

令和元年5月30日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08033

研究課題名(和文)ネオスポラ症をモデルとした経口投与型藻類クラミドモナスワクチンの作出

研究課題名(英文)Development of alga Chlamydomonas oral administration type vaccine for neosporosis as a model.

研究代表者

池 和憲 (Ike, Kazunori)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・教授

研究者番号：50159597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ネオスポラ症は、細胞内寄生原虫*N. caninum*感染に起因する疾患で、牛では母牛における死・流産および先天感染新生牛の神経・筋疾患、犬では幼犬の後駆麻痺を主徴とする進行性の神経・筋疾患である。本症伝播で問題となるのは、非妊娠時の原虫感染による宿主体内での増殖と分布(水平感染)、とそれに続く妊娠時の原虫感染あるいは妊娠等の刺激が誘因となるシスト内原虫の再活性による垂直感染である。水平感染に対してはTh1免疫が、垂直感染に対してはTh2が有効で、に対してはTh1型アジュバントを用いた注射型ワクチンが、に対しては藻類経口投与型ワクチンに誘導されたTh2免疫が効果的で省力的であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的は、クラミドモナスを用いた藻類ワクチンの(a)粘膜アジュバントおよび発現抗原遺伝子のコドンの最適化、(b)宿主藻類培養条件による蛋白発現の最適化、そして(c)経口投与型ワクチンとしての局所免疫および全身免疫誘導におけるワクチンプログラムの最適化、をすることで更なるネオスポラ症に対する効果的かつコストパフォーマンスに優れたワクチン開発の道を開き、他の感染症への応用性も明示することである。本研究を進めることで注射剤ではなく経口投与型ワクチン開発をすることで、経費節減や開発途上国での使用に向けて有意義なものである。

研究成果の概要(英文)：Neospora caninum is an apicomplexan protozoan parasite closely related to *Toxoplasma gondii*. *N. caninum* causes repeated abortions, stillbirths, and transplacental transmission in cattle and neuromuscular progressive disease in dogs (neosporosis). There are two problems in this disease. One is horizontal transmission by tachyzoite stage of *N. caninum*. The other is vertical transmission via placenta of the reactivated protozoan stage-converted from bradyzoite (tissue cyst) to tachyzoite.

For horizontal transmission, Th1 immunity is effective. The method to produce this immunity is effective inoculation of the injection type vaccine used to Th1 immune adjuvant. For vertical transmission, Th2 immunity is effective. Recombinant alga *Chlamydomonas* vaccine (NcSAG1) was effective to make Th2 immunity and might contribute the saving of labor.

研究分野：獣医寄生虫学

キーワード：Neospora caninum ネオスポラ症 経口投与 クラミドモナス ワクチン 原虫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ネオスポラ症は、細胞内寄生原虫 *Neospora caninum* 感染に起因する疾患で、牛では母牛における死・流産および先天感染新生牛の神経・筋疾患、犬では幼犬の後駆麻痺を主徴とする進行性の神経・筋疾患である。本症伝播で問題となるのは、非妊娠時の原虫感染による宿主体内での増殖と分布(タキゾイトによる水平感染)とそれに続く妊娠時の原虫感染あるいは妊娠等の刺激が誘因となるシスト内原虫(ブラディゾイト)の再活性による垂直感染である。

以前の研究で水平感染に対しては Th1 型免疫が、垂直感染に対しては Th2 型が有効であることを明らかにし、これに対しては Th1 型アジュバントを用いた注射型ワクチンが、これに対しては藻類経口投与型:試作ワクチンに誘導された Th2 型免疫が効果的であることを明らかにし、経口投与型の藻類ワクチンの可能性を見いだした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、クラミドモナスを用いた藻類ワクチンの (a) 粘膜アジュバントおよび発現抗原遺伝子のコドンの最適化、(b) 宿主藻類培養条件による蛋白発現の最適化、そして (c) 経口投与型ワクチンとしての局所免疫および全身免疫誘導におけるワクチンプログラムの最適化、をすることで更なるネオスポラ症に対する効果的かつコストパフォーマンスに優れたワクチン開発の道を開き、他の感染症への応用性も明示することである。

