

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細胞免疫応答の研究

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

マラリア感染赤内型においては、 $CD4^+$  T細胞が感染防御に重要な役割を担っている。一方マラリア感染においてT細胞機能が修飾されることが報告されているが、その詳細は十分に明らかではない。ワクチン等により宿主側の感染防御対策を行う場合、マラリア感染と宿主感染防御機構との相互作用を十分理解した上で行うことが重要である。そのため、我々はマウスモデルを用いて宿主感染防御機構、特にT細胞反応系について研究を行った。本年度は、マラリア感染中の $CD4^+$  T細胞活性制御に関する研究を行い、感染マウス $CD4^+$  T細胞のIFN- $\gamma$ 産生がIL-2依存性であるという新たな仕組みを明らかにしたので報告する。

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する。最初は肝細胞に感染し（肝細胞期）、引き続き赤血球期へと移行して発症する。赤血球期の防御免疫は主として $CD4^+$  T細胞とB細胞によって担われている。マラリア感染においては、樹状細胞機能の低下や免疫抑制などの免疫機能修飾が知られているが、その詳細は明らかではない。

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研究を行ってきた。本研究では、 $CD4^+$  T細胞のサイトカイン産生に対するマラリア原虫感染の影響について明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. 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を行った。
2. OVA-PbA或いは野性型PbAを感染させた。
3. 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、リアルタイムRT-PCR

等により解析した。

4.必要に応じて、細胞をソーティングにより精製して、抗原やリコンビナントIL-2などの刺激に対するIFN- $\gamma$ 産生をELISA法などで調べた。

### 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. PbA感染マウスのCD4<sup>+</sup> 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- $\gamma$ 、IL-4及びIL-10を産生することが明らかになった。また、IL-2と同じファミリーであるIL-7やIL-15に対して増殖反応はあるもののIFN- $\gamma$ 産生を行わなかった。IL-2刺激伝達系が何らかの経路でIFN- $\gamma$ 産生に結びついていると考えられた。

2. 感染マウスのCD4<sup>+</sup> T細胞は、マラリア粗抗原に反応してIFN- $\gamma$ 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<sup>+</sup> T細胞のマラリア抗原に対するIFN- $\gamma$ 産生反応はIL-2依存性であることが明らかになった。一方抗T細胞受容体に対するIFN- $\gamma$ 産生反応は抗IL-2抗体で阻止されず、IL-2非依存性であると考えられた。

### D. 考察

マラリア感染中のマウスCD4<sup>+</sup> T細胞は、常に抗原刺激を受けているためかIL-2受容体を発現し、IL-2刺激に対してIFN- $\gamma$ 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。この仕組みがマラリアと他感染症との重複感染における病態に影響する可能性が十分に考えられる。また、T細胞受容体刺激に対するCD4<sup>+</sup> T細胞のIFN- $\gamma$ 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、両者の違いの分子基盤は何か、今後の研究が必要である。

### E. 結語

本年度は、昨年引き続きマラリア赤血球期におけるCD4<sup>+</sup> T細胞の免疫応答の特徴について検討した。IL-2依存性と非依存性のIFN- $\gamma$ 産生があることを初めて明らかにする事ができた。本研究はマウスマラリアモデルを用いた実験系であり、マラリア感染患者のリンパ球でも同様なのか検討が必要である。さらに、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

Kimura D., Miyakoda M., Honma K., Yuda M., Chinzei Y., and Yui K., Production of IFN- $\gamma$  by CD4<sup>+</sup> T cells in response to malaria antigens is IL-2-dependent. *Int. Immunol.*, 22 (12); 941-952, 2010.

Complete abrogation of sporozoite-induced sterile immunity by blood stage parasites of

homologous and heterologous malaria parasites, M. Inoue, J. Tang, O. Kaneko, K. Yui, R. Culleton, *Malaria J.*, 9 (suppl) O19, 2010.

## 2. 学会発表

Production of IFN- $\gamma$  by CD4<sup>+</sup> T cells in response to malaria antigen is IL-2 dependent during infection with *Plasmodium berghei*, D. Kimura, M. Miyakoda, K. Honma, K. Kimura, M. Yuda, Y. Chinzei, K. Yui, p105, April 11-16, 2010, Keystone Symposia, Colorado, USA

モデル抗原組換えマラリア原虫を用いた肝細胞期防御免疫応答の解析、木村一美、木村大輔、都田真奈、本間季里、田村隆彦、油田正夫、由井克之、2D-ML29 第79回日本寄生虫学会大会 旭川 2010年5月20日21日

CD4<sup>+</sup> T 細胞のマラリア原虫抗原特異的 IFN- $\gamma$ 産生は IL-2 依存的である。木村大輔、都田真奈、本間季里、木村一美、油田正夫、鎮西康雄、由井克之、2D-ML30 第79回日本寄生虫学会大会 旭川 2010年5月20日21日

マラリア感染における特異的記憶 CD8<sup>+</sup> T 細胞反応性の解析、都田真奈、木村大輔、本間季里、木村一美、油田正夫、鎮西康雄、由井克之、2D-ML31 第79回日本寄生虫学会大会 旭川 2010年5月20日21日

Flt3 ligand 発現による実験的脳マラリア発症の抑制、田村隆彦、八木田秀男、由井克之、2D-ML48 第79回日本寄生虫学会大会 旭川 2010年5月20日21日

Expansion of dendritic cells by Flt3 ligand modifies T cell responses during infection with *Plasmodium berghei* ANKA and prevents the development of cerebral malaria, T. Tamura, K. Yui, 14<sup>th</sup> International congress of Immunology Kobe August 22-27, 2010

Reduction of the memory CD8<sup>+</sup> T cell responses during infection with *Plasmodium berghei* ANKA, M. Miyakoda, D. Kimura, K. Honma, K. Kimura, M. Yuda, Y. Chinzei, K. Yui, 14<sup>th</sup> International congress of Immunology Kobe August 22-27, 2010

Prevention of cerebral malaria by Flt3 ligand during infection with *Plasmodium berghei* ANKA, T. Tamura, K. Kimura, M. Yuda, K. Yui, 45<sup>th</sup> annual Japan-US joint conference on parasitic diseases, Jan. 10-11, 2011.

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

マラリア原虫のリガンドおよび赤血球侵入関連分子の解析

分担研究者 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、赤血球認識リガンドはワクチン開発の標的となる。我々は赤血球侵入型原虫メロゾイトと原虫感染赤血球表面に発現している SURFIN の三日熱マラリア原虫における相同体 PvSTP について、転写とタンパク質発現を明らかにすることを目的に研究を進めた。

A. 研究目的

三日熱マラリア原虫には、熱帯熱マラリア原虫の感染赤血球表面と赤血球侵入型原虫表面に発現している SURFIN と呼ばれる分子の相同体 PvSTP がゲノム上に見出される。原虫種を越えて保存されている分子は原虫の生存にとって共通する重要な役割を担っている可能性が高いと考え、PvSTP について、その転写とタンパク質発現を明らかにすることとした。

B. 研究方法

三日熱マラリア原虫 PvSTP には PvSTP1 と PvSTP2 の二種類が存在するため、両者について転写解析を行う。分子の発現および局在を明らかにするために、両者に対して特異抗体を作成しウェスタンブロット解析および間接蛍光抗体法を行う。

（倫理面への配慮）三日熱マラリア原虫は、共同研究を行ったタイのマヒドン大学が、タイでの倫理審査を経たうえで得た原虫標本を分与してもらうことで入手した。

C. 研究結果

転写解析の結果、PvSTP2 は PvSTP1 に比べて数倍-数百倍多く転写されていることが分かった。各分子に対して3つづつの組換えタンパク質を作成し、抗血清を作成したが原虫との反応が認められなかった。そのため、さらに各分子のアミノ酸配列を用いたペプチド抗体を作成したところ、ELISAにて両者ともペプチドに対する抗体価が128,000以上のウサギ抗血清を得ることが

