

## マウスの Babesia rodhaini 感染に及ぼす死虫体ワクチンと アジュバンドの組合せに関する比較試験

誌名	日本獣医畜産大学研究報告 = The bulletin of the Nippon Veterinary and Zootechnical College
ISSN	03738361
著者	佐伯, 英治 新沼, 伸吾 石井, 俊雄
巻/号	35号
掲載ページ	p. 57-64
発行年月	1986年12月

## マウスの *Babesia rodhaini* 感染に及ぼす死虫体ワクチンと アジュバントの組合せに関する比較試験

佐伯英治・新沼伸吾\*・石井俊雄

日本獣医畜産大学 獣医寄生虫学教室

\*全農 家畜衛生研究所

**要約** *Babesia rodhaini* (BR) 感染血球溶血超音波処理抗原 (S 抗原) あるいはグルタルアルデヒド固定血球抗原 (G 抗原) に、アジュバントとして Freund's Complete adjuvant (FCA) あるいは *Corynebacterium parvum* ホルマリン不活化菌体 (CP) を加えて免疫処理したマウスに対し、初回免疫 5 週後に  $10^6$  の BR 感染血球で攻撃感染した。その結果、使用する抗原とアジュバントの組合せにより BR 感染発症防御能誘導に差が生ずることが示された。すなわち、S 抗原と CP の組合せで免疫したマウスは最も高い生残率を示し、G 抗原と CP の組合せがこれに続いて安定した成績を示した。一方、アジュバントとして FCA を使用した場合、抗原の如何に拘らず、安定した高い生残率を得ることはできなかった。

キーワード: *B. rodhaini*, 死虫体ワクチン, アジュバント, 日獣畜大研報, 35, 57~64, 1986.

我々は数年来牛のピロプラズマ病のモデル実験系として、マウスを用いて<sup>6)</sup>*Babesia rodhaini* (以下 BR) に対する感染防御実験を行ってきた<sup>7)</sup>。

今回は製法の異なる 2 種の抗原と 2 種のアジュバントの組合せを用いる 4 方法により、ICR 系雌マウスの BR 感染に対する発症防御効果に関する比較試験を行なった。その成績の概要を報告する。

### 材料と方法

実験には市販の ICR 系雌 5 週齢のマウスを使用した<sup>24)</sup>。

溶血超音波処理抗原 (以下 S 抗原) は Fig. 1 に示す如く、前報<sup>7)</sup>に若干の改良を加えて作製した。すなわち、dd 系マウスより得た BR 寄生赤血球 (以下 PE) を 0.1% サポニンで溶血し<sup>25)</sup>、高速と低速の遠心操作を交互に都合 3 回繰り返すことにより、血球遺残物の可及的除去を試みた。なお使用時には抗原量としてマウス 1 匹宛  $10^7 \sim 10^8$  の PE を接種するように調製した。

グルタルアルデヒド固定血球抗原 (以下 G 抗原) の作製法は Fig. 2 に示す如く BENEACH ら<sup>21)</sup>に準拠した。すなわち、dd 系マウス由来 PE (寄生率 60~70%) を 0.25% グルタルアルデヒド (半井化学製) で室温下において 15 分間固定し、リン酸緩衝液で遠心洗滌後、マ

ウス 1 匹宛  $10^7 \sim 10^8$  のグルタルアルデヒド固定赤血球を接種するように調整した。

アジュバントとしては Freund's の complete adjuvant (以下 FCA, マイルス社製) および農林水産省家畜衛生試験場より分与を受けた *Corynebacterium parvum* ホルマリン不活化菌体浮游液 (以下 CP) を使用した。FCA はマウス 1 匹あたり 0.1 ml とし、抗原液と等量混合し oil in water の状態で腹腔内に接種した。CP はマウス 1 匹宛 0.5 mg/0.1 ml とし抗原液 0.1 ml とともに十分に攪拌混和して使用した。

免疫スケジュールの概要は Fig. 3 に示した。すなわち、初回免疫 2 週後に各抗原単独で追加免疫し、さらにその 3 週後に  $10^6$  の PE で腹腔内に攻撃感染した。その後は前報<sup>9)</sup>の如く、連日末梢血液塗抹標本の観察と諸症状の観察を、攻撃感染後 21 日間以上継続して実施した。

