

葛西真治, 駒形 修, 正野俊夫, 富田隆史.  
マイクロアレイ法を用いたシトクロム  
P450 解析 (2) : ピレスロイド剤抵抗性  
アカイエカおよびチカイエカの遺伝子発  
現. 同上、長崎

橋本知幸, 新庄五朗, 富田隆史, 葛西真  
治. ピレスロイド抵抗性アカイエカの蚊  
取り剤使用環境下での吸血行動の実験的  
検証. 同上、長崎

内海与三郎, 釜田 壹, 古田真也, 亀井  
正治, 吉田政弘, 山下敏夫, 小林陸生.  
雨水枡および浄化槽に生息するアカイエ  
カ群に対するピリプロキシフェン含有発  
泡剤の防除効果. 同上、長崎

松岡裕之、平井誠、服部隆太、笠原優一、  
吉田元、新井明治 ハマダラカ成虫の唾  
液腺におけるキサントレン酸含量とマラ  
リア伝播効率 同上、長崎

嶋原貴子、橋本宗明、進藤典子、青木 孝：  
細胞内寄生を可能にする遺伝子（群）の  
解析：*Trypanosoma cruzi* 感染細胞のトラ  
ンスクリプトーム解析。日本分子生物学  
会フォーラム、2006年12月、名古屋

牧内貴志、奈良武司、案浦健、橋本哲男、  
青木孝：トリパノソーマ類に特異的なピ  
リミジン生合成第4遺伝子および第6-第5  
融合遺伝子の分子進化：近縁生物群  
diplonemids の第4、第5、第6酵素遺伝子  
の解析。同上、名古屋

平山謙二、高木明子、Weerasooria MV, 菊  
池三穂子、安波道郎、奥田尚子、伊藤誠、

木村英作、吉浦孝一郎、新川詔夫：スリ  
ランカの象皮病多発家系における罹患同  
胞対解析を用いた疾患感受性遺伝子の探  
索 第51回日本人類遺伝学会大会、2006  
年10月、米子

中西憲司 寄生虫感染と宿主応答. 特定  
領域研究「感染現象のマトリックス」第  
一回シンポジウム. 2007年1月、東京

金子修 熱帯熱マラリア原虫のロプトリ  
ータンパク質 RhopH 複合体の解析 第5  
回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム、  
2006年10月、東京

竹尾暁、金 玲、韓 銀澤、入子英幸、金  
子 修、鳥居本美、坪井敬文 熱帯熱マラ  
リア原虫の新規ワクチンをめざす多種類  
組換えタンパク質の合成とスクリーニン  
グ. 同上

坪井敬文、入子英幸、竹尾 暁、金 玲、  
韓 銀澤、大槻 均、金子 修 コムギ胚芽  
無細胞系を用いた新規マラリア伝搬阻止  
ワクチン候補抗原の探索 同上

早川敏之、Richrad Culleton, 堀井俊宏、  
田辺和祐 霊長類マラリア原虫とその宿主  
の進化、同上

西本由利子、有末伸子、川合覚、田辺和  
祐、橋本哲男、核コード細胞質 SSUrRNA  
遺伝子に基づくマラリア原虫 *Plasmodium*  
属の系統解析、同上

美田敏宏、田辺和祐、大前比呂思、北 潔、  
小早川隆敏 Independent unique evolution of  
pyrimethamine resistance of *P. falciparum* in

Melanesia. 同上

工業所有権の種類：特許

番号：特願 2007-033904

出願年月日：2007年2月14日

Culleton R, Ndounga M, Unger H, Carter R,  
Tanabe K *Plasmodium vivax* in Africa. 同  
上

井関博、五十嵐郁男他 LAMP (loop-  
mediated isothermal amplification)法を用い  
たウシバベシア症の簡易迅速遺伝子診断  
法の開発 第 142 回日本獣医学会 2006  
年9月、山口

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

特許取得

発明の名称：気管支喘息発症モデル動物  
およびその作製方法、並びにその利用

発明者名：中西憲司、善本知広

権利者名：科学技術振興機構

工業所有権の種類：特許

番号：特願 2006-124354

出願年月日：2006年4月27日

2. 発明の名称：Th2 型アレルギー性疾患  
治療薬及び感染症治療薬

発明者名：善本知広、中西憲司、善本隆  
之、水口純一郎

権利者名：科学技術振興機構

工業所有権の種類：特許

番号：特願 2006-305852

出願年月日：2006年11月10日

3. 発明の名称：実験動物の腸管癒着を形  
成する方法、腸管癒着実験動物の製造方  
法、腸管癒着抑制剤のスクリーニング方  
法及び腸管癒着抑制剤

発明者名：善本知広、中西憲司、藤元治  
朗

権利者名：科学技術振興機構

「寄生虫の宿主適応機構の分子情報解明に基づく新しい治療戦略開発及びその寄生虫対策  
への応用に関する研究」  
分担研究報告書

分担課題：日本住血吸虫症の病態発現制御分子の解析

分担研究者 太田伸生 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・国際環境寄生虫病学分野  
研究協力者 熊谷 貴（同上）

**研究要旨** 住血吸虫が宿主血管内という高度の酸化ストレスに曝される環境に寄生適応できる背景に虫による抗酸化作用が重要であるとの仮説の下で日本住血吸虫の peroxiredoxin (Prx)の機能解析をおこなった。日本住血吸虫のゲノム情報に基づいて検討した結果、日本住血吸虫には2システインタイプの Prx-1~3 があり、それぞれ組織分布が異なっていた。RNAi により Prx-1 遺伝子発現を抑制した場合、*in vitro* において様々な酸化ストレスに対して虫体は易感受性を高めて虫は死滅したが、非酸化ストレス環境下では虫の生存に影響しなかった。本研究では long-dsRNA を用いて RNAi を行なったが、生虫体は体表面から long-dsRNA を取り込むことが観察された。本研究を通じて日本住血吸虫の寄生戦略に Prx が利用され、その機能解析手段としての long-dsRNA を用いた RNAi の手技開発が進んだ。

