

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2024年5月28日

採択番号	2023-共同-10		
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	白藤 梨可
研究課題名	高増殖型マダニ細胞の作出		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	なかおりょう 中尾 亮	北海道大学大学院獣医学研究院・准教授	
研究分担者	たや ゆりえ 田谷 友里恵	北海道大学大学院国際感染症学院・大学院生	
	にわ しほ 丹羽 志萌	北海道大学獣医学部・学部学生	
	かただ ゆき 片田 雪	北海道大学獣医学部・学部学生	
	しらふじりか 白藤 梨可	帯広畜産大学原虫病研究センター・准教授	
研究期間	2023年4月1日 ～ 2024年3月31日		
目的・趣旨	<p>マダニはウイルス、細菌、原虫など様々な病原体を媒介するため、多くの感染症研究分野で研究対象となっている。マダニに由来する細胞はマダニ媒介性病原体の分離やその性状解析にとって有用な実験ツールである。しかしながら、本邦を含めたアジア地域に優占するチマダニ属マダニの細胞が開発されていないことが、研究遂行の大きなボトルネックとなっている。本研究では、フタゲチマダニなどの国内の重要チマダニ属マダニ種の細胞作出を目的とした。マダニ初代培養細胞の作出時に、化合物や人工基質を培地に添加することで、マダニ細胞の高増殖化を試みた。</p>		
研究経過の概要	<p>【マダニ細胞材料】 実験室マダニ維持株(フタゲチマダニ、キチマダニ、ヤマアラシチマダニ)および野外採集株(フタゲチマダニ、タカサゴチマダニ)を実験に用いた。雌成ダニをウサギに吸血させ、飽血マダニを得た。25度のインキュベーター内で飼育し、産卵させた。発育卵を経時的に観察し、産卵後約21日後に卵塊を回収し、細胞作出材料とした。</p> <p>【マダニ初代培養細胞の調整】 マダニ卵塊の表面を滅菌したのちに、ハンドホモジェナイザーを用いて乳剤を作製した。ハンクス平衡塩類溶液を用いて複数回の洗浄し、卵殻構成物等を除去した。L-15培地をベースとした培養液中に、抗真菌剤、抗生物質、ビタミン類を添加し、マダニ乳剤を懸濁した。初代培養細胞は、28度または32度で静置し、増殖をモニタリングした。</p>		

<p>研究成果の概要</p>	<p>【マダニ細胞増殖モニタリング】 マダニのアクチンタンパク質をコードする遺伝子の保存領域にプライマーを設計し、その遺伝子発現を RT-PCR 系により評価した。また、株化マダニ細胞では、増殖に従って培地の pH が低下することが報告されている。RT-PCR による活性評価に加えて、培地の pH を測定した。</p> <p>【高増殖化マダニ細胞の作出試験】 マダニの高増殖化を目的に、①染色体の分裂阻害剤の添加、②人工基質の添加、という2つ方法を試みた。</p> <p>① 染色体の分裂阻害剤の添加実験 これまで開発され広く用いられている株化マダニ細胞では染色体の異数性が観察されている。本実験では、上述のマダニ初代培養細胞の作成時に、染色体分配を阻害することが知られている 2 種の化合物を複数の濃度で添加し、マダニ細胞の増殖をモニタリングした。その結果、化合物1添加群では非添加群と比べて遺伝子発現強度に有意な差はみられなかった。一方、化合物2添加群では、添加濃度が高いロットほど、遺伝子発現強度が高い傾向にあった。培地の pH 変化については、全ての群間で有意な差は得られなかった。</p> <p>② 人工基質の添加試験 マダニ細胞は、接着系と浮遊系の多様な細胞種が混じり合った形で増殖することが報告されている。また、細胞濃度が低い状態では、容易に細胞死につながるものが観察されている。そこでヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) のフィーダーフリー培養などにも有効性が示されているハイドロゲルの人工基質を培地に添加して、上述の手法でマダニ初代培養細胞を作出した(図1)。RT-PCR 系による遺伝子発現解析、培地の pH 測定の両方で、人工基質の添加群と非添加群の間に有意な差はみられなかった。</p> <div data-bbox="826 1032 1372 1393" data-label="Image"> </div> <p>図1. ハイドロゲルを用いた人工基質の添加試験</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>なし</p>