

```

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

```

5. 結果

作成したプログラムによるシミュレーションを7回独立して繰り返した結果を図8に示す。

セルカリアの宿主侵入過程を数学的に表現している **immigration-death model** の初期値として、体内に寄生している虫体数25、単位時間あたりのセルカリアの体内への侵入数を8、単位時間あたりの死亡率を0.3に設定すると、**deterministic approach** による結果では一定時間経過後約26.7の虫体数に収束した(図8中央を横切る曲線)。

これに対して **stochastic approach** によるシミュレーションでは、虫体数は激しい変動を示し、最高で48、最低では11で、収束する傾向はまったく認められなかった(図8では折れ線様に示されている)。初期値を様々な値に変更して行った結果もすべて同様の傾向を示した。

D. 考察

Stochastic approach によるシミュレーションの結果は、自然界における単なる偶然が寄生虫体数を非常に大きく変動させている可能性を示唆している。野外調査で得られる住民の排泄虫卵数(感染強度)が偶然の変動によって指標として用いるには耐えられないほどの変動を示しているとすれば、これまでの虫卵排泄数測定のためのこれまでの単純な検便や検尿方法を再考する必要がある。

Immigration-death model における **stochastic approach** は明らかに **deterministic approach** より現実をよりリアリスティックにシミュレートしている。しかし、それが住血吸虫症伝搬数理モデルの作成のために不可欠な方法であるか、また有利な方法であるか、はまだ明らかではない。今年度の結果は伝搬数理モデル全体のほんの一部であり、他のコンポーネントの完成とコンポーネント同士の組み合わせを待たないで結論付けることは出来ない。現実をより良くシミュレートすることと、そのモデルが役立つこととは必ずしも一致しないかもしれない。

今回のプログラムで主に用いた初期値、虫体数 25, 単位時間あたりのセルカリアの体内への侵入数 8、単位時間あたりの死亡率 0.3、はこれまでのアフリカのビルハルツ住血吸虫症調査の結果などから推測したものであるが、確実な根拠があるわけではない。従って継続的な野外調査によるデータ収集がなければ、数理モデルは机上の空論で終わることになる。住民の水接触調査など、野外調査の結果と数理モデルの開発を互いに補完する事により、意味のある数理モデルを完成させる必要がある。

また、本プログラムは厳密な意味では未だに IBM とは言えない。住血吸虫虫体が個体として扱われているわけではない。今後、プログラムを虫体一隻を中心とした IBM に変換することが急務である。

E. 結論

Stochastic approach による住血吸虫症伝搬数理モデルの開発は、住血吸虫症の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と考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

A population study of the intermediate host of *Schistosoma mansoni* and the application of remote sensing. Fatma Y. Mohamed, Kiyoshi Shiratori, E. S. Massawe, R. J. Shayo, Tomoko Kisu and Masaaki Shimada. Japan. J. Trop. Med. Hyg., 28 suppl. 116.

A questionnaire study to quantify the human

behavior at river infested with *Schistosoma mansoni*. Tomoko Kisu, Susumu Tanimura, E. S. Massawe, R. J. Shayo, Kiyoshi Shiratori, Fatma Y. Mohamed, and Masaaki . Japan. J. Trop. Med. Hyg., 28 suppl. 117.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

Mean-field Model

モデルの中で、振る舞うすべての個体は均質で、空間中に一様に分布しており、平等に相互作用する。

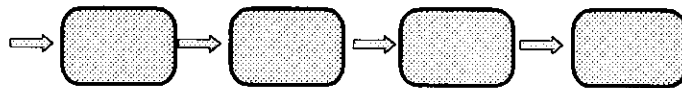
Individual-based Model (IBM)

モデル中の個体は、それぞれがユニークで異質であり、分布は不均等で、相互作用は平等ではない。

図1 モデルの種類

決定論的アプローチ

数式に従って結果は一義的に決定される



ストカスティック（確率論的）アプローチ

確率と選択によるため結果は一義的に決定されない

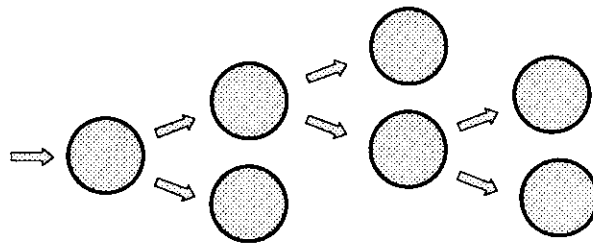


図2 アプローチの方法

決定論的アプローチ

Macdonald, G.

Anderson, R. M. and May, R. M.

Barbour, A. D.

Woolhouse, M. E. J.

ストカスティック (確率論的) アプローチ

Habbema, J. D. F and De Valas, S. J.

図3 モデル開発の歴史

Diagram of Model (1)

Human and Snail population

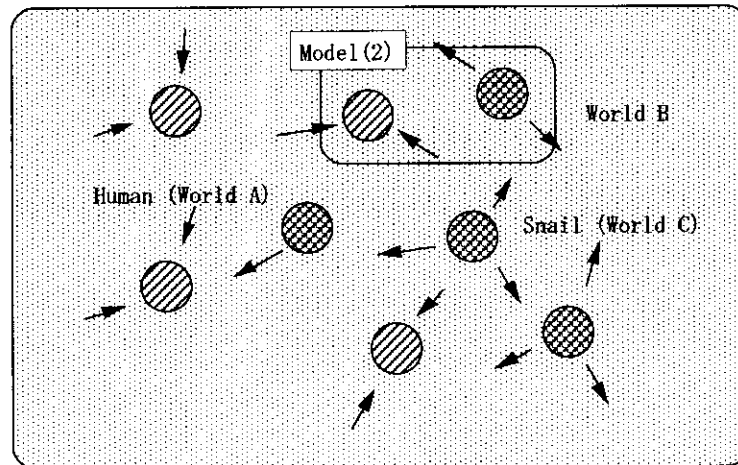


図4 住民と伝搬員

Diagram of Model (2)

Worms

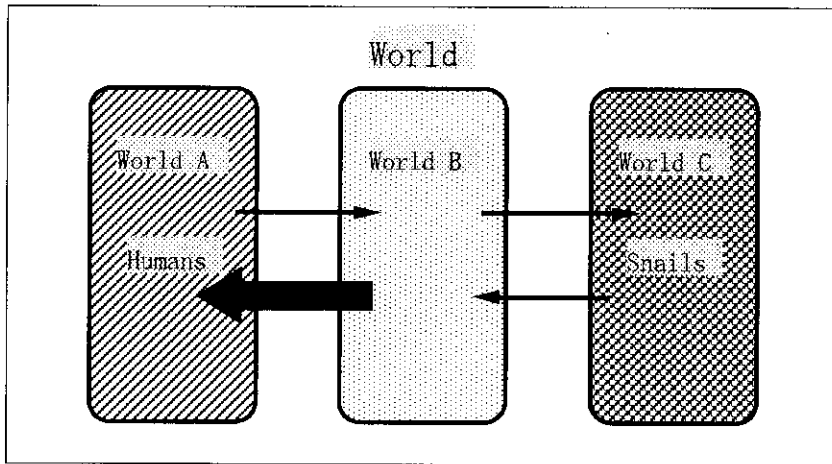


図5 住血吸虫虫体の人体への感染

Diagram of Model (3)

