

応させ、ヒトに対して抗原性のある分子の予備的スクリーニングを行った。

C. D. 研究結果および考察

昨年度に合成した 149 種の組み換えタンパク質を、タイの海外共同研究者から入手した健常ヒト血清、及びマラリア患者プール血清と反応させたところ、17 種類の原虫タンパク質が抗原として同定された。これらの中には、既知の抗原も数種類含まれており、本法で作製した組換えタンパク質の有用性が示唆された。流行地住民から得られたより多検体のマラリア免疫血清を用いて、高感度かつハイスループットの抗原抗体反応検出系を確立し、新規ワクチン候補抗原分子の探索を実施する予定である。

E. 結論

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いることにより、熱帯熱マラリア原虫メロゾイト期の組換えタンパク質を多品種少量発現することに成功した。また、これらの組換えタンパク質は抗原性を保持していることが示唆された。これらの組換えタンパク質と患者血清を用いることにより、新規発病阻止ワクチン候補抗原のスクリーニングがゲノムワイドに可能と考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Mudeppa DG, Pang CKT, Tsuboi T, Endo

Y, Buckner FS, Varani G, Rathod PK. Cell-free production of functional *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase. Mol. Biochem. Parasitol. 2007, 151:216-219.

2) 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. 2007, 56:31-43.

3) Kobayashi F, Waki S, Niikura M, Tachibana Mayumi, Tsuboi T, Torii M, Kamiya S.

Plasmodium berghei XAT: Protective 155/160 kDa antigens are located in parasitophorous vacuoles of schizont-stage parasite.

Exp. Parasitol. 2007, 116:450-457.

4) Han ET, Watanabe R, Sattabongkot J, Khuntirat B, Sirichaisinthop J, Iriko H, Jin L, Takeo S, Tsuboi T. Detection of four *Plasmodium* species by genus- and species-specific loop-mediated isothermal amplification for clinical diagnosis.

J Clin Microbiol. 2007, 45:2521-2528.

2. 学会発表

- 1) 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.
Forty-first Joint Conference on Parasitic Diseases. The Japan-U. S. Cooperative Medical Science Program. Tokyo, Japan, February 1-3, 2007.
- 2) Tsuboi T.
Wheat germ cell-free translation system: An application to the genome-wide screening for novel malaria vaccine candidates.
Forty-first Joint Conference on Parasitic Diseases. The Japan-U. S. Cooperative Medical Science Program. Tokyo, Japan, February 1-3, 2007.
- 3) Cao J, Kaneko O, Thongkuiatkul A, Tachibana M, Otsuki H, Sattabongkot J, Tsuboi T, Torii M.
Plasmodium falciparum rhoptry neck protein (PFRON2) expressed at both erythrocytic and pre-erythrocytic invasive parasites. The 7th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan. September 4-7, 2007.
- 4) Tsuboi T, Jin L, Takeo S, Iriko H, Kaneko O, Sattabongkot J, Torii M.
Novel sporozoite antigen discovery of *Plasmodium falciparum* screened using human immunosera. The 7th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan. September 4-7, 2007.
- 5) Kawazu S, Yano K, Otsuki H, Arai M, Komaki-Yasuda K, Tsuboi T, Torii M, Kano S.
Disruption of 2-Cys peroxiredoxin TPX-1 gene in *Plasmodium berghei* hinders the sporozoite development. ASTMH 56th annual meeting, Philadelphia, USA, November 4-8, 2007.
- 6) Jin L, Takeo S, Iriko H, Kaneko O, Sattabongkot J, Torii M, AGUIAR JC, Tsuboi T.
Novel sporozoite antigen discovery of *Plasmodium falciparum* screened using human antisera. ASTMH 56th annual meeting, Philadelphia, USA, November 4-8, 2007.
- 7) Takeo S, Hisamori D, Matsuda S, Vinetz J, Sattabongkot J, Tsuboi T.
Chitinase: active recombinant protein from *Plasmodium vivax*. ASTMH 56th annual meeting, Philadelphia, USA, November 4-8, 2007.
- 8) Tachibana M, Eitoku C, Otsuki H,

- Sattabongkot J, Torii M, Tsuboi T.
Transmission-blocking activity of
DNA vaccine encoding *Plasmodium*
vivax gametocyte protein Pvs230.
ASTMH 56th annual meeting,
Philadelphia, USA, November 4-8,
2007.
- 9) 大槻均、金子修、橘真由美、入子英幸、
竹尾暁、坪井敬文、Thongkukiakul
Amporn、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
第 76 回日本寄生虫学会大会、大阪、
3/29-30、2007。
- 10) Palacipac NQ, Arisue N, Tanabe K,
Sattabongkot J, Tsuboi T, Torii M,
Udomsangpetch R, Horii T
Polymorphism in malaria antigens
and microsatellite markers of
Plasmodium vivax: a parasite
strategy for survival?
第 76 回日本寄生虫学会大会、大阪、
3/29-30、2007。
- 11) 金玲、坪井敬文、竹尾暁、入子英幸、
金子修、鳥居本美
新規熱帯熱マラリア感染阻止ワクチ
ン候補抗原分子の探索
第 76 回日本寄生虫学会大会、大阪、
3/29-30、2007。
- 12) 竹尾暁、金玲、坂本寛和、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赤血球期発病阻
止ワクチン:新規候補抗原分子の探索
第 76 回日本寄生虫学会大会、大阪、
3/29-30、2007。
- 13) Ghoneim A、金子修、坪井敬文、鳥居
本美
熱帯熱マラリア原虫ロプトリー蛋白
質 (RhopH 複合体) のロプトリー移行
シグナル
第 76 回日本寄生虫学会大会、大阪、
3/29-30、2007。
- 14) 入子英幸、金玲、金子修、韓銀澤、
橘真由美、大槻均、竹尾暁、福本宗嗣、
鳥居本美、坪井敬文
熱帯熱マラリア原虫は頻繁に選択的
スプライシングを起こしている
第 76 回日本寄生虫学会大会、大阪、
3/29-30、2007。
- 15) 高本美佐、矢野弘子、溝渕俊二、長龍
充、Susiji W、Lalani Y、鳥居本美、
坪井敬文、笹栗志郎、渡部嘉哉、吾妻
美子、吾妻健
ソフィβ-グルカンによる NK 細胞活
性を利用した *Plasmodium yoelii* 感染
に対する効果
第 76 回日本寄生虫学会大会、大阪、
3/29-30、2007。
- 16) 坪井敬文、竹尾暁、鳥居本美
マラリアワクチン研究へのコムギ無
細胞法の応用
第 15 回分子寄生虫学ワークショップ、
草津、7/25-28、2007。
- 17) 坂本寛和、竹尾暁、松岡和弘、橘真
由美、澤崎達也、坪井敬文

- 新規マラリアワクチン候補抗原探索
へ向けたハイスループットスクリー
ニング法の開発
第 15 回分子寄生虫学ワークショップ、
草津、7/25-28、2007。
- 18) 伊藤大輔、韓 銀澤、竹尾 暁、坪井
敬文
単クローン抗体を用いた熱帯熱マラ
リア原虫メロゾイト先端部小器官の
新規分子の同定
第 15 回分子寄生虫学ワークショップ、
草津、7/25-28、2007。
- 19) Cao J, Kaneko O, Thongkukiatkul A,
Tachibana M, Otsuki H, Tsuboi T,
Torii M.
A complex formation of rhoptry neck
protein 2 with a microneme protein,
AMA 1, in *Plasmodium falciparum*.
第 6 回分子寄生虫・マラリア研究フォー
ラム、松山、10/27-28、2007。
- 20) 橘真由美、永徳千穂、大槻均、
Sattabongkot J、鳥居本美、坪井敬文
生殖母体抗原 Pvs230 を標的とする新
規三日熱マラリア伝搬阻止ワクチン
第 6 回分子寄生虫・マラリア研究フォー
ラム、松山、10/27-28、2007。
- 21) 竹尾暁、坂本寛和、橘真由美、鳥居
本美、坪井敬文
コムギ胚芽無細胞系を用いた新規熱
帯熱マラリア感染阻止ワクチン候補
抗原の探索
第 6 回分子寄生虫・マラリア研究フォー
ラム、松山、10/27-28、2007。
- 22) 河津信一郎、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
2-Cys 型ペルオキシレドキシ
ン (TPx-1) ノックアウトがマラリア原虫
の哺乳類体内での発育に及ぼす影響
の解析
第 6 回分子寄生虫・マラリア研究フォー
ラム、松山、10/27-28、2007。
- 23) 竹尾 暁、久森大輔、松田周作、Joseph
Vinetz、Jetsumon Sattabongkot、坪
井敬文
コムギ無細胞系を用いた三日熱マラ
リア原虫キチナーゼタンパク質の合
成と解析
第 30 回日本分子生物学会年会、第 80
回日本生化学会大会、合同大会、横浜、
12/11-15、2007。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきものはない

赤痢アメーバの病原機構の解明

分担研究者 野崎 智義 群馬大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨 赤痢アメーバ症はアジア等の開発途上国を中心として蔓延する重要な腸管寄生性原虫症である。本研究では赤痢アメーバの病原機構を明らかにすることを目的としている。本年度は、赤痢アメーバの生存エネルギー代謝に不可欠な鉄硫黄タンパク質であるフェレドキシンなどの解析を行った。

A. 研究目的

赤痢アメーバ症は熱帯・亜熱帯の開発途上国を中心として世界の1%が感染する重要な感染症である。同時に、先進国である我が国においても、知的障害者および男性同性愛者において重度の感染浸淫を引き起こしている。赤痢アメーバの全ゲノムの解読(Lofus Nature 2005)によりHM1標準株における全遺伝子・タンパク質が明らかになり、赤痢アメーバ原虫の寄生ならびに病原性の分子機構が次第に明らかになって来た。我々は特に嫌気的環境下でのエネルギー産生において重要なフェレドキシン(Fdx)並びにフェレドキシン・ピルビン酸酸化還元酵素(PFOR)の寄生における役割を理解することを目的として、これら遺伝子を同定し、タンパク質解析を試みた。

B. 研究方法

1. 遺伝子の獲得

大腸菌などの既知のFdx, PFORタンパク質を用いてTIGRの*Entamoeba histolytica* genome databaseから相同性を示す遺伝子をスクリーニングした。更に得られた配列はNCBIのnon-redundant databaseに対してblastp検索を行うとともに、Fdx, PFORタンパク質特有のアルファヘリックス構造の保存性、膜貫通領域の保存性を確認した。

2. 組換え酵素の獲得

大腸菌発現ベクターpET15bなどを用いてHistidine標識されたFdx, PFOR組

換えタンパク質を作製した。

(倫理面への配慮)本研究に関わるDNA組換え実験の許可は当該研究機関にて得られている。

C. 研究結果

1. 赤痢アメーバFdxの多様性

赤痢アメーバゲノムに7のFdxと相同性を示すエントリーが見つかり、このうち5は独立していた。いずれのFdxも真性細菌、古細菌のFdxと高い相似を示した。XP_655183/XP_655182、XP_654311/XP_652694のペアは全く同一であった。この中の代表的な遺伝子/タンパク質をFdx1-3と名付けた。演繹されたタンパク質の分子量は6.1-8.8kDaであった。またFdx1-3の等電点は4.2-8.6と大きく異なり、電子供与/受容体としての性質が大きく異なることが予想された。

2. 赤痢アメーバPFORのタンパク質配列上の特徴

赤痢アメーバのPFORは微小な多様性を示す2種類のエントリーとして見つかった。これらは恐らく遺伝子座間の相違と予想された。いずれの遺伝子も真性細菌のPFORと高い同一性を示すとともに、系統発生解析に結果真性細菌から水平転移により獲得されたことが示唆された。

2. 赤痢アメーバFdx1-3のタンパク質の作製

いずれのタンパク質もニッケルカラムと通常のプロトコルを用いて>95%の精製度

で、予想された分子量のタンパク質として精製された。得られたタンパク質は活性を確認した後、抗血清の作製に供与された。

D. E. 考察及び結論

赤痢アメーバの PFOR を中心としたエネルギー合成系は極めてユニークであり、重要である。それは本源中が NAD 依存的ピルビン酸デヒドロゲナーゼとピルビン酸デカルボキシラーゼをもたないことによる。この結果はゲノム情報により裏付けされている。PFOR はピルビン酸からアセチル CoA を産生し、電子は酸化型 Fdx に受け渡される。還元型 Fdx は臨床約であるメトロニダゾールの還元、活性化の根幹をなしており、薬剤作用機序の観点からも Fdx, PFOR の解析は極めて重要である。

初年度の成果により、赤痢アメーバのエネルギー代謝において重要な役割をする鉄硫黄タンパク質の生化学的解析が、次年度以降に進展することが期待される。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

- C. Graham Clark, C.G., Cecilia, U., Alsmark, M., Hofer, M., Saito-Nakano, Y., Ali, V., Marion, S., Weber, C., Mukherjee, C., Bruchhaus, I., Tannich, E., Leippe, M., Sicheritz-Ponten, T., Foster, P. G., Samuelson, J., Noel, C. J., Hirt, R. P., Embley, T. M., Gilchrist, C. A., Mann, B. J., Singh, U., Ackers, J. P., Bhattacharya, S., Bhattacharya, A., Lohia, A., Guillen, N., Duchene, M., Nozaki, T., and Hall, N. (2007) Structure and content of the *Entamoeba histolytica* genome. *Adv. Parasitol.* 65, 51-190.

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当せず。
2. 実用新案登録
該当せず。

厚生労働科学研究費補助金（社会保障国際協力推進研究事業）
分担研究報告書

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、スリランカにおいてその有用性を検討した。デニヤヤ地方においては、フィラリア症集団治療（年 1 回治療の 5 年目）の効果を評価するために小・中学生を対象として尿 ELISA を実施した。また、南部州では、広域（人口約 200 万）をカバーする感染率調査を実施した。

ビルハルツ住血吸虫症が流行するケニアでは、尿 ELISA がしばしば偽陽性を示す。ELISA 法の改良を行い、偽陽性をほぼ無くすることに成功した。

A. 研究目的

2020 年までに世界からリンパ系フィラリア症を撲滅する計画（Global Program to Eliminate Lymphatic Filariasis）が進行中である。この計画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（尿 ELISA）を開発した。サンプル採取が容易なため、幼小児の検査が可能となり、住民の協力も得やすい。本研究の課題は、この尿 ELISA が (i) 隠れた流行地の発見に役立つか、(ii) 治療効果のモニタリングに役立つか、(iii) 撲滅の確認および流行再燃の監視作業に利用できるかを検討し、現場における有用性を確認することである。また、最終的には (iv) 途上国で使用できる簡便で安価な尿診断法の開発を目指す。

B. 研究方法

1. 集団治療の効果を評価する

WHO のフィラリア症撲滅計画の基本は年 1 回の集団治療（MDA）を 5 回繰り返すことである。今年度は、第 5 回目の MDA が終了した Matara 県デニヤヤ地方で、小・中学生 1,646 人を対象に尿 ELISA を実施し、陽性率を治療前後で比較した。

2. MDA の評価に用いる基礎データ

南部州全域をカバーした大規模な MDA 評価を実施するため、尿 ELISA による base-line data の集積を Galle 県、Matara 県、Hambantota 県で行った。

3. 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。後者は尿 ELISA で交差反応を起こし偽陽性者

が出るということがわかったため、尿 ELISA の改良に取り組んだ。

(倫理面の配慮)

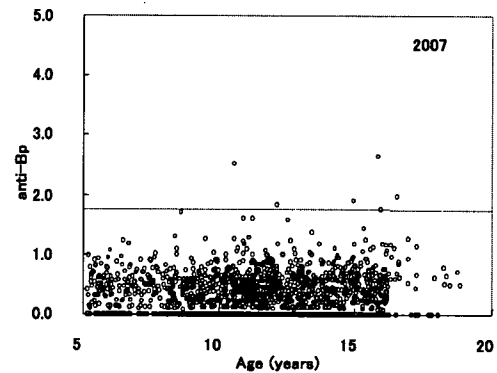
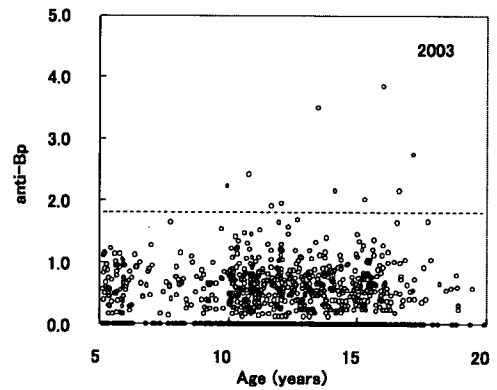
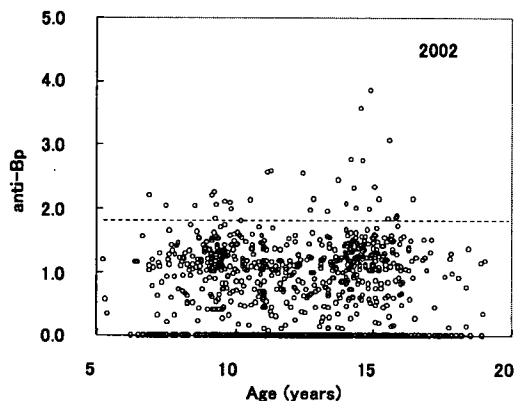
愛知医科大学倫理委員会の審査・承認を受けた。また、海外共同研究者の所属する機関においても同様の審査・承認を得た（スリランカではルフナ大学医学部倫理委員会、ケニアではケニア中央医学研究所の承認）。また、実施に当たり検者よりインフォームドコンセントを得ている。

C. 研究結果

1. MDA の効果判定（スリランカ）

尿 ELISA 陽性率は、集団治療前の 2002 年に 3.2%であったが、2003 年に 2.9%、2007 年には 0.36%まで低下した。また、抗体価の著明な減少が認められ、2007 年には抗体価 1 以下の学童が大多数となった。治療前に多数見られた 10 才以下の陽性者は、2007 年には姿を消した。5 回の MDA により、フィラリア伝搬が阻止されたことを示唆する（図 1）。

図 1 治療による年齢別抗体価の変化



2. 南部州における尿 ELISA による疫学調査（MDA 評価の基礎データ）

尿 ELISA の陽性率は、Matara 県が最も高いこと、海岸部の流行が内陸より遥かに高いことが明らかとなった（表 1）。MDA の長期的効果判定に重要な base-line date である。

表 1 県、地域別尿 ELISA 陽性率

District (県)	Location	No. exam	+ve (%pos)
Galle	Coast	381	39 (10.2)
	Middle	345	9 (2.6)
	Inland	341	6 (1.8)
Matara	Coast	340	51 (15.0)
	Middle	244	21 (8.6)
	Inland	316	5 (1.6)
Hambantota	Coast	361	15 (4.2)
Total		2,328	146 (6.3)

3. ケニアにおける尿診断法の有用性に関する研究

住血吸虫感染により、尿 ELISA と交叉反応する抗体が産生される。組換え蛋白 SXP-1 を抗原とし、新しい blocking reagent を使用することによって交差反応を起こさない新しい尿 ELISA (尿 ELISA-N) を開発した(図 2)。尿 ELISA-N の感度は 88.7%、特異性は 93.4%であった。

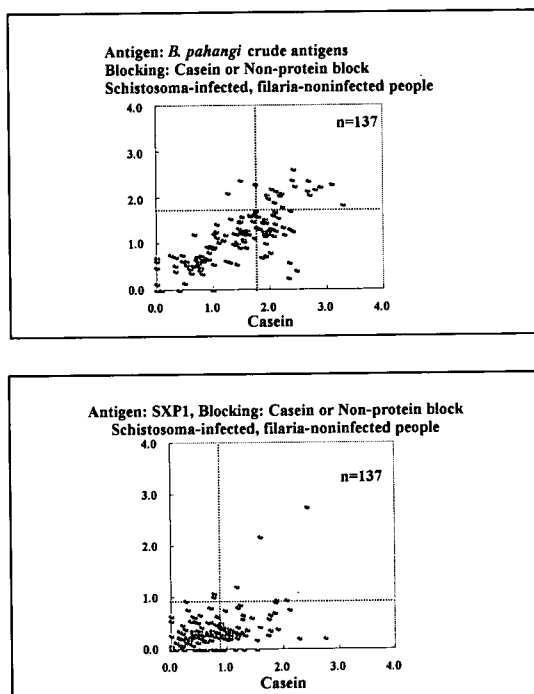


図 2 *B. pahangi* 粗抗原では偽陽性が多い(上図)。組換え抗原 SXP-1 と non-protein block の併用により偽陽性がほとんどなくなる(下図)

D. 考察

治療効果の評価 (スリランカ)

抗体を測定する尿 ELISA が MDA の効果判定に利用できるのか? 過去 5 回 (WHO の指針による最終判定) に渡る追跡調査

で、学童の尿中 IgG4 抗体価は予想以上に短期間で着実に減少することが確認された。尿 ELISA の応用が、国家規模の MDA 評価につながることを期待される。今年度は、より規模が大きく、長期的な治療効果追跡調査を始動させるための基礎となる疫学調査を南部州で実施した。

アフリカにおける尿診断法の応用

アフリカに流行する住血吸虫がフィラリアと交差反応を起こすため、従来の尿 ELISA は使用できなかった。今回の研究により、住血吸虫流行地でも使用できる新しい尿 ELISA-N が完成した。今後、野外調査により、その有用性を検討する必要がある。アフリカはフィラリア症の大流行地であり、この大陸において尿診断法が応用できるならば、世界的なフィラリア症撲滅計画に大きく寄与することができる。

E. 結論

尿中 IgG4 を検出する尿 ELISA は (i) フィラリア集団治療の効果判定 (モニタリング) に利用できることを確認した (スリランカ)。また(ii) 尿 ELISA のアフリカでの応用に道を開く新しい尿診断法を開発した。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Confirmation of elimination of lymphatic filariasis by an IgG4 enzyme-

linked immunosorbent assay with urine samples in Yongjia, Zhejiang Province and Gaoan, Jiangxi Province, People's Republic of China. Itoh M, Wu W, Sun D, Yao L, Li Z, Islam MZ, Chen R, Zhang K, Wang F, Zhu S, Kimura E.

Am J Trop Med Hyg 2007; 77: 330-333.

(2) Multicentre evaluations of two new rapid IgG4 tests (WB rapid and panLF rapid) for detection of lymphatic filariasis. Noordin R, Itoh M, Kimura E, Rahman RA, Ravindran B, Mahmud R, Supali T, Weerasooriya M.

Filaria J 2007; 6: 9 (26 October 2007).

(3) Production of recombinant kinesin-related protein of *Leishmania donovani* and its application in the sero-diagnosis of visceral leishmaniasis. Takagi H, Islam MZ, Itoh M, Islam AU, Saifuddin Ekram AR, Hussain SM, Hashiguchi Y, Kimura E.

Am J Trop Med Hyg 2007; 76(5): 902-905.

(4) The ELISA-based detection of anti-*Opisthorchis viverrini* IgG and IgG4 in samples of human urine and serum from an endemic area of north-eastern Thailand. Tesana S, Srisawangwong T, Sithithaworn P, Itoh M, Phumchaiyothin R.

Ann Trop Med Parasitol 2007; 101: 585-591.

2. 学会発表

(1) Urine ELISA to monitor programs to eliminate lymphatic filariasis and to confirm elimination. Kimura E. The 13th Japan-Korea Parasitologists' Seminar (Forum Cheju-13). 2007. Oct. (Chuncheon, Korea)

(2) スリランカ南部マタラ地区におけ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, Mudalige P.S.M, Yahathugoda C, Islam MZ, 木村英作. 第76回日本寄生虫学会大会. 2007年3月 (大阪)

(3) LAMP法を用いたリーシュマニア症診断法の開発. 高木秀和, 伊藤誠, Islam MZ, 木村英作. 第76回日本寄生虫学会大会. 2007年3月 (大阪)

(4) Prediction of clinical visceral leishmaniasis cases in its early stages by rKRP42 urine-based ELISA. Islam MZ, 伊藤誠, Islam AU, Ekram A.R.M, 高木秀和, 橋口義久, 木村英作. 第48回日本熱帯医学会大会. 2007年10月 (大分)

(5) ビルハルツ住血吸虫流行地に適したフィラリア症尿診断法の開発. 伊藤誠, Wamae N, 高木秀和, Kiliku FM, 青木克己, 木村英作. 第63回日本寄生虫学会西日本支部大会. 2007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（社会保障国際協力推進研究事業）
分担研究報告書

フィラリアと媒介昆虫の相互関係の解明
分担研究者 辻 尚利 動物衛生研究所主任研究員

寄生線虫の脱皮関連酵素である無機ピロホスファターゼ (AsPPase) の酵素特性の解明及び AsPPase ノックダウン回虫の作出によって、AsPPase がフィラリアなどの寄生線虫の脱皮に必須であることが判明した。また、媒介動物（ベクター）が産生する生物活性分子の機能探索の結果、ベクターには伝搬する寄生虫に対する抗寄生虫分子が保持されていることがわかった。

A. 研究目的

本研究では、宿主体内（内部寄生虫）及び体表（外部寄生虫）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フィラリアなどの線虫類と媒介昆虫等が産生する遺伝子産物の機能解明を実施する。これによって、線虫及び媒介者の遺伝子戦略・分子戦略を阻害することのできる新しい寄生虫感染及び伝搬防除技術を確立する。

B. 研究方法

フィラリア線虫に類似した回虫をモデル寄生虫として、寄生虫の特有な生活環維持に必須な脱皮に関与する酵素群の酵素活性等の生化学的性状を解析した。同時に、*in vivo*での内在機能を明らかにするために、逆遺伝学的手法である RNA 干渉 (RNAi) を用いて遺伝子ノックダウン回虫を作製した。また、病原体媒介者のベクター解析ではマダニを用いて、マダニが産生する生物活性分子 (TBM) の機能を生化学・細胞生物学的及び RNAi による逆遺伝学的手法を用いて *in vitro* 及び *in vivo* で解析した。

内部寄生虫：

- 1) 回虫はモデル寄生虫であるブタ回虫 (*Ascaris suum*) を使用した。虫体の *in vitro* 培養は *A. suum* 成熟卵を経口投与したウサギの肺より得られた肺内幼虫 (LL3) を用いて行った。
- 2) 蛋白分解に用いた 2 次元電気泳動は等電点電気泳動と SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いて実施し、分離した蛋白質は銀染色またはニトロセルロース膜に転写した。イムノブロットは抗ブタ回虫抗体を用いて NBT/BCIP で可視化した。
- 3) 免疫組織化学及び免疫蛍光抗体法は抗ブタ回虫血清を用いて LL3 のパラフォルムアルデヒド固定及びはアセトン固定虫体を用いて

実施した。可視化はアルカリホスファターゼ標識及び FITC 標識抗ブタ IgG 2 次血清を用いて行った。

- 4) 脱皮酵素の無機リン酸フォスファターゼ (AsPPase) 活性は、大腸菌で作製した組換え AsPPase もしくは虫体抽出液を 20mM Tris-HCl, pH7.5 で可溶化し、5mM Mg²⁺, 100mM Tris-HCl (pH7.5), 1mM ピロホスフェートの反応液中に添加して測定した。
- 5) 電子顕微鏡観察は虫体を 3%グルタルアルデヒド (0.1M リン酸緩衝液, pH7.4) 固定した後、定法の可視化に従って実施した。
- 6) AsPPase ノックダウン回虫の作製：AsPPase をコードする dsRNA を LL3 の *in vitro* 培養系に添加することによって作製した。

外部寄生虫：

- 1) TBM をコードするマダニ EST データベースより複数のマダニディフェンシンを単離した。
- 2) マダニディフェンシンの発現動態は定量 PCR 及びイムノブロットを用いて検討した。
- 3) マダニ個体内で発現する内在型のマダニディフェンシンは免疫組織化学及び免疫蛍光抗体法を用いて細胞生物学的に検討した。
- 4) マダニディフェンシンの抗菌活性及び抗寄生虫活性は各種病原細菌及びマダニ媒介性寄生虫のバベシア原虫を用いて実施した。
- 5) ノックダウンマダニの作製は以下の方法で実施した。マダニの第 4 脚基節にガラス毛细管を用いて標的分子をコードする dsRNA を血体腔へ注入にすることによって作製した。一昼夜 25℃ のインキュベーター放置した後、バベシア原虫感染イヌの耳に付着した。

C. 研究結果

回虫：

- 1) RNAi を用いてブタ回虫無機リン酸フォスファターゼ (AsPPase) 遺伝子を標的とする

AsPPase ノックダウン回虫を作製したところ、内在性 AsPPase の発現抑制によって第3期から4期への脱皮が阻止されることが確認された。AsPPase ノックダウン回虫では遺伝子及び蛋白質レベルの AsPPase の発現が抑制されていた。また、AsPPase 酵素活性も著しく減少していることが確認された。

- 2) 組換え AsPPase を免疫したマウスを用いてブタ回虫成熟卵の攻撃感染を実施し、体内移行幼虫数を検討したところ、肺への移行が約71%阻止できることが確認された。
- 3) 新たな脱皮関連蛋白質として幼虫期虫体から As14、As16 及び 24 を同定した。AsPPase と同様に標的分子に対する特異 IgG 抗体によって顕著な脱皮阻止効果が確認された。
- 4) 第3期から第4期幼虫への変化を2次元電気泳動プロファイルで検討したところを脱皮に関連した蛋白質 22 個が同定された。
- 5) 以上より、ブタ回虫の脱皮に関連する蛋白質は回虫ワクチンの候補分子など回虫症制圧に貢献できる分子を含むことが確認された。

・マダニ：

- 1) 国内最優占種のパタトゲチマダニよりディフェンシンをコードする複数の cDNA を単離した。
- 2) 大腸菌で作製した組換えディフェンシンを用いて各種病原細菌に対して抗菌活性を検討したところ、グラム陰性・陽性菌の広範な細菌種に $20 \mu\text{mol/l}$ 以下で殺菌作用が確認された。最も効果が発揮されたのは病原性大腸菌であった。
- 3) 特に、ロンギシンと名付けた抗菌ペプチドは C 末側に活性部位があることが分かった。また、真菌に対しても殺作用があることが確認された。
- 4) ロンギシンをバベシア寄生虫の *in vitro* 培養系に添加したところ、用量依存的殺寄生虫作用があることが分かった
- 5) 殺バベシア寄生虫作用は、ロンギシンが原虫膜に特異的接着することで発揮されたことが共焦点レーザー顕微鏡によって判明した。
- 6) バベシア原虫感染イヌに付着したロンギシンノックダウンマダニは、対照群のマダニと比較して、バベシア寄生虫を有意に多く伝搬できることが分かった。伝搬した寄生虫の増加は定量 PCR 及び蛍光抗体法によっても明らかにされた。

- 7) ロンギシンはディフェンシンの中で初めて抗寄生虫作用が確認された抗菌ペプチドであった。

D. 考察

内部寄生虫：回虫の幼虫期虫体の脱皮を支える分子群は回虫ワクチンの候補分子を含むことが分かった。おそらく、それらは回虫の発育を支える重要な分子群であると考えられる。フィラリア症を含む寄生線虫に対して有効であると思われる

外部寄生虫：マダニのディフェンシンは個体生存に重要な役割を果たしていることが強く示唆された。また、ロンギシンは他の媒介昆虫でも保持していることが十分予想され、抗寄生虫薬として媒介昆虫を含めベクター制御に貢献できると同時に、ベクター免疫学及びベクター由来の新規抗寄生虫薬の開発にも応用できると思われる。

E. 結論

本知見はフィラリアを含めた寄生線虫幼虫の脱皮過程を標的とした抗寄生虫薬の開発に有効な知見であると考えられた。また、ブタ回虫は抗寄生虫薬の開発に有望なモデル寄生虫であると思われる。さらに、ロンギシンはマダニの生存と病原体伝搬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寄生線虫薬、抗マダニ薬及び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

Tsuji N, Badgar B, Damdinsuren B, Miyoshi T, Xuan X, Oliver Jr JH, Fujisaki K. (2007). Babesial vector tick defensin against *Babesia* sp. parasites. *Infect Immune*. 75, 3633-3640.

2. 学会発表

吉原 忍、服部順子、西菌一也、川村彩乃、西田由美、小田憲司、平山紀夫、辻 尚利. 豚回虫人工感染鶏における幼虫の消長と肝病変. 第 144 回日本獣医学会学術集会. p. 168.

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

分担課題：日本住血吸虫症の病態発現分子解析

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

住血吸虫が血管内寄生を成立させる機序として、ヒトを含むほ乳類宿主からの酸化ストレスの回避が重要であるという仮定に基づいて、日本住血吸虫の酸化ストレス回避に直接関与する peroxiredoxin (Prx) の遺伝子ノックダウンによる効果を検討した。In vitro における RNAi による Prx-1 の発現抑制システムをすでに開発したので、この方法が in vivo においても RNAi が同様に機能して寄生適応に影響を与えることが出来るかを検討した。その結果、Prx-1、Prx-2 の dsRNA を住血吸虫感染マウスに投与することにより、同遺伝子に対して一定の発現抑制をかけることが観察され、その結果として寄生虫体数には変化を生じなかったが、寄生住血吸虫による産卵抑制効果が認められた。現状では十分なレベルまで発現タンパクを抑制することは出来ないが、住血吸虫の寄生適応システムを in vivo で検証するシステムの構築が進んだ。

A. 研究目的

住血吸虫がほ乳類宿主に寄生する血管内環境では、虫は宿主の防御免疫の最前線に直面していることが推定される。ほ乳類宿主の住血吸虫に対する防御免疫の本態はなお不明であるが、酸化ストレスは予想されるエフェクターの一つである。そのような環境においては、住血吸虫が宿主に適応するために、抗酸化ストレスの機構を持つことが必要であり、その機能を担うのが peroxiredoxin (Prx) である。日本住血吸虫ではシステイン残基を2つ持つ 2-Cys 型 Prx が存在し、酸化ストレスに対する抵抗性の獲得に働いていることが予想されている。事実、in vitro では Prx-1 遺伝

子のノックダウンによって、各種酸化ストレスに対する生存に有意な影響が観察される。

このような現象が in vivo でも起こっているか否かを解明することが今後の治療戦略の検討に不可欠な情報となるが、遺伝子ノックアウト住血吸虫の確立が極めて困難な状況では、RNAi は遺伝子発現の阻止方法としては第1に試される方法である。この研究では、RNAi が in vivo で機能して、Prx の寄生適応に関与するか否かを検討することの可能性を試みた。

B. 研究方法

1. 寄生虫とマウス：山梨株の日本住血吸

虫と BALB/c マウスを用いた。Prx-1、Prx-2 の RNA 投与/非投与は各 5 個体のマウスを用いた。RNAi による発現阻害実験は、感染 4 週で行なった。

2. in vivo RNAi : 日本住血吸虫の Prx-1 の dsRNA は尾静脈から投与した。dsRNA 量はマウス 1 個体当たり 20 μ g で 3 日おきに 4 回投与した。初回 dsRNA 投与後 2 週で、マウスを灌流して虫体を回収し、回収虫体数、体内残余虫卵数および雌成虫 1 匹あたりの産卵数で効果を評価した。

倫理面への配慮: 本研究は東京医科歯科大学の動物実験委員会による承認を得て実施した。

C. 研究結果

1. in vivo RNAi の方法論

日本住血吸虫感染マウスへの dsRNA 投与は感染 4 週で行なった。今回の dsRNA 処理の条件下では、得られた成虫の Prx-1、Prx-2 の発現を定量 RT-PCR で検討した場合、発現量には有意な低下が観察された。しかし、効果の持続は十分ではなく、投与した dsRNA が機能はしているが、タンパク発現を完全に抑制することまでは確認できなかった。

2. in vivo RNAi による寄生環境の改変の可能性

Prx-1 に対する dsRNA を投与することによる各種寄生パラメータにどのような変化が生じるかを観察した。その結果、寄生個体数には有意な変化は見られなかった。一方、虫卵数を測定した結果、dsRNA 投与群で産卵数減少が観察された。

D. E. 考察と結論

日本住血吸虫のように、胚細胞レベルでの遺伝子ノックダウンが技術的に困難な生物の遺伝子機能を解析するのに、RNAi は強力な実験アプローチである。寄生虫感染における宿主-寄生虫相互作用の解明への高い応用性が期待されるが、遺伝子産物の機能解明のためには、in vivo でその機能を追跡できることが要求される。今回は、日本住血吸虫で初めて in vivo の RNAi を検討したもので、この分野の嚆矢となるものである。

方法論的には課題が多いと言わざるを得ない。しかし、投与した dsRNA が RNAi に機能していることは、標的遺伝子の発現が量的に有意な抑制を受けていることから明らかである。問題は、その量的減少が表現型変換に十分なレベルに達していないことである。その解決のためには、dsRNA の投与条件を変えてみる必要があるが、宿主生体環境中での RNA がどこまで安定であるかも検討する必要がある。将来の方法として、何らかの dds の点での改善が可能であれば、より明確な結果が得られることが期待される。

今後の方法論的改良を加えて行くことにより、dsRNA 投与による in vivo RNAi がより宿主-寄生虫相互作用に新規知見を与える事になることが期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

Ohta N, Waikagul J.: Disease burden and epidemiology of soil-transmitted helminthiasis and schistosomiasis in

Asia. Trends in Parasitol, 23:30-35, 2007.

Akao N, Ohta N.: Toxocariasis in Japan. Parasitol Int, 56:87-93, 2007.

Kojima S, Aoki Y, Ohta N, Tateno S, Takeuchi T.: School-health-based parasite control initiatives: extending successful Japanese policies to Asia and Africa. Trends in Parasitol, 23:54-57, 2007.

2. 学会発表

熊谷 貴、長田良雄、金澤 保、太田伸生：
日本住血吸虫ペルオキシレドキシシンにおける抗酸化機能の解析。第18回日本生体防御学会学術総会、2007年7月、福岡市
熊谷 貴、下河原理江子、長田良雄、金澤 保、太田伸生：ペルオキシレドキシシンを標的とした日本住血吸虫への *in vitro/in vivo* RNAi の検討。第30回日本分子生物学会、2007年12月、横浜市

熊谷 貴、長田良雄、下河原理江子、板橋明子、太田伸生：RNAi による感染宿主内での日本住血吸虫ペルオキシレドキシシンの機能解析。第76回日本寄生虫学会大会、2007年3月、大阪市

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

住血吸虫の防御免疫・病態生理の解明

分担研究者 金澤 保(産業医科大学・免疫学寄生虫学)

研究要旨

〈マラリア〉 *in vitro* 培養で作成したネズミマラリア原虫 (*Plasmodium berghei*) のスポロゾイトをマウスに接種し、感染性を検討した。培養スポロゾイト接種マウスはいずれも虫血症が認められなかったが、これらのマウスを感染蚊に吸血させると、対照群に比べてわずかながら発症遅延が認められた。すなわち培養スポロゾイトには感染性は認められないものの、マウスへの接種によって感染防御効果が付与される可能性が示唆された。〈住血吸虫〉 関節リウマチ(RA)のモデルとして多用されているマウス・コラーゲン関節炎(CIA)に対するマンソン住血吸虫(Sm)感染の効果について検討した。Sm感染によりCIAの発症は有意に抑制された(昨年度報告済)。リアルタイムPCR解析により、非感染のII型コラーゲン(IIC)免疫マウスの足肢においては、IL-1 β 、IL-6、RANKLなどの炎症性サイトカインの発現が上昇するが、感染を受けたIIC免疫マウスにおいては、この発現上昇が抑制されていることが明らかになった。

[研究協力者]

新井 明治 長田 良雄

A. 研究目的

A-1 マラリア

マラリア原虫の媒介蚊体内における分化・発育の分子機構は、赤血球内発育ステージに比べて研究が遅れている。我々はネズミマラリア原虫の蚊体内発育ステージの *in vitro* 培養を用いることで、媒介蚊への寄生適応機構を明らかにするとともに、蚊体内での原虫の発育を阻害する新しい伝播阻止法の開発を目指している。また、培養由来スポロゾイトを生ワクチンとして利用することを想定し、本年度は培養で得られたスポロゾイトの感染性と、媒介蚊による感染吸血に対する感染防御効果について検討を行った。

A-2 住血吸虫

微生物や寄生虫の感染によってアレルギーや自己免疫などの免疫異常疾患が予防あるいは改善するという現象が、疫学的証拠あるいは実験的証拠により示唆されている(いわゆる「衛生仮説」)。住血吸虫感染に関しても、種々のアレルギーおよび自己免疫疾患の

発症を抑制するという実験的報告がある。

関節リウマチ(RA)は国内だけで70万人の患者がいるとされている主要な自己免疫疾患であるが、この疾患と寄生虫感染の関係は明らかでない。昨年度より我々は、住血吸虫の感染が実験的関節炎における影響を評価している。本年度は炎症局所におけるサイトカイン遺伝子の発現について検討を行った。

B. 研究方法

B-1 マラリア

ネズミマラリア原虫 (*Plasmodium berghei*) 感染 BALB/c マウスより採取した血液を出発材料としてオオキネート培養を行った。精製したオオキネートをオオシスト培地に懸濁し、19℃にて培養を開始した。培養25日目のサンプルを回収して C57BL/6 マウスの腹腔内へ注入し、以後マウスの末梢血における寄生赤血球率 (parasitemia) をギムザ染色にてモニターした。発症しなかったマウスについては、*P. berghei* 感染蚊による感染吸血を行い、発症の有無を検討した。

B-2 住血吸虫

マンソン住血吸虫(Sm)セルカリア40隻をDBA/1マ

ウスに経皮的に感染し、2 週後にウシ II 型コラーゲン (IIC) 200 μ g を FCA エマルジョンとして尾部根元の皮内に免疫した。免疫後4~12週において肉眼観察によるスコアリング (0-3 点) および四肢の厚み測定を行った。四肢のスコアの合計点および 2 mm 以上の腫れを示した肢数を個体ごとに算出し、関節炎の程度を評価した。免疫 12 週後にマウスの四肢を採取し、RNAを抽出して関節炎関連の炎症メディエーターの発現レベルを TaqMan 法リアルタイムPCRにて評価した。

[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:AE06-33、AE06-003)。なお本研究では人体材料は用いていない。

C. 研究結果

C-1 マラリア

培養 25 日目のサンプルを腹腔内に注入されたマウスは、いずれも虫血症を生じなかった。*P. berghei* 感染蚊による感染吸血の結果、全ての培養スポロゾイト接種マウスが発症した。各マウスについて1% prepatent period を算出して比較したところ、スポロゾイト接種マウスでは 6.3 ± 1.1 days ($n = 3$, 第1回培養)、 6.2 ± 0.6 days ($n = 2$, 第2回培養)、 6.2 ± 0.5 days ($n = 2$, 第3回培養)、無処置マウスでは 5.4 ± 0.2 days ($n = 3$)であり、わずかながらスポロゾイト接種群での発症遅延が認められた。吸血 12 日後の生存率はスポロゾイト接種群で 57%(4/7)、無処置群で 33%(1/3)であった。

C-2 住血吸虫

Sm感染によって関節炎の指標の低下が観察された(昨年度報告済)。非感染の IIC 免疫マウスの炎症局所(足肢)においては、炎症性サイトカインのうち IL-1 β , IL-6, RANKL の発現が上昇していたが、TNF α , IL-1 α の発現上昇はみられなかった。感染を受けた IIC 免疫マウスでは、前者3つのサイトカインの発現上昇が強力に抑制されていた。一方、免疫抑制性サイトカイン(IL-10, TGF β)の局所における発現は IIC 免疫によっても上昇せず、かつ非感染マウス・感染マウス間で差がみられなかった。

D. 考察

D-1 マラリア

従来より中腸オオシストから回収したスポロゾイトの感染性は、唾液腺スポロゾイトに比べて著しく低いことが報告されており、今回培養スポロゾイトの感染性が認められなかったことは、培養環境が唾液腺因子を欠いていることに原因があると考えられる。一方で培養スポロゾイト接種マウスにおいて、わずかではあるが感染吸血に対する発症遅延が認められたことから、培養スポロゾイトによる感染防御ワクチンへの応用を検討する余地が残されたと考える。

D-2 住血吸虫

住血吸虫感染によりマウス CIA の発症が抑制されるメカニズムについて、サイトカイン遺伝子発現の観点から検討した。その結果、寄生部位と離れた足肢における炎症性サイトカインの発現上昇が抑制されていた。これを昨年の結果(脾細胞におけるサイトカインパターンの抗炎症側へのシフト)と考え併せると、住血吸虫感染宿主においては全身的な抗炎症環境の誘導とともに、末梢において産生される炎症メディエーターも減少していることが示唆された。

E. 結論

E-1 マラリア

培養由来スポロゾイトについて感染性が認められなかったが、同スポロゾイトの接種によりわずかながら発症遅延効果が認められた。今後、唾液腺因子の添加等、培養条件の改良によってスポロゾイトの感染性向上を目指すとともに、培養スポロゾイト接種方法と感染防御効果の関係について検討する。

E-2 住血吸虫

住血吸虫感染によるマウス CIA 改善効果には、関節局所における炎症性サイトカイン発現上昇の抑制が伴っていることが示された。特に RANKL の発現レベルの抑制は、関節炎進行に伴う骨破壊を阻止できる可能性を示唆するものであり、この現象に関与する因子を特定し解析することにより、将来的には寄生虫由来物質を用いた自己免疫性炎症の新規治療法の開発が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

新井明治、平井 誠、松岡裕之

Plasmodium berghei 培養スポロゾイトの培養肝細胞への侵入性の検討

第 76 回 日本寄生虫学会大会

吹田 (2007 年 3 月)

長田良雄、熊谷 貴、本田 誠、奥沢英一、濱田篤郎、金澤 保

マンスン住血吸虫の分泌タンパク CRISP の分子生物学的解析

第 76 回 日本寄生虫学会大会

吹田 (2007 年 3 月)

平井 誠、新井明治、森 稔幸、川合 覚、北 潔、黒岩常祥、松岡裕之

PbMP-1: 植物とマalaria原虫との比較ゲノムによって同定されたマalaria原虫の受精制御因子

第 76 回 日本寄生虫学会大会

吹田 (2007 年 3 月)

松岡裕之、平井 誠、新井明治

吸血のとき蚊から放出されたマalaria原虫はしばし皮膚内に留まる

第 76 回 日本寄生虫学会大会

吹田 (2007 年 3 月)

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

抗酸化タンパク 2-Cys 型ペルオキシレドキシシン(Prx)ノックアウトがマalaria原虫のオーシスト発育に及ぼす影響の解析

第 143 回 日本獣医学会学術集会

つくば (2007 年 4 月)

長田良雄、熊谷 貴、奥沢英一、濱田篤郎、金澤 保
分泌タンパク CRISP ファミリー分子住血吸虫ワクチン候補としての可能性

第 60 回 日本寄生虫学会南日本支部大会

熊本 (2007 年 10 月)

河津信一郎、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

2-Cys 型ペルオキシレドキシシン(TPx-1)ノックアウトがマalaria原虫の哺乳類体内での発育に及ぼす影響の解析

第6回分子寄生虫・マalaria研究フォーラム

松山 (2007 年 10 月)

長田良雄、熊谷 貴、金澤 保

住血吸虫 CRISP の分子機能解析

第 1 回 蠕虫研究会

宮崎 (2007 年 11 月)

Kawazu S, Yano K, Otsuki H, Arai M, Komaki-Yasuda K, Tsuboi T, Torii M, and Kano S.

Disruption of 2-Cys peroxiredoxin TPx-1 gene in *Plasmodium berghei* hinders the sporozoite development.

56th Annual Meeting of American Society of Tropical Medicine and Hygiene

Philadelphia, Pennsylvania, USA (November 2007)

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

分担研究報告書

リーシュマニア症対策疫学研究

分担研究者 筑波大学大学院人間総合科学研究科 教授 我妻ゆき子

研究要旨

目的：本研究では、ニームオイルを家屋内散布することによって、リーシュマニア症コントロールが可能であるかを効果判定することを目的とする。

研究方法：バングラデシュにおいてリーシュマニア症が蔓延している地域において、その標準化家屋内散布介入をする世帯(850)とコントロール世帯(850)をランダム割り当てし、各世帯から1人のインデックスケースに対して、患者発生が減少したかを2年間モニタリングして評価する。

結果：介入1年後の血液検査を2007年11月－2008年1月に実施し、予備データ解析を行った。散布家屋においては抗体陽性化率の減少傾向（散布家屋＝2.0%；非散布家屋＝2.7%）がみられた。もう1年間、介入継続し最終評価をする予定である。

まとめ：農薬問題のない天然植物素材のニームオイルが、リーシュマニア症制圧に役立つことが示せれば、世界のリーシュマニア症患者を減らすことができるばかりでなく、他の媒介昆虫による重要疾患、たとえば、マラリアやデング熱への応用が示唆される。

A. 研究目的

本研究の分担研究者である我妻は、ニームオイルの散布がサシチュウバエの減少に効果があることを予備実験で確かめ、その成果を日本熱帯医学会にて2005年に発表している。リーシュマニア症は世界保健機構（WHO）の薦める重要感染症疾患に入っているにもかかわらず、人体投与薬物治療薬は非常に副作用の高い重金属アンチモニ製剤の注射薬で20日から60日の連続投与が必要である。小児や妊婦に使用が難しく、治療成績もばらばらで、治療後致死率はバングラデシュでは10%以上もあることを報告した(Bern et al, 2005)。当該申請研究には、農薬問題のない天然植物素材であるニームオイルを家屋内散布することによって、リーシュマニア症コントロールが可能であるかを効果判定することを目的とする。

B. 研究方法

ニームオイル中の有効成分であるアザルダイクチンの含有度を正確に測り、その濃度と散布回数標準化を図り、バングラデシュのリーシュマニア症蔓延フィールドにおいて、その標準化

家屋内散布介入をする家とそうでない家とをランダムに割り当て、2年間の観察評価をして、媒介昆虫が家屋内で減少したか、また、さらには、患者発生が減少したかを評価する。

（倫理面への配慮）

国際下痢症研究センター（ICDDR,B）の倫理委員会に研究プロトコルを提出し、承認を受けている。研究参加者にはインフォームド・コンセントを行い、同意書を取っている。

C. 研究結果

コミュニティサーベイランス人口（1700世帯；人口8,500人）のうち、3歳以上を対象にニーム介入1年後の疾病発生血液検査（セロサーベイ）を2007年11月－2008年1月に実施し、予備データ解析を行った。介入1年後の血液検査を2007年11月－2008年1月に実施し、予備データ解析を行った。散布家屋においては罹患率の減少傾向（散布家屋＝2.0%；非散布家屋＝2.7%）がみられた。

D. 考察

環境残留有害物質の検出技術が向上するにつれ、

農業問題はその加速度を増して難しくなっている。地球環境を考慮し、将来にわたって持続性ある安全な衛生動物制御が求められている。農業問題のない天然素材のニームオイルが、もしリーシュマニア症制圧に役立つことが示せば、世界中のリーシュマニア症患者を減らすことができるばかりでなく、他の媒介昆虫による重要疾患、たとえば、マラリアやデング熱へも天然素材の応用が可能である道が開けるかもしれない。

E. 結論

ニーム介入群において、抗体陽性変化率の減少傾向がみられた。もう1年間、介入継続し最終評価をする予定である。

F. 健康危険情報
該当せず。

G. 研究発表

1. 論文発表

Bern C, Haque R, Chowdhury R, Ali M, Kurkjian KM, Vaz L, Amann J, Wahed MA, Wagatsuma Y, Breiman RF, Williamson J, Secor WE, Maguire JH. The epidemiology of visceral leishmaniasis and asymptomatic leishmanial infection in a highly endemic Bangladeshi village. *Am J Trop Med Hyg.* 2007 May;76(5):909-14.

Haque R, Thriemer K, Wang Z, Sato K, Wagatsuma Y, Salam MA, Akther S, Akter J, Fukuda M, Miller RS, Noedl H. Therapeutic efficacy of artemether-lumefantrine for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Bangladesh. *Am J Trop Med Hyg.* 2007 Jan;76(1):39-41.

2. 学会発表
なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）
該当せず。