

マダニ自体の飽血時体重が有意に減少していることが確認された。

D. 考察

ロンギスタチンは吸血時の宿主血液凝固の阻害に関与していることが示唆された。また、ロンギスタチンは宿主の吸血部位の皮下に分泌されており、効率的な吸血の持続に不可欠な blood pool の形成にも不可欠な役割を持っていることが考えられた。このような抗血液凝固因子は他の媒介節足動物や住血性寄生線虫類も保持していることが想定され、媒介昆虫を含めベクター制御に貢献できると同時にベクター由来の新規抗寄生虫薬の標的としても有効であると考えられた。

E. 結論

本知見はマダニをはじめとした外部寄生性節足動物の生存戦略の根幹である、付着および吸血に関与する分子を標的とした新規寄生虫防圧法の開発に有効な知見であると考えられた。また、ロンギスタチンは住血寄生線虫や他の媒介性節足動物の寄生戦略にも関与することが考えられ、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。

G. 研究発表

1. 論文発表

Anisuzzaman, Islam MK, Miyoshi T, Alim MA, Hatta T, Yamaji K, Matsumoto Y, Fujisaki K, Tsuji N. (2010). Longistatin, a novel EF-hand protein from the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*, is required for acquisition of host blood-meals. *Int J Parasitol.* 40, 721-9.

2. 学会発表

Anisuzzaman, Islam Khyrul, 三好猛晴、Alim Adul, 八田岳士、山地佳代子、松本安喜、藤崎幸蔵、辻尚利 Longistatin plays vital roles in blood pool formation and successful feeding by ixodid tick, *Haemaphysalis longicornis* 第79回日本寄生虫学会学術集会 P.65

Anisuzzaman, Islam MK, Miyoshi T, AlimMA, Hatta T, Yamaji K, Matsumoto Y, Fujisaki K, Tsuji N. Longistatin, a potent

salivary-gland plasminogen activator from ixodid tick, is critical for blood pool development and successful blood-feeding by the ticks. The XII International Congress of Parasitology. abs#121 in CD.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
 2. 実用新案登録
 3. その他
- 以上なし

分担課題：日本住血吸虫症の病態発現分子解析

分担研究者 太田伸生

（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科国際環境寄生虫病学分野）

研究協力者 熊谷 貴、関 丈典（同上）

研究要旨

住血吸虫症の病態発現に IL-4/IL-13 の Th2 サイトカインが関与する事実がマンソン住血吸虫 (Sm) の感染実験系で証明されてきたが、感染プロフィールが異なる日本住血吸虫 (Sj) 感染においても同様の現象が起こるのか、検証がなされていなかった。Sj を感染させた IL-4^{-/-}/IL-13^{-/-} マウス (DKO) の肝臓では対照マウス (WT) と比較して、好酸球浸潤は低下したが好中球浸潤が増加し、肉芽腫性炎症所見はむしろ悪化した。さらに、DKO マウスの肝臓では IL-5 の mRNA 発現が低下し、好中球浸潤や炎症性疾患に関わる Th17 関連サイトカインの mRNA 発現が上昇していた。しかし、DKO マウスでも IFN- γ の mRNA 発現上昇はなかった。以上の結果より Sj 感染病態発現には IL-4/IL-13 が Th17 関連サイトカインの産生を抑制する事によって、虫卵性肉芽腫性炎症の過度の進行や過剰な好中球の浸潤を抑制していると考えられ、Sm 感染とは異なる免疫学的機序が機能していることがわかった。

A. 研究目的

住血吸虫に対するほ乳類宿主の免疫反応の発現と調節機構の本態はなお不明であるが、マウスの実験的感染データからはマンソン住血吸虫 (Sm) 感染時の応答と日本住血吸虫感染時のそれとは大きな違いも存在することが示されるようになった。住血吸虫が宿主体内に産下する虫卵は毛細血管で塞栓し、宿主免疫システムは肉芽腫性炎症を引き起こす。これが Th2 系細胞による応答であることがマンソン住血吸虫感染実験で明らかにされた「一般常識」となりつつある。しかし、日本住血吸虫 (Sj) 感染においても同様であるのか、詳細な追

跡実験で証明されたとは言えない状況である。

IL-4/13 ダブルノックアウト (DKO) マウスでは Th2 応答がほぼ完全に抑制されてしまうので、Th2 応答が肉芽腫形成を促進することが証明されているマンソン住血吸虫感染でも DKO マウスは虫卵肉芽腫形成が明らかに縮小されてくることが示されている。

Sj 虫卵や Sm 虫卵は共に肝臓に蓄積し、虫卵性肉芽腫の形成を誘導する。しかし、Sj と Sm 虫卵性肉芽腫の間には構成細胞に違いがあり、Sm では好酸球優位の、Sj では好酸球だけでなく多数の好中球も浸潤

した肉芽腫を形成する。また、Sj と Sm 虫卵は IL-4 や IL-13 など宿主 Th2 サイトカインの産生を強く誘導する。宿主応答の共通性の一方で、Sj と Sm 虫卵性肉芽腫では構成する細胞などに違いがあることは、Sj 虫卵性肉芽腫形成における Th2 応答が果たす役割は Sm とは異なる可能性を示唆する。本実験は Sj 虫卵性肉芽腫形成における IL-4/IL-13 の機能を明らかにする事を目的として行った。

B. 研究方法

1. IL-4/13 DKO マウス：英国 A. McKenzie らが創出した BALB/c バックグラウンドの IL-4/13 ダブルノックアウトマウスを入手して実験に用いた。

2. 住血吸虫感染：山梨株の日本住血吸虫 30 隻を DKO マウスおよび野生型 (WT) BALB/c マウスに感染させ、6 週後に安楽死処理の上、肝臓と血清を回収した。肝臓は虫卵肉芽腫を観察するために病理標本として HE 染色をおこなった。肝機能障害を評価するのに ALT を測定した。

3. フローサイトメトリー解析：感染宿主肝臓の構成細胞をフローサイトメトリーにて解析した。

4. サイトカインアッセイ：肝細胞を回収して局所のサイトカインをリアルタイム PCR で測定した。IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, IL-17, IFN γ , IL-22, TNF α , CXCL2 等を測定した。

倫理面への配慮：本研究は東京医科歯科大学の動物実験委員会による承認を得て実施した。

C. 研究結果

1. DKO マウスにおける日本住血吸虫感染に対する病理の変化

肝臓に形成された肉芽腫サイズは、WT マウスと比較して DKO 群で増加した (図 1A)。この結果は、Sm 感染とは逆の現象であった。さらに、肝臓の好中球と好酸球浸潤を調べると、DKO マウスでは好酸球浸潤が抑制されていた一方で、好中球が多数浸潤していた (図 1B, C)。また、血清中の ALT 活性は DKO マウスで有意に増加した (図 1D)。以上の結果より DKO マウスでは好中球主体の肉芽腫が形成され、さらに肉芽腫性炎症が悪化して肝機能障害が進んだ事がわかった。

