

果たしているのではないかと考えた。

そこで本研究は、日本住血吸虫症の病態形成における IL-4/IL-13 による肉芽腫性炎症抑制機構と Th17 関連サイトカインである IL-17A の関係を明らかにする事を実施した。

B. 研究方法

1. IL-4^{-/-}IL-13^{-/-}(DKO) マウス、

IL-4^{-/-}IL-13^{-/-}IL-17A^{-/-}(TKO)マウス : 英国 A. McKenzie らが創出した IL-4^{-/-}IL-13^{-/-}(BALB/c バックグラウンド)マウスを入手して実験に用いた。

DKO マウスと岩倉洋一郎博士(東京大学医学研究所)が作製した IL-17A^{-/-}(BALB/c バックグラウンド)マウスを交配させたマウスを作製された IL-4^{-/-}IL-13^{-/-}IL-17A^{-/-} (TKO)マウスは鳥山一博士より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 BALB/c(WT)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血清中の ALT を測定した。

3.フローサイトメトリー解析 : 感染宿主肝臓に浸潤してくる顆粒球は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 : 宿主肝臓より RNA 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-6, IL-17A, IL-17F, 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. WT、DKO、TKO マウスにおける肝臓の病態の変化

肝臓に形成された肉芽腫のサイズは DKO 群では WT 群と比べ有意に増加していた。しかしながら TKO 群と DKO 群では有意な差が見られなかった(図 1A)。また、肝細胞の障害の指標である血清中の ALT 値を測定したところ、DKO 群は WT 群と比較して値が有意に上昇していたが、DKO 群と TKO 群の間では有意な差が見られなかった(図 1B)。また IL-17A は好中球の浸潤を誘導すると言われるが、肝臓に浸潤してくる好中球数は DKO 群と TKO 群で有意な差が見られなかった(図 1C)。以上の結果より DKO マウスで見られた肉芽腫性炎症の領域の拡大や肝細胞の障害、過剰な好中球の浸潤は IL-17A だけでは説明がつかなかった。

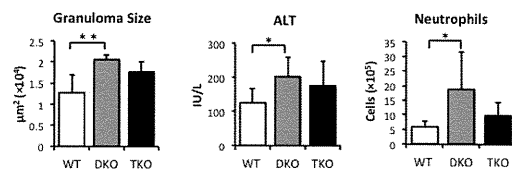
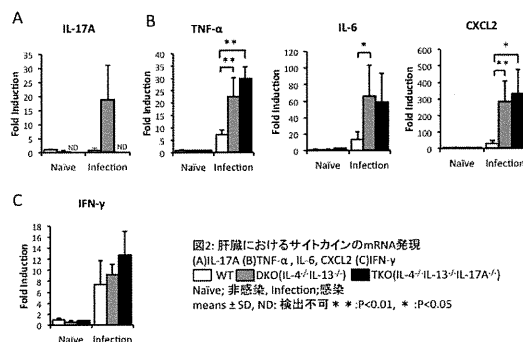


図1: (A)肉芽腫サイズ (B)血清ALT (C)好中球数
WT: BALB/c, DKO:IL-4^{-/-}IL-13^{-/-}, TKO:IL-4^{-/-}IL-13^{-/-}IL-17A^{-/-}
means \pm SD, ** :P<0.01, * :P<0.05

2. Si 感染 WT、DKO、TKO マウスにおけるサイトカインの mRNA 発現プロファイル

次に肝臓における mRNA 発現について調べた。IL-17A の mRNA は WT 群と比較して DKO 群で有意に上昇していた(図 2A)。

また、炎症性サイトカインである IL-6、や TNF- α および好中球のケモカインである CXCL2 の mRNA 発現も同様に WT 群と比較して DKO 群では上昇していたが、TKO 群と DKO 群では有意差が見られなかった(図 2B)。また、IFN- γ の発現は WT 群、DKO 群、TKO 群で差が見られなかった(図 2C)。これらの結果より、DKO 群でみられた炎症性サイトカインや好中球の遊走に関わるケモカインの発現上昇も IL-17A だけでは説明がつかなかった。



Th17 は IL-17A 以外に IL-17F や IL-22 を産生し、好中球の浸潤や炎症性サイトカインの産生を誘導する事が知られている。そこで、次に我々は IL-17F や IL-22 の肝臓における mRNA 発現について調べた。結果、DKO 群との間に有意な差は見られなかったが、TKO 群では WT 群と比較して IL-17F や IL-22 の mRNA 発現量が上昇していた(図 3)。したがって、IL-17F や IL-22 などの IL-17A 以外の Th17 関連サイトカインも DKO 群でみられた肝臓の肉芽腫性炎症の悪化に関与している可能性が示唆された。

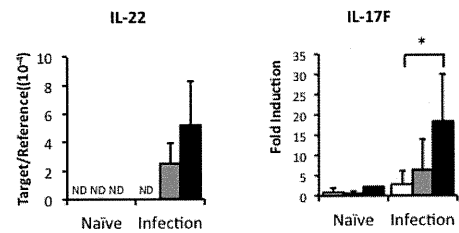


図2: 肝臓におけるTh17関連サイトカインのmRNA発現 (A)IL-22 (B)IL-17F
□ WT ■ DKO(IL-4^{-/-}IL-13^{-/-}) ■ TKO(IL-4^{-/-}IL-13^{-/-}IL-17A^{-/-})
Naive; 非感染, Infection; 感染
means \pm SD, ND: 検出不可, * :P<0.05

(ア) 考察と結論

これまで、IL-4/IL-13 が日本住血吸虫感染マウスにおける肉芽腫性炎症の悪化を抑制する事を明らかにしてきた。しかしながら、日本住血吸虫症における Th2 と Th17 の関係は不明であった。

