

人獣共通感染症研究 —ワンヘルスの取り組みと 動物実験の役割— (IV)

エキノコックス研究と動物実験

北海道大学 大学院獣医学研究院
応用獣医科学分野実験動物学教室
教授 安居院 高志

1. 感染症研究と動物実験

感染症の研究として実験動物を用いた感染実験が多く行われている。実験動物としてはマウスが最も多く使用されている。マウスを用いた感染実験により、病原体の病原性や症状を調べることができる。研究者は本来であればヒトあるいは家畜を用いた感染実験を行いたい、それが叶わぬためにマウスをその代替として使用している。同じほ乳類であるので、マウスから得られた知見、即ち病原性や症状をヒトや家畜のものとして置き換えることができる。しかし実験動物をこのような方法で使用することは受動的であり、もっと積極的な利用法が存在する。それは病原体に対し感受性の系統と抵抗性の系統を見出し、それらを遺伝学的に解析することにより、宿主の病原体応答に関与する遺伝子を明らかにする方法である。この方法はフォワードジェネティクスと呼ばれている。著者らはフォワードジェネティクスを用いてエキノコックス感染に対する宿主の応答反応に関わる遺伝子の探索を行っており、それについて紹介したい。

2. 多包虫症（エキノコックス症）とは

多包虫症（エキノコックス症）は日本では主に北海道で発生をみる人獣共通感染症（寄生虫症）である。キツネ等の野生イヌ科動物の糞便中に含まれる虫卵をヒトや家畜が摂取することにより発症する。

北海道では当初礼文島や道東地域に限定されていたが、現在では感染キツネは全道に広がり、全道で毎年20人程度の新規患者が報告されるに至っている。近年では本州でも青森県、山形県、愛知県などでヒトや家畜の感染例が報告されている。本州においても本土キツネのようにエキノコックスの宿主が存在しているため、やがては本州全域に広がる可能性が懸念されている。手術切除が最も有効な治療法であるが、切除が困難な場合や放置した場合は有効な治療法はなく致命的（致死率約30%）である。治療薬としてアルベンダゾールが開発されている。この薬物の作用機序は虫体の微小管形成を阻害することによると考えられている。しかし、包虫増殖の遅延などが認められているものの、完全な治療薬としては機能していない。

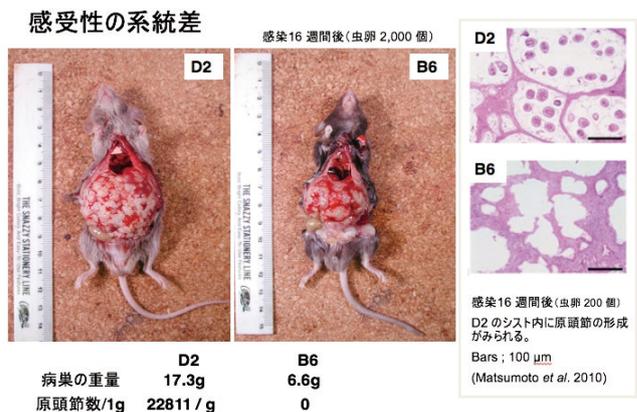


図1

3. マウスを用いたエキノコックス感染実験

Matsumotoらはエキノコックス虫卵を複数のマウス系統に経口感染させ、感受性の系統 (DBA/2 (D2)) と抵抗性の系統 (C57BL/6 (B6)) を見つけた¹⁾ (図1)。即ち、D2マウスではB6マウスに比べ多数のシスト (嚢胞) が観察された。更にD2マウスではシスト中の原頭節が正常に形成されていたのに対し、B6マウスでは全く形成されていなかった。そこで筆者らはD2マウスとB6マウスよりバッククロス個体を多数作製し (図2)、それらに同じ数のエキノコックス虫卵を経口感染させ、定着虫体数と原頭節の密度を測定し、それらを量的形質として quantitative trait locus (QTL) 解析を行った²⁾。定着虫体数については、F1マウスはB6と同じ値を示したことから、B6の形質が優性であることが示唆された。バッククロスにおいては定着数の多いものから少ないものまで幅広く分布したことにより、複数の遺伝子座に支配されていることが示唆された (図3左)。原頭節の密度については、F1マウスではD2マウスとB6マウスの中間値を取ったことより、D2マウスの形質が不完全優性であることが示唆された。バッククロスにおいては原頭節密度の高いものから低いものまで幅広く分布したことより、同じく複数の遺伝子座に支配されていることが示唆された (図3右)。

