

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

新しい日本住血吸虫ワクチン実用化に関する研究
分担研究者 太田伸生 名古屋市立大学医学部教授

研究要旨

日本住血吸虫の重要な保虫宿主である家畜動物で実用に供するワクチン開発の研究を進めた。日本住血吸虫カルパインの感染防御と発病阻止効果の発現機序を解析するために、日本住血吸虫カルパインに対するモノクローナル抗体を作製して虫体における発現分布を虫の発現ステージ間および日本住血吸虫とマンソン住血吸虫との種間比較をおこなった。蛍光抗体法および免疫組織学的検討によってカルパインはセルカリア、成虫いずれにおいてもタンパク質として発現されており、セルカリアにおいては分泌腺周辺部および尾部離断面に強いシグナルが認められた。成虫体での発現は雌雄間で発現部位の違いがある他、種間でも明らかな違いがあり、同じカルパインワクチンでも日本住血吸虫とマンソン住血吸虫とは作用機序の違いがある可能性が示された。ワクチンのアジュバントとして CpG オリゴヌクレオチドの検討も加えた。CpG オリゴヌクレオチドは単独で強い IFN γ 産生誘導活性があるが、日本住血吸虫感染マウスに CpG オリゴヌクレオチドを投与することで強い発病阻止効果があった。カルパインなどワクチン候補タンパクに CpG オリゴヌクレオチドをアジュバントとして用いることの有用性が示唆された。

A. 研究目的

日本住血吸虫症は人獣共通感染症でヒトの流行対策においては保虫宿主対策が重要な柱となる。家畜動物はヒトでの流行維持に特に大きな役割を果たしているが、流行地で家畜動物を特效薬であるプラジカンテルで治療すると死亡する例が散見され、より安全な予防・治療法の開発が望まれている。住血吸虫ワクチンはマラリアと並んで今日寄生虫病ワクチンとして開発に最も大きな期待が寄せられているものであり、その中でも日本住血吸虫ワクチンは当面は保虫宿主動物を対象としたものでも流行地住民の健康・福祉に貢献できるものとして、開発の優先度が高いものである。これまで日本住血吸虫ワクチンとして家畜での試験まで進められているものとしてパラミオシン、GST (Glucronyl-S-transferase)、カルパインなどの報告がある。パラミオシンは感染防御効果が、GST は発病防止効果がそれぞれ特長であるが、カルパインは感染防御と発病阻止の両面で強い効果のあることを動物実験で観察した。カルパインのワクチン実用化をさらに進めるために、

今年度はその作用機序解析をおこなうことを計画した。日本住血吸虫カルパインに対するモノクローナル抗体を作製し、虫体内のカルパインの分布を明らかにする研究をおこなった。虫体内の発現分布を発育ステージ間およびマンソン住血吸虫との種間で比較検討することによって、カルパインを免疫することによってどのステージの虫体にどのような障害活性を示すのかを考察することにした。

ワクチン実用化に際しては使用するアジュバントの選択を検討しなくてはならない。日本住血吸虫感染における感染防御と発病阻止には IFN γ の効果が大きいことが従来の検討で強く示唆されている。CpG オリゴヌクレオチドは脊椎動物の DNA に存在しない塩基配列で脊椎動物に投与すると強い IFN γ 産生が誘導されることが知られている。そこで将来、住血吸虫ワクチンのアジュバントに CpG オリゴヌクレオチドを使用することを念頭において、その安全性と効果に関する基礎データを得ることを目的にマウスの実験的住血吸虫感染に使用して感染プロファイルに与える影響を調べた。

B. 研究方法

日本住血吸虫カルパインに対するモノクローナル抗体の作製と虫体内発現分布の検討

大腸菌で発現させた日本住血吸虫カルパインLサブユニットのドメイン2部分をBALB/cマウスに免疫し、ELISAによるスクリーニングで反応クローンを1株分離した。さらにウェスタンブロッティングでカルパインとの反応性を確認した。この抗体を用いて日本住血吸虫セルカリアでの発現分布を蛍光抗体法で調べた。一方、成虫体での発現分布は日本住血吸虫と Manson 住血吸虫の各雌雄虫体固定標本を用いて免疫組織化学的に検討した。

CpG オリゴヌクレオチド筋注投与によるマウスの実験的住血吸虫感染プロフィールに与える影響の検討

BALB/c マウス雌を用いて日本住血吸虫セルカリア 40 隻を経皮感染させた。マウスは 3 群に分け、CpG (TCCATGACGTTCTCTGACGTT) 投与群、non-CpG (TCCAGGACTTCTCTCAGGTT) 投与群、及び無処置コントロール群を各 6-7 匹用いた。CpG、non-CpG とも住血吸虫チャレンジ感染の day -2, 3, 8 に 100 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ で投与し、感染後 14, 28, 及び 42 日めに採血した。マウスは感染 42 日めに麻酔処置にて屠殺し、住血吸虫の虫体回収、肝臓の肉芽腫形成、腸管および肝臓内の虫卵数を調べた。

(倫理面への配慮)

感染実験は本学の動物実験指針にそって実施し、動物に対する苦痛の少ない方法によって実験を進めた。

C. 研究結果

作製したモノクローナル抗体が認識する分子は、セルカリアにおいては先端部の分泌腺周囲に強いシグナルが認められた。また尾部を離断した直後のシストソミューラでは断端部に強いシグナルがあり、ヒトの場合にカルパインが組織修復に重要な酵素であることと関連を示唆す

