

## 論文の内容の要旨

獣医学 専攻

平成 17 年度博士課程 入学

氏 名 片山 進亮

指導教員名 小野 憲一郎

## 論文題目

マウスのバベシア原虫 *Babesia microti* と *Babesia rodhaini* の生物学的特性に関する研究

マウスのバベシア症の原因原虫である *Babesia microti* ならびに *Babesia rodhaini* は、いずれも孢子虫綱、ピロプラズマ亜綱、ピロプラズマ目、バベシア科、バベシア属に分類されるが、宿主の免疫防御反応、虫体の糖代謝特性、糖取り込み機構など様々な点で異なっている。しかしながらその一方で、いわゆるピロプラズマ目に属する原虫の分類学的名称、位置については未だ確定されていない部分が残っており、世界的な論議的となっている。*B. microti* と *B. rodhaini* についても同様で、両原虫は同一のバベシア科に属するものではなく、*B. microti* はタイレリア科に分類すべきとする研究者もいる。バベシア科の原虫の形態的な特徴として、偽食胞、感染赤血球膜の原虫側への嵌凹、

コイル状の膜構造物、小胞の凝集などが上げられている。また、*B. microti* ならびに *B. rodhaini* 感染赤血球の糖輸送では、いずれの感染赤血球も正常赤血球に比較して糖の膜透過性が亢進している。一方、*B. microti* 感染マウスは一過性の感染赤血球率増加を示した後に感染耐過するのに対し、*B. rodhaini* 感染マウスは斃死する。この感染経過の相違は主に宿主の免疫応答によるもので、とくに感染初期における細胞性免疫の活性化が重要である。宿主の免疫機構では樹状細胞の抗原認識が重要であるが、両原虫の抗原に対するToll-like receptor (TLR) のサブタイプは不明である。近年、バベシア科とタイレリア科の分類には18S ribosomal RNA (18S rRNA) の分子系統解析が行なわれ、バベシア科の原虫ではタイレリア科の原虫に比較して約30塩基の欠失が存在する。また、バベシア科とタイレリア科の原虫において、最も重要で、かつ基本的な違いはその発育環で、バベシア科に属する原虫は経卵巣感染し、タイレリア科の原虫は経発育期感染する。マウスバベシア症の原因原虫である*B. microti* と *B. rodhaini* は各種動物のバベシア症の感染モデルとして広く用いられているが、両原虫の相違点を解析する上では、両原虫が同じバベシア科に属することが前提となる。そこで本論文では、両原虫の生物学的特性を明らかにすることで、両原虫が同じバベシア科に属するか否かについて検討した。

第一章では*B. microti*、*B. rodhaini* ならびにそれぞれの感染赤血球の微細形態ならびに糖輸送担体であるGLUT 1について比較検討した。両原虫は宿主赤血球膜に隣接した位置に認められ、原虫内には*B. microti*では小型の、*B. rodhaini* では大型の偽食胞が認められた。また感染赤血球膜には虫体側に赤血球膜を引き寄せたように陥凹部位が観察された。また*B. microti*では小胞の凝集が、*B. rodhaini* ではコイル状の膜構造物が観察された。一方、*B. microti*あるいは*B. rodhaini* 感染赤血球膜のいずれにおいてもGLUT 1は著しく減少していたが、陥凹部とその他の部位との間にGLUT 1の発現に差は認められな

かった。したがって、*B. microti* および *B. rodhaini* の赤血球内感染虫体の微細構造ならびに感染赤血球の微細構造に大きな相違は認められず、また GLUT 1 の分布ならびに発現量にも差は観察されず、*B. microti* をタイレリア科に分類する根拠は得られなかった。

第二章では *B. microti* あるいは *B. rodhaini* 感染マウスの脾臓内樹状細胞の活性化を比較検討し、ついで、*in vitro* における樹状細胞の反応性ならびに TLR の阻害により両原虫の樹状細胞活性化に關与する TLR のサブタイプについて検討した。*B. microti* および *B. rodhaini* 感染マウスの脾臓内樹状細胞は、いずれも感染48時間後から樹状細胞成熟化のマーカである CD40 発現細胞数、共刺激分子である CD80 ならびに CD86 発現細胞数、抗原提示分子である MHC class I ならびに MHC class II 発現細胞数が増加しており、活性化していた。骨髓細胞から分化誘導した樹状細胞と、*B. microti* 感染赤血球あるいは *B. rodhaini* 感染赤血球とを 24 時間共培養した培養上清中の IL-12p40 の濃度は、*B. microti* 感染赤血球と共培養した樹状細胞培養上清で、他と比較して有意な高値を示した。TLR の阻害を示す IRS を添加すると、*B. rodhaini* 感染赤血球との共培養時には TLR7 を阻害する IRS661、TLR9 を阻害する IRS869、TLR7 と TLR9 を阻害する IRS954 を添加した場合に有意な減少（それぞれ非添加の 53 %、43 %、34 %）が認められた。したがって、*B. rodhaini* の樹状細胞活性化には少なくとも TLR7 ならびに TLR9 が關与していることが明らかとなった。しかしながら、両原虫間で關与する TLR サブタイプの違いを確定することは出来ず、*B. microti* と *B. rodhaini* とを再分類する根拠は得られなかった。

第三章では *B. microti* ならびに *B. rodhaini* について 18S rRNA hyper variable region V4 の遺伝子解析を行なった。*B. microti* Munich 株の塩基数は 445 塩基で、バベシア科の

原虫の特徴とされる 30 塩基の欠失部位は観察されなかった。*B. microti* AJ 株と GI 株の塩基数は 441 塩基で、Munich 株とは 13 塩基に相違が認められたが、いずれも 30 塩基の欠失は観察されなかった。一方、*B. rodhaini* の塩基数は 436 塩基で、*B. microti* Munchen 株とは 40 塩基の相違が認められたが、30 塩基の欠失部位は認められなかった。したがって、バベシア科の原虫の特徴とする約 30 塩基の欠失は原虫の種によって異なるものと考えら、18S rRNA hyper variable region V4 の塩基配列の相違からは、*B. microti* をタイレリア科に再分類する必要性は少ないものと考えられた。

第四章では *B. microti* ならびに *B. rodhaini* のダニ体内における発育を、両原虫を実験感染させたフタトゲチマダニの卵巣、卵、幼ダニ、若ダニの 18S rRNA hyper variable region V4 遺伝子について検討した。*B. microti* 感染赤血球を接種後 30 日目のフタトゲチマダニ（成ダニ）、接種後 3 日目の卵巣、孵化直後の幼ダニ、孵化後 7 日間飼育した若ダニから約 450 bp の泳動位置に 18S rRNA hyper variable region HVR-V4 の遺伝子が検出されたが、接種後産卵開始 3 日目の卵からは検出できなかった。また、*B. rodhaini* 感染赤血球を接種したフタトゲチマダニにおいても同様であった。、*B. microti* ならびに *B. rodhaini* いずれの原虫も卵巣、幼ダニ、若ダニに 18S rRNA hyper variable region V4 の遺伝子が検出され、両原虫ともに介卵感染していることが明らかとなった、ダニにおける発育形態からは、いずれもバベシア科に属する原虫であると考えられた。

以上の結果、*B. microti* と *B. rodhaini* は微細構造、18S rRNA hyper variable region V4 の塩基配列、ダニ体内における発育、いずれの点についても同じバベシア科に属する原虫であると考えられた。