

*Babesia gibsoni* の弱毒化メロゾイト株の作出と  
ワクチン効果に関する研究

須永 藤子

2004

*Babesia gibsoni* の弱毒化メロゾイト株の作出と  
ワクチン効果に関する研究

須永 藤子

2004

序 文.....	- 1 -
第 1 節 <i>B.gibsoni</i> 培養株の作出 .....	- 6 -
I. 血清至適濃度の検討.....	- 6 -
材料と方法 .....	- 6 -
結 果 .....	- 8 -
小 括 .....	- 8 -
II. 継代方法と培養メロソイトの形態学的変化 .....	- 8 -
材料と方法 .....	- 9 -
結 果 .....	- 11 -
小 括 .....	- 13 -
第 2 節 弱毒化メロソイト株の作出および作出株の発症防御効果.....	- 14 -
I. 弱毒化メロソイト株の作出.....	- 14 -
材料と方法 .....	- 15 -
結 果 .....	- 17 -
小 括 .....	- 19 -
II. 弱毒メロソイト株の発症防御効果.....	- 20 -
材料と方法 .....	- 20 -
結 果 .....	- 22 -
小 括 .....	- 23 -
第 3 節 不活化抗原（培養上清抗原・ $\beta$ -プロピオラクトン処理メロソイト 抗原）の発症防御効果.....	- 25 -
材料と方法 .....	- 25 -
結 果 .....	- 29 -



小 括 .....	- 32 -
考 察 .....	- 34 -
1. <i>B.gibsoni</i> 培養株の作出 .....	- 34 -
2. 弱毒化メロゾイト株の作出および作出株の発症防御効果 .....	- 39 -
3. 不活化抗原（培養上清抗原・ $\beta$ -プロピオラクトン処理メロゾイト抗原） の発症防御効果 .....	- 44 -
結 論 .....	- 50 -
謝 辞 .....	- 53 -
参考文献 .....	- 54 -
Abstract .....	- 68 -



## 序 文

バベシア病は、*Babesia* 原虫がダニによって媒介され、宿主の赤血球内に侵入することによっておこる疾病である。このため発熱、脾腫、強度の貧血などを呈するマラリア様症状が認められる。バベシア症ではウシ[18, 24]、ウマ[17, 36]、ヒツジ[5, 99]、ブタ[10-12]、イヌ[15, 26]、およびげっ歯類[29, 51, 77]などの各種動物に対してほぼ宿主特異的に感染する原虫の種類が知られており、ヒトの感染例[2, 16, 67, 75]も報告されている。イヌのバベシア病には *B.gibsoni* と *B.canis* の2種類の病原体によるものがあり、さらに *B.canis* には *B.canis canis*, *B.canis vogeli* および *B.canis rossi* の3亜種が知られている[93]。このうち *B.canis* は主に欧州[76]、南・北アメリカ、アフリカに分布しており、*B.gibsoni* は東南アジアや日本に分布している[55]。日本でも *B.canis vogeli* の分布が沖縄県でのみ認められているがこの亜種は *B.canis canis* に比べ病原性がかなり低く、感染が不顕性に終わることが多いため問題になることは少ない[30, 100]。一方、*B.gibsoni* 症は近畿以西に多発しており、重篤な症状を示し死亡する例もあり、問題となっている[15, 26, 98]。従来、本症例の治療には即効性のガナゼック（ジミナジン製剤）が用いられたが、治療域と安全域が近く、投与量によっては重篤な副作用が認められる[32, 48, 87, 88]。また、本剤は製造工程で問題が生じ、製造中止となったため、イヌ重症例での死亡率が増加しており、発症防御ワクチンの開発が望まれている。

バベシア症のワクチン研究は牧畜業に大きな経済的被害を与える *B.bovis* と *B.bigemina* 感染を予防するために始められた[38, 68]。最初に報告されたバベシア症のワクチンはオーストラリアで 1897

年に *B. bigemina* や *B. bovis* から回復したウシから採取した虫体感染血液をそのまま未感染牛に少量接種し、軽く発症・回復させ、バベシア症回復牛体内に原虫が長期間残存することにより人工感染牛は発病抵抗性を獲得するという性質を利用した毒血生ワクチンであった[62]。このような毒血生ワクチン接種法は虫体そのものを接種するため、接種材料の選別に注意し、接種方法をいろいろ工夫したとはいえ、接種によって重篤な症状や致死的な経過を示す個体が認められる。この様な毒血生ワクチン接種による感染・発症の被害を少なくするために、放射線照射[63-65]や急速継代[4, 7, 8]によって原虫株を弱毒化するための研究が行われた。

このような生ワクチンは、ワクチン株の病原性や免疫原性が一定せず、保存が難しいこと、また、血液をそのまま接種するため白血病などのウイルスが混入する危険性があること、さらに、接種されたワクチン株はウシ体内に長期間残存するので、これが感染源となって牧野が汚染されるなどの欠点がある[9]。しかし、少量の接種で強い発症予防効果が得られ、かつ安価であるという長所があるため、現在でもオーストラリアや南アフリカではバベシア汚染地域に清浄地域からウシを導入する場合に、感染血液による「生ワクチン」接種（毒血注射）が行われている[3]。

イヌの *B. gibsoni* 症の生ワクチンとしては、産業動物のように毒血の少量接種ということは病原性の点で考えられないが、イヌの *B. gibsoni* 症も、家畜のバベシア症と同様に一度感染すれば、2度目の感染に対しては強い抵抗性を示すことが知られている[86]。そのため、イヌに対して病原性がなく、免疫原性のある弱毒 *B. gibsoni* 株が作出できれば、少量の接種で強い発症予防効果が得られる非常

に有効な生ワクチンとなることが考えられる。しかし、現在まだ、開発されていない。

ワクチン開発はウイルス分野において著しく進んでおり、継代培養による弱毒変異株ワクチンやゲノム改変によるワクチンが実用化されている。継代培養によって弱毒変異株を得るには、ウイルスをいろいろな条件で動物や培養細胞を用いて何代も継代し、そこから病原性がなく、免疫原性が強く認められるウイルス株を拾う従来からの方法と病原性に影響を与える遺伝子領域を同定し、病原性に関与する遺伝子を病原体から除き、ワクチンに使用できるような弱毒変異株を作製するゲノム改変ワクチンがある。ゲノム改変ワクチンは病原性に関与する遺伝子を除去して作出するため発育ステージを持たないウイルスには好都合であるが、より複雑な生活環を有し、発育ステージによって抗原性が異なる原虫では、病原性に関与する遺伝子が多数存在すると考えられるため、適用することは非常に困難である。

そこで今回 *B.gibsoni* の培養方法が確立し、長期継代することが可能となったため、ウイルスで従来から行われている方法を応用して、継代培養による弱毒化を試み、作出した弱毒化メロゾイト株の免疫原性とその発症防御効果を検討した。

一方、原虫病の不活化ワクチンも、いまだ研究途上にあるが、既存のウイルス・細菌の不活化ワクチンと比較した場合、際だった特徴が見られる。バベシア原虫は、媒介動物であるダニ体内で変態をとげて増殖し、最終的にスポロゾイト様虫体となり唾液腺に侵入し、ダニが動物から吸血する際、血液の赤血球に侵入する。その赤血球の中で分裂増殖し赤内型メロゾイトが形成される。赤血球が破壊さ



れ、メロゾイトが放出される。この時期、動物には発熱や貧血症状が発現する。血液中に放出されたメロゾイトは数分以内に次の宿主赤血球の膜表面に付着し、赤血球内に侵入する。ダニはこの赤内型虫体を吸引し、一部の虫体はダニの消化管内でガメートとなり、卵巣に侵入する。卵巣に侵入した虫体はダニ卵を経て、孵化した次代の幼ダニに感染し、その唾液腺でスポロゾイト様虫体となって感染の機会を待つ。各発育期の虫体は、いずれも異なる微生物であるかのごとく違った抗原性を保持している。そのため、バベシア症の感染予防のために不活化ワクチンを開発する時、ワクチン抗原としては、ダニからのスポロゾイト感染を防御するにはスポロゾイトワクチンが、生体内でのメロゾイトの増殖を抑制するためにはメロゾイトワクチンが候補となる。しかし、バベシア原虫の場合はマラリアやタイレリアと違い、媒介動物体内のスポロゾイト様虫体が明確に確認されている種類が限られており、さらに、スポロゾイト様虫体の精製やこれを大量に採取することが難しい。そのため、バベシア症の不活化ワクチン抗原の候補としてはメロゾイト抗原が最も有力であり、さまざまなバベシア種で実験が行われている。

*B.gibsoni* でも実験感染犬から *B.gibsoni* 感染血液を採取し、それをホルマリンで不活化したものを免疫原としてイヌに接種した後、攻撃感染し、そのワクチン効果を判定した結果、ある程度原虫抑制効果が認められたという報告がある[53, 54]。しかし、ワクチン抗原を採取するために、別の実験犬に原虫を感染させ、大量に採血することによってメロゾイトを集めることは倫理的にも問題である。不活化ワクチンを作製するためには、まず、*B.gibsoni* メロゾイトを大量に培養する方法を確立することが不可欠である。

血液原虫の培養は Trager ら[92]が 1976 年にヒトのマラリアである *Plasmodium falciparum* の連続的培養に成功して以来、いくつかの原虫で試みられてきた。しかし、この方法をウシバベシア症の原因である *B.bovis* の培養に適用しようと試みたが成功しなかった。その後、suspension 培養の進歩によって *B.bovis* [14]および *B.canis* [41]の *in vitro* による培養が短期間ながら可能となった。さらに、この *B.bovis* の短期培養技術を多少変えた方法で、*B.rodhaini* および *B.bigemina* の *in vitro* による連続培養が可能となった[91]。その間、スピナーフラスコが用いられたが、これには大容量の培養液と複雑な操作が必要で、原虫の成長が遅いため、この方法にも限界があった。このような問題点を解決したのが Levy ら[35]により開発された Microaerophilus stationary phase culture system(MASP)である。この方法を応用し、*B.gibsoni* の短期培養[47]が行われたが 15 日間の短期培養しか成功していない。

そこで今回、*B.gibsoni* のワクチンを作製するために不可欠であるメロゾイトの培養方法を検討し、安定的に増殖する培養メロゾイト株の作出を試みた。次いで、この培養メロゾイト株の弱毒化を試み、その弱毒化したメロゾイト株の発症防御効果について検討した。さらに、安全性の高い不活化ワクチンを開発するためにメロゾイトの培養上清中に認められた可溶性の抗原と培養感染赤血球から採取して  $\beta$ -プロピオラクトンで処理した不活化メロゾイト抗原の発症防御効果について検討した。

## 第 1 節 *B.gibsoni* 培養株の作出

ワクチン抗原を作製するには常に安定的に大量の原虫抗原を得ることが必須条件である。しかし、*B.gibsoni* 原虫の短期間培養は試みられているものの、長期培養は成功していない。*Babesia bovis* の培養で成功した Microaerophilous stationary phase culture system に準じて、*B.gibsoni* 原虫の培養を試み、*B.gibsoni* の増殖に適した培地に加えるイヌ血清の至適濃度を検討し、*B.gibsoni* 培養法を確立した。次いで、この培養法を用いて初めて安定的に増殖する *B.gibsoni* 培養株を作出する実験を行った。

### I. 血清至適濃度の検討

*B.gibsoni* の増殖に適した培地に加えるイヌの至適血清濃度の検討。

## 材料と方法

### 1. 供試 *B.gibsoni*

大分県で 1978 年に自然感染したイヌから分離し、当研究室で摘脾犬およびイヌで継代維持している強毒性 *B.gibsoni* 大分株 [49, 83] を用いた。

### 2. 培養に用いた *B.gibsoni* 感染赤血球

*B.gibsoni* 大分株をイヌに接種し、発病後、回復した実験犬 (PCV 値 39%、parasitemia 2.0%) の血液を採取し、2,000rpm、10 分間、4℃で遠心し、血漿と白血球層を除去して赤血球層を採取した。採取赤血球を洗浄するため赤血球に 3 倍量の PBS を加えて、



攪拌した後、遠心するという操作を3回繰り返し行い、これを *B.gibsoni* 感染赤血球とした。

### 3. 供血犬

1歳のビーグル犬メス2頭を使用した。これらのイヌは全て接種前に血液検査を実施し、*B.gibsoni* の感染がないことをギムザ染色および間接蛍光抗体法で確認した。供血犬は生物科学総合研究所感染飼育室で室温  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  の条件下で飼育用ケージに1頭ずつ収容し、固形ドックフードと水道水を1日1回与えた。

### 4. イヌ血清

供血犬から定期的に血液を採取し、3,000rpm、15分間遠心し、血清を分離し、 $-20^{\circ}\text{C}$  で使用時まで保存した。

### 5. 培養液

RPMI1640 培地 (GIBCO) に 25mM HEPES (N-[2-hydroxyethyl] piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid])、2mM L-glutamine、1mM pyruvic acid、24mM  $\text{NaHCO}_4$ 、penicillin G 100 units/ml、streptomycin  $100\mu\text{g/ml}$  を添加したものを使用した。

### 6. 実験方法

まずイヌ血清を 10,20,30,40 および 50% の割合に含む培養液を作製し、各血清濃度の培養液に *B.gibsoni* 感染赤血球を濃度が 10% になるように加えた後、12well マイクロプレート の 2well に 2ml ずつ分注し、5%  $\text{CO}_2$ 、 $37^{\circ}\text{C}$  でインキュベートした。6 日間の培養

期間中毎日、培養上清の 1ml を等量のそれぞれの培養液と交換した。この培養液交換時に血液塗抹ギムザ染色標本を作製し、赤血球 1,000 個中の原虫感染赤血球数を算定し、百分比 (%) で示した (=parasitemia)。

## 7. 統計処理

それぞれの血清濃度で培養した時の parasitemia は Student's *t*-test を用いて検定した。

## 結 果

感染赤血球にイヌ血清を 10 から 50%の割合に加えて初代培養した結果を図 1 に示した。20 から 40%で培養した場合は 4-6 日目の parasitemia はいずれも 14%前後の高い値を示し差は認められなかった。parasitemia の低かった 10%と 50%で培養した場合と比べた場合には、危険率 0.05%で有意差がみとめられた。

## 小 括

感染赤血球を初代培養する培養液の血清濃度は 20-40%が適当であることが確認できた。

## II. 継代方法と培養メロゾイトの形態学的変化

培養液に加えるイヌの至適血清濃度が 20-40%であることが明らかになったので、正常イヌ血清を 20%の割合で培養液に加えて、*B. gibsoni* 原虫の継代培養を開始し、安定的に増殖する培養株の作出を試みた。

## 材料と方法

### 1. イヌ血清および培養液

第 1 章 I . 4、5 と同様のものを使用した。

### 2. イヌ赤血球液

供血犬からヘパリン処理したシリンジで血液を採取し、この血液に等量の培養液を加え、25%赤血球浮遊液として 4°Cで保存したものを血球液として使用した。この血球液は約 3 週間使用可能であった。

### 3. 培養方法

第 1 章 I の実験で用いた 20%イヌ血清加培養液で 6 日間培養した感染赤血球（*prasitemia*14%）に正常イヌ赤血球を加え、*prasitemia* が約 1%になるように調整した。さらに、この調整した赤血球濃度が培養液の 10%になるように 20%イヌ血清加培養液を加えた。これを 2ml ずつ 12well マイクロプレートに分注し、5%CO<sub>2</sub>、37°Cで培養した。毎日培養上清 1ml を等量の 20%イヌ血清加培養液 1ml と交換した。培養液交換時に血液塗沫ギムザ染色標本作製し、赤血球 1,000 個中の原虫感染赤血球数を算定し、百分比（%）示した。

### 4. 継代方法

赤血球内に感染しているメロゾイトの継代方法はウエル内の培養赤血球の 1/3 を別のウエルに取り、これに新鮮イヌ赤血球 2/3 を加えて混和し、この赤血球液 1 容に培養液 9 容を加えて培養す



る方法を用いた。

2 代目から 28 代目までは、メロゾイトの赤血球内増殖が悪かったので、培養期間は 15 日間とし、継代は培養 3 日目、6 日目、9 日目、12 日目および 15 日目にそれぞれ行なった。この中で最もメロゾイトの増殖が良いものを選び継代した。安定的に増殖し始めた 30 代目からの継代培養は 3 日目ごとに実施した。

#### 5. 継代による増殖率の推移

原虫の増殖が安定した 30 代目に培養 0 日目から 7 日目までの *parasitemia* の平均値を計算し、メロゾイトの増殖態度を観察した。

さらに、70 代、150 代、190 代および 230 代の各培養 0 日目 (*parasitemia* 2.2-2.5%) から 3 日目までの *parasitemia* の平均値を計算し、培養 3 日目のそれぞれの *parasitemia* を Student's *t*-test を用いて検定した。

#### 6. 培養原虫の形態学的変化

継代によるメロゾイトの形態学変化を観察する目的で、感染したイヌの末梢血に認められる原虫、初代、5 代、30 代および 200 代各培養メロゾイトの形態を観察し、さらに、大きさを比べるためにそれぞれのメロゾイトの長径および短径を 30 個ずつ計測した。また、多数虫体寄生血球の割合も同時に算定した。

## 結 果

### 1. 継代による prasitemia の推移

培養初代（0 日目）から 220 日目までの prasitemia の推移を図 2 に示した。初代培養では 20%以上の高い prasitemia が得られたが、2 から 4 代では最高 prasitemia が 5%、5 から 7 代では 2%となり、8（66 日目）から 10 代目では 0.1%以下となった。原虫の増殖が認められない場合も赤血球液を加えながら継代培養を続けた結果、12 代目から prasitemia が 5%に回復したが、再び 20(130 日目)代目から原虫が認められなくなった。さらに継代培養を続けた結果、22 代目から増殖し始め、29 代目からは安定的に増殖するようになった。

図 3 に 30 代目の培養 7 日間の prasitemia の平均値( $n=10$ )の推移を示した。prasitemia は培養 3 日目にピークとなり、最高値は  $3.1 \pm 1.2\%$ であった。

さらに、3 日ごとに継代を続けた結果、図 4 に示すように 70 代では培養 3 日目の平均 prasitemia は  $9.2\% \pm 1.8\%$ であったが、190 代では平均  $18.8\% \pm 1.3\%$ となり、継代を重ねることによって、メロゾイトの赤血球への感染率が有意に増加した。しかし、その後 220 代以上継代を重ねたが、これ以上 prasitemia が高くなることはなかった。

### 2. 培養原虫の形態学的変化

形態的には初代培養で認められる原虫は大きさおよび形態ともにイヌの末梢血中で認められる原虫と同様に小型の楕円形や

点状のものが多く認められた（図 5-1）。継代を重ねると直径 3  $\mu\text{m}$  以上の大型化した原虫が認められ、また、赤外型の原虫も出現し、さらに 1 個の赤血球内に多数の原虫が感染しているものや大型の原虫が融合しているもの、赤外型原虫が多数観察された（図 5-2）。

原虫の大きさは表 1 に示すとおりで、初代培養 4 日目の楕円形の原虫の大きさは  $1.87 \pm 0.40 \mu\text{m} \times 1.61 \pm 0.36 \mu\text{m}$  であったが、継代 5 代目では原虫の大きさは  $2.56 \pm 0.70 \mu\text{m} \times 2.27 \pm 0.67 \mu\text{m}$  となり、初代培養で観察された原虫よりも危険率 0.05% で有意に大きかった。

継代 5 代の培養 3 日目の原虫の多数寄生の割合は、1 個体寄生赤血球 83% に対し、2 個体寄生赤血球 10%、4 個体寄生赤血球 3%、および 8 個以上寄生赤血球 4% であった。しかし、原虫がほとんど増殖せずに parasitemia が 0.1% 以下であった継代 8-10 代および 20-21 代では、赤外型原虫は認められず、楕円形原虫および点状の原虫が 1 個のみ赤血球内に寄生していた。23 代目以降再び、原虫の増殖が認められるようになると多数寄生の赤血球や赤外型原虫が多く認められた。継代 30 代の原虫の大きさは  $2.03 \pm 0.44 \mu\text{m} \times 1.78 \pm 0.41 \mu\text{m}$ 、また、多数寄生の割合は 1 個体寄生赤血球 70% に対し、2 個体寄生赤血球 19%、4 個体寄生赤血球 8%、および 8 個体以上寄生赤血球 3% であった。これを継代 5 代目の 3 日目の原虫と比べると多数寄生赤血球数が約 2 倍となった。しかし、さらに継代を重ねても大きさ、多数寄生赤血球数、赤外型原虫出現数に差は認められなかった。



