平成２４年度　成績概要書

研究課題コード：5102-514532（一般共同研究）、5102-514522（一般共同研究）、414513（共同（民間））

１．研究成果

１）研究成果名：育成牛を用いたネオスポラ実験感染に対するリポソームワクチンの効果
（**予算課題名**：牛の原虫感染症に対するリポソームワクチンの効果（H23））
（**予算課題名**：牛ネオスポラ感染に対するリポソームワクチンの効果（H22））
（**予算課題名**：牛ネオスポラ感染モデルの作出（H21））

２）キーワード：牛、ネオスポラ、リポソームワクチン

３）成果の要約：ネオスポラ抗原を封入したリポソームワクチンを育成牛に 4 週間隔で 2 回接種すると、血清中ネオスポラ特異抗体の産生とネオスポラ特異的リンパ球応答が誘導され、ネオスポラ実験感染初期の血清中 IFN-γ 濃度の上昇が抑制されるとともに脳内ネオスポラ数が減少し、本ワクチンの有効性が示された。

２．研究機関名

１）担当機関・部・グループ・担当者名：畜試・基盤研究部・家畜衛生 G・研究主査　小原潤子

２）共同研究機関（協力機関）：帯広畜産大学原虫病研究センター、共立製薬株式会社

３．研究期間：平成 21～23 年度　（2009～2011 年度）

４．研究概要

１）研究の背景

ネオスポラは牛の流産の主要な原因となる細胞内寄生性原虫であるが、牛のネオスポラ感染に対する有効な治療薬はなく、流産を予防するワクチンの開発が必要とされている。ネオスポラは細胞に寄生するため、細胞性免疫が感染防御の主体となる。したがって、液性免疫であるネオスポラ特異抗体の産生だけでなく、細胞性免疫であるネオスポラ特異的リンパ球の活性化などの免疫応答を誘導することがワクチン設計の鍵となる。オリゴ糖リポソーム（脂質二重膜）は、抗原タンパクを封入して生体に投与すると、抗原特異的な液性免疫と細胞性免疫を効率よく誘導できることが知られている。ネオスポラ抗原を封入したリポソームワクチンは、マウスの実験感染に対して垂直感染の防御効果が示されており、牛への応用が期待されている。

２）研究の目的

牛のネオスポラ感染に対する細胞性免疫応答を誘導するワクチンを開発するために、ネオスポラ抗原を封入したリポソームワクチンを試作し、牛におけるワクチン効果を検討する。

５．研究方法

１）育成牛を用いたネオスポラ実験感染

・**ねらい**：ネオスポラを実験感染させた育成牛における免疫応答の解析により、ワクチン効果を評価するための検査項目について検討する。

・**調査項目等**：ネオスポラ抗体陰性の育成牛（ホルスタイン種雄牛、3～4 か月齢）4 頭（No.1～No.4）にネオスポラ原虫 5×10^7 個あるいは 1×10^7 個を各 2 頭に静脈内接種し、血清中のネオスポラ特異抗体と IFN-γ 濃度の測定、および臓器からのネオスポラ遺伝子の検出を行った。

２）育成牛を用いたネオスポラ実験感染におけるリポソームワクチンの評価

・**ねらい**：ネオスポラ抗原を封入したリポソームワクチンを接種した育成牛にネオスポラを実験感染させ、ネオスポラ感染に対するワクチン効果を評価する。

・**試験項目等**：ネオスポラ抗体陰性の育成牛（ホルスタイン種雄牛、3～4 ヵ月齢）13 頭を 3 群に分け、①ワクチン 50μg 群 4 頭（No.5～No.8）、②ワクチン 200μg 群 4 頭（No.9～No.12）；ネオスポラ抗原を封入したリポソームワクチンを各々50μg/頭または 200μg/頭を 4 週間隔で 2 回皮下接種、③コントロール群 5 頭（No.13～No.17）；ワクチン非接種とした。ワクチン 2 回目接種後 4 週目に全頭にネオスポラ原虫 1×10^7 個を静脈内接種により実験感染させ、血清中のネオスポラ特異抗体とネオスポラ特異リンパ球の応答性、血清中 IFN-γ 濃度の測定および脳からのネオスポラ遺伝子の検出を行った。

６．研究の成果

１）育成牛にネオスポラ原虫 5×10^7 個あるいは 1×10^7 個を静脈内接種すると、血清中ネオスポラ特異抗体の上昇、血清中 IFN-γ 濃度の一過性の上昇が認められた。さらに脳からネオスポラ遺伝子が検出され、感染が成立していた。ワクチン効果は、ワクチン接種による血清中特異抗体の上昇、実験感染後の血清中 IFN-γ 濃度の一過性の上昇抑制および脳内ネオスポラ遺伝子量の減少により評価できると考えられた。