出来た。ウェスタン解析では、両者ともに予想分子量周囲に反応が見られたが、明瞭なバンドが検出できる PvSTP2 に対して、PvSTP1 のバンドは非常に薄かった。間接蛍光抗体法により局在を観察すると、原虫感染赤血球膜上の多数の小さな点として反応が見られたが、このようなパターンは、三日熱マラリア原虫感染赤血球をギムザ染色した際に見られるシュフナー斑点に似るため、蛍光抗体反応後にさらにギムザ染色を行い、PvSTP2 の局在をシュフナー斑点の局在と比較したところ、両者の局在は良く一致した。

D. 考察

シュフナー斑点は、電子顕微鏡では赤血球表面から内側に陥凹したポケット状構造物として観察され、熱帯熱マラリア原虫でギムザ染色ではモラー斑点として見られるモラー・クレフトと相同の構造物と考えられる。SURFIN や PfEMP-1 はモラー・クレフトに原虫から輸送された後に、赤血球表面に発現すると考えられているため、PvSTP2 とシュフナー斑点との共局在は、三日熱マラリア原虫にも熱帯熱マラリア原虫と似た赤血球分子輸送機構が存在し、PvSTP2 もシュフナー斑点を経由して感染赤血球表面に輸送される可能性を示唆する。このようなユニークな輸送機構は生物学的にも興味深いと共に、創薬の標的となりうるのではないかと考えている。

E. 研究発表

1. 論文発表
  1. Wang Y, **Kaneko O**, Sattabongkot J, Chen J-H, Lu F, Chai J-Y, Takeo S, Tsuboi T, Ayala FJ, Chen Y, Lim CS, Han ET Genetic Polymorphism of *Plasmodium vivax* msp1p, a Paralog of Merozoite Surface Protein 1, from Worldwide Isolates. *Am J Trop Med Hyg* 84(2), 292-297 (2011/Feb).
  2. Pandey BD, Pun SB, **Kaneko O**, Pandey K, Hirayama K. Expansion of Visceral Leishmaniasis to Western Hilly Part of Nepal. *Am J Trop Med Hyg* 84(1):107-8. (2011/Jan)
  3. Pandey K, Pandey BD, Mallik AK, **Kaneko O**, Uemura H, Kanbara H, Yanagi T, Hirayama K. Diagnosis of visceral leishmaniasis by polymerase chain reaction of DNA extracted from Giemsa's solution-stained slides. *Parasitol Res* 107(3):727-30 (2010/Aug)
2. 学会発表
  1. **Kaneko O**. "Plasmodium SURFIN: evolution, polymorphism, and human sera reactivity." Nagasaki Singapore Symposium, Singapore (2010. Apr. 15-17)
  2. Yahata K, Treeck M, Culleton R, Inoue M, Gilberger T-W, **Kaneko O**. "Time-lapse imaging of red blood cell invasion by rodent malaria parasites." The 6th annual BioMalPar conference, Heidelberg, Germany (2010. May. 3-5)
  3. 矢幡一英、リチャード・カレトン、井上愛美、**金子修**. 「1A-ML09: 熱帯熱マalaria原虫とローデントマalaria原虫を用いた赤血球侵入時の動態観察」 (oral) 第 79 回日本寄生虫学会大会、旭川 (2010. May. 20-22)
  4. 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. 「1A-ML10: ネズミマalaria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」 (oral) 第 79 回日本寄生虫学会大会、旭川 (2010. May. 20-22)
  5. Mutungi JK, Kaewthamasorn M, Culleton R, Sakaguchi M, Yahata K, **Kaneko O**. "1A-ML11: Characterisation of PyRON5, A *Plasmodium yoelii* rhoptry neck protein." (oral) 第 79 回日本寄生虫学会大会、旭川 (2010. May. 20-22)
  6. 井上愛美、砂原俊彦、神田萌、**金子修**、カレトン・リチャード. "2D-ML51: Intra-host dynamics of mixed species malaria parasite infections in mice and mosquitoes." (oral) 第 79 回日本寄生虫学会大会、旭川 (2010. May. 20-22)
  7. リチャード・カレトン、津守陽子、ヌデウング・マセユ、砂原俊彦、五十棲理恵、上村春樹、**金子修**、田邊和祐. "2A-ML26: Selection for drug resistance in malaria parasites differs between urban and suburban areas of Brazzaville, Republic of Congo." (oral) 第 79 回日本寄生虫学会大会、旭川 (2010. May. 20-22)
  8. Sungkapong T, 矢幡一英, Chotivanch K, **金子修** "三日熱マalaria原虫 PvSTP の解析" (oral) 第 18 回分子寄生虫学ワークショップ、草津 (2010. Aug. 2-5)
  9. Yahata K, Treeck M, Culleton R, Inoue M, Gilberger TW, **Kaneko O**. "Time-lapse imaging of red blood cell invasion by rodent malaria parasites" (poster) The 12th International Conference of Parasitology, Melbourne, Australia (2010. Aug. 15-20)
  10. Inoue M, Tang J, **Kaneko O**, Yui K, Culleton R "Complete abrogation of sporozoite-induced sterile immunity by blood stages of homologous and heterologous malaria parasite species" (poster) The 12th International Conference of Parasitology, Melbourne, Australia (2010. Aug. 15-20)
  11. **Kaneko O**. "*Plasmodium vivax* subtelomeric transmembrane protein 2 (PvSTP2), a homolog of *P. falciparum* SURFIN: transcription and localization" (oral) XII Brazilian Meeting on Malaria Research, Ouro Preto, Brazil (2010. Oct. 3-6)
  12. 佐倉孝哉・矢幡一英・**金子修** "マalaria原虫 EBL の細胞内輸送の解析" (oral) 第 9 回分子寄生虫・マalaria学研究フォーラム、長崎 (2010. Oct. 8-9.)
  13. 矢幡一英, Treeck M, Culleton R, 井上愛美, Gilberger T-W, **金子修** "熱帯熱マalaria原虫とローデントマalaria原虫を用いた赤血球侵入時の動態観察" (oral) 第 9 回分子寄生虫・マalaria学研究フォーラム、長崎 (2010. Oct. 8-9.)
  14. Inoue M, Tang J, **Kaneko O**, Yui K, Culleton R "Complete abrogation of sporozoite-induced sterile immunity by blood stage parasites of homologous and

- heterologous malaria species." (oral) Parasite to prevention: Advances in the understanding of malaria, Edinburgh, UK (2010 Oct. 20-22) [on-line abstract]
15. Tang J, Inoue M, Sunahara T, Kanda M, **Kaneko O**, Culleton R "Intra-host dynamics of mixed species malaria parasite infections in mice and mosquitoes" (oral) Parasite to prevention: Advances in the understanding of malaria, Edinburgh, UK (2010 Oct. 20-22) [on-line abstract]
  16. Nakazawa S, Maeno Y, Culleton R, Quang NT, **Kaneko O**, Marchand RP "Plasmodium knowlesi frequently infects Anopheles dirus and human with P. vivax and P. falciparum in Khanh Phu, Khan Hoa, Vietnam" (poster) Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections, Hanoi, Vietnam (2010 Nov. 11-12)
  17. Sungkapong T, Yahata K, Culleton R, Tsuboi T, Torii M, Ruengveerayuth R, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, **Kaneko O**, Chotivanich K "Antibody response to Plasmodium vivax Subtelomeric Transmembrane Protein (PvSTP), a homolog of Plasmodium falciparum SURFIN, in P. vivax-infected patients" (poster) Joint International Tropical Medicine Meeting 2010 and International Malaria Colloquium 2010, Bangkok, Thailand, (2010. Dec. 1-3)
  18. 佐倉孝哉、矢幡一英、**金子修** "マラリア原虫赤血球結合リガンド EBL の細胞内輸送" (oral) 第9回感染症沖縄フォーラム、宜野湾市 (2011. Feb. 10-12)
- 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 恵淑 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の体内動態の改善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の体内動態の改善を目的に投与量・投与回数の減少を目的に添加剤の検討を行った。懸濁化剤として Hydroxymethylcellulose (CMC) を用いた時の血漿中濃度推移を検討した。その結果、従来の CMC では化合物の懸濁化は出来たものの、体内動態値の改善は見られなかった。一方、CMC 構造ベースに OH 残基を付加した誘導体では N-89 の懸濁化の効率が改善されたが、血漿中濃度の長時間維持には至らなかった。上記に示した添加剤の検討結果、これら化合物は N-89 の抗マラリア活性に影響しない事が明らかになった。以上の結果より、一つの固体分散剤の添加では体内動態の改善が難しいので、今後、他のオイル製剤を数種混合して最適の添加条件を検討する必要がある。また、N-89 作用機序の解析研究で特定のマラリア原虫関連タンパク質（詳細は構造解析後に明らかにする）の関わりを示す予備的な結果を得た。今後標的分子とこれらタンパク質の相互作用を検討する。

