

令和6年4月24日

令和5年度 共同研究報告書

研究代表者： 鈴木 真紀子

1. 研究課題名	日本語表記：広東住血線虫感染による血液凝固機能修飾メカニズムの解明 英語表記：Elucidation of the mechanism of blood coagulation function modification by <i>Angiostrongylus cantonensis</i>		
2. 研究期間	令和5年 4月 1日 ～ 令和6年 3月 31日		
3. 共同研究者	氏 名	機関・所属部署名	職 名
	鈴木 真紀子	四日市看護医療大学 看護医療学部 臨床検査学科	講師
	大島 茂	四日市看護医療大学 看護医療学部 臨床検査学科	講師
	林 宣宏	東京工業大学 生命理工学院	教授
	吉田 彩子	宮崎大学 産業動物防疫リサーチセンター 感染症研究・診断 部門	教授
	入江 隆夫	宮崎大学 農学部 獣医学科	准教授
4. 研究目的	広東住血線虫 (<i>Angiostrongylus cantonensis</i>) はドブネズミなどの肺動脈内に寄生する。オスは体長25～30 mm、体幅0.5 mm、メスは体長約22 mm、体幅0.35 mmである。ラットの肺動脈の直径は約2.87 ± 0.2 mmであり、虫体が肺動脈の血流を阻害することが予測されるが、寄生された個体は感染後も虫体を保有したまま宿主として生存を続ける。また、異物が血管内に存在しているにもかかわらず、血流の停滞や血栓形成に起因する症状を呈することもない。そこで、広東住血線虫が、何らかの凝固系活性化を阻害する物質を持っている、あるいは放出しているのではないかと考えた。広東住血線虫の感染が、ラットの血液凝固機能に与える影響を評価し、感染による影響が確認された場合は、その<u>広東住血線虫感染による血液凝固機能修飾メカニズムの解明</u>を目指す。		
5. 研究内容・成果	広東住血線虫感染ラットにおける血液凝固機能の変化について検討を行った。 本研究では、非感染ラットと、感染後4週（肺動脈への寄生開始時期に相当）、7週（肺動脈内における成熟成虫寄生時期に相当）、24週（慢性感染期に相当）の3ポイントにおける感染ラットにおいて、以下の項目の測定を実施した。 ① 凝固因子の活性が低下する可能性を検討するため、血漿を採取し、プロトロンビン時間（PT）、活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）を実施。結果より、活性低下などが考えられる凝固因子の活性を測定した。 ・感染後4週、7週、24週において、非感染ラット、感染ラットのPT及び、APTTの結果に有意差は見られなかった。 ② 凝固阻止因子の影響を検討するため、血漿を採取し、アンチトロンビン（AT）活性の測定を実施した。		

- ・AT 活性について、感染後 4 週、7 週、24 週において、非感染ラットと感染ラットに有意差が見られた。感染後 4 週では、非感染ラット (n=4) 平均 149.75% に対し、感染ラット (n=3) 平均 164.7%、感染後 7 週では、非感染ラット (n=3) 平均 141.3% に対し、感染ラット (n=3) 平均 173.3%、感染後 24 週では、非感染ラット (n=4) 平均 129% に対し、感染ラット (n=4) 平均 162% であった。

③ 血漿タンパク質の網羅的解析のため非感染ラットと感染ラットのプロテオミクス解析を行った。感染後 4 週及び、7 週、及び 24 週において非感染ラットと、感染ラットのプロテオミクス解析を実施した。

- ・感染後 4 週 of 非感染サンプルと 24 週 of 感染サンプルを比較したところ、感染・非感染ラット間で有意に発現差のあるスポットが計 62 個見つかった。
- ・いくつかのタンパク質を同定し、凝固系 (Complement C) ・免疫 (Glutathione peroxidase3) ・炎症 (Protein AMBP) に関わるタンパク質が確認され、これらのタンパク質についてはさらなる解析を予定している。

④ 凝固・線溶関連因子の mRNA 発現レベルを検討するため、造血臓器の脾臓、造血関連臓器の肝臓、腎臓、副腎および、感染部位である肺動脈を、感染・非感染ラットから採材した。プロテオミクス解析の結果で、Complement C3、Glutathione peroxidase3、Protein AMBP の 3 つ有意な差が見られたため、これらのタンパク質について mRNA 発現を確認することとした。

⑤ 現在、real-time PCR による発現解析の準備をしている。

本研究により、広東住血線虫感染ラットでは、凝固制御因子の活性の亢進により、抗凝固的な作用が誘導されている可能性が示唆された。

※ 必要に応じて、枠を広げて記載してください。

6. 成果となる論文・学会発表等

(※参考となる資料を添付してください。)

今回の研究について、現在までに学会発表や論文の作成は行っていない。
今後研究を進める中で検討していく。

7. 産業動物防疫リサーチセンターへ訪問した回数

(例)	氏 名	職名等	国 籍	訪問回数・合計日数	訪 問 時 期
	〇〇 〇〇〇	准教授	日本	2 回・10 日	7 月・10 月
	鈴木 真紀子	講師	日本	2 回・4 日間	6 月・7 月
	大島 茂	講師	日本	1 回・2 日間	6 月

8. 利用した設備・施設等 ※必要に応じ様式の追加・削除可。

施設

室 名	動 物 種	飼 育 数	期 間
BSL 3 施設			
獣医棟 P 2 動物実験室			
教育棟 P 2 動物実験室	ラット	21 匹	7/20-11/15