### 成 績

Table 1 に示す如く、アジュバントとして FCA を用いた実験は都合 3 回実施した。その結果虫体の末梢血中への出現は使用抗原の如何を問わず攻撃感染後 1.6~3.9 日であり、対照群と比較して遅延する傾向が認められた。攻撃感染に対して耐過生残したマウスの PE 率はほぼ 30~50% の範囲のようであったが、Exp. 1 の S

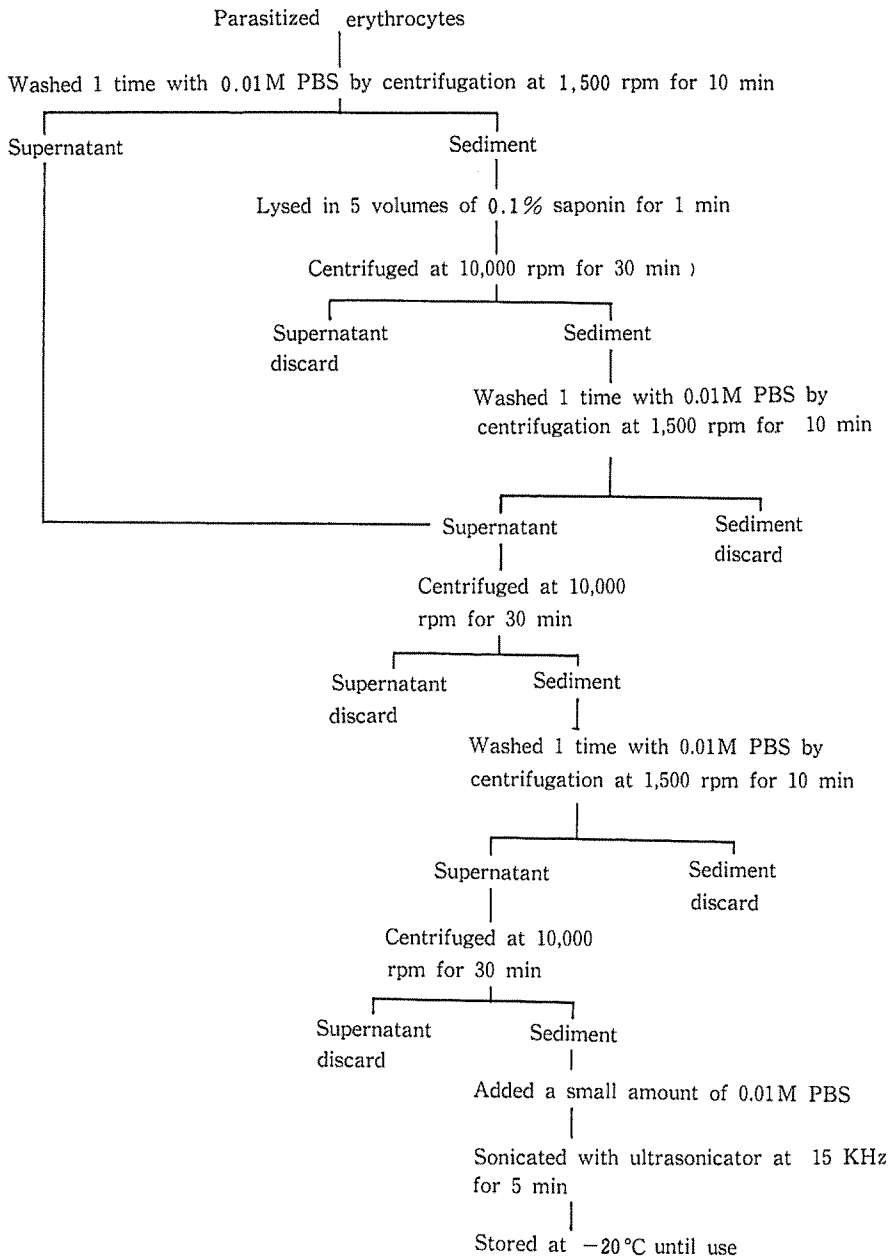


Fig. 1. Preparation of sonicated antigen of *Babesia rodhaini*.

