

(3)

氏名(国籍)	Jargalsaikhan Enkhtuya (モンゴル国)
学位の種類	博士(獣医)
学位記番号	獣医博甲第235号
学位授与年月日	平成19年9月14日
学位授与の要件	学位規則第3条第1項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	帯広畜産大学
学位論文題目	Study on Anthrax Vaccine Development by Inactivated Spores (不活化芽胞を利用した炭疽ワクチンの開発に関する研究)
審査委員	主査 帯広畜産大学 教授 牧野 壮一 副査 帯広畜産大学 教授 武士 甲一 副査 岩手大学 教授 津田 修治 副査 東京農工大学 教授 松田 浩珍 副査 岐阜大学 教授 福士 秀人

論文の内容の要旨

グラム陽性芽胞形成桿菌である炭疽菌は炭疽の原因菌である。芽胞は熱や乾燥などの外界のストレスに強い抵抗性を持ち、環境中に長期間生残する。炭疽菌は、芽胞として宿主内に入り、発芽を経て、増殖しながら体内に広がり、毒素を産生し炭疽を起こす。マクロファージ(Mφ)が発芽過程において重要な働きをするが、発芽と宿主防御との詳細な関係は不明である。炭疽菌の主な病原因子は、2種類の大プラスミド、pX01とpX02上にあり、前者は致死因子(LF)、浮腫因子(EF)および防御因子(PA)から成る毒素の産生に必須で、後者はγ-D glutamic acidの重合体である莢膜形成に必須である。PAは宿主細胞表層の受容体と結合し、この結合体を介してLFとEFが細胞質内に移入される。

自然界では、一般的には土壌中の芽胞が動物に感染して炭疽が発生する。ヒトは、感染動物や汚染組織などを介して稀に感染することがある。しかし、米国で2001年の炭疽テロ以降、炭疽菌芽胞の使用の可能性が増し、社会の脅威となり、炭疽の発症機構の解明や新たなワクチン開発が必要になってきた。

動物用には弱毒生ワクチンが使用されている。ヒト用には炭疽菌の培養上清からなるanthrax vaccine adsorbed(AVA)やanthrax vaccine precipitated(AVP)ワクチンが米国と英国で使用され、弱毒生ワクチンがロシアで使用され

ている。PA に対する抗体は、マウスで炭疽の発症を抑えるので、PA に対する抗体は PA の細胞への結合を抑制し、PA はワクチンに必須の成分であるといえる。しかし、PA 単独では完全なワクチン効果を示さないで、より有効なワクチン成分には PA 以外の菌体成分が必要であると考えられている。

そこで、申請者は炭疽の感染機構を明らかにし、ワクチン開発の手がかりを得るために、以下の研究を行った。

まず、芽胞の抗原が炭疽菌の感染防御に関係することを明らかにした。プラスミド非保有の非病原株由来炭疽菌芽胞をホルマリンで固定し、抗体を作成した。この抗芽胞抗体は炭疽菌の芽胞表層に結合するが、栄養型の炭疽菌体や *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis* とは結合せず、抗芽胞抗体をマウス体内に投与すると炭疽の発症を抑えた。さらに投与抗体量に比例して生存率の上昇が観察された。また、抗体と前培養した芽胞を、マウスに感染させると、抗体量に比例して感染力の低下が観察された。この際、感染マウスの脾臓と肝臓内菌数は、抗体で処理したマウスでは有意に低かった。さらに、抗芽胞抗体は、炭疽菌芽胞の J774.1 Mφ 内での発芽効率を抑えた。以上より、抗芽胞抗体の投与は食食作用を促進させ、Mφ による殺菌力を増強すると結論した。

上記に示したように、抗芽胞抗体による炭疽への受動免疫が成立したので、次に、プラスミドの脱落により病原性を喪失した炭疽菌芽胞の感染防御能の有無を調べた。パーコールにより精製した芽胞を 4%パラホルムアルデヒドで不活化し、マウスに皮下接種し、強毒株の芽胞を腹腔内に感染させ、生存率を調べた。免疫したマウスは非免疫マウスに比べ長く生き残り、免疫した芽胞数に依存して生存率が上昇した。さらに、不活化芽胞の免疫の際に組換え PA を同時に接種すると、生存率は上昇した。

