

40回日本免疫学会学術集会、11月  
27-29日、2011年

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

マラリア原虫感染赤血球膜タンパク質輸送の解析

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

マラリア原虫は感染した赤血球膜を改変し、赤血球の変形能を変化させたり、接着能を付加することで宿主から排除されることを回避する。感染赤血球膜に局在している接着分子 PfEMP-1 は N 末端にある PEXEL モチーフと呼ばれるアミノ酸配列が何らかの分子輸送機構に認識され、原虫から感染赤血球膜に輸送されることが分かっており、この輸送機構は創薬の標的と考えられている。一方、同様に赤血球膜に局在し、接着現象に関係していると考えている SURFIN や Pf332 と呼ばれる分子には、典型的な PEXEL モチーフが存在せず、どのように赤血球膜まで輸送されるのかはわかっていなかった。本研究では、遺伝子組換えの手法を用いて、Pf332 の輸送は PEXEL に非依存的で、膜貫通領域が必須であることを明らかにした。

A. 研究目的

マラリア原虫は感染した赤血球膜を改変し、新しい膜構造（モロー斑点など）を形成させ、赤血球の変形能を変化させたり、接着能を付加することで宿主から排除されることを回避する。感染赤血球膜に局在している接着分子 PfEMP-1 は N 末端にある PEXEL モチーフと呼ばれるアミノ酸配列が原虫独自の分子輸送機構に認識され、原虫から感染赤血球膜に輸送されることが分かっており、この輸送機構は創薬の標的と考えられている。一方、同様に赤血球膜に局在し、接着現象に関係していると考えられている SURFIN や Pf332 と呼ばれる一回膜貫通型タンパク質には、典型的な PEXEL モチーフが存在せず、どのように赤血球膜まで輸送されるのかはわかっていない。そこで、本研究では、遺伝子組換えの手法を用いて、Pf332 の輸送に重要な領域を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

Pf332 の細胞外領域には PfEMP-1 の赤血球結合領域である DBL(Duffy-Binding-Like)領域と相同性を有する領域を持ち、細胞膜貫通領域につづいて細胞内領域には Glu リピート領域、末端に PfEMP-1 の細胞内領域と相同性を有する WR(Tryptophan-rich)領域が存在する。Pf332 の種々の領域を緑色蛍光タンパク質

GFP と Ty タグ配列との融合タンパク質として発現する遺伝子組み換え熱帯熱マラリア原虫を作成し、局在を間接蛍光抗体免疫法により検討した。

C. 研究結果

最初に、Glu リピート領域を除き、DBL 領域を含む細胞外領域と膜貫通領域、WR 領域を GFP と結合させた mini-Pf332 を作成して解析した結果、Glu リピート領域は寄生胞膜の通過とモロー斑点への局在には必要でないこと、および赤血球侵入型原虫表面での局在が見られないことを明らかにし、さらなる解析のための mini-Pf332 を確立することが出来た。続いて、mini-Pf332 から細胞外領域を除くと粗面小胞体マーカーと共局在を示すが、WR 領域を除いてもモロー斑点に輸送されることを明らかにした。さらに、細胞外領域を GFP と融合させたものは原虫細胞質に局在することも明らかにした。一方、膜貫通領域を GFP と融合させたものは、粗面小胞体マーカーと共局在を示した(図 1、TM)。これらより、GFP は①Pf332 の膜貫通領域により、粗面小胞体に移行すること、②Pf332 の細胞外領域があると、粗面小胞体からさらに寄生胞内に移行し、さらに赤血球内、モロー斑点にまで移行すること、③また、WR 領域はモロー斑点までの輸送と局在に必要でないことがわかった。細胞外領域の N 末端側

の配列が感染赤血球内への輸送に関与しているかどうかを検討するために、N末端の14アミノ酸残基を、感染赤血球内へは移行しないことがわかっている熱帯熱マラリア原虫アデニロコハク酸リアーゼ (PfASL) のN末端の14アミノ酸 "MDVHVNQLKNISPI" と置換した細胞外領域と膜貫通領域をもつ組換えタンパク質を発現させたところ、このアミノ酸置換にかかわらず、GFPはモラー斑点まで輸送された。さらに、PEXEL様配列 (RSLAD) が感染赤血球内への輸送に関与しているかどうかを検討するために、"RSLAD" を "ASAAA" に置換した細胞外領域と膜貫通領域をもつ組換えタンパク質を発現させたところ、このアミノ酸置換にかかわらず、GFPはモラー斑点まで輸送された。

#### D. 考察

Pf332はPEXEL配列非依存的に、細胞外領域に存在する何らかの情報により感染赤血球に輸送されることを示す事が出来た。Pf332がどのようにして赤血球侵入型原虫表面に局在するのかについては、今回の解析結果では明らかでなく、さらなる解析が必要である。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Sungkapong T, Culleton R, Yahata K, Tachibana M, Ruengveerayuth R, Udomsangpetch R, Torii M, Tsuboi T, Sattabongkot J, **Kaneko O**, Chotivanich K. Humoral immune responses to *Plasmodium vivax* subtelomeric transmembrane proteins in Thailand. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health** 42(6), 1313 (2011/11).
2. Tsumori Y, Ndounga M, Sunahara T, Hayashida N, Inoue M, Nakazawa S, Casimiro P, Isozumi R, Uemura H, Tanabe K, **Kaneko O**, Culleton R. *Plasmodium falciparum*: Differential selection of drug resistance alleles in contiguous urban and peri-urban areas of Brazzaville, Republic of Congo. **PLoS ONE** 6(8), e23430 (2011/08).
3. Li J, Pattaradilokrat S, Zhu F, Jiang H, Liu S, Hong L, Fu Y, Koo L, Xu W, Pan W, Carlton JM, **Kaneko O**, Carter R, Wootton

JC, Su XZ. Linkage maps from multiple genetic crosses and loci linked to growth-related virulent phenotype in *Plasmodium yoelii*. **Proc Natl Acad Sci USA** 108(31): E374-82 (2011/08).

4. Alexandre JSF, Kaewthamasorn, Yahata K, Nakazawa S, **Kaneko O**. Positive selection on the *Plasmodium falciparum* *clag2* gene encoding a component of the erythrocyte-binding rhoptry protein complex. **Trop Med Health** 39(3):77-82 (2011/09).
5. Alexandre JSF, Yahata K, Kawai S, Torii M, **Kaneko O**. PEXEL-independent trafficking of *Plasmodium falciparum* SURFIN4.2 to the parasite-infected red blood cell and Maurer's clefts. **Parasitol Int** 60(3):313-20 (2011/09).