A. 研究目的

近年 Artemisinin をベースに他の抗マラリア薬を併用した ACT (Artemisinin-Combination Therapy) 療法が WHO を中心に展開されているが、カンボジア国境を中心にこれら ACT 耐性の熱帯熱マラリア原虫が報告され、新しい抗マラリア薬の開発の重要性が急務になっている。

私は抗マラリア新薬開発研究で得られた分子内ペルオキシド構造を含む有機合成化合物に優れた抗マラリア活性を見出し、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おいて研究を進めた。そこで、マラリア流行地の状況を考慮し、安価で大量に有機合成しやすい化合物を選抜する。また、服用しやすい製剤の検討と投与回数の減少を目指した製剤の検討を行った。また、薬剤耐性マラリアを克服するためには作用機序の解析研究を同時に行い、もし、薬剤耐性の

マラリア原虫が出現しても回避できる。

B. 研究方法

1. N-89 の体内動態解析

LC/MS/MS を用いた N-89 の検出条件をもとに懸濁化剤 (CMC, CMC-OH など) を有機溶媒に溶解した N-89 に配合率を 0~10% まで上げて、懸濁した。そして、凍結乾燥方法を行い、得られた化合物の粉末を生理食塩水に再懸濁した。マウスに従来のオイル溶解した N-89 を投与する群をコントロールとして、懸濁条件の異なる N-89 懸濁液を実験群として経口投与して体内動態の推移を解析した。

2. N-89 の抗マラリア作用機序の解析

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た。一部の標的候補タンパク質については大腸菌内で大量発現して結晶構造解析を行うとともに、組換えタンパク質標的分子候補を用いて他のマラリア原虫タンパク質と分子間相互作用を示すかどうかについても解析した。

### C. 研究結果

N-89 の体内動態の解析の結果、従来のオイル製剤の値と比較して懸濁化剤 (CMC) を 10% 含む N-89 の体内動態のパラメータを比較した。40mg/kg 単回経口投与時の血漿中濃度は、従来のオイル溶解時の血漿中半減期 (1.1 時間) と比較して変化は無く、逆にこれら化合物の抗マラリア活性検討の結果でも相違が見られないことから懸濁化剤を添加しても抗マラリア活性に影響品子とが判った。CMC の誘導体である CMC-OH を用いた実験でも体内動態の値は従来のオイル溶解 N-89 の値と相違がなく、これら懸濁単剤では体内動態の改善が見られない事が明らかとなった。

N-89 の作用機序の解析研究を行った。当研究室で 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 耐性株と元の株 (抗マラリア活性が 10 倍異なる) を用いて株価のマラリア原虫遺伝子の網羅的解析を行った。株間比較の結果、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は 58 個、耐性株で発現量に減少が見られた遺伝子は 41 個あった。タンパク質変動を見るために両株のプロテオーム解析の結果、N-89 処理で Protein A, Protein B (仮称) の 2 種が共通の動きを示した。Protein A の組換えタンパク質を作成し、結晶構造解析を行っている。一方、このタンパク質の変動を western Blot で解析した結果、N-89 処理時間に伴い、

Protein A の減少が見られ、また、これに付随してマラリア原虫特有のタンパク質が逆にレベルが上昇する事が割ったか。現在、これらタンパク質と Protein A との案錬成について複合体形成有無を検出している。

### 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しやすい新規抗マラリア薬として開発していく必要がある。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、安定性を含めた解析研究も平行していく。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。それに付随して溶解性の改善を目的に新しい溶解性と抗マラリア活性を併せ持つ新規シーズの探索も平行していく事で、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。

### 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) をマラリアコントロールのためには流行地の状況を考慮した製剤の検討が必要で、今回の結果では体内動態



改善出来る懸濁化剤は見出せなかった。今後懸濁化剤を含む種々の添加剤の検討し、さらに配合等の膨大な組み合わせを行い、最適の製剤条件を見出す必要が有る。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Morisaki, D., Kim, H.-S., Inoue, H., Terauchi, H., Kuge, S., Naganuma, A., Wataya, Y., Tokuyama, H., Ihara, M. and Takasu, K. Selective accumulation of rhodacyanine in plasmodial mitochondria is related to the growth inhibition of malaria parasites. *Chemical Science*, 1 (2): 206-209, 2010.

2. Nishiyama, Y., wasa, K., Okada, S., Takeuchi, S., Moriyasu, M., Kamigauchi, M., Koyama, J., Takeuchi, A., Tokuda, H., Kim, H.-S., Wataya, Y., Takeda, K., Liu, YN., Wu, PC., Bastow, KF., Akiyama, T. and Lee, KH. Geranyl derivatives of isoquinoline alkaloids show increased biological activities. *Heterocycles*, 81 (5): 1193-1229, 2010.

3. Sato, A., Naito, T., Hiramoto, A., Goda, K., Omi, T., Kitade, Y., Sasaki, T., Matsuda, A., Fukushima, M., Wataya, Y. and Kim, H.-S. Association of RNase L with a Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1 in mediating the apoptosis of a human cancer cell-line. *FEBS Journal*, 277 (21), 4464-4473, 2010.

4. Sato, A., Satake, A., Hiramoto, A., Wataya, Y. and Kim, H.-S. Protein expression profiles of necrosis and apoptosis induced by 5-fluoro-2'-deoxyuridine in mouse cancer cells. *Journal of Proteome Research*, 9 (5): 2329-2338, 2010.

### 2. 学会発表

1. 鎌井一気, 平本晃子, 森田将之, 秀野勇人, 小山貴彦, 江文, 林孝輔, 佐藤聡, 平岡修, 野島正朋, 金惠淑, 綿矢有佑. 新規抗マラリア薬・環状過酸化化合物

物の作用機序解析. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会, 2010年12月7-10日, 神戸, 兵庫.

2. 岡田和朗, 脇本達也, 松本雅弘, 小林明日香, 森田将之, 野島正朋, 川合覚, 平本晃子, 佐藤聡, 金惠淑, 綿矢有佑. 新規抗マラリア薬の開発研究～環状過酸化化合物の抗マラリア活性と体内動態～ 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会, 2010年12月7-10日, 神戸, 兵庫.

3. 金惠淑, 平本晃子, 佐藤聡, 森田将之, 熊谷貴, 下河原理江子, 谷口斎恵, 太田伸生, 綿矢有佑. 新規抗住血吸虫薬の開発研究. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会, 2010年12月7-10日, 神戸, 兵庫.

4. 中間健太郎, 佐藤聡, 山本朗央, 平本晃子, 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研究 ～ネクローシスとアポトーシスを制御する因子の探索～ 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会, 2010年12月7-10日, 神戸, 兵庫.

5. 山本朗央, 佐藤聡, 中間健太郎, 平本晃子, 金惠淑, 綿矢有佑. 5-Fluoro-2'-deoxyuridine (FUdR)が誘導する細胞死分子機構の解析研究 ～ネクローシスとアポトーシスの制御因子としてのHSP90機能～. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会, 2010年12月7-10日, 神戸, 兵庫.

6. 大見拓也, 内藤智春, 佐藤聡, 平本晃子, 松田彰, 佐々木琢磨, 福島正和, 北出幸夫, 金惠淑, 綿矢有佑. 抗腫瘍性ヌクレオシドアナログ 3-Ethynylcytidine (ECyd)によるアポトーシス誘導機構の解明. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会, 2010年12月7-10日, 神戸, 兵庫.

7. Yusuke Wataya, Akira Sato, Tomoharu Naito, Takuya Omi, Akiko Hiramoto, Yukio Kitade, Takuma Sasaki, Akira Matsuda, Masakazu Fukushima, Hye-Sook Kim. Molecular mechanisms of cell death induced

by 3'-ethynylcytidine. The 37<sup>th</sup> International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2010, November 10-12, 2010, Yokohama, Japan.

