論文内容要旨

東京大学大学院
応用動物科学専攻
平成１０年度博士課程進学
西川義文
指導教官　大塚治城

ネオスポラ原虫感染症の発症予防と診断法の分子免疫学的開発研究

Neospora caninum（*N. caninum*）は１９８８年に発見された細胞内寄生性原虫で、それ以前は *Toxoplasma gondii*（*T. gondii*）と誤診されていた。近年、*N. caninum* の感染例が世界各地で報告され、獣医学領域で非常に問題視されている。*N. caninum* 感染は家畜及び愛玩動物において神経麻痺や死を引き起こす。牛における流産、死産、神経疾患の主な原因の一つとして *N. caninum* の感染が挙げられ、畜産関係者にとっては経済的に大きな問題となっている。中間宿主が終宿主の犬から排出された oocysts の感染をうけることで、*N. caninum* の生活環が成立する。このため、*N. caninum* 感染に対するワクチン及び診断法の開発が急務とされる。それらの開発にあたり、*N. caninum* 感染による宿主の免疫応答を理解することが重要となる。本研究は *N. caninum* 感染に対する宿主免疫応答の解明、ワクチン開発、診断法の確立を目的とし、４章より構成される。

（１）*N. caninum* 感染に対する宿主免疫応答の解明（第 1 章）

病原体感染に対する宿主の防御免疫機構にはサイトカインの働きが重要であ

る。そのなかでもインターフェロン（IFN）の作用が注目されている。IFN が *N. caninum* 感染に及ぼす影響を *in vitro* と *in vivo* で解析した。

３種類の IFN (IFN-α, -β, -γ)をクローニングし、*in vitro* で宿主細胞内の *N. caninum* の増殖に与える IFN の影響を調べた。すべての IFN で虫体の増殖を抑制し、その中でも特に IFN-γはその活性が高かった。この IFN の作用は宿主細胞側の増殖力の低下に関係していることが判明し、その機構の解明に注目した。

IFN-γにより増殖力が低下した宿主細胞において核の断片化がみられ、アポトーシスの誘導が確認された。アポトーシスを誘導する割合は、作用させる IFN-γと *N. caninum* の量に依存した。アポトーシスが誘導される宿主細胞では、カスパーゼ３と８が活性化され、さらに Fas と FasL の発現の増加がみられた。アポトーシスに対して抵抗性の *Toxoplasma gondii*（*T. gondii*）との比較試験により、今回の系でのアポトーシスの誘導には FasL の発現が重要であることが明かとなった。また、アポトーシス誘導下では *N. caninum* の増殖が抑制されたことからも、IFN-γは宿主細胞レベルで *N. caninum* の増殖を制御していることが示唆された。

N. caninum 感染における IFN-γの *in vivo* での重要性を調べるために、IFN-γ遺伝子欠損マウス（IFN-γ欠損マウス）の免疫応答を解析した。*N. caninum* の急性感染に対し BALB/c マウスは抵抗性であるが、IFN-γKO マウスは感受性であった。 *N. caninum* は IFN-γ欠損マウスの全身に感染する一方で、BALB/c マウスでは全身に感染した後に脳に侵入することが判明した。IFN-γを *N. caninnum* 感染 IFN-γ欠損マウスに投与すると、生存期間の延長がみられた。IFN-γで刺激することで、両マウスの腹腔内マクロファージは原虫殺滅効果と一酸化窒素の産生量を増加させた。*N. caninum* 感染後、BALB/c マウスに比べ、IFN-γ欠損マウス由来腹腔内マクロファージにおける MHC クラス II の発現量は低いものの、その発現は IFN-γ投与により増加させることができた。さらに IFN-γ欠損マウスでは感染防御に対し T 細胞を十分に活性化できなかった。血清中のサイトカイン産生で、BALB/c マウスでは IFN-γ、インターロイキン（IL）-12 遅れて IL-4 が産生したが、IFN-γ欠損マウスでは IL-10 の産生がみられた。これらのことより *N. caninum* の急性感染に対する防御免疫応答には、IFN-γ依存性の MHC クラス II 発現の誘導と T 細胞の活性化が重要であることが示された。

