

複合体 II (コハク酸-ユビキノン還元酵素) は TCA 回路の酵素中唯一の膜結合性の酵素であり、ミトコンドリアのマーカー酵素として知られている。本酵素は呼吸鎖の脱水素酵素としてコハク酸からの還元力を呼吸鎖のユビキノンに伝達し、TCA 回路と呼吸鎖を直接結ぶ重要な酵素であり、宿主哺乳類ばかりでなく、寄生虫においてもそのエネルギー代謝に大きな役割を果たしている。これまで、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。この構造はアフリカトリパノソーマやリーシュマニアにも共通しており、12 サブユニットの複合体 II に対する特異的阻害剤を探索する事によって、極めて作用スペクトルの広い抗寄生虫薬の開発が期待される。

E. 結論

マラリア原虫やトリパノソーマなど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、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った。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

- 1) Identification of New Inhibitors for Alternative NADH Dehydrogenase (NDH-II). Mogi, T., Matsushita, K., Murase, Y., Kawahara, Miyoshi, H., Ui, H., Shiomi, K., Ōmura, S. and Kita, K. (2009) FEMS Microbiol. Lett. 291, 157-161
- 2) 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
- 3) Antibiotics LL-Z1272 identified as novel inhibitors discriminating bacterial and mitochondrial quinol oxidases. Mogi, T., Ui H., Shiomi, K., Ōmura, S., Miyoshi, H. and Kita, K. (2009) Biochim Biophys. Acta (Bioenergetics) 1787, 129-133
- 4) 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
- 5) Novel Mitochondrial Complex II Isolated from *Trypanosoma cruzi* Composed of Twelve Peptides Including a Heterodimeric Ip Subunit. Morales, J., Mogi, T., Mineki, S., Takashima, E., Mineki, R., Hirawake, H., Sakamoto, K., Ōmura, S. and Kita, K. (2009) J. Biol. Chem. 284, 7255-7263
- 6) 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
- 7) 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
- 8) 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
- 9) 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
- 10) 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
- 11) 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
- 12) 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
- 13) 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
- 14) 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)* 1797,443-450,2010/02/23
- 15) The *Plasmodium* HU homolog, which binds the plastid DNA sequence-independent manner, is essential for the parasite's survival. Sasaki, N., Hirai, M., Maeda, K., Yui, R., Itoh, K., Namiki, S., Morita, T., Hata, M., Murakami-Murofushi, K., Matsuoka, H., Kita, K., Sato, S. *FEBS Lett.* 583, 1446-1450,2009.

学会発表

- 1) 日野明紀菜、平井誠、田中健、松岡裕之、北潔 「マラリア原虫コハク酸-ユビキノン還元（複合体 II）の遺伝子破壊による表現型解析」第 78 回日本寄生虫学会大会平成 21 年 4 月
 - 2) 城戸康年、原田繁春、斎本博之、北 潔 「抗アフリカトリパノソーマ薬アスコフラノンの薬剤開発とその薬剤標的 Trypanosome Alternative Oxidase (TAO) の解析」第 78 回日本寄生虫学会大会平成 21 年 4 月
 - 3) 北 潔 「低酸素適応におけるミトコンドリアの役割」第 82 回日本生化学会大会 平成 21 年 10 月
 - 4) 原田倫世、藤本陽子、城戸康年、坂元君年、松崎素道、藪義貞、鈴木高史、笹原武史、中井裕、北潔 「ミトコンドリアを持たない寄生原虫・クリプトスポリジウムにおける呼吸鎖の生化学的解析」第 82 回日本生化学会大会 平成 21 年 10 月
 - 5) 増田 功、松崎素道、北 潔 「寄生性渦鞭毛藻類 *Perkinsus* のミトコンドリアにおける ribosomal frameshift を伴う遺伝子発現系」第 82 回日本生化学会大会 平成 21 年 10 月
 - 6) 日野明紀菜、平井誠、田中健、松岡裕之、北潔 「ネズミマラリア原虫ミトコンドリアコハク酸-ユビキノン還元酵素（複合体 II）の遺伝子破壊による表現型解析」第 82 回日本生化学会大会 平成 21 年 10 月
 - 7) Kita, K. 「Novel respiratory enzymes of trypanosomes」Mitochondrion of *Trypanosoma brucei* enters the post-proteomics, 2009 Sept. Czech Republic
 - 8) Kita, K. 「Purification and crystallization of drug target trypanosome alternative oxidase (TAO) from *Trypanosoma brucei brucei*」The 5th Japan-Korea Chemical Biology Symposium, 2010 Jan. Busan, Korea
- H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

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)
分担研究報告書

マラリアの病態解明及びその治療をめざした研究

研究分担者 狩野繁之 国立国際医療センター研究所 部長

研究要旨:マラリアは地球規模の保健課題としては最大級で、その病態解明と治療をめざした研究の発展が望まれる。我々は、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、1)マラリア原虫の可溶化抗原で刺激した際のB cellでのIgMからIgG/IgEへのクラススイッチのメカニズムの研究、2)わが国の輸入マラリア患者の治療方針の研究、3)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、でそれぞれ成果を上げた。それらの成果をもって、マラリアの病態解明と治療の向上へ一定の貢献が果たせたと考えられる。

A. 研究目的

マラリアの流行は未だに世界で猖獗し、2009年のWHOの報告によれば、年間の患者数は2億4千300万人、死亡者数も86万3千人と見積もられ、地球規模の保健課題としては最大級である。当該分担研究では、国立国際医療センター(IMCJ)とタイ・マヒドン大学熱帯医学病院やフィリピン大学公衆衛生学部寄生虫学などの海外研究機関と協力して研究をすすめ、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、その成果をもってわが国の厚生労働政策医療に資することを目的とする。

B. 研究方法

本年度は、下記3つのサブテーマを推進した。

1) 病態解明研究:ヒトの免疫グロブリンのクラススイッチに関する研究(マヒドン大学熱帯医学部熱帯病理学教室との共同研究)