る所見であった。

成虫体の検討では、まず日本住血吸虫の雌雄間での明らかな発現部位の違いが認められた。雄成虫では外被下層、間充織細胞の細胞質でシグナルが認められ、少なくとも外被表面には発現シグナルがなかった。雌成虫では子宮およびその細胞核にシグナルが認められた。Manson 住血吸虫成虫体と比較した場合、Manson では雌雄とも細胞核に強いシグナルが認められ、発現パターンには日本住血吸虫との間で明らかな差異が存在した。

CpG オリゴヌクレオチドの効果を観察した結果、回収虫体数にはコントロールと比較して有意差はなかったものの、宿主体内に残存する虫卵数に明らかな違いが認められ、CpG 投与群で著明に虫卵数が減少した (図-1)。また、肝臓内に形成された肉芽腫の平均サイズも CpG 投与群で有意に減少しており (図-2)、この結果から CpG オリゴヌクレオチドの単独投与で日本住血吸虫感染に対する感染防御は成立しないものの、発病防止効果があることがわかった。マウスの抗住血吸虫抗体の IgG1 サブクラスを ELISA で測定したところ、CpG 投与群で有意な減少が観察された。

D. 考察

日本住血吸虫ワクチンの有望な候補分子であるカルパインの虫体内発現部位の観察をおこなったところ、日本住血吸虫の中でも雌雄差があり、また Manson 住血吸虫との種間差も認められた。成虫体では体表にカルパインのシグナルはいずれの場合にもないことから、ワクチン効果の機序としては抗体が直接虫体表面に作用して何らかの阻止効果を示すという機序は考えにくいことがわかった。むしろ IFN γ の作用を主とする細胞性免疫の機序により虫体発育阻止または産卵阻害という機序の可能性が高い。その意味からも IFN γ 産生誘導を導く形での免疫をおこなうことがカルパインワクチンの場合には重要なことと考えられた。Manson 住血吸虫と日本住血吸虫とで我々のモノク

ローナル抗体で検出されるタンパクシグナルの分布が異なることは、マンソン住血吸虫のカルpainワクチンの効果発現機序と日本住血吸虫の場合とでは何らかの質的差異がある可能性を示唆する。すでに報告のあるマンソン住血吸虫カルpainを日本住血吸虫のワクチンとして用いることによる効果を比較検討することが興味あることと思われた。

将来のヒトを含むワクチン実用化に際して安全で苦痛の少ないアジュバントを考えれば CpG オリゴヌクレオチドは一つの選択肢である。CpG オリゴヌクレオチドの投与で強い Th1 応答誘導がかかることはすでに多くの報告があり、今回の研究でも強い IFN γ 産生と IgG1 産生抑制が観察され、日本住血吸虫感染プロフィールに与えた CpG オリゴヌクレオチドの効果が宿主応答の Th1 優位へのシフトによることが推測された。住血吸虫に対する感染防御と発病阻止効果が IFN γ によることを考えれば CpG オリゴヌクレオチドのアジュバントとしての有用性が期待される。しかし、CpG 投与後 5 週間以上も効果が持続することの説明として、CpG が虫体に直接作用して虫の発育に影響した可能性も考えられ、今後は異なったアプローチからの検討も考えていきたい。

E. 結論

日本住血吸虫ワクチンの有望な候補抗原であるカルpainの虫体内の発現部位をカルpain特異的モノクローナル抗体を用いて検討した。この結果、セルカリア及び成虫体での発現プロフィールが明らかになり、カルpainが虫体表面には見られないこと、雌雄で発現部位に違いがあること、日本住血吸虫とマンソン住血吸虫とで違いがあることなどの新知見が得られた。このことはカルpainワクチンの作用機序が細胞性免疫によること、マンソン住血吸虫ワクチンとは異なった作用機序の可能性があることなど考えられた。ワクチン接種時のアジュバント候補として CpG オリゴヌクレオチドは強

力な IFN γ 産生誘導を介して住血吸虫ワクチンの機能増強効果が期待され、今後の一層の検討が必要である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Zhang R, Yoshida A, Kumagai T, Kawaguchi H, Maruyama H, Suzuki T, Itoh M, El-Malky M & Ohta N. Vaccination with calpain induces a Th1-biased protective immune response against *Schistosoma japonicum*. *Infect Immun*, 69: 386-391, 2001.

2) He H, Zhang R, Kawaguchi H, Itoh M, Chen Y & Ohta N. Role of testosterone in host-parasite interaction during murine experimental infection of *Schistosoma japonicum*. *Jpn J Trop Med*, 29: 1-4, 2001.

3) Okumura-Noji K, Sasai K, Zhang R, Kawaguchi H, Maruyama H, Tada T, Takahashi H, Okazaki M, Miida T, Sakuma N, Kimura G, Ohta N & Yokoyama S. Cholesteryl ester transfer protein-deficiency causes slow egg embryonation of *Schistosoma japonicum*. *Biochem Biophys Res Commun*, 286: 305-310, 2001.

4) Yoshida A, Maruyama H, Kumagai T, Amano T, Kobayashi F, Kuribayashi K & Ohta N. Enhanced UV γ 1 tumor growth in CBF1 mice infected with *Schistosoma mansoni* due to modulation of Th1-mediated host responses. (*Submitted*)

2. 学会発表

1) Maruyama H, Ohta N. : *Strongyloides venezuelensis* : Life in the intestinal mucosa. 36th Joint Conference on Parasitic Diseases, US-Jpn Cooperative Medical Science Program, July 2001, Washington D.C., USA.

