

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は残る。IBM では個体のアルゴリズムとパラメータを決定した後は各個体が勝手に生きるため、コントロール不能である。これは特にモデルを複雑にした場合に起こる問題であり、今後の課題として残る。

また、シミュレーションの結果の解釈はより重大な問題である。IBM の場合、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。そこで今後、ラカトシュの科学哲学に従い、ベイズ統計学の手法を用いながら 2 つのモデルの優劣を比較し、最善のモデルに近づく作業を継続する必要がある。

本研究では、インプットしたパラメータ（その平均確率、変動の幅）は出来るだけ過去の文献に基づくものとしたが、実際にはまったくデータがないものもある。また、作成したプログラムでは、全ての過程を IBM で表現することは困難で、IBM によらない stochastic approach や一部には deterministic approach を融合せざるを得なかった。

これらを考慮しながら、今後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が多くなり、修正が困難になる可能性もある。

感染症数学モデルにおいて、とりわけ IBM が有効である場合のひとつは、「宿主-病原体関係が局地的で、均一性が仮定できない場合」とされるが、今回作成した IBM による本シミュレーションの結果は、作成した IBM が基本的には住血吸虫症に有効な方法であることを示している。

今後、予防対策や予測に役立つモデルの開発のためには、本 IBM を修正しながら発展させたものが望ましい。流行地において、どのファクターをどれだけ変化させればどの程度有効な対策になるか、または撲滅を成功させることができるかなどをリアルに示すことが期待できる。

E. 結論

1) 住血吸虫症の数学モデルに部分的にでも IBM を取り入れることによって、実世界をリアルに反映したと考えられる結果が得られる

ことが明らかになった。IBM によるシミュレーションが、疫学像を推定または予想する上で有効な武器となる可能性が高い。

2) 住血吸虫症の流行に、人の住居と伝搬員の分布というふたつのファクターが重要な役割を担うことが明らかになった。人の住血吸虫病原体への暴露の推定において、人の行動の量的推定だけでは不十分である。

3) また、本研究では住血吸虫症に特化した伝搬数学モデルを開発することを目的としたが、その開発過程で、IBM による数学モデルの重要性が明らかになった。将来、急性から慢性に至るすべての感染症の検討に有効なより汎用性のある独自の IBM モデルを開発することは、健康危機管理の点から必須の作業である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

