

食の安全を脅かす人獣共通感染症の疾病予防に関する研究

加藤 健太郎

帯広畜産大学原虫病研究センター地球規模感染症学分野 准教授
(現 東北大学大学院農学研究科動物環境システム学分野 教授)

はじめに

原虫感染症はその多くが法定・届出伝染病、海外悪性伝染病、国際獣疫疾病及び感染症予防法においても指定を受けていることから明らかなように畜産・獣医学領域のみならず、医学領域においても甚大な被害を与えている。また、現在日本においては、BSE、新型インフルエンザウイルス、口蹄疫に代表される感染症による食に対する危機感、それに伴った風評被害が蔓延しており、特に食肉産業における国民の不信感は極めて大きい。さらに、2012年9月に先天性トキソプラズマ症の患者会が設立され、医師らの報告では食肉文化の習慣の変化に伴い、我が国の新生児において年数百件の被害があると推定されている。

トキソプラズマ症はネコを終宿主とする人獣共通感染症であり、潜伏感染したり、宿主免疫系から逃れることで終宿主に感染し続ける。日本を含めて、世界人口の約3割が感染しているものの、健康なヒトが感染した場合はほとんど臨床症状がないが、免疫不全状態に陥った際に潜伏感染虫体（休眠型）が再活性化することによって起こるトキソプラズマ脳炎や肺炎はAIDS発症患者の死因の一つである。加熱調理等が不十分な肉の食用や近年の食習慣の変化の影響もあり、妊婦の初感染が原因である先天性トキソプラズマ症の症例数が増加している。現在のトキソプラズマ薬では病態を引き起こす急性感染虫体（栄養型）を潜伏感染虫体（休眠型）へと移行させるだけで根本的な駆虫に至らない（図1）。

一方で、クリプトスポリジウム症は主にウシなどの畜産動物や野生動物の糞便中に含まれる大量の虫卵が上水に混入することでヒトに水系感染による集団的下痢症を引き起こす。特に、北海道などの畜産地域においては感染牛とヒトの接触が多いことから、公衆衛生上、最も重要な人獣共通感染症の一つである。また、畜産動物においては、特に生後1-2週齢の仔ウシに集団感染による下痢症を引き起こし、斃死、廃用につながる。同症が発生

した農場においては、動物を飼育している衛生環境の構造的問題から排除することが困難であり、乳製品の生産と品質の低下へと直結する。感染症法では四種病原体、五類感染症に規定されており、通常の浄水システムではろ過できず、日本においては未だ有効な治療薬がない。

このような背景の中、我々の研究グループでは、トキソプラズマ症、クリプトスポリジウム症といった食の安全性を脅かす人獣共通の原虫感染症について発症メカニズムの解明と新しい疾病予防、治療法の開発を行ってきた。以下の4項目について、我々のこれまでの研究成果を紹介したい。

1. 原虫感染レセプターの同定

アピコンプレックス門に属する原虫は共通して吻刺部に細胞内小器官（オルガネラ）を有している。このオルガネラから放出される原虫膜蛋白質は、特に宿主細胞侵入時に原虫と宿主細胞を結合させるmoving junctionの形成に寄与していることが明らかになりつつある。今回、レトロウイルスベクターを用いることでこれらの原虫膜蛋白質に対応する宿主細胞レセプターの同定系（図2）の確立に成功した。この系以外にも、質量解析、糖鎖アレ

