

ヘパリンを用いた熱帯熱マラリア原虫の同調培養法

小林郷介^{1),2)} 加藤健太郎¹⁾

1) 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 2) 東京大学医科学研究所 幹細胞治療研究センター 幹細胞プロセッシング分野
1) 〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1 2) 〒108-8639 東京都港区白金台 4-6-1

[抄録] 熱帯熱マラリア原虫は、人の体内で赤血球に感染し、一連の形態変化を示しながら無性生殖的に分裂・増殖する。これは、*in vitro* でも再現され、培養技術として確立されている。この際、培養原虫のステージを同調する技術は、ステージ特異的な現象を解析するうえで必須である。現在広く用いられている同調法として、D-ソルビトール処理やパーコール・ソルビトール法などがあるが、同調の幅、回収できる原虫の量、利便性、再現性、コストといった様々な側面を考慮すると、一長一短である。今回著者らが紹介するヘパリンを用いた同調法は、これらの問題を解決する手法である。ヘパリンが可逆的にメロゾイトの赤血球侵入を阻害するといった特徴を利用し、限られた期間だけ侵入できるよう培養条件をコントロールすることで、手軽で安価に安定した同調が可能である。

キーワード；熱帯熱マラリア原虫、培養法、同調法、D-ソルビトール処理、ヘパリン、メロゾイト、赤血球侵入

Synchronization method for *in vitro* cultures of *Plasmodium falciparum* using heparin

Kyousuke Kobayashi^{1), 2)}, Kentaro Kato¹⁾

1) Department of Veterinary Microbiology, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, 2) Division of Stem Cell Processing, Center for Stem Cell Biology and Regenerative Medicine, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo,
1) 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan, 2) 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan

Abstract: Malaria parasites *Plasmodium falciparum* infect human erythrocytes and reproduce asexually through the intraerythrocytic developmental cycle. The *in vitro* culture method enables us to investigate the blood stage of *P. falciparum*. To focus on a specific step in the developmental cycle, it is necessary to use synchronization techniques for the cultured parasite. Until now, some techniques have been used: D-sorbitol treatment, Percoll-sorbitol method, etc. However, these techniques have both merits and demerits, considering the degree of synchronization, the amount of synchronized parasite acquired after the treatment, convenience, reproducibility, and cost. To resolve these problems, we introduce a novel synchronization method using heparin. Heparin reversibly inhibits erythrocyte invasion of *P. falciparum* merozoites. Therefore, by the addition and removal of heparin, we can control a period of the parasite invasion easily, inexpensively, and reproducibly.

Key Words: *Plasmodium falciparum*, *in vitro* culture, synchronization, D-sorbitol treatment, heparin, merozoite, erythrocyte invasion

[はじめに]

赤内期マラリア原虫はリング型 (ring form)、トロホゾイト (trophozoite)、シゾン (schizont) と、一連の形態変化を示しながら発育し、シゾンからのメロゾイト (merozoite) 放出及び新たな赤血球への侵入を繰り返すことで増殖する (図1)。発現される遺伝子もステージごとに大きく変化することから、各ステージの特徴や薬剤の影響などを調査する上で、発育周期の同調は極めて重要な作業である。

既にいくつかの同調法が利用されている。リング期原虫以外を死滅させる「D-ソルビトール

処理」(三田村, 2000) は簡便で再現性が高い一方、20 時間程度の範囲でしか同調ができない欠点がある。また、後期トロホゾイトからシゾンと分離する「パーコール・ソルビトール法」(三田村, 2000) あるいは「磁気細胞分離法 (MACS)」(Ribaut et al., 2008) は、比較的短い範囲内 (8 時間程度) に同調できるが、回収時のロスや作業の煩雑さなどの欠点がある。これら2つを組合せることで、さらにタイトな同調も可能だが、さらなる煩雑さと回収効率の低下を伴う。本法は、煩雑さと回収効率の問題を解決し、尚且つ安価で行えるというメリットがある。

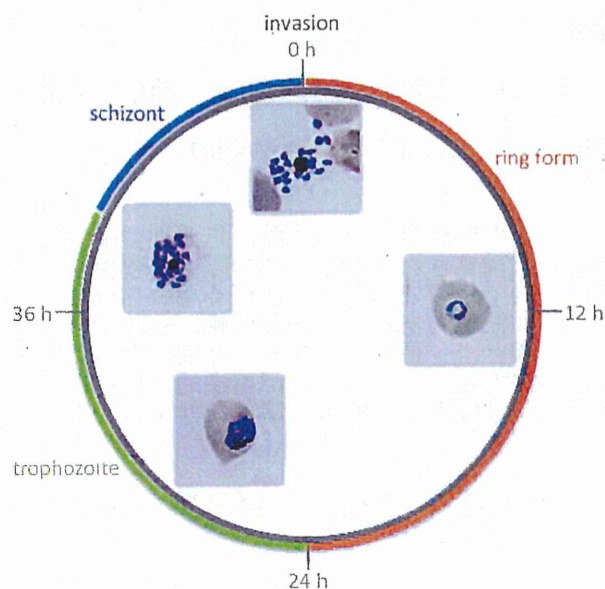


図 1: 熱帯熱マラリア原虫 *in vitro* 培養における増殖サイクル

ここで用いるヘパリンは、血液凝固阻害薬として医療分野で一般的に用いられているため、安価であり入手も容易である。ヘパリンは、メロゾイトの侵入を強力にブロックするという特徴が知られており (Kobayashi et al., 2009)、その効果が可逆的であるため、培養液からヘパリンを除去することでメロゾイトは正常な侵入・発育を行うことができる。つまり、培養液中のヘパリンの有無によりメロゾイト侵入のタイミングをコントロールすることで、望みどおりの幅で発育ステージを同調させることが可能になる。

