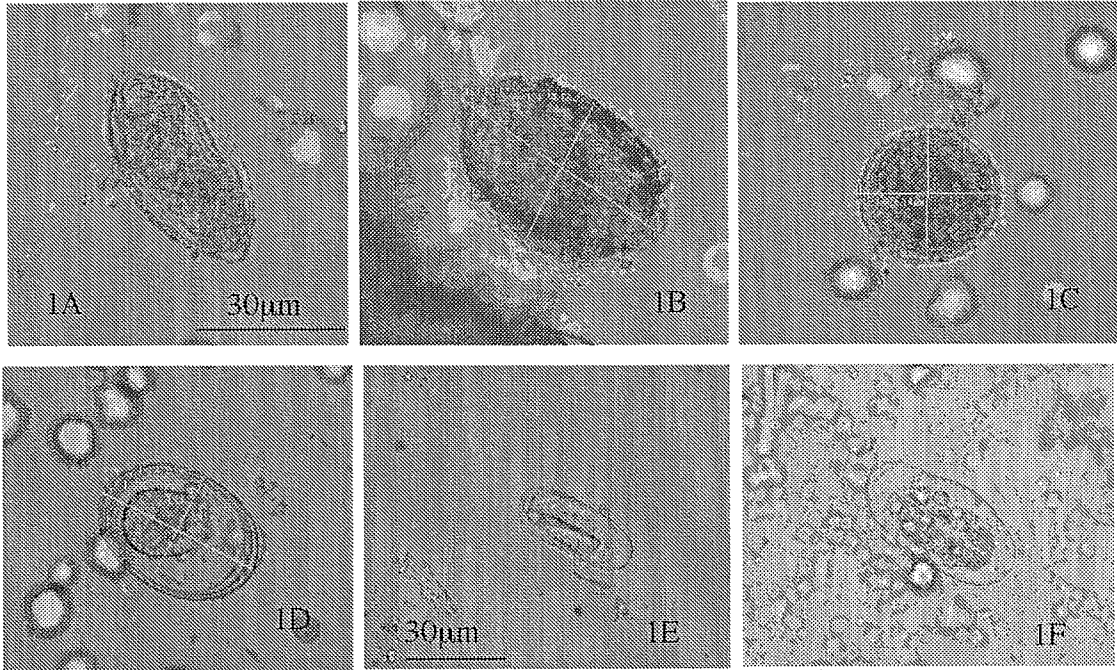


なかった。

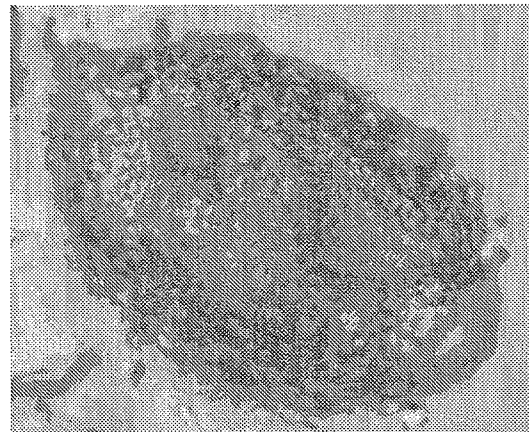
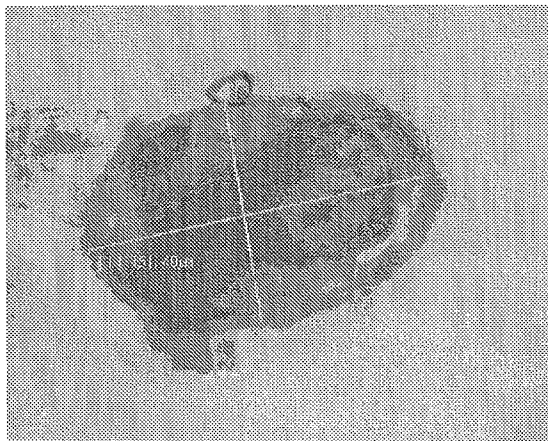
虫卵 A はもっとも数多く検出された種類の虫卵で、6種類のキムチのうち3種類から見つかった。この虫卵には長軸の

虫卵 D の内容は既に幼虫が形成されていた。この虫卵は、検出された虫卵の中で最も小さく、長径が約 30 μm であった。虫卵 G は最も大きく 151 \times 96 μm であつ



両端には「たかまり」がみられた(図1A)。

た。

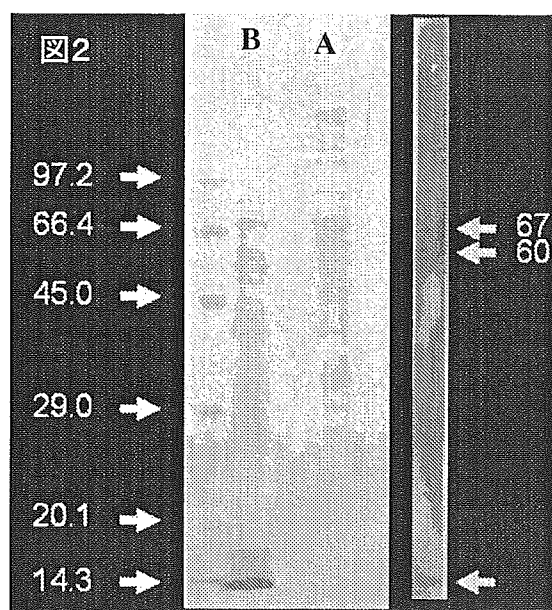


2. 虫卵タンパク膜を指標とするあたらしい虫卵汚染検出法

(1) ESP のタンパク分画とその抗原性

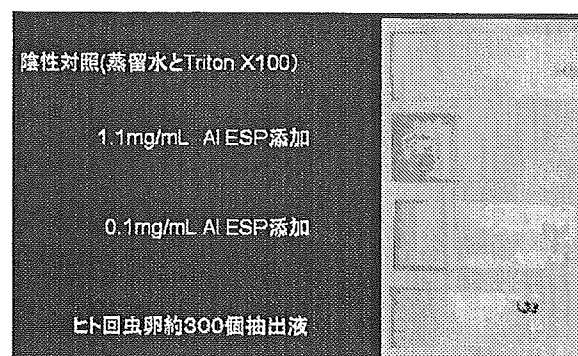
ヒト回虫卵から分離調製した ESP を

10%SDS-PAGE で分画したところ45KDa から 140KDa の間に複数の明瞭なバンドを認めた。また 16KDa と 14.3KDa の低分子領域にもタンパク分画を認めた(図2 A)。ESP の抽出に 0.5%SDS を用いたときのタンパク分画像と比較したところ、SDS 処理虫卵では低分子量領域のタンパクがより効率よく抽出されていた。マウスに ESP を免役して得られた抗 ESP 血清と ESP の反応性を Immunoblot 似て検討したところ、マウス抗 ESP 血清は67および 60 KDa の分画および泳動先端の 14.3KDa 分画を認識していた。



回虫卵300個を検体として、これから抽出した ESP が抗マウス ESP 血清によって検出可能か否かを検討したところ、陰性対照に比べて、ESP 抗原添加あるいは虫卵添加によって抗原吸着膜は灰

緑色を呈し、陰性対照の痰黄緑色とは明らかに区別することができた。



D. 考察

回虫卵の表面を覆う卵殻には「タンパク膜」と呼ばれる粘着性の層が存在する。これまでこのタンパクは回虫卵が人の皮膚に付着するのを助けるための働きをするものだけ考えられ、この膜タンパクの詳しい生化学的性状については全く報告がなかった。今回我々はこの卵殻膜タンパク膜に注目し、これを指標に回虫卵汚染の有無が検出できないかと考えた。今回卵殻膜タンパクの検出に用いた方法は、既に我々が尿中トキソプラズマ抗原を検出するために開発したものと同様のものである(Ayi et al., 2005)。今回の予備的な実験によって、虫卵300か程度の汚染であればその上清を用いることによって汚染を把握できる可能性が示唆された。

キムチの寄生虫卵汚染が問題となったとき、全国の検疫所でキムチの検査が実施された。しかし検疫所での検査では虫卵は全く検出できなかったという。

我々の研究班では全国3カ所でそれぞれ異なったスーパーマーケットから輸入キムチを購入して調査したところ、3研究班すべてで何らかの寄生虫卵を検出した。このことはキムチからの寄生虫卵検出にはかなりの熟練を要することを示している。そのためにも、検査に熟練を要しない、免疫学的手法を用いた検査態勢の確立が必要であると考えられた。今後より簡便にかつ効率よく虫卵汚染を検出できるよう検査手技の改良をおこなっていききたい。

F. 健康危険情報

国内で販売されている韓国産キムチから寄生虫卵を検出し、厚生労働省に報告した。

G. 研究論文

1. Akao N. Human dirofilariasis in Japan. In: Kimura E, Rim, H.-J., Dejian, S. & Weerasooriya, M.V., editor. Filariasis in Asia and Western Pacific Islands. Tokyo: AAA Committee, The Federation of Asian Parasitologists; 2005. p. 145-152.