熱帯熱マラリア原虫(Pf: *Plasmodium falciparum*)の分裂体可溶化抗原(schizont lysate)に晒されたヒトB細胞(human B cell)における、免疫グロブリンG(Immunoglobulin G; IgG)およびIgEのheavy chainのクラススイッチ組換え(CSR: class switch recombination)の機序を解明するために、human B cell(CD20+CD27-)をPf粗抗原(cPfAg: crude Pf antigen) plus anti-CD40で共培養した。培養後4日目のIgMからIgG/IgEへのCSRをB cellのtotal RNAのRT-PCRで解析し、種々active CSRの分子マーカーを検出した。培養後7日目

と14日目には、培養上清の各種免疫グロブリンをELISAで定量した。

2) 治療研究(1):わが国の輸入マラリア(合併症を伴わないマラリア)の治療に関する研究(IMCJ 国際疾病センター(DCC)、フィリピン大学寄生虫学との共同研究)

国立国際医療センターを訪れた(2009.1.1-12.31)患者22例に関して、その病歴プロフィールの解析と、治療に関する臨床検討を行った。

3) 治療研究(2):海外低流行地における混合感染の治療に関する研究(マヒドン大学熱帯医学部臨床熱帯医学教室との共同研究)

タイにおけるマラリアの流行状況を、マヒドン大学熱帯医学病院の患者治療指針に合わせて考察し、熱帯熱マラリア原虫および三日熱マラリア原虫(*Pv: Plasmodium vivax*)の混合感染の治療方針について検討した。

(倫理面への配慮)

当該研究遂行にあたっては、ヘルシンキ宣言における臨床研究の基準遵守を大原則とする。具体的には我が国の臨床研究に関する倫理指針(平成20年厚生労働省告示第415号)及び、国立国際医療センターで定めた倫理規定及び、タイ国マヒドン大学およびタイ赤十字社の倫理規定を遵守した。疫学的状況も考慮する研究内容となるため、同様に文部科学省、厚生労働省が共同で作製した「疫学研究に関する倫理指針(平成14年6月17日)(平成16年12月28日全部改正)(平成17年6月29日一部改正)」を、流行地における調査研究にもあてはめた。

また、調査研究対象となる流行国・地域における対象となる住民や患者の不利益になることの無いように最大限の配慮を払った。

C. 研究成果

1) 病態解明研究: 以下の結果を得た。

・培養 B cell での CSR 分子マーカーの発現:

AID (activation-induced cytidine deaminase) mRNA, germ line transcripts (γ -GLT, ϵ -GLT), circle transcript ($I\gamma$ -C μ CT, $I\epsilon$ -C μ CT) と mature transcripts (γ -mRNA, ϵ -mRNA) の PCR 産物をアガロースゲル電気泳動で検出したところ、a) IL-4 plus Anti-CD40 で培養した B cell がもっとも高いレベルの AID mRNA を発現し、cPfAg plus anti-CD40 で培養した B cell の AID mRNA の発現レベルはその 50%ほど、anti-CD40 のみで培養した B cell の AID mRNA の発現レベル、さらにその 50%ほどであった。b) IgM から IgG へ、IgM から IgE へ、IgG から IgE への active CSR が起こっているかどうかを示すマーカーは、それぞれ $I\gamma$ -C μ 、 $I\epsilon$ -C μ 、 $I\epsilon$ -C γ CT であるが、 $I\epsilon$ -C μ CT のみが、IL-4 plus anti-CD40 とで培養した B cell で常時発現されていた。 $I\gamma$ -C μ CT の発現は cPfAg plus Anti-CD40 で培養した B cell で 1/2 の反復実験で発現されていた。 $I\epsilon$ -C γ CT の発現は、いずれで刺激した B cell でも認められなかった。

・培養 B cell 上清での免疫グロブリンのクラス:

IL-4 plus anti-CD40、cPfAg plus anti-CD40、anti-CD40 のみのいずれの条件でも、total IgG の上昇が培養7日目及び14日目で観察できた。anti-Pf IgG は培養7日目及び14日目でいずれでも上昇していたが、特異的 IgE の上昇は、培養14日目で初めて認められた。

2) 治療研究(1)の研究課題に関しては、次の表の様に、2009年にIMCJ/DCCを訪れた輸入マラリア患者のプロフィールを作成した。

IMCJ/DCC 渡航者健康管理室 (渡航者外来) を訪れた患者プロフィール (2009.1.1-12.31)

イニシャル	年齢	性別	国籍	感染先	感染病原体	非血球寄生率(%)
1. T. T.	25	男性	日本	バブアニューギニア	Pv	0.13
2. T. J.	33	男性	ガーナ	ガーナ	Pf	0.53
3. T. N.	29	男性	日本	バブアニューギニア	Pf	0.03
4. K. N.	28	男性	日本	シエラレオネ	Pf	22.7
5. M. H.	24	女性	日本	マラウイ	Pf	0.20
6. T. O.	28	男性	日本	エカドル	Pv	0.15
7. G. O.	34	男性	ナイジェリア	ナイジェリア	Pf	1.8
8. T. S.	33	男性	日本	モザンビーク	Pf*	Pf/リングマ
9. H. E.	47	男性	日本	モザンビーク	(Pf**)	-
10. Y. T.	23	女性	日本	タイ、インドネシア、パプアニューギニア	Pv	0.06
11. Y. U.	22	女性	日本	ガーナ、エジプト、ヨルダン、エチオピア	Po	0.08
12. R. S.	46	男性	ガーナ	ガーナ	Pf	0.48
13. F. S.	29	女性	日本	ガーナ	Pf	12.1
14. S. S.	26	男性	日本	ブルキナファソ、ギニア	Pf	0.06
15. E. C.	39	男性	ナイジェリア	ナイジェリア	Pf	0.04
16. O. B.	40	男性	ガーナ	ガーナ	Pf	0.15
17. K. S.	21	男性	日本	モロッコ、マリ、セネガル、ガンビア	(Pf***)	-
18. S. U.	27	女性	日本	ベナン	Pf	0.7
19. B. R.	38	男性	ネパール	ネパール	Pv	0.36
20. O. I.	30	男性	ナイジェリア	ナイジェリア	Pf	2.3
21. T. M.	42	男性	日本	仏領ギアナ	Pv	0.34
22. K. F.	27	女性	日本	ウガンダ	Pf	0.33

