

「哺乳類体内に匹敵する肝蛭（かんてつ）幼虫の *in vitro* 培養系の確立 —薬剤開発のボトルネック解消を目指して—

岩手大学獣医学部 関 まどか

要旨

肝蛭（かんてつ）は寄生性扁形動物（吸虫）の一種であり、哺乳類の肝臓や胆管に寄生する。人獣共通感染性で、幼虫の肝臓移行により引き起こされる重篤な肝障害や突然死（急性肝蛭症）は深刻な問題となっている。急性期に有効な治療薬に対する耐性が世界各地で報告されているが、従来の *in vitro* 培養系では肝臓内での幼虫の発育を再現できず、新規薬剤開発の障害となっている。そこで本研究では、急性肝蛭症期を対象とした *in vitro* 研究基盤の確立を目的とした。

マウス感染後 7 日齢および 11 日齢の肝臓から回収した幼虫は、50% ウシ胎児血清添加 RPMI1640 培地（37°C、5%CO₂）で約 100 日間生存した。さらに、ウシ赤血球（RBC）および自由生活性扁形動物であるプラナリアにおいて性成熟を誘導する有性化因子（SIS）の添加を検討したところ、SIS は肝蛭幼虫の成長、分化、生殖器の発達を誘導した。一方、RBC は成長のみを促進し、SIS との併用による相乗効果は認められなかった。以上より、現時点では SIS 単独添加が最適条件であり、肝蛭幼虫の肝臓内発育をより忠実に再現できることが示された。

背景・目的

肝蛭症は「顧みられない熱帯病（NTDs）」に分類される人獣共通感染性の食品媒介性吸虫症である。ヒトの肝蛭症は世界 75 ヶ国以上で報告があり、畜産業に対する経済的損失の推計値は年間 32 億ドルとされる。WHO が推奨する唯一の薬剤（トリクラベンダゾール、商品名 Egaten）に対する耐性の出現に伴い、感染率が上昇しているため、新規薬剤の開発が喫緊の課題である。本研究では、哺乳類体内での発育を再現した *in vitro* 培養系の確立に取り組んだ。これに成功すれば、新規候補化合物スクリーニングの信頼性が向上し、薬剤開発研究のボトルネックが解消される。

これまでに、ニワトリ血清添加培地で、肝蛭の感染期幼虫を *in vitro* で発育させたとする報告¹があるが、我々の研究室ではこの報告を再現できず、より安定した培養系を確立する必要があると考えられた。

そこで本研究では、以下の 4 つの新規戦略で *in vitro* 培養系の確立を試みた。

- ①マウス由来の幼虫に着目して *in vitro* 培養系の確立を試みる
- ②肝蛭が摂食する赤血球²を添加すること
- ③寄生性扁形動物の祖先とされるプラナリアで見出された有性化因子（Sex-Inducing Substances: SIS）³を添加すること
- ④赤血球と SIS の併用効果を検討すること

方法

Fasciola sp. 実験室株 (Wuh15-2: 中国武漢市由来、ONB-D2: 北海道由来) を使用し、マウス (Slc: ddY) から感染後 3、7、11 日齢で回収した幼虫を、ウシ胎児血清を 50% 添加した RPMI 1640 培地 (基本培地) で 37°C、5%CO₂ の条件下で培養した。さらに、ウシ赤血球 (RBC) 添加群、SIS 添加群、3 倍濃度 SIS 添加群、赤血球+両濃度の SIS 添加群と各コントロール群を設定した。各虫体は継続観察または染色標本の作製に使用した。週 3 回培地を交換し、同時に観察用虫体を撮影した。当研究室では、肝蛭の成長・分化・生殖を、面積の増大・頭円錐の発育・生殖器の発達で評価している (図 1)。ImageJ を用いて顕微鏡下で撮影した虫体の面積と頭円錐指数を測定し、生殖器の発達は染色標本で評価した。

