

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2019-116454
(P2019-116454A)

(43) 公開日 **令和1年7月18日(2019.7.18)**

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	4 C 0 8 5
A 6 1 P 33/02 (2006.01)	A 6 1 P 33/02	4 H 0 4 5
A 6 1 K 39/002 (2006.01)	A 6 1 K 39/002	
C 0 7 K 14/44 (2006.01)	A 6 1 P 33/02 1 7 1	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 14/44 Z N A	
審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 12 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2017-252032 (P2017-252032)
(22) 出願日 平成29年12月27日 (2017.12.27)

(71) 出願人 504300088
国立大学法人帯広畜産大学
北海道帯広市稲田町西2線11番地
(72) 発明者 西川 義文
北海道帯広市稲田町西2線11番地国立大
学法人帯広畜産大学内
(72) 発明者 ラガブ マッハルーフ マハムッド フェ
レイク
北海道帯広市稲田町西2線11番地国立大
学法人帯広畜産大学内
Fターム(参考) 4C085 AA03 AA38 BA02 CC07 CC21
DD62 EE01 EE06 FF13 FF18
GG04 GG05 GG08 GG10
4H045 AA10 AA30 BA10 BA41 CA20
DA89 EA20 FA74

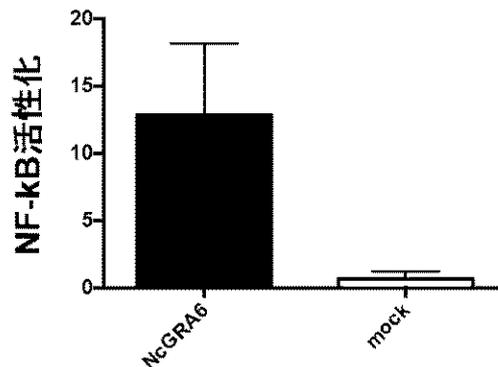
(54) 【発明の名称】 アジュバント

(57) 【要約】

【課題】 ワクチン効果を高めることができる新規なアジュバントを提供すること。

【解決手段】 ネオスポラ原虫 (*Neospora caninum*) 由来の蛋白であって、高密度顆粒6 (dense granule protein6 : NcGRA6)、もしくはグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) との融合蛋白質を含むことを特徴とするアジュバント。NcGRA6はニュークリアファクター-カッパーB(NF- B)を誘導することによってアジュバント効果を発揮する。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ネオスポラ原虫 (*Neospora caninum*) 由来の蛋白であって、高密度顆粒 6 (dense granule protein 6 : NcGRA6) もしくはグルタチオン S トランスフェラーゼ (GST) との融合蛋白質 (NcGRA6 + GST) を含むことを特徴とするアジュバント。

【請求項 2】

NcGRA6 が、

- (a) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含む蛋白質、あるいは
- (b) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において 1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質であることを特徴とする請求項 1 に記載のアジュバント。

10

【請求項 3】

NcGRA6 + GST が、

- (a) 配列番号 3 に示されるアミノ酸配列を含む蛋白質、あるいは
- (b) 配列番号 3 に示されるアミノ酸配列において 1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質であることを特徴とする請求項 1 に記載のアジュバント。

【請求項 4】

ニュークリアファクター - カッパー B (NF - B) を誘導することを特徴とする請求項 1 から請求項 3 に記載のアジュバント。

20

【請求項 5】

請求項 1 から請求項 4 のいずれか 1 項に記載のアジュバントを含むワクチン製剤。

【請求項 6】

アジュバント機能を持つ請求項 1 から請求項 4 のいずれか 1 項に記載のアジュバント機能を持つ NcGRA6、もしくは NcGRA6 + GST を抗原とするネオスポラワクチン。

【請求項 7】

さらに製薬上許容しうる担体を含む、請求項 5 もしくは請求項 6 に記載のワクチン製剤。

30

【請求項 8】

皮下、皮内、経口又は経鼻投与されるものである、請求項 7 に記載のワクチン製剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はアジュバント機能を持つネオスポラ原虫 (*Neospora caninum*) 由来の高密度顆粒 6 (dense granule protein 6 : NcGRA6) とその利用に関する。

