

大会 長崎 2008年4月3、4日

M. Miyakoda, D. Kimura, Y. Yuda, Y. Chinzei, K. Kimura, K. Honma, K. Yui. Malaria-specific and non-specific activation of CD8⁺ T cells during blood stage of Plasmodium berghei infection, Keystone symposia, Malaria: Immunology, Pathogenesis and Vaccine Perspectives. p88, 339, June 8-13, 2008.

D. Kimura, M. Miyakoda, K. Kimura, K. Honma, Y. Yuda, Y. Chinzei, K. Yui. Malaria infection modulates cytokine responses of CD4⁺ T-cells in an antigen-non-specific manner. Keystone symposia, Malaria: Immunology, Pathogenesis and Vaccine Perspectives. p71, 209, June 8-13, 2008

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 マラリア特異的及び非特異的CD8⁺細胞の活性化と赤内型感染病態への効果 第61回日本寄生虫学会南日本支部大会 第58回日本衛生動物学会南日本支部大会 合同大会 沖縄 2008年11月1日、2日

K. Honma, D. Kimura, M. Miyakoda, T. Matsuyama, K. Yui, Differential roles of interferon regulatory factor-4 (IRF-4) in the production of Th2 cytokines in naïve vs. effector/memory CD4 T cells, 日本免疫学会学術集会、2008年12月1日～3日、京都、

D. Kimura, M. Miyakoda, K. Honma, K. Kimura, K. Yui, Malaria infection modulates IFN- γ production of memory CD4⁺ T-cells in an antigen-non-specific manner, 日本免疫学会学術集会、2008年12月1日～3日、京都、

M. Miyakoda, D. Kimura, K. Honma, K. Kimura, K. Yui, Activation of CD8⁺ T cells and its consequences in mice infected with blood stage malaria parasites, 日本免疫学会学術集会、2008年12月1日～3日、京都、

M. Miyakoda, D. Kimura, K. Honma, K. Kimura, M. Yuda, M. Chinzei, K. Yui, Inhibition of the malaria-specific memory CD8⁺ T-cell memory responses during infection with *Plasmodium berghei*, 43rd U.S.-Japan Joint Conference on Parasitic Diseases, 2009年1月7-8日、東京

H. 知的所有権の出願・登録状況
なし

マラリア原虫の細胞侵入動態の解析

研究分担者 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群について解析を進めた。

A. 研究目的

移動接合体を形成する AMA1 と RON タンパク質の間の結合を阻害すると、赤血球侵入が阻害されることが示されているため、移動接合体を形成するのに重要なドメインを明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

RON2 や RON4 を部分的に発現する遺伝子組換えマラリア原虫を作成し、タンパク質間の相互作用を検討する。

C. 研究結果

ネズミマラリア原虫 *Plasmodium yoelii* の RON2 および RON4 をヒト、ネズミマラリア原虫および他のアピコンプレクサ門原虫の相同体とのアライメントを基に、いくつかの領域に分けた。ネズミマラリア原虫のメロゾイト期に発現するロプトリー分子のプロモーター領域およびシグナルペプチド領域を組み込んだプラスミドと部分 RON タンパク質を組み込んだプラスミドを構築し、ネズミマラリア原虫への遺伝子導入を行う準備を整えた。

D. 考察

移動接合体複合体の構成成分について、種々の相同体を比較したところ、相同性が低い領域と相同性が高い領域が見出された。相同性が高い領域は、重要な機能を持つと考えられる。遺伝子導入実験により複合体形成に関する領域が同定できると考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Cao J, **Kaneko O**, Thongkukiakul A, Tachibana M, Otsuki H, Gao Q, Tsuboi T, Torii M. "Rhoptry Neck Protein RON2 forms a complex with microneme protein AMA1 in *Plasmodium falciparum* merozoites." *Parasitology International* (in press)
2. Tsuboi T, Takeo S, Iriko H, Jin L, Tsuchimochi M, Matsuda S, Han E-T, Otsuki H, **Kaneko O**, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, Sawasaki T, Torii M, Endo Y. "The wheat germ cell-free based production of malaria proteins for discovery of novel vaccine candidates." *Infection and Immunity* 76(4):1702-1708 (2008).
3. Mphande FA, Ribacke U, **Kaneko O**, Kironde F, Winter G, Wahlgren M. "SURFIN₄₁, a schizont-merozoite associated protein in the SURFIN family of *Plasmodium falciparum*." *Malaria Journal* 7:116 (2008).
4. Pandey K, Pant S, Kanbara H, Shuaibu MN, Mallik AK, Pandey BD, **Kaneko O**, Yanagi T. "Molecular detection of *Leishmania* parasites from whole bodies of sandflies collected in Nepal." *Parasitology Research* 103(2):293-7 (2008).
5. Pandey BD, Pandey K, **Kaneko O**, Yanagi T, Hirayama K. "Relapse of visceral leishmaniasis following miltefosine treatment in a Nepalese patient." *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* (in press).

