

学 位 論 文 題 名

Stimulation on Hematopoiesis by a Synthetic Muramyl Dipeptide
Derivative, MDP-Lys (L18) : Its Novel Biological Activity

（合成ムラミルジペプチド誘導体 MDP-Lys (L18) の
造血刺激作用：その生物学的有効性）

学位論文内容の要旨

合成ムラミルジペプチド誘導体 MDP-Lys(L18)による造血刺激作用の機作を解明するために、まず健常マウスおよびカニクイサルにおける本剤の白血球数増多作用を検討した。本剤100 μ gをマウスに単回皮下投与することによって、好中球および単球を主体とした明瞭な末梢総白血球数増多作用が発現した。本作用はその用量に依存して発現し、また、その投与の継続によって著しく作用時間が持続した。このような造血刺激作用の機作研究の一環として骨髓像を検討した結果、本剤は主として好中球系の未成熟細胞（前骨髓球および骨髓球）の増殖と成熟細胞（後骨髓球、桿状核好中球および多形核好中球）への分化を促進することが明らかとなった。また、本剤によるこれらの細胞反応は末梢好中球数の増加と一致して観察されたばかりでなく、骨髓におけるリンパ球系および赤芽球系の細胞増殖をも刺激し、著しく多岐にわたる造血作用を伴うことが示唆された。さらに、本剤の投与による骨髓および脾臓などの造血組織における多能性造血幹細胞（colony-forming unit-spleen, CFU-S）数の有意な増加を脾コロニー形成法を用いて観察するとともに、これらの組織における顆粒球・マクロファージ系前駆細胞の顕著な増殖促進効果を証明した。以上の造血刺激作用をもとに、マウス骨髓細胞を用いた試験管内コロニー形成法によりコロニー刺激因子（colony-stimulating factor, CSF）産生におよぼす本剤の影響を検討した。その結果、本剤は単回投与後早期から血清 CSF レベルの有意な上昇をもたらし、その産生を著しく増強することが判明した。次に異種動物でも同様の作用が得られるかどうかをみるために、健常カニクイサルにおける造血作用を検討したところ、本剤はマウスにおけると同様にカニクイサルでも好中球数および単球数の増加を主体とした明瞭な末梢総白血球数増多作用を

示した。また、本剤は連続10日間の皮下投与によって末梢血小板数の増加効果をも示し、様々な造血刺激作用を有することが示唆された。

サルにおけるこれらの作用機作を解明する目的で、サル末梢単球を試験管内で本剤とともに培養し、各種造血因子の産生増強効果について検討を加えた。その結果、本剤添加による培養単球のCSF産生増強が濃度依存性であったことから、本剤の標的細胞のひとつとして単球・マクロファージ系細胞が重要な役割を演じていると判断された。さらにまた、本剤は培養単球のインターロイキン1およびインターロイキン6の産生をも増強したことからサルの血小板数増多作用にも関与しているものと推定された。次いで、本剤投与サルから末梢好中球を分離・培養して大腸菌で刺激したところ、その活性酸素産生能の著しい亢進が認められた。同様のことは末梢単球においても観察されたことから、本剤はこれらの血液細胞数の増加を促すのみならず、その活性酸素産生能をも増強することが示唆された。

上述した本剤の造血刺激作用は抗癌剤シクロフォスファミド（CPA）投与あるいはX線全身照射によって作出された実験的マウス白血球減少模型においても認められ、本剤投与によって末梢総白血球数の回復を有意に促進することが確認された。また、型別白血球数増加の推移を検討した結果、本剤による治療効果の主体は好中球数の顕著な回復促進によっていると考察された。この治療効果はCPA投与後あるいはX線照射後に本剤を投与した場合にのみ認められ、予防的投与ではいずれの模型においても無効であった。本剤治療群では末梢総白血球数の回復に先立って、CSFの産生増強と骨髓における未成熟好中球の顕著な増殖・分化が観察され、骨髓抑制の早期改善がいずれの模型においても認められた。以上の成績は新しい型の白血球数増多剤として本剤の臨床応用を強く期待し得るものと考えられた。