* PCRでPf単独感染 **迅速診断キットでPf陽性

患者の平均年齢は 33.1 才。男性 16 人 (73%) /女性6人 (27%)。日本人 15 人 (68%) /外国人7人 (32%)。熱帯熱マラリア 16 人 (73%): 全員アフリカで感染、三日熱マラリア5人 (23%)、卵形マラリア1人 (4%)であった。診断は、顕微鏡検査による種の鑑別と種特異的プライマーを用いた PCR で行った。治療に関しては、Pf マラリア (寄生率が高い重症例4および13を除く) はリアメット (Riamet) で、Pv および Po マラリアはクロロキン+プリマキンですべて完治した。わが国の年間輸入マラリア患者数は60人余りであるので、2009年はわが国のおよそ 1/3 の症例が IMCJ に集まってきたと考えられる。また、これらの症例の詳細に関しては、研究発表に記載した学会発表の他、下記のようなシンポジウムを開催して、ディスカッションを行った。

第50回日本熱帯医学会大会:マラリア ACT シンポジウム、沖縄コンベンションセンター、2009.10.22-23.

i) Shigeyuki Kano (IMCJ): Malaria: Current epidemiological situation and drug policies in Asia which has to be now well recognized by JSTM.

ii) Srivicha Krudsood (Mahidol Univ): Multidrug resistant malaria: Research on antimalarials and where do we go from here?

iii) Pilarita T Rivera (Univ of the Philippines): Revised policy and guidelines on the diagnosis and treatment for malaria in the Philippines: ACT as first-line treatment.

3) 治療(2)の研究課題に関しては、現在 hypoendemic と考えられているタイにおける Pf マラリアと Pv マラリアの比率がほぼ50%ずつになってきている中(unpublished data, Ministry of Health, Thailand 2009)、熱帯熱マラリアの単独感染と思って治療した後、Pv マラリアの2ヶ月以内の再発率が約 30%、また逆に、Pv マラリアの単独感染として治療した後、28日以内の Pf マラリアの発症が約 10%に認められている(マヒドン大学熱帯医学部の報告)。すなわち、顕微鏡で検出できない(subpatentな)混合感染の予防的治療法に何らかの方針が必要であることが理解できる。そこで、我々は Pf、Pv マラリアの区別無く ACT (Artemisinin combination therapy) で治療して、プリマキン(primaquine)を14日間投与する方法が、もっとも経済的である仮説を立てて検証した。

D. 考察

1) 病態解明:AID mRNA は刺激無しの B cell

では発現せず、active Ig CSR が起きていることの良い指標になることが分かった。さらには、IL-4 plus anti-CD4 が AID の発現と CSR の機序研究の良い inducer になることも理解された。AIDmRNA の発現の上昇と Pf 特異的 Ig が検出されたことで、cPFAg によって (IgM から IgG/IgE への) CSR が完全におきていることが証明されたと考える。刺激する抗原と、バイオマーカー一定量の鋭敏度/特異度に関する更なる研究の進展で、防御免疫に効果的に関与する Ig の class/subclass の CSR が意図的に誘導できる可能性があると考えられる。

2) 治療研究(1): わが国のマラリア治療薬の使用には制限があり(ファンシダール、メフロキン、キニーネ)、薬剤耐性マラリアの治療に困難をきたす可能性がある。国立国際医療センターでは、厚生労働省科学研究費「熱帯病治療開発研究」班から供与される artemisinin 誘導體 (artemether) plus lumefantrine (Riamet) という ACT 治療薬で熱帯熱マラリアの治療を行うことができるが、現在この ACT の有用性を IMCJ の輸入症例で詳細に記載し始めている。すでにわが国での治療失敗例を昨年度報告したが、今後、わが国での薬事法の承認をとって広く使用できる薬剤として供与されるべきと考える。一方、三日熱マラリア、卵形マラリアの治療では、従来より用いられているクロロキンおよび肝内型の休眠体 (hypnozoite) を殺すプリマキンを用いて完治させているが、両薬剤もわが国での保険適用が無く、今後の課題である。プリマキン耐性のマラリアに対応すべき増量両方の適用に関しても、臨床研究を進展中である。

3) 治療研究(2): タイでは迅速診断法 (Rapid Diagnostic Test: RDT) のキットを用いた検査はおよそ3(US)ドル、顕微鏡検査は0.5ドルと見積もられる。この両方を用いれば Pf と Pv マラリアを (顕微鏡検出限界以下の寄生率の感染を含めて) 鑑別できるが、かなり高めに付く(3.5ドル)。ACT (artesunate-mefloquine) 3日間の治療は2.5ドル、キニーネ+ドキシサイクリン(7日間)の治療は2ドル、プリマキン 15mg/日(14日間)の治療は0.3ドル、よって ACT/キニーネ+ドキシ+プリマキンでも、2.3-2.8ドルで治療できる。

すなわち、Pf のち Pv マラリア/Pv のち Pf マラリアを cost effective に治療するには、検査の精度を上げるより、Pf または Pv の単純感染 (single infection) である可能性があっても、プリマキンをすべての症例で追加した方が効率がよいことが理解できる(この詳細な議論は、下記研究発表にあるように投稿中)。

E. 結論

1) AIDmRNA の発現により、CSR が起きていることを量的に表すことが示唆された。CSR の全貌を明らかにする研究の進展が、防御免疫を果たす免疫グロブリンの誘導を可能にできると考える。

2) わが国およびタイにおける治療薬の選択基準に関して、社会経済学的な制約の中での適正性を議論する必要性がある。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、それぞれの課題がある。共に、わが国だけでなく地球規模でのマラリアの保健課題解消に資する研究成果へと発展する可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Potup P, Kumsiri R, Kano S, Kalambaheti T, Looareesuwan S, Troye-Blomberg M, Maneerat 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

2) Wilairatana P, Tangpukdee N, Kano S, Krudsood S: 14 days of primaquin administration after falciparum malaria treatment in malaria hypoendemic areas with high incidence of falciparum and vivax mixed infection: Pros and Cons. **Korean J Parasitol** (submitted)

3) 狩野繁之: マラリアの旅行医学、**日本旅行医学会学会誌** 9, 74-79, 2009

2. 学会発表

1) 狩野繁之、石上盛敏、駒木-安田加奈子、矢野和彦、福本恵、水野泰孝、竹下望、加藤康幸、金川修造、工藤宏一郎: 私たちはどの様に国立国際医療センターでマラリアを診断しているか、**第13回日本渡航医学会学術集会**、アクロス福岡、2009.7.17-18.

