

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：80106

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580433

研究課題名(和文) 特殊感染実験施設を利用した媒介動物標的抗エキノコックスワクチン開発の包括的研究

研究課題名(英文) Development of a vaccine against Echinococcus multilocularis for vectors using pupose-built experimental facilities.

研究代表者

八木 欣平 (YAGI, KINPEI)

北海道立衛生研究所・感染症部・部長

研究者番号：70414323

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：多包条虫の中間宿主の免疫に、鼻腔粘膜免疫が有効であることを示した。さらに、より有効な免疫を行うため、アジュバント効果が報告されているマイコバクテリウム・アビウム(Mycobacterium avium)のfibronectin-attachment protein(FAP)との融合蛋白を用いた免疫について検討を行い、その有効性を示した。また、感受性と抵抗性の近交系マウスを用いた実験を行い、将来のワクチン適用における遺伝的情報の解析の重要性を示した。終宿主動物であるイヌのワクチン開発については、選択した抗原(SRF1)で免疫したイヌで、寄生定着数の有意な減少を示した。これらのワクチン研究の結果は、将来的なエキノコックス予防に強く寄与するものである。

研究成果の概要(英文)：Mucosal immunization to the nasal cavity using tetraspanin protein was shown to be effective for alveolar echinococcosis. In order to boost immunity in the intermediate host, we examined immune-stimulation using fusion proteins with fibronectin-attachment protein (FAP) of Mycobacterium avium, of which the adjuvant effect has been reported. Further experiments were conducted using inbred mice with known susceptibility and resistance for adaptation of an intermediate host vaccine, elucidating the importance of analysis of genetic information in future vaccine applications. We also considered vaccine development for the dog, which is the definitive host for Echinococcus multilocularis and successfully established this novel route of vaccination. These findings will contribute strongly to the prevention of alveolar echinococcosis in Japan.

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：エキノコックス ワクチン 人獣共通感染症 多包虫症 寄生虫

1. 背景

エキノコックス症は、世界中に広く患者の発生がある薬剤治療が困難な寄生虫疾患で、主要な原因寄生虫種は、単包条虫 (*Echinococcus granulosus*; イヌと有蹄家畜で生活環が維持) と、多包条虫 (*E. multilocularis*; キツネと野ネズミで生活環が維持) の二種である。人への感染は、終宿主動物である肉食獣の糞便中に排出された虫卵を、経口的に取り込むことにより成立し、消化管内で孵化した幼虫が肝臓や肺、時には脳や骨髄などの臓器に定着し、無性的に増殖することで各臓器の機能障害を引き起こす。有効な薬剤がなく、感染早期に病巣を発見し外科的に切除しなければ、患者は致死的な経過を取る。本邦では多包条虫による多包虫症が北海道で流行しており、毎年15 - 20 名の新規患者が発生している。北海道のキツネの感染率は40%前後と高レベルであり、野外での撲滅が困難な状態であるとともに、散発的に報告される飼育犬の感染が、住民の健康に対する重大な脅威となっている。エキノコックスのワクチンに関する研究は、その必要性にもかかわらず、1)エキノコックスが多細胞の複雑な生物であること、2)中間宿主と終宿主という二つの宿主をもち、寄生部位が異なること(肝、肺臓に対して小腸)、3)宿主の免疫機構を逃れるシステムが複雑であること、4)実験者に対して感染のリスクが伴うこと、5)大動物(単包条虫の場合有蹄家畜)を実験に使うことが困難であること、などの理由から、充分になされていない。しかしながら、我々グループは、前回のプロジェクトにおいて、中間宿主における多包条虫の定着を防ぐ手段としては、「ワクチン」が有望である事を感染実験により明らかにしてきた。中間宿主のワクチン開発は単包条虫対策に応用が可能であり、マウスを用いた多包条虫での研究が、公衆衛生上重要だけでなく、畜産分野で経済的損失を招いている単包条虫の対策に貢献する。また、終宿主におけるエキノコックス感染については、加齢による感