本研究では Th17 などから産生される IL-17A の機能に注目し、IL-4/IL-13 と IL-17A が Sj 感染マウスの肝臓の病態に及ぼす影響について調べた。IL-17A は炎症性疾患に関与しており、好中球の浸潤や炎症性サイトカインの産生などを誘導することが知られる。また住血吸虫症においても IL-17A は肝臓病態悪化に関与している事が示唆されている。そこで我々は IL-4/IL-13 が IL-17A の過剰な産生を抑える事により、Sj 感染における肝臓の病態悪化を抑制していると仮定して研究を行った。しかしながら IL-4/IL-13 が欠損した DKO 群と IL-4/IL-13 に加え IL-17A が欠損した TKO 群では、肉芽腫のサイズや血清 ALT 値に有意な差は見られず、DKO 群でみられた肉芽腫性炎症の悪化は IL-17A だけでは説明がつかなかった。同様に IL-17A は好中球の浸潤に関与している事が知られているが、好中球の浸潤も DKO

群と TKO 群で比較して有意な差が見られなかった。さらに種々の炎症性サイトカインや好中球のケモカインの mRNA 発現量にも差が見られず、DKO 群でみられた肉芽腫性炎症の悪化は IL-17A だけでは説明がつかず、その他の経路によっても引き起こされる事が示唆された。

Th17 は IL-17A だけでなく IL-17F や IL-22 の産生する事が知られており、IL-17F や IL-22 も好中球の浸潤や炎症性サイトカインの産生に関与していると考えられている。興味深いことに Sj 感染した DKO 群と TKO 群の肝臓における IL-17F と IL-22 の mRNA 発現量はこの両者で差が見られず、TKO 群では WT 群と比較して発現量が増加していた。この結果より、IL-17F や IL-22 も DKO 群で見られた肉芽腫性炎症悪化に関与している事が考えられ、TKO 群において肉芽腫性炎症の改善が見られなかった理由として IL-17F や IL-22 の関与が示唆された。以上の結果より、IL-4/IL-13 は Th17 関連サイトカイン (IL-17A、IL-17F、IL-22) の産生を抑制し、過剰な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。

(イ) 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

論文発表

T. Seki, Kumagai T, Kwansa-Bentum B,

Furushima-Shimogawara R, Anyan WK, Miyazawa Y, Iwakura Y, Ohta N.

IL-4 and IL-13 suppress excessive neutrophil infiltration and hepatocyte damage during acute murine schistosomiasis japonica. *Infection and Immunity*. 2012, 80(1):159.

学会発表

関 丈典、熊谷 貴、Kwansa-Bentum Bethel、Anyan WK、宮沢悠樹、下河原理江子、小畑一茂、鳥山一、太田伸生. 日本住血吸虫感染 IL-4/IL-13DKO マウスにおける IL-17 非依存的な肉芽腫形成、第 89 回日本寄生虫学会総会、2011 年 7 月、東京都港区

・関 丈典、熊谷 貴、Kwansa-Bentum Bethel、下河原理江子、太田伸生. 日本住血吸虫感染における IL-4/IL-13 による肉芽腫性炎症の抑制、第 71 回日本寄生虫学会東日本支部大会、2011 年 10 月、東京都三鷹市

・T. Seki, Kumagai T, Kwansa-Bentum B, Furushima-Shimogawara R, Anyan WK, Miyazawa Y, Iwakura Y, Ohta N. IL-4/IL-13 suppress excessive granulomatous inflammation in schistosomiasis japonica. Improving human health conditions and resilience to climate change in Ghana, 2011 年 12 月, Acra, Ghana.

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

昨年度我々は、マウスの腸管寄生蠕虫である *Heligmosomoides polygyrus* (Hp)が誘発型 1 型糖尿病(T1D)モデルである多回低用量ストレプトゾトシン誘導糖尿病を抑制すること、その作用は STAT6 に依存しないことを報告した。本年度はさらにその機構を解明するため、IL-10KO マウスにおける Hp 感染の影響について検討した。その結果、IL-10KO マウスにおいても野生型と同様に本線虫の T1D 抑制作用が観察された。また、マンソン住血吸虫にも強力な T1D 抑制作用が観察され、Hp 同様に STAT6 に依存しないことが判明した。これらの結果から、寄生蠕虫類は自らが誘導するサイトカインである IL-4, IL-13 や IL-10 に依存しない、共通の T1D 抑制機構をもっている可能性があることが示唆された。

[研究協力者]

長田 良雄

A. 研究目的

日本を含む先進諸国では、アレルギーや自己免疫疾患が増加傾向にある。その原因には諸説があるが、衛生状態の良くない国においては、微生物や寄生虫の感染により免疫疾患が予防されているのではないかという仮説が、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、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。一昨年度までに、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た。昨年度より我々は、I 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している。マンソン住血吸虫(Sm)や *Heligmosomoides polygyrus* (Hp)が NOD マウス(T1D 自然発症モデル)における T1D 抑制作用を示すことは既に報告されているが、NOD マウスの系は C57BL/6 背景の種々の遺伝子欠損マウスとの比較実験が行えないため解析に不便である。そこで我々は、C57BL/6 マウ

スに対して多回低用量の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 感染の効果を検討した。昨年度は Hp が NOD マウスの T1D と同様にこのモデルの T1D も抑制すること、そしてその作用は STAT6 に依存しないことを明らかにして報告した。本年度はさらに IL-10 について検討を行った。IL-10 は様々な自己免疫疾患およびアレルギー疾患において負の制御因子として働いていることが知られている。NOD マウスの系においては抗体を用いた中和実験で IL-10 の関与が T1D 抑制作用には必須ではないことが示唆されているが、KO マウスを用いた実験は行われていない。In vivo において IgE 値や好酸球数で抗体の中和能を評価できる IL-4 や IL-5 とは異なり、IL-10 の効果が in vivo で抗体により完全に中和されていることを確認することは難しく、KO マウスを用いた実験が特に重要である。今回我々は初めて KO マウスを用いて蠕虫の T1D 抑制作用の IL-10 依存性を検討した。また、Sm についても T1D 抑制作用およびその STAT6 依存性の検討を行った。

B. 研究方法

Hp 感染の影響を野生型(WT)マウスと IL-10KO マウスの間で比較を行った。STZ 投与開始 1 週前に Hp200 隻を経口感染させ、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。Sm 感染は、STZ 投与開始 5～6 週前に、尾部より経皮的に感染させた。