8. Akira Sato, Kentaro Nakama, Akihiro Yamamoto, Akiko Hiramoto, Hye-Sook Kim, Yusuke Wataya. Association of intermediate filament proteins with necrosis and apoptosis in cell death induced by 5-fluoro-2'-deoxyuridine. The 37<sup>th</sup> International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2010, November 10-12, 2010, Yokohama, Japan.

9. 脇本達也, 岡田和朗, 松本雅弘, 小林明日香, 森田将之, 野島正明, 川合 覚, 平本晃子, 佐藤 聡, 金 惠淑, 綿矢有佑. 新規抗マラリア薬の開発研究～環状過酸化化合物の抗マラリア活性と体内動態～第66回日本寄生虫学会西日本支部大会, 2010年11月6-7日, 岡山.

10. 鎌井一気, 森田将之, 小山貴彦, 秀野勇人, 江 文, 林 孝輔, 平本晃子, 佐藤聡, 平岡 修, 平本一幸, 野島正明, 綿矢有佑, 金 惠淑. 環状過酸化化合物の抗マラリア作用機序の解析. 第66回日本寄生虫学会西日本支部大会, 2010年11月6-7日, 岡山.

11. Akiko Hiramoto, Hye-Sook Kim, Akira Sato, Masayuki Morita, Kazuki Okada, Tatsuya Wakimoto, Kazuki Kamai, Wen Jiang, Osamu Hiraoka, Satoru Kawai, Yusuke Wataya. NEW antimalarial drug developmental research – Antimalarial synthetic endoperoxides –. 8<sup>th</sup> Asia-Pacific Travel Health Conference, October 20-23, 2010, Nara, Japan.

12. 森田将之, 小山貴彦, 平本晃子, 鎌井一気, 秀野勇人, 江 文, 林 孝輔, 佐藤聡, 平岡 修, 平本一幸, 益山新樹, 野島正明, 綿矢有佑, 金 惠淑. 環状過酸化化合物の抗マラリア作用機序の解析. 第9回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム, 2010年10月8-9日, 長崎.

13. 山本朗央, 佐藤 聡, 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研究～ネクロシ

スとアポトーシスの制御因子の探索研究～. 日本がん分子標的治療学会第14回学術集会, 2010年7月6-8日, 東京.

14. 大見拓也, 佐藤 聡, 松田 彰, 佐々木琢磨, 福島正和, 金 惠淑, 綿矢有佑. 新規抗腫瘍ヌクレオシドアナログ 3'-Ethynylcytidine(ECyd; TAS-106)によるアポトーシス誘導機構の解明. 日本がん分子標的治療学会第14回学術集会, 2010年7月6-8日, 東京.

15. 森田将之, 平本晃子, 笹岡健二, 小山貴彦, 佐藤 聡, 益山新樹, 野島正明, 綿矢有佑, 金 惠淑. 環状過酸化化合物の抗マラリア作用機序の解析. 第79回日本寄生虫学会大会, 2010年5月20-21日, 札幌, 北海道.

16. 鎌井一気, 小山貴彦, 森田将之, 平本晃子, 佐藤 聡, 平岡 修, 益山新樹, 野島正明, 金 惠淑, 綿矢有佑. 新規抗マラリア薬・環状過酸化化合物の作用機序解析. 第130年会日本薬学会, 2010年3月28-30日, 岡山.

17. 金 惠淑, 平本晃子, 佐藤 聡, 熊谷 貴, 下河原理江子, 谷口斎恵, 太田伸生, 綿矢有佑. 新規抗住血吸虫薬の開発研究. 第130年会日本薬学会, 2010年3月28-30日, 岡山.

18. 松本雅弘, 岡田和朗, 脇本達也, 笹岡健二, 森田将之, 小山貴彦, 鎌井一気, 益山新樹, 野島正明, 川合 覚, 平岡 修, 平本一幸, 平本晃子, 佐藤 聡, 金 惠淑, 綿矢有佑. 新規抗マラリア薬の開発研究～環状過酸化化合物の抗マラリア活性と体内動態～. 第130年会日本薬学会, 2010年3月28-30日, 岡山.

19. 和田 憲幸, 谷口 抄子, 佐藤 聡, 綿矢有佑, 伊東 秀之, 波多野 力. 花椒の抗リーシュマニア活性成分. 第130年会日本薬学会, 2010年3月28-30日, 岡山.

20. 中間 健太郎, 佐藤 聡, 岡松 朗子, 山本 朗央, 平本 晃子, 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研究～ネクロシスとアポトーシスの制御因子の探索～. 第130年会日本薬学会, 2010年3月28-30日, 岡山.

21. 山本 朗央, 佐藤 聡, 中間 健太郎, 岡松 朗子, 平本 晃子, 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研究 ～ネクローシスとアポトーシスの制御因子としてのHSP90の機能～. 第130年会日本薬学会, 2010年3月28 – 30日, 岡山.

22. 大見 拓也, 内藤 智春, 佐藤 聡, 平本 晃子, 松田 彰, 佐々木 琢磨, 福島 正和, 北出 幸夫, 金 惠淑, 綿矢 有佑. 抗腫瘍性ヌクレオシドアナログ

3'-Ethynylcytidine (ECyd, TAS-106)によるアポトーシス誘導機構の解明. 第130年会日本薬学会, 2010年3月28 – 30日, 岡山.

#### 研究要旨

内臓リーシュマニア症のマウスモデルとして、NF- $\kappa$ B inducing kinase を遺伝的に欠損している *aly/aly* マウスに *Leishmania donovani* の前鞭毛期型虫体を感染させ免疫病理学的解析を行なった。その結果、*aly/aly* の肝臓内の原虫数は4週目にコントロールの *aly/+* よりは小さいピークを示したのち、8週目には減少したが、その後原虫数は維持され感染後数ヶ月経ても肝臓内に原虫が存続していた。肝臓内の Foxp3 mRNA 発現量と CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T 細胞数は感染経過に伴って増加した。そこで、感染26週目の *aly/aly* マウスに抗 CD25 抗体または抗 FR4 抗体を投与したところ、いずれの抗体を投与したマウスにおいても抗体投与後10日目の肝臓内原虫数は対照抗体を投与した感染マウスに比べ有意に減少した。このことから、*aly/aly* マウスにおけるリーシュマニア原虫の存続機構として CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T cells の関与が強く示唆された。

ミャンマー産薬用植物のブドウ科の *Vitis repens* のエチルアセテート抽出画分について抗 *Trypanosoma evansi* 血流型虫体活性について検討したところ、抗酸化物質として知られる resveratrol にその活性のあることが判明した。

#### A. 研究目的

住血性原虫（トリパノソーマ、リーシュマニア、バベシア）の発症や病態に関わる宿主側ならびに原虫側の要因を明らかにする。アジア産薬用植物資源から抗住血性原虫活性物質を探索し、有効成分を同定するとともに、作用機序と細胞毒性について検討し、住血原虫症の創薬開発に貢献する。

#### B. 研究方法

(1) 内臓リーシュマニア症における原虫存続のメカニズム

内臓リーシュマニア症は人と犬で世界的に問題となっている人獣共通原虫症である。原虫は肝臓、脾臓、骨髄などのマクロファージ細胞内に寄生し、慢性の経過を辿る。発病機転は宿主の免疫機能と深く関わるが、宿主体内からの原虫の完全排除は困難である。内臓リーシュマニア症のマウスモデルにおいては、肝臓が感染初期の原虫増殖の場となり、免疫が誘導（肉芽腫形成）されると肝臓から原虫は排除される。感染後期になると脾臓ではその構造が破壊され、免疫不全状態となり、脾臓が原虫増殖の場となる。皮膚リーシュマニア症は、内臓リーシュマニア症の原因虫種とは異なるリーシュマニア種によって引き起こされるが、そのマウスモデルでは、抑制性T細胞（Treg）が原虫の皮膚における存続に関与することが知られている。しかし、内臓リーシュマニア症のマウスモデルにおける Treg の役割についてはまだ確実な報告はない。

