

C. 研究結果

日本住血吸虫 SEA の点鼻感作によって C57BL/6 マウスは強い Th2 応答を示した。血中の SEA 特異的および非特異的 IgE はいずれも有意に増加していた。鼻粘膜リンパ球によるサイトカイン測定でも IL-4 と IL-5 の産生が上昇する一方で IFN γ の産生は検出できず、Th2 優位の宿主応答が誘導されたことを確認した。その一方で BALB/c マウスの同様の感作では IgE 上昇や IL-4 産生上昇は観察されず、日本住血吸虫 SEA による Th2 応答誘導にはマウス系統差が存在することが示唆された。C57BL/6 マウスの Th2 誘導活性は SEA の糖鎖除去処理によりほぼ完全に消失したが Mock 処理試料を用いた場合には活性が保持されていたことから、日本住血吸虫 SEA の宿主 Th2 応答誘導能は SEA の構成糖鎖の関与が重要であることが示された。

C57BL/6 マウスと BALB/c との間に見られた Th2 誘導能の違いがマウスの系統差に基づくことを確認するためにそれぞれの H-2 を持つマウスを用意して比較を行った。その結果、BALB/c と同じ H-2^d である DBA/2 も日本住血吸虫 SEA に定応答性であり、C57BL/6 と同じ H-2^b を持つ C57BL/10 も B6 と同様に高応答性を示した。さらに H-2 だけが異なる 2 つの B10 コンジェニックマウスを用いた場合も H-2^b の場合に高応答性を示したことから、日本住血吸虫 SEA 点鼻感作によるマウスの Th2 応答誘導は H-2 によって遺伝的に制御された宿主応答であることが示された。

D. 考察

日本住血吸虫の SEA を脱糖鎖処理して感作することによって Th2 応答誘導が失活することから、マンソン住血吸虫の SEA の場合と同様に虫卵抗原の糖鎖構造がマウス宿主の Th2 応答誘導に重要な関与をしていることが明らかとなった。しかしマンソン住血吸虫の場合との明確な差異は Th2 応答誘導能の宿主側の系統差であり、マンソン住血吸虫 SEA により Th2 応答が誘導されてくるのが BALB/c であったのに対して、日本住血吸虫 SEA 刺激では BALB/c マウスは殆ど Th2 応答を示さなかった。これがマウスの遺伝的な応答制御機構によるかについての確実な証拠は未だ得ていないが、H-2 ハプロタイプと相関する形質であることは間違いないと思われた。

このように異なった住血吸虫種の SEA を用

いることによって反応性が大きく異なる理由は明らかではないが、マンソン住血吸虫 SEA の主要構成糖鎖はオリゴ糖である Lacto-N-Fucopentaose III である。しかし日本住血吸虫 SEA の主要構成糖鎖がそれと同一であるか否かについては十分な証拠がなく、今後の検討を待つところである。

糖鎖除去による Th2 応答誘導失活が Th1 優位応答への変換によるものでないことは鼻粘膜リンパ球のサイトカイン産生において IFN γ に変化が見られなかったことから明らかである。鼻粘膜局所に糖鎖刺激のレセプターが存在して、それが強い IL-4 産生シグナルを出すことが考えられるが、その分子を同定することで今後の住血吸虫症の予防・治療に新たな戦略構築に繋がる可能性が考えられる。

E. 結論

日本住血吸虫虫卵抗原の糖鎖成分が宿主の Th2 応答誘導システムの一部を担うことがわかった。その Th2 応答誘導能は宿主マウスの遺伝的背景によって異なり、マンソン住血吸虫 SEA の場合とは逆に H-2^b が高応答性を示すが H-2^d は低応答性形質を示した。このことから宿主の遺伝素因によって住血吸虫感染による Th2 応答には量的差異が存在すること、及び住血吸虫種によって反応特性に明確な差異があることがわかった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

論文発表

1. Osada Y, Kumagai T, Hato M, Suzuki T, El-Malky M, Asahi H, Kanazawa T & Ohta N. Establishment of *Schistosoma japonicum* calpain-specific mouse T cell hybridoma and identification of a T cell epitope that stimulates IFN γ production. *Vaccine*, 23 : 2813-2819, 2005.
2. Sasaki Y, Yoshimoto T, Maruyama H, Tegoshi T, Ohta N, Arizono N & Nakanishi K. IL-18 with IL-2 protects against *Strongyloides venezuelensis* infection by activating mucosal mast cell-dependent type 2 innate immunity. *J Exp Med*, 202: 607-616, 2005.
3. Ohno N, Suzuki M, Matsumoto T, Ohashi T, Murakami S & Ohta N. Strain differences of the immunostimulatory effect of CpG in OVA-sensitized mice. *Nagoya Med JI*, 47: 111-122, 2005.

学会発表

1. 大槻茂男、磯村巖、尾藤真由美、森田明理、太田伸生、A/J マウスの *Plasmodium cgabaudi* 感染感受性を規定する免疫担当細胞反応動態の検討、第 74 回日本寄生虫学会、2005 年 4 月、米子市

2. Otsuki S, Lu S, Kumagai T, Kanazawa T, Ohta N. PCR diagnosis of *Schistosoma japonicum* infection: Testing in experimental infections and the field samples. 40th Joint Conference of the Parasitic Diseases Pnael, US-Japan Cooperative Medical Science Program, Dec. 2005, Washington, DC.

H. 知的財産権の出願。登録状況
なし

厚生科学研究費補助金（研究事業）

分担研究報告書

原虫症治療標的分子の機能解析

分担研究者 北 潔 東京大学大学院医学系研究科

研究要旨 寄生虫のミトコンドリアは宿主哺乳類のミトコンドリアと大きく異なった性質を持ち、アトバコンやアスコフラノンなどの抗寄生虫薬の重要な標的となる事が明らかになった。

A. 研究目的

われわれは寄生適応に必須な基本的要素である各種代謝系のなかでも特にエネルギー代謝系に焦点を絞り、寄生虫ミトコンドリアが宿主と極めて異なったエネルギー代謝系を作動させることによって宿主内の環境に適応していることを明らかにしてきた。この成果をふまえマラリア原虫やトリパノソーマのミトコンドリア電子伝達系の特異性を解析することにより、最終的に化学療法の標的として捉えたいと考えている。そこで、熱帯熱マラリア原虫におけるエネルギー代謝系を先端的なエネルギー転換系研究の視点から追求し、さらにトリパノソーマなど他の寄生原虫も含め寄生現象全般に共通する適応戦略の分子基盤とその多様性を明らかにする事を目的として研究を進めている。