2. 学会発表
1. 大槻均、金子修、入子英幸、竹尾暁、坪井敬文、Thongkukiattkul A、鳥居本美「BPA-11、ネズミマラリア原虫の赤血球結合分子 EBL の局在と病原性」第 77 回日本寄生虫学会大会プログラム・抄録集 p43、長崎 (2008. Apr. 3-4)
 2. 曹俊、Kaneko O、Thongkukiattkul A、Tachibana M、Otsuki H、Tsuboi T、Torii M「I-A-07、A complex formation of Rhopty Neck Protein 2 with a microneme protein, AMA1, in *Plasmodium falciparum*」第 77 回日本寄生虫学会大会プログラム・抄録集 p46、長崎 (2008. Apr. 3-4)
 3. 矢幡一英、前島一博、今本文男、金子修「マラリア原虫への外来遺伝子の導入と制御にむけて」第 16 回分子寄生虫学ワークショップ 草津 (2008. Aug. 3-6)
 4. Kaewthamasorn M、矢幡一英、Alexandre JSF、中澤秀介、鳥居本美、Sattabongkot J、Udomsangpetch R、金子修「マラリア原虫感染赤血球表面分子に対する選択圧」第 16 回分子寄生虫学ワークショップ 草津 (2008. Aug. 3-6)
 5. Kaewthamasorn M、Yahata K、Alexandre JSF、Nakazawa S、Torii M、Sattabongkot J、Udomsangpetch R、Kaneko O. "SY/SS01-O001: Positive diversifying selection on *Plasmodium falciparum* SURFIN4.2" XVIIth International Congress for Tropical Medicine and Malaria, Jeju, Korea (2008, Sep, 29- Oct, 3)
 6. Tsumori Y、Ndounga M、Tanabe K、Kaneko O、Culleton R. "P444: Urbanisation and malaria epidemiology in west Africa" XVIIth International Congress for Tropical Medicine and Malaria, Jeju, Korea (2008, Sep, 29- Oct, 3)
 7. 金子修、Kaewthamasorn M、矢幡一英、Alexandre JSF、中澤秀介、鳥居本美、Sattabongkot J、Udomsangpetch R「O23-02: マラリア原虫感染赤血球表面分子に対する選択圧」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 東京 (2008. Oct. 25-26)
 8. Pandey K、Kumar MA、Pandey BD、金子修、柳哲雄「O22-02: Diagnosis of visceral leishmaniasis by polymerase chain reaction of DNA extracted from Giemsa stained slides from Nepal」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 東京 (2008. Oct. 25-26)
 9. Cao J、Kaneko O、Thongkukiattkul A、Tachibana M、Otsuki H、Tsuboi T、Torii M. "A complex formation of Rhopty Neck Protein 2 with a microneme protein, AMA1, in *Plasmodium falciparum*." The American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 57th annual meeting, New Orleans, USA (2008. Dec. 7-11).
 10. Zhu XT、Kaewthamasorn M、Yahata K、Cao YM、Kaneko O "W-22: *Plasmodium vivax* subtelomeric transmembrane protein 1 (PvSTP1), a homolog of *P. falciparum* SURFIN, is highly polymorphic" 43rd Annual U.S.-Japan Joint Conference of Parasitic Diseases, Tokyo (2009, Jan, 7-8)
 11. Otsuki H、Kaneko O、Thongkukiattkul A、Tachibana M、Iriko H、Takeo S、Tsuboi T、Torii M "W-21: Erythrocyte-Binding-Like molecule and Virulence of *Plasmodium yoelii*" 43rd Annual U.S.-Japan Joint Conference of Parasitic Diseases, Tokyo (2009, Jan, 7-8)
 12. 金子修「マラリア原虫の赤血球侵入の分子基盤」第 7 回感染症沖縄フォーラム 那覇 (2009. Feb. 12-14)
 13. 矢幡一英、前島一博、今本文男、金子修「マラリア原虫への外来遺伝子の導入と制御にむけて」第 7 回感染症沖縄フォーラム 那覇 (2009. Feb. 12-14)
 14. 金子修「マラリアは世界的な問題だけど、科学はどこまで追い詰めてるの？」第 27 回日本国際保健医療学会西日本地方会 大阪 (2009. Feb. 28)
- F. 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(国際医学協力研究事業))
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

研究分担者 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500種類を用いて優れた抗マラリア活性を示す化合物(N-89)を見出した。この化合物はクロロキン耐性の熱帯熱マラリア原虫に対しても同程度の阻害活性を示した。また、*in vivo* のマウスを用いた実験系、N-89 は単剤でネズミマラリア原虫感染マウスを完治する能力を有することが判った。さらに、N-89 の作用機序の解析研究で数種のマラリア原虫タンパク質が N-89 の抗マラリア作用に関わることが判った。

A. 研究目的

クロロキンをはじめとする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含む化合物をもとに、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、マラリア流行地の状況を考慮した安価で大量に有機合成しやすい化合物を選抜する。並行して、現在マラリアの治療に使われるアルテミシンの構造に注目し、アルテミシニン誘導体の合成も同様に行う。これアルテミシニンは、現在、天然生薬資源より単離・精製して用いるため、生産量は自然環境の影響を受けやすい。そのため、安定な供給が困難で、複雑な構造のために完全有機合成品として提供するのには困難である。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行う。

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 O₂ 濃度 5%、CO₂ 濃度 5%、N₂ 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. 抗マラリア活性評価

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 CO₂ -O₂ -N₂ 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、CO₂ 濃度 5%、37℃ 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 5×10⁴ 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用いる。24 穴培養プレートにサンプル溶液を 5 μl 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 μl 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 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 EC₅₀ (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 EC₅₀ 値 / 熱帯熱マラリア原虫に対するサンプルの EC₅₀ 値

4. 抗マラリア作用機序の解析

マラリア原虫のステージ阻害能を検討するため、リング期、トロポゾイト期、及びスカイゾント期の熱帯熱マラリア原虫に各々の薬剤を作用させてステージの阻害能を調べる。分子標的の探索のため、2次元電気泳動法を用いたプロテオーム解析、及びトランスクリプトーム解析法を駆使して抗マラリア候補化合物処理時に変動する遺伝子群、及びタンパク質を解析する。標的分子と思われる分子について、MALDI-TOF/MS および nano-LC/MS/MS を用いてマラリア原虫のタンパク質を同定し、これらタンパク質が真の薬剤標的になるかをも解析する。

C. 研究結果

分子内に簡単なペルオキシド構造を有する500種の有機合成化合物の中から優れた選択毒性を示すN-89を見出した。この化合物は8員環にペルオキシド構造を有し、12員環の簡単な構造を持つ。通常、ペルオキシド構造は爆発性の危険性があると報告されているが、私が見出した化合物はペルオキシドを有する環の大きさが8員環と大きいため、爆発性はなく、室温でも安定であることが判った。また、クロロキン耐性の培養熱帯熱マラリア原虫を用いた実験でN-89はクロロキン感受性のマラリア原虫と同様の阻害活性を示した。この結果はN-89がクロロキン耐性マラリアにも効果を示すことを意味する。

ネズミマラリア原虫を用いた *in vivo* 実験でN-89はマラリア原虫感染マウスを50 mg/kgの3日間の経口投与で完治した。一方のアルテミシニン処理群では薬剤投与時のみ感染率の低下が見られたが、投与を中止すると再び血中マラリア原虫が増殖し、最終的にマウスは全数死亡した。この結果からN-89は単独でマラリア原虫に抗マラリア活性を示し、且つ、持続的に抗マラリア活性を維持することが予想される。安全性の評価の結果、N-89は2000mg/kgの単回経口投与でラットが生存し、最少致死量は2000mg/kg以上であった。この結果か

らN-89は臨床試験でも安全性が高いことが期待できる。N-89の作用機序の解析研究の結果、リング期にN-89を作用させると数種のマラリア原虫タンパク質と思われるスポットでの変動が見られ、これらタンパク質スポットをMALDI-TOF/MSおよびnano-LC/MS/MSを用いて解析した結果、タンパク質X、MSP関連タンパク質、及び14-3-3タンパク質が検出された。現在、これらタンパク質がN-89の標的分子でアルかどうかを証明するために組換えタンパク質の作成と結晶構造解析を行い、これらタンパク質の機能解析を行う計画を立てている。一方、アルテミシニンを基本骨格とする一連の化合物の中から種々の抗マラリア候補化合物を見出したので、現在阻害能について精査している。

