

た住民には虫卵検査も尿細胞診も彼らに何ら負荷、苦痛を与えるものでもないことを説明し、協力依頼を行った。虫卵検査で感染が確認された住民、および血尿患者へは駆虫薬プラジカンテルを投与し、尿細胞診でクラスⅣ、Ⅴを呈した住民へは、その結果をすみやかに報告し、沿岸州立病院を訪ねる様すすめた。

### C. 研究結果

#### 1. 非流行地キアンブ地区の尿細胞診

住血吸虫感染の危険のない地区で294名の20才以上の大人について尿細胞診を実施した。その結果をTable1に示す。すべての住民がパパニコローのグレード1で、扁平上皮化生は1例もみられなかった。しかしスメアーには高頻度に白血球が検出された。一視野に5個以上の白血球がみられる病的と考えられる例が5.4%にみられた。

#### 2. ビルハルツ住血吸虫症流行地での尿検査（虫卵、血尿）結果

流行地では1516名の20才以上の大人が本研究に協力した。その中で虫卵が尿中に検出された人は27.0%で、肉眼的血尿を呈した人は3.8%、顕微鏡的血尿を呈した人は26.2%、蛋白尿を呈した人は28.8%であった（Table2）

#### 3. 流行地住民の尿細胞診結果

1516名（男531名、女985名）の尿細胞診の結果をTable3に示す。男性ではグレードⅤ1名、グレードⅢ1名、女性ではグレードⅤ2名、Ⅳ1名、Ⅲ5名みられた。扁平上皮化生は19例みられ、グレードⅢ、Ⅳ、Ⅴを示した10例中8例にみられた。スメアーには赤血球、白血球が検出されている（20%と11.9%）。一視野当り5個以上の赤血球、白血球が検出される病的と考えられる例は8.8%と11.5%にみられた。

Table4にグレードⅢ以上を示した人の年

齢、性、尿細胞診結果、尿検査結果を示している。年齢は20才から70才までと若年者にも高年齢者にも異常所見がみられている。10名中8名が女性である。肉眼的血尿を呈した人はグレードⅤの1名である。しかし顕微鏡的血尿は10例中8例にみられ、蛋白尿も7例にみられている。しかし虫卵は5例にしかみられてない。グレードⅣとⅤの4例中2例は扁平上皮癌で2例は移行上皮癌と診断された。

スメアーに白血球が検出されることが多いので、白血球尿症の頻度をビルハルツ住血吸虫症の流行地と非流行地で比較してみた。結果をTable5に示す。

白血球がスメアーに検出される率は共に高いが、5個以上の白血球が検出される病的と考えられる症例は明らかに流行地で高い（12.3%）。

### D. 考察

古くからビルハルツ住血吸虫症の流行地には膀胱癌の発生頻度が高いことが、Hospital-based studyで明らかになっており、WHOのInternational Agency for Research on Cancer (IARC)より発刊された1994年版のモノグラフVol.61にはビルハルツ住血吸虫感染が膀胱癌をおこすといえる十分な証拠があると記されている。しかし住血吸虫症の流行地において実際に膀胱癌の発生頻度がどのくらい高いのかはほとんどわかっていない。我々が知る唯一の報告は1982年エジプトでEl-Bolkainyらが行った調査のみである。今回我々はケニアのビルハルツ住血吸虫症の流行地でコミュニティレベルで膀胱癌の調査を行い非常に高い発生頻度であることを示した（2.7名/1000名大人）。先進国での膀胱癌の発生頻度が3-4/100,000名であることを考えれば、我々が得た値は異常に高い値で

考えれば、我々が得た値は異常に高い値である。ビルハルツ住血吸虫症の流行地では実際に高い率で住民が膀胱癌を発生しているといえる。膀胱癌の診断には種々の検査が必要である。尿細胞診は古くから用いられている診断法の一つで、開発途上国の住血吸虫症流行地でコミュニティーレベルで膀胱癌の疫学調査を行うには用いることが出来る唯一の方法である。尿細胞診は住民に何らかの苦痛も負荷も与えないからである。しかし尿細胞診はsensitivityが40%と低いといわれている。我々は尿細胞診を昼間尿を用いて一回しか行っていない。低いsensitivityを考えれば、もし我々が尿細胞診を繰り返し検査すると膀胱癌の発生率はずっと高い値が得られると考えられる。

今回のケニアの調査では女性に扁平上皮癌の診断が下された。女性の場合子宮頸癌のコンタミを考えねばならない。我々は女性2例とも異形性の強い移行上皮がスメアーに数多くみられたことから、これらの症例はコンタミでないと判断した。

ビルハルツ住血吸虫感染による膀胱癌の発生機序の一つとして、尿路の慢性細菌感染があげられている。我々の調査結果は住血吸虫症の流行地でより高率に白血球尿症が検出されることを示した。このことはこれまでいわれている慢性尿路感染と膀胱癌の関係をサポートするのも知れない。

我々の調査とエジプトでの調査のみがこれまで世界で行われたコミュニティーレベルでの膀胱癌調査である。そこで両者の成績を比較し、エジプトとケニアの膀胱癌の頻度を比較してみる。その結果をTable 6に示す。発症年齢も若年から高齢と幅広い。膀胱癌の種類もほぼ同じで、扁平上皮癌と移行上皮癌の頻度が同じである。唯一異なるのが男女の発生頻度である。エジプトでは男性に多く、ケニアでは女性に多い。両国