２）リポソームワクチンを 2 回接種することにより、血清中ネオスポラ特異抗体の産生（図 1）およびネオスポラ特異的リンパ球の応答が誘導され（表 1）、実験感染後の血清中 IFN-γ 濃度の上昇が抑制された（図 2）。これらのことから、ネオスポラに特異的な液性免疫および細胞性免疫が誘導できたと考えられた。さらに、脳内ネオスポラ遺伝子量が減少し、リポソームワクチンが実験感染に対する一定の防御効果を示したと考えられた（図 3）。

＜具体的データ＞

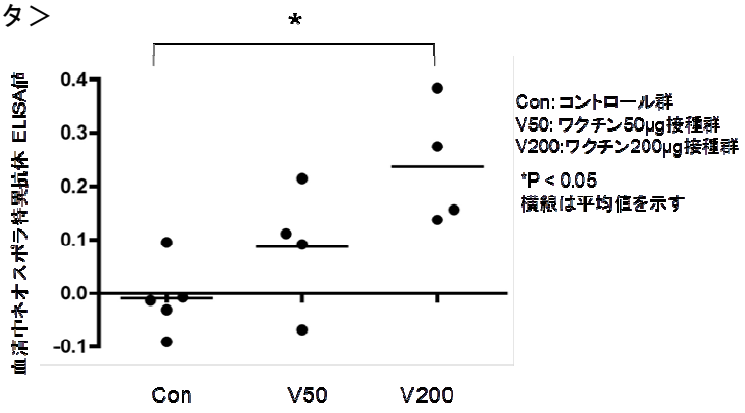

図１　ワクチン２回目接種後２週目における牛の血清中ネオスポラ特異抗体

表１　ワクチン接種後における牛末梢血リンパ球の反応性

ワクチン 50μg 接種群		ワクチン 200μg 接種群		コントロール群	
牛 No.	IFN-γ濃度比	牛 No.	IFN-γ濃度比	牛 No.	IFN-γ濃度比
No.5	4.12	No.9	11.68	No.13	2.04
No.6	5.76	No.10	2.14	No.14	1.17
No.7	11.27	No.11	>1000	No.15	1.82
No.8	4.75	No.12	8.52	No.16	ND
				No.17	ND

IFN-γ 濃度比：ネオスポラ抗原刺激下 IFN-γ 濃度/無刺激下 IFN-γ 濃度
ND：非検出

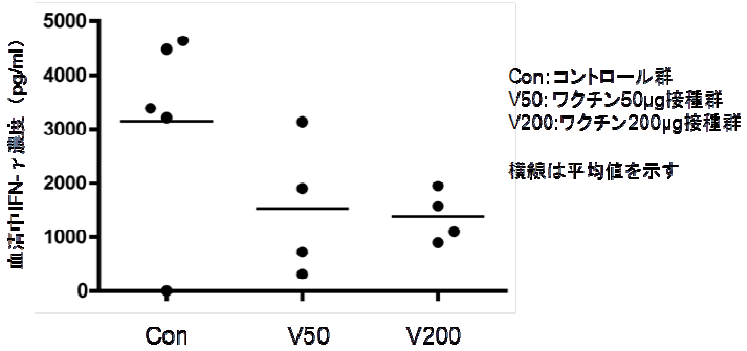

図２　ネオスポラ接種後３日目における牛の血清中 IFN−γ 濃度

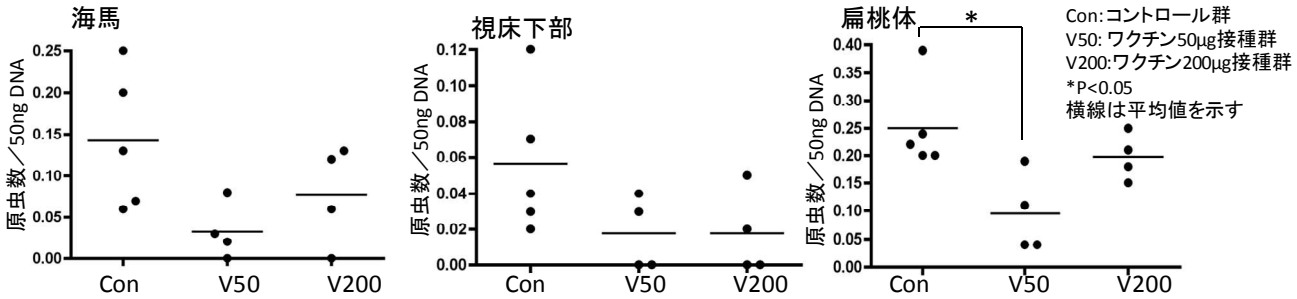

図３　ネオスポラ感染後２ヵ月目における牛の脳内ネオスポラ数

７．成果の活用策

１）成果の活用面と留意点

本研究の成果は、ネオスポラ症による流産を予防するワクチン開発研究に活用する。

２）残された問題とその対応