

図3 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)

皮侵入にきわめて重要であるとの実験結果を得ており、分子構造を明らかにすることは、プロテアーゼ阻害剤等による感染阻止薬の開発につながると考えたからである。さらに、活性測定系が確立しているため、RNAi 実験系の検定のためにも有用である。

ベネズエラ糞線虫の 40kDa メタロプロテアーゼの 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 であった (図 3)。

RT-PCR によってメタロプロテアーゼ遺伝子の発育段階における発現をみたところ、前述の通り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 4)。この発現量の変動は、すでにわれわれが報告しているタンパクの活性データと完全に一致した。

遺伝子機能を *in vivo* で明らかにする方法としては RNAi による遺伝子ノックダウンがもっと

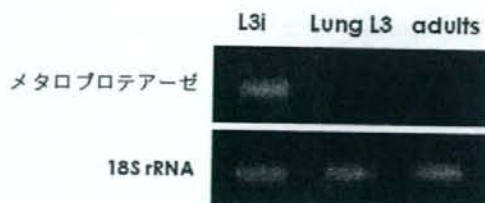


図4 ベネズエラ糞線虫のメタロプロテアーゼの各発育ステージにおける発現 感染幼虫(L3i)のみで発現している

RNAi の手法は確立されていないので、ベネズエラ糞線虫の幼虫において RNAi のための条件検討をおこなった。

最初に、幼虫が環境中の物質を体内に取り込むかどうかを調べるために、孵化直後の L1 幼虫、糞便培養開始 24 時間後の L2/L3 幼虫、および感染幼虫を準備し、蛍光標識ウシ血清アルブミン (BSA) を含むリン酸緩衝液 (PBS) 中に 3 時間インキュベートした。

その結果、孵化直後の L1 幼虫と糞便培養 24 時間後の L2/L3 幼虫では虫体の腸管が強い蛍光を発しており、BSA の取り込みが確認できた (図 3)。これに対して、感染幼虫 (L3i) では蛍光標識 BSA の取り込みは確認できなかった。つまり、感染幼虫の段階では RNAi による遺伝子ノックダウンは困難であると考えられた。

次に、孵化直後の L1 幼虫を蛍光標識した二重鎖 RNA とともにインキュベートしたところ、取り込みが確認できた。以上のデータはベネズエラ糞線虫の糞便培養段階の幼虫で RNAi が可能なことを強く示唆しており、早急にノックダウン実験を進める。

2) ブタ回虫

ブタ回虫の体内移行期幼虫を感染ウサギの肺から回収し cDNA ライブラリを作製した。クロ

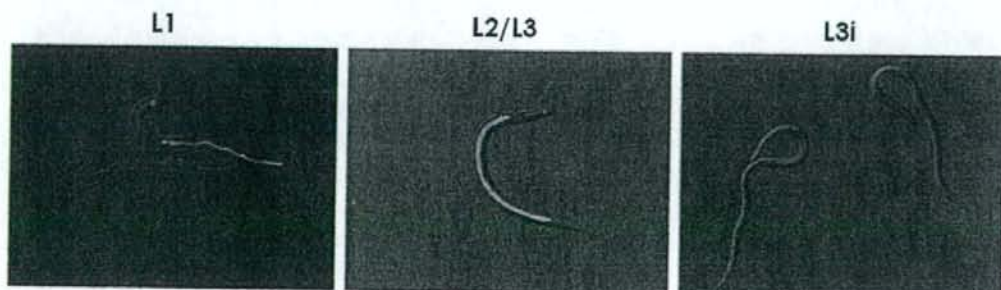


図5 ベネズエラ糞線虫の幼虫による蛍光標識BSAの取り込み 孵化直後のL1幼虫と糞便培養24時間後に回収したL2/L3幼虫はBSAを取り込んだが、感染幼虫では取り込みはみられなかった。

も直接的である。しかしながら糞線虫類での ーん数は 1.8×10^6 で、平均インサート長は 670bp

であった。cDNA クローンの塩基配列を決定したところ、多くはすでに登録されているブタ回虫の配列であったが、3.8%のクローンは新規配列と考えられた。

ブタ回虫の既存 cDNA データベースは、虫卵、機械的に孵化させた第 3 期幼虫、腸管の第 4 期幼虫、および成虫から構築されている。したがって、本研究で得られた新規配列は肺の段階でのみ発現している可能性が高い。今後、これらの遺伝子の詳細な解析を進める。

2. 血清診断用組換え抗原

血清診断用の抗原候補としては、ブタ回虫からは antigen WB14 (パンクロフト糸状虫の診断用抗原 SPX-1 protein と相同)、ベネズエラ糞線虫からは鉤虫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 immunodiagnostic antigen (NIE) が得られた。今後さらに候補抗原を探索するとともに、上記 cDNA から組換えタンパクを作製し、実用性を検討する。

D. 考察

イヌ回虫やブタ回虫による内臓幼虫移行症は、当教室で実施している寄生虫病血清診断で陽性と判定される症例の大きな部分を占める。これらの寄生虫は、本来の宿主である幼犬やブタに感染したのであれば、一定の体内移行の後すぐに小腸へ到達し、人体症例のように年余にわたる幼虫移行症という病態を引き起こすことはない。

不適合宿における幼虫は発育が停止しているが、これは発育のために必要なシグナルを宿主から受け取ることができないのが原因と考えられる。宿主シグナルには、幼虫の発育を直接誘導する因子と、発育すべき適切な場所へ導く目印のふた通りの場合が考えられる。現在のところ、腸管寄生虫におけるこのような発育シグナルについては、全く何もわかっていないと言ってよい。腸管寄生虫が、宿主の何を「感じ」ているのかを明らかにすることは、幼虫移行症の病態を解明して治療の役立てることのほかに、寄生虫の宿主特異性という、寄生虫学の黎明期から存在する大きな謎を解く鍵になるであろう。

今年度の研究では、ベネズエラ糞線虫の感染幼虫とブタ回虫の肺ステージ幼虫が発現してい

る遺伝子の分析をおこなった。

ベネズエラ糞線虫では、感染幼虫では発現しているのに成虫では発現していない遺伝子には、宿主侵入後すぐに発現が停止するものと、肺ステージまで発現が持続して成虫段階で停止するもののふた通りがあることがわかった。それぞれ異なった発現制御を受けているのは確実である。

ベネズエラ糞線虫でとくに解析を加えたのは、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と考えられ、分子の詳細を知ることは新しい感染阻止法につながると思ったからである。ベネズエラ糞線虫では RNAi の系が作動する可能性がきわめて高いことが蛍光標識 BSA の取り込みによって示されたので、可及的速やかに本プロテアーゼのノックダウン実験をおこなう予定である。

