

氏 名 (国籍)	廖 敏 (中華人民共和国)
学 位 の 種 類	博士 (獣医)
学 位 記 番 号	獣医博甲第 2 1 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 1 9 年 3 月 1 3 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 3 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	Studies on Identification of Cross-reactive Antigens between <i>Neospora caninum</i> and <i>Toxoplasma gondii</i> and Development of Immunodiagnostic Test for <i>N. caninum</i> Infection (ネオスポラ原虫とトキソプラズマ原虫の交差抗原の解析とネオスポラ原虫感染症の免疫診断法の開発に関する研究)
審 査 委 員	主査 帯広畜産大学 教授 鈴木 宏 志 副査 帯広畜産大学 教授 佐 藤 基 佳 副査 岩 手 大 学 教授 品 川 隼 汎 副査 東京農工大学 教授 岩 崎 利 郎 副査 岐 阜 大 学 教授 鬼 頭 克 也 副査 鹿 児 島 大 学 教授 藤 崎 幸 藏

論 文 の 内 容 の 要 旨

Neospora caninum および *Toxoplasma gondii* は、いずれもアピコンプレクサ Apicomplexa に属する原虫で、さまざまな脊椎動物に感染する。*T. gondii* は人獣共通感染症の病原体であり、*N. caninum* はウシの流・死産を引き起こす病原体であることが知られており、両原虫によるネオスポラ症およびトキソプラズマ症は、畜産業において世界的に重要視されている。したがって、*N. caninum* および *T. gondii* の交差抗原を同定することは、これら原虫の制圧法の開発だけでなく、宿主細胞への接着および侵入メカニズムの解明において重要であると考えられる。これまでに多くの *T. gondii* 由来タンパクの特性は解明されているため、*T. gondii* および *N. caninum* の交差抗原を探索することにより、*N. caninum* 由来の新規タンパクを同定し、その機能解析が可能になるものと考えられる。また、これまでに *N. caninum* に対する血清学的診断法が存在するものの、イムノクロマトグラフィー (ICT) のような簡易迅速診断法はまだ開発されていない。

第 1 章では、*N. caninum* および *T. gondii* の交差抗原を同定するために、*N. caninum* タキゾイトに対するマウスモノクローナル抗体 (mAb) を作製した。交差抗原を認識する 10 種の mAb が得られ、

それらは間接蛍光抗体法 (IFAT) およびウエスタンブロット法での反応性に基づき、6 つのグループに分類された。グループ 1 に分類された 3 種の mAb は、原虫表面に局在する分子量 28~76 kDa の抗原を認識した。グループ 2 に分類された 1 種の mAb は、細胞内小器官に局在する分子量 50 kDa の抗原を認識した。グループ 3 に分類された 1 種の mAb は、細胞内小器官に局在する分子量 35 および 14 kDa の抗原を認識した。グループ 4 に分類された 3 種の mAb は、細胞内小器官に局在する分子量 64 kDa の抗原を認識した。グループ 5 に分類された 1 種の mAb は、原虫表面に局在する分子量未知の抗原を認識した。グループ 6 に分類された 1 種の mAb は、原虫の先端部に局在する分子量未知の抗原を認識した。グループ 1, 2, 3, および 5 に分類された mAb は、濃度依存的に *N. caninum* および *T. gondii* の *in vitro* 増殖抑制効果を示した。グループ 2, 3, および 4 に分類された mAb を用いて、*N. caninum* タキゾイトの mRNA から作製した cDNA ライブラリーのイムノスクリーニングを行ったところ、protein disulfide isomerase (PDI), heat-shock protein 70 (HSP70), および ribosomal protein 1 (RP1) がそれぞれ同定された。本研究では、PDI の特性を解明したが、HSP70 および RP1 だけでなく他のいくつかの mAb で認識された表面抗原についてもさらなる研究が必要であり、これらの交差抗原は抗原虫薬およびワクチン開発に有用であると考えられた。

