

が明確であること、コンピューターの進歩によって試行が簡単になったことである。また、良いモデルができた場合には、様々な副産物としてのパラメーターが得られること、パラメーターが現実と一致していなかった場合に簡単にやり直すことができることなどである。しかし、住血吸虫などの寄生虫による感染の疫学像は簡単なものではなく、これから多くの試行錯誤を必要とする。現時点で十分な住血吸虫症の疫学モデルは世界中で完成されていない。

本年度は IBM の基礎を研究し、どのような IBM を作るかのデザインを検討した。なお、数学モデルを使ったシミュレーションの利点の一つは、現実人間を使ったコントロールや暴露が出来ない場合にそれを予測することであり、それによって生じる可能性のある倫理的問題を回避・解決できる点にある。当然、数学モデルは現実のデータとよく一致する必要があり、モデルの妥当性を検討する経験的データは十分に倫理的に配慮されて収集されねばならない。今回の研究は純粋に数学モデルの検討であったために現場研究と関連する倫理的問題は生じなかった。

## B. 研究方法

まず、従来の決定論モデルから各モデルが発展した経緯を文献的に検討し、それによって IBM モデルの特徴を明らかにした。次に住血吸虫対策のコンポーネントを検討した。そしてそれぞれのコンポーネントに SWARM の適用を検討した。そして一部 SWARM を試用して行動規則の妥当性を検討した。SWARM はモデルの各コンポーネントについてプログラムパッケージであり、サンタフェ研究所で開発されたものである。初期パラメーターを入れて個体を勝手に生きさせるとそれにつれて様々なパラメーターを図示してくれるものであり、集団人口数、死亡率、出生率、年齢構成などが得られる。

## C. 研究結果

### 1. IBM への発展とその適用条件

Maynard Smith (1974) は生態学における普遍的数学記載モデルをモデルと呼び、詳細な数学的記載によって特定のシステムを記載す

る方法をシミュレーションと呼んだ。どちらも生態学にとって大切であるが、近年その不連続性は薄れ、それを繋ぐ機能として IBM がでてきたとも考えられる。

まず決定論的アプローチが提示され、時間とともに変化する確率を非決定論的にしたのが stochastic model である。その後、空間的な異質性を考慮した格子モデル lattice model が導入され、両者が合体して stochastic lattice model ができた。IBM はその親戚のような関係にあり、複雑系や人工生命の研究から発展し、生態学に広く応用されるようになった。

IBM を使用する基礎認識は、1) 個体の生活史 life cycles of individuals が重要であり、2) 個体相互間作用の様式も重要であるとの認識である。あるモデルが IBM であるための 4 条件は以下の通りである：

- 1) 個体の生活史の複雑さを考慮している
- 2) 環境の変動ダイナミズムを考慮している
- 3) 人口規模を実数表記している
- 4) 同年代の個人間の差を考慮している。

Huston ら(1988)は「生態学はすべて個体の動向から成立つのだから、どんな生態学的現象も IBM が使われるべきだ」と述べている。これは一面で正しい。簡単にできるようになったのだから確定モデルと並立すべきであるという Renshow の意見も正しい。しかし、IBM がより有効である場合は、以下の通りである：

- 1) 個体の特性が異なり、それが重要な場合、
- 2) 人口規模が小さく、確定モデルではサンプリングエラーが生じる場合(モデルは複雑になるが、上記 2 つは確定モデルでも理論的には対応できる。しかし、実際の計算は極めて大変である。)
- 3) 個体間作用が局地的で、均一性が仮定できない場合
- 4) 動物行動 (zoographics) にランダムな要因が大きい場合
- 5) 非連続性が大きい場合 (生物の側あるいは環境の側において)
- 6) 希な事象が重要な意味をもつ場合

### 2. コンポーネントの検討

昨年度は、人間の各個体内 A、外界としての水環境 B、中間宿主である伝搬貝内 C の 3 つの環境を想定した。しかし、それぞれに変動が大きい場合、3 つのコンポーネントと

も IBM で検討すると試作段階では非現実的な結果となることが判明した。従って、人間の川との接触のデータのみに従い、それに比例してセルカリアが体内に侵入するモデルを考え、その後の寄生虫の行動・生存を IBM で計算する方が現実的だった。しかし、問題は体内での生存率に影響を与える要因であり、それがまだ十分に理解されていない

将来的に3つのコンポーネントを走らせ、またそれぞれに間の移行ルールを定めればよい。

#### D. 考察

IBMの問題点として、1) 鳥などの個体に比べれば、寄生虫の数は圧倒的に大きい。もし生まれてくる虫卵全部を個体として扱った場合、膨大なモデルとなり、現時点でそれをやることの意義は明確ではない。従って親虫を IBM で扱ったとしても卵の部分と同扱うかが課題として残る。また、川にたどりつく虫卵だけを個体として扱ったとしても中間宿主貝の中での無性生殖ででてくるセルカリア1匹1匹を個体として扱うことも技術的に難しい。結局、IBMとストキャスティックモデルを融合させることが課題となる。

次に、2) インプットするパラメーターの問題(その平均確率、変動の幅)について実際にはデータがない点である。例えば、川との接触行動は、性・年齢別の接触頻度は研究された地域ではある程度わかっている。しかし、だれがどの程度に川の水と接触し、どの程度感染しているかについて経験的データがない。これについて現在、観察データを収集しているところである。その他にも、貝の生息地による各セルカリアの人への接触確率などについてデータを得ることが難しい。

一定の仮定をおいて現実的だと思われる条件を入れたとしても、結果が実際の観察と大きく異なる場合が考えられる。その場合、4) どのようにモデルを訂正するかも IBM では難しい。パラメーターが3つぐらいの簡単なものならば直感的に修正できるが、住血吸虫モデルではパラメーターが多くなり、修正が困難になる可能性が高い。

次に5) モデルの評価の問題がある。パラメーターを修正して一致した場合でもそれが本当に正しいモデルだから一致したのか偶然一致したのかの問題が残る。これは特にモデ

ルを複雑にした場合に起こる問題である。

最後に6)結果の解釈の問題がある。これは、モデルの一致度を決定論的モデルのように数学的に吟味することができない。統計的にも難しい。そこで最近ではラカトシュの科学哲学に従い、2つのモデルの優劣を決めながら話を進めるようになった。また、その際にベイズ統計学の手法が使われるようになった。

いずれにしても、今回の検討からモデルを簡素化することの重要性が明確となった。

#### E. 結論

現時点ではウィルス感染などの microparasite についてはストキャスティックモデルを用いた研究が進行しており、哺乳類・鳥類・魚類などの行動理解には IBM が利用させている。その中間の住血吸虫などの寄生虫を扱う適切なモデルはどちらの方法からも遠い。しかし、部分的に IBM を取り入れることによって現実的な結果が得られるようになり、それは将来の疫学像を推定する上で有効な武器となるだろう。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Yoshimine H, Oishi K, Mubiru F, Nalwoga H, Takahashi H, Shimada M, Mugerwa R, Nagatake T (2001) Community-acquired pneumonia in Ugandan adults: Short-term parenteral ampicillin therapy for bacterial pneumonia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 64(3), 172-177.

Yamamoto T, Shimada M, Moji K, Mizota T (2001) Research activities on emerging and reemerging diseases. *Jpn. J. Trop. Med. Hyg.*, 29(2), 231-234.

