

201403014B

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24年度～26年度 総合研究報告書

研究代表者 加藤 健太郎

平成27（2015）年 5月

目 次

I. 総合研究報告	
新しい抗マラリア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	----- 10
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 13

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。

平成24年度は、熱帯熱マラリア原虫の赤血球培養系において、硫酸化多糖類としてヘパリン、λ、κ、ιカラギーナン、硫酸化κカラギーナン、ジェランガム、硫酸化ジェランガムを用いて、赤血球侵入阻害試験と増殖阻止試験を行った。この結果、ヘパリン、λカラギーナン、硫酸化ジェランが高い阻害効果を示した。また、ジェランガムをはじめ、硫酸化を付加した糖鎖の作製を進めた。

平成25年度はヘパリン親和性クロマトグラフィーを用いて原虫抽出液から特定の原虫膜蛋白質の捕捉を行った。次に、捕捉した原虫膜蛋白質を糖鎖への結合強度によって分画し、各分画に対する抗体がマラリア原虫の感染阻止に効果があるかを解析した。この結果、1つの分画に対する抗体について感染阻止能を持つものを同定した。

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。

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alaria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alaria薬開発を目的として、まずウイルスベクターを用いてマalaria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リン硫酸等の糖鎖レセプターの同定に成功し、糖鎖がマalaria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alaria作用があることを見出した糖鎖について、新しい抗マalaria戦略を目指した糖鎖製剤とマalariaワクチンの実用化に向けた開発研究を行うことにある。以上の途上国の現状とマalaria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

研究代表者らは原虫の感染レセプターの同定系を確立し、これまでにヘパリン硫酸、シアル酸、コンドロイチン硫酸といった糖鎖レセプターを同定してきた。以下に、平成24年度、25年度、26年度に各年度において実施した研究の方法について記す。

[平成24年度]

様々な糖鎖とその派生体を用いてどの糖鎖構造体がマalaria原虫の感染に重要か解析を行った。

(i) ヘパリン、コンドロイチン硫酸、フコイダン、デキストラン硫酸等の各種硫酸化多糖類を用いて、熱帯熱マalaria原虫の赤血球侵入（感染）阻止能についての解析をマalaria原虫の培養系において行った。

(ii) (i)で感染阻止に効果のあった糖鎖について硫酸基等の側鎖の位置が異なる派生体や様々な分子量の糖鎖群を用いて、感染阻止能の解析を行い、どの糖鎖構造体が原虫感染阻止に重要であるかを解析した。

[平成25年度]

糖鎖結合性の原虫膜蛋白質を抗原とした抗体を作製し、これらの抗体が感染防御能を持つか解析を行った。

(i) ヘパリン親和性クロマトグラフィーを用いて成熟ジゾンド期のマalaria原虫抽出液から特定の原虫膜蛋白質の捕捉を行った。

(ii) (i)で捕捉した原虫膜蛋白質をヘパリンへの結合強度によって分画し、各分画を用いてマウスに免疫することで、これらに対する抗体をそれぞれ作成した。

(iii) (ii)で作製した抗体がマalaria原虫の感染阻止に効果があるかを解析した。

[平成26年度]

マウスマalaria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alaria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。

(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alaria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alaria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)

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、実施した東京大学大学院農学生命科学研究科及び帯広畜産大学から認可を受け

ている。

C. 研究結果

(i) ヘパリン、 λ 、 κ 、 ι カラギーナン、硫酸化 κ カラギーナン、ジェランガム、硫酸化ジェランガムの各種硫酸化多糖類を用いて、熱帯熱マラリア原虫の赤血球侵入（感染）阻止能についての解析をマラリア原虫の培養系において行った。

(ii) (i)で感染阻止に効果のあった糖類について硫酸基等の側鎖の位置が異なる派生体や様々な分子量の糖鎖群を用いて、感染阻止能の解析を行い、ヘパリン、 λ カラギーナン、硫酸化ジェランが高い阻害効果を示した。

(iii) ヘパリン親和性クロマトグラフィーを用いることで、成熟ジゾンド期のマラリア原虫抽出液から原虫の蛋白質を捕捉することに成功した。

(iv) (iii)で捕捉した原虫膜蛋白質をヘパリンへの結合強度によって分画し、各分画を用いてマウスに免疫して作出した抗体群の中で、1つの分画に対する抗体が強い感染阻止能を持っていた。

(v) 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。

(vi) 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。

(vii) 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

熱帯熱マラリア原虫の赤血球侵入（感染）阻止能について、ヘパリン、 λ カラギーナン、硫酸化ジェランが高い阻害効果を示した。また、硫酸化度の高い硫酸化多糖類では、その阻害効果が高い傾向があることが明らかとなった。今後は、マウスマラリア原虫を用いた動物感染実験によって阻害効果のあった糖鎖派生体について実際の生体内での効果を

