

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：16201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659188

研究課題名(和文)媒介蚊体内でのマラリア原虫の分化・発育誘導に關するハマダラカ特異的因子の同定

研究課題名(英文) Identification of mosquito-specific factors which promote growth and differentiation of malaria parasite in the vector mosquito

研究代表者

新井 明治 (ARAI, Meiji)

香川大学・医学部・准教授

研究者番号：30294432

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は最近、ローデントマラリア原虫の媒介蚊体内での発育ステージを培養で再現することに成功した。しかし培養条件下で形成されたスポロゾイトはマウスに対して感染性を持たないことから、蚊の体内で感染性をもつスポロゾイトが作られるには、媒介蚊のもつ特有の因子が必要であるという作業仮説を立てた。蚊の抽出物を培養系に添加する実験を行ったところ、サナギ抽出物はわずかにスポロゾイト形成促進効果を示したが、成虫抽出物では効果が認められなかった。抽出物調製手順の改良によって、より高濃度の抽出液を調製することができれば、ハマダラカ因子の同定が可能になると期待される。

研究成果の概要(英文)：Recently we have developed an in vitro culture system for development of mosquito stages of rodent malaria parasite, Plasmodium berghei. Interestingly, the sporozoites produced by the culture system are not infectious to mice, suggesting that some unidentified mosquito-derived factor(s) might be essential for mosquito stages of P. berghei to grow and differentiate into infectious sporozoites. Based on this working hypothesis, we tried to identify mosquito-specific factor(s) which promotes parasite development in the mosquito vector, by using our in vitro culture system. Extract from pupae showed only small effect on sporozoite development, although extract of adult mosquitoes did not show any promoting effect on parasite development. Technical improvement on preparation of much more concentrated mosquito extract may allow us to identify active factor(s) which promote infectious sporozoite development in the vector mosquito.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア原虫 蚊体内ステージ オオシスト培養

1. 研究開始当初の背景

マラリア伝播阻止とは、媒介蚊体内で原虫発育を抑制することにより新たな感染者・患者の発生を防ぐ手法であり、流行地での罹患率低下のみならず、薬剤耐性原虫の拡散防止にも有効である。当該分野の研究としては伝播阻止ワクチンと伝播阻止薬があり、いずれもコミュニティ全体としての罹患率を低下させ得るが、ワクチンあるいは薬剤の接種・投与を受ける者のマラリア感染を直接予防することができないという問題がある。

研究代表者・新井は、これまでに伝播阻止薬に関する研究を行い、結核治療薬であるイソニコチン酸ヒドラジド (INH) やマクロライド系抗菌薬であるアジスロマイシン (AZM) の伝播阻止効果を報告してきた (Arai *et al.*, *Exp Parasitol*, 2004; Shimizu *et al.*, *Malaria J*, 2010)。また、蚊体内でのマラリア原虫の分化・発育機構を解析するための研究基盤として、マラリア原虫の蚊体内発育ステージの *in vitro* 培養 (以下、*Plasmodium Mosquito Stage* 培養と表記する) に取り組み、培養肝細胞に侵入し発育するスポロゾイトを得ることに成功している。最近、媒介蚊体内のマラリア原虫では、発育段階ごとに異なる遺伝子発現パターンを示すことが明らかとなったことから、新井は、マラリア媒介蚊であるハマダラカには、原虫の発育ステージ特異的な遺伝子発現を誘導する因子 (ハマダラカ因子) が存在するという作業仮説を得るとともに、これまでの研究手法を活用して、ハマダラカ因子を同定しその作用を阻害するという新たな伝播阻止法の着想に至った。

2. 研究の目的

マラリア原虫は媒介蚊であるハマダラカに特異的な因子によって分化・発育の誘導刺激を受けるとの作業仮説に基づき、*Plasmodium Mosquito Stage* 培養系を用いてハマダラカ因子を同定し、同因子を標的とする新たな伝播阻止法を確立するための技術の提案と検証を行う目的で研究を行った。

新井が提案する伝播阻止法は、健康人に対してワクチン接種や薬剤投与を行う必要がなく、殺虫剤散布による殺虫剤抵抗蚊の出現や環境負荷等の問題も回避できることから、流行地での早期の実用化が期待できる。

3. 研究の方法

1) *Plasmodium Mosquito Stage* 培養条件の検討 (1)

Plasmodium Mosquito Stage 培養の評価系を改良する目的で、培養フラスコを用いての基礎実験を行った。まずローデントマラリア原虫 (*Plasmodium berghei*) 感染マウスから採取した血液をオオキネート培地 (20%FBS を添加して pH を 8.2 に調整した RPMI-1640 培地) で希釈し、19 で 24 時間培養することでオオキネートを形成させた。常法にて精製したオオキネート浮遊液をオオシスト培地