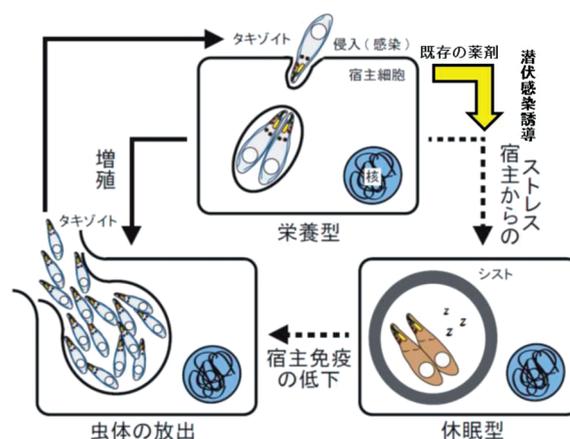


図1 トキソプラズマ原虫のライフサイクル

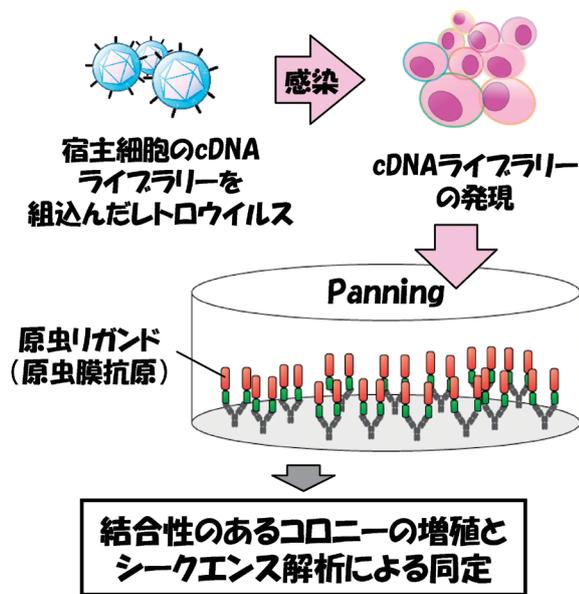


図2 原虫感染レセプター同定系の確立

表1 同定に成功した原虫感染レセプター

原虫種	分泌蛋白質	同定したレセプター	文献番号
熱帯熱マラリア原虫 <i>Plasmodium falciparum</i>	AMA1	Kx	1)
	BAEBL	ヘパラン硫酸	2)
トキソプラズマ <i>Toxoplasma gondii</i>	MIC13	シアル酸	3,4)
	RON4	βチューブリン ヘパラン硫酸	
	P104	コンドロイチン硫酸	5)
	P94	HSP70	6)
タイレリア <i>Theileria orientalis</i>	MPSP	ヘパラン硫酸	7)
	P23	ヘパラン硫酸	8)
クリプトスポリジウム <i>Cryptosporidium parvum</i>	EF1α	ヘパラン硫酸	9)

イ等の分子生物学的解析も駆使し、原虫分泌蛋白質のレセプターや結合分子の同定を行い、表1に示す通り、糖鎖と宿主細胞蛋白質を同定した。

一方で、同定したレセプター分子(表1)のうち、シアル酸、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸は糖鎖であり、予想外に多くの同定したレセプター分子が糖鎖の一種であった。硫酸基の付加が大きいほど原虫阻止に効果があることも明らかとし、硫酸化多糖類(ヘパリン、コンドロイチン硫酸、デキストラン硫酸等)を用いて原虫の感染阻止試験を培養細胞と動物感染実験(マウス、ブタ)によって行い、デキストラン硫酸が特異的にトキソプラズマ原虫の感染を阻止することを明らかとした^{10,11)}。

これらの結果から、ウイルス、細菌、原虫の宿主細胞侵入にヘパラン硫酸が普遍的に関わっていることを明らかにした。さらにこの結果を基に、硫酸化多糖類の原虫感染阻止能の解析や糖鎖結合原虫蛋白質のワクチンとしての検討等の実用化研究を行った¹²⁻¹⁵⁾。

2. 原虫プロテインキナーゼ(PK)の機能解析

トキソプラズマの宿主細胞侵入、増殖、潜伏感染移行、宿主細胞からの脱出といった複雑なライフサイクルの各ステージにおいて原虫PKが重要な役割を果たし、これらをターゲットとした薬剤が宿主細胞への侵入を実際に阻害することを見出した¹⁶⁻²¹⁾。

具体的には、トキソプラズマ原虫の宿主細胞侵入時の滑走運動を「こぶつきキナーゼ阻害薬」が阻害すること、この薬剤標的は原虫PKであるTgCDPK1であることを明らかとした¹⁶⁾。特に、この研究成果については候補者らが2010年4月に論文発表した後、ほぼ同内容のデータがNature及び、Nat Struct Mol Biolに5月に発表されており、世界の最先端でその研究競争に勝利した。また、ゲノム変異を誘発する薬剤を用いて、「こぶつきキナーゼ阻害薬」に耐性を持つ原虫を作出し、この薬剤耐性機構と次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析により、耐性の原因遺伝子が原虫PKであるTgMAPK1であることを同定した¹⁸⁾。