論文発表なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

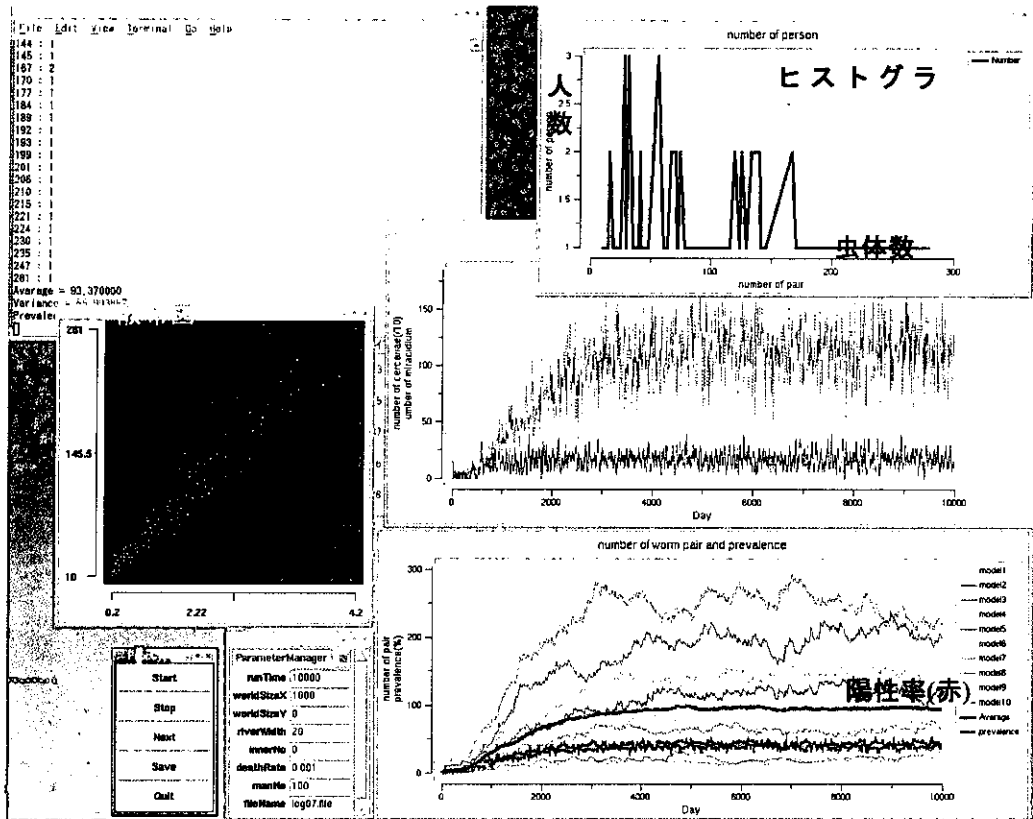


図 1

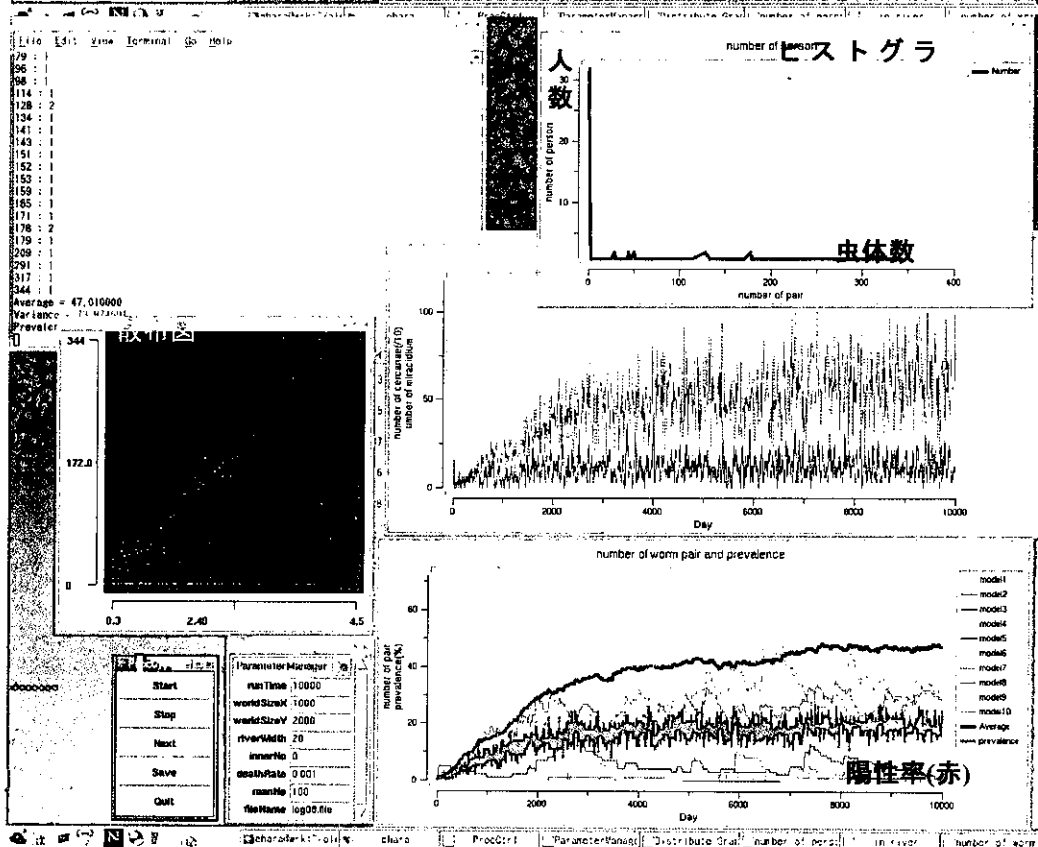


図 2

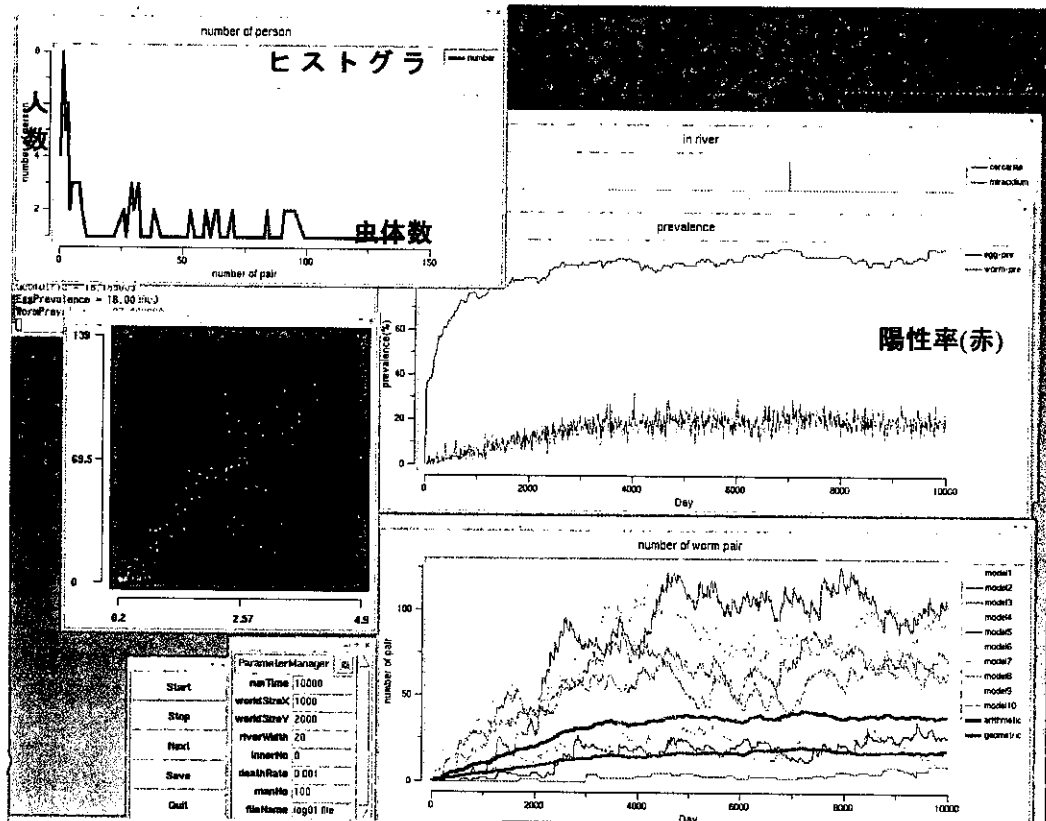


図 3

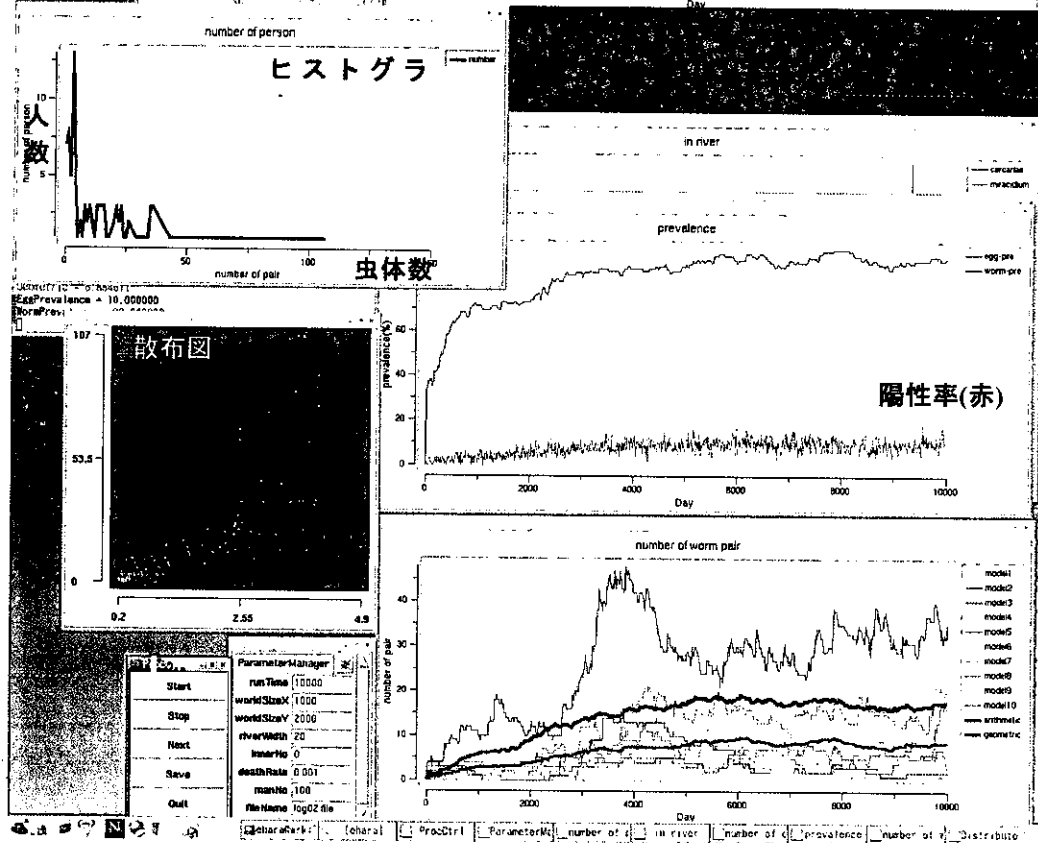


図 4

住血吸虫感染による凝固活性化因子（CILIP）誘導機構の解析

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）、
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）、
北 潔（東京大学大学院国際保健生物医科学）

研究要旨 昨年度までの研究で、我々は、マンスン住血吸虫（Sm）感染マウスの肝臓内虫卵性肉芽腫に多量に存在する痙攣誘発リポ蛋白(CILIP)が血液凝固活性化作用〔凝固第 X 因子(FX)活性化作用を示す procoagulant(PCA)] を有することをつきとめた。そこで、今年度は、この FX 活性化作用を指標として CILIP 誘導機構の解析を行い、以下の成績を得た。

- ① 感染マウスの腹腔内滲出マクロファージ(Mφ)を単独で培養した場合、マンスン住血吸虫成虫抗原（SWAP 抗原）の存在の有無に関わらず、Mφの FX 活性化 PCA 産生は低レベルであった。また、感染マウスの脾臓から分離したリンパ球は、SWAP 抗原の有無に関わらず、FX 活性化 PCA を産生しなかった。
- ② Mφに SWAP 抗原で刺激した非感染マウス脾リンパ球を添加すると、中程度の FX 活性化 PCA 産生が見られたが、SWAP 抗原で刺激した Sm 感染マウス脾臓リンパ球を添加した場合には、FX 活性化 PCA 産生が強く誘導された。
- ③ 感染マウスの脾リンパ球と SWAP 抗原を反応させ、その培養液（細胞を含まない）を培養 Mφ に添加しても FX 活性化 PCA は殆ど誘導されないが、感作リンパ球を Mφに添加すると、FX 活性化 PCA 産生が強く誘導された。
- ④ 感染マウスの脾臓リンパ球を細胞表面マーカーで分離精製し、Mφの FX 活性化 PCA 産生誘導を指標として解析したところ、CD4+ T cell および DX5+ cell が Mφの FX 活性化 PCA 産生を強く誘導することが明らかとなった。
- ⑤ CD4+Tcell を抗 CD3 および抗 CD28 モノクロナル抗体で刺激した培養上清、あるいは脾細胞を Con A で刺激した培養上清を Mφに添加すると、その FX 活性化 PCA 産生が強く誘導された。
- ⑥ 各種マウス・サイトカインを用いて解析を行い、IFN- γ や GM-CSF が Mφの FX 活性化 PCA 産生を強く誘導することが明らかとなった。
- ⑦ SWAP 抗原感作リンパ球で刺激した Mφの FX 活性化 PCA 産生を指標として、PCA 産生に関わるシグナル伝達経路の解析を行い、この Mφの PCA 産生には PTK および PKC の活性化が必要であり、サイクリック AMP の細胞内濃度の増加をもたらす試薬はこの PCA 産生を抑制することが明らかとなった。

以上の解析から、Mφが主として FX 活性化 PCA を産生していること、そしてこの PCA 誘導には宿主免疫機構が密接に関連していることが明らかとなった。また、この PCA 誘導には PTK および PKC シグナル伝達経路が関与していることが示唆された。

A. 研究目的

報告者らは Manson 住血吸虫 (Sm) 感染マウスの肝臓内虫卵性肉芽腫中に多量に存在する瘧疾誘発リポ蛋白(CILIP)の総合的理解に向けて解析を行ってきた。昨年度までの研究によって、CILIP が正常動物組織に広く分布する物質であり、その活性は住血吸虫をはじめ各種寄生虫感染によって強く誘導されること、さらには CILIP の作用機構を明らかにした。即ち、CILIP が血液凝固因子の第 X 因子を直接活性化する凝固活性化因子(PCA)であり、この作用が急激な血管内凝固(血栓形成)を引き起こし、その結果として循環不全、各種行動異常、さらには瘧疾といった症状が出現するものと考えられた。さらに、CILIP 自身がリポ蛋白であること、その活性発現には Ca^{2+} 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、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ことが推定された。そこで、今年度は、FX 活性化 PCA である CILIP の誘導機構に焦点を絞り、その機構解明を目的として研究を行った。