## A. 研究目的

住血吸虫は血管内寄生をするため、寄生環境として強い酸化ストレスに曝されていることが想像される。そのためには抗酸化機構の獲得が寄生成立のために必要である。同様に血管内に寄生するマラリア原虫が Peroxiredoxin (Prx)による抗酸化機構を機能させている事実から日本住血吸虫にも同様の機構が存在することが予想された。これまでの研究で日本住血吸虫がシステイン残基を2つ含む 2-Cys 型 Prx を持つことを明らかにしていたので、本研究では日本住血吸虫の Prx が虫の寄生適応に果たす役割を RNAi によって解析することを企図した。虫体に分布する Prx-1 と Prx-2 を対象にして RNAi による発現抑制をかけた場合に虫の生存に如何なる効果があるかを調べ、将来の日本住血吸虫症治療・予防法開発の新しい標的分子としての意義を明らかにすることが目的である。また、住血吸虫の遺伝子転写調節のための RNAi は方法論的に十分な解明が進ん

でいないこともあり、本法の効果発現の機序を明らかにすることも併せて研究目的とした。

## B. 研究方法

### 1. RNAi

RNAi は soaking 法で実施した。日本住血吸虫を経皮感染させたマウスの皮膚を RPMI1640 中で培養してシストゾミューラを得た。日本住血吸虫の Prx-1 または Prx-2 の ds-RNA を添加して6日間培養し、それぞれの発現抑制シストゾミューラを作製した。特異的な発現抑制は回収虫体を用いた RT-PCR により確認した。

### 2. 非酸化ストレス環境下の影響

RNAi 処理虫体を *in vitro* で14日間培養して、その間の虫の生存率を観察した。対照として無処理虫体および大腸菌 MBP 遺伝子の dsRNA 処理虫体を用いて Prx 抑制虫体と比較した。虫の生存は顕微鏡下で虫体の動きを観察して判定した。

### 3. 酸化ストレス下の影響

上記 2.と同様の虫体を用いて酸化刺激として H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、t-butyl hydroperoxide、cumene-hydroperoxide をそれぞれ 10 μM、10 μM、1 μM 添加して 48 時間培養した場合の虫の生存率を調べた。

#### 4. long-dsRNA の虫体への取り込み

シストソミューラに Cy3-dsRNA を添加して 2 時間以内の虫体への移行を観察した。能動的な取り込みか否かを判定するために 56°C 処理にて死滅させたシストソミューラと比較観察をおこなった。

倫理面への配慮

本研究は寄生虫を直接対象とした実験によるので倫理面での問題はない。

### C. 研究結果

#### 1. 非酸化ストレス環境下での影響

RNAi 処理後のシストソミューラを in vitro で培養した所、Prx-1 および Prx-2 いずれを抑制した場合も対照と比べて有意な生存率低下は認められなかった。

#### 2. 酸化ストレス環境下での影響

Prx-1 の RNAi 処理をおこなった虫体は調べた 3 種の酸化ストレス下においてすべて生存率の優位な低下が見られた。一方、Prx-2 の場合は生存率に全く変化は見られなかった。加えた dsRNA は 100nM であったが、これを 0~100nM の範囲で量を変化させた場合、量依存性に生存率が低下した。

#### 3. long-dsRNA の虫体への取り込み

Cy3-dsRNA を生虫体に in vitro で加えた所、1 時間後には体表から体内に移行して内部に強いシグナルが検出され 2 時間後も同程度の強度が持続した。一方、熱処理で死滅した虫体に dsRNA を加えてもそのような体内移行は観察されず、虫体が能動的に dsRNA を体内に取り込んでいることがわかった。

### D. 考察と結論

日本住血吸虫が血管内の強い酸化ストレス下に寄生するために抗酸化機構が機能していることが必要である。その

ために Prx-1 が虫にとって酸化ストレスを回避するための重要な装置として働くことが示唆された。しかし、非酸化ストレス環境下では Prx-1 抑制虫体は、少なくとも 14 日の観察期間中では対照虫体と生存率に有意差がなく、虫体の生存に必須の分子であるとは考えられなかった。酸化ストレス回避として如何なる分子間相互作用、作用誘導機構等が働くのかは今後の検討課題である。

一方、機能評価法としての RNAi が日本住血吸虫において応用可能であることが確認されたが、今回の RNAi で用いている long-dsRNA がどのようにして虫体内に取り込まれるかは従来情報がなかった。今回の観察では long-dsRNA を虫が能動的に取り込んでいることが初めて確認された。取り込みの機構は不明であるが、濃度勾配など物理的な機序でないことは死虫体で RNA の取り込みが見られないことから明らかであった。ここに関わる機序解明も今後の課題である。

### E. 健康危険情報

該当せず

### F. 研究発表

#### 論文発表

Lu SH, Kumagai T, Ai QH, Yan XL, Ohmae H, Yabu Y, Li SW, Wen LY, Maruyama H, Ohta N. Evaluation of anthelmintic effects of artesunate against *Schistosoma mansoni* infection in mice using different treatment protocols. *Parasitol Int*, 55:63-68, 2006.

Yabu Y, Suzuki T, Nihei CI, Minagawa N, Hosokawa T, Nagai K, Kita K, Ohta N. Chemotherapeutic efficacy of ascofuranone in *Trypanosoma vivax*-infected mice without glycerol. *Parasitol Int*, 55:39-43, 2006.

Ohta N, Waikagul J. Disease burden and

epidemiology of soil-transmitted helminthiasis and schistosomiasis in Asia: the Japanese perspective. Trends Parasitol, 23:30-35, 2007.

学会発表

Ohta N. Carcinogenesis due to parasitic infection. 19<sup>th</sup> Int Conference of Foundation for Promotion of cancer Res. Feb. 2006, Tokyo.

Ohta N, Otsuki S, Lu SH, Wen YL, Kumagai T, Kanazawa T, Wang TP. PCR diagnosis of *Schistosoma japonicum* infection: testing in experimental infections and the field samples. ICOPA XI, August 2006, Glasgow.

Ohta N. Lessons learned from discovery to elimination of schistosomiasis in Japan. Int Symposium on Schistosomiasis, Sept. 2006, Manila.

Kumagai T, Osada Y, Kanazawa T, Ohta N. The analysis of the essential function about Peroxiredoxin-1 from *Schistosoma japonicum* by RNA interference. Forum Cheju-12, November 2006, Tokyo.

