

学 位 論 文 題 名

Structural Studies on Antigenic Polysaccharides of *Leptospira biflexa* and the Application of These Polysaccharides and Structurally Related *Rhodotorula* Mannan to Prevention and Serodiagnosis of Leptospirosis

(*Leptospira biflexa* 由来抗原多糖に関する構造研究と、これらの多糖体および構造的に関連する *Rhodotorula* 属酵母由来マンナンのレプトスピラ症予防と血清学的診断への応用に関する研究)

学位論文内容の要旨

今なお世界中でさまざまな感染症が猛威をふるっており、全世界の年間死亡者数の約25%が感染症によるものと推定されている。野生動物がヒトと接触する機会の増加や畜産業の発展に伴い、人獣共通の感染症が注目されるようになった。その中でもレプトスピラ症は典型的な人獣共通感染症として知られており、その流行が世界中で数多く報告されている。

レプトスピラ症はレプトスピラ属の菌によって引き起こされる急性の出血、発熱を特徴とする人獣共通感染症である。その診断には、MAT 法や ELISA 法などの血清学的診断法や PCR 法が主に用いられているが、操作が煩雑で、また、試薬等が高価であり、経済的に恵まれない開発途上国などにおいては一部の医療機関でのみ利用されている。近年、レプトスピラ属特異的抗原を含むとされる *Leptospira biflexa* の熱安定抗原を利用した簡便な dipstick 法が開発され、その普及が期待されている。他方、これまでに、この非病原性レプトスピラである *L. biflexa* に属特異的抗原が存在すること、また、リポ多糖の糖鎖部分が属特異的抗原性を担うと報告されていたが、その本体は明らかにされていない。この属特異的抗原の本体が明らかになれば、レプトスピラ症の診断試薬やワクチンの開発に大きく貢献するものと思われる。そこで本研究はレプトスピラ属特異的抗原の本体を明らかにすることを目的として、*L. biflexa* serovar patoc strain Patoc I よりリポ多糖成分を精製し、その抗原性を確認し、あわせてその抗原糖鎖部分の構造を決定した。

L. biflexa Patoc I 株菌体を熱 45% フェノール処理し、そのフェノール可溶性画分から 2 種の抗原性多糖を、また、水溶性画分から 1 種の抗原性多糖を得た。化学分析と機器分析に基づいて、これらの 3 種の多糖はアシル基による置換様式を異にするが、いずれも $\rightarrow 3$)- β -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-Manp-(1 $\rightarrow$ を繰り返し単位とする多糖構造をもつと推定した。ELISA による解析から、本抗原多糖はさまざまな病原性レプトスピラ菌に対するウサギ抗血清 28 種類のうち、24 種の抗血清と交差反応性を示すことが確認された。この広い交差反応性は本抗原多糖と同一、あるいは類似した構造を有する抗原性物質が広くレプトスピラ属細菌に分布していることを強く示唆している。従って、本抗原多糖はレプトスピラ属

特異的抗原の一種であると推定している。また、これらの免疫反応はきわめて低濃度の β -1,4-mannobiose により特異的に阻害されることから、前記の繰り返し単位が抗原エピトープである可能性が強く支持された。

一方、現在利用されているレプトスピラ用ワクチンは血清型特異的な防御効果しか示さず、世界中で広く利用されるまでには至っていない。本研究対象の *L. biflexa* 由来のリボ多糖成分 (*L. biflexa*-LPS) はその広い交差反応性から、その血清型にかかわらず多種の病原性レプトスピラに対するワクチンとして有効であると予測した。この予測を確かめるため、*L. biflexa*-LPS 前投与による病原性レプトスピラ感染に対する防御効果を検討した。この実験ではモデル動物であるハムスターへの投与量と回数を変えて *L. biflexa*-LPS を投与した後に、感染菌として選択した *L. interrogans manilae* UP-MMG による感染実験を行った。その結果、*L. biflexa*-LPS の投与量、回数に依存した感染防御効果が確認された。特に 100 μ g の *L. biflexa*-LPS を、一週間間隔で 2 回投与した場合に、感染はほぼ抑えられた。また、目立った副作用も確認されず、*L. biflexa*-LPS のワクチンとしての有用性が示された。*Escherichia coli* 由来の LPS を投与した実験ではその感染防御効果は認められず、本実験で確認された *L. biflexa*-LPS による病原性レプトスピラに対する防御効果は、一般的な LPS による非特異的防御効果によるものではないと推定された。

L. biflexa 由来の抗原多糖はレプトスピラ症の診断試薬あるいはワクチンとして利用できる可能性が示唆されたが、その収量はきわめて低く、その実用化はコスト的に困難であると予測される。一方、酵母の一種である *Rhodotorula glutinis* は本抗原多糖と同じ繰り返し単位を持つ菌体外マンナン (*Rhodotorula mannan*) を産生することが既に報告されており、*Rhodotorula mannan* が *L. biflexa*-LPS と同様に抗レプトスピラ抗体の検出に利用できるかを ELISA により検討した。まず、目的の菌体外マンナンを *R. glutinis* AHU 3479 の培養上清から、エタノール沈殿、フェーリング溶液による沈殿により精製した。化学分析および機器分析の結果、*Rhodotorula mannan* は *L. biflexa* 由来の抗原多糖と同じ繰り返し単位 $\rightarrow 3$)- β -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-Manp-(1 $\rightarrow$ を有する多糖であることが確認された。この *Rhodotorula mannan* 標品を抗原として、各種の病原性レプトスピラ菌に対する抗血清との交差反応性を ELISA で検討したところ、検討した抗血清 28 種類のうち 24 種と交差反応性を示し、上記の *L. biflexa* 由来抗原多糖による ELISA の結果と完全に一致した。また、*Rhodotorula mannan* を抗原とする ELISA により確定診断を受けたレプトスピラ症患者から採取した血清中の抗レプトスピラ抗体存在の有無を検討した。その結果、レプトスピラ症患者血清 45 検体中 42 検体と交差反応性を示した。他方、レプトスピラ症と同じくスピロヘータに起因する感染症であるライム病患者および梅毒患者から採取した血清との交差反応性は全く認められなかった。従って、*Rhodotorula mannan* を抗原とする ELISA できわめて特異的にレプトスピラ症患者血清中に存在する抗レプトスピラ抗体を検出可能であると判断した。