従来の PCA 誘導に関する研究では、マクロファージ(Mφ)が主として実験に使われていることから(1-5)、我々もチオグリコレートを腹腔内注射した C57BL/6J マウスの腹腔滲出 Mφ を用いて *in vitro* の解析を行った。まず最初に、①培養 Mφ に Sm 成虫抗原(SWAP 抗原)で刺激した Sm 感染 C57BL/6J マウス脾リンパ球を添加する系を用いて解析を行い、PCA 誘導機構の解析を行った。次いで、② PCA 誘導に関わるリンパ球亜集団を特定するため、Sm 感染マウス脾リンパ球を細胞表面マーカーで分離し、上記の実験系を用いて解析した。さらに、③各種サイトカインを培養 Mφ に加え、PCA 誘導に関わるサイトカインの特定を行った。そして、④腹腔滲出 Mφ を各種シグナル伝達経路に特異的な阻害剤で処理し、誘導される FX 活性化 PCA の変化を指標として、Mφ の PCA 産生誘導に働くシグナル伝達経路を特定した。

B. 研究方法

1. 実験動物

実験には C57BL/6J 雌マウス(感染時 5 週令)を用いた。また、感染マウスは C57BL/6J 雌マウスの皮下に 25 隻の Sm セルカリアを接種して作製した。

2. 試薬

リンパ球亜集団の分離には磁気標識抗体を用いた Macs 細胞分離システムを用いた。今回用いた磁気標識抗体は抗 mouse CD4 抗体、抗 mouse CD8 抗体、抗 mouse DX5 抗体、抗 mouse B220 抗体であり、Miltenyi Biotec (Gladbach Germany)から購入した。ウシ由来の精製第 X 因子は ICN Pharmaceuticals (Aurora, Ohio) から購入した。活性化第 X 因子測定用の人工基質 S-2222(Chromogenix 社製)は第一化学薬品(Tokyo, Japan)から購入した。リコンビナント mouse IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-12、GM-CSF は Peptotec EC(London, UK) から購入した。lipopolysaccharide (LPS)は *E. coli* 055:B5 由来のものを Calbiochem (Darmstadt, Germany)から購入した。培養液、細胞分離に用いた溶液は全てエンドトキシンを含まないものを使用した。また、培地作製に用いたウシ胎児血清(FCS)はエンドトキシン濃度が 0.1ng/ml 以下の Hyclone 血清を使った。

3. マクロファージ(Mφ)の分離

腹腔滲出マクロファージはチオグリコレートを腹腔内投与した C57BL/6J 雌マウスの腹腔内滲出細胞からプラスチックシャーレへの付着性を利用して分離精製した(6)。分離された Mφ の純度は 95~97%であった。また、生存率も 95%以上であった。分離した Mφ はフェノールレッドを含まない MEM medium/10% FCS/2mM glutamin/25 mM HEPES/1mM pyruvate /antibiotics で培養した。

4. 脾臓リンパ球の分離

マウス脾リンパ球は非感染及び Sm 感染 8-10 週の C57BL/6J 雌マウスから分離した。パーコール密度勾配遠心で分離した単核細胞からプラスチックシャーレへの付着細胞を除いたものをリンパ球として用いた。脾リンパ球の刺激に

は SWAP 抗原を用いた。T cell はリンパ球をナイロンウール・カラムにかけて分離した。リンパ球垂集団の分離には磁気標識抗体を用いる Macs (Miltenyi Biotec, Gladbach, Germany)細胞分離システムを用いた。CD4+, CD8+, B220+ および DX5+細胞はそれぞれ磁気標識抗 mouse CD4 抗体、抗 mouse CD8 抗体、抗 mouse DX5 抗体、抗 mouse B220 抗体を用いて分離精製した。分離したリンパ球はフェノールレッドを含まない MEM medium/10% FCS/2mM glutamin / 25mM HEPES/ 1mM pyruvate / antibiotics で培養した。

5. 凝固活性化因子(PCA)の活性測定

PCA 活性の測定は正常ヒト血漿、あるいは正常マウス血漿を用いた一段階法で測定した(7)。100 μ l のヒト、あるいはマウス血漿と 100 μ l のサンプルを混和し、37°C で 3 分間プレインキュベートし、100 μ l の 30mM CaCl₂ 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 \sim 10⁵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、各濃度の凝固時間を両対数グラフにプロットして標準曲線を作製し、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)。

FX 活性化 PCA 活性は精製したウシ由来第 X 因子と合成ペプチド基質 S-2222 を用いた二段階法で測定した(4)。サンプルは Ca²⁺の存在下で第 X 因子と混合し、37°C で 50 分間インキュベートし、ペプチド基質 S-2222 を加え室温で 10 分間反応させた後、10%酢酸で反応を停止し、ELISA Reader で比色定量した。

6. 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(8)。

C. 研究結果

1. CILIP 誘導機構の解析

① M ϕ による FX 活性化 PCA の産生

非感染マウスの腹腔滲出 M ϕ を単独で培養した場合、Sm 成虫抗原(SWAP 抗原)添加の

有無に関わらず、M ϕ は低レベルの FX 活性化 PCA を産生するにすぎない。また、感染マウスの脾臓リンパ球のみを培養した場合も、SWAP 抗原添加の有無に関わらず、FX 活性化 PCA 産生は認められなかった。これに対して、M ϕ に SWAP 抗原で刺激した非感染マウス脾臓リンパ球を添加すると、LPS(100ng/ml)を添加した場合と同様有意な FX 活性化 PCA 産生増加が観察され、しかも添加したリンパ球数に応じて FX 活性化 PCA 産生量の増加が観察された。さらに、SWAP 抗原で刺激した Sm 感染マウスの脾臓リンパ球を添加した場合には、著しい FX 活性化 PCA 産生の誘導が観察され、しかも添加リンパ球数に応じてその産生量が増加した。

② 感染マウスの脾臓リンパ球による M ϕ の FX 活性化 PCA 産生の誘導

感染マウスの脾臓リンパ球を SWAP 抗原存在下に一晚培養した培養上清(細胞を含まない)を M ϕ に添加しても FX 活性化 PCA 産生は殆ど誘導されなかったが、感作リンパ球を M ϕ に添加した場合には、強い FX 活性化 PCA 産生誘導が観察された。また、M ϕ を予め actinomycin D (1-10 μ g/ml)や cycloheximide(1-10 μ g/ml)で処理しておく、感作リンパ球を添加しても FX 活性化 PCA 産生は殆ど認められなかった(表 2)。

③ 感染マウスの脾臓 T cell の添加効果

Sm 感染マウスから脾臓 T 細胞をナイロンウールカラムで分離し、SWAP 抗原と共に培養 M ϕ に添加したところ、強い FX 活性化 PCA 産生が誘導された。

④ Con A 及び PHA-P で刺激した感染マウスの脾臓 T 細胞の添加効果

Sm 感染マウスから脾臓 T 細胞をナイロンウールカラムで分離し、Con A(2-20 μ g/ml)、あるいは PHA-P(1-10 μ g/ml)存在下に一晚培養した。T 細胞を回収し、培養 M ϕ に添加したところ、T 細胞数に比例して FX 活性化 PCA 産生量が増加した。

⑤ Sm 感染マウス脾臓 CD4+ T cell の添加効果

Sm 感染マウスの脾臓リンパ球を表面抗原マーカーで分離精製し、FX 活性化 PCA 産生誘導を指標として解析した。CD4+ T cell あるいは

DX5+ cell を SWAP 抗原と共に培養 Mφ に添加すると、強い FX 活性化 PCA の産生誘導が観察された。しかしながら、CD8+ T cell、B220+ B cell には Mφ の FX 活性化 PCA 産生を増加させる効果は認められなかった。

⑥ Con A で刺激した脾細胞培養上清の添加効果
非感染 C57BL/6J マウスの脾臓細胞を分離し、Con A 存在下に 72 時間培養し、培養上清を回収した。α-methyl mannoside (20 mg/ml) で Con A を不活化した培養上清を Mφ に添加すると、濃度依存的に FX 活性化 PCA 産生量の増加が観察された。

⑦ 抗 CD3 mAb および抗 CD28 mAb で刺激した CD4+ T cell 培養上清の添加効果
Sm 感染マウスの脾臓から分離した CD4+ T

cell を抗 CD3mAb および抗 CD28 モノクロナル抗体の存在下に 72 時間培養し、培養上清を回収した。これを培養 Mφ に添加したところ、Mφ の FX 活性化 PCA 産生が強く誘導された。