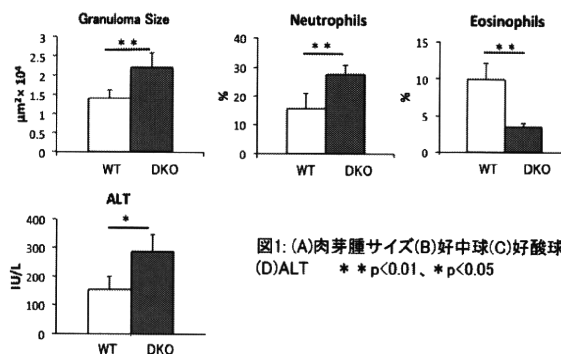


図1: (A)肉芽腫サイズ(B)好中球(C)好酸球 (D)ALT ** p<0.01, * p<0.05

2. DKO マウスにおけるサイトカイン産生プロフィール

感染6週における肝細胞を用いてサイトカイン産生を調べた所、WT マウスでは、IL-4、IL-5、IL-13 等 Th2 サイトカインの mRNA 発現が上昇していたが、DKO 宿主では IL-4 や IL-13 の mRNA 発現は検出されず、また IL-5 の mRNA 発現上昇もなかった (図 2A, B, C)。また、Th1 サイトカインである IFN γ の mRNA 発現では WT と DKO マウス間で有意差はなかった (図 2D)。

好中球浸潤や炎症性サイトカインの産生を誘導する Th17 に注目すると、Th17 刺激で産生される IL-17A や IL-22 の mRNA 発現が、DKO では WT と比べて上昇していた(図 3A, B)。また、Th17 の分化を誘導する IL-6 の mRNA 発現も上昇していた(図 3C)。さらに Th17 により産生が誘導される、好中球の遊走に關与する CXCL2 の mRNA 発

いては、これまで十分な検証はなされてこなかった。

本実験の結果より、IL-4/IL-13 は Sj 虫卵周囲への過剰な好中球浸潤と、肉芽腫性炎症を抑制している事が示唆された。さらに肉芽腫のサイズは Sm 感染 DKO マウスと異なり、Sj 感染 DKO マウスでは増加したが、これは Sj 虫卵性肉芽腫では Sm 虫卵性肉芽腫よりも多数の好中球が浸潤している事が影響していると考えられる。これら結果より、IL-4/IL-13 が肉芽腫形成において果たす役割は Sj と Sm 虫卵性肉芽腫では異なる事がわかった。

好酸球増多は IL-4/IL-13 が好酸球の分化・増殖に關与す IL-5 の産生を誘導することにより誘導される事が示唆された。また、Th1/Th2 バランスを考慮して IFN- γ の mRNA 発現を調べたが、WT と DKO マウスで差がなかったことより、IFN- γ は DKO マウスでの好中球浸潤や肉芽腫性炎症の悪化には關与していないと考えられる。一方で Th17 から産生される IL-17A や IL-22 の mRNA 発現が増加していた。また Th17 の分化に關与する IL-6 や Th17 により産生が誘導される好中球遊走に關与する CXCL2 の mRNA 発現も上昇していた。したがって、Sj 感染マウスの肝臓では IL-4/IL-13 は Th17 關連サイトカインを抑制して過剰な好中球浸潤や肉芽腫性炎症を抑制している可能性が示唆された。

今回の観察結果をもとに、日本住血吸虫感染時の病態発現に影響する因子の特定と解明が進み、将来の治療的応用にむけて研究が進むことが期待される。

E. 健康危険情報

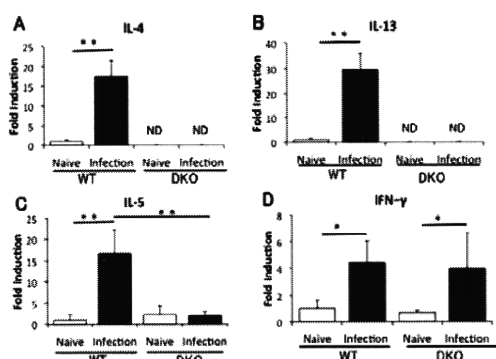


図2: 肝臓におけるTh2, Th1サイトカインmRNA発現(A)IL-4, (B)IL-5, (C)IL-13, (D) IFN- γ ** p <0.01, * p <0.05

現も DKO マウスでは WT マウスと比較して上昇していた(図 3D)。

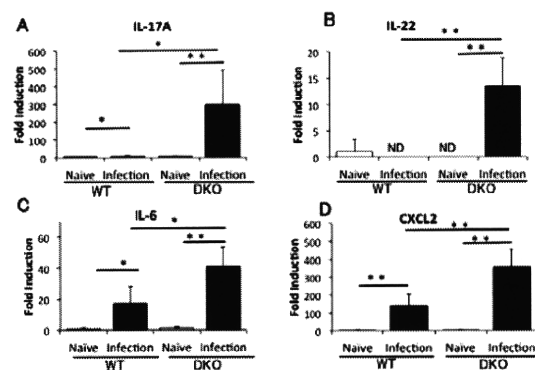


図3: 肝臓におけるTh17關連サイトカインmRNA発現 (A)IL-17A(B)IL-22(C)IL-6(D)CXCL2 ** p <0.01, * p <0.05

D. 考察と結論

日本住血吸虫と Manson 住血吸虫はともに intestinal schistosomiasis とされるものであり、主病変も肝臓に見られる点で免疫病因論にも共通性があるものとの推測がなされる。それが正しいのか否かにつ

該当せず

G. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

関 丈典、熊谷 貴、Anyan WK、Kwansa-Bentum Bethel、宮沢悠樹、下河原理江子、太田伸生. 日本住血吸虫感染マウスにおける IL-4/IL-13 による炎症性サイトカインの産生抑制、第 79 回日本寄生虫学会総会、2010 年 5 月、旭川市

・ 関 丈典、熊谷 貴、Anyan WK、Kwansa-Bentum Bethel、宮沢悠樹、下河原理江子、太田伸生. 日本住血吸虫感染マウスにおける IL-4/IL-13 を介した炎症性サイトカインの産生抑制、第 21 回日本生体防御学会学術総会、2010 年 7 月、仙台市

・ T. Seki, Kumagai T, Kwansa-Bentum B, Anyan WK, Shimogawara R, Ohta N: The role of IL-4/IL-13 in *Schistosoma japonicum* infected mice, 59th Annual Meeting of American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 2010 年 11 月, Atlanta, USA.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

寄生蠕虫の寄生適応および免疫修飾機構の研究

分担研究者 金澤 保(産業医科大学・免疫学寄生虫学)