3. 研究の方法

本研究の方法は以下の項目について検討した。

(1) 大腸菌由来易熱性毒素 (LT-B) アジュバントの検証

毒素原性大腸菌の産生する易熱性毒素 (LT) の B サブユニット (LT-B) である。LT はコレラ毒素に類似した毒素で、毒素本体の A サブユニットと粘膜への付着因子である B サブユニットから構成されている。LT は主にヒト由来株と豚由来株から産生され、A サブユニットはヒト由来株と豚由来株では塩基配列に相違が認められるが、B サブユニットには相違は認められない。従って、B サブユニットはヒト粘膜および豚粘膜で同様のリセプターを認識することを意味している。LT-B も CT-B と同様に GM1 ガングリオシドを認識することが報告され、広い宿主領域での使用の可能性が示唆される。LT-B の使用に当たってはまず、CT-B の時と同様にクラミドモナスでの発現を考慮し、そのコドンの最適化を行う。最適化は“かずさ DNA 研究所”のホームページ (www.kazusa.or.jp) を利用して設計し、DNA 合成の依頼によって確認と合成の委託を行った。今回供試する発現ベクターは“クラミドモナス - 大腸菌シャトルベクター”である pChlamy_4 (Invitrogen) である。まず LT-B の粘膜アジュバントとしての粘膜への付着能をオレンジ系蛍光蛋白 tdTomato と LT-B の共発現を行い基礎試験に供試した。これら蛍光色素についてもコドンの最適化を行った後にベクターへ挿入を行った。

粘膜細胞への付着性はヒト腸管粘膜上皮細胞である HT-29 細胞を用い、上記 LT-B 組換え体を HT-25 細胞へ 37、60 分間接着させ、PBS(-)にて 3 回洗浄後、蛍光顕微鏡下でその付着性を確認した。

(2) ワクチン用抗原遺伝子のクローニング

ワクチン用抗原としてはタキゾイト表面由来 NcSAG1 はすでに pChlamy_4 へクローニングを行っており、すでにクラミドモナス内での発現を確認している。本抗原も LT-B と同様にコドンの最適化を行い、遺伝子合成、クローニング、および発現を行った。

(3) 遺伝子の形質転換クラミドモナスの培養条件の検討

クラミドモナスは緑藻類に属し、クロロフィル a および c を持つ。またクラミドモナスの蛋白発現系には核内、葉緑体内、ミトコンドリア内の 3 種類のゲノム内での相同組換えであることが分かっている。本研究に供試する pChlamy_4 は核内ゲノムにランダムに組換えが起こる。クラミドモナス内での蛋白発現には光合成とのバランスが重要で、光合成を活性化させると蛋白発現が抑制されることが知られている。最適な蛋白発現の条件設定には植物インキュベーター (トミー; CLE-303) による光量、培養時間、ならびに溶存酸素量により行う。

(4) クラミドモナス野外分離株の分離

本研究の当初用いる予定のクラミドモナスは実験室内株である *C. reinhardtii* 137c 株である。本研究内ではさらに蛋白発現量等の好条件を満たす野外株の分離を行う。Chlamydomonas 属は単細胞の緑藻類で、2 本の鞭毛とその基部に 2 個の収縮胞を持ち、かつ葉緑体にピレノイドを持つ。しかし本属には 500 以上の種類があり、種の同定は至難の技であるとされている。従って、野外分離株では属レベルまでの同定とする予定である。すでに埼玉県のとろ池 (入間市、秩父市) から 4 株の本属原虫を分離しているが、今後さらに多くのワクチン候補株の分離を行い、より高い蛋白発現株の選択を行う。クラミドモナスの保存は通常の細胞株の保存条件 (セルバンカーやバンバンカー等の保存剤、-80℃) で保存可能である。