解析する必要がある。

ヘパリン親和性クロマトグラフィーを用いて成熟ジゾンド期のマラリア原虫抽出液から特定の原虫膜蛋白質の捕捉を行った。ヘパリンへの結合強度によって溶出して得られた各分画において、銀染色において複数のバンドが見られたため、原虫の蛋白質を捕捉することに成功したことが示唆された。さらに、各分画を用いてマウスに免疫して作出した抗体群の中で、1つの分画に対する抗体が強い感染阻止能を持っていた。今後はこの分画に含まれている原虫蛋白質を同定する必要がある。

硫酸化多糖類は高分子多糖であるため、実際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

熱帯熱マラリア原虫の赤血球培養系において、硫酸化多糖類としてヘパリン、 λ 、 κ 、 ι カラギーナン、硫酸化 κ カラギーナン、ジェランガム、硫酸化ジェランガムを用いて、赤血球侵入阻害試験と増殖阻止試験を行った。この結果、ヘパリン、 λ カラギーナン、硫酸化ジェランが高い阻害効果を示した。また、ジェランガムをはじめ、硫酸化を付加した糖鎖の作製を進めた。 λ カラギーナンについては、他のカラギーナンと比べて元々硫酸化度が高い。

研究代表者らのこれまでの研究成果から糖鎖はマラリアワクチン候補分子で赤血球侵入時に働く原虫膜蛋白質群に結合性があることが明らかとなった。このことから、ヘパリン親和性クロマトグラフィーを用いて原虫抽出液から特定の原虫膜蛋白質の捕捉を行った。次に、捕捉した原虫膜蛋白質を糖鎖への結合強度によって分画し、各分画に対する抗体がマラリア原虫の感染阻止に効果があるかを解析した。この結果、1つの分画に対する抗体につ

いて感染阻止能を持つものを同定した。

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. The 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 inhibitory effect of a bumped kinase inhibitor on cell cycle. **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)

Recuenco FC, Kobayashi K, Ishiwa A, Enomoto-Rogers Y, Fundador NGV, Sugi T, Takemae H, Iwanaga T, Murakoshi F, Gong H, Inomata A, Horimoto T, Iwata T, **Kato K (corresponding author)**. Gellan sulfate inhibits *Plasmodium falciparum* growth and invasion of red blood cells *in vitro*. **Sci Rep. (Nature Publishing Group)** 4:4723. (2014) 帯広畜産大学プレスリリース、東京大学大学院農学生命科学研究科研究成果 (2014年4月23日)、十勝毎日新聞記事掲載 (2014年5月2日1面)、UTokyo Research 記事掲載 (2014年5月14日)、北海道新聞記事掲載 (2014年5月22日朝刊29面)

Kobayashi K, Takano R, Takemae H, Sugi T, Gong H, Recuenco FC, Iwanaga T, Horimoto T, Akashi H, **Kato K (corresponding author)**. Analyses of interactions between heparin and the apical surface proteins of *Plasmodium falciparum*. **Sci Rep. (Nature Publishing Group)** 3:3178. (2013) 帯広畜産大学プレスリリース、東京大学大学院農学生命科学研究科プレスリリース (2013年11月13日)、Todai Research 記事掲載 (2013年11月21日)、日経産業新聞記事掲載 (2013年11月21日11面)、十勝毎日新聞記事掲載 (2013年11月25日24面)、北海道新聞記事掲載 (2013年11月26日朝刊25面)

Ishiwa A, Kobayashi K, Takemae H, Sugi T, Gong H, Recuenco FC, Murakoshi F, Inomata A, Horimoto T, **Kato K (corresponding author)**. Effects of dextran sulfates on the acute infection and growth stages of *Toxoplasma gondii*. **Parasitol Res**. 112: 4169-4176. (2013)

Iwanaga T, Sugi T, Kobayashi K, Takemae H, Gong H, Recuenco FC, Ishiwa A, Horimoto T, Akashi H, **Kato K (corresponding author)**. Characterization of *Plasmodium falciparum* cdc2-related kinase and the effects of a CDK inhibitor on the parasites in erythrocytic schizogony. **Parasitol Int**. 62: 423-430. (2013) **Malaria Nexus**記事掲載 (2013年6月6日)

月

Gen F, Yamada S, **Kato K**, Akashi H, Kawaoka Y, Horimoto T. Attenuation of an influenza A virus due to alteration of its hemagglutinin-neuraminidase functional balance in mice. **Arch Virol**. 158:1003-1011. (2013)

Kobayashi K, Takemae H, Sugi T, Gong H, Recuenco F, Iwanaga T, Horimoto T, Akashi H, **Kato K (corresponding author)**. Approach for the development of antiprotozoal agents and vaccines on the basis of invasion inhibitory effect of heparin. **Jpn J Vet Parasitol**. 11:23. (2012)

Gong H, Kobayashi K, Sugi T, Takemae H, Kurokawa H, Horimoto T, Akashi H, **Kato K (corresponding author)**. A novel PAN/apple domain-containing protein from *Toxoplasma gondii*: characterization and receptor identification. **PLoS One**. 7:e30169. (2012)

Kato K (corresponding author), Sugi T, Iwanaga T. Roles of Apicomplexan protein kinases at each life cycle stage. **Parasitol Int**. 61: 224-234. (2012)
Malaria Nexus 記事掲載 (2012年3月9日)

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alaria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

加藤健太郎 「原虫感染症の制御と克服に向けて—マalaria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alaria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alaria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alaria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alaria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alaria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alaria研究フォーラム 合同大会、北海道、2014年9月

石和 玲子, 杉達紀, レクエンコ・フランセス, 村越 ふみ, 竹前等, 堀本泰介, **加藤健太郎** 「硫酸化多糖類によるトキソプラズマ原虫の感染およびマウス生存率に与える影響」 第83回日本寄生虫学会、愛媛、2014年3月

猪又 敦子, 村越 ふみ, 石和 玲子, 堀本泰介, **加藤健**

太郎「ヘパリンのクリプトスポリジウム原虫に対する感染阻害機構の解析」第83回日本寄生虫学会、愛媛、2014年3月

高野量、竹前等、杉達紀、田坂修也、加藤健太郎「マラリア原虫感染赤血球における分泌タンパク質のインタラクトーム解析」第83回日本寄生虫学会、愛媛、2014年3月

Recuenco Frances Cagayat, Herbas Maria Shirley, 杉達紀、竹前等、高野量、村越ふみ、石和玲子、加藤健太郎「Lambda carrageenan treatment induces cerebral malaria in BALB/c mice infected with *Plasmodium berghei* ANKA」第83回日本寄生虫学会、愛媛、2014年3月

Frances Recuenco, 小林郷介、石和玲子、ロジャース有希子、Noreen Fundador, 杉達紀、竹前等、岩永達也、村越ふみ、猪又敦子、堀本泰介、岩田忠久、加藤健太郎「Assessing the microbial polysaccharide gellan gum and its sulfated derivative on their inhibition of growth of *Plasmodium yoelii* 17XL in BALB/c mice」第156回日本獣医学会、岐阜、2013年9月

竹前等、杉達紀、高野量、村越ふみ、Recuenco Frances C., 石和玲子、堀本泰介、横山直明、加藤健太郎「小型ピロプラズマ主要膜抗原と結合する宿主因子の解析」第156回日本獣医学会、岐阜、2013年9月

猪又敦子、村越ふみ、石和玲子、加藤健太郎、堀本泰介「クリプトスポリジウム原虫に対する感染阻害糖鎖の探索および阻害機構の解明」第156回日本獣医学会、岐阜、2013年9月

石和玲子、杉達紀、竹前等、レクエンコ・フランセス、村越ふみ、猪又敦子、ロジャース有希子、フンダドル・ノリーン、堀本泰介、岩田忠久、加藤健太郎「硫酸化多糖類投与によるトキソプラズマ原虫感染・増殖

に対する影響」第156回日本獣医学会、岐阜、2013年9月

高野量、田坂修也、加藤健太郎「マラリア原虫分泌蛋白質のインタラクトーム解析」第21回分子寄生虫学ワークショップ、神戸、2013年8月

石和玲子、杉達紀、竹前等、レクエンコ・フランセス、村越ふみ、猪又敦子、堀本泰介、加藤健太郎「硫酸化多糖類によるトキソプラズマ原虫感染・増殖阻害効果の解析」第21回分子寄生虫学ワークショップ、神戸、2013年8月

猪又敦子、村越ふみ、石和玲子、堀本泰介、加藤健太郎「多糖鎖によるクリプトスポリジウム原虫に対する感染阻害」第21回分子寄生虫学ワークショップ、神戸、2013年8月

Frances Recuenco, 石和玲子、小林郷介、ロジャース有希子、Noreen Grace Fundador, 竹前等、ゴン海燕、杉達紀、村越ふみ、岩永達也、堀本泰介、岩田忠久、加藤健太郎「*In vitro* growth inhibition activities of modified carrageenans and gellan gum against *Plasmodium falciparum* 3D7」第82回寄生虫学会、東京、2013年3月

石和玲子、杉達紀、レクエンコ・フランセス、ロジャース有希子、フンダドル・ノリーン、竹前等、堀本泰介、岩田忠久、加藤健太郎「海藻由来及び合成硫酸化多糖類によるトキソプラズマ原虫の感染および増殖阻害」第82回寄生虫学会、東京、2013年3月

岩永達也、杉達紀、小林郷介、堀本泰介、明石博臣、加藤健太郎「熱帯熱マラリア原虫のサイクリン依存性キナーゼ相同遺伝子の機能解析」第82回寄生虫学会、東京、2013年3月

Haiyan Gong, Kyouzuke Kobayashi, Tatsuki Sugi, Hitoshi Takemae, Akiko Ishiwa, Taisuke Horimoto, Hiroomi Akashi, Kentaro Kato. "Two adhesive

domain-containing proteins are involved in the interaction of *Toxoplasma gondii* with host cell.” Molecular Parasitology Meeting XXIII, Woods Hole, MA, USA. (2012.9) 日本獣医寄生虫学会より招待派遣

Frances Recuenco、石和玲子、小林郷介、ロジャース有希子、Noreen Grace Fundador、竹前 等、ゴン海燕、杉 達紀、村越ふみ、岩永達也、堀本泰介、岩田忠久、加藤健太郎「Effect of λ -carrageenan on the course of infection of *Plasmodium yoelii* in BALB/c mice」第 154 回日本獣医学会、岩手、2012 年 9 月

ゴン海燕、小林郷介、杉達紀、竹前等、堀本泰介、明石博臣、加藤健太郎「To explore the interaction factors in *Toxoplasma gondii* infection」第 154 回日本獣医学会、岩手、2012 年 9 月 第 3 回日本獣医寄生虫学奨励賞受賞

岩永達也、杉達紀、小林郷介、堀本泰介、明石博臣、加藤健太郎「熱帯熱マラリア原虫に対するサイクリン依存性キナーゼ(CDK)阻害剤の影響」第 154 回日本獣医学会、岩手、2012 年 9 月

石和玲子、小林郷介、杉達紀、竹前等、ゴン海燕、レクエンコ・フランセス、村越ふみ、堀本泰介、明石博臣、加藤健太郎「硫酸化多糖類によるトキソプラズマ原虫増殖阻害に関する解析」第 154 回日本獣医学会、岩手、2012 年 9 月

岩永達也、杉達紀、小林郷介、堀本泰介、明石博臣、加藤健太郎「熱帯熱マラリア原虫の赤血球内発育におけるサイクリン依存性キナーゼの役割」第 20 回分子寄生虫学ワークショップ、神戸、2012 年 8 月

Frances Recuenco、小林郷介、石和玲子、竹前 等、ゴン海燕、杉達紀、村越ふみ、岩永達也、堀本泰介、加藤健太郎「The effect of carrageenans on the course of infection of *Plasmodium yoelii* and *Plasmodium berghei* in BALB/c mice」第 20 回分子寄生虫学ワークショップ、神戸、2012 年 8 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
加藤健太郎	熱帯熱マラリア原虫の赤血球侵入試験	浅川満彦	寄生虫研究 材料と方法 2013年版	三恵社	名古屋市	2013年	91-92
レクエンコフランセス、加藤健太郎	熱帯熱マラリア原虫の増殖阻害試験	浅川満彦	寄生虫研究 材料と方法 2013年版	三恵社	名古屋市	2013年	89-90
石和玲子、加藤健太郎	マウスを用いたトキソプラズマ原虫感染実験	浅川満彦	寄生虫研究 材料と方法 2013年版	三恵社	名古屋市	2013年	51-53
竹前 等、小林郷介、加藤健太郎	トキソプラズマ原虫膜抗原の糖鎖結合性の解析法	浅川満彦	寄生虫研究 材料と方法 2013年版	三恵社	名古屋市	2013年	27-29
田坂修也、加藤健太郎	赤内期における熱帯熱マラリア原虫の培養法	浅川満彦	寄生虫研究 材料と方法 2013年版	三恵社	名古屋市	2013年	47-50
加藤健太郎	原虫プロテインキナーゼの酵素活性測定系	宇賀昭二、丸山治彦	寄生虫研究 材料と方法 2012年版	三恵社	名古屋市	2012年	111-112
小林郷介、加藤健太郎	ヘパリンを用いた熱帯熱マラリア原虫の同調培養法	宇賀昭二、丸山治彦	寄生虫研究 材料と方法 2012年版	三恵社	名古屋市	2012年	37-40
ゴン海燕、玄学南、加藤健太郎	プルダウン法を用いたトキソプラズマ原虫の宿主細胞レセプターの同定	宇賀昭二、丸山治彦	寄生虫研究 材料と方法 2012年版	三恵社	名古屋市	2012年	103-104

石和玲子、 加藤健太郎	培養細胞を用いたトキソプラズマ原虫培養系における感染・増殖阻害アッセイ	宇賀昭二、丸山治彦	寄生虫研究 材料と方法 2012年版	三恵社	名古屋市	2012年	105-108
岩永達也、 加藤健太郎	熱帯熱マラリア原虫の培養系における増殖阻害アッセイ	宇賀昭二、丸山治彦	寄生虫研究 材料と方法 2012年版	三恵社	名古屋市	2012年	109-110
杉達紀、 加藤健太郎	トキソプラズマ原虫の培養と精製	宇賀昭二、丸山治彦	寄生虫研究 材料と方法 2012年版	三恵社	名古屋市	2012年	41-44