ベネズエラ糞線虫の寄生世代生活史の上でもっとも劇的な変化は、成虫への変化が始まる肺ステージでおこっていると考えられる。来年度は肺ステージ幼虫の cDNA を分析し、発育機構の解明を進めていきたい。具体的には、コンベンショナルな cDNA ライブラリを作製してクローンの塩基配列を決定しておおよその傾向をつかみ、肺ステージから発現がみられる遺伝子のノックダウン法を確立する。その上で、次世代シーケンサをもちいた定量的な超ハイスループット遺伝子発現解析をおこなう。

今年度のベネズエラ糞線虫の感染幼虫とブタ回虫の肺ステージ幼虫が発現している遺伝子の分析により、糞線虫症およびブタ回虫症の血清診断抗原として有望なものが得られた。

現行の血清診断では虫体粗抗原を用いているために擬陽性と真の陽性の判別が容易でない事例がある。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り、早急に解決すべき問題としてある。これらの組換えタンパクを作製して診断用抗原としての有用性を検討していきたい。

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た。ベネズエラ糞線虫の感染幼虫で発現している遺伝子の中から明らかに異なる発現制御を受けているものを同定した。両者の cDNA ライブラリから、ブタ回虫症と糞線虫症の診断抗原として有望な遺伝子をそれぞれ得ることができた。

G. 研究発表

著書

- 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
- 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
- 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

- 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.
- 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
- 丸山治彦 (2008) 肺吸虫症 化学療法の領域 24: 1343-1350.

学会発表

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

- 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)
- 吉田彩子, 荒木潤, 島山金太, 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)
- 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)
- 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)
- 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)
- 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)
- 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

- 特許取得
なし
- 実用新案特許
なし
- その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

蠕虫の腸管感染排除機構の解明

研究分担者 中西憲司 兵庫医科大学 教授

研究要旨 腸管寄生線虫の感染に伴い宿主マウスの脾臓内で好塩基球数の集積が誘導された。脾臓から精製した好塩基球は IL-3 を含む培地内で Th2 サイトカインを産生した。また MHC クラス II 抗原を発現し OVA ペプチドをナイーブ CD4 陽性 T 細胞に提示して OVA 特異的 Th2 細胞を誘導した。一方、感染マウスの腸管周囲組織で IL-33 陽性細胞の数が増加した。更に、C57BL/6 マウスに IL-33 単独投与すると杯細胞の活性化が誘導され、このようなマウスに経胃的（外科的）に Nb 成虫を投与したところ、24 時間以内に排虫が認められた。この様な IL-33 の排虫効果は IL-13KO では認められないが RAG2KO では認められたことから、IL-33 が T/B 細胞が不在でも IL-13 を誘導し、杯細胞が誘導され排虫が誘導されることがあきらかとなった。

研究目的

腸管寄生線虫 (*Nippostrongylus brasiliensis*; Nb) の感染実験から、感染で誘導された Th2 細胞の作用で、高 IgE 血症、好酸球増多、杯細胞増多が起こることが明らかとなっていた。最近、感染マウスの脾臓で好塩基球の集積が起こることが明らかとなった。そこで本研究では、好塩基球の Th2 応答誘導能を検討した。

最近、IL-33 がクローニングされ、orphan receptor の ST2 のリガンドであることが明らかとなった。そこで本研究では、IL-33 の腸管寄生虫の排除能も同時に検討した。

A. 研究方法

BALB/c マウスに Nb の L3 幼虫を感染させた。次に、感染 10 日目のマウス脾臓から non-T, non-B 分画を得、更にこの分画から c-Kit⁺FcεR1⁺ の好塩基球を得た。次に、得られた好塩基球を IL-3 存在下で培養し各種サイトカインの産生と、Th2 細胞誘導能を検討した。Th2 細胞の誘導は、APC、OVA ペプチド、OVA 特異的 T 細胞受容体遺伝子トランスジェニックマウスから得た CD4⁺T 細胞を培養し、OVA-特異的 Th2 細胞の誘導を FACS で調べた。次に、IL-33 の排虫機能を検討した。即ち、Nb 感染マウスの腸とその周辺組織での IL-33 発現を検討した。次に C57BL/6 (B6) マウス、B6 バック back の RAG2KO, ST2KO, MyD88KO, IL-13KO マウスに IL-33 を投与し、杯細胞

の誘導を組織学的に検討した。更に、IL-33を投与したマウスに経胃的（外科的）にNb成虫を投与し、24時間以内の排虫を調べることで、排虫能を調べた。

（倫理面の配慮）

動物実験は、関係法令を遵守し、「兵庫医科大学動物委員会」、「兵庫医科大学遺伝子組み換え委員会」の承認・許可された実験を行なっている。

B. 研究結果

正常マウスから得た脾臓由来好塩基に比して、Nb感染マウス脾臓由来の好塩基球は、IL-4、IL-6、IL-13等を大量に産生した。さらに、MHCクラスIIを発現し、OVAペプチドの共存下でナイーブOVA特異的CD4⁺T細胞をTh2細胞に分化誘導した。

Nb感染マウスでは腸とその周辺組織でIL-33陽性細胞を認めた。IL-33をC57BL/6マウスに投与すると杯細胞数の増加が誘導された。この様な増加はRAG2KOマウスでも認められたが、

F. 研究発表

■ 論文発表 ■

[原著]

ST2KO, MyD88KO, IL-13KOでは認められなかった。以上のことから、IL-33のシグナルはST2/MyD88依存的で、IL-13の産生を介して杯細胞からのムチン産生を誘導することが明らかとなった。最後に、IL-33を投与したマウスに経胃的（外科的）にNb成虫を投与したところ、24時間以内に完全排虫が認められた。

C. 考察

Nb感染マウスの脾臓由来の好塩基球はTh2細胞を誘導するAPCである。一方、IL-33は杯細胞を誘導してNb排除に貢献する。

D. 結論

Nb感染マウスの脾臓では、Th2細胞を誘導する好塩基球が誘導されていた。IL-33のシグナルはST2/MyD88依存的で、IL-13の産生を介して杯細胞からのムチン産生を誘導することで腸管寄生虫の排除に関わった。

E. 健康危険情報

該当せず。

Seki, E., Kondo, Y., Iimuro, Y., Naka, T., Son, G., Kishimoto, T., Fujimoto, J., Tsutsui, H. and Nakanishi, K. Demonstration of cooperative contribution of MET- and EGFR-mediated STAT3

phosphorylation to liver regeneration by exogenous suppressor of cytokine signalings. *J. Hepatol.*, 48, 237-245, 2008.