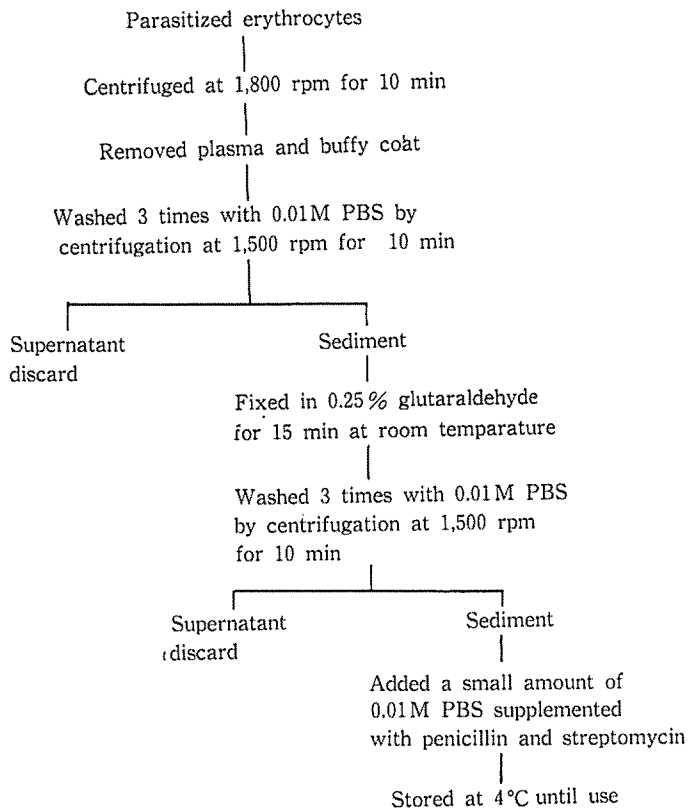


Fig. 2. Preparation of glutaraldehyde fixed antigen of *Babesia rodhaini*.

	0	2	5 (weeks after initial vaccination)
	Initial vaccination	Booster vaccination	Challenge infection
Treatment	Antigen + Adjuvant (ip)	Antigen (ip)	10 <sup>6</sup> PE (ip)

Fig. 3. Experimental design of vaccination and challenge infection.

Table 1. Prophylactic efficacy of treatment with killed vaccines and FCA on infection with *Babesia rodhaini* in mice.

Treatment	No. of mice	Mean of onset of patent period in days (range)	Mean of maximal PE rate (%)		Survival rate (%)	Mean of survival time in days	Mean of patent period in days
			Survived	Died			
Exp. 1							
G <sup>1)</sup> +FCA	9	3.9(2-5)	31.3	66.2	33.3	8.8	12.0
S <sup>2)</sup> +FCA	10	3.9(2-6)	65.4 <sup>3)</sup>	66.4	10.0	9.3	14.0
None	10	1.7(1-2)	—	73.3	0	6.2	—
Exp. 2							
G+FCA	7	1.6(1-2)	33.2 <sup>3)</sup>	62.5	14.3	11.5	37.0
S+FCA	9	3.1(1-6)	48.2	62.7	22.2	8.3	27.0
None	9	1.2(1-2)	—	71.7	0	6.6	—
Exp. 3							
G+FCA	10	3.7(2-5)	—	73.5	0	10.2	—
F+FCA	10	2.9(1-9)	42.5	68.7	20.0	9.5	18.0
None	10	1.7(1-6)	—	70.8	0	6.1	—

1) Glutaraldehyde fixed antigen.

2) Sonicated antigen.

3) Only one mouse survived.

Table 2. Prophylactic efficacy of treatment with killed vaccines and *Corynebacterium parvum* on infection with *Babesia rodhaini* in mice.

