

厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書

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

研究分担者 松岡裕之 自治医科大学・教授

研究要旨 遺伝子導入技術により人類に有用なワクチン蛋白を蚊につくらせ、吸血とともにワクチン蛋白を注入してくれる蚊のモデルをつくるため、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た。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。

A. 研究目的

マラリアをはじめ各種疾病を媒介するために嫌悪されている蚊であるが、見方を変えると吸血相手に唾液を打ち込んで抗唾液抗体をつくらせる働きをしている。遺伝子導入技術により人類に有用なワクチン蛋白を蚊につくらせ、吸血とともにワクチン蛋白を注入してくれる有益な蚊がつかれないかと考えた。今回は外来性蛋白のモデルとして DsRed を唾液腺に発現させることを試みた。

B. 研究方法

当ラボで新規に発見したハマダラカ唾液腺特有蛋白遺伝子のプロモーター領域に、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た。

C. 研究結果

唾液腺に DsRed 蛋白を産生する遺伝子導入蚊の作成に成功した。唾液腺には DsRed 蛋白が 40ng 程度発現した。DsRed は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。。この蚊群を繰り返しマウスに吸血させたところ、マウスは抗唾液抗体を産生したものの DsRed 蛋白に対する抗体の誘導はごくわずかであった。

D. 考察

遺伝子導入蚊の唾液腺において、外来性蛋白 DsRed を産生させることに成功した。DsRed は紫外線を当てると赤色に光るため、蛋白の局在が観察しやすく、遺伝子導入蚊のよいモデルとなった。今後は遺伝子導入蚊の刺咬により、効率よく抗体を産生させられる工夫をしてゆかねばならない。

E. 結論

遺伝子導入蚊の作成に成功した。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。

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 南雲浩志, 山本大介, 吉田栄人, 松岡裕之: マラリアワクチン候補タンパク PfcSP を唾液腺に発現する遺伝子操作ハマダラカの作製 第 60 回日本熱帯医学会大会 2009 年 10 月 22-23 日 (抄録集 p100)

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

マラリアにおける宿主病原体相互関係の解析

研究分担者 久枝 一 群馬大学医学系研究科教授

研究要旨 マラリアの流行地域では蠕虫感染も蔓延しており、種々の免疫修飾作用をもつ蠕虫感染がマラリアに対する免疫応答に与える影響は小さくないと考えられる。本研究では、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。

A. 研究目的

マラリアが今なお問題となっている途上国での環境、例えば、栄養不良、その他の感染症の重複感染はマラリアに対する免疫応答に大きな影響を与えていることが示されている。なかでもマラリアの流行地域とほぼ同じ分布を呈する蠕虫感染症は頻りに重複感染が生じていると想定される。蠕虫感染は種々の免疫応答を修飾することが知られている。例えば、好酸球や IgE の高値で特徴づけられる Th2 ヘルパーT細胞の活性化が挙げられる。また、CD4⁺CD25⁺制御性T細胞 (Treg) を選択的に活性化することも報告されてきた。今年度は蠕虫感染がマラリア原虫に対する免疫応答に与える影響を検討した。

B. 研究方法

近交系マウスにマウスの線虫 *Heligmosomoides polygyrus* (Hp) の感染幼虫を経口的に、ネズミマラリア原虫 *Plasmodium yoelii* 17XNL (PyNL) を腹腔内に接種して感染させた。感染後の経過を末梢血中の感染赤血球の割合である虫血症率と致死率で評価した。Treg は脾臓より MACS 法により精製し、その機能をT細胞の増殖を抑制する程度で評価した。

全ての動物実験は九州大学倫理委員会の承認を得た後、ガイドラインに従って行われた。

C. 研究結果

1. Hp 共感染マウスにおけるマラリアの病態

マウスに PyNL を感染させると一過性に原虫が増殖するが、最終的には全てのマウスが感染をクリアする。Hp を先行感染させたマウスでは、PyNL 感染早期より、マラリア原虫の増殖が顕著であり、驚くべきことに全てのマウスが死に至った。

Hp によるマラリアに対する抵抗性の減弱は Hp を駆虫薬で治療するとその効果はなくなったことから Hp の存在自体に依存することが明らかとなった。

2. Hp 共感染の抗マラリア免疫に対する影響

PyNL 感染後 5-7 日目に脾臓中の T細胞応答を検討した所、PyNL の単独感染では感染赤血球に应答して T細胞の増殖、IFN- γ の産生が強く認められた。一方、Hp の共感染マウスでは有意にそれらのマラリア原虫に対する反応性が低下していた。また、血中のマラリア原虫に対する抗体価は PyNL 単独感染では IgG2a の高値が認められた。しかしながら Hp 共存することで IgG2a は有意に減少していた。一方で IgG1 は不変であった。これらの結果から、Hp がマラリア原虫に対する細胞性免疫、液性免疫を抑制していることが明らかになった。

3. Hp 共感染による Treg の活性化

次いで、免疫抑制性 Treg の関与を検討した。PyNL 単独感染で脾臓中の CD4⁺CD25⁺foxp3⁺ の Treg が微増していた。Hp が共感染することで有意に Treg が増加していた。さらには、Treg の機能である、通常の T細胞の増殖を抑制する能力が、共感染群のみで有意に強くなっていた。これは、Treg の活性化を反映していると思われ、致死感染を起こす強毒のマラリア原虫株で認められる所見と同じであった。