D. 考察

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しており、アルテミシニンと比較して単剤で完治能力を示した。現在WHOはアルテミシニンを主とした併用法(Artemisinin-Combination Therapy (ACT))を推奨しているが、既にカンボジアを中心とした東南アジアでACTに耐性を示す熱帯熱マラリア原虫の出現が報告されている。従って、ACT耐性の克服にもN89は力を発揮すると考えられる。

今後、高等動物を用いた N-89 の抗マラリア活性の評価と安全性試験を行い、実際マラリア流行地で使用できる新規抗マラリア薬として開発していく予定である。また、N-89 の作用機序解析の研究で数種のマラリア原虫タンパク質を見出したので、これらタンパク質の組換えタンパク質を作成し、結晶構造の解析を行い、これらタンパク質がマラリア原虫の生死に直接関係するかどうかを検証する予定である。

E. 結論

安全で簡単な構造を有する環状過酸化化合物 (N-89) を見出した。この化合物は *in vitro* の培養熱帯熱マラリア原虫、及び *in vivo* のネズミマラリア原虫に対して優れた抗マラリア活性を示し、完治能力を合わせ持つことが判った。N-89 の作用機序を明らかにする為に、マラリア原虫タンパク質数種を同定し、これらタンパク質が N-89 の真の標的分子であるかどうかの研究を着手した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Jin, C., Kaewintajuk, K., Jiang, J., Jeong, W., Kamata, M., Kim, H.-S., Wataya, Y. and Park, H. *Toxoplasma gondii*: A simple high throughput assay for drug screening *in vitro*. *Exp. Parasitol.*, 121,

132-136, 2009.

2. 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.*, 31 (4), 703-708, 2008.

3. Ueno, Y., Kawada, K., Naito, T., Shibata, A., Yoshikawa, K., Kim, H.-S. and Wataya, Y. Synthesis and silencing properties of siRNAs possessing lipophilic groups at their 3'-terminal. *Bioorg. Med. Chem.*, 16, 7698-7704, 2008.

4. 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*, 92(1):9-17. 2008.

5. 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*, 27, 433-438, 2008.

6. 新しい抗マラリア薬の開発研究。金 惠淑、綿矢 有佑。新規素材探索-医薬品リード化合物・食品素材を求めて。シーエムシー出版社。108-114、2008。

4. 学会発表

1. 環状過酸化化合物のマンソン住血吸虫に対する効果～Proteomics によるアプローチ～。平本 晃子、佐藤 聡、熊谷 貴、下河原理江子、谷口 斎恵、太田 伸生、金 惠淑、綿矢 有佑。日本薬学会第 128 年会、2008 年 3 月 28 日～31 日、横浜。

2. 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 晃子、益山新樹、野島正朋、平岡 修、金 惠淑、綿矢 有佑。日本薬学会第 128 年会、2008 年 3 月 28 日～31 日、横浜。

3. 5-Fluoro-2'-deoxyuridine が誘導する細胞死分子機構の解析-ネクローシスとアポトーシスのオミクス解析-。佐竹 昭人、佐藤 聡、宮崎 英里子、平本 晃子、三宅 剛史、金 惠淑、綿矢 有佑。日本薬学会第 128 年会、2008 年 3 月 28 日～31 日、横浜。

4. 新規抗腫瘍ヌクレオシドアナログ

1-(3-*C*-ethynyl- β -D-*ribo*-pento-furanosyl)cytosine (ECyd, TAS-106) によるアポトーシス誘導機構の解明。

合田 風人、内藤 智春、横川 達史、金 惠淑、平本 晃子、松田 彰、佐々木 琢磨、福島 正和、北出 幸夫、綿矢 有佑。日本薬学会第 128 年会、2008 年 3 月 28 日～31 日、横浜。

5. 抗住血吸虫作用を有する環状過酸化化合物の作用機序の Proteome 解析。平本 晃子、佐藤 聡、森田 将之、谷口 斎恵、熊谷 貴、下河原理江子、太田 伸生、金 惠淑、綿矢 有佑。77 回日本寄生虫学会、2008 年 4 月 2 日、長崎。

6. 抗マラリア作用を有する環状過酸化化合物の標的分子の探索。加藤邦泰、高島康秀、池田知里、平本 晃子、益山新樹、野島正朋、平岡 修、金 惠淑、綿矢 有佑。77 回日本寄生虫学会、2008 年 4 月 2 日、長崎。

7. 新規抗マラリア薬の開発-抗マラリア活性を有する新規環状過酸化化合物の体内動態-。小道由香、中瀬由佳里、犀川優、佐伯真希、益山新樹、野島正明、川合覚、片岡洋行、金 惠淑、綿矢 有佑。77 回日本寄生虫学会、2008 年 4 月 2 日、長崎。

8. マラリア新規治療薬開発の基盤研究。金 惠淑、綿矢 有佑。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集会 合同大会。2008 年 10 月 25-26 日、東京。

9. 環状過酸化化合物の抗マラリア作用とその作用機構の解析。綿矢 有

佑。第6回分子寄生虫・マラリア研究
フォーラム。2008年10月9～10日、
松山。

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 新規抗住血吸虫剤。綿矢 有佑、
金 惠淑、平本晃子、佐藤聡、太田伸
生、熊谷貴、下河原理江子、谷口斎恵。
特願 2008-172663。

分担研究報告書

住血原虫症の伝播機構と治療薬に関する研究

研究分担者 片倉 賢 北海道大学大学院獣医学研究科教授

研究要旨

パキスタン中南部のインダス河低地流域における *Leishmania (L.) major* を主な原因とする皮膚リーシュマニア症の新しい流行地においてサシチョウバエの調査を行った。その結果、*Phlebotomus* 属と *Sergentomyia* 属のサシチョウバエが生息し、どちらも人を含む複数種の動物から吸血していることが明らかになった。また、薬用植物の *Brucea javanica* の乾燥種子抽出物から分離・精製したクアシノイドについて *Trypanosoma evansi* に対する *in vitro* における増殖抑制効果を検討した。その結果、C20 クアシノイドには低濃度で抗トリパノソーマ活性を示す化合物があり、構造的な特徴として ring A における diosphenol の存在ならびに C15 側鎖の性質がその活性に重要であることが明らかになった。

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サシチョウバエと保虫動物種を明らかにする。
- (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・精製し構造と活性との関係を明らかにする。

B. 研究方法

(1) 皮膚リーシュマニア症の患者約 200 人の皮膚生検材料について、リーシュマニア原虫のチトクローム b 遺伝子と kDNA の PCR 解析により、感染原虫種の同定を試みた。また、本流行地においてサシチョウバエをライトトラップを用いて採取し、18S rRNA 遺伝子の解析による種同定ならびに吸血血液のチトクローム遺伝子の解析による吸血源動物の特定を行った。(2) アジア産薬用植物であるニガキ科の *Brucea javanica* の乾燥種子から抽出した C20 タイプのクアシノイド類について *Trypanosoma evansi* の trypomastigote 培養虫体に対する増殖阻害活性を測定した。