B. 研究方法

赤血球内型マラリア原虫ミトコンドリアの呼吸鎖電子伝達系は化学療法剤の標的として期待されている。しかしマラリア原虫ミトコンドリアに関する情報は非常に限られたものであり、これが研究の進展を妨げている。そこで活性を保持したミトコンドリアの単離法を確立し、各種阻害剤の効果を生化学的な解析を可能にした。そこで、この系を用いてミトコンドリアの呼吸鎖電子伝達系を標的とすると考えられている新規抗マラリア薬アトバコンの作用部位を調べた。

また、アフリカトリパノソーマに関しては、極めて低濃度で効果を示す抗トリパノソーマ薬アスコフラノンの標的であるシアン耐性酸化酵素のタンパク質としての性質を、組み換え酵素を用いた部位特異的変異に

よって調べた。

(倫理面への配慮)

本研究はすべてが *in vitro* の実験系であり、倫理面の問題はない。

C. 研究結果

最も新しい抗マラリア剤であるマラロンの主要成分であるアトバコンの標的がミトコンドリア呼吸鎖電子伝達系の複合体 III (ユビキノール-シトクロム *c* 還元酵素、シトクロム *bc₁* 複合体とも呼ばれる) である事を耐性株の解析から明確にした。すなわち熱帯熱マラリア原虫の培養系から単離したミトコンドリアを用い、ジヒドロオロト酸脱水素酵素およびジヒドロオロト酸-シトクロム *c* 還元酵素活性に対するアトバコンの阻害効果を調べた。その結果、ジヒドロオロト酸脱水素酵素は mM オーダーの薬剤でも全く阻害を受けなかったが、ジヒドロオロト酸脱水素酵素に加え、ユビキノール-シトクロム *c* 還元酵素活性を測定するジヒドロオロト酸-シトクロム *c* 還元酵素活性は極めて低濃度のアトバコンで阻害され、その IC₅₀ は 50 pM であった。

また、アフリカトリパノソーマのシアン耐性酸化酵素に関して、大腸菌で発現させた *Trypanosoma vivax* のシアン耐性酸化酵素の第 3 ヘリックスに存在し、活性発現に関与すると

予想されるグルタミン酸およびチロシン残基に対してアラニンスキャニングを行なった。その結果、活性発現に E(X)₆Y モチーフが重要である事が明らかになった。またトランスフォームした大腸菌がアスコフラノン存在下でも増殖する E216A および Y247A 変異では、組み換え酵素においてもアスコフラノンの IC₅₀ が上昇していた。

D. 考察

アトバコンはプログアニルとの合剤のマラロンとして、新規抗マラリア剤としてアフリカや東南アジアで使用が開始されている。本剤はクロロキン耐性熱帯熱マラリアに有効な事から、貴重な新薬として期待されている。その標的はマラリア原虫のミトコンドリアとされてきたが、実際の標的は判っていなかった。今回の結果から、その標的が複合体 III (ユビキノール-シトクロム *c* 還元酵素) である事が明確になった。

我々が開発中のアスコフラノンは、現在最も強力な抗トリパノソーマ薬とされ、その標的はトリパノソーマのミトコンドリアに局在するシアン耐性酸化酵素である。今回見出した E(X)₆Y モチーフはデータベースを詳細に調べたところ、リボヌクレオチド還元酵素や CLK-1 など鉄を 2 分子含むいわゆる di-iron タンパク質に保

存されている事が判った。現在、トリパノソーマのシアン耐性酸化酵素の補欠分子属に関する直接的な情報は皆無であるが、この結果は本酵素が鉄を2分子含む di-iron タンパク質である事を、強く示唆している。現在高純度の精製標品を得る事が可能になった事から、金属の含有量についての分析を予定している。

トリパノソーマのシアン耐性酸化酵素は基質であるユビキノールに対する親和性が低いため詳細な酵素学的解析が困難であり、アスコフラノンによる阻害の様式については明確になっていない。E216A および Y247A の変異によって、組み換え酵素においてアスコフラノンの IC₅₀ が上昇していた事から、これらのアミノ酸残基がアスコフラノンの認識あるいは結合に関与している事が判った点は、今後の阻害機構の解析に非常に有効な情報となると考えられる。

E. 結論

寄生虫のミトコンドリアは宿主哺乳類のミトコンドリアと大きく異なった性質を持ち、抗寄生虫薬の重要な標的となる事が明らかになった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Expression, purification, and crystallization of *Trypanosoma cruzi* dihydroorotate dehydrogenase complexed with orotate. Inaok, D. K., Takashima, E., Osanai, A., Shimizu, H., Nara, T., Aoki, T., Harada, S. and Kita, K. (2005) Acta Crystallographica F61, 875-878
- 2) Mutational analysis of the *Trypanosoma vivax* alternative oxidase: the E(X)₆Y motif is conserved in both mitochondrial alternative oxidase and plastid terminal oxidase and is indispensable for enzyme activity. Nakamura, K., Sakamoto, K., Kido, Y., Fujimoto, Y., Suzuki, T., Suzuki, M., Yabu, Y., Ohta, N., Tsuda, A., Onuma, M. and Kita, K. (2005) Biochem. Biophys. Res. Commun. 334, 593-600
- 3) Parasite mitochondria as a target of chemotherapy: The inhibitory effect of licochalcone A on the *Plasmodium falciparum* respiratory chain. Mi-ichi, F., Miyadera, H., Kobayashi, T., Takamiya, S., Waki, S., Iwata, S., Shibata, S. and Kita, K. (2005) Ann. New York Acad. Sci. 1056, 46-54

- 4) PfPDE1, a novel cGMP-specific phosphodiesterase, from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Yuasa, K., Mi-ichi, F., Kobayashi, T., Yamanouchi, M., Kotera, J., Kita, K. and Omori, K. (2005) *Biochem. J.* 392, 221-229
- 5) Chemotherapeutic efficacy of ascofuranone in *Trypanosoma vivax*-infected mice without glycerol. Yabu, Y., Suzuki, T., Nihei, C., Minagawa, N., Hosokawa, T., Nagai, K., Kita, K. and Ohta, N. (2006) *Parasitol. Int.* 55, 39-43
- 6) Genetic diversity and kinetic properties of *Trypanosoma cruzi* dihydroorotate dehydrogenase. Sario, I., Annoura, T., Nara, T., Hashimoto, M., Tsubouchi, A., Iizumi, K., Makiuchi, T., Murata, E., Kita, K. and Aoki, T. (2006) *Parasitol. Int.* 55, 11-16
2. 学会発表
- 1) 大橋（鈴木）光子、鈴木高史、橋本哲男、籾 義貞、羽藤真理子、城戸康年、坂元君年、北 潔、太田伸生 化学療法
の標的としての *Trypanosoma cruzi* 原虫呼吸システム解析
第74回日本寄生虫学会総会
平成17年4月
- 2) 鈴木高史、大橋（鈴木）光子、籾 義貞、北 潔、太田伸生
アフリカトリパノソーマ原虫
におけるグリセロールキナーゼ
活性とアスコフラノン、グリセ
ロール併用治療との関連
第74回日本寄生虫学会総会
平成17年4月
- 3) 中村公亮、坂元君年、城戸康
年、藤本陽子、鈴木高史、籾 義
貞、太田伸生、北 潔 アスコ
フラノン感受性に及ぼす
trypanosome alternative oxidase
(TAO) の点突然変異に関する
研究 第74回日本寄生虫学
会総会 平成17年4月
- H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

