

氏名（本籍）	<small>くろね ゆういちろう</small> 畔蒜 祐一郎（東京都）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	博第 281 号
学位授与の日付	平成 30 年 3 月 14 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	<i>Aspergillus</i> 症の早期診断ならびに薬物治療への細胞壁多糖成分の関与
論文審査委員	（主査） 教授 大野 尚仁 教授 平野 俊彦 教授 下枝 貞彦

論文内容の要旨

化学療法や移植など高度先端医療の進歩は、悪性疾患における予後の改善をもたらしたが同時に、immunocompromised host を増加させている。これらの患者は、病原性が低いか、あるいは病原性がないと考えられている微生物による日和見感染が起きる可能性が高く、臨床的に重大な問題となっている。日和見感染症のなかでも真菌が原因微生物である深在性真菌症は増加の一途を辿っており、直接死因に結びつくことも少なくない。わが国で経験される主な深在性真菌症は *Aspergillus* 症、*Candida* 症である。感染臓器としては肺感染が半分以上を占め、その原因真菌は *Aspergillus* が 70%以上を占める。

深在性真菌症の確定診断には時間を要することが多く、結果的に抗菌薬による治療効果が乏しくなることから、迅速な診断に伴う早期からの積極的な薬物療法が不可欠である。わが国で開発されたカプトガニの血球成分、factor G (β -1,3-glucan 感受性因子) を利用したリムルス G テスト (limulus G test) は、菌体外に放出される抗原として β -glucan を検出し、血清学的診断基準のひとつとして広く普及し、保険適応されている。

化学療法、移植医療等による免疫抑制下における易感染患者においては、真菌、細菌、ウイルスによる感染症や複合的な感染を起こすことがあり、重篤な転機を辿ることが少なくない。また、抗菌薬に対する耐性や医薬品の併用による相互作用やそれに付随する様々な影響も臨床上的大きな問題となっており、医薬品の適正な使用が求められている。また、血液内科領域においては化学療法、移植医療が日常的に施行されていることから、感染症が大きな脅威となっており、予防投与も積極的に行われている。特に、抗ウイルス薬は高頻度に用いられていること

から、宿主の感染免疫システムに対して様々な影響を及ぼしている可能性がある。

本研究では、このように複雑化している感染症の背景を踏まえ、病原真菌 *Aspergillus* から菌体外に放出される可溶性抗原を調製し、その早期診断への応用の可能性について検討した (第 1 章)。また、抗微生物薬ならびに培地成分の *Aspergillus* 菌体の構造や薬剤感受性への影響を検討し、薬物療法の宿主感染免疫能に及ぼす影響について解析した (第 2 章)。

【第 1 章】 *Aspergillus* 培養上清可溶性多糖画分の早期診断への応用と宿主機能への影響

第 1 節 *Aspergillus* 培養上清可溶性多糖成分 (ASWS) の調製と早期診断への応用

limulus G test は Aspergillosis 患者の早期診断に汎用されている。Factor G は β -1,3-glucan によって活性化されることから、Aspergillosis 患者血中には細胞壁由来の β -1,3-glucan が放出されるものと推定されているが構造の詳細は不明である。そこで *Aspergillus* spp. を完全合成培地 (C-limiting medium) を用いて培養し、*Aspergillus* 培養上清可溶性多糖画分 (ASWS) を調製し解析に用いた。

A. fumigatus NBRC 30870, 4400, *A. niger* NBRC 6342 ならびに *A. oryzae* NBRC 30103 の 4 株から ASWS を調製したところ、ほぼ同様の収率で得られた。NBRC 30870 由来の ASWS の ^1H , ^{13}C -HSQC NMR を測定したところ、 α -1,3-glucan, β -1,3-glucan, galactomannan に帰属されるシグナルが検出されたことから、これらの多糖成分を含有することが示唆された。また、ASWS 中の β -1,3-glucan は limulus G test に反応し、その濃度は *Candida* の 1/10 程度の濃度であった (Fig. 1)。