最後に、受動防御能を示す抗芽胞抗体が Western blotting 法で反応する約 25 および 250 キロダルトン (kDa) の 2 種類の抗原について、これらの分子量から推定される産物、BclA (*Bacillus*, collagen-like protein of *anthracis*, 約 250 kDa) と LPXTG (Leu-Pro-X-Thr-Gly 配列を保有する菌体表層蛋白、約 25 kDa) に焦点をあて、組換え蛋白の作成を試みた。BclA の配列から推定される分子量は約 39 kDa であり、炭疽菌内では集合体となり分子量 250 kDa 以上として検出される。LPXTG 蛋白は細胞膜上のアンカー蛋白として働き、グラム陽性菌の毒力に関与していると報告されている。炭疽菌の全ゲノム配列から 14 種類の LPXTG 蛋白が見出される。AVA ワクチンで免疫されたヒトの血清は、PA 以外に数種類の芽胞関連蛋白と反応し、そのうちの 2 種類は LPXTG 蛋白であった。その一つの分子量は約 25 kDa であった。上記 2 種類の組換え蛋白に対する抗体を作成した。BclA に対する抗体は炭疽菌芽胞表層に特異的に結合したが、LPXTG に対する抗体は結合しなかった。また、BclA の組換え蛋白は抗芽胞抗体により認識されたが、LPXTG 組換え蛋白は認識されなかった。以上の結果から、BclA 蛋白は、抗芽胞抗体の受動免疫能に関与していると考えられる。BclA 以外の抗原の関与も調べる必要がある。

以上より、炭疽のワクチン候補として芽胞の表層蛋白が有効であると考えられた。炭疽菌の PA などの主要な防御因子と共に、芽胞表層抗原を用いることで炭疽の発症を抑える安全で有効なワクチン開発が期待できる。

審 査 結 果 の 要 旨

申請者の研究は、細菌性人獣共通感染症の中で最も毒性の強い急性感染症である炭疽の感染機構を明らかにし、ワクチン開発の手がかりを得ようとするものである。申請者は、炭疽の原因菌である *Bacillus anthracis* が、芽胞として体内に侵入後、マクロファージ内で発芽する初期感染過程に着目し、芽胞に特異的な抗体と芽胞を同時にマウスに投与することにより、投与量に比例して生存率の上昇が観察され、炭疽の発症が抑えられることを明らかにした。同様に、芽胞を抗体と前培養した後、マウスに感染させると、感染力の低下が観察された。この際、感染マウスの脾臓と肝臓内菌数は、抗体で処理したマウスでは有意に低く、さらに、抗芽胞抗体はマクロファージ内での発芽効率を抑え、抗芽胞抗体投与は貪食作用を促進させ、マクロファージによる殺菌力を増強することを明らかにした。以上より、抗芽胞抗体による炭疽への受動免疫が成立することを証明した。次に、プラスミドが脱落し、病原性が喪失した炭疽菌の芽胞が感染防御能を有するかを調べ、芽胞で免疫されたマウスは非免疫マウスに比べ、野性株で攻撃後、長く生き延び、免疫した芽胞数に依存して生存率が上昇し、その際に組換え防御抗原を同時に接種すると、生存率がさらに上昇することを明らかにした。この受動防御能を示す抗芽胞抗体は、約 25 および 250 キロダルトンの 2 種類の芽胞上の抗原と反応するので、この分子量から推定される産物、BclA (*Bacillus*, collagen-like protein of *anthracis*)と LPXTG (Leu-Pro-X-Thr-Gly 配列を保有する菌体表層蛋白)に焦点をあて、組換え蛋白を作成し、抗体を作成した。BclA に対する抗体は炭疽菌芽胞表層に特異的に結合したが、LPXTG に対する抗体は結合しなかった。また、BclA の組換え蛋白は抗芽胞抗体により認識されたが、LPXTG 組換え蛋白は認識されなかった。以上の結果から、BclA 蛋白は、抗芽胞抗体の受動免疫能に関与していると考えられる。以上の内容は、炭疽菌の感染経路を明らかにする手がかりとなると共に、予防法の新たな開発の可能性を示すものであり、学術的に重要な知見を提示したといえる。更に、その成果を評価の高い海外の雑誌に発表し、研究者としての素質ならびに熱意は十分学位を与えるだけの価値があると全員一致で判断した。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分な価値があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Significant passive protective effect against anthrax by antibody to *Bacillus anthracis* inactivated spores that lack two virulence plasmids

著者名 : Enkhtuya, J., Kawamoto, K., Kobayashi, Y., Uchida, I., Rana, N. and Makino, S-I.

学術雑誌名 : Microbiology

巻・号・頁・発行年 : 152(10) : 3103-3110, 2006

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Epidemiological and serological survey of Brucellosis in Mongolia by ELISA using sarcosine
extracts

著者名 : Erdenebaatar, J., Bayarsaikhan, B., Yondondorj, A., Watarai M., Shirahata T.,
Jargalsaikhan, E., Kawamoto, K. and Makino, S-I.

学術雑誌名 : Microbiology and Immunology

巻・号・頁・発行年 : 48(8) : 571-577, 2004