4. Hp による免疫抑制における Treg の関与

Hp の共感染で認められる免疫抑制とそれによるマラリア原虫に対する高感受性への Treg の関与を調べた。PyNL を感染させる前に、CD25 に対する抗体を投与することで Treg を選択的に除去した。PyNL の単独感染ではやはり一過性の感染を示した。Hp が共存すると、再度全てのマウスで速やかなマラリア原虫の増殖が見られ、死に至った。

共感染マウスから Treg を除去すると、非除去群で見られた原虫の増殖は認められなくなり、半数のマウスが生き残るようになった。また、これらのマウスでは抑制されていた T 細胞応答、抗体応答が回復していた。以上のことは、少なくとも部分的には、Treg が Hp による免疫抑制ならびに PyNL に対する抵抗性の低下に寄与していることが明らかとなった。

D. 考察

蠕虫感染の免疫系への影響はよく知られる所である。本研究では Treg の活性化を介して免疫抑制を起こしていること、その結果として本来は一過性感染を起こすマラリア原虫に対しても防御免疫が樹立できなくなることを見出した。Hp の共感染という外的要因による Treg の活性化で一過性感染を致死性感染に変換できたことは、Treg の活性化の有無がマラリア原虫の病原性を決定するという申請者らがこれまでに提唱してきた説をさらに支持するものである。共感染時の Treg の活性化は、PyNL 単独、あるいは Hp 単独では見られない。したがって Hp は Treg 活性化の条件を整え、そこに PyNL が感染することで初めて Treg の活性化起こるのであろう。この分子メカニズムを明らかにするのは今後の課題である。

E. 結論

マウスモデルを用いて、蠕虫感染が Treg の活性化を通して抗マラリア免疫を抑制していることを見出した。これはマラリア流行域においてマラリア患者でも起こっていることが想定される。したがって、マラリアの効果的な治療には蠕虫感染も治療することが重要であることを示唆するものである。

G. 論文発表

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.

H. 知的財産権の出願・登録状況 該当なし

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

マラリア感染におけるT細胞免疫応答の解析

研究分担者 由井 克之 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科教授

研究要旨

＜赤内型マラリア感染＞マラリア感染においては、CD4⁺ T細胞が感染防御に重要な役割を担っているが、その制御については十分に明らかではない。我々が作製したモデル抗原を発現するマウスマラリア原虫*Plasmodium berghei* ANKA (PbA) の実験系を用いて、マラリア感染中のCD4⁺ T細胞活性制御に関する研究を行った。その結果、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。肝細胞期では、CD8⁺ T細胞による防御免疫が成立することが明らかにされている。しかしながら、これまで明らかになった抗原は僅かで、研究が十分に進んでいない。モデル抗原を用いた実験系を樹立することができれば、研究の幅は大きく広がる。また、ワクチン候補抗原の探索にも寄与できると考えられる。

A. 研究目的

マラリアは、感染ハマダラ蚊の吸血に伴いヒトをはじめとする哺乳動物への感染が成立し、最初は肝細胞期、引き続き赤血球期へと移行して発症する。肝細胞期においてはCD8⁺ T細胞、赤血球期においては抗体やCD4⁺ T細胞が感染防御に主要な役割を果たしていることが知られているが、その制御機構やエフェクター機構は十分に明らかではない。

我々は、モデル抗原としてマラリア原虫に卵白アルブミン (ovalbumin, OVA) を導入した組換えマラリア原虫 (OVA-PbA) とOVA特異的T細胞受容体 (TCR) トラ

ンスジェニックマウスT細胞の組み合わせを用いた実験系により、マラリア感染におけるT細胞の機能制御と感染防御における役割について明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

OVA発現組換えマラリア原虫の作成については、昨年報告した。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或いは野性型PbA感染を行った。原虫血症上昇後、CD4⁺ T細胞を精製し、OT-II細胞

を含むCD4⁺ T細胞の反応を細胞表面マーカー、ELISA法、細胞内サイトカイン染色等により解析した。

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2日後にマウスを安楽死させ、肝臓内のマラリア原虫の量をreal-time RT-PCR法により測定した。また、感染後定期的に採血し原虫血症の推移をモニターした。

C. 研究結果

モデルマラリア抗原を用いた研究から、以下の点が明らかになった。

1. OT-II細胞を移入したPbA感染B6マウスのCD4⁺ T細胞は、OVA抗原刺激に対してIFN- γ を産生した。しかしながら産生細胞はOT-IIではなく宿主B6のCD4⁺ T細胞であることが明らかになった。
2. 上記の結果からさらに検討した結果、PbA感染マウスのCD4⁺ T細胞はIL-2受容体を発現し、TCRの刺激が無くてもIL-2の刺激だけでIFN- γ を産生することが明らかになった。
3. 感染マウスのCD4⁺ T細胞は、マラリア粗抗原に反応してIFN- γ を産生することができる。この反応は抗CD25 (IL-2受容体) 抗体で完全に阻止されることから、CD4⁺ T細胞のマラリア抗原に対するIFN- γ 産生反応はIL-2依存性であることが明らかになった。
4. OVA-PbA組換えマラリア原虫では、

組換え蛋白OVAは原虫細胞質内に発現されることが予想される。活性化OT-II細胞

(OVA特異的トランスジェニックマウスのCD8⁺ T細胞) をマウスに移入した後、この原虫のスポロゾイト感染実験を行ったところ、原虫血症は全く出現せず、肝臓内原虫RNA量も著名に低下していた。即ち肝細胞期において原虫感染が完全に阻止されたことが示された。このことから、モデル抗原組換えマラリア原虫を用いたマラリア肝細胞期防御免疫の解析実験系が樹立された。

