菌の遊走をたかめる明確な作用を示した。

2. 4 菌種の細胞壁より分離した所標品も、対応する細胞壁に比べるとやや弱いが、明確な球菌遊走刺激作用を發揮した。

3. S. epidemidis 所を酵素処理して得た水溶性の PG 構築単位中の "ポリマー" のみならず "モノマー" に、球菌の遊走をたかめる明確な作用を認められた。

4. 合成 MDP にも明確な球菌遊走刺激活性が認められた。この活性は D-イソグルタミン残基を L-イソグルタミン等にかえた 5 種類のアナログには全く認められず、MDP の上記活性がむしろ化学構造依存性を有することを示された。ちなみに、MDP の球菌遊走刺激作用は 6-O-アミル化によりむしろ弱められるとの結果を得た。

5. 4 エッカード分析により、S. epidemidis 細胞壁ならぬ MDP の球菌遊走に打する作用が

、濃度勾配に方向づけられた走化性 (Chemotaxis) によるものであることを強く示唆する結果を得た。

6. LPS には、それ自体は単球遊走を直接的にたかめる作用は認められなかったが、LPS を酢酸で加水分解して得たリポド A には単球の遊走を刺激する作用が認められた。チエック-ボード分析の結果は、リポド A の作用は、MDP のそれとは異なり、単球のランダム運動の亢進 (Chemokinesis) による部分が大きいことを示唆した。

稿を終えるにあたり、本研究のご指導、ご稿閲を賜、た口腔細菌学教室小谷尚三教授をはじめ、さまざまなお援助をいただいた教室員の方々に深く感謝致します。

また種々のムラミルペプチドおよびその6-0-アミル誘導体を恵与下さった大阪大学理学部・天然有機化学講座の芝哲夫教授、楠本正一博士をはじめとする研究グループの方々、多数の細胞壁標品の分子に与かった大日

本製薬・総合研の横川哉恵博士，河田茂雄氏
および日本医科大学・微生物学免疫学教室の
大國寿士博士ならびにLPSおよびリポドA標
品を恵与していただいた昭和大学薬学部・微
生物薬品化学教室の河西信彦教授に深く感謝
いたします。

文 献

- 1) Kato, K., Kotani, S., Kawano, K., Monodane, T., Kitamura, H., Kusumoto, S. and Shiba, T. (1982) : Monocytosis-inducing activity of L. monocytogenes cell wall and muramyl dipeptide; in Immunomodulation by microbial products and related synthetic compounds (Yamamura, Y., Kotani, S., Azuma, I., Koda, A. and Shiba, T., editor). Excerpta Medica, Amsterdam, 181-184.
- 2) Pabst, M.J. and Johnston, R.B. (1980) : Increased production of superoxide anion by macrophages exposed in vitro to muramyl dipeptide or lipopolysaccharide. J. Exp. Med., 151, 101-114.
- 3) Tanaka, A., Nagao, S., Imai, K. and Mori, R. (1980) : Macrophage activation by muramyl dipeptide as measured by macrophage spreading and attachment. Microbiol. Immunol., 24, 547-557.
- 4) Adam, A., Souvannavong, V. and Lederer, E. (1978) : Nonspecific MIF-like activity induced by the synthetic immunoadjuvant: N-acetyl muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (MDP). Biochem, Biophys. Res. Commun., 85, 684-690.

- 5) Yamamoto, Y., Nagao, S., Takada, A., Koga, T. and Onoue, K. (1978) : Inhibition of macrophage migration by synthetic muramyl dipeptide. Biochem. Biophys. Res. Commun., 80, 923-928.
- 6) Akagawa, K.S. and Tokunaga, T. (1980) : Effect of synthetic muramyl dipeptide (MDP) on differentiation of myeloid leukemic cells. Microbiol. Immunol., 24, 1005-1011.
- 7) Tanaka, A., Nagao, S., Ikegami, S., Shiba, T. and Kotani, S. (1982) : The suppression of macrophage DNA synthesis by MDP, a probable correlate of macrophage activation; in Immunomodulation by microbial products and related synthetic compounds (Yamamura, Y., Kotani, S., Azuma, I., Koda, A. and Shiba, T., editor). Excerpta Medica, Amsterdam, 201-204.
- 8) Schindler, T.E., Chedid, L.A. and Hadden, J.W. (1982) : Stimulatory effects of MDP and its butyl ester derivative on macrophage proliferation and activation in vitro. Int. J. Immunopharmacol., 4, 382.
- 9) Takada, H., Tsujimoto, M., Kato, K., Kotani, S., Kusumoto, S., Shiba, T., Yano, I., Kawata, S. and Yokogawa, K. (1979) : Macrophage activation by bacterial cell walls and related synthetic compounds. Infect. Immun., 25, 48-53.

- 10) Imai, K., Tomioka, M., Nagao, S., Kushima, K. and Tanaka, A.
(1980) : Biochemical evidence for activation of guinea pig macrophages by muramyl dipeptide. Biomed. Res., 1, 300-307.
- 11) Imai, K. and Tanaka, A. (1981) : Effect of muramyl dipeptide, a synthetic bacterial adjuvant, on enzyme release from cultured mouse macrophages. Microbiol. Immunol., 25, 51-62.
- 12) Pabst, M.J., Cummings, N.P., Shiba, T., Kusumoto, S. and Kotani, S.
(1980) : Lipophilic derivative of muramyl dipeptide is more active than muramyl dipeptide in priming macrophages to release superoxide anion. Infect. Immun., 29, 617-622.
- 13) Hadden, J.W. (1978) : Effects of isoprinosine, levamisole, muramyl dipeptide, and SM1213 on lymphocyte and macrophage function in vitro. Cancer Treat. Rep., 62, 1981-1985.
- 14) Cummings, N.P., Pabst, M.J. and Johnston, R.B., Jr. (1980) : Activation of macrophages for enhanced release of superoxide anion and greater killing of Candida albicans by injection of muramyl dipeptide. J. Exp. Med., 152, 1659-1669.

- 15) Nozawa, R.T., Sekiguchi, R. and Yokota, T. (1980) : Stimulation by conditioned medium of L-929 fibroblasts, E. coli lipopolysaccharide, and muramyl dipeptide of candidacidal activity of mouse macrophages. Cell. Immunol., 53, 116-124.
- 16) Smialowicz, R.J. and Schwab, J.H. (1978) : Inhibition of macrophage phagocytic activity by group A streptococcal cell walls. Infect. Immun., 20, 258-261.
- 17) Juy, D. and Chedid, L. (1975) : Comparison between macrophage activation and enhancement resistance to tumors by mycobacterial immunoadjuvants. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 4105-4109.
- 18) Swialowicz, R.J. and Schwab, J.H. (1977) : Cytotoxicity of rat macrophages activated by persistent or biodegradable bacterial cell walls. Infect. Immun., 17, 599-606.
- 19) Taniyama, T. and Holden, H.T. (1979) : Direct augmentation of cytolytic activity of tumor-derived macrophages and macrophage cell lines by muramyl dipeptide. Cell. Immunol., 48, 369-374.
- 20) Sone, S. and Fidler, I.J. (1980) : Synergistic activation by lymphokines and muramyl dipeptide of tumoricidal properties in rat alveolar macrophages. J. Immunol., 125, 2454-2460.

- 21) Wahl, S.M., Wahl, L.M., McCarthy, J.B., Chedid, L. and Mergenhagen, S.E. (1979) : Macrophage activation by mycobacterial water soluble compounds and synthetic muramyl dipeptide. J. Immunol. 122, 2226-2231.
- 22) Rook, G.A.W. and Stewart-Tull, D.E.S. (1976) : The dissociation of adjuvant properties of mycobacterial components from mitogenicity, and from the ability to induce the release of mediators from macrophages. Immunology, 31, 389-396.
- 23) Oppenheim, J.J., Togawa, A., Chedid, L. and Mizel, S. (1980) : Components of mycobacteria and muramyl dipeptide with adjuvant activity induce lymphocyte activating factor. Cell. Immunol., 50, 71-81.
- 24) Tenu, J.P., Lederer, E. and Petit, J.F. (1980) : Stimulation of thymocyte mitogenic protein secretion and of cytostatic activity of mouse peritoneal macrophages by trehalose dimycolate and muramyl dipeptide. Eur. J. Immunol., 10, 647-653.
- 25) Iribe, H., Koga, T., Onoue, K., Kotani, S., Kusumoto, S. and Shiba, T. (1981) : Macrophage-stimulating effect of a synthetic muramyl dipeptide and its adjuvant-active and -inactive analogs for the production of T-cell activating monokines. Cell. Immunol., 64, 73-83.

- 26) Schleifer, K.H. and Kandler, O. (1972) : Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. Bacterial. Rev., 36, 407-477.
- 27) Ellouz, F., Adam, A., Ciorbaru, R. and Lederer, E. (1974) : Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives. Biochem. Biophys. Res. Commun., 59, 1317-1325.
- 28) Kotani, S., Watanabe, Y., Kinoshita, F., Shimono, T., Morisaki, I., Shiba, T., Kusumoto, S., Tarumi, Y. and Ikenaka, K. (1975) : Immunoadjuvant activities of synthetic N-acetylmuramyl-peptides or -amino acids. Biken J., 18, 105-111.
- 29) Westphal, O. and Lüderitz, O. (1954) : Chemische Erforschung von Lipopolisacchariden gramnegativer Bakterien. Angew. Chem., 66, 407-417.
- 30) Nakano, M., Asou, H. and Yamamoto, I. (1975) : Stimulation of phagocytic activity in the reticuloendthelial systems of mice by lipid A complexed with homologous or heterologous proteins. Infect. Immun., 11, 592-594.

