

論文の内容の要旨

応用動物科学 専攻

平成 11 年度博士課程入学

氏 名 三條場 千寿

指導教官名 松本 芳嗣

論文題目 : Studies on amastigotes of the *Leishmania* parasites

(リーシュマニア原虫無鞭毛型に関する研究)

リーシュマニア症は熱帯から温帯地方にかけて広く世界的に分布し、イヌ科動物およびげっ歯類を主な保虫宿主とする重要な人獣共通感染症である。患者は多くの場合小児であり、起因原虫の種類により皮膚型、皮膚粘膜型、あるいは内臓型など多彩な病態を呈する。現在、リーシュマニア症に対する有効なワクチンは知られていない。唯一、中央アジアのウズベキスタン共和国において慣習的にリーシュマニア原虫の生ワクチン接種が行われているが、本ワクチンの性状ならびに有用性については議論の多いところである。本症の病原体である *Leishmania* 属原虫は、媒介昆虫であるサシチョウバエ中腸内では有鞭毛型のプロマスティゴート (promastigote; PRO) として増殖するのに対し、ヒトを含む脊椎動物宿主では無鞭毛型のアマスティゴート (amastigote; AMA) としてマクロファージ内で分裂増殖する。PRO は *in vitro* での培養が容易にできるが、AMA の *in vitro* 培養は限られた分離株で報告されているに過ぎない。それ故これまでのリーシュマニア原虫構成分子の解析は PRO を用いており、AMA 特異的発現分子に関する解析は殆どなされていない。しかしながら、リーシュ

マニア原虫はヒトを含む脊椎動物宿主内においては AMA で分裂増殖し、それら宿主における多彩な病態も AMA に起因するものであり、宿主免疫反応も AMA 発現分子に対するものと考えられる。したがって、リーシュマニア症に対する免疫学的診断、治療、あるいは予防法を開発する上で、AMA 発現分子がその標的となるべきである。

本研究では、リーシュマニア症の中でも最も分布域が広い旧大陸皮膚型リーシュマニア症に着目し、その起因原虫のヒトおよび動物の自然感染および実験動物感染における病態発現の解析を行った。さらに皮膚型リーシュマニア症起因原虫である *L. major* を用い、病態形成および免疫反応に重要な役割を演ずると考えられる AMA 発現分子の探索を行い、本症の免疫学的診断、治療、発症予防法の開発に資すること目的とした。

第一章では、宿主-寄生体相互作用におけるリーシュマニア原虫無鞭毛型、AMA の重要性を明らかにする目的で、皮膚型リーシュマニア症起因原虫の解析および、自然感染または実験動物感染における病理学的解析を行った。まず、中国新疆ウイグル自治区においてオオスナネズミ耳介部より分離した 2 株 (KMA-2、KMA-4)、同地域サシチョウバエから分離した 2 株 (KMP-2、KMP-3)、トルコ、サンリウルファ市において皮膚型リーシュマニア症患者より分離した *L. tropica* (URFH-16)、およびウズベキスタン、サマルカンドのリーシュマニア研究所との共同研究により得られた皮膚型リーシュマニア症生ワクチン株 RM2 のアクチン遺伝子の一部塩基配列 (830bp) を決定した。リファレンス株 (*L. gerbilli* (MRHO/CN/60/GERBILLI)、*L. turanica* (MRHO/CN/92/Qitai)、*L. major* (MHOM/Israel/83/LT252)) との比較検討を行い、KMA-4、KMP-3 は *L. gerbilli*、KMA-2、KMP-2 は *L. turanica*、RM2 は *L. major* と同定した。*L. gerbilli* 自然感染オオスナネズミでは耳介部に AMA の局在的な感染像が認められるものの、組織反応は殆ど観察されず、良好な寄生適応が成立していると考えられた。一方、*L. tropica* 感染によるヒト皮膚病変部位では潰瘍形成が認められ、またマクロファージ内 AMA の著しい増殖像、広範な組織壊死とその周囲組織の炎症像が観察された。

また、分離株およびワクチン株の実験動物に対する感染性を検索するため、BALB/c マウスに対する PRO 感染実験を行った。結果、*L. major* RM2 株が最も強い病原性を示し、組織学的観察では病変部位において広範な壊死像、マクロファージの浸潤、およびマクロファージ内での AMA の著しい増殖像が観察された。更にイヌ (ビーグル)、リスザル (*Saimiri sciureus boliviensis*) に *L. major* RM2 株 PRO を実験感染させ病理学的検索を行った。それらの結果、イヌ、リスザル共にヒトと同様感染部位

における腫瘍形成を認め、イヌにおいては更に潰瘍を形成し典型的な皮膚型病変を呈した。また病理組織的解析において、病変部位のマクロファージ浸潤、およびマクロファージ内での AMA の著しい増殖が観察された。以上の結果は、旧大陸における皮膚型リーシュマニア症の病態の多様性を示すとともに、本症の病態形成、免疫反応に AMA およびその発現分子が重要な役割を演ずることを示唆した。

