

筑波大学

博士（医学）学位論文

トキソプラズマ原虫感染における  
マウス胎盤に存在する免疫細胞の解析

2015

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

竹 島 絹 子

[目次]

概要.....	3
1. 背景.....	4
2. 目的.....	6
3. 材料と方法.....	8
3-1 病原体サンプルの調整.....	8
① トキソプラズマ急増虫体の培養・検出	
② トキソプラズマ組織内嚢子の継代と検出	
3-2 妊娠マウスでのトキソプラズマ経口感染モデルの確立	
.....	10
① マウス、交配	
② 妊娠マウスでの経口感染実験	
③ 感染マウス胎盤での PCR	
3-3 マウス胎盤における免疫細胞のフローサイトメトリ解析	
.....	11
4. 結果.....	13
4-1 組織内嚢子の検出.....	13
4-2 感染マウス胎盤におけるトキソプラズマ表面抗原遺伝子	
(SAG1) の検出.....	13
4-3 マウス胎盤に存在する免疫細胞のフローサイトメトリ解析	
(1) CD11b/Gr-1.....	14
4-4 マウス胎盤に存在する免疫細胞のフローサイトメトリ解析	
(2) リンパ球分画.....	15
5. 考察.....	17

6. 結論.....	22
7. 謝辞.....	23
8. 参考文献.....	24
9. 図・図の説明.....	32
省略語.....	43
参考論文.....	44

## 概要

トキソプラズマ(*Toxoplasma gondii*)は、偏性細胞内寄生性原虫に分類される病原体で、胎盤通過性があり、胎児に重篤な脳障害を伴う先天性トキソプラズマ症を引き起こす。胎盤におけるトキソプラズマ原虫感染に対する免疫応答の分子学的メカニズムについては、未だよくわかっていない。本研究では、胎盤における免疫細胞の表現型を同定するためのフローサイトメトリを用いた解析方法を確立した。トキソプラズマ原虫感染後の胎盤では、CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>+</sup> 細胞分画が有意に増加していた。これらの結果は、胎盤を介したトキソプラズマ原虫感染に対する免疫において、自然免疫応答が重要な役割を担っている可能性を示唆している。

# 1. 背景

トキソプラズマ症は、宿主の免疫能が正常な状態ではほとんど症状はなく不顕性感染として経過するが、エイズや臓器移植、妊娠などにより免疫抑制の状態になると発症する日和見感染症である(1-3)。特に妊娠中のトキソプラズマ初感染では、流産や死産、先天性トキソプラズマ症として重篤な脳障害、眼病変を引き起こす(4-7)。1974年にフランスの Desmonts と Couvreur らが先天性トキソプラズマ症について、胎内感染（経胎盤感染）の予防のために妊娠中のスクリーニングや妊婦への教育、治療の重要性について初めて言及したが(8)、いまだ確かな予防法は確立されていない。出生時に典型的な症状を呈する症例の報告は、日本では年間5~10例前後とされている。これまで日本における先天性トキソプラズマ症の発症頻度は欧米に比べて低いとされてきたが(9,10)、ペットブームや食生活の変化で、近年は日本でも必ずしも低頻度ではないと認識されるようになってきた。欧米と同様の新生児感染率で年間100~1,000症例/100万分娩と考えられる(11)。不顕性・遅発性の先天性感染は、出生時の画像検査や肉眼所見での診断が困難であり、近年、思春期や成人に発症または診断される先天性トキソプラズマ症の症例も増加してきており、実際の発症頻度は低いと考えられている(12)。

トキソプラズマは、偏性細胞内寄生性原虫に属する病原体である。その感染は、加熱処理が不十分な肉をはじめとする食物・水などの経口摂取を介して起こる。図 I にトキソプラズマの生活環を示す。

トキソプラズマ原虫感染は、中間宿主であるヒトへの経口感染により腸管内で嚢子から緩増虫体が遊離して、腸管壁から侵入し、腸管静脈経由によりリンパ行性または血行性に全身に移行する。経口感染してから3～7日で大動脈系へ移行するが、この間にトキソプラズマ原虫が白血球細胞内に感染すると、急増虫体へステージ変換・増殖しながら全身へ組織・臓器へ播種され、各臓器へ感染し増殖する。トキソプラズマ感染には臓器親和性があり、肺・肝・心・脳・骨格筋に好んで感染するが、特に妊婦では、胎盤にも好んで感染し、胎児への経胎盤感染に至る場合もある。これら臓器においては感染後、組織内嚢子として存在する(13-15)。

胎盤は、栄養膜により形成された絨毛膜有毛部の絨毛と、それに接する母体脱落膜(基底脱落膜)とによって形成される円盤状の構造体である。胎盤絨毛には、母体・胎児間の物理的なバリアとして、胎盤関門が存在し、主に母体血に接している絨毛表面から、その内部の細胞性栄養細胞層、基底膜、結合組織、胎児血管基底膜、血管内皮細胞までの絨毛組織が関門を形成している。トキソプラズマの胎盤感染は、母体の経口感染から数日後には胎盤へ血行性に到達し、成立するとされる。何らかの因子で胎盤の感染防御能が低下すると、急増虫体となって臍帯静脈へ侵入し、胎児へ移行することで母児感染が起こるとされる(16,17)。

## 2. 目的

トキソプラズマ原虫は、経口感染に続いて腸管上皮を通過し、広範囲に伝播する。ヘルパーT1細胞やNK細胞から誘導されたIFN $\gamma$ は、トキソプラズマ原虫に対する免疫応答において重要な役割を担っている(18-21)。さらに、炎症性単球がトキソプラズマ原虫に対する粘膜抵抗のために不可欠とされる(22-24)。好中球はIFN $\gamma$ の供給源として、トキソプラズマ原虫に対する宿主防御に重要な役割を担っていることが報告された(25,26)。加えて、好中球はトキソプラズマ原虫感染を制限する好中球細胞外トラップ(NET)を放出する(27)。その一方で、好中球はトキソプラズマ原虫に侵入されると、体中へのトキソプラズマ原虫の伝播を導くリザーバとしての役割を果たすことの示唆が2013年に報告された(28)。

トキソプラズマ原虫は胎盤を通過することが可能で、胎児の視覚障害や聴覚障害、精神運動発達遅滞、痙攣発作、血液学的異常を伴う先天性トキソプラズマ症の原因となる(1,2,29,30)。トキソプラズマ原虫が妊娠中の胎児への深刻な影響を与えているにも関わらず、トキソプラズマ原虫感染に対する免疫学的制御や胎盤における免疫応答の分子学的メカニズムについては、未だよくわかっていない。

本研究では、感染防御の舞台となっている胎盤に存在する免疫細胞を解析し、どのような免疫細胞が病原体排除に主に働くかを検討することにより、トキソプラズマ原虫感染に対する胎盤における免疫応答の機序を解明することを目的とした。そのための手法とし



て、マウスでのトキソプラズマ原虫のライフサイクルがヒトと極めて類似していることから、実験動物としてマウスを用いた。

また、本研究で使用する病原体サンプルの調整として、①トキソプラズマ急増虫体の培養・検出 (*in vitro*)、②トキソプラズマ組織内嚢子の継代・検出(*in vivo*, マウス)を行った。次に、妊娠マウスでのトキソプラズマ経口感染モデルの確立を過去の文献を参考に 行い (20,31-34)、最終的には、トキソプラズマ感染妊娠マウスでの胎盤における免疫細胞の表現型を同定するために、これまで胎盤における免疫細胞に関する研究では報告されていなかったフローサイトメトリ解析の手法を初めて確立することとした。

## 3. 材料と方法

### 3-1 病原体サンプルの調整

#### ① トキソプラズマ急増虫体の培養・検出

トキソプラズマ原虫（PLK 株；ME49 株由来クローン、弱毒性 嚢子形成 type2 株：急増虫体）（35）は、国立感染症研究所の永宗 喜三郎先生より分与して頂いた。アフリカミドリザル腎由来細胞である *Vero* 細胞（36）は、RPMI 培地（Sigma-Aldrich）、10%ウシ胎児血清（Biological Industries）、10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Gentamicin（Sigma-Aldrich）、37  $^{\circ}\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ 環境下にて培養を行った。トキソプラズマ急増虫体を *Vero* 細胞単層培養シャーレにふりかけて、RPMI 培地（Sigma-Aldrich）、3%ウシ胎児血清（Biological Industries）、37  $^{\circ}\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ 環境下にて培養を行った（図II）。*Vero* 細胞は細胞内への急増虫体の侵入寄生、増殖により溶解し、急増虫体が培養液中に放出されるため、血球計算盤にて急増虫体数をカウントし使用する希釈濃度に調整して用いた。

