

Summary in Japanese

論文の内容の要旨

獣医学 専攻

平成 22 年度博士課程 入学

氏名 村越 ふみ

指導教員名 堀本 泰介

論文題目 Molecular analyses and epidemiology of *Cryptosporidium* and the symbiotic virus of this parasite

(クリプトスポリジウム原虫及び本原虫内在性ウイルスの疫学と分子生物学的解析)

Cryptosporidium の中でも、特に *Cryptosporidium parvum* (以下 *C. parvum*) は、水系伝播によりヒトで重篤な下痢症を呈し、家畜に対し生産性の低下および斃死を引き起こす。これはアピコンプレクサに属する人獣共通感染原虫であり、獣医・畜産学領域で極めて重要である。新興感染症である本原虫症は発展途上国のみならず先進国でも深刻な問題であり、米国でのヒトへのクリプトスポリジウム感染推定件数は年間 740,000 件にも上る。日本でも、1996 年に埼玉県で 9,140 人の集団感染が発生している。しかし、有効な治療薬は存在しない。しかし、本原虫を扱える施設や使用できる分子生物学的ツールが限られているため、まずは疫学や病原性などの基礎データの蓄積が重要である。

そこで、本研究ではクリプトスポリジウム原虫及び本原虫共生ウイルスの疫学と分子生物学的解析に着目し、解析を行った。

第一章では、本原虫と近縁のコクシジウム治療に使用されている薬剤である「ラサロシド」の仔牛への投与試験を行った。クリプトスポリジウムが蔓延している農場において、生後間もない仔牛に本薬剤の予防的投与を行い、本原虫に与える影響を調査した。その結果として、ラサロシドを生後間もない仔牛に投与すると、投与期間中はクリプトスポリジウム排出を抑えることが明らかとなった。更に、現場で使用する際に問題となっていた、副作用が起こらない濃度を明らかにすることができた。本薬剤はイオノフォアであるため、ルーメン微生物叢に多少の影響を与えられらるが、生後間もない仔牛はルーメンが発達していないため、投薬中も大きな問題は生じない。従って、本薬剤は、本原虫に感受性の高い仔牛の予防薬に成りうる。

本原虫の分類体系は未だ整理されておらず、本邦における疫学調査も不足している。そこで、第二章では北海道石狩地区の仔牛の疫学調査を行った。結果として *C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae* の三種のクリプトスポリジウムを検出した。筆者は糞便から直接原虫の DNA を抽出することにより、精度の高い検出系を用いることにより、北海道で初めて *C. ryanae* を検出した。*C. parvum* 感染と仔牛の下痢には相関がみられ、*C. parvum* のサブタイプは IIaA15G2R1 であった。これは第一章において愛知県で検出された仔牛の *C. parvum* のサブタイプと同様であった。

第一章、第二章において行われた *C. parvum* のサブタイピングは、60 kDa glycoprotein (GP60) 遺伝子によって行われる。これは *C. parvum* の病原性と関連性があると言われていたが、本邦においては全て IIa サブタイプであることが知られているため、感染源の推定や病原性との関連性を明らかにするために、新たなサブタイピング遺伝子が求められている。そこで第三章では本原虫に感染している dsRNA virus として報告されている *Cryspovirus* に注目した。本原虫ウイルスはポリメラーゼをコードする dsRNA1 とカプシ

ドをコードする dsRNA2 を持つウイルスである。そこで、筆者はカプシドタンパク質の局在解析および本ウイルスの疫学及び分子生物学的調査を行った。本ウイルスカプシドタンパク質の抗体を作成し、本原虫の感染型ステージであるスポロゾイトにおいて、カプシドタンパク質である dsRNA2 は原虫細胞質全域にドット状に存在していることが明らかとなった。日本の標準株である HNJ-1 株および、ウシ糞便から採取した北海道、岩手、種子島、沖縄由来の *C. parvum* 陽性検体における *Cryspovirus* の dsRNA 配列から系統樹を作成した。系統解析によって、日本のサンプルはクレードを形成し、更に細かく解析を行うと、ブートストラップ値の支持率は低いながらも、大きく本州、北海道のサブクレードに分かれた。更に、同農場のサンプルは同一のサブクレードに属した。以上から、*Cryspovirus* dsRNA を用い、*C. parvum* 感染地の推定が行えることが示唆された。

第一章、第二章、第三章において本原虫の精度の高いサブタイピングが行えることが示唆されたため、更に本原虫の分子機序およびそれを基にした薬剤探索のため、第四章ではエピジェネティクスに注目した。本原虫に近縁であるマラリア原虫やトキソプラズマにおいて、ヒストン修飾が病原性にかかわる因子の発現制御や伝播における形態の変換に密接に関わっているということが報告されている。本原虫のエピジェネティクス機構については報告がないが、エピジェネティクス阻害剤であるヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の増殖阻害効果が報告されているため、筆者は本原虫のヒストン修飾およびヒストン修飾酵素の解析を行った。その結果、本原虫の侵入形態であるスポロゾイトステージにおいて、遺伝子発現抑制的なヒストン修飾は検出されなかった。さらに、H4K20me3 の修飾を今後調べることにより、本原虫のセントロメア領域が明らかになること、本原虫のメチル化修飾酵素が薬剤ターゲットとなりうることが示唆された。

本論文において筆者はクリプトスポリジウムの疫学と分子生物学的解析を行った。本原虫共生ウイルス RNA 配列を用いることで、本邦において全て同サブタイプとして区別する

ことができなかつた *C. parvum* を精度高くサブタイピングできることを示した。更に、イオノフォアであるラサロシドが仔牛のクリプトスポリジウム予防に使用できること、メチル化修飾酵素が分子生物学的機序に基づいた本原虫の薬剤ターゲットとなりうることを明らかにした。今後、本データが本原虫の薬剤開発および病原性の解明に寄与することが期待される。