

## シストにも有効な抗トキソプラズマ薬シード候補の探索

山野 安規徳 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 橋本 哲男 (筑波大学 生命環境系)

## 背景・目的

トキソプラズマ (*Toxoplasma gondii*) はアピコンプレクサに属する細胞内寄生生物であり、ヒトにも感染する病原微生物である。トキソプラズマはすべての温血動物のすべての有核細胞に感染能を持っていると言われており、多くの場合、原虫は宿主に何ら症状を起こさず不顕性感染として宿主に一生寄生し続けることができる。主な感染経路は経口感染であり、腸管壁から宿主体内に侵入し、宿主の細胞に侵入すると寄生体胞 (parasitophorous vacuole) を形成しその中で増殖する。原虫の増殖に伴い寄生体胞は肥大化していき、最終的には細胞を破裂させ、ふたたび周囲の細胞に侵入することを繰り返す。この時期の原虫を急増虫体 (tachyzoite) と呼ぶ。急増虫体は通常宿主免疫系の作用によって排除されるが、免疫系の作用が及びにくい筋肉や脳でシスト壁 (cyst wall) を形成してその中で緩やかに増殖を続ける。シスト壁は外部ストレスなどからトキソプラズマを守る役割を担っている。このシスト壁中の原虫を緩増虫体 (bradyzoite) と呼ぶ。宿主の免疫能が HIV 感染などによって低下すると、緩増虫体は急増虫体に再分化し、宿主に重篤な症状を与える。急増虫体に対する治療薬としてはピリメサミン、スルファジアジンなどが存在するが、シスト壁に囲まれた緩増虫体に対する治療薬は存在しない。

先行研究で、トキソプラズマが植物ホルモンの一種であるアブシジン酸 (ABA) を産生し、原虫はこのホルモンにより自身の増殖を調節していることが明らかになった (Nagamune *et al.* 2008)。ABA 生合成阻害薬であるフルリドンの培養中への添加により ABA の生合成を阻害すると、原虫のシストへの分化が誘導された。以上の結果より、トキソプラズマのステージ転換に植物ホルモンが重要な役割を担っていると考えられる。そこで本研究では、まだ解明されていないシストからの再分化する仕組みの解明や緩増虫体の治療薬のシード候補探索を、植物ホルモンまたは阻害剤を用いることで行うことができるのではないかという発想に至った。

## 材料・方法

材料: トキソプラズマ PLK/DUAL 株、HFF 細胞 (宿主細胞)

## ●薬剤スクリーニング

通常培養培地から RPMI1640 培地 (1 % FBS, 50 mM HEPES, 0.1 % Gentamicin をそれぞれ添加, pH 8.1) に培地を交換し、通常大気中で7日間培養することによってトキソプラズマの急増虫体を緩増虫体に分化誘導した。分化した緩増虫体にさまざまな植物ホルモンや阻害剤を 100  $\mu$ M 添加し、

48 時間後に蛍光顕微鏡観察を行った。スクリーニングによって顕著な差が認められたものに関しては再現性およびより低濃度での効果を確認した。

## ●薬剤の宿主細胞への影響

コンフルエントな HFF 細胞に、スクリーニングにより顕著な差が認められた薬剤をさまざまな濃度で添加し、48 時間後に Cell Counting Kit-8 (同仁堂) を用いて細胞毒性試験を行った。

## 結果・考察

用いた薬剤のうち A, B は有意に急増虫体・緩増虫体いずれをも減少させた。また宿主細胞への影響を調べたところ、どちらの薬剤も HFF 細胞に影響を及ぼしたが、B に関してはその感受性はトキソプラズマより低かった。そのため薬剤 B に関してはトキソプラズマ抗シスト薬として利用できる可能性がある。

A, B 処理により、どのような作用機序によってトキソプラズマが死滅するのか、また *in vivo* での効果はあるのかについて現在探索中である。

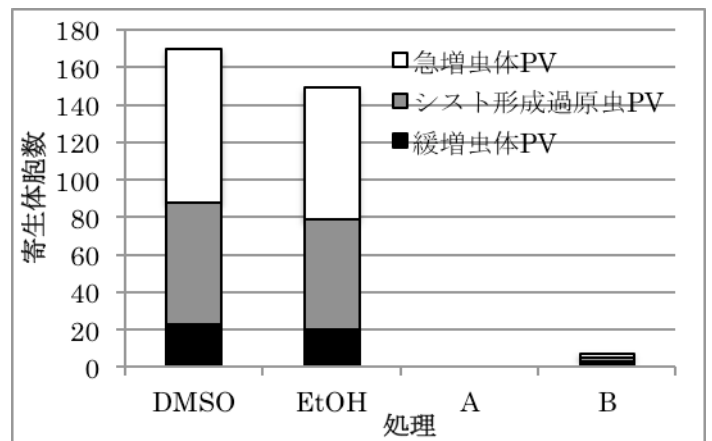


Figure 1: 薬剤 A, B はトキソプラズマの急増虫体と緩増虫体の寄生体胞 (PV) 数を減少させる。値は 630 倍、40 視野あたりの寄生体胞数で示す。