

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(国際医学協力研究事業))
分担研究報告書

ワクチン分子の無細胞系合成システムの確立

研究分担者 坪井敬文 愛媛大学無細胞生命科学工学研究センター 教授

研究要旨： 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遺伝子を何ら改変することなくゲノムワイドに組換えタンパク質として発現することに成功した。これまで発現に成功した熱帯熱マラリア原虫組換えタンパク質の内、メロゾイト期の組換えタンパク質 114 種をモデルに用いて、我々が確立したハイスループット抗原スクリーニング法（アルファスクリーン法）により、タイから得られたマラリア免疫血清を用いて熱帯熱マラリア原虫の新規抗原タンパク質のスクリーニングを試行した。その結果、機能未知の原虫分子の中に、既知のワクチン抗原分子に匹敵する高い抗原性を有する分子を検出することに成功した。

A. 研究目的

マラリア撲滅が 2007 年に再度宣言されて依頼、マラリアワクチン開発は緊急の課題として再認識された。そのためには、既知のワクチン候補のみの研究では限界に達しており、新たなワクチン候補分子の探索が、緊急の課題となっている。申請者らは、マラリア原虫組換えタンパク質の合成に優れているコムギ胚芽無細胞タンパク質合成法を用いて熱帯熱マラリア原虫のゲノムワイドに組換えタンパク質を発現し、その中から新規抗原を同定することを目的に本研究を実施した。

B. 研究方法

1) 熱帯熱マラリア原虫メロゾイト期組換えタンパク質の合成

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて、熱帯熱マラリア原虫タン

パク質の内、マラリアゲノム情報データベース (PlasmoDB) より、メロゾイト期にのみ発現が示唆されている遺伝子を選択した。これらに特異的な PCR プライマーを用いて各 cDNA を増幅し、プラスミドベクターにクローン化した。これらの cDNA クローンから PCR によって転写用の鋳型 DNA を作製し、それらとコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて組換えタンパク質を合成した。最終的に得られた組換えタンパク質を用いて、以下のスクリーニングを実施した。

2) ハイスループット抗原抗体アッセイの試行

これらのタンパク質とマラリア感染者血清との抗原抗体反応を検出するために、これまでに確立したアルファスクリーン法を応用した。この方法の利点は、ELISA 法の 10 分の 1 の血

清量と、微量の未精製組換えタンパク質を用いて、迅速に多検体のアッセイが可能で、検出感度も ELISA 法より優れている点にある。

3) タイ国におけるマラリア流行地からの血清試料の入手

タイ国カンチャナブリ県のマラリア流行地コンモンタ村において得られたマラリア免疫血清を入手した。

(倫理面への配慮)

これまでに入手したタイ国におけるマラリア患者血液の採取に当たってはタイ国保健省の許可を得、患者への説明を十分行なった上で同意を得て実施した。また、本血清試料の利用は愛媛大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会の許可を得ている。

C. 研究結果および考察

1) 熱帯熱マラリア原虫メロゾイト期組換えタンパク質の合成

赤血球期ワクチン候補分子となる可能性のある熱帯熱マラリア原虫メロゾイト期に発現が予想されている分子の中から 171 種類を選択し、それらの cDNA をクローン化した。それらの cDNA クローンからコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて組換えタンパク質を発現した結果、現在までに 114 種 (67%) の組み換えタンパク質をピオチン化した状態で発現することに成功した。

2) ハイスルーブット抗原抗体アッセイの試行

上記の組換えタンパク質 114 種類を用いて、タイのコンモンタ村から得ら

れた熱帯熱マラリアに対する防御抗体を含有している可能性の高いヒト血清 22 人分との反応性をアルファスクリーン法を用いて検討した。その結果、18 人以上の血清と反応した抗原性の高い分子が 20 種類選択された。その内訳は、これまでにワクチン候補抗原として研究されてきた既知分子が 8 種類、機能未知の分子が 12 種類であった。以上の結果から、本法のハイスルーブット免疫スクリーニング系としての有用性が確認された。

3) 今後の課題

アルファスクリーン法を用いて、既に保有している 1500 種類以上のゲノムワイドな熱帯熱マラリア原虫組換えタンパク質からワクチン候補となりうる抗原の網羅的探索をおこなう。

D. 結論

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いたハイスルーブット抗原抗体反応スクリーニングにより、新規マラリア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なると考えられた。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Iriko H, Kaneko O, Otsuki H, Tsuboi T, Su XZ, Tanabe K, Torii M. Diversity and evolution of the rhoph1/clag multigene family of *Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol. 2008, 158:11-21.

- 2) Tsuboi T, Takeo S, Iriko H, Jin L, Tsuchimochi M, Matsuda S, Han ET, Otsuki H, Kaneko O, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, Sawasaki T, Torii M, Endo Y.
Wheat germ cell-free system-based production of malaria proteins for discovery of novel vaccine candidates. *Infect Immun.* 2008, 76:1702-1708.
- 3) Yano K, Otsuki H, Arai M, Komaki-Yasuda K, Tsuboi T, Torii M, Kano S, Kawazu S.
Disruption of the *Plasmodium berghei* 2-Cys peroxiredoxin TPx-1 gene hinders the sporozoite development in the vector mosquito. *Mol Biochem Parasitol.* 2008, 159:142-145.
2. 学会発表
- 1) Takeo S, Sawasaki T, Torii M, Sattabongkot J, Endo Y, Tsuboi T.
Functional production of malaria proteins with wheat germ cell-free system.
Keystone Symposia, Structural Genomics and its Applications to Chemistry, Biology and Medicine, Steamboat Springs, USA, January 6 - 11, 2008.
- 2) Tsuboi T, Takeo S.
Wheat germ cell-free system: A breakthrough in malaria vaccine research.
Forty-second annual U.S.- Japan Parasitic Diseases Panel Meeting, Davis, USA, January 16-18, 2008.
- 3) Tsuboi T, Takeo S, Iriko H, Jin L, Tsuchimochi M, Matsuda S, Han ET, Otsuki H, Kaneko O, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, Sawasaki T, Torii M, Endo Y
Expression of malaria vaccine candidates using a wheat germ cell-free protein synthesis system without codon optimization.
Third molecular Approaches to Malaria Meeting, Lorne, Australia, February 3-7, 2008.
- 4) Tsuboi T, Takeo S, Otsuki H, Torii M.
Genome-wide malaria vaccine candidate discovery using wheat germ cell-free system.
JSPS presents Sweden-Japan joint Seminar, Malaria Research - Diversity & Control, Stockholm, Sweden, June 11, 2008.
- 5) Tsuboi T.
Wheat germ cell-free protein synthesis system: a key tool for novel malaria vaccine candidate discovery.
Symposium on Capacity Building for Malaria Vaccine Development, Pune, India, June 21, 2008.
- 6) Tsuboi T, Takeo S, Sakamoto H, Hirabayashi N, Otsuki H, Torii M.
Novel antigens at *Plasmodium falciparum* schizont-merozoite stages as potential vaccine candidates.
The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan.

