

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24380163

研究課題名(和文) 犬における内臓リーシュマニア症の病態解明と原虫存続機構の分子基盤

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of pathogenesis and parasite persistence in canine visceral leishmaniasis

研究代表者

片倉 賢 (KATAKURA, Ken)

北海道大学・(連合) 獣医学研究科・教授

研究者番号：10130155

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,800,000円

研究成果の概要(和文)：インド亜大陸の内臓リーシュマニア症の伝播における犬の役割は不明である。本研究では、バングラデシュの本症流行地において、犬のリーシュマニア感染調査を行い、約10%の野犬が抗体陽性あるいは末梢血のPCR陽性であることを明らかにした。次に、実験用ビーグル犬にリーシュマニア原虫を接種して解析した。その結果、臨床症状や血液性状に異常は認められず、また、PCR検査や原虫分離検査も陰性であったが、長期にわたる抗体産生が認められた。以上、*Leishmania donovani*に感染した犬は、不顕性感染として原虫を保持する保虫宿主として、内臓リーシュマニア症の伝播に関与している可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Visceral leishmaniasis (VL) in humans in the Indian subcontinent is caused by infection with *Leishmania donovani* and the transmission is thought to be anthroponotic. The prevalence of *L. donovani* infection and the role of VL transmission in dogs have not been well investigated. The present epidemiological study showed that approximately 10% of stray dogs were serological or PCR positive in the blood in a VL endemic area in Bangladesh, but no severe clinical symptoms were observed. Experimental infection of beagle dogs with *L. donovani* showed that no remarkable changes were detected in clinical signs, hematological and serum biochemical values, and peripheral T lymphocyte subpopulations. Although these dogs were negative for PCR examinations, antibodies were detected during the experimental period. Taken together, the results suggest that dogs infected with *L. donovani* maintain the latent infection, but serve as the reservoir animal for the transmission of human VL.

研究分野：寄生虫学

キーワード：内臓リーシュマニア症 *Leishmania donovani* 血清診断 PCR診断 犬 制御性T細胞 病態 バングラデシュ

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 内臓リーシュマニア症と犬の役割

人の内臓リーシュマニア症の旧大陸における分布をみると、ヨーロッパから北アフリカおよび中東にかけては *Leishmania infantum* が原因虫種である。この地域では犬が保虫宿主として重要な役割をする zoonotic な伝播であるとされる。一方、東アフリカ諸国やインド、ネパール、バングラデシュなどのインド亜大陸では *L. donovani* が主要原虫種である。これらの地域では、原虫はサシチョウバエによって人から人へ伝播される anthroponotic な伝播であるといわれており、犬における感染状況と伝播における役割は不明のままである (図 1)。

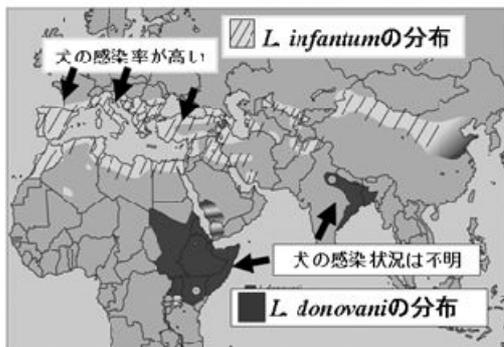


図 1. *Leishmania infantum* と *L. donovani* による内臓リーシュマニア症の分布と犬の感染状況。

### (2) 内臓リーシュマニア症の病態モデル

内臓リーシュマニア症は肝臓、脾臓、骨髄などのマクロファージ系細胞内で原虫が増殖することに起因するが、原虫種と宿主の組み合わせで症状が異なる。

マウスモデルにおいては、臓器特異的免疫応答が原虫持続に重要である。正常マウスでは原虫の増殖は感染初期に肝臓で行われるが、感染 4 週目頃には肉芽腫が形成され原虫は除去される。一方、脾臓においては、初期免疫が成立して原虫の排除が起こるが、感染の後期になると免疫不全状態になることによって原虫が増殖・存続する。この免疫学的変化にはケモカインやサイトカイン、とくに  $\text{TNF-}\alpha$  や  $\text{IL-10}$  が重要な役割を果たしていることが知られている。最近われわれは、免疫不全マウス (*aly/aly*) を用いた内臓リーシュマニア症のモデルでは、 $\text{Foxp3}^+$   $\text{CD4}^+$ T 細胞 (制御性 T 細胞, Treg) が臓器内原虫の維持・存続に関与していることを明らかにした。