第 2 章では、*N. caninum* 由来推定 PDI をコードする遺伝子の完全長配列を得た。NcPDI 遺伝子の ORF は 1416 bp で、その推定産物は 24 アミノ酸のシグナル配列を有する 471 アミノ酸残基から構成され、推定分子量は 50 kDa であった。NcPDI 遺伝子の推定アミノ酸配列は、*T. gondii* PDI と 94% の相同性を示した。シグナル配列を含まない NcPDI 遺伝子の DNA 断片を発現ベクターに組み込み、大腸菌発現系で GST 融合タンパクとして組換え NcPDI を作製した。1 次元、2 次元電気泳動およびイムノブロット法により、*N. caninum* タキゾイトのライセートおよび excretory-secretory (ES) 産物から内在性 NcPDI が検出され、その推定分子量は 50 kDa であった。また、ウシ涙液中の IgA 抗体は、GST を除去した組換え NcPDI および *N. caninum* タキゾイトライセート中の内在性タンパク質を認識した (58.0%)。このことは、PDI 特異的抗体が原虫に対する防御応答に関わる可能性を示唆する。さらに、PDI 特異的阻害剤 zinc bacitracin, tocinoic acid, および NcPDI 抗血清は、*N. caninum* タキゾイトの増殖抑制効果を示した。一方、精製した組換え NcPDI は、還元型 RNase A の触媒作用およびリフォールディング、未変性リゾチームの復元に関わる分子であることが *in vitro* において示された。これらの所見は、NcPDI が PDI 特異的酵素活性を有し、ネオスポラ症の化学療法のターゲット分子になりうることを示唆する。

第 3 章では、ウシ血清中の抗 *N. caninum* 抗体の迅速な検出法として ICT を開発した。大腸菌発現系で組換え *N. caninum* 表面抗原 1 (NcSAG1t) を作製し、その精製タンパクを金コロイドに結合させ、ニトロセルロース膜上に固定した。この ICT を用いて、*N. caninum* 実験感染マウスおよびイヌのすべての血清中から特異抗体が検出されたが、非感染マウス、イヌおよび *T. gondii* 実験感染マウスからは全く検出されなかった。また、ICT では、IFAT 陽性ウシ血清および IFAT 陰性ウシ血清を区別することができた。中国 (延辺) のウシから回収した血清検体について ICT を行ったところ、96 検体のうち、23 検体 (24.0%) が ICT 陽性であり、19 検体 (19.8%) が以前開発された ELISA で陽性であった。ELISA 陽性 19 検体のうち 18 検体は、ICT においても陽性であった。ICT および ELISA の結果は良好な相関を示したことから (Kappa value 0.99)、組換え NcSAG1 を用いた ICT は、ウシ血清中の抗 *N. caninum* 抗体を検出するうえで非常に有用な方法であることが示唆された。

本研究では、*N. caninum* および *T. gondii* に対する mAb を用いて、それらの原虫の交差抗原をスクリーニングし、*N. caninum* および *T. gondii* の新規交差抗原 (PDI, RP1, および HSP70) を同定した。また、*N. caninum* 由来交差抗原 NcPDI は、寄生虫 - 宿主間相互作用および粘膜免疫に関わることを示された。さらに、本研究は、ウシ血清中の抗 *N. caninum* 抗体を検出するための、迅速・簡便で、信頼でき、かつ実用的な免疫診断法 ICT を開発した最初の報告である。

審 査 結 果 の 要 旨

Neospora caninum および *Toxoplasma gondii* 感染症は、世界的に重要視されており、両原虫の交差抗原を同定することは、これら原虫の制圧法の開発に寄与すると考えられる。これまで、多くの *T. gondii* 由来タンパクの特性が報告されていることから、*T. gondii* および *N. caninum* の交差抗原を探索することにより、*N. caninum* 由来の新規タンパクの同定、機能解析が可能と考えられる。また、*N. caninum* の簡易迅速診断法は開発されていない。

N. caninum および *T. gondii* の交差抗原を同定するため、*N. caninum* タキゾイトに対するモノクローナル抗体 (mAb) を作製したところ、合計 10 種の mAb を得た。これらの mAb の幾つかは、濃度依存的に *N. caninum* および *T. gondii* の *in vitro* 増殖を抑制した。さらに、これらの mAb を用いて *N. caninum* タキゾイト cDNA ライブラリーのイムノスクリーニングを行ったところ、protein disulfide isomerase (PDI), heat-shock protein 70 および ribosomal protein 1 を同定した。

N. caninum 由来 PDI 遺伝子の ORF は 1416 bp で、その推定産物は 471 アミノ酸残基から構成され、*T. gondii* PDI と 94% の相同性を示した。ウシ涙液中の IgA 抗体は、組換えおよび内在性 NcPDI を認識したことから、PDI 特異的抗体が原虫に対する防御応答に関わると考えられた。さらに、PDI 阻害剤および NcPDI 抗血清は、*N. caninum* タキゾイトの増殖抑制効果を示した。

