

200904004A

厚生労働科学研究費補助金
地球規模保健課題推進研究事業
(国際医学協力研究事業)

**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**

(H21-国医-指定-004)

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 平山謙二

平成22(2010)年3月

厚生労働科学研究費補助金
地球規模保健課題推進研究事業
(国際医学協力研究事業)

**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**

(H21-国医-指定-004)

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 平 山 謙 二

平成22 (2010) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

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

平山謙二 …………… 1

II. 分担研究報告

1. 寄生虫症感受性の宿主因子の検討に関する研究	平山謙二 …………… 11
2. 原虫症治療標的分子の機能解析	北 潔 …………… 14
3. マラリアの病態解明及びその治療をめざした研究	狩野繁之 …………… 20
4. ワクチン分子の無細胞系合成システムの確立	坪井敬文 …………… 23
5. 赤痢アメーバの病原機構の解明	野崎智義 …………… 29
6. フィラリア症の疫学研究（診断法の開発と野外応用）	木村栄作 …………… 33
7. フィラリア線虫と媒介節足動物の相互関係の解明	辻 尚利 …………… 37
8. 日本住血吸虫症の病態発現分子解析	太田伸生 …………… 39
9. マラリアおよび住血吸虫症の寄生適応機構の研究	金澤 保 …………… 42
10. リーシュマニア症対策疫学研究	我妻ゆき子 …………… 45
11. マラリア原虫の宿主細胞認識と侵入機序の解析	鳥居本美 …………… 47
12. 寄生虫感染宿主由来好塩基球の Th2/IgE 誘導・増強効果の解析	中西憲司 …………… 52
13. 遺伝子導入ハマダラカを作成し空飛ぶ注射器としての実用性を探る	松岡裕之 …………… 57
14. マラリアにおける宿主病原体相互関係の解析	久枝 一 …………… 58

15.	マラリア感染における T 細胞免疫応答の解析	由井克之	60
16.	マラリア原虫の赤血球侵入関連分子の解析	金子 修	63
17.	マラリア原虫に有効な新規阻害剤の探索	金 惠淑	66
18.	薬用植物由来天然化合物による住血原虫症の創薬に関する研究	片倉 賢	75
19.	トリパノソーマの防御応答回避メカニズムの解析	嶋田淳子	77
20.	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	丸山治彦	78
21.	住血原虫症の診断学	五十嵐郁男	85
22.	フィールドで利用しやすい住血吸虫免疫診断法改良に関する研究	大前比呂思	89
23.	人獣共通寄生原虫・蠕虫症の寄生適応に関する分子生物学的解析	奈良武司	93
24.	人獣共通幼条虫症（脳囊虫症、エキノコックス症）の病態、診断、治療、予防に向けた研究	伊藤 亮	95
Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表			104
Ⅳ. 研究成果の刊行物・別刷り			118

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

研究代表者 平山謙二 長崎大学熱帯医学研究所教授

研究要旨 アジア地域は多様な地理的環境と多様な民族により構成されているが、東南アジアを中心に熱帯地域が広がっている。これらの地域ではいまだに寄生虫感染症の患者が多数存在し、住民の健康に重大な影響を与えているばかりでなく、社会経済学的な影響も大きい。これら主要な寄生虫疾患の制圧を目指した新たな治療・予防法の開発を最終目標として、疾患別にグループを組み、各疾患の制圧を目指した基礎研究から応用研究を幅広く行い、真に地域の健康増進に資する研究を推進した。対象とした寄生虫疾患あるいは領域は以下のものである。（１）マラリア、（２）住血吸虫症、（３）フィラリア症、（４）住血原虫症（トリパノソーマ、リーシュマニア症など）、（５）新興・再興感染症（腸管寄生原虫症、腸管寄生ぜん虫症、エキノコッカス症、人獣共通感染症など）、（６）媒介昆虫領域である。上記の対象疾患の制圧に資する学術的な知見を得るために以下のようなアプローチで多様な研究を展開した。a) 保有宿主や媒介動物を含めた感染動態や伝播経路に関わる基礎研究、b) 病原体の寄生適応の分子メカニズム、c) ヒトの防御免疫および病態生理。

研究分担者名

北 潔 東京大学大学院・医学系研究科・教授
狩野繁之 国立国際医療センター研究所・部長
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
野崎智義 国立感染症研究所・部長
木村英作 愛知医科大学医学部・教授
辻 尚利 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究所・主任研究員
太田伸生 東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授
金澤 保 産業医科大学・教授
我妻ゆき子 筑波大学大学院人間総合科学研究科・教授
鳥居本美 愛媛大学大学院医学系研究科・教授
中西憲司 兵庫医科大学・教授
松岡裕之 自治医科大学・教授
久枝 一 群馬大学大学院医学研究科・教授
由井克之 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・教授
金子 修 長崎大学熱帯医学研究所・教授
金 恵淑 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・准教授
片倉 賢 北海道大学大学院獣医学研究科・教授
嶋田淳子 群馬大学医学部・教授
丸山治彦 宮崎大学医学部・教授
五十嵐郁男 帯広畜産大学原虫病研究センター・教授
大前比呂思 国立感染症研究所・室長
奈良武司 順天堂大学大学院医学研究科・准教授
伊藤 亮 旭川医科大学・教授

A.研究目的

アジアに広がる寄生虫疾患に関する基礎研究を推進し、その制圧、予防、治療に資する革新的な知見を集積することを目的とする。多くの寄生虫疾患は「見捨てられた病気」として分類され、途上国や研究環境の貧弱な地域で流行し、たくさんの命が奪われ、あるいは脅かされ続けている。この分野に光を当て、現地の研究者も含めて新しくより効率的な制圧法を開発することは日本や欧米先進国の役割である。本研究課題を推進することにより、アジア地域の研究者を巻き込んだ共同研究を活性化することが可能となる。また、寄生虫疾患という環境に密着した感染症に関する研究に日本やアジア地域の若手研究者が参加することで、新たな医科学領域の後継者を育成することが可能となる。

B.研究方法

マラリア、住血吸虫症、フィラリア症、住血原虫症、新興再興感染症、媒介昆虫の6つの疾患において、以下のような観点から分子レベルでの研究を行った。

A) 感染伝播メカニズム B) 寄生虫の宿主適応 C) ヒト防御免疫および病態生理 (倫理面への配慮)

本研究計画においてはアジアの流行地域での疫学調査の実施も含まれるので、WHOの基準に従った倫理基準に基づいて実施された。血液などの試料提供者には研究主旨を説明した上で自由意思による同意を書面で得た。また、ヒト資料については匿名化を行った。今年度実施分については各分担研究者が所属機関とカウンターパートの機関において倫理審査を得た上で研究を開始するべく準備中である。動物実験についても各所属機関の動物実験審査の承認を得てから実施した。なお、計画にはヒトゲノム・遺伝子解析も含んでいる

● ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針

- 疫学研究に関する倫理指針
- 遺伝子治療臨床研究に関する指針
- 臨床研究に関する倫理指針
- 疫学・生物統計学の専門家の関与有
- 臨床研究登録予定無

C.研究結果

各研究領域において出版された主な論文と本年度の活動成果をまとめた。このうち代表者のわかる範囲で日米での協力が見られるものに星印を付した。またアジアの研究者には網

掛けを付けている。

(1) マラリア

国立国際医療センター研究所の狩野はマラリアの病態解明及びその治療をめざした研究を行い、国立国際医療センターに訪れた輸入マラリア患者22例(2009)の治療プロフィール、タイマヒドン大学熱帯医学病院の治療方針、フィリピン大学寄生虫学における同国治療方針の解析などで協力研究を展開し、わが国の輸入マラリア患者の治療方針の研究、タイなど低流行地域での熱帯熱/三日熱マラリア混合感染でのプリマキン投与の有用性の研究を行った。その結果、わが国でのACTとプリマキンの導入の必要性、タイでのプリマキンの治療法の見直しなどの課題があることが判明した。

Potup P, Kumsiri R, Kano S, Kalambaheti T, Loo areesuwan S, Troye-Blomberg M, Manerat Y: Blood stage *Plasmodium falciparum* antigens induce immunoglobulin class switching in human enriched B cell culture. Southeast Asian J Trop Med Public Health 40(4): 651-64, 2009

愛媛大学無細胞生命科学工学研究センターの坪井はワクチン分子の無細胞系合成システムの確立に関する研究を行い、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、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免疫血清22人分と、タイ国ターク県のマラリア患者から入手した患者血清22人分の反応性を検討した。その結果、患者血清よりも免疫血清と有意に高く反応した防御抗体の誘導に関連する可能性のある分子が7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5種類、機能未知の分子が2種類であった。以上の結果から、本法のハイスループ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。

Culleton R, Ndounga M, Zeyrek FY, Coban C, Casimiro PN, Takeo S, Tsuboi T, Yadava A, Carter R, Tanabe K. Evidence for the transmission of *Plasmodium vivax* in the Republic of the Congo, west central Africa. J Infect Dis. 2009, 200:1465-1469.