[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 感染による血糖値上昇の抑制作用は、IL-10KO マウスにおいても WT マウスと同様に観察された。また、Sm 感染マウスにおいても STZ による血糖値上昇が有意に抑制された。STAT6KO マウスでは WT マウスに比べ、Sm 感染により実験途中で死亡するマウスの割合が多かったが、生残マウスにおける STZ 誘発 T1D は、WT マウスと同様に抑制されていた。

D. 考察

Hp 感染は他の寄生蠕虫と同様に、IL-4 産生や IL-10 産生の増強と IFN- γ 産生の抑制をもたらすことが分かっているが、STAT6KO マウスのみならず IL-10KO マウスにおいても Hp による血糖値上昇抑制が見られた。したがって、本寄生虫による IL-4、IL-13、IL-10 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、マンソン住血吸虫にも強力な T1D 抑制作用が観察されたこと、その作用は Hp と同様に STAT6 に依存しなかったこと、さらにはフィラリア *Litomosoides sigmodontis* を用いた同様の報告が他所からなされている(Hubner et al., 2012)ことから、これら蠕虫類が自らの誘導する Th2 応答や IL-10 に依存しない、共通の T1D 抑制メカニズムを持つ可能性が示唆された。NOD マウスを用いた既報のいくつかでは TGF- β や Treg 細胞の関与が示唆されている。今後はそれらの関与についても解析を進める予定である。

E. 結論

マウスにおける Hp による STZ 誘発 T1D 抑制作用は IL-10 に依存しないことが判明した。既報のような抗体による中和ではなく、初めて KO マウスを用いた系で T1D 抑制作用において IL-10 が必須でないことが示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

[総説]

Osada Y, Kanazawa T.

Schistosome: its benefit and harm in patients suffering from concomitant diseases.

J Biomed Biotechnol. 2011. vol.2011, 264173.

[原著]

Imai K, Koibuchi T, Kumagai T, Maeda T, Osada Y, Ohta N, Koga M, Nakamura H, Miura T, Iwamoto A, Fujii T.

Cerebral schistosomiasis due to *Schistosoma haematobium* confirmed by PCR analysis of brain specimen.

J Clin Microbiol. 2011. vol.49, no.10, p.3703-3706.

[著書]

Osada Y. (分担執筆)

Parasitic Helminths as Potential Therapeutic Agents against Autoimmune Disorders.

Autoimmune Disorders - Current Concepts and Advances from Bedside to Mechanistic Insights. InTech, 2011. p.591-614.

2. 学会発表

長田良雄、山田壮亮、金澤保.

腸管寄生虫感染はマウスのストレプトゾトシン誘発糖尿病を抑制する

第 32 回日本炎症・再生医学会(京都) 6 月 2～3 日

長田良雄、山田壮亮、山岸靖宣、金澤保.

Heligmosomoides polygyrus 感染はマウスのストレプトゾトシン誘発糖尿病を抑制する

第 80 回日本寄生虫学会大会(東京)7 月 17～18 日

H. 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（社会保障国際協力推進研究事業）

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 医学医療系 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。2年後の介入結果においても、抗体陽性化率には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、予防効果を向上させることができるかもしれない。また、リペラントローションなどによる毎日の使用により、予防効果が向上するかもしれない。その応用に期待がもたれる。

A. 研究目的

これまで、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年後の感染罹患血液検査(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)。しかし、介入後の抗体陽性化率には有意な差を認めなかった。

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。また、この研究では、家屋内残留散布というマラリア対策に準じた方策を試みた。サシチョウバエの特性を考慮し、ローションリペラントの使用など、日常的に毎日使用できるものになると良い効果が出るかもしれない。

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れば、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。

最終解析結果の論文を投稿中である。

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。抗体陽性化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、ニーム抽出物やアザルデイクチンを利用したリペラント、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やその有効性を検証する必要がある。

F. 健康危険情報

該当せず。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし。

2. 学会発表
なし。

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： マラリア原虫の生活環において、スポロゾイトは肝細胞、メロゾイトは赤血球にそれぞれ寄生胞を形成して侵入し寄生する。この2つの侵入ステージ原虫のみが先端部にロプトリーと呼ばれる先端部小器官を有することから、その貯蔵分泌タンパク質の侵入・寄生に関与すると推測されてきた。また、メロゾイトのロプトリー分子のいくつかは、赤血球侵入時に形成される密着接合に局在することも、侵入への関与を強く示唆する所見である。一方、スポロゾイトが肝細胞に侵入する分子機構、特にロプトリーに局在する分子の解析は全く進んでいない。そこで本研究ではネズミマラリア原虫 (*Plasmodium berghei*) を用いて、既知のメロゾイトのロプトリー分子の蚊体内の原虫ステージにおける発現プロファイルを用いて RT-PCR 法で解析した。その結果、12 個のロプトリー分子の転写がスポロゾイトでも認められることを新たに見出した。

A. 研究目的

蚊の吸血の際に哺乳類宿主に注入されたマラリア原虫は、種々の細胞を通過した後肝細胞に寄生胞を形成して侵入し、分裂増殖して赤血球への感染型メロゾイトを形成する。赤血球に侵入して分裂増殖した原虫が次の赤血球へと侵入を繰り返す。マラリア予防法開発の観点から、原虫の宿主細胞への侵入機構の解明が待たれているが、分子レベルでの機序の解析は進んでいない。

マラリア原虫の宿主細胞への侵入型原虫であるメロゾイトとスポロゾイトの先端部には、ロプトリーと呼ばれる先端部小器官が存在しており、宿主細胞侵入に際して、貯蔵されたタンパク質が分泌されることが報告されている。そのためにロプトリー分子が宿主細胞侵入に重要な役割を果

たすことが強く示唆されているが、研究が比較的進んでいるメロゾイトにおいても、その機能解は全く手が付けられていない。

我々はメロゾイトのロプトリー分子である RON2 (Rhoptry neck protein 2) が、スポロゾイトのロプトリーにも局在していることを免疫電顕法で見いだした。これは2つの異なる感染ステージ原虫 (メロゾイトとスポロゾイト) が、共通の分子を利用して宿主細胞に侵入する可能性を示す所見である。そこでネズミマラリア原虫 (*Plasmodium berghei*) を用いて、他のメロゾイトのロプトリー分子がスポロゾイトにおいて発現しているか否かを明らかにする目的で、蚊ステージ原虫におけるロプトリー分子の発現プロファイルを RT-PCR 法によって解析した。