【背景技術】

【0002】

ワクチンは数々の感染症を予防するのに非常に有効な手段であり、アジュバントはその予防効果を増強する補助剤として用いられている。従ってワクチンの接種回数を少なくし、かつ長期間にわたって効果を持続させることのできるアジュバントの開発が重要である。

40

【0003】

ワクチンの接種に際して、アジュバント機能を持つ組換え微生物やリポソームを用いる例が知られている。特許文献 1 はオリゴマンノース被覆したリポソームにネオスポラ原虫由来の高密度顆粒 7 (NcGRA7) を封入したネオスポラワクチンを開示している。また非特許文献 2 は NcGRA6 遺伝子を導入した組換え *Brucella abortus* をベクターに用いた場合のネオスポラワクチンの効果を報告している。しかしながら、

50

ベクター自身の病原性やドラッグデリバリーシステムのコスト面が課題となっている。

【0004】

ネオスポラ原虫は犬科動物を終宿主とし、牛、羊、山羊、鹿などを中間宿主とする細胞内寄生性原虫である。終宿主の糞便中に排出されるオーシストによる水平感染や中間宿主における垂直感染により伝搬される。特に牛には流産、死産或いは子牛の神経症状を主徴とする異常産を高率に引き起こす。欧米諸国の報告では、牛の流産の約40%の原因はネオスポラ原虫感染によるものとされている。ネオスポラ原虫の垂直感染は何世代にも渡り成立し、このことが本原虫の感染拡大の最大の原因として挙げられる。実際、ネオスポラ原虫の感染例が世界中で報告されており、日本においてもその発生が深刻である。畜産業界では、ネオスポラ原虫が感染した母牛を搾乳に供することができない場合が多く、子牛と搾乳量の損耗などにより、その発生による経済的損失は極めて大きい。地球規模での被害額は年間約数十億USドルにのぼるとの試算もある。

10

【0005】

妊娠時の感染は、母体特有の免疫応答により、流産や垂直感染を引き起こす。すなわち、妊娠初期にネオスポラ原虫が感染した場合、母体の免疫反応により流産が誘発される。また、母体が免疫抑制状態になっている妊娠中期にネオスポラ原虫が感染した場合、胎児への垂直感染が成立し、先天的にネオスポラ原虫に感染している個体が生まれてくる。

【0006】

これまでに、牛のネオスポラ症を対象に、不活化ワクチンや生ワクチンを用いたネオスポラ原虫に対するワクチン開発がいくつか試みられてきた。不活化したネオスポラ原虫とアジュバントとしてPOLYGENを用いた場合、胎児への感染を防ぐことはできなかった。不活化したネオスポラ原虫とアジュバントとしてHAVLOGENを用いた場合、ニュージーランドでは5.2%から54%の予防効果、コスタリカでは46%の予防効果が報告されている(非特許文献1)。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】再表2010-032408

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Dubey J P. et al., *Clinical Microbiology Reviews*, 2007, 20: 323 - 367

【非特許文献2】Ramamoorthy S. et al., *Int. J. Parasitol.* 2007, 37: 1521 - 1529

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明の課題は、ワクチンの機能、特にネオスポラワクチンの機能を増強させるアジュバントを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

40

【0010】

本発明者らは、上記の課題を解決すべく鋭意検討した結果、NcGRA6が免疫反応の増強に必須なニュークリアファクター - カッパーB (Nuclear factor- κ B)を誘導するとともに、NcGRA6自体がネオスポラ原虫に対してワクチン効果のあることを見出し、本発明を完成させた。

【0011】

(1) ネオスポラ原虫 (*Neospora caninum*) 由来の蛋白であって、高密度顆粒6 (dense granule protein 6: NcGRA6) もしくはグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) との融合蛋白質 (NcGRA6 + GST) を含むことを特徴とするアジュバント。