染率の低下、特異抗体の産生、再感染時にみられる顕著な宿主反応などが、自然感染や実験感染により明らかにされており、我々も実験的な反復感染により、抵抗性を得たイヌの作出に成功していることから、宿主に感染抵抗性を付与するワクチンによる感染防御は実現可能であると考えられる。すなわち、媒介動物をターゲットとしたワクチン開発は、公衆衛生学領域ならびに畜産学領域で求められる本症解決の社会的な要求に応えるものである。

一方、北海道立衛生研究所は、エキノコックス実験に特化した施設を設置している。この施設では20年にわたり同一の分離株を継代維持し、エキノコックスの生物学的性状を実験的に明らかにすることで、衛生教育のための基礎的な情報を供給してきた。

我々は、新たなエキノコックス対策の戦略として、寄生蠕虫症では未開発の分野であるワクチン戦略の導入を考え、前段のプロジェクトとして、平成18年度-20年度基盤研究(C)「エキノコックスcDNAライブラリーを基盤とした感染イヌ対策法の検討」を行い、中間宿主動物への感染を防御する免疫を誘導する新規蛋白EMY162を発見、遺伝子emY162の構造を明らかにした。この遺伝子については、ワクチンおよび血清診断の有用性を確認し、特許を取得した(平成24年8月10日、特許第5055522号)。

2. 研究の目的

(1)中間宿主ワクチン候補蛋白を用いた粘膜免疫の有用性、ならびに効果的な免疫を誘導するアジュバントについての検討を行う。

(2)中間宿主の感受性に関する遺伝子領域の QTL (量的遺伝子座)解析をおこない、感受性に関する遺伝子の関与を明らかにする。

(3)終宿主におけるエキノコックスの感染防御免疫を誘導する抗原候補の探索をおこなう。

を目的として遂行した。

3. 研究の方法と結果

(1)粘膜免疫法の検討

皮下免疫によりワクチン効果の有用性が確認されている rEm-TSP1 および rEm-TSP3 を用いて、毒性のない CpG ODN(CpG oligodeoxynucleotides) アジュバントとし、BALB/c マウスに対し鼻腔内免疫を行い、その効果を検査後 4 週目に肝臓に形成される病巣数の減少をカウントする事によりを評価された。その結果、コントロール群と比較して、rEm-TSP1 免疫群は 37.1%($p < 0.05$)、rEm-TSP3 免疫群は 62.1%($p < 0.001$)減少し、ワクチン効果を示した。また異なった方法によるワクチン効果の違いを検討するため、rEm-TSP3 をもちいて CpG アジュバントを用いた鼻腔内免疫とフロイントアジュバントを用いた皮下免疫を ELISA による全身及び粘膜の抗体反応を比較検討した。その結果、皮下免疫では 81.9%($p < 0.001$)、鼻腔内免疫では 62.8%($p < 0.01$)の減少を示した。両者の実験で強い血清中の IgG, IgG1, 及び IgG2 の反応を示した。また鼻腔内免疫では鼻腔と腸管において、皮下免疫より有意に高い IgA 応答をを誘導した。両者の免疫で肝臓における高い IgA 応答を確認した ($p < 0.001$)。免疫組織染色により Em-TSP1 と Em-TSP3 は多包条虫のシスト、原頭節および成虫の表面に広範囲に認められることが分かった。さらに Em-TSP3