☆Takeo S, Hisamori D, Matsuda S, Vinetz J, Sat tabongkot J, Tsuboi T. Enzymatic characterization of the *Plasmodium vivax* chitinase, a potential malaria transmission-blocking target. Parasitol Int. 2009, 58:243-248.

Otsuki H, Kaneko O, Thongkukiattkul A, Tachibana M, Iriko H, Takeo S, Tsuboi T, Torii M. Single amino acid substitution in *Plasmodium yoelii* erythrocyte ligand determines its localization and controls parasite virulence. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009, 106:7167-7172.

愛媛大学の鳥居はマラリア原虫の宿主細胞認識と侵入機序の解析に関する研究を行い、ネズミマラリア原虫 (*Plasmodium yoelii*) の弱毒株の Py17X NL と致死株の Py17XL においては、赤血球侵入に必須とされる分子であるマラリア原虫メロゾイトの赤血球結合分子 EBL (EBL : Erythrocyte Binding-Like) 分子内の第 6 領域が PyEBL 分子の細胞内輸送に重要であること、また、第 6 領域のアミノ酸変異がマラリア原虫の赤血球侵入動態に影響し、さらには病原性の変化をもたらすことが明らかになった。

Cao J, Kaneko O, Thongkukiattkul A, Tachibana M, Otsuki H, Gao Q, Tsuboi T, Torii M. Rhoptry neck protein RON2 forms a complex with merozoite surface protein AMA1 in *Plasmodium falciparum* merozoites. *Parasitol Int*, 58(1):29-35, 2009

Iriko H, Jin L, Kaneko O, Takeo S, Han ET, Tachibana M, Otsuki H, Torii M, Tsuboi T. A small-scale systematic analysis of alternative splicing in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Int* 58(2):196-199, 2009

Otsuki H, Kaneko O, Thongkukiattkul A, Tachibana M, Iriko H, Takeo S, Tsuboi T, Torii M. Single amino acid substitution in *Plasmodium yoelii* erythrocyte ligand determines its localization and controls parasite virulence. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009, 106:7167-7172

Arakawa T, Tachibana M, Miyata T, Harakuni T, Kohama H, Matsumoto Y, Tsuji N, Hisaeda H, Stowers A, Torii M, Tsuboi T. Malaria ookinete surface protein-based vaccination via the intranasal route completely blocks parasite transmission in both passive and active vaccination regimens in a rodent model of malaria infection. *Infect Immun*, 77(12):5496-5500, 2009

群馬大学の久枝はマラリアにおける宿主病原体相互関係の解析に関する研究を行い、マウスの線虫 *Heligmosomoides polygyrus*(Hp)の共感染がマラリアの病態を悪化させることを見出した。Hp はマラリア感染時に免疫抑制性の制御性 T 細胞を活性化させ、免疫抑制を起こすことが明らかとなった

Tu L, Moriya C, et al. Critical role for immunoproteasome subunit LMP7 in the resistance of mice to *Toxoplasma gondii* infection. *Eur. J. Immunol*. 39:3385-3394, 2009.

Arakawa T, Tachibana M, et al. Malaria ookinete surface protein-based vaccination via the intranasal route completely blocks parasite transmission in

both passive and active vaccination regimens in a rodent model of malaria infection. *Infect. Immun*. 77:5496-5450, 2009.

Tetsutani K, Ishiwata K, et al. Concurrent infection with *Heligmosomoides polygyrus* suppresses anti-*Plasmodium yoelii* protection partially by induction of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg in mice. *Eur. J. Immunol*. 39:2822-2830, 2009.

Duan X, Yonemitsu Y, et al. Efficient protective immunity against *Trypanosoma cruzi* infection after nasal vaccination with recombinant Sendai virus vector expressing amastigote surface protein-2. *Vaccine* 27: 6154-6159, 2009.

長崎大学の由井はマラリア感染における T 細胞免疫応答の解析に関する研究を行い、OVA 特異的 T 細胞受容体トランスジェニックマウス OT-II の CD4⁺ T 細胞を精製して C57BL/6 (B6) マウスに受け身移入し、OVA-PbA あるいは野性型 PbA 感染を行った。肝細胞期については、OVA-PbA 感染マウスをハマダラ蚊に吸血させ、約 2 週間後蚊の唾液腺からスポロゾイトを採取した。スポロゾイト 300-10,000 をマウスに静注して感染させた。感染マウスの CD4⁺ T 細胞は、T 細胞受容体刺激がなくても IL-2 刺激を受けて IFN- γ を産生することが明らかになった。さらに、マラリア抗原特異的 CD4⁺ T 細胞の IFN- γ 産生は IL-2 依存性であることが明らかになった。<肝細胞期マラリア感染>モデル抗原発現マラリア原虫を用いて、肝細胞期のマラリア感染に対する防御免疫に関する研究に着手した。

長崎大学の金子修は、マラリア原虫の赤血球侵入関連分子の解析に関する研究を行い、赤血球侵入に重要な移動接合帯を形成する AMA1 と RON タンパク質の間の結合に関与する 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した。RON5 については、特異抗体を作成し、解析を進めた。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い、タンパク質レベルでの発現を一部確認した。また、RON5 について、特異抗体をマウスとウサギを用いて作成し、メロゾイト先端部に局在することを確認した。

Otsuki H, Kaneko O, Thongkukiattkul A, Tachibana M, Iriko H, Takeo S, Tsuboi T, Torii M. Single amino acid substitution in *Plasmodium yoelii* erythrocyte ligand determines its localization and controls parasite virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(17):7167-72 (2009/04)

Iriko H, Jin L, Kaneko O, Takeo S, Han E-T, Tachibana M, Otsuki H, Torii M, Tsuboi T, A small-scale systematic analysis of alternative splicing in

n Plasmodium falciparum. *Parasitol Int* 58:196-9 (2009/06)

Cao J, Kaneko O, Gao Q, Zhou HY, Xia CM, Zhuge HX, Tsuboi T, Torii M. Transcription profile of PfRON4 gene in Plasmodium falciparum erythrocytic stage. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi*. 2009 Jun;27(3):206-9. (Chinese)

Culleton R, Kaneko O. Erythrocyte binding ligands in malaria parasites: Intracellular trafficking and parasite virulence. *Acta Tropica* (in press)

岡山大学の金は、マラリア原虫に有効な新規阻害剤の探索に関する研究を行い、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として環状過酸化化合物・N-89 の体内動態の解析と作用機序の解析研究を進めた。マウス体内動態の解析研究で、N-89 は半減期が1時間程度で、既存の抗マラリア薬であるアルテメシニンと似た血中半減期を示すことが判った。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明した。

Kumuraa, N., Furukawaa, H., Onyangob, A., Izumi a, M., Nakajimaa, S., Ito, H., Hatano, T., Kim, H.-S., Wataya, Y. and Baba. Different behavior of artemisinin and tetraoxane in the oxidative degradation of phospholipid. *Chemistry and Physics of Lipids*. 160, 114-120, 2009.

Naito T, Yokogawa T, Takatori S, Goda K, Hiramoto A, Sato A, Kitade Y, Sasaki T, Matsuda A, Fukushima M, Wataya Y, Kim HS. Role of RNAse L in apoptosis induced by 1-(3-C-ethynyl-beta-D-ribo-pentofuranosyl) cytosine. *Cancer Chemother Pharmacol.*, 63(5):837-850, 2009.

Kumura, N., Furukawa, H., Kobayashi, M., Onyango, A. N., Izumi, M., Nakajima, S., Kim, H.-S., Wataya, Y. and Baba, N. Synthesis of novel conjugates of tetraoxane endoperoxide with bis (quaternary ammonium salts). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73 (1), 217-220, 2009.

Jin, C., Kaewintajuk, K., Jiang, J., Jeong, W., Kamata, M., Kim, H.-S., Wataya, Y. and Park, H. T. *Toxoplasma gondii*: A simple high throughput assay for drug screening in vitro. *Exp. Parasitol.*, 121, 132-136, 2009.

Sato, A., Satake, A., Hiramoto, A., Okamatsu, A., Nakama, K., Kim, H.-S. and Wataya, Y. Association of nuclear-intermediate filament lamin B1 with necrotic- and apoptotic- morphologies in cell death induced by 5-fluoro-2'-deoxyuridine. *Nucleic Acids Sympo. Ser.*, 53, 293-294, 2009.