2) Yoshida A, Maruyama H, Amano T, Kobayashi F, Iseki M, Ohta N. : Influence of *Schistosoma mansoni* infection on the onset and the development of other parasitic diseases. 2nd International Symposium on Schistosomiasis, July 2001, Shanghai, China.

3) Zhang R, Wu S, Yoshida A, Gao S, Min L, Ohta N. : Vaccination with calpain

induces a Th1-biased protective immune response against *Schistosoma japonicum*. 2nd International Symposium on Schistosomiasis, July 2001, Shanghai, China.

4) 二瓶直子、齊藤康秀、近藤昭

太田伸生、平山謙二、陳 炎、陳 紅根、茅根司郎：中国湖南省および江西省における日本住血吸虫中間宿主貝

Oncomelania hupensis の分布に関わる環境要因の解析。第70回日本寄生虫学会大会、2001年4月、山形

5) 熊谷 貴、吉田彩子、丸山治彦

張 仁利、天野皓昭、太田伸生：各発育段階における日本住血吸虫 Calpain 抗原の解析。第70回日本寄生虫学会大会、2001年4月、山形

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

☒-1

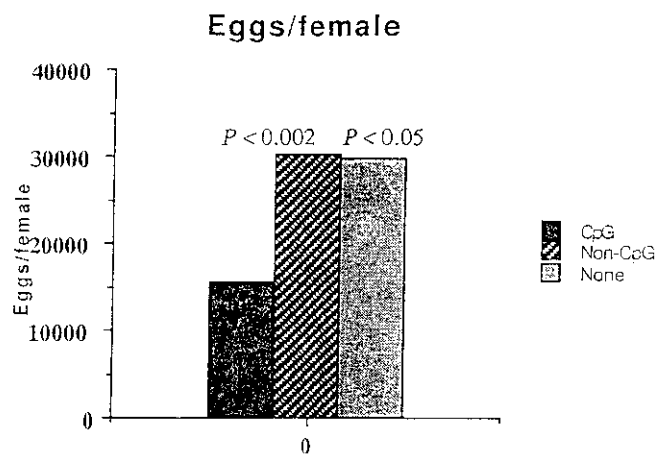
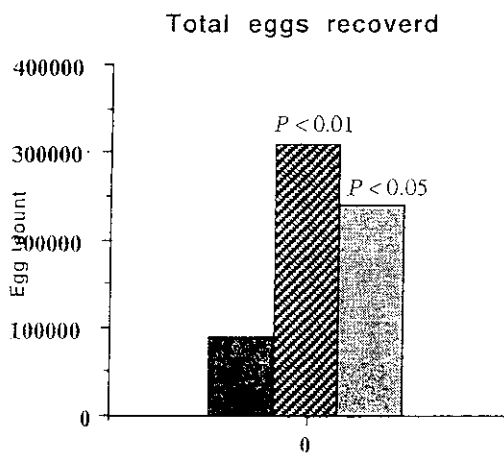
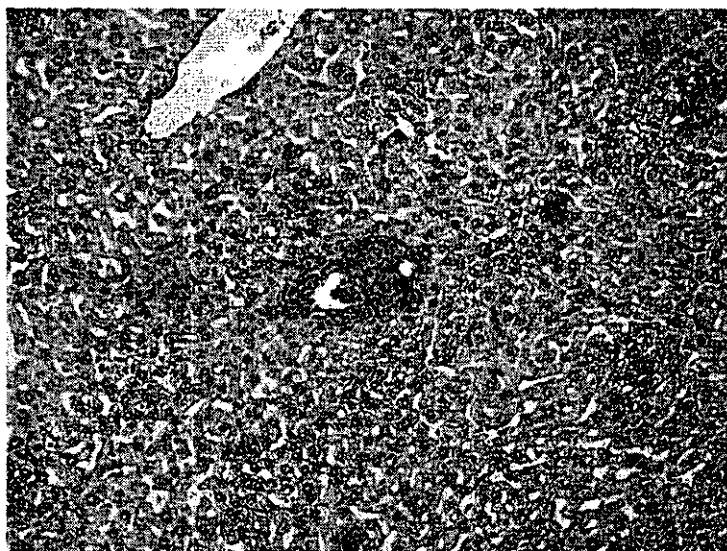
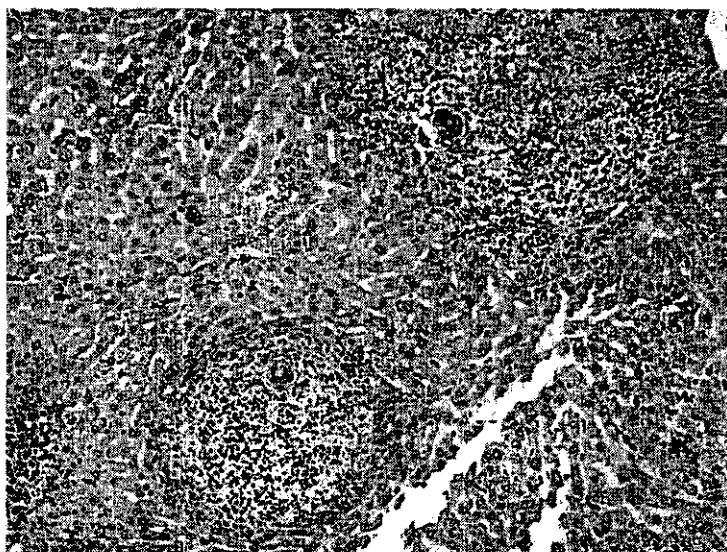


