

氏 名 (本籍)	小 山 智 洋 (北 海 道)
学 位 の 種 類	博士 (獣医学)
学 位 記 番 号	獣医博甲第 8 3 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 1 3 年 3 月 1 3 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	帯広畜産大学
学 位 論 文 題 目	A Basic Study on Sexual Development of <i>Toxoplasma gondii</i> in Feline Enter epithelial Cells
審 査 委 員	主査 帯広畜産大学 教 授 齊 藤 篤 志 副査 帯広畜産大学 教 授 白 幡 敏 一 副査 岩 手 大 学 教 授 首 藤 文 榮 副査 東京農工大学 教 授 本 多 英 一 副査 岐 阜 大 学 教 授 平 井 克 哉

論 文 の 内 容 の 要 旨

Toxoplasma gondii (*T. gondii*)は、真コクシジウム目アイメリア亜目の偏性細胞内寄生性原虫で、ヒトを含む哺乳動物と鳥類を中間宿主とし、中間宿主の細胞内で内部出芽による二分裂増殖を繰り返して宿主細胞を破壊する。感染家畜では流産や生育遅滞、妊婦への感染では流産や水頭症の原因となる。また、免疫抑制状態の患者に日和見感染を起こすなど人獣共通感染症として重要な病原寄生体である。本原虫はネコ科動物の小腸上皮内でのみ有性生殖を行い、初 (急性) 感染ネコは糞便中に外部的環境に耐性で、感染性の強いoocystを排泄する。近年、伴侶動物として住居内で飼育されるネコが増加する傾向があり、oocystによるヒトへのトキソプラズマ感染の危険が増加している。したがって、有性生殖の機序を解明し、oocyst排泄を阻止することは、この原虫の感染を抑止することにつながり、人間への感染や家畜の経済的損失などを減少させる上で極めて重要であると考えられている。

近年、*T. gondii*の有性生殖過程の虫体 (feline enteroepithelial-stages parasites: FES) が分離され、本原虫はステージによって、抗原的、形態学的、及びdense granule protein (GRA protein) などの抗原分子にも相違があることが示唆されている。

本学位論文は、*T. gondii*の腸管内寄生虫体と増殖期の虫体との相違を中心に、ネコ科動物に特異的な*T. gondii*の有性生殖機序の解明とoocyst排泄抑止による感染防御手段を検討する上に重要な基礎資料を提供したものである。

本学位論文の骨子は次の3章から構成されている。

第1章は、「トキソプラズマ原虫のネコ腸管内有性生殖期に発現する抗原」に関するものである。この章では、まず、ネコFESに発現する抗原の解析を目的として、FESよりcDNAライブラリーを構築している。FESで免疫したネコの抗血清を使用しスクリーニングを行い、14の陽性クローンを得ている。それらの塩基配列解析の結果、陽性クローンは hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT), Heat Shock Protein70 (HSP70), 14-3-3 protein homologueにDNAレベルで高い相同性のある分子、及び未知の配列を持つ分子の4つのグループに分類され、これらのクローンがコードする分子は有性生殖期の虫体に優勢に発現していることを確認している。

第2章は、「14-3-3 protein homologueがトキソプラズマ原虫のネコ腸管内有性生殖期に優勢に発現される」事に関するものである。この章では、14-3-3 protein homologueのリコンビナント蛋白と同蛋白に対するモノクローナル抗体を作成し、FESに優勢に発現し、14-3-3 protein homologueに高い相同性をもつクローンであることを明らかにしている。そして、同蛋白に対するモノクローナル抗体は、*T. gondii*の有性生殖期の虫体に強い反応性を示ことを明らかにし、このクローンをプローブとしたSouthern blotでも虫体ゲノム上の14-3-3遺伝子の存在を確認している。更に、この遺伝子はsingle copyであることを示唆している。また、変異酵母を用いた系でFES由来14-3-3 proteinの機能を検討し、他の動物種 (human, *Echinococcus*) の14-3-3proteinと同様の機能を持つことを明らかにしている。

第3章は、「トキソプラズマ感染ネコにおける14-3-3 protein homologueに対する免疫応答」に関するものである。この章では、RT-PCRを用いたネコのトキソプラズマ感染に対する免疫応答の観察方法を確立してから、14-3-3分子に対する宿主の免疫応答を観察する目的で、このリコンビナント蛋白をネコに免疫し、宿主の免疫応答を観察している。FESに対するIFATの結果、免疫群において血清中抗FES抗体が有意に上昇することを確認している。しかし、その後の*T. gondii*マウス脳内cystの経口感染では、感染後の排泄oocyst数、末梢血リンパ球、脾臓及び腸間膜リンパ節におけるサイトカイン発現、体内における虫体の分布、及び病理組織学的検索においても免疫群と対照群との間に差はみられなかったことから、この14-3-3リコンビナント蛋白でのネコに対する免疫は、特異抗体の産生は誘導するが、*T. gondii*の有性生殖の阻止には影響を与えないという結論にいたっている。

よって、本学位論文は、14-3-3遺伝子の機能を解明し、働きを抑制するには、この遺伝子の発現を遺伝子レベルで抑制する方法の確立（アンチセンス鎖RNAの利用、14-3-3遺伝子欠損虫体の作製）が必要であることを示唆し、有性生殖期に発現が確認された未調査抗原を含めネコに特異的な*T. gondii*の有性生殖機序の解明とoocyst排泄抑止による感染防御手段を検討する上に重要な基礎資料を提供したものである。

審 査 結 果 の 要 旨

Toxoplasma gondii (*T. gondii*)は、真コクシジウム目アイメリア亜目の偏性細胞内寄生性原虫で、ヒトを含む哺乳動物と鳥類を中間宿主とし、中間宿主の細胞内で内部出芽による二分裂増殖を繰り返して宿主細胞を破壊する。感染家畜では流産や生育遅滞、妊婦への感染では流産や水頭症の原因となる。また、免疫抑制状態の患者に日和見感染を起こすなど

人獣共通感染症として重要な病原寄生体である。本原虫はネコ科動物の小腸上皮内でのみ有性生殖を行い、初（急性）感染ネコは糞便中に外部的環境に耐性で、感染性の強いoocystを排泄する。近年、伴侶動物として住居内で飼育されるネコが増加する傾向があり、oocystによるヒトへのトキソプラズマ感染の危険が増加している。したがって、有性生殖の機序を解明し、oocyst排泄を阻止することは、この原虫の感染を抑止することにつながるとともに、ヒトへの感染や家畜の経済的損失などを減少させる上で極めて重要であると考えられている。

近年、*T. gondii*の有性生殖過程の虫体 (feline enteroepithelial-stages parasites: FES)が分離され、本原虫はステージによって、抗原的、形態学的、及びdense granule protein (GRA protein)などの抗原分子にも相違があることが示唆されている。

学位申請者小山智洋氏の提出した論文は、*T. gondii*の腸管内寄生虫体と増殖期の虫体との相違を中心に、ネコ科動物に特異的な*T. gondii*の有性生殖機序の解明とoocyst排泄抑止による感染防御手段を検討する上に重要な基礎資料を提供したものである。

同学位申請論文では、1) FESより構築したcDNAライブラリーを用いてネコFESに発現する抗原を解析し、14の陽性クローンを得るとともに、それらをhypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT), Heat Shock Protein70 (HSP70), 14-3-3 protein homologueにDNAレベルで高い相同性のある分子、及び未知の配列を持つ分子の4つのグループに分類し、それらをコードする分子は有性生殖期の虫体に優勢に発現していること、2) 14-3-3 protein homologueのリコンビナント蛋白と同蛋白に対するモノクローナル抗体を作成し、14-3-3 protein homologueに高い相同性をもつクローンがFESに優勢に発現すること、3) 同蛋白に対するモノクローナル抗体は、*T. gondii*の有性生殖期の虫体に強い反応性を示すばかりでなく、Southern blotで虫体ゲノム上に14-3-3遺伝子が存在し、この遺伝子はsingle copyであること、4) 変異酵母を用いた系で14-3-3 protein homologueリコンビナント蛋白の機能を検討し、他の動物種 (human, *Echinococcus*) の14-3-3proteinと同様の機能を持つこと、5) RT-PCRを用いたネコのトキソプラズマ感染に対する免疫応答の観察方法を確立したこと、及び6) 14-3-3分子に対する宿主の免疫応答を観察し、14-3-3リコンビナント蛋白で免疫されたネコでは、特異抗体の産生がみられるが、*T. gondii*の有性生殖は阻止されないこと等を3章にわたって論述している。そして、それらの新しい所見から、14-3-3遺伝子の機能を解明し、働きを抑制するには、この遺伝子の発現を遺伝子レベルで抑制する方法の確立（アンチセンス鎖RNAの利用、14-3-3遺伝子欠損虫体の作製）が必要であると結論しており、本学位論文の内容は、ネコに特異的な*T. gondii*の有性生殖機序の解明とoocyst排泄抑止による感染防御手段を検討する上に重要な基礎資料を提供する研究であると評価する。

以上について、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のあるものと認めた。

基礎となる学術論文の発表雑誌名

Journal of Veterinary Medical Science (日本獣医学会) :61, 819-821, 1999

Journal of Veterinary Medical Science (日本獣医学会) : 62, 1089-1092, 2000

Veterinary Parasitology (エルセビア, オランダ) : 印刷中

既発表学術論文の発表雑誌名

Parasitology Research (エルセビア, オランダ) : 83, 574-577, 1997

Veterinary Parasitology (エルセビア, オランダ) : 82, 211-215, 1999

Veterinary Parasitology (エルセビア, オランダ) : 83, 73-78, 1999