50

- (2) NcGRA6が、
 (a) 配列番号2に示されるアミノ酸配列を含む蛋白質、あるいは
 (b) 配列番号2に示されるアミノ酸配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質であることを特徴とする(1)に記載のアジュバント。
 (3) NcGRA6 + GSTが、
 (a) 配列番号3に示されるアミノ酸配列を含む蛋白質、あるいは
 (b) 配列番号3に示されるアミノ酸配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質であることを特徴とする(1)に記載のアジュバント。
 (4) ニュークリアファクター - カッパー B (NF - B) を誘導することを特徴とする(1)から(3)に記載のアジュバント。
 (5) (1) から(4) のいずれか1項に記載のアジュバントを含むワクチン製剤。
 (6) アジュバント機能を持つ(1)から(4)のいずれか1項に記載のアジュバント機能を持つNcGRA6、もしくはNcGRA6 + GSTを抗原とするネオスポラワクチン。
 (7) さらに製薬上許容しうる担体を含む、(5)もしくは(6)に記載のワクチン製剤。
 (8) 皮下、皮内、経口又は経鼻投与されるものである、(7)に記載のワクチン製剤。

10

【発明の効果】

20

【0012】

NF - Bは炎症性サイトカインの発現に関与する特異的な転写因子であって、免疫反応の増強に重要な役割を果たす。ネオスポラ原虫(*Neospora caninum*)由来の蛋白質であるNcGRA6は免疫細胞でNF - Bを誘導し炎症性サイトカインの産生を誘導することから、このものはアジュバントとして有用である。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】HEK293T細胞へのNcGRA6遺伝の導入で活性化される因子

【図2】NcGRA6の添加によるIL - 12p40の産生

【図3】非妊娠感染マウスモデルにおける特異抗体の検出

30

【図4】マウス由来脾臓細胞の抗原刺激に対する応答(A:吸光度、B:IFN - γ 、C:IL - 4、D:IL - 10)

【図5】非妊娠感染マウスモデルにおける生存曲線、体重変動、臨床スコア、脳内原虫数の評価(A:マウス生存曲線、B:新生マウスの脳内原虫数、C:臨床スコア、D:脳内原虫数)

【図6】妊娠感染マウスモデルにおける母親マウスの体重変動、臨床スコアの評価(A:体重変化率、B:臨床スコア)

【図7】妊娠感染マウスモデルにおける新生マウスの生存曲線と脳内原虫数、母親マウスの脳及び子宮の原虫数(A:新生マウスの生存曲線、B:新生マウスの脳内原虫数、C:母親マウスの脳内原虫数、D:子宮内原虫数)

40

【発明を実施するための形態】

【0014】

本発明は、NcGRA6が免疫反応の増強に必須なNF - Bを誘導することによってアジュバント機能を発揮するとともに、ネオスポラ原虫に対して細胞性免疫と液性免疫の両方を誘導することに関するものである。

以下、本発明について、詳細に説明する。

【0015】

(1) ルシフェラーゼアッセイによるNF - Bシグナル活性化の評価

HEK293T細胞を用い、NF - Bシグナル活性化を空ベクター導入時(Mock)とNcGRA6遺伝子導入時とで比較した。NcGRA6遺伝子の導入により、NF -

50

Bの活性化が認められた(図1)。NF- κ Bは免疫反応において中心的役割を果たす転写因子であり、各種のサイトカインを誘導することから、NcGRA6のアジュバントとしての機能が推定された。

【0016】

(2) マウス腹腔由来マクロファージのIL-12p40産生

NcGRA6にグルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)をタグとして融合させたNcGRA6+GST組換え蛋白質およびGST組換え蛋白質を20時間作用させたマウス腹腔由来マクロファージの培養上清におけるIL-12p40濃度を図2に示した。NcGRA6+GSTの処理により、マクロファージからのIL-12p40の産生が誘導された。IL-12は細胞性免疫を誘導するサイトカインとして知られている。

10

【0017】

(3) 非妊娠感染マウスモデルにおける特異抗体の検出

BALB/cマウス(メス、8週齢)に対し、NcGRA6+GST、オリゴマンノース被覆リポソーム封入NcGRA6+GST(NcGRA6+GST-OML)、OML封入GST(GST-OML)、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)を2週間隔で3回皮下接種した。それぞれの免疫日の2日前に血清を採取し、NcGRA6特異的IgG1及びIgG2a抗体をELISA法により検出した。なおOMLは抗原物質を抗原提示細胞のMHCクラスI分子およびクラスII分子に効率良く提示させることができるリポソームとして開発されたものである(WO2006/104199)。

