

学 位 論 文 題 名

バベシア原虫感染にともなう免疫応答、

病態ならびに原虫表面抗原の解析

学位論文内容の要旨

バベシア原虫感染症においては、宿主が致死的な症状を示す原虫と、宿主が激的な症状を示さず生存する原虫が知られているが、その病態形成に關与する機序の詳細は明らかではない。また、バベシア原虫感染馬は低寄生率で原虫を保有することがあり、確実な診断法の開発が望まれている。本研究では、まずバベシア原虫感染症における宿主の免疫反応と病態形成の關連について、2種のバベシア原虫を用いて解析を行った。次いで、原虫表面抗原のエピトープ解析を行った。

まず致死的な症状を示さない系として、*Babesia microti* 感染マウスにおける宿主免疫反応の解析を行った。これまで、宿主体内からの*B. microti* 排除機構には、T細胞の關与が重要であるとされていたが、詳細は明らかにされていなかった。そこで、BALB/cマウス、CD4⁺もしくはCD8⁺T細胞欠損マウス、および severe combined immunodeficient (SCID)マウスを用いた解析を行った。その結果、*B. microti* の排除にはCD4⁺ T細胞と、その産生するinterferon-gamma (IFN- γ)が重要であることが示唆された。*B. microti* 感染防御にはT細胞が重要であることからT細胞クローンを樹立し、SCIDマウスに受け身移入して、その感染防御能を調べた。その結果、樹立したT細胞クローンのうち3株が感染初期の原虫増殖を顕著に抑制した。さらに、*B. microti* 感染マウスにおけるサイトカイン産生を測定したところ、interleukin-2 (IL-2)、IL-4、tumor necrosis factor-alpha (TNF- α)、一酸化窒素 (NO)のいずれも血清中の濃度は検出限界以下であった。

病態の形成には、宿主の免疫反応、特に過度のサイトカインの産生が關与することが知られている。*B. microti* 感染宿主が、高い寄生率を示したにも関わらず、死亡しなかったのは、本原虫が

組織に障害を与えるサイトカインを誘導しないことに起因する可能性が考えられる。そこで次に寄生率が低いにも関わらず宿主が死亡する例として、*B. caballi* 実験感染馬における病態解析を行った。

B. caballi 実験感染馬における病理学的検索の結果、増殖性糸球体腎炎と肺水腫が認められ、直接の死因は肺水腫による呼吸不全と考えられた。このような病態形成には、サイトカインやフリーラジカルが関与していることが知られている。そこで、*B. caballi* 感染馬における末梢血リンパ球のサイトカインmRNAの発現を、reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) 法により調べた。その結果、1頭ではIFN- γ 、TNF- α 、IL-2、別の個体においてはTNF- α mRNAの発現が増強されていた。いずれの個体においてもIL-4 mRNAの発現に変化は見られなかった。さらにNOの産生を調べたところ、デキサメサゾン (Dex) 投与馬の感染末期において、血清中のNOレベルが上昇していた。そこで、1頭のウマにDexとアミノグアニジン (AG) を投与して感染経過を調べたところ、AG非投与馬と比較してAG・Dex投与馬で高い寄生率と低いNOレベルが認められたが、ウマは最終的には死亡した。以上の結果から、*B. caballi* 感染馬においては、NOとTNF- α が誘導され、これらが原虫増殖抑制ならびに病態の形成に関与していることが示唆された。同時に組織障害にはNO依存性の経路と非依存性の経路が存在することが予想された。

次に、ウマピロプラズマ原虫感染馬の確実な血清診断の系を確立するために、*B. equi* の30kDa ピロプラズム主要表面抗原 (p30) 上のB細胞エピトープの同定と解析を行った。その結果、ペプチド¹²³FYQEVLFKGF¹³⁵が、最も強い陽性反応を示し、この領域に主要なB細胞エピトープが存在することが明らかとなった。また、*B. equi* p30に対するモノクローナル抗体 (MAb) 36/133.97によって認識されるエピトープ領域の同定を行った。その結果²⁷ASGAVVDFQ³⁹LESIの領域が極めて強い陽性反応を示し、この領域にエピトープが存在することが明らかとなった。しかし、今回同定したB細胞エピトープとMAb 36/133.9のエピトープはアミノ酸配列が異なっているうえ、一次構造上でも100アミノ酸残基程度離れた領域に存在していた。そこで、MAb 36/133.9の*B. equi* p30に対する結合が、感染馬血清によって阻

