



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Establishment of In Vivo and In Vitro Systems for Propagation of Salivarian Trypanosomes, and Their Application for Molecular Biological and Immunological Studies

メタデータ	言語: eng 出版者: 公開日: 2014-04-01 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 井上, 昇 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/2018

氏名（本籍）	井上昇（北海道）
学位の種類	博士（獣医学）
学位記番号	獣医博乙第34号
学位授与年月日	平成11年9月21日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Establishment of <i>In Vivo</i> and <i>In Vitro</i> Systems for Propagation of Salivarian Trypanosomes, and Their Application for Molecular Biological and Immunological Studies
審査委員	主査 帯広畜産大学 教授 見上 彪 副査 帯広畜産大学 教授 齊藤 篤志 副査 岩手大学 教授 品川 邦汎 副査 岐阜大学 教授 平井 克哉 副査 東京農工大学 教授 本多 英一

論文の内容の要旨

本論文ではこれまで培養が困難であった弱毒トリパノソーマ原虫の SCID マウスまたは試験管内培養法による大量増殖法を確立し、これらの原虫の分子生物学および免疫学的応用研究を行った。

第一章では弱毒トリパノソーマ原虫の実験動物あるいは試験管内培養技術を用いた簡便な大量増殖法の開発を試みた。弱毒株 2 種 7 株を含むトリパノソーマ原虫 3 種 15 株の血流型原虫を SCID および BALB/c マウスに感染し、血液中の原虫濃度を比較検討した。SCID マウス血液中の原虫濃度は全てのトリパノソーマ原虫株で 1×10^8 cells/ml 以上に到達し、47 日間以内に全頭斃死した。一方、BALB/c マウスでは弱毒株感染に対して抵抗性を示し、一過性の原虫血症を呈した後、生存耐過した。以上の結果より、SCID マウスが弱毒トリパノソーマ原虫の増殖に有用であることが示された。次に、SCID マウスにより大量増殖させた虫体を用いてパルスフィールド電気泳動法を行い、*T. b. gambiense* 4 株、*T. b. rhodesiense* 2 株、*T. congolense* 1 株および *T. evansi* 7 株についてクロモソーム電気泳動パターンを比較検討した。エチジウムブロマイド染色によるバンドパターンは *T. b. gambiense* において分子量約 150 kb 以下のミニクロモソーム領域がその他の種に比べて少ない傾向が認められた。しかしながら、全体的な泳動パターンでは原虫種、原虫株および分離地域を特徴づける一定のパターンは認められなかった。

血流型トリパノソーマ原虫の培養法はすでに確立され、原虫の純培養も可能である。しかし、培養をはじめると同時に原虫を一度実験動物で増殖する必要があるため、これまで培養可能な原虫は強毒株に限られていた。そこで SCID マウスから得られた血流型虫体

を用いて弱毒トリパノソーマ原虫の試験管内培養法の確立を試みた。主として基礎培地に添加する血清について検討した結果、同原虫培養には従来用いられてきた 20%ウシ胎仔血清添加培地よりも 20%ヒト血漿添加培地が適していることが明らかになった。