2) 加藤康幸、水野泰孝、竹下望、氏家無限、金川修造、工藤宏一郎、狩野繁之: 熱帯熱マラリアにおけるアーテメター・ルメファントリン合剤の使用経験、**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、2009.10.22-23.

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金(国際医学協力研究事業)

分担研究報告書

ワクチン分子の無細胞系合成システムの確立

研究分担者 坪井敬文 愛媛大学無細胞生命科学工学研究センター 教授

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

A. 研究目的

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

B. 研究方法

1) 熱帯熱マラリア原虫メロゾイト期組換えタンパク質の合成

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて、熱帯熱マラリア原虫タン

パク質の内、マラリアゲノム情報データベース (PlasmoDB) より、メロゾイト期にのみ発現が示唆されている遺伝子を選択し、昨年度樹立した cDNA クローンから PCR によって転写用の鋳型 DNA を作製し、それらとコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて組換えタンパク質を合成した。最終的に得られた組換えタンパク質を用いて、以下のスクリーニングを実施した。

2) ハイスループット抗原抗体アッセイ

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

3) タイ国におけるマラリア流行地からの血清試料の入手

なお、用いたマラリアに対する防御

免疫を保有していると考えられる血清はタイ国カンチャナブリ県のマラリア流行地コンモンタ村において昨年度入手し、また防御免疫を保有していないと考えられる血清は、タイ国ターク県のマラリア患者から入手した。(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果および考察

1) 熱帯熱マラリア原虫メロゾイト期組換えタンパク質の合成

熱帯熱マラリア原虫メロゾイト期に発現が予想されている分子の中から昨年度樹立した114種類のcDNAクローンから、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて組換えタンパク質を114種発現した。

2) ハイスループット抗原抗体アッセイの試行

上記の組換えタンパク質114種類を用いて、タイのコンモンタ村から得られた熱帯熱マラリアに対する防御抗体を含有している可能性の高いヒト免疫血清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人分の反応性をアルファスクリーニング法を用いて検討した。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。

3) 今後の課題

同定された新規の抗原に関しては、個別の研究を進めてゆき、ワクチン活性の同定にすすめてゆく予定である。

D. 結論

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いたハイスループット抗原抗体反応スクリーニングにより、新規マラリアワクチン候補抗原のスクリーニングがゲノムワイドに可能となると考えられた。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) Takeo S, Hisamori D, Matsuda S, Vinetz J, Sattabongkot J, Tsuboi T. Enzymatic characterization of the *Plasmodium vivax* chitinase, a potential malaria transmission-blocking target. *Parasitol Int.* 2009, 58:243-248.

3) Otsuki H, Kaneko O, Thongkuiatkul 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.

2. 学会発表

1) Otsuki H, Kaneko O, Thongkuiatkul A, Tachibana M, Iriko H, Takeo S, Tsuboi T, Torii M.

Erythrocyte-binding-like molecule and virulence of *Plasmodium yoelii*.

Forty-third annual U.S.- Japan Parasitic Diseases Panel Meeting, Tokyo, Japan, January 7-8, 2009.

2) Takeo S, Sakamoto H, Hirabayashi N, Torii M, Tsuboi T.

Novel antigens at *Plasmodium falciparum* schizont-merozoite stages as potential vaccine candidates.

Forty-third annual U.S.- Japan Parasitic Diseases Panel Meeting, Tokyo, Japan, January 7-8, 2009.

3) Kawazu S, Yano K, Otsuki H, Arai M, Komaki-Yasuda K, Tsuboi T, Torii M, Igarashi I, Kano S.

Disruption of 2-Cys peroxiredoxin TPx-1 gene in *Plasmodium berghei* hinders the sporozoite development.

Forty-third annual U.S.- Japan Parasitic Diseases Panel Meeting, Tokyo, Japan, January 7-8, 2009.

4) Suktawonjaroenpon W, Watanabe R,

Han ET, Buates S, Krasaesub S, Takeo S, Sirichaisinthop J, Tsuboi T, Sattabongkot J.

Update on field evaluation of LAMP for malaria diagnosis in Thailand.

Forty-third annual U.S.- Japan Parasitic Diseases Panel Meeting, Tokyo, Japan, January 7-8, 2009.

5) Tsuboi T, Wu Y.

Pfs230:Prefertilization

Transmission-blocking Vaccine Candidate.

Malaria Transmission Blocking Strategies. Bangkok, Thailand, March 12-13, 2009.

6) Tsuboi T, Takeo S, Otsuki H, Tachibana M, Sattabongkot J, Torii M. Wheat germ cell-free protein synthesis system: a breakthrough for the post-genome malaria vaccine candidate discovery.

Vivax malaria research III: 2009 and beyond, Gamboa, Panama, May 24-28, 2009.

7) Tachibana M, Iriko H, Muratova O, Song G, Wu Y, Sattabongkot J, Takeo S, Otsuki H, Torii M, Tsuboi T.

Immunization with N-terminal region of a gametocyte protein Pfs230 successfully induce transmission-blocking antibodies against *Plasmodium falciparum*.

The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan. September 8-11, 2009.

8) Tachibana M, Iriko H, Muratova O,

- Song G, Wu Y, Sattabongkot J, Takeo S, Otsuki H, Torii M, Tsuboi T.
Immunization with N-terminal region of a gametocyte protein Pfs230 successfully induce transmission-blocking antibodies against *Plasmodium falciparum*.
ASTMH 58th annual meeting, Washington DC, USA, November 18-22, 2009.
- 9) Takeo S, Sakamoto H, Kaneko T, Tachibana M, Miura K, Varma S, Sattabongkot J, Torii M, Tsuboi T.
Identification of novel blood-stage vaccine candidates against *Plasmodium falciparum* by high-throughput immunoscreening.
ASTMH 58th annual meeting, Washington DC, USA, November 18-22, 2009.
- 10) Aguiar JC, Bolton J, Wanga J, Urquhart A, Sacci JB, Limbach K, Tsuboi T, Ockenhouse C, Richie TL.
Discovering novel pre-erythrocytic antigens for malaria vaccines.
ASTMH 58th annual meeting, Washington DC, USA, November 18-22, 2009.
- 11) 宮田 健、小濱秀泰、原國哲也、坪井敬文、Sattabongkot Jetsumon、橘真由美、鳥居本美、松崎吾朗、新川 武
マラリアワクチン開発のための三部構成五価免疫賦活複合体
第 78 回日本寄生虫学会大会、東京都、3/27-28、2009。
- 12) Sungkapong Tippawan、Culleton Richard、矢幡一英、坪井敬文、鳥居本美、Sattabongkot Jetsumon、金子 修、Chotivanch Kesinee
Characterization of *Plasmodium vivax* subtelomeric transmembrane protein (PvSTP), a homolog of *P. falciparum* SURFIN.
第 78 回日本寄生虫学会大会、東京都、3/27-28、2009。
- 13) 横内ゆき、大槻 均、橘 真由美、伊与久菜摘、韓 銀澤、竹尾 暁、坪井敬文、鳥居本美
LDH 活性測定によるネズミマラリア原虫感染率の迅速簡便測定法の確立
第 78 回日本寄生虫学会大会、東京都、3/27-28、2009。
- 14) 坂本寛和、竹尾 暁、金子隆昌、谷上弘恵、松岡和弘、橘真由美、澤崎達也、Sattabongkot Jetsumon、鳥居本美、坪井敬文
高速免疫スクリーニングによる新規熱帯熱マラリア赤血球期ワクチン候補抗原の探索
第 78 回日本寄生虫学会大会、東京都、3/27-28、2009。
- 15) 橘真由美、Wu Yimin、入子英幸、大槻 均、Sattabongkot Jetsumon、竹尾 暁、鳥居本美、坪井敬文
コムギ無細胞系を用いた抗体誘導可能な熱帯熱マラリア伝搬阻止ワクチン候補抗原 Pfs230 の作製
第 78 回日本寄生虫学会大会、東京都、3/27-28、2009。
- 16) Kangwanransan Niwat、Jenwithisuk

- Rachaneeporn、橘真由美、坪井敬文、鳥居本美
A novel ookinete surface protein with high potential of transmission-blocking vaccine candidate.
第 78 回日本寄生虫学会大会、東京都、3/27-28、2009。
- 17) 小濱秀泰、宮田 健、原國哲也、坪井敬文、Sattabongkot Jetsumon、橘真由美、鳥居本美、松崎吾朗、新川 武
酵母 *Pichia pastoris* 発現三日熱マラリア伝搬阻止ワクチン Pvs25 の感染防御効果
第 78 回日本寄生虫学会大会、東京都、3/27-28、2009。
- 18) 高橋優三、奥祐三郎、青木 孝、赤尾信明、嶋田淳子、鈴木 守、松岡裕之、有園直樹、坪井敬文、金澤 保、由井克之、竹内 勤
日本における寄生虫学・医動物学教育の現況調査報告
第 78 回日本寄生虫学会大会、東京都、3/27-28、2009。
- 19) 加藤 晶、竹尾 暁、坪井 敬文
マラリア原虫メロゾイトにおける新規 Inner Membrane Complex 関連分子の探索
第 17 回分子寄生虫学ワークショップ、草津町、8/6-9、2009。
- 20) 竹尾 暁、坪井 敬文
網羅と決め打ち：コムギ胚芽無細胞系組換えタンパク質合成法を用いた、マラリア原虫赤血球期発現分子の解析
第 17 回分子寄生虫学ワークショップ、草津町、8/6-9、2009。
- 21) 金子 隆昌、坂本 寛和、竹尾 暁、坪井 敬文
マラリア原虫に対する増殖阻害率を測定済みの抗体を用いた新規ワクチン候補抗原の探索
第 17 回分子寄生虫学ワークショップ、草津町、8/6-9、2009。
- 22) 埜本 竜宏、竹尾 暁、坪井 敬文
熱帯熱マラリア原虫メロゾイトにおける新規抗原タンパク質の性状解析
第 17 回分子寄生虫学ワークショップ、草津町、8/6-9、2009。
- 23) 北村 圭、熊谷 貴、Bethel Bentum K、三田村俊秀、坪井敬文、朝日博子、太田伸生
熱帯熱マラリア原虫 *Plasmodium falciparum* におけるオートファジーの役割
第 17 回分子寄生虫学ワークショップ、草津町、8/6-9、2009。
- 24) 佐野 桂、畑 昌幸、坪井敬文、上田貴志、由比良子、伊藤喜重、中野明彦、北 潔、室伏きみ子、佐々木成江
熱帯熱マラリア原虫ミトコンドリア DNA polymerase の解析
第 8 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム、豊中市、10/9-10、2009。
- 25) 大槻 均、石野智子、金子 修、橘 真由美、坪井敬文、鳥居本美
ネズミマラリア原虫赤血球結合タンパク (EBL) の細胞内輸送ドメインの機能解析