Treatment	No. of mice	Mean of onset of patent period in days (range)	Mean of maximal PE rate (%)		Survival rate (%)	Mean of survival time in days	Mean of patent period in days
			Survived	Died			
Exp. 1							
G <sup>1)</sup> +CP <sup>3)</sup>	10	1.1(1-2)	42.3	59.5	40.0	6.0	21.0
S <sup>2)</sup> +CP	10	1.0	17.9	56.8	60.0	7.3	9.2
None	10	1.0	—	75.2	0	6.2	—
Exp. 2							
C+CP	10	1.2(1-3)	35.5	79.6	40.0	7.5	11.8
S+CP	5	1.4(1-2)	31.1	—	100	—	8.4
None	6	1.5(1-2)	—	84.2	0	6.5	—

1) Glutaraldehyde fixed antigen.

2) Sonicated antigen.

3) *Corynebacterium parvum* bacterin.

Table 3. Comparison of survival rate in immunized mice.

Immunogen	Adjuvant	
	FCA	CP
G <sup>1)</sup>	33.3%	40.0%
	14.3 (15.3) <sup>3)</sup>	40.0
	0	
S <sup>2)</sup>	10.0%	60.0%
	22.2 (17.2)	100 (73.3)
	20.0	

1) Glutaraldehyde fixed antigen.

2) Sonicated antigen.

3) Arithmetic mean.

抗原処理マウスのうち1頭は65.4%という高いPE率を示した後耐過した。

生残率はG抗原を使用した場合、3回の実験の平均で15.3%であったが、Exp. 3では全頭斃死しExp. 1で示された生残率33.3%と大きな開きがあった。一方、S抗原を使用した場合、3回の実験で得られた生残率はそれぞれ10.0%、22.2%および20.0%、平均17.2%であり、G抗原を使用した実験の成績と平均値についてはほとんど差は認められなかったが、数値のバラツキはG抗原使用群に比べ、比較的斉一であった。斃死マウスの生存日数についてみれば、G抗原使用群では8.8~11.5日、S抗原使用群では8.3~9.5日であった。これに対し、全例が斃死した対照群は6.1~6.6日であり、試験群のいずれにも延命効果が観察された。

Table 2にはアジュバントとしてCPを使用した場合の成績を示した。いずれの抗原を用いた場合においても虫体は攻撃感染後1~3日で末梢血中出现し、虫血症の発現が遅延する傾向は認められなかった。しかし、CPを使用することで、FCAを用いて得られた生残率をさらに向上かつ安定化させることができた。この傾向は特にS抗原を使用した場合に著明であった。すなわち、G抗原使用群では2回の実験における生残率はいずれも40%であったのに対し、S抗原使用群ではそれぞれ60%および100%であり、S抗原の有効性が窺われた。

さらに、S抗原を使用した場合、耐過生残したマウスの平均最高PE率は17.9%および31.1%でありG抗原使用群の成績に比べて、虫体の増殖も若干抑制される傾向が窺われた。またS抗原使用群では攻撃感染後平均8.4~9.2日で虫体が末梢血中から速やかに消失するこ

とが特徴的であった。

## 考 察

原虫類の感染あるいは発症防御を目的として、ワクチン開発の試みが世界各地で精力的になされている。

家畜、特に放牧牛に対して大きな被害を与えるピロプラズマ病に対しても、本病撲滅のための一手段として抗原虫剤の開発とともに免疫学的予防法に関わるワクチンの開発が行なわれつつある<sup>21)</sup>。そのなかですでに、オーストラリアでは *Babesia bigemina* あるいは *B. bovis* (= *argentina*) の接種感染免疫予防法が試みられ、感染生鮮血液がいわゆる生ワクチンとして市販されている<sup>3)</sup>。さらに近年、凍結感染血液による流通システムも考案されている<sup>19)</sup>。

一方、我が国においては小型ピロプラズマ (*Theileria sergenti*) 病の発症予防措置としていわゆる毒血注射法が実施されていた<sup>8)</sup>が、野外株に何ら減弱措置を施していないために、当然被接種牛が *T. sergenti* のキャリアになるばかりでなく、他の病原体、例えば牛白血病ウイルス混入の可能性などが指摘され、現在開発は中止されている。かかる理由から、より安全でしかも有効な虫体減弱ワクチンあるいは不活化ワクチンの開発研究が要望されている。

