

201403014A

厚生労働科学研究費補助金
地球規模保健課題推進研究事業

新しい抗マラリア戦略を目指した糖鎖関連薬の開発

平成26年度 総括研究報告書

研究代表者 加藤 健太郎

平成27(2015)年 5月

目 次

| | |
|----------------------------|---------|
| I. 総括研究報告 | |
| 新しい抗マalaria戦略を目指した糖鎖関連薬の開発 | ----- 3 |
| 加藤 健太郎 | |
| II. 研究成果の刊行に関する一覧表 | ----- 6 |
| III. 研究成果の刊行物・別刷 | ----- 7 |

新しい抗マラリア戦略を目指した糖鎖関連薬の開発

研究代表者 加藤 健太郎 帯広畜産大学原虫病研究センター 特任准教授

研究要旨

マラリア感染者は、熱帯、亜熱帯の途上国を中心として年間約3億人、死亡者は年間150～300万人にのぼると報告され、その対策が急務とされている。既存の抗マラリア剤耐性株の出現のため、多くの新しい抗マラリア剤が開発され、また、マラリアワクチン開発の研究が世界規模で試みられているが未開発であり、マラリア撲滅には至っていない。この大きな原因の1つに、先進国の製薬企業では市場性が見込めないことを理由に抗マラリア薬、ワクチンの開発を進めないことが挙げられる。

研究代表者らは独自に開発したマラリア原虫の赤血球感染レセプターの同定系を用いて糖鎖レセプターの同定に成功し、糖鎖がマラリア原虫の赤血球侵入（感染）を著しく阻害することを見出した。本研究では新しい抗マラリア戦略を目指した糖鎖製剤とマラリアワクチンの実用化に向けた開発研究を行うことを目的とする。

研究代表者らはこれまでに感染阻止に効果のあった糖類派生体についてどの糖鎖構造体が原虫感染阻止に重要であるか解析を行ってきた。平成26年度はマウスマラリア原虫を用いた動物感染実験により、これまでの*in vitro*での熱帯熱マラリアの感染阻止の解析結果から感染阻止に効果のあった硫酸化多糖類であるカラギーナンや硫酸化ジェランについて、感染阻止能を生体内で解析を行った。また、硫酸化修飾を行って作製した硫酸化ジェランについて元素分析により硫酸基付加を確認した。

滅には至っていない。この大きな原因の1つに、先進国の製薬企業では市場性が見込めないことを理由に抗マラリア薬、ワクチンの開発を進めないことが挙げられる。

研究代表者らは抗マラリア薬開発を目的として、まずウイルスベクターを用いてマラリア原虫の赤血球感染レセプターの同定系の開発に独自に成功した。さらにこの感染レセプター同定系を用いてヘパラン硫酸等の糖鎖レセプターの同定に成功し、糖鎖がマラリア原虫の赤血球侵入（感染）を著しく阻害することを見出した。本研究の目的は、これまでの研究代表者らの研究において抗マラリア作用があることを見出した糖鎖について、新しい抗マラリア戦略を目指した糖鎖製剤とマラリアワクチンの実用化に向けた開発研究を行うことにある。以上の

研究代表者 加藤 健太郎

帯広畜産大学原虫病研究センター 特任准教授

A. 研究目的

マラリアは*Plasmodium*属原虫の感染によって引き起こされる感染症で、ハマダラカ属の蚊の吸血によってヒトに感染する。マラリアの感染者は、亜熱帯や熱帯地域、特にアフリカ、南アメリカ、東南アジア等の途上国を中心として年間約3億人、死亡者は年間150-300万人にのぼると報告され、その対策が急務とされている。昨今、既存の抗マラリア剤耐性株の出現のため、多くの新しい抗マラリア剤が開発され、また、マラリアワクチン開発の研究が世界規模で試みられているが未開発であり、マラリア撲

途上国の現状とマラリア薬開発の遅滞を鑑みると当該研究の必要性が極めて大きい。

B. 研究方法

平成26年度はマウスマラリア原虫を用いた動物感染実験により、これまでの*in vitro*での熱帯熱マラリアの感染阻止の解析結果から感染阻止に効果のあった糖鎖構造体の感染阻止能について生体内で解析を行った。以下に平成26年度に実施した研究について記す。