2. Akao N. Critical assessment of existing and novel model systems of toxocariasis. In: Holland C, Smith H, editors. *Toxocara: The Enigmatic Parasite*. Oxfordshire: CABI Publishing; 2005. p. 74-85.

3. Ayi I, Akao N, Bosompemb KM, Akafo SK, Clarke J, Nyador 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.

4. Horiuchi A, Satou T, Akao N, Koike K, Fujita K, Nikaido T. The effect of free and polyethylene glycol-liposome-entrapped albendazole on larval mobility and number in *Toxocara canis* infected mice. *Veterinary Parasitology*. 2005;129:83-87.

5. Sato H, Une Y, Kawakami S, Osanai A, Kamiya H, Akao N, et al. Fatal *Baylisascaris procyonis* larva migrans in a colony of Japanese macaques in a safari-style zoo. *Journal of Parasitology*. 2005;91:716-719.

6. Satou T, Horiuchi A, Akao N, Koike K, Fujita K, Nikaido T. *Toxocara canis*: Search for a potential drug amongst beta-carboline alkaloids-in vitro and mouse studies. *Experimental Parasitology*. 2005;110:134-139.

7. Suzuki T, Joko T, Akao N, Ohashi Y. Following the migration of a *Toxocara* larva in the retina by optical coherence tomography and fluorescein angiography. *Japanese Journal of Ophthalmology*. 2005;49:159-161.
8. 川瀬正昭, 赤尾信明, 名和行文, 影井昇, 渡辺直熙, 新村真人. 旋尾線虫幼虫type-Xによるcreeping eruptionの1例. *臨床皮膚科*. 2005;59:490-493.
9. 芦田敦子, 河内繁雄, 斎田俊明, 高木雅哉, 赤尾信明. 旋尾線虫幼虫によるcreeping disease-自家製ホタルイカ沖漬けの生食により生じた1例. *皮膚科の臨床*. 2005;47(5):749-752.
10. 赤尾信明, Chu AE. 演者開発による寄生虫抗体迅速検査キット. *臨床寄生虫学雑誌*. 2005;16:11-14.
11. 鈴木崇, 上甲武志, 陳光明, 大橋裕一, 赤尾信明. 眼トキソカラ症の診断におけるトキソカラチェックの有用性. *あたらしい眼科*. 2005;22:263-266.
12. Hayashi E, Tuda J, Imada M, Akao N, Fujita K. The high prevalence of asymptomatic *Toxocara* infection among school children in Manado, Indonesia. 2006; *Southeast Journal of Tropical Medicine and Public Health* (in press).
13. Hayashi E, Tuda J, Imada M, Akao N, Fujita K. The high prevalence of asymptomatic *Toxocara* infection among school children in Manado, Indonesia. *Southeast Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 2005; 36; 1399-1406.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
該当項目なし

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

住血吸虫感染による凝固活性化因子（CILIP）誘導機構の解析

分担研究者 田 邊 将 信

慶應義塾大学医学部熱帯医学寄生虫

<要 旨>

私達は、Lipopolysaccharide(LPS)/ D-galactosamine(D-GalN)による急性肝障害に対するマンソン住血吸虫 (Sm) 感染マウスの抵抗性機構について解析し、以下の成績を得た。

- 1：非感染 B6 雌マウスは、1 μ g の LPS と 8mg の D-GalN 混合物 (LPS/ D-GalN) の静脈内投与に対して高い感受性を示し、肝臓に著しい出血性病変および広範な肝細胞アポトーシスを示し、投与後 4～5 時間で全個体が死亡した。これに対して、Sm 感染 9 週以降のマウスは LPS/ D-GalN 投与に対して高い抵抗性を示し、肝病変も軽度で、投与後 72 時間での生存率は 50～75 %を示した。
- 2：この急性肝障害に対する Sm 感染マウスの抵抗性機構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。Sm 感染 15 週のマウス血清中 TNF α 、IL-6、IL-12、IFN γ レベルは LPS/ D-GalN 投与に伴い著しく増加し、いずれも LPS/ D-GalN 投与非感染群より高値を示した。また、Sm 感染及び非感染マウスの脾細胞を *in vitro* で LPS 刺激した場合のサイトカイン産生量の比較では、感染マウスの脾細胞がより多く炎症性サイトカインを産生・放出することが明らかとなった。これらの成績は、肝臓及び脾臓から分離した RNA を用いた RT-PCR による解析でも確認され、Sm 感染マウスにおいてより強い炎症性サイトカイン放出がみられることが明らかとなった。一方、抗炎症性サイトカインである IL-10 および IL-13 の肝臓及び脾臓における mRNA 発現量の比較では、感染マウスに高い発現が認められたが、血清 IL-10 レベルには両群に差は認められなかった。また、感染マウスの肝臓における Fas および FasL の mRNA 発現が高いことが明らかとなった。従って、Sm 感染マウスの LPS/ D-GalN に対する抵抗性は、住血吸虫感染によって誘導される Th2 優位な免疫反応、炎症性サイトカインの産生抑制、あるいは肝臓での Fas および FasL の発現抑制を介したものと考える。にくい。
- 3：感染マウスでは肝臓内 iNOS、HO-1、HSP-70 mRNA 発現量の増加がみられた。そこで、阻害剤の投与効果を検討し、iNOS 阻害剤が Sm 感染マウスの LPS/ D-GalN に対する抵抗性を著しく低下させることが明らかとなった。

以上の成績から、慢性 Sm 感染マウスの LPS/ D-GalN による劇症肝炎に対する高い抵抗性は、致死性のサイトカイン(?)刺激に対する肝細胞の感受性の低下に起因したものと考えられ、iNOS の誘導がその抵抗性発現に深く関わっていることが推定された。

＜序 論＞

Lipopolysaccharide(LPS)はグラム陰性菌の細胞壁の主要かつ必修の構成成分であり、微生物由来の最も強い起炎性物質の一つとして知られている。LPS はリポ多糖体で、親水性の polysaccharide と疎水性の lipid A から構成されているが、lipid A が LPS の生物学的活性を担っている物質である(1)。LPS は monocyte やマクロファージを活性化し、各種炎症性サイトカインの産生をもたらすが、LPS 刺激による炎症性サイトカインの大量放出が敗血症性ショックの主要病原機構と考えられている(2)。従来、この LPS による敗血症性ショックの研究には、主として 2 つのマウス実験モデルが利用されてきた。一方は LPS 大量投与モデルであり、他方は少量の LPS と D-GalN を併用投与するものである。前者はヒトの敗血症性ショックの実験モデルと考えられ、虚脱、下痢、衰弱、嗜眠、肺の出血性病変や炎症、多臓器不全といった病態が観察される(3)。しかし、後者では、このような敗血症性ショックに一致する症状は観察されず、主として肝臓病変のみが観察され、急性肝障害ないしは劇症肝炎モデルと考えられている(3)。

今回、我々が使用したのは後者であり、大量 LPS 投与や生菌接種による敗血症性ショックモデルと同様に炎症性サイトカインがこの肝臓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(4、5)。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、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の投与、サイトカイン受容体のブロック及びノックアウト)、マウスの急性肝障害による死亡率を大幅に低下させることが可能である。さらに、一酸化窒素(NO)の放出剤や hemoxygenase-1 の誘導剤(6)、あるいは caspase 阻害剤(3)を投与することによって、LPS/D-GalN 投与マウスの肝細胞アポトーシスが抑制され、マウスの死亡率が著しく低下することが報告されている。従って、LPS 刺激に

よる炎症性サイトカイン産生から肝細胞のアポトーシスに至る機構がこの実験モデルの主要な病原機構と推定できるが、その分子機構は依然として十分理解できていない。

著者らは予備実験として、マンソン住血吸虫(Sm)感染マウスに LPS/D-GalN を投与したところ、LPS/D-GalN 投与非感染マウスに比較して高い抵抗性を示すことを観察した。Sm 感染マウスでは、成虫より大量に産出された虫卵から放出される虫卵抗原によって宿主免疫反応が Th1 から Th2 優位にシフトすることが知られていることから(7)、この TH2 優位な免疫反応がこの実験モデルでみられる炎症性サイトカイン産生から肝細胞アポトーシスに至る病原機構のどこかに作用することで、このような LPS/D-GalN に対する抵抗性が発揮されている可能性が考えられた。そこで、Sm 感染および非感染マウスを用いて、LPS/D-GalN 投与後の血清中サイトカインレベルの経時的変化、肝臓及び脾臓の各種遺伝子の mRNA 発現状況、in vitro における脾臓細胞の LPS 刺激によるサイトカイン産生量の比較、さらには NO 合成酵素や Haemoxygenase-1 の特異的な阻害剤を投与した場合の Sm 感染マウスの抵抗性の変化について解析を行ったので報告する。

