

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460513

研究課題名(和文) 病態と連関する広東住血線虫の「株strain」の実験的証明

研究課題名(英文) Validation of the "strain" difference of *Angiostrongylus cantonensis* in susceptible and non-susceptible hosts related to the disease pathogenesis

研究代表者

赤尾 信明 (AKAO, Nobuaki)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：00126559

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝的背景の異なる広東住血線虫(Ac)の病原性について検討した。感染感受性の高いスナネズミに10隻を経口感染させたところ、ハワイ株感染群では45日目までにすべての個体は死亡したが、小笠原株と千葉株感染群では30%の個体は生存した。感染後45日目のハワイ株と小笠原株感染スナネズミからはAc本来の寄生部位である肺動脈と心臓から虫体が回収され、糞便内には第1期幼虫も検出された。しかし、千葉株では大部分の虫体は脳内にとどまったままで、肺動脈と心臓に移行した虫体もすでに死亡しており、糞便中にも第1期幼虫は検出されなかった。以上より、異なるハプロタイプを持つAcは病原性にも違いがあることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the disease susceptibility of Mongolian gerbil for *Angiostrongylus cantonensis* (Ac) infection among the isolates exhibiting phylogenetic diversity. The results obtained as follows: 1) all the gerbils infected with 10 larvae of the Hawaiian strain of Ac were dying until 45 days after infection. On the other hand, prolongation of the provability of survivals in gerbils infected with the Ogasawara strain and the Chiba strain were observed. 2) On the 45th day of infection, adult parasites were recovered from pulmonary arteries and heart in the Hawaiian and the Ogasawara strains of Ac, and they showed actively motile. The 1st stage larvae were found in their stools. However, most of parasites found in gerbils infected with the Chiba strain were persisted in the brain and died there. These results indicated that different genetic diversity among Ac strains shows different pathogenesis in gerbils.

研究分野：寄生虫学

キーワード：広東住血線虫 遺伝的多形性 病原性 スナネズミ 感染感受性

1. 研究開始当初の背景

広東住血線虫は家住性ネズミを終宿主とする住血性寄生線虫であり、ヒトを含め多くの哺乳類ではクモ膜下腔に寄生して、好酸球性髄膜脳炎を引き起こす人獣共通寄生虫である。感染ネズミや中間宿主である陸生貝類や軟体動物の調査から、国内の多くの地域に本寄生虫は生息していることが知られていたが、国内各地から採取した広東住血線虫を用いて実施した遺伝子多型解析の結果、国内に分布する広東住血線虫には7つのハプロタイプが存在することをわれわれは明らかにしてきた。一般に、遺伝子多型を示す寄生虫の中には、トキソプラズマ原虫のように、ヒトに対する病原性が異なっているものが知られている。しかし、広東住血線虫においてはハプロタイプの相違と病原性との関連は不明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、国内に分布する主要な3系統のAc株(Hawaii株、小笠原株、千葉株)間で感染感受性の高い中間宿主(スナネズミ)あるいは非好適中間宿主(マウス)において病原性に相違があるか否かを検討することにある。

3. 研究の方法

研究に用いたAcはHawaii株、小笠原株、千葉株で、われわれが行った遺伝子解析の結果から、Hawaii株と小笠原株は同じハプロタイプを持ち、千葉株は東京近郊に分布するAcと同じハプロタイプを持つことをわれわれは報告している<sup>1)</sup>。これら3株のAcを*Bionphalaria glabrata*を中間宿主に実験室内でラットを終宿主として系統維持を行い実験に使用した。

感染にはBALB/c雄マウス(7週齢)とスナネズミ Mongolian gerbil 雌雄(8週齢~10週齢)を用い、マウスにはAc感染幼虫5隻から40隻を、10隻あるいは40隻を経口投与し、生存率、大槽から直接採取した髄液中の好酸球数、髄液中の炎症マーカー、Ac抗原に対する抗体、脳内からの虫体回収とその寄生部位、またスナネズミについては肺や心臓内から回収される虫体長の測定、マウス脳内で死滅・崩壊する虫体を経時的に観察した。

4. 研究成果

(1) Ac感染マウスの重症度を反映する髄液中のBrain Injury Biomarkerの探索

BALB/cマウスにAc Hawaii株40隻を感染させ3週後に血液と大槽穿刺によって髄液を採取した。そして、好酸球数とC反応性タンパク、IL-6、IL-33量を測定し、非感染マウスと比較した。その結果、血清および髄液中のIL-33濃度は、非感染マウスに比べ有意な上昇が見られた( $p < 0.001$ )(図1)。しかし、C反応性タンパクやIL-6の濃度には有意差は見られなかった。

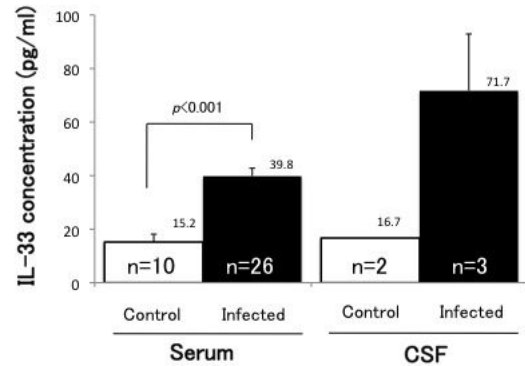


図1 Quantitative determination of IL-33 in mice infected with Ac Hawaiian strain

大槽から直接採取した髄液中の好酸球数は感染マウスで著明に上昇していた(図2)。

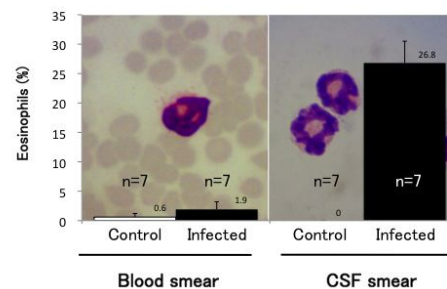


図2 Blood and CSF eosinophils in mice infected with Ac Hawaiian strain

(2) Ac感染マウス髄液の炎症応答

大槽穿刺により直接採取した髄液中の好酸球の変化を経時的に観察したところ、40隻感染マウスでは感染2週目から急上昇し、感染4週目まで持続した(図3)。

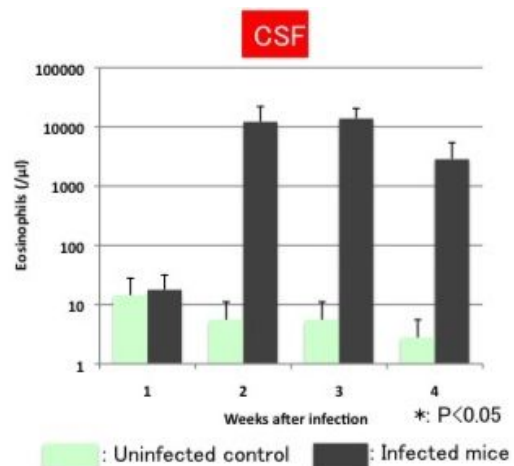


図3 Chronological changes of eosinophil count in mice infected with 40 larvae of Ac Hawaiian strain

しかし、髄液中のAcに対するIgG抗体はほとんど上昇が見られなかった。血清中の抗体は感染2週目から上昇し4週目まで非感染群に比べて有意な上昇を持続した。

40 隻感染マウスの脳室拡張の程度を経時的に画像解析したところ、側脳室と第3脳室の拡張が顕著であったが、第4脳室の拡張は見られなかった。

髄液中の好酸球数や抗体量と感染隻数が相関するか否かを確認するために、感染数を2隻から40隻まで変えて検討したが、感染後2週目の時点での比較では感染隻数に依存する好酸球数の増加は認められなかった。しかしIgG抗体は40隻感染マウスで20隻以下の感染マウス群よりも有意な上昇が見られた。

脳室の拡張の程度と感染隻数との間にも相関は見られず、2隻感染マウスにおいても側脳室の有意な拡張が見られた。

(3) Ac 千葉株は他の2株よりも早期に感染マウス脳内で虫体が崩壊し始める

3分離株感染幼虫5隻を経口投与し脳内に移行した虫体の運動性、崩壊の程度を評価したところ、ハワイ株(図4a)と小笠原株(図4b)は感染18日目まで虫体に変性は全く認められず、活発に運動していたが、千葉株虫体は感染14日目ですでに半数以上の虫体は運動性が消失しており、25日目以降ですべての虫体は崩壊死滅していた(図4c)。

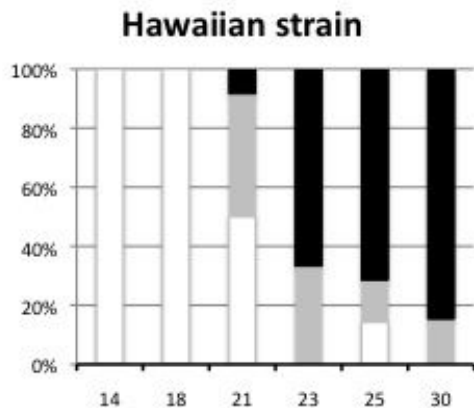


図 4a

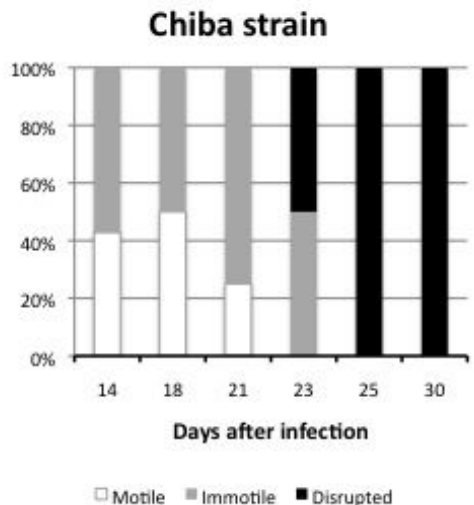


図 4b

### Ogasawara strain

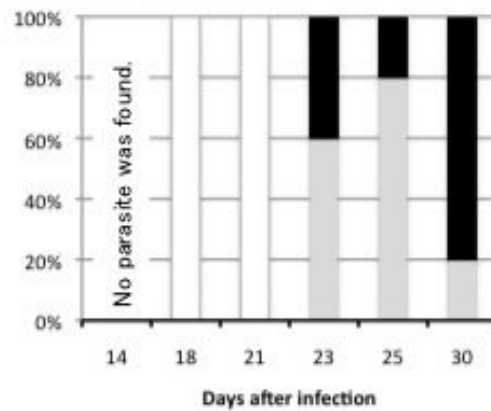


図 4c

崩壊過程にある虫体の腸管内には好酸球を食食している像が観察された。

死滅している虫体において、従来報告のあった角皮の破断像は確認されず、むしろ腸管の崩壊像が顕著であった。

(4) Ac 感染スナネズミの感染感受性は3株間で異なっている

感染幼虫10隻をスナネズミに経口投与するとHawaii株では感染45日目までにすべての個体は死亡した(生存率0%)。しかし、小笠原株、千葉株感染スナネズミでは28.6%、あるいは37.5%の個体が生き延びた。

生存日数の中央値は30.5日(Hawaii株)、34日(小笠原株)、32日(千葉株)であった。

Hawaii株と小笠原株を感染させたスナネズミでは、虫体は脳を脱出してAcの本来の寄生部位である肺動脈に到達していた(図5)。

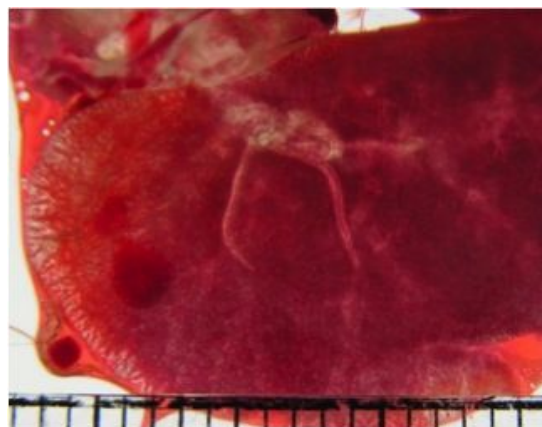


図 5 Adult worm of Ac Hawaiian strain in pulmonary arteries at 34 days after infection.

千葉株では回収された10隻の虫体のうち8隻は未だ脳内にとどまっており、肺動脈あるいは心臓から回収されたものは2隻であ

った。

心臓や肺から回収された Hawaii 株と小笠原株の虫体はすべて活発に運動しており、また糞便内に第 1 期幼虫を搬出していたが、千葉株では脳内の虫体だけでなく心臓と肺動脈から回収された虫体も死別していた。

回収された虫体の計測でも、千葉株は Hawaii 株に較べ発育が悪いことが確認された。

#### 参考文献

[1] Tokiwa T, Harunari T, Tanikawa T, Komatsu N, Koizumi N, C.Tung K, Suzuki J, Kadosaka T, Takada N, Kumagai T, Akao N, Ohta N. Phylogenetic relationships of rat lungworm, *Angiostrongylus cantonensis*, isolated from different geographical regions revealed widespread multiple lineages. *Parasitol International*. 2012;61:431-6.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 6 件)

