

氏 名 (本籍)	須 永 藤 子 (神奈川県)
学位の種類	博士 (獣医学)
学位記番号	乙第402号
学位授与の要件	学位規則第3条第3項該当
学位論文題名	<i>Babesia gibsoni</i> 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
論文審査委員	(主査) 菅 野 康 則 (副査) 茅 根 士 郎 福 安 嗣 昭 板 垣 博 (本学名誉教授)

論 文 内 容 の 要 旨

Babesia gibsoni 症は、イヌ科動物に感染性を持つ *Babesia gibsoni* がマダニの媒介によってイヌ赤血球に感染し、発熱、脾腫、強度の溶血性貧血を起こす原虫性の疾病である。本原虫は Patton(1910) によって初めて検出されて以来アジアでの報告が多く、わが国では西日本を中心に分布し、近年、その汚染地域が東日本にも拡大しつつある。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、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、ワクチンの開発が望まれている。

B.gibsoni 症でイヌが死亡する原因は、汚染マダニの吸血と共に注入されたスポロゾイト虫体がイヌ赤血球内に侵入して赤内型メロゾイトとなり、メロゾイトが無性生殖によって異常に増殖し、急激に大量のイヌ赤血球が破壊され、イヌに極度の溶血性貧血が発生することによる。そこで、メロゾイトの異常増殖を抑制し、発熱、貧血などの発症を軽減する効果が弱毒化メロゾイト株とその不活化抗原に存在するかを明らかにする実験を行った。

弱毒化メロゾイト株とその不活化抗原を得るために、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 β -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。

本論文の概要は次の通りである。

1. *B.gibsoni* メロゾイト培養株の作出

B.gibsoni の発育環は不明な部分もあるが、マダニにより感染したスポロゾイトは直ちにイヌ赤血球

に侵入し、必要な栄養素や微量成分を血液から得て2分裂を繰り返し増殖する。増殖した多数のメロゾイトは赤血球を破壊して血漿中に遊出し、新たな赤血球に侵入し、再び増殖する。このようなサイクルで増殖を繰り返すメロゾイトを培養器内で増殖させる場合、増殖に必要な因子の解明はまだ不十分である。しかし、牛バベシアのメロゾイトの人工培養の結果から、培養には栄養となる血清が必要で、その量は原虫の種によって微妙に異なることが知られている。そこで、メロゾイトの培養に用いる液体培地（RPMI1640）に栄養分として添加するイヌ血清濃度を検討した結果、イヌ血清の添加が10%以下では原虫の発育が悪く、50%以上添加すると返ってメロゾイトの増殖が阻害されることが明らかとなったので、以下の実験ではRPMI1640液体培地にイヌ血清を20%の割合に添加して感染赤血球を培養した。

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（0.53ml/cm²）ずつ分注して、5%CO₂/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（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エル内の培養感染赤血球液の1/3を別のウエルに取り、これに新鮮イヌ赤血球加培養液2/3を加えて混和し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、29代目からは培養3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。その結果、30代では培養3日目のparasitemiaは $3.1 \pm 1.2\%$ であったが、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

継代培養が可能な強毒メロゾイト株が作出できたので、この株を何代継代すれば弱毒化するかを検討し、この弱毒化メロゾイトの発症防御効果を検討した。

何代継代すれば弱毒化するか判断は、溶血性貧血と発熱を指標にして行った。まず、200代継代した培養メロゾイトの10⁹個を1頭のビーグル犬（1歳、雌）に接種し、60日間にわたって貧血と発熱を指標に病原性を観察した結果、発熱は認められなかったが、軽度の貧血（PCV 30%）が認められた。parasitemiaは、接種後32日目に4.4%を示した。PCVが正常値より低いという結果から弱毒化が不十分であることが明らかとなった。

同様に400代継代した培養メロゾイトの10⁹個を接種した2頭のビーグル犬（1歳、雌）では発熱や貧血（PCV 40%以上）は認められず、元気・食欲にも変化はなかった。実験期間を通じてparasitemiaは0.01%以下（No.2に38日目のみに0.4%）であった。これらの結果から400代継代メロゾイトは、弱毒化されたと判断した。400代継代メロゾイト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。さらに、この血中抗体には、強毒メロゾイトで攻撃感染後、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代継代メロゾイトは、強毒メロゾイト接種と同様の*B.gibsoni*抗体を誘導することが明らかとなった。

