

川裕士, 前橋恭子, 岩楯公晴. 脳腫瘍が原因と考えられる浴槽内溺死の1剖検例. 第81回日本法医学会学術関東地方集会. 高崎, 10月.

- 7) 福井謙二, 落合恵理子, 戸田利津子, 岩楯公晴. 生体口腔粘膜細胞からの簡便なDNA抽出法の検討. 第49回日本犯罪学会総会. 東京, 12月. [犯罪誌 2013; 79(3): 94-5]

## 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  
講師: 熊谷 正広 寄生虫症の検査・診断法の開発

### 教育・研究概要

#### I. 腸管寄生虫に対するマウス小腸ムチンの変化

消化管粘膜では, 高分子糖蛋白であるムチンを主成分とする粘液が防御因子として機能していると考えられている。これまで, ネズミの腸管寄生線虫である *Nippostrongylus brasiliensis* (Nb) 感染に対して2型サイトカインである IL-13 依存性にムチンへのシアル酸の付加を認め, それが排虫に関与する可能性をマウスにおいて示してきた。この現象が Nb 感染に固有なものかどうかを検討するために, Nb と同様に小腸に定着する *Heligmosomoides polygyrus* (Hp; 線虫) と *Vampirolepis nana* (Vn; 条虫) 感染に対するムチン応答を調べた。Nb 感染では, 排虫時期に寄生部位である空腸でムチン量が顕著に増加し, そのムチンは抗シアロ糖鎖抗体と反応した。Hp の一次感染では排虫は遷延し, 一次感染虫体の駆虫後4週での再感染 Hp は2週以内に排除される。一次, 二次感染ともにムチン量は排虫の有無に関わらず増加し, 抗シアロ糖鎖抗体と反応した。Vn 感染に対しては, 排虫時期に寄生部位である回腸でムチン量が増加し, 抗スルホ糖鎖抗体と反応した。線虫感染に対してシアロムチン, 条虫感染に対してスルホムチンの産生亢進を認めた。Vn 感染に対する寄生部位でのスルホムチン産生は, 排虫後速やかに元の状態へ戻っていたことから, 排除に関与する可能性が示唆される。機械的な防御因子との認識が強い粘液が, 寄生虫種によって免疫応答仲介性に性状を変化させ, 一部の寄生虫種においてその変化が排除に関与する可能性を示唆したものといえる。

#### II. 超高速シーケンサーを用いた *Entamoeba* のトランスクリプトーム解析

我々は, 学外との共同研究で, *Entamoeba histolytica* (赤痢アメーバ) と *E. invadens* (爬虫類に寄生のアメーバ。赤痢アメーバと形態と生活環が類似しており, 培養液中で容易に嚢子形成を誘導できるので赤痢アメーバの嚢子形成の代替モデル生物として使われている。) のトランスクリプトーム解析を行ってきている。mRNA の転写開始点 (TSS)

を正確にかつ大量に決定するために、オリゴキャップ法を用いた。まず、5'末端が欠失していないcDNAの全長シーケンス (full-length cDNA sequence) を行った。次に、オリゴキャップ法と次世代シーケンサーを組合わせた TSS から始まる30数塩基の大量シーケンス (TSS-seq) を行った。これらのシーケンス・データの解析結果から、これまでに、両種のアメーバの5'非翻訳領域 (5' UTR) が非常に短い (それぞれ、平均 12.38 nt, 8.15 nt) ことを初めて網羅的 (それぞれ、全予測遺伝子の 37%, 25%) に明らかにした。今回、TSS 近傍および上流のモチーフ (共通配列) および TSS に対して位置特異的に高頻度に出現する塩基の検索を行った。ひとつの遺伝子に対して複数の TSS が認められたため、これらを TSS クラスターとして捉えた。クラスター内の塩基の比率は、プリン (G または A) : ピリミジン (C または T) = 9 : 1 という特徴がみられた。各 TSS クラスターのなかで最も頻度が高い TSS の 70% 以上が A であり、そのひとつ上流の塩基の 80% 以上はピリミジンであった。TSS の上流に5つのモチーフが認められ、そのうち、'AACT', 'TAT (A/T) (T/A) AA' が TSS に対して位置特異的であり、'AACCT' と 'AGGGTT' という相補的なモチーフが存在し、また、'GGAA' は位置特異的であり、このモチーフをもつ多くの遺伝子は、*E. invadens* の嚢子形成時にのみ発現することが明らかとなった。

