

論文の内容の要旨

獣医学専攻
平成 18 年度博士課程入学
氏名 麻田 正仁
指導教員名 松本 芳嗣

論文題目 : Molecular-parasitological studies on heterogeneity of leishmaniasis
caused by *Leishmania donovani*

(*Leishmania donovani*によるリーシュマニア症の多型性に関する分子寄生虫学的研究)

リーシュマニア症は熱帯から温帯地方にかけて世界的に分布し、イヌ科動物およびげっ歯類を主な保虫宿主とする人獣共通感染症である。ヒトのリーシュマニア症はその症状により内臓型リーシュマニア症(VL)及び皮膚型リーシュマニア症(CL)に大別される。このうち VL は kala-azar と呼ばれ、原虫が脾臓や骨髄など深部臓器に寄生するため、脾腫等の重篤な症状を呈し治療が行われなければ致死的である。旧大陸においては *L. donovani* 及び *L. infantum* が、新大陸においては *L. chagasi* が VL を引き起こす主要な病原体であるとされ、世界で毎年 50 万人もの新規患者が発生しているとされる。特にアジアではバングラデシュ、インド、ネパールにおいて *L. donovani* による VL が猛威をふるっているが、それにも関わらず *L. donovani* の性状及びそれがもたらすリーシュマニア症の病態はよく分かっていない。そこで本論文ではアジアにおける VL の病原体とされる *L. donovani* が引き起こす病型に着目し、病原体及び宿主の免疫応答について分子レベルでの比較解析を行うことで *L. donovani* によるリーシュマニア症の病態の一端を明らかにすることを目的とした。

第一章では VL の病原原虫である *L. donovani*, *L. infantum*, *L. chagasi* は遺伝的

に近縁であるものの *L. donovani* には遺伝的多様性が存在することを明らかとした。*L. donovani*, *L. infantum*, *L. chagasi* の分布域はアジアからヨーロッパ、アフリカ、南米に至り、各地域ごとに媒介昆虫、保虫宿主が異なる。そこでこの VL の病原原虫 3 種についてミトコンドリアペルオキシレドキシシン(mPxn)遺伝子の塩基配列を決定し、CL の病原体とされる *L. major* 等 4 種との比較解析を行った。mPxn 遺伝子全長 681 bp が決定され塩基配列の比較の結果、*L. donovani*, *L. infantum*, *L. chagasi* 間では互いに最大 4 塩基の相違しか見られず同一のクレード内に存在していた。一方これら VL の病原原虫 3 種と CL の病原原虫 4 種間では少なくとも 19 塩基の差がみられた。次に *L. donovani* 内での遺伝的多様性を明らかにするため *L. donovani* 7 株について同様に mPxn 遺伝子塩基配列を決定し比較解析を行った。その結果 *L. donovani* 内でも最大 4 塩基、予想アミノ酸配列においても 3 残基の相違が存在していた。これらの結果から *L. donovani*, *L. infantum*, *L. chagasi* において mPxn 遺伝子が高度に保存されており、これら VL の病原原虫 3 種は遺伝的に非常に近縁であると考えられた。その一方で *L. donovani* には種内に遺伝的多様性があることが明らかとなった。

第二章では VL を引き起こす *L. donovani* が内臓のみならず皮膚にも寄生することを Post kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL) の解析より明らかにした。VL の浸淫地域においてはその治療後に皮膚病変を主徴とする PKDL を発症することが知られている。そこで *L. donovani* による VL の高度の浸淫地域であるバングラデシュにおいて PKDL 患者を対象とした調査を行い VL との比較解析を行った。対象とした PKDL 患者は VL の治療後数カ月から 3 年後に斑状及び小結節或いは丘疹状の病変を発症していた。PKDL 患者の皮膚病変に原虫が存在するのかが明らかとするため皮膚生検材料の培養により原虫の分離を試みた結果、丘疹状の皮膚病変からのみ原虫が検出された。この PKDL 患者分離株について VL 分離株と比較するため、システインプロテアーゼ遺伝子の一部塩基配列を決定した。決定した塩基配列は VL の病原原虫 3 種内において多様性を持つ部位であり、決定された 616 ないし 655 塩基は *L. donovani*, *L. infantum*, *L. chagasi* に属する 6 株内で塩基配列の欠失を含め 0~48 塩基の相違が存在した。PKDL 患者分離株塩基配列の比較解析の結果、決定された 655 塩基はインド由来 *L. donovani* (MHOM/IN/80/DD8) の塩基配列と完全に一致していた。皮膚生検材料の病理組織学的解析から斑状病変では軽い炎症像が、小結節状病変では組織球やリンパ球の浸潤が見られる類上皮細胞肉芽腫が観察されたがいずれの病理組織像においても原虫は観察されなかった。さらに、患者の血漿を用い *L. donovani* 粗抗原ないし rK39 などの複数のリコンビナント抗原からなる混合抗原を使用した ELISA 法による血清学的な解析を行った。その結果いずれの抗原に対しても PKDL 患者血清の抗体価