Horio M, Nakamura K, Shimada M (2001) Risk of *Toxoplasma gondii* Infection in Slaughterhouse Workers in Kitakyushu City. *J.*

UOEH 23(3), 233-243.

## 2. 学会発表

Siswanto, Shimada M, Joseph R, Kisu T, Suparmantol P (2001) A questionnaire survey for dengue control in Blitar municipality, east Java province, Indonesia: An evaluation for better community education approach. 第42回日本熱帯医学会大会（2001年9月23-24日、東京）（日本熱帯医学会雑誌、第29巻増刊号、188）

Ruyongal J, Siswanto, Kisu T, Shimada M, Mathew E (2001) A Study of Communicable Diseases Pattern in Hoima District, Uganda. Based on the Monthly Reports from 34 Health Units in the year 2000. 第16回日本国際保健医療学会総会（2001年10月7-8日、東京）

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の肝臓に存在する瘧疾誘発リポタンパク（G-CILIP）の作用発現機構

分担研究者 田 邊 将 信

慶應義塾大学医学部熱帯医学寄生虫

共同研究者

永田博司（慶應義塾大学医学部内科）

関塚永一、宮崎耕司（国立埼玉病院内科）、

谷 正人（慶應義塾大学医学部老年科）、

奈良武司、青木 孝（順天堂大学医学部寄生虫学）、

小川 勝（国立埼玉病院臨床検査）、

小泉 周、三好俊一郎、金子章道（慶應義塾大学医学部生理学）

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の肝臓に多量に存在する瘧疾誘発リポタンパク（G-CILIP）の作用発現機構を解析し、以下の成績をえた。

①G-CILIP をマウスやラットに投与すると、マクロ的には神経症状、行動異常、呼吸変化、心電図異常、循環不全といった変化が観察され、ミクロ的には心臓及び肺に血栓形成が認められた。

②G-CILIP を投与したマウスやラットには消耗性血液凝固不全が認められた。

③ヘパリン、ワーファリン、あるいはメシル酸ナファモスタットといった血液凝固阻止剤で前処置されたマウスは致死量の G-CILIP 投与に対して全く症状を示さなかった。

④G-CILIP 投与ラットの血漿、あるいは血清中の血液凝固因子、凝固亢進マーカー、線溶亢進マーカーの経時的測定を行い、投与直後から PT、APTT 時間の延長、血小板及びフィブリノーゲンの低下、TAT、DDimer、FDP の増加が観察された。

⑤各種動物血漿を用いた試験管内凝固反応において G-CILIP が血小板の有無に関わりなく凝固促進効果を示し、G-CILIP 量と凝固時間には相関関係がみられた。

⑥G-CILIP が血液凝固カスケードのどこに作用しているかを明らかにするため、精製凝固因子及び MCA ペプチド基質を用いた解析を行い、G-CILIP が血液凝固第 IX 因子および第 X 因子を活性化するが、第 VII 因子、第 XI 因子、第 XII 因子、Prothrombin、Protein C、あるいは Fibrinogen には作用しないこと、G-CILIP による第 X 因子活性化反応は Ca<sup>2+</sup> 要求性で、中性域 pH でその活性が最大となることが明らかとなった。

⑧マンスン住血吸虫感染マウスを 1 週間ワーファリンで処理すると、肝臓内の CILIP 活性は消失し、Procoagulant 活性や factor X 活性化活性も著しく低下した。

以上の成績から、G-CILIP が血液凝固を活性化する procoagulant であること、そしてこの作用が急激な血管内凝固（血栓形成）を引き起こし、次いで循環不全、さらには各種行動異常を引き起こすものと推定された。さらに、G-CILIP 自身がリポタンパクであること、その活性発現には Ca<sup>2+</sup> が必須であること、血液凝固系の第 IX 因子および第 X 因子を直接活性化しうること、そしてワーファリン処理マウスではその活性が著しく低下することから、G-CILIP に存在する凝固活性化分子は組織因子と活性化第 VII 因子の複合体であると推定された。

## 研究目的

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多量に存在することを発見した（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る）。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（回転運動、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。そして、半致死量投与後十分に回復したマウスに再度致死量のCILIP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とも観察している。

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7000KDa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と考えられ、マウス血清リポ蛋白（VLDL, LDL, HDL）とも違った性状（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、あるいはその脾臓から精製した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おり、さらには、同じ動物から精製したG-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。

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G-CILIPの痙攣誘発機構の解析を行い、その機構および痙攣誘発に直接関わっている分子が明らかとなったので報告する。

## 研究方法

### 実験動物

実験にはBALB/c雌マウス（感染時5週令）、Wister雌ラット（250g）を用いた。また、血液採取用として、正常なICR雌マウス、Wister雌ラット、あるいは日本白色種雌ウサギを用いた。感染マウスはBALB/cマウスの皮下に25隻のマンソン住血吸虫（Sm）セルカリアを接種して作製した。また、肝臓内虫卵性肉芽腫からのG-CILIP精製用として、100隻のSmセルカリアを感染させたICRマウスを準備した。

### 各種動物からの血液の採取

今回、マウス、ラット、ウサギ、そしてヒトから血小板浮遊血漿、および血小板欠乏血漿を調整した。血小板浮遊血漿は、採血した血液に1/10容の3.8%クエン酸ソーダを加え、1000rpmで10分間遠心して調整した。血小板欠乏血漿は、この血液をさらに3000rpmで20分遠心して調整した。

### ヘパリン、ワーファリン、あるいはメシル酸ナファモスタット（フサン）の投与

ヘパリンは2～200U/Kg body weightをG-CILIP投与30分前に皮下投与した。ワーファリンは0.5～10mg/Kg body weight/dayのdoseで1日1回計3日間カニューレを用いて経口投与した。メシル酸ナファモスタットは0.5～5mg/Kg body weightのdoseでG-CILIP投与前2分以内に静脈内投与した。正常および感染マウスに1週間ワーファリンを投与する実験では、飲料水にワーファリンを溶解して投与した。Delainiらの方法(1)に準じて、第1日目は7.5 mg/liter、2日目以降は1.5 mg/liter濃度のワーファリンを与えた。この

方法で投与した場合、血漿の PT 時間にかなりの個体差がみられたので、解剖時各マウスから血漿を分離し、PT 時間が正常マウスの 2 倍以上 4 倍以下のマウスについてのみ実験に用いた。

#### 痙攣誘発リポ蛋白(CILIP)および正常動物からの痙攣誘発物質の精製

G-CILIP は Manson 住血吸虫感染 ICR マウスの肝臓内虫卵性肉芽腫から精製した。また、住血吸虫に感染していない正常ラット、スナネズミ、ウサギ、イヌ、そしてヒトの肺から痙攣誘発物質を精製した。組織を 20mM Tris-Cl, pH8.0 / 2mM EDTA / 150 mM 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画した。活性画分を 20 mM Tris-Cl, pH7.2 / 2 mM EDTA / 250mM NaCl に対して透析後、ゲル濾過カラム(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 (105,000g X 16 時間) にかけて、比重が 1.15 の部分を回収し、もう一度超遠心にかけて、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。