#### ② トキソプラズマ組織内嚢子の継代と検出

トキソプラズマ原虫は、ヒトやマウスなどの中間宿主内では急増虫体から組織内嚢子（緩増虫体）へ、組織内嚢子から急増虫体へとステージ変換する。急増虫体は感染細胞で急速に分裂増殖し、感染細胞を破壊し、宿主を死に至らしめることもある。一方、組織内嚢子は休眠型で、安定した壁に覆われているため、トキソプラズマは

免疫系の攻撃を受けずに、宿主の細胞内で共存する。

トキソプラズマ組織内嚢子の継代用として、8~12 週齢の CBA/J 雌マウスをチャールズリバーより購入し用いた。SPF (specific pathogen free) の環境下にて飼育し、筑波大学生命科学動物資源センターの規約に従った。

まず CBA/J マウスにトキソプラズマ急増虫体を腹腔内感染させ、感染して約 1 ヶ月後にマウス脳を摘出した。次世代以降への継代は、この摘出した脳 (組織内嚢子を含む) を PBS 中でホモジェナイズし、CBA/J マウスに、脳溶解液として 20 シスト / 200  $\mu$ l で腹腔内に注入し感染させた。感染後に急増虫体へステージ変換したトキソプラズマを抑制するために抗生剤 sulfadiazine 0.5 g / l を、接種後 5 日~18 日に飲水ボトルで投与した。接種後 1 ヶ月以降でマウス脳より組織内嚢子を得て、新たな CBA/J マウスに感染させることで継代した (図 III) (37,38)。

摘出した感染マウス脳をホモジェナイズし、PBS で洗浄した後、組織内嚢子を検出する前処置として、Fixing & Permeabilizing Solution (4%formaldehyde、0.2%triton) を加えて、氷上で 20 分静置した。最終的にトキソプラズマ組織内嚢子の検出は、PBS、10% ウシ胎児血清で洗浄後、FITC-conjugated dolichos lectin (Vector) を加え、45 分~1 時間、常温、遮光で静置し蛍光染色により行なった (39-41)。

## 3-2 妊娠マウスでのトキソプラズマ経口感染モデルの確立

### ① マウス、交配

トキソプラズマ感染実験には、BALB/c 野生型マウスをチャールズリバーより購入し 8~12 週齢マウスを交配した。SPF (specific pathogen free) の環境下にて飼育し、筑波大学生命科学動物資源センターの規約に従った。

交配は各ケージに 1 匹の雄マウスと 2 匹の雌マウスを入れ、翌朝より数日間にわたり観察し、雌マウスの膣内プラグの有無を確認した。膣内プラグが確認された日を妊娠 Day 0 (G0) と決定し、妊娠が確認されたマウスは、交配ケージから別のケージに移動させた。

### ② 妊娠マウスでの経口感染実験

妊娠マウスについて、より実際的な感染経路である経口感染実験を行った。マウスを交配し、妊娠初期にあたる妊娠 Day 7 にトキソプラズマ組織内嚢子 30 シストを経口的に感染させ、通常妊娠 Day 19~Day 20 で満期分娩に至るが、その前の妊娠 Day 16 (感染後 9 日) に子宮を摘出し、胎盤でのトキソプラズマ原虫検出 (PCR) を行うこととした。胎盤組織については、1 匹の母体マウスの妊娠子宮よりおよそ 7~12 胎児分の胎盤組織が採取され、すべてを一括して扱うこととした (図IV)。

### ③ 感染マウス胎盤での PCR

妊娠 Day 16 (感染後 9 日) にマウス胎盤を摘出し、ISOGEN (NIPPON GENE) を用いて mRNA を抽出し、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems) を用いて cDNA を合成した。いずれも製品プロトコールに従い行った。ABI9700 (Applied Biosystems) にて解析を行った。

マウス胎盤へのトキソプラズマ感染を確認するために、トキソプラズマ急増虫体表面抗原遺伝子である SAG1 (surface antigen 1) を検出した (42,43)。プライマーは

SAG1 Forward : TCGGATCCCCCTCTTGTTGC

SAG1 Reverse : CTCCAGTTTCACGGTACAGT

GAPDH Forward : CTTCACCACCATGGAGAAGGC

GAPDH Reverse : GGCATGGACTGTGGTCATGAG

を用い、PCR サイクル条件は、94 °C にて 5 分変性後、94 °C 30 秒、55 °C 30 秒、72 °C 1 分にて 35 サイクルで行った。

### 3-3 マウス胎盤における免疫細胞のフローサイトメトリ解析

胎盤組織は 1 mm<sup>3</sup> 大に細かく切り、45 分間、37 °C、1 mg/ml コラゲナーゼ D (Roche) を加えた PBS に入れて振盪させながら反応させた。さらにスライドガラスでホモジェナイズし、2% FBS (ウシ胎児血清) を加えた PBS で洗浄後、細胞懸濁液を無菌のステン

レス製100ナイロンメッシュのフィルターに通過させた。0.75% 塩化アンモニウム溶液にて溶血後、2% FBS（ウシ胎児血清）を加えた PBS で再懸濁した（44）。細胞浮遊液を  $5 \times 10^5$  個/サンプルに調整し、氷上で抗 CD16/32 抗体（2.4G2）0.5  $\mu\text{g}$ にて Fc レセプターに対するブロッキングを常温で 5 分間行った。以下カッコ内にはモノクローナル抗体のクローン名を示す。その後、同時に血球マーカーである PE 結合抗 CD45.2 モノクローナル抗体（104）、および FITC または APC 結合の CD3（5K7）、CD4（GK1.5）、CD8（53-6.7）、B220（RA3-6B2）、NK1.1（PK136）、Gr-1（RB8）、CD11b（M1/70）を含む系統マーカーに対するモノクローナル抗体で染色した。いずれも BD Bioscience より購入した。細胞を洗浄後、フローサイトメトリ解析を行った。サンプルの取り込み、解析については FACS Calibur（Cell Quest software）を用いて、同社のプロトコールに従って行った。

## 4. 結果

### 4-1 組織内囊子の検出

キーエンス蛍光顕微鏡にて組織内囊子の検出が確認できた (図V)。通常、囊子は球形で、その直径は 40~50  $\mu\text{m}$ 、大きいもので 100  $\mu\text{m}$  とされる。囊子懸濁液を一定量スライドにとり、蛍光顕微鏡下で囊子数をカウントした。使用する投与濃度に希釈することで病原体サンプルの調整が可能となった。

### 4-2 感染マウス胎盤におけるトキソプラズマ急増虫体表面抗原遺伝子 (SAG1) の検出

マウス胎盤より DNA を抽出し、トキソプラズマ急増虫体の表面抗原である SAG1 の特異的プライマーを用いて、PCR にて検出した。ターゲットバンドである 759 塩基のバンドが、トキソプラズマ感染マウス胎盤で検出され、トキソプラズマ病原体が存在していることが確認できた (図VI)。これにより今回の実験系において、妊娠マウスにトキソプラズマ原虫 (組織内囊子) を経口接種し、胎盤へのトキソプラズマ感染が成立していることが確認でき、トキソプラズマに感染した胎盤を得ることが可能となった。1 匹の妊娠マウスから得られる胎盤サンプル量には限界があり、フローサイトメトリ解析に必要な細胞数を確保するには、同一サンプルを PCR に使用する

ることが困難であった。そのため本実験は予備実験として行い、この実験系における胎盤感染を確認することとした。

### 4-3 マウス胎盤に存在する免疫細胞のフローサイトメトリ解析 (1) CD11b/Gr-1

胎盤におけるトキソプラズマ原虫感染に対する免疫応答を調べるために、本研究ではトキソプラズマ原虫を感染させたマウス妊娠モデルを用いて、胎盤における免疫細胞の解析方法を確立した。

腔内プラグを同定した日を妊娠 Day0 (G0) とした。トキソプラズマ原虫感染群マウスには妊娠 Day7 (G7) にトキソプラズマ原虫組織内嚢子 30 シストを経口感染させた。胎盤組織は感染後 9 日目 (妊娠 Day16 ; G16) に採取した (図VII)。

上記のように妊娠 Day7 にトキソプラズマ原虫感染させたマウスと、非感染マウスを用意した。これまでの研究では、妊娠 Day7 に嚢子を接種されたマウスの場合、流産は妊娠 Day16 ころに観察され (45)、これらよりトキソプラズマ原虫感染は妊娠 Day16 まで胎盤に恒常的に影響を与えることが示唆された。そのため、我々は胎盤の免疫細胞分画におけるトキソプラズマ原虫感染の影響を解析するため、妊娠 Day16 に胎盤組織を採取することとした。