の膀胱癌発生が男女で異なることの説明は現時点では全く出来ない。

古くからビルハルツ住血吸虫感染による膀胱癌の特長として、1) 若年者に発生する、2) 男性に多い、3) 扁平上皮癌が多い、ことがあげられている。これらの特長はすべて病院の症例からの報告である。我々の成績は、しかし、この古い常識と合うのは若年者に発生するのみである。そこでケニアの州立病院で行われた剖検例および生検例で得た膀胱癌の病理検査成績（長崎大学熱帯医学研究所 鳥山 寛 博士の調査成績 Table 7）と我々のデータを比較した。ケニアは各地にビルハルツ住血吸虫症の流行地があるが、国全体の膀胱癌の発生頻度は全悪性腫瘍の6.9%で、移行上皮癌が多く扁平上皮癌は少ない。移行上皮癌は男性に多くみられるが、扁平上皮癌は男女差はみられない。この調査結果と我々の尿細胞診の結果はおおむね一致する。

動物実験ではビルハルツ住血吸虫感染で移行上皮癌の発生が観察される。我々の調査結果はこれまで報告されてきたHospital-based studyの結果とCommunity-based studyの結果とは異なる可能性が高いことを暗示している。ビルハルツ住血吸虫感染によって惹起される膀胱癌についてはこれまでの常識とは異なることがあることを認識すべきであろう。

## E. 結論

ケニア国沿岸州クワレ地区はビルハルツ住血吸虫症の高浸淫地である。地区全体の感染率は50%を越えている。この地でコミュニティーレベルで尿細胞診を用いて20才以上の住民の膀胱癌調査を行った。

1516名の尿細胞診の結果は下記のごとくであった。パパニコローグレードV 2名、IV 2名、III 6名で、これら10名中8名に扁平

から70才で女性が8名であった。グレードV、IVの4名中2名は扁平上皮癌、2名は移行上皮癌であった。流行地では尿細胞診スメアーで高率（12.3%）に白血球尿症がみられた。

以上の成績はビルハルツ住血吸虫症流行地では高頻度に膀胱癌が発生することを示している。我々の調査は1982年El-Bolkainyらがエジプトで行ったコミュニティレベルでの膀胱癌調査につぐ世界で第2例目の調査である。その結果は発生頻度がケニアでは女性に高い点を除いて、ほぼエジプトからの報告に比適する。

クワレ地区の住民は住血吸虫感染により住民は死ぬと恐れている。住血吸虫感染により膀胱癌が発生することを住民に教育すれば、住血吸虫症に対する住民の認識が高まり、住血吸虫症対策への協力も十分得られることになり、対策計画は成功することが期待される。

#### G. 研究発表

##### 1. 学会発表

・ Y. Aoki, T. Ohki, M. Anami, N.D. Muhoho and M. Iseki : Urine cytology in an endemic area of Schistosomiasis haematobia in Kenya. Oxford 2000. 18-22 September, 2000. Abstract p.160.

・ 大木智春、山内秀彦、松山拓史、穴見正信、井関充及、N.D. Muhoho、青木克己：ケニアのビルハルツ住血吸虫症流行地における尿細胞診。第41回日本熱帯医学会 11月10-11日、2000。 28巻増刊号 P123.

**Table 1****Smear Reports from Non-endemic Area of Schistosomiasis**

|   |                  |
|---|------------------|
| No. of persons examined                           | <b>294</b>       |
| No. of persons with cells of Papanicolaou grade I | <b>294</b>       |
| No. of persons with squamous metaplasia           | <b>0</b>         |
| No. of persons with leukocyturia                  |                  |
| Less than 5 WBC/hpf                               | <b>72(24.5%)</b> |
| 5 and more WBC/hpf                                | <b>16( 5.4%)</b> |

**Table 2****Summary of Results of Urine Examination of 1,516 Persons Who Participated in Urine Cytology Studies Done in the Endemic Areas**

|   |                  |
|---|------------------|
| No. of persons who passed the eggs in urine | <b>410(27.0)</b> |
| No. of persons with gross haematuria        | <b>58( 3.8)</b>  |
| No. of persons with microscopic haematuria  | <b>398(26.2)</b> |
| No. of persons with proteinuria             | <b>432(28.8)</b> |

( ) : %

**Table 3****Cytology Reports of 1516 Persons in the Endemic Areas of Schistosomiasis haematobia**

|   | No. of Persons with cells of Papanicolaou grade |    |     |    |   | Total |
|---|---|----|-----|----|---|-------|
|   | I   | II | III | IV | V |       |
| No. of men examined                     | 524   | 5  | 1   | 0  | 1 | 531   |
| No. of men examined                     | 960   | 17 | 5   | 1  | 2 | 985   |
| No. of persons with squamous metaplasia | 1   | 10 | 6   | 1  | 1 | 19    |
| more than 5RBC/hpf                      | 286   | 13 | 4   | 1  | 0 | 304   |
| 1-4RBC/hpf                              | 130   | 2  | 2   | 0  | 1 | 135   |
| more than 5WBC/hpf                      | 178   | 5  | 3   | 0  | 1 | 187   |
| 1-4WBC/hpf                              | 164   | 11 | 3   | 0  | 0 | 178   |

