

A. 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。本症における最も重要な病態は食道静脈瘤からの大量出血であり、本症での主要な死亡原因となっている。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、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。この痙攣誘発物質の精製を試み、この物質が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も広く分布している可能性が推定された。CILIPの効果発現機構の解析から、CILIPが血液凝固を活性化するprocoagulantであることが突き止められ、この作用が急激な血管内凝固（血栓形成）を引き起こすことにより各種行動異常や呼吸循環異常、さらには痙攣を引き起

こすものと推定された。二次元電気泳動法を用いた解析から、CILIP分子中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ことも明らかとなっている。さらに、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、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おり、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。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、CILIPが強く誘導されると考えている。

このようにCILIPに関する基本的な解析は進んでいるが、このリポ蛋白の生理機能、住血吸虫症の病態との関連性、構成アポ蛋白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、報告者らは、住血吸虫感染マウスの肝脾に誘導されるCILIPが強い凝固活性化因子であることから、本症における凝固異常、さらには肝の病変形成に関わっている可能性を推定し、CILIPの病態生理学的機能を明らかにするための解析を行ったので報告する。

B. 研究方法

実験動物

実験にはC3H、BALB/c、ICR、DBA/2、C57BL/6J雌マウス（感染時5週令）、Wister雌ラット（250g）を用いた。感染マウスは皮下に25~60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隻のセルカリアを感染させたICRマウスを準備した。CILIP投与実験には、25隻のセルカリア感染B6マウスを用いた。CILIPは感染の56~76日にかけて週6回投与し、1回あたりマウスの腹腔内にCILIPを10単位投与した。Anti-CILIP MoAb投与実験には、60隻のセルカリア感染BALB/cおよびB6マウスを用いた。感染マウ

スには、感染の 35~55 日にかけて 2 日に 1 回の頻度で精製した MoAb を腹腔内に投与し、1 回あたり蛋白量として 500 ug を投与した。

瘧疾誘発リポ蛋白(CILIP)および正常動物からの瘧疾誘発物質の精製

G-CILIP はマンスン住血吸虫感染 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、イヌ、そしてヒトの肺から瘧疾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。

CILIP 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 1 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 に対するモノクロナル抗体 (MoAb) の作製

MoAb は BALB/c マウス、あるいはラットに虫卵性肉芽腫から精製した G-CILIP を免疫して作製した。MoAb の 1st スクリーニングは G-CILIP を抗原とした ELISA で行い、2nd スクリーニングは CILIP の Procoagulant (PCA) 活性を阻害する効果を指標として抗体の選択を行った。MoAb は HiTrap Protein G HP カラム (アマシャム社製) で IgG を除いたのちに、HiTrap

IgM purification HP カラム (アマシャム社製) を用いて精製した。中和活性は抗体液と CILIP とを混合し、室温で 2 時間反応させ、その混合液の血液凝固活性化活性を調べて判定した。

Procoagulant (PCA) 活性および FX 活性化 PCA 活性の測定

G-CILIP の PCA 活性は正常ラット血漿を用いた一段階法で測定した。100 μ l のラット血漿と 100 μ 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 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) は正常ラット血漿に段階希釈 ($\times 1 \sim \times 10^5$) 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。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。サンプルは Ca²⁺ の存在下で第 X 因子と混合し、37 $^{\circ}$ 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。

Dot-ELISA 法を用いた MoAb の特異性の解析

粗抽出液の場合は、被検材料の蛋白濃度を調整し、ニトロセルロース膜に 0.4~15 μ g の蛋白を塗布した。また、精製した CILIP の場合には、0.02~15 μ g の蛋白を塗布した。塗布した膜は室温で 30 分間乾燥させ、洗浄後、ブロッキングを行った。抗 CILIP MoAb (5 μ g/ml) と反応後、HRP 標識抗ラット IgM 抗体 (ファーマインジェン製) を反応させ、DAB 反応を行った。

サンドイッチ ELISA 法

従来、CILIP の検出には FX 活性化 PCA 活性の測定を行ってきたが、どの方法を用いても常にその特異性が問題となっていた。そこで、CILIP

分子を直接定量することを目的として、マウス及びラット由来の2種類の抗 CILIP MoAb を用いたサンドイッチ ELISA 法の開発を行った。各種条件設定を行い、精製した CILIP を用いた場合、蛋白濃度で 10 ~1500 ng の範囲で測定が可能となった。Capture 抗体にはマウス由来の抗 CILIP MoAb (5.2 ug/ml) を用い、また detection 抗体には中和活性のあるラット由来の抗 CILIP MoAb (5.8 ug/ml)を用いた。

Western blotting による抗原活性分子の解析

CILIP 及び各種動物から精製した凝固活性化因子を SDS-PAGE、あるいは二次元電気泳動「一次元目には ImmobililineDryStrip (pH 3-10L 及び pH3-10 NL、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」で展開し、PVDF 膜に転写した。3% BSA/PBS でブロッキング後、抗 CILIP MoAb と反応させ、次いで HRP 標識抗ラット IgM 抗体(ファーマンジェン製)と反応させ、DAB 反応を行った。

肝臓内 DNA 量およびヒドロキシプロリン量の測定

肝臓組織を 10% トリクロロ酢酸中で破碎し、酸沈澱画分を脱脂し、DNA およびコラーゲン量の測定に用いた。コラーゲン量は、6N 塩酸で 110℃ 22 時間加水分解したサンプル中のヒドロキシプロリン量を Inayama ら(1978)の方法で比色定量する事で測定した。DNA 量は、4% 過塩素酸中で加温分解したサンプル中のデオキシリボースを比色定量することで測定した。