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伝播疫学

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主要原虫種が *L. (L.) major* であることを、患者皮膚病変の DNA 診断の結果からも確認することができた。この低地流行地のサシチョウバエ約 500 個体を採取して解析したところ、全体の 14% が *Phlebotomus* 属の 2 種類(*P.*

papatasi と *P. alexandri*-like) であり、*L. (L.) major* を媒介するとされる *P. papatasi* の生息を確認することができた。*Phlebotomus* 属サシチョウバエは人、イヌ、ネズミ、ウシ、ヤギなどから吸血していることが明らかになった。一方、残りの 86% は変温動物を吸血するとされる *Sergentomyia* 属のサシチョウバエであり、少なくとも 5 種類に分類された。吸血源としては、変温動物のヤモリよりもむしろ、恒温動物である人、ウシ、ネズミ、水牛、ヤギ、ロバなど複数の哺乳類から吸血していることが明らかになった。

(2) 薬用植物から抽出したクアシノイドの抗トリパノソーマ活性

Brucea javanica の乾燥種子から抽出した C20 タイプのクアシノイド 11 種類について *Trypanosoma evansi* の trypomastigote 型虫体の *in vitro* における増殖阻害について検討した。その結果、bruceine A, bruceantinol, bruceine C, brusatol, bruceine B が最も低濃度 ($IC_{50} = 2.9 - 17.8 \text{ nM}$) で抑制することが明らかになった。クアシノイドの構造と抗トリパノソーマ活性との相関を調べたところ、C20 クアシノイドの ring A における diosphenol の存在ならびに C15 側鎖の性質が活性に重要であることが明らかになった。

D. 考察

(1) *L. (L.) major* の感染による皮膚リーシュマニア症患者がパキスタン中南部のインダス河低地帯に広がっていることが、患者の皮膚材料の DNA 診断の結果から確認することができた。現

地には *L. (L.) major* を媒介するとされる *Phlebotomus papatasi* が生息していることが確認されたが、これまでの調査では原虫が検出されていない。一方、変温動物を吸血するとされてきた *Sergentomyia* 属のサシチョウバエが、人を含む複数の哺乳類から吸血していることが明らかになった。近年、本属サシチョウバエからリーシュマニアやサシチョウバエ熱ウイルス（トスカーナウイルス）の遺伝子が検出されていることから、*Sergentomyia* 属のサシチョウバエがリーシュマニアを含む住血性病原体の伝播に関与しているかについても検討することが必要と考えられた。

(2) クアシンノイド類には抗癌活性や抗炎症作用のほかに、抗原虫（マラリア原虫、赤痢アメーバ、トキソプラズマ、バベシア）を有することが報告されている。これらのデータと比較すると、C20 クアシンノイドはトリパノソーマ原虫に対して選択的に作用し、明瞭な構造—活性相関があることが明らかになった。

E. 結論

リーシュマニア症の伝播疫学においてサシチョウバエの吸血源動物の特定は重要である。薬用植物は人や家畜の原虫症の広域治療薬の資源として有用である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsumoto J, Sakamoto K, Shinjyo 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
- 2) 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
- 3) Elkhateeb A, Yamasaki M, Maede Y, Katakura K, Nabeta K, Matsuura H: Anti-babesial quassinoids from the fruits of *Brucea javanica*. *Nat Prod Commun* 3, 145-148, 2008
- 4) Bawm S, Matsuura H, Elkhateeb A, Nabeta K, Subeki, Nonaka N, Oku Y, Katakura K: *In vitro* antitrypanosomal activities of quassinoid compounds from the fruits of a medicinal plant, *Brucea javanica*. *Vet Parasitol* 158, 288-294, 2008
- 5) Bhutto AM, Soomro FR, Katakura K: Leishmaniasis in Sindh, Pakistan: outbreak and

review of the literature. *J Pak Assoc Dermatol*, 18, 212-219, 2008

- 6) Nakao R, Mizukami C, Kawamura Y, Subeki, Bawm S, Yamasaki M, Maede Y, Matsuura H, Nabeta K, Nonaka N, Oku Y, Katakura K: Evaluation of efficacy of bruceine A, a natural quassinoid compound extracted from a medicinal plant, *Brucea javanica*, for canine babesiosis. *J Vet Med Sci* 71, 33-41, 2009
- 7) Katakura K: Molecular epidemiology of leishmaniasis in Asia (focus on cutaneous infections). *Curr Opin Infect Dis* in press

2. 学会発表

- 1) Bawm S, Subeki, Nakao R, Matsuura H, Takahashi K, Nabeta K, Matsumoto J, Nonaka N, Oku Y, Katakura K: *In vitro* antitrypanosomal activity of quassinoid compounds isolated from the medicinal plant *Brucea javanica*. 第 77 回日本寄生虫学会, 2008 年 4 月 (長崎)
- 2) 川村悠太、中尾亮、青島圭介、小寺亜由美、Baloch JH, Bhutto MK, Soomro FR, Bhutto AM, 野中成晃、奥祐三郎、片倉賢: パキスタンの皮膚リーシュマニア症流行地におけるサシチョウバエの分子疫学調査. 第 77 回日本寄生虫学会, 2008 年 4 月 (長崎)
- 3) Bawm S, Subeki, Nakao R, Matsuura H, Elkhateeb A, Takahashi K, Nabeta K, Nonaka N, Oku Y, Katakura K: Antibabesial and antitrypanosomal activity of quassinoid compounds isolated from the medicinal plant *Brucea javanica* 17th International Congress for Tropical Medicine and Malaria, 2008 年 9 月 (韓国)
- 4) Katakura K, Kawamura Y, Nakao R, Aoshima K, Tiwananthagorn S, Nonaka N, Oku Y, Uezato H, Kato H, Bhutto AM, Baloch JH, Soomro FR, Hashiguchi Y: Diagnosis and molecular epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Ecuador and Pakistan, 17th International Congress for Tropical Medicine and Malaria, 2008 年 9 月 (韓国)

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

I. 研究協力者

Saw Bawm, Subeki, Saruda Tiwananthagorn, 川村悠太、中尾亮、青島圭介、松本淳、野中成晃、奥祐三郎 (北海道大学大学院・獣医学研究科・寄生虫学); Ahmed Elkhateeb, 松浦英幸、鍋田憲助 (北海道大学大学院・農学研究科・生命有機化学); JH Baloch, MK Bhutto, FR Soomro, AM Bhutto (Chandka Medical College/Hospital, Pakistan); 上里博 (琉球大学・医学部・皮膚科学); 加藤大智 (山口大学・農学部・獣医衛生学); 橋口義久 (高知大学・医学部・寄生虫学)