痙攣誘発活性は検体 (6~200  $\mu$ 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。

#### CILIP 投与マウスおよびラットの病理学的検査

マウスには 2 単位、ラットには 20 単位の G-CILIP を尾静脈内に投与し、投与後 5 分、30 分、60 分に動物を殺し、脳、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓の肉眼的所見を記録し、ついで各組織を 10%ホルマリンで固定し、型のごとくパラフィン切片を作製した。HE およびフィブリン染色を行い、組織学的検査を行った。

血液凝固時間、凝固因子、凝固亢進マーカー、線溶亢進マーカーの測定

ラットに 20 単位の G-CILIP を尾静脈から注入し、投与後 10 分、60 分、そして 120 分にラットをネンブタールで麻酔し、全採血した。血漿の PT および APTT 時間を測定し、さらには血漿中の血小板数、フィブリノーゲン量を測定した。PT および APTT 時間はそれぞれ Dade Behring 社製の Dade Thromboplastin C-Plus および Dade Actin Activated Cephaloplastin Reagent を用いて測定した。フィブリノーゲンはトロンビン時間法によって測定した。凝固亢進マーカーであるトロンビン・アンチトロンビン複合体(TAT)の測定は Affinity Biologicals 社製の ELISA キットを用いて行った。また、線溶亢進マーカーの指標としては、フィブリン・フィブリノーゲンの分解産物(FDP)および安定化フィブリン分解産物(DDimer)の測定を行った。FDP および DDimer はそれぞれダイアマトロン社製のイアトロエース FDP(A)、あるいはエルピアエース DDimer を用いて測定した。

#### Procoagulant (PCA) 活性の測定

G-CILIP の PCA 活性は正常ヒト血漿、あるいは正常マウス血漿を用いた一段階法で測定した(2)。100  $\mu$ l のヒト、あるいはマウス血漿と 100 $\mu$ l の精製した G-CILIP、あるいは緩衝液を混和し、37  $^{\circ}$ C で 3 分間プレインキュベートし、100  $\mu$ l の 30mM CaCl<sub>2</sub> を加えて反応を開始し、フィブリン析出までの時間を凝固時間とした。PCA 単位(miliunits)は正常ヒト血漿に段階希釈 (原液~10<sup>5</sup> 倍希釈) したウサギ脳トロンボプラスチン (Dade Behring 社製) を添加した時の凝固時間を測定し、各濃度ごとの凝固時間を両対数グラフにプロットし標準曲線を作製し、希釈をしないウサギ脳トロンボプラスチンの PCA 単位を 10 万単位と仮定して求めた(3)。

また、凝固因子欠乏血漿を用いた凝固時間の測定も行った。血液凝固第 II 因子、第 VII 因子、第 IX 因子、第 X 因子、第 XI 因子欠乏血漿 (Georgia King Bio-Medicals) を用いて、G-CILIP の凝固因子依存性を解析した。

#### G-CILIP による凝固因子の直接的な活性化

G-CILIP による第 X 因子活性化活性は、精製したヒト由来第 X 因子(ICN)と合成ペプチド基質(Z-Pyr-

Gly-Arg-MCA)を用いた二段階法で測定した(4)。5～50 µl の G-CILIP を Ca<sup>2+</sup>の存在下で第 X 因子と 37°C で 5～60 分間インキュベートし、この反応液の一部を Ca<sup>2+</sup>を含む MCA ペプチド基質反応液に加え、放出される蛍光産物の量を蛍光光度計で測定し、活性を求めた。また、それぞれの凝固因子に特異的な MCA 合性ペプチド基質を用いて、血液凝固第 II 因子 (5)、第 VII 因子 (6)、第 XI 因子 (4)、protein C (7)、第 XII 因子 (4) への G-CILIP の活性化作用の有無を調べた。

G-CILIP の第 IX 因子活性化作用(8)は、G-CILIP と精製した第 IX 因子の反応液を凝固第 IX 因子欠乏ヒト血漿に添加した場合の凝固時間を指標として測定した。また、G-CILIP の fibrinogen 活性化作用は、fibrinogen 液に直接 G-CILIP を加えた場合の凝固時間を指標として測定した。

#### タンパク質の定量

蛋白量は BSA を標準とした Bradford 法により測定した(9)。

## 研究結果

### G-CILIP 投与後に観察される病理組織学的変化

G-CILIP をマウスやラットに投与すると、投与動物には各種神経症状、行動異常、呼吸変化、心電図異常、循環不全といった変化が観察される。そこで、今回 G-CILIP 投与マウスおよびラットを病理学的に詳しく検討した。マクロ的には、G-CILIP 投与マウスの右心房や右心室に凝血の存在が観察されたことから、マウスの心臓、肺、さらには主要臓器について病理組織学的検討を加えた。その結果、右心房、右心室、あるいは肺動脈内に凝血が観察され、しかも凝血内にはフィブリンの析出が認められたことから、この凝血が血栓であることが判明した。このような血栓形成はラットにも認められ、G-CILIP 投与後少なくとも 5 分以内に形成されること、さらには血栓が右心房、右心室、あるいは肺動脈本幹および末梢にも存在することが明らかとなった。

### G-CILIP 投与後の血液凝固不全

マウスやラットに G-CILIP を投与し、60 分後に採血し、血液の凝固活性の変化を PT および APTT 時間を測定して解析した。G-CILIP 投与マウスおよびラットでは、著明な PT および APTT 時間の延長が観察され、G-CILIP 投与動物に血液凝固不全がみられることが明らかとなった。

この結果は、G-CILIP 投与によってマウスやラットに血管内血液凝固がみられ、その結果として血液凝固因子の消耗が起こり、血液凝固不全になったものと推測した。

### G-CILIP 投与ラットの血液凝固因子、凝固亢進マーカー、線溶亢進マーカーの量的変化

ラットに G-CILIP を 20 単位投与し、一定時間後に全採血し、血清および血漿中の血液凝固因子、凝固亢進マーカー、線溶亢進マーカーの量的変化を観察した(表 1)。その結果、投与直後から PT、APTT 時間の著明な延長、血小板及びフィブリノーゲンの著しい低下が認められた。また、凝固亢進マーカーである TAT 量が著しく増加すること、さらには線溶亢進マーカーである DDimer や FDP 量が著明に増加することが観察された。

これらの結果は G-CILIP 投与によって急激な血管内凝固がみられ、その結果凝固亢進マーカー、あるいは線溶亢進マーカーが増加したものと推定された。

### 血液凝固阻止剤の前処置による G-CILIP に対する感受性の変化

ヘパリン、ワーファリン、あるいはメシル酸ナフアモスタット(フサン)といった血液凝固阻止剤をあらかじめ投与されたマウスに致死量の G-CILIP 投与を行い、投与マウスの G-CILIP に対する感受性の変化を観察した。表 2 に明らかなように、ヘパリンでは 100 U/Kg body weight 以上の皮下投与、ワーファリンでは 2mg/Kg body weight/day 以上の 3 日間経口投与、またフサンでは 2mg/Kg body weight 以上の静脈内投与を受けたマウスは、致死量の G-CILIP に対する感受性を消失し、全例が全く症状を示さず、生存した。