D. 考察

マラリア感染中のマウスCD4⁺ T細胞は、IL-2受容体を発現し、TCRの刺激がなくてもIL-2刺激に対してIFN- γ を産生することが明らかになった。このことは、マラリア感染時においては、他の細胞が産生したIL-2にも原虫特異的T細胞が傍観者的に反応することを示している。マラリアと他感染症との重複感染においては、このようなことが病態に影響する可能性が十分に考えられる。また、TCR刺激に対するCD4⁺ T細胞のIFN- γ 産生には、IL-2依存性の反応と非依存性の反応があることが明らかになった。どのような場合にIL-2依存性・非依存性になるのか、今後の研究が必要である。

肝細胞期の防御免疫に関しては、モデル抗原を用いた実験系を作製することができた。従来系ではCS蛋白抗原を用い、BALB/cマウスの実験に限られたが、モデル抗原を用いることにより肝細胞期防

御免疫の研究の幅が広がり、今後の研究に資することが期待できる。

E. 結語

昨年は主としてCD8⁺ T細胞について報告したが、今年度は赤血球期におけるCD4⁺ T細胞を中心に報告した。また、肝細胞期の免疫応答を研究するモデル実験系も作製することができた。今後とも肝細胞期から赤血球期にかけて、T細胞の免疫応答機構の解明に総合的に取り組んでいきたい。また、これらの成果を治療法の開発やワクチン開発へと発展させたい。

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

Antigen-specific T cell responses during infection with *Plasmodium berghei*: studies using OVA as a model malaria antigen, M. Miyakoda, D. Kimura, M. Yuda, K. Yui, The 4th Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases, 11月26-28日、長崎

Induction and maintenance of memory CD8⁺ T cells during infection with *Plasmodium berghei* ANKA, M. Miyakoda, D. Kimura, Honma, K., T. Tamura, K. Kimura, K. Yui, 日本免疫学会学術集会、2009年12月2

日-4日、大阪,

CD4⁺ T cells from mice infected with *Plasmodium berghei* ANKA produce high levels of IFN- γ in response to cytokine like-molecule generated by other CD4⁺ T cells, D. Kimura, M. Miyakoda, K. Kimura, T. Tamura, K. Honma, K. Yui, 日本免疫学会学術集会、2009年12月2日-4日、大阪,

IRF-4 欠損 CD4 T 細胞においては、GATA-3 発現だけでは Th2 分化に不十分である。日本免疫学会学術集会、2009年12月2日-4日、大阪,

Regulation of IFN- γ production in CD4⁺ T cells during infection with *Plasmodium berghei*, K. Yui, D. Kimura, Adaptive and innate immune responses to neglected tropical diseases, January 10-11, 2010, San Diego, USA

H. 知的所有権の出願・登録状況
該当なし

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

マラリア原虫の赤血球侵入関連分子の解析

研究分担者 金子 修 長崎大学熱帯医学研究所 教授

研究要旨

マラリアは熱帯地方において、いまだ重篤な感染症である。マラリア原虫はヒト体内では赤血球への再侵入を繰り返すことで増殖するため、赤血球侵入の分子機構を詳細にすることは、ワクチン開発や創薬への基盤情報を提供することとなる。マラリア原虫が赤血球に侵入の際には、原虫と赤血球との間に移動接合体と呼ばれる構造を形成するが、この形成に関与すると思われる分子群についての解析を中心に研究を進めた。

A. 研究目的

移動接合体を形成する AMA1 と RON タンパク質の間の結合を阻害すると、赤血球侵入が阻害されることが示されているため、移動接合体を形成するのに重要なドメインを明らかにすること。また、EBL と呼ばれる赤血球認識リガンドの細胞内輸送領域が弱毒株と強毒株の間で一塩基異なっていることを見出しているが、この置換が弱毒と強毒を規定することを証明すること。

B. 研究方法

RON2 や RON4 を部分的に発現する遺伝子組換えマラリア原虫を作成し、タンパク質間の相互作用を検討する。RON タンパク質のうち、研究がおこなわれていなかった RON5 について、特異抗体を作成し、解析を進める。ネズミマラリア原虫の弱毒株と強毒株の間で EBL 分子の遺伝子型を、異なる株のタイプに置換し、マウスに対する病勢を観察する。

C. 研究結果

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

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。EBL については、強毒株の EBL を弱毒株型にすると、完全に弱毒型となった。一方、弱毒株の EBL を強毒株型にすると、感染率は上昇したが感染したマウスが死ぬまでには至らなかった。

D. 考察

RON-AMA1 複合体形成に関与する RON の領域の確認を行う準備を整えた。RON5 について、免疫沈降により複合体に含まれているか否かの検討を行う準備が整った。EBL 分子の解析の結果、EBL がネズミマラリア原虫の弱毒・強毒を規定する主要な因子であり、かつ、第二の因子が存在することが示唆された。

E. 研究発表

1. 論文発表

- Otsuki H, **Kaneko O**, Thongkukiatkul 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 *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Int* 58:196-9

