

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. 腸管寄生線虫による慢性感染の初期免疫応答

ヒトの腸管寄生虫の多くは慢性感染している。マウスモデルでは、ほとんどの急性感染は感染後2週ほどで終息する。一方 *Heligmosomoides polygyrus* (Hp) は、8週頃まで感染が持続し、慢性感染のモデルと考えられている。Hpが慢性感染しうる機序を明らかにするために、感染初期の腸間膜リンパ節細胞をフローサイトメトリー解析し、急性感染モデルの *Nippostrongylus brasiliensis* (Nb) 感染のそれと比較した。樹状細胞 (dendritic cells; DC) のマーカーである CD11c とリンパ節への遊走に必須な CCR7、および抗原提示分子の MHC class II の発現を見ると、CCR7 陽性細胞は CD11c の発現が少し低く、class II の発現は最も高かった (DC1; CCR7^{high}CD11c^{int}class II^{high})。この DC1 樹状細胞は Hp の感染後4日には顕著に class II 発現を低下させ、同8日には細胞数も激減させた。Hp 感染後8日には CCR7 陽性細胞数そのものが激減していた。Nb 感染においては感染後5日より class II の発現低下を認め、DC1 は同8日には細胞数も減少させたが、CCR7 陽性のマクロファージおよび感染によって浸潤した好酸球が樹状細胞並みのレベルの class II 発現を示していた。また、抑制性のシグナルを伝達する PD-1 分子の CD4 陽性 T 細胞上の発現が Hp 感染後2日より8日にかけて上昇していた。Nb 感染において PD-1 分子の発現は感染後8日にわずかに認められるようになる。これらの結果は、寄生虫による抗原提示能の低下および T 細胞上の抑制性シグナルの発現増強が、感染を慢性へと変遷させる要因に関わっていることを示唆している。

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

Entamoeba invadens は爬虫類寄生のアメーバで、赤痢アメーバに形態・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ことから、赤痢アメーバの嚢子形成の代替モデルとして使われている。*E. histolytica* (赤痢アメーバ) と *E. invadens*

の網羅的なトランスクリプトーム解析を実施した。これまでに、両種のアメーバについて、mRNA の転写開始点 (TSS) を正確にかつ大量に決定することができるオリゴキャップ法を用いて、5'末端が欠失していない全長 cDNA のシーケンス (full-length cDNA sequence)、および、TSS から始まる30数塩基の cDNA (TSS タグ) の超大量シーケンス (TSS-seq) を行い、mRNA の5'非翻訳領域 (5'UTR) が非常に短いこと (平均12.4塩基および8.2塩基) 等を明らかにしてきた。今回、TSS-seq のデータを用いて、TSS の分布について解析した。5'UTR が平均10塩基前後と非常に短いにも関わらず、各遺伝子の TSS は1か所に限定されず、クラスターを形成していた。これらの TSS クラスターは1峰性、2峰性、多峰性に分布し、平坦な分布を示すものはなかった。各 TSS クラスターの尖度を計算して順位付けを行ったところ、TSS タグの数が多い遺伝子 (すなわち、高頻度に転写される遺伝子) ほど、尖度が高いことが明らかとなった。

III. ホルマリン固定したジアルジアのシストを用いた永久染色プレパラートの作製

ホルマリン固定した便中のジアルジアのシストを用いて、永久染色プレパラートを作製することはできなかった。それは、次の2つの理由による。(1) ホルマリン固定した便を塗抹することができなかった。(2) ホルマリン固定されたシストを永久染色に用いられる染色液で染色することができなかった。(1) については、BD シュアパス™ (ベクトン・ディッキンソン) を用いて解決した。BD シュアパス™ は、近年開発された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細胞「塗抹」法である。ホルマリン中のシストはスライドに塗抹されなかったが、水で遠心・洗浄した後のシストは塗抹された。(2) については、コーン染色を改変して用いることによって解決した。コーン染色は、基本液と呼ばれるアルコール系の固定液にクロラゾールブラックという黒色素を溶解して熟成させたものを固定・染色液として用いる染色法である。基本液を水で希釈したもの (10%刻み) を用意し、塗抹を低濃度~100%基本液に順次10分以上浸漬した後にコーン染色することによって、細胞質の収縮が見られず、シスト壁、核、カリオソーム、曲刺、鞭毛等の形態が明瞭に識別できる良好な永久染色プレパラートの作製に成功した。

IV. 肝内型マラリア原虫における寄生胞膜形成の分子メカニズム

マラリアは、死亡者数は約 100 万人にもおよぶ世界最大の感染症の一つであり、マラリア原虫の寄生により生じる疾患である。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、最も宿主の免疫応答に曝されている肝内型マラリア原虫、特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、PVM 形成における分子メカニズムの解明を試みた。これまでに我々は、肝内型マラリア原虫に特異的な分子のスクリーニングを行い、新たな特異分子“B9”を見出した。 $\Delta b9$ を用いた詳細な解析から、本株は肝内型原虫特異的に不完全な PVM を形成する表現型を示し、一遺伝子欠損により複数の PVM タンパク質の局在性を失わせることが明らかとなった。この $\Delta b9$ の表現型は、齧歯類マラリア原虫および熱帯熱マラリア原虫を用いた解析で共通であった。RT-PCR および抗 B9 抗体を用いた解析から、 $b9$ は転写後制御により発現調節される分子であることが明らかとなり、免疫蛍光抗体法により原虫 plasma membrane に局在する事が明らかとなった。さらに各種構造解析などから、B9 の推定立体構造は 6-Cys family protein に類似している事が明らかとなった。このような原虫-宿主の接点である PVM を形成する分子を明らかにすることで、原虫の宿主内生き残り戦略を明確にすることでワクチン開発につながる分子基盤情報を得ることが期待される。

V. マラリア媒介蚊腸管における対病原体防御機構と構造的恒常性維持機能

節足動物媒介感染症において、病原体に対する節足動物 (ベクター) 側最大の防御壁である腸管は、免疫応答の場であるとともに物理的な壁としても極めて重要であるが、その構造の詳細や機能は未解明のままである。我々は、マラリア原虫感染モデルとしてハマダラカ (*Anopheles stephensi*) と齧歯類特異的マラリア原虫 (*Plasmodium berghei*) を用いて、ベクター腸管の構造と病原体に対する腸管側防御機構の解析を試みた。病原体侵入時の中腸細胞の形態を、免疫染色を用いて共焦点レーザー顕微鏡で詳細

に観察した。その結果、マラリア原虫が侵入した細胞は細胞列から突出しており、両側の細胞から押し出されている様子が観察された。これは、原虫侵入によって損傷を受けた細胞を、腸管が押し出して隔離しようとしていると推測された。また、マラリア原虫を内包する細胞の多くで、ストレス応答に関わる JNK 活性化 (リン酸化) が亢進していることを明らかにした。これらの JNK 活性化細胞の多くにおいて、マラリア原虫を含むリン酸化 JNK に強染されるカプセル様構造が多数見られた。つまり、病原体が侵入した細胞は JNK を活性化させ、細胞内に病原体を囲い込むことで、病原体が侵入した細胞ごと中腸から隔離していると考えられた。さらに、蚊の腸において分裂・分化能をもつ細胞が存在することを見出した。蚊に、細胞分裂時の DNA 複製マーカーである EdU を、血液と共に中腸内に取り込ませ、細胞の分裂を観察した。これにより、吸血 24 時間後の中腸において、活発な細胞分裂がおこなわれていることを明らかにした。つまり、蚊の中腸には分裂能をもつ細胞が存在すること、そして吸血後には腸細胞のターンオーバーが促進されることを明らかにした。以上の結果から、病原体侵入で傷ついた細胞を病原体と共に排除し、幹細胞を分裂・分化させて入れ替えをおこなうメカニズムが、ベクター中腸の維持に貢献していると推測された。

VI. ヒト寄生性条虫とその中間宿主トリボリウム間の感染戦略

ヒト寄生性条虫である小形条虫 (*Hymenolepis nana*) は、ネズミあるいはヒトの腸内で発育する他、中間宿主 (ノミ、甲虫、蛾など) の体内でも感染性をもった擬嚢尾虫に発育する。甲虫の一種であるコクヌストモドキ (*Tribolium castaneum*) は、貯蔵穀物の害虫であると同時に、様々な動物寄生性条虫の中間宿主として知られている。小麦などの餌と同時に虫卵を摂取すると、中腸内で六鉤幼虫が孵化する。それが体腔側に移行し、感染性を持った擬嚢尾虫となる。また、コクヌストモドキでは RNA 干渉が極めて高効率に働くことが知られており、pg オーダーの二本鎖 RNA を体腔に注入するだけで次世代までその効果が持続する。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、コクヌストモドキを中間宿主とした小形条虫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。主要なシグナル伝達経路を構成する 98 個の遺伝子について、二本鎖 RNA を微量注入し、遺伝子機能が減衰した

トリポリウム個体を作成した。小形条虫感染後の擬囊尾虫数を指標に、スクリーニングを実施したところ、JAK/STAT 経路が感染コンピテンシーを低下させていることが明らかとなった。そこで感染 vs 非感染、および感染（野生型個体）vs 感染（STAT92E ノックダウン個体）の条件において、コクヌストモドキ中腸から採取した RNA 試料を用いて RNAseq 解析を実施した。その結果、20 個の遺伝子（カテプシン L、セリンプロテアーゼ（4 個）、variable lymphocyte receptor 等）が JAK/STAT 経路依存性かつ条虫感染時に、その発現を変化させること、さらにその中に含まれる複数の遺伝子が、実際に条虫感染のコンピテンシーを制御していることを明らかにした。

Ⅶ. マダニにおける重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) ウイルス伝播経路

病原体媒介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。我々は、高い致死率を呈するマダニ媒介性 SFTS ウイルスの、流行予測と対策におけるプラットフォーム形成を目的とし、野外生息マダニの病原体保有状況の把握および SFTS ウイルス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として知られ、SFTS 死亡患者発生地域である鹿児島県を対象地域とし、20km 四方の山林地帯を採集場所として選定した。その地帯の合計 15ヶ所に定点を設けた。Flagging 法により採取したマダニ類は、16S rRNA 遺伝子解析による種の特定、並びに SFTS ウイルス・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*)、ヤマアラシチマダニ (*H. hystricis*) およびタカサゴチマダニ (*H. formosensis*) の 4 種から SFTS ウイルス遺伝子が検出された。本地域における SFTS ウイルス保有率は 10.2% (n=753)、日本紅斑熱リケッチア 12.9% (n=192) であった。SFTS ウイルスのマダニ感染経路は、野生動物をレゼルボアとした経路と考えられているが、本研究では孵化後の未吸血の幼ダニからも SFTS ウイルス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。これらの結果は、複数のマダニ種が SFTS ウイルスを保持し、レゼルボアを介した感染に限らず垂直感染によってもマダニへの感染が維持されることを示すものである。

「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、外部資金による特任助教 2 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 3 件、財団助成金等を擁し、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、ブルキナファソに加えナイジェリアを新たに対象とした。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開始し、感染症のグローバル化に備えた「熱帯医学の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主要な基礎研究課題を 7 つ実施した。また公衆衛生指向研究課題として、国内の重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) ウイルス保有マダニの調査と伝播経路の解明を進めている。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。また、突如出現する新興・再興感染症について、社会の公衆衛生学的受容に応え、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、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“顧みられない熱帯病” (Neglected Tropical Disease) に含まれるトリパノソーマ、リーシュマニア等を追加し、