- [1] Kobayashi T, Hayakawa K, Mawatari M, Itoh M, Akao N, Yotsu RR, Sugihara J, Takeshita N, Kutsuna S, Fujiya Y, Kanagawa S, Ohmagari N, Kato Y. Loiasis in a Japanese Traveler Returning from Central Africa. *Tropical Medicine and Health*. 査読あり. 2015;43:149-53.
- [2] Kong Q, Fan L, Zhang J, Akao N, Dong K, Lou D, Ding J, Tong Q, Zheng B, Chen R, Ohta N, Lu S. Molecular identification of *Anisakis* and *Hysterothylacium* larvae in marine fishes from the East China Sea and the Pacific coast of central Japan. *International Journal of Food and Microbiology*. 査読あり. 2015;199:1-7.
- [3] Anyan WK, Seki T, Kumagai T, Obata-Ninomiya K, Furushima-Shimogawara R, Kwansa-Bentum B, Akao N, Bosompem KM, Boakye DA, Wilson MD, Karasuyama H, Ohta N. Basophil depletion downregulates *Schistosoma mansoni* egg-induced granuloma formation. *Parasitology International*. 査読あり. 2013; 62: 508 -13.
- [4] 稲坂優, 常盤俊大, 赤尾信明, 臼田俊和. 浮腫性紅斑を呈した皮膚顎口虫症. *日本皮膚科学会雑誌*. 査読あり. 2014;124:840.
- [5] 松尾典子, 谷口裕子, 大滝倫子, 赤尾信明. 両下腿に多発した creeping eruption の 1 例. *日本皮膚科学会雑誌*. 査読あり. 2014; 124:1790.
- [6] 安部真由, 奥村陽子, 長野功, 赤尾信明, 清島真理子. 剛棘顎口虫による Creeping

Disease の 1 例. *皮膚科の臨床*. 査読あり. 2014;56: 269 -74.

〔学会発表〕(計 5 件)

- [1] 赤尾信明, 石井美里, 太田伸生. 遺伝的背景の異なる広東住血線虫分離株における非好適宿主脳内虫体の崩壊過程の比較. 第 85 回日本寄生虫学会大会; 2016 2016年3月19日~3月20日; 宮崎市民プラザ(宮崎県宮崎市); 2016.
- [2] 赤尾信明, 石井美里, 太田伸生. 非好適宿主における広東住血線虫の崩壊過程に関する研究. 第74回日本寄生虫学会東日本支部大会; 2015; LEN貸会議室御茶ノ水ニコライ堂前(東京都文京区) 2015.
- [3] 赤尾信明, 太田伸生. 遺伝的背景の異なる広東住血線虫分離株に対するスナネズミの感染感受性についての検討. 第84回日本寄生虫学会大会; 2015; 杏林大学医学部三鷹キャンパス(東京都三鷹市); 2015.
- [4] 赤尾信明, 村上舞, 太田伸生. 広東住血線虫感染によって惹起されるマウス髄膜脳炎の炎症性免疫応答. 第74回日本寄生虫学会東日本支部大会; 2014; 自治医科大学(栃木県下野市); 2014.
- [5] 赤尾信明, 石井明, 常盤俊大, 太田伸生. 広東住血線虫感染マウスの重症度を反映する brain injury biomarkers の探索. 第83回日本寄生虫学会; 2014; 愛媛大学城北キャンパス(愛媛県松山市); 2014.

〔図書〕(計 4 件)

- [1] 赤尾信明. 原虫感染症の検査. 感染症専門医テキスト(第 2 版). 東京; 2016.1200 頁
- [2] 赤尾信明. 寄生虫感染症の検査. 感染症専門医テキスト(第 2 版). 東京: 南江堂; 2016.1021 頁
- [3] 赤尾信明. 寄生虫症. Qシリーズ 新微生物学. 東京: 日本医事新報社; 2016.240 頁
- [4] 赤尾信明. 肝蛭、Toxocara 属、広東住血線虫、コスタリカ住血線虫、旋尾線虫、東洋眼虫、浮遊法. 南山堂医学大辞典. 東京: 南山堂; 2015.3100 頁

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

赤尾 信明 (AKAO, Nobuaki)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号: 00126559