

201204004A

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
(国際医学協力研究事業)

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

(H24-国医-指定-004)

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 平山謙二

平成 25 (2013) 年 3 月

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
(国際医学協力研究事業)

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

(H24－国医－指定－004)

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 平山謙二

平成 25 (2013) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

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

平山謙二 1

II. 分担研究報告

1. 日本住血吸虫性肝線維症感受性と関連するHLA-DRB1*15:01遺伝子頻度の
高齢者での減少

平山謙二 11

2. 原虫症治療標的分子の機能解析

北 潔 15

3. アジアの三日熱マラリア原虫の遺伝的多様度と伝播動態の解明

狩野繁之 21

4. ワクチン分子の無細胞系合成システムの確立

坪井敬文 23

5. 赤痢アメーバの病原機構の解明

野崎智義 30

III. 研究協力者報告書

1. フィラリア症の疫学研究（診断法の開発と野外応用）

伊藤 誠 33

2. フィラリア線虫と媒介節足動物の相互関係の解明

辻 尚利 37

3. 日本住血吸虫症の病態発現分子解析

太田伸生 39

4. 寄生蠕虫の寄生適応および免疫修飾機構の研究

金澤 保 43

5. 慢性フィラリア症対策に関する疫学研究

我妻ゆき子 45

6. マラリア原虫の宿主細胞認識と侵入機序の解析

鳥居本美 47

7. 寄生虫感染で誘導される肺好酸球の防御機能の解明

中西憲司 50

8.	遺伝子導入マラリア原虫による有用蛋白質供給の研究	松岡裕之	55
9.	マラリアにおける宿主病原体相互関係の解析	久枝 一	57
15.	マラリア感染におけるT細胞免疫応答の研究	由井克之	59
16.	マラリア原虫感染赤血球膜タンパク質輸送の解析	金子 修	62
17.	マラリア原虫に有効な新規阻害剤の探索	金 惠淑	66
18.	住血原虫症の伝播、病態、創薬に関する研究	片倉 賢	69
19.	トリパノソーマの防御応答回避メカニズムの解析	嶋田淳子	72
20.	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	丸山治彦	74
21.	住血吸虫症の検査・診断・対策に関する研究	大前比呂思	79
22.	人獣共通寄生原虫・蠕虫症の寄生適応に関する分子生物学的解析	奈良武司	85
23.	人獣共通幼条虫症（脳囊虫症、エキノコックス症）の病態、診断、治療、 予防に向けた研究	伊藤 亮	89
IV.	研究成果の刊行に関する一覧表		97
V.	研究成果の刊行物・別刷り		117

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

研究代表者 平山謙二 長崎大学熱帯医学研究所・教授

研究要旨 アジア地域は多様な地理的環境と多様な民族により構成されているが、東南アジアを中心に熱帯地域が広がっている。これらの地域ではいまだに寄生虫感染症の患者が多数存在し、住民の健康に重大な影響を与えているばかりでなく、社会経済学的な影響も大きい。これら主要な寄生虫疾患の制圧を目指した新たな治療・予防法の開発を最終目標として、疾患別にグループを組み、各疾患の制圧を目指した基礎研究から応用研究を幅広く行い、真に地域の健康増進に資する研究を推進した。対象とした寄生虫疾患あるいは領域は以下のものである。（１）マラリア、（２）住血吸虫症、（３）フィラリア症、（４）住血原虫症（トリパノソーマ、リーシュマニア症など）、（５）新興・再興感染症（腸管寄生原虫症、腸管寄生ぜん虫症、エキノコックス症、人獣共通感染症など）、（６）媒介昆虫領域である。上記の対象疾患の制圧に資する学術的な知見を得るために以下のようなアプローチで多様な研究を展開した。a) 保有宿主や媒介動物を含めた感染動態や伝播経路に関わる基礎研究、b) 病原体の寄生適応の分子メカニズム、c) ヒトの防御免疫および病態生理。

研究分担者

平山謙二 長崎大学熱帯医学研究所・教授
北 潔 東京大学大学院・医学系研究科・教授
狩野繁之 国立国際医療研究センター研究所・部長
坪井敬文 愛媛大学無細胞生命科学工学研究センター・教授
野崎智義 国立感染症研究所・部長