本研究では、NF- $\kappa$ B inducing kinase を遺伝的に欠いている *aly/aly* マウスに *Leishmania donovani* の promastigotes  $5 \times 10^7$  を感染させ、肝臓、脾臓、骨髄の原虫数の算定（realtime PCR）、各種サイトカイン・ケモカインの転写量の定量（RT-PCR）、肝臓の肉芽腫の組織学的解析、および抗 Treg 抗体の原虫数に与える影響などを検討した。

(2) 抗トリパノソーマ活性を有する薬用植物の探索

これまでの研究により、ミャンマー産薬用植物の中から民間療法として用いられている60種の薬用植物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 (*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スクリーニングし、*Vitis repens* に高い抗トリパノソーマ活性があることを突き止めた。そこで本研究では、*Vitis repens* のエチルアセテート画分の抗トリパノソーマ活性物質について検討した。

（倫理面への配慮）

動物実験にあたっては、北海道大学および北海道大学大学院獣医学研究科の動物実験指針を遵守した。

#### C. 研究結果

(1) 内臓リーシュマニア症における原虫存続のメカニズム

コントロールの *aly/+* マウスの肝臓内の原虫数は4週目にピークが認められたが、感染後8週では原虫は排除されていた。*aly/aly* マウスでは感染

4週目に *aly/+* マウスよりは少ない肝臓内原虫数のピークを示し、その後8週目には減少したが、その原虫数は維持され感染後数ヶ月を経過しても肝臓内に原虫が存続していた。肝臓の肉芽腫を組織学的に観察したところ、*aly/aly* マウスでは類上皮細胞や単核球の浸潤の少ないは未熟な肉芽腫が多く認められた。*aly/aly* マウスの肝臓内の IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、iNOS、TGF- $\beta$ 、MAP-1、および IP10 の mRNA 発現量は感染4週目ではいずれも *aly/+* マウスより低値を示したが、8週目からはコントロールマウスよりも高い値を維持した。

肝臓内の Foxp3 mRNA 発現量と CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T 細胞数は感染経過に伴って増加した。そこで、感染26週目の *aly/aly* マウスに、T reg 活性を抑えることが知られている抗 CD25 抗体または抗 FR4 抗体を投与したところ、いずれの抗体を投与したマウスも抗体投与後10日目の原虫数は対照抗体を投与したマウスに比べ有意に減少した。

*aly/aly* マウスの脾臓や骨髄の原虫数は感染8週目から著しく増加したが、抗 CD25 抗体または抗 FR4 抗体を投与すると脾臓と骨髄内原虫数も有意に減少した。

(2) 抗トリパノソーマ活性を有する薬用植物の探索

ブドウ科の *Vitis repens* のエチルアセテート画分の抗トリパノソーマ活性について検討したところ、抗酸化物質として知られる resveratrol に活性のあることが判明した。

#### D. 考察

*aly/aly* マウスでは原虫が長期間(7か月)にわたって肝臓に存続すること、また、脾臓や骨髄では慢性期に原虫数が増加することを見出した。原虫のマウス体内における存続機構として CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T 細胞の関与が強く示唆されたが、T reg の組織内局在と細胞数の関係は興味深い。

ミャンマー産薬用植物のなかで強い抗トリパノソーマ活性を示した薬用植物の成分の1つは抗酸化物質として知られる resveratrol であることが示唆されたが、原虫に対する直接的障害性の作用機序についてさらに解析する必要がある。

#### E. 結論

内臓リーシュマニア症における原虫存続には抑制性T細胞が関与することが明らかとなった。一方、住血原虫症に対する創薬の天然資源として薬用植物の有用性が示された。

#### F. 健康危険情報

該当せず

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Kawamura Y, Yoshikawa I, Katakura K: Imported leishmaniasis in dogs, US military bases, Japan. *Emerg Infect Dis* 16, 2017-2019, 2010
- 2) 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* 72, 525-528, 2010
- 3) Mizukami C, Spiliotis M, Gottstein B, Yagi K, Katakura K, Oku Y: Gene silencing in *Echinococcus multilocularis* protoscoleces using RNA interference. *Parasitol Int* 59, 647-652, 2010
- 4) Armua-Fernandez MT, Nonaka N, Sakurai T, Nakamura S, Gottstein B, Deplazes P, Phiri IGK, Katakura K, Oku Y: Development of PCR/dot blot assay for specific detection and differentiation of taeniid cestode eggs in canids. *Parasitol Int* in press

##### 2. 学会発表

- 1) 片倉賢, 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: 抗トリパノソーマ活性を有するミャンマー産薬用植物の探索. 第79回日本寄生虫学会, 2010年5月(旭川)
- 2) Tiwananthagorn S, Iwabuchi K, Ato M, Sakurai T, Oku Y, Katakura K: Immunopathology of *Leishmania donovani* infection in alymphoplasia (*aly/aly*) mice, ICOPA XII. 2010年8月(Melbourne, オーストラリア)
- 3) Tiwananthagorn S, Iwabuchi K, Ato M, Sakurai T, Oku Y, Katakura K: Immunopathological response to *Leishmania donovani* infection in alymphoplasia (*aly/aly*) mice. 10<sup>th</sup> Awaji international Forum on Infection and immunity, 2010年9月(兵庫)
- 4) Tiwananthagorn S, Iwabuchi K, Ato M, Sakurai T, Katakura K: Persistent *Leishmania donovani* infection in alymphoplasia (*aly/aly*) mice. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology "Immunologic Memory, Persisting Microbes and Chronic Disease, 2011年2月(Calgary, カナダ)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担課題：トリパノソーマの防御応答回避メカニズムの解析

分担研究者 嶋田 淳子 群馬大学医学部 教授

#### 研究要旨

*Trypanosoma cruzi* 感染により発現上昇がみられる宿主アポトーシス抑制因子 c-FLIP および c-IAP と相互作用する原虫側因子を探索するため、yeast two hybrid 用 bait ベクターを構築した。また、pull down 用の c-IAP BIR 高発現細胞株を樹立した。

#### A. 研究目的

*Trypanosoma cruzi* 感染により宿主アポトーシス抑制因子 c-FLIP および c-IAP の発現上昇機構を解明する。また、これらのタンパク質と相互作用する原虫側因子の探索を行う。

#### B. 研究方法

Yeast two hybrid 法により c-FLIP および c-IAP と相互作用する原虫側因子を探索するため、bait ベクターの作製を行った。また、pull down 法を行うため、tag 付き発現ベクターの作製を行った。

（倫理面への配慮）組み換え DNA 実験は群馬大学で承認されている。

#### C. 研究結果

c-FLIP 全長を bait ベクターに組み込んだが、目的とするものが得られなかった。そこで、c-FLIP 分子を DED 領域と pseudocaspase 領域に分割し、ベクターに連結した。c-IAP の全長もベクターへ組み込むことが困難であったため、BIR 領域と CARD-RING 領域に分けてベクターに挿入した。この BIR 領域を含むベクターを培養細胞に導入し、高発現させた株を樹立することができた。

#### D. 考察と結論

c-FLIP、c-IAP の全長の遺伝子は両者とも yeast two hybrid の bait ベクターに連結するのが難しく、これらの遺伝子が発現すると大腸菌の生育に影響を与える可能性が考えられた。それぞれの遺伝子を断片化したところ、コロニーが得られたので、酵母を用いて解析を進める予定である。また、pull down 用の

細胞株ができ、ようやく準備が整った。

#### E. 結論

c-FLIP および c-IAP 遺伝子全長の発現ベクターの構築は困難であったため、分割して連結したベクターを作製した。またこれらの分割した遺伝子を発現する培養細胞株を樹立することができた

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
日本生薬学会大会、徳島、2010  
The XIIth International Congress of Parasitology, Melbourne, 2010

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得  
特許出願（2010-163039）  
抗トリパノソーマ剤およびトリパノソーマ症治療薬
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## 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