[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。詳細は (Radfar et al., 2009) あるいは (堀井, 2000) を参照のこと。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。

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。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 ヘパリン

凝固阻止用でも研究用試薬でも構わない。凝固阻止用の場合、高濃度で滅菌済みの溶液であるため使いやすい。医薬品として持

田製薬や味の素ファルマから販売されている。

研究用試薬の場合、10 mg/ml でリン酸緩衝食塩水 (PBS) などに溶解し、0.45 μm フィルターで濾過滅菌してから使用する。

[B] 手順

本法の概要を図 2 に示す。以下にその詳細な手順を記す。

- (1) D-ソルビトール処理とヘパリンの添加
 - i. 原虫の発育ステージをギムザ染色により確認する。大部分がリング型あるいは初期トロホゾイトである状態が望ましい (注 1、2)。
 - ii. 培養液を 15ml ポリプロピレン遠沈管に移し (注 3)、710 \times g、室温~37°C で 5 分間遠心分離する。
 - iii. 上清を除去後、ペレット容積の 9~10 倍量の 5% D-ソルビトール液を加え、30 秒間激しくボルテックスミキサーで混和する。
 - iv. 37°C で 8 分間インキュベート後、再び約 15 秒間激しくボルテックスミキサーで混和する。
 - v. ii. の遠心操作と同様にして、上清を除去する。
 - vi. 10ml の ICM で 2 回、遠心操作による血球の洗浄を行う。
 - vii. 最終的に得られた血球のペレット容積に対し、約 100 倍量の CM を加え (ヘマトクリット: 1%)、培養フラスコ又はディッシュに移す。
 - viii. ここに、最終濃度 30U/ml (20-30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) になるようにヘパリンを加え、軽く混和後、37°C/5% CO₂/5% O₂ 下で培養する。

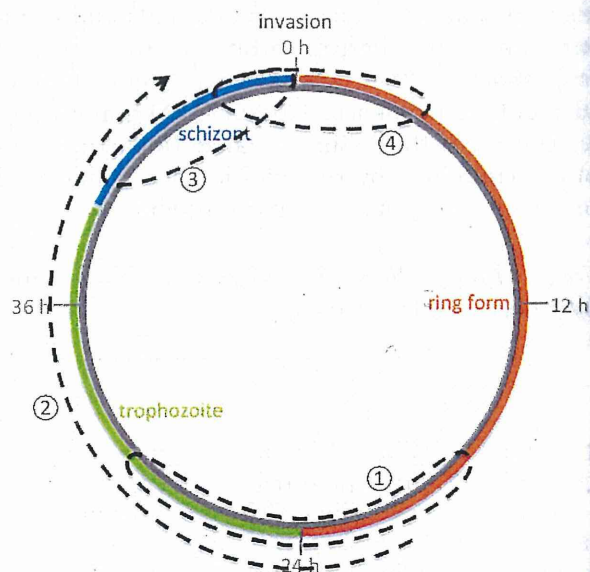


図 2: 本法の概要。①リングからトロホゾイト移行期に D-ソルビトール処理を行い、移行直前のリングフォームに揃える。②ヘパリンを加えて、意図しない侵入を防ぐ。③成熟シズントに至ったら、ヘパリンを除去して侵入可能な状態にする。④侵入時間が終了したら D-ソルビトール処理により、残っているシズントを死滅させる。

これ以降、ヘパリンによりメロゾイトの侵入はほぼ完全に阻害される。

(2) ヘパリン除去によるメロゾイト侵入の開始

- i. D-ソルビトール処理後 24 時間から、原虫発育ステージの経時的観察を行う (注 4、5)。
- ii. 大部分 (少なくとも全体の半分以上) がシズントになったことを確認したら、(1) ii. と同様の遠心操作により培養上清を除去する。
- iii. 得られた血球ペレットは、10ml の ICM で 2 回洗浄し、ペレット容積の 100 倍量の CM を加え (ヘマトクリット: 1%)、培養フラスコ又はディッシュに移し、37°C/5% CO₂/5% O₂ 下で培養する。
これ以降、培地中にヘパリンが存在しないため、メロゾイトの侵入が可能になる。

(3) D-ソルビトール処理によるメロゾイト侵入の停止

例として同調の幅を 4 時間にしたい場合を示す。

- i. ヘパリン除去の 4 時間後に、(1) と同様にして D-ソルビトール処理を行う。
これにより、4 時間の間に侵入したものはリング型を形成しており D-ソルビトール処理に耐えるが、侵入に至らなかったトロホゾイトやシズントは死滅する。
- ii. これ以降は通常通り培養する。