研究要旨

我々は以前より、寄生蠕虫が Th17 型自己免疫疾患モデルに対し抑制作用を持つ場合があることを、住血吸虫を感染させたマウスにおける関節炎の実験系で証明してきた。今年度は誘発型1型糖尿病モデルに対する蠕虫感染の影響について検討した。マウスの腸管寄生蠕虫である *Heligmosomoides polygyrus* (Hp) をあらかじめ感染させたマウスでは、ストレプトゾトシンを多回低用量投与して誘発する1型糖尿病における血糖値上昇が、対照群に比べ抑制された。Hp 感染により脾細胞IL-4 産生能の上昇および IFN γ 産生能の低下が観察されたが、Hp による血糖値上昇抑制効果は STAT6KO マウスにおいても観察されたため、本線虫のもつ抗糖尿病作用は、感染マウスにおけるTh2 への偏位に依存しないことが示唆された。

[研究協力者]

長田 良雄

A. 研究目的

微生物や寄生虫の感染によってアレルギーや自己免疫などの免疫異常疾患が予防あるいは改善するという現象が、疫学的証拠あるいは実験的証拠により示唆されている(衛生仮説)。住血吸虫を含む蠕虫の感染に関しても、種々のアレルギーおよび自己免疫疾患の発症を抑制するという実験的報告がある。我々は、寄生虫の抗炎症効果のメカニズムを解明し、炎症・アレルギー性疾患の治療法開発に貢献することを目的として研究を行っている。昨年度までに、住血吸虫感染が実験的関節炎および Th17 応答の抑制作用をもつことを報告してきた。本年度我々は、1 型糖尿病(T1D)モデルを利用し、その発症に対する蠕虫感染の影響を検討することにした。今回、住血吸虫と同様に慢性感染を起こす蠕虫として腸管寄生線虫である *Heligmosomoides polygyrus* を選択した。本虫の抗糖尿病作用は既にNODマウス(T1D 自然発症モデル)における報告があるが、NODマウスの系では種々の遺伝子欠損マウスとの比較実験が不可能なため、サイトカインの関与などについての詳細な解析が困難である。

そこで我々は C57BL/6 マウスに対してストレプトゾトシン(STZ)を投与することで T1D を誘発するモデルを用いて Hp 感染実験を行うこととした。STZによる T1D の誘発には2つの方法がある。一つは単回高用量投与モデル、もう一つは多回低用量投与モデルである。後者における β 細胞破壊には免疫学的機序の関与が示唆されているため、ヒトにおける自己免疫性の T1D により近いモデルと考えられる。

B. 研究方法

実験系として、免疫学的機序の関与があると思われる多回低用量投与モデルを採用した。まず STZ 投与開始1週前に Hp200 隻を経口感染させた。STZ は 50mg/kg で連続 5 日間腹腔内投与し、1 週毎に血糖値を測定した。実験終了時に脾細胞を刺激培養し、サイトカイン産生を ELISA で測定した。また、膵臓はホルマリン固定後 HE 染色し、病理像の解析(ランゲルハンス島の面積の評価)を行った。さらに、Hp 感染の影響を野生型(WT)マウスと STAT6KO マウスや IFN γ KO マウスの間で比較する実験を行い、サイトカインの関与を検証した。また、Hp 感染がマウスの糖吸収や代謝に影響を与えている可能性について検証するため、糖尿病を誘発していない感染マウ

スにおいて経口的にグルコース負荷試験を行い、非感染マウスの血糖値の動態と比較した。

[倫理面への配慮]

実験動物処置の際は必ず麻酔を使用した。産業医科大学動物実験及び飼育倫理審査において承認を受けている(承認番号:AE08-005、AE06-003)。なお本研究では人体材料は用いていない。

C. 研究結果

Hp 感染は STZ 投与による血糖値上昇を抑制した。また、膝ランゲルハンス島の面積減少に対して若干の抑制傾向を示した。Hp 感染により脾細胞の IFN γ 産生能は低下し、IL-4 や IL-10 産生能は上昇した。非感染 STAT6KO マウスや IFN γ KO マウスでは WT マウスと同様に血糖値が上昇したが、いずれの KO マウスにおいても Hp 感染は WT と同様に血糖値上昇抑制効果を示した。また、経口グルコース負荷後の血糖値の動態は感染マウスと非感染マウスにおいて差は認められなかった。

D. 考察

IFN γ KO マウスにおいても発症がみられたことから、本糖尿病モデルは Th1 依存性モデルではないことが判明した。Hp 感染は Th2 応答の増強と Th1 応答の抑制をもたらしたが、STAT6KO および IFN γ KO マウスにおいても Hp による血糖値上昇抑制が見られたことにより、Th2 偏位自体は本虫の血糖値上昇抑制効果に必須ではないと考えられた。また、Hp 感染は経口グルコース負荷後の血糖値の動態には影響を与えなかったことにより、血糖値の上昇抑制は、寄生虫の腸管寄生による「グルコース吸収阻害」や虫体による「グルコースの大量消費」による影響ではないことが示唆された。

E. 結論

マウスにおけるストレプトゾトシン誘発 1 型糖尿病の血糖値上昇に対して、Hp は Th2 偏位に依存しない機構により抑制効果を示した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

[総説]

長田良雄.

寄生虫とアレルギーの親密な関係

Medical Practice. 27 (9): 1541-1542.

[原著]

Shimizu S, Osada Y, Kanazawa T, Tanaka Y, Arai M.

Suppressive effect of azithromycin on *Plasmodium berghei* mosquito stage development and apicoplast replication.

Malar J. 9:73. 2010.

2. 学会発表

長田良雄、金澤保.

住血吸虫による Th サイトカイン修飾に関与する因子の解析

第 79 回 日本寄生虫学会大会

旭川 (2010 年 3 月)

長田良雄、清水少一、熊谷貴、山田壮亮、金澤保.

住血吸虫による関節炎抑制には、炎症性サイトカインの産生抑制が伴う

第 75 回 日本インターフェロン・サイトカイン学会

北九州 (2010 年 6 月)

Osada Y, Shimizu S, Kumagai T, Yamada S, Kanazawa T.
Schistosoma mansoni has anti-arthritic effects accompanied with IL-17's down-modulation dependent on viable eggs.

XIIth International Congress of Parasitology

メルボルン (2010 年 8 月)

Osada Y.

Experimental *Schistosoma mansoni* infection suppresses autoimmune arthritis in mice.

EPS Global-Shanghai 1st International Biomedicine Forum.

上海 (2010 年 9 月)

長田良雄、黒田悦史、金澤 保.