Worms in Human (World A)

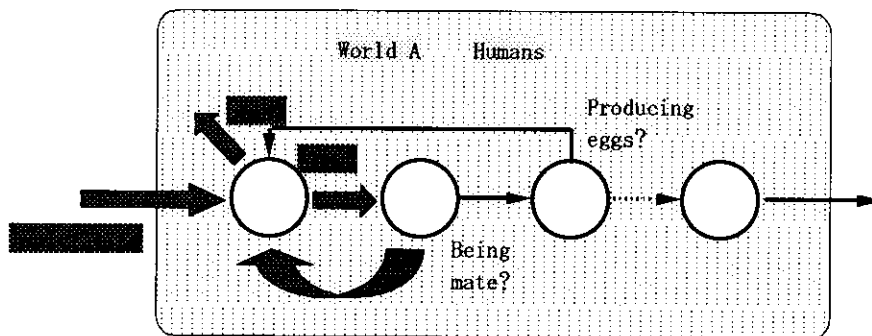


図6 Immigration-death model

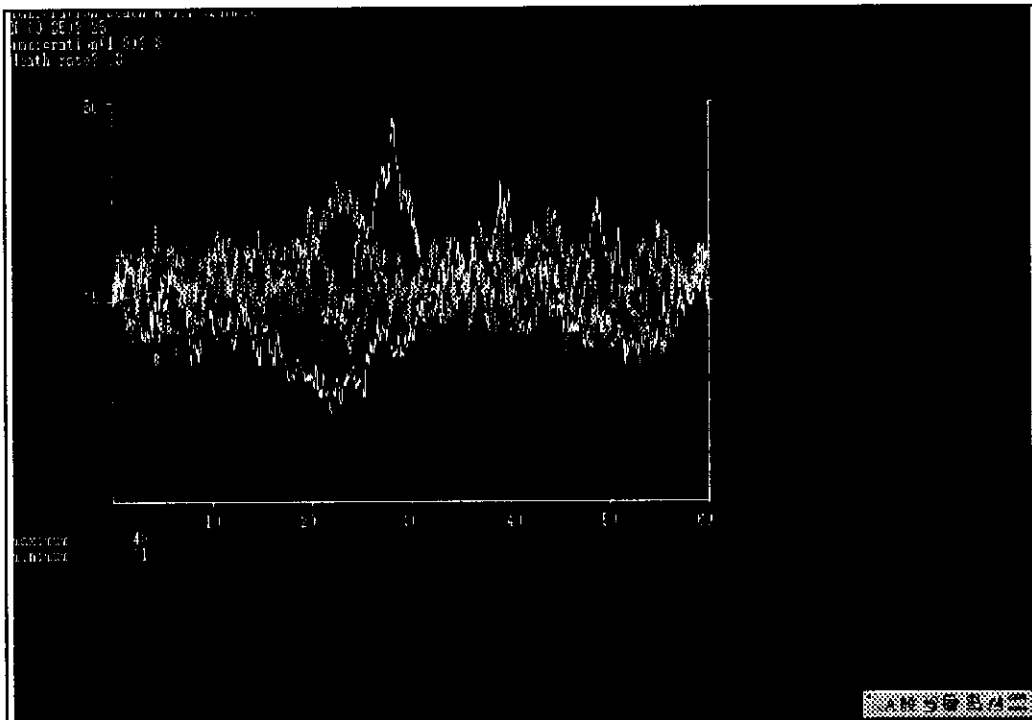
deterministic approach

$$N_t = \lambda / \mu (1 - e^{-\mu t}) + N_0 e^{-\mu t}$$

stochastic approach

$$\begin{aligned} P_N(t+h) = & P_N(t) X (1 - \lambda h - \mu N h) \\ & + P_{N-1}(t) X \lambda h \\ & + P_{N+1}(t) X [(N+1) \mu h] \end{aligned}$$

図7 Immigration-death modelにおける異なるアプローチの比較



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

住血吸虫感染マウスに検出される瘧疾誘発リポタンパク（CILIP）の研究

分担研究者 田 邊 将 信

慶應義塾大学医学部専任講師

共同研究者

小泉 周、三好俊一郎、金子章道（慶應義塾大学医学部生理学教室）

永田博司（慶應義塾大学医学部内科学教室）

福田恵一（慶應義塾大学医学部内科学教室）

高松 研（東邦大学医学部第二生理学教室）

北 潔（東京大学大学院国際保健生物医科学）

研究要旨

マンスン住血吸虫感染マウスからすでに精製されている瘧疾誘発リポタンパク（CILIP）と比較検討するため、マンスン住血吸虫感染 ICR マウスの肺や腸、旋毛虫感染 ICR マウスの腸、寄生虫感染を受けていない ICR および BALB/c マウスの腸、あるいはラット、ウサギ、ヒトの肺から瘧疾誘発物質の精製を行った。これらの瘧疾誘発物質は、①全く同じ方法で精製が可能、②マウスやラットに投与すると CILIP と同じ症状をもたらす、③CILIP と同じ機構を介してマウスに作用する、④よく似た物理化学的性状を示したことから、CILIP と同等な物質と考えられ、CILIP が種を越えて動物組織に広く分布する物質であることが推定された。

各種動物組織から精製された CILIP を二次元電気泳動法を用いて分析し、共通して存在する 3 つのペプチド分子群を同定した。このうち第 2 と第 3 のペプチド分子群は抗 CILIP ウサギ・ポリクロナル抗体を用いた WB によって陽性反応を示したことから、これらの分子が瘧疾誘発に関わっている可能性が示唆された。

各種動物組織から精製された CILIP が神経細胞の Na⁺チャネルおよび K⁺チャネルの両方に働き（Ca⁺⁺チャネルへの効果は不明）、その機能を一時的にブロックすること、培養心筋細胞に働きその拍動を一時的に停止させることが見いだされた。さらに、CILIP がラットの腸間膜微小循環の完全な血流停止を引き起こし、その原因が心臓のポンプ機能の低下による可能性が示唆された。

研究目的

住血吸虫症は熱帯地域を中心に世界に広く分布しており、現在、2 億人の感染者、2 千万人の有病者がおり、毎年 100 万人が本症によって死亡していると推定されている。本症の病原機構の中心をな