- (2009/06)
3. 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)
 4. Culleton R, **Kaneko O**. Erythrocyte binding ligands in malaria parasites: Intracellular trafficking and parasite virulence. *Acta Tropica* (in press)
2. 学会発表
1. Culleton R, Sittiporn P, **Kaneko O**, Cheesman S, Carter R. "2A-01: Gene encoding erythrocyte binding ligand linked to blood stage multiplication rate in *Plasmodium yoelii*. (oral)" 第78回日本寄生虫学会大会プログラム・抄録集 p78、東京 (2009. Mar. 27-28)
 2. Alexandre JSF, Morakot Kaewthamasorn M, Yahata K, Nakazawa S, Torii M, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, **Kaneko O**. "2A-02: Diversity of the *rhoph1/clag* multigene family of *Plasmodium falciparum* in Thailand. (oral)" 第78回日本寄生虫学会大会プログラム・抄録集 p78、東京 (2009. Mar. 27-28)
 3. Kaewthamasorn M, Yahata Y, Alexandre JSF, Nakazawa S, Torii M, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, **Kaneko O**. "2A-03: Positive diversifying selection on *Plasmodium falciparum* SURFIN4.2. (oral)" 第78回日本寄生虫学会大会プログラム・抄録集 p78、東京 (2009. Mar. 27-28)
 4. Sungkapong T, Culleton R, Yahata K, Tsuboi T, Torii M, Sattabongkot J, **Kaneko O**, Chotivanch K. "2A-05: Characterization of *Plasmodium vivax* subtelomeric transmembrane protein (PvSTP), a homolog of *P. falciparum* SURFIN. (oral)" 第78回日本寄生虫学会大会プログラム・抄録集 p79、東京 (2009. Mar. 27-28)
 5. Tang J, Yahata K, Torii M, **Kaneko O**. "2A-04: The diversity of the extracellular domains of *Plasmodium falciparum* SURFIN family proteins; evidence for positive diversifying selection. (oral)" 第78回日本寄生虫学会大会プログラム・抄録集 p78、東京 (2009. Mar. 27-28)
 6. Zhu XT, Sungkapong T, Kaewthamasorn M, Culleton R, Tachibana M, Tsuboi T, Torii M, Yahata K, Cao YM, Chotivanch K, **Kaneko O**. "*Plasmodium vivax* subtelomeric transmembrane protein 1 (PvSTP1), a homolog of *P. falciparum* SURFIN; polymorphism and human sera reactivity. (Invited oral speaker)" Vivax Malaria Research III: 2009 and beyond, Panama city (2009. May. 24-28)
 7. **金子修**「マラリア原虫の赤血球侵入・感染赤血球表面の生物学」第17回分子寄生虫学ワークショップ、草津 (2009. Aug. 7-9)
 8. **金子修**「マラリア原虫分子の細胞内動態および原虫のライブイメージング」第8回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム、大阪 (2009. Oct. 9-10)
 9. Xangsayarath P, Kaewthamasorn M, Yahata K, Nakazawa S, **Kaneko O**. "Positive diversifying selection on *Plasmodium falciparum* SURFIN4.1 (poster)" The 3rd National Health Research Forum to Support the health research systems strengthening in Lao PDR Champasak, Lao PDR (2009. Oct. 2-3)
 10. Alexandre JSF, Kaewthamasorn M, Yahata K, Nakazawa S, Torii M, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, **Kaneko O**. "Variation in the *rhoph1/clag* multigene family of *Plasmodium falciparum* from Thai field isolates (poster)" 第50回日本熱帯医学会大会プログラム抄録集 p79、宜野湾市 (2009. Oct. 23-24)
 11. Kaewthamasorn M, Yahata Y, Alexandre JSF, Nakazawa S, Torii M, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, **Kaneko O**. "Diversity of *Plasmodium falciparum* SURFIN4.2 in Thai field isolates (poster)" 第50回日本熱帯医学会大会プログラム抄録集 p78、宜野湾市 (2009. Oct. 23-24)
 12. Zhu XT, Kaewthamasorn M, Yahata K, Cao YM, **Kaneko O**. "Polymorphism patterns of *Plasmodium vivax* subtelomeric transmembrane protein 1 (PvSTP1) among China field isolates (poster)" 第50回日本熱帯医学会大会プログラム抄録集 p78、宜野湾市 (2009. Oct. 23-24)
 13. Xangsayarath P, Kaewthamasorn M, Yahata K, Nakazawa S, **Kaneko O**. "Positive diversifying selection on *Plasmodium*

- falciparum* SURFIN4.1 (poster)" 第50回
日本熱帯医学会大会プログラム抄録集
p80、宜野湾市 (2009.Oct.23-24)
14. **Kaneko O.** "Erythrocyte ligand and malaria virulence. (Plenary Speech)" The Third International Symposium of Parasitology (Chinese Society of Parasitology), Xi'an, China (2009. Oct. 23-26)
 15. Pandey K, Mallik AK, Pandey BD, **Kaneko O.**, Yanagi T, Hirayama K. "Diagnosis of Visceral Leishmaniasis by Polymerase Chain Reaction of DNA extracted from Giemsa stained slides collected from Nepal. (poster)" The American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 58th annual meeting, Washington DC, USA (2009. Nov. 18-22)
 16. Cao J, **Kaneko O.**, Thongkukiatkul A, Tachibana M, Otsuki H, Sattabongkot J, Gao Q, Tsuboi T, Torii M. "Plasmodium vivax rhoptry neck protein (PvRON2) expressed at both erythrocytic and pre-erythrocytic invasive parasites. (oral)" The American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 58th annual meeting, Washington DC, USA (2009. Nov. 18-22)
 17. **Kaneko O.** "*Plasmodium* SURFIN: evolution, polymorphism, and human sera reactivity." The 4th Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases, Nagasaki (2009. Nov. 23-26)
- F. 知的財産権の出願・登録状況
特記すべきものはない