Andoh, T., Kishi, H., Motoki, K., Nakanishi, K., Kuraishi, Y. and Muraguchi, A. Protective effect of IL-18 on Kainate- and IL-1 β -induced cerebellar ataxia in mice. *J. Immunol.*, 180, 2322-2328, 2008.

Kosaka, H., Yoshimoto, T., Fujimoto, J. and Nakanishi, K. Interferon- γ is a therapeutic target molecule for prevention of postoperative adhesion formation. *Nat. Med.*, 14, 437-441, 2008.

Imai, Y., Hayashi, N., Yasuda, K., Tsutsui, H., Mizutani, H. and Nakanishi, K. Freshly isolated Langerhans cells negatively regulate naive T cell activation in response to peptide antigen through cell-to-cell contact. *J. Dermatol. Sci.*, 51, 19-29, 2008.

Kondo, Y., Yoshimoto, T., Yasuda, K., Futatsugi-Yumikura, S., Morimoto, M., Hayashi, N., Hoshino, T., Fujimoto, J. and Nakanishi, K. Administration of IL-33 induces airway hyperresponsiveness and goblet cell hyperplasia in the lungs in the absence of adaptive immune system. *Int. Immunol.*, 20, 791-800, 2008.

Sakishita, M., Yoshimoto, T., Hirota, T., Harada, M., Ohkubo, K., Osawa, Y., Fujieda, S., Nakamura, Y., Yasuda, K., Nakanishi, K. and Tamari, M. Association of IL-33 level and IL-33 genetic variant with Japanese cedar pollinosis. *Clinical & Exp Allergy*, 38, 1875-1881, 2008.

[総説]

中西憲司 IL-18 で誘導されるユニークなアレルギー性炎症. 医学の

あゆみ, 227, 367-371, 2008.

中西憲司 アトピー性皮膚炎と気管支喘息において Super Th1 が果たす役割. *アレルギー* 57 (8), 989-994, 2008

今村美智子, 筒井ひろ子, 藤元治朗, 中西憲司. TLR シグナルによる IL-1 と IL-18 と分泌機序. *臨床免疫・アレルギー科*, 50, 147-153, 2008

松葉沙織, 近藤祐一, 善本知広, 中西憲司. IL-33 とアレルギー. *臨床免疫・アレルギー科*, 50, 323-332, 2008.

■ 学会発表 ■

[指定講演]

中西憲司 アレルギー疾患の複数病因論と Th2 細胞の誘導機序の多彩さ (特別講演) 第58回日本アレルギー学会秋期学術大会, 11.27-29, 東京, 2008.

Nakanishi K IL-18 and atopic dermatitis :IL-18 might be a therapeutic target molecule for the treatment of infection associated allergic inflammation. (招待講演) *International investigative dermatology* 5.14-17, Kyoto, 2008.

[シンポジウム等]

中西憲司, 善本知広 IL1ファミリーサイトカインと自然型アトピー性炎症 (シンポジウム) 第58回日本アレルギー学会秋季学術大会, 11.27-29, 東京, 2008.

善本知広, 中西憲司 T細胞の異常とアレルギー : IL-18 による Super Th1 細胞の誘導と IL-33 による Th2 細胞

増強作用。(特別シンポジウム) 第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会 (アレルギー, 57, 1276) 11.27-29, 東京, 2008.

善本知広, 中西憲司 気道炎症疾患と自然免疫: IL-18/IL-33 による自然型気管支喘息の誘導. (シンポジウム) 第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会, (アレルギー, 57, 1301) 11.27-29, 東京, 2008.

Nakanishi, K. and Yoshimoto, T. Basophils induce and augment Th2 response. (シンポジウム) 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, 12.1-3, 京都, 2008.

Yoshimoto, T., Kosaka, H., Fujimoto, J., Nakanishi, K. IFN- γ is a therapeutic target molecule for prevention of postoperative adhesion formation. (シンポジウム) 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, 12.1-3, 京都, 2008.

Kondo, Y., Yoshimoto, T., Yasuda, K., Fujimoto, J., and Nakanishi, K. Administration of IL-33 induces airway hyperresponsiveness and goblet cell hyperplasia in the lungs in the absence of adoptive immune system. (ワークショップ) 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, 12.1-3, 京都, 2008.

Yasuda, K., Sasaki, Y., Kondo, Y., Matsumoto, M., Yoshimoto, T., Nakanishi, K. In vivo administration of IL-33 induces goblet cells capable of expelling *Nippostrongylus brasiliensis* in the absence of adaptive immune system. (ワークショップ) 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, 12.1-3, Kyoto, 2008.

中西憲司 術後の腸管癒着も免疫学的機序を基盤に形成される 第五回「免疫難病・感染症等の先進医療技術」第 5 回 (最終) 公開シンポジウム, 12.15, 東京, 2008.

善本知広, 小坂久, 大橋浩一郎, 中西憲司 好塩基球は IL-4 産生能と抗原提示能の両機能を持ち生体内で Th2 応答を誘導・維持・増強する。「免疫難病・感染症等の先進医療技術」第 5 回 (最終) 公開シンポジウム, 12.15, 東京, 2008.

松葉沙織, 善本知広, 杉村和久, 伊藤祐二, 北本祥, 森本麻衣, 三村治, 中西憲司 実験的アレルギー性結膜炎モデルにおける IL-33 の病因論的役割の解明。「免疫難病・感染症等の先進医療技術」第 5 回 (最終) 公開シンポジウム, 12.15, 東京, 2008.

今井康友, 安田好文, 今村美智子, 林伸樹, 善本知広, 山西清文, 筒井ひろ子, 水谷仁, 中西憲司 新規 DC 免疫法: 抗原とアジュバントでパルスした樹状細胞はナイーブマウスに迅速かつ顕著な Th2 応答を誘導する。「免疫難病・感染症等の先進医療技術」第 5 回 (最終) 公開シンポジウム, 12.15, 東京, 2008.

[一般講演]

安田好文, 佐々木由紀, 近藤祐一, 松本真琴, 善本知広, 中西憲司 IL-33 のマウス生体内投与は *Nippostrongylus brasiliensis* 排虫作用を有する杯細胞を誘導する. 第 77 回日本寄生虫学会大会, 4.3-4, 長崎, 2008.