厚生労働科学研究費補助金（国際医学協力研究事業）

分担研究報告書

マラリア伝搬阻止ワクチン分子の探索に関する研究

分担研究者 鳥居本美 愛媛大学医学部教授

研究要旨 新規の三日熱マラリア伝搬阻止ワクチン候補抗原を同定することを目的に、熱帯熱マラリア原虫生殖母体タンパク質 Pfs48 のアミノ酸配列を用いて、三日熱マラリアゲノムデータベースからホモログと予想される Pvs48 及び Pvs47 遺伝子を同定した。それらに対する DNA ワクチンを用いて抗血清をマウスで作製し、原虫タンパク質の発現を確認した。その結果、Pvs48 及び Pvs47 いずれも生殖母体表面に発現していることを確認した。さらに三日熱マラリア原虫流行地分離株を用いて、Pvs48 及び Pvs47 の遺伝子多型を解析した結果、いずれも多型を示し、何らかの選択圧を受けていることが示唆された。したがって、これらの分子はブースト効果の期待できる新規三日熱マラリア伝搬阻止ワクチン候補抗原と考えられた。

A. 研究目的

マラリア伝搬阻止ワクチンは、媒介蚊ステージの中でマラリア原虫の生活環を断つことを目的とするワクチンである。我々はアジア地域で猛威をふるっている三日熱マラリア伝搬阻止ワクチンの実用化を目的として研究を続けている。先ず、三日熱マラリア実験室内（SalI）株由来のオーキネート表面蛋白遺伝子 Pvs25 及び Pvs28 から酵母を用いて作成した組み換え蛋白 yPvs25 又は yPvs28 をアラムアジュバントとともにマウスに免疫し、その血清を SalI 株感染チンパンジー血液と混合した後、数種類のマラリア媒介蚊に吸血させ伝搬阻止活性を検討した。その結果、yPvs25 及び yPvs28 いずれに対する抗血清も三日熱マラリア原虫の蚊への伝搬を完全に阻止することを確認した。

また、三日熱マラリア yPvs25 または yPvs28 による伝搬阻止ワクチンについて、タイ国の流行地患者株を用いてその効果を検討すると共に、その伝搬阻止効果と抗原多型との関連性について検討した。その結果、組み換え yPvs25 および yPvs28 をワクチン抗原として作成した抗血清は抗原多型の有無に関わらず流行地の三日熱マラリア原虫の媒介蚊体内での発育を阻害することが示され、yPvs25 および yPvs28 が伝搬阻止ワクチンの抗原として有望であることがこれまでの我々の研究で明らかとなった。一方、マラリア原虫は抗原変異や多型等の獲得免疫回避機構を有しており、ワクチン候補抗原も異なった発育ステージに効くものを複数準備する必要があると考えられている。しかし、オーキネート表面蛋白以外の伝搬阻

止ワクチン候補抗原の研究は限られており、熱帯熱マラリア原虫において生殖母体表面蛋白が 2 種 (Pfs230 及び Pfs48) 同定されているのみであった。そこで、新規の三日熱マラリア伝搬阻止ワクチン候補抗原を同定することを目的に、本研究を実施した。

B. 研究方法

生殖母体期にも発現しており、ブースト可能な熱帯熱マラリア伝搬阻止ワクチン候補抗原と考えられている Pfs48 のアミノ酸配列を用いて三日熱マラリアゲノムデータベースを探索し、そのホモログと予想される遺伝子の部分塩基配列情報を検索した。SalI 株原虫ゲノム DNA を用いて検出された遺伝子情報を基に PCR 法にて増幅し、全長の遺伝子をクローン化し、更に DNA ワクチン用プラスミドを作成した。次にそれらの DNA ワクチンをマウスに免疫し、特異抗血清を作成した。これらの抗血清を用いた間接蛍光抗体法及びウエスタンブロット法により、原虫タンパク質の生殖母体における発現を確認し、さらに三日熱マラリア原虫流行地分離株を用いてこれらの遺伝子多型を解析した。

(倫理面への配慮)

タイ国における三日熱マラリア患者血液の採取に当たってはタイ国保健省の許可を得、患者への説明を十分行なった上で同意を得て実施した。動物実験は愛媛大

学総合科学研究支援センター生物資源分野の実施要領に基づいて実施した。

C. 研究結果および考察

熱帯熱マラリア伝搬阻止ワクチン候補抗原と考えられている生殖母体タンパク質 Pfs48 のアミノ酸配列を用いて、三日熱マラリアゲノムデータベースからそのホモログと予想される Pvs48 及び Pvs47 遺伝子の部分塩基配列情報を同定した。これらの情報を基に、SalI 株原虫ゲノム DNA から PCR 法を用いて Pvs48 及び Pvs47 遺伝子の全長塩基配列を解析した。Pvs48 及び Pvs47 の塩基配列から予想されるアミノ酸配列の特徴としては、いずれも N 末端にシグナル配列を持ち、C 末端には GPI アンカーと思われる短い疎水性領域が存在していた。またそれらの間には、システインに富む領域が存在し、Pfs48 との構造比較から 6 個の保存的なシステインが存在している「6-Cys Domain II」、2 個 (Pvs47) または 4 個 (Pvs48) の保存的なシステインが存在している「2/4-Cys Domain III」、6 個の保存的なシステインが存在している「6-Cys Domain IV」で構成されていた。これらの構造は、マラリア原虫に特異的な構造であった。

また RT-PCR 法を用いて Pvs48 及び Pvs47 遺伝子の転写を確認した。その結果、いずれもオーキネート及び無性生殖期の原虫では転写が認められず、生殖母体のステージにのみ転写されていた。し

