

# Muramyl Dipeptide-Induced Inhibition of DNA Synthesis of Guinea Pig Peritoneal Exudate Macrophage and its Biological Significances

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/7788">http://hdl.handle.net/2297/7788</a>

# ムラミルジペプチドによるモルモット腹腔浸出 マクロファージのDNA合成の抑制と その生物学的意義に関する研究

金沢大学医学部生化学第一教室 (主任: 米山良昌教授)

永 尾 重 喜

(昭和60年3月18日受付)

ムラミルジペプチド (muramyl dipeptide, MDP) は、細菌細胞壁ペプチドグリカンが示す諸種生物活性の最小有効構造である。MDP をモルモットに投与すると、マクロファージ(M $\phi$ )およびM $\phi$ より分化した類上皮細胞から成る肉芽腫が形成される。このことはMDPがM $\phi$ を類上皮細胞に分化させることを示唆している。従って、MDPによるM $\phi$ 活性化と分化の機序の一端を解明することを試みた。一般に細胞が分化するとき、細胞核DNA合成が減少することが知られているので、 $^3\text{H}$ チミジンのとり込みを指標として、DNA合成に及ぼすMDPの影響について研究を行った。モルモットの腹腔浸出M $\phi$ は、*in vitro*でM $\phi$ 増殖因子を添加することなしに、10%トリクロール酢酸不溶画分へ $^3\text{H}$ チミジンを取り込んだ。この $^3\text{H}$ チミジンの取り込みはDNAポリメラーゼ $\alpha$ の阻害剤であるアフィディコリンにより完全に抑制され、またオートラジオグラフィでM $\phi$ 細胞核の強いラベリングが示された。これらの結果から、M $\phi$ に取り込まれたチミジンはDNAの複製に利用されていることが明らかになった。MDPで刺激されたM $\phi$ においては、 $^{14}\text{C}$ グルコサミンの取り込みが増加すると同時に $^3\text{H}$ チミジンの取り込みは著明に減少した。MDPによる $^3\text{H}$ チミジンの取り込みの抑制は、細胞膜のチミジン透過性の低下によるものではなかった。オートラジオグラフィでも細胞核がラベルされたM $\phi$ 数の著明な減少が示された。これらの結果は、MDPによるチミジンの取り込みの抑制が真の細胞核DNA合成の抑制によることを示唆している。同様のDNA合成の抑制は、MDPの刺激によって増量することが知られているサイクリックAMPおよびプロスタグランディンE $_2$ によっても示されたので、MDPによるM $\phi$ のDNA合成の抑制に細胞内サイクリックAMPが関与している可能性が示唆された。また種々の細菌細胞壁成分およびMDP誘導体を用いて、M $\phi$ 活性化能、DNA合成抑制活性および類上皮細胞肉芽腫形成能を検討したところ、これら諸活性の間に密接な相関が認められた。これらの実験結果から、本研究で観察されたDNA合成の抑制はM $\phi$ の活性化によって生じた現象であり、MDPによるM $\phi$ から類上皮細胞への分化のはじまりを示していると考えられる。

---

**Key words** muramyl dipeptide, peritoneal exudate macrophage, nuclear DNA synthesis, activation of macrophages, epithelioid granuloma.

---

MDPはすべての細菌細胞壁に共通に存在する細菌特有の物質であるペプチドグリカン中のN-acetyl muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (図1の点線でかこまれた部分)であり、細菌細胞壁ペプチドグリカン

の有する免疫アジュバント活性の最小有効単位である<sup>1)2)</sup>。MDPはアジュバント活性以外にも種々の生物学的活性を有しているが、水溶性で細胞毒性や抗原性を有しないので、免疫・炎症などの生体防禦に関する

---

Abbreviations: BCG, bacille Calmette-Guérin; cAMP, adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate; LPS, lipopolysaccharide; M $\phi$ , macrophage; MDP, muramyl dipeptide; PBS, phosphate buffered saline; PCA, perchloric acid; PGE $_2$ , prostaglandin E $_2$ ; TCA, trichloroacetic acid.

種々の現象のメカニズムを *in vitro* で解析するさいに、とくに有用な物質である。現在 MDP および種々の誘導体の合成が行われ、その生物学的作用について検討されている<sup>3)</sup>。

一方、生体防禦反応において M $\phi$  は重要な役割を演じており、とくに結核菌、リステリアのような通性細胞寄生細菌に直接抵抗する細胞は、活性化された M $\phi$  であることはよく知られている<sup>4)</sup>。また結核菌が生体に感染すると感染部位で M $\phi$  が類上皮細胞に分化すると考えられているが、この時結核菌に対する抵抗性を獲得し<sup>5)</sup>、類上皮細胞肉芽腫は結核菌に対する抵抗性の組織表現と認められている<sup>6)7)</sup>。しかしながら、M $\phi$  から類上皮細胞への分化の過程に関しては、Tリンパ球が関与していると言う報告が多いが<sup>8)</sup>、詳細については明らかにされていない。

著者は MDP が *in vitro* で Tリンパ球やリンフォカインの関与なしに M $\phi$  を活性化し<sup>9)10)</sup>、リステリアに対する抵抗性を高め<sup>11)</sup>、更に、江森との共同研究により、MDP を Freund 型の油中水型エマルジョンとしてモルモットおよびラットの足蹠に注射すると、所属リンパ節に Tリンパ球の関与なしに広汎な類上皮細胞肉芽腫が形成されることを見出した<sup>12)13)</sup>。これらの結果は、MDP が M $\phi$  を直接活性化し、類上皮細胞へと分化させることを示唆している。本研究では M $\phi$  の活性化と分化におよぼす MDP の効果を細胞核 DNA への [<sup>3</sup>H] チミジンの取り込みを指標として検討した。その結果 MDP によって細胞核 DNA の合成が抑制され

ることを見出し、その作用機序についても検討を加えた。

さらに、種々の合成 MDP 誘導体および細菌細胞壁由来の物質を用いて、免疫アジュバント活性、M $\phi$  活性化能、DNA 合成抑制活性および類上皮細胞肉芽腫形成能との関連について検討した。以上の実験結果に基づいて、MDP による DNA 合成抑制の意義を M $\phi$  の分化との関連において考察した。

#### 材料および方法

##### I. 材 料

##### 1. 試 薬

##### 1) 合成 MDP およびその誘導体

N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine の L-アラニン部分が L-バリンに置換された N-acetylmuramyl-L-valyl-D-isoglutamine, D-アラニンで置換された N-acetylmuramyl-D-alanyl-D-isoglutamine, および D-イソグルタミン部分が L-イソグルタミンで置換された N-acetylmuramyl-L-alanyl-L-isoglutamine, D-イソアスパラギンで置換された N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isosparagine は、小谷尚三教授 (大阪大学歯学部細菌学講座)、芝哲夫教授 (大阪大学理学部天然物有機化学講座) より恵与を受けた<sup>14)</sup>。

##### 2) 供試細菌細胞壁標品

*Staphylococcus epidermidis* (ATCC 155) と *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014) の細胞壁および