Wataya, Y., Naito, T., Sato, K., Hiramoto, A., Kitade, Y., Sasaki, T., Matsuda, A., Fukushima, M. and Kim, H.-S. Molecular mechanism of apoptosis induced by 3'-Ethynylcytidine. *Nucleic Acids Sympo. Ser.*, 53, 291-292, 2009.

特許第4289911号。新規な化合物及び抗マラリア剤。綿矢 有佑、金 惠淑、野島正朋。平成21年4月10日

特許第4289911号。新規な化合物及び抗マラリア剤。綿矢 有佑、金 惠淑、野島正朋。平成21年4月10日

(2) 住血吸虫症

長崎大学の平山は、寄生虫症感受性の宿主因子の検討に関する研究を行い、フィリピン国ルソン島南端ソルソゴン州の流行地ではネットワークパターン(NW)を示す肝線維化症患者でHLA-DRB1*1501 の頻度が非線維化症群と比較して有意に増加し、また、マイクロサテライトマーカー多型の相関解析を行った結果、IL12B MS*241(OR=2.48)が抵抗性に関連することを発見した。

☆Abdel-Hafeez EH, Kikuchi M, Watanabe K, Ito T, Yu C, Chen H, Nara T, Arakawa T, Aoki Y, Hirayama K. Proteome approach for identification of Schistosomiasis japonica vaccine candidate antigen. *Parasitology International*. 58 (1): 36-44, 2009

産業医科大学の金澤は、マラリアおよび住血吸虫の寄生適応機構の研究を行い、マクロライド剤の抗マラリア活性の機序、住血吸虫卵による免疫抑制の分子機序について新たな知見を示した。

Osada Y, Kanazawa T. Parasitic helminths: New weapons against immunological disorders. *J Biomed. Biotechnol. Special Issue "Immunology and Cell Biology of Parasitic Diseases"* (In press)

東京医科歯科大学の太田は日本住血吸虫症の病態発現分子解析に関する研究を行い、IL-4/13 ダブルノックアウト(DKO)マウスでは、マンソン住血吸虫感染で肉芽腫形成の縮小時に見られたIL-17の発現が、日本住血吸虫感染では逆に有意な上昇として観察され、Th2 サイトカインが存在しない環境下では虫卵肉芽腫形成をIL-17が調節しており、その発現調節機構が日本住血吸虫とマンソン住血吸虫感染の場合とでは異なることがわかった。

Anyan WK, Kumagai T, Shimogawara RF, Seki T, Ohta N et al. Schistosome eggs have a direct role for induction of basophils capable of high level of IL-4 production: Comparative study of single- and bisexual infection of *Schistosoma mansoni* in vivo *Trop Med Health, in press*, 2010.

国立感染症研究所の大前はフィールドで利用しやすい住血吸虫免疫診断法改良に関する研究を行い、メコン住血吸虫症有病地の現場で使用可能な高感度免疫検査法の開発にむけて、TSP-ELISAの導入を進めた。本年度は、ELISAの2次反応試薬について検討し、HRP-Protein Gが、従来使用してきたHRP-抗ヒトIgGよりも約10倍高い希釈倍率

で使用可能なことがわかった。迅速法である whole blood-ELISA で、HRP-Protein G を使用できれば経済的な負担の軽減が期待される。2009年4~5月にカンボジア、クラチエ県にてメコン住血吸虫症血清検査 (ELISA) を実施した。8村落の抗体陽性率は6.7%~72.5%であった。高い抗体陽性率を示した2村落では其々10%および30%の児童に糞便内虫卵が確認された。対象地域は、2005年に行った Kato-katz 法による虫卵検査では、陽性者が検出されなかったが、今年度の調査で、未だ感染の機会が多い地域が、点在していることがわかった。

Ishikawa H, Ohmae H. Modeling the dynamics and control of transmission of *Schistosoma japonicum* and *S. mekongi* in Southeast Asia. *Korean J of Parasitol* 47: 1-5, 2009.

Kato-Hayashi N, Kirinoki M, Iwamura Y, Kanazawa T, Kitikoon V, Matsuda H, Chigusa Y. Identification and differentiation of human schistosomiasis by PCR. *Exp Parasitol*. 124: 324-329, 2010.

(3) フィラリア症

愛知医科大学の木村はフィラリア症の疫学研究 (診断法の開発と野外応用) を行い、繰り返し集団治療を受けたスリランカの3村において、ミクロフィラリア (mf) 検査、尿 ELISA を同時に実施して比較検討により、尿 ELISA は、mf 陽性率が低下した時には特に有用であることを見出した。また組み換え SXP-1 抗原を結合させた着色ラテックス・ビーズと検体尿を反応させ、目視により尿中抗体の有無を判定できる新しい免疫診断法を確立した。

Sensitive, specific and rapid detection of *Leishmania donovani* DNA by loop-mediated isothermal amplification. Takagi H, Itoh M, Islam MZ, Razzaque A, Saiffudin Ekram ARM, Hashiguchi Y, Noiri E, Kimura E. *Am J Trop Med Hyg* 2009; 81(4): 578-582.

動物衛生研究所の辻はフィラリア線虫と媒介節足動物の相互関係の解明に関する研究を行い、病原体媒介性節足動物 (ベクター) 由来生物活性分子の機能探索の結果、マダニの消化器官 (中腸) より、血液消化に関与するカテプシン L 様システインプロテアーゼと、唾液腺からはカテプシン等に阻害作用を示すシスタチン様システインプロテアーゼインヒビターを発見した。マダニ個体において、システインプロテアーゼとその内在性阻害剤が、血液消化や宿主への付着に深く関与することが示唆された。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。

Yamaji K, Tsuji N, Miyoshi T, Islam MK, Hatta T, Alim MA, Anisuzzaman, Takenaka A, Fujisaki K.(2009). Hemoglobinase activity of a cysteine protease from the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*. *Parasitol Int*. 58, 232-237.

Yamaji K, Tsuji N, Miyoshi T, Islam MK, Hatta T, Alim MA, Anisuzzaman M, Kushibiki S, Fujisaki K.(2009). A salivary cystatin, HISC-1, from the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis* play roles in the blood-feeding processes. *Parasitol Res*. 106, 61-68.

(4) 住血原虫症 (トリパノソーマ、リーシュマニア)

東京大学の北は原虫症治療標的分子の機能解析に関する研究を行った。寄生原虫のミトコンドリア呼吸鎖は特異的阻害剤による抗寄生虫薬の重要な標的となるので、マラリア原虫およびトリパノソーマのミトコンドリアの呼吸鎖電子伝達系の特異的な性質の解明をめざした。ネズミマラリアのミトコンドリアを用いて呼吸酵素の性質を調べた結果、コハク酸-ユビキノロン還元酵素 (SQR) は宿主哺乳類同様に2つの膜アンカーサブユニットを持っていたが、キノロン結合部位の性質が宿主と異なっていた。また、宿主哺乳類ミトコンドリアには存在しない膜表在性 NADH 脱水素酵素 NDH-II の性質を調べたところマラリア原虫の NDH-II はキノロン系阻害剤に感受性であり、共に新規抗マラリア剤の標的候補となることが判った。複合体 II (コハク酸-ユビキノロン還元酵素) は TCA 回路の酵素中唯一の膜結合性の酵素であり、そのサブユニット構造はヒトから細菌まで基本的には4つとされていたが、今回 *T. cruzi* の複合体 II が12サブユニットから構成される事が明らかになり、寄生虫の持つ多様性がさらに明確になった。

Identification of New Inhibitors for Alternative NADH Dehydrogenase (NDH-II). Mogi, T., Matsu shita, K., Murase, Y., Kawahara, Miyoshi, H., Ui, H., Shiomi, K., Omura, S. and Kita, K. (2009) *FEMS Microbiol. Lett.* 291, 157-161

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

Antibiotics LL-Z1272 identified as novel inhibitors discriminating bacterial and mitochondrial quinol oxidases. Mogi, T., Ui H., Shiomi, K., Omura, S., Miyoshi, H. and Kita, K. (2009) *Biochim Biophys. Acta (Bioenergetics)* 1787, 129-133