コラーゲン関節炎に対する蠕虫感染の影響

- *Heligmosomoides polyguryis* の場合 -

第 63 回 日本寄生虫学会南日本支部大会・第 60 回日

本衛生動物学会南日本支部大会・合同大会

鹿児島(2010 年 11 月)

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

分担研究報告書

— 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 —

リーシュマニア症対策疫学研究

分担研究者 氏名 筑波大学大学院人間総合科学研究科 教授 我妻ゆき子

研究要旨

目的：本研究では、ニームオイルを家屋内散布することによって、リーシュマニア症コントロールが可能であるかを効果判定することを目的とした。

研究方法：バングラデシュにおいてリーシュマニア症が蔓延している地域において、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、各世帯から1人のインデックスケースに対して、患者発生が減少したかをモニタリングして評価した。

結果とまとめ：散布家屋内において、サシチョウバエの総数は変化しなかったが、吸血しているサシチョウバエの割合の減少がみられた。介入世帯とコントロール世帯において、抗体陽性化率では統計学的に有意な差はなかった。

ニームオイルの有効成分については近年、有機栽培使用に奨励されたこともあり、殺虫効果についてのエビデンスが蓄積されてきている。本研究で、サシチョウバエの総数はあまり変動せず、吸血している数が減少したことは、低濃度での散布の特性を示しているのかもしれない。さらに有効成分純度の高いニームオイルを使用することにより、予防効果を向上することができると思う。農薬問題のない天然植物素材のニームオイルが、リーシュマニア症制圧に役立つことが示せれば、世界のリーシュマニア症患者を減らすことができるばかりでなく、他の媒介昆虫による重要疾患、たとえば、マラリアやデング熱への応用が示唆される。

A. 研究目的

本研究の分担研究者である我妻は、ニームオイルの散布がサシチョウバエの減少に効果があることを予備実験で確かめ、その成果を日本熱帯医学会や国際リーシュマニア症シンポジウム会議にて発表してきた。リーシュマニア症は世界保健機構（WHO）の薦める重要感染症疾患に入っているにもかかわらず、人体投与薬物治療薬は非常に副作用の高い重金属アンチモニ製剤の注射薬で20日から60日の連続投与が必要である。小児や妊婦での使用が難しく、治療成績もばらばらで、治療後致死率はバングラデシュでは10%以上もあることを報告した（Bern et al, 2005）。本研究では、農薬問題のない天然植物素材であるニームオイルを家屋内散布することによって、リーシュマニア症コントロールが可能であるかを効果判定することを目的とした。

B. 研究方法

ニームオイル中の有効成分であるアザルディクチンの含有度を正確に測り、その濃度と散布回数の標準化を図り、バングラデシュのリーシ

ュマニア症蔓延フィールドにおいて、その標準化家屋内散布介入をする家とそうでない家とをランダムに割り当て（各群約750世帯）、2年間の観察評価をして、媒介昆虫が家屋内で減少したか、また、さらには、患者発生が減少したかを評価した。2年間の介入後、最終評価のための血液検査とCDC ライトトラップによるサシチョウバエの収集を行った。並行して、ニームオイルの人々への受け入れと使用に関して、社会調査（formative study）を実施した。

（倫理面への配慮）

国際下痢症研究センター（ICDDR,B）の倫理委員会に研究プロトコルを提出し、承認を受けた。研究参加者にはインフォームド・コンセントを行い、同意書を得た。

C. 研究結果

コミュニテイサーベイランス人口（1700世帯；人口8,500人）のうち、3歳以上を対象にニーム介入1年後の疾病発生血液検査（セロサーベイ）を実施し、データ解析を行った。介入1年後、2年後の評価で、罹患率に有意な差を認めな

かった。しかし、介入群において吸血しているサシチョウバエの減少に有意な差がみられた(Wagatsuma Y, 2009)。また、ニームオイルの人々への受け入れ度に関しては、比較的高く、現行の価格であっても、51%の住民が購入使用を希望していた (Fukushige M, 2009)。

D. 考察

サシチョウバエの総数はあまり変動せず、吸血している数が減少したことは、この濃度散布におけるニームオイルの効果の特性を示しているかもしれない。散布濃度が低すぎた可能性があり、さらに有効成分純度の高いニームオイルを使用することにより、予防効果を向上することができるかもしれない。

環境残留有害物質の検出技術が向上するにつれ、農薬問題はその加速度を増して難しくなっている。地球環境を考慮し、将来にわたって持続性ある安全な衛生動物制御が求められている。農薬問題のない天然素材のニームオイルが、もしリーシュマニア症制圧に役立つことが示せば、世界中のリーシュマニア症患者を減らすことができるばかりでなく、他の媒介昆虫による重要疾患、たとえば、マラリアやデング熱へも天然素材の応用が可能である道が開けるかもしれない。

E. 結論

ニーム介入群において、吸血しているサシチョウバエの割合の低下がみられた。罹患率まで影響を与えるためには、さらに有効成分純度の

高いものを使用して、介入試験を実施する必要がある。また、リペラント、防虫シートやカーテンなど予防ツールの多様化を図ってゆくことにより、人々の受け入れ効果を見る必要がある。

F. 健康危険情報

該当せず。

G. 研究発表

1. 論文発表

Khan MGM, Alam MS, Podder MP, Itoh M, Jamil KM, Haque R, Wagatsuma Y. Evaluation of rK-39 strip test using urine for diagnosis of visceral leishmaniasis in an endemic area in Bangladesh. *Parasites and Vectors* 2010; 3:114.

2. 学会発表

Ferdousi F, Alam MS, Ma E, Ito M, Haque R, Wagatsuma Y. Community-based intervention study using neem extract to control visceral leishmaniasis in Bangladesh. The 45th U.S.-Japan Joint Conference on Parasitic Diseases U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program, Tokyo, Japan, January 10, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

該当せず。

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

マラリア原虫の宿主細胞認識と侵入機序の解析

分担研究者 鳥居本美 愛媛大学大学院医学系研究科教授

研究要旨： マラリア原虫メロゾイトの赤血球結合分子 EBL (EBL : Erythrocyte Binding-Like) は赤血球侵入に必須とされる分子である。ネズミマラリア原虫 (*Plasmodium yoelii*) の弱毒株である Py 17X NL (non-lethal) の EBL 分子内のアミノ酸置換をおこなって EBL 分子の局在の変化および病原性の変化について検討した。Py17XNL 株原虫 EBL の領域 6 に存在する 8 個のシステインのうち 1、3、4、5、7、8 番目のものを、それぞれアラニンに置換した遺伝子組換え原虫を作成して、EBL の局在を間接蛍光抗体法で観察したところ、1 番目、4 番目、5 番目、7 番目の Cys 組換え原虫においては EBL の局在が Py17XNL のマイクロネームから強毒株の Py17XL に見られるデンスグラニュール局在パターンへと変化した。3 番目、8 番目の Cys 組換え原虫では EBL の局在の変化が見られなかった。また、領域 6 の Cys 以外の表面アミノ酸の中でも置換によって PyEBL の局在が変化させるアミノ酸部位が見出された。以上の結果から、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 領域の中に PyEBL の局在を決定するサブドメインが存在する事が示唆された。