Tarutani, M., Imai, Y., Tsuda, T., Nakanishi K. and Yamanishi, K. Psoriasis-like hyperplastic and inflammatory lesions produced by epidemic-specific, inducible activation of Raf in mice. *International investigative dermatology*, 5.14-17, Kyoto, 2008.

小坂久, 善本知広, 中西憲司, 藤元治朗
術後癒着形成は IFN- γ / STAT1 依存性の PAI 亢進による, 第 108 回日本外科学会定期学術集会, 5.15-17, 長崎, 2008.

Kosaka, H., Yoshimoto, T., Nakanishi, K., and Fujimoto, J., Role of NKT cell-driven IFN- γ in postoperative adhesion formation. *DDW(AGA)*, 5.17-22, San Diego • USA, 2008.

今井康友, 林伸樹, 安田好文, 筒井ひろ子, 水谷 仁, 中西憲司 表皮ランゲルハンス細胞は、ペプチド抗原によるナイーブ T 細胞の活性化を細胞間相互作用によって抑制する, 第 29 回日本炎症・再生学会, 7.8-10 東京, 2008.

安田好文, 佐々木由紀, 近藤祐一, 松本真琴, 善本知広, 中西憲司
IL-33 のマウス生体内投与は獲得免疫応答非依存性に *Nippostrongylus brasiliensis* 排虫作用を有する杯細胞を誘導する, 第 73 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会, 7.10-12, 北海道, 2008.

今村美智子, 安田弘文, 審良静男, 筒井ひろ子, 藤元治朗, 中西憲司
TLR を介した caspase-1 活性化における TRIF の必要性. 第 73 回インターフェロン・サイトカイン学会学術集

会, 7.10-12, 北海道, 2008.

小坂久, 善本知広, 中西憲司, 藤元治朗
腹腔内術後癒着形成メカニズムの解明と予防, 第 63 回日本消化器外科学会総会, 7.16-18, 北海道. 2008.

Yasuda, K., Sasaki, Y., Kondo, Y., Matsumoto, M., Yoshimoto, T., Nakanishi, K. In vivo administration of IL-33 induces goblet cells capable of expelling *Nippostrongylus brasiliensis* in the absence of adaptive immune system. The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 9.7-11, Hyogo, 2008.

善本知広, 松葉沙織, 中西憲司
IL-27 による新規抗アレルギー作用; IL-27 による気管支喘息とアレルギー性結膜炎発症の抑制. 第 20 回日本アレルギー学会春季学術大会, 6.12-14, 横浜, 2008.

松葉沙織, 善本知広, 安田好文, 池田誠宏, 三村治, 中西憲司
RW 特異的 T 細胞株を用いたアレルギー性結膜炎モデル - IL-33 の病因的役割の解析 -

第 20 回日本アレルギー学会春季学術大会, 6.12-14, 横浜, 2008.

Imamura, M., Tsutsui, H., Yasuda, K., Akira, S., Fujimoto, J. and Nakanishi, K. Requirement of MyD88 and TRIF but not ATP signaling for TLR4-mediated caspase-1 activation. The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity. 9.7-11. Hyogo, 2008.

松葉沙織, 善本知広, 安田好文, 池田誠宏, 三村治, 中西憲司
ブタクサ花粉特異的実験的アレルギー性結膜炎に対する IL-33 の病因的役割

の解析. 第 38 回日本免疫学会総会・
学術集会, 12.1-3, 京都, 2008.

小坂久, 善本知広, 中西憲司, 藤元治
朗 HGF を用いた術後腹腔内癒着形
成予防法, 16th JDDW, 10.1-4, 東京,
2008.

川浩介, 筒井ひろ子, 松本譽之, 中
西憲司 マウスエンドトキシシンシ
ョックで認める、免疫応答を基盤とし
た PAI-1 の発現誘導. 第 38 回免疫
学会総会・学術集会, 12.1-3, 京都,
2008.

Imamura, M., Tsutsui, H., Yasuda, K.,
Akira, S., Fujimoto, J., and Nakanishi,
K. TLR4 を介した caspase-1 活性化
における MyD88 と TRIF の必要性.
第 38 回免疫学会総会・学術集会,
12.1-3, 京都, 2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況

■ 特許 ■

特許名称: Th2細胞誘導用組成物およ
びTh2型疾患の治療組成物、ならびに
これらの利用. 発明者名: 善本知広、
中西憲司 権利者名: 兵庫医科大学
出願番号: 特願2008-281930 出願年月
日: 2008.10.31

特許名称: 実験動物の腸管癒着を形
成する方法、腸管癒着実験動物
の製造方法、腸管癒着抑制剤のス
クリーニング方法及び腸管癒着抑制剤.
発明者名: 善本知広、藤元治朗、中
西憲司 権利者名: 兵庫医科大学
国際出願番号: PCT/JP2008/05229 出
願年月日: 2008.2.14

エキノкокスの嫌氣的呼吸鎖の生理機能の解明

研究分担者 北 潔 東京大学大学院医学系研究科

研究要旨 寄生原虫のミトコンドリア呼吸鎖は宿主哺乳類のミトコンドリアと大きく異なった性質を持ち、しかもその増殖に必要な不可欠である事から特異的阻害剤による抗寄生虫薬の重要な標的となる。本研究はエキノкокスに特異的な代謝系を標的とする治療薬の開発を目的としている。本年度の研究の結果、我々は蠕虫類に共通な嫌氣的呼吸鎖である NADH-フマル酸還元系がエキノкокスにおいてもその生存に必須である事を見出し、特異的な阻害効果を示すリード化合物を見出す可能性は高い。

A. 研究目的

われわれは寄生適応に必要な基本的要素である各種代謝系のなかでも特にエネルギー代謝系に焦点を絞り、寄生虫ミトコンドリアが宿主と極めて異なったエネルギー代謝系を作動させることによって宿主内の環境に適応していることを明らかにしてきた。この成果をふまえ蠕虫のモデル系としての回虫、また寄生原虫としてマalaria原虫やトリパノソーマのミトコンドリア電子伝達系の特異性を解析することにより、最終的に化学療法標的として捉えたいと考えている。

エキノкокス症はわが国でも患者数が減少せず、一方北海道におけるキタキツネの感染率は50%を超えている。この条虫感染症の最大の問題点は効果的な治療薬がない事であり、病原体である多包虫を殺滅する薬剤の開発は性質の類似している単包虫も含め、国際的な視野からも意義深い研究である。本研究では、これまでに我々が得て来た寄生虫ミトコンドリアに特異的なエ