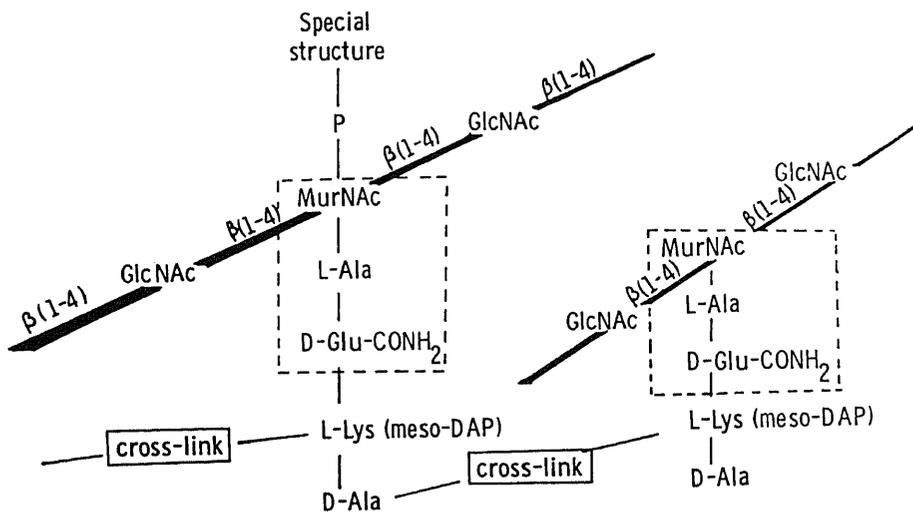


Fig. 1. A structure of bacterial cell wall peptidoglycan. The structure surrounded by broken lines shows MDP.

ペプチドグリカン、小谷らの方法<sup>15)</sup>に従って調整されたものを横川哉恵博士(大日本製薬、総合研)より恵与を受けた。SEPS (*Staphylococcus epidermidis* の細胞壁ペプチドグリカンのエンドペプチダーゼ処理により分離精製された disaccharide-stempeptide polymer) と、LPCM-A (*Lactobacillus plantarum* の細胞壁の M-1 エンド-N-アセチルムラミダーゼ処理により分離精製された bis-disaccharide-stempeptide)<sup>16)</sup>とは、小谷尚三教授より恵与を受けた。

*Mycobacterium tuberculosis* (H<sub>37</sub>Rv) は Sauton 培地で4週間培養後、エタノール/エーテル(1:1, V/V)混液で処理し、滅菌乾燥した。菌体を破壊し、トリプシンとプロナーゼで処理し精製細胞壁を得た。

LPS(グラム陰性菌より得られた内毒素, lipopolysaccharide) は、*Escherichia coli*, Serotype o 127: B8 から Westphal 法によって抽出されたものを Difco 社(米国)より購入した。

### 3) その他の試薬

アフィディコリンは *Harziella entomophila* の培養濾液より分離精製された<sup>17)</sup>ものを池上晋博士(広島大学生物生産学部応用生化学講座)より恵与を受けた。

プロスタグランディン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), N<sup>6</sup>, O<sup>2</sup>-ジブチールアデノシン 3', 5'-サイクリック 1リン酸(ジブチールサイクリック AMP), N<sup>2</sup>, O<sup>2</sup>-ディブチリールグアノシン 3', 5'-サイクリック 1リン酸(ジブチールサイクリック GMP) は Sigma 社(米国)より購入した。(米国)より購入した。

### 2. 培養液

細胞培養液(TC199 培地)は千葉県血清研究所より購入した。TC199 培地には、7 mM HEPES (N-2-hydroxyethyl-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid, 同仁薬化学), ペニシリン(100u/ml), ストレプトマイシン(100μg/ml)と非動物ウシ胎仔血清(MAB, 米国)を補充して細胞を培養した。

### 3. 動物

体重約500gの雌のハートレイ系モルモットを使用した。

### 4. 腹腔浸出マクロファージ

モルモット腹腔内に滅菌流動パラフィン(和光純薬)を注射し、4日後に腹腔浸出細胞を回収し、37°CのTC199 培地中で1時間、ガラスシャーレ内で培養した。ガラス面に付着した細胞を非付着細胞群より分離した。通常付着細胞群の99%以上がMφであることを、形態、貧食能およびウサギ抗ヒツジ赤血球 IgG 抗体で被覆したヒツジ赤血球とのロゼット形成能によって確認した。

## II. 方 法

### 1. [<sup>3</sup>H]チミジンと [<sup>14</sup>C]グルコサミンの取り込みの測定法

1×10<sup>6</sup>個のMφをTC199 培地2mlに懸濁し、プラスチックシャーレ中で培養した。培養は被検物質の存在下、非存在下で、5%炭酸ガス組織培養器内で37°C、24時間行い、0.5μCiの [<sup>3</sup>H]チミジン(methyl-<sup>3</sup>H-thymidine, specific activity 53,5mCi/m mol, New England Nuclear, 米国)を加えて、さらに24時間培養した(MDPによる [<sup>3</sup>H]チミジン取り込み抑制の効果はこの条件で最も強く表われることが分つたので、この条件を標準とした)。培養終了6時間前に、0.4μCiの [<sup>14</sup>C]グルコサミン(<sup>14</sup>C(U)-glucosamine hydrochloride, specific activity, 354.0mCi/m mol, New England Nuclear, 米国)を添加した。この細胞培養液に10%トリクロル酢酸(TCA)を加え、Mφをシャーレから回収し、TCA不溶画分中の [<sup>3</sup>H]チミジンと [<sup>14</sup>C]グルコサミンを、液体シンチレーションカウンター(LSC-900, アロカ社)で測定した。

### 2. Schmidt-Thannhauser-Schneider の変法による DNA の分画

1×10<sup>7</sup>個のMφをMDPの存在下、非存在下で、細胞培養用プラスチックシャーレ(100×20mm, Falcon 社, 米国)内でTC199 培地10mlに浮遊させ、37°C、24時間培養後5μCiの [<sup>3</sup>H]チミジンを添加し、さらに24時間培養した。Mφを回収し、Schmidt-Thannhauser-Schneider の変法<sup>18)</sup>を用いてDNA 画分を抽出した。すなわち、Mφを3回凍結融解し、10%TCAで3回遠心洗滌し、TCA可溶部とTCA不溶画分を得た。TCA不溶画分は5%過塩素酸(PCA)で3回遠心洗滌後、90°Cの5%PCAで20分間加水分解して加熱PCA可溶画分を得た。この画分が260mμに最大吸収を示すことを確認してDNA 画分とした。

### 3. オートラジオグラフィ

1×10<sup>7</sup>個のMφをTC199 培地10mlに浮遊させ、10μg/mlのMDPの存在下、非存在下に培養し、24時間後に [<sup>3</sup>H]チミジン5μCiを添加し、さらに24時間培養した。Mφを回収し、洗滌後塗抹標本を作り、メタノール固定後、ディッピング法によって感光乳剤(autoradiographic emulsion, Type NR-M2, 小西六)を密着させ、7日間冷暗所で感光させたのち現像し、さらにニュートラルレッド染色液で染色した。

### 4. 遅延型皮ふ反応

Freundの油中水型エマルジョンを常法に従って調整した。免疫原として、結晶ニワトリ卵白アルブミン(Sigma 社, 米国)100μgと種々の被検物質100μgをリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に溶解させ、incomplete Freund's adjuvant (Difco 社)と1:1の割合で混合さ

Table 1. [<sup>3</sup>H]Thymidine incorporation into whole cell and cell fraction of macrophage

	[ <sup>3</sup> H]thymidine incorporation (cpm)
whole cell	115,493 ± 11,524
TCA insoluble fraction	110,591 ± 12,637
TCA soluble fraction	3,946 ± 402
hot PCA soluble fraction	102,007 ± 9,461
hot PCA insoluble fraction	2,500 ± 493

Assays were performed as described under Materials and Methods. Data represent the mean (± standard deviation) of replicate cultures.