実習においてはモデル動物を用いた寄生虫症模擬診断を新たに組み込んだ。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) Nei Y¹⁾, Obata-Ninomiya K¹⁾, Tsutsui H¹⁾, Ishiwata K, Miyasaka M (Osaka Univ), Matsumoto K (National Research Institute for Child Health and Development), Nakae S (Univ of Tokyo), Kanuka H, Inase N¹⁾, Karasuyama H¹⁾ (¹Tokyo Medical and Dental Univ). GATA-1 regulates the generation and function of basophils. Proc Natl Acad Sci U S A 2013; 110 (46): 18620-5.
- 2) Obata-Ninomiya K¹⁾, Ishiwata K, Tsutsui H¹⁾, Nei Y¹⁾, Yoshikawa S¹⁾, Kawano Y¹⁾, Minegishi Y¹⁾, Ohta N¹⁾, Watanabe N, Kanuka H, Karasuyama H¹⁾ (¹Tokyo Medical and Dental Univ). The skin is an important bulwark of acquired immunity against intestinal helminths. J Exp Med 2013; 210(12): 2583-95.
- 3) Bando H, Okado K, Guelbeogo WM¹⁾, Badolo A¹⁾²⁾ (²Université de Ouagadougou), Aonuma H, Nelson B (Univ of Toronto), Fukumoto S³⁾, Xuan X³⁾ (³Obihiro Univ of Agriculture and Veterinary Medicine), Sagnon N¹⁾ (¹Centre National de Recherche et de Formation sur le Paludisme), Kanuka H. Intra-specific diversity of *Serratia marcescens* in *Anopheles* mosquito midgut defines *Plasmodium* transmission capacity. Sci Rep 2013; 3: 1641.
- 4) Aonuma H, Badolo A (Univ of Ouagadougou, Centre National de Recherche et de Formation sur le Paludisme), Okado K, Kanuka H. Detection of mutation by allele-specific loop-mediated isothermal amplification (AS-LAMP). Methods Mol Biol 2013; 1039: 121-7.
- 5) Saiki E, Nagao K¹⁾, Aonuma H, Fukumoto S²⁾, Xuan X²⁾ (²Obihiro Univ of Agriculture and Veterinary Medicine), Bannai M¹⁾ (¹Ajinomoto), Kanuka H. Multivariable analysis of host amino acids in plasma and liver during infection of malaria parasite *Plasmodium yoelii*. Malar J 2013; 12: 19.

II. 総説

- 1) 熊谷正広. 【感染症症候群 (第2版) [下] - 症候群から感染性単一疾患までを含めて -】腹膜炎, 肝・胆道系感染症, 脾臓感染症, 消化管感染症 消化管感染

症 腸管感染症・食中毒 腸管感染症 蠕虫感染症. 日臨 2013; 別冊感染症症候群 (下): 326-30.

- 2) 嘉糠洋陸. 【感染症 “死の病原体” に前線で挑むサイエンス】序にかえて感染症, あるいは死について. 実験医 2013; 31(19): 3036-9.
- 3) 嘉糠洋陸. トップランナーに聞く (第38回): 病原体を運ぶ節足動物に迫る. 最新医 2014; 69(2): 297-303.

III. 学会発表

- 1) 熊谷正広, 原田友美, 案浦 健, 嘉糠洋陸. (一般口演) 液状細胞診システム BD シュアパス TM を用いた赤痢アメーバおよびジアルジアの簡易な染色標本作成法. 第31回北陸病害動物研究会. 金沢, 7月.
- 2) 熊谷正広, 稲葉孝志¹⁾, 山内可南子¹⁾ (¹弘前大), 嘉糠洋陸. (一般演題: 食品由来寄生虫症等) ホルマリン固定したジアルジアおよび赤痢アメーバ嚢子の永久染色プレパラート作製の試み. 第83回日本寄生虫学会大会. 松山, 3月. [第83回日本寄生虫学会プログラム・抄録集]

IV. 著書

- 1) 熊谷正広. 第7章: 寄生虫感染症 条虫症. 小野寺昭一 (富士市立中央病院) 編. 感染症内科学: 医学スーパーラーニングシリーズ. 東京: 丸善, 2013. p.257-60.
- 2) 熊谷正広. 第6章: 原虫感染症 アメーバ赤痢. 小野寺昭一 (富士市立中央病院) 編. 感染症内科学: 医学スーパーラーニングシリーズ. 東京: 丸善, 2013. p.226-9.

V. その他

- 1) 嘉糠洋陸. 感染耐性を制御するトレランスメカニズム. 上原生命科団研報 2013; 27: 1-3.