

## マラリア感染によるT細胞免疫応答の修飾と免疫記憶の成立

分担研究者 由井克之 長崎大学 大学院医歯薬学総合研究科 教授

研究要旨：マラリア抗原特異的なT細胞免疫応答を解析するための新たな実験モデルを開発した。このモデルを用いた研究から、マラリア感染により宿主にはマラリア抗原特異的なCD8<sup>+</sup> T細胞が誘導されること、さらにこの誘導には宿主抗原提示細胞のTAP分子（細胞質内ペプチドを小胞体内に転送する分子）が必須であった。また、弱いながら、CD8<sup>+</sup> T細胞は抗原非特異的にも活性化することが明らかになった。

### A. 研究目的

マラリア感染においては、免疫抑制、免疫病理、防御免疫など、免疫系が疾患と深い関わりをもっているが、その仕組みは十分に解明されていない。本研究では、マラリア感染におけるCD8<sup>+</sup> T細胞の感染防御及び病因的役割について解明し、マラリアの病因に関する基礎的な理解を深めると共に、ワクチン開発における有用な情報を提供することを目的とした。

### B. 研究方法

マウスマラリアの実験系を用いる。我々は、人工マラリア抗原として卵白アルブミン (Ovalbumin, OVA) を細胞質内に発現する組み換えマラリア原虫 *Plasmodium berghei* ANKA (OVA-PbA) を樹立した。OVA特異的T細胞受容体トランスジェニックマウスOT-IのT細胞を用いることにより、OVA-PbA感染における特異的CD8<sup>+</sup>T細胞の反応をモニターすることができる。即ち、OT-Iマウスから精製したCD8<sup>+</sup> T細胞をC57BL/6マウスに移入し、その後OVA-PbA或いは野生型マラリア原虫 (WT-PbA) を感染させる。原虫血症上昇後、脾臓中のCD8<sup>+</sup>T細胞の細胞表面抗原及び活性をモニターする。

(倫理面への配慮)

動物実験は、長崎大学動物実験規則に基づき委員会の承認を得た実験計画に沿って行う。

### C. 研究結果

OT-I細胞を移入したマウスにOVA-PbAを感染させると、OT-Iの増殖、活性化表現型への変化、細胞傷害活性の誘導が観察された。また、宿主マウスをTAP遺伝子欠損マウスにすると、このような特異的な活性化は観察されなかった。これらのことから、宿主抗原提示細胞がマラリア抗原を取り込み、TAP分子依存的にMHCクラスI経路でクロスプレゼンテーションによる抗原提示を行って特異的CD8<sup>+</sup>T細胞を活性化することが明らかになっ

た。一方、WT-PbA感染の場合にも弱いながらOT-I細胞の活性化が観察された。この活性化はTAP非依存的であり、T細胞受容体を介さずにT細胞活性化が誘導される可能性が示された。

### D. 考察

赤内型感染において、CD8<sup>+</sup> T細胞の活性化には抗原特異的活性化と抗原非特異的活性化があることが明らかになった。マラリア感染の感染防御、或いは脳マラリアや重症貧血などの病因に、これら2種類のCD8<sup>+</sup> T細胞がどのように関わるかについて、今後明らかにしていく必要がある。さらに、熱帯熱マラリアをはじめとする人のマラリアでも同様なCD8<sup>+</sup> T細胞の活性化があるか明らかにすることは、ワクチン開発の上でも重要な意義をもつと考えられる。

### E. 結論

赤内型マラリア感染において、抗原提示細胞は原虫抗原を取り込みTAP依存性にMHCクラスI経路でクロスプレゼンテーションを行うことにより、特異的CD8<sup>+</sup> T細胞が活性化される。一方、弱いながら抗原非特異的にもCD8<sup>+</sup> T細胞は活性化を受ける。

### G. 研究発表

1. 論文発表  
投稿中

2. 学会発表

Modulation of T-cell function during malaria infection; a study using OVA as a surrogate malaria antigen, D. Kimura, M. Miyakoda, K. Honma, M. Yuda, Y. Chinzei, K. Yui, 41<sup>st</sup> Joint Conference on Parasitic diseases Japan-United States cooperative medical science program, Tokyo, February 1-3, 2007.

マalaria感染における CD8<sup>+</sup> T 細胞の活性化及び  
アポトーシス、都田真奈、木村大輔、本間季里、  
木村一美、油田正夫、鎮西康雄、由井克之、第  
76 回日本寄生虫学会大会、大阪 2007年3月2  
9、30日

Specific and non-specific activation of CD8<sup>+</sup>  
T-cells during malaria infection; implication for  
the pathogenesis of cerebral malaria, M.  
Miyakoda, D. Kimura, K. Honma, K. Kimura, K.  
Yui, 日本免疫学会学術集会、2007 年 11 月 20  
日～22 日、東京

Regulation of T-cell responses during blood  
stage of Plasmodium berghei infection: an  
approach using OVA as a surrogate malaria  
antigen, K. Yui, 2<sup>nd</sup> Nagasaki Symposium on  
Tropical and Emerging Infectious Diseases,  
2007 年 11 月 26, 27 日、長崎大学

Malaria-specific and non-specific activation of  
CD8<sup>+</sup> T cells during blood stage of  
Plasmodium berghei infection, M. Miyakoda, D.  
Kimura, Y. Yuda, Y. Chinzei, K. Honma, K. Yui,  
Jan. 17-18, 2007, 42<sup>nd</sup> annual US-Japan  
parasitic diseases panel meeting.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし

マラリア原虫の細胞侵入動態の解析

分担研究者 金子 修 長崎大学熱帯医学研究所 教授

研究要旨

マラリアは熱帯地方においていまだ重篤な感染症である。マラリア原虫はヒト体内では赤血球への再侵入を繰り返すことで増殖するため、赤血球侵入の分子機構を詳細にすることは、ワクチン開発や創薬への基盤情報を提供することとなる。マラリア原虫が赤血球に侵入の際には、原虫と赤血球との間に移動接合体と呼ばれる構造を形成するが、この形成に関与すると思われる分子 RON2 について解析を進めた。

A. 研究目的

本研究では、マラリア原虫移動接合体複合体に含まれる RON2、RON4、AMA1 の間の相互作用および赤血球との相互作用を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

本年度は、複合体の各構成分子 RON2 および RON4 について無細胞蛋白質合成系を用いて、組換えタンパク質を作成し、マウス抗血清を作成する。抗血清を用いて、マラリア原虫に対する IFA、免疫電子顕微鏡による局在解析およびウェスタン解析を行う。さらに免疫沈降法にて、複合体構成分子間の複合体形成を検討する。また、多型解析を行うことで、宿主免疫にさらされている領域があるかどうかを検討する。