A. 研究目的

マラリア原虫メロゾイトの赤血球結合分子 (EBL : Erythrocyte Binding-Like) はメロゾイトの赤血球侵入に重要な機能を果たすことから、赤血球ステージ原虫に対するワクチン候補抗原として注目されている。我々は EBL 分子を標的とするワクチン開発のモデルとして、ネズミマラリア原虫 *Plasmodium yoelii* の EBL (PyEBL) の解析を行っている。感染後の急激な原虫感染率の上昇により致死となる強毒株 (17XL) と致死でない弱毒株 (17XNL) の PyEBL 分子の塩基配列を解析し、その結果から予想されるアミノ酸配列を比較したところ、オープンリーディングフレーム内での相違は、C 末端部のシステイン (Cys) に富む領域 (第 6 領域) 内の Cys の

一つが、17XL 株では Arg に置換されていることのみであった。この Cys の変異に着目し、Py17XL 株と Py17XNL 株におけるアミノ酸置換と分子の局在の差異および病原性の差違との関連性を検討した。免疫電子顕微鏡法を用いて PyEBL の詳細な局在をみると、17XNL 株では PyEBL は原虫先端部のマイクロネームに局在するのに対し、17XL 株では先端部より後方に位置するデンスグラニュールに局在することが判明した。そこで、PyEBL の第 6 領域のアミノ酸を置換した遺伝子改変原虫を作成して検討した結果、第 6 領域が PyEBL 分子の細胞内輸送に重要であること、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を明らかにすることが

できた。本年度は、Py17XL と Py17XNL 株における EBL 分子の局在の差が領域 6 の他のアミノ酸を置換しても起こりうるか否かについて、領域 6 内のシステインと分子表面に位置することが予想され種間で保存されているアミノ酸に着目して検討を行った。

B. 研究方法および結果

遺伝子改変によって 17XNL 株の PyEBL の 726 番目のアミノ酸 (第 6 領域の 2 番目の Cys) を Arg に置換した原虫 17XNL (Cys-Arg) を作成して、間接蛍光抗体法によって観察したところ、原虫における EBL の局在が Py17XNL 株特有のマイクロネーム局在パターンから Py17XL 株特有のデンスグラニュール局在パターンに変化した。そこで、17XNL 株の PyEBL の同じ 726 番目のアミノ酸 (を Ara に置換した原虫を作製して観察すると、Arg 置換と同様のデンスグラニュール局在パターンへの変化が認められた。PyEBL の 726 番目のアミノ酸をそれぞれ Cys から Arg と Ara に置換した原虫の間で特に EBL の局在に差が見出されなかったため、以下の研究では領域 6 内のシステインをそれぞれ Ara へ置換して、アミノ酸置換による局在に及ぼす影響を検討した。また、アミノ酸を置換せず PyEBL の C 末端に緑色蛍光タンパク質 (GFP) を付加するコンストラクトを作成して、組換え原虫における EBL の局在を観察したところ、GFP による蛍光の局在はマイクロネーム局在パターンを示した。これによって GFP 付加が EBL の局在に影響しないことを確認した。そこで、PyEBL の C 末端に GFP を付加する組換

え用コンストラクトに、Stratagene 社の QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kits を用いて目的の部位の Cys を置換するための変異を挿入した。このコンストラクトを Xho I で切断して直鎖化し、Amaya 社の Nucleofector II で *P. yoelii* 17XNL 株にトランスフェクションした。ピリメサミンで組換え原虫を選択し、GFP の蛍光と、抗 EBL 抗体による間接蛍光抗体法で EBL の局在を確認した。

Withers-Martinez らは熱帯熱マラリア原虫の EBL のひとつ PfEBA-175 の構造解析によって、領域 6 で保存されている 8 個のシステインの 1 番目と 5 番目、2 番目と 4 番目、3 番目と 8 番目、6 番目と 7 番目が S-S 結合によって架橋されることを予測している。そこで、Py17XNL 株原虫 EBL の領域 6 内の全 Cys を、それぞれ Ara に置換した組換え原虫を作成した。観察の間に合わなかった 6 番目の Cys 置換原虫を除く全ての組換え原虫で、間接蛍光抗体法で EBL の細胞内局在を観察した。3 番目と 8 番目の Cys を置換した原虫を除く全ての組換え原虫において、EBL の局在は本来のマイクロネーム局在からデンスグラニュール局在パターンへと変化した。3 番目と 8 番目を組換えた原虫は、ワイルドタイプと同じマイクロネーム局在パターンを示し、局在は変化しなかった。以上の結果から、S-S 結合によって形成される領域 6 の立体構造が PyEBL の細胞内輸送に重要であるが、領域 6 内部にはより重要なサブドメインが存在する事が示唆された。また、変化が生じなかった Cys の組み合わせ (3 番目と 8 番目) は、

Withers-Martinezらが熱帯熱マラリア原虫のEBL (PfEBA175) において予測したS-S結合のCysの組合わせと一致していた。

次いで、PyEBLの細胞内輸送に重要なサブドメインを特定するため、種間で保存された領域6のCys以外のアミノ酸を同様にAraに置換した原虫を作製した。Withers-Martinezらにより提唱された領域6表面のKIX類似ドメインに含まれるアミノ酸残基と、これに含まれないが保存されたアミノ酸複数を置換して同様に間接蛍光抗体法で観察した所、765番目のTyrを置換した原虫でのみPyEBLの局在がデンスグラニュール局在パターンに変化した。なお、隣接する766番目のTyrを置換した原虫では局在は変化しなかった。以上から領域6表面にPyEBLの細胞内輸送に重要なアミノ酸が存在する事、そのサブドメインは非常に限られたアミノ酸によって構成されている事が示唆された。

E. 結論

弱毒株のPy17XNLと致死株のPy17XLでPyEBL分子のC末端部のCysに富む第6領域内のCysの一つが、17XL株ではArgに置換されていることに着目して検討を行った。Py17XNL株原虫EBLの領域6に存在する8個のシステインのうち、1番目のCys、4番目のCys、5番目のCys、7番目のCysを、それぞれAraに置換した組換え原虫を作成して間接蛍光抗体法で観察したところ、これら全ての組換え原虫においてEBLの局在はマイクロネーム局在パターンからデンスグラニュール局在パターンへと変化した。しかし、

3番目のCysと8番目のCysを置換した原虫ではマイクロネーム局在パターンから変化しない事を見出した。また、Cys以外の種間で保存されたアミノ酸の中に、置換するとマイクロネーム局在パターンからデンスグラニュール局在パターンへ変化するものがある事を見出した。以上の結果から、第6領域がPyEBL分子の細胞内輸送に重要であり、さらにその立体構造と、分子表面の特定の領域が細胞内輸送に関わっていることが明らかになった。

