

Figure 2C スナネズミ体内でのクマ回虫幼虫の移行動態

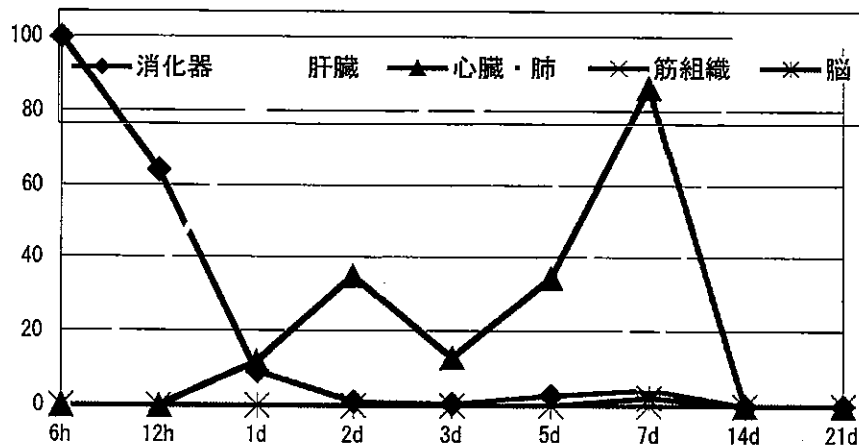


Figure 2D スナネズミ体内でのブタ回虫幼虫の移行動態

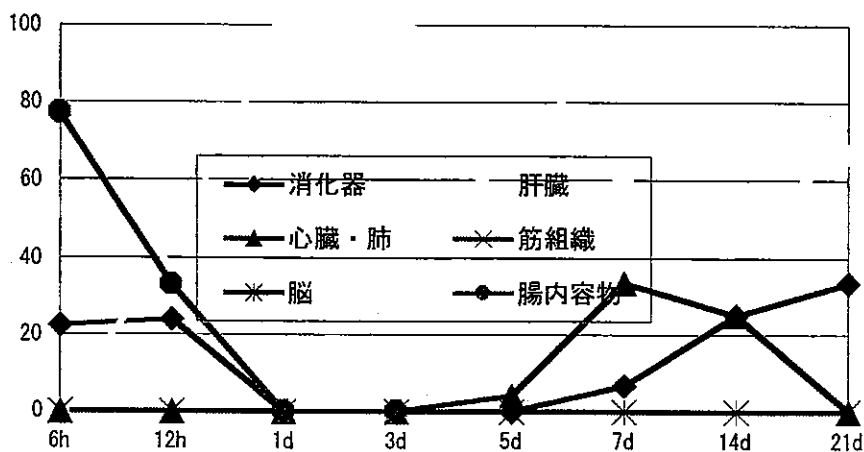


Figure 2E スナネズミ体内でのヒト回虫幼虫の移行動態

アライグマ回虫とクマ回虫では、腸管壁から侵入した幼虫は24時間以内に肝臓から心肺を経て、一部脳内に達するものも見られた。また肺臓では3日目以降重篤な出血性病変がみられた (Figure 3)。感染5日目以降、アライグマ回虫では脳内移行する幼虫数は筋肉内に移行する幼虫数を上回っていたが、クマ回虫では脳内に移行する幼虫よりも筋肉に移行する幼虫数が常に多く、全体の70%を超えていた。

イヌ回虫では、幼虫が肝臓から心肺に達する時期は3日目以降と他の回虫に比べて遅れる傾向にあった。ブタ回虫とヒト回虫では、幼虫は肝臓に速やかに達したあと5日まで肝臓内にとどまり、肺へと移行して出血性病変を惹起したが、1週間以降これらの病変は漸次消失した。感染

2週間以後、イヌ回虫とアライグマ回虫、クマ回虫では幼虫の大半は脳内と筋肉内から回収されたが、ブタ回虫とヒト回虫ではこれらの臓器をはじめ体内からは全く検出されなくなった。唯一、ブタ回虫を感染させた1匹のスナネズミの感染7日目の脳内から1隻の幼虫が発見されている。眼内に移行する幼虫も、実験期間中 (感染後3週間まで) これら2種類の回虫感染スナネズミでは確認することができなかった。

また、ブタ回虫とヒト回虫を比較すると、ブタ回虫はスナネズミの腸管壁に速やかに侵入して肝臓へと移行したが、ヒト回虫では腸管腔内にしばらく停留したのち腸管壁内に侵入し、肝臓へと移行した。そして感染後5日目まで肝臓内にとどまり、徐々に肺臓へと移行した。

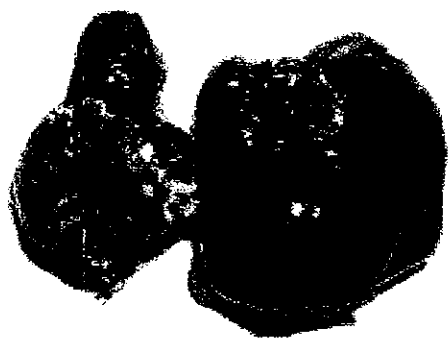


Figure 3 クマ回虫感染3日目のスナネズミ肺臓と肝臓

#### D. 考察

アライグマ回虫は国内の動物展示

施設の一部で感染が確認され、ヒトへの感染が懸念されている。ヒトに感染すると不可逆的で進行性の神経

症状を発症し致命的となる。また、網膜内に移行すると瀰慢性片眼性の網脈絡膜炎を起こし失明に至る。国内でも野生のアライグマが各地で繁殖し、その個体数を増加させているが、幸いなことに野生アライグマからはアライグマ回虫の寄生は、現在のところ確認されていない。しかし、アライグマ回虫と同属(*Baylisascaris*)のクマ回虫(*B. transfuga*)については、野生あるいは施設飼育下を問わず、またクマの種類(ツキノワグマ、ホッキョクグマ、ヒグマ)を問わず、その感染率が非常に高いことが報告されている。

これまでマウスにクマ回虫を感染させるとアライグマ回虫と同じような神経症状が発現する(Papini and Casarosa 1994; Papini, Renzoni et al. 1996)と報告されているが、その詳細については明らかではなかった。今回のICRマウスとBALB/cマウス、スナネズミを用いた感染実験から、クマ回虫の感染によって起きる神経症状はマウスでは一過性であったが、スナネズミではアライグマ回虫と同様の、進行的で不可逆性の重篤な神経症状を引き起こすことが明らかになった。また、病理組織学的検討から、アライグマ回虫やクマ回虫に感染したマウスでは、脳内の幼虫は肉芽組織で完全に被囊されていたが、

スナネズミでは幼虫周囲の病変は軽微であるにもかかわらず、小脳髄質に多数の脳軟化病巣と細胞浸潤がみられ、このような組織反応の違いが神経症状の差違となっていることが推測された。