厚生労働科学研究費補助金・地球規模保健課題推進研究事業
分担研究報告書

マラリア原虫に有効な新規阻害剤の探索

研究分担者 金 惠淑 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 准教授

研究要旨

熱帯熱マラリア原虫に有効な新規抗マラリア薬の候補化合物を探索するために、分子内にペルオキシドを有する化合物の中から環状過酸化化合物・N-89を見出した。この化合物は *in vitro*, *in vivo* の両実験系で優れた抗マラリア活性と完治効果を併せ持つことが判った。今年度はN-89の体内動態の解析と作用機序の解析研究に重点を置いて研究を進めた。マウスを用いたN-89の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ミシニンと似た血中半減期を示すことが判った。40mg/kgのN-89をマウスに経口投与すると、投与後3時間まで $1 \times 10^{-7} \text{M}$ の血中濃度を示し、その後は速やかに血中から消失していくことが判った。この結果はN-89が体内で蓄積しないことを意味する。N-89の作用機序の解析研究で数種のマラリア原虫タンパク質がN-89の抗マラリア作用に関わることが判ったので、現在、これら標的分子候補タンパク質の組換えタンパク質を作成している。

A. 研究目的

クロロキンをはじめとする抗マラリア薬に対する耐性熱帯熱マラリア原虫が出現し、既存の抗マラリア薬では治療できない状況になりつつある。そのため新しい抗マラリア薬の開発研究はマラリアに関する最優先研究事項である。私は、有機合成化合物を用いて薬剤

耐性マラリアを克服できる新規マラリア治療薬を開発し、マラリア制圧に寄与することを研究目的として本研究を進める。本研究では今までの研究で得られた高い抗マラリア活性を有する分子内ペルオキシド構造を含む化合物をもとに、将来抗マラリア薬として臨床の現場で使用することを念頭に

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

B. 研究方法

1. 養熱帯熱マラリア原虫の培養

本実験では、*P. falciparum* FCR-3 strain (ATCC 30932) の原虫を用いた。実験に用いた培地は、濾過滅菌した RPMI 1640 培地で、pH を 7.4 に合わせ、ヒト血清を 10% となるように添加した。マラリア原虫の培養は O₂ 濃度 5%、CO₂ 濃度 5%、N₂ 濃度 90%、温度は 36.5 °C で行った。ヘマトクリット値(赤血球浮遊液中に占め

る赤血球の体積の割合)は 5% にして用いた。培養開始時の熱帯熱マラリア原虫の初期感染率は 0.1% とした。24 穴培養プレートを用いて培養し、培地は毎日交換し、感染率 4% で植継ぎを行なった。感染率は薄層塗末標本を作成し、ギムザ染色あるいは Diff-Quick 染色を行なった後、顕微鏡(油浸、1,000×)下で計測した。

感染率 (%) = 感染赤血球数 / 総赤血球数 × 100

2. 抗マラリア活性評価

培養したマラリア原虫感染赤血球を遠心で集め、血清を含む培地で洗浄を行った後、非感染赤血球を加え、初期感染率を 0.3% とした。この時のヘマトクリット値は 3% である。抗マラリア活性を測定するサンプル(有機合成化合物)は滅菌水、あるいは dimethylsulfoxide (DMSO) に溶解してあらかじめ用意しておく。

24 穴培養プレートにサンプル溶液を 5-10 μl ずつ加え、サンプルは duplicate あるいは triplicate にとった。コン

トロールは滅菌水、あるいは DMSO を 5 μ l をプレートに加えた。

次に、あらかじめ用意しておいた熱帯熱マラリア原虫培養液を 995 μ l ずつ加え、静かにピペッティングを行ない培地に一様に懸濁させる。

培養プレートは CO₂ -O₂ -N₂ インキュベーター中で 72 時間培養した後、薄層塗末標本を作成し、染色した後、顕微鏡下で観察し、化合物をを加えたものの感染率、及び溶媒にもを加えたコントロールの感染率を算出し、それぞれの値からマラリア原虫増殖率を算出した。求めた感染率により次の式によって増殖率を算出した。

$$\text{増殖率 (\%)} = [b] - [a] / [c] - [a] \times 100$$

a : (0 時間の感染率)

b : サンプル添加時の感染率

c : サンプル非添加時の感染率

3. 細胞毒性の評価

マウス乳癌由来 FM3A 細胞を用いた。培地は ES 培地に非働化した胎児牛血清を 2% となるように添加し、CO₂ 濃度

5%、37°C で培養した。この条件下での FM3A 細胞の倍加時間は約 12 時間である。

前培養を行い、対数増殖期に入った細胞を 5 \times 10⁴ cells / ml になるように培地で希釈する。サンプルはマラリア原虫の抗マラリア活性測定時調製したものをを用いる。24 穴培養プレートにサンプル溶液を 5 μ l ずつ加える。化合物は duplicate あるいは triplicate にとり、コントロールとして滅菌水、あるいは DMSO を 5 μ l 加えたウェルも同時に用意した。次に、用意しておいた培養細胞浮遊液を 995 μ l ずつ加え、静かにピペッティングを行ない培地に一様に懸濁させた。48 時間培養した後、それぞれのウェルについて細胞数を cell counter (CC-108, Toa Medical Electrics) で計数する。

$$\text{増殖率 (\%)} = (c) - (a) / (B) - (A) \times 100$$

a : (0 時間の細胞数)

b : 48h 後のコントロールの細胞数、

c : 化合物を添加した 2 日後の

細胞数

細胞増殖阻害活性は、サンプルを添加したウェルの細胞数及びコントロールの細胞数から算出する。これにより、用いた化合物の細胞毒性を評価する。

マラリア原虫と FM3A 細胞に対するサンプルの EC_{50} (50% のそれぞれの細胞とマラリア原虫に対する増殖阻害濃度) 値から化合物の抗マラリア活性有無と細胞毒性の有無を評価する。化合物のマラリア原虫に対する薬効判定には選択毒性を用いて表す。選択毒性とは下記のことである。