图-2



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

住民の住血吸虫症に対する認識を高める方法の開発：住民に受け入れられる病害の新しい測定法の開発に関する研究

分担研究者 青木克己 長崎大学熱帯医学研究所教授

研究要旨

流行地における住血吸虫症対策を効果的に進めるに当たり、住民の疾病認識を高めることが必要である。そのために住民が住血吸虫症を自らの問題と認識することを誘導していくための病害性の客観的な evidence を集めることにした。昨年度は尿中の上皮細胞の悪性度を細胞診で調べ、ビルハルツ住血吸虫感染者で悪性細胞の出現頻度が高いことを確認した。今年度はビルハルツ住血吸虫感染による排尿障害の有無を尿の流量計で測定し、住民への啓蒙の材料としようとした。しかし調査集団が若年集団であったため明らかな排尿傷害データは得られなかった。

A. 研究目的

流行地住民が住血吸虫症の病害性を認識して対策事業に積極的に参加することを誘導するために、感染者に見られる客観的な症状を evidence をして提示することを進めている。ビルハルツ住血吸虫感染時に血尿の他に排尿障害が考えられるが、教科書的な記載があるだけで詳しい調査報告がない。ケニアのクワレ県ムワチンガ村およびムサニガタン村のビルハルツ住血吸虫症濃厚流行地で排尿困難の程度と頻度を調査し、今後の住民の健康教育や啓蒙活動への応用を考えた。

B. 研究方法

ケニアの流行地、クワレ県ムワチンガ村およびムサニガタン村のビルハルツ住血吸虫症濃厚流行地を対象に、小学校の学童男子 100 名を調査した。尿検査にて住血吸虫感染の有無を診断し、排尿時痛や排尿困難などの排尿障害の有無を一般の病院で用いているアンケート用紙で調査回収した。排尿困難の定量的計測方法として、尿流量計を用いた。

（倫理面への配慮）

住民の調査にあたっては相手側政府の承認を経て実施した。実施の際に

は本人および保護者に対してインフォームドコンセプトを得て行い、虫卵陽性者に対しては投薬にて駆虫した。

C. 結果と考察

尿流量計を用いた排尿パターンの測定：虫卵陽性者の中には異常な排尿パターンを示すものが見られた。排尿初期は勢いよく排尿するが排尿の後期ではとぎれる、最初から勢いが弱く全般にとぎれがちなものなどがそのパターンであった。調査対象者を虫卵陰性者、感染濃度の低い者（<虫卵 100 個/10 ml 尿）、濃厚感染者（虫卵>100 個/10ml の 3 グループにわけて検討したところ、排尿の勢い（単位時間に排泄される尿量）、排尿開始から最も勢いよく排尿するまでの時間などについて比較すると、各グループ間で違いはなかった。住血吸虫感染者の場合も尿量が多いと勢いよく排尿できることは事実であるが、感染群に排尿パターンの異常を示す例のあることも確認された。アンケートによる排尿障害の自覚症状：アンケートで調査した排尿回数、夜間排尿、排尿時痛、尿意切迫など全ての項目について感染状況の異なる 3 群間で有意差がなかった。今回の調査で住血吸虫感染との相関がでなかったことの解釈として、対

象者が小学生で尿路病変の進行度が排尿障害を招く程までに至っていない可能性、排尿時の各被験者の条件（検査直近の排尿からの時間など）などが必ずしも一定でなかったこと、アンケートに対しては小学生が質問の意味を正確に理解していなかった可能性などが考えられた。検査対象群を成人群まで拡大して検討を継続することが重要であると思われた。

D. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 勝又達哉¹、熊取厚志²、青木克己¹（¹長崎大・熱研・寄生行動制御、²症細胞機構）：住血吸虫セルカリア-脂肪酸刺激による preacetabular gland の Ca 濃度上昇。第 70 回日本寄生虫学会大会、2001 年 4 月、山形

2) 山内秀彦、松山拓史、青木克己（長崎大・熱研・寄生行動制御）：住血吸虫ミラシジウムの中間宿主貝への chemoklinokinensis。第 70 回日本寄生虫学会大会、2001 年 4 月、山形

3) 藤巻康教¹、DaO To Quyen²、佐藤ゆき³、Nguyen Thi Dang⁴、Ha Huy Khoi²、

Do Thi Kim Lien²、青木克己¹、山本 茂³、太田房雄⁵（長崎大・熱研・寄生行動制御¹、ベトナム国立栄養研究所²、徳島大・医・実践栄養³、徳島大・医・栄養衛生⁵、ベトナム国立マラリア・寄生虫・昆虫学研究所⁴）：ベトナムハノイの学童におけるアレルギーと栄養状況および寄生虫感染。第42回日本熱帯医学会大会、2001年9月、東京

H. 知的財産権の出願・登録状況
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

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：
住血吸虫症の簡易診断法の開発

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	大前比呂思	筑波大学	講師
研究協力者	金澤 保	産業医科大学	教授