- 31) Allison, A.C., Davies, P. and Page, R.C. (1973) : Effects of endotoxin on macrophages and other lymphoreticular cells. J. Infect. Dis., 128(Suppl.), 212-219.
- 32) Rowley, D. (1956) : Rapidly induced changes in the level of non-specific immunity in laboratory animals. Br. J. Exp. Pathol., 37, 223-234.
- 33) Ralph, P. and Nakoinz, I. (1974) : Lipopolysaccharides inhibit lymphosarcoma cells of bone marrow origin. Nature, 249, 49-51.
- 34) Nigam, V.N. (1975) : Effect of core lipopolysaccharides from Salmonella minnesota R mutants on the survival times of mice bearing Ehrlich tumor. Cancer Res., 35, 628-633.
- 35) Mizel, S.B., Oppenheim, J.J. and Rosenstreich, D.L. (1978) : Characterization of lymphocyte-activating factor (LAF) produced by a macrophage cell line, P388D1 II. Biochemical characterization of LAF induced by activated T cells and LPS. J. Immunol., 120, 1504-1508.
- 36) Carswell, E.A., Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N. and Williamson, B. (1975) : An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 3666-3670.

- 37) Mahmood, T. and Robinson, W.A. (1978) : Granulocyte modulation of endotoxin-stimulated colony-stimulating activity (CSA) production. Blood, 51, 879-887.
- 38) Gordon, S., Unkeless, J.C. and Cohn, Z.A. (1974) : Induction of macrophage plasminogen activator by endotoxin stimulation and phagocytosis. J. Exp. Med., 140, 995-1010.
- 39) Rosenstreich, D.L., Glode, L.M., Wahl, L.M., Sandberg, A. L. and Mergenhagen, S.E. (1977) : Analysis of the cellular defects of endotoxin-unresponsive C3H/HeJ mice; in Microbiology (Schlessinger, D. editor). Am. Soc. Microbiol., Washington, D.C., 314-320.
- 40) Yoshida, T. and Hasson, M. (1982) : Suppression of cell-mediated immune reactions in animals bearing granulomatous inflammation induced by a muramyl dipeptide; in Proceedings of the 17th joint meeting of the tuberculosis panel. US-Japan cooperative medical science program, Tokyo, Japan, 322-333.
- 41) Verghese, M.W. and Snyderman, R. (1982) : Endotoxin (LPS) stimulates in vitro migration of macrophage from LPS-resistant mice but not from LPS-sensitive mice. J. Immunol., 128, 608-613.

- 42) Van Furth, R. and Cohn, Z.A. (1968) : The original and kinetics of mononuclear phagocytes. J. Exp. Med., 128, 415-433.
- 43) Boyden, S. (1962) : The chemotactic effect of mixture of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocyte. J. Exp. Med., 115, 453-466.
- 44) Kotani, S., Kitaura, T., Hirano, T. and Tanaka, A. (1959) : Isolation and chemical composition of the cell walls of BCG. Biken J., 2, 129-141.
- 45) Kotani, S., Narita, T., Stewart-Tull, D.E.S., Shimono, T., Watanabe, Y., Kato, K. and Iwata, S. (1975) : Immunoadjuvant activities of cell walls and their water-soluble fractions prepared from various gram-positive bacteria. Biken J., 18, 77-92.
- 46) Takada, H., Hirachi, Y., Hashizume, H. and Kotani, S. (1980) : Mitogenic activity of cytoplasmic membranes isolated from L-forms of Staphylococcus aureus. Microbiol. Immunol. 24, 1079-1090.
- 47) Ohkuni, H. and Kimura, Y. (1976) : Increased capillary permeability in guinea pigs and rats by peptidoglycan fraction extracted from group A streptococcal cell walls. Expl. Cell. Biol., 44, 83-94.

- 48) Fuller, A.T. (1938) : The formamide method for the extraction of polysaccharide from haemolytic streptococci. Br. J. Exp. Pathol., 19, 130-139.
- 49) Harada, K., Kotani, S., Takada, H., Tsujimoto, M., Hirachi, Y., Kusumoto, S., Shiba, T., Kawata, S., Yokogawa, K., Nishimura, H. Kitaura, T. and Nakajima, T. (1982) : Liberation of serotonin from rabbit blood platelets by bacterial cell walls and related compounds. Infect. Immun., 37, 1181-1190.
- 50) Yokogawa, K., Kawata, S., Takemura, T. and Yoshimura, Y. (1975) : Purification and properties of lytic enzymes from Streptomyces globisporus 1829. Agr. Biol. Chem., 39, 1533-1543.
- 51) Kusumoto, S., Tarumi, Y., Ikenaka, K. and Shiba, T. (1976) : Chemical syntheses of N-acetylmuramyl peptides with partial structure of bacterial cell wall and their analogs in relation to immunoadjuvant activity. Bull. Chem. Soc. Jpn., 49, 533-539.
- 52) Kusumoto, S., Okada, S., Shiba, T., Azuma, I. and Yamamura, Y. (1976) : Synthesis of 6-O-mycoloyl-N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine with immunoadjuvant activity. Tetrahedron Lett., 47, 4287-4290.

- 53) Kusumoto, S., Inage, M. and Shiba, T. (1978) : Synthesis of long chain fatty acid esters of N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine in relation to antitumor activity. Tetrahedron Lett., 49, 4899-4902.
- 54) Kusumoto, S., Okada, S., Yamamoto, K. and Shiba, T. (1978) : Synthesis of 6-O-acyl derivatives of immunoadjuvant active N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine. Bull. Chem. Soc. Jpn., 51, 2122-2126.
- 55) Shiba, T., Okada, S., Kusumoto, S., Azuma, I. and Yamamura, Y. (1978) : Synthesis of 6-O-mycoloyl-N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine with antitumor activity. Bull. Chem. Soc. Jpn., 51, 3307-3311.
- 56) Boivin, A., Mesrobian, I. and Mesrobian, L. (1933) : Extraction d'un complexe toxique et antigénique a partir du Bacille d'Aertrycke. Compt. Rend. Soc. Biol., 114, 307-310.
- 57) Westphal, O., Lüderitz, O. and Bister, F. (1952) : Über die Extraction von Bakterien mit Phenol/Wasser. Z. Naturforschg., 7b, 148-155.
- 58) 河西信彦 (1979) : Endotoxin の構造と機能に関する最近の知見. 日細菌誌, 34, 489 - 504, 昭和54.

- 59) Shiffmann, E., Corcoran, B.A. and Wahl, S.M. (1975) :
N-formylmethionyl peptides as chemoattractants for leukocytes. Proc.
Nat. Acad. Sci. USA, 72, 1059-1062.
- 60) Snyderman, R. and Pike, M.C. (1978) : Methodology for monocyte
and macrophage chemotaxis; in Leukocyte chemotaxis: methods, physiology,
and clinical implications (Gallin, J.I. and Quie, P.G. editor).
Raven Press, New York, 73-78.
- 61) Snyderman, R., Altman, L.C., Hausman M. S. and Mergenhagen, S.E.
(1972) : Human mononuclear leukocyte chemotaxis: A Quantitative assay
for humoral and cellular chemotactic factors. J. Immunol. 108, 857-860.
- 62) Böyum, A. (1968) : Isolation of mononuclear cells and granulocytes
from human blood. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 21(Suppl. 97), 77-89.
- 63) Falk, W., Goodwin, R.H., Jr. and Leonard, E.J. (1980) :
A 48-well micro chemotaxis assembly for rapid and accurate measurement
of leukocyte migration. J. Immunol. Methods, 33, 239-247.
- 64) Harvath, L., Falk, W. and Leonard, E.J. (1980) : Rapid quantitation
of neutrophil chemotaxis: Use of a polyvinylpyrrolidone-free polycarbonate
membrane in a multiwell assembly. J. Immunol. Methods, 37, 39-45.

- 65) Zigmond, S.H. and Hirsch, J.G. (1973) : Leukocyte locomotion and chemotaxis: New methods for evaluation, and demonstration of a cell-derived chemotactic factor. J. Exp. Med., 137, 387-410.
- 66) Kotani, S., Takada, H., Tsujimoto, M., Ogawa, T., Kato, K., Okunaga, T., Ishihara, Y., Kawasaki, A., Morisaki, I., Kono, N., Shimono, T., Shiba, T., Kusumoto, S., Inage, M., Harada, K., Kitaura, T., Kano, S., Inai, S., Nagaki, K., Matsumoto, M., Kubo, T., Kato, M., Tada, Z., Yokogawa, K., Kawata, S. and Inoue, A. (1981) : Immunomodulating and related biological activities of bacterial cell walls and their components, enzymatically prepared or synthesized; in Immunomodulation by bacteria and their products (Friedman, H., Klein, T.W. and Szentivanyi, A. editor). Plenum Press, New York, 231-273.
- 67) 辻本雅哉 (1981) : 6-O-アシルムラミルジペプチドの細胞性および体液性免疫強化作用を實用することとを目的とした基礎的研究. 阪大歯学誌, 26, 63 - 83, 昭和56.