たがって、これらは早期の有性生殖ステージ原虫に特異的と考えられた。またこの cDNA をクローン化した後塩基配列を解析した結果、いずれの遺伝子もイントロンを含んでいないことが判明した。

次にこれらの遺伝子を個別に DNA ワクチン用プラスミド (VR1020) にクローン化した。またそれらの DNA ワクチンをマウスに免疫し、特異抗血清を得た。これらの抗血清と三日熱マラリア原虫生殖母体を抗原に用いた Western blot 法及び間接蛍光抗体法により、Pvs48 及び Pvs47 がいずれも約 50kDa の蛋白として生殖母体表面に特異的に発現していることが確認された。またこれらの抗血清は、非還元条件下ではより強く原虫蛋白を認識し、明らかに移動度の異なる二種の蛋白をそれぞれ認識していた。以上の結果より、DNA 免疫法を用いることにより、システインに富む Pvs48 及び Pvs47 のいずれの立体構造も認識できる特異抗体が作成できることが判明した。またこれらの結果は、1993 年から現在まで、いかなる組換え蛋白を用いても特異抗体を作成できなかった熱帯熱マラリア原虫伝搬阻止ワクチン候補抗原 Pfs48 の研究にも応用しうる有用な知見と考えられた。

次にタイ、バヌアツ、コロンビアのマラリア流行地において得られた三日熱マラリア原虫株 DNA から PCR 法を用いて Pvs48 及び Pvs47 遺伝子の全長を増幅し、遺伝子多型の解析を行った。その結果、23 分離株の解析から、Pvs48 では 4

カ所の同義置換、7 カ所の非同義置換が認められ、非同義置換は C 末端に近い 6Cys の部分に比較的多数認められた。また、Pvs47 では 3 カ所の同義置換、15 カ所の非同義置換が認められ、非同義置換は前半部の 6Cys-2Cys の部分に集中していた。これらの結果は、Pfs48 で報告されているのと同様であり、多型に地域的偏りが認められた。また、これらのデータの集団遺伝学的解析から、少なくとも Pvs47 は、何らかの選択圧によって多型が生じていることが示唆された。また、Pvs48 においても、最後の「6Cys」ドメインは選択圧にさらされていることが示唆された。したがって、Pvs48 及び Pvs47 のいずれもヒトの免疫系にさらされている可能性が高く、ブースト効果の期待できる新規三日熱マラリア伝搬阻止ワクチン候補抗原と考えられた。今後、これらの抗血清の伝搬阻止活性を検討することが、重要な研究課題と考えられる。

D. 結論

新規三日熱マラリア伝搬阻止ワクチン候補抗原 Pvs48 及び Pvs47 の遺伝子クローン化に成功した。DNA ワクチンで作成した抗血清を用いた抗原タンパク質の性状解析、および抗原多型の解析より、いずれもヒトの免疫系にさらされている可能性が高く、ブースト効果の期待できる新規三日熱マラリア伝搬阻止ワクチン候補抗原と考えられた。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) T. Rungruang, O. Kaneko, Y. Murakami, T. Tsuboi, H. Hamamoto, N. Akimitsu, K. Sekimizu, T. Kinoshita, M. Torii
Erythrocyte surface glycosylphosphatidyl inositol anchored receptor for the malaria parasite.
Mol. Biochem. Parasitol. 140, 13-21, 2005.
- 2) O. Kaneko, B.Y.S. Yim-Lim, H. Iriko, I.T. Ling, H. Otsuki, M. Grainger, T. Tsuboi, J.H. Adams, D. Mattei, A.A. Holder, M. Torii
Apical expression of three RhopH1/Clag proteins as components of the *Plasmodium falciparum* RhopH complex.
Mol. Biochem. Parasitol. 143, 20-28, 2005.
- 3) T. Arakawa, A. Komesu, H. Otsuki, J. Sattabongkot, R. Udomsangpetch, Y. Matsumoto, N. Tsuji, Y. Wu, M. Torii, T. Tsuboi
Nasal immunization with a malaria transmission-blocking vaccine candidate, Pfs25, induces complete protective immunity in mice against field isolates of *Plasmodium falciparum*.
Infect. Immun. 73, 7375-7380, 2005.

2. 学会発表

- 1) Tsuboi T, Takeo S, Iriko H, Jin L, Han E-T, Kaneko O, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, Sawasaki T, Torii M, Endo Y.
Wheat germ cell-free system: A powerful tool to identify novel vaccine candidates based on the *Plasmodium falciparum* genome database.
ASTMH 54th annual meeting, Washington, DC, USA, December 11-15, 2005.
- 2) Takeo S, Iriko H, Jin L, Tsuchimochi M, Han E-T, Kaneko O, Torii M, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, Sawasaki T, Endo Y, Tsuboi T.
High-throughput screening for asexual blood stage *Plasmodium falciparum* vaccine candidates.
ASTMH 54th annual meeting, Washington, DC, USA, December 11-15, 2005.
- 3) Iriko H, Takeo S, Jin L, Kaneko O, Torii M, Sattabongkot J, Singh S, Sawasaki T, Endo Y, Tsuboi T.
Screening of novel malaria transmission-blocking vaccine candidates using wheat germ cell-free protein synthesis system.
ASTMH 54th annual meeting, Washington, DC, USA, December 11-15, 2005.

- 4) Iriko H, Kaneko O, Otsuki H, Tsuboi T, Torii M.
Gene conversion and extensive polymorphism of the RhopH1/clag family members in *Plasmodium falciparum*.
ASTMH 54th annual meeting, Washington, DC, USA, December 11-15, 2005.
- 5) 木村理沙、矢野和彦、駒木-安田加奈子、坪井敬文、鳥居本美、狩野繁之、河津信一郎
2-Cys 型ペルオキシレドキシシン (PfTPx-1)欠損熱帯熱マラリア原虫のトランスクリプトーム解析
第 74 回日本寄生虫学会大会、米子、4/8-9、2005。
- 6) 矢野和彦、駒木-安田加奈子、大槻均、坪井敬文、鳥居本美、狩野繁之、河津信一郎
2-Cys 型ペルオキシレドキシシン (TPx-1)ノックアウトがマラリア原虫の媒介蚊体内発育に及ぼす影響の解析
第 74 回日本寄生虫学会大会、米子、4/8-9、2005。
- 7) 大槻均、金子修、入子英幸、竹尾暁、坪井敬文、鳥居本美
ネズミマラリア原虫の赤血球結合分子相同体 EBL の局在と病原性
第 74 回日本寄生虫学会大会、米子、4/8-9、2005。
- 8) 鄭麗、金子修、大野民生、Rungruang T、橘真由美、城石俊彦、鳥居本美
Plasmodium yoelii RhopH 複合体の赤血球側レセプターの同定
第 74 回日本寄生虫学会大会、米子、4/8-9、2005。
- 9) 橘真由美、鄭麗、馮輝、金子修、鳥居本美
熱帯熱マラリア原虫の翻訳開始コードン周囲の塩基配列と翻訳効率
第 74 回日本寄生虫学会大会、米子、4/8-9、2005。
- 10) 梁惠賢、有末伸子、三田村俊秀、Udomsangpetch R、坪井敬文、鳥居本美、堀井俊宏
Studies of expressions and polymorphism of the SERA-homologous genes in *Plasmodium vivax*.
第 74 回日本寄生虫学会大会、米子、4/8-9、2005。
- 11) 入子英幸、竹尾暁、金玲、金子修、鳥居本美、坪井敬文
新規熱帯熱マラリア伝搬阻止ワクチン候補抗原のゲノムワイドな探索
第 74 回日本寄生虫学会大会、米子、4/8-9、2005。
- 12) 竹尾暁、入子英幸、金玲、金子修、鳥居本美、坪井敬文
熱帯熱マラリア原虫プロテインA