せ油中水型エマルジョンを調製し、モルモット後肢足蹠に注射し免疫した。3週間後にPBSに溶解した卵白アルブミン(10 $\mu$ g/0.1ml)を側腹部皮内に注射し、24, 48, 72時間後に、注射部の発赤と硬結の直径を測定して、細胞性免疫の指標の一つである遅延型皮ふ反応の有無と程度を判定した。

#### 5. 類上皮細胞肉芽腫形成

種々の被検物質100 $\mu$ gをPBS0.1mlに溶解させ、incomplete Freund's adjuvant (Difco社)と同量ずつ混合して油中水型エマルジョンを調製し、モルモットの右後肢足蹠に注射した。3週間後に所属リンパ節を摘出し、重量測定後、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し組織学的検索を行った。

### 成 績

#### I. M $\phi$ 細胞核 DNA への [<sup>3</sup>H] チミジンの取り込みについて

モルモット腹腔浸出M $\phi$ は表1に示すように、in vitroで[<sup>3</sup>H]チミジンを細胞内に取り込むが、取り込まれた[<sup>3</sup>H]チミジンの約90%は10%TCA不溶画分に存在した。TCA不溶画分は細胞膜はもちろん、ミトコンドリアやミクロゾームなどの小器官や細胞核などを含んでいる。そこでTCA不溶画分に取り込まれた[<sup>3</sup>H]チミジンが、細胞内DNA画分中に存在するか否かを、Schmidt-Thannhauser-Schneiderの変法<sup>19)</sup>に従って検索した(表1)。TCA不溶画分より加熱PCA可溶画分と不溶画分を得て各々の[<sup>3</sup>H]チミジン量を測定した。その結果TCA不溶画分に取り込まれた[<sup>3</sup>H]チミジンの85%以上が加熱PCA可溶画分に見出された。これは取り込まれた[<sup>3</sup>H]チミジンの大部分が細胞内のDNAに存在していることを示している。次に[<sup>3</sup>H]チミジンが細胞核に存在しているか否かをオートラジオグラフィで調べると、図2aに示すように、細胞核が強くラベルされており、[<sup>3</sup>H]チミジンは細胞

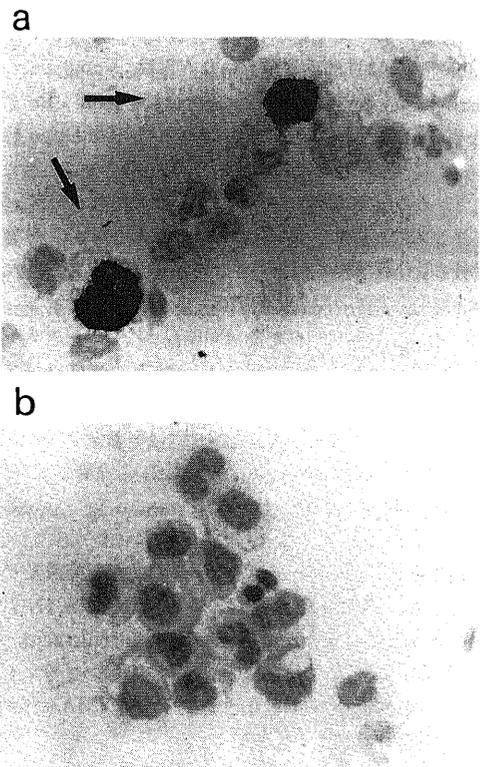


Fig. 2. Autoradiographs ( $\times$ ) of [<sup>3</sup>H] thymidine-incorporated macrophages.

a) control. b) MDP treated. The arrows in the figure show heavily labelled macrophages. Assays were performed as described under materials and methods.

核DNAに主として取り込まれていることが分った。細胞核のラベリングの状態によって[<sup>3</sup>H]チミジンがDNAの複製に利用されたのか修復に利用されたのかを推定できる<sup>19)</sup>が、M $\phi$ 細胞核のラベリングの状態は図2aの矢印で示すように、高率かつ均一にラベルされていてDNA複製時のパターンと一致していたの

で、取り込まれた  $^3\text{H}$  チミジンは DNA の複製に利用されていると推定される。

さらに、真核細胞の DNA 複製は DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  によって担われていることが知られている<sup>20)</sup>ので、DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  の特異的な阻害剤<sup>21)</sup>であるアフィディコリン存在下で、 $^3\text{H}$  チミジンの M  $\phi$  への取り込みが抑制されるか否かを検討した(図 3)。M  $\phi$  をアフィディコリンで 5 分間前処理したのちにみられる  $^3\text{H}$  チミジンの TCA 不溶画分への取り込みは、アフィディコリンの用量に依存して抑制された。このことは M  $\phi$  に取り込まれた  $^3\text{H}$  チミジンが DNA 複製に利用されていることを示唆している。以上示したいくつかの実験事実から、M  $\phi$  に取り込まれた  $^3\text{H}$  チミジンは細胞核 DNA の複製に特異的に利用されていることが明らかである。従来より M  $\phi$  は in

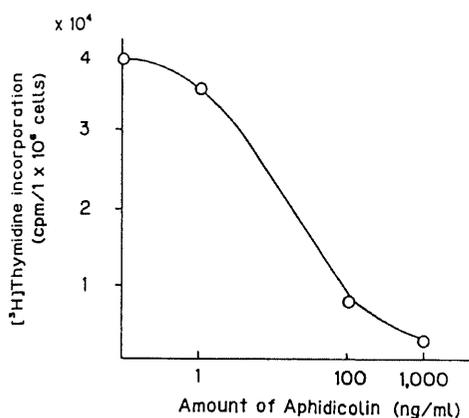


Fig. 3. Suppression of  $^3\text{H}$  thymidine incorporation by aphidicolin. Macrophages ( $1 \times 10^6$  cells) were incubated in 2 ml TC 199 medium with various concentrations of aphidicolin for 5 min.  $^3\text{H}$  thymidine ( $0.5 \mu\text{Ci}$ ) was added to the culture medium and the radioactivity of the TCA-insoluble fraction was measured 3 hr after the addition of  $^3\text{H}$  thymidine. Data represent the mean of triplicate cultures.

vitro では、M  $\phi$  増殖促進因子なしには増殖しないと考えられて来た<sup>22)</sup>が、以上の結果は M  $\phi$  が増殖因子の助けなしに in vitro で DNA を合成し、従って増殖する能力があることを示唆していると思われる。

## II. M $\phi$ 細胞核 DNA への $^3\text{H}$ チミジンの取り込みに及ぼす MDP の影響

表 2 は MDP の存在下、非存在下での M  $\phi$  の TCA 不溶画分への  $^3\text{H}$  チミジンの取り込みを示している。MDP 存在下に培養された M  $\phi$  においては MDP なしに培養された M  $\phi$  に比し、 $^3\text{H}$  チミジンの取り込みが著しく減少した。この MDP による M  $\phi$  への  $^3\text{H}$  チミジンの取り込み抑制は、MDP の用量依存性であることが明らかになった(図 4)。またグラム陰性細菌

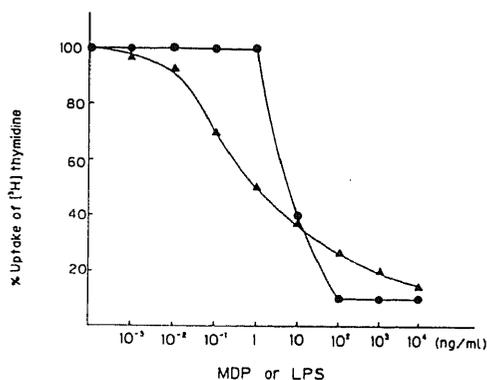


Fig. 4. Effects of various concentrations of MDP or LPS on  $^3\text{H}$  thymidine incorporation into TCA insoluble fraction.