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。

倫理面への配慮

ヒトの肺組織は子宮ガンで死亡した 72 歳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。

C. 研究結果

各種系統マウスのマンソン住血吸虫感染による死亡率及び消化管出血の頻度

各種系統マウスにマンソン住血吸虫を多数感染 (60 セルカリア/マウス) させ、約 40 週間マウスの死亡率及び消化管出血の有無を観察した。その結果、消化管出血を高頻度に起こし高死亡率を示す系統 (C3H、BALB/c、ICR)、逆に消化管出血をほとんど起こさず低死亡率を示す系統 (DBA/2、C57BL/6J) が存在することが明らかとなった(図 1)。消化管出血に関連するリスクファクターを解析するため、高率に消化管出血を起こす系統と消化管出血を起こしにくい系統マウスの病態生理学的比較検討を行い、高率に出血を示す BALB/c マウスは出血を起こしにくい B6 マウスに比べ有意に高い肝組織内 CILIP 活性(図 2)及び肝線維化レベル(肝内ヒドロキシプロリン量高値)を示すことが明らかとなった(図 3)。

抗 CILIP MoAb の作製とその反応特異性

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 MoAb の作製を試み、BALB/c マウス由来の 75 クローンが抗体陽性であった。そのうち 6 株をクローニングした。一方、ラットから分離した抗体陽性クローン 31 株の中和活性を検討し、8 株が中和活性陽性であった。この内 4 株をクローニングした。マウスおよびラットからクローニングした抗体のサブタイピングを行ったところ、今回得られた全てのクローンは IgM クラスの抗体であることが判明した(表 1)。

これらのクローニングした抗体の中和活性を検討したが、マウス由来の 6 株はいずれも中和活性を示さなかった。これに対し、ラットから樹立した 4 つのクローンはいずれもマウス由来の G-CILIP や S-CILIP、あるいはイヌの肺から精製した凝固活性化因子の活性を低濃度で、しかも濃度依存的に阻害することが明かとなったが、ヒトやラットの肺から精製した凝固活性化因子の活性は阻害しなかった(図 4)。また、Dot-ELISA を用いて、ラットから分離した MoAb の

特異性を検討したが、この MoAb はマウスの血清や血漿とは反応せず、さらには正常マウスの脳から分離したトロンボプラスチンとも反応しないことが明かとなり、この MoAb が高い特異性をもった抗体であることが推定された。

中和活性のある MoAb が認識する分子の同定を目的として、WB を用いて解析を行った。ELISA や Dot-ELISA 法での反応性から十分検出できる量の CILIP を解析しているにも関わらず、この MoAb が SDS-PAGE や二次元電気泳動で分離したペプチドとは反応しないことが明かとなった。これは CILIP を電気泳動する際に各種表面活性剤を可溶化剤として加えるが、表面活性剤処理が CILIP の抗原活性を消失させている可能性が示唆された。そこで、各種表面活性剤で処理した CILIP の抗原性の変化を Dot-ELISA 法で調べたところ、12 種類の表面活性剤全てによって CILIP の抗原性が消失することが明らかとなった。

二種類の MoAb を用いたサンドイッチ ELISA 法による CILIP 分子の定量

従来、CILIP の検出には Procoagulant 活性の測定を行ってきたが、どの方法を用いても常にその特異性に問題があった。そこで、CILIP 分子を直接定量することを目的として、マウス及びラット由来の 2 種類の抗 CILIP MoAb を用いたサンドイッチ ELISA 法の開発を行った。予備実験で、capture 抗体の適正濃度を決定し、次いで detection 抗体の適正濃度を決定し、さらにビオチン標識抗ラット IgM 抗体、および HRP 標識ストレプトアビジンの使用濃度を決定した。その結果、capture 抗体の使用濃度は 5.2 ug/ml で、detection 抗体の使用濃度は 5.8 ug/ml と決定した。この条件で G-CILIP や S-CILIP の測定を行ったところ、蛋白濃度で 10-1500 ng の範囲で CILIP 濃度と吸光度との間に直線関係が得られ、この範囲内では CILIP の定量が可能であった。そこで、イヌの肺から精製した凝固活

性化因子の測定をこころみたと、測定可能であったが、ラットやヒトの肺から精製した凝固活性化因子の測定はできなかった(図 5)。

抗 CILIP MoAb 投与のマンソン住血吸虫感染マウスの肝線維化への影響

ラット由来の MoAb が低濃度で CILIP 活性を阻害することから、感染マウスにこの MoAb を投与した場合の肝線維化への影響を調べた。予備実験として行った実験の結果を図 6 に示した。この実験では MoAb を感染の 6~8 週にかけて 2 日に一度 BALB/c マウスの腹腔内に蛋白量として 500 ug を投与したが、感染 8 週目における肝臓内 DNA 量およびハイドロキシプロリン量に明らかな低下が認められた。しかし、本試験として行った実験では、MoAb を感染の 5~8 週にかけて 2 日に一度 BALB/c (図 7)および B6 (図 8)マウスの腹腔内に蛋白量として 500 ug を投与したが、両系統ともに感染 8 週目における肝臓内 DNA 量およびハイドロキシプロリン量に有意な低下は認められなかった。

マンソン住血吸虫感染マウスに CILIP を投与した場合の肝線維化への影響

感染マウスに CILIP を連続投与した場合に、投与マウスの病態や肝線維化にどのような変化が表れるかを明らかにするための解析を行った。CILIP は感染の 8~11 週にかけて 1 回につき 10 単位を週 6 回腹腔内投与し、感染 11 週における肝臓内 DNA 量およびハイドロキシプロリン量を対照群と比較した。その結果、CILIP 投与群において肝臓内 DNA 量およびハイドロキシプロリン量に有意な低下が認められた(図 9)。

D. 考 察

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ことは間違いないことと考えられる。しかし、エジプトの研究者達は、マンソン住血吸虫症患者には病態の進行に一致する血液凝固異常が存在することを明らかにしている。すなわち、マンソン住血吸虫症患者では、凝固時間の延長が認められ、血小板数、血漿フィブリノーゲン量や各種凝固因子量（ファクターII, VII, IX, X, XI, XII, XIII）、あるいは抗凝固因子量（protein C, protein S, anti-thrombin）の著明な低下、さらには、血管内凝固を反映する血清中 TAT、FDP、Ddimer レベルの著明な増加が観察されている。また、これらの患者には線溶系の亢進も認められており、これらの変化は DIC の診断基準に一致したものであることが明らかとなっている。しかも、このような変化が病態の進行とともに著しく憎悪すること、吐血既往者において最も強い変化が観察されることから、このような血液凝固異常もまた本症患者の食道静脈瘤破裂による大量出血の原因として重要視されるべきものと考えられる。