スナネズミは眼トキシカラ症の有用な動物モデルであり(Takayanagi, Akao et al. 1999), 動物由来回虫の感染に対して特徴的な反応を引き起こすにもかかわらず、感染による幼虫の移行経路や感染によるスナネズミの病態に関して系統立った検討は全く行われてこなかった。我々がおこなった今回の感染実験から、スナネズミにアライグマ回虫を感染させると幼虫は最終的には脳内と筋肉内に移行するが、クマ回虫では70%近くが筋肉内に移行してしまい、脳内に寄生する幼虫はアライグマ回虫に比べて少ないことが判明した。また、ブタ回虫とヒト回虫の幼虫がスナネズミの中枢神経系に侵入する可能性はきわめて低く、また眼内へ移行した幼虫も皆無であったことから、これら2種の回虫によるスナネズミの眼感染症は起こりえないと考えられた。

## E. 結論

動物由来回虫を用いてスナネズミにおける病態発現を観察したところ、

クマ回虫の感染によって致死的な神経病変が引き起こされた。また、ブタ回虫とヒト回虫を感染させると、幼虫は最終的にスナネズミの体内からは検出できなくなり、慢性感染を引き起こすことはなかった。クマ回虫やアライグマ回虫、イヌ回虫を感

染させたときの脳内の病変の特徴は細胞浸潤を伴う脳軟化巣で、マウスとは異なった組織反応を示した。異なる種類の回虫感染に対して、スナネズミはそれぞれ少しずつ異なった感染態度を示すことが明らかになった。

#### F. 健康危険情報

該当項目なし

#### G. 研究論文

1. Ayi I, Akao N, Bosompemb KM, Akafo SK, Clarke J, Nyadore L, Apea-Kubi KA, Fujita K. Development of membrane-based tests for the detection of urinary antigens and antibodies in human toxoplasmosis: preliminary studies in Ghanaian patients. *Acta Tropica* 2005; **93**: 151-159.
2. Akao N. Zoonotic filariasis in Japan. In: *Asian Parasitology*. Tokyo: 2005: in press
3. Akao N. Critical assessment of existing and novel model systems of toxocariasis. In: *Toxocara: The Enigmatic Parasite*. 2005: in press
4. Ohnishi K, Kogure H, Kaneko S, Kato Y, Akao N. Strongyloidiasis in a patient with acquired immunodeficiency

syndrome. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2004; **10**:178-180.

5. Sato H, Matsuo K, Osanai A, Kamiya H, Akao N, Owaki S, Furuoka H. Larval migrans by *Baylisascaris transfuga*: Fatal neurological disease in Mongolian jirds, but not in mice. *Journal of Parasitology* 2004; **90**:774-781.

6. 赤尾信明 アニサキス症の現況と予防・治療 日本医事新報社, 4168: 113-114.

7. 赤尾信明. アライグマ回虫症. In: 共通感染症ハンドブック. 東京: 日本獣医師会, 2004: 82-83.

8. 赤尾信明. イヌ・ネコ回虫症. In: 共通感染症ハンドブック. 東京: 日本獣医師会, 2004: 88-89.

9. 赤尾信明. イヌからうつる寄生虫症—プライマリ・ケアのための寄生虫症および動物媒介疾患—. 治療 2004;86:102-106.
10. 嶋田雅暁, 赤尾信明, 石渡賢治, 奥祐三郎, 奥沢英一, 竹内勤, 名和行文, 西山利正, 原樹, 濱田篤郎, 堀尾政博 寄生虫に関する情報システム—プライマリ・ケアのための寄生虫症および動物媒介疾患—. 治療 2004;86:29-34.
11. 芦田敦子, 河内繁雄, 高本雅哉, 赤尾信明. 旋尾線虫幼虫によるcreeping diseaseの1例. 日本皮膚科学会雑誌 (0021-499X) 2004;114(7):1315
12. 嶋田雅暁, 赤尾信明, 石渡賢治, 奥祐三郎, 奥沢英一, 竹内勤, 名和行文, 西山利正, 原樹, 濱田篤郎, 堀尾政博 寄生虫に関する情報システム—プライマリ・ケアのための寄生虫症および動物媒介疾患—. 治療 2004;86:29-34.
13. 赤尾信明, 安藤勝彦, 中村 (内山) ふくみ, 川中正憲. ホタルイカ生食による旋尾線虫幼虫移行症の発生動向 1995~2003. 病原微生物情報 2004;25
14. 赤尾信明. 気になる病気 旋尾線虫症. 日経ヘルス 2004;7:35.
15. 飯野弘之, 並木美夏, 永井祐喜子, 酒井 勤, 神前賢一, 吉利 尚, 鎌田芳夫, 赤尾信明. トリアムシノロン併用硝子体手術が有効であった眼トキシカラ症の1例. 新しい眼科 2004;21:385-388.
16. 北山沙知, 兵地信彦, 木島敏樹, 岩井安芸, 高沢亮治, 松岡 陽, 大塚幸宏, 矢野雅隆, 増田 均, 藤井靖久, 川上 理, 小林 剛, 木原和徳, 赤尾信明 日本人に発症したビルハルツ住血吸虫症の1例. 泌尿器科紀要 2004;50:191-194.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当項目なし

厚生労働科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業)

分担研究報告書

大都市圏で拡大する広東住血線虫症の疫学調査  
中間宿主からの感染幼虫の発見

分担研究者 赤尾信明

東京医科歯科大学大学院国際環境寄生虫病学分野

共同研究者

林 栄治

東京医科歯科大学大学院国際環境寄生虫病学分野

研究要旨:大都市圏における広東住血線虫症の流行疫学を明らかにするため、終宿主となるネズミを捕獲し、その肺動脈内に寄生する広東住血線虫の寄生状況を調査した。また、感染ネズミが確認された地域での中間宿主の調査を実施した。今年度新たに2地点で捕獲されたドブネズミに感染が確認された。寄生率は100%~91%と極めて濃厚な感染がみられた。このうち1カ所で採取されたチャコウラナメクジ17匹から476隻の第3期幼虫が回収された。

**A 研究目的**

ネズミの肺動脈内に寄生する広東住血線虫はヒトに感染すると好酸球性髄膜炎を起こすことが知られている。感染経路は、成虫が寄生したネズミの糞便内に産出された第1期幼虫が中間宿主であるナメクジ類や陸生貝類内で感染幼虫にまで発育し、これをヒトが何らかの手段によって摂食することによって起きる。堀ら(1969, 1972)は川崎・横浜の港湾地区で捕獲されたドブネズミの1.8%, 品川晴海地区のドブネズミの10.7%に寄生がみられたと報告している。また、内田ら(1982)も第13号埋め立て地(現在のお

台場周辺)のドブネズミ129頭中11頭(8.5%)に寄生をみている。我々も昨年の調査で、東京都下21カ所で捕獲されたドブネズミ118頭から15頭の感染ネズミを見だし、ドブネズミ間での流行が20年前の状況と全く変わっていないことが確認された(Table 1)。陽性個体が見いだされた2地区での感染率はいずれも58%と100%と高率であり、汚染地区における感染密度の集積が生じていると考えられた。しかし、同時におこなった中間宿主の調査では感染幼虫を持つものを発見できなかったため、今回さらに調査地域を拡大するとともに中間宿主の調査