Macrophages ( $1 \times 10^6$  cells) were incubated in 2 ml TC 199 medium with various concentrations of MDP (●) or LPS (▲).  $^3\text{H}$  thymidine ( $0.5 \mu\text{Ci}$ ) was added to the culture medium at 24 hr and the radioactivity of the TCA-insoluble fraction was measured 24 hr after the addition of  $^3\text{H}$  thymidine. Data represent the mean of triplicate cultures.

% incorporation = (cpm with MDP or LPS/cpm without MDP or LPS) × 100

Table 2.  $^3\text{H}$ Thymidine incorporation into TCA-insoluble fraction of macrophages

Substance added to culture	cpm			
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4
none	31,597 ± 1,108	44,177 ± 730	25,461 ± 2,107	12,010 ± 1,562
MDP 10 $\mu\text{g/ml}$	2,811 ± 161	3,151 ± 209	4,809 ± 550	2,329 ± 272

Macrophages ( $1 \times 10^6$  cells) were incubated in 2 ml TC 199 medium with or without MDP (10  $\mu\text{g/ml}$ ) for 24 hr, and then  $1 \mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$ thymidine was added. After another 24 hr incubation, 10% TCA was added. TCA-precipitable radioactivity was measured in a scintillation counter. Data represent the means ( $\pm$  standard deviation) of triplicate cultures.

の細胞壁より抽出された内毒素であるLPSもM $\phi$ を活性化することが知られている<sup>23)</sup>が、MDPと同様に用量依存的にM $\phi$ への<sup>3</sup>Hチミジンの取り込みを抑制することが分った(図4)。MDPおよびLPSの最小有効能度は各々10ng/mlと0.1ng/mlであった。また<sup>3</sup>Hチミジンの取り込みを抑制するMDPとLPSの濃度で、M $\phi$ 活性化の指標とされている<sup>14</sup>Cグルコサミンの取り込み<sup>24)</sup>は増加していた(図5)。これは、<sup>3</sup>Hチミジン取り込みの抑制が、MDPによってM $\phi$ が傷害されたためではなく、活性化されたために生じたことを示唆している。

次に、MDPによる<sup>3</sup>Hチミジンの取り込みの抑制が1)細胞内への取り込みの抑制(細胞膜透過性の抑制)、2)細胞核DNA合成の抑制のいずれによるものか検討した。先ず<sup>3</sup>HチミジンのM $\phi$ 細胞膜透過性について調べたが、<sup>3</sup>Hチミジンを15分間取り込ませた時、MDP存在時のM $\phi$ への取り込み量はMDPが存在しない場合よりも増加していた(図6)。すなわちMDP処理によってM $\phi$ 細胞膜のチミジン透過性は抑制されないことが示された。そこでTCA不溶画分への<sup>3</sup>Hチミジン取り込みの抑制がDNA合成の抑制によるものか否かを検討した。オートラジオグラフィでM $\phi$ 細胞核への<sup>3</sup>Hチミジンの取り込みを調べたところ、図2bに示すように、MDP非処理M $\phi$ (図2a)に見られるような<sup>3</sup>Hチミジンで密にラベルされた核を有するM $\phi$ 数は、1%以下に減少していた。またMDP処理により、DNA画分(加熱PCA可溶画分)への<sup>3</sup>Hチミジンの取り込み量が、表1に示すMDP非処理のM $\phi$ の取り込み量に比べ、約15%以下に減少した(未発表データ)。これらの結果は、MDPによるチミジン取り込みの抑制が真のDNA合成抑制を反映していることを示している。

### III. MDPによるM $\phi$ DNA合成の抑制の機序の解析

MDPがM $\phi$ のDNAポリメラーゼに直接作用してDNA合成を抑制する可能性が考えられるので、蔗糖密度勾配遠心法によってDNAポリメラーゼ画分を得てMDPを種々の濃度で作用させたが、酵素活性には全く変化が見られなかった(データ未発表)。

MDPで活性化されたM $\phi$ はPGE<sub>2</sub>を放出することが報告されている<sup>25)</sup>。またPGE<sub>2</sub>はM $\phi$ を含む種々の細胞の増殖を抑制することも知られている<sup>26)</sup>ので、PGE<sub>2</sub>のチミジン取り込みに及ぼす影響を調べた。図7に示すようにPGE<sub>2</sub>も用量依存的に<sup>3</sup>Hチミジンの取り込みを抑制した。PGE<sub>2</sub>はアデニレートシクラーゼ反応系を活性化し、細胞内CAMPを増加させることが知られている<sup>27)</sup>ので、MDPによって細胞膜が刺激さ

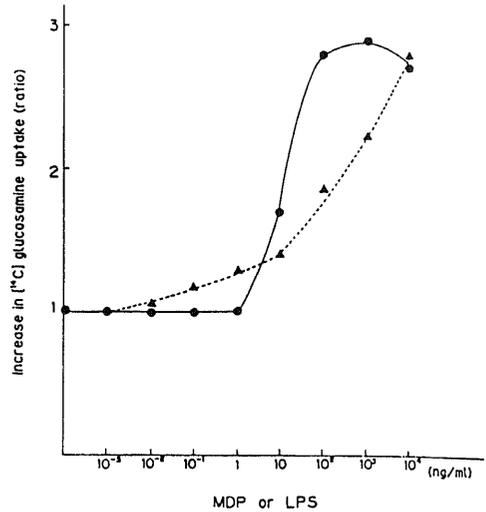


Fig. 5. Effects of various concentrations of MDP or LPS on <sup>14</sup>C glucosamine incorporation into TCA-insoluble fraction.

Macrophages ( $1 \times 10^6$  cells) were incubated in 2 ml TC 199 medium with various concentration of MDP (●) or LPS (▲) first for 42 hr, and then 0.2  $\mu$ Ci <sup>14</sup>C glucosamine was added and they were incubated further for 6 hr. 10% TCA was added to the culture and TCA precipitable radioactivity was measured in scintillation counter.

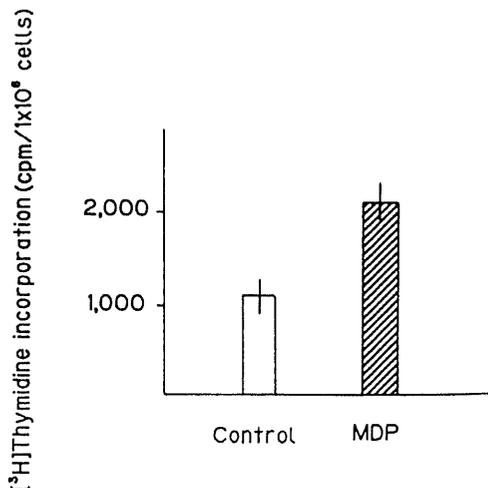


Fig. 6. Effect of MDP on the cell membrane transport of thymidine into macrophages.