レイを利用した新規ワクチン候補
抗原分子の探索
第 74 回日本寄生虫学会大会、米
子、4/8-9、2005。

F. 知的財産権の出願・登録状況
特記すべきものはない

寄生虫症感受性の宿主因子の検討

長崎大・熱帯医学研究所 疾病生態分野 平山謙二 疾病生態分野 教授

研究要旨

マラリア感染による淘汰圧が存在するのかを検討する目的で、南太平洋のメラネシアに浮かぶ大小80の島からなるバヌアツ共和国の、マラリア非流行地（アネイチム）とマラリア中度浸淫地（ガウア、エロマンゴ）、高度浸淫地（サント、マラクラ、ペンタコスタ）の6島の小学生を対象として、 α サラセミア遺伝子変異、及びTNF α プロモーターアレルの解析を行い、マラリア浸淫度との相関について解析を行った。その結果、マラリア流行度とTNFPハプロタイプ遺伝子頻度との相関、さらにサラセミア遺伝子頻度とTNFP-D遺伝子頻度の相関について示したが、ほとんど相関係数が1に近く完璧な相関を示した。また、マラリアによる淘汰の指標となる α サラセミア遺伝子頻度と比較しても逆の相関が観察された。このことから、バヌアツにおいて、マラリア淘汰によりマラリア感受性に関連する遺伝子群の遺伝子頻度を変化させていったことが強く示唆された。

A. 研究目的

マラリアにおける鎌型赤血球症はヘモグロビンの異常遺伝子が、マラリア感染に対して有利に働くために選択され、マラリア流行地での遺伝子頻度の上昇をもたらしたという説は有名である。では、これ以外にも有利に働く遺伝子はないのだろうか？一般的には世界の各民族間に各遺伝子座のアレルや多型マーカーの遺伝子頻度に変動が観察されることは周知の事実であるが、その遺伝子頻度の変動が選択圧による結果か、それとも単なる民族間の相違によるものであるのかを区別することは極めて困難である。南太平洋のメラネシアに浮かぶ大小80の島からなるバヌアツ共和国は、人類学的に非常に興味深い地域であることが知られている。アフリカ大陸で誕生した人類の祖先は陸路をユーラシア大陸へ移動し、当時陸続きだったインドシナからインドネシア、パプアニューギニア、ソロモンと移動して行ったと推測されている。民俗学的な調査結果によれば、移住後には各島々に定住したとされており、その結果、島に言語が発達し約100もの言語が存在する。バヌアツは緯度の関係で南北で気候が大きく異なり、それによってマラリアの流行度に勾配が生じ、ハマダラカが生息しないバクストンライン以東のマラリア非流行地、中央部のマラリア中度浸淫地、高度浸淫地が存在する（図1）。

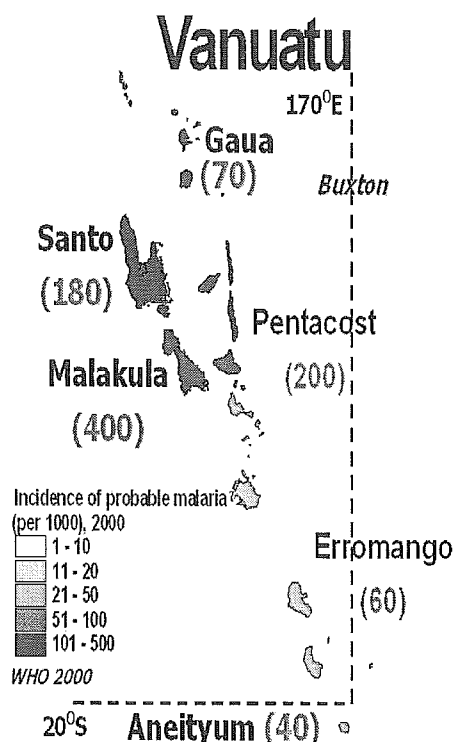


図1. バヌアツ各島におけるマラリアの浸淫度 (A. Kaneko,1998)

このことから、同一民族がマラリア浸淫度の異なる環境に暴露されたと過程することが可能である。実際にマラリアの淘汰圧が存在したのか、否かはバヌアツというある意味、

特殊な環境下において、初めてこの遺伝的淘汰に関する解析が可能であると考えている。ヘモグロビン異常症として、鎌状赤血球症やβあるいはαサラセミア（地中海性貧血）があげられているが、これらの遺伝病とマラリア抵抗性が報告されている。一方、我々がミャンマーにおいて TNF-α 遺伝子のプロモーター領域の一箇所の単一ヌクレオチド多型 (SNP) により重症型マラリア（脳マラリア）感受性が著しく上昇することを報告している。この、抵抗性あるいは感受性に関わる遺伝子がバヌアツでどのような変化をもたらしているのかを解析することにより、マラリア感染による淘汰圧がバヌアツに存在したのかを検討することを目的として本研究を行った。

B. 研究方法

対象とする、バヌアツ諸島の島はマラリア非流行地（アネイチム）とマラリア中度浸淫地（ガウア、エロマンガ）、高度浸淫地（サント、マラクラ、ペンタコスタ）の6島とする。共同研究を施行してきた東京女子医大・金子明博士により、10年以上のマラリア流行に関する疫学調査が進行している。対象とする6つの島の小学生を対象として行われる、マラリア感染調査時に紙採血を施行しDNAを抽出し、αサラセミア遺伝子変異、及びTNF αプロモーターアレルの解析を行い、マラリア浸淫度との相関について解析を行った。