### Ⅲ. BD シュアパス™を用いた赤痢アメーバおよびジアルジアの染色標本の簡易作成法

BD シュアパス™ (ベクトン・ディッキンソン) は、液状処理細胞診システムで、プラスに帯電させたプレコートスライドにマイナスに帯電している細胞を吸着させることによって行う新しい細胞塗抹法である。我々は、本来はババニコロウ染色を行うこの細胞診のシステムの手順を大幅に改変・省略し、トリクローム染色の改良法に繋げることによって、赤痢アメーバとジアルジアの嚢子の塗抹染色標本を容易に作製することができた。まず、便をコーン染色の基本液に入れて懸濁し、静置して固定した。固定後、再懸濁し、セトリングチャンパー (プレコートスライドガラスに密着させたプラスチックの筒) の中に入れ、10分以上静置した。チャンパーをはずし、スライドガラスを70%エタノールに浸漬後、トリクローム染色を行った。その結果、便はスライドガラス上に薄く均一に塗抹され、赤痢アメーバ、ジアルジアともに、染色された嚢子は核、カリオソーム等

の内部構造が明瞭に識別できた。直接塗抹では便を薄く均一に塗抹することが困難なため、作製した染色標本は、塗抹の厚い部分の原虫の形態が見えにくく、また、染色にムラができやすい。さらに、塗抹に時間がかかる、何日も経ってから標本をつくることができない、水様便では塗抹が剥がれやすいという欠点もある。BD シュアパス™を用いた我々の方法ではこれらの欠点を改善することができた。

### Ⅳ. 肝内型マラリア原虫と宿主間相互作用の分子メカニズム

世界最大の感染症の一つであるマラリアは、年間の罹患患者数3~5億人、死亡者数は約100万人にもおよぶ。そのため効果的な対策として、マラリアワクチンの開発に期待が寄せられているが、残念ながら未だ有効な感染防御ワクチンは開発されていない。これはマラリア原虫が防御免疫の標的部位を多様に変化させることが大きな要因だとされており、そのため次世代のワクチン開発には、細胞性免疫の活性化を含めた多方面からの検討が必要であると考えられている。そこで我々は、マラリア原虫感染ステージで、最も宿主の免疫応答に曝されている肝内型期に着目し、細胞性免疫応答や様々な宿主応答メカニズムの解明を試みている。まず初めに、宿主と原虫を隔てる“最前線”の膜である寄生胞膜 (PVM) に着目し、宿主肝細胞の原虫感染による変化や PVM に対する宿主応答を明らかにすることを試みた。これまでの我々の研究から、肝内型マラリア原虫に対して感染初期 (感染24時間以内) に宿主オートファジー (Atg) の応答が観察されるが、感染後期 (40時間以降) には観察されず、またその応答は PVM に依存する事が明らかとなった。今後は、この現象が①マラリア原虫による宿主ハイジャック応答なのか、②宿主による原虫排除ディフェンス応答なのかを明らかにする予定である。このような原虫-宿主間作用メカニズムを一つずつ明らかにすることで、次世代のワクチン開発に応用できる情報を得られることが期待される。

### Ⅴ. マラリアをモデルとした重症化と宿主血中アミノ酸ダイナミクスの相関解析

年間約100万人の死者を出すマラリアは、複雑なライフサイクルを有するマラリア原虫によって引き起こされ、血中ステージの原虫が宿主に重篤な症状をもたらす。マラリア原虫は、大半のアミノ酸生合成経路を欠いており、アミノ酸源を主に宿主の血中に依存している。宿主のアミノ酸群代謝合成経路は、

