

博士（薬学）

腸炎ビブリオ O 抗原リポ多糖（LPS）の化学的および血清学的性状に関する研究

橋井 則貴

腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*) は 1950 年に大阪市南部で死者 20 名を含む総患者数 272 名を出した、いわゆる「シラス食中毒事件」の原因菌として発見された食中毒原因菌である。腸炎ビブリオは現在 13 種の血清型（O 抗原型）に分類されているが、これらの血清型を決定する因子は、細胞壁外膜に局在する O 抗原リポ多糖 (lipopolysaccharides : LPS) である。腸炎ビブリオでは 13 種の血清型のうち、その糖鎖の構造が解明されているのは O12 LPS のみで、その他の血清型 LPS の糖鎖および血清学的特異性に関与するエピトープの構造は未だに不明である。

一方、食中毒患者および原因食品から分離される腸炎ビブリオ菌株の中には、血清型別が困難な O-untypeable (OUT) 菌株がしばしば存在し、感染防止対策に大きな障害をもたらしている。従って、腸炎ビブリオ LPS の血清学的特異性に関与するエピトープを含む糖鎖の構造解析は、各血清型に特異的な人工抗原の開発、およびそれをを用いたより迅速且つ正確な血清学的診断につながることから臨床的および公衆衛生学的に有用性が高いと考えられる。

これらの状況をふまえ、本研究ではこれまでに分離された OUT 菌株の血清型別と腸炎ビブリオ LPS の糖鎖の構造解析を目的として以下 1~5 章に述べる研究を行なった。

第 1 章 腸炎ビブリオ OUT 菌株の LPS の化学的・血清学的性状

腸炎ビブリオの 13 種の血清型 LPS はその多糖部の糖組成に基づき 10 種の化学型に分類される。本研究では先づ、OUT 菌株として分離された 7 種の LPS の化学型を検討した結果、いずれも既知の化学型に分類された。

次にこれら OUT 菌株の血清型型別を、LPS を感作抗原として用いる受身溶血 (PH) 試験によって試みた。その結果、7 種類の OUT 菌株の中で 4 種類の OUT 菌株は既知血清型に属することを示した。一方、残りの 3 菌株のうち、AK-33473 の LPS は O5 と O8 に共通する抗原因子をもつものの、本菌株 LPS に特異的な抗原因子をもつことが示された。また他の 2 菌株 (90A-6611 と KX-V212) の LPS はいずれも既知血清型とは異なる特異抗原因子をもち、さらに両菌株の抗原因子は一致することが示された。以上の結果、患者由来の腸炎ビブリオ OUT 菌株の中には、従来知られていない新血清型に属する菌株が存在することが明らかにされた。

第 2 章 腸炎ビブリオ O2 および KX-V212 菌株 LPS の構成成分として見出された未同定物質の同定

O2 および KX-V212 LPS には弱酸加水分解によって遊離される、Folin 反応陽性物質 (O2-FP)

が存在することが明らかとなった。これらの物質は腸炎ビブリオの他の血清型 LPS からは見出されず、従って両 LPS の血清学的特異性を発現するエピトープに強く関与していると考えられる。そこで本章では両 LPS から分離、精製した FP の同定を試みた。

O2 および KX-V212 LPS から分離、精製した FP を NMR および GC-MS によって解析した結果、O2-FP は 5,7-di-(*N,N*-di-acetyl)-amino-3,5,7,9-tetradecoxy-D-*glycer*-D-*galact*-non-2-ulosonic acid (O2 NonIA) であり、OUT-FP は 5-(*N*-acetyl)- amino-7-[*N*(*N*-acetyl)-D-alanyl]-amino-3,5,7,9-tetradecoxy-D-*glycer*-D-*galact*-non-2-ulosonic acid (OUT NonIA)であることを明らかにした。LPS 構成糖としてアミノ酸結合型の NonIA が発見されたのは本研究が初めてである。

第3章 腸炎ビブリオ O2 LPS 多糖鎖の構造解析

腸炎ビブリオでは、O12 以外の血清型 LPS の多糖鎖の構造は未だ不明である。本章では腸炎ビブリオの全血清型 LPS についてその多糖鎖の構造を解明するための一環として O2 LPS 多糖鎖の構造解析を FAB-MS、MALDI-TOF MS、NMR およびメチル化分析によって行なった。その結果、O2 LPS 多糖鎖 1 mol の glucose (Glc)、galactose (Gal)、glucuronic acid (GlcA)、L-*glycer*-D-*manno*-heptose (L,D-Hep)、D-*glycer*-D-*manno* heptose、3-deoxy-D-*manno*-octo-2-ulosonic acid (Kdo)、O2 NonIA、および 2 mol の glucosamine (GlcN) の 8 種 9 個の糖で構成される糖鎖であり、その全構造が解明された。また O2 LPS 多糖鎖の特異的な構成成分である O2 NonIA は非還元末端糖として Glc の 6 位に結合していることも示された。

第4章 腸炎ビブリオ OUT 菌株 KX-V212 LPS 多糖鎖の構造解析

次に、本研究において新血清型であることが明らかにされた KX-V212 LPS についても同様にその多糖鎖の構造解析を行なった。KX-V212 LPS は O2 と血清学的に共通抗原性を持ち、また両 LPS には NonIA が構成糖として含まれる。その結果、本菌株の LPS 多糖鎖 1 mol の Glc、Gal、Kdo、OUT NonIA、2 mol の GlcA、L,D-Hep、GlcN の 7 種 10 個の糖で構成される糖鎖であり、その全構造が明らかにされた。KX-V212 LPS 多糖鎖においても、その特異的な構成成分である OUT NonIA は非還元末端糖として L,D-Hep の 3 位に結合していることが示された。本 LPS 多糖鎖は O2 LPS の多糖鎖と比較すると、非還元末端部に共通した部分構造を持ち、この構造類似性が両菌株の共通抗原性に関与するものと考えられる。一方で、O2 と KX-V212 の両 LPS 多糖鎖はそれぞれに特有の構造を持ち、この構造の相違が両 LPS の血清学的特異性に反映されるものと考えられる。

第5章 ELISA 阻止試験による O2 LP の血清学的特異性を示すエピトープの解明

O2KX-V212 の LPS の血清学的特異性に関与するエピトープの構造を解明する目的で、固定化抗原に LPS を用いる ELISA 阻止試験を行なった。その結果、O2 LPS 多糖鎖に非還元末端として存在する O2 NonIA は、O2 LPS の血清学的特異性を発現する主要エピトープの 1 つであることが強く示

唆された。一方、KX-V212 においては、その LPS の非還元末端として存在する OUT Non1A はそれ自身では主要エピトープとはならず、本菌株の血清学的特異性の発現には O2LPS におけるそれよりも、より複雑な構造が関与すると思われる。

結論

- 1) 分離当初 OUT とされた 7 種の菌株の中で 4 種類の菌株については、O 抗原因子そのものである LPS を用いる血清反応により、明瞭に型別することが可能であった。また 90A-6611 および KX-V212 菌株はこれまでに報告されていない新血清型であることが示された。
- 2) 腸炎ビブリオ O2 および OUT KX-V212 LPS 多糖鎖の全構造を明らかにするとともに、両菌株の LPS には他の既知血清型 LPS には見出されていない Non1A 存在することが示された。
- 3) O2 LPS において O2 Non1A はそれ単独で血清学的特異性を発現し得る主要なエピトープである。