C. D. 研究結果及び考察

TNF-α 遺伝子のプロモーター領域の一箇所の単一ヌクレオチド多型 (SNP) をメラネシアのバヌアツ諸島の6つのそれぞれマラリア流高度の異なる島の集団で観察したところ、流行度とこの感受性 SNP 遺伝子頻度との間に相関が認められた。マラリア感染率の高い島から順番に並べると TNFP-D 頻度は 0.26 からだんだんと上昇し、それとは反対にサラセミア遺伝子頻度は 0.37 から徐々に減少した。マラリア流行度と TNFP ハプロタイプ遺伝子頻度との相関、さらにサラセミア遺伝子頻度と TNFP-D 遺伝子頻度の相関について示したが、ほとんど相関係数が1に近く完璧な相関を示した。また、マラリアによる淘汰の指標となる αサラセミア遺伝子頻度と比較してもやはりきれいな逆の相関が観察された(図2)。3500年前に移動してきた共通の祖先集団がその後のマラリア淘汰によりマラリア感受性に関連する遺伝子群の遺伝子頻度を変化させていったことが強く示唆された。

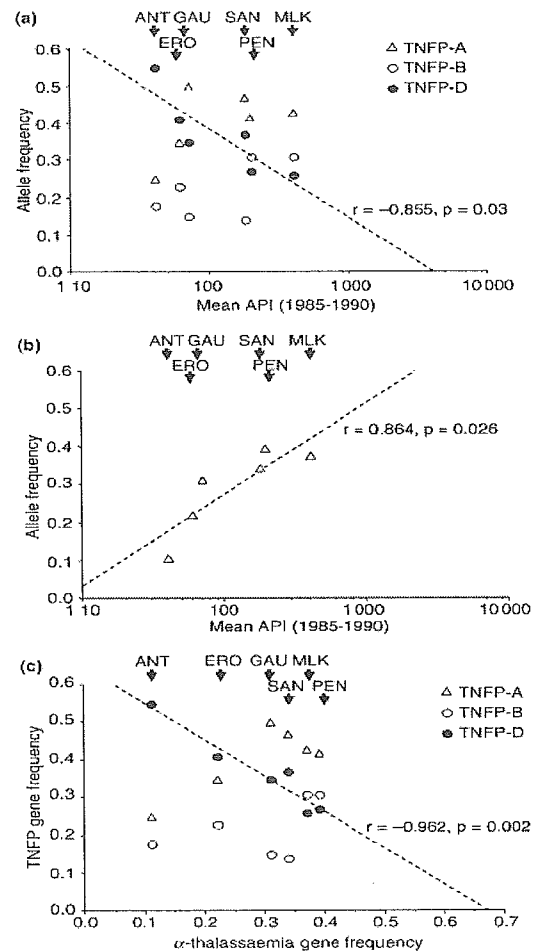


図2. マラリア浸淫度との相関

- TNFPD アレルとマラリア浸淫度
- α-thalassemia 遺伝子欠損とマラリア浸淫度
- TNFPD アレルとα-thalassemia 遺伝子欠損

E. まとめ

今後、バヌアツ諸島を対象地域としてマラリア感受性に関連する遺伝子群の遺伝子頻度を変化させるような淘汰圧の影響を免疫応答関連遺伝子群について解析を行い、感染症あるいは環境要因に影響を受けた可能性の高い遺伝子を検出することができれば、新たなマラリア感染の抵抗性・感受性遺伝子に関する知見のみならず、また、遺伝子多型の維持機構や遺伝子間相互作用解析等などの研究への発展も期待することができると考えている。

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 特許申請 なし

2. 実用新案特許 なし
3. その他 なし

G. 研究発表

1. 論文

1. R. Ubalee, T. Tsukahara, M. Kikuchi, K. J. Lum, M. Dzodzomenyo, A. Kaneko, K. Hirayama. Association between a susceptible TNF- α promoter allele and malaria endemicity in Vanuatu. *Tropical Medicine and International Health*.10(6): 544-549. June, 2005

2. M. Dzodzomenyo, A. Kaneko, M. Kikuchi, R. Ubalee, H. Osawa, T. Tsukahara, T. Tanihata, H. Perlmann, K. Hirayama, T. Kobayakawa. IL4 polymorphisms and IgE levels on malaria-endemic islands in Vanuatu. *J. of Tokyo Women's Medical University*, 75(3.4):82-89, 2005

3. Takeda, M., Kikuchi, M., Ubalee, R., Na-Bangchang, K., Ruangweerayu, R., Shibahara, S., Imai, S., Hirayama, K.. Microsatellite Polymorphism in the Heme Oxygenase-1 Gene Promoter is Associated with Susceptibility to Cerebral Malaria in Myanmar. *Jpn. J. of infectious disease.*, 58(5):268-71, 2005.

2. 学会発表

1. 平山 謙二 Vaccine and Diagnosis tool development for Schistosomiasis control 日本熱帯医学会九州支部会 1月21~22日平成17年
2. Kenji Hirayama, Chisei Satoh, Megumi Matsuo, Mihoko Kikuchi. Ratawan Ubalee, Takahiro Tsukahara, Koji J. Lum, Akira Kaneko. Genetic analysis of Malaria selective pressure influenced by variable malaria endemicities of four islands in Vanuatu. US-JAPAN, USA, WC, Dec.8~9, 2005
3. Kenji Hirayama. Immunity in Schistosomiasis. Scientific Working Group Meeting on Schistosomiasis. WHO/TDR, Switzerland, Geneva, 14-16, Nov. 2005.
4. Ratawan Ubalee, Takahiro Tsukahara, Mihoko Kikuchi, Koji J. Lum, Maui. Dzodzomenyo, Akira Kaneko, Kesara Na Bangchang, Kenji Hirayama. Associations between frequencies of a susceptible TNF- α promoter allele and protective α -thalassemias and malaria parasite incidence in Vanuatu. XVIth International Congress for Tropical Medicine and Malaria. Medicine and Health in Tropics, Marseille France, September 11~15, 2005