- 68) Ishihara, Y., Takada, H., Kotani, S., Kusumoto, S., Shiba, T., Kawata, S. and Yokogawa, K. (1982) : Stimulation polymorphonuclear leukocytes by bacterial cell wall components and related synthetic compounds; in Immunomodulation by microbial products and related synthetic compounds (Yamamura, Y., Kotani, S., Azuma, I., Koda, A. and Shiba, T. editor). Excerpta Medica, Amsterdam, 217-220.
- 69) Azuma, I., Taniyama, T., Sugimura, K., Aladin, A.A. and Yamamura, Y. (1976) : Mitogenic activity of the cell walls of mycobacteria, Nocardia, corynebacteria and anaerobic coryneforms. Japan. J. Microbiol., 20, 263-271.
- 70) Azuma, I., Sugimura, K., Yamazaki, M., Uemiya, M. and Yamamura, Y. (1977) : Mitogenic activity of cell-wall components in mouse spleen cells. Microbiol. Immunol., 21, 111-115.
- 71) Takada, H., Tsujimoto, M., Kotani, S., Kusumoto, S., Inage, M., Shiba, T., Nagao, S., Yano, I., Kawata, S. and Yokogawa, K. (1979) : Mitogenic effects of bacterial cell walls, their fragments, and related synthetic compounds on thymocytes and splenocytes of guinea pigs. Infect. Immun., 25, 645-652.

- 72) Ogawa, T., Kotani, S., Tsujimoto, M., Kusumoto, S., Shiba, T., Kawata, S. and Yokogawa, K. (1982) : Contractile effects of bacterial cell walls, their enzymatic digests, and muramyl dipeptides on ileal strips from guinea pigs. Infect. Immun., 35, 612-619.
- 73) Ogawa, T., Takada, H., Kotani, S., Kusumoto, S., Shiba, T., Kawata, S., Yokogawa, K. and Inoue, A. (1982) : "Basophile leukocyte stimulation" by bacterial cell walls and related compounds; in Immunomodulation by microbial products and related synthetic compounds (Yamamura, Y., Kotani, S., Azuma, I., Koda, A. and Shiba, T. editor). Excerpta Medica, Amsterdam, 221-224.
- 74) 河崎顕則 (1982) : 細菌細胞壁成分に酵素処理あるいは合成により得た細胞壁構築成分によるヒト補体の活性化. 阪大医学誌, 27, 46 - 61, 昭和57.
- 75) Colten, H.R., Ooi, Y.M. and Edelson, P.J. (1979) : Synthesis and secretion of complement proteins by macrophages. Ann. N.Y. Acad. Sci., 332, 482-490.
- 76) Wahl, S.M., Iverson, G.M. and Oppenheim, J.J. (1974) : Induction of guinea pig B-cell lymphokine synthesis by mitogenic and nonmitogenic signals to Fc, Ig, and C3 receptors. J. Exp. Med., 140, 1631-1645.

STIMULATING OF HUMAN MONOCYTE MIGRATION BY IMMUNOMODULATING COMPONENTS
FROM BACTERIAL CELL SURFACE AND RELATED COMPOUNDS

Tomohiko OGAWA

~~Department of Microbiology and Oral Microbiology, Osaka University~~

~~Dental School, 3-48, Nakanoshima 4-chome, Kita-Ku, Osaka, Japan~~

Bacterial cell walls, peptidoglycans (PG), water-soluble fragments of a PG, synthetic N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (MDP), 6-O-acyl derivatives of MDP, lipopolysaccharides (LPS) and their lipid A moieties were examined for the migration-stimulating activity on human peripheral blood monocytes, without the mediation of serum complement components, by a membrane filter method using a multiwell chemotaxis assembly.

Cell walls isolated from 12 bacterial species caused a definite increase in monocyte migration, except the wall of Micrococcus lysodeikticus which was scarcely active. The migration-enhancing activity of Staphylococcus epidermidis walls was retained by a monomer as well as a polymer of disaccharide-peptides which were prepared by controlled hydrolysis of the peptidoglycan with PG-splitting enzymes.

Further study showed that the enhanced migration of monocytes was caused by synthetic MDP molecule. Specificity (dependency on chemical structure) of the migration-stimulating activity of MDP was evidenced by no activity of analogs lacking most of the immunopharmacological activities. 6-O-Octadecanoyl-MDP, 6-O-(2-tetradecylhexa-

decanoyl)-MDP, and 6-O-(3-hydroxy-2-docosylhexacosanoyl)-N-acetyl-muramyl-L-seryl-D-isoglutamine were active, but to lesser extent than MDP.

A checkerboard assay demonstrated that the increased monocyte migration caused by either *S. epidermidis* cell walls or MDP was directed toward a positive stimulus (chemotaxis).

LPS, in the absence of serum, unaffected the migration of monocytes, whereas a lipid A moiety of the molecule definitely stimulated the migration of monocytes, mainly by increased chemokinesis.

図 の 説 明

図1 A群型の細胞壁ペプチドグリカンタイプ
 の模式的な化学構造および本研究に
 用いた2種類のペプチドグリカン加水
 分解酵素の作用点。Lys-タイプ：Staphy-
lococcus aureus, Streptococcus pyogenesなど；Aspm-タ
 イプ：Lactobacillus plantarum, Mycobacterium smegmatis,
Nocardia spp., Streptomyces gardneriなど；D-Glu^αGly
 タイプ：Micrococcus lysodeikticusなど。Aspm-タ
 イプのペプチドグリカンの隣接する軸
 ペプチドは、ペプチドやアミノ酸の介
 在なしに直接結合している。

▲：SALEエニドペプチドの作用点
 を示す。△：M-1エニド-N-アセ
 テル4ラミダの作用点を示す。□
 ：N-アセチル4ラミル-L-アラニ
 ル-D-イソグルタミン(MDP)。

GlcNac：N-アセチルグルコサミン，Mur
 Nac：N-アセチル4ラミン酸，meso-Aspm

: meso 型 2,6-ジ"アミノ"ピロリ"ン酸。

図2 Staphylococcus epidermidis 細胞壁ペプチドグリカン
を酵素処理して得たペプチドグリカン構築單位の“ポリマー” (SEPS)
および“モノマー” (SEPS-M) の推定構造

図3 MDP ならびに種々のアナログの化学構造

図4 48穴走化チエンバーを用いて検定した FMLP (A) および LPS 活性化ヒト血清 (B) による単球遊走刺激作用 (用量・反応曲線)。各テスト物質の各用量ごとに3通り培養し、一視野当たりの平均遊走単球数を算出し、平均値と標準誤差 (S. E.) とを求めた。破線は、Gey's BSA-GVB⁺⁺ 培養液のみ陰性対照における遊走単球数を示す。*は Student t - 検

定により、テスト培養と対照培養の間に1%以下の危険率で有意の差がみられたことも示す。

図5 細胞濃度がFMLP ($10^{-8}M$) およびLPS活性化血清 (10倍希釈) によるヒト単球の遊走におよぼす影響の検討。実験条件および有意差の検定は図4に同じ。

図6 培養時間がFMLP ($10^{-8}M$) およびLPS活性化血清 (10倍希釈) による単球遊走におよぼす影響の検討。実験条件および有意差の検定は図4に同じ。

図7 種々の細菌細胞壁のヒト単球に対する遊走刺激作用。陽性対照での平均遊走単球数は、FMLP ($10^{-8}M$) では 99 ± 2 (S.E.) (a), 59 ± 3 (S.E.) (b) ならびに 55 ± 2 (S.E.) (c), 陰性対照 (破線) のそれは 6 ± 1 (S.E.)

(a , b および c) であつた。他の実験条件および有意差の検定は図4に同じ。

図8 種々の細菌細胞壁とペプタドグリカンの単球遊走刺激作用の比較。陽性対照での平均遊走単球数は、FMLP ($10^{-8}M$) では 97 ± 2 (S. E.), LPS 活性化血清 (10倍希釈) では 96 ± 3 (S. E.), 陰性対照 (破線) のそれは 6 ± 1 (S. E.) であつた。他の実験条件および有意差の検定は図4に同じ。

図9 *S. epidermidis* 細胞壁, ペプタドグリカン (PG) および PG加水分解酵素による溶解物から分離した PG構築単位の "オリマー", SEPS ならびにモノマー, SEPS-M の単球遊走刺激作用の比較。陽性対照での平均遊走単球数は FMLP ($10^{-8}M$) では 140 ± 2 (S. E.), LPS 活性化血清