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, (2009) *J. Cell Metabolism*, 9, 191-202
- 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., Omura, S. and Kita, K. (2009) *J. Biol. Chem.* 284, 72 55-7263
- Crystallization of mitochondrial rhodoquinol-fumarate reductase from the parasitic nematode *Ascaris suum* with specific inhibitor, flutolanil. Osanai, A., Harada, S., Sakamoto, K., Shimizu, H., Inaoka, D. K., and Kita, K. (2009) *Acta Crystallographica*, F65, 941-944
- Identification of mitochondrial Complex II subunits SDH3 and SDH4 and ATP synthase subunits *a* and *b* in *Plasmodium* spp. Mogi, T. and Kita, K. (2009) *Mitochondrion*, 9, 443-453
- Crystallization and preliminary X-ray analysis of aspartate transcarbamoylase from the parasitic protist *Trypanosoma cruzi*. Matoba, K., Nara, T., Aoki, T., Honma, T., Tanaka, A., Inoue, M., Matsuoka, S., Inaoka, D.K., Kita, K. and Harada, S. (2009) *Acta Crystallographica*, F65, 933-936
- Three redox states of *Trypanosoma brucei* alternative oxidase identified by infrared spectroscopy and electrochemistry. Maréchal, A., Kido, Y., Kita, K. Moore, A. and Rich, P. (2009) *J. Biol. Chem.* 284, 31827-31833
- Visualization of mitochondrial and apicoplast nucleoids in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* by SYBR Green I and PicoGreen staining. Sano-Maeda, K., Sato, S., Ueda, T., Yui, R., Itoh, K., Hata, M., Nakano, A., Kita, K., Murakami-Murofushi, K. and Sasaki, N. *Cytologia*, in press
- Crystallization and preliminary crystallographic analysis of cyanide-insensitive alternative oxidase from *Trypanosoma brucei brucei*. Kido, Y., Shiba, T., Inaoka, D. K. Sakamoto, K., Nara, K., Aoki, T., Honma, T., Tanaka, A., Inoue, M., Matsuoka, S., Moore, A., Harada, S. and Kita, K. *Acta Crystallographica* in press
- Divergence of mitochondrial genome structure in the apicomplexan parasites, *Babesia* and *Theileria*. Hikosaka, K., Watanabe, Y., Tsuji, N., Kita, K., Kishine, H., Arisue, N., Palacpac, N. M. Q., Kawazu, S., Sawai, H., Horii, T., Igarashi, I. and Tanabe, K. *Mol. Biol. Evolution* in press
- Overproduction, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of *Trypanosoma brucei gambiense* glycerol kinase. Balogun, O. E., Inaoka, D. K., Kido, Y., Shiba, T., Nara, T., Aoki, T., Honma, T., Tanaka, A., Inoue, M., Matsuoka, S., Michels, P. AM., Harada, S. and Kita, K. *Acta Crystallographica* in press
- Purification and kinetic characterization of recombinant alternative oxidase from *Trypanosoma brucei brucei*. Kido, Y., Sakamoto, K., Nakamura, K., Harada, M., Suzuki, T., Yabu, Y., Saimoto, H., Yamakura, F., Ohmori, D., Moore, A., Harada, S. and Kita, K. *Biochim Biophys. Acta (Bioenergetics)* in press
- 筑波大学の我妻はリーシュマニア症対策疫学研究を行い、農業問題のない天然植物素材のニームオイルを家屋内散布のリーシュマニア症コントロールへの効果を検討した。バングラデシュのリーシュマニア症流行地で、その標準化家屋内散布介入をする世帯とコントロール世帯をランダム割り当てし、患者発生が減少したかを2年間モニタリングして評価し、サンショウバエの総数は変化はなかったが、吸血しているサンショウバエの割合の減少がみられた。抗体陽性化率では統計学的に有意な差はなかった。
- Wagatsuma Y., Alam MS., Fukushige M., Islam MZ., Itoh M., Mondal D., Haque R. Neem extract as a control tool for vector-borne diseases: an example of visceral leishmaniasis in Bangladesh. *Biopestic. Int.* 2009;5(2):134-140.
- Fukushige M., Alam MS., Haque R., Wagatsuma Y. Acceptance for neem oil as a visceral leishmaniasis vector control. *Biopestic. Int.* 2009;5(2):141-147.
- 北海道大学の片倉は薬用植物由来天然化合物による住血原虫症の創薬に関する研究を行い、ミャンマーの60種の薬用植物より得られた71種類の植物材料からのアルコール粗抽出物の抗トリパノソーマ活性について、エバンストリパノソーマの血流型虫体に対する *in vitro* における増殖阻害活性と二倍体ヒト線維芽細胞株 (MRC-5) に対する細胞毒性測定により検証した。その結果、9種の薬用植物が潜在的有用性を有する候補薬用植物であることが判明した。
- 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, *Bruce*

a javanica, for canine babesiosis. *J Vet Med Sci* 71, 33-41, 2009

Katakura K: Molecular epidemiology of leishmaniasis in Asia (focus on cutaneous infections). *Curr Opin Infect Dis* 22, 126-130, 2009

Bhutto AM, Soomro FR, Baloch JH, Matsumoto J, Uezato H, Hashiguchi Y, Katakura K: Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (L.) major* infection in Sindh province, Pakistan. *Acta Trop* 111, 295-298, 2009

Yamada K, Subeki, Nabeta K, Yamasaki M, Katakura K, Matsuura H: Isolation of anti-babesial compounds from *Brucea javanica*, *Curcuma xanthorrhiza*, and *Excoecaria cochinchinensis*, *Biosci Biotechnol Biochem* 73, 776-780, 2009

Nonaka N, Sano T, Inoue T, Teresa Armua M, Fukui D, Katakura K, Oku Y: Multiplex PCR system for identifying the carnivore origins of faeces for an epidemiological study on *Echinococcus multilocularis* in Hokkaido, Japan. *Parasitol Res* 106, 75-83, 2009

Bawm S, Tiwananthagom S, Lin KS, Hirota J, Irie T, Htun LL, Maw NN, Myaing TT, Phay N, Miyazaki S, Sakurai T, Oku Y, Matsuura H, Katakura K: Evaluation of Myanmar medicinal plant extracts for antitrypanosomal and cytotoxic activities. *J Vet Med Sci* in press

群馬大学の嶋田はトリパノソーマの防御応答回避メカニズムの解析に関する研究を行い、*Trypanosoma cruzi*感染により宿主アポトーシス抑制因子c-FLIP遺伝子発現が感染初期に起こることがリアルタイムPCRにより明らかとなった。

帯広畜産大学の五十嵐は住血原虫症の診断学に関する研究を行い、バベシア病に対する血清診断法として*Babesia bigemina* 200 kDa 組み換え抗原を用いたELISA、遺伝子診断法として*Babesia bovis*のSBP2遺伝子を標的としたnPCRを確立した。また、*B. microti*のBMN1-17組換え抗原を用いたICTは、日本で初めて検出されたヒト患者の血清にも陽性反応を示した。更に、バベシア原虫に対し、エポキシマイシンとカテキンが新規薬剤候補になりうることを示した

Altangerel K, Alhassan A, Iseki H, Sivakumar T, Boldbaatar D, Yokoyama N, Igarashi I: Evaluation of *Babesia bigemina* 200 kDa recombinant antigen in enzyme-linked immunosorbent assay. *Parasitol Res* 105:249-254, 2009.

Ota H, Mizuno D, Kuboki N, Igarashi I, Nalamura Y, Yamashina H, Hanzaike T, Fujui K, Onoe S, Hata H, Kondo S, Matsui S, Koga M, Matsumoto K, Inokuma H, Yokoyama N: Epidemiological su-

vey of *Theileria orientalis* infection in grazing cattle in the eastern part of Hokkaido, Japan. *J Vet Med Sci*. 71:937-944, 2009.

Aboulaila M, Nakamura K, Govind Y, Yokoyama N, Igarashi I: Evaluation of the in vitro growth-inhibitory effect of epoxomicin on *Babesia* parasites. *Vet Parasitol*. 167: 19-27, 2010.

Aboulaila M, Yokoyama N, Igarashi I: Inhibitory effects of (-)-Epigallo catechin-3-gallate from green tea on the growth of *Babesia* parasites. *Parasitology* (2009), doi:10.1017/S003118 2009991594.

Aboulaila M, Yokoyama N, Igarashi I: Development and evaluation of a nested PCR based on spherical body protein 2 gene for the diagnosis of *Babesia bovis* infection. *Vet Parasitol*. (2009), doi:10. 1016/j.vetpar.2009.12.013.