研究協力者

伊藤 誠 愛知医科大学医学部・教授
辻 尚利 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究所・主任研究員
太田伸生 東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授
金澤 保 産業医科大学・教授
我妻ゆき子 筑波大学大学院人間総合科学研究科・教授
鳥居本美 愛媛大学大学院医学系研究科・教授
中西憲司 兵庫医科大学・教授
松岡裕之 自治医科大学・教授
久枝 一 群馬大学大学院医学研究科・教授
由井克之 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・教授
金子 修 長崎大学熱帯医学研究所・教授
金 惠淑 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・准教授
片倉 賢 北海道大学大学院獣医学研究科・教授
嶋田淳子 群馬大学医学部・教授
丸山治彦 宮崎大学医学部・教授
大前比呂思 国立感染症研究所・室長
奈良武司 順天堂大学大学院医学研究科・准教授
伊藤 亮 旭川医科大学・教授

A. 研究目的

アジアに広がる寄生虫疾患に関する基礎研究を推進し、その制圧、予防、治療に資する革新的な知見を集積することを目的とする。多くの寄生虫疾患は「見捨てられた病気」として分類され、途上国や研究環境の貧弱な地域で流行し、たくさんの命が奪われ、あるいは脅かされ続けている。この分野に光を当て、現地の研究者も含めて新しくより効率的な制圧法を開発することは日本や欧米先進国の役割である。本研究課題を推進することにより、アジア地域の研究者を巻き込んだ共同研究を活性化することが可能となる。また、寄生虫疾患という環境に密着した感染症に関する研究に日本やアジア地域の若手研究者が参加することで、新たな医科学領域の後継者を育成することが可能となる。

B. 研究方法

マラリア、住血吸虫症、フィラリア症、住血原虫症、新興再興感染症、媒介昆虫の6つの疾患において、以下のような観点から分子レベルでの研究を行った。

A) 感染伝播メカニズム B) 寄生虫の宿主適応 C) ヒト防御免疫および病態生理 (倫理面への配慮)

本研究計画においてはアジアの流行地域での疫学調査の実施も含まれるので、WHOの基準に従った倫理基準に基づいて実施された。血液などの試料提供者には研究主旨を説明した上で自由意思による同意を書面で得た。また、ヒト資料については匿名化を行った。今年度実施分については各分担研究者が所属機関とカウンターパートの機関において倫理審査を得た上で研究を開始するべく準備中である。動物実験についても各所属機関の動物実験審査の承認を得てから実施した。なお、計画にはヒトゲノム・遺伝子解析も含んでいる

- ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針
- 疫学研究に関する倫理指針
- 遺伝子治療臨床研究に関する指針

- 臨床研究に関する倫理指針
- 疫学・生物統計学の専門家の関与有
- 臨床研究登録予定無

C. 研究結果

東南アジアの寄生虫疾患制圧への貢献をめざして、住血吸虫症の流行状況の把握や病害の程度、マラリアの診断技術やワクチン開発、糸虫症の血清診断法の開発普及、リーシュマニア症の防除プログラムなど常に患者の存在を意識して具体的な成果を挙げられるような研究を行った。

上記目的のために厳選した各領域の専門家を配し、各研究計画に沿ってアジア各地のフィールド研究や研究者交流を進めた。各研究者のこれまでの実績と現地研究者グループとの親密な信頼関係の上に立っている。これまでの発表論文にはアジアの研究者の名前と役割が明確に記述されているが、本計画においても論文報告の際に具体的な関与を明確に示している。

班員間の連携を促進するために人材育成や研究プロジェクトの協力体制をより強化する。グループ全体としての数年以内にアジアという広大な地域に流行する多様な寄生虫疾患の制御に資する先端研究を推進しワクチンや診断薬の開発を具体化することを最終的な目的であるので、そのための有望な研究を今後も厳選し、そのより大きな成果をめざすことができる理想的なグループをさらに模索する予定である。