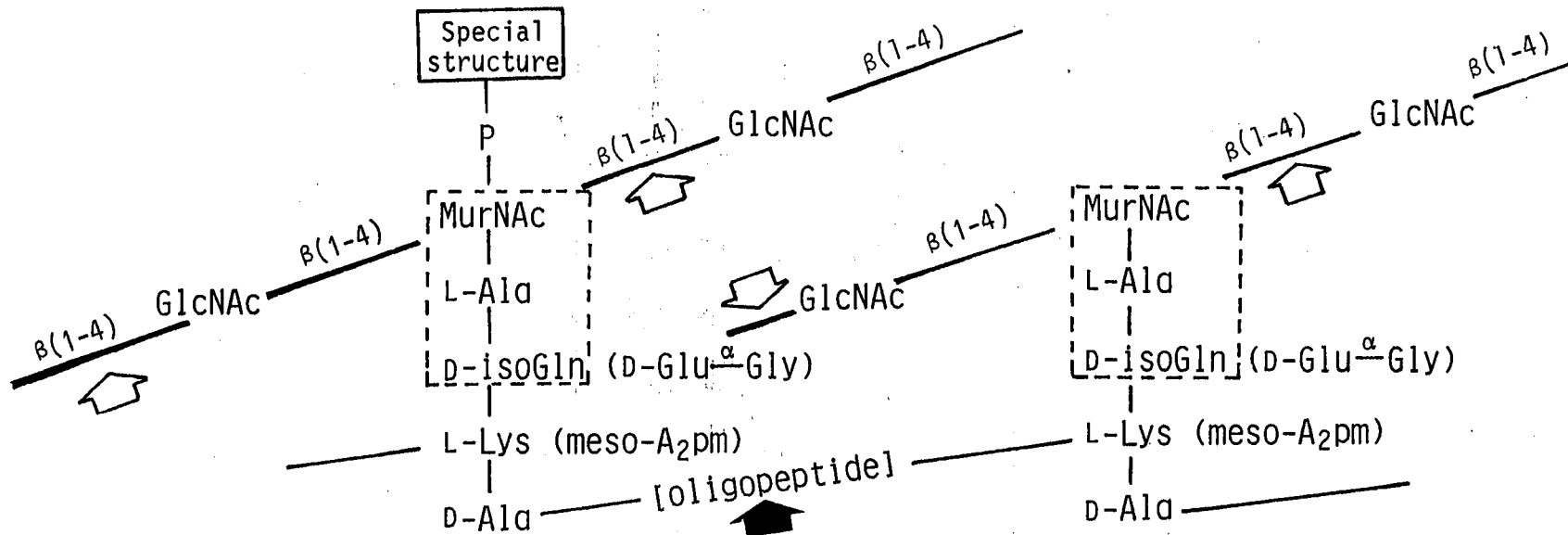
(10倍稀釈)では 126 ± 4 (S. E.), 陰性対照(破線)のそれは 7 ± 1 (S. E.)であった。他の実験条件および有意差の検定は図4に同じ。

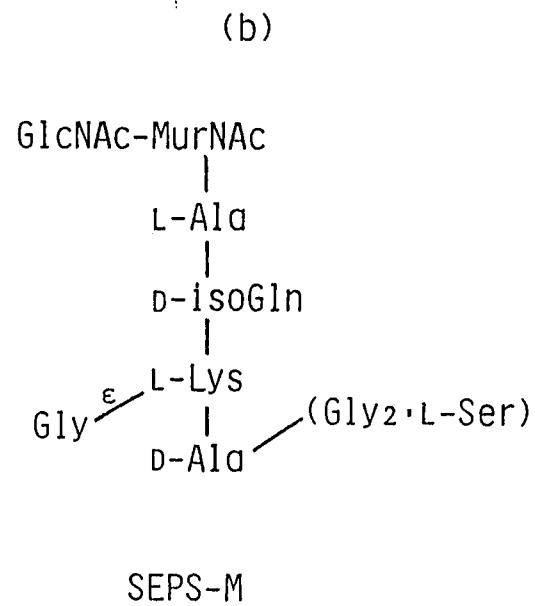
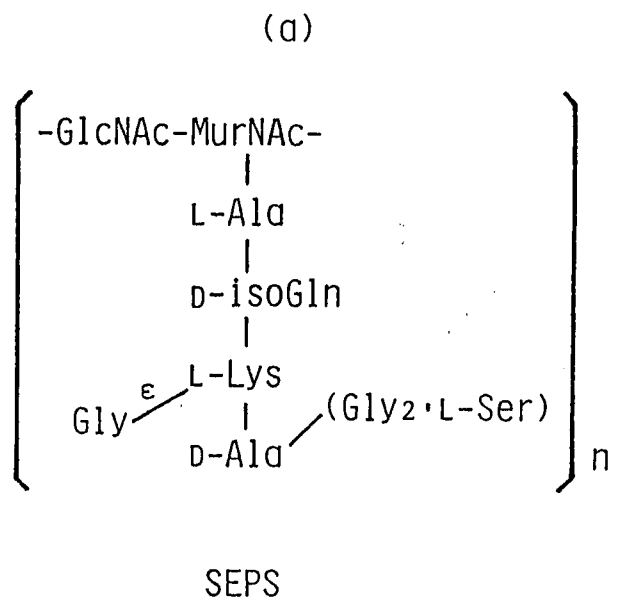
図10 MDPおよび種々のアナログの単球遊走に対する作用。●: MDP, ○: MurNAc-L-Ala-L-isoGln, △: MurNAc-L-Ala-D-isoAsn, □: MurNAc-L-Ala-D-Gln, ▲: MurNAc-L-Ala-D-Glu, ■: MurNAc-L-Ala-L-Glu。陽性対照での平均遊走単球数は、FMLP (10^{-8} M)では 52 ± 3 (S. E.), LPS活性化血清(10倍稀釈)では 70 ± 4 (S. E.), 陰性対照(●)のそれは 5 ± 1 (S. E.)であった。他の実験条件および有意差の検定は図4に同じ。

