

寄生虫ワクチン分子の探索 豚回虫感染幼虫抗原の分子論的解析

感染症研究部・寄生虫病研究室

辻 尚利

TSUJI, Naotoshi



ワクチンと言えばウイルスや細菌感染症をすぐに連想されると思うが、欧州には立派に寄生虫ワクチンが活躍している（HuskVac）。アンプルに入った放射線照射された1,000匹の幼虫を牛に投与すれば牛肺虫症を防げるという。

寄生虫の特徴はそれぞれの種で特異な生活環を持つことであるが、実は昔から大半の寄生虫で宿主への感染ステージ虫体を免疫すると、再感染に対する防御免疫が誘導できることが知られている。本稿で紹介する豚回虫をはじめ前に私自身も犬系状虫の再感染抵抗性を経験している。蚊が伝搬する犬系状虫では、蚊体内ステージ虫体を放射線照射あるいはすりつぶして犬に免疫すると、攻撃感染した虫体はその後の発育が阻止され、免疫犬の肺には成虫がほとんど観察されなかったことを覚えている。

おそらく、この現象を聞けば誰も宿主への感染ステージ虫体にワクチン分子が存在すると気づくと思う。今から約10年前、寄生虫分野にも遺伝子クローニングの手法が導入され、私がポストドクをしていたラボでも全員で必死になって犬系状虫ワクチン抗原のcDNAハンティングに取り掛かっていた。しかし、ワクチン候補分子と称するクローンが多数分離されるものの、宿主域が限定される犬系状虫ではワクチン効果検定は犬しか使えず、結局のところ労力と研究資金が続かず真のワクチン分子は得ることができなかった。

帰国後は何としてでも生態論だけに終わらず、分子論による固有宿主で有効なワクチン分子の単離を目指した。犬系状虫での失敗を教訓に代替宿主として実験動物が利用できる寄生虫として豚回虫を選んだ。回虫といえば大半の読者がご存知かと思うが、国内では忘れられつつある寄生虫である。しかし、世界的には依然として医学・獣医学領域を問わず最も重要な消

化管内寄生線虫である。学術的にもPubMedに掲載されている回虫の論文数は寄生虫の中でトップクラスである。また、最近のレポートの傾向としてはユニークな生き物としての豚回虫を生物学の道具として捉えた研究が多くなってきている。

豚回虫の生活環は複雑である。小腸内に寄生する成虫が産卵した未成熟卵は糞便とともに体外に出され、外界で宿主への感染ステージである第3期幼虫(L3)を含む成熟卵まで発育する。成熟卵を取り込んだ豚では、L3が小腸粘膜を突破し腹腔より肝臓に進入、血流を介して肺まで達する。その後幼虫は肺胞を突破し気管に進入後嚥下によって小腸に達し成虫になる。宿主侵入時の虫体長は200 μm程度であるが成虫になると20~30cmまで成長する。複雑な移行経路はもちろんのこと豚回虫の成長には驚くばかりである。

豚回虫ワクチン分子のハンティングはL3免疫血清とL3cDNAライブラリーの作製から始まった。加えて、今で言うところのプロテオーム解析を導入し、L3の2次元電気泳動ゲルから内在性の抗原蛋白を直接取り出す方法を用いた。L3抗原の網羅的解析によってアミノ酸配列をベースに豚回虫のワクチン候補分子のcDNA単離が飛躍的に進んだ。遺伝子が取れば次は組換え抗原を作製して、動物でのチャレンジ試験である。しかし、単離したすべての組換え抗原について豚でワクチン攻撃試験を実施するのは前述のように非常に難しい。

豚回虫は許容宿主の範囲が非常に広い。その一例として、豚舎を改装した牛舎で豚回虫による牛の集団死亡例がある。実験動物から家畜まで宿主と成り得ることから、マウスも豚の代替宿主となり豚回虫L3の再感染抵抗性も再現できる。

単離したcDNAをもとに作製した組換え抗原は、約30分子以上になった。それぞれの抗原をマウスに

図1．鼻腔滴下による粘膜免疫



図2．As16の経鼻免疫で誘導される鼻粘膜As16特異IgA抗体(左)及び血清As16特異IgG抗体(右)