G. 研究発表

2. 学会発表

- 1) 大槻 均、入子英幸、石野智子、金子 修、福本宗嗣、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79回日本寄生虫学会大会、旭川市、5/20-21、2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきものはない

寄生虫感染宿主内で誘導される好塩基球の感染制御能の証明

中西憲司 兵庫医科大学

研究要旨

蠕虫が感染すると、Th2 型の免疫応答が誘導されるとともに、好塩基球が著明に増加する。昨年度までに我々は好塩基球が抗原提示細胞として Th2 細胞を誘導できることを明らかにした。しかし、蠕虫感染に対して好塩基球がどのような役割を果たしているのかは不明である。そこで、本研究では好塩基球欠損マウスを用いて、蠕虫排除における好塩基球の働きを検討した。その結果、好塩基球がいないと、感染が著しく遷延することを明らかにした。

A. 研究目的

好塩基球は全顆粒白血球の 1% 弱を占める少数派細胞である。好中球あるいは好酸球と異なり、好塩基球は細菌あるいは寄生虫が感染しても末梢血中の細胞数が増加することはない。しかし、寄生虫が感染した動物では Th2 型免疫応答が誘導され、特に肝臓や脾臓において好塩基球の数が著明に増加する。好塩基球は、肥満細胞とともに、IgE 媒介性のアレルギー性炎症のエフェクター細胞として重要である。しかし、両者の特筆すべき違いは、肥満細胞が組織に固着するのに対し、好塩基球は末梢血中を巡回することである。本研究で、好塩基球の Th2 型免疫応答誘導能と蠕虫排除における役割を解明することを目的に研究した。

B. 研究方法

好塩基球欠損マウスの作製：

①正常マウスに抗 FcεRIα抗体(MAR-1)を投与し、好塩基球を除去する。あるいは、好塩基球特異的 Diphtheria toxin(DT)

receptor 発現マウス(Bas-TRECK)に DT を投与し、好塩基球を除去する。

Strongyloides venezuelensis(Sv)排虫実験：

野生型マウス、または好塩基球欠損マウスに Sv の 3 型幼虫を経皮感染させたマウスから糞便を連日採取し、この中に現れる虫卵数を計測する。虫卵が検出されなくなった時点を排虫完了日とする。この実験によりマウスの Sv 排虫能における好塩基球の必要性を明らかにする。

Th2 型免疫応答誘導に対する好塩基球の影響：

1) Sv 感染 7 日目の野生型マウス、または好塩基球欠損マウスの腸間膜リンパ節細胞を採取し、抗 CD3/抗 CD28 抗体で刺激をして細胞内 IFNγ/IL-4 を染色して FACS で調べる。

2) Sv 感染前後の野生型マウス、または好塩基球欠損マウスの血清を経時的に採取し、血清中 IgE と粘膜型肥満細胞マーカー mMCP-1 の値を ELISA にて測定する。

1)、2) より蠕虫感染に伴う Th2 細胞誘導、IgE 産生、粘膜型肥満細胞誘導における好塩基球の役割を明らかにす

る。

(倫理面の配慮)

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

C. 研究結果

MAR-1 処置マウス、Bas-TRECK マウスのいずれの好塩基球を欠損したマウスでも、*Sv* を感染させた場合、排虫時期が野生型マウスに比べて著しく遅延した。このときの腸間膜リンパ節 T 細胞からのサイトカイン産生、血清中 IgE 産生、粘膜型肥満細胞の誘導には好塩基球の有無で変化は認められなかった。

D. 考察

研究発表

■ 著書 ■

安田好文, 中西憲司. 寄生虫に対する粘膜免疫. 清野宏 編. 臨床粘膜免疫学. 東京: シナジー, 2010: 522-529

■ 学術論文 ■

[総説]

中西憲司. IL-18 とユニークなアレルギー. ファルマシア 2010; 46: 55-59.

中平雅清, 中西憲司. Super Th1 細胞 / IL-18 による非 IgE 炎症と気管支喘息. 呼吸 2010; 29: 37-43.

松本真琴, 中西憲司. IL-18 と免疫疾患. Fronti Rheumatol Clin Immunol 2010; 37-43.

中西憲司. 好塩基球によるアレルギー

好塩基球欠損マウスでは感染が著しく遷延したことから、蠕虫感染防御における好塩基球の重要性が明らかとなった。しかし、そのメカニズムは蠕虫特異的 Th2 細胞の誘導よりも、むしろ腸管での効果相で作用していることが考えられる。そのメカニズムとして、IgE/FcεRIα を介した好塩基球の活性化が考えられ、今後、この関連を明らかにしていきたい。

E. 結論

今回の研究で、*Sv* 感染時に好塩基球は、Th2/IgE 誘導する抗原提示細胞としての役割よりも、寄生虫の排除機構に、大きく関与することが明らかになった。

F. 健康危険情報

該当せず。

性炎症の誘導と憎悪. アレルギー 2010; 59: 251

筒井ひろ子, 中西憲司. 自然型アレルギー. 侵襲と免疫 2010; 19: 85-86.

善本知広, 中西憲司. アレルギーと IL-18/IL-33. 実験医学 2010; 28: 1975-1981.

小坂久, 善本知宏, 中西憲司, 藤元治朗. 腹腔内術後癒着形成における IFN-γ の重要性. 炎症と免疫 2010; 18: 531-537.

中平雅清, 中西憲司. アレルギー憎悪機構. 臨床免疫・アレルギー科 2010; 54: 224-233.

