

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2025 年 6 月 4 日

採択番号	2024 共同-18		
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	2024 年 4 月 1 日 ～ 2025 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	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、軟体動物及び甲殻類などで散見される。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。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、全ゲノム情報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、海棲哺乳類に寄生する本原虫の感染動態を明らかにすることである。本研究の成果は、原虫生態系の情報は公衆衛生・野生動物保護対策の立案に貢献することが期待できる。		
研究経過の概要	昨年度は、襟裳に生息する 65 頭のゼニガタアザラシ試料を用い、以下を実施した。 1. 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 2. PCR によるトキソプラズマ特異的 DNA 断片の検出 3. ゼニガタアザラシ心臓ホモジネートのマウスへの経口投与 以上を実施し、ゼニガタアザラシ血清を用いた ELISA 法を確立した。また、トキソプラズマ特異的な PCR 増幅産物が 65 頭中 10 頭で検出されたが、マウスへの陽性個体心臓のホモジネート投与では感染が確認されなかった。以上より、今年度は、ELISA によるゼニガタアザラシのトキソプラズマ感染率の調査、マウス感染に向けたシスト保存温度と保存の検討などを行う必要があると考えられた。		
研究成果の概要	今年度は、襟裳の 115 頭分のゼニガタアザラシ試料を用いて解析を行った。結果と考察を以下に示す。 <u>1. ELISA 法によるトキソプラズマ感染率の調査</u> 昨年度の本共同研究助成により確立した ELISA 法を用いた。ゼニガタアザラシの血清は、2023 年度に採取した 37 試料及び 2024 年度に採取した 60 試料を用いた。その		

	結果、計 97 試料のうち 6 試料が陽性であった(陽性率 6.2%)。北海道におけるゼニガタアザラシの血清を用いたトキソプラズマ感染の調査は 2007 年に報告がある(Fujii ら、<i>J Vet Med Sci</i>)。この報告では、2005 年の納沙布の調査で 77 頭中 3 頭が陽性であったが、襟裳では 1999 年(8 頭)、2003 年(15 頭)、2004 年(28 頭)、2005 年(24 頭)のいずれの年にもトキソプラズマ陽性個体が検出されていない。そのため、襟裳のゼニガタアザラシにトキソプラズマ感染が拡大している可能性もあり、今後も継続的な調査が必要であると考えられた。 <u>2. シストの保存条件の検討</u> 昨年度、トキソプラズマ PCR 陽性ゼニガタアザラシの心臓ホモジネートを用いたマウスへの感染実験を実施したが、感染マウスが確認されなかった。これより、ゼニガタアザラシより心臓を摘出した後の試料の保存方法がシストの感染能に影響を与えている可能性が考えられたため、シストの保存条件を検討した。トキソプラズマシストは、当研究室でマウスへの経口投与で継代を行っている脳ホモジネート中の Fukaya 株のシストを用いた。保存条件は、温度条件 4℃もしくは室温、保存期間 1、2、3 及び 4 日間で検討した。通常、千葉大学で維持している Fukaya 株は、マウスへのシスト 10 個の経口投与で急性感染を引き起こし、投与後 14 日間以内でマウスが斃死する。上記の条件で保存したシストをマウスに経口投与したところ、室温、4℃の温度条件で 1、2、3 日間保存したシストでは 12 日以内のマウス斃死が確認された。これより、これらの条件では、シストの感染能が維持されているものと考えられた。一方、4 日間保存したシストを投与したマウスは生存したが、投与後 2 ヶ月に脳内においてシストが確認されたことから、感染能が低下したことが考えられた。以上の結果より、ゼニガタアザラシより採取した心臓試料にトキソプラズマシストが存在した場合、室温でも 4℃でも 3 日間は感染能を有していることが示唆された。この成果は、今後のトキソプラズマのゼニガタアザラシ分離株の確立に向けた実験に活用できる。 <u>3. ゼニガタアザラシの心臓ホモジネートを用いたマウスへの感染</u> 昨年度はホモジネートの経口投与のみで感染を試みたが、今年度は、経口投与と同時に腹腔内接種も実施した。また、上述の 2. で得られた結果をもとに心臓試料分離後 3 日以内にホモジネートを作成しマウスへの感染を実施したが、トキソプラズマの感染は確認されなかった。保存条件に問題がなかったとすると、ホモジネート作成に用いた心臓部位にシストが存在しなかった可能性があり、今後は、心臓試料の採取箇所の検討が必要と考えられた。
研究成果の発表	なし