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
Recuenco FC, Kobayashi K, Ishiwa A, Enomoto-Rogers Y, Fundador NGV, Sugi T, Takemae H, Iwanaga T, Murakoshi F, Gong H, Inomata A, Horimoto T, Iwata T, Kato K (corresponding author)	Gellan sulfate inhibits <i>Plasmodium falciparum</i> growth and invasion of red blood cells <i>in vitro</i>	Sci Rep. (Nature Publishing Group)	4	4723	2014年
Kobayashi K, Takano R, Takemae H, Sugi T, Gong H, Recuenco FC, Iwanaga T, Horimoto T, Akashi H, Kato K (corresponding author)	Analyses of interactions between heparin and the apical surface proteins of <i>Plasmodium falciparum</i>	Sci Rep. (Nature Publishing Group)	3	3178	2013年

Ishiwa A, Kobayashi K, Takemae H, Sugi T, Gong H, Recuenco FC, Murakoshi F, Inomata A, Horimoto T, <u>Kato K (corresponding author)</u>	Effects of dextran sulfates on the acute infection and growth stages of <i>Toxoplasma gondii</i>	Parasitol Res.	112	4169-4176	2013年
Iwanaga T, Sugi T, Kobayashi K, Takemae H, Gong H, Recuenco FC, Ishiwa A, Horimoto T, Akashi H, <u>Kato K (corresponding author)</u>	Characterization of <i>Plasmodium falciparum</i> cdc2-related kinase and the effects of a CDK inhibitor on the parasites in erythrocytic schizogony	Parasitol Int.	62	423-430	2013年
Gen F, Yamada S, <u>Kato K</u> , Akashi H, Kawaoka Y, Horimoto T	Attenuation of an influenza A virus due to alteration of its hemagglutinin-neuraminidase functional balance in mice	Arch Virol.	158	1003-1011	2013年
Kobayashi K, Takemae H, Sugi T, Gong H, Recuenco F, Iwanaga T, Horimoto T, Akashi H, <u>Kato K (corresponding author)</u>	Approach for the development of antiprotozoal agents and vaccines on the basis of invasion inhibitory effect of heparin	Jpn J Vet Parasitol.	11	23	2012年
<u>Kato K (corresponding author)</u> , Sugi T, Iwanaga T	Roles of Apicomplexan protein kinases at each life cycle stage	Parasitol Int.	61	224-234	2012年
Gong H, Kobayashi K, Sugi T, Takemae H, Kurokawa H, Horimoto T, Akashi H, <u>Kato K (corresponding author)</u> .	A novel PAN/apple domain-containing protein from <i>Toxoplasma gondii</i> : characterization and receptor identification	PLoS One.	7	e30169	2012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 Gentamycin (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・シゾン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。

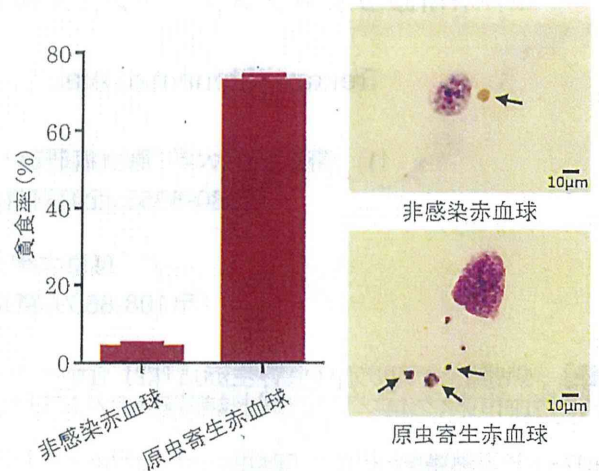


図1 マクロファージによる非感染赤血球、及び熱帯熱マラリア原虫寄生赤血球の貪食効率。ヒト末梢血由来単球から分化させたマクロファージと非感染赤血球、及び熱帯熱マラリア原虫寄生赤血球を共培養2時間後の貪食効率を測定した。左図は、測定された貪食率の違いを、右図は、赤血球を貪食するマクロファージの代表的な写真を示す。矢印：貪食された赤血球

[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、テニューアトラック普及・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半数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。