次に定着虫体数を量的形質 (QT) として QTL 解析を行ったところ、第6染色体に significant レベルを超える QTL、*Emcys1* を検出できた (図4)。一方、原頭節密度を QT として QTL 解析を行ったところ、第1染色体に highly significant を遥かに超える QTL、*Empsc1* を検出できた (図5)。

4. コンジェニックマウスを用いた QTL の証明

QTL 解析により検出された領域に虫体の定着及び原頭節の形成をコントロールする宿主因子の遺伝子が存在することが示唆されたが、これらはあくまで様々なゲノム領域を有するバッククロス群において統計学的に導き出された結果であり、本当にこの部分にこれらの形質をコントロールする遺伝子が存在することが証明されたわけではない。証明するためには B6 と D2 でこれらの部分を入れ替えたコンジ

実験材料

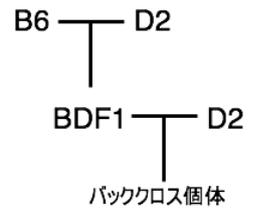


図2

バッククロスマウスを用いた宿主抵抗性の評価

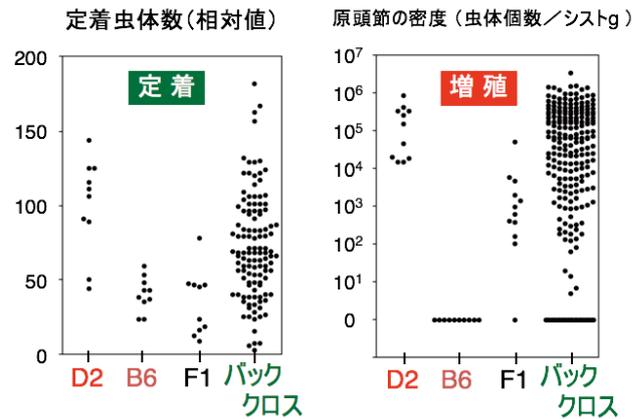


図3

(Nakao et al., 2011)

虫体定着に対する宿主抵抗性 (4週目)

定着

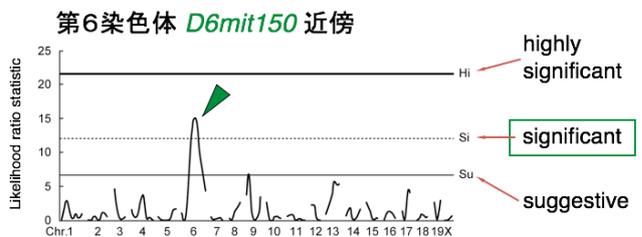
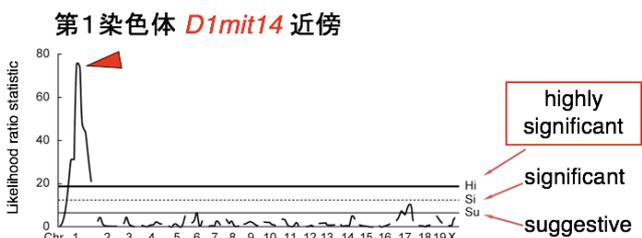


図4

原頭節形成に対する宿主抵抗性 (16週目)

増殖



(Nakao et al., 2011)

図5

ェニックマウスを作製し証明しなければならない。そこで、著者らは図6に示す方法によってコンジェニックマウスを作製した³⁾。Emcys1領域を入れ替えたコンジェニックとしてB6.D2-Emcys1及びD2.B6-Emcys1が作製された(図7)。これらのコンジェニックマウスにエキノコックス虫卵を感染させ虫体の定着を測定したところ、入れ替えられたEmcys1領域の影響は見られなかった(図8)。このことはQTL解析の結果がFalse-positiveであったか、この領域のみで虫体の定着がコントロールされているわけではないことを示唆している。一方、Empsc1領域を入れ替えられたコンジェニックとして、B6.D2-Empsc1及びD2.B6-Empsc1が作製された(図9)。これらのコンジェニックマウスにエキノコックス虫卵を感染させ原頭節の密度を測定したところ、遺伝的背景ではなくEmpsc1領域のジェノタイプによって原頭節の密度(有無)がコントロールされていることが証明された(図10)。