研究要旨

『1』ヒト日本住血吸虫症における感染と病態の評価：ヒト日本住血吸虫症を non-invasive な検査法を用いて診断する方法を開発することを目して、尿中の抗体産生状況を第一段階として調べた。日本住血吸虫感染者の尿中には診断に用いることが十分に期待できる程度の高い濃度の抗体が認められた。抗体産生の特徴としては、1) 高い SWAP および SEA に対する IgG 抗体の産生、2) SEA に対する低い IgA 抗体産生、3) SWAP に対する中程度の IgA 抗体産生、4) 幾つかのサンプルにおける高い IgM 検出 である。Morbidity や 感染 の Intensity とこれらの抗体がどのように関連するかや indirect な感染マーカーとしてどの位利用できるかは、さらに大きなサンプルサイズで検証する必要がある。

『2』マンソン住血吸虫感染における病態形成の機構：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。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、さらにヘルパー T 細胞を刺激する抗原に特に焦点を当ててマウスモデルを用いて T 細胞応答の解析を行ってきた。これまで CD4 陽性のヘルパー T 細胞の認識する抗原成分としていくつか特定されたが、ここでは新規に見い出されたマンソン住血吸虫虫卵由来のヘルパー T 細胞刺激抗原分子 150/166-kDa 成分の免疫学的、分子学的特性について詳細に調べた。アミノ酸構造を決定し、レコンビナント蛋白を作製し、それぞれのネィティブ及びレコンビナント抗原について、免疫学的特性を比較検討した。

『1』 ヒト日本住血吸虫症における感染と病態の評価

『1』 A. 研究目的

慢性の経過を辿り、この慢性期が最も重要な病因となる住血吸虫症では、Morbidity と 感染の Intensity を的確に評価することが望まれる。本研究ではヒト日本住血吸虫症を non-invasive な検査法を用いて診断する方法を開発することを目して、尿中の抗体産生状況を第一段階として調べた。

『1』 B. 研究方法

日本住血吸虫の流行地であるフィリッピン国レイテ島にある Schistosomiasis Control and Research Hospital に住血吸虫症治療のために来院した患者から、便、血清、尿等を採取し、検便によって *S. japonicum* 虫卵の確認できたものを active 感染と判定した。この陽性者から得た尿中における抗 S.j adult (SWAP) および抗 S.j 虫卵抗体 (SEA) を酵素抗体法を用いて測定した。調べた抗体は IgG, IgA, IgM, IgE である。また加えて、血清を用いて組織線維化のマーカの測定およびその他の生化学的検査を実施した。

(倫理面への配慮)

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。

『1』 C. 研究結果

日本住血吸虫感染者の尿中には診断に用いることが十分に期待できる程度の高い濃度の抗体が認められた。抗体産生の特徴としては、1) 高い SWAP および SEA に対する IgG 抗体の産生、2) SEA に対する低い IgA 抗体産生、3) SWAP に対する中程度の IgA 抗体産生、4) 幾つかのサンプルにおける高い IgM 検出 である。

『1』 D. 考察

S.j 感染者の尿中の特異抗体は、推測より遥かに高く、血清に代り感染の検出に非侵襲的検査用検体として十分に期待できよう。特に高い IgG 抗体の検出を組み合わせることによってさらに高い感度を確保することができる。Morbidity や 感染 の Intensity とこれらの抗体がどのように関連するかや indirect な感染マーカーとしてどの位利用できるかは、さらに大きなサンプルサイズで検証する必要がある。

『1』 E. 結論

S_j 感染者の尿中の特異抗体は、血清に代り感染の検出に非侵襲的検査用検体として十分に期待できよう。今後は active 感染を検出するための indirect なマーカーとして利用できる組み合わせを検討する必要がある。また誰でもが簡単に使用できる簡易な検出システムを導入する必要がある。また抗原の作製に多くの困難を伴うことから、主要抗原を特定し、レコンビナント抗原の応用等を導入する必要がある。

『2』 マンソン住血吸虫感染における病態形成の機構

『2』 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。この肉芽腫形成はマンソン住血吸虫症では、CD4⁺T ヘルパー細胞及びアクセサリー細胞上の MHC クラス II 分子に厳密に依存することが判っている。また私達は 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。

これまで重症化の抑制及び予測に供する目的で、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ていくつかの T 細胞抗原を特定し、それぞれについて詳細な検討を行ってきた。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、診断法への応用等を試みてきた。本研究ではさらに主要な T 細胞抗原として新規に見い出された虫卵由来の 150/166-kDa 成分の免疫学的、分子学的特性について調べた。

『2』 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。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。

(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。

〔2〕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てきた。その中で、150/166-kDa の成分に特に強い T 細胞刺激活性を認めた。これまでに見い出された T 細胞抗原と異なり、C57BL/6 および CBA マウスの両方にバランスのとれた Th1, Th2 応答を誘導したことから、分子の性状をさらに詳細に調べた。部分アミノ酸配列を決定し、検索をしたところ、albumin precursor と高いホモロジーを示した。このことから *S. mansoni* EST database に報告した内の一つのクローンを用いて 608 アミノ酸をコーディングしている部分をクローニングし、maltose-binding fusion 蛋白としてレコンビナント蛋白 (rSm-Prealbumin) を作製した。この rSm-Prealbumin は、CBA, C3H, BALB/c, C57BL/6 感染マウスのリンパ節細胞の増殖刺激を誘導した。

〔2〕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。

〔2〕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。これまでにすでに明らかにしてきたいくつかの抗原成分に加えて新規に T 細胞抗原として Sm-Prealbumin を特定した。この抗原のアミノ酸をコーディングしている部分をクローニングし、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

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.

