The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

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

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]、固体表面にお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]

御注

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]，スーパーオキサイドアニオンレベル[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、きわめて多彩な活性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ドA[29]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]、顆粒球のコロニー形成を促進する因子（CSA）[37]、プラス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、多様な刺激作用を発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ないしリピド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球－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（考察参照

)[40,41]。

本研究では、組織Mφの前駆細胞であると一般に考えられている単球（ヒト末梢血由来）[42]に対する細胞壁およびLPS、ならびに関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 corynebacteriodes (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恵与を受け、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）の細胞壁は大国寿士博士（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、それぞれ恵与を受けた（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）ペプチドグリカン（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、それぞれの細胞壁より調製したものを、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、大国寿士博

士が熱ホルムアミド法[48]によって調製したものの恵与を受けた。

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-アラニルグリシ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エンドーN-アセチルムラミダーゼ[50]を用いて調製した(これら両酵素のPGに対する作用部位を図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・糖ペプチド)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エンドーN-アセチルム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プチドの"モノマー"であるSEPS-M（図2b）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）合成ムラミルペプチド

MDP[51]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－MDP[52~55]（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授より恵与を受け、実験に供した。

5）LPSおよびリピド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）より恵与を受けた標品，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 法によって得たLPSを酢酸で加水分解することにより分離したリピド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-フォルミル-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 055:B5) (Sigma)由来のLPSの200μg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×g, 4°C, 15分間遠心し、上清として得た。56°C, 30分間加熱して非働化後、-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、後述する培養液を加えて所要濃度に稀釈し、単球に対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20mM N－2－ハイドロキシエチルピペラジン－N－2－エタンスルフォン酸（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容とゼラチ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皮静脈よりヘパリンナトリウム注射液（小玉KK, 東京）を塗れたプ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（Phamacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden）上に重層し、室温で400×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

の細胞濃度となるように浮遊させた。このように調製した細胞浮遊液では、単球が全細胞に対して占める割合は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）遊走の測定

48穴走化チェンバー（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25μlのテスト標品，標準走化性因子あるいは対照培養液をチェンバーのbottom plateの凹み（下室）に満たし，ついで孔径5μm，厚さ約10μmのポリカーボネートメンブランフィルター（Neuro Probe）およびシリコン製ガ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50μlずつを加えた。培養は5% CO_2－95%空気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

ずつ浸して細胞を固定，染色した。このメンブラン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×100対物レンズと×10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×0.6［一視野は12グリッドに相当する。］）をテスト標品を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3通り行ない，平均値と標準誤差（S.E.）を求めた。

5）単球の遊走促進が活化作用によるものかどうかの検討

Zigmond とHirsch[65] 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って検討した。

結　果

1．実験条件の吟味

標準走化性因子を用い，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ら[59]）ならびにLPS活性化血清（Snydermanら[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，図表ともに同じ）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倍ないし16倍稀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倍稀釈の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倍稀釈の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，以後は除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Falk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、0.1～100 μg/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

い遊走刺激作用を示す細胞壁の濃度が菌種によって異なるために（例えばS. aureus細胞壁で10 μg/ml, L. plantarumでは1 μg/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のそれが最も強力であった。ちなみに，ミコール酸を含む菌種（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，ミコー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．細胞壁とペプチドグリカン（PG）の単球遊走刺激作用の比較

S. aureus, S. epidermidis, 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，単球に対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対応する細胞壁に比べて概して弱いようであ

った。

4. 細胞壁ペプチドグリカ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エンドペプチダーゼ処理して得たPG構築単位のいわば"ポリマー"であるSEPS（図2a）ならびにSEPSをM-1エンドーN-アセチルムラミダーゼで処理して得たPG構築単位のモノマー，SEPS-M（図2b）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 μg/mlの用量でピーク活性を示すのに対して、SEPS，SEPS-Mはともに0.1 μg/mlの用量で、100 μg/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ることが知られている合成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 μg/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-O-アシル-MDPの単球遊走刺激作用

免疫調節ないし薬理作用の一部についてMDP自体より強い活性を示すことが別の研究[9,67,68]で知られている6-O-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-O-オクタデカノイル-MDP（L18-MDP），6-O-（2-テトラデシルヘキサデカノイル）-MDP（B30-MDP）ならびに6-O-（3-ハイドロキシ-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。ピーク活性を示す用量は、MDPの0.01μgないし0.1μg（20.3 p mole ないし 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のそれに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チェッカーボード法による解析

上述した抗菌細胞壁ならびにMDPによると

ト単球の遊走の促進が、単球の方向性をもたない運動、すなわちランダム運動の亢進（Chemokinesis）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、チェッカーボード分析[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、上下室間に種々の濃度勾配を作った場合にフィルター下面まで遊走する単球数を算え、下室のみに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に例示するような組み合せで、S. epidermidis細胞壁あるいはMDPを走化チェンバーの上室、下室あるいは両室に容れた場合、両室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きくなるに従って、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

ち検討した作用物質による単球の遊走の亢進が、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およびリピド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の温フェノール・水抽出法[57]で得たリポタ糖（LPS-W）ならびにBoivinのトリクロル酢酸抽出法[56]で得たリポタ糖（LPS-B）、計5標品は、いずれも0.1ないし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ピドA標品は、LPSとは異なり、明確な遊走刺激作用を発揮した。ちなみにこれらリピド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に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. リピドAの単球遊走刺激作用のチェッカーボード法による解析

リピドAによるヒト単球の遊走の亢進がり

ピドAの濃度勾配に方向づけられた走化性によるものかどうかを、S. minnesota 由来のリピドAを供試して検討した結果が表4に示されている。走化チェンバーの上下両室間に濃度勾配のない斜線で囲んだ部分においても、単球の遊走がたかまっていることを示す所見が得られた。すなわち、リピドAによる単球遊走の促進は、上室と下室間のリピドAの濃度勾配に方向づけられた遊走の亢進を必ずしも反映せず、ラニダム運動の亢進、すなわち(Chemokinesis)による部分が少なくないことが示唆された。

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ない条件下で、すなわち直接的に

、ヒト単球の遊走を促進することが明らかにされた。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]ミ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. epidermidis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出発材料である細胞壁やPGにまさ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彩な免疫薬理作用の多くと同様，A群型のペプタ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。同様な矛盾

は、抗原特異の免疫活性化作用等についても認められている[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。なお高田らによって、6-O-アシル-MDPのあるものはMDP自体よりMφ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を供試した検定を通じて、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1～100 μg/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プチドのそれは0.01ないし0.1 μg/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ないし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

大きなかか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、わずかに吉田とHassonの日米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 μg/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が、Hartrey系モルモットの腹腔滲出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、細胞壁ないし関連物質の単球－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、多彩な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の免疫薬理作用の発現に中心的な役割を演じるリピド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活性が認められた。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 C3H/HeN および C57BL10/SN マウスの腹腔滲出 Mφ では遊走の亢進は認められず，またリピド 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，リピド 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，リピド 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，サルモネラのリピド A 部分を模して 13 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つつあるが，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るものがLPSより調製したリピド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積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，著者の研究は反応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性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SE-PS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と云えよう。