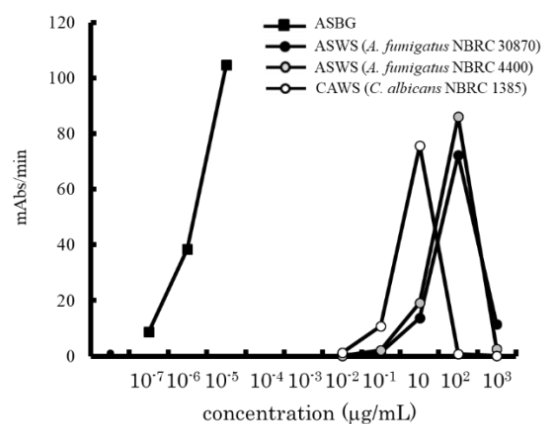


Fig. 1. Limulus activity of ASWS derived from *Aspergillus fumigatus*

第 2 節 *Aspergillus* 培養上清可溶性多糖成分 (ASWS) の抗原性

宿主免疫系と *Aspergillus* 菌体外放出抗原である ASWS との相互作用を検討するために、ASWS 固相化 ELISA 法により、ヒト血清中の抗 ASWS 抗体価を測定した。ヒト免疫グロブリン製剤ポリグロビン N を用いて抗 ASWS 抗体価を測定したところ、固相への吸着量は濃度依存的に上昇したことから、ヒト血清中に抗 ASWS 抗体が存在することが示唆された (Fig. 2)。次に、可溶性抗原として ASWS, ASBG, LPS を用い抗 ASWS 抗体の競合 ELISA を行ったところ、ASWS 添加により、吸光度は著しく低下し、ASBG では低下傾向を示した。これらの結果より、ASWS 中の β -1,3-glucan, α -1,3-glucan, galactomannan 等の多種の成分に対する抗体がヒト

血清中に存在することが示唆された。

第 3 節 *Aspergillus* 培養上清可溶性多糖成分 (ASWS) の血中からの消失速度の検討

ASWS は感染患者血中に放出される抗原と考えられることから, DBA/2 マウスに ASWS を i.v. 投与し, limulus G test を用いて血中からの消失速度を測定した. その結果, 消失半減期は約 15 分であり, 速やかに血中から除去されることが明らかとなった.

これらのことから, ASWS は *Aspergillus* 症において, 血中から見出される limulus G test 陽性物質の物性と活性の一端を担っている成分であることが強く示唆された.

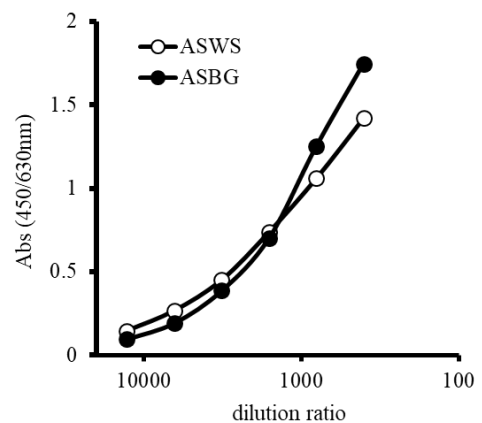


Fig. 2. Anti-ASWS antibody titer in human sera

【第 2 章】*Aspergillus* 症の薬物治療への細胞壁構成多糖成分の関与

細胞壁は, 微生物の構造維持ならびに生存に極めて重要な構成要素であることから, 抗菌薬のターゲットの一つとされている. *Aspergillus* は無性世代において, 孢子, 分生子, ならびに菌糸を作ることから細胞壁の構築は複雑である. 菌糸の細胞壁構成多糖は chitin, α -1,3-glucan ならびに β -1,3-glucan から主に構成されており, 分岐しながら増殖することから, 各成分の発現は巧みに制御されている. 本章では, 細胞壁の構築ならびに成分に影響を与える培養環境ならびに抗菌薬の影響について検討した.

