



# Phagocytosis of bacteria by macrophages : changing the carbohydrate of lipopolysaccharide alters interaction with complement and macrophages

高崎, 潔子

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1983-03-09

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙0823

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2000823>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍） <sup>たか</sup>高 <sup>さき</sup>崎 <sup>よし</sup>潔 <sup>こ</sup>子 （兵庫県）

学位の種類 医学博士

学位記番号 医博ろ第 720 号

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

学位授与の日付 昭和 58 年 3 月 9 日

学位論文題目 PHAGOCYTOSIS OF BACTERIA BY MACROPHAGES: CHANGING THE CARBOHYDRATE OF LIPOPOLYSACCHARIDE ALTERS INTERACTION WITH COMPLEMENT AND MACROPHAGES  
 （マクロファージによるバクテリアの食作用  
 ——補体及びマクロファージとの相互作用に及ぼすリポ多糖  
 の糖鎖の影響）

審査委員 主査 教授 木 幡 陽

教授 西 塚 泰 美 教授 藤 原 美 定

## 論文内容の要旨

### 序 文

グラム陰性桿菌の細胞表層の外側にある Outer membrane は、リポ多糖（以下 LPS と略す）がその構成成分の 1 つをなしている。サルモネラ菌を中心とする腸内細菌の分類のために古くから用いられてきた血清学的な分別因子、即ち O 抗原の決定因子はこの LPS の構造によっており、また LPS は、いわゆる Endotoxin として注目をあびてきた物質の本体を成している。LPS は大きく分けて、1) Lipid A 部分、2) Core 部分および 3) O 抗原の 3 部分から構成されている。Lipid A 部分および Core 部分の構造についてはサルモネラ属間では共通であると言われており、一方 O 抗原は特徴的な糖鎖によるくりかえし構造をもつ。

実験に用いた三種のサルモネラ菌は表 1 に示した様に特徴的な異種の O 抗原をもち、さらに各々が異った病原性をもつ。

表 1 O 抗原のタイプ O 抗原の構造

O-4, 12	Abe 1
	(Man-Rha-Gal) n
O-9, 12	Tyv 1
	(Man-Rha-Gal) n
O-6, 7	Glu
	(Man-Man-Man-Man-GlcNAc) n

そこでLPSの構造と病原性の発現機作を解明するために、マクロファージ系によるサルモネラ菌のとりこみ機構に焦点を当て、まず、培養胞株として確立されているマクロファージ、J774（以下J774と略す）によるサルモネラ菌のとりこみの定量法を確立しさらにこの方法を用いて、菌の病原性とJ774によるとりこみとの関連性およびそのとりこみを機構に關与するレセプターについて生化学的に解析を行った。

## 実験方法

### 省 略

## 実験結果

### (1) J774による菌のとりこみ定量法

サルモネラ菌は、すでにLD<sub>50</sub>の知られている、LPS部分の糖鎖構造の異なる3種の変異株を用いた。アイソトープ標識した一定量のサルモネラ菌とカバーガラス上に培養したJ774を保温(37℃)し、J774にとりこまれたアイソトープを測定することにより、従来からの顕微鏡下による観察に比べて、感度及び精度の上ではるかに優れた菌のとりこみの定量法を確立した。

### (2) 糖鎖構造の異なるO抗原をもつサルモネラ菌のJ774によるとりこみの差異の検討

LPSのO抗原部分の糖鎖構造の異なる三種の菌についてのLD<sub>50</sub>は、O-4, 12<O-9, 12<O-6, 7の順であることがすでに報告されている。(1)の定量法を応用して、この3種の菌のとりこみを比較したところ、O-6, 7タイプの菌が最も良くとりこまれ、O-9, 12タイプの菌がこれに次ぎ、O-4, 12タイプの菌のとりこみが最も少なかった。この差異は顕微鏡下でも同様に観察された。以上のことから、菌のもつ病原性とJ774によるとりこみが逆相関々係にあることが明らかになった。

さらに、とりこみの反応速度論的な解析を行なった結果、通常の酵素反応と同様の挙動を示すことから、レセプターが介在していることが予想された。菌とJ774との親和性(K uptake)について求めてみると、O-6, 7タイプの菌が最も強く、O-4, 12タイプの菌が最も弱いことが明らかになった。とりこみの最大速度(V uptake)に差が認められないことから、とりこみ及び病原性の差は、菌のJ774に対する親和性の差を反映しているものと思われる。

