

# 自殺原虫による多機能ワクチンの開発研究

## 研究室

先端予防治療学研究分野  
Research Unit for Advanced Preventive Medicine

## 事業推進 担当者

杉本 千尋 (Chihiro Sugimoto), 河津信一郎 (Shin-ichiro Kawazu), 井上 昇 (Noboru Inoue)

## 異動先 (異動先ポジション)

杉本千尋, 北海道大学人獣共通感  
染症リサーチセンター

## 研究室 ホームページ

<http://www.obihiro.ac.jp/~tryp>

## 研究要旨

細胞外寄生性原虫であるトリパノソーマを用いて作製したプロトタイプの誘導致死変異原虫（自殺原虫ワクチン）を更に発展させ、細胞内寄生原虫ではトキソプラズマを用いて自殺原虫を作製し、試験管内での致死誘導試験、実験動物を用いた効果試験を行う。本研究の過程で原虫ワクチンとしての応用のみならず、様々な宿主-原虫相互作用(免疫応答・免疫回避・細胞侵入・細胞脱出など)を解析する上で優れた実験系として機能することが期待される。また、簡便高感度な診断法が開発が世界的な急務である熱帯原虫病について、LAMP法を応用した画期的診断法を開発を行う。

## 多機能ワクチンの開発研究

弱毒生ワクチン原虫株の安全性を向上する目的で、ワクチン原虫を遺伝子改変し、致死遺伝子発現あるいは必須遺伝子のRNA干渉を誘導的に制御できるようにする。得られたワクチン原虫は免疫誘導時には通常の生ワクチンとして効果的な防御免疫を確立し、免疫誘導後は致死遺伝子またはRNA干渉の誘導によって完全に宿主動物体内から排除することができる。

本研究計画でははじめに、トキソプラズマの宿主細胞侵入に必須であるTgMIC2をテトラサイクリン誘導性に過剰発現するトキソプラズマを作成し、その細胞侵入能および病原性を精査した。その結果、TgMIC2過剰発現トキソプラズマは細胞侵入能および病原性が低下し、弱毒化されていることが明らかとなった。弱毒化はTgMIC2の翻訳後修飾あるいは細胞内ソーティングの以上によると考えられた。成果は国際学術誌に投稿中である。トキソプラズマに対する誘導的RNA干渉ベクターの構築に関しては、すでに構築が完了した非誘導的RNA干渉ベクターにテトラサイクリンオペレーターを導入し、誘導的RNA干渉ベクターへと改良する予定であったが、組換えプラスミドを得ることができなかったため、期間内に終了できなかった。研究を担当したポストドク研究員は現在タイ国マヒドン大学に常勤の職を得、感染症に関する応用研究を行っている。

## LAMP法を用いた原虫病迅速簡便診断法開発

Loop-mediated isothermal gene amplification法(LAMP法)は等温反応で高感度かつ特異的に標的遺伝子を増幅する方法である。検出感度はPCR法と同程度だが、高価な反応装置を必要とせず、1時間以内に反応が終了することから病原体検出への応用が期待されている。現在熱帯原虫病流行地では顕微鏡検査などの安価ではあるが感度や正確度に問題のある診断技術が主として利用されている。PCR法は高感度かつ正確な原虫病診断法として有望であるが、複雑な反応系と高価な反応装置が必要であるため開発途上国などではほとんど利用されていない。そこで我々の研究グループでは反応がシンプルで高価な装置も必要が無いLAMP法を熱帯原虫病の診断手法として確立するべく、海外研究協力者と共同で開発研究を実施した。これらの成果の一部は国際学術誌に報告済みである。特にLAMP法を用いたアフリカトリパノソーマ検出法の開発に関しては良好な成績が得られたので、米国NIHグラント申請(2007年申請中)、スイスに拠点を置く熱帯病(結核、アフリカトリパノソーマ、マラリア)診断法開発財団、Foundation for Innovative New Diagnostics (FIND)研究プロジェクト申請(2007年採択)、OIEリファレンスラボ申請(2007年採択・トリパノソーマ診断に関する責任者は井上)などの国際共同研究に発展した。今後もLAMP法を用いた熱帯原虫病診断法開発国際拠点として我々の研究グループが主導的役割を担っていくことが期待できる。