ネルギー代謝系を標的とした薬剤開発を進め、エキノкокス症に対する有効な治療薬のリード化合物を見出す事を目的としている。

B. 研究方法

条虫類に属するエキノкокスは同じく寄生蠕虫に属する線虫類の回虫と同様に腸管寄生虫であり、その生活環から考えて、低酸素の環境下に嫌氣的呼吸鎖を利用して可能性があると予想された。そこでミトコンドリアにおけるエネルギー代謝、特に回虫などで見られる嫌氣的呼吸鎖であるNADH-フマル酸還元酵素系を中心とする呼吸系の解析を進めるため、活性を保持したミトコンドリアの単離法を確立し、各種阻害剤の効果を調べる系の構築を試みた。

（倫理面への配慮）

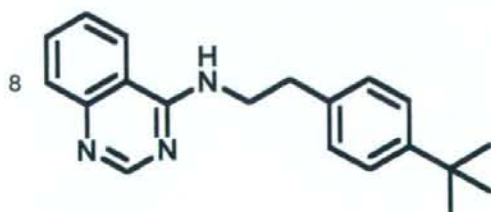
本研究は大部分がin vitroの実験系であり、倫理面の問題はない。また、コトンラットを用いた感染実験は北海道大学、北海道立衛生研究所の動物実験倫理規定に基づい

て行った。

C. 研究結果

エキノコックスを感染させたコットンラットの肝臓より原頭節を分離し、その組織・細胞を破碎して遠心分離を繰り返す事によって微量ではあるが、生化学的解析に充分耐え得るミトコンドリア画分の調製法を確立した。この画分への宿主ミトコンドリアの混入は数種の哺乳類ミトコンドリア呼吸鎖酵素に対する抗体を用いて調べた Western ブロットから、検出限界以下である事が判った。このミトコンドリアを用いて、嫌氣的呼吸鎖である NADH-フマル酸還元系の活性と好氣的呼吸鎖である NADH オキシダーゼ活性を比較すると、前者は 45 nmol/min/mg であるのに対して、後者は 9.1 nmol/min/mg と主要な活性は嫌氣的呼吸鎖であった。

この NADH-フマル酸還元系に対する特異的阻害剤のスクリーニングを行った所、哺乳類より低濃度でエキノコックスの呼吸系を阻害するキナゾリン系の化合物を見出した。これは以前、線虫の NADH-キノン還元酵素 (複合体 I) に選択的に作用する事を見つけていた化合物であるが (Yamashita *et al.* 2004, BBA 1608:97-103)、中でも 8 位に水酸基を持つ誘導体がよりエキノコックスに選択的に作用する事が判った。



(a) 6-NH₂

- (b) 7-NH₂
- (c) 8-OCH₃
- (d) 8-OH
- (e) 6-NHCO(CH=CH₂)
- (f) 8-OCH₂CH₃
- (g) 8-OCH(CH₃)₂

次に原頭節の培養系を用いてその殺滅効果を検討した所、現在治療に使われているアルベンダゾールは対照とほぼ同様に効果を示さなかったが、ミトコンドリア呼吸鎖の複合体 I の特異的阻害剤として知られているロテノンを添加した場合は、約 1 週間で原頭節は死滅した。一方、8-OH キナゾリンはさらに高い効果を示し、5 日後には全ての原頭節を完全に殺滅した。

さらに、原頭節ミトコンドリア呼吸鎖の性質を調べるために、他の酵素活性や阻害剤の効果を検討した所、好氣的呼吸鎖の末端酸化酵素の阻害剤 KCN により NADH オキシダーゼ活性が一部阻害されることから哺乳類型のシトクロム c 酸化酵素の存在が示唆された。しかし、KCN 存在化でも残存活性が大きく、他に酸素と反応する部位があると考えられた。この残存 NADH オキシダーゼ活性は複合体 II の阻害剤であるマロン酸の添加により大部分が阻害された。これは複合体 II が酸素と反応することを示している。

複合体 II は哺乳類など好気性生物では TCA 回路におけるコハク酸酸化系として機能しているが、低酸素環境下の NADH-キノン還元系では逆反応であるキノール-フマル酸還元酵素 (QFR) として機能している。この複合体 II と酸素との反応を検討するために、ブタ回虫およびエキノコックスのミトコンドリアを用いて、NADH-フマル酸還元

系の活性と QFR を介した NADH-酸素還元反応を比較した。その結果、ブタ回虫の酵素とエキノコックスでは酸素との反応性に大きな違いが見られた。ブタ回虫ではフマル酸還元に対して 85% と高い効率で酸素と反応したのに対し、エキノコックスではフマル酸還元反応の 16% しか酸素と反応しなかった。酸素との反応においては活性酸素が発生すると考えられるため、エキノコックスの QFR の方が酸素共存下での電子放出の低い、安全性の高い酵素であると考えられる。

D. 考察

エキノコックス症はその治療にアルベンダゾールなどが一部用いられているが、特効薬と呼ぶにはほど遠い。途上国に限らず、先進国にもその感染は多く見られ、わが国でも北海道の多包条虫症はキタキツネの高い感染率と相まって、大きな問題となっている。このエキノコックスの特異的な代謝系を標的として新規の薬剤開発をめざすのが本研究の目的である。

この目的のためにエキノコックスの生活環を考えると、ほとんど酸素を利用していないのではないかと考えられた。すなわち成虫は酸素分圧の低い腸管に寄生し、また唯一外界に接する虫卵のステージはエネルギーを必要とする発生は終わっているので酸素は必要としない。また幼虫の生息する肝臓などの環境も包虫の状態では酸素の供給は低いと考えられる。今回、原頭節のミトコンドリア呼吸鎖を解析した結果、一部、好氣的な哺乳類型のシトクロム c 酸化酵素を末端酸化酵素とする系も存在するが、主成分は小腸に生息する回虫成虫同様、蠕虫類に見られる NADH-フマル酸還元系である事が明らかになった。そしてこの系を特

異的に阻害するキナゾリン系化合物が実際に原頭節を短期間に全て削減する事が判った。この事は NADH-フマル酸還元系が原頭節の生存に必須であり、化学療法の好適な標的である事を示している。予備的な実験から 8-OH キナゾリンはシストに対しても効果を示し、実際の治療にも有効である可能性が高い。今後、さらに効果の高い薬剤のスクリーニング、動物を用いた感染治療実験によって、真のリード化合物が見出される可能性は高いと考えられる。

今回、生化学的解析から複合体 II と酸素の反応に関する興味深い知見が得られた。複合体 II と酸素の反応に関しては活性酸素の発生とも関連し、最近では、発ガンや寿命の観点から臨床を中心としたグループで研究が進められている。