Kumagai T, Osada Y, Kanazawa T, Ohta N. The essential role of peroxiredoxin from *Schistosoma japonicum* - Analysis by RNA interference-. 41th Joint Meeting on parasitic Diseases, US-Jpn Cooperative Medical Science Program, February 2007, Tokyo.

二瓶直子、熊谷貴、陸紹紅、聞礼永、汪天平、斎藤康秀、小林睦生、太田伸生。RS/GPSによる中国安徽省における日本住血吸虫中間宿主貝の生息環境解析と貝の形状の地域差。第75回日本寄生虫学会大会。2006年5月、弘前

**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

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

原虫ミトコンドリアを標的とした化学療法剤の探索

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、アスコフラノンやその誘導体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。一方、最近マラリア原虫にはアピコプラストと呼ばれる 35 kb の環状 DNA を持つオルガネラが存在し、マラリア原虫の増殖に必須な機能を有している事が判って来た。また、電子顕微鏡による観察から両者が細胞の中で常に近傍に局在している事が報告されている。そこでこの2つのオルガネラの相互作用を調べ、さらにそれぞれの機能を独立に解析する目的で細胞分画における挙動を

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調べる目的で、組換え酵素を用い高純度で高活性の酵素の精製法の確立を試みた。

(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

熱帯熱マラリア原虫の培養系から単離した粗ミトコンドリア画分をアピコプラストに局在するフェレドキシンに対する抗体を用いて、Western ブロットを行なった所、他の画分に比較して強いシグナルが観察され、これまでの粗ミトコンドリア画分にはアピコプラストが含まれている事が判った。そこでミトコンドリアとアピコプラストの相互作用を調べる目的でパーコールによる分離を試みた。ミトコンドリアに関しては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、またアピコプラストに関しては上述のフェレドキシンに対する抗体を用いてその挙動を調べた。その結果、両オルガネラは常に同一の画

分に回収された。そこで密度以外の要素で両者の分離を試みる目的でセルソーターによる分離後の挙動を調べた。この目的のため、まずマラリア原虫ミトコンドリアを GFP で標識した。すなわち、ミトコンドリア型 HSP の N 末端部分のミトコンドリア移行シグナルを結合させた GFP を原虫内で発現させミトコンドリアへの局在を確認した。このマラリア原虫から調製した粗ミトコンドリア画分をセルソーターにより分離し、GFP が検出される画分を回収し、PCR で含まれる DNA を調べた。その結果、ミトコンドリア DNA に加えアピコプラスト DNA が粗ミトコンドリア画分と同じ比率で検出された。

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精製を試みた。以前にも我々は本酵素を精製し報告しているが、比活性は低く活性を持たないペプチドの共存が示唆された。そこで、宿主となる大腸菌の培養条件、組換え酵素の発現誘導条件、大腸菌細胞膜調製法、可溶化条件、精製法に関して様々な条件を検討した結果、SDS-PAGE で純度 95%以上でしかも非常に高い活性を持つ精製標品を得る事ができた。この方法は再現性も高く、常に高純度、高活性の標

品の精製法が確立できた。この標品を用いて補欠分子族として予想されている鉄の含量を測定したところ、酵素 1 分子に 2 分子の鉄が含まれる事が判った。また、この標品を用いて結晶化を試みた所、サイズは小さいが均一な結晶が得られた。

#### D. 考察

マラリア原虫のアピコプラストが常にミトコンドリアの近傍に局在している事は以前から判っていたが、その生理的意義は不明であった。今回の結果から、2つの原理の異なる方法で分離しても常に両者の挙動が一致する事から、その相互作用はかなり強固であり、生理的にも意義がある事を示唆する結果と考えられる。

我々が開発中のアスコフラノン、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。しかしそのタンパク質としての性質は酵素が極めて不安定であるため、ほとんど判っていなかった。今回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直接示す重要な成果であり、今後の阻害機構の解析に非常に有効な試料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. Sario I, Annoura T, Nara T, Hashimoto M, Tsubouchi A, Iizumi K, Makiuchi T, Murata E, Kita K, Aoki T. Genetic diversity and kinetic properties of *Trypanosoma cruzi* dihydroorotate dehydrogenase. *Parasitol Int*, 55, 11-16, 2006.
2. Okada M, Hustond CD, Ouea M, Manne Petri WJ Jr, Kita K, Nozaki T. Kinetics and strain variation of phagosome proteins of *Entamoeba histolytica* by proteomic analysis. *Mol Biochem Parasitol*, 145, 171-183, 2006.
3. Nishida S, Kurokawa K, Matsuo M, Sakamoto K, Ueno K, Kita K, Sekimizu K. Identification and characterization of amino acid residues essential for the active site of UDP-N-acetylenol-pyruvylglucosamine reductase (MurB) from *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem*, 281: 1714-1724, 2006.
4. Shinjyo N, Kita K. Up-regulation of heme biosynthesis during neuronal



- differentiation. J. Biochem. 139, 373-381, 2006.
5. Mi-ichi F, Kita K, Mitamura, T. Intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* utilize a broad range of serum-derived fatty acids with limited modification for their growth. Parasitology, 133, 399-410, 2006.
6. Ui H, Shiomi K, Suzuki H, Hatano H, Morimoto H, Yamaguchi Y, Masuma R, Sunazuka T, Shimamura H, Sakamoto K, Kita K, Miyoshi H, Tomoda H, Omura S. Verticipyronone, a new NADH-fumarate reductase inhibitor, produced by *Verticillium* sp. FKI-1083. J. Antibiot. 59: 785-790, 2006.
7. Miura S, Tomitsuka E, Kamei Y, Yamazaki T, Kai Y, Tamura M, Kita K, Nishino I, Ezaki O. Overexpression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  Coactivator -1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) Develops Muscle Atrophy with Depletion of ATP. Am J Physiol, 169:1129-1139, 2006.
8. Arita M, Suematsu T, Osanai A, Inaba T, Kamiya H, Kita, K, Sisido M, Watanabe Y, Ohtsuki T. An evolutionary "intermediate state" of mitochondrial translation systems found in *Trichinella* species of parasitic nematodes: Co-evolution of tRNA and EF-Tu. Nuc Acid Res, 34:5291-5299, 2006.
9. Ui H, Shiomi K, Suzuki H, Hatano H, Morimoto H, Yamaguchi Y, Masuma R, Sakamoto K, Kita K, Miyoshi H, Tomoda H, Tanaka H, Omura S. Paecilaminol, a new NADH-fumarate reductase inhibitor, produced by *Paecilomyces* sp. FKI-0550. J Antibiot. 59:591-596, 2006.
10. Kobayashi T, Sato S, Takamiya S, Komaki-Yasuda K, Yano K, Hirata A, Onitsuka I, Hata M, Mi-ichi F, Tanaka T, Hase T, Miyajima A, Kawazu S, Watanabe Y, Kita K. Mitochondria and apicoplast of *Plasmodium falciparum*: behaviour on subcellular fractionation and the implication. Mitochondrion 7: 125-132, 2007.
11. Mita T, Tanabe K, Takahashi N, Tsukahara T, Eto H, Dysoley L, Ohmae H, Kita K, Krudsood S, Looareesuwan S, Kaneko A, Bjokman A, Kobayakawa T. Independent evolution of pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum* in Melanesia. Antimicrob Agents Chemother. 51:1071-1077, 2007.
12. Kimata-Arigo Y, Kurisu G, Kusunoki M, Aoki S, Sato D, Kobayashi T, Kita K, Horii T, Hase T. Cloning and characterization of ferredoxin and ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase from human malaria parasite. J. Biochem. *in press*