(5) 抗原発現クラミドモナスの免疫原性およびワクチンプログラムの作成

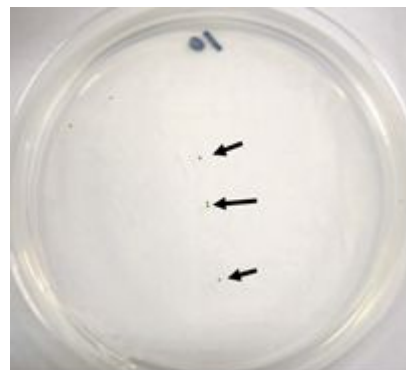
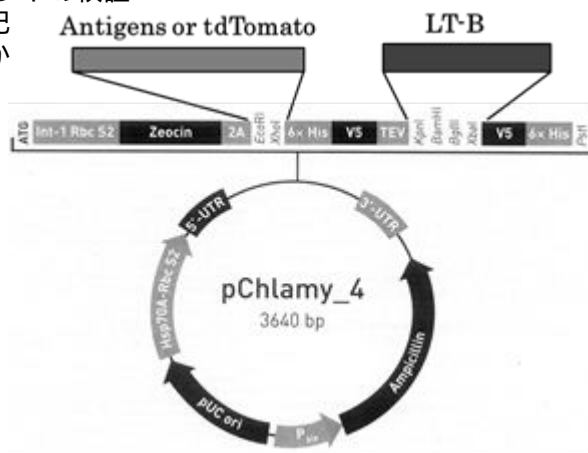
ワクチン (50℃、15 分加熱した不活化藻類) としての免疫原性はマウスへの経口投与による

実験系で評価する。以前の研究から CT-B をアジュバントとしたワクチン候補クラミドモナスでは 1mg/頭の 2 週間(計 4 回投与)で血中抗体が検出できることが判明している。本研究では(2)での挿入遺伝子コドンの最適化、ならびに(3)における蛋白発現の最適化を行うことで、従来よりも高い蛋白発現量を実現させ、抗原に対する抗体(血清と糞便内の IgA, IgM, IgG)産生、Th1 および Th2 型のサイトカイン(主に IFN- と IL-4)産生の動向を調べ、免疫原性の向上と種々の最適なワクチンプラグラム設計を行う。さらにマウスあるいはスナネズミを用いたネオスポラ症に対する防御能を検証する。この過程に最も研究時間を要するものと思われる。

4. 研究成果

(1) 大腸菌由来易熱性毒素(LT-B)アジュバントの検証

毒素原性大腸菌の易熱性毒素(LT)の塩基配列をクラミドモナスでの発現させるために、“かずさ DNA 研究所”のホームページ(www.kazusa.or.jp)を利用して設計し、コドンの最適化を行った。さらにその配列を基に人工遺伝子をファスマック社に依頼することで作製した。本遺伝子を“クラミドモナス-大腸菌シャトルベクター”である pChlamy_4 (Invitrogen)へ挿入組換えを行った。さらに発現蛋白の付着性を確認するために蛍光遺伝子である tdTomato 遺伝子をも組換え挿入した。GFP 遺伝子はさらにこのプラスミドを *Chlamydomonas reinhardtii* 137c 株(Invitrogen)へ、Gene Pulser II(Bio-Rad)を用いて 500V, 50 μF, 800 の条件下で遺伝子導入を行い、形質転換を行った。導入遺伝子体の選択は抗生物質である Zeocin を含む TAP 寒天培地にて 10~14 日、26 での培養で行った。その結果、右図のような組換え体を得ることができた。



本組換え体は培養後、HT-25 細胞への付着試験の結果、細胞への付着性が確認された。

(2) ワクチン用原虫抗原遺伝子の発現

上記作製したクラミドモナスベクターにコドンの最適化を行った抗原遺伝子 NcSAG1 を挿入させた。上記方法で形質転換を行い、SDS-PAGE にて蛋白発現の確認を行った。しかし蛋白発現は抗原遺伝子 NcSAG1 もしくは LT-B の偏った発現を示した。次にこの問題を解消するために LT-B および NcSAG1 の融合遺伝子を合成し、再度 pChlamy_4 へ導入することでベクターを作製し直した。その結果、癒合蛋白として発現していることが確認できた。

(3) 遺伝子の形質転換クラミドモナスの培養条件の検討

遺伝子の形質転換クラミドモナスの培養条件の検討を行った。

CO2 濃度依存性：予備実験の結果から CO2 濃度依存性は確認できなかった。

照度：培養用植物インキュベーター内の照度を 0 ルクス(lx), 1,500 lx, 6,000 lx, 15,000 lx の 4 段階で検討を行った。その結果、0 lx では 14 日以上培養してもクラミドモナスは発現しなかった。1,500 lx では 14 日間、6,000 lx では 10 日間、15,000 lx では 7 日間の培養でほぼ最大の培養数を計測した。それぞれの発現体について SDS-PAGE を行った結果、発現量には差は認めなかった。今後の検討を 15,000 lx で 7 日間の培養で行うこととした。