トキソプラズマ原虫接種後 9 日目 (G16) に、感染マウス (n=6) と非感染マウス (n=6) から採取した胎盤における CD45.2<sup>+</sup> 細胞のうち、CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>+</sup> 細胞、CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>-</sup>細胞、CD11b<sup>-</sup> Gr-1<sup>-</sup>細



胞の割合についてフローサイトメトリで解析した。CD45.2とは、BALB/cやC57BL/6などのマウス白血球共通抗原で、赤血球系と血小板系を除いた全ての造血系由来の細胞に発現しており、すなわちその分画に含まれる免疫細胞について解析した。主に、CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup>細胞には炎症性単球や好中球、CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>-</sup>細胞には単球やマクロファージ、CD11b<sup>-</sup>Gr-1<sup>-</sup>細胞にはリンパ球が含まれる。

フローサイトメトリ解析により、胎盤に存在する細胞にCD45.2<sup>+</sup>細胞として描出される血球細胞が含まれていることが示されたため(図VIII)、我々はCD45.2<sup>+</sup>細胞分画ゲートの細胞について解析した。CD45.2<sup>+</sup>のゲーティングについては、特にトキソプラズマ感染胎盤で出現する胎盤細胞の死細胞と考えられる集塊を除外して解析を行うため図VIIIに示す通りとした。死細胞については、PI (Propidium Iodide) 染色にて確認した。非感染マウスの妊娠Day16のCD45.2<sup>+</sup>細胞のうちCD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup>細胞分画の割合は、 $5.73 \pm 3.4\%$ を占めていた(図VIII,IX)。

これに対し、トキソプラズマ原虫感染後9日目(G16)のマウス胎盤では、非感染マウス胎盤に比較して、CD45.2<sup>+</sup>細胞のうちCD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup>の細胞分画の割合が有意に増加していた( $23.3 \pm 8.2\%$ )(図VIII,IX)。対照的に、非感染マウス( $60.1 \pm 13.1\%$ )に比較して、CD11b<sup>-</sup>Gr-1<sup>-</sup>の細胞分画は、有意に減少していた( $36.5 \pm 8.0\%$ )(図VIII,IX)。一方で、CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>-</sup>の細胞分画は感染マウスと非感染マウスの間で同程度( $32.3 \pm 10.8\%$  vs  $37.0 \pm 9.2\%$ )であった(図VIII,IX)。

#### 4-4 マウス胎盤に存在する免疫細胞のフローサイトメトリ解析 (2) リンパ球分画

トキソプラズマ感染により胎盤で割合の減少を認めていた  $CD11b^- Gr-1^-$  の細胞分画には、リンパ球分画が主に含まれることから、胎盤における  $CD45.2^+$  細胞の内、リンパ球ゲート（前方散乱；  $FSC^{low}$ 、側方散乱；  $SSC^{low}$ ）のリンパ球分画について解析した（図 X）。 $CD4^+$ T 細胞、 $CD8^+$ T 細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、B 細胞の細胞分画の各々の割合は、トキソプラズマ原虫感染後 9 日目（G16）の感染マウスおよび非感染マウスの間で同程度であった（図 X, XI）。

## 5. 考察

### 1. 本研究のまとめ

本研究では、妊娠マウスにおけるトキソプラズマ感染で感染防御の舞台となっている胎盤に存在する免疫細胞を解析し、どのような免疫細胞が病原体排除に主要に働くかを検討することにより、トキソプラズマ原虫感染に対する胎盤における免疫応答の機序を解明することを目的とした。経口感染後 9 日目のマウス胎盤では、CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>+</sup> 細胞分画の割合が、トキソプラズマ感染マウスで非感染マウスより有意に高率であるという結果を得た。CD11b と Gr-1 は Ly6G<sup>+</sup> 好中球と Ly6C<sup>+</sup> 炎症性単球に発現しているため、増加している細胞が好中球や炎症性単球、あるいは両方である可能性が考えられる。

今回のトキソプラズマ感染させたマウス妊娠モデルにおいては、末梢血をはじめ他の臓器での免疫細胞について検討するに至っていない。これまでの報告では、トキソプラズマ組織内嚢子 (type2 株) のマウス経口感染で小腸における免疫細胞の割合について検討されているものがある (28)。そこでは、CD45<sup>+</sup>細胞における炎症性単球 (Ly6C<sup>high</sup>CD11b<sup>+</sup>)、好中球 (Ly6G<sup>+</sup>CD11b<sup>high</sup>)、CD11c<sup>high</sup>細胞について、非感染時と感染後 7~8 日目を比較している。小腸の粘膜固有層や腸上皮についてフローサイトメトリで解析しており、感染後 7~8 日目に炎症性単球 (Ly6C<sup>high</sup>CD11b<sup>+</sup>)、好中球 (Ly6G<sup>+</sup>CD11b<sup>high</sup>) の割合がいずれも有意に増加していることを示している。この報告や本研究では、いずれも末梢血で好中球や炎

症性単球が増加し、それを反映している可能性は否定できないが、このような生体防御バリアである腸管に集積する免疫細胞についての報告は、本研究において胎盤で観察されたデータを支持する一つと考える。

## 2. Gr-1<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> 細胞（好中球と炎症性単球）について

文献的には、Gr-1<sup>+</sup> 炎症性単球は、マウス腹腔内感染でトキソプラズマ原虫に対する免疫応答の初期段階で感染部位に遊走され、感染早期のトキソプラズマ複製増殖を抑制することに密接に関連し、また、Gr-1<sup>+</sup> 炎症性単球が遊走されないと、IL12、TNF $\alpha$ 、IFN $\gamma$ などの感染制御に重要とされるサイトカインを高レベルに分泌する正常なヘルパーT1 細胞応答の誘導があっても、大幅な死亡率の増加をもたらすと報告されている（46）。Gr-1<sup>+</sup> 炎症性単球の選択的欠損により、トキソプラズマ原虫の増殖や好中球の高度流入、過剰な腸管壊死、急性感染による死亡が制御不能であったとの報告もある（22）。また、好中球除去したマウスの腹腔内感染では、ヘルパーT1 応答が減弱し、トキソプラズマ原虫の増殖が制御不能となった（47）。

さらに、CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>+</sup> 細胞は、トキソプラズマ感染に対して防御的に働く前炎症性サイトカインやケモカイン、一酸化窒素（NO）または活性酸素種を分泌できることが知られている（48,49）。従って、本研究において、CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>+</sup> 細胞分画の割合がトキソプラズマ感染マウスで非感染マウスより高率であったことは、感染防御に何らかの関与をしていることを示唆するものと考えられる。他の臓器

ではすでに報告されているように、胎盤でもトキソプラズマ原虫感染に対する免疫において、自然免疫応答が重要で、CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> 細胞で示される炎症性単球や好中球が特に関与している可能性が判明したが、現在、その機序についてはまだ不明な点も多い。

### 3. 感染防御の機序についての考察 (IFN $\gamma$ の相反する作用)

IFN $\gamma$ は、トキソプラズマをはじめとする様々な細胞内病原体に対する感染防御にとって特に不可欠なサイトカインとされている。トキソプラズマ感染初期における、T細胞のIFN $\gamma$ 産生や好中球の遊走や腸粘膜でのp47 GTPases IGTPの誘導が、MyD88 (Myeloid differentiation factor 88) に依存しているとの報告がある (50)。TLR-2 (Toll like receptor-2) と MyD88 を介して IFN $\gamma$  や NO 産生が活性化され、IFN $\gamma$  はインドールアミンを活性化し、インドールアミンはトキソプラズマの必須アミノ酸であるトリプトファンへの代謝を促進する (51)。ヒト胎盤での TLR-2 の発現の報告があり (52)、胎盤におけるトキソプラズマの感染防御のメカニズムとして、トキソプラズマのトリプトファン枯渇を起こすことによる抗原虫作用に TLR-2 や MyD88 が関与している可能性が考えられる。

一方で、妊娠マウスでのトキソプラズマ感染では、IFN $\gamma$  中和により母体血中の急増虫体数は増加するにもかかわらず、胎盤感染と胎児感染が減少する (21)。トキソプラズマ感染において、IFN $\gamma$  は胎盤細胞の ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1) という細胞間接着分子の発現増加を介して、単球の胎盤細胞への接着プ

ロセスに關与している (34)。ヒトでのトキソプラズマやトリパノソーマなどの感染において、胎盤細胞に ICAM-1 が過剰発現している (53)。また、ICAM-1 を有するヒト胎盤由来細胞を用いた *in vitro* の実験では、可溶性 human ICAM-1 と抗 ICAM-1 抗体が、それら細胞層へのトキソプラズマの通過を妨げることを報告している (54)。これらより、①トキソプラズマ感染により母体では IFN $\gamma$  が産生され、胎盤細胞での ICAM-1 発現が増加する、②トキソプラズマ感染した炎症性単球の ICAM-1 を介した胎盤細胞への接着を促進し胎盤へのトキソプラズマ感染を増悪させる、③胎盤での炎症増悪が起こり、胎盤関門が破壊される、④トキソプラズマが胎盤を通過した結果、胎児感染が起こる、という機序の仮説が考えられる。すなわち、IFN- $\gamma$  は、妊娠マウスにおいては、母体感染には感染防御作用として働き、胎児感染においては胎盤への感染を増悪させる作用も有する可能性が考えられ、胎盤を介した胎児感染のプロセスについても重要な役割を担っていることが示唆される。

