

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月13日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580342

研究課題名（和文） ネオスポラ症における垂直感染メカニズムの蛍光発色原虫等を用いた網羅的解析

研究課題名（英文） Global study using fluorescent *Neospora caninum* on the vertical transmission mechanism in neosporosis

研究代表者

池 和憲（IKE KAZUNORI）

日本獣医生命科学大学・獣医学部・獣医学科・准教授

研究者番号：50159597

研究成果の概要（和文）：本研究では、まず *Neospora caninum* の蛍光発色原虫を作製することで本原虫を可視化し、ネオスポラ症の種々の実験を容易にした。垂直伝播の要因であるブラディゾイト（シスト）のマーカートとなり得る NcBAG1 蛋白をコードする遺伝子を同定した。さらにブラディゾイト由来抗原の水平伝播モデルでの本蛋白の有用性を確認した。タキゾイト抗原およびブラディゾイト由来抗原の混合ワクチンは水平伝播において相乗効果を示したが、垂直伝播では効果は認められなかった。垂直伝播に関するホルモンの影響はこれまでのところその影響は確認できなかった。

研究成果の概要（英文）：At first we visualized *Neospora caninum* by making a fluorescent color development this protozoan and facilitated various kinds of experiments of neosporosis in this study. We identified the gene encoded the NcBAG1 protein which could become the marker of bradyzoite stage. Furthermore, we confirmed the effect of this protein in the horizontal transmitted mouse model of the antigen derived from bradyzoite. The mixed vaccine of the both antigens showed synergy effects against the horizontal transmission, but the effect was not found in the vertical transmission. We were not able to confirm the effect of the estrogen in the vertical transmission in this study.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
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・基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：寄生虫

1. 研究開始当初の背景

Neospora caninum は1984年にノルウェーにおける脳脊髄炎および筋炎を発症した犬の組織から分離され（Bjerkas ら、

1984）、その後新種として記載されたアピコンプレックス類に属する病原性細胞内寄生原虫である（Dubey ら、1988）。本原虫は人獣共通感染症の原因としてよく知られる

*Toxoplasma gondii*に構造学的、遺伝学的および免疫学的に類似し、初記載以前は *T. gondii* などと混同されていたが、現在では両原虫は感受性宿主、宿主に対する病原性、免疫学的性状から識別可能である (Dubey ら, 2003)。*N. caninum* は犬、牛、緬羊、山羊、馬など広範囲の宿主で感染が認められるが、本原虫の終宿主はオーシストの排泄性から犬であることが報告された (McAllister ら, 1998)。自然界ではコヨーテなどを含むイヌ科動物を終宿主、イヌ科動物を含む他動物全てを中間宿主として生活環を成していることが分かっている。本原虫による臨床症状を伴った疾病は主として犬と牛においてみられるが、本原虫性疾患における伝播上の最大の特徴は犬および牛いずれの場合にも垂直感染による伝播が主経路となることである。

牛における疾病は母牛での死・流産、および新生子牛における神経症状、後駆の進行性過伸展による被乳および起立の不能である (Dubey ら, 1989)。ヨーロッパにおける血清学的調査では、乳牛の 16~76%、肉牛の 41~61%が感染し (Bartels ら, 2006)、感染牛は非感染牛に比べ 3~7 倍流産の危険性が高いと報告されている (Thurmond と Hietala, 1997; Wouda ら, 1998)。また日本でも 1992 年の初報告 (Ogino ら, 1992; Umemura ら, 1992) 以来、全国各地でその発生が報告され、牛の流産の主要な原因となっており、本症の清浄化により流産が 21.8%、経済的損失が 23.8 億円軽減できるとされ (Koiwai ら, 2006)、本症に対する予防・治療法の確立が強く求められている。一方、犬においては死・流産の報告は少なく (Lindsay と Dubey, 2000)、疾病としては先天感染した子犬の進行性後駆麻痺、筋肉衰退、摂食および燕下困難である (Barber と Trees, 1996)。临床上ネオスポラ症を発症しやすい犬種はよく知られていないが、犬からの報告例をみると猟犬に多く認められている (Dubey ら, 2007)。犬の場合、実験感染によって胎盤感染が成立することが判明しているが (Cole ら, 1995)、ほとんどの臨床症状は生後 5~7 週まで出現しない (Dubey と Lindsay, 1989)。母犬から子犬への原虫の伝播は妊娠の末期に胎盤を通じて行われるか、あるいは生後の経乳感染であることが示唆される。