個別の疾患グループの成果

【住血吸虫症】

■平山謙二はフィリピンの流行地での慢性期における肝線維化や肝硬変などによる死亡率が上がるのが感受性HLAクラス2アレルの高年齢層における頻度の減少を引き起こしている可能性を示すことができた。今後このマーカーを用いた重点的な線維化の治療標的患者の選定について医療経済学的な検討を行う必要がある。●太田伸生は、日本住血吸虫

感染マウスの系を用いて肉芽腫性炎症誘導に関わるイニシエーション機構と調節について検討し、マクロファージを *in vitro* で虫卵抗原 (SEA) により刺激すると IL-13 の発現が特異的に上昇し、その刺激を受けたマクロファージがさらに IL-6 などの炎症性サイトカインや IL-10 などの抑制性サイトカインの mRNA 発現を誘導する事を明らかにした。肉芽腫性炎症発現に必要な初期応答として、SEA によるマクロファージからの IL-13 産生が重要な調節を担う事が示唆され、新規の治療・予防戦略への情報となるものと考えられた。

●金澤保は、マンソン住血吸虫 (Sm) が 1 型糖尿病 (T1D) の誘発型モデルである多回・低用量ストレプトゾトシン誘発糖尿病を抑制するメカニズムを解明するために、Sm 感染マウスの膵臓および膵リンパ節における関連遺伝子の発現について解析し、モデルマウスで上昇する IFN- γ , IL-1 β , TNF- α , FasL, IL-6 の発現が Sm を感染させたマウスにおいては、ほとんどの発現が抑制され、IL-4 や Arg-1 など T1D を抑制する因子が上昇することをつきとめた。感染症と自己免疫疾患の関連性を示す重要な研究である。

■大前比呂思は、カンボジア国内での寄生蠕虫感染状況を、3 つの省で比較した。タイ肝吸虫症の感染率は、プラジカンテル集団治療が毎年行われてきた Kratie 省の村落では 0 ~ 1.8% と低く、一方、鉤虫の感染率に差は見られなかった。プラジカンテルによる集団治療は、メコン肝吸虫症対策にも有効であることが示された。しかし、メベンダゾールは、鉤虫感染にはあまり効果がなかった可能性が高い。集団治療のサーベイランスの重要性が示された。

【マラリア】

■狩野繁之は、長期間の韓国の三日熱マラリア検体を用い、マイクロサテライト多型情報を用いてマラリア対策による原虫集団の変動について解析し、Structure 解析の結果、2002 年ごろを境に *Pv* 集団が遺伝的に大きく変化していることが明らかとなった。また年毎の *Pv* 集団間の遺伝的分化度を推定した結果、2001 年と 2002 年の集団間で有意に分化していることが明らかとなった。新たな *Pv* 株が継続的に韓国に流入していると推察され、このことが再流行から約 20 年経過した現在でもなお、同国が三日熱マラリアを制圧できずにいる原因だと推察された。●坪井敬文は、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いることによ

り、熱帯熱マラリア原虫メロゾイト期に特異的な分子のビオチン化マラリアタンパク質アレイを作製した。これをマラリア免疫ヒト血清を用いてスクリーニングし、マラリア防御抗体と特異的に反応する PfMSPDBL1 を見出した。さらに、抗 PfMSPDBL1 抗体が培養熱帯熱マラリア原虫の増殖阻害活性を有することを明らかにした。その結果、それまで解析が全く行われていなかった未知の原虫分子 PfMSPDBL1 がマラリア赤血球期ワクチン候補となる可能性が示唆された。●鳥居本美は、ネズミマラリア原虫 (*Plasmodium berghei*) を用いて、メロゾイトのロプトリー分子がスポロゾイトにおいても発現しているか否か、その発現プロファイルと詳細な局在解析を目的として研究を実施した。12 個のロプトリータンパク質について、オーシスト内スポロゾイトと唾液腺スポロゾイトにおける当該分子タンパク質の発現および局在を解析した結果、これらのロプトリータンパク質がスポロゾイトにおいて発現していること、また、これらの分子がスポロゾイトのロプトリーに局在することを確認した。ワクチンの標的としての可能性を強く示唆するものである。