分担研究者 丸山治彦 宮崎大学医学部教授

**研究要旨** 宮崎大学医学部寄生虫学で施行した血清診断では、2010年においても肺吸虫症と回虫類の幼虫による内臓幼虫移行症が多数を占めた。血清診断の重要度が高い幼虫移行症の組換え診断抗原を得るために、ブタ回虫およびイヌ回虫の体内移行期幼虫に発現している As16 と TES32 の組換えタンパク質を用いて患者血清との反応を調べた。それぞれの組換え抗原に対する血清の反応は、ブタ回虫 ES とイヌ回虫 ES 抗原との反応と相似であり、病原体診断に使用できると考えられた。また、幼虫移行症の病態解明では、虫卵、感染幼虫、肺ステージの幼虫および成虫のトランスクリプト解析をおこない、約 14,000 の isotig にアセンブルした。その中に、細菌からの水平伝播により獲得されたが推測される ferrochelatase 遺伝子を同定し、Blast2GO を用いて 53.9% の配列にアノテーション付与した。

### A. 研究目的

われわれは、multiple-dot ELISA 法による抗体スクリーニングと 96-well microtiterplate ELISA 法による精査を基本とした寄生虫症診断システムを構築し、多くの寄生虫病の診断に関わってきた。2000 年以降、総検体数は年間 500 前後で推移し、毎年 100-200 例を寄生虫症と診断している（下表）。

原因寄生虫	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
イヌ回虫・ブタ回虫	100	103	82	101	77	52	45
アニサキス	0	4	4	6	3	2	2
イヌ糸状虫	7	1	5	1	1	0	0
顎口虫	11	0	0	6	7	6	3
鉤虫	0	1	0	1	0	0	0
マンソン孤虫	5	4	3	6	4	3	1
有鉤囊虫	4	0	0	0	0	1	0
肺吸虫	45	30	37	46	38	40	43
肝蛭	5	6	2	3	0	3	2
住血吸虫	5	5	6	6	4	5	3
肝吸虫	1	0	0	0	0	0	2
糞線虫	11	2	1	1	1	6	2
回虫	0	1	1	1	2	0	0
日本海裂頭条虫	1	0	2	0	1	0	4

これらの血清診断は、ほとんどの場合虫体の粗抗原を用いておこなわれているが、いくつかの問題点が明らかになっている。その第 1 は、多くの寄生虫が実験室内での維持ができないの

で、抗原の入手には常に困難がともなうことである。第 2 に、いくつかの疾患において粗抗原では擬陽性と真の陽性の判別が必ずしも容易でないことがあげられる。病歴や検査所見などから総合的に判断しているが、とくに動物由来の回虫類による幼虫移行症および糞線虫症では、あきらかに感染の可能性がないと考えられる症例でも抗体高値を示すことがある。

そこで、とくに幼虫移行症について、血清診断における抗原入手の問題を解決すると同時に擬陽性を排除し、さらに抗原の一定した品質を確保して体外診断薬として一般医療機関でも使用できるように、組換え抗原を作製し、患者血清との反応性をしらべ有用性を検討する。

基礎的な研究として、幼虫移行症の病態を解明するために、モデル寄生虫であるベネズエラ糞線虫の発現遺伝子解析をおこない、寄生線虫の体内移行という寄生虫の謎の解明のメカニズムを明らかにする。具体的には、虫卵、感染幼虫、体内移行期幼虫、成虫の cDNA ライブラリを作製し、高速シーケンサの 454 GS-FLX Titanium で網羅的に塩基配列を決定してステージ特異的な遺伝子発現を定量的に検討する。

### B. 研究方法

## 1. 診断用組換え抗原の作製

幼虫移行症ではブタ回虫について組換え抗原を作製した。沖縄県および宮崎県内で採取されたブタ回虫のメスから虫卵を分離して幼虫包蔵卵を形成させた。これをウサギに投与し、感染5-6日後にウサギ肺から幼虫を回収した。

次いで肺から回収した幼虫から polyA+ RNA を抽出・精製して逆転写反応をおこない、cDNA ライブラリを作製した。得られた cDNA クローンの塩基配列を決定して、成虫や虫卵では発現の報告がないものを診断用抗原の候補とし、組換えタンパク質を作製した。このうち、予備的な実験により As16 を以下の実験にもちいた。

イヌ回虫の組換え抗原は、国立感染症研究所寄生動物部の山崎浩博士から TES32 を供与いただき、実験に使用した。

以上の研究課題は、宮崎大学動物実験委員会、宮崎大学遺伝子組換え実験安全委員会、宮崎大学病原体等安全管理委員会、の審査を受け、機関承認を得ている。

以上により組換えタンパク質を得た上で、宮崎大学医学部寄生虫学分野において2005年以前に動物由来の回虫類による幼虫移行症と診断された患者、およびどの寄生虫にも感染していないと判定された患者の血清を用い、前項で作製した組換え抗原の診断抗原としての有用性を酵素抗体法で検討した。

患者血清の使用に際しては、ヘルシンキ宣言の趣旨に則り、臨床研究に関する倫理指針等を遵守した。本研究は、宮崎大学医学部医の倫理委員会による審査を受け、宮崎大学医学部の承認を受けている。

## 2. ベネズエラ糞線虫のトランスクリプト解析

ベネズエラ糞線虫の虫卵、感染幼虫、肺ステージの幼虫および成虫から cDNA を作製し、高速シーケンサ 454 GS-FLX Titanium によって塩基配列を決定する。次いで Newbler (v. 2.3) を用いてアセンブルし isotig を得る。大規模アノテーションを Blast2GO プログラムでおこなうとともに、各 isotig がどれくらいのリードを背景にしているか、各 isotig に相当する *Caenorhabditis elegans* タンパク質は何かについて検討した。

また、*C. elegans* の NAS-34 に類似した Zinc-metalloprotease 遺伝子が何種類ゲノム上に存在するかを明らかにするため、ベネズエラ糞線

ゲノム DNA をテンプレートに PCR をおこない塩基配列を決定した。

## C. 研究結果

### 1. ブタ回虫組換え抗原の作製と患者血清との反応性

ブタ回虫の体内移行期幼虫の cDNA ライブラリを作製しランダムに 1722 クローンの塩基配列を決定した。得られた 175 種類のユニークな配列のうち、イヌ回虫の C-タイプレクチンのブタ回虫ホモログと考えられるタンパク質 As-CTL-1 と、ブタ回虫感染に対するワクチン候補 As16 に特に注目して組換え抗原を作製し、解析を進めた。このふたつを選んだ理由は、両者とも肺から回収した幼虫の cDNA ライブラリ中のクローンの出現頻度が高く、患者の免疫系が強く感作されている可能性が高いと考えたからである。

最初に両者の幼虫移行症患者血清との反応を検討したところ、As16の方がブタ回虫感染と考えられる患者血清と強く結合した。よって、以降の実験には、組換えブタ回虫抗原として As16 を用いた。

最初に 40 種類の幼虫移行症患者血清についてイヌ回虫幼虫 ES と As16 を反応させた。吸光度の比をとりどちらに強く結合したかを表したのが図 1 である。

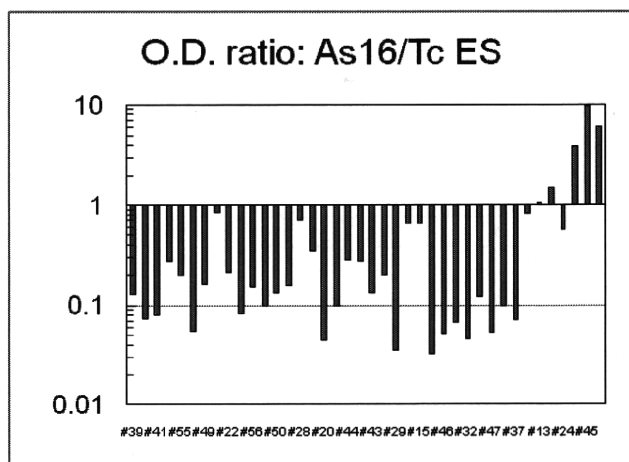


図1 幼虫移行症患者血清の As16/イヌ回虫 ES 抗原結合比

40 検体のうち 3 検体がイヌ回虫幼虫 ES に比べて As16 に強く反応しており、これらの血清はブタ回虫感染血清と考えられた。次にイヌ回虫幼虫 ES の代わりに組換え ES 抗原である TES32 を用いて同様の実験をおこなった。結果は図 2 の通りで、イヌ回虫幼虫 ES と完全に平行ではないものの、両者は同様の結合傾向を示した。以上より、どちらも組換え抗原である As16 と