これまでの我々の研究はタキゾイトの細胞内侵入には虫体抗原の 73kdal の抗原が関与することを単クローン抗体を用いて証明し、タキゾイトに対するワクチン抗原として有用であることを報告した (Uchida ら, 2004)。この抗原は後に Zhang ら (2007) によって報告された NcAMA1 であった。さらにワクチン開発に必須の実験動物としてマウスよりもジャンガリアンハムスターが感受性において優れていること (Uchida ら,

2003)、そして原虫感染に対する免疫を人為的に Th1 に誘導させるアジュバントとしてゴージャ綿抽出物が優れていること (Ike ら, 2005) を報告し、ワクチン化への準備を進めてきた。またさらにグレーハウンド犬における先天性ネオスポラ症の症例を経験するに至った (Ishigaki ら, 2012)。遭遇した犬の症例は典型的な進行性の後駆不全であったにも拘わらず、抗体検査ではタキゾイト由来抗原に対する抗体が殆ど検出できず、むしろブラディゾイト由来抗原に対する抗体が検出された。これまでの報告では、垂直感染自体の本体はタキゾイトであるとする報告が多く (Dubey ら, 2007)、ブラディゾイト抗体を検出した報告は皆無である。一方類似原虫である *T. gondii* での易感染性はブラディゾイト>タキゾイト>オーシストの順であることがすでに教科書的にも周知の事実となっている。そこで我々はワクチン抗原としてブラディゾイト抗原の重要性も認識し、ブラディゾイト抗原として NcBAG1 遺伝子のクローニングを行い、全塩基配列の解読を行い (DDBJ/EMBL/GenBank AB475042)、その組換え蛋白を得た (Kobayashi ら, 2013)。これまでの研究から、我々は *N. caninum* の本来の感染経路であるとされている垂直感染に対して関わる事象の全てにおいてその誘因・メカニズムと原虫ステージを確認することがワクチン化に向けた抗原の選定や免疫誘導などには必須の事例であると考えた。

2. 研究の目的

ネオスポラ症において临床上問題となるのは、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、犬では生後約 5~7 週齢の幼犬における後駆麻痺を主徴とする進行性の神経・筋疾患などで、いずれの場合も垂直感染が主体となる伝播方式をとる。本原虫は終宿主が犬科動物、中間宿主は犬科動物も含む他の動物で、発症を起因する原虫ステージは中間宿主としての急速型原虫 (タキゾイト) と緩徐型原虫 (ブラディゾイト) である。本症では、罹患動物に対する治療法および垂直感染に対する予防法は未確立のまま、唯一の対策は感染動物の淘汰である。

本研究の目的は、本症予防ワクチンの開発を念頭におき、タキゾイト→ブラディゾイトの各ステージ特異的蛍光発色原虫を作製し、本症における水平感染後ならびに垂直感染時での原虫のステージ変換の動向ならびにその誘因 (ホルモン、免疫状態?) を特定し、妊娠時における対原虫免疫への基礎的知見の取得と、予防ワクチンの方向性の決定を行うことである。

3. 研究の方法

(1) ステージ特異的蛍光発色原虫の作出

犬科動物を終宿主とする偏性細胞内寄生性原虫 *N. caninum* が引き起こすネオスポラ症は、垂直感染による牛の死・流産ならびに子犬の筋・神経疾患が臨床問題となる。この垂直感染への関与は、シスト内ブラディゾイトが活性化後にステージ変換したタキゾイトであると考えられているが、シストと胎盤通過原虫の因果関係を証明した報告はない。本研究の目的はこれら垂直感染メカニズムを解明すべく蛍光蛋白を利用した中間宿主ステージ特異的発色原虫を作出することで虫体を可視化させ、上記研究等における手技・時間等を簡略化することである。

