

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

令和元年 5 月 3 1 日

採択番号	30 共同-14		
研究部門	地球規模感染症学分野	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	加藤 健太郎
研究課題名	クリプトスポリジウム症発症メカニズム解明に向けた形態学的アプローチ		
研究代表者	(ふりがな) 氏名	所属部局等・職名	
	ぼちもと ひろき 暮地本 宙己	帯広畜産大学保健管理センター・特任准教授	
研究分担者	こんどう だいすけ 近藤 大輔	帯広畜産大学基礎獣医学研究部門獣医解剖学研究室・助教	
	加藤 健太郎	帯広畜産大学原虫病研究センター・准教授	
研究期間	平成 30 年 4 月 1 日 ~ 平成 31 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	<p>クリプトスポリジウム症は、ヒトにおける最も重要な人獣共通感染症の一つであるが、ヒトへの感染性や発症メカニズムには不明な点が多く、その解明のためにクリプトスポリジウムの微細構造を含む形態学的知見を確立する必要がある。本研究ではクリプトスポリジウム感染モデルマウス腸管組織の微細構造解析を行うことで、ヒトのクリプトスポリジウム症の診断や治療、予防法研究のための基本的知見を得るとともに、マウス動物モデルにおける感染様式に関する形態学的基盤の強化を目的として実施した。</p>		
研究経過の概要	<p>原虫病研究センターにおいて <i>Cryptosporidium parvum</i> を感染させた SCID マウスモデルを作製した。感染後 2 週間を経過し胃腸症状を呈しているモデルマウスより腸管組織を採取後、0.5% Paraformaldehyde (PFA)・0.5% Glutaraldehyde (GA)・0.1 M phosphate buffer (PB) にて 30 分間の浸漬固定を実施した。その後腸管組織の一部については 2% GA・0.1 M PB にて 2-3 日間追加固定した後に 1% 四酸化オスミウム溶液にて後固定し、常法に従い L.R.White 樹脂に包埋した。L.R.White 樹脂包埋標本より 0.5 μm 厚の準超薄切片を作製し、トルイジンブルー染色を施して光学顕微鏡観察に供した。また同標本より 70nm 厚の超薄雪片を作製し、酢酸ウランを用いた電子染色を施して透過電子顕微鏡観察に供した。さらに腸管組織の一部については、0.5% PFA・0.5% GA・0.1 M PB への浸漬固定後、ただちに 1% 四酸化オスミウム溶液にて後固定した。その後段階的に濃度を上昇させた DMSO 溶液に浸漬して氷晶防止処置を施し液体窒素中で凍結切断を実施した。凍結切断後の試料を 0.1% 四酸</p>		

受理年月日	受理番号

	<p>化オスミウム溶液にてオスミウム浸軟処理を実施した後、1%四酸化オスミウムおよび 1%タンニン酸溶液を用いた導電染色処理を行った。処理後の試料はエタノール上昇系および t ブチルアルコールへと置換し凍結乾燥後にアルミニウム試料台に載台し、白金パラジウムコーティングによる帯電防止処置を実施して電解放出型走査電子顕微鏡観察に供した。</p>
研究成果の概要	<p>クリプトスポリジウム感染 SCID マウスモデルの腸管組織を用いて実施された過去の研究で、クリプトスポリジウムが小腸微絨毛間に侵入する侵入形態や、複雑な形態の feeder organelle を形成することが示されている (Umemiya R, et al. J Parasitol. 2005;91(5):1034-9.; Rosales MJ, et al. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1998;93(6):847-50.)。しかし feeder organelle をはじめとするクリプトスポリジウムに関連した微細構造の立体的特性については、不明な点が残されていた。</p> <p>本研究課題において実施したオスミウム浸軟試料の走査電顕観察により、クリプトスポリジウムに関連した細胞内微細構造の三次元的可視化が可能となった。これらの走査電顕所見は、同一個体から取得した樹脂包埋標本を用いた光顕及び透過電顕所見との対比的観察により裏付けられた。特に feeder organelle の形状について、透過電顕観察から 3 つの異なる性状を有する部位が同定されたが、走査電顕観察により、上述の異なる 3 部位は連続性をもった構造であることが示された (現在論文投稿中)。これらの所見は動物個体におけるクリプトスポリジウム症発症メカニズムに関わる形態学的基盤の解明の一端に貢献できると考えられた。</p>
研究成果の発表	<p>「研究成果の概要」欄で述べた通り、研究成果の一部に関する論文を投稿しており、現在はリバイスを行なっている。</p>