- 第 8 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム、豊中市、10/9-10、2009。
- 26) 北村 圭、熊谷 貴、Bethel Bentum K、三田村俊秀、坪井敬文、太田伸生
熱帯熱マラリア原虫のオートファジー関連分子
第 8 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム、豊中市、10/9-10、2009。
- 27) Akira Kaneko、Luis Fernando Chaves、George Taleo、Hedvig Perlmann、Hideaki Eto、Satoru Takeo、Takafumi Tsuboi、Chris Drakeley、Kazuyuki Tanabe、Marita Troye-Blomberg
Plasmodium vivax resurgence a decade after malaria elimination on Aneityum island.
第 8 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム、豊中市、10/9-10、2009。
- 28) 竹尾 暁、坂本寛和、金子隆昌、埤本竜宏、Jetsumon Sattabongkot、坪井敬文
熱帯熱マラリア原虫の赤血球期分子：免疫スクリーニングから新規抗原分子の解析
第 8 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム、豊中市、10/9-10、2009。
- 29) 竹尾 暁、坂本寛和、金子隆昌、坪井敬文
赤血球期マラリアワクチン候補抗原分子を探索する免疫スクリーニング
第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、12/9-12、2009。
- 30) 大槻 均、金子 修、Amporn Thongkukiatkul、橘 真由美、入子 英幸、竹尾 暁、坪井 敬文、鳥居 本

美
マラリア原虫の赤血球侵入に必須な分子(EBL)の細胞内移行と病原性を決定する部位の同定
第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、12/9-12、2009。

厚生科学研究費補助金（国際医学協力研究事業）
分担研究報告書

赤痢アメーバの病原機構の解明

研究分担者 野崎 智義 国立感染症研究所 部長

研究要旨 本研究はアジア・アフリカ等の開発途上国を中心として蔓延する重要な腸管寄生原虫症である赤痢アメーバ症を対象として、その特殊な病原機構と代謝を明らかにすることを目的としている。本年度は、細胞外の酸化ストレスが赤痢アメーバのエネルギー代謝に対する影響に関する解析を行った。

A. 研究目的

アメーバ赤痢（赤痢アメーバ症）は熱帯・亜熱帯の開発途上国を中心として世界の1%が感染する重要な感染症である。一方、我が国を含む一部先進諸国においても、知的障害者および男性同性愛者において重度の感染浸淫を引き起こしている。2005年の赤痢アメーバの全ゲノムの解読(Lofus Nature 2005)により標準株における全遺伝子地図が明らかになり、本原虫の病原性や寄生の分子メカニズムの青写真が明らかになった。しかしながら個別の経路やタンパク質の機能に関しては依然未解明なものが多い、ポストゲノム時代のアプローチが不可欠である。

我々は赤痢アメーバのエネルギー産生の解明に主眼をおいて研究を継続している。赤痢アメーバは一般の原核・真核生物と異なり、主要な抗酸化物質であるグルタチオン並びに、グルタチオン生合成並びに代謝の能力を持たず、NADPH依存性酸化還元酵素などに代表される特殊な酸化ストレス防御機構を有している。しかしながら、酸化ストレスが赤痢アメーバの中心代謝に与える影響に関してはほとんど未解明である。そこで本研究では、酸化ストレスが赤痢アメーバの中心代謝に与える影響をキャピラリー電気泳動法と質量分析法による網羅的代謝プロファイリングにより解析し

た。

B. 研究方法

1. 培養

赤痢アメーバ株 HM-1: IMSS cl6 (Louis Buddy Diamond の分離による) の培養は常法の無菌培養法に従った。

2. メタボロミクス

赤痢アメーバの代謝物の抽出、キャピラリー電気泳動法、飛行時間計測質量分析、代謝物の定量に関しては既に Soga らにより報告された方法を用いた。

（倫理面への配慮）本研究に関わる病原体の取扱に関する許可は当該研究機関にて得られている。

C. 研究結果

1. 酸化ストレスによる細胞内システイン/シスチンの影響

赤痢アメーバの栄養型にパラコートと大気中の酸素の暴露を行ったところ、細胞内のシステイン（還元型）とシスチン（酸化型）の細胞内濃度はいずれも約半分に減少した（図1）。

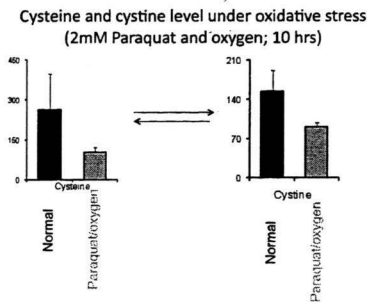


図1 パラコートと酸素ストレスによる細胞内システイン/シスチン濃度の変化

2. 酸素とパラコートによる細胞内活性酸素種産生

赤痢アメーバ栄養型を大気中酸素単独或は酸素プラス2mMパラコートに12時間暴露し、細胞内活性酸素種(ROS)を定量した。図2に見られる通り、酸素単独で約60%、両者で約2.7倍のROS濃度の上昇が見られた。

Induction of ROS by ambient oxygen and 2mM paraquat for 10 hrs

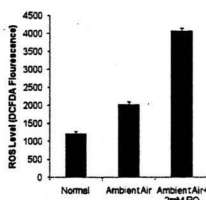


図2 大気中酸素とパラコートの活性酸素種合成への寄与

更に、パラコートによるROSの産生は量と時間に依存的であった(図3)。

Dose and time dependence of ROS production by Paraquat and oxygen

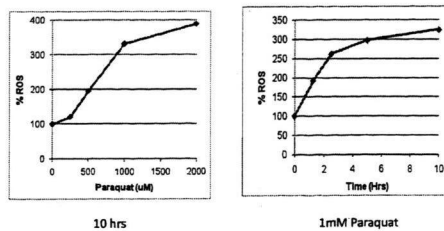


図3 パラコートによるROS産生の量・時間依存性

3. 酸素とパラコート暴露による代謝への影響、特に解糖経路に関して

大きく濃度が上昇した代謝中間体は、解糖経路の最初の部分とペントースリン酸経路などの集中していた。特に解糖系最上流のグルコース6リン酸、フルクトース6リン酸、ペントースリン酸経路のリブローズ5リン酸、リブローズ1,5リン酸、エリスローズ4リン酸、セプトローズ7リン酸、更に解糖経路とグリセリン脂質をつなぐグリセロール3リン酸、セリンの合成中間体0-フォスフォセリン、解糖経路の中間に位置する3-フォスフォグリセリン酸、CoAが顕著に増加していた。一方で、アセチルCoAやマレイン酸は減少していた(図4)。