## 小 括

ワクチンを作製する上で大量の抗原を安定して生産することはもっとも重大な課題の1つである。今回、大分県で自然感染した犬から採取し、当研究室内で摘脾犬と非摘脾犬により長期間維持した *B.gibsoni* 株を、イヌ赤血球を用いてプレート培養を試みた結果、培養が可能となった。この方法で原虫を継代し続けた結果、30代では培養3日目に *parasitemia* は  $3.1 \pm 1.2\%$  の最高値を示した後、減少した。しかし、継代を重ねると *parasitemia* は増加し、70代では培養3日目の *parasitemia* は  $9.2\% \pm 1.8\%$ 、さらに、190代では  $18.8\% \pm 1.3\%$  となった。しかし、これ以上継代しても *parasitemia* の増加は認められなかった。

形態学的には初代培養虫体は感染犬末梢血中に認められる原虫と変わりはないが、培養を重ねると原虫は大型化し、橢円形の赤内型および赤外型原虫の中に直径  $3 \mu\text{m}$  以上のものが観察されるようになった。また1個の赤血球内に多数の原虫が感染している例や赤外型原虫がみられる例が多数認められた。

以上の結果から、190代継代を続けることにより安定的に増殖する *B.gibsoni* メロゾイト培養株が作出できた。

## 第2節 弱毒化メロゾイト株の作出および作出株の発症防御効果

*B.gibsoni* の培養方法が確立し、安定的に継代可能な培養株が作出されたので、この培養株を用いて *B.gibsoni* のワクチンを開発するための基礎実験を行った。生ワクチンの開発はウイルス分野において著しく進んでおり、継代培養による弱毒変異株作出やゲノム改変によって作られたワクチンが実用化されている。継代培養によって弱毒変異株を得るには、ウイルスをいろいろな条件で動物や培養細胞を用いて継代し、そこから病原性がなく、免疫原性が強く認められるウイルス株を拾う従来からの方法がある。これに対してゲノム改変ワクチンは、病原性に影響を与える遺伝子領域を同定し、これを病原体から除いて得られた弱毒変異株を用いて作製する。病原性に関与する遺伝子を除去してゲノム改変ワクチンを作成する方法は、発育ステージを持たないウイルスには好都合であるが、複雑な生活環を有し、発育ステージによって抗原性が異なる原虫では、病原性に関与する多数の遺伝子が存在すると考えられるため、適用することは非常に困難である。

そこで、ウイルスに応用されている継代培養による弱毒化を前節において確立した *B.gibsoni* メロゾイト培養株に適用することを試みた。さらに、得られた弱毒株の免疫原性とその発症防御効果について検討した。

### I. 弱毒化メロゾイト株の作出

第1節でメロゾイトの継代培養株が作出できたので、得られた株を何代継代すれば弱毒化するかを検討した。

## 材料と方法

### 1. 供試 *B.gibsoni*

① *B.gibsoni* 大分株：第 1 節で使用した当研究室でイヌを用いて継代維持している強毒株である。

② *B.gibsoni* 培養株：第 1 節、Ⅱの方法で 200 代 (=200 代培養株) および 400 代継代培養した株 (=400 代培養株) である。

### 2. 供試犬

1 歳、雌のビーグル犬 4 頭を使用した。これらのイヌは全て接種前に血液検査を実施し、赤血球中に原虫の感染がないことをギムザ染色で確認した。また、間接蛍光抗体法で *B.gibsoni* 抗体が陰性であることを確認した。

### 3. 飼育環境

供試犬は生物科学総合研究所感染飼育室で室温  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  の条件下で飼育用ケージに 1 頭ずつ収容し、固形ドックフードと水道水を 1 日 1 回与えた。

### 4. 実験方法

表 2 に実験の概要を示した。200 代培養株  $1 \times 10^9$  個体をイヌ 1 頭に、400 代培養株  $1 \times 10^9$  個体をイヌ 2 頭にそれぞれ静脈内接種した。対照として大分株  $1 \times 10^9$  個体をイヌ 1 頭に静脈内接種した。実験期間は原虫接種後 60 日間とし、その間次の検査を実施した。

### 5. 検査項目と方法

① 血液検査：イヌから隔日に血液 1ml を採取した。抗凝固剤は

EDTA・2K を用いた。採取血液を用いて PCV 値を測定後、ギムザ染色血液塗抹標本を作製し、赤血球 1,000 個中の感染数を計測し、parasitemia を算出した。

②体温：毎日、直腸温を測定した。

③抗 *B.gibsoni* 抗体価の測定：4 日おきに実験犬から 3ml 採血し、遠心処理後血清を採取し、間接蛍光抗体法で抗体価を測定した。

間接蛍光抗体法：抗原塗抹標本は、parasitemia 約 10% の *B.gibsoni* 感染血液を PBS で 3 回洗浄 (2,000rpm、10 分間遠心) し、無蛍光スライドガラスの全面に薄層塗抹した後、直ちに風乾し、冷アセトンで 10 分間固定して作製し、 $-20^{\circ}\text{C}$  で使用時まで保管した。被検血清および対照血清は PBS でそれぞれ 10 倍に希釈し、 $56^{\circ}\text{C}$  で 30 分間非働化して作製し、被検血清は 10 倍から 2 倍に段階希釈した。陰性および陽性血清は PBS で 50 倍に希釈したものを使用した。段階希釈した被検血清と対照血清をそれぞれ  $20\mu\text{l}$  ずつ抗原塗抹標本に載せ、湿潤箱中で室温にて 30 分間反応させた。反応後、冷 PBS で 3 回洗浄した後、FITC 標識抗イヌ IgG 抗体を  $20\mu\text{l}$  ずつ各区画に添加し、30 分間反応させた。反応後、冷 PBS で 3 回洗浄し、50%グリセリン緩衝液を滴下し、落射型蛍光顕微鏡を用いて 400 倍で鏡検した。赤血球内原虫が明瞭に蛍光染色されている場合の血清の最高希釈倍率を抗体価とした。

④ SDS-page およびウエスタンブロッティング法：400 代培養株接種後 60 日目に採取した血清を用いて、SDS-PAGE とウエスタンブロッティング法を実施した。対照として大分株接種後、回復した実験犬の血清を使用した。

術式：ガラス板を組み立て、調整した 5~20% のグラジュエン

ト分離ゲル溶液をガラス板に流し入れ、分離ゲルが重合した後、3.5%濃縮ゲルを重層した。*B.gibsoni* 抗原試料は第3節5, 2)のメロゾイト抗原と同様に作製した。この抗原を各試料溝に4 $\mu$ lずつ負荷し、同時に標準マーカを最後の試料溝に4 $\mu$ l負荷した後、定電流・定電圧装置を20mAにセットし泳動を開始し、BPBバンドがゲル下端から5mmのところに達した時点で泳動を終了した。ゲルをガラス板から分離し緩衝液に5分間浸し、あらかじめ緩衝液に浸した濾紙、PVDF膜、ゲル、濾紙の順に重ねて、転写装置にセットし、定電流・定電圧装置を150mAにセットし30分間泳動した。転写したPVDF膜は蒸留水に浸した後、マーカを切り離し、マーカ以外はブロッティング液(BSA)に30分間浸した。転写PVDF膜はPBSで10分間、3回洗浄した後、被検血清を載せ室温で60分間反応させた。反応させた転写PVDF膜はPBSで10分間、3回洗浄した後、ペルオキシダーゼ標識2次抗体を載せ、さらに室温で60分間反応させた。反応させた転写PVDF膜はPBSで10分間、3回洗浄した後、DAB液に浸し、反応させ、蒸留水に浸して反応を停止させた。

## 結 果

### 1) parasitemia の推移

200代および400代培養株をそれぞれイヌに接種したところ、接種したイヌの末梢血中に接種後2-4日目にわずかに原虫が認められたが、ただちに陰転した。しかし、200代培養株を接種したイヌにおいては30日目に原虫が再度出現し、34日目に4.4%の parasitemia

を示した後、陰転した。一方、400 代培養株を接種したイヌでは 34 日目前後に原虫が出現したが、増加することなく陰転した。これに対し大分株を接種したイヌでは原虫は 2 日目より出現した後、急増し、14 日目には 20% の parasitemia となった。その後、原虫は徐々に減少し、イヌは回復した（図 6）。

## 2) PCV の推移

PCV は、200 代培養株を接種したイヌでは原虫が増加した 34 日目に一過性に 30% とやや低い値を示したが、その後、回復した。一方、400 代培養株を接種したイヌにおいては PCV が 40% 以下に減少することはなかった。しかし、大分株を接種したイヌでは parasitemia の増加に伴って PCV は著しく減少し、16 日目から 32 日目までは 10% 台を示した（図 7）。

## 3) 体温の推移

40°C 以上の発熱は大分株を接種したイヌで parasitemia の高い時期に一致して 7 日間認められたが、200 代および 400 代培養株を接種したイヌには認められなかった。

## 4) 抗体価の推移

200 代および 400 代培養株をそれぞれイヌに接種したところ、8 日目に抗 *B.gibsoni* 抗体が認められた後、急激に抗体価は上昇し、実験終了時の 60 日目までに 20,480－40,960 倍を示した。大分株を接種した実験犬でも培養株原虫を接種した場合と同様、接種後直ぐに抗 *B.gibsoni* 抗体が認められ、培養株原虫を接種したイヌに比べ、抗体価の上昇が早く、26 日目に 81,920 倍を示し、実験終了時まで同じ力価を維持した（図 8）。

#### 5) 各分子量のメロゾイト抗原蛋白に対する抗体の検出

メロゾイト抗原を SDS-PAGE の試料とし、400 代培養株接種後 60 日目の血清を 1 次抗体としてウエスタンブロッティングを行った結果を図 9 に示した。400 代培養株を接種した実験犬 No.1(line1)と No.2(line2)では、22kDa、29kDa、38kDa、50kDa、62kDa、78kDa および 127kDa の 7 本のバンドが認められた。大分株（強毒株）で攻撃感染した後、回復した実験犬(line3)の血清中にも同様な位置に反応が認められた。

### 小 括

イヌの *B.gibsoni* 症は、原虫が宿主の赤血球に侵入増殖することによっておこる溶血性の疾病で、原虫が示す主たる病原性は虫血症、発熱、強度の貧血などである。したがって、*B.gibsoni* 培養株を生ワクチンとして用いても安全であるという弱毒化の指標は、parasitemia、貧血および発熱の程度で判断することになる。

今回の実験から、200 代培養株をイヌに接種すると parasitemia は 4.4%を示し、一過性の貧血を引き起こすことからワクチン株として用いるには弱毒化が不十分であると考えた。しかし、400 代培養株は接種後 parasitemia がそれぞれ 0.01%と 0.4%と認められたが、直ぐに陰転し、貧血や発熱などの臨床症状は認められなかった。このことから 400 代培養株は生ワクチン株としての弱毒化条件は十分に満たしていると判断した。一方、継代培養株の免疫原性は、接種犬に 20,480－40,960 倍の高い *B.gibsoni* 抗体が認められた。さらに、この

血中抗体には、強毒株で攻撃感染後、回復したイヌの血清中にウエスタンブロット法により確認された主要な 7 本のバンド（22kDa から 127kDa）が認められた。以上の結果から 400 代継代メロゾイト株は、強毒株接種と同等の免疫原性があることが明らかとなった。

## Ⅱ．弱毒メロゾイト株の発症防御効果

*B.gibsoni* 強毒株を 400 代継代培養することによって得られた弱毒化メロゾイト株の発症防御効果を検討するため、弱毒株で免疫したイヌ 2 頭に強毒株で攻撃感染をし、原虫の出現状況とイヌが現す貧血と発熱の症状ならびに免疫の推移を測定し、発症軽減度を判定した。

### 材料と方法

#### 1. 供試 *B.gibsoni*

攻撃感染には第 1 節で使用した当研究室でイヌを用いて継代維持している大分株（強毒株）原虫を使用した。

#### 2. 免疫原

赤血球を用いて 400 代継代培養した *B.gibsoni* 弱毒化メロゾイト株（弱毒メロゾイト株）を免疫原として使用した。

#### 3. 供試犬

第 2 節 I で用いた弱毒メロゾイト株を接種したイヌ 2 頭を免疫群として用いた。対照群としてビーグル犬 1 歳、雌 2 頭を使用した。これらのイヌは全て接種前に血液検査と間接蛍光抗体法で *B.gibsoni* 抗体の検査を実施し、赤血球中に原虫感染のないことと潜伏感染していないことを確認した。



#### 4. 飼育環境

供試犬は生物科学総合研究所感染飼育室で室温  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  の条件下で飼育用ケージに 1 頭ずつ収容し、固形ドックフードと水道水を 1 日 1 回与えた。

#### 5. 免疫方法と攻撃感染

表 3 に免疫方法と攻撃感染の概要を示した。免疫群 2 頭は弱毒化メロゾイト  $1\times 10^9$  個体 (0.6ml) を静脈内に接種後 60 日目に大分株  $2\times 10^8$  個体で攻撃感染を行った。同時に対照群 2 頭にも同量の大分株を接種した。

#### 6. 検査項目と方法

弱毒化メロゾイト株の発症防御効果を判定するため、攻撃感染後の原虫の出現状況とイヌが示す貧血・発熱の状況ならびに免疫の推移を測定した。また、免疫犬の血清中に虫体抗原のどの部分に対する特異抗体が産生されているかを SDS-PAGE (Sodium dodecylsulfate ポリアクリルアミド電気泳動法) とウエスタンブロッティング法を用いて検出した。実験期間は免疫後 60 日間、攻撃感染後 40 日間とした。

① 血液検査：実験犬から隔日に血液 1ml を採取した。抗凝固剤は EDTA・2K を用いた。この血液を用いて毛細管法で PCV を測定後、ギムザ染色血液塗抹標本を作製し赤血球 1,000 個中の感染血球数を計測し、parasitemia を算出した。

② 体温：毎日、電子体温計で直腸温を測定した。

③ 抗 *B.gibsoni* 抗体価の測定：4 日おきに実験犬から 3ml を採血し、遠心処理後血清を採取し、間接蛍光抗体法で抗体価を測定し

た。

検査方法は第 2 節 I と同様である。

## 結 果

### 1. 弱毒化メロゾイト株の prasitemia、PCV 値、体温および抗体価の推移

弱毒化メロゾイト株接種後、原虫はそれぞれ 0.01%と 0.4%の赤血球に認められたが、その後、直ぐに陰転し、貧血や発熱などの臨床症状は認められなかった（図 6,7）。

*B.gibsoni* 抗体は接種後 8 日目から認められ、60 日目には 20,480 倍を示した(図 8)。

### 2. 攻撃感染後の prasitemia、PCV 値、体温および抗体価の推移

#### 1) prasitemia の推移

攻撃感染後の prasitemia の推移を図 10 に示した。免疫群の No.2 は 13-29 日目まで 0.1-1.2%の低い prasitemia を示した後、35 日目から陰転した。一方 No.1 は No.2 よりも prasitemia が高く、20-30 日目まで 2-4%であった。対照群は攻撃感染後 2 日目から末梢血液中に原虫が出現し、その後急激に増加し、10.7%の最高値を示し、感染後 27 日まで 5%以上の高い prasitemia を示した。

#### 2) PCV の推移

攻撃感染後の PCV の推移を図 11 に示した。対照群では攻撃感染後から PCV が減少し、最低 PCV10%を示し、16 日目から 36 日目まで 20%以下の低い値で推移し、実験終了時も 21%と低い値であっ

た。一方、免疫群 No.2 は 26 日目から減少し、30 日目に最低値 32% を示したが、その後急速に回復し、34 日目には 41% を示した。一方 No.1 は 22 日目から PCV が低下し、28 日目に最低値 28% を示した後、回復し、実験終了時には 40% 以上を示した。

### 3) 体温の推移

体温の推移を図 12 に示した。対照群ではメロゾイトが出現している 6-29 日に発熱が認められたが、免疫群では発熱は認められなかった。

### 4) 抗体価の推移

抗体価の推移は図 13 に示した。攻撃感染時には 20,480 倍を示した免疫群の抗体価は攻撃感染後さらに上昇し、81,920 倍の高い抗体価を示した。対照群は攻撃感染後急激に抗体価が上昇し、実験終了時には免疫群と同様の抗体価を示した。

## 小 括

今回はじめて長期継代培養によって、イヌに対して病原性がなく、かつ、免疫原性がある *B.gibsoni* の弱毒株が作出できた。この培養株はイヌに対して病原性がなく、その発症防御効果は、攻撃感染に対して原虫の増殖を抑制し、さらに発熱および貧血も抑制した。また、この弱毒株はウシのメロゾイト生ワクチンのように弱毒化の過程で生体を使用せず、培養によって弱毒化を行っているため、白血病などのウイルスが混入する危険性が少なく、病原性も安定しているという長所がある反面、弱毒メロゾイト株を生ワクチンとして野外で応用した場合には、免疫に用いた弱毒化メロゾイト株が生体に残存し、免疫犬がキャリアとなる危険性があるため、生ワクチンと

しての使用は汚染地域に限定されよう。

### 第3節 不活化抗原（培養上清抗原・ $\beta$ —プロピオラクトン処理メロゾイト抗原）の発症防御効果

安定的に増殖する弱毒化メロゾイト株を作出し、この株の生ワクチンとしての性質を検討した結果、この株には接種による副作用はなく、強い発症防御効果を示すことが明らかになった。しかし、生ワクチンとして使用する場合、接種メロゾイトが長期間血中に残存することが想定されるので、安全性の高い不活化抗原を作製し、その発症防御効果を検討した。

原虫の不活化ワクチンとしてはスポロゾイト抗原による感染阻止ワクチン、メロゾイト抗原による発病阻止ワクチンおよびガメトサイト抗原による伝播阻止ワクチンの3種類が考えられる。その中でも人工培養によって、安定的に増殖する培養メロゾイト株の作出に成功し、不活化抗原に用いる虫体が大量に採取することが可能になったので、この培養株から2種類の抗原すなわち、メロゾイトそのものを感染赤血球から分離し、 $\beta$ —プロピオラクトンで不活化した抗原と培養上清中に認められた可溶性の原虫抗原物質を濃縮精製して抗原を作製し、両者をイヌに接種した後、攻撃感染を行い、それぞれの発症防御効果を検討した。

### 材料と方法

#### 1. 供試 *B.gibsoni*

原虫は第1節で使用した当研究室で摘脾犬とイヌで継代維持している大分株（強毒株）を使用した。

## 2. *B.gibsoni* 培養株

第 1 節で作出した 400 代培養株を使用した。

## 3. イヌ血清、培養液およびイヌ赤血球液

第 1 節 II と同様のものを使用した。

## 4. 大量培養法

培養方法は第 1 節 II . 3 と同様に行ったが、培養容器を 12well のプレート (2ml/well) から直径 10cm のシャーレに変え、12 個のシャーレに prasitemia が約 2% の培養感染赤血球液を 20ml ずつ分注して培養を開始した。シャーレは 5%CO<sub>2</sub>、37℃で培養し、毎日培養液を 10ml ずつ交換し、prasitemia を算出した。3 日目ごとに 8 個のシャーレから回収した赤血球液の prasitemia と赤血球数を算定した後、2,500rpm で 10 分間遠心し、上清液と沈渣赤血球を別々に回収した。残り 4 個のシャーレから回収した原虫感染赤血球に新鮮赤血球液を加え、prasitemia が 1~2% になるよう調整し、赤血球の最終濃度が約 10% になるようにイヌ血清加 RPMI1640 培養液を加え、20ml ずつ 12 個のシャーレに分注した。回収した培養上清液は使用時まで -20℃に保存した。メロゾイトは以下の方法で赤血球沈渣から分離した。

## 5. 不活化抗原の作製

### 1) 培養上清中の可溶性抗原の作製

-20℃に凍結して保存した原虫培養上清液 200ml を融解し、8,000rpm、15 分間遠心し、上清液を限外濾過器 (10kDa) で 50ml に濃縮後、この濃縮液を蒸留水 300ml で 1 回、さらに生理食塩水 300ml で 1 回、洗浄し 4ml に濃縮した。この濃縮培養上清液の

*B.gibsoni* 抗原濃度は、ゲル内沈降試験を用いて測定したところ、標準 *B.gibsoni* 抗血清（間接蛍光抗体価 40,960 倍）に対して 8 倍の力価を示した（図 14）。濃縮培養上清液は使用時まで -80℃ に保存した。1 回の接種量は沈降反応で 8 倍を示した濃縮培養上清液抗原 4ml とした。