Trypanosoma cruzi 感染宿主細胞におけるアポトーシス抑制と
酸化ストレス応答について

研究分担者 嶋田 淳子 群馬大学医学部教授

研究要旨：*Trypanosoma cruzi* 感染宿主細胞では宿主アポトーシス抑制因子 c-FLIP が nitrosylation されることにより細胞内に蓄積することが示唆された。また感染細胞では活性酸素種の生成がおり、関連遺伝子の発現が起きていることが明らかとなった。

A. 研究目的

Trypanosoma cruzi 感染により宿主アポトーシス抑制因子 c-FLIP の発現上昇機構を解明する。さらに感染による活性酸素種の産生を調べ、アポトーシス抑制との関連を解析する。

B. 研究方法

ヒト由来培養細胞に *T. cruzi* を感染させ、抗ニトロシステイン抗体により c-FLIP のニトロソ化を検討した。また感染後の一酸化窒素 (NO) 産生、NO 関連遺伝子発現を調べる。さらに、NO 阻害剤添加によるアポトーシスについて調べる。

(倫理面への配慮)

組み換え DNA 実験は群馬大学で承認されている。

C. 研究結果

原虫感染細胞では c-FLIP のニトロソ化が観察された。培養上清中の NO を測定したところ、感染 24 時間後に高い値を示した。NO 産生に関連する遺伝子発現では、iNOS、SOD、IL-8 などの発現上昇がみられた。NO 阻害剤添加により本アポトーシス抑制が回復した。

D. 考察

T. cruzi 感染により c-FLIP のニトロソ化が検出されたことから、c-FLIP のユビキチン化が起らず細胞内に蓄積する可能性が示唆された。また原虫感染により NO 産生、NO 関連遺伝子の発現がみられ、感染により NF- κ B の活性化が起る可能性が示唆された。本アポトーシス抑制のメカニズムの 1 つとして c-FLIP の NO 化が関与していることが明らかとなった。

E. 結論

T. cruzi 感染宿主細胞では宿主アポトーシス抑制因子 c-FLIP が nitrosylation されることにより細胞内に蓄積し活性酸素種の産生、関連遺伝子の発現が起きていることが明らかとなった。

F. 健康危険情報 (省略)

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
The Awaji International Forum on Infection and Immunity pp.104, 2008
第77回日本寄生虫学会大会、pp. 57, 2008

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

人獣共通寄生虫病の血清診断システムの開発と 幼虫移行症の病態解明

研究分担者 丸山治彦 宮崎大学医学部教授

研究要旨 2008年の寄生虫病血清診断でも、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るという近年の傾向に変化はなかった。血清診断で抗原に問題のある幼虫移行症と糞線虫症について、ブタ回虫およびベネズエラ糞線虫の幼虫から cDNA ライブラリを作製し、診断抗原として有望な遺伝子を得ることができた。ベネズエラ糞線虫の感染幼虫では、さらに経皮侵入に重要な働きをしていると考えられる亜鉛結合型メタロプロテアーゼの全長をクローニングすることができた。ベネズエラ糞線虫における遺伝子ノックダウン実験の実現可能性は高く、今後の研究は大いに発展するものと考えられる。

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 で推移し、毎年 100-200 例を寄生虫症と診断している（表 1）。

これらの血清診断は、ほとんどの場合虫体の

粗抗原を用いておこなわれているが、いくつかの問題点が明らかになっている。その第一は、多くの寄生虫が実験室内での維持ができないので、抗原の入手には常に困難がともなうことである。国内ではすでに入手不能のものもある。第二に、いくつかの疾患において粗抗原では擬陽性と真の陽性の判別が必ずしも容易でないことがあげられる。病歴や検査所見などから総合的に判断しているが、とくに動物由来の回虫類による幼虫移行症および糞線虫症では、あきらかに感染の可能性がないと考えられる症例でも抗体高値を示すことがある。

そこで、血清診断における抗原入手の問題を解決すると同時に判定にまつわる曖昧さの程度をできる限り減らすために、幼虫移行症と糞線虫症の診断用組換え抗原を作製する。組換え抗原では材料の入手を「天然物」に頼る必要がなく、しかも特異性の高い分子を選ぶことが可能であり、品質が一定しているのでカットオフ値の設定などが可能になるからである。これは、将来目指すべき血清診断の保険適用にとっても重要な課題である。

以上のような診断における問題点のほかに、幼虫移行症には、あまりよい薬剤がないという問題がある。現在の動物由来の回虫類による幼虫移行症に対する標準的な治療法はアルベンダゾールの内服だが、服用期間が長く（4-8 週間）

| 原因寄生虫 | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 |
|------------|------|------|------|------|------|
| イヌ回虫・ブタ回虫 | 100 | 103 | 82 | 101 | 77 |
| アニサキス | 0 | 4 | 4 | 6 | 3 |
| イヌ糸状虫 | 7 | 1 | 5 | 1 | 1 |
| 顎口虫 | 11 | 0 | 0 | 6 | 7 |
| 鉤虫 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| マンソン孤虫 | 5 | 4 | 3 | 6 | 4 |
| 有鉤囊虫 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 肺吸虫 | 45 | 30 | 37 | 46 | 38 |
| 肝蛭 | 5 | 6 | 2 | 3 | 0 |
| 住血吸虫 | 5 | 5 | 6 | 6 | 4 |
| 肝吸虫 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 糞線虫 | 11 | 2 | 1 | 1 | 1 |
| 回虫 | 0 | 1 | 1 | 1 | 2 |
| 日本海・広節裂頭条虫 | 1 | 0 | 2 | 0 | 1 |

表 1 過去 5 年間に宮崎大学医学部寄生虫学の血清診断結果
イヌ回虫・ブタ回虫による幼虫内臓移行症と肺吸虫症が症例のほとんどを占めている

肝機能障害などの副作用がしばしばみとめられる。幼虫移行症の病態はほとんど未知といってもよいので、その病態を解明するために、モデル寄生虫であるベネズエラ糞線虫の発現遺伝子解析をおこない、寄生線虫の体内移行のメカニズムを明らかにし、新規薬剤の開発に道を開きたい。

B. 研究方法

1. 診断用組換え抗原の作製

幼虫移行症では、まず最初にブタ回虫について組換え抗原を作製する。宮崎県内で採取されたブタ回虫のメスから虫卵を分離して幼虫包蔵卵を形成させ、ウサギに投与する。感染 5-6 日後にウサギ肺から幼虫を回収して、体内移行幼虫の cDNA ライブラリを作製する。cDNA クローンの塩基配列を決定して有用な診断用抗原を探索する。