このような背景のもとに、報告者はまず消化管出血マウスモデルの作製を行った。各種系統マウスにマンソン住血吸虫を多数感染させ、死亡率及び消化管出血の有無を長期に渡り観察した。その結果、消化管出血を高頻度に起こし高死亡率を示す系統（C3H、BALB/c、ICR）、逆に消化管出血をほとんど起こさず低死亡率を示す系統（DBA/2、C57BL/6J）が存在することが明らかとなった。そこで、消化管出血に関連するリスクファクターを解析するため、高率に消化管出血を起こす系統と消化管出血を起こしにくい系統マウスの病態生理学的比較検討を行い、高率に出血を示す BALB/c マウスは出血を起こしにくい B6 マウスに比べ肝組織内 CILIP 活性が有意に高く、また有意に高い肝線維化レベル（肝内ヒドロキシプロリン量高値）を示した。この結果は、消化管出血と肝臓の線維化レベル、あるいは CILIP 活性との間に何らかの関連性があることを示唆しているものと考えられた。すでに報告者らは、マンソン住血吸虫感染マウス

に血液凝固阻害剤であるワーファリンを連続投与した場合、肺、肝臓、脾臓および腸間膜リンパ節の PCA 活性、あるいは第 X 因子活性化 PCA 活性が著しく低下すること、さらには肝臓内 DNA 量やヒドロキシプロリン量が有意に低下することを観察しており、CILIP の誘導と消化管出血や肝臓の線維化に密接に関連していることが推定される。しかし、具体的な機構については依然明らかではない。

従って、もし CILIP の誘導が肝臓での虫卵性肉芽腫形成やその線維化に関係していると仮定した場合、この CILIP の誘導を何らかの方法で阻害した時には、肝臓の虫卵性肉芽腫形成やその線維化に変化がみられるに違いないと考えた。先述したように、感染マウスにワーファリンを投与すると、投与マウスでは著しい CILIP 活性の低下が観察され、しかも肝臓内の DNA やヒドロキシプロリン量の有意な低下が観察された。このことは、血液凝固系の活性化が住血吸虫症の肝臓における虫卵性肉芽腫形成やその線維化に関連していることを示唆しているものと考えられた。そこで、より直接的に CILIP の作用を阻害するものとして、今年度は CILIP に対する MoAb の作製および MoAb の住血吸虫感染マウスにおける肝臓内虫卵性肉芽腫形成やその線維化への影響を調べた。そこで、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 MoAb の作製を試み、ラットからクローニングした4株がマウス由来の G-CILIP や S-CILIP、あるいはイヌの肺から精製した凝固活性化因子の活性を低濃度で、しかも濃度依存的に阻害することが明らかとなった。また、Dot-ELISA を用いた MoAb の特異性の検討で、この MoAb が高い特異的をもった抗体であることが推定され、この MoAb を用いたサンドイッチ ELISA で感度よく CILIP の測定が可能となった。しかし、この MoAb が SDS-PAGE や二次元電気泳動で分離したペプチドとは反応しないことから、これらの MoAb が CILIP の立体構造を認識する抗体と

推定された。ラット由来の MoAb が低濃度で CILIP 活性を阻害することから、感染マウスにこの MoAb を投与した場合の肝線維化への影響を調べたが、実験によって結果が一定せず、最終的な結論には至っていない。ただし、抗体の投与量や投与期間が十分でない可能性もあり、今後さらに検討を要する課題である。

一方、当初の予想では、CILIP を住血吸虫感染マウスに持続的に投与した場合、投与マウスはその病態が悪化し、より早くより多くのマウスに消化管出血といった致死的な病態が誘導されると予想していた。しかし、実際に CILIP をマンソン住血吸虫感染マウスに持続的に投与したところ、感染 77 日目の検査では、肝臓の湿重量、脾臓の湿重量が有意に低下し、肝臓の細胞浸潤の指標である DNA 量の有意な低下、さらには線維化の指標であるハイドロキシプロリン量の有意な低下が観察された。このことは CILIP が感染マウスの肝臓病変や線維化を抑制したことになるが、現時点ではその機構は明らかではない。しかし、強い procoagulant 活性を有する CILIP を腹腔内に連続投与したことから、腹腔内で凝固系が活性化し、その結果として凝固因子や抗凝固因子などが消耗し、肝臓での凝固系の活性化が十分に行われなくなった可能性はある。ところが、CILIP 投与群の腹腔内にはフィブリンの析出は認められたが、投与群と非投与群の血漿の凝固時間に差は認められなかったことから、この機構は考えにくい。他方、CILIP が何らかの免疫抑制効果をもっており、その結果肝臓の病変形成が抑制されたと考えることも可能であろう。この研究と平行して行っている CILIP に関する機能解析で、CILIP が LPS 投与マウスの septic shock に対して救命効果を示すことが判明しており、しかもその効果がマクロファージに対する機能抑制効果による可能性が考えられている。具体的に住血吸虫感染マウスにおいて CILIP 投与によるマクロファージ、あ

るいは他の免疫担当細胞の機能変化を具体的に検出できてはいないが、おそらく何らかの機能抑制が観察されるものと推定している。この点も来年度の課題の一つである。

従来の研究によって、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。CILIP 活性は感染を受けていない各種動物組織からも検出されるが、ヒトを固有宿主とする 3 種類の住血吸虫感染では、感染マウスの肝臓、脾臓、腸、あるいはリンパ節といった組織の CILIP 活性が著明に増加する。In vivo での CILIP 誘導メカニズムは依然理解できてはいないが、In vitro での解析では、マクロファージが CILIP 誘導において主要な役割を果たしており、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。それ故、住血吸虫に対する宿主免疫反応が CILIP の誘導に密接に関連していると推定されている。しかし、今年度の結果からは、CILIP が宿主の免疫機能を抑制している可能性が考えられ、理解が難しい状況に至っている。しかし、CILIP は数多くの蛋白および脂肪分子からなる巨大なリポ蛋白であることから、多機能性分子である可能性が考えられ、CILIP の機能を知るためにはより詳細な解析が必要と考えられた。