を継続することとした。

## B. 研究方法

### 1. ネズミの捕獲

昨年度と同様に、民間害虫駆除業者の協力を得て、東京都、神奈川県、千葉県内の12カ所で捕獲されたドブネズミ合計67匹について、捕獲後の個体を研究室に持ち帰り剖検した。開胸後、心臓と肺臓を摘出して実体顕微鏡下に肺動脈内を精査し、広東住血線虫の寄生の有無を検査した。

### 2. 中間宿主の調査

昨年度の調査で広東住血線虫の寄生を確認した2カ所のうちの1カ所（Figure 1 A地点）と、本年度の調査で寄生ネズミが確認された2カ所の地区（C および D 地点）で、中間宿主の調査を実施した。昨年度の調査と同様に、広東住血線虫の中間宿主として最も可能性の高いナメクジ類（特にチャコウラナメクジ）を対象として調査を実施した。採取されたナメクジは20～30個体ずつ細切し、人工消化液（0.5%ペプシン、0.7%塩酸）で1時間消化し、消化後の液の沈渣をペトリ皿に取り感染幼虫の有無を検査した。

## C. 研究結果

### 1. ネズミにおける広東住血線虫の寄生

### 状況

今年度の調査で新たに2カ所の地区のドブネズミから広東住血線虫の感染が確認された（C および D 地点）。A 地点と B 地点は昨年度の調査で寄生が確認された箇所であるが、今回再度 B 地点で調査を実施したところ、捕獲された11頭中5個体から成虫が回収された。C 地点は隅田川の堤防堤沿いに位置し、D 地点は多摩川河口の公園に隣接した広場で、現況は不要品が多量に投棄されていた。両地点ともに河川に面した場所であった。

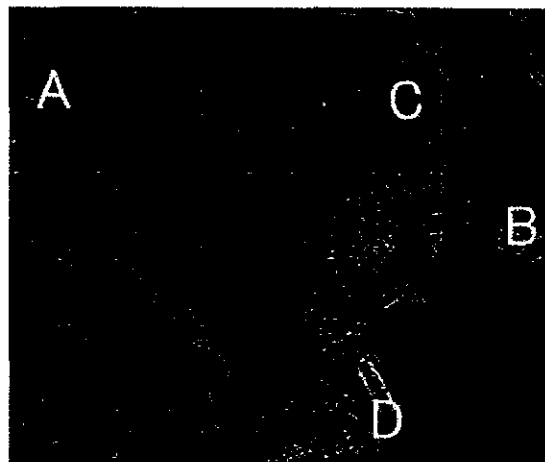


Figure 1 感染ドブネズミが確認された地点

C 地点で捕獲された1頭のドブネズミの肺動脈内に成虫が確認された。また、D 地点では24頭のドブネズミのうち22頭から広東住血線虫の寄生が確認され、この地区ではきわめて濃厚な流行が起きていると考えられた。

—

Table 1 平成15年度の調査地点とその検査結果

捕獲場所			捕獲日	捕獲個体	陽性個体数
<東京都>	千代田区	大手町地下鉄	01.7~	40以上	0
	品川区	港湾部	02.9	2	0
	台東区	ビル内	01.6	4	0
		上野公園	02.6	2	0
	豊島区	池袋駅前	02.8	18	0
		ビル内	01.8	10	0
		要町	03.6	4	0
	江東区	千川路上植込み	03.4	10	0
		新木場	03.2	1	0
		荒川河川敷	03.2	3	0
		路上植込み	03.4	12	0
	新宿区	ビル内	01.5	4	0
		高田馬場	01.11	1	0
		蒲田駅ビル	00.10	5	0
	大田区	住宅街	02.4,11	8	8
	<神奈川県>	横浜市	工場	01.5	8
戸塚区		駅周辺	01.9	5	0
平塚市		工場	01.5	2	0
<千葉県>	千葉市	若葉区	03.4	3	0
		都賀	03.6	7	0
	市川市	遊戯施設	01.4	12	7



Table 2 平成16年度の中間宿主調査地点とその検査結果

調査地点	捕獲場所	環境	調査日	捕獲 個体数	陽性 個体数	中間宿主調査	採取数	感染幼虫
A	西東京市	住宅街	02.April	8	8	チャコウラナメクジ	100	検出されず
C	墨田区	住宅地	04 August	1	1	チャコウラナメクジ	147	検出されず
D	浮島地区	公園	04 Sep	24	22	チャコウラナメクジ	27	検出

## 2. 中間宿主の調査

昨年度に感染ドブネズミが確認されたA地点と今年度に新たに感染の確認された2地点(C, D地点)の3カ所で中間宿主の調査を実施した。結果をTable 2に示した。採取できたナメクジはすべてチャコウラナメクジであった。

3地点で合計274個体のチャコウラナメクジが採取できた。このうち、D地点の3カ所で採取されたもののうち、1カ所17個体のチャコウラナメクジから476隻の広東住血線虫第3期幼虫(Figure 2)を回収できた。



Figure 2a チャコウラナメクジから人工消化法によって回収された広東住血線虫第3期幼虫

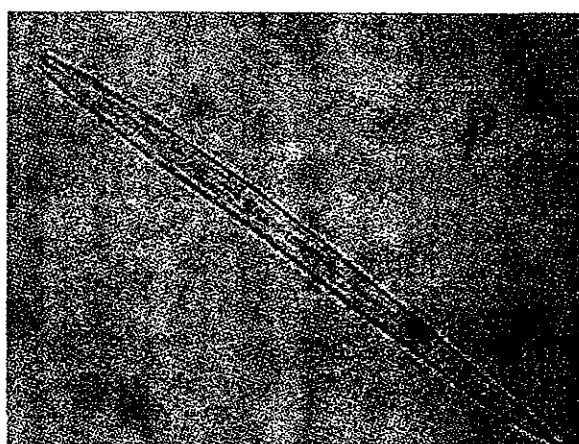


Figure 2b 固定後の感染幼虫

回収できた幼虫をラットに感染させたところ、糞便内に第1期幼虫を確認することができ、現在も継続して飼育観察中である。

## D. 考察

今回の調査で、多摩川河口の公園に隣接する地区のドブネズミにきわめて高率な広東住血線虫の寄生が確認され、同じ地点で採取されたチャコウラナメクジから本虫の感染幼虫を回収することができた。この地点は公園に隣接する空き地

であり、不特定多数のヒトが出入りすることができる地域であった。この地区での感染がいかんして起きたかについては今後のさらに調査を継続する必要があると考えられた。昨年までの調査で感染ネズミの存在は把握できていたが、感染源となる中間宿主からの感染幼虫は見つかっていなかった。今回の調査から、東

京都下のドブネズミの間で流行している広東住血線虫症の感染源としてチャコウラナメクジが重要であることが判明した。また、隅田川沿いにも感染ドブネズミの分布がみられ、さらに、昨年度の調査でも陽性であった市川市の遊戯施設周辺では未だ感染流行が見られることが明らかになった。