複雑な栄養ネットワークを構成していることから、宿主血中アミノ酸とマラリアの病態との相関が示唆される。しかしながら、それらの詳細は明らかとなっていない。我々は、宿主血中のアミノ酸動態をパラメータ化し、致死性の齧歯類特異的マラリア原虫 (*P. yoelii* および *P. berghei*) を用いることにより、以下のような知見を得た。マラリア原虫感染前後のマウス血漿・肝臓のアミノ酸およびその誘導体 (計 35 種類) について、網羅的濃度パターン (アミノグラム) を測定した。その結果、赤血球感染率および個体致死率が上昇するに従って、血漿・肝臓のアミノグラムが劇的に変動することが明らかとなった。さらに、アミノグラムを多変量として扱いクラスター解析を行った結果、マラリア原虫感染後期群が、他のアミノグラムとは顕著に異なるグループを形成した。宿主アミノグラムは、飼料中のアミノ酸成分に強く影響を受ける。そのため、アミノ酸配合率を変化させた飼料の投与により、アミノグラムを人為的に変化させることが可能である。我々は上記の知見をもとに、特定のアミノ酸配合率を有する完全合成飼料を作製し、この飼料を投与したマウスへの原虫感染実験を試みた。その結果、重症マラリアのモデルマウス C57BL/6J において、飼料投与による原虫増殖動態の変化は認められないにも関わらず、宿主の死亡率が減少した。これらの結果は、マラリア発症宿主の重症化にアミノ酸を介する病原体との相互作用が影響することを強く示唆している。網羅的な宿主血中遊離アミノ酸情報 (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、感染症に対する新規アプローチの有効性を強く示唆するものである。

## VI. マラリア媒介蚊における腸内細菌と原虫の相互作用

病原体媒介節足動物 (ベクター) の腸管内には、多種多様な種によって構成される細菌叢が存在する。我々は、齧歯類特異的マラリア原虫 (*Plasmodium berghei*) と媒介節足動物であるハマダラカ (*Anopheles stephensi*)、そして広く昆虫から見出される非共生細菌であるセラチア菌 (*Serratia marcescens*) に着目し、限局されたコンパートメント内における生物間相互作用を解明することを試みた。セラチア菌の各種表現型の変化と、それに伴うハマダラカのマラリア原虫感染率の推移を詳細に観察する目的で、ハマダラカ中腸内に生着できないセラチア菌野生株 (HB3) に、蚊の中腸内で選択圧を与えることによって、セラチア菌の形質転換をおこなった。その結果、

蚊の中腸内に生着可能な菌株 (HB18) を作出することに成功した。オリジナル菌株である HB3 は、各種表現型が多様であるのに対し、HB18 は細胞形態の多様性および鞭毛の形成能力が著しく減少していることが明らかとなった。さらに、HB3 はマラリア原虫の分化抑制能を有する一方、HB18 はこの能力が欠損していることも明らかとなった。マラリア流行地域である西アフリカ・ブルキナファソにて野生ハマダラカを採取し、その中腸から分離されたセラチア菌群について解析したところ、細胞形態および鞭毛の形成能力とマラリア原虫抑制能力の間には強い相関関係が見出された。これらの結果は、腸管内非共生細菌の表現型揺らぎの振幅が、節足動物の媒介能に影響を与えている可能性を示唆している。