第二章では第一章で確立した方法を用いて得られた血流型トリパノソーマ原虫を用いて同原虫の分子生物学的性状を比較検討した。家畜のズルラ病の病原体である *T. evansi* は吸血昆虫によって機械的に伝播されるため、世界中の熱帯、亜熱帯および温帯地域に分布する。一方、家畜およびヒトの睡眠病病原体である *T. brucei* はアフリカ大陸のサハラ砂漠以南にのみ生息するツェツェバエによって生物学的に伝播する。両者は形態学的にも生化学的にも酷似しており、一般に *T. evansi* は *T. brucei* から分化したと考えられている。近年、キネトプラストミニサークル DNA 特異的 PCR 法による *T. evansi* 特異的診断法も報告されているが、南米や中国ではキネトプラスト DNA を欠損した *T. evansi* が流行していることから、この PCR 法を診断へ応用するには注意が必要である。さらに本研究によって世界で初めて同 PCR 法で陽性結果を示す *T. brucei* が存在することが証明された。この結果は、*T. evansi* が *T. brucei* に由来していることを支持するが、*T. evansi* 特異的 PCR 法はキネトプラスト欠損型 *T. evansi* の感染を見逃す危険性があるのみならず、その特異性においても問題があることを示した。次に、*T. brucei* の昆虫型虫体に特異的に発現する表面抗原遺伝子 (PARP) が近縁種である *T. evansi* においてどの程度保存されているか否かを検討した。*T. evansi* は昆虫型の発育ステージを持たないにもかかわらず、検索した 7 株の *T. evansi* 全てにおいて PARP 特異的 PCR 法で *T. brucei* と同一の増幅パターンが得られた。さらに、プロモーター領域を含む PARP 遺伝子の配列を両原虫種間で比較したところほぼ同一で、RT-PCR 法によって PARP 遺伝子の転写が *T. evansi* においても起こっていることが証明された。以上の結果は、*T. evansi* が *T. brucei* 由来であることをさらに強く支持する。さらに、PARP 特異的 PCR 法は *T. brucei* および *T. evansi* に特異的で、キネトプラスト DNA 欠損型 *T. evansi* も検出可能であったことから、両原虫の検出および診断に有用であることが示唆された。

第三章では、SCID マウス体内で増殖した弱毒株トリパノソーマ原虫を BALB/c マウスに感染し、同原虫株に対する感染防御機構を解析した。抗 CD4 単クローン抗体 (mAb) で処置した BALB/c マウスでは感染後無処置マウスより有意に高く ($P < 0.05$) 持続性の原虫血症を呈したのに対し、無処置マウスの原虫血症は散発性かつ軽度であった。さらに、抗 IL-4 mAb で処置したマウスでは無処置マウスと比較して頻繁に原虫血症を再発した ($P < 0.01$)。また、抗 CD4 mAb 投与マウスでは感染後血清中に IL-4 が検出されなかった。以上の結果から、弱毒株トリパノソーマ原虫に対する感染防御には CD4 陽性 T 細胞および同 T 細胞サブセットによって制御される IL-4 が重要であることが示された。

以上、本論文では弱毒トリパノソーマ原虫の SCID マウスまたは試験管内培養法による大量増殖法を確立し、同原虫の分子生物学および免疫学的応用研究を行った結果、キネトプラスト DNA および PARP 遺伝子の比較から、*T. brucei* と *T. evansi* の近縁関係を強く支持する結果が得られたと共に、PARP 遺伝子特異的 PCR 法による *T. brucei* および *T. evansi* 感染症に対する診断法への応用の可能性が示された。さらに、弱毒株トリパノソーマ原虫を用いて宿主の感染防御機構を解析した結果、トリパノソーマ原虫に対する感染防

御に CD4 陽性 T 細胞および IL-4 が重要であることが示された。これらの結果は、いかなる分離株においてもその病原性に関係なく大量増殖できることを示唆しており、トリパノソーマ原虫の生化学的、分子生物学および免疫学的研究の推進に貢献する。

審 査 結 果 の 要 旨

本論文ではこれまで培養が困難であった弱毒トリパノソーマ原虫の SCID マウスまたは試験管内培養法による大量増殖法を確立し、これらの原虫の分子生物学および免疫学的応用研究を行った。

第一章では弱毒トリパノソーマ原虫の実験動物あるいは試験管内培養技術を用いた簡便な大量増殖法の開発を試みた。弱毒株 2 種 7 株を含むトリパノソーマ原虫 3 種 15 株の血流型原虫を SCID および BALB/c マウスに感染し、血液中の原虫濃度を比較検討した。SCID マウス血液中の原虫濃度は全てのトリパノソーマ原虫株で 1×10^8 cells/ml 以上に到達し、47 日間以内に全頭斃死した。一方、BALB/c マウスでは弱毒株感染に対して抵抗性を示し、一過性の原虫血症を呈した後、生存耐過した。以上の結果より、SCID マウスが弱毒トリパノソーマ原虫の増殖に有用であることが示された。次に、SCID マウスにより大量増殖させた虫体を用いてパルスフィールド電気泳動法を行い、*T. b. gambiense* 4 株、*T. b. rhodesiense* 2 株、*T. congolense* 1 株および *T. evansi* 7 株についてクロモソーム電気泳動パターンを比較検討した。エチジウムブロマイド染色によるバンドパターンは *T. b. gambiense* において分子量約 150 kb 以下のミニクロモソーム領域がその他の種に比べて少ない傾向が認められた。しかしながら、全体的な泳動パターンでは原虫種、原虫株および分離地域を特徴づける一定のパターンは認められなかった。