#### 4. 今後の展望

本研究における今後のさらなる解析として、まず CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>+</sup> 細胞で示される細胞分画のうち、Ly6G<sup>+</sup> で示される好中球あるいは Ly6C<sup>+</sup> で示される炎症性単球のいずれかが胎盤におけるトキソプラズマ感染の制御に關与しているかを同定する必要がある。その上で、それら免疫細胞の除去抗体や、遊走機能を欠損させたノックアウトマウスを用いて、胎盤でのトキソプラズマの急増虫体数や Inflammatory index、胎児感染の割合について比較していくことで、

胎盤感染におけるそれぞれの免疫細胞の機能を調べていくことが考えられる。

また、本研究で確立した免疫細胞のフローサイトメトリ解析は、トキソプラズマと同様にサイトメガロウイルス、風疹ウイルス、パルボウイルス、梅毒のような、胎盤を介する先天感染の原因となる様々な病原体に対する胎盤における免疫応答を解析するのに有効な手法となると考える。

さらに、これら病原体の経胎盤感染についてもトキソプラズマ感染と同様に、母体での感染防御により胎盤での炎症が惹起され、胎盤関門の破壊が起こる結果として胎児感染が成立する機序が関与している可能性も考えられる。本研究で明らかになった  $CD11b^+$   $Gr-1^+$  細胞で示される免疫細胞の他に、 $IFN\gamma$  や  $ICAM-1$  分子を含む感染防御メカニズムがさらに解明されれば、先天感染における最終的な目標である胎児への感染予防のワクチン開発につながる非常に有用なものとなることが期待できる。

## 6. 結論

本研究では、トキソプラズマ原虫感染に対する胎盤における免疫応答の機序を解明するため一連の実験系を確立した。今回は妊娠マウスでのトキソプラズマ経口感染モデルを確立し、胎盤に存在する免疫細胞がトキソプラズマ感染によりどのように変化するかを解析することができた。この実験系を用いて、CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>+</sup> 細胞の割合が胎盤で有意に増加していることを明らかにし、トキソプラズマ感染の免疫防御において重要な役割を持つ可能性を示した。トキソプラズマ原虫の胎盤を介した胎児への感染防御システムのメカニズムは未だ不明な点が多く、本研究はそのメカニズムの解明につながる結果であると言える。今後は、感染胎盤において感染防御を担う免疫細胞の同定やその機能についてのさらなる解析が必要と考える。



## 7. 謝辞

本研究は、日本の文部科学省が提供する助成金によってサポートされてきました。本研究を遂行するにあたり、直接ご指導、ご助言を頂きました渋谷和子准教授（筑波大学大学院人間総合科学研究科生命システム医学専攻免疫制御医学）、渋谷彰教授（筑波大学大学院人間総合科学研究科生命システム医学専攻免疫制御医学、生命領域学際研究センター（TARA））、永宗喜三郎先生（国立感染症研究所寄生動物部）および佐藤豊実教授（筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻婦人周産期医学）、濱田洋実教授（筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻婦人周産期医学）、吉川裕之前教授（筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻婦人周産期医学）に感謝の意を表します。

## 8. 参考文献

1. Montoya J.G., Liesenfeld O. (2004) Toxoplasmosis. *Lancet* **363**:1965-76.
2. Wong S.-Y., Remington J.S. (1994) Toxoplasmosis in pregnancy. *Clin Infect Dis* **18**:853-62; quiz 862.
3. Weiss L.M., Dubey J.P. (2009) Toxoplasmosis : a history of clinical observations. *Int J Parasitol* **39**:895-901.
4. Furtado J.M., Winthrop K.L., Butler N.J., Smith J.R. (2013) Ocular toxoplasmosis I : parasitology, epidemiology and public health. *Clin Exp Ophthalmol* **41**:82-94.
5. McLeod R., Boyer K.M., Lee D., Mui E., Wroblewski K., Karrison T., Noble A.G., Winthers S., Swishe C.N., Heydemann P.T., Sautter M., Babiarz J., Rabiah P., Meier P., Grigg M.E., Toxoplasmosis Study Group. (2012) Prematurity and severity are associated with *Toxoplasma gondii* alleles (NCCCTS, 1981-2009). *Clin Infect Dis* **54**:1595-605.
6. Safadi M.A., Berezin E.N., Farhat C.K., Carvalho E.S. (2003) Clinical presentation and follow up of children with congenital toxoplasmosis in Brazil. *Braz J Infect Dis* **7**:325-31.
7. Berrebi A., Assouline C., Bessieres M.H., Lathiere M., Cassaing S., Minville V., Ayoubi J.M. (2010) Long-term outcome of children with congenital toxoplasmosis. *Am J Obstet Gynecol* **203**:552-6.
8. Desmonts G, Couvreur J. (1974) Congenital toxoplasmosis: A

- prospective study of 378 pregnancies. *N Engl J Med* **290**:1110-6.
9. Remington J.S., McLeod R.M., Desmonts G. (2011) Toxoplasmosis. Infectious disease of the fetus and newborn infant, 7<sup>th</sup>ed :918-1041.
  10. 川名 尚, 小島 俊行. (2011) 母子感染. 金原出版株式会社. 136-66.
  11. 矢野 明彦, 青才 文江, 野呂瀬 一美 (2007) 日本におけるトキソプラズマ症. 九州大学出版会.
  12. 国立感染症研究所ホームページ  
<http://www.nih.go.jp/niid/ja/kansennohanashi/3009-toxoplasma-intro.html#r11> (accessed on August 10,2015)
  13. Norose K., Mun H.S., Aosai F., Chen M., Hata H., Tagawa Y., Iwakura Y., Yano A. (2001) Organ infectivity of *Toxoplasma gondii* in IFN-gamma knock out mice. *J Parasitol* **87**:447-52.
  14. Kobayashi M., Aosai F., Hata H., Mun H.S., Tagawa Y., Iwakura Y., Yano A. (1999) *Toxoplasma gondii* : difference of invasion into tissue of digestive organs between susceptible and resistant strain and influence of IFN-gamma in mice inoculated with cysts perorally. *J Parasitol* **85**:973-5.
  15. Piao L.X., Aosai F., Mun H.S., Yano A. (2005) Peroral infectivity of *Toxoplasma gondii* in bile and feces of interferon-gamma knockout mice. *Microbiol Immunol* **49**:239-43.
  16. Wilkin P. (1965) Pathologie du placenta. Masson & Cie, Paris.
  17. Novak R.F. (1991) A brief review of the anatomy, histology and ultrastructure of the full-term placenta. *Arch Pathol Lab Med*

- 115:654-9.**
18. Denkers E.Y., Gazzinelli R.T. (1998) Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin Microbiol Rev* **11:569-88.**
  19. Munoz M., Liesenfeld O., Heimesaat M.M. (2011) Immunology of *Toxoplasma gondii*. *Immunol Rev* **240:269-85.**
  20. Abou-Bacar A., Pfaff A.W., Letscher-Bru V., Filisetti D., Rajapakse R., Antoni E., Villard O., Klein J.-P., Candolfi E. (2004) Role of gamma interferon and T cells in congenital *Toxoplasma* transmission. *Parasite Immunol* **26:315-8.**
  21. Abou-Bacar A., Pfaff A.W., Gerges S., Letscher-Bru V., Filisetti D., Villard O., Antoni E., Klein J.-P., Candolfi E. (2004) Role of NK cells and gamma interferon in transplacental passage *Toxoplasma gondii* in a mouse model of primary infection. *Infect Immun* **72:1397-401.**
  22. Dunay I.R., Damatta R.A., Fux B., Presti R., Greco S., Colonna M., Sibley L.D. (2008) Gr1<sup>+</sup> (Ly6C<sup>+</sup>) inflammatory monocytes are required for mucosal resistance to the pathogen *Toxoplasma gondii*. *Immunity* **29:306-17.**
  23. Dunay I.R., Fuchs A., Sibley L.D. (2010) Inflammatory monocytes but not neutrophils are necessary to control infection with *Toxoplasma gondii* in mice. *Infect Immun* **78:1564-70.**
  24. Dunay I.R., Sibley D. (2010) Monocyte mediate mucosal immunity to *Toxoplasma gondii*. *Curr Opin Immunol* **22:461-6.**