この実験結果は、G-CILIP を実験動物の静脈内に投与すると、急激な血管内血液凝固が引き起こされ、その結果として投与動物に様々な症状が出現すると

いう我々の推論が正しいことを裏付けるものと考えられた。

#### 試験管内血液凝固反応への G-CILIP の添効効果

各種動物由来血漿を用いた試験管内凝固反応を行い、G-CILIP が直接動物の血液を凝固させるかどうかについて *in vitro* の実験系を用いて解析した。表 3 に明らかなように、血小板浮遊血漿を使った実験において、G-CILIP の添加は、その凝固時間を著しく短縮させることが明らかとなった。また、その効果は血小板欠乏血症においても認められたことから、G-CILIP の凝固促進効果は血小板に依存しないメカニズム、即ち、直接的、あるいは間接的に凝固因子に働き、その活性化を行っているものと推定された。さらに、G-CILIP 投与量と凝固時間との間には相関関係が認められたことから、G-CILIP が直接凝固系に働いていることが推定された。

一方、住血吸虫の感染を受けていない各種動物から精製した瘧疾誘発物質についてもマウス血漿を用いた試験管内凝固反応への添加効果を調べた。今回調べた瘧疾誘発物質はヒト、ラット、ウサギ、イヌ、スナネズミの肺から分離・精製したものであるが、いずれもマウス血小板欠乏血漿の凝固時間を著しく短縮させることが明らかとなった。このことは、これらの動物から分離された瘧疾誘発物質もまた CILIP と同様に procoagulant であること、さらにはこれらの瘧疾誘発物質もまた他種動物の血液凝固系に作用しうることが明らかとなった。

#### 凝固因子欠乏血漿を用いた凝固反応

G-CILIP の凝固因子依存性を明らかにするため、ヒト凝固因子欠乏血漿を用いた凝固反応を行った。G-CILIP の添加で凝固促進効果がみられたものは第 VII 因子、第 IX 因子、第 XI 因子欠乏血漿であった。一方、全く凝固促進効果がみられなかったのは第 II 因子、第 X 因子欠乏血漿であった。この結果から、G-CILIP は第 X 因子を活性化する procoagulant であることが推定された。

#### G-CILIP による凝固因子の活性化

G-CILIP が血液凝固カスケードのどこに作用して

いるかをより詳細に解析するため、精製された凝固因子および各凝固因子に特異的な MCA ペプチド基質を用いた解析を行った。また、第 IX 因子、あるいはフィブリノーゲン活性化活性の測定は、精製された凝固因子を用いた凝固反応で調べた。表 4 に明らかなように、G-CILIP が血液凝固第 IX 因子および第 X 因子を活性化することが明らかとなった。しかし、第 VII 因子、第 XI 因子、第 XII 因子、Prothrombin、Protein C、あるいはフィブリノーゲンには作用しないことが判明した。さらに、G-CILIP による第 X 因子活性化反応は  $Ca^{2+}$  要求性で、中性域 pH でその活性が最大となることが明らかとなった。そして、この反応による蛍光産物放出量は添加する G-CILIP 量に比例して増大することが明らかとなった。

#### ワーファリンを投与された正常及びマンソン住血吸虫感染マウスの各臓器内 procoagulant 活性および第 X 因子活性化活性の変化

正常およびマンソン住血吸虫感染マウスに感染後 70 から 77 日にかけてワーファリンの投与を行い、肺、肝臓、脾臓および腸間膜リンパ節の procoagulant 活性 (図 1) および第 X 因子活性化活性 (図 2) の変化を観察した。結果に明らかなように、非感染マウスに比較して、感染マウスでは調べた全ての臓器においてその procoagulant 活性および第 X 因子活性化活性が著しく増加していた。しかし、感染マウスにワーファリンを 1 週間投与したところ、どの臓器においてもその procoagulant 活性および第 X 因子活性化活性が著しく低下していた。特に、第 X 因子活性化活性では、ワーファリン投与によってその活性はほぼ正常マウスのレベルにまで低下していた。このことは、マンソン住血吸虫感染マウスにおいて誘導される procoagulant 活性の大部分がワーファリン投与で消失したことを意味しており、住血吸虫感染で誘導される procoagulant (G-CILIP) はワーファリン投与に対して感受性を有することが明らかとなった。



## 考 察

今年度の研究によって、マンソン住血吸虫感染マウスの肝臓から分離・精製される瘧疾誘発リポ蛋白 (G-CILIP) が血液凝固第 IX 因子及び第 X 因子活性化作用をもった procoagulant であることが示唆された。従って、G-CILIP を実験動物の血管内に投与した場合、G-CILIP の凝固促進作用が急激な血管内凝固 (血栓形成) を引き起こし、次いで循環不全、さらには各種行動異常といった症状を引き起こすものと推定された。

ヒトやマウスの細胞に存在する、あるいは誘導される procoagulant にはつぎのようなものが知られている。1 つ目は、組織因子であり、数多くの正常細胞表面にその表出がみられ、通常発現していない細胞でも病的状態では発現がみられることが知られている(10)。しかし、組織因子には第 X 因子活性化作用はない。2 つ目は腫瘍細胞や胎児組織に高頻度に発現される Cancer procoagulant と呼ばれるもので(11)、システインプロテアーゼに属し、第 X 因子活性化作用を有する。3 つ目はウイルス感染や特殊なリポ蛋白刺激によってマクロファージが発現するもので、prothrombinase 活性を示すものであり、第 X 因子活性化作用はない(12)。4 つ目は、マクロファージや血管内皮細胞が各種刺激 (LPS、IL-1、TNF、mitogen、soluble immune complex) を受けて発現するもので、組織因子と活性化第 VII 因子の複合体であり、第 X 因子活性化作用を有する(13)。5 つ目は、自己免疫自然発症マウスの腎臓の糸球体に発現されるもので、その効果発現に関与している分子は特定されていないが、第 X 因子活性化作用を有することが知られている(14)。この様にいろいろな procoagulant が現在までに報告されており、その凝固活性化分子も特定されている。我々が解析をすすめている G-CILIP はリポ蛋白であり、その活性発現に  $Ca^{2+}$  が必須であり、第 IX 因子、第 X 因子を直接活性化しうることが分かっている。また、ワーファリン投与動物ではその活性が著しく低下するといった性状が明らかとなったことから、マンソン住血吸虫感染によって肝臓に誘導される G-CILIP の活性分子、即ちその凝固活性化分子は組織因子と活性化された第 VII 因子の複合体ではないかと現時

点では推定している。

昨年度の研究で、G-CILIP に似た性状を有する瘧疾誘発物質が各種動物組織から分離精製出来ることを報告した。そして、これらの瘧疾誘発物質が、① CILIP の精製に用いている方法で精製が可能、② マウスやラットに投与すると G-CILIP と同じ症状をもたらす、③ G-CILIP と同じ機構を介してマウスに作用している、④ CILIP によく似た物理化学的性状を示す、ことから、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、さらには、これらの分子が共通の効果発現機構を有することを推定した。今年度の研究において、マウス由来の G-CILIP が他種動物由来の血漿に対して凝固促進効果を示すこと、さらには住血吸虫の感染を受けていない各種動物の肺から分離・精製した瘧疾誘発物質がマウス血漿に対して凝固促進効果を示すことが明らかとなったことから、我々の推定の正しさが確認された。さらに、我々がマンソン住血吸虫感染マウスから精製した CILIP、あるいは各種動物組織から精製した瘧疾誘発物質に共通して存在すると推定した効果発現機構がこれらの分子に共通してみられる procoagulant 活性によることが推定された。しかしながら、住血吸虫の感染を受けていない動物の肺、リンパ節、あるいは脾臓に存在する瘧疾誘発物質は、ワーファリン処理に対して抵抗性であったことから、マンソン住血吸虫感染によって誘導される CILIP とは異なるものと考えらるべきであろう。