B. 研究方法および結果

本研究では、ネズミマラリア (*Plasmodium berghei* ANKA 株) を BALB/c マウス (8 週令) に腹腔内投与後、4 日目に 5 から 10% の感染赤血球率のものに、羽化後 6 日目のハマダラ蚊 (*Anopheles stephensi*) の雌成虫に吸血させ 20°C で飼育したものを材料として用いた。RT-PCR で解析するサンプルには以下のものを用いた。肝細胞への寄生能をもつ段階まで成熟したスポロゾイトが採取可能となる吸血後 17 日目に蚊を解剖して、スポロゾイトを含む唾液腺を採取した。同時に蚊の中腸を取り出し、中腸外壁のオーシスト内スポロゾイトを中腸とともに採取した。更に、スポロゾイトの形成が始まる時期に相当する吸血後 13 日目のオーシストが付着した中腸、スポロゾイトの形成がまだ始まっていない吸血後 9 日目のオーシストが付着した中腸を取り出して RNA Later® に 4°C で保存した後、解析に用いた。各サンプルを QIAGEN RNeasy® microkit で RNA を精製した後、TAKARA PrimeScript RT reagent Kit を用いて逆転写反応を行って cDNA を合成した。これを鋳型として各ロプトリータンパク質遺伝子特異的プライマーを用いて PCR 増幅をおこなった後に、電気泳動して増幅産物を検出した。内部標準コントロールとして HSP70 を用いた。

陽性コントロールとして唾液腺スポロゾイトで発現する既知のマイクロネーム分子である SPECT2 の発現を調べたところ、唾液腺スポロゾイトで強く発現している

ことが確認された。次にスポロゾイトのロプトリーに局在することが判明している RON2 の発現を唾液腺スポロゾイトで解析した結果、タンパク質が検出されているにも関わらず、RON2 の mRNA の発現は検出されなかった。更に、中腸オーシストにおける RON2 の発現を解析した結果、RON2 はマイクロネームの分子よりも早いタイミングの吸血後 13 日目と 17 日目の中腸ですでに転写が行われていることが明らかになった。

また、RON2 以外のロプトリー関連分子 (ASP, RON3, RON4, RON5, RON6, RhopH1A, RhopH1AP, RhopH2, RhopH3, RALP, RAMA, RAP1) の発現プロファイルの解析を行った。その結果、これらの全ての分子は RON2 と同様の発現プロファイルを示し、唾液腺スポロゾイトでは mRNA は検出されないが、それよりも早期の発育ステージである中腸オーシスト内で既に発現していた。以上の RT-PCR の結果から、発現解析した 13 個のロプトリー関連分子の転写はスポロゾイト形成が行われる中腸オーシストにおいて起こっていることが明らかになった。

次に、実際にタンパク質への翻訳が行われているか否かを明らかにするために RON2 の発現と局在解析を行った。まず始めに、RON2 を小麦胚芽無細胞タンパク質合成系によって作成し、これを用いてウサギを免疫して特異抗体を作成した。野生型原虫を用いて RON2 タンパク質の発現解析をウエスタンブロッティング法で行った。2.5 × 10⁵ 個の分裂体、中腸スポロゾイトお

よび唾液腺スポロゾイトを抗原として、RON2 特異的なウサギ抗血清でタンパク質の検出を行った。その結果、分裂体だけでなく中腸のスポロゾイトにおいても RON2 タンパク質が発現していることが明らかとなった。また RT-PCR で mRNA の発現が見られなかった唾液腺スポロゾイトでも RON2 タンパク質が発現していることが確認された。

E. 結論

蚊ステージ原虫のうち哺乳類宿主への感染型であるスポロゾイトのロプトリー関連分子 (ASP, RON2, RON3, RON4, RON5, RON6, RhopH1A, RhopH1AP, RhopH2, RhopH3, RALP, RAMA, RAP1) の発現プロファイルの解析を RT-PCR によって行った。その結果、これら全ての分子は唾液腺スポロゾイトにおいて mRNA は検出されなかったが、それよりも早期の中腸オーシストの発育ステージでは転写が認められた。以上の結果から、発現解析した 13 個のロプトリー関連分子はスポロゾイト形成が行われる中腸オーシストにおいて転写されていることが明らかとなった。このうち RON2 のスポロゾイトにおける翻訳を確認したところ、中腸スポロゾイトと唾液腺スポロゾイトともにタンパク質の発現が認められた。

G. 研究発表

2. 学会発表

- 1) 徳永順士、村田英理、石野智子、鳥居

本美.

マラリア原虫スポロゾイトのロプトリー分子の探索及び発現プロファイル解析
第 80 回日本寄生虫学会大会、東京、7/17-18、2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきものはない。

寄生虫感染で誘導される Th2/IgE/ 顆粒球応答の防御機能解明

中西憲司 兵庫医科大学

研究要旨

ベネズエラ糞線虫 (*Strongyloides venezuelensis*; *S. venezuelensis*) 感染で起こる肺好酸球症の発症に IL-33 が重要な役割を果たすことを、IL-33 欠損マウスを用いて証明した。肺において IL-33 を発現している細胞が II 型肺胞上皮細胞 (AT II) であることを証明した。そしてベネズエラ糞線虫感染や、本寄生虫の虫体成分であるキチンを経鼻的に投与しても、AT II の数や IL-33 発現量が増加することを明らかにした。さらにベネズエラ糞線虫感染前後の肺を比較すると、野生型マウスでは IL-5 と IL-13 を産生する NH 細胞が著明に増加しているが、このような変化は IL-33 欠損マウスでは認められないことも明らかにした。最後に、T 細胞 (Th2 細胞) も B 細胞も保有しない免疫不全マウス (Rag2 欠損マウス) でも、野生型マウスと同様に、AT II 細胞数が増加するとともに肺での IL-33 発現量が上昇し、肺内で NH 細胞や好酸球数が増加して肺好酸球症を発症することを明らかにした。