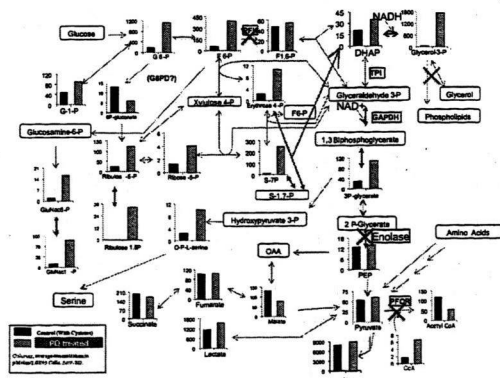


図4 酸化ストレス暴露による細胞内代謝物の変化

D. 考察及び結論

赤痢アメーバは嫌氣的寄生適応の過程で通常のミトコンドリアの機能を失った。赤痢アメーバは酸化的リン酸化によるATP合成能力を欠き、解糖経路と酢酸・エタノール発酵によってエネルギーを合成している。赤痢アメーバ原虫におけるエネルギー合成においてはこの発酵に不可欠なアセチルCoAの生成とその前駆体としてのピルビン酸の生成が重要であるが、ピルビン酸の生成は解糖並びにアミノ酸の分解により行われる。本研究では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。また、途中の流れの途絶により還流された代謝物はペントースリン酸経路へとredirectされているように見える。尚、赤痢アメーバにおいてはグルコース6リン酸デヒドロゲナーゼはゲノム中に存在せず、解糖回路の中間代謝産物の還流はグルコース6リン酸でなく、フルクトース6リン酸やグリセルアルデヒド3リン酸を介して行われていると考えられる。更に、グリセロール3リン酸濃度の高度の上昇は酸化ストレスのグリセロリン脂質合成への影響を強く示唆している。

嫌気原虫におけるエネルギー合成系は哺乳動物と大きく異なり、本研究により明らかにされた、酸化ストレスによる中心代謝経路の調節機構は前例がない。PFORはピルビン酸、 α ケトブチル酸からアセチルCoA、プロピオニルCoAを産生し、電子は酸化型Fdxに受け渡される。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。

今後他の代謝経路の代謝中間産物の解析を行い、酸化ストレスの代謝に与える影響を総合的に評価したい。

E. 健康危険情報

該当せず

F. 研究発表

1. 論文発表

- (i) 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.
- (ii) Sato, D. and Nozaki, T. (2009) Methionine gamma-lyase: the unique reaction mechanism, physiological roles, and therapeutic applications against infectious diseases and cancers. *IUBMB Life*, 61, 1019-1028.

2. 学会発表

- (i) Jeelani, G., Husain, A., Sato, D., Suematsu, M., Ali, V., and Nozaki, T. Biochemical and physiological function of a novel reductase from the microaerophilic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji, September 8-11, 2009.
- (ii) Husain, A., Jeelani, G., Sato, D., Mi-ichi, F., Soga, T., Suematsu, M., Ali, V., and Nozaki, T. Metabolomic and transcriptomic analysis of sulfur-containing amino acid

metabolism in enteric
protozoan parasite *Entamoeba*
histolytica. The 9th Awaji
International Forum on
Infection and Immunity. Awaji,
September 8-11, 2009.

なし

G. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当せず。
2. 実用新案登録
該当せず

フィラリア症の疫学研究（診断法の開発と野外応用）

研究分担者 木村英作 愛知医科大学医学部教授

研究要旨

- (i) 繰り返し集団治療を受けたスリランカの3村において、マイクロフィラリア（mf）検査、尿 ELISA を同時に実施して比較検討を行った。尿 ELISA は、mf 陽性率が低下した時には特に有用と考えられた。
- (ii) 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開発した。
- (iii) 石鹼と水で象皮病患者の患足を洗い、細菌の二次感染を防止すると象皮病の進展を食い止めるのみならず、次第に改善することが示された。

A. 研究目的

WHO は 2020 年までに世界からリンパ系フィラリア症を 'eliminate' することを目標に Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis (GPELF) を実施している。その基本戦略は流行地住民の集団治療 (MDA) で、年 1 回、5 年間繰り返すことになっている。GPELF では、象皮病や陰嚢水腫など既存の患者をケアすることにも重点を置いている。本研究は、この世界的計画に寄与することを目的としている。

我々が開発した尿を検体とする免疫診断法（尿 ELISA）は、疫学調査の実施を著しく容易にした。2009 年度は、尿 ELISA を応用した幾つかの野外調査・研究がスリランカで実施された。また、器機を要

しない新しい免疫診断法の開発、象皮病患者のケアに関する研究も行われた。

B. 研究方法

1. MDA の効果判定

Hamugewatta, Matotagama, Walgama の 3 地区で 7 年間に MDA が 7-13 回実施された。その効果を判定するために、夜間採血によるマイクロフィラリア検出、および尿 ELISA を実施し比較検討を行った。

2. 高比重ラテックス・ビーズを用いた尿中フィラリア抗体の検出

V 底の 96 穴マイクロタイタープレートを用い、組み換え SXP-1 抗原を結合させた着色ビーズと検体尿を反応させる系を開発した。反応時間は室温で 4 時間、結

果は目視で判定できる。

3. 象皮病患者の治療に関する研究

象皮病はリンパ浮腫に繰り返しの細菌感染が重なることによって悪化する。感染防止のため、石鹼と水による患足の washing を1日1回実施する方法の効果が検討された。Washing の確認と指導を毎日行うグループ (A 群) と月に1回だけ行うグループ (B 群) が、開始より1年後に比較された。

4. 媒介蚊調査の簡便化

集団治療の効果判定の方法として、媒介蚊の感染率調査がある。通常、蚊を1匹ずつ解剖してフィラリア幼虫の検出を行う。最近では、蚊を数10匹ずつまとめてフィラリア DNA を検出する PCR 方法が行われるようになった。我々は、この方法をさらに簡便化するために LAMP (loop-mediated isothermal amplification) 法を導入すべく検討を行っている。

(倫理面の配慮)