虫体減弱化の試みの1つとして、放射線照射による方法が最もよく知られている。PHILLIPS ら<sup>10)</sup>はBRに<sup>60</sup>Coを照射し虫体の減弱化を図り、PURNELL および LEURS<sup>22)</sup>あるいは LEURS ら<sup>13)</sup>はそれぞれX線またはγ線を照射した *B. divergens* を用い、感染防御実験を行ない、相応の成績を得ている。しかしながら、これら減弱虫体も結局は生ワクチンの範ちゅうに属するものであり、従って、バックミュレーションあるいはベクターを通過した場合の病原性回復などの問題点を含んでいるとも言えよう。そこで、死虫体あるいは虫体の部分抗原<sup>5,20)</sup> さらには虫体培養上清<sup>11,12,17)</sup> など、生ワクチンに比べより安全でしかもその効果に遜色のない不活化ワクチンの開発がより望まれる訳である。

住血原虫類の死虫体を免疫原として利用する試みは多く、ホルマリン<sup>18,20)</sup> あるいはグルタルアルデヒド<sup>1)</sup> で固定した感染血球を使用する方法や、溶血処理等で得た虫体をホモジナイズあるいは超音波処理<sup>7,10,19)</sup> して免疫原とした報告がある。著者ら<sup>7)</sup>もBRを用い、PEを低張液で溶血処理した後、さらに超音波処理を施した抗原にFCAを加えてマウスを免疫し、ある程度の感染発症防御効果を賦与することに成功している。

本実験の目的は、使用する抗原とアジュバントの組合

せにより感染発症防御効果が向上するや否やを明らかにすることにあった。すなわち、抗原としては前報<sup>7)</sup>の超音波処理抗原作製法に、低速遠心と高速遠心を交互に都合 3 回繰り返して白血球および赤血球膜などの可及的除去を試みるなどの改良を加え、抗原としての精製化を企図した S 抗原と、BENACH ら<sup>1)</sup>の方法に準拠して作製した G 抗原の 2 種を供試した。またアジュバントは、dipot タイプの代表として FCA、および細菌性アジュバントの代表として CP をとり上げた。

その結果、Table 3 に示す如く FCA をアジュバントとして用いた場合、何れの抗原を使用してもその免疫効果は弱く、より安定した成績を得た S 抗原使用群においても各 3 回の実験の生残率はそれぞれ 10.0%、22.2% および 20.0%、平均 17.2% を得たに過ぎなかった。一方、G 抗原使用マウスの生残率は各々 33.3%、14.3% および 0% で平均 15.3% であった。生残率で判断する限り、FCA と S 抗原の組合せが安定した成績を示したものの、その値は未だ満足すべきものではなかった。FCA をアジュバントとして使用した実験で得られた特徴的な事象として、虫血症出現までの期間の延長と斃死マウスにおける生残率の延長を挙げることができる。これは今回供試した抗原について常に共通して認められる現象であった。

一方、アジュバントに CP を使用した場合、上述の FCA を用いて得られた実験成績に比較して生残率の向上と安定化が認められ、ほぼ満足すべき成績が得られた。すなわち、特に S 抗原を使用した場合にその傾向は著明で、2 回の実験の生残率はそれぞれ 60% および 100% であった。また、G 抗原を使用した場合においても、その生残率は各々 60% および 40% であり、アジュバントとして FCA を使用した前述の実験成績に比較して成績の向上が認められた。しかしながら、FCA を使用した場合に認められた虫血症発現までの期間の延長や、死亡マウスにおける延命効果はほとんど認められなかった。従ってこの 2 つの免疫効果に関しては専ら使用したアジュバント (FCA) の非特異的作用に起因するのではないかと考えられた。

以上の成績から、無処置対照群と比較すればその免疫効果は明らかであったものの、アジュバントとして FCA を用いた場合、抗原の如何に拘らず、前報<sup>7)</sup>と比較して生残率の向上を求めることは難しかった。一方、アジュバントとして CP を使用すれば、特に S 抗原との組合せにより、生残率を向上させることが可能となった。

*Trypanosoma cruzi*<sup>2,9)</sup>, *Plasmodium yoelii*<sup>14)</sup> および *P. berghei*<sup>18)</sup> 不活化ワクチンと CP で免疫したマウスで