図11 MDPおよび6-D-アシル-MDPの単球遊走刺激作用。●: MDP, ○: L18-

MDP, ■ : B30-MDP, ▲ : BH48-MDP (L-Ser)。陽性対照ならびに陰性対照 (●) での平均遊走単球数は、図10のそれに同じ。他の実験条件および有意差の検定は図4に同じ。

図12 種々のLPSならびにリポドA標品の単球遊走に対する作用。陽性対照での平均遊走単球数は、FM LP (10^{-8} M) では 71 ± 4 (S. E.), LPS 活性化血清 (10倍稀釈) では 91 ± 2 (S. E.), 陰性対照 (破線) のそれは 11 ± 1 (S. E.) であった。他の実験条件および有意差の検定は図4に同じ。





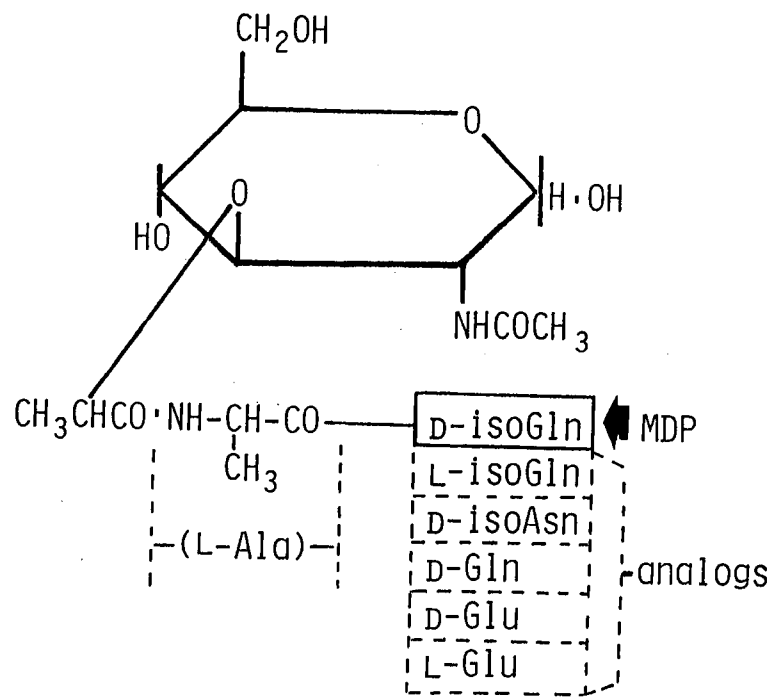
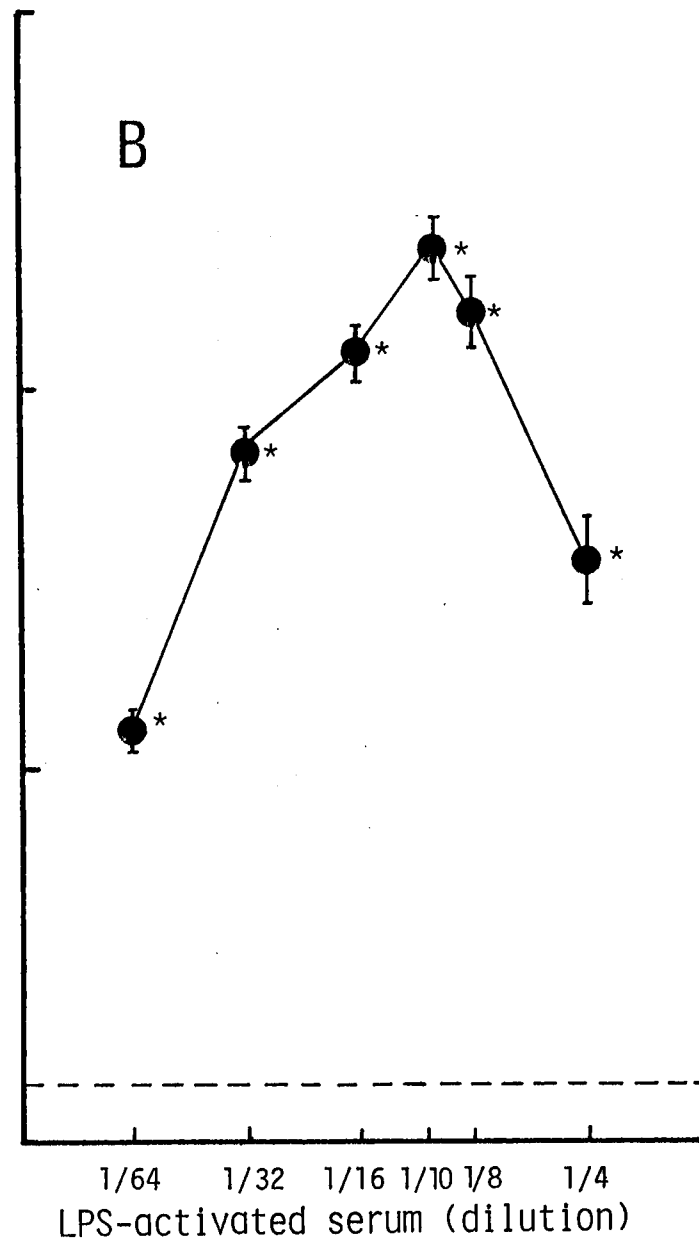
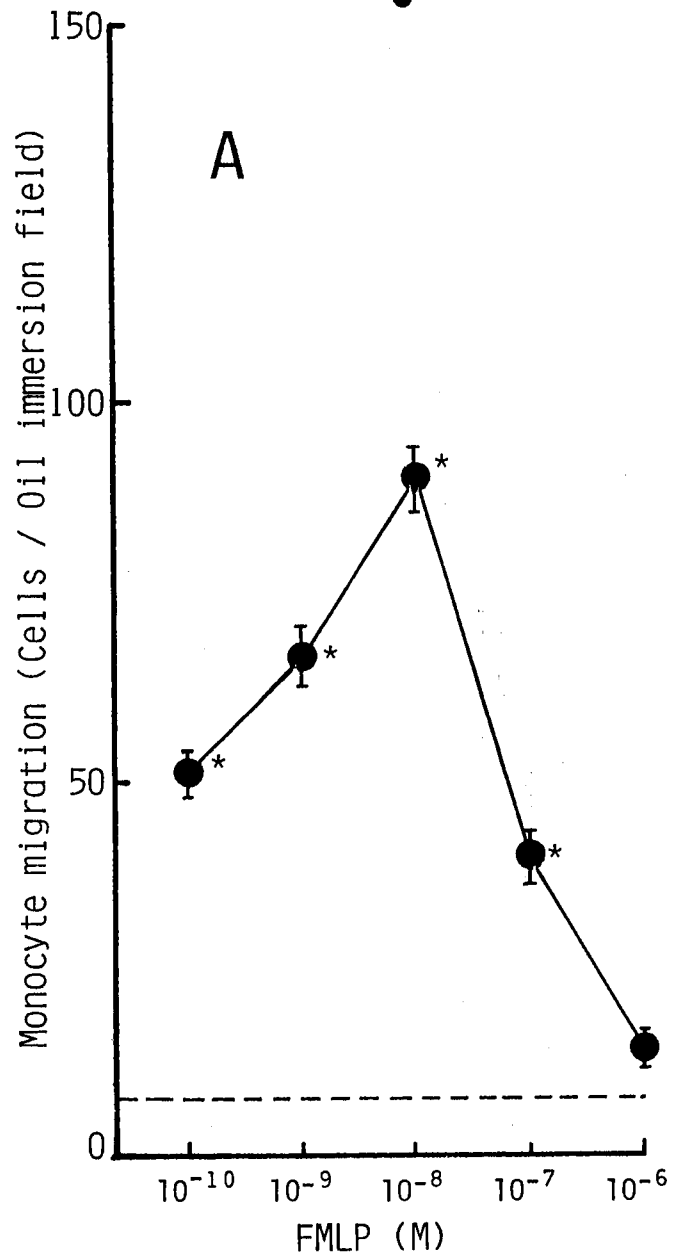