一方、半致死量の CILIP を投与し、2 時間以上経過して十分に回復したマウスに再度致死量の CILIP を投与しても症状が全く認められなくなるという現象も今年度の研究成績から説明可能となった。即ち、CILIP を投与したマウスやラットでは血漿の凝固時間の著しい延長、あるいは凝固因子 (血小板、フィブリノーゲン) の低下が認められることから (消耗性凝固不全)、この消耗性凝固不全状態が二度目に投与された CILIP の効果を発現させない原因となっているものと考えられた。

ある種の寄生虫感染モデル、例えば住血吸虫、マラリア原虫、あるいはリーシュマニア原虫感染において、マウス組織中の CILIP 活性が有意に増加することが明らかとなっている。特に、住血吸虫感染では、ヒトを固有宿主とする 3 種類の住血吸虫感染に

において、マウス組織中の CILIP 活性が著明に増加する。このことは、各組織中の Procoagulant 活性、あるいは第 X 因子活性化活性も著明に増加していることを示唆している。このような住血吸虫感染マウスにおけるこれらの活性増加がどのようなメカニズムでなされているかについては現時点で明確に説明することは出来ない。しかし、G-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、さらには高い CILIP 活性が胸腺、肺、脾臓、リンパ節、そして消化管といった免疫組織の発達した組織に検出されることを考えあわせると、宿主の免疫反応が CILIP の誘導に密接に関連しているように思われる。G-CILIP 活性が虫卵性肉芽腫中に多量に含まれていること、さらにはリンパ球やマクロファージが虫卵性肉芽腫の主要な構成細胞として存在することを考えあわせると、これらの細胞が procoagulant の誘導に主要な役割を演じているように思われる。組織に沈着した虫卵からは多量の抗原物質が放出され、肉芽腫形成局所においては多量の免疫複合体が形成され(15)、さらには肉芽腫内、あるいはその周囲において炎症性サイトカインの活発な放出(16)が認められることから、これらが刺激となって局所に procoagulant の誘導が起こるものと現時点では推定している。

## 結 論

今年度の研究によって、G-CILIP が投与動物の血液凝固を活性化する procoagulant であること、そしてこの作用が投与動物に急激な血管内凝固を引き起こし、その結果として投与動物に各種行動異常や循環不全といった症状をもたらしていることが明らかとなった。さらに、G-CILIP 自身がリポ蛋白であり、その活性発現に Ca<sup>2+</sup>が必須であること、血液凝固第 IX 因子および第 X 因子を直接活性化しうること、そしてワーファリン処理マウスではその活性が著しく低下することから、G-CILIP に存在する凝固活性化分子は組織因子と活性化第 VII 因子の複合体であると推定された。

## 文 献

1. Delaini, F. et al. (1981). *Throm. Res.*, 24: 263-266.
2. Tsao, B.P., et al. (1984) *J. Exp. Med.*, 159: 1042-1057.
3. Maier, R. V. and Ulevitch, R. J. (1981). *J. Immunol.*, 127: 1596-1600.
4. Kawabata, S. et al. (1988). *Eur. J. Biochem.*, 172:17-24.
5. Kawabata, S. et al. (1985). *J. Biochem.*, 97: 1073-1079.
6. Shigematsu, Y., et al. (1992). *J. Biol. Chem.*, 267: 21329-21337.
7. Ohno, Y. et al. (1981). *J. Biochem.*, 90: 1387-1395.
8. Fujikawa, K. et al. (1974). *Biochemistry*, 13: 4508-4516.
9. Bradford, M. M. (1976). *Anal. Biochem.*, 72: 248-253.
10. Lorenzet, R. et al. (1983). *Blood*, 62: 271-273.
11. Gordon, S. G. and Mielicki, W. P. (1997). *Blood Coagul. Fibrinol.*, 8: 73-86.
12. Schwartz, B. S., et al. (1982). *J. Exp. Med.*, 155: 1464-1479.
13. El-Baruni, K., et al. (1990). *Hematol. Oncol.*, 8: 323-332.
14. Perampalam, S., et al. (1999). *J. Am. Soc. Nephrol.*, 10: 2332-2341.
15. Houba, Y., et al. (1979). *Adv. Exp. Med. Biol.*, 114: 683-685.
16. Wahl, S. M. (1985). *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 460: 224-231.

## 研究発表

### 論文発表

Fukao, T., Yamada, T., Tanabe, M., Terauchi, Y., Ota, T., Takayama, T., Asano, T., Takeuchi, T., Kadowaki, T., Hata, J-i. and Koyasu, S. (2002) Selective loss of gastrointestinal mast cells and impaired immunity in PI3K-deficient mice.

Nature Immunology, 3(3): 295-304.

### 学会発表

(1) 田邊将信、永田博司、関塚永一、奈良武司、宮崎耕司、谷 正人、小川 勝、小泉 周、三好俊一郎、金子章道、青木 孝、北 潔、竹内 勤  
マンソン住血吸虫虫卵性肉芽腫に存在する煙燻誘発リポ蛋白(CILIP)の作用発現機構

第71回日本寄生虫学会、平成14年3月

(2) 岡田英理子、山崎元美、岡本隆一、大島 茂、金井隆典、坂本直哉、矢島知治、日比紀文、田邊将信、竹内 勤、石川博通、渡辺 守

腸管粘膜浸潤 IL-7 レセプター陽性細胞の移入による新しい慢性大腸炎モデルの作成

第87回日本消化器病学会、平成13年4月

(3) Watanabe, M., Yamazaki, M., Kanai, T., Okada, E., Sakamoto, N., Tanabe, M., Takeuchi, T., Yajima, T., Hibi, N. Selective elimination of IL-7 receptor+ mucosal lymphocytes ameliorated established chronic colitis.

