

審査の結果の要旨

氏名 村越 ふみ

Cryptosporidium の中でも、特に *Cryptosporidium parvum* (以下 *C. parvum*) は、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となっている。本原虫は形態学的な分類が不可能であるため、疫学や病原性などの基礎データの蓄積が不十分であること、有効な治療薬が存在しないことが大きな課題である。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、薬剤探索に向けた分子生物学的解析に着目し、解析を行った。

第一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。*C. ryanae* は北海道初検出であった。*C. bovis* および *C. ryanae* と下痢には相関がみられず、二種の仔牛に対する病原性は低いことが示唆された。*C. parvum* のサブタイプは IIa サブタイプであった。*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るが、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、進化や宿主の移動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。そこで第二章では、本原虫に感染している dsRNA virus として報告されており、病原性とも関係があると報告される *Cryspovirus* に注目した。結果として、*C. parvum* 陽性サンプル全てにおいて *Cryspovirus* が検出され、本ウイルスが原虫の疫学に用いることができることが示唆された。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 ML 系統樹を作成した。日本のサンプルはクレードを形成し、本ウイルス配列によって、由来国が明らかになることが示唆された。更に細かく解析を行うと、系統樹は大きく北海道、北海道以外のクレードに分かれた。更に、北海道以外のクレードは、岩手および沖縄・種子島サブクレードに分かれ、沖縄サンプルもまとまったクレードを形成した。以上から、*Cryspovirus* dsRNA を用い、*C. parvum* 感染地の推定が行えることが明らかとなった。スポロゾイトにおいて、カプシドタンパク質は原虫細胞質全域にドット状に存在していた。従って、疫学解析に用いることができることが示唆された。

第三章では、本原虫の治療を目的とし、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、本薬剤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。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。しかしながら、本薬剤をヒトに用いることは現実的ではないため、第四章ではエピジェネティクス阻害剤に注目した。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おり、エピジェネティクス阻害剤は原虫の生育を抑えるという報告が存在する。そこで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、本原虫にはヒストン修飾が存在することがはじめて明らかになった。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いこと、スポロゾイトおよび細胞内ステージにおいては遺伝子発現を活性化すると考えられる修飾が検出されること、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が示唆された。更に、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明らかとなった。

以上のように、本研究はクリプトスポリジウムにおいて有用なサブタイピング遺伝子および薬剤が存在しない問題について、有用なサブタイピング遺伝子、薬剤候補を明らかにすることに成功しており、これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値あるものと認めた。