RBC : Red Blood Cells    WBC : White Blood Cells

**Table 4**

**Results of Urine Examination of the Cases Who had Cytology Reports of Papanicolaou Grade III, IV and V**

| Case No. | Sex | Age (yrs) | Cytology Report        |                     |                             | Eggs in Urine | Gross Haematuria | Microscopic Haematuria | Proteinuria |
|----------|-----|-----------|------------------------|---------------------|-----------------------------|---------------|------------------|------------------------|-------------|
|          |     |           | Papanicolaou's Grading | Squamous Metaplasia | Leukocyturia No. of WBC/hpf |               |                  |                        |             |
| 1        | F   | 43        | V*                     | +                   | >5                          | +             | ++               | ++                     |             |
| 2        | M   | 62        | V+                     | -                   | 0                           | -             | -                | +                      |             |
| 3        | F   | 38        | V+                     | -                   | 0                           | -             | +++              | +                      |             |
| 4        | F   | 70        | IV*                    | +                   | 0                           | -             | +                | -                      |             |
| 5        | F   | 40        | III                    | +                   | 0                           | +             | ++               | +                      |             |
| 6        | F   | 46        | III                    | +                   | 0                           | +             | +                | -                      |             |
| 7        | F   | 50        | III                    | +                   | 0                           | -             | -                | -                      |             |
| 8        | M   | 20        | III                    | +                   | >5                          | +             | +                | +                      |             |
| 9        | F   | 21        | III                    | +                   | 0                           | +             | ++               | +                      |             |
| 10       | F   | 35        | III                    | +                   | >5                          | -             | +++              | ++                     |             |

\* Squamous Cell Carcinoma  
 . Transitional Cell Carcinoma

**Table 5**

**Prevalence of Leukocyturia in the Endemic and Non-Endemic Areas of Schistosomiasis haematobia**

|                   | No. of persons examined | No. of persons with                 |                                     |            |
|-------------------|-------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|------------|
|                   |                         | more than 5 WBC / hpf <sup>1)</sup> | less than 5 WBC / hpf <sup>2)</sup> | none       |
| Endemic Areas     | 1516                    | 187(12.3)                           | 178(11.7)                           | 1151(75.9) |
| Non-endemic Areas | 294                     | 16( 5.4)                            | 72(24.5)                            | 206(70.1)  |

1): Possible bacterial infection at urinarytract  
 2): Possible physiological leukocyturia  
 ( ) : %

**Table 6**

**Urine Cytology in the Endemic Areas of Schistosomiasis haematobia in Egypt and Kenya**

|  | Kenya (present study)         | Egypt (El-Bolkainy, 1982)                      |
|--|-------------------------------|--|
| <b>Study population</b>  | Villager aged 20 yrs and over | Farmer aged 20 yrs and over                    |
| <b>Incidence</b>   |                               |  |
| No. of subjects who showed the criteria of maling nancy/<br>No. of subjects examined | 4/1,516(2.7 / 1000)           | 10/4,769(2.3 / 1000)                           |
| <b>Male:Female</b>   | 1 : 3                         | 8 : 2  |
| <b>Age</b>   | 38 - 70                       | 25 - 85  |
| <b>Type of cancer</b>  | squamous 2<br>transitional 2  | squamous 5<br>transitional 4<br>inconclusive 1 |

Table 7

**Bladder Cancer Diagnosed at Provincial Hospitals in Kenya  
Between 1979 and 1997**

---

No. of Malignant Tumor : 8349

No. of Bladder Cancer : 58(6.9%)

Transitional : 38 (male 29, female 8)

Squamous : 11(male 6, female 5)

Unidentified : 9 (male 9)

---

厚生科学研究費補助金（新興、再興感染症研究事業）

分担研究報告書

日本住血吸虫等世界の寄生虫疾患の疫学及び予防に関する研究

|       |       |          |       |
|-------|-------|----------|-------|
| 分担研究者 | 朝日 博子 | 国立感染症研究所 | 主任研究官 |
| 研究協力者 | 天野 皓昭 | 横浜市立大学   | 助教授   |
| 研究協力者 | 金澤 保  | 産業医科大学   | 教授    |

研究要旨

マンソン住血吸虫感染においては、虫卵の沈着による虫卵周囲肉芽腫形成とそれに続いて起こる組織の線維化が主要な病因となる。病態は個々人間で著しく変化に富む。こうしたバリエーションは異なるマウスストレイン間にも認められる。私達は病態の異なるマウスストレイン間ではヘルパー T 細胞応答に大きな差異が認められることを先に報告し、さらにここではヘルパー T 細胞を刺激する抗原に特に焦点を当てて T 細胞応答の解析を行った。比較的小さい虫卵周囲肉芽腫を形成する C57BL/6 マウスの CD4+T 細胞の認識する抗原成分としていくつか同定されたが、その中で 62kDa (Phosphoenolpyruvate carboxykinase) 及び 26kDa (Thioredoxin peroxidase) の抗原についてアミノ酸構造を決定し、レコンピナント蛋白を作製し、それぞれのネィティブ及びレコンピナント抗原について、免疫学的特性を比較検討した。62kDa 抗原に関してはさらに 12 アミノ酸残基からなる T 細胞エピートプを決定した。加えて、こうして選択されてきた 2 つの抗原はヒトマンソン住血吸虫感染者の血清診断に有用であった。

A. 研究目的

住血吸虫感染では、肝臓や腸管組織に沈着した虫卵の周囲に形成される虫卵周囲肉芽腫およびそれに続く組織の線維化が主たる病因となる。この肉芽腫形成は CD4+T ヘルパー細胞及びアクセサリ細胞上の MHC

クラス II 分子に厳密に依存することが判っている。またこれまで H-2 ハプロタイプの異なるマウスストレインでは病態が顕著に異なるとともに T 細胞応答に著しい差異が認められることを明らかにしてきた。

本研究では、本症の免疫応答を T

細胞応答と主要抗原分子の探索に焦点を当てて解析し、重症化の抑制及び予測を目指した研究を行った。併せて本症の感染状況を的確に診断するために有用な標的分子を同定し、診断法への応用等今後の研究発展のための基礎的データを得た。