ともあれ，抗原特異的な，あるいは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"と考えられる。

他方，LPSは直接的な単球走化刺激作用は乏しくが，補体を活性化して走化性因子を産生する"Chemotaxigen"であり，加えてそのリピドA部分には単球（－Mφ）の走化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やリピドAはヒト単球に作用して，リンホカイン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ペプチドグリカンおよびLPSは，様々な機

序によって単球ーMφ系細胞を反応部位に集積させる作用を発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云えよう。

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－O－アシル誘導体，ならび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）およびそのリピドA部分を供試して、ヒト末梢血単球の遊走に対する作用を、48穴走化チェン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、単球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、明確な単球遊走刺激作用を発揮した。

3. S. epidermidis所を酵素処理して得た水溶性の所構築単位の"ポリマー"のみならず"モノマー"に、単球の遊走をたかめる明確な作用を認めた。

4. 合成MDPにも明確な単球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の上記活性がきびしい化学構造依存性を有することが示された。ちなみに、MDPの単球遊走刺激作用は6-O-アシル化によりむしろ弱められるとの結果を得た。

5. チェッカーボード分析により、S. epidermidis細胞壁ならびMDPの単球遊走に対する作用が

、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、それ自体は好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ピドAには好球の遊走を刺激する作用が認められた。チェッカーボード分析の結果は、リピドAの作用は、MDPのそれとは異なり、好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、ご閲覧を賜った口腔細菌学教室小谷尚三教授をはじめ、さまざまなご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－O－アシ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与に与かった大日

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国寿士博士ならびにLPSおよびリピド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 suppresion of macrophage DNA synthesis by MDP, a probable correlate of macrophage activation; in Immunomodulation by microbiol 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 muramyldipeptide, a synthetic bacterial adjuvant, on enzyme release from cultured mouse macrophages. Microbiol. Immunol., 25, 51-62.

12) Pabst, M.J., Commings, 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 muramyldipeptide. 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 Lipopolisaccariden 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) : Immunoadujuvant 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., Mesrobeanu, I. and Mesrobeanu, 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: methodes, 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タドの細胞性および体液性免疫賦化作用を実用するこ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) : 細菌細胞壁ならびに酵素処理あるいは合成によって得た細胞壁構築成分によるヒト補体の活性化. 阪大歯学誌, 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 nonmotogenic 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：Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenesなど；Azpm－タイプ：Lactobacillus plantarum, Mycobacterium smegmatis, Nocardia spp., Streptomyces gardneriなど；D-Glu α Gly タイプ：Micrococcus lysodeikticusなど。Azpm－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エンドペプチダーゼの作用点を示す。⌂：M－1エンド－N－アセチルムラミダーゼの作用点を示す。⬚：N－アセチルムラミル－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，MurNac：N－アセチルムラミン酸，meso-Azpm

：meso型2,6-ジアミノピメリン酸.

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単位の"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穴走化チェ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を示す。

図5　細胞濃度がFMLP（10^{-8}M）およびLPS活性化血清（10倍稀釈）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倍稀釈）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54±2（S.E.）（c），陰性対照（破線）のそれは6±1（S.E.）

（a，bおよびc）であった。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チ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倍稀釈）では96±3（S.E.），陰性対照（破線）のそれは6±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9　S. epidermidis細胞壁，ペプチドグリカン（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"ポリマー"，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－O－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ならびにリピド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、FMLP(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。

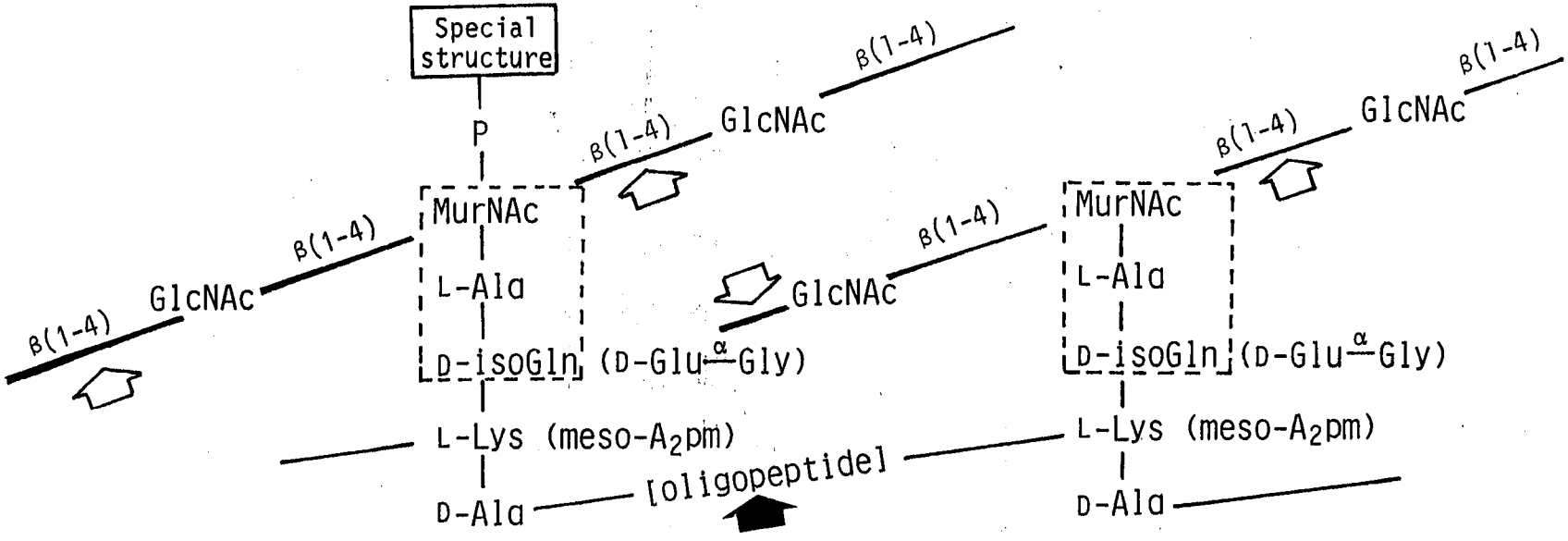
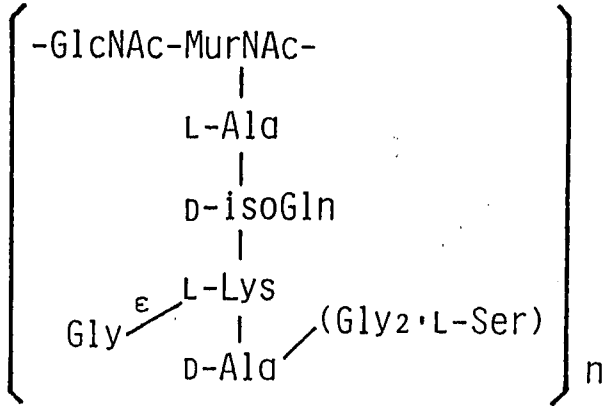

Special structure
P
MurNAc
L-Ala
D-isoGln
(D-Glu α Gly)
L-Lys (meso-A2pm)
D-Ala
[oligopeptide]
GlcNAc
β(1-4)
GlcNAc
β(1-4)
GlcNAc
β(1-4)
GlcNAc
β(1-4)
MurNAc
L-Ala
D-isoGln
(D-Glu α Gly)
L-Lys (meso-A2pm)
D-Ala
β(1-4)
GlcNAc
β(1-4)

