

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究（C）一般

研究期間：2010～2012

課題番号：22580344

研究課題名（和文）タイレリアオリエンタリス原虫の培養系および実験動物系を用いた分化・増殖機構の解析

研究課題名（英文）*In vitro and in vivo* analyses of differentiation/proliferation mechanism of the *Theileria orientalis* protozoan parasite

研究代表者

荻原 喜久美（OGIHARA KIKUMI）

麻布大学・生命・環境科学部・講師

研究者番号：50154381

研究成果の概要（和文）：*Theileria orientalis* 原虫に感染したウシの末梢血接着細胞より *T.o* 原虫感染株を樹立した。その細胞株は単球・マクロファージ系であった。その細胞株の *T.o* 感染を nested-PCR 法で証明した後、ウシ赤血球置換 SCID マウス（Bo-RBC-SCID）を作製し、*T.o* 感染細胞株を接種した。その結果、Bo-RBC-SCID の末梢血中の赤血球内にピロプラズムが認められた。本実験よりマクロファージで継代増殖する *T.o* 原虫が SCID マウス内のウシ赤血球に感染し赤内型原虫へと分化増殖することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：*Theileria orientalis* (*T.o*) parasite infection cell lines were established from adherent cells of the peripheral blood of the bovine which was infected with *T.o* protozoan parasite. The cell lines were derived from monocytes/macrophages. After detection of *T.o* in the infected cell lines by the nested-PCR method, the SCID mice were substituted for bovine red blood cells (Bo-RBC-SCID), and transfected with *T.o* infected cells. As a result, piroplasms were detected in red blood cells in the peripheral blood of Bo-RBC-SCID. These findings suggest that *T.o* protozoan were subcultured in macrophage cells, differentiated and proliferated into the intraerythrocytic stage after having been infected with the bovine red blood cells in Bo-RBC-SCID.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：寄生虫、*Theileria orientalis*

1. 研究開始当初の背景

(1) ウシ小型ピロプラズマ症は、ダニが媒介する寄生性原虫によって起こる感染症である。臨床症状は貧血の進行に伴って発熱、粘膜の退色、食欲減退などで、発病の程度は侵襲した原虫の量や病原性および宿主の免

疫応答性により様々である。放牧牛においては、重症になると補液や輸血も必要とする。しかし、*Theileria orientalis* (*T.o*) の生活環については *Theileria parva* や *Theileria annulata* のように詳細な検討はほとんど行われておらず、感染牛においてはマクロシジ

ントやマイクロシズントがどの組織内で増殖しているのかという報告も少ない。

アフリカで大きな被害を出している *Theileria parva* 等の生活環については研究が重ねられ、リンパ球系細胞でマイクロシズントからマイクロシズントに発育すると報告されているが、*T. o* 原虫に関してはその点すら未だ不明である。

(2) 研究代表者の荻原と、研究協力者の児玉は、小型ピロプラズマ寄生率4+を認めた放牧牛の末梢血を培養し、*in vitro* で細胞内に存在する原虫を免疫組織学的ならびに超微形態学的に証明した。また、Chitose 株および Ikeda 株の primer を用いて培養細胞の nested PCR を行った結果、いずれも 591bp にバンドが検出され、さらに、児玉が作製した原虫の膜抗原に対する単クローナル抗体を用いた免疫電顕所見においても原虫の膜抗原に強く反応した。この細胞株が *T. o* 原虫に持続的に感染し、細胞内に存在する *T. o* 原虫が感染性を保持していることを確かめることが可能であれば *T. o* 原虫の生活環の解明に繋がり、原虫の分化・増殖機構の解析が期待できる。

2. 研究の目的

(1) ウシ小型ピロプラズマ症は、フタトゲチマダニの吸血によって媒介されるが、スポロゾイトがウシの体内でどのようなステージを経てピロプラズマになるか、現在のところその詳しい性状についてほとんど解明されていない。そこで、感染したウシ末梢血中の単球・マクロファージ系の細胞株を樹立し、細胞内に寄生するマイクロシズントを証明し、Bo-RBC-SCID を用いて細胞内のマイクロシズントがウシ赤血球に感染するかを確認する。