薬剤耐性マーカーとして *N. caninum* 由来 dihydrofolate reductase (DHFR) 遺伝子を *T. gondii* 由来 *dhfr* 遺伝子配列を基にクローニングと塩基配列の決定を行った。さらに *NcSAG1* 遺伝子、*NcSAG4* 遺伝子の 5'UTR ならびに *NcMAG1* の 3'UTR のクローニングと塩基配列の決定も同様に行った。*N. caninum* ベクターの原虫への遺伝子導入はエレクトポレーション法で行い、カラー選択は蛍光顕微鏡下で行った。

(2) ブラディゾイトマーカー蛋白 BAG1 の塩基配列ならびにその同定

偏性細胞内寄生原虫である *N. caninum* は犬科動物を終宿主とし、また犬科動物を含めた幅広い種類の哺乳動物を中間宿主とする。本原虫は犬に対し筋・神経症状を、牛に対し習慣性の異常産などを引き起こす。感染後、宿主の免疫応答への対応のため「タキゾイト→ブラディゾイト」にステージ変換するが、*in vitro* における「タキゾイト→ブラディゾイト」のステージの変換は必ずしも容易ではなく、ブラディゾイトに関しては未だ不明な点が多い。本研究では、本原虫におけるブラディゾイト特異的指標を得るべく *N. caninum* 類似原虫である *T. gondii* ブラディゾイト抗原 1 (TgBAG1) に対する相同体を検索し、遺伝子クローニングおよびその塩基配列の決定を行った。

本研究に供試した原虫は *N. caninum* NC-1 株である。TgBAG1 相同体遺伝子の検索のために、鋳型遺伝子として本株由来 cDNA およびゲノム DNA を、遺伝子増幅用プライマーとして TgBAG1 を参考に設計したプライマーを用いて PCR を行った。さらに増幅遺伝子断片を基に N-および C-末端側に伸張反応を行うことで、完全長遺伝子を得 (NcBAG1 とした)、塩基配列を決定した。さらに本組換え蛋白の作製は PGEX-6P ベクターを用いて大腸菌によって行った。

(3) ブラディゾイト抗原の防御効果

ネオスポラ症とは細胞内寄生原虫である *N. caninum* に起因し、牛や犬で特に問題となる。本原虫は宿主体内で活発に増殖するタキゾイトと宿主免疫系から身を守るブラディゾイトの二つのステージをとることが知られている。タキゾイトに関しては、そのステージ特異的抗原を用いた感染実験が報告されているが、ブラディゾイト抗原に関する報告は少ない。今回複数種のブラディゾイト特異的抗原を用いた *N. caninum* 感染実験を行ったので、その感染防御効果について比較検討した。

ブラディゾイト特異的抗原である rNcBAG1、rNcSAG4、rNcMAG1、rNcBSR4 をワクチン抗原とし、O/W 型オイルアジュバントを用いた。BALB/c 系マウスに 3 週間隔で 2 回筋肉内注射を行い、2 回目注射後の 3 および 4 週間後に *N. caninum* を腹腔内投与した。ワクチン投与から攻撃感染 4 週間後までの原虫特異的抗体の産生、脳を主体とした各種臓器からの原虫遺伝子の検出、および脳における原虫遺伝子の定量を行った。

(4) タキゾイトおよびブラディゾイト抗原の水平および垂直伝播効果

ネオスポラ症における伝播で特に問題となるのは、1. 非妊娠時の原虫感染による宿主体内での増殖と分布、2. 妊娠時の原虫感染および妊娠等の刺激によるシスト内原虫の再活性による垂直伝播、であると考えられる。前者においては多くの効果的なタキゾイト由来防御抗原が報告されている一方、ブラディゾイト由来抗原に関しても一定の効果が認められている。そこで今回、タキゾイト由来抗原 NcSAG1 とブラディゾイト由来抗原 NcBAG1 を混合免疫した場合の防御効果をマウスモデルで検討した。