## 2) メロゾイト虫体抗原の作製

培養メロゾイト感染血球浮遊液（メロゾイト  $1 \times 10^{11}$  個体）を 2000rpm で、10 分間遠心し、沈渣の赤血球に対して、pH7.65 の溶血 buffer（0.83% 塩化アンモニウム・トリス緩衝液）を 10 倍量加え、転倒混和し、30 分間室温に静置した後、1500rpm、10 分間遠心した。次に、上清を回収し、さらにこれを 8000rpm、15 分間遠心した後、沈渣を回収し、生理食塩水で 50ml に調整した。この時点で原虫浮遊液  $1 \mu\text{l}$  をスライドグラスに塗抹した後、ギムザ染色し、1,000 倍で鏡検し、メロゾイト数を数えてメロゾイトの回収量を計算した。この沈渣に  $\beta$ -プロピオラクトンを最終濃度が 0.0125% になるように添加し、4℃ で 3 日間静置してメロゾイトを不活化した。不活化後のメロゾイトを生理食塩液で 8000rpm、15 分間で 3 回洗浄し、 $\beta$ -プロピオラクトンを除去し、メロゾイト  $2.5 \times 10^{10}$  個に生理食塩水を加え 4ml に調整したものを不活化メロゾイト抗原とし、この量を 1 回の接種量とした。

## 6. 供試犬

1 歳メスのビーグル犬 7 頭を使用した。これらのイヌは全て接種前に血液検査を実施し、赤血球中に原虫の感染がないことをギムザ染色で確認した。また、間接蛍光抗体法で *B.gibsoni* 抗体が陰性

であることを確認した。

## 7. 飼育環境

イヌは生物科学総合研究所感染飼育室で室温  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  の条件下で飼育用ケージに 1 頭ずつ収容し、固形ドックフードと水道水を 1 日 1 回与えた。

## 8. アジュバント

Quil A (Purified saponin lyophilized) (Superfos Bilsector<sup>®</sup>, Denmark) を使用した。

## 9. 免疫方法と攻撃感染

表 4 に免疫方法と攻撃感染の概要を示した。培養上清免疫群 2 頭は培養上清抗原 4ml に QuilA (0.5mg) を加えたものを 20 日おきに 3 回、頸部皮下に投与して免疫した。不活化メロゾイト抗原免疫群 2 頭は不活化メロゾイト抗原 4ml ( $2.5\times 10^{10}$  個) に QuilA (0.5mg) を加えたものを 20 日おきに 3 回、さらに、不活化メロゾイト抗原単独で 7 日おきに 3 回、頸部皮下に投与して免疫した。対照群の内 1 頭には 4ml の生理食塩水に QuilA 0.5mg を混合したものを 20 日おきに 3 回、頸部皮下に投与した。これら免疫群は 1 回目の免疫後 68 日目に大分株  $2\times 10^8$  個体で攻撃感染を行った。同時に対照群の 2 頭と QuilA 接種犬 1 頭にも同量の大分株を接種した。

## 10. 検査項目と方法

不活化抗原接種による発症軽減度を判定するため、接種後の原虫の出現状況とイヌが示す貧血・発熱の程度ならびに免疫の推移を測定した。また、免疫犬の血清中に虫体抗原のどの部分に対する特異抗体が産生されているかを SDS-PAGE (Sodium dodecylsulfate ポリアクリルアミド電気泳動法) とウエスタンブロッティング法を用い



て検出した。実験期間は免疫後 68 日間、攻撃感染後 40 日間とした。

① 血液検査：実験犬から隔日に血液を 1ml ずつ採取した。抗凝固剤は EDTA・2K を用いた。この血液を用いて毛細管法で PCV 値を測定後、ギムザ染色血液塗抹標本を作製し赤血球 1,000 個中の感染数を計測し、parasitemia を算出した。

② 体温：毎日、電子体温計で直腸温を測定した。

③ 抗 *B.gibsoni* 抗体価の測定：4 日おきに実験犬から 3ml を採血し、遠心処理後血清を採取し、間接蛍光抗体法で抗体価を測定した。

検査には第 2 節 I と同様の方法を用いた。

④ SDS-page およびウエスタンブロッティング法：培養上清抗原免疫群および不活化メロゾイト抗原免疫群から初回接種後 68 日目に採取した血清を用いて、SDS-PAGE とウエスタンブロッティング法を実施した。

検査には第 2 節 I と同様の方法を用いた。

## 結 果

### 1. 免疫期間中の PCV および体温の変化

不活化メロゾイト抗原免疫群、培養上清抗原免疫群および QuilA 接種犬では免疫期間中に PCV および体温に変化は認められなかった。また、元気、食欲にも変化は認められなかった。

## 2. 抗原接種部位の変化

不活化メロゾイト抗原免疫群、培養上清抗原免疫群および QuilA 接種犬では 1～3 回目の接種の 2 日後に接種部位である頸部皮下にしこりが認められたが 3～4 日後には消失した。両抗原免疫群および QuilA 接種犬の間に差は認められなかった。

## 3. 不活化抗原の発症防御効果

### 1) parasitemia の推移

parasitemia の推移を図 15 に示した。対照群（QuilA 接種犬を含む）では原虫は 2 日目より出現し、18-20 日目に 10%前後の parasitemia を示した後、徐々に低下したが実験終了日まで陰転はしなかった。不活化メロゾイト抗原免疫群では赤血球中の原虫は対照群に比べて遅く、10-12 日目に出現し、18-20 日目にそれぞれ 3.2%と 4.5%の値を示した後減少し、一旦陰転したが、32 日目から再び出現した。一方、培養上清抗原免疫群では不活化メロゾイト抗原免疫群と同様に原虫は 10 日目から出現し、No.1 では 15 日目に 2.4%、No.2 では少し遅く 28 日目に 3.3%の最高値を示した後陰転した。

### 2) PCV の推移

PCV の推移を図 16 に示した。対照群（QuilA 接種犬を含む）では攻撃感染直後に原虫の出現とともに PCV 値は減少し始め、16-30 日目にかけて 10%台の低い値で推移した後、徐々に回復したが、実験終了日までには 27-28%までにしか回復しなかった。一方、不活化メロゾイト抗原免疫群では、16 日目まで 45%前後の値で推移した。その後 1-4%と低い parasitemia にもかかわらず、PCV は低下し、それぞれ 20%と 17%の値を示した。しかし、対照群に比べ、PCV は

速やかに増加し実験終了日には No.1 では 46%まで回復した。原虫が 34 日目以降、再び出現した No.2 では 36%であった。

しかし、培養上清抗原免疫群では不活化メロゾイト抗原免疫群と同様に原虫が 1-3%の率で認められたが、No.1 では PCV は 30%を下回ることなく回復し、No.2 でも 28 日目に 26%の値を示した後、順調に 40%まで回復した。培養上清抗原免疫群の 2 頭は実験期間をとおして元気、食欲とも比較的良好であった。

### 3) 体温の推移

体温の推移を図 17 に示した。培養上清抗原免疫群および不活化メロゾイト抗原免疫群ともに実験期間中に 1~2 日、40℃以上の発熱が認められた。一方、対照群（QuilA 接種犬を含む）では原虫の出現時からピークにかけて 6~13 日間発熱が認められた。

### 4. 不活化抗原接種後の抗体価の推移

不活化抗原接種後の抗体価の推移を図 18 に示した。培養上清抗原免疫群では、1 回目の接種後 20 日目に抗体価 320 倍と 640 倍を示し、2 回目接種後は 1280 倍となり、3 回目接種後さらに抗体価は上昇し、攻撃感染時（68 日目）には 2560 倍と 5120 倍を示した。攻撃感染後は急激に抗体が上昇し、実験終了時には 81,920 倍を示した。

一方、不活化メロゾイト抗原免疫群は培養上清抗原免疫群に比べ、抗体の上昇が早く、2 回接種のみで 5120 倍を示したが、その後抗体価は横ばいで攻撃感染時の抗体価は培養上清抗原免疫群とほぼ同様の値を示した。攻撃感染後は同様に抗体が急激に上昇した。

対照群では攻撃感染後急激に抗体が上昇し、実験終了時には 40,960 倍を示した。QuilA 接種犬も同様の値を示した。

## 5. 各分子量のメロゾイト抗原蛋白に対する抗体の検出

メロゾイト抗原を SDS-PAGE の試料とし、両免疫群の接種後 68 日目の血清を 1 次抗体としてウエスタンブロッティングを行った結果を図 19 に示した。培養上清抗原を接種した実験犬 No.1 と 2 (Line2,3) では 22kDa、29kDa、38kDa、50kDa、62kDa、78kDa および 127kDa の 7 本のバンドが認められた。不活化メロゾイト抗原で免疫した実験犬 No.1 と 2 (Line4,5) も同様のバンドが認められた。また、大分株を接種した対照群の実験犬 No.1 と 2 (Line6,7) でも 7 本の分画が認められた。

### 小 括

培養して得られた不活化メロゾイト抗原とメロゾイト培養上清中に認められた可溶性抗原（培養上清抗原）の発症防御効果を検討した結果、不活化メロゾイト抗原および培養上清抗原で免疫した実験犬には十分な抗 *B.gibsoni* 抗体が認められたので、両免疫群に *B.gibsoni* 大分株で攻撃感染し、メロゾイトと貧血（PCV）の抑制効果および発熱の有無を指標にして発症防御効果を検討した。両群ともに強いメロゾイトの増殖抑制と発熱の防止効果が認められた。貧血抑制効果は両群ともに認められたが、培養上清抗原で免疫した群に強く認められた。以上の事実から、培養上清抗原は強い発症防御効果を示し、安全性に優れ、大量生産が可能で、赤血球膜の混入がなく、精製が容易であることが明らかとなった。また、培養上清抗原（可溶性抗原）の性状を知るために、この抗原をイヌに接種し、得られた抗体をウエスタンブロット法で分析した結果、強毒株接種後に認められる 22kDa から 127kDa の間のメロゾイト抗原に対する抗体と同様な

抗体が確認されたことから、培養上清抗原には主要なメロゾイト抗原が全て含まれていることが明らかとなった。

## 考 察

### 1. *B.gibsoni* 培養株の作出

*B.gibsoni* 症は原虫がイヌの赤血球に感染し、溶血性貧血をおこす疾病で、ダニによって媒介される。本症は感染ダニの生息地域で多発しており、ほとんどのイヌでは慢性化するが、なかには重篤な症状を示し死亡する例も認められ、臨床上問題となっている[15, 26, 32, 98]。この対策としてもっぱら Diminazene 製剤、特に Diminazene aceturate (Ganaseg®) による治療が行われている。本剤は、治療域と安全域が近く、犬種によっては脳内出血などの副作用が認められることがあり、著効を示す反面、危険を伴う治療薬である[32, 48, 87, 88]。しかも、Ganaseg は近年製造工程で問題が生じ、製造中止となった。現在、弱い抗原虫性を示すクリンダマイシン[96]の投与と輸血等の対症療法による治療が行われているが、重症例での治療は非常に困難である。こうした事態を解決するため *B.gibsoni* 症に対する新しい対策の開発研究が緊急に必要なとなってきた。中でもこれまでになく、有効なワクチンの開発が望まれている。

住血性原虫の中でワクチンに関する研究が最も進んでいるのはマラリアである。マラリアは感染したカおよび動物の体内においてスポロゾイト、メロゾイト、ガメトサイトと形態を変化させ、いずれも異なる微生物のごとく違った抗原性を表現すると言われている。したがって本病のワクチンにはその抗原性の違いから3つのタイプのワクチンが考えられる。マラリアを媒介するカからヒト体内に注入される感染型虫体（スポロゾイト）に対する免疫により感染を防御しようとする感染阻止ワクチン、赤血球内で増殖する型の虫

体（メロゾイト）に対する免疫を賦与し、ヒト体内での虫体の増殖を抑制することにより症状の軽減もしくは無症状化をはかり、重度の虫血症期を短くしてカへの感染の機会を少なくしながら原虫の発育環を断ち切る発病阻止ワクチン、カ体内で発現する型の虫体（ガメトサイト）に対する抗体をヒトで作らせることで、感染血液を吸引したカ体内でのマラリアの発育を阻止し、カによるマラリアの伝播を防止する伝播阻止ワクチンなどである[28, 89]。

マラリアワクチンの研究はハマダラカから侵入したスポロゾイトを免疫学的に不活化することを目的としたスポロゾイトワクチンから始まった[50]。カの唾液腺に集まったスポロゾイトに放射線を照射し不活化した *Plasmodium berghei* のスポロゾイトをワクチンとして用いるとマウスに効果的な防御免疫を賦与でき、免疫マウスはカの吸血時に侵入するスポロゾイトの増殖を強く抑制することが明らかとなったが、スポロゾイトは *in vitro* 培養ができず、その都度、多数の保毒カの唾液腺からスポロゾイトを採取し、ワクチン抗原としなければならず、ワクチンの大量生産という観点から実用化は望めない。このことがスポロゾイト虫体を用いたスポロゾイト不活化ワクチンの実験を進めていく上で大きな障害となった。その後、遺伝子組み換え技術の進歩に伴い、この手法を導入してこの問題を克服する研究が開始された。ヒトに強い病原性を示す熱帯熱マラリア原虫（*Plasmodium falciparum*）のスポロゾイトの表面に認められる CSP 抗原（CSP:circum sporozoite protein）[40, 52]をクローニングし、大腸菌を用いた組換え CSP が作られ、そのワクチン効果が実験されたが、いずれも抗体誘導、防御効果の点で思ったほどの成果は得られず、実験室レベルの効果にとどまっている[80]。この

組換え技術で作製されたワクチンの問題点は免疫賦与に用いる1部のCSP抗体だけでは高い防御免疫が得られず、ハマダラカの1回の吸血で注入される数百個といわれるスポロゾイトの侵入を完全に防ぐことはできず、ワクチン免疫を逃れた少数のスポロゾイトが、肝細胞に侵入して増殖、発病することである。この問題の解決の困難さが明らかにされ、さらに、熱帯熱マラリアの赤内型メロゾイトのガラス器内で連続して培養することが可能になった[92]ことから、マラリアワクチンの研究はスポロゾイトワクチンから、メロゾイト抗原を用いた発病予防ワクチンの研究に重点が置かれるようになった。その後、培養メロゾイトの抗原解析が遺伝子工学の手法を用いて精力的に行われている[58, 59, 82]が、今のところスポロゾイトワクチン同様、十分な成果は得られていない。CSPワクチンの実験結果から明らかなようにマラリア症の獲得免疫は弱く、自然界においても子供のときから何回も繰り返し感染し、大人になってはじめて、ある程度の防御免疫を獲得できるという性質からマラリアワクチンの研究は困難を極めている。

一方、同様の生活史を示すバベシア症の場合は、一度、罹患すれば強固な防御免疫を獲得し、2度と感染しないことから、ワクチン開発は有望である。バベシア症においても、スポロゾイトワクチン、メロゾイトワクチンおよびガメトサイトワクチンが理論上考えられる。しかし、バベシア原虫は複雑なライフサイクルを営み、現在、スポロゾイト虫体の採取がマラリアに比較してより困難なためスポロゾイトを抗原としたバベシアワクチンの実験は行われていない。すなわち、野外でのバベシア原虫のライフサイクルは、雌成ダニが感染動物を吸血することによって宿主体内の原虫がダニの中



腸から卵巣に侵入して卵巣内の卵細胞に感染する。卵が産出され、それが孵化・発育する過程で経卵的に感染した原虫は幼ダニの唾液腺に侵入する。感染した幼ダニが吸血を開始すると吸血刺激によって、虫体はスポロゴニーを開始し、吸血 2-3 日目には唾液腺内に多数のスポロゾイトが形成される。スポロゾイトはダニが吸血する際に宿主に移行し、感染が成立する[57]。そのためバベシアのスポロゾイトを採取するには、非常に小さな幼ダニを 1 匹ずつ解剖して唾液腺内に形成されているスポロゾイトを採取しなければならない。そのため、純粋なスポロゾイトを必要量、採取することは技術的に困難であり、バベシアのスポロゾイトワクチンに関する研究は行われていない。

イヌバベシア症のメロゾイト不活化抗原の研究は、扇谷ら[53, 54]が *B.gibsoni* 感染犬から採取したメロゾイトをホルマリンで不活化し、これを免疫原としてイヌに接種した実験報告があるが、これは、免疫原中に赤血球膜が多量に混入しており、かつ、効果が不十分であるばかりでなく、1 頭のイヌに接種する免疫原を採取するために、多数のイヌに原虫を感染させ、原虫を増殖させた後に、放血して原虫感染赤血球を採取し、そこから不活化メロゾイト抗原を作製しなければならず、この方法でこれ以上実験することは実験動物に対する倫理の面からも困難である。これらの問題を克服するために、Xuan らは遺伝子組換え技術を応用して *B.gibsoni* メロゾイトから 29kDa、50 kDa および 76kDa のそれぞれから単味のワクチン抗原を作製し、そのワクチン効果を実験したが、いずれも強い原虫増殖抑制作用や貧血の改善などの発症防御効果の点で十分な成果は得られなかった[97]。

一方、1982年にMolinarら[41]はMASP法で*B.canis*メロゾイトの長期継代培養株を確立し、Schettersら[70]はその培養上清中にメロゾイトの増殖を強く抑制する作用のあることを見出し、培養上清液を濃縮し、それにサポニンアジュバントを加えて、*B.canis*不活化ワクチンを完成させた。そこで今回、*B.gibsoni*病の発症予防に効果を示すワクチンの開発を目的として、まず、*B.gibsoni*メロゾイトの培養方法を確立し、安定的に増殖する*B.gibsoni*培養株の作出を試みた。

*B.gibsoni*原虫の長期培養法はLevyら[35]の方法を改良して行った。彼らが考案した静置培養方法のMASP法（Microaerophilus stationary phase culture system）は、*B.bovis*が0.1-2%感染したウシの赤血球を培養液（15mM HEPESと抗生物質を添加した199培地に成牛血清を40%の割合に加えて作製）で、最終血球量が5-10%になるように調整し、平底プレートまたはシャーレなどの培養器に0.62ml/cm<sup>2</sup>になるように分注して、5%CO<sub>2</sub>/air、37-38℃下で培養する。この間、培養液の交換は約24時間間隔に行い、培養上清を新鮮培養液と交換し、原虫が増殖する場となる正常赤血球の追加は42-72時間培養後に、培養感染赤血球1/3に非感染新鮮ウシ赤血球2/3を加えることによって培養する。このMASP培養法を基礎にした*B.gibsoni*原虫の培養に関する2-3の報告[47, 56]があるが、いずれも短期間の培養にとどまり、長期の培養には成功していない。これら数少ない報告から*B.gibsoni*の培養を開始するには、原虫を分裂増殖させる培地の種類と培地に加える血清濃度との関係が重要であると判断された。そこで、まず初めに培地に加える至適イヌ血清濃度の検討を行った。その結果、20-40%の範囲でイヌ正常血清

を加えて培養すれば、良好な増殖が認められたので、以後のメロゾイト感染赤血球の培養方法はメロゾイト感染赤血球 1 容に培養液を 9 容加え、これを 12 ウェルの平底プレートに 2ml ( $0.53\text{ml}/\text{cm}^2$ ) ずつ分注して、5%CO<sub>2</sub>/air、37°C 下で培養した。各ウェルの培養液は毎日、1ml の培養上清を新鮮な培養液と交換し、この時、ギムザ染色血液塗抹標本を作製し、parasitemia (赤血球 1000 個中のメロゾイト感染赤血球数を百分比で示したもの) を算定した。赤血球内に感染しているメロゾイトの継代方法はウェル内の培養赤血球の 1/3 を別のウェルに取り、これに新鮮イヌ赤血球 2/3 を加えて混和し、この赤血球液 1 容に培養液 9 容を加えて培養する方法を用いた。

2 代目から 28 代目までは、メロゾイトの赤血球内増殖が悪かったので、培養期間は 15 日間とし、継代は培養 3 日目、6 日目、9 日目、12 日目および 15 日目にそれぞれ行なった。この中で最もメロゾイトの増殖が良いものを選び継代した結果、23 代目からは培養 1 日目から急激な増殖が認められるメロゾイトが現れ、さらに、29 代目からは培養 2-4 日目にメロゾイト増殖のピークが認められたので、以後の継代培養は 3 日目ごとに実施した。30 代では parasitemia は  $3.1 \pm 1.2\%$  であったが、その後の増殖率は次第に高くなって 190 代では parasitemia が  $18.8 \pm 1.3\%$  を示す *B.gibsoni* メロゾイト培養株が作出できた。