(2) *T. o* 原虫がマウスの生体内でどのような生活環をたどりウシの赤血球に移行していくのか、さらにウシの生体を介さない実験系の確立を目指し、*T. o* 原虫の分化・増殖機構の解析を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 感染牛から末梢血を採材し、マクロファージ系細胞を分離し、6 ヶ月から1年程度培養し、マクロファージ由来細胞株を樹立した (iAd-48567 細胞株、iAd-607 細胞株)。

(2) マクロファージ系細胞株の詳細な性状を検討するために、ギムザ染色、エステラーゼ染色をはじめ、*T. o* 原虫に対する単クローナル抗体を用いて蛍光抗体法、酵素抗体法を行った。また、市販抗体を用いてフローサイトメーターによる細胞表面マーカーの検索を行い、細胞株の由来について詳しく検討し

た。さらに、超微形態学的に観察を行い、免疫電顕により、細胞内に *T. o* 原虫が存在することを証明した。

(3) 細胞株に存在する *T. o* 原虫の遺伝子学的解析を行う目的で、Chitose 株および Ikeda 株の primer で培養細胞の nested PCR を行い、細胞株内の遺伝子検索を行った。

(4) SCID マウスを摘脾し、Chitose 株および Ikeda 株の primer を用いて SCID マウスの輸血に用いる健康なウシの末梢血中に *T. o* 原虫が存在しないことを確かめ、Bo-RBC-SCID を作製し、各々感染細胞株および陰性コントロールの非感染細胞を 1×10^6 個に調整し SCID マウスに接種した。

(5) Bo-RBC-SCID から血液を採取し、血液塗抹を行い、*T. o* 原虫の割合を調べるとともに、蛍光抗体法、電子顕微鏡による観察および nested PCR を行った。貧血が進み、衰弱が認められたマウスは安楽殺し、病理組織学的検査を行い、腹部大静脈から採材した末梢血を用い、PCR 産物の塩基配列を調べた。

(6) Balb/c マウスの脾より接着細胞を培養し、*T. o* 非感染細胞株 (M-Adh) を樹立した。*T. o* 感染細胞は、*T. o* 原虫感染培養細胞の上清中の浮遊細胞を M-Adh 細胞と共培養後、10 ヶ月間継代したものを実験に供した (M-iAdh)。マウスおよびウシの β アクチンの primer を用い、両細胞株がマウスに由来することを確かめた。原虫の感染は蛍光抗体法、nested-PCR 法および電顕によって確認した。M-iAdh 細胞を6匹に、M-Adh 細胞を3匹にそれぞれ腹腔内接種した。また、陰性コントロールとして、マウス3匹にウシ赤血球のみを接種した。

4. 研究成果

(1) 感染細胞株は、いずれも MPSP 遺伝子の U-プライマーを用いた PCR 法で Ikeda 株のみ 591bp にバンドが検出され、抗 *T. o* モノクローナル抗体 Rag23 により蛍光抗体陽性を呈した。May-Grünwald-Giemsa 染色において細胞質の空胞内に好塩基性の点状構造物が多数認められた。超微形態学的には類円形や切れ込み様の核を持ち、明瞭な核小体が認められ、広い細胞質にはファゴソームや空胞が多数観察された。免疫電顕では、細胞質の空胞内に 500~700nm 程度の類円形をした原虫が確認された。

(2) SCID-Bo の牛赤血球の割合は 35.3~61.9%であった。iAd-48567 細胞接種群では、図2に示すように感染細胞接種12日後より赤内型原虫が確認され、接種後77日めで最

高感染率 36.9%を示した。SCID-Bo の末梢血中には図 3 に示すようにピロプラズムが認められ、電子顕微鏡観察においても *T.o* 原虫および bar が認められた。iAd-607 細胞接種群では 60 日後の感染率は平均 0.1%であった。