##### 2. 学会発表

1. Sungkapong T, Yahata K, Culleton R, Tsuboi T, Torii M, Ruengveerayuth R, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, **Kaneko O**, Chotivanich K "Antibody Responses to Plasmodium vivax Subtelomeric Transmembrane Protein (PvSTP), a Homolog of Plasmodium falciparum SURFIN, in P. vivax-infected Patients " (poster) The Royal Golden Jubilee-Ph.D. program Congress XII, Pattaya, Thailand, (2011. Apr. 1-3) ("The award in outstanding poster presentation"を受賞)
2. 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 80 回日本寄生虫学会大会、東京 (2011. July. 17-18)
3. 矢幡一英、Richard Culleton、金子修 "Time-lapse imaging を用いたマラリア原虫の赤血球侵入時における動態解析" (oral) 第 80 回日本寄生虫学会大会、東京 (2011. July. 17-18)
4. Jiang N, Alexandre J, Yahata K, Tsuboi T, Chen Q, **Kaneko O**. "Identification of a region responsible for *Plasmodium falciparum* Pf332 export to the infected erythrocyte" (oral) 第 80 回日本寄生虫学会大会、東京 (2011. July. 17-18)
5. 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)第 80 回日本寄生虫学会大会、東京 (2011. July. 17-18)
6. Tang J, Inoue M, Kanda M, Sunahara T, **Kaneko O**, Culleton R. "Intra-host dynamics of mixed species malaria parasite infections in mice and mosquitoes" (oral)第 80 回日本寄生虫学会大会、東京 (2011. July. 17-18)
  7. Zhu X, Yahata K, Alexandre JSF, **Kaneko O**. "Recombinant *Plasmodium falciparum* SURFIN4.1 protein is exported to the parasite-infected red blood cell" (oral) Nagasaki Symposium on Malaria Biology 2011 (II), Nagasaki (2011. Nov. 16-17)
  8. Inoue M, Zoungrana A, Miyakoda M, Tang J, **Kaneko O**, Yui K, Culleton R. "The specificity of immunity against the blood stages and pre-erythrocytic stages of *Plasmodium yoelii*" (oral) Nagasaki Symposium on Malaria Biology 2011 (II), Nagasaki (2011. Nov. 16-17)
  9. Kimanthi MJ, Kaewthamasorn M, Culleton R, Sakaguchi M, Yahata K, **Kaneko O**. "Expression of PyRON5, a *Plasmodium yoelii* rhoptry neck protein in merozoite and sporozoite" (poster) Nagasaki Symposium on Malaria Biology 2011 (II), Nagasaki (2011. Nov. 16-17)
  10. Jiang N, Sakaguchi M, Alexandre JSF, Yahata K, Tsuboi T, Chen Q, **Kaneko O**. "Transmembrane region of *Plasmodium falciparum* antigen 332 is essential for the transport to the Maurer's clefts in the parasite-infected red blood cell" (poster) Nagasaki Symposium on Malaria Biology 2011 (II), Nagasaki (2011. Nov. 16-17)
  11. Sakura T, Yahata K, **Kaneko O**. "Trafficking of Erythrocyte-Binding-Antigen 175 (EBA175) in *Plasmodium falciparum*" (poster) Nagasaki Symposium on Malaria Biology 2011 (II), Nagasaki (2011. Nov. 16-17)
  12. Zhu X, Yahata K, Alexandre JSF, **Kaneko O**. "Recombinant *Plasmodium falciparum* SURFIN4.1 protein is exported to the parasite-infected red blood cell" (oral) Joint International Tropical Medicine meeting 2011, Bangkok, Thailand (2011. Dec. 1-2) ( "Prof. Sornchai Looareesuwan Foundation Award"を受賞)
  13. 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 のマイクロネーム輸送に必要な配列の同定" (oral) 感染症若手フォーラム、長崎市 (2012. Feb. 2-4)
  14. Ning Jiang, 坂口美亜子, Jean Alexandre, 矢幡一英、坪井敬文、Qijun Chen、**金子修** "マラリア原虫感染赤血球に輸送される Pf332 分子の局在について" (oral) 感染症若手フォーラム、長崎市 (2012. Feb. 2-4)
  15. 矢幡一英、**金子修** "Time-lapse imaging を用いたマラリア原虫の赤血球侵入時における動態解析" (oral) 感染症若手フォーラム、長崎市 (2012. Feb. 2-4)
  16. Zhu X, Yahata K, Alexandre JSF, **Kaneko O**. "Recombinant *Plasmodium falciparum* SURFIN<sub>4.1</sub> protein is exported to the parasite-infected red blood cell" (oral) Singapore Malaria Network Meeting 2012, Singapore (2012. Feb. 16-17)
  17. Inoue M, Zoungrana A, Miyakoda M, Tang J, **Kaneko O**, Yui K, Culleton R. "The specificity of immunity against the blood stages and pre-erythrocytic stages of *Plasmodium yoelii*" (poster) Singapore Malaria Network Meeting 2012, Singapore (2012. Feb. 16-17)
  18. Cheng Y, Wang Y, **Kaneko O**, Sattabongkot J, Tsuboi T, Lim CS, Han ET. "Genetic polymorphism of *Plasmodium vivax* msp1p, a paralogue of merozoite surface protein 1, from worldwide isolates" (poster) Singapore Malaria Network meeting 2012, Singapore (2012. Feb. 16-17)
  19. Yahata K, **Kaneko O**. "Time-lapse imaging of red blood cell invasion by rodent malaria parasites" (poster) The 7th Molecular Approaches to Malaria 2012, Lorne, Australia (2012. Feb. 19-23)
  20. 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 のマイクロネーム輸送に必要な配列の同定" (oral) 第 81 回日本寄生虫学会大会、西宮 (2012. Mar. 23-24)
  21. 井上愛美、Zoungrana A、都田真奈、Tang J、**金子修**、由井克之、Culleton R "マラリア赤内期に対する獲得防御免疫とマラリア赤外期に対する獲得防御免疫の種特異性" (oral) 第 81 回日本寄生虫学会大会、西宮 (2012. Mar. 23-24)
  22. **金子修** "マラリア原虫感染赤血球への

分子輸送" (Symposium, oral) 第 81 回日  
本寄生虫学会大会、西宮 (2012. Mar.  
23-24)

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・社会保障国際協力推進研究事業  
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。H22年度までに懸濁化剤として Hydroxymethylcellulose (CMC) を用いた時の血漿中濃度推移を検討したが従来の 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ため、H23年度は複数の添加剤を混合してマイクロエマルジョンを形成する製剤処方を検討した。その結果、溶媒・界面活性剤・補助界面活性剤の組み合わせを変える事でN-89と同程度の抗マラリア活性と同時間血漿中濃度が維持される結果を得た。また、N-89にローダミンを置換させた誘導体を用いてN-89の原虫内取り込みを検討した結果、N-89はマラリア原虫内に特異的に取り込まれ、正常の赤血球への取り込みは見られなかった。この結果はN-89の高い選択毒性と宿主に対する毒性が低い結果を支持する結果であった。

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 の体内動態解析と抗マラリア薬効評価

LC/MS/MS を用いた N-89 の検出条件を

もとに、新しい処方で作成した N-89 の配合率を 0~500mg/g まで含む種々のマイクロセルを作成した。作成した N-89 をマウスに単回投与、あるいは複数回経口投与し、0~12 時間までの血液サンプルを用いて N-89 含有量を測定した。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た。抗マラリア薬効解析は *in vivo* 4-day suppressive test 法で行った。

2. N-89 誘導体を用いたマラリア原虫内局在の解析

N-89 のマラリア原虫内への取り込み能を調べるために N-89 にローダミン色素付加した誘導体を作成して、培養熱帯熱マラリア原虫に作用させ、取り込み能を蛍光顕微鏡下で観察した。作用する化合物の濃度—時間を改変して N-89 の局在変動についても解析した。

C. 研究結果

水に難溶性の N-89 の体内利用率の改善を目指した製剤処方（溶媒・界面活性剤・補助界面活性剤の組み合わせを改変した）を作成した。体内動態解析と抗マラリア薬効評価はネズミマラリア原虫感

染マウスを用いて行った。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クレモポアー、あるいはグリセロールを基本とした溶媒で N-89 は可溶化できた。溶解補助剤と補助界面活性剤としてアプリオール、あるいはカルビトールを混合した処方では N-89 が安定したマイクロセルを形成する事が判った。最低3か月以上室温で放置してもマイクロセルを維持していた。