犬における *L. infantum* 感染では、全身性の皮膚症状を呈するが、所属リンパ節経由で原虫が皮膚へ移行する可能性が示されている。しかし、犬における *L. donovani* の感染病態はほとんど研究されていない。また、

犬のリーシュマニア感染における Treg の役割に関する知見は少ない。これらの解明には、疫学的アプローチと実験的アプローチが必要である。

### (3) エキソソーム

近年、ヒトやマウスの各種細胞からエキソソームと呼ばれる直径 30-100 nm の小型膜小胞が放出され、細胞間の情報伝達機能を介して、免疫や病態を調節していることが明らかになってきた。エキソソームは、リーシュマニア原虫をはじめ各種寄生虫からも放出されていることが判明しており、エキソソームに含まれる分子の宿主への影響や寄生戦略における役割の解析が進められている。

## 2. 研究の目的

本研究は、アジア・アフリカにおける内臓リーシュマニア症の主要原虫種である *L. donovani* に焦点をあて、以下の項目について解析することを目的とした。

(1) バングラデシュの流行地における犬のリーシュマニア自然感染例の実体とその病態の解析。(2) 実験的犬リーシュマニア症の病態と制御性 T 細胞 (Treg) の役割の解析。(3) リーシュマニア原虫が放出するエキソソームの分析。

## 3. 研究の方法

### (1) 疫学研究

バングラデシュ農業大学獣医学部の協力のもと、バングラデシュの北部中央の内臓リーシュマニア症流行地であるマイメンシン区において、犬 50 頭を捕獲し採血した (図 2)。

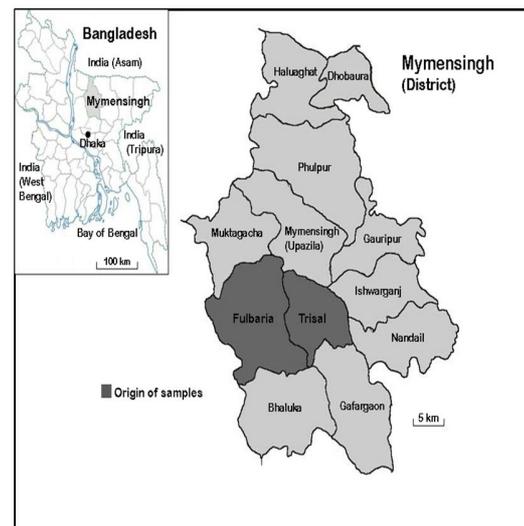


図 2. バングラデシュの内臓リーシュマニア症流行地 (マイメンシン区) における野犬の捕獲地

血清学的診断として、簡易血清キット (Kalazar Detect™, rk39 dipstick)を用いた抗 rk39 抗体の検出とウエスタンブロッティング解析を行った。DNA 診断として、末梢血白血球から DNA を抽出し、リーシュマニアの ITS 領域を標的とした PCR (ITS-PCR) 検査を実施した。

## (2) 実験的犬リーシュマニア症モデル

実験的アプローチにおいて、第 1 回目の実験では、ビーグル犬 3 頭に *L. donovani* の promastigote 型虫体  $4.3 \times 10^9$  を静脈内注射した (北海道大学動物実験計画承認番号 13-0149)。毎日の臨床症状の観察、約 1 ヶ月間隔での採血、1, 3, 5 および 8 ヶ月後の超音波診断装置ガイド下における肝臓生検、原虫接種 8 ヶ月半後における剖検を実施した。肝臓の生検材料と剖検時の肝臓と脾臓については、組織を磨砕したのち培養し、原虫の分離を試みた。血液については、一般血液検査 (赤血球数、白血球数、白血球百分比、血小板数、ヘマトクリット値) 生化学検査 (Alb, A/G 比, GOP, GPT,  $\gamma$ -GT, UN, CRE)、原虫 DNA の ITS-PCR 検査と原虫キネトプラスト DNA (kDNA) を標的とした real-time PCR (kDNA-qPCR) 検査を行った。血清についてはウエスタンブロッティングによる抗原の分子量解析を行った。末梢血単核球については、フローサイトメーターによって CD4<sup>+</sup>T cell、CD8<sup>+</sup>T cell、CD25<sup>+</sup>T cell、Foxp3<sup>+</sup>細胞の各割合を測定した。肝臓の生検サンプルについては、PCR 検査と組織学的検査を実施した。