選択毒性 = FM3A 細胞に対するサンプルの EC_{50} 値 / 熱帯熱マラリア原虫に対するサンプルの EC_{50} 値

4. 抗マラリア作用機序の解析と体内動態解析

N-89 の体内動態解析のため、LC/MS/MS を用いた N-89 の検出条件を決定した。N-89 は UV 吸収を持たないため、HPLC での測定が難しい。そのため、LC/MS/MS を用いて検出条件を

決めた。N-89 は分子量 273 の化合物であるが、この親化合物をさらにイオン化して分子量 183 のピークを親化合物として測定した。

N-89 の分子標的の探索のため、2次元電気泳動法を用いたプロテオーム解析、及びトランスクリプトーム解析法を駆使して抗マラリア候補化合物処理時に変動する遺伝子群、及びタンパク質を解析する。標的分子と思われる分子について、MALDI-TOF/MS および nano-LC/MS/MS を用いてマラリア原虫のタンパク質を同定し、これらタンパク質が真の薬剤標的になるかをも解析する。

C. 研究結果

分子内に簡単なペルオキシド構造を有する N-89 の体内動態の解析の結果、マウスにおける体内動態試験では、50mg/kg (*i. v.*) 単回投与時と 40mg/kg (*p. o.*) 単回投与時の血漿中濃度を LC/MS/MS により測定し、2-コンパートメントモデルと台形公式を用いてそれぞれパラメータを求めた。その結果、半減期は *i. v.* で 1 時

間、*p. o.* で 1.1 時間と短く、*p. o.* 時の bioavailability は約 13%であった。既に N-89 は *in vivo* のネズミマラリア原虫マウスに対して完治効果を示しており、安全性の評価の結果、N-89 は 2000mg/kg の単回経口投与でラットが生存し、最少致死量は 2000mg/kg 以上であった。この結果から N-89 は臨床試験でも安全性が高いことが期待できる。

N-89 の作用機序の解析研究の結果、私は N-89 の作用機構を調べるために、3 年間以上 N-89 の薬剤プレッシャを与えた原虫株より N-89 耐性株を獲得した。この耐性株元の株と比べて 10 倍の N-89 耐性を示す。この N-89 感受性・耐性の両株を用いて株価のマラリア原虫遺伝子の発現パターンを比較解析した。トランスクリプトーム解析には affymetrix 社の Genechip を用いた。株間比較による発現量解析を行い、FCR-3 株を基準として N-89 耐性株で 1.5 倍以上発現量に変化が見られた遺伝子を選抜した。N-89 耐性株で発現量に増加が見られた遺伝子は 58

個、NRC10 株で発現量に減少が見られた遺伝子は 41 個あった。その中で、プロテオーム解析と共通して発現量に変化が見られた因子には Protein A, Protein B (仮称) の 2 つが見られた。これら 2 つの因子は N-89 をリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィーで N-89 と親和性を持ち、遺伝子レベル、タンパク質レベルで発現量に変動が見られ、N-89 作用においてタンパク質レベルで量的減少が見られた因子である。現在、Protein A に関しては組換えタンパク質を作成し、このタンパク質の性質を解析している。一方、免疫蛍光法を駆使してこのタンパク質のマラリア原虫内局在を精査している。

D. 考察

分子内のペルオキシド構造を有する化合物は抗マラリア活性と安全性を同時に有しており、アルテミシニンと比較して単剤で完治能力を示した。現在 WHO はアルテミシニンを主とした併用法 (Artemisinin-

Combination Therapy (ACT)) を推奨しているが、既にカンボジアを中心とした東南アジアで ACT に耐性を示す熱帯熱マラリア原虫の出現が報告されている。従って、ACT 耐性の克服にも N89 は力を発揮すると考えられる。今後、高等動物を用いた N-89 の抗マラリア活性の評価と安全性試験を行い、実際マラリア流行地で使用できる新規抗マラリア薬として開発していく予定である。また、マラリア流行地でこれら環状過酸化化合物が新規抗マラリア薬として使用されるためには、現地の劣悪な環境での化合物の安定性が必須である。そのため、安定性を含めた製剤の研究も平行していく必要がある。N-89 の作用機序解析の研究で数種のマラリア原虫タンパク質を見出したので、これらタンパク質の結晶構造の解析と機能解析研究を現在行っている。

E. 結論

安全で簡単な構造を有する環状過酸化化合物 (N-89) を見出した。この化合物は *in vitro* の培養熱帯熱マラリア原虫、及

び *in vivo* のネズミマラリア原虫感染マウスに対して優れた抗マラリア活性を示し、完治能力を合わせ持つことが判った。N-89 の抗マラリア活性を最大限に発揮するための最適の投与スケジュールの確立、及び作用機序を明らかにするための研究を行い、いち早くマラリア流行地で必要とする新規抗マラリア薬を提供できるように最大限に努力する。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kumuraa, N., Furukawaa, H., Onyangob, A., Izumia, 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.