C. 研究結果

RON2 および RON4 に対する抗血清作成を試みたが、RON2 に対する抗血清のみが出来た。IFAの結果、RON2 はメロゾイトの先端部に局在したが、その局在はマイクロネームともロプトリー体部とも異なっていた。免疫電子顕微鏡により、局在はロプトリー体部であることが明らかとなった。免疫沈降実験により RON2 と AMA1 は複合体を形成していることが明らかとなった。RON2 は RhopH 複合体の構成成分である RhopH1 と共通する領域を持つが、免疫沈降実験の結果、RON2 は RhopH 複合体の構成成分ではないことが示唆された。世界各地から得られた 5 株を用いて細胞外領域の塩基配列を決定したところ、ほとんど多型が見られなかった。

D. 考察

移動接合体複合体は、マラリア原虫と同じアピコンプレクサ門に属するトキソプラズマ原虫で最初に報告されたが、マラリア原虫においても、同様に複合体が形成されていることがわかった。また、RhopH 複合体はトキソプラズマ原虫には存在せず、マラリア原虫にのみ存在するが、RON2 と共通する領域を保有するにもかかわらず、RON2 は RhopH 複合体には含まれていないことから、RhopH 複合体と移動接合体複合体はおそらく異なる機能を持つと考えられた。RON2 は多型を示さないことから、宿主免疫にはそれほどさらされていないと考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. “Diversity and evolution of the *rhopH/clag* multigene family of *Plasmodium falciparum*.” Iriko H, Kaneko O, Otsuki H, Tsuboi T, Su XZ, Tanabe K, Torii M. *Molecular and Biochemical Parasitology* (in press)
2. “Epigenetic silencing of *Plasmodium falciparum* genes linked to erythrocyte invasion.” Cortés A, Carret C, Kaneko O, Yim-Lim BYS, Ivens A, Holder AA. *PLoS Pathogen* 3:e107 (2007)
3. “A novel DBL-domain of the *P. falciparum* 332 molecule involved in erythrocyte adhesion.” Moll K, Chene A, Ribacke U, Kaneko O, Nilsson S, Winter G, Haeggstrom M, Pan W, Berzins K, Wahlgren M, Chen Q. *PLoS ONE* 2:e477 (2007)

4. "The *Plasmodium falciparum* RhopH2 promoter and first 24 amino acids are sufficient to target proteins to the rhoptries." Ghoneim A, Kaneko O, Tsuboi T, Torii M. *Parasitology International* 56(1):31-43 (2007)
2. 学会発表
1. 大槻均、金子修、橘真由美、入子英幸、竹尾暁、坪井敬文、Thongkukiatkul A、鳥居本美 「O-5、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プログラム・抄録集 p37、吹田 (2007. Mar. 29-30)
  2. 金玲、坪井敬文、竹尾暁、入子英幸、金子修、鳥居本美 「P-4、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 76 回日本寄生虫学会大会プログラム・抄録集 p46、吹田 (2007. Mar. 29-30)
  3. 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 「P-5、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プログラム・抄録集 p47、吹田 (2007. Mar. 29-30)
  4. Ghoneim A、金子修、坪井敬文、鳥居本美 「P-31、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プログラム・抄録集 p53、吹田 (2007. Mar. 29-30)
  5. 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 「P-34、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プログラム・抄録集 p54、吹田 (2007. Mar. 29-30)
  6. Rungruang T, Putaporntip C, Jongwutiwes S, 金子修 「三日熱マラリア原虫ロプトリータンパク質への選択圧」 第 15 回分子寄生虫学ワークショップ 草津 (2007.Jul.25-28)
  7. Cao J, Kaneko O, Thongkukiatkul 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* (2007 Sep 2-5)
  8. Tsuboi T, Jin L, Takeo S, Iriko H, Kaneko O, Sattabongkot J, Torii M. "Novel sporozoite antigen discovery of *Plasmodium falciparum* screened using human immunesera" *The 7th Awaji International Forum on infection and Immunity Awaji, Japan* (2007 Sep 2-5)
  9. Cao J, Kaneko O, Thongkukiatkul A, Tachibana M, Otsuki H, Sattabongkot J, Tsuboi T, Torii M. "A complex formation of Rhoptry Neck Protein 2 with a microneme protein, AMA1, in *Plasmodium falciparum*." *The 13th Korea-Japan Parasitologists' seminar (Forum Cheju 13)*, Chuncheon, Korea (2007.Oct.24).
  10. 金子修 「マラリア原虫の赤血球侵入の分子基盤 —熱研での私的将来構想—」 第 6 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム 松山 (2007. Oct. 27-28)
  11. 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 immunesera" *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 56th annual meeting*, Philadelphia, USA (2007.Nov.4-8).
  12. 金子修 「マラリア原虫の赤血球侵入の分子基盤」 第 6 回感染症沖縄フォーラム 北谷 (2008. Feb. 14-16)
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
特記すべきものはない

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

マラリア原虫に有効な新規阻害剤の探索

分担研究者 金 惠淑 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 准教授

研究要旨

熱帯熱マラリア原虫に有効な新規抗マラリア薬の候補化合物を探索するために、分子内にペルオキシドを有する化合物、及び既存抗マラリア薬であるアルテミシニンの基本骨格をもとに500種類の化合物を有機合成し、抗マラリア活性を評価した。その結果、有機合成した化合物 500 種類のうち、分子内に簡単なペルオキシド構造を有する化合物、及びアルテミシニンの構造を基本骨格とする化合物の両方に高い抗マラリア活性と選択毒性を示す化合物を見出した。これら得られた候補化合物の構造-活性の解析の結果、環状過酸化構造を有する単純な構造(8員環に環状過酸化構造が挿入され、12員環と連結した構造)を示す化合物は細胞毒性が少なく、また、ヒトのモデルとして用いたマウスの培養細胞に対し、毒性が低いことが判った。一方、アルテミシニンを基本骨格とする一連の化合物は基本構造を変換すると抗マラリア活性は維持されるものの、細胞毒性は逆に強いことが判った。

A. 研究目的

クロロキンをはじめとする既存抗マラリア薬に対する耐性熱帯熱マラリア原虫が出現し、既存の抗マラリア薬では治療できない状況になりつつある。そのために新しい抗マラリア薬の開発研究はマラリアに関する最優先研究事項である。私は、有機合成化合物を用いて薬剤耐性マラリアを克服できる新規マラリア治療薬を開発し、マラリア制圧に寄与することを研

究目的として本研究を進める。本研究では今までの研究で得られた高い抗マラリア活性を有する分子内ペルオキシド構造をもとに、将来抗マラリア薬として臨床の現場で使用することを念頭において有機合成を行う。また、大量に有機合成して供給しやすいような点にも注目した。この方法とは並行して、現在マラリアの治療に使われるアルテミシニンの構造に注目し、アルテミシニン誘導体の合成も同様に行

った。これアルテミシニンは、現在、天然生薬より単離・精製して用いるため、自然環境の影響を受けやすい。そのため、安定な供給が難しいだけでなく、複雑な構造のために完全有機合成して供給するには困難である。この点を解決するためにアルテミシニン誘導体の合成研究も並行した。