＜材 料・方 法＞

実験動物

実験には C57BL/6J 雌マウス(感染時 5 週令)を用いた。マウスは 2 群に分け、一群には 25 隻のマンソン住血吸虫セルカリアを感染させ、残りは非感染対照群とした。マウス急性肝障害モデルは LPS(1 µg)と D-GalN (8 mg)の混合液(LPS/D-GalN)をマウス尾静脈に注射することで作製した。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。

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、TUNEL 染色標本のすべてに DAPI 染色を行った。

RT-PCR

肝臓および脾臓の total RNA は Trizol reagent (Invitrogen, Tokyo) を用いて分離した。cDNA は SuperScript III (Invitrogen) および random primer (Takara, Tokyo) を用いた reverse transcriptase 反応で作製した。PCR 反応は 94 °C で 5 分間の denaturation を 1 回行ったのち、94 °C で 30 秒の denaturation、58~60 °C で 30 秒の annealing、72 °C で 30 秒の extension を 1 サイクルとして合計 30~40 サイクル繰り返した。最後に、72 °C で 10 分間の final extension を行った。増幅産物は 1.7 % agarose ゲルを用いて分離し、ethidium bromide で染色後、紫外線トランスイルミネーターで可視化した。β-actin の発現強度を指標として各サンプルの cDNA 濃度を調整し、各サイトカイン mRNA の発現レベルを比較検討した。

細胞の viability およびサイトカインの測定

培養細胞の viability は市販の WST-1 色素法 (日本ロシュ株式会社) を用いて測定し、指定の方法に準拠して行った。培養液および血清中の TNFα、IL-6、IL-10、IL-12p70、IFNγ レベル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。

統計解析

感染および非感染群の成績は mean ± SD で表し、Student *t*-test を用いて有意差検定を行った。P value が 0.05 以下の場合、有意差があると判定した。

<結果>

Sm 感染マウスの LPS/ D-GalN 誘発急性肝障害に対する抵抗性

LPS、あるいは D-GalN を単独投与しても、マウスは無症状で全例生存した。しかしながら、LPS/ D-DalN を非感染マウスに投与すると、マウスは投与後 4~5 時間で全個体が死亡した。また、Sm 感染期間が 8 週以内のマウスでは、LPS/ D-DalN 投与に対して高い感受性を示し、マウスは投与後 4~5 時間で全個体が死亡した。これに対して、Sm 感染期間が 9 週以上のマウスでは明らかに LPS/ D-GalN 投与に対して抵抗性を示し、LPS/ D-GalN 投与後 72 時間における生存率は、Sm 感染 9~12 週のマウスでは約 50 %、感染 15~20 週のマウスでは約 75 %であった (Fig.1)。

病理組織学的解析

非感染マウスに LPS/ D-GalN を投与した場合、肝臓は腫大し、暗紫色を呈し、出血性的変化が観察された。一方、Sm 感染マウスに LPS/ D-GalN を投与した場合、感染による肝臓の腫大、色調の変化、虫卵性肉芽腫は観察されるが、LPS/ D-GalN 投与に伴う出血性病変は見られなかった。肝臓の病理組織学的検討では、LPS/ D-GalN 投与非感染マウスに著しい出血性変化が見られ、さらにアポトーシスに起因する肝細胞の核変化が多数観察された (Fig.2-2)。これに対して、LPS/ D-GalN 投与 Sm 感染マウスの肝臓では、出血性変化はほとんど観察されず、アポトーシス陽性細胞も少数認められるのみで (Fig.2-4)、Sm 感染が LPS/ D-GalN 投与による肝臓の著しい病理変化を防止したものと考えられた。このことは、肝切片を用いた TUNEL 染色によっても確認された。すなわち、LPS/ D-GalN を投与しなかった非感染 (Fig.2-9) および感染マウス (Fig.2-11) では、アポトーシス陽性細胞は検出されなかったのに対し、LPS/ D-GalN 投与非感染マウスでは多数のアポトーシス陽性細胞が検出された。さらに、LPS/ D-GalN 投与 Sm 感染マウスでは、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(Fig.2-12)。

LPS/D-GalN 投与マウスにおける血清中サイトカインレベルの経時的変化

LPS/D-GalN 投与非感染および Sm 感染マウスの血清中サイトカインを経時的に測定したところ (Fig.3)、LPS/D-GalN 投与を受けた感染および非感染マウスは共に時間の経過に伴いサイトカインレベルが著しく増加した。また、IL-10 レベルは両群間に違いはみられなかったが、Sm 感染マウスの血清 TNF α 、IL-6、IL-12p40、IFN γ レベルはいずれも LPS/D-GalN 非感染マウスに比べ有意に高い値を示した。

Sm 感染および非感染マウスから分離した脾臓細胞の in vitro サイトカイン産生量の比較

非感染および Sm 感染マウスから分離した脾臓細胞の in vitro 培養系に LPS 刺激を加えた場合の各種サイトカインの産生の経時的変化を観察した。この実験においても、Sm 感染マウスから分離した細胞のほうが、より高い TNF α 、IL-6、IL-12p40、IFN γ の産生が認められた(Fig.4)。

RT-PCRを用いた解析

LPS/D-GalN 投与非感染および Sm 感染マウスの肝臓と脾臓における各種遺伝子の mRNA 発現を経時的に解析した。Sm 感染マウスでは肝臓および脾臓における TNF α 、IL-12p40 および IFN γ の mRNA が非感染マウスに比べはるかに強く発現していた(Fig.5)。同様な傾向は IL-1 β および IL-6 の発現においても観察された。また、抗炎症性サイトカインである IL-10 は Sm 感染マウスの肝臓および脾臓でより強く発現しており、さらに IL-13 もまた Sm 感染マウスの肝臓および脾臓でわずかながら強く発現していた(Fig.6)。また、今回行った RT-PCR による解析で、LPS/D-GalN 投与 Sm 感染マウスにおいて、肝臓の Fas、FasL、TNFR1 および TNFR2 の mRNA 発現が非感染マウスに比較して高い傾向を示した(Fig.7)。また、

ミトコンドリア経由のアポトーシス誘導経路を阻害することが知られている Bcl-XL および Bcl-2 の mRNA 発現は両軍に殆ど差は認められなかった。これに対して、Sm 感染マウスの肝臓では、iNOS、HO-1、HSP70 といった遺伝子の mRNA 発現量の増加が観察された。特に、Sm 感染マウスの iNOS 発現量は著しく増加することが明らかとなった(Fig.8)。

iNOS および HO-1 の特異的阻害剤を投与した Sm 感染マウスの LPS/D-GalN に対する抵抗性の変化

iNOS および HO-1 に対する特異的阻害剤が Sm 感染マウスの LPS/D-GalN に対する抵抗性にいかなる効果を示すかを検討した。その結果、Fig.9 に示したように、HO-1 阻害剤である ZnPP9 投与では、Sm 感染マウスの LPS/D-GalN に対する抵抗性に変化は認められなかったが、iNOS の特異的阻害剤である aminoguanidine 投与では、Sm 感染マウスの LPS/D-GalN に対する抵抗性が著しく減弱することが明らかとなった。また、Sm 感染を受けた他の系統マウスにおいても、その抵抗性が aminoguanidine 投与によって低下することも明らかとなった (Fig.10)。

<考 察>

今回、我々は、Sm 感染マウスが LPS/D-GalN 投与による急性肝障害に対して高い抵抗性を示すことを明らかにした。しかも、Sm 感染早期のマウスでは (<8週)、全く LPS/D-GalN 投与に対する抵抗性がみられなかったのに対して、感染 9 週以降のマウスでは高い抵抗性が観察された。この成績は、Sm 感染の慢性期になってはじめてこのような抵抗性が誘導されることを示唆している。また、病理組織学的検索において、LPS/D-GalN 投与非感染群では肝臓に著しい出血性変化と広範な肝細胞アポトーシスが観察されたが、慢性 Sm 感染群では肝臓の出血性変化はほとんど見られず、アポトーシス陽性

細胞も少数であった。このことは、TUNEL 法を用いた組織レベルでのアポトーシス検出によっても確認された。従って、慢性 Sm 感染が LPS/D-GalN 投与によるマウスの肝病変形成が阻害することが救命に繋がっていることを示唆しているが、どのような機構によってこのような抵抗性が発揮されているのか、あるいは肝臓病変を形成する病原機構のどの段階に作用して救命効果をもたらしているのかについては不明である。

我々の研究では、低量の LPS と D-GalN を併用投与することで作製することができる急性肝障害マウスモデルを実験に使用した。この実験モデルでは、大量 LPS 投与によって作製した敗血症モデルでみられるような全身性の症状は観察されないが、急性かつ高度な肝臓病変が形成されるのが特徴で、急性肝臓死の経過をとり、LPS/D-GalN 投与後早い時期にマウスが死亡する。従って、この実験モデルは、劇症肝炎マウスモデルと捉えることが可能である。この実験モデルでは、マウス敗血症モデルと同様に炎症性サイトカインの高度な上昇が見られるが、特に TNF α (4) および IFN γ (5)の増加が肝臓の病変形成に密接に関与していることが示唆されており、LPS の代わりに TNF α を D-GalN と共に投与することによっても、同一な急性肝障害マウスモデルを作製することができる(4)。さらに、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、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の投与、サイトカイン受容体のブロック及びノックアウト)、マウスの死亡率を大幅に低下させることができる。従って、この LPS/D-GalN 投与による急性肝障害モデルは、マウス敗血症モデルと同様、炎症性サイトカインが肝臓の病変形成に密接に関与していると考えられる。

