

氏 名 土 谷 正 和
 学位(専攻分野) 博 士 (農 学)
 学 位 記 番 号 論 農 博 第 2250 号
 学位授与の日付 平 成 11 年 7 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 STUDIES ON THE ANALYSIS OF MICROBIAL CELL WALL COMPONENTS, UTILIZING THE SELF-DEFENSE SYSTEMS OF HORSESHOE CRABS AND SILKWORMS
 (カブトガニ及びカイコの生体防御系を利用した微生物細胞壁成分の解析に関する研究)

論文調査委員 (主 査) 教 授 松 野 隆 一 教 授 熊 谷 英 彦 教 授 村 田 幸 作

論 文 内 容 の 要 旨

エンドトキシン(リポ多糖), (1→3)- β -D-グルカン(β -グルカン)及びペプチドグリカンはそれぞれ, グラム陰性菌の細胞壁外膜, 真菌の細胞壁, 細菌の細胞壁を構成する成分で, 多様な生物活性を持つ。本論文はそれらの成分を, カブトガニ及びカイコの生体防御系を利用して, 個別に検出, 分析するシステムを構築し, さらにそれを微生物汚染の検査に利用することを目的として行った研究をまとめたもので7章よりなっている。

カブトガニの体内にグラム陰性菌や真菌が侵入すると, 血液のゲル化カスケードが活性化されてゲル化が起こり, 侵入物を包囲し, 生体を防御する。第I～第V章においては, この現象に着目して構築された, カブトガニ由来のリムルス試薬(Limulus Amebocyte Lysate)のエンドトキシンと β -グルカンにより活性化されるゲル化特性を十分に把握し, 両成分の識別法, エンドトキシン特異的リムルス試薬の開発及びそれらの医療用具等の汚染検査への応用について述べている。

第I章においては, リムルス試薬のエンドトキシンと β -グルカンにより活性化されたゲル化反応の応答性の違いから, 両成分を判別する方法について述べている。両成分によりゲル化反応を活性化すると, リムルス試薬はある遅延時間を経た後ゲル化を開始し, 透過光量が減少する。透過光量の時間に関する微係数の最大値とその値に達するまでの時間をプロットすることにより, エンドトキシンと β -グルカンの場合, ゲル化カスケードの経路が異なるため, 明らかに異なった直線を得た。このことから, 両成分を区別することかできる。また, エンドトキシニンに特異的に結合することで知られるポリミキシンBを反応液に共存させると, β -グルカンのみを測定することかできた。

第II章では, エンドトキシン特異的リムルス試薬の開発について述べている。 β -グルカンは, リムルス試薬に対して至適濃度を持つ反応性を示し, 高濃度ではリムルス試薬の活性化が起こらなくなる。従って, エンドトキシンを含まない水溶性 β -グルカンが入手可能で, 大過剰の β -グルカンがエンドトキシン測定に影響を与えないとすれば, 大過剰の β -グルカンを共存させたリムルス試薬はエンドトキシン特異的であるはずである。このことを, β -グルカンとして1 mg/mlのカルボキシメチル化カードランで試した結果, エンドトキシン特異性が確かめられた。

第III章では, 第II章の原理を比濁時間分析法に適用する際の, 試料の添加量, セルの形状の最適化について検討した。その結果, 薬局方で定められているゲル化法の100倍の感度を持つ方法の開発に成功した。

第IV章では, エンドトキシン汚染を調べるためのリムルス試薬を医療用具に適用する際の温度, 抽出条件について検討し, さらに第V章では, プラスチック製の医療器具, あるいは, リムルス試薬そのものに使用するプラスチック器具がエンドトキシニンで汚染されているのではないが, その汚染を調べるための付着エンドトキシニンの抽出に人血清アルブミンが効果的であるなどの医療の実際面に役立つ発見を行い報告している。

昆虫の生体防御機構の一つに, フェノール酸化酵素前駆体カスケードがある。このカスケードは, 細菌の細胞壁成分, ペ

プチドグリカン及び β -グルカンにより活性化され、3, 4-ジヒドロキシフェニルアラニン (DOPA) を添加しておく、最終的に目視可能なメラニン色素を生成する。第 VI, VII 章では、この現象を応用して、ペプチドグリカン及び β -グルカンを検出するためにカイコプラズマ (Silkworm Larvae Plasma) 試薬を開発し、その反応性並びに滅菌済み使い捨て器具の微生物汚染検査への適用について報告している。