Macrophages ( $1 \times 10^6$  cells) were incubated in 2 ml TC199 medium with or without MDP (10  $\mu$ g/ml) for 24 hr, pulsed with one  $\mu$ Ci of <sup>3</sup>H thymidine for 15 minutes and measured for radioactivity incorporated into the whole cell.

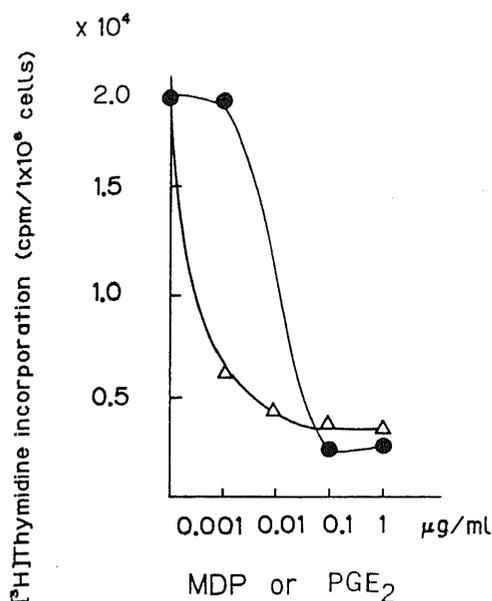


Fig. 7. Effects of various concentrations of PGE<sub>2</sub> or MDP on [<sup>3</sup>H] thymidine incorporation into TCA insoluble fraction.

Macrophages ( $1 \times 10^6$  cells) were incubated in 2 ml TC 199 medium with MDP (●) or PGE<sub>2</sub> (Δ). [<sup>3</sup>H] thymidine (0.5 μCi) was added to the medium at 24 hr and the radioactivity of TCA-insoluble fraction was measured 24 hr after the addition of [<sup>3</sup>H] thymidine. Data represent the means of triplicate cultures.

れ、cAMPを介する反応系が活性化された可能性が示唆される。またMDPはMφ内のcAMP量を増加させることが報告されている<sup>20)</sup>ので、チミジンの取り込みに及ぼすcAMPの効果を検討した。表3に示すように、ジブチルサイクリックAMPの存在下で、TCA不溶画分への(<sup>3</sup>H)チミジンの取り込みは減少したが、ジブチルサイクリックGMPによる影響は全く見られなかった。これらの結果は、MDPによるMφのDNA合成抑制の少くとも一部は、cAMPを介するシステムによって担われている可能性を示唆するものと考えられる。

#### IV. Mφ活性化, DNA合成抑制および類上皮細胞肉芽腫形成の関連性について

図4と図5に示すように、MDPやLPSによるMφへの(<sup>3</sup>H)チミジンの取り込みの抑制と、Mφ活性化の指標とされている(<sup>14</sup>C)グルコサミンの取り込みの増加とが同時に見られたので、種々のMDP誘導体および細菌細胞壁成分を用いて、両者の関係を検討した。表4に示すように、グルコサミンの取り込みを増加させるMDP誘導体および細菌細胞壁成分は(<sup>3</sup>H)チミジンの取り込みを抑制し、グルコサミンの取り込みを増加させない被検物質はチミジンの取り込みにも影響を与えなかった。さらに、生体におけるMDPの生物学的活性の最も重要な指標の一つであるアジュバント活性(遅延型皮ふ反応誘導能)、および類上皮細胞肉芽腫形成能についても検討した。表4に示すように、Mφ

Table 3. Effect of MDP, cyclic AMP or cyclic GMP on [<sup>3</sup>H]thymidine or [<sup>14</sup>C]glucosamine incorporation into macrophage TCA-insoluble fraction

Chemicals added (μg)		[ <sup>3</sup> H]Thymidine (cpm)	[ <sup>14</sup> C]Glucosamine (cpm)
none		42,927 ± 1,564	200 ± 80
MDP	0.001	49,908 ± 2,289	210 ± 24
	0.01	46,888 ± 1,583	413 ± 8
	0.1	14,299 ± 276	564 ± 47
	1	8,431 ± 127	633 ± 18
	10	7,845 ± 4	698 ± 107
	Cyclic AMP	0.001	41,475 ± 244
0.01		39,123 ± 542	196 ± 16
0.1		34,940 ± 1,984	183 ± 6
1		8,840 ± 482	252 ± 17
10		1,938 ± 200	299 ± 25
Cyclic GMP		1	44,214 ± 986
	10	43,786 ± 4,075	226 ± 6
	100	39,922 ± 1,110	172 ± 15

The assay conditions were the same as in Fig. 4 and 5 except that dibutyl cyclic AMP and dibutyl cyclic GMP at different concentrations was added. Data represent the means (± standard deviation) of triplicate cultures.

の活性化, DNA 合成の抑制, 免疫アジュバント活性および類上皮細胞肉芽腫形成との間に密接な相関が認められた。

### 考 察

結核菌感染によって類上皮細胞肉芽腫が形成されることはよく知られているが, その形成のメカニズムについてはまだ不明な点が多い<sup>6)28)29)</sup>。著者らは結核菌を含むすべての細菌細胞壁に共通して存在するペプチドグリカンの構成成分であり, その免疫アジュバント活性の最小有効単位である MDP によって, モルモットやラットに類上皮細胞肉芽腫が形成されることを先に報告している<sup>11)12)13)</sup>が, 本研究において, 類上皮細胞肉芽腫形成メカニズムの一端を明らかにする目的で, MDP による M $\phi$  の活性化および分化と類上皮細胞肉芽腫形成との関係を検討した。とくに, MDP によるモルモット腹腔浸出 M $\phi$  の DNA 合成への影響を [<sup>3</sup>H] チミジンの取り込みを指標として調べた。

モルモット腹腔浸出 M $\phi$  を *in vitro* で培養すると, TCA 不溶画分に [<sup>3</sup>H] チミジンが取り込まれることを見出した。従来, M $\phi$  は L 細胞の培養上清<sup>30)</sup>, 炎症組織浸出液<sup>31)</sup> リンフォカイン<sup>32)</sup>等が加えられないと *in vitro* では増殖しないと一般に考えられている。それ故 M $\phi$  に取り込まれた [<sup>3</sup>H] チミジンが DNA 合成を

反映しているか否かが問題<sup>34)</sup>になるので, Schmidt-Thannhauser-Schneider 法とオートラジオグラフィによって検討したところ, チミジンは細胞核 DNA に取り込まれていることが確認された(表 1, 図 2 a)。また真核細胞において通常 DNA の複製を担っている<sup>20)</sup> DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  の特異的阻害剤, アフィディコリンを M $\phi$  と 5 分間接触させるだけで, 図 3 に示されるように [<sup>3</sup>H] チミジンの取り込みが著しく抑制された。従って, M $\phi$  の TCA 不溶画分へ取り込まれた [<sup>3</sup>H] チミジンは, M $\phi$  の細胞核 DNA の複製に利用されていると考えられる。

