

氏 名 (本籍)                   よこ           ざわ           あつ           のぶ  
横           沢           厚           信

学 位 の 種 類                   医           学           博           士

学 位 記 番 号                   医    第       1 0 3 5       号

学位授与年月日                昭和 5 3 年 2 月 2 2 日

学位授与の要件                学位規則第 5 条第 2 項該当

最 終 学 歴                    昭和 4 3 年 3 月  
東北大学医学部医学科卒業

学 位 論 文 題 目                Chemistry and Biology of Hot water  
Extract from Delipidated Mycobacterium  
bovis, Strain BCG.  
(脱脂 B C G 由来の熱水抽出物の化学的及  
び生物学的研究)

(主 査)

論 文 審 査 委 員   教 授   今   野            淳   教 授   滝   島            任

  教 授   吉   沢   善   作

# 論文内容要旨

## 目 的

近年、癌治療における免疫療法が注目されている。特にBCGおよびその菌体成分に抗腫瘍作用のあることはよく知られており、これらを用いての腫瘍の免疫療法が、すでに臨床の場においても行なわれている。しかし投与方法、副作用等に関する問題がまだ残されている。数年前より、脱脂BCG菌体から、水素添加処理、酵素処理、超音波処理の後に得られた。それぞれの水溶性の物質にもアジュバンド活性のあることが報告されている。しかし抗腫瘍性に関する実験はまだあまりない。そこでこの様な水溶性アジュバンドを得る新しい方法として脱脂BCG菌体と熱水で抽出してみた。この脱脂BCG菌体の熱水抽出物 (hot-water soluble adjuvant: HSA) についてアジュバンド活性の有無、抗腫瘍性について検討した。

## 方 法 と 結 果

BCGをSauton変法培地で4週間培養。収穫後、濾過、蒸留水で洗滌し、エーテル・エタノール(1:1)混合液、クロロホルム、クロロホルム・メタノール(2:1)混合液で脱脂した。脱脂BCG菌体を磨砕し、冷水可溶画分を除法する為、水で繰り返し洗滌した。この様にして得られた脱脂菌体濾液を100°Cで15分加温、Milliporeフィルターで濾過後、減圧濃縮した。この濃縮液に、3容量のアセトンを加え、遠心、沈渣を集め、蒸留水に対し48時間透析、透析内液を凍結乾燥し、HSAを得た。HSAの精製にはSephadex-G75のカラム(2.5×60cm)を使用した。溶出には0.1N酢酸を用い、溶出液を4mlづつ試験管に集め、中性糖とノンヒドリン陽性物質を指棟として、2つのピークを得た。約90%を占める、二番目のピークをFr-IIとした。HSAに硫酸ストレプトマイシン(SM)を添加し、HSAから核酸を除去した。HSA水溶液に、0.1容量の10%硫酸SMを攪拌しながら滴下した。ついで12,000gで20分遠心し、上清は蒸留水に対して透析し、SMを除いた。透床内液は凍結乾燥し核酸を除去したHSA(SM-HSA)を得た。HSA、Fr-II、SM-HSAを分析すると、三者ともに主として中性糖からなり(50-70%)、ガスクロマトグラフィーにより中性糖の組成を分析すると、グルコースとマンノースが大部分を占めた。アミノ糖は1-4%で、そのほとんどはグルコサミンであり、ムラミン酸は僅か(アミノ糖の5-18%)である。アミノ酸は15-25%で、分析するとアラニン、グルタミン酸、ジアミノピメリ酸以外にも多くのアミノ酸が検出された。核酸はHSAで5-10%、Fr-II、SM-HSAでは1%未満であった。アジュバンド活性の検定には卵白アルブミンを抗原とし、Freund不完全アジュバンドと混合感作し、遅延型反応(角膜反

応、皮膚反応、足蹠反応)と血中抗体量の上昇(定量沈降反応、受身赤血球凝集反応)を指標として判定した。その結果、この物質にはアジュバンド活性が認められた。HSAの毒性、HSA投与による内毒素に対する感受性の亢進はaalマウスでは認められなかった。Sarcoma 180(S-180)に対するHSAの抗腫瘍性はaalマウスを用いて検討し、以下の成績を得た。1)  $3 \times 10^6$  個のS-180接種後、HSA 0.25 mgを7-20日間、腹腔内注射すると、生存日数が延長した。2) MMCとの併用により、併用効果が認められた。3) HSAから核酸を除く事により、抗腫瘍作用が増強した。Ehrlich carcinoma(EC)については、 $1.2 \times 10^7$  個のEC細胞に対しては効果は認められないが、 $1.0 \times 10^5$  個には抗腫瘍作用があり、Cyclophosphamide(CY)との併用により、生存日数が延長した。Methyl cholanthrene(MCA)注射7日間のHSA投与では、MCAによる発癌を抑えることはできなかった。