すものは成虫より生み出された虫卵であると考えられている。宿主は肝臓や腸管壁に沈着した虫卵周囲に肉芽腫を形成するが、この虫卵性肉芽腫形成が肝線維化、門脈圧亢進、さらには食道静脈瘤形成といった病態をもたらしている。この虫卵性肉芽腫形成と宿主免疫、あるいはサイトカインとの関連性につ

いては良く研究されているが、肉芽腫に存在する生理活性物質については殆ど知られていない。

我々は偶然マウスに硬直性痙攣を惹起する物質が虫卵性肉芽腫抽出液中に存在することを発見した。この物質の致死量投与では、投与後 20～40 秒でマウスは行動異常といった前駆症状を呈した後、強直性痙攣を起こして死亡するが、半致死量投与では、マウスは投与後 30 秒以降に各種神経症状（回轉運動、迷走運動、不随意運動）や呼吸の変化を呈し、ぐったりと横たわったまま全く活動しなくなる。しかし、投与後 1 時間以上経過すると、マウスは徐々に回復し、その後は非投与マウスと同様に長期にわたり生存する。半致死量投与後 6 時間たって十分に回復したマウスに致死量を静注しても殆ど症状を示さず、いわゆる不応期のような状態が見られる。この物質は住血吸虫感染マウスの肝臓に多量に存在し、1 匹の感染マウスの肝抽出液中には 150 匹のマウスを殺し得る痙攣誘発物質が含まれている。このような物質の存在は、住血吸虫症はもとより他の感染症においても全く知られていない。

我々はこの痙攣誘発物質の精製を試み、マンソン住血吸虫感染マウスの肝臓内虫卵性肉芽腫や脾臓の抽出液からの分離精製法を確立した。この物質は高比重高分子量リポ蛋白（推定分子量は 7000K+Da 以上、比重 1.15）であったことから、この物質を痙攣誘発リポ蛋白（CILIP）と呼んでいる。このリポ蛋白はその構成成分である脂肪と蛋白の立体的構造が痙攣誘発に不可欠であり、既知の痙攣誘発物質（細菌毒、化学物質）とは全く異なった物質であり、マウス血清リポ蛋白（VLDL, LDL, HDL）とも明らかに違った性状（脂質組成および抗原性）を示すことが明らかとなっている。マンソン住血吸虫感染マウスの虫卵性肉芽腫から精製した G-CILIP、あるいは脾臓から精製した S-CILIP の解析から、このリポ蛋白には数多くのアポ蛋白が存在し、その中にはマウス免疫グロブリン（IgG, IgM, IgA, IgE）や住血吸虫成虫及び虫卵由来の物質が含まれている。さらに、同じ動物から精製した CILIP においても由来組織が異なるとその構成アポ蛋白に違いが見られることが明らかとなっている。

一方、CILIP はもともと住血吸虫感染マウスから分離精製したが、その後の解析で CILIP に似た活性

を有する物質が寄生虫の感染を受けていないヒトや各種動物組織からも見いだされており、CILIP と同等な物質がヒトや各種動物組織に分布している可能性が推定された。

このように CILIP に関する基本的な解析は進んでいるが、このリポ蛋白の起源、生理機能、住血吸虫症の病態との関連性、痙攣誘発機構、構成アポ蛋白、痙攣誘発に直接関わっている物質といった点については依然として理解できていない。そこで、本年度は①ヒトにも CILIP に一致した物質は存在するか、②マンソン住血吸虫感染マウスから精製した CILIP と寄生虫感染を受けていない他種動物、あるいはヒトから精製した痙攣誘発物質との比較検討、③痙攣誘発に関わっている物質の同定、④痙攣誘発機構の解明、を目的として研究を行い、以下の成績が得られたので報告する。

研究 方 法

痙攣誘発リポ蛋白(CILIP)及び痙攣誘発物質の精製

CILIP はマンソン住血吸虫感染 ICR マウスの肝臓内虫卵性肉芽腫 (G-CILIP) 及び脾臓 (S-CILIP) から精製し、そして同感染マウスの肺及び腸から痙攣誘発活性を持つ物質の精製を試みた。また、旋毛虫感染 ICR マウスの腸からも痙攣誘発活性を持つ物質の精製を行った。一方、寄生虫感染を受けていない ICR および BALB/c マウスの腸、あるいはラット、ウサギ、あるいはヒトの肺からも痙攣誘発因子の精製を行った。ヒトの肺組織は子宮ガンで死亡した 72 才の女性の病理解剖時に遺族の了解を得て採取した。また、動物実験は慶應義塾大学医学部動物実験ガイドラインに準拠して行った。

CILIP 及び痙攣誘発物質の精製は我々が確立した方法で行った。組織を 20mM Tris-Cl, pH8.0/2mM EDTA/150mM NaCl 中でホモジナイズし、15000 g x 30 min 遠心上清を回収し、硫酸塩析 (30-60%) を行った。活性画分を 20mM Tris-Cl, pH8.0/2mM EDTA/150mM NaCl に対して透析し、DEAE イオン交換クロマトで分離した。活性画分を 20 mM Tris-Cl, pH7.2/2 mM EDTA/250mM NaCl に対して透析後、ゲル濾過力

ラム(HW65S)で分画し、最初のピークを回収し、濃縮後へパリンカラムで分画した。活性画分を濃縮後、不連続ショ糖密度勾配超遠心(105000gX16時間)にかけ、比重が1.15の部分で回収し、もう一度超遠心にかけ、活性画分を回収した。濃縮後、HW75Sゲル濾過カラムで分画し、脱塩処理を行い最終精製標品を得た。脂質分析、あるいは二次元電気泳動による解析には、精製標品をさらに濃縮したサンプルを用いた。また、痙攣誘発機構の解析にはCILIPの溶媒を各実験ごとに最適なものに変更して用いた。

CILIP及び痙攣誘発因子の活性は検体(6~200 μ l)をICRマウス(体重6~10g)の尾静脈に注射し、投与後3分以内に何らかの神経症状が認められる最少量を1単位とした。検体に含まれる蛋白量から比活性U/mg proteinを算出した。

脂質及びタンパク質の定量

CILIP及び痙攣誘発物質に含まれる遊離コレステロール、コレステロール・エステル、トリグリセリド、リン脂質は市販の測定キット(和光純薬)を用いて定量した。蛋白量はBSAを標準としたBradford法により測定した。