## E. 結論

東京都下の人口密集地で捕獲されたドブネズミに広東住血線虫の寄生が高率に認められ、チャコウラナメクジがその中間宿主として重要な役割を担っていることが判明した。

## F. 健康危険情報

多摩川河口域に生息するチャコウラナメクジに、ヒトに感染すると好酸球性髄膜炎を起こす広東住血線虫の感染幼虫を確認した。

## G. 研究論文

1. Ayi I, Akao N, Bosompemb KM, Akafo SK, Clarke J, Nyadore L, Apea-Kubi KA, Fujita K. Development of membrane-based tests for the detection of urinary antigens and antibodies in human toxoplasmosis: preliminary studies in Ghanaian patients. *Acta Tropica* 2005; **93**: 151-159.
2. Akao N. Zoonotic filariasis in Japan. In: *Asian Parasitology*. Tokyo: 2005: in press
3. Akao N. Critical assessment of

existing and novel model systems of toxocariasis. In: *Toxocara: The Enigmatic Parasite*. 2005: in press

4. Ohnishi K, Kogure H, Kaneko S, Kato Y, Akao N. Strongyloidiasis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2004; **10**: 178-180.
4. Sato H, Matsuo K, Osanai A, Kamiya H, Akao N, Owaki S, Furuoka H. Larval migrants by *Baylisascaris trasfuga*: Fatal neurological disease in Mongolian jirds, but not in mice. *Journal of Parasitology*

2004;90:774-781.

5. 赤尾信明 アニサキス症の現況と予防 治療 日本医事新報社, 4168: 113-114.

6. 赤尾信明. アライグマ回虫症. In: 共通感染症ハンドブック. 東京: 日本獣医師会, 2004: 82-83.

7. 赤尾信明. イヌ・ネコ回虫症. In: 共通感染症ハンドブック. 東京: 日本獣医師会, 2004: 88-89.

8. 赤尾信明. イヌからうつる寄生虫症—プライマリ・ケアのための寄生虫および動物媒介疾患—. 治療 2004;86:102-106.

9. 芦田敦子, 河内繁雄, 高本雅哉, 赤尾信明. 旋尾線虫幼虫によるcreeping diseaseの1例. 日本皮膚科学会雑誌 (0021-499X) 2004;114(7):1315

10. 嶋田雅暁, 赤尾信明, 石渡賢治, 奥祐三郎, 奥沢英一, 竹内勤, 名和行文, 西山利正, 原樹, 濱田篤郎, 堀尾政博 寄生虫に関する情報システム—プライマ

リ・ケアのための寄生虫症および動物媒介疾患—. 治療 2004;86:29-34.

11. 赤尾信明, 安藤勝彦, 中村 (内山) ふうみ, 川中正憲. ホタルイカ生食による旋尾線虫幼虫移行症の発生動向 1995~2003. 病原微生物情報 2004;25

12. 赤尾信明. 気になる病気 旋尾線虫症. 日経ヘルス 2004;7:35.

13. 飯野弘之, 並木美夏, 永井祐喜子, 酒井 勤, 神前賢一, 吉利 尚, 鎌田芳夫, 赤尾信明. トリアムシノロン併用硝子体手術が有効であった眼トキソカラ症の1例. 新しい眼科 2004;21:385-388.

14. 北山沙知, 兵地信彦, 木島敏樹, 岩井安芸, 高沢亮治, 松岡 陽, 大塚幸宏, 矢野雅隆, 増田 均, 藤井靖久, 川上 理, 小林 剛, 木原和徳, 赤尾信明 日本人に発症したビルハルツ住血吸虫症の1例. 泌尿器科紀要 2004;50:191-194.

#### H 知的財産権の出願・登録状況

該当項目なし

分担研究報告書

蠕虫病の病態解析に関する研究

分担研究者 田邊將信

慶應義塾大学医学部専任講師

研究要旨

報告者らは、住血吸虫感染マウスの肝脾に誘導される瘰癧誘発リポ蛋白（CILIP）が強い凝固活性化因子であり、本症における凝固異常、さらには肝の病変形成に関連していることを推定し研究を進めてきたが、この CILIP が LPS shock 救命に働くことが明らかとなったので、その機構解明を目的として研究を行い、以下の成績を得た。

1. LPS shock マウス(B6 ♀, 5 週令)は1  $\mu$ g の LPS と 8 mg の D-galactosamine 混合物 (LPS/ D-GalN) を尾静脈に投与することで作製した。この実験モデルにおいては、主として肝臓に出血性変化や肝細胞アポトーシスといった病変が形成され、投与後 6~8 時間で全個体が死亡する。
2. LPS/ D-GalN 投与 2 時間前に CILIP を腹腔内投与した場合、肝病変は軽度となり、投与後 7 日目の生存率は 98% 以上となる。機能的な T および B 細胞を持たない rag2<sup>-/-</sup> マウスも LPS/ D-GalN 投与で LPS shock を引き起こすが、この場合にも CILIP の前投与が LPS shock マウスを救命した。
3. この救命効果は CILIP 投与量に依存し、投与時期がその効果発現に重要であった。他種動物由来の CILIP も効果を示したが、熱変性 CILIP では効果は見られなかった。
4. マウス脳から分離した thromboplastin 投与では、救命効果は認められなかった。また、チオグリコレート誘発腹腔マクロファージ(M $\phi$ )を in vitro で IFN $\gamma$ 、あるいは GM-CSF で刺激して得た FX 活性化因子には救命効果は認められなかった。
5. この CILIP の救命効果は *Pseudomonas aeruginosa* 感染マウスでは認められなかった。
6. この救命機構の解明を目的として血清中の各種サイトカイン量を測定した。CILIP 投与群の TNF $\alpha$  および IL-6 レベルは LPS/ D-GalN 単独投与群の変化にほぼ一致して変動した。CILIP 投与群の血清 IL-10 レベルは LPS/ D-GalN 単独投与群の 1/2~1/3 の値を示した。LPS/ D-GalN 単独投与群では、LPS 投与後 6 時間における IL-12 および IFN $\gamma$  レベルが著しく増加したが、CILIP 投与群では有意に低いレベルであった。
7. in vitro での LPS 刺激によるチオグリコレート誘発腹腔 M $\phi$ 、あるいは Raw 細胞による NO、TNF $\alpha$ 、IL-6 産生への CILIP の添加効果は認められなかった。
8. 抗 IgM( $\mu$ )抗体による Wehi-231 細胞のアポトーシス誘導刺激による DNA 合成能の低下は CILIP の添加量に比例して回復したが、他のアポトーシス誘導系 (Raw cell/ SNAP, Jurkat cell/ anti-Fas 抗体, Hela cell/ anti-Fas 抗体+cycloheximide) ではこのような効果は見られなかった。

以上の成績から、住血吸虫感染によって誘導される凝固活性化リポ蛋白 (CILIP) が LPS shock マウスを救命することが明らかとなった。しかし、その救命機構を特定することはできなかった。

## 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。

我々は、この虫卵性肉芽腫の病態生理学的機能を解析する過程で、致死的作用を有する瘰癧誘発リポ蛋白(CILIP)が虫卵性肉芽腫中に存在することを見出した。その後、CILIPの精製法、生体内分布、あるいはその誘導機構を明らかにし、さらにはCILIP構成アポ蛋白や各種寄生虫感染における誘導の有無等について解析を行ってきた。また、昨年度の研究で、このリポ蛋白の生理機能、特に住血吸虫症の病態との関連性について解析を行い、CILIPが哺乳動物の血液凝固系を活性化する凝固活性化因子であり、本症における病態形成、特に本症でみられる凝固異常、あるいは肝臓の病変形成に深く関わっていることを明らかにした。