糞線虫症の診断抗原では、ベネズエラ糞線虫の感染幼虫から cDNA ライブラリを作製し、ブタ回虫と同様にクローンの塩基配列を決定して有用な診断用抗原を探索する。

2. ベネズエラ糞線虫の体内移行メカニズム

ベネズエラ糞線虫の感染幼虫、体内移行期の幼虫、および腸管定着期の幼虫の cDNA ライブラリを作製し、それぞれの EST データベースを構築する。それぞれの発育段階特異的な遺伝子を同定し、局在などを調べるとともに、RNAi による遺伝子ノックダウンの手法を確立して遺伝子機能を *in vivo* で明らかにする。

C. 研究結果

1. 組換え抗原の作製

ブタ回虫の体内移行期幼虫の cDNA ライブラリを作製した。クローン数は 1.412×10^6 で、平均インサート長は 920bp であった。いくつかのクローンの塩基配列を決定したところ、その中にバンクロフト系状虫の診断抗原 SPX-1 protein と相同な遺伝子が含まれていた。今後さらに多くのクローンの塩基配列を決定するとともにこの遺伝子について検討を進める。また、ファージディスプレイによって患者血清と特異的に結合するクローンを選別する予定である。

糞線虫症の診断抗原では、ベネズエラ糞線虫の感染幼虫から cDNA ライブラリを作製し、470

クローンについて塩基配列を決定した。ユニークなクラスターが 194 個得られ、その中の 89 個が有意の注釈付けが可能であり、機能が推定できた。そのようなクラスターの中のひとつに、活性化した鉤虫の感染幼虫から分泌され、ワクチン候補分子として研究が進められている Ancylostoma-secreted protein (ASP) と相同なものがあつた。今後全長のクローニングと組換えタンパクの作製をおこなう。

2. ベネズエラ糞線虫の体内移行メカニズム

上述の、注釈付けが可能であつたベネズエラ糞線虫の感染幼虫 cDNA クラスターの中には、外界で宿主を待つ感染幼虫にとってきわめて重要と考えられる遺伝子が多数含まれていた。すなわち各種シャペロンタンパク、DNA 修復酵素、オートファジー関連タンパク、抗菌ペプチドなどである。また、糞線虫 *S. stercoralis* で報告されている、分子量約 40kDa のメタロプロテアーゼであるストロンジアスタシンと相同な cDNA もあつた。われわれはこの遺伝子について詳しい解析をおこなつた。

ベネズエラ糞線虫のストロンジアスタシンと思われる cDNA の ORF 全長の塩基配列を決定して予想アミノ酸配列を決めたところ、アスタシンファミリーに属する亜鉛結合型メタロプロテアーゼであり、N 末端シグナルペプチド、プロドメイン、プロテアーゼドメイン、Cub ドメインからなる構造をとっていた。予想される成熟タンパクの分子量は 38.8kDa であつた (図 1)。

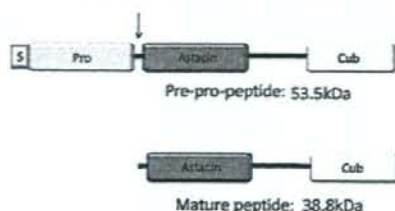


図 1 ベネズエラ糞線虫の感染幼虫メタロプロテアーゼの構造。成熟タンパクはアスタシンドメインと Cub ドメインから構成される (矢印は推定自己消化サイト)

RT-PCR によって発育段階における発現をみたところ、感染幼虫では強く発現しているが、幼虫が肺に達した段階ですでに mRNA は検出されなくなり、きわめて厳密な発現調節を受けていることが推察された (図 2)。



図2 ペネズエラ糞線虫のメタロプロテアーゼの発育ステージにおける発現 感染幼虫 (L3i) のみで発現がみとめられる

このプロテアーゼを始めとして、ペネズエラ糞線虫の遺伝子機能を明らかにするためには RNAi による遺伝子ノックダウンがもっとも直接的な方法である。しかしながら糞線虫類での RNAi の手法は確立されていない。そこで本研究において RNAi のための条件の検討をおこなった。

最初に、虫卵から感染幼虫の形成までを、組成が一定の培地をもちいた *in vitro* 培養のみでおこなえるかを試みた。感染ラットの糞便から飽和食塩水浮遊法で虫卵を集め、リン酸緩衝液 (PBS)、LB、DMEM 中で 27°C、3-4 日培養した。虫卵は孵化し生存率も良好であったがそれ以上は発育せず、*in vitro* で感染幼虫が得られることはなかった。

そこで次に、糞便培養の途中で幼虫を取りだして塩類溶液中のインキュベートが可能かどうかを調べた。可能であればそのステップで ds-RNA を加えることができるからである。感染ラット糞便をまず 5 時間通常の方法で糞便培養し、L1 虫体を回収して洗った後、PBS 中に 24 時間インキュベートし、虫体を正常ラット糞便に混ぜて糞便培養を 60 時間おこなった。すると感染幼虫が得られたことから、PBS インキュベートのステップで ds-RNA を加えれば RNAi ができる可能性がある。

次に、PBS インキュベート中に幼虫が RNA を取り込むかどうかを確かめるために、PBS 中に 1mg/ml の Alexa Fluor 488 標識ウシ血清アルブミン (BSA) を加えた。14 時間後に虫体を回収して蛍光顕微鏡で観察すると、虫体の腸管が蛍光を発していた (図3)。つまり L1 幼虫は PBS 中の物質を取り込むことが確認できた。

D. 考察

当教室で実施している寄生虫病血清診断の結果陽性と判定される症例の大多数は、食品媒介性の人獣共通寄生虫症である。具体的には肺吸虫

症とイヌ回虫やブタ回虫による内臓幼虫移行症であり、これだけで全体の 80%を超えている (表1)。

現行の決死診断では虫体粗抗原を用いているが、擬陽性と真の陽性の判別は必ずしも容易でない。とくに動物由来の回虫類による幼虫移行症および糞線虫症では、あきらかに感染の可能性がないと考えられる症例でも抗体高値を示すことがある。例えば、子イヌやブタの排泄物と接触する機会がなく、生肉や生レバーなど一切食べないという患者で、しかも幼虫移行症の症状としては非典型的であるにもかかわらず抗体高値という例がある。このような場合、やはり感染しているのか、それとも何らかの原因で産生された抗体がたまたまイヌ回虫・ブタ回虫抗原に結合しているだけなのか、なかなか判断できない。

現在もっとも信頼度の高い診断抗原は幼虫の分泌排泄抗原 (ES 抗原) であるとされ、われわれもイヌ回虫については幼虫 ES 抗原を用いているが、上述のように特異性は十分満足すべきものとはいえない。糞線虫症においては、確定診断は便中に幼虫を検出することであるが、現場では信頼度の高い血清診断の必要性は高い。

以上のような、幼虫移行症および糞線虫症の血清診断における問題点を解決するために、われわれは、ブタ回虫の体内移行幼虫およびペネズエラ糞線虫の感染幼虫の cDNA ライブラリを作製してクローンの塩基配列を網羅的に決定し、診断用抗原の候補分子を探索した。その結果、ブタ回虫ではバンクロフト系状虫の診断抗原 SPX-1 protein と相同な遺伝子、ペネズエラ糞線虫では *Ancylostoma*-secreted protein (ASP) と相同な遺伝子の cDNA を得ることができた。

