

令和 6 年 4 月 12 日現在

機関番号：24405

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19192

研究課題名（和文）クリプトスポリジウムによる子牛下痢症の根絶を目指した次世代弱毒誘導ワクチンの創出

研究課題名（英文）Study toward production for the next generation and precocious live vaccines against Cryptosporidium infections to control the calf diarrhea

研究代表者

松林 誠（Matsubayashi, Makoto）

大阪公立大学・大学院獣医学研究科 ・教授

研究者番号：00321076

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、人獣共通感染症であり、特に子牛の下痢症の原因となっているクリプトスポリジウム原虫について、効果的に粘膜免疫を誘導する弱毒生ワクチンの創出に向け、他種動物として免疫不全マウスに繰り返し継代を行い、全ゲノム解析による多型および感染性の変遷を解析した。詳細な比較ゲノム解析は現在進行中であるが、マウスへの10代の継代により、感染性が上昇していることが確認できた。宿主変換により表現型が変化しており、今後の解析により、本原虫では初めてとなる寄生適応、さらには病原性に関わる責任遺伝子を発掘できる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人、そして特に子牛において、クリプトスポリジウムによる下痢症の予防法、そして著効を示す治療薬は未だ開発されていない。本研究により、国内の病原株を他種動物に繰り返し継代することで、感染性が変化することを見出した。今後、これら株間での全ゲノム比較解析により、寄生性や病態、さらに寄生適応に関わる責任遺伝子を世界で初めて同定できる可能性がある。これらの結果は、将来、病原性を減弱させた弱毒生ワクチンの創出につながると期待される。

研究成果の概要（英文）：In the present study, the objective is to analyze for production of the live vaccines to induce the protective mucosal immunity against the Cryptosporidium infections. Here, we obtained the Cryptosporidium isolate and inoculated to immunodeficient mice. Then, the obtained oocysts were passed through other mice, and this step was repeatedly conducted ten times so far. Consequently, the infectivity to the mice is increasing. Although further study is needed, there is a possibility that comparative whole genome analyses find the responsibility genes related to pathogenicity and host adaptation to different animal species including human.

研究分野：獣医寄生虫学

キーワード：クリプトスポリジウム 寄生適応 ゲノム解析 牛 マウス

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1)クリプトスポリジウムは子牛の消化管粘膜に寄生し、激しい水様性下痢を引き起こす原虫である。消化管粘膜の上皮細胞の表面に存在する微絨毛に寄生するため『細胞内-細胞質外寄生』といわれ、駆虫薬、予防薬の開発は困難とされている。また、宿主の糞便と共に多量に排出されるオーシストは外界で長期間生存し、各種消毒剤にも強い耐性を有している。本原虫により汚染された農家では清浄化が極めて難しく、繰り返し、感染発症牛が出る傾向にある。一方で感染に耐過した子牛は再感染に抵抗を示すことから、ワクチンによる免疫付与は有効な防除法の一つであると考えられる。しかし、サブユニットワクチンはもちろんのこと、生ワクチンも現在、開発されていない。本原虫に対する主たる防御免疫応答は粘膜免疫であり、免疫誘導方法にも大きなハードルがある。また、原虫の侵入、発育そして分化という増殖プロセスは複雑であり、わずか数種の原虫分子による免疫付与では部分的な感染防除しか誘導できない。

我々は、野外の牛由来株を実験的にマウスに投与した場合、感染が成立し、その病態および感染性が変遷することを見出した。そこで本研究では、病態を減弱させることにより、粘膜免疫を効率的に誘導できる弱毒株の創出に向け、マウスへの寄生適応の有無についてゲノムレベルで解析を行った。また、クリプトスポリジウムのワクチン株に使用できる元株のクローニングのため、その培養系として *in vitro* 培養を試みた。

2. 研究の目的

クリプトスポリジウムの生ワクチン創出に向けた新規防除法の応用提案に向け、全ゲノム比較解析および *in vivo*、*in vitro* の評価、培養系を活用し、宿主変換における感染性評価を全ゲノム解析により明らかにする。

3. 研究の方法

- (1)日本国内の牛を飼育する農家おおよそ 20 戸において、下痢を呈する子牛について糞便検査を実施し、感染の有無および OPG を測定した。陽性を確認した後、下痢を呈する子牛からオーシストを浮遊法により大量に精製した。オーシストからゲノム DNA を抽出し、NovaSeq6000 により全ゲノムシーケンスを実施した。
- (2)野外の感染子牛の下痢便から精製したオーシストを免疫不全マウスに投与し、プレパテントピリオドおよび OPG(1g 当たりのオーシスト数)を計測した。このオーシストを精製し、また新たなマウスに投与し、評価し、この工程を繰り返した。そして、元株に加えて 5 代、10 代目のマウス継代株についても、同様にゲノム DNA を抽出し、全ゲノムシーケンスを実施した。
- (3)マウスにおいて長期間継代を行っている国内のウシ型の人由来株についてもゲノム解析を実施し、比較を行った。
- (4)これらクリプトスポリジウムの *in vivo* での小数投与によるクローニングを試みるため、免疫不全マウスに投与し、感染性を評価した。
- (5)*in vitro* でのクローニングおよび培養を試みるため、HCT-8 細胞、KTSE110 細胞、そして Colo680N 細胞でクリプトスポリジウムの好氣的、嫌氣的培養を試みた。