順天堂大学の奈良は人獣共通寄生原虫・蠕虫症の寄生適応に関する分子生物学的解析に関する研究を行い、シャーガス病の病原体 *Trypanosoma cruzi* の dihydroorotate dehydrogenase (DHOD) 遺伝子の多型を解析した。DHOD 遺伝子は調べた分離株全てで3-4コピー存在した。塩基配列の比較から、分離株間よりも同一個体内に存在する遺伝子コピー間で塩基置換が多い系統が存在した。従来 *T. cruzi* では、有性生物に見られるように個体内での遺伝的多様度が極めて小さいとされていたが、初めて無性生物に特有の進化的特徴が見いだされた。

Matoba K, Nara T, Aoki T, Honma T, Tanaka A, Inoue M, Matsuoka S, Inaoka DK, Kita K, Hara da S: Crystallization and preliminary X-ray analysis of aspartate transcarbamoylase from the parasitic protist *Trypanosoma cruzi*. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 65: 933-936, 2009

Bao Y, Weiss L, Hashimoto M, Nara T, Huang H: Protein kinase A regulatory subunit interacts with P-type ATPases in *Trypanosoma cruzi*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 80 (6): 941-943, 2009

☆**Abdel-Hafeez EH, Kikuchi M, Watanabe K, Ito T, Yu C, Chen H, Nara T, Arakawa T, Aoki Y, Hirayama K**: Proteome approach for identification of schistosomiasis japonica vaccine candidate antigen. *Parasitol Int*, 58 (1): 36-44, 2009

(5) 新興・再興感染症(腸管寄生原虫症、腸管寄生ぜん虫症、エキノコッカス症、人獣共通感染症など)

兵庫医科大学の中西は寄生虫感染宿主由来好塩基球のTh2/IgE誘導・増強効果の解析に関する研究を行い、寄生虫感染に際しての自然免疫系細胞とし

での好塩基球が、Th2細胞の誘導および／または増加に寄与する抗原提示細胞であることを明らかにした。好塩基球はin vitro 並びにin vivoで 抗原を取り込み、MHC class IIに抗原ペプチドを結合、CD80/86を発現、更にIL-4を産生することで、Th2細胞をin vitro/in vivoで選択的に誘導することが明らかとなった。また更に、抗原/IgE複合体が生体内で形成されると、これを効率的に取り込み、Th2応答を更に増強することも明らかとなった。

Imamura M, Tsutsui H, Yasuda K, Uchiyama R, Yumikura-Futatsugi S, Mitani K, Hayashi S, Akira S, Taniguchi S, Van Rooijen N, Tschopp J, Yamamoto T, Fujimoto J, Nakanishi K. Contribution of TIR domain-containing adapter inducing IFN-beta-mediated IL-18 release to LPS-induced liver injury in mice. *J Hepatol*; 51:333-341, 2009

Yoshimoto T, Yasuda K, Tanaka H, Nakahira M, Imai Y, Fujimori Y, Nakanishi K. Basophils contribute to TH2-IgE responses in vivo via IL-4 production and presentation of peptide-MHC class II complexes to CD4⁺ T cells. *Nat Immunol*; 10:706-712, 2009

Harada M, Obara K, Hirota T, Yoshimoto T, Hitomi Y, Sakashita M, Doi S, Miyatake A, Fujita K, Enomoto T, Taniguchi M, Higashi N, Fukutomi Y, Nakanishi K, Nakamura Y, Tamari M. A functional polymorphism in IL-18 is associated with severity of bronchial asthma. *Am J Respir Crit Care Med*; 180:1048-1055, 2009

善本知広, 中西憲司 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.
出願日:2009.10.26 国際出願番号:PCT/JP2009/005625

国立感染症研究所の野崎は赤痢アメーバの病原機構の解明に関する研究を行い、酸化ストレスが赤痢アメーバの中心代謝に大きく影響を与えることを示した。代謝中間体の局所の上昇は明らかに代謝経路の特定の酵素が酸化ストレスにより不活化あるいは調節を受けていることを示した。すなわち、フォスフォフルクトキナーゼ、エノラーゼ、ピルビン酸:フェレドキシン酸化還元酵素(PFOR)の活性が低下していることが明らかになった。赤痢アメーバにおける嫌氣的電子伝達・酸化還元システムは臨床薬であるメトロニダゾールの作用機作の根幹であり、赤痢アメーバに対する新規創薬、赤痢アメーバの薬剤耐性の克服等の観点からも、本研究成果は重要な示唆を与えると期待される。

Husain, A., Jeelani, G., Sato, D., Ali, V., and Nozaki, T. (2010) Characterization of two isotypes of L-threonine dehydratase from *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 170, 100-104.

Sato, D. and Nozaki, T. (2009) Methionine gamma-lyase: the unique reaction mechanism, physiological roles, and therapeutic applications against infec-

tious diseases and cancers. *IUBMB Life*, 61, 1019-1028.

宮崎大学の丸山は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に関する研究を行い、ブタ回虫の体内移行期幼虫に発現しているAsCTL-1とAs16の組換えタンパク質抗原の患者血清との反応から、両者とくにAs16は組換えブタ回虫症診断抗原としてきわめて有望であることが示された。また、幼虫移行症の病態解明のために、体内移行をするモデル寄生虫であるベネズエラ糞線虫のゲノムの解析をおこなった。次世代型シーケンサによる解析の結果、計18,716本のコンティグが得られ、ベネズエラ糞線虫のゲノムサイズは55.4 Mbと推定された。他種線虫遺伝子との比較から約7,000 lociのベネズエラ糞線虫の遺伝子候補を同定することができた。

Senba Y, Tsuda K, Maruyama H, Kurokawa I, Mizutani H, Taniguchi Y. (2009) Case of creeping disease treated with ivermectin. *J Dermatol.* 36: 86-89.

Enko K, Tada T, Ohgo KO, Nagase S, Nakamura K, Ohta K, Ichiba S, Ujike Y, Nawa Y, Maruyama H, Ohe T, Kusano KF. Fulminant eosinophilic myocarditis associated with visceral larva migrans caused by *Toxocara canis* infection. *Circ J.* 73: 1344-1348.

旭川医科大学の伊藤は人獣共通幼虫症(脳囊虫症、エキノコックス症)の病態、診断、治療、予防に向けた研究を行い、人獣共通寄生虫疾患である脳囊虫症とエキノコックス症についての免疫、遺伝子診断法の改善と、病原体である寄生虫の遺伝子多型を解析した。1)有鉤条虫(*Taenia solium*)は、ミトコンドリアDNAの遺伝子解析により大きくアジア型とアメリカ・アフリカ型に分けることができ(Nakao et al. 2002, *Parasitology* 124)が、アジアではさらに国や地域ごとに特徴的なハプロタイプが存在すること。2) Loop-mediated isothermal amplification(LAMP)法による、人体寄生テニア属条虫3種の遺伝子鑑別法の確立。3)人体寄生テニア条虫、*Taenia asiatica*と*Taenia saginata*の交雑個体の確認。4)エキノコックス症に関する迅速診断法の確立。北海道の地方病であるエキノコックス症について我々が確立した検査法は、世界最高水準との国際評価を得ており、米国疾病情報対策センター(CDC)から米国内でのエキノコックス症住民健診、確定検査法として旭川医科大学で開発した血清診断用抗原(RecEm18, RecAgB8/1)を正式採用したいという協力要請を2010年1月に受けた。

Gurbadam A, Naymkhuu D, Nyamkhuu G, Tsendjav A, Sergelen O, Narantuya B, Batsukh Z, Batts etseg G, Oyun-Erdene B, Uranchimeg B, Otgonbatar D, Temuulen D, Bayarmaa E, Abmed D, Tso gtsaikhan S, Usukhbayar A, Smirmaul K, Gereltuy