第 2 回目の実験では、シクロスポリンを 1 ヶ月間毎日経口投与して免疫抑制を導いたビーグル犬 2 頭に原虫を静脈内接種し、2 および 4 週間後の血液材料と剖検材料を精査した。

## (3) エキソソーム蛋白質の分析

原虫接種実験に用いた *L. donovani* 原虫を培養液で 3 - 4 日培養し、培養液中に含まれるエキソソームをキット (ExoQuick™) を用いて回収した。エキソソームの粒径は、ゼータ電位粘度分布測定装置を用いて測定した。エキソソームの主要蛋白質は、ポリアクリルアミドゲルで蛋白質を分離後、飛行時間型質量分析装置 (MALDI-TOF-MS) を用いて分析した。

## 4. 研究成果

### (1) 疫学研究

バングラデシュで捕獲した 50 頭の野犬のうち、6 頭 (12%) が rk39 抗体陽性を示した (図 3 に一例を示す)。

また 5 頭 (10%) が ITS-PCR 陽性反応を示した (図 4)。

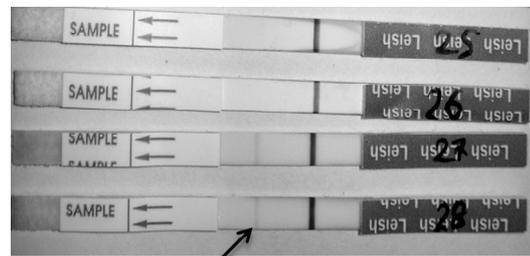


図 3. rk39 dipstick による犬の内臓リーシュマニア症の簡易血清診断。

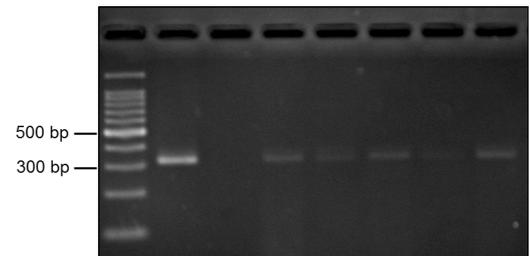


図 4. ITS-PCR によるイヌ末梢血液からのリーシュマニア DNA の検出。

ウエスタンブロッティング解析では、9 頭 (18%) に陽性反応がみられた。しかし、共通抗原は特定できなかった。

このことから、バングラデシュにおいては、犬が内臓リーシュマニア症の保虫動物としての役割を果たしている可能性が示唆された。しかし、3 つのリーシュマニア症の診断法の結果が必ずしも一致しなかったことから、感度、特異性についてのさらなる検討が必要である。

## (2) 実験的犬リーシュマニア症モデル

北海道大学獣医学研究科内の P2 レベル感染動物施設内で、まず第 1 回目にビーグル犬 3 頭を用いた感染実験を実施した。当初、脾臓の生検も実施する予定であったが、脾臓は小さく技術的に困難であること、また原虫接種後に脾腫が生じなかったことから、脾臓生検は実施しなかった。原虫接種に伴う体重減少は 3 頭とも認められず、接種後 8 ヶ月までの血液と肝臓生検材料の ITS-PCR および kDNA-qPCR はいずれも陰性であった。血液検査においては、貧血や血小板減少は認められず、また、生化学的検査結果にも特に異常は認められなかった。末梢血 T 細胞のサブpopulation についてフローサイトメトリーによる解析を行ったが、CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>細胞 (Treg) の末梢血数および CD4<sup>+</sup> T 細胞に対する割合は、6 ヶ月後にやや高値を示したが、特に目立った変化は認められなかった (図 5)。