2. 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.

3. 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.

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

5. 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.

6. 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.

2. 学会発表

1. Akira Sato, Akito Satake, Akiko Hiramoto, Akiko Okamatsu, Kentaro Nakama, Hye-Sook Kim, and Yusuke Wataya. Association of nuclear-intermediate filament lamin B1 with necrotic- and apoptotic-morphologies in cell death Induced by 5-fluoro-2'-deoxyuridine. Sixth International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, September 27 - October 1, 2009, Gifu, Japan.

2. Yusuke Wataya, Tomoharu Naito, Akira Sato, Akiko Hiramoto, Yukio Kitade, Takuma Sasaki, Akira Matsuda, Masakazu Fukushima, and Hye-Sook Kim.

Molecular Mechanisms of Apoptosis induced by 3'-Ethynylcytidine. Sixth International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, September 27 - October 1, 2009, Gifu, Japan.

3. 佐藤 聡, 平本晃子, 金 惠 淑, 綿 矢 有 佑 . 5-Fluoro-2'-deoxyuridine が誘導する細胞死のオミクス解析. 第 13 回がん分子標的治療学会, 2009 年 6 月 24 - 26 日, 徳島, 徳島.

4. 綿矢有佑, 平本晃子, 佐藤 聡, 金 惠淑. 新規抗腫瘍ヌクレオシドアナログ 1-(3-C-ethynyl-β-D-ribo-pentofuranosyl) cytosine (ECyd, TAS-106) によるアポトーシス誘導機構の解明. 第 13 回がん分子標的治療学会, 2009 年 6 月 24 - 26 日, 徳島, 徳島.

5. 佐藤 聡, 平本晃子, 熊谷 貴, 下河原理江子, 谷口斎恵,

太田伸生, 金 惠淑, 綿矢有佑. 環状過酸化化合物 N-89 投与時のマンソン住血吸虫プロテオーム解析. 第 129 年会日本薬学会, 2009 年 3 月, 26 日, 京都, 京都.

6. 中間健太郎, 佐藤 聡, 佐竹昭人, 岡松朗子, 平本晃子, 平岡 修, 金 惠淑, 綿矢有佑 . 5-Fluoro-2'-deoxyuridine が誘導する細胞死分子機構の解析 - ネクローシスとアポトーシスのプロテオーム解析 -. 第 129 年会日本薬学会, 2009 年 3 月, 26 日, 京都, 京都.

7. 岡松朗子, 佐藤 聡, 佐竹昭人, 中間健太郎, 平本晃子, 平岡 修, 金 惠淑, 綿矢有佑 . 5-Fluoro-2'-deoxyuridine が誘導する細胞死分子機構の解析 - ネクローシスとアポトーシスのトランスクリプトーム解析 -. 第 129 年会日本薬学会, 2009 年 3 月, 26 日, 京都, 京都.

8. 小山貴彦, 森田将之, 平本晃子, 佐藤 聡, 益山新樹, 野島正朋, 金 惠淑, 綿矢有佑. 環状過酸化化合物の抗マラリア作用機序のプロテオーム

ム解析-1. 第 129 年会日本薬学会, 2009 年 3 月, 26 日 - 28 日, 京都, 京都.

9. 笹岡健二, 秀野勇人, 森田将之, 高島康秀, 平本晃子, 佐藤 聡, 平岡 修, 益山新樹, 野島正朋, 金 惠淑, 綿矢有佑. 環状過酸化化合物の抗マラリア作用機序のプロテオーム解析-2. 第 129 年会日本薬学会, 2009 年 3 月, 26 日 - 28 日, 京都, 京都.

10. 平本晃子, 佐藤 聡, 金惠淑, 熊谷 貴, 下河原理江子, 谷口斎恵, 太田伸生, 綿矢有佑. 環状過酸化化合物 N-89 投与時の Manson 住血吸虫プロテオーム解析. 第 78 回日本寄生虫学会大会, 2009 年 3 月 27 - 28 日, 東京.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 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

分担研究報告書

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

研究分担者 片倉 賢 北海道大学大学院獣医学研究科教授

研究要旨

豊富な植物資源を有するミャンマーでは、薬用植物による独自の伝承医薬療法が発達している。そこで、ミャンマーの薬用植物の中から抗トリパノソーマ活性を有する植物を探索した。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）に対する細胞毒性を測定した。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として選出された。また、クアシノイド化合物は、*Brucea javanica* などのニガキ科薬用植物に見いだされる苦味のある天然化合物であり、これまで犬バベシアやエバンストリパノソーマなどの血液原虫に対して有効であることを見出してきた。今回、本植物から分離・精製したクアシノイド類を標準化合物として、UPLC-MS/MSを用いたクアシノイド迅速定量法を開発し、*B. javanica* のメタノール粗抽出液中に含まれるクアシノイド類の含有量を測定した。その結果、同種植物のクアシノイド化合物の組成と成分含有量は地理的要因や収穫時期などに依存する可能性が示された。

A. 研究目的

アジア、とくにミャンマー産薬用植物資源から住血性原虫（トリパノソーマ、リーシュマニア、バベシアなど）に対する抗活性物質を探索し、有効成分の構造を決定する。また、その作用機序と細胞毒性について検討し、住血原虫症の創薬に関する基礎的知見を提供する。