第101回 Annual Meeting of the American Gastroenterological Association, 平成13年5月

(4) 山崎元美、岡田英理子、岡本隆一、金井隆典、矢島知治、日比紀文、田邊将信、竹内 勤、石川博通、渡辺 守

腸管粘膜浸潤 IL-7 レセプター陽性細胞移入による慢性大腸炎の惹起

第38回消化器と免疫、平成13年8月

(5) 山崎 元美、岡田 英理子、松本 智子、岡本隆一、大島 茂、戸塚 輝台、金井 隆典、矢島 知治、日比 紀文、田邊 将信、竹内 勤、石川 博通、渡辺 守

腸管粘膜浸潤 IL-7 レセプター陽性細胞による慢性大腸炎の惹起

第31回日本免疫学会、平成13年12月

(6) 深尾 太郎、田邊 将信、嘉陽 啓之、太田 孝幸、竹内 勤、小安 重夫

PI3K キナーゼは樹状細胞からの IL-12 産生を抑制することで、過剰な Th1 反応から生体を守っている

第31回日本免疫学会、平成13年12月

(7) 山崎元美、松本智子、岡田英理子、岡本隆一、中村哲也、金井隆典、矢島知治、日比紀文、田邊将信、竹内 勤、石川博通、渡辺 守

腸管粘膜浸潤 IL-7 レセプター高発現細胞による慢性大腸炎発症

第39回消化器と免疫、平成14年3月

表1 G-CILIP 投与ラットにおける血液凝固因子、凝固亢進マーカー、線溶亢進マーカーの経時的変化

		Min after CILIP injection			
		PBS	10	60	120
PT	sec	11.8±0.2	26.3±7.4	27.0±7.3	23.3±6.8
APTT	sec	17.1±0.43	52.6±16.3	41.6±12.0	63.3±45.9
PLATELET	10 <sup>3</sup> / ul	91.3± 6.3	5.1±1.9	28.6±7.1	22.5±20.0
FIBRINOGEN	mg / dl	160.5±8.4	12.8±1.4	25.2±13.6	43.2±38.6
TAT	ng / ml	<1.0	8.2±1.7	7.2±1.3	8.4±2.6
FDP	ug / ml	3.1±0.4	3.6±1.0	11.4±0.9	9.5±1.1
DDIMER	ug / ml	<0.5	2.2±1.8	>30.0	26.2±27.5

表 2 血液凝固阻止剤の前処置を受けたマウスの致死量のG-CILIP 投与に対する感受性の変化

Chemicals	Dose	No. survived /No. examined
Heparin <sup>a</sup>	200 U/Kg BW	4 /4
	100	5 /5
	50	2 /5
	20	0 /4
	0	0 /4
Warfarin <sup>b</sup>	10 mg/Kg BW/day	3 /3
	5	5 /5
	2	4 /4
	0.5	2 /5
	0	0 /5
Nafamostat mesilate <sup>c</sup> (futhan)	5 mg/Kg BW	5 /5
	2	5 /5
	1	1 /4
	0.5	0 /4
	0	0 /4

a: Mice were pre-treated with subcutaneous injection of heparin 15 min before CILIP injection.

b: Mice were pre-treated with oral administration of warfarin for 3 days.

c: Mice were pre-treated with intravenous injection of futhan 2 min before CILIP injection.

表 3 試験管内血液凝固反応への G-CILIP  
の添加効果

	N	Platelet-rich plasma			Platelet-poor plasma		
		a Buffer	b CILIP	c TP	Buffer	CILIP	TP
Human	2				285	21.1	10.8
Rabbit	3	46.4±0.38	16.3±0.32	8.0±0.14	47.3±0.38	17.6±0.26	8.3±0.15
Rat	5	40.1±1.02	15.0±0.12	11.4±0.22	40.6±0.59	15.9±0.31	11.8±0.27
Mouse	10	72.1±2.24	13.5±0.14	9.9±0.21	74.0±5.39	13.8±0.65	10.3±0.46

a: 20 mM Tris-Cl, pH 8.0/5% glycerol/150 mM NaCl

b: Two units of CILIP purified from rabbit lung was used in this experiment.

c: Thromboplastin isolated from rabbit brain (purchased from Dade Behring )  
was used in this experiment.

表 4 G-CILIP による血液凝固第 IX 因子および  
第 X 因子の活性化

Reaction mixture	$\Delta$ Fluorescent intensity/min
Z-Pyr-Gly-Arg-MCA + Buffer	0
Z-Pyr-Gly-Arg-MCA + CILIP	8
Z-Pyr-Gly-Arg-MCA + F-X	11
Z-Pyr-Gly-Arg-MCA + F-X/CILIP	4150

Reaction mixture	Clotting time (sec)
F-IX deficient plasma + buffer	88.4
F-IX deficient plasma + F-IX	45.1
F-IX deficient plasma + CILIP	54.2
F-IX deficient plasma + F-IX/CILIP	19.8
F-IX deficient plasma + F-IXa	18.2