## B. 研究方法

マンソン住血吸虫感染マウスを用いて、特異的ヘルパー T 細胞の認識するマンソン住血吸虫虫卵抗原の探索を行い、その抗原の分子構造を決定し、大腸菌での発現法を用いてレコンビナント蛋白を作製した。それぞれの抗原の免疫学的特性をネイティブのものとレコンビナント蛋白で比較検討した。加えて、診断抗原としての有用性について検討した。

### (倫理面への配慮)

動物実験については国立感染症研究所および米国タフツ大学で定めた実験倫理規定を遵守して行った。血液および検体は、提供者が自由意志のもとで、本研究に関してその研究目的、内容につき十分な説明を受けた上で、提供者の同意を得て採取した。

## C. 研究結果

マンソン住血吸虫虫卵成分として

SDS-PAGE ゲル上およそ 40kDa の Sm-p40 と称される抗原が既に報告されている。この Sm-p40 は MHC クラス II の拘束を強く受け、一つのハプロタイプ (H-2k) のマウスにおいて Th-1 タイプの応答を誘導する。このことから異なる H-2 ハプロタイプ (H-2b と H-2d) のマウスストレインを用いて、いくつかの T 細胞抗原成分を同定した。その中で 62kDa 及び 26kDa の抗原について、遺伝子クローニングを行い、アミノ酸配列を決定し、レコンビナント蛋白抗原を作製した。62kDa の成分は、phosphoenolpyruvate carboxykinase (Sm-PEPCK)であり、全長 626 のアミノ酸から構成される。さらにこの分子の中で12アミノ酸からなる T 細胞エピトープを決定した。26kDa の成分は thioredoxin peroxidase (Sm-TPx) であり、全長 185 のアミノ酸からなる。これら2つのネイティブの抗原は、比較的小さい肉芽腫を形成する C58BL/6 マウスに於いて、バランスのとれた Th-1, Th-2 タイプの T 細胞応答を惹起した。

得られたレコンビナント蛋白をヒトマンソン住血吸虫症の血清診断に利用したところ、有用であることが判明した。

## D. 考察



感染マウス由来 CD4+T 細胞や特異的 T 細胞ハイブリドーマを用いて比較的効率良く T 細胞抗原が同定されたが、それらの抗原の詳細な検討に於いてまだ多くの課題が残されている。例えば免疫学的に重要となる他の抗原の構造決定、それぞれの抗原の *in vivo* における病理に対する効果試験、同定された抗原、エピトープを発症制御ワクチンとしてどのように利用、導入してゆくか等である。

またネイティブ抗原とレコンビナント抗原では異なる T 細胞応答を誘導することが、これら一連の研究に於いて明らかになってきた。レコンビナント抗原をワクチンとして実用化するためにはその原因が何なのかを解明することが重要であろう。

一方 特異的 T 細胞を用いてスクリーニングしてきた抗原はヒトマンソン住血吸虫感染者の血清抗体と非常によく反応することから、血清診断法への応用が期待される。

#### E. 結論

マンソン住血吸虫感染において免疫学的に主要となる抗原の解析を行った。いくつか同定された抗原成分の中、Sm-PEPCK と TPx のアミノ酸構造を決定し、レコンビナント蛋白を作製した。それぞれの抗原について免疫学的特性を詳細に検討した。

F. 健康危険情報  
なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Asahi, H., Cook, M.R., Osman, A., LoVerde, P.T. and Stadecker, M.J. *Schistosoma mansonii* phosphoenolpyruvate carboxykinase (Sm-PEPCK), a novel egg antigen: Immunobiological properties of the recombinant protein and identification of T cell epitope. *Infection and Immunity* 68(6), 3385-3393. 2000

Williams, D.L., Asahi, H., Botkin, D.J. and Stadecker, M.J. Schistosome infection stimulates host CD4+ T helper cell and B cell responses against a novel egg antigen thioredoxin peroxidase. *Infection and Immunity* 69(2), 1134-1141, 2001

Stadecker, M.J., Hernandez, H.J. and Asahi, H.: The identification and characterization of new immunogenic egg components: implications for evaluation and control of the immunopathogenic T cell response in schistosomiasis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 95, in press, 2001

## 2. 学会発表

Asahi, H, Hernandez, H.J. and Stadecker M.J.: *Schistosoma mansoni* Phosphoenolpyruvate carboxykinase (Sm-PEPCK), A novel schistosoma egg antigen, induces potent CD4+ T helper cell response in the C57BL/6 mouse. 第69回日本寄生虫学会大会、平成12年4月

Asahi, H., Osman, A., Cook, R.M., Hernandez, H.J., Ohta, N., LoVerde, P.T. and Stadecker, M.J. : *Schistosoma mansoni* phosphoenolpyruvate carboxykinase, a novel egg antigen; immunological properties of the recombinant protein and identification of a T-cell epitope. Thirty-fifth Joint Conference on Parasitic Diseases, The JAPAN-U.S. Cooperative Medical Science, July 2000

Williams D.L., Asahi, H., Botkin, D.J. and Stadecker M.J.: Thioredoxin peroxidase of *schistosoma mansoni* is a novel T-cell and B-cell egg antigen. The 49<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene, USA, November 2000