今年度も引き続きCILIPの病態生理学的機能の解析を行ってきたが、その過程でCILIPが致死的なLPS shockマウスモデルをほぼ完全に救命することを見出した。グラム陰性菌による敗血症では細菌から放出されたlipopolysaccharide(LPS, endotoxin)がその病原機構の根本原因と考えられている。実際、マウスにLPSを投与することでグラム陰性菌による敗血症性ショックを再現でき、しかもこの実験モデルでは血清中の炎症性サイトカインの著しい増加が見出されることから、LPS shockはLPS刺激による活性化Mφや内皮細胞による炎症性サイトカインの大量放出により引き起こされる全身性炎症反応によるものと考えられている。従って、何らかの方法でサイトカインの産生を抑えたり[サイトカイン遺伝子のノックアウト(TNF $\alpha$ 、IFN $\gamma$ )、抗炎症性サイトカイン

(IL-10、IL-4、IL-13、IL-9)の投与]、あるいはその機能を抑制すると[抗サイトカイン抗体(TNF $\alpha$ 、IFN $\gamma$ )の投与、サイトカイン受容体のブロック(IL-1R antagonist)及びノックアウト(TNFR、IFN $\gamma$ R)]、実験的LPS shockモデルの死亡率を大幅に低下させることが可能である。我々が今回用いた実験モデルはLow dose LPS shockマウスであり、主として肝臓に急性病変(広範囲な出血性変化や多量の肝細胞死)が形成されるが、大量LPS shockや生菌接種によるseptic shockモデルと同様に炎症性サイトカインがこの肝病変形成に主要な役割を演じていることが明らかとなっている。しかしながら、その病原機構はかならずしも完全には理解できていない。我々は、このLow dose LPS shockマウスモデルを用い、CILIPがLPS shockの病原機構の中のどの段階に作用することでその救命効果を発揮しているかを解析したので報告する。

## B. 研究方法

### 実験動物

実験にはICR、C57BL/6J、C57BL/6J-rag2<sup>-/-</sup>雌マウス(感染時5週令)を用いた。肝臓内虫卵性肉芽腫からのCILIP精製用として、60隻のマンソン住血吸虫セルカリアを感染させたICRマウスを作製した。

### CILIP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から精製した。組織を20mM Tris-Cl, pH8.0 / 2mM EDTA / 150mM NaCl中でホモジナイズし、15,000g x 30min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20mM Tris-Cl, pH7.2 / 2mM 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、濃縮後ヘ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、比重が1.15の部分で回収し、

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  $\mu$ l)を ICR マウス(体重 8~10g)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。

#### マウス LPS shock モデル

LPS shock マウス(B6♀、5週令)は1 $\mu$ gのLPSと8mgのD-galactosamine混合物(LPS/D-GalN)を尾静脈に投与することで作製した。CILIPは通常LPS/D-GalN投与2時間前にマウス腹腔内に5単位投与した。LPS shock救命に必要なCILIP量を明らかにするため、CILIP投与量を変えてマウスに投与し、LPS/D-GalN投与後の生存率を調べた。また、CILIPの最適投与時期を明らかにするため、LPS/D-GalN投与前および投与後にCILIPを投与する実験を行った。血清中のサイトカインレベルおよびトランスアミナーゼ活性やビリルビンレベルを測定するために、CILIP投与群と非投与群について、LPS/D-GalN投与前および投与後の様々な時間に採血を行い、血液を室温で1時間放置後、遠心により血清を分離した。さらに、病理組織学的に肝臓を調べるために、LPS/D-GalN投与後1、2、4、6時間後の各群マウスの肝臓を採取し、10%ホルマリンで固定した。

一方、in vitroでマクロファージ(M $\phi$ )をIFN $\gamma$ 、あるいはGM-CSFで刺激することで誘導されるFX活性化因子がCILIPと同様な救命効果を持っているかどうかについても検討を加えた。

#### *Pseudomonas aeruginosa* 感染による急性敗血症マウスモデル

*Pseudomonas aeruginosa*の感染実験では、CILIPをマウス腹腔内に投与し、2時間後に $10^9$  cfuの*P. aeruginosa*を腹腔内投与し、経時的にマウスの生死を観察した。

#### 病理組織学的検査およびアポトーシス陽性細胞の検出

ホルマリン固定した肝臓から型のごとくパラ

フィン切片を作製し、HE染色を行い病理組織学的観察を行った。また、同切片を用いて、市販のアポトーシス検出キット(TUNEL法、日本ロシュ株式会社)を用いてアポトーシス陽性細胞の検出を行った。TUNEL法は指定された方法に準拠して行った。また、全ての核を検出するため、TUNEL染色標本の全てにDAPI染色を行った。

#### 細胞の培養

M $\phi$ 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M $\phi$ の純度は95~97%、生存率は95%以上であった。分離したM $\phi$ はin vitroにおけるFX活性化因子の誘導およびin vitroにおけるCILIPの機能解析に用いた。前者では、M $\phi$ はフェノールレッドを含まないMEM medium/2mM glutamin/10 mM HEPES/1mM pyruvate/antibioticsで培養した。培養M $\phi$ にリコンビナント・マウスIFN $\gamma$ 、あるいはGM-CSFを加え、8時間培養後に細胞を凍結した。解凍した細胞は音波処理し、5,000 g x 10min遠心し、その上清を105,000 g x 60min遠心して得られた沈渣(microsomal fraction)を音波処理することでFX活性化因子を得た。FX活性化因子の救命効果は、分離したFX活性化因子をマウス腹腔内に投与し、2時間後に致死量のLPS/D-GalNを投与することで判定した。後者では、M $\phi$ をRPMI 1640 medium/10% FCS/2mM L-glutamine/10mM HEPES/50 $\mu$ M 2-ME/1mM sodium pyruvate/antibioticsで培養した。CILIPを添加した60分後にLPS(100 ng/ml)を添加し、培養16時間後に細胞のviabilityとサイトカイン産生量を測定した。

Wehi-231、Hela S3およびJurkat細胞はRPMI 1640 medium/10% FCS/2mM L-glutamine/10mM HEPES/50 $\mu$ M 2-ME/1mM sodium pyruvate/antibioticsで培養した。Raw cellはDMEM medium/10% FCS/4mM L-glutamine/antibioticsで培養した。CILIPがアポトーシス誘導刺激を受けた細胞に防御的に働

くかどうかを解析するため、これらの細胞培養系に CILIP を添加し、1 時間後にアポトーシス誘導試薬 [Wehi-231 cell には抗 IgM( $\mu$ ) 抗体、Raw cell には SNAP、Jurkat cell には anti-Fas 抗体、Hela cell には anti-Fas 抗体と cycloheximide の混液] を加え、16 時間後に細胞の DNA 合成活性を測定し、アポトーシス誘導試薬を加えない細胞を対照として比較した。