图 3



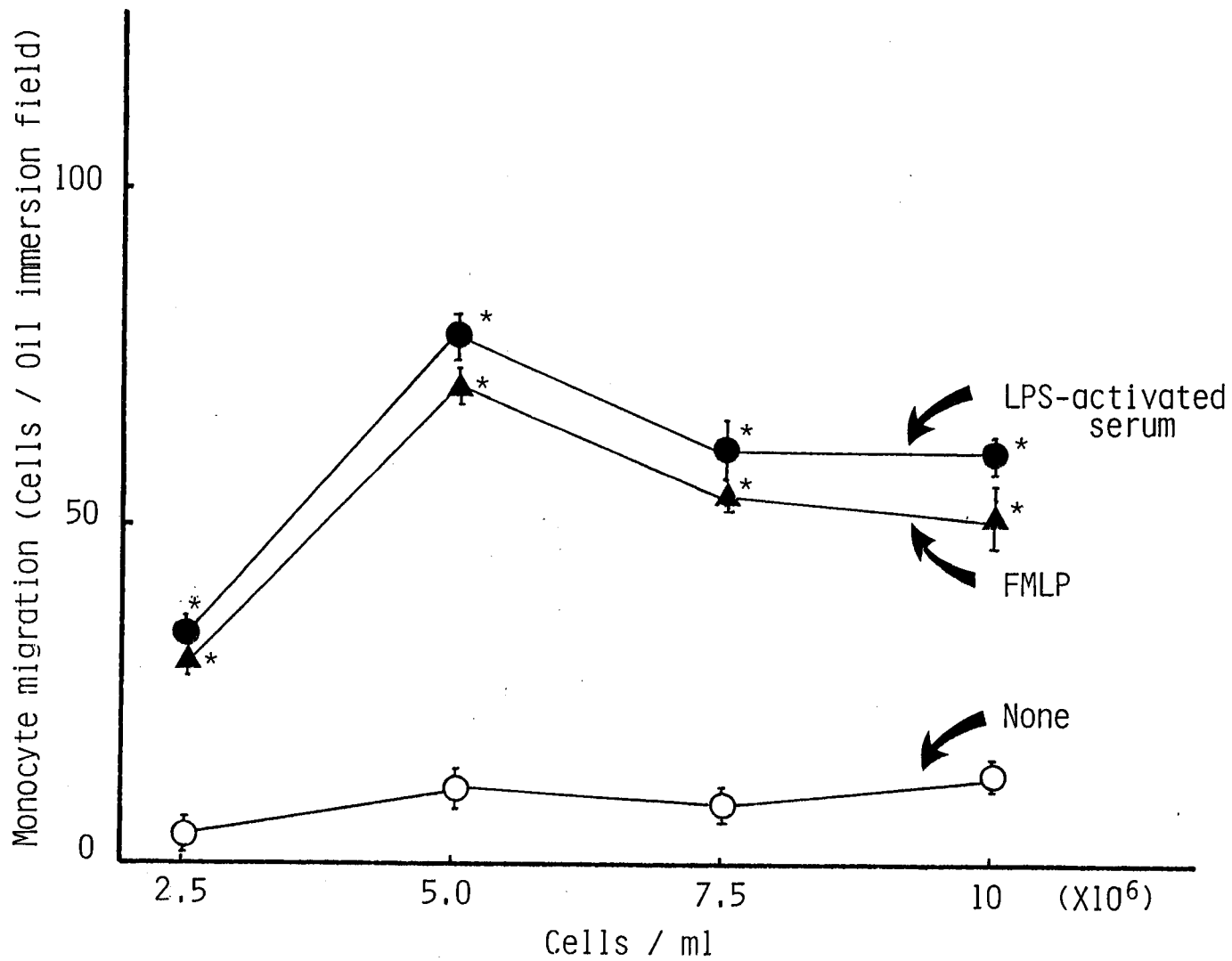


圖5

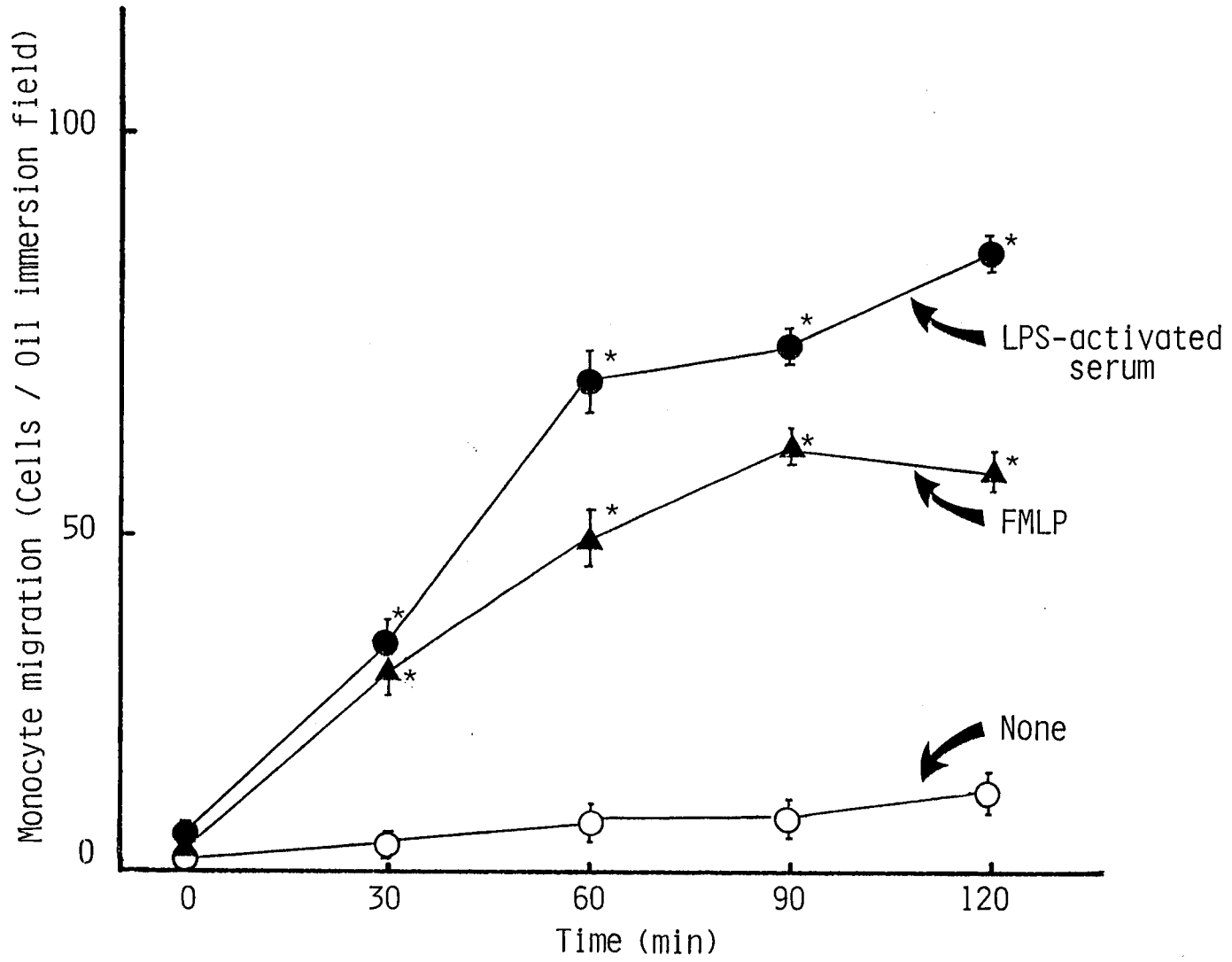
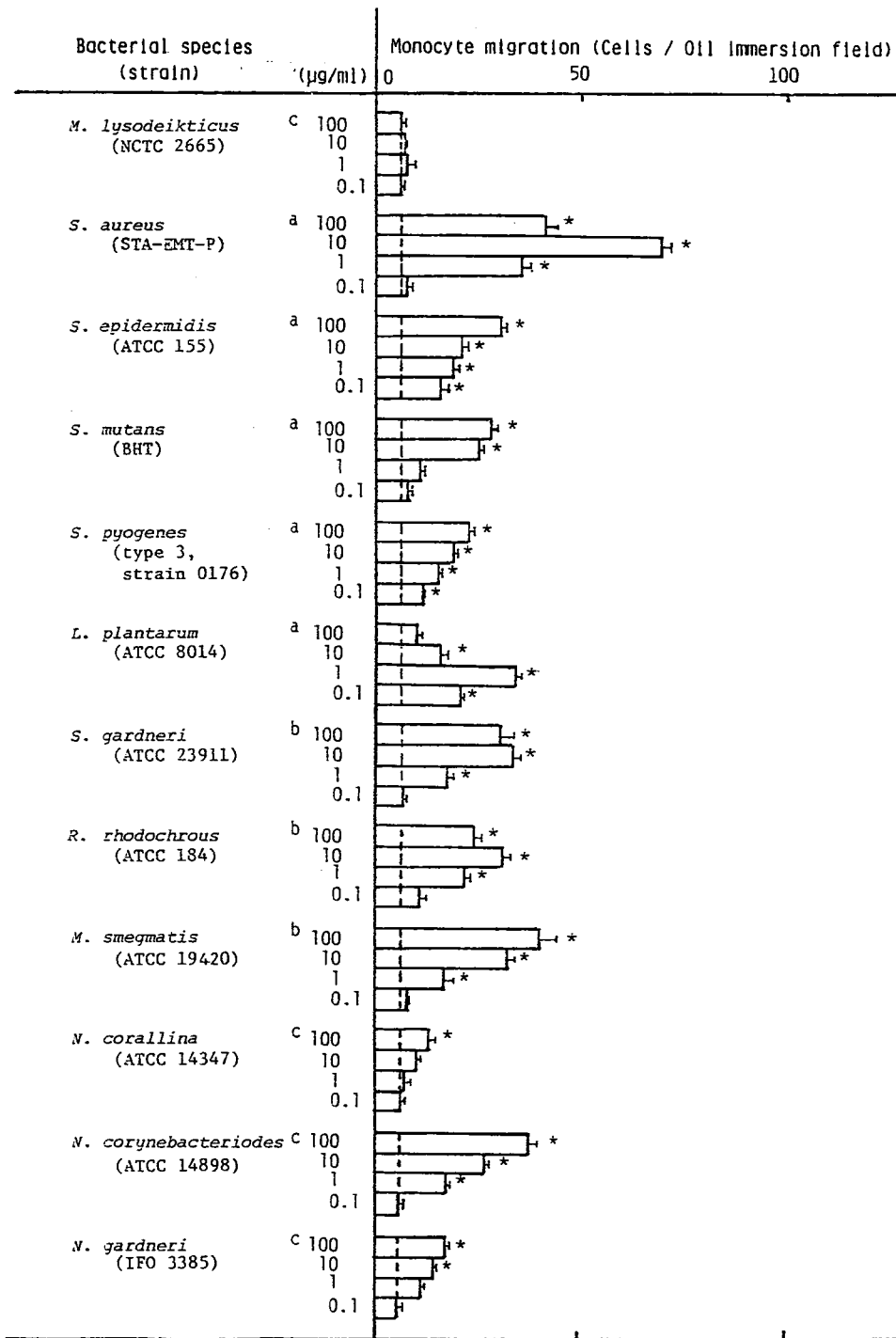


图6



Monocyte migration
(Cells / Oil immersion field)

Test specimen ($\mu\text{g/ml}$)

0

50

100

S. aureus

(STA-EMT-P)

Cell walls

100

10

1

0.1

Peptidoglycans

100

10

1

0.1

S. epidermidis

(ATCC 155)

Cell walls

100

10

1

0.1

Peptidoglycans

100

10

1

0.1

S. pyogenes

(type 3,

strain 0176)

Cell walls

100

10

1

0.1

Peptidoglycans

100

10

1

0.1

L. plantarum

(ATCC 8014)

