

氏名 简 井 摄

学位の種類 歯学博士

学位授与番号 博甲第917号

学位授与の日付 平成3年3月28日

学位授与の要件 歯学研究科歯学専攻

(学位規則第5条第1項該当)

学位論文題目 Streptococcus faecalis (Enterococcus hirae) ATCC 9790

(リポタイコ酸の化学構造と免疫・生物学的活性に関する研究)

論文審査委員 教授 松村智弘 教授 加藤慶二郎 教授 古田裕昭

学位論文内容の要旨

【緒言】

細菌細胞表層に存在し、その分子内に親水基と疎水基の両基をもつ両親媒性物質の中で、グラム陰性菌のリポ多糖体（LPS）とグラム陽性菌のリポタイコ酸（LTA）が最も多くの研究対象とされてきた。LPSは多糖（親水基）とリピドA（疎水基）とからなり、一方LTAはグリセロールリン酸が α （1, 3）結合した重合体であるポリグリセロリン酸（PGP：親水基）とグリコリピド部分（疎水基）の結合したものである。LPSは古くから多糖抗原およびエンドトキシンとして免疫化学的および免疫薬理学的研究の対象とされてきた。一方、LTAは1970年に発見されたが、LTAとLPSが種々の免疫・生物学的作用の多くを共有することが明らかにされつつある。しかしLTAの分子構造と腫瘍壊死因子（TNF）誘導作用等の免疫・生物学的作用との相関についての知見は乏しい。

本研究においてS. faecalis (E. hirae) ATCC9790株から抽出、精製したLTAが強いTNF誘導作用を示すことが明らかになったので、LTAの分子構造と免疫・生物学的作用との相関を調べた。

【材料と方法】

- 使用菌株：S. faecalis (E. hirae) ATCC9790を使用した。
- LTA抽出及び精製：Fischerらの方法に従い脱脂した全菌体を、温フェノールー水（1:1）で処理してLTAを抽出した。スクレアーゼ処理、Sephadex G-25によるゲル濾過およびOctyl-Sephadex CL-4Bでの疎水クロマトにより分画、精製した。
- LTAの化学処理：精製LTAをそれぞれ濃NH₄OH、1N HClおよびトリス緩衝液（pH=8.0）中で処理した。
- 化学組成：リン、グリセロール、ヘキソースは常法に従い比色定量し、脂肪酸及びア

ミノ酸分析は、それぞれガスクロマトグラフィー及び高速液体クロマトグラフィーによって行った。

5. 免疫生物学的活性：

- (1) TNF誘導活性は、P. acnes で前感作した ICR マウスに被検試料を投与したとき、血清中に誘導される L-929細胞に対する障害活性として測定した。
- (2) インターロイキン 1 (IL-1) 誘導活性は、Vacheron らの方法に従い、C3H/HeJ マウス胸腺細胞の分裂促進能を PHA 存在下、³H-[TdR]の取り込みを指標として測定した。
- (3) インターフェロン (IFN) 誘導活性は、岡村らの方法に従い、P. acnes で前感作した ICR マウスに被検試料を投与したとき、血清中に誘導される VSウイルスによっておこる L 細胞の細胞変性を阻止する活性として測定した。
- (4) ヒト末梢血の多形核白血球 (PMN) に対する chemiluminescence (CL) 活性測定は、Ginsburg らの方法に従い、ヒト末梢血 PMN 浮遊液に被検試料を加えて反応させ、さらにルミノールを加えて混和後直ちに CL を測定した。
- (5) in vivo における Meth-A fibrosarcoma に対する抗腫瘍効果の判定は、BALB/c マウスの皮内に Meth-A 細胞を植え付け、腫瘍の直径が 7 - 8 mm に達したときに muramyl dipeptide (DMP) で前感作したのち被検試料を静脈内に投与し、以後腫瘍の大きさを計測しておこなった。

【結 果】

1. S. faecalis LTA をゲル濾過後疎水クロマトによって分画すると脂肪酸含量の異なる 2 つの LTA (LTA-1, LTA-2) が得られた。化学分析の結果、グリセロールとリンの構成比率はともにほぼ 1 : 1 であり LTA-1, LTA-2 はそれぞれ 2 つのアシル基および 4 つのアシル基をもつ LTA であることが明らかになった。
2. LTA-1, LTA-2 はともに TNF, IL-1 および IFN を誘導する活性を示したが、LTA-2 の方がいずれの誘導活性も強かった。
3. LTA-2 について化学処理を行なうとアルカリ処理によって脂肪酸とアラニンが遊離し、弱アルカリ処理によってアラニンが遊離した。また酸処理によってグリセロリン酸の結合部位が切断されてグリコリピドとなった。TNF, IL-1 について調べると、グリコリピドは未処理 LTA よりも強い誘導性が認められ、弱アルカリ処理 LTA は未処理 LTA よりやや弱く、アルカリ処理 LTA では誘導活性は消失した。IFN に関しては、グリコリピドでも誘導活性は保持されていたが、アルカリ処理 LTA には認められなかつた。以上の成績は LTA のグリコリピドが TNF, IL-1, IFN 誘導活性を示す最小構造単位であることを示した。
4. CL 活性測定の結果、LTA が PMN を活性化するには LTA 全分子と抗 LTA 抗体の存在が必須の条件であることが分かり、LTA の生体防御機構の活性化の一側面を示した。
5. in vivo における LTA の抗腫瘍効果を調べると、MDP 前感作後 LTA-1, LTA-2 お

よびグリコリピド投与群のマウスでは腫瘍の壊死が見られ、腫瘍の増大の抑制もしくは完全退縮を認めた。しかし MDP 前感作後アルカリ処理 LTA 投与群あるいは LTA-1, LTA-2, グリコリピドおよび MDP 単独投与群では抗腫瘍効果は全く認められなかつた。このように *in vivo* における抗腫瘍効果においてもグリコリピドが重要であることが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

本研究は、*Streptococcus faecalis* (*Enterococcus hirae*) ATCC9790株の全菌体からリポタイコ酸 (LTA) を抽出・分画・精製し、LTA の化学構造と腫瘍壊死因子 (TNF) 誘導作用等の免疫・生物学的作用との相関を調べたものである。

S. faecalis LTA が TNF, インターロイキン 1 (IL-1), インターフェロン (IFN) 誘導活性を有することならびに LTA の化学的処理によって構造を変化させたときの各構造群の免疫・生物学的活性を比較検討したものであり、その結果 LTA のグリコリピド部分が TNF, IL-1, IFN 誘導活性を示す最小構造単位であることを示した。また、*in vivo* においても MDP 前感作後において LTA は抗腫瘍効果を発揮することを明らかにし、同効果においてもグリコリピド部分が重要であることを示した。以上本研究の結果は、LTA の化学構造と免疫・生物学的作用との相関を明らかにした点で価値ある研究である。