#### 細胞の viability および DNA 合成活性の測定

培養細胞の viability は市販の WST-1 色素法 (日本ロシユ株式会社) を用いて測定した。測定は指定された方法に準拠して行った。また、DNA 合成活性は BrdU の取り込み活性を測定するキット (日本ロシユ株式会社) を用いて測定した。測定は指定された方法に準拠して行った。

#### 凝固活性化活性および FX 活性化活性の測定

CILIP の凝固活性化活性は正常ラット血漿を用いた一段階法で測定した。80  $\mu$ l のラット血漿と 80  $\mu$ l の精製した CILIP、あるいは緩衝液を混和し、37  $^{\circ}$ C で 3 分間インキュベートし、80  $\mu$ 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 活性化活性は精製したヒト由来第 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 Ca<sup>2+</sup> 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。

#### サイトカイン、ビリルビンおよびトランスアミナーゼ活性の測定

培養液および血清中の各種サイトカイン量

(TNF $\alpha$ 、IL-6、IL-10、IL-12p70、IFN $\gamma$ ) は市販のサンドイッチ ELISA キット (日本ベクトン・デッキンソン) を用いて測定した。培養液中の NO<sub>2</sub>- 及び NO<sub>3</sub>- は市販の測定キット (NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> assay kit-c, Dojindo Labs) を用いて測定した。血清トランスアミナーゼ活性および総ビリルビン量は市販の測定キット (和光純薬) を用いて測定した。

#### タンパク質の定量

蛋白量は BSA を標準とした Bradford 法 (ナカライ・テスク) により測定した。

#### 倫理面への配慮

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

#### 1. CILIP によるマウス LPS shock モデルの救命

今年度の研究では、LPS shock マウスは 1  $\mu$ g の LPS と 8mg の D-galactosamine 混合物 (LPS/D-GalN) を尾静脈に投与することで作製した。LPS、あるいは D-GalN は単独投与してもマウスは死亡することはなく、全例生存した (Fig. 1A)。しかし、両者を混合して投与すると (LPS/D-GalN)、投与後 6~8 時間で全個体が死亡する。しかしながら、LPS/D-GalN 投与 2 時間前に、マウスの腹腔内に 5 単位の CILIP を投与しておく、LPS/D-GalN 投与後 7 日間の生存率は 98% 以上となる (Fig. 1B)。

この救命効果を発揮するのに必要な CILIP 量を明らかにするために、CILIP 投与量を変えてマウスに投与し、LPS/D-GalN に対する抵抗性を検討した。その結果、CILIP 1 単位以上を投与することで 90% 以上のマウスを救命出来ることが明らかとなった (Fig. 2A)。また、機能的な T および B 細胞を持たない rag2<sup>-/-</sup> マウスも LPS/D-GalN 投与で LPS shock を引き起こすが、このケースでも CILIP 前投与によって LPS shock

マウスを救命することが可能であった。

また、CILIP の最適投与時期を明らかにする実験を行った。LPS/D-GalN 投与前および投与後に5単位のCILIPを投与し、その生存率を比較した、救命効果が最も高かったのは、LPS/D-GalN 投与2時間前にCILIPを投与したグループであった(Fig. 2B)。

このCILIPの救命効果発現には、活性を持った未変性のCILIPを投与する必要がある、熱変性CILIPではこのような救命効果は認められなかった。また、マウス脳から分離した凝固活性化活性を持つthromboplastin投与では、このような救命効果は認められなかった(Fig. 3A)。

## 2. In vitro で誘導した FX 活性化因子の LPS shock 救命効果の検討

チオグリコレート誘発腹腔Mφをin vitroでIFN $\gamma$ あるいはGM-CSFで刺激すると、CILIPと同じ活性を持ったFX活性化因子を誘導することができる、今回、この誘導系で得られた凝固活性化因子をマウスLPS shockマウスに投与する実験を行った。その結果、Mφ由来のFX活性化因子をマウス腹腔に投与し、2時間後にLPS/D-GalNを静脈内投与したところ、救命効果は認められなかった(Fig. 3B)。

## 3. *Pseudomonas aeruginosa* 感染マウスに対するCILIP投与効果の検討

前述の実験モデルと同様に、マウス腹腔内にCILIPを投与し、2時間後に*P. aeruginosa*の生菌(10<sup>9</sup> cfu)を腹腔内に投与し、投与後のマウスの生死を観察した。Fig.4に明らかなように、CILIPには*P. aeruginosa*急性敗血症マウスモデルを救命する効果は認められなかった。

## 4. 病理組織学的解析

PBS単独投与群では肝臓に著変を見なかったのに対して、LPS/D-GalN単独投与群では肝臓が腫大し、暗紫色を呈していた。一方、LPS/D-GalN投与前にCILIPを投与した群では、

対照に比較して僅かながら暗い色調を呈していたが、それ以外の変化は認められなかった。肝臓の病理組織学的検討では、LPS/D-GalN単独投与マウスにおいて著しい出血性変化がみられ、さらにアポトーシスに起因する肝細胞の核変化が数多く観察された(Fig. 5)。これに対して、CILIPを前投与されたマウスの肝臓では、出血性変化は殆ど認められず、アポトーシス陽性細胞も少数認められるのみで、CILIPの前投与がLPS/D-GalN投与による肝臓の著しい病理変化を防いだことが推定された。このことは、肝切片のTUNEL法染色に依って確認された。即ち、Fig.6に示したように、LPS/D-GalN非投与対照群では、全くアポトーシス陽性細胞は検出されなかったが、LPS/D-GalN単独投与群では多数の陽性細胞が認められた。しかし、CILIPを前投与されたマウスでは、アポトーシス陽性細胞は検出されたが、その数は極めて少数であった。

## 5. 血清トランスアミナーゼ活性及びビリルビンレベルの測定

LPS/D-GalN非投与対照マウスの血清中トランスアミナーゼ活性(GPT)及びビリルビン量は測定期間を通して正常範囲にあったが、LPS/D-GalN単独投与群では、投与後6時間において著しいGPT活性およびビリルビンレベルの上昇が認められた。これに対して、CILIP投与群では、LPS/D-GalN投与6時間後においてもビリルビンレベルに変化は無く、GPT活性は増加していたが、LPS/D-GalN単独投与群に比較し1/3~1/4のレベルであった(Fig.7)。

## 6. LPS shock における経時的なサイトカインレベルの測定

LPS/D-GalN単独投与群のサイトカインレベルを経時的に測定した。TNF $\alpha$ は投与後1時間でピークとなりその後急速に血中レベルが低下した。IL-6は投与後2時間でピークとなりその後急速に血中レベルが低下した。IL-10は投与