Sm 感染マウスでは、成虫より大量に産出された虫卵から放出される抗原によって、Th1 優位の宿主免疫反応が感染 6 週以降において Th2 優位にシフトすることが知られている(7)。

実際、TH2 サイトカインである IL-10(13)、IL-9(14)、あるいは IL-13(15)を投与したマウス、あるいはこれらの遺伝子を高発現させたマウスでは、炎症性サイトカイン産生の抑制、さらには LPS に対する抵抗性の増大が観察されている(16,17)。それ故、この TH2 優位な免疫反応の誘導が Sm 感染マウスの LPS/D-GalN に対する抵抗性の発現に関与しているかどうかについての解析が必要となった。

そこで、Sm 感染マウスに誘導される救命機構を明らかにすることを目標として、LPS/D-GalN 投与後の Sm 感染および非感染マウスの血清中サイトカインレベルの経時的変化、あるいは肝臓および脾臓の各種遺伝子の mRNA 発現状況を解析した。Sm 感染 15 週のマウス血清中の TNF α 、IL-6、IL-12、IFN γ レベルは LPS/D-GalN 投与に伴い著しく増加し、いずれも LPS 投与非感染群より高値を示した。この成績は、肝臓及び脾臓から分離した RNA の RT-PCR 法を用いた解析からも確認され、Sm 感染マウスにおいてより強い炎症性サイトカイン産生がみられることが明らかとなった。また、非感染および Sm 感染マウスから分離した脾臓細胞の *in vitro* 培養系に LPS 刺激を加えた場合の各種サイトカイン産生量の経時的変化を観察したが、この実験においても、Sm 感染マウスから分離した細胞がより高いサイトカイン産生を行うことが明らかとなった。従って、慢性 Sm 感染マウスの LPS/D-GalN による急性肝障害に対する高い抵抗性には炎症性サイトカインの産生抑制が関与しているとは考えられなかった。

抗炎症性サイトカインである IL-10 の血清レベルの比較では、Sm 感染および非感染群との間に差は認められなかったが、IL-10 および IL-13 の肝臓および脾臓における mRNA 発現量の比較では、Sm 感染マウスにおいてより強い発現が認められた。この結果は、Sm 感染によって誘導される TH2 優位な免疫反応がこの LPS/D-GalN に対する抵抗性に関与している可能性を示唆するものと考えられた。しかし、抗炎症性サイトカインによる LPS 大量投与、あ

るいは LPS/ D-GalN 投与に対するマウスの救命効果は、基本的には炎症性サイトカインの産生抑制によると考えられており(3)、LPS/ D-GalN を投与した Sm 感染マウスが強い炎症性サイトカイン反応を示したことから、その抵抗性発現に TH2 優位な免疫反応が主要な役割を演じているとは考えにくい。

一方、LPS/ D-GalN 投与非感染群では肝臓に多数のアポトーシス陽性細胞が出現するが、Sm 感染群では少数が認められるにすぎない。それ故、LPS/ D-GalN 投与によるマウスの致死機構に肝細胞のアポトーシスが重要な意味を持っていると考えられた。この実験モデルでは、FasL の Fas への結合(18)、あるいは TNF- α の TNF receptor-1 への結合(19)によるシグナル伝達が肝細胞のアポトーシス誘導に重要な役割を演じていることが報告されている。それ故、慢性 Sm 感染が肝細胞のアポトーシス誘導刺激に対する抵抗性を高めている可能性が考えられた。そこで、LPS/ D-GalN 投与マウスにおける肝臓において、Fas、FasL、TNFR1 および TNFR2 の mRNA 発現についても検討を加え、LPS/ D-GalN 投与 Sm 感染マウスの肝臓内 Fas、FasL、TNFR1 および TNFR2 が非感染マウスよりも強く発現していることを明らかにした。このことは、Sm 感染マウスにおける LPS/ D-GalN 刺激による肝細胞アポトーシスの抑制が Fas、FasL、TNFR1 および TNFR2 の発現抑制といったメカニズムによるものではないことを示唆していると考えられた。

最近、一酸化窒素(NO)の放出剤や hemoxygenase-1 の誘導剤(6)、あるいは caspase 阻害剤(3)の投与が LPS/ D-GalN 投与マウスの死亡率を著明に改善するという成績が報告されている。特に、IL-1 β converting enzyme (ICE)ファミリーに属す caspase の阻害剤を LPS/ D-GalN 実験モデルに投与した実験では、Caspase 3 の完全阻害が肝細胞アポトーシスの抑制、さらにはマウスの救命に働いている可能性が示唆された(3)。また、同様な成績が Salmonella-LPS/ D-GalN を用いたマウス実験でも報告されている(20)。今回の我々

の成績においても、Sm 感染マウスの肝臓における iNOS mRNA の発現が著しく高いこと、さらには Sm 感染マウスの LPS/ D-GalN に対する抵抗性が iNOS 阻害剤である aminoguanidine の投与によって著しく低下することが明らかとなった。従って、慢性 Sm 感染マウスの LPS/ D-GalN による劇症肝炎に対する高い抵抗性は、アポトーシス誘導刺激に対する肝細胞の抵抗性を高めることで発揮されている可能性が示唆された。即ち、Sm 感染マウスの抵抗性は、致死性のサイトカイン(?)刺激に対する肝細胞の感受性の低下に起因したものであり、iNOS の誘導がその抵抗性発現に深く関わっている可能性が示唆された。

<文 献>

1. Van Amersfoort ES, Van Berkel TJC, Kuiper J. 2003. Clin Microbiol Rev., 16:379-414.
2. Glauser MP. et al., 1991. Lancet, 338:736-739.
3. Mignon A. et al., 1999. Am J Respir Crit Med., 159:1308-1315.
4. Lehmann V. et al., 1987. J Exp Med., 165:657-663.
5. Car VD. et al., 1994. J Exp Med., 179:1437-1444.
6. Zuckerbraun BS. et al., 2003. J Exp Med., 198:1707-1716.
7. Pearce EJ and MacDonald AS. 2002. Nature Rev Immunol., 2:499-511.
8. Tsutsui, H. et al., 1997. J Immunol., 159:3961-3967.
9. Lee E. et al., 2005. Immunol Cell Biol., 83:445-465.
10. Mangan NE. et al., 2004. J Immunol., 173:6346-6356.
11. Chu J. et al., 1993. J Exp Med., 178:723-730.
12. Khalil RMA. et al., 1996. Infect Immunity, 64:4960-4966.

13. Santucci L. et al., 1996. Gastroenterol., 111:736-744.
14. Grohmann U. et al., 2000. J Immunol., 164:4197-4203.
15. Muchamuel T. et al., 1997. J Immunol. 158:2898-903
16. Baumhofer JM. et al., 1998. Eur J Immunol., 28:610-615.
17. Rogy MA. et al., 1995. J Exp Med., 181:2289-2293.
18. Tsutsui H. et al., 1997. J Immunol., 159:3961-3967.
19. Pfeffer K. et al., 1993. Cell, 73: 457-467.
20. Jaeschke H. et al., 1998. J Immunol., 160:3480-3487.

<共同研究者>

武田和樹（慶應大・医・熱帯寄生虫）
 深尾太郎（東大院・工・化学生命工学）
 永田博司（慶應大・医・内科）
 関塚永一、宮崎耕司（国立埼玉・内科）
 太田伸生（名市立大院・医・宿主寄生体関係）

H. 研究発表

1. 論文発表

(1) Nara T, Iizumi K, Ohmae H, Sy OS, Tsubota S, Tanabe M, Kojima S, Aoki T. Antibody isotype responses to paramyosin, a vaccine candidate for schistosomiasis, and their correlations with resistance and fibrosis in patients with *Schistosoma japonicum* in Leyte, the Philippines.
 Submitted for publication.

(2) Fukao T, Fukuda Y, Kiga K, Sharif J, Enomoto Y, Kawamura A, Nakamura K, Minoshima H, Takeuchi T and Tanabe M.
 Transcriptional regulation of microRNA-

223: An alternative view.
 Submitted for publication.

2. 学会発表

(1) 田邊將信、深尾太郎、永田博司、関塚永一、宮崎耕司、竹内勤 マンソン住血吸虫虫卵性肉芽腫から分離した凝固活性化リポ蛋白 (CILIP) によるマウス LPS ショック救命について 第 74 回寄生虫学会、平成 17 年 4 月

(2) 田邊將信、武田和樹、深尾太郎、永田博司、関塚永一、宮崎耕司、太田伸生、竹内勤 慢性マンソン住血吸虫感染マウスは LPS/Ga1N 投与による劇症肝炎に対し抵抗性である 第 75 回寄生虫学会、平成 18 年 5 月.