液相：気相関係：液相：気相関係を 1：10、1：5、1：3、1：2、および 1：1 で上記条件にて検討した。その結果、1：10、1：5、および 1：3 ではほとんど差を認めなかった。一方、1：2 および 1：1 では良好な生育は得られなかった。この結果、液相と気相の関係では概ね液層：気相 = 1：3 が良好な成育を示した。

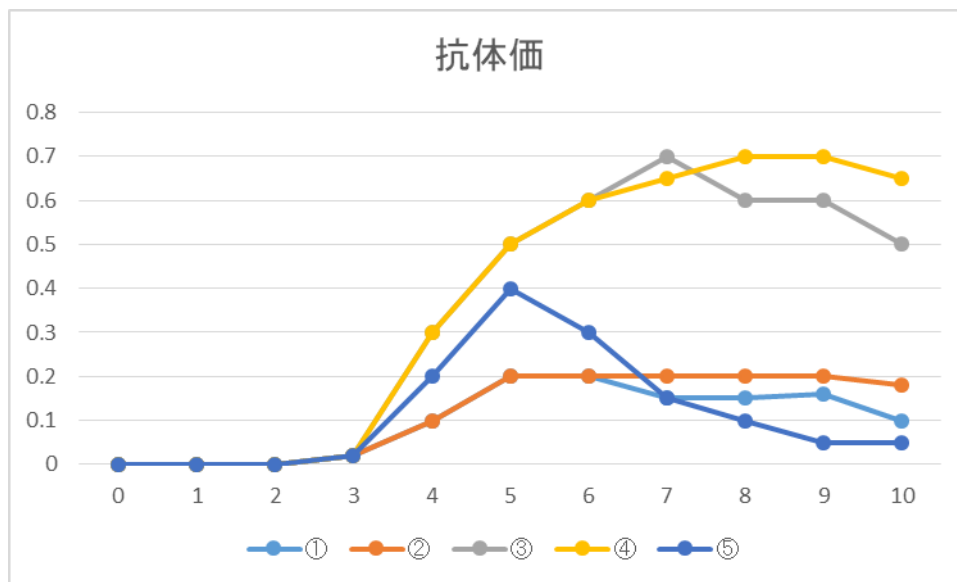
(4) ワクチン剤型の検討

ワクチン剤型については市販の飼料(CE-2、日本クレア)をベースに下記のように検討した。

クラミドモナス乾燥パウダー、クラミドモナス乾燥ペレット、CE-2 パウダー+クラミドモナス乾燥パウダー、CE-2+クラミドモナス混合ペレット、CE-2 のみの 5 種類について検討した。その結果、および ではマウスは殆ど食しなかった。また では食餌の定量が不可能であった。最後に のみが食餌の定量が可能であり、さらにマウスの食餌量が の市販飼料とほぼ同量の食餌量であった。

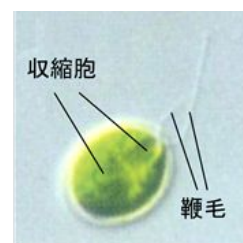
(5) ワクチンプログラムの設定

ワクチンプログラムの設定には以下の投与群を設定した。経口投与のみ(1回/週)、経口投与のみ(2回/週)、注射(1回)+経口投与(1回/週)、注射(1回)+経口投与(2回/週)、注射(1回)の方法で各群マウス10匹(ddy、5週齢、)に投与し、投与後10週間まで各週に各群5匹ずつの採血を尾静脈より行い、その血中抗体価をELISAにて抗NcSAG1抗体価を測定した。結果は下記に示す様に、およびが良好な抗体価を示した。従って、経口投与方法のみでなく、最初に注射剤を投与し、その後経口投与を行うことで良好な抗体が持続することが判明した。



(6) 野外クラミドモナス株の分離

北海道、東京都、埼玉県湖沼より右図のようなクラミドモナス分離株を分離し、分散媒を利用し-150で保存することが出来た。合計20株の分離を行ったが、残念ながら、これら分離株を今回の実験で使用する機会はなかった。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計10件)

Kubota R., Matsubara K., Tamukai K., Ike K., Tokiwa T. Molecular and histopathological features of *Cryptosporidium ubiquitum* infection in imported chinchillas *Chinchilla lanigera* in Japan. *Parasitol. Int.* 2019. 68: 9-13. [doi: 10.1016/j.parint.2018.09.002. Epub 2018 Sep 19].