⑧各種マウス・サイトカインの添加効果

培養 Mφ に各種リコンビナント・マウス・サイトカインを加えて培養し、16 時間後の FX 活性化 PCA 産生量を比較検討した。培養 Mφ に IL-2、IL-4、IL-12 をそれぞれ単独で添加した場合、FX 活性化 PCA 産生は殆ど認められなかったが、同条件において IFN-γ や GM-CSF を添加した場合には、Mφ に LPS を添加した場合とほぼ同じ程度、あるいはそれ以上の FX 活性化 PCA 産生が誘導された (表 1)。

表1. Mφ のFX 活性化PCA産生への各種サイトカインの添加効果

Condition	FX activating activity pmoles S-2222 hydrolyzed/mir
Mφ	5.6 ± 1.9
Mφ+Spleen cell/Con A/Sup	33.0 ± 2.5
Mφ+rmIFNγ	25.3 ± 3.3
Mφ+rmIL-2	4.0 ± 0.9
Mφ+rmIL-4	5.3 ± 0.8
Mφ+rmIL-12	6.2 ± 1.6
Mφ+rmGM-CSF	16.9 ± 1.0
Mφ+LPS	16.2 ± 1.3
Mφ+rmIFNγ+rmIL-2	25.0 ± 1.3
Mφ+rmIFNγ+rmIL-4	35.3 ± 2.9
Mφ+rmIFNγ+rmIL-12	29.3 ± 1.8
Mφ+rmIFNγ+rmGM-CSF	49.4 ± 0.8
Mφ+rmIFNγ+LPS	41.4 ± 4.7

2. CILIP 誘導に関わるシグナル伝達機構の解析

① Protein Kinase C (PKC) 阻害剤の効果

Mφに Phorbol myristate acetate (PMA)を加えてもMφのFX活性化PCA産生は増加しないが、H-7(>50μM)、calphostin C(>0.1 μ M)、あるいはstaurosporine(>50nM)などのPKC inhibitorでMφを予め処理しておく、MφのFX活性化PCA産生は著明に低下した(表2)。

② Protein Tyrosine Kinase (PTK) 阻害剤の効果

Protein Tyrosine Kinase (PTK) のインヒビターである genistein (>5 μ M) や lavendustin A (>1 μ M) で予め Mφを処理しておく、MφのFX活性化PCA産生は著明に低下した(表2)。

③細胞内 cyclic AMP 濃度を増加させる試薬の効果

forskolin (>10 μ M)、IBMX(>20 μ M)、あるいはDB cyclic AMP(>10 μ M)といった細胞内 cyclic AMP 濃度を増加させる試薬を培養 Mφに添加すると、MφのFX活性化PCA産生は著明に低下した(表2)。

④細胞内カルシウム濃度を低下させる試薬の効果

細胞内カルシウム濃度を低下させることが知られている TMB-8 (>10 nM)や verapamil (>10 nM) を培養 Mφに添加しても、MφのFX活性化PCA産生は殆ど変化しなかった。また、細胞内カルシウム濃度を増加させることが知られている Calcium ionophore A-23187(>1 μ M)を培養 Mφに添加すると、MφのFX活性化PCA産生は著明に低下した(表2)。

⑤ Calmodulin や MAPK の阻害剤の効果

Calmodulin や MAPK のインヒビターである W-7 (>5 μ M) や PD98059 (>0.5 μ M) を培養 Mφに添加しても、MφのFX活性化PCA産生は殆ど変化しなかった(表2)。

D. 考察

CILIP は、非感染動物では主として免疫組織に分布しており、その活性は低い水準に維持されている。通常、肝臓にCILIP活性が検出されることはないが、住血吸虫感染マウスでは、肝臓、脾臓、リンパ節、あるいは腸などに高い活性が検出されることから、

住血吸虫感染によってCILIPが誘導されるものと考えられる。さらに、虫卵性肉芽腫、あるいは脾臓やリンパ節に高いCILIP活性が検出されることは、宿主免疫反応がCILIP誘導に関わっている可能性を示唆していると考えられた。今年度の研究でも確認されたことであるが、リンパ球それ自身がPCAを産生することはなく、主としてMφがmRNA合成および蛋白合成を経てFX活性化PCAを産生していることが示された。Levyらは、LPSを加えた培養Mφにリンパ球を添加することで、MφのPCA産生が著しく増加することを観察したが(9)、我々もLPSを使った実験で確認した。この実験成績は、リンパ球それ自身がPCA産生をすることはないが、MφのPCA産生を高める作用、即ちプロモーター作用を持っていることを示唆している。今回、我々が解析したマソン住血吸虫感染マウスの実験系においても、リンパ球がMφのPCA産生に重要な役割を演じていることが明らかとなった。即ち、SWAP抗原で感作したSm感染マウス脾臓リンパ球がMφのFX活性化PCA産生を著しく増加させることが確認された。このことは、住血吸虫感染マウスにおいて、CILIPが虫卵性肉芽腫形成臓器、あるいは脾臓やリンパ節といった免疫組織に強く誘導されるという実験成績に一致するものであり、さらには住血吸虫感染によってSWAP抗原や虫卵抗原で感作されたリンパ球がMφのFX活性化PCA産生を誘導している可能性を示唆しているものと考えられた。

そこで、我々はこのMφのPCA産生の誘導に関連しているリンパ球を明らかにするため、Con A やPHA-PといったT cell mitogenで刺激したT cellをMφに添加した場合、あるいはSWAP抗原と共にT cellをMφに加えた場合、MφのPCA産生が強く誘導された。それ故、T cellがMφのFX活性化PCA産生にプロモーターとしての役割を演じている可能性が示唆された。さらに、脾臓細胞をその細胞表面マーカーによって分離して解析したところ、CD4+ T cellやDX5+ cellがMφのPCA産生を有意に増加させること、B220+ B cellやCD8+ T cellはMφのPCA産生を殆ど誘導しないことが明らかとなった。従って、T helper cell、NK cell、あるいは

表 2. Mφ のFX 活性化PCA産生への各種阻害剤の添加効果

	Concentration	% Inhibition
Mo+Lym/Ag	---	0
Mo+Lym+Cycloheximide	1 ug/ml	93.0
Mo+Lym+Cycloheximide	10 ug/ml	79.1
Mo+Lym+Actinomycin D	1 ug/ml	97.8
Mo+Lym+Actinomycin D	10 ug/ml	97.6
Mo+Lym/Ag+H7	50 uM	45.7
Mo+Lym/Ag+H7	200 uM	96.9
Mo+Lym/Ag+Calphostin C	100 nM	88.1
Mo+Lym/Ag+Calphostin C	500 nM	97.9
Mo+Lym/Ag+GF109203X	50 nM	10.0
Mo+Lym/Ag+GF109203X	250 nM	6.5
Mo+Lym/Ag+Staurosporin	10 nM	1.5
Mo+Lym/Ag+Staurosporin	50 nM	22.8
Mo+Lym/Ag+Genistein	5 uM	9.8
Mo+Lym/Ag+Genistein	20 uM	52.6
Mo+Lym/Ag+Lavendustin A	1 uM	74.8
Mo+Lym/Ag+Lavendustin A	5 uM	81.0
Mo+Lym/Ag+forskolin	10 uM	79.4
Mo+Lym/Ag+forskolin	100 uM	86.4
Mo+Lym/Ag+IBMX	20 uM	21.4
Mo+Lym/Ag+IBMX	100 uM	49.1
Mo+Lym/Ag+DBcAMP	10 uM	15.8
Mo+Lym/Ag+DBcAMP	100 uM	61.9
Mo+Lym/Ag+PD98059	0.5 uM	1.9
Mo+Lym/Ag+PD98059	2.5 uM	1.0
Mo+Lym/Ag+W-7	5 uM	3.9
Mo+Lym/Ag+W-7	25 uM	0.4
Mo+Lym/Ag+TMB-8	10 nM	1.6
Mo+Lym/Ag+TMB-8	50 nM	3.5
Mo+Lym/Ag+Verapamil	10 nM	15.8
Mo+Lym/Ag+Verapamil	50 nM	19.3
Mo+Lym/Ag+A23187	1 uM	11.1
Mo+Lym/Ag+A23187	10 uM	44.8

NKT cell といったリンパ球系細胞が Mφ の FX 活性化 PCA 産生誘導に働いていることが推定された。

一方、Con A で刺激した非感染マウス脾臓細胞の培養上清、あるいは抗 CD3 及び抗 CD28 モノクロナル抗体で刺激した Sm 感染マウス脾臓 T cell および CD4+ T cell の培養上清が Mφ の FX 活性化 PCA 産生を強く誘導することが明らかとなった。従って、