A. 研究目的

蠕虫感染時には Th2/IgE 応答が誘導され、IL-5 の作用で全身性の好酸球増多が起こる。ところが、Th2 応答が誘導される前 (感染後 3 日～4 日目頃) にも、肺の好酸球浸潤が起こる。このような肺炎は人では Löffler 症候群といわれる。発症機序に関して、長年研究されてきたが、尚も詳細は不明である。私達は蠕虫感染で誘導される好酸球性肺炎の発症機序を解明する目的で昨年度まで研究してきた。

B. 研究方法

野生型マウス、Rag2 遺伝子欠損マウス、IL-33 遺伝子欠損マウスにベネズエラ糞線虫 *Strongyloides venezuelensis* (Sv) の第 3 期幼虫を経皮感染させ、経時的に肺での好酸球浸潤と杯細胞増多を組織学的に検討した。あるいはキチンを経鼻投与し、同様の検討を行った。更に、

これらの処置によって肺内で IL-33 ならびに IL-5 と IL-13 の産生が見られるか検討した。また、IL-33 依存的に誘導される Natural helper (NH) 細胞の増多の有無も検討した。

C. 研究結果

Sv を感染させると、野生型マウスでは一週目をピークに肺好酸球症と杯細胞増多を認めた。一方、IL-33 遺伝子欠損マウスでは、このような変化を認めなかったことから、IL-33 が蠕虫感染で起こる肺好酸球症と杯細胞増多の原因因子と考えられた。次に、Sv 感染が原因で肺組織に IL-33 の産生が誘導されるかを検討した。その結果、感染 2～3 日目から顕著に IL-33 産生が増強された。Rag2 遺伝子欠損マウスに Sv を感染させると、野生型同様に肺好酸球症と杯細胞増多を示し、Th2 細胞の誘導がこれらの肺組織変化に不必要なことが明らかとなった。そこで、Th2 細胞類似の細胞が誘導されると考え

その正体を探索したところ、IL-33依存的に誘導されたNatural helper (NH) 細胞がIL-5とIL-13を産生することで、肺好酸球症と杯細胞増多が誘導されることが明らかとなった。最後に、キチンを経鼻投与することで肺好酸球症と杯細胞増多を誘導出来たので、IL-33産生の有無を検討したが、やはりこの処置でもIL-33産生が誘導されることが明らかとなった。

D. 考察

寄生虫はその構成成分であるキチンの作用で、肺内でIL-33の産生を誘導する。次に、Th2細胞が誘導されなくても、こ

G. 研究発表

■ 論文発表 ■

[著書]

Yoshimoto T, Tsutsui H, and Nakanishi K. Importance of Th17- and Th1-associated responses for the development of asthma. (Izuhara K, Holgate S.T, Wills-Karp M. eds), In: Inflammation and Allergy Drug Design, 27-38, Blackwell Publishing Ltd, London, 2011.

Tsutsui H, Mizutani H, Nakanishi K. Contribution of interleukin 18 to the development of infection-associated atopic dermatitis. *Curr Probl Dermatol*. 2011;41:93-103

安田好文, 中西憲司. Th2 アジュバントの作用機序と臨床応用. 石井健, 山西弘一 監修. アジュバント開発研究の新展開. 東京: シーエムシー出版, 2011:32-8.

[原著]

Nishizaki C, Nishikawa M, Yata T, Yamada T, Takahashi Y, Oku M, Yurimoto H, Sakai Y, Nakanishi K,

のIL-33に反応してNH細胞が誘導される。最後に、このIL-33刺激を受けたNH細胞がIL-5とIL-13を産生して肺好酸球症を発症させる。

E. 結論

私達は今回の研究で、Th2型免疫応答が誘導されなくてもナチュラルヘルパー (natural helper; NH) 細胞の誘導が起こることで肺好酸球症が起こることを初めて明らかにした。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

Takakura Y. Inhibition of surgical trauma-enhanced peritoneal dissemination of tumor cells by human catalase derivatives in mice. *Free Radic Biol Med* 2011. 51(3):773-9.

Nakahira M, Nakanishi K. Requirement of GATA-binding protein 3 for IL13 gene expression in IL-18-stimulated Th1 cells. *Int Immunol*. 2011;23:761-72

Yasuda K, Muto T, Kawagoe T, Makoto M, Sasaki Y, Matsushita K, Taki Y, Futatsugi-Yumikura S, Tsutsui H, Ishii KJ, Yoshimoto T, Akira S, Kenji Nakanishi. Contribution of IL-33-activated natural helper cells to pulmonary eosinophilia in intestinal nematode-infected mice. *PNAS*, in press.

[総説]

今井康友, 善本知広, 善本隆之, 中西憲司, 山西清文. IL-27 トランスジェニックマウスではDNFBの接触過敏症が減弱している

Journal of Environmental Dermatology

and Cutaneous Allergology 2011;5:289
中西憲司 アレルギーの増悪機構
Journal of Environmental Dermatology
and Cutaneous Allergology 2011;5:203

■ 学会発表 ■

国際学会

Nakanishi K. Role of basophils in induction and augmentation of Th2 response. The 6th Leukocyte Signal Transduction Workshop 2011. 6, Greece
Matsumoto M, Yasuda K, Yoshimoto T, Nakanishi K. Basophils are essential for rapidly expelling *Strongyloides venezuelensis*. 45th Annual Japan-U.S. Joint Conference on Parasitic Diseases 2011.1 Tokyo

Matsumoto M, Yasuda K, Kubo M, Yoshimoto T, Nakanishi K. Basophils are essential for rapidly expelling *Strongyloides venezuelensis*. The Joint International Meeting Sponsored by The Japanese Society for Interferon and Cytokine Research and The Japanese Society for Macrophage Molecular and Cell Biology (JSICR-MMCB2011) 2011.5 Osaka

