

氏名 中川 ゆかり
 学位の種類 博士 (薬学)
 学位記番号 論薬博第 692 号
 学位授与の日付 平成 15 年 5 月 23 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 細菌および真菌細胞壁構成成分の生物学的活性および in vitro 検出系に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 市川 厚 教授 川 寄 敏 祐 教授 河 合 明 彦

論 文 内 容 の 要 旨

細菌や真菌の細胞壁を構成する種々の菌体成分は、各々の菌体の構造を特徴づけると共に病原性を担う因子でもあると考えられる。これらの中で、微量で強力かつ多彩な生物活性を示すグラム陰性菌エンドトキシンについては多くの研究があるが、それ以外の菌体成分に関する研究は少なく、それらの生物活性については不明な部分が多い。ところが近年、グラム陽性菌敗血症の増加やエイズ患者の真菌症発症が社会的な問題となり、これらの原因菌の菌体成分およびその活性発現機構の解明が強く望まれている。この背景をもとに、著者は、先ずグラム陽性菌および真菌それぞれの主要な菌体成分であるペプチドグリカンおよび β グルカンの生物活性について検討し、これらにヒトT細胞機能を抑制する作用があることを初めて明らかにした。一方、医薬品の安全性確保の観点から、このような免疫担当細胞機能への障害作用を有する菌体成分の汚染は漏れなく検知する必要がある。そこで次に、そのような各種菌体成分を広く検出できる in vitro 検出系を構築した。更に、構築した検出系を用いて、天然素材を使用した医療用具について、菌体成分による汚染の実態を調べた。

第 1 章 単球およびT細胞サイトカイン産生に及ぼすグラム陽性菌ペプチドグリカンおよび真菌 β グルカンの影響

ペプチドグリカン (peptidoglycan, PGN; *Staphylococcus aureus*より抽出精製) はエンドトキシンより3オーダー高い用量でエンドトキシンとほぼ同等のウサギ発熱活性およびヒト末梢血単球に対する炎症性(発熱性)サイトカイン(IL-1, IL-6およびTNF- α)産生誘導活性を示した。更にPGNは、ヒト末梢血細胞培養系において、細胞性免疫に中心的な役割を演じるIL-2の産生を強く抑制した。この作用機序を解析した結果、①PGNはIL-2を産生するT細胞には直接作用せず、先ず単球に作用すること、②PGNで刺激された単球は直接接触によってT細胞を刺激すること、③単球によって刺激されたT細胞は液性の抑制因子を産生し、その因子がT細胞に作用してIL-2の産生を抑制すること、が明らかとなった。このT細胞由来の抑制因子は、検討した限りにおいて既知の因子と合致せず、新規の因子である可能性が示唆された。一方、 β グルカン(β -(1, 3)-D-glucan, β G; *Candida albicans*より抽出精製)はウサギに有意な発熱は惹起しなかったが、ヒト単球に対して弱い炎症性サイトカイン産生誘導活性を示した。また単球存在下においてT細胞のIL-2産生を抑制した。以上より、PGNおよび β Gは単球機能に直接影響を及ぼすだけでなく、単球を介してT細胞の機能にも影響を及ぼし、生体の防御機構を障害することによって各々の菌による感染症の発症に関与する可能性が示唆された。

第 2 章 細菌および真菌細胞壁構成成分のインビトロ検出系の構築

近年、種々の菌体成分は、自然免疫担当細胞上に発現するtoll-like receptor (TLR) familyのそれぞれに特異的に認識されることが明らかになった。また菌体成分の多くは発熱活性を示すが、これは単球上の各種TLRを介して炎症性サイトカインの産生が誘導されることと関連する。従来、各種の菌体成分の医薬品汚染はこの発熱活性を指標に局方発熱性物質試験法で検知されてきたと考えられる。しかし、そのin vitro代替法として現在広く普及している局方エンドトキシン試験法ではエンドトキシン以外の菌体成分は検知できない。そこで、著者は、発熱活性、すなわちヒト単球系細胞に対する炎症性サイトカインの産生誘導を指標とすることにより、免疫担当細胞に作用し得る菌体成分を広く検出できる in vitro 検出系を構

築した。まず既存のヒト単球系細胞株mono-mac 6からエンドトキシンやPGNに高感度に応答する細胞クローン (MM 6-CA 8) を単離し、指標細胞とした。更に、この細胞の各種菌体成分に対する応答性を検討し、培養ヒト末梢血の応答性と高い相関を示すことを確認した。測定指標とする炎症性サイトカインとしては、各種の菌体成分に最も鋭敏に応答し、かつ最も多量に産生されるIL-6が最適と判断された。本検出系を用いて、天然素材 (コラーゲン、アルギン酸塩、ラテックスゴム等) を使用した創傷被覆材等 (22検体) の抽出液について菌体成分汚染を調べた結果、9検体にIL-6産生誘導活性が検出され、有意な汚染のあることが示唆された。事実、これらの抽出液をウサギに投与すると発熱が惹起され、抽出液中からはリムルス試薬等によりエンドトキシン、PGNおよび β Gが検出された。ただし、これらの抽出液のIL-6産生誘導活性および発熱活性は、エンドトキシンアンタゴニストの添加によりほぼ完全に消失した。以上の成績は、開発した試験系の有用性を実証すると同時に、創傷被覆材等の品質規格を見直す必要があることを示唆している。検出された汚染発熱物質の実体はエンドトキシンと推定されるが、PGNや β Gも同時に検出されたことから、厳密な安全性の評価には、これらを漏れなく、またそれらの活性を総和として検知することが必要と考えられる。