B. 研究方法

(1) 抗トリパノソーマ活性を有する薬用植物の探索

ミャンマーは薬用植物資源が豊富にあり、民間薬として様々な病気に用いられているが、科学的薬効に関する研究は少ない。そこでミャンマーのパテイン大学および獣医局と共同研究を開始した。本研究では、採取したミャンマー産薬用植物について、エバンストリパノソーマ (*Trypanosoma evansi*) の血流型虫体を標的として、抗原虫活性を有する植物を探索するとともに、二倍体ヒト線維芽細胞株（MRC-5）に対する細胞毒性について Alamar Blue®法を用いて測定した。

(2) クアシノイド類の迅速定量法の開発

薬用植物の1つである *Brucea javanica* は多種類のクアシノイドを含むが、これは多くの熱帯性ニガキ科植物において見いだされる苦味成分である。今回、本植物から分離・精製したクアシノイド類を標準化合物として、超高速液体クロマトグラフィー（UPLC）と質量分析（MS/MS）法を用いてクアシノイド迅速定量法を開発し、*B. javanica* のメタノール粗抽出液物に含まれるクア

シノイド類の含有量の評価を行った。

C. 研究結果

(1) 抗トリパノソーマ活性を有する薬用植物の探索

ミャンマーの薬用植物の中から民間療法としてマラリア、下痢などの疾患に用いられている60種の薬用植物について、55種類の新鮮材料と16種類の乾燥材料について、それぞれ70%エタノールと70%メタノールで粗成分を抽出し、*T. evansi* に対する *in vitro* における増殖阻害活性とMRC-5細胞に対する細胞毒性を測定した。その結果、本スクリーニング法において、3つの新鮮材料と6つの乾燥材料の粗抽出物が *T. evansi* に対して100 µg/ml未達のIC₅₀値を示したことから、これら9種の薬用植物を活性成分の分離・精製を実施する候補薬用植物として選出した。とくに、*Vitis repens*、*Eucalyptus globulus* そして *Jatropha podagrica* の粗抽出物は高い抗トリパノソーマ活性と選択指数を示し、その有望性が示唆された。

(2) クアシノイド類の迅速定量法の開発

B. javanica から分離・精製したクアシノイド類のうち、bruceine A、bruceine B、bruceine C、bruceine D および brusatol を標準化合物として、インドネシア、ミャンマーならびに中国産の *B. javanica* のメタノール粗抽出液物に含まれるクアシノイド類の含有量を測定した。その結果、各種クアシノイドの含有量は産地によって異なること明らかになった。

D. 考察

*B. javanica*に含まれるクアシノイド類の組成と成分含有量は、地理的要因、薬用植物の収穫時期などに依存している可能性が示唆されたため、今回開発した UPLC-MS/MS 法は、未精製の植物抽出物からのクアシノイド類の検出と定量的スクリーニングに有用であると考えられた。

ミャンマー産薬用植物のなかで最も強い抗トリパノソーマ活性を示した薬用植物成分は、抗がん剤として現地で使用されており、今後、有効成分の分離精製を実施する予定である。

E. 結論

ミャンマー産薬用植物が血液原虫症に対する創薬の資源として有用であることが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakao R, Mizukami C, Kawamura Y, Subeki, Bawm S, Yamasaki M, Maede Y, Matsuura H, Nabeta K, Nonaka N, Oku Y, Katakura K: Evaluation of efficacy of bruceine A, a natural quassinoid compound extracted from a medicinal plant, *Brucea javanica*, for canine babesiosis. *J Vet Med Sci* 71, 33-41, 2009
- 2) Katakura K: Molecular epidemiology of leishmaniasis in Asia (focus on cutaneous infections). *Curr Opin Infect Dis* 22, 126-130, 2009
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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
- 6) Bawm S, Tiwananthagorn 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

2. 著書

- 1) 片倉賢: リーシュマニア症. 岸本寿男, 山田章雄 監修. *ズーノーシスハンドブック*. 東京: メディカルサイエンス社, pp115-117, 2009

3. 学会発表

- 1) Bawm S, 松浦英幸, Subeki, Elkhateeb A, 鍋田憲助, 野中成晃, 奥祐三郎, 片倉賢: Quassinoids from a medicinal plant *Brucea javanica*: their *in vitro* activities against *Trypanosoma evansi*. 第147回日本獣医学会, 2009年3月(東京), 講演要旨集 p233
- 2) Bawm S, Matsuura H, Elkhateeb A, Nabeta K, Nonaka N, Oku Y, Katakura K: Isolation of quassinoids from a medicinal plant, *Brucea javanica* and their *in vitro* activities against *Trypanosoma evansi*. 11th International Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology, 2009年7月(Leipzig, ドイツ)
- 3) Bawm S, Tanaka R, Tiwananthagorn S, Matsuura H, Subeki, Nabeta K, Chono S, Morimoto K, Oku Y, Katakura K: Quassinoids isolated from a medicinal plant, *Brucea javanica* and their antitrypanosomal activities *in vitro*. The 23rd International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, 2009年8月(Calgary, カナダ)
- 4) Bawm S, Matsuura H, Miyazaki S, Lin KS, Hirota J, Irie T, Htun LL, Maw NN, Tiwananthagorn S, Sakurai T, Oku Y, Katakura K: Evaluation of Myanmar medicinal plants for antiparasitic and cytotoxic activities. 第148回日本獣医学会, 2009年9月(鳥取), 講演要旨集 p182

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし