

示された。

中国におけるフィラリア症撲滅の認定は厳しい基準に基づいており、最低 10 年間の観察期間を要する。すなわち、撲滅の認定がなされた場合には少なくとも 10 才以下の子供達は全員が尿抗体陰性となることが期待される。高安市の学童を対象とする尿検査では陽性率 0.35% という低い値が得られた。尿再検査、マイクロフィラリア検査、抗原検査すべて陰性であったことより、陽性者は偽陽性であったと考えられる。これは、特異性が極めて高い (99.65%) ことを示しており、尿 ELISA が撲滅の確認にも利用できることが証明された。

E. 結論

尿 ELISA は感度、特異性が高く、(i) スリランカでは集団治療の効果判定 (モニタリング) に利用できること、(ii) 中国ではフィラリア症撲滅の確認作業に応用できることが示された。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Differential effects of diethyl-carbamazine, tetracycline and the combination on *Brugia pahangi* adult females in vitro. Gunawardena NK, Fujimaki Y, Aoki Y, Mishima N, Ezaki T, Uni S, Kimura E. *Parasitology*

International, 54: 253-259, 2005.

(2) Molecular phylogenetic relationships among seven Japanese species of *Cercopithifilaria*. Agatsuma T, Iwagami M, Uni S, Takaoka H, Katsumi A, Kimura E, Bain O. *Parasitology International*, 54: 195-199, 2005.

2. 学会発表

(1) フィラリア特異的な尿中 IgG4 抗体を検出する尿 ELISA 法の有用性に関する研究

—中国江西省における調査—. 伊藤誠、李志宏、伍衛平、孫徳建、木村英作. 日本熱帯医学会大会. 2005 年 10 月(京都)

(2) Prevalence of *Leishmania donovani* specific urinary antibody in a community in Bangladesh. Islam MZ, 伊藤誠, Islam Md. Anwar Ul, Ekram ARM Saifuddin, 高木秀和, 橋口義久, 木村英作. 日本熱帯医学会大会. 2005 年 10 月(京都)

(3) 尿 ELISA 法によるリンパ系フィラリア症集団治療のモニタリング. 伊藤誠, Weerasooriya MV, 磯貝芳徳, Gunawardena KN, Mudalige PSM, Yahathugoda C, Wickrema D, 木村英作. 日本寄生虫学会西日本支部大会. 2005 年 11 月 (高知)

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当無し

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

回虫及びマダニ生物活性分子の機能解明
分担研究者 辻 尚利 動物衛生研究所主任研究官

回虫個体内で発現する無機ピロフォスファターゼ（AsPPase）の機能を明らかにした。AsPPaseは回虫幼虫期の発育に欠かせない脱皮作用に関与していることから新規抗寄生虫薬の標的分子であることが示唆された。また、RNA干渉法を用いてマダニセリンプロテアーゼが新規抗マダニ剤の標的分子の一つであることを明きからにした。

A. 研究目的

本研究では、宿主体内（回虫）及び体表（マダニ）で生き延びるために狡猾な生残戦略を備えていると想定される回虫及びマダニ遺伝子産物の機能解明を実施し、利己的遺伝子戦略・分子戦略を阻害することのできる新しい寄生虫感染防除技術の確立し、薬物残留が危惧されている現在の化学療法剤に依存した駆虫法の脱却をめざす。

B. 研究方法

寄生線虫の回虫及び感染症を媒介者であるマダニの生残に必須な生物活性分子（蛋白・酵素）をコードする遺伝子を単離する。組換え蛋白質を用いて標的遺伝子産物の生化学的・酵素学的性状を明らかにし、寄生虫生活環を支える遺伝子産物の機能を推定する。さらに、RNA干渉法による逆遺伝学的手法を用いて標的遺伝子のノックダウン寄生線虫及びマダニを作製し、*in vivo*における標的遺伝子産物の機能解明を実施する。具体的には以下の手法を用いて検討した。

- 1) 感染幼虫及び体内移行幼虫の2次元電気泳動分離抗原と豚回虫免疫血清の反応する抗原スポットの同定ならびにそれらのN末及び内部アミノ酸配列解析を実施した。
- 2) アミノ酸配列情報をもとに抗原をコードするcDNA遺伝子クローニングを実施した。
- 3) 組換え抗原を大腸菌及び酵母で作製し、組換え抗原に対する特異抗体を作製した。
- 4) イムノブロット法による組換え抗原と豚回虫免疫血清との反応性、特異抗体を用いた虫体抽出蛋白質及び免疫組織化学からのネイティブ型抗原を同定した。
- 5) 組換え抗原の生化学的性状解析。

- 6) 組換え抗原の免疫学的性状解析。

- 7) 標的RNAに対するdsRNAを合成し、回虫幼虫ステージの培養液への添加及び成ダニの第4脚への注入を行い、回虫及びマダニの生存に与える影響を調べた。

C. 研究結果

回虫：抗寄生虫薬の候補分子として期待されて回虫無機ピロフォスファターゼ（AsPPase）の分子性状及びRNA干渉法(RNAi)による逆遺伝学的性状について検討した。AsPPaseはアミノ酸360残基で構成され、内在型AsPPaseの分子量は39kDa等電点7.1であった。内在性AsPPaseの発現はクチクラ下層、消化管上皮、子宮上皮で確認され、ヒト回虫を含む回虫類で認められた。大腸菌発現の組換えAsPPase(rAsPPase)はピロリン酸(PP_i)を生リン酸(P_i)へ加水分解する活性($937 \mu\text{mol } P_i \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein}$, $k_{\text{cat}} 638 \text{ s}^{-1}$ at 55°C)の保持が確認された。酵素活性は Mg^{2+} 濃度に依存し、 Ca^{2+} によって阻害されることが分かった。rAsPPaseの V_{max} は $K_m: 0.117 \pm 0.006 \text{ mM } (PP_i)$ で $849.005 \pm 14.635 \mu\text{mol } P_i \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein}$ であった。そこで、ブタ回虫幼虫の*In vitro*培養系を用いてはじめにPPase阻害剤(IDP、NaF)添加による虫体への影響を調べた。阻害剤添加のL3では脱皮が認められず、添加後3週間でもL3は生存しL4への発育は確認されなかった。さらに、内在性AsPPaseの機能を明らかにするため、RNAiによるAsPPaseノックダウンL3を作製した。回虫培養系へのAsPPase dsRNA添加によってL3の内在性AsPPase発現及び酵素活性が特異的に抑制され、同時にL4への脱皮が阻止されることが分かった。

マダニ：国内最優先種のフタトゲチマダニ

Haemaphysalis longicornis の中腸上皮細胞より分離したマダニセリンプロテアーゼ様分子 (HISP) は吸血によって取り込んだ宿主血液の消化に重要な役割をはたすこと明らかにした。今回、HISP の吸血時における機能について検討するため、RNA 干渉 (RNA interference : RNAi) による HISP 遺伝子の発現抑制を試みた。HISP 酵素活性ドメインに対応する領域から逆転写酵素反応によって HISPdsRNA を合成し、成ダニ第 4 脚基節より血体腔に注入した。HISPdsRNA を注入した成ダニは耳袋法を用いてウサギより 6 日間吸血させた後、HISPmRNA および内在性 HISP の発現を調べた。HISPdsRNA で処理した成ダニでは、HISPmRNA および内在性 HISP の特異的な発現抑制が確認された。さらに、HISPdsRNA 処理群の成ダニでは、PBS のみを注入した対照群と比較して、吸血に伴う体重の増加が有意に阻害された。