は、その後の各虫体の攻撃感染に対し強い防御能を示すことが報告されている。さらに加えて今実験の成績も、BR 感染発症防御に関わる CP のアジュバントとしての有用性を示唆するものであった。

S 抗原と G 抗原の免疫賦与効果の差異は 1 つにはおそらく抗原の形状によるものと推察された。すなわち、グルタールアルデヒドで血球を固定した場合、その血球自体が抗原性を有し、そのため免疫部位の腹腔に動員された貪食能の強い Ia 陰性マクロファージが、虫体感染血球のみならず虫体未感染正常血球までも異物認識して処理するであろうことや、取り込まれた感染血球中の虫体を異物処理し、これを抗原情報として伝達する過程で何らかの支障があるのかも知れない。

## 文 献

- 1) BENACH, J. L., HABITCH, G. S., HOLBROOK, T. W. and COOK, J. A. (1982). Glucan as adjuvant for a murine *Babesia microti* immunization trial. *Infect. Immun.*, **35**, 947-951.
- 2) BOMFORD, R. and MCHARDY, N. (1979). *Corynebacterium parvum* as an adjuvant for *Trypanosoma cruzi* epimastigote vaccines. *Parasitology*, **78**, 77-87.
- 3) CALLOW, L. L. (1966) A new vaccine for *Babesia argentina* infection prepared in splenectomized calves. *Aust. Vet. J.*, **42**, 464-465.
- 4) CALLOW, L. L. and MCGREGOR, W. (1969). Vaccination against *Babesia argentina* infection in cattle during chemoprophylaxis with a quinuronium compound. *Aust. Vet. J.*, **45**, 408-410.
- 5) GOODGER, B. V., COMMINS, M. A., WRIGHT, I. G. and MIRRE, G. B. (1984). *Babesia bovis*: Vaccination of cattle against heterologous challenge with fraction of lysate from infected erythrocytes. *Z. Parasitenkd.*, **70**, 321-329.
- 6) HAN, S. S., SAEKI, H., HIYAMA, M. and ISHII, T. (1982). Susceptibility of small laboratory animals to *Babesia rodhaini* infections. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **44**, 497-501.
- 7) HAN, S. S. and SAEKI, H. (1985). Prophylactic efficacy of a killed vaccine against *Babesia rodhaini* infection in mice. *Bull. Nippon Vet. Zootech. Coll.*, **34**, 72-75.
- 8) 石原忠雄・南 哲郎 (1978). ピロプラズマ病のワクチン接種計画感染による発症予防法. *獣畜新報*, **685**, 442-451.
- 9) KIERSZENBAUM, (1975). Enhancement of resistance and suppression of immunization against experimental *Trypanosoma cruzi* infection by *Corynebacterium parvum*. *Infect. Immun.*, **12**, 1227-1229.