注 1) 同調性が低く、発育ステージの判断が難しい場合、いずれのタイミングでも用いることは可能であるが、最終的に残る原虫の数は著しく低下する。

注 2) このステージを選ぶ理由は、発育周期に要する時間をもとに計算すると、約 24 時間後に成熟シズントに至ることが予想されるからである (注 3 も参照)。

注 3) 培養スケールが 15ml 以上の場合、静置して血球が培養容器の底に沈んだ状態で、血球を吸わないように培養上清を吸引除去し、全体の容量を 15ml 以下にする。それでも 15ml を超える場合は、数本の遠沈管に分注する。

注 4) ヘパリン添加から除去までに要する時間は、使用する原虫クローンに依存する。著者らが頻繁に使用している HB3 クローンは 24 時間が最も適した時間であるが、培養条件により変化する可能性がある。初めて本法を実施する際には注意深く観察を行い、クローンごとに最適なタイミングを調べる必要がある。

注 5) ヘパリンはトロホゾイトからシズント期の原虫の発育を遅延させるという報告もあり (Boyle et al., 2009)、予想されるタイミングよりも遅くなる可能性を考慮すべきである。

[結果]

著者らが実施した一例を示したい。

最初の D-ソルビトール処理直前を 0 時間とした時の、リング型 (ring)、トロホゾイト (troph.)、シズント (schiz.) 及びこれらの合計 (total) の寄生率を、以下の表に示す。

この例では、当初大部分がリング型で一部がトロホゾイトに移行した状態の培養液に D-ソルビトール処理をほどこした。24 h ではトロホゾイトとシズントが約半数ずつを占める状態であった。この際、全体の寄生率が約 17% (1 h) から約 11% (24 h) まで減少しているのは、一

| | ring (%) | troph. (%) | schiz. (%) | total (%) |
|--------|-------------------|------------|------------|-----------|
| 0 h | 16.637 | 2.714 | 0.472 | 19.823 |
| 0.5 h | D-ソルビトール処理、ヘパリン添加 | | | |
| 1 h | 16.949 | 0.339 | 0 | 17.288 |
| 24 h | 0.831 | 4.765 | 5.596 | 11.191 |
| 24.5 h | ヘパリン除去 | | | |
| 28.5 h | 8.742 | 3.595 | 6.700 | 19.036 |
| 29 h | D-ソルビトール処理 | | | |

部の原虫がメロゾイトの放出に至ったが、ヘパリンによって侵入を阻害され、死滅したことによるものと考えられる。この培養液からヘパリンを除去し、4 時間後に観察すると、元々 0.831% であったリング型が 8.742% まで増加していた。つまり、この 4 時間の間に、約 8% のリング型が新たに出現したことになり、これらは 4 時間の幅で同調されている。この培養液を D-ソルビトール処理することで、侵入まで至っていないトロホゾイトやシズントを死滅させ、理論上 8.742% の同調されたリング型のみが生き残る (この実施例では処理直後の検鏡は行っていない)。その後のモニタリングを実施した例では、同調が極めてタイトであることも確認されている。

同調処理前後の原虫量に着目すると、同調処理前に寄生率は 20% 近くあったが、最終的に同調されたリング型の寄生率は 8.7% 程度に減少している。つまり、この回収率を計算すると、 $8.742 \div 19.823 \times 100 = 44.1\%$ となる。過去 8 回分の同調処理に関して、回収率を計算すると、最高で 78.6%、最低で 12.7%、平均で 33.17% であった。

[考察]

従来の同調処理法と比べたときの、本法の利点は以下の 5 点である。

- ① 遠心操作のみで行えるため操作が簡便であること。
- ② そのため、操作の際に虫体が被る悪影響 (温度や浮遊液の変化など) が最小限であること。
- ③ 使用する試薬が安価かつ容易に入手可能であること。
- ④ 同調操作によって失われる原虫数が少ないこと。
- ⑤ 同調の幅を自由にコントロールできること。

結果で述べた回収率のばらつきは、培養状態に大きく依存するためである。しかし、一度本法を用いて同調させた培養液は、発育周期の予

測が容易になるため、再び同調させる際に、高い回収率が期待できる。仮に回収率の確保が難しい場合でも、初めの寄生率をできる限り高めておくことで、同調後に得られる寄生率もその分高くできるため、用途によってはその後の解析に十分用いることができるだろう。

[謝辞]

本研究は、文部科学省特別研究員奨励費及び科学研究費補助金・挑戦的萌芽研究、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により行われた。

[文献]

原著

- 1) Ribaut C, Berry A, Chevalley S, et al.: Concentration and purification by magnetic separation of the erythrocytic stages of all human *Plasmodium* species. *Malaria Journal*, 7: 45, 2008
- 2) Kobayashi K, Kato K, Sugi T, et al.: *Plasmodium falciparum* BAEBL binds to heparan sulfate proteoglycans on the human erythrocyte surface. *Journal of Biological Chemistry*, 285: 1716-25, 2010
- 3) Radfar A, Méndez D, Moneriz C, et al.: Synchronous culture of *Plasmodium falciparum* at high parasitemia levels. *Nature Protocol*, 4: 1899-915, 2009
- 4) Boyle M J, Richards J S, Gilson P R, et al.: Interactions with heparin-like molecules during erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum* merozoites. *Blood*, 115: 4559-68, 2010