組換え *N. caninum* 表面抗原 1 (NcSAG1t) を用いた ICT は、*N. caninum* 感染マウスおよびイヌ血清中から特異抗体を検出した。また、中国のウシ由来血清では、24% が ICT 陽性であり、20% が既存の ELISA 陽性であった。ICT および ELISA の結果は良好な相関を示したことから (K 値 = 0.99)、本 ICT は、ウシ血清中の抗 *N. caninum* 抗体の検出に非常に有用であると考えられた。

本研究では、*N. caninum* および *T. gondii* に対する mAb を用いて、それらの原虫の交差抗原をスクリーニングし、3 種の新規交差抗原を同定した。また、*N. caninum* 由来交差抗原 NcPDI は、寄生虫 - 宿主間相互作用に関わることを示した。さらに、ウシ血清中の抗 *N. caninum* 抗体を検出するための、迅速・簡便で、かつ実用的な免疫診断法 ICT を開発した。

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があると認めた。

基礎となる学術論文

1) 題 目 : Identification and characterization of cross-reactive antigens from *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*

著 者 名 : Liao, M., Xuan, X., Huang, X., Shirafuji, H., Fukumoto, S., Hirata, H., Suzuki, H. and Fujisaki, K.

学術雑誌名 : Parasitology

巻・号・頁・発行年 : 130 : 481-488, 2005

- 2) 題 目 : Development of rapid immunochromatographic test with recombinant NcSAG1 for detection of antibodies to *Neospora caninum* in cattle
著 者 名 : Liao, M., Zhang, S., Xuan, X., Zhang, G., Huang, X., Igarashi, I. and Fujisaki, K.
学術雑誌名 : Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology
卷・号・頁・発行年 : 12 (7) : 885-887, 2005
- 3) 題 目 : Identification of a protein disulfide isomerase of *Neospora caninum* in excretory-secretory products and its IgA binding and enzymatic activities
著 者 名 : Liao, M., Ma, L., Bannai, H., Lee, E. G., Xie, X., Tang, X., Zhang, H., Xuan, X. and Fujisaki, K.
学術雑誌名 : Veterinary Parasitology
卷・号・頁・発行年 : 139 (1-3) : 47-56, 2006

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Detection of antibodies to *Neospora caninum* in cattle by enzyme-linked immunosorbent assay with truncated NcSRS2 expressed in *Escherichia coli*
著 者 名 : Gaturaga, I., Chahan, B., Xuan, X., Huang, X., Liao, M., Fukumoto, S., Hirata, H., Nishikawa, Y., Takashima, Y., Suzuki, H., Fujisaki, K. and Sugimoto, C.
学術雑誌名 : Journal of Parasitology
卷・号・頁・発行年 : 91 (1) : 191-192, 2005
- 2) 題 目 : Identification of a follistatin-related protein from the tick *Haemaphysalis longicornis* and its effect on tick oviposition
著 者 名 : Zhou, J., Liao, M., Hatta, T., Tanaka, M., Xuan, X. and Fujisaki, K.
学術雑誌名 : Gene
卷・号・頁・発行年 : 10 (372) : 191-198, 2006
- 3) 題 目 : Identification and characterisation of a leucine aminopeptidase from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*
著 者 名 : Hatta, T., Kazama, K., Miyoshi, T., Umemiya, R., Liao, M., Inoue, N., Xuan, X., Tsuji, N. and Fujisaki, K.
学術雑誌名 : International Journal for Parasitology
卷・号・頁・発行年 : 36 : 1123-1132, 2006
- 4) 題 目 : *Haemaphysalis longicornis*: Molecular characterization of a homologue of the macrophage migration inhibitory factor from the partially fed ticks
著 者 名 : Umemiya, R., Hatta, T., Liao, M., Tanaka, M., Zhou, J., Inoue, N. and Fujisaki, K.
学術雑誌名 : Experimental Parasitology
卷・号・頁・発行年 : 115 (2) : 135-142, 2006

- 5) 題 目 : RNA interference of cytosolic leucine aminopeptidase reduces fecundity in the hard tick, *Haemaphysalis longicornis*
- 著 者 名 : Hatta, T., Umemiya, R., Liao, M., Gong, H., Harnnoi, T., Tanaka, M., Miyoshi, T., Boldbaatar, D., Battsetseg, B., Zhou, J., Xuan, X., Tsuji, N., Taylor, D. and Fujisaki, K.
- 学術雑誌名 : Parasitology Research
- 巻・号・頁・発行年 : In press