寄生虫症の病態発現調節に関する研究

分担研究者 有菌直樹 京都府立医科大学医学研究科寄生病態学教授

研究要旨：腸管寄生虫症に対する防御機構を解明する目的で、鉤虫症モデル *Nippostrongylus brasiliensis* (Nb) 感染ラット小腸上皮細胞における粘液コアペプチド、粘液糖鎖修飾に関する転移酵素及び杯細胞由来非粘液分泌ペプチドの遺伝子発現を real-time PCR 法で解析した。感染 2-4 日後の Nb が小腸に定着する時期に、粘液コア蛋白 MUC2、intestinal trefoil factor TFF3 及びシアル酸転移酵素 Siat4c の発現増強が、感染 1-2 週後の Nb が成熟した時期から排除される時期に、粘液コア蛋白 MUC3, MUC4, resistin like-molecule (Relm) β 、硫酸基転移酵素 3ST1 の発現増強が見られた。これらの結果から、感染後各種の杯細胞関連遺伝子が経時的に発現増強することが明らかになった。線虫排除時期に発現増強する遺伝子をさらに詳しく解析することにより新規の蠕虫防御因子が見出される可能性があると考えられた。

A. 研究目的

世界における回虫、鉤虫の感染者はそれぞれ 13-14 億人に達する。これら古典的消化管寄生虫症は低死亡率であることから国際医療協力の中で軽視されてきた。しかし、開発途上国においては回虫症や鉤虫症が小児の知的、身体的発育や成人の就労に大きな影響を及ぼしており、その結果生じる社会的損失はマラリアなどに比しても決して小さいとはいえない。本研究の目的は、消化管寄生線虫症によって生じる反応、特に杯細胞から分泌される粘液や非粘液分泌ペプチドを解析することにより、治療、予防に関わる新しい防御因子を探索することにある。

B. 研究方法

ヒト鉤虫症モデルとして、*Nippostrongylus brasiliensis*(Nb) 感染ラットを用いた。感染後経時的に小腸上皮細胞を単離し、total RNA を抽出後、cDNA を合成し、real time PCR 法で粘液コアペプチド MUC2, MUC3, MUC4、非

粘液分泌ペプチド Relm β , TFF3、シアル酸転移酵素 Siat 4c, 硫酸基転移酵素 3ST1, 3ST2, フコース転移酵素 FUT1, FUT2, FUT4 等の遺伝子発現を半定量化した。

C. 研究結果

BN ラットにおける上記杯細胞関連遺伝子の発現の感染後の変化を図 1 に示した。幼虫が小腸に到達する感染初期に粘液コアペプチド MUC2、粘液糖鎖末端のシアル化に関する Siat 4c 及び非粘液分泌ペプチド TFF3 の upregulation が見られた。線虫が小腸内で成虫に発育し産卵を始める感染 1 週間後から、線虫が小腸から T 細胞依存性に排除される感染 2 週間後には MUC2 及び TFF3 の発現は低下し、変わって MUC3, MUC4 の発現、硫酸基転移酵素 3ST1 及び非粘液分泌ペプチド Relm β の発現増強が見られた。Siat 4c の発現増強はこの時期まで維持されていた。一方、T 細胞依存性に線虫が排除された後にはこれらの発現は低下し、3ST2 の発現増強が見られた。

上述のような経時的遺伝子発現増強は、原則的に線虫が寄生する空腸の上皮において見られ、線虫の寄生しない回腸粘膜上皮では Relm β の発現増強を除いては見られなかった。F-344 系ラット及び BN を background とする

マスト細胞欠損 *W_s/W_s* ラットでも BN 系ラットと同様の結果が得られ、上述の変化はマスト細胞の活性化に依存しない変化であると考えられた (データ表示せず)。

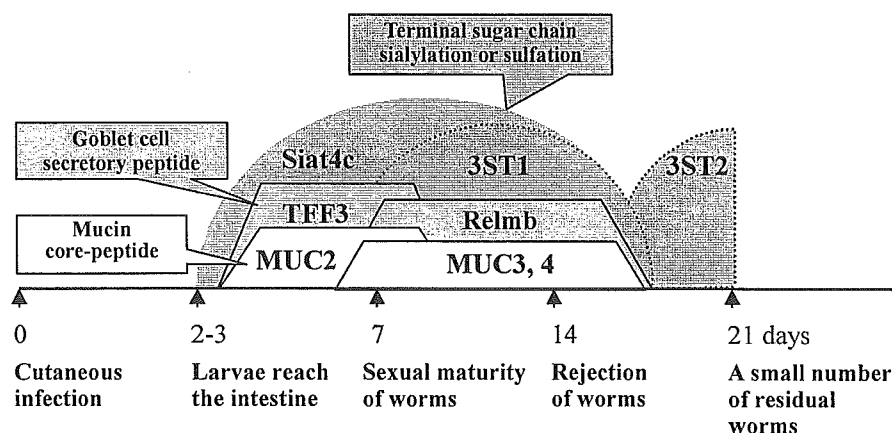


図 1. Successive upregulation of goblet cell- and mucin glycosylation-related genes in the intestinal epithelial cells during the course of *N. brasiliensis* infection.

D. 考察

本研究によって、小腸寄生線虫感染の初期から、寄生虫成長期、産卵期、排除期、排除後に至るまで、杯細胞関連遺伝子の発現が経時的に変化していくことが明らかになった。感染初期に見られる MUC2, Siat4c, TFF3 の発現増強は急性期反応の 1 つと考えられた。一方、線虫の産卵時期から排除時期にかけては MUC3, MUC4, Relm β 及び硫酸転移酵素の 1 つ 3ST1 の発現増強が見られた。これらの線虫に対する作用をさらに詳しく解析することにより新規の蠕虫防御因子が見出される可能性が示唆された。

E. 結論

線虫感染によって各種の杯細胞関連遺伝子が経時的に発現パターンを変化させることが明らかになった。線虫排除時期に発現増強する遺伝子をさらに詳しく解析することにより新規の蠕虫防御因子が見出される可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yamauchi J, Kawai Y, Yamada M, Uchikawa R, Tegoshi T, Arizono N. Altered expression of goblet cell- and mucin glycosylation-related genes in the intestinal epithelium during infection with the nematode *Nippostrongylus brasiliensis* in rat. APMIS 2006 (in press)

2. 学会発表

Arizono N, Kawai Y, Yamauchi J, Yamada M. Expression of goblet cell/mucin synthesis-related genes during infection with the nematode *Nippostrongylus brasiliensis* in rat. The 11th Korea-Japan Parasitologist's Seminar, Seoul, 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

フィラリア症の疫学研究（診断法の開発と野外応用）

分担研究者 木村英作 愛知医科大学医学部教授

研究要旨

血液の代わりに尿を検体とする免疫診断法（尿 ELISA）は、サンプル採取が非侵襲的で容易なため人々の協力が得やすく、野外調査に大変適した方法である。特に乳幼児や児童を対象とする野外調査には威力を発揮する。我々はこれまでに幾つかの尿診断法を開発したが、その実用化に向け、様々な条件下での野外応用を試みている。これまでの研究により、フィラリア特異的尿 IgG4 抗体の検出は感度・特異性が高く、隠れた流行地の発見、治療効果の判定、撲滅達成の確認作業に有効であることが示された。