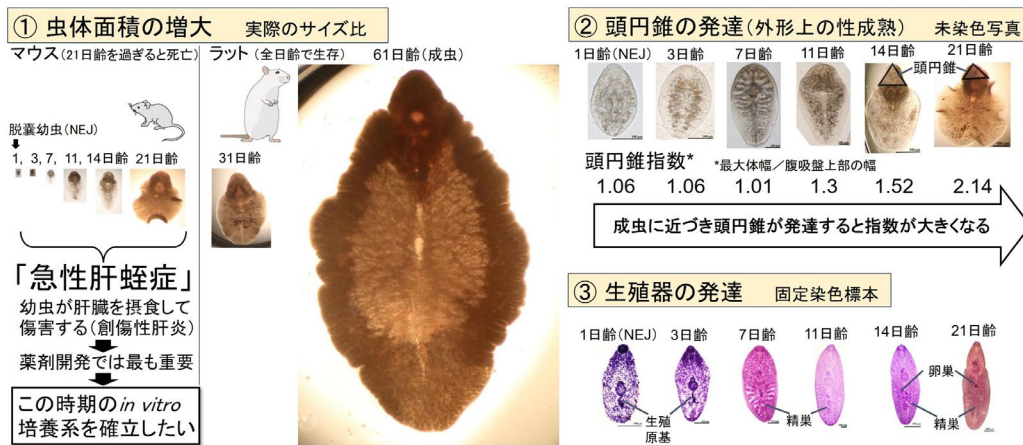


図 1 肝蛭の①成長、②分化、③生殖を評価するための 3 要素

結果

マウス由来 7 日齢と 11 日齢の幼虫は基本培地で 100 日前後生存し、面積が増大した (図 2)。7 日齢幼虫と 11 日齢幼虫に RBC を添加した結果、面積がさらに増大したが、頭円錐は発育しなかった (図 3)。また、各日齢の幼虫に SIS を添加した結果、RBC 添加を上回る面積の増大が認められ、頭円錐が明瞭に発育したが (図 4)、SIS 添加の濃度依存性はなかった。また、RBC と SIS の併用効果は観察されなかった。SIS 添加群の結果は、*in vivo* の感染後 14 日齢と 21 日齢の間に匹敵し、成長と分化の 2 つを達成した。一方、本研究の培養条件では、生殖器の完全な発達は全実験群で再現できなかったが、SIS 添加群では部分的な精巣の分岐が観察された (図 5)。

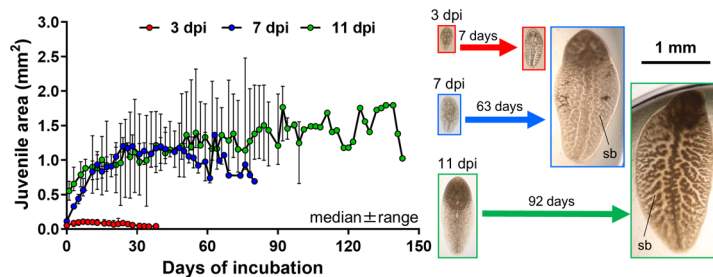


図 2 マウス由来虫体の発育 (基本培地)