Koubun Yasuda, Yuki Sasaki, Makoto Matsumoto, Yuuko Taki, Tomohiro Yoshimoto, Kenji Nakanishi. IL-33 mediated expulsion of *Nippostrongylus brasiliensis* and *Strongyloides venezuelensis*. JSICR-MMCB2011. 5 Osaka

Koubun Yasuda, Taichiro Muto, Yasutomo Imai, Makoto Matsumoto, Yuki Sasaki, Yuuko Taki, Shizue Yumikura, Tomohiro Yoshimoto, Kenji Nakanishi. Contribution of IL-33 activated natural helper / nuocyte-like cells to IL-5 production and eosinophil accumulation in intestinal nematode infected mice. 第40回日本免疫学会総会・学術集会 2011.11 千葉

Adachi K, Uchiyama R, Tsutsui H, Nakanishi K. Non-conventional mechanisms of IgE response in lethal mouse malaria JAPANESE JOURNAL OF BACTERIOLOGY, 2011.9.9 Sapporo

国内学会

中西憲司. 新しいアレルギーの概念. 第28回日本医学会総会 2011.4.8 東京 (WEB上にて開催)

Nakanishi K. Role of IL-1 family cytokines in allergic inflammation. 第76回日本インターフェロン・サイトカイン学会 2011.5.25 泉佐野 (特別講演)

中平雅清, 中西憲司. Requirement of GATA-binding protein 3 for IL13 gene expression in IL-18-stimulated Th1 cells. 第76回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 2011.5 泉佐野

中西憲司. 新しいアレルギーの概念 第41回日本皮膚アレルギー接触性皮膚炎学会総会学術大会 2011.7.17 甲府

今井康友, 善本知広, 善本隆之, 中西憲司, 山西清文 IL-27 トランスジェニックマウスではDNFBの接触過敏症が減弱している第41回日本皮膚アレルギー接触性皮膚炎学会総会学術大会 2011.7.17 甲府

中西憲司. 上皮性サイトカインで誘導されるアレルギー性炎症. 第62回日本皮膚科学会中部支部学術大会 2011.11.19 四日市

松本真琴, 佐々木由紀, 安田好文, 村松正道, 本庶佑, 善本知広, 中西憲司.

ヴェネズエラ糞線虫に対する抗体依存性排除機構について. 第 67 回日本寄生虫学会西日本支部大会 2011.10 金沢

中西憲司. 好塩基球, 肥満細胞, 好酸球の何れもが寄生虫排除に重要である. 第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2011.11.11 高輪

松本真琴, 佐々木由紀, 安田好文, 村松正道, 本庶佑, 善本知広, 中西憲司. 抗体によるヴェネズエラ糞線虫の排除機構. 第 40 回日本免疫学会総会 2011.11 千葉

中平雅清, 中西憲司. IL-18 で刺激した Th1 細胞における I113 遺伝子の発現には GATA3 が必要である (Requirement of GATA binding protein 3 for I113 gene expression in IL-18-stimulated Th1 cells). 第 40 回日本免疫学会学術集会

2011. 11 千葉

蒯拔陽子, 久育男, 中西憲司, 善本知広. 免疫細胞と組織構成細胞の接点 アレルギー性鼻炎モデルマウス鼻粘膜におけるマスト細胞/好塩基球の動態と IL-33 の病因的役割 アレルギー60 巻 9-10 Page1242 (2011.10)

中平雅清, 中西憲司. Requirement of GATA-binding protein 3 for I113 gene expression in IL-18-stimulated Th1 cells. 第 34 回日本分子生物学会年会 2011.12 横浜

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 人類に有用なワクチン蛋白を唾液腺で発現し、吸血とともにワクチン蛋白を注入する蚊をつくるため、蚊の唾液腺特有蛋白遺伝子のプロモーターに、マalaria抗原（部分スポロゾイト表面蛋白 pCSP）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 pCSP が発現し、唾液腺細胞から唾液腺腔に分泌され、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 pCSP に対する抗体を産生した。この抗体はスポロゾイトの培養 HepG2 細胞への侵入を阻害した。

A. 研究目的

蚊はマalariaをはじめ各種疾病を媒介するために嫌悪されているが、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、吸血とともに蛋白を注入してくれる有蚊を作れないかと考えた。今回は外来性蛋白としてマalaria抗原ペプチド（部分スポロゾイト表面蛋白 pCSP）を蚊の唾液に発現させた。

B. 研究方法

当ラボでかつて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、pCSP 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

pCSP は唾液腺細胞で発現し、唾液腺腔に分泌され、蚊の口吻から放出された。この蚊を繰り返しマウスに吸血させたところ、マウスは抗 pCSP 抗体を産生した。この抗体はスポロゾイトの培養 HepG2 細胞への侵入を阻害した。

D. 考察

pCSP を産生する蚊を刺咬させることにより十分な抗 pCSP 抗体を産生させるためには 50 匹ずつ 20 回の刺咬が必要であり、もっと効率良く抗体を産生させる方法が必要である。

E. 結論

唾液腺に外来性の蛋白を産生させ、この蚊の刺咬により、その蛋白に対する抗体を誘導させることができた。その抗体は生物学的に有効であった。

G. 研究発表

1. 論文発表

Yamamoto DS, Sumitani M, Nagumo H, Yoshida S, Matsuoka H. Induction of anti-sporozoite antibodies by biting of transgenic *Anopheles stephensi* delivering malarial antigen via blood feeding. *Insect Mol Biol* 21(2): in press, 2012

2. 学会発表

山本大介, 炭谷めぐみ, 吉田栄人, 松岡裕之: 唾液腺に DsRed-CSP 融合タンパク質を発現するトランスジェニックハマダラカの解析 第 54 回日本衛生動物学会大会 2011 年 4 月 14-16 日 東京 (抄録集 p80)

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 マラリアのコントロールには致死性合併症である脳マラリアの病態の理解が大切である。本研究では、脳マラリア発症における、炎症性サイトカインである IL-23、IL-17 の関与をマウスモデルで検討した。IL-23 欠損マウス、IL-17 欠損マウスのいずれもが、野生型マウスと同様に脳マラリアを発症したことから、これらのサイトカインは脳マラリアの発症には関わらないことが明らかとなった。

