

- 4) 千葉明生, 杉本真也, 佐藤文哉, 堀 誠治, 水之江義充. 迅速な非侵襲的バイオフィルムマトリクス抽出法の開発. 第37回日本分子生物学会年会, 横浜, 11月.
- 5) Okuda K, Sugimoto S, Iwase T, Tajima A, Yamada S, Mizunoe Y. Effects of bacteriocins on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm. 19th World Congress on Advances in Oncology and 17th International Symposium on Molecular Medicine. Athens, Oct.
- 6) 杉本真也, 有田(森岡)健一¹⁾, 山中邦俊¹⁾, 小椋光¹⁾ (¹熊本大), 水之江義充. 分子シャペロン DnaK はタンパク質のフォールディングと局在化を介してバイオフィルム形成を制御する. 第37回日本分子生物学会年会. 横浜, 11月.
- 7) Sugimoto S, Okuda K, Sato M¹⁾, Sato C¹⁾ (¹National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), Mizunoe Y. Fine structures of biofilms in solution visualized by atmospheric scanning electron microscopy. 19th World Congress on Advances in Oncology and 17th International Symposium on Molecular Medicine. Athens, Oct.
- 8) 水之江義充. (シンポジウム2: 感染症治療の問題点とその克服 ~基礎ならびに臨床から~) バイオフィルム形成による治療抵抗性を示す感染症 (Device-related infection) とその克服. 医療薬学フォーラム 2014/第22回クリニカルファーマシーシンポジウム. 東京, 6月.
- 9) 有田(森岡)健一¹⁾, 山中邦俊¹⁾, 水之江義充, 小椋光¹⁾ (¹熊本大), 杉本真也. 分子シャペロン DnaK を標的とする低分子化合物を用いた新たなバイオフィルム阻害法の開発. 第37回日本分子生物学会年会. 横浜, 11月.
- 10) 岩瀬忠行. 哺乳類腸内における窒素固定. 文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「安定同位体医学応用研究基盤拠点 (SI 医学応用研究基盤拠点) の形成」第5回研究報告会. 東京, 3月.
- 11) 岩瀬忠行. 細菌学研究の流れ. 細菌学次世代構想研究会. 岐阜, 3月.

IV. 著 書

- 1) 水之江義充. 3. 細菌学各論 3.1. グラム陰性細菌 3.1.4. グラム陰性球菌および球菌 a. ナイセリア属, b. モラクセラ属, c. アシネトバクテラ属. 荒川宜親 (名古屋大), 神谷 茂 (杏林大), 柳 雄介 (九州大) 編. 病原微生物学: 基礎と臨床. 東京: 東京化学同人, 2014. p.96-7.

熱帯医学講座

教授: 嘉糠 洋陸 寄生虫感染と衛生動物学
准教授: 石渡 賢治 寄生虫感染と粘膜免疫

教育・研究概要

I. 消化管寄生線虫2種の混合感染による相互作用

ヒトの消化管寄生線虫は長期に渡って感染し、しばしば混合感染をしている。この寄生に対して宿主免疫は Th2 応答を発現し、腸管内環境をダイナミックに変化させるが、結果的には排虫に至らない。マウスの実験では、腸管からの排虫は IL-13/Stat6 を介したシグナルに大きく依存していることが明らかとなっている。*Nippostrongylus brasiliensis* (Nb) は経皮感染後3日で小腸に到達し、10日には IL-13/Stat6 依存性に排除される。一方、*Heligmosomoides polygyrus* (Hp) は経口感染後、一旦小腸の筋層内で発育して8日に管腔に戻り、Th2 応答を誘導するものの、2ヶ月は感染し続ける。今回、ヒトの感染モデルと考えられる Hp 感染に対して、急性に感染が終息する Nb を感染させた際の、両種の寄生動態について検討した。Hp 感染後10日に Nb を感染させて、Nb が Hp の感染に乗じて長期間定着するかどうか、逆に、Nb が排除される時期 (感染後10日) に Hp が筋層から管腔に戻るように Hp を後追い感染させて、Hp が Nb と共に排除されるかどうかなどを検討した。その結果、1) 先行感染した寄生虫は他種の後続感染によって寄生期間を延ばし、一方、2) 後続感染寄生虫は、先行感染寄生虫によって誘導された宿主免疫応答の影響を受けること、さらに、3) 虫卵形成は排除とは別に宿主免疫の影響を受けやすいことが示唆された。単独感染による排虫機構解析から「寄生虫種によって排除機序が異なる」という概念が提唱されてきているが、自然界での事象をより反映させた本実験系は「宿主免疫応答を介した寄生虫間相互作用」において新しい概念を提唱すると考える。