これら化合物を用いてマウスを用いた体内動態の解析の結果、カプリオール：クレモポアー：カルビトール（配合割合；2：2.7：5.3）の処方では N-89 の血漿中濃度はオリーブオイルで溶解した N-89 と同様の血漿中濃度を示し、且つ抗マラリア効果が改善された（従来の N-89 オリーブオイル溶解 N-89 と比較して ED<sub>50</sub> 値は同程度、一方、ED<sub>90</sub> 値は従来の 80%まで軽減）。この結果は溶媒を改変した N-89 が血漿中で長く維持され、強い抗マラリア活性を発揮したためであると考えられる。しかし、処方改善した N-89 の体内動態解析の結果はオリーブオイルの値と同程度であることから、抗マラリア薬効が増強された結果についての詳細解析がさらに必要になる。

N-89 にローダミンを付加した化合物を用いた局在解析の結果、N-89 は正常赤血球に蓄積する事無く、マラリア原虫にのみ特異的に蓄積した。コントロールとして用いたローダミン色素のみ処理したコントロール君と N-89 処理群での蛍光色素の取り込み能に違いない事から、N-89 はマラリア原虫に特異的に取り込まれ、抗マラリア効果を発揮する事が予想される。また、N-89 の処理時間を長くするとマラリア原虫内への N-89 の蓄積量は多くなるが、正常赤血球への取り込み能の上昇は見られなかった。今回の結ではマラリア原虫の特定部位を同定する事が出来なかったため、今後局在場所を同定するためにさらに解析していく必要がある。

#### 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) は水に難溶性であるため、体内利用率を改善させた新しい製剤化医療が必要になる。今回の研究でマイクロセルを室温で長期間維持しながら高い抗マラリア活性を有し、且つオリーブオイルと同程度の体内動態能を示す新規製剤処方を見出すことが出来た。また、N-89 にローダミンを付加した誘導体を用いた局在解析研究で N-89 はマラリア原虫にのみ特異的に取り込まれる結果を得た。これら結果を基にマラリア流行地で使用可能で且つ作用機序の明らかな新規抗マラリア薬を開発するための解析をさらに進める。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kamata, M., Hagiwara, J., Hokari, T., Suzuki, C., Fujino, R., Kobayashi, S., Kim, H.-S. and Wataya, Y. Applications

- of triphenylpyrylium salt-sensitized electron transfer photo-oxygenation reactions to the synthesis of benzo-fused 1,4-diaryl-2,3-dioxabicyclo[2.2.2]octanes as new antimalarial cyclic peroxides. *Research on Chemical Intermediate* (in press).
2. Sato, A., Kawai, S., Hiramoto, A., Morita, M., Tanigawa, N., Nakase, Y., Komichi, Y., Matsumoto M., Hiraoka, O., Hiramoto, K., Tokuhara, H., Masuyama, A., Nojima, M., Higaki, K., Hayatsu, H., Wataya, Y., and Kim, H.-S. Antimalarial activity of endoperoxide compound 6-(1,2,6,7-tetraoxaspiro[7.11]nonadec-4-yl)hexan-1-ol. *Parasitology International*, 60(4), 488-192, 2011.
  3. Sato, A., Hiramoto, A., Morita, M., Matsumoto, M., Komichi, Y., Nakase, Y., Tanigawa, N., Hiraoka, O., Hiramoto, K., Hayatsu, H., Higaki, K., Kawai, A., Masuyama, A., Nojima, M., Wataya, Y., and Kim, H.-S. Antimalarial activity of endoperoxide compound 6-(1,2,6,7-tetraoxaspiro[7.11]nonadec-4-yl)hexan-1-ol. *Parasitology International*, 60(3), 270-273, 2011.
  4. Taniguchi, T., Kumagai, T., Shimogawara, R., Ichinose, S., Hiramoto, A., Sato, A., Morita, M., Nojima, M., Kim, H.-S., Wataya, Y., Ohta, N. Schistosomicidal and antifecundity effects of oral treatment of synthetic endoperoxide N-89. *Parasitology International*, 60(3), 231-236, 2011.
2. 学会発表
    1. 新規抗マラリア薬・環状過酸化化合物の作用機序解析。林 孝輔, 平本 晃子, 森田 将之, 鎌井 一気, 佐藤 聡, 江 文, 片本 茜, 平岡 修, 平本 一幸, 野島 正朋, 綿矢 有佑, 金 惠淑。第84回日本生化学会大会, 京都, 9/21-24, 2011
    2. New antimalarial drug development research- current status of endoperoxide。Yusuke Wataya, Akiko Hiramoto, Akira Sato, Masayuki Morita, Satoru Kawai, Hye-Sook Kim。International Union of Microbiological Societies 2011 congress, Sapporo, 9/6-16, 2011
    3. 環状過酸化新規抗マラリア薬の開発研究の現況と長期展望。森田 将之, 平本 晃子, 佐藤 聡, 小山 貴彦, 松本 雅弘, 江 文, 鎌井 一気, 岡田 和朗, 脇本 達也, 小林 明日香, 林 考輔, 檜垣 和孝, 平岡 修, 平本 一幸, 野島 正朋, 金 惠淑, 綿矢 有佑。第80回日本寄生虫学会大会, 東京, 7/17-18, 2011
    4. New antimalarial drug development research – current status of endoperoxide。Hye-Sook Kim。第45回寄生虫疾患部会日米合同会議、東京、1/10-11、2011



#### 研究要旨

免疫不全を伴う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* を感染させると肝臓内の CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>抑制性 T 細胞が増加する。今回、免疫組織学的解析を行い、Foxp3 陽性細胞がリーシュマニア原虫感染細胞の周囲に形成された肉芽腫内に存在することを明らかにした。また、肉芽腫組織をレーザーマイクロダイセクション法で回収し *Foxp3*、*IL-10*、*TGF- $\beta$*  の mRNA 発現量を測定したところ、*Foxp3* と *IL-10* の発現量に相関がみとめられた。このことから、リーシュマニアの肝臓内持続機構として、肉芽腫内の抑制性 T 細胞が IL-10 を介して殺原虫活性を抑制する可能性が考えられた。

薬用植物 *Brucea javanica* から抽出したクアシノイド類は抗エバンストリパノソーマ活性を有する。今回、化合物の構造と活性の相関をさらに検討するために、*bruceine A* と *bruceine C* のアセチル誘導体を合成し、抗原虫活性に及ぼす影響を検討した。その結果、C-3,-11,-12 の無保護の水酸基はより強い活性に必須であること、C-11,-12 の水酸基は C-3 の水酸基より活性に重要であること、また、*bruceine C* の C-4' 水酸基のアセチル化は活性に影響を及ぼさないことが明らかとなった。

#### A. 研究目的

(1) マウス内臓リーシュマニア症モデルにおける抑制性 T 細胞の肝臓内局在を明らかにする。(2) 天然薬用植物由来クアシノイド化合物の構造と抗トリパノソーマ活性相関を検討する。

#### B. 研究方法

(1) 抑制性 T 細胞の肝臓内局在について  
マウスの内臓リーシュマニア症モデルでは、原虫の排除と持続感染に肝臓と脾臓のそれぞれにおける臓器特異的な免疫機構が関与している。昨年度の研究から、NF- $\kappa$ B inducing kinase を遺伝的に欠損している *aly/aly* マウスに *Leishmania donovani* を感染させると、原虫が肝臓内に慢性的に持続するが、これには抑制性 T 細胞が深く関与することが明らかになった。本研究では、抗 Foxp3 抗体と抗リーシュマニア抗体を用いた免疫組織学的解析を実施し抑制性 T 細胞の局在を検討した。また、肉芽腫組織をレーザーマイクロダイセクション法で回収し *Foxp3*、*IL-10*、*TGF- $\beta$*  の mRNA 発現量を測定し、抑制性 T 細胞の抑制機構について検討した。