- September 8-11, 2008.
- 7) Hitoshi Otsuki, Osamu Kaneko, Thongkukiatkul Amporn, Mayumi Tachibana, Hideyuki Iriko, Satoru Takeo, Takafumi Tsuboi, Motomi Torii Erythrocyte- Binding-Like molecule and Virulence of *Plasmodium yoelii*.
19th Annual Molecular Parasitology Meeting, Woods Hole, USA, September, 2008.
- 8) Tsuboi T, Takeo S, Otsuki H, Torii M. Wheat germ cell-free system: A breakthrough in malaria vaccine candidate discovery.
17th International Congress for Tropical edicine and Malaria, Jeju Island, Korea, September 29 – October 3, 2008.
- 9) Tachibana M, Wu Y, Iriko H, Otsuki H, Sattabongkot J, Takeo S, Torii M, Tsuboi T. Immunization with recombinant proteins of a gametocyte protein Pfs230 expressed using wheat germ cell-free system successfully induce transmission-blocking antibodies against *Plasmodium falciparum*.
ASTMH 57th annual meeting, New Orleans, USA, December 7-11, 2008.
- 10) Takeo S, Sakamoto H, Hirabayashi N, Torii M, Tsuboi T. Novel antigens at *Plasmodium falciparum* schizont-merozoite stages as potential vaccine candidates.
ASTMH 57th annual meeting, New Orleans, USA, December 7-11, 2008.
- 11) 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, AMA1, in *Plasmodium falciparum*.
ASTMH 57th annual meeting, New Orleans, USA, December 7-11, 2008.
- 12) 大槻均、金子修、入子英幸、竹尾暁、坪井敬文、Thongkukiatkul 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 の局在と病原性
第 77 回日本寄生虫学会大会、長崎市、4/3-4、2008。
- 13) 曹俊、金子修、Thongkukiatkul Amporn、橘真由美、大槻均、坪井敬文、鳥居本美
A complex formation of rhoptry neck protein 2 with a microneme protein, AMA1, in *Plasmodium falciparum*.
第 77 回日本寄生虫学会大会、長崎市、4/3-4、2008。
- 14) Palacipac NQ, Arisue N, Culleton R, Tanabe K, Zeyrek FY, Coban C, Sattabongkot J, Tsuboi T, Torii M, Udomsangpetch R, Hotii T
Diversity in geographically distinct *Plasmodium vivax* populations.
第 77 回日本寄生虫学会大会、長崎市、4/3-4、2008。
- 15) 竹尾暁、坂本寛和、平林直己、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 77 回日本寄生虫学会大会、長崎市、4/3-4、2008。

- 16) 橘真由美、永徳千穂、大槻均、Sattabongkot Jetsumon、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 77 回日本寄生虫学会大会、長崎市、4/3-4、2008。
- 17) 坪井敬文、竹尾 暁
マラリアワクチンの歴史
第 16 回分子寄生虫学ワークショップ、草津町、8/3-6、2008。
- 18) 坂本寛和、竹尾 暁、金子隆昌、谷上弘恵、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 16 回分子寄生虫学ワークショップ、草津町、8/3-6、2008。
- 19) 坂本寛和、竹尾 暁、金子隆昌、谷上弘恵、松岡和弘、橘真由美、澤崎達也、Jetsumon Sattabongkot、鳥居本美、坪井敬文
熱帯熱マラリア原虫感染におけるヒトの抗体応答プロファイリング
第 7 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム、松山、10/10-11、2008。
- 20) 横内ゆき、韓銀澤、大槻均、伊与久菜摘、竹尾暁、坪井敬文、鳥居本美
LDH 活性測定によるネズミマラリア原虫増殖率の迅速簡便測定法の

確立

第 49 回日本熱帯医学会大会、東京都、10/25-26、2008。

厚生科学研究費補助金（社会保障国際協力推進研究事業）
分担研究報告書

赤痢アメーバの病原機構の解明

研究分担者 野崎 智義 国立感染症研究所 部長

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、赤痢アメーバのエネルギー代謝に不可欠なアミノ酸の代謝経路の主要酵素スレオニンデヒドラターゼの解析を行った。

A. 研究目的

アメーバ赤痢（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。一方、我が国を含む一部先進諸国においても、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。2005年の赤痢アメーバの全ゲノムの解読(Lofus Nature 2005)により標準株における全遺伝子地図が明らかになり、本原虫の病原性や寄生の分子メカニズムの青写真が明らかになった。しかしながら個別の経路やタンパク質の機能に関しては依然未解明なものが多い、ポストゲノム時代のアプローチが不可欠である。我々は赤痢アメーバのエネルギー産生の解明に主眼をおいて研究を継続している。赤痢アメーバはエネルギーの大半を解糖経路と発酵により得ているが、アミノ酸の分解により中間代謝産物が供給されるらしいことがゲノム情報から明らかにされた。本年度はそんなアミノ酸からケト酸を供給する酵素の一つであるスレオニンデヒドロゲナーゼ(threonine dehydratase, TD)の同定、クローニング等の解析を行った。

B. 研究方法

1. 遺伝子の獲得

大腸菌などの既知のTDタンパク質配列を用いて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、TDタンパク質特有の二次構造の保存性、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TD組換えタンパク質を作製した。

3. 系統樹解析

GenBank/NCBI/EBIから得られた他種の関連酵素と赤痢アメーバのTD配列をClustalWを用いたNeighbor-joining法により系統樹解析を行った。

（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TDの同定

赤痢アメーバゲノムに他種生物のTDと相同性を示すエントリが複数見つかり、同一性と部分的共有などについて精査した結果、このうち2は独立していた。この2種をTD1, TD2とした。TD1(Gene ID, EHI_092390), TD2(EHI_049910)はそれぞれ分子量44.95, 46.53kDaで、等電点6.68, 5.88であった。いずれのTDも細菌・植物等の他種生物由来のTDと相同性を示

した。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TDのタンパク質配列上の特徴

赤痢アメーバのTD1, TD2と代表的生物由来のTDとの比較を示す(最終ページに図1を示す)。タンパク質全長にわたり高い相同性を示した。他種生物由来のTDにおいて基質結合と触媒に関与することが示されたアミノ酸残基はTD1において完全に保存していた。一方TD2においては多くのアミノ酸が保存していなかった。このことはTD2がTDとしての活性をもたない、あるいは分化した他の機能をもつことを示唆していた。