D. 考察

回虫 : AsPPase は回虫幼虫期虫体の発育、とりわけ脱皮の過程に重要な役割を果たしている酵素であることが示唆された。また、AsPPase 遺伝子のノックダウン回虫が作製できたことにより回虫培養液への dsRNA を添加によって目的とする内在性蛋白の発現が抑制できることが分かった。

マダニ : HISP ノックアウトマダニの作製によって HISP は *H. longicornis* の吸血行動に重要な役割をはたしていることが分かった。

E. 結論

回虫無機ピロフォスファターゼ及びマダニセリンプロテアーゼ様分子は回虫、マダニの生存に必須であることから、これら分子を標的とする新規の抗回虫薬及び抗寄生線虫薬、さらに抗マダニ薬・外部寄生虫薬の開発が期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

Islam MK, Miyoshi T, Yamada M, Tsuji N. (2005). The roundworm *Ascaris suum* pyrophosphatase plays an essential role in worm's molting and development. *Infect Immun.* 73, 1995-2004.

Islam MK, Miyoshi T, Tsuji N.

(2005). Vaccination with recombinant *Ascaris suum* 24-kilodalton antigen induces a Th1/Th2-mixed type immune response and confers high levels of protection against challenged *A. suum* lung-stage infection in BALB/c mice. *Int J Parasitol* 35, 1023-1030.

2. 学会発表

辻 尚利、藤崎幸蔵. パベシア原虫媒介者のフタトゲチマダニ中腸内生物活性分子の機能解明. 第 18 回日本ダニ学会
三好猛晴、辻 尚利、黄 暁紅、藤崎幸蔵. 吸血行動に関与するフタトゲチマダニ *Haemaphysalis longicornis* 由来 cubilin 関連セリンプロテアーゼの遺伝子発現抑制. 第 74 回日本寄生虫学会大会.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他
以上なし

平成 17 年度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
(日米医学協力研究会寄生虫疾患専門部)

中国南部における元住血吸虫症流行地の寄生虫性疾患に関する疫学的研究

分担研究者 川中正憲 国立感染症研究所寄生動物部

協力研究者 余森海 中国疾病予防センター寄生虫病研究所

協力研究者 黎学銘 中国広西壮族自治区予防医学研究所

研究要旨：中国有数の日本住血症有病地であった広西壮族自治区における現在の寄生虫疾患として、さきに肝吸虫症、腸管寄生線虫症、肺吸虫症、有鉤及び無鉤条虫と有鉤囊虫症の侵淫状況について報告した。この地域住民の肝吸虫感染率は、1989年の18%から大きく増加して今回の調査では31.5%にのぼり、感染強度を表現する虫卵排出数は平均で5,159EPG（1グラム中の虫卵数）であることが記録されている。したがって、この地域における肝吸虫伝播の疫学的な要因を解析することが、肝吸虫症を制御するストラテジーを設定することに繋がると考えられた。

A, 研究目的

一昨年度に引き続き、中国南部における元住血吸虫症流行地の寄生虫性疾患に関する疫学的調査を実施した。中国広西壮族自治区（省）において3ヵ所の調査区を設定し、より包括的に肝吸虫症を制御するストラテジーを立てる目的で肝吸虫症に関する人々の意識を探るべくアンケート調査を行った。

B, 研究方法

調査地と内容

前年に肝吸虫症の調査地として選んだ横県(Hengxian)地域を引き続き対象地とした。この地域にある三つ

の村を選び、それぞれ500人についてインタビューによるアンケート調査を実施した。他方で、ネコ、イヌ、及びブタの肝吸虫感染状況を知るために糞便を集め、また、感染源調査のために淡水魚を養魚池及び市場から集めてメタセルカリアの検査を行った。

用いた方法

1、アンケート調査：質問は27項目で、肝吸虫に関する知識、魚の食べ方、魚の入手法と料理法、病歴と病気に対する態度などからなる。更に付け加えて、9項目は養魚場の所有者へ、もう一つは料理店の所有者と料理人への

質問とした。アンケートは匿名で回答を集め、全てのインタビューはインタビューの前に簡単に訓練された。

- 2、それぞれの村のネコ、イヌ及びブタの糞を 10 サンプルずつ採集し、ホルマリンエーテル集卵法で肝吸虫卵の検査を行った。
- 3、スライスされた魚肉サンプルは、ペプシンを含む人工消化液に 12 時間処理を行い実体顕微鏡の下で肝吸虫メタセルカリアを検査した。
4. SPSS ソフトウェアとカイ二乗テストを統計分析のために用いた。

研究結果

アンケート調査

アンケートを受け取った居住者の数は Shitang、Xiaoyi と Lingzu の郡区の町から、それぞれ 520、497、および 504 であった。これら 1521 人の被面接者のわずか 36%が肝吸虫症の知識があり、32%の人は病気がどのように感染するかということを知っていた。肝吸虫を知っていた人々のうち 54%(296/551)は、その感染が病気の原因になる事を認識していたが、残る 46%の人々は特別な害は無いと考えていた。魚の摂食方法については、インタビューした人の 51% (773/1521) が、少なくとも月に 1-2 回生食をしており、その多くが中年男性 (404/773) であった。また、1 ヶ月あたり、10 回以上、魚を生食した人々のうち 96 パーセント(81/84)が

成人男性であることが明らかとなった。魚の生食の主な方法は、スライスにして食するもの(720/773)で、殆どが家庭で食べられており(689/773)、最もよく食べられているのは *Ctenopharyngodon idellus* (grass carp、ソウギョ)であった。

今回の調査により、被面接者の 8%(121/1521)が、生魚を調理するための同じまな板、ナイフ、および他の用具を用いて、他の食物をも調理している事が明らかになった。罹患歴に関する質問では、14%(217/1521)がかつて検査を受けたことがあり、8%(117/1521)は治療を受けたことがあると答えているが、36%(544/1521)の人々については、検査を受けたいとは思わなかったと答えている。また、魚の生食をしないようにとのアドバイスに従うかどうかを質問したところ 73%(1103/1521)の人々は、そのつもりはないと答えている。年齢別にこの質問に対する答えを解析したところ 30 歳以上の人々については、60% もの人に生食の習慣があり、そのうち 67%~80%でこの習慣をやめるつもりはないと答えており、全体での比率は 73%(1103/1521)にものぼった (表参照)。

養魚場の所有者へのインタビューについては次のような結果が得られた。魚に与えるエサについて、25%(14/56)が家畜の排泄物を用い、9%(5/56)は人の排泄物を用いていると答えている。養魚場から外周の 50 メートル以内に存在するものとして、