成書

- 5) 三田村俊秀：熱帯熱マラリア原虫の同調培養法。マラリア学ラボマニュアル，紀伊國屋書店，東京都，2000，pp55-60
- 6) 堀井俊宏：熱帯熱マラリア原虫の大量培養法。マラリア学ラボマニュアル，紀伊國屋書店，東京都，2000，pp49-54

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

ゴン海燕¹⁾ 玄 学南²⁾ 加藤健太郎¹⁾

1) 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 2) 帯広畜産大学 原虫病研究センター
1) 〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1 2) 〒080-8555 帯広市稲田町 2-11

[抄録] まず、トキソプラズマ原虫の膜蛋白質と考えられる蛋白質 A を、大腸菌発現系等を用いて GST との融合蛋白質として作製する。次にビオチンで標識した 293T 細胞等の培養細胞の lysate から、GST+蛋白質 A の融合蛋白質と結合させた sepharose ビーズを用いてプルダウン法によって蛋白質 A と結合する蛋白質を抽出する。この抽出物を 2次元電気泳動により展開し、ビオチン、ストレプトアビジン標識によって解析を行う。今回取り上げた例では、その後、質量分析により heat shock protein を同定した。

キーワード；プルダウン法、質量分析、2次元電気泳動、ビオチン、ストレプトアビジン

Pull-down method to identify receptor on cell surface for *Toxoplasma gondii*

Haiyan Gong¹⁾, Xuenan Xuan²⁾, Kentaro Kato¹⁾

1) Department of Veterinary Microbiology, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo 2) National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine,

1)1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan 2) 2-11 Inada-cho, Hokkaido 080-8555, Japan

Abstract: Protein A proved to bind with protein on cell surface was expressed as GST-recombinant protein, conjugated to sepharose 4B and used to pull down biotin-labeled 293T cell. The product was analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) and Western blot assay. The reacted spots picked out were revealed as heat shock proteins by mass spectrometry (MS).

Key Words: pull-down method, mass spectrometry (MS), two-dimensional electrophoresis, biotin, streptavidin

[はじめに]

2次元電気泳動及び質量分析による蛋白質の同定は、近年盛んに行われているプロテオーム解析において多用され、蛋白質間の相互作用の解析に必須の手法をなっている。

今回、トキソプラズマ原虫を例にその原虫蛋白質と結合する宿主細胞因子の同定について紹介する。

[方法]

1. 原虫遺伝子のクローニング

トキソプラズマ原虫の mRNA から目的とする原虫遺伝子 A を RT-PCR によって増幅し、pGEX-6P-2 等のベクターに挿入する。ここで発現・精製した GST との融合蛋白質（ここでは仮に rA/GST と呼ぶ）を、以降のプルダウン法に使用する。

2. 宿主細胞の蛋白質のビオチン標識

1×10⁷ 個の 293T 細胞をビオチン (sigma) で標識する (1 時間、4℃)。グリシンでブロッキングし、PBS で洗浄した後、1% NP-40 RIPA buffer (50mM Tris-HCl [PH 7.4], 1mM EDTA, 150mM NaCl, 10µg/ml protease inhibitor cocktail (Promega, Madison, WI, USA), 1mM PMSF) で可溶化し、上清を回収する。

3. プルダウン法

回収した上清に GST 親和性 sepharose ビーズを混ぜ、前吸着を行う。同時に、(1) で大腸菌発現により精製した rA/GST を sepharose ビーズに結合させる。ビーズに結合させた rA/GST をビオチン標識した 293T 細胞の lysate と混ぜる (overnight、4℃)。

4. Precission protease 消化

(3) で作製したビーズ結合体を先の NP-40 RIPA buffer で洗い、Precission protease (GE: 270843) で消化する (overnight、4℃) ことで、GST を除く rA/GST とビオチン標識した 293T 細胞の lysate を sepharose ビーズから切り離す。

5. 2次元電気泳動 (1次元目)

(4) で作成した蛋白質を、先の報告 (Zhang et al., 2011) での方法と少し改変した方法で 2次元泳動により展開した。簡単に説明すると、GST-プルダウン法によって (4) で作製した蛋白質をサンプル buffer に溶かし、2つの rehydrate strip (長さ: 7cm) に吸収させる (1つの strip に 125 µl のサンプル)。Strip 中のサンプルを等電点電気泳動で分離する (250V/30分、500V/1時間、1000V/1時間、4000V/1時間、4000V/2.5時間)。

6. 2次元電気泳動 (2次元目)

(5) で作製したものを SDS-PAGE (12%) によって分離する (2枚作製)。1つを HRP-conjugated streptavidin で標識することで rA/GST に結合した 293T 細胞由来の蛋白質を同定する (右下図)。もう1つは CBB 染色を行う (左下図)。

7. 質量分析

(6) で同定したスポットを質量分析にかける。質量分析には、Autoflex MALDI-TOF/TOF MS systems (Bruker Daltonics, Germany) (Lee *et al.*, 2006) を使用した。

[結果]

図1で、スポット1は同定できなかった。スポット2,3,4は heat shock protein ファミリーに属する蛋白質として同定した。スポット5は rA/GST であることがわかった。スポット6は陰性対照として使用した。

[考察]

今回の研究は原虫蛋白質Aが、実験に使用する細胞に結合能があることが前提となっている。質量分析や結合蛋白質の同定には、実験に用いる細胞のゲノム情報がデータベース化されている必要がある。さらに、質量分析の後、原虫蛋白質Aと同定した宿主細胞の蛋白質の相互作用を解析する必要がある。なお、原虫蛋白質Aの結合する蛋白質が脂質や糖などに広

範に存在するものである場合、今回紹介した2次元電気泳動と質量分析による同定には適さない。

[結論]

プルダウン法と質量分析によって、原虫蛋白質Aの結合蛋白質として、一連の heat shock protein が同定された。

[謝辞]

本研究は、文部科学省特別研究奨励費及び、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により行われた。

[文献]

- 1) Zhang H, Lee EG, Yu L, et al.: Identification of the cross-reactive and species-specific antigens between *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* tachyzoites by a proteomics approach. *Parasitol Res.* 109:899-911, 2011
- 2) Lee EG, Na BK, Bae YA, et al.: Identification of immunodominant excretory-secretory cysteine proteases of adult *Paragonimus westermani* by proteome analysis. *Proteomics.* 6:1290-1300, 2006

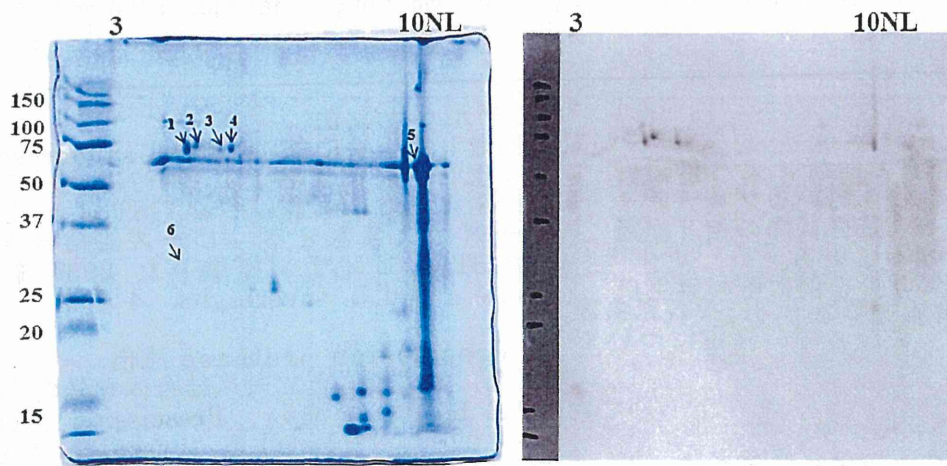


図1 : 2次元電気泳動後の CBB 染色図 (左)、HRP-conjugated streptavidin で標識したもの (右)

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

石和玲子 加藤健太郎

東京大学大学院農学生命科学研究科
〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

[抄録] アピコンプレクサ門に属する原虫であるトキソプラズマ原虫は世界的に感染率の高い寄生虫の一つであり、人獣共通感染症を引き起こす。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として、培養細胞を用いたトキソプラズマ原虫タキゾイト培養系に対して各種薬剤を投与し、 β -ガラクトシダーゼアッセイ法によるトキソプラズマ原虫タキゾイトの定量を行うことで、添加薬剤による感染・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、 β -ガラクトシダーゼアッセイ、感染阻害、増殖阻害剤

Infection/growth inhibition analyses of *Toxoplasma gondii* by various additives using *in vitro* culture system

Akiko Ishiwa, Kentaro Kato

The University of Tokyo Graduate School of Agricultural and Life Sciences,
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 zoonoses 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 to examine the effects of inhibition/growth inhibitors using *in vitro* culture system of *T. gondii* tachyzoites.

Key Words: *Toxoplasma gondii*, β -galactosidase assay, infection inhibition, growth inhibitor

[はじめに]

トキソプラズマ原虫は、アピコンプレクサ門に属する原虫であり、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）を中間宿主とし得るため、食肉は種類によらず感染源になりうる。現在使われているヒトに対する薬剤投与による治療では、原虫の根治には至っていない（大西、2008）。トキソプラズマ感染症を根治するためには、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必要であり、今後とも各ライフサイクルにおける知見の蓄積が求められる。本稿では、培養細胞を用いたトキソプラズマ原虫タキゾイト培養系に対し、各種薬剤を投与することにより、トキソプラズマ原虫タキゾイトの増殖阻害効果を示す物質の効果を検証する実験系について述べる。

[方法]

本稿では、上記実験系の例として、 β -ガラクトシダーゼによる呈色反応を用いたトキソプラズマ原虫タキゾイト感染・増殖阻害効果の検討法を示す。また、宿主細胞のクリスタルバイオレット染色による宿主細胞生存率の算出を行うことで効果を検討する実験法も併せて紹介する。

1. 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）。トキソプラズマ原虫として、大腸菌由来 β -ガラクトシダーゼ導入トキソプラズマ原虫株 2F（ATCC No.50839）を使用した（Dobrowolski, JM and Sibley LD, 1996）。宿主として使用する培養細胞には Vero 細胞を用いた。 β -ガラクトシダーゼアッセイ用の試薬は、Enhanced β -galactosidase assay kit (CPRG) (Genlantis, San Diego, CA, USA) を用いた。発色基質に CPRG（クロロフェノールレッド- β -ガラクトピラノシド）を用いる高感度呈色アッセイ法の操作は、上記キット付属プロトコールに従った。

2. 薬剤添加による感染・増殖阻害アッセイ

アッセイ開始前日にトキソプラズマ原虫の前培養を開始する。トキソプラズマ原虫の生育を同調させるため、継代培養中のフラスコの培地交換を行って浮遊するタキゾイトを除去してから、宿主細胞をスクレイパーで剥離後、#25 ゲージ注射針を装着したシリンジで数回強く吸引することにより宿主細胞と寄生体胞を破壊し、ポアサイズ $5\mu\text{m}$ のフィルターで濾過して未破壊の宿主細胞および細胞の破片を除去し、宿主細胞内で増殖中のタキゾイトのみを回

収する。血球計算盤を用いてトキソプラズマ原虫の虫体数を計算し、前培養に用いる宿主細胞（通常、96 ウェルプレート1~2枚を用いるアッセイにつき T25 フラスコ1本程度）に接種する。翌日のアッセイに用いる場合、接種する虫体数はおよそ MOI=10 とする。

アッセイに使用する培養細胞を 96 ウェルプレートに播種する。各ウェルに播種する細胞数は 3.0×10^4 個とし、一晚培養してウェル底面にセルシートを形成させる。アッセイ実施日、アッセイ用の 96 ウェルプレートの培地を除去し、新しい培地と交換する。96 ウェルの培地交換操作は素早く行い、乾燥による培養細胞の損傷を防ぐ。レーン毎に薬剤添加条件が異なる場合が多いこともあり、1~2 レーン毎に培地交換操作を行うようにすると上記の危険は少ない。

対照群となるウェルには通常の感染実験用培地（1%FCS 添加 DMEM 培地）、薬剤添加アッセイウェルには予め薬剤を添加した培地を分注する。1/2 連続希釈により薬剤を希釈する場合は、この時点で 96 ウェルを利用して行って良いが、ピペットチップの先端でセルシートを傷つけないように注意する。培地交換および薬剤添加後、96 ウェルプレートは CO₂ インキュベーター内で待機させる。

トキソプラズマ原虫の前培養を回収する。原虫の感染能低下を防ぐ為、以降の操作での低温への曝露は避ける（室温で操作する）。回収操作は前培養開始の際と同様に行い、宿主細胞内で増殖中のタキゾイトのみを回収し、血球計算盤を用いて虫体数を計測する。必要に応じて 1000g、10 分程度遠心し虫体を回収、濃縮する。遠心操作の際も室温で行う。

原虫懸濁液濃度を調整し、各ウェルに添加する。原虫接種後、37°C の CO₂ インキュベーター内で培養する。培養終了後、キムタオルを敷いたバット等にプレートを逆さに叩きつけて非感染原虫を培地ごと除去し、各ウェルを PBS(-) により 1~2 回洗浄する。

3. β -ガラクトシダーゼアッセイ (CPRG)

β -ガラクトシダーゼアッセイを行う場合、PBS(-) により洗浄したプレートを 20°C または -70°C で凍結する。この時点で一週間程度の保存が可能である。当日アッセイする場合は、30 分以上凍結してから以下の操作を実施する。尚、キット付属のプロトコールでは、PBS(-) による洗浄後に Lysis buffer を添加した状態で凍結しているが、筆者らは PBS(-) による洗浄後、そのままプレートを凍結しており、特に問題は生じていない。

凍結したプレートを室温で解凍する。実際には、冷凍庫から取り出してすぐに各ウェルに Lysis buffer 50 μ l を添加して良い。Lysis buffer を添加後、室温で静置し、宿主細胞と原虫を溶解する。操作時には顕微鏡下で観察して溶解を確認する。96 ウェル用のプレートミキサー等を用いてウェル内を攪拌することにより、細胞の溶解が促進されるが、筆者らが Vero 細胞で実験した場合には、Lysis buffer 添加後にプレートを手で軽く数回叩いて攪拌する程度で十分に細胞および原虫が溶解した。使用す

る細胞株によっては溶解しにくい可能性がある。必要に応じて Lysis buffer に TritonX-100 を終濃度 1% まで添加可能である。溶解に要する時間の目安は 15 分程度である。また、細胞溶解後のデブリが目立つ場合には、プレートを一旦遠心し、新しいアッセイプレートに Lysate 上清を移して反応を行っても良い。