CILIPに対するポリクロナル抗体(PolyAb)、モノクロナル抗体(MoAb)の作製

PolyAbは虫卵性肉芽腫から精製したG-CILIPをウサギ、あるいはマウスに免疫して作製した。MoAbはBALB/cマウス、あるいはラットにG-CILIPを免疫して作製した。MoAbのスクリーニングはG-CILIPを抗原としたELISAで行った。PolyAb及びMoAbの痙攣誘発阻止活性(中和活性)を調べる目的には、血清、培養液、あるいは腹水を2回硫酸塩析(0-50%)して得た γ グロブリン画分を用いた。中和活性はこの γ グロブリン画分と痙攣誘発物質とを混合し、4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させた後、その混合液をマウスの尾静脈に注射することで測定した。

二次元電気泳動

CILIP及び各種動物から精製した痙攣誘発物質の二次元電気泳動による解析では、一次元目にImmobilineDryStrip(pH3-10L及びpH3-10NL、

Pharmacia)を用いた等電点電気泳動を行い、二次元目には10% SDS-PAGE(160 X 160 mm)を行った。泳動後、ゲルは銀染色(和光純薬)を行い、構成ペプチドの比較検討を行った。また、ペプチドをPVDF膜に転写し、CILIPに対するウサギPolyAbを用いたWBを行い、ウサギPolyAbが認識しているペプチドの解析を行った。

ラット腸間膜微小循環へのCILIPの効果

本実験はToyodaら(Angiology, 44:376, 1993)の方法に準じて行った。Wisterラットの雌(200g)をネンプタールで麻酔し、開腹して腸間膜を取り出し、倒立顕微鏡のステージ上にのせ、微小循環の様子をビデオに記録した。対照実験にはCILIPの溶媒として用いている緩衝液を尾静脈から注入し、微小循環に変化が起きないことを確認した上で、2単位のG-CILIP(25 μ l)を静注した。投与後、経時的に微小循環の変化をビデオに記録した。また、必要に応じてラット胸部を開き心拍動の様子をビデオカメラで記録した。

培養心筋細胞へのCILIPの効果

培養心筋細胞はマウスの骨髄stroma細胞から分化誘導させたものを用いた(Makino et al., J. Clin. Invest., 103:697, 1999)。C3H/Heマウスの骨髄細胞を分離し、Dexterらの方法(J. Cell Physiol., 91:335, 1977)で初代培養した。培地はIscove's modified Dulbecco's medium (IMDM)/20% FBS/penicillin(100 μ g/ml)/streptomycin(250 μ g/ml)/amphotericin B(85 μ g/ml)を用い、33 $^{\circ}$ C/5% CO₂/95% airで培養した。この初代培養した骨髄細胞にAzacytidine(3 μ moles/l)を加え、心筋細胞への分化を誘導した。誘導開始後24時間では、多数の細胞が心筋細胞へと分化し、一定のリズムで拍動することが確認された。35mm径のプラスチックトレイに培養した心筋細胞に1単位から16単位のCILIPを加え、経時的に細胞の拍動の変化を倒立顕微鏡下にビデオに記録した。対照実験にはCILIPの溶媒として用いている培養液のみを同量加え、経時的に観察し、影響のないことを確認した。

培養神経細胞に対する CILIP の効果

CILIP の神経細胞に対する作用を明らかにするため、一過性 Na⁺電流、外向き遅延整流性 K⁺電流、Ca⁺⁺電流の存在が知られているラット網膜アマクリン細胞を標的細胞として解析を行った。アマクリン細胞はラット網膜から Watanabe ら (J. Neurophysiol., 84: 1826, 2000) の方法で分離した。細胞にパッチクランプ法を装着し、パフと呼ばれる微小管を通して G-CILIP (80 U/ml) をアマクリン細胞表面に持続的にかけ続け、各種電気刺激に対する細胞の活動電位の発生、脱分極性電位、電位固定法による電流記録をとり、G-CILIP の添加効果を解析した。対照実験には、CILIP の溶媒である緩衝液のみを添加した実験を行い、神経細胞への影響がないことを確認した。

研究結果

各種動物由来の痙攣誘発因子と CILIP との比較

従来我々が確立した方法によって、マンソン住血吸虫感染マウスの肺や腸から痙攣誘発活性をもつリポ蛋白が精製でき、さらに旋毛虫感染マウスの腸、あるいは寄生虫感染を受けていない ICR および BALB/c マウスの腸、そしてラット、ウサギ、ヒトの肺から痙攣誘発活性をもつリポ蛋白を精製することが可能であった。今回精製した標品は全て HW-75S ゲルろ過で単一かつ左右対称なピークを示し、CILIP とほぼ同じ位置に溶出され、連続シヨ糖密度勾配超遠心では比重 1.15 付近に単一バンドを示した。精製標品の比活性は 400~800 U/mg protein であった。

これらの精製した痙攣誘発因子の脂質組成の解析では、これらの脂質組成が CILIP のものとほぼ同じであることが明らかとなった (図 1)。そして、これらの痙攣誘発因子の脂質組成はマウスの血清リポ蛋白である VLDL、LDL、HDL やラットの HDL の脂質組成とは明らかに異なっていた。CILIP 及びこれらの痙攣誘発因子の比重は血清リポ蛋白の中では HDL のそれに一致するものであったが、分子の大きさでは HDL に比べ遙かに大きな分子であり、脂質組成の点でも明らかな違いを示した (図 1)。

一方、これらの痙攣誘発因子はいずれもマウスの尾静脈に注射することで、CILIP と同じ様な症状をもたらすことが明らかとなった。さらに、これらの痙攣誘発因子の半致死量をそれぞれマウスの尾静脈に投与し、病的状態から回復した (投与後 1 時間) マウスに今度は致死量の G-CILIP を投与したところ、いずれのマウスも殆ど症状を示さなかった (表 1)。このことは各種動物から精製した痙攣誘発活性を持つリポ蛋白の効果発現機構と CILIP のそれとが全く同じ機構を介していることを示唆している。一方、前処置用の各種動物由来の痙攣誘発因子を SDS や Triton X-100 で処理したものをマウスに投与した場合には、致死量の G-CILIP に対する抵抗性は付与されず、投与マウスは致死的变化を示した。これと同じ結果は前処置に SDS 処理した S-CILIP を用いた対照実験においても観察された。

抗 CILIP ポリクロナル抗体による CILIP の効果発現の阻害

マンソン住血吸虫感染マウスから精製した G-CILIP に対するウサギ、あるいはマウス PolyAb の γグロブリン画分が CILIP 及び痙攣誘発因子の効果発現を阻止しうるかどうかを検討した。表 2 に明らかなように、ウサギ及びマウスの γグロブリン画分は共に G-CILIP や S-CILIP の活性発現を抑え、さらにはマンソン住血吸虫感染マウスの腸から精製した痙攣誘発因子、寄生虫感染を受けていない ICR や BALB/c マウスの腸から精製した痙攣誘発因子、あるいはラット、ウサギ、そしてヒトの肺から精製した痙攣誘発因子の効果発現をほぼ完全に阻止することが明らかとなった。

