

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22380158

研究課題名(和文) 家畜に流産をおこす病原体の臓器向性を規定する体内伝播様式の解明

研究課題名(英文) Vertical transmission pattern of pathogens cause abortion of domestic animals

研究代表者

高島 康弘 (YASUHIRO, TAKASHIMA)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：20333552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円、(間接経費) 4,080,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内寄生性病原体が母体に感染し胎児へと感染する際の挙動について以下のことが明らかになった。まず雌性生殖器への指向性が強い病原体に関しても、母体血流中の感染細胞が必ずしも胎盤にとどまりやすいわけではなかった。これは胎盤の最表層の細胞で接着分子の発現が抑制されているためであると思われる。局所的にこのような細胞が剥離することが病原体の伝達に重要な役割を果たしている可能性が高い。

研究成果の概要(英文)：In this study, the dissemination of intracellular pathogen from maternal blood flow to the placenta was revealed. Even in the case of pathogens, which preferentially infect to the placenta, drastical accumulation of the infected maternal leukocytes was not observed in the placenta. It may be because the lack of expression of molecules related with cell adhesion on the most surface layer of the placenta. Physical disruption of the layer must be important for vertical transmission of intracellular pathogens.

研究分野：畜産学・獣医学

科研費の分科・細目：基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：胎盤 家畜 トキソプラズマ

## 1. 研究開始当初の背景

家畜に流産をおこす病原体の感染経路には性器感染、垂直感染などがあるが、その他にも、病原体に汚染された飼料や水からの経口感染が重要な経路としてあげられる。例えば家畜流産の原因として極めて重要視されている *Brucella abortus*(ブルセラ)、*Chlamydia abortus*(羊伝染性流産菌、以下本申請では「クラミジア」と記載)、*Toxoplasma gondii* (トキソプラズマ)は、いずれも、胎盤や子宮分泌液に含まれた病原体が飼料や水を汚染することで経口的に同居家畜へ伝播することが知られている。経口的に母体に侵入した病原体は、母体血流にのって全身へ播種的に伝播するが、すべての臓器に同じように感染するわけではない。例えば上記3病原体においては雌性生殖器・胎児には多くの病原体の侵入・増殖するが、他の臓器での感染は軽微であることが知られている [FEMS Microbiol. Lett. 2006. 259.120-; Vet. Pathol.2004. 41.498-; 日本産科婦人科・新生児血液学会誌. 2001.11 S28-]。このような現象が起こる理由として下記の2つの可能性が考えられる。

1) 雌性生殖器への病原体の流入量および定着量が多臓器より多い。

2) 定着した病原体が雌性生殖器においては他臓器より激しく増殖する。

当然、実際の疾病においては上記の2つのメカニズムが同時に働いているものと考えられるが、従来の研究の多くは2)の問題を扱ったものであった。すなわち、生殖器官における免疫寛容や胎盤の細胞(トロフォブラスト)における病原体の増殖戦略といった視点で雌性生殖器官の特殊性を解明しようとするものである。しかし、そもそ

も病原体がどのようにして雌性生殖器に効率よく到達・定着するのかという1)の疑問についてはほとんど未知のままである。

## 2. 研究の目的

家畜に流産をおこす病原体はいくつも存在するが、その多くは母体に顕著な症状を引き起こさないまま胎盤・胎児のみを激しく傷害する(すなわち雌性生殖器に対して強い臓器向性をしめす)。本研究では流産の原因となる複数の病原体が侵入門戸から雌性生殖器へ効率よく侵入・定着する共通メカニズムの解明を目指す。具体的には、*in vitro* およびマウスを用いた実験系を用いて以下の および を明らかにした後、これが反芻家畜にも適用できるかどうか検証する(目的)。

侵入門戸から雌性生殖器へ病原体が運搬されるメカニズムを解明。

雌性生殖器に到達した病原体が局所にとどまるメカニズムを解明。

小型実験動物で得られた知見が反芻家畜にも適用できるか検証。

## 3. 研究の方法

トキソプラズマに感染した母体白血球は胎盤に豊富に存在するヒアルロン酸(HA)への吸着を増やすことが代表者らのこれまでの研究で明らかになっている。本研究では母体血流中の感染白血球が胎盤構成成分へ特異的に吸着する現象により、「流産をおこす病原体」が雌性生殖器に効率よく定着しているか否か検証する。

