

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 15 日現在

機関番号：80106

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790464

研究課題名 粘膜免疫法を基盤としたエキノコックス終宿主経口ワクチンの開発

 研究課題名 Development of the oral vaccine for definitive hosts against *Echinococcus multilocularis* infection based on mucosal immunization.

研究代表者

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

研究成果の概要：イヌやキツネに対する多包条虫用終宿主ワクチンの開発にはほとんど進展が無く、同じエキノコックス属の寄生虫である単包条虫用の終宿主ワクチン開発の研究が数例存在するのみである。本研究では、多包条虫用ワクチンの有力な候補となる糖タンパク質成分を見だし、2年間の研究期間中、その候補抗原の性質を調べ、経口ワクチン候補としての適性を有していることを明らかにした。実際にイヌに粘膜免疫を実施し、実験的に感染させることで、感染防御効果の評価を行うと何も投与していないグループに比べ、免疫を施したグループは、およそ87%の寄生虫体数の減少を認めた。一方、粘膜アジュバントのみを免疫したグループにおいても、およそ49%の虫体数の減少を認め、今後どのようなメカニズムによって感染防御効果が誘導されているのかを検証する必要性が示唆された。

研究成果の概要：Alveolar echinococcosis is a refractory disease caused by the metacestode stage of *Echinococcus multilocularis*. The life cycle of this parasite is maintained primarily between foxes and many species of rodents; thus, dogs are thought to be a minor definitive host except in some endemic areas. However, dogs are highly susceptible to *E. multilocularis* infection. Because of the close contact between dogs and humans, infection of dogs with this parasite can be an important risk to human health. Therefore, new measures and tools to control and prevent parasite transmission required. Using 2-dimensional electrophoresis followed by western blot (2D-WB) analysis, a large glycoprotein component of protoscoleces was identified based on reactivity to intestinal IgA and serum IgG in dogs experimentally infected with *E. multilocularis*. Dogs (n = 6) were immunized intranasally and orally with this antigen. As a result, dogs immunized with this antigen showed an 87% reduction in worm numbers compared to control dogs (n = 5) who received only PBS administration. On the other hand, the control group immunized with the adjuvant alone showed a 49.1% reduction in the mean number of adult worms compared with that of the control group. Therefore, studies are needed to further support the immunogenicity of the antigen.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：基礎医学、寄生虫学（含衛生動物学）

キーワード：蛋白質、遺伝子、バイオテクノロジー、エキノコックス、ワクチン、組換え抗原、粘膜免疫

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

エキノコックス（多包虫）症は、本寄生虫の排出する虫卵を偶発的に経口摂取することにより発症する難治性寄生虫疾患である。この寄生虫は、キツネやイヌ等の終宿主の腸管において成虫まで成育し、感染源である虫卵をその糞便中に排出する。北海道内のイヌのエキノコックス感染率は 0.4%~1%との報告がなされており、推定上、800~2000 頭もの感染イヌが道内に存在することになる。イヌは、本寄生虫の生活環の維持に直接的な役割を持つとは考えられていない。しかしながら、イヌと人との濃厚な接触頻度を考慮すると、イヌの感染は飼い主はもとより、その家族、地域住民にとって重大な脅威となる。

現在、エキノコックス症の流行を制御する有力な手段は、駆虫薬入りの餌（ベイト）散布による媒介動物対策と衛生教育活動である。中でもベイト散布は、世界中の流行地で実施され、その効果が証明されている。本邦でも、いくつかの市町村では、ベイト散布が取り込まれており、散布地域におけるキツネの感染率の低下が認められている。しかしながらこの方法で、キツネの感染率を低い状態に維持するためには、ベイトの散布を恒久的に、少なくとも数ヶ月に一度の散布を継続していく必要があり、このことは社会的および経済的な負担を負う必要性があることを意味している。長期間に渡って終宿主におけるエキノコックスの感染を防御するワクチンの開発は、これらの問題を克服する有力な手段になりえる。

2. 研究の目的

(1) 終宿主において、エキノコックスの感染防御免疫を誘導する、新しい抗原候補を探索する。

(2) 抗原候補の性質を明らかにし、粘膜免疫を行うに当たって必要と考えられる、プロテアーゼ消化耐性や抗原性を評価する。

(3) 抗原候補を実際に実験動物に粘膜免疫し、実験感染を行うことで、感染防御効果を評価する。

(4) 将来的に抗原候補を用いて、終宿主のエキノコックス感染率を下げるには、その抗原の安定性や、ベイト散布などの合理的な投与方法を検討する必要がある。そのため、経鼻投与や消化管プロテアーゼ耐性コーティングなどの効果を検討する。

