

学位論文題名

*Trypanosoma evansi*の分子疫学調査および発病機序に関する研究

学位論文内容の要旨

Trypanosoma evansi (*T. evansi*) によるスーラ病は、中南米、アフリカ、および東南アジアに認められる家畜の感染症である。ヒトの睡眠病や家畜のナガナ病の原因となる *T. brucei* と非常に近縁でありながら、*T. evansi* はツェツェバエによる生物学的伝播ではなく、吸血昆虫による機械的伝播をする。そのため、サハラ砂漠以南に限局されているアフリカトリパノソーマ原虫とは異なり、世界の幅広い地域で流行が認められる。また *T. evansi* は、アフリカトリパノソーマ原虫の特徴である variant surface glycoprotein (VSG) の抗原変異機構を備えているため、ワクチンの開発は困難を極める。さらに近年は、薬剤耐性原虫の増加も報告されており、今後家畜被害が増加する可能性が高い感染症である。しかし、*T. evansi* は、他のトリパノソーマ原虫に比べて、遺伝子学的解析ならびに病態発生機序に関する知見は乏しい。

本研究の第1章では、世界的な流行をみせる *T. evansi* 感染状況を把握するため、南米のボリビア、ペルー、東南アジアのフィリピンにおいてウシトリパノソーマ病の分子疫学調査を行い、スイギウやウシにおける *T. evansi*、および *T. vivax* の感染率を調査した。その結果、トリパノソーマ原虫感染率はフィリピンのスィギウにおいて6.4% (*T. evansi*)、ペルーのウシにおいて3.3% (*T. evansi*)、1.2% (*T. vivax*)、ボリビアのウシにおいて11.5% (*T. evansi*)、0.9% (*T. vivax*) であり、高度にトリパノソーマ原虫が蔓延していることが確認された。南米および東南アジアに分布する *T. evansi* の遺伝学的背景を調査するため、各国の材料由来 *T. evansi* のトランスフェリン受容体遺伝子を含む expression-site-associated gene 6 (ESAG6) 遺伝子塩基配列の同定を行い、予測アミノ酸配列の多型解析を行った。その結果、27種類の *T. evansi* ESAG6 が同定され、うち、20種類が新規に同定された配列であった。国別にみるとペルーでは15種、フィリピンでは14種の多型が検出されたのに対し、ボリビアではわずか4種のみの検出であった。また、同定された27種のESAG6のうち、多くの配列がその国独自に存在するものだった。以上の結果から、南米と東南アジアの *T. evansi* はそれぞれ異なる独自の進化を示してきたことが示唆された。

第2章では近年、強毒化した *T. evansi* の流行が示唆されているフィリピンにおいて、野外株の分離を行い、マウスおよびウシを用いた病原性解析を行った。同国のルソン島およびミンダナオ島において *T. evansi* 感染スィギウから *T. evansi* を分離後、*in vitro* での馴化を行い、限界希釈法により10株の原虫クローンを樹立した。BALB/cマウスを用いて、それらの原虫クローンの病原性を比較解析したところ、原虫出現期間、原虫量ならびに感染マウスの平均生

存期間に有意な差が認められた。*T. evansi*強毒株接種マウスでは、接種後8日目に著しい脾臓の腫大や白血球数の増加など、激しい炎症反応の兆候が認められた。次に、本来の宿主であるウシに対する病原性を検討するために、マウスで病原性の差が認められた強毒株または弱毒株をウシに感染させた。その結果、ウシにおいてもマウスと同様、原虫の増殖に有意な差が認められ、強毒株接種ウシでは原虫出現期間が弱毒株に比べて短かった。また、強毒株感染ウシのみで、白血球数の急激な減少や貧血が観察された。このような病原性の差の原因を解析するために感染ウシの炎症性サイトカイン遺伝子の発現量を解析したところ、貧血症状を呈した強毒株感染ウシにおいて*Tumor necrosis factor- α* mRNAの発現増加が確認された。以上の結果から、フィリピンで流行する*T. evansi*は、株間において異なる病原性を示すことが明らかとなり、感染個体で有意に増殖速度の速い強毒株が存在することが確認された。

第3章では、*T. evansi*感染時における宿主免疫反応を解析した。はじめに、*T. evansi*感染によって生じる炎症性因子を解析するため、感染マウス脾臓を用いたPCRアレイ解析法によって、炎症性因子およびその受容体の網羅的な遺伝子発現解析を行った。その結果、急性期においてサイトカインおよびケモカインストームの発生が確認された。次に、炎症性因子の産生源となる細胞を同定するため、免疫磁気ビーズ法による細胞分画を行い、各細胞分画でのサイトカイン発現量を検討した。その結果、マクロファージが炎症性因子の主要な産生源であることが明らかとなった。一方、脾臓において*Ccl8*および*Il10*の明らかな発現上昇が確認された。このことは、制御性樹状細胞 (DCs) の分化、誘導との関連を示しているもので、*T. evansi*感染マウスの脾臓における制御性DCsの動態を解析した。その結果、*T. evansi*感染マウスの脾臓において、原虫量の増加に伴い制御性DCsは増加し、一方で炎症性のDCsが減少することが明らかとなった。そこで、制御性DCsの機能を解析するため、*T. evansi*感染マウスへの移入試験を行ったところ、移入群において細胞数依存的な生存期間の延長および炎症性サイトカインの発現低下が観察された。さらに*T. evansi*感染ウシの末梢血中においても*CCL8*および*IL10*の発現増加が認められたことから、マウス同様にウシにおいても制御性DCsの増加が示唆された。以上の結果から、*T. evansi*感染動物における病態発生の要因である過度の炎症反応には制御性DCsの動態が深く関与することが示唆された。