## 2. 弱毒化メロゾイト株の作出および作出株の発症防御効果

メロゾイトの継代培養株が作出できた [85] ので、得られた株を何代継代すれば弱毒化するかを *B.gibsoni* 特有の溶血性貧血と発熱などの臨床症状を指標として検討し、この弱毒化メロゾイト株で免

疫した犬に強毒株を接種し、その発症防御効果を検討した。

最初に、弱毒化の検討のため 200 代継代した培養株をイヌに接種し、その病原性を調べた。その結果、*B.gibsoni* 大分株（強毒株）を接種したイヌでは発熱と重度の貧血（PCV 値 10-15%）が続き、高い parasitemia（10%）が認められたが、200 代培養株を接種したイヌでは、発熱は認められず、軽度の貧血（PCV 値 30%）と低い parasitemia（4.4%）が認められたのみで、かなり病原性が低下したことが明らかとなったが、ワクチンとして用いるにはまだ、不十分であった。一方、400 代継代した培養株の場合は 0.01%と 0.4%の parasitemia を示したのみで、PCV はおおむね 40%を示し、正常値の範囲にあった。また、発熱もなく、元気・食欲にも変化は認められず、400 代継代培養株には病原性のないことが明らかになった（弱毒化メロゾイト株）。そこで、400 代継代メロゾイト株の免疫原性を間接蛍光抗体法とウエスタンブロット法で確認した結果、間接蛍光抗体法による血中抗体は 20,480 倍を示した。この抗体価は野外株を接種し、重篤な症状を示した後、回復したイヌと同等の力価に相当するもので、なおかつ、メロゾイト不活化抗原を接種した場合の 2~4 倍の力価に相当し、弱毒化メロゾイト株は高い免疫原性のあることが判明した。さらに、この血中抗体には、強毒株で攻撃感染後、回復したイヌの血清中にウエスタンブロット法により確認された主要な 7 本のバンド（22kDa から 127kDa）が認められた。以上の結果から 400 代継代メロゾイト株は、強毒株接種と同等の免疫原性があることが明らかとなった。

次に弱毒化メロゾイト株接種犬が強毒原虫に対してどの程度の発症軽減効果があるかを攻撃感染後の原虫の増殖抑制率、PCV によ

る貧血の抑制度および 40℃以上の発熱の有無を指標として検討した。その結果、あらかじめ弱毒化メロゾイト株を接種したイヌでは、*B.gibsoni* 大分株で攻撃感染後の原虫の増殖抑制効果は parasitemia の最高値で比較すると対照群のそれぞれ 10.6%と 10.7%に比べ免疫群は No.1 が約 1/2 (5.9%)、No.2 が 1/7 (1.5%) であり、弱毒化メロゾイト株による強い原虫の増殖抑制効果が明らかとなった。次に弱毒化メロゾイト株の症状軽減効果を実験犬の PCV で判定した結果、PCV は対照群では攻撃感染直後から急激に低下し、10-15%の最低値を示し後、その回復は遅く、実験終了時でも 20%前後の値にとどまった。これに対し、免疫群では 18 日目まで正常値で推移したが、その後減少し、一過性に 28%と 32%の値を示した後、速やかに回復した。さらに、発熱から見た症状の軽減度は著しく、対照群では 40℃以上の発熱が 8 日間も認められたが、免疫群では全く認められなかった。これらの事実から、この弱毒化メロゾイト株は生ワクチンとしての条件である病原性がないこと、免疫が獲得できること、原虫増殖を抑制し、貧血や発熱などのバベシア症状を軽減する発症軽減効果を有することのすべての条件を満たしていることが明らかとなった。

イヌ以外のバベシア症のワクチンの研究はオーストラリアや南米でウシに強い病原性を示す *B.bovis* [4, 8]と *B.bigemina* [6]について報告されている。*B.bovis* の弱毒化は Callow ら[4]によって成功した。その方法は *B.bovis* を摘脾子ウシを用いて 4-7 日間隔で継代し、適時その継代株を採取して正常ウシに接種し、継代株の病原性を発熱期間と累積原虫増殖度で評価した。その結果、11 代の急速継代で、発熱期間は継代前の株に比べ 1/4 に短縮し、累積原虫増殖度は 1/3

に低下した。この時点で彼らはこの株が弱毒化されたと報告した。これを受けて、De Vos ら [8] は、*B. bovis* を摘脾子ウシで急速継代することによって作出した弱毒生ワクチンの病原性と発症軽減効果を prasitemia、貧血（PCV）の抑制率ならびに発熱の有無を指標として評価した。その結果、ワクチン接種群では発熱と貧血は強毒株を接種した対照群よりも抑制されたが、prasitemia は対照群に比べやや低い程度であったと報告している。つまり、*B. bovis* の弱毒化の程度は確実にバベシア症が発症する程度の弱毒化状態といえよう。このワクチンで免疫したウシを強毒株で攻撃感染して発症軽減効果を観察したところ、ワクチン接種群の prasitemia は対照群の 1/2.8 に抑制され、PCV の低下率も対照群に比べ、1/8.3 とかなり抑制された。さらに、発熱も認められず、ワクチンによる発症軽減効果は十分認められたという。この事実から prasitemia と貧血の抑制率および発熱のどの項目に関しても、400 代継代培養した弱毒化メロゾイト株のほうが弱毒生ワクチンとし優れていることが明らかとなった。このように *B. bovis* 弱毒化ワクチンと呼称されている弱毒化ワクチンの弱毒化は今回のイヌの弱毒化ワクチンに比べて不十分といえる。しかし、*B. bovis* 毒血生ワクチン [3] は少量の接種で強い発症軽減効果が得られ、かつ安価であるという実利面から、オーストラリアや南アフリカなどの *B. bovis* 汚染地域でワクチン接種によるリスクを承知の上で現在でも実際に使用されている。

一方、*B. bigemina* ワクチンは Dalgliesh ら [6] によって正常の子ウシを用いた slow 継代法で作出されている。この作出方法は、*B. bigemina* 原虫を正常な子ウシに接種し、回復後に摘脾手術を行い、再発させ、得られた原虫を別の正常の子ウシに接種し、回復後摘脾

し、再発させてウシに継代するという操作を繰り返して得られた原虫を生ワクチンとして用いるものである。この原虫の弱毒化の程度は強毒株に比べ、parasitemiaの程度が1/2となり、最高PCV低下率が1/2.7に抑制され、発熱は認められないという程度のものであった。この弱毒ワクチンの発症軽減効果は対照群と比べ、parasitemiaの程度が1/2.8で、最高PCVにおける低下率が8.5%に抑制され、発熱は認められず、発症軽減効果があることが明らかにされ、汚染地域で実用化されているが、*B. bovis*の場合と同様、400代継代*B. gibsoni*株よりも弱毒化の程度は劣っている。

イヌの*B. gibsoni*原虫の弱毒化の研究は少なく、ウシのバベシア症と同様に摘脾犬を用いた急速継代やイヌ赤血球による短期培養[56]およびイヌ赤血球入れ替えSCID(=Ca-RBC-SCID)マウスを用いた継代によるもの[19]であるが、いずれも全く病原性に変化は認められなかった。

今回はじめて長期継代培養によってイヌに対して病原性がなく、かつ、免疫原性がある*B. gibsoni*の弱毒株が作出できた。この培養株はイヌに対して病原性がなく、その発症防御効果は、攻撃感染に対して原虫の増殖をおよび貧血を抑制し、さらに発熱も抑制した。また、この弱毒株はウシの生ワクチンのように弱毒化の過程で生体を使用せず、培養によって弱毒化を行っているため、白血病などのウイルスが混入する危険性が少なく、しかも、病原性が安定しているという長所がある反面、弱毒メロゾイト株を生ワクチンとして野外で応用した場合には、免疫に用いた弱毒化メロゾイト株が生体に残存し、免疫犬がキャリアとなる危険性があるため、生ワクチンとしての使用は汚染地域に限定されよう。

### 3. 不活化抗原（培養上清抗原・ $\beta$ -プロピオラクトン処理メロゾイト抗原）の発症防御効果

安定的に増殖する弱毒化メロゾイト株を作出し、この株の生ワクチンとしての性質を検討した結果、この株には接種による副作用はなく、強い発症防御効果を示すことが明らかになった。しかし、生ワクチンとして使用する場合、接種メロゾイトが長期間血中に残存することが想定されるので、安全性の高い不活化抗原を作製し、その発症防御効果を検討した。

バベシア症の不活化ワクチンには赤血球内のメロゾイトを抗原とした不活化メロゾイトワクチン[31, 37, 90]と培養方法が確立された大型バベシア種の *B.canis* [71-74]や *B.bovis* [34, 43, 46, 60]や *B.bigemina* [13]で試みられている培養上清中の発症防御抗原を用いた不活化ワクチンがある。両者とも原虫の増殖を抑制し、貧血や発熱を抑える効果が認められているが、培養上清抗原のほうが、抗原を大量に生産することができ、精製もメロゾイト不活化抗原よりも容易で、かつ、発症防御効果も高いことが報告されている。そこで、今回培養方法が確立した *B.gibsoni* メロゾイトの培養上清中にも発症を防御する抗原物質が存在するかどうかを確認し、この培養上清抗原の発症防御効果と従来からおこなわれている不活化メロゾイト抗原の発症防御効果を検討した。

実験方法はメロゾイト培養上清液を濃縮した培養上清抗原と培養メロゾイト感染赤血球から取り出したメロゾイトを $\beta$ -プロピオラクトンで処理した不活化メロゾイト抗原の2種類を抗原として用いて、あらかじめ免疫を付与したイヌを作出し、これに強毒原虫



で攻撃感染して、示された原虫増殖抑制の程度、貧血の抑制効果および発熱の度合いを指標として両免疫原の効果を比較検討した。その結果、原虫増殖抑制効果および発熱防止効果は両免疫群ともに大きく、一方、貧血抑制効果は対照群に比べると両免疫群ともに効果は認められたが、両免疫群間で比較すると培養上清抗原免疫群により強い貧血抑制効果が認められた。

以上の事実から *B.gibsoni* 培養上清中に認められる抗原物質が不活化ワクチン抗原として、有効であることが明らかとなった。

原虫の不活化ワクチンの研究は感染動物から採取した血液からメロゾイトを分離し、これをホルマリンや $\beta$ プロピオラクトンで不活化し、Freund's 完全アジュバント (FCA) などと等量混合したものを免疫原として用いた実験から始まった[1, 61]。これらの不活化メロゾイトワクチンは、*B.rodhaini* [61]、*B.ovis* [1]、*B.bovis* [37]、*B.equi* [31]および *B.bigemina* [33] などで作製された。このワクチンには原虫増殖抑制効果および貧血や発熱の抑制効果が認められたが、感染赤血球を溶血させてメロゾイトを回収する作業は煩雑であり、また、赤血球 stroma がどうしても多量にメロゾイトに混入するため、このメロゾイト不活化抗原を接種した動物の血中に iso 赤血球抗原に対する抗体ができ、貧血を引き起こす個体が出るという欠点があった[69]。今回の実験でも不活化メロゾイト抗原免疫群には十分な原虫増殖抑制効果が認められたが、培養上清抗原免疫群よりも貧血の抑制効果が劣っていた。これは不活化メロゾイト抗原に赤血球 stroma の混入が認められたことが原因の一つと考えられる。それに比べ、培養上清抗原は比較的大量に作製でき、赤血球 stroma の混入がないという利点があり、培養法が確立した *B.bovis* [42, 45, 44, 46,

78, 79]、*B. canis* [41, 70-74]および *B. divergens* [94]ではワクチン抗原の有力な候補となっている。Kuttler ら [34]は *B. bovis* の培養上清を凍結乾燥によって濃縮し、これをサポニンアジュバントと混合したものを免疫原として 3 週間隔でウシの皮下に 2 回接種し、1 回目の免疫原接種後 49 日目に攻撃感染を行った結果、免疫群は対照群に比べ、原虫出現期間が短く、PCV は対照群の 18%に対して、免疫群では 23%と減少率が低く、また、対照群では 3 頭中 2 頭が死亡したが、免疫群では全頭が生存したことから、培養上清中に強い発症防御抗原があることを報告した。今回実験した *B. gibsoni* 培養上清抗原免疫群はウシの *B. bovis* 培養上清抗原接種群に比べ、原虫出現日数ばかりでなく、parasitemia も低かったこと、さらに、対照群の平均最低 PCV が 12.5%であったのに比べ、培養上清抗原免疫群では 28.5%であったことから、*B. bovis* 培養上清抗原に比べ、強い発症防御効果を持つことが明らかとなった。また、Schetters ら [71]は、*B. canis* のメロゾイト培養上清 50ml を濃縮した免疫原とサポニンアジュバントを混合してビーグル犬の皮下に 2 回接種した後、感染赤血球数  $6 \times 10^6$  個で攻撃感染し、発症防御能について検討した。その結果、原虫負荷量 (Parasite load) は対照群が 4.03 であるのに対して、免疫群では 1.50 となり、1/2.7 に低下していた。また、最低 PCV も対照群の 20%に比べ、培養上清抗原免疫群で 34%を示したことから、*B. canis* の培養上清中には強い原虫増殖抑制効果と貧血抑制効果を持つ抗原が認められることを明らかにした。

今回の実験では、Schetter ら [71]の *B. canis* の場合の 6 倍量の培養上清を抗原として接種した。これは、不活化ワクチンの効果が接種抗原量依存であり、かつ、小型バベシア種である *B. divergens* は、

大型バベシア種である *B.bovis* や *B.canis* よりも培養上清中に認められる抗原量が少ない[25]ためである。今回の *B.gibsoni* の培養上清中に認められる抗原量も、1/50 に濃縮して、はじめてゲル内沈降反応で 8 倍の力価を示す程度であった。さらに、この培養上清抗原（可溶性抗原）の性状を知るために、この抗原をイヌに接種し、得られた抗体をウエスタンブロット法で分析した結果、強毒株接種後に認められる 22kDa から 127kDa の間のメロゾイト抗原に対する抗体と同様な抗体が確認されたことから、この培養上清抗原には主要なメロゾイト抗原が全て含まれていることが明らかとなった。この培養上清抗原で免疫したイヌに強毒株で攻撃感染すると原虫負荷量は対照群に比べ 1/3.7 であり、*B.canis* 培養上清抗原の場合の 1/2.7 よりも低く、原虫増殖抑制が強く認められた。また、貧血の抑制効果および発熱抑制効果は *B.canis* 培養上清抗原と同程度であった。

Xuan ら [97] は *B.gibsoni* メロゾイトから 29kDa、50 kDa および 76kDa のそれぞれ単味の抗原を作製し、これでイヌを免疫した後、強毒株で攻撃感染して発症の抑制効果を検討した結果、それぞれの免疫原を接種したイヌには、各免疫原に対する抗体価が十分に上昇していたにもかかわらず発症軽減効果が劣っていたことから、単一の免疫原の接種のみでは、強い原虫増殖抑制作用や貧血の改善は認められないと結論した。

今回の実験では多数のメロゾイト抗原に対する抗体（22kDa から 127kDa まで）が培養上清抗原で免疫したイヌに認められ、また強い原虫増殖抑制効果や貧血の改善が認められたことから、培養上清抗原が効果的に働くのは培養上清抗原中に存在する複数の抗原蛋白の相互作用によるものと推察される。これらの *B.gibsoni* メロ

ゾイト抗原蛋白のうち、22kDa [84]、50kDa [20-21]および 76kDa [97] のものはメロゾイト膜抗原であり、29kDa [22]はメロゾイトの細胞質に局在する抗原であるとの報告がある。今回作製した培養上清ワクチンの接種によって、*B.gibsoni* メロゾイトの膜抗原である 22、50 kDa および 76kDa 付近の分画と、メロゾイトの細胞質に局在するといわれている 29kDa の分画が認められた。あらかじめ、培養上清抗原で免疫したイヌではメロゾイトの発育・増殖と貧血の発症が強く抑制されたという事実から、培養上清抗原接種によってイヌ体内に誘導された抗体が遊離型メロゾイトの膜抗原に反応し、メロゾイトの赤血球内への侵入を防ぎ、原虫増殖を抑制する効果や貧血の抑制効果が生じたと考えられる。

また、同様の事実がウシに感染性を持つ *B.bovis* においても確認されている。*B.bovis* の培養上清中には[23, 66]42kDa (MSA-1) と 44kDa (MSA-2) のメロゾイト膜抗原と[27]、60kDa のロプトリー関連蛋白 (RAP-1) [81] の存在が報告されている。メロゾイト膜抗原の MSA-1 と MSA-2 は中和抗体 (neutralization-sensitive エピトープが含まれる) を作り出すことが、また、RAP-1 は原虫が赤血球へ侵入するときに何らかの役割をはたすことが知られており、*B.bovis* の培養上清抗原が効果的に働くのは、これらの抗原蛋白とそのほかの培養上清抗原中の蛋白に対する抗体の相互作用によると推察されている[39, 95]。

培養上清抗原は、家畜ではその発症防御効果が認められているものの、価格の面で実用化にはいたっておらず、安価で大量に生産できる毒血生ワクチンの接種のみが実用化されている。しかし、イヌの *B.canis* の原虫培養上清ワクチンはフランスですでに市販されて

おり、このワクチンの発症防御効果は、今回作製した *B.gibsoni* 培養上清抗原と同程度であることから、*B.gibsoni* 培養上清中に認められる可溶性抗原物質が効果および安全性の点から不活化ワクチンとして優れた作用を示すことが明らかとなった。

## 結 論

*B.gibsoni* 症は、原虫がイヌの赤血球に感染し、発熱、脾腫、強度の溶血性貧血を主徴とする疾病でマダニによって媒介される。本病は西日本を中心に多発しているが有効な治療薬はなく、ワクチンの開発が強く望まれている。本研究は疾病の発症予防に効果を示すワクチンの開発を目的としているが、それに先立ち、安定的に増殖する培養メロゾイト株の作出を試みた。次いで、この培養メロゾイト株の弱毒化を試み、その弱毒化したメロゾイト株の発症防御効果について検討した。さらに、安全性の高い不活化ワクチンを開発するためにメロゾイトの培養上清中に認められた可溶性の抗原と培養感染赤血球から採取して  $\beta$ -プロピオラクトンで処理した不活化メロゾイト抗原の発症防御効果について検討した。その結果、次の結論を得た。

1. *B.gibsoni* 培養株の作出：メロゾイトの培養法を考案し、培養を試みた結果、プレート内での培養が可能となった。メロゾイト感染赤血球の培養方法はメロゾイト感染赤血球 1 容に培養液を 9 容加え、これを 12 ウエルの平底プレートに 2ml ( $0.53\text{ml}/\text{cm}^2$ ) ずつ分注して、5%CO<sub>2</sub>/air、37℃ 下で培養した。各ウエルの培養液は毎日、1ml の培養上清を新鮮な培養液と交換し、この時、ギムザ染色血液塗抹標本作製し、parasitemia を算定した。赤血球内に感染しているメロゾイトの継代方法はウエル内の培養赤血球の 1/3 を別のウエルに取り、これに新鮮イヌ赤血球 2/3 を加えて混和し、この赤血球液 1 容に培養液 9 容を加え

て培養する方法を用いた。その結果、30代では parasitemia は  $3.1 \pm 1.2\%$ であったが、その後の増殖率は次第に高くなって190代では parasitemia が  $18.8 \pm 1.3\%$ を示す *B.gibsoni* メロゾイト培養株が作出できた。

2. 弱毒化メロゾイト株の作出と作出株の発症防御効果：弱毒化を目的に培養株を400代にわたって継代培養した結果、イヌに対して発熱や貧血などの病原性がなく、かつ、免疫原性を有する弱毒メロゾイト株が作出できた。この弱毒メロゾイト株の発症防御効果を検討した結果、攻撃感染に対して原虫の増殖および貧血を抑制し、さらに発熱も抑制した。この弱毒化メロゾイト株は、生ワクチンとしての条件である病原性がないこと、免疫原性があること、原虫増殖を抑制し、貧血や発熱などの臨床症状を軽減し、バベシア症の発症抑制効果を有することが明らかとなった。しかし、弱毒メロゾイト株を生ワクチンとして野外で応用した場合には、免疫に用いた弱毒化メロゾイト株が生体に残存し、免疫犬がキャリアとなる危険性があるため、生ワクチンとしての使用は汚染地域に限定される。

3. 不活化抗原（培養上清抗原・ $\beta$ -プロピオラクトン処理メロゾイト抗原）の発症防御効果：不活化抗原はメロゾイト培養上清液を限外濾過法で濃縮して得た培養上清抗原と培養感染赤血球から採取して  $\beta$ -プロピオラクトン

