

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30日

採択番号	2023-共同-14		
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	福本 晋也
研究課題名	北海道における海獣由来トキソプラズマの単離培養法の確立と全ゲノム解析		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	ひこさか けんじ 彦坂 健児	千葉大学大学院医学研究院感染生体防御学・准教授	
研究分担者	こばやし まり 小林 万里	東京農業大学生物産業学部・教授	
	ふくもと しんや 福本 晋也	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>本研究の目的は、海棲哺乳類に寄生するトキソプラズマを分離培養することで、その全ゲノムによる系統解析及びマウス感染による病原性の評価を可能とし、海棲哺乳類が有する本原虫の感染動態を明らかにすることである。海洋におけるトキソプラズマ感染の報告は、鰭脚類や鯨類などの海棲哺乳類、魚類、軟体動物、甲殻類などに散見される。しかし、そのほとんどが抗体検査による疫学調査の報告であり、遺伝子型などの分子系統学的情報は極めて少ない。また、ラッコを対象とした大規模なトキソプラズマ感染の調査では、陸上のネコ科動物では同定されずラッコでのみ同定される遺伝子型が検出されている。以上より、海洋環境において陸上とは異なった独自の原虫生態系を形成している可能性が考えられ、本研究で得られる原虫生態系情報は公衆衛生・野生動物保護対策の立案に貢献することが期待できる。</p>		
研究経過の概要	<p>今年度は 65 頭のゼニガタアザラシを用い、以下の 1～3 の項目について研究を実施した。</p> <p>1. PCR によるトキソプラズマ感染状況の調査</p> <p>研究開始当初は、ヒトのトキソプラズマ PCR 検査で用いられている B1 遺伝子を標的とした PCR を実施したが、条件検討の結果、当研究室で設計した <i>cox1</i> 遺伝子を標的とした PCR の方が検出感度は高く、シーケンスによる種同定にも使えることから、検出方法を <i>cox1</i>-PCR に変更した。PCR に用いる鋳型 DNA は、捕獲したゼニガタアザラシ 65 頭のうち、23 頭からは血液のみ、42 頭からは脳、心臓および血液を採取し、それぞれの試料から抽出したものを使用した。PCR およびシーケンスの結果、65 頭中 10 頭(15.4%)でトキソプラズマ特異的配列が同定された。また、PCR 陽性試料より抽出した DNA を用い、種分類に利用される ITS1 領域の塩基配列を決定したところ、こちらにもトキソプラズマ特異的配列であることが確認された。</p>		

<p>研究成果の概要</p>	<p>2. マウスを用いたトキソプラズマ株の樹立 ゼニガタアザラシ 20 頭(うち 6 頭は心臓が PCR 陽性)の心臓のホモジネートを作成し、それぞれの試料を 8 週齢の ICR マウス 1 匹ずつ計 20 匹に経口投与した。その後、感染経過を 2 ヶ月間観察した。20 匹中 2 匹のマウスは途中で斃死したため、トキソプラズマの PCR 検査を実施したが、原虫 DNA は検出されなかった。残りのマウスについては、脳を分離しホモジネートを作成後、検鏡によりシストの有無を観察したが、シストは検出されなかった。2023 年度のマウス感染実験においてトキソプラズマの感染は確認されなかったが、次年度は、より新鮮な試料の使用、シスト保存温度の検討などを行い、マウス感染によるゼニガタアザラシ由来トキソプラズマ株を樹立したいと考えている。</p> <p>3. ELISA によるゼニガタアザラシ血清中の抗トキソプラズマ抗体検出系の確立 PCR 法による原虫 DNA の検出方法では検出に使用するサンプル量が微量であるため、PCR 陰性の場合でもトキソプラズマに感染しているかどうか判断がつかない場合がある、そのため、ELISA による抗トキソプラズマ抗体の検出を併用することとした。抗原は、地球規模感染症学分野の玄学南教授より供与を受けたトキソプラズマ表面抗原である SAG2 の遺伝子を発現するプラスミドを用い精製した。現在、トキソプラズマ感染/非感染マウスの血清を用いた ELISA 検出系の条件検討を行っており、次年度にはゼニガタアザラシの血液試料を用いた抗トキソプラズマ抗体保有調査が可能となる予定である。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>彦坂健児, Chen F Xue, Bai Jingrun, 松崎素道, 坂本寛和, 小林万里, 福本晋也. 北海道のゼニガタアザラシにおけるトキソプラズマの感染調査. 第 93 回日本寄生虫学会大会(ポスター発表), 2024 年 3 月, 東京.</p>