複合体 II の持つ酸化還元中心それぞれが保有できる電子の最大数は FAD が 2 個、鉄硫黄クラスターがそれぞれ 1 個ずつ、基質のキノンは 2 個の電子で酸化還元を行う NADH-フマル酸還元系では複合体 II は QFR として機能する。すなわちフマル酸を還元する酵素であり、フマル酸の反応部位である FAD に電子がある方がフマル酸との反応に有利であると考えられる。電子供与体キノールは 2 電子を酵素に供与するため、還元型の酵素は FAD に 2 個の電子か FAD に 1 個、鉄硫黄クラスターのいずれかに 1 個の電子を有すると予想される。QFR と逆反応のコハク酸酸化を行う大腸菌のコハク酸脱水素酵素では二つの電子は主の一つ目と三つ目の鉄硫黄クラスターに留まると考えられており、この酵素の場合は酸素との反応は検出されていない。この事からフマル酸還元活性の高い QFR と酸素との反応は表裏一体の現象とも考えられる。

また一方、フマル酸還元反応と酸素との反応は必ずしも相関するわけではないことが判り、エキノコックスのQFRの更なる解析により、酸素との反応性を低減する一方、フマル酸還元反応を維持する機構について知見を得る事ができると考えられる。

E. 結論

本研究ではエキノコックスに特異的な代謝系を標的とする治療薬の開発を目的としている。本年度の研究の結果、我々は蠕虫類に共通な嫌氣的呼吸鎖である NADH-フマル酸還元系がエキノコックスにおいてもその生存に必須である事を見出した。今回のキナゾリン誘導体をはじめとして、特異的な阻害効果を示すリード化合物を見出し、実用化へと進める可能性は高い。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Change of subunit composition of mitochondrial complex II (Succinate-ubiquinone reductase/Quinol-fumarate reductase) in *Ascaris suum* during the migration in the experimental host. Iwata F., Shinjyo N., Amino H., Sakamoto K., Islam M. K., Tsuji N. and Kita K. (2008) Parasitol. Int. 57, 54-61
- 2) Anaerobic NADH-Fumarate Reductase System Is Predominant in the Respiratory Chain of *Echinococcus multilocularis*, Providing a Novel Target for the Chemotherapy of Alveolar Echinococcosis. Matsumoto

- J., Sakamoto K., Shinjyo N., Kido Y., Yamamoto N., Yagi K., Miyoshi H., Nonaka N., Katakura K., Kita K. and Oku Y. (2008) Antimicrob. Agents. Chemother. 52, 164-170
- 3) Mutation underlying resistance of *Plasmodium berghei* to atovaquone in the quinone binding domain 2 (Qo₂) of the cytochrome *b* gene. Siregar J. E., Syafruddin D., Matsuoka H, Kita K., and Marzuki S. (2008) Parasitol. Int. 57, 229-232
- 4) A cryptic algal group unveiled: a plastid biosynthesis pathway in the oyster parasite *Perkinsus marinus*. Matsuzaki M., Kuroiwa H., Kuroiwa T., Kita K. and Nozaki H. (2008) Mol. Biol. Evolution 25, 1167-1179
- 5) Malaria parasites reproduce with the same manner as flowering plants. Hirai M., Arai M., Mori T., Kawai S., Kita K., Kuroiwa T. and Matsuoka H. (2008) Current Biol. 18, 607-613
- 6) Coinfection with nonlethal murine malaria parasites suppresses pathogenesis caused by *Plasmodium berghei* NK65. Niikura M., Kamiya S., Kita K. and Kobayashi F. (2008) J. Immunol. 180, 6877-6884
- 7) Structures of *Trypanosoma cruzi* dihydroorotate dehydrogenase complexed with substrates and products: Atomic resolution insights into mechanisms of dihydroorotate oxidation and fumarate reduction. Inaoka, D. K., Sakamoto, K., Shimizu, H., Shiba T., Kurisu, G., Nara, T., Aoki,

- T., Kita, K. and Harada, S. (2008) *Biochemistry* 47, 10881-10891
- 8) Screening of detergents for solubilization, purification and crystallization of membrane proteins: a case study on succinate:ubiquinone oxidoreductase from *Escherichia coli*. Shimizu, H., Nihei, C., Inaoka, D. K., Mogi, T., Kita, K. and Harada, S. (2008) *Acta Crystallographica F* 64, 858-862
- 9) Identification of New Inhibitors for Alternative NADH Dehydrogenase (NDH-II). Mogi, T., Matsushita, K., Murase, Y., Kawahara, Miyoshi, H., Ui, H., Shiomi, K., Ômura, S. and Kita, K. (2009) *FEMS Microbiol. Lett.* 291, 157-161
- 10) Mitochondrial Dehydrogenases in the Aerobic Respiratory Chain of the Rodent Malaria Parasite *Plasmodium yoelii yoelii*. Kawahara, K., Mogi, T., Tanaka, Q. T., Hata, M., Miyoshi, H. and Kita K. (2009) *J. Biochem.* 145, 229-237
- 11) Antibiotics LL-Z1272 identified as novel inhibitors discriminating bacterial and mitochondrial quinol oxidases. Mogi, T., Ui H., Shiomi, K., Ômura, S., Miyoshi, H. and Kita, K. (2009) *Biochim Biophys. Acta (Bioenergetics)* 1787, 129-133
- 12) Fasting induced hypothermia and reduced energy production in mice lacking Acetyl-CoA Synthetase 2. Sakakibara, I., Fujino, T., Ishii, M., Tanaka, T., Shimosawa, T., Miura, S., Zhang, W., Tokutake, Y., Yamamoto, J., Awano, M., Iwasaki, S., Motoike, T., Okumura, M., Inagaki, T., Kita, K., Ezaki, O., Naito, M., Kuwaki, T., Chohnan, S., Yamamoto, T., Hammer, R. E., Kodama, T., Yanagisawa, M. and Sakai, J. (2009) *Cell Metabolism* 9, 191-202
- 13) Novel Mitochondrial Complex II Isolated from *Trypanosoma cruzi* is Composed of Twelve Peptides Including a Heterodimeric Ip Subunit. Morales, J., Mogi, T., Mineki, S., Takashima, E., Mineki, R., Hirawake, H., Sakamoto, K., Ômura, S. and Kita, K. (2009) *J. Biol. Chem.* 284, 7255-7263
- ## 2. 学会発表
- 1) 北 潔 寄生虫の生活環におけるダイナミックなエネルギー代謝の変動 第81回日本生化学会大会第・31回日本分子生物学会年会 合同大会平成20年12月
- 2) Madhavi Paraganama, Kimitoshi Sakamoto, Kiyoshi Kita *Ascaris suum* quinol fumarate reductase can produce high amount of reactive oxygen species. 第81回日本生化学会大会第・31回日本分子生物学会年会 合同大会平成20年12月
- 3) Purification and crystallization of drug target trypanosome alternative oxidase (TAO) from *Trypanosoma brucei* Y. Kido, K. Sakamoto, S. Fujioka, M. Harada, D. Ohmori, F. Yamakura, H. Saimoto, Y. Yabu, T. Suzuki, S. Harada, K. Kita XVIIth International Congress for Tropical Medicine and Malaria 2008, Sept. Cheju, Korea

- 4) Novel subunit organization of the respiratory Complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase) in *Trypanosoma cruzi*
Morales, J., Sakamoto, K., Kita, K.
XVIIth International Congress for Tropical Medicine and Malaria 2008, Sept. Cheju, Korea
- 5) Toward anti-cryptosporidial chemotherapy by ascofuranone, specific and potent inhibitor against

alternative oxidase (AOX)
Harada, M., Fujimoto, Y., Nakamura, K., Kido, Y., Sakamoto, K., Yabu, Y., Suzuki, T., Yoshinari, S., Kita, K.
XVIIth International Congress for Tropical Medicine and Malaria 2008, Sept. Cheju, Korea

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

研究分担者 大前比呂思 国立感染症研究所・寄生動物部 室長

研究要旨 寄生蠕虫症は、顧みられない熱帯感染症：Neglected Tropical Diseases(NTDs)と国際的にされる疾患群の約半数を占めるが、現在、集団治療を中心とした対策の進展により、疫学的状況は世界的に大きく変化している。従って、今後の蠕虫症の検査診断技術の開発にあたっては、国際的に標準とされる糞便検査や現在一般的とされる補助診断法の意義を、集団治療の普及によって生じた最近の大きな疫学的変化の中で再検討することも重要である。そこで今年度は、集団治療による morbidity 変化が顕著に現れる住血吸虫症を対象として、住血吸虫感染者が示す病態や肝機能検査・免疫血清検査の異常を、プラジカンテルによる集団治療が本格化する前後した。フィリピン、レイテ島の Schistosomiasis Research Hospital の受診患者を経年的に比較すると、集団治療の進展によって、肝脾腫を示す例は顕著に減少し、神経症状を示す例が相対的に増加した。また、当初は、多くの例で血清中の肝胆道系酵素の異常がみられたが、治療的介入が進むと、異常が認められるのは肝線維化の進んだ例のみとなった。また、肝虫卵粗抗原を用いた ELISA 抗体価は、肝障害を示す群では高く、神経症状を示す群では低くなった。治療的介入が本格化すると、相対的に糞便中への虫卵排泄数が少ない感染例が多くなるが、そのような例に対しても、ELISA による検査診断は有効であり、抗体価の変動は、morbidity 評価にも利用できる可能性が認められた。住血吸虫症低浸淫地での免疫血清検査の意義については、まだ懐疑的な意見も多く、今後は、このような免疫血清検査の意義について、広く国際的な合意が得られるよう働きかけを強める必要がある。

A. 目的

寄生蠕虫症は、国際的に顧みられない熱帯感染症：Neglected Tropical Diseases (NTDs)とされる疾患群の約半数を占めている。熱帯の途上国では、寄生蠕虫の感染者が多く、大きな公衆衛生上の問題となっているが、近年の対策の進捗により、現在、大きな疫学上の変化がみられる地域も多い。回虫や鉤虫等の土壌伝播線虫や住血吸虫・肝吸虫といった蠕虫の対策に際し、途上国ではまず集団治療が中心となることが多いが、集団治療の効果は、感染率の変化よりも morbidity の変化に対して大きい。そのため、集団治療が行われた地域では、寄生蠕虫の感染率はあまり低下しないまま、典

型的な症状を示さない寄生蠕虫症が、蔓延しているところもある。また、人体に成虫が寄生する寄生蠕虫症の場合、検査診断法の国際的基準は、虫卵検査によることが殆どだが、臨床症状がはっきりしない寄生蠕虫症の場合、標準的検査法では虫卵が検出できないことも多い。日本国内での輸入例についても、最近、途上国での浸淫地での変化を反映してか、典型的な症状を示さない寄生蠕虫症例が増えているが、検査担当者の経験不足もあって、やはり糞便等を利用した虫卵検査では診断できず、ELISA 等の免疫血清検査を利用しなければならないことが多い。

このような事情から、途上国でもわが国

を含む先進国でも、信頼性が高く簡便に利用できる寄生蠕虫症検査の開発が、現在必要とされるが、その開発にあたっては、あわせて、現在国際的な基準となる虫卵検査や一般的に利用されている免疫血清検査の意義について、最近の大きな疫学的変化の中で再確認することも必要である。そこで、今年度は、プラジカンテルによる集団治療が積極的に行われることが多かった住血吸虫症について、集団治療前後における病態の変化や、標準となる糞便検査の結果・既存の免疫血清検査である ELISA による抗体価の関係などについて検討した。

B. 研究方法

フィリピンの日本住血吸虫症浸淫地では、1990年代前半からプラジカンテルによる集団の治療が本格化した。そこで、対象として、フィリピンの代表的住血吸虫症浸淫地であるレイテ島パロの Schistosomiasis Research Hospital の受診者を選び、病型を経年的にフォローした。また、2000年に糞便検査によって診断された18才以上の日本住血吸虫感染者を選び、集団治療前の結果と比較した。2000年の受診時に採取され保存されていた血液を用いて肝胆道系酵素の変動や日本住血吸虫卵粗抗原を用いて ELISA 抗体価を調べるとともに、肝線維化の進行との関係について検討した。2000年に血清を採取できた対象者は131人で、男女比は、およそ2:1であった。また、HBs抗原陽性者と HCV 抗体陽性者、問診で過度のアルコール摂取歴が疑われた例は、対象から除外した。

(倫理面への配慮)

本研究で用いられた血清は、フィリピン共和国保健省主導の住血吸虫症対策のもと、検査時当初は、個々の Schistosomiasis Research Hospital 受診者の病態把握を主目的として採取されたものである。将来の