【0018】

本結果より、NcGRA6+GST、NcGRA6+GST-OMLの免疫によりNcGRA6特異的IgG1抗体の産生が確認され、NcGRA6+GSTの免疫の方がより早期に抗体産生が誘導された。また、ネオスポラ原虫感染後には、GST-OML、PBS接種群と比較して、NcGRA6+GSTおよびNcGRA6+GST-OML接種群においてNcGRA6特異的IgG2a抗体の産生が確認され、NcGRA6+GSTの免疫の方がより多くの抗体産生が誘導された(図3)。以上より、NcGRA6は液性免疫を活性化させる機能を有することが明らかになった。

20

【0019】

(4) マウス由来脾臓細胞の抗原刺激に対する応答

同様の処理をしたマウスの最終免疫から2週目に脾臓を採材し、脾臓細胞に対しコンカナバリンA(ConA)、ネオスポラ原虫ライセート(NLA)、NcGRA6+GST、GSTを加え、48時間培養した。陰性対象として、抗原刺激無しで培養した試験区を設定した(Medium)。結果を図4に示す。培養細胞の増殖(A)を測定したところ、NcGRA6+GSTおよびNcGRA6+GST-OML接種群由来脾臓細胞のNcGRA6抗原特異的な増殖が確認された。次に、培養上清中の(B)インターフェロン・ガンマ(IFN- γ)、(C)インターロイキン4(IL-4)、(D)インターロイキン10の産生量を測定した。NcGRA6+GSTおよびNcGRA6+GST-OML接種群由来脾臓細胞の培養上清からは、NcGRA6抗原特異的なIFN- γ の産生が確認された。本結果により、NcGRA6+GST接種による抗原特異的なTh1免疫応答が確認された。

30

【0020】

(5) 非妊娠感染マウスモデルにおける生存曲線、体重変動、臨床スコア、脳内原虫数の評価

同様に処理したマウスに対して、最終免疫から2週目にネオスポラ原虫(1×10^6)を腹腔内接種した。結果を図5に示す。図から明らかのように、NcGRA6+GST接種群において、感染後32日目の生存率の上昇(A)、2~32日の体重減少の抑制効果(B)、臨床スコア(身体的症状、行動、神経症状、脱水・食欲減退、その他の5項目に関する合計値)が示す臨床症状の抑制効果(C)、が確認された。さらにネオスポラ原虫感染後32日目に生存マウスの脳組織を採材し、脳組織DNAの50ngあたりに含まれる原虫量を定量したところ、NcGRA6+GST接種群で脳内原虫数の少ない傾向が

40

50

認められた(D)。これはNcGRA6の接種がネオスポラ原虫を排除していることを示すものである。

【0021】

(6) 妊娠感染マウスモデルにおける母親マウスの体重変動、臨床スコアの評価

同様に処理したマウスの最終免疫から7日後にオスマウスと交配させ、妊娠6~10日目にネオスポラ原虫(1×10^5)を腹腔内接種した。結果を図6に示す。NcGRA6+GSTの接種群において、ネオスポラ原虫感染後の4~42日で、母親マウスの体重減少の抑制効果(A)、臨床症状の抑制効果(B)が確認された。

【0022】

(7) 妊娠感染マウスモデルにおける出産率、平均出産数、新生マウスの生存数と生存率

前記妊娠マウスの出産率、平均出産数、新生マウスの生存数と生存率を表1に示した。本結果により、妊娠期感染でのNcGRA6+GST接種による出産率の上昇傾向が確認された。

【表1】

表1. 妊娠感染マウスモデルにおけるワクチン評価結果

実験群	使用した母マウス数	出産した母マウス数	出産率	一腹あたりの生存した新生マウス/出生数	新生マウスの生存数/新生マウスの総数(生存率)
PBS	5	2	40%	0/8, 0/6	0/14 (0%)
GST	6	2	33.3%	0/6, 0/6	0/12 (0%)
NcGRA6+GST	5	4	80%	0/4, 3/6, 2/5, 3/7	8/22 (36.4%)