安田好文, 中西憲司. IL-33 と好塩基球、

- マスト細胞-免疫応答と疾患における役割-. 炎症と免疫 2010;18:585-591.
- 中平雅清, 中西憲司. Super Th1 細胞 /IL-18 による非 IgE 炎症と気管支喘息. 呼吸 2010;29(2):115-121.
- 松本真琴, 中西憲司. IL-18と免疫疾患. *Frontiers in Rheumatology & Clinical Immunology* 2010;4(1):37-43.
- 中西憲司
好塩基球:新たな視点からみたアレルギー一性炎症の誘導, 序. 炎症と免疫, 18(1) : 1-2, 2010.
- [原著]
- Kawa K, Tsutsui H, Uchiyama R, Kato J, Matsui K, Iwakura Y, Matsumoto T, Nakanishi K. IFN- γ is a master regulator of endotoxin shock syndrome in mice primed with heat-killed *Propionibacterium acnes*. *Int Immunol* 2010;22(3):157-66.
- Nakanishi K, Tsutsui H, Yoshimoto T. Importance of IL-18-Induced Super Th1 Cells for the Development of Allergic Inflammation. *Allergol Int* 2010;59(2):137-141.
- Kuroda-Morimoto M, Tanaka H, Hayashi N, Nakahira M, Imai Y, Imamura M, Yasuda K, Yumikura-Futatsugi S, Matsui K, Nakashima T, Sugimura K, Tsutsui H, Sano H, Nakanishi K. Contribution of IL-18 to eosinophilic airway inflammation induced by immunization and challenge with *Staphylococcus aureus* proteins. *Int Immunol* 2010;561-570.
- Matsuba-Kitamura S, Yoshimoto T, Yasuda K, Futatsugi-Yumikura S, Taki Y, Muto T, Ikeda T, Mimura O, Nakanishi K. Contribution of IL-33 to induction and augmentation of experimental allergic conjunctivitis. *Int Immunol* 2010;22(6):479-489.
- Nakanishi K. Basophils are potent antigen-presenting cells that selectively induce Th2 cells. *Eur J Immunol*. 2010 ;40(7):1836-42.
- Yoshikawa S, Iijima H, Saito M, Tanaka H, Imanishi H, Yoshimoto N, Yoshimoto T, Futatsugi-Yumikura S, Nakanishi K, Tsujimura T, Nishigami T, Kudo A, Arii S, Nishiguchi S. Crucial role of impaired Kupffer cell phagocytosis on the decreased Sonazoid-enhanced echogenicity in a liver of a nonalcoholic steatohepatitis rat model. *Hepatol Res* 2010;40(8):823-831.
- Tsutsui H, Imamura M, Fujimoto J, Nakanishi K. The TLR4/TRIF-Mediated Activation of NLRP3 Inflammasome Underlies Endotoxin-Induced Liver Injury in Mice. *Gastroenterol Res Pract* 2010:641865.
- Satoh T, Takeuchi O, Vandenberg A, Yasuda K, Tanaka Y, Kumagai Y, Miyake T, Matsushita K, Okazaki T, Saitoh T, Honma K, Matsuyama T, Yui K, Tsujimura T, Standley DM,

Nakanishi K, Nakai K, Akira S. The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection. Nat Immunol 2010;11: 936-944.

Nakanishi K. Basophils as APC in Th2 response in allergic inflammation and parasite infection. Curr Opin Immunol 2010. 22(6):814-20.

■学会発表■

[国際学会]

Kenji Nakanishi. Innate and acquired immunity in expulsion of intestinal nematode. 14th International Congress of Immunology 2010. 8 Kobe

Makoto Matsumoto, Koubun Yasuda, Masato Kubo, Tomohiro Yoshimoto, Kenji Nakanishi. Basophils play a pivotal role in the expulsion of gastrointestinal nematode *Strongyloides venezuelensis*. 14th International Congress of Immunology 2010. 8 Kobe

Koubun Yasuda, Yuki Sasaki, Yuichi Kondo, Makoto Matsumoto, Tomohiro Yoshimoto, Kenji Nakanishi. IL-33 mediated expulsion of *Nippostrongylus brasiliensis* in the absence of adaptive immune system. 14th International Congress of Immunology 2010. 8 Kobe

Nakahira M, Nakanishi K. Involvement

of Gata3 in transcriptional regulation of *IL13* gene expression in IL-18-stimulated Th1 cells. 14th International Congress of Immunology 2010. 8 Kobe

Koubun Yasuda, Yuki Sasaki, Makoto Matsumoto, Yuuko Taki, Tomohiro Yoshimoto, Kenji Nakanishi. IL-33 mediated expulsion of *Nippostrongylus brasiliensis* and *Strongyloides venezuelensis*. The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity 2010. 9 Hyogo

[国内学会]

中西憲司. IL-1 ファミリーサイトカインと炎症. 第43回日本痛風・核酸代謝学会総会 2010. 2 大阪

安田好文, 松葉沙織, 善本知広, 弓倉静英, 高城ゆう子, 武藤太一朗, 池田誠宏, 三村治, 中西憲司. Contribution of IL-33 to induction and augmentation of experimental allergic conjunctivitis. 第75回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 2010. 6 北九州

松本真琴, 安田好文, 久保允人, 善本知広, 中西憲司. *Strongyloides venezuelensis* の感染防御における好酸球と好塩基球の役割について. 第66回日本寄生虫学会西日本支部大会 2010.11 岡山

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

分担研究者 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、マラリア抗原ペプチド遺伝子をつないでハマダラカ受精卵に注射、遺伝子導入蚊を作成した。唾液腺にはマラリア抗原ペプチドが発現し、唾液腺細胞から唾液腺腔に分泌された。またマラリア抗原ペプチドは蚊の口吻から放出された。その蚊をマウスに頻回に吸血させると、マウスはマラリア抗原ペプチドに対する抗体を産生した。

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マラリア抗原ペプチド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、マラリア抗原ペプチド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

唾液腺にマラリア抗原ペプチド産生する遺伝子導入蚊の作成に成功した。マラリア抗原ペプチドは唾液腺細胞から唾液腺腔に分泌されること、蚊の口吻からマラリア抗原ペプチド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、マウスはマラリア抗原ペプチド抗体をわずかであるが産生した。

D. 考察

遺伝子導入蚊の唾液腺において、外来性蛋白であるマラリア抗原ペプチドを産生させることに成功した。今後はこの遺伝子導入蚊の刺咬により、マウスに効率よく抗体を産生させられる工夫が必要である。

E. 結論

遺伝子導入蚊の作成に成功した。マラリア抗原ペプチドが唾液腺に発現し、唾液腺腔へ分泌された。このペプチドは蚊の口吻から放出され、マウスに若干の抗体を誘導した。

G. 研究発表

1. 論文発表 Matsuoka H, Ikezawa T, Hirai M: Production of a transgenic mosquito expressing circumsporozoite protein, a malarial protein, in the salivary gland of *Anopheles stephensi*. Acta Medica Okayama 64(4): 233-241, 2010
2. 学会発表 山本大介, 南雲浩志, 吉田栄人, 松岡裕之: ワクチン抗原を唾液成分として発現・分泌するトランスジェニックハマダラカの作製 第79回日本寄生虫学会大会 2010年5月20-21日(旭川市)(抄録集 p46)

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

分担研究者 久枝 一 群馬大学医学系研究科教授

研究要旨 マラリアに対する防御免疫を詳細に解析することは有効なワクチン開発に重要である。本報告では、マウスモデルを用いて CD8 T細胞の赤血球ステージマラリアに対する防御的役割を詳細に検討した。赤血球には MHC 分子を発現しないことからその関与は否定的であった。しかしながら、CD8 T細胞は IFN- γ 依存的に抗マラリア原虫作用を発揮することが明らかになった。

A. 研究目的

マラリアが今なお問題となっている理由の一つに有効なワクチンがないことが挙げられる。ワクチンの開発には有効な免疫応答を詳細に解析することが必須である。肝臓ステージマラリアに対しては、感染肝細胞を破壊することで CD8 T細胞は防御免疫に関与していることが知られている。その際には肝細胞表面にある MHC クラス I 分子に提示されたマラリア原虫の抗原を認識する。一方で、赤血球は MHC 分子を発現していないことから、CD8 T細胞は赤血球ステージマラリアに対する防御には貢献しないとされてきた。実際に赤血球ステージマラリアに対するワクチンは抗体が認識する抗原を標的に開発されてきた。近年、脳マラリアの発症への関与等、CD8 T細胞の赤血球ステージマラリアでの役割が示唆されてきた。本研究では、ネズミマラリアモデルを用いて CD8 T細胞の防御的役割を詳細に検討した。

