

(4) マイクロアレイ実験

抽出した RNA を用いて、トランスクリプトーム解析を行う。Agilent 社製のマイクロアレイの詳細なプロトコルは、以下のウェブサイト参照するとよい。

[https://www.chem-agilent.com/lsc-a-booth/DNAMicroArray/yan\\_MicroArray.htm](https://www.chem-agilent.com/lsc-a-booth/DNAMicroArray/yan_MicroArray.htm)

ウェブサイトアクセス時に、ID とパスワードを求められるが、これは Agilent 社製品の日本代理店である、トミーデジタルバイオロジー株式会社に問い合わせると教えてもらえる。

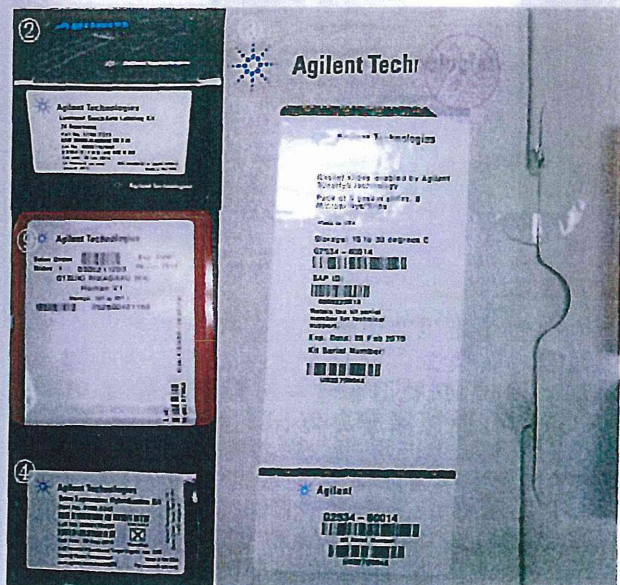
手順は簡便であるが、本実験は一度経験しているかどうかのものをいう。Agilent 社製のマイクロアレイスライドを購入すると、特典として実技の講習会に無料で参加できるため、これに参加することをお勧めする。

☆使用キット：

- ① Agilent RNA Spike In Kit (for one-color), Catalog#: 5188-5282
- ② Agilent Low Input Quick Amp Labeling Kit, one-color, Catalog#: 5190-2305, 24 反応分
- ③ Hybridization Gasket Slide Kit (5) - 8 microarrays per slide, Catalog#: G2534-60014, 5 枚
- ④ Agilent Gene Expression Hybridization Kit, Catalog#: 5188-5242, 8×60K 100 アレイ分
- ⑤ Agilent 2×Hi-RPM Hybridization Buffer (25 mL), Catalog#: 5190-0403
- ⑥ Agilent 25×Fragmentation Buffer, Catalog#: 5185-5974
- ⑦ Agilent 10×Blocking Agents, Catalog#: 5188-5281
- ⑧ Agilent Gene Expression Wash Pack, Catalog#: 5188-5327

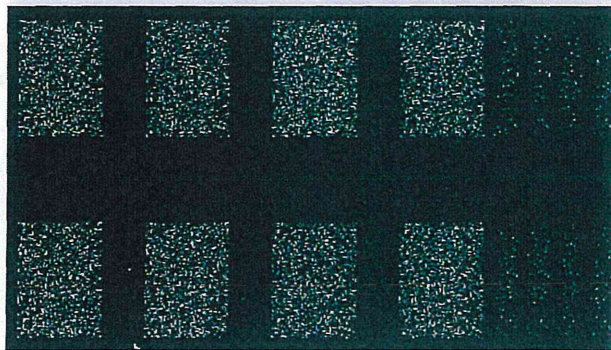
ヒト遺伝子発現解析には、一枚で 8 検体の解析が可能な以下のアレイを使用する。

- ⑨ SurePrint G3 Human GE Microarray 8×60K ver. 2.0 (受注生産)

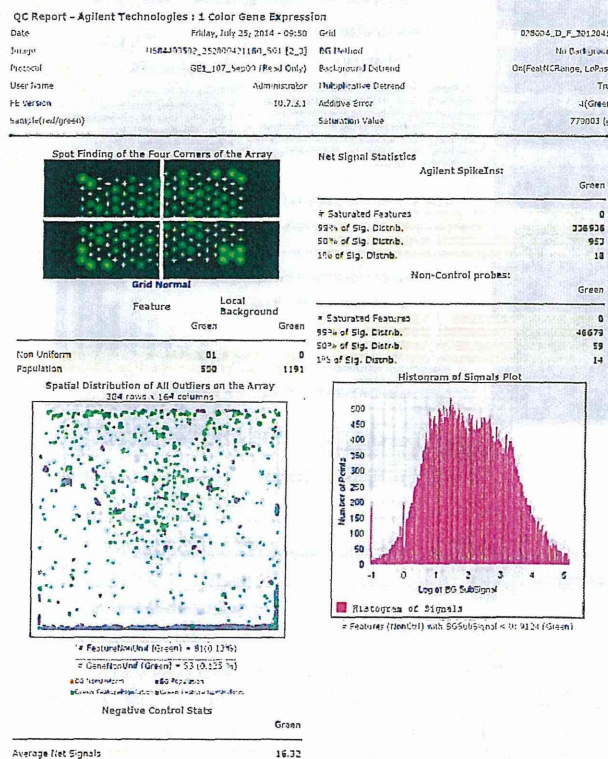


(5) 画像撮影及び数値化、データ解析

アレイスライドは、高感度マイクロアレイスキャナー (Agilent Technologies) を用いて撮影する。生データは、以下のような画像となる。



これを Feature Extraction Software (Agilent) に読み込ませることで、全自動でスポットの数値化、及びアレイスライドの品質チェックを行うことができる。以下に、アレイの品質チェックシートである QC Report の例を添付する。この結果を精査することで、アレイの結果が信頼性があるかが判断できる。QC Report についても、前述のウェブサイトにも細かく記載されているので参照されたい。



Feature Extraction では、QC Report とともに、全スポットを数値化したテキストファイルが作製される。このテキストファイルを、Gene Spring (Agilent) に読み込ませることで、データの標準化、及び統計解析を簡便に行うことができる。コンピュータに自信がないのであれば、商用のソフトウェアである Gene Spring や Rosetta Resolver (Rosetta) 等の使用をお勧めする。Linux 等を使用できる程度のリテラ

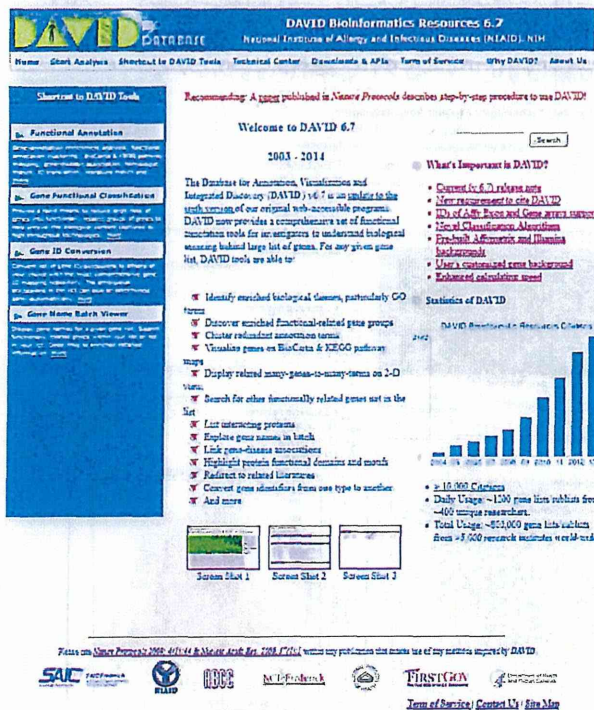
シーがあれば、現在では様々な解析パッケージが入手可能なため、ライトユーザーでも自前で解析を行うことができる。

(6) バイオインフォマティクス

比較対照群との間で、発現に統計的な有意差が見られた遺伝子群について、以下に示す様々な解析手法が用いられる。

① 機能分類 (Functional annotation)

発現変動を示した遺伝子群の中に、どのような機能に関連した遺伝子が多く含まれているか調べる解析手法。遺伝子は、細胞内局在、分子機能、及び生物学的意味合いといった、様々なカテゴリで分類される。トランスクリプトーム解析の結果に対し最も頻繁に使用され、代表的なものとして Gene Ontology が挙げられる。現在では、DAVID Bioinformatics Database ( 下 図 : <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) を用いれば、ウェブ上で簡便に行うことができる。



③ 細胞種解析 (Cell-type enrichment analysis)

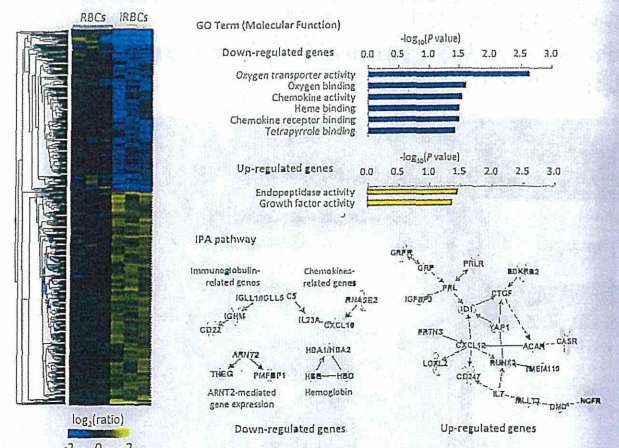
病原微生物の感染実験において、ある特定の組織へどのような免疫細胞が遊走、流入してきたかを、トランスクリプトームの結果から推定する解析手法。本解析は、CTen (<http://www.influenza-x.org/~jshoemaker/cten/>) を用いれば、ウェブ上で簡便に行うことができる。現在では、感染組織のみならず、そこに遊走された免疫細胞を、FACS 等によりソーティングし、これらについてトランスクリプトーム解析をすることが可能になったため、当該解析法はあまり使用されない。

[結果と考察]

熱帯熱マラリア原虫感染赤血球、または非感染赤血球と末梢血由来マクロファージを 37°C で 2 時間共培養し、これらの細胞から total RNA を抽出した。抽出された RNA が、RIN > 7.0 であることを Bioanalyzer を用いて確認した後、Agilent 社製ヒト用マイクロアレイスライドを用いてトランスクリプトーム解析を行った。

非感染赤血球と共培養したマクロファージと比較して、原虫感染赤血球と共培養したマクロファージにおいて、168、及び 216 遺伝子の発現低下、及び上昇が見られた (下図: ヒートマップを参照)。

これらの発現が変動した遺伝子群に対し、Gene Ontology 解析による機能分類、及び Ingenuity Pathways Analysis を用いてネットワーク解析を行った。発現低下が見られた遺伝子群には、ヘモグロビン合成や炎症反応に関与する遺伝子群が有意に多く含まれていた。一方、発現上昇が見られた遺伝子群には、陽イオン性ペプチドや、タンパク質分解酵素、及び (サイトカインを含む) 増殖因子等が有意に多く含まれていた (下図: 右パネルを参照)。



② ネットワーク解析 (Network analysis)

発現変動を示した遺伝子群に対し、遺伝子-遺伝子間の制御関係を表した遺伝子ネットワークの構築を行うことにより、どのような因子が発現制御に関連しているのかを調べる解析手法。トランスクリプトーム解析の結果に対し、機能分類とともに使用される。本解析には、Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity) や、GeneGo (GeneGo Inc.) 等の Software が頻用される。これらのソフトウェアは商用であるが、KEGG 等と比較して、クオリティの高い図の作製が行え、基となるデータベースの更新が早く信頼性が高いのが特徴である。

上図 トランスクリプトーム解析の結果

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し、2 時間後のマクロファージ内の遺伝子発現を両群間において比較した。左図は、群間において統計的に優位に発現が変動していた遺伝子の発現を、ヒートマップによって示したもの (Unpaired T-test, P

< 0.05)。右図は、これらの遺伝子に対して、Gene Ontology 解析、及び Ingenuity Pathways Analysis によるネットワーク解析を施し、機能分類、及び遺伝子間ネットワークを構築した結果を示した。

このことから、熱帯熱マラリア原虫寄生赤血球を貪食したマクロファージ内では、病原体を効率良く分解・破壊するため、様々なタンパク質分解酵素の遺伝子発現が誘起されていることが示唆された。これらの分解酵素が、実際に原虫寄生赤血球に対して破壊効果を持つのか等について、今後検証していく必要がある。

#### [あとがき]

マイクロアレイチップを用いたトランスクリプトーム解析は、コストがかかると思っている研究者が多いが、業者に外注するのと比較して、自身で実験・解析を行うことができ、設備さえ整っていれば、3分の1のコストで結果を得ることができる。次世代シーケンサーによる解析と比較しても安価であり、RNA 抽出から最短2日で結果を得ることができる。現在販売されている Agilent 社製マイクロアレイチップには、遺伝子に対するプローブだけでなく、近年同定された long intergenic non-coding RNA の発現を検出するためのプローブも搭載されており、ヒト培養細胞に対する、次世代シーケンサーを用いた解析は、エピジェネティクスや Chip-Seq 等に主流が移っているように思われる。

寄生虫学研究において、感染後の宿主応答を網羅的に解析したい場合、特に、ヒト培養細胞、またはマウスを用いた感染実験における宿主応答を解析したい場合、次世代シーケンサーを用いるよりも、マイクロアレイチップの方が安価で効率的であり、データ解析も容易である。次世代シーケンサーは、アノテーションされていない遺伝子が存在する、寄生虫等のゲノムに対して用いるのが本来の用途と言える。

ここで紹介した解析手法に質問・疑問等、詳細なプロトコルが知りたい等ご要望がございましたら、ryot@obihiro.ac.jp までご連絡ください。

#### [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。

本研究を行うにあたり、マイクロアレイ実験に関わる技術、及びデータ解析についてご指導頂きました。米国ワシントン大学医学部 Michael G. Katze 教授に深謝いたします。

また、Bioanalyzer、及びマイクロアレイ機器等は、帯広畜産大学動物・食品検査診断センター、及び東京大学医科学研究所共通機器を使用して行われた。機器使用等にご指導頂きまし

た、帯広畜産大学食品有害微生物学分野の川本恵子教授、食品リスク分野の豊留孝仁講師、及び東京大学医科学研究所宿主寄生体学分野の伊庭英夫教授、小林郷介助教に深謝いたします。

#### [参考文献]

- 1) Terkawi Mohamad Alaa, 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、寄生虫研究 材料と方法 2014年版、三恵社、愛知、2014
- 2) Bradel-Tretheway BG, Mattiaccio JL, Krasnoselsky A, Stevenson C, Purdy D, Dewhurst S, Katze MG. Comprehensive proteomic analysis of influenza virus polymerase complex reveals a novel association with mitochondrial proteins and RNA polymerase accessory factors. *J Virol.* 85: 8569-81. 2011.
- 3) Chang ST, Sova P, Peng X, Weiss J, Law GL, Palermo RE, Katze MG. Next-generation sequencing reveals HIV-1-mediated suppression of T cell activation and RNA processing and regulation of noncoding RNA expression in a CD4+ T cell line. *MBio.* 2:e00134-11.
- 4) Dennis G Jr, Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC, Lempicki RA. DAVID: Database for annotation, visualization, and integrated discovery. *Genome Biol.* 4:P3. 2003.
- 5) Go JT, Belisle SE, Tchitchek N, Tumpey TM, Ma W, Richit JA, Safronetz D, Feldmann H, Katze MG. 2009 pandemic H1N1 influenza virus elicits similar clinical course but differential host transcriptional response in mouse, macaque, and swine infection models. *BMC Genomics.* 13:627. 2012.
- 6) Kiso M, Takano R, Sakabe S, Katsura H, Shinya K, Uraki R, Watanabe S, Saito H, Toba M, Kohda N, Kawaoka Y. Protective efficacy of orally administered, heat-killed *Lactobacillus pentosus* b240 against influenza A virus. *Sci Rep.* 3:1563. 2013.
- 7) Kupfer DM, White VL, Strayer DL, Crouch DJ, Burian D. Microarray characterization of gene expression changes in blood during acute ethanol exposure. *BMC Med Genomics.* 6:26. 2013.
- 8) Langfelder P, Horvath S. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics.* 9:559. 2008.
- 9) Nalpas NC, Park SD, Magee DA, Taraktsoglou M, Browne JA, Conlon KM, Rue-Albrecht K, Killick KE, Hokamp K, Lohan AJ, Loftus BJ, Gormley E, Gordon SV, MacHugh DE. Whole-transcriptome, high-throughput RNA sequence analysis of the bovine macrophage response to *Mycobacterium bovis* infection in vitro. *BMC Genomics.* 14:230. 2013.

- 10) Pasieka TJ, Cilloniz C, Carter VS, Rosato P, Katze MG, Leib DA. Functional genomics reveals an essential and specific role for Stat1 in protection of the central nervous system following herpes simplex virus corneal infection. *J Virol.* 85:12972-81. 2011.
- 11) Rahrman EP, Watson AL, Keng VW, Choi K, Moriarity BS, Beckmann DA, Wolf NK, Sarver A, Collins MH, Moertel CL, Wallace MR, Gel B, Serra E, Ratner N, Largaespada DA. Forward genetic screen for malignant peripheral nerve sheath tumor formation identifies new genes and pathways driving tumorigenesis. *Nat Genet.* 45:756-66. 2013.
- 12) Sakabe S, Takano R, Nagamura-Inoue T, Yamashita N, Nidom CA, Cuyinh Le Mt, Iwatsuki-Horimoto K, Kawaoka Y. Differences in cytokine production in human macrophages and in virulence in mice are attributable to the acidic polymerase protein of highly pathogenic influenza A virus subtype H5N1. *J Infect Dis.* 207: 262-71. 2013.
- 13) Shoemaker JE, Lopes TJ, Ghosh S, Matsuoka Y, Kawaoka Y, Kitano H. CTen: a web-based platform for identifying enriched cell types from heterogeneous microarray data. *BMC Genomics.* 13:460. 2012.
- 14) Tisoncik JR, Billharz R, Burmakina S, Belisle SE, Prohl SC, Korth MJ, Garcia-Sastre A, Katze MG. The NS1 protein of influenza A virus suppresses interferon-regulated activation of antigen-presentation and immune-proteasome pathways. *J Virol.* 92: 2093-104. 2011.
- 15) Werner T. Bioinformatics applications for pathway analysis of microarray data. *Curr Opin Biotechnol.* 19: 50-4. 2008.

## 熱帯熱マラリア原虫の赤血球侵入試験

加藤健太郎<sup>1),2)</sup>

- 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] マラリア原虫の感染による死者数の大部分を占めるのは熱帯熱マラリア原虫の感染によるものである。マラリアにおいてその臨床症状の発症に直接関与しているのは、赤内期における虫体の増殖に伴う赤血球の破壊である。従って、発症防止の観点からも赤内期のステージでのメロゾイトの赤血球侵入機構の解明とこの抑制に働く薬剤やワクチンの開発は直接的に抗マラリア戦略へとつながる。本項では、熱帯熱マラリア原虫の赤血球侵入試験の方法と実際の解析結果について紹介したい。

キーワード ; 熱帯熱マラリア原虫、赤血球侵入試験、抗マラリア薬

### Invasion assay of *Plasmodium falciparum*

Kentaro Kato<sup>1),2)</sup>

- 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

Most people who died of Malaria were infected with *Plasmodium falciparum*. The rupture of erythrocyte by parasite is directly related to clinical pathology. Therefore, from the clinical standpoint, the elucidation of invasion mechanism of merozoite and development of drug and vaccine which can inhibit the invasion have been needed. Here the authors introduce how to perform the invasion assay of *Plasmodium falciparum* and the actual results.

**Key Words;** Antimalarial drug, invasion assay, *Plasmodium falciparum*

#### はじめに

現在、ヒトを含めた動物に感染するマラリア原虫において、試験管内で常用的な培養系が確立されているのは熱帯熱マラリア原虫のみである。また、世界的にみてマラリア感染による死亡の原因の大部分は熱帯熱マラリア原虫の感染によるものである。現在のところ試験管内で培養系が確立されているのはいわゆる赤内期のステージのみであることから、熱帯熱マラリア原虫に関してはライフサイクルの全ステージにわたって解析を行うことは容易ではない。しかしながら、臨床症状の発症に直接関与しているのは赤内期における虫体の増殖に伴う赤血球の破壊に起因することが大きいことから、発症防止の観点からも赤内期のステージでの特に、メロゾイトの赤血球侵入機構の解明とこの抑制に働く薬剤やワクチンの開発は直接的に抗マラリア戦略へとつながる。

そこで本項では、熱帯熱マラリア原虫の赤血球侵入試験について以下に記載し、由来の異なる赤血球に対する感染効率の比較や薬剤候補物質の侵入抑制効果について解析する系を紹介したい。

#### [方法]

##### [A] 準備

##### ① *P. falciparum* 培養液

定法により、ヘマトクリット:1%、寄生率:15%~25%程度で培養しているもの。熱帯熱マラリア原虫の培養法の実際については本書の田坂らの項を参照されたい。なお、どのような方法でも構わないので、あらかじめある程度の範囲で発育周期を同調してあることが望ましい。我々は5% D-ソルビトール液での同調を10日に1度程度の頻度で行っている。

##### ② ヒト血液、基礎培地 (Incomplete medium;

ICM)、完全培地 (Complete medium; CM) 等の培養用試薬

(これに関しても、上記の参考文献が詳しい (田坂ら、2013)。血液は採血直後のものが望ましい。

③ 5% D-ソルビトール液

D-ソルビトールの粉末を超純水に溶解し、5% (w/v) に調製し、0.45 μm フィルターなどで濾過滅菌したもの。4°C 保存だが、使用前に室温～37°C に温めておく。

④ 90% Percoll/Sorbitol 液

10X RPMI を作製する。1L 用の RPMI の粉末と 5.9g の HEPES を 100ml の蒸留水に溶かし、フィルターで濾過滅菌する。90ml の Percoll、10ml の 10X RPMI、6g の Sorbitol を混ぜて溶かし、フィルターで濾過滅菌する。

⑤ 70% 及び 40% Percoll/Sorbitol 液

70% Percoll/Sorbitol 液の作製。31ml の 90% Percoll/Sorbitol 液と 9ml の CM を混ぜる。

40% Percoll/Sorbitol 液の作製。18ml の 90% Percoll/Sorbitol 液と 22ml の CM を混ぜる。

⑥ 血球計算盤

感染体を扱うので使い捨てのものが便利である。

[B] 手順

(1) Percoll/Sorbitol 処理

i. 90% Percoll/Sorbitol 液から、70% 及び 40% Percoll/Sorbitol 液を作製する。Percoll/Sorbitol 処理を行う度に、作製することが望ましい。

ii. ポリプロピレンチューブ (Falcon 2059) に 3ml の 70% Percoll/Sorbitol 液を入れる。この上に注意深く、3ml の 40% Percoll/Sorbitol 液を重層する。

iii. さらにこの上に 3ml 以下で 50% Hct (ヘマトクリット) に調整した感染赤血球 (この後に赤血球侵入試験を行うためには、2~4 核のジゾン期の虫体が望ましい。事前にギムザ染色を確認しておく。) を注意深く重層する。

iv. 10,000rpm, 20 分, RT で遠心し、70% と 40% Percoll/Sorbitol の境目にできたジゾンドの虫体の層をパスツールピペットなどで吸い取る。

v. 採取したジゾンドの虫体を ICM で 2 回程度洗う。

vi. 血球計算盤で虫体の数を数える。

(2) 赤血球侵入試験

i. 試験は duplicate で行う。Percoll/Sorbitol 処理で集めてきた虫体  $6 \times 10^5$ 、ヒト赤血球  $3 \times 10^7$  (1μl のヒト赤血球の数が約  $1 \times 10^7$  個である。)、CM を総量が 300μl になるように混合し、96 ウェルプレートに入れる。培養液の蒸発が気になる場合は、周囲のウェルに培養液のみを入れたウェルをつくっておくとよい。

ii. インキュベータ (CO<sub>2</sub> 5%, O<sub>2</sub> 5%, 37°C) で 20-24 時間培養し、ギムザ染色による塗抹切片から、parasitemia を計測する。ring 型の虫体が大部分を占めているはずである。

[結果]

我々が行った赤血球侵入試験の結果の一例

を示す (表 1)。赤血球の膜蛋白質 Kx が欠損している McLeod 型赤血球への熱帯熱マラリア原虫の侵入効率は健常者由来の赤血球に比べて、低下している。

Experiment	Invasion rate, % ring-infected erythrocytes		% Control
	Normal	McLeod	
1	17.5	8.2	46.9
2	5.7	1.9	33.3
3	4.4	2.1	48.3

表 1 健常者と McLeod 型赤血球保有者の赤血球を用いて、赤血球侵入試験を行った結果の比較。3 回試験を行っている (Kato *et al.*, 2005)。

[考察]

上の例のように、表現型が異なる赤血球を用いて、熱帯熱マラリア原虫の侵入効率を比較することが可能である。また、赤血球侵入を抑制する薬剤や抗体を用いて同試験を行うことで、薬剤や抗体の侵入抑制効果を解析することも可能である。同試験では、熱帯熱マラリア原虫の赤血球侵入効率についてのみ解析を行うことができるが、例えば赤血球内での虫体の増殖について解析する場合は、本書のレクエンコらの項を参照していただきたい。

[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、厚生労働科学研究費補助金、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、内藤記念科学奨励金により行われた。

[文献]

原著

- 1) Kato K, Mayer DC, Singh S, Reid M, Miller LH. Domain III of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 binds to the erythrocyte membrane protein Kx. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:5552-5557.
- 2) Kobayashi K, Kato K, Sugi T, Takemae H, Pandey K, Gong H, Tohya Y, Akashi H. *Plasmodium falciparum* BAEBL binds to heparan sulfate proteoglycans on the human erythrocyte surface. *J Biol Chem.* 285:1716-1725.