以上の知見は、PGNおよび β Gはグラム陽性菌および真菌それぞれの病原性および生物活性を担う菌体成分であることを示唆すると共に、それぞれの菌による感染症の発症機構や病態の解明に寄与するものと考えられる。これらはエンドトキシンに偏重してきた菌体成分に関する研究に新たな方向性を示すのみならず、医薬品の安全性を確保する上で、エンドトキシン以外の菌体成分を検出することの重要性を改めて指摘するものである。これら各種の菌体成分による汚染が懸念されるものとして、天然医用材料の他に、生体材料を使用した生物製剤や、細菌や酵母が作り出す医薬品などが考えられる。本研究において開発した検出系は、これらの医薬品や医療用具、更には今後新たに開発されるバイオ医薬品の安全性確保に寄与するものと期待される。

論文審査の結果の要旨

細菌や真菌の細胞壁成分は病原性因子としてよく知られている。グラム陰性菌エンドトキシンについては多くの研究があり、安全性の観点からも局方に試験法の記載がある。しかし、それ以外の菌体成分に関する研究は少なく、それらの生物活性については不明な部分が多い。近年、グラム陽性菌敗血症の増加やエイズ患者の真菌症発症が大きな社会問題となっており、その解明が切望されている。このような状況をふまえ、著者は、グラム陽性菌および真菌それぞれの主要な菌体成分であるペプチドグリカン (PGN) と β グルカン (β G) の生物活性の発現機構を解明すること、また、その成果に基づいてエンドトキシン以外の菌体成分を検出する方法を考案することを目的として研究を行い、以下の成果を得た。

著者は、まずPGNの生物活性を検討し、PGNはエンドトキシンのそれらに比べて弱いながらもウサギ発熱活性および β Gに対する炎症性サイトカイン (IL-1, IL-6およびTNF- α) 産生誘導活性を有していることを見出した。次いで、ヒト末梢血細胞培養系の実験から、PGNは細胞性免疫に関わるIL-2産生を強く抑制することを見出した。この抑制機構を検討したところ、PGNがまず単球を活性化し、単球は細胞間接触を介してT細胞を活性化し、未同定のIL-2産生抑制因子の産生と分泌を促した結果、抑制因子がオータコイドとして働き、他のT細胞におけるIL-2産生を抑制することを明らかにした。著者はまた、 β GはPGNと同様に、ヒト単球からの炎症性サイトカイン産生誘導活性とヒトT細胞におけるIL-2産生を抑制する活性のあることを明らかにした。これらの研究成果はPGNと β Gの生体作用を単球とT細胞間の相互作用において初めて明らかにしたものであり、感染症と生体防御に関する衛生薬学の発展に貢献するものである。医薬品や医療用具の菌体成分汚染の検出は、これまでエンドトキシンを対象とした局方発熱物質試験法とそのin vitro代替法によるエンドトキシン試験法しかなかった。これらの試験法はエンドトキシン以外の菌体成分の検出が困難であることから、著者は、今回見出したヒト単球-T細胞相互作用により炎症性サイトカインの産生誘導が起きる反応を利用して、菌体成分を幅広く検出する方法を考案した。この方法はヒト単球系細胞株からクローンされたPGNやエンドトキシンに高感度に応答する細胞を用いて菌体成分刺激で産生されるIL-6量を測定するものである。この方法の有効性は天然素材 (コラーゲン、アルギン酸塩、ラテックスゴムなど) を使用した創傷被覆材22検体中、9検体に菌体成分による汚染を確認したことで実証された。

以上、著者は、グラム陽性菌および真菌それぞれの病原性および生物活性を担う菌体成分はPGNと β Gであり、それらが単球を介してT細胞の機能に影響を及ぼす結果、生体防御機構を障害するという作用機構を明らかにした。さらに著者は、

ヒト単球系細胞株におけるIL-6の産生量を指標とした新規な試験法を考案し、それが医薬品や医療用具の菌体成分汚染を検出する方法として有効であることを示した。これらの研究成果は、これまでエンドトキシンに偏重していた菌体成分に関する研究に新たな方向性を示すとともに、医薬品や医療用具の安全性確保に必要な新たな試験法の確立において重要な知見となるものである。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。さらに、平成15年3月12日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。