

氏名 (本 (国) 籍)	齋藤大蔵 (群馬県)
主指導教員氏名	岐阜大学 准教授 高島 康弘
学位の種類	博士 (獣医学)
学位記番号	獣医博甲第604号
学位授与年月日	令和4年3月14日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学位論文題目	Studies on the Extracellular Environmental Factors that Induce <i>Toxoplasma gondii</i> to Egress from Tissue Cysts (トキソプラズマの組織シストからの脱出を誘導する細胞外環境因子に関する研究)
審査委員	主査 岐阜大学 教授 福士 秀人 副査 帯広畜産大学 教授 横山 直明 副査 岩手大学 教授 板垣 匡 副査 東京農工大学 教授 古谷 哲也 副査 岐阜大学 准教授 高島 康弘

### 学位論文の内容の要旨

*Toxoplasma gondii* (トキソプラズマ)は偏性細胞内寄生性の原虫である。ヒトを含めたほぼ全ての哺乳類と鳥類に感染し、人獣共通感染症であるトキソプラズマ症の原因となる。トキソプラズマは、その生活環の中で様々な形態に姿を変える。終宿主であるネコの糞便中に排出されたオーシストは、別の宿主に経口摂取されると腸管内で直ちに脱殻し、内部のスポロゾイトが宿主の組織に侵入する。その後、スポロゾイトはタキゾイトに変化して増殖するが、やがて多数のブラディゾイトが殻に覆われた組織シスト(シスト)となって脳や筋肉などの細胞内に長期間潜伏感染する。基本的にはシストのまま終生潜伏感染を続けるが、他の動物に捕食されると、シスト内部の虫体がシストから脱出して次の宿主の体内で増殖を始める。このように周辺環境の変化に合わせてタイミングよく形態を変化させるトキソプラズマは、周囲の環境変化を認識する機構を有しているものと考えられる。しかし、環境変化によってもたらされるどのような刺激を認識しているのか、具体的には明らかになっていない。本研究では、潜伏感染中のシストから内部の虫体が脱出する現象に着目し、外部環境から虫体に加わるどのような刺激が、この現象の引き金になるのか検証した。

前述の通り潜伏感染中のシストは通常宿主細胞内にあるが、捕食された際には宿主細胞

が消化されることで、シストは宿主細胞外に流出すると考えられる。そこで本研究の第一章では、宿主細胞外へのシストの流出が、シスト内部の虫体の脱出の引き金となるかを検証した。まずトキソプラズマが潜伏感染しているマウスの脳をすりつぶして宿主細胞内にあるシストを宿主細胞外に流出させた後、シストだけを分離して細胞外液の電解質組成を模した液中で培養した。その結果、実験に供したシストのほとんどで内部虫体の脱出が認められた。一方、細胞内の電解質組成を模した液中で培養したシストからは内部虫体の脱出が一切観察されなかった。以上の結果から、宿主細胞外へのシストの流出が内部虫体のシストからの脱出の引き金となることが示唆された。これまで潜伏感染状態の動物が捕食されたときに生じるシスト内部からの虫体脱出は、捕食した側の動物の消化酵素によってシスト殻が消化されて起こる受動的な現象だと考えられてきた。しかし本実験の結果から、シストからの虫体脱出に宿主由来の消化酵素は必ずしも必要ないことが示された。また、シスト内部からの虫体脱出は、トキソプラズマの機械的運動を阻害するサイトカラシン D を添加することで抑制された。このことからシストからの虫体脱出は、シスト壁の破壊に伴う受動的な現象ではなく、内部の虫体の機械的運動を必要とする能動的な現象であることが示唆された。