II. フィラリアの生活環における環境応答性トランジション

寄生性線虫であるフィラリアの生活環は、媒介昆虫 (蚊) と哺乳動物宿主の2つの動物ステージを経て完結する。この際、蚊-宿主間の移行に伴う温度変化の乗り越え (適応) システムを解明するため、犬フィラリア (*Dirofilaria immitis*) の第3期幼虫 (L3) における脱皮機構をモデルとして解析した。

このL3は、吸血時に蚊から宿主へ移行する際に、急激な環境変化を経験する。フィラリアの脱皮を *in vitro* で再現し、温度 (37°C) と栄養環境の2つが蚊から宿主への移行時におけるフィラリア発育の重要な刺激因子であることを見出した。その際、自由生活線虫である *C. elegans* では、熱応答パラメータである *hsp70* の発現が持続的に維持されるのに対し、フィラリアではごく短時間にその応答が収束することが明らかになった。これらの環境刺激によって誘導されるL3内部の変化を明らかにするため、cDNA サブトラクション法を用いて温度変化前後での遺伝子発現を比較したところ、クチクラ関連因子 (*cut-1*) に加え、フォン・ヴェレブランド様因子 (*vWFA*) およびシステインプロテアーゼであるカテプシン-Lが単離された。これらの遺伝子のノックダウンによりL3の脱皮が抑制されたことから、寄生性線虫であるフィラリアは、温度変化に対する適応機構とともに、それを刺激としてライフサイクルを促進する遺伝子制御メカニズムを有することが示された。フィラリアは、温度変化を利用して乗り越えのみならず発育の切り替え (トランジション) を行っていると考えられる。

Ⅲ. 微小プレートを用いた寄生虫の宿主細胞侵入過程の多角度共焦点観察

寄生虫の宿主細胞への侵入過程を観察する際、共焦点顕微鏡観察により細胞の三次元立体画像を再構築する技術が広く用いられている。しかし光学系の原理的な問題により、再構築画像のz軸方向における解像度は、x-y平面と比べて低く、寄生虫の侵入過程の高解像度観察が困難であった。従来、台座や対物レンズの傾斜化を行い顕微鏡上の光路を傾斜化することで、細胞断面を全てx-y平面で観察する試みがなされてきたが、傾斜角度の最適化が難しく、寄生虫の微小構造の観察が依然困難であった。そこで、宿主細胞を外部磁場で操作する微小プレートについて検討した。任意の角度に細胞を傾斜化状態で共焦点観察を行い、細胞断面を全てx-y平面で観察することで高解像度な断面像の取得が可能となる。微小プレートを構成するパリレンの表面には、寄生虫の宿主細胞が培養されており、微小プレートの中には磁場応答性金属が内包されているため、細胞が培養された微小プレートは外部磁場により任意の方向に傾斜化されることを確認した。これにより配向状態を維持した状態で観察したい断面をx-y平面でスキャンすることで、取得された寄生虫感染細胞の断面の画像が高解像度で取得でき、寄生虫の

侵入時における細胞の内部構造の変化の詳細な理解が可能となった。トキソプラズマ原虫の宿主HFF細胞への侵入過程解析を試みたところ、トキソプラズマタキゾイト侵入時のアクチンや微小管の各繊維断面やその変形を観察することに成功し、宿主細胞と原虫の境界面での細胞骨格上の相互作用が示唆された。

