

氏名 (本 (国) 籍)	邱 詩 蘋 (中華民国)		
主 指 導 教 員 名	岐阜大学 准教授 高 島 康 弘		
学 位 の 種 類	博士 (獣医学)		
学 位 記 番 号	獣医博甲第 4 1 9 号		
学 位 授 与 年 月 日	平成 2 6 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	岐阜大学		
学 位 論 文 題 目	Pathogenesis of Hemolytic Serum in <i>Babesia rodhaini</i> -Infected Mice (<i>Babesia rodhaini</i> 感染マウスにおける溶血性血清の病原性に関する研究)		
審 査 委 員	主査	岐 阜 大 学 教 授	前 田 貞 俊
	副査	帯 広 畜 産 大 学 教 授	猪 熊 壽
	副査	岩 手 大 学 教 授	板 垣 匡
	副査	東 京 農 工 大 学 教 授	白 井 淳 資
	副査	岐 阜 大 学 准 教 授	高 島 康 弘

学位論文の内容の要旨

バベシアは Apicomplexa 門に属する原虫であり，ダニによって媒介され，イヌやウシなど多くの種類の動物に感染して赤血球内で増殖する。また，本原虫に感染した動物は比較的低い寄生率であっても重篤な貧血を呈することがある。感染赤血球は虫体が赤血球から脱出する際に物理的に破壊されるが，この他にも，赤血球の貪食や脾臓および肝臓における赤血球凝集といった血管外溶血につながる現象もバベシア感染時に亢進する。さらに，*B. gibsoni* 感染犬の血清が本原虫に感染していない健康なイヌの赤血球を破壊することが知られており，溶血性因子の存在が重篤な貧血につながっているものと考えられている。しかしながらこのような溶血性因子による赤血球破壊の機構については未知の部分が多い。これまでにイヌやウシのバベシア症において，赤血球を認識する自己抗体が生産されることや，感染血清が赤血球を破壊することが報告されている。本研究ではまず，このような現象が *B. rodhaini* に感染した C57/BL6 マウスにおいても見られることを確認した。そしてこの点が確認できたので，このマウスモデルを用い，溶血性血清がバベシアの病原性にどのように関与しているのか *in vitro* と *in vivo* の両面から検証した。過去の研究から，血清中の溶血性因子として抗赤血球自己抗体と活性酸素種の可能性が考えられる。

第一章では，これら二つの要因のうちいずれが *in vitro* における溶血現象の要因になっているのか，以下の通り検証した。まず複数の感染血清について抗赤血球自己抗体の濃度と溶血活性の強さについて相関関係を調べたところ，有意な相関は見られなかった。したがって，観察された溶血活性は自己抗体によるものではないものと考えられる。一方 *B.*

rodhaini 感染マウス血清による溶血は、古典的な抗酸化酵素であるカタラーゼを添加することで阻害され、*in vitro* での溶血現象は標的となる赤血球の酸化障害によるものと考えられる。ところが *B. rodhaini* 感染によってマウス血清中の超酸化物濃度は上昇せず、また各血清検体中の超酸化物濃度と溶血活性の強さにも相関関係が見られなかった。このことから、血清中に存在する超酸化物が溶血の原因になっているとは考えにくく、むしろ赤血球が持つ抗酸化能力の低下が溶血につながっているものと考えられた。そこで感染マウスの血清が健全赤血球の抗酸化機構にどのように影響するか検証し、健康なマウスから採材した赤血球を *B. rodhaini* 感染マウスの血清にさらすと、赤血球が持っていたカタラーゼ活性が低下するということを明らかにした。このようなカタラーゼ活性の低下により赤血球内部に超酸化物が蓄積し、それが溶血につながっているものと考えられる。

第二章では、*B. rodhaini* 感染マウスの血清が生体内でどのような病原性を示すか検証した。まず *B. rodhaini* 感染後の抗赤血球 IgG および IgM の動態を観察したところ、感染 6 日後に抗赤血球 IgM の産生が認められた。これは *B. rodhaini* 感染の初期段階で赤血球抗原に対する一次免疫応答が起こったことを示している。これまでも *B. gibsoni* に感染したイヌや *B. bigemina* に感染したウシが抗赤血球自己抗体を産生することは知られていた。しかしこのような抗体の出現が、酸化障害を受けた赤血球や老化した赤血球の抗原を認識する記憶 B 細胞の再活性化によるものか、あるいは赤血球抗原に対する一次免疫応答が起こった結果なのかは分からなかった。本研究により、バベシア感染が赤血球抗原に対する一次免疫応答を惹起することが初めて示された。次にこのようにして誘導された自己抗体が生体内で赤血球を破壊する能力があるかどうか検証した。*B. rodhaini* 感染マウスのうち高濃度の抗赤血球自己抗体を含む個体数匹から血清を採取しこれを非感染マウスの尾静脈に移入したところ、移入の数日後に赤血球数が有意に減少することが確認できた。*B. rodhaini* 感染マウス血清であっても、抗赤血球自己抗体濃度の低い個体の血清ではこのような現象は起こらなかった。これらの結果は、抗赤血球自己抗体が循環血流中の赤血球を破壊する能力を有しバベシア症における病態に関与している可能性を強く示唆している。

この自己抗体について更なる研究を進めるためには、血清中から自己抗体を精製する必要がある。しかし感染血清中の自己抗体濃度が低いことや抗原との親和力が低いことが原因となり、精製は困難である。そこで第三章では自己抗体をモノクローナル抗体の形で得ることを試み、*B. rodhaini* 感染マウスの脾臓細胞からハイブリドーマを確立した。*B. rodhaini* 感染マウスの脾臓細胞からは、赤血球と反応する抗体を産生するハイブリドーマが得られた。これに対し、非感染マウスの脾臓からはこのようなハイブリドーマは得られなかった。本研究で確立された自己抗体を産生するハイブリドーマは、バベシア症の病原性を研究するための強力なツールになる。

以上の通り本研究では、*B. rodhaini* 感染マウス血清が *in vitro* で示す溶血現象についてその機序を明らかにしただけでなく、自己抗体を含む感染血清の病原性について *in vivo* で検証した。さらに自己抗体の病原性を研究する上で強力なツールとなるモノクローナル抗体を作成することができた。

審査結果の要旨

バベシアはダニによって媒介され、動物の赤血球内で増殖する原虫である。本原虫に感染した動物は比較的低い寄生率であっても重篤な貧血を呈することがあり、虫体による感染赤血球の物理的破壊以外にも貧血の原因があると考えられてきた。これまでに明らかに

なっていることとして、バベシアに感染したイヌやウシにおいて赤血球を認識する自己抗体が生産されること、感染動物の血清が *in vitro* において赤血球を破壊することがあげられる。しかし血清による赤血球破壊の機構には不明の点が多く、自己抗体および溶血性血清が生体レベルでも貧血の一因となっているかどうか不明であった。これをふまえて本学位論文では、マウスに感染するバベシアである *B. rodhaini* をモデルとし、溶血性血清がバベシアの病原性にどのように関与しているのか検証した。

学位論文の第一章では、感染動物の血清が赤血球を破壊するのは、標的となる赤血球の酸化障害によるものであることを示した。さらにこの酸化障害は血清中に存在する超酸化物によるものではなく、標的赤血球が持っていたカタラーゼ活性が低下するためであることを示した。第二章では、*B. rodhaini* 感染マウスの血清が生体内でも赤血球数を減少させることを明らかにした。さらに血清中の抗赤血球自己抗体がこの作用に深くかかわっていることを示唆した。以上の結果からバベシア感染によって誘導される自己抗体について更なる研究を進める必要性が明らかになったが、感染血清中の自己抗体を精製することは困難であった。そこで第三章では自己抗体をモノクローナル抗体の形で得ることを試み、*B. rodhaini* 感染マウスの脾臓細胞から赤血球と反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの作出に成功した。本研究で確立されたモノクローナルな自己抗体は、バベシア症の病原性を研究するための強力なツールになると思われる。本研究では、*B. rodhaini* 感染マウス血清が *in vitro* で示す溶血現象についてその機序を明らかにし、バベシア感染動物の血清が生体内で赤血球数を減少させうることを証明した。さらにこの現象に抗赤血球自己抗体が深く関与している可能性を示唆した。今後、感染動物の血清や本研究で得られたモノクローナル抗体が生体内で赤血球を破壊する機構を詳細に解明することにより、バベシア症の理解が進むものと期待される。

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があると認めた。

基礎となる学術論文

1) 題 目 : Serum of *Babesia rodhaini* infected mice down regulates catalase activity of healthy erythrocytes

著 者 名 : Chiou, S. H., Yokoyama, N., Igarashi, I., Kitoh, K. and Takashima, Y.

学術雑誌名 : Experimental Parasitology

巻・号・頁・発行年 : 132(3):327-333, 2012