(2) クアシノイド化合物の構造と抗トリパノソーマ活性相関について

ニガキ科の薬用植物に含まれるクアシノイド化合物は広域の抗原虫活性を有し、とくに *bruceine* 類はエバンストリパノソーマに対して低濃度で増殖を抑制することを明らかにしてきた。本研究では、クアシノイド類の化学構造と活性との相関をさらに検討するために、*bruceine A* と *bruceine C* のアセチル誘導体を合成し、抗原虫活性に及ぼす影響

を検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験にあたっては、北海道大学の動物実験に関する規定および北海道大学大学院獣医学研究科の動物施設運営標準操作手順(SOP)を遵守した。

#### C. 研究結果

(1) 抑制性 T 細胞の肝臓内局在について  
抗 Foxp3 抗体と抗リーシュマニア抗体を用いた免疫組織学的解析の結果、Foxp3 陽性細胞はリーシュマニア原虫感染細胞の周囲に形成された肝臓内肉芽腫内に存在することが明らかになった。肉芽腫内には Foxp3 陰性の T 細胞も存在した。また、肉芽腫組織をレーザーマイクロダイセクション法で回収し *Foxp3*、*IL-10*、*TGF- $\beta$*  の mRNA 発現量を測定したところ、*Foxp3* と *IL-10* の発現量に相関が見られた。このことから、肝臓内リーシュマニアの持続機構として、肉芽腫内の抑制性 T 細胞が IL-10 を介して殺原虫活性を抑制しているモデルが考えられた。

(2) クアシノイド化合物の構造と抗トリパノソーマ活性相関について

*Trypanosoma evansi* に対する殺原虫活性機序を解析するために蛍光ラベル *bruceine* 類の合成を試みたが、望みの化合物を得ることはできなかった。その理由として、C2-C3-C4 位の  $\alpha$ ,  $\beta$ -不飽和ケトン官能基が保護基の脱保護に用いる塩基条件に対して不安定であるためと考えられた。次に、*bruceine* 類の重水素ラベルアセ

チル誘導体の合成し、得られた誘導体の *T. evansi* に対する IC<sub>50</sub> を算出した。その結果、C-3,-11,-12 の無保護の水酸基はより強い活性に必須であること、C-11,-12 の水酸基は C-3 の水酸基より活性に重要であること、また、bruceine C の C-4' 水酸基のアセチル化は活性に影響を及ぼさないことが明らかとなった。

#### D. 考察

免疫不全を伴う内臓リーシュマニア症のマウスモデルとして *aly/aly* マウスにドノバンリーシュマニアを感染させると、肝臓内原虫の存続に CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T 細胞(Treg)が関与してことが明らかになったが、免疫不全を伴う人の内臓リーシュマニア症においても同様に、原虫存続に抑制性 T 細胞が関与しているかは興味深い。また、内臓リーシュマニア症の保虫宿主である犬では、不顕性感染として一見正常に見える皮膚組織にも多数の原虫が存在することが知られている。感染犬においても、各種臓器や皮膚に抑制性 T 細胞が誘導されて機能するか否かを検証することが必要であると考えられた。

Bruceine 類の化学構造と活性との関係がより明らかになり、活性部位の保護や誘導体合成にむけたさらなる研究の進展が期待される。

#### E. 結論

免疫不全を伴う内臓リーシュマニア症における肝臓内原虫の存続は、肝臓内肉芽腫内に存在する抑制性 T 細胞によって制御されている可能性が強く示唆された。一方、bruceine 類の化学構造の微妙な違いが抗エバンストリパノソーマ活性に大きく影響することが確認された。

#### F. 健康危険情報

該当せず

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Nonaka N, Nakamura S, Inoue T, Oku Y, Katakura K, Matsumoto J, Mathis A, Chembesofu M, Phiri IGK: Coprological survey of alimentary tract parasites in dogs from Zambia and evaluation of a coproantigen assay for canine echinococcosis. *Ann Trop Med Parasitol* 105, 521-530, 2011
- 2) 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* 60, 84-89, 2011
- 3) Ichikawa M, Bawn S, Maw NN, Htun LL, Thein M, Gyi A, Sunn K, Katakura K, Itagaki T: Characterization of *Fasciola* spp. in Myanmar on the basis of spermatogenesis

status and nuclear and mitochondrial DNA markers. *Parasitol Int* 60, 474-479, 2011

- 4) Kobayashi T, Kanai Y, Oku Y, Matoba Y, Katakura K, Asakawa M: Morphological and molecular characterization of sylvatic isolates of *Trichinella* T9 obtained from feral raccoons (*Procyon lotor*). *Nematol Res* 41, 27-29, 2011
- 5) 片倉 賢: リーシュマニア症. 木村哲, 喜田宏編集, 改訂版 人獣共通感染症, 東京: 医薬ジャーナル社, pp.431-436, 2011
- 6) Elkhateeb A, Tosa Y, Matsuura H, Nabeta K, Katakura K: Antitrypanosomal activities of acetylated bruceines A and C; a structure-activity relationship study. *J Nat Med* 66, 233-240, 2012

##### 2. 学会発表

- 1) 片倉 賢. わが国の寄生虫病の現状と研究開発: 寄生虫病の国内統計、獣医寄生虫学会の活動等について. 平成 22 年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会 シンポジウム (招待講演) 2011 年 2 月 (岐阜)
- 2) Elkhateeb A, Matsuura H, Tosa Y, Nabeta K, Katakura K. Antitrypanosomal activities of acetylated bruceine A, B, and C; a structure-activity relationship (SAR) study. 日本農芸化学会 2011 年度大会. 2011 年 3 月 (京都)
- 3) Tiwananthagorn S, Iwabuchi K, Ato M, Sakurai T, Katakura K. Involvement of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in the persistent infection of *Leishmania donovani* in the liver of immunodeficiency *aly/aly* mice. 第 80 回日本寄生虫学会. 2011 年 7 月 (東京)
- 4) 市川まどか, Pannigan C, Bawn S, Maw NN, Htun LL, Prusert S, 片倉賢, 板垣匡. アジアに分布する肝蛭の系統関係の解明: タイ産およびミャンマー産肝蛭の分子学的解析. 第 80 回日本寄生虫学会. 2011 年 7 月 (東京)
- 5) Tiwananthagorn S, Iwabuchi K, Ato M, Sakurai T, Katakura K. CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in hepatic *Leishmania donovani* persistence. In the 3rd International Young Researcher Seminar in Zoonosis Control, 2011 年 9 月 (札幌)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究要旨

*Trypanosoma cruzi* 感染により発現上昇がおこる宿主アポトーシス抑制因子 c-FLIP および c-IAP の遺伝子を高発現させた培養細胞株を樹立した。また、c-FLIP は感染細胞でニトロソ化され、NO 阻害剤によりアポトーシス抑制が回復した。

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。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ため、各々の高発細胞を樹立する。また、活性窒素産生とニトロソ化、アポトーシス抑制について考察する

B. 研究方法

昨年度の解析で、c-FLIP は宿主細胞内で nitrosylation という分子修飾を受けることがわかったため、biotin switch assay により確認する。また、NO 阻害剤を添加し、アポトーシス抑制が回復するかどうかフローサイトメトリーで解析する。さらに c-FLIP および c-IAP の tag 付き発現ベクターの作製を行い、これら遺伝子の高発現細胞を樹立する。

（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

*T. cruzi* 感染細胞に NO 阻害剤を添加したところ、カスパー 3 の活性化の抑制が解除された。これより、活性窒素産生がアポトーシス抑制に関与していることが示唆された。また、c-FLIP、c-IAP とともに全長を発現させることが困難であった。そこで、ドメインに分割して培養細胞にトランスフェクションし、高発現細胞を樹立した。