A. 研究目的

ワクチンの開発には免疫応答の詳細な理解が必須である。熱帯熱マラリアの致死性合併症である脳マラリアもまた免疫応答によって惹起されることから、防御的免疫と病理学的免疫応答を明確に区別することが重要である。脳マラリアの発症には IL-12 の役割がよく知られている。IL-23 は IL-12 ファミリーに属し p40 と p19 サブユニットからなる二量体である。p40 は p35 と共に IL-12 を構成しており、IL-12 と IL-23 は共通して p40 サブユニットを用いる。IL-12 の病態形成における知見は p40 を欠損するマウスを使って得られたものが多く、p40 欠損による IL-23 の欠損が病態に関与していることも考えられる。そこで、本研究では、IL-23 の脳マラリア発症における役割を、自己免疫病の原因ともなり、IL-17 を分泌するヘルパーT細胞サブセットである Th17 の誘導を中心に、マウス実験的脳マラリアモデルにおいて検討した。

B. 研究方法

C57BL/6 マウス、および IL-17 を欠損するマウス(IL-17KO)、IL-23 の p19 サブユニットを欠損するマウス(p19KO)にネズミマラリア原虫 *Plasmodium berghei* ANKA (PbA)感染赤血球を腹腔内に接種して感染させた。感染後の経過を原虫血症率と致死率で検討した。脳マラリアはエバンスブルーの漏出、組織学的解析により評価した。

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. IL-23 の脳マラリア発症への関与

野生型 C57BL/6 マウス(WT)に PbA を感染させると、感染後 1 週間程で低い原虫血症にもかかわらず、麻痺などの中枢神経症状を呈し、10 日以内に死に至る。感染後 8 日目にエバンスブルーを静脈内接種した後に、脳を分離すると、脳血液関門の破壊による染色液の漏出により青く染色されていた。また、この時期の脳の組織学的解析では、脳血管が感染赤血球により充満していることが認められた。これらは、脳マラリアに典型的な所見であり、脳マラリアの発症が確認された。p19KO マウスに PbA を感染させると、WT マウスと同様の原虫血症が見られた。また、神経症状も認め、10 日以内に全てのマウスが死に至った。このマウスでも脳マラリアを示す、エバンスブルーの漏出、脳血管の感染赤血球による閉塞が認められ、脳マラリアを発症していることが明らかとなった。

WT マウスにおいて、PbA 感染後に脾臓、脳浸潤リンパ球、末梢血単核球中の IL-23 の発現を mRNA、タンパク質レベルで検討した所、非感染マウスでの発現レベルと変化なかった。

2. IL-17 の脳マラリア発症への関与

IL-17KO マウスに PbA を感染させると、WT マウスと同様の原虫血症が見られた。神経症状も認め、10 日以内に全てのマウスが死に至った。このマウスでもエバンスブルーの漏出、脳血管の感染赤血球による閉塞が認められ、脳マラリアを発症していた。また、WT マウスにおいて、PbA 感染後に脾臓、脳浸潤リンパ球、末梢血単核球中の IL-17 の発現は非感染マウスでの発現レベルと変化なかった。IL-17 を産生する Th17 の分化に必須な転写因子 ROR- γ t の発現も変化なかった。

D. 考察

以上の結果から、PbA 感染では IL-23 の発現、Th17 の誘導、IL-17 の発現が認められないこと、p19KO、IL-17KO マウスでも脳マラリアは発症することが示され、脳マラリアの発症にこれらのサイトカインが関与していないことが明らかとなった。また、いずれの KO マウスでも原虫血症のレベルも同程度だったことから、これらのサイトカインの抗マラリア免疫における役割も否定的と思われる。

脳マラリアの炎症性 T 細胞の関与が知られており、今回の研究でも IFN- γ を分泌する Th1 が誘導されていることが確認された。IL-12 とそれによる Th1 の誘導が脳マラリアの発症には重要であり、IL-12 関連のサイトカインである IL-23、また炎症性サイトカイン IL-17 は無関係であった。マラリアワクチンを考慮する際に、これらの応答は有害でも有効でもなく、注意を払う必要はないと思われた。

予備実験で *P. berghei* NK65 を感染させると IL-23 と IL-17 の発現が見られた。その生理的役割を不明であるが、PbA では発現すら見られなかった。

E. 結論

マラリアの致死性合併症である脳マラリアの原因となる免疫応答に、IL-23 と IL-17 は関与していることを明らかにした。これは世界で初めての報告であり、ヒトにおける解析も待たれる。

G. 論文発表

Moriya-Matsuzaki C, Tu L, Ishida H, Imai T, Suzue K, Hirai M, Tetsutani K, Hamano S, Shimokawa C, and Hisaeda H: A critical role for phagocytosis in resistance to malaria in iron-deficient mice. **Eur. J. Immunol.** 41: 1365-1375, 2011.

Kim HJ, Jung BK, Lee JJ, Pyo KH, Choi BI, Kim TW, Hisaeda H, Himeno K, Shin EH, Chai JY: CD8 T-cell activation in mice injected with a plasmid DNA vaccine encoding AMA-1 of the reemerging Korean *Plasmodium vivax*. **Korean J. Parasitol.** 49: 85-90, 2011

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.

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

脳マラリアは、マラリア感染の最も重要な合併症であり主要な死因であるが、その仕組みは十分に理解されていない。本研究では、C57BL/6マウスに*Plasmodium berghei* ANKA (PbA)を感染させる実験的脳マラリア（Experimental cerebral malaria; ECM）モデルを用い、脳マラリア発症におけるCD8⁺ T細胞の役割を解析した。CD8⁺ T細胞を活性化する樹状細胞の増殖因子Flt3 ligandをマウスに導入後PbA感染を行ったところ、脳マラリア発症が抑制された。脳内CD8⁺ T細胞の集積は脳マラリアを発症した対象群と同様であり、脳マラリア発症にはCD8⁺ T細胞が脳に集積するのみならずその活性化状態が重要であることが示された。

