

氏名	むら やま たか こ 村 山 尚 子
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	論 医 博 第 1599 号
学位授与の日付	平 成 9 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Suppressive effects of <i>Aspergillus fumigatus</i> culture filtrates on human alveolar macrophages and polymorphonuclear leukocytes (<i>Aspergillus fumigatus</i> 培養濾液のヒト肺胞マクロファージと多核白血球に対する抑制効果)
論文調査委員	(主 査) 教 授 古 庄 卷 史 教 授 西 淵 光 昭 教 授 久 世 文 幸

論 文 内 容 の 要 旨

(目的) *Aspergillus fumigatus* の培養濾液 (ACF) が侵入門戸である気道の線毛上皮に対して強い傷害作用を発現し、その主要な原因物質の一つは同菌種の産生する gliotoxin であることが明らかになっている。また侵入した *Aspergillus* 属に対するヒトの感染防御機構については、分生子に対しては肺胞マクロファージの発芽抑制が、発芽した分生子や生育した菌糸に対しては、活性酸素生成系を介した好中球の殺菌機構が重要な役割を担っていることが示唆されている。本研究は肺感染防御におけるヒト貪食球の機能に及ぼす ACF の影響を観察し、加えて gliotoxin とともに ACF 各分画の作用について比較検討を行ったものである。

(方法) ポテト・デキストロース寒天培地で発育した *A. fumigatus* から分生子を採取し、その 2×10^7 個を 300ml の Medium-199 (M-199) に接種し、 37°C 5 日間培養し ACF を得た。ヒト肺胞マクロファージ (AM) は気管支肺胞洗浄により、ヒト多核白血球 (PMN) はヘパリン加静脈血からデキストラン及びフィコール比重遠沈により採取した。AM の分生子と蛍光ラテックスビーズに対する貪食能はそれぞれ fluorescence quenching 法とフローサイトメーターで測定した。PMN の遊走能は formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine を用いてアガロース法で、同細胞の O_2 -放出量は phorbol myristate acetate で刺激して cytochrome C 還元法で測定した。ACF の蛋白濃度は Lowry 法で、プロテアーゼ活性は azocoll を基質とし 520nm での吸光度変化によって測定した。また貪食球の viability はいずれも 90% 以上であることを確認した。

(結果) 分生子を貪食した AM の比率ならびに貪食された分生子数は、ACF 非添加 M-199 培養下でそれぞれ 52%, $126/10^2$ AM であったのに対し、30% ACF 添加培養下ではそれぞれ 24%, $42/10^2$ AM と、ACF 添加による有意の抑制がみられた。ACF 添加による蛍光ラテックスビーズ貪食の抑制も有意であった。PMN の遊走能も ACF 3% 添加から抑制効果が発現し、添加 ACF の増量に伴って濃度依存性に抑制効果の増強がみられた。ACF の分画別の比較では、分子量 10kDa 以下、10kDa 以上の両分画に遊走能

抑制活性がみられたが、前者でより強い抑制がみられた。また、ACF をトリブシンやプロテアーゼ阻害剤である chicken ovomacroglobulin で前処理すると、ACF の遊走能阻害作用は未処理の ACF に比較してそれぞれ56%、29.5%減弱した。ACF 自体のプロテアーゼ活性は1U/mlであった。PMN の O_2^- 放出量は、ACF 非添加 M-199 前処理では53.8nmol/10⁶AMであったが、12.5%と50% ACF 添加ではそれぞれ41.6nmol/10⁶AM、14.5nmol/10⁶AMと、ACF 濃度依存性に低下した。ACF 自体には O_2^- 放出刺激効果は認められなかった。通常分子量10kDa以下の分画に含まれる *A. fumigatus* 産生 gliotoxin (分子量326) 自体の添加によっても、PMN の遊走能や O_2^- 放出量には有意の抑制がみられた。

(考察) 本研究ではアスペルギルス培養濾液がヒト貪食球の諸機能に対し抑制的に働くこと、この作用には ACF に含まれる複数の因子が関与することを明らかにした。また、アスペルギルス産生物質である単離 gliotoxin のヒト貪食球機能抑制効果も明らかにした。肺胞マクロファージや好中球は、肺へのアスペルギルス侵入に対して中心的な感染防御の役割を果たすと考えられるが、その感染の成立と周囲肺組織への侵襲には、アスペルギルスが産生する貪食球機能抑制物質が関与していることが強く示唆された。

論文審査の結果の要旨

Aspergillus fumigatus (Af) に対する感染防御には、肺胞マクロファージ (AM) の分生子に対する発芽抑制、また、発芽分生子と生育菌糸に対しては好中球 (PMN) の殺菌機構が重要な役割を担っていることが指摘されている。本研究は、患者分離の Af (YN 株) の培養濾液 (ACF) と Af の産生する gliotoxin が、これらヒト貪食球の機能に及ぼす影響を検討したものである。

寒天培地上で発育菌から分生子を、また、YN 株の Medium-199 (M-199) を用いた培養液から ACF を採取し、ヒト AM と PMN はそれぞれ気管支肺胞洗浄液、ヘパリン加静脈血から分離したものをを用いた。以下が研究結果の要約である。

(1) Fluorescence quenching 法で測定した AM の分生子貪食能は、ACF 添加 M-199 での培養下では、貪食した AM の比率、貪食された分生子数が、それぞれ52%と平均126個/100AMであったが、30% ACF 添加で、24%、42個と有意に抑制された。蛍光ラテックスビーズの貪食能も ACF 添加で有意に抑制された。(2) FMLP に対するアガロース法での PMN 遊走能は、ACF 添加により濃度依存性に抑制がみられ、ACF の分画別では10kDa以下でより強い抑制活性がみられた。さらに、10kDa以下の分画に含まれると考えられる精製 gliotoxin 自体の添加でも同様な現象が観察された。また、cytochrome C 還元法で測定した PMA 刺激による PMN の O_2^- 放出量も、ACF ならびに gliotoxin の添加で濃度依存性に有意な減少がみられた。

以上の研究は、Af がヒト体内での増殖に際して産生する物質が AM と PMN の機能を抑制する可能性を強く示唆するもので、難治の Af 感染症の病態解明に貢献し、今後の治療改善に寄与し得るところが多い。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成9年2月5日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。