本研究において、*L. biflexa* 由来抗原多糖を抽出・精製する方法を確立し、また、その抗原エピトープ構造を決定した。さらに、本抗原多糖がレプトスピラ症の血清学的診断試薬およびワクチンとして利用できる可能性が強く示唆された。また、*Rhodotorula mannan* が、微量にしか得られない *L. biflexa* 由来抗原多糖の代用多糖としてレプトスピラ症の血清学的診断試薬として利用できることが確認された。*Rhodotorula mannan* 標品を抗原物質として dipstick 法などに応用することで、開発途上国でも利用可能な、より安価な診断キットの開発につながるものと期待している。加えて、*Rhodotorula mannan* あるいはその誘導体は *L. biflexa* 由来抗原多糖と同様の交差反応性を示すことから、不均質な *L. biflexa*-LPS に代わるレプトスピラ症に対する安全なワクチンとして利用可能であると予測しており、現在、その検討を進めている。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 荒 木 義 雄
副 査 教 授 西 則 雄
副 査 教 授 坂 入 信 夫
副 査 助 教 授 奥 山 英 登 志

学 位 論 文 題 名

Structural Studies on Antigenic Polysaccharides of *Leptospira biflexa* and the Application of These Polysaccharides and Structurally Related *Rhodotorula* Mannan to Prevention and Serodiagnosis of Leptospirosis

(*Leptospira biflexa* 由来抗原多糖に関する構造研究と、これらの多糖体および構造的に関連する *Rhodotorula* 属酵母由来マンナンのレプトスピラ症予防と血清学的診断への応用に関する研究)

感染症による死亡者数は全世界の年間死亡者数(5000万人を超える)の25%以上に及ぶ。先進国では、抗生物質の利用・治療法の発達に伴い、感染症は余り重要視されていないが、開発途上国においては依然として大きな問題である。特にレプトスピラ症は急性の出血、発熱を特徴とする人獣共通感染症で、その流行が世界各国で報告されている。レプトスピラ症の診断はMAT法やELISAによる血清学的診断法あるいはPCR法に基づく診断法で実施されているが、操作が煩雑であり、使用する装置・試薬類などが高価であるため、感染症が多発している、経済的に恵まれていない開発途上国では一部の医療機関を除き、このような診断法の利用が困難であるという大きな矛盾を抱えることになる。最近になり、レプトスピラ属に特異的な抗原を含有する画分を利用した簡便な検査法が開発され、その普及が期待されている。このような属特異的抗原の存在は古くから予想され、また、リボ多糖成分の糖鎖部分はその抗原性を担うとする報告があるが、その本体は不明である。その構造が明確になれば、レプトスピラ症の血清学的診断試薬およびワクチンの開発に大きく寄与できるものと思われる。

本論文では、非病原性 *L. biflexa* から抗原性多糖を抽出・精製する方法を検討し、単離した3種の抗原性多糖の構造を化学分析と機器分析から決定してい

る。また、ELISA による解析から、本抗原多糖は各種の病原性レプトスピラ菌で免疫化したウサギ抗血清と広い交差性を示し、本抗原多糖がレプトスピラ属に高い共通性をもつ抗原である可能性を明確に示している。さらに、オリゴ糖による免疫反応の阻害実験からその抗原エピトープを推定している。

第2に、本菌から得たリポ多糖画分がワクチンとして活用可能かを確認するため、モデル動物による感染防御効果を検討し、リポ多糖投与（1週間隔、2回）により、病原性レプトスピラ菌感染がほぼ完全に抑制できることを確認している。このように、*L. biflexa* 由来のリポ多糖あるいはその多糖部はレプトスピラ症に対するワクチンあるいは血清学的診断用抗原として有効であることを確認している。しかし、それらの収量はいずれの極めて低く、また、培養・精製などのコストが高く、実用化は困難と予測された。

第3に、上記に指摘した実用化面での難点を解決する方向の研究を進展させている。本論文で決定したレプトスピラ抗原糖鎖の構造はかつて報告されていた *Rhodotorula* の菌体外マンナンと同じ繰り返し構造を有することに着目して、*L. biflexa* リポ多糖の代用抗原となるかを検討し、*Rhodotorula glutinis* AHU 3479 の培養液から *Rhodotorula* マンナンを分離・精製し、その構造が抗原多糖と同一であることを確認し、また、ELISA により解析から抗原多糖と同一の交差性を示すことを確認している。さらに、*Rhodotorula* マンナンが血清学的診断用抗原として実際に有効であることを確認するため、レプトスピラ症と確認されている患者抗血清に対する反応性を検討し、*Rhodotorula* マンナンがレプトスピラ症患者抗血清と特異的に反応することを確認している。

これらの研究成果を踏まえて、今後、低コストで大量に得ることが可能な *Rhodotorula* マンナンを利用することで、レプトスピラ症の簡便で安価な血清学的診断法の開発が期待でき、さらに、トキシイドなどのキャリアー分子にマンナンを結合させることで、ワクチンとして活用できると予測される。また、本 *Rhodotorula* マンナン標品はきわめて均質であり、より安定な、より安全性の高いワクチンの開発に直結する抗原多糖である。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（地球環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。