3. 研究の方法

(1) エキノコックスの虫卵をコトナラットに経口投与し、約 10 ヶ月間増殖させた。幼虫シストから、原頭節を取り出し、抗生物質を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を用い

て 6~7 回洗浄した。これを 2.4% TritonX100 を含む PBS 中で超音波破碎機を用いてホモゲナイズし、細胞破碎液を調製した。

(2) 細胞破碎液をアセトン沈殿し、そこに含まれている脂質や核酸および塩などを除いた。この粗抗原を ZOOM (Invitrogen) システムを用いた二次元電気泳動に負荷した。

(3) 二次元電気泳動により分離した虫体由来タンパク質を PVDF 膜に転写し、予めエキノコックスに感染させたイヌの血清あるいは腸管拭い液と反応させ、それぞれ、血清中の IgG および粘膜面に分泌する IgA が結合するタンパク質を検出した。

(4) 血清 IgG および腸管拭い液に含まれる IgA が強く反応する成分を Superose6 (GE Health Science) カラムを用いたゲルろ過クロマトグラフィーによって精製した。これを SRF1 と名付け、本研究におけるワクチン候補抗原とした。

(5) SRF1 の性質を調べるため、消化管プロテアーゼに対する消化耐性を調べた。すなわち、SRF1 をペプシンあるいはトリプシンおよびキモトリプシンの存在下で消化した後、Superose6 カラムを用いたゲルろ過クロマトグラフィーに付加し、ピークエリアの減少を観察した。

(6) SRF1 の虫体における局在を、balb/c マウスを用いて作製した抗 SRF1 抗体を用いて、明らかにした。虫体はコトナラットを用いて増殖させた原頭節およびイヌに実験的に感染させた腸管内に寄生する成虫 (23 日目) を 10%ホルマリン PBS で固定し、組織免疫染色を行なった。

(7) イヌへの免疫は SRF1 を経鼻および経口投与することにより行なった。経鼻免疫は 400 μ g の SRF1 に 200 μ g のコレラ毒素 (CT) B サブユニット (CTB) を混合し、これをスプレーシリンジ (ニプロ社製) を用いて 0、14、28 および 42 日目に鼻腔内に噴霧することで行なった。経口免疫は、15mg の SRF1 に CT0.5mg を混合し、凍結乾燥した後腸溶性カプセル (日生医薬) に封入し、28、42 および 56 日目に直接経口投与した。一週間後、約 50 万原頭節を含む幼虫シストをイヌに経口投与し、実験感染を行なった。感染 35 日後、剖検し、腸管内に寄生する虫体数を測定した。コントロール群は、PBS のみあるいはアジュバントのみを同様なスケジュールで投与した 2 つの群を用いた。

4. 研究成果

(1) エキノコックスの幼虫から抽出した粗抗原を二次元電気泳動で分離し、エキノコックスに感染させたイヌの血清 IgG あるいは腸

管拭い液中に分泌される IgA と反応させ、粘膜ワクチン候補抗原の探索を行なった。その結果、感染イヌ血清は数多くのスポットと共にゲルの上端に分離されるスメア状のバンドと強く反応した。一方、感染イヌ腸管拭い液 IgA は、ほとんどタンパクスポットに反応を示さず、ゲル上端に分離されるスメア状のバンドのみに反応した。先に我々は、このゲル上端に分離されるスメア状のタンパク質は、4000kDa の排除限界を示すゲルろ過クロマトグラフィーにおいて、ボイドボリュームに溶出される巨大糖タンパク質が含まれていることを明らかにしている。この報告を参考に Superose6 カラムを用いたクロマトグラフィーで、この糖タンパク質成分の精製を試みた。粗抗原を蒸留水に溶かし Superose6 カラムに負荷すると、図 1 に示すような二つのピークが溶出した。それぞれのフラクションを二次元電気泳動および、二次元ウェスタンブロット法で分析すると、先に溶出したピークフラクションには、目的の巨大糖タンパク質が豊富に含まれ、後に溶出されたそれには二次元電気泳動上でスポットとして検出されるほとんどのタンパク質が含まれていることが明らかになった。先に溶出されたピークフラクションを SRf1 と名付け、免疫抗原としての性質を調べることにした。