（2）ウイルスベクターを用いたワクチン開発（第２章）

組換えワクチンの開発にあたり、その抗原の選定が重要となる。その候補となる抗原を同定するために、*N.caninum* を認識するモノクローナル抗体（mAb）を作製した。作製した mAb のうち、虫体の表面タンパクである NcSRS2 あるいは NcSAG1 を認識する抗体は、虫体の細胞侵入を阻害した。このことから、これらタンパクは *N. caninum* の細胞侵入に関与することが明かとなった。

前述の結果を基に、*N. caninum* 感染に対するワクチンを開発するため、NcSRS2 あるいは NcSAG1 を発現する組換えワクシニアウイルスを作製した。これら組換えタンパクは *N. caninum* 由来のタンパクと類似した構造を維持し、遺伝子挿入によるウイルス力価の減少もみられなかった。

これら組換えウイルスの *N. caninum* に対するワクチン効果を評価するために、マウスモデル系を用い PCR 法により虫体の感染を調べた。組換えウイルスを接種したマウスにおいて、*N. caninum* の感染から防御される結果が得られた。しかしながら、感染後期（感染後２６日）においては、NcSAG1 接種群において虫体の存在が確認された。次に、これら組換えウイルス接種が誘導する免疫反応を解析した。組換えウイルスを接種したマウスの脾臓細胞は *N. caninum* の抗原刺激に反応し、IFN-γを産生した。NcSAG1 接種に比べ、NcSRS2 接種は虫体特異的な IgG1 抗体を優位に産生し、抗 NcSRS2 mAb は *in vivo* においても感染初期の虫体の脳への侵入を阻止した。しかしながら、NcSRS2 接種マウスの T 細胞を枯渇させた場合、ワクチン効果はみられなかった。この結果、虫体感染の初期には補体依存性の IgG1 抗体の働き、感染後期には IFN-γ産生に関与する T 細胞の働きが重要であることが示された。

N. caninum の重要な感染経路の一つとして垂直感染が挙げられる。組換えワクシニアウイルスが *N. caninum* の垂直感染を阻止しうるかをマウスモデル系を用いて検討した。NcSRS2 接種群では新生マウスの数に減少はみられず、その死亡率、*N. caninum* 感染率も極めて低い成績が得られた。一方、NcSAG1 接種では十分な防御効果は得られなかった。前述の結果も考慮すると、NcSRS2 は *N. caninum* 感染に対するワクチン開発として有用な抗原であることが明かとなった。ワクシニアウイルスは広範囲の宿主域を持つので、牛、犬を含めたさまざまな自然宿主への応用が期待される。

N. caninum の終宿主である犬のみを標的にしたワクチンを開発するために、イヌヘルペスウイルス（CHV）をベクターとして NcSRS2 の犬での発現を試みた。組換え CHV で免疫した犬からは *N. caninum* 特異的な IgG 抗体が産生され

た。また、ウイルス接種した犬は臨床症状を示すことはなく、感染性ウイルスを排出することもなかった。この結果より、組換え CHV ベクターは犬におけるネオスポーラ症のワクチンの開発につながることを示唆する。

3）診断法の確立（第3章）

N. caninum 感染の血清診断法として、間接抗体蛍光法（IFAT）、ELISA、抗体凝集検査が報告されている。しかしながら、虫体のホモジネートを抗原として使用する場合、他の原虫（*T. gondii*）との交差反応とその生産性が問題となる。そこで、*T. gondii* と交差反応のみられない NcSRS2 をバキュロウイルス発現系を用いて解析し、新しい診断系の開発を試みた。組換え NcSRS2 はウイルス感染細胞の膜に発現し、その成熟タンパクは培養上清に分泌した。分泌型タンパクを用いた ELISA 系で野外牛血清サンプルから *N. caninum* 陽性血清を検出することができた。組換え NcSRS2 を用いた ELISA は抗原の生産性及び特異性の点から *N. caninum* の血清診断に有用であると思われる。

4）ウイルスベクターの改良（第4章）

ウイルスベクターをワクチンとして使用する場合、その安全性が問題となる。イヌ IFN-β、-γを導入した組換えワクシニアウイルスを作製し、性状解析を行ったところ、組換えウイルスは発現した IFN の活性により、その増殖が抑制された。IFN 遺伝子の導入とその発現を調整することで、ウイルスベクターの安全性を高められることが示唆される。

以上の結果は *N. caninum* だけでなく他の原虫の研究に有用な知見を与えると思われ、今後更なる発展が期待される。