



Title	細菌細胞壁構築成分ならびに関連する合成標品のモルモットリンパ系細胞に対する刺激作用
Author(s)	高田, 春比古
Citation	大阪大学, 1980, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32605
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名 ・ (本籍)	高 田 春 比 古
学 位 の 種 類	歯 学 博 士
学 位 記 番 号	第 4 9 1 3 号
学位授与の日付	昭 和 55 年 3 月 25 日
学位授与の要件	歯学研究科 歯学基礎系専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学 位 論 文 題 目	細菌細胞壁構築成分ならびに関連する合成標品のモルモット リンパ系細胞に対する刺激作用
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 小 谷 尚 三 (副査) 教 授 鈴木不二男 教 授 岡 田 宏 助教授 長谷川 清

論 文 内 容 の 要 旨

モルモット等に抗原に対する遅延型過敏症を誘導し、血中抗体価を上昇させる Freund の完全アジュバント中の有効因子がミコバクテリアの細胞壁に局在することがまず明かにされ、ついで最小構造単位が MurNAc-L-Ala-D-isoGln (MDP) であることが示された。

著者は、種々のグラム陽性菌ないしはペプチドグリカン (PG)、またこれらを PG 加水分解酵素で溶解して得た水溶性標品、さらに上記 MDP ならびにその構造類似体ないし誘導体について、モルモットの脾臓および胸腺リンパ系細胞に対するマイトジェン活性、ならびに腹腔マクロファージ (Mφ) に対する刺激作用を *in vitro* 系で調べ、細菌細胞壁の免疫生物学的活性と化学ないし分子構造との関係を追求した。

供試した細胞壁は、約 20 菌種のグラム陽性菌より常法に従って調製し、うち 5 標品については、トリクロル酢酸ないしホルムアミド処理を行って特殊構造を除き、PG を分離した。また細胞壁ないし PG を、グリカン鎖を切断する M-1 エンド-N-アセチルムラミダーゼ、ならびにペプチドサブユニット間の架橋を開裂する L-3 および SALE エンドペプチダーゼで処理し、水溶性標品を得た (以上の標品の調製には大日本製薬・総合研の横川哉恵・河田茂雄両氏の協力を得た)。さらに合成 MDP、その構造類似体ならびに 6-O-アシル-MDP は、本学理学部芝哲夫教授より恵与を受けた。

マイトジェン活性の検定は、Hartley 系の雌モルモットの胸腺ないし脾臓より、Conray 400-Ficoll 法により、リンパ球画分を分離し、これをウシ胎仔血清および抗生物質を加えた RPMI 培養液に、 1.0×10^6 個/ml の割合に浮遊させた。この浮遊液の 1.0 ml に 0.1 ml 容のテスト物質を加え、5% CO₂-95% 空気中で 48 時間培養し、培養終了の 24 時間前に 1 μ Ci の [³H] チミジンを加え、培養終了後にリンパ

球へのチミジンの取り込み量を測定し、対照での測定値との比 (Stimulation index) と標準誤差 (S. E.) を求め、テスト標品のマイトジェン作用の指標とした。また腹腔M ϕ 刺激作用は、雌Hartleyモルモットの腹腔内にチオグリコレート培地を50ml注入し、4日目に採取した滲出細胞から、プラスチック製培養器に付着する細胞層 (1.0×10^6 cells/well) に、テスト標品のRPMI浮遊液ないし溶液を1ml加え、常法通り、72時間培養した。培養終了の8時間前に各wellに0.25 μ Ciの [14 C] グルコサミンを加え、培養終了後にM ϕ 単細胞層をHanks液で洗った。ついで0.5mlの4%ラウリル硫酸ナトリウム液を加えて細胞を溶解し、取り込まれた [14 C] グルコサミン量を測定した。対照との比を算出して刺激係数 (Stimulation index) とした。

脾細胞に対するマイトジェン活性については、ミコバクテリアおよび類縁菌の細胞壁は、他のグラム陽性菌の細胞壁に比べて、おおむね強い活性を示した。しかし必ずしもミコール酸含量と活性との間には相関は認められなかった。また一般にPGは細胞壁より強い活性を示した。さらに細胞壁あるいはPGの酵素溶解物にも活性は保持され、なかでもエンドペプチダーゼ溶解物 (PG構築単位がグリカン鎖により多数結合している) は、グリコシダーゼ溶解物 (PG構築単位のモノマーないしダイマー構造) よりも強い活性を示した。合成標品については、MDPに弱いが明確な活性が認められ、免疫アジュバント作用を欠く類似体は不活性であり、6-*o*-アシル-MDPでは、MDPにくらべて活性の減弱が認められた。

胸腺細胞に対するマイトジェン活性については、細胞壁の全てが明確な活性を示し、この活性の発現にもミコール酸の存在は必須でないことが明かにされた。また脾細胞に対するのとは逆に、細胞壁の方がPGよりも強い作用を示した。さらに細胞壁を酵素で溶解すると刺激作用は認められなくなった。合成標品では、MDPは活性を欠くが、適当なアシル誘導体、すなわち6-*o*-ステアロイル-MDPや6-*o*-(2-テトラデシルヘキサデカノイル)-MDPは明確な活性を示した。

つぎに、腹腔M ϕ 刺激作用については、供試細胞壁は全て明確な活性を示し、この場合にもミコール酸は活性発現に必須ではなかった。またMDPは弱いながらも明確な活性を示し、6-*o*-アシル誘導体のうち、6-*o*-(2-テトラデシルヘキサデカノイル)-MDPや6-*o*-(3-ヒドロキシ-2-テトラデシルオクタデカノイル)-MDPはMDPよりも強い刺激作用を示した。

以上の結果より、次の結論を得た。細菌細胞壁のモルモット脾細胞に対するマイトジェン活性を担う最小構造はPG構築単位の一部であるMDPであり、PG構築単位が重合すると作用がより効果的に発現する。胸腺細胞に対するマイトジェン活性の発現にはMDP構造だけでは不十分であり、粒子状構造ないしは適当な付加的構造が必要である。M ϕ に対する活性の最小有効構造もMDPであるが、適当な修飾を加えること等によって難水溶性とすると、作用の発現がより効率的になる。

論文の審査結果の要旨

高田君の研究は、最近数年間、日仏を中心に活発な研究が進められている細菌細胞壁ならびに関連

する合成物質の生体防御機構賦活化作用のうち、モルモットのリンパ系細胞に対する刺激作用を *in vitro* で検討したものである。

この研究の結果、種々のグラム陽性菌の細胞壁やその酵素による溶解物のみならず、これ迄作用の有無について議論が分かれていた *N*-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン (MDP) のマイトジェン活性について、細胞壁の免疫強化作用を担うこの最小有効構造単位がモルモット脾細胞に明確な刺激作用を示すこと、さらにMDPの種々の構造類似体を用いることによって、マイトジェン作用と *in vivo* での免疫強化作用との間に相関が認められることが、他に先駆けて明らかにされた。

またこれ迄結核菌等のミコール酸を含む細胞壁についてのみ報告のあったグルコサミンの取り込みの増加を指標とするマクロファージ刺激作用が、他の菌種のミコール酸を含まない細胞壁にも認められ、さらにこの作用を担う最小有効構造単位もやはりMDPであることが明らかにされた。

以上のように、高田春比古君の論文は、生体防御の第一線を担うリンパ球およびマクロファージに対する細菌細胞壁ならびにその最小有効構造単位の刺激作用に新しい知見を加えた優れた業績であり、歯学博士の学位請求に十分値するものと認める。