D. 考察

活性窒素産生を阻害すると、原虫感染細胞のアポトーシス抑制が回復することから、活性窒素がアポトーシス抑制に関与していることが明らかとなった。c-FLIP のニトロソ化との関連についてはこの反応が可逆的であるため解釈が困難であった。アポトーシス抑制因子の分割した遺伝子を用い細胞樹立ができた。

E. 結論

宿主アポトーシス抑制因子 c-FLIP および c-IAP の遺伝子を高発現させた培養細胞株を樹立した。また、感染細胞において活性窒素が本抑制に関与していることが明らかとなった。

F. 健康危険情報  
該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

The role of VAMP7/TI-VAMP in cell polarity and lysosomal exocytosis in vivo.  
Sato M, Yoshimura S, Hirai R, Goto A, Kunii M, Atik N, Sato T, Sato K, Harada R, Shimada J, Hatabu T, Yorifuji H, Harada A.  
Traffic 2011 12:1383-93

2. 学会発表

第48回 関東甲信地区医学検査学会  
前橋 2011年10月

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

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、2011年においても肺吸虫症と回虫類の幼虫による幼虫移行症が多数を占めた。幼虫移行症の原因虫種の確定は予防などの対策のために必須の情報なので、組換えブタ回虫抗原である As16 がブタ回虫感染とイヌ回虫感染を鑑別できるかを、ブタを用いた感染実験で検討した。その結果、ブタ回虫に感染したブタが産生する抗 As16 抗体は As16 特異的であり、イヌ回虫抗原には結合しないことが明らかとなった。幼虫移行症の病態解明では、ベネズエラ糞線虫のゲノム配列を約 700 本の Scaffold に集約することができた（N50 Scaffold 長=167,301 塩基、最大 Scaffold 長=1,894,427 塩基）。フォスミドライブラリ（冗長度 10.5 x）をもちいて最終的な検定を実施しベネズエラ糞線虫ゲノムの概要配列を公表する。

### 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。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（表 1 は過去 6 年間の集計）。

表 1 宮崎大学医学部寄生虫学における寄生虫症診断実績

原因寄生虫	2006	2007	2008	2009	2010	2011
イヌ回虫/ブタ回虫	82	101	78	49	48	48
アニサキス	4	6	3	2	2	3
顎口虫	0	6	7	9	3	4
鉤虫	0	1	0	1	1	1
マンソン孤虫	3	6	4	5	2	4
肺吸虫	37	46	38	38	45	35
肝蛭	2	3	1	1	3	2
住血吸虫	6	6	4	4	3	6
肝吸虫	0	0	0	0	1	3
糞線虫	1	1	2	0	2	0
広節/日本海裂頭条虫	2	0	1	0	4	2

これらの抗体検査は、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、大きな問題点がふたつある。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抗原間の交叉反応が強く、単純な結合試験では真の原因虫種を明らかにできないことである。とくに動物由来の回虫類による幼虫移行症では、イヌ回虫とブタ回虫では感染経路や疫学に違いがあることが予想されるにも関わらず、現時点では両者を鑑別することは容易ではない。

そこで、幼虫移行症の診断にまつわるこれらの問題点を解決するために、イヌ回虫とブタ回虫の組換え抗原を用いた診断/鑑別システムを開発する。これまでの研究において、組換えブタ回虫抗原 rAs16 と組換えイヌ回虫抗原 r*T.canis*Ag (TES32) の組み合わせがもっとも有望であるので、患者血清で虫種鑑別をおこなうとともに、感染実験により虫種が分かっている感染ブタ血清をもちいて、rAs16 がブタ回虫に特異的なエピトープを含むのかを検討する。

また、幼虫移行症の病態を解明するための基礎的な研究として、体内移行するモデル寄生虫であるベネズエラ糞線虫のゲノム解析を進め、概要配列の公表を目指す。概要配列の決定により、ベネズエラ糞線虫の体内移行期幼虫の発現配列データの解析がより高精度になり、しかも、最近公表されたブタ回虫のゲノムとの比較により、体内移行する線虫に共通する生物学的な性質を探ることができる。

## B. 研究方法

### 1. 組換え抗原による幼虫移行症の虫種決定

#### (1) 組換え抗原

組換えブタ回虫抗原 rAs16 は農業食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究所・細菌寄生虫研究領域の辻尚利博士から、組換えトキソカラ抗原 rT.canisAg は国立感染症研究所・寄生動物部・蠕虫室の山崎浩博士から供与いただいた。

#### (2) 患者血清

患者血清は、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、他の寄生虫疾患（肺吸虫症とアニサキス症）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た。

本研究における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、疫学研究に関する倫理指針、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。

#### (3) ブタ血清

ブタ回虫感染ブタ血清は、コペンハーゲン大学の Stig Milan Thamsborg 教授（Danish Centre for Experimental Parasitology, Department of Veterinary Disease Biology, Faculty of Life Sciences, University of Copenhagen）から供与いただいた。血清は、ブタに虫卵を経口投与して 58、102 日後に採取したものをもちいた。宿主としてマウスやラット等の小動物でなくブタを採用したのは、ブタは生理学的にヒトと近いとされることが理由である。

#### (4) 粗抗原および組換え抗原に対する患者血清の結合

抗体と血清の結合は通常酵素抗体法により評価し、非感染者血清の吸光度の平均+3SD をカットオフ値とした。患者が感染したのがイヌ回虫なのかブタ回虫なのかという推定は、それぞれの抗原に対する吸光度の比をとって、吸光度（イヌ回虫抗原）／吸光度（ブタ回虫抗原）が 2.0 以上であればイヌ回虫、吸光度（ブタ回虫抗原）／吸光度（イヌ回虫抗原）が 2.0 以上であればブタ回虫とした。

#### (5) ブタ回虫特異的エпитープ

イヌ回虫感染とブタ回虫感染を抗体検査によって鑑別することが可能であるためには、検査

にもちいるそれぞれの虫種由来の抗原が、種特異的なエピトープを持っていることが必要である。

そこで、ブタ回虫症の診断用抗原として有望な rAs16 がブタ回虫特異的なエピトープを持っているかどうかをブタ回虫感染ブタ血清をもちいて吸収試験（阻害試験）により検討した。あらかじめブタ血清をインヒビター抗原でインキュベートした後に、rAs16 との結合をアッセイした。抗原のコート濃度は 0.5-1.0 µg/ml、血清の希釈倍率は 1,000 倍とした。

### 2. ベネズエラ糞線虫のゲノム解析

#### (1) 次世代シーケンサによる解析

前年度までに実施していた高速シーケンサ 454 GS-FLX Titanium による 3 回のゲノムフラグメントのシーケンシングに加えて、454 GS-FLX Titanium x 1 run (paired-end 8.0 kb)、Applied Biosystems SOLiD システム x 1 run、Illumina HiSeq 2000 システム x 1 run を実行した。

配列データのアセンブルは、GS-FLX のみのデータでは *de novo* アセンブラの Celera Assembler Version 6.1 をもちいた。HiSeq 2000 のデータは、東京工業大学の伊藤武彦教授の研究グループにより新規に開発されたショートリード用のアセンブラを用いてアセンブルし、さらに GS-FLX と SOLiD による配列データを加えてスキップフォルディングをおこなった。

#### (2) フォスミドライブラリ

フォスミドベクタ pCC1FOS (EPICENTRE) に平均長 40 kb のベネズエラ糞線虫ゲノムを挿入してフォスミドライブラリを構築した。96 穴プレートにクローンを整列化した後、ランダムにピックアップしたクローンのインサート末端の塩基配列をキャピラリーシーケンサによって決定した。

## C. 研究結果

### 1. 組換えブタ回虫／イヌ回虫抗原の患者血清に対する反応性

最初に、回虫類による幼虫移行症診断のゴールドスタンダードともいえる、幼虫の ES（分泌排泄）抗原の各種血清に対する反応性を検討した。もちいた血清の種類は、非感染者血清・回虫類による幼虫移行症患者血清、肺吸虫症患者血清、アニサキス症患者血清である。