そこで400代継代メロゾイト（弱毒化メロゾイト株）の発症防御効果を検討した。実験は弱毒化メロゾイトの 10^9 個を接種して免疫を獲得した2頭のビーグル犬（1歳、雌）を強毒メロゾイトで攻撃感染して、メロゾイトと貧血（PCV）の抑制度および発熱の有無を指標として発症防御効果を検討した。その結果、弱毒化メロゾイトで前処置した群は、強いメロゾイトの増殖抑制と貧血抑制効果を有することが明らかとなった。さらに、発熱から見た症状の軽減度は著しく、強毒メロゾイトを接種した対照群の2頭のビーグル犬（1歳、雌、）では発熱が8日間にわたって認められたが、免疫群では全く認められなかった。これらの成績から、この弱毒化メロゾイトは、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、メロゾイト増殖を抑制し、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、弱毒化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・ β -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にわたって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。

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た培養上清抗原と培養感染赤血球から採取して β -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、発症防御効果を検討した。実験はそれぞれの抗原にQuilAアジュバントを加え、それを20日間隔で3回、各2頭のビーグル犬（1歳、雌）に皮下投与し、初回投与後68日目に強毒メロゾイトで攻撃感染して、メロゾイトと貧血（PCV）の抑制度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。両群ともに初回抗原投与後68日目の間接蛍光抗体法による血中抗体価は2,560 - 10,240倍を示した。これら免疫群に強毒メロゾイトで攻撃感染したところ、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。

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、初回免疫後68日目に得られた抗体をウエスタンブロット法で分析した結果、強毒メロゾイトを接種し回復した犬、および

不活化メロゾイト抗原で免疫した犬の血清中に認められたメロゾイト抗原に対する主要な7本のバンド（22kDaから127kDa）と同じ位置にバンドが確認された。このことから、培養上清抗原には主要なメロゾイト抗原が含まれていると判断された。

以上、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、強毒メロゾイトから安定的に増殖する *B.gibsoni* メロゾイトを作出し、このメロゾイトを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 β -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。

論文審査の結果の要旨

Babesia gibsoni 症は、イヌ科動物に感染性を持つ *Babesia gibsoni* がマダニの媒介によってイヌ赤血球に感染し、発熱、脾腫、強度の溶血性貧血を起こす原虫性の疾病である。本原虫は Patton (1910) によって初めて検出されて以来、アジアでの報告が多く、わが国では西日本を中心に分布し、近年、その汚染地域が東日本にも拡大しつつある。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、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、ワクチンの開発が望まれている。

B.gibsoni 症でイヌが死亡する原因は、汚染マダニの吸血と共に注入されたスポロゾイト虫体がイヌ赤血球内に侵入して赤内型メロゾイトとなり、メロゾイトが無性生殖によって異常に増殖し、急激に大量のイヌ赤血球が破壊され、イヌに極度の溶血性貧血が発生することによる。そこで、メロゾイトの異常増殖を抑制し、発熱、貧血などの発症を軽減する効果が弱毒化メロゾイト株とその不活化抗原に存在するかを明らかにする実験を行った。

弱毒化メロゾイト株とその不活化抗原を得るために、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 β -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。

本論文の概要は次の通りである。

1. *B.gibsoni* メロゾイト培養株の作出

B.gibsoni の発育環は不明な部分もあるが、マダニにより感染したスポロゾイトは直ちにイヌ赤血球に侵入し、必要な栄養素や微量成分を血液から得て2分裂を繰り返し増殖する。増殖した多数のメロ

ゾイトは赤血球を破壊して血漿中に遊出し、新たな赤血球に侵入し、再び増殖する。このようなサイクルで増殖を繰り返すメロゾイトを培養器内で増殖させる場合、増殖に必要な因子の解明はまだ不十分である。しかし、牛バベシアのメロゾイトの人工培養の結果から、培養には栄養となる血清が必要で、その量は原虫の種によって微妙に異なることが知られている。そこで、メロゾイトの培養に用いる液体培地（RPMI1640）に栄養分として添加するイヌ血清濃度を検討した結果、イヌ血清の添加が10%以下では原虫の発育が悪く、50%以上添加すると返ってメロゾイトの増殖が阻害されることが明らかとなったので、以下の実験ではRPMI1640液体培地にイヌ血清を20%の割合に添加して感染赤血球を培養した。