で希釈し、この混液を 25cm² の培養フラスコ (コーニング社製 No. 430639) に移して 19 で振盪培養を開始した。培養フラスコを経時的に位相差倒立顕微鏡にて観察し、オオシストの発育状態を検討した。

2) *Plasmodium Mosquito Stage* 培養条件の検討 (2)

上記 1) は汎用的な培養容器を用いて *Plasmodium Mosquito Stage* 培養評価系の確立を目指すものであった。しかしながら培地交換の度にオオシストにかかる過大な圧力負荷が、接着しかけたオオシストを培養フラスコ底面から遊離させることとなり、評価系としての有用性が損なわれる結果となった。そこで、培地交換による圧力負荷が軽減される培養系として、マイクロチャンバーによる培養を行うこととした。使用したマイクロチャンバースライドは ibidi 社の μ -Slide VI 0.4 で、表面コーティングとしては未処理、ibi 処理、4 型コラーゲン処理、フィブロネクチン処理、ポリ-L-リジン処理の計 5 種類のスライドを使用した。上記 1) と同様の方法で得たオオキネート浮遊液をオオシスト培地で希釈し、各マイクロチャンバースライドのチャンバー部分にアプライして振盪することなく培養を開始した。各スライドを経時的に位相差倒立顕微鏡にて観察し、オオシストの発育状態を検討した。

3) ハマダラカ虫体抽出物の *Plasmodium Mosquito Stage* 培養に及ぼす影響の評価 (1)

Plasmodium Mosquito Stage 培養にハマダラカ抽出物を添加し、スポロゾイト形成促進効果について検討する実験を行った。ハマダラカ雌成虫のホモジネートと、サナギのホモジネートを調製したところ、いずれのホモジネートも淡い黒緑色の色調を示し、プロフェノール酸化酵素カスケード活性化による色素形成が示唆された。還元剤添加による色素形成阻害を避け、加熱によるタンパク変性処理で、それ以上の色素形成の進展を抑えることとした。各ホモジネートは加熱処理後に遠心により変性タンパクを沈殿させ、上清部分を濾過滅菌したものを抽出液として実験に用いた。

4) ハマダラカ虫体抽出物の *Plasmodium Mosquito Stage* 培養に及ぼす影響の評価 (2)

上記 3) では加熱処理によりタンパク成分が失われた可能性があるため、加熱処理を行わずにハマダラカ抽出物を調製し、*Plasmodium Mosquito Stage* 培養系に添加した。

羽化後 5 ~ 7 日目の蚊を集めて麻酔したマウスに吸血させた後、吸血メス、非吸血メス、オスの 3 群に分けた。吸血 5 日後に、それぞれの群の蚊をエタノールで洗浄した後、PBS に懸濁してホモジナイズし、遠心後の上清を回収して抽出液とした。各抽出液をオオ

シスト培地と1 : 1の割合で希釈し、約 30 匹/mL 相当の蚊抽出物を含む培養液を調製して培養を開始した。培養容器には ibidi 社の μ -Slide VI 0.4 (未処理、ibi 処理、4 型コラーゲン処理、フィブロネクチン処理、ポリ-L-リジン処理) を用いた。

4 . 研究成果

1) *Plasmodium* Mosquito Stage 培養条件の検討 (1)

25cm² の培養フラスコを用いて培養を開始してから 8 日目の時点で、フラスコ底面に接着しているオオシストが認められた。9 日目にはオオシストは最大径 12.5 μ m まで発育していたが、一部で底面から遊離して浮遊状態となっていた。培養 10 日目では大部分のオオシストが浮遊状態へと移行していた。細胞成分をギムザ染色したところ、オオシストの核分裂像が認められた。培養 12 日目のギムザ染色像では 10 日目よりも核分裂が進展していたが、一部のオオシストに変性傾向が認められた。培養 13 日目にはオオシスト数が激減しており、培養継続が困難となった。従来のチャンバースライドやマルチウェルプレートよりも効率良く培地の循環をはかる目的で、培養フラスコを用いての振盪培養を行ったが、シェーカーの仕様上の制約から振盪強度が強過ぎたことが、フラスコ底面へのオオシストの定着が完成されなかった要因であったと考えられる。また、培地交換の度にオオシストに対して過大な圧力負荷がかかったことが、接着しかけたオオシストを底面から遊離させたと考えられる。オオシストにおける核分裂の進行が認められたことから、フラスコによる振盪培養は有効な方法であることがわかったが、振盪強度についての再検討を要する。別のシェーカーに変更して振盪強度の軽減をはかり、最適条件を決定する。さらに重要な問題として、培地交換によるオオシストへの圧力負荷がオオシスト成熟の妨げとなることが示唆された。

2) *Plasmodium* Mosquito Stage 培養条件の検討 (2)