は VL 患者血清の抗体価と同等の高い値を示した。以上の結果は VL を起こす *L. donovani* であっても治療等の影響により皮膚に寄生することを示している。その一方で皮膚から原虫が検出されなくとも PKDL 患者は VL 患者と同等の血清学的な反応を示すため、深部臓器に原虫が未だに存在する可能性が示された。また、PKDL に見られる皮膚病変は原虫の皮膚における増殖というよりは患者の免疫反応が重要な役割を演じていることが示唆された。

第三章では *L. donovani* 変異種が VL を起こすことなく皮膚型リーシュマニア症を引き起こすことを明らかにした。スリランカにおいて CL が疑われる患者を対象に皮膚生検材料の培養又は塗抹標本からの原虫の検出を試み、28 検体中 21 検体の培養液中及び 25 検体の塗抹標本から原虫が検出された。CL 患者には VL を示唆するような徴候や既往歴は無く、皮膚病変は水疱状の丘疹ないし小結節状であり潰瘍形成の見られる場合もあった。この CL 患者より分離された原虫の種を明らかにするためアクチン遺伝子の一部塩基配列を決定し、旧大陸におけるリーシュマニア症の主要な病原原虫種 4 種の当該塩基配列との比較を行った。その結果スリランカ分離株の塩基配列は *L. donovani* と最も相同性が高く、754 塩基中 1 塩基を除き完全に一致していた。スリランカ分離株について比較解析を行うため第二章と同じくシステインプロテアーゼ遺伝子の一部塩基配列を決定し VL の病原原虫 3 種 6 株との比較を行った。その結果興味深いことにスリランカ分離株の塩基配列は中国由来 *L. infantum* (IWUI/CN/77/771) に最も相同性が高く、次いでインド由来 *L. donovani* (MHOM/IN/80/DD8) という結果となった。CL 患者の血清学的反応を明らかにするため患者血漿について rK39 抗原を用いた ELISA 法による血清学的な解析を行った。その結果患者の抗体価は VL 患者の抗体価に比べはるかに低いことが明らかとなった。本章の結果から *L. donovani* がヒトに CL を引き起こしうるということが明らかとなった。また、PKDL 患者と違い CL 患者の原虫に対する免疫反応は弱いことから原虫が皮膚に限局し、深部臓器に寄生しないことが示唆された。さらに、この CL の病原体は VL を引き起こす典型的な *L. donovani* とは寄生指向性等において性質が異なることが示唆された。

第四章では mPxn の発現及び免疫原性を明らかにした。リーシュマニア原虫 mPxn 検出のため mPxn 特異的な配列からなるオリゴペプチドを合成し、マウスポリクローナル抗体(抗 mPxn ペプチド抗体)を作製した。*L. donovani* 粗抗原を用いたウエスタンブロット法により 24 kDa の位置に一本のバンドが観察され、作製した抗体は mPxn を特異的に認識していると考えられた。この抗体を用い *L. major* 等 5 種のリーシュマニア原虫粗抗原についてウエスタンブロット法による解析を行った。その結果僅かに *L. mexicana* では他種に比べ大きい分子量で検出されたものの、5 種のリーシュマニア原虫全てにおいて約 24

kDa の位置に単一のバンドが観察された。また、抗 mPxn ペプチド抗体を用いた蛍光抗体法による局在の解析により、使用したいずれのリーシュマニア原虫においても蛍光がミトコンドリアに一致して観察され、mPxn が各種リーシュマニア原虫において同様の局在を示すことが明らかとなった。VL 及び PKDL 患者血漿の mPxn に対する反応性を調べるため、合成したオリゴペプチドを抗原として ELISA 法による解析を行った。その結果 VL 患者の抗体価は PKDL 患者の抗体価と共に陰性対象とした健常日本人血漿の抗体価よりも有意に高い値を示した。本章から mPxn は *L. donovani* を始めとするリーシュマニア原虫に広く発現しており、高い免疫原性を持つ分子であることが示唆された。

以上本研究において 1) *L. donovani*, *L. infantum*, *L. chagasi* は遺伝的に近縁であるが、*L. donovani* には遺伝的多様性が存在する。2) 内臓に寄生する *L. donovani* であっても薬剤治療や宿主の免疫応答等の要因により皮膚に寄生することがある。3) *L. donovani* がヒトに内臓型リーシュマニア症を起こすことなく皮膚型リーシュマニア症を引き起こす場合がある。4) mPxn は *L. donovani* を始めとするリーシュマニア原虫に広く発現し、高い免疫原性を有することが明らかとなった。遺伝子解析により *L. donovani*, *L. infantum*, *L. chagasi* 及びその変異種はリーシュマニア属内において一つのクレードを形成しており *L. donovani* s.l. としてとらえられた。そしてこの *L. donovani* s.l. に属する原虫がその多型、場合によっては免疫等の宿主側の要因により VL, 原虫の皮膚寄生を伴う PKDL, そして CL という症状の多型を引き起こしていると考えられた。これらの知見は *L. donovani* は内臓型リーシュマニア症のみを引き起こす病原体であるという通説に一石を投じるものである。また、mPxn は高い免疫原性を有するため診断用抗原として期待されると共に *L. donovani* 内に見られた多様性が病態に関わるものであるか検討する必要がある。さらに本研究で得られた原虫株の詳細な比較解析により病態決定因子を明らかとすることで薬剤治療の標的分子の探索や遺伝子改変生ワクチンの開発に貢献することが期待される。