何らかのサイトカインが Mφ の PCA 産生誘導に働いている可能性が推定された。そこで、培養 Mφ に各種リコンビナント・マウス・サイトカインを添加したところ、IFN- γ および GM-CSF が Mφ の FX 活性化 PCA 産生を有意に増加させることが明らかとなった。これに対して、IL-2、IL-4、IL-12 は単独投与では殆ど Mφ の PCA 産生を誘導することはな

かった。しかしながら、IL-4 を IFN- γ と共に添加すると、IFN- γ 単独の場合よりも PCA 産生量が約 50% 増加した。さらに、IFN- γ と GM-CSF の両者を添加すると、FX 活性化 PCA 産生量は各々の単独投与時の産生量の合計にほぼ一致することが明らかとなったことから、これらのサイトカインはそれぞれ違った機構を介して働いている可能性が示唆された。現在までに検討したサイトカインは僅か 5 種類にすぎず、他のサイトカインがこの M ϕ の PCA 産生誘導に働いている可能性は否定できないが、IFN- γ および GM-CSF が共に T cell から分泌されるサイトカインであり、これらのサイトカインが T cell による M ϕ の PCA 産生誘導に働いている可能性が推定された。しかし、リンパ球による PCA 産生誘導をサイトカインだけで説明できるかどうかについては現時点では評価できていない。

抗原感作リンパ球で刺激した M ϕ の FX 活性化 PCA 産生に関わるシグナル伝達機構の解析を行い、この PCA 産生には PTK、PKC の活性化が必須のものと推定された。同様な成績は LPS で刺激した M ϕ や血管内皮細胞の PCA 産生でも観察されており(1,10)、PCA 産生の基本的なシグナル伝達機構は外来刺激の種類に関わらず差がないことを示している。しかしながら、我々の解析している M ϕ の PCA 産生機構には calmodulin や MAPK の活性化は必要でないことが示唆されたが、LPS 刺激による M ϕ の PCA 産生には MAPK の活性化が必須とされており(11)、我々の成績と明らかな違いを示している。LPS は M ϕ 表面の CD14 リセプターに結合することが知られているが、我々が解析している PCA 産生誘導ではサイトカイン・リセプターの I 型や II 型、あるいは CD40 などがリセプターとして働いている可能性が考えられており、両者の違いがリセプターの違いを反映したのと考えられることは可能であるかもしれない。

Phorbol myristate acetate (PMA) は PKC の agonist と考えられており、PMA は血管内皮細胞や肺胞 M ϕ による PCA 産生を誘導することが報告されている(1,10)。しかし、腹腔滲出 M ϕ では PKC 依存性の PCA 産生が認められるにもかかわらず PMA による PCA 産生の誘導は観察されていない(12)。我々の解析しているリンパ球刺激による腹腔滲出 M ϕ の FX 活性化 PCA 産生では PMA が

M ϕ の PCA 産生に抑制的に働くことが明らかとなった。このような違いの原因は分かっていないが、基本的には実験に使った M ϕ の違いによるものと考えられる。

サイクリック AMP の細胞内濃度を増加させる試薬の添加で、培養 M ϕ の PCA 産生が著明に低下した。同様な観察は血管内皮細胞の PCA 産生でも観察されており(2)、cyclic AMP 依存性の機構(例えば A キナーゼなど)が PCA 産生に抑制的に働いている可能性を示唆しているものと考えられた。

我々は、Sm 感染マウスの肝臓、脾臓、リンパ節、腸に大量の凝固活性化因子(CILIP)が存在することを報告してきたが、このことは、マンソン住血吸虫感染が引き金となってこれらの組織に凝固活性化因子(CILIP)が誘導されたことを意味している。多量の凝固活性化因子が組織内に存在することは播種性血管内凝固症候群(DIC)に近似した病態ととらえることは可能であろう。実際、エジプトで行われたマンソン住血吸虫症患者の血液凝固関連因子の測定によって(13-17)、血液凝固異常が広く住血吸虫症患者に認められること、さらにはこの血液凝固異常が DIC の診断基準に一致するものであることが明らかとなっている。

住血吸虫症においては、食道静脈瘤からの出血が主要な死亡原因と考えられており、本症の疫学上重視すべき病態と考えられている。この食道静脈瘤形成、あるいはその破裂には肝臓内虫卵性肉芽腫形成に伴う門脈圧亢進が主要な役割を演じているが、血液凝固異常もまた食道静脈瘤破裂による大量出血の原因の一つとして重要視されるべきものである。しかし、この血液凝固異常がどのような機構で誘導されるかについては殆ど明らかとはなっていない。Amer らは、マンソン住血吸虫症患者血清中のエンドトキシン、TNF α 、さらには IL-1 α レベルが上昇していることから(18)、これらの物質が血管内皮細胞、あるいは M ϕ に働き PCA を誘導している可能性を指摘している。我々は、CILIP に関する一連の研究から、成虫、あるいは虫卵抗原で惹起された宿主の過剰ともいえる免疫反応が直接またはサイトカイン分泌を介して M ϕ に働き、その PCA 産生を誘導する機構が最も重要と考えている。この機構が働くことによって、M ϕ の PCA 産生が飛躍的に増大し、凝固活性化因子である CILIP が大量に組織に

存在する状況を作り出し、さらには持続的な血栓形成による DIC に近似した病態形成が行われているものと推定している。

E. 結論

マンソン住血吸虫感染マウスの肝臓内虫卵性肉芽腫、脾臓、リンパ節、あるいは腸に大量に存在する凝固第 X 因子(FX)活性化リポ蛋白の誘導機構の解析を行い、①Mφが主としてこの FX 活性化 PCA 産生に働いていること、②SWAP 抗原で刺激した CD4+Tcell および DX5+NKcell が Mφに働き、その FX 活性化 PCA 産生を強く誘導しうること、③IFN-γ および GM-CSF といったサイトカインが Mφの FX 活性化 PCA 産生を強く刺激すること、④この Mφの FX 活性化 PCA 産生には PTK および PKC の活性化が必要であること、⑤細胞内 cyclic AMP 濃度の増加はこの PCA 産生を抑制することが明らかとなった。従って、CILIP の産生には組織内マクロファージが主要な役割を果たしているが、宿主の免疫反応がその産生誘導に深く関わっていることが明らかとなった。

F. 引用文献

- 1)Car, B., et al. (1990) *Inflammation* 14: 681-689.
- 2)Chung, SW., et al.(1995)*J.Gen.Virol.*, 76: 1181-1187.
- 3)Maier, RV., et al.(1981)*J. Immunol.*, 127:1596-1600.
- 4)Shands, JW. (1983) *Blood*, 62: 333-340.
- 5)Shands, JW. (1985) *Blood*, 65: 169-175.
- 6)Schwartz, BS., et al. (1981) *J. Immunol.*, 127: 438-445.
- 7)Tsao, BP., et al. (1984) *J. Exp. Med.*, 159: 1042-1057.
- 8)Bradford, MM. (1976) *Anal. Biochem.*, 72: 248-253.
- 9)Levy, GA. and Edgington, TS. (1980) *J. Exp. Med.*, 151: 1232-1244.
- 10)Yang, Z., et al. (1994) *Inflammation*, 18: 221-233.
- 11)O'Connell, GM., et al. (2001) *Blood*, 98: 1429-1439.
- 12)Kucey, DS., et al. (1991) *Infect. Immunol.*, 60: 1244-1248.
- 13)Amin, HM., et al. (1994) *Haemostasis*, 24: 22-26.
- 14)El-Bassiouni, NE., et al. (1997) *Haemostasis*, 27: 39-48.
- 15)El-Bassiouni, NE., et al. (1997) *Blood Coagul. Fibrinol.*, 9: 189-194.
- 16)Omran, SA., et al. (1994) *J. Clin. Pathol.*, 47: 502-504.
- 17)Omran, SA., et al. (1995) *Haemostasis*, 25: 218-228.
- 18)Amer, AM., et al. (1994) *Blood Coagul. Fibrinol.*, 5: 789-793.

G. 健康危険情報

なし

H. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Fukao, T., Tanabe, M., Terauchi, Y., Ota, T., Matsuda, S., Asano, T., Kadowaki, T., Takeuchi, T., Koyasu, S. PI3K mediated negative feedback regulation of IL-12 production in DCs. *Nature Immunology* 3(9): 875-881. 2002.
- (2) Asahi, H., Ohmae, H., Sy, OS., Tanabe, M., Matsuda, H., Kanazawa, H., Yamada, H., Kajima, J., Ohta, N. Detection of specific antibodies in the urine as markers of human *Schistosoma japonicum* infection. *Proceedings of 10th International Congress of Parasitology*, 303-305. 2002.