で処理した不活化メロゾイト抗原の2種類を用いて、それらの発症防御効果を検討した結果、両免疫群ともに強いメロゾイトの増殖抑制と発熱の防止効果が認められた。貧血抑制効果は両群ともに認められたが、培養上清抗原で免疫した群に強く認められた。また、培養上清抗原は大量生産が可能で、赤血球膜の混入がなく、精製が容易であった。以上のことから、効果および安全性の点から *B.gibsoni* 培養上清中に認められる可溶性抗原物質が不活化ワクチンとして優れた作用を示すことが明らかとなった。

本研究は、強毒株から安定的に増殖する *B.gibsoni* メロゾイト株を作出し、この株を400代継代することで弱毒化メロゾイト株の作出に成功した。この弱毒化メロゾイト株、その培養上清抗原と $\beta$ -プロピオラクトン処理メロゾイト抗原にはバベシア症の発症を抑制するワクチン効果のあることを明らかにし、さらにワクチンとして実用化するには安全性の高い培養上清抗原を用いた不活化ワクチンが最も優れていることを明らかにした。



## 謝 辞

稿を終えるに当たり、本研究のご指導と論文の御校閲を賜りました麻布大学獣医学部伝染病学研究室教授 菅野康則博士に衷心より感謝の意を表します。また、懇切な論文の御校閲を賜りました麻布大学教授 茅根士郎博士、福安嗣昭博士、同名誉教授 板垣博博士に深く感謝の意を表します。最後になりましたが本研究の遂行に協力いただいた伝染病学研究室 並河和彦助教授に謝意を表します。

## 参考文献

1. Alabay M, Duzgun A, Cerci H, Wright IG, Waltisbuhl DJ, Goodger BV (1987) Ovine babesiosis: induction of a protective immune response with crude extracts of either *Babesia bovis* or *B. ovis*. Res Vet Sci 43: 401-402.
2. Anderson JF, Mintz ED, Gadbaw JJ, Magnarelli LA (1991) *Babesia microti*, human babesiosis, and *Borrelia burgdorferi* in Connecticut. J Clin Microbiol 29: 2779-2783.
3. Callow LL (1977) Vaccination against bovine babesiosis. Adv Exp Med Biol 93: 121-149.
4. Callow LL, Mellors LT, McGregor W (1979) Reduction in virulence of *Babesia bovis* due to rapid passage in splenectomized cattle. Int J Parasitol 9: 333-338.
5. Christensson D, Thunegard E (1981) *Babesia motasi* in sheep on the island of Gotland in Sweden. Vet Parasitol 9: 99-106.
6. Dalgliesh RJ, Callow LL, Mellors LT, McGregor W (1981) Development of a highly infective *Babesia bigemina* vaccine of reduced virulence. Aust Vet J 57: 8-11.
7. Dalgliesh RJ, Stewart NP, Duncalfe F (1981) Reduction in pathogenicity of *Babesia bovis* for its tick vector, *Boophilus microplus*, after rapid blood passage in splenectomized calves. Z Parasitenkd 64: 347-351.
8. De Vos AJ, Bessenger R, Fourie CG (1982) Virulence and heterologous strain immunity of South African and Australian

*Babesia bovis* strains with reduced pathogenicity. Onderstepoort J Vet Res 49: 133-136.

9. De Vos AJ, Combrink MP, Bessenger R (1982) *Babesia bigemina* vaccine: comparison of the efficacy and safety of Australian and South African strains under experimental conditions in South Africa. Onderstepoort J Vet Res 49: 155-158.
10. De Waal DT, Lopez Rebollar LM, Potgieter FT (1992) The transovarial transmission of *Babesia trautmanni* by *Rhipicephalus simus* to domestic pigs. Onderstepoort J Vet Res 59: 219-221.
11. Dipeolu OO, Majaro OM, Akinboade OA, Nwufor KJ (1982) Studies on the blood parasites of pigs in Ibadan, Nigeria. Vet Parasitol 10: 87-90.
12. Dipeolu OO, Otesile EB, Adetunji A, Fagbemi BO (1983) Studies on blood parasites of pigs in Nigeria: pathogenicity of *Babesia trautmanni* in experimentally infected pigs. Zentralbl Veterinärmed 30: 97-102.
13. Echaide IE, de Echaide ST, Guglielmone AA (1993) Live and soluble antigens for cattle protection to *Babesia bigemina*. Vet Parasitol 51: 35-40.
14. Erp EE, Smith RD, Ristic M, Osorno BM (1980) Continuous in vitro cultivation of *Babesia bovis*. Am J Vet Res 41: 1141-1142.
15. Farwell GE, LeGrand EK, Cobb CC (1982) Clinical observations on *Babesia gibsoni* and *Babesia canis* infections in dogs. J

Am Vet Med Assoc 180: 507-511.

16. Filstein MR, Benach JL, White DJ, Brody BA, Goldman WD, Bakal CW, Schwartz RS (1980) Serosurvey for human babesiosis in New York. J Infect Dis 141: 518-521.
17. Frerichs WM, Allen PC, Holbrook AA (1973) Equine piroplasmosis (*Babesia equi*): therapeutic trials of imidocarb dihydrochloride in horses and donkeys. Vet Rec 93: 73-75.
18. Fujinaga T (1981) Bovine babesiosis in Japan: clinical and clinico-pathological studies on cattle experimentally infected with *Babesia ovata* . Nippon Juigaku Zasshi 43: 803-813.
19. Fukumoto S, Xuan X, Igarashi I, Zhang S, Mugisha J, Ogata T, Nagasawa H, Fujisaki K, Suzuki N, Mikami T (2000) Morphological changes of *Babesia gibsoni* grown in canine red blood cell-substituted severe combined immune deficiency mice. J Parasitol 86: 956-958.
20. Fukumoto S, Xuan X, Nishikawa Y, Inoue N, Igarashi I, Nagasawa H, Fujisaki K, Mikami T (2001) Identification and expression of a 50-Kilodalton surface antigen of *Babesia gibsoni* and evaluation of its diagnostic potential in an enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol 39: 2603-2609.
21. Fukumoto S, Xuan X, Kadota K, Igarashi I, Sugimoto C, Fujisaki K, Nagasawa H, Mikami T, Suzuki H (2003) High-level expression of truncated surface antigen P50 of *Babesia gibsoni* in insect

- cells by baculovirus and evaluation of its immunogenicity and antigenicity. Clin Diagn Lab Immunol 10: 596-601.
22. Fukumoto S, Xuan X, Inoue N, Igarashi I, Sugimoto C, Fujisaki K, Nagasawa H, Mikami T, Suzuki H (2003) Molecular characterization of a gene encoding a 29-kDa cytoplasmic protein of *Babesia gibsoni* and evaluation of its diagnostic potentiality. Mol Biochem Parasitol 131: 129-136.
  23. Goff WL, Davis WC, Palmer GH, McElwain TF, Johnson WC, Bailey JF, McGuire TC (1988) Identification of *Babesia bovis* merozoite surface antigens by using immune bovine sera and monoclonal antibodies. Infect Immun 56: 2363-2368.
  24. Gray JS, De Vos AJ (1981) Studies on a bovine *Babesia* transmitted by *Hyalomma marginatum rufipes* Koch, 1844. Onderstepoort J Vet Res 48: 215-223.
  25. Gray JS, Gannon P (1992) Preliminary development of a live drug-controlled vaccine against bovine babesiosis using the Mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*. Vet Parasitol 42: 179-188.
  26. Groves MG, Dennis GL (1972) *Babesia gibsoni*: field and laboratory studies of canine infections. Exp Parasitol 31: 153-159.
  27. Hines SA, Palmer GH, Jasmer DP, McGuire TC, McElwain TF (1992) Neutralization-sensitive merozoite surface antigens of *Babesia bovis* encoded by members of a polymorphic gene family. Mol Biochem Parasitol 55: 85-94.

28. 堀井 俊宏 (2001) マラリア原虫寄生の分子戦略とワクチン開発.  
蛋白質 核酸 酵素 46: 2154-2162.
29. Irvin AD, Brocklesby DW (1969) Continuous high parasitemia  
in mice infected with *Babesia (Nuttallia) microti* . J  
Parasitol 55: 1190.
30. 石橋徹, 須永藤子, 並河和彦, Jongejan F, 菅野康則 (1995) 沖  
縄本島の犬から分離された *Babesia canis* 亜種. 日本獣医師会雑  
誌 48: 35-37.
31. Kumar S, Malhotra DV, Dhar S, Nichani AK (2002) Vaccination  
of donkeys against *Babesia equi* using killed merozoite  
immunogen. Vet Parasitol 106: 19-33.
32. 楠禎人, 土本正明, 伊藤義博, 尾崎文雄 (1973) 徳島市にみられ  
たイヌ piroplasma 症とその治療. 医学と生物学 87: 285-288.
33. Kuttler KL, Johnson LW (1980) Immunization of cattle with a  
*Babesia bigemina* antigen in Freund's complete adjuvant. Am  
J Vet Res 41: 536-538.
34. Kuttler KL, Levy MG, James MA, Ristic M (1982) Efficacy of  
a nonviable culture-derived *Babesia bovis* vaccine. Am J Vet  
Res 43: 281-284.
35. Levy MG, Ristic M (1980) *Babesia bovis*: continuous  
cultivation in a microaerophilous stationary phase culture.  
Science 207: 1218-1220.
36. Madden PA, Holbrook AA (1968) Equine piroplasmosis: indirect  
fluorescent antibody test for *Babesia caballi* . Am J Vet Res  
29: 117-123.

37. Mahoney DF (1967) Bovine babesiosis: the immunization of cattle with killed *Babesia argentina*. Exp Parasitol 20: 125-129.
38. McCosker PJ (1981) The global importance of babesiosis. In: Babesiosis, Ristic and Kreier (eds). Academic Press: New York, pp 1-24.
39. McElwain TF, Perryman LE, Musoke AJ, McGuire TC (1991) Molecular characterization and immunogenicity of neutralization-sensitive *Babesia bigemina* merozoite surface proteins. Mol Biochem Parasitol 47: 213-222.
40. Miller LH, Howard RJ, Carter R, Good MF, Nussenzweig V, Nussenzweig RS (1986) Research toward malaria vaccines. Science 234: 1349-1356.
41. Molinar E, James MA, Kakoma I, Holland C, Ristic M (1982) Antigenic and immunogenic studies on cell culture-derived *Babesia canis*. Vet Parasitol 10: 29-40.
42. Montenegro-James S (1989) Immunoprophylactic control of bovine babesiosis: role of exoantigens of *Babesia*. Trans R Soc Trop Med Hyg 83 Suppl: 85-94.
43. Montenegro-James S, James MA, Ristic M (1983) Localization of culture-derived soluble *Babesia bovis* antigens in the infected erythrocyte. Vet Parasitol 13: 311-316.
44. Montenegro-James S, Ristic M, Toro Benitez M, Leon E, Lopez R (1985) Heterologous strain immunity in bovine babesiosis using a culture-derived soluble *Babesia bovis* immunogen. Vet

Parasitol 18: 321-337.

45. Montenegro-James S, Toro Benitez M, Leon E, Lopez R, Ristic M (1987) Bovine babesiosis: induction of protective immunity with culture-derived *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* immunogens. Parasitol Res 74: 142-150.
46. Montenegro-James S, Toro M, Leon E, Guillen AT (1992) Field evaluation of an exoantigen-containing *Babesia* vaccine in Venezuela. Mem Inst Oswaldo Cruz 87 Suppl 3: 283-288.
47. Murase T, Hashimoto T, Ueda T, Maede Y (1991) Multiplication of *Babesia gibsoni* in in vitro culture and its relation to hemolysis of infected erythrocytes. J Vet Med Sci 53: 759-760.
48. 並河和彦, 千田昭文, 横山一裕, 須永藤子, 菅野康則 (1988) 感染イヌに対する Ganaseg の常用量と投与回数の再検討. 医学と生物学 117: 383-388.
49. Namikawa K, Sunaga F, Kanno Y (1988) Morphology of *Babesia gibsoni* in canine erythrocytes. J Vet Med Sci 50: 936-938.
50. Neussenzweig R (1967) Protective immunity produced by the infection of X-irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*. Nature 216: 160.
51. Nowell F (1969) The blood picture resulting from *Nuttallia* (=Babesia) *rodhaini* and *Nuttallia* (=Babesia) *microti* infections in rats and mice. Parasitology 59: 991-1004.
52. Nussenzweig V, Nussenzweig RS (1986) Development of a sporozoite malaria vaccine. Am J Trop Med Hyg 35: 678-688.
53. 扇谷年昭, 岡部達二, 佐々木文存 (1990) 犬の住血原虫 *Babesia*



- gibsoni* 免疫に関する研究 *Bordetella bronchiseptica* の免疫増強効果. 日本細菌学雑誌 45: 785-795.
54. 扇谷年昭, 岡部達二, 岩本市蔵, 佐々木文存 (1983) *Babesia gibsoni* 接種犬の血清抗体価と貧血・原虫血症の推移. 日本細菌学雑誌 38: 687-693.
  55. 大西堂文, 仲井眞由子, 後藤あかね, 堀江牧夫, 仲田恵利香, 梶川武次 (1994) 日本における犬の *Babesia gibsoni* 感染症の発生状況. 日本獣医師会雑誌 47: 23-28.
  56. Onishi T, Morita M, Ando T (1993) *In vitro* cultivation and infectivity of *Babesia gibsoni*. Jpn J Parasitol 42: 340-344.
  57. 大塚宏光 (1974) *Haemaphysalis longicornis* Neumann(1901)による *Babesia gibsoni* Patton(1910)の伝播に関する研究. 宮崎大学農学部研究報告 21: 359-367.
  58. Pang XL, Horii T (1998) Complement-mediated killing of *Plasmodium falciparum* erythrocytic schizont with antibodies to the recombinant serine repeat antigen (SERA). Vaccine 16: 1299-1305.
  59. Pang XL, Mitamura T, Horii T (1999) Antibodies reactive with the N-terminal domain of *Plasmodium falciparum* serine repeat antigen inhibit cell proliferation by agglutinating merozoites and schizonts. Infect Immun 67: 1821-1827.
  60. Patarroyo JH, Prates AA, Tavares CA, Mafra CL, Vargas MI (1995) Exoantigens of an attenuated strain of *Babesia bovis* used as a vaccine against bovine babesiosis. Vet Parasitol 59: 189-199.

61. Phillips RS (1967) Active immunization of rats against *Babesia (Nuttallia) rodhaini* using a killed vaccine. Parasitology 57: 11P.
62. Pound CJ (1897) Tick fever. Notes on the inoculation of bulls as a preventive against tick fever at Rathdowney and Rosedale. Queensl Agric J 1: 473.
63. Purnell RE, Lewis D, Brocklesby DW, Taylor SM (1979) Bovine babesiosis: steps towards an irradiated vaccine. J S Afr Vet Assoc 50: 339-344.
64. Purnell RE, Lewis D, Brabazon A, Francis LM, Young ER, Grist C (1981) Field use of an irradiated blood vaccine to protect cattle against redwater (*Babesia divergens* infection) on a farm in Dorset. Vet Rec 108: 28-31.
65. Purnell RE, Lewis D (1981) *Babesia divergens*: combination of dead and live parasites in an irradiated vaccine. Res Vet Sci 30: 18-21.
66. Reduker DW, Jasmer DP, Goff WL, Perryman LE, Davis WC, McGuire TC (1989) A recombinant surface protein of *Babesia bovis* elicits bovine antibodies that react with live merozoites. Mol Biochem Parasitol 35: 239-247.
67. Ristic M, Conroy JD, Siwe S, Healy GR, Smith AR, Huxsoll DL (1971) *Babesia* species isolated from a woman with clinical babesiosis. Am J Trop Med Hyg 20: 14-22.
68. Ristic M, Levy MG (1981) A new era of research toward solution of bovine babesiosis. In: Babesiosis, Ristic and Kreier (eds).

Academic Press: New York, pp 509-544.

69. Ristic M, Montenegro-James S (1988) Immunization against *Babesia*. in Babesiosis of Domestic Animals and Man, CRD Press, Florida pp 167.
70. Schetters TP, Kleuskens J, Scholtes N, Bos HJ (1992) Vaccination of dogs against *Babesia canis* infection using parasite antigens from in vitro culture. Parasite Immunol 14: 295-305.
71. Schetters TP, Kleuskens JA, Scholtes NC, Pasman JW, Bos HJ (1994) Vaccination of dogs against *Babesia canis* infection using antigens from culture supernatants with emphasis on clinical babesiosis. Vet Parasitol 52: 219-233.
72. Schetters TP (1995) Vaccine development from a commercial point of view. Vet Parasitol 57: 267-275..
73. Schetters TP, Kleuskens JA, Scholtes NC, Pasman JW, Goovaerts D (1997) Vaccination of dogs against *Babesia canis* infection. Vet Parasitol 73: 35-41.
74. Schetters TP, Kleuskens JA, Scholtes NC, Gorenflot A, Moubri K, Vermeulen AN (2001) Vaccination of dogs against heterologous *Babesia canis* infection using antigens from culture supernatants. Vet Parasitol 100: 75-86
75. Shih CM, Liu LP, Chung WC, Ong SJ, Wang CC (1997) Human babesiosis in Taiwan: asymptomatic infection with a *Babesia microti*-like organism in a Taiwanese woman. J Clin Microbiol 35: 450-454.

76. Shortt HE (1973) *Babesia canis*: the life cycle and laboratory maintenance in its arthropod and mammalian hosts. Int J Parasitol 3: 119-148.
77. 塩田恒三 (1983) 日本のネズミからはじめて見出されたバベシアに関する研究 1. 疫学と形態. 寄生虫学雑誌 32: 165-175.
78. Smith RD, Carpenter J, Cabrera A, Gravely SM, Erp EE, Osorno M, Ristic M (1979) Bovine babesiosis: vaccination against tick-borne challenge exposure with culture-derived *Babesia bovis* immunogens. Am J Vet Res 40: 1678-1682.
79. Smith RD, James MA, Ristic M, Aikawa M, Vega y Murguia CA (1981) Bovine babesiosis: protection of cattle with culture-derived soluble *Babesia bovis* antigen. Science 212: 335-338.
80. Stoute JA, Slaoui M, Heppner DG, Momin P, Kester KE, Desmons P, Wellde BT, Garçon N, Krzych U, Marchand M (1997) A preliminary evaluation of a recombinant circumsporozoite protein vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria. N Engl J Med 336: 86-91.
81. Suarez CE, Palmer GH, Hines SA, McElwain TF (1993) Immunogenic B-cell epitopes of *Babesia bovis* rhoptry-associated protein 1 are distinct from sequences conserved between species. Infect Immun 61: 3511-3517.
82. Sugiyama T, Suzue K, Okamoto M, Inselburg J, Tai K, Horii T (1996) Production of recombinant SERA proteins of *Plasmodium falciparum* in *Escherichia coli* by using synthetic genes.

Vaccine 14: 1069-1076.

83. Sunaga F, Namikawa K, Kanno Y (1988) The thermic circadian rhythm of dogs infected with *Babesia gibsoni*. J Vet Med Sci 50: 279-281.
84. 須永 藤子, 高倉麻樹, 臼井恭子, 西尾正敏, 並河和彦, 菅野康則 (1999) *Babesia gibsoni* 赤内型メロゾイトに対するモノクローナル抗体の作出. 第 127 回日本獣医学会 (相模原) 92.
85. Sunaga F, Namikawa K, Kanno Y (2002) Continuous *in vitro* culture of erythrocytic stages of *Babesia gibsoni* and virulence of the cultivated parasite. J Vet Med Sci 64: 571-575.
86. Sunaga F, Namikawa K, Kanno Y (2002) Protection of dogs against homologous challenge by the inoculation of irradiated *Babesia gibsoni*. J Anim Protozooses 17: 15-18.
87. Taboada J (1998) Babesiosis. Infectious Diseases of Dog and Cat Second Edition (Greene, GE ed.), Philadelphia: Saunders Company 473-481.
88. Takahashi K, Kurosawa T, Sonoda M, Nakade T, Fujita J (1984) Action of several antiprotozoal compounds against *Babesia gibsoni* infection in dogs. J Jpn Vet Med Assoc 37: 203-207.
89. 田辺和祐, 先濱直子 (2002) パラサイトの分子戦略 マラリア原虫の抗原多型と集団生物学. 蛋白 核酸 酵素 47: 5-12.
90. Taylor SM, Kenny J, Mallon T (1983) The effect of route of administration of a *Babesia divergens* inactivated vaccine on protection against homologous challenge. J Comp Pathol 93:

423-428.