25. Sturge C.R., Benson A., Raetz M., Wilhelm C.L., Mirpuri J., Vitetta E.S., Yarovinsky F. (2013) TLR-independent neutrophil-derived IFN-gamma is important for host resistance to intracellular pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**:10711-6.
26. Denkers E.Y., Butcher B.A., Rio L.D., Bennouna S. (2004) Neutrophils, dendritic cells and *Toxoplasma*. *Int J Parasitol* **34**:411-21.
27. Abi Abdallah D.S., Lin C., Ball C.J., King M.R., Duhamel G.E., Denkers, E.Y. (2012) *Toxoplasma gondii* triggers release of human and mouse neutrophil extracellular traps. *Infect Immun* **80**:768-77.
28. Coombes J.L., Charsar B.A., Han S.-J., Halkias J., Chan S.W., Koshy A.A., Striepen B., Robey E.A. (2013) Motile invaded neutrophils in the small intestine of *Toxoplasma gondii*-infected mice reveal a potential mechanism for parasite spread. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**:E1913-22.
29. McCabe R., Remington J.S. (1988) Toxoplasmosis: the time has come. *N Engl J Med* **318**:313-5.
30. Wong S.Y., Hajdu M.-P., Ramirez R., Thulliez P., McLeod R., Remington J.S. (1993) Role of specific immunoglobulin E in diagnosis of acute toxoplasma infection and toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* **31**:2952-9.
31. Fiona M.M., Fiona L.H., Craig W.R. (2008) Immunological control of congenital toxoplasmosis in murine model. *Immunol Lett* **115**:83-9.

32. Thouvenin M., Candolfi E., Villard O., Klein J.P., Kien T. (1997) Immune response in a murine model of congenital toxoplasmosis : increased susceptibility of pregnant mice and transplacental passage of *Toxoplasma gondii* are type 2-dependent. *Parasitol* **39**:279-83.
33. Elsiad M.MA., Martins M.S., Frezard F., Braga E.M., Vitor R.WA. (2001) Vertical toxoplasmosis in a murine model. Protection after immunization with antigens of *Toxoplasma gondii* incorporated into liposomes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **96**:99-104.
34. Pfaff A.W., Georges S., Abou-Bacar A., Letscher-Bru V., Klein J.-P., Mousli M., Candolfi E. (2005) *Toxoplasma gondii* regulates ICAM-1 mediated monocyte adhesion to trophoblasts. *Immunol Cell Biol* **83**:483-9.
35. Ajzenberg D., Banuls A.L., Su C., Dumetre A., Demar M., Carme B., Darde M.L. (2004) Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* **34**:1185-95.
36. Hughes H.P.A., Hudson L., Fleck D.G. (1986) In vitro culture of *Toxoplasma gondii* in primary and established cell lines. *Int J Parasitol* **16**:317-22.
37. Brinkmann V., Remington J.S., Sharma S.D. (1987) Protective immunity in toxoplasmosis : correlation between antibody response, brain cyst formation, T- cell activation, and survival in normal and B-cell-deficient mice bearing the H-2<sup>k</sup> haplotype. *Infect Immun* **55**:990-4.

38. Letscher-Bru V., Pfaff A.W., Abou-Bacar A., Filisetti D., Antoni E., Villard O., Klein J.-P., Candolfi E. (2003) Vaccination with *Toxoplasma gondii* SAG-1 protein is protective against congenital toxoplasmosis in BALB/c mice but not in CBA/J mice. *Infect Immun* **71**:6615-9.
39. Zhang Y.W., Halonen S.K., Ma Y.F., Wittner M., Weiss L.M. (2001) Initial characterization of CST1, a *Toxoplasma gondii* cyst wall glycoprotein. *Infect Immun* **69**:501-7.
40. Nagamune K., Hicks L.M., Fux B., Brossier F., Chini E.N., Sibley L.D. (2008) Abscisic acid controls calcium-dependent egress and development in *Toxoplasma gondii*. *Nature* **451**:207-10.
41. Tomita T, Bzik DJ, Ma YF, Fox BA, Markillie LM, Taylor RC, Kim K, Weiss LM.(2013) The *Toxoplasma gondii* cyst wall protein CST1 is critical for cyst wall integrity and promotes bradyzoite persistence. *PLoS Pathog* **9**:1-15.
42. Luo W.-T., Seki T., Yamashita K., Aosai F., Ueda M., Yano A. (1995) Quantitative detection of *Toxoplasma gondii* by competitive polymerase chain reaction of the surface specific antigen gene-1. *Jpn J Parasitol* **44**:183-90.
43. Luo W., Aosai F., Ueda M., Yamashita K., Shimizu K., Sekiya S., Yano A. (1997) Kinetics in parasite abundance in susceptible and resistant mice infected with an avirulent strain of *Toxoplasma gondii* by using quantitative competitive PCR. *J Parasitol* **83**:1070-4.

44. Vacca P., Pietra G., Falco M., Romeo E., Bottino C., Bellora F., Prefumo F., Fulcheri E., Venturini P.L., Costa M., Moretta A., Moretta L., Mingari M.C. (2006) Analysis of natural killer cells isolated from human decidua:evidence that 2B4 (CD244) functions as an inhibitory receptor and blocks NK-cell function. *Blood* **108**:4078-85.
45. Shiono Y., Mun H.S., He N., Nakazaki Y., Fang H., Furuya M., Aosai F., Yano A. (2007) Maternal-fetal transmission of *Toxoplasma gondii* in interferon-gamma deficient pregnant mice. *Parasitol Int* **56**:141-8.
46. Robben P.M., LaRegina M., Kuziel W.A., Sibley L.D. (2005) Recruitment of Gr-1+ monocytes is essential for control of acute toxoplasmosis. *J Exp Med* **201**:1761-9.
47. Bliss S.K., Gavrilescu C., Alcaraz A., Denkers E.Y. (2001) Neutrophil depletion during *Toxoplasma gondii* infection leads to impaired immunity and lethal systemic pathology. *Infect Immun* **69**:4898-905.
48. Shi C., Pamer E.G. (2011) Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* **11**:762-74.
49. Kolaczowska E., Kubes P. (2013) Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* **13**:159-75.
50. Sukhumavasi W., Egan C.E., Warren A.L., Taylor G.A., Fox B.A., Bzik D.J., Denkers E.Y.(2008) TLR adaptor MyD88 is essential for



pathogen control during oral *Toxoplasma gondii* infection but not adaptive immunity induced by a vaccine strain of the parasite. *J Immunol* **181**:3464-73.

51. Silva N.M., Rodrigues C.V., Santoro M.M., Reis L.F., Alvarez-Leite J.I., Gazzinelli R.T. (2002) Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase, tryptophan degradation, and kynurenine formation during in vivo infection with *Toxoplasma gondii*: induction by endogenous gamma interferon and requirement of interferon regulatory factor 1. *Infect Immune* **70**:859-68.
52. Mitsunari M., Yoshida S., Shoji T., Tsukihara S., Iwabe T, Harada T., Terakawa N. (2006) Macrophage-activating lipopeptide-2 induces cyclooxygenase-2 and prostaglandin E(2) via toll-like receptor 2 in human placental trophoblast cells. *J Reprod Immunol* **72**:46–59.
53. Juliano P.B., Blotta M.H., Altemani A.M. (2006) ICAM-1 is overexpressed by villous trophoblasts in placentitis. *Placenta*. **27**:750-7.
54. Barragan A., Brossier F., Sibley L.D. (2005) Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* involves an interaction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) with the parasite adhesin MIC2. *Cell Microbiol* **7**:561-8.