【0023】

(8) 妊娠感染マウスモデルにおける新生マウスの生存曲線と脳内原虫数、母親マウスの脳及び子宮の原虫数

前記のネオスポラ感染妊娠マウスが出産した新生マウスに対するNcGRA6+GST接種の効果を検証した(図7)。出生後30日間の新生マウスの生存曲線を示した。NcGRA6+GST接種群では有意に生存率の上昇が確認された(A)。NcGRA6+GST接種群において、新生マウスの生存個体での脳内原虫数が有意に減少していることが認められた(B)。母親マウス(出産後30日、感染後42日)の脳内原虫数に関しては、有意差は認められなかったものの、NcGRA6+GST接種群の母親マウスの脳内原虫数が低値を示す傾向が確認された(C)。上記の母親マウスのNcGRA6+GST接種群では、子宮内原虫数は有意に減少していることが認められた(D)。

【0024】

本結果により、NcGRA6+GSTの接種により、ネオスポラが排除され、垂直感染が抑止されることが確認された。以上のデータは、NcGRA6はアジュバント機能に加えてネオスポラワクチンとしての機能も有することを示すものである。なおGSTにはアジュバント機能やネオスポラに対するワクチン効果の無いことは明らかである。

【実施例】

【0025】

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【0026】

サンプルの調整

NcGRA6+GSTは、NcGRA6をコードする配列番号1に記載の遺伝子をGST融合蛋白発現ベクターであるpGEX4T1(GEヘルスケアジャパン株式会社より購入)のEcoRIサイトとXhoIサイトに導入し、大腸菌BL21(DE3)で発現させて得たものである。GSTはpGEX4T1を大腸菌BL21(DE3)で発現させて得たものである。組換え体の調整や目的蛋白質の精製は、納入業者が提供するプロトコルもしくは当業者が周知の方法で行うことができる。細胞の培養、ルシフェラーゼ活性や

10

30

40

50

サイトカインの測定等もそれぞれの業者が提供するプロトコールあるいは成書に従えば実施可能である (Nishikawa Y. et al., 2017. Immunization with Toxoplasma gondii Peroxiredoxin 1 Induces Protective Immunity against Toxoplasmosis in Mice. PLoS One. 12:e0176324.)。組換え蛋白質のOMLへの封入は特許第5429821号に記載の方法に従った。

【0027】

ルシフェラーゼアッセイによるNF- κ Bシグナル活性化の測定(図1)

HEK293T細胞を用い、NF- κ Bシグナルの活性化を空ベクター導入時(Mock)とNcGRA6遺伝子導入時で比較した。NcGRA6遺伝子(配列番号1)のHEK293T細胞への導入は業者が提供するプロトコールの方法に従った。NcGRA6遺伝子の導入により、NF- κ Bの活性化が認められた。

【0028】

マウス腹腔由来マクロファージのIL-12p40産生(図2)

NcGRA6+GSTおよびGST組換え蛋白質を20時間作用させたマウス腹腔由来マクロファージの培養上清におけるIL-12p40濃度の結果を示した。NcGRA6+GSTの処理により、マクロファージからのIL-12p40の産生が誘導された。

【0029】

非妊娠感染マウスモデルにおける特異抗体の検出(図3)

BALB/cマウス(メス、8週齢)に対し、NcGRA6+GST、オリゴ糖リポソーム封入NcGRA6+GST(NcGRA6+GST-OML)、OML封入GST(GST-OML)、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)を2週間隔で3回皮下接種した(1回あたり25pmol蛋白質)。最終免疫から2週目にネオスポラ原虫(1×10^6)を腹腔内接種した。それぞれの免疫日の2日前に血清を採取し、NcGRA6特異的IgG1及びIgG2a抗体をELISA法により検出した。1回の実験で1試験区6匹のマウスを使用し、同様の結果が得られた2回の実験のうち、代表的な1回の実験結果を示した。結果は、平均値±標準偏差で示した。*: $p < 0.05$ 、二元配置のANOVAとチューキー・クレーマーの多重比較検定により、同一免疫群において免疫前(day 0)と有意差を示した。棒グラフに記載の異なるアルファベットは、採材日が同一のサンプル間での有意差を示した。本結果より、NcGRA6+GST、NcGRA6+GST-OMLの免疫によりNcGRA6特異的IgG1抗体の産生が確認され、NcGRA6+GSTの免疫の方がより早期に抗体産生が誘導された。また、ネオスポラ原虫感染後には、GST-OML、PBS接種群と比較して、NcGRA6+GST、NcGRA6+GST-OML接種群においてNcGRA6特異的IgG2a抗体の産生が確認され、NcGRA6+GSTの免疫の方がより多くの抗体産生が誘導された。