第 1 節 *Aspergillus* 菌糸成長に及ぼす細胞壁構成多糖添加培養の影響

細胞壁は剛体であるが, 成長するために合成と分解を繰り返しながら増殖する. そこで, 構成多糖を培地中に添加し, 増殖に影響を与えるか否かを検討した. 培地は C-limiting medium を用い, β -1,3-glucan として curdlan または laminarin を添加し, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. oryzae* の増殖速度の変化について検討した. その結果, curdlan または laminarin の添加により, 菌体の増殖速度の促進が認められた (Fig. 3).

これらのことから, 培地中の多糖成分, 特に β -1,3-glucan は細胞壁の構築に著しく影響することが明らかとなった.

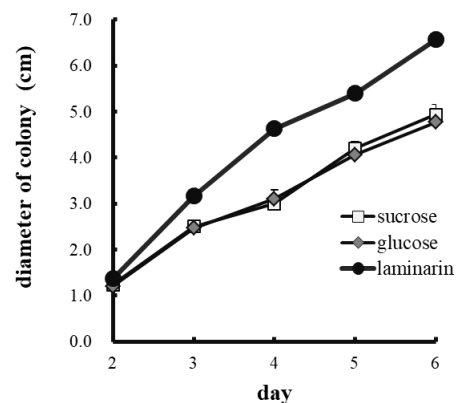


Fig. 3. Colonies of *A. fumigatus* in the presence of β -glucan on agar plate

第2節 *Aspergillus* の病原性に及ぼす抗微生物薬の影響

深在性真菌症は、がん患者等の易感染患者に対して発症することが多い。そのような状況においては複合感染も稀ではなく、抗ウイルス薬と抗真菌薬が同時に投与される場合がある。薬物相互作用は様々なケースで起きていることから、抗ウイルス薬と抗真菌薬の相互作用について検討することとした。

培地は C-limiting medium を用い、抗ウイルス薬存下に、*Aspergillus* を培養し、形態変化を検討した。その結果、抗ウイルス薬存下において菌体の増殖促進が認められた。次に、抗ウイルス薬を添加して培養した *A. fumigatus* に抗真菌薬を添加し、菌体の成長、薬剤感受性について解析したところ、感受性が低下した。

次にこれらの菌体に対するマクロファージ応答の違いをマウス腹腔滲出細胞を用いて検討したところ、処理菌体の活性酸素種産生能が向上した。

これらのことから、抗ウイルス薬添加培養によって、*Aspergillus* 菌体の細胞壁構成、形態に影響を与え、それらが白血球の活性化能に影響し、炎症応答の違いを生じる可能性があることが示唆された。

【総括】

Aspergillus 菌体外に放出される limulus G test 陽性抗原である ASWS は α -1,3-glucan, β -1,3-glucan, ならびに galactomannan を主構成多糖とすることを明らかにした。さらに、ヒト血清中には ASWS に対する特異抗体が含まれ、抗原性は β -1,3-glucan 部分のみならず他の多糖成分も関与していることが示唆された。また、マウスモデルを用い ASWS は血中から速やかに消失することが明らかとなった。これらのことから、ASWS は宿主免疫系に対して作用する病原関連分子 (PAMPs) としての機能を備えていると考えられ、*Aspergillus* による深在性真菌症に対する診断、治療を行う上で有力な因子になりうる可能性がある。

Aspergillus の培養時に抗ウイルス薬を共存させると、菌体の増殖が促進し、ASWS の産生量が高まった。さらに、共存下に得られた菌体においてはマクロファージの活性酸素産生能が上昇した。また、抗ウイルス薬を共存させると、抗真菌薬に対する感受性が低下することを見出した。

高度医療の進歩に伴い感染症も複雑化している。生体内における複数の医薬品同士の相互作用は臨床において非常に重要な問題であるが、本研究によって、複数の抗微生物薬が病原真菌 *Aspergillus* を介した相互作用を示した。これらのことは、臨床において、より安全で適切な医療を提供するうえで新たな重要な点であると考えられる。