I. 知的財産権の出願・登録

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

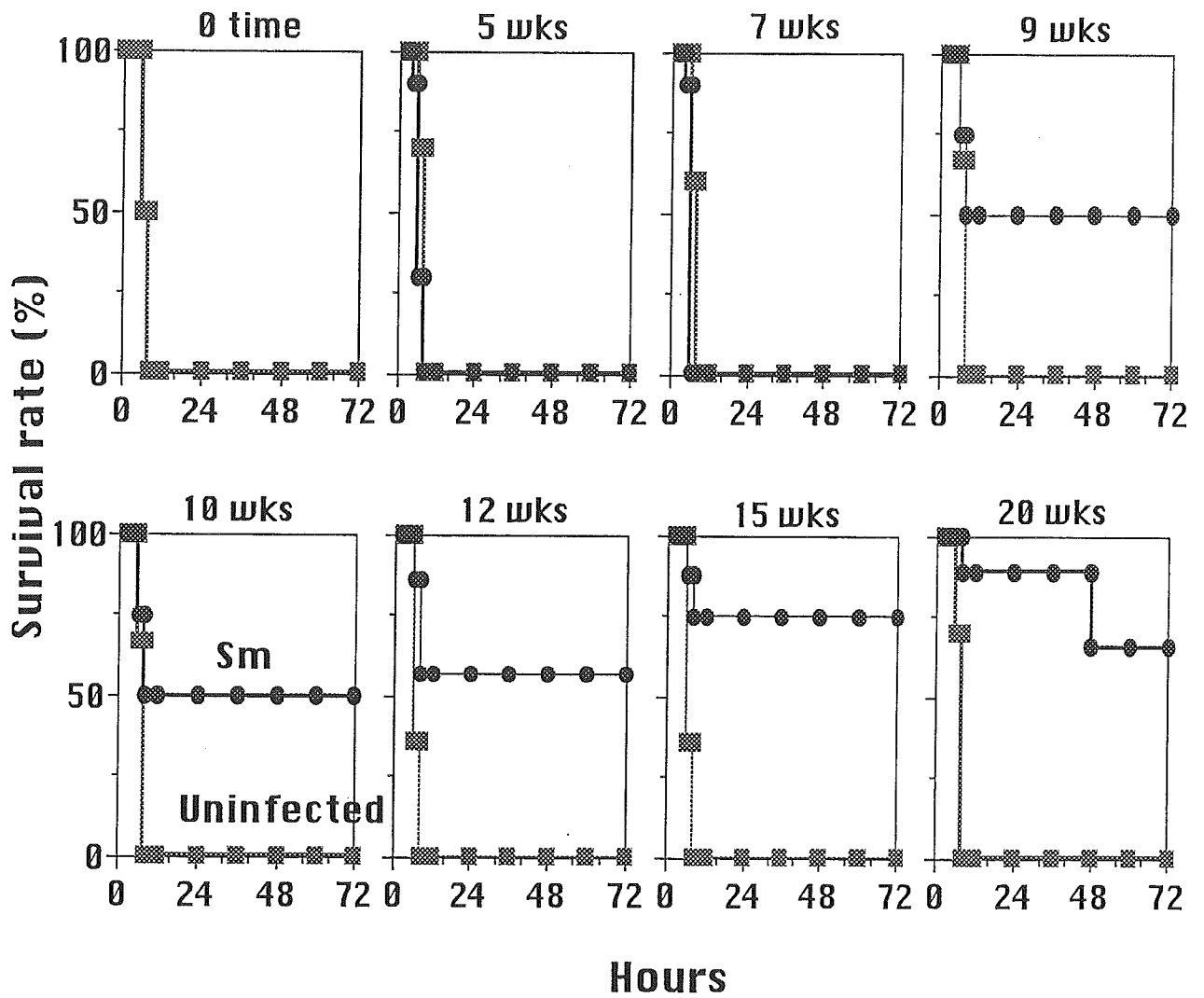


Fig. 1
Effect of infection period on the survival rate of
***Schistosoma mansoni*-infected mice**
after LPS/D-GalN challenge

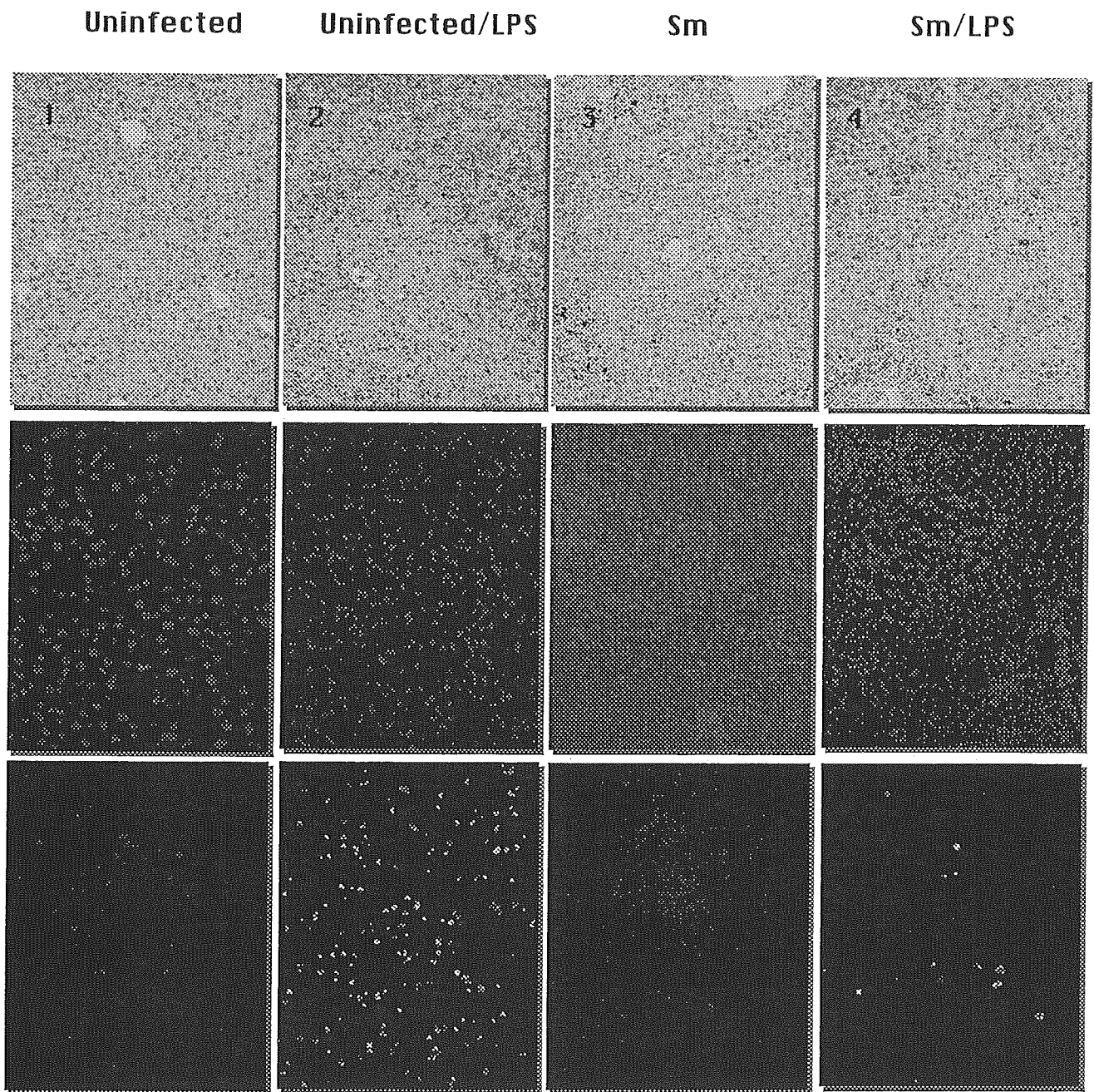


Fig. 2
Histopathological and apoptotic changes in the livers
of *Schistosoma mansoni*-infected and uninfected
mice 4 hours after LPS/D-GalN challenge

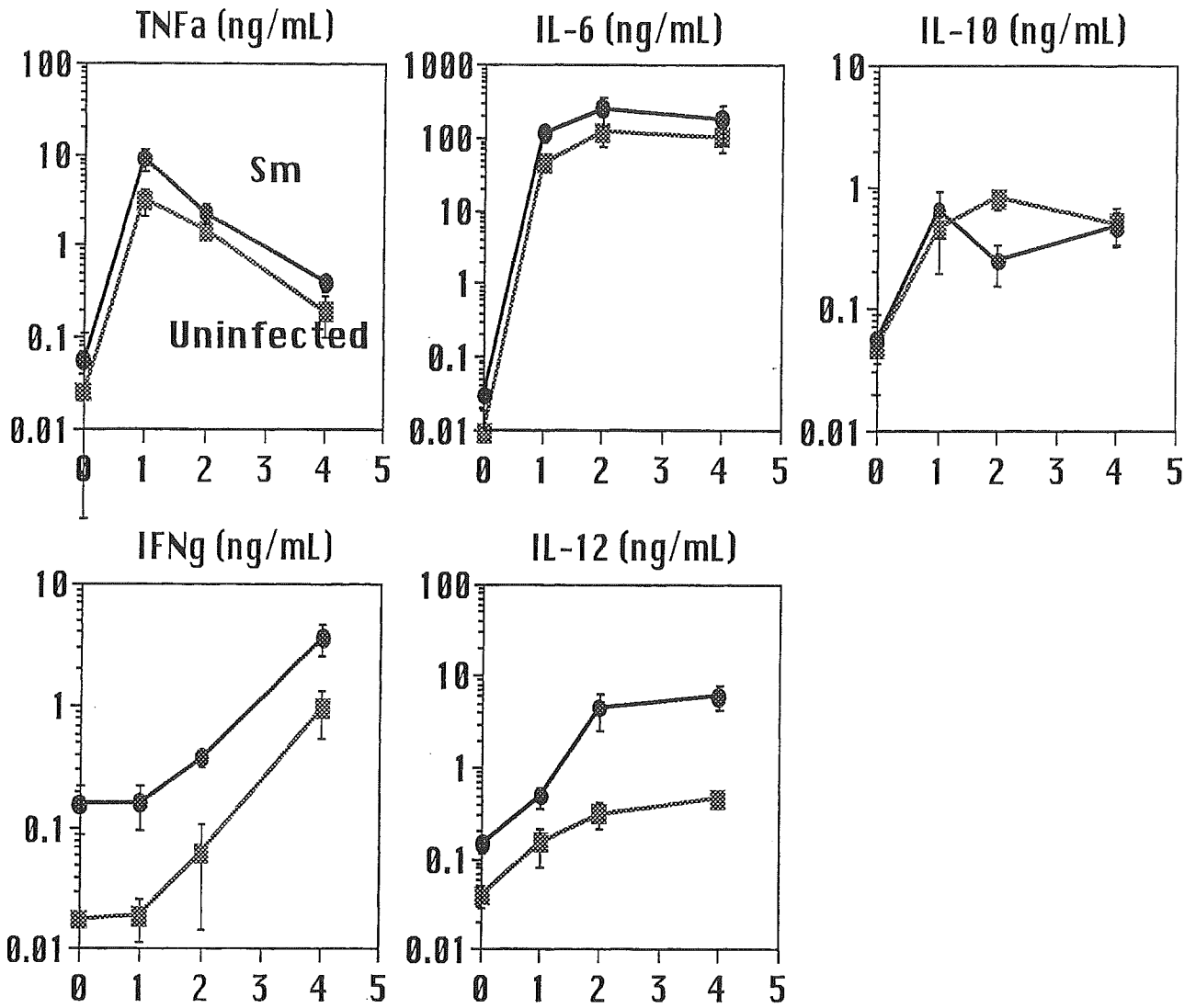


Fig. 3
Changes in serum cytokine levels in
Schistosoma mansoni-infected and uninfected mice
 after LPS/D-GalN challenge

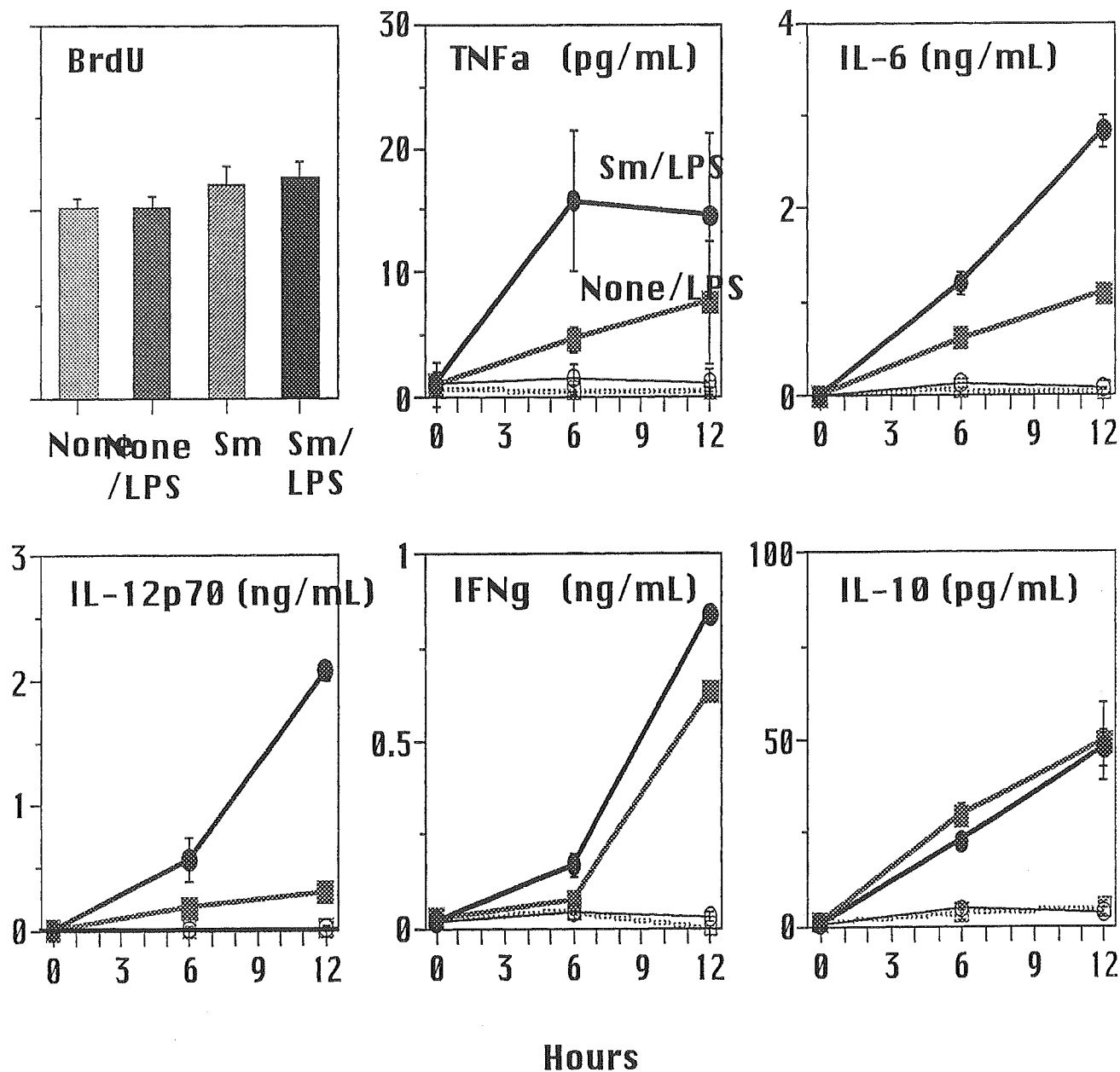


Fig. 4
Effect of in vitro LPS stimulation on the cytokine production by splenocytes isolated from *Schistosoma mansoni*-infected and uninfected mice

