

学 位 論 文 題 名

Neospora caninum の診断系の開発とウシ
およびヒトにおける血清調査

学位論文内容の要旨

Neospora (*N.*) *caninum* はウシに流産を起こす原虫である。*N. caninum* は、形態学的に *Toxoplasma* (*T.*) *gondii* に類似しているため、1988 年に新種の原虫であることが確認されるまでは *T. gondii* と誤認されていた。*N. caninum* による流産は世界中で発生し、日本でも1992 年の報告以来、全国各地で発生が報告され、ウシにおける流産の原因の一つとして大きな経済的損失を与えている。*N. caninum* の終宿主はイヌで、中間宿主にはイヌおよびウシを含めた多くの哺乳類がなり得る。中間宿主の体内での発育型はタキゾイトまたはブラディゾイトを含有するシストで、シストは中枢神経系にのみ認められる。自然界での *N. caninum* のウシへの主な感染様式は、母牛からの経胎盤感染が確認されているが、終宿主であるイヌの糞便から排出されるオーシストによる感染は証明されていない。

第 I 章では、*N. caninum* による流産を 2 度起こした成牛の病理組織学的検索ならびにこの成牛からの原虫の分離を試みた。病理組織学的検索では成牛の中枢神経系および骨格筋に非化膿性炎症が認められ、この病変は流産胎子の *N. caninum* 感染に見られる病変と類似していた。また、この成牛の脳から *N. caninum* タキゾイトを分離することに成功した。このことから、この成牛における中枢神経病変は *N. caninum* によって惹起されたことが示唆され、抗体陽性成牛での潜伏感染部位は脳であることが示唆された。今回の検索により、抗体陽性成牛の脳に潜伏感染したタキゾイトが何らかの原因で再活性化し、血流を介して胎子に経胎盤感染を惹起することが推察された。

今回分離した成牛由来株と以前に分離した流産胎子由来株のゲノムを *N. caninum* internal transcribed spacer 1 (ITS1) 特異的プライマーで増幅したところ、すべての株において 279 bp の DNA 断片が増幅された。この DNA 断片は、*T. gondii* RH 株では増幅されなかった。このことから、成牛および流産胎子由来の株は *N. caninum* であることが確認され、ITS1 には差異のないことが推察され

た。成牛由来株と流産胎子由来株を用いて抗原プレートでの血清反応を比較したところ、イヌ、ウシおよびマウス血清のいずれにおいても反応性に大きな差は認められなかった。よって、いずれの株のタキゾイトも抗原プレートに用いることができ、株による血清の反応性には差のないことが分かった。

N. caninum は人獣共通感染症である可能性が疑われ、ヒトにおける *N. caninum* 感染症の発生報告はないが、ヒトへの感染性の有無を明らかにする必要がある。そこで、第Ⅱ章では、ヒトの抗 *N. caninum* 抗体保有率を調査し、ヒトへの感染の可能性を検討した。その結果、何らかの病気を持つ 271 人中 4 人 (1.5%) が間接蛍光抗体法および ELISA にて抗 *N. caninum* IgG 抗体を保有しており、これまでのアメリカや韓国での抗体陽性率に類似していた。今回の陽性例の 4 例すべての血清で 43 kD 以上の大きさの抗原が認識され、以前のヒトの報告に一致していた。43 kD 抗原はタキゾイトとブラディゾイトで検出され、36 kD 抗原はタキゾイトのみで検出される。*N. caninum* に感染したマウスの血清では、慢性期になって 43 kD 抗原に対する抗体が産生され、慢性期には IgG 抗体のみで IgM 抗体が検出されない。従って、本研究で検出されたヒトの抗体は *N. caninum* のブラディゾイトに対する抗体を含むが、タキゾイトに対する抗体を含んでおらず、これらの症例が *N. caninum* 感染の急性期例ではないことが示唆された。