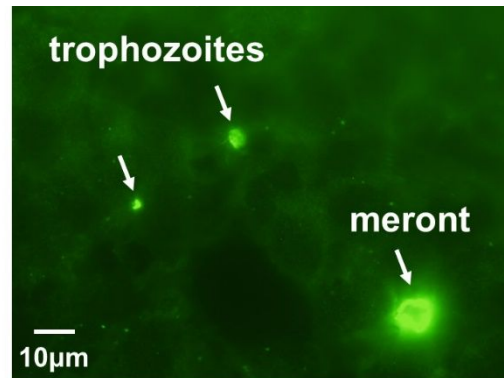
4. 研究成果

- (1)国内の 2 つの地域において、約 20 戸の農家から糞便を回収し、糞便検査を実施した。2 地域の 3 農家から、クリプトスポリジウムに感染している子牛の下痢便を大量に回収した。下痢便からの原虫の精製は、前処理として、2 回程度、入念にメッシュで濾すことで粘液を除去する必要がある。PCR およびシーケンス解析の結果、5 株は国内で広く存在している aA15G2R1 型、残る 1 株は aA14G1R1 型であった。抽出したゲノム DNA の全ゲノム解析では、5Gbp 以上の塩基配列を取得した。公開されている海外のリファレンス株、IOWA 株のシーケンスデータを基にマッピングを行った結果、61-98%の割合でリードがマッピングされた。アノテーションが付与された遺伝子領域は少なく、現在、比較解析中ではあるが、各株が固有に有する多型は極めて限られており、国内の株は遺伝子学的には近縁である可能性が高いことが分かった。一方で、海外の株をマッピングのリファレンスとした場合、多型として評価される割合が高くなる。したがって、国内株の塩基配列をリファレンスとするために、現在、リシーケンスにより再解析を実施している。
- (2)1 地域の子牛由来のクリプトスポリジウム株を免疫不全マウス、複数匹に投与した。その結果、感染が成立し、糞便中にオーシストが確認できた。免疫不全マウスでは、治癒することなく、糞便中にオーシストを排出し続ける。これを回収し、新たに別のマウスに投与し、これを 10 代まで繰り返した。その結果、プレパテントピリオドは早まり、10 の 5 乗個、6 乗個に到達する日数も短縮した。ゲノム DNA を抽出し、全ゲノム解析を行い、5Gbp 以上の塩基配列を得ることができた。海外のリファレンス株を基にマッピングが完了した。現在、そのデータ解析を進めている。また、現在、20 代目の継代に向けて、引き続き、同マウスでの感染試験を行っている。
- (3) マウスにおいて長期間継代を行っている国内の牛型の人由来株について、ゲノム解析を実施した。その結果、上述した野外の牛由来株と比較し、遺伝的多様性が低く、比較的クローナ

ルに増殖し、維持されている可能性が示唆された。2地域からの野外株との全ゲノム比較解析は現在、進行中である。

- (4) 上述したマウスにおいて長期間継代を行っている国内の牛型の人由来株について、1個、5個、10個のオーシストを免疫不全マウスに経口投与し、感染性を評価した。その結果、1個の投与では感染は認められず、5個そして10個で感染が確認できた。5個のオーシストを投与したマウスから回収したオーシストを精製し、ゲノムDNAを抽出して全ゲノム解析を実施した。合計で約5Gbpの塩基配列を得ることができた。IOWA株のリファレンスデータとマッピングした結果、おおよそ99%のリードがマッピングされた。アノテーションが付与された領域は限られるが、2株のうちいずれかの株のみが有する多型を決定する事ができた。また、継代維持株は5個投与株と比較して、より広範に多型を有する集団である可能性が考えられた。そして、アノテーションから推察すると、クリプトスポリジウムの病原性や宿主体内での生存や増殖に関する遺伝子にヘテロ多型が多く存在している可能性が示唆された。現在、種々の解析ソフトや設定値等を変更することで追加および確認作業を行っている。

- (5) 元株またはワクチン株の *in vitro* でのクローニングを目指し、3種の株化細胞による培養を試みた。いずれの株化細胞でも48時間まではトロフォゾイト数の減少、メロント数の増加により、虫体の発育は確認できた[右図]。しかし、これ以後、培養を継続しても虫体数は減少し、最終段階の有性生殖期の虫体は確認できなかった。嫌気条件下での培養は、1%O₂条件下では細胞に対する強い毒性が確認された。5%O₂条件下では毒性は抑えられたが、本条件下で同様に培養しても、有性生殖期の虫体は確認できなかった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	松尾 智英 (Matsuo Tomohide) (50383667)	鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・准教授 (17701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関