潜伏感染中のシスト内部の虫体はブラディゾイトと呼ばれる運動性や増殖能力の低い形態だが、シストからの虫体脱出から数日後の時点で、既にタキゾイトと呼ばれる運動性や増殖能力の高い形態となっていることが知られている。しかしブラディゾイトからタキゾイトへの分化がいつ起こっているのかは分からなかった。そこで第二章では、ブラディゾイトからタキゾイトへの分化が虫体脱出前にシスト内部で起こるのか、虫体がシストから脱出した後に起こるのか検証した。このためにタキゾイト期に特異的に蛍光を発する遺伝子組換えトキソプラズマ株を作製し、マウスに潜伏感染させて脳からシストを得た。こうして得た組換え株のシストを用いて内部虫体のシスト脱出を継時的に観察した。マウスの脳から分離した直後では、シスト内部の虫体に蛍光は認められないが、やがて内部虫体が蛍光を発しはじめ、その後にシストからの虫体脱出が確認された。蛍光を発しないままの状態ですべてシストから脱出する虫体は認められなかった。よって、ブラディゾイトからタキゾイトへの分化は虫体がシストから脱出する前の段階で起こることが示された。すなわちシストからの内部虫体の脱出は、ブラディゾイトの機械的運動が活発となってシスト壁を破壊するという単純な現象ではなく、ブラディゾイトからタキゾイトへの分化を伴う複雑な現象であることが示された。

以上の実験により、宿主細胞内液と細胞外液の電解質組成の違いが、ブラディゾイトからタキゾイトへの分化を伴うシスト内部からの虫体脱出を誘導することが明らかになった。そこでより具体的にどの電解質がシスト内部からの虫体脱出に関与しているか明らかにすることを第三章の目的とした。細胞内外で大きく濃度が増減する電解質のうち、ナトリウム・カリウムの比率は生体現象に広く関わることが知られているため、まずこれに注目した。ナトリウム・カリウム以外のイオン濃度は細胞外液を模した状態に保ち、ナトリウム・カリウム比のみを段階的に変化させた様々な組成の溶液中でシストを培養すると、細胞外に近いナトリウム・カリウム比の条件下でのみシストからの虫体脱出が誘導された。また、ナトリウム・カリウム比を最も効率よくシストからの虫体脱出を誘導できる条件に固定し、カルシウムのみを除いた液や、カルシウムをキレートした液を作製した。これらの液中でシストを培養したところ、内部虫体のシストからの脱出はほとんど起こらなかった。これ

らの結果は、トキソプラズマが細胞内液と外液のナトリウム・カリウム比の違いおよびカルシウムの存在を感知してシスト脱出を起こすことを示している。

本研究によって、トキソプラズマが特定の電解質組成を感知することで宿主細胞外への流出を感知し、シストからの虫体の脱出を能動的に起こすことを明らかにした。本研究によって、トキソプラズマがその生活環の中で周囲環境の変化を認識し、適切なタイミングで次の感染ステージへと移行するメカニズムの一端が解明された。

## 審 査 結 果 の 要 旨

*Toxoplasma gondii* は偏性細胞内寄生性の原虫であり、人獣共通感染症の原因となる。本原虫は、その生活環の中で周囲の環境変化に合わせてタイミングよく様々な形態に変化する。このため、本原虫は周囲の環境変化を認識する機構を有していると考えられるが、具体的にどのような刺激を認識して環境の変化を感知しているのかは明らかになっていない。以上をふまえ、本学位論文では本原虫がどのような刺激を認識して環境変化を認識し形態変化に及ぶのかを、潜伏感染中のシストからの内部虫体の脱出という現象に着目して検証した。

学位論文の第一章では、本原虫が潜伏感染したマウスの脳内から分離したシストを細胞内外それぞれの電解質組成を模した液中で培養し、細胞外液を模した液中でのみ内部虫体の脱出が起こることを示した。これは、宿主細胞内にある組織シストが宿主細胞外に流出し、細胞外の電解質組成に触れることがシストからの内部虫体の脱出を誘導することを示唆している。第二章では、シスト内部の虫体のブラディゾイトからタキゾイトへの形態変化が、シストからの脱出に先駆けて起こっているのか、脱出後に起こっているのか明らかにするため、タキゾイト期にのみ蛍光を呈する遺伝子組換えトキソプラズマ株を作成した。

この株のシストを用いて内部虫体のシストからの脱出の様子を経時的に観察したところ、脱出に先駆けて蛍光発光がみられた。この結果により、ブラディゾイトからタキゾイトへの形態変化はシストからの脱出に先駆けて起こっていることが証明された。第三章では、細胞外の電解質組成のうち、より具体的にどの電解質がシスト内部からの虫体の脱出を誘導するのかを検証した。結果として、細胞外液に類似した特定のナトリウム・カリウム比およびカルシウムの存在が必要であることを明らかにした。本研究で明らかにしたトキソプラズマの環境変化認識機構に加え、今後、特定の電解質組成を感知する虫体側分子群が同定されることにより、本原虫の形態変化に関する更なる解明が期待される。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

## 基礎となる学術論文

1) 題 目 : Releasing latent *Toxoplasma gondii* cysts from host cells to the extracellular environment induces excystation

著 者 名 : Saito, T., Masatani, T., Kitoh, K., and Takashima, Y.