TES32 により、幼虫移行症の病原体診断が可能であることが示唆された。

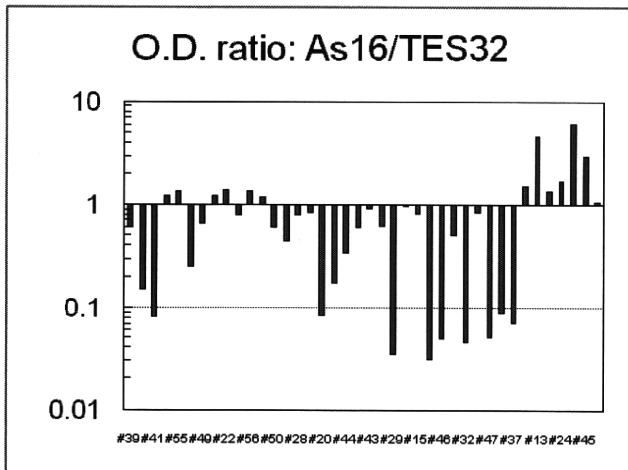


図2 幼虫移行症患者血清のAs16/TES32 結合比

## 2. ベネズエラ糞線虫ゲノム解析

ベネズエラ糞線虫のゲノムに関しては、昨年度のデータに SOLEXA のデータを加えた。現在ではベネズエラ糞線虫のゲノムサイズは 100Mb 程度と推定されている。今後さらにゲノムフラグメントの塩基データを追加する。ペアエンドライブラリの作製と解析、フォスミドライブラリの構築が進行中である。

## 3. ベネズエラ糞線虫トランスクリプトーム解析

虫卵、感染幼虫、肺移行期幼虫、および寄生世代成虫から cDNA ライブラリをそれぞれ作製し、454 GS-FLX で塩基配列を決定した。

2 回のランにより総計 2,483,165 のリードが得られた。リード数の内訳は、虫卵/L1 が 543,713、感染幼虫が 622,248、肺移行期幼虫が 679,257、成虫が 638,728 リードであった。これらを Newbler v.2.3 によりアセンブルし、計 14,016 のアイソティグ（トランスクリプトと考えられるもの）を得た。

この中で、7,560 に何らかのアノテーションを付けることができ、1,591 については酵素活性を推定することができた。*C. elegans* タンパク質にヒットしたものは 10,569 個、*Brugia malayi* は 9,779 個、統合線虫 EST データベースである NEMABASE4 には 11,367 個がヒットした。つまり、約 3,000 個のトランスクリプトはベネズエラ糞線虫特異的と考えられた。

ベネズエラ糞線虫のトランスクリプトと *C.*

*elegans* タンパク質の比較において、単一の *C. elegans* タンパク質に多数のベネズエラ糞線虫トランスクリプトがヒットするという現象が頻繁にみられた（下表）。

contig/isotig ID	<i>C. elegans</i>	tentative annotation	occurrence
Contig02305...	F40E10.1	zinc-dependent metalloprotease, NAS-34 like	117
Isotig00079...	F37C12.1	-	79
Isotig00692...	T04D1.4	-	64
Isotig03977...	Y44E3A.2	acetylcholinesterase similar to scavenger receptor cysteine-rich protein	45
Isotig00155...	Y69H2.3e	WW domain containing protein	36
Isotig00765...	ZK1098.1	-	32
Isotig00570...	ZC434.7b	Chitin binding	30
Isotig00502...	C39D10.7	Peritrophin-A domain containing protein	30
Isotig08694...	T16H12.5b	similar to roadkill, isoform A	30
Isotig11169...	C04F6.5	Dehydrogenase	25

この中で特に注目されたのが、*C. elegans* の亜鉛結合性メタロプロテアーゼ NAS34 と相同なものが 117 個も認められたことである。NAS34 は線虫のアスタシン様メタロプロテアーゼのひとつで、*C. elegans* ではゲノム中に 39 個の NAS が存在する。そこで、他の NAS についても調べたところ、ベネズエラ糞線虫のトランスクリプトには総計 161 種類の NAS 相同配列が存在することがわかった。この中には肺移行期においてのみ発現がみられるものがあり、体内移行メカニズム研究の突破口になることが期待される。

糞線虫類では NAS34 に相同なアスタシン様メタロプロテアーゼは感染幼虫の経皮侵入に関与するとされている。そこで、本当にベネズエラ糞線虫がこのような多数のアスタシン様メタロプロテアーゼ遺伝子を持っているのかを調べる目的で、ベネズエラ糞線虫ゲノムを NAS34 相同プロテアーゼ配列を標的に PCR をおこない、PCR 産物をクローニングして、各コロニーについてサンガー法により塩基配列を決定した。

その結果、約 140 クローンの塩基配列から 87 種類のアスタシン様メタロプロテアーゼが得られた。これらはすべて活性中心やモチーフ、システインの位置が共通であり、すべてが機能的なプロテアーゼとして転写されることを示していた。

トランスクリプト解析での他の注目点は、

細菌からの水平伝播によって獲得されたと推測される *Ferrochelatase* 遺伝子を同定できたことである。この遺伝子は自由生活線虫では失われているが *B. malayi* は持っており、動物寄生によって再び獲得されたことが示唆された。

#### D. 考察

当教室で実施している寄生虫病血清診断の結果陽性と判定される症例の大多数は、食品媒介性の人獣共通寄生虫症である。具体的には肺吸虫症とイヌ回虫やブタ回虫による内臓幼虫移行症である。例年、両者で全体の 80%を超えている。

現行の血清診断では、抗原として虫体粗抗原と一部分泌排泄抗原 (ES 抗原) を用いているが、抗原の供給が安定していないこと、品質が一定の抗原を大量に準備することができないこと、抗体陽性と判定される場合でも、それが真の感染によるのか、あるいは何らかの原因で産生された抗体が偶然結合しただけなのか判断できない場合があることである。

以上のような問題点を解決するために、われわれは診断用組換え抗原を調製することとした。組換えタンパク質であれば一定の品質の抗原を大量に準備することが可能であり、供給は安定する。さらに、用いるタンパク質を注意深く選ぶことで、真の感染のみを検出する系を確立することも可能であると考えられるからである。

ブタ回虫の体内移行幼虫の cDNA ライブラリから得られた *As16* と、イヌ回虫症において一定の信頼性が証明されている *TES32* をもちいて患者血清との結合を精査した結果、両者の結合特性は、分泌排泄抗原 (ES 抗原) と似通っていることが示された。これは、組み立て、組換え抗原を用いた幼虫移行症診断システムの開発が可能であることを示す。

一方、基礎的な研究として取り組んでいる幼虫移行症の病態解明でも、今年度はきわめて重要な知見が得られた。すなわち、モデル腸管寄生線虫であるベネズエラ糞線虫のトランスクリプトを次世代型シーケンサで解析し、これまでまったく報告のなかった発現情報を得ることができたのである。

現在までの解析において特筆すべき点は、*C. elegans* の *NAS34* と相同な亜鉛結合性メタロプロテアーゼが、巨大なファミリーを形成している

ことが示されたことがあげられる。では 1 個しかないものが、少なくとも 117 個も認められたことは、この遺伝子群がベネズエラ糞線虫にとって、きわめて重要な機能を担っていると考えられる。

さらに、まだ予備的なデータしか得られていないが、*NAS34* 相同アスタシン様メタロプロテアーゼは発現のタイミングが分子によりいろいろで、虫卵から成虫まで一貫して発現がみられるもの、肺移行期以降に発現しているもの、成虫でのみ見られるものなどがある。

腸管寄生線虫の体内移行との関係で興味を引くのは、肺ステージのみで発現しているアスタシン様メタロプロテアーゼがあることである。このような分子は体内移行の *key molecule* である可能性が高く、今後詳しく検討する価値がある。

#### E. 結論

ブタ回虫の体内移行期に発現している ES 抗原の組換えタンパク質 *As16* とイヌ回虫の組換え診断抗原 *TES32* の組み合わせで、幼虫移行症診断システムの開発が可能であることが示された。

