

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：24601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19383

研究課題名（和文）住血吸虫モデルによるin vitro発育システムの開発

研究課題名（英文）Development of in vitro Schistosoma culture system

研究代表者

吉川 正英（Yoshikawa, Masahide）

奈良県立医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：50230701

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：中間宿主を有する寄生虫のライフサイクルを実験室レベルで実現するには、宿主（中間宿主、終宿主）の維持や感染実験など多数の過程を必要とする。また、一般的に、中間宿主体内における寄生虫の発育状況の観察や解析は容易ではない。我々は本研究において、住血吸虫をモデルとしたin vitroライフサイクルの実現を目指して、中間宿主（貝）を使用しない培養系での発育実現を試み、貝由来抽出物を用いることで住血吸虫のin vitro培養に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、住血吸虫の中間宿主（淡水巻貝）内における発育動態を世界で初めて明らかにすることができた。さらに、それらの知見を基に、貝を用いることなく住血吸虫を維持、発育可能な培養系の樹立に成功した。本成果は、貝由来抽出物が住血吸虫の維持や発育を制御可能とするばかりでなく、住血吸虫の貝内発育メカニズムを解明する点で重要な知見をもたらし、向後の駆虫薬の開発や農業薬剤の開発において、福音をもたらすと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Schistosomiasis is one of the most prevalent waterborne parasitic diseases affecting humans. In natural conditions, snails are necessary for maintenance of its lifecycle and also required as intermediate hosts to maintain the lifecycle in laboratory settings. In the present study, the location of *S. mansoni* larvae in snails after infection was investigated. Larvae were found located in the head-foot area of snails at 10 days post-infection, then their location was predominantly changed to the hepatopancreas and ovotestis area by 56 days post-infection. Next, the effects of extracts from various organs of snails including head-foot and hepatopancreas and ovotestis for in vitro culturing of *S. mansoni* larvae were investigated. The head-foot extract enabled prolonged culturing of *S. mansoni* larvae. These results may provide important information for identifying essential factors and molecules for culturing *Schistosoma* larvae in vitro.

研究分野：感染症

キーワード：寄生虫 感染症 住血吸虫 培養 臓器 中間宿主 淡水貝 抽出

1. 研究開始当初の背景

住血吸虫症は、世界で2億人以上の罹患者を有する世界三大寄生虫病の1つである。住血吸虫症の病原体である「住血吸虫」は、淡水巻貝を中間宿主とし、皮膚から直接ヒトへと感染する。世界的な疾患対策として、特効薬（プラジカンテル）による治療と啓発活動が行われているが、更なる防圧にはそのライフサイクルを断ち切ることが重要と考えられる。かつての日本住血吸虫症の撲滅にみるように、ヒトに感染後の治療ではなく、“中間宿主”に着目した研究が功を奏した”という研究史を顧み、本研究を計画した。

2. 研究の目的

我々がこれまで培ってきた培養技術を駆使し、中間宿主を介さない住血吸虫発育法、即ち、『*in vitro* 住血吸虫発育システム』の開発を本研究の目的とした。培養系による虫体発育の実現は世界的にみても実現できておらず、中間宿主（貝）由来細胞抽出成分を用いることで住血吸虫が育つ環境を人工的に再現する。

3. 研究の方法

(1) マンソン住血吸虫ライフサイクルの確立

マンソン住血吸虫 (*S. mansoni*) を感染動物実験施設内で維持すべく、生物材料 (ICR マウス、*S. mansoni* および *B. glabrata*)、水槽等の準備を行った。*S. mansoni* を感染させた *B. glabrata* を長崎大学 熱帯医学研究所 (濱野真二郎 博士) より入手後、ICR マウス (8 週齢) に感染させ、8 週間後、摘出した肝臓より *S. mansoni* 虫卵を酵素処理にて回収後、孵化させたミラシジウムを *B. glabrata* へ再感染させることで、実験室レベルでライフサイクルを維持した。

(2) マンソン住血吸虫のミラシジウム初期感染における中間宿主（貝）内の動態解析

S. mansoni 虫卵より孵化させたミラシジウムを *B. glabrata* へ感染させ、経時的に 4%PFA にて固定し、凍結切片を作成後、H&E 染色、抗マンソン住血吸虫抗体を用いた免疫染色により貝内における *S. mansoni* の分布を詳細に解析した。

(3) マンソン住血吸虫の *in vitro* 培養の試み

S. mansoni を感染させた ICR マウスより肝臓を摘出後、酵素処理にて虫卵を回収し、種々の培養液#1~#8 (表 1 参照) にてミラシジウムの培養を試みた。培養条件としては、培養液以外に CO₂ 濃度および温度をパラメーターとした。

基本培地	DMEM	Ham/F10	RPMI	BgeM*
FBS(-)	#1	#2	#3	#4
10%FBS(+)	#5	#6	#7	#8

*BgeM : Schneider's *Drosophila* Medium を主とする Bge 細胞培養液 (ATCC を参照)

表 1 *S. mansoni* の *in vitro* 培養系に用いた各種培養液

(4) マンソン住血吸虫の *in vitro* 培養における貝由来抽出物 (BGP) の影響

未感染 *B. glabrata* より全体、あるいは各種臓器 (頭足、櫛鰓、心臓、肝臓・卵精巣) に分割し、セラミックビーズにより組織を粉碎させ、遠心後の上清分画を個体あるいは各種臓器由来抽出物 (BGP) とした。(3) の項目で培養を試みたミラシジウムの *in vitro* 培養系に BGP を添加培養し、培養後のミラシジウムの動態 (viability や大きさ等) を調べることで、BGP の影響を精査した。

4. 研究成果

(1) マンソン住血吸虫ライフサイクルの確立

B. glabrata を未感染状態で繁殖飼育することで、十分数の貝を維持することが可能となった。また、*S. mansoni* 感染させた *B. glabrata* よりセルカリアを遊泳させ、ICR マウスに感染させ、8 週間後に、肝臓より虫卵を採取し、ミラシジウムに孵化後、未感染 *B. glabrata* に感染させることで、実験室内でのライフサイクルが維持可能となった。

(2) マンソン住血吸虫のミラシジウム初期感染における中間宿主（貝）内の動態解析

S. mansoni の感染した *B. glabrata* を経時的に固定し、凍結連続切片を作成後、H&E 染色、あるいは免疫染色により虫体の分布を解析した。その結果、感染直後のスポロシストは頭足部に局在し、一方、感染 4 週目以降では主に肝臓、卵精巣部に存在することが明らかとなった (図 1)。

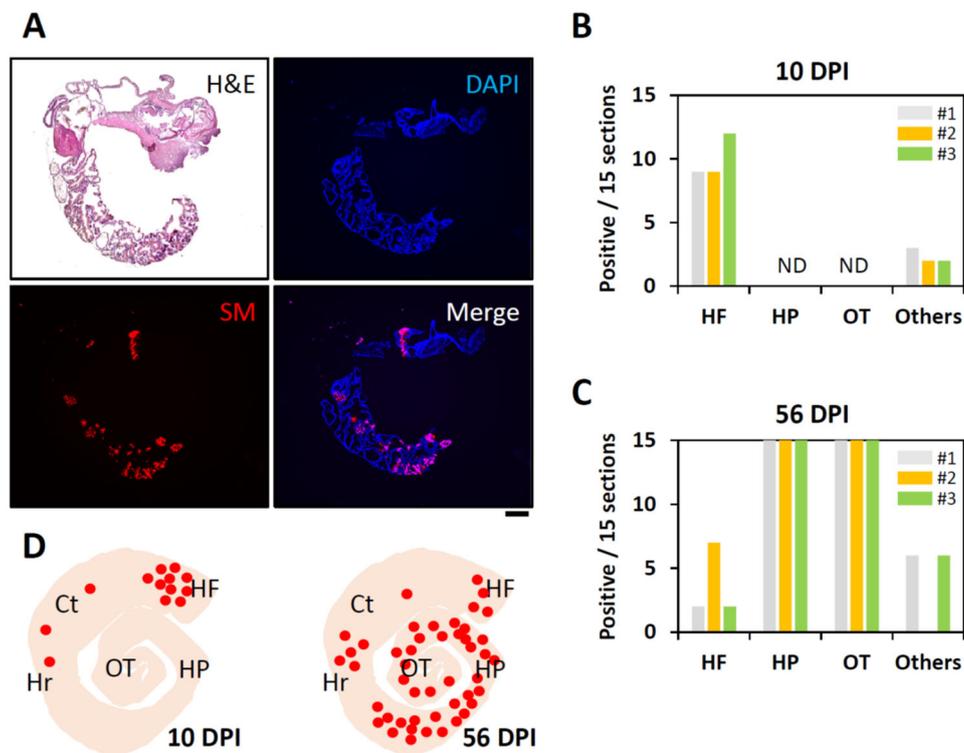


図 1 貝内動態解析 (A) 貝の HE 染色および免疫染色、(B、C) 経時的な貝の存在臓器 (B: 感染 10 日目、C: 感染 56 日目)、(D) 感染後の住血吸虫存在領域

(3) マンソン住血吸虫の *in vitro* 培養の試み

S. mansoni 感染 ICR マウスより回収した虫卵から孵化後、ミラシジウムを Table 1 に示す培養液を用いて培養した。その結果、10%FBS-BgeM のみが ciliary plate の shedding を認め、母スポロシストまで転換可能であった (図 2)。一方で、他の培養液ではミラシジウムの運動性が低下し、萎縮を認めた。他条件として、温度は 28°C が至適温度であり、また、CO₂ の条件 (5% あるいは大気) に違いは認めなかった。

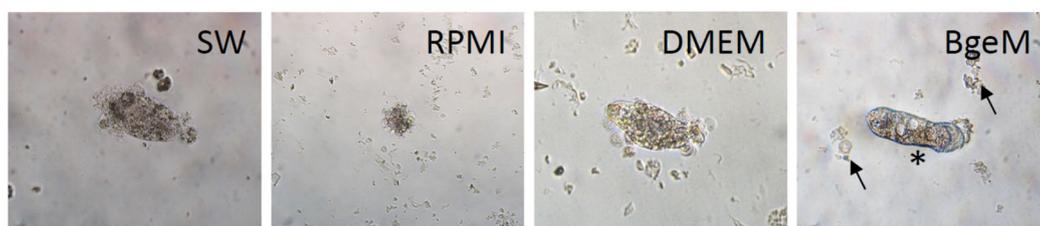


図 2 種々の培養液を用いた *S. mansoni* の形態変化

(4) マンソン住血吸虫の *in vitro* 培養における貝由来抽出物 (BGP) の影響

未感染 *B. glabrata* より各種臓器由来抽出物 (BGP) を分離後、10%FBS-BgeM を用いたミラシジウムの *in vitro* 培養系に添加培養することで、スポロシストへの変換、viability、大きさへの影響を調べた。その結果、頭足部位由来 BGP を添加した場合、最も viability が高く、長径も最大になる傾向であった (図 3)。