【0030】

マウス由来脾臓細胞の抗原刺激に対する応答(図4)

BALB/cマウス(メス、8週齢)に対し、NcGRA6+GST、オリゴ糖リポソーム封入NcGRA6+GST(NcGRA6+GST-OML)、OML封入GST(GST-OML)、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)を2週間隔で3回皮下接種した(1回あたり25pmol蛋白質)。最終免疫から2週目に脾臓を採材し、脾臓細胞に対しコンカナバリンA(ConA)、ネオスポラ原虫ライセート(NLA)、NcGRA6+GST、GSTを加え、48時間培養した。陰性対象として、抗原刺激無しで培養した試験区を設定した(Medium)。1試験区4匹のマウスを使用し、結果は平均値±標準偏差で示した。(A)脾臓細胞の増殖はCell Counting Kit-8 reagent(CCK-8, Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)で測定し、吸光度450nmで示した。ELISA法で測定した培養上清中のインターフェロン- γ (IFN- γ)濃度(B)、インターロイキン4(IL-4)濃度(C)、インターロイキン10(IL-10)濃度(D)を示した。#: $p < 0.05$ 、二元配置のANOVAとチューキー・クレーマーの多重比

10

20

30

40

50

較検定により、同一接種群内で抗原刺激無しで培養した試験区 (Medium) との有意差を示した。* : $p < 0.05$ 、二元配置のANOVAとチューキー・クレーマーの多重比較検定により、同一抗原刺激においてPBS接種群と有意差を示した。本結果により、NcGRA6 + GST接種群由来脾臓細胞の抗原特異的なTh1免疫応答が確認された。

【0031】

非妊娠感染マウスモデルにおける生存曲線、体重変動、臨床スコア、脳内原虫数の評価(図5)

BALB/cマウス(メス、8週齢)に対し、NcGRA6 + GST、オリゴ糖リポーム封入NcGRA6 + GST (NcGRA6 + GST - OML)、OML封入GST (GST - OML)、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を2週間隔で3回皮下接種した(1回あたり25 pmol蛋白質)。最終免疫から2週目にネオスポラ原虫 (1×10^6) を腹腔内接種した。1回の実験で1試験区6匹のマウスを使用し、合計2回の実験結果を示した(1試験区12匹のマウス)。(A)ネオスポラ原虫感染後32日間のマウスの生存曲線を示した。* : $p < 0.05$ 、感染後32日目のマウス生存をLog-rank (Mantel-Cox) testにより解析し、NcGRA6 + GST接種群とNcGRA6 + GST - OML接種群はGST - OML接種群とPBS接種群と有意差が認められ、生存率の上昇が確認された。(B)ネオスポラ原虫感染後、2~32日のマウスの体重変動を示した。結果は平均値 標準誤差で示した。* : $p < 0.05$ 、二元配置のANOVAとBonferroniの多重比較検定により、NcGRA6 + GST接種群とPBS接種群で有意差が(*一つ)、NcGRA6 + GST接種群とNcGRA6 + GST - OML接種群で有意差が(*二つ)認められ、NcGRA6 + GST接種によるマウスの体重減少の抑制効果が確認された。(C)ネオスポラ原虫感染後、2~32日のマウスの臨床スコアを示した。臨床スコアは身体的症状、行動、神経症状、脱水・食欲減退、その他の5項目に関する合計値を用い(Reichel and Ellis, 2009)、結果は平均値 標準誤差で示した。* : $p < 0.05$ 、二元配置のANOVAとBonferroniの多重比較検定により、NcGRA6 + GST接種群とNcGRA6 + GST - OML接種群はPBS接種群及びGST - OML接種群と有意差が認められ、NcGRA6 + GST接種あるいはNcGRA6 + GST - OML接種による臨床症状の抑制効果が確認された。(D)ネオスポラ原虫感染後32日目に生存マウスの脳組織を採材し、脳組織DNAの50 ngあたりに含まれる原虫量を定量した。一元配置のANOVAとチューキー・クレーマーの多重比較検定により、各試験区で有意差は認められなかったが、NcGRA6 + GST接種群で脳内原虫数の少ない傾向が認められた。