3. 赤痢アメーバTDの進化上の位置

赤痢アメーバTDの進化上の位置を確認するためにClustalWによる系統樹解析を行った(図2)。

赤痢アメーバの多くの代謝系酵素では様々な真性細菌や古細菌からの水平転移による遺伝子獲得が見られるが、TD1/TD2はいずれも明瞭な共通祖先を示唆する系統関係を示さなかった。

4. 赤痢アメーバTD1, TD2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。精製の途中と最終産物をSDS-PAGEで泳動したものを示す。

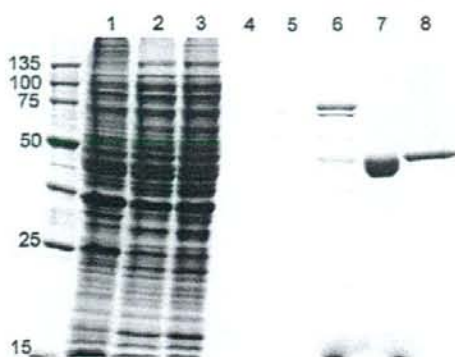


図3 Expression and Purification of the recombinant EhTD1: Lanes 1-3, the total lysate (1), supernatant (2), or unbound fraction (3); lanes 4-6, fraction eluted with 10, 20, 50 mM imidazole, respectively and lanes 7-8, purified rEhTD1 and EhTD2 respectively.

5. 赤痢アメーバTDタンパク質の酵素学的解析

TD1, TD2の基質特異性を明らかにするために20種のアミノ酸を調べた。TD2が全く活性を示さなかったのに対し、TD1は以下に示すように、セリンとスレオニンに対してのみ強い加水分解活性をもち、それぞれケト酸を産生した。組換えTD1のセリン、スレオニンに対する K_m はそれぞれ 13.53 ± 0.77 , 7.31 ± 1.69 mMであった。また、 V_{max} は 0.46 ± 0.08 , 0.72 ± 0.03 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ であった。 k_{cat} はそれぞれ 3.00 ± 0.53 , 5.20 ± 0.23 であった。

	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	K_{cat} (s^{-1})
--	---------------	---	---------------------------

Serine 13.53 ± 0.77 0.46 ± 0.08 3.00 ± 0.53

Threonine 7.31 ± 1.69 0.72 ± 0.03 5.20 ± 0.23

表1 組換えTD1のカイネテックパラメーター

D. 考察及び結論

ミトコンドリアにおける酸化リン酸化によるATP合成を欠く赤痢アメーバは解糖経路と酢酸・エタノール発酵によってエネルギーを合成している。これまで病気を起こす栄養型では取り込まれたグルコースが解糖経路を流れATP合成がなされると信じられて来たが、同時にゲノム情報から多くのアミノ酸分解酵素が存在することが示唆され、アミノ酸の加水分解産物である α ケト酸が直接ピルビン酸：フェレドキシン酸化還元酵素 (PFOR) に対して供給される可能性が示唆されていた (図4)。

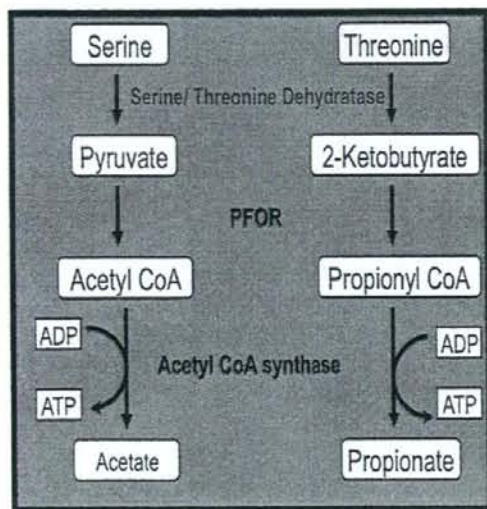


図4 アミノ酸由来の α ケト酸のPFORによる代謝スキーム

赤痢アメーバにおける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、重要であり、本研究により同定されたTDはそのギャップを埋める重要な貢献であるということが出来る。PFORはピルビン酸、 α ケトブチル酸からアセチル CoA、プロピオニル 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, 更に α ケト酸

を供給するアミノ酸デヒドラターゼの解析は極めて重要である。

今後 TD を含めたアミノ酸デヒドラターゼの細胞内局在、調節機構、機能を解明することを目的として、研究を継続する予定である。本年度得られた TD 組換え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、初年度のフェレドキシンとともに今後の解析に供せられる。

E. 健康危険情報

該当せず

F. 研究発表

1. 論文発表

- (i) Ebert, F., Bachmann, A., Nakada-Tsukui, K., Hennings, I., Drescher, B., Nozaki, T., Tannich, E., and Bruchhaus, I. (2008) An *Entamoeba* cysteine peptidase specifically expressed during encystation. Parasitol. Int. 57, 521-524
- (ii) Wong, E., Okhonin, V., Berezovski, M., Nozaki, T., Alexandrov, K., and Krylov, S. (2008) "Inject-mix-react-separate-and-quantitate" method for High-throughput screening of enzyme Inhibitors. J. Am. Chem. Soc. 130, 11862-11863.