M $\phi$  を MDP と一定時間培養すると TCA 不溶画分への [<sup>3</sup>H] チミジンへの取り込みは著明に減少した(図 4)。同時に測定されたグルコサミンの取り込みは増加しており, これは M $\phi$  の機能亢進を示唆する所見なので, M $\phi$  が傷害されたためにチミジンの取り込みが抑制されたとは考えられない。一方, M $\phi$  が活性化された時, ある種の物質の細胞膜透過性が著明に変化することが報告<sup>34)</sup>されているので, MDP が M $\phi$  の細胞膜のチミジンの透過性を抑制した結果 DNA 合成に利用され得るチミジン量が減少した可能性も考えられた。しかしながら, 図 6 に示すように, MDP によるチミジンの細胞膜透過性の抑制は認められなかった。

最近長野らとの協同研究により, MDP や LPS は M

Table 4. Relationship among biological activities of MDP, it's analogs and cell wall components

	[ <sup>14</sup> C]glucosamine <sup>a)</sup> incorporation stimulation index	[ <sup>3</sup> H]thymidine <sup>b)</sup> incorporation % suppression	granuloma formation	adjuvant activity
Control	1.0	0	—	—
MDP	2.8 ± 0.3	80 ± 7	+	+
(L-Val)	2.5 ± 0.3	70 ± 7	+	+
(D-Ala)	1.1 ± 0.2	-19 ± 12	—	—
(L-isoGln)	0.8 ± 0.3	-7 ± 10	—	—
(D-isoAsn)	0.8 ± 0.2	8 ± 13	—	—
M. tuberculosis whole cell	2.7 ± 0.3	60 ± 9	+	+
cell wall	2.9 ± 0.5	55 ± 7	+	+
S. epidermidis peptidoglycan	2.5 ± 0.4	81 ± 8	+	+
SEPS*	2.6 ± 0.3	83 ± 10	+	+
L. plantarum peptidoglycan	2.7 ± 0.5	85 ± 11	+	+
LPCM-A**	2.6 ± 0.6	84 ± 8	+	+
E. coli LPS (w)	3.5 ± 0.7	86 ± 9	+	+

Assays were performed as described under Materials and Methods.

\* SEPS: a fraction obtained from enzyme-lysate of *S. epidermidis* cell walls. \*\* LPCM-A: a fraction obtained from enzyme-lysate of *L. plantarum* cell walls. Data represent the means of the stimulation index<sup>a)</sup> and % suppression<sup>b)</sup> obtained in 3 separate experiments. Stimulation index (SI) and % suppression (PS) were calculated from triplicate cultures as follows: SI = mean [<sup>14</sup>C]glucosamine incorporation without test materials / PS = (1 - mean [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation with test materials / mean [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation without test materials) × 100.

$\phi$  の DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  には直接作用しないが、MDP や LPS によって活性化された時  $M\phi$  の DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  活性は著明に抑制されることを見出した。この場合 DNA の修復に関与するとされている DNA ポリメラーゼ  $\beta$  活性には影響が見られなかった (未発表データ)。以上の結果から、MDP や LPS による  $M\phi$  の細胞核 DNA へのチミジンの取り込みの抑制は、 $M\phi$  の DNA 複製の真の抑制を反映していると考えられる。

次に MDP による  $M\phi$  DNA 合成の抑制のメカニズムについて考察してみたい。

MDP による  $M\phi$  の活性化は、表 4 に示すように、N-acetyl muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine の L-アラニンに D-アラニンに変えたり、D-イソグルタミンを L-イソグルタミンや D-イソアスパラギンに変えると発現されないことから、 $M\phi$  は MDP の構造を何らかの機構によって、認識すると推測されるが、現在まで MDP に対する特異的な認識機構の存在については分っていない。しかしながら、著者らは MDP や LPS によって活性化された  $M\phi$  に、接触後短時間で細胞膜の形態学的変化<sup>35)</sup>と生化学的変化<sup>36)</sup>を認めているので、MDP や LPS は  $M\phi$  の細胞膜を刺激し、その結果細胞内に何らかのシグナルが伝達されて DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  活性を抑制する機構が活性化されるのではないかと推測される。

このような細胞膜を介する細胞内代謝活性の促進機序として、サイクリック AMP 依存性プロテインキナーゼ系と  $Ca^{++}$  依存性プロテインキナーゼ系の関与が知られている<sup>37)</sup>。MDP が細胞膜を介してこれらの酵素系を直接刺激するか否かについては、まだ十分な解析がなされていないが、MDP 刺激により活性化された  $M\phi$  では  $PGE_2$  の合成と放出が亢進<sup>25)</sup>し、サイクリック AMP の濃度も上昇する<sup>25)</sup>ことが知られており、 $PGE_2$  がサイクリック AMP 依存性プロテインキナーゼを活性化し、 $M\phi$  の DNA 合成抑制作用が誘導される可能性が考えられる。そこで  $M\phi$  を  $PGE_2$  の存在下に培養したところ、図 7 に示すように、 $M\phi$  の DNA 合成が著しく抑制された。またジブチリールサイクリック AMP を直接  $M\phi$  に作用させても DNA 合成が抑制された (表 3)。これらの実験結果は、MDP によってサイクリック AMP 依存性プロテインキナーゼ反応系が活性化されて、何らかのメカニズムで DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  活性が抑制され、DNA 合成の抑制へと連絡している可能性を示唆している。

最近、矢川らとの共同研究において、マウス骨髄腫由来の  $M1$  細胞に LPS を作用させると DNA 合成が抑制されることを見出した。さらに、この LPS 処理

$M1$  細胞と正常な  $M1$  細胞とをポリエチレングリコールで融合させた時、正常な  $M1$  細胞の DNA 合成が抑制されることを見出した (データ未発表)。この結果は、MDP や LPS 刺激により DNA 合成抑制を誘導するシグナル因子が、 $M\phi$  内に存在する可能性を示唆していると考えられる。

一方、MDP による  $M\phi$  の DNA 合成の抑制と、 $M\phi$  の活性化を反映するグルコサミン取り込みの増加とが同一濃度で見られた (図 4, 5) ので、さらに種々の MDP 誘導体および細菌細胞壁成分についても検討した。表 3 に示すように、DNA 合成の抑制とグルコサミン取り込みの亢進との間に相関があることが分った。また免疫アジュバント活性の代表的な指標の一つである遅延型皮膚反応の誘導と、DNA 合成の抑制との間にも表 4 に示すように密接な相関が認められた。これらの結果は、 $M\phi$  の DNA 合成の抑制が、活性化の部分現象であることを示唆している。

さらに、MDP を油中水型エマルジョンとしてモルモットに注射したとき、所属リンパ節に類上皮細胞肉芽腫が形成される<sup>12)13)</sup>ので、種々の MDP 誘導体および細菌細胞壁成分による、類上皮細胞肉芽腫形成能と DNA 合成抑制活性との関係を検討したところ、両者の間に密接な関連が示された (表 4)。