5. サブコンジェニックマウスを用いたQTL領域の絞り込み

原頭節の密度(有無)をコントロールする宿主因子同定のため、サブコンジェニックマウスを作製しQTL領域の絞り込みを行なった。図11に示すように、B6.D2-Empsc1よりB6.D2-Empsc1.1及びB6.D2-Empsc1.2の2系統のサブコンジェニックが、D2.B6-Emcys1よりD2.B6-Empsc1.1の1系統のサブコンジェニックが作製された。これら3系統のサブコンジェニックにエキノコックス虫卵を感染させ、原頭節の密度(有無)を測定したところ図12に示す結果が得られた。この結果を図11に入れ込むと、責任遺伝子の存在する領域(Critical region)を30 cMにまで狭めることができた。マウスゲノムインフォーマティクス(<http://www.informatics.jax.org/>)によれば、この領域には331個のタンパク質をコードする遺伝子が存在しており、この中のどれかがシスト中に原頭節を生じさせる、あるいは生じさせない宿主側因子をコードしていることが示唆された。この責任因子の作用機序の一つの考え方として、B6マウスにおいて働く抗エキノコックス感染因子がD2マウスで

コンジェニックマウスの作製

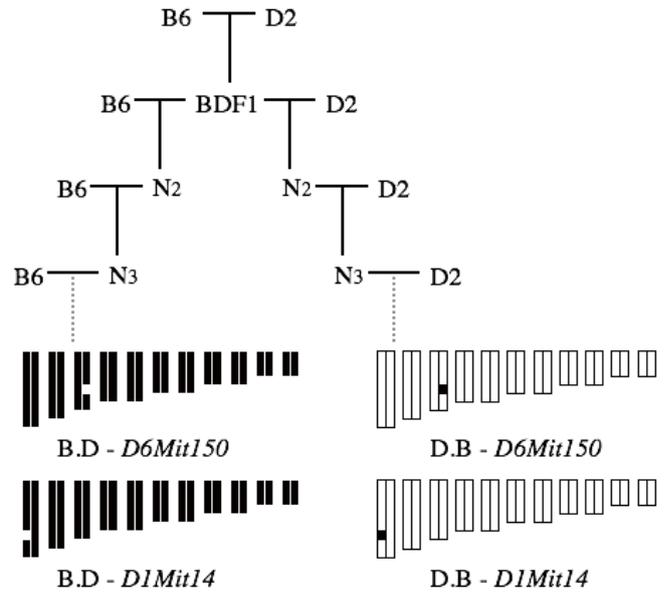


図6

Establishment of congenic lines for the cyst established phenotype and results

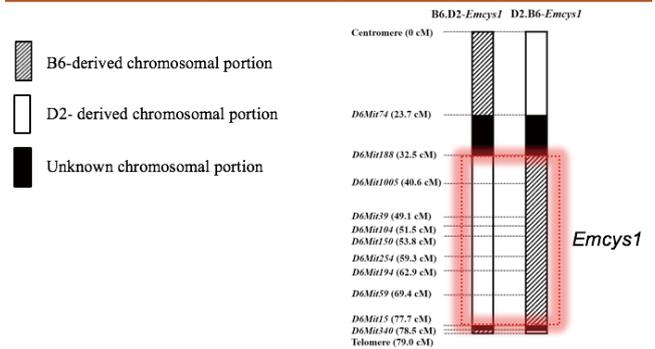


図7

Establishment of congenic lines for the cyst established phenotype and results

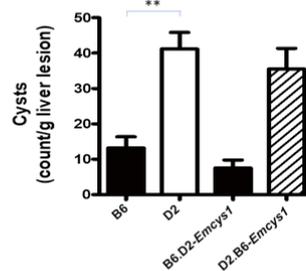


図8

欠損していることが推察される。しかしながらD2マウスの形質が優性であることを考慮すると、D2マウスに存在する原頭節形成に必要な因子がB6マウスで欠損しているという仮説の方が自然に思える。この因子が同定できれば中間宿主内でエキノコックスの増殖を抑制する薬物の開発につながることを期待される。

6. さいごに

ここでは実験動物（特にマウス）を単なるヒトや家畜の代わりとしての感染実験ではなく、種々のマウス系統が有しているゲノムの違いから病原体応答に関与する宿主側因子の同定を行う試みとしてエキノコックス感染を例に示した。虫体の定着をコントロールするQTLとして*Emcys1*が第6染色体に検出されたが、コンジェニックマウスではその存在が証明できなかった。一方、シスト内の原頭節形成をコントロールするQTLとして*Empsc1*が第1染色体に検出され、コンジェニックマウスによってその存在が証明された。更にサブコンジェニックマウスによりその存在領域が30 cMにまで絞り込まれ、その領域に存在する遺伝子は331個にまで限定された。このようにこの手法は確実に宿主因子の遺伝子を追い詰め、最終的には同定できる確実にパワフルな手法であることが示された。