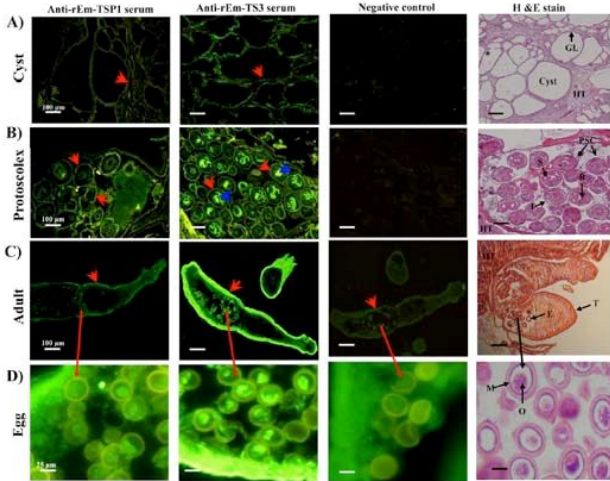


図1 Em-TSP1 と Em-TSP3 に対する抗体による免疫組織染色。Em-TSP1 と Em-TSP3 は多包条虫のシスト、原頭節および成虫の表面に広範囲に認められ、Em-TSP3 は原頭節と六鉤幼虫の内部にも存在する。(Dang et al. 2011) [↗](#)

は原頭節と六鉤幼虫の内部にも存在することがわかった(図1)。これらのことから rEm-TSP3 の CpG をアジュバントとした投与は全身的並びに局所的な免疫を誘導し、多包虫症に対する有意な防御を誘導することを示した。

ヨ - ネ 菌 *Mycobacterium avium* の fibronectin-attachment protein(FAP)は宿主腸上皮細胞への接着と侵入に不可欠であり、粘膜免疫にも緊密な関係があることが報告されている。FAP と他の蛋白質を混合して使用すると、アジュバント効

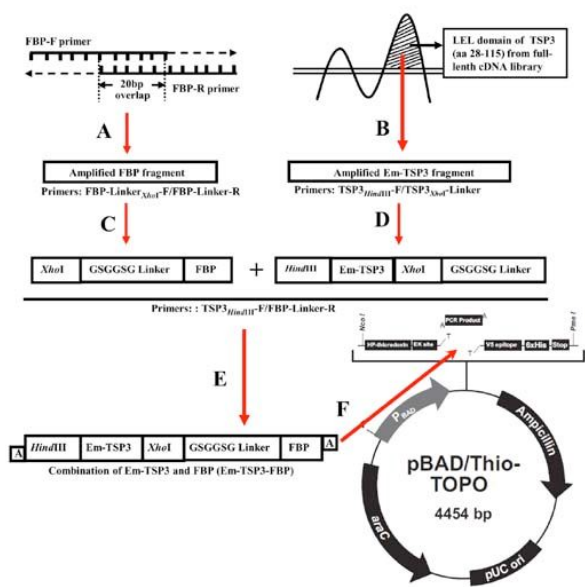


図2 融合 rEm-TSP3-FBP プラスミドの構築の概要(Dang et al. 2012)

果があることが知られているが、FAP と他の蛋白質を融合させた場合の効果は不明である。今回、Em-TSP3 と FAP の一部である fibronectin-binding protein(FBP)を融合蛋白質として発現させ(図2)、アジュバントを用いず、BALB/c マウスに経鼻免疫した。抗体応答を調べたところ、高い血清 IgG 及び各臓器(鼻腔、肝臓、肺、脾臓、腸等) IgA 抗体価がえられた。この結果より、TSP-FAP 融合蛋白質が抗多包虫ワクチン開発における有望な方法であることが示唆された。

(2) 中間宿主の感受性に関する遺伝子領域の QTL (量的遺伝子座) 解析

中間宿主ワクチンについては、その適用にあたり、数々の制限が予測される。特に近交系マウスにおける感受性の差の存在は、感受性が遺伝的な支配を受けていることを示唆し、この解析が将来のワクチン開発に重要であると考えられたため、感受性の高いDBA/2(D2)と抵抗性であるC57BL/6(B6)のバッククロスマウスを用いて、多包条虫虫卵の感染後4週目の肝臓のシストをカウントする事で示される定着数(定着)と感染後16週の病巣に含まれる原頭節の数(発育)について、QTL(量的遺伝子座)解析を行った。その結果、定着については、第6染色体にsignificantな領域があり、幾つかのsuggestiveな領域があること、原頭節の形成に関しては第1染色体染色体上にhighly significantな領域があることを示す事が出