A. 研究目的

脳マラリアは、マラリア感染の最も重要な合併症であり主要な死因であるが、その仕組みは十分に理解されていない。動物モデルとしてC57BL/6マウスに*Plasmodium berghei* ANKA (PbA)を感染させた場合、原虫血症が低い感染初期に脳マラリア様症状を呈して死亡するモデルがあり、実験的脳マラリア（Experimental cerebral malaria; ECM）と呼ばれる。ECM発症にはCD8⁺ T細胞が重要な役割を果たしていることが明らかになっているが、その仕組みは十分に理解されていない。我々は、脳マラリア発症におけるCD8⁺ T細胞の役割について解析してきた。今回は特にT細胞活性化に重要な樹状細胞の働きに着目し、樹状細胞の数や機能の変容に

よる脳マラリア発症への影響を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. マウスに樹状細胞の分化・増殖因子Flt3 リガンド（Flt3L）の発現ベクタープラスミドを投与して生体内で樹状細胞を増殖させた。
2. マウスマラリア *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) を感染させ、原虫血症、脳マラリアの臨床症状、死亡率を検討した。血液脳関門は、エバンスブルーの透過性を指標に検討した。
3. 脾臓内の樹状細胞、NK細胞、マクロファージ、顆粒球数を調べた。
4. 脾臓と脳に集積するT細胞の数、細胞表面活性化マーカー発現、機能（IFN- γ

産生など) を調べた。

C. 研究結果

以下の点が明らかになった。

1. Flt3L導入により、脾臓でCD8⁺樹状細胞数が著明に増大したが、細胞表面の補助刺激分子などの発現に大きな変化はみられなかった。

2. Flt3L導入により、PbA感染後の脳マラリア発症が著明に抑制された。感染初期の原虫血症レベルも抑制された。

3. Flt3L導入後にPbA感染したマウスの脾臓では、非導入の感染マウスに比べてCD8⁺T細胞が著増した。これらのT細胞の多くはCD11cを発現し、CD44やCXCR3はコントロールより多く発現したが、CD25、CD137、granzyme B発現は低く、通常とは異なる活性化状態を示した。

4. 脳に集積したCD8⁺T細胞数はFlt3L導入マウス(非発症群)も非導入マウス(発症群)と差がなかった。しかしながら、非発症群では感染赤血球の脳集積はみられなかった。

D. 考察

実験的脳マラリアの発症においては、CD8⁺T細胞が重要な役割を果たしていることが明らかにされているが、その機構は解明されていない。本研究では、樹状細胞増殖因子であるFlt3L投与により、脳マラリア発症が抑制されることが明らかになった。脳マラリアを発症する対照群と比較して脳に集積するCD8⁺T細胞数は大差なく、CD8⁺T細胞の集積だけでは脳

マラリアは発症せず、活性化状態も重要な因子であると考えられた。また、Flt3L投与群では感染赤血球の脳集積は観察されなかった。このことは、脳マラリア発症の2段階メカニズムを示唆する。即ち、①マラリア感染より活性化したCD8⁺T細胞の脳への集積と、②これらT細胞を介した脳血管の機能変容による感染赤血球の脳への集積である。今後、これらを介する分子メカニズムについて解明することが重要である。

E. 結語

動物モデルによる脳マラリア発症機構の研究から、発症におけるCD8⁺T細胞の役割の一端を解明することができた。今後その分子機構の詳細を明らかにすると共に、熱帯熱マラリア原虫感染に伴うヒトの脳マラリア発症においても同様な機構が存在するか否かについて解析を行う必要がある。また、樹状細胞やT細胞レベルに治療介入による脳マラリアの発症予防や治療法開発の可能性が期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

Tamura, T., Kimura, K., Yuda, M., Yui, K., Flt3 ligand prevents the development of cerebral malaria during infection with *Plasmodium berghei* ANKA. *Infection and Immunity*, 79 (10), 3947-3956.2011.

2. 学会発表

Th2 非依存的な *N. brasiliensis* 感染排除機構の解析—小腸に浸潤している好酸球の解析、本間季里、木村大輔、木村一美、成毛有紀、都田真奈、蔵重智美、中島正洋、松山俊文、由井克之、第80回日本寄生虫学会大会、7月17, 18日、2011年

Flt3 ligand 発現による実験的脳マラリア発症抑制メカニズムの解析、田村隆彦、木村一美、油田正夫、由井克之、第80回日本寄生虫学会大会、7月17, 18日、2011年

マラリア原虫感染における抗原特異的 CD8⁺ T細胞の分化、都田真奈、木村大輔、本間季里、木村一美、油田正夫、由井克之、第80回日本寄生虫学会大会、7月17, 18日、2011年

マラリア肝細胞期における CD8⁺ と CD4⁺ T細胞のエフェクター機構の解析、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、第80回日本寄生虫学会大会、7月17, 18日、2011年

マラリア原虫感染により誘導される CD4⁺ T細胞は IL-2 産生抑制の新規サイトカインを発現する、木村大輔、都田真奈、本間季里、木村一美、油田正夫、由井克之、第80回日本寄生虫学会大会、7月17, 18日、2011年

Complete abrogation of sporozoite-induced sterile immunity by blood stage parasites of homologous and heterologous malaria species、井上愛実、Tang Jianxia、金子修、由井克之、Culleton Richard、第80回日本寄生虫学会大会、7月17, 18日、2011年

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、由井克之、第40回日本免疫学会学術集会、11月27-29日、2011年

IRF4 はナチュラルヘルパー細胞の Th2 サイトカイン産生を負に制御する、本間季里、木村大輔、木村一美、都田真奈、茂呂和世、小安重夫、松山俊文、由井克之、第40回日本免疫学会学術集会、11月27-29日、2011年

IRF-4 欠損 MRL/lpr マウスは Th1 過剰応答を起こし複数の組織に肉芽腫性病変を発症する、町田隆、本間季里、松山俊文、由井克之、Ruiz Phil、藤田禎三、Gilkeson Gary、関根英治、第40回日本免疫学会学術集会、11月27-29日、2011年

マラリア原虫感染によって誘導される制御性 CD4⁺ T細胞は液生因子によって IL-2 産生を抑制する、木村大輔、都田真奈、本間季里、木村一美、由井克之、第