H. 知的財産権の出願. 登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

研究成果の刊行に関する一覧表

| 発表者氏名  | 論文タイトル名  | 発表誌名                         | 巻号 | ページ           | 出版年  |
|--|--|------------------------------|----|---------------|------|
| Asahi, H.,<br>Cook,<br>M.R.,<br>Osman, A.,<br>LoVerde,<br>P.T. and<br>Stadecker,<br>M.J. | <i>Schistosoma mansoni</i><br>phosphoenolpyruvate<br>carboxykinase (Sm-<br>PEPCK), a novel egg<br>antigen:<br>Immunobiological<br>properties of the<br>recombinant protein<br>and identification of T<br>cell epitope. | Infection<br>and<br>Immunity | 68 | 3385-<br>3393 | 2000 |
| Williams,<br>D.L., <del>Asahi,</del><br>H., Botkin,<br>D.J. and<br>Stadecker,<br>M.J.    | Schistosome<br>infection stimulates<br>host CD4+ T helper<br>cell and B cell<br>responses against a<br>novel egg antigen<br>thioredoxin<br>peroxidase.   | Infection<br>and<br>Immunity | 69 | 1134-<br>1141 | 2001 |

| 発表者氏名   | 論文タイトル名  | 発表誌名   | 巻号 | ページ      | 出版年  |
|---|--|--|----|----------|------|
| Stadecker,<br>M.J.,<br>Hernandez,<br>H.J. and<br>Asahi, H.: | The identification and<br>characterization of new<br>immunogenic egg<br>components:<br>implications for<br>evaluation and control of<br>the immunopathogenic T<br>cell response in<br>schistosomiasis. | Memorials<br>do Instituto<br>Oswaldo<br>Cruz | 95 | in press | 2001 |

新規殺貝剤の開発に関する研究

分担研究者 川中 正憲 国立感染症研究所寄生動物部室長

研究要旨 住血吸虫中間宿主貝を殺滅する植物由来殺貝剤の開発を目的とし、エジプト、中国、フィリピンの有病地に自生する植物から殺貝効果のある成分を探索している。初年度は、エジプトのセオドア・ビルハルツ研究所から提供されたエジプトに自生する植物である *Anagallis arvensis* (ルリハコベ) に含まれる成分のうち、殺貝効果の最も高いサポニンの検討を行なった。また、茶種子サポニンの解析を手がけた。

A. 研究目的

開発途上国での住血吸虫症有病地においてその地に自生する植物から殺貝活性植物を見出しそれを殺貝剤へと利用する方法への期待は近年益々大きくなっている。この背景として、現在、実際に殺貝剤として用いられているニコロサマイドは高価でまた魚毒性が強いという欠点があり、またこの薬剤が1960年代以来使用されてきた為に中間宿主貝の側に薬剤耐性が生じてきていると一部で報告されていることがある。そこで、本研究の目的は、住血吸虫が今も猛威をふるっているエジプト、中国、フィリピンにターゲットをおいて植物由来殺貝剤の開発を目指すところにある。

B. 研究方法

エジプトのセオドア・ビルハルツ研究所において、エジプトに自生する177種の植物について野外スクリーニングを行った結果 *Anagallis arvensis* が殺貝剤として有望であることが分かった。そこで本種植物に含まれる殺貝活性成分の解析をおこなった。方法は、化学的なフラクショネーションと、貝を用いたバイオアッセイ

で検討をすすめ、殺貝活性のあるフラクションを精製したのち NMR とマスペクトルグラフィーによる測定によって構造の決定をおこなった。その他に、現在手がけている植物材料として、中国の有病地については茶種子のサポニン、フィリピンに関しては *Tuban bakod* (*Jatropha curcas*) がある。

C 研究結果

*Anagallis arvensis* の殺貝成分はサポニン分画にあり、二つのサポニンの構造を決定するとともに (Desglucoanagalloside B, Anagalloside B)、それらが *Biomphalaria glabratus* と *Oncomelania quadrasi* に対して実験室内の条件では、0.625ppm から 2.0ppm の濃度で殺滅効果があった。

D. 考察

乾燥させた *Anagallis arvensis* の野外試験における有効濃度 (LC90) は約 71ppm であったが、本研究によって単離されたサポニンの殺貝有効濃度は、実験室の条件で 0.625ppm から 2.0ppm という ニコロサマイドと同程度の

殺貝効果があることが明かになった。

#### E, 結論

*Anagallis arvensis* より殺貝効果の高いサポニンが分離同定された。サポニンは直接血管中に入らない限り人畜には殆ど害はなく、水によく溶けるという性質がある。本成分は植物由来の殺貝剤として有望であると考えられる。

#### F 健康危険情報

なし

#### G 研究発表

##### 1. 論文発表

Molluscicidal saponins from *Anagallis*

*arvensis* against schistosome intermediate hosts. Mahfouz M. Abdel-Gawad, Samir M. El-Amin, Hajime Ohigashi, Yoshinori Watanabe, Naohito Takeda, Hiromu Sugiyama, Masanori Kawanaka  
Jpn. J. Infect Dis., 53, 17-19, 2000

##### 2. 学会発表

茶種子サポニンの殺貝活性成分について、川中正憲、杉山 広、大東 肇、第60回日本寄生虫学会東日本大会、平成12年10月21日

#### H 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

現在のところなし

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

住血吸虫症ワクチン開発に関する基礎的並びに応用的研究

分担研究者 小島 莊明 国際医療福祉大学保健学部教授

研究要旨 住血吸虫症ワクチン開発のための実験モデルとしてマウスが多く用いられているが、その防御免疫機構の一端を担うと考えられるエフェクター細胞のうち好酸球について、その住血吸虫幼虫殺滅作用をラット好酸球のそれと比較する一方、幼線虫殺滅作用におけるマウス好酸球の活性について検討した。その結果、マウス好酸球は、幼線虫に対しては補体成分やファイブロネクチン等の接着分子を用いた強力な殺滅活性をもつにもかかわらず、ラット好酸球と比較し住血吸虫幼虫に対する殺滅作用は極めて弱いことが判明した。このことは、住血吸虫症ワクチン開発モデルとしてのマウスが必ずしも理想的なものではないことを示唆している。

