

受理年月日	受理番号

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

平成 30 年 5 月 30 日

採択番号	29 共同-9		
研究部門	国際連携協力部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	菅沼 啓輔
研究課題名	媾疫トリパノソーマ感染症における宿主免疫応答と 末梢神経病変の発生機序に関する研究		
研究代表者	(ふりがな) 氏名	所属部局等・職名	
	わたなべ けんいち 渡邊 謙一	帯広畜産大学グローバルアグロメディシン研究センター・特任助教	
研究分担者	こやま けんじ 小山 憲司	帯広畜産大学家畜病理学研究室・大学院生 被験動物の病態解析・病理組織学的検討	
	すがぬま けいすけ 菅沼 啓輔	帯広畜産大学原虫病研究センター・特任助教	
研究期間	平成 29 年 4 月 1 日 ~ 平成 30 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	<p>媾疫は <i>T. equiperdum</i> 感染により馬属家畜に流死産などの繁殖障害と運動機能障害等の神経症状を起こす致死的な原虫病であり、中央アジアやアフリカなどの汚染国では重大な経済的損失が生じている。申請者らはモンゴルにて媾疫罹患ウマの病理解剖を実施し、運動神経傷害の責任病変と思われる強い炎症性変化が末梢神経に生じていること、脳脊髄液中及び生殖器粘膜に多数の <i>T. equiperdum</i> が認められることを明らかにした (Horiuchi <i>et al.</i>, 論文投稿中)。一方で、虫体の寄生部位と病変部位とは一致しておらず、2つの事象の関連性や末梢神経炎発症に至る機序は不明である。末梢神経炎の組織像は免疫介在性の神経炎に類似していることから、脳脊髄液中に移行した虫体が過剰な宿主免疫応答を誘導し、免疫介在性の末梢神経炎が生じたものと考えた。そこで、本研究では宿主免疫応答と末梢神経炎との関連について実験病理学的検討を行った。</p>		
研究経過の概要	<p><i>T. equiperdum</i> は宿主特異性が強く、マウスなどの小動物を用いた感染及び病態の再現は困難である。本研究では媾疫 <i>in vivo</i> モデルの作出に向けた予備的検討として、1)実験的免疫介在性脳脊髄炎 (EAE) モデル作出法を応用した末梢神経炎の再現実験、2)SCID マウスを用いた <i>T. equiperdum</i> 感染実験の2つの手法を試みた。</p>		

受理年月日	受理番号

研究成果の概要	<p>1. <i>T. equiperdum</i> 虫体蛋白による末梢神経炎の誘発</p> <p>媾疫感染ウマより分離培養した <i>T. equiperdum</i> を破砕し、凍結乾燥したものの（虫体蛋白）200 μg を1単位とし、免疫介在性関節炎・血管炎を自然発症する Il-1raK0 マウスの皮下/脳実質内/脳室内に投与した。皮下投与群、脳実質内投与群については、フロイント不完全アジュバントまたは TiterMax アジュバントと混合した water-in-oil エマルジョンの状態にて投与した。虫体蛋白の投与は7日おきに最大3回実施し、21日目に剖検を実施、血清、脳、脊髄、坐骨神経を含む全身臓器の病理学検査を実施した。また、虫体蛋白に対する抗体価の上昇を評価するため、0, 7, 14, 21日目に採血を実施し、<i>T. equiperdum</i> tubulin 蛋白を定量する ELISA により抗体価の評価を行った。</p> <p><結果 1></p> <p>アジュバントの種類や投与経路、投与量の様々な組み合わせを試したが、媾疫自然症例にみられるような末梢神経炎の再現には至らなかった。さらにいずれの個体についても虫体蛋白に対する抗体価の上昇は認められなかった。より強い免疫応答を誘導できるとされるフロイント完全アジュバントについては今回検討していないが、組織学的検査でも投与部位局所における炎症細胞浸潤などの反応性変化はきわめて軽微であったことから、同手法による末梢神経炎の再現は困難であると考えている。</p> <p>2. <i>T. equiperdum</i> 分離培養株を用いた感染実験</p> <p><i>T. equiperdum</i> は宿主特異性が極めて高く、C57BL/6 などの通常の免疫を有するマウスには感染が困難である。そこで、重度免疫不全マウスである NOD-SCID マウスの腹腔内に <i>T. equiperdum</i> 分離培養株を 1.0×10^6 匹接種した。接種後、末梢血中の虫体数を感染の指標として経時的にモニタリングし、血中の虫体数が $1.0 \times 10^6 / \mu$l に達する時点をエンドポイントとして剖検を実施し、全身臓器を精査した。</p> <p><結果 2></p> <p>接種から 1-2 週間で 83% の個体に感染が認められた。病理学的検査の結果、肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺など全身臓器の血管内に多数の虫体が観察された。また、髄膜血管並びに脈絡膜、脳実質内の毛細血管内にも虫体の寄生がみられた。一方で、これら部位においても <i>T. equiperdum</i> の明らかな組織への侵入はみとめられず、実質細胞の障害、炎症細胞浸潤や梗塞、血管内皮細胞の障害等は認められなかった。</p> <p><考察と今後の展望></p> <p>いずれの実験においても末梢神経炎の再現には至らなかったが、NOD-SCID マウスを用いた感染実験ではウマ以外の動物では困難とされていた <i>T. equiperdum</i> の感染が確認できた。今後、再現実験と詳細な病態解析を行い、媾疫の病態発生の解明や薬剤スクリーニングに利用可能な <i>in vivo</i> モデルの作出に努めたい。</p>
研究成果の発表	一連の実験結果に関しては、追加実験を含め論文化に向けた準備を進めている。