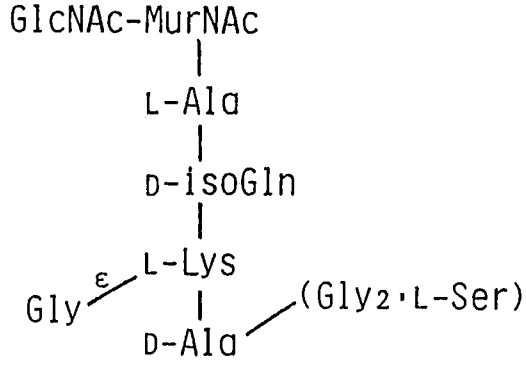
図1

(a)



SEPS

(b)



SEPS-M

図2

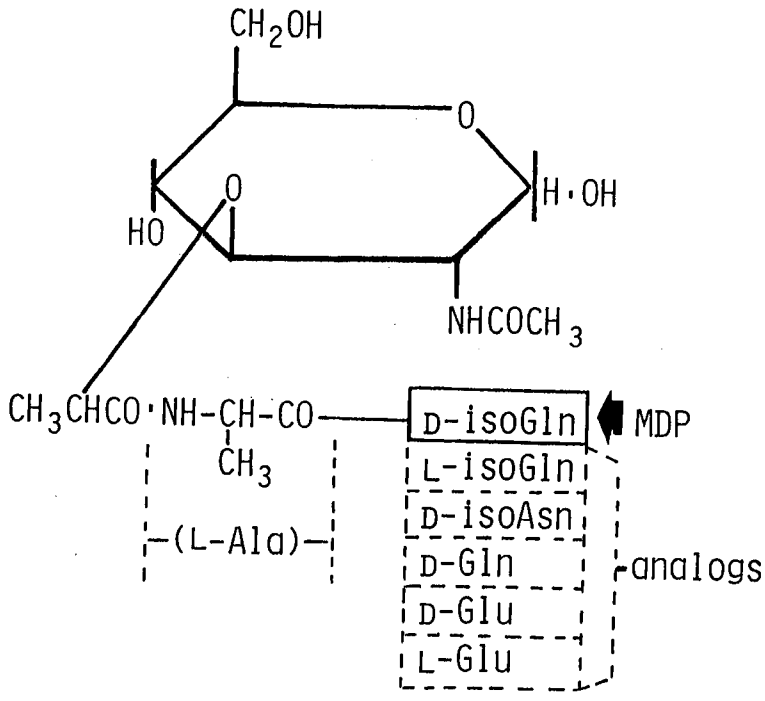

CH2OH
O
H·OH
HO
O
NHCOCH3
CH3CHCO·NH-CH-CO
CH3
(L-Ala)
D-isoGln
MDP
L-isoGln
D-isoAsn
D-Gln
D-Glu
L-Glu
analogs

図3

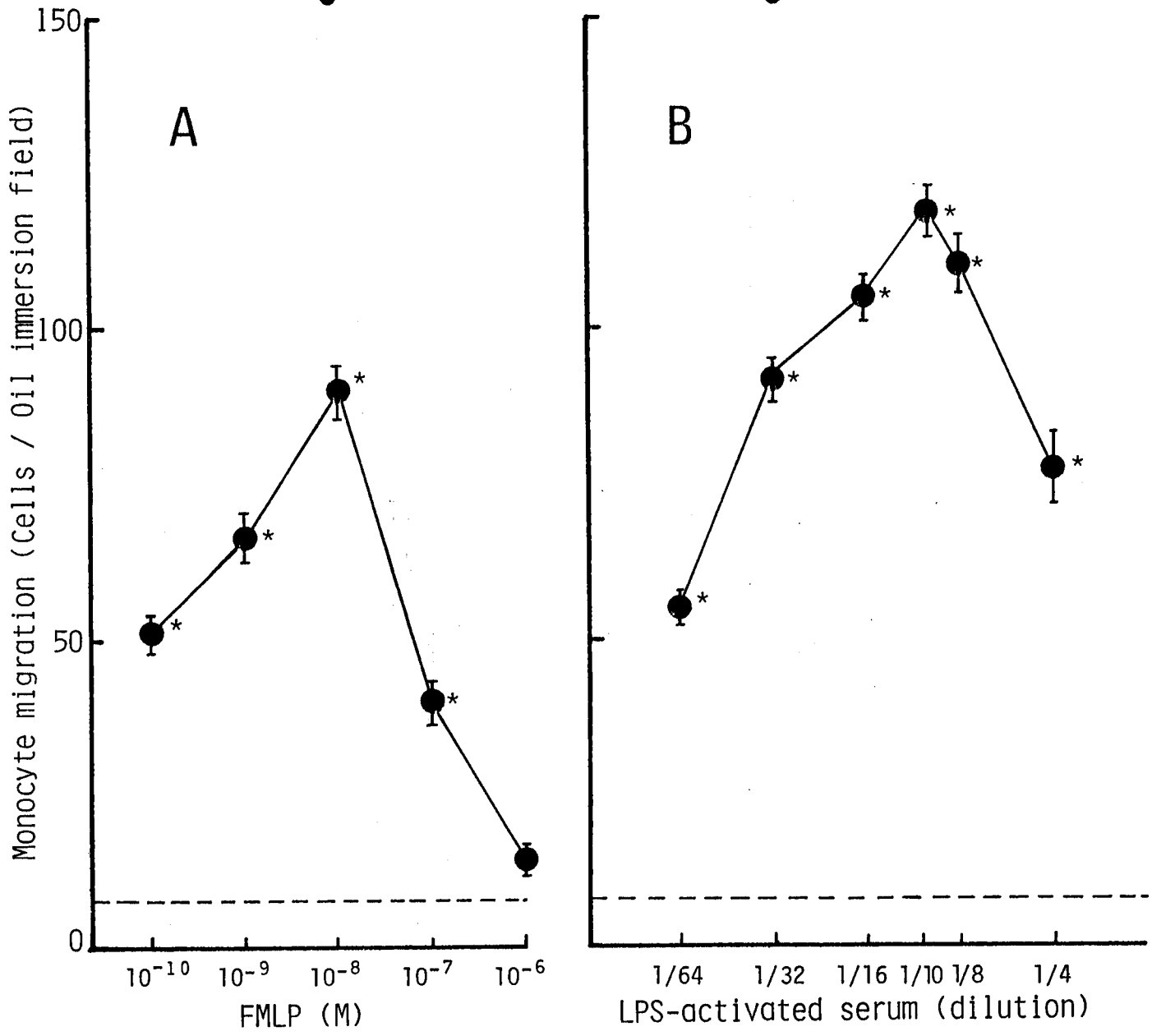

A
B
Monocyte migration (Cells / Oil immersion field)
150
100
50
0
10^{-10}
10^{-9}
10^{-8}
10^{-7}
10^{-6}
FMLP (M)
1/64
1/32
1/16
1/10
1/8
1/4
LPS-activated serum (dilution)