Cell walls

100

10

1

0.1

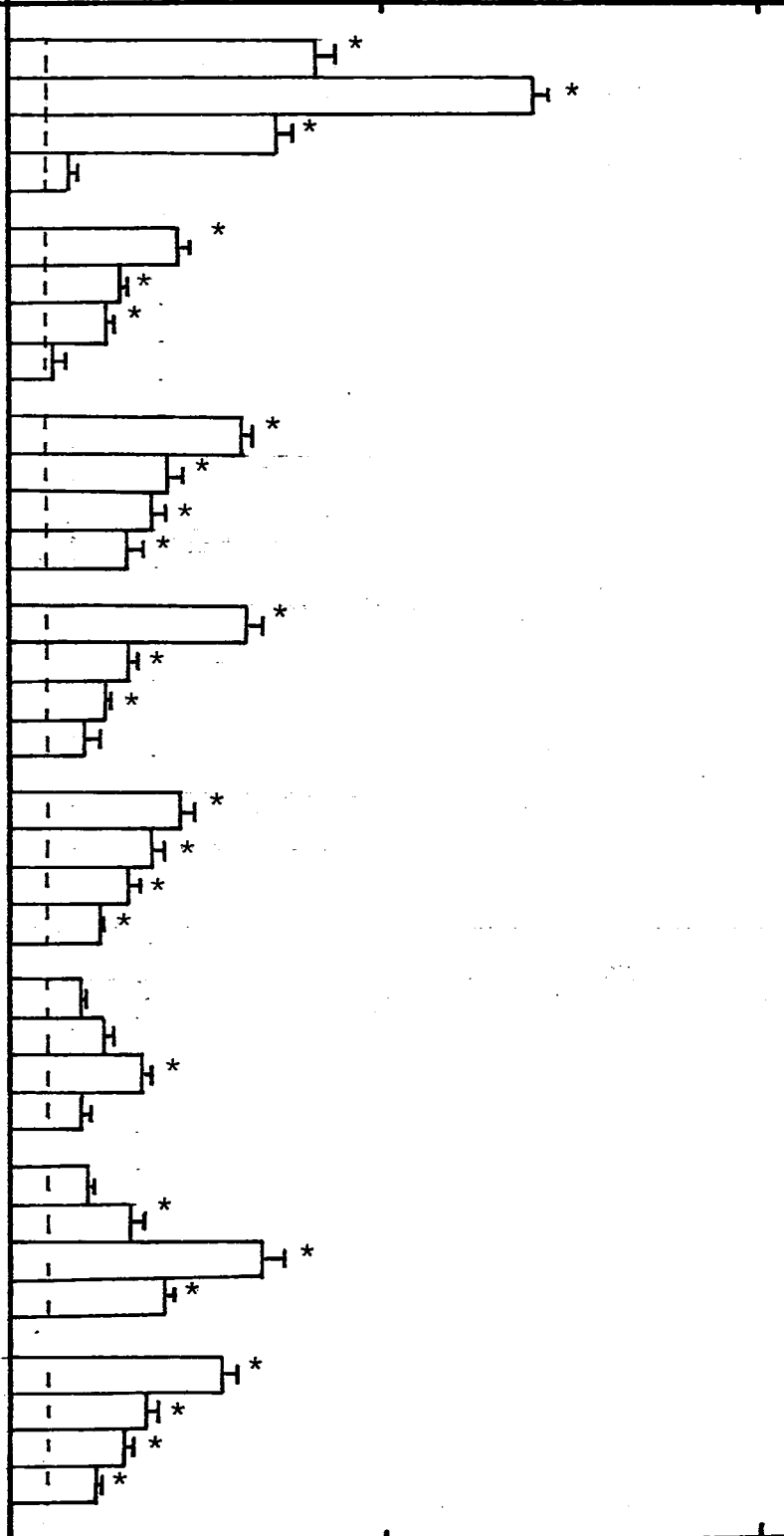
Peptidoglycans

100

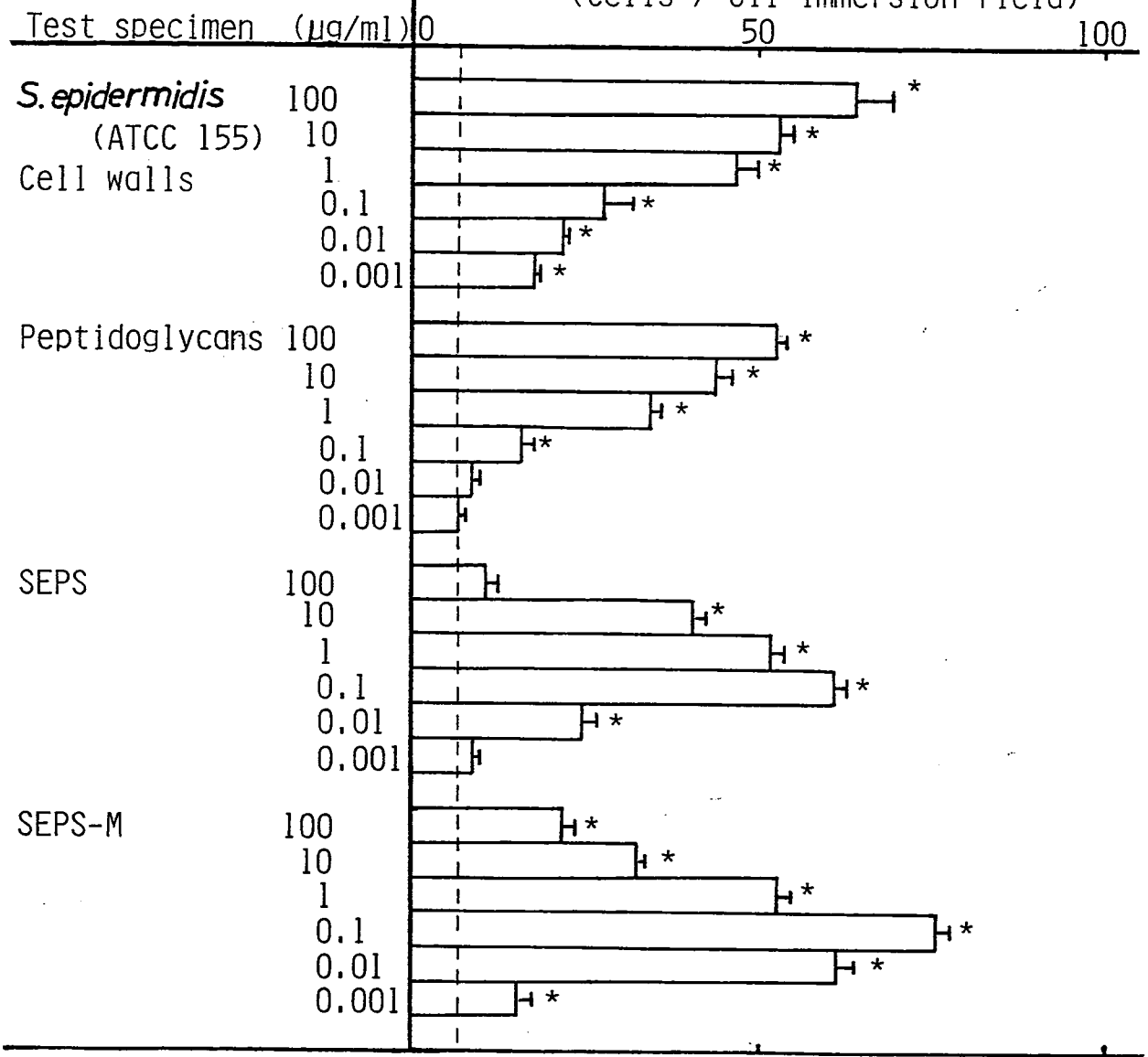
10

1

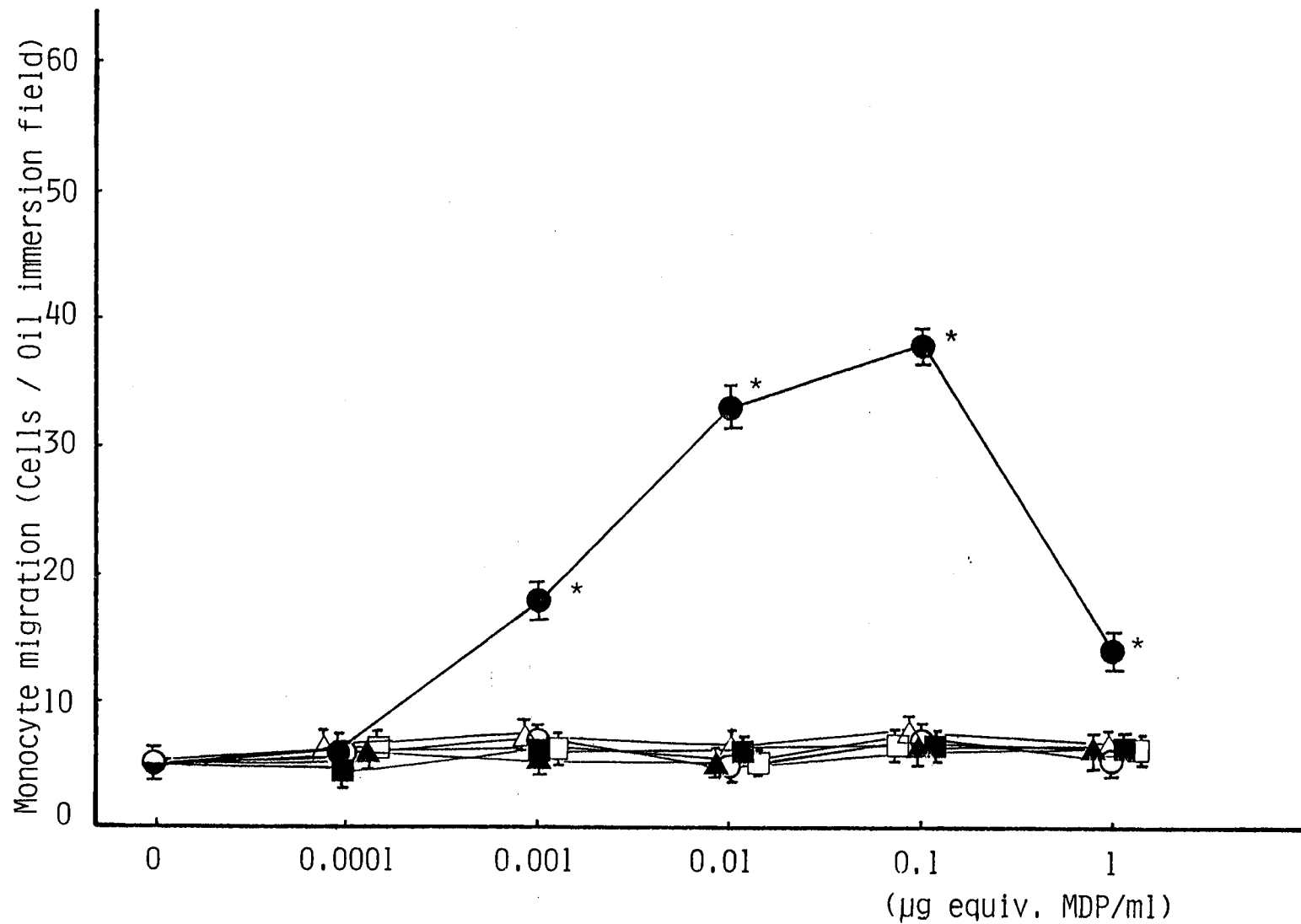
0.1



Monocyte migration
(Cells / Oil immersion field)



9



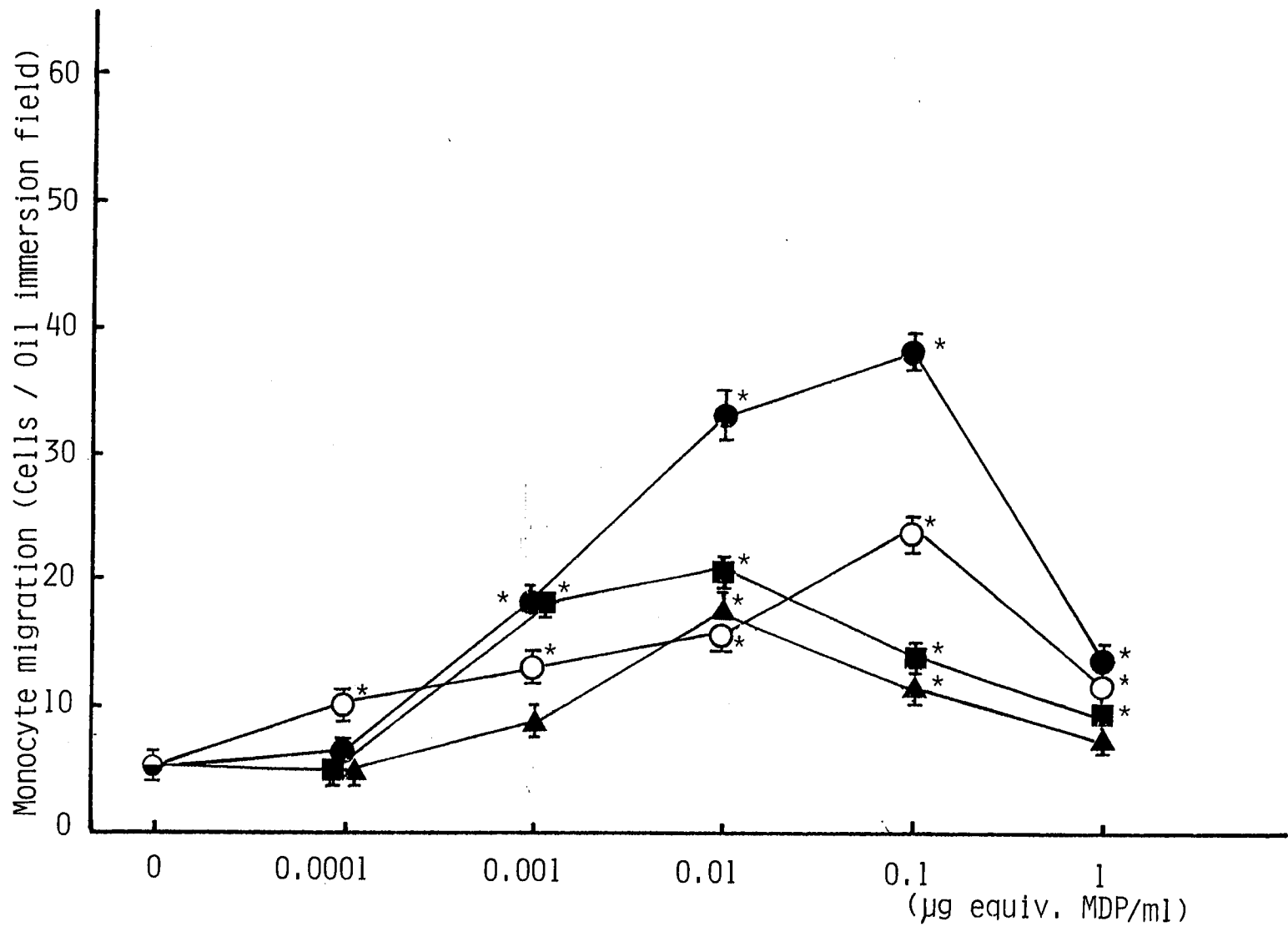


图 11

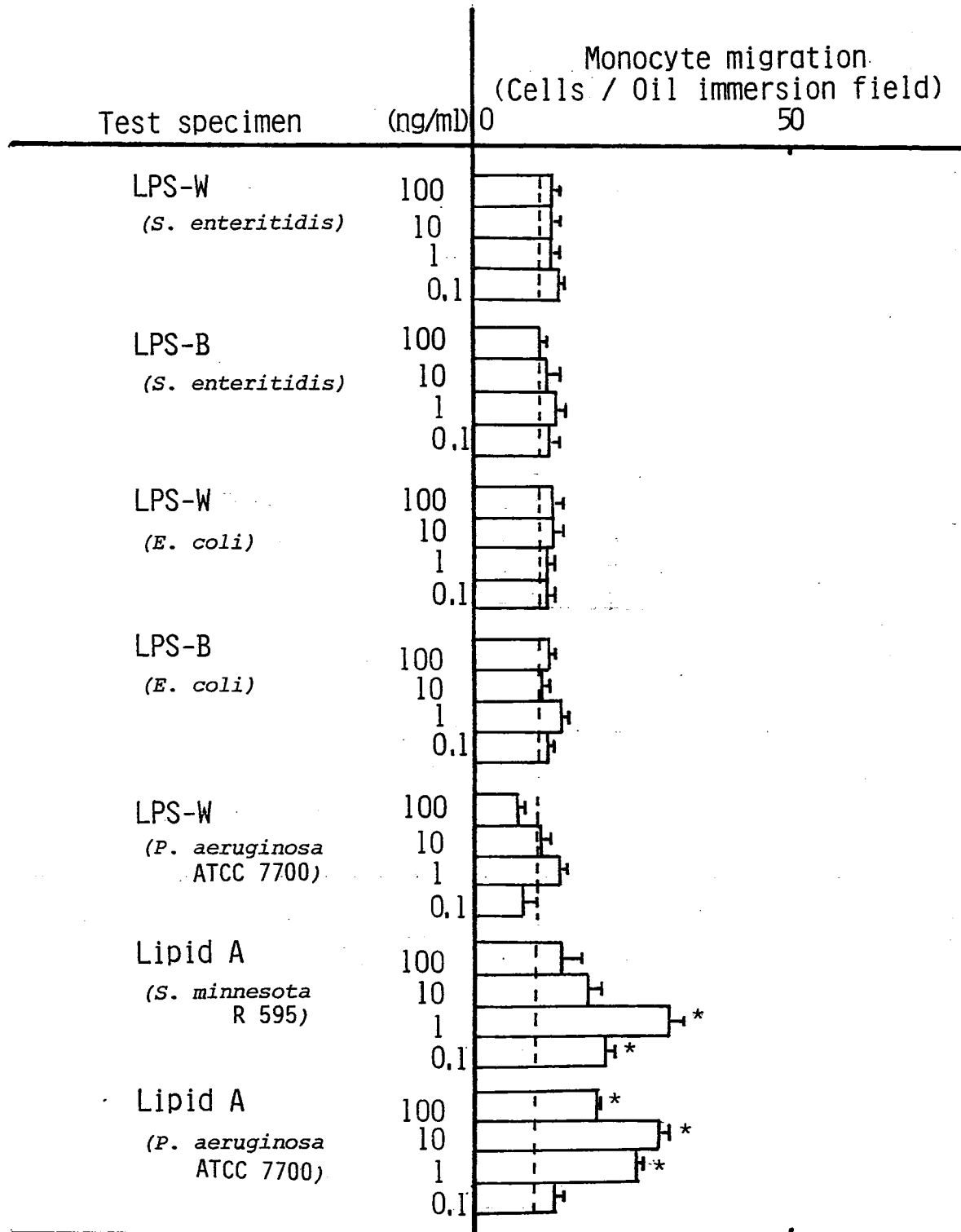


表 1 供試した 6-O-アシル-MDP の化学構造およびその略号

化学構造	略号
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CO-MurNac-L-Ala-D-isoGln}$	L18-MDP
$\begin{array}{l} \text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13} \\ \text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13} \end{array} \text{CHCO-MurNac-L-Ala-D-isoGln}$	B30-MDP
$\begin{array}{l} \text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{CH(OH)} \\ \text{CH}_3(\text{CH}_2)_{21} \end{array} \text{CHCO-MurNac-L-Ser-D-isoGln}$	BH48-MDP(L-Ser)

表2 S. epidermidis 細胞壁による単球遊走促進の「ヒッカー-ボート」法による解析^a

下室の試料濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	平均遊走単球数/油浸視野 \pm 標準誤差 ^b			
	上室(細胞浮遊液側)の試料濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)			
	0	1	10	100
0	5 \pm 2 ^c	8 \pm 1	8 \pm 1	6 \pm 1
1	19 \pm 1	8 \pm 1	9 \pm 1	11 \pm 1
10	22 \pm 2	19 \pm 2	12 \pm 2	9 \pm 1
100	32 \pm 1	29 \pm 0	27 \pm 2	8 \pm 1

^a 試料を48穴底板ウェンバーの上室, 下室あるいは両室に入れ, フィルター下面への遊走を調べた。

^b 検定はテスト物質の各用量ごとに3通り行ない, 同一実験における一視野当たりの平均遊走単球数を算出し, 平均値と標準誤差を求めた。

^c 斜線で囲んだ部分では, フィルターの両側(上下室)でのテスト物質濃度が等しい。

表3 MDPによる単球遊走促進のチェッカーボード法による解析^a

下室の試料濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	平均遊走単球数 / 油浸視野 \pm 標準誤差 ^b 上室(細胞遊走液側)の試料濃度($\mu\text{g/ml}$)			
	0	0.001	0.01	0.1
0	4 \pm 1 ^c	6 \pm 1	4 \pm 1	4 \pm 1
0.001	5 \pm 1	2 \pm 1	3 \pm 1	5 \pm 0
0.01	24 \pm 1	13 \pm 1	5 \pm 1	2 \pm 0
0.1	33 \pm 2	27 \pm 3	5 \pm 2	7 \pm 1

^a 試料を48穴老成チャンバーの上室, 下室あるいは両室に入れ, フィルター下面への遊走を調べた。

^b 検定はテスト物質の各用量ごとに3通り行ない, 同一実験における一視野当たりの平均遊走単球数を算出し, 平均値と標準誤差を求めた。

^c 斜線で囲んだ部分では, フィルターの両側(上下室)でのテスト物質濃度が等しくなっている。

表4 S. minnesota 由来のリポド A による単球遊走促進の4ウェルプレート法による解析^a

下室の試料濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	平均遊走単球数 / 油浸視野 ± 標準誤差と 上室 (細胞培養液側) の試料濃度 ($\mu\text{g/ml}$)			
	0	1	5	10
0	14 ± 2 c	27 ± 1	29 ± 4	36 ± 2
1	23 ± 3	26 ± 3	28 ± 2	24 ± 0
5	25 ± 2	26 ± 1	20 ± 1	28 ± 1
10	29 ± 1	24 ± 0	26 ± 5	29 ± 2

^a 試料を48穴底板ウェルプレートの上室、下室あるいは両室に入れ、フィルター下面への遊走を調べた。

^b 検定はテスト物質の各用量ごとに3通り行ない、同一実験における一視野当たりの平均遊走単球数を算出し、平均値と標準誤差を求めた。

^c 斜線で囲んだ部分では、フィルターの内側(上下室)でのテスト物質濃度が等しくなっている。