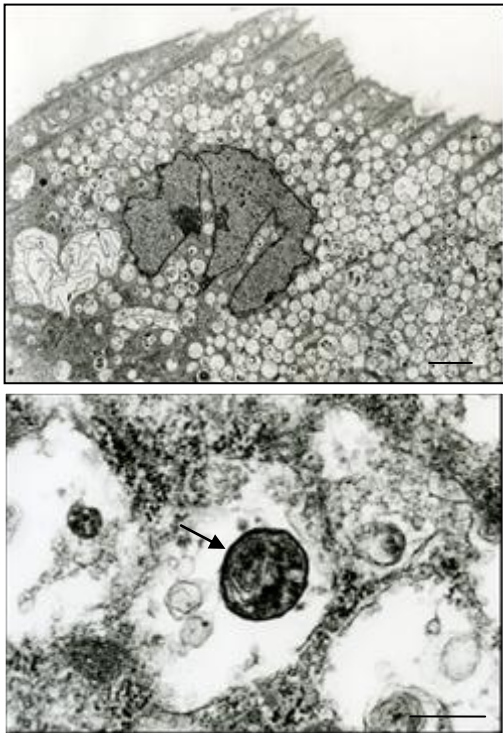


図 1 *T.o* 原虫感染株化細胞の電子顕微鏡像（上：-は 2 μ m、下：-は 500nm）：細胞質の空胞内に約 500nm のミクロシジント様の物質が認められた（ \rightarrow ）。

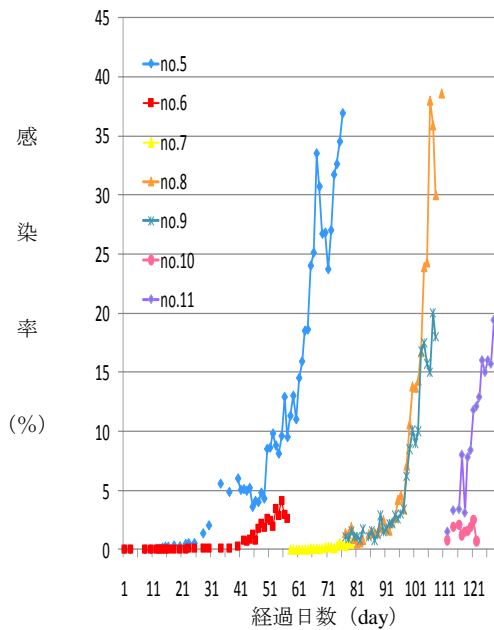


図 2 SCID-Bo における赤内型原虫の感染率の推移

iAd-48567 細胞接種群と iAd-607 細胞接種群では、SCID-Bo マウス内での赤血球感染率に大きな差が認められた。同様に同一実験群でもマウスの個体差が認められた。

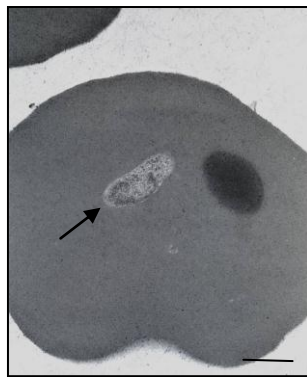
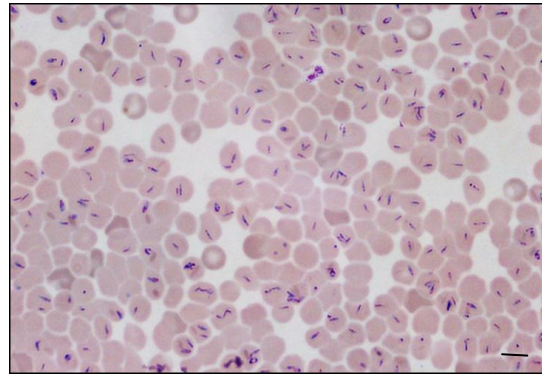


図 3 SCID-Bo における末梢血中の塗抹標本の May-Grünwald-Giemsa 染色（上：-は 10 μ m）、*T.o* 原虫感染赤血球の電子顕微鏡像（下：-は 2 μ m）

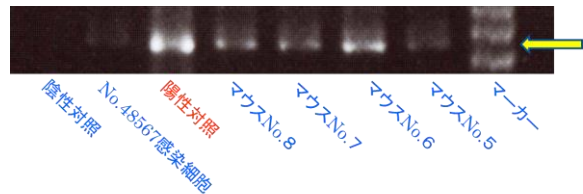


図 4 SCID-Bo における末梢血中の nested-PCR 法

(3) β -アクチンを Primer に用いた PCR 法では M-Adh 細胞株および M-iAdh 細胞株のいずれもウシ由来の β アクチンは検出されなかった。M-iAdh 細胞は、ウシ由来 *T.o* 原虫感染細胞と同様に、MPSP 遺伝子の U-プライマーを用いた nested-PCR で 591bp の特異的なバンドが検出された。抗 *T.o* 単クローナル抗体 Rag23 により蛍光抗体法で陽性を呈した。超微形態学的には類円形の核と明瞭な核小体が認められ、細胞質の空胞内に 500 nm \sim 1 μ m 程度の原虫が存在した。観察した全ての M-iAdh 細胞に原虫が確認された（図 5）。