研究利用については、採取時に書面で許可を得た。

C. 研究結果

日本住血吸虫症の臨床病型を、脳神経型(痙攣・麻痺などの一過性神経症状を示す群)、肝臓脾臓型(触知できるような肝脾腫を示す群)、消化管型(腹痛や下血といった消化管症状が中心の群)の3つにわけると、Schistosomiasis Research Hospital における入院患者の臨床病型は、プラジカンテルによる集団治療の開始後、肝臓脾臓型が減少し、脳神経型が相対的に増加したことがわかる(表)。また、1991年、2000年の肝胆道系検査結果を比較すると、集団治療前の1991年には、多くの日本住血吸虫症患者で、aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP)の上昇がみられたが、集団治療後の2000年は、特に肝線維化と判断される例で AST や ALP の上昇がみられるにとどまった。

また、同じ血清を用いて、ELISA 抗体価の測定(カット・オフ値:吸光度で0.200)を行ったところ、1991年と2000年で有意な抗体価の変動はみられなかった。1991年の感染例では全例、2000年の感染例では1例を除き、ELISA で日本住血吸虫症と診断された。しかし、感染強度を表す糞便1g当たりの虫卵排泄数: Eggs per gram (EPG)と ELISA 抗体価の間には、なんの相関もみられなかった(図1)。

一方、肝脾腫を示す例や若年者でも進行した肝線維化を示す例を肝障害型とした場合、重なる部分は多いものの、ELISA 抗体価は、肝障害型で高くなる傾向を示した(図2)。特に、吸光度で1.00以上となった例は、全例肝障害型であった。しかし、一般に肝線維化の血清マーカーとされる type IV collagen や procollagen-III-peptide の値と ELISA 抗体価の間には、特

に相関はみられなかった。

D. 考察

今回の調査で、日本住血吸虫症の場合、集団治療を中心とした対策が進むと肝障害を示す型は著しく減少し、相対的に、脳神経症状を示す群が増加する傾向がみられた。血清による肝機能検査でも、1980年代、1990年代前半の調査では、マンソン・日本住血吸虫症とも、肝胆道系酵素（特にASTとALP）が上昇していたとの報告が多いが、1990年代後半以降は、ウイルス肝炎合併例以外で、肝胆道系酵素の異常を指摘した住血吸虫感染例の報告は少ない。これらの変化は、最近の集団治療を中心とした対策による morbidity 改善により、住血吸虫浸淫地で、肝障害を示す感染例が減少したことによると考えられる。

住血吸虫症に限らず、寄生蠕虫症の検査診断の基準は、国際的には糞便検査におかれ、感染強度は糞便1g中の虫卵排泄数（EPG）で表されることが多い。日本では、住血吸虫症の診断に際し一般的に利用される、虫卵抗原を用いたELISAは、国際的には副次的な役割にとどまっている。しかし、集団治療が行われるようになると、EPGが20未満になるような感染例が80%以上を占めるようになるが（図1）、このような例は1回のKato-katz法による糞便検査で診断される可能性は極めて低い。一方、虫卵抗原を用いたELISAであれば、このような例でも容易に診断することができた。さらに、臨床病型の違いにより、虫卵排泄数の差異は認められなかったが、ELISA抗体価は、脳神経型よりも肝障害型で高くなる傾向を示した。従来、免疫血清検査の用途は、スクリーニングや軽症例の診断に限られ、病態との関連については指摘されることは少なかったが、現在の疫学的変化の中で、虫卵抗原を用いたELISA抗体価の変動

が、morbidity 評価にも応用できるとすれば、その用途は拡大することになる。このような観点から、2008年度の国際熱帯医学会（The 27th International Conference of Tropical Medicine and Malaria, Cheju, Korea）では、住血吸虫症低浸淫地における免疫血清検査の意義について、国際的なコンセンサスを得るべく、意見交換を行った。

E. 結論

フィリピン、レイテ島の日本住血吸虫症浸淫地で、住血吸虫感染者が示す病態や肝機能検査・免疫血清検査の異常を、プラジカンテルによる集団治療が本格化する前後した。集団治療の進展によって、肝臓脾臓の障害を示す例は、顕著に減少し、神経症状を示す例が相対的に増加する。また、虫卵粗抗原を用いたELISA抗体価は、肝障害を示す群では高く、神経症状を示す群では低くなった。治療的介入が本格化した地域では、糞便中への虫卵排泄数が少ない感染例が多くなるが、そのような例に対しても、ELISAによる検査診断は有効であり、抗体価の変動は、morbidity 評価にも利用できる可能性も認められた。今後は、このような既存の免疫血清検査の意義についても、国際的な合意が得られるよう、働きかけを行う必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ishikawa H, Ohmae H.

Modeling the dynamics and control of transmission of *Schistosoma japonicum* and *S. mekongi* in Southeast Asia. *Korean Journal of Parasitology* 2009 (in press)

- 2) 大前比呂思, 朝日博子, Orlando S Sy, 桐木雅史, 千草雄一. 肝胆道系酵素の測定は、住血吸虫症の診断に役立つのか。
Clinical Parasitology 2008 (in press)

2. 学会発表

- 1) Ohmae H, Olveda R, Socheat D, Sudomo M, Chigusa Y, Matsuda H. Recent situation and next steps of schistosomiasis control programs in Southeast Asia.
The 27th International Conference of Tropical Medicine and Malaria, Cheju, Korea, 30 Sep – 3 Oct, 2008.
- 2) Socheat D, Sinuon M, Tsuyuoka R, , Odermatt P, Ohmae H, Matsuda H, Antonio MS Palmer K.
A success story of Schistosomiasis integrated with deworming in Cambodia.
The 27th International Conference of Tropical Medicine and Malaria, Cheju, Korea, 30 Sep – 3 Oct, 2008.
- 3) Ishikawa H, Hisakane N, Ohmae H,

Kirinoki M, Chigusa Y, Pangilinan Redulla A, Sinuon M, Socheat D, Matsuda H.

Modeling the dynamics and control of transmissions of *Schistosoma japonicum* and *S. mekongi* in Southeast Asia

The 27th International Conference of Tropical Medicine and Malaria, Cheju, Korea, 30 Sep – 3 Oct, 2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. その他 なし

表 フィリピン、レイテ島における住血吸虫症専門病院における日本住血吸虫症の臨床病型の経年的変化

臨床型 年次	臨床型			
	脳神経型	肝臓脾臓型	消化管型	不明
1991	54	17	21	2
1993	62	12	17	2
1995	67	10	15	3
1997	70	9	17	1
2000	71	7	18	0
2003	74	6	20	0
2007	86	3	11	0

%

図1 日本住血感染者における虫卵粗抗原を利用した ELISA 抗体価と糞便中の虫卵排泄数の関係 — フィリピン、レイテ島、Schistosomiasis Research Hospital における 2000 年の調査 —

