

も異常所見を認めなかった。刺創による動脈損傷が疑われた事例では、上位頸椎レベルでの、椎骨動脈からの造影剤漏出が確認され、解剖においても肉眼的に同部の血管損傷が確認された。

2. 血腫内の造影剤漏出は、内因性では9/13例、外傷性では4/12例で確認された。内因性事例のうち2例においては、spot signを示さず、血腫内の1点から造影剤が漏出し、同部から血腫内へ造影剤が貯留する特異なパターンを示した。また、外傷性事例の2例では、spot signの出現とともに、辺縁不整なびまん性の広がりを見せる造影剤漏出が認められた。内因性における事例毎のspot signの数(個)・平均CT値(HU)・平均面積(mm²)の平均値は、それぞれ、10.2・138.5・3.2であり、外傷性においては、22.8・131.1・2.9であった。

考 察

1. 椎骨動脈造影は、非破壊的に動脈損傷を評価できる可能性が示唆された。今後も事例数を重ね、対照を血管内視鏡および組織学的所見とした場合の、椎骨動脈損傷における、死後造影CTの診断価値を、統計学的手法を用いて検討する予定である。
2. 頭蓋内出血に対する造影CTにおいて、血腫内の造影剤漏出は、内因性発症では、微小動脈瘤などから、孤発性に出現するのに対し、外傷性では広範な損傷に伴う破綻血管から、多発性に出現するという仮説のもと、それぞれのspot signの数を比較した。しかしながら、内因性であっても多数のspot signが認められる事例があったことなどから、単純にspot signの数で、内外因の別を評価することには限界があると考えられた。また、平均CT値や平均面積に関しても事例ごとにばらつきがあり、鑑別に利用することは難しいと考えられた。一方、内因性事例においては、spot signが血腫内に比較的均一に分布する他、1点から造影剤漏出が増大する特異なパターンが認められたのに対し、外傷性事例においては、spot signは比較的血腫の辺縁

(外側)に集中して出現しているように観察され、辺縁が不整なびまん性の広がりを示すものも認められた。これらは、血管破綻部における内因性・外傷性のそれぞれの病態生理学的状態を反映している可能性がある。今後は、これらパターンの定義を明確化し、統計学的手法を用いて検討を行うとともに、組織学的検討も加える予定である。

文 献

- 1) Inokuchi G, et al. The utility of postmortem computed tomography selective coronary angiography in parallel with autopsy. Forensic Sci Med Pathol 2013; 9: 506-14.
- 2) Inokuchi G, et al. Postmortem dynamic cerebral angiography for detecting aneurysm and bleeding sites in cases of subarachnoid hemorrhage. Forensic Sci Med Pathol 2014; 10: 487-95.
- 3) Delgado Almandoz JE, et al. The spot sign score in primary intracerebral hemorrhage identifies patients at highest risk of in-hospital mortality and poor outcome among survivors. Stroke 2010; 41: 54-60.

4. ミトコンドリアDNA塩基配列を用いたトキソプラズマの遺伝子型解析

千葉大学大学院医学研究院 感染生体防御学
彦 坂 健 児

はじめに

トキソプラズマはアピコンプレクサ生物群に属する寄生性原虫である。感染すると健常者では宿主の免疫系により抑え込まれ日和見感染症として経緯するが、HIV感染患者や臓器移植・免疫抑制療法などに伴う免疫不全患者では、既感染のトキソプラズマが再活性化し死に至ることもある。また、妊娠時の初感染では垂直感染を引き起こし、胎児が水頭症や網脈絡膜炎などの重篤な症状を呈することがあるため重要な寄生虫疾患の一つとして挙げられている。しかし、トキソプラズマを完全に駆除する薬剤は存在せず、確定診断の遅れによる重症化や後遺症を残す患者も多い。