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（0.53ml/cm²）ずつ分注して、5%CO₂/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エル内の培養感染赤血球液の1/3を別のウエルに取り、これに新鮮イヌ赤血球加培養液2/3を加えて混和し、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、29代目からは培養3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。その結果、30代では培養3日目のparasitemiaは $3.1 \pm 1.2\%$ であったが、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

継代培養が可能な強毒メロゾイト株が作出できたので、この株を何代継代すれば弱毒化するかを検討し、この弱毒化メロゾイトの発症防御効果を検討した。

何代継代すれば弱毒化するか判断は、溶血性貧血と発熱を指標にして行った。まず、200代継代した培養メロゾイトの10⁹個を1頭のビーグル犬（1歳、雌）に接種し、60日間にわたって貧血と発熱を指標に病原性を観察した結果、発熱は認められなかったが、軽度の貧血（PCV 30%）が認められた。parasitemiaは、接種後32日目に4.4%を示した。PCVが正常値より低いという結果から弱毒化が不十分であることが明らかとなった。

同様に400代継代した培養メロゾイトの10⁹個を接種した2頭のビーグル犬（1歳、雌）では発熱や貧血（PCV 40%以上）は認められず、元気・食欲にも変化はなかった。実験期間を通じてparasitemiaは0.01%以下（No.2に38日目のみに0.4%）であった。これらの結果から400代継代メロゾイトは、弱毒化されたと判断した。400代継代メロゾイト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。さらに、この血中抗体には、強

毒メロゾイトで攻撃感染後、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代継代メロゾイトは、強毒メロゾイト接種と同様の*B.gibsoni*抗体を誘導することが明らかとなった。

そこで400代継代メロゾイト（弱毒化メロゾイト株）の発症防御効果を検討した。実験は弱毒化メロゾイトの 10^9 個を接種して免疫を獲得した2頭のビーグル犬（1歳、雌）を強毒メロゾイトで攻撃感染して、メロゾイトと貧血（PCV）の抑制度および発熱の有無を指標として発症防御効果を検討した。その結果、弱毒化メロゾイトで前処置した群は、強いメロゾイトの増殖抑制と貧血抑制効果を有することが明らかとなった。さらに、発熱から見た症状の軽減度は著しく、強毒メロゾイトを接種した対照群の2頭のビーグル犬（1歳、雌、）では発熱が8日間にわたって認められたが、免疫群では全く認められなかった。これらの成績から、この弱毒化メロゾイトは、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、メロゾイト増殖を抑制し、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、弱毒化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・ β -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にわたって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。

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た培養上清抗原と培養感染赤血球から採取して β -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、発症防御効果を検討した。実験はそれぞれの抗原にQuilAアジュバントを加え、それを20日間隔で3回、各2頭のビーグル犬（1歳、雌）に皮下投与し、初回投与後68日目に強毒メロゾイトで攻撃感染して、メロゾイトと貧血（PCV）の抑制度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。両群ともに初回抗原投与後68日目の間接蛍光抗体法による血中抗体価は2,560 - 10,240倍を示した。これら免疫群に強毒メロゾイトで攻撃感染したところ、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。

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、初回免疫後68日目に得られた抗体をウエスタンブロット法で分析した結果、強毒メロゾイトを接種し回復した犬、および不活化メロゾイト抗原で免疫した犬の血清中に認められたメロゾイト抗原に対する主要な7本のバン

ド (22kDa から 127kDa) と同じ位置にバンドが確認された。このことから、培養上清抗原には主要なメロゾイト抗原が含まれていると判断された。

以上、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、強毒メロゾイトから安定的に増殖する *B.gibsoni* メロゾイトを作出し、このメロゾイトを 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 β -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。

本研究は伝染病学、寄生虫学ならびに小動物臨床学上寄与するところが大きく、博士（獣医学）の学位を授与するのに相応しい業績と評価する。