The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	A群連鎖球菌細胞壁に関する研究
Author(s)	浜田, 茂幸
Citation	大阪大学, 1971, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/30229
rights	Copyright © 歯科基礎医学会
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【6】

氏名・(本籍)	浜田茂幸（はまだ しげゆき）
学位の種類	歯学博士
学位記番号	第 2232 号
学位授与の日付	昭和46年3月25日
学位授与の要件	歯学研究科歯学基礎系 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**A群連鎖球菌細胞壁に関する研究**
論文審査委員	(主査) 教授 小谷 尚三 (副査) 教授 山本 巌　助教授 鈴木不二夫　講師 足達綱三郎

論文内容の要旨

A群連鎖球菌は正常人の咽頭・口腔などから5～10％の頻度で検出され、その感染によって直接継起する多彩な化膿性疾患を惹起すると共に、リウマチ熱や急性糸球体腎炎などのnon-suppurative sequelaeを続発する点で特異な病原細菌であり、これらの疾患の病理発生に関与する因子の多くがこの菌の細胞壁に局在することが知られている。しかし細胞壁の化学構造や上述の活性因子の化学的実体、作用機序等については不明の点が多い。本研究はA群連鎖球菌細胞壁を溶解する酵素を利用することにより、これら未解決の問題の一端を解明することを目的に行ったものである。

実験に供した細胞壁は培養菌体(A群化膿連鎖球菌、12型、S.F.42株)をBraun の装置で破壊し、分画遠心、蛋白分解酵素処理を行って分離、精製した。また細胞壁溶解酵素（L－11酵素）としては*Flavobacterium* L-11菌の培養上清の硫安塩析物をSephadex によるゲルロ過、あるいはCM-セルロースカラムによるクロマトグラフィーにより分離精製したものを使用した。

被験細胞壁はGlu 残基（500mμモル/1mg）1.0モルあたり2.4モルのL-Ala、1.0モルのD-Ala、1.1モルのLys、1.6モルのグルコサミン（GlcN)、(0.5)モルのムラミン酸（Mur)、2.9モルのラムノース(Rham)、0.2モルの総リン、1.0モルのNH_3を主要な構成成分とし、Muñoz らの報告と異なりグルコースは全く検出されなかった。

本細胞壁にL－11酵素を作用させると最大80％のOD減少がみられ、Glu 残基1.0モルあたり0.71モルのN-末端L-Ala、0.50モルのC-末端D-Ala、0.24モルの単体L-Ala が遊離した。ついで細胞壁の溶産産物をゲルロ過し、溶解物中のHexNおよびRham のすべてと、少量のペプチドを含むC多糖体—グリコペプチド複合体と考えられる高分子量画分（HMW）、ペプチドないしアミノ酸よりなる低分子量画分（LMW）とに分離した。

LMWをAmberlite CG-120カラムクロマトおよびロ紙電気泳動法によって分画し、7種類のペプチドを単離した。これらについてアミノ酸組成、N－およびC－末端アミノ酸を同定・定量し、かつ

Edman 分解によりN-末端部分の構造を解析し、これらのペプチドが L-Ala→D-(*iso*)-Glu→L-Lys →D-Ala のテトラペプチド、2つのペプチドユニットが L-Ala →L-Ala の架橋を介して一方のC-末端位の D-Ala 残基のCOOH 基と他方のLys 残基のε-NH_2基との間で結合したデカペプチド、さらに2つのテトラペプチドがD-Ala →N^{ε}-Lys によって直接結合したオクタペプチドなどであることを決定した。以上の分析結果より、被験細胞壁ペプチドグリカンのペプチド部分は上述のテトラペプチドを構築単位とし、これらのユニットがL-Ala →L-Ala を介して、あるいは直接結合したネットワークから成っていること、またL-11酵素の作用によりペプチドユニット間のD-Ala →L-Ala 結合およびペプチド部分とグリカン部分とを結ぶMur →Ala 結合が開裂されて細胞壁は可溶化することが明かにされた。

つぎに、被験細胞壁、酵素標品、水ならびに器具に外来性の発熱物質が混入しないよう細心の注意を払って調整したHMWをウサギの静脈内に注射して調べたところ、この画分に強い発熱作用と流血中白血球数減少作用のあることが明かになった。最少有効量は体重2kgのウサギに対し0.1mgであった。なお発熱作用の検定には断食断水させた安静状態のウサギの直腸温を測定した。

HMWの連続投与をうけたウサギはHMWの発熱作用に対する明確なtolerance を示すが、*E. coli* 内毒素の静注に対する感受性は保有している。逆に内毒素にtolerant のウサギはHMWの発熱作用を著しくこうむりにくかった。

またHMWを静注した後エピネフリンを皮内注射すると、内毒素を注射した場合と同様、注射部位を中心に壊死巣を生じた。しかし局所Shwartzman 現象においてはHMWは内毒素とは異なり、試みた限りの用量（最大いずれも2.0mg）では準備因子としても惹起因子としても作用しなかった。

以上のように、A群連鎖球菌細胞壁の酵素的溶解産物からえたC多糖体—グリコペプチド複合体はウサギに発熱、流血中の白血球数減少を惹起し、エピネフリンに対する感受性を高める点でグラム陰性菌内毒素に類似しているが、しかし混入した内毒素によるのではないと考えられる病理作用を有することを明かにした。

論文の審査結果の要旨

この研究は、起病機序よりみて病原細菌のプロトタイプの一つと考えられるA群化膿連鎖球菌について、病原性の発現に重要な役割を演じる細胞壁の化学性状と病理作用、および両者の関係を探究しょうとしたものである。

浜田君は所属する研究室で発見された細胞壁溶解酵素を利用し、従来推定の域を出なかったA群化膿連鎖球菌（12型、S. F. 42株）の細胞壁ペプチドグリカンのペプチド部分の基本構造を明かにするとともに、これまで物理的に破壊して得た細胞“破片”という形でしか認められなかった発熱作用、流血中白血球数減少作用、エピネフリンに対する皮膚感受性を増加させる作用などの病理作用がC多糖体—グリコペプチド複合体と考えられる可溶性画分として捉えられることを示した。

以上の点より、浜田君の論文は歯学博士の学位請求に十分価する論文と認められる。