今後はこれらの全長の塩基配列を決定するとともに組換えタンパクを作製し、診断用抗原と

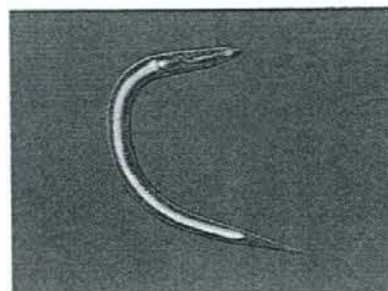


図3 ペネズエラ糞線虫の幼虫 (L1) による蛍光標識 BSA の取り込み

しての有用性を検討したい。さらに、新たな cDNA ライブラリを作製し、ファージディスプレイ法によって陽性患者血清に特異的に結合するクローンを選別し、新規の診断用抗原を得る方法も実施する予定である。

腸管寄生線虫の体内移行メカニズムの研究では、ベネズエラ糞線虫の感染幼虫においてきわめて興味深い遺伝子を多数同定することができた。その中でもっとも解析を加えたのは、分子量約 40kDa のメタロプロテアーゼである。なぜならば、この酵素は、われわれが以前報告していた、ベネズエラ糞線虫の感染幼虫の経皮侵入において重要な働きをしているプロテアーゼそのものと考えられたからである。実際に、RT-PCR によって発現パターンを調べると、われわれが以前報告した感染幼虫のメタロプロテアーゼの特徴と完全に一致することがわかった。今後は特異抗体を作製して局在の確認や経皮感染における働きを調べる予定である。

メタロプロテアーゼ以外の遺伝子に関しても、発現の発育段階における特異性を RT-PCR で検討し、さらに結合組織移行虫体、肺移行虫体、腸管膜に定着した虫体の cDNA をそれぞれ作製し、EST データベースを構築する。

今回クローニングしたプロテアーゼを始めとして、今後多数得られるであろうベネズエラ糞線虫の遺伝子機能を明らかにするためには、RNAi による遺伝子ノックダウンがもっとも直接的な方法である。しかしながら糞線虫類での RNAi の手法は確立されていない。

われわれのデータによれば、糞便培養の途中で塩類溶液にソーキングしても感染幼虫まで発育させることは可能であり、しかもこの段階の虫体は溶液中の高分子物質を取り込むことがわかった。すでにメタロプロテアーゼの ds-RNA は作成済みであるので、すぐにでも RNAi による遺伝子ノックダウンを試みる段階にまで達している。

E. 結論

ブタ回虫およびベネズエラ糞線虫の幼虫から cDNA ライブラリを作製し、診断抗原として有望な遺伝子を得ることができた。ベネズエラ糞線虫の感染幼虫では、さらに経皮侵入に重要な働きをしていると考えられるプロテアーゼの全長をクローニングすることができた。ベネズエ

ラ糞線虫における遺伝子ノックダウン実験の実現可能性はきわめて高く、今後の研究は大いに発展するものと考えられる。

G. 研究発表

著書

1. 丸山治彦 (2008) 幼虫移行症 (イヌ糸状虫症、動物由来の回虫症、顎口虫症、旋尾線虫症を含む) (今日の治療指針 2008, pp190-191) 朝倉書店
2. 丸山治彦 (2008) 人体寄生虫 (寄生と共生、石橋信義、名和行文編)、pp26-55. 東海大学出版会
3. 丸山治彦 (2009) 今あぶない寄生虫 (ぜん虫編) (知りたいサイエンスシリーズ: 寄生虫のふしぎ)、pp159-202. 技術評論社

総説

1. 木村幹男、丸山治彦、小田原隆 (2008) 帰国者の感染症 - 概説と最近の治療 - 特集「国際旅行と感染症」Circles 29: 7-10.
2. 丸山治彦、吉田彩子、小田原隆、木村幹男 (2008) 熱帯病・寄生虫症に対する国内未承認薬の輸入・保管と治療体制 (特集 オーフンドラッグの今) 月刊薬事: 50: 885-890.
3. 丸山治彦 (2008) 肺吸虫症 (特集・寄生虫感染症) 化学療法の領域 24: 1343-1350.
4. 丸山治彦 (2008) わが国における寄生虫病・熱帯病薬物治療の実際 治療シリーズ (31) 寄生虫病・熱帯病治療薬② 日本薬理学雑誌くすりとかからだファーマコロジカ: 132: 292-296.
5. 丸山治彦 (2008) 食物寄生虫感染症 medical forum CHUGAI 12: 33
6. 丸山治彦 (2008) イヌ回虫症 別冊日本臨床新領域別症候群シリーズ 呼吸器症候群 (第 2 版) I-その他の呼吸器疾患を含めて -pp211-215
7. 丸山治彦 (2008) 肺吸虫症 化学療法の領域 24: 1343-1350.

学会発表

1. Yukifumi Nawa, Haruhiko Maruyama: Clinical paragonimiasis and changing patterns in Japan. XVIIth International Congress for Tropical Medicine and Malaria (Sep 29-Oct 3, 2008, International Convention Center Jeju, Jeju, Korea)
2. Haruhiko Maruyama, Ayako Yoshida, Anna

Nishimaki: Ascarid larva migrants: raw meat lovers' uninvited guests. XVIIth International Congress for Tropical Medicine and Malaria (Sep 29-Oct 3, 2008, International Convention Center Jeju, Jeju, Korea)

3. Eiji Nagayasu, Pham Ngoc Doanh, Ana Nishimaki, Ayako Yoshida, Yoichiro Horii, Yukifumi Nawa, and Haruhiko Maruyama: Serological determination of the causative species of human paragonimiasis. Forum Cheju 14 (Oct. 2, 2008, International Convention Center Jeju, Jeju, Korea)

4. Ayako Yoshida, Nobuo Ohta, and Haruhiko Maruyama: Depletion of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cells down-regulates parasite clearance during early phase of *Plasmodium chabaudi* AS infection in A/J mice. 43rd. US-Japan Joint Conference on Parasitic Diseases (Jan 7-8, 2009, International Medical Center of Japan, Tokyo, Japan)

5. 吉田彩子, 荒木潤, 畠山金太, 丸山治彦「ワタリコウガイビルによる偽寄生の1例」第77回日本寄生虫学会大会(2008年4月2-4日、長崎市)

6. 吉田彩子, 太田伸生, 丸山治彦「CD4+CD25+制御性T細胞の*Plasmodium chabaudi* AS感染に与える影響」第77回日本寄生虫学会大会(2008年4月2-4日、長崎市)