2. 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
マンソン住血吸虫卵性肉芽腫に存在する瘧疾誘発リポ蛋白(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) Tanabe, M.
The induction of convulsion-inducing lipoprotein (CILIP) by *Schistosoma mansoni* infection is dependent on PTK and PKC activation. 第 72 回日本寄生虫学会、平成 15 年 3 月。
- (3) Asahi, H., Ohmae, H., Sy, OS., Tanabe, M., Matsuda, H., Kanazawa, H., Yamada, H., Kajima, J., Ohta, N. Detection of specific antibodies in the urine as markers of human *Schistosoma japonicum* infection. *10th International Congress of Parasitology*, 平成 14 年 8 月。
- (4) Fukao, T., Tanabe, M., Terauchi, Y., Ota, T., Matsuda, S., Asano, T., Kadowaki, T., Takeuchi, T., Koyasu, S. PI3K-Mediated Negative Feedback Regulation of IL-12 Production in Dendritic Cells 第 32 回日本免疫学会、平成 14 年 12 月。

(5) Yamazaki, M., Okada, E., Matsumoto, T., Okamoto, R., Nakamura, T., Kanai, T., Tanabe M., Takeuchi, T., Watanabe, M. Transfer of highly interleukin-7 receptor expressing mucosal T cells into immunodeficient mice induced chronic severe colitis. 第102回 Annual Meeting of the American Gastroenterological Association, 平成14年5月.

(6) Yamazaki, M., Okada, E., Okamoto, R., Nakamura, T., Kanai, T., Tanabe, M., Takeuchi, T., Ishikawa, H., Watanabe, M.

Transfer of highly interleukin-7 receptor expressing mucosal T cells into immunodeficient rag2^{-/-} mice induced chronic severe colitis.

第11回 International Congress of Mucosal Immunology, 平成14年6月.

I. 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 |

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

(H12—新興—18)

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

(共同研究者) 山梨県衛生公害研・梶原昭徳、麻布大・斉藤康秀、獨協医大・松田 肇
千種雄一・桐木雅史、パスコ GIS 総合研究所・嶋村竜太・金田弘幸、
国立国際医療センター・中村 哲

(要旨) 甲府盆地の定点調査について昨年度までに測量できなかった数箇所の定点の測量を行い 120 定点すべての位置を確定した。2002 年度生息調査の結果を図示し、それと地理情報と併せて潜在的生息地を抽出し、今後の定点の増減や位置を検討し監視体制の再構築を検討した。関東地方のかつての浸淫地である利根川流域や、ミヤイリガイが現在でも生息する千葉県小櫃川流域において野外調査を実施した。利根川流域については空中写真、衛星画像や既往資料に基づき地域を選定し調査したが、土地改良、護岸工事によって環境は変化しミヤイリガイの生息は認められなかった。千葉県小櫃川流域ではかつてのカイ生息範囲内の 6ヶ所の水田、休耕田、荒地で生息が確認され、監視すべき生息地として図下した。より効率のよい監視体制としてモバイル GIS の導入を試みた。世界の日本住血吸虫やメコン住血吸虫あるいはマンソン住血吸虫、ビルハルツ住血吸虫の中間宿主貝の飼育を開始・継続し、世界の住血吸虫が日本に侵入あるいは再興した際の対応に備えている。

A. 目的

昨年度報告したように、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。日本で最大の浸淫地であった甲府盆地においては県や衛生研究所、住民の協力で、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。感染症新法に基づき日本住血吸虫症の届け出義務がなくなり、安全宣言がなされたため撲滅対策を中止したが、地元住民の不安から、現在でもミヤイリガイの生息調査や感染の有無を検査している。これらの資料を収集し GIS の手法を用い

て、分布地域におけるミヤイリガイの生息面積や生息密度の消長を示し、効果的迅速な監視体制を検討した。

今回は出来上がった分布図をハザードマップとしてポケットパソコンに入れて、生息状況の変化を追う方法として、ArcPAD(ESRI)ソフトを用いたモバイル GIS を開発したい。

日本・中国・フィリピン・インドネシア各地の日本住血吸虫症中間宿主貝あるいはビルハルツ住血吸虫・マンソン住血吸虫の中間宿主貝を実験室内で飼育繁殖し、地域差の要因や、緊急時に対応できる方策を検討している。

B. 方法

山梨県のミヤイリガイ監視体制は昨年と同じ方法を踏襲した。すなわち山梨県衛生公害研究所では1996年から2000年まで、定点を120設定し、生息調査を実施してきた。この結果をGISにより解析する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（機器借用：トリンブルジャパン）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を用いて、デジタルマップPFMを背景として、解析結果を図化した。今年度の採集結果に疑義があり、2002年度のミヤイリガイ採集数および、2001年と2002年の採集数の合計値、1996年から2002年までの採集数の年変化を図化した。

千葉県小櫃川流域のミヤイリガイ生息地の調査は小櫃川の下流から上流にかけて、徒歩あるいは携帯自転車でのべ5回調査した。1:25,000の地形図上に示された1985年当時の分布図を参照した。最後に10月、独協医大、麻布大、感染研のメンバーが集まり、Trimbleの機器を借用して調査し結果を図化した。

利根川流域については範囲が広いので、約1:20,000の、空中写真で環境を読みとり調査地域を選定した。また昨年度と同様フランスの衛星のSPOT画像や日本の衛星JERS-1画像を利用して、土地条件を検討した。

モバイルGISに持ち込めるArcViewと互換性のあるソフトウェアArcPadを、東芝GenioなどPDAのほかTrimbleのGPS搭載（日本国内では50cm誤差内）

PDAに入れての効用を検討して、詳細な調査を試みた。貝の生息は認められなかったが、デジタルカメラと合わせて、地図をクリックすると写真がパソコンに表現できるソフトウェアが開発され、野外調査への実用化を検討している。

なお昨年までに入手した衛星画像の一部は宇宙開発事業団の公募した陸域衛星ALOSに関わる事業で、今後も継続して共同研究が実施されている。この衛星は本研究班が立ち上げられた当時打ち上げられ、研究に利用できることになっていたが、延期され、やっと比較的近い時期に利用できる可能性が出ている。

C. 結果

山梨県甲府盆地のミヤイリガイ定点の位置の測量はTrimble Geoxplorerにより誤差50cm以内の測量を行ってきたが、土地改良事業や道路建設で位置のわかりにくい数点の測量を行い、120定点の確定作業を終了した。さらに60定点の図も作成終了した。ミヤイリガイの採集による生息調査の結果は今年度も山梨県公害衛生研究所梶原昭徳氏らから提供を受けた。120地点から60地点に減少して以来2年目の結果である。2002年の貝採集総数は1176で昨年と同様であったが、採集地点（位置）に変化が見られた。現存する生息地は山梨県韮崎市以南の白根、竜王、大草など釜無川以西の御勅使川その他の川の合流扇状地上であるが、今年は特に御勅使川以南の地域に高密度生息地があった。御勅使川以北は多くの寄生虫学関係者が10月から11月にかけて採集する地域で、採集が困難であるという情報が多かった。生息調査は11月から12月にかけて行われ、やはり数は少なかった。実際に減少したのか気候や人為的要因による一時的な現象なのか、検討・監視する必要がある。今年度の報告では、2002年の生息数の図と、

と、2001年と2002年の計の図を両方示した。

GISソフトを用いた定点調査結果の図化は、パスコのデジタルマップ Pasco Fresh Map 25000 (PFM、2002年発行)で行った。これは1:25,000デジタルデータと平成7年度及び12年度国勢調査データ(町丁字別集計、メッシュ集計)をセットにした製品で、今後貝の分布と他の要因とのGIS解析に利用できると考える。

1) 2002年の60定点別ミヤイリガイ採集数(図1)、2) 2001年および2002年の採集数の合計(図2)、3) 過去7年間の採集数の変化の3枚(図3)をいずれもA3サイズ、Jpegファイルで作成した。

今回は図にかつての生息地で、現在でも地形、土壌、地下水位の高い自然条件にあり、水田が残存している地域を、ミヤイリガイの潜在的な生息地として図化した(図2)。今後この範囲での貝の監視体制が必要である。

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、生息地域は制約された。現在ではかつてのカイ生息範囲内の6ヶ所の水田、休耕田、荒地で生息が確認された(図4)。

