

学 位 論 文 題 名

Haemaphysalis longicornis 中腸分子を認識する

単クローン抗体による抗ダニ効果

学位論文内容の要旨

マダニの家畜に対する被害は、吸血による貧血などの直接的被害の他に、病原体の媒介があり、日本国内では、フタトゲチマダニ (*Haemaphysalis longicornis*)によるタイレリアやバベシアなどの原虫感染症が大きな問題とされている。こうしたダニ媒介性感染症に対して、化学物質を用いた殺ダニ剤や病原体に対するワクチンが従来の対応策であったが、ダニの化学薬剤に対する耐性や環境汚染、病原体の抗原変異などの諸問題があり開発が難しい。このような背景から、抗ダニワクチンの開発が進められている。

現在、商品化されている抗ダニワクチンの抗原として、オウシマダニ (*Boophilus microplus*) の中腸から分離された Bm86 が知られている。中腸分子は、唾液腺から分泌される分子のように、ダニの吸血中、宿主体内へ曝露されることがない抗原であるため、ワクチネーションによる強い免疫効果が知られている。本研究では、この非曝露型抗原の性質に着目し、フタトゲチマダニ (*H. longicornis*)の未知の中腸分子について、単クローン抗体の作出と遺伝子クローニングを行った。

まず、フタトゲチマダニ (*H. longicornis*)の成ダニ中腸蛋白をマウスに免疫し、中腸分子を認識する単クローン抗体を作製した。合計 22 株の陽性ハイブリドーマを得たが、マウスで腹水産生できたクローンは 8 株であった。これらの IgG アイソタイプは、IgG1、IgG2a、IgG2b の 3 種類であったが、どれも分子量 76kDa の同一蛋白を認識していた。免疫染色でも、各アイソタイプの抗体について染色像に違いはみられず、どれも中腸上皮細胞の膜及び食胞周囲を染色した。

次に、得られた単クローン抗体を腹水として産生しているマウスにダニを吸血させたところ、成ダニで抗ダニ効果が観察された。そこで、この抗体をプローブとして、成ダニ由来 cDNA を用いてイムノスクリーニングを行った。その結果、抗体が認識した中腸抗原の塩基配列について、3' 側が部分的に解析された。

各アイソタイプの単クローン抗体について、マウスで受動免疫試験を行い、アイソタイプ間で抗ダニ効果に違いがみられるか否か検討した。その結果、アイソタイプ間での差はみられず、いずれの抗体でも抗体投与後の成ダニで、体重や産卵量、幼ダニの孵化率について減少がみられた。特に幼ダニ孵化率について著しい減少が確認でき、これらの単クローン抗体が認識する中腸蛋白が、抗ダニワクチン抗原として有効であることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 沼 操
副 査 教 授 岩 永 敏 彦 (医学研究科)
副 査 助 教 授 奥 祐 三 郎
副 査 助 教 授 大 橋 和 彦

学 位 論 文 題 名

Haemaphysalis longicornis 中腸分子を認識する 単クローン抗体による抗ダニ効果

マダニの家畜に対する被害は、吸血による貧血などの直接的被害の他に、病原体の媒介があり、日本国内では、フタトゲチマダニ (*Haemaphysalis longicornis*)によるタイレリアやバベシアなどの原虫感染症が大きな問題とされている。こうしたダニ媒介性感染症に対して、殺ダニ剤や病原体に対するワクチンが用いられているが、殺ダニ剤に対する耐性ダニの出現や環境汚染、病原体の抗原変異などの多くの問題がある。このような背景から、抗ダニワクチンの開発が進められている。ダニ中腸分子は、ダニの吸血中、宿主体内へ曝露されることがない抗原であるため、ワクチネーションによる強い免疫効果が知られている。そこで、フタトゲチマダニの中腸分子について、単クローン抗体の作出と遺伝子クローニングを検討した。

フタトゲチマダニの成ダニ中腸蛋白をマウスに免疫し、中腸分子を認識する単クローン抗体を作製した。合計 22 株の陽性ハイブリドーマを得たが、マウスで腹水産生できたクローンは 8 株であった。これらの IgG アイソタイプは、IgG1、IgG2a、IgG2b の 3 種類であったが、いずれも分子量 76kDa の同一蛋白を認識していた。免疫染色でも、各アイソタイプの抗体について染色像に違いはみられず、中腸上皮細胞の膜及び食胞周囲が染色された。次に、得られた単クローン抗体を腹水として産生しているマウスにダニを吸血させたところ、成ダニで抗ダニ効果が観察された。そこで、この抗体をプローブとして、成ダニ由来 cDNA ライブラリーを用いてイムノスクリーニングを行った。その結果、抗体が認識する中腸抗原の遺伝子の 3'側が部分的に同定された。各アイソタイプの単クローン抗体について、マウスで受動免疫試験を行い、抗ダニ効果を検討した結果、いずれの抗体でも抗体投与後の成ダニで、体重や産卵量、幼ダニの孵化率について減少がみられた。特に幼ダニ孵化率について著しい減少が確認でき、これらの単クローン抗体が認識する中腸蛋白が、抗ダニワクチン抗原として有効であることが

示唆された。

本研究は、抗ダニ効果を有するフタトゲチマダニ中腸由来分子を同定したものであり、今後の抗ダニワクチン開発に道を開いた。よって、審査委員一同は、上記博士論文提出者中島美枝氏の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第6条の規程による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。