本剤の好中球および単球を主体とした白血球数増多作用およびその機能増強作用に注目し、感染動物模型に対するその有効性を検討した。すなわち、コブラ毒因子投与によって作出された補体消耗マウスに肺炎球菌57664（血清型3型）を噴霧感染させて肺炎球菌性肺炎模型を作出した。これらのマウスでは感染2日目以降に肺のみならず、肝臓と脾臓においても著しい菌の増殖が認められた。特に肺における病理組織像は菌の増殖と一致し、また好中球を主体とした炎症細胞の広範な浸潤と顕著な水腫が血管周囲性に形成され、典型的な大葉性肺炎への進展が観察された。この肺炎模型に対する本剤と抗生物質アンピシリン（ABPC）との併用効果を検討したところ、ABPCをマウスあたり25mgの割合で感染1日後から1日1回、連続3日間皮下投与してもその生存率は45%にとどまり、その治療効果は必ずしも十分でなかった。これらのマウスにおける細菌学的および病理学的検索では、薬剤投与終了後に肺内の菌の再増殖と一致して化膿性肺炎の進

展が観察された。これに対して、本剤（100 μ g／マウス）を感染1日前に単回皮下投与して ABPC を併用した場合、生存率は90%まで上昇し、明瞭な併用効果が観察された。ABPC との併用効果は本剤の用量に従って観察され、その10 μ g／マウスの併用ではある程度の生存率改善効果が認められたものの有意差はなく、また、1 μ g／マウスの併用では全く改善は認められなかった。併用マウスにおける肺組織像検索では、感染初期から肺泡マクロファージおよび浸潤マクロファージの強い活性化が観察され、また化膿性肺炎への進展も効果的に阻止されていた。同時に実施された細菌学的検索でも肺からの噴霧菌の排除が認められ、組織学的検索結果とよく一致した。また、肺局所における病理組織学的変化と対応して、末梢血液でも単球数の増加が特徴的に観察された。これらの所見から、本剤の抗生物質との併用効果は特に単球・マクロファージ系細胞の活性化および肺局所へのそれらの動員を主体とした細胞反応に基づくことが示唆された。

以上のように、著者は本剤が宿主の造血機構を刺激して好中球および単球を主体とした明瞭な白血球数増多作用を示すこと、これらの細胞の活性酸素産生能を増強すること、および CSF 産生増強作用に基づいて造血刺激効果が発現することなどを明らかにした。さらに、本剤の造血刺激作用は ABPC と併用しても発現することから、本剤は白血球減少症に対する治療薬としてのみならず、感染症に対する抗生物質との併用薬としても幅広い臨床応用の可能性をもつことを立証した。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	橋 本 信 夫
副 査	教 授	波 岡 茂 郎
副 査	教 授	藤 田 正 一
副 査	助教授	高 島 郁 夫

宿主の造血作用を促す薬剤の開発は臨床医学上大きな意義を持つ。著者は細菌細胞壁の構成成分の一つであるムラミルジペプチドの多彩な免疫増強作用に着目し、合成ムラミルジペプチド誘導体 MDP-Lys (L18) の造血刺激作用について研究をすすめた。本論文はその成績をまとめたもので、英文142頁からなり参考論文7編を付している。