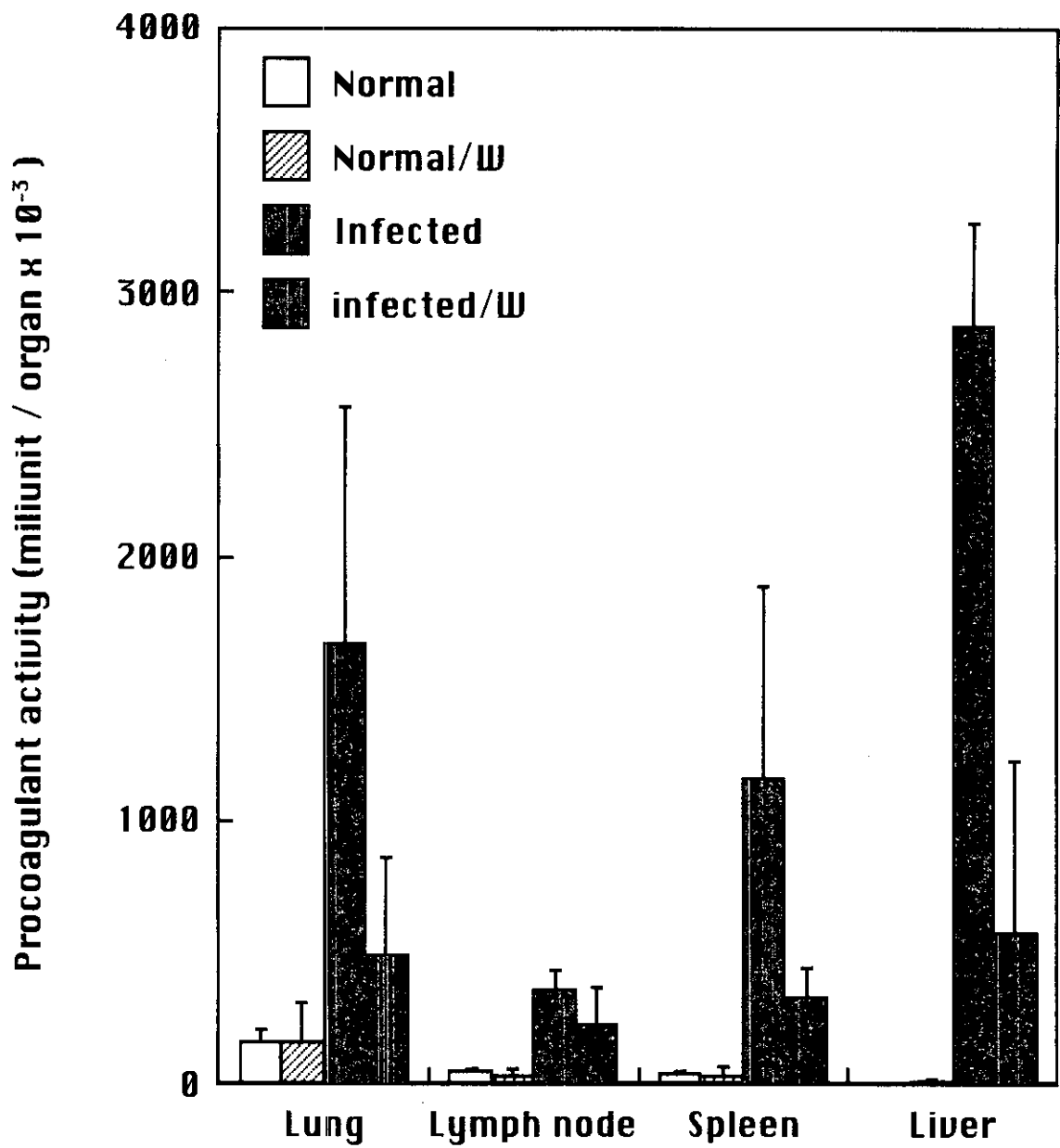


図 1 ワーファリンを投与された正常及びマンソン住血吸虫感染マウスの各臓器内 Procoagulant 活性の変化



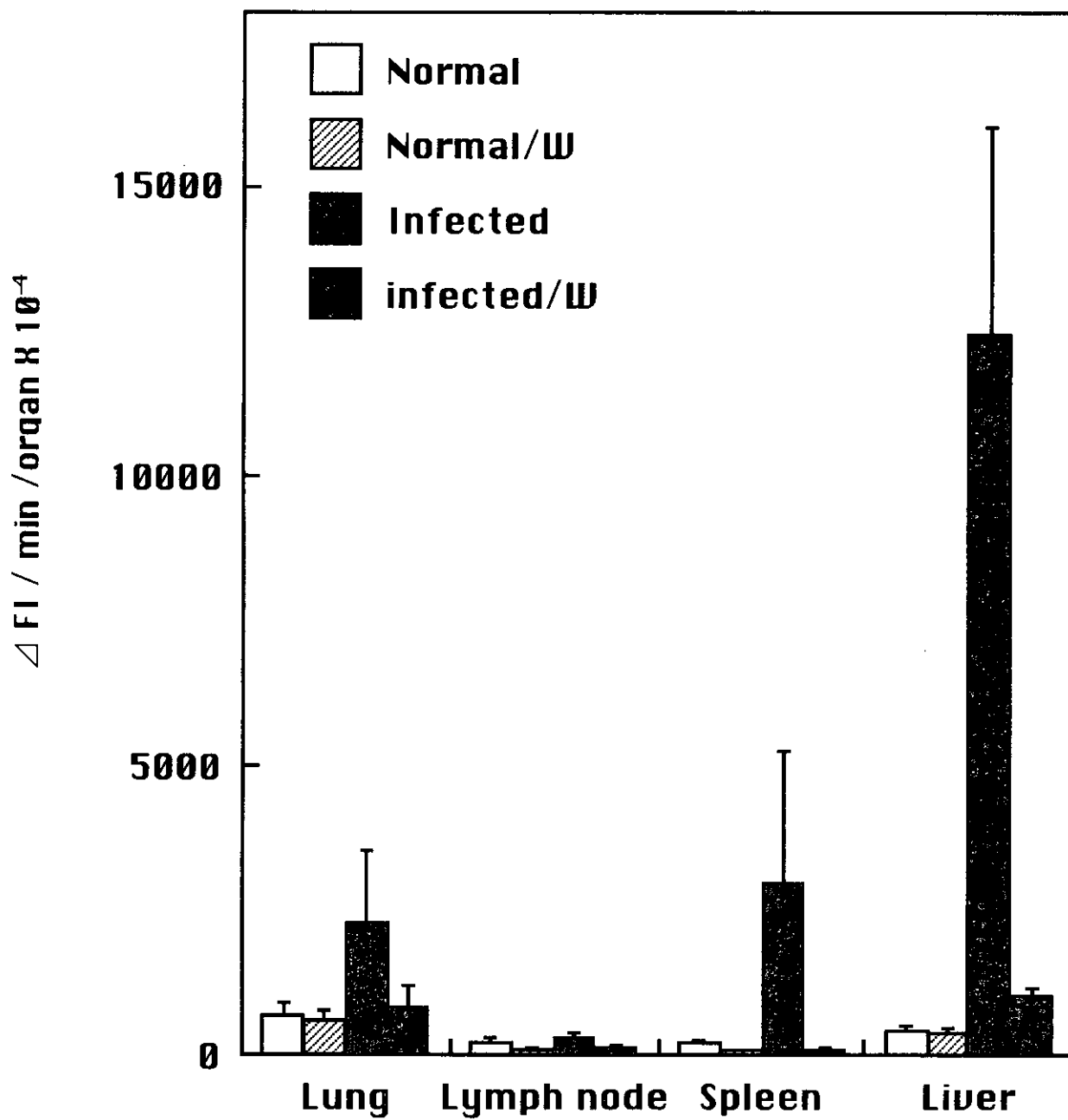


図 2 ワーファリンを投与された正常及びマンソン住血吸虫感染マウスの各臓器内第 X 因子活性化活性の変化

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症事業）

分担研究報告書

## 国内監視体制の維持強化—リモートセンシング/GIS

分担研究者 二瓶直子（国立感染症研究所・昆虫医科学部）

共同研究者 梶原昭徳<sup>1</sup>・斎藤康秀<sup>2</sup>・桐木雅史<sup>3</sup>・千種雄一<sup>3</sup>・松田肇<sup>3</sup>

（<sup>1</sup>山梨県公害衛生研、<sup>2</sup>麻布大獣医寄生虫、<sup>3</sup>獨協医大熱帯寄生虫）

要旨：日本住血吸虫症の監視体制として中間宿主のミヤイリガイの生息調査を実施してきたが、今年度は山梨県の生息調査定点 120 点の測量を終了し、生息結果を GIS で解析し図で表示した。この結果を利用して定点数を半分にして予算の削減や時間の短縮を試みている。今年度は生息範囲は狭まる傾向であるが、生息密度は急速に上昇し今後の監視による危機管理が必要である。千葉県木更津市、袖ヶ浦町等の小櫃川流域の生息調査を実施し、かつての浸淫地である利根川についても衛星画像を用いて監視体制を構築している。

### A. 目的

日本においては日本住血吸虫症はなくなったものの、中間宿主のミヤイリガイ *Oncomelania nosophora* は山梨県甲府盆地、千葉県木更津市、袖ヶ浦町等の小櫃川流域の一部に、生息している。海外においては中間宿主貝がいれば患者がいると考えられ、日本においても住民の間ではその不安が解消したわけではない。未だミヤイリガイがいる限り、日本住血吸虫症の監視体制を整備しておくことが危機管理上必要である。日本で最大の浸淫地であった甲府盆地においては山梨県や山梨県衛生公害研究所、住民の協力で、日本住血吸虫症（地方病）対策が実施され監視されてきた長い歴史がある。感染症新法で日本住血吸虫症の届け出義務がなくなり、安全宣言が出されたにも関わらず、特に 70 才以上の地元住民には不安があり、現在でもミヤイリガイ採集貝の感染の有無やミヤイリガイの生息調査を実施している。これらの資料を GIS

の手法を用いて、分布地域の拡大と縮小、あるいは生息密度の増減を解析して、効果的かつ迅速な監視体制を構築する上で重要である。

また日本住血吸虫症の中間宿主の貝を日本のミヤイリガイだけでなく、中国・フィリピン・インドネシアの各地で採集し、同時に生息地の土壌を採集し、実験室内で飼育繁殖し、日本住血吸虫の安定した維持管理を実施したい。

### B. 方法

山梨県衛生公害研究所では 1996 年から 2000 年まで定点を 120 点設定し、生息調査を実施してきた。この結果を迅速かつ視覚的に訴え、行政に反映させるために GIS による解析のために、昨年度に引き続き、稲刈り終了後定点の区画の輪郭と、流入・排水用水口の位置を、高精度のディファレンシャル GPS の GPS Pathfinder Pro XR/XRS (Trimble 社) で測定し、同時に貝