2. 学会発表

なし

G. 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。

S. typhimurium	-----MHIITDLP-----VATEDIL-KAKQRLAGRIYKTMGR 32
C. elegans	(35 a. a.) DDKQTSGSMEDTEALPFDGDCPENPK-----LEFSDIS-SAAFNINSGVQTPCVR 87
E. coli	-----MHIITDLP-----VAIDQII-KAKQRLAGRIYKTMGR 32
T. acidophilum	-----MDEEALP-----STEDIL-KARATLEGRINHPFK 30
T. vaginalis	-----MDEEALP-----STEDIL-KARATLEGRINHPFK 31
A. thaliana	(55 a. a.) FLPLRLVSPNSLQVFLGAVPENTKAEKNSIAEMEYLDNLSSTVYDIALSEFQL 115
EntD1	MDESEGLVSP-----EDVVGQISNTECP-----ITSDVY-KASRRIKRYATTALEY 48
EntD2	MDEVEYFALALDASTS-----EISIGEGDEQVLEQ-----IFLSDVY-TAKRIVSRIHTPLDSE 55
S. typhimurium	SNTPSECKGEIPLKFNMQTGGIRGAPNLSLSTAEKXKGVVACSAQAGQVQLSCAMGIDGK 102
C. elegans	SLGLSECKEMDLYFKKTYLQVGGIYERGARVALDQDQKQKAGVIAAGAGSALALSYHQMGQIFPV 102
E. coli	SNTPSECKGEIPLKFNMQTGGIRGAPNLSLSTAEKXKGVVACSAQAGQVQLSCAMGIDGK 102
T. acidophilum	STTPDREYQSDMFKLEDFQVGGIYERGARVALDQDQKQKAGVIAAGAGSALALSYHQMGQIFPV 100
T. vaginalis	SDNIDHNVNAGIYFKLEDFQVGGIYERGARVALDQDQKQKAGVIAAGAGSALALSYHQMGQIFPV 98
A. thaliana	AKNLSKRLQVDMYKRELDQVFFIRGAYNKKVFLPADQLAGVICSSAGAGQVVALSASGLKSTAV 185
EntD1	SNTPSECKGEIPLKFNMQTGGIRGAVNRIATLTKKXKGVVACSAQAGQVVALSASGLKSTAV 118
EntD2	NASISADIGMDVYKLENSKQSGIRGAVNRIATLTKKXKGVVACSAQAGQVVALSASGLKSTAV 125
S. typhimurium	VVWFGAPSKVAATCDYSARVLLGDNFNQIAKVEIVET-SGRIFIPIDQPIIAGDTIGLEIME 171
C. elegans	VWVWFGAPSKVAATCDYSARVLLGDNFNQIAKVEIVEM-SGRIFIPIDQPIIAGDTIGLEIME 171
E. coli	VVWFGAPSKVAATCDYSARVLLGDNFNQIAKVEIVEM-SGRIFIPIDQPIIAGDTIGLEIME 171
T. acidophilum	VWVWFGAPSKVAATCDYSARVLLGDNFNQIAKVEIVEM-SGRIFIPIDQPIIAGDTIGLEIME 169
T. vaginalis	IMFENASAEKVAATCDYSARVLLGDNFNQIAKVEIVEM-SGRIFIPIDQPIIAGDTIGLEIME 168
A. thaliana	IVWVFTATKVAATCDYSARVLLGDNFNQIAKVEIVEM-SGRIFIPIDQPIIAGDTIGLEIME 184
EntD1	IVWVFTATKVAATCDYSARVLLGDNFNQIAKVEIVEM-SGRIFIPIDQPIIAGDTIGLEIME 157
EntD2	IIVNFTATKVAATCDYSARVLLGDNFNQIAKVEIVEM-SGRIFIPIDQPIIAGDTIGLEIME 194
S. typhimurium	DLY-DVNVIVPFGGGGLDAGIAIAIKSNIPTKVIGQAVNVMQAASTYTGITRHH-----TPGFLA 235
C. elegans	QVF-DVNTILVFPFGGGGLDAGIATAVKLQGVNHYGIESSTCPSTPEAYEAGHITSG-----AKAALA 290
E. coli	DLY-DVNVIVPFGGGGLDAGIAIAIKSNIPTKVIGQAVNVMQAASTYTGITRHH-----TPGFLA 235
T. acidophilum	DRP-DIDTIVFPFGGGGLDAGIAIAAONHPVRIIGIESELSDMQASRERKIVAH-----SQQVIC 233
T. vaginalis	QIF-KVQTVVFPFGGGGLDAGIAIAAONHPVRIIGIESELSDMQASRERKIVAH-----SQQVIC 237
A. thaliana	QAGQPLHAIFFVFPFGGGGLDAGIAIAVYKRVSEVKEIIGVEPADANAMALSINHERVILD-----QVGGFA 319
EntD1	QLE-KCDVIGAGFGGGGLDAGIAIAVYKRVSEVKEIIGVEPADANAMALSINHERVILD-----TAKTGA 251
EntD2	DLF-DVDIAIAPFGGGGLDAGIALAVKTLDPVIVTGVQNERGSSATLSDRHHVLRTH-----QNSDNE 258
S. typhimurium	DGCDVSPGNLTFTYIVRELVDIVLVEDEIRNSMIALIQRNKIVTEGDALACAALLSGKLDSHIQNRK 305
C. elegans	DCLAVPFGVGNLSYAKGLVQKVIYVKESEIALSLILKLVKAVVEGDVAVLAALLEGVFLKSKK- 305
E. coli	DGCDVSPGNLTFTYIVRELVDIVLVEDEIRNSMIALIQRNKIVTEGDALACAALLSGKLDQIQNRK 309
T. acidophilum	DGDSKVTSGDILFTYIAKDVVDIVVTESEVSKAIYALFERNKIVAEFDVAVLAALLEGVFLKSKK- 301
T. vaginalis	DGIAVTKPGDILNLAINDGLVDIVVSEDEVAEVALAERKIVISEGDAITPLANVLEKVKF-YQPMVE 306
A. thaliana	DGAVKVEGETFTYIVRELVDIVLVEDEIRNSMIALIQRNKIVTEGDALACAALLLEGVFLKSKK- 389
EntD1	DGIAVKAQDTEKFTYIVRELVDIVVTESEVSKAIYALFERNKIVAEFDVAVLAALLEGVFLKSKK- 321
EntD2	DGAVNVTYIQLSLMIEETVDDIITVDEQITRAMGLMERCKVIEGDVAVLAALLEGVFLKSKK- 327
S. typhimurium	TVSIIIDGNIDLSRVQITG--LVDA----- 329
C. elegans	VVSIIDGNIDTTLGASIERGLAVDGRVLEVVSDRPGGIAKLTITTIAMLGASIKDIFHERAMISTD 429
E. coli	TVSIIIDGNIDLSRVQITG--FVDA----- 329
T. acidophilum	VAVIIVDGNINFLNRSIITYELNQLGLVRIECIIPDRPQNLTRIAAIAARNGNITIAASVNLKSTP 371
T. vaginalis	ICCVIIVDGNINFLNRSIITYELNQLGLVRIECIIPDRPQNLTRIAAIAARNGNITIAASVNLKSTP 375
A. thaliana	VVALIIVDGNINFLNRSIITYELNQLGLVRIECIIPDRPQNLTRIAAIAARNGNITIAASVNLKSTP 459
EntD1	VVCIIVDGNINFLNRSIITYELNQLGLVRIECIIPDRPQNLTRIAAIAARNGNITIAASVNLKSTP 394
EntD2	VAVIIVDGNINFLNRSIITYELNQLGLVRIECIIPDRPQNLTRIAAIAARNGNITIAASVNLKSTP 394
S. typhimurium	-----VFYKVEVVAETGKEE----- 329
C. elegans	-----VFYKVEVVAETGKEE----- 446
E. coli	-----VFYKVEVVAETGKEE----- 329
T. acidophilum	-----PGQSVIFSVNVVQDQE----- 388
T. vaginalis	-----ANRQQTITIMVDVQDQE----- 392
A. thaliana	-----LVSQVYTAGELKALQKRMSSQLKTVNLTSDLVKDELRYLMDGRSTVGDVLCRFTTFRPGALMFL 476
EntD1	-----IGICLQDVMCEYQVE----- 407
EntD2	-----IGMCTIRFSVEVADNE----- 411
S. typhimurium	----- 329
C. elegans	-----VDEIETALKEIYDNIILM 464
E. coli	----- 329
T. acidophilum	-----LDRIILSTLRMGIYFKVT 406
T. vaginalis	-----LNDIKTECHSGWTFYFIQ 410
A. thaliana	-----DSFSPNNITLFFYRQGETGANVLVQVQVEQKMEFNNRAKALGYDYL 592
EntD1	-----RDKIFDVLKAGYVFFK-- 423
EntD2	-----KQALGDALKARQYEFVY 429

