

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 ブリン ニムスファン

化学療法剤の副作用や耐性原虫出現などの観点から、リーシュマニア症においてもワクチンの開発が望まれている。さらに、ワクチン投与経路として、非侵襲的で痛みを伴わず、投与方法が容易で、安全な粘膜免疫法が、従来の注射免疫に代わる免疫法として注目されている。国際動物資源科学研究室では、近年、ワクチン候補分子として注目されているリーシュマニア原虫由来抗原 (Leish-111f) を経鼻投与することにより、BALB/c マウスにおいて *Leishmania major* 感染に対し発症防御効果を誘導することに成功した。本論文は、Leish-111f 経鼻免疫の汎用性を検討するため、Leish-111f の経鼻免疫による *L. amazonensis* 感染に対する発症防御効果を検討しており、以下の 3 章で構成されている。

第 1 章では、BALB/c マウスにおいて、Leish-111f の経鼻免疫による *L. amazonensis* 感染に対する発症防御効果が示されるかどうかを検討した。マウスに Leish-111f 10 $\mu$ g を CT 5 $\mu$ g とともに 2 回、4 回、および 6 回経鼻免疫し、最終免疫の 1 週間後に 1x10<sup>6</sup> 個の *L. amazonensis* プロマスティゴートを尾根部に皮内感染した。それぞれの免疫後には、脾臓細胞において、抗原特異的な Th1 細胞が誘導されていることが確認された。感染部位における病変形成を経時的に測定したところ、Leish-111f 経鼻投与マウスでは、進行性の病原が認められたものの、その腫瘍の大きさは非投与マウスのそれよりも有意に小さかった。以上の結果から、Leish-111f の経鼻投与は、*L. amazonensis* 感染においても発症防御効果があると結論付けられた。

第 2 章では、異なるマウス系統における Leish-111f 経鼻投与の *L. amazonensis* 感染時の発症防御効果を検討した。C57BL6 マウスに対し、Leish-111f と CT を 2 回経鼻投与し、最終免疫の 1 週間後に 1x10<sup>6</sup> 個の *L. amazonensis* プロマスティゴートを尾根部に皮内感染した。驚いたことに、C57BL6 においても、経鼻投与により抗原特異的な Th1 細胞が誘導されていたが、Leish-111f 経鼻投与マウスにおける腫瘍の大きさは、非投与マウスのそれとほとんど変わらず、Leish-111f の経鼻投与による発症防御効果はほとんど認められなかった。感染後の免疫反応を調べるため、BALB/c, C57BL6 両マウスにおいて、感染 8 週後の脾細胞を回収し、Leish-111f に対するサイトカイン産生を比較した。BALB/c マウスでは、IL-4, IL-10 産生を伴わない高い IFN $\gamma$  産生が見られ、感染防御に有効な Th1 型の免疫反応が維持されていた。一方、C57BL6 では、IFN $\gamma$  産生が低値で、IL-4, IL-10 産生が高値であり、Th2 の活性化を示唆していた。以上の結果から、Leish-111f の経鼻投与により Th1 細胞の活性化は認められるものの、マウス系統によっては、その効果が感染後まで維持されないことが示唆された。なぜ、抗原投与によって付与された Th1 型の反応が、感染後に Th2 型に置き換わったのかは、今後検討すべき課題である。

第 3 章では、Leish-111f の経鼻投与と皮下接種間で認められる発症防御効果の差が抗原投与時の Leish-111f エピトープ認識効率の差に起因するかどうかを、ペプチドマッピング

ング法により検討した。Leish-111f を BALB/c マウスに経鼻投与で 1, 2, または 6 回、皮下投与で 1 または 3 回行い、最終免疫 1 週後に各マウスより脾細胞を回収し、別途抗原提示細胞を追加した後 Leish-111f のアミノ酸配列を基に合成したペプチドを加えて 72 時間培養し、上清中に分泌された IFN $\gamma$  を定量した。その結果、双方で免疫回数の増加に伴い、認識されるエピトープ数が減少したが、全体的に、経鼻投与の方が、免疫マウス脾細胞に対し IFN $\gamma$  産生を誘導するエピトープが多い傾向があった。Leish-111f の T 細胞認識において、緩慢にエピトープを認識する T 細胞を選抜する経鼻投与と、速やかに選抜が起こる皮内投与の差が、リーシュマニア症発症防御効果と相関する可能性が示された。

以上のように、本論文は、Leish-111f の経鼻投与が *L. major* のみならず *L. amazonensis* に対しても発症防御効果を示し、また、経鼻投与と皮内投与の間の、防御効果に関連する可能性のあるエピトープ認識パターンの違いを指摘した。さらに、遺伝的背景の異なるマウスで免疫効果が低いなどの課題も明らかにしたもので、医学および獣医学の学術上貢献するところが少なくない。よって、審査員一同は、本論文が博士（獣医学）の学位論文として、価値あるものと認めた。