近年の分子疫学調査により、トキソプラズマは遺伝的に異なる3つのクローンに分類され、そ

れぞれ病原性が異なることが明らかになっている。このことは、トキソプラズマ症の診断や治療において起因原虫の遺伝子型の分類が重要であることを示す。これまで、遺伝子型の分類のためにSAG2遺伝子座におけるnested PCRの電気泳動パターンが用いられてきたが、典型的でない塩基配列の遺伝子をもつ原虫の場合などは対応が困難であった。近年では、解析する遺伝子座を増やすことや(BTUB, GRA6, SAG3遺伝子など)、全ゲノムシーケンスによって遺伝子型を分類する方法が検討されているが[1]、解析に用いる遺伝子の選定や手技の複雑さ、解析にかかるコスト面など多くの課題が残る。このような状況の中、我々は、トキソプラズマの遺伝子型解析の新規標的としてミトコンドリアゲノム(mtDNA)に注目している。mtDNAは交配の影響を受けず保存性が高いため他の多くの生物において分子系統分類に用いられているが、トキソプラズマのmtDNAについては塩基配列やゲノム構造などの基本的な情報が公開されていない。そこで本研究では、トキソプラズマmtDNAの遺伝子型解析に向け、トキソプラズマmtDNAの特性の解明を目指した。

方 法

トキソプラズマのmtDNAの塩基配列や構造はまだ報告がないため、トキソプラズマの全ゲノムシーケンス情報が公開されているwebページ(ToxoDB[<http://toxodb.org/toxo/>])より、断片的なmtDNAに関連する塩基配列を取得した。取得した情報をもとにmtDNAにコードされていると考えられる2つのタンパク質コード遺伝子(シトクロムcサブユニットI [*coxI*]及びシトクロムb [*cob*])を標的としたプライマーをそれぞれ設計し、本研究室で継代維持している*Toxoplasma gondii* RH株のDNAの部分配列をPCRによって増幅後、増幅産物の塩基配列を決定した。

次に、mtDNAのコピー数を算出するために、核ゲノムがコードするシングルコピー遺伝子ACT1及びmtDNAに存在する*coxI*遺伝子を標的としたプライマーを設計し、real-time PCRを行った。さらに、トキソプラズマmtDNAのゲノム構造を明らかにするために、線形ゲノムを末端から分解するエキソヌクレアーゼ(Plasmid-

Safe™ ATP-Dependent DNase, Epicentre社)を用いた分解試験を行った。エキソヌクレアーゼによる分解試験では、対照として環状プラスミドを用い、分解の割合は酵素反応前後の*coxI*遺伝子の存在量より算出した。*coxI*遺伝子の定量には、mtDNAのコピー数の算出時と同様に、real-time PCRを用いた。

結 果

PCRの結果、12のプライマーの組み合わせでDNA断片の増幅が確認された。これらの増幅産物の塩基配列を決定し、アッセンブルしたところ2つのcontigが生成された。これら2つのcontigは*coxI*及び*cob*遺伝子の全長もしくは部分配列を含んでいた。さらに、このうち1つのcontigには、トキソプラズマではこれまでに同定されていなかったシトクロムcサブユニットIII (*cox3*)の全長領域と推定される塩基配列が存在していた。*coxI*遺伝子を標的としたreal-time PCRでは、1原虫あたり50コピー程度のmtDNAの存在が推定された。エキソヌクレアーゼを用いた分解試験では、環状プラスミドの分解の割合が5.1%であったのに対し、トキソプラズマmtDNAでは99.5%であった。この結果はトキソプラズマmtゲノムの構造が線形であることを示唆する。

考 察

これまでに、トキソプラズマのmtDNAでは*coxI*及び*cob*の2つが同定されているのみであった。この要因の一つとして、トキソプラズマの核ゲノムに*coxI*及び*cob*遺伝子の断片配列が複数コピー存在するため、PCR増幅産物による塩基配列の決定を困難にしていたことが挙げられる。本研究では、プライマー設計の際にトキソプラズマの全ゲノム情報から核ゲノムにマッピングされないcontig配列を用いたため、mtDNAにのみ存在する*cox3*遺伝子の検出に成功したことが考えられた。

本研究では、i) トキソプラズマのmtゲノムが線形ゲノムであること、ii) mtDNAの塩基配列が複数存在すること、iii) 1原虫あたり約50コピーのmtDNAが存在することが明らかとなった。これらの結果よりトキソプラズマのmtゲノ