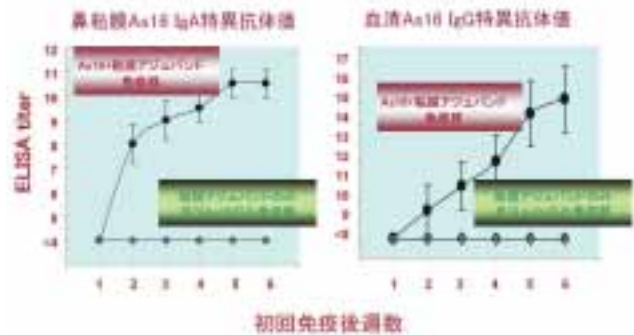
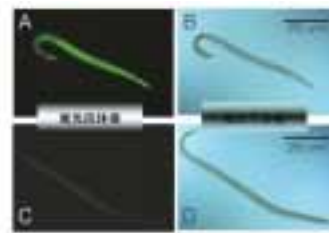


図3．As16特異IgG抗体による幼虫期虫体の発育障害



A,Bは脱皮障害を受けた肺内幼虫を示す。緑色蛍光はAs16特異IgG抗体を示す。C,Dは正常に発育した肺内幼虫。肺内幼虫ステージ前期の虫体に対しては死滅作用を示す。

免疫し豚回虫攻撃試験を実施した結果、As14(Infect Immune 69, 7285)とAs16(Infect Immune 71, 5314)がワクチン候補分子として同定することができた。さらに免疫方法の検討によって、この2つの分子は経鼻免疫でより防御効果が上がることが分かった。詳細については上記のレポートをご覧ください。許容宿主ではあるがワクチン候補分子が同定できたことはマウス-豚回虫感染系の存在が大きかったと言える。

許容宿主のマウスで実証されたワクチン分子が本当に固有宿主でも有効なのか。この問題解決にはどうしても固有宿主である豚で攻撃試験を実施するしかない。そこで、豚での豚回虫感染実験に精通した先輩方のご協力のもと、As16の効果を見ることにした。As16を選んだのは、人回虫にも全く同じ分子が存在することから人回虫症のワクチン分子にも成り得るのではないかと考えたからである。粘膜アジュバンドとAs16組換え抗原を鼻腔に滴下(図1)した免疫群では、As16特異IgGとIgA抗体の上昇が確認された(図2)。攻撃感染の結果、As16免疫豚では無処置群と比較して肺までの幼虫移行阻止率約60%であることが分かった。As16免疫豚内の移行途中で虫体が何らかの障害を受けていることが推察された。

免疫組織化学によって内在性As16は消化管上皮細胞及びククラ下層で発現・分泌していることが確認されたが、As16の生物学的機能はいまのところ分かっていない。そこでAs16免疫豚からAs16特異IgG抗体を精製し、豚回虫の*in vitro*培養系に添加してみることにした。その結果、図3のように

As16特異IgG抗体はL3を死滅させ、体内移行末期で発育した肺内の幼虫に対してはL4への脱皮阻止に働くことがわかった。As16特異IgG抗体が内在性As16に結合し、虫体の生理機能が抑制された結果、移行幼虫が死滅したと考えられる。肺を通過した虫体(L4、成虫)には何ら影響は認められていない。データベースで調べる限りAs16は哺乳動物には存在しない蛋白質で、回虫類だけがもつことから回虫の生残に必須な生理活性分子であると考えている。豚でのAs16ワクチン試験とAs16特異IgG抗体による豚回虫の幼虫障害に関するレポートはJournal Infectious Diseases(2004): 190, 1812をご覧ください。

豚回虫の許容宿主についてはすでに本稿でふれたがヒトも豚回虫に感染する。最近、有機農法や集約的な畜産形態の導入により農畜産物に混入した豚回虫成熟卵を摂取したヒトの幼虫移行症が国内で発生し、豚回虫が新たな人獣共通寄生虫として注目されている。また、駆虫薬などの化学療法剤使用の低減が求められている中、環境にやさしい寄生虫制圧法の開発・導入が必要となってきた。寄生虫に由来するAs16のような生物活性分子は時代のニーズに合った寄生虫コントロールに貢献できると考える。

本研究実施にあたりご協力いただいた実験動物管理科及び衛生検査科のみなさんに感謝いたします。本稿で紹介した研究は生研機構の新技术・新分野創出のための基礎研究推進事業-若手研究者支援型によって実施された。