91. Timms P (1980) Short term cultivation of *Babesia* species. Res Vet Sci 29: 102-104.
92. Trager W, Jensen JB (1976) Human malaria parasites in continuous culture. Science 193: 673-675.
93. Uilenberg G, Franssen FF, Perie NM, Spanjer AA (1989) Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. Vet Q 11: 33-40.
94. Valentin A, Precigout E, L'Hostis M, Carcy B, Gorenflot A, Schrevel J (1993) Cellular and humoral immune responses induced in cattle by vaccination with *Babesia divergens* culture-derived exoantigens correlate with protection. Infect Immun 61: 734-741.
95. Wright IG, Casu R, Commins MA, Dalrymple BP, Gale KR, Goodger BV, Riddles PW, Waltisbuhl DJ, Abetz I, Berrie DA (1992) The development of a recombinant *Babesia* vaccine. Vet Parasitol 44: 3-13.
96. Wulansari R, Wijaya A, Ano H, Horii Y, Makimura S (2003) Lymphocyte subsets and specific IgG antibody levels in clindamycin-treated and untreated dogs experimentally infected with *Babesia gibsoni*. J Vet Med Sci 65: 579-584.
97. Xuan X, 福本晋也, 鈴木宏志 (2003) *Babesia gibsoni* 感染症の組換えワクチン開発. 第 136 回 日本獣医学会学術集会 (青森) 42.
98. 山根逸郎 (1995) 犬の *Babesia gibsoni* 感染症の最近の知見: 特

にカリフォルニア州における疫学調査を中心にして. 家畜衛試研究報告 101: 1-13.

99. Yeruham I, Hadani A, Galker F, Rosen S (1995) A study of an enzootic focus of sheep babesiosis (*Babesia ovis* Babes, 1892). Vet Parasitol 60: 349-354.
100. Yonamine H, Ichiki H, Hamakawa M, Shimabukuro T, Sugiyama M, Isoda M (1984) Studies on canine babesiosis in Okinawa Island. Nippon Juigaku Zasshi 46: 511-518.

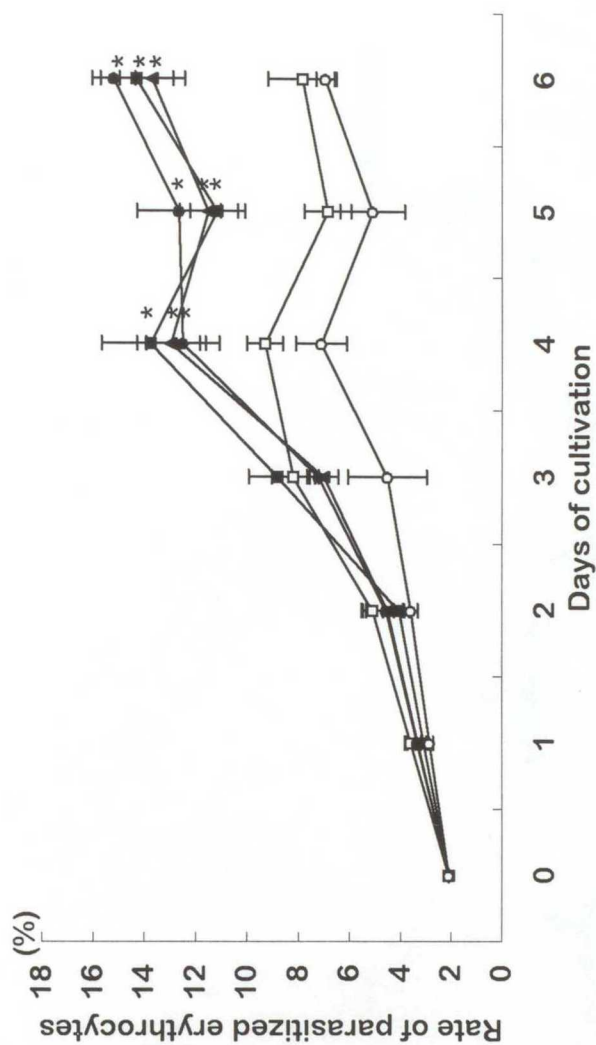


Fig.1. Effect of different serum concentrations on in vitro growth of *B. gibsoni*. 10%(-□-), 20%(-▲-), 30%(-■-), 40%(-●-), 50%(-○-). Vertical bars indicate mean  $\pm$  standard deviation of two samples. Mark (\*) shows the values statistically different from 10% and 50% by means of Student's t-test at  $p < 0.05$ .



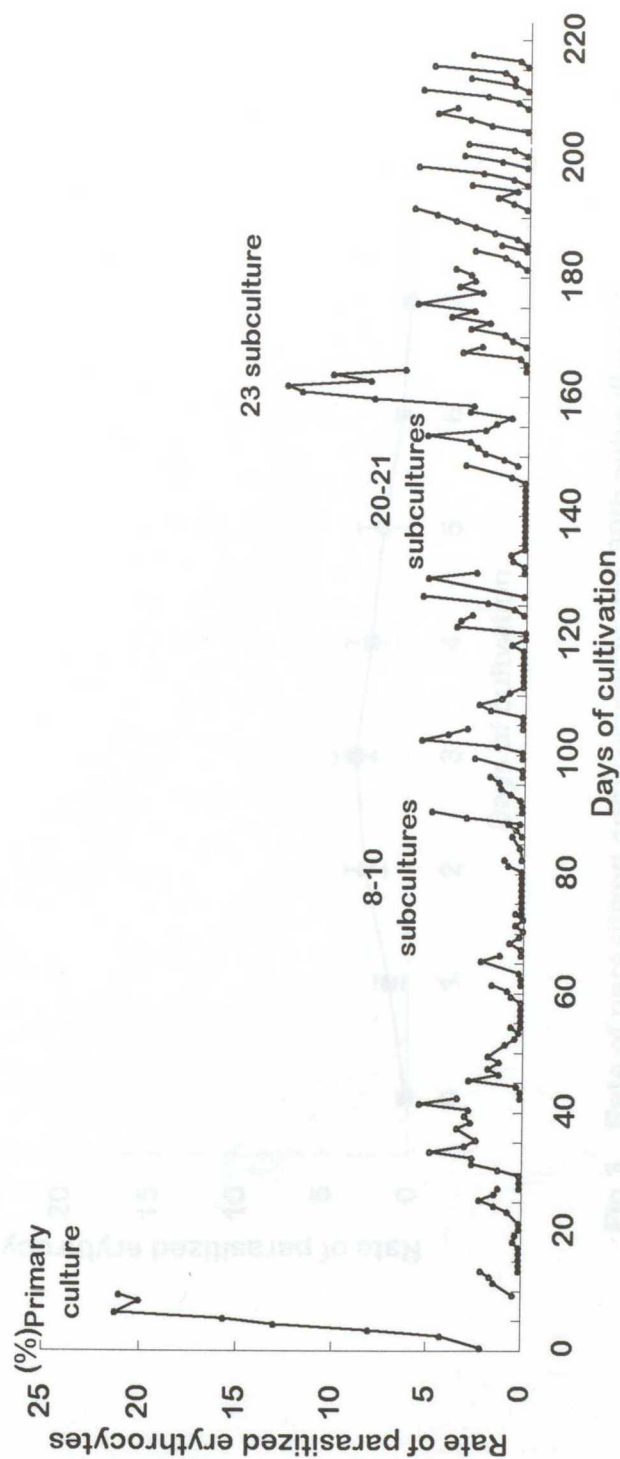


Fig.2. Rate of parasitized erythrocytes in 1st-36th subcultures of *B.gibsoni*.

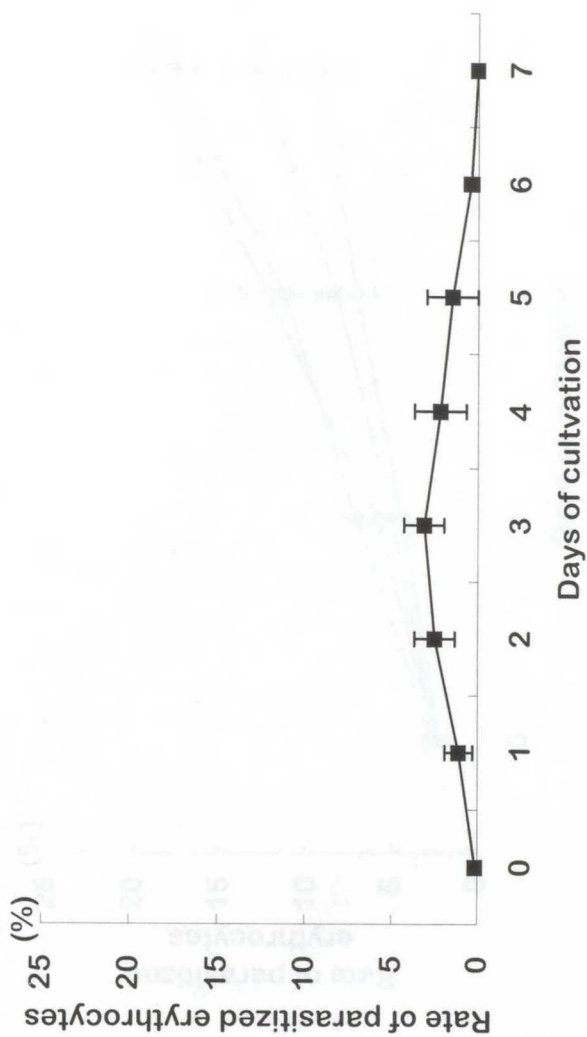


Fig.3. Rate of parasitized erythrocytes in the 30th subculture of *B.gibsoni* . Vertical bars indicate mean  $\pm$  standard deviation . n=10

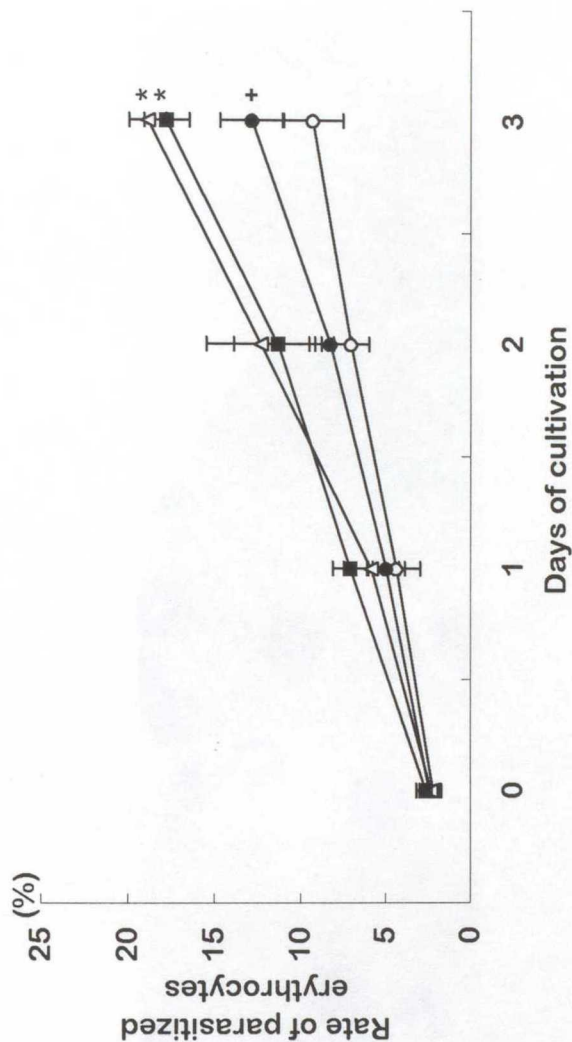


Fig.4. Effect of subculturing on in vitro growth of *B.gibsoni*. 70th subcultures(-O-), 150th (-●-), 190th(-■-), 230th (-△-). Vertical bars indicate mean  $\pm$  standard deviation ( n=10). Mark (\*) shows the values statistically different from 70th and 150th subcultures by means of Student's t-test at  $p < 0.05$ . Mark (+) shows the values statistically different from 70th subcultures by means of Student's t-test at  $p < 0.05$ .

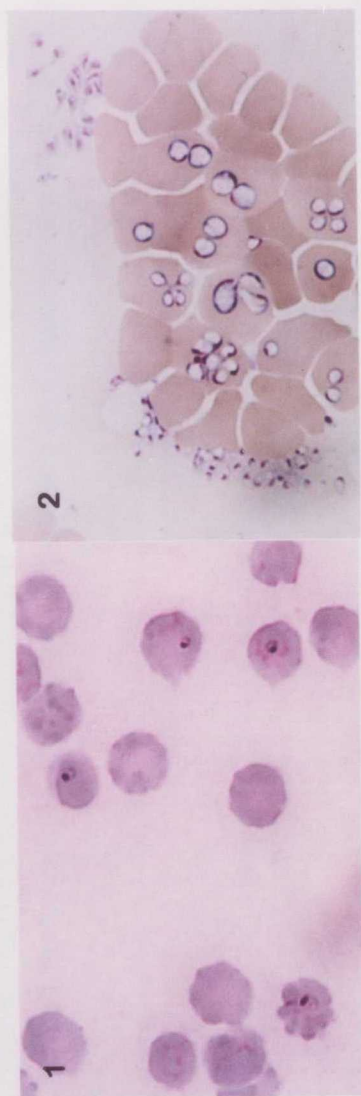


Fig.5. Intra and extra-erythrocytic forms of *B.gibsoni* in the subcultures.  
1.The small oval parasites in original subculture. 2.The large oval and extracellular parasites in the 5th subculture.

Table 1. Size of oval shape *B. gibsoni* in vitro culture and in peripheral blood of an infected dog

Subculture No.	Days of cultivation	Rate of parasitized erythrocytes (%)	Size (μ m)		
			Length±SD	Mean size (μ m)	Width±SD
1	4	13.1	1.87 ± 0.40	1.61 ± 0.36	
5	4	1.2	2.56* ± 0.70	2.27* ± 0.67	
30	3	5.8	2.03 ± 0.44	1.78 ± 0.41	
200	3	17.8	2.02 ± 0.45	1.77 ± 0.39	

Mark(\*) shows the values statistically different from subculture NO.1 by means of Student's t-test at p<0.05. (n=30)

Table 2. Experimental procedures to evaluate virulence of subcultures of the isolate

Experimental animal		Parasite		Period		Evaluation items
No.		Subcultures	Dose		Days	
1		200th subcultures				Parasitemia(%)
2		400th subcultures	1x10 <sup>9</sup>		60	PCV (%)
3						Temperature(°C)
4		Original (Oita isolate)				Antibody titer (IFAT)

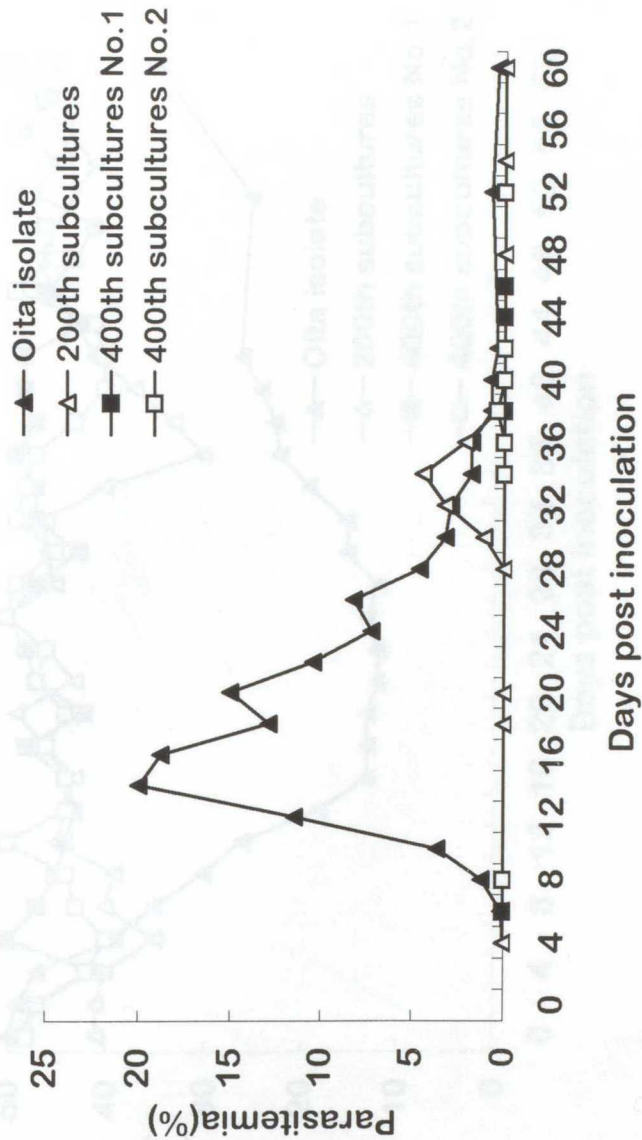


Fig.6 Change in parasitemia of dogs infected with 200th, 400th subcultures and Oita isolate of *B.gibsoni*. Oita isolate:-▲-, 200th subcultures:-△-, 400th subcultures No.1:-■-, No.2:-□-.



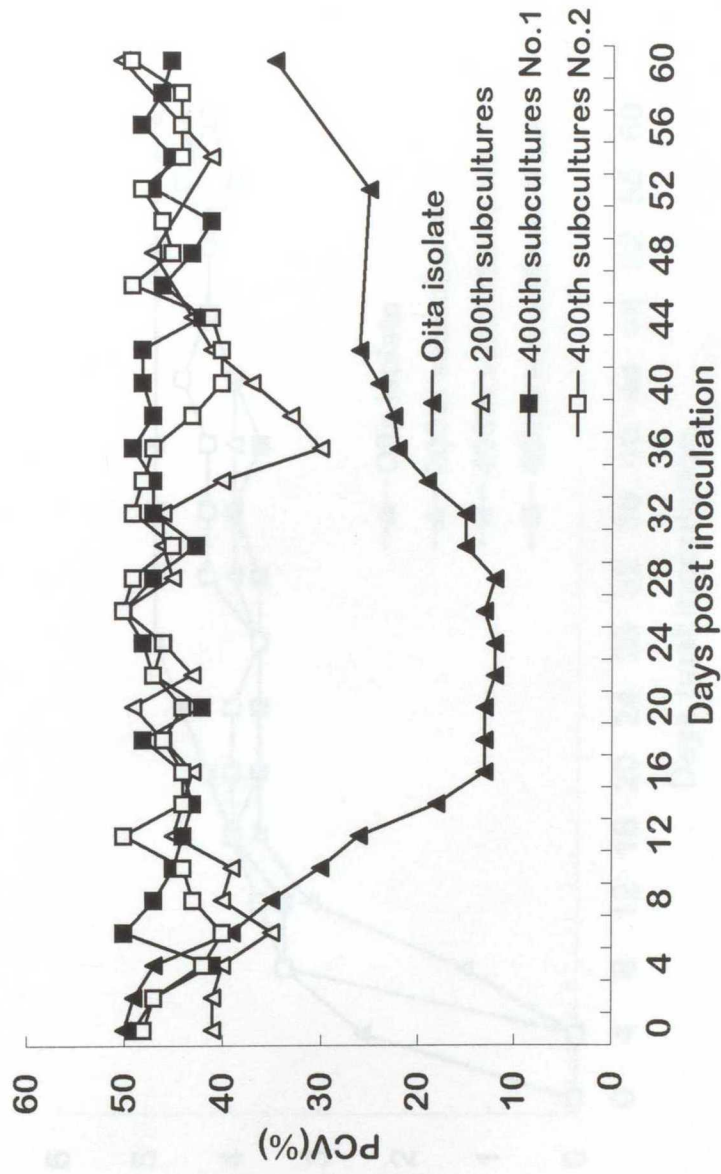


Fig.7 Change in PCV of dogs infected with 200th, 400th subcultures and Oita isolate of *B.gibsoni*. Oita isolate:-▲-, 200th subcultures:-△-, 400th subcultures No.1:-■-, No.2:-□-.