- (i) これまでの解析によって、硫酸化多糖類であるカラギーナンや硫酸化ジェランが*in vitro*で熱帯熱マラリアの赤血球感染阻止に効果があることがわかった。このため、原料であるジェランガムに硫酸化の修飾を行って独自に作製した硫酸化ジェランについて、その構成元素について元素分析を行った。
- (ii) 硫酸化ジェランの薬剤としての使用について検討するため、細胞毒性試験を行った。抗凝固剤として使用される硫酸化多糖類の1つであるヘパリン等では、薬剤としての使用を考える場合当然ながら抗凝固活性の問題が生じる。そこで、硫酸化ジェランについて抗凝固活性の測定を行った。
- (iii) マウスマラリア原虫を用いたマウスへの感染実験により、 λ -カラギーナンの感染阻止効果について解析を行った。

(倫理面への配慮)

平成26年度に実施した研究は、*in vitro*での実験系が主であったため、研究対象者の人権擁護に関わる実験等は行っていないことから、倫理面の問題は無い。動物実験については、実施した帯広畜産大学から認可を受けている。

C. 研究結果

- (i) 硫酸化ジェランについては、原料であるジェランガムに硫酸化の修飾を行って作製し、元素分析によって、硫酸基に付加を確認した。
- (ii) 硫酸化ジェランについて細胞毒性試験を行った結果、細胞毒性は見られなかった。次に抗凝固活性の測定を行った結果、抗凝固活性については低い

値を示した。

- (iii) マウスマラリア原虫を用いたマウスへの感染実験により、 λ -カラギーナン投与は逆に炎症を助長し、硫酸化ジェランについては特段の感染阻止効果はマウスでは見られなかった。

D. 考察

硫酸化多糖類は高分子多糖であるため、実際的に薬剤として製造するためには、合成が難しく、かつ均質性の保証が懸念される。研究代表者らはこれらの問題を解消するため、様々な硫酸化多糖類の派生体を用いて、マラリア原虫の増殖阻止効果を解析することで、増殖を抑制するコアとなる構造体の同定を試みていた。これにより、抗マラリア薬として効果のある構造体の低分子化を図ることで、均質性の保証も担保しようと考えている。

E. 結論

本研究は硫酸化ジェランの抗マラリア活性についての初めての報告である。硫酸化ジェランは新規の材料から合成された熱帯熱マラリア原虫の増殖阻害薬の候補物質と言える。また、ジェランガムにはドラッグデリバリーシステムの担体としての使用の報告もあることから、この薬剤機序の解明を行うことで、新たなマラリア治療薬の開発につながることを期待される。

F. 健康危険情報

無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kato K (corresponding author), Ishiwa A. Roles of carbohydrates in the infection strategies of enteric pathogens. **Trop Med Health**. 43: 41-52. (2015)

Sugi T, Kawazu S, Horimoto T, **Kato K (corresponding author)**. A single mutation in the gatekeeper residue in TgMAPKL-1 restores the effect of bumped kinase inhibitor on cytokinesis arrest. **Int J**

Parasitol Drugs Drug Resist. 5:1-8. (2015)

Recuenco FC, Takano R, Chiba S, Sugi T, Takemae H, Murakoshi F, Ishiwa A, Inomata A, Horimoto T, Kobayashi Y, Horiuchi N, **Kato K (corresponding author)**. Lambda-carrageenan treatment exacerbates the severity of cerebral malaria caused by *Plasmodium berghei* ANKA in BALB/c mice. **Malar J.** 13:487. (2014)

Sugi T, Masatani T, Murakoshi F, Kawazu S, **Kato K (corresponding author)**. Microplate assay for screening *Toxoplasma gondii* bradyzoite differentiation with DUAL luciferase assay. **Anal Biochem.** 464C:9-11. (2014)

2. 学会発表

Terkawi Alaa, 高野 量、**加藤健太郎** 「Differentiated gene profile of macrophage induced by phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-parasitized erythrocytes」 第 84 回日本寄生虫学会、東京、2015 年 3 月

高野 量、秦 裕子、竹前 等、尾山 大明、**加藤健太郎** 「熱帯熱マラリア原虫寄生赤血球にみられるマウレル裂を構成する因子の網羅的同定」 第 84 回日本寄生虫学会、東京、2015 年 3 月

猪又 敦子、村越 ふみ、石和 玲子、堀本 泰介、**加藤健太郎** 「*Cryptosporidium parvum* の elongation factor 1alpha は宿主細胞表面のヘパリン硫酸と相互作用する」 第 84 回日本寄生虫学会、東京、2015 年 3 月