●久枝一は、マラリア原虫が MHC class I 分子を発現する赤芽球に感染すること、さらには CD8⁺ T 細胞が感染赤芽球を認識して活性化されることを明らかにした。T 細胞の抗原認識機構に新たな可能性を示したものである。

●由井克之は、ワクチン開発の際に問題となる免疫記憶細胞の動態をマウスモデルで解析し *Plasmodium berghei* ANKA 感染のマウス実験モデルを用い、CD8⁺ T 細胞の免疫記憶の誘導と記憶 T 細胞の応答に関して解析を行った。その結果、マラリア原虫感染治癒後記憶 CD8⁺ T 細胞が形成されること、記憶 CD8⁺ T 細胞の原虫感染に対する免疫応答はナイーブ T 細胞の応答に比べてより強く抑制されることが明らかになった。●金子修は、

熱帯熱マラリア原虫の病原性に関わる接着分子等のマウレル裂を経て赤血球表面に輸送される分子輸送機構の解明をめざした。マウレル裂と感染赤血球表面に局在する接着分子候補である SURFIN_{4.1} は感染赤血球へ輸送されており、その輸送にはアミノ末端側配列が必須で、かつ膜貫通領域周辺配列が輸送効率に大きく影響することがわかった。抗マラリア剤の標的分子となる可能性が示された。■金恵淑は、過酸化構造を有する有機合成品、及び天然生薬資源由来の化合物、計 31 種について *in vitro* での薬効評価を行った。*In vitro* 薬効評価に用いた計 31 種の化合物は、いずれも 1 μM 程度で熱帯熱抗マラリア活性を示すか、あるいは、それ以下の濃度で阻害活性を示した。哺乳動物細胞への細胞毒性も解析したが、阻害活性は抗マラリア活性と同等、あるいは若干弱く、結果として 10 倍以下の選択毒性を示すことが分った。

【フィラリア症】

■伊藤誠は、尿免疫診断法に改良を加えることにより、測定の手数を減らし、抗体あるいは抗原結合プレート常温で長期間保存できるようにした。LAMP 法による媒介蚊中のフィラリア由来 DNA 検出法を定量化し、フィラリア伝播調査の精度を上げることができた。尿診断法と LAMP 法は「住民に優しい」フィラリア症制圧のための疫学調査を可能にする。●辻尚利は、病原体を伝播する吸血性節足動物（ベクター）の吸血行動の中心器官である中腸には、宿主血液を効率よく消化するヘモグロビン分解経路が存在し、蛋白分解酵素とその阻害剤の連携・協調作用によって制御されていること、特に、マダニ中腸カテプシン（HICPL-A）をノックダウンしたマダニでは有意な致死率が認められたことから、HICPL-A が吸血行動を支えるヘモグロビン分解経路の中心的役割を果たしていることを明らかにした。またマダニのヘモサイトに発現するキモトリプシンインヒビター様分子（HICHI）が、恒常性維持に不可欠であることが示された。ベクターコントロールのための新たな薬剤開発に資する研究である。■我妻ゆき子は、フィラリア症の慢性有病率対策に関して、特にその薬物治療後も長引く disability であるリンパ性浮腫に関して、その重症化予防と治療のためのフィールド疫学研究を実施した。2001 年の MDA 開始以降もリンパ浮腫の新規発生が続いていることが明らかとなった。また、重症化には、発症部位や年齢、その他のリスクファクターによって、ばらつきが出るのが推測された。アジア地域に広く存在する慢性

疾患の医療ケア政策決定に重要な情報となる。

【住血原虫症】

●北潔は、マウスマラリア原虫ミトコンドリアのマーカ酵素で TCA 回路と電子伝達系を直接結ぶ複合体 II（コハク酸-ユビキノン還元酵素）の触媒部位である Fp サブユニット遺伝子（*Pbsdha*）破壊株を作製し、その表現型解析を行った。*Pbsdha* 遺伝子破壊原虫は赤血球内ステージにおいてマウス体内で正常に発育した。しかし、蚊ステージであるオーキネートの形成が大きく阻害され、さらにはオーシストを全く形成しなかった。また、マウスへの感染は観察されなかった。マラリア原虫は脊椎動物宿主体内と昆虫ベクター体内において、前者では解糖系、後者では酸化リン酸化とエネルギー代謝系を切り替えている事が明らかになった。抗マラリア剤の標的分子の選択に大きな情報となる。