## 9. 図・図の説明

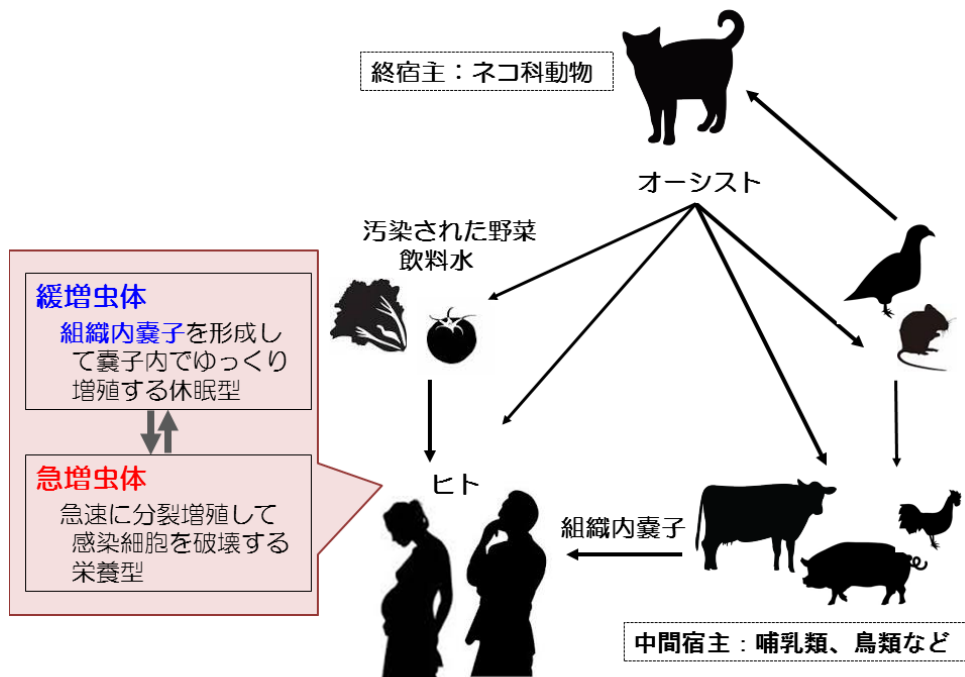
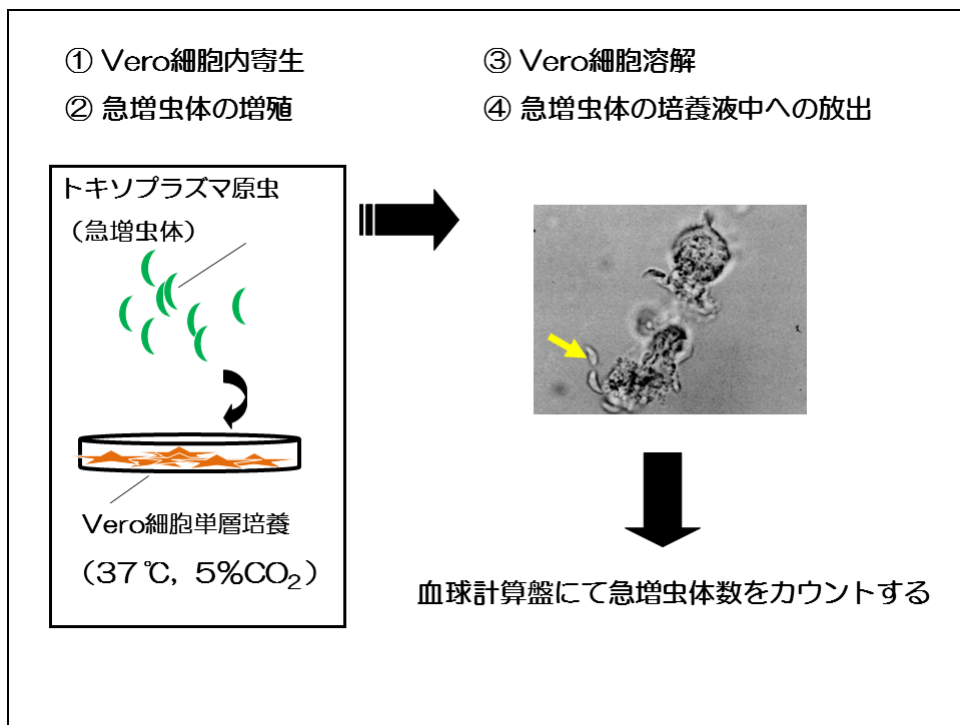


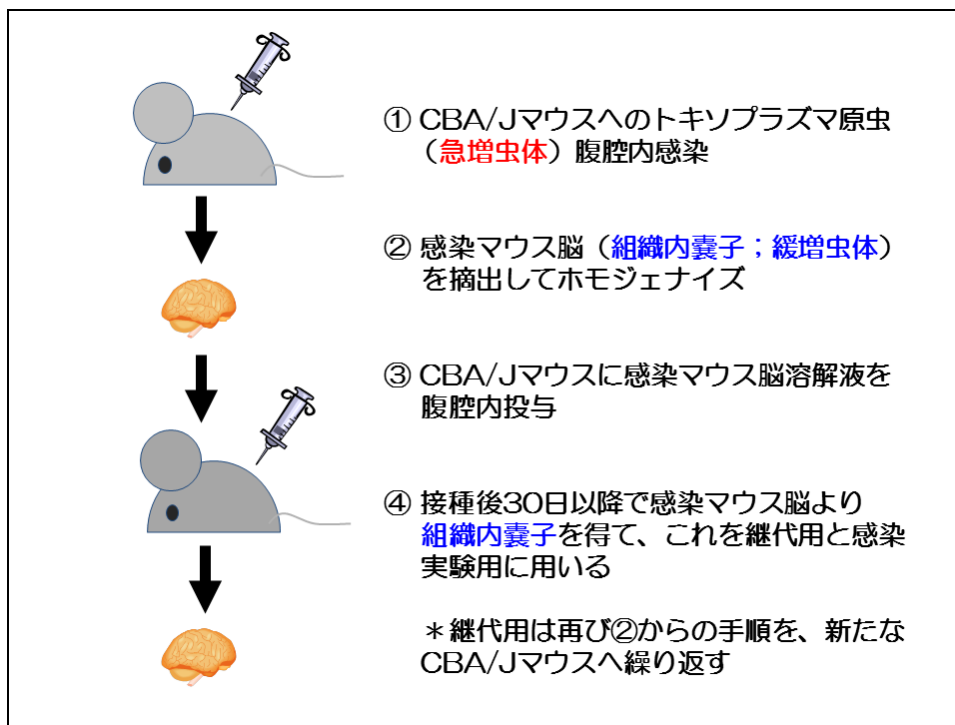
図 I トキソプラズマの生活環

先天性トキソプラズマ症の病原体であるトキソプラズマ (*Toxoplasma gondii*) は、孢子虫類に属する細胞内寄生性の病原性原虫である。ネコを終宿主とし、ヒトを含む哺乳類、鳥類などの恒温動物を中間宿主とする、代表的な人畜共通感染症である。ヒトへの感染は、ネコの糞便中に含まれるオーシストや加熱処理の不十分な感染肉に含まれる組織内嚢子の経口感染により起こる。中間宿主であるヒト腸管では、嚢子内でゆっくり増殖する緩増虫体が遊離して腸管壁に侵入し、白血球細胞内に感染すると、急速に増殖する急増虫体に変換・増殖しながら播種する。嚢子は安定な壁に覆われているため、トキソプラズマは免疫系の攻撃を受けずに生存を続ける。

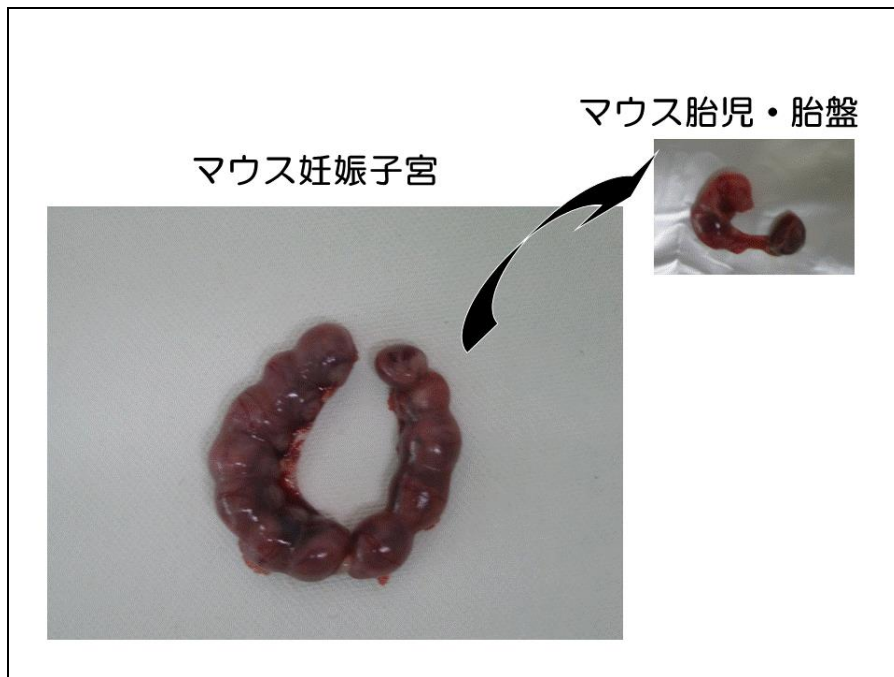


図Ⅱ サンプル調整 1 ; トキソプラズマ急増虫体

写真は文献 11 より引用。トキソプラズマ急増虫体は黄色の矢印で示す。急増虫体は増殖した後、寄生細胞を破壊して、細胞外へ放出される。半円から三日月形をしており、長径 4~7 μm、短径 2~3 μmである。