便所が 36%(20/56)、ブタ小屋が 37%(21/56)であり、人糞を肥料として用いている農地が存在しているのは 48%(27/56)にのぼっていた。雨が降るようなことがあれば、養魚場の 68%(38/56)で、子供や動物からの糞便や屑が池に流れ込む。中間宿主貝を減少させると思われる養魚場の清掃を 2 年に一度実施しているのは 52%(29/56)であった。また、調査した 33 の料理店のマネージャーと料理人に対して、客が最も好む献立は何であるか聞いたところ、生魚のスライス（刺身）であるとしたのは、33 店全部であった。

家畜と淡水魚の肝吸虫調査

調査地として選んだ 3 つの村におけるネコ、イヌ、ブタの感染率は、動物種ごとに 70%(21/30)、50%(16/32)、および 27%(8/30)であった ($P < 0.05$)。人々が好んでいる魚種について、それぞれの村の養魚場から 10 匹ずつ捕獲し、検査に供した。その結果、肝吸虫メタセルカリアの感染率は、全体で 40% (35/88) であり、魚種別には、30%(*Rhodeus sinensis* : タナゴ、*Mylopharyngodon piceus* : アオウオ)、43%(*Opsariichthys bidens* : オイカワ類似)そして、60%(*Toxabramis houdemeri* : モツゴ類似)であった。一方で、市場から同数の魚種について

検査したところ、肝吸虫メタセルカリアの感染個体は見つからなかった。

E, 結論

肝吸虫の疫学要因を解析した本研究は、衛生知識の欠如や思い込み、不健康な行動、貧しい環境衛生、不十分な農業や漁業習慣などが、肝吸虫症の罹患率を高く維持している重要な要因であることを明らかにした。このような状況にあっては、衛生教育と環境改善(適切に作られた便所と豚小屋、衛生状態の改善)とを組み合わせ、伝統的な農業/漁業の習慣を変革し、寄生虫の集団駆虫と家畜の適切な管理など実施することが重要であると考えられた。

F, 健康危険情報

なし

G, 研究発表

1、論文発表

Lin, R., Li, X., Lan, C., Yu, S. & Kawanaka, M. Investigation on the epidemiological factors of *Clonorchis sinensis* infection in an area of south China. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health 36 (5), 114-117, 2005.

住血吸虫の寄生適応機構の分子解析

分担研究者 金澤 保（産業医大・寄生虫学熱帯医学）

研究協力者 熊谷 貴 長田 良雄

研究要旨

住血吸虫は組織内・血管内で生存するために、様々な活性酸素種（ROS）からの回避が必要である。我々は日本住血吸虫の抗酸化タンパクであるチオレドキシシンペルオキシダーゼ（TPx）について、3種類の遺伝子をすでにクローニングしている。今回、TPxの虫体組織内の分布を解析した結果、TPx-1は虫体の外被に、TPx-2は体肉および腸管上皮に局在していることが明らかになった。またRNAi法を用いてTPx-1遺伝子をノックダウンすると、過酸化水素に対する感受性が増大した。これらの結果から、Tpx-1は虫体外部環境で産生される活性酸素からの防御に関係していることが判明した。

A. 研究目的

寄生虫はさまざまな方法で宿主体内の環境に適応し生存していることが知られている。住血吸虫はとりわけ組織内・血管内で生存するために、様々な場面で発生する活性酸素種（ROS）からの回避が必要である。この機構を解明することは、主に途上国で蔓延する住血吸虫症に対する新規治療薬の開発へとつながるとともに、日本国内で感染例のある他の多くの寄生虫症の治療法開発においても重要な知見を提供すると考えられる。

我々は日本住血吸虫の抗酸化タンパクであるチオレドキシシンペルオキシダーゼ（TPx）に着目し、3種類のTPx遺伝子の全長cDNAをクローニングした。さらに、RT-PCRとウェスタンブロットを用いて日本住血吸虫のすべての発育段階でこれら3種のTPx遺伝子が発現していることをすでに見出している。

本年度は、特異抗体を用いてTPxの住血吸虫組織内の分布を明らかにし、またRNAi法を用いてTPx遺伝子をノックダウンすることにより

その機能を推測することを目的として実験を行った。

B. 研究方法

1. 虫体内における分布

すでに作製したTPxに対する特異抗体を用いて、日本住血吸虫成虫切片および、シストソミユラに対して間接蛍光抗体法を行った。

2. 活性酸素抵抗性における役割

TPx-1・TPx-2それぞれをコードするdsRNAを作製し、シストソミユラに対して100nMの濃度でRNAiを行った。6日間培養後、それぞれ処理を行ったシストソミユラからRNAを回収し、特異的なTPx遺伝子ノックダウンを確認した。その後、遺伝子ノックダウンしたシストソミユラを過酸化水素で処理し、その生存率を対照群と比較した。

[倫理面への配慮]

実験動物処置の際は必ず麻酔を使用した。産業医科大学動物実験及び飼育倫理審査において

承認を受けている（承認番号：AE04-006）。なお本研究では人体材料は用いていない。

C. 研究結果

1. 虫体内における分布

TPx-1 はシストソミユラや成虫の外被に存在していた。一方、TPx-2 は外被ではなく、体肉および腸管上皮に存在することが明らかになった。

2. 活性酸素抵抗性における役割

RNAi により TPx-1 遺伝子をノックダウンしたシストソミユラにおいては、過酸化水素に対する感受性が増大した。一方、TPx-2 遺伝子をノックダウンしたシストソミユラでは、過酸化水素に対する感受性に変化は見られなかった。

D. 考察

虫体内における局在から、TPx-1 は宿主免疫細胞による外部からの活性酸素種の除去に、TPx-2 はシグナル情報伝達や、またはヘモグロビンの代謝過程で生じる活性酸素の除去に関わっている可能性が推測された。

また、遺伝子ノックダウン試験の結果から TPx-1 は虫体外環境で産生される活性酸素から幼虫を防御することに関与しているが、TPx-2 はこれに関与していないことが確認された。

E. 結論

TPx-1 は虫体の外被に存在することにより外部環境で産生される活性酸素の防御に関与していることが分かった。また TPx-2 の局在は TPx-1 の局在とかなり異なり外部からの過酸化水素に対する抵抗性にも関与していないことから、住血吸虫が複数の TPx 分子を機能的に使い分けて生体内の複雑な酸化ストレスに対応していることが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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 hybridomas and identification of a T cell epitope that stimulates IFN γ production.
Vaccine Vol.23, No. 21: 2813–2819, 2005.

Osada Y, Kumagai T, Masuda K, Suzuki S, Kanazawa T.
Mutagenicity evaluation of *Schistosoma* spp. extracts by the *umu*-test and V79/HGPRT gene *mutational assay* Vol.54, No.1: 29–34, 2005.

Kumagai T, Maruyama H, Hato M, Ohmae H, Osada Y, Kanazawa T, Ohta, N.
Schistosoma japonicum: localization of calpain in the penetration glands and secretions of cercariae.
Exp Parasitol. Vol.109: 53–57, 2005.

