

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 三條場千寿

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。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脊椎動物宿主においては 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、その起因原虫である *L. major* を用い、AMA 特異的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、本研究で用いた *L. major* RM2 株の実験動物における病原性を検討した。本株はウズベキスタン共和国においてヒトへの生ワクチン株として使用されている。本株の BALB/cA マウスに対する病原性を中央アジア各地域よりの分離株と比較したところ、*L. major* RM2 株が最も強い病原性を示した。さらに、同株の実験動物に対する感染性を検索するため、イヌ (ビーグル)、リスザル (*Saimiri sciureus boliviensis*) に対する感染実験を行った。それらの結果、両者共にヒトと同様感染部位における腫瘤形成を認め、イヌにおいては潰瘍を形成し典型的な皮膚型病変を呈した。病理組織学的解析では、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。なお、実験動物における本株のワクチン株としての有用性を検索するために、本株を BALB/cA マウスに感染させ4週後に再接種したが防御効果は認められなかった。以上の結果から、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、また有用な生ワクチンの開発のためには AMA 特異的発現分子を標的とすることが必要と考えた。

AMA 特異的発現分子の探索にあたり、AMA の精製が必要である。そこで、第二章では病変組織よりの AMA の精製法を検討し、その方法を確立した。すなわち

マウス由来の免疫関連分子の混入を極力避けるために、先天的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、破砕し、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 3×10^8 の AMA を回収することが可能であった。本方法は簡便かつ迅速な AMA 調整法として利用価値が高いと考えた。更に、これらの精製 AMA と PRO とのマウスに対する感染性を検討した結果、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た。

第三章では、AMA 特異的発現分子の探索を目的とし、精製 AMA を免疫原とし、マウスモノクローナル抗体 (MAb) C11C、B8D、および F2A を作製した。ELISA 解析において、C11C は AMA と PRO の共通抗原に対する抗体、および B8D、F2A は AMA 特異抗体であることが示された。また IFA 解析においては C11C が AMA の細胞膜に強い蛍光を発し、B8D、F2A は AMA 細胞質内抗原との反応性を示した。これらの MAb は 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。さらに、AMA と PRO との構成タンパクの相違を二次元電気泳動法 (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 32 スポットの AMA 特異的発現タンパクを確認した。

第四章では、まず、AMA を免疫原に家兎ポリクローナル抗体を作製し、PRO および AMA の抗原性の比較を 2-D SDS-PAGE と 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。次に、これら AMA 特異的抗原のうち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 発現分子であり、強い抗原性を示すことが示唆された。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。

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 の簡易精製法を確立した。3) AMA 特異抗体の作製、および 2D SDS-PAGE による構成タンパクの比較により AMA 特異的発現分子の存在を確認した。4) さらに AMA 特異的発現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初めて示した。

本研究で得られた成果は、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大きく貢献するものと考えられた。また、免疫学的診断、治療およびワクチン開発のため AMA 特異的発現分子を標的分子とする新たなアプローチを提供することができた。本研究は、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。よって、審査員一同は、本論文が博士 (農学) の学位論文として価値あるものとした。