この成績を基に、CILIP の痙攣誘発を阻止するモノクロナル抗体の作製を試みた。現在までに 29 種類の hybridoma のクローニングを終了しているが、この中には CILIP の効果発現を阻止し得る抗体は見いだされなかった。

二次元電気泳動による CILIP アポ蛋白の解析

マンソン住血吸虫感染マウスの脾臓や肝臓内虫卵性肉芽腫から精製した CILIP、同感染マウスの肺や腸、旋毛虫感染マウスの腸、ラット、ウサギ、そしてヒトの肺からそれぞれ精製した痙攣誘発因子に

ついて別個に二次元電気泳動法を行い、それぞれの構成ペプチドの解析を行った。CILIP、あるいは痙攣誘発因子に尿素、Triton X-100、DTT を加え、構造を壊したものをサンプルとし、二次元電気泳動を行い、ゲルの銀染色及び WB によって検討した。ゲルの銀染色では、今回調べた CILIP 及び痙攣誘発因子の全てに共通するペプチド分子群を複数同定した (図 2)。第一のペプチド分子群は分子量がおおよそ 46 KDa で、等電点が 7.5~7.9 の範囲にある 3 つのペプチドから構成されていた。第 2 のペプチド分子群は分子量がおおよそ 61 KDa で、等電点が 7.7~8.0 の範囲にある 4 つのペプチドから構成されていた。第 3 のペプチド分子群は分子量がおおよそ 60 KDa で、等電点が 8.0~8.2 の範囲にある 4 つのペプチドから構成されていた。

WB による解析では、ウサギ PolyAb は銀染色で検出できたペプチドの大部分を認識しておらず、WB で検出できたペプチド分子群は 2 つであった (図 3)。銀染色で検出された共通のペプチド群のうち、第一のペプチド分子群は全く認識されていなかったのに対し、第 2 及び第 3 のペプチド群は抗 CILIP 抗体によって認識され、しかも検討した全ての CILIP 及び痙攣誘発因子にそれらの存在が認められた。

培養神経細胞への CILIP の効果

アマクリン細胞をあらかじめ 5 分間 G-CILIP で処理し、様々な電気刺激を加えると、G-CILIP で処理しなかった細胞に比較し Na⁺電流及び K⁺電流の大きさが著しく低下することが明らかとなった (図 4)。そして、同一細胞に CILIP の入っていない緩衝液を 6 分間流し続けると、その Na⁺電流及び K⁺電流の反応性が共に回復することが明らかとなった。さらに、アマクリン細胞を G-CILIP で 10 分間処理した場合には、アマクリン細胞に様々な電気刺激を加えても K⁺電流は殆ど認められなくなった (図 5)。さらにアマクリン細胞の G-CILIP による処理時間を変えた実験では、処理時間が長くなるほどアマクリン細胞の反応性が低下することも明らかとなった。そして、殆ど反応できなくなったアマクリン細胞に CILIP の入っていない緩衝液で洗浄すると、その反応性が徐々に回復することが明らかとなった (図 6)。従って、アマクリン細胞への G-CILIP の効果は

一時的なものであり、細胞に致死的な作用を及ぼすものではなかった。また、このような G-CILIP による効果はラットやウサギから精製した痙攣誘発物質の投与によっても再現された。アマクリン細胞の Ca⁺⁺電流は非常に小さいため、今年度の研究では、CILIP の Ca⁺⁺チャネルへの作用を解析することはできなかった。

ラット腸間膜微小循環や心臓への CILIP の効果

G-CILIP を溶解している Eagle's MEM medium だけを腸間膜表面に滴下しても、あるいは静注しても腸間膜の微小循環には全く変化は認められなかった。また、G-CILIP を腸間膜の表面に滴下した場合にも、微小循環には何ら変化は認められなかった (滴下後 20 分間観察)。これに対して、G-CILIP をラットに静注した場合、投与後 30~40 秒でほぼ完全な血流停止がみられた。この場合、動静脈ともに収縮したり拡張したりすることなく急激に血流が停止することが認められた。それ故、CILIP が微小循環に直接作用を発揮しているとは考えにくい。そこで、ラットの胸腔を直ちに開き心臓の動きを観察したところ、心房の早い動きに対してゆっくりとした心室の動きがみられ、CILIP を静注したラットでは心臓の房室ブロックが引き起こされている可能性が考えられた。また、このような G-CILIP による効果はラットやウサギから精製した痙攣誘発物質の投与によっても再現された。

培養心筋細胞への CILIP の効果

培養心筋細胞に G-CILIP を添加すると、その投与量の増加に伴い心筋細胞の拍動に様々な変化が認められた。そして、16 単位の G-CILIP を投与すると、心筋細胞はその拍動を完全に停止した。しかし、拍動を停止した心筋細胞をそのままの状態に放置していたところ、60 分後には再び拍動を再開し、その後は対照細胞と同様に 10 日間以上に渡って拍動を続けることが明らかとなった。従って、G-CILIP が心筋細胞に直接作用を及ぼしうることが明らかとなった。また、このような G-CILIP による効果はラットやウサギから精製した痙攣誘発物質の投与によっても再現された。一方、心筋細胞をあらかじめ 5 単位の G-CILIP で処理しておき、拍動の変化が回復

した 20 分後に拍動停止を起こさせる量の G-CILIP (16 単位) を加えたところ、心筋細胞は全く変化を示さなかった。即ち、マウスに半致死量の G-CILIP を投与したときに見られる不応期のようなものが心筋細胞の系でも観察された。

前述のごとく、3.5 mm 径のシャーレーに培養した心筋細胞 (2 ml の培養液) の拍動を完全に停止させるためには 16 単位の G-CILIP が必要であった。ラットでは 2 単位の G-CILIP を静注することで腸間膜の血流停止、あるいは心臓の房室ブロックが見られることから、培養心筋細胞の拍動停止には大量の G-CILIP が必要であることが明らかとなった。ただし、この実験系では心筋細胞の機能的変化を定量的に解析することは不可能であったことから、視覚的に判定が可能な拍動停止を指標としたので、より多くの CILIP が必要であった可能性がある。