タキゾイト由来抗原として組換え (r)NcSAG1、ブラディゾイト由来抗原として rNcBAG1 を供試し、それぞれ単独および混合したものに O/W 型オイルアジュバントを添加したものを免疫原とした。GST タグ蛋白添加オイルアジュバントおよび PBS 単独投与をそれぞれアジュバントおよび感染対照とした。免疫は BALB/c マウスに 2 週間隔で 2 回筋肉内接種し、最終免疫より 3 週間後に *N. caninum* での攻撃感染を腹腔内に行った。ワクチンの評価として、抗体産生能は各種抗原を用いた ELISA、防御評価は脳内原虫数の定量的 PCR の測定値で行った。

垂直感染モデルではワクチン接種、さらに原虫感染後 5 週目に交配、出産させた。その評価は産仔数、産仔からの原虫の検出によって行った。

(5) マウス慢性感染モデルにおけるホルモンの影響

5 週齢 BALB/c マウスに 1×10^7 の *N. caninum* Liverpool 株を腹腔内に接種した。その 5 週間後、プロゲステロン+ゴマ油 (20mg/mL)、ゴマ油、PBS の 3 群に 2 週間、毎日 $50 \mu\text{L/g}$ 皮下接種を行い、その後剖検にて脳、血液、子宮を採取し、原虫の存在を PCR にて確認を行った。

4. 研究成果

(1) ステージ特異的蛍光発色原虫の作出

タキゾイト発色には 5'UTR (NcSAG1)–ORF (GFP)–3'UTR (NcMAG1) を、ブラディゾイト発色には 5'UTR (NcSAG4)–ORF (tdTomato)–3'UTR (NcMAG1) を、そして薬剤耐性マーカーには *N. caninum* 由来 *DHFR* 遺伝子を各々用いて原虫ベクターを構築した。遺伝子導入した原虫においては *in vitro* での発色を確認した。さらに *in vivo* においても蛍光発色原虫の発色が認められた。

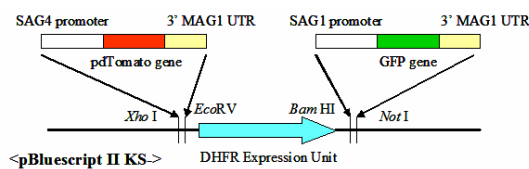


図 1 ステージ特異的蛍光発色ベクターの模式図

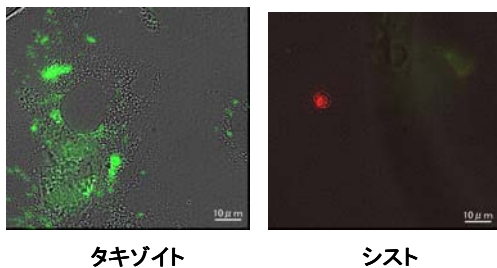


図 2 *in vitro* における *N. caninum* 虫体の蛍光発色

(2) ブラディゾイトマーカー蛋白 NcBAG1 の塩基配列ならびにその同定

今回得られた NcBAG1 をコードする完全長遺伝子 *bag1* は 684bp、そこから予想されるアミノ酸は 227 個で、TgBAG1 をコードする遺伝子とは塩基配列で 78.4%、アミノ酸配列で 80.3% の相同性を示した。また組換え体による発現蛋白は 26kDa の GST との融合蛋白として約 50kDa に発現した(予想分子量約 25kDa)。