A. 研究目的

これまで、住血吸虫症ワクチン開発のための実験モデル動物として、マウスが多用されてきているが、いずれのワクチン候補分子を用いても、あるいは免疫方法やアジュバントとの組み合わせを変えても、誘導される防御免疫は完全なものではなく、通常30~40%程度の虫体回収率減少しか得られない。人体に応用可能なワクチン候補分子を見出すためにも、できるだけヒトの防御機構に近似した実験モデルでのワクチン開発実験が望ましいが、マウス以外の実験動物は飼育・管理が困難であり、どうしてもマウスに頼らざるを得ない面がある。したがって、ワクチンモデルとしてのマウスの妥当性ないし弱点について十分に検討しておく必要がある。そこで、本研究では、マウスにおける防御免疫機構の一端を担うエフェクター細胞と考えられる好酸球について、その住血吸虫幼虫殺滅活性をラット好酸球のそれと比較するとともに、その性状が普遍的なものであるか否かを知る目的で幼線虫に対する殺滅活性についても検討した。

B. 研究方法

C57BL/6 または C3H/HeN をバックグラウンドとする IL-5 トランスジェニックマウスの腹腔浸出細胞からマクロファージを除去

し、精製分離した好酸球を実験に供した。ラット好酸球は、metrizamide 重層法にて分離した。日本住血吸虫感染マウス血清もしくは非感染マウス血清で前処置した日本住血吸虫幼虫への粘着・殺滅実験には、標的：エフェクター細胞比が 1：4000 となるよう調整し、細胞粘着の度合いは 16-20 時間後に、殺滅については 48 時間後に判定した。また、細胞抽出液による殺滅実験も行い、1 幼虫あたり 40000 個相当の細胞抽出液が作用するように調整した。併せて、eosinophil peroxidase (EPO) 活性並びに superoxide anion 産生についても検討した。一方、幼線虫への粘着・殺滅実験では、*Nippostrongylus brasiliensis* 第3期幼虫 (L3) を用い、標的：エフェクター細胞比が 1：10000 となるよう調整し、判定はすべて 24 時間後に行った。

C. 研究結果

感染血清の存在下でマウス好酸球は、日本住血吸虫幼虫に粘着しこれを殺滅できるが、その能力はラット好酸球に比較しきわめて低いこと、かつこの事実は前者における EPO 活性や superoxide anion 産生の低さとも関連することが判明した。ところが、幼線虫が角皮構造を有しているにもかかわらず、マウス好酸球は幼線虫に対してはきわめて効果的な粘着・殺滅活性を示している

こと、また、CD11b や VLA-4 に対するモノクローナル抗体で好酸球をあらかじめ処置すると粘着・殺滅活性が著明に抑制されること、さらに正常マウス血清処理後の L3 には蛍光抗体法により C3c や fibronectin を証明できることから、虫体に結合したこれらの分子と細胞膜上のそれぞれのリガンドを介して、好酸球による粘着や殺滅が行われるとみられることが明らかとなった。

#### D. 考察

上記の実験事実から、住血吸虫症に対する防御免疫において重要なエフェクター細胞と考えられている好酸球が、マウスにおいては住血吸虫感染に対して十分な能力を発揮していない可能性が明らかとなった。

#### E. 結論

本研究により、住血吸虫症ワクチン開発のモデルとしてマウスを用いることには、一定の限界があることが示された。したがっ

て、住血吸虫症ワクチンの開発には、ヒトの防御免疫機構に可能な限り類似した、マウス以外の動物実験モデルを考慮する必要がある。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Chen H, Nara T, Zeng, X et al.: Vaccination of domestic pig with recombinant paramyosin against *Schistosoma japonicum* in China. *Vaccine*, 18: 2142-2146, 2000.

2) Shin E-H, Osada Y, Sagara H et al.: Involvement of complement and fibronectin in eosinophil-mediated damage to *Nippostrongylus brasiliensis* larvae. *Parasite Immunol.*, 24, 27-37, 2001.

3) Osada Y, Janecharut T, Hata H et al.: Protective immunity to *Schistosoma japonicum* infection depends on the balance of T helper cytokine responses in mice vaccinated with  $\gamma$ -irradiated cercariae. *Parasite Immunol.*, 23, in press.



住血吸虫症の数理モデルの構築

分担研究者 嶋田 雅暁 長崎大学熱帯医学研究所教授

研究要旨：Individual-based modelによる住血吸虫症伝搬数理モデル構築を目的に、セルカリアの宿主侵入過程の数理モデル immigration-death modelを利用して、deterministic approach と stochastic approach の比較を行った。その結果、stochastic approach は deterministic approach よりも現実を良く反映することが明らかになり、stochastic approach による住血吸虫症伝搬数理モデルの開発が、住血吸虫症流行の変動を規定する各因子の重要性のプライオリティーを決定するために有用である可能性が示された。

A. 研究目的

住血吸虫症が新興感染症や再興感染症として出現する場合、次のふたつのケースが考えられる。

1. これまで全く流行が認められなかった地域で流行が始まるか、または狭い地域で流行していたものがこれまで流行の見られなかった周囲の地域に拡大する。
2. これまで完全に制圧されていた地域に再び流行が始まる。