設備・機器類

(I) 獣医棟 3 階

部 屋 名		機 器 名	使用した延日数
P 2 実験室	S216	フローサイトメーター (ライフテクノロジーズジャパン)	
		マイクロプレートリーダー (BioRad, Thermo)	
		マイクロプレート洗浄装置 (Thermo WellWash)	
		NanoDrop 分光光度計 (Thermo ND-1000)	
		冷却遠心機 (KUBOTA 7780)	
		冷却遠心機 (Thermo)	
		卓上型冷却遠心機 (HITACHI)	
		安全キャビネット (AIRTEC)	7 日
		ハイブリオーブン (タイテック)	
		オートクレーブ (平山製作所 HG-50)	7 日
		自動核酸抽出装置 (magLead 12gC)	
	V304	ヒートブロック (アステック)	
		安全キャビネット (AIRTEC)	
		卓上遠心機 (HITACHI)	
		MALDI Biotyper (BRUKER)	
	V308	アイソレーター (マウス/ラット用) (Tokiwa T-BCC-Micro-M25)	
		安全キャビネット (AIRTEC)	
		オートクレーブ (トミー精工、LSX-700)	
	V310	アイソレーター (マウス/ラット用) (Tokiwa T-BCC-Micro-M25)	
		オートクレーブ (HIRAYAMA HV-110)	
		安全キャビネット (AIRTEC)	
	V313	安全キャビネット (AIRTEC)	
	V314	蛍光顕微鏡 (ライフテクノロジーズジャパン、EVOS)	
		CO ₂ インキュベーター (ASTEC SCI-165D/APC)	
		倒立位相差顕微鏡 (OLYMPUS CKX41)	
		安全キャビネット (AIRTEC)	
		オートクレーブ (平山製作所 HG-50)	
		卓上遠心機 (KUBOTA 5520)	
		卓上冷却遠心機 (eppendorf 5415R)	
	V319	CO ₂ インキュベーター (Thermo F370)	
		安全キャビネット (AIRTEC)	
		倒立蛍光顕微鏡 (KEYENCE BZ-9000)	

			位相差顕微鏡 (OLYMPUS CK2)	
			超遠心機 (HITACHI CP80WX)	
		V323	安全キャビネット (AIRTEC)	
			多本架冷却遠心機 (KUBOTA AX-311)	
			インキュベーター (SANYO MIR-153)	
			卓上冷却遠心機 (eppendorf 5415R)	
			紫外・可視分光光度計 (GE Healthcare GeneQuant100)	
			ヒートブロック (アステック)	
	遺伝子実験室	V303	ゲル・メンブラン撮影装置 (BioRad)	
			PCR 装置 (BioRad, Applied Biosystems)	
			多標識測定用プレートリーダー (ワラック社)	
			リアルタイム濁度測定装置 (テラメックス LoopampEXIA)	
			リアルタイム PCR 装置 (ABI, Quant Studio 3, 5)	
			デジタル PCR (日本バイオラッド)	
		V306	卓上遠心機 (HITACHI CT6E)	
			卓上冷却遠心機 (HITACHI CT15RE)	
		V307	細菌検査用ホモジナイザー (オルガノ EXNIZER400)	
			シーケンサー (SeqStudio, Spectrum Compact)	
	試薬調製室	V305	pH メーター (HORIBA)	
			デシケーター (ASONE)	
	病理標本作製室	V316	パラフィン包埋ブロック作製装置 (SAKURA)	
			手動回転式ミクロトーム (Leica MR2235)	
			密閉式自動固定包埋装置 (SAKURA)	
			卓上型ドラフト (明光メディカル)	
	洗浄室	V318	超純水製造装置 (Milli-Q Advantage)	
			オートクレーブ (TOMY SX-500)	
			全自動洗浄機 (Miele PG858)	
	滅菌室	V322	オートクレーブ (TOMY、平山製作所)	
			高純水製造装置 (Merck)	
			全自動血球計数器 (日本光電工業)	
	微生物保存室	V324	液体室素保存容器 (太陽日酸㈱, アステック)	
			超低温槽 (Thermo REVC0 TSX400G)	

(II) 獣医寄生虫病学研究

部 屋 名		機 器 名	使用した延日数
獣医寄生虫病学研究室	H212	核酸抽出自動化装置 (QIAcubr)	

(III) 産業動物教育研究センター

部 屋 名	機 器 名	使用した延日数
大中動物検査実験室	大中動物検査実験室	
	全身麻酔装置	
	埋込式回転診療台	
中動物陽圧実験室	手術台、无影灯 (2 機)、麻酔装置、生体情報モニター、X 線投下装置 (C アーム)	

	一式	
MRI 室	3T MRI、MRI 用生体情報モニター、MRI 用麻酔装置一式	
	MRI オペレーター	
P2 検査実験室	アイソレーター	
	安全キャビネット	
	オートクレーブ	
器具・薬品庫	ウサギ飼育用ケージ	
滅菌リネン庫	高圧蒸気滅菌装置	
	カートリッジ式酸化エチレンガス滅菌器	
動物飼育	動物飼育費	
	飼育管理員	

その他の装置・データ等

分 類	名 称	使用した延日数
データベース		
バイオリソース		
データ・文献		
装置		