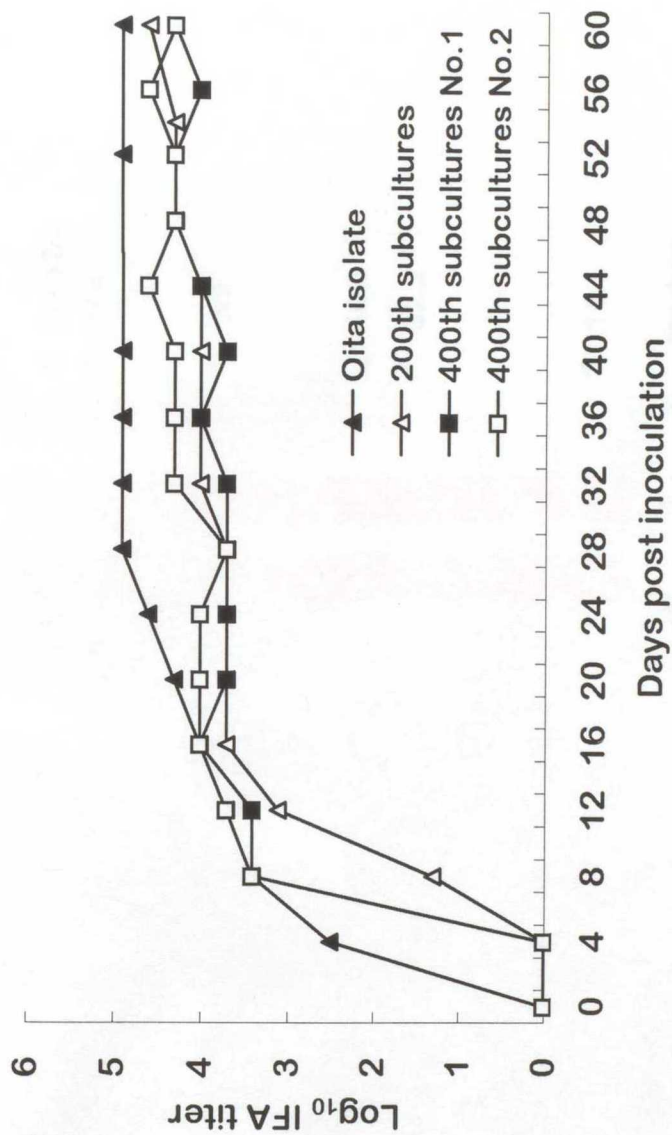


Fig.8 Change in antibody titers (IFAT) of dogs infected with 200th, 400th subcultures and Oita isolate of *B.gibsoni*. Oita isolate:-▲-, 200th subcultures:-△-, 400th subcultures No.1:-■-, No.2:-□-.



Fig. 9 Western blot analysis of *B.gibsoni* proteins following electrophoresis on a 5-20% SDS-PAGE gel, membrane transfer and development with dog antisera; Lane 1 : 400th subcultures isolate inoculated No.1 dog serum , Lane 2: No.2 dog serum. Lane 3: *B.gibsoni* positive serum. The numbers to the side are molecular weights.

Table 3. Experimental procedures in evaluation of immunogens

Experimental dogs		Vaccination		Challenge infection		Evaluation items
Group	No. Sex/Age	Immunogen	Dose/ route	Parasite	Dose /route	Time of infection
Immunized	1	<sup>1)</sup> Attenuated, culture-derived <i>B.gibsoni</i> isolate	1x10 <sup>9</sup> i.v.			Parasitemia(%)
	2					
Control	1			<sup>2)</sup> <i>B.gibsoni</i> Oita isolate	2x10 <sup>8</sup> i.v.	PCV (%)
	2					
						Temperature(°C)
						Antibody titer (IFAT)

1) *B.gibsoni* isolate attenuated by 400th subcultures.

2) *B.gibsoni* Oita isolate is virulent organisms.

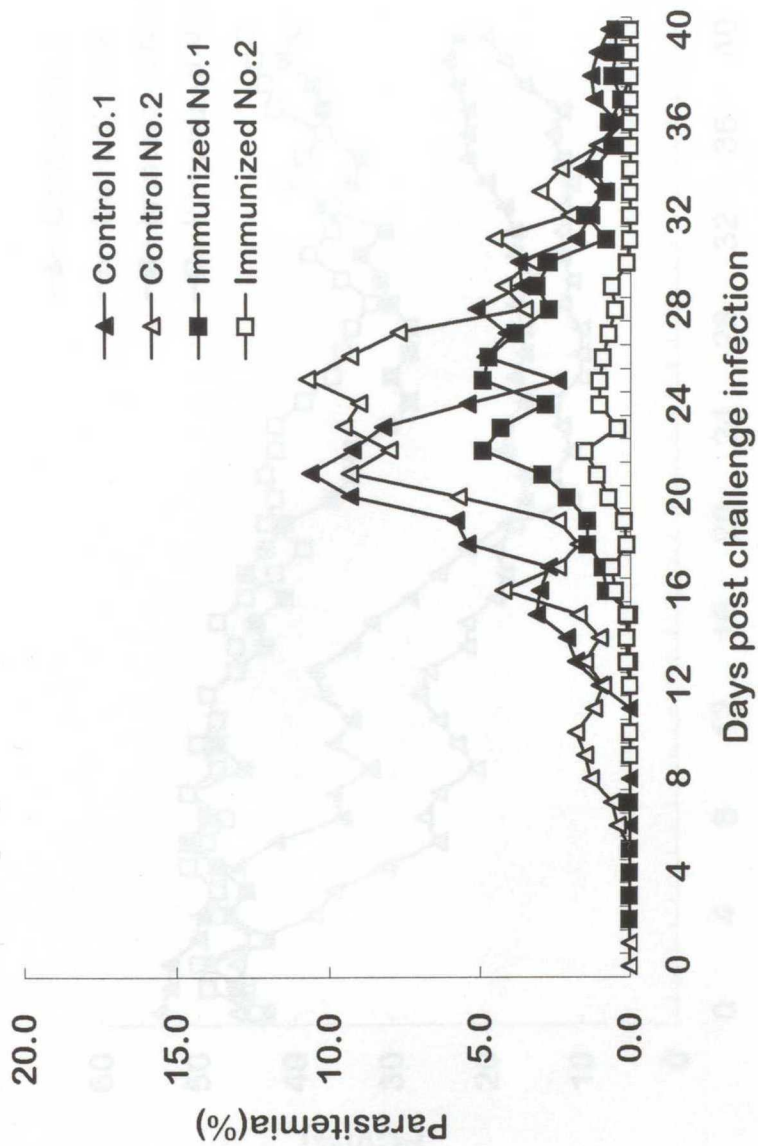


Fig.10 Changes in parasitemia observed after challenge infection (day 0). Control No.1:-▲-, Control No.2:-△-, Immunized No.1:-■-, Immunized No.2:-□-.

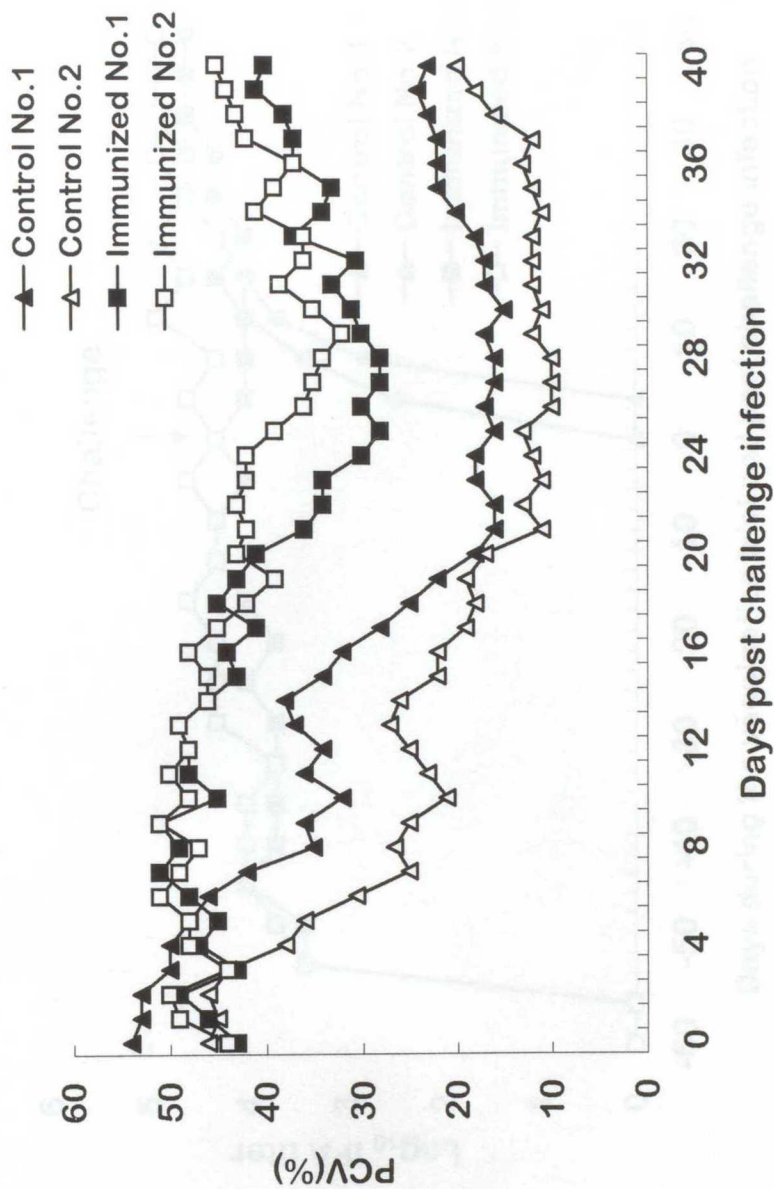


Fig.11 Changes in PCV observed after challenge infection (day 0). Control No.1:-▲-, Control No.2:-△-, Immunized No.1:-■-, Immunized No.2:-□-.



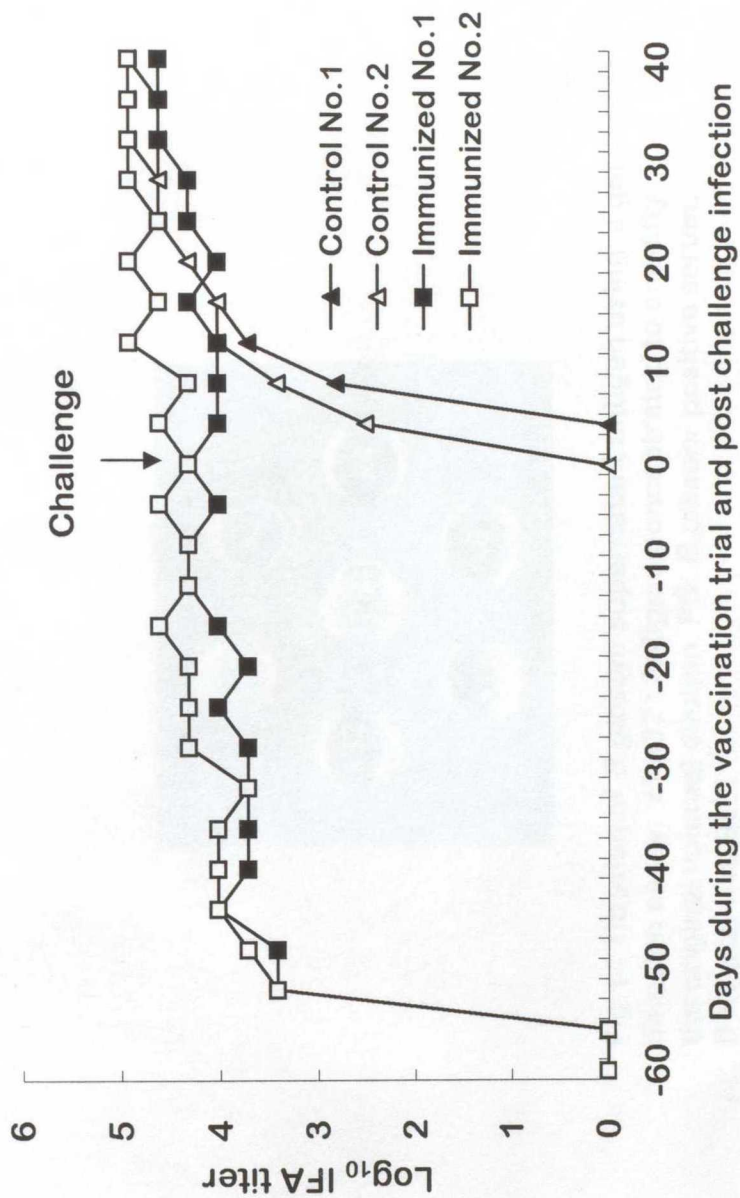


Fig.13 Changes in antibody titer (IFAT) observed during the immunization and after challenge infection (day 0). Control No.1:-▲-, Control No.2:-△-, Immunized No.1:-■-, Immunized No.2:-□-.



Fig.14 Titration of *B.gibsoni* supernatant antigen using a gel diffusion assay. x1-x32 : Antigen (concentrated to one-fifty the original volume) dilution. PS: *B.gibsoni* positive serum, IFAT titer x40,960.

Table 4. Experimental procedures in evaluation of immunogens

Experimental dogs			immunization		Challenge infection		Evaluation items			
Group	No.	Sex/Age	Immunogens	Ajuvant	Dose/route	Frequency	Parasite	Dose/ route	Time of infection	
Immunized	1		<sup>1)</sup> <i>B.gibsoni</i> exoantigen		<sup>2)</sup> 4ml /sc.	3 times				Parasitemia(%) PCV(%) Temperature(°C) Antibody titer (IFAT)
	2			Quil A		6 times				
	1		Inactivated merozoites	(0.5mg)	<sup>3)</sup> 4ml /sc.	(3 times without Quil A)	<sup>4)</sup> <i>B.gibsoni</i> <i>i</i> Oita isolate	2x10 <sup>8</sup> /i.v.	68 days after immunization	
	2	♀ 1 year								
	1		Saline		4ml / sc.	3 times				
Control	2		—	—	—	—				
	3									

1)*B.gibsoni* exoantigen was obtained from the supernatant of the in vitro culture.

2)200ml supernatant derived from a culture was concentrated to 4ml.

3)Inactivated merozoites 2.5x10<sup>10</sup>/4ml

4)*B.gibsoni* Oita isolate is the virulent strain.

5)The examination period is 68 days and 40 days after immunization and challenge infection, respectively.



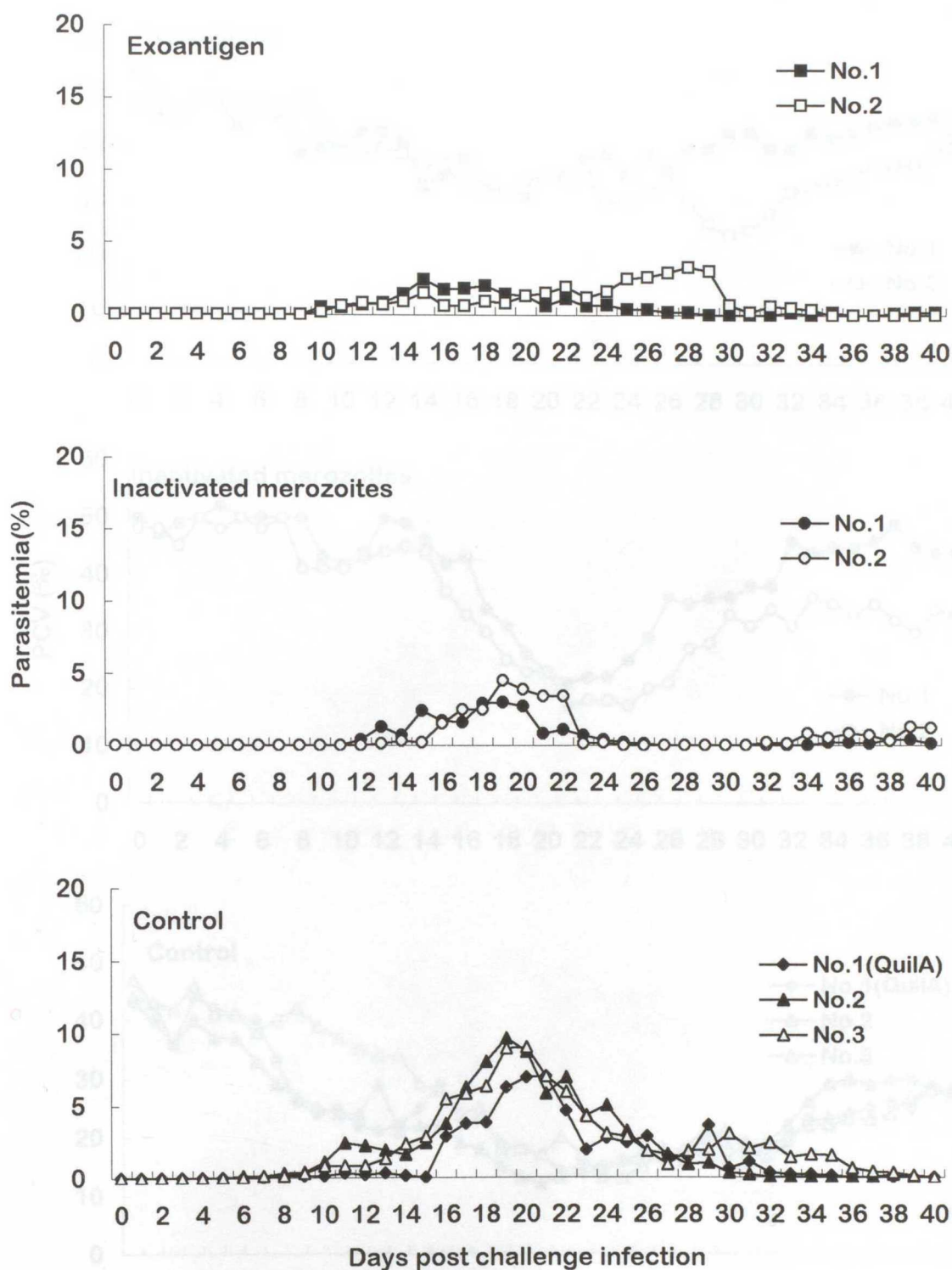


Fig.15 The effect of immunization with different vaccines on parasitemia after challenge infection (day 0). Exoantigen No.1: -■-, No.2: -□-. Inactivated merozoites No.1: -●-, No.2: -○-. Control No.1(Quil A) : -◆-, No.2: -▲-, No.3: -△-.

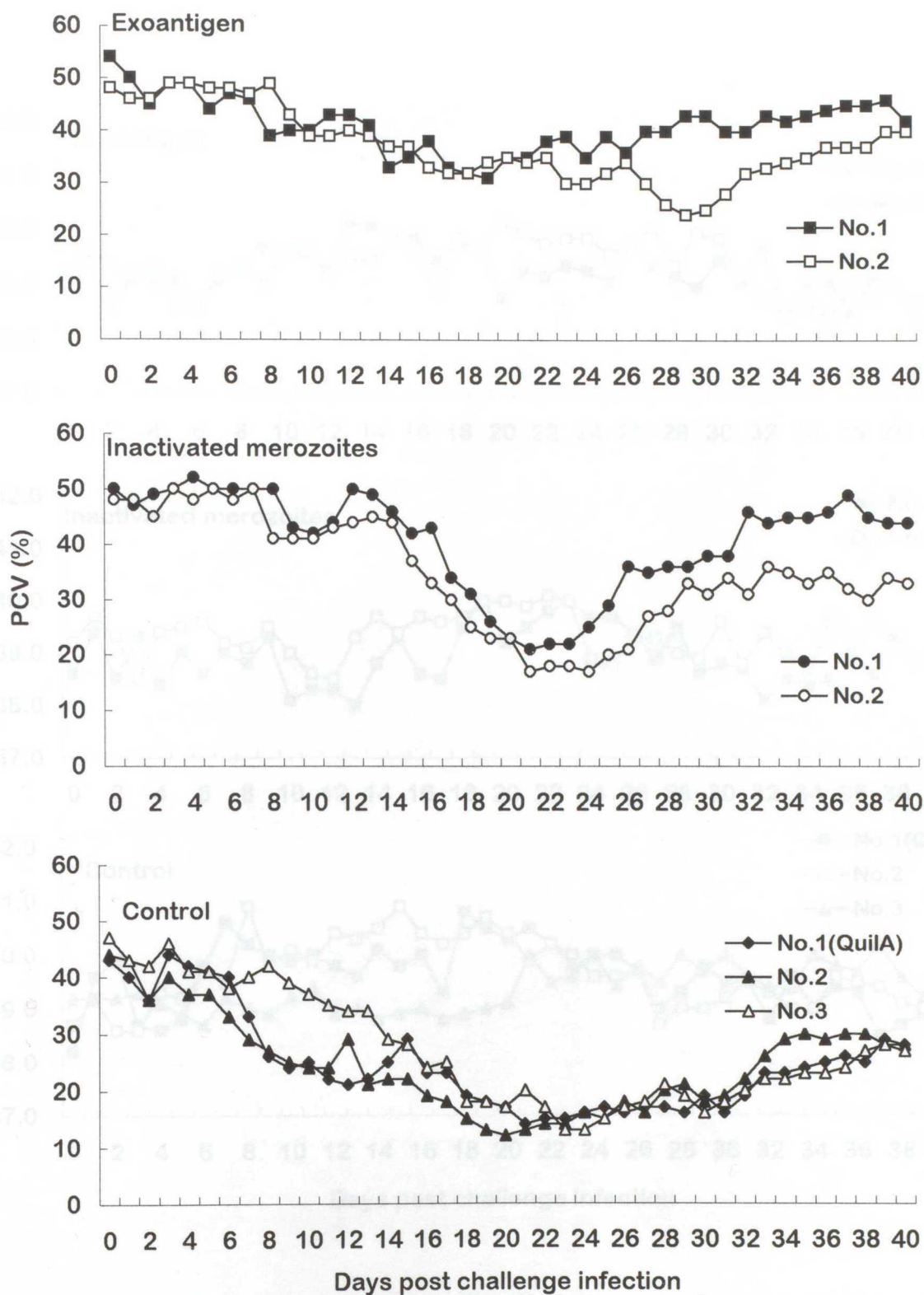


Fig.16 The effect of immunization with different vaccines on PCV after challenge infection (day 0). Exoantigen No.1: -■-, No.2: -□-. Inactivated merozoites No.1: -●-, No.2: -○-. Control No.1(Quil A): -◆-, No.2: -▲-, No.3: -△-.