●奈良武司はトリパノソーマ症の薬剤標的として有望であるグリコソームの成立起原およびその生理学的意義の解明に向けて、キネトプラスチダ類の姉妹系統群であるディプロネマ類に着目し、ディプロネマ *Diplonema papillatum* のドラフトゲノム解読を行ない、糖代謝酵素群の遺伝子の同定を試みた。ディプロネマの推定ゲノムサイズは 176 Mb で、トリパノソーマ類のゲノム（26~36 Mb）と比較して大きく、遺伝子内にイントロンが存在することが明らかとなった。糖代謝関連酵素群およびグリコソームまたはペルオキシソーム局在性酵素をコードする遺伝子を同定し、酵素の一次構造の特徴を解析した。■片倉賢は、吸血性サシガメの唾液腺由来蛋白 dimiconin の組換えタンパクについて、血液凝固に及ぼす影響を検討したところ、dimiconin は内因系凝固カスケードの初期段階である fXII から fXIIa への活性化段階を阻害する新規の血液凝固阻害物質であることが判明した。病原体の伝搬を抑制する新たな制御法の開発に資する研究となった。ミャンマー産薬用植物 *Vites repens* のエタノール抽出物から抗トリパノソーマ活性をもつ化合物として resveratrol、11-O-acetyl bergenin および stigmast-4-en-3-one を分離した。今後医薬品開発のパイプラインへの導入を検討する。●嶋田淳子はアポトーシス抑制因子 c-FLIP の pseudo caspase 領域を発現する細胞を樹立することができた。c-FLIP と相互作用するタンパク質を探すためのツールとして photo-cross-linking の実験系を確立した。全く新しい医薬品の標的となる可能性がある。

【新興再興感染症】

●野崎智義は、赤痢アメーバに特有な抗酸化物質である鉄イオウクラスターとフラビンを活性中心に有する ISF タンパク質群のうち、2種の ISF1, 2 に注目し、gene silencing 法で発現抑制した形質転換体を用いてその生理的役割を調べた。その結果、ISF1, 2 いずれも細胞の増殖に、特にシステイン飢餓状態での増殖に関与していることが示された。一方で予想に反して、過酸化水素に対する酸化ストレスへの応答は改善されなかった。複数の ISF が相補的な重複した機能を担う可能性もあり、複数遺伝子の同時抑制による問題点の解明が今後不可欠となると結論された。

●中西憲司は、腸管寄生虫 *Strongyloides venezuelensis* (*S. venezuelensis*) の排除に IgG1 と IgE が必要か検討した。この目的で抗体のクラススイッチを起こすことが不可能な AID 欠損マウスに *S. venezuelensis* を感染させたところ、線虫の排除が著明に遅れることが明らかとなった。次に、*S. venezuelensis* に二度感染させたマウスの血清を AID 欠損マウスに移入したところ、正常の野生型マウス同様に *S. venezuelensis* を排除できることが明らかとなった。最後に、血清中に存在する *S. venezuelensis* 特異的 IgG1 と IgE が粘膜型肥満細胞を感作し、次に *S. venezuelensis* 由来の抗原がこれらの抗体に結合することで、*S. venezuelensis* 排除が起こることが明らかとなった。この情報は糞線虫や鉤虫のようなアジアで流行する土壌寄生ぜん虫に対するワクチン開発に有用なものである。■丸山治彦は、独自の血清診断システムにより同定した多数の動物由来回虫類感染症の原因虫種について、組換えブタ回虫抗原 As16 と組換えイヌ回虫抗原 rTcAg を組み合わせた抗体検査により、イヌ回虫かブタ回虫の可能性のうち、イヌ回虫症が 90%程度であることを示した。■伊藤亮は人獣共通寄生虫疾患である脳囊虫症とエキノコックス症についての免疫、遺伝子診断法の開発、改善と、病原体である寄生虫の遺伝子多型解析ならびに解析結果に基づく感染地域の特定、リアルタイムで正確な検査結果を出せる迅速免疫診断キット開発研究を前年度からの継続研究として実施し、人体エキノコックス症(多包虫症、単包虫症)、囊虫症に関する迅速免疫診断キットが完成し、市販されるにいたった。