(4) SCID-Boにおいて最短で接種後22日目に、また最長で28日目より、6匹全例に赤内型原虫が確認され、最高感染率は接種59日目で14.6%を示した。M-Adh細胞ならびにウシ赤血球のみ接種したマウスは全例に感染が認められなかった。M-iAdhで長期に継代増殖していた*T.o*原虫がSCIDマウス内のウシ赤血球に感染し、赤内型原虫へと分化増殖することが証明された。種を越えて異種動物のマクロファージ内で*T.o*原虫が分化増殖することが確認できた。

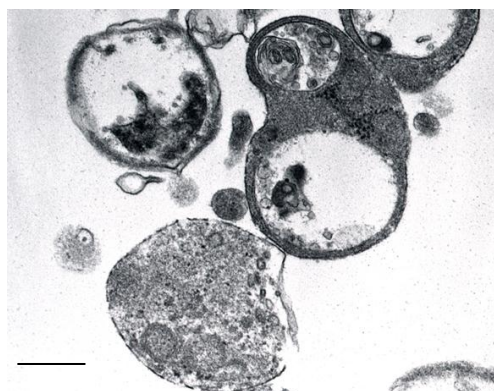
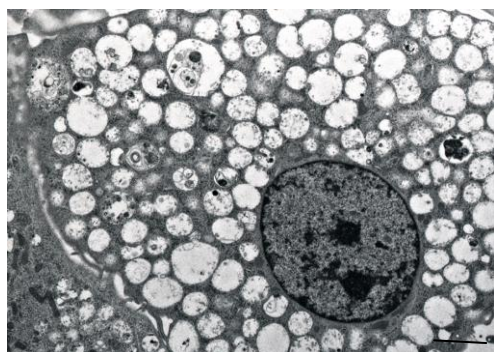


図5 M-iAdh株化細胞の電子顕微鏡像
(上：—は2 μ m、下：—は200nm)：細胞質の空胞内に約500nm~1 μ mのシズント期*T.o*原虫が認められた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

荻原喜久美、児玉道、培養タイレリアオリエンタリスシズント期原虫のウシ赤血球置換SCIDマウスを用いたピロプラズムへの分化・発育の証明、Jornal of Animal Protozooses、査読無、Vol. 25、2010、pp. 18-19

[学会発表] (計4件)

荻原喜久美、納谷裕子、富樫麻由子、阿部真

純、久松伸、岸川正剛、久保正法、児玉道マウス*Theileria orientalis*感染培養細胞におけるシズント期原虫のウシ赤血球置換SCIDマウスを用いた赤内型原虫への分化・増殖、第150回日本獣医学会学術集会、2010年9月

児玉道、荻原喜久美、納谷裕子、久保正法、榑原伸一、村田史郎、今内覚、大橋和彦、牛末梢血より*Theileria orientalis*と*Babesia ovata*との混合感染有核細胞培養系の樹立、第150回日本獣医学会学術集会、2011年3月

荻原喜久美、納谷裕子、赤嶺さくら、阿部智哉、稲葉翼、岸川正剛、白砂勇、久保正法、児玉道、*Theileria orientalis*と*Babesia ovata*感染牛から樹立した細胞株の性状および超微形態学的検討、第153回日本獣医学会学術集会、2012年3月

児玉道、荻原喜久美、納谷裕子、村田史郎、今内覚、大橋和彦、岸川正剛、*Babesia ovata*感染宿主有核細胞の培養系産物を抗原としたELISAによる抗体検出系、第153回日本獣医学会学術集会、2012年3月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荻原喜久美 (OGIHARA KIKUMI)

麻布大学・環境保健学部・講師

研究者番号：50154381

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

児玉道 (KODAMA MICHI)

北海道大学・(連合) 獣医学研究科・客員研究員

研究者番号：90466467

岸川正剛 (KISHIKAWA SEIGOU)

麻布大学・環境保健学部・教授

研究者番号：10099377

久松伸 (HISAMATSU SHIN)

麻布大学・環境保健学部・講師

研究者番号：10198997