Ⅳ. 熱帯熱マラリアにおける重症化と宿主血中アミノ酸群動態の相関

熱帯熱マラリア患者は、適切な処置が行われない場合、重症貧血や脳性マラリアなどの重篤な症状を呈する。マラリア原虫は、赤血球内にて分裂・増殖を繰り返す際、感染宿主から様々な栄養素を取り込む。マラリア原虫は大半のアミノ酸合成経路を欠いているため、アミノ酸源をヘモグロビンおよび血漿中の遊離アミノ酸に依存している。このことから、熱帯熱マラリア患者の病態と、アミノ酸群の血中動態との関連が予想された。そこで我々は、アミノ酸濃度とその変化をパラメータ化し、ヒトの臨床検体および齧歯類モデルを用いた解析を実施することにより、マラリア重症化とアミノ酸群の相互作用の検証を実施した。タイのマヒドン大学にて重症熱帯熱マラリアと診断された患者血清に関して、遊離アミノ酸およびその誘導体 (計35種類) について、網羅的な濃度パターン (アミノグラム) を測定した。その結果、患者血清アミノグラムは治療前後において顕著な差を有することが明らかとなった。同データをtwo-wayクラスター解析およびスピアマンの順位相関分析に供した結果、アミノグラムとマラリア重症化との間に相関関係が認められた。さらに、実験的脳性マラリアのモデルマウスを用いて、アミノグラムと脳性マラリアとの相互作用解析を行った。その結果、アミノグラムを変化させたマウスにおいては、原虫の増殖動態に変化は認められないままに生存率が上昇した。網羅的な宿主アミノ酸情報 (アミノ酸インフォマティクス) を解析パラメータとしたこれらの実験結果は、一部のアミノ酸群がマラリアの重症化に関与する仕組みを示唆する。

Ⅴ. マラリア媒介蚊腸管における対病原体防御機構

病原体媒介節足動物 (ベクター) の腸管は、病原体に対するベクター側最大の物理的防御壁であるが、その構造と病原体に対する防御機構の全容は明らかになっていない。中でも、マラリア原虫が侵入し易いとされる中腸細胞の存在については、これまで長く議論の対象となってきた。微絨毛をもたない細胞

が中腸に存在し、原虫はその細胞に侵入するという説と、原虫が侵入することによって微絨毛が欠失するという説である。これを明らかにするため、齧歯類特異的のマalaria原虫 (*Plasmodium berghei*) 感染血液を吸血させたハマダラカ (*Anopheles stephensi*) の中腸を取り出し、各種染色法を用い、原虫侵入時の中腸構造を共焦点レーザー顕微鏡で詳細に観察した。その結果、感染中腸では一層の細胞列から突出している細胞が観察された。その体腔側では両側の細胞が隙間を埋めており、従って突出細胞が細胞列から押し出されている状態であった。さらに、これらの細胞では中腸内腔側表面の微絨毛が欠失していることを明らかにした。また多くの場合において、突出細胞の体腔側に原虫が観察された。つまり、このような突出細胞は、原虫が一度侵入し、次の細胞へと脱出したものであると考えられる。一方、非感染ハマダラカの中腸細胞層内腔側は均一であり、全ての細胞に微絨毛が存在することも示した。これらの結果は、ハマダラカにおいては後者の説を支持するものである。従って、ハマダラカの中腸は原虫が侵入した細胞を細胞ごと押し出すことにより排除を試み、他方原虫は中腸細胞にランダムに侵入し、ハマダラカの排除メカニズムを逃れるため次々と細胞を移動していることが示された。このような両者の闘ぎ合いにより、ハマダラカ体内のマalaria原虫数がコントロールされていると考えられる。