E. 結論

住血吸虫感染マウスの肝臓、脾臓、リンパ節、消化管に誘導される瘰癧誘発リポ蛋白 (CILIP) の病態生理学的機能、特に本症の肝病変形成や肝線維化過程における役割を明らかにするための解析を行い、以下の成績を得た。

各種系統マウスによって、マンソン住血吸虫感染により高頻度に消化管出血を起こし高い死亡率を示す系統 (C3H, BALB/c, ICR) とほとんど消化管出血を示さない系統 (DBA/2, C57BL/6J) が存在することが明らかとなった。この消化管出血の発生メカニズムを解析するため、高感受性および低感受性マウスの病態生理学的比較検討を行い、高頻度出血を示すマウス

は低頻度出血性マウスに比べ肝組織内 CILIP 活性が有意に高く、また有意に高い肝線維化レベル（肝内ヒドロキシプロリン量高値）を示したことから、CILIP が肝線維化や消化管出血に関連している可能性が示唆された。この可能性を検証するため、CILIP に特異的な MoAb の作製を試み、CILIP 活性を抑制しうる高い特異性を持った 4 種類の MoAb 「IgM (λ)」が得られた。しかし、この MoAb をマンソン住血吸虫感染マウスに投与し、その肝病変や線維化への影響を調べたが、はっきりした投与効果は観察されなかった。これに対して、感染マウスに CILIP を連続投与した場合、非投与群に比較し、肝湿重量、脾湿重量、肝線維化レベルに有意な低下が観察された。

以上の成績から、CILIP の病態生理学的機能を推測することはできないが、CILIP が住血吸虫症において肝病変や肝線維化過程において何らかの機能を果たしていることは間違いなさそうである。しかし、CILIP は数多くの蛋白および脂肪分子からなる巨大なリポ蛋白であることから、多機能性分子である可能性が考えられ、CILIP の機能を知るためにはより詳細な解析が必要と考えられた。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究協力者

永田博司（慶大・医・内科）、
関塚永一、宮崎耕司（国立埼玉・内科）、
小川 勝（国立埼玉・臨床検査）、
奈良武司、青木 孝（順天堂・医・寄生虫）、
北 潔（東大院・国際保健・生物医科学）

H. 研究発表

1. 論文発表

Tanabe M. Haemostatic abnormalities in schistosomiasis mansoni. *Parasitology International*, 52(4): 351-359, 2003.

Yamazaki M, Yajima T, Tanabe M. Fukui K, Okada E, Okamoto R, Oshima S, Nakamura T, Kanai T, Uehira M, Takeuchi T, Ishikawa H, Hibi T, Watanabe M. Mucosal T cells expressing high levels of IL-7 receptor are potential targets for

treatment of chronic colitis. *J Immunol.*, 171(3):1556-63, 2003.