Shaohong L, Kumagai T, Qinghua A, Xiaolan Y, Ohmae H, Yabu Y, Siwen L, Liyong W, Maruyama H, Ohta N.
Evaluation of the anthelmintic effects of artesunate against experimental *Schistosoma mansoni* infection in mice using different treatment protocols.
Parasitol Int. Vol. 1: 63-8, 2006

2. 学会発表

熊谷 貴、長田 良雄、金澤 保
過酸化水素存在下で誘導される日本住血吸虫 thioredoxin peroxidase の解析
第 74 回 日本寄生虫学会大会
米子(2005 年 4 月)

熊谷 貴、長田 良雄、金澤 保
日本住血吸虫 thioredoxin peroxidase の組織内発現分布
第 58 回 日本寄生虫学会南日本支部大会 第 55 回 日本衛生動物学会南日本支部会 合同大会
宮崎市(2005 年 10 月)

熊谷 貴、長田 良雄、金澤 保
日本住血吸虫 thioredoxin peroxidase の組織内分布
第 4 回 分子寄生虫・マラリア研究フォーラム
東京(2005 年 11 月)

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

地域参加型の住血吸虫症対策モデルの構築

分担研究者 門司和彦 長崎大学熱帯医学研究所 教授

本年度はケニアにおける国際協力機構が実施する ESACIPAC (Eastern and Southern Africa Centre for International Parasite Control) プロジェクトに協力し、地域参加型の住血吸虫症および土壌伝播寄生虫疾患対策モデルの構築にむけた基礎的研究を支援した。また、ラオスでのタイ肝吸虫感染の疫学調査を実施した。

A. 研究目的

アフリカ・アジアにおける地域参加型の寄生虫疾患対策モデルの構築にむけた基礎的研究として、住血吸虫、土壌伝播寄生虫、タイ肝吸虫を対象とした研究を実施した。

B. 研究方法

ケニアでは国際協力機構が実施する ESACIPAC (Eastern and Southern Africa Centre for International Parasite Control) プロジェクトに協力し、住血吸虫症および土壌伝播寄生虫疾患対策に関するデータの統計解析を実施した。ラオスでは中部の継続的調査地で小学生のタイ肝吸虫の駆虫を行いその後の体重増加について検討した。

C. 研究結果

1. ケニアでの研究

以下の ESACIPAC の活動・研究結果に対して、データのまとめ方、統計解析についてサポートを行った。

1) ケニア、キリニャガ郡、ムエア地区における小学生の学校便所の清潔度に関する認識と改善に対する意見 (Primary school children' perception on cleanliness of school latrine and their opinion for improving school latrine in Mwea Division, Kirinyaga District, Kenya)

同地区の 28 小学校の 6 年生 407 名に彼らの学校の便所についてその清潔度を聞いたところ、41%がきれい、42%が普通、18%が汚いと回答した。汚いと回答した者は公立校で灌漑外の地域の小学生が多かった。便所の清潔

度は「喜んでトイレ掃除をする」「便所の問題を気にしている」「使用後に手を洗う」と正の関連を示し、「便所を使用しないようにしている」「便所を使いたくない」と負の関連を示した。生徒があげた便所の問題としては、「ドアがない」「便所の数の不足」「汚れている・詰まっている・蛆がいる」「手洗いの水がない」などであった。本研究は、生徒の認識と意見を聞くことが学校便所の評価に有効であること、学校の便所の改良が生徒の衛生行動にとって重要であることを明らかにした。

2) 住民参加を通しての学校衛生施設の改善マニュアル(Manual for Improvement of Sanitary Facility in School through Community-oriented Approach)

本マニュアルの改訂は最小限に抑え、簡易版「校長ガイド：衛生的な学校トイレ建設のための 10 ステップ (School Headmasters' Guide: Ten Steps for Constructing Sanitary School Latrine: also useful for school teachers and health personnel)」を作成した。10 ステップは以下の通りである。

- STEP 1 学校便所の重要性を理解しよう。
- STEP 2 学校便所の問題点を明らかにしよう。
- STEP 2a (選択) 寄生虫蔓延状況を把握しよう。
- STEP 3 自分で今できることを始めよう (自力本願)。
- STEP 4 地域住民を学校便所建設に巻込もう。
- STEP 5 新しい衛生的な学校便所を計画しよう。
- STEP 6 建築予算を計算し、支出先と相談しよう。
- STEP 7 さあ建設を始めよう。
- STEP 8 しっかり進行を監督し、問題点を改善しよう。
- STEP 9 建設を完成させよう。

STEP 10 衛生的な学校便所を正しく使用しよう。

3) ケニア・ムエア地区の大人のマンソン住血吸虫感染とその危険因子：水田耕作との関係に着目して (**Risk factors of *S. mansoni* infection among adult population in Mwea Division, Central Kenya with special reference to wet rice cultivation**)

ケニア・ムエア地区の18歳以上の2244名に対してKato Katz法で検便を行なった結果、成人のマンソン住血吸虫感染率は21%、一人平均1グラム糞便中に2.4個の虫卵を排泄していた。灌漑地域のほぼ全員、半灌漑地域の71%、非灌漑地域の41%が水田で働いており、感染は灌漑地域、男性、水田で働いている人で多かった。灌漑地域での感染率は18-27歳で男性48%、女性で29%に達していた。以上のように当地域では、水田で働く若い男性が最も感染リスクが高く、成人ではこの層に対する対策（定期的投薬、健康教育等）に重点をおくべきである。

4) ケニア・ムエア地区における学童への駆虫剤（プラジカンテル、アルベンダゾール）の効果判定(**Drug efficacy of praziquantel and albendazole in school children in Mwea Division, Central Province, Kenya**)

ケニア・ムエア地区において5校の生徒2300名（4-18歳）に対し、マンソン住血吸虫の駆虫を目的としてプラジカンテルを投与し、また、土壌伝播寄生虫（鉤虫、回虫、鞭虫）の駆虫を目的としてアルベンダゾールを投与し、8週間後に効果を測定した。駆虫前の感染率（割合）はマンソン住血吸虫47.4%、アメリカ鉤虫16.7%、回虫1.6%、鞭虫0.8%であった。駆虫後1942名の生徒を再検査した結果では、それぞれ、8.6%、0.2%、0、0.6%となり、駆虫割合（効果）はマンソン住血吸虫で92.6%、アメリカ鉤虫で95.0%と満足のいくものであり、有効性が再確認された。

5) ケニア・ムエア地区学童のマンソン住血吸虫と土壌伝播寄生虫の感染率と感染強度：灌漑、公立・私立学校の差、学校水源に着目して(**Prevalence and intensity of**

***Schistosoma mansoni* and soil-transmitted helminthes in schoolchildren in Mwea Division of Central Kenya with special reference to irrigation, school type, and school water source**)

