

氏 名（本籍）	田 仲 哲 也 （福岡県）
学 位 の 種 類	博士（獣医学）
学 位 記 番 号	獣医博甲第30号
学 位 授 与 年 月 日	平成9年3月14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	The Study on the Biological Activity of Bovine Lactoferrin - Growth Inhibitory Effects of Bovine Lactoferrin to <i>Toxoplasma gondii</i> -
審 査 委 員	主査 帯広畜産大学 教授 齊 藤 篤 志 副査 岐 阜 大 学 教 授 平 井 克 哉 副査 帯広畜産大学 教授 白 幡 敏 一 副査 岩 手 大 学 教 授 岡 田 幸 助 副査 東京農工大学 教授 小久江 栄 一

論 文 の 内 容 の 要 旨

トキソプラズマ原虫(*Toxoplasma gondii*, *T. gondii*原虫)は、ネコ科の動物を終宿主する真コクシジウム目アイメリア亜目の偏性細胞内寄生原虫で、ヒトを含むあらゆる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。本原虫は多くの感染中間宿主体内で宿主の免疫系による生体防御機構を逃れて脳、骨格筋、および心筋組織内に嚢包(cyst)を形成して緩慢な増殖を続けながら長期間生息し続ける結果、感染中間宿主は不顕性感染の状態で生存する。しかし、中間宿主の生体防御機構に障害が生じた場合、中間宿主の死をももたらす疾病を起こす。また、*T. gondii*原虫感染細胞の種々の殺原虫機構が活性化されれば、感染細胞内での原虫の増殖が抑制されることも知られている。

一方、乳汁、涙液、鼻汁、唾液、ならびに好中球分泌物中に含まれ、分子量約80kDaの鉄結合性糖蛋白質であるウシラクトフェリンは、種々の生物活性（静菌作用、免疫賦活作用、抗炎症作用、細胞増殖作用、腸管内での鉄吸収促進、および脂質の過酸化抑制など）を有していることが知られている。また、ウシラクトフェリンと約69%のホモロジーを有

するヒトラクトフェリンはマウスマクロファージ内でのamastigoto期の*Trypanosoma cruzi*の増殖を抑制するという報告がある。

本学位論文は、*T. gondii*原虫のマウス腹腔マクロファージとマウス胎仔線維芽細胞内での増殖と*T. gondii*原虫感染マウスの生残に対するウシラクトフェリンの効果を検討し、これまで知られていなかったウシラクトフェリンの生物活性を明らかにしたものである。

本学位申請論文の骨子は、次の6つの章から成っている。

第1章は、「ウシラクトフェリンのマウス体細胞内での*T. gondii*原虫増殖抑制効果」に関するものである。この章ではウシラクトフェリンは*T. gondii*虫体に対しては直接的な障害性を示さないが、*T. gondii*原虫感染マウス腹腔マクロファージとマウス胎仔線維芽細胞にウシラクトフェリンを作用させるとそれらの細胞内での原虫の増殖が抑制されるという事実を明らかにしている。また、鉄完全飽和型、および鉄非結合型ウシラクトフェリンでも同様の効果が認められることと、鉄結合性蛋白でるトランスフェリンにはそのような効果が認められないことから、ウシラクトフェリンの細胞内原虫増殖抑制作用には鉄分子が関与していないことを明らかにしている。

第2章は、「マウス腹腔マクロファージ内におけるウシラクトフェリンによる*T. gondii*原虫増殖抑制機作、とくに活性酸素と一酸化窒素の役割」を検討したものである。原虫感染、あるいは非感染マウス腹腔マクロファージにウシラクトフェリンを作用させても活性酸素、ならび一酸化窒素の増加を観察する事が出来ないことを明らかにし、これまでマクロファージ内での原虫増殖抑制、あるいは細胞内での殺原虫因子として広く論じられてきた活性酸素や一酸化窒素は、ウシラクトフェリンでの原虫増殖抑制機構には関与していないことを明らかにしている。また、この章では、培養液中にL-arginine依存系を阻害するmonomethyl-L-arginine acetateを添加すると、ウシラクトフェリンによる原虫増殖抑制効果が阻害されることを明らかにし、L-arginineを基質とする一酸化窒素産生系以外の代謝系が関与している事を示唆する結果を示している。

第3章では、「マウス腹腔マクロファージ内におけるウシラクトフェリンによる*T. gondii*原虫増殖抑制機作、とくにチロシンのリン酸化の関与」を検討し、抗リン酸化チロシン抗体を用いてのimmunoblottingによりウシラクトフェリン処理マクロファージ内に30kDaのリン酸化蛋白を発見すると共に、チロシンATP依存性リン酸化阻害剤処理でウシラクトフェリンによる原虫増殖抑制と30kDaの蛋白のリン酸化が阻害されることを明らかにした。

第4章では、「*T. gondii*原虫感染マウスに対するウシラクトフェリンの効果」を検討し、ウシラクトフェリンの投与によって*T. gondii*原虫感染マウスに延命効果が見られたこと、延命マウスの脳内シストが減少することを明らかにし、ウシラクトフェリンの生体内投与の有効性を実証している。また、同章ではヌードマウスではウシラクトフェリンは