表面処理したマイクロチャンバースライドを用いて培養を行ったところ、培養開始 6 日目からオオシストが認められた。12 日目の時点では、フィブロネクチン処理 > 4 型コラーゲン処理 > ポリ-L-リジン処理 > 非処理 > ibi 処理の順でオオシスト発育が認められた。しかしながら 14 日目の時点でオオシストの変性が著明となり、スポロゾイト形成に至らなかった。培養容器の表面処理の違いによってオオシスト発育に差が生じる傾向については、今回初めて明らかになった。マイクロチャンバースライドを用いる最大のメリットは、底面から油浸レンズを用いて高倍率観察が可能となる点である。一方で、マイクロチャンバースライドのデメリットも明らかとなった。培養を開始して日数が経過するに

つれて、培養容器表面に何らかの層状構造が形成され、チャンバーの流路が狭くなり、培地交換がスムーズにできなくなってきた。やがてチャンバー内の培地をちきんと交換するためには一定の圧力を要するようになり、本来圧力負荷をかけない目的で使用したマイクロチャンバースライドの意義が失われる結果となってしまった。このため、12 日目までは比較的順調に発育したオオシストが、この時期から培地交換の度に圧力負荷を受けるようになり、接着面からの離脱およびオオシスト自体の変性が生じたものと考えられる。

3) ハマダラカ虫体抽出物の *Plasmodium* Mosquito Stage 培養に及ぼす影響の評価 (1)

Plasmodium Mosquito Stage 培養系にハマダラカ雌成虫の抽出液あるいはサナギ抽出液を添加し、オオシスト発育およびスポロゾイト形成に対する影響を検討したところ、成虫抽出液添加群、サナギ抽出液添加群とも、非添加群に比して明らかな差が認められなかった。しかしながらオオシストからスポロゾイトが形成される時期では、サナギ抽出液添加群で若干のスポロゾイト形成促進効果が認められたが、成虫抽出液添加群では促進効果が認められなかった。これは本研究の作業仮説に反する結果であり、その要因について考察した。まず第一に、サナギは水中生活しているのに対して、成虫は羽化後は水中に浸ることはなく、両者の水分含有量が著しく異なることが活性物質の抽出効率の差として現れたと考えられる。次に、今回用いた抽出方法では、加熱処理によりタンパク成分の大部分を失った可能性を考慮する必要がある。ハマダラカ因子がタンパクである可能性は否定できないため、タンパク変性処理を行わない実験を行うこととした。

4) ハマダラカ虫体抽出物の *Plasmodium* Mosquito Stage 培養に及ぼす影響の評価 (2)

Plasmodium Mosquito Stage 培養におけるハマダラカ成分の影響を検証する目的で、タンパク変性処理を行わずに調製した蚊成虫抽出物を添加する実験を行った。培養 5 日目までは低率ながらオオキネートから幼若オオシストへの分化が認められたが、その後雑菌の繁殖によるコンタミネーションの徴候が出現し、蚊抽出液を用いた群では十分なオオシスト発育に至らなかった。対照として実施した、蚊抽出液を添加しない群では一定の大きさまでオオシストの発育が認められたが、スポロゾイト形成には至らなかった。コーティングの種類別では、フィブロネクチン処理が最もオオシスト発育が良好であった。別の蚊抽出液を調製して同じ実験を繰り返したが、同様の結果となった。上記の結果から、蚊成虫の表面はエタノールである程度殺菌処理が可能であるが、中腸内の細菌の持ち込みを防ぐことは極めて難しいことがわか

った。特に吸血の前後で中腸内の細菌数は10倍以上に増殖するため、ホモジネート遠心後の上清部分の滅菌操作をフィルター濾過で行うことはほぼ不可能である。吸血蚊の抽出液を使用することは現実的ではないと考えられる。

5) 考察と今後の展開

本研究課題を遂行するうえで最も重要な課題は、実験プラットフォームとしての *Plasmodium Mosquito Stage* 培養系の完成度を高めることである。ハマダラカ抽出物添加によるオオシスト発育促進効果は、わずかではあるが実感できるレベルであった。実験間でのバラツキを軽減し、コンスタントにスポロゾイトが得られるような実験系へと改良することが、ハマダラカ因子同定のために行うべき急務である。本研究では培地交換によるオオシストへの圧力負荷がオオシスト成熟の妨げとなることが示唆されたため、この問題を解決すべく、トランスウェルを用いるフォーマットで培養を行い、オオシストにかかる圧力負荷を最小限に抑えた状態でのオオシストの成熟を検討する予定である。また、蚊の抽出物を添加する実験では、蚊抽出物を調製する過程で、蚊の成分が相当程度にまで希釈されたと考えられ、さらに培地で希釈されたことを考慮すると、従来100倍以上の高濃度の蚊抽出物を得るための方法を模索する必要がある。蚊抽出物の調製手順の改良によって、より高濃度の抽出液を調製することができれば、ハマダラカ因子の同定が可能になると期待される。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新井 明治 (ARAI, Meiji)

香川大学・医学部・准教授

研究者番号：30294432

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

平井 誠 (Hirai, Makoto)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：50326849