【媒介動物】

●松岡裕之(媒介動物)は、ヒト凝固因子遺伝子導入マラリアを用いて凝固系の欠損ハマダラカに感染実験を行い、媒介動物と病害寄生虫の間の相互関係を解析する有力な実験系であることを証明した。

D. 考察

本年度の事業活動は日米合同会議の開催がNIHの予算打ち切りによりキャンセルになった以外は、ほぼ計画通りに遂行された。研究計画全体の5年目にあたり、特にアジア地域に流行する寄生虫疾患とりわけ、以下にあげた、住血吸虫症、フィラリア症、マラリア、新興再興寄生虫病、ベクターの各研究領域で研究を遂行した。今後は汎太平洋新興感染症会議での3年に一度の合同会議を基盤として個別の私的な交流事業と組み合わせた活動が重要になると考えられる。確立された日本とアジアの連携にさらに日米、あるいは米アジアを加えた3角協力による優れた共同研究を継続し、特に医薬品開発に方向性を集中し、新たな日米の協力体制を作り上げてゆきたい。

E. 結論

アジアに蔓延する広範囲な寄生虫疾患を対象にした分子レベルから公衆衛生レベルまでの活発な研究が行われ、本プログラムが日米における各研究グループの間の情報交換や新しいプロジェクトの提案、若手研究者の育成に重要な役割を果たした。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

住血吸虫症

1. Mbanefo EC, Chuanxin Y, Kikuchi M, Shuaibu MN, Boamah D, Kirinoki M, Hayashi N, Chigusa Y, Osada Y, Hamano S, Hirayama K. Origin of a novel protein-coding gene family with similar signal sequence in *Schistosoma japonicum*. BMC Genomics. 2012, 13:260 doi: 10.1186/1471-2164-13-260
2. Boamah D, Kikuchi M, Huy NT, Okamoto K, Chen H, Ayi I, Boakye DA, Bosompem KM, Hirayama K. Immunoproteomics Identification of Major