VI. 中間宿主甲虫の小形条虫に対する感染コンピテンシー

小形条虫や縮小条虫、瓜実条虫などの条虫は、その生活環に中間宿主として甲虫、ノミ、シラミ、アリなどの節足動物を必要とする。いずれの場合も、節足動物が虫卵を経口で取り込むことで、孵化した六鉤幼虫が体腔内で擬嚢尾虫となり、ヒトやイヌ、ネコなどの終宿主に中間宿主ごと捕食される機会を待つ。進化的な起源は同一と推測されるこの特殊な生活環と感染戦略は、節足動物と条虫の間の相互作用が織りなす、適切なバランスの上に成立している。これらの条虫では、昆虫の体内で六鉤幼虫が中腸壁を通過した後、擬嚢尾虫 (シスチセルコイド) に成長し終宿主への感染性を獲得する。擬嚢尾虫は、昆虫の体腔から排除されることなく、長期間にわたり寄生することが可能であるため、中間宿主と条虫の間の相互作用は皆無か、またはその貢献度は軽微であると考えられていた。

条虫感染時の中間宿主昆虫における相互作用の有無を明らかにするため、甲虫目昆虫コクヌストモド

キ (*Tribolium castaneum*) を中間宿主とした小形条虫 (*Hymenolepis nana*) 感染実験系において、逆遺伝学的アプローチにより条虫感染に関与する中間宿主側遺伝子を探索した。この昆虫はゲノム解読が終了していることに加え、RNA干渉 (RNAi) が極めて鋭敏に作用する生物として知られている。小形条虫感染時に腸特異的に発現変動する遺伝子群をRNAseqにより網羅的に解析したところ、抗菌ペプチド等の発現上昇が明らかになった。自然免疫経路および関連するシグナル伝達経路を構成する98個の遺伝子について、それぞれ二本鎖RNAインジェクション法によってコクヌストモドキにRNAiを誘導し、小形条虫感染後の擬嚢尾虫数をもとに解析を実施した。その結果、自然免疫応答のコンポーネントであるToll経路を阻害すると、擬嚢尾虫感染数の増加が認められた。これらの結果から、中間宿主の小形条虫感染に対するコンピテンシーとそれを制御するシグナル伝達経路の存在が示唆された。

VII. 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) ウイルスのマダニにおける垂直感染

吸血性節足動物であるマダニは、ライム病、日本紅斑熱、重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) などの重篤な疾患を発症させる病原体を媒介する。マダニの病原体伝播メカニズムを解析するため、マダニ媒介性重症熱性血小板減少症候群ウイルス (SFTSV) を対象とし、野外棲息マダニにおける感染状況の把握と、SFTSVのマダニ生活環における動態の解明を試みた。日本紅斑熱流行地域であり、SFTS死亡患者発生地域である山林地帯 (20km四方、九州南部) 15ヶ所に定点を設け、Flagging法によるマダニ採取を3年間 (2013~2015年、マダニの活動時期にあわせ、採取時期は4月および10月に限定) にわたり計4回実施した。採取したマダニ類は、16S-rRNA遺伝子による種同定に加え、SFTSVおよび日本紅斑熱リケッチア遺伝子のRT-PCR法による検出に供した。その結果、日本優占種であるフタトゲチマダニ (*Haemaphysalis longicornis*)、キチマダニ (*H. flava*)、タカサゴチマダニ (*H. formosensis*)、ヤマアラシチマダニ (*H. hystricis*) の4種からSFTSV遺伝子が検出された。本地域におけるSFTSV・日本紅斑熱リケッチア保有率は9%~20%で推移し、全てのマダニ発育ステージ (幼ダニ・若ダニ・成ダニ) で検出された。SFTSVのマダニ感染経路として、レゼルボア野生動物が重要と考えられているが、孵化後の未吸血の幼ダニからもSFTSVを検出したことから (陽性率8.6%, n =

173), 垂直感染経路の存在が示唆された。また, 野外採取した幼ダニを, ラットを宿主として1世代継代した後, 孵化した幼ダニを調べた結果, 約10%の幼ダニからSFTSV mRNAが検出された。これらの結果から, SFTSVはマダニの病原体排除機構を逃れ長期にわたり感染し, 親ダニから子ダニへの垂直感染経路を利用して自然界で維持される可能性が示唆された。