血流型トリパノソーマ原虫の培養法はすでに確立され、原虫の純培養も可能である。しかし、培養をはじめると同時に原虫を一度実験動物で増殖する必要があるため、これまで培養可能な原虫は強毒株に限られていた。そこで SCID マウスから得られた血流型虫体を用いて弱毒トリパノソーマ原虫の試験管内培養法の確立を試みた。主として基礎培地に添加する血清について検討した結果、同原虫培養には従来用いられてきた 20% ウシ胎仔血清添加培地よりも 20% ヒト血漿添加培地が適していることが明らかになった。

第二章では第一章で確立した方法を用いて得られた血流型トリパノソーマ原虫を用いて同原虫の分子生物学的性状を比較検討した。家畜のズルラ病の病原体である *T. evansi* は吸血昆虫によって機械的に伝播されるため、世界中の熱帯、亜熱帯および温帯地域に分布する。一方、家畜およびヒトの睡眠病病原体である *T. brucei* はアフリカ大陸のサハラ砂漠以南にのみ生息するツェツェバエによって生物学的に伝

播する。両者は形態学的にも生化学的にも酷似しており、一般に *T. evansi* は *T. brucei* から分化したと考えられている。近年、キネトプラストミニサークル DNA 特異的 PCR 法による *T. evansi* 特異的診断法も報告されているが、南米や中国ではキネトプラスト DNA を欠損した *T. evansi* が流行していることから、この PCR 法を診断へ応用するには注意が必要である。さらに本研究によって世界で初めて同 PCR 法で陽性結果を示す *T. brucei* が存在することが証明された。この結果は、*T. evansi* が *T. brucei* に由来していることを支持するが、*T. evansi* 特異的 PCR 法はキネトプラスト欠損型 *T. evansi* の感染を見逃す危険性があるのみならず、その特異性においても問題があることを示した。次に、*T. brucei* の昆虫型虫体に特異的に発現する表面抗原遺伝子 (PARP) が近縁種である *T. evansi* においてどの程度保存されているか否かを検討した。*T. evansi* は昆虫型の発育ステージを持たないにもかかわらず、検索した 7 株の *T. evansi* 全てにおいて PARP 特異的 PCR 法で *T. brucei* と同一の増幅パターンが得られた。さらに、プロモーター領域を含む PARP 遺伝子の配列を両原虫種間で比較したところほぼ同一で、RT-PCR 法によって PARP 遺伝子の転写が *T. evansi* においても起こっていることが証明された。以上の結果は、*T. evansi* が *T. brucei* 由来であることをさらに強く支持する。さらに、PARP 特異的 PCR 法は *T. brucei* および *T. evansi* に特異的で、キネトプラスト DNA 欠損型 *T. evansi* も検出可能であったことから、両原虫の検出および診断に有用であることが示唆された。

第三章では、SCID マウス体内で増殖した弱毒株トリパノソーマ原虫を BALB/c マウスに感染し、同原虫株に対する感染防御機構を解析した。抗 CD4 単クローン抗体 (mAb) で処置した BALB/c マウスでは感染後無処置マウスより有意に高く ($P<0.05$) 持続性の原虫血症を呈したのに対し、無処置マウスの原虫血症は散発性かつ軽度であった。さらに、抗 IL-4 mAb で処置したマウスでは無処置マウスと比較して頻繁に原虫血症を再発した ($P<0.01$)。また、抗 CD4 mAb 投与マウスでは感染後血清中に IL-4 が検出されなかった。以上の結果から、弱毒株トリパノソーマ原虫に対する感染防御には CD4 陽性 T 細胞および同 T 細胞サブセットによって制御される IL-4 が重要であることが示された。

以上、本論文では弱毒トリパノソーマ原虫の SCID マウスまたは試験管内培養法による大量増殖法を確立し、同原虫の分子生物学および免疫学的応用研究を行った結果、キネトプラスト DNA および PARP 遺伝子の比較から、*T. brucei* と *T. evansi* の近縁関係を強く支持する結果が得られたと共に、PARP 遺伝子特異的 PCR 法による *T. brucei* および *T. evansi* 感染症に対する診断法への応用の可能性が示された。さらに、弱毒株トリパノソーマ原虫を用いて宿主の感染防御機構を解析した結果、トリパノソーマ原虫に対する感染防御に CD4 陽性 T 細胞および IL-4 が重要であることが示された。これらの結果は、いかなる分離株においてもその病原性に関係なく大

量増殖できることを示唆しており，トリパノソーマ原虫の生化学的，分子生物学および免疫学的研究の推進に貢献する。

以上について，平成 11 年 9 月 10 日に開催された審査委員会において審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

基礎となる学術論文

1. Inoue, N., Honzako, Y., Hirumi, K., Xuan, X., Agatsuma, T., Nagasawa, H., Mikami, T. and Hirumi, H. (1998) Kinetoplast DNA and procyclic acidic repetitive protein A- α gene of *Trypanosoma evansi*. *The Journal of Protozoology Research* 8 (1): 28~43.
2. Inoue, N., Narumi, D., Mbatia, P. A., Hirumi, K., Situakibanza N-T. H. and Hirumi, H. (1998) Susceptibility of severe combined immuno-deficient (SCID) mice to *Trypanosoma brucei gambiense* and *T. b. rhodesiense*. *Tropical Medicine and International Health* 3 (5): 408~412.
3. Inoue, N., Inoue, M., Kuriki, K., Yamaguchi, H., Nagasawa, H., Mikami, T., Fujisaki, K., Suzuki, N. and Hirumi, H. (1999) Interleukin 4 is a crucial cytokine in controlling *Trypanosoma brucei gambiense* infection in mice. *Veterinary Parasitology* (In Press).

既発表学術論文

1. Inoue, N., Omata, Y., Igarashi, I., Saito, A., Claveria, F. G. and Suzuki, N. (1994) *Babesia rodhaini* and *Babesia microti*: Cross-immunity and cross-antigens. *The Journal of Protozoology Research* 4 (3): 98~104.
2. Igarashi, I., Avarzed, A., Tanaka, T., Inoue, N., Ito, M., Omata, Y., Saito, A. and Suzuki, N. (1994) Continuous in vitro cultivation of *Babesia ovata*. *The Journal of Protozoology Research* 4 (3): 111~118.
3. Kato, M., Maki, Y., Inoue, N., Omata, Y., Claveria, F. G., Igarashi, I., Saito, A. and Suzuki, N. (1994) *Toxoplasma* lysate antigen (TLA144)-Ig8 antigenic component: Binding and induction of cytotoxic cell activity in mouse spleen cells. *The Journal of Protozoology Research* 4 (4): 149~157.

4. Omata, Y., Inoue, N., Yonematsu, K., Claveria, F. G., Igarashi, I., Saito, A. and Suzuki, N. (1995) Detection of collagen-cross reactive antigenic components in *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Protozoology Research* 5 (1): 33~39.
5. Inoue, N., Omata, Y., Yonemasu, K., Claveria, F. G., Igarashi, I., Saito, A. and Suzuki, N. (1996) Collagen cross-reactive antigen of *Sarcocystis cruzi*. *Veterinary Parasitology* 63 (1-2): 17~23.
6. Hirumi, H., Martin, S., Hirumi, K., Inoue, N., Kanbara, H., Saito, A. and Suzuki, N. (1997) Cultivation of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* and *T. evansi* in a serum-free medium. *Tropical Medicine and International Health* 2 (3): 240~244.
7. Avarzed, A., Igarashi, I., De Waal, D. T., Kawai, S., Oomori, Y., Inoue, N., Maki, Y., Omata, Y., Saito, A., Nagasawa, H., Toyoda, Y. and Suzuki, N. (1998) Monoclonal antibody against *Babesia equi*: Characterization and potential application of antigen for serodiagnosis. *Journal of Clinical Microbiology* 36 (7): 1835~1839.