



Title	リピドAによるマウス致死活性の作用機構とその応用
Author(s)	朝井, 康行
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3155302
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	朝 井 康 行
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 5 4 8 号
学位授与年月日	平成 11 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 歯学研究科歯学臨床系専攻
学 位 論 文 名	「リピド A によるマウス致死活性の作用機構とその応用」
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 作田 正義
	(副査) 教 授 伊集院直邦 講 師 前田 定秋 講 師 島内 英俊

論 文 内 容 の 要 旨

グラム陰性菌の外膜に存在するリボ多糖体 (LPS) は、宿主に対して致死活性、発熱性、血管内血液凝固、肝障害などの内毒素作用を惹起する。これらの内毒素作用を示す LPS の活性中心の本体は、主としてリピド A であることが知られている。歯周病原性細菌として注目される *Porphyromonas gingivalis* LPS より分離したリピド A は、大腸菌型リピド A とは異なり低毒性でかつ種々の免疫生物学的作用を発揮することが報告されている。本研究は、これら内毒素活性の異なるリピド A を用いて刺激したガラクトサミン負荷 C57BL/6 マウスおよび同マウス由来のマクロファージからの炎症性サイトカインの產生誘導やその作用機構の一端を明らかにするとともに、マウス致死活性に対する抑制について検討した。

本研究において供試した *P.gingivalis* リピド A および大腸菌型合成リピド A (化合物506) は、朝日大学歯学部口腔細菌学講座の小川知彦博士より恵与された。また、実験動物として雄性 C57BL/6 マウスを用いた。致死活性は、ガラクトサミンを腹腔内投与したマウスにリピド A を尾静脈に投与し、マウスの生死を観察した。その結果、*P.gingivalis* リピド A は、化合物506と比べてガラクトサミン負荷マウスに対する致死活性は、50% 致死量に換算して約1600分の 1 と非常に弱かった。

P.gingivalis リピド A の低毒性の一端を明らかにする目的で、ガラクトサミン負荷マウスの肺胞、腹腔、脾臓および肝臓よりマクロファージを各々調整し、所定量のリピド A とともに培養後、その上清中の炎症性サイトカイン量を ELISA 法により測定した。これらマクロファージのなかで、肺胞や腹腔マクロファージから著明なサイトカイン产生の誘導がみられた。なかでも肺胞マクロファージからの IL-1 α および IL-1 β 产生は、化合物506刺激により特に著明に増加したが、*P.gingivalis* リピド A のそれは弱かった。そこで種々のプロテインキナーゼ阻害剤を用いて、リピド A 刺激肺胞マクロファージからの炎症性サイトカインの产生について検討し、また、サイトカイン mRNA の発現について RT-PCR 法により調べた。その結果、*P.gingivalis* リピド A あるいは化合物506刺激による IL-6 および TNF- α 产生誘導は、protein kinase C (PKC) および cyclic AMP/GMP-dependent protein kinase 阻害剤により用量依存的に抑制された。また、化合物506刺激による IL-1 α 产生誘導は、PKC 阻害剤により促進効果がみられた。さらに、*P.gingivalis* リピド A 刺激による IL-1 β 产生誘導は、化合物506 とは異なりカルモデュリン (CaM) 阻害剤により特異的に抑制されるという興味ある所見を得た。これらサイトカイン产生の抑制と同様の結果が、mRNA レベルにおいてもみられた。

マウス血中のエンドトキシン濃度をリムルス試薬を用いて、また、同炎症性サイトカイン量をELISA法により各々測定した。ガラクトサミン負荷マウスの血中エンドトキシン濃度は、化合物506投与直後に著明な上昇がみられたが、30分後にはほとんど検出されなかった。同マウスの血中炎症性サイトカインの経時的变化については、TNF- α およびIL-6は化合物506投与後60分でプラトーに達し、その後漸次減少した。また、IL-1 α は180分後より増加傾向を示し、IL-1 β は致死直前に急激な増加がみられた。

ガラクトサミン負荷C57BL/6マウスに化合物506を投与した場合、その血中IL-1 β 産生の増加と致死活性の結果はよく一致していた。また、低毒性*P.gingivalis*リピドA刺激によるマウス肺胞マクロファージからのIL-1 β の低産生性には、細胞内CaMの活性が関与しているとの所見を得た。これらの結果を踏まえ、CaM kinase activatorであるイオノホアA23187を化合物506刺激したマウスに投与したところ、血中IL-1 β の産生が抑制され、その致死活性も阻止するとの所見を得た。また、ハムスター抗マウスIL-1 β 抗体を用いて検討した場合にも致死活性の抑制がみられた。

以上の結果から、グラム陰性菌による敗血症性致死活性には、IL-1 β が重要な役割を演じていると考えられる。また、感染宿主の細胞内情報伝達系を調節することにより、致死活性を回避できることが示唆された。これらの所見が、エンドトキシンショックを含めた敗血症の新しい予防や治療法の開発につながることが期待される。

論文審査の結果の要旨

本研究は生物学的活性の異なる*Porphyromonas gingivalis*リピドAと大腸菌型リピドA（化合物506）を用いて、マクロファージからの炎症性サイトカインの産生誘導やその作用機構を検討することにより、マウス致死活性に対するリピドAの役割を解明しようとしたものである。

その結果、化合物506に比し、*P.gingivalis*リピドAの致死活性は低毒性であり、さらに化合物506による致死活性は血中IL-1 β 産生增加と相關していた。*P.gingivalis*リピドAは化合物506に比し、肺胞マクロファージからのIL-1 α およびIL-1 β 産生誘導が弱く、また両リピドAによるIL-6およびTNF- α 産生誘導は、PKCおよびcyclic AMP/GMP-dependent protein kinase阻害剤により抑制された。さらに、*P.gingivalis*リピドA刺激によるIL-1 β 産生誘導は、化合物506と異なり、カルモデュリン阻害剤により特異的に抑制された。これらの結果から、グラム陰性菌による敗血症性致死活性にはIL-1 β が重要な役割を担っていることが推測された。

以上の結果は敗血症の新しい予防や治療法の開発につながることが期待されるものであり、博士（歯学）の学位に値するものであると認める。