3. 潜伏感染機構の解明

トキソプラズマ症に対する現状の薬剤は急性感染虫体を抑える一方で、急性感染虫体の潜伏感染虫体への移行を促進してしまい、根治できない(図1)。また、2015年に既存薬であるピリメサミンの製法特許の買占めで、薬価が約50倍に高騰するという問題が起こっている。従って、新規薬剤に求められる作用点として、i) 急性感染期を抑える、ii) 潜伏感染への回避行動をとらせない、iii) 宿主細胞内の潜伏感染期にも効果がある、点が挙げられる。以上の問題を解決するため、原虫数と潜伏感染虫体数を測定できる組換え原虫を作製した。東京大学創薬機構の機能既知の化合物ライブラリーを使用し、原虫の増殖と潜伏感染誘導をともに抑制する薬剤のスクリーニングを行った。この結果、2種の化合物の同定に成功した。さらに、スクリーニングの結果得られた化合物について、実際に原虫への潜伏感染誘導効果を解析した結果、既存薬のピリメサミンと比較して、数%と極めて低いことがわかった²²⁾。

4. 金属ナノ粒子の抗原虫作用の解明

ナノテクノロジーの発展により同技術の医療への利用の可能性が期待され、様々な疾患に対する将来的な治療方法の1つとして研究が進められている。金属ナノ粒子は、一般的な大きさの金属（バルク）とは異なる物理的、化学的特性を持っている。つまり、金属ナノ粒子は溶解温度・焼成温度の大幅な低下、蛍光発光、触媒の高効率化・新規反応などの特性が、バルクとは異なる。また、比表面積が極めて大きいことが知られている。量子サイズによって特有の物性を示す。粒子の大きさ、その他の特性を変化させることで医学応用が図られ、特に活性酸素の生成を促進することで感染性微生物の殺傷に効果がある。さらに、小さいサイズのナノ粒子は細胞膜を通過することが可能であり、より強い反応を起こすことが期待できる。このように金属ナノ粒子の用途の多様性を鑑み、抗原虫薬としての将来的な利用の可能性も考えられる。今回、研究グループでは原虫感染細胞を用いて、金属ナノ粒子の新規の抗トキソプラズマ作用について解析を行った。

解析の結果、金、銀、白金の各々の金属ナノ粒子が各々、宿主細胞への細胞毒性が発現する1/20以下の濃度でトキソプラズマの増殖阻止に働くことを明らかとした。また、この作用は原虫の酸化還元シグナルに關与し、ミトコンドリアの膜電位に影響を与えることで、原虫の宿主細胞侵入、増殖、感染性に影響を与えることがわかった。さらに、金属ナノ粒子の表面にアミノ酸を被膜することで、トキソプラズマへの増殖阻止作用が増大することを明らかとした。アミノ酸被膜金属ナノ粒子の抗原虫作用には、酸化ストレスや低酸素誘導因子の調節によるキヌレニン経路の活性化等のトリプトファン代謝経路が関わっていることがわかった²³⁻²⁶⁾。

考 察

畜産業において問題となるインフルエンザ等を代表とする人獣共通感染症は、風評被害も含めて、食品産業に甚大な経済的打撃をもたらしてきた。トキソプラズマ症、クリプトスポリジウム症といった食品産業に関わる人獣共通感染症を研究対象としてきたため、これらの研究業績は食の安全性や疾病予防の観点から「食の科学」に密接に関連している。

要 約

原虫感染症には、ヒトや動物に甚大な被害を与える感

染症が含まれている。本研究では、ウイルスベクターを利用した原虫の宿主細胞侵入レセプターの同定系の開発に成功した。この系と質量解析などの手法を駆使することで、人獣共通感染症であるトキソプラズマ症、クリプトスポリジウム症等の原因となる原虫の感染レセプターの同定を行い、同定したレセプターの中から糖鎖レセプターを基にした抗原虫薬の開発を行った。また、原虫のプロテインキナーゼ（PK）が、宿主細胞侵入、増殖、潜伏感染移行、宿主細胞からの脱出といった原虫の複雑なライフサイクルの各ステージにおいて重要な役割を果たし、これらをターゲットとした薬剤が宿主細胞への侵入を実際に阻害することを見出した。また、トキソプラズマ症の病態発現の原因となる潜伏感染機構の解明を行い、急性感染期と潜伏感染期をともに抑制する薬剤スクリーニング系を開発し、複数の薬剤の同定に成功した。さらに、原虫感染阻止に働く金属ナノ粒子とアミノ酸被膜金属ナノ粒子の抗原虫機構の解明を行った。

