

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

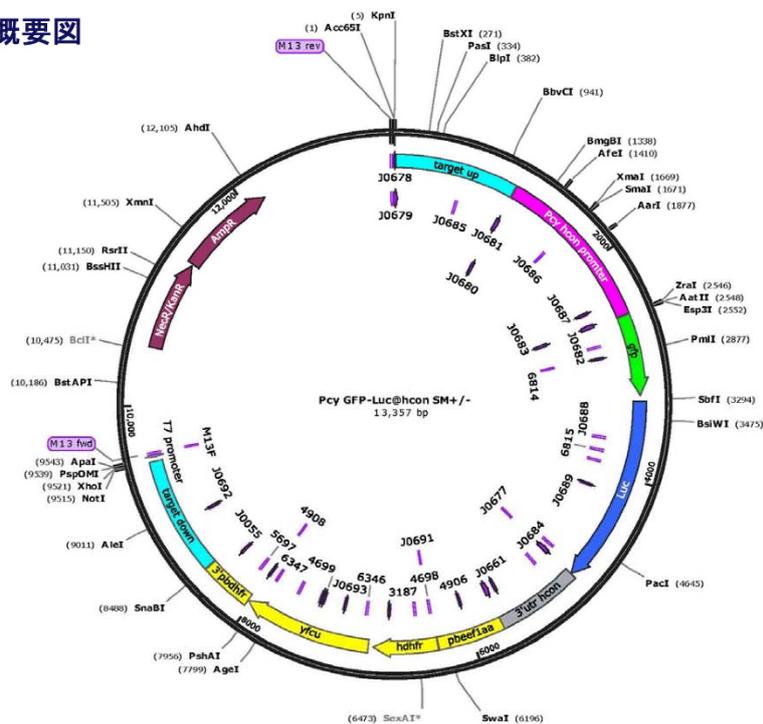
令和2年5月29日

採択番号	2019-共同-1		
研究部門	診断治療研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	河津 信一郎
研究課題名	サルマラリアの肝臓休眠体を標的とした可視化原虫株の作製		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	かわい さとる 川合 覚	獨協医科大学熱帯病寄生虫病学講座・教授	
研究分担者	あんのうら たけし 案浦 健	国立感染症研究所寄生動物部・主任研究官	
	おかもと むねひろ 岡本 宗裕	京都大学霊長類研究所・教授	
	かわづ しんいちろう 河津 信一郎	帯広畜産大学原虫病研究センター・教授	
研究期間	2019年4月1日 ~ 2020年3月31日		
目的・趣旨	<p>三日熱マラリア原虫(<i>Plasmodium vivax</i>,以下 Pv)は媒介蚊からヒトへ侵入後、肝臓内で一部の原虫が休眠体を形成し、休眠体を根治しない限り再発を繰り返すことが知られている。したがって、三日熱マラリアの感染制御には休眠体に対する対処方法がカギとなる。しかし Pv の休眠体は完全に再現される培養系が確立されておらず、一般的な動物実験に使われるネズミマラリア原虫でも休眠体が形成されないことから、いまだ多くの基盤情報が未知のまま残されている。一方、サルマラリア原虫の <i>P. cynomolgi</i>(Pcy)は、Pvとゲノム配列の相同性が90%以上と系統的に極めて近縁の原虫種で、休眠体の形成や赤内期の増殖サイクル等、生物学的性状も非常に類似している。そのため欧米の研究機関では、Pcyを肝臓休眠体の <i>in vivo</i> モデルとして古くから用いている。近年、研究代表者らもニホンザルと Pcy を用いた肝臓休眠体疾患モデルの作出に取り組み、国内で初めて <i>in vivo</i> 実験系の確立に成功した。そこで、本研究では肝臓休眠体の休眠および再活性化に必須の分子メカニズムを明らかにすることを目的に、遺伝子導入による Pcy 可視化株の樹立を目指す。</p>		

研究経過の概要	<p><b>2019年</b>  9/19-10/10: 京都大学霊長類研究所(愛知県犬山市)から基盤研・霊長類医学科学研究センター(茨城県つくば市)へ、実験用アカゲザル 4 頭を移送。導入検疫による経過観察。  11/6: 脾臓摘出、アカゲザル 4 頭(No. 1, 2, 3, 4)。</p> <p><b>2020年</b>  1/20: サル 1 頭(No.1)へ、<i>P. cynomolgi</i> (Pcy)を静脈内接種。  1/30: No.1(day 10)より血液塗抹標本による寄生率の算出開始。  2/4-6: No.1 より採血→約 12 時間培養→標的遺伝子の電気穿孔法による導入→直ちに遺伝子導入した Pcy をサル No.2 へ静脈内接種。  2/6-10: サル No. 1 に対して、クロロキン硫酸を筋肉内投与により、治療。  2/10-24: サル No. 2 に対して、ピリメサミンを経鼻投与。  2/25: サル No. 2 で増殖した Pcy に GFP 信号を確認。凍結保存血液を作製。  2/25-3/1: サル No. 2 に対して、クロロキン硫酸を筋肉内投与により治療。  3/11: サル No.1, 2 に対して PCR により Pcy の遺伝子検出を行い、いずれも陰性。</p>
研究成果の概要	<p><b>1) 遺伝子導入ベクターの設計と作製:</b>  Pcy に GFP/ルシフェラーゼを発現させるためのトランスフェクションベクターを設計し、作製した(別紙、図1)。</p> <p><b>2) Pcy 分裂体感染赤血球の回収:</b>  効率的な遺伝子導入を実施するためには、大量の Pcy 分裂体が必要となるため、分裂体回収のための条件を検討した。早期～中期栄養体の感染した血液をサル No.1 から採血し、混合ガスインキュベータ内で約 12 時間振盪培養を行った。培養感染血液は、Nycodenz®による密度勾配遠心分離をしたところ、大量の Pcy 分裂体感染赤血球を回収することができた。</p> <p><b>3) Pcy に対する遺伝子導入と可視化株の確立:</b>  Pcy 分裂体へ標的遺伝子を導入し、直ちにサル No.2 へ静脈内接種した。No.2 は接種 4 日後から 15 日間、ピリメサミンを経鼻投与を行った。接種 20 日後以降、No.2 の末梢血液中に出現した原虫に GFP シグナルが確認された(別紙、図2)。</p>
研究成果の発表	<ul style="list-style-type: none"> <li>・令和 1 年度、原虫病研究センター共同研究成果報告会、2020 年 2 月 13 日、帯広畜産大学・原虫病研究センター</li> <li>・Development of an effective alternative model for <i>in vivo</i> hypnozoite-induced relapse infection: a Japanese macaque (<i>Macaca fuscata</i>) model experimentally infected with <i>Plasmodium cynomolgi</i>. Parasit Int, 2020; 76, 102096. Kawai S, Annoura T, Araki T, Shiogama Y, Soma S, Takano JI, Otake Sato M, Kaneko O, Yasutomi Y, Chigusa Y</li> </ul>

サルマラリアの肝臓休眠体を標的とした可視化原虫株の作製（研究代表者 川合寛）

組換え実験の概要図



サルマラリアの肝臓休眠体を標的とした可視化原虫株の作製（研究代表者 川合寛）