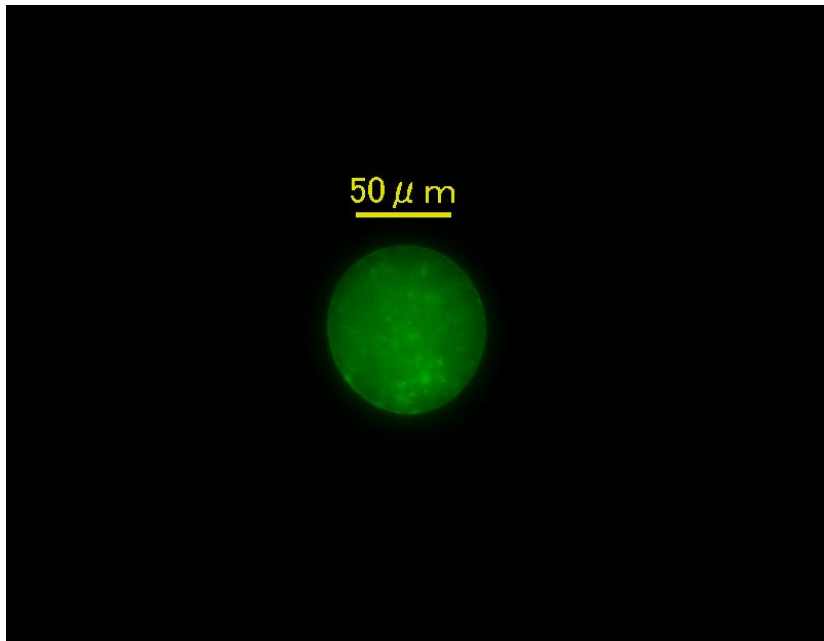


図Ⅲ サンプル調整 2 ; トキソプラズマ組織内嚢子



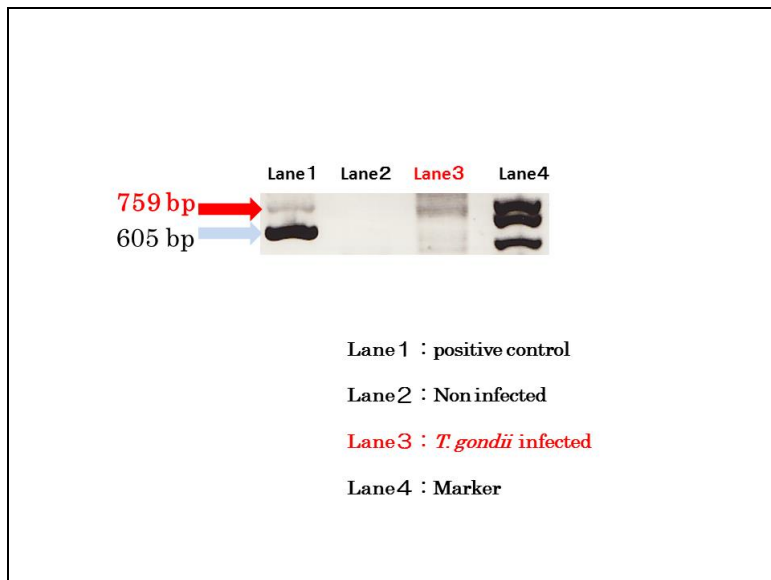
図IV 妊娠 Day16 に摘出した妊娠子宮と胎児胎盤

マウスの子宮は双角子宮で、数珠上に各胎囊が並んでいる。1匹の妊娠マウスからおよそ7~12胎児分の胎盤組織が採取された。



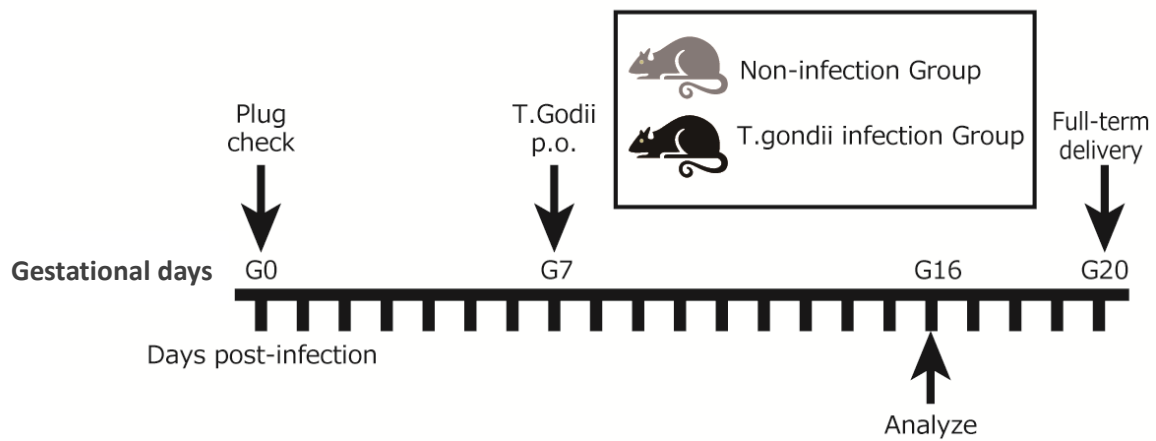
#### 図V トキソプラズマ組織内嚢子の蛍光染色

トキソプラズマ組織内嚢子は、FITC-conjugated dolichos lectin (Vector) にて蛍光染色を行った。キーエンス蛍光顕微鏡にて組織内嚢子の検出を確認した。通常、組織内嚢子は球形で、その直径は40~50  $\mu\text{m}$ 、大きいもので100  $\mu\text{m}$ とされる。



## 図VI 感染マウス胎盤におけるトキソプラズマ急性増虫体表面抗原遺伝子 (SAG1) の検出

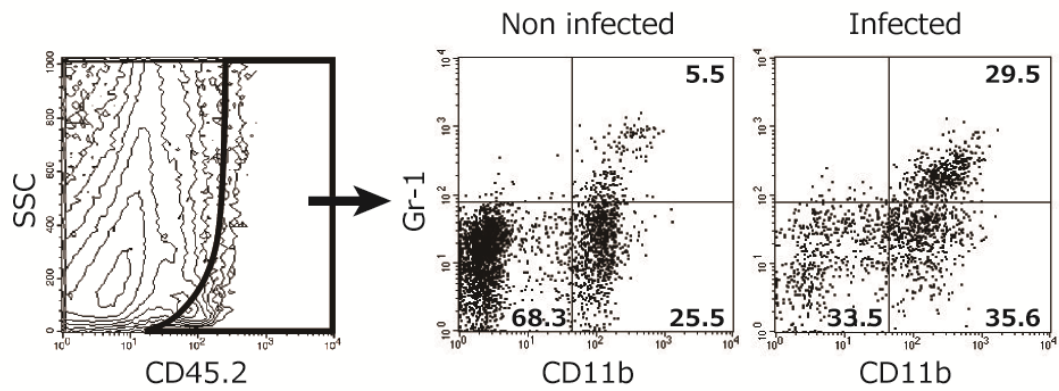
Lane3 (トキソプラズマ感染マウス胎盤) では、759 塩基のバンドとして SAG1 遺伝子の PCR 産物が確認できた。Lane1 (ポジティブコントロール) での 605 塩基のバンドは、競合フラグメントを示す。