- a J, Ito A. Mongolian and Japanese Joint Congress on "Echinococcoses: diagnosis, treatment and prevention in Mongolia" June 4, 2009. *Parasites and Vectors* in press, 2010*
- Li TY, Ito A, Chen XW, Sako Y, Qiu J, Xiao N, Qiu DC, Nakao M, Craig PS. Specific IgG responses to recombinant antigen B and Em18 in cystic and alveolar echinococcosis in China. *Clinical and Vaccine Immunology* in press, 2010*
- Ito A, Agvaandaram G, Myadagsuren N, Bat-Ochir OE, Chuluunbaatar B, Nakaya K, Yanagida T, Sako Y, Nakao M, Ishikawa Y, Davaajav A, Dulmaa N. Histopathological, serological and molecular confirmation of alveolar echinococcosis cases in Mongolia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* in press, 2010*
- Li T, Chen X, Zhen R, Qiu J, Qiu D, Xiao N, Ito A, Wang H, Giraudoux P, Sako Y, Nakao M, Craig PS. Wide-spread coendemicity of human cystic and alveolar echinococcosis on the eastern Tibetan plateau, northwest Sichuan/southeast Qinghai, China. *Acta Tropica* in press, 2010*
- Yanagida T, Matsuoka H, Nakao M, Ito A. Anomalous proglottids of the fish tapeworm *Diphyllobothrium nihonkaiense* with abnormal segmentation. *Parasitology International* in press, 2010*
- Yanagida T, Yuzawa I, Joshi DD, Sako Y, Nakao M, Nakaya K, Kawano N, Oka H, Fujii K, Ito A. Neurocysticercosis: assessing where the infection was acquired? *Journal of Travel Medicine* in press, 2010*
- Nakao M, Li T, Han X, Ma X, Xiao N, Qiu J, Wang H, Yanagida T, Mamuti W, Wen H, Moro PL, Giraudoux P, Craig PS, Ito A. Genetic polymorphisms of *Echinococcus* tapeworms in China as determined by mitochondrial and nuclear DNA sequences. *International Journal for Parasitology* in press, 2010*
- Okamoto M, Nakao M, Anantaphruti MT, Waikagul J, Blair D, Ito A. Evidence of hybridization between *Taenia saginata* and *Taenia asiatica*. *Parasitology International* in press, 2010*
- Shirakawa K, Yamasaki H, Ito A, Miyajima H. The wandering lesion: cerebral sparganosis. *Neurology* 74: 180, 2010*
- Wicht B, Ruggeri-Bernardi N, Yanagida T, Nakao M, Peduzzi R, Ito A. Inter- and intra-species characterization of tapeworms of the genus *Diphyllobothrium* (Cestoda: Diphylobothriidea) from Switzerland, using nuclear and mitochondrial DNA targets. *Parasitology International* in press, 2010*
- Knapp J, Chirica M, Simonnet C, Grenouillet F, Bart JM, Sako Y, Itoh S, Nakao M, Ito A, Millon L. *Echinococcus vogeli* infection in a hunter, French Guyana. *Emerging Infectious Diseases* 15, 2029-2031, 2009*
- Nakao M, Xiao N, Okamoto M, Yanagida T, Sako Y, Ito A. Geographic pattern of genetic variation in the fox tapeworm *Echinococcus multilocularis*. *Parasitology International* 58: 384-389, 2009*
- Ishikawa Y, Sako Y, Itoh S, Ohtake T, Kohgo Y, Matsuno T, Ohsaki Y, Miyokawa N, Nakao M, Nakaya K, Ito A. Serological monitoring of progression of alveolar echinococcosis with multi-organ involvement using recombinant Em18. *Journal of Clinical Microbiology* 47: 3191-3196, 2009*
- Yang YR, Liu R, Bai X, Boufana B, Craig PS, Nakao M, Ito A, Zhang JZ, Giraudoux P, McManus DP. Molecular Genotyping Reveals Natural Infection of the Ground Squirrel (*Spermophilus* spp) with *Echinococcus granulosus* in China. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 3, e518, 2009*
- Snabel V, Altintas N, D'Amelio S, Nakao M, Romig T, Yolasmaz A, Gunes K, Turk M, Busi M, Huttner D, Sevcova D, Ito A, Altintas N, Dubinsky P. Cystic echinococcosis in Turkey: genetic variability and first record of the pig strain (G7) in the country. *Parasitology Research* 105: 145-154, 2009*
- Moro PL, Nakao M, Ito A, Schantz PM, Caverio C, Cabrera L. Molecular identification of *Echinococcus* isolates from Peru. *Parasitology International* 58: 184-186, 2009*
- Tappe D, Sako Y, Itoh S, Frosch M, Gruner B, Reuter S, Nakao M, Ito A, Kern P. Close correlation of clinical regression and specific serology in the follow-up of patients with alveolar echinococcosis in different clinical stages. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 80: 792-797, 2009*
- Nkouawa A, Okamoto M, Mabou AK, Edinga E, Yamasaki H, Sako Y, Nakao M, Nakaya K, Blair D, Agatsuma T, Enyong P, Shibahara T, Moyou-Somo R, Ito A. Paragonimiasis in Cameroon: molecular identification, serodiagnosis and clinical manifestations. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 103: 255-261, 2009*
- Nkouawa A, Sako Y, Nakao M, Nakaya K, Ito A. Loop-mediated isothermal amplification method for differentiation and rapid detection of *Taenia* species. *Journal of Clinical Microbiology* 47: 168-174, 2009*
- Sako Y, Fukuda K, Kobayashi Y, Ito A. Development of a rapid immunochromatographic test for the diagnosis of alveolar echinococcosis. *Journal of Clinical Microbiology* 47: 252-254, 2009*
- Ito A, Nakao M, Okamoto M, Sako Y, Yanagida

T, Nkouawa A, Nakaya K. Taeniasis and cysticercosis: serological detection of patients and animals, and molecular identification of parasites. *Future Microbiology* 2010; in press.

Nakao M, Yanagida T, Okamoto M, Knapp J, Nkouawa A, Sako Y, Ito A. Echinococcus and Taenia: phylogenetic taxonomy of human-pathogenic tapeworms and its application to molecular diagnosis. *Infection, Genetics and Evolution* 2010; in press.

(6) 媒介昆虫

自治医科大学の松岡は、遺伝子導入ハマダラカを作成し空飛ぶ注射器としての実用性を探る研究を行い、蚊の唾液腺特有蛋白遺伝子のプロモーターに、DsRed 遺伝子をつないでハマダラカ受精卵に注射し、遺伝子導入蚊を作成し、唾液腺には DsRed 蛋白が 40ng 程度発現し、唾液腺細胞から唾液腺腔に分泌されること、蚊の口吻から RsRed が放出されることを確認した。

D. 考察

本年度の事業活動はほぼ計画通りに遂行された。研究計画の3年目にあたり、特にアジア地域に流行する寄生虫疾患とりわけ、以下にあげた、住血吸虫症、フィラリア症、マラリア、新興再興寄生虫病、ベクターの各研究領域で研究を遂行した。昨年度国立国際医療センターで開かれた合同会議では、多数の日本の若手の研究者による発表を行い今後の共同研究への展開を図った。今後の日本からのポストクの派遣や共同研究の推進に著しく寄与するものと期待される。また今年度は米国サンディエゴで免疫部会と合同で会議を開催し、免疫および寄生虫部会から多数の発表を行い、両分野の第一線の研究者による熱心な討論が行われた。今後の日米医学協力の方向性を示唆する歴史的な会議となった。今後日米の共同研究をさらに加速させることが重要である。すでに確立された日本とアジアの連携にさら

に日米を加えた3角協力による優れた論文の産出を本研究事業の成果の指標とすると共に、次期の5年計画では上記の3角協力を重点的に推進するような研究組織に発展させることが望ましいと考えられる。

E. 結論

アジアに蔓延する広範囲な寄生虫疾患を対象にした分子レベルから公衆衛生レベルまでの活発な研究が行われ、本プログラムが各研究グループの間の情報交換や新しいプロジェクトの提案、若手研究者の育成に重要な役割を果たした。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

既述。

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

善本知広, 中西憲司 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.

出願日: 2009.10.26 国際出願番号: PCT/JP2009/05625

特許第 4289911 号。新規な化合物及び抗マラリア剤。綿矢 有佑、金 惠淑、野島正朋。平成 21 年 4 月 10 日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金
(地球規模保健課題推進研究事業 (国際医学協力研究事業))
「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

寄生虫症感受性の宿主因子の検討に関する研究

長崎大学・熱帯医学研究所・免疫遺伝学 平山 謙二

研究要旨

住血吸虫症は中間宿主の淡水産巻貝から放出される感染型幼虫 (セルカリア) の経皮感染によって引き起こされるぜん虫感染症で中国揚子江流域、フィリピンなどに分布する日本住血吸虫症である。感染によって直接死に至る事はないが、感染を繰り返した結果、数年後に発症する肝硬変が致死的となる。住血吸虫感染数年後に発症する肝線維化症は肝臓の虫卵に対する生体防御反応の結果で、虫卵結節の線維化が進行することによって発症し、T 細胞応答性の免疫応答に制御されていることが報告されている。フィリピン国ルソン島南端ソルソゴン州は 10 歳代においてネットワークパターン(NW)を示す肝線維化症患者が 12.3%、20 歳以上では 55.3%が存在する浸淫地である。この対象集団では、加齢による肝線維化症の影響のない 15~35 才の群で HLA-DRB1*1501 の頻度が非線維化症群と比較して線維化症群で有意に増加しており、肝線維化症の発症に関与していると考えられた。また、肝線維化症発症に関わる免疫関連遺伝子を探索する目的で、遺伝子等の近傍に設定したマイクロサテライトマーカー多型の相関解析を行った結果、4 マーカーに、有意差を認める 6 アレルを検出した。このうち、特に有意差及び発現頻度が高く、住血吸虫性肝線維化症の感受性と強い相関を示したマーカーは D3S3561 MS*214(OR=3.21)と IL12B MS*241(OR=2.48)であった。IL12B マーカーには抵抗性に相関する MS*245(OR=0.45)が観察された。

