



|              |                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | 細菌細胞壁ならびに細胞壁ペプチドグリカンを模した合成標品の多形核白血球刺激作用                                                                                                                                                                                                                              |
| Author(s)    | 石原, 吉孝                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Citation     | 大阪大学, 1981, 博士論文                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Version Type |                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/32712">https://hdl.handle.net/11094/32712</a>                                                                                                                                                                                  |
| 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">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >大阪大学の博士論文について</a>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) | 石 原 吉 孝                                                          |
| 学位の種類   | 歯 学 博 士                                                          |
| 学位記番号   | 第 5 2 3 9 号                                                      |
| 学位授与の日付 | 昭和 56 年 3 月 25 日                                                 |
| 学位授与の要件 | 歯学研究科 歯学臨床系専攻<br>学位規則第 5 条第 1 項該当                                |
| 学位論文題目  | 細菌細胞壁ならびに細胞壁ペプチドグリカンを模した合成<br>標品の多形核白血球刺激作用                      |
| 論文審査委員  | (主査)<br>教 授 作 田 正 義<br>(副査)<br>教 授 小 谷 尚 三 助教授 岩 山 幸 雄 助教授 下 野 勉 |

## 論 文 内 容 の 要 旨

細菌細胞壁，細胞壁を酵素処理して得た水溶性画分，ならびに細胞壁ペプチドグリカン(PG)の構築単位を模して合成したムラミルペプチドがマクロファージやリンパ球を賦活することが日仏を中心とする活発な研究により明らかにされている。しかしマクロファージと並んで微生物感染に対する生体防御の第一線を担う多形核白血球に対する刺激作用についての研究は皆無に近い。

著者は，モルモットの腹腔を刺激して得た多形核白血球の表面食作用(*Streptococcus pyogenes* に対する)を亢進させる作用を指標として，細胞壁，同水溶性画分ならびに関連する合成標品，なかでも近年合成アジュバントとして注目を集めている *N*-アセチルムラミル-*L*-アラニル-*D*-イソグルタミン(MurNAc-*L*-Ala-*D*-isoGln, MDP)の6-*O*-アシル誘導体の多形核白血球刺激作用を *in vitro* で調べた。

供試した10菌種11菌株のグラム陽性菌の細胞壁は常法にしたがって調製した。また細胞壁あるいはPGの水溶性標品としては，*Staphylococcus epidermidis*の細胞壁PGをSALEエンドペプチダーゼで処理して得たSEPS，およびSEPSをM-1エンド-*N*-アセチルムラミダーゼで処理したSEPS-M，同じく*Lactobacillus plantarum*細胞壁の酵素処理物より分離したジサッカリドトリペプチド，(GMP<sub>3</sub>)，ジサッカリドテトラペプチド(GMP<sub>4</sub>)を供試した（これら水溶性標品の調製には大日本製薬・総合研の横川哉恵，河田茂雄両博士の協力を得た）。合成MDP，その構造類似体ならびに6-*O*-オクタデカノイル(ステアロイル)-MDP，[L18]-MDPおよび6-*O*-(2-テトラデシルヘキサデカノイル)-MDP，[B30]-MDPは，本学理学部芝哲夫教授より恵与をうけた。

食作用に対する刺激作用の検定はMidtvedtらの方法を修飾して用いた。指示菌としては，[<sup>3</sup>H]チ

ミジンを加えた Todd-Hewitt ブロスに培養した *S. pyogenes* (3 型, Sv 株) の菌体を 56℃ で 30 分間加熱処理したもの (一部の実験では生菌) を用いた。多形核白血球は雌の Hartley 系モルモットの腹腔をチオグリコレート培地で刺激し、ヘパリン加 Hanks' balanced salt solution (HBSS) で洗浄して得た腹腔浸出物、ならびにモルモットあるいはヒトのヘパリン加末梢血より、常法にしたがって分離したものをを用いた。得られた多形核白血球を  $5 \times 10^6$  /ml となるように HBSS に浮遊させ、これにテスト物質 0.01~10  $\mu\text{g}$  /ml HBSS (最終濃度) になるように加えたもの (対照では HBSS のみ) の 0.5ml ずつを Linbro の培養トレイの各凹みに分注し、37℃ で 2 時間反応させた。凹み底に付着したテスト物質で処理した多形核白血球に、HBSS に浮遊させた上記標識加熱菌液を加え、37℃ で 60~90 分間反応させた。時間を追って菌液を吸引除去し、付着多形核白血球を PBS で注意深く洗浄した。培養トレイを乾燥後、Lowry のアルカリ性銅液で多形核白血球を溶解させ、放射能 (cpm) および多形核白血球数の指標として蛋白量を測定した。テスト物質の各用量、各時間宛 3 ないし 4 通りの反応物について、cpm/蛋白の平均値ならびに標準誤差 (S. E.) を求め、これらの値をテスト物質を加えなかった対照の値と比較し、テスト物質の多形核白血球刺激作用の有無、程度を判定した。

以上の検定系で細菌細胞壁関連物質の多形核白血球刺激作用を調べた結果、次の事実が明らかにされた。(1) 供試した細胞壁標品すべてに、強弱の差はあるが、モルモット腹腔多形核白血球による *S. pyogenes* の表面食作用をたかめる効果が認められた。(2) この効果は、細胞壁を PG 加水分解酵素で解体した水溶性標品においても保持され、PG 構築単位の“ポリマー” (SEPS) のみならずモノマー (SEPS-M, GMP<sub>3</sub> および GMP<sub>4</sub>) にも認められた。(3) 合成標品を供試した実験により、細菌細胞壁の腹腔多形核白血球の食作用増強効果を担う最小有効構造単位が、細胞壁の他の免疫調節作用についてと同様に、MDP であることが明らかにされた。しかし、(4) MDP のムラミン酸残基に  $\alpha$ -分岐高級脂肪酸を結合した [B30]-MDP には、MDP に比べてより強い多形核白血球刺激作用が認められた。さらに、(5) [B30]-MDP はヒトならびにモルモットの末梢血より得た多形核白血球に対しても表面食作用を亢進させる作用を示した。(6) 以上の細胞壁関連物質による多形核白血球の食作用刺激効果は、用量が過大であるとかえって現れにくい傾向があり、概して  $5 \times 10^6$  多形核白血球当たり 0.1 ないし 1  $\mu\text{g}$  の濃度で最も効果的に発現した。

## 論文の審査結果の要旨

石原吉孝君の研究は、種々の細菌種の細胞壁標品が多形核白血球による  $[\text{H}^3]$  標識 *Streptococcus pyogenes* 表面食作用を増強する作用を有することを、世界の研究者に先駆けて明らかにしたものである。

石原君は加えて、細胞壁の多形核白血球刺激作用が、細胞壁を酵素により解体して得たペプチドグリカンの水溶性“ポリマー”のみならず“モノマー”にも保持され、さらにペプチドグリカンの基本構造を模して合成された *N*-アセチルムラミル-*L*-アラニル-*D*-イソグルタミン (MDP) にも認められ

ることを示し、またMDPの6-O-アシル誘導体のあるもの、例えば6-O-(2-テトラデシルヘキサデカノイル)-MDPがMDPに比べてより強い刺激作用を呈することを併せて明らかにした。

以上のように、この研究は、マクロファージとならんで微生物感染症に対する生体防衛の第一線を担う多形核白血球が細胞壁関連アジュバントにより刺激されるという新しい事実を異論の余地なく示したもので、歯学博士の学位請求に十分に値する優れた業績と認める。