

平成 21 年 4 月 17 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007 ～ 2008
 課題番号：19580358
 研究課題名（和文） 牛クリプトスポリジウム症制圧に向けたリポソームワクチンの開発
 研究課題名（英文） Development of liposomal vaccine for bovine cryptosporidiosis
 研究代表者 渡来 仁 (WATARAI SHINOBU)
 大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科・准教授
 研究者番号：50175139

研究成果の概要：

本研究は、免疫担当細胞への抗原搬送能に優れるリポソームに pH 感受性膜融合能を持たせ、牛クリプトスポリジウム感染症予防に効果的な pH 感受性膜融合リポソームワクチンの開発を目指した基礎的研究を目的として行われた。その結果、pH 感受性膜融合リポソームは、クリプトスポリジウム抗原に対して高い免疫誘導能を持つことが明らかとなり、牛クリプトスポリジウム症に対するリポソームワクチン開発の可能性が示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：リポソーム、ワクチン、クリプトスポリジウム、ウシ、粘膜免疫

1. 研究開始当初の背景

クリプトスポリジウムは、人や牛など多くの動物の消化管に寄生する人獣共通感染症の病原性原虫である。本症に対する有効な予防・治療法がないため、酪農家にとつ

ては大きな経済的損失ともなっている。本原虫に対する有効な薬剤ならびにワクチンは開発されておらず、本感染症の制圧に有効となる新たなワクチン、特に粘膜ワクチンの開発が急務となっている。

2. 研究の目的

本研究では、免疫担当細胞への抗原搬送能に優れたリポソームに pH 感受性膜融合能を持たせ、抗原提示細胞内に封入抗原の内在化を可能とするリポソームを、牛クリプトスポリジウム感染症予防に効果的なワクチンの開発に応用するものがある。そのため、抗原提示細胞との融合能が高く、封入抗原を効率よく内在化できるリポソームの脂質組成、免疫誘導をより高めることのできるアジュバントならびに免疫方法について明らかにし、牛クリプトスポリジウム感染症予防に効果的な pH 感受性膜融合リポソーム型粘膜ワクチンの開発を目指した基礎的研究を目的として行う。

3. 研究の方法

(1) pH 感受性膜融合リポソームの調整

これまでに開発しているワクチン用リポソームをベースに、pH 感受性膜融合脂質を再構成したりポソームを作成する。蛍光色素ラベルタンパクを封入した pH 感受性膜融合リポソーム用い、樹状細胞株の細胞質内への封入抗原の導入実験を行い、封入抗原を効率よく樹状細胞内に内在化できる pH 感受性膜融合リポソームを明らかにする。

(2) pH感受性膜融合リポソームによる免疫誘導実験

上記で明らかにされた樹状細胞内に抗原を内在化できる pH 感受性膜融合リポソームに、モデル抗原として卵白アルブミン (OVA) を封入し、免疫用リポソームを作製する。作製した免疫用リポソームをマウスに経鼻投与し、血清中の OVA 抗原に対する抗体の誘導について ELISA 法により測定する。さらに、免疫マウスの脾臓リンパ球を

用い IL-4 ならびに INF- γ の mRNA の発現について RT-PCR 法により調べるとともに、リンパ球培養上清中のそれぞれのサイトカイン産生についても解析し、pH 感受性膜融合リポソームによる免疫誘導 (液性免疫ならびに細胞性免疫) について明らかにする。

(3) pH 感受性膜融合リポソームの最適化
pH 感受性膜融合リポソームに封入された抗原の免疫原性を高めるために、pH 感受性膜融合リポソームの脂質組成の検討を行うとともに免疫用アジュバントの素材についても研究を行い、免疫誘導を強く促すことのできる pH 感受性膜融合リポソームについて明らかにし、リポソームの最適化をはかる。

(4) *Cryptosporidium parvum* 抗原の調整ならびに免疫誘導実験

C. parvum 感染牛の糞便から *C. parvum* オーストを精製し、免疫用抗原を調整する。最適化リポソームに調整された *C. parvum* 抗原を封入し、マウスに経鼻免疫を行う。免疫後、血清ならびに腸管中の *C. parvum* 抗原に対する抗体産生を ELISA 法により測定し、最適化リポソームによる経鼻免疫が、抗 *C. parvum* 抗体の誘導を強く促すことができることを明らかにする。

4. 研究成果

(1) pH 感受性膜融合リポソームの調整 :
pH 感受性膜融合脂質を新規に開発し、新規 pH 感受性膜融合脂質を再構成したりポソームの膜融合能を調べた。その結果、新規 pH 感受性膜融合脂質修飾リポソームは、高い膜融合能を示す事が明らかとなった。さらに、封入マーカーとして FITC 標識卵白アルブミン (FITC-OVA) を封入し、マウス樹状細胞株の細胞質内への FITC-OVA の導入実験を行った。その結果、新規 pH 感受性膜