Substrate solution (CPRG) 100 μ l を各ウェルに添加し、 β -ガラクトシダーゼによる呈色反応を行う。反応は室温で行うが、より好ましくは 28°C~30°C 程度のインキュベーター内にプレートを静置することにより、一定条件下で反応を行うと、実験結果の比較検討が容易になる。反応時間は発色の状態を目視で観察して適宜調節可能である。必要に応じて原虫の接種量や培養時間などの条件検討を行い、対照群ウェルが 1~4 時間で十分に発色する条件を選択する。96 ウェルアッセイの場合、通常は Stop solution の添加による反応停止操作は不要である。十分に発色した時点で 96 ウェルプレートリーダーにより、570~595nm の波長で吸光度を測定する（好ましくは 570nm で測定するが、595nm でほぼ問題はない）。尚、Stop solution を添加しても反応は完全に停止しないため、十分に発色したら直ちに測定を行う。

アッセイを実施するにあたり、同時に大腸菌由来 β -ガラクトシダーゼを段階希釈した試料を作成し、スタンダードとしてアッセイプレートと同条件で呈色させる。

1 ウェルあたりの原虫数を計測する場合は、原虫数を計測した懸濁液から連続希釈を行ってそれぞれによる lysate を調製し、アッセイプレートと同条件で呈色させて検量線を作成する。

4. 培養細胞の生存率の差により薬剤の効果を検証する方法

薬剤添加によるトキソプラズマ原虫感染・生育阻害アッセイの別法として、トキソプラズマ原虫感染後に、対照ウェルの宿主細胞が全て破裂するまで培養を行い、宿主細胞の生存率の差を検出する方法もある (Roos *et al.*, 1994)。この手法では、感染および増殖ステージ全てに対する効果を反映する。

培養時間の目安は 72 時間までとする。72 時間後までに対照ウェルの細胞が全て剥落するように、必要に応じて接種する原虫数等について条件検討を行う。培養終了後、プレートを回収、PBS(-) により洗浄を 1~2 回行い、4% パラフォルムアルデヒド溶液 (PBS に溶解して調製しておく) を各ウェルに分注し、室温 10 分固定する。固定液を除去後、0.5% クリスタルバイオレット溶液を各ウェルに滴下し、室温 20 分染色後十分に水洗する。クリスタルバイオレット染色したプレートは、プレートリーダーにより 595nm の波長で吸光度を測定するか、プレート全体をスキャナーで取り込み、画像データ化した上で、ウェル毎の着色面積を計算する。

上記どちらの方法で数値化を実施するかは、生存細胞の分布状況により判断する。染色後の状態を観察して、ウェルの着色が均一ならばプレートリーダーでの読み込みが可能である。生

存細胞の分布が不均一であれば、スキャナーで画像として取り込み、着色面積を計算する。

[結果]

薬剤の濃度依存的効果の検証 (β -ガラクトシダーゼアッセイによる)

原虫接種数を一定とし、添加薬剤の濃度を段階的に変化させることにより、薬剤の効果濃度依存的に検証することができる。感染初期および感染成立後の宿主細胞内における増殖までを含めたステージに対する効果を検証する場合、接種後に対照群ウェルにおける原虫の増殖が十分に進行するまで培養する。接種する原虫の虫体数は、1ウェルあたり1,000個を基本条件とし、必要に応じ接種数を検討することをお奨めする。

トキソプラズマ原虫は、およそ6~8時間に1回分裂するため、24時間まで培養することにより、理論上は感染成立時の8倍まで増殖する。感染後の宿主細胞内における増殖に対する阻害効果を検証するには、目安として24時間培養後にプレートを回収し、 β -ガラクトシダーゼアッセイによる原虫数の比較定量を行う。

培養の際に24時間以上経過すると、トキソプラズマ原虫が宿主細胞外に放出され始め、その後の操作で正確な定量ができなくなる恐れがある。増殖ステージを含めた検討を行う際には特に、培養時間の設定には注意が必要である。また、使用するトキソプラズマ原虫株および宿主となる培養細胞の種類や状態などにより、細胞外への放出が開始するまでの時間は異なる場合があるため、好ましくはアッセイ中に経時的に顕微鏡観察を行うか、予備実験を実施して、原虫の宿主細胞からの放出が起きるおそれのない培養時間を把握しておくことが良い。

一方、宿主細胞への接着および侵入に対する影響のみを検証したい場合には、原虫を接種後に短時間の培養後、直ちにプレートを洗浄、回収して呈色反応を行う (Carruthers *et al.*, 2000)。

培養時間 (感染時間) は10分から20分程度、あるいは、必要に応じて更に短時間に設定することも可能である。ただし、このような短時間の感染時間を設定した場合、1ウェルあたりの原虫数1,000程度の接種数では、有意な差が検出されない可能性がある (短時間である程、宿主細胞に感染できる原虫の数が少なくなる為)。必要に応じて接種虫体数を増やす等の条件検討を行う。筆者らの経験では、各ウェル中に1,000~10,000個程度の原虫が感染していた場合に安定した実験結果を得た。

感染成立後、宿主細胞内における増殖に対する影響のみを検証したい場合には、薬剤の投与は感染成立後に行うことも可能である。一定時間の感染操作の後、培地および浮遊している非感染原虫を除去し、薬剤を添加した培地を分注して培養を継続する。非感染原虫の除去の際には、予めオートクレーブ滅菌しておいたキムタオルを敷いたバットの上にプレートを叩きつけ、その後素早く各ウェルに培地を分注する。筆者らの経験では、非感染タキゾイトは、上記