加藤健太郎 「原虫病感染症の制御と克服に向けてーマラリアとクリプトスポリジウム」 原虫病研究会、北海道、2014 年 11 月

猪又敦子、村越ふみ、石和玲子、堀本泰介、**加藤健太郎** 「クリプトスポリジウム原虫のヘパリン結合性感染抑制因子の解析」 第 157 回日本獣医学会、北海

道、2014 年 9 月

猪又 敦子、村越 ふみ、堀本 泰介、**加藤健太郎** 「*Cryptosporidium parvum* EF1- α のヘパリン結合性とその機能解析」 第 22 回分子寄生虫ワークショップ、第 12 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム 合同大会、北海道、2014 年 9 月

高野 量、尾山大明、秦 裕子、**加藤健太郎** 「熱帯熱マラリア原虫分泌タンパク質の探索」 第 22 回分子寄生虫ワークショップ、第 12 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム 合同大会、北海道、2014 年 9 月

Mohamad Alaa Terkawi, Ryo Takano, **Kentaro Kato** 「Analyses of macrophage responses to *Plasmodium falciparum*-parasitized erythrocytes」 第22回分子寄生虫ワークショップ、第12回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム 合同大会、北海道、2014年9月

土生川佳世、小林郷介、**加藤健太郎** 「マラリア原虫とヘパリンと私」 第22回分子寄生虫ワークショップ、第12回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム 合同大会、北海道、2014年9月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

加藤健太郎、杉達紀、正谷達膳（以上発明者）「抗原虫薬のスクリーニング方法及び組換えトキソプラズマ株」 特願2014-109262、国立大学法人帯広畜産大学、国立大学法人鹿児島大学（以上出願人） 2014年5月27日

2. 実用新案登録

無し。

3. その他

無し。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

| 著者氏名 | 論文タイトル名 | 書籍全体の編集者名 | 書籍名 | 出版社名 | 出版地 | 出版年 | ページ |
|--------------------|--------------------------------------|-----------|--------------------|------|------|-------|---------|
| テルカウィアラー、高野量、加藤健太郎 | ヒト末梢血由来マクロファージと熱帯熱マラリア原虫寄生赤血球の共培養法 | 高宮信三郎 | 寄生虫研究 材料と方法 2014年版 | 三恵社 | 名古屋市 | 2014年 | 9-10 |
| 加藤健太郎 | トキソプラズマ原虫のブタを用いた感染実験 | 高宮信三郎 | 寄生虫研究 材料と方法 2014年版 | 三恵社 | 名古屋市 | 2014年 | 27-28 |
| 村越ふみ、加藤健太郎 | クリプトスポリジウム原虫における培養細胞を用いた感染・増殖阻害アッセイ | 高宮信三郎 | 寄生虫研究 材料と方法 2014年版 | 三恵社 | 名古屋市 | 2014年 | 105-106 |
| 高野量、テルカウィアラー、加藤健太郎 | 熱帯熱マラリア原虫寄生赤血球貪食時におけるマクロファージ内遺伝子発現解析 | 高宮信三郎 | 寄生虫研究 材料と方法 2014年版 | 三恵社 | 名古屋市 | 2014年 | 111-116 |

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|--|--|---|------|-------|-------|
| Kato K (corresponding author) , Ishiwa A. | The roles of carbohydrates in the infection strategies of enteric pathogens | Trop Med Health. | 43 | 41-52 | 2015年 |
| Sugi T, Kawazu S, Horimoto T, Kato K (corresponding author) . | A single mutation in the gatekeeper residue in TgMAPKL-1 restores the inhibitory effect of a bumped kinase inhibitor on cell cycle | Int J Parasitol Drugs Drug Resist. | 5 | 1-8 | 2015年 |
| Recuenco FC, Takano R, Chiba S, Sugi T, Takemae H, Murakoshi F, Ishiwa A, Inomata A, Horimoto T, Kobayashi Y, Horiuchi N, Kato K (corresponding author) . | Lambda-carrageenan treatment exacerbates the severity of cerebral malaria caused by <i>Plasmodium berghei</i> ANKA in BALB/c mice | Malar J. | 13 | 487 | 2014年 |
| Sugi T, Masatani T, Murakoshi F, Kawazu S, Kato K (corresponding author) . | Microplate assay for screening <i>Toxoplasma gondii</i> bradyzoite differentiation with DUAL luciferase assay | Anal Biochem. | 464C | 9-11 | 2014年 |