モデル腸管寄生線虫であるベネズエラ糞線虫を用いた幼虫移行症のメカニズム解明のプレイクスルーとなるような、肺ステージのみで発現しているアスタシン様メタロプロテアーゼを特定することができた。

#### F. 研究発表

##### 著書

1. 丸山治彦 その他の吸虫症 (肺吸虫症、肝吸虫症、横川吸虫症、肝蛭症) (今日の治療指針 2011、山口徹、北原光夫、福井次矢編)、pp.263-264、医学書院 (東京) (2011 年 1 月 1 日)

##### 総説

1. 木村幹男、丸山治彦、三浦聡之: 熱帯病・寄生虫症に対する研究班保管国内未承認薬 *Medical Practice* 27: 1565-1568, 2010
2. 丸山治彦: 腹部症状 (腹痛、下痢、下血など) (寄生虫の標的臓器別症状からすすめる実地診療一疑い、問診・診断から治療まで) *Medical Practice* 27: 1496-1550, 2010

##### 原著論文

1. Yoshida A, Nagayasu E, Nishimaki A, Sawaguchi

A, Yanagawa S, Maruyama H.: Transcripts analysis of infective larvae of an intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis* Parasitol Int. 2010 Nov 5. [Epub ahead of print]

#### 症例報告

1. Uni S, Boda T, Daisaku K, Ikura Y, Maruyama H, Hasegawa H, Fukuda M, Takaoka H, Bain O: Zoonotic filariasis caused by *Onchocerca dewittei japonica* in a resident of Hiroshima Prefecture, Honshu, Japan, Parasitol Int. 2010 Sep;59(3):477-80. Epub 2010 May 31.
2. 安東加恵、檜原真由美、徳安彰子、明石哲彦、高谷恵子、丸山治彦：気胸・胸水から診断された肺吸虫症の1例 大分市医師会医学雑誌 アルメイダ医報 37: 2-6. 2010

#### 学会発表

1. 長安英治、伊藤武彦、小椋義俊、吉田彩子、林哲也、丸山治彦、ベネズエラ糞線虫のゲノム・トランスクリプトーム解析、第79回日本寄生虫学会大会（旭川）
2. 長安英治、吉田彩子、丸山治彦、ベネズエラ糞線虫トランスクリプトームシーケンシング、第18回分子寄生虫ワークショップ（草津）
3. 長安英治、小椋義俊、伊藤武彦、吉田彩子、林哲也、丸山治彦、第9回分子寄生虫・マalaria研究フォーラム（長崎）
4. Eiji Nagayasu, Ayako Yoshida, Haruhiko Maruyama, A bioinformatics approach to identify immunodiagnostic antigens for strongyloidiasis, 8th Asia-Pacific Travel Health Conference (Nara)
5. 長安英治、伊藤武彦、小椋義俊、吉田彩子、林哲也、丸山治彦ベネズエラ糞線虫のゲノム・トランスクリプトーム解析から見えてきたもの、第4回蠕虫研究会（宮崎）
6. Eiji Nagayasu, Yoshitoshi Ogura, Takehiko Ito, Ayako Yoshida, Tetsuya Hayashi and Haruhiko Maruyama, 45th Annual Japan-US Joint Conference on Parasitic Diseases (Tokyo)
7. 吉田彩子、長安英治、堀井洋一郎、丸山治彦 ブタ回虫肺移行期幼虫 cDNA ライブラリーの解析から得られた新規 C-type レクチン 第79回日本寄生虫学会大会（旭川）
8. Ayako Yoshida, Nobuo Ohta, Haruhiko Maruyama: Depletion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells down-regulates parasite clearance during early phase of *Plasmodium chabaudi* AS infection in A/J

mice. The 14th International Congress of Immunology, Kobe, Japan, August 22-27, 2010

9. Yoshida A, Nagayasu E, Yoichiro Horii, Naotoshi Tsuji, Hiroshi Yamasaki, Maruyama H: Serological diagnosis of Visceral Larva Migrans with recombinant antigens from *Toxocara* and *Ascaris*. 8th Asia-Pacific Travel Health Conference, Nara, Japan, October 20-23, 2010
10. 吉田彩子、堀井洋一郎、丸山治彦. ブタ回虫症血清診断用抗原候補分子のファージディスプレイ法を用いた網羅的検索 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
11. Eiji Nagayasu, Ayako Yoshida, Haruhiko Maruyama: Large-scale gene expression analysis of different developmental stages of *Strongyloides venezuelensis*, a rodent intestinal nematode. 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Sep. 7-10, 2010, Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji, Japan
12. Haruhiko Maruyama, Ayako Yoshida, Eiji Nagayasu: Not only Fish: Japanese Delicacies and Eosinophilia. 8th Asia-Pacific Travel Health Conference, Nara, Japan, October 20-23, 2010
13. 吉田彩子、長安英治、丸山治彦 幼虫移行症の診断における局所液の有用性第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（鹿児島市）

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案特許  
なし
3. その他  
なし

## 分担研究報告書

### 住血原虫症の診断学

分担研究者 五十嵐郁男 帯広畜産大学教授

#### 研究要旨

バベシア病は、バベシア原虫がダニの媒介により動物に感染し、世界的規模で畜産業に莫大な経済的被害を与えている。また、人獣共通原虫病としても重要である。本研究では、バベシア病に対する新規遺伝子を用いた診断法と新たな薬剤開発について検討を行った。その結果、血清診断法として *Babesia bovis* の SBP4 組換え抗原を用いた ELISA がこれまで報告されている抗原の中で最も感度及び特異性が優れている事が明らかとなった。また、遺伝子診断法として *Babesia bovis* の2種類の膜抗原遺伝子を標的とした nPCR を確立した。更に、これらの方法を用いた疫学調査をアジア、アフリカで行った。また、人に感染する *B. microti* の BM94 組換え抗原を用いた ELISA 法を確立し、マウス感染実験において長期間にわたり抗体検出が可能であった。人に感染するサルマラリア原虫の遺伝子診断法についても検討を行った。更に、バベシア原虫に対する有効薬剤候補のスクリーニングを行い、trepen nerolidol 及び artesunate が牛、馬、犬及びマウスのバベシアに対して増殖抑制効果を有する事を示した。これらの研究成果は、バベシア病に対する有効診断法や治療法の実用化に向け、今後の更なる検討が必要である。

#### A. 研究目的

バベシア病は、ダニの媒介によりバベシアが動物に感染し、世界的規模で畜産業に莫大な経済的被害を与えている。また、人におけるバベシア感染も報告されている。バベシア病を制圧し経済的な損失を最小するためには、早期の診断と治療・予防策の開発が重要である。本研究では、バベシア病に対する新規遺伝子及び組換え抗原を用いた診断法と新たな薬剤開発について検討を行った。

#### B. 研究方法

##### (1) バベシア症に対する診断法の検討

最初に血清診断法としてウシバベシア *Babesia bovis* のスフェリカルボディ4 (BbSBP4) 組換え抗原を用いた ELISA について検討を行った。次に、ウシバベシア *Babesia bovis* の膜抗原遺伝子 BV5650 および BV8970 を用いた nPCR について検討を行った。また、*Plasmodium knowlesi* の

LAMP 法および *B. microti* の BM94 組換え抗原を用いた ELISA 法についても検討を行った。

##### (2) バベシア症に対する治療薬の検討

バベシアに対する新たな治療薬を開発する目的で、植物由来で芳香剤として使用されている trepen nerolidol および抗マラリア剤として使用されている artesunate のバベシアに対する増殖抑制効果について、培養原虫及びネズミバベシアモデル系を用いて検討を行った。

#### C. 研究結果

##### (1) バベシア症に対する診断法の検討

*Babesia bovis* のスフェリカルボディ4 (BbSBP4) 遺伝子は最近その配列が明らかとなった。そこで、本遺伝子がコードする蛋白質を作製し、この組換え抗原とこれまで報告されている抗原を用いて ELISA について検討を行った。その結果、BbSBP4 を用いた ELISA は BbMSA-2c、BbRAP-1/CT、