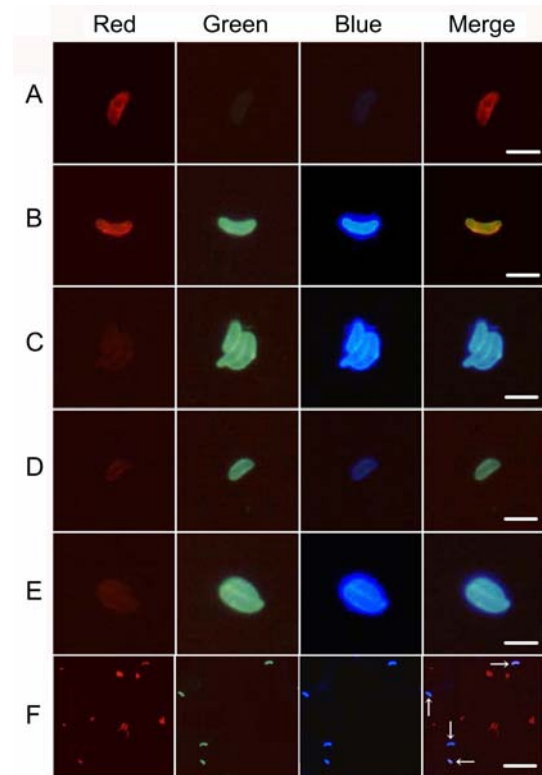


図 3 ニトロプルシドナトリウム (SNP) 添加による培養後の *N. caninum* 虫体の三重染色像

A: αNcSAG1 (red) + αNcBAG1 (green) + αTgBAG1 (blue) (SNP⁻; day 0 after SNP treatment), B: αNcSAG1 (red) + αNcBAG1 (green) + αTgBAG1 (blue) (SNP⁺; day 3), C: αNcSAG1 (red) + αNcBAG1 (green) + αTgBAG1 (blue) (SNP⁺; day 6), D: αNcSAG1 (red) + αNcBAG1 (green) + αNcSAG4 (blue) (SNP⁺; day 3), E and F: αNcSAG1 (red) + αNcBAG1 (green) + αNcSAG4 (blue) (SNP⁺; day 6).

(3) ブラディゾイト抗原の防御効果

各接種抗原に対する特異的抗体価は、IgG₁ 抗体価においては各ワクチン接種群とも良好な上昇を示したが、IgG_{2a} 抗体価は同様ではなかった。PCR 法の結果から、ワクチン接種群を含む全てのマウスの脳より、原虫特異的遺伝子断片が検出された。また、定量的 PCR 法の結果から、5 種のワクチン接種群と対照群との間に有意差が認められた。ワクチンによる防御効果と IgG_{2a} 抗体価との間には相関関係が認められなかった。これらの結果からブラディゾイト由来抗原は *N. caninum* 感染に対し、一定の防御能を有することが示唆された。

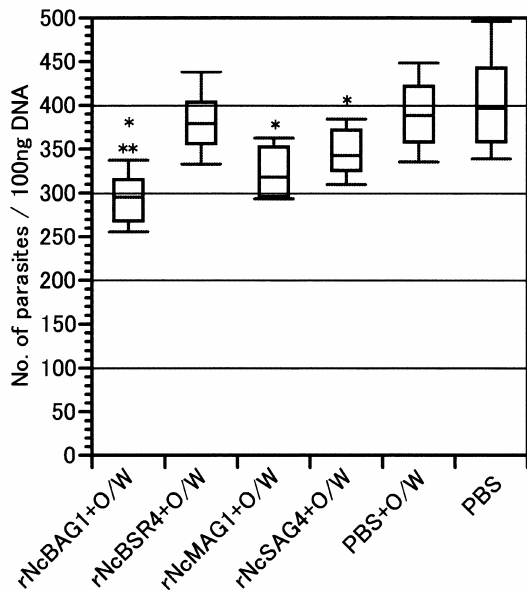


図4 定量的 PCR による rNcBAG1, rNcBSR4, rNcMAG1, rNcSAG4 を含むワクチン接種マウスにおける脳内原虫遺伝子の検出

(4) タキゾイトおよびブラディゾイト抗原の水平および垂直伝播効果
マウス水平感染予防効果では
アジュバントおよび感染対照と比較して、
タキゾイト由来抗原 rNcSAG1 とブラディゾイト由来抗原 rNcBAG1 の免疫は共に脳内原虫数を低下させた。さらに rNcSAG1 と rNcBAG1 を混合したものでは、それぞれ単独の場合に比べ、原虫数をより低下させ、相乗効果が確認された。

