The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	内毒素に類似する生物活性を示すMycobacteriaceae由来の免疫調節物質に関する研究
Author(s)	藤田, 孝子
Citation	大阪大学, 1988, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35746
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、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

【9】

氏名・(本籍)	藤田孝子（ふじた たかこ）
学位の種類	薬学博士
学位記番号	第 7986 号
学位授与の日付	昭和63年2月19日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	**内毒素に類似する生物活性を示すMycobacteriaceae由来の免疫調節物質に関する研究**
論文審査委員	(主査) 教授 近藤 雅臣 (副査) 教授 岩田平太郎　教授 三浦 喜温　教授 内田 驍

論文内容の要旨

1952年Westphalらは，グラム陰性腸内細菌をフェノール／水（1：1，v／v）混液により加温処理することにより，内毒素活性ならびに0抗原性を示すリポ多糖（lupopolysacchavide，LPS）を比較的選択的に，しかも再現性良く，抽出しうることを示した。以来，この方法は，LPSの標準的な調製法として汎用されている。

このようにグラム陰性菌の細胞表層成分である内毒素の抽出法として考案されたWestphal法は，1970年代前半には，種々のグラム陽性菌に適用され（ただし抽出温度は一般室温），その結果，例えばStaphylococcus Spp.，Streptococcus Spp.，Bacillus Spp.，やLactobacillus Spp.，などのグラム陽性菌から，この抽出法によってポリグリセロリン酸の骨格構造に糖脂質が結合した両親媒性物質・リポタイコ酸（LTA）が得られること，そのあるものは，例えばStreptococcus pyogenesのLTAに代表されるように，LPSに一部類似する生物学的作用（免疫薬理作用）を示すことが明らかにされた。

しかし，結核菌に代表されるMycobacteriaceae科に属する菌種については，フェノール／水混液処理法を適用した研究はこれまでのところ皆無である。抗酸性の強い菌属，例えばMycobacteriumやGordonaでは，グラム染色法が本来の手順では実施できないという意味で，そのグラム染色性は不明であるとの観方も成り立つ。

そこで，まず第1章ではMycobacteriaceaeに属する4菌種Mycobacterinm tuberclasis，Nocordia rufra，Gordona aurantiuacaおよびRhodococus terraeを選びこれらの全菌体あるいは細胞エンベロープ画分にフェノール／水混液抽出法を適用した。すなわち，菌体を95%フェノールと水との等容混合液に懸濁させて室温で抽出し，水に対して透析後，凍結乾燥してフェノール／水，水相画分（Pho H／

H_2O，H_2O fraction）を得た。

得られた画分は，いずれもアンノースおよびアラビノースを主とする多糖を主成分とし，パルミチン酸，ステアリン酸，ツベクロステアリン酸を主とする脂肪酸と少量のアミノ酸およびアミノ糖を含んでいた。しかもこれらの画分には，ＬＰＳやＬＴＡさらにペプチドグリカン，トレハロースダイマイコレートおよびＤＮＡなどの免疫薬理学的細菌細胞表層成分は含まれていなかった。

しかし，これらの画分，特にG.aurantiaca，R.terrae由来のものは，強いLimulus活性，発熱原性ガラクトサミン負荷マウスに対する致死毒性などの内毒素活性を示した。またこれらの画分は，マウスの脾リンパ球刺激作用，マウスおよびモルモットの腹腔マクロファージの刺激作用を示した。さらに，マウスおよびモルモットのそれぞれウジ血清アルブミンおよび卵白アルブミンに対する抗体産生を高め，また後者では，遅延型，過敏症を誘導する免疫強化作用を示した。また，それぞれＢＣＧ生菌あるいはPropionibactarium acnes死菌注射によりprimeしたマウスに投与するとにより，腫瘍壊死因子（tumor necrosis facton，ＴＮＦ）およびインターフェロン$\alpha+\beta$（ＩＦＮ－$\alpha+\beta$）を誘導する作用を発揮した。

第二章では，まずMycobacterium bours ＢＣＧ菌体を前章で記したようにフェノール／水混液で抽出して得た水相画分をセファロース６Ｂおよび４Ｂカラムを用い，Limulus活性およびＴＮＦ誘導能を指標として分画し，粗画分中の活性因子の大部分が濃縮された部分精製標品，４Ｂ^{2}Fr.２（粗水相画分よりの収率は26%）を得た。

この４Ｂ^{2}Fr.２は，化学分析の結果，マンノース，アラビノース，グルコースおよびガラクトースより成る多糖（約90%）に，パルミチン酸，ツベクロステアリン酸を主とする脂肪酸（約10%）と少量ずつのアミノ酸およびアミノ糖を含むことが示された。細菌細胞由来の既知の免疫調節物質（既述）の混在しない存在は検出限界以下，あるいは痕跡程度であった。

ついで，４Ｂ^{2}Fr.２はLimulus活性は粗水相画分の４倍に上昇し，ＴＮＦ誘導活性については，４Ｂ^{2}Fr.２の1.5μｇが粗画分の25μｇに相当する活性を示し，約16倍の重量当りの比活性の上昇が認められた。その他の内毒素活性として，４Ｂ^{2}Fr.２は発熱原性およびガラクトサシン負荷マウスに対する致死毒性を示した。しかし調べた限りの用量では，ウサギにShwartqman反応を準備する作用を示さなかった。

さらに，４Ｂ^{2}Fr.２は，マウス脾リンパ球，ならびにモルモット腹腔マクロファージを様々に刺激する作用，ウシ血清アルブミンに対するマウスの抗体産生を高めるアジュバンド作用，P.acnes加熱死菌でprimeしたマウスに投与した際にＩＦＮ－$\alpha+\beta$およびγを誘導する作用ならびにヒト血清中の補体カスケードを活性化する作用を示した。

第三章では，Meth Ａファイブロサルコーマを定着，生育させたＢＡＬＢ／Ｃマウスに，４Ｂ^{2}Fr.２の0.75mgずつを５日間連続静脈内投与したところ，0.025mgのＬＰＳ参考標品を投与した際にみられるのと同様に，腫瘍を出血，壊死，退縮される抗腫瘍効果が認めれた。テスト標品投与開始18日目には，５匹中４匹のマウスで腫瘍は完治した。

さらにこの章では，サルコーマ180を接種したＩＣＲマウスに，接種翌日から４Ｂ^{2}Fr.２の0.1mgずつ

を１日置きに10回静脈内投与することにより，参考標品としたＬＰＳ（用量25μｇ）の投与と同様，著明な腫瘍成育抑制作用が認められることを示した。

論文の審査結果の要旨

Mycobacteriaceaeを代表する４菌種から３内毒素生リポ多糖を分離し，細菌細胞由来の既知のものと異なる免疫調節物質であることを明らかにした。この構成成分を分析し，その成分からも新しい免疫調節物質であることを確認し，このものが従来のものと同程度の免疫薬理活性を示し，また，マウスに静脈内投与することにより明確な腫瘍退縮小互いは腫瘍成育抑制作用を示すことを認めた。これらの研究成果は薬学博士を授与するに値するものと判定した。