ヒト末梢血由来マクロファージと熱帯熱マラリア原虫寄生赤血球の共培養法

Terkawi Mohamad Alaa¹⁾, 高野量^{1),2)}, 加藤健太郎¹⁾

1) 帯広畜産大学 原虫病研究センター 地球規模感染症学分野
〒080-8555 北海道帯広市稲田町西 2 線 13 番地

2) 東京大学 医科学研究所
〒108-8639 東京都港区白金台 4-6-1

[抄録] 熱帯熱マラリア原虫寄生赤血球は、血中マクロファージによって効率的に排除される。ここでは、ヒト末梢血由来マクロファージと熱帯熱マラリア原虫寄生赤血球の共培養法について紹介する。

キーワード; 熱帯熱マラリア原虫、マクロファージ、共培養、貪食

Co- culture of human peripheral blood- derived macrophages and *Plasmodium falciparum*- infected erythrocytes

Terkawi Mohamad Alaa¹⁾, Ryo Takano^{1),2)}, Kentaro Kato¹⁾

- 1) Research Unit for Global Infection Control, National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Inada-cho, Obihiro, Hokkaido 080-8555, Japan
2) Institute of Medical Science, The University of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan

Abstract: Macrophages play a key role for the clearance of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes in the blood. Here, we introduce the method for co-culture of human peripheral blood-derived macrophages and *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes.

Key Words; *Plasmodium falciparum*, Macrophage, Co-culture, Phagocytosis

[はじめに]

マクロファージによる病原微生物の貪食は、感染防御の第一線である。熱帯熱マラリアは、熱帯熱マラリア原虫(*Plasmodium falciparum*)に感染したハマダラカの吸血によって引き起こされる原虫感染症である。血中内のマラリア寄生赤血球は、マクロファージにより貪食され排除されるが(McGilvray *et al.*, 2000)、どのようにして原虫寄生赤血球がマクロファージ内で破壊されるのか、その詳細なメカニズムは明らかにされていない。

本稿では、その分子基盤を明らかにする一助として、ヒト末梢血由来マクロファージと、熱帯熱マラリア原虫寄生赤血球の共培養法を紹介する。共培養条件下において、マクロファージは原虫寄生赤血球を自律的に貪食し、ファゴソーム内で分解する様子が観察できる。本共培養法は、マラリア原虫のみならず、他の感染症研究においても有用である。

[方法]

(1) 熱帯熱マラリア原虫の培養

MR4より入手した、熱帯熱マラリア原虫 3D7 クローンを、培養液 I で培養する。

培養液 I

RPMI-1640 (Sigma Aldrich)
25 mM HEPES
0.15% Sodium carbonate
0.50% Albumax II (Invitrogen)
100 μM Hypoxanthine
12.5 μg/mL Gentamycine (Sigma)

10 mL の培養液 I に対し、ヒト赤血球を 100 μL (Hematocrit = 1.0%) 加え、25 cm² の培養フラスコを用いてマラリア原虫を培養する。Parasitemia が 10%を超えたら、75 cm² の培養フラスコに移し、Hematocrit が 0.2%となるよう培養液 I の液量を増やす(100 μL の赤血球に対し、50 mL の培養液 I となる)。

(2) マラリア原虫寄生赤血球の精製

トロフォゾイト・シズントが豊富な原虫寄生赤血球 100 μL (Parasitemia > 20%) を含む培養液 I から、原虫寄生赤血球のみを MACS 分離カラム (Miltenyl Biotec, Auburn CA) を用いて精製する (Ribaut *et al.*, 2008)。原虫寄生赤血球の精製効率は、血液塗末標本により確認する (一般的には、精製が上手くいくと Parasitemia > 85%となる)。精製した原虫寄生

赤血球は、5mLの培養液Iで2回洗浄し、マクロファージとの共培養に用いる。

(3) 単核球分離、及びマクロファージ分化誘導
健康なドナーから採取した末梢血から、Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare) を用いて、単核球を分離する。

あらかじめ37°Cに温めたPBSと、採取した血液を体積比1:1で混合し、6 mLのFicollに重層する。これを21°C、800gの条件で30分間遠心分離した後、末梢血由来単核球の層を回収し、PBSで2回洗浄し、以下の培養液IIに、 1.0×10^6 cells/mLとなるように懸濁する。