AMA 特異的分子の探索にあたり、大量の AMA を得ることが必要である。そこで、第二章では病変組織よりの AMA の調整法を検討し、その方法を確立した。すなわち BALB/cA マウスおよび様々な免疫抑制動物を用いて、病変組織からの AMA 回収法を検討した結果、以下のような方法がもっとも簡便かつ有効であることを明らかにした。マウス由来の免疫関連分子の混入を極力避けるために、先天性免疫不全動物である BALB/cA RAG2 knock out マウスを用い、潰瘍形成の起こる直前の感染4週目に病変部位を摘出、破碎し、ポリカーボネート製アイソポアメンブレンフィルターを使用することによりマウス1匹より、おおよそ 1.5×10^8 の AMA を回収することが可能となった。

第三章では、これらの精製 AMA と PRO とのマウスに対する感染性、および構成タンパクの比較検討を行った。 1×10^7 AMA と PRO をそれぞれ BALB/cA マウスの尾根部に接種し、腫瘍の大きさを経時的に観察した結果、AMA 接種群における腫瘍の大きさが PRO 接種群を明らかに上回った。これらのことから、本手法で精製された AMA は感染性を保っていることが確認され、また同じ原虫種でありながら、PRO と AMA では、その形態だけではなく感染性もことなることが明らかにされた。次に、これら精製 AMA を用い、PRO との構成タンパクの相違を SDS-PAGE を用いた二次元電気泳動法 (2-D SDS-PAGE) により解析した。結果 AMA、PRO 双方に共通に認められるタンパク以外に 8 kDa、14 kDa、25 kDa、27 kDa、45 kDa 等の AMA 特異的発現タンパクを確認した。

第四章では、これら AMA 特異的発現タンパクの同定を試みた。第二章で確立された手法により精製された AMA を免疫原に家兎ポリクロナール抗体を作製し、PRO および AMA の抗原性の比較を Western blotting 法を用いて行った。その結果、おおよそ 25 kDa 付近に AMA 特異的抗原を確認した。2D SDS-PAGE で展開し、得られた2つのスポットについてアミノ酸解析を行った結果、近年、*L. major* (1998) および *L. chagasi* (2001) の遺伝子クローニングにより得られた塩基配列より推定された peroxidoxin のアミノ酸配列の一部と一致し、peroxidoxin が AMA 特異的発現分子であり、強い抗原性を示すことが明らかとなった。Peroxidoxin は antioxidant family に

属する分子であり、AMA のマクロファージ内での増殖能、すなわち活性酸素よりの回避機構を考える上で興味深い。

更に精製 AMA を免疫原とし、マウスモノクローナル抗体 (MAb) を作製した。結果、B8D、C11C、および F2A の 3 株のハイブリドーマが樹立され、これら 3 株由来 MAb の性状解析を ELISA, IFA を用いて行った。何れの MAb も AMA および PRO を抗原とした ELISA 解析において、PRO 抗原に対するよりも AMA 抗原に対し、明らかに強い反応を示した。また IFA 解析においては PRO にも僅かながら反応するものの、C11C 株由来 MAb が AMA の細胞膜に最も強い蛍光を発し、他の 2 株由来 MAb は AMA 細胞質内抗原との反応性を示した。これらの MAb は細胞内寄生型である AMA を標的とした新たな免疫学的診断および、AMA 特異的発現分子の探索に有用であると考えられた。

以上、本研究において 1) AMA がヒトを含む脊椎動物宿主においてリーシュマニア症の病態形成、および免疫反応に重要な役割を演ずることを示した。2) リーシュマニア原虫の宿主寄生型の研究に有用な AMA の簡易調整法を確立した。3) AMA と PRO の感染性、および構成タンパクの比較において、AMA と PRO ではその形態だけではなく増殖能、感染性が異なることを明らかにし、また AMA 特異的発現分子の存在を確認した。さらに 4) 2D SDS-PAGE にて展開したタンパクのアミノ酸配列の解析により、peroxidoxin が AMA 発現分子であることを本研究によって初めて示した。また、AMA を免疫原として用いることで AMA 発現分子に強く反応する 3 クローンの MAb を作製した。

本研究で得られた成果は、免疫学的診断、治療およびワクチンの標的分子の探索に新たなアプローチを提供することができ、全世界で 3 億 5 千万人が常時感染の危機に曝され、1 千 2 百万人の患者がいるリーシュマニア症の防圧に大きく寄与するものと考えられる。さらに、皮膚型リーシュマニア症の病態形成機序および、AMA のマクロファージ内増殖能の解明にも大きく貢献するものと考えられた。