A. 研究目的

フィリピン国ルソン島南端ソルソゴン州は高度信淫地で、これまで住血吸虫症に対する十分な治療や防圧対策が取られていない。千種らが 2005~6 年に渡って行われた 1500 名(3~84 歳)に及ぶ住血吸虫症の現地調査の結果、虫卵陽性率 (Kato-Katz) は全体の 6.3% 程度であったが、虫卵に対する抗体陽性率は 61.4%、10 歳代においてネットワークパターン (NW) を示す肝線維化症患者が 12.3%、20 歳以上では 55.3%が存在する浸淫地であることが報告されている。

本研究においては、フィリピン国ソルソゴン州で観察された若年性肝線維化症発症に関わる免疫応答分子を網羅的に解析することにより、発症機序の本態を明らかにし発症の予防・治療法の開発、あるいは高リスク患

者の早期発見に寄与することを目的とする。

B. 研究方法

肝線維化症を憎悪させる要因には HLA だけではなく他の免疫関連分子も関係することが報告されていることから、発症に関わる免疫関連遺伝子を探索する目的で、フィリピン国ルソン島南端ソルソゴン州の住血吸虫浸淫地で収集した 288 名のうち、15~35 才の肝線維化症群 54 名と 36 才以上の非肝線維化症群 40 名で、免疫応答に関わる遺伝子である、各種サイトカイン、サイトカインレセプター、シグナル伝達に関わる遺伝子、文献等から選択した遺伝子 160 について遺伝子座内あるいは近傍 (200K 以内) にマイクロサテライトマーカーを設置した。このマイクロサテライトマーカーを用いて相関解析

を行った。また、感受性を示した DRB1*1501 との関連や相関を示した免疫応答遺伝子発現レベルの解析の為に、フィリピン国ルソン島南端ソルソゴン州で住血吸虫症患者を対象とし、共同研究を行う独協大・千種教授ら、フィリピン大学・寄生虫学レオナルド教授、及びソルソゴン州保険チームらと超音波診断、血清抗体価、Kato-Katz を施行し 30 歳以下での肝線維化症患者 10 名と、40 歳以上非肝線維化症対象者 10 名の 8~10ml 程度の EDTA 採血を行い、mRNA 発現解析用の試料を採取する。

現地調査及び採血、遺伝子解析等については、長崎大学・熱帯医学研究所・研究倫理委員会及びフィリピン大学での承認を得て行った。「フィリピンにおける住血吸虫性肝線維化症の遺伝的調節機構の解析」承認番号 04031002 長崎大学・熱帯医学研究所・研究倫理委員会

C. 研究結果

これまでに、設置した 160 のマイクロサテライトマーカーのうち 30 について解析が終了し、4 マーカーに、有意差を認める 7 アレルを検出した。用いたマイクロサテライトマーカーは IRF6, IL6R, IL10, IL19, CR1L, IL20, STAT4, IL1F6, IL1F8, IL1F9, STAT1, D3S3561, IL5RA, CD86, JNK3, SOD3, IRF2, IL4.2, IL12B, IL4.1, SOD2, NFKB1, IL6, IFNG, IL26, STAT6, STAT3, FCER2, MICA, HO-1 で、そのうち、有意差を認めるアレルが存在したマイクロサテライトマーカーは IL10 (1q31-q32), IL6R (1q21), IL12B (5q31.1-33.1), D3S3561 (3q21.3), IL6 (7q21) に設置したもので検出された。このうち、特に有意差及び発現頻度が高く、住血吸虫性肝線維化症の感受性と強い相関を示したマーカーは D3S3561 MS*214 (OR=3.21, pc<0.02) と IL12B MS*241 (OR=2.48, pc<0.02) であった。IL12B マーカーには抵抗性に相関する MS*245 (OR=0.45 pc<NS) が観察された。これらのマイクロサテライトマーカーと HLA-DRB1*1501 との相乗作用は認められず、独立に肝線維化症の感受性に関与したと考えられた。

また、感受性を示した DRB1*1501 との関

連や相関を示したサイトカイン遺伝子発現レベルの解析の為に、フィリピン国ルソン島南端ソルソゴン州で住血吸虫症患者を対象として収集した、30 歳以下での肝線維化症患者 10 名と、40 歳以上で非肝線維化症対象者 10 名の HLA タイピングの結果から 30 歳以下 (DRB1*1501 陽性 6 名)、肝線維化症患者 40 歳以上 非肝線維化症対象者 (DRB1*1501 陰性 4 名) から、抗体価、中卵検査、超音波診断結果をもとに肝線維化症患者 2 名 (DRB1*1501 陽性)、非肝線維化患者 2 名 (DRB1*1501 陰性) 住血吸虫非感染者 (DRB1*1501 陽性) 1 名を選択し、mRNA の発現解析の試料を得た。

D. 考察

フィリピンの住血吸虫浸淫地における、若年性肝線維化症発症には HLA-DRB1*1501 以外にも、免疫応答関連分子の多型が関与している可能性が示唆された。L12 は IFN- γ 産生を誘導するとともに、NK 細胞の細胞傷害活性を亢進させる活性を示し、いわゆる Th1Th2 バランスの上で重要なサイトカインである。IL12B-MS*241 の連鎖する多型が IL12 発現量に関連するとすれば、このことが、直接的に線維化症発症に影響するかもしれない。残りのマイクロサテライトマーカーの解析を継続し、線維化症に対する感受性あるいは抵抗性に関与する可能性について検討する。

E. 結論

免疫応答遺伝子近傍に設置したマイクロサテライトマーカーを用いて解析することにより、肝線維化症発症に感受性あるいは抵抗性に相関する多数遺伝子についてのスクリーニングが可能となる。さらに、相関を示した遺伝子の mRNA の発現レベルの解析、DRB1*1501 の免疫応答性の特徴、分子間での相互作用等を検討することにより、肝線維化を増悪させる鍵となる分子の同定を試みる。肝線維化症治療または、予防に寄与する成果を得る事が期待できると考えている。

G. 研究発表

1. 論文発表

Abdel-Hafeez EH, Kikuchi M, Watanabe K, Ito T, Yu C, Chen H, Nara T, Arakawa T, Aoki Y, Hirayama K. Proteome approach for identification of Schistosomiasis japonica vaccine candidate antigen. *Parasitology International*. 58 (1): 36-44, 2009

2. 学会発表

Abdel-Hafeez EH, Kikuchi M, Watanabe K, Boamah D, Chen H, Yu C, Hirayama K. Analysis of protective immunity induced by gamma-irradiated cercaria immunization with *Schistosoma japonicum* infection in miniature pigs. 第 78 回日本寄生虫学会大会、2009 年 3 月 27-28 日

Kikuchi M, Segubre-Mercado EM, Leonardo LR, Chigusa Y, Inoue T, Arevalo NL, Lim RR, Agsolid, LM, Hirayama K, Agatsuma T. フィリピンにおける若年性住血吸虫性肝線維化症の発症に関わる HLA-DRB1*1501 の相関解析 第 78 回日本寄生虫学会大会、2009 年 3 月 27-28 日

菊池三穂子, EDELWISA M. SEGUBRE-MERCADO, LYDIA R LEONARDO, 千種雄一, 林尚子, 亀井香里, 井上哲, NAPOLEON L AREVALO, RONALD R LIM, LEA M AGSOLID, 吾妻健、平山謙二. フィリピンにおける若年性住血吸虫性肝線維化症の発症に関わる免疫関連遺伝子の探索 第 50 回日本熱帯医学会大会 沖縄コンベンションセンター 10 月 22~23 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進（国際医学協力）研究事業）
分担研究報告書

原虫症治療標的分子の機能解析

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不可欠であること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事が明らかになりつつある。我々はマラリア原虫およびトリパノソーマのミトコンドリアを薬剤標的として捉え、特に呼吸鎖電子伝達系に関して、その特異的な性質を明らかにした。

A. 研究目的

われわれは寄生適応に必須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。この成果をふまえマラリア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。そこで、熱帯熱マラリア原虫におけるエネルギー代謝系を先端的なエネルギー転換系研究の視点から追求し、さらにトリパノソーマなど他の寄生原虫も含め寄生現象全般に共通する適応戦略の分子基盤とその多様性を明らかにする事を目的として研究を進めている。

B. 研究方法

赤血球内型マラリア原虫ミトコンドリアの呼吸鎖電子伝達系は化学療法剤の標的として期待されている。しかしマラリア原虫ミトコンドリアに関する情報は非常に限られたものであり、これが研究の進展を妨げている。そこで活性を保持したミトコンドリアの単離法