Memorials do Instituto Oswaldo Cruz 96, 29-33, 2001

Asahi H, Osman A, LoVerde PT and Stadecker MJ

Albumin precursor homologue is a novel T helper cell immunogenic egg component in murine infection with *Schistosoma mansoni*.

In preparation, 2002

2. 学会発表

朝日博子、Douglas J. Botkin, Miguel J. Stadecker, David L. Williams

新しく同定されたマンソン住血虫卵由来 thioredoxin peroxidase (TPx-1) によって誘導されるヘルパー T 細胞及び B 細胞応答

第 70 回日本寄生虫学会大会 平成 13 年 4 月.

Asahi H, Osman A, LoVerde PT and Stadecker MJ.

Albumin precursor homologue is a novel T helper cell immunogenic egg component in murine infection with *Schistosoma mansoni*.

The 50th Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene, USA, November 2001

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

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

新規殺貝剤の開発に関する研究

ミヤイリガイの実験室内殺貝効果試験法の改良

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。今年度は中国の茶種子とフィリピンの *Jatropha curcas* についての活性成分の検討を行っているが、*Oncomelania* 貝の殺貝効果を問題にする際に実験室内での試験法について再検討をすることが必要になったので、その結果について報告する。

A. 研究目的

Oncomelania 属のミヤイリガイは、*Biomphalaria* や *Bulinus* などの水棲貝と異なり水陸両棲である為に、実験室内において殺貝剤の効果試験を行う際には試験薬液からの離脱を防ぐ工夫が必要になる。この目的で komiya ら (1962) は、内径 12cm のペトリ皿に適合する木枠付きビニール網を考案するとともに、殺貝効果の試験法として 1) 試験薬液の浸漬時間 2) 試験時の温度 3) 試験貝の数と試験薬液の容量 4) 生死の判定時間について検討し、それぞれ、1) 48 時間 2) 25±1℃ 3) 10 個の貝に対して 100ml 4) 48 時間が、適当であるとしてこれが現在まで国際的な標準法として用いられてきた。しかしながらこの試験法は木枠付きビニール網を必要とし、これを繰り返し使用するにはその洗浄に長時間を要する上にガラス製ペトリ皿の使用を前提にしているなど、現在の実験室内環境から見て多くの不便がある。そこで木枠付きビニール網の代替として、試験薬

液の界面に浮遊する多孔のプラスチックフタを作成し、通常デイスポーザブルで用いられる内径 15cm のプラスチックシャーレと組み合わせることで改良をはかった。

B. 研究方法

試験容器の形状を変えるに当たって上記検討事項のうち、3) 試験貝の数と試験薬液の容量に関して再検討の必要が生じた。植物由来の殺貝成分など新規殺貝剤の効果を検討するうえで精製物の量は一般に微量であり、試験薬液の容量は少量に設定した方が検討できる濃度範囲が広がるからである。そこで新規の試験容器を用い、山梨県韮崎市で採集されたミヤイリガイに対するニコロサマイド (Bayluscid WP70) の実験室内での殺貝効果を Time-concentration relationships の観点から 10 個の貝に対する試験薬液を 100ml と 50ml との場合について検討を行った。試験は、10ppm から倍々稀釈で 0.03125ppm までの 9 系列を作成し、3 回繰り返すことで LC50

を求めた。浸漬時間は、6, 16, 24, 48 時間として生死の判定は komiya ら (1962) の方法に従った。また、100ml と 50ml の水へ貝を浸漬することによる酸素消費を考慮し薬剤を含まない水で、経時的な溶存酸素の変化を電極法によって測定した。

C. 研究結果

各浸漬時間での LC₅₀ を ppm で表し、括弧内に 95%信頼限界を示すと試験容量 100ml の場合では、6 時間：1.44 (0.81 - 2.89)、16 時間：0.28 (0.21 - 0.38)、24 時間：0.17 (0.11 - 0.22)、48 時間：<0.125 であり、試験容量 50ml の場合になると、6 時間：2.86 (1.57 - 7.59)、16 時間：0.38 (0.26 - 0.56)、24 時間：0.21 (0.15 - 0.28)、48 時間：0.13 (0.10 - 0.19)であった。即ち、予想に反して何れの浸漬時間をとってみても、試験容量 50ml の方が 100ml に比較して LC₅₀ が若干高い濃度であることが明らかとなった。また、薬剤を含まない水溶液で、100ml と 50ml で貝の浸漬水中の溶存酸素を経時的に比較したところ、用いた試験装置では溶存酸素の値で、24 時間、48 時間に至ってもそれらの間に差は認められなかった。

D. 考察

殺貝剤の貝への効果を検討する上で浸漬する水での濃度と浸漬時間を変えていく事によって試験薬剤の Time-concentration relationships が把握されるがこの場合、どのくらいの水の量で検討するのが適当であるのかということが問題になる。植物の殺

貝活性成分を詳細に検討する上では浸漬液量が少量の方が望ましい。この点で 10 個の貝を 50ml で行う試験系が 100ml で行う試験系に比較して溶存酸素で差が無く、実際にニクロサマイドで検討したときに LC₅₀ が若干高い濃度になるという結果は今後の検討の為には有利な結果であった。