【0032】

妊娠感染マウスモデルにおける母親マウスの体重変動、臨床スコアの評価(図6)

BALB/cマウス(メス、8週齢)に対し、NcGRA6 + GST、GST、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を2週間隔で3回皮下接種した(1回あたり25 pmol蛋白質)。最終免疫から7日後にオスマウスと交配させ、妊娠6~10日目にネオスポラ原虫 (1×10^5) を腹腔内接種した。(A)ネオスポラ原虫感染後、4~42日の母親マウスの体重変動を示した。結果は平均値 標準誤差で示した。NcGRA6 + GST接種による母親マウスの体重減少の抑制効果が確認された。(B)ネオスポラ原虫感染後、4~42日の母親マウスの臨床スコアを示した。臨床スコアは身体的症状、行動、神経症状、脱水・食欲減退、その他の5項目に関する合計値を用い(Reichel and Ellis, 2009)、結果は平均値 標準誤差で示した。* : $p < 0.05$ 、二元配置のANOVAとBonferroniの多重比較検定により、NcGRA6 + GST接種群はPBS接種群と有意差が認められ、NcGRA6 + GST接種による臨床症状の抑制効果が確認された。妊娠後期と分娩前後は母親マウスへのストレス回避のため、体重及び臨床スコアの測定は実施しなかった(観察未実施期間)。

【0033】

10

20

30

40

50

妊娠感染マウスモデルにおける出産率、平均出産数、新生マウスの生存数と生存率（表1）

BALB/cマウス（メス、8週齢）に対し、NcGRA6 + GST、GST、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）を2週間隔で3回皮下接種した（1回あたり25 pmol蛋白質）。最終免疫から7日後にオスマウスと交配させ、妊娠6～10日目にネオスポラ原虫（ 1×10^5 ）を腹腔内接種した。出産率、平均出産数、新生マウスの生存数と生存率を表1に示した。本結果により、妊娠期感染でのNcGRA6 + GST接種による出産率の上昇傾向が確認された。

【0034】

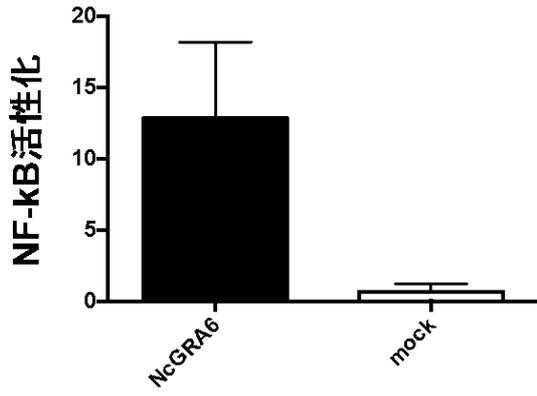
妊娠感染マウスモデルにおける新生マウスの生存曲線と脳内原虫数、母親マウスの脳及び子宮の原虫数(図7)