図1 赤痢アメーバと代表的他種生物由来のTDの比較

結晶構造等により結合と触媒に関与していることの示されたアミノ酸残基に背景を付けた。

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 (国際医学協力研究事業))
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)

研究分担者 木村英作 愛知医科大学医学部教授

研究要旨

(i)スリランカの低流行地において住民のアンケート調査により陰嚢水腫等の患者数を調べた。同時に、医師による検診、免疫診断法 (尿 ELISA) を実施した。結果の比較により、住民情報が十分信頼できることが示された。(ii)年一回の集団治療を6回以上繰り返すと感染率の著明な減少が認められた。(iii)デニヤヤ地方において尿 ELISA 陽性の学童とその家族を再調査した。全員陰性であった。(iv)東チモール国では、全国より抽出された中学校において尿 ELISA を実施し、フィラリア症の全国的な分布状況を明らかにした。

A. 研究目的

WHOの主導によるGlobal Programme to Eliminate Lymphatic Filariasisは2020年までに世界からリンパ系フィラリア症を撲滅することを目指している。この計画に寄与することを目標に、我々が開発した尿を検体とする免疫診断法 (尿 ELISA) を応用した疫学調査を実施している。2008年度は、スリランカにおいて[a]隠れた流行地を効率よく発見する方法の検討、[b]フィラリア症に対する集団治療 (MDA) の効果判定、および[c]東チモール国における全国的な疫学調査の実施とデータ解析を行った。なお、本研究の最終目的は途上国で応用できる簡便で安価な尿診断法の開発をすることである。

B. 研究方法

1. 隠れた (低) 流行地の効率的発見

フィラリア症撲滅を達成するには流行地の見落としが有ってはならない。住民に質問表を配布し象皮病、陰嚢水腫の有無を調査した。住民情報の信頼性を医師による検診と尿 ELISA により検討した。

2. MDA の効果判定

WHOの撲滅戦略は年1回のMDAを4-6回繰り返すことである。感染率が比較的高い地域で6-12回のMDAを実施し経時的にその効果を分析した。

3. デニヤヤ地方におけるフィラリア伝搬終結の確認作業

同地方は2006年、2007年にそれぞれ4、5回目のMDAを実施したが、それらの終了後、尿 ELISA 陽性児童が11人みられた。

彼（女）等とその家族、計 55 人の再調査を尿 ELISA、マイクロフィラリア検査、ICT 抗原検査を用いて行った (Sep/Oct, 2008)。

4. 東チモール国における全国的な疫学調査

同国の人口は 95 万人、12 県があり全国に 147 の中学校がある。各県より 2~4 校の割合で計 34 校を選出し、計 5,638 人の学童を対象に尿 ELISA を実施した。

(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・承認を得た（スリランカではルフナ大学医学部倫理委員会の承認を得ている。東チモール国の調査は同国の保健省および WHO 事務所との共同研究である）。被検者には十分な説明を行い同意を得ている。

C. 研究結果

1. 隠れた流行地の簡便な発見法

住民アンケートにより得られた陰嚢水腫の有病率 (n=24 村)、医師の診察による有病率 (n=24 村) および尿 ELISA 陽性率 (n=15 村) を高、中、低の 3 段階に分け Kappa test を用いて関連を調べた。住民情報と医師の診察結果、および住民情報と尿 ELISA の結果に有意な関連がみられた。

2. MDA の効果判定

Hamugewatta (H), Matotagama (M), Walgama (W) の 3 地区で 6 年間に MDA が

6-12 回実施された。その結果、マイクロフィラリア陽性率は(H)で 8.6 から 1.4%に、(M)で 5.7 から 1.1%に、(W)で 3.7 から 0.8%に減少した。なお、尿 ELISA の結果は、検査中である。

3. デニヤヤ地方におけるフィラリア伝搬終結の確認作業

55 人中 3 人が尿 ELISA 陽性であったが、マイクロフィラリア検査、ICT 抗原検査では陰性であった。その他は全て陰性であった。

4. 東チモール国における全国的な疫学調査

尿 ELISA 陽性者の全国平均は 2.7% (154/5,638) で、かなり低い感染率である。10%以上の学校が 3 校、0%が 6 校あった。感染率は低地（標高 500 m未満）の学校で高く（27 校、平均 3.2%）、高地（標高 500 m以上）の学校で有意に低かった（7 校、平均 0.6%）。また、標高 100 m以下の学校に関し、島の南側（6 校、平均 8.4%）は北側（12 校、平均 1.7%）に比して感染率が有意に高かった。

D. 考察

隠れた流行地を効率よく発見する

疑われる総ての流行地においてマイクロフィラリア検査や免疫診断を行うことは不可能である。住民情報によって流行地の推定が出来れば効率よい対策を取ることができる。今回、アンケート調査により低流行地の発見も可能であったことから、未調査地域に本法を応用できる。

MDA の効果判定

MDA の著名な効果が実証されたが、なお完全に陰性化することができない。今後どのような基準で elimination を確認し、またフィラリア症の再燃を発見するのか、新たな方法・戦略が必要となる。

東チモール国における全国的な疫学調査

東チモールは独立間もない小さな島国で、全国規模のフィラリア症調査は実施されたことがない。今回の調査により、フィラリア感染の分布が初めて明らかになった。今後の治療対策の計画立案と実施に役立つものと期待される。

E. 結論

- (i) 陰嚢水腫の発生に関する住民情報はフィラリア流行地の発見に利用できる。
- (ii) 年1回のMDAを繰り返すと感染率の著明な減少を認めるが、ゼロを達成するのは容易ではない。
- (iii) 5回目のMDAが終了したデニヤヤ地方では、流行が終息している可能性が示された。
- (iv) 東チモール国において中学生を対象に全国的な疫学調査を実施した。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Presence and gradual disappearance of filaria-specific urinary IgG4 in babies born to antibody-positive mothers: A 2-year follow-up study. Mirani V. Weerasooriya, Makoto Itoh,

Mohammad Z. Islam, Yoshiki Aoki, Wilfred A. Samarawickrema, Eisaku Kimura. *Parasitol Int* 2008; 57: 386-389.

- (2) Distribution of filarial elephantiasis and hydrocele in Matara district, Sri Lanka, as reported by local leaders, and an immunological survey in areas with relatively high clinical rates. Mirani V. Weerasooriya, Yoshinori Isogai, Makoto Itoh, T. Channa Yahathugoda, Kanchana K. Vidanapathirana, Malka P.S. Mudalige, Eisaku Kimura. *Parasitol Int* 2008; 57: 390-395.

- (3) Enzyme-linked immunosorbent assay to detect urinary antibody against recombinant rKRP42 antigen made from *Leishmania donovani* for the diagnosis of visceral leishmaniasis. Mohammad Z. Islam, Makoto Itoh, Hidekazu Takagi, Md. Anwar Ul Islam, A. R. M. Saifuddin Ekram, Ajijur Rahman, Atsuhide Takesue, Yoshihisa Hashiguchi, Eisaku Kimura. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 79(4): 599-604.

2. 学会発表

- (1) Urine-based diagnosis of filariasis for monitoring of elimination of LF. Eisaku Kimura. Int Conference to Combat Neglected Tropical Diseases. 28-29 Jul, 2008. Programme and Abstracts: p. 44 (Dhaka, Bangladesh).
- (2) Urine-based immunodiagnosis with

children to monitor mass drug administrations, confirm elimination and detect resurgence of filarial infection. Eisaku Kimura, Mirani V. Weerasooriya, Makoto Itoh, Weipin Wu, Dejian Sun. 17th Int Congress for Trop Med and Malaria. 29 Sep-3 Oct, 2008. Program and Abstract Book: p. 148 (Jeju, Korea).

(3) Early diagnosis of visceral leishmaniasis and prediction of clinical cases by rKRP42 urine ELISA. MZ Islam, Makoto Itoh, MAU Islam, MA Rahman, ARMS Ekram, Hidekazu Takagi, Yoshihisa Hashigichi, Eisaku Kimura. 17th Int Congress for Trop Med and Malaria. 29 Sep-3 Oct, 2008. Program and Abstract Book: p. 153 (Jeju, Korea).

(4) Immunodiagnosis of lymphatic filariasis using urine samples and its field application in Sri Lanka and China. Eisaku Kimura, Mirani V Weerasooriya, Makoto Itoh, Weiping Wu, Dejian Sun. Joint Int Tropical Medicine Meeting. 13-14 Oct, 2008. Abstracts: 68 (Bangkok, Thailand).

(5) Six-year follow-up study on the effect of 5 rounds of mass drug administration on filaria-specific IgG4 titers in urine as determined by ELISA in Sri Lanka. Eisaku Kimura. 43rd Annual U.S.-Japan Joint Conference on

Parasitic Diseases. 7-8 Jan, 2009. Abstracts: p. 60 (Tokyo, Japan).

(6) 尿を使ったマラリアの疫学調査は可能か？伊藤誠、金田英子、門司和彦、Pongbongsa Tiengkham、坪井敬文、長岡史晃、木村英作。第49回日本熱帯医学会大会・第23回日本国際保健医療学会学術大会合同大会。25-26 Oct, 2008. プログラム抄録集: p. 138 (国立国際医療センター)。

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当無し

フィラリア線虫と媒介節足動物の相互関係の解明
研究分担者 辻 尚利 動物衛生研究所主任研究員

寄生線虫のニワトリへの複数回感染によって、単回感染では見られなかった病変が肝臓で確認された。また、媒介性節足動物（ベクター）が産生する生物活性分子の機能探索の結果、ベクターの保持するペプチダーゼの中には、摂取物の消化のみならず、自身の消化管細胞の形成・卵細胞における胚発生にも関与するものがあることが示された。

A. 研究目的

本研究では、宿主体内への寄生（内部寄生虫）及び体表への寄生（外部寄生虫）に適応した巧妙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節足動物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、線虫及び媒介者の生存・侵入・存続に不可欠な分子機構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、ニワトリをモデル宿主として、家禽類における幼虫移行症による病変について検討を加えた。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 *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マダニを作製した。

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。A. suum 成熟卵をニワトリに単回あるいは2回にわたって経口投与し、感染後1、3、7、14、22日に解剖して肝臓・肺・胸筋・十二指腸から幼虫を回収するとともに、病変部を観察した。
- 2) 組織化学染色はパラフォルムアルデヒド固定組織をパラフィン包埋し、薄切した試料を用いて実施した。

外部寄生虫：

- 1) 国内最優占種であるフタトゲチマダニの TBM をコードする EST データベースより複数のマダニレグマイン遺伝子を分離した。
- 2) マダニレグマインの発現動態は定量 PCR 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レ

グマイ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) マダニレグマインのペプチダーゼ活性は各種特異的基質及び宿主血液由来成分（ヘモグロビン・アルブミン）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脚基節にガラス毛細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°C のインキュベーター放置した後、宿主ウサギの耳に付着した。

C. 研究結果

回虫：

- 1) 成熟回虫卵を経口投与したニワトリについて、体内移行幼虫数を検討したところ、幼虫は感染後1日、3日に主として肝臓から分離された。単回投与群、2回投与群の間で、幼虫の移行および分布に顕著な差はみられなかった。
- 2) 2回にわたって成熟回虫卵を経口投与したニワトリでは、感染後7日目に半透明の白い病斑が肝臓表面に見られたが、単回投与のものには確認されなかった。

マダニ：

- 1) フタトゲチマダニよりレグマインをコードする複数の cDNA を分離した。
- 2) 大腸菌で作製した組換えレグマインを用いて各種特異的基質に対して加水分解活性を検討したところ、レグマイン特異的基質に対する活性が確認された。
- 3) レグマイン遺伝子の発現をノックダウンしたマダニでは、吸血後（飽血時）の体重が、対照群のマダニと比較して有意に減少していることが確認され、レグマインが正常な吸血行動に不可欠であることが示唆された。