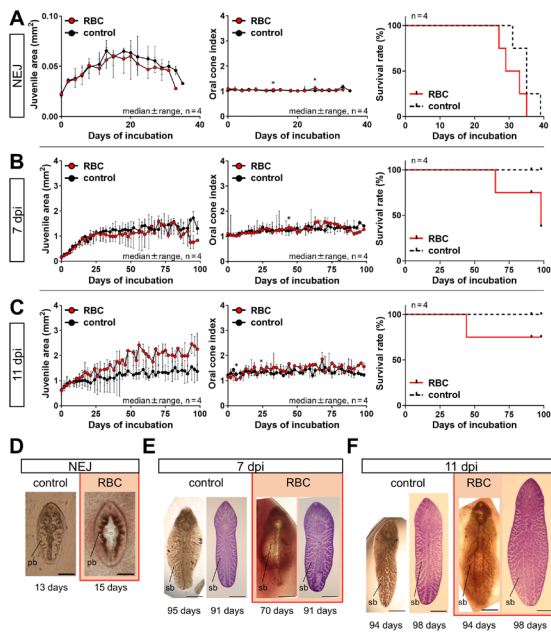


図3 赤血球添加試験

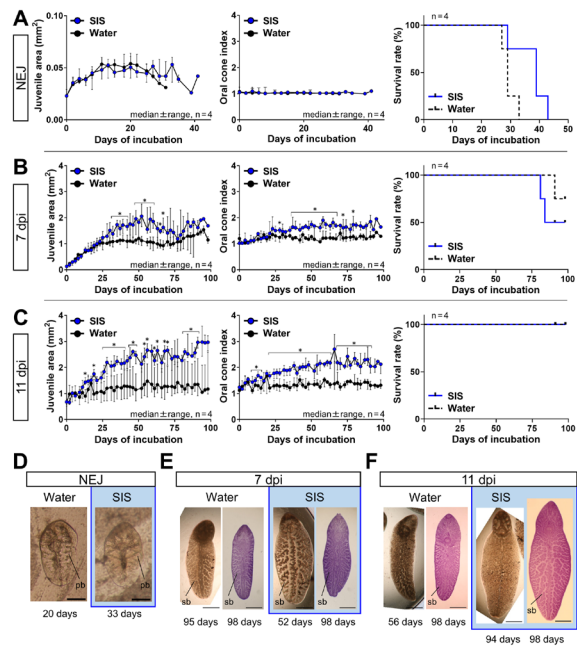


図4 SIS添加試験

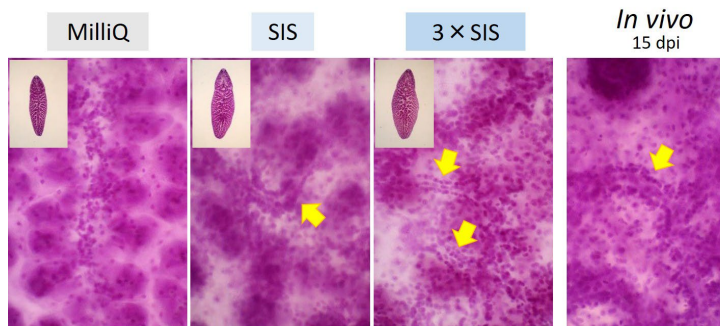


図5 SIS添加群では精巢の分岐（矢印）が観察された

考察

本研究では、マウス由来の肝蛭幼虫が、*in vitro*で虫体面積の増大と長期生存が可能であることを示したことにより、新たな*in vitro*研究基盤の確立に成功した。したがって、宿主肝臓内での幼虫の成熟過程の一端を*in vitro*で解析することが可能になった。本研究成果は、肝臓内移行期の肝蛭幼虫に対する研究開発の契機となると考えられる。

現在のところ、基本培地にSISを単独添加する培養条件が幼虫の発育に最適である。SISは肝臓内移行期の幼虫における3つの変化、すなわち虫体面積の増大、外形上の性成熟、生殖器の発達を促進した。しかし、生殖器の発達は精巢の部分的な分岐のみであった。一方、RBCは外形上の性成熟を誘導せず、面積増大および精巢発達の誘導能もSISより弱かった。これらの結果は、自由生活性プラナリアにおけるSIS関連の性成熟機構が、少なくとも部分的に肝蛭にも保存されていることを示唆する。本研究の知見は、関連する分子機構の解明の契機となり、肝蛭の性成熟を標的とした新規薬剤候補の開発に貢献すると期待される。今後、SISの本態である生理活性物質を同定することで、SISが誘導する性成熟の分子機構を詳細に解明できると考えられる。

共同研究者

関井 清乃・慶応義塾大学・助教
坂元 君年・弘前大学・准教授
小林 一也・弘前大学・教授

引用論文

- [1] McCusker P, McVeigh P, Rathinasamy V, et al. Stimulating Neoblast-Like Cell Proliferation in Juvenile *Fasciola hepatica* Supports Growth and Progression towards the Adult Phenotype In Vitro. PLoS Negl. Trop. Dis. 2016. 10:e0004994
- [2] Bennett APS, de la Torre-Escudero E, Dermott SSE, et al. *Fasciola hepatica* gastrodermal cells selectively release extracellular vesicles via a novel atypical secretory mechanism. Int. J. Mol. Sci. 2022. 23:5525
- [3] Sekii K, Miyashita S, Yamaguchi K, et al. Sex-inducing effects toward planarians widely present among parasitic flatworms. iScience. 2022. 26:105776

助成研究に関連した発表論文

該当なし（現在 1 報リバイス中）