成書

- 3) 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、寄生虫研究 材料と方法 2013 年版、三恵社、愛知、2013
- 4) 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、寄生虫研究 材料と方法 2013 年版、三恵社、愛知、2013

## 熱帯熱マラリア原虫の増殖阻害試験

レクエンコ フランセス<sup>1), 2)</sup>, 加藤健太郎<sup>1), 2)</sup>

- 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] 我々の研究グループでは、熱帯熱マラリア原虫の増殖阻止試験を用いて新規の薬剤候補分子について評価を行っている。この解析系では抗体や薬剤についてハイスループットなスクリーニングを行うことが可能であり、本稿ではその解析法について紹介する。

キーワード ; 熱帯熱マラリア原虫、増殖阻止試験、*in vitro*、マラリア

### Growth inhibition assay of *Plasmodium falciparum*

Frances Cagayat Recuenco<sup>1), 2)</sup>, Kentaro Kato<sup>1), 2)</sup>

- <sup>1)</sup> National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro, Hokkaido 080-8555, Japan.
- <sup>2)</sup> 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

The authors evaluated novel drug candidate for *Plasmodium falciparum* using the growth inhibition assay *in vitro*. In this method, the high-throughput screening for the evaluation of antibodies or antiprotozoal drugs can be performed. In this section, we introduce this method and analysis.

**Key Words:** growth inhibition assay, *in vitro*, malaria, *Plasmodium falciparum*

#### はじめに

既存のマラリアに対する薬剤に対して、耐性原虫が発生していることから、現在も新規の薬剤や治療法が求められている。我々の研究グループでは、マラリアに対する薬剤について増殖阻止試験を用いて新規の薬剤候補分子について評価を行っている。本稿では、薬剤候補分子についての増殖阻止試験について、熱帯熱マラリア原虫の 3D7、Dd2 クローンを用いてこの実際について紹介する。

#### [方法]

(1) 熱帯熱マラリア原虫の培養  
今回は、熱帯熱マラリア原虫の 3D7 と Dd2 の 2 つのクローンを使い、1% parasitemia、1% hematocrit の条件で A 型のヒト赤血球を使用し、培養を行った。赤内期における熱帯熱マラリア原虫の培養法については、本書の田坂らの項を参照いただきたい。ここでは手短かに述べる

が、培養液 (RPMI 1640, 25 $\mu$ M HEPES, 100 $\mu$ M hypoxanthine, 12.5 $\mu$ g/ml gentamycin sulfate, 2.5% (w/v) Albumax II, 62.5 $\mu$ g/ml NaHCO<sub>3</sub>) を用い、37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> の条件下で培養を行う (Radfar *et al.*, 2009)。

#### (2) *In vitro* Growth Inhibition Assay. a. *In vitro* growth inhibition assay (GIA).

D-sorbitol 処理などの同調培養法によって、あらかじめ同調培養させておく (本書の田坂の項を参照)。GIA は late trophozoite のステージにおいてまず操作を行う。このステージの感染赤血球に、非感染赤血球と培養液を加えることで、0.30% parasitemia、1% hematocrit の条件で培養する。25 $\mu$ l の感染赤血球と培養液を 96 ウェルプレートに分注し、効果を測定すべき薬剤や抗体について最終濃度を振分けて培養液に投入する (図 1. ここでは仮に 9, 4.5, 2.25, 0.9  $\mu$ g/ml とした)。通常は同じ条件のウェルを 3 通り用意し、得られたデータの有意差の検定

を行う。感染赤血球の培養は 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 5%O<sub>2</sub> の条件下で行い、48 時間後に complete medium を 5μl それぞれのウェルに追加する。最終的に 96 時間後に Flow cytometry での解析によって、parasitemia を測定する(Persson *et al.*, 2006)。

**b. Flow cytometry analysis.**

感染赤血球の培養液に 10μg/ml の ethidium bromide in PBS を加え、遮光して常温で 1 時間静置する。遠心後、500ml の PBS で洗い、flow cytometry 用のチューブに入れる(図 2; Persson *et al.*, 2006)。Flow cytometry での解析は FACSCALIBUR (BD Sciences) を使用し、データについては WinMDi ver. 2.9. で処理している。

**[結果]**

今回の我々の実験例では 9.0 μg/ml の薬剤 C は熱帯熱マラリア原虫の Dd2 クローンで 85.83% の増殖阻害効果を有し、3D7 クローンでは 55.33% の増殖阻害効果を持っていた。一方、薬剤 B ではそれぞれ 39.22% (Dd2)、23.04% (3D7) という結果であった。薬剤 D についても増殖阻害効果が見られ、この効果は濃度依存的であった(図 3. A, B)。

**[考察]**

本項では、抗体を用いている Persson *et al.*, 2006 の方法を参考にして、主に薬剤効果試験を目的として我々が確立した GIA の方法を紹介した。この方法では、原虫の赤内型のサイクルを 2 周させ、flow cytometry で定量を行っている。最初の parasitemia を低くしているのは、虫体が overgrowth によって死滅するのを防ぐためである。flow cytometry を利用することで定量的な解析が可能である。また、幾通りかの同条件の培養ウェルを作っていくことで有意差を取ってデータ処理を行う必要がある。

**[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、厚生労働科学研究費補助金、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、内藤記念科学奨励金により行われた。

**[文献]**

- 1) Persson KEM, Lee CT, Marsh K, Beeson JG. 2006: Development and optimization of high-throughput methods to measure *Plasmodium falciparum*-specific growth inhibitory antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 44(5):1665-1673.
- 2) Radfar A, Mendez D, Moneriz C, Linares M, et al. 2009: Synchronous culture of

*Plasmodium falciparum* at high parasitemia levels. *Nature Protocols* 4(12):1899-1915.