結果は、幼虫移行症患者血清はブタ回虫幼虫の ES 抗原 (AsLL3-ES) あるいはイヌ回虫幼虫の ES 抗原 (Tc-ES) に、さまざまな程度に反応したが、非感染血清は結合しなかった。注目すべきは、肺吸虫症患者血清およびアニサキス症患者血清も ES 抗原に結合したことである (図 1)。とくにアニサキス症患者血清のブタ回虫幼虫の ES 抗原の結合は血清診断上無視できないレベルであった。日本人には抗アニサキス抗体陽性の潜在的既往者が多数いることが報告されており、幼虫 ES 抗原の使用の限界を示すデータと考えられる。

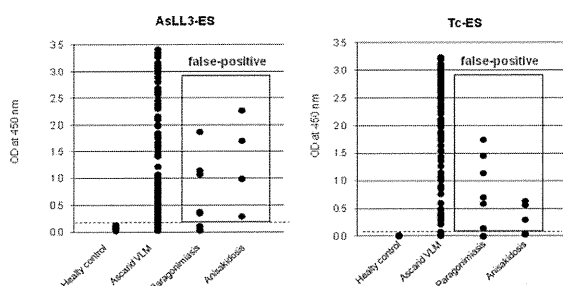


図 1 幼虫 ES 抗原と患者血清の反応性

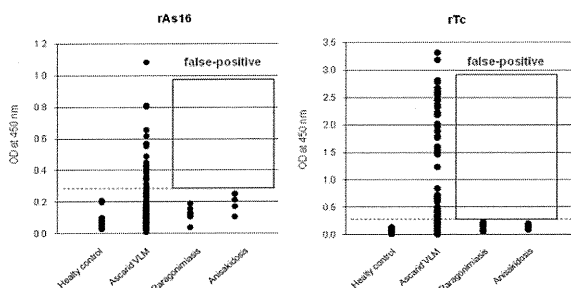


図 2 組換え抗原と患者血清の反応性

一方、同様の結合試験を組換え抗原でおこなうと、吸光度が全体として低くなり、幼虫移行症患者血清であっても陰性と判断される例が出現した。しかしながら、肺吸虫症患者血清およびアニサキス症患者血清の偽陽性反応は消失し、診断の特異性は高くなった (図 2)。したがって、少なくとも現段階では組換え抗原は陽性症例をすくい上げるスクリーニング検査ではなく、虫種決定のための精査にもちいられるべきだと考えられた。

## 2. 幼虫 ES 抗原および組換え抗原による幼虫移行症の原因虫種の推定

幼虫移行症患者血清 120 サンプルの、ブタ回虫幼虫の ES 抗原 (AsLL3-ES) とイヌ回虫幼虫の ES 抗原 (Tc-ES) への結合を比較し、それぞ

れの血清がどちらの幼虫による感染なのかを推定した。その結果、イヌ回虫と判断されたものが 64 例 (53.3%)、ブタ回虫と判断されたものが 9 例 (7.5%) で、どちらも判定できないものが 47 例 (39.2%) に達した。

そこで次にこの 47 サンプルについて、イヌ回虫とブタ回虫の組換え抗原に対する反応性を比較した。すると、組換えイヌ回虫抗原 (rTcAg) への反応が強く、イヌ回虫症と判断されたものが 26 例、組換えブタ回虫抗原 (rAs16) への反応が強く、ブタ回虫症と判断されたものが 1 例、どちらも判定できなかったものが 20 例であった。結果として、120 サンプルのうち、イヌ回虫症が 90 症例 (75.0%)、ブタ回虫症が 10 例 (8.3%)、虫種不明が 20 例 (16.7%) となった。

## 3. 組換えブタ回虫抗原 rAs16 特異的エピトープ

前項で述べた結果はヒト血清をもちいたものであり、患者が実際に感染していたのがイヌ回虫なのかブタ回虫なのかを確定させることは原理的に不可能である。そこで、幼虫移行症全体の中からブタ回虫症を見分けることが可能か否かを、ブタ回虫感染ブタ血清をもちいて検討した。

ブタ回虫感染ブタ血清の、ブタ回虫幼虫の ES 抗原 (AsLL3-ES)、イヌ回虫幼虫の ES 抗原 (Tc-ES)、そして組換えブタ回虫抗原 rAs16 への結合をみた。AsLL3-ES に対しては全例陽性で、吸光度も Tc-ES より高値であった。Tc-ES に対しては陰性のブタもみられた。抗 rAs16 抗体は、ヒトの場合と同じように吸光度は低かったが全例陽性であった (図 3)。

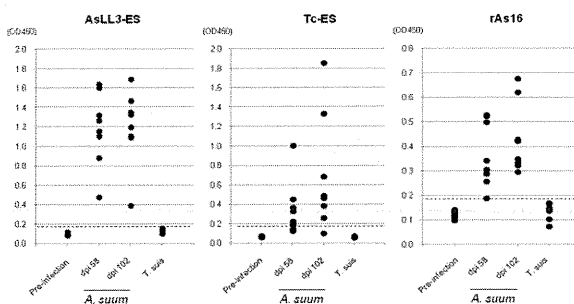


図 3 ブタ回虫感染ブタ血清と組換え抗原との反応性

この抗 rAs16 抗体がブタ回虫特異的なエピトープを認識しているかを確認する目的で、ブタ血清をあらかじめイヌ回虫 ES 抗原 (Tc-ES) と反応させて結合試験を実施した。その結果、

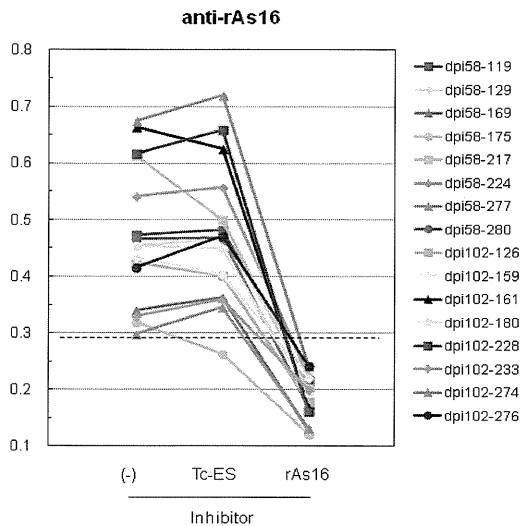


図 4 ブタ回虫感染ブタ血清と rAs16 との結合におけるトキソカラ抗原と rAs16 の阻害効果

ブタ回虫感染ブタが産生している抗 rAs16 抗体の rAs16 への結合は、rAs16 によって完全に阻害されたが、Tc-ES からは何の影響も受けなかった (図 4)。従ってブタ回虫感染ブタが産生している抗 rAs16 抗体は、イヌ回虫抗原には存在しないエピトープを認識していることが明らかとなった。

#### 4. 新型シーケンサによるベネズエラ糞線虫のゲノム解析

前年度までに実施していた高速シーケンサ 454 GS-FLX Titanium による 3 回のゲノムフラグメントのシーケンシングでは、得られたコンティグの総数は 18,716 個、平均コンティグ長 2,958 塩基、N50 コンティグ長 11,789 塩基、最大コンティグ長が 200,865 塩基であった。コンティグが小さなフラグメントに分断されているのは、ベネズエラ糞線虫ゲノムの GC 含量が 25.6%と低いことが大きな原因と考えられた。

この配列データに 8.0 kb のペアエンドライブラリの配列データを加えてアセンブルしたところ、スキップフォルド (スーパーコンティグ) の総数は 686 個、N50 スキップフォルド長 150,827 塩基、最大スキップフォルド長は 974,119 塩基と大幅にデータを改善させることができた (表 2)。