後 1 時間でピークとなりその後は徐々に低下した(Fig.8)。IFN $\gamma$ 及び IL-12 は投与後 1 時間で増加し始め、その後多少の変化はあるものの大きく変化することなく推移するが、死亡直前の 6 時間では著しく増加した(Fig.9)。これに対して、CILIP 投与群では、その血中の TNF $\alpha$  および IL-6 は LPS/D-GalN 単独投与群の変化にほぼ一致して推移した。また、IL-10 は投与後 1 時間で増加したものの、そのレベルは LPS/D-GalN 単独投与群の 1/2~1/3 で、その後は殆ど変動することなく推移した。CILIP 投与群と LPS/D-GalN 単独投与群において最も明確な差が認められたのは IFN $\gamma$ 及び IL-12 レベルであった。LPS/D-GalN 投与後 4 時間までは両群に差は認められなかったが、6 時間後における CILIP 投与群の両サイトカインレベルは 4 時間値と殆ど変化しなかったのに対して、LPS/D-GalN 単独投与群では両サイトカインレベルが急激に増加し、両群間に有意な違いが観察された。

#### 7. CILIP による腹腔 M $\phi$ 機能の変化

チオグリコレート誘発腹腔 M $\phi$ 機能への CILIP の添加効果を *in vitro* で解析した。*in vitro* で培養した M $\phi$ に LPS 刺激(100ng/ml)を加え 16 時間培養した。細胞の viability には変化は認められなかったが、培養上清中には NO, IL-6 および TNF $\alpha$ の著明な増加が見られた。この培養系に各種濃度の CILIP を加えたが、M $\phi$ の viability、あるいは NO, IL-6 および TNF $\alpha$  産生量には殆ど変化は認められなかった。

同様に、株化 M $\phi$ である Raw cell に LPS 刺激を加えると、その viability が有意に低下したが、CILIP 添加によってその viability は回復した。また、LPS 刺激によって、培養上清中の NO, IL-6 および TNF $\alpha$ は著明に増加した。この培養系に各種濃度の CILIP を加えたが、NO, IL-6 および TNF $\alpha$  産生量には殆ど変化は認められなかった。

#### 8. *In vitro* におけるアポトーシス誘導細胞に対

する CILIP の防御効果の有無

Fig. 10 に示したように、4 種類の細胞にアポトーシス誘導刺激を加えた細胞とあらかじめ CILIP を添加し 1 時間後にアポトーシス誘導刺激を加えた細胞の DNA 合成能の違いを比較検討した。CILIP であらかじめ処理した Raw cell, Jurkat cell、あるいは Hela cell にアポトーシス誘導刺激を加えた場合には、CILIP の添加効果はほとんど観察されなかった。しかし、Wehi-231 cell に Anti-IgM ( $\mu$  specific) によるアポトーシス誘導刺激を加えた場合、その viability は著しく低下したが、CILIP をあらかじめ添加した場合には、その添加量に比例して細胞の DNA 合成能が高くなることが明らかとなった。

#### D. 考 察

最近の統計によると、米国では毎年敗血症を原因とする死亡者が 10~30 万人いることが報告されており、そのうちの 30~40%はグラム陰性菌を原因とするものである。しかも年毎に症例数が増加しており、临床上重要な問題点となっている。敗血症は循環血液への病原性細菌、あるいは真菌の侵入によって引き起こされる病態であり、高い死亡率を示す疾患である。グラム陰性菌による敗血症では細菌から放出された lipopolysaccharide(LPS, endotoxin) がその病原機構の根本原因となっている。LPS をマウスに投与することで、グラム陰性菌による敗血症性ショックを再現することができ、しかも血液中炎症性サイトカインレベルが著しく増加することから、この病態は LPS 刺激による M $\phi$ や内皮細胞からの炎症性サイトカインの大量放出によって引き起こされる全身性炎症反応によるものと理解されている。実際、敗血症に陥ったヒトや実験動物の血清サイトカインレベルが著しく高い値を示すことから、炎症性サイトカインの大量放出が本症における病原機構の中心的役割を果たしているものと考えられている。また、抗炎症作用を有する制御機構の発動が致

命的な病態を改善しうること、さらには、抗サイトカイン抗体(TNF $\alpha$ 、IFN $\gamma$ )の投与、サイトカイン受容体のブロック(IL-1R antagonist) やノックアウト(TNFR IFN $\gamma$ R)、サイトカイン遺伝子のノックアウト(TNF $\alpha$ 、IFN $\gamma$ )、抗炎症性サイトカイン(IL-10、IL-4、IL-13、IL-9)の投与といった炎症を抑制するような処置を施すことで実験的 LPS shock モデルの死亡率を大幅に低下させ得ることが知られている。従って、炎症性サイトカインの大量放出が、グラム陰性菌による敗血症、あるいは LPS shock における病原機構の中心的役割を果たしていることは間違いないことと思われる。

本年度の CILIP に関する機能解析によって、CILIP が low dose LPS shock (LPS/D-GalN) マウスを救命することが明らかとなった。B6 マウスに LPS/D-GalN を投与すると、ほぼ 100%のマウスが 8 時間以内に死亡する。これに対して、LPS/D-GalN 投与 2 時間前に CILIP を腹腔内投与しておくことで 98%以上のマウスが生存する。大量 LPS 投与による LPS shock では多臓器不全を含む全身性の疾患を誘導するが、今回我々が用いた Low dose LPS shock モデルでは肝臓が標的臓器であり、著しい肝病変が引き起こされる。LPS/D-GalN 投与 6 時間後には肝臓に広範囲な出血性変化、アポトーシス陽性細胞数の増加、血清中のトランスアミナーゼ活性やビリルビンレベルの上昇などがみられる。しかし、CILIP をあらかじめ投与したマウスでは、このような肝臓の出血性変化は殆ど観察されず、少数のアポトーシス陽性細胞が認められるにすぎない。また、血清ビリルビンレベルは正常範囲にあり、トランスアミナーゼ活性は増加するが、LPS/D-GalN 単独投与群に比べ 1/3~1/4 の値を示すにすぎない。これらの実験事実から、CILIP 投与が LPS/D-GalN によるマウスの肝病変形成を阻害することによって救命しているものと理解できる。しかし、この CILIP の効果が、サイトカ

イン産生抑制によるものか、その機能抑制によるものか、あるいは標的臓器である肝臓への防御効果によるものかは特定出来ていない。

そこで、この CILIP の LPS shock マウスの救命機構を明らかにするための解析を行った。LPS/D-GalN 単独投与群と CILIP 投与群との血清中 TNF $\alpha$ や IL-6 レベルには差が認められないことから、TNF $\alpha$ や IL-6 がこの救命に働いているとは考えにくい。IL-10 は、IL-4、IL-9、あるいは IL-13 などと同様に Th2 サイトカインであり、強い抗炎症作用を有する。各種 LPS shock モデルにおいて、IL-10 が増加するような処置を行うことで救命できることが明らかとなっているが、我々の今回の成績では、LPS/D-GalN 単独投与群と比較し、CILIP 投与群の IL-10 レベルは有意に低い値を示したことから、IL-10 が CILIP の救命機構に働いているとは考えにくい。CILIP 投与群と LPS/D-GalN 単独投与群において明確な差異が認められたのは血清 IFN $\gamma$  及び IL-12 レベルであった。即ち、LPS/D-GalN 投与後 4 時間までは両群に差は認められなかったが、6 時間目における LPS/D-GalN 単独投与群では両サイトカインレベルが急激に増加したのに対して、CILIP 投与群では IFN $\gamma$  及び IL-12 レベルは殆ど変化しないで推移した。この LPS/D-GalN 投与後 6 時間では、肝臓に著しい形態学および機能的変化が認められることから、このモデルでの肝病変形成や致死経過にこの 2 つのサイトカインが重要な役割を演じている可能性が推定された。