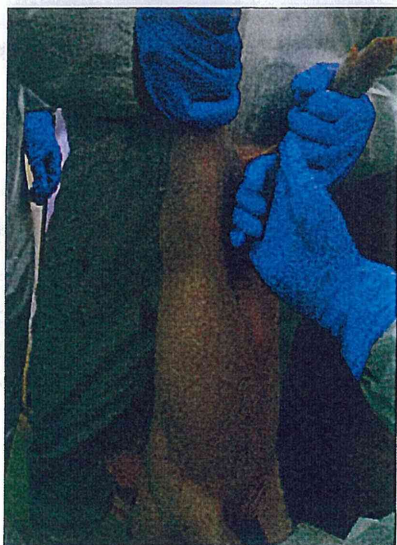


図 1 ブタの鼠蹊部への腹腔内投与の様子。



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

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

村越ふみ^{1), 2)}, 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] 添加薬剤によるクリプトスポリジウム原虫の感染・増殖阻害効果を *in vitro* で検証する実験系について説明する。

キーワード ; クリプトスポリジウム原虫, 感染阻害, 増殖阻害

Infection/growth inhibition analyses of *Cryptosporidium parvum* by various additives using *in vitro* culture system

Fumi Murakoshi^{1), 2)}, 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: We described methods to examine the effects of inhibition / growth inhibitors using *in vitro* culture system of *Cryptosporidium parvum*.

Key Words: *Cryptosporidium parvum*, infection inhibition, growth inhibition

[はじめに]

クリプトスポリジウム症はヒトにおいて免疫不全患者で重篤となり、仔牛において生産性の低下や斃死を引き起こすことで問題となるが、有効な薬剤が存在しない。本稿では、薬剤探索法の一つとして培養細胞株を用いたクリプトスポリジウム原虫の増殖・侵入阻害実験について説明する。本方法では 96well プレートと蛍光抗体を用いたカウント法を用いるため、少ない原虫数と視野数で比較的省力的に精度の高い薬剤探索を行うことが可能である。

[方法]

本稿では、上記実験系の例として、クリプトスポリジウム原虫に対して一定の効果を持つニタゾキサニド(Rossignol *et al.*, 2001)をポジティブコントロールとして用いた増殖阻害効果の検討法を示す。

[A]材料、道具

原虫株: *Cryptosporidium parvum* (HNJ-1 株)

宿主細胞: HCT-8 (ATCC No. CCL-244TM)

[培地]

HCT-8 を用いた本原虫用培地の組成は Upton ら(1995)の方法を参照している。

HCT-8 維持培地: RPMI-1640 with 10mM

HEPES, 1mM sodium pyruvate, 1.5/L sodium bicarbonate and 10% FCS. ペニシリン、ストレプトマイシン。

クリプトスポリジウム原虫維持培地: 細胞の維持培地に 50 mM glucose, 35 mg of ascorbic acid, 1.0 mg of folic acid, 4.0 mg of 4-aminobenzoic acid, 2.0 mg of calcium pantothenate を加える。抗生物質はペニシリン、ストレプトマイシンの他に 0.25 mg/ml の amphotericin B (Fungizone) を加える。

[脱殻用試薬、道具]

本原虫のオーシストからスポロゾイトへの脱殻は Rochelle ら(2002)の方法を部分的に変更して行っている。

6%次亜塩素酸ナトリウム、AHBSS (pH2.0 に調整した HBSS)、1%タウロコール酸ナトリウム (sigma T0875) in PBS、1%トリプシン (GIBCO®) in PBS

精製フィルター: Millex SV 5.00um (Millipore)

[観察用試薬、機器]

Sporo-gloTM (Waterborne, Inc.): クリプトスポリジウム特異的な標識付ポリクローナル抗体
オールインワン蛍光顕微鏡 (株式会社キーエンス BZ-9000)

[B]脱殻

- ①塩化セシウム精製により高度に精製されたクリプトスポリジウムオーシストを用いる。1mlのPBSに懸濁した原虫オーシストにピューラックスを1 μ l加え、氷上で10min静置する(ここから無菌操作を行う。)。その後、PBSで3回遠心洗浄する。
- ②オーシストのペレットにAHBSSを1ml加え、37°Cで30分インキュベートする。
- ③遠心上清を除き、タウロコール酸を750 μ l、トリプシンを250 μ l加えて37°Cで60分インキュベートする。
- ④顕微鏡下にて脱殻率を確認する(図1)。十分に脱殻していた場合はPBSで2回洗浄する。
- ⑤スポロゾイトの懸濁液をMillex SVフィルターに通し、脱殻後のオーシストウォールを取り除く。得たスポロゾイト懸濁液を遠心して1mlのPBS懸濁液にまとめる。血球計算盤などを用いて顕微鏡下でスポロゾイト数をカウントする。

[C] [接種]

- ①接種時にコンフルエントになるよう、96wellに播種したHCT-8細胞を用意する。スポロゾイトが 2×10^5 個/mlとなるよう調整し、1wellに200 μ lずつ播種する(1wellに 4×10^4 接種)。
- ②侵入しなかった原虫を除くため、3h後に培地を交換する。増殖阻害実験を行う際は、交換する培地に薬剤を加えておく。接種後48時間培養する。(今回はニタゾキサニドを10 μ M, 5 μ M, 1 μ M, 0.1 μ Mの濃度になるよう調整した培地と、コントロールとしてDMSOを加えた培地を用意し、培地交換を行った。)