2. 学会発表

(1) 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

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 |

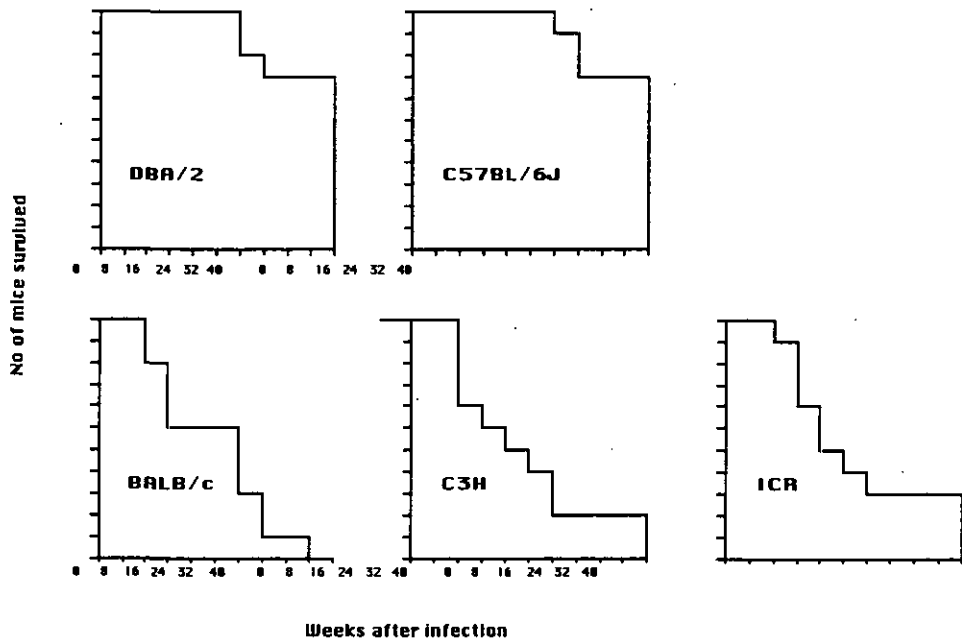


Fig 1 Survival rate of 5 strains of mice infected with *Schistosoma mansoni*

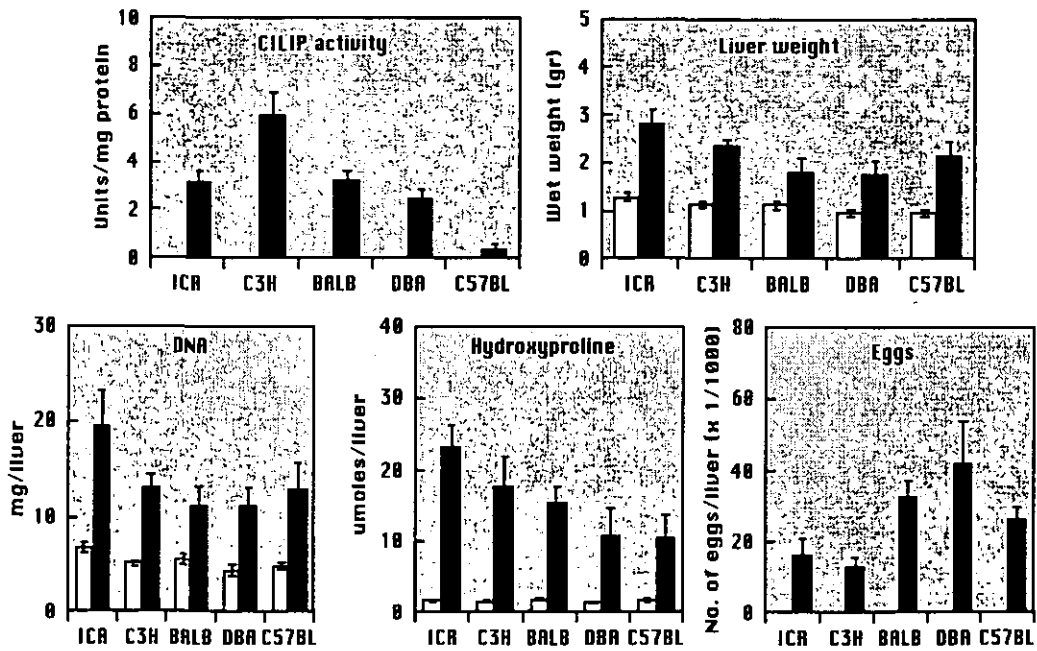


Fig 2 CILIP activities, liver weight, DNA and hydroxyproline contents, and number of eggs in the livers of 5 strains of mice 90 days after *Schistosoma mansoni* infection

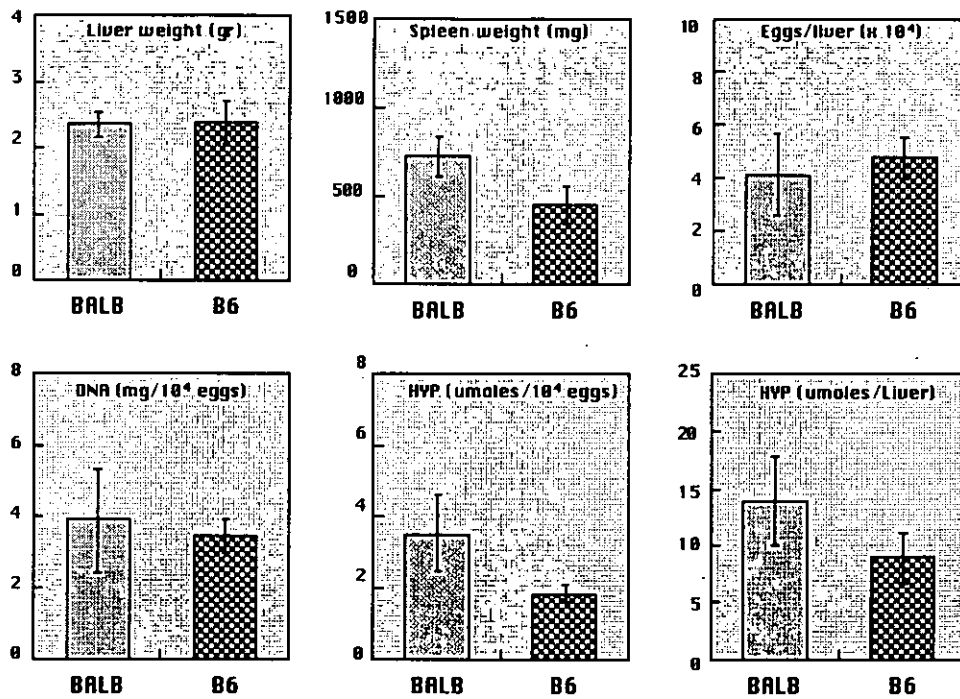


図3 Difference in various parameters of liver changes between BALB/c and B6 mice infected with *Schistosoma mansoni*

表1 モノクロナル抗体の Isotype

MoAb	Isotype	Origin
1 G5/10	Rat IgM (λ)	Wister Rat
2 G5/14	Rat IgM (λ)	Wister Rat
3 G4/14	Rat IgM (λ)	Wister Rat
4 G2/09	Rat IgM (λ)	Wister Rat
1 BaC1	Mouse IgM (κ)	BALB/c
2 BaC9	Mouse IgM (κ)	BALB/c
3 BbB2	Mouse IgM (κ)	BALB/c
4 BbF6	Mouse IgM (κ)	BALB/c
5 BcC1	Mouse IgM (κ)	BALB/c
6 BdD7	Mouse IgM (κ)	BALB/c