- 4) レグマインノックダウンマダニの中腸では、吸血期間中に起こる中腸上皮細胞の再構築に支障をきたしていることがみとめられた。
- 5) さらに、対照群マダニの産下卵が、産卵後18日の段階ですでに幼ダニの形態を備えた状態まで胚発育していることが観察されたのに対し、レグマインノックダウンマダニの産下卵では正常な胚発育が確認できなかった。

D. 考察

内部寄生虫：ニワトリを用いた試験により、モデル寄生虫である回虫は幼虫移行過程において、可食部のひとつである肝臓からも分離されることが明らかとなった。回虫は非固有宿主における線虫生存戦略を解明できるモデル線虫になりえると考えられた。

外部寄生虫：マダニのレグマインは中腸における吸血消化のみならず生殖に関しても重要な役割を果たしていることが強く示唆された。また、レグマインは他の媒介節足動物でも保持していることが十分予想され、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移行・発育過程を標的とした新規寄生虫防圧法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、レグマインはマダニの生存と生殖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

Yoshihara S, Hattori J, Nishizono K, Kawamura A, Shimozaki K, Nishida Y, Oda K, Tsuji N, Hirayama N. (2008). Hepatic lesions caused by migrating larvae of *Ascaris suum* in chickens. J Vet Med Sci. 70, 1129-1131

Alim MA, Tsuji N, Miyoshi T, Islam MK, Hatta T, Fujisaki K. (2009). Legumains from the hard tick *Haemaphysalis longicornis* play modulatory roles in

blood feeding and gut cellular remodelling and impact on embryogenesis. Int J Parasitol. 39, 97-107.

2. 学会発表

Alim MA, Tsuji N, Miyoshi T, Islam MK, Hatta T, Yamaji K and Fujisaki K. Legumains from the hard tick *Haemaphysalis longicornis* play modulatory roles in blood feeding and gut cellular remodeling and impact on embryogenesis. 第146回日本獣医学会学術集会 P.169

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

研究分担者 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。住血吸虫の寄生病態を解析するためには *in vivo* の RNAi が方法的に確立する必要があり、そのための検討をすすめた。Prx-1、Prx-2 の dsRNA を住血吸虫感染マウスにさまざまな方法で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。In vivo RNAi の効果改善を図る目的で住血吸虫の RNA 取込みに関する生物学的システムを検討することを試み、*C. elegans* の情報をもとに日本住血吸虫の *sid* 遺伝子の解析を進めた。

A. 研究目的

住血吸虫に対するほ乳類宿主の防御免疫の本態はなお不明であるが、血管内寄生という寄生環境から考えれば酸化ストレスが予想されるエフェクターの一つである。その事は、同時に住血吸虫が抗酸化ストレスの機構を持つことが必要であることを示唆し、日本住血吸虫にも peroxiredoxin (Prx) が見られる事を示してきた。その寄生適応上の意義を検討するには遺伝子ノックダウンが直接的な証拠となるが、多くの単細胞性動物や細菌と異なって中間宿主を必要とする多細胞動物である住血吸虫ではその検証方法が限られる。RNAi はわずかに利用可能な実験アプローチであ

り、*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。

しかし、寄生適応への影響を検証するためには *in vivo* の RNAi による実験が必要であり、ほ乳類宿主の血管内に適応している住血吸虫に対して如何に dsRNA を取込ませるかは必ずしも容易ではない。実際に予備実験では *in vitro* で観察したような発現ノックダウンが困難であったので、住血吸虫の dsRNA の取込みの機構と制御を検討して、より応用性の高い方法論確立を目指すことにした。そこで *C. elegans* の systemic RNAi を制御する *sid-1* 遺伝子に注目し、日本住血吸虫においても同様に機

能しているかを検証する事を試みた。

B. 研究方法

1. In vivo RNAi : 山梨株の日本住血吸虫感染 BALB/c マウスを用いた。Prx-1、Prx-2 の dsRNA 投与による発現阻害実験は、感染 4 週で行なった。日本住血吸虫の Prx-1 の dsRNA 20 µg/マウスを尾静脈から 3 日おきに 4 回投与した。初回 dsRNA 投与後 2 週に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。

2. 日本住血吸虫における sid 関連遺伝子の検索 : データベースより *C. elegans* の *sid-1* 遺伝子配列を求め、公表されている日本住血吸虫の EST 情報を基に *sid*-like genes の検索を行い、遺伝子の全長クローニングを行った。

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 の効果

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。試みた条件下では得られた成虫の Prx-1、Prx-2 の発現が有意に低下していた。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。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。

2. 日本住血吸虫の dsRNA 取込みに関する遺伝子の解析

sid-like 遺伝子の検索から相同遺伝子

が検出されたが、mRNA からはサイズが異なるものが複数得られた。しかし、11 回膜貫通領域を持つ SID タンパク質の全長が決定でき、SjSID-1 と命名した。さらにその発現ステージを明らかにした。SjSID-1 を in vitro RNAi で発現抑制を行ったところ、dsRNA の核への取り込みが抑制され、dsRNA の取り込み制御に直接関わるタンパクである事を確認した。

D. 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。しかし宿主-寄生虫相互作用の解明のためには in vivo でその機能を追跡できることが要求される。われわれは日本住血吸虫で初めて in vivo の RNAi の検討に着手しているが、方法的な改善は今後も継続して行く必要がある。しかし、遺伝子発現量の有意な低下や機能変化が観察された事実は、今後の実験アプローチとしての有用性を強く示唆するものである。

一方、これまでの方法で RNAi を住血吸虫で行うには、虫体の dsRNA 取り込みの制御機構が解明されればより効率的な RNAi の実施が期待される。今回明らかにした SjSID は in vitro では実際に dsRNA 取込みに関与しており、その応用が期待される。さらに、*Sjsid-1* 遺伝子が RNA の取り込み制御を通じて虫の発育分化にも機能している事が予想され、今後の新しい知見解明にも直結することが考えられた。

E. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

論文発表

Kumagai T, Osada Y, Ohta N, Kanazawa T.
Peroxiredoxin-1 from *Schistosoma japonicum* functions as a scavenger against hydrogen peroxide but not nitric oxide. *Mol. Biochem Parasitol*, 164:26-31, 2009.

Jin Z, Akao N, Ohta N. Prolactin evokes lactational transmission of larvae in mice infected with *Toxocara canis*.

学会発表

Ohta N, Taniguchi T, Kumagai T, Shimogawara R, Kim HS and Wataya Y
Therapeutic effects of a synthesized compound on schistosomiasis mansoni: two different effects on worm killing and anti-fecundity in murine experimental infection. ICTM17, October, 2008, Jeju.