さらに、Illumina HiSeq 2000 および Applied Biosystems SOLiD による各 1 run を行い、東京工業大学の伊藤武彦教授の研究グループにより

新規に開発されたショートリード用のアセンブラを用いてアセンブルしたところ、スキップフォルドの総数は 703 個、N50 スキップフォルド長 167,301 塩基、最大スキップフォルド長は 1,894,427 塩基となった (表 2)。

この新たな解析で、スキップフォルド総数に大きな変化はなかったが、初めて 1Mb 以上のスキップフォルドを得ることができた。また、大幅に改善した点として、GS-FLX Titanium によるフラグメントとペアエンドのみのデータではギャップが 30.2%もあったのに、イルミナと SOLiD を加えた後ではギャップはわずか 2.0%にまで減少した (表 2)。これは、十分に概要配列として公表できるだけのデータが得られたことを意味する。

表 2 次世代型シーケンサを用いたベネズエラ糞線虫ゲノムのアセンブル結果

	GS-FLX 3x fragment+ 1x paired end	GS-FLX + HiSeq2000+SOLiD
scaffold number	686	703
max length (nt)	974,119	1,894,427
N50 (nt)	150,827	167,301
gap (%)	30.2	2.0
total length (nt)	48,409,213	49,723,237

#### 5. ベネズエラ糞線虫ゲノムのフォスミドライブラリの作成

フォスミドベクタ pCC1FOS (EPICENTRE) にシアリングによって調整した平均長 40 kb のベネズエラ糞線虫ゲノムを挿入してフォスミドライブラリを構築した。1 x 10<sup>5</sup> オーダーのクローンが得られたので、約 3 万クローンをピックアップし、96 穴プレートに整列化して凍結保存した。

そのうち 192 クローンについてインサート両端のシーケンシングを行ったところ、ベネズエラ糞線虫ゲノムは約半数のクローンに過ぎず、残りは細菌などに由来する配列と考えられた。しかしながら、新型シーケンサのデータからベネズエラ糞線虫のゲノムサイズは約 50Mb と推定されており、クローンの半数が細菌等であってもライブラリがカバーする冗長度は 10.5 x であり (40 kb x 15,000 クローン = 60,000 kb)、今後の解析に十分に利用可能であると考えられた。

#### 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、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おらず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、ならびに抗体陽性と判定される場合でも、原因虫種が何なのか確定できない場合があることが、問題点として指摘される。

以上のような問題点を解決するために、われわれは組換え抗原をもちいた検査システムの構築を進めている。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、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だからである。

前年度までの研究において、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 と組換えイヌ回虫抗原 rTcAg の組み合わせで感染虫種を絞れる見通しが付いており、実際に患者血清 120 サンプルについて組換え抗原による虫種鑑別を実施したところ、どうしても鑑別できなかったサンプル数は 20 (16.7%) にとどまった。

ただし、臨床サンプルをもちいた検討では真の原因虫種は確定できないので、どうしても感染実験によって検査の感度と特異性を確認する必要がある。通常はマウスやラットなどの小動物で検討するが、今回われわれはブタをもちいることにした。これは、ブタはヒトの回虫とごく近縁のブタ回虫の宿主になり得ることから、免疫生理学的にヒトとブタは類似していると考えられるからである。

ブタ血清をもちいたアッセイにより、ブタ回虫感染ブタが産生している抗 rAs16 抗体は、イヌ回虫には存在しないエピトープを認識していることが明らかとなった。これは rAs16 による血清診断が合理的であることを意味しており、今後はイヌ回虫感染ブタが産生する抗 rTcAg 抗体がブタ回虫には存在しないエピトープを認識していることを明らかにできれば、このふたつの組換え抗原を使った検査システムにより虫種

鑑別が可能であると証明できる。すでにブタをもちいた感染実験が進行中であり、今後の成果が期待できる。

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は、ベネズエラ糞線虫ゲノムの解析が大きく進捗した。高速シーケンサ GS-FLX Titanium による3回のゲノムフラグメントシーケンシングと 8.0 kb のペアエンドライブラリ 1 run のデータにより、20,000 近かったコンティグを数百本にまとめることができた。さらに Illumina HiSeq 2000 システムによる膨大な配列データと新規アセンブラの投入により、概要配列の公表に近いところまで達することができた。

今後は Fosmid クローンの配列とアセンブル結果を比較し、バイオインフォマティクスが産出したデータが真の配列とどのくらい近いかを決定する。ベネズエラ糞線虫のゲノム解析には先行研究がなく、遺伝子地図や物理地図のないところから出発した。しかもベネズエラ糞線虫は純系ではないので相同染色体の間で塩基配列が異なっている。このような悪条件下でもゲノム解読が可能であれば、今後の真核生物病原体の研究に大きな弾みがつくと考えられる。

#### 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抗原 rTcAg 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のゲノム解読が、概要配列の公表に近いところまで到達した。

#### F. 研究発表

##### 著書

1. 丸山治彦：幼虫移行症（イヌ糸状虫症、動物由来の回虫症、顎口虫症、旋尾線虫症を含む）（今日の治療指針 2012、山口徹、北原光夫、福井次矢編）、pp.246-247、医学書院（東京）（2012年1月1日）
2. 丸山治彦：肺吸虫症（感染症事典、感染症事典編集委員会 p. 552-557、オーム社（東京）、2012年1月10日）
3. 木村幹男、丸山治彦：抗原虫薬・抗蠕虫薬（治療薬ハンドブック 2012、高久史磨監修、p.



1321-1329、じほう（東京）、2012年1月15日

#### 総説

1. 丸山治彦：寄生虫疾患の各種診断法と漏らさないための検査システムの提案 *Clinical Parasitology* 22: 24-39, 2011

#### 原著論文

1. Yoshida A, Nagayasu E, Horii Y, Maruyama H: A novel C-type lectin identified by EST analysis in tissue migratory larvae of *Ascaris suum*. *Parasitol Res* DOI 10.1007/s00436-011-2677-9, 2011

#### 症例報告

1. Izumikawa K, Kohno Y, Izumikawa K, Hara K, Hayashi H, Maruyama H, Kohno S: Eosinophilic pneumonia due to visceral larva migrans possibly caused by *Ascaris suum*: a case report and review of recent literatures. *Jpn J Infect Dis.* 64 (5): 428-32. 2011
2. Yamazaki H, Yamaguchi K, Iwase T, Niki T, Kusunose K, Tomita N, Taketani Y, Yamada H, Soeki T, Wakatsuki T, Fukunaga Y, Nakanishi H, Maruyama H, Matsuoka H, Sata M: A patient who developed toe necrosis due to poor blood circulation after an interdigital tick bite. *Journal of Cardiology Cases* 4, e106—e109, 2011
3. 河野仁寿、近藤晃、金沢祐星、原耕平、泉川欣一、泉川公一、河野茂、丸山治彦、林洋子：好酸球増多を伴った糞線虫症の1例 長崎医学会雑誌 86 (3): 129-133. 2011

#### 学会発表

1. 吉田彩子、長安英治、堀井洋一郎、丸山治彦：ファージディスプレイ法を用いたブタ回虫症血清診断用抗原候補分子の検索、第80回日本寄生虫学会大会（東京）
2. 吉田彩子、Peter Nejsum, Stig Milan Thamsborg、丸山治彦：ブタ回虫体内移行期幼虫の発育決定分子の同定を目指して、第5回蠕虫研究会（宮崎）
3. Yoshida A, Nejsum P, Thamsborg SM: Identification of key molecules for the development of *Ascaris suum* by comparing transcriptome of migrating larvae in adequate host and inadequate host., NORDFORSK WORKSHOP 2011: Nordic Network on Veterinary Parasitology
4. 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80回日本寄生虫学会大会（東京）