培養液 II

RPMI-1640 (Sigma Aldrich)
10% FCS
25 mM Penicillin/streptomycin

懸濁した細胞を25 cm²の培養フラスコに移し、37°C、5% CO₂のインキュベーター内で3時間培養する。培養後、あらかじめ4°Cに氷冷したPBSを用いて、非接着細胞を洗浄、除去する。フラスコ底面に接着した細胞は、20 µg/mLのGM-CSF、及び100 µg/mLのIFN-γを含む培養液IIを加え、37°Cの5%CO₂インキュベーター内で7日間培養し、マクロファージへと分化させる。培地は3日毎に交換する。

上記の通りに分化させたマクロファージは、通常の培養細胞と同様、1%トリプシン-EDTA溶液を用いて20分間処理することにより、フラスコ底面から剥がれる。回収したマクロファージはPBS、培養液IIを用いて3回ずつ洗浄し、 5.0×10^6 cellsとなるよう再度培養フラスコに播き直し、共培養に用いる。

(4) 共培養

末梢血由来マクロファージに、(2)で精製した熱帯熱マラリア原虫寄生赤血球を1:20の割合となるよう添加する。すなわち、 5.0×10^6 cellsのマクロファージに対し、 1.0×10^8 cellsの原虫寄生赤血球を添加する。比較対照群として、等量の非感染赤血球をマクロファージに加えた群も用意するとよい。共培養は、培養液IIの培養液を用いて、37°Cで2時間行う (Ayi *et al.*, 2004)。

共培養開始後、マクロファージによる原虫寄生赤血球の貪食が観察されるが、この貪食効率の測定は、ギムザ染色後の標本を、全体のマクロファージ数に対する、赤血球を貪食しているマクロファージ数として計測することにより得る。

[結果と考察]

ヒト末梢血由来単球から分化させたマクロファージは、非感染赤血球よりも、熱帯熱マラリア原虫寄生赤血球と共培養した際に、非常に高い貪食活性を示した(図1)。このことから、原虫寄生赤血球に暴露されたマクロファージ内では、非感染赤血球に曝された際とは異なる反応が起きていることが推察される。

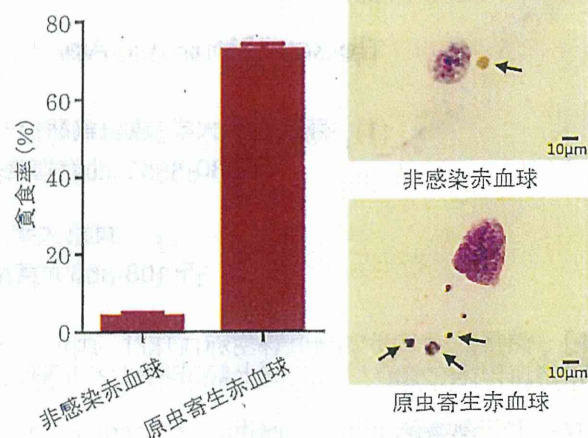


図1 マクロファージによる非感染赤血球、及び熱帯熱マラリア原虫寄生赤血球の貪食効率。ヒト末梢血由来単球から分化させたマクロファージと非感染赤血球、及び熱帯熱マラリア原虫寄生赤血球を共培養2時間後の貪食効率を測定した。左図は、測定された貪食率の違いを、右図は、赤血球を貪食するマクロファージの代表的な写真を示す。矢印：貪食された赤血球

[謝辞]

本研究は、科学研究費補助金・若手研究、挑戦的萌芽研究、新学術領域研究、テニユアトラック普及・定着事業、生物系特定産業技術研究支援センター・イノベーション創出基礎的研究推進事業、農林水産省・農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業により行われた。また、本実験は帯広畜産大学人体及びヒト試料研究倫理審査委員会の承認を受けて行われた。

[文献]

- 1) McGilvray ID, Serghides L, Kapus A, Rotstein OD, Kain KC. Nonopsonic monocyte/macrophage phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-parasitized erythrocytes: a role for CD36 in malarial clearance. *Blood* 96: 3231-40, 2000.
- 2) Ribaut C, Berry A, Chevalley S, Reybier K, Morlais I, Parzy D, Nepveu F, Benoit-Vical F, Valentin A. Concentration and purification by magnetic separation of the erythrocytic stages of all human *Plasmodium* species. *Malar. J.* 7: 45, 2008.
- 3) Ayi K, Turrini F, Piga A, Arese P. (2003) Enhanced phagocytosis of ring-parasitized mutant erythrocytes: a common mechanism that may explain protection against falciparum malaria in sickle trait and beta-thalassemia trait. *Blood* 104: 3364-71, 2003.