7. 山内(川浦)稚代, 丸山治彦「ヴェネズエラ糞線虫の運動能力変化を支配する栄養成分の追求」第77回日本寄生虫学会大会(2008年4月2-4日、長崎市)

8. 吉田彩子, 太田伸生, 丸山治彦「CD4+CD25+制御性T細胞の*Plasmodium chabaudi* AS感染に与える影響」第38回日本免疫学会大会(2008年12月1-3日、京都市)

9. 西牧亜奈, 有賀俊二, 安藤健二, 川嶋将司, 森本高太郎, 兼松孝好, 丸山治彦「1匹のマムシを生食し, 抗体検査によってひとりはドロレス顎口虫症, ひとりはマンソン孤虫症と診断された例」第19回日本臨床寄生虫学会(2008年6月7日、京都市)

10. 赤尾信明, 吉川正英, 丸山治彦, 太田伸生, 名和行文「臨床寄生虫学雑誌データベースの構築とその利用」第19回日本臨床寄生虫学会(2008年6月7日、京都市)

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

住血原虫症の診断学

研究分担者 五十嵐郁男 帯広畜産大学 教授

研究要旨

グライコフォリン A(GPA)欠損マウスに致死性マウスバベシア原虫 *B. rodhaini* を感染させても、赤血球への侵入が認められず、マウスバベシア原虫の赤血球への侵入に GPA が重要である事が報告されていた。今回、*B. rodhaini* 感染実験を GPA 欠損マウスで繰り返す過程で、赤血球寄生を示す GPA 欠損マウス1頭が認められ、バベシア原虫は GPA 以外にも赤血球膜分子を侵入標的にしている可能性がある事が示唆された。また、*P. acnes* の接種によりバベシア感染に対する感染抵抗性が認められ、今後特異抗原との併用により、更なる感染防御効果が期待される。更に、ウマバベシア *T. equi* に対する Real-time PCR 法が確立され、定量的な遺伝子検出が可能となった。また、従来の ELISA よりも感度の高い犬バベシア原虫 *B. gibsoni* の BgTRAP を用いた ELISA 法が確立された。スーダンの馬ピロプラズマ症の疫学調査を ELISA 法と PCR 法を用いて行い、その有用性が認められた。

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感染防御機構および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、感染防御に関与する因子の検討

マウスバベシア原虫とグライコフォリン A(GPA)欠損マウスを用いて、パラジテミア、サイトカイン濃度、生存率等について検討を

行い、侵入機構に関する解析を行った。また、*Propionibacterium acnes* 死菌を用いてマウスバベシア感染に対する感染防御効果を検討した。

(2) バベシア症に対する診断法の検討

馬バベシア原虫 *Babesia. caballi* と *Theileria equi* の組み換え抗原を用いた ELISA および PCR によりスーダンにおける馬ピロプラズマ症の疫学調査を行った。また、*Theileria eqi* の定量的検出を目的とした Real-time PCR に関する検討を行った。更に犬バベシア原虫の組換え抗原を用いた ELISA 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、感染防御に関与する因子の検討

マウスバベシア原虫 *B. rodhaini* 感染実験を GPA 欠損マウスで繰り返す過程で、赤血球寄生を示す GPA 欠損マウス1頭が認めら

れた(OB1株)。OB1感染GPA欠損マウスでは約40%の赤血球寄生率が認められたが、全頭生残した。しかし、脾臓を摘出したOB1感染GPA欠損マウスは全例死亡した。OB1感染正常およびGPA欠損マウスにおけるサイトカイン濃度に差は認められなかったが、赤血球膜に対する自己抗体濃度が感染初期にGPA欠損マウスで低かった。

死菌 *P. acnes* で免疫後、マウスバベシア原虫を感染させたところ、免疫後2週以後から寄生率や死亡率の低下が認められた。

(2)バベシア症に対する診断法の検討

スーダンの馬血清131例について馬ピロプラズマ症の疫学調査をELISA法とPCR法を用いて行った。*B. caballi*と*T. equi*の感染率はELISA法でそれぞれ4.4%と63.5%であった。PCR法では、25.2%が*T. equi*陽性であったが、*B. caballi*陽性例は認められなかった。

また、*T. equi*に対するReal-time PCR法が確立された。培養原虫を用いた実験により、1.5/mlの原虫を検出可能である事が明らかとなった。また、ガーナとブラジルで得られたDNAを用いてReal-time PCRを行ったところ、65例中45例で原虫遺伝子が検出された。

さらに、犬バベシア原虫 *B. gibsoni* のスロンボスポンディン関連接合蛋白質(BgTRAP)を用いたELISA法を確立した。BgTRAPのELISA法は既存の組換え抗原を用いたELISA法よりも高い感度を示した。

D. 考察

致死性マウスバベシア原虫 *B. rodhaini* のGPA欠損マウスに感染させても、赤血球への感染は認められず、GPAが*B. rodhaini*の重要なレセプターである事は既に報告されている。今回、GPA欠損マウス赤血球に感染するマウスバベシア原虫(OB1株)を分離する事に成功した。この事は、バベシア原虫はGPA以外にも赤血球膜分子を侵入標的にしている可能性がある事を示している。また、OB1株はGPA欠損マウスでは約40%

の赤血球寄生率を示しが全例生残する。しかし、摘脾により死亡する事により、感染防御に脾臓が重要な役割を果たしている事が示唆された。また、*P. acnes*のバベシア感染に対する免疫賦活効果が認められ、今後特異抗原との併用により、更なる感染防御効果が期待される。

これまでに開発されたELISA法とPCR法を用いて、スーダンの馬ピロプラズマ症の疫学調査を行った。ELISA法は抗体を検出系であるため、原虫遺伝子を検出するPCR法より高い検出率が得られた。しかし、PCR法は現在原虫に感染をしている事を示す検出法であるばかりでなく、原虫の遺伝子の解析にも応用可能である。また、*T. equi*に対するReal-time PCR法が確立され、定量的な遺伝子検出が可能となった。この方法の有効性はガーナとブラジルの野外試料でも確認された。

したがって、これらの血清及び遺伝子診断法を用いた疫学調査を実施する事により、より詳細な疫学情報が得る事が可能となり、バベシア病にたいする予防対策等に利用される事が期待される。

犬バベシア原虫 *B. gibsoni* のBgTRAPを用いたELISA法が確立された。この方法はこれまで報告された組換え抗原を用いたELISA法よりも高い感度を示し、慢性感染の検出に今まで以上に有効な方法となる事が示された。

E. 結論

バベシアの赤血球への侵入や感染防御に関する新たな知見や新規の血清学的小および遺伝子診断法が開発された。また既に発表された血清及び遺伝子診断法を用いた疫学調査も実行された。今後バベシア症の新たな薬剤や予防法の開発や流行地での疫学調査に貢献するものと期待される。