一般に分化した細胞の DNA 合成が低下することはよく知られている<sup>38)</sup>ので、MDP 刺激による  $M\phi$  の DNA 合成の抑制は、 $M\phi$  の分化に関連した現象ではないかと推測される。Adams<sup>9)</sup>は BCG により誘起された  $M\phi$  から類上皮細胞への変化を形態学的に追求した結果、分化であると考えた。また結核結節中の類上皮細胞は結核菌に対する殺菌能を持つが、これは、機能的な分化と考えられる<sup>6)28)</sup>。同様な結果は MDP でも得られた。MDP は類上皮細胞肉芽腫を形成させ<sup>12)</sup>、また機能的に見ても、MDP によって刺激された  $M\phi$  は、リステリアに対する殺菌能を獲得するので<sup>11)</sup>、MDP は  $M\phi$  を分化させると考えられる。従って、MDP による  $M\phi$  の活性化は分化の始まりであり、 $M\phi$  の活性化に伴って DNA 合成の低下が起る。 $M\phi$  が MDP 構造に接すると、増殖から分化へと代謝のスイッチを切り換え、増殖のためのエネルギーを止めて、より強力な活性化、すなわち殺菌能をもつ細胞へと分化を開始するのではないかと推測される。 $M\phi$  を MDP で刺激するとき、 $M\phi$  生長因子、インターロイキン 1、 $PGE_2$ 、パイロジェン、コラゲナーゼ、線維芽細胞増殖因子、プラスミノゲン活性化因子等が放出されることが報告されている<sup>39)</sup>。これらの因子やその他の未知の因子が類上皮細胞肉芽腫の形成に関与していると考えられるが、MDP の刺激によって活性化さ

れ、分化を開始したMφが、どのような機序で類上皮細胞肉芽腫の形成に導かれて行くかは、今後詳細に解明されなければならない問題である。

### 結 論

細菌細胞壁ペプチドグリカン構成成分であるMDPによる類上皮細胞形成とMφの分化との関係を検討するために、モルモット腹腔浸出MφのDNA合成に及ぼすMDPの影響を、<sup>3</sup>H]チミジンの取り込みを指標として検討し以下の知見を得た。

1. モルモット腹腔浸出Mφは *in vitro* で、Mφ増殖因子の添加なしに、<sup>3</sup>H]チミジンを取り込んだ。このチミジンは細胞核DNAに取り込まれており、真のDNA複製に利用されていることが示された。

2. MDPおよびLPS等の免疫アジュバント物質で刺激されたMφにおいては、DNAの複製の著明な抑制が認められた。

3. MDPによるDNA複製の抑制の少くとも一部は、サイクリックAMP依存性プロテインキナーゼを介して発現される可能性が示唆された。

4. 種々の細菌細胞壁成分やMDP誘導体を用いた実験から、Mφ活性化能、DNA合成抑制活性および類上皮細胞肉芽腫形成能の間には密接な関連が認められた。

以上の結果から、MDPによるモルモット腹腔浸出MφのDNA複製の抑制は、Mφ活性化の部分現象であり、Mφから類上皮細胞への分化 (terminal differentiation) の始まりであると考えられた。

### 謝 辞

稿を終るにあたり、御指導と御校閲を賜った米山良昌教授に深甚なる謝意を表します。また終始御教示いただきました友田燁夫助教授に心から感謝いたします。更に貴重なサンプルと御指導を賜りました島根医科大学田中渥教授と大阪大学歯学部小谷尚三教授に心から感謝いたします。また御協力いただきました共同研究者ならびに研究室各位に厚く御礼申し上げます。

### 文 献

- 1) Ellouz, F., Adam, A., Ciorbaru, R. & Lederer, E.: Minimal structural requirement for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **59**, 1317-1325 (1974).
- 2) Kotani, S., Watanabe, Y., Kinoshita, F., Shimono, T., Morisaki, I., Shiba, T., Kusumoto, S., Tarumi, Y. & Ikenaka, K.: Immunoadjuvant activities of synthetic N-acetylmuramylpeptides or

amino acids. *Biken. J.*, **18**, 105-111 (1975).

- 3) 小谷尚三・高田春比古: 細菌細胞壁ならびに関連する合成標品 (ムラミルペプチド) の免疫作用. *薬学雑誌*, **103**, 1-27 (1983).
- 4) Cohn, Z. A.: The activation of mononuclear phagocytes. fact, fancy, and future. *J. Immunol.*, **121**, 813-816 (1978).
- 5) Lurie, M. B.: Resistance to tuberculosis. Experimental studies in native and acquired defensive mechanisms. Cambridge, Mass., Harvard University Press, (1964).
- 6) Adams, D. O.: The granulomatous inflammatory response. A review. *Am. J. Pathol.*, **84**, 164-191 (1976).
- 7) Ando, M., Dannenberg, Jr. A. M., Sugimoto, M. & Tepper, B. S.: Histochemical studies relating the activation of macrophages to the intracellular destruction of tubercle bacilli. *Am. J. Pathol.*, **86**, 623-633 (1977).
- 8) Epstein, W. L.: Cutaneous granulomas. *Intern. J. Dermatol.*, **16**, 574-579 (1977).
- 9) Nagao, S., Tanaka, A., Yamamoto, Y., Koga, T., Onoue, K., Shiba, T., Kusumoto, K. & Kotani, S.: Inhibition of macrophage migration by muramyl peptides. *Infect. Immun.*, **24**, 308-312 (1979).
- 10) Nagao, S., Miki, T. & Tanaka, A.: Macrophage activation by muramyl dipeptide (MDP) without lymphocyte participation. *Microbiol. Immunol.*, **25**, 41-50 (1981).
- 11) 田中 渥・今井勝行・永尾重喜・冨岡美智子・久島紘司・江森浩三: 合成細菌細胞壁成分 (MDP) によるマクロファージの活性化について、感染初期における生体防御. 第3回阿蘇シンポジウム記録. 1979. 南山堂 p. 82-95 (1980).
- 12) Nagao, S., Ota, F., Emori, K., Inoue, K. & Tanaka, A.: Epithelioid granuloma induced by muramyl dipeptide in immunologically deficient rats. *Infect. Immun.*, **34**, 993-999 (1981).
- 13) Tanaka, A., Emori, K., Nagao, S., Kushima, K., Kohashi, O., Saitoh, M. & Kataoka, T.: Epithelioid granuloma formation requiring no T-cell function. *Am. J. Pathol.*, **106**, 165-170 (1982).
- 14) Kusumoto, S., Tarumi, Y., Ikenaka, K. & Shiba, T.: Chemical synthesis of N-acetylmuramylpeptides with partial structures of bacterial cell wall and their analogs in relation to

