

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19580357
 研究課題名(和文) リポソームを利用した細胞内寄生性病原体感染症の
 予防・治療法の確立
 研究課題名(英文) Application of liposome to prevention and treatment against
 infectious diseases caused by intracellular pathogens
 研究代表者
 田島 朋子(TAJIMA TOMOKO)
 大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授
 研究者番号：90173145

研究成果の概要：

不活化 *Ehrlichia canis* をリポソームに封入して犬に接種したところ、末梢血細胞中に、インターフェロン γ (IFN γ) mRNA の発現増強を認め、*E. canis* による攻撃後も感染は成立しなかった。次いで、治療効果を調べるため、*E. canis* 感染犬2匹に、リポソーム封入抗原を接種したところ、末梢血白血球の IFN γ mRNA 発現増強を認め、末梢血白血球中に *E. canis* DNA は検出されなかった。これらの結果から、リポソーム封入不活化抗原が、細胞内寄生性病原体の予防ならびに治療に有効である可能性が示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、応用獣医学

キーワード：リケッチア、*Ehrlichia canis*、リポソーム、細胞性免疫、細胞内寄生性病原体
 インターフェロン γ

1. 研究開始当初の背景

(1) 編成細胞性寄生性病原体による疾病

偏性細胞内寄生性病原体による疾病には多くの重篤なウイルス病や原虫病をはじめ、オウム病、Q熱のような人獣共通感染症も含まれ、獣医学領域でも重要である。これらの病原体は細胞内のみで増殖するため、抗体や補体のような液性免疫は病原体が細胞外に出た機会にしか作用せず、感

染防御において限られた効果しかない。また、治療にあたっては、抗生物質等の薬剤が細胞内に滲入することが必要であり、困難を伴う。さらに、病原体によっては、持続感染の状態が長期間続き、宿主の免疫能の低下に伴って、増殖、発病にいたるものもある。

リケッチア属アナプラズマ科に含まれる *Ehrlichia canis* によって引き起こ

される犬単球好性エーリキア症では、抗生物質による治療後も長期にわたってエーリキアが体内に留まり、免疫能の低下などによって再発することがある。*E. canis* 感染犬では、感染直後に抗体が上昇し始め、高いレベルで維持されるが、病原体が完全に排除されるわけではない。申請者らが*E. canis* 弱毒株を感染させた犬でサイトカインmRNA発現の動態を調べたところ、インターフェロン- γ (IFN- γ) mRNA が感染直後から、長期にわたって発現した。さらに、試験管内で*E. canis* を犬マクロファージ由来株化細胞に感染させ、*E. canis* 感染犬の末梢血単核球を加えると培養上清中にIFN- γ が産生され、*E. canis* の増殖が抑制された。この抑制効果は感染後1週から4週までは継続していたが、4ヶ月後には認められなかった。これらの結果から、*E. canis* 感染症においては、細胞性免疫が病原体増殖抑制に重要であるが、長期間の継続が望めないことがわかる。したがって、ワクチンとしては液性免疫よりも細胞性免疫を誘導するものが効果的であり、治療、快復後も細胞性免疫を誘導することで潜伏感染を排除することができる可能性が考えられる。ウイルスの場合、弱毒化させた生ワクチンによる細胞性免疫の誘導が期待できるが、リケッチアについては生ワクチン開発の試みは少なく、特に、エーリキアについて弱毒株を用いたワクチン作製の試みは報告されていない。

(2) リポソームを用いたワクチン

脂質二重膜からなるリポソームに抗原を封入すると、樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞に効果的に取り込まれ、ペプチドにまで分解された後にMHCクラスII分子を介して抗原提示され、免疫を誘導することが知られている。また、リポソーム表面を糖鎖等で修飾することでMHCクラスII分子だけではなくMHCクラスI分子も介して効果的に抗原提示をさせることができる。

渡来らは動物に対するリポソームワクチンの研究に1990年代から着手し、多くの研究成果をあげてきた。最近では、リ

ポソーム表面にマンノースをつけて抗原物質を封入すると、マクロファージや樹状細胞表面のマンナン・フコースレセプターを介してワクチンが細胞内に容易にとりこまれ、IFN- γ をはじめ、インターロイキン4 (IL-4) 等、種々のサイトカイン産生を促すことで液性免疫のみならず、細胞性免疫を誘導することができることを確認した。さらに、pH感受性膜融合リポソームを用いることで抗原が内在化され、細胞性免疫をより効果的に誘導できることを見出した。これらの方法は、ウイルス、細菌、原虫と、広い範囲に応用可能である。

そこで、リポソームを用いた予防ならびに治療効果を示すワクチンの開発を、エーリキアをモデルとして、試みることにした。

2. 研究の目的

前述のように、エーリキア感染の予防、菌の増殖抑制には細胞性免疫が重要であるが、これまでのワクチンでは液性免疫の誘導は望めるものの、細胞性免疫の誘導は望めない。そこで、菌体を不活化し、リポソームに封入することで、細胞性免疫の誘導をはかることで、ワクチン効果の向上を目的とした。さらに、リポソーム封入抗原を接種することで細胞性免疫を賦活化し、潜伏感染を防ぐことができるのではないかと考え、抗生物質による治療以外の治療法としての可能性についても検討することを目的とした、具体的には、