E. 結論

これらの結果により、内径 15cm のプラスチックシャーレを用いた場合、試験期間を通じて貝体が試験液に完全に浸漬される為の最少容量である 50ml を本法での試験容量として設定することが、従来言われてきた 10 個の貝には 100ml の試験液量が必要とする設定よりも、殺貝効果試験法としてより適当であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Agatsuma, T., Iwagami, M., Liu, CX., Saitoh, Y., Kawanaka, M., Upatam, S., Qui, D., and Higuchi, T. Molecular phylogenetic position of *Schistosoma sinensium* in the genus *Schistosoma*. *J. Helminthol.* Vol.75, 215-221 (2001)

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

住血吸虫症のワクチン開発に関する研究

分担研究者 小島 莊明 国際医療福祉大学教授

研究要旨

住血吸虫症ワクチン候補分子であるパラミオシン（PM）について、患者の各抗体サブクラスによって認識されるエピトープを明らかにし、それらと抵抗性並びに肝線維化との関連について検討する目的で、断片化したパラミオシンを抗原とする ELISA を行って解析した。その結果、それぞれの抗体サブクラスで特定の PM 断片に対する高い抗体価が認められたが、その抗体価と加齢の間には相関がみとめられず、各抗体サブクラスが強く認識する PM 断片は、抵抗性に関してはむしろ煙幕抗原として機能している可能性が考えられた。しかしながら、断片化 PM に対する IgE 抗体価は肝線維化と負の相関を示したことから、IgE 抗体が肝線維化を抑制している可能性が示唆された。

A. 研究目的

世界保健機関（WHO）によれば、現在、住血吸虫症罹患の危険にさらされている人口は5～6億、実際の感染者数は2億人に及ぶものと推定されており、本症が公衆衛生学上その流行する途上国の社会や経済発展に与える影響は極めて大きい。有効な薬剤があるとは言え、単なる集団治療のみでは再感染が容易に起こり制圧は困難である。我が国のかつての経験によれば、その制圧のためには集団検診・集団治療に加えて、殺貝剤散布や灌漑水路のコンクリート化などの中間宿主撲滅対策や、農業の近代化、土地利用の改変など多彩な取り組みが必要であるが、広大な流行地をかかえ経済的にも困難な

状況にある途上国では、日本の経験をそのまま適用することはできない。したがって、その制圧にはワクチン開発などの新たな戦略を含む強力な取り組みが必要である。特に、日本住血吸虫症のように、感受性の高い家畜の存在がヒトへの伝播を維持し、流行制圧の大きな阻害要因となっている場合には、ワクチンの開発・導入は本症の制圧にとってきわめて有効であると考えられる。われわれは、これまでに、受動免疫により抵抗性を賦与するモノクローナル IgE 抗体が認識するパラミオシン（PM）を、有力なワクチン候補分子と考え研究を重ねてきた。本研究においては、実際の住血吸虫症患者の各抗体サブクラスによって認識される PM のエ

ピトープを明らかにし、それらと抵抗性並びに肝線維化との関連について検討した。

B. 研究方法

866 アミノ酸からなる PM の全長、及び約 150 残基からなる 6 本のポリペプチド、PM1 (1-164)、PM2 (156-302)、PM3 (296-451)、PM4 (447-602)、PM5 (597-743)、PM6 (734-866) を大腸菌内で発現させ、抗原として用いた。フィリピンレイテ島の日本住血吸虫虫卵陽性者 40 名の血清を用いた ELISA により、各 PM 断片を認識する抗体価をサブクラス (総 IgG、IgG1、G2、G3、G4、IgA、IgE) 毎に測定し、加齢に伴う再感染抵抗性、並びに超音波検査、血清中の IV 型コラーゲン及び P-III-P を指標とした肝線維化と、抗 PM 抗体の関連について解析した。虫卵陽性者の採血に当たっては、抗体検査を行う旨現地の医師もしくは看護婦に説明を依頼し、被検者から了解を得た後、現地医師もしくは看護婦が採血を行った。また、虫卵陽性者に対しては、現地医師により適切な治療が行われるよう配慮した。

C. 研究結果

日本住血吸虫症患者血清中には、PM を認識する IgG、IgA、及び IgE 抗体が存在し、それぞれの抗体サブクラスで特定の PM 断片に対する抗体価が高いことが判明したが、抗体価と加齢の間には相関が認められなかった。一方、抗体価は低いにもか

かわらず、PM3 に対する IgG 抗体価、PM2、PM3、PM4、PM6 に対する IgG1 抗体価、PM6 に対する IgG2 抗体価、及び PM1 に対する IgG4 抗体価が、それぞれ加齢と正の相関を示した。このことから、各抗体サブクラスが強く認識する PM 断片は、抵抗性に関してはむしろ煙幕抗原として機能している可能性が考えられた。また、抵抗性に関与すると考えられている IgA、IgE については、各 PM 断片に対する抗体価と加齢との間で正の相関は認められなかった。他方、PM 全長に対する IgG3 抗体価と超音波検査による肝線維化の程度の間には強い正の相関が認められた。これに対し、PM3 に対する IgE 抗体価は肝線維化が軽度であるほど高値を示し、肝線維化マーカーである IV 型コラーゲン及び P-III-P の血清値とは負の相関を示すことが判明した。