## II 学会発表

1. 原田倫世、藤本陽子、中村公亮、城戸康年、坂元君年、八木欣平、所正治、北潔 *Cryptosporidium* シアン耐性酸化酵素 (AOX) の解析 第75回日本寄生虫学会総会 平成18年5月
2. 富塚 江利子、宮寺 浩子、江角 浩安、北 潔 抗蟻虫薬 Pyrvinium Pamoate の寄生虫およびガン細胞を含む哺乳類ミトコンドリアにおける嫌氣的呼吸に対する阻害機構 第75回日本寄生虫学会総会 平成18年5月
3. 藪 義貞, 鈴木高史, 齋本博之,

坂元君年, 皆川信子, 細川知良, 永井和夫, 北 潔, 太田伸生 抗生物質アスコフラノンのクリプトスポリデウム症治療効果 第75回日本寄生虫学会総会 平成18年5月

4. Y. Kido, K. Sakamoto, K. Nakamura, Y. Fujimoto, M. Harada, Y. Yabu, T. Suzuki, K. Kita Purification of recombinant trypanosome alternative oxidase (rTAO) ICPOA XI (平成18年9月、グラスゴー)

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

マラリア原虫の宿主細胞侵入機序の解析

分担研究者 鳥居本美 愛媛大学大学院医学系研究科教授

研究要旨 熱帯熱マラリア原虫は、ヒト体内では赤血球内に形成した寄生胞内で増殖するが、赤血球に侵入し寄生胞を形成する際には、侵入型原虫メロゾイトの先端部小器官（ロプトリーやマイクロネーム）が重要な役割を果たす。ロプトリーの内容物は侵入の際に赤血球膜に放出されるが、その中に、RhopH 複合体と呼ばれるワクチン候補分子があり、寄生胞形成時期に重要な役割を果たすと考えられている。しかし、RhopH 複合体の機能は不明で、他生物種で同定されている既知のドメイン構造も見当たらない。本研究では、熱帯熱マラリア原虫のゲノム・データベースの検索により RhopH 複合体を構成する蛋白質群のドメイン構造解析を行い、遺伝子導入の手法により、RhopH 複合体の形成に関与する領域の同定をめざしている。本年度は、熱帯熱マラリア原虫では多細胞真核生物や原核生物のプロモーターは働かないため、マラリア原虫の転写・翻訳調節領域を含み、ロプトリー形成期に蛋白質を発現する新規遺伝子導入ベクターを構築した。その結果、熱帯熱マラリア原虫の RhopH2 のアミノ末端部の小胞体輸送シグナルを含む 24 アミノ酸のみで、蛋白質がロプトリーへ輸送されることが明らかになった。

A. 研究目的

マラリアは年間数億人の感染者、数百万人の死者を出す重篤な熱帯病である。ヒトの防御免疫を誘導する蛋白質がいくつか同定されているが、これらをベースとするワクチン開発は成功していない。これまで「高い抗原性」を求めて盲目的に候補抗原の探索を行ってきたワクチン研究を推進するためには、抗原の機能蛋白質としての解析が必要である。熱帯熱マラリア原虫は、ヒト体内では赤血球内に形成した寄生胞内で増殖するが、赤血球に侵入し寄生胞を形成する際には、侵入型原虫メロゾイトの先端部小器官（ロプトリーやマイクロネーム）が重要な役割

を果たす。ロプトリーの内容物は侵入の際に赤血球膜に放出されるが、その中に、RhopH 複合体と呼ばれるワクチン候補分子があり、寄生胞形成時期に重要な役割を果たすと考えられている。RhopH 複合体は、3つの異なる分子 (RhopH1, RhopH2, RhopH3) により構成され、RhopH1 は *clag2*, *clag3.1*, *clag9* を含む *rhopH1/clag* 多重遺伝子族によりコードされている。しかし、RhopH 複合体の機能は不明で、他生物種で同定されている既知のドメイン構造も見当たらない。そこで申請者らは、熱帯熱マラリア原虫のゲノム・データベースの検索により RhopH 複合体を構成する蛋白質群のドメイン構造解析を行い、

遺伝子導入の手法により、RhopH 複合体の形成に関与する領域を同定することを試みた。一方、熱帯熱マラリア原虫では多細胞真核生物や原核生物のプロモーターは働かないため、マラリア原虫の転写・翻訳調節領域を含み、ロプトリー形成期に蛋白質を発現する新規遺伝子導入ベクターの構築を試みた。