5. 長安英治、糞線虫フェロケラターゼ（鉄挿入酵素）の同定とその起源・役割についての考察、第5回蠕虫研究会（宮崎）
6. Chakraborty G, Nagayasu E, Yoshida A, Maruyama H: Development of Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for rapid and sensitive detection of *Strongyloides*, XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology (6-10 September 2011, Sapporo)
7. Nagayasu E, Ogura Y, Ito T, Yoshida A, Chakraborty G, Hayashi T, Maruyama H: Transcriptome sequencing of *S. venezuelensis*, an animal parasitic nematode. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology (6-10 September 2011, Sapporo)
8. Maruyama H: Genome and transcriptome analysis of *Strongyloides venezuelensis*, an intestinal nematode of rats. (Symposium: What Makes Worms Parasitic? - Understanding the Molecular Basis for Parasitism), XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology (6-10 September 2011, Sapporo)
8. 長安英治、糞線虫の持つプロテオバクテリア様フェロケラターゼ遺伝子の解析、第19回分子寄生虫ワークショップ（神戸）

#### 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

厚生労働科学研究費補助金（平成 23 年度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  
住血吸虫症の検査・診断・対策に関する研究

分担研究者	大前 比呂思	国立感染症研究所 寄生動物部
研究協力者	千種 雄一	獨協医科大学 熱帯病寄生虫病室
研究協力者	Eyal Leshem	The Center for Geographic Medicine and Tropical Diseases, Chaim Sheba Medical Center, ISRAELI

**研究要旨** 今世紀に入り東南アジアでは、新たに住血吸虫症有病地が確認された。これらの有病地については、有病地が新たに出現したのか、或いは、潜在的に存在した有病地が拡大したのかを明らかにすることが、今後の対策を考えるうえでも重要である。フィリピンやインドネシアでは、新たに日本住血吸虫症有病地が報告されているが、メコン住血吸虫症についても、ラオス北部で感染したとの旅行者の報告があり、まだ確認されていない有病地が存在している可能性がある。そこで、住血吸虫症が疑われたイスラエル人旅行者の保存血清を用いて、メコン住血吸虫卵による SMP-ELISA を行ったところ、14 人中 6 人で陽性となり住血吸虫の感染が強く疑われ、ラオス北部に未知の有病地が存在する可能性が指摘された。SMP-ELISA で陽性となった 6 人の旅行歴から最も可能性の高い Van Vieng 地域では、雨季に環境調査も行ったが、媒介貝：*Neotricula Aperta* は見つけることができなかった。

## A. 研究目的

現在世界的には、多くの住血吸虫症有病地で、プラジカンテルによる集団治療は大きな成果をあげているが、一方では有病地の拡大も懸念され、今世紀に入りフィリピンやインドネシアでは、新たに日本住血吸虫症有病地が複数確認された。これらの有病地が、従来の有病地からの感染者や感染員の移動により新たに出現したのか、或いは、潜在的に存在した小規模な有病地が拡大したのかを明らかにすることは、今後の対策を考えるうえで重要である。

フィリピンの日本住血吸虫有病地では、免疫血清診断や腹部超音波検査を利用した疫学調査で、両地域を区別する方法につい

て検討することができたが、メコン住血吸虫については、従来、特異性の高い免疫血清検査がなかった。最近、過ヨウ素酸ナトリウム (sodium metaperiodate) で処理した虫卵抗原を用いた場合、メコン住血吸虫症でも偽陽性の例が減ることが確認されたので (図)、メコン住血吸虫症の新規流行が疑われるラオスの Van Vieng 地域で、媒介貝生息に関する基礎的調査を行うこととした。

## B. 研究方法

まず、2006 年から 2010 年にかけてラオスの Van Vieng 地域を旅行し、帰国後に腹痛や血性下痢などの住血吸虫症様症状を示し

た 14 人のイスラエル人旅行者の保存血清を用いて、メコン住血吸虫卵抗原による SMP-ELISA をおこなった。これらの旅行者は、ラオス旅行中、従来からメコン住血吸虫症有病地として知られるラオス南部のコーン島周辺には、全く立ち寄っていない。また、2011 年 11 月には、メコン住血吸虫の媒介貝である *Neotricula aperta* が生息しているかどうか、Van Vieng 地域で環境調査を行った。

#### ( 倫理面への配慮 )

被検者には、検査結果を個別に伝えると同時に、検査結果の研究への利用については、書面で同意を得て行った。また、環境調査は、ラオス共和国保健省が行う住血吸虫症対策事業の一環として行われた。

### C. 結果

ラオスの Van Vieng 地域での感染が疑われたイスラエル人旅行者については、14 人中 6 人が、メコン住血吸虫卵による SMP-ELISA で陽性を示した ( 表 )。一方、日本住血吸虫卵でも陽性を示したのは、3 人とどまり、その 3 人はいずれもメコン住血吸虫卵を用いた検査でも陽性を示した。しかしながら、11 月に実施した環境調査では、Van Vieng 地域の河川、湖沼において *N. aperta* の生息は確認されなかった。

### D. 考察

ラオス旅行中の外国人旅行者の感染例の検査結果からは、従来メコン住血吸虫症の

報告がない Van Vieng 地域での罹患が強く疑われた。また今年度は、メコン住血吸虫の媒介貝である *N. aperta* の生息地に関する調査を行ったが、その生息は確認できなかった。ただし、*N. aperta* は、カンボジアのメコン住血吸虫症流行地においても、乾季 ( 2 ~ 5 月 ) 以外は、殆ど見つけることができない。メコン住血吸虫症の新流行地については、地理情報システムを利用した環境調査や住民を対象とした疫学調査の継続が求められ、フィリピンの新しく発見された流行地で試みられた手法での調査が求められる。制圧に向けた動きが加速するなか、今後は、糞便検査と並んで、広い範囲で住民の血清疫学調査をあわせて行うべきと判断された。

### E. 結論

ラオス旅行中の外国人旅行者の保存血清を用いた、メコン住血吸虫卵による SMP-ELISA の結果から、従来メコン住血吸虫症の報告がないラオス北部での、感染リスクが疑われた。しかし、雨季に行った現地調査では、媒介貝の生息を確認することはできなかった。

### F. 健康危険情報

特になし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Kirinoki M, Chigusa Y, Ohmae H,

Matsumoto J, Kitikoon V, Sinuon M,  
Saem C, Socheat D, Matsuda H.  
Efficacy of sodium metaperiodate  
(SMP)-ELISA for the serodiagnosis of  
schistosomiasis mekongi.

*Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth*  
2011, 42:25-33.

- 2) 大前比呂思, 千種雄一, 桐木雅史,  
Muth Sinuon, Duong Socheat.  
住血吸虫症に対するプラジカンテル  
投与方法に関する考察 - 1回投与か  
分割複数投与か-  
臨床寄生虫学会誌 2011, 22:54-58.

## 2. 学会発表

- 1) 大前比呂思, 千種雄一, 桐木雅史,  
Muth Sinuon, Duong Socheat.

住血吸虫症に対するプラジカンテル  
投与方法に関する考察 - 1回投与か  
分割複数投与か-

第 22 回臨床寄生虫学会 東京都  
2011 年 7 月 14 日

- 2) 桐木雅史, 林尚子, Muth Sinuon, Duong  
Socheat, 大前比呂思, 千種雄一, 松  
田肇  
メコン住血吸虫症の感染リスクマッ  
プの作成に向けて  
第 81 回寄生虫学会 兵庫県西宮市  
2012 年 3 月 23-24 日

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし