

平成 28 年 5 月 6 日現在

機関番号：80106

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460524

研究課題名(和文) 実用化に向けたエキノコックス終宿主粘膜免疫ワクチンの改良と再感染防御機能解析

研究課題名(英文) Development of practical mucosal vaccine for the final host of Echinococcus multilocularis and characterization of host protective reaction induced by reinfection of the parasite in dogs

研究代表者

孝口 裕一 (KOUGUCHI, Hirokazu)

北海道立衛生研究所・感染症センター感染症部 ・主査

研究者番号：50435567

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：イヌの抗多包条虫ワクチンの開発は将来的に飼いイヌからヒトへ、あるいは終宿主動物の感染率を長期的に下げる有力な手段になる可能性がある。一方、イヌに感染と駆虫を繰り返すと部分的な感染抵抗性を示すという報告があり、再感染によって誘導される虫体排除機序を解明することはワクチン開発を行う上で重要であると考えられる。本研究ではイヌに多包条虫を繰り返し実験感染させ、従来の糞便検査に加え、分子生物学的な解析を行うことにより主要な虫体排除機序の一端を明らかにした。また、繰り返し感染により感染抵抗性を獲得したイヌの虫体排除能は短期的に消失せず、イヌの抗多包条虫ワクチン開発の可能性を裏付けた。

研究成果の概要(英文)：Experimental Echinococcus multilocularis infection and deworming was repeated 3 or 5 times in 9 dogs at various reinfection schedules. The mean number of worms decreased more than 91% in dogs with repeated infection, compared to first infection controls. To examine whether such worm exclusion was a nonspecific response, 5 dogs were sequentially infected with the parasite four times and subsequently fed freely for 6 months. Even after the 6-month interval, the dogs that were infected five times with the parasite were still able to largely exclude the adult worms. The results suggested that the ability of worm exclusion in dogs that developed a resistance was not rapidly extinct. The observation of the faeces condition and the excretion of hooks in the faeces of repeatedly infected dogs revealed that the exclusion of worms started at the first week after the reinfection, and it continued during the patent period. These findings suggested the possibility of developing a vaccine.

研究分野：生化学、分子生物学

キーワード：多包条虫 ワクチン 犬 粘膜免疫 遺伝子 バイオテクノロジー 蛋白質 エキノコックス

1. 研究開始当初の背景

(1) 本邦におけるエキノコックス(多包条虫)症の患者は毎年10~20名程度の発生が見られている。現時点では患者は主に北海道内での感染(虫卵の偶発的な経口接種)が原因であると考えられている。近年、本州でのイヌの多包条虫感染事例も報告され、北海道内でのキツネの多包条虫感染率も依然として30~40%と高い値に推移していることから、注視するべき感染症と考えられる。

(2) 北海道内の飼いイヌのエキノコックス(多包条虫)感染率は、0.4%と報告されている¹⁾。本寄生虫の生活環は一般にキツネと野ネズミの間で維持されており、それにイヌが重要な役割を果たすことは無いと考えられている。しかしながらイヌとヒトとの接触頻度を考慮すると、イヌの感染は飼い主のみならず、その家族・地域住民にとって大きな感染リスクとなる。イヌのワクチンの開発は将来的に飼いイヌからヒトへ、あるいは終宿主動物の感染率を長期的に下げる有力な手段になる可能性がある。一方、イヌに感染と駆虫を繰り返した場合、部分的な感染抵抗性を示すという報告があり²⁾、再感染時に起こる虫体排除機序を解明することはワクチン開発を行う上で重要であると考えられる。本研究ではイヌに多包条虫を繰り返し感染させた場合に起きる虫体排除について検討した。

2. 研究の目的

(1) エキノコックス(多包条虫)症を制御するためには本寄生虫のライフサイクルを長期的に途絶えさせることが有効であるが、そういった手法は開発が困難であり、世界的にも確立された技術は無い。我々は、寄生虫の体表に局在する有力なワクチン抗原候補として見出し、イヌに人為的に感染防御反応を誘導することに成功した³⁾。しかしながら、イヌの感染防御反応が長期的に持続されるか否かについては世界的に見ても見解がない。本研究において、イヌに繰り返し多包条虫の感染と駆虫を繰り返した場合、感染防御反応に持続性があるかどうかを検証した。

(2) また、イヌにおけるエキノコックスの再感染防御反応という未知の現象について分子レベルで解析し、エキノコックス粘膜ワクチンの実用化に向け宿主感染防御の全体像を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ビーグル犬15頭を3群(1回(n=6)、3回(n=2)および5回感染群(n=7))に分け、コトンラットを用いて増殖させた原頭節を50万個経口投与し、実験的にエキノコックスに感染させた。感染期間は原則35日間とした。3回感染群の2頭は7日間~32日間の間隔で感染と駆虫を繰り返した。5回感

染群7頭のうち5頭は、4回連続的に感染と駆虫を繰り返した後、半年間通常飼育し、5回目の感染を行った(表1)。糞便は、感染期間中は毎日(週末1日を除く)採取しプラスチック製のヘラを用いて完全に混合し、同時に下痢・粘液等の糞便の状態を目視で観察した。採取した糞便試料を用いて、糞便内抗原ELISA⁴⁾、排出虫卵数⁵⁾および排出鉤数測定を行った。排出鉤数測定は、AMS法⁶⁾により行った。

(2) 再感染時における虫体排除時期を調べるため、ビーグル犬8頭を1回(n=4)および、4回感染群(n=4)に分け、コトンラットを用いて増殖させた原頭節を10万個経口投与し、実験的にエキノコックスに感染させた。1回感染群の感染期間は6日とし、4回感染群は、35日間の感染を3回繰り返した後、4回目の感染期間を6日とし、安楽死後剖検を行った。駆虫から再感染までの間隔は1~2週間とした。

(3) 6日目の感染イヌ(1回感染および4回感染)および健常イヌ小腸を採取し、HE染色により、比較病理解析を行った。同様に、3種類のイヌの小腸組織から、RNAを抽出し、CanineオリゴDNAマイクロアレイ Ver.2.0(Agilent社製)を用いてDNAマイクロアレイ比較解析を行った。その結果を基に、リアルタイムPCRによる遺伝子の発現解析を行い、健常イヌに比べて、感染イヌではどのような遺伝子がより多く発現しているのかを調べた。リアルタイムPCRはAihara et al.⁷⁾の報告に従って行った。

表1. イヌを用いた多包条虫の繰り返し感染スケジュールおよび35日目における虫体数

Dog groups	Times of infection	Worm numbers	Age of dogs (at final infection)	Period of infection	Days between infections
Control					
C1	1	184,575	8	35	
C2	1	62,275	8	35	
C3	1	264,818	14	35	
C4	1	116,875	13	35	
C5	1	90,438	11	35	
C6	1	18,633	14	35	
Average		122,936*			
Reinfection					
R1	3	1,005	8	55, 50, 35	14, 32
R2	3	10,800	8	35, 35, 35	7, 7
Average		5,903			
Reinfection					
R3	5	65	20	44, 77, 41, 52, 35	18, 14, 175, 98
R4	5	450	14	35, 35, 35, 28, 35	7, 7, 7, 7
R5	5	1,530	14	33, 36, 35, 35, 35	21, 12, 7, 189
R6	5	467	14	33, 36, 35, 35, 35	34, 13, 49, 184
R7	5	875	14	33, 36, 35, 35, 35	34, 13, 49, 184
R8	5	2,067	14	35, 35, 35, 35, 35	13, 8, 7, 184
R9	5	5	14	35, 35, 35, 35, 35	13, 8, 7, 184
Average		780*			

4. 研究成果

(1) 感染と駆虫を繰り返したイヌの虫体数の平均値は、初感染コントロールのそれに比べ、91%以上の減少を示した(表1)。糞便内抗原および排出虫卵数は、イヌが感染を繰り返す度に減少し(表2)、それは再感染が起きるたびに虫体数が減少していくこ

と示唆した。5回感染群は、半年間の間隔をあけても初感染コントロールに比べ、99%以上の虫体数の減少を示し、繰り返し感染により感染抵抗性を獲得したイヌの虫体排除能が短期的に消失しないことを示唆した。これらの情報は犬における多包条虫感染にも再感染に対する防御機構が存在することを示唆しており、イヌの抗多包条虫

表2. 多包条虫を1, 3および5回感染繰り返し感染させたイヌからの排出虫卵数(感染後26~35日目の合計数)

Time of infections	Mean number of eggs/dog			
	R6	R7	R8	R9
First	2.68 (±0.33) ×10 ⁶	5.89 (±0.68) ×10 ⁶	5.58 (±0.55) ×10 ⁶	2.90 (±0.38) ×10 ⁶
Third	2.97 (±0.65) ×10 ³	3.03 (±0.35) ×10 ³	3.20 (±0.23) ×10 ³	6.85 (±0.23) ×10 ³
Fifth	N.D	119 (±30)	N.D	N.D

ワクチン開発の可能性を裏付けるものであった。一方、全ての再感染イヌで有意な虫体排除が確認されたものの、多くの個体で成虫が完全に排除されることは無く、寄生虫の生残と発育が起きると効果的な免疫応答の発現がなされないと考えられた。糞便中の排出鉤数は感染初期に大量に排出される場合が多く、また、下痢や粘液の排出も

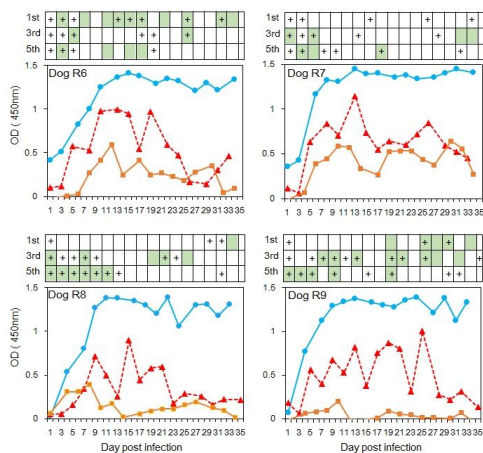


図1. 多包条虫を1, 3および5回感染繰り返し感染させたイヌの糞便検査

糞便内に排出された鉤は(+)で示され、緑色網掛けは下痢・粘液が観察された区間を表す。これらの結果については、感染後2日間を1区間として35日目までの結果を示した。ELISA値(O.D 450nm)は1回() 3回() および5回() 感染群の1~35日目の糞便を用いて2日おきに測定した。

同時に観察されたことから、繰り返し感染させたイヌの虫体排除が、感染初期(2~7日目)に起きていることが示唆された(図1)。下痢および粘液の排出回数は、イヌに繰り返し感染させるたびに、より多く観察される傾向があった。糞便内抗原量は、糞便内抗原ELISAによって測定された。いずれのイヌでも初回感染より、3回および5回と感染回数が増えるたびに、排出抗原量の減少が観察された(図1)。これは、再感染の度に虫体数が減少していることを示唆し、前述した、再感染時において、排出虫卵数が減少していくという結果と一致した。これらの実験により、再感染ごとに、虫体排除反応が増強されること、また、再感染のどのタイミングで虫体排除が起きているのかを特定できた。この結果に基づき、感染初期の再感染イヌの小腸組織の病理学的観察および網羅的遺伝子発現解析を行い、さらにイヌの虫体排除機序の検討を進めた。

表3. イヌを用いた多包条虫の繰り返し感染スケジュールおよび感染後6日目の虫体数

Dog groups	Times of infection	Worm numbers	Age of dogs (at final infection)	Period of infection	Days between infections
Control					
C1	1	43,175	8	6	
C2	1	41,075	8	6	
C3	1	29,950	8	6	
C4	1	55,175	8	6	
Average		42,344*			
Reinfection					
R1	4	9,450	8	30, 34, 35, 6	14, 8, 14
R2	4	N.D	8	30, 34, 35, 6	14, 8, 14
R3	4	11,450	8	30, 34, 35, 6	14, 8, 14
R4	4	3,050	8	30, 34, 35, 6	14, 8, 14
Average		5,988*			

(2) 繰り返し多包条虫の感染を受けたイヌの虫体排除機序について、更に検討するため、イヌ8頭を2群に分け、4頭は1回感染コントロール群、もう一方の4頭は、4回感染群とした。感染初期(6日目)の解剖検査において、4回繰り返し群の虫体数の平均値は、1回感染群のそれに比べて86%以上減少しており、実際に再感染後6日目において主要な虫体排除が進行していることが明らかになった(表3)。剖検時に同時に採取した小腸組織(胃から盲腸までを6等分し中央部分を採取)をHE染色し、健常イヌのそれらと比較病理解析を行った。その結果、通常組織と比べて1回および4回再感染イヌの組織にも著変は見当たらず、炎症、好酸球あるいは好中球の集積なども見当たらなかった(図2)。4回繰り返しイ

又の絨毛には、若干の成長不良が認められた。

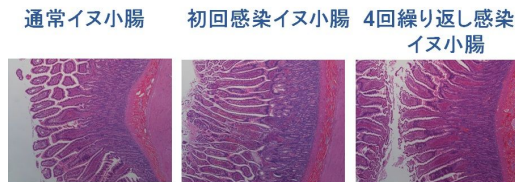


図2. 多包条虫を1, 3および5回感染繰り返し感染させたイヌの小腸組織(x40)の比較(感染後6日目)

(3) 剖検時に同時に採取した小腸組織(胃から盲腸までを6等分し中央部分を採取)は即座に氷温にしたRNAlater(Life technologies社製)中で振とうし、一晚4 RNA保護剤を浸透させた。使用まで-80で保管し、添付のプロトコールに従ってtotal RNAの抽出を行った。その試料のインテグリティをチェックすると、結果に影響を及ぼす程の分解はなく、DNAマイクロアレイ解析(Canine オリゴ DNA マイクロアレイ Ver.2.0, Agilent社製)を実施した。その結果、健常イヌコントロールに比べ発現が2倍以上上昇した遺伝子数は、1回感染群で1916、4回繰り返し感染群で2950であった。同様に2倍以上減少した遺伝子数は、初感染群で2418、4回繰り返し感染群で3485であった。変動のあった遺伝子数は、上昇および減少ともに4回繰り返し感染群のほうが、それぞれ1.44倍および1.54倍多い結果となった。

上昇した遺伝子の内訳は、炎症や組織修復に関わる遺伝子が多くを占めていた。DNAマイクロアレイ解析において、これらの遺伝子の多くは4回感染群のほうがより変動が大きいことを示していた。これらの結果は1回感染イヌに比べて、4回繰り返し感染群の小腸組織内で、より複雑な反応が行われていることを予測させた。

(4) DNAマイクロアレイの結果を基に、健常イヌ、1回感染イヌおよび4回感染イヌ小腸組織内の炎症や、組織修復に関わる遺伝子発現をリアルタイムPCRにより調べた(図3)。その結果、インターフェロン γ 遺伝子に関しては3群の間に有意差は認められず、IL4遺伝子は検出限界以下であった。腫瘍壊死因子(TNF- α)遺伝子の相対発現量は1回感染イヌが健常群および4回感染群よりも2.2倍高かった。トランスフォーミング増殖因子(TGF- β)遺伝子は、1回感染および4回感染群のほうが健常群のそれよりも約2倍発現量が上昇していた。繊維芽細胞成長因子(FGF)遺伝子では、1回感染群が2.7倍、4回感染群は4.9倍健常群のそれよりも発現が上昇していた。コラーゲン型および型遺伝子は、1回感染

群では約2~3倍、4回感染群では約5~6倍健常群よりも発現が上昇していた。コラーゲン型遺伝子は1回感染群および4回感染群とも、健常群より約5倍発現が上昇していた。細胞外マトリクスを構成する接着分子であるフィブロネクチン遺伝子は1回感染群は約6倍、4回感染群は約13倍、健常群のそれより高い値を示した。これらの結果から、4回目の再感染6日目の小腸組織内において、組織修復機能が亢進し、組織のターンオーバーが強く行われていることが推察された。この結果は、絨毛が短いという病理所見と関連し得る。一方、炎症関連遺伝子の上昇があまり観察されなかったことから、6日目には既に炎症のピークが過ぎ、組織修復が強く始まっている可能性も考えられた。いずれにせよ著しい虫体排除には虫体が幼弱である感染初期により早く、炎症由来する強い下痢・組織脱落(粘液)が引き起こされることが重要であると考えられた。感染後より早い段階での組織内での多くの遺伝子発現を調べる必要があるが、本課題で得られた新しい知見は、今後の終宿主ワクチンの開発に向けた重要な情報であると考えられた。

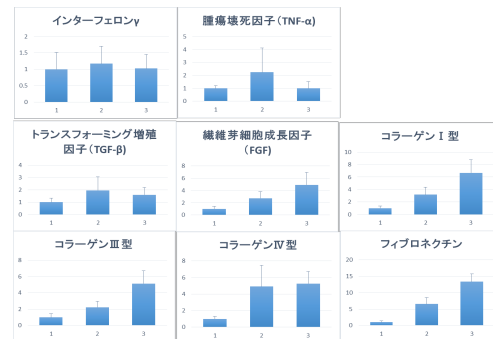


図3. 多包条虫を1, 3および5回感染繰り返し感染させたイヌの小腸組織(感染後6日目)における炎症および組織修復関連遺伝子のリアルタイムPCRを用いた相対発現比較 1: 健常群、2: 1回目感染群、3: 4回目感染群

参考文献

- 1) Nonaka N. et al. *Vector Borne Zoonotic Diseases*. 2009, 9, 201-6
- 2) Tanaka, R. *Japanese Journal of Veterinary Research*, 1998, 46, 138-139
- 3) Kouguchi H et al. *PLoS One*. 2013 8(7): e69821
- 4) Nonaka, N. et al. *Annals of Tropical Medicine and Public Health*, 2011, 105, 521-530
- 5) Morishima, Y. et al. *Parasitology International*, 1999, 48, 121-134
- 6) Hunter, G.W. 3rd, & Hodges E.P. *Bulletin of*

the U. S. Army Medical Department, 1948, 8, 128-131

7) Aihara, Y et al. Stroke, 2001, 32, 212-217.

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 8 件)

The timing of worm exclusion in dogs repeatedly infected with the cestode *Echinococcus multilocularis*.

Kouguchi H, Irie T, Matsumoto J, Nakao R, Sugano Y, Oku Y, Yagi K. J Helminthol. (2016) in press.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26750177>
査読有り

Analysis on gene expression profile in oncospheres and early stage metacestodes from *Echinococcus multilocularis*. Huang F, Dang Z, Suzuki Y, Horiuchi T, Yagi K, Kouguchi H, Irie T, Kim K, Oku Y. PLOS Neglected Tropical Diseases, (2016) in press. 査読有り

First detection of *Echinococcus multilocularis* infection in two species of nonhuman primates raised in a zoo: a fatal case in *Cercopithecus diana* and a strongly suspected case of spontaneous recovery in *Macaca nigra*.

Yamano K, Kouguchi H, Uraguchi K, Mukai T, Shibata C, Yamamoto H, Takaesu N, Ito M, Makino Y, Takiguchi M, Yagi K.

Parasitol. Int. (2014), 63(4):621-6. doi: 10.1016/j.parint.2014.04.006. 査読有り

実験室内における多包条虫卵の不活化条件に関する諸検討 入江隆夫、孝口裕一 北海道立衛生研究所報 (2014) 64、63-65
http://www.iph.pref.hokkaido.jp/Kankobutsu/Shoho/annual64/15_n08.pdf 査読有り

http://www.iph.pref.hokkaido.jp/Kankobutsu/Shoho/annual64/21_s06.pdf 査読有り

北海道の多包条虫に対するネコの感受性及び市販スポットオン駆虫薬(エモデブシ

ド・プラジクアンテル製剤)の駆虫効果の検討 孝口裕一、八木欣平 北海道立衛生研究所報 (2014) 64 97-99
http://www.iph.pref.hokkaido.jp/Kankobutsu/Shoho/annual64/22_s07.pdf 査読有り

Characterization of a surface glycoprotein from *Echinococcus multilocularis* and its mucosal vaccine potential in dogs.

Kouguchi H, Matsumoto J, Nakao R, Yamano K, Oku Y, Yagi K.