トキソプラズマ原虫のブタを用いた感染実験

加藤健太郎^{1),2)}

- 1) 帯広畜産大学 原虫病研究センター 地球規模感染症学分野
〒080-8555 北海道帯広市稲田町西 2 線 13 番地
- 2) 東京大学 大学院農学生命科学研究科 獣医微生物学研究室
〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

[抄録] トキソプラズマ原虫は、アピコンプレックス門に属する寄生性の原虫である。哺乳類や鳥類に幅広く感染し、ヒトにおいても世界人口の数割程度が感染している。肉の生食習慣が大きな感染リスク因子である。しかしながら、マウス等の実験動物を用いたトキソプラズマ原虫の感染実験の解析データはあるものの、我々の食生活において実際に感染媒介源となっている食肉の生産母体であり、本来の宿主動物である産業動物における感染実験の解析データは非常に少ない。本項では、著者らが行ったブタにおけるトキソプラズマ原虫の感染実験について紹介したい。

キーワード ; トキソプラズマ原虫、ブタ、感染実験

IN VIVO INFECTION EXPERIMENT OF *TOXOPLASMA GONDII* USING SWINE MODEL

KENTARO KATO^{1),2)}

- 1) RESEARCH UNIT FOR GLOBAL INFECTION CONTROL, NATIONAL RESEARCH CENTER FOR PROTOZOAN DISEASES,
OBIHIRO UNIVERSITY OF AGRICULTURE AND VETERINARY MEDICINE,
INADA-CHO, OBIHIRO, HOKKAIDO 080-8555, JAPAN
- 2) DEPARTMENT OF VETERINARY MICROBIOLOGY, GRADUATE SCHOOL OF AGRICULTURAL AND LIFE SCIENCES,
THE UNIVERSITY OF TOKYO
1-1-1 YAYOI, BUNKYO-KU, TOKYO 113-8657, JAPAN

ABSTRACT

TOXOPLASMA GONDII IS AN OBLIGATE INTRACELLULAR PARASITE OF THE PHYLUM APICOMPLEXA. *TOXOPLASMA GONDII* CAN INFECT MAMMALS AND BIRDS WIDELY. LARGE POPULATION IN THE WORLD CAN BE INFECTED WITH THIS PARASITE. THE FOOD HABIT OF FRESH MEAT IS A MAJOR RISK FACTOR FOR THE INFECTION. ALTHOUGH THE EXPERIMENTAL INFECTIONS WITH *TOXOPLASMA* HAVE BEEN ANALYZED USING THE EXPERIMENTAL ANIMALS SUCH AS MICE, FEW DATA OF EXPERIMENTAL INFECTIONS USING THE ORIGINAL HOSTS, THE INDUSTRIAL FARM ANIMALS, FROM WHICH MEAT IS GENERATED, EXIST. HERE THE AUTHORS INTRODUCE THE CASE OF EXPERIMENTAL INFECTION WITH *TOXOPLASMA GONDII* USING SWINE.

KEY WORDS; EXPERIMENTAL INFECTION, SWINE, *TOXOPLASMA GONDII*

[はじめに]

トキソプラズマ原虫は哺乳類や鳥類に幅広く感染し、ネコを終宿主とする人獣共通の感染症を引き起こすことが知られている (SAKIKAWA ET AL., 2012)。ヒトへの感染経路としては、ネコの糞便中のオーシスト (虫卵) や生肉中の虫体を経口摂取することが主である。特に、肉の生食習慣が大きな感染リスク因子である。しかしながら、感染源であるブタ、ヒツジ等由来の食肉についての感染状況についての報告は乏しく、感染源となる動物を用いた感染実験の報告も数少ない。

このような現状の中、本項では著者らが行ったブタを用いたトキソプラズマ原虫の感染実験の方法について紹介したい。しかしながら、著者らが行った方法が最良の手法というわけではなく、過去の報告例も少ないことから、試行錯誤の状態であり、現在もこの最適化に取り組んでいるところである。

[方法]