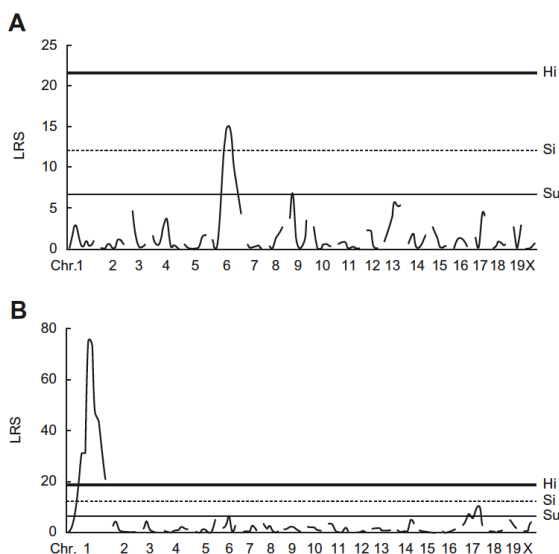


図3 D2マウスとB6マウスのF1と、D2マウスをバッククロスさせたマウスに多包条虫虫卵を感染させ、定着(A)と原頭節の形成(B)に係わる遺伝子の存在について染色体の領域を調べた。定着に係わる遺伝子は第6染色体上にsignificant(Si)の領域があり、原頭節の形成には第1染色体上にhighly significant(Hi)があることが明らかになった(Nakao et al. 2011)。

来た(図3,4)。感受性の遺伝子支配については、ハイリスクグループの推定にも重要であり、ワクチンを行う上で重要な知見であると考えられた。

(3)終宿主におけるエキノкокスの感染防御免疫
エキノкокス終宿主ワクチンの開発は将来的に飼いいヌからヒトへ、あるいは終宿主動物の感染率を長期的に下げる有力な手段になり得る可能性があ

る。ワクチンとして有力な候補を見出すため、エキノкокスに感染させたイヌから、血清および腸管拭い液を採取した。これらの検体に反応する抗原を二次元ウェスタンブロット(2D-WB)法によりスクリ

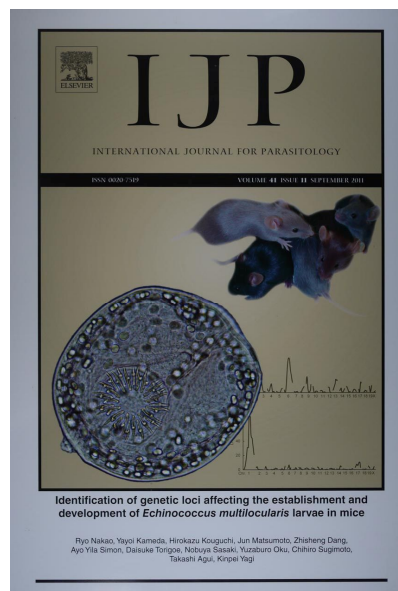


図4 論文が掲載されたI.J.P vol.41 (11)の表紙(Nakao et al. 2011)

ーニングした。特に強く反応した成分(SRf1)を、幼虫の細胞破碎液からゲルろ過カラムによって精製した。この抗原の性質を、免疫染色および糖鎖染色によって調べた。さらにこの抗原を粘膜アジュバントと共に4回経鼻および3回経口免疫を行い、実験感染後、腸管内に寄生する成虫の数を測定することで、感染防御効果を調べた。エキノкокス感染イヌから採取した腸管拭い液を用いて2D-WBを行った結果、タンパクスポットには全く反応を示さず、膜の上端にスメアーバンドとして分離される巨大糖タンパク質成分に強い反応を示した。この成分は感染イヌ血清が強く反応する成分と同一であると考えられ、本成分が感染イヌの免疫に強く認識されていることが明らかになった。この抗原に対する抗血清を用いて幼虫シストおよび成虫の免疫染色を行うと、幼虫および成虫のどちらにおいても虫体表面に局在していることが明らかになった(図5)。この抗原を用いて免疫したイヌに50万原頭節を含むシストを投与し、実験感染を行うと、何も投与しないグルー