考 察

CILIP はもともと住血吸虫感染マウスの肝臓内虫卵性肉芽腫から分離精製したが、その後の解析で、CILIP と同様な瘧疾誘発活性を有する物質が感染を受けていない各種動物組織にも分布していることが明らかとなった。これらの瘧疾誘発物質は、①全く同じ方法で精製が可能、②マウスやラットに投与すると CILIP と同じ症状をもたらす、③CILIP と同じ機構を介してマウスに作用している、④よく似た物理化学的性状を示す、ことから、CILIP と同じ物質と推定される。従って、CILIP が種を越えて動物組織に広く分布する物質であることが推定された。当初、CILIP のアポ蛋白として宿主の免疫グロブリンや住血吸虫由来の物質が含まれていたことから、CILIP は住血吸虫感染が原因となって特異的に誘導されるリポ蛋白と考えていた。しかし、①感染を受けていない各種動物組織に広く分布している、② SPF 飼育された免疫不全マウスにも CILIP 活性が検出され、その精製が可能であることから考えると、CILIP は本来動物組織に生理的に存在する物質であり、何らかの生理機能を持った分子と考えられる。ところが、ある種の感染症、例えば住血吸虫症、マラリア、あるいはリーシュマニア症では、マウス組

織中の CILIP 活性が増加することが明らかとなっている。この活性増加のメカニズムは現時点では全く理解できていないが、CILIP のアポ蛋白として免疫グロブリンや寄生虫由来物質が含まれていること、あるいは CILIP 活性が胸腺、肺、脾臓、リンパ節、そして消化管に高いことを考えあわせると、宿主の免疫が密接に関連しているように思われる。恐らく多量の免疫複合体の形成、あるいは polyclonal activation といった宿主の抗体産生の異常亢進が見られるような病態が CILIP 活性の増加に関与しているように思われる。

虫卵性肉芽腫由来の G-CILIP に対して作製したウサギやマウス・ポリクロナル抗体は各種動物組織から精製した CILIP、あるいは瘧疾誘発物質の効果発現を一律に阻止することが明らかとなった。このことは、これらの瘧疾誘発活性を持つリポ蛋白には共通のエピトープをもった分子が存在し、この分子が瘧疾誘発に直接関わっていることを示唆しているものと考えられた。そこで、瘧疾誘発に直接関わっている分子を同定するため、CILIP に対するモノクロナル抗体を作成し、CILIP の効果発現阻止を指標としてスクリーニングを行ってきた。しかし、現在までのところ中和活性を持つモノクロナル抗体は得られなかった。そこで二次元電気泳動を用いて、直接各種動物組織から精製された CILIP を分析し、共通の分子の存在を検討した。その結果、今年度の研究で調べることが可能であった 8 種類の精製した瘧疾誘発物質に共通して存在する 3 つのペプチド分子群を検出した。第一のペプチド分子群は分子量がおおよそ 46 kDa で、等電点が 7.5~7.9 の範囲にある 3 つのペプチドから構成されていた。第 2 のペプチド分子群は分子量がおおよそ 61 kDa で、等電点が 7.7~8.0 の範囲にある 4 つのペプチドから構成されていた。第 3 のペプチド分子群は分子量がおおよそ 60 kDa で、等電点が 8.0~8.2 の範囲にある 4 つのペプチドから構成されていた。しかも、抗 CILIP ウサギ・ポリクロナル抗体を用いたイムノブロットで、第 2 と第 3 のペプチド群が共にこの抗体によって認識されていたことから、これらのペプチド分子が瘧疾誘発に関わっている可能性が示唆された。現時点では、これらの分子が実際に瘧疾誘発に関与しているか、あるいはどのような種類の蛋白であるかとい

った点に関しては何もわかっていない。それ故、この分子に対するモノクロナル抗体の作製、あるいはアミノ酸配列の解析を早急に行うべく準備している。

一方、CILIP の痙攣誘発機構の解析では新たな知見が得られた。CILIP のマウスあるいはラットに対する薬理作用として少なくとも2つの作用が推定されており、第1は神経系への作用であり、第2は循環系への作用である。そこで、神経系への作用を解析するため培養神経細胞を用いた解析を行った。ラット網膜アムクリン細胞への CILIP の効果をパッチクランプ法を用いて解析し、CILIP が神経細胞の N^+ チャンネルおよび K^+ チャンネルの両方に働き (Ca^{++} チャンネルへの効果は不明)、その機能を一時的にブロックすることが明らかとなった。しかも、CILIP の作用は細胞に致死的な変化をもたらすものではなく、一時的にその機能を低下させる可逆的なものと推定された。このことは、マウスやラットに半致死量の CILIP を投与した場合、回復した動物はその後長期にわたって生存が可能で、異常な行動、あるいは不自然死がなかったことから推測できる。しかし、CILIP の神経細胞への効果はゆっくりとしたもので、マウスに投与した場合に観察されるような早い神経症状の出現を説明できるものではなかった。

他方、ラットを用いた腸間膜微小循環系への CILIP の効果の解析では、投与後 30 秒で完全な血流停止がみられことが明らかとなった。さらにその血流停止が心臓の房室ブロックによる心臓のポンプ機能の低下による可能性が推定された。現在 CILIP の心臓への作用機構は明らかとはなっていないが、恐らく CILIP が心臓の刺激伝導系に働き、その機能をブロックすることによるものと推定している。また、CILIP が培養心筋細胞に直接働き、その拍動を停止させる効果を有すること、しかもその効果が一時的なものであり、1時間後には心筋細胞は拍動を再開し、その後は対照細胞と同様に長期に渡って拍動を続けることが明らかとなった。従って、CILIP の心筋細胞への薬理作用もまた一時的かつ可逆的なものであった。以上の成績から、CILIP の作用機構を明確に述べることはできないが、現時点においては CILIP の効果発現機構の本幹をなすものは心臓への作用と考えている。恐らく、CILIP を静注すると、ある特定のレセプターに結合し、直接、あるいはセ

コンド・メッセンジャーを介して心筋細胞に直接ないしは心臓の刺激伝導系に働き、その収縮能を急激に低下させるものと思われる。その結果、微小循環の血流停止、肺の鬱血および呼吸停止、さらには脳循環不全による脳虚血を引き起こし、各種の神経症状、あるいは除脳性強直といった症状を引き起こしているのではないかと推定している。

このような痙攣誘発活性を持つリポ蛋白の存在は正常動物はもとより寄生虫感染症、あるいは他の感染症においても全く知られていないが、高度熱傷のヒト血清中、あるいは人工的に熱傷を負わせたマウスの皮膚組織から CILIP と同様な生理活性を持つリポ蛋白が検出されている。しかしながら、当該物質の分子特性、性状、作用機構に関する解析が殆ど行われていないため、我々の CILIP との比較はできていない。Dubois ら (J. Physiol., 76: 663, 1980) は、高度熱傷患者における心臓および各種神経症状発現にこのリポ蛋白が関係していると推論しているが、依然として確認はできていない。少なくとも我々が調べた範囲では、CILIP が動物の血清中に検出されたことはなかった。しかし、熱傷といった広範囲に組織破壊がみられるような病態では、CILIP が血清中に多量に放出される可能性は十分にあると考えられる。このようなケースでは、我々が観察しているような CILIP 投与による各種症状が出現してくる可能性があるものと推定できる。いずれにしても CILIP の病態生理学的な機能を明らかにするためには、CILIP と熱傷で出現するリポ蛋白との異同、CILIP の定量化、CILIP と特定の病態との関連性、CILIP と各種感染症の病態との関連性、といった解析が必要と考えられた。