図VII 妊娠マウスモデルでのトキソプラズマ経口感染実験のスケジュール

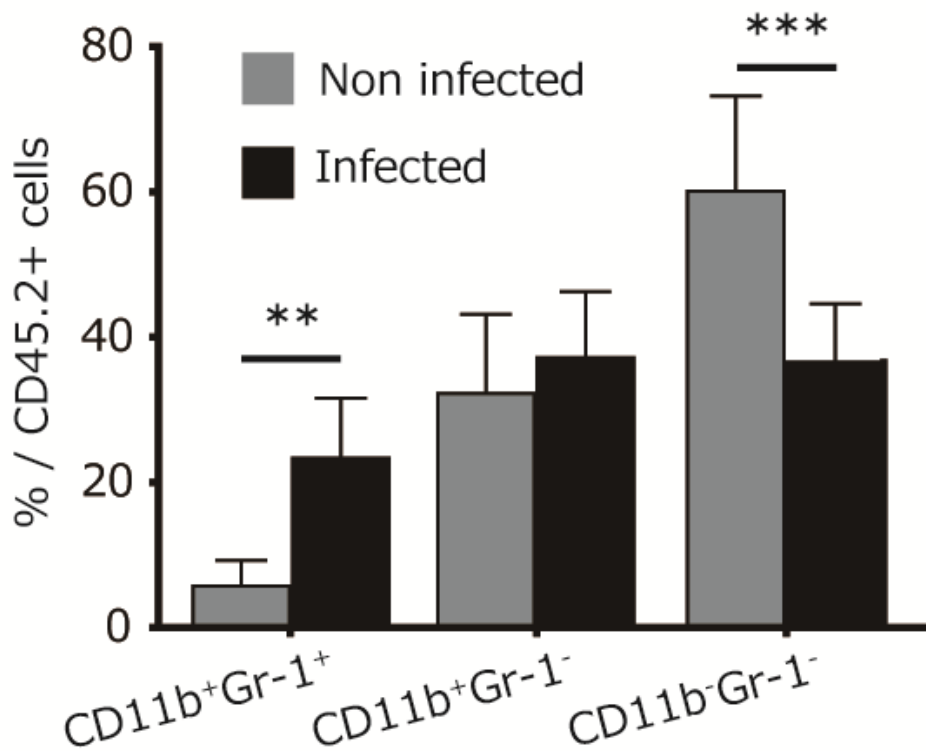
膈内プラグを同定した日を妊娠 Day0 (G0) とした。トキソプラズマ原虫感染群マウスには妊娠 Day7 (G7) にトキソプラズマ原虫 30 シストを経口感染させた。胎盤組織は感染後 9 日目 (妊娠 Day16 ; G16) に採取した。





図Ⅷ マウス胎盤における免疫細胞のフローサイトメトリ解析  
 (1) CD11b と Gr-1

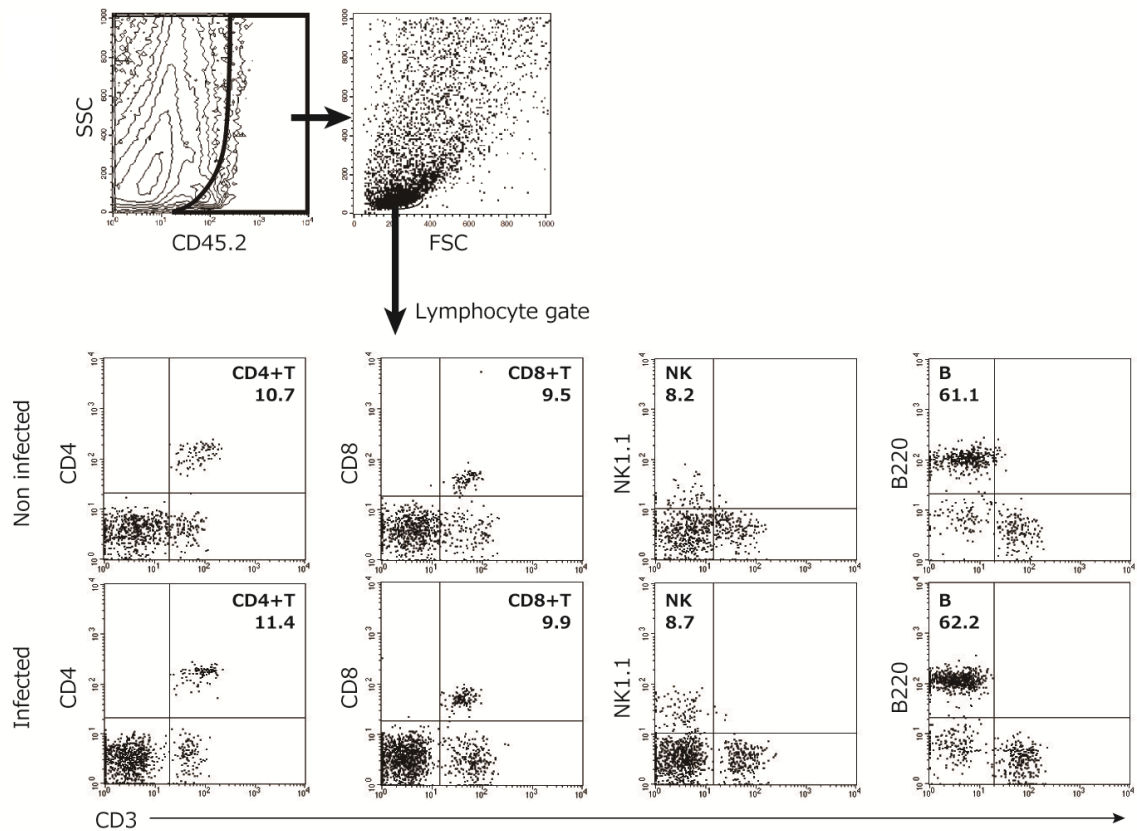
トキソプラズマ原虫接種後 9 日目 (妊娠 Day16) に、感染マウスと非感染マウスから採取した胎盤における CD45.2<sup>+</sup> 細胞中での、CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>+</sup> 細胞、CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>-</sup> 細胞、CD11b<sup>-</sup> Gr-1<sup>-</sup> 細胞についてフローサイトメトリで解析した。



図IX マウス胎盤における免疫細胞のフローサイトメトリ解析

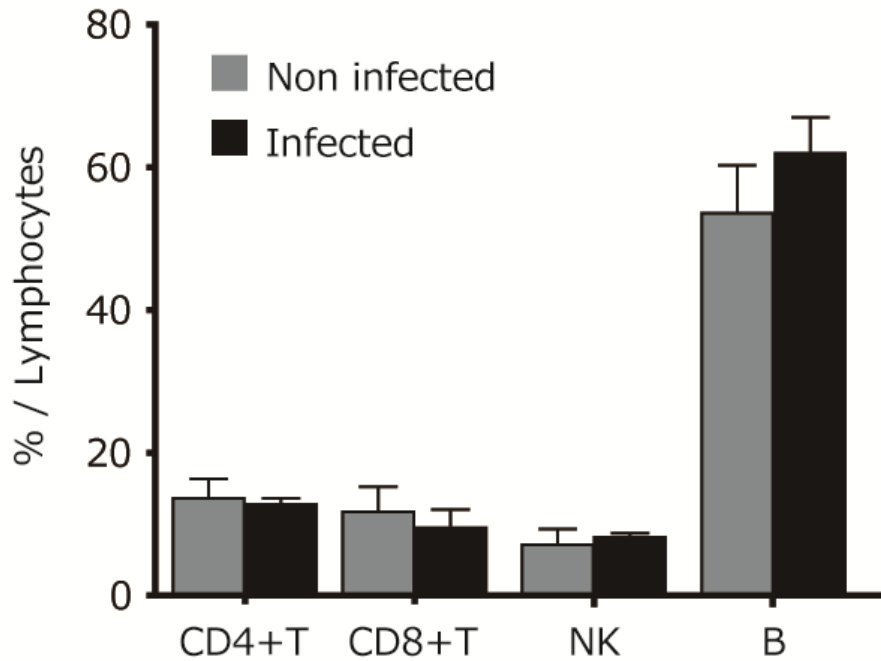
(1) CD11b と Gr-1

トキソプラズマ原虫接種後 9 日目 (妊娠 Day16) に、感染マウス (n=6) と非感染マウス (n=6) から採取した胎盤における CD45.2<sup>+</sup> 細胞のうち、CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>+</sup> 細胞、CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>-</sup> 細胞、CD11b<sup>-</sup> Gr-1<sup>-</sup> 細胞の割合。エラーバーは SD を表す。データは 2 つの独立した実験の代表である。\*\*p<0.01、\*\*\*p<0.001。(対応のない Student t 検定)



図X マウス胎盤における免疫細胞のフローサイトメトリ解析  
(2) リンパ球分画

妊娠 Day16 にトキソプラズマ原虫感染マウスと非感染マウスから採取した胎盤における細胞を CD45.2、CD4、CD8、NK1.1、B220 に対する特異抗体で染色し、フローサイトメトリで解析した。



図XI マウス胎盤における免疫細胞のフローサイトメトリ解析  
(2) リンパ球分画

トキソプラズマ原虫接種後 9 日目 (妊娠 Day16) に、感染マウス (n=6) と非感染マウス (n=6) から採取した胎盤におけるリンパ球ゲート (前方散乱 ;  $FSC^{low}$ 、側方散乱 ;  $SSC^{low}$ ) における  $CD4^+ CD3^+$  T 細胞、 $CD8^+ CD3^+$  T 細胞、 $NK1.1^+ CD3^-$  NK 細胞、 $B220^+ CD3^-$  B 細胞の割合。エラーバーは SD を表す。データは 2 つの独立した実験の代表である。

## 省略語

APC : allophycocyanin

FITC : fluorescein isothiocyanate

FSC : forward scatter

IFN $\gamma$  : interferon gamma

PBS : phosphate buffered saline

PCR : polymerase chain reaction

PE : phycoerythrin

SSC : side scatter