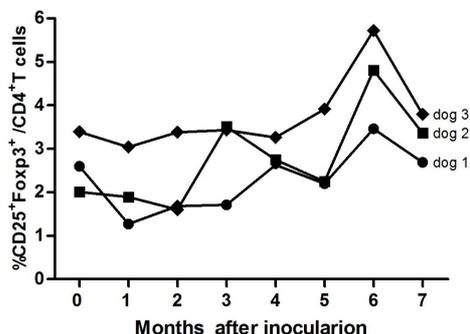


図 5. リーシュマニア原虫を接種した犬の末梢血 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>細胞(Treg)の CD4<sup>+</sup>T細胞に対する割合の経時変化。

肝臓生検材料および剖検時の肝臓と脾臓組織については、磨砕後に3週間培養したが、原虫を分離することはできなかった。また、肝臓生検材料については、パラフィン包埋後HE染色標本を作製し、組織学的検査を行ったが、肉芽腫などの著明な病変は認められなかった。

血清のウエスタンブロット解析では、3頭すべてにおいて原虫接種後1ヶ月から約90 kDaの抗原に対する抗体が、剖検時の8ヶ月半後でも検出された。この産生量は経時的減少が認められた(図6)。今後、90 kDa蛋白質の同定を行うことで、犬において高い抗原性を持つ原虫由来物質が明らかになることが期待される。

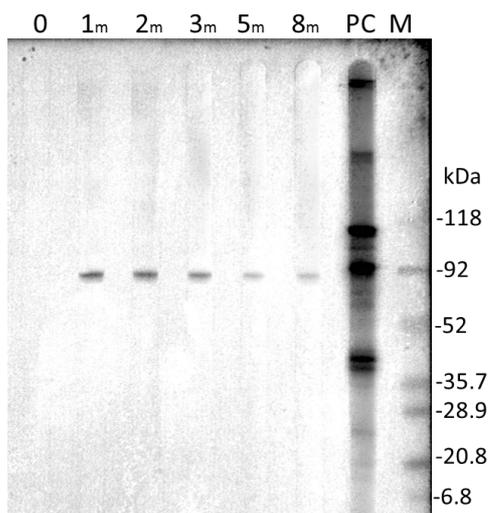


図 6. 実験的に原虫を接種した犬血清のウエスタンブロット解析像。陽性コントロール(PC)として内臓リーシュマニア症と診断された犬血清を用いた。接種前および1、2、3、5、8ヶ月後の血清(0、1m、2m、3m、5m、8m)は100倍希釈で使用し、2次反応試薬としてHRPラベルのprotein Gを用い、ECL Plus<sup>TM</sup>キットによる発光を検出した。

第2回目の原虫接種実験では、シクロスポリンを1ヶ月間経口投与して免疫抑制を導いたが、原虫接種後2および4週間目における血液ならびに剖検材料のPCR検査や培養検査は陰性であった。

以上、ビーグル犬を用いた2回の原虫接種実験においては、原虫の分離や原虫DNAの検出をすることができなかった。そのためリーシュマニア原虫が生存・存続しているという確実な証拠を得ることができなかったが、特定の抗原に対して8ヶ月という長期にわたり抗体を産生している事実が明らかとなった。今後は、追加実験によって*L. donovani*による犬リーシュマニア症のさらなる病態解明が必要であると考えられた。

### (3) エキソソーム蛋白質の分析

*L. donovani*由来エキソソームに含まれる蛋白質の一部の同定をMALDI-TOF-MSとMascot Searchを用いて試みた。その結果、本解析法では全体で26種類の蛋白質リストが得られた。そのうち11種類(probable eukaryotic inhibition factor 4A, 40S ribosomal protein SA, probable 60S ribosomal protein L14, heat shock 70 kDa protein, receptor-type adenylate cyclase A, S-adenosylmethionine synthase, elongation factor Ts (mitochondrial), histon H3, kinesin-like protein K39 (fragment), leishmanolysin, protein phosphatase 2C)は既知のリーシュマニアのエキソソーム蛋白質と一致した。残りの15種類はこれまで報告のない蛋白質であった。ただし、今回は予備的な実験であるため、今後は高速液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS/MS)などを用いた蛋白質同定や遺伝子オントロジー解析法(GO)などを用いた蛋白質の機能解析によって、リーシュマニア原虫のエキソソーム蛋白質の役割が明らかになることが期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計12件)( 以外はすべて査読有り)