## VII. ハエ類による病原体機械的媒介メカニズムの解明

節足動物による感染症媒介において、その感覚器官が重要な役割を持つことが知られている。マラリア媒介蚊などの吸血性節足動物は、分泌物、体温または CO<sub>2</sub> 濃度などを様々な付属肢により認識し、標的宿主を効率的に捉える。一方、イエバエのように、病原体を食品などに直接運ぶタイプの節足動物では、脚や体表などを介したシンプルな機械的伝播方式が主流であると考えられている。我々は、ハエ類による病原体の機械的伝播メカニズムを解析するために、実験モデル系を構築した。飢餓状態のキロシヨウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) を入れた寒天培地の中央に GFP 発現大腸菌を滴下し、その蛍光を追跡することにより大腸菌の挙動を解析した。その結果、シヨウジョウバエの腹部内に強い GFP の蛍光が認められた。さらに、寒天培地表面のシヨウジョウバエ糞内にも蛍光が観察されたことから、シヨウジョウバエは細菌を直接摂食し、糞を介して効率的に感染拡大を引き起こすことが示された。この媒介は、触覚を切除したシヨウジョウバエではほぼ消失し、嗅覚受容体サブユニットをコードする *ORCO* 遺伝子 (*Or83b*) の変異体シヨウジョウバエでもその効率は激減することから、シヨウジョウバエは細菌由来の化学物質を触覚における嗅覚により認識することが予想された。そこで、ガスクロマトグラフ質量分析 (GC-MS) を用いて大腸菌培養液を解析し、シヨウジョウバエ誘引物質の候補としてインドールを同定した。シヨウジョウバエにおけるインドール受容体の相同分子種 (オルソログ) は、性フェロモン受容体として知られる LUSH

である。我々は、このLUSH変異ショウジョウバエが媒介能力を失うことを示した。以上の結果から、病原細菌により産生されるインドールは、ハエ類を誘引するための性フェロモンの化学的擬態であることが示唆された。

## 「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名と外部資金によるポスドク1名が加わり、講座研究体制が若返ると同時に新しい実験技術や手技等が補完され、新規と既存研究テーマとの有機的連携が促進された。研究費では内閣府最先端次世代・研究開発支援プログラム1件、文科省科研費2件、財団助成金等1件、学内研究奨励費1件を擁し、十分な研究遂行体制を維持している。また、寄生虫感染実験に必須なP2実験室を5部屋に拡大し、名実共に「真核生物の病原体を研究対象とする最先端研究グループ」の基盤が整いつつある。このような状況のもと、宿主（媒介動物）と寄生虫間の相互作用に関する基礎研究課題を7つ実施した。また臨床指向研究課題として、寄生虫症の迅速・簡便診断法の開発と、ヒロズキンバエによるMaggot Debridement Therapyの技術改良を進めている。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。多様性のある研究テーマを、講座構成員の全員参加型議論により、前向きに検証することが望ましい。

### 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。しかし、寄生虫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寄生虫感染症のボーダーレス化を踏まえ、次

年度から寄生虫講義のシラバス再検討（講義内容選択など）と、実習内容（特に検査法項目）の追加拡充を進めるべく準備を開始した。

## 研究業績

### I. 原著論文

- 1) Makioka A, Kumagai M, Hiranuka K (Kyoto Univ.), Kobayashi S<sup>1)</sup>, Takeuchi T<sup>1)</sup> (Keio Univ.). Expression analysis of *Entamoeba invadens* profilins in encystation and excystation. *Parasitol Res* 2012; 110(6): 2095-104.
- 2) Nelson B, Freisinger T, Ishii K, Okado K, Shinzawa N, Fukumoto S, Kanuka H. Activation of Imd pathway in hemocyte confers infection resistance through humoral response in *Drosophila*. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 430(3): 1120-5.
- 3) Badolo A, Okado K, Guelbeogo WM, Aonuma H, Bando H, Fukumoto S, Sagnon N, Kanuka H. Development of an allele-specific, loop-mediated, isothermal amplification method (AS-LAMP) to detect the L1014F kdr-w mutation in *Anopheles gambiae* s. l. *Malar J* 2012; 11: 227.
- 4) 石渡賢治, 渡辺直照. 【サイトカインのすべて（完全改訂版）】細胞機能とサイトカイン T細胞のサブセットへの分化・機能発現とサイトカイン. *臨床免疫・アレルギー科* 2012; 57(Suppl.21): 670-7.