結 論

マンソン住血吸虫感染マウスからすでに精製されている痙攣誘発リポ蛋白 (CILIP) と比較検討するために、各種動物組織から痙攣誘発物質を精製し、その性状を調べた。その結果、これらの痙攣誘発物質が CILIP と同等な物質と考えられ、CILIP が種を越えて動物組織に広く分布する物質であることが推定された。各種動物由来の CILIP のアポ蛋白の分析

で、CILIP に共通して存在する3つのペプチド分子群を同定し、このうち第2と第3のペプチド分子群が瘧疾誘発に関わっている可能性が示唆された。CILIP の効果発現機構の解析から、CILIP の心臓への作用がその効果発現に重要と推定された。

研究発表

学会発表

マンスン住血吸虫感染マウスに見いだされる瘧疾誘発リポ蛋白 (CILIP) の性状

田邊将信

第69回日本寄生虫学会 (ワークショップ 9)

平成12年4月

表1 CILIP及び各種動物組織から精製した痙攣誘発物質の半致死量で前処置したマウスが示す致死量のG-CILIPに対する抵抗性

	Pretreatment (Half-lethal dose)		Challenge (Lethal dose)
Mouse	G-cilip(Sm)	Native	Survival
	S-cilip(Sm)	Native	Survival
	L-cilip(Sm)	Native	Survival
	I-cilip(Ts)	Native	Survival
Rat	L-cilip	Native	Survival
Rabbit	L-cilip	Native	Survival
Human	L-cilip	Native	Survival
Mouse	VLDL	Native	Lethal
	LDL	Native	Lethal
	HDL	Native	Lethal
Rat	HDL	Native	Lethal
Mouse	S-cilip(Sm)	Denatured (SDS)	Lethal
	I-cilip(Ts)	Denatured (Triton)	Lethal
Rat	L-cilip	Denatured (SDS)	Lethal
Rabbit	L-cilip	Denatured (SDS)	Lethal
Human	L-cilip	Denatured (SDS)	Lethal

ICRマウスにあらかじめ活性のあるCILIP、あるいは各種動物組織から精製した痙攣誘発物質1単位を静注し、1時間後に致死量のG-CILIP(4単位)を静注し、マウスの変化を観察した。また、マウス血清リポ蛋白およびラット血清HDLを前処置したマウス、あるいは表面活性剤で構造を壊し活性を持たないCILIP及び各種動物から精製した痙攣誘発物質を前処置したマウスにG-CILIPの致死量を投与し、マウスの変化を観察した。

表中以下の略語を用いた。G-CILIP: 虫卵性肉芽腫から精製したCILIP; S-CILIP: 脾臓から精製したCILIP; L-CILIP: 肺から精製した痙攣誘発物質; I-CILIP: 腸から精製した痙攣誘発物質; VLDL: 超低比重リポ蛋白; LDL: 低比重リポ蛋白; HDL: 高比重リポ蛋白。

表2 抗CILIPウサギおよびマウス・ポリクロナル抗体（γグロブリン分画）によるCILIPの効果発現の阻害

Antiserum	Protein (μg)	Uninfected mice				Sm-infected mice				Rat	Rabbit	Human
		ICR Purified	B18.02/c I-CILIP Purified	B18.02/rag I-CILIP ^a Crude	NOD/scid I-CILIP ^a Crude	G-CILIP Purified	ICR S-CILIP Purified	I-CILIP Purified	Wistar I-clip Purified	NZ White I-clip Purified	L-clip Purified	
NMS (γ-globulin)	250	- ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rabbit anti-CILIP γ-globulin	250	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NMS (γ-globulin)	250	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mouse anti-CILIP γ-globulin	250	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Infected mouse γ-globulin	580	-	NO	-	NO	-	-	-	NO	NO	NO	NO
Normal goat serum (γ-globulin)	50	-	NO	NO	NO	-	-	-	NO	NO	NO	NO
Goat anti-mouse IgG (H+L) (IgG)	25	-	NO	NO	NO	-	-	-	NO	NO	NO	NO
Goat anti-mouse IgM (μ)(IgG)	25	-	NO	NO	NO	-	-	-	NO	NO	NO	NO
Goat anti-mouse IgE (ε)(IgG)	50	-	NO	NO	NO	-	-	-	NO	NO	NO	NO

a: +: 阻害効果マウス; -: 阻害効果マウス; ND: 未検出.
b: B10D2/rag2^{-/-}およびNOD/scidマウスは共に高度免疫不全マウスであり、SPE環境下で飼育されたものを用いた。本実験にはこれらのマウスの腸から分離した菌叢発活性を持つ物質をイオン交換クロマトおよびゲルろ過にかけて部分精製したものを使用した。マウスIgG、IgM、そしてIgEに対する抗血清は市販のものを使用した。
図中以下の略語を用いた。G-CILIP: 虫卵性肉芽腫から精製したCILIP; S-CILIP: 脾臓から精製したCILIP; L-CILIP: 脾臓から精製した菌叢発物質; I-CILIP: 腸から精製した菌叢発物質。