D. 考察

PM は、きわめて最近、免疫グロブリン Fc のレセプターであることが報告されたが、コラーゲン及び補体成分 C1q とも結合することが知られている。さらに、線維化と強い相関の示唆された IgG3 は C1q 結合能をもつことから、これらによって形成された複合体が肝においてコラーゲンを主体とする線維化を促進している可能性が考えられる。これに対し、IgE は補体結合能を有していないので、PM に対する IgE 抗体は「PM-IgG3-C1q-コラーゲン」複合体の形成を阻

害することにより、肝線維化を抑制している可能性が考えられる。

E. 結論

ワクチン候補分子である PM が他のさまざまな生体分子と結合し、住血吸虫症の病態にも大きな影響を与えるものであることが明らかとなってきた。われわれの作製した抗 PM モノクローナル IgE 抗体 (SJ18e.1) の認識するエピトープは、PM3 に含まれる (359IRRA362) ことから、今後、IgE 抗体の病態に及ぼす意義について実験的に明らかにするとともに、感染濃度 (排出虫卵数) 等の指標にも注目したヒトにおける再感染抵抗性についても詳細な検討を行う必要がある。(共同研究者: 奈良武司、大前比呂思、青木 孝)

F. 健康危険情報

日本住血吸虫症は、中国では揚子江流域 (洞庭湖などの湖沼を含む)、フィリピンではミンダナオなどが感染の機会のあるところとして注意を要する。メコン川流域には、メコン住血吸虫症の流行地がある。南米には、マンソン住血吸虫が、アフリカにはこれに加えてビルハルツ住血吸虫が分布する。このような流行地では、淡水での水泳、水浴は避けるべきである。

G. 研究発表

1 論文発表

Osada, Y., Janecharut, T., Hata, H.,

Mahakunkijcharoen, Y., Chen, X.-W., Nara, T., Kita, K. and Kojima, S.: Protective immunity to *Schistosoma japonicum* infection depends on the balance of T helper cytokine responses in mice vaccinated with g-irradiated cercariae. *Parasite Immunol.*, 23: 251-258, 2001.

2 学会発表

長田良雄、Bosompem KM、小島莊明、太田伸生: ガーナ共和国のビルハルツ住血吸虫浸淫地における感染者と非感染者の抗体応答の検討. 第 71 回日本寄生虫学会大会プログラム抄録集、p127、2002.

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

対策のための数学モデル作成

分担研究者 嶋田 雅暁 長崎大学熱帯医学研究所熱帯感染症研究センター教授

研究要旨：昨年度より取組んでいる stochastic approach による住血吸虫症伝搬数理モデル構築の為に、本年は 1) deterministic approach と stochastic approach の比較をさらに追及するとともに、2) SWARM と呼ばれるソフトウェアパッケージによる Individual-based model (IBM) 作成を試みた。SWARM はモデルの中の構成要素（単位）ごとに基本的な個体の行動とその結果に対するルール（生死など）のみを決定し、それに従って個体が行動した場合に集団として見られるパラメーターを提示するソフトである。まずは人体内、水域、貝体内という 3 つの構成要素からなるモデルを検討した。その結果、どの観察データをより強化する必要があるかについての知見を得た。しかし、1 対の成虫からの虫卵数、貝 1 個体からでるセルカリア数の多さなどから、モデルによるシミュレーションは現実以上に大きな変動を示した。一部のみを IBM とし、他を決定論的モデルか従来の非決定論的モデルによって全体を組立てる必要が判明した。

A. 研究目的

感染症の数理モデルが疫学像の理解や対策と予防に有効・不可欠であることは十分に認識されている。感染症の数理モデルは将来、万一、住血吸虫が日本に再流行する場合に、その流行の早さ、広がり、重篤度などを検討する上に有効であり、また急性から慢性に至るすべての感染症での検討に有効であり、健康危機管理の点からも必須の作業である。

感染症の数理モデルの基礎を確立したアンダーソンとメイ(1991)はモデルを大きく 2 つに分類した。ウィルスや原虫（彼らの定義による microparasites）に対しては、人間を単位として誰が感染し、誰が感染する危険があるかを人間個体単位で推定し、集団内の感染者割合等を予測する。一方、有性生殖によって卵を産卵する腸管寄生虫や住血吸虫、寄生節足動物などは macroparasites に分類され、寄生虫の 1 個体づつを単位としてモデルを作成することが提案された。前者に関してはかなり実用レベルの研究が進められてきた。しかし、後者については、理論レベルでは現実の観察結果の一部を説明することは可能であったけれども、疫学全体像を把握するような

発展にはいたっていない。これは寄生虫感染には人間行動が大きく関連し、かつ偶然性も大きく関連するからである。そのような事象を確定モデルで推定することは（非常に単純なモデルでは可能であっても）、少し込んだモデルでは現実との解離が大きくなって、現実性がなかった。近年、コンピューターが発達し、寄生虫 1 匹づつを単位とした膨大な計算を繰り返すことが可能となった。その発展に呼応して IBM (Individual-based model) という手法が数理生態学分野で応用されるようになった。IBM は、単位個体に対して比較的単純な規則だけを与え、その規則に従ってそれぞれの個体が勝手に行動した結果として、その上位の次元（集団、つまり体内等）でどのようなことが起こるかを見る方法である。個体の行動はシステム全体のパラメーターに直接的に影響を受けるのではなく、より直近の環境に対応しているという近年の行動生態学の成果を基礎としたものであり、これによって集団の行動や特性が良く説明できることが知られてきた。魚の群れ行動や鳥の縄張り行動などがこの方法によって簡単に理解できるようになった。

この方法の利点は、理論（何をしているか）