「点検・評価」

1. 研究について

講座が対象とする研究領域は, 原虫学, 蠕虫免疫学ならびに衛生動物学である。各種寄生虫種の生活環全体を俯瞰的に構築できることが大きな特色であり, それが講座独自の研究を支えている。新たに助教1名が加わり, 講座研究体制がより若返ると同時に新しい実験技術や病原体・媒介節足動物等が補完され, 新規と既存研究テーマとの有機的連携が促進された。研究費では新たに文科省科研費3件(基盤研究(B)2件, 挑戦的萌芽研究1件)を獲得し, 十分な研究遂行体制を維持している。また, 従来の西アフリカ研究拠点について, 日本学術振興会研究拠点形成事業の支援を新規に得ることに成功し, ブルキナファソ(ワガドゥグ大学)およびナイジェリア(イバダン大学医学部)とのマラリア媒介蚊に関する共同研究をさらに推進した。このような状況と成果のもと, 本講座が中心となり, 先端医学推進拠点群に衛生動物学研究センターを設置した。医科学分野における節足動物を研究する, 日本の国公立大学における初めての専門研究機関であり, 本講座との有機的連携をもとに, 研究の深化が期待される。熱帯医学は寄生虫学・医動物学を内包し, その研究対象も多岐に渡る。当講座は, 伝統的に講座構成員が個別の課題に取り組む姿勢を堅持している。感染症が研究対象ゆえ, 重要な課題は時々刻々と変化し, また研究そのものの技術革新も進んでいることから, より普遍的で新しい概念を常に模索する姿勢が肝要である。また, 突如出現する新興・再興感染症について, 社会の公衆衛生的受容に応え, 流動的に対応できる“研究実践力”を身に付けることが望ましい。

2. 教育について

全教員が「寄生虫と感染」ユニットの講義と実習, 「感染・免疫テュートリアル」「研究室配属」および「選択実習」を, 一部教員が「免疫と生体防御ユニット」を担当した。寄生虫症自体はマイナーな鑑別疾患でありながら, 何れの診療科にも現れる可能性が

あるステルス型疾患であることから, 従来のコアカリキュラムに準拠しつつも医療現場のニーズに則した講義・実習を心掛けた。加えて, 寄生虫症等感染症の国内での疾病構造の急激な変化, および国際社会の発展に伴う熱帯由来感染症のボーダーレス化を踏まえ, 寄生虫講義のシラバス再検討と, 実習内容(特に検査法項目)の追加拡充を実施した。講義ではトコジラミやイエダニ等, 節足動物による咬刺症等を「衛生動物」として追加した。実習では, 学生数増への対応と教育効果上昇を狙い, グループ別のローテーション型実習を実施した。担当教員がそれぞれの項目に専従になるため, より練度の高い実習内容の提供が可能になった。加えて, 本講座が独自のフィールド展開支援の枠組みにより, 3年次の医学科学生1名をブルキナファソでの共同研究に帯同させた。次年度以降も講義・実習の一部を流動的に扱い, 新興・再興寄生虫症に対応可能な医学教育を試みる。

研究業績

I. 原著論文

1) Teshima T¹⁾, Onoe H¹⁾²⁾, Aonuma H, Kuribayashi-Shigetomi K¹⁾, Kamiya K (Kanagawa Academy of Science and Technology), Tonooka T¹⁾, Kanuka H, Takeuchi S¹⁾²⁾ (¹Univ of Tokyo, ²Japan Science and Technology). Magnetically responsive microflaps reveal cell membrane boundaries from multiple angles. *Adv Mater* 2014; 26(18): 2850-6.

II. 総説

- 1) 嘉糠洋陸. エボラ出血熱・SFTS・デング熱 感染症はどこから現れ, どこへ行くのか. *実験医* 2015; 33(1): 72-8.
- 2) 日向綾子, 横山卓也, 嘉糠洋陸. 中間宿主としての甲虫と糸虫の相互作用. *獣医寄生虫学会誌* 2014; 13(2): 86-90.