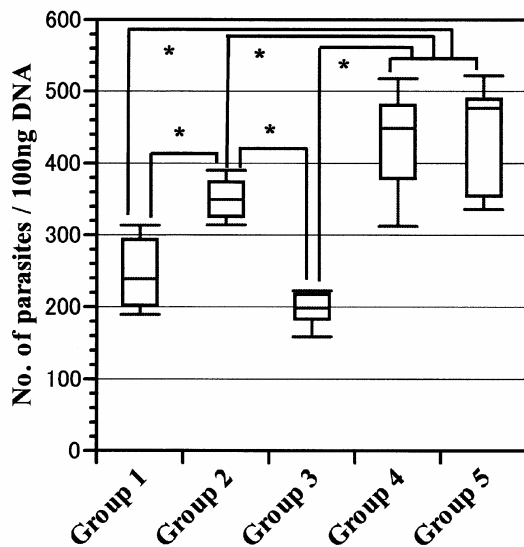


図5 ワクチン接種マウス脳内における原虫数の比較
Group1: rNcSAG1, group2: rNcBAG1,

group3: rNcSAG1+rNcBAG1, group4: GST (アジュバント対照), group5: PBS (感染対照). * $P < 0.01$

一方、垂直感染阻止に関しては、各群でのマウスからの産仔数、新生仔からの原虫の分離に差を認めなかった。

(5) 慢性感染マウスモデルにおけるホルモン (エストロゲン) の影響

採取した脳、血液、子宮からの *N. caninum* DNA の検出を行った。その結果全てのマウス脳内から原虫遺伝子が検出された。一方、血液および子宮からの原虫遺伝子は検出されなかった。従って現在のところ、エストロゲンによる脳内原虫の活性化は認められなかった。

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 5 件)

- ① Ishigaki, K., Noya, M., Kagawa, Y., Ike, K., Orima, H., Imai, S. Detection of *Neospora caninum*-specific DNA from cerebrospinal fluid by polymerase chain reaction in a dog with confirmed neosporosis. J. Vet. Med. Sci. 74: 1051-1055 (2012). 査読有
- ② Ike, K., Kameyama, N., Ito, A., Imai, S. Induction of T Helper 1 (Th1) immune response by an extract from *Pleurotus eryngii* (Eringi). J. Med. Food, 15: 1124-1128 (2012). 査読有
- ③ Uchida, M., Nagashima, K., Akatsuka, Y., Ito, A., Imai, S., Ike, K. Comparative study of protective abilities of NcBAG1, NcBSR4, NcMAG1, and NcSAG4 antigens against *Neospora caninum* infection in acute mouse model. Parasitol. Res. 112: 655-663 (2013). 査読有
- ④ Dong, J., Otsuki, T., Kato, T., Kohsaka, T., Ike, K., Park, E. Y. Development of two murine antibodies against *Neospora caninum* using phage display technology and application on the detection of neosporosis. PlosOne, 8, e53264 (2013). doi:10.1371/journal.pone.0053264. 査読有
- ⑤ Kobayashi, T., Narabu, S., Yanai, Y., Hatano, Y., Ito, A., Imai, S., Ike, K. Gene cloning and characterization of the protein encoded by the *Neospora caninum* bradyzoite-specific antigen

gene *BAG1*. *J. Parasitol.* 99: 453-458 (2013). 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① 羽多野優芳、池 和憲、内田昌樹、赤塚唯、永島琴美、森田達志、今井壯一
*Neospora caninum*中間宿主ステージ特異的発色原虫の作出 第150回日本獣医学会学術集会 2010年9月18日(帯広市)
- ② 内田昌樹、池 和憲、羽多野優芳、赤塚唯、永島琴美、森田達志、今井壯一
*Neospora caninum*ブラディゾイト由来抗原による防御能のマウスモデルにおける検討 第150回日本獣医学会学術集会 2010年9月18日(帯広市)
- ③ 石垣恭平、池 和憲、野矢雅彦、賀川由美子、織間博光、今井壯一 臨床症状を伴った犬ネオスポラ症の一例 第150回日本獣医学会学術集会 2010年9月18日(帯広市)
- ④ 永島琴美、池 和憲、小林哲也、赤塚唯、沢村洋緒、栗原佑生子、松本裕美乃、森田達志、今井壯一 マウスモデルにおける*Neospora caninum*タキゾイトおよびブラディゾイト由来抗原の防御に関する相乗効果 第154回日本獣医学会学術集会 2012年9月15日(盛岡市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池 和憲 (IKE KAZUNORI)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・獣医学科・准教授

研究者番号：50159597

(2) 研究分担者

今井壯一 (IMAI SOICHI)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・獣医学科・教授

研究者番号：90120758

(3) 連携研究者

なし