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

【3】

氏名・(本籍)	小川知彦（おかわともひこ）
学位の種類	歯学博士
学位記番号	第 6015 号
学位授与の日付	昭和58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**
論文審査委員	(主査) 教授 小谷 尚三 (副査) 教授 八木 俊雄 助教授 村山 洋二 助教授 雫石 聰

論文内容の要旨

種々の免疫調節物質が，生体防禦の要めとなる単球—マクロファージ（Mφ）系をin vitroならびにin vivoで刺激するとの知見が集積している。

著者は，1．免疫調節（免疫薬理活性）物質として広く知られている細菌細胞壁ないしペプチドグリカン（PG），PGの酵素による溶解産物，さらにPG構築単位の一部を模して合成したムラミルペプチド，ならびに 2．グラム陰性菌の内毒素性リポ多糖体（LPS），LPSの生物学的活性の発現に当たって中心的な役割を担うリピドAを供試し，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，調べた。

供試した細胞壁は，12菌種のグラム陽性菌から常法に従って調製した。またペプチドグリカンは，4菌種の細胞壁をトリクロル酢酸あるいはホルムアミド処理して非PG部分を除去することにより，分離した。さらに，*S. epidermidis*のPGをSALEエンドペプチダーゼで溶解して得たPG構築単位の“ポリマー”（SEPS），およびSEPSをM-1エンド-*N*-アセチルムラミダーゼで分解して得た“モノマー”（SEPS-M）を供試した（これらの標品の調製には大日本製薬・総合研の横川博士・河田氏の協力を得た）。合成標品は，本学理学部・化学科芝哲夫教授の研究室で合成されたMurNAc-L-Ala-D-isoGln（MDP）とそのアナログ，ならびにMDPの6-*O*-アシル誘導体を使用した。一方，LPSおよびリピドA標品は，昭和大学薬学部・河西信彦教授により調製されたもの，ならび市販の製品を用いた。

単球遊走刺激作用の検定には，健康成人より採取したヘパリン加末梢血から，Ficoll-Paque比重遠心法により単球に富む細胞画分を分離して用いた。テスト物質はいずれも，2％ウシ血清アルブミ

ンおよび20mM HEPESを含むGey's均衡塩類溶液の7容とゼラチン加ヴェロナール緩衝液の5容とを混合した培養液に溶解ないし浮遊させた。陽性対照とした標準走化性因子には，*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）およびLPS処理により活性化したヒト血清（補体の活性化により生じた走化性因子を含む）を用いた。細胞培養には，48穴走化チェンバー（Neuro Probe, Cabin John, Md., USA）を用い，特に断わらない限り，チェンバーの上室に細胞浮遊液（5×10^6個/mℓ）の50μℓを，下室にテストないし，標準標品の所定濃度の溶液ないし浮遊液の25μℓを容れ，5％CO_2—95％空気中で37℃，90分間培養した。判定は，メンブランフィルターを固定，染色，乾燥後，下室に接するフィルター面を光学顕微鏡により油浸，検鏡し，一視野当たりの平均遊走単球数をテストならびに対照培養とについて算出，比較した。各標品毎に3通りの培養を行ない，平均値と標準誤差（S.E.）を求めた。チェッカーボード分析は，ZigmondとHirschの記載を参考にして実施した。

供試12菌種の細菌細胞壁は，*M. lysodeikticus* のそれを除き，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。4菌種の細胞壁より分離したPGは明確な単球の遊走活性を示したが，刺激の程度は対応する細胞壁のそれに比べると弱かった。*S. epidermidis* PGを酵素処理して得た水溶性のPG構築単位の“ポリマー”，SEPSおよび“モノマー”，SEPS-Mは，いずれも単球の遊走をたかめる明確な作用を示した。合成標品では，MDPが単球の遊走をたかめる明確な活性を示したが，MDPのD-isoGln残基をL-isoGln，D-isoAsn，D-Glnなどにかえた5種類のアナログは不活性であり，MDPの単球遊走刺激作用がきびしい化学構造依存性を有することが示された。一方MDPの6-*O*-アシル誘導体である6-*O*-オクタデカノイル-MDP，6-*O*-(2-テトラデシルヘキサデカノイル)-MDPおよび6-*O*-(3-ハイドロキシ-2-ドコシルヘキサコサノイル)-MDP（L-Ser）は，他の免疫薬理活性とは異なり，MDPより弱い刺激作用しか示さなかった。チェッカーボード分析により，*S. epidermidis* ならびにMDPの単球遊走刺激作用が当該物質の濃度勾配に方向づけられた走化活性を主とするものであることが強く示唆された。

供試した*S. enteritidis*, *E. coli* および *P. aeruginosa* 由来のLPSには，単球遊走を直接的にたかめる作用は認められなかった。しかし，*S. minnesota* および *P. aeruginosa* のLPSから酢酸分解法により調製したリピドA標品には明確な刺激作用が認められ，チェッカーボード分析の結果，リピドAの活性がランダム運動の亢進を主とするものであることが明らかとなった。

以上，この研究により，細菌細胞表層の重要な構築成分である細胞壁ペプチドグリカンならびにLPSのリピドA部分が，補体系の活性化の助けを借りることなく，直接的に単球—Mφ系細胞をその反応部位へ集積させる作用を有することが明らかにされた。

論文の審査結果の要旨

小川知彦君の研究は，細菌細胞壁ペプチドグリカン（PG）および内毒素性リポ多糖（LPS）のリ

ピドA部分，ならびにＰＧに関連する合成物質のヒト末梢血単球に対する遊走刺激作用を，メンブランフィルター法により，検討したものである。

この研究の結果，１）種々のグラム陽性菌の細胞壁およびペプチドグリカン，その酵素による溶解産物，さらにＰＧの要めの部分を模して合成した*N*-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン（MDP）が単球の遊走をたかめる作用を示し，MDPの種々の構造類似体はこの作用を欠くこと，２）グラム陰性菌のLPSには単球遊走刺激作用は認められないが，LPSの免疫薬理作用の大部分を担うことが知られているリピドA部分は単球の遊走をたかめる活性を示すこと，さらに３）チェッカーボード分析により，MDPの単球遊走刺激作用は化学走性によるものであり，一方，リピドAのそれはケモカイネーシスを主とするものであること，などの新しい知見が得られた。

以上のように小川君の研究は，細菌細胞表層関連物質が生体防禦の第一線を担う単球―マクロファージ系細胞に対して，これ迄に記載のなかった刺激作用を呈することを，世界の研究者に先駆けて，明らかにしたものであり，歯学博士の学位請求に十分値する優れた業績と認める。