[A] 準備

① ブタ

著者らが行ったトキソプラズマ原虫の感染時には 14 日齢のブタを用いた。若齢のため、

飼育室に入荷後、馴化飼育に 5 日程度かける必要がある。従って、この場合は 9 日齢で入荷した。

ブタは産業動物であることから、マウスのような実験動物とはコストや取扱いの面で実験に供することが難しい点が多い。著者らは、ノーマル、SPF、去勢オス (LW) のブタを用いた。LW とは、ランドレース種 (L) と大ヨークシャー種 (W) を掛け合わせた雑種ブタである。1 回の感染実験で、10 頭程度を使用した。

② トキソプラズマ原虫

原虫株としては、マウスに対して致死的で強毒株である RH 株 (TYPE I) を使用した。ブタから分離された株を使うことも考えられる。著者らはブタでの感染実験の報告があったため、RH 株を用いた。

[B] 手順

(1) トキソプラズマ原虫の培養

I. 感染実験に供するためのトキソプラズマ原虫 (タキゾイト) を作製する。原虫を培養細胞に感染させることで、培養及び精製を行う。原虫の培養と精製の方法については本書 2012 年版の杉らの項を参照していただきたい。著者らは VERO 細胞を用いて培養した原虫を用いている。

(2) ブタへのトキソプラズマ原虫の投与

I. ブタに原虫を投与する経路であるが、大きく分けて、腹腔内投与と静脈投与が想定される。注射針は 23G を使用した。

[腹腔内投与] 図 1 の通り、ブタを逆さにした状態で鼠蹊部に投与する。

[静脈投与] 投与部位としては、頸静脈、乳静脈、耳介静脈が考えられる。このうち、頸静脈への投与を図 2 に示す。ブタの頸静脈は皮下からやや深い位置にあるため、注射時に血管を探す必要があり、慣れていない場合は安定的な投与が難しい。

II. ブタに投与する原虫数であるが、著者らの実験では、 10^7 、 10^8 個 (腹腔内投与)、 $10^4 \sim 10^7$ 個 (頸静脈に投与) の原虫を投与した。

(3) ブタでのトキソプラズマ原虫の感染実験

I. 飼育室に搬入後、血清を採取し、トキソテスト (栄研) により、トキソプラズマへの感染が無いことの確認を行う。

II. 14 日齢のブタに原虫を投与した後は、再度の投与は行っていない。

III. 感染後は毎日症状の観察を行い、体温、体重の測定を行った。



図 1 ブタの鼠蹊部への腹腔内投与の様子。



図 2 ブタの頸静脈への投与の様子。

[結果]

トキソプラズマ感染ブタについては、感染後 4、5 日目に発熱が観察された。感染実験後の各臓器での病理学的検査では、腹腔内投与、静脈投与ともに、投与原虫数に関わらず、原虫感染による炎症像が観察された。しかしながら、病理像に関しては、投与した原虫数に依存した解析結果が得られなかった。また、腹腔内投与に比べて、静脈投与のほうが全身性の病理像がより少ない原虫の投与数においても得られることが明らかとなった。

[考察]

ブタを用いたトキソプラズマ原虫の感染実験の例を上 に示した。上記の結果から、感染実験系によって、安定した解析結果を得るには、安定した投与経路を確保する必要があることが明らかとなった。今後の実験では、静脈投与を選択し、かつより確実な投与経路を確保するため、耳介静脈からの投与実験を予定している。

[謝辞]

本研究は、科学研究費補助金・若手研究、挑戦的萌芽研究、新学術領域研究、テニュアトラック普及・定着事業、生物系特定産業技術研究支援センター・イノベーション創出基礎的研究推進事業、農林水産省・農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業により行われた。

また、本実験は帯広畜産大学動物実験委員会の承認を受けて行われた。トキソプラズマ病は届出伝染病であるため、関連法規に則って実験を実施した。

[文献]

原著

1) SAKIKAWA M, NODA S, HANAOKA M, NAKAYAMA H, HOJO S, KAKINOKI S, NAKATA M, YASUDA T, IKENOUE T, KOJIMA T. ANTI-TOXOPLASMA ANTIBODY PREVALENCE, PRIMARY INFECTION RATE, AND RISK FACTORS IN A STUDY OF TOXOPLASMOSIS IN 4,466 PREGNANT WOMEN IN JAPAN. CLIN VACCINE IMMUNOL, 19: 365-367, 2012.

成書

2) 杉達紀、加藤健太郎：トキソプラズマ原虫の培養と精製、寄生虫学研究 材料と方法 2012 年版、三恵社、愛知、41-44, 2012