この Low level LPS shock モデルでは主として M $\phi$  が病原機構の中心的な役割を果たしていることが報告されている。今回、機能的な T および B 細胞を欠損する rag2 $^{-/-}$  マウスにおいても同量の LPS/D-GalN 投与によって LPS shock が見られたこと、さらには CILIP の救命効果が rag2 $^{-/-}$  マウスの LPS shock に対しても発揮されたことから、この LPS shock の病原機

構、あるいはCILIPの救命機構にはT及びB細胞に依存しない機構が働いていることが推定できる。従って、CILIP投与マウスで見られたIL-12の産生抑制にはMφや樹状細胞へのCILIPの抑制効果が関与している可能性が示唆され、同様に、CILIP投与によるIFN $\gamma$ 産生抑制にはNK細胞へのCILIPの抑制効果が関与している可能性が推測された。そこで、チオグリコレート誘発マウス腹腔MφやMφの機能を保持しているRaw cellに対するCILIPの直接的な効果をin vitroで検討した。CILIPの添加は両細胞のviabilityには影響しなかったことから、CILIPには細胞変性効果はないものと考えられた。また、LPS刺激によって腹腔MφやRaw cellは著明なサイトカイン放出を行ったが、この培養系にCILIPを添加しても、その培養上清中のサイトカイン量には殆ど変化は認められなかった。従って、CILIPがMφに対して何らかの抑制的な作用を及ぼしているとは考えにくい。それ故、CILIPのLPS shock救命効果はMφ以外の細胞、あるいは機構への作用を介して発揮されているものと推定された。

LPS/D-GalN単独投与マウスでは、肝臓に多数のアポトーシス陽性細胞が出現するが、CILIP投与群ではほとんど認められないことから、アポトーシス陽性細胞の出現はLPS shockにおける致死的経過に重要な意味を持っていると考えられた。CILIP投与群において、アポトーシス陽性細胞が少ないことは、CILIPがアポトーシス誘導刺激を抑制したか、あるいはアポトーシス誘導刺激に対する標的細胞の感受性を低下させたことによると推定できる。アポトーシス誘導刺激に関する解析はまだ行っていないが、標的細胞のアポトーシス誘導刺激に対する感受性へのCILIPの添加効果に関する解析では、解析した4種類の細胞中Wehi-231細胞[Anti-IgM( $\mu$  specific)抗体によるアポトーシス誘導]のアポトーシス誘導刺激によるDNA合成能低下が

CILIPの添加量に比例して回復することが明らかとなった。このことはアポトーシス誘導刺激に対する細胞の感受性をCILIPが有意に低下させたことを意味しており、CILIPのLPS shock救命機構の一端を担っていると考えられる。しかし、実際にin vivoにおいてもこのようなアポトーシス誘導刺激に対する肝細胞の感受性をCILIPが低下させているかどうかについては現時点では明らかではない。

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、Mφや樹状細胞がCILIP誘導に主要な役割を果たしており、宿主の免疫反応(活性化T細胞とMφの直接的な相互作用、サイトカイン)やLPSなどの細菌由来物質がこれらの細胞によるCILIP(FX活性化因子)の産生誘導に深く関わっていることが明らかとなっている。従って、今回の成績は、CILIPが感染といった侵襲に対し宿主防御反応(innate immunity)として機能している可能性を示唆していると考えられた。CILIPを構成しているどの分子がこのような救命に関わっているかについても現時点では明らかとなっていない。しかし、in vitroで誘導したFX活性化因子に救命効果が認められないことから、FX活性化因子そのものが救命に働いているとは考えられない。CILIPは虫卵性肉芽腫を構成する多種類の細胞の膜成分を分離・精製したのと考えられ、数多くの構成蛋白と脂肪からなる巨大な多機能性分子と考えられることから、救命に働いている分子を明らかにす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凝固活性化リポ蛋白 (CILIP) の LPS shock 救命機構の解析を行い、以下の成績を得た。

LPS/ D-galactosamine 混合物の静脈内投与で作製した LPS shock マウスにおいては、主として肝臓に出血性変化や肝細胞アポトーシスといった病変が形成され、投与後 6~8 時間で全個体が死亡する。しかし、LPS/ D-GalN 投与 2 時間前に CILIP を腹腔内投与した場合、肝病変は軽度となり、LPS 投与後 7 日目の生存率は 98% 以上となる。この救命効果は CILIP の投与時期及び投与量に依存し、他種動物由来の CILIP も効果を示したが、熱変性 CILIP やマウス脳から分離した thromboplastin 投与では、このような救命効果は見られなかった。また、この CILIP の救命効果は *Pseudomonas aeruginosa* 感染マウスでは認められなかった。この救命機構の解明を目的として血清サイトカイン量を測定した。CILIP 投与群の TNF $\alpha$  および IL-6 レベルは LPS/ D-GalN 単独投与群の変化にほぼ一致して推移した。CILIP 投与群の IL-10 レベルは LPS/ D-GalN 単独投与群の 1/2~1/3 の値を示した。LPS/ D-GalN 単独投与群では、LPS 投与後 6 時間における IL-12 および IFN $\gamma$  レベルが著しく増加したが、CILIP 投与群では有意に低いレベルであった。LPS 刺激によるチオグリコレート誘発腹腔 M $\phi$ 、あるいは Raw 細胞による NO、TNF $\alpha$ 、IL-6 産生への CILIP の添加効果は認められなかった。抗 IgM( $\mu$ ) 抗体による Wehi-231 細胞のアポトーシスは CILIP の添加量に依存して阻害されたが、他のアポトーシス誘導系(Raw cell/ SNAP、Jurkat cell / anti-Fas 抗体、Hela cell/ anti-Fas 抗体+cycloheximide) では有意な阻害効果は見られなかった。

以上の成績から、住血吸虫感染によって誘導される CILIP が LPS ショックマウスを救命する

ことが明らかとなった。しかし、現時点ではその救命機構を特定することはできなかった。

F. 健康危険情報 なし

## G. 研究協力者

深尾太郎 (東大院・工・化学生命工学)  
永田博司 (慶大・医・内科)、  
関塚永一、宮崎耕司 (国立埼玉・内科)、  
竹内 勤 (慶大・医・熱帯寄生虫)

## G. 研究発表

### 学会発表

田邊將信、永田博司、関塚永一、宮崎耕司、奈良武司、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血液凝固活性化因子の病態生理学的機能の解析 第 73 回日本寄生虫学会、平成 16 年 4 月。

### 論文発表

Okada E, Yamazaki M, Tanabe M, Takeuchi T, Nanno M, Oshima S, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Kanai T, Hibi T, and Watanabe M. 2005. IL-7 exacerbates chronic colitis with expansion of memory IL-7R<sup>high</sup> CD4<sup>+</sup> mucosal T cells in mice. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol., in press.

## 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 |