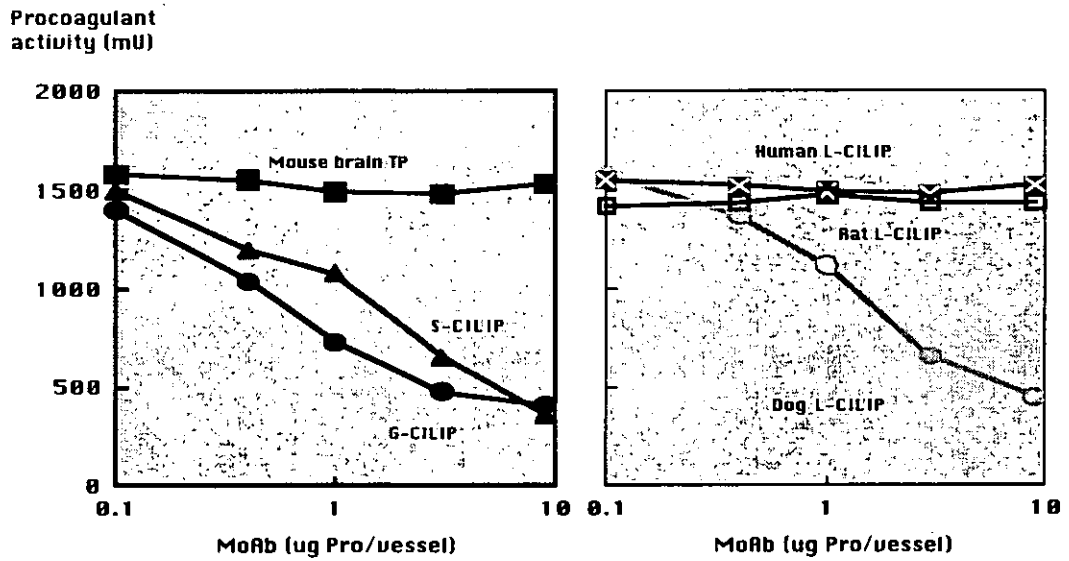


Fig 4 Effect of anti-CILIP monoclonal antibody on the PCR activity of CILIPs purified from various animals

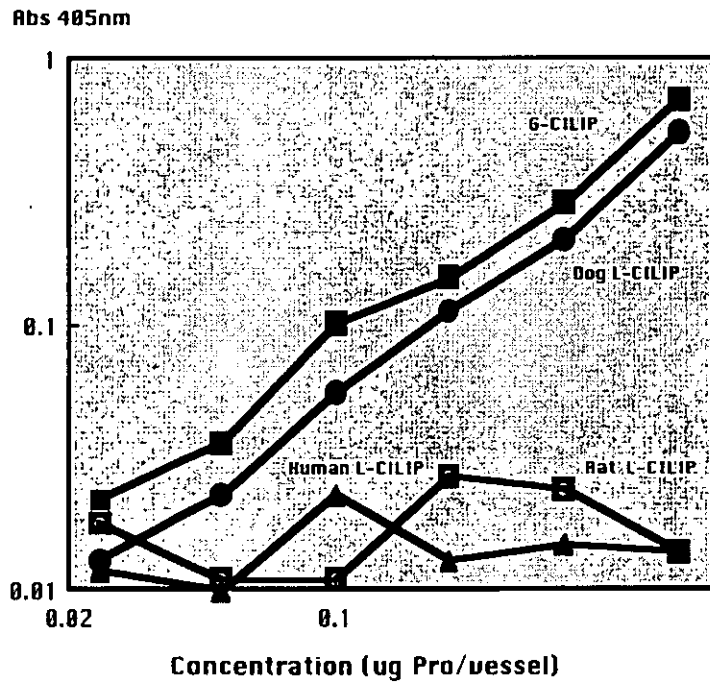


Fig 5 Quantitative determination of CILIP by sandwich ELISA

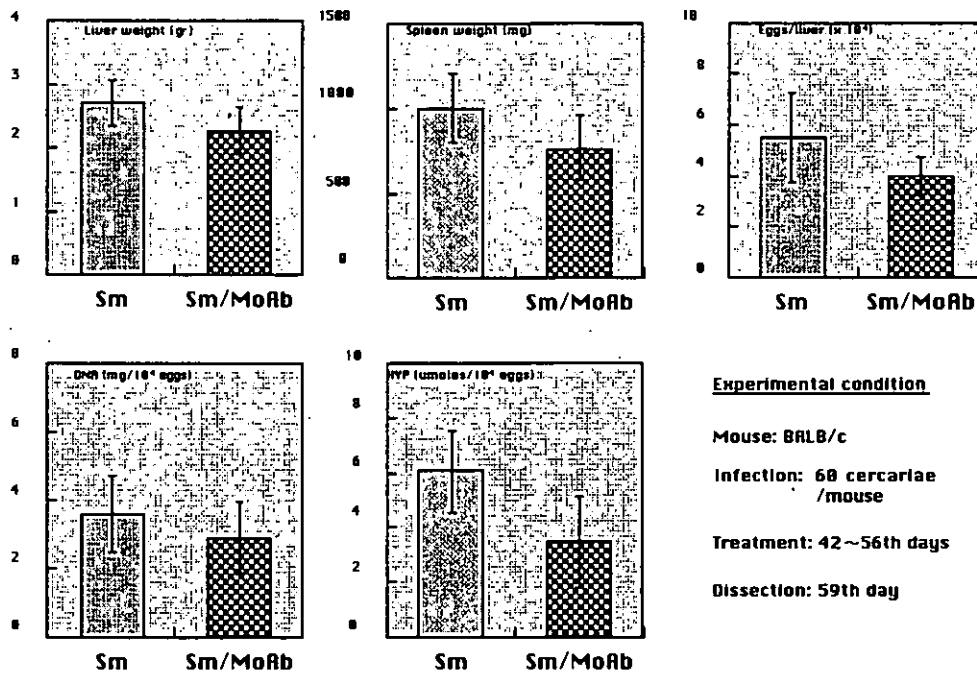


Fig 6 Effect of anti-CILIP MoRb administration on the liver fibrosis of BALB/c mice infected with *Schistosoma mansoni*