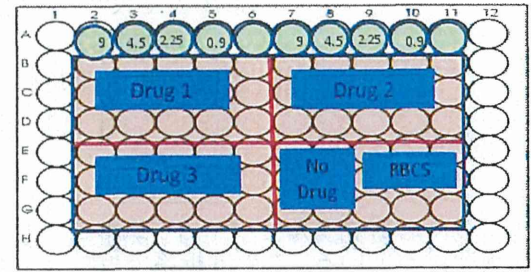


図 1. *In vitro* growth inhibition assays を 96 ウェルの U 底プレートで行った例。



図 2. flow cytometry での解析の準備。サンプルを FACS (fluorescence activated cell sorting) 用のチューブに移す。

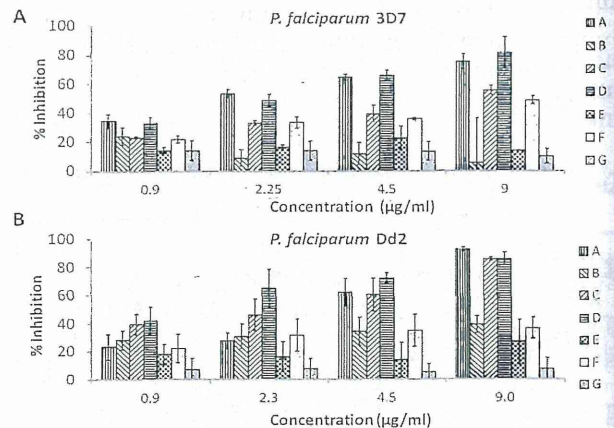


図 3. *In vitro* growth inhibition assay. A. *Plasmodium falciparum* 3D7. B. *Plasmodium falciparum* Dd2.



## マウスを用いたトキソプラズマ原虫感染実験

石和玲子<sup>1)2)</sup> 加藤健太郎<sup>1)2)</sup>

- 1) 帯広畜産大学 原虫病学研究センター 地球規模感染症学分野  
〒080-8555 北海道帯広市稲田町西 2 線 1 3 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]** アピコンプレクサ原虫の一種であるトキソプラズマ原虫は人獣共通感染症の原因微生物の一つであり、世界的に感染率の高い寄生虫の一つである。トキソプラズマ原虫の複雑なライフサイクルを遮断する各種新規薬剤の開発が求められている。本稿においてはそのための基本的な手法の一つとして、マウスモデルを用いた *in vivo* 感染実験系により、薬剤投与によるトキソプラズマ原虫の感染・増殖阻害効果を検証する実験系について述べる。

**キーワード** ; トキソプラズマ原虫、マウス、感染実験

### *In vivo* infection experiment of *Toxoplasma gondii* using mouse model

Akiko Ishiwa<sup>1) 2)</sup>, Kentaro Kato<sup>1) 2)</sup>

- 1) 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*, which belongs to phylum Apicomplexa, is one of the most abundant protozoan parasites, and causes zoonosis named as toxoplasmosis. The invention of novel drugs to block each stage of intricate life cycle of *T. gondii* still has been required until now. In this article, we described one of the most basic and useful methods as *in vivo* *Toxoplasma gondii* infection experiment using mouse model.

**Key Words**; animal experiment, mouse, *Toxoplasma gondii*

#### はじめに

トキソプラズマ原虫は、アピコンプレクサ原虫の一種であり、人獣共通感染症を引き起こす寄生虫である(吉田、2002)。終宿主はネコ科動物のみである一方、ヒトを含むほぼすべての温血動物(哺乳類および鳥類)を中間宿主とするため、食肉は種類によらず感染源になる可能性を持つ。現在使用されているヒトに対する薬剤投与による治療では、原虫を体内から完全に排除するには至っていない(大西、2008)ことから、トキソプラズマ感染症の根治のため、今後ともトキソプラズマ原虫が持つ複雑なライフサイクルに関する知見を集積し、これを遮断する各種新規薬剤の開発、効果的な感染防除方法の研究が必要とされる。本稿においては、トキソプラズマ感染症において生じる各種トキソプラズマ原虫・宿主(中間宿主)間相互作用を検証する最も基本的かつ有用な *in vivo* 実験系として、マウスを用いたトキソプラズマ原

虫感染実験の手法について述べる。

#### [方法]

本稿においては、宿主となるマウスとして、BALB/c ♀、トキソプラズマ原虫として強毒株(*T. gondii* RH, ATCC No. 50174)のタキゾイト(急性増殖虫体)を使用し、マウス腹腔内投与を行った感染実験の例を紹介する。

#### (1) マウスの馴化飼育

使用するマウスは5週齢の状態で購入した。個体識別を容易にするためアニマルマーカールにより体表に明瞭に標識を施し、納品当日から6日間の馴化飼育を実施した。馴化飼育期間中および実験期間中、各個体の体重を計測し、体重増加の推移を記録した。

#### (2) トキソプラズマ原虫の培養

培養細胞による *in vitro* 培養系を用いて、感

染実験に用いるトキソプラズマ原虫の培養を行った。使用する原虫株と宿主細胞、試薬類、基本的なトキソプラズマ原虫の取り扱い操作は、Roos らの記述を参照した (Roos *et al.*, 1994)。宿主細胞としては Vero 細胞を使用した。Vero 細胞の培養用培地として FCS を 5% 添加した DMEM 培地を使用した。セミコンフル状態にまで培養した宿主細胞に対し、*T. gondii* RH 株 (強毒株、野生型) を接種して 1~2 日間程度培養を行った。トキソプラズマ原虫の感染用培地として FCS を 1% 添加した DMEM 培地を使用した。