[観察]

- ①細胞をPBS(-)で素早く3回洗浄
- ②ice coldメタノールで5分固定し、PBS(-)で3回洗浄する
- ③1%BSA in PBS(-)で15分ブロッキングする
- ④sporo-glo(1 \times)を1%BSA in PBS(-)で3倍希釈し、96wellに加え1時間室温で遮光静置
- ⑤PBS(-)で3回洗浄し、50 μ lPBS(-)を加える
- ⑥オールインワン顕微鏡、対物レンズ $\times 10$ 倍にて、wellの蛍光をカウントする(図2)。

[結果・考察]

増殖阻害曲線を書くことにより(図3)、ニタゾキサニドの IC_{50} は1.36 μ Mとなった。変動係数(CV)は2.5%であり、増殖阻害評価系として、本実験系が使用可能であることがわかった。

[謝辞]

本研究は、文部科学省特別研究奨励費及び科学研究費補助金・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。

[文献]

- 1) Rossignol JF, Ayoub A, Ayers MS. Treatment of diarrhea caused by *Cryptosporidium parvum*: a prospective randomized, double-blind, placebo-controlled study of Nitazoxanide. J Infect Dis. 184:103-106, 2001.
- 2) Upton SJ, Tilley M, Brillhart DB. Effects of select medium supplements on in vitro development of *Cryptosporidium parvum* in HCT-8 cells. J Clin Microbiol. 33:371-375, 1995.
- 3) Rochelle PA, Marshall MM, Mead JR, Johnson AM, Korich DG, Rosen JS, De Leon R. Comparison of *in vitro* cell culture and a mouse assay for measuring infectivity of *Cryptosporidium parvum*. Appl Environ Microbiol. 68:3809-3817, 2002.

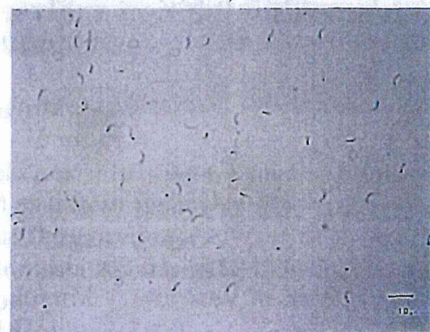


図1 脱殻したスポロゾイト



図2 蛍光顕微鏡像

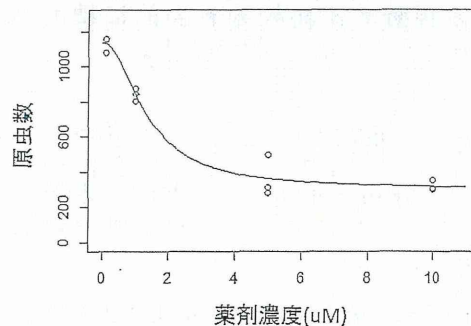


図3 生存曲線

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

高野量^{1),2)}, Terkawi Mohamad Alaa¹⁾, 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】 ヒト末梢血由来マクロファージは、非感染赤血球に比べ、熱帯熱マラリア原虫寄生赤血球に対し、高い貪食・破壊活性を示す。ここでは、マクロファージによる原虫寄生赤血球の選択的な貪食・破壊指向性の分子基盤を明らかにするために、原虫寄生赤血球とマクロファージの共培養系を利用した、マクロファージ内における遺伝子発現応答の解析手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、遺伝子発現、バイオインフォマティクス

Gene expression analysis of human peripheral blood-derived macrophages exposed to *Plasmodium-falciparum* infected erythrocytes.

Ryo Takano^{1,2)}, Terkawi Mohamad Alaa¹⁾, 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: Human peripheral blood-derived macrophages show highly specific phagocytic activity to *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes as compared to those co-cultured with uninfected erythrocytes. Here, to gain better insights into the possible mechanism by which macrophages preferentially phagocytize and kill the parasitized erythrocytes, we introduce the method for analyzing the gene expression of human peripheral blood-derived macrophages exposed to *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes.

