

熱帯医学講座

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

教育・研究概要

I. マダニ咬症による赤身肉アレルギーの可能性

米国東海岸で赤身肉アレルギーを起こした患者の9割にマダニに対するIgE抗体が検出され、本アレルギーとマダニ咬症の関係が指摘されている。IgEはgalactose-alpha-1,3-galactose (alpha-Gal)に対するものであるが、これは牛肉や豚肉などの赤身肉とともにマダニにも存在する。ダニ媒介性日本紅斑熱の症例が多い島根県で赤身肉アレルギーの患者も多いことから、島根大学医学部皮膚科学教室とこの関係について検討した。抗alpha-Gal抗体を用いたイムノブロットで、30年以上実験室で継代しているフタトゲチマダニの唾液腺抽出タンパクにalpha-Galを検出した。反応した唾液タンパクは50kDa前後、対照とした牛肉抽出タンパクでは約250kDaおよび>250kDaであった。30例中24例の患者血清中に、フタトゲチマダニ唾液腺抽出タンパクの50kDa前後に結合するIgEを認めた。牛肉抽出タンパクに対しては、上記分子量以外にも多数のバンドに結合を認めた。転写した膜を過ヨウ素酸ナトリウム処理することで結合が認められなくなったことから、これらIgEは糖タンパクを認識していることが示唆された。患者の多くはダニに噛まれたという記憶がなかったが、犬を屋外で飼育している。これらの結果は本邦においてもマダニ咬症が赤身肉アレルギーに関与している可能性を示唆している。すなわちマダニ咬症は、病原体の伝播のみならず、吸血の際に宿主体内に放出されるマダニの唾液腺成分に含まれるalpha-Galによって感作されることで赤身肉アレルギーを誘引する可能性を有することが示された。

II. 遺伝子改変ヒロズキンバエを用いる新規マゴットセラピー (Maggot Debridement Therapy: MDT) 法の開発

MDTとは、ヒロズキンバエ幼虫が患者の壊死組織だけを摂食する性質を利用し、人体の難治性創傷を治療する方法である。そのメカニズムの詳細は未解明であるが、これまでに多くの症例で効果を上げてきた。一方で、患部感染により十分な効果が得られない例や、慎重使用例も存在する。そこで本研究

では、適用範囲が広く短期間で高い効果を上げるMDT開発に向けた基盤として、ヒロズキンバエ幼虫(マゴット)の摂食量および摂食対象を改良した遺伝子改変マゴットの作出を試みる。まず、ヒロズキンバエの嗅覚と摂食行動の相関に着目し、解析を実施した。様々な腐肉を摂食対象としていると推測される野外採集系統ヒロズキンバエと、実験室内において牛肉豚肉飼料で継続的に飼育している実験室系統ヒロズキンバエについて、その嗅覚の違いに注目した。飼料に対する順化は様々な動物で知られているが、これには嗅覚の変化が関わると推測される。野外から採集したヒロズキンバエを、それぞれの採集群ごとに交配して系統化をおこなった。ヒロズキンバエの種同定は、形態学的分類法および各種遺伝子の配列を基におこなった。これにより野外採集ヒロズキンバエ3系統の確立に成功した。これらの野外系統と、実験室維持系統1系統を用い、嗅覚関連遺伝子の比較を実施した。特に、全ての嗅覚受容細胞で発現する嗅覚受容体遺伝子に注目し、その遺伝子配列を比較した。その結果、アミノ酸配列は全ての系統で保存されていた。つまり、嗅覚受容体遺伝子は高く保存されており、摂食対象の違いによる多様性はみられなかった。今回得られた嗅覚受容体遺伝子配列を基に、今後遺伝子改変ヒロズキンバエの作出へと応用する。

III. マダニによる宿主認識と行動メカニズムの解析

マダニや蚊のような吸血性節足動物は、宿主となる動物から吸血するために温度、二酸化炭素、匂いなどの外部環境を認識している。蚊では、熱・二酸化炭素・匂いなど宿主由来の様々な要素の認識に触角や小顎髭、口吻などの付属肢が重要な役割を果たしており、熱センシングに重要なTransient Receptor Potential (TRP) チャネルが局在していることが知られている。マダニは形態学的研究から、第一脚にあるハラー氏器官に「温度・湿度感覚を受容する感覚子」が局在すると推測されているが、宿主探知行動を支える分子基盤については明らかになっていない。そこでわれわれはマダニの宿主探知行動を明らかにすることを目的とし、日本優占種であるフタトゲチマダニ(*Haemaphysalis longicornis*)より熱センサー分子の候補であるTRPA1のホモログ(HITRPA1)を同定した。これによりRT-PCR解析を行うことで、中腸と第一脚を含めた複数の組織でHITRPA1遺伝子が発現していることが示唆された。マダニは各発育ステージ(幼ダニ、若ダニ、成ダニ)および種によって活動時期が異なることから、

外部温度等の刺激により宿主探索行動を変化させていると推測される。そこで現在、温度変化に対するマダニの宿主探知行動を解析するため、マダニの行動が24時間追跡可能なビデオ行動解析システム(エソビジョンXT, ソフィア・サイエンティフィック)を用いて、温度変化に対する個体の行動距離(mm/10min)を測定している。さらに、マダニの宿主認識における誘引要素の候補である二酸化炭素、匂いに対する感受性を明らかにするため、各種誘引要素に対する個体の運動量、速度、蛇行性、温度選択制、宿主捕捉体勢回数など、様々なパラメータによる行動解析を実施している。今後、宿主探索行動へのHITRPA1分子の関与を行動解析システムにより検証する。

IV. ヤブカにおける吸血行動制御機構

病原体媒介節足動物(ベクター)による寄生虫やウイルス、細菌の伝播の根源はベクターの吸血行動である。そのため、吸血行動を司る機構を理解し制御することが望まれる。吸血は「吸血標的への誘引→吸血開始→吸血飽和状態→吸血停止→逃避」という連続的な過程の遂行により達成される。最初のステップである吸血標的への誘引機構の研究は蚊の嗅覚を中心に盛んであり、吸血標的が発する熱・二酸化炭素・匂いが大きな役割を果たすことやDEET等の忌避誘導の仕組みが明らかになっている。しかし、これらの要素は相乗的に作用しているため、嗅覚機能を失った蚊や二酸化炭素の認識が不可能な蚊も、標的を認識できることが報告されている。そこで標的への誘引に引き続く、吸血飽和状態の感知・吸血停止の機構に焦点を当てる。蚊がATPを添加した緩衝液を疑似吸血し血液と同様に中腸へと送り込むことが知られていたため、ATPが蚊にどのように認識されるかを解明することは吸血行動の理解に繋がると考えられる。ネッタイシマカに様々なスクレオチドを疑似吸血させたところ、ネッタイシマカが1. ATP, AMP, dATPを疑似吸血する一方で、アデノシンを疑似吸血しないこと、2. ATPと同じプリン塩基であるGTPを疑似吸血しないことを見出した。以上より、ATP, AMP類を認識する受容体の存在が示唆された。加えて、ネッタイシマカの中腸を用い、吸血前後およびATP疑似吸血前後で発現変動のある分子の網羅的探索(RNA-seq)を行った。中腸は疑似吸血したATPや血液を送り込む組織であり、蚊が満腹状態になり吸血を停止するために鍵となる分子を発現すると考えられる。この結果、ATPと血液の両者に対して吸血後に共通

して発現上昇/減少する分子が多数得られた。以上よりATP認識機構の解明は吸血行動の理解に重要であることが示唆された。

V. 活動性トキソプラズマ症診断に向けたダイテスト(色素試験)改良の試み

トキソプラズマ症は、健常人において自然軽快する疾患である。トキソプラズマに感染すると、体内でタキゾイトが増殖し活動期感染となる。やがて宿主の免疫構築に伴い、分裂が乏しいブラディゾイトを形成し、中枢神経や筋肉に潜み、宿主の生涯にわたり、慢性感染が成立すると考えられている。AIDS患者や免疫抑制患者では、過去に感染したトキソプラズマの再燃により、脳炎や肺炎を引き起こし、ときに致死性である。また、先天性トキソプラズマ症は母体が妊娠中に初感染することが契機となる。このような再燃病態の評価や、感染時期を推測する検査法として、一般的な保険診療では抗体検査が行われるが、不十分な評価となることが多い。活動性トキソプラズマ症の診断に有用であるダイテストは、1948年に開発され世界各地で行われてきた血清学的検査法であり、活性タキゾイトを直接用いる方法である。通常、タキゾイトはメチレンブルーで青染されるが、抗体を有する患者血清に反応させると、メチレンブルー不染となる。抗原として用いた虫体の50%以上が不染を示す(LD50とする)、最高の被検血清希釈倍をもって抗体価とする。LD50が16倍希釈以上となる場合、活動期感染と判定する。ダイテストの判定は評価者のスキルに依存しているところが大きく、検査の客観性を保つには工夫が必要である。我々はこの問題に対して、GFP発現タキゾイト(RH株)を用いたダイテストの有効性を見出した。感染急性期血液と未感染者血液を比較した改良型ダイテスト(Toxoplasma Killing Observation法:TOKIO法)では、急性期血液で有意にGFP蛍光の消失が見られ、メチレンブルー染色による不染率と相関関係を認め、そのLD50判定は一致した。GFP蛍光陽性虫体を画像情報化し自動計数を行うことにより、評価方法の飛躍的な簡易化が実現した。

「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。近年は、病原体として細菌およびウイルスを積極的に導入し、病原体媒介節足動物をコアとした研究に移行しつつある。各

種病原体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2名が加わり、教員が6名の陣容となった。うち助教1名は感染制御部からの期限付き出向であり、感染症臨床家の参画は、教育と研究双方のさらなる充実をもたらした。新しい研究課題が立ち上がると同時に、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。特筆すべきは、ネットイシマカ実験室システムを導入し、ウイルス媒介蚊の研究システムが立ち上がったことである。ゲノム情報が完備され、ゲノム編集も容易なヤブカの導入により、既存のハマダラカ等を用いた研究との相乗効果が期待される。研究費では、日本医療研究開発機構(AMED)の大型研究費(5年間)の獲得に成功し、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、この大型研究費の支援の下に、ブルキナファソ国ワガドゥグ大学との Dengue ウイルス媒介蚊の国際共同研究を新たに開始した。ワガドゥグ大学および本学それぞれにおいて、国際ワークショップおよびシンポジウムを開催し、最先端研究を実施している衛生動物学者と有機的連携を構築することに成功した。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、講義内容および学習順序等の再検討と、実習内容(特に食品由来寄生虫感染症)の追加拡充を実施した。実習では、学生数増への対応と教育効果上昇を指向したグループ別のローテーション型実習

に改良を加え、本年度も実施した。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。本講座独自のフィールド展開支援の枠組みにより、昨年度に引き続き、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。また、ブルキナファソの若手研究者2名を対象に、蚊媒介性感染症の分子遺伝学解析についての短期研修(2週間)を本講座にて実施した。新しい試みとして、目黒寄生虫館における蚊・マダニ媒介性感染症の一般向け講演会と、小学生向けの親子教室を複数回開催した。アウトリーチ活動の需要と要請は年々増しており、本講座は今後も積極的に関与する。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Badolo A¹⁾²⁾³⁾ (³Université de Ouagadougou), Bando H¹⁾, Traoré A²⁾, Ko-Ketsu M¹⁾, Guelbeogo WM²⁾, Kanuka H, Ranson H (Liverpool Sch Tropical Med), Sagnon N²⁾ (²CNFRFP), Fukumoto S¹⁾ (¹Obihiro Univ Agriculture Veterinary Med). Detection of G119S ace-1 (R) mutation in field-collected *Anopheles gambiae* mosquitoes using allele-specific loop-mediated isothermal amplification (AS-LAMP) method. *Malaria J* 2015; 14: 477.
- 2) Sakuma C¹⁾, Okumura M¹⁾, Umehara T¹⁾, Miura M¹⁾, Chihara T¹⁾²⁾ (¹Univ Tokyo, ²AMED-CREST). A STRIPAK component Strip regulates neuronal morphogenesis by affecting microtubule stability. *Sci Rep* 2015; 5: 17769.
- 3) Matsubara R¹⁾²⁾, Aonuma H, Kojima M³⁾, Tahara M¹⁾, Andrabi SB¹⁾, Sakakibara H³⁾ (³RIKEN), Nagamune K¹⁾²⁾ (¹Natl Inst Infectious Diseases, ²Univ Tsukuba). Plant hormone salicylic acid produced by a malaria parasite controls host immunity and cerebral malaria outcome. *PLoS One* 2015; 10(10): e0140559.
- 4) Tsubokawa D¹⁾, Ishiwata K, Goso Y¹⁾, Yokoyama T¹⁾, Kanuka H, Ishihara K¹⁾, Nakamura T¹⁾, Tsuji N¹⁾ (¹Kitasato Univ). Induction of Sd³-sialomucin and sulfated H-sulfomucin in mouse small intestine mucosa by infection with parasitic helminth. *Exp Parasitol* 2015; 153: 165-73.