ケニア・ムエア地区の86小学校の3年生学童3,809名に検便を行った結果、36%がマンソン住血吸虫陽性、15%が何らかの土壌伝播寄生虫に感染していた。特に鉤虫が12%と多かった。感染強度はマンソン住血吸虫で便1グラムあたり、4.83個、鉤虫で0.74であった。マンソン住血吸虫の感染は灌漑地域の学校に通う学童で43%と高く（非灌漑地域では22%, $p < 0.001$ ）、公立校で38%と高く（私立校は18%, $p < 0.001$ ）、地表水を使う学校で42%と高かった（水道・井戸を使う学校では22%, $p < 0.001$ ）。鉤虫では逆に非灌漑地域が16%と灌漑地域よりも高く（10%, $p < 0.001$ ）、また、男子は14%と女子の10%より高かった（ $p < 0.001$ ）。感染強度も同様の結果を示し、ロジスティック回帰分析でも同様の結果を得た。これらの結果は現地で対策を計画する時に役にたつ。住血吸虫対策は灌漑地域の公立学校で地表水を使用している学校から進めるべきである。

6) ケニア・ムエア地区54小学校のマンソン住血吸虫と土壌伝播寄生虫の感染率と感染強度の相関関係 (**School-level correlation between prevalence and intensity of soil-transmitted helminthes and *Schistosoma mansoni* in Mwea Division, Central Kenya**)

ケニア・ムエア地区の59小学校の3年生学童3,442名の検便結果を元に小学校レベルでの分析を実施した。小学校の学童数は25-108名で、平均年齢は10.7歳であった。小学校レベルの平均感染割合（および最小値-最大値）はマンソン住血吸虫で36.5%（0-94.4%）、鉤虫で13.0%（0-40.9%）、回虫で2.4%（0-19.2%）、鞭虫で1.3%（0-6.9%）であった。小学校の平均感染強度（糞便1グラム中の虫卵数、およびその最小値-最大値）は、それぞれ4.94（0-237.7）、0.82（0-4.81）、0.14（0-1.35）、and 0.06（0-0.55）であった。学校レベルの学童感染割合と平均感染強度の説明係数（相関係数の二

乗)は0.98 ($p < 0.001$), 0.97 ($p < 0.001$), 0.96 ($p < 0.001$), and 0.93 ($p < 0.007$)と高く、学童感染割合から十分に平均感染強度を推定することが可能なレベルであった。途上国におけるマンパワーの不足、費用、時間を考慮すると、多くの努力を必要とする顕微鏡下での虫卵数カウントをせずに検便と投薬を実施することが現実的であると考えられた。

7) ケニア・ムエア地区学童の学校便所に関する行動と認識と下痢症の発症との関係 (Relation of school latrine-related perception and practices of children with diarrhoeal episodes in Mwea Division, Kirinyaga District, Central Kenya)

ムエア地区の3小学校において小学3年生215人にアンケート調査を実施し、標記関係を検証した。調査前1週間の下痢の発症は23%で、男児で29%と女児17%より有意に多かった。下痢は便所使用後に手を洗わない生徒で有意に高く(28%対15%)、また学校の便所を汚いと感じている生徒で多かった。また、トイレ掃除を罰則だと思っている生徒で下痢発生が多かった(41%対18%)。一方、トイレ掃除をする、トイレの使用を避ける、トイレ掃除を喜んで出来るという回答と下痢の発症には関連がなかった。トイレ使用後の手洗いは下痢予防に有効であり、そのために施設の充実と健康衛生教育が必要である。それがまた学校のトイレの使用推進に繋がるであろう。

2. ラオスでの研究

ラオス中央部サバナケット県ソンコン郡ラハナム地区の5小学校の学童670名を対象として検便を実施し、Kato-Katz法により虫卵検査を実施した。2004年9月の1回目の検便ではタイ肝吸虫の虫卵陽性率は48%であった。学年別の最高は小学校最高学年の5年生の62%、最低は小学校最高学年の1年生の37%であった。虫卵陽性者のみをプラジカンテルで治療した。治療後1週間目に再度検便を行ったが、この時の陽性者に対しては治療を行わなかった。2005年の9月に再度、学校における検便を実施した。2004年の第1回目と2005年には身長と体重を測定した。

2004年の9月と2005年の9月の検便の両方に参加した303名(男児134名、女児169名、平均年齢9.0歳)について2004年の2回の検便の結果により4群にわけて1年間の体重増加の差を検討した。4群は、虫卵陰性非治療群(NNT群)122名、第1回目が陰性で1週間後に虫卵陽性となったが治療しなかった群(PNT群)63名、第1回目虫卵軽度陽性(<499epg)で治療した群(LIT群)81名、第1回目の虫卵中程度以上陽性(>500epg)で治療した群(HIT群)36名であった。感染強度(幾何平均epg)はそれぞれ、1回目0、0、84、1418、2回目0、14、11、33であった。1年間の体重増加はHIT群で3.6kg(標準偏差1.7kg)、その他の群で2.7kg(2.6)であり、HITで有意に1年間の体重増加が大きかった($p < 0.05$)。この傾向は身長では見られなかった。また、年齢、性、初期体重と感染強度(HIT群とその他)によって体重増加を推定する重回帰分析では、年齢は体重増加に対し正の関連を示し、初期体重は負の関連を示したが、性と感染は有意な関連を示さなかった(それぞれ、 $p = 0.095$, $p = 0.096$)。HIT群で体重増加が大きかったのはHIT群の年齢が高かったからであり、それを補正した場合、体重増加にHIT群と他群で差は見られなかった。

D. 考察

寄生虫感染は住民の行動様式と強く関連しており、ライフスタイル病でもある。対策は長期的な教育と環境改善が組み合わされなければならない。学童時期からの教育による態度形成が大切であり、そのためには現地ですっかり教えられる教師・保健担当者の育成といった長い関与が必要である。

E. 結論

日本は教育と住民の環境改善努力によって寄生虫対策に成功した。そこから途上国が学べることは多い。しかし、それは日本のモデルが直接、途上国に応用できるということではない。どうメッセージを伝えられるかが課題である。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

安高雄治・金田英子・木須友子・門司和彦・
嶋田雅暁 (2005.11) 住血吸虫症と感染行
動. 宮入慶之助記念誌編纂委員会(編)「住
血吸虫症と宮入慶之助」九州大学出版会.
121-130.

門司和彦 (2005.02) 文化と疾病の狭間 --- ケ
ニアで風土病を学ぶ ---. 医学のあゆみ 212
(7) 709-714.