- immuno-adjutant activities. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **49**, 533-539 (1976).
- 15) **Kotani, S., Narita, T., Stewart-Tull, D. E. S., Shimono, T., Watanabe, Y., Kato, K. & Iwata, S.** : Immuno-adjutant activities of cell walls and their water-soluble fractions prepared from various gram-positive bacterial. *Biken. J.*, **18**, 77-92 (1975).
- 16) **Harada, K., Kotani, S., Takada, H., Tsujimoto, M., Hirachi, Y., Kusumoto, S., Shiba, T., Kawata, S., Yokogawa, K., Nishimura, H., Kitaura, T. & Nakajima, T.** : Liberation of serotonin from rabbit blood platelets by bacterial cell walls and related compounds. *Infect. Immun.*, **37**, 1181-1190 (1982).
- 17) **Ikegami, S., Kawada, K., Kimura, Y. & Suzuki, A.** : A rapid and convenient procedure for the detection of inhibitors of DNA synthesis using starfish oocytes and sea urchin embryos. *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 161-166 (1979).
- 18) **Schneider, W. C.** : Phosphorous compounds in animal tissues. III. A comparison of method for the estimation of nucleic acid. *J. Biol. Chem.*, **164**, 747-751 (1946).
- 19) **Ishikawa, Y., Kodama, K., Ida, F. & Takayama, S.** : Demonstration of in vivo DNA repair synthesis in mouse skin exposed to various chemical carcinogens. *Cancer Res.*, **42**, 5216-5221 (1982).
- 20) **松影昭夫・田部一史・吉田松年** : DNA ポリメラーゼ  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , 蛋白質, 核酸, 酵素, **28**, 242-255 (1983).
- 21) **Ikegami, S., Taguchi, T., Ohashi, M., Nagano, H. & Mano, Y.** : Aphidicolin prevents mitotic cell division by interfering with the activity of DNA polymerase- $\alpha$ . *Nature*, **275**, 458-460 (1978).
- 22) **Goud, Th. J. L. M., Schotte, C. & Vanfurth, R.** : Mononuclear phagocytes in immunity, infection and pathology, Blackwell Scientific publication. Oxford, p.189-203 (1975).
- 23) **Doe, W. F. & Henson, P. M.** : Macrophage stimulation by bacterial lipopolysaccharides. I. Cytolytic effect on tumor target cell. *J. Exp. Med.*, **148**, 544-556 (1978).
- 24) **Hammond, M. E. & Dvorak, H. E.** : Antigen-induced stimulation of glucosamine incorporation by guinea pig peritoneal macrophages in delayed hypersensitivity. *J. Exp. Med.*, **136**, 1518-1532 (1972).
- 25) **Wahl, S. M., Wahl, K. M., Macarthy, J. B., Chedid, L. & Mergenhagen, S. E.** : Macrophage activation by mycobacterial water soluble compounds and synthetic muramyl dipeptide. *J. Immunol.*, **123**, 2226-2231 (1979).
- 26) **Kurland, J. I., Broxmeyer, H. E., Pelus, L. M., Bockman, R. S. & Moore, M. A. S.** : Role for monocyte-macrophage-derived colony-stimulating factor and prostaglandin E in the positive and negative feedback control of myeloid stem cell proliferation. *Blood*, **52**, 388-407 (1978).
- 27) **Yagawa, K., Itoh, T. & Tomoda, A.** : Effect of transmethylation reactions and increased levels of cAMP on superoxide generation induce with wheat germ agglutinin and phorbol myristate. *FEBS Letts.*, **154**, 383-386 (1983).
- 28) **Boros, K. L.** : Granulomatous inflammation. *Prog. Allergy.*, **24**, 183-267 (1978).
- 29) **Epstein, W. L.** : Granulomatous hypersensitivity : *Prog. Allergy.*, **11**, 36-88 (1967).
- 30) **Stewart, C. C., Lin, H-S. & Adles, C.** : Proliferation and colony-forming ability of peritoneal exudate cell in liquid culture. *J. Exp. Med.*, **141**, 1114-1132 (1975).
- 31) **Adolphe, M., Fontagne, J., Pellitire, M. & Giroud, J. P.** : Induction of DNA synthesis in rat macrophages in vitro by inflammatory exudate. *Nature*, **253**, 637 (1975).
- 32) **Hadden, J. W., Sadlik, J. R. & Hadden, E. M.** : Macrophage proliferation induced in vitro by a lymphocyte factor. *Nature*, **257**, 483-485 (1975).
- 33) **Bennett, R. M., Davis, J., Campbell, S. & Portnoff, S.** : Lactoferrin binds to cell membrane DNA. Association of surface DNA with an enriched population of B cell and monocytes. *J. Clin. Invest.*, **71**, 611-618 (1983).
- 34) **Bonventre, P. F., Strauss, D., Baughn, R. E. & Inhoff, J.** : Enhancement of carrier-mediated transport after immunologic activation of peritoneal macrophages. *J. Immunol.*, **118**, 1827-1835 (1977).
- 35) **Tanaka, A., Nagao, S., Imai, K. & Mori, R.** : Macrophage activation by muramyl dipeptide as measured by macrophage spreading and attachment. *Microbiol. Immunol.*, **24**, 547-557 (1980).
- 36) **Kaku, M., Yagawa, K., Nagao, S. & Tanaka, A.** : Enhanced superoxide anion release from phagocytes by muramyl dipeptide or lipo-

polysaccharide. *Infect. Immun.*, **39**, 559-564 (1983).

37) 塩田 誠・梶川憲雄・西山 馨・西塚泰美: 受容機構におけるリン脂質代謝と蛋白質リン酸化反応. *生体の科学*, **33**, 258-263 (1982).

38) Cline, M. J. & Sumner, M. A.: Bone marrow macrophage precursors. I. Some functional characteristics of the early cell of the marrow

macrophage series. *Blood*, **40**, 62-76 (1972).

39) Chedid, L., Audebert, F., Johnson, A. G.: Biological activities of muramyl dipeptide, a synthetic glycopeptide analogous to bacterial immunoregulating agents. *Prog. Allergy.*, **25**, 63-105 (1978).

**Muramyl Dipeptide- Induced Inhibition of DNA Synthesis of Guinea Pig Peritoneal Exudate Macrophage and its Biological Significances** Shigeki Nagao, Department of Biochemistry, School of Medicine Kanazawa University Kanazawa 920 - *J. Juzen Med. Soc.*, **94**, 403-414 (1985).

**Key words.** muramyl dipeptide, peritoneal exudate macrophage, nuclear DNA synthesis, activation of macrophage, epithelioid granuloma

#### Abstract

Muramyl dipeptide (MDP) is a minimal structure necessary for various biological activities of bacterial cell wall peptidoglycans. MDP induces in guinea pigs the granulomas containing macrophages and epithelioid cells differentiated from macrophages. This suggests that MDP differentiates macrophages into epithelioid cells. This study was undertaken to gain an insight into the mechanism of the activation and differentiation of macrophage induced by MDP. For this purpose, the effect of MDP on macrophage DNA synthesis was studied in view of the generally accepted fact that DNA synthesis is decreased when cells differentiate.

Guinea pig peritoneal exudate macrophages actively incorporated [<sup>3</sup>H] thymidine into trichloroacetic acid-insoluble fraction in vitro without macrophage proliferating factors. The incorporation of [<sup>3</sup>H] thymidine was almost completely inhibited by aphidicolin, an inhibitor of DNA polymerase- $\alpha$  and an autoradiograph showed heavy labeling in nuclei of about 20% of macrophage populations. These results indicate that the observed thymidine incorporation reflected a DNA synthesis for replication.

When macrophage were stimulated by MDP, the [<sup>3</sup>H] thymidine incorporation was markedly suppressed while [<sup>14</sup>C] glucosamine incorporation was increased. The suppression of [<sup>3</sup>H] thymidine incorporation by MDP was not due to the decrease in thymidine transport through the cell membrane. An autoradiograph revealed that MDP decreased markedly the number of macrophages whose nuclei were labeled by [<sup>3</sup>H] thymidine. These results indicate that the suppression of [<sup>3</sup>H] thymidine incorporation by MDP was due to a true inhibition of DNA synthesis. Cyclic AMP and PGE<sub>2</sub>, both of which are known to be increased in amount in macrophage by MDP stimulation, suppressed DNA synthesis of macrophage, suggesting that cyclic AMP might be involved in the inhibitory effect of MDP.

Concerning various analogs of MDP, a close correlation was observed among the capacities of activating macrophage, suppressing DNA synthesis and inducing epithelioid granuloma formation. These findings suggest that suppression of DNA synthesis by MDP may be induced by macrophage activation and represent an initial event during the differentiation of macrophages for epithelioid cells.