ムは、遺伝子配置やサイズが多様な複数の線形分子によって構成されていることが推定された。このようなmtゲノムの存在様式は他の近縁な寄生性原虫では確認されておらず新規の発見である。

今後は、本研究室で20年間にわたり蓄積されているトキソプラズマ症の臨床検体における *cox1* 遺伝子の全塩基配列を決定後、従来の分子系統解析法との比較を行う予定である。トキソプラズマの *cox1* 遺伝子による新規遺伝子型分類法が確立されれば、より簡便なトキソプラズマ症治療法の選択が可能となることが期待される。

文 献

- 1) Su C et al. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. Proc Natl Acad Sci USA 2012; 109: 5844-9.

5. 慢性骨髄性白血病治療時の薬剤感受性・耐性機構に関する研究

千葉大学大学院薬学研究院 生物薬剤学研究室
青木重樹

はじめに

近年、酸素の有無に関わらずエネルギー産生を解糖系に依存するがん細胞特有の代謝系や、autophagyなどの解糖系以外のエネルギー獲得機構が、がん治療の新たな標的として注目されている。これら代謝系に対し、チロシンキナーゼ阻害剤（以下TKI）が影響を及ぼすという報告があるが、これらの薬剤は長期投与を原則とするにも関わらず、経日的な薬物曝露によるエネルギー代謝系の変動や薬剤感受性への影響に対する知見は乏しい。

我々は先行研究において、ヒト由来慢性骨髄性白血病（CML）細胞株であるK562細胞に対して、経日的にimatinib（IM）0.1 μ Mを処理することで、高濃度IM 15 μ Mに対する薬剤感受性が増強し、解糖系の最終産物である乳酸の産生量が低下することを見出している。この結果から、TKIの経日的曝露によるエネルギー代謝の変動が抗がん剤の感受性に影響を及ぼすことが示唆された。そこで

我々は、このエネルギー代謝の変動により引き起こされ得る autophagy などの代謝経路や分子シグナル変動を薬剤感受性と結びつけることで、将来的には薬剤耐性機構の理解や薬物治療戦略の提案に繋がると考え、種々の検討を行った。

方 法

(i) 最も顕著な乳酸産生量の低下が認められた低濃度IM曝露3週間の細胞株（K562-3wk）のATP量をCellTiter-Gloにより測定した。次に、LC3を指標として、ATP量の減少に伴った autophagy の活性変動をWestern blotting法により評価した。さらに autophagy ががん細胞の生死に与える影響を検討するため、autophagy 阻害剤であるchloroquine（CQ）10 μ M曝露に伴う細胞毒性をフローサイトメーターにより評価した。(ii) IMの経日的曝露によるIM感受性増大が、他の抗がん剤においても同様に確認されるかを検討するため、K562-3wk株を用いて、様々の抗がん剤に対する感受性を評価した。(iii) K562-3wk株におけるTKI感受性の増大が解糖系関連の分子シグナル変動によるものであると考え、mTOR（mammalian target of rapamycin）に着目し、細胞内シグナル伝達の観点から検討を行った。さらにIMの経日的曝露による分子シグナルを模倣するため、mTOR阻害剤であるrapamycin（Rapa）10nMやAMPK活性化剤であるmetformin（Met）1 mMを併用することによるIM感受性の変動を評価した。(iv) CQによるIM感受性増強効果を検討するために、(iii)にCQを併用した条件でIM感受性の変動を評価した。

結 果

(i) K562-3wk株において、IM非曝露のK562細胞と比べ60%程度のATP量の減少が認められ、LC3IIタンパク質発現量の上昇から、autophagyの亢進が確認された。さらにCQによる細胞死が確認されたことから、autophagyが解糖系抑制時におけるK562細胞の生存に寄与することが示された。(ii) TKIであるdasatinibやbosutinibでは感受性の増大が確認される一方で、methotrexateやcytarabineなどのDNA障害型抗がん剤の多くでは感受性の低下が認められた。このことから、IMの経日的な曝露による解糖系の抑制がTKI特