## 4. 研究成果

まず本研究では、胎盤内に流入・定着する母体感染細胞の数を定量するための実験系を確立した。DsRed Express 遺伝子を

組込んだ組換えトキソプラズマをいったん GFP 遺伝子を組込んだ組換えマウスの白血球に感染させ、これを野生型妊娠マウスの血流中に移入した。移入後一定時間たった段階で胎盤を含む各臓器を採取し、そこから DNA を回収。その中に含まれる DsRed Express ならびに GFP 遺伝子のコピー数をリアルタイム PCR で定量することにより、各臓器に定着した白血球数、虫体数を算出した。さらに DsRedExpress コピー数/GFP コピー数 を算出することで非感染白血球と感染白血球の挙動の違いについても推察した。このような実験系を用いて母体血流中の感染白血球がどの臓器にとどまりやすいか比較したところ、驚いたことに胎盤はかならずしも感染白血球がとどまり易い臓器ではないという結果が出た。一方で胎盤の組織切片を観察すると局所に感染白血球が集中的に存在するのが観察された。すなわち、胎盤全体で見た場合、母体血流中の白血球は必ずしも接着し易いわけではないが、胎盤のごく一部に感染白血球が接着し易い「Hot Spot」が存在するということを強く示唆している。

そこでトキソプラズマ感染白血球の吸着に重要であると示唆されている ICAM-1 分子について、マウス胎盤における発現状況を確認した。非感染状態では過去の報告にあるとおり ICAM-1 分子の発現は血管内皮にとどまっており、トロフォブラストには発現が見られなかった。母体がトキソプラズマに感染した場合、胎盤全体では ICAM-1 発現がやや強くなったが、胎盤の各箇所によってその発現状況は大きく異なった。特に感染母体白血球の接着に関与していると思われる箇所においては ICAM-1 の発現状況が他の箇所と顕著に異なっていた。

このような細胞種による発現状況の違いは、培養系で幹細胞から誘導したトロフォブラストを用いて検証しても同様であった。

そこで培養細胞系と実際の胎盤組織の両方を用いて細胞接着に関わる分子の発現状況の違いについて更に検証を加えた。現時点で、胎盤の局所によってなぜ接着細胞の発現パターンが異なっているのか、分子レベルで明らかになりつつある。現時点ではまだ確定していない部分もあり、今後の精査が必要であるため、詳細はここで述べることは避けるが、本研究の成果を知識基盤とすることで病原体が胎盤に侵入しやすい「Hot Spot」が形成される原因が明らかになるものと期待される。

#### 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 3 件)

Hayashi T., Unno A., Baba M., Ohno T., Kitoh K., Takashima Y\*. 2014. CD44 mediated Hyaluronan adhesion of *Toxoplasma gondii*-infected leukocytes. *Parasitol. Int.* 63(2):479-84. (査読あり)

**Takashima Y\***, Takasu M., Yanagimoto I., Hattori N., Batanova T., Nishikawa Y., Kitoh K. 2013. Prevalence and dynamics of antibodies against NcSAG1 and NcGRA7 antigens of *Neospora caninum* in cattle during the gestation period. *J. Vet. Med. Sci.* 75(11):1413-8 (査読あり)

Unno A., Kachi S., Batanova T., Ohno T., Elhawary N., Kitoh K., **Takashima Y\***. 2013. *Toxoplasma gondii* tachyzoite-infected peripheral blood mononuclear cells are enriched in mouse lungs and liver. *Exp. Parasitol.* 134. 160-164. (査読あり)

〔学会発表〕(計 2 件)

日本寄生虫学会

高島康弘

マウス胎盤におけるトキソプラズマ感染白血球の挙動 2013年3月29 - 31日 東京医科歯科大学

第154回 日本獣医学会 林武志、鬼頭克也、高島康弘

Toxoplasma gondii 感染 THP-1 細胞における CD44 発現パターンの比較 2012年9月14 - 16日 岩手大学

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

高島 康弘

(TAKASHIMA, Yasuhiro)

岐阜大学応用生物科学部・准教授

研究者番号：20333552

(2)研究分担者

大屋 賢司

(OHYA, Kenji)

岐阜大学応用生物科学部・准教授

研究者番号：50402219

(3)連携研究者

高須 正規

(TAKASU, Masaki)