その他 (口頭発表)

門司和彦・金田英子 (2006.2.2, 岐阜) ラオス・
ラハナム DSS における活動 --- 人類生態班
の年次総括 --- 第3回モンスーンアジアの生
態史研究会

H. 知的財産権

なし

マラリア原虫の寄生適応機構

分担研究者 狩野 繁之 国立国際医療センター研究所 部長

研究協力者 河津信一郎 国立国際医療センター研究所 室長

研究要旨：チオレドキシシン系抗酸化タンパク Peroxiredoxin (Prx) の欠損が原虫生理に与える影響を観察する目的で、2-Cys 型 Prx (TPx-1) 遺伝子を欠損するローデントマラリア原虫を作製し、その表現型を観察した。Prx 欠損原虫 (Prx KO) を BALB/c、C57BL/6N および DBA/2J に感染させて赤血球内発育型での増殖を観察した。その結果、Prx KO の赤内型増殖率は、いずれのマウス系統においても、親株 (WT) およびコントロール (Prx WT) のそれらと同等であった。しかしながら、Prx KO ではガメトサイトの形成率が Prx WT に比して有意に低かった。一方、Prx の欠損はガメトサイトの性比および雄ガメトの形成には影響しなかった。

A. 研究目的

マラリア原虫にとって、宿主寄生体関係の最前線で原虫が被る酸化ストレスへの適応機構、即ち、原虫細胞内での抗酸化タンパクの発現調節機構は原虫の寄生適応の成否を左右する重要なメカニズムと考える。私達は、チオレドキシシン系抗酸化タンパクをモデルとして、マラリア原虫での酸化ストレス適応の分子メカニズムの一端を解明することをこの分担課題での目的としている。具体的には、一連の研究を通じて、同分子群の生理機能、活性化のメカニズムを解明し、原虫寄生適応戦略での役割を明らかにする。

私達は、以前 2-Cys 型ペルオキシレドキシシン (Prx) を欠損する熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) は O_2^- ならびに NO の負荷に対する感受性が上昇するが、通常の *in vitro* 培養では親株と同様に増殖するこ

とを報告した。今回は、*in vivo* 環境において、Prx の欠損が原虫生理に与える影響を観察する目的で、2-Cys 型 Prx (TPx-1) 遺伝子を欠損するローデントマラリア原虫 (*P. berghei*, ANKA strain) を作製し、その表現型を観察した。

B. 研究方法

ノックアウトコンストラクト (2-Cys 型 Prx 遺伝子の 5'および 3'を薬剤マーカー遺伝子の 5'および 3'を挿入したプラスミド) の作製および原虫細胞への導入は定法に従っておこなった。ノックアウトコンストラクトの導入、薬剤マーカー (ピリメタミン) によるスクリーニング後に、限界希釈で得られたクローンについて 2-Cys 型 Prx 遺伝子座での相同組換えを Southern blot で確認した。この時、マーカー遺伝子座で組換えをおこしピリメタ

ミンに対する耐性のみを獲得した原虫クローンも、薬剤耐性コントロール (Prx WT) として選択した。原虫細胞での Prx 欠損は mRNA およびタンパクレベルで確認した。Prx 欠損原虫 (Prx KO) を BALB/c、C57BL/6N および DBA/2J に感染させて赤血球内発育型 (赤内型) での増殖を観察した。全ての実験は国立国際医療センター研究所バイオセーフティー委員会および動物実験管理委員会の許可を受けておこなった。

C. D. 研究結果および考察

Prx KO の赤内型増殖率は、いずれのマウス系統においても、親株 (WT) および Prx WT のそれらと同等であった。一方、Prx の欠損は原虫ゲノム DNA での酸化損傷塩基 (8-OHdG) の蓄積にも影響しなかった。これらの成績から、2-Cys 型 Prx (TPx-1) の欠損がマラリア原虫の赤血球内無性増殖には影響しないことが、ローデントマラリアのモデルにおいても示唆された。しかしながら、Prx KO では生殖母体 (ガメトサイト) の形成率が Prx WT に比して有意に低かった。一方、Prx の欠損はガメトサイトの性比および雄ガメトの形成には影響しなかった。これらの成績から、2-Cys 型 Prx (TPx-1) がローデントマラリア原虫のガメトサイト形成に関連して機能していることが示唆された。Prx が如何にガメトサイト形成に関与しているのか、そのメカニズムは今のところ不明である。最近哺乳類と酵母の Prx について報告された分子シャペロン活性が、この表現型に関与しているのかもしれない。ガメトサイト形成はマラリア原虫の生活環維持に必須で、原虫伝搬阻止の標的

となるプロセスである。今後、この過程で Prx が果たす役割を詳細に調べることで、ガメトサイト形成の分子メカニズム解明に向けて、新たな知見が提示されることが期待される。

E. 結論

新規抗酸化タンパク 2-Cys 型 Prx がローデントマラリア原虫のガメトサイト形成に関連して機能していることが示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yano K, Komaki-Yasuda K, Kobayashi T, Takemae T, Kita K, Kano S, Kawazu S: Expression of mRNAs and proteins for peroxiredoxins of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in the blood stage. *Parasitol Int* 54: 35-41, 2005

2. 学会発表

1. 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ン (Prx) ノックアウトがマラリア原虫の哺乳類及び蚊体内発育に及ぼす影響の解析、第 139 回日本獣医学会、2005
2. 河津信一郎：マラリア原虫の宿主寄生戦略：酸化ストレスへの適応の分子メカニズム、第 74 回日本寄生虫学会、2005

熱帯熱マラリア原虫メロゾイト表面抗原の遺伝子多様性に関する研究

分担研究者 田辺 和裕 大阪工業大学工学部 教授

研究要旨

熱帯熱マラリア原虫（*Plasmodium falciparum*）メロゾイト表面タンパク質-1（MSP-1）の遺伝子多様性は、減数分裂時における対立遺伝子間の組換えによって生じる。マラリア侵淫地であるソロモン諸島国ガダルカナル島における MSP-1 遺伝子の組換え頻度を調べ、流行度のより低いタイ及びバヌアツと比較した。5' recombinant type（5'側可変領域における組換え型）、3' sequence type（3'側保存領域のシーケンスタイプ）及び msp1 ハプロタイプ（両者の組み合わせ）について調べた。ソロモン諸島、バヌアツ、タイの間では msp1 ハプロタイプの分布には明らかな地域差が認められた。ガダルカナルでは患者一人当たりの 5' recombinant type 数の平均値（感染多重度）がタイよりも低かった。また、ガダルカナルの原虫集団内の msp1 ハプロタイプの数はタイよりも少なく、バヌアツと同程度であった。msp1 内の連鎖不平衡は、ガダルカナルはタイよりも強かった。以上の結果は、MSP-1 遺伝子の組換えは単にマラリア伝播度の強弱で決まるものではなく、集団内に存在する MSP-1 対立遺伝子の数、及び、感染多重度にも依存することを示す。

A. 研究目的

熱帯熱マラリアに対するワクチンの開発において大きな障害となっているものの一つに、マラリア原虫ワクチン候補抗原の遺伝的多様性があげられる。抗原遺伝子の多様性はマラリア流行地によって大きく異なる。従って、有力なワクチン候補であるメロゾイト表面タンパク質 1（MSP-1）においてもその遺伝子（msp1）の多様性の地理的差異を調べる必要がある。MSP-1 対立遺伝子の多様性は組換えによって生じる。一般的に、マラリア伝播の強い地域では有性生殖の頻度も高くなるので、msp1 の組換え頻度も上昇すると考えられている。しかし、我々は南西太平洋バヌアツにおいてはマラリア伝播度がそれほど低くはないにもかかわらず、msp1 の組換えがほとんど起っていないという事を明らかにした。本研究ではバヌアツに隣接し、マラリア伝播が非常に強いソロモン諸島ガダルカナル島の熱帯熱マラリア原虫集団における MSP-1 対立遺伝子の多様性を調べ、その多様性をバヌアツ、及び、タイのそれと比較した。

B. 研究方法

1995年7月から1996年3月にかけて、ソロモン諸島ガダルカナル島の北部の3地域

においてマラリア感染者90人から熱帯熱マラリア原虫株を分離した。3地域とサンプルの内訳は以下である。A地域はホニアラ市内の病院の外来患者(40株)から、B地域がKaotave, Tadhimboko, Nugalitavの3村(26株)の児童を中心としたマラリア調査から、C地域はRuavatu村(24株)のマラリア調査から。感染血液から熱帯熱マラリア原虫のDNAをQIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)によって抽出した。バヌアツ及びタイの原虫株はすでに報告している。

msp1 ハプロタイプは我々のPCRタイピング法を用いた。タイのサンプルについては改良されたタイピング法で再度タイピングを行ない、新旧のタイピング法の相違による不一致をなくした。DNAシーケンスはBig Dyeを用いた直接シーケンス法によって得た。msp1における組換え頻度の推定はmsp1多型ブロック及び多型塩基サイトの連鎖不平衡解析によった。また、クロロキン耐性遺伝子(pfert)の多型は遺伝子の第2エクソン領域のシーケンスによって調べた。

(倫理面への配慮)

インフォームドコンセントは血液提供者(児童の場合はその親)から得た。本研究はソロモン諸島国の医学研究倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

5' recombinant type (5'側可変領域における組換え型)、3' sequence type (3'側保存領域のシーケンスタイプ)及びmsp1ハプロ

タイプ(両者の組み合わせ)について調べた。ガダルカナルの3地域ではmsp1ハプロタイプの分布には有意な差は認められなかった。しかし、ソロモン諸島、バヌアツ、タイの間ではmsp1ハプロタイプの分布には明らかな地域差が認められた。

ガダルカナルでは患者一人当たりの5' recombinant type数の平均値(感染多重度)がタイよりも低かった。また、ガダルカナルの原虫集団内のmsp1ハプロタイプの数は6-8個で、タイよりも少なく(16個)、バヌアツと同程度(6個)であった。

一方、msp1内の多型ブロック/サイトの連鎖不平衡は、ガダルカナルではタイと比較して強かった。

pfert遺伝子の多型のシーケンス結果は、ガダルカナルではすべての原虫株がパプアニューギニア型のクロロキン耐性(SVMNT)を示した。

D. 考察

ソロモン諸島におけるマラリアの伝播はタイ、及び、バヌアツよりも強く、地域によってはアフリカの高度流行地に匹敵する。このことと本研究で得られた結果を総合すると、msp1遺伝子の組換えは単にマラリア伝播度の強弱で決まるものではなく、集団内に存在するmsp1対立遺伝子の数や感染多重度にも依存することを示す。

*P. falciparum*の感染では感染を何度も繰り返すことによって徐々に防御免疫が獲得される。この過程において株特異的免疫が関与すると言われ、この免疫に抗原多型が関わる。ソロモン諸島では他のマラリア流行地域に較

べ、マラリア伝播が強いにもかかわらず感染が比較的軽症である。ソロモンでは MSP-1 対立遺伝子の数が限られ、さらに異なる対立遺伝子型の多重感染も少ないことが本研究で明らかになった。従って、ソロモンでは組換えによる新規対立遺伝子の発生頻度が限られていることが示唆される。そのため同一の対立遺伝子の感染が重なり、このことがひいては株特異的免疫をうまく誘導しているという可能性を示唆する。

E. 結論

msp1 ハプロタイプで見た *P. falciparum msp1* の対立遺伝子多様性はマラリア伝播強度には必ずしも依存せず、msp1 における組換え頻度は伝播強度だけでなく、地域に分布する MSP-1 対立遺伝子の数、及び、多重感染の度合いによっても決定されることを示す。

F. 健康危険情報

本研究から 1995-96 年の時点においてソロモン諸島ガダルカナル島の熱帯熱マラリア原虫集団は 100%、抗マラリア薬のクロロキンに対して遺伝的耐性を有していることが明らかとなった。ソロモン諸島における抗マラリア薬の使用にあたってはこのことを念頭に置き、抗マラリア薬の選択をする必要がある。

G. 研究発表

論文発表

1. Sakihama, N., Ohmae, H., Bakote, B., Kawabata, M., Hirayama, K. and Tanabe, K.

(2006) Limited allelic diversity of *Plasmodium falciparum msp1* from populations in The Solomon Islands, a highly endemic area. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 74: 31-40.

2. Dachlan, Y. P., Yotopranoto, S., Susanto, B. V., Santoso, S. H. B., Widodo, A. S., Kusmartisnawati, Sutanto, A., Gerudug, I. K. K., Takagi, M., Tsuda, Y., Tanabe, K., Kawamoto, F., Yoshinaga, K., Kanbara, H. (2005) Malaria endemic patterns on Lombok and Sumbawa islands, Indonesia. *Trop. Med. Health*, 33: 105-113.

学会発表

1. 田辺和裕、先濱直子、I. Rooth, A. Farnert, A. Bjorkman、平山謙二、熱帯熱マラリア原虫表面抗原における単塩基多型の安定性、第 4 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム、2005.11.5

2. Kazuyuki Tanabe, Naoko Sakihama, Hiroshi Ohmae, Akira Kaneko、Evolution of antigen polymorphisms of malaria parasites in isolated populations、第 7 回日本進化学会、2005.8.28

3. 田辺和裕、先濱直子、金子明、熱帯熱マラリア原虫集団に見られる遺伝的可変性、第 74 回 日本寄生虫学会大会、2005.4.8

4. 先濱直子、大前比呂思、田辺和裕、ソロモン諸島における熱帯熱マラリア原虫の抗原多型、第 74 回 日本寄生虫学会大会、2005.4.8

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（日米医学協力研究事業）

分担研究報告書

寄生虫症の免疫病理学

研究要旨

IL-18 と IL-2 は生体内で T 細胞から IL-3, IL-4, IL-9, IL-13 等の産生を誘導する。これらのサイトカインの中で、IL-3 は IL-18 と協力して肥満細胞の分化・誘導を促す。そして誘導された粘膜型肥満細胞は活性化され、*S. venezuelensis* の排除に決定的な役割を示す。

中西憲司・兵庫医科大学・教授

A. 研究目的

腸管寄生虫の感染によって、発展途上国では多くの小児が、感染が直接の原因となっており、あるいは二次感染が原因で死亡している。本研究は腸管寄生線虫感染と宿主応答、特に、*Strongyloides Venezuelensis* (Sv) に対する宿主防御機構を解明することである。既に Sv は活性化された粘膜型肥満細胞 (mucosal mast cell: MMC) の作用で排虫されることが明らかとされている。インターロイキン 18 (IL-18) は、IL-12 の共存下で IFN- γ の産生を誘導する因子として発見されたが、その後、IL-2 の共存下で CD4⁺T 細胞から、また IL-3 の共存下で肥満細胞/好塩基球から、IL-4 と IL-13 の産生を強力に誘導することが明らかとなっている。本研究では IL-18 の示すヴェネズエラ糞線虫感染宿主における防御機能を解明することである。