Tokiwa T., Ohnuki A., Kubota R., Tamukai K., Ike K. Morphological and molecular characterization of *Cystoisospora* sp. from Asian small-clawed otters *Aonyx cinereus*. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 2018. 7: 268-273. [doi: 10.1016/j.ijppaw.2018.07.001. eCollection 2018 Dec.].

Yamamoto M., Tokiwa T., Tobiume M., Akamatsu S., Matsuo K., Moribe J., Ike K. *Hepatozoon apri* n. sp. (Adeleorina: Hepatozoidae) from the Japanese wild boar *Sus scrofa leucomystax* (Mammalia: Cetartiodactyla). *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 2017 6: 354-360. [doi: 10.1016/j.ijppaw.2017.11.001. eCollection 2017 Dec.].

Morita T., Momota Y., Mori A., Oda H., Ike K., Sako T. Successful treatment of refractory demodicosis and transient papules with a single dose of fluralaner in a dog with uncontrolled severe endocrine disease. *J. Vet. Med. Sci.* 2018 80: 672-675. [doi: 10.1292/jvms.17-0274. Epub 2018 Mar 8.].

Morita T., Ohmi A., Kiwaki A., Ike K., Nagata K.. A New Stubby Species of Demodectic Mite (*Acari: Demodicidae*) From the Domestic Dog (Canidae). J. Med. Entomol. 2018.55: 323-328. [doi: 10.1093/jme/tjx226. PMID: 29309708] .

Tokiwa T., Kobayashi Y., Ike K., Morishima Y., Sugiyama H. Detection of Anisakid Larvae in Marinated Mackerel Sushi in Tokyo, Japan. Jpn. J. Infect. Dis. 2018. 71: :88-89. [doi: 10.7883/yoken.JJID.2017.280. Epub 2017 Dec 26.] .

Shibasaki K., Tokiwa T., Sukegawa A., Kondo H., Tamukai K., Haga Y., Ike K. First report of fatal disseminated microsporidiosis in two inland bearded dragons *Pogona vitticeps* in Japan. JMM Case Rep. 2017. 4: e005089. [doi: 10.1099/jmmcr.0.005089. eCollection 2017 Apr.] .

Tokiwa T., Kojima A., Sasaki S., Kubota R., Ike K. *Isospora lunaris* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the domestic Java sparrow in Japan. Parasitol. Int. 2017. 66: 100-105. [doi: 10.1016/j.parint.2016.12.007. Epub 2016 Dec 18.] .

Yoshimoto M., Otsuki T., Itagaki K., Kato T., Kohsaka T., Matsumoto Y., Ike K., Park E. Y. Evaluation of recombinant *Neospora caninum* antigens purified from silkworm larvae for the protection of *N. caninum* infection in mice. J. Biosci. Bioeng. 2015. 120: 715-719. [doi: 10.1016/j.jbiosc.2015.04.002. Epub 2015 Apr 29.] .

Kato T., Otsuki T., Yoshimoto M., Itagaki K., Kohsaka T., Matsumoto Y., Ike K., Park E. Y. *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus displaying *Neospora caninum* antigens as a vaccine candidate against *N. caninum* infection in mice. Mol. Biotechnol. 2015. 57: 145-154. [doi: 10.1007/s12033-014-9810-9.] .

〔学会発表〕(計 1 件)

小林麻優子、藤本朱理、窪田理恵、常盤俊大、池 和憲
固定血球を用いたトキソプラズマ症の簡易血清学的診断法
第 161 回日本獣医学会学術集会 2019 年

〔図書〕(計 5 件)

池 和憲 他、講談社、最新 獣医寄生虫学・寄生虫病学、2019、357
池 和憲 他、インターズー、犬と猫の検査・手技ガイド 2019 私はこちら読む、2019、822
池 和憲 他、緑書房、臨床獣医師のための犬と猫の感染症診断、2018、448
池 和憲 他、緑書房、動物病院スタッフのための犬と猫の感染症ガイド、2019、168
池 和憲 他、緑書房、寄生虫病学 改定版、2017、229

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。