Key Words: *Plasmodium falciparum*, Macrophage, Gene expression, Bioinformatics

【はじめに】

マラリアは世界三大感染症の一つとして、感染者は年間約 2 億人、死亡者は 60~70 万人に上ると推測され、その対策が急務とされている原虫感染症である。赤血球内に寄生するマラリア原虫は、その増殖に伴い赤血球を破壊し、これが貧血、発熱、脾腫等といった臨床症状を引き起こす。血中内のマラリア原虫寄生赤血球の排除には、単球とマクロファージの動員と活性化が必須であるが、マクロファージがどのようにマラリア原虫寄生赤血球を破壊するか、その詳しいメカニズムは不明な点が多い。

本書の Terkawi らの稿で述べたように、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系を用いると、原虫寄生赤血球がマクロファージに効率良く貪食される様子が観察される。本稿では、その分子基盤を明らかにする一助として、原虫寄生赤血球、

及び非感染赤血球と共培養後のマクロファージにおける細胞内遺伝子発現の網羅的解析手法について紹介する。

遺伝子発現解析は、現在、マイクロアレイチップと次世代シーケンサーを用いた手法が主流だが、ここでは Agilent 社製 DNA マイクロアレイチップを用いた解析手法を紹介する。

【方法】

(1) 細胞の準備

熱帯熱マラリア原虫の培養、マラリア原虫寄生赤血球の精製、単核球分離、マクロファージ分化誘導、及び共培養は、本書の Terkawi らの稿を参照されたい。

(2) マクロファージからの RNA 抽出

原虫寄生赤血球、及び非感染赤血球との共培養後のマクロファージから Total RNA を抽出

する。ここでは、前述した 5.0×10^6 cells のマクロファージに、 1.0×10^8 cells の原虫寄生赤血球、及び非感染赤血球を添加し、共培養開始から 37°C にて 2 時間経過後のサンプルから RNA を抽出する。

共培養したマクロファージを、あらかじめ 4°C に氷冷した PBS を用いて 3 回洗浄し、培養液上清中の貪食されていない赤血球を除去する。続いて、細胞に 1.0 mL の TRIzol Reagents (Ambion) を加え、ピペッティングにより、よく懸濁する。溶液が均一になったら、500 μL ずつ 1.5 mL のエッペンチューブに移す。これらのチューブは、直ちに -80°C に保存するか、片方のチューブから直ちに RNA を抽出する。

☆注意：RNA は凍結融解により品質劣化するため、出来る限り凍結融解を繰り返さないこと。

☆使用キット：RNA 抽出には、RNeasy Mini Kit (Qiagen) の使用を推奨する。しかし、SV Total RNA Isolation System (Promega) や、同等の品質で RNA を抽出できるキットであれば、いずれも使用可能である。

500 μL の TRIzol Reagents により回収した細胞溶解液に、100 μL のクロロホルムを加え、蓋を開けた後、15 秒間勢いよく上下に振る。その後、室温にて 10 分間静置後、12000 g、15 分間、 4°C にて遠心する。遠心分離後、一番上の透明な層（水層）を 350 μL 回収し、新しい 1.5 mL のエッペンチューブに移す。一番下のピンク色の有機層、及び白い中間層には、タンパク質及び脂質、DNA が含まれているので、これらの液層がコンタミしないよう注意する（下図）。



回収した水層に 350 μL の RLT Buffer を加え、よく懸濁した後、さらに 700 μL の 70% エタノールを加え、ピペッティングにより懸濁す

る。この懸濁液を、キットに付属しているカラムにアプライし、11000 rpm の条件下で 15 秒間、室温で遠心する。カラムに吸着した RNA は、キット付属の洗浄 Buffer RW1 で 1 回、洗浄 Buffer RPE で 2 回洗浄し、30~50 μL の Nuclease-free water (D.W. でもよい) を用いて溶出する。

溶出した RNA 3.0 μL を、1.5 mL の新しいエッペンチューブに取り、 -80°C で保存する。分注した 3.0 μL の RNA は、RNA の収量、及び品質チェックに用いる。

(3) RNA の収量、及び品質チェック

分注した 3.0 μL の RNA を融解し、RNA の収量、及び品質チェックを行う。RNA の収量は、NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) を用いて、RNA の品質チェックは、Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) を用いて評価する。

RNA が分解されていると、その後のマイクロアレイや次世代シーケンサー解析で得られるデータの信頼性が著しく低下する。NanoDrop では、溶出した RNA へのタンパク質等のコンタミは判断できるが、RNA が分解されているか判断することはできない。トランスクリプトーム解析を行う場合、これを防ぐため、RNA の品質を、必ず Bioanalyzer 等を用いて評価する必要がある。

RNA の品質は、28S、18S rRNA のバンドが、きちんと確認できるかにより判断する。Bioanalyzer では、これらのバンドピークを用いて、RNA の品質を独自の RNA Integrity Number (RIN) によって数値化することにより、定量的に判断することが可能である。RNA 抽出が正確に行われ、RNA の分解が進んでいないと、培養細胞で $\text{RIN} > 9.0$ 、組織では $\text{RIN} > 7.0$ を一般的に示す。凍結融解を繰り返すと、この RIN が著しく低下する。実際のマイクロアレイには、RIN が 6.5 を下回った場合は、再度実験が可能であれば、RNA の取り直しを推奨する。

☆使用キット：

Agilent RNA 6000. Nano Kit. Catalog#: 5067-1511、または Agilent RNA 6000 Pico Kit. Catalog#: 5067-1513