(1) 細胞性免疫を誘導することがわかっているリポソームに不活化 *E. canis* を封入し、ワクチンとしての効果を調べる。

(2) *E. canis* 感染犬に不活化 *E. canis* を封入したリポソームを接種し、治療が可能かどうかを調べる。

の2点を目的として、研究を行った。

3. 研究の方法

(1) リポソーム封入抗原の作製: *E. canis* を犬マクロファージ由来株化細胞であるDH-82細胞に接種、90%以上の細胞が封入体

陽性になったのを確認後、細胞をスクレーパーで剥ぎ取った。細胞は、超音波で破碎し、培養上清とともに 1,000 x g で 10 分間遠心した。得られた上清をさらに 10,000 x g で 10 分間遠心して得た沈渣を PBS で洗浄後、Sephacryl S-1000 superfine で精製した。得られた菌体をさらに超音波処理し、16,000xg、15 分間遠心して得られた上清を超音波破碎抗原とした。抗原の蛋白量を測定し、1mg をリポソームに封入し、リポソーム封入抗原 (E-L) とした。

(2) ワクチン効果の検討 : E-L 1mg と、超音波破碎抗原のみ 1mg をそれぞれ、2 匹のビーグル犬 (雌、5 歳) に、また、対照として、2 匹のビーグル犬 (雌、5 歳) に等量の PBS を、皮下接種した。接種後、毎週採血し、末梢血白血球より抽出した RNA を用いて realtime RT-PCR を行い、IFN γ mRNA の発現を定量的に調べた。また、血中抗体を ELISA で調べた。

5 週間後にブースターとして、E-L と、超音波破碎抗原を再び皮下に接種した。

8 週間後に *E. canis* 感染 DH82 細胞を静脈内接種して攻撃を行った。攻撃後は毎週採血して末梢血白血球より DNA を抽出、PCR で感染の有無を調べるとともに、白血球を DH82 細胞に接種して、分離を試みた。

(3) 治療効果の検討 : ビーグル犬 4 匹 (雌、1 歳) に *E. canis* を静脈内投与し、感染を PCR で確認後、2 匹に不活化 *E. canis* を接種した。経時的に採血し、末梢血白血球から RNA を抽出、IFN γ mRNA を realtime PCR で検出した。また、末梢血白血球中の *E. canis* DNA を PCR で検出した。

4. 研究成果

(1) 抗体産生能への影響 : E-L を接種した犬では接種後 2 週で抗体価が上昇し始め、5 週間には抗体価がそれぞれ、1:40,000 と 1:20,000 に達した。一方、超音波破碎抗原を接種した犬では抗体価は 3 週目から上昇し始め、5 週間にはいずれも 1:10,000 であった。また、ブースター後の抗体価の上昇も、E-L 接種犬の方が大きく、8 週後の攻撃の際には、1:80,000 に達した。

(2) IFN- γ mRNA の発現 : 免疫 8 週後の攻

撃前に採血し、末梢血白血球 RNA を用いた realtime RT-PCR において、 β -グルクロニダーゼをリファレンス遺伝子とし、 $\Delta\Delta$ Ct 法で、非接種対照犬 No.1 の IFN- γ mRNA 量を 1 として相対発現量を求めた。同じく対照の No.2 は 2.3、超音波破碎抗原のみを接種した犬 (No.3、4) がそれぞれ 3.2 と 1.75 であったのに対して、E-L を接種した犬 (No.5、6) は 4.6 と 6.3 で、発現の増強を認めた。

(3) *E. canis* 攻撃に対する反応 : E-L 接種犬では末梢血白血球 DNA を用いた PCR、DH82 細胞を用いた *E. canis* 分離ともに陰性であったのに対して、超音波破碎抗原のみを接種した犬では、PCR が陰性であったものの、1 匹の末梢血白血球から *E. canis* が分離された。

(4) 治療効果の検討 : *E. canis* 感染犬に E-L 接種後、末梢血白血球の IFN γ mRNA 発現を realtime PCR で調べた。接種後 1 週目に、末 β -グルクロニダーゼをリファレンス遺伝子とし、 $\Delta\Delta$ Ct 法で、E-L 非接種対照犬 No.1 の IFN- γ mRNA 量を 1 として相対発現量を求めたところ、同じく対照の No.2 が 1.6 であったのに対して、E-L 接種犬はそれぞれ、5.3 と 3.4 で、発現の増強を認めた。また、E-L 接種犬の末梢血白血球中に *E. canis* DNA は検出されなかった。

以上の結果より、不活化 *E. canis* を単独でワクチンに用いた場合、抗体が産生され、ある程度の防御能は示されるものの、完全なものではなかったのに対して、リポソームに封入した抗原では、抗体産生ならびに IFN- γ mRNA 発現量が増強され、攻撃を完全に防御できた。この結果は、リポソーム封入抗原が細胞内寄生性病原体へのワクチンとしてすぐれていることを立証するものである。

さらに、感染犬にリポソーム封入抗原を接種することで、IFN- γ mRNA 発現量の増強を認め、末梢血白血球中の *E. canis* が検出されなくなった。このことは、リポソーム封入抗原がワクチンとしてのみならず、治療にも有効であることを示しており、今後、細胞内寄生性病原体による感染症の

治療への応用が期待される。

*E. canis*感染症においては、抗生物質による治療後も病原体が長く体内にとどまり、再発することが知られている。今回得られた結果の機序については不明であるが、免疫の賦活化によって病原体を排除することができれば、その作用は抗生物質よりも長期にわたることが想像される。潜伏感染を防ぐためにも、リポソーム封入抗原の有用性をさらに検討することが必要と考える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 2 件)

① 田島朋子、輪田真理、渡来 仁.

インターフェロン- γ による *Ehrlichia canis* の増殖抑制

動物サイトカイン研究会

2008年9月26日、宮崎

② 田島朋子、輪田真理、小沼操.

Inhibition of *Ehrlichia canis* infection by interferon gamma *in vitro*.

8th International Veterinary Immunology Symposium.

2007年8月15日、Auro Preto, Brazil

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田島 朋子 (TAJIMA TOMOKO)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：90173145

(2) 研究分担者

渡来 仁 (WATARAI SHINOBU)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：50175139