

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. 消化管寄生線虫の再感染防御における腸管粘膜バリアー

マウスの消化管寄生線虫である *Heligmosomoides polygyrus* (Hp) は、経口摂取された感染幼虫が小腸粘膜から粘膜下の筋層へ侵入し、発育後に管腔に戻って絨毛間に寄生し続ける。初感染で慢性感染するが、その駆虫後の再感染では短期間で小腸管腔より排除される。しかしながら、腸管腔に戻った直後の再感染 Hp 数は、同時に行った初感染の同 Hp 数よりも少ない。これは、再感染において小腸粘膜内に侵入する Hp 数が少ないことを反映していると考えられる。今回、再感染 Hp の腸管粘膜への侵入阻止の確認とそれに関わる機序について検討した。初感染 Hp を駆虫後 4 もしくは 8 週に再感染し、6 日後に小腸筋層内の Hp 数を調べた。同時に感染させた初感染群に対して、再感染群では有意に Hp 数が少なかった。しかも、駆虫後 8 週の方が同 4 週よりも少なかった。これは再感染 Hp の粘膜への侵入阻止が時間経過とともに増強されていることを示している。また、この阻止は初感染で Hp が最も侵入する小腸上部 1/6 で認められた。免疫学的記憶を司る T 細胞の関与を確認するために、再感染 1 週間より抗マウス CD4mAb 処理をして CD4 陽性細胞を除去すると、侵入阻止は解除された。IL-4 受容体 α 鎖欠損マウスおよび Fc γ RIa 欠損マウスでは有意な侵入阻止は認めなかった。これらの結果は、Hp の再感染に対して従来より解析されてきた腸管腔からの早期排除に加えて、新たに感染幼虫による小腸粘膜(体内)への侵入阻止が長期間にわたり維持される機序の存在を示している。Hp の感染幼虫によって誘導された腸管粘膜バリアーが抗原特異性を超えて多種の病原体の侵入を阻止している可能性を示唆している。

II. 改良マゴットセラピー (Maggot Debridement Therapy: MDT) に向けた高機能マゴットの樹立

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。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)の摂食行動をコントロールするし、高機能マゴットの確立を試みた。MDT に使用するマゴットの機能では、壊死組織の摂食、殺菌作用、肉芽組織の増生が重要である。しかし、現在 MDT に使用されているマゴットでは、これらについて詳細な評価はおこなわれておらず、MDT に適した系統についての検討もなされていない。そこでまず、ヒト組織を用いたマゴット評価系の構築を実施した。附属病院形成外科でおこなわれた手術において廃棄された組織を採取し、幼虫に摂食させた。飼育中は、幼虫の体重を毎日計測し、摂食量の評価をおこなった。通常の牛肉豚肉飼料を摂食した幼虫と比較した結果、ヒト組織の組成によりマゴットの成長が異なることを明らかにした。このことは、MDT に使用するマゴットの評価は、MDT を用いた治療時に摂食するヒト壊死組織を用いることが必要であることを示している。また、MDT に適用となるヒロズキンバエの各ステージの幼虫に、ステロイド代謝酵素阻害剤である E220 を微量注入し、それらの発育と変態を観察した。その結果、幼虫早期に E220 を注入した場合においても、その後の蛹化が抑制できることを明らかにした。MDT に使用するマゴットのエクジステロイド合成経路を阻害することにより、蛹化せず、長期間患部に適用できる医療用マゴットを開発できる可能性が示された。このような付加価値の高いマゴットの確立は、患者の QOL を高め、また院内の衛生環境面においても MDT の普及に寄与するものと期待される。

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。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。そこで本研究ではダニの宿主探知行動を明らかにすることを目的とし、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。次に、ウサギを宿主とし実験室内において30年以上継続的に飼育している実験室系統フタトゲチマダニと、哺乳類に限らず両生類を宿主とするタカサゴキララマダニ (*Amblyomma testudinarium*) について、その宿主探知行動の違いに注目した。ビデオ行動解析システムにより熱依存性二酸化炭素センシング行動を定量した結果、フタトゲチマダニでは二酸化炭素刺激により活性化され、タカサゴキララマダニは刺激前後で行動に変化がみられなかった。以上より、宿主域に応じて熱・二酸化炭素等の誘引刺激に対する行動が異なること可能性が示唆された。今後、宿主探索行動へのTRPA1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。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。標的への誘引に引き続く吸血行動、特に吸血開始に焦点を当てた。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、蚊におけるATP認識機構の分子基盤解明を目指した。ショウジョウバエが蚊と同様にATPを嗜好することを確認した後、ショウジョウバエで既に作成されている味覚受容体RNAiライブラリーを活用した。ショウジョウバエ神経に53味覚受容体遺伝子に対する116種類のRNAiをそれぞれ発現させ味覚機能を抑制した状態でATP嗜好の行動実験を行うことにより、ATP嗜好に関与する味覚受容体をスクリーニングした。この結果、ATP認識に関与することが示唆される味覚受容体は17遺伝子（うちネッタイシマカに保存されているものは4遺伝子）に絞り込まれた。さらにATPとは構造が似ているものの蚊が疑似吸血を行わないアデノシンに関しても同様に、ショウジョウバエが嗜好しないことを確認し、味覚受容体RNAiライブラリーを発現した個体でスクリーニングを行うことでアデノシン認識に関与する味覚受容体を7遺伝子（うちネッタイシマカに保存されているものは1遺伝子）に絞り込んだ。以上より、蚊とショウジョウバエがATP/アデノシンに対して共通の嗜好性を示すこと、味覚受容体とその認識に関わることが示唆された。今後ネッタイシマカにおいてATP受容体候補である味覚受容体の機能欠失変異体を作成し、分子機構の解明をさらに進める。

V. 国内 HIV 感染者における抗トキソプラズマ抗体保有率の検討

ヒトに感染した *Toxoplasma gondii* は、急性期感染（有症状）の後、宿主の生涯に渡り慢性感染（無症状）を維持すると考えられており、免疫不全者では感染が再燃する恐れがある。国内の HIV/AIDS 患者数は依然、増加傾向にあり、2015 年末の時点で累計患者数は26,000人となった。HIV 感染に加え、悪性疾患、またはその治療により免疫不全が助長される可能性があり、トキソプラズマ症のリスクと考えられる。ただし、国内の HIV 感染者におけるトキソプラズマ感染の頻度は、十分評価されておらず、疫学情報は限られている。附属病院に通院する成人 HIV 感染者を対象に、抗トキソプラズマ IgG 抗体 (TpIgG) 測定を実施した。また抗体保有者に対しては、感染の確認と、疾患活動性の評価目的に Sabin-Feldman Dye test (SFDT) を実施した。2015 年 8 月から 2016 年 10 月の間に 400 例が登録され、2017 年 1 月現在までに 399 例の血清検体を回収した。399 例中女性は 18 例、外国出身者は 16 例であった。TpIgG 陽性例は 33 例で、うち女性、外国出身者はそれぞれ 2 例であった。TpIgG 陽性例に急性期感染者はおらず、治療介入例はなかった。SFDT は、全ての TpIgG 陽性例で判定値の上昇が確認されたが、非活動期感染でも高値の例が散見された。またアンケート結果から、日本人男性における猫の飼育歴とトキソプラズマ感染に相関関係が見られたが、統計学的には有意ではなかった。また、海外で感染リスクとされている二枚貝の生食は、本研究では認められなかった。

「点検・評価」

1. 研究について

講座が対象とする研究領域は、衛生動物学を中心に、原虫学および蠕虫免疫学も加えた陣容になっている。衛生動物学については、病原体媒介節足動物のみならず、創傷治療等に使用されるウジ虫治療や法医昆虫学など Medical Entomology の名にふさわしい研究課題も扱っている。研究対象となる病原体はウイルスから蠕虫まで多岐に渡り、中間宿主を豊富に取り揃えていること、感染実験に特化した各種実験室を整備済みであることなどの特色を生かして、各種病原体の生活環全体を俯瞰的に構築できることが最大の強みとなっている。日本医療研究開発機構 (AMED) の大型研究費により、本年度から助教 (特任) 2 名、ポスドク研究者 3 名、研究補助員 2 名が参画し、十分な研究遂行体制と相成った。また、旧

寄生虫学教室から熱帯医学講座に移行後、初めての本学大学院博士課程学生が加入し、若手感染症研究者のリソースとして研鑽を積んでいる。新規研究課題の立ち上げや既存課題の進展に際し、研究材料の導入や技術の習得、共同研究の打診等を躊躇しない姿勢は本年度も堅持され、各研究テーマが十分に深化したと評価する。特筆すべきは、CRISPR/Cas9によるゲノム編集技術が導入され、ヤブカやハマダラカ、ヒロズキンバエ等において任意の遺伝子欠損や外来遺伝子挿入が飛躍的に容易になったことである。また、10年来共同研究を実施している西アフリカ・ブルキナファソについて、国立ワガドゥグ大学と本学との大学間協力覚書等が正式に取り交わされ、国際共同研究体制の実質化を果たした。過年度に引き続き、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た。本学での国際シンポジウムは3回目を迎え、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（特に衛生動物）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。ブルキナファソの大学院生3名を招聘し、蚊媒介性感染症の分子遺伝学解析に

ついで短期研修（2週間）を本講座にて実施した。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Teshima T¹⁾, Onoe H¹⁾, Tottori S¹⁾, Aonuma H, Mizutani T¹⁾, Kamiya K¹⁾, Ishihara H¹⁾, Kanuka H, Takeuchi S¹⁾ (¹Univ Tokyo). High-resolution vertical observation of intracellular structure using magnetically responsive microplates. *Small* 2016; 212(25): 3366-73.
- 2) Sakuma C, Satio Y¹⁾, Umehara T¹⁾, Kamimura K²⁾, Maeda N²⁾ (²Tokyo Metropolitan Inst Med Sci), Mosca TJ (Stanford Univ), Miura M¹⁾ (¹Univ Tokyo), Chihara T (Hiroshima Univ). The Strip-Hippo pathway regulates synaptic terminal formation by modulating actin organization at the *Drosophila* neuromuscular synapses. *Cell Rep* 2016; 16(9): 2289-97.
- 3) Kuniwa T¹⁾, Enomoto Y¹⁾, Terazawa N¹⁾, Omi A¹⁾, Miyata N¹⁾, Ishiwata K, Miyajima A¹⁾ (¹Univ Tokyo). NK cells activated by interleukin-4 in cooperation with interleukin-15 exhibit distinctive characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; 113(36): 10139-44.
- 4) Chinuki Y¹⁾, Ishiwata K, Yamaji K, Takahashi¹⁾, Morita E¹⁾ (¹Shimane Univ). Haemaphysalis longicornis tick bites are a possible cause of red meat allergy in Japan. *Allergy* 2016; 71(3): 421-5.
- 5) 保科 齊生, 青沼 宏佳, 堀 誠治, 嘉糠 洋陸. 活動期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. *Clin Parasitol* 2016; 27(1): 105-8.

II. 総 説

- 1) 大塚 沙緒里, 青沼 宏佳, 嘉糠 洋陸. 【医学と昆虫の新しい関係】医療用ウジ虫によるマゴツセラピーの過去・現在・未来. *大阪保険医雑誌* 2017; 606: 31-5.
- 2) 保科 齊生, 嘉糠 洋陸. 【古くて新しい日和見感染症】原虫感染症 クリプトスポリジウム. *臨と微生物* 2017; 44(1): 83-8.