【研究結果の掲載誌】

Med Mycol J, **58**, E121-E129 (2017)

論文審査の結果の要旨

易感染患者においては、真菌、細菌、ウイルスによる感染症が単独あるいは複合的に起きることがあり、重篤な転機を辿ることが少なくない。また、抗菌薬に対する耐性や医薬品の併用による相互作用は臨床上的大きな課題となっている。血液内科領域においては化学療法、移植医療が日常的に施行されており易感染患者が多いことから感染症が大きな脅威となっており、予防投与も積極的に行われている。特に、抗ウイルス薬は高頻度に用いられていることから、宿主の感染免疫システムに対して様々な影響を及ぼしている可能性がある。

本研究では、このように複雑化している感染症の背景を踏まえ、病原真菌 *Aspergillus* から菌体外に放出される可溶性抗原を調製し、その早期診断への応用の可能性について検討した（第 1 章）。また、抗微生物薬ならびに培地成分の *Aspergillus* 菌体の構造や薬剤感受性への影響を検討し、薬物療法の宿主感染免疫能に及ぼす影響について解析した（第 2 章）。

第一章「*Aspergillus* 培養上清可溶性多糖画分の早期診断への応用と宿主機能への影響」では、数種の *Aspergillus* spp. を完全合成培地（C-limiting medium）を用いて培養し、培養上清可溶性多糖画分（ASWS）を調製した。ASWS(NBRC 30870 由来)の成分分析を行ったところ、 α -1,3-glucan, β -1,3-glucan, galactomannan を含む複合多糖であることが示唆された。早期診断に汎用されている limulus G test に対する相対活性は *Candida* 由来の菌対外多糖画分 CAWS の 1/10 程度であった。ヒト血清を用いて特異抗体の有無について検討したところ、 β グルカン部分のみならず、複数の抗原物質を含むことが示唆された。さらに、DBA/2 マウスに ASWS を i.v. 投与し、血中からの消失速度を測定したところ、消失半減期は約 15 分であり、 β グルカンよりも速やかに血中から除去されることが明らかとなった。これらのことから、ASWS は *Aspergillus* 症の患者血中から見出される limulus G test 陽性物質の物性と活性の一端を担っている成分であることが示唆された。また、ASWS の解析を進めることで、早期診断の精度がさらに高まる可能性のある事を示唆した。

第 2 章「*Aspergillus* 症の薬物治療への細胞壁多糖成分の関与」では、環境中の様々な分子が、ストレス分子として菌の増殖ならびに機能性に与える影響について検討した。まず、培地中に細胞壁成分である β -1,3-glucan を添加し、*A. fumigatus*, *A. niger*, *A. oryzae* を培養したところ、増殖が促進した。次に、がん患者等の易感染患者に対してウイルス感染予防の為に用いられるアシクロビルを添加したところ、増殖が促進した。さらに、菌体外に放出された β -1,3-glucan 量は増加した。また、アシクロビルを添加して培養した *A. fumigatus* の、抗真菌薬感受性について検討したところ、ミカファンギンに対する感受性が低下した。また、アシクロビル添加、非添加培養菌体に対するマクロファージ応答の違いをマウス腹腔滲出細胞を用いて比較検討したところ、添加培養菌体が高い活性酸素種産生能を示した。これらのことから、アシクロビルは *Aspergillus* 菌体の細胞壁構成、形態に影響を与え、白血球の活性化能に影響し、炎症応答に違いを生じる可能性のあることが示唆された。

以上本研究では、*Aspergillus* 菌体外に放出される limulus G test 陽性抗原である ASWS について構造と活性の観点から解析し、早期診断の標的分子となりうることを示唆した。また、アシクロビルは *Aspergillus* の増殖を促進するとともに、ミカファンジンに対する感受性低下させることを明らかにした。

本研究内容は、病原性真菌の早期診断と薬物治療における新たな知見を含んでおり、博士(薬学)の学位論文として相応しい価値あるものと判断する。