### (3) J774によるサルモネラ菌のとりこみに対する補体の必要性の検討

反応液中に含まれるウシ胎児血清を予め56℃, 30分加熱処理しておき、反応に用いたところ、J774による菌のとりこみが著しく低下し、3種の菌の間にはほとんど差がみられなくなった。同様の現象は、血清をZymosanで処理してもみられた。従って、菌のとりこみには反応系に血清成分(おそらく補体第3成分: 以下C3と略す)が必要であることが明らかになった。また、菌のとりこみに対する免疫グロブリンの関与はみられないことから、Fcレセプターは関与していないものと結論された。

J774はじめマクロファージの細胞表面には補体レセプター(C3bレセプター)が存在することがすでに報告されているので、サルモネラ菌のJ774によるとりこみは、このC3bレセプターを介して行なわれているものと考えられる。

## 考 察

病原性の異なる3種のサルモネラ菌とマクロファージとの相互作用を調べた結果、病原性の弱いものほど容易にマクロファージにとりこまれることが明かになった。この病原性とマクロファージによるとりこみの間に見られる逆相関々係は、サルモネラ菌による感染防御に対してマクロファージが重要な役割を果していることを示すものであろう。このマクロファージによるとりこみには抗体は関与しないが、補体第3成分が必須であることが示唆されC3b レセプターが介在していることが示された。従って3種の菌のとりこみの差異は、補体第3成分の活性化の度合に依存しているものと思われる。本研究に用いた3種の菌は、リボ多糖の糖鎖構造が異っており、この糖鎖構造の差異が補体の活性化及びそれに引き続くマクロファージによる食作用に深くかわっているものと考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

哺乳動物が細菌感染を受けた場合に発動する防衛機構には、液性抗体を介する溶菌作用とマクロファージによる食菌作用とがあるが、後者を誘発する機構の詳細については不明な点が多い。

申請者は、マクロファージの食作用が宿主の主な防御反応となっていると考えられているサルモネラがその表面に持つ抗原の構造の違いにより異った病原性を示す点に注目して、菌の病原性とマウスより培養細胞株として確立されたマクロファージによるとりこみとの関連性を解析し、この知見をもとにマクロファージのサルモネラのとりこみ機構に関与すると考えられるレセプターについて、生化学的解析を加える研究を行っている。

従来、マクロファージによる細菌のとりこみ度合の測定は、主として顕微鏡下の観察という感度並びに精度の上で極めて問題の多い方法がとられて来たが、申請者はカバーグラス上に培養したマクロファージに<sup>14</sup>C-グルコースで代謝標識したサルモネラをとりこませ、これを液体シンチレーションカウンターで測定すると云う極めて精度と感度の高いとりこみの測定法を確立することに成功した。これが本研究の価値を高める一因となっている。

サルモネラ属の菌は細胞表層の外側にあるOuter membrane に共通Lipid A部分、Core 部分からなるリボ多糖を持っており、Core 部分の外側に結合したO抗原の名でよばれる糖鎖の構造の違いによって血清学的に区別しうる様々なタイプに分類されている。申請者はマウスに対する病原性の異なるO-4, 12, O-9, 12, O-6, 7の3種のサルモネラ菌について、先にのべた定量法を応用してマクロファージへのとりこみを測定した結果、菌のもつ病原性とマクロファージへのとりこみがきれいな逆相関々係にあることを明らかにした。そしてとりこみ反応の速度論的解析を進めた結果、通常の酵素反応の場合と同様のデータを与えることから、このとりこみにマクロファージの表面に存在するレセプターが介在していることを予想した。この解析において菌とマクロファージの親和性がとりこみの度合の違いを良く反映した差を示すのに対し、菌のマクロファージによるとりこみの最大速度は3種の菌で差がないことから、菌のとりこみおよ

び病原性の差が菌のマクロファージ表面のレセプターに対する親和性の差に起因していると結論している。

マクロファージ表面には糖鎖のマンノース残基と結合するレセプターが存在することがStahlらによって確認されており、サルモネラ菌のO抗原にマンノースを含むことも確認されているので、三種の菌のマクロファージによるとりこみの差がマクロファージ表面のマンノースレセプターに対するO抗原糖鎖の親和性の違いによる可能性が先ず考えられることである。しかし申請者は菌のマクロファージによるとりこみに胎児血清の添加が必須であることを示して先ずこの可能性を否定した。そして血清中の必要因子を調べて、抗体は一切関与しないが補体第3成分がとりこみに不可欠であることを証明した。実験に用いた培養細胞を含めてマクロファージの表面にはC3bレセプターが存在していることを考え合わせると、この事実はサルモネラのO抗原糖鎖によって補体第3成分が活性化され、生じたC3bが菌とマクロファージのC3bレセプターを結びつける役を果していることを示すもので、補体系のAlternate pathwayの生体防衛上の機構を解明する糸口を与える重要な知見と云えよう。

このように本研究成果の免疫生化学的価値は極めて大であり、申請者は医学博士の学位をうる資格十分と判定する。