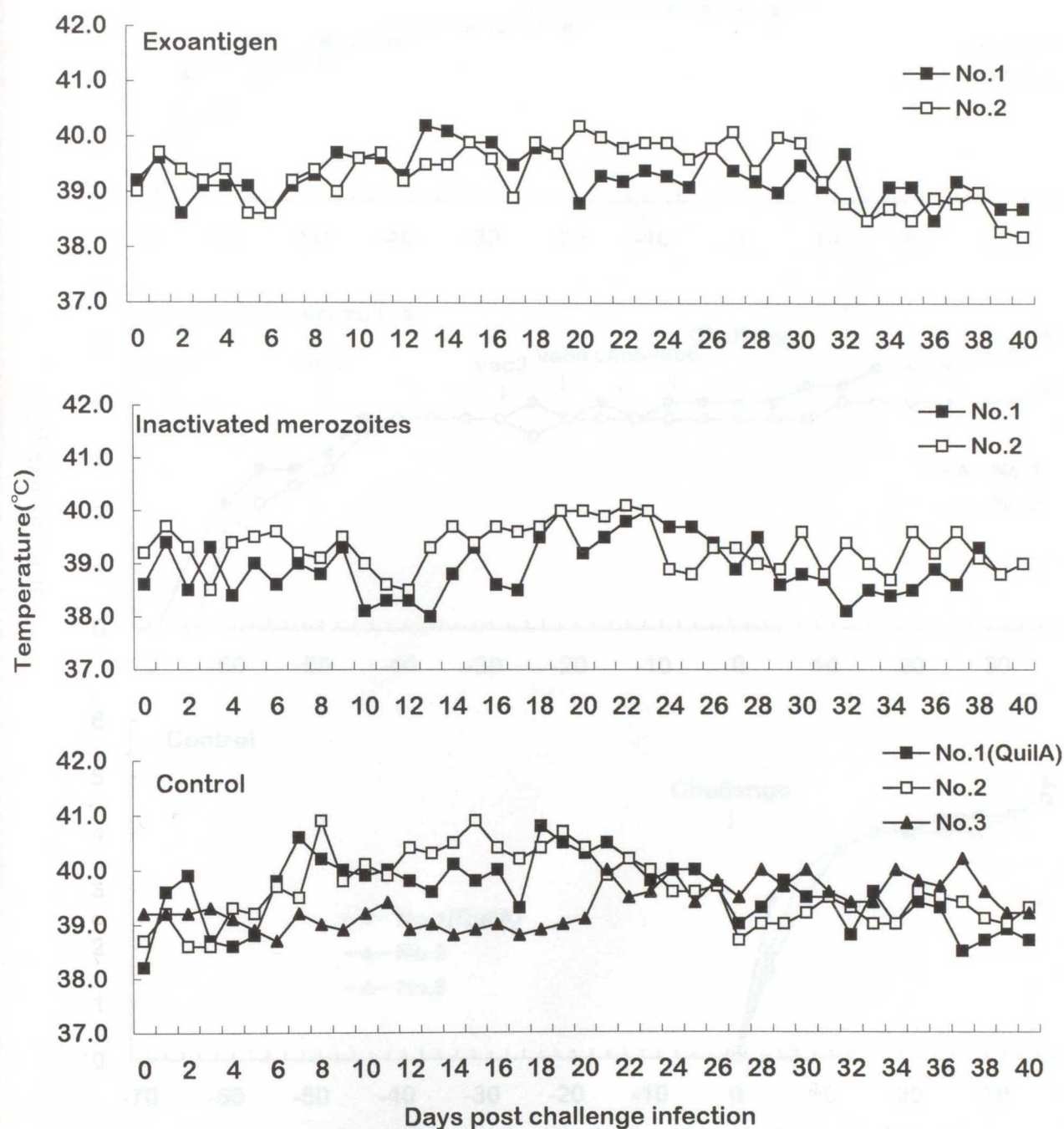


Fig.17 The effect of immunization with different vaccines on temperature after challenge infection (day 0). Exoantigen No.1: -■-, No.2: -□-. Inactivated merozoites No.1: -■-, No.2: -□-. Control No.1(Quil A) : -□-, No.2: -■-, No.3:-▲-.



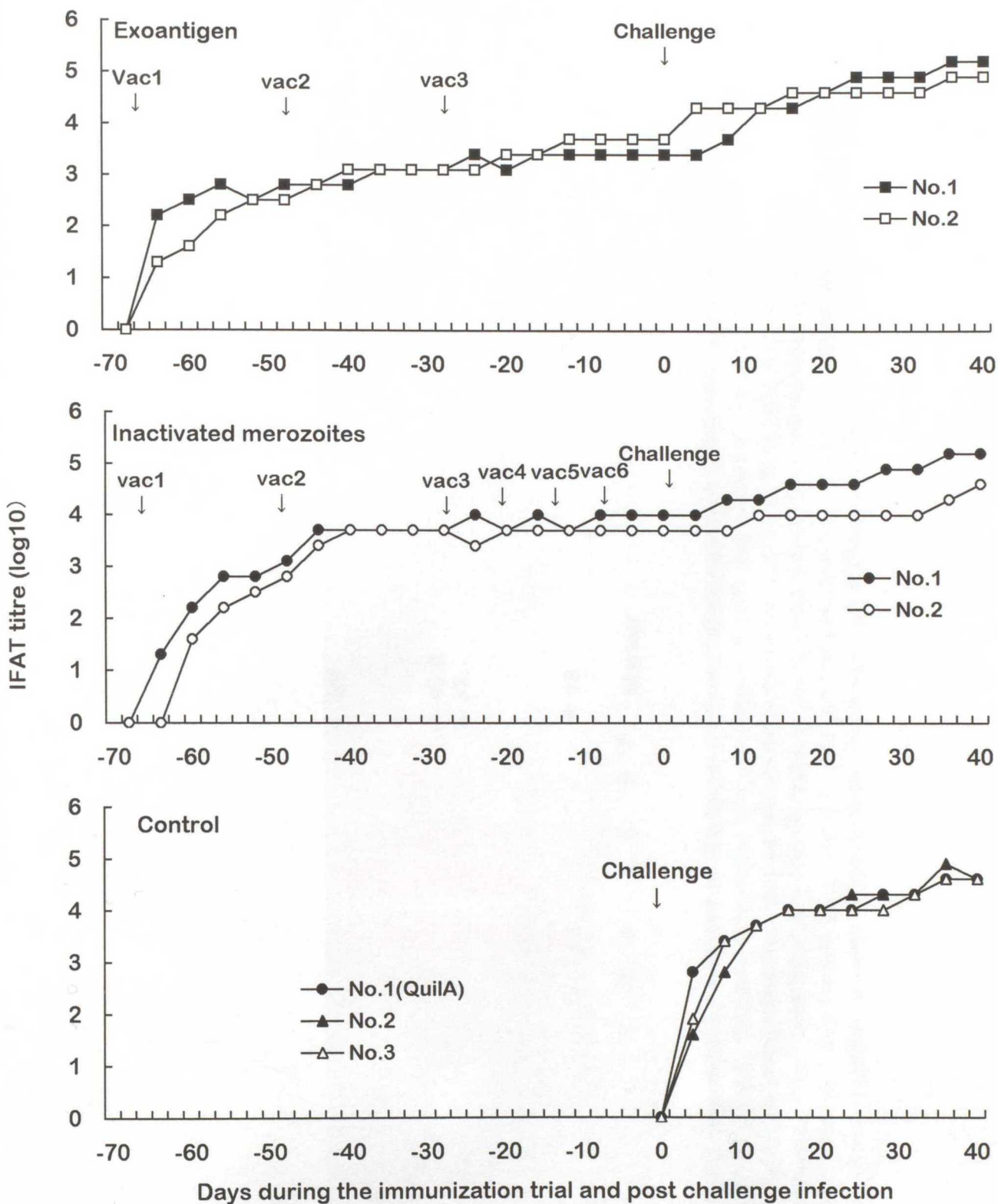


Fig.18 Changes in antibody titer (IFAT) observed during the immunization trial and after challenge infection (day 0). Exoantigen No.1: -■-, No.2: -□-. Inactivated merozoites No.1: -●-, No.2: -○-. Control No.1(Quil A) : -◆-, No.2: -▲-, No.3: -△-.

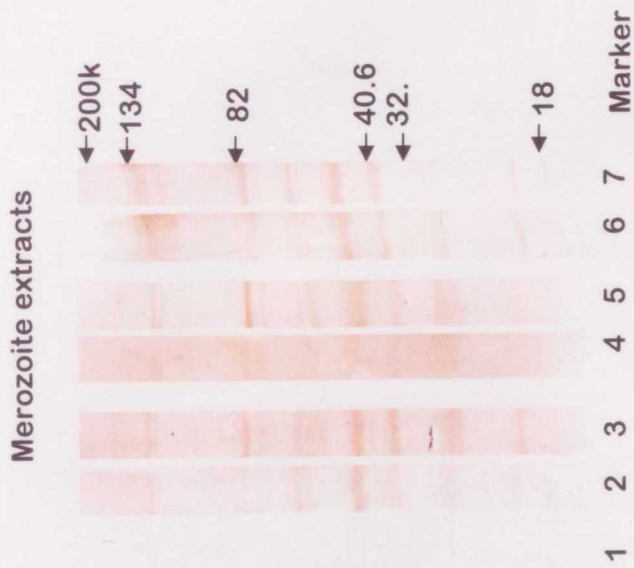


Fig.19. Western blot analysis of *B.gibsoni* proteins following electrophoresis on a 5-20% SDS-PAGE gel, membrane transfer and development with dog antisera; Lane 1 : pre exoantigen immunized No1.dog serum (negative serum), Lane 2 and 3: post exoantigen immunized No.1 and No.2 dog serum, Line 4 and 5 : post inactivated merozoites immunized No.1 and No.2 dog serum. Line 6 and 7 : oita isolate infected No.1 and No.2 dog serum (B.gibsoni positive serum). The numbers to the side are molecular weights.

**Abstract**

Study on the *in vitro* culture and vaccine activity of  
the attenuated *Babesia gibsoni* isolate

Fujiko Sunaga

Laboratory of Infectious Diseases, School of Veterinary Medicine

Azabu University

*Babesia* infection of dogs is caused by *B. gibsoni*, which infects animals belonging to Canidae in the erythrocyte and is transmitted by ticks, and develops pyrexia, splenomegaly and severe hemolytic anemia. This protozoan was first detected by Patton in 1910, since then the infection was frequently reported from different areas of Asia. In Japan, it is widely distributed mainly in the western part and recently, the infected area is spread farther to the eastern part. Hitherto, an immediately effective drug, Ganaseg, a diminazen preparation, was used for treatment, but its manufacture was discontinued because an accident occurred in the manufacturing process. Since then, the product was not obtained in good quality in spite of the improvement of the process, while the fatal cases of dogs treated with the product were increased. Consequently, the development of protective vaccines is earnestly desired.

In babesiosis, death is caused in the process that the sporozoites injected into dogs by infected ticks invade the erythrocytes, in which the parasites developed to erythrocytic merozoites, and then they multiply by asexual reproduction and lead the blood cells to destruction and resultant anemia of dogs. Therefore, an experiment was attempted to examine the protective efficacy of the proteins originating from the merozoites or attenuated merozoites. First, *in vitro* culture method were examined to produce the steadily propagating isolate. Secondly, attenuation of the isolate was attempted by subculture and the resultant isolate was examined for immunogenicity. Thirdly, inactivated vaccines with more safety were

examined by two antigens;  $\beta$  - propiolactone-treated merozoite antigen and exoantigen derived from the culture supernatant of merozoite in vitro culture.

The results of the present study are summarized as follows.

#### 1. Production of the merozoite isolate by *in vitro* culture

Although the life cycle of *B. gibsoni* is still partially indistinct, the sporozoites injected to dogs by infected ticks immediately invade the erythrocytes and multiply by binary fission, absorbing necessary nutritive elements and microelements from the blood. Many merozoites multiplied are released from the broken erythrocytes into the plasma and then they attack uninfected cells. The factors necessary for culture of merozoites are insufficiently elucidated because the parasite has such complicated cycle as described above. However, it is known from the results obtained from the in vitro culture of bovine *Babesia* species that serum is necessary for culture of the parasite and its quality differs delicately in different *Babesia* species. Therefore, the concentration of serum added to the liquid culture medium, RPHI-1640 (GIBCO), was examined and the result obtained was that merozoites developed insufficiently under a concentration of 10%, while their development was inhibited in a concentration more than 50 %. So, in the following experiments, infected erythrocytes were cultured in the RPMI1640 liquid medium supplemented with 20% of serum.

Infected canine erythrocytes was diluted with the culture



medium to a PCV of 8—12%. The suspension, 2ml each, was divided in 12 wells of culture plate. The plate was incubated at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> . In each well, 1ml of the overlying medium was removed and replaced with fresh medium every day, at the same time, Giemsa-stained blood smears were made to determine parasitemia. A subculture was usually started after 3 days incubation diluting the old culture by 1:3 with a fresh suspension of normal erythrocytes.

The merozoites in erythrocytes were not well developed from the 2<sup>nd</sup> to 28<sup>th</sup> subculture. So, the period of culture was prolonged to 15 days. On Days 3, 6, 9, 12 and 15 of the period, some of the cultures were tentatively subcultured to examine the multiplication of merozoites. The procedure used was as follows: a part of infected erythrocytes were removed from a well to another, which a proper volume of fresh suspension of canine erythrocytes was added to and the mixture was cultured for 15 days. From the cultures described above, the culture containing the most multiplied merozoites was selected and further subcultured. Consequently, from the 23<sup>rd</sup> subculture, the merozoites rapidly proliferated from day 1 of culture, and from the 29<sup>th</sup> subculture, the merozoites showed a peak of multiplication from day 2 to 4. After then, subculture was carried out every 3 days. As a result, parasitemia, denoted by a percent of infected erythrocytes in 1000 erythrocytes measured, reached  $3.1 \pm 1.2\%$ . Thereafter, the rate increased and the isolate showing a parasitemia of  $18.8 \pm 1.3\%$  was established at the 190<sup>th</sup> subculture.

## 2. Production of the attenuated merozoite isolate and its protective effect of the challenge infection by the virulent isolate

The merozoite isolate was established as described above. Next, the attenuated isolate should be made, so the period necessary for attenuation of the isolate was confirmed and further the protective effect of the attenuated isolate was examined by challenging the dogs pre-inoculated with the attenuated isolate.

The attenuated isolate was evaluated with the indexes of hemolytic anemia and pyrexia. First, one female beagle, one-year old, was inoculated with  $10^9$  merozoites of the 200<sup>th</sup> subculture and the pathogenicity of merozoite was observed in dogs for 60 days. The 200-subcultured isolate caused no pyrexia but a slight anemia with a PCV value of 30%. Parasitemia reached 4.4% of erythrocytes on day 32 after inoculation. The subnormal value of PCV indicated that the isolate was insufficiently attenuated.

Two one-year old female beagles inoculated with the 400<sup>th</sup> subcultured merozoites, however, developed no pyrexia nor was recognized anemia, a PCV value being above 40%. No change was also seen in appetite and health. Parasitemia was retained under 0.01% throughout the experimental period, exceptionally 0.4% in dog 2 on the 38<sup>th</sup> day after challenge, and yet parasites appeared sporadically in the peripheral blood. These results showed that the 400<sup>th</sup> subcultured isolate was sufficiently attenuated. The isolate was examined for immunogenicity by the indirect fluorescence and Western blot 60 days

after inoculation, and the antibody titer showed 20,480 by the indirect fluorescence. Furthermore, the main seven bands from 22 to 127 kDa were observed with both antiserum of dogs inoculated with the 400<sup>th</sup> subcultured merozoites and recovered from challenge infection with the virulent isolate by the Western blot. These results clearly indicated that the 400<sup>th</sup> subcultured merozoite isolate had the same degree of immunogenicity as of the virulent isolate.

In the next step, the 400<sup>th</sup> subcultured isolate or attenuated merozoite isolate was examined for the activity protecting the attack by disease. Two female beagles, one year old each, were inoculated with the attenuated isolate and the protective activity of the isolate was examined using such indexes as the suppression of the multiplication of parasite and anemia indicated by PCV and the reduction of pyrexia, after challenge infection with the virulent isolate. In a result, the group pre-inoculated with the attenuated isolate showed the singular effect suppressing the multiplication of parasite and anemia. Further, the isolate had marked activity reducing clinical signs, especially pyrexia, because the treated group of two one-year old beagles showed no pyrexia although the control group suffered from pyrexia for 8 days. These results indicated that the attenuated stain met such qualifications of live vaccine as non-pathogenicity and effective immunogenicity, furthermore, suppressive effect of the multiplication of parasite and reductive activity of clinical signs such as anemia and pyrexia after challenge infection by the virulent isolate.

However, the attenuated isolate will be limited to apply as live

vaccine with because the parasite inoculated will survive in the dogs, which become carriers, so the application of the isolate as live vaccine will be limited to the endemic area.

3. The effect protecting the attack of disease by the inactivated antigens: the culture supernatant antigen and  $\beta$  propiolactone treated merozoite antigen

The attenuated isolate consisting of steadily propagating merozoites was established and examined to reveal that it showed no side effect but marked effect protecting the attack by disease. The isolate, however, should be limitedly applied as live vaccine, so the inactivated vaccines with more safety were examined.

Two kinds of antigens were examined as immunogen. The supernatant antigen was made by concentrating the supernatant of culture medium with the ultrafilter and the merozoite antigen by treating the merozoites, which were obtained by hemolyzing the cultured infected erythrocytes, with  $\beta$  propiolactone. These immunogens were subcutaneously injected to two female beagles one-year old. Both antigens were examined for immunogenicity by the indirect fluorescent method and Western blot 68 days after inoculation. The result obtained was that the antibody showed a titer of 2,560-10,240 and showed the same seven main bands from 22 to 128kDa as recognized by Western blot in the serum of dogs recovered from challenge infection with the virulent isolate. This result indicated that both inactivated antigens had the like immunogenicity as of the

virulent isolate. Then, two groups of dogs inoculated with both antigens, respectively were challenged with the virulent isolate and both inactivated antigens were compared to each other on the preventive activity of the attack with such indexes as the preventive rate of the multiplication of parasites, anemia denoted by PCV value and pyrexia. Consequently, the marked suppressive effects of the multiplication of parasites and pyrexia were recognized in both group of dogs, especially the suppressive effect of anemia was excellently observed in the group inoculated with the supernatant antigen. Further, this antigen could be manufactured in large quantities and easily refined as vaccine.

The above results clearly showed that the antigenic substance recognized in the supernatant of culture medium had an excellent activity as inactivated vaccine.

The present study clarified that the steadily proliferating isolate of *Babesia gibsoni* was successfully established by *in vitro* culture and the 400<sup>th</sup> subcultured attenuated isolate was effectively used as live vaccine, and further, the supernatant antigen and  $\beta$ -propiolactone treated merozoite antigen had an excellent effect suppressing the attack of babesiosis. The comparison of these inactivated vaccines about the suppressive activity of anemia and safety led the result that the supernatant antigen of culture medium was the more usefulness.