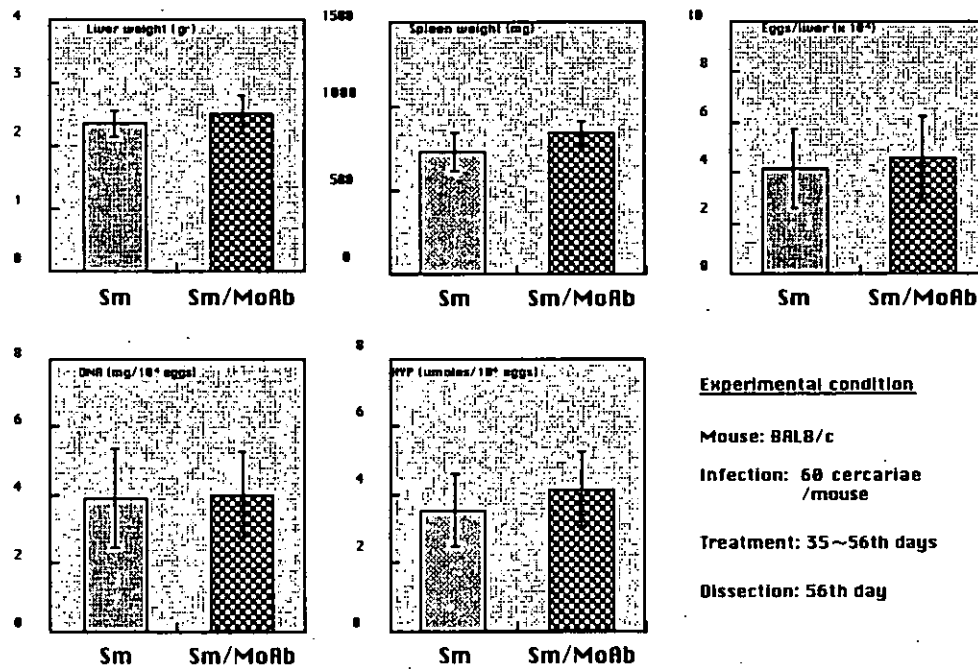


Fig 7 Effect of anti-CILIP MoRb administration on the liver fibrosis of BALB/c mice infected with *Schistosoma mansoni*

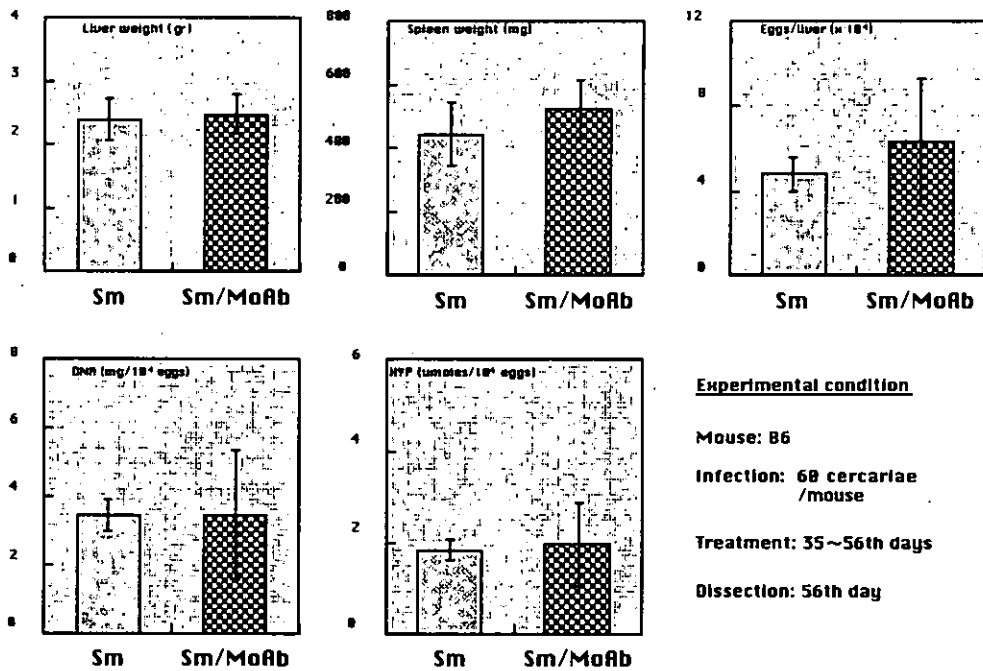


Fig 8 Effect of anti-CILIP MoAb administration on the liver fibrosis of B6 mice infected with *Schistosoma mansoni*

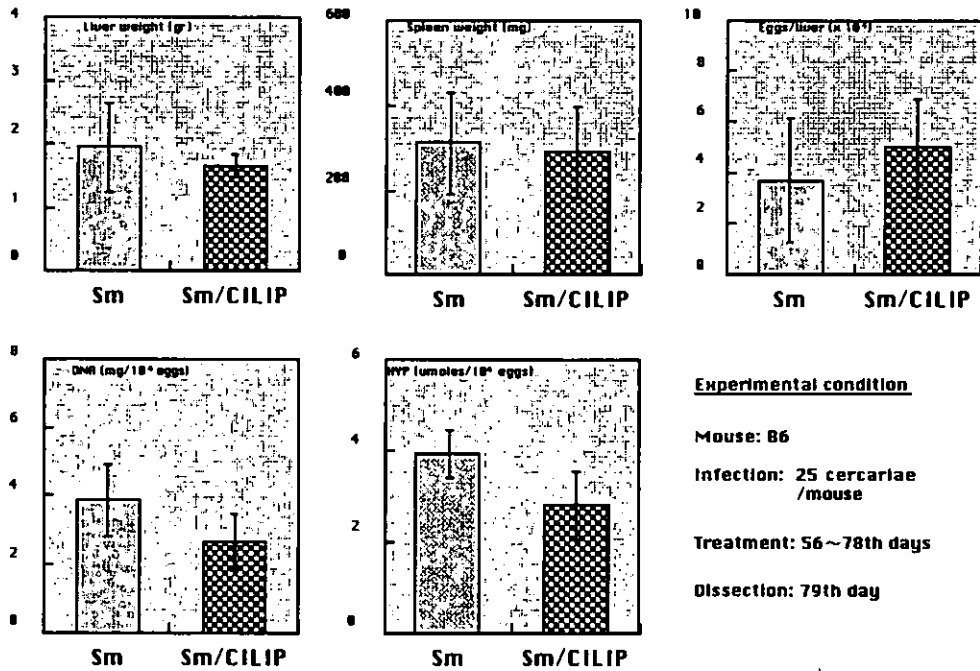


Fig 9 Effect of CILIP administration on the liver fibrosis of B6 mice infected with *Schistosoma mansoni*