利根川流域については空中写真、衛星画像や既往資料に基づき、かつての貝の生息地域を選定し、貝の生息調査経験の豊富な9人の研究者で調査した。Trimble社のGPS(誤差50cm)付ポケットPCを用い、モバイルGISを試みた。しかし土地改良、護岸工事によって水位も約2m下がり、河川敷は乾燥し、環境も変化しており、貝は発見できなかった。最後に乳牛の住血吸虫症が発見されて以来、乳牛の河川敷での飼育が控えられていたが、利根川の茨城県側の堤外地では再び飼育されていた。検便の結果は陰性であった。

さらに今後より簡便な監視体制の開発

を検討している。

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。

ミヤイリガイの監視体制の構築のため定点位置の測量を開始したが当初の計画より時間と労力を要した。その最大の要因は、道路建設、宅地化に基づく土地利用の変化で、定点の位置の確認が不可能になったことがあげられる。その点からもGPSで位置を確認することは重要である。ただこれには時間、労力、精密機器などを要するが、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、GIS等の分野の専門家が集まり、詳細な調査を実施し、民間のGISのアドバイザーの協力があつたからこそ監視体制の構築が可能となった。さらにこれは簡便なGPSの機器付のポケットPCおよびそのソフトウェアの開発によるものである。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、調査の継続が可能となった。さらに今回は新しく更新されたデジタルマップと、国勢調査の結果を利用できる資料が容易に入手できた。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。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可能である。

メコン流域についても画像の解析を始めたが、この対象範囲を一部の研究者によって指摘されているミャンマー地域に拡大する予定である。またアフリカのケニヤ周辺の事例についても考慮している。

中間宿主貝は *Oncomelania* 属であるが、中国各地、フィリピン、日本で大きさ、形態等が異なり、その生息地の土壌条件は明ら

かに異なるため、実験室内で土壌の影響や、農作物に付着して日本に輸入された場合定着できるかをも含めて検討している。

E. 結論

2002年における甲府盆地のミヤイリガイ定点別生息調査結果を図化すると、1996-2001年に比し、採集数の地域差が認められた。御勅使川扇状地の北側の部分は減少し、南部は増加した。これらの傾向が今後も続くのか動向を監視する必要がある。

千葉県木更津周辺の小櫃川流域で、生息調査を実施した結果、1985年当時の分布域内ではあったが、6箇所の休耕田や荒地などでミヤイリガイの生息が確認された。

利根川流域については広域ゆえに衛星画像や空中写真によるリモートセンシングを利用し、またGPSによるGISの導入を開始した。利根川流域については護岸工事による築堤や灌漑排水溝渠の建設により、水位は低下し、ミヤイリガイ生息適地はほとんどなくなったと推定された。

今後もポケットPC(PDA)を導入したGISを用いて、ミヤイリガイの生息状況を効率よく監視すると同時に、日本住血吸虫のみでなく他の住血吸虫の侵入に備えて中間宿主貝の分類、生態、飼育法を検討している。

F. 健康危機管理情報

今年度の調査でも、甲府盆地のミヤイリガイの感染は認められなかったが、ミヤイリガイは生息範囲、密度を変えながら生息している。また小櫃川流域においても、新しい地域ではないが、未だ生息地は広い範囲に散在していることが分かった。これらの地域では今後とも分布状況を把握しておく必要がある。

G. 研究発表

1 二瓶直子(2003): 感染症の拡大を予測す

る。地理、48、74-83。

Nihei, N., Hashida, Y., Kobayashi, M. and Ishii, A.(2002): Analysis of malaria endemic areas on the Indochina Peninsula using remote sensing. JIID.

2 学会発表

二瓶直子・梶原昭徳・斉藤康秀・桐木雅史・千種雄一・松田肇・太田伸生(2002): GPS/GISによる甲府盆地のミヤイリガイ分布監視体制について。第71回日本寄生虫学会大会、3月29日

二瓶直子・小林睦生・関根智子・高阪宏行・土井睦雄・神谷正男(2002): 地理情報システムによる北海道エキノコックス症の空間的拡散の解析。第71回日本寄生虫学会大会、3月29日

小林睦生・前鼻三雄・二瓶直子・栗原毅(2002): 北海道留辺蘂町で見られた戦後マラリアに関する考察。第71回日本寄生虫学会大会、3月30日、伊勢原。

小林睦生・二瓶直子・佐々木年則・栗原毅(2002): メッシュ気候図による東北地方のヒトスジシマカの分布解析。第54回日本衛生動物学会、4月2日

橋田良彦・二瓶直子・小林睦生・高阪宏行・石井明(2002): インドシナ半島のマラリア分布指標としての植生指数NDVIについて。第54回日本衛生動物学会、4月3日

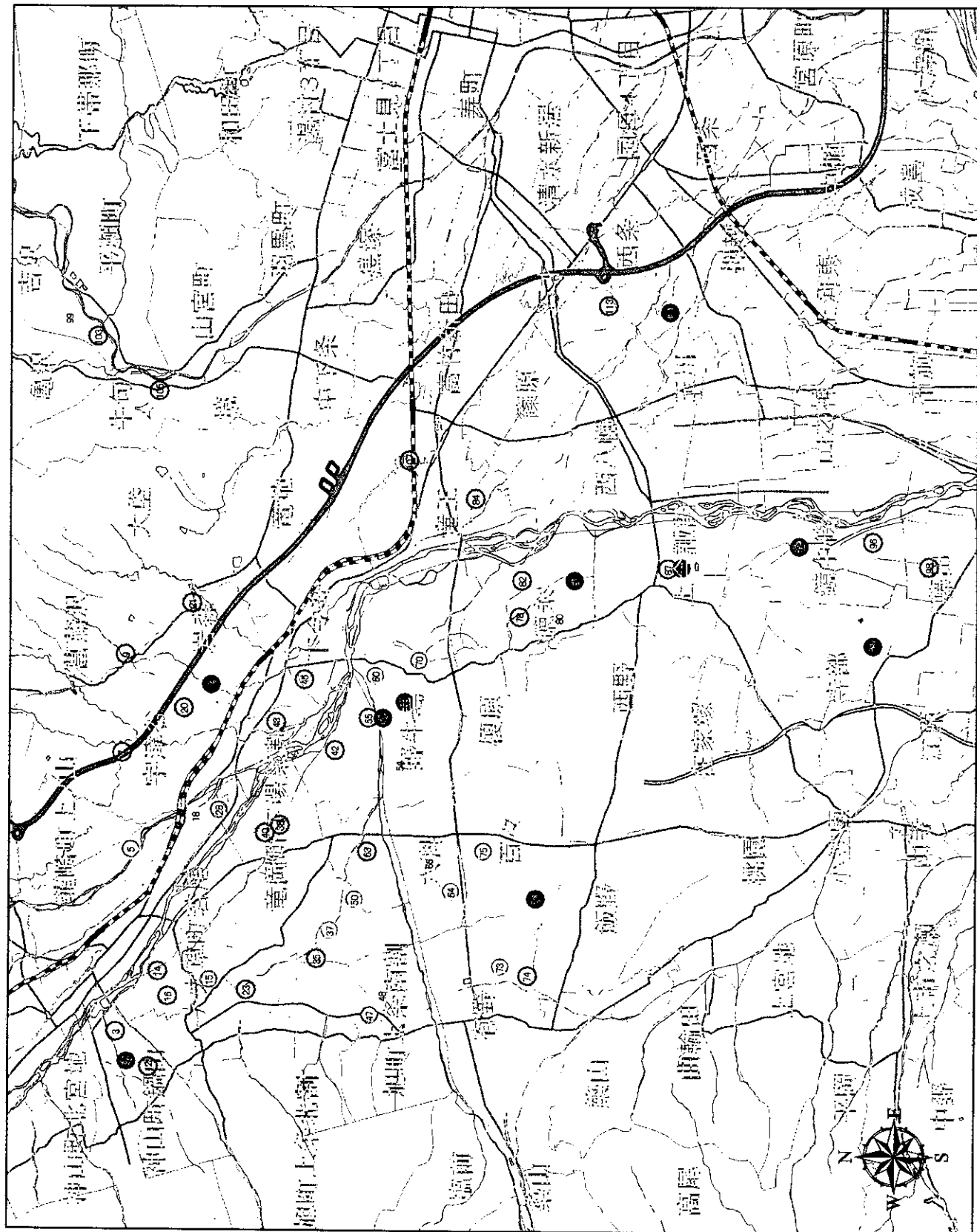
二瓶直子・吉田政弘・小林睦生・金田弘幸・嶋村竜太・高阪宏行・安居院宣昭(2002): 地理情報システムによる大阪府におけるセアカゴケグモの分布解析。第54回日本衛生動物学会、4月3日

の防圧戦略」集会、10月5日

二瓶直子・小林睦生・斉藤康秀(2002):モ
バイルシステムによるハマダラカ類の採
集地点の図化と地理情報収集の試み。第
54回日本衛生動物学会東日本支部大会、9
月28日