の要領でプレートをタオルに叩きつける方法でほぼ除去できたが、顕微鏡観察で観察してウェル内への残存が認められる場合は、PBS(-)による洗浄操作を1回~数回程度行う。一連の操作は素早く行い、ウェル内の乾燥による細胞の損傷を防ぐ。

[考察]

培養細胞を用いた *in vitro* 原虫培養系を応用することにより、トキソプラズマ原虫タキゾイトの宿主細胞侵入および増殖ステージにおける生育阻害剤等の効果を検証することが可能である。 β -ガラクトシダーゼを導入したトキソプラズマ原虫株を用いると、呈色反応により各ウェルあたりの原虫数を定量的に検出できる。簡便かつ汎用性の高い実験系である。

本稿で紹介した CPRG を発色基質として用いる β -ガラクトシダーゼアッセイにより、トキソプラズマ原虫定量を行い、感染・増殖阻害効果の検証を行うことができるが、より高感度のアッセイを必要とする場合には、発光基質を用いた β -ガラクトシダーゼアッセイ系を用いることも可能である。発光を検出できるタイプのプレートリーダーが必要である点など、呈色反応に比べて総合的に高コストである等の難点はあるが、より少ない虫体数によるアッセイを行いたい場合等、高い感度を要する実験系を計画している場合には、発光による検出系も選択肢に入れての検討をお奨めする。

発光基質による市販のアッセイキットは各社から提供されているが、発光反応が一定時間安定に継続し、扱いやすい製品の一例として Beta-Glo™ Assay System (Promega, Madison, WI, USA) が挙げられる。化学発光アッセイを行う場合は、各ウェル間の蛍光リークを遮断し、正確な結果を得るために、白色または黒色不透明プレートを使用する。白色不透明プレートは発光の反射により検出感度を向上させるため、通常は白色プレートを使用する。黒色プレートはバックグラウンドを抑えるため、より微細な発光を精度よく検出できる。状況によりどちらかを選択する。白色・黒色の細胞培養プレートを用いて培養から行うか、発光反応の前に反応液をアッセイ用の未滅菌プレートに移して発色反応および測定を行う。

一方、本稿では、薬剤添加によるトキソプラズマ原虫感染・生育阻害アッセイの別法として、トキソプラズマ原虫感染後に、対照ウェルの宿主細胞が全て破裂するまで培養を行い、薬剤添加ウェルの宿主細胞をクリスタルバイオレット染色して、宿主細胞の生存量の差を検出する手法も紹介した (Roos *et al.*, 1994)。上記の手法は β -ガラクトシダーゼアッセイに比べて定量性には乏しいが、用いるトキソプラズマ原虫の種類・株等を問わないという利点がある。 β -ガラクトシダーゼ導入株以外を用いるアッセイの際などには有用な方法である。また、極めて簡便かつ低コストのアッセイ法であり、研究の初期に実施するスクリーニングなどに適している。

[謝辞]

本研究は、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により行われた。

[文献]

- 1) 吉田幸雄：人畜共通感染症のまとめ. 図説人体寄生虫学 改訂第6版, 南山堂 東京 2002, 262-263
- 2) 大西健児：話題の感染症 人獣共通寄生虫症. モダンメディア, 54:193-201, 2008
- 3) Roos DS, Donald RGK, Morrissette NS et al.: Molecular tools for genetic dissection of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Microbes as tools for cell biology* (Methods in cell biology, Vol.45), Academic Press Inc., Maryland, 1994, 27-63
- 4) Dobrowolski, JM and LD Sibley: *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell*, 84:933-9, 1996
- 5) Carruthers VB, Hakansson S, Giddings OK et al.: *Toxoplasma gondii* uses sulfated proteoglycans for substrate and host cell attachment. *Infect Immun*, 68:4005-11, 2000

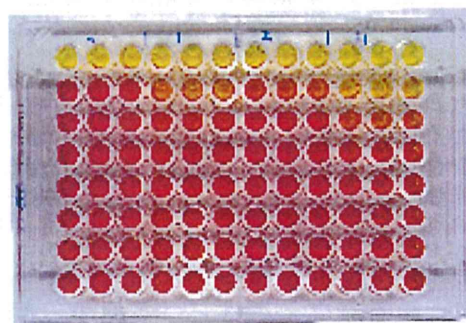


写真1：β-ガラクトシダーゼアッセイによる実験例

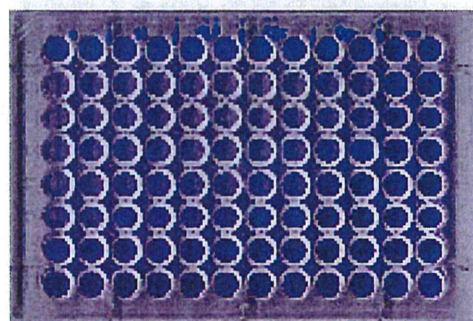


写真2：クリスタルバイオレット染色による実験例