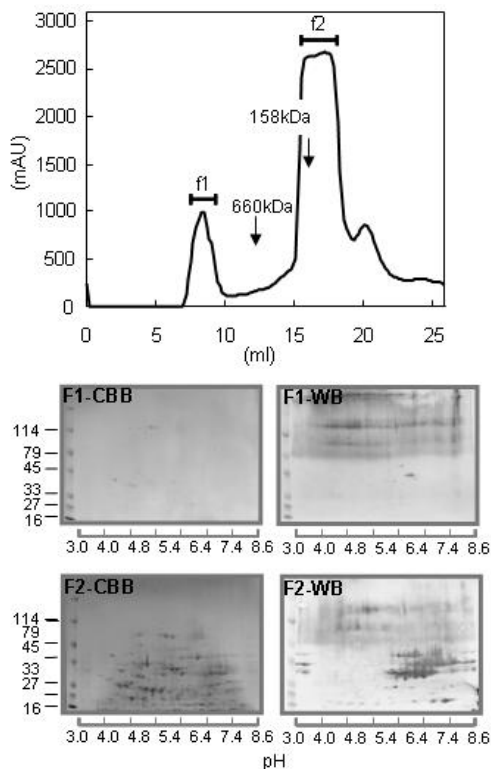


図 1. Superose6 カラムを用いた SRf1 の精製
 (2) SRf1 に対する抗血清を balb/c マウスを用いて調製した。この抗血清を用いて、SRf1 の幼虫あるいは成虫における局在を調べた。その結果、図に示すように、幼虫および

成虫ステージのどちらにおいても、虫体表面に発現していることが明らかになった。特に、幼虫および成虫のどちらのステージにおいても鉤や吸盤表面に局在していることから、終宿主が感染中間宿主を捕食し、幼虫を経口摂取して感染を受ける際に、この糖タンパク質が腸管内壁に接触し、宿主の免疫に認識されるというメカニズムが推察された (図 2)。

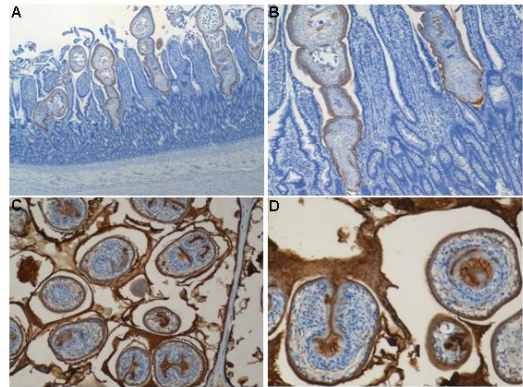


図 2. エキノコックスの幼虫および成虫における SRf1 の局在 A および B: 実験的にエキノコックスに感染させたイヌの小腸に寄生する成虫 (23 日目)。C および D: 実験的にエキノコックスに感染させたコトナットの肝臓に寄生する幼虫。褐色に染色された部分に SRf1 が局在していることを示している。

(3) SRf1 を経口的に投与することを考えた場合、消化管プロテアーゼに対する消化耐性を示すことが望ましい。今回、SRf1 をペプシンあるいはトリプシンおよびキモトリプシンの存在下で 1-4 時間消化し、Superose 6 カラムにおけるピークの減少を観察した。その結果、コントロールのピークエリア 31.1mAU に対して、ペプシン (1mg/ml) 存在下で 1 および 4 時間消化した試料は 28.8 および 26.6mAU をそれぞれ示した。このように、およそ 80% の SRf1 が 4 時間のペプシン消化によっても残存した。同様に、トリプシンおよびキモトリプシン存在下で消化させた場合、1h では 31.1mAU、4 時間では 30mAU を示し、SRf1 が高いトリプシン消化耐性を示すことが明らかになった。

(4) 前述したように、SRf1 は宿主の免疫に認識され、虫体表面、特に、宿主の粘膜に接触する部位に発現し、プロテアーゼによる消化耐性を示すことが明らかにされた。このように、SRf1 が粘膜免疫ワクチン抗原候補としての適性を持つことが示唆された。我々は、この抗原を用いて、粘膜アジュバント (CT および CTB) と共に実際にイヌに免疫を施し、その後、約 50 万原頭節を含む病巣を経口投