### III. 学会発表

- 1) 嘉糠洋陸, 伴戸寛徳, 岡戸 清, Guelbeogo WM, Badolo A, 青沼宏佳, 福本晋也, Sagnon N. 非共生細菌の表現型揺らぎが規定するベクター・寄生虫間相互作用. 第82回日本寄生虫学会大会. 東京, 3月.
- 2) Saiki E, Nagao K, Fukumoto S, Bannai M, Kanuka H. Amino acid-related host nutrition dynamics during malaria infection. *Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology: Malaria*. New Orleans, Jan.
- 3) Okado K, Kanuka H. Odor-based contagious transmission of pathogen by *Drosophila melanogaster*. 第10回日本ショウジョウバエ研究集会. 東京, 10月.
- 4) Saiki E, Nagao K, Fukumoto S, Bannai M, Kanuka H. Amino acid-related host nutrition dynamics during malaria infection. 第14回日韓寄生虫学セミナー. 宮崎, 5月.
- 5) 齊木選射, 長尾健児, 福本晋也, 坂内 慎, 嘉糠洋陸. マラリア原虫感染時の宿主血中アミノ酸インフォマティクス. 第82回日本寄生虫学会大会. 東京, 3月.
- 6) 石渡賢治. 寄生虫感染における腸管免疫の進歩. 第19回日本免疫毒性学会学術大会. 東京, 9月.

- 7) Yamanouchi K<sup>1)</sup>, Kida K<sup>1)</sup>, Kumagai M, Sasaki J<sup>1)</sup>, Inaba T<sup>1)</sup> (Hiroasaki Univ.). Seroprevalence survey of *Toxoplasma gondii* in swine in northern Japan. 1st AFSA (Asian Food Security Association) Conferences on Food Safety and Food Security. Osaka, Sept.

#### IV. 著 書

- 1) 熊谷正広. 24章：感染症・寄生虫疾患 17. 原虫感染症 ⑤リーシュマニア症, ⑥トリパノソーマ症. 門脇 孝 (東京大学), 永井良三 (自治医科大学) 総編集. 内科学：カラー版. 東京：西村書店, 2012. p.1887-9.

### 臨床検査医学講座

教授：栗原 敏	
(兼任)	
教授：鈴木 政登	臨床生理学
教授：大西 明弘	臨床肝臓病学
教授：吉田 博	循環器病学, 脂質代謝学
准教授：海渡 健	臨床血液学
准教授：須江 洋成	精神神経医学
准教授：杉本 健一	循環器病学
准教授：松浦 知和	臨床細胞生物学
講師：河野 緑	臨床微生物学
講師：秋月 摂子	病態検査学

#### 教育・研究概要

##### I. 臨床生理学に関する研究

肥満・糖尿病モデル OLETF ラットを用い、インスリン抵抗性指標の1つとされる骨格筋および肝臓のグリコーゲン (Gly) および中性脂肪 (TG) 含量に及ぼすカフェイン投与と自発走運動併用の影響を調べた。被検ラットは、25週齢から29週齢までの5週間、安静維持させた群 (Sed), 運動単独群 (Ex), 0.25%カフェイン混餌摂取安静維持群 (Caf), カフェイン摂取と運動併用群 (Caf&Ex) および正常対照安静維持群 (LETO-Sed) に分類された。Ex, Caf, Caf&Ex 群いずれも体重、内臓脂肪重量および肝 TG 含量が減少したが、Caf&Ex 群の減少が最も顕著であり、メタボリック症候群危険因子およびインスリン抵抗性改善にはカフェインと運動療法併用が望ましいことが示唆された。

##### II. 臨床微生物学に関する研究

日常検査では同定困難であった臨床分離菌株について 16SrRNA 遺伝子の塩基配列解析により菌種の推定同定を行った。

Panton-Valentine ロイコシジン (PVL) 毒素産生黄色ブドウ球菌の分離状況を第三病院中央検査部の皮膚・膿検体から分離された黄色ブドウ球菌を対象に調べた。86株中6株に PVL 遺伝子および毒素が確認され (7%), その内訳は対 MSSA では 5.1%, 対 MRSA では 11.1%であった。また分子疫学解析として SCCmec type, agr type および MLST 解析を行った。

##### III. 臨床化学に関する研究

1. *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) に対する除