学術雑誌名 : International Journal for Parasitology

巻・号・頁・発行年 : 51 (12) : 999-1006, 2021

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Native SAG1 in *Toxoplasma gondii* lysates is superior to recombinant SAG1 for serodiagnosis of *T. gondii* infections in chickens  
著 者 名 : Appiah-Kwarteng, C., Saito, T., Toda, N., Kitoh, K., Nishikawa, Y., Adenyo, C., Kayang, B., Owusu, E. O., Ohya, K., Inoue-Murayama, M., Kawahara, F., Nagamune, K. and Takashima, Y.  
学術雑誌名 : Parasitology International  
卷・号・頁・発行年 : 69:114-120, 2019
  
- 2) 題 目 : A *Toxoplasma gondii* strain isolated in Okinawa, Japan shows high virulence in Microminipigs  
著 者 名 : Taniguchi, Y., Yanagihara, I., Nakura, Y., Ichikawa, C., Saito, T., Appiah-Kwarteng, C., Matuzaki, M., Fukumoto, J., Nakgamune, K., Kyan, H., Takasu, M., Kitoh, K. and Takashima, Y.  
学術雑誌名 : Parasitology International  
卷・号・頁・発行年 : 72 : 101935, 2019
  
- 3) 題 目 : Suppression of inflammatory genes expression in the injured host intestinal wall during *Mesocostoides vogae* tetrathyridium larvae migration  
著 者 名 : Hayashi, K., Sugisawa, R., Saito, T., Matsui, T., Taniguchi, Y., Batanova, T., Yanai, T., Matsumoto, J., Kitoh, K. and Takashima, Y.  
学術雑誌名 : PLOS Neglected Tropical Diseases  
卷・号・頁・発行年 : 14 (10) : e0008685, 2020
  
- 4) 題 目 : Spatial distribution of anti-*Toxoplasma gondii* antibody-positive wild boars in Gifu Prefecture, Japan  
著 者 名 : Saito, T., Kitamura, Y., Tanaka, E., Ishigami, I., Taniguchi, Y., Moribe, J., Kitoh, K. and Takashima, Y.  
学術雑誌名 : Scientific Reports  
卷・号・頁・発行年 : 11 (1) : 17207, 2021
  
- 5) 題 目 : Detection and molecular characteristics of *Pyelosomum cochlear* (Digenea: Pronocephalidae) in the urinary bladder of the green sea turtle (*Chelonia mydas*) in the Northwest Pacific Ocean  
著 者 名 : Hayashi, K., Kitayama, C., Saito, T., Ohari, Y., Hayashi, K., Kondo, S., Takashima, Y., Kuroki, T., Shibahara, T. and Itagaki, T.  
学術雑誌名 : Infection, Genetics and Evolution  
卷・号・頁・発行年 : 93 : 104962, 2021

- 6) 題 目 : Morphological observation and first molecular characterization of *Grasshenema procaviae* Petter, 1959 (Cosmocercoidea: Atractidae) in the stomach of Cape hyrax (*Procavia capensis*) raised in a zoo in Japan  
著 者 名 : Saito, T., Hayashi, K, Hayashi, K, Akita, Y., Une, Y., Kuroki, T., Shibahara, T. and Takashima, Y.  
学術雑誌名 : Parasitology International  
卷・号・頁・発行年 : 84 : 102385, 2021
- 7) 題 目 : Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection among small mammals in Tatarstan, Russian Federation  
著 者 名 : Shamaev, N. D., Shuralev, E. A., Nikitin, O. V., Mukminov, M. N., Davidyuk, Y. N., Belyaev, A. N., Isaeva, G. S., Ziatdinov, V. B., Khammadox, N. I., Safina, R. F., Salmanova, G. R., Akhmedova, G. M., Khaertynov, K. S., Saito, T., Kitoh, K. and Takashima, Y.  
学術雑誌名 : Scientific Reports  
卷・号・頁・発行年 : 11 (1) : 22184, 2021