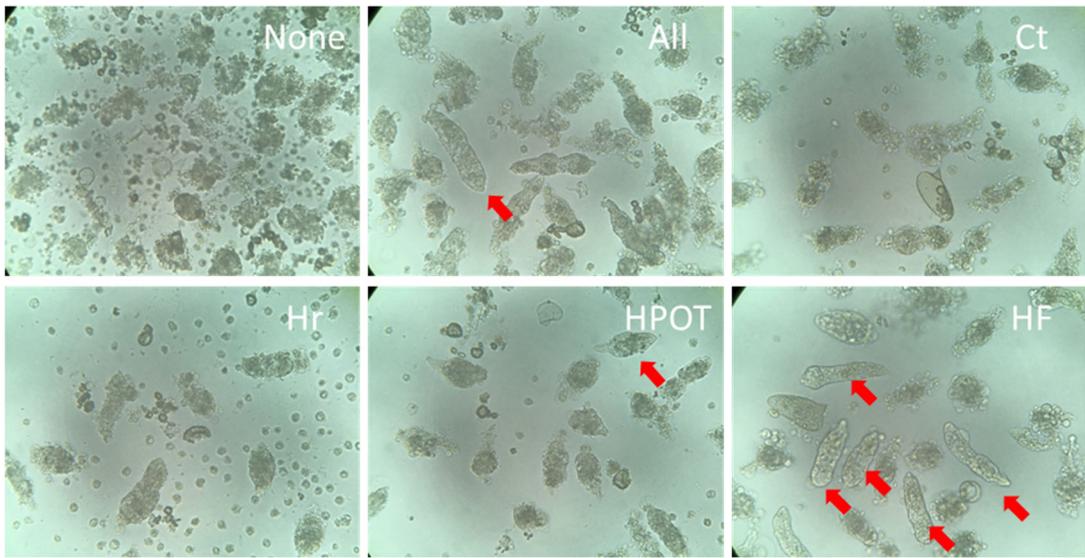


図3 各臓器由来抽出物における *S. mansoni* の *in vitro* 培養

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ouji Y, Hamasaki M, Misu M, Kitamura T, Hamano S, Yoshikawa M.	4. 巻 235
2. 論文標題 Schistosoma mansoni larvae in vitro cultures using Biomphalaria glabrata extracts.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Acta Tropica.	6. 最初と最後の頁 106636
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.actatropica.2022.106636.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ouji Y, Misu M, Kitamura T, Okuzaki D, Yoshikawa M.	4. 巻 12
2. 論文標題 Impaired differentiation potential of CD34-positive cells derived from mouse hair follicles after long-term culture.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 11011
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-15354-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Misu M, Yoshikawa T, Sugimoto S, Takamatsu Y, Kurosu T, Ouji Y, Yoshikawa M, Shimojima M, Ebihara H, Saijo M.	4. 巻 14
2. 論文標題 Rapid whole genome sequencing methods for RNA viruses.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Front Microbiol.	6. 最初と最後の頁 1137086
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2023.1137086.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 西村知子、渡部一貴、中谷敏也、菊池英亮、三須政康、北村知高、根津大樹、山戸一郎、高済峯、笠原敬、王寺幸輝、吉川正英	4. 巻 33
2. 論文標題 肝被膜下出血, その後に好酸球増多, 蕁麻疹出現を認めた肝蛭症の1例	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical Parasitology	6. 最初と最後の頁 79-83
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 吉川正英	4. 巻 5151
2. 論文標題 治療法の再整理とアップデートのために 専門家による私の治療 住血吸虫症	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 日本医事新報	6. 最初と最後の頁 43-44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 王寺幸輝、濱崎めぐみ、三須政康、北村知嵩、尾崎大輔、島田賢子、濱野真二郎、吉川正英	4. 巻 32
2. 論文標題 蛍光標識住血吸虫による貝感染におけるリアルタイム可視化の試み	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Parasitology	6. 最初と最後の頁 34-36
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Eiras J, Zhu XQ, Yurlova N, Pedrassani D, Yoshikawa M, Nawa Y.	4. 巻 81
2. 論文標題 Dioctophyme renale (Goeze, 1782) (Nematoda, Dioctophymidae) parasitic in mammals other than humans: A comprehensive review.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Parasitol Int.	6. 最初と最後の頁 102269
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2020.102269	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 王寺幸輝、北村知嵩、三須政康、西村知子、島田賢子、濱崎めぐみ、中村梨沙、濱野真二郎、吉川正英
2. 発表標題 貝を用いないin vitro住血吸虫培養システムの開発
3. 学会等名 第91回 日本寄生虫学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 王寺幸輝、濱崎めぐみ、北村知高、三須政康、島田賢子、中村梨沙、濱野真二郎、吉川正英
2. 発表標題 感染能を有する住血吸虫卵保存法の開発
3. 学会等名 第92回 日本寄生虫学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉川正英、渡部一貴、中谷敏也、菊池英亮、西村知子、三須政康、北村知高、根津大樹、山戸一郎、高濟峯、笠原敬、王寺幸輝
2. 発表標題 肝被膜下出血およびその後の好酸球増多が診断の契機となった肝蛭症の1例
3. 学会等名 第33回 日本臨床寄生虫学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三須政康、吉河智城、黒須剛、高松由基、王寺幸輝、下島昌幸、吉川正英、海老原秀喜、西條政幸
2. 発表標題 RNAウイルスをターゲットとした迅速、且つ簡便で正確な全ゲノム配列決定法の開発
3. 学会等名 第69回 日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ouji Y, Misu M, Kitamura T, Yoshikawa M.
2. 発表標題 Characterization of mouse hair follicle stem cells under long-term culture conditions
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 王寺幸輝、濱崎めぐみ、三須政康、北村知嵩、尾崎大輔、島田賢子、濱野真二郎、吉川正英
2. 発表標題 蛍光標識住血吸虫による貝感染におけるリアルタイム可視化の試み
3. 学会等名 第90回 日本寄生虫学会・第32回 日本臨床寄生虫学会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三須政康、吉河智城、黒須剛、高松由基、王寺幸輝、下島昌幸、吉川正英、西條政幸
2. 発表標題 迅速、簡便かつ正確なRNAウイルスの全ゲノム配列決定法の確立
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 王寺幸輝、吉川正英	4. 発行年 2022年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 5
3. 書名 医学のあゆみ 別冊“古くて新しい”住血吸虫症	

1. 著者名 吉川正英、王寺幸輝	4. 発行年 2022年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 7
3. 書名 医学のあゆみ 別冊“古くて新しい病気”トキソカラ症 温故知新	

1. 著者名 吉川正英、北村知嵩、王寺幸輝	4. 発行年 2021年
2. 出版社 日本臨牀社	5. 総ページ数 5
3. 書名 別冊日本臨牀 呼吸器症候群（第3版）IV その他の呼吸器疾患を含めて 呼吸器感染症 イヌ回虫症	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	王寺 幸輝 (Ouji Yukiteru) (50343421)	奈良県立医科大学・医学部・准教授 (24601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------