A. 研究目的

WHO の主導による、世界からのリンパ系フィラリア症撲滅計画は、2020 年の達成を目差して多くの流行国で実施されている。その基本戦略は、抗フィラリア薬による集団治療であるが、治療効果の判定には夜間採血によりミクロフィラリアを検出するという古典的な方法が広く用いられている。本研究では、血液の代わりに尿を検体とする免疫診断法を利用し、(i) 隠れた流行地の発見、(ii) 治療効果のモニタリング、(iii) 撲滅の確認作業を行うことを目的とする。さらに、(iv) 途上国で使用できる安価で簡便な尿診断法を開発する。

B. 研究方法

本年度は主として目的 (ii) および (iii) に関する研究を行った。

1. 治療効果のモニタリング

スリランカ、デニヤヤ地方の小・中学生約 1,000 人を対象に、過去 4 年にわたり集団治療の前後で尿中 IgG4 の測定を続けている。

2. 撲滅の確認作業

フィラリアが既に撲滅されたという認定を受けた過去の流行地（中国河西省高安市）において、免疫学的に撲滅を確認することを目的として、高安市全域から選ばれた 57 の小・中学校において 7,998 人（5～16 才）を対象に尿 IgG4 を測定した。尿検査

が陽性であった者は再検査を行うとともに、血中マイクロフィラリアおよびフィラリア抗原の検出（Og4C3 ELISA による）も行った。

（倫理面の配慮）

全ての研究は、愛知医科大学倫理委員会の審査・承認を受けた。また、海外共同研究者の所属する機関においても同様の審査・承認を得た（スリランカではルフナ大学医学部倫理委員会、中国では Chinese Center for Disease Control and Prevention, Shanghai）。実施に当たり児童、父兄よりインフォームドコンセントを得ている。

C. 研究結果

1. 治療効果のモニタリング

デニヤヤでは 2002 年の集団治療前、尿 ELISA 陽性率は 3.2%であったが、第 1 回の治療により 0.9%に、第 2 回の治療により 0.4%まで低下した。また、抗体価の減少も認められた（図 1）。

2. 撲滅の確認作業

高安市で計 7,998 人の生徒が検査され、28 サンプル（0.35%）が尿抗体陽性と判定された。陽性者は全員 6 か月後に再検査されたが全て陰性であった。また、マイクロフィラリア、血中フィラリア抗原も全て陰性であった（図 2、3）。

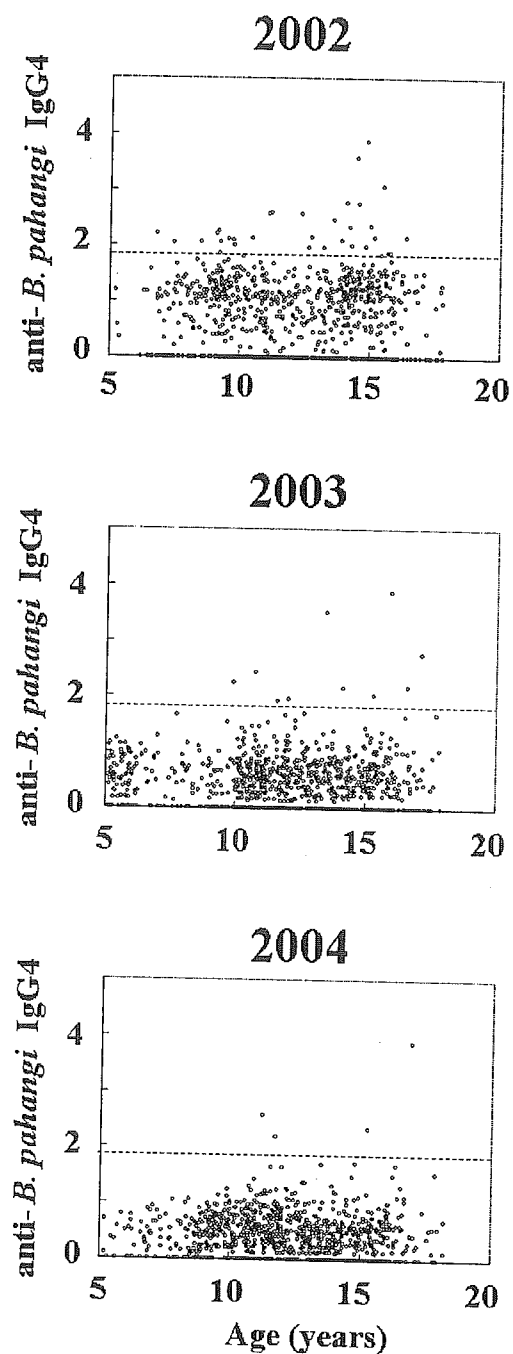


図 1



図 2

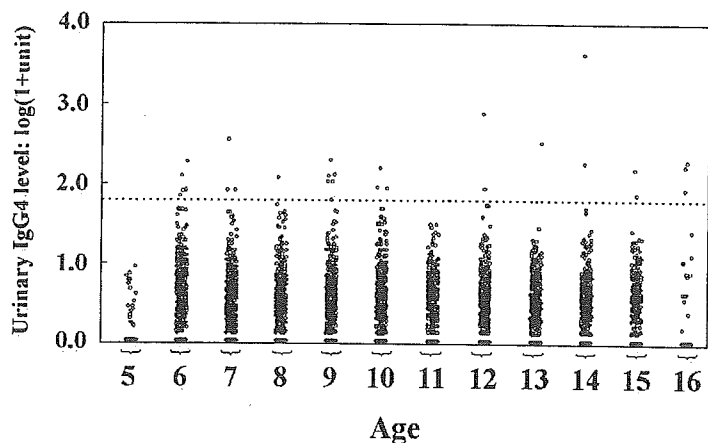


図 3

D. 考察

IgG4 抗体は、過去のフィラリア感染でも陽性となるので流行地の大人の陽性率は非常に高い。従って、最近のフィラリア伝播の程度を知るためには幼小児・学童における抗体価の分布、時間的推移を調べる事が重要である。この意味で、尿をサン

プルとする検査法は理想的である。学校で実施する場合、短時間で多数のサンプルを集めることができる。

スリランカ、デニヤヤの小学校では、年一回の集団治療により着実に陽性率、抗体価の減少が観察された。これによって尿 ELISA が治療効果のモニタリングに利用できる可能性が