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Osada Y, Anyan W K, Boamah D, Otchere J, Quartey J, Asigbee J R, Bosompem K M, Kojima S & <u>Ohta N.</u>	The antibody responses to adult-worm antigens of <i>Schistosoma haematobium</i> , among infected and resistant individuals from an endemic community in southern Ghana.	Ann Trop Med Parasitol	97	817-826	2003
Itoh M, <u>Ohta N.</u> , Kanazawa T, Nakajima Y, Sho M, Minai M, Zhou D, Chen Y, He H, He Y & Zhong Z.	Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay with urine samples: A tool for surveillance of schistosomiasis japonica.	Southeast Asian J Trop Med Public Health	34	469-472	2003
Kumagai T, El-Malky M, Maruyama H & <u>Ohta N.</u>	Effects of CpG oligonucleotides on <i>Schistosoma japonicum</i> infection in mice.	Nagoya Med J	46	99-110	2003
Minai M, Hosaka Y & <u>Ohta N.</u>	Historical view of schistosomiasis japonica in Japan: implementation and evaluation of disease-control strategies in Yamanashi Prefecture.	Parasitol Int	52	321-326	2003
<u>Ohta N.</u> , Kumagai T, Maruyama H, Yoshida A, He R K, Renli Z.	Research on calpain of <i>Schistosoma japonicum</i> as a vaccine candidate.	Prasitol Int	53		in press

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sekikawa, S., Kawai, Y., Fujiwara, A., Takeda, K., Tegoshi, T., Uchikawa, R., Yamada, M., Arizono, N.	Alterations in hexose, amino acid and peptide transporter expression in intestinal epithelial cells during <i>Nippostrongylus brasiliensis</i> infection in the rat.	International Journal for Parasitology	33	1419-1426	2003
有菌直樹	国内寄生虫の動向	治療学	37	567-570	2003
塩田恒三, 山田 稔, 内川隆一, 手越達也, 吉田幸雄, 有菌直樹	広節/日本海裂頭条虫の疫学的動向	Clinical Parasitology	14	in press	2003

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yu, S.H., Kawanaka, M., Li, X.M., Xu, L.Q., Lan C.G., Lin.R.	Epidemiological investigation on <i>Clonorchis sinensis</i> in human population in an Area of South China.	Jpn. J. Infect. Dis.	56	168-171	2003

別紙 5

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
平山謙二	住血吸虫を悪化させる宿主側の遺伝要因	医学のあゆみ	208巻2号	95-98	2004
Kanji Watanabe, Mihoko Kikuchi, Akio Ohno, Raafat Taha Mohamed, Takeshi Nara, Ratawan Ubalee, Masachika Senba, Takuya Iwasaki, Honggen Chen, Yoshiki Aoki, Kenji Hirayama	The miniature pig: A unique experimental model for <i>Schistosoma japonicum</i> infection.	Parasitology International	in press		2004

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
赤尾信明	十億人を悩ます鉤虫感染症 (翻訳)	日経サイエンス編集部	別冊日経サイエンス 世界を脅かす感染症とどう闘うか	日経サイエンス社	東京	2003	136-143

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
N. Akao M. Tomoda E. Hayashi T. Hara- Takayanagi K. Fujita	Cerebellar ataxia due to <i>Toxocara</i> infection in Mongolian gerbils	Veterinary Parasitology	113	229-237	2003
E. Hayashi N. Akao K. Fujita	Evidence for the involvement of the optic nerve as a migratory route for larvae in ocular toxocariasis in Mongolian gerbils	Journal of Helminthology	77	311-315	2003
N. Akao E. Hayashi H. Sato K. Fujita H. Furuoka	Diffuse retinochoroiditis due to <i>Baylisascaris procyonis</i> in Mongolian gerbils	Journal of Parasitology	89	174-175	2003

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Higashide, T. Akao, N. Shirao, E. Shirao, Y.	Angiographic and optical coherence tomographic features of presumed ocular toxocariasis in the adult macula	American Journal of Ophthalmology	136	188-190	2003
Satou, T. Akao, N. Koike, K. Watanabe, I. Fujita, K. Nikaido, T.	A new method for identifying potential remedies for larva migrans using crude drug extracts (1)	Natural Medicines	57	7-11	2003
Satou, T. Akao, N. Koike, K. Watanabe, I. Fujita, K. Nikaido, T.	A new method for identifying potential remedies for larva migrans using crude drug extracts (2)	Natural Medicines	57	23-26	2003
広岡昌史 堀池典生 金子恵理 阿部雅則 道堯浩二郎 坪井敬文 赤尾信明 恩地森一	肝内に多発性小結節像を呈した犬回虫症の1例	肝臓	5	237-242	2003
西浦博 角田隆文 赤尾信明	著明な好酸球増多を認めたタイ肝吸虫症の1例	感染症学雑誌	77	677-681	2003

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
吉川正英 城井 啓 王寺幸輝 美留町潤一 西村文彦 横田 浩 石坂重昭 米田 諭 松森篤史 山根佳子 安藤 稔 西村公男 山尾純一 福井 博 内山ふくみ 名和行文 赤尾信明	腸閉塞症状を来した旋尾 線虫幼虫 type X 感染例	奈良医学雑誌	54	43-47	2003
赤尾信明	ペットを介する病気—原 虫・蠕虫感染症—	小児科	44(5)	789-798	2003
赤尾信明	気になる病気 アニサキ ス症	日経ヘルス	6(4)	36	2003

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>Tanabe M</u>	Haemostatic abnormalities in schistosomiasis mansoni.	Parasitology International	52(4)	351-359	2003
Yamazaki M, Yajima T, <u>Tanabe M</u> , Fukui K, Okada E, Okamoto R, Oshima S, Nakamura T, Kanai T, Uehira M, Takeuchi T, Ishikawa H, Hibi T, Watanabe M	Mucosal T cells expressing high levels of IL-7 receptor are potential targets for treatment of chronic colitis.	J Immunol,...	171(3)	1556-1563	2003