ブに比べて 86.7%の寄生成虫数の減少が認められた。一方、アジュバントのみを投与したグループに 49.1%の寄生数の減少が確認され、アジュバントによる感作がイヌのエキノコックス感染に対する防御機構に何らかの関係を持つことが示唆された(図6)。今後、どのようなメカニズムによってイヌの感染防御効果が誘導されているのか検討する必要がある。

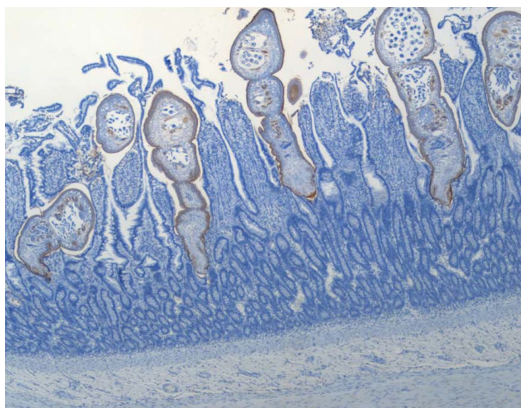


図5 ワクチン効果が認められた抗原 (SRf1) に対する抗体を用いた免疫組織染色。腸管に寄生した成虫の体表が強く染まる。(Kouguchi et al. 2013)

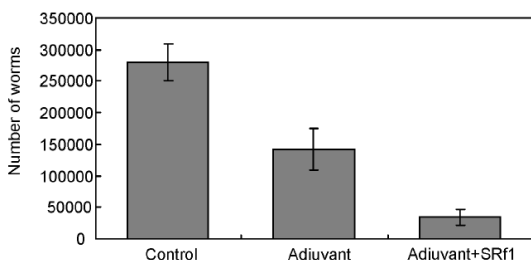


図6 SRf1の粘膜免疫の効果 それぞれのイヌはCTBアジュバントとともに経鼻免疫が4回行われ、ブースター免疫として3回の経口免疫も追加された。その結果SRf1とアジュバントで免疫したイヌでは虫体数の有意な減少が認められた。(Kouguchi et al. 2013)

4. まとめ

我々は、北海道立衛生研究所に設置された多包条虫の実験に特化した施設を用いて実験を行い、多包条虫のワクチン戦略に関する多くの知見を得た。中間宿主のワクチンは、ヒトを含む動物の感染の抑制につながり、終宿主動物のワクチンは、ペット動物

であるイヌからの感染リスクの減少のみならず、経口ワクチンの開発が進めば、既にエキノコックスコントロールに向けて効果的な対策である野外における駆虫薬散布に代わる有効な手段を提供する可能性がある。今回の研究により基礎的ではあるが、革新的なエキノコックスワクチンに関する情報を提供する事が出来た。

5. 主な発表論文等

雑誌論文(計5件)

A pilot study on developing mucosal vaccine against alveolar echinococcosis (AE) using recombinant tetraspanin 3: Vaccine efficacy and immunology. Dang Z, Yagi K, Oku Y, Kouguchi H, Kajino K, Matsumoto J, Nakao R, Wakaguri H, Toyoda A, Yin H, Sugimoto C PLoS Negl Trop Dis. (2011) 6(3): e1570 査読あり

Identification of genetic loci affecting the establishment and development of *Echinococcus multilocularis* larvae in mice. Nakao R, Kameda Y, Kouguchi H, Matsumoto J, Dang Z, Simon AY, Torigoe D, Sasaki N, Oku Y, Sugimoto C, Agui T, Yagi K. Int J Parasitol. (2011) 41(11):1121-8 査読あり