図4

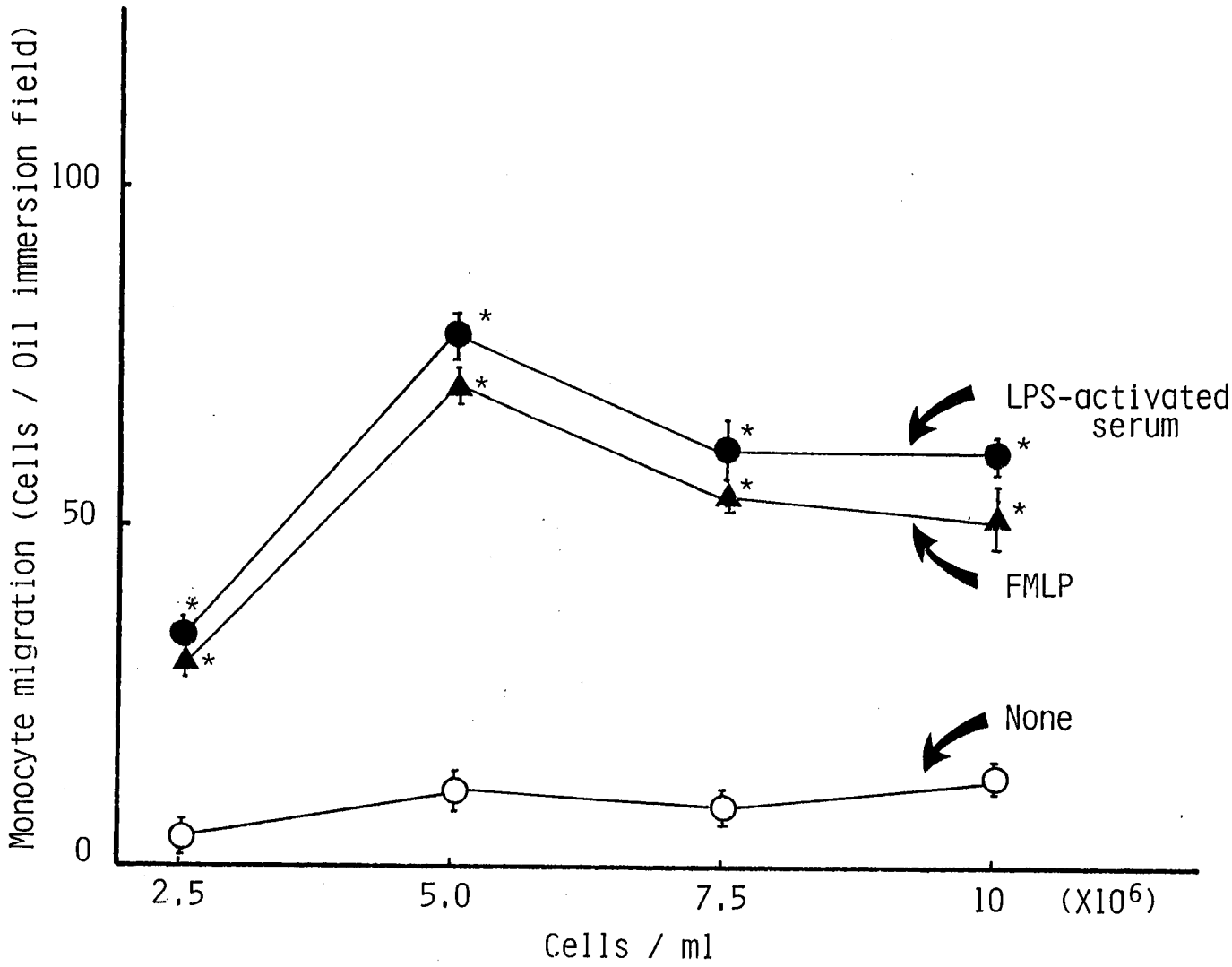

Monocyte migration (Cells / Oil immersion field)
100
50
0
LPS-activated serum
FMLP
None
2.5
5.0
7.5
10
(X10⁶)
Cells / ml

図5

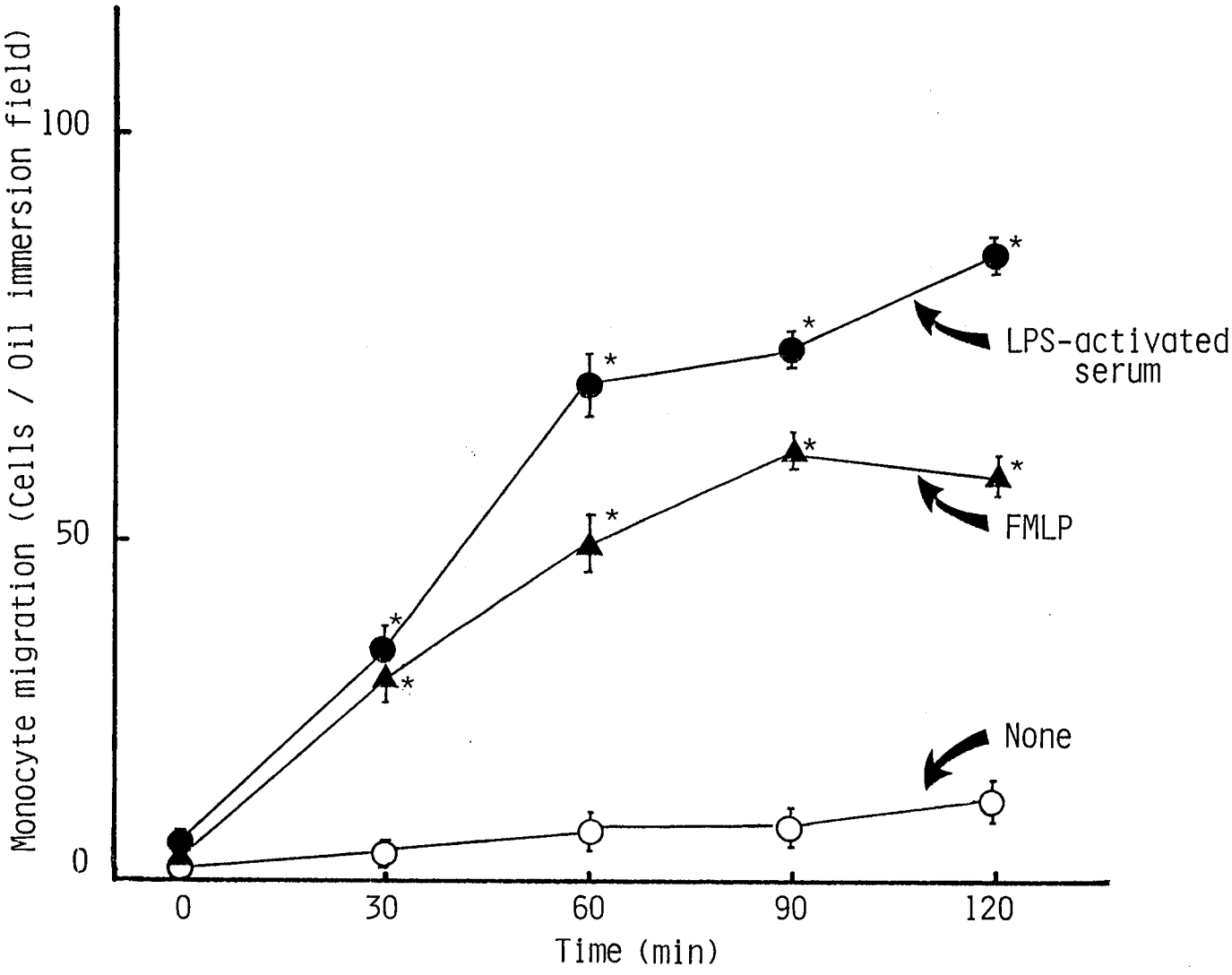

Monocyte migration (Cells / Oil immersion field)
100
50
0
0
30
60
90
120
Time (min)
LPS-activated serum
FMLP
None

図6

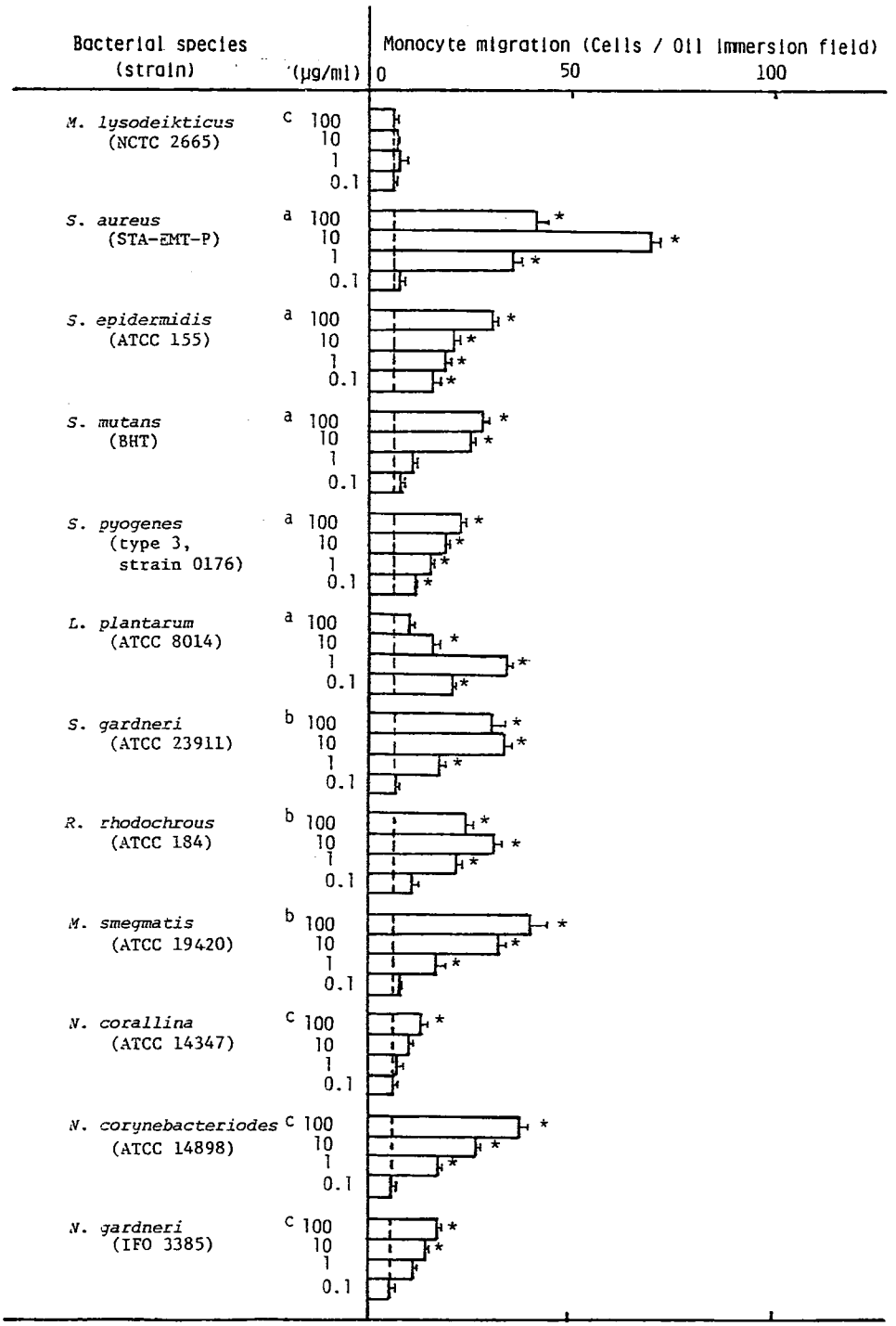

Bacterial species
(strain)
(μg/ml)
Monocyte migration (Cells / Oil immersion field)
0
50
100
M. lysodeikticus
(NCTC 2665)
c
100
10
1
0.1
S. aureus
(STA-EMT-P)
a
100
10
1
0.1
S. epidermidis
(ATCC 155)
a
100
10
1
0.1
S. mutans
(BHT)
a
100
10
1
0.1
S. pyogenes
(type 3,
strain 0176)
a
100
10
1
0.1
L. plantarum
(ATCC 8014)
a
100
10
1
0.1
S. gardneri
(ATCC 23911)
b
100
10
1
0.1
R. rhodochrous
(ATCC 184)
b
100
10
1
0.1
M. smegmatis
(ATCC 19420)
b
100
10
1
0.1
N. corallina
(ATCC 14347)
c
100
10
1
0.1
N. corynebacteriodes
(ATCC 14898)
c
100
10
1
0.1
N. gardneri
(IFO 3385)
c
100
10
1
0.1

図7

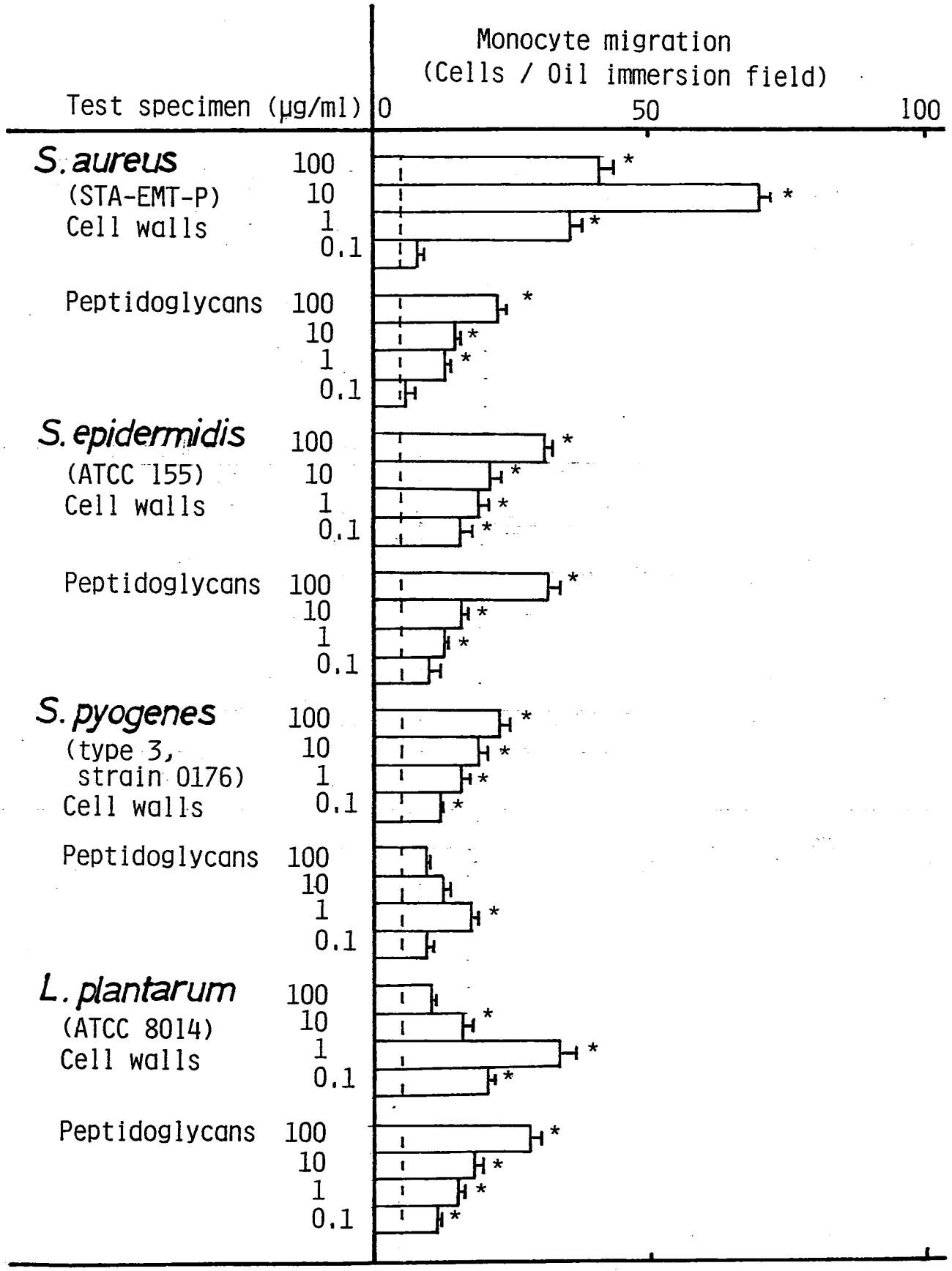

Monocyte migration
(Cells / Oil immersion field)
Test specimen (μg/ml)
0
50
100
S. aureus
(STA-EMT-P)
Cell walls
Peptidoglycans
S. epidermidis
(ATCC 155)
Cell walls
Peptidoglycans
S. pyogenes
(type 3,
strain 0176)
Cell walls
Peptidoglycans
L. plantarum
(ATCC 8014)
Cell walls
Peptidoglycans
100
10
1
0.1

図8

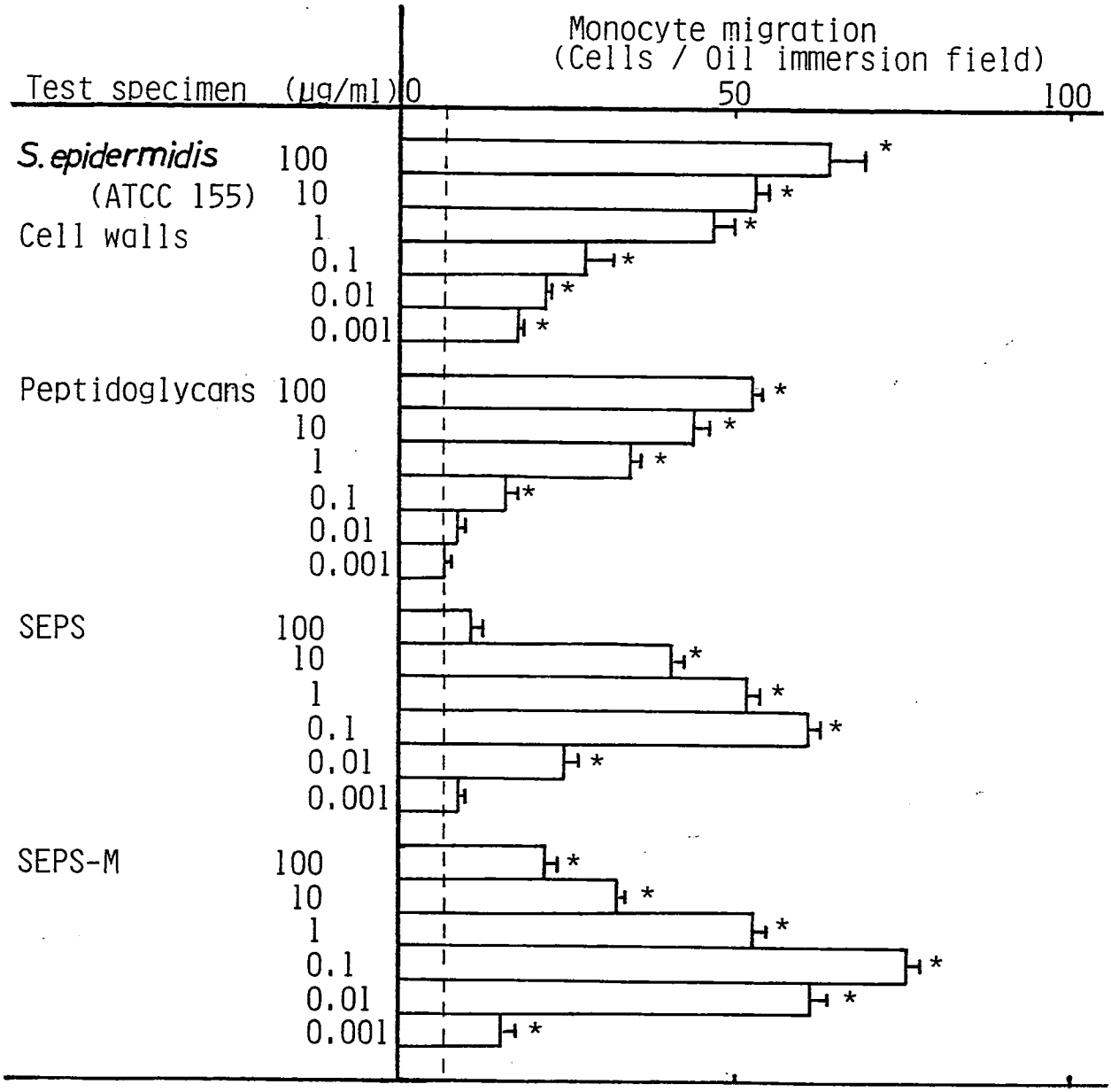

Monocyte migration
(Cells / Oil immersion field)
Test specimen
(μg/ml)
0
50
100
S. epidermidis
(ATCC 155)
Cell walls
100
10
1
0.1
0.01
0.001
Peptidoglycans
100
10
1
0.1
0.01
0.001
SEPS
100
10
1
0.1
0.01
0.001
SEPS-M
100
10
1
0.1
0.01
0.001

図9

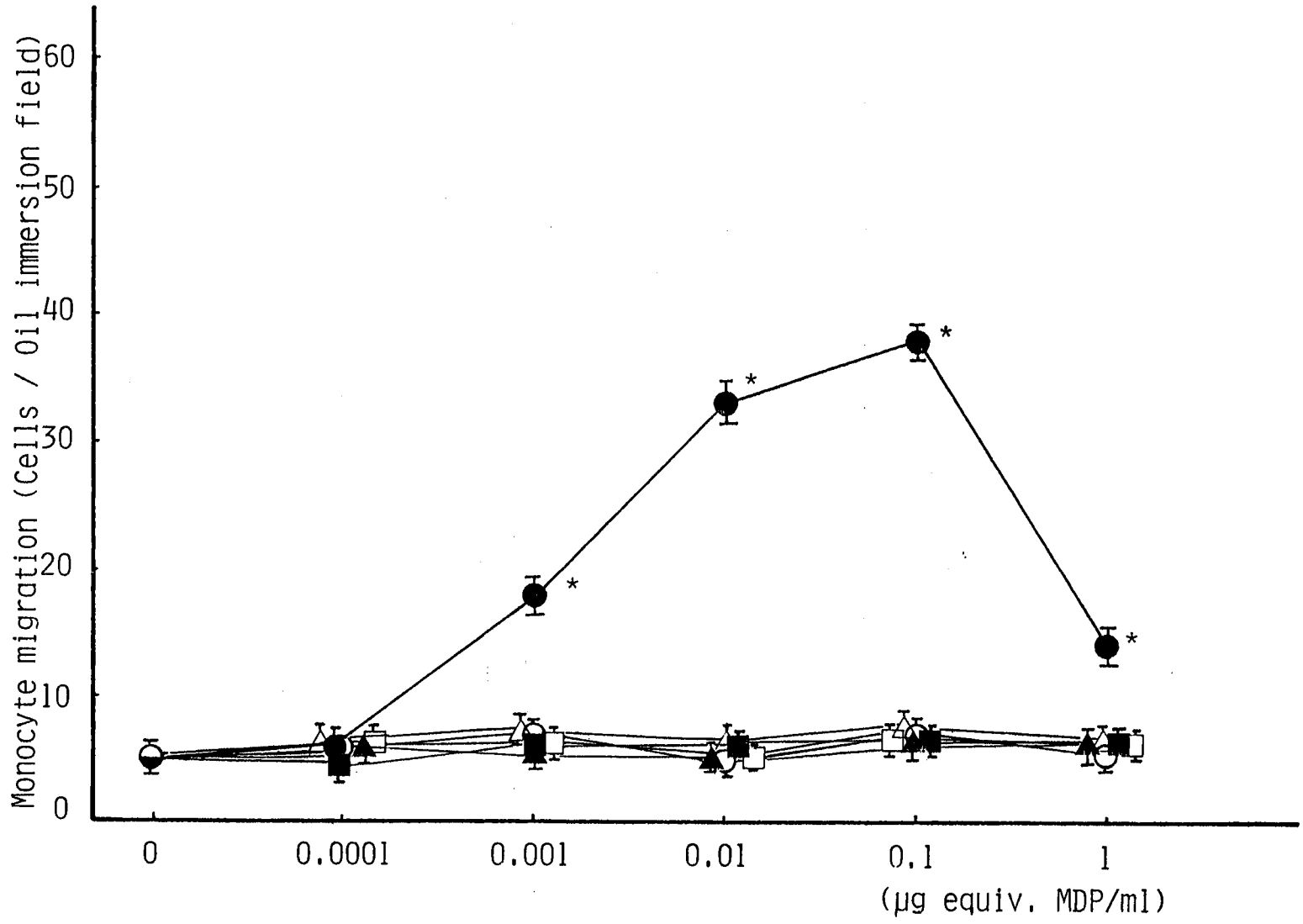

Monocyte migration (Cells / Oil immersion field)
60
50
40
30
20
10
0
*
*
*
*
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
(μg equiv. MDP/ml)

図10

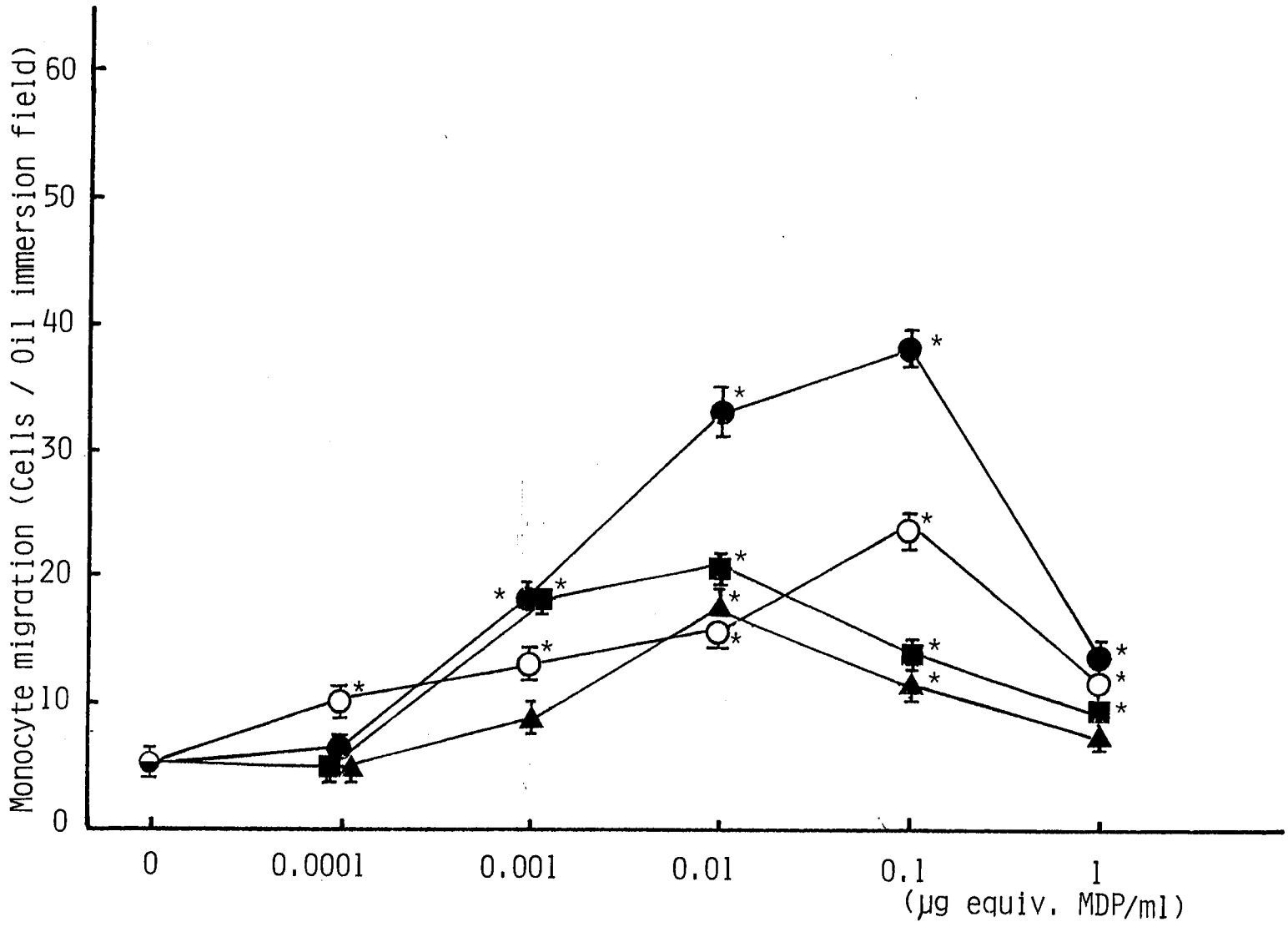

Monocyte migration (Cells / Oil immersion field)
60
50
40
30
20
10
0
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
(μg equiv. MDP/ml)