動物のネオスポラ症の血清学的な診断には、間接蛍光抗体法が広く用いられている。ELISA の方が一度に沢山の検体を診断するために簡便であるが、日本では市販の可溶化抗原 ELISA プレートが入手出来ない。そこで、第Ⅲ章では、*N. caninum* 可溶化抗原 ELISA (可溶化抗原 ELISA) プレートと、*N. caninum* 表面タンパク Nc-p43 を抗原とした ELISA (Nc-p43 ELISA) プレートを作製し、ウシおよびイヌの血清を用いてこれら 2 種類の ELISA の OD 値をそれぞれ、間接蛍光抗体法の抗体価と比較した。ウシ血清において、Nc-p43 ELISA は間接蛍光抗体法との相関が可溶化抗原 ELISA より高く、*N. caninum* 罹患牛の検出に有用であることが示唆された。イヌ血清では Nc-p43 ELISA より、可溶化抗原 ELISA の方が相関係数が高くなった。このことから、用いたイヌ血清の中には *N. caninum* と交叉反応を起こす他の原虫に対する抗体が含まれていなかったが、ウシ血清には含まれていた可能性が推察された。さらに、ヒト血清を用いて Nc-p43 ELISA を行ったところ、可溶化抗原 ELISA および間接蛍光抗体法ともに陽性のヒト血清は Nc-p43 ELISA でも高い OD 値を示したことから、Nc-p43 ELISA はヒト血清を用いた検索にも利用できることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 梅 村 孝 司

副 査 教 授 小 沼 操

副 査 教 授 高 橋 芳 幸

副 査 教 授 島 田 章 則 (鳥取大学)

学 位 論 文 題 名

Neospora caninum の診断系の開発とウシ

およびヒトにおける血清調査

Neospora (*N.*) *caninum* はウシに流産を起こす原虫である。*N. caninum* による流産は世界中で発生し、日本でも1992年の報告以来、全国各地で発生が報告され、ウシにおける流産の原因の一つとして大きな経済的損失を与えている。

本研究では、まず最初に、*N. caninum* による流産を2度起こした成牛の病理組織学的検索ならびにこの成牛からの原虫の分離を試みた。その結果、流産胎子の *N. caninum* 感染に見られる病変と類似した病変が成牛の脳に認められた。また、この成牛の脳から *N. caninum* タキゾイトを分離した。よって、この成牛における中枢神経病変は *N. caninum* によって惹起され、抗体陽性成牛での潜伏感染部位は脳であることが示唆された。さらに、疫学的調査により *N. caninum* の伝播経路が垂直感染であることを推察した。これらの結果より、抗体陽性成牛の脳に潜伏感染したタキゾイトが何らかの原因で再活性化し、胎子に垂直感染することが推察された。

次に、ヒトにおける抗 *N. caninum* 抗体保有率を調査し、ヒトへの感染の可能性を検討した。その結果、何らかの病気を持つ271人中4人(1.5%)が間接蛍光抗体法およびELISAにて抗 *N. caninum* IgG 抗体を保有しており、これらの人々は何らかの機会に *N. caninum* 抗原に感作された可能性が示唆された。

最後に、*N. caninum* 可溶化抗原または組み換えタンパク Nc-p43 を用いたELISA プレートを作製し、イヌおよびウシ血清を用いて間接蛍光抗体法の抗体価とそれぞれのELISAのOD値との相関を調べた。その結果、ウシ血清ではNc-p43を抗原に用いたELISAで、イヌ血清ではNc-p43を抗原に用いたELISAと可溶化抗原を用いたELISAの両方で、間接蛍光抗体法との高い相関係数が得られた。よって、今回作製したELISAプレートがウシおよびイヌの *N. caninum* 抗体検出に有用であることが示唆された。

ウシにおける *N. caninum* 感染では、脳が潜伏感染部位であること、および垂直感染が主たる伝播経路である可能性が高いことを見出した。また、新たな診断系を開発し、ヒトにおける抗 *N. caninum* 陽性例を見出した。よって、審査員一同は澤田倍美氏が博士（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る。