の生息数、土地利用、地形、土壌、水の状況等の地理情報を調査し GPS カメラ（コニカ）で環境を記録した。これらの結果を Pathfinder Office でパソコン上に示し、さらにデータを shape file に変換し、GIS 解析ソフト ArcView (Esri 社) を用いて、デジタルマップ PDM (パスコ社) の主要道路から農道までの道路、河川、宇名、国土交通省国土地理院の設定する約 500m 間隔の 4 次メッシュ等が描かれた地図を背景として、図化した。これを基本図として、1996 年から 2000 年までの 5 年間のミヤイリガイ生息調査の結果を、図化した。2001 年度は予算の関係で、60 定点に半減させ、生息調査を実施し、その結果を一般的に用いられているファイルの J P G で、過去 5 年間と同様に図化し、パソコン上では容易に解析に供するようにした。

千葉県小櫃川流域のミヤイリガイ生息地の調査は 1:25,000 の地形図上に示された 1975 年当時の分布図を参照しながら、現地調査した。また S P O T 画像や J E R S - 1 画像を利用して、土地条件を検討した。

利根川流域については範囲が広いので、1:25,000 の地形図で生息可能と思われる地域を選び出し、衛星画像で環境を読みとった。また独立法人環境研究所から配布されている土地利用情報システム LUIS を参考に土地利用の変化や現状を考慮した。なお衛星画像の一部は宇宙開発事業団 NASDA の公募した陸域衛星 ALOS に関わる共同研究事業で入手した。

### C. 結果

定点の GPS による位置確定は、これから得られた一筆毎に示された多角形を約 A0 サイズの地図に示した。この図は山梨県衛生公害研究所に寄贈し、同時に一般にパソコンで容易に用いられているソフトウェアで見られるように 5 枚に分割して J P G

で保存し、その一部を図 1 に示した (図 1)。全定点の測量は 2001 年 12 月 25 日に終了した。1 年間の調査結果をもとに、調査地点やそこへのルートを示すガイドマップを作成するため、目標物や道路名を入れた A0 版の地図を作成し、山梨県衛生公害研究所梶原研究員に検討を依頼した。山梨県衛生公害研究所を中心とする定点一筆毎の生息調査結果から、1) 5 年間の定点観測期間で生息が確認された年数 (図 2)、2) 過去 5 年間の採集貝数の合計 (図 3)、3) 近年 2 年間の採集貝数等をレベル付けして A3 サイズに図化した。本報告では図 2 及び図 3 を報告書用に縮小し、単色で示した。2001 年度からは予算の関係で定点を 60 箇所に限定して調査し、その生息数を図 4 に、1996 年から 2001 年までの 6 年間の変化の一部を図 5 に示した。これと 1975 年頃の地理情報の地形図、水田率による医学地理的地域分類図と比較した。この結果から全く貝が確認されなかった定点は、盆地中央部の釜無川扇状地や調査地域内低地の農地整備されたり、住宅地およびその周辺の人工改変地で、5 年間の貝の総数、近年の貝の採集数が多く、採集年数の多い定点は、御勅使川や釜無側西側の扇状地の扇頂部・扇端部にあつて、地形が複雑で、堰の水、泉の水の湧水する細粒の土壌からなる水持ちのよい地域であつた。これらの結果から今後定点として要観察地、不要地域の選定が容易となった。特に近年の生息状況は、生息確認定点数は減少したが、生息確認定点における生息数は 2000 年の 4 倍に増加し、生息密度が急増していることが分かる。

千葉県小櫃川周辺の生息調査では発見当時に比べて土地改良事業に伴う水位の低下が顕著で、より乾燥しており、生息地域は狭小化した。利根川流域を含めて衛星画像の入手に時間がかかり、解析は現在継続中である。

中間宿主の貝は麻布大学で、二瓶及び斉藤が中心に、飼育実験を実施し、系統の維持を行っている。ミヤイリガイ *Oncomelania nosophora* としては、山梨県甲府盆地、千葉県小櫃川流域、筑後川流域、フィリピンの *Oncomelania quadrasi* としてはレイテ島、ボホール島、ミンドロ島、ミンダナオ島等、中国の *Oncomelania hupensis* としては湖南省、江西省各地の貝の継代飼育に成功している。採集貝は採集地の土壌や甲府の生息地土壌で飼育し、生育・産卵・貝の殻に及ぼす土壌の影響を検討している。土壌の性質については、特に Ca 含量、pH に地域差があり、これらと生息条件や分布条件について検討している。

#### D. 考察

今回の事業は日本における医療、医学分野で GIS を本格的に導入したモデルケースとして、注目されるものである。医療の GIS が重要と言われながら、また国土庁をはじめ GIS のデータが整備されながら、利用が進んでいなかった理由のひとつは、GIS ソフトの熟練と、医療・医学の知識・情報の入手、そして、地理的言い換えれば空間情報をいかに把握するかを同時に考える人材や同グループの不足によるものと考えられる。今回の我々のグループでは、行政、大学、研究所レベルの、医学、生物、地理学等の分野の専門家が集まり、詳細な調査を実施し、精度の高い GPS の機器の借用、ソフトを開発し精通している GIS のアドバイザーの協力があったために、今回のような監視体制が構築できたものと考えられる。この構築には5年間の貝生息調査と、1年間の定点測量など、時間・労力・熟練を要したが、定点の位置を経緯度で示すことが出来た。さらにこの結果を簡便な GPS の機器に入力し、効率のよい調査ルートを選び、今後定点をナビゲートし、

迅速な調査が可能となった。現状の把握と、今後の動静を把握しうることは危機管理の上からも重要で、この調査結果は、医学のみでなく、行政上特に有意義であると考えられる。土地利用、地目、道路の位置等環境変化が生じても定点を確認でき、また調査者の交替が生じても、また調査者の人数が少なくとも、すなわち TPO に応じて、調査の継続が可能となった。今後ミヤイリガイの生息調査結果や、他の地理情報、管理すべき定点の追加・削減を客観的・整合性をもって判断できる。また定点に関係なく採集場所が確認できれば、このシステムにデータを追加することが可能である。

ここで作成された各種の地図は今後共同研究者が共有できるように早期の公表を検討している。その際、一般に普及しているソフトでまとめられるように加工したい。この方法の開発と結果の解析法により得られた知識を海外の浸淫地にも反映させ、実施し、さらに日本での利用を促進させるため、中国・メコン地域についても検討したい。なお中国とメコン流域の衛星画像を入手、地図代わりに使うために、画像に座標軸を付けて解析をはじめ、DPS カメラの結果も入れて、GIS と GPS と RS の統合に向けて、作業を進めている。

中間宿主貝の実験室内繁殖の結果、日本系・フィリピン系・中国系・日本住血吸虫症をそれぞれの地域の貝で飼育可能となったことは重要である。必要な貝の供給要請に答えうる状況となったことは、今後の日本住血吸虫症の対策、研究の発展に役立つものと考えられる。

#### E. 結論

甲府盆地におけるミヤイリガイの生息調査の全定点の経緯度を測定して、地図化が終了した。現在の生息密度の増大や、分布域の変化や拡大等その動向の監視体制の構