図11

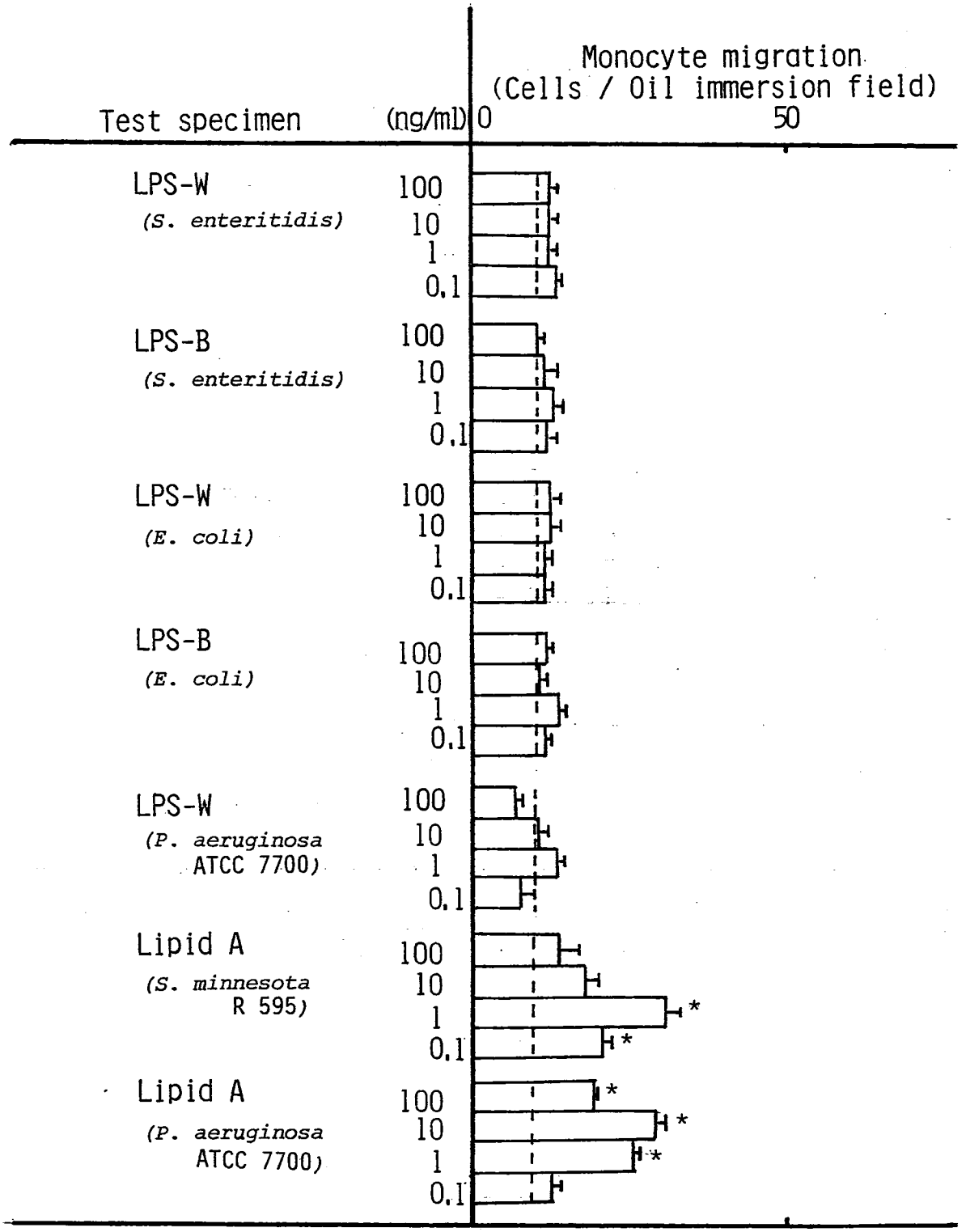

Monocyte migration
(Cells / Oil immersion field)
Test specimen
(ng/ml)
0
50
LPS-W
(S. enteritidis)
100
10
1
0.1
LPS-B
(S. enteritidis)
100
10
1
0.1
LPS-W
(E. coli)
100
10
1
0.1
LPS-B
(E. coli)
100
10
1
0.1
LPS-W
(P. aeruginosa
ATCC 7700)
100
10
1
0.1
Lipid A
(S. minnesota
R 595)
100
10
1
0.1
*
*
Lipid A
(P. aeruginosa
ATCC 7700)
100
10
1
0.1
*
*
*

図12

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
$CH_3(CH_2)_{16}CO$-MurNAc-L-Ala-D-isoGln	L18-MDP
$CH_3(CH_2)_{13}$ $CH_3(CH_2)_{13}$ >CHCO-MurNAc-L-Ala-D-isoGln	B30-MDP
$CH_3(CH_2)_{22}CH(OH)$ $CH_3(CH_2)_{21}$ >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チェッカーボード法による解析[a]

下室の試料濃度 (μg/mℓ)	平均遊走単球数/油浸視野 ± 標準誤差[b] 上室(細胞浮遊液側)の試料濃度 (μg/mℓ) 0	1	10	100
0	5 ± 2 [c]	8 ± 1	8 ± 1	6 ± 1
1	19 ± 1	8 ± 1	9 ± 1	11 ± 1
10	22 ± 2	19 ± 2	12 ± 2	9 ± 1
100	32 ± 1	29 ± 0	27 ± 2	8 ± 1

[a] 試料を48穴走化チェンバーの上室，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くなっている。

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 (μg/ml)	平均遊走単球数/油浸視野 ± 標準誤差[b] 上室(細胞浮遊液側)の試料濃度(μg/ml) 0	0.001	0.01	0.1
0	4 ± 1[c]	6 ± 1	4 ± 1	4 ± 1
0.001	5 ± 1	2 ± 1	3 ± 1	5 ± 0
0.01	24 ± 1	13 ± 1	5 ± 1	2 ± 0
0.1	33 ± 2	27 ± 3	5 ± 2	7 ± 1

[a] 試料を48穴走化チェンバーの上室，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くなっている。

表4　S. minnesota 由来のリピドA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 (μg/ml)	平均遊走単球数／油浸視野 ± 標準誤差[b]　上室（細胞浮遊液側）の試料濃度 (μg/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穴走化チェンバーの上室，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くなっている。