与し、腸管内に寄生する成虫数をカウントすることで、宿主感染防御効果を判定した(図4)。

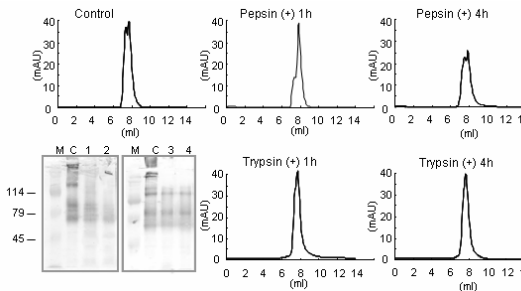


図3. SRF1の消化管プロテアーゼに対する消化耐性 SRF1はペプシン(1mg/ml)あるいはトリプシンおよびキモトリプシン(それぞれ0.4mg/mlおよび1.7mg/ml)の存在下で、1-4時間消化された。SRF1はペプシンによる4時間の消化によって80%残存し、トリプシンによる4時間の消化ではほぼ変化がなかった。ウェスタンブロットは、それぞれのピークフラクションをSDS-PAGEによって分離し、感染イヌ血清によって検出した。レーンM:分子量マーカー、C:SRF1(control)、1および2:ペプシン消化SRF1(1および4時間)、3および4:トリプシン消化SRF1(1および4時間)。

その結果、コントロールとした5頭のイヌにはそれぞれ298,675、349,875、169,875、289,000および291,000匹の成虫が確認された。一方、アジュバントのみを同じスケジュールで免疫したイヌ6頭には201,450、215,850、175,800、41,800、73,800および145,125匹、SRF1をアジュバントと共に免疫した6頭は、210、7,700、37,675、20,670、64,550および77,000匹が確認された。SRF1を免疫したグループは平均値で87.6%虫体数が減少し、SRF1の粘膜免疫が高い宿主感染防御効果を誘導することが明らかになった。一方、粘膜アジュバントのみを免疫したグループでも、49.1%の減少が見られ、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おける防御機構に何らかの関係を持つことが示唆された。今後どのようなメカニズムで、宿主感染防御が引き起こされているか明らかにする必要があると考えられる。これらの成果は現在欧文誌に投稿中である。二年間の研究期間中、虫体表面に存在する巨大糖タンパク質をエキノコックス感染イヌの血清IgGおよび腸管拭い液IgAの反応を基に見出し、その抗原を粘膜免疫することで有意な終宿主感染防御効果を誘導することに成功した。現時点で、イヌのエキノコックスに対する感染防御に関する知見は少なく、免疫によって宿主感染防御が生じるのかどう

かは、議論の最中にある。その中、今回の研究成果は世界で初めて明確な、免疫による防御効果を示したと言える。しかしながら、この効果が、一時的なものか、あるいは長期的にワクチンとして使用できる効果を示すかどうかは不明である。本寄生虫の終宿主はイヌ科動物で、実質イヌのみしが実験動物として使用することが出来ず、代替となるモデル動物が存在しないことも、研究を進める上で非常に困難な状況を生み出している。今後は、本研究で得られた成果を基に、免疫抗原の量をより節約できるアジュバントや投与方法を検討する必要がある。これらの課題を克服することができれば、本寄生虫を長期的に制御するワクチン入りバイトや飼い犬に対するワクチンの開発が期待できる。

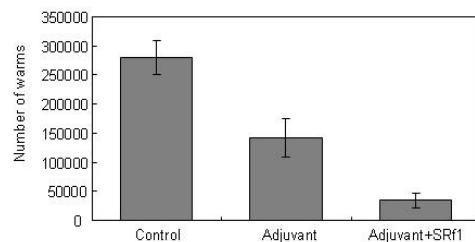


図4. SRF1を用いた粘膜免疫によるイヌのエキノコックス宿主感染防御効果

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4件)

- ① *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) Sep;41(11):1121-8. 査読あり
- ② 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他4名 *PLoS Negl Trop Dis.* (2012);6(3):e1570. 査読有り
- ③ 初代幼虫シストを用いたエキノコックス症血清診断用抗原成分のロット間差 孝口裕一、山野公明 北海道立衛生研究所報 (2012) 62、95-97 査読有り
- ④ Molecular cloning and characterization of major vault protein of *Echinococcus multilocularis*. Goto A, Kouguchi H, Yamano K, Sawada Y. *Exp Parasitol.* (2013) 134、102-108 査読有り

〔学会発表〕(計3件)

- ① 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大会，
2011年10月1日，東京都三鷹市
- ② 党志勝 八木欣平 孝口裕一 杉本千尋
奥祐三郎 Tetraspanin を用いた抗多包虫症
免疫粘膜免疫ワクチンの開発，第67回日本
寄生虫学会北日本支部会，2011年10月7日，
石川県金沢市
- ③ 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
学会大会，2013年3月30日，東京都文京区

6. 研究組織

(1) 研究代表者

孝口 裕一 (KOUUCHI 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

(2) 研究協力者

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・主幹(医動物グループ)
研究者番号：70414323

松本 淳 (MATSUMOTO JUN)
日本大学・生物資源学部 獣医学科・准教
授
研究者番号：70296169

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