

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和3年5月28日

採択番号	2020-共同-9		
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・研究の統括およびサルマラリア感染実験の実施	
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・遺伝子組換え原虫株の作製および保存、サルマラリア感染実験の実施	
	おかもと むねひろ 岡本 宗裕	京都大学霊長類研究所・教授・実験用サルを選定、導入、サルマラリア感染実験の実施	
	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・培養肝細胞を用いた <i>in vitro</i> 感染実験	
研究期間	2020年4月1日 ~ 2021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、肝臓内で休眠体を形成する。休眠体は肝細胞内で数日~数年間経過したのちに活性化し、再増殖を繰り返すことが知られている。したがって、三日熱マラリアの撲滅には、休眠体に対する適切な処置が重要なカギとなる。しかし Pv の休眠体は、培養による再現が難しく、一般的な動物実験に使われるネズミマラリア原虫でも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 のゲノム配列と 90%以上の相同性があり、休眠体の形成や赤内期の増殖サイクル等、生物学的性状も極めて類似している。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(Parasitol Int,76,2020,102096)。本研究では先行研究をさらに発展させ、肝臓休眠体の休眠期および再活性期に必須の分子メカニズムを明らかにすることを目的に、Pcy 可視化株の樹立を試みた。</p>		

<p>研究経過の概要</p>	<p>本研究は 2019 年度からの継続研究のため、前年度に DNA コンストラクトの設計と作製を完了しており、実験用アカゲザル 4 頭も前もって実験施設(基盤研・霊長類医学科学研究センター、茨城県つくば市)へ導入済みであった。実験用アカゲザル No.1(No.R1)に対して、凍結保存した Pcy B 株(ATCC No.3029)を静脈内接種し、接種 15 日後、感染血液の採血を実施した。採取した感染血液はインキュベータ内で 12 時間振とう培養し、原虫の赤血球内ステージを早期栄養体から分裂体へ発育させたうえで、GFP,ルシフェラーゼおよびピリメサミン耐性遺伝子を電気穿孔法により導入した。遺伝子導入した Pcy は、直ちにサル No.R2 に静脈内接種し、接種 4 日後から 15 日間ピリメサミンを経鼻投与した。接種 20 日後以降、No.R2 の末梢血液中に GFP シグナルを有した原虫の増殖がみられ、これらを Pcy 遺伝子導入株 (Pcy, GFP::Luci 株)として凍結保存した。さらに Pcy, GFP::Luci 株感染血液を人工膜吸血法でハマダラカに吸血させ、媒介蚊体内における原虫の GFP シグナルを観察した。</p>
<p>研究成果の概要</p>	<p>1)赤血球内ステージにおける GFP シグナル: 早期栄養体には細胞質全域に強い GFP シグナルが認められた(別紙図 1-A)。また、さらに発育した後期栄養体や分裂体においても、一定の蛍光シグナルが検出された(別紙図 1-B)。</p> <p>2)媒介蚊内ステージにおける GFP シグナル: Pcy, GFP::Luci 株を人工膜吸血法でハマダラカに吸血させて 15 日後、蚊の中腸外側には、多数のオーシストが形成されており、いずれも強い GFP シグナルが認められた(別紙図 2-A)。吸血 22 日後、蚊の唾液腺内にスポロゾイトの形成が認められ、個々のスポロゾイトに強い GFP シグナルが認められた(別紙図 2-B)。</p> <p>3) Pcy, GFP::Luci 株の感染性と増殖性: Pcy, GFP::Luci 株のスポロゾイト 5×10^5 個を、未感染の実験用サルの静脈内へ接種した。接種 9 日後より抹消血液中に原虫が出現し、接種 14 日後には寄生率約 2%に達した。これにより、本株が遺伝子導入前の株(野生株)と同様の感染性を有し、宿主の肝細胞内および赤血球内で増殖することが明らかとなった。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>荒木球沙、川合 覚、角田宗一郎、小林宏尚、中野由美子、久枝 一、案浦 健: 電子顕微鏡 3D 構造解析を用いたマalaria原虫のオーシスト期・核分裂様式の解明、第 90 回日本寄生虫学会大会、2021 年 4 月、奈良市</p>

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）

図1、Pcy, GFP::Luci 株における赤血球内ステージのGFPシグナル（CLMによる解析像）

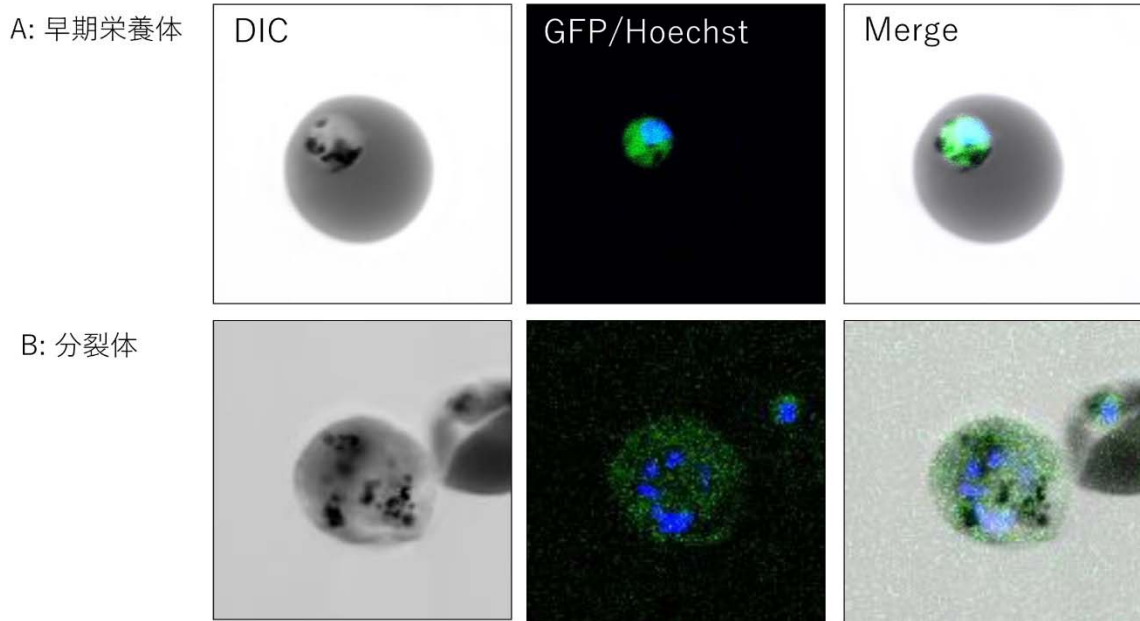


図2、Pcy, GFP::Luci 株における媒介蚊内ステージのGFPシグナル（蛍光顕微鏡像）