二瓶直子(2002):GISは流行発生予測に使
えるか。「節足動物媒介性疾患と媒介動物

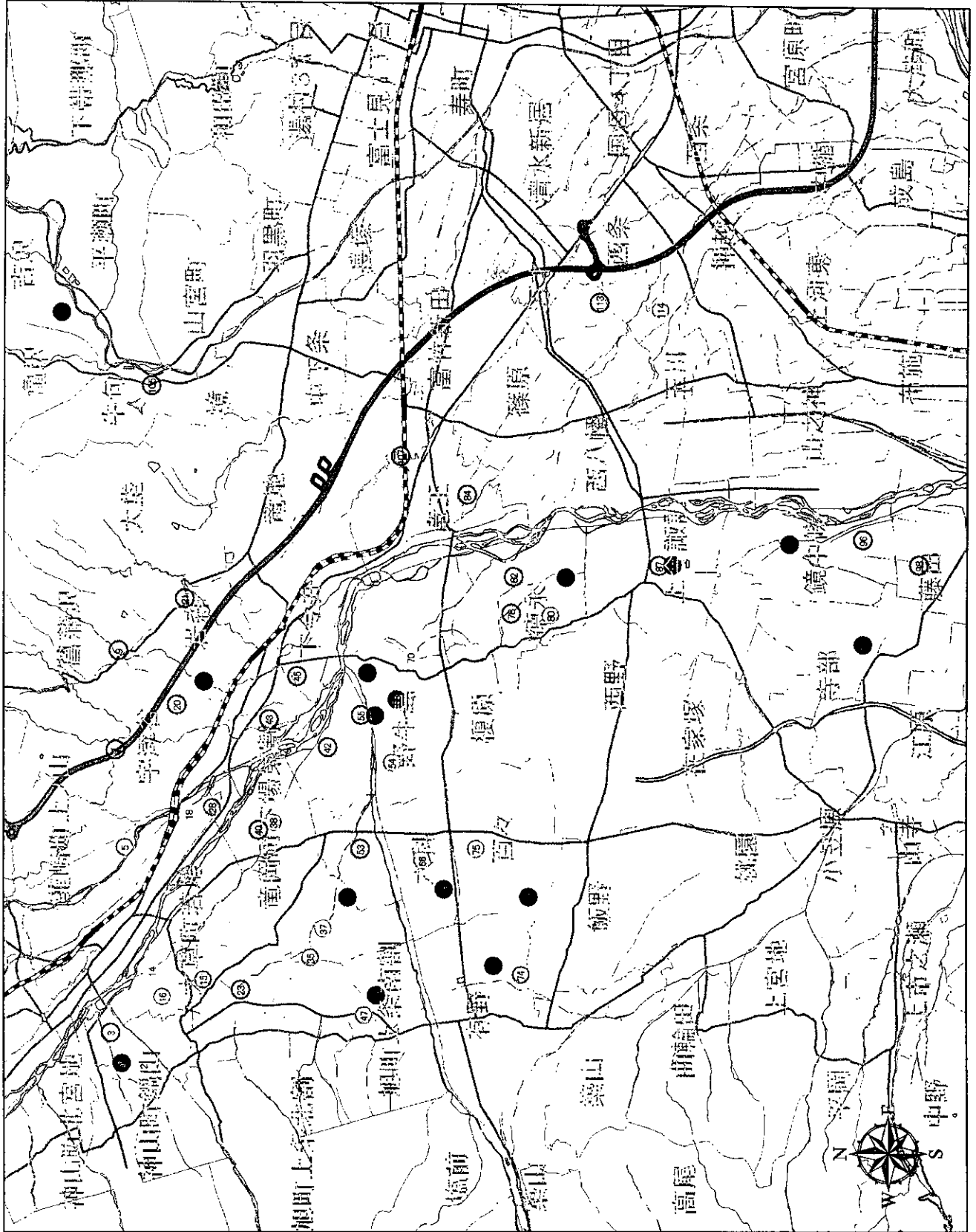
定点別マイリガイ生息数(2002年)








凡例

- 生息数(個数)
- 0
- 1-9
- 10-19
- 20-39
- 40-99
- 100-
- 鉄道
- 高速道路
- 主要道路
- 詳細道路
- 河川

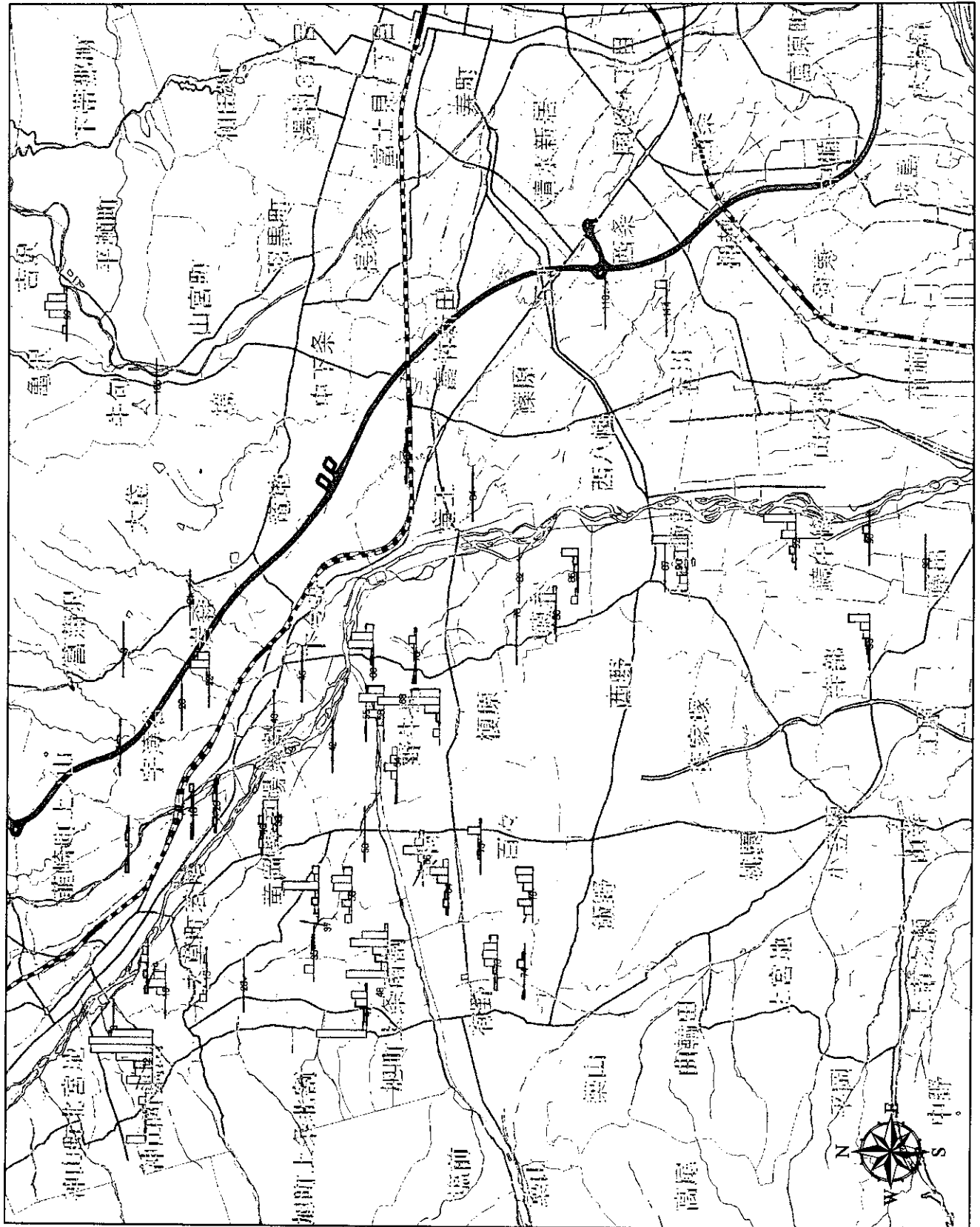
定点別マイリガイ生息数(2001、2002年)



凡例

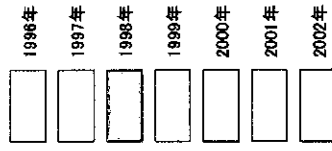
- 生息数(個数)
- 0-1
 - 2-19
 - 20-39
 - 40-79
 - 80-199
 - 200-
-  鉄道
 高速道路
 主要道路
 詳細道路
 河川

マイリガイ年度別生息数の変化(1996～2002年)



凡例

年度別生息数



- 鉄道
- 高速道路
- 主要道路
- 詳細道路
- 河川