カイコプラズマ試薬はカイコの体液を無菌的に採取し、血球を除いた後、反応に必要な全因子を含むように調製する。酸化酵素の基質として DOPA を添加し、目視法または、反応時間分析法によって、両成分を検出する。本試薬は、 β -1, 3-グルコシド結合を持つグルカン、ペプチドグリカンには反応するが、エンドトキシンには反応しなかった。また、グラム陽性菌と同様グラム陰性菌にも反応した。さらに滅菌済み使い捨て器具を調べたところ、本法により検出できる汚染がある場合も認められた。

論文審査の結果の要旨

カブトガニの体内に微生物が侵入すると、グラム陰性菌の細胞壁に存在するエンドトキシン (リポ多糖) や、真菌の細胞壁に認められる (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-グルカン (β -グルカン) によって活性化される血液ゲル化系で、血液がゲル化し、侵入物を包囲し生体を防御する。一方、昆虫の生体防御において重要な役割を演ずる機構の一つにフェノール酸化酵素前駆体カスケードがある。このカスケードは、細菌の細胞壁成分、ペプチドグリカン及び β -グルカンにより活性化され、最終的に 3, 4-ジヒドロキシフェニルアラニン (DOPA) 添加下、メラニン色素を生成する。本研究はこれらの現象の特性を十分に把握し、カブトガニ血球由来のリムルス試薬 (Limulus Amebocyte Lysate) 及びカイコ体液由来のカイコプラズマ (Silkworm Larvae Plasma) 試薬を用いて、医薬品・医療用具で義務づけられているエンドトキシン試験のみならず、容器に付着し、試料に含まれるごく少量の微生物の種類を高感度で検出・分析する方法の構築及び応用を目的とした。成果として評価すべき点は次の通りである。

- 1) 比濁時間分析法によるリムルス試薬を用いたリムルス試験において、その反応タイムコースを解析することにより、リムルス試薬と反応している物質がエンドトキシンか β -グルカンかを判別する方法を開発した。
- 2) 大過剰の水溶性 β -グルカンを反応液に添加することにより、 β -グルカン自身のリムルス試薬の活性化を抑制し、エンドトキシンに特異的なリムルス試験法を開発した。
- 3) エンドトキシン特異的試薬を用いたエンドトキシン測定法において、測定器具等の条件を最適化することによって、既存の薬局方ゲル化法の 100 倍の感度に向上し、医療用具のエンドトキシン試験への応用に成功した。
- 4) 水や生理食塩水で抽出できないエンドトキシンを効率よく抽出するために、人血清アルブミン溶液が効果的であることを見だし、エンドトキシン抽出液を開発した。
- 5) カイコの体液よりフェノール酸化酵素前駆体カスケードに関与する因子をすべて含むカイコプラズマ試薬を調製し、ペプチドグリカン及び β -グルカンに反応してフェノール酸化酵素が活性化されるカイコプラズマ試薬を、世界に先駆けて開発した。
- 6) カイコプラズマ試薬の反応性を検討し、ペプチドグリカン及び β -1, 3-グルコシド結合を持つ β -グルカンにはよく反応するが、エンドトキシンには反応しないことを示した。さらに、グラム陽性菌及びグラム陰性菌に反応することも明らかにした。
- 7) 上述の成果を総合して用いると、医薬品、医療用具、各種器具、試料中の汚染微生物の種類を予測することが可能である。

以上のように本論文は、カブトガニ、カイコの生体防御機構を利用して、微生物の細胞壁成分、エンドトキシン、 β -グルカン、ペプチドグリカンを個別に高感度で検出、分析する方法を確立し、医薬品、医療用具の安全性といった実用上の重要な問題の解決に新しい方法を提供したもので、応用微生物学、分析化学、医療工学に寄与するところが大きい。

よって本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 11 年 6 月 15 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。