III. 学会発表

- 1) Kanuka H. The role of gut in pathogen-transmitting insects: barrier or gate? The 1st International Symposium for Infectious Diseases: Vector-Borne Disease. Shenzhen, June.
- 2) Sakuma C, Kanuka H. Dissecting molecular mechanism of taste sensation of ATP in fly and mosquito. Taiwan Entomological Society 37th Annual Meeting. Taipei, Oct.

- 3) Kanuka H. Generation of transgenic mosquito harboring pseudotype virus. 2017 International Conference on Dengue and Dengue Prevention, Taipei, Mar.
- 4) 嘉糠洋陸. (特別企画5: 目からウロコの基礎医学) マダニ刺咬症と感染症のリスクを知る. 第115回日本皮膚科学会総会. 京都, 6月.
- 5) 嘉糠洋陸. (口頭) トランスジェニック蚊を用いたウイルス生ワクチン産生の試み. 第24回分子寄生虫学ワークショップ/第14回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会. 帯広, 8月.
- 6) 大手 学, 上山盛夫, 嘉糠洋陸, 山元大輔. 共生細菌ボルバキアによるヤブカとショウジョウバエの操作. 第39回日本分子生物学会年会. 横浜, 12月.
- 7) 山地佳代子, 下島昌幸, 西條政幸, 嘉糠洋陸. 重症熱性血小板減少症候群(SFTS) ウイルスのマダニ内伝播メカニズムの解析. 第68回日本衛生動物学会大会. 宇都宮, 4月.
- 8) 吉田拓磨, 青沼宏佳, 宮脇剛司, 嘉糠洋陸. マゴツトセラピーに用いる医療用ウジの改良に向けた試み. 第59回日本形成外科学会総会・学術集会. 福岡, 4月.
- 9) 吉田拓磨, 青沼宏佳, 宮脇剛司, 嘉糠洋陸. マゴツトセラピーに用いるヒロズキンバエ (*Lucilia sericata*) 幼虫の改良に向けた試み. 第68回日本衛生動物学会大会. 宇都宮, 4月.
- 10) 吉田拓磨, 青沼宏佳, 宮脇剛司, 嘉糠洋陸. 創傷治療に用いる医療用ウジの改良に向けた試み. 第8回創傷外科学会総会・学術集会. 東京, 7月.
- 11) 吉田拓磨, 青沼宏佳, 宮脇剛司, 嘉糠洋陸. ヒト組織を用いたマゴツトセラピー評価系の構築. 第4回日本マゴツトセラピー症例検討会. 京都, 12月.
- 12) Sakuma C, Kanuka H. Dissecting taste sensation of ATP in *Drosophila* and mosquitoes. 12th Japanese *Drosophila* Research Conference. Tokyo, Sept.
- 13) Sakuma C, Kanuka H. Dissecting molecular mechanism of taste sensation of ATP in fly and mosquito. Taiwan Entomological Society 37th Annual Meeting. Taipei, Oct.
- 14) Hoshina T, Yamaji K, Hori S, Kanuka H. Human tapeworms: characterization of Diphyllorhynchiasis and Taeniasis in Tokyo, Japan 2011-2015. ASTMH 2016 (American Society of Tropical Medicine and Hygiene 65th Annual Meeting). Atlanta, Nov.
- 15) 保科斉生, 青沼宏佳, 堀 誠治, 嘉糠洋陸. 新規トキソプラズマ診断法の開発. 第133回成医会総会. 東京, 10月.
- 16) 山地佳代子, 嘉糠洋陸. 重症熱性血小板減少症候群(SFTS) ウイルスのマダニ内伝播メカニズムの解析. 第68回日本衛生動物学会大会. 宇都宮, 4月.
- 17) Ishiwata K. Effects of the host immune response against precedent infection on the establishment of successively infected gastrointestinal nematode. ICI (International Congress of Immunology) 2016. Melbourne, Aug