BALB/cマウス（メス、8週齢）に対し、NcGRA6 + GST、GST、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）を2週間隔で3回皮下接種した（1回あたり25 pmol蛋白質）。最終免疫から7日後にオスマウスと交配させ、妊娠6～10日目にネオスポラ原虫（ 1×10^5 ）を腹腔内接種した。新生マウスの生存数と生存率を以下の表に示した。（A）出生後30日間の新生マウスの生存曲線を示した。 $* : p < 0.05$ 、Log-rank（Mantel-Cox）testにより解析し、NcGRA6 + GST接種群はGST-OML接種群とPBS接種群とで有意差が認められ、生存率の上昇が確認された。（B）新生マウスの死亡個体及び生後30日の生存個体での脳内原虫数を示した。 $* : p < 0.05$ 、一元配置のANOVAとチューキー・クレーマーの多重比較検定により、NcGRA6 + GST接種群由来の生存新生マウスとPBS接種群で有意差が認められた。（C）母親マウス（出産後30日、感染後42日）の脳内原虫数を示した。一元配置のANOVAとチューキー・クレーマーの多重比較検定により各試験区で有意差は認められなかったが、NcGRA6 + GST接種群の母親マウスの脳内原虫数が低値を示す傾向が確認された。（D）母親マウス（出産後30日、感染後42日）の子宮内原虫数を示した。 $* : p < 0.05$ 、一元配置のANOVAとチューキー・クレーマーの多重比較検定により、NcGRA6 + GST接種群とPBS接種群とで有意差が認められた。本結果により、妊娠感染マウスモデルにおけるNcGRA6 + GST接種による垂直感染抑止効果が確認された。

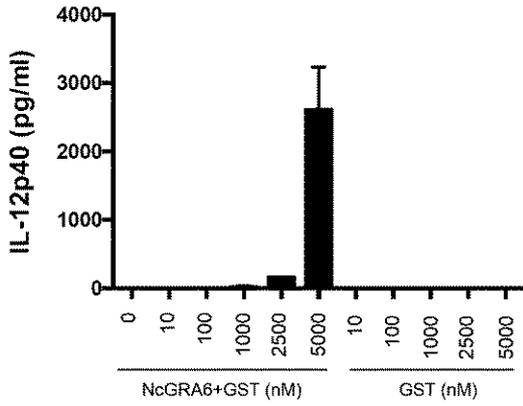
10

20

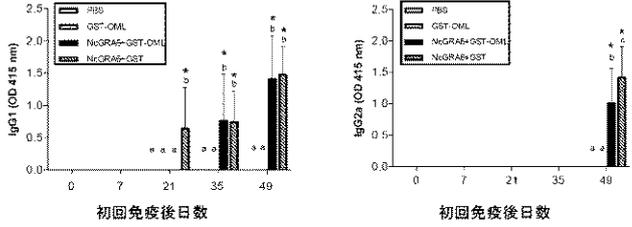
【図1】



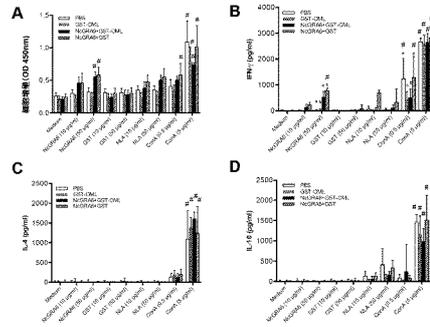
【図2】



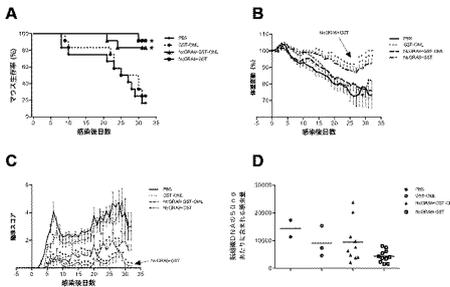
【図3】



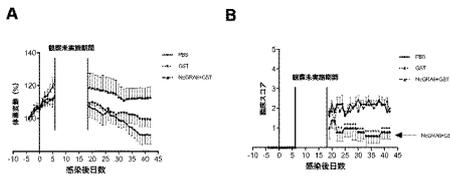
【図4】



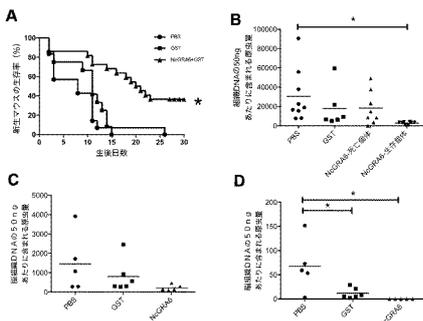
【図5】



【図6】



【図7】



【配列表】

2019116454000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 0 7 K	19/00
			C 1 2 N	15/00
				A