を昨年度に引き続き検討し、その結果ネズミマラリア原虫の系を用いて生化学的な解析が可能なる量のミトコンドリアの調製法を確立した。また、マラリア原虫にはアピコプラストと呼ばれる 35 kb の環状 DNA を持つオルガネラが存在し、マラリア原虫の増殖に必須な機能を有している。電子顕微鏡による観察から両者が細胞の中で常に近傍に局在している事が報告されている。そこでこれまでの成果をふまえ、引き続きこの2つのオルガネラの相互作用を調べ、さらにそれぞれの機能を独立に解析する目的で細胞分画における挙動を調べた。

また、アフリカトリパノソーマに関しては、極めて低濃度で効果を示す抗トリパノソーマ薬アスコフラノンの標的であるシアン耐性酸化酵素のタンパク質としての性質を調べる目的で、これまでに組換え酵素を用い高純度で高活性の酵素の精製法を確立した。今年度はこの精製標品を用いて、その結晶化を試みた（倫理面への配慮）

本研究はほとんどが *in vitro* の実験系であり、またネズミマラリア原虫の実験は東京大学医学部の動物実験指針に従って行ったもので、倫理面の問題はない。

C. 研究結果

【マラリア原虫】

大量のマラリア原虫ミトコンドリアを調製する目的で種々のマラリア原虫の系を検討した結果、ネズミマラリア原虫 *Plasmodium yoelii yoelii* を用いた系を確立した²⁾。3 x 10⁷ の P. y. 17XL 株を BALB/c マウスに感染させ、130～140 時間後に回収した血液からセルロースパウダーカラムで白血球や血小板を除き、得られた赤血球を 10%AlbuMax I を添加した RPMI-1640 により 37 度、3 時間培養し、トロホゾイトに富む赤血球を得る。サポニン処理で得たマラリア原虫を N₂ キャビテーションにより破碎し、遠心分離でミトコンドリア画分を回収する。この方法で 10 匹のマウスの血液 (約 7.5 ml) から約 5.5 mg のミトコンドリアを得る事ができるが、これは 360 ml の培養から 1mg しか調製できない熱帯熱マラリア原虫の場合を大きく上回る方法である。

このミトコンドリアを用いて呼吸酵素の性質を調べた結果、コハク酸-ユビキノ還元酵素 (SQR) は 宿主哺乳類同様に 2 つの膜アンカーサブユニットを持っていたが、キノン結合部位の性質が宿主と異なっていた。また、宿主哺乳類ミトコンドリアには存在しない膜表在性 NADH 脱水素酵素 NDH-II の性質を調べたところマラリア原虫の NDH-II はキノロン系阻害剤に感受性であり、共に新規抗マラリア剤の標的候補となる事が判った^{1,2)}。

SQR のアンカーサブユニットは種特異性が高く、マラリア原虫ゲノム上でも見つかっていなかった。しかし今回の生化学的解析から、マラリア原虫がアンカーサブユニットを持つ

事が判ったので、ゲノムデータベースを詳細に調べた結果、候補となる遺伝子を見出す事ができた⁷⁾。

また、オルガネラの分離に関しては、熱帯マラリア原虫の培養系から単離した粗ミトコンドリア画分を用い、ミトコンドリアとアピコプラストの相互作用を調べる目的でパーコールによる分離に対する細胞破碎条件などを含み、種々の処理、薬剤の効果の検討を続けた。ミトコンドリアに関してはジヒドロオロト酸脱水素酵素およびジヒドロオロト酸-シクロム c 還元酵素活性、またアピコプラストに関してはアピコプラスト DNA に結合するタンパク質 HU に対する抗体 (名古屋大学佐々木成江博士より分与¹⁰⁾) 用いてその挙動を調べた。これまでの結果から、N₂ キャビテーションによる細胞破碎をこれまでの 1200psi から 300psi に低下させても細胞破碎の効率は変化せず、またより障害の少ないミトコンドリアを得る事ができる点が明らかになったが、さらにこの粗ミトコンドリア画分をパーコールによる分離後、上層部にある種々のオルガネラ、特に褐色のヘモゾインを含む食胞や DNA などの固まりとなった部分をピペットで除き、再度遠心を繰り返す事によって、ミトコンドリアは上層部の画分に、アピコプラストは底部に近い画分に分離する事ができた。

【アフリカトリパノソーマ】

アフリカ睡眠病の病原体アフリカトリパノソーマのシアン耐性酸化酵素に関しては、これまでに大腸菌の発現系を用い、高純度、高活性の酵素の精製法を確立し、1 分子の酵素が 2 分子の鉄を含む事を示したが、今年度はさらに酵素学的な解析を行い、還元型ユビキノ-1 に対する *K_m* が 338 μM であり、特異的阻害剤であるアスコフラノンによる阻害形式は非競合混合型である事が明らかになっ

た¹⁴⁾。さらにこの標品を用いて結晶化を試みた所、最初はほとんど回折を示さない結晶であったが、結晶化に用いる界面活性剤や添加物を最適化し、2.9Å分解能の回折強度データを測定し、結晶学的パラメータ (93.1% completeness, overall R_{merge} 9.5%, orthorhombic space group $I222$ or $I2_12_12_1$ with unit cell parameters, $a = 63.11$, $b = 136.44$, $c = 223.06$ Å, the calculated Matthews coefficient (V_M) $3.2 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$) を得る事ができた¹¹⁾。さらに分解能の高い結晶を得るために、結晶化条件の最適化、精製後 His タグを除去した TAO を用いた結晶化を行い、鉄の添加が結晶を良質にする事を見出した。この結晶はシアン耐性酸化酵素としてはもちろん、膜結合性の 2 核鉄タンパク質として初めての結晶である。

【アメリカトリパノソーマ】

中南米のトリパノソーマ症 Chagas 病の病原体である *Trypanosoma cruzi* のレドックス調節に関わる酵素群の立体構造に基づく薬剤の分子設計を進めているが、ミトコンドリアの複合体 II (SQR) に関しては、その第一段階として精製を試みた。精製された *T. cruzi* 酵素は 12 種類のサブユニット (7.3–62 kDa) で構成される二量体酵素 (286.5 kDa x 2) で、哺乳類や出芽酵母の 4 サブユニット型酵素 (約 130 kDa) とは大きく異なっていた⁵⁾。各サブユニットの部分アミノ酸配列をもとに *T. cruzi* ゲノムの遺伝子産物を同定することにより、トリパノソーマ類の酵素は核ゲノムでコードされる 6 種類ずつの親水性サブユニット (SDH1、SDH2_N、SDH2_C、SDH5–SDH7) と疎水性サブユニット (SDH3、SDH4、SDH8–SDH11) で構成され、構造遺伝子は核ゲノム上に分散していることが判った。また、SDH2 は遺伝子レベルで分割されており、N 末側の I_{pN} ドメインを保存する SDH2_N と C 末側の I_{pC} ドメイン

を保存する SDH2_C からなるヘテロ二量体である事が判った。そして、*T. cruzi* 酵素は、SDH6 は 4 種類、SDH1、SDH2_N、SDH5 と SDH9 を除くサブユニットは各 2 種類存在するので、単量体当たり 22 種類のタンパク質が $512 (= 1^4 \times 4^1 \times 2^{(12-5)})$ 通りの組み合わせでできた類例のない分子多様性の高い酵素であることが明らかになった。

また本酵素は複合体 II の特異的阻害剤に対する感受性が哺乳類の酵素と大きく異なっており、実際に酵素活性を最も強く阻害するアトペニン¹⁵⁾は原虫の増殖を抑制する事から、薬剤標的として極めて有望と考えられる。

D. 考察

マラリア原虫ミトコンドリアは大量調製法が確立されていなかった事から生化学的解析が遅れていた。しかし今回、ネズミマラリア原虫を用いて、10 匹の感染マウスを出発材料として 5mg 以上のミトコンドリアを再現性良く調製する方法を確立できた事は、今後マラリア原虫の研究の新しい展開に大いに貢献すると考えられる。さらにマラリア原虫のミトコンドリアとアピコプラストの分離条件を見出した事は、これらのオルガネラ間の相互作用の解析、またそれぞれの機能を独立に調べる事が可能になったと言う点で大きな前進である。

我々が開発中のアスコフラノン¹⁶⁾は、現在最も強力な抗トリパノソーマ薬とされ、その標的はトリパノソーマのミトコンドリアに局在するシアン耐性酸化酵素である。しかしそのタンパク質としての性質は酵素が極めて不安定であるため、ほとんど判っていなかった。今回の酵素学的な解析に加え、結晶を得る事ができた事は鉄を 2 分子含む di-iron タンパク質として膜タンパク質では初めての報告である。