謝 辞

この度は、荣誉ある三島海雲学術賞を賜り、公益財団法人三島海雲記念財団の関係者の皆様、選考委員の先生方に厚くお礼申し上げます。以上の研究成果は、帯広畜産大学原虫病研究センター、東京大学大学院農学生命科学研究科獣医微生物学研究室、米国国立衛生研究所等の関係者、そして家族の協力の下で行われたものであり、また、現所属である東北大学大学院農学研究科動物環境システム学分野の関係者を含め、ここに感謝の意を表します。

文 献

- 1) K. Kato, et al: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **10**, 5552-5557, 2005.
- 2) K Kobayashi, et al: *J. Biol. Chem.*, **285**, 1716-1725, 2010.
- 3) H. Takemae, et al: *Sci. Rep.*, **3**, 3199, 2013.
- 4) H. Takemae, et al: *Parasitol. Int.*, **67**, 123-130, 2018.
- 5) H. Gong, et al: *PLoS One*, **7**, e30169, 2012.
- 6) H. Gong, et al: *Parasitol. Int.*, **63**, 381-388, 2014.
- 7) H. Takemae, et al: *Vet. Rec.*, **175**, 149, 2014.
- 8) H. Takemae, et al: *Jpn. J. Vet. Res.*, **62**, 17-24, 2014.
- 9) A. Inomata, et al: *Sci. Rep.*, **5**, 11599, 2015.
- 10) K. Kato, et al: *Parasit. Vectors.*, **9**, 134, 2016.
- 11) A. Ishiwa, et al: *Parasitol. Res.*, **112**, 4169-4176, 2013.
- 12) F. C. Recuenco, et al: *Jap. J. Vet. Res.*, **65**, 207-212, 2017.
- 13) K. Kato, et al: *Trop. Med. Health.*, **43**, 41-52, 2015.
- 14) F. C. Recuenco, et al: *Sci. Rep.*, **4**, 4723, 2014.
- 15) K. Kobayashi, et al: *Sci. Rep.*, **3**, 3178, 2013.
- 16) T. Sugi, et al: *Eukaryot. Cell.*, **9**, 667-670, 2010.
- 17) H. Kurokawa, et al: *PLoS One*, **6**, e22492, 2011.

- 18) T. Sugi, et al.: *Int. J. Parasitol. Drugs Drug. Resist.*, **3**, 93–101, 2013.
- 19) T. Sugi, et al.: *Int. J. Parasitol. Drugs Drug. Resist.*, **5**, 1–8, 2015.
- 20) K. Kato, et al.: *Parasit. Vectors.*, **9**, 405, 2016.
- 21) T. Sugi, et al.: *mBio*, **7**, e00755–16, 2016.
- 22) Y. Murata, et al.: *PLoS One*, **12**, e0178203, 2017.
- 23) O. S. Adeyemi, et al.: *Artif. Cells. Nanomed. Biotechnol.*, 1–9, 2018.
- 24) O. S. Adeyemi, et al.: *J. Biomed. Nanotechnol.*, **14**, 847–867, 2018.
- 25) O. S. Adeyemi, et al.: *Biochem. Biophys. Rep.*, **11**, 84–92, 2017.
- 26) O. S. Adeyemi, et al.: *Int. J. Nanomedicine*, **12**, 1647–1661, 2017.

著者紹介



加藤 健太郎 (カトウ ケンタロウ)

1974年 京都府生まれ
2000年3月 東京大学農学部獣医学課程獣医学専修卒業
2003年3月 東京大学大学院農学生命科学研究科獣医学博士課程修了（短縮）
2003年3月 博士（獣医学）の学位取得（東京大学）
2003年4月 米国国立衛生研究所（NIH）客員研究員
2005年1月 東京大学大学院農学生命科学研究科 助手/助教
2013年3月 帯広畜産大学原虫病研究センター 特任准教授/准教授
2019年4月 東北大学大学院農学研究科 教授

専門分野：獣医微生物学、寄生虫学、人獣共通感染症学
「如何にして病原微生物は宿主細胞に感染し、増殖するのか」という命題について、主に分子生物学、ウイルス学の手法をもってアプローチしています。得られた知見を基にして、新しい抗感染症薬等の実用化を目指しています。