Terao M, Akter S, Yasin Md.G, Nakao R, Kato H, Alam MZ, Katakura K: Molecular detection and genetic diversity of *Babesia gibsoni* in dogs in Bangladesh. *Infect Genet Evol* 31:53-60, 2015.

doi: 10.1016/j.meegid.2015.01.011

Ikeda T, Yoshimura M, Onoyama K, Oku Y, Nonaka N, Katakura K: Where to deliver baits for deworming urban red foxes for *Echinococcus multilocularis* control: new protocol for micro-habitat modeling of fox denning requirements. *Parasit Vectors*

7(1):357, 2014.

doi:10.1186/1756-3305-7-357

Alam MZ, Bhutto AM, Soomro FR, Baloch JH, Nakao R, Kato H, Schönian G, Uezato H, Hashiguchi Y, Katakura K: Population genetics of *Leishmania (Leishmania) major* DNA isolated from cutaneous leishmaniasis patients in Pakistan based on multilocus microsatellite typing. *Parasit Vectors* 7(1): 332, 2014.

doi: 10.1186/1756-3305-7-332.

Chiba R, Amagai Y, Tanaka A, Katakura K, Matsuda H.: Nerve growth factor promotes killing of *Leishmania donovani* by macrophages through the induction of hydrogen peroxide. *Microbes Infect* 16(8): 702-706, 2014.

doi: 10.1016/j.micinf.2014.06.001

Bawm S, Shimizu K, Hirota J, Tosa Y, Htun LL, Maw NN, Thein M, Kato H, Sakurai T, Katakura K: Molecular prevalence and genetic diversity of bovine *Theileria orientalis* in Myanmar. *Parasitol Int* 63(4): 640-645, 2014.

doi: 10.1016/j.parint.2014.04.009

Alam MZ, Nakao R, Sakurai T, Kato H, Qu J-Q, Chai J-J, Chang K-P, Schönian G, Katakura K: Genetic diversity of *Leishmania donovani/infantum* complex in China through microsatellite analysis. *Infect Genet Evol* 22, 112-119, 2014.

doi: 10.1016/j.meegid.2014.01.019

Nzulu CO, Gomez EA, Cáceres AG, Sakurai T, Martini-Robles L, Uezato H, Mimori T, Katakura K, Hashiguchi Y, Kato H: Development of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid mass-screening of sand flies for *Leishmania* infection. *Acta Trop* 132:1-6, 2014.

doi: 10.1016/j.actatropica.2013.12.016.

片倉 賢: 原虫・寄生虫検査に強くなるⅢ 線虫類、糸虫類. *臨床と微生物* 40(4) 347-352, 2013.

[https://www.kindai-s.co.jp/products/list.php?category\\_id=37](https://www.kindai-s.co.jp/products/list.php?category_id=37)

片倉 賢: リーシュマニア症の分子疫学: 南・東アジアを中心として. *獣医寄生虫学会誌* 11(2) 61-70, 2013.

<http://jsvp.umin.jp/kaishi.html>

Alam MZ, Yasin MG, Kato H, Sakurai T, Katakura K: PCR-based detection of *Leishmania donovani* DNA in a stray dog from a visceral leishmaniasis endemic focus in Bangladesh. *J Vet Med Sci* 75, 75-78, 2013.

doi:10.1292/jvms.12-0134

Tiwananthagorn S, Iwabuchi K, Ato M,

Sakurai T, Kato H, Katakura K: Involvement of CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in persistence of *Leishmania donovani* in the liver of alymphoplastic *aly/aly* mice. *PLoS Negl Trop Dis* 6, e1798, 2012.

