

# 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 西 川 義 文

*Neospora caninum* (*N.caninum*) は1988年に発見された細胞内寄生性原虫で、近年、その感染例が世界各地で報告されている。*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。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ている。

*N. caninum*感染に対する宿主免疫応答を解明するため、IFNの効果をも *in vitro* と *in vivo* で解析した。イヌIFN- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ はすべて *in vitro* で虫体の増殖を抑制し、その中でも特にIFN- $\gamma$ はその活性が高かった。マウスの細胞を用いてその機構の解明に注目した。IFN- $\gamma$ 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。アポトーシス誘導下では*N. caninum*の増殖が抑制されたことから、IFN- $\gamma$ 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。次にIFN- $\gamma$ 遺伝子欠損マウス (IFN- $\gamma$ 欠損マウス) を用いて、*N. caninum*感染におけるIFN- $\gamma$ の *in vivo* での重要性を調べた。*N. caninum*の急性感染に対しBALB/cマウスは抵抗性であるが、IFN- $\gamma$  KOマウスは感受性であった。IFN- $\gamma$ を*N. caninum*感染IFN- $\gamma$ 欠損マウスに投与すると、生存期間の延長がみられた。IFN- $\gamma$ 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。虫体感染に対し、IFN- $\gamma$ は腹腔内マクロファージにおけるMHCクラスIIの発現量を誘導し、T細胞を活性化させた。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- $\gamma$ 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。

*N. caninum*感染に対するワクチンを開発するため、その表面タンパク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。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、感染後期においては、NcSAG1接種群において虫体の存在が確認された。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- $\gamma$ 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、補体存在下で虫体を中和した。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- $\gamma$ 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。さらに、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。この結果は、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。

バキュロウイルス発現系を用いて *N. caninum*感染の新たな血清診断法の確立を試みた。C末端疎水領域を欠損させた組換え NcSRS2 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。

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られ、今後更なる発展が期待される。

よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値のあるものと認めた。