本研究は、愛知医科大学倫理委員会の審査を経て実施されている。スリランカにおける共同研究者は、その所属機関(ルフナ大学医学部)において同様の審査・承認を得ている。被検者には十分な説明を行い同意を得ている。

C. 研究結果

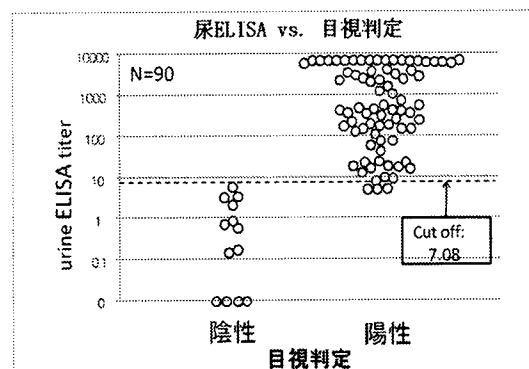
1. MDA の効果判定

Hamugewatta, Matotagama, Walgama 3 地区で、2008 年 6~7 月に 2,617 名が尿

ELISA と mf 検査を受けた。その結果、前者の陽性率は 16.4% (429 人陽性)、後者のそれは 0.46% (12 人陽性) であった。Mf 陽性者は 1 名 (16 歳) を除きほとんどが中高年者である。一方、尿 ELISA では 15 歳以下 22 人、10 歳以下 4 人の陽性者が検出された。

2. 高比重ラテックス・ビーズを用いた尿中フィラリア抗体の検出

尿 ELISA の結果と目視の結果を比較した。ELISA 陽性尿と陰性尿を目視によりほぼ正しく判定することが出来た。ビーズ法は概ね尿 ELISA に近い感度を持つと考えられる。本法のさらなる改良に取り組んでいる。



3. 象皮病患者の治療に関する研究

共同研究者の医師の指導のもとで患者とその家族が中心となってケアが行われた。1年後、A 群では 2 次感染による熱発作の頻度が 5.0 回/年より 0.2 回/年に減少した。また患足のボリュームは 85.7% で明らかな減少を見た。QOL の改善も認められた。B 群では、A 群ほどではないものの同様に顕著な改善が得られた。



D. 考察

MDA の効果判定

今回の調査で、尿 ELISA は mf 検査に比較してはるかに多くの感染者を検出した。特に小児の陽性率は伝搬の終息や再燃の indicator として利用できるのも、尿 ELISA の有用性が示されたことになる(なお、mf 陽性者はすべて尿 ELISA 陽性であった。)

高比重ラテックス・ビーズを用いた尿中フィラリア抗体の検出

ELISA は測定器機を要するため、途上国の現場では普及しにくい。これに代わる簡便な診断法の開発が期待されている。今回のビーズ法は、目視での判定が可能であり、野外応用で有用性が確立されれば大きな進歩である。

象皮病患者の治療に関する研究

「不治の病」とされていた象皮病が、最近では、石鹼と水で毎日丁寧に洗い患皮膚の細菌二次感染を防止すれば改善すると言われるようになった。このような患者ケアが実際に有効であることが確認された。

E. 結論

(i) 集団治療によって、mf 陽性率が極めて低くなった時には、流行の終結、あるいは再燃を確認する上で尿 ELISA による抗体検査が有用であると考えられた。

(ii) 組み換え SXP-1 抗原を結合させた着色ラテックス・ビーズを用い、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開発した。器機を必要としない診断法が確立できれば途上国などで大きな貢献が出来るかと期待される。

(iii) 石鹼と水で象皮病の患足を洗い、細菌感染を防止すると象皮病が改善することが示された。多くの患者が恩恵を受けられるように組織作りを進める必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) 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.

2. 学会発表

(1) Identification of endemic areas of bancroftian filariasis in Hambantota district, Sri Lanka, using Rapid Assessment Procedures (RAPs). Yahathugoda TC, Weerasooriya MV, Kimura E.

10th International Symposium on Vector & Vector-borne Diseases. 4-6 Nov, 2009.

Programme and Abstracts: p. 171 (Goa, India).

(2) Annual mass drug administration in Walgama, a suburb of Matara, Sri Lanka and its evaluation. Yahathugoda TC, Weerasooriya MV, Kimura E.

10th Int Symposium on Vector & Vector-borne Dis. 4-6 Nov, 2009. Programme and Abstracts: p. 172 (Goa, India).

(3) Evaluation of two monitoring schemes after one year of Community Home-Based Care (CHBC) programme of morbidity control in lymphatic filariasis in three suburbs of Matara. Yahathugoda TC, Weerasooriya MV, Kimura E.

10th Int Symposium on Vector & Vector-borne Dis. 4-6 Nov, 2009. Programme and Abstracts: p. 173 (Goa, India).

(4) Linkage analysis of elephantiasis by affected sib-pairs in Sri Lanka. Weerasooriya MV, Takaki A, Yahathugoda TC, Kikuchi M, Yasunami M, Kimura E, Itoh M, Yoshimura K, Hirayama K. 2009. *Galle Medical*

Journal, 14(1): 99-100 (Galle, Sri Lanka)

(5) 高比重ラテックス粒子を用いた抗フィラリア IgG4 抗体の検出. 長岡史晃、伊藤誠、高木秀和、木村英作. 第 50 回日本熱帯医学会大会. 22-23 Oct, 2009. プログラム抄録集: p. 107 (沖縄コンベンションセンター).

(6) ミトコンドリア DNA の C01 から見たフィラリアの分子系統関係. 吾妻健、宇仁茂彦、高岡宏行、木村英作. 第 78 回日本寄生虫学会大会. 27-28 Mar, 2009. プログラム抄録集: p. 57 (法政大学市ヶ谷キャンパス外濠校舎).

(7) 世界からのフィラリア症根絶計画: 現状と成果、今後の課題. 木村英作、伊藤誠、高木秀和、武居敦英. 第 78 回日本寄生虫学会大会. 27-28 Mar, 2009. プログラム抄録集: p. 57 (法政大学市ヶ谷キャンパス外濠校舎).

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当無し