どちらのケースであろうとも、しかし、これらの流行域の拡大や出現、再興は、流行を規定する因子の大きな変化のためにもたらされる。例えば、その地域における中間宿主生息可能水域の拡大、中間宿主である淡水産貝の生息個数の増加、住民による排泄虫卵数の増加、虫卵が淡水に到達するチャンスの増加、住民の水接触頻度の増加などである。実際、ダム建設による水域の拡大、農業開発に伴う用水路の建設、洪水などは流行拡大の大きな原因と考えられる一方、生活レベルの向上による便所の普及や水道水の建設、自己治療などは逆に流行を阻止する重要な鍵と考えられている。従って住血吸虫症の流行（再興）予測を行うとき、

またその予測に基づいて防圧対策を実施する場合、それぞれの流行規定因子が持つ意義、重要度を明らかにすることはきわめて重要である。しかし、今日でもこれら様々な規定因子の流行変化に対する量的な影響や効果を予め知ることは容易ではない。

住血吸虫症の拡大や再興の予測、防圧対策に必要な各因子の重要度を解析するためには、野外調査による各因子の測定による具体的なデータ蓄積がまず不可欠である。しかし、それだけでは十分ではなく、一方で数理モデルの開発という手法が考えられる。

数理モデルの開発とは、ある問題を方程式などの数学的な形で表現し、コンピュータを用いてシミュレーションを行い、効率的に答えを導き出す手法で、住血吸虫症においては、その伝搬過程を規定する各因子の相互作用を数学的に表現し、それぞれの因子の変化が住民の感染や流行の拡大などに与える影響を量的に明らかにするものである。数理モデルは従って、住血吸虫症対策の効果判定、評価等に応用することも可能である。

本研究では、住血吸虫症の伝搬過程を表現でき

る数理モデルを開発するとともに、そのモデルを利用して、住血吸虫症流行の変動を規定する各因子の重要性のプライオリティーを決定することを目的とする。

## B. 研究方法

1. 住血吸虫症伝搬数理モデル開発のアプローチ（方法論）の選択
2. 伝搬モデルのダイアグラムの作成（模式図化）
3. ダイアグラム（模式図）を構成する各コンポーネントのプログラム化とシミュレーション
4. コンポーネント統合によるモデルの作成とシミュレーション

## C. 研究結果

本年度は、1) 数理モデル開発の方針の決定と、2) モデルのダイアグラムの作成、3) コンポーネント作成の一部として、住血吸虫の終宿主体内への侵入過程のプログラム作成、を行った。

### 1. 数理モデル開発方針の決定

一般的に数理モデルには、**mean-field model** という方法に対して **individual-based model (IBM)** と呼ばれる方法がある (図1)。

**Mean-field model** の方法を住血吸虫症モデル開発に当てはめれば、伝搬員の感染率、住民の虫卵陽性率、住民の平均虫卵排泄数など、率 (**rate**: ある集団中に起こるある現象の出現頻度) や平均値、すなわち集団を表現するパラメーターを用いることが特徴となる。しかし、この方法は伝搬員や住民が集団として均一であることや観察される現象が常に一定の頻度で起こることを前提としており、住血吸虫症伝搬の現実を反映しているとは言い難い。

これに対し **IBM** は伝搬員や住民が均質性を持

つ、あるいは虫体の侵入や虫卵の排泄が一定の頻度で起こるなどの前提を置く必要がなく、住民個人、伝搬員個体、住血吸虫虫体個体がそれぞれ独立して動く様子をシミュレートすることが可能で、**mean-field model** に比較して、より住血吸虫症伝搬の現実を反映すると考えられる。

また数理モデル開発には、ある問題に対して決定論的アプローチ (**deterministic approach**) をとる方法と、非決定論的アプローチ (**stochastic approach**) をとる方法が存在する (図2)。

**Deterministic approach** では、数理モデルにおける数式の複雑さに関わらず、シミュレーションの結果は常に一義的に決定される。これに対し、**stochastic approach** では、結果が初期条件等に大きく影響を受けることがあり、必ずしも常に決まった結論が得られるわけではないが、リアリスティックな結果を示す点が特徴である。これまでに作成された住血吸虫症伝搬モデルの多くは決定論的アプローチによるものが多く、非決定論的アプローチによるものは少ない (図3)。

そこでこれらの条件を検討した結果、我々は **IBM** を基礎に非決定論的アプローチによる住血吸虫症伝搬数理モデルを作成することにした。

### 2. ダイアグラムの作成

開発する数理モデルのダイアグラムとして、まず、終宿主である住民と中間宿主である伝搬員がある空間 (**world B**) 上 (実際には淡水中) に存在するモデルを想定した (図4)。このモデルに基づいて、個々の伝搬員の動き、住民の行動を表現する数理モデルを開発するが、この部分の開発は本年度は行っていない。来年度以降に行う予定である。

これに加えて、住血吸虫個体の動きをモデル化するために、住民、伝搬員、淡水をそれぞれ虫体が生存しうる世界 (住民: **world A**、伝搬員: **world C**、淡水: **world B**) と見なし、虫体個体がこの3

世界を移動するモデルを想定した (図5)。さらに図5の太矢印の部分、すなわち淡水中の住血吸虫 (セルカリア) が住民に侵入する過程を含む終宿主体内における虫体行動を表現するモデルとして図6を作成した。

### 3. 住民への住血吸虫侵入過程における決定論的アプローチ並びに非決定論的アプローチによるプログラム作成とその比較

本年度は、図5の太矢印の部分、図6の太矢印部分、すなわち淡水中の住血吸虫 (セルカリア) が住民に侵入する過程を表現するプログラムを、決定論的アプローチと非決定論的アプローチ双方の方法で作成、比較し、その特徴を確認した。