B. 研究方法

MMC と mouse mast cell protease-1 (mMCP-1) の誘導 : IL-18+IL-2 を野生型 C57BL/6 (B6) マウス、B6 バックの Stat6KO、RAG2KO マウス、CD4⁺T 細胞を除去した B6 マウス、あるいはマスト細胞を欠損した W/W^v マウスに 2 週間連日投与した。マウス小腸の MMC の集積は組織学的に、また血中の IL-3, IL-4, IL-9, IL-13, IgE, mMCP-1 の測定は ELISA で行った。更に、この様に前処置されたマウスに Sv の成虫を経十二指腸的に感染させ、翌日、腸管内の虫体数を測定した。あるいは、上記のマウス、あるいはまた B6 バックの IL-18KO マウス、IL-18RKO マウスに Sv の L3 幼虫を感染させ、経時的に便中の排卵数を測定した。同時、血中 IL-18 値を ELISA で測定した。

(倫理面への配慮)

マウスの処置はエーテル麻酔下で行なっている。

C. 研究結果

1. IL-18+IL-2 で前処置されたマウスでは、上

部小腸上皮に mMCP-1 陽性の MMC が誘導されていた。また血中 IgE, IL-3, IL-4, IL-9, IL-13 値は上昇していた。この様なマウスに Sv 成虫を移入したところ、24 時間後に、排虫を完了していた。一方、非投与群では Sv は腸管粘膜に侵入していた。 2. IL-18+IL-2 で前処置された Stat6KO マウスは、その小腸に mMCP-1 陽性の MMC が誘導され、移入した Sv を 24 時間後に完全に排除した。 3. IL-18+IL-2 で前処置された W/Wv では MMC は誘導されなかった。 4. IL-18+IL-2 のかわりに IL-3+IL-9 を投与したところ、mMCP-1 陽性の MMC が、小腸に誘導され、血清中の mMCP-1 も上昇した。この様なマウスは移入された Sv 成虫を迅速に排除した。 5. WT に Sv 成虫を感染させると、血清 IL-18 値は感染後 4 日目から上昇し 7 日目をピークに経時的に増減した。 6. WT は Sv の L3 幼虫感染後 6 日目から排卵を開始し、12 日目まで持続した。 7. IL-18KO あるいは IL-18RKO マウスは Sv の L3 幼虫感染後 6 日目から排卵を開始したが、WT に比較して排卵は著しく遅延したが、16 日目には排虫を完了した。 8. STAT6KO マウスに Sv の L3 幼虫を感染させると、排虫は著明に遅れていたが、抗 IL-18+抗 IL-2 抗体を投与すると、排虫は更に遅延した。すなわち、排虫には Th2 依存性/IL-18 非依存性と Th2 非依存性/IL-18 依存性の経路があり、両者が協調していることが明らかとなった。

D. 考察

L3 幼虫感染実験から、内因性の IL-18 の排

虫への関与が明らかとなった。IL-18 は T 細胞を刺激して IL-3 の産生を誘導する。次に IL-3 と IL-18 とが直接 MMC の分化と活性化を誘導すると考えられる。今後は、IL-3KO マウスを用いて、IL-3 の役割をより明確なものにしたいと考えている。

E. 結論

今回の研究から、IL-18 の有する小腸上皮 MMC の誘導機序と活性化機序が明らかとなった。更に、今後は Sv 以外の腸管寄生線虫排除法の確立に貢献すると期待される。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

Oh, K., Iimuro, Y., Takeuchi, M., Kaneda, Y., Iwasaki, T., Terada, N., Matsumoto, T., Nakanishi, K. and Fujimoto, J. (2005) Ameliorating effect of hepatocyte growth factor on inflammatory bowel disease in a murine model. *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.* 288: G729-35.

Seki, E., Tsutsui, H., Iimuro, Y., Naka, T., Son, G., Akira, S., Kishimoto, T., Nakanishi, K. and Fujimoto, J. (2005) Contribution of Toll-like receptor/Myeloid differentiation factor 88 signalings to liver regeneration. *Hepatology*, 41, 443-450.

Suzuki, T., Nakanishi, K., Tsutsui, H., Iwai, H., Akira, S., Inohara, N., Chamaillard, M., Nunez, G. and Sasakawa C. (2005) A novel caspase-1/Toll-like receptor 4-independent

pathway of cell death induced by cytosolic *Shigella* in infected macrophages. J Biol Chem. 280, 14042-14050.

Yamaguchi, N., Fujimori, Y., Fujibayashi, Y., Kasumoto, I., Okamura, H., Nakanishi, K. and Hara, H. (2005) Interferon-gamma production by human cord blood monocyte-derived dendritic cells. Annals of Hematology, 84, 423-428.

Fujii, H., Seki, S., Kobayashi, S., Kitada, T., Kawakita, N., Adachi, K., Tsutsui, H., Nakanishi, K., Fujiwara, H., Ikarashi, Y., Taniguchi, M., Mitchell, K., Ikemoto, M., Nakajima, Y., Arakawa, T. and Kaneda, K. (2005) A murine model of NKT cell-mediated liver injury induced by alpha-galactosylceramide/d-galactosamine. Virchows Archiv. 446, 663-673.

Kyo, F., Futani, H., Matsui, K., Terada, M., Adachi, K., Nagata, K., Sano, H., Tateishi, H., Tsutsui, H. and Nakanishi, K. (2005) Endogenous IL-6 but not TNF- α contributes to the development of TLR4/MyD88-mediated acute arthritis in mice. Arthritis & Rheum. 52, 2530-2540.

Sasaki, Y., Yoshimoto, T., Maruyama, H., Tegoshi, T., Ohta, N., Arizono, N. and Nakanishi, K. (2005) 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.

Hamasaki, T., Hashiguchi, S., Ito, Y., Kato, Z., Nakanishi, K., Nakashima, T. and Sugimura, K. (2005) Human Anti-Human IL-18 Antibody Recognizing the IL-18-Binding Site 3 with IL-18 Signaling Blocking Activity. J. Biochem. 138, 433-442.

2. 学会発表

Nakanishi, K. (2005) The role of IL-18 in the Pathogenesis of Asthma. Allergy and clinical Immunology. 5.27-28. Korea.

善本知広、中西憲司 (シンポジウム) (2005) 蠕虫感染とサイトカイン (Helminth infection and cytokine) . 第 74 回日本寄生虫学会大会, 4.8-9. 米子

善本知広、中西憲司 (シンポジウム) (2005) マウスにおけるマスト細胞・好塩基球の最新知見. 第 17 回日本アレルギー学会春期臨床大会, 6.2-4. 岡山.

Yoshimoto, T., Sasaki, Y. and Nakanishi, K. (Workshop) (2005) IL-18 with IL-2 protects against *Strongyloides venezuelensis* infection by activating mucosal mast cell-dependent type 2 innate immunity. International cytokine society conference 2005, 10.27-31. Korea.