延命効果を示さないことと、生体内投与による延命とIFN- γ 産生との間には直接的関係がないことを明らかにしている。

第5章と第6章では、「ウシラクトフェリンN-端構成ペプチドであるラクトフェリンの効果」を*in vitro*と*in vivo*の系で検討し、同ペプチドは*T.gondii*原虫に対して直接的な抗原虫作用を有し、*T.gondii*原虫の宿主細胞への侵入性を抑え、ラクトフェリンで予め処理された*T.gondii*原虫はマウスに対する感染能力が低下すること、*T.gondii*原虫感染マウスへの同ペプチド投与もウシラクトフェリンと同様*T.gondii*原虫感染に対し延命効果をもたらすと伴に、ヌードマウスやIFN- γ 産生に対する反応もウシラクトフェリンと同様な結果を得ている。

以上、各章に示された新しい知見は、ウシラクトフェリンの有効利用に示唆に富むものとなっている。

審 査 結 果 の 要 旨

トキソプラズマ原虫(*Toxoplasma gondii*, *T. gondii*原虫)は、ネコ科の動物を終宿主とする真コクシジウム目アイメリア亜目の偏性細胞内寄生原虫である。本原虫は、ヒトを含むあらゆる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。また、本原虫は、多くの感染中間宿主体内で宿主の免疫系による生体防御機構を逃れて脳、骨格筋、および心筋組織内に嚢包(cyst)を形成して緩慢な増殖を続けながら長期間生息し続ける結果、感染中間宿主は不顕性感染の状態で生存する。しかし、中間宿主の生体防御機構に障害が生じた場合、中間宿主の死をももたらす疾病を起こす。また、*T.gondii*原虫感染細胞の種々の殺原虫機構が活性化されれば、感染細胞内での増殖は抑制されることも知られている。

一方、ウシラクトフェリンは、乳汁、涙液、鼻汁、唾液、ならびに好中球分泌物中に含まれる分子量約80kDaの鉄結合性糖蛋白質であり、種々の生物活性（浄菌作用、免疫賦活作用、抗炎症作用、細胞増殖作用、腸管内での鉄吸収促進、および脂質の過酸化抑制など）を有していることが知られている。また、ウシラクトフェリンと約69%のホモロジーを有するヒトラクトフェリンはマウスマクロファージ内でのamastigoto期の*Trypanosoma cruzi*の増殖を抑制するという報告がある。

学位申請者田仲哲也氏の提出した論文は、マウス腹腔マクロファージ、およびマウス胎仔線維芽細胞内での*T.gondii*原虫の増殖に対するウシラクトフェリンの効果とその作用機作の解析を*in vitro*の系で検討すると伴に、*T.gondii*原虫感染マウスへのウシラクトフェリンの生体内投与の効果を*in vivo*の実験系で検討したものである。

同学位申請論文では、1) ウシラクトフェリンがマウス体細胞内での*T.gondii*原虫増殖

を抑制する効果を有することと、その効果は鉄完全飽和型、および鉄非結合型ウシラクトフェリンでも認められること、2) マウス腹腔マクロファージ内におけるウシラクトフェリンによる *T.gondii* 原虫の増殖抑制には活性酸素、ならび一酸化窒素の増加を伴わないが、L-arginine 依存系を阻害するとウシラクトフェリンによる原虫増殖抑制効果が阻害されること、3) ウシラクトフェリンによる原虫増殖抑制効果には、感染細胞中の30kDaの蛋白質のリン酸化が関与していること、4) ウシラクトフェリンの経口投与、ならびに腹腔内投与が *T.gondii* 原虫感染マウスの生存率を高めるが、その機構にはIFN- γ の関与は考えられないが、少なくとも免疫担当細胞の関与が推定出来ること、5) ウシラクトフェリンのN- 端側構成ペプチドであるラクトフェリシンは *T.gondii* 原虫に対して直接的な抗原虫作用を有し、*T.gondii* 原虫の宿主細胞への侵入性を抑え、ラクトフェリシンで予め処理された *T.gondii* 原虫はマウスに対する感染能力が低下すること、6) *T.gondii* 感染マウスへのラクトフェリシン投与もウシラクトフェリンと同様 *T.gondii* 原虫感染に対し延命効果をもたらした事などを6章にわたって論述している。各章に新しい知見がみられ、牛乳中に多量に含まれるウシラクトフェリンの利用とウシラクトフェリンの新しい生理活性作用を示した研究業績であるという評価をした。

本学位申請論文は平成9年1月20日の学位審査会に先立ち、各審委員によって十分な査読が行われ、いくつかの指摘に対し、申請者からの適切な対応がとられた。上記、学位論文の内容、研究立案の独創性、および研究結果の纏め方から判断し、かつ、学位申請論文の主要な部分が既に国際誌に掲載されていることも勘案して、審査委員全員一致で同申請論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の博士（獣医学）の学位論文として十分価値のあるものと認めた。