最後に本研究を遂行してくれた当教室の室員各位と北海道立衛生研究所の八木欣平博士と共同研究者各位に深謝致します。

文献

- 1) Matsumoto, J., Kouguchi, H., Oku, Y., Yagi, K. Primary alveolar echinococcosis: course of larval development and antibody responses in intermediate host rodents with different genetic backgrounds after oral infection with eggs of *Echinococcus multilocularis*. *Parasitol. Int.* 59, 435-444 (2010)
- 2) Nakao, R., Kameda, Y., Kouguchi, H., Simon, A.Y., Matsumoto, J., Dang, Z., Torigoe, D., Sasaki, N., Oku, Y., Sugimoto, C., Agui, T., and Yagi, K. Identification of genetic loci affecting the establishment and development of *Echinococcus multilocularis* larvae in mice by quantitative trait loci analysis. *Int. J. Parasitol.* 41: 1121-1128 (2011)
- 3) Md Atiqul Islam, Daisuke Torigoe, Yayoi Kameda, Takao Irie, Hirokazu Kouguchi, Ryo Nakao, Md Abdul Masum, Osamu Ichii, Yasuhiro Kon, Hassan T. Tag-EL-Din-Hassan, Masami Morimatsu, Kinpei Yagi, and Takashi Agui. Analysis for genetic loci controlling protoscolex development in the *Echinococcus multilocularis* infection using congenic mice. *Infect. Genet. Evol.* 65: 65-71 (2018)

Establishment of congenic lines for protoscolex development phenotype and results

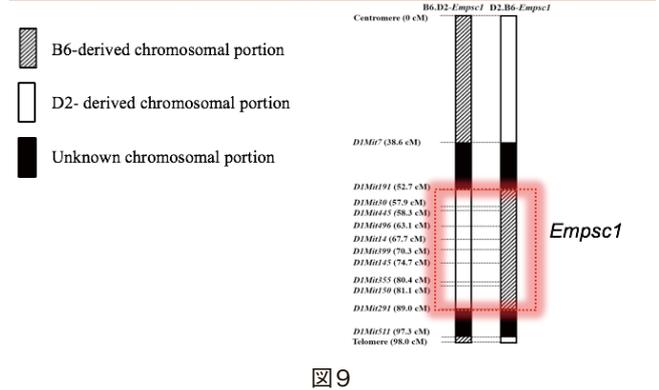


図9

Establishment of congenic lines for protoscolex development phenotype and results

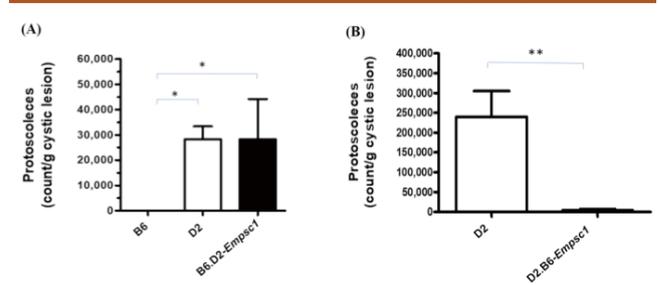


図10

Generation subcongenic lines for protoscolex development phenotype and results

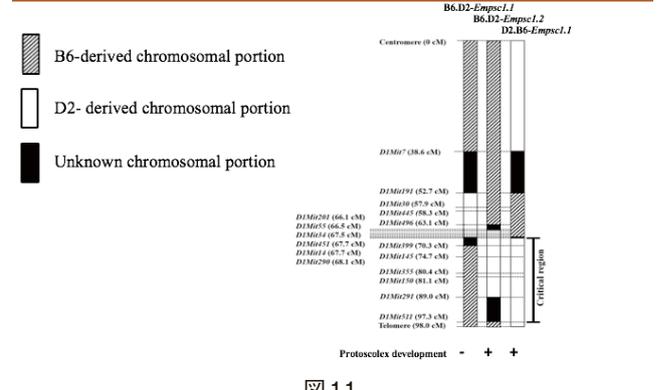


図11

Generation subcongenic lines for protoscolex development phenotype and results

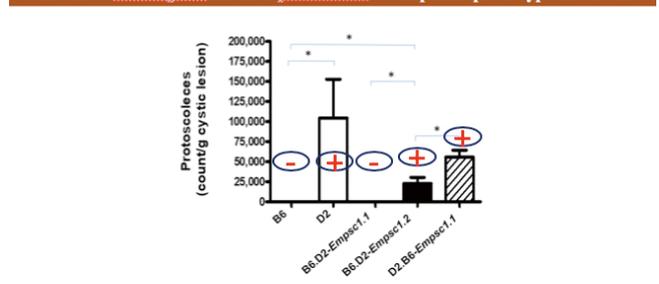


図12

(日動協ホームページ、LABIO21 カラーの資料の欄を参照)