害されるか否かを確認する目的で競合阻害ELISAを行った。その結果、MAb 36/133.97と感染馬血清の間で競合が起こることが確認された。この結果は、*B. equi* p30の高次構造に起因するものであると考えられる。

以上の結果より、バベシア原虫感染症における病態形成機序の一端が明らかとなった。また、今回同定した*B. equi* p30上のB細胞エピトープ領域は、株間で多様性に富む領域であったが、数種の抗原を組み合わせることにより、ウマピロプラズマ症の診断用抗原として使用できる可能性が示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 沼 操
副 査 教 授 橋 本 晃
副 査 教 授 神 谷 正 男
副 査 助 教 授 杉 本 千 尋

学 位 論 文 題 名

バベシア原虫感染にともなう免疫応答、 病態ならびに原虫表面抗原の解析

バベシア原虫感染症においては、宿主が致死的な症状を示す原虫と、軽い症状で生存する原虫が知られているが、その病態形成の機序は明らかではない。また、バベシア原虫感染馬は低寄生率で原虫を保有することがあり、確実な診断法の開発が望まれている。本研究では、2種のバベシア原虫感染症における宿主の免疫反応と病態形成の関連について解析を行うとともに、1種の原虫表面抗原のエピトープ解析を行った。

まず致死的な症状を示さない系として、*Babesia microti* 感染マウスにおける宿主免疫反応の解析を行った。これまで、宿主体内からの*B. microti* 排除機構には、T細胞の関与が重要であるとされていたが詳細は明らかにされていなかった。解析の結果、*B. microti* の排除にはCD4⁺T細胞と、その産生するinterferon-gamma (IFN- γ)が重要であることが示唆された。そこでT細胞クローンを樹立し、SCIDマウスへの受け身移入実験によって、その原虫排除能を調べた結果、樹立したT細胞クローンのうち3株が感染初期の原虫増殖を顕著に抑制した。しかし、*B. microti* 感染マウスでは、interleukin-2 (IL-2)、IL-4、tumor necrosis factor-alpha (TNF- α)、一酸化窒素 (NO)のいずれも検出されなかった。*B. microti* 感染宿主が、高い寄生率を示したにも関わらず、死亡しなかったのは、本原虫が組織に障害を与えるサイトカインを誘導しないことによると考えられる。そこで次に、寄生率が低いにも関わらず宿主が死亡する例として、*B. caballi* 実験感染馬における病態解析を行った。

B. caballi 実験感染馬における病理学的検索の結果、増殖性糸球体腎炎と肺水腫が認められ、直接の死因は肺水腫による呼吸不全と考えられた。実験感染馬における末梢血リンパ球のサイトカインmRNAの発現を調べた結果、1頭ではIFN- γ 、TNF- α 、IL-2、別の個体においてはTNF- α の発現が増強されていた。さらにNOの産生を調べたところ、デキサメサゾン投与馬の感染末期において、血清中のNOレベルが上昇していた。以上の結果から*B. caballi* 感染馬においては、NOとTNF- α が誘導され、これらが原虫増殖抑制ならびに病態の形成に関与していることが示唆された。

次に、ウマピロプラズマ原虫感染馬の簡便な血清診断の系を確立するために、*B. equi* ピロプラズム主要表面抗原 (p30)上のB細胞エピトープの同定と解析を行った。その結果、感染馬血清が認識するB細胞エピトープと*B. equi* p30に対するモノクローナル抗体 (MAb) が認識するエピトープは別の領域に存在することが明らかとなった。これら二つのエピトープはアミノ酸配列が異なるうえ、一次構造上でも100アミノ酸残基程度離れて存在していたが、競合阻害試験の結果、MAbと感染馬血清抗体の間で競合が起こることが確認された。この結果は、*B. equi* p30の高次構造に起因するものであると考えられた。

本研究はバベシア原虫感染症における病態形成ならびにB細胞エピトープの解析に重要な知見を提供するものである。よって審査員一同は花房泰子氏が博士（獣医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。