PLoS One. (2013) 8(7):e69821. doi: 10.1371/journal.pone.0069821. 査読有り

〔学会発表〕(計 16 件)

北海道のエキノコックス症媒介動物対策 八木欣平、奥祐三郎、浦口宏二、孝口裕一、山野公明、入江隆夫、野中成晃、福本真一郎、森嶋康之、小林文夫、神谷正男、吉川泰弘 第85回日本寄生虫学会 2016年3月20日 宮崎市民プラザ(宮崎県・宮崎市)

犬の糞便内エキノコックスDNAの抽出方法の検討 入江隆夫、伊東拓也、孝口裕一、山野公明、浦口宏二、八木欣平 第85回日本寄生虫学会 2016年3月20日 宮崎市民プラザ(宮崎県・宮崎市)

Expression level analysis of antigens in oncosphere and early stage metacestode from *Echinococcus multilocularis*

Huang Fuqiang, 八木欣平、孝口裕一、入江隆夫、鈴木穰、堀内映実、金京純、党志勝、奥祐三郎 第85回日本寄生虫学会 2016年3月20日 宮崎市民プラザ(宮崎県・宮崎市)

Characterization of glucose transporter genes from fox tapeworm *Echinococcus multilocularis* Takuya Kashiide, Shingo Kikuta, Misaki Yamaguchi, Toru Kato, Takao Irie, Hirokazu Kouguchi, Kinpei Yagi, Jun Matsumoto

Molecular and Cellular Biology of Helminth Parasites IX, 31 August - 5 September 2015

Hydra (Greece)

Molecular and functional characterization of glucose transporter genes from *Echinococcus multilocularis*

Takuya Kashiide, Shingo Kikuta, Misaki Yamaguchi, Toru Kato, Takao Irie, Hirokazu Kouguchi, Kinpei Yagi, Jun Matsumoto

25th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, 16-20 August, 2015. Liverpool (United Kingdom)

The urban fox population and the risk assessment of *Echinococcus* in Sapporo, Japan. Kohji Uraguchi, Takao Irie, Hirokazu Kouguchi IWMC 2015 Vth International Wildlife Management Congress 2015, July 26-30 2015 Sapporo (Japan).

エキノコックスを繰り返し連続的に感染させたイヌの再感染抵抗性について

孝口 裕一、入江 隆夫、松本 淳、山野 公明、浦口 宏二、奥 祐三郎、八木 欣平

第 8 回蠕虫研究会、2014 年 9 月 6 日、ホテル鹿の湯 (北海道・札幌市)

北海道株多包条虫虫卵の凍結および試薬処理による不活化の検討 入江隆夫、孝口裕一 第 157 回日本獣医学会学術集会、2014 年 9 月 10 日 北海道大学 (北海道・札幌市)

多包条虫感染イヌの血清および腸管粘液を利用した終宿主粘膜ワクチン抗原候補の探索 孝口裕一、松本 淳、中尾 亮、山野公明、入江隆夫、奥 祐三郎、八木欣平

第 59 回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会北日本支部合同大会 2013 年 10 月 5 日 酪農学園大学 (北海道・江別市)

エキノコックス由来表面タンパク質の性質とそのイヌにおける潜在的粘膜ワクチン効果 孝口裕一、松本 淳、中尾 亮、山野公明、入江隆夫、奥 祐三郎、八木欣平 第 86 回生化学会大会 2013 年 9 月 13 日 パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

孝口 裕一 (KOUGUCHI, Hirokazu)
北海道立衛生研究所・感染症センター
感染症部・主査
研究者番号：50435567

(2) 研究分担者

山野 公明 (YAMANO, Kimiaki)
北海道立衛生研究所・感染症センター
感染症部・主査
研究者番号：40435566

八木 欣平 (YAGI, Kinpei)
北海道立衛生研究所・感染症センター
感染症部・部長
研究者番号：70414323

(3) 連携研究者

奥 祐三郎 (OKU, Yuzaburo)
鳥取大学・農学部・獣医学科・教授
研究者番号：60133716

松本 淳 (MATSUMOTO, Jun)
日本大学・生物資源学部 獣医学科・准教授
研究者番号：70296169

浦口 宏二 (URAGUCHI, Koji)
北海道立衛生研究所・感染症センター
感染症部・主幹
研究者番号：80414324