本研究の結果から、アジアに分布する*T. evansi*の遺伝子背景は、南米のそれと異なること、フィリピンに流行する原虫株において病原性が異なる強毒株が存在すること、スーラ病の病態発生機序には制御性DCsが関与することが明らかとなった。今後、*T. evansi*の感染拡大を防ぐための新規制御法の開発が必要と思われる。

学位論文審査の要旨

主査	教授	大橋和彦
副査	教授	杉本千尋
副査	教授	片倉賢
副査	准教授	今内覚

学位論文題名

Trypanosoma evansi の分子疫学調査および発病機序に

関する研究

Trypanosoma evansi は、ウシなどにスーラ病を引き起こす。*T. evansi* は吸血昆虫による機械的伝播をするため、中南米、アフリカ大陸、東南アジアなど幅広い地域で流行している。*T. evansi* は、variant surface glycoprotein の抗原変異機構を備えているため、ワクチンの開発は困難を極め、さらに近年では、薬剤耐性原虫の増加も報告されており、今後もその経済的被害が増加する可能性が高い。しかし、*T. evansi* は、他のトリパソーマ原虫に比べて、遺伝子学的解析ならびに病態形成機序に関する知見は乏しい。

そこで本研究では、世界的な流行をみせる *T. evansi* 感染状況を把握するため、南米のボリビア、ペルー、東南アジアのフィリピンにおいてウシトリパソーマ病の分子疫学調査を行い、スイギュウやウシにおける *T. evansi* や *T. vivax* の感染率を調査した。その結果、これらの国々では、高度にトリパソーマ原虫が蔓延していることが確認された。さらに、これらの地域に分布する *T. evansi* について、*expression-site-associated gene 6 (ESAG6)* 遺伝子の多型解析を行った結果、27 種類の *ESAG6* 遺伝子が同定され、その中で 20 種類が新規に同定された配列であった。また、同定された 27 種の *ESAG6* 遺伝子のうち、多くの配列がその国独自に存在するものであり、南米や東南アジアの *T. evansi* はそれぞれ異なる独自の進化をしてきたことが示唆された。

次に、近年、*T. evansi* 感染症が流行しているフィリピンにおいて、野外株を分離し、マウスおよびウシに対する病原性を解析した。感染スイギュウから *T. evansi* を分離後、培養系での馴化を行い、10 株の原虫クローンを樹立した。BALB/c マウスを用いて、原虫クローンの病原性を比較すると、原虫出現期間、原虫量ならびに感染マウスの平均生存期間に有意な差が認められ、*T. evansi* 強毒株接種マウスでは、接種後 8 日目に激しい炎症反応が認められた。そこで本来の宿主であるウシに対する病原性を検討するため、マウスで病原性の差が認められた強毒株や弱毒株をウシに感染させた。その結果、ウシでもマウスと同様に、原虫の増殖に有意な差が認められ、強毒株接種ウシでは、弱毒株に比べて原虫出現までの期間が短かった。また、強毒株感染ウシのみで、白血球数の急激な減少や貧血が観察された。このような病原性の差の原因を解析するために、感染ウシにおける炎症性サイトカイン遺伝子の発現量を解析したところ、貧血症状を呈した強毒株感染ウシで *Tumor necrosis factor- α* mRNA の発現増加が確認された。以上の結果より、フィリピンで流行する *T. evansi* は、株間で異なる病原性を示すことが明らかとなり、増殖速度の速い強毒株が存在することが確認された。

最後に、*T. evansi* 感染宿主における免疫反応を解析した。*T. evansi* 感染によって生じる炎症性因子を解析するため、感染マウス脾臓を用いて、PCR アレイ法による網羅的な遺伝子発現解析を行った。その結果、急性期においてサイトカインおよびケモカインシステムの発生が確認され、炎症性因子の主要な産生源は、マクロファージであることが明らかとなった。一方、脾臓において発現が上昇していた *Ccl8* および *Il10* は、制御性樹状細胞 (DCs) の分化・誘導との関連が示されているので、*T. evansi* 感染マウスにおける制御性 DCs の動態を解析した。そして *T. evansi* 感染マウスの脾臓では、原虫量の増加に伴い制御性 DCs は増加し、一方で炎症性 DCs は減少することが示された。さらに、*T. evansi* 感染マウスへの制御性 DCs の移行試験を行ったところ、移入群において細胞数依存的な生存期間の延長や炎症性サイトカインの発現低下が観られた。また *T. evansi* 感染ウシの末梢血中においても *Ccl8* および *Il10* 遺伝子の発現増加が認められたことから、ウシでも制御性 DCs の増加が示唆された。以上より、*T. evansi* 感染動物における病態発生の要因である過度の炎症反応には制御性 DCs の動態が深く関与することが示唆された。

本研究は、世界各地に分布する *T. evansi* の遺伝子背景や病原性が異なる原虫株の存在を示したばかりでなく、スーラ病の病態形成機序への制御性 DCs の関与を明らかにするなど、原虫感染症研究に非常に有用な新規の情報を提供している。よって、審査委員一同は、上記論文提出者 目堅博久氏の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第6条の規定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。