- 10) KUTTLER, K.L. and JOHNSON, L.W. (1980). Immunization of cattle with a *Babesia bigemina* antigen in Freund's Complete adjuvant. Am. J. Vet. Res., 41, 536-538.
- 11) KUTTLER, K.L., LEVY, M.G., JAMES, M.A. and RISTIC, M. (1982). Efficacy of a nonvial culture-derived *Babesia bovis* vaccine. Am. J. Vet. Res., 43, 281-284.
- 12) KUTTLER, K.L., LEVY, M. G. and RISTIC, M. (1983). Cell culture-derived *Babesia bovis* vaccine: Sequential challenge exposure of protective immunity during a 6-month postvaccination period. Am. J. Vet. Res., 44, 1456-1459.
- 13) LEWIS, D., PURNELL, R.E. and BRORKLESBY, D.W. (1980). *Babesia divergens*: Protection of intact calves against heterogenous challenge by the injection of irradiated piroplasms. Vet. Parasitol., 6, 297-303.
- 14) MACCOLUM, A.A., BOMFORD, R. and DALTON, L. (1982). A comparison of saponin with other adjuvants for the potentiation of protective immunity by a killed *Plasmodium yoelii* vaccine in the mouse. Parasite Immun., 4, 337-347.
- 15) MAHONEY, D.F. (1967). Bovine babesiosis: The immunization of cattle with killed *Babesia argentina*. Exp. Parasitol., 20, 125-129.
- 16) MELLORS, L.T., DALGLIESH, R.J., TIMM, P.T. RODWELL, B.J. and CALLOW, L.L. (1982). Preparation and laboratory testing of a frozen vaccine containing *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma centrale*. Res. Vet. Sci., 32, 194-197.
- 17) MONTENEGRO-JAMES, S., RISTIC, M., BENITEZ, M.T., LEON, E. and LOPEZ, R. (1985). Heterologous strain immunity in bovine Babesiosis using a culture-derived soluble *Babesia bovis* immunogen. Vet. Parasitol., 18, 321-327
- 18) MURPHY, J.R. and LEFFORD, M.J. (1979). Host defenses in murine malaria: Successful vaccination of mice against *Plasmodium berghei* by using formazinized blood parasites. Am. J. Trop. Med. Hyg., 28, 4-11.
- 19) PHILLIPS, R.S. (1971). Immunity of rats and mice following infection with <sup>60</sup>Co-irradiated *Babesia rodhaini* infected red cells. Parasitology, 62, 221-231.
- 20) PLAYFAIR, J.H.L., DE SOUZA, J.B. and COTRELL, B.J. (1977). Protection of mice against malaria by a killed vaccine: differences in effectiveness against *Plasmodium yoelii* and *Plasmodium berghei*. Immunology, 33, 507-515.
- 21) PURNELL, R.E. (1980). In: Vaccination against Piroplasma, Symposia of the British Society for Parasitology, Vol. 18. (TAYLOR, A.E. T. and MULLER, R. eds.), 25-55, Blackwell Scientific Publication, Oxford.
- 22) PURNELL, R.E. and LEWIS, D. (1981). *Babesia divergens*: combination of dead and live parasites in an irradiated vaccine. Res. Vet. Sci., 30, 18-21.
- 23) RISTIC, M. and KREIER, J.P. (1981). In: Babesiosis (RISTIC, M. and LEVY, M.G. eds.), 509-544, Academic Press, New York,
- 24) SAEKI, H., NAKAJIMA, K., SAITO, C., HAN, S.S. and ISHII, T. (1985). Susceptibility of seven strains of mice to *Babesia rodhaini*. Bull. Nippon Vet. Zootech. Coll., 34, 65-71.
- 25) SPIRA, D. and ZUCKERMAN, A. (1962). Antigenic structure of *Plasmodium vinckei*. Science, 137, 536.
- 26) WRIGHT, I.G., MIRRE, G.B., RODE-BRAMANIS, K., CHAMBERLAIN, M., GOODGER, B.V. and WALTISBUHL, D.J. (1985). Protective vaccination against virulent *Babesia bovis* with a low-molecular-weight antigen. Infect. Immun., 48, 109-113.



Comparative Studies on Prophylactic Efficacies of Vaccine-Adjuvant  
Combinations against *Babesia rodhaini* Infection in Mice

Hideharu SAEKI, Shingo NIINUMA\* and Toshio ISHII

Department of Parasitology,  
Nippon Veterinary and Zootechnical College

\* Zenno, Institute of Animal Health

ABSTRACT

Comparative studies on the prophylactic efficacies of 4 kinds of vaccine-adjuvant combinations against *Babesia rodhaini* infection were carried out in ICR female mice. Vaccines prepared with parasitized erythrocytes (PE) of mice were used in the present experiment. One of the preparation methods was hemolization-sonication (S) and the other was fixation with glutaraldehyde (G). As the combination agents, Freund's Complete adjuvant (FCA) and killed bacterin of *Corynebacterium parvum* (CP) were supplied. All treated mice were challenged with  $10^6$ PE/mouse 5 weeks after the initial immunization.

As a result, the highest survival rate was obtained against challenge infection in mice treated with S-CP combination (73.3%) followed by G-CP (40.0%). On the other hand, the survival rates were rather low (15.3 and 17.2%) and unstable (0 to 33.3%) in mice inoculated with FAC regardless of the kind of PE vaccine used.

**Key words:** *B. rodhaini*, Vaccine-adjuvant combination, *Corynebacterium parvum* bacterin.

Bull. Nippon Vet. Zotech. Coll., No. 35, 57~64, 1986.