## 総 括

化学的分析の結果、HSAはこれまで報告されている結核菌由来の水溶性アジュバンドとは組成が異なる。即ち中性糖ではアラビノースとガラクトースは少なく、むしろグルコースとマンノースが主体である。この他アミノ糖含量も極めて低く、細胞壁に由来すると考えられるムラミン酸は約0.5%である。アミノ酸では、細胞壁に特有な、ジアミノピメリン酸、グルタミン酸、アラニンの他にも、各種のアミノ酸が検出された。この様な組成からみて、HSAは細胞壁と細胞質の再成分により構成されているものと推測される。この様にarabinogalactan-mucopeptide以外の水溶性物質によってもアジュバンド活性が発現され、arabinogalactanがアジュバンド作用の発現に、すくなくとも必須でないことが明らかにされた。抗腫瘍性実験において、HSAはS-180に対してはMMCと、ECに対してはCYとの併用効果が認められた。免疫療法においては、接種細胞数と治療効果との間には密接な関係があり、接種細胞数が多い場合は、EC  $1.2 \times 10^7$  個接種の時の様に効果が認められないが、EC細胞を $1.0 \times 10^5$  個に減らすと治療効果がある。この様なことから、制癌剤との併用効果の理由として、制癌剤投与により腫瘍細胞数が減少したため、HSAが効果を発現したことが考えられる。又制癌剤によって引き起された免疫撻能の抑制がHSAにより回復したために併用効果があらわれた可能性もある。以上HSAについて化学的分析、アジュバンド活性、更に抗腫瘍性について検討した。

## 審査結果の要旨

本研究は、脱脂BCG菌体から熱水によって抽出した水溶性物質のアジュバント活性と、抗腫瘍作用について検討したものである。従来、結核菌のアジュバント活性物質は、細胞壁画分に含まれる peptidoglycolipid であると考えられていた。しかし近年、アジュバント活性物質がlipidをほとんど含まない水溶性の物質としても得られることが報告され、著者は、この点に着目した。即ち有機溶媒により徹底的に脱脂したBCG菌体を、熱水で抽出、濾過、アセトンを加え、できた沈渣が熱水抽出物(HSA: hot-water soluble adjuvant)である。HSAはこれまで報告されている結核菌由来の水溶性アジュバントとは組成が異なり、その組成から、細胞壁と細胞質の再成分により構成されているものと考えられる。モルモット、マウスを用いての実験で、HSAにはアジュバント活性のあることが証明され、arabinogalactan-mucopeptide以外の水溶性物質によってもアジュバント活性が発現されるということが示され、アラビノガラクトンがアジュバント作用の発現に、少なくとも必須でないことを明らかにした。抗腫瘍作用に、ddIマウスにおいて、Sarcoma 180 Ehrlich carcinomaでは、腫瘍細胞接種後、HSAを7～20日、腹腔内に投与すると生存日数が延長し、又制癌剤との併用によっても、併用効果が認められた。HSAの抗腫瘍性における作用機序としては、腫瘍細胞接種後に引き起されると思われる免疫機能の低下を回復させることが考えられる。

近年、癌治療における免疫療法が注目されている。特にBCGおよび菌体成分を用いての腫瘍の免疫療法が、すでに臨床の場においても行なわれている。しかし投与方法、副作用等に関する問題が残されている。ところが、HSAは、静脈内注射、腹腔内注射ともに可能で副作用が認められない。抗腫瘍作用も、腫瘍細胞数が少ない時は単独でも、又、多い時は制癌剤と併用することにより、かなりの延命効果が認められることから、今後、臨床に広く応用されることが期待される。

以上より本研究は、アジュバント活性物質について一知見を加え、更に水溶性アジュバントにも抗腫瘍作用のあることを証明し、今後の癌治療に大きなウエイトを占めると思われる免疫療法の研究に寄与するところが大きいと考えられる。よって本論文は学位授与に値すると思われる。