doi:10.1371/journal.pntd.0001798

Tiwananthagorn S, Bhutto AM, Baloch JH, Soomro FR, Kawamura Y, Nakao R, Aoshima K, Nonaka N, Oku Y, Katakura K: Zoophilic feeding behaviour of phlebotomine sand flies in the endemic areas of cutaneous leishmaniasis of Sindh Province, Pakistan. *Parasitol Res* 111, 125-133, 2012.

doi:10.1007/s00436-011-2808-3

[学会発表](計8件)

片倉 賢, Alam M, 中尾 亮, 櫻井達也, 加藤大智, Chang KP, Schönian G: Population genetics of *Leishmania donovani/infantum* complex in China by multilocus microsatellite analysis. 第83回日本寄生虫学会大会、2014年3月27日、愛媛大学(松山市) Katakura K: Molecular epidemiological studies on livestock parasites in Myanmar. First International Conference and the 13<sup>th</sup> Annual Meeting of Myanmar Veterinary Association, 2014年2月2日、Yangon Convention Center, Yangon, Myanmar (ミャンマー)(招待講演)

寺尾将司, Alam MZ, Akter S, 中尾 亮, 櫻井達也, 加藤大智, 片倉 賢: バングラデシュにおけるイヌのパベシア感染について. 第156回日本獣医学会学術集会、2013年9月21日、岐阜大学(岐阜市)

Alam MZ, Nakao R, Sakurai T, Kato H, Chang KP, Schönian G, Katakura K: Multilocus microsatellite typing of *Leishmania infantum* parasites from China. Fifth World Congress on Leishmaniasis. 2013年5月14日、Enotel Resort & Spa, Porto de Galinhas (ブラジル)

アラム・モハマド・ザハンギル、アクター・シリル、ヤジン・エムディ・ゴラム、中尾 亮、櫻井達也、加藤大智、片倉 賢: バングラデシュの内臓リーシュマニア症流行地における野犬の調査. 第82回日本寄生虫学会大会、2013年3月31日、東京医科歯科大学(東京都)

Alam MZ, Akter S, Yasin Md.G, 中尾 亮、櫻井達也、加藤大智、片倉 賢: Serological and molecular evidence of *Leishmania* parasite in dogs of visceral leishmaniasis endemic areas in Bangladesh. 第155回日本獣医学会学術集会、2013年3月28日、東京大学(東京都)

Alam M, 中尾 亮, 櫻井達也, 加藤大智, Chang KP, Schönian G, 片倉 賢: Genetic

polymorphism of Chinese *Leishmania infantum* strains revealed by multilocus microsatellite analysis. 第154回日本獣医学会学術集会、2012年9月16日、岩手大学(盛岡市)

Tiwananthagorn S、加藤大智、櫻井達也、岩淵和也、阿戸学、片倉賢：免疫不全 *aly/aly* マウスの内臓リーシュマニア症における肝臓内原虫存続と制御性 T 細胞. 第154回日本獣医学会学術集会、2012年9月16日、岩手大学(盛岡市)

〔図書〕(計2件)

片倉賢 他(木村哲, 喜田宏編) 医薬ジャーナル社、改訂第3版 人獣共通感染症(リーシュマニア症) 印刷中

片倉賢 他(獣医公衆衛生学教育研修協議会編) 文永堂、獣医公衆衛生学Ⅱ(アメリカトリパノソーマ症、アフリカトリパノソーマ症、リーシュマニア症、ジアルジア症) 2014、331 (pp.126-130)

〔その他〕

研究室ホームページ

<http://www.vetmed.hokudai.ac.jp/parasitology01.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片倉 賢 (KATAKURA, Ken)  
北海道大学・(連合)獣医学研究科・教授  
研究者番号：10130155

(2) 研究分担者

加藤 大智 (KATO, Hirotomo)  
北海道大学・(連合)獣医学研究科・准教授  
研究者番号：50281853

(3) 連携研究者

滝口 満喜 (TAKIGUCHI, Mitsuyoshi)  
北海道大学・(連合)獣医学研究科・教授  
研究者番号：70261336

阿戸 学 (ATO, Manabu)  
国立感染症研究所・免疫部・部長  
研究者番号：20392318