1. 合成ムラミルジペプチド誘導体 MDP-Lys (L18) の造血刺激作用の研究の一環として、

マウスとカンクイサルにおける本剤の白血球数増加作用を検討した。本剤（100 μ g／マウス）を単回皮下投与することによって、好中球および単球を主体とした明瞭な末梢総白血球数増加作用が発現した。本剤の当該作用はその用量に依存して発現し、その投与を継続することによって顕著に持続した。また、本剤は骨髓において、主として好中球系の未成熟細胞（前骨髓球および骨髓球）の増殖とその成熟細胞（後骨髓球、桿状核好中球および多型核好中球）への分化を促進することが明らかにされ、しかもこれらの細胞反応は末梢好中球数の増加ともよく一致した。さらに、本剤は骨髓におけるリンパ球系および赤芽球系の細胞増殖をも刺激し、その造血作用は多岐にわたることが示唆された。造血幹細胞数の測定によって、本剤の投与は骨髓および脾臓などの造血組織における多能性幹細胞数の増加をもたらす、ついで顆粒球・マクロファージ系前駆細胞の増殖を促進することが明らかにされた。さらに、本剤は造血因子であるコロニー刺激因子（colony-stimulating factor, CSF）の産生増強作用を示し、このことが本剤の造血刺激作用に密接に関与するものと結論された。カンクイサルにおける本剤（1 mg／頭）の末梢総白血球数増加作用はマウスの場合とほぼ等しく、好中球数および単球数の増加を主体とすることが示唆された。加えて、本剤はその連続10日間皮下投与によって末梢血小板数の増加効果をも示し、多岐にわたる造血刺激作用の存在が示唆された。そこでこの作用機作を解明するために、試験管内に培養した末梢単球を本剤で刺激して造血因子産生増強効果を検討した。その結果、本剤によって培養単球のCSF産生能の増強が認められたことから単球・マクロファージ系細胞が本剤の標的細胞のひとつと考えられた。さらに、本剤は培養単球を刺激してインターロイキン1およびインターロイキン6の産生を増強することも立証され、これが本剤のサル血小板数増加作用と密接に関与していると推察された。以上の造血作用に基づいてサル白血球機能の増強におよぼす本剤の影響を検討した。すなわち、本剤投与動物から末梢好中球を分離して大腸菌で刺激したところ、その活性酸素産生能が著しく亢進した。このことは末梢単球においても同様に観察され、本剤はこれらの血液細胞数の増加のみならず、この機能をも増強することが示唆された。

2. 上述した本剤の造血刺激作用は抗癌剤シクロフォスファミド投与あるいはX線全身照射によって作出された実験的白血球減少マウスにおいても認められ、白血球数の回復を有意に促進することが確認された。さらに末梢総白血球数の回復に先立って、いずれの模型においても本剤治療群ではCSF産生増強とこれに続く骨髓抑制の早期改善が観察された。

3. 本剤の好中球および単球を主体とした白血球数増加作用に注目し、細菌の感染模型に対する有効性を検討した。すなわち、補体消耗マウスに肺炎球菌（血清型3型）を噴霧して肺炎球菌性肺炎模型を作出し、これに対する本剤と抗生物質アンピシリン（ABPC）との併用効果を検

討した。ABPC を感染 1 日後から 1 日 1 回、連続 3 日間皮下投与しても約 60% の動物に化膿性肺炎が進展し、これらの動物は薬剤の投与終了後に死亡した。これに対して、本剤 ($100\mu\text{g}/\text{マウス}$) を感染 1 日前に単回皮下投与して ABPC を併用した場合、感染初期から肺胞マクロファージおよび浸潤マクロファージの明瞭な活性化が観察され、これに対応して肺からの噴霧菌の排除が認められた。また、肺局所におけるこれらの細胞反応と一致して、末梢血液でも単球の増加が観察された。これらの所見から、本剤は特に単球・マクロファージ系細胞の活性化および肺局所へのそれらの動員を主体とした細胞反応に基づいてマウスに明瞭な感染防御効果を現わすことが明らかとなった。

以上のように、本剤は宿主の造血反応を刺激して明瞭な白血球数増多作用を示し、しかもほとんど副作用の認められないことから白血球減少症に対する治療薬としてのみならず、感染症に対する抗生物質との併用薬として幅広い臨床応用の可能性を持つことが示唆された。よって審査員一同は、申請者中島良平氏が獣医学博士の学位を受ける資格を有するものと認める。