感染実験に用いるトキソプラズマ原虫を得る際、特に、フリーズストックを蘇生させた直後などは、実験に使用する前に *in vitro* 培養系において予め 2~3 代程度継代し、安定的に増殖することを確認する。感染実験用に回収する直前の継代の際には、25 ゲージの注射針と注射筒を用いて宿主細胞および寄生体胞を破断し、ポアサイズ  $5\mu\text{m}$  のシリンジフィルターを通過させて未破砕細胞および細胞片を除去し、遊離したタキゾイトのみを用いて継代を行うと生育が同調する。

### (3) タキゾイト回収作業

実験用にトキソプラズマ原虫のタキゾイトを回収する場合、宿主細胞内部で寄生体胞が十分に成長し、且つ破裂していない状態からの回収が好ましい。翌日に使用する場合、接種する虫体数は MOI=10 を目安とし、前日夜に接種作業を行い、翌日午前中から検鏡により生育状況を確認し、十分な生育が確認できた時点で回収作業を行う。回収の際にはフレッシュな培地で培養細胞シート上を洗浄し、浮遊している非感染タキゾイトを可能な限り排除してから回収作業を行う。

タキゾイトの感染能低下を避けるため、回収作業以降は、全ての作業は室温で行う。回収直前の継代作業と同様にして遊離タキゾイト懸濁液を調製し、1000g x10min 程度で遠心してタキゾイトを回収する。PBS(-) により虫体を懸濁後、血球計算盤を用いて虫体数を計測する。適宜希釈して投与用の懸濁液を調製し、速やかにマウスへの投与を行う。原虫懸濁液の注射筒への充填は投与直前が好ましい。

### (4) マウスへの接種と経過観察

マウスに腹腔内投与を実施する際、マウス 1 頭あたりの腹腔内投与量は最高でおよそ 0.4ml (20ml/kg) までとされているが、筆者らの経験では、1 頭あたりの投与量が多いと作業効率が低下し、少なすぎると投与量が安定しないことから、実際の作業での投与液量は 1 頭あたり 0.1ml を選択した。注射筒は 1ml のツベルクリンタイプ、注射針は 26 ゲージ、3/4 インチを使用した。マウスを 1 頭ずつケージから出し、確実に保定を行って腹腔内投与を行う。腹部をアルコール綿で消毒し、内臓に針が刺さらないように注意して腹腔内にトキソ懸濁液を投与する。

投与後は引き続きケージ内で飼育し、経過の観察と記録を行う。生存率の推移を観察する場

合、トキソプラズマの接種群および未処置の対照群を一日 1~2 回程度観察する。目視による観察のほか、各個体の体重を計測し記録する。

### [結果と考察]

筆者らは実際のアッセイ系として、トキソプラズマ原虫強毒株 (Type I, RH 株) タキゾイトをマウス 1 頭あたり  $10^3$  個接種したところ、マウスは接種後約 7 日で全て死亡した。また、マウス各個体を経過観察したところ、接種後 3 日目頃から、被毛の乱れ、運動量の減少と症状が進行し、死亡前日には四肢の麻痺による歩行困難が観察された。また、投与後 3 日目以降は体重の減少が観察された (図 1, 2)。

トキソプラズマ原虫には、代表的な 3 タイプの株があり、それぞれ病原性が異なることが知られている (Saeji *et al.*, 2005)。RH 株に代表される Type I トキソプラズマは強毒性である。Type I は特にマウスに対し強い毒性を示し、活性を有する虫体が 1 個感染すればマウスは確実に死亡するとされる。一方、Type II, Type III に分類されるトキソプラズマは弱毒性である。Type II の場合、マウスに対する LD<sub>50</sub> は  $10^3$  以上である。トキソプラズマ原虫のタイプ、株により、マウスに対する LD<sub>50</sub> 虫体数がそれぞれ異なること、また、培養の条件等によっても実際の LD<sub>50</sub> 値は変動する可能性があるため、実際の実験に使用する際には接種虫体数を振って LD<sub>50</sub> を算出する予備実験を行っておく必要がある。

Howe らの文献によれば、接種した虫体数により、死亡までの日数は変動するが、強毒株タキゾイトを  $10^1$  個以上接種した場合にはマウスは全てが死亡し、 $10^0$  個を接種した場合は、1/5 の個体が死亡した (Howe *et al.*, 1996)。実際の実験系においては、 $10^0$  個接種の場合、感染能を保持した虫体を確実に接種することは困難であると考えられる。

### [応用・発展]

トキソプラズマ原虫タキゾイトを腹腔内投与によりマウスに感染させる実験手法は、様々な応用・発展が可能である。

マウスの生存率を記録する手法は、治療薬候補物質の効果検証などに用いられる (Sugi *et al.*, 2011)。一方、マウス体内におけるトキソプラズマ原虫の動態を検証する各種実験も多く実施されている。トキソプラズマ原虫接種後、一定時間マウスを飼育した後に解剖を行い、各種組織毎に DNA を抽出し、トキソプラズマ特異配列プライマーを用いた定量 PCR による虫体数の算出を行う方法もある。感染後の培養時間を厳密にコントロールでき、宿主動物体内の各種臓器・組織内における感染および増殖を、虫体数データとして取得できる利点がある。また、宿主である感染マウス各組織の RNA を抽出して、遺伝子発現の差異を健常マウスと比較