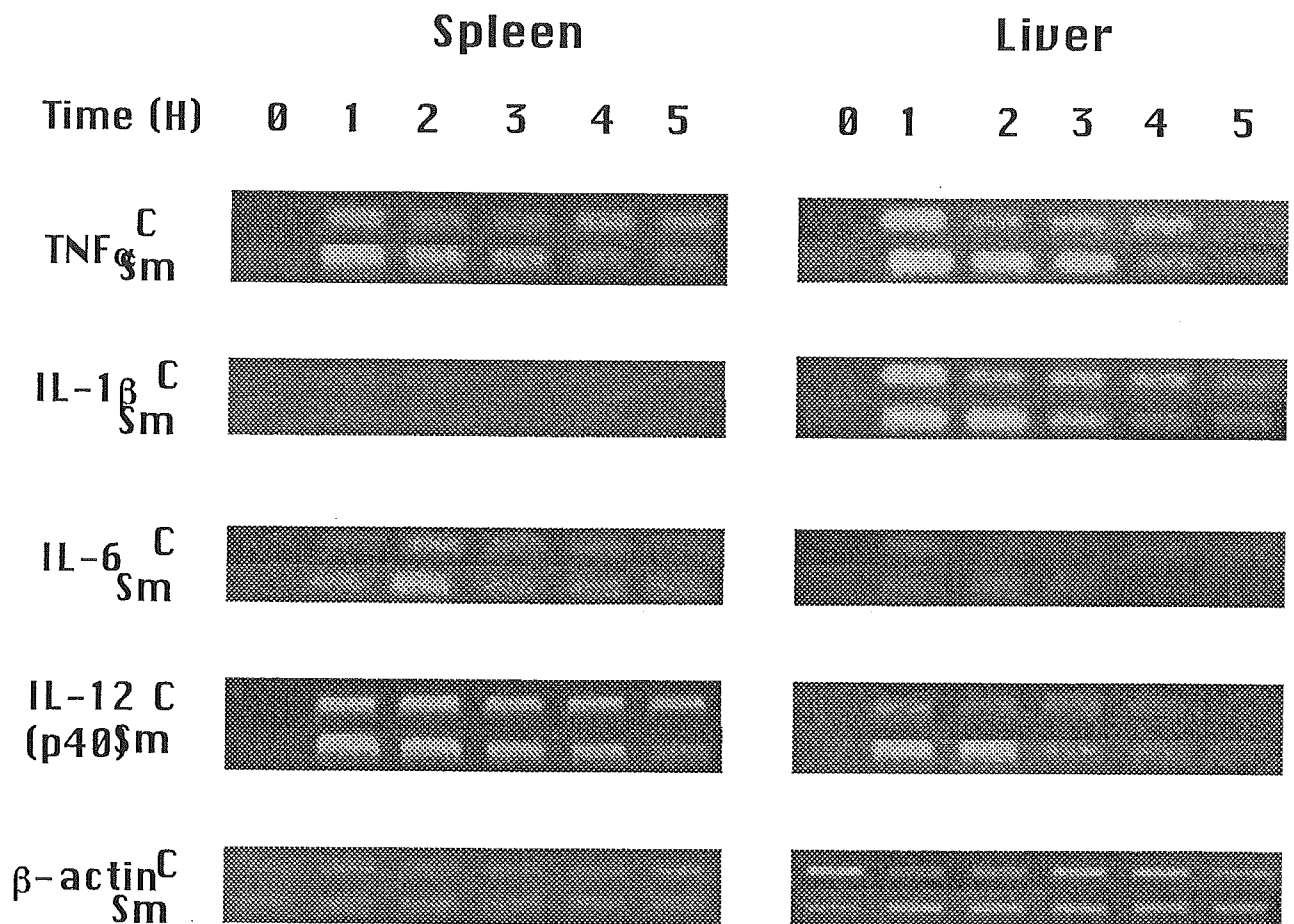


Fig. 5
RT-PCR analysis of various mRNA expression in the spleens and livers of *Schistosoma mansoni*-infected mice after LPS/D-GalN challenge

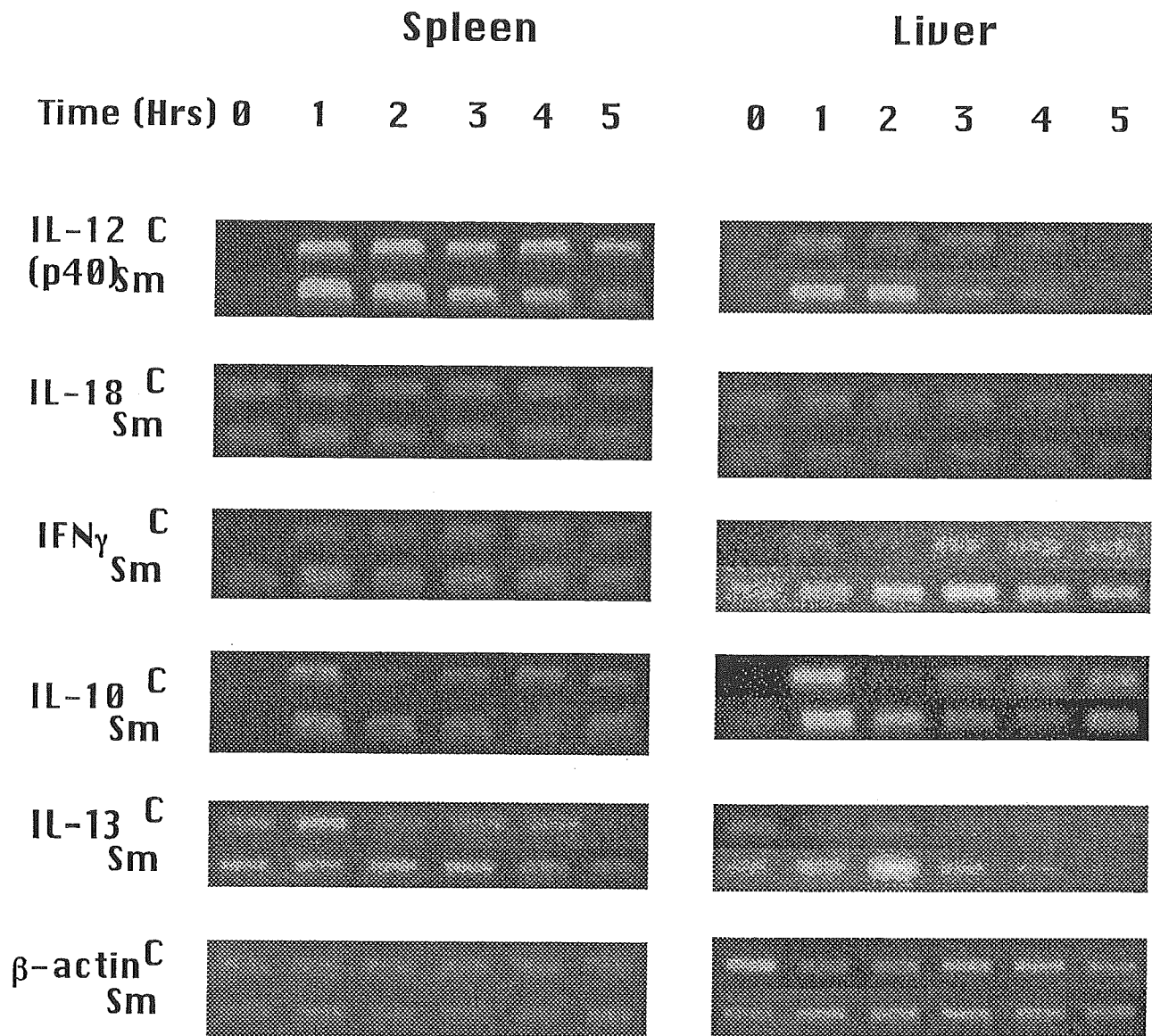


Fig. 6
RT-PCR analysis of various mRNA expression in the spleens and livers of *Schistosoma mansoni*-infected mice after LPS/D-GalN challenge

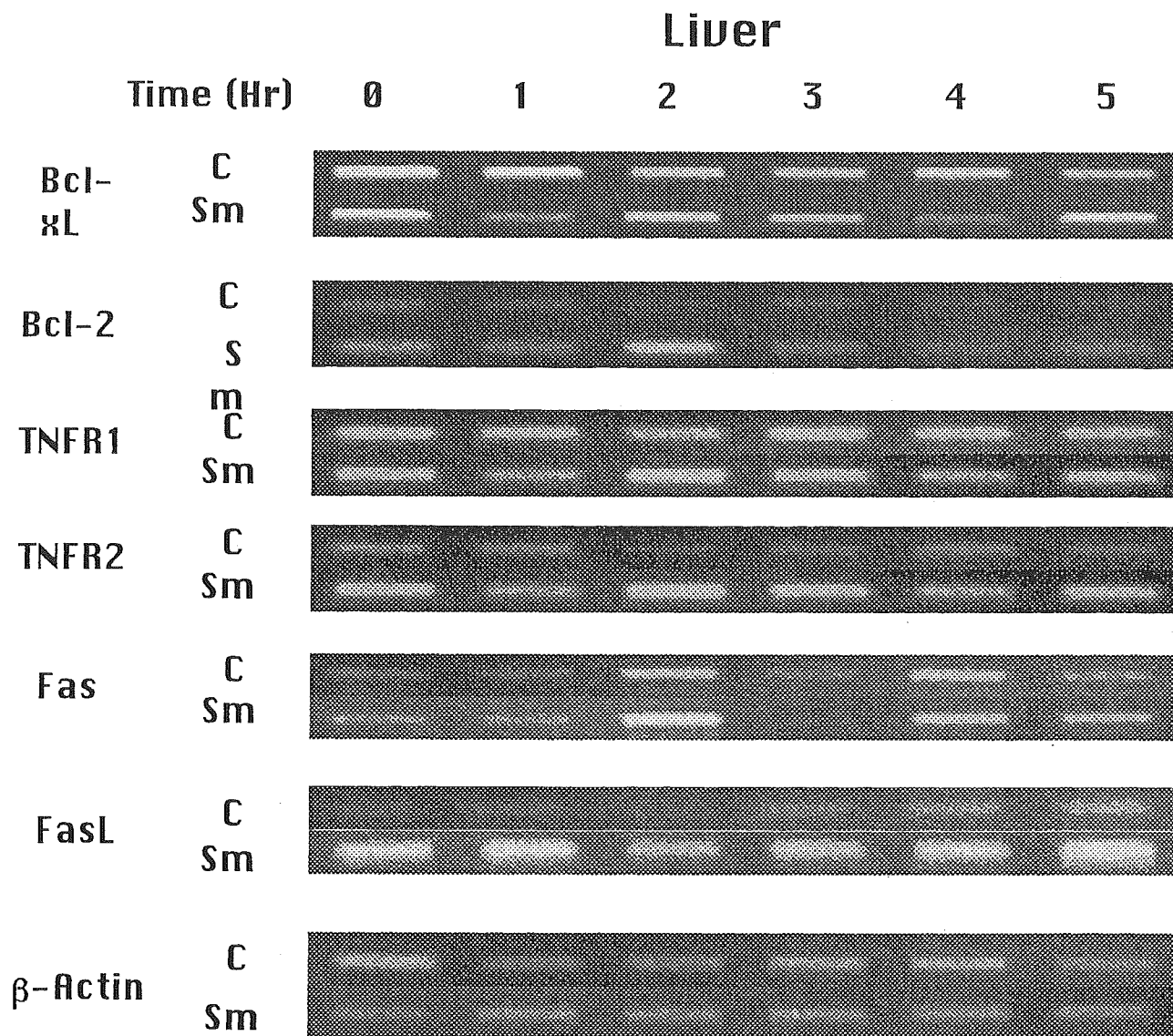


Fig. 7
RT-PCR analysis of various mRNA expression in the livers of *Schistosoma mansoni*-infected mice after LPS/D-GalN challenge