熊谷 貴、長田良雄、下河原理江子、板橋明子、太田伸生 感染宿主内の日本住血吸虫 peroxiredoxin を標的とした in vivo RNAi 法 題 77 回日本寄生虫学会大会、2008 年 4 月、長崎市。

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

マラリアおよび住血吸虫の寄生適応機構の研究

研究分担者 金澤 保(産業医科大学・免疫学寄生虫学)

研究要旨

マラリア:マクロライド系抗菌薬アジスロマイシン(AZM)について、ネズミマラリア原虫(*Plasmodium berghei*)に対する伝播阻止効果を検討した。AZM投与マウス吸血蚊の唾液腺内のスポロゾイト数は対照群に比べて有意に少なく、AZMはオーシストにおけるスポロゾイト形成を阻害する可能性が示唆された。

住血吸虫:マンソン住血吸虫(Sm)虫卵のT細胞サイトカイン産生修飾について検討した。Smの新鮮虫卵を正常マウスの腹腔内に投与することにより、感染マウスで観察されたものと同様の脾細胞サイトカイン産生能の変化(IL-17A、TNF α 、IFN γ 産生能の低下、IL-10、IL-4産生能の上昇)が観察された。虫卵をあらかじめ凍結融解・破碎処理することにより、上記効果は減弱あるいは消失した。Sm虫卵の抗炎症効果には、新鮮虫卵がもっとも有効であることが示された。

[研究協力者]

新井 明治 長田 良雄

A. 研究目的

A-1 マラリア

我々は集団投与可能なマラリア伝播阻止薬の開発を目指して、一定の安全性が確保されている既存薬剤の中からマラリア伝播阻止効果を有するものを選び出し、より有効性・安全性の高い投与方法を模索するとともに、その作用機序を解明することで、マラリア原虫の蚊体内発育ステージにおける新たな薬剤標的を同定すべく研究を行っている。本年度は、熱帯熱マラリア原虫の赤内型に対する増殖阻害効果が報告されているマクロライド系抗菌薬アジスロマイシン(AZM)について、ネズミマラリア原虫(*Plasmodium berghei*)に対する伝播阻止効果を検討した。

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。

我々は、寄生虫の抗炎症効果のメカニズムを解明することを目的として研究を行っている。昨年度までに、住血吸虫感染が実験的関節炎の抑制作用をもつこと、その際に脾細胞の炎症性サイトカイン(IL-17、TNF α)産生ポテンシャルの低下が伴うことを明らかにしている。本年度は虫卵によるTh1/Th2/Th17サイトカイン産生の修飾について、基礎的な検討を行った。

B. 研究方法

B-1 マラリア

同レベルの生殖母体を有する *P. berghei* 感染 BALB/c マウスに AZM 400 mg/kg、あるいは対照としてカルボキシメチルセルロース(CMC)を経口投与し、AZMの血中濃度がピークに達する投与3時間後にハマダラカ(*Anopheles stephensi*)に吸血させて、生殖母体と薬剤を蚊に取り込ませた。蚊体内での原虫発育の評価を中腸内オーキネート数(1日後)、中腸壁オーシスト数(17日後)、唾液腺スポロゾイト数(17日後)のカウントによって行った。

B-2 住血吸虫

マンソン住血吸虫(Sm)の虫卵20,000個をC57BL/6

マウスに1-3回腹腔内投与し、最終投与1週後に脾細胞をConA刺激下に培養し、上清中のサイトカインをELISAで測定した。また、虫卵のviabilityの影響をみるため、凍結融解虫卵・破碎虫卵などと新鮮虫卵の効果比較を行った。

[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:AE08-005, 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

AZM 投与マウスを吸血した蚊の中腸で形成されたオーキネート数とオーシスト数は、いずれもCMC投与マウスを吸血した蚊と比較して差がなかったが、唾液腺内のスポロゾイト数は蚊1匹当たりAZM投与マウス吸血群、CMC投与マウス吸血群でそれぞれ156±436、2344±2955と、AZM投与マウス吸血群で有意に少なかった。

C-2 住血吸虫

Sm虫卵のただ1回の投与により、感染マウスで観察されたものと同様の脾細胞サイトカイン産生能の変化(IL-17A, TNF α , IFN γ 産生能の低下、IL-10, IL-4産生能の上昇)が観察された。これらの効果は、投与を2-3回と繰り返すことによっても増強せず、むしろ減弱傾向が観察された。1回投与の系を用いて虫卵のviabilityの影響について検討したところ、あらかじめ凍結融解や機械的破碎などの処置を行うことによりIL-17A, IFN γ の低下作用は新鮮虫卵に比べ減弱した。特に、両処置を併用するとIL-17低下作用は消失した。

D. 考察

D-1 マラリア

AZMは生殖体形成、受精、オーキネート形成、オーシスト形成には影響を与えず、オーシストにおけるスポロゾイト形成を阻害する可能性が示唆された。AZM投与マウス吸血の唾液腺においては、対照群と比較して少ないながらもスポロゾイトが認められたことから、

今後これらのスポロゾイトの機能(=マウスへの感染性)についてさらに検討する必要がある。

D-2 住血吸虫

あらかじめ凍結融解・破碎などの処置を行っておくことにより虫卵のもつTh1応答低下作用やTh17応答低下作用が減弱したことから、生きた虫卵から免疫修飾物質が持続的に放出されることが、虫卵のもつ抗炎症効果を増強している可能性が示唆された。

E. 結論

E-1 マラリア

AZMはハマダラカ体内でマラリア原虫のスポロゾイト形成を有意に抑制する効果を有することがわかった。今後AZMの投与条件等を最適化し、より確実な伝播阻止効果を示すことができれば、赤内型原虫に対する増殖阻害効果とあわせて、流行地におけるAZMの集団投与に理論的根拠を与えることができる。

E-2 住血吸虫

Sm虫卵の投与により、感染マウスと同様のサイトカイン産生能の変化が観察された。感染において産出されている「生きた虫卵」が、強力な抗炎症効果をもたらしていると考えられた。現在、虫卵由来物質が作用している標的細胞について検討中である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Osada Y, Shimizu S, Kumagai T, Yamada S, Kanazawa T. *Schistosoma mansoni* infection reduces severity of collagen-induced arthritis via down-regulation of pro-inflammatory mediators. *Int J Parasitol* 164:457-464, 2009.

2. 学会発表

清水少一、新井明治、金澤 保
アジスロマイシンの *Plasmodium berghei* に対する伝播阻止効果の検討
第77回 日本寄生虫学会大会