III. 学会発表

- 1) 山地佳代子, 下島昌幸¹⁾, 西條政幸¹⁾ (¹国立感染症研究所), 青沼宏佳, 嘉糠洋陸. (ポスター: 疾患生物学-3) 感染症) 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS)

ウイルスのマグニにおける垂直感染. BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会, 第88回日本生化学会大会). 神戸, 12月.

- 2) 吉田拓磨, 青沼宏佳, 岡戸 清, 宮脇剛司, 内田 満, 嘉糠洋陸. (一般演題: 下肢: 感染創) 創傷治療における医療用ウジの改良に向けた試み. 第7回日本創傷外科学会総会・学術集会. 東京, 7月.
- 3) 吉田拓磨, 青沼宏佳, 宮脇剛司, 嘉糠洋陸. マゴットセラピーの国外事情. 第3回マゴットセラピー症例検討会. 岡山, 10月.
- 4) Yoshida T, Aonuma H, Miyawaki T, Kanuka H. Artificial control of development of *Lucilia sericata* larvae in maggot debridement therapy. International Wound & Biotherapy Conference 2015. Petaling Jaya, Oct.
- 5) Ishiwata K. Suppression of fecundity induced by mixed infection with gastrointestinal nematodes in mice. 第84回日本寄生虫学会総会. 東京, 2015年3月.
- 6) Ishiwata K. Immune Responses to protozoa, helminths and Fungi Host immune response-mediated effects of precedent parasite infection on prosperity of the consecutively infected parasite. 第44回日本免疫学会学術集会. 札幌, 11月. [日免疫学会学術記録 2015: 44(Proceedings): 55]
- 7) 保科斉生, 李 広烈, 中拂一彦, 河野真二, 清水昭宏, 保阪由美子, 佐藤文哉, 堀野哲也, 中澤 靖, 熊谷正広, 山崎 浩 (国立感染症研究所), 嘉糠洋陸, 堀 誠治. (セッション8) 台湾で感染が疑われたアジア条虫症の1例. 第26回日本臨床寄生虫学会大会. 宇都宮, 6月.

たウエステルマン肺吸虫症の中国人家族内発症例. 感染症誌 2014: 88(6): 866-70.

IV. 著 書

- 1) 山地佳代子, 青沼宏佳, 佐久間知佐子, 保科斉生, 嘉糠洋陸. 第1章: 感染症 Hot Topics~新興再興感染症を中心に. 8. 節足動物によって運ばれる感染症. 嘉糠洋陸, 忽那賢志 (国際医療研究センター) 編. 感染症 いま何が起きているのか: 基礎研究, 臨床から国際支援まで (実験医学増刊 (2015年33巻17号)). 東京: 羊土社, 2015. p.57-63.

V. その他

- 1) 保科斉生, 李 広烈, 中拂一彦, 河野真二, 清水昭宏, 保阪由美子, 佐藤文哉, 堀野哲也, 中澤 靖, 熊谷正広, 山崎 浩 (国立感染症研究所), 嘉糠洋陸, 堀 誠治. 台湾での感染が疑われたアジア条虫症の1例. Clin Parasitol 2015: 26(1): 117-20.
- 2) 保科斉生, 田村久美, 河野真二, 加藤哲朗, 佐藤文哉, 堀野哲也, 中澤 靖, 吉川晃司, 吉田正樹, 熊谷正広, 堀 誠治. オクタロニー法が診断に有用であっ