Mucosal adjuvanticity of fibronectin-binding peptide (FBP) fused with *Echinococcus multilocularis* tetraspanin 3: systemic and local antibody responses. Dang Z, Feng J, Yagi K, Sugimoto C, Li W, Oku Y. PLoS Negl Trop Dis. (2012) 6(9): e1842 査読あり

多包条虫の終宿主診断と感染源対策 奥祐三郎 日本獣医寄生虫学雑誌(2012) 11(1)8-14 査読無し

Characterization of a Surface Glycoprotein from *Echinococcus multilocularis* and Its Mucosal Vaccine Potential in Dogs Kouguchi H, Matsumoto J, Nakao R, Yamano K, Oku Y, Yagi K. PLoS One

(2013) 8(7):e69821. 査読あり

学会発表(計7件)

中尾 亮、亀田弥生、孝口裕一、松本 淳、党 志勝、Simon, Ayo Yila、鳥越大輔、佐々木宣哉、杉本千尋、奥 祐三郎、安居院高志、八木欣平、エキノコックス症モデルマウスを用いた虫体発育に対する宿主抵抗性の解析 第71回日本寄生虫学会東日本支部会 2011年10月1日 杏林大学医学部(東京都三鷹市)

八木欣平、北海道のエキノコックス症コントロールの現状と課題-今、どのような研究が求められているのか?- 第6回蠕虫研究会、2012年7月28日 青島サンクマール(宮崎県宮崎市)

Dang Z, Yagi K, Li W, Sugimoto C, Oku Y. Vaccine development against alveolar echinococcosis using tetraspanin. International Symposium on Cestode Zoonoses Control, 2012年10月29日、上海パラダイスホテル(上海市, 中華人民共和国)

奥祐三郎、水上智秋、土井純子、松本淳、八木欣平。多包条虫感染マウス(感受性 DBA/2 と抵抗性 C57BL/6)の肝臓病変部の宿主遺伝子発現。平成 24 年度日中合同シンポジウム-中国・青海省に蔓延する人獣共通寄生虫・エキノコックス 3 種とウシバエ類の疫学の解明と対策法の確立-、2013 年 1 月 13 日 ホテルメリージュ(宮崎県宮崎市)

奥祐三郎、水上智秋、土井純子、松本淳、孝口裕一、八木欣平、多包条虫感染マウス(感受性 DBA/2 と抵抗性 C57BL/6)の肝臓病変部の宿主遺伝子発現。第82回日本寄生虫学会、2013年3月30日、東京医科歯科大学湯島キャンパス(東京都)

Kouguchi H, Matsumoto J, Nakao R, Yamano K, Oku Y, Irie T, Yagi K., Characterization of a Surface Glycoprotein from *Echinococcus multilocularis* and Its Mucosal Vaccine Potential in Dogs, 第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 11 日~2013 年 9 月 13 日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

孝口裕一、松本淳、中尾亮、山野公明、入江隆夫、奥祐三郎、八木欣平、多包条虫感染イヌの血清および腸管粘液を利用した終宿主粘膜ワクチン抗原候補の探索、第 59 回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会北日本支部合同大会、2013 年 10 月 5 日、酪農学園大学研修館(北海道江別市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八木欣平(YAGI KINPEI)

北海道立衛生研究所・感染症センター・感染症部・部長

研究者番号: 70414323

(2) 研究分担者

奥祐三郎(OKU YUZABURO)

鳥取大学・農学部・獣医学科・教授

研究者番号: 60133716

松本淳(MATSUMOTO JUN)

日本大学・生物資源科学部・獣医学科・准教授

研究者番号: 70296169

(3) 連携研究者

孝口裕一(KOUGUCHI HIROKAZU)

北海道立衛生研究所・感染症センター・感染症部・研究職員

研究者番号: 50435567