融合脂質修飾リポソームは、マウス樹状細胞質内へ効果的に封入抗原 (FITC-OVA) を送達出来ることが示された。

(2) pH感受性膜融合リポソームによる免疫誘導実験

上記で明らかにされたマウス樹状細胞内に抗原を送達できるpH感受性膜融合リポソームに、モデル抗原として卵白アルブミン(OVA)を封入し、免疫用リポソームを作製した。作製した免疫用リポソームをマウスに経鼻投与し、免疫応答について調べた。その結果、経鼻免疫後、血清ならびに腸管にOVAに対する抗体 (IgGならびにIgA抗体) の産生が確認され、全身のみならず粘膜局所にも免疫を誘導出来る事が示された。また、誘導される免疫応答について解析した結果、免疫マウスの脾臓リンパ球においてIL-4ならびにINF- γ のmRNAの有意な発現が認められ、液性免疫のみならず細胞性免疫の誘導が確認された。

(3) pH感受性膜融合リポソームの最適化

pH感受性膜融合リポソームに封入された抗原の免疫原性を高めるために、抗原提示細胞内に封入抗原を効率よく搬送できるpH感受性膜融合リポソームの脂質組成の検討を行った。その結果、リポソームの構成脂質として相転移温度の低いリン脂質を用いることによりリポソームの膜融合能が高まり、抗原提示細胞内に封入抗原を効率よく搬送できることが明らかとなった。このことにより、免疫誘導を強く促すことのできるpH感受性膜融合リポソームの最適化が図れた。

(4) *Cryptosporidium parvum* 抗原の調整ならびに免疫誘導実験

C. parvum 感染牛の糞便から *C. parvum* オーシストを精製し、凍結融解・超音波処理により免疫用 *C. parvum* 不活化・破碎抗

原を得た。最適化リポソームに調整された *C. parvum* 抗原を封入し、マウスに経鼻免疫を行い、全身ならびに粘膜局所に抗 *C. parvum* 抗体の誘導を強く促すことができるか検討した。その結果、経鼻免疫後、血清ならびに腸管に *C. parvum* 抗原に対する抗体 (IgG ならびに IgA 抗体) の産生が確認された。また、誘導される免疫応答について解析した結果、IL-4 ならびに INF- γ の mRNA の有意な発現が免疫マウスの脾臓リンパ球において認められ、液性免疫のみならず細胞性免疫の誘導が確認された。

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)

[雑誌論文] (計2件)

1. 渡来 仁 (2009) 牛の乳房炎に対する新規リポソーム経鼻ワクチンの開発. 臨床獣医師, 27 (3), 18-24. 査読 (無し)

2. Watarai, S., Tana, and Koiwa, M. (2008) Feeding Activated Charcoal from the Bark Containing Wood Vinegar Liquid (Nekka-Rich) Is Effective as Treatment for Cryptosporidiosis in Calves. J. Dairy Sci., 91, 1458-1463. 査読 (有り)

[学会発表] (計8件)

1. 渡来 仁 (2008) 新規リポソーム経粘膜 (経鼻) ワクチン ~膜融合リポソームによる樹状細胞への抗原デリバリーと免疫誘導~ 農研機構シンポジウム「DDS (ドラッグデリバリーシステム) が開く新しい家畜の疾病防除」-薬剤の効果を調節するDDSの可能性を考える - 10月31日 (秋葉原)

2. 渡来 仁、塔 娜、田島朋子、岩崎 忠、
児玉 洋、河野健司、小岩政照 (2008)
リポソーム型ウシ乳房炎経鼻ワクチン
の開発. 平成 20 年度日本産業動物獣医
学会 (近畿)、10 月 19 日 (堺)
3. 田島朋子、輪田真理、渡来 仁 (2008)
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 第 6 回学術集会、9 月 26 日 (宮
崎)
4. 弓場英司、Tana、児島千恵、原田敦史、
渡来 仁、河野健司 (2008) 膜融合性高
分子修飾リポソームを用いた抗原タン
パク質の細胞内デリバリーとその免疫
活性化能. 第 57 回高分子討論会、9 月
25 日 (大阪)
5. 渡来 仁、塔 娜、田島朋子、岩崎 忠、
児玉 洋、河野健司、小岩政照 (2008)
ウシ乳房炎に対する新規リポソーム型
経鼻ワクチンの開発. 第 146 回日本獣
医学会、9 月 25 日 (宮崎)
6. 弓場英司、Tana、児島千恵、原田敦史、
渡来 仁、河野健司 (2008) 膜融合性高
分子修飾リポソームによる粘膜を介し
た高効率な免疫誘導. 大阪府立大学産
学官連携機構・放射線研究センター平成
19 年度共同利用報告会、7 月 4 日 (堺)
7. 弓場 英司、Tana、児島 千恵、原田 敦
史、渡来 仁、河野 健司 (2008) 膜融
合性高分子で修飾したリポソームによ
る経粘膜免疫誘導. 第 24 回日本 DDS 学会、
6 月 30 日 (東京)
8. 渡来 仁 (2008) 乳房炎起因菌 (黄色ブ
ドウ球菌) に対する粘膜免疫誘導のため
の経鼻接種用リポソームワクチンの検
討. 平成 19 年度研究推進会議 [安全・
安心な畜産物生産技術の開発] 2 系
減投薬を可能とするドラッグデリバリー

ーシステム (DDS) の利用技術の開発」、2
月 25 日 (つくば)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡来 仁 (WATARAI SHINOBU)

大阪府立大学・大学院生命環境科学研究
科・准教授

研究者番号 : 50175139

(3) 連携研究者

小岩 政照 (KOIWA MASATERU)

酪農学園大学・獣医学部・教授

研究者番号 : 90094820