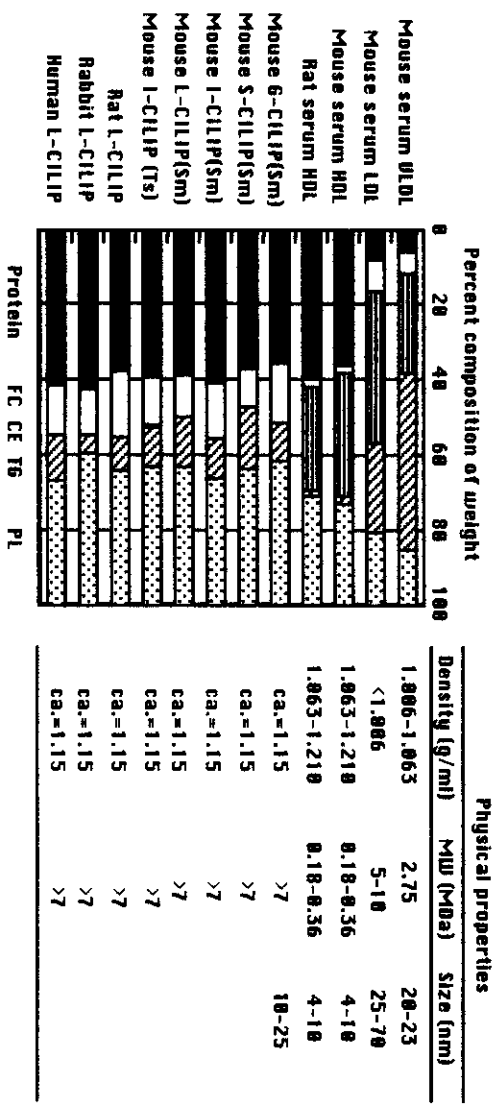


図1 CILIPおよび各種動物組織から精製された遊離誘発物質の脂質組成、比重、分子量、および分子サイズ

图中以下の略語を用いた。G-CILIP: 虫卵性肉芽腫から精製したCILIP; S-CILIP: 脾臓から精製したCILIP; L-CILIP: 肺から精製した遊離誘発物質; K-CILIP: 腸から精製した遊離誘発物質; VLDL: 超低比重リポ蛋白質; LDL: 低比重リポ蛋白質; HDL: 高比重リポ蛋白質; FC: 遊離コレステロール; CE: コレステロール・エステル; TG: トリグリセリド; PL: リン脂質。



図 2 ラットの肺から精製された遊離誘発物質の二次元電気泳動像 (銀染色)

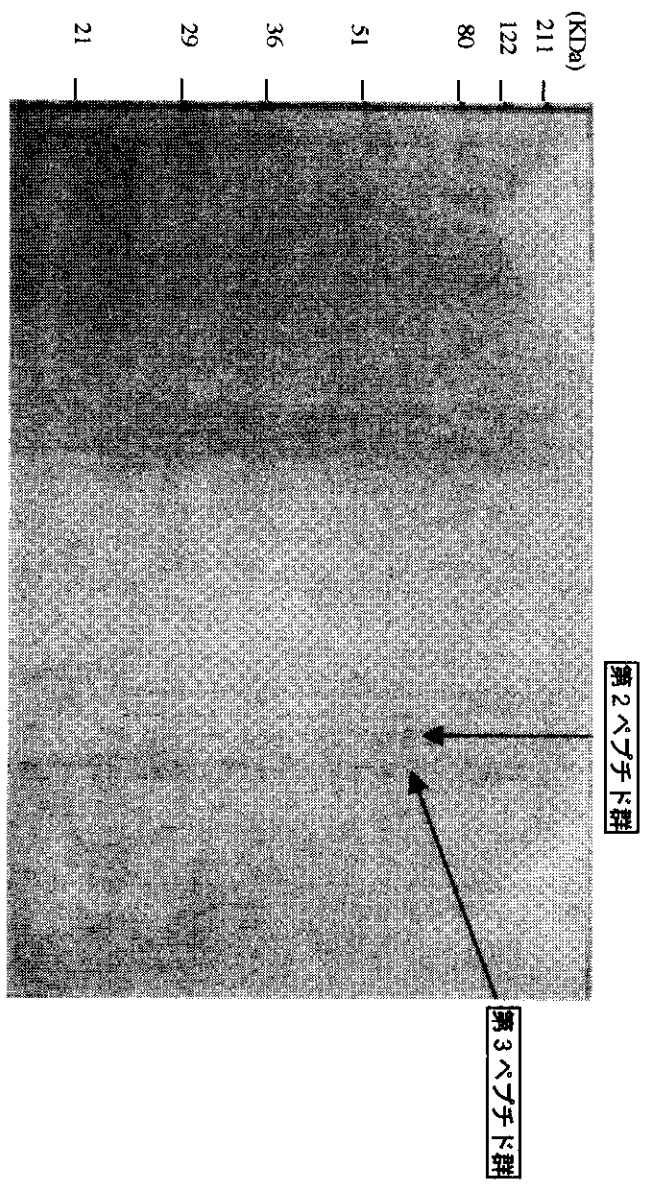


図 3 ラット肺から精製された癌變誘発物質の抗 CILIP ウサギ・ポリクロナル抗体を用いたイムノブロット像

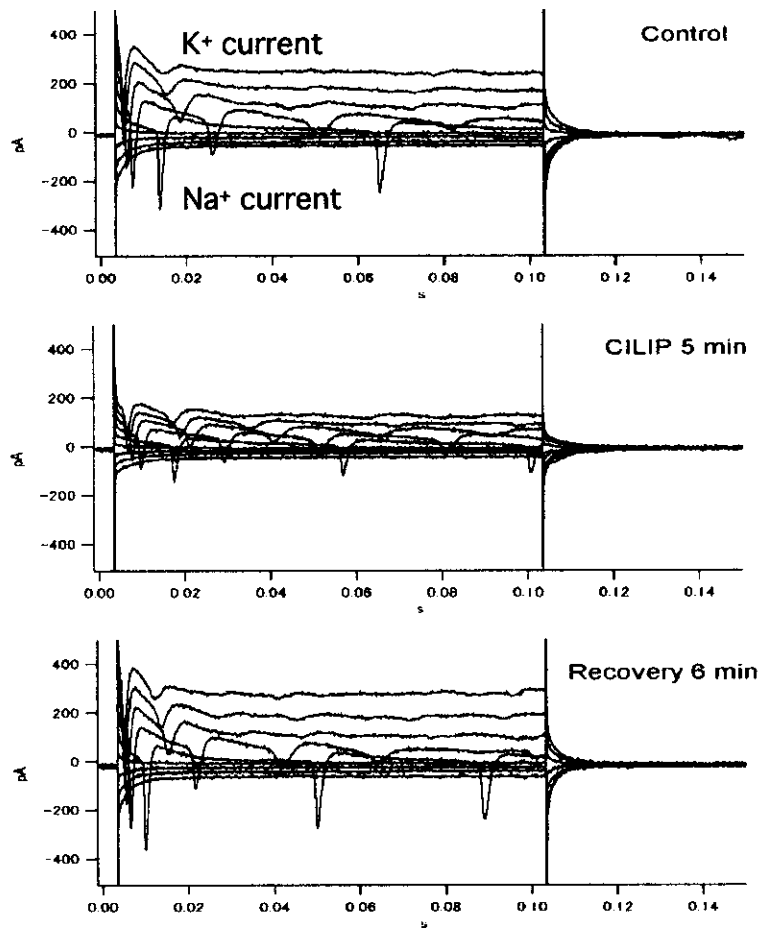


図 4 CILIPの培養アマクリン細胞のNa⁺ および K⁺ 電流への影響

培養アマクリン細胞に何も処置を加えない状態（Control）での各種電圧刺激を加えた時の Na⁺ および K⁺ 電流、次いで同一細胞に CILIP を5分間流した状態（CILIP 5 min）での Na⁺ および K⁺ 電流、そしてさらに CILIP の入っていない緩衝液を6分間流した（Recovery 6 min）状態での Na⁺ および K⁺ 電流を測定した。