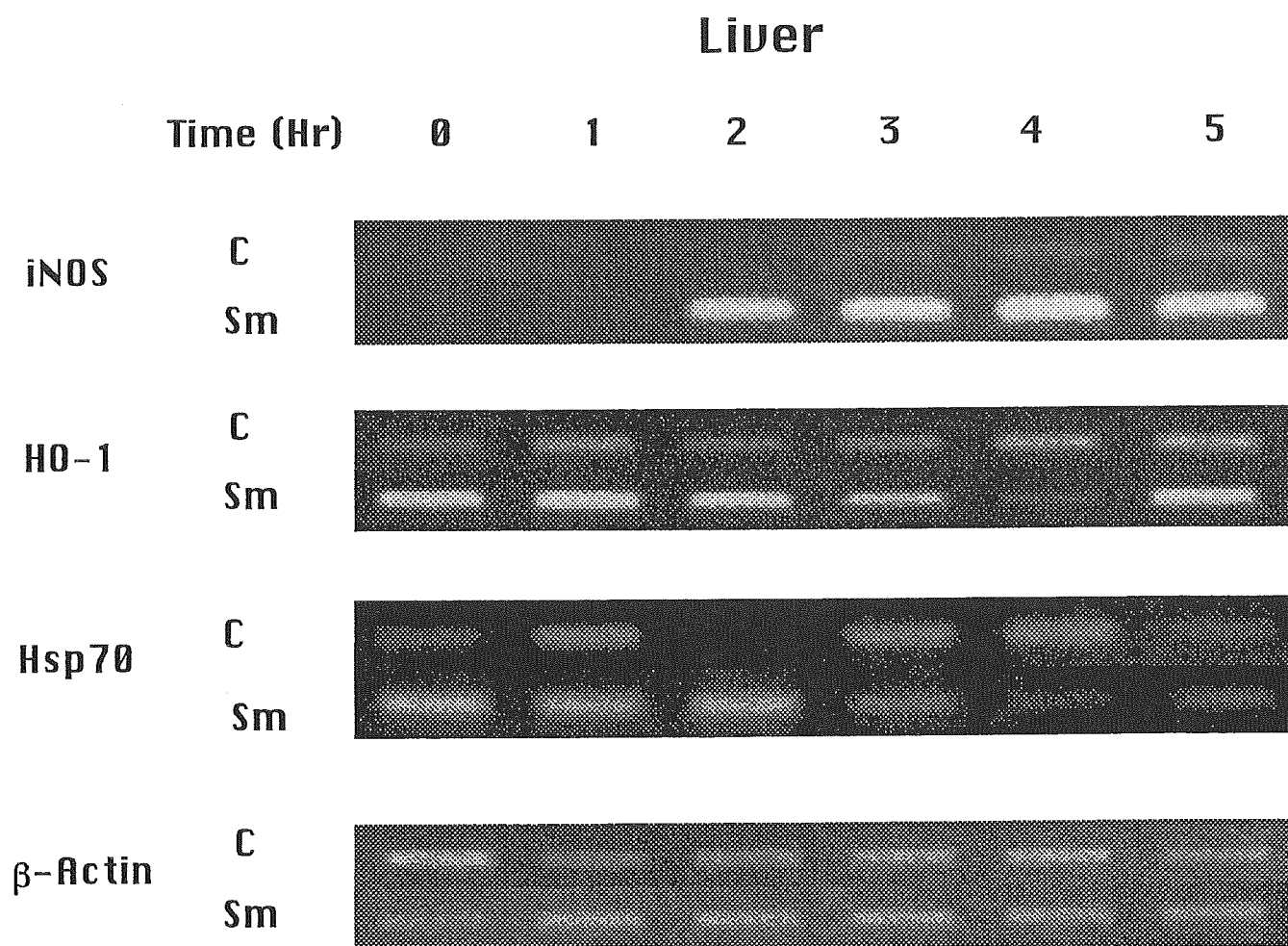


Fig. 8
RT-PCR analysis of various mRNA expression in the livers of *Schistosoma mansoni*-infected mice after LPS/D-GalN challenge

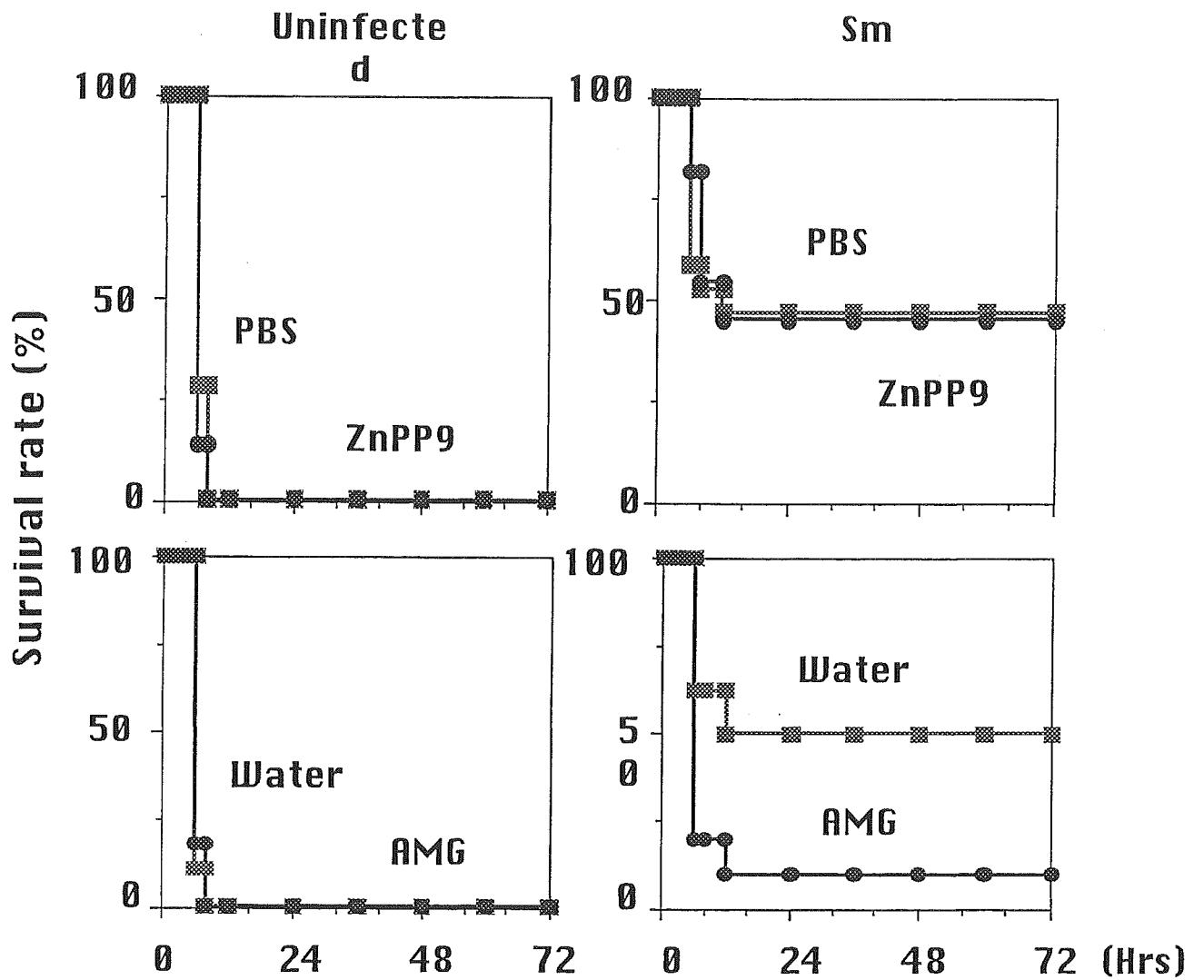


Fig. 9
Effect of zinc-protoporphyrin IX or aminoguanidine administration on the survival rate of *Schistosoma mansoni*-infected and uninfected mice after LPS/D-GalN challenge