B. 研究方法

近交系マウスにネズミマラリア原虫 *Plasmodium yoelii* 17XNL (PyNL), 17XL (PyL) 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。CD8 T細胞は脾臓より MACS 法により精製し、X線を照射したマウスに移入した。

全ての動物実験は群馬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. マラリア生ワクチンモデルの樹立

PyNL の感染を受けたマウスでは一過性に原虫血症が認められた後、最終的に原虫は排除される。

一方、PyL を感染したマウスでは急激な原虫の増殖が見られ、全てが 10 日前後で死に至る。弱毒株の感染を治癒したマウスは PyL による致死性感染に対して抵抗性となる。このように、弱毒性の PyNL は致死性の PyL に対して生ワクチンとして作用する。

2. 生ワクチンモデルにおける CD8 T細胞の防御的役割の検討

PyNL を耐過したマウス（免疫マウス）に抗 CD8 抗体を投与することで CD8 T細胞を除去した後に PyL を感染させた。CD8 T細胞を除去しても、PyL に対する抵抗性に变化なく全てのマウスが生き残った。また、免疫マウスから CD8 T細胞を精製し、通常マウスに移入した後に PyL を感染させても、抵抗性を賦与することが出来なかった。これらの結果は、CD8 T細胞の防御的役割を否定するものであった。

3. PyL の追加免疫による CD8 T細胞応答の活性化

免疫マウスに PyL を感染させ、さらにもう一度 PyL を感染させた。依然として抵抗性であるが、これらのマウス（追加免疫マウス）から CD8 T細胞を精製し、通常マウスに移入した後に PyL を感染させた。これらのマウスは PyL に対する抵抗性を獲得したことから、CD8 T細胞は防御に貢献していることが明らかとなった。追加免疫マウスの CD8 T細胞は CD44^{hi}CD62L^{lo} のいわゆるエフェクターメモリー細胞が増加していた。

4. CD8 T細胞の抗マラリア作用の解析 1

CD8 T細胞に免疫応答は IFN- γ の分泌と細胞傷害活性に大別できる。それら抗マラリア応答への寄与を検討するために、IFN- γ ノックアウトマウス (GKO)、細胞傷害活性に必須である perforin を欠損するマウス (PKO) に PyNL 生ワクチン、PyL 2 回追加免疫を行なった。これらの変異マウスは PyNL

感染でも半分が死に至ったが、生存したマウスは PyL に対しても抵抗性を示した。これらのマウスから CD8 T 細胞を精製し、通常マウスに移入した後に PyL を感染させた。GKO マウスの CD8 T 細胞を移入したマウスでは全てのマウスで抵抗性が得られず死亡した。一方、PKO マウスの CD4 T 細胞は野生型マウスの CD4 T 細胞同様、防御的であったが、PKO CD8 T 細胞を移入したマウスでは高い原虫血症を認め、一匹のマウスが死亡した。

5. CD8 T 細胞の抗マラリア作用の解析 2

CD8 T 細胞の防御効果には IFN- γ が必須であるが、このサイトカインの主な作用はマクロファージの活性化である。そこで、マクロファージの重要性についても検討した。追加免疫マウスの CD8 T 細胞を移入したマウスに、マクロファージを無力化するカラギーナンを接種し、PyL を感染させた。対照群で認められた CD8 T 細胞による抵抗性は、カラギーナン投与群で完全に解除された。野生型マウスの追加免疫群からの CD8 T 細胞を移入したマウスのマクロファージは感染赤血球を選択的に貪食していたが、GKO マウスの CD8 T 細胞を移入したマウスのマクロファージでは著しく貪食能力が弱まっていた。

D. 考察

CD8 T 細胞の赤血球ステージマラリアに対する防御における関与が明らかになった。CD8 T 細胞の活性化には PyNL の単独免疫では不十分であった。PyL の追加免疫はエフェクターメモリー細胞を誘導するのに必要であろう。

CD8 T 細胞の防御機能としては、IFN- γ を分泌しマクロファージを活性化させ感染赤血球を取り込ませることがメインストリームであると思われる。予想外に、細胞傷害に関わるメカニズムも部分的にはあるが関与していることも明らかとなった。赤血球は MHC クラス I を発現しないので標的とはなり得ない。しかしながら、網状赤血球では一部 MHC クラス I が残っており、この細胞が標的となる可能性がある。また、さらに未熟な赤芽球が感染を受けた場合にも破壊の対象となる。もう一つの可能性は感染赤血球を貪食したマクロファージへの細胞傷害活性であるが、これらの標的細胞の検索はこれからの課題であろう。

E. 結論

これまでは否定的であった赤血球ステージマラリアに対する CD8 T 細胞の防御的役割を明らかにした。この知見は抗マラリアワクチンの開発に大きなインパクトを与えることが期待できる。これまでの抗体を基盤としたワクチン戦略では、多様性に富む原虫表面上の抗原を標的とする必要性があり、その開発には困難を極めている。CD8 T 細胞が認識する抗原は原虫のどこに発現していてもよいはずであり、保存された配列を持つ標的抗原を見つけることで幅広く効果を発揮するワクチンの開発が可能となる。

G. 論文発表

Imai T, Shen J, Chou B, Duan X, Tu L, Tetsutani K, Moriya C, Ishida H, Hamano S, Shimokawa C, Hisaeda H, and Himeno K: Involvement of CD8⁺ T cells in protective immunity against murine blood-stage infection with Plasmodium yoelii 17XL strain. **Eur. J. Immunol.** 40: 1053-1061, 2010.

Ishida H, Matsuzaki-Moriya C, Imai T, Yanagisawa K, Nojima Y, Suzue K, Hirai M, Iwakura Y, Yoshimura A, Hamano S, Shimokawa C, and Hisaeda H: Development of experimental cerebral malaria is independent of IL-23 and IL-17. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 402: 790-795, 2010.

Ozeki Y, Sugawara I, Udagawa T, Aoki T, Osada-Oka M, Tateishi Y, Hisaeda H, Nishiuchi Y, Harada N, Kobayashi K, and Matsumoto S: Transient role of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in mycobacterial infection in mice. **Int. Immunol.** 22: 179-189, 2010.

Chou B, Hiromatsu K, Hisaeda H, Duan X, Imai T, Murata S, Tanaka K, and Himeno K: Genetic immunization based on the ubiquitin-fusion degradation pathway against Trypanosoma cruzi. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 392: 277-282, 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況 該当なし