

ブタ回虫 *Ascaris suum* 感染に対する発育期幼虫の防御抗原に関する研究

春日 春江

Protective antigens from larval stages of the swine roundworm *Ascaris suum*

Harue KASUGA

ブタ回虫 (*Ascaris suum*) は、ブタの小腸に寄生する重要な寄生線虫の一つである。日本の *A. suum* の寄生率はおおむね10%前後と推定されており、この寄生率には地域格差、飼育農家、年齢および季節によって差があることが報告されている。

宿主のブタでは *A. suum* の多様な発育経過に伴って多くの病態が引き起こされる。その病態は、主として肝臓に侵入した感染幼虫 (L3) による白斑病変の形成、体内移行幼虫による肺の点状出血、消化管内の成虫寄生による発育不良・経済的損失などが挙げられる。特に、虫卵孵化後のL3の侵入による肝実質の破壊や出血および癒痕化による白斑はミルクスポット milk spots と呼ばれ、と畜検査に際して廃棄の対象となるため経済的損害が大きい。

近年、*A. suum* のヒトへの感染報告例が、海外旅行および発展途上国からの入国者の著増、グルメ傾向による食生活の多様化、有機農産物の人気の高まりに伴って増加している。これらのことから、ブタ回虫症は、有機的循環型農業の見直しと復活に伴って再興した人畜共通感染症の一つとして注目されている。

ブタ回虫症の治療および駆除には、アルベンダゾール、フェンベンダゾール、レバミゾールおよびパモ酸ピランテルの抗寄生虫薬が用いられている。しかし、近年、抗寄生虫薬に対し耐性を示す寄生虫の報告がされるようになった。これまでのところ、抗寄生虫薬に耐性を示す寄生虫の存在は日本では明らかになっていないが、家畜寄生虫病対策に抗寄生虫薬が用いられている限り家畜寄生虫の薬剤耐性獲得は懸念される問題である。また、抗寄生虫薬の使用による畜産物の薬剤残留の危険も予測される問題である。これらの問題と薬剤を使用せずに生産された安全な畜産物を指向する現在の消費者ニーズを

考え合わせると、今後ますます抗寄生虫薬に頼らない新たなアプローチによる抗寄生虫対策の開発が重要になることが考えられる。

A. suum においては、種々の動物を用いた防御免疫に関する様々な免疫学的研究が行なわれている。ブタ、マウスおよびモルモットの宿主は紫外線照射によって弱毒化した成熟虫卵を経口投与すると、その後の *A. suum* 卵による攻撃感染に抵抗性を示すことが知られている。免疫効果は主に体内移行幼虫に対して発揮されるが、小腸へ達した直後の幼若虫に対しても同様な効果が示されることが知られている。また、L3を含む成熟虫卵を皮下へ接種することによって免疫が賦与できることも報告されている。これらの免疫動物では、接種された虫卵の多くは皮下で孵化し、その幼若虫の一部が肝臓を通過することなしに肺組織へ移行する。このようなモルモットは致死量の成熟虫卵で攻撃されても耐過し、体内移行幼虫の発育を阻止するかなり強い感染防御免疫が誘導されていることが報告されている。さらに、*A. suum* 成熟虫卵による感染と抗寄生虫薬の反復投与をそれぞれ数回繰り返す感染・治療免疫をされたブタでは、*A. suum* L3による肝臓の白斑形成と回収される肺内移行幼虫数が減少し、体内移行幼虫の発育が阻止されることが報告されている。そしてまた、肺内移行幼虫を培養した上清中に含まれる幼虫の分泌・排泄物を用いて、マウス、モルモットおよびブタに免疫すると、*A. suum* 感染後のL3の発育を阻止する効果が認められることも知られている。さらに、ブタにおいては *A. suum* 感染に対する肝臓の白斑病変形成の軽減や抑制などの防御能が、L3および肺内移行幼虫のクチクラ構成物を用いて免疫することによって獲得されることも報告されている。しかし、これらの種々の免疫学的試験が行われているにもかかわらず、現在まで、*A.*

A. suum 感染に対する防御を誘導する防御抗原（ワクチン抗原）分子の同定は行われておらず，その候補抗原分子の生化学的性状，抗原性および免疫学的特性についてもまったく不明の現状にある。

本研究では，*A. suum* 感染に対して有効な防御免疫を誘導する抗原（ワクチン候補抗原）を探索することを目的とし，はじめに2次元電気泳動法によって，*A. suum* 発育期幼虫であるL3および肺内移行幼虫の虫体構成タンパク質の解析を実施した。次いで，*A. suum* 免疫ブタ血清と反応する36 kDaの抗原を分離・同定し，その遺伝子クローニングとその生化学的性状について検討後，組換え36 kDa抗原を作製してその*A. suum* 感染に対する防御効果を明らかにした。

第I章 *A. suum* のL3および肺内移行幼虫の2次元電気泳動によるタンパク質性状の解析

第 章では，*A. suum* L3および肺内移行幼虫から抽出したタンパク質の2次元電気泳動を実施し，両発育期に共通および各発育期に特異的な虫体構成タンパク質を検出した。また，2種類のピオチン標識による2次元電気泳動によって，親水性および疎水性ピオチンと結合する表面タンパク質の存在を明らかにした。さらに，L3および肺内移行幼虫の親水性ピオチンと結合する表面タンパク質のスポット数の比較から，幼虫の発育に伴って，親水性表面タンパク質の数が增加することが判明した。そしてまた，疎水性ピオチンによって検出される表面タンパク質の数は，幼虫の発育に伴って，減少することも明らかになった。さらに，ウサギ免疫血清を用いたイムノブロットによる，L3および肺内移行幼虫における抗原タンパク質のスポットパターンの比較から，発育期には特異的な表面抗原が存在することが明らかになった。

第II章 ブタによって認識される*A. suum* のL3抗原および肺内移行幼虫抗原解析

第 章では，*A. suum* 成熟虫卵とフェンペンダゾール治療による感染・治療免疫を繰り返すことによって作製したブタ免疫血清を用いた2次元イムノブロットを実施し，L3および肺内移行幼虫における本血清との反応抗原について検討した。その結果，ウサギおよびブタ免疫血清によって検出される抗原のスポットパターンには違いがあり，ウサギとブタの間で*A. suum* 抗原に対する認識応答に違いのあることが認められた。すなわち，ブタ免疫血清のみと反応するL3特異的な抗原は，主として表面タンパク質ではない虫体構成タンパク質であるが，ウサ

ギで抗原として認識される肺内移行幼虫の表面タンパク質はブタでは抗原として認識されないことが判明した。また，感染・治療免疫をしたブタは*A. suum* に対して感染抵抗性を獲得していたことから，本章で同定された抗原の中に，*A. suum* に対する防御免疫を誘導できる抗原分子の存在することが示唆された。

第III章 *A. suum* L3から分離した36 kDa抗原の分子生物学的性状

第 章では，ブタ免疫血清と反応する*A. suum* L3抗原の中で，分子量36 kDa，等電点6.5タンパク質を2D-PAGEゲルから分離後，その内部アミノ酸配列を決定し，これを基に完全長の36 kDa抗原遺伝子のクローンを得ることができた。36 kDa抗原遺伝子の推定アミノ酸配列はデータベースに登録されているタンパク質情報と比較した結果，他種生物が保有するグリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ（GAPDH）と最も高い相同性を示すことが明らかになった。また，大腸菌で発現させた組換え36 kDa抗原タンパク質は，GAPDH酵素活性の測定によってグリセルアルデヒド3リン酸からエネルギー源である1, 3-ジホスホグリセレート生成を行うGAPDHとしての酵素活性を保有しており，哺乳動物由来と異なる基質pH9.2条件下において最も高い酵素活性を示すことが明らかになった。さらに，抗組換え36 kDa抗原タンパク質マウス血清を作製し，これを用いたイムノブロットによって，36 kDa抗原が*A. suum* の成熟虫卵から成虫までの各発育期の虫体抽出タンパク質に単一バンドとして検出された。このことから，36 kDa抗原がすべての発育期で発現していることが示唆された。そしてまた，N末端アミノ酸配列中にシグナル配列が認められないにもかかわらず，36 kDa抗原が成虫および肺内移行幼虫の分泌・排泄タンパク質において検出されることから，本抗原はシグナルペプチドによらない別の方法によって，細胞外および虫体外に分泌されることが推測された。さらに，*A. suum* の肺内移行幼虫および雌雄成虫を用いた免疫組織化学的観察によって，36 kDa抗原が角皮下層組織，精母細胞，精子，子宮・卵巣，腸管の上皮細胞および筋肉組織に主として局在することが明らかになった。加えて，組換え36 kDa抗原タンパク質は，*A. suum* 感染に抵抗性を示すウサギ，マウスおよびブタ免疫血清によっても認識されることが判明した。

第IV章 *A. suum* L3から分離した36 kDa抗原の感染防御効果

第 章では、*A. suum* L3から遺伝子クローニングした36 kDa抗原，すなわち*A. suum* GAPDHの組換え体をマウスに免疫後，*A. suum* の攻撃感染に対する防御誘導の有無について検討した。その結果，組換え*A. suum* GAPDHで免疫されたマウスでは，*A. suum* 成熟虫卵による攻撃感染後の回収される肺内移行幼虫数が，対照群に比べ，減少する傾向がみられ，肝臓の白斑形成および肺の点状出血病変も，対照群に比べ，著しく軽減していたことから，*A. suum* GAPDHが*A. suum* の感染に対する防御免疫を誘導する抗原であることが示された。

本研究において，2次元イムノプロット，アミノ酸配列の解析および遺伝子クローニングを組み合わせたプロテオーム解析法によって，*A. suum* の発育期幼虫の防御抗原の一つである36kDa抗原が獲得され，そのワクチン抗原としての有効性が示された。本研究で得られた成績は，従来の薬剤に代わるブタ回虫症の新しい防除技術の開発に一石を投じると共に，地球環境に配慮した家畜の感染症対策の開発および家畜の生産性の向上を通じて人類社会に貢献すると思われる。また，本研究で用いた方法は，寄生虫病に限らず他の感染症においても新たな防除技術の開発におけるモデルの一つとなることが期待される。