## 発表論文

著者名	論文タイトル	掲載雑誌	巻	ページ	発行年
Namangala, B., Inoue, N. and Sugimoto, C.	Effects of exogenous transforming growth factor-beta on Trypanosoma congolense infection in mice	Infection and Immunity		印刷中	
Thekisoe, O. M. M., Inoue, N., Kuboki, N., Tuntasuvan, D., Bunnoy, W., Borisutsuwan, S., Igarashi, I. and Sugimoto, C.	Evaluation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP), PCR and parasitological tests for detection of Trypanosoma evansi in experimentally infected pigs	Veterinary Parasitology	130	327-330	2005
Witola, W. H., Inoue, N., Ohashi, K. and Onuma, M.	RNA-interference silencing of the adenosine transporter-1 gene in Trypanosoma evansi confers resistance to diminazene aceturate	Experimental Parasitology	107	47-57	2004
Kumar, S., Yokoyama, N., Kim, J. Y., Huang, X., Inoue, N., Xuan, X., Igarashi, I. and Sugimoto, C.	Expression of Babesia equi EMA-1 and EMA-2 during merozoite developmental stages in erythrocytic membrane skeleton	Molecular and Biochemical Parasitology	133	221-227	2004
Kuboki, N., Inoue, N., Sakurai, T., Di Cello, F., Grab, D. J., Suzuki, H., Sugimoto, C. and Igarashi, I.	Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and its application for the detection of African trypanosomes	Journal of Clinical Microbiology	41	5517-5524	2003

### 細胞骨格遺伝子の発現抑制による自殺型原虫の作製

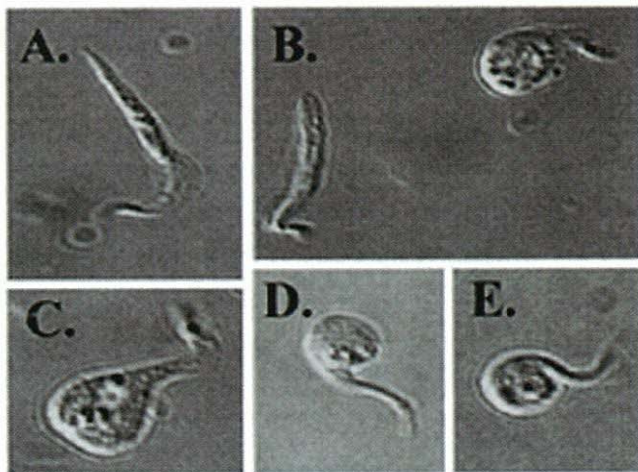


図1：細胞骨格タンパク質の一つであるチュプリンのmRNAををRNA干渉法によってノックダウンし、自滅させたトリパノソーマ原虫の形態変化。正常型 (A), 正常型 (B左) と自滅型 (B右), 自滅型 (C, D, E)

### LAMP法によるトリパノソーマ感染の高感度検出

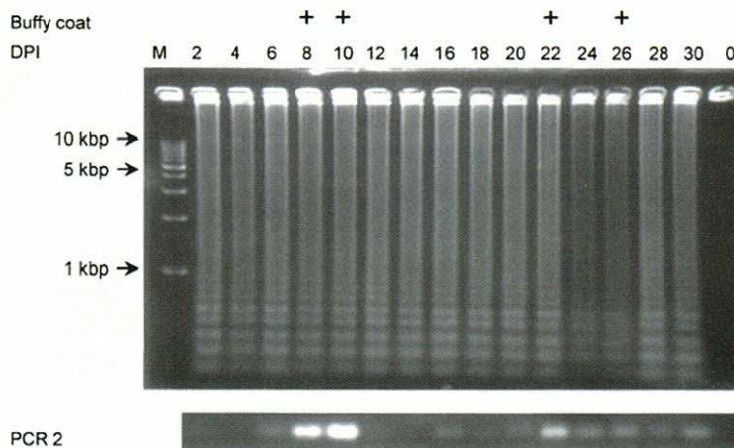


図2：トリパノソーマ感染後30日間、1日毎に感染マウスから血液を採取し、顕微鏡検査 (図上段・Buffy Coat), LAMP法 (図中段), およびPCR法 (図下段・PCR2) の検出感度を比較した結果, LAMP法が最も検出感度が高かった。