## B. 研究方法

### 1. 養熱帯熱マラリア原虫の培養

本実験では、*P. falciparum* FCR-3 strain (ATCC 30932) の原虫を用いた。実験に用いた培地は、濾過滅菌した RPMI 1640 培地で、pH を 7.4 に合わせ、ヒト血清を 10% となるように添加した。マラリア原虫の培養は O<sub>2</sub> 濃度 5%、CO<sub>2</sub> 濃度 5%、N<sub>2</sub> 濃度 90%、温度は 36.5 °C で行った。ヘマトクリット値 (赤血球浮遊液中に占める赤血球の体積の割合) は 5% にして用いた。培養開始時の熱帯熱マラリア原虫の初期感染率は 0.1% とした。24 穴培養プレートを用いて培養し、培地は毎日交換し、感染率 4% で植継ぎを行なった。感染率は薄層塗末標本を作成し、ギムザ染色あるいは Diff-Quick 染色を行なった後、顕微鏡 (油浸、1,000×) 下で計測した。

感染率 (%) = 感染赤血球数 / 総赤血球数 × 100

### 2. 抗マラリア活性測定

培養したマラリア原虫感染赤血球を遠心で集め、血清を含む培地で洗浄を行った後、非感染赤血球を加え、初期感染率を 0.3% とした。この時のヘマトクリット値は 3% である。抗マラリア活性を測定するサンプル (有機合成化合物) は 滅菌水、あるいは dimethylsulfoxide (DMSO) に溶解してあらかじめ用意しておく。

24 穴培養プレートにサンプル溶液を 5~10 μl ずつ加え、サンプルは duplicate あるいは triplicate にとった。コントロールは滅菌水、あるいは DMSO を 5 μl をプレートに加えた。

次に、あらかじめ用意しておいた熱帯熱マラリア原虫培養液を 995 μl ずつ加え、静かにピペティングを行ない培地に一様に懸濁させる。

培養プレートは CO<sub>2</sub> -O<sub>2</sub> -N<sub>2</sub> インキュベーター中で 72 時間培養した後、薄層塗末標本を作成し、染色した後、顕微鏡下で観察し、化合物を加えたものの感染率、及び溶媒にもを加えたコントロールの感染率を算出し、それぞれの値からマラリア原虫増殖率を算出した。

求めた感染率により次の式によって増殖率を算出した。

$$\text{増殖率 (\%)} = [b] - [a] / [c] - [a] \times 100$$

a : (0 時間の感染率)

b : サンプル添加時の感染率

c : サンプル非添加時の感染率

### 3. 細胞毒性の評価

マウス乳癌由来 FM3A 細胞を用いた。培地は ES 培地に非働化した胎児牛血清を 2% となるように添加し、CO<sub>2</sub> 濃度 5%、37°C で培養した。この条件下での FM3A 細胞の倍加時間は約 12 時間である。

前培養を行い、対数増殖期に入った細胞を  $5 \times 10^4$  cells / ml になるように培地で希釈する。サンプルはマラリア原虫の抗マラリア活性測定時調製したものをを用いる。24 穴培養プレートにサンプル溶液を 5  $\mu$ l ずつ加える。化合物は duplicate あるいは triplicate にとり、コントロールとして滅菌水、あるいは DMSO を 5  $\mu$ l 加えたウェルも同時に用意した。次に、用意しておいた培養細胞浮遊液を 995  $\mu$ l ずつ加え、静かにピペッティングを行ない培地に一様に懸濁させた。48 時間培養した後、それぞれのウェルについて細胞数を cell counter (CC-108, Toa Medical Electrics) で計数する。

$$\text{増殖率 (\%)} = (c) - (a) / (B) - (A) \times 100$$

a : (0 時間の細胞数)

b : 48h 後のコントロールの細胞数、

c : 化合物を添加した 2 日後の細胞数

細胞増殖阻害活性は、サンプルを添加したウェルの細胞数及びコントロールの細胞数から算出する。これにより、用いた化合物の細胞毒性を評価する。

マラリア原虫と FM3A 細胞に対するサンプルの EC<sub>50</sub> (50%のそれぞれの細胞とマラリア原虫に対する増殖阻害濃度) 値から化合物の抗マラリア活性有無と細胞毒性の有無を評価する。化合物のマラリア原虫に対する薬効判定には選択毒性を用いて表す。選択毒性とは下記のことである。

選択毒性 = FM3A 細胞に対するサンプルの EC<sub>50</sub> 値 / 熱帯熱マラリア原虫に対するサンプルの EC<sub>50</sub> 値

### C. 研究結果

有機合成した化合物 500 種類のうち、分子内に簡単なペルオキシド構造を有する化合物、及びアルテミシニンの構造を基本骨格とする化合物の両方に高い抗マラリア活性と選択毒性を示す化合物を見出した。これら得られた候補化合物の構造-活性の解析の結果、環状過酸化構造を有する単純な構造 (8 員環に環状過酸化構造が挿入さ

れ、12員環と連結した構造)を示す化合物は細胞毒性が少なく、また、ヒトのモデルとして用いたマウスの培養細胞に対し、毒性が低いことが判った。これら化合物の抗マラリア活性は  $1 \times 10^{-7}$  M 以上、選択毒性は 50 倍以上であった(現在、特許申請のため、構造式は省略する)一方、アルテミシニンを基本骨格とする一連の化合物はペルオキシド構造を有する化合物では、上記の単純な構造を有する化合物を同程度の抗マラリア活性を示した。一方、基本構造を置換すると抗マラリア活性は維持されるものの、細胞毒性は逆に強いことが判った(細胞毒性は 50 倍以上の選択毒性の結果が逆に細胞毒性が抗マラリア活性より強まる結果となった。特許申請後に速やかに構造を公開する予定)。

#### D. 考察

今回の研究の結果、分子内のペルオキシド構造を有する化合物は抗マラリア活性と安全性を同時に有することが判ったので、今後更に誘導体の合成と抗マラリア活性の検討が必要になる。また、安全性が高いことが期待できることから、今後マウスを用いた動物実験を行う予定である。一方、アルテミシニン関連化合物は構造変換することで、マラリア原虫より、むしろ癌細胞に対して強い制がん作用を示すことから、マラリアの治療薬だけでなく、制がん剤としての両方面での検討

が必要になると思われる。また、アルテミシニンの構造を変換してより安全性を示す化合物を見出すために、新たに置換期を導入した化合物を合成し、抗マラリア活性と細胞毒性を評価する予定である。

#### E. 結論

新規に有機合成した分子内ペルオキシドを有する環状過酸化化合物5種類とアルテミシニン誘導体 10 種に  $1 \times 10^{-7}$  M 以上の高い抗マラリア活性を示すことを見出した。これら化合物はホストのモデルとして用いた培養細胞に対して低毒性を示す、50 倍以上の選択毒性を示すことから、新規抗マラリア薬候補となりえる。今後、これら化合物を用いてマウスでの抗マラリア薬効解析と作用機序の解析を行う。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 綿矢 有佑、金 惠淑。抗マラリア薬。ファルマシア, 44 (1), 32-36, 2008.
2. 金 惠淑。最近の抗マラリア薬の開発状況。病原微生物検出情報、厚生労働省発行 vol. 28, No 1,9-10, 2007.
3. Tangin, A., komichi, Y., Wagatsuma, Y., Rashidul, H., Wataya, Y. and Kim, H.-S. Detection of malaria parasites in mosquitoes from a malaria endemic area Chakaria, Bangladesh. *Biol. Pharm. Bull.*



(In Press).

4. Sato, A., Hiramoto, A., Satake, A., Miyazaki, E., Naito, T., Wataya, Y. and Kim, H.-S. Association of nuclear membrane protein lamin B1 with necrosis and apoptosis in cell death induced by 5-fluoro-2'-deoxyuridine. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* (In Press).

5. Sato, A., Hiramoto, A., Uchikubo, Y., Miyazaki, E., Satake, A., Naito, T., Hiraoka, O., Miyake, T., Kim, H.-S. and Wataya, Y. Gene expression profiles of necrosis and apoptosis induced by 5-Fluoro-2'-deoxyuridine. *Genomics* (in Press).

6. Lim, S., Kim, H.-S. and Lee, D. In vitro antimalarial activity of flavonoids and chalcones. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 28 (12), 2495-2497, 2007.

7. Suzuki, H., Aly, N., Wataya, Y., Kim, H.-S., Tamai, I., Kita, M. and Uemura, D. Preparation of Quinoline Hexose Analogs as Novel Chloroquine-Resistant Malaria Treatments (1). Synthesis of 4-Hydroxyquinoline- $\beta$ -glucosides. *Chem. Pharm. Bull.*, 55(5) 821-824, 2007.

8. Aly, N., Hiramoto, A., Sanai, H., Hiraoka, O., Hiramoto, K., Kataoka, H., Wu, J.-M., Masuyama, A., Nojima, M., Kawai, S., Kim, H.-S. and Wataya, Y. Proteome analysis of new antimalarial endoperoxide against *Plasmodium falciparum*. *Parasitol. Res.*, 100,

1119-1124, 2007.

## 2. 学会発表

1. Detection of malaria parasite by Microtiter plate hybridization in field collected *Anopheles* mosquitoes from a malaria endemic area of Bangladesh. Akter Tangin, Komochi Yuka, Wagatsuma Yukiko, Haque Rshidul, Hye-Sook Kim, Yusuke Wataya. 日本薬学会第 127 年会、2007 年 3 月 27 日～29 日、富山。

2. 新規抗マラリア薬の開発—環状過酸化化合物の抗マラリア活性と体内動態—小道由香、谷川菜津希、中瀬由佳里、Wu Jinming、益山新樹、野島正朋、川合覚、三谷公里栄、片岡洋行、金惠淑、綿矢有佑。日本薬学会第 127 年会、2007 年 3 月 27 日～29 日、富山。

3. 抗マラリア作用を有する新規環状過酸化化合物の標的分子の探索。加藤邦泰、池田知里、平本昇子、Nagwa, S.M. Aly, 佐内仁美、Jinming Wu、益山新樹、野島正朋、平岡修、金惠淑、綿矢有佑。第 6 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム、2007 年 10 月 27～28 日、松山。

4. 新規抗マラリア薬の開発研究—環状過酸化化合物の抗マラリア活性と体内動態。中瀬由佳理、小道由香、犀川優、佐伯真希、谷川菜津希、Jinming Wu、益山新樹、野島正朋、川合覚、

片岡洋行、三谷公里栄、金 惠淑、綿  
矢有佑。第6回分子寄生虫・マラリア  
研究フォーラム、2007年10月27～28  
日、松山。

#### 研究要旨

リーシュマニア症の分子疫学的研究として、パキスタンにおける皮膚リーシュマニア症の新しい流行地であるパキスタン中南部のインダス河低地流域には、これまで報告のなかった *Leishmania (L.) major* が広く分布していることが明らかとなった。一方、薬用植物に含まれる抗住血原虫活性物質の探索として、ニガキ科の *Brucea javanica* の乾燥種子抽出物には、多種類のクアシノイド(苦み成分)が含まれており、イヌ・バベシア症の病原体である *Babesia gibsoni* の *in vitro* における赤血球内増殖や、*Trypanosoma evansi* の *in vitro* における増殖を抑制する作用のあることが明らかとなった。

#### A. 研究目的

(1) パキスタンにおける皮膚リーシュマニア症の伝播機構の地域特性を明らかにする。(2) 東南アジアの薬用植物資源から抗住血原虫活性物質を抽出し構造を決定する。

#### B. 研究方法

(1) パキスタンにおける皮膚リーシュマニア症患者 69 名の皮膚病変生検材料から PCR 法でリーシュマニアのミトコンドリア・チトクローム b 遺伝子を増幅し、その塩基配列から感染原虫種を同定した。(2) 薬用植物の抽出物から、*in vitro* における増殖抑制効果を指標して抗バベシア活性や抗トリパノソーマ活性を有する成分を分離・精製し、各種スペクトルデータを解析して化合物の構造決定を行った。強力な抗バベシア活性が認められた bruceine A については、イヌ・バベシア実験感染犬を用いて治療効果を検討した。

#### C. 研究結果

(1) パキスタンにおける皮膚リーシュマニア症の原因虫種については、患者からの分離 17 株を解析したこれまでの結果から、北西部の山岳地帯においては *L. (L.) tropica* が、新しい流行地である中南部のインダス河低地帯では *L. (L.) major* がそれぞれ主要種であることが示されていたが、本研究における 69 名の患者皮膚病変の DNA 診断の結果からも原虫種分布に地域差があることが支持された。しかし、*L. (L.) major* のチトクローム b 遺伝子については、変異が認められ 3 つのタイプに分類された。

(2) イヌ・バベシア症の病原体である *Babesia*

*gibsoni* を標的として、*in vitro* における赤血球内増殖を抑制する植物を探索したところニガキ科の *Brucea javanica* の乾燥種子のエチルアセテート抽出物に最も強い活性が認められた。抽出物の成分を分析したところ、抗バベシア活性をもつ有効成分として既知のクアシノイド 6 種類と新規クアシノイド 2 種類が含まれていた。また、同種子の水溶性クアシノイドの主成分は bruceine D であった。*B. gibsoni* に対しては、bruceine A と bruceantinol が最も低濃度で強い活性を示した。そこで、3 頭のビーグル犬に *B. gibsoni* を実験感染させ、感染早期における bruceine A の経口投与効果について検討した。非投与対照感染犬は感染 10 日目から発熱傾向を示し、parasitemia 2.3%、重度貧血、食欲廃絶、沈鬱などを示したため、14 日目に人道的エンドポイントによる実験中断(輸液等の加療)を行った。一方、感染 5 日目から bruceine A を 6.4 mg/kg の用量で 6 日間連続経口投与した 2 頭の犬では実験期間中に目立った臨床症状を呈することはなかった。しかし、ヘマトクリット値、血小板数などの血液学的検査値は正常値より低位を推移し、末梢血液中には parasitemia 1% 以下のバベシア原虫が確認され、実験期間終了(感染 28 日目)までに完全に排除されることはなかった。

*Trypanosoma evansi* の trypomastigote 型虫体の *in vitro* における増殖に対しては、bruceine A、bruceine C、bruceantinol が最も低濃度で抑制したが、*B. gibsoni* に対してあまり効果のなかった bruceine B や bruceine D にも強い抑制効果が認められた。

## D. 考察

(1) パキスタン中南部のインダス河低地帯の皮膚リーシュマニア症の新しい流行地における主要原因虫種は *L. (L.) major* であることについては、これまでの分離株の解析結果と今回の患者皮膚病変の DNA 診断の解析結果とが良く一致した。しかし、*L. (L.) major* については、チトクローム b 遺伝子に変異が認められたことから、*L. (L.) major* の由来についてはさらなる調査が必要であると考えられた。また、*L. (L.) major* については *Phlebotomus papatasi* が媒介し、伝播には保虫動物の関与が示唆されるのに比べて、*L. (L.) tropica* は *P. sergenti* が媒介し、伝播には保虫動物が関与しないとされていることから、今後、媒介サシチョウバエ種の分布や保虫動物の特定に関する研究が必要であると考えられた。

(2) 犬バベシア症は *Babesia gibsoni* や *B. canis* によって引き起こされるダニ媒介性感染症で、発熱、貧血、黄疸、血小板減少を主症状とする。近年、日本における分布域は拡大しつつあり獣医臨床床上重要な感染症の一つとなっている。治療には、ジミナゼン・アセチュレート製剤 (Ganaseg) が用いられてきたが、現在その生産は中止され、新たな抗バベシア薬の開発が急務となっている。今回の感染初期における bruceine A 経口投与結果では、原虫を完全に殺滅させることはできなかったが、臨床症状の発現をある程度抑えることができた。クアシノイド類は細胞毒性が高い化合物とされているが、東南アジア諸国は *B. javanica* を薬用に用いており、現地生産も可能であることから、今後は効果的な投与方法を検討するとともに、薬物動態や作用機序についての研究が必要と考えられた。

## E. 結論

皮膚リーシュマニア症の新しい流行地であるパキスタン中南部のインダス河低地流域には、これまで報告のなかった *Leishmania (L.) major* が広く分布していることが明らかとなったが、その伝播機構解明のためには、今後、ベクターと保虫動物の特定が必要である。一方、住血原虫症の治療薬開発の一つの視点として、現地生産が可能な薬用植物の再評価と抗原虫活性物質の探索を行い、新たな治療薬としての利用法を開拓していくことが期待される。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Myint CK, Asato Y, Yamamoto Y, Kato H, Bhutto AM, Soomro FR, Memon MZ,

Matsumoto J, Marco JD, Oshiro M, Katakura K, Hashiguchi Y, Uezato H: Polymorphisms of cytochrome b gene in *Leishmania* parasites and their relation to types of cutaneous leishmaniasis lesions in Pakistan. *J Dermatol* 35, 76-85, 2008

- 2) Matsumoto J, Sakamoto K, Shinjo N, Kido Y, Yamamoto N, Yagi K, Miyoshi H, Nonaka N, Katakura K, Kita K, Oku Y: Anaerobic NADH-fumarate reductase system is predominant in the respiratory chain of *Echinococcus multilocularis*, providing a novel target for the chemotherapy of alveolar echinococcosis. *Antimicrob Agents Chemother* 52, 164-170, 2008
- 3) Subeki, Matsuura H, Takahashi K, Nabeta K, Yamasaki M, Maede Y, Katakura K: Screening of Indonesian medicinal plant extracts for anti-babesial activity and isolation of new quassinoids from *Brucea javanica*. *J Nat Prod* 70, 1654-1657, 2007
- 4) Matsuura H, Nomura S, Subeki, Yamada K, Yamasaki M, Yamato O, Maede Y, Katakura K, Trimurningsih, Chairul, Yoshihara T, Nabeta K: Anti-babesial compounds from *Curcuma xanthorrhiza*. *Nat Prod Res* 21, 328-33, 2007
- 5) Elkhateeb A, Matsuura H, Yamasaki M, Maede Y, Katakura K, Nabeta K: Anti-babesial compounds from *Rosa damascena*. *Nat Prod Commun* 2, 765-769, 2007
- 6) Elkhateeb A, Yamada K, Takahashi K, Matsuura H, Yamasaki M, Maede Y, Katakura K, Nabeta K: Anti-babesial compounds from *Berberis vulgaris*. *Nat Prod Commun* 2, 173-175, 2007

## 2. 学会発表

- 1) 中尾亮, 水上智秋, 川村悠太, スベキ, S. ボン, 山崎真大, 前出吉光, 松浦英幸, 高橋公咲, 鍋田憲助, 片倉賢: 薬用植物由来天然化合物 bruceine A のイヌ・バベシア症に対する治療効果 第 144 回日本獣医学会, 2007 年 9 月 (江別)
- 2) 川村悠太, 吉川功, 片倉賢: 日本国内で発症した犬リーシュマニア症 第 144 回日本獣医学会, 2007 年 9 月 (江別)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## I. 研究協力者

奥祐三郎, 野中成晃, 松本淳, Subeki, Saw Bawm, 川村悠太, 中尾亮, 水上智秋 (北海道大学大学院・獣医学研究科・寄生虫学); 山崎真大, 前出吉光 (北海道大学大学院・獣医学研究科・内科学); 松浦英幸, 高橋公咲, 鍋田憲助 (北海道大学大学院・農学研究科・生命有機化学); Baloch JH, Bhutto MK, Soomro FR, Bhutto AM (Chandka Medical College/Hospital, Pakistan); 上里博 (琉球大学・医学部・皮膚科学); 橋口義久 (高知大学・医学部・寄生虫学)

研究要旨：*Trypanosoma cruzi* 感染細胞では宿主アポトーシス抑制因子である c-FLIP の発現が上昇しており、Fas を介するアポトーシスが抑制することを明らかにしてきた。原虫感染細胞で c-FLIP タンパク質の発現が上昇していることからその作用機構を解明することを目的として、今年度は c-FLIP の分解について検討した。本タンパク質はユビキチン-プロテアソーム系で分解されることが知られているので、ユビキチン化、プロテアソーム活性を測定した。その結果、感染細胞でも c-FLIP のユビキチン化は起こっており、プロテアソーム活性は非感染細胞よりも高く、おそらく正常に働いていることが示唆された。

#### A. 研究目的

これまでに *Trypanosoma cruzi* 感染宿主細胞ではアポトーシスが抑制され、宿主抑制因子 c-FLIP の発現が上昇していることを明らかにしてきた。本年度は、c-FLIP の発現上昇機構を明らかにすることを目的とし、特に c-FLIP タンパク質の分解について解析を行った。

#### B. 研究方法

*T. cruzi* 感染および非感染 HT1080 細胞からライセートを調製し、抗 c-FLIP および抗ユビキチン抗体により免疫沈降を行った。抗ユビキチン抗体あるいは抗 c-FLIP 抗体でウェスタンブロットを行い、ユビキチン化された c-FLIP が検出されるかどうか調べた。また原虫感染細胞におけるプロテアソーム活性を測定し、非感染細胞と比較した。

#### C. 研究結果

感染細胞内の c-FLIP はユビキチン化されたバンドとして検出され、さらに分子量が大きいサイズに複数のバンドが見られることからポリユビキチン化されていることが示された。感染、非感染細胞におけるプ

ロテアソーム活性について検討したところ、非感染細胞の Km 値は 56 $\mu$ M、Vmax 値は 0.22 RFU min<sup>-1</sup>  $\mu$ g<sup>-1</sup> に対し、感染細胞では Km 値は 50 $\mu$ M、Vmax 値は 1.67 RFU min<sup>-1</sup>  $\mu$ g<sup>-1</sup> であった。

#### D. 考察

原虫感染細胞で c-FLIP のユビキチン化が起きていることがわかった。プロテアソーム活性は感染、非感染細胞で Km 値はほぼ同程度であり、基質に対する親和性は同様であると推察された。Vmax 値が感染細胞で高いことが示された。

#### E. 結論

感染細胞でも c-FLIP のユビキチン化は起こり、プロテアソーム活性は非感染細胞よりもむしろ高く、おそらく正常に働いていることが示唆された。

#### G. 研究発表

##### 1. 学会発表

日本生化学会・分子生物学会合同大会 BMB  
2007, 483, 2007

## 人獣共通寄生虫病の血清診断システムの開発と病態解明

分担研究者 丸山治彦 宮崎大学医学部教授

研究要旨 2007年の宮崎大学での寄生虫症検査受託総数は617件、そのうち新規検査は416件、そのなかの168件（43.8%）を寄生虫症と診断した。内訳では肺吸虫症と回虫類の幼虫による内臓幼虫移行症が多数を占めた。トリクラベンダゾール（エガテン）による肝蛭症の治療はこれまでの報告どおり良好な結果が得られ、重篤な副作用も見られなかった。今後も国内発生全例のデータの蓄積を続けていく。

### A. 研究目的

われわれは、multiple-dot ELISA法による抗体スクリーニングと96-well microtiterplate ELISA法による精査を基本とした寄生虫症診断システムを構築し、多くの寄生虫病の診断に関わっている。2000年以降、総検体数は年間500-600、治療効果判定のための検査を除いて新規約400の検査を受託し、その中から毎年100-200例を寄生虫症と診断している。

そのような中で注目されるのは、患者に次第に多くの外国人、とくに東アジアから東南アジア出身の外国人が含まれるようになっていくことと、これらの地域で感染したと考えられる日本人症例が増加している点である。これは、この地域の人的交流が盛んである結果であると考えられるが、いつどこで感染したのかははっきりせず、病原寄生虫の特定に至らない症例も多い。

そこでわれわれは、外国人症例のサーベイを続けるとともに、アジア地域に存在し、かつ研究室での維持が困難で診断用抗原が確保できない寄生虫について、分泌排泄抗原を中心とした組み換え蛋白を作製し、スクリーニングおよび虫種特定用の血清診断システムを確立したい。

### B. 研究方法

当教室で受託した寄生虫症検査の結果、陽性と判定されたものについて、主治医と連絡をとりながら治療を行ない、日本人症例とともに、外国人症例を収集する。頻度の高い疾患群について、最初に粗抗原による吸収試験で原因寄生虫の決定ができるか否かについて検討する。

次に、診断的価値が高いと報告されている寄生虫抗原のうち、アミノ酸配列が公表されているものについて組み替えタンパクを作製し、当教室に保存されている既知の患者血清を用いて検証する。

### C. 研究結果

#### 1. 輸入寄生虫症の動向

2007は41都道府県の257医療機関、289診療科から診断依頼があり、検査総数617件のうち新規受付が416件、その中で168例が寄生虫病と診断された。これは最近の傾向を引き継いだ格好になっており、2000年以降、総検体数は年間500-600、フォローアップを除いた新規症例は400強である。

この中で外国人症例は22例であり、内訳は肺吸虫症19例、回虫類の幼虫による内臓幼虫移行症が2例、住血吸虫症1例であった。

とくに痛目すべきは肺吸虫症で、患者の出身地はほとんどがタイまたは中国で、全員女性であった。彼らの多くは関東地区の飲食店勤務で、母国の食習慣をそのまま持ち込んで、日本で買い求めたサワガニなどを仲間とともに生食して感染したと考えられたが、母国で感染した可能性も否定できなかった。医療機関への受診は遅れがちであり受診医療機関もばらばらで、グループで感染したことがわかりにくい場合もあるが、仲間のひとりが診断されて芋づる式に患者が発掘されることもあった。

わが国に分布する肺吸虫はウエステルマン肺吸虫と宮崎肺吸虫だが、タイを中心とした地域には *Paragonimus heterotremus* をがヒトへの感染を起こすことが報告されている。そこで、ベトナム人の *P. heterotremus* 確定診断血清を入手し、日本人ウエステルマン肺吸虫症の血清とで cross inhibition assay をおこなったところ、両者を明確に区別できることを明らかにした。(図1)

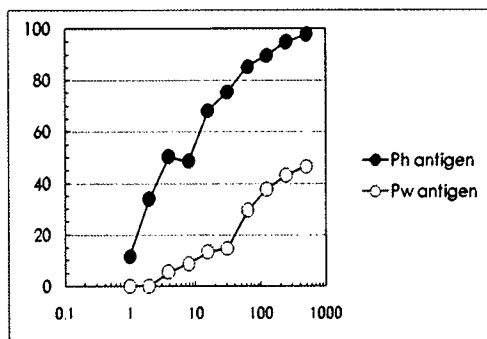


図1 *P. heterotremus* 抗原およびウエステルマン肺吸虫抗原による *P. heterotremus* 患者血清の *P. heterotremus* 抗原への結合の阻害

## 2. 組替え抗原による寄生虫症診断

粗抗原による原因寄生虫決定が可能とわかったので、somatic antigen の代表であるパラミオシンで寄生虫症診断が可能であるかを検討した。

その結果、組替え日本住血吸虫パラミオシンでは特異的な反応をとらえることが困難であることが明らかとなった。

## D. 考察

当教室で診断している寄生虫疾患の圧倒的多数は食品媒介性の人獣共通寄生虫症である。肺吸虫症は以前わが国における寄生虫病として重要

な位置を占めるが、国内居住外国人症例が目立つことから、在日外国人の診療に際しては注意が必要である。

今回、タイからベトナムにかけて人体症例が報告されている *P. heterotremus* が、血清検査によりウエステルマン肺吸虫と区別できることが明らかとなった。肺吸虫症では今後、組替え分泌排泄抗原によって同様に区別できるのかが焦点となる。*P. heterotremus* ではまだメジャーなエピトープは知られていないが、おそらくウエステルマン肺吸虫と相同タンパクであろうと考えられるので、違いの大きいエピトープ部分に関して実験をすすめる予定である。

## E. 結論

新興・再興感染症としての輸入食品媒介性寄生虫症、人獣共通寄生虫症の粗抗原血清診断について検討した。組替えタンパクでは、somatic antigen であるパラミオシンは、抗原として不適切であることが明らかであった。今後、最適なエピトープの選定が必要であると考えられる。

## G. 研究発表

### 著書

- 丸山治彦 巨大寄生虫が宿主から排除される仕組み (生体防御医学事典) 鈴木和男監修 pp. 28-32 朝倉書店 (2007)
- Maruyama, H, and Nawa, Y Immunology of the Infection. In: 'Food-Borne Parasitic Zoonoses' World Class Parasites, Vol. 11, (Murrell, K. Darwin; Fried, Bernard Eds.), pp.337-381, Springer Science, Newark (2007)
- 丸山治彦 幼虫移行症 (今日の治療指針 2008) 朝倉書店 (2007)

### 総説

- 丸山治彦、名和行文 肺吸虫 (特集 呼吸器と寄生虫) 日本胸部臨床 66: 269-275 (2007)
- 丸山治彦 寄生虫疾患と好酸球・好塩基球 (今月の主題 白血球) 臨床検査 51: 1047-1052 (2007)

### 原著論文

- 丸山治彦、名和行文 寄生虫妄想が疑われる3例 Clinical Parasitology 17; 100-101.

2. Chiyo Yamauchi-Kawaura, Hitomi Watanabe, Anna Nishimaki, Haruhiko Maruyama, Ayako Yoshida, and Nobuo Ohta Goblet cell hyperplasia elicited by infection with an intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis*, is not protective against goblet cell-sensitive *Nippostrongylus brasiliensis* in mice. Nagoya Medical Journal (2007)

学会発表

1. 米田頼晃、城井啓、廣瀬哲、西浦亮子、木下輝樹、大浦元、高木地孝、山田哲、石井望人、西尾福真理子、守屋圭、福井博、丸山治彦、吉川正英 イヌ回虫幼虫 ES 抗原に対して高い抗体価を示した幼虫移行症の一例 —ウシ生肝を食した焼鳥店勤務者のケース—臨床寄生虫学会 日本大学 東京 (2007)
2. 奥村さやか、成澤恵理子、藤田明 感染から発症まで長期を要し、胸水からの虫卵検出で診断されたウエステルマン肺吸虫症の一例臨床寄生虫学会 日本大学 東京 (2007)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案特許  
なし
3. その他  
なし



# 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

### 住血原虫症の診断学

分担研究 研究者 五十嵐郁男 帯広畜産大学 教授

#### 研究要旨

ウシバベシア原虫 *B. bovis* の赤血球侵入・増殖におけるコレステロール、システインプロテアーゼ阻害剤およびサイクリン依存性キナーゼ阻害剤の影響を検討した。また、ウシバベシア原虫 *B. bovis* と *B. bigemina* の組み換え抗原を用いたイムノクロマト法、バベシア原虫症に対する PCR、LAMP 法などの遺伝子診断法の開発について検討を行った。

#### A. 研究目的

赤血球寄生原虫であるバベシアはダニの媒介により動物に感染し、発熱、貧血、黄疸などの症状を引き起こし、世界的に甚大な経済的な被害を与えている。また、人に感染するバベシア原虫も報告されている。しかし、バベシア原虫の分子レベルでの赤血球への侵入、赤血球内での原虫の増殖のメカニズムなど不明な点が多く、また有効な治療・予防法や診断法の開発も遅れている。そこで、本研究ではバベシア原虫の侵入機構や新たな診断法の開発を目的とした。

#### B. 研究方法

##### (1)バベシア原虫の赤血球侵入に関する因子の検討

ウシ赤血球をコレステロール除去剤である Methyl- $\beta$ -cyclodextrin(MCD)で処理し、*B. bovis* の in vitro 培養を行い、原虫の増殖、赤血球に侵入に対する影響を検討した。また、4種類のシステインプロテアーゼ阻害剤および4種類のサイクリン依存性キナーゼ (CDK) 阻害剤の原虫に対する影響を in vitro 培養を用いて検討した。

##### (2)バベシア症に対する診断法の検討

ウシバベシア原虫 *B. bovis* と *B. bigemina* の組み換え抗原を用いて、イムノクロマト法の検討を行った。また、バベシア原虫に対する PCR、LAMP 法などの遺伝子診断法について検討を行った。

#### C. 研究結果

##### (1)バベシア原虫の赤血球侵入におけるコレステロールの役割

ウシ赤血球を 5mM MCD で処理すると、膜コレステロールの減少が認められ、MCD 処理赤血球を用いて *B. bovis* の in vitro 培養を行った結果、原虫の赤血球への侵入、分裂・増殖が抑制された。しかし、1mM MCD 処理赤血球を用いて検討した結果、原虫の赤血球への侵入、増殖が促進された。また、4種類のシステインプロテアーゼ阻害剤 (E64, E64d, leupeptin, and ALLN) および4種類の CDK 阻害剤 (roscovitine, purvalanol A, CGP74514A, CDK2 Inhibitor II)を用いて、原虫に対する影響を検討した。システインプロテアーゼ阻害剤の E64d は赤血球への侵入、ALLN は赤血球内の増殖、また、CDK 阻害剤の roscovitine, purvalanol A, CDK2 Inhibitor II は初期の原虫増殖、CGP74514A は赤血球への侵入を抑制する事が明らかとなった。

##### (2)バベシア症に対する診断法の検討

ウシバベシア原虫 *B. bovis* と *B. bigemina* の RAP1 抗原の組換え蛋白質を用いて、それぞれに特異的なイムノクロマト法を開発した。また、*B. bovis* と *B. bigemina* を同時に検出可能な LAMP 法が確立された。更に、ウマバベシア原虫 *B. caballi* と *B. equi* に対する LAMP 法は PCR 法と同等の感度で、培養

法による原虫検出よりも感度が高い事が明らかになった。PCRによる *B. equi* 遺伝子検出のため、ろ紙による血液材料採取法は、通常の DNA 抽出法と同等の検出結果を示した。

#### D. 考察

赤血球膜コレステロールが減少することによって、赤血球膜の流動性や物質の膜透過性が先進し、それが *B. bovis* の赤血球への侵入、あるいは赤血球内での分裂に影響を与えていると考えられる。またごく少量のコレステロールが減少した場合にはかえって *B. bovis* の侵入、増殖において有利に働くことから、*B. bovis* の増殖、侵入に最適な赤血球膜コレステロール量が存在することが示唆された。また、システインプロテアーゼ阻害剤および CDK 阻害剤は、赤血球への原虫侵入および赤血球内での増殖を抑制するグループにわかれ、原虫に対する異なる効果を有する事が明らかとなった。これらの結果は、バベシア原虫の赤血球への侵入、赤血球内増殖に関する新たな知見を与えた。

2種類のウシバベシア原虫に特異的なイムノクロマト法、同時に両原虫の遺伝子の検出を可能にする LAMP 法が開発された。また、ウマバベシア原虫に対す遺伝子診断法では、ろ紙を用いた簡便な DNA 試料の調整法が開発された。さらに、ウマバベシア原虫の遺伝子検出において、LAMP 法は PCR と同等かそれ以上の感度を示す事が示された。これらの方法は、精密な機材を必要としない流行地での正確で迅速な診断に役立つものと期待される。

#### E. 結論

バベシアの赤血球への侵入・増殖に関する新たな知見や新規の血清学のおよび遺伝子診断法が開発され、今後バベシア症の新たな治療や流行地での診断法の実用化に貢献するものと期待される。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Amount of cholesterol in host membrane affects erythrocyte invasion and replication by *Babesia bovis*. Parasitology. 134:625-630. 2007.
2. *Babesia bovis*: Effects of cysteine protease inhibitors on in vitro growth. Exp Parasitol. 117:214-217. 2007.
3. Cyclin-dependent kinase inhibitors block erythrocyte invasion and intraerythrocytic development of *Babesia bovis* in vitro. Parasitology. 134:1347- 1353. 2007.
4. Comparative evaluation of the sensitivity of LAMP, PCR and in vitro culture methods for the diagnosis of equine piroplasmosis. Parasitol. Res. 100: 1165- 1168. 2007.
5. Comparison of polymerase chain reaction methods for the detection of *Theileria equi* infection using whole blood compared with pre-extracted DNA samples as PCR templates. Trop Anim Health Prod. 39: 369 -374. 2008.
6. Development of two immunochromatographic tests for the serodiagnosis of bovine babesiosis. Vet Parasitol. 148:137- 143. 2007.
7. Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification (mLAMP) method for the simultaneous detection of bovine *Babesia* parasites. J Microbiol Methods. 71:281-287. 2007.

##### 2. 学会発表

1. ウシバベシア症の簡易迅速診断法を目的とした mLAMP (multiplex Loop-mediated isothermal amplification)法の確立。井関博ほか5名、

- 第 76 回日本寄生虫学会, 平成19年  
3月 29-30 日、吹田市。
2. システインプロテアーゼインヒビター  
による *Babesia bovis* の増殖抑制効  
果について。大久保和洋ほか2名,  
第 76 回日本寄生虫学会, 平成19年  
3月 29-30 日、吹田市。
  3. Effects of cysteine protease inhibitors  
on the in vitro growth of *Babesia bovis*.  
大久保和洋ほか2名。第 143回日本  
獣医学会, 平成19年4月 3-5 日、つく  
ば。
  4. Development of real-time PCR assays  
for detection of *B. bovis* and *Babesia*  
*bigemina*. C. Kim ほか 4 名。第 143  
回日本獣医学会, 平成19年4月 3-5  
日、つくば。
  - 5 . mLAMP(Multiplex loop-mediated  
isothermal amplification)法を用いたガ  
ーナ及びザンビア共和国におけるウ  
シバベシア症の疫学。井関博ほか8  
名。第 143回日本獣医学会, 平成19  
年4月 3-5 日、つくば。
  6. Development of a Multiplex  
Loop-Mediated Isothermal Am-  
plification (mLAMP) Method for Rapid  
Detection of Bovine *Babesia* parasites.  
五十嵐郁男他 6 名。 The 2nd  
Thailand-Japan Joint Forum on  
Infectious Diseases。平成19年10月 8  
日。バンコック。
  7. Development of an immuno-  
chromatographic test for the  
simultaneous serodiagnosis of bovine  
babesiosis。五十嵐郁男ほか6名。  
42th Annual Meeting of the US/Japan  
Parasitic Diseases Joint Panels。平成  
20年1月16、17日、デイス。

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）  
寄生虫疾患の病態解明及びその予防・治療をめざした研究  
分担研究報告書  
住血吸虫症の病態・診断・疫学

分担研究者 大前比呂思 国立感染症研究所・寄生動物部 室長

**研究要旨** カンボジアのメコン住血吸虫浸淫地で、年1回のプラジカンテルによる非選択的集団治療（住民参加率 62~86%）を行ったところ、Kato-katz 法による糞便検査での虫卵陽性率は、数年で速やかに減少し、2004 年以降は新たな虫卵陽性者を認めていない。本年度の糞便検査においても、メコン住血吸虫卵陽性者は認めなかった。また、プラジカンテルを集団投与した場合、住血吸虫症浸淫地では、感染率の低下のみならず、感染者の臨床症状の改善による Morbidity の改善も期待でき、その効果は感染率の低下よりも早く現れる。カンボジアのメコン住血吸虫浸淫地でも、プラジカンテルによる非選択的集団治療の結果、3 年で触知できるような肝肥大を認めるような小児はみられなくなり、本年度の調査においてもその成果は継続していた。この間、メコン川に生息する媒介貝への直接の対策は実施されず、住民への健康教育も限定的であった。ほぼ集団治療のみでこの成果が得られた理由として、①集団治療への高い住民参加 と並んで、②媒介貝がヒトと接触する期間が年間 3 ヶ月に限られること ③ヒト以外に問題となる保虫宿主が殆どいないことなどをあげることができる。

A. 研究目的

近年、住血吸虫症対策の根幹となっているプラジカンテルによる集団治療の有用性について、カンボジアのメコン住血吸虫症対策で検討する。

B. 研究方法

カンボジア、クラチエ省のメコン川中流域の4村落（Achen, Chatnaol, Srekhoem, Sambok）において、乾季の始まりにあわせてプラジカンテルによる非選択的集団治療を行った。その時期にあわせて疫学調査（糞便検査及び肝腫大のチェック）を行い、メコン住血吸虫症対策の成果について検討した。なお、本研究は、カンボジア王国保健省によるメコン住血吸虫症対策事業に対する協力の一環として行われた。

C. 研究結果

2004 年に行われた人口センサスを基礎とすると、本年度の非選択的集団治療に対す

る住民参加率は、約 70%と推測された。4, 5 月に行われた疫学調査の結果、Achen, Chatnaol, Srekhoem, Sambok の4村落において、糞便検査の結果、メコン住血吸虫卵が認められた例はなかった（図1）。また、それらの4村落の小学校における触診による肝腫大のチェックでも、肝腫がみられた小児はいなかった（図2）。

D. 考察

メコン住血吸虫症対策の一環として、年1回のプラジカンテルによる非選択的集団治療を行ったところ、糞便検査での虫卵陽性率は、数年で速やかに減少し、2004 年以降は新たな虫卵陽性者を認めなかったが、この間、メコン川に生息する媒介貝への直接の対策は実施されず、住民への健康教育も限定的であった。ほぼ集団治療のみで大きな成果が得られた理由として、①集団治療への 70%以上の高い住民参加 と並んで、