プログラムは BASIC 言語で作成したが、将来は C 言語または swarm に変換して汎用性を高める予定である。

セルカリアが淡水中から住民の体内へ侵入し、その後住民の体内で寿命がつきる過程は immigration-death model としてよく知られている。Deterministic approach で行う immigration-death model では単位時間に侵入するセルカリアの数と寄生している虫体の死亡率が常に一定ならば、時間の経過に従って寄生している虫体数はある固定された数に収束する。しかし現実には、侵入するセルカリア数は一定ではなく、寄生している虫体は死亡率に従って必ずある確率で死んでいくわけではない。Deterministic approach の限界である。

そこで、下記のプログラムでは、stochastic approach の方法として、deterministic model のために設定した単位時間に侵入するセルカリア数と寄生している虫体の死亡率はそのままに、(0-1で発生させた乱数の値)と(セルカリア数をセルカリア数と死亡虫体数の合計で割った値)を比較することによって、セルカリアの侵入と寄生虫体の死亡を個体ごとに決定する方法を

導入した。後者が前者より大きい場合、すなわち寄生している虫体数が減少する傾向にある場合にはセルカリア一隻が侵入する機会が増加し、後者が前者より小さい場合、すなわち寄生している虫体数が増加傾向になると虫体一隻が死亡する機会が増加する。

### 4. プログラム

```

1000 'Immigration Death Model (Simple)
1001 'program name : IMMIG_DEATH
    _50_60.BAS
1002 'December 22, 2000   Masaaki Shimada
1003 'Information and Reference Center
1004 'Institute of Tropical Medicine, Nagasaki
    University
1005 '
1006 '      graphics
1007 '
1008 cls
1010 WINDOW (-50,-20)-(779,229) :color
    7,0,0,7
1015 VIEW (0,0)-(639,479)
1020 locate 8, 6 : print " 50"
1025 locate 8,18 : print " 25"
1030 LOCATE 10,32 : PRINT "
10      20      30      40
1050      60"
1035 LINE(100,100)-(100,500) 'left vertical
1040 LINE(100,500)-(700,500) 'horizontal
1050 LINE(700,100)-(700,500) 'right vertical
1060 FOR I=0 TO 5 :LINE(I*100+200,500) -
    (I*100+200,505): NEXT I
1070 FOR I=0 TO 3 :LINE(95,I*100+100) -
    (100,I*100+100): NEXT I
1080 FOR I=0 TO 3 :LINE(700,I*100+100) -
    (705,I*100+100): NEXT I
1200 '

```

```

1203 '      input
1204 '
1205 locate 0, 0
1210 print "      "
1220 print "      "
1230 print "      "
1232 print "      "
1235 locate 0,0
1237 print "Immigration-Death Model
(Simple)"
1240 locate 0,1
1250 input "N (0-25)"; n : ns=n
1260 input "immigration(1-8)" ; L
1270 input "death rate" ; U
1280 t=0 : x=1
1285 for i=0 to 59
1290      LINE(i*10+100,500-(L/U*(1-exp(-
u*i))+ns*exp(-u*i))*8)-((i+1)*10+100,500-
(L/U*(1-exp(-u*(i+1)))+ns*exp(-u*(i+1))*8)
1295 if 500-(L/U*(1-exp(-u*(i+1)))+ns*exp(-u*(i
+1))*8)<80 then 1300
1296 next i
1297 '
1298 '      main program
1299 '
1300 randomize
1350 y1=rnd(1)
1400 randomize
1450 y2=rnd(1)
1700 'if n=0 then end
2000 if (y1=0 or y1>0) and (y1<L/(L+U*n) or
y1=L/(L+U*n)) then 2100 else 2200
2100 n=n+1 : np=n-1 : goto 2300
2200 n=n-1 : np=n+1
2300 if n<0 then end
2310 if n=0 then s=0 : goto 2400
2350 s=-log(y2)/(L+U*n)
2400 t=t+s : tp=t-s
2450 'print t
2460 'print n
6700 'for i=0 to
6740 color 7,0,0,x : LINE(tp*10+100,(500-np
*8))- (t*10+100,(500-n*8)): color 7,0,0,7
6800 if t<15 and x=1 then max=n : min=n : goto
6900 else 6805
6805 if t<15 then 6900 else 6810
6810 if n>max then max=n else max=max
6820 if n<min then min=n else min=min
6900 if t>60 or n>125 then 7000 else 1300
7000 x=x+1 : t=0 : n=ns
7005 locate 0,33 : print "      "
7007 locate 0,34 : print "      "
7010 locate 0,33 : print "maximum", max
7020 locate 0,34 : print "minimum", min
7100 if x>7 then end else 1300
1205 locate 0, 0
1210 print "      "
1220 print "      "
1230 print "      "
1232 print "      "
1235 locate 0,0
1237 print "Immigration-Death Model(Simple)"
1240 locate 0,1
1250 input "N (0-25)"; n : ns=n
1260 input "immigration(1-8)" ; L
1270 input "death rate" ; U
1280 t=0 : x=1
1285 for i=0 to 59
1290      LINE(i*10+100,500-(L/U*(1-exp(-
u*i))+ns*exp(-u*i))*8)-((i+1)*10+100,500-
(L/U*(1-exp(-u*(i+1)))+ns*exp(-u*(i+1))*8)
1295 if 500-(L/U*(1-exp(-u*(i+1)))+ns*exp(-
u*(i+1))*8)<80 then 1300
1296 next i

```