## B. 研究方法および結果

### 1) 熱帯熱マラリア原虫のロプトリー蛋白質用の新規遺伝子導入ベクターの構築と解析

熱帯熱マラリア原虫のロプトリー形成期に活性がある RhopH2 のプロモーター、RhopH2 由来の小胞体輸送シグナルペプチド配列、c-myc タグ配列、緑色蛍光蛋白質 (GFP) 配列を持つ新規ベクターを作成した。このコンストラクトを原虫に遺伝子導入すると、メロゾイトが形成される時期に GFP の最大の発現を見られることが蛍光顕微鏡およびウェスタンブロット解析で確認された。興味深いことに、発現された GFP はシグナルペプチド配列 (19 アミノ酸) とそれに続く 5 アミノ酸、および、制限酵素配列から翻訳されるアミノ酸、c-Myc タグ、GFP のみで構成されているにもかかわらず、ロプトリーに局在した。c-Myc タグと多くの制限酵素配列を除去しても、GFP はロプトリーに局在した。ゆえに、RhopH2 プロモーターとアミノ末端の 24 アミノ酸のみで蛋白質がロプトリーに輸送されることがわかった。過去の研究では、メロゾイト期に小胞体輸送シグナル配列を付加した GFP を発現すると、原虫細胞膜外へ放出され

ることがわかっているため、これは全く新しい知見であり、RhopH2 アミノ末端の 24 アミノ酸にロプトリー移行シグナルが含まれることが示唆された。

### 2) Clag3.1 の RhopH 複合体への結合部位の同定

熱帯熱マラリア原虫のゲノムデータベースに対して相同解析を行った結果、構成分子の一つ RhopH1 には、マラリア原虫が含まれるアピコンプレクサ門原虫で保存している領域があることが判明した。そこで、RhopH1 が RhopH 複合体の中でも重要な役割を担っていると想定し、解析を進めた。RhopH1 の RhopH 複合体への結合部位を検討するため、RhopH1 の一つである Clag3.1 のアミノ末端 1/3 (アミノ酸部位 24-483) と GFP の融合蛋白質を発現する原虫を作成した。免疫沈降法により、この融合蛋白質が RhopH 複合体に含まれている事を見出した。コントロールとして Clag3.1 全長と GFP の融合蛋白質を発現するコンストラクトを遺伝子導入したところ、全長は発現されず、Clag3.1 の C 末端部 40kD と GFP を欠損した組換え蛋白質の発現が見られた。この融合蛋白質は RhopH 複合体に含まれることから、Clag3.1 の C 末端部 40kD には RhopH 複合体への結合部位が存在しないことが明らかとなった。

## E. 結論

熱帯熱マラリア原虫の RhopH2 のアミノ末端部の小胞体輸送シグナルを含む 24 アミノ酸のみで、蛋白質がロプトリーへ輸送されることを示した。また、RhopH1 の中央部位が RhopH 複合体への結合に重要であることを明らかにした。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yano K, Komaki-Yasuda K, Tsuboi T, Torii M, Kano S, Kawazu S. 2-Cys Peroxiredoxin TPx-1 is involved in gametocyte development in *Plasmodium berghei*. *Mol Biochem Parasitol* 148(1):44-51, 2006.
- 2) Kaneko O, Templeton TJ, Iriko H, Tachibana M, Otsuki H, Takeo S, Sattabongkot J, Torii M, Tsuboi T. The *Plasmodium vivax* homolog of the ookinete adhesive micronemal protein, CTRP. *Parasitol Int* 55(3):227-231, 2006.
- 3) Palacpac NMQ, Leung BWY, Arisue N, Sattabongkot J, Tanabe K, Tsuboi T, Torii M, Udomsangpetch R, Horii T. *Plasmodium vivax* serine repeat antigen (SERA) multigene family exhibits similar expression patterns in independent infections. *Mol Biochem Parasitol* 150(2):353-358, 2006.
- 4) Ghoneim A, Kaneko O, Tsuboi T, Torii M. The *Plasmodium falciparum* RhopH2 promoter and first 24 amino acids are sufficient to target proteins

to the rhoptries. *Parasitol Int* 56:31-43 2007.

### 2. 学会発表

- 1) 金子修、橘真由美、大槻均、鳥居本美 熱帯熱マラリア原虫感染赤血球表面分子 surf ファミリーは著しく多型である 第 75 回日本寄生虫学会大会、弘前市 (2006, 05, 19-20)
- 2) 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ドン周辺の塩基配列と翻訳効率 第 75 回日本寄生虫学会大会、弘前市 (2006, 05, 19-20)
- 3) 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 75 回日本寄生虫学会大会、弘前市 (2006, 05, 19-20)
- 4) 鄭麗、金子修、大野民生、タナポーン・ルングルアング、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 75 回日本寄生虫学会大会、弘前市 (2006, 05, 19-20)
- 5) 矢野和彦、大槻均、新井明治、坪井敬文、鳥居本美、駒木-安田加奈子、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オーシスト発育に及ぼす影響の解析 第 75 回日本寄生虫学会大会、弘前市 (2006, 05, 19-20)

- 6) 入子英幸、竹尾暁、金玲、大槻均、金子修、鳥居本美、坪井敬文 コムギ胚芽無細胞系を用いた新規マラリア伝搬阻止ワクチン候補抗原の探索 第75回日本寄生虫学会大会、弘前市 (2006, 05, 19-20)
- 7) 竹尾暁、金玲、韓銀澤、入子英幸、金子修、鳥居本美、坪井敬文 熱帯熱マラリア原虫新規赤血球型ワクチン候補抗原分子の探索 第75回日本寄生虫学会大会、弘前市 (2006, 05, 19-20)
- 8) 鳥居本美 最近のマラリア診断と研究 第19回臨床微生物迅速診断研究会総会、松山市、(2006, 06, 17)
- 9) K. Yano, K. Komaki-Yasuda, T. Tsuboi, M. Torii, S. Kano and S. Kawazu Peroxiredoxin is involved in gametocyte development in *Plasmodium berghei*. ICOPA XI Glasgow Scotland (August 6-11, 2006)
- 10) Iriko H, Jin L, Kaneko O, Han ET, Tachibana M, Otsuki H, Takeo S, Torii M, Tsuboi T. Alternative splicing is not rare in *Plasmodium falciparum*. The 6<sup>th</sup> Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, (September 4-7, 2006)
- 11) 金子修 熱帯熱マラリア原虫のロブトリータンパク質 RhopH 複合体の解析 第5回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム、東京 (2006. 10. 28-29)
- 12) 竹尾暁、金玲、韓銀澤、入子英幸、金子修、鳥居本美、坪井敬文 熱帯熱マラリア原虫の新規ワクチンをめざす多種類組換えタンパク質の合成とスクリーニング。 第5回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム、東京 (2006. 10. 28-29)
- 13) 坪井敬文、入子英幸、竹尾暁、金玲、韓銀澤、大槻均、金子修 コムギ胚芽無細胞系を用いた新規マラリア伝搬阻止ワクチン候補抗原の探索 第5回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム、東京 (2006. 10. 28-29)
- 14) 鳥居本美 ミニレクチャー(3) 無細胞タンパク質合成法について 第62回日本寄生虫学会西日本支部大会、愛知医科大学 (2006. 11. 11-12)
- 15) 大槻均、金子修、橘真由美、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62回日本寄生虫学会西日本支部大会、愛知医科大学 (2006. 11. 11-12)
- 16) Takeo S, Jin L, Sakamoto H, Han ET, Iriko H, Kaneko O, Torii M, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, Sawasaki T, Endo Y, Tsuboi Y. Discovering novel blood stage malaria vaccine candidates: Screening with immune sera from falciparum malaria patients and asymptomatic parasite carriers. 56<sup>th</sup> Annual Meeting of ASTMH, Philadelphia, USA (November 4-8, 2007)
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
特記すべきものはない

「寄生虫の宿主適応機構の分子情報解明に基づく新しい治療戦略開発及びその寄生虫対策への  
応用に関する研究」  
分担研究報告書

寄生虫症感受性の宿主因子の検討に関する研究  
—日本住血吸虫の感染負荷量を決定する循環抗原測定系の開発—

分担研究者 平山謙二 長崎大学・熱帯医学研究所・疾病生態分野

### 研究要旨

マンスン住血吸虫で確立されている血中に検出される循環抗原を特異的に認識するモノクローナル抗体を用い、感染負荷量を決定しうる高感度な測定系を日本住血吸虫症で開発すること、さらに、これをツールとして用いて住血吸虫症の感染抵抗性に関わる宿主遺伝要因について解析することを目的として本研究を行った。腸粘膜関連抗原(GAA)を認識する抗体を産生するハイブリドーマ株を樹立し、モノクローナル抗体を組み合わせた GAA 抗原を高感度で検出するサンドイッチ ELISA 法を確立し、中国江西省の浸淫地の Kato-Katz 法 3 回繰り返し法により虫卵数が明らかな患者の血清中の循環抗原量と虫卵数との相関について検討した。この結果、陽性血清を TCA（トリクロロ酢酸）処理した結果、感染強度の高い患者血清においても、OD 値と感染強度とのある程度の相関が認められる検出系を確立した。

### A. 研究目的

寄生虫感染症の感染抵抗性については、ある程度の獲得免疫が作用していると考えられているが、日本住血吸虫症ではマンスン住血吸虫や、ビルハルツ住血吸虫症に認められる加齢に伴う感染防御能の増強は顕著ではない。我々のこれまでの調査において、年齢による階層化を行ったあとに個人間の感染強度を比較すると、高い感染強度を示す者、あるいは低い感染強度を示す者がランダムに存在し、加齢以外のなんらかの個体差が感染防御に関係していることが推測された。しかしながら、遺伝的な個体差を解析するには感染量の定量が可能となるような測定法の確立が必須となる。

感染の確定診断としては、便中虫卵を直接観察する Kato-Katz 法が主に用いられているが、活動性感染の検出や感染負荷量の評価には適さないこと、また慢性期患者では検出力が低下するという欠点がある。また、今後、住血吸虫症のコントロールが進行するにつれ、低い感染率を示す地域での患者の治療には簡便で高感度の活動性感染を識別できる診断法の開発も求められている。我々はマンスン住血吸虫で確

立されている血中に検出される循環抗原を特異的に認識するモノクローナル抗体を用い、感染負荷量を決定しうる高感度な測定系を日本住血吸虫症で開発すること、さらに、これをツールとして用いることにより住血吸虫症の感染抵抗性に関わる宿主遺伝要因について解析することを目的として本研究を行った。

### B. 研究方法

活動性の感染を検出する系としては、血中の住血吸虫由来の DNA を検出する PCR 法や、血中の循環抗原を検出するディップスティック法等の様々な手法が検討されている。我々は、腸粘膜関連抗原(GAA)を認識する抗体を産生するハイブリドーマ株を樹立し、モノクローナル抗体を組み合わせた GAA 抗原を検出するサンドイッチ ELISA 法を確立した。これを用いて中国江西省の共同研究者から供与された浸淫地の Kato-Katz 法 3 回繰り返し法により虫卵数が明らかな患者の血清中の循環抗原量と虫卵数との相関について検討した。また、患者尿中の抗原についても、検出が可能であるかについて検討した。2003 年より継続して行っているフ

フィリピンのミンドロ島、ソルソゴン島で、独協大・千種らがやっているフィールドサンプルについても検討を行う。

(倫理面での配慮)

フィールド調査及び、採血に関しては共同研究者らにより対象者のインフォームドコンセントを得た上で行った。フィリピンのフィールド調査に関しては長崎大学・熱帯医学研究所の倫理審査委員会での承認を得て行った(承認番号 04031002)。

### C. 研究結果

通常法のサンドイッチ ELISA では、陽性血清 2.5~5%と高感度での検出が可能であったが、感染強度 EPG100 以上の患者サンプルでは、逆に OD 値の低下が認められた(図 1)。

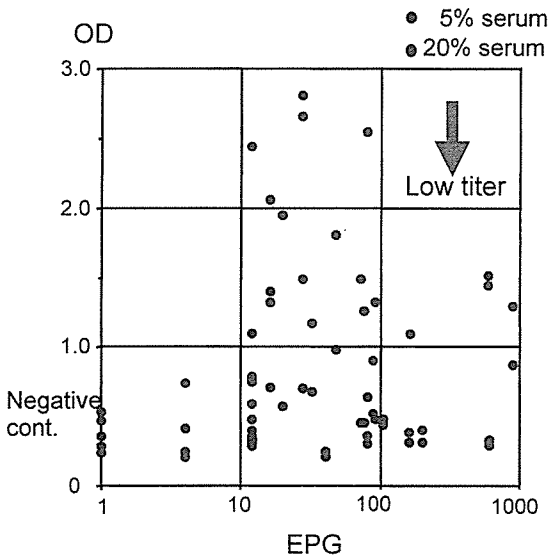


図 1 虫卵数と血清 5%及び 20%OD 値との相関

これは、感染が進行するに従って産生される抗体により、抗原がトラップされて検出が阻害されることが原因と考えられた。そこで、マンスン住血吸虫で一般的に用いられる方法である TCA (トリクロル酢酸) 処理を行った結果、感染強度の高い患者血清においても、OD 値と感染強度とのある程度の相関が認められるような検出系を確立することができた(図 2)。

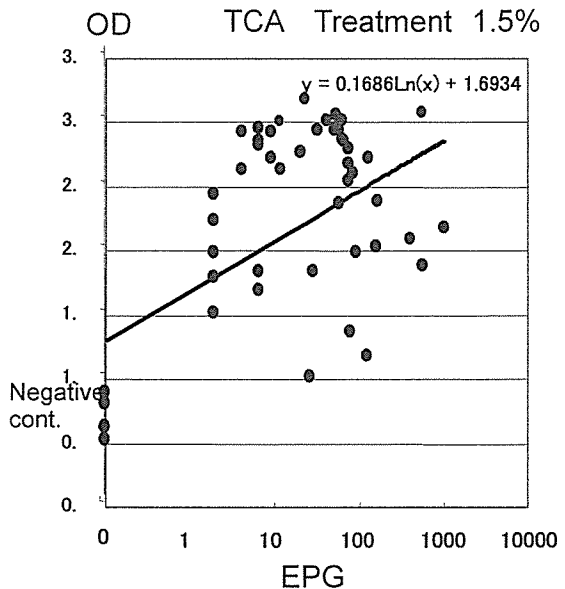


図 2. TCA 処理後の OD 値の変化  
血中循環抗原と OD 値との相関  
(血清濃度は 25%)

この検出系の正当性を確認するために、実験的に住血吸虫を感染させたミニブタでの血清試料からの検出を試みた。

通常法のサンドイッチ ELISA では、ごく初期の感染の検出のみが可能で、感染経過に応じて同様に検出力の低下が認められた。この感染後期の血清は TCA 処理することにより検出が可能となった(図 3)。

また、試験的に試した患者尿中の抗原を検出することはできなかった。今後、検出条件等について検討する必要があると思われる。

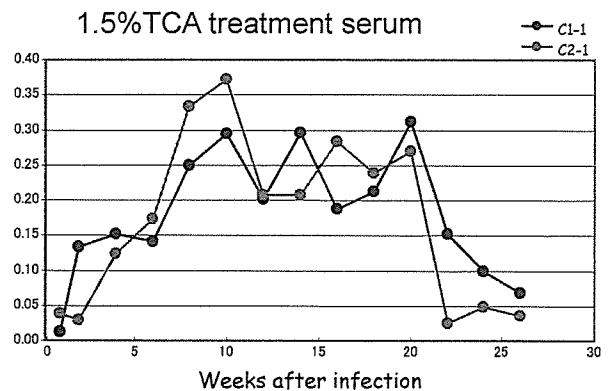


図 3. 200 隻セルカリア感染させたミニブタ血清を用いた検出結果

### D. 考察

抗虫体抗体価の高い対象者では TCA 処理



することにより、活動性の感染の検出が可能となるものの、初期感染対象者については通常法で行う必要性があることを示唆する結果を得た。

また、実際のフィールドでの使用を考慮すると通常法、TCA 処理の 2 種類の方法を行うのは非常に困難であると考えられる。実際の検出感度は十分であると考えられたため、抗原抗体複合体から抗原を解離して検出する方法（抗体ビーズ法など）についてさらに検討し、高感度かつ簡便なキット化をめざして改良を行う。

また、マンソン住血吸虫で用いられているモノクローナル抗体は住血吸虫由来の腸管関連糖鎖抗原とされている。TCA 処理によって糖鎖が上清に濃縮され、検出が可能になる場合と TCA 処理後の pH 調整による抗原抗体複合体からの抗原の分離との両方の意味合いがあるため、このモノクローナル抗体が認識している抗原について、その抗原蛋白の性質を決定する必要があると考えられた。

今後、中国あるいはフィリピンの日本住血吸虫症浸淫地のフィールドで評価を行い、さらに改良を加えることによって、感染強度の測定系を確立することが可能であると考えている。

## E. 結論

日本住血吸虫症患者の血中に検出される循環抗原を特異的に検出する測定系により、感染強度の定量の可能性が示唆された。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Yu C., Yin X., Kikuchi M., Hirayama, K. Zhu Y., Sequence analysis of full length cDNA of *Schistosoma japonicum* egg miracidia genes harboring signal sequence. Chinese journal of Schistosomiasis Control 18(1): 10-14, 2006.

Chen HG, Zeng XJ, Ge J, Jiang WS, Kikuchi M, Hirayama K. [Study of the efficacy of a monoclonal antibody biotin-avidin system for the diagnosis of schistosomiasis japonica] Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi. 2006 Jul;40(4):244-7. Chinese.

## 2. 学会発表

平山謙二、菊池三穂子、安波道郎、塚原高広、石井一成、Lim J Koji, 金子明：Malaria selection pressure might influence on the frequencies of several polymorphic markers for immune related genes in Vanuatu

第 75 回日本寄生虫学会大会、平成 18 年 5 月 19 日・20 日、弘前文化センター、青森県弘前市 (I-A-06)

菊池三穂子、奥田尚子、塚原高広、安波道郎、佐藤智生、松尾恵、Ratawan Ubalee, Koji J. Lim, 金子明、平山謙二：Geography-dependent difference in allele frequencies of immune-related loci presumably under malarial selection in Vanuatu. 56<sup>th</sup> annual meeting for the American society of Human Genetics, October 9-13, 2006, Earnest N. Morial Convention Center, New Orleans, Louisiana (1052-A)

高木明子、W. V. Mirani, 菊池三穂子、伊藤誠、木村英作、安波道郎、吉浦孝一郎、新川詔夫、平山謙二：スリランカの象皮病多発家系における罹患同胞対解析を用いた疾患感受性遺伝子の探索 第 47 回日本熱帯医学会・第 21 回日本国際保健医療学会合同大会、2006 年 10 月 11 日～13 日、長崎ブリックホール、長崎県長崎市 (Tropical Medicine and Health 34<sup>th</sup> supplement 166)

平山謙二、高木明子、W. V. Mirani, 菊池三穂子、安波道郎、奥田尚子、伊藤誠、木村英作、吉浦孝一郎、新川詔夫：スリランカの象皮病多発家系における罹患同胞対解析を用いた疾患感受性遺伝子の探索 第 51 回日本人類遺伝学会大会、2006 年 10 月 17 日～20 日、米子コンベンションセンター、鳥取県米子市 (O-31 150)

## 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

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

Th2 サイトカインによるシアル酸転移酵素，硫酸基転移酵素の発現調節

分担研究者 有菌直樹 京都府立医科大学大学院医学研究科教授

研究要旨 Th2 サイトカイン IL-4, IL-13 のシアル酸転移酵素 Siat4c, 硫酸基転移酵素 3ST1 の発現に及ぼす影響を，腸管上皮由来細胞株 IEC-6 を用いて検討した．その結果，IEC-6 細胞には IL-4R, IL-13Ra の constitutive な発現が見られ，IL-4, IL-13 の投与により，Siat4c, 3ST1 の遺伝子発現を亢進することが明らかになった．線虫 *Nippostrongylus brasiliensis* 成虫を IEC-6 と共培養した場合には，IL-6 遺伝子の発現亢進及び Siat4c, MUC2 の発現亢進が見られた．以上の結果から，IL-4, IL-13 は腸管上皮細胞における Siat4c, 3ST1 発現を亢進させ，さらに線虫代謝産物は IL-6 産生を通じて，粘液の性状を修飾する可能性が示唆された．

A. 研究目的

腸管寄生虫の定着や排除には，腸管粘液や腸管上皮細胞膜糖タンパクの糖鎖の性状が重要な役割を果たしている．我々は，線虫 *Nippostrongylus brasiliensis* を用いた研究により，*N. brasiliensis* を Th2 依存性に排除する+/+ラットでは，虫体排除期にシアル酸転移酵素 Siat4c 及び硫酸基転移酵素 3ST1 の小腸上皮細胞における遺伝子発現レベルの上昇が見られるが，*N. brasiliensis* を排除しない mu ラットでは，この発現亢進が生じないことを明らかにした．本研究では，Th2 サイトカインによる腸管上皮細胞 Siat4c, 3ST1 の発現調節機構について検討した．

B. 研究方法

ラット小腸上皮細胞由来細胞株 IEC-6 に IL-4, IL-13, IL-6 を投与し，24 時間培養後 RNA を回収後 real-time PCR により遺伝子発現を検討した．一部の実験では IEC-6 と *N. brasiliensis* 成虫を 24 時間共培養し，同様に遺伝子発現を検討した．

C. 研究結果

IEC-6 細胞には IL-4R, IL-13Ra の constitutive な発現が見られ，IL-4, IL-13 の投与により，Siat4c, 3ST1 の遺伝子発現が亢進することが明らかになった．一方，炎症性サイトカインの IL-6 の投与では，粘液コアペプチド MUC2 の発現増強が見られた．*N. brasiliensis* 成虫を

IEC-6 と共培養した場合には，IL-6 遺伝子の発現亢進及び Siat4c, MUC2 の発現亢進が見られた．

D. 考察

線虫感染により，宿主動物には Th2 サイトカインの IL-4, IL-13 等が誘導される．IL-4, IL-13 には IgE 抗体産生，マスト細胞分化増殖など重要な機能が知られているが，本研究から，小腸上皮細胞の Siat4c, 3ST1 発現を調節するという新しい機能が明らかになった．この機能は，線虫の定着，排除に重要な役割を果たしていると推測される．

E. 結論

IL-4, IL-13 は腸管上皮細胞における Siat4c, 3ST1 発現を亢進させ，さらに線虫代謝産物は IL-6 産生を通じて，これを修飾する可能性が示唆された．

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;114:270-8.

2. 学会発表

Arizono N, Takeda K, Hashimoto K, Yamada M,

Uchikawa R, Tegoshi T. Th2 cytokines IL-4 and IL-13 up-regulate the gene expression of sialyl- and sulfo-transferases in intestinal epithelial cells.

41st Joint Conference on Parasitic Diseases, The Japan-United States Cooperative Medical Science Program, February 1-3, 2007, Tokyo

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）を確立し、途上国の現場においてその有用性を検討している。今年度は、スリランカにおいて、フィラリア集団治療の効果判定に尿 ELISA が利用できることを確認するための追跡調査を実施し、良い結果を得た。また、ケニアでは、血尿を起こすビルハルツ住血吸虫感染が尿 ELISA に及ぼす影響について検討した。その結果、住血吸虫感染が交差反応を引き起こすことが明かとなった。さらに組換え抗原 SXP-1 を用いる新しい尿 ELISA を開発した。

### A. 研究目的

WHO 主導による、世界からのリンパ系フィラリア症撲滅計画の促進に寄与することを目標に、途上国における野外調査に便利な尿を用いる免疫診断法を開発した。これにより、夜間採血の必要性がなくなった。また、サンプル採取が非侵襲的なので、幼小児の検査が格段に容易となった。人々の協力も得やすい。

具体的な研究目的は以下の4点である。

- (i) 隠れた流行地を効率良く発見する、
- (ii) 治療効果のモニタリング、(iii) 撲滅の確認および再燃の監視作業を行う、
- (iv) 途上国での使用に便利な安価で簡便な尿診断法を開発する。

### B. 研究方法

#### 1. 集団治療の効果のモニタリング

WHO のフィラリア症撲滅計画の基本は年一回の集団治療（MDA）を5回繰り返すことである。従って、治療効果の最終判定は治療開始5年後となる。今回は、第4回 MDA の効果を評価した。前回に引き続きスリランカ、デニヤヤ地方の小・中学生約1,000人を対象とした。

#### 2. アフリカにおける尿診断法の有用性に関する研究

ケニアのフィラリア流行地では、ビルハルツ住血吸虫症も蔓延しているため尿に血液が混入することがある。その影響を調査した。

（倫理面の配慮）

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