- IgE and IgG4 Reactive Schistosoma japonicum Adult Worm Antigens Using Chronically Infected Human Plasma. Trop Med Health. 2012 Sep;40(3):89-102. doi: 10.2149/tmh. 2012-16..
3. Huy NT, Thao NT, Tuan NA, Khiem NT, Moore CC, Thi Ngoc Diep D, Hirayama K. (2012) Performance of thirteen clinical rules to distinguish bacterial and presumed viral meningitis in vietnamese children. PLoS One. 2012;7(11):e50341. doi: 10.1371/journal.pone.0050341. Epub 2012 Nov 28.
 4. Okumura-Noji K, Miura Y, Lu R, Asai K, Ohta N, Brindley PJ, Yokoyama S. CD36-related protein in Schistosoma japonicum: candidate mediator of selective cholesteryl ester uptake from high-density lipoprotein for egg maturation. FSAEB J, 2012 Dec 13 (Epub ahead of print)
 5. ElMalky M, Lu SH, El-Beshbish SN, Saundy NS, Ohta N. Effect of mirazid in Schistosoma japonicum-infected mice: parasitological and pathological assessment. Parasitol Res, 112:373-7, 2013.
 6. 金澤保 長田良雄. 日本住血吸虫と神経系. 神経内科. 77 (3) p267-273, 2012.
 7. 大前比呂思. Today's Therapy 2013, 今日の治療指針 2013 版 (vol.54). 私はこう治療している。医学書院 山口徹、北原光夫、福井次矢編、住血吸虫症 pp:265-266, 2013 (2013年1月発刊)
 8. 大前比呂思 輸入寄生虫病 日本獣医学会雑誌 2012;65 : 101-105
 9. 大前比呂思 食品媒介寄生虫症 一旅行医学における本症 一 防菌防黴雑誌 2012;40 : 649-656
- マラリア
10. Iwagami M, Fukumoto M, Hwang SY, Kim SH, Kho WG, Kano S. Population structure and transmission dynamics of *Plasmodium vivax* in the Republic of Korea based on microsatellite DNA analysis. PLoS Neglected Tropical Diseases 6: e1592, 2012
 11. Tachibana M, Sato C, Otsuki H, Sattabongkot J, Kaneko O, Torii M, Tsuboi T. *Plasmodium vivax* gametocyte protein Pvs230 is a transmission-blocking vaccine candidate. Vaccine. 2012, 30:1807-1812
 12. Sakamoto H, Takeo S, Maier AG, Sattabongkot J, Cowman AF, Tsuboi T. Antibodies against a *Plasmodium falciparum* antigen PfMSPDBL1 inhibit merozoite invasion into human erythrocytes. Vaccine. 2012, 30:1972-1980.
 13. Ord RL, Rodriguez M, Yamasaki T, Takeo S, Tsuboi T, Lobo CA. Targeting sialic acid dependent and independent pathways of invasion in *Plasmodium falciparum*. PLoS One. 2012;7(1):e30251.
 14. Chapman, L.M., Aggrey, A.A., Field, D.J., Srivastava, K., Ture S., Yui, K., Topham, D.J., Baldwin III, W.M., Morell, C.N., Platelets presents antigen in the context of MHC class I, J. Immunol., 189 (2): 916-923. 2012.
 15. Inoue M., Jianxia T., Miyakoda M., Kaneko O., Yui, K., Culleton R., The species specificity of immunity generated by live whole organism immunization with erythrocytic and pre-erythrocytic stages of rodent malaria parasites and implications for vaccine development, Int. J. Parasitol., 42; 859-870. 2012.
 16. Miyakoda, M., Kimura, D., Honma, K., Kimura, K., Yuda, M., Yui, K. Development of memory CD8⁺ T cells and their recall responses during blood-stage infection with *Plasmodium berghei* ANKA. J. Immunol., 189(9) : 4396-4404. 2012.
 17. Asada M, Goto Y, Yahata K, Yokoyama N, Kawai S, Inoue N, Kaneko O, Kawazu S-I. Gliding motility of *Babesia bovis* merozoites visualized by time-lapse video microscopy. PLoS ONE 7(4):e352272012 (2012/04).
 18. Tang J, Dai Y, Zhang H, Culleton RI, Liu Y, Zhao S, Wang X, Guan X, Kaneko O, Zhu Y. Positive diversifying selection on *Plasmodium vivax* RON2 protein. Parasitology 139(6):709-15 (2012/05)
 19. Kaewthamasorn M, Yahata K, Alexandre JSF, Xangsayarath P, Nakazawa S, Torii M, Sattabongkot J, Udomsangpetch R,
 20. Kaneko O. Stable allele frequency distribution of the polymorphic region of SURFIN_{4.2} in *Plasmodium falciparum* isolates from Thailand. Parasitol International 61(2):317-23 (2012/06)
 21. Inoue M, Tang J, Miyakoda M, Kaneko O, Yui K, Culleton R. The species specificity of immunity generated by live whole organism immunization with erythrocytic and pre-erythrocytic stages of rodent malaria parasites and implications for vaccine development Int J Parasitol 42(9):859-70 (2012/08).
 22. Alexandre JSF, Xangsayarath P, Kaewthamasorn, Yahata K, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, Kaneko O. Stable allele frequency distribution of the

- Plasmodium falciparum* clag genes encoding components of the high molecular weight rhoptry protein complex. Trop Med Health 40(3):71-7 (2012/09).
23. Xangsayarath P, Kaewthamasorn K, Yahata K, Nakazawa S, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, Kaneko O. Positive diversifying selection on the *Plasmodium falciparum* *surf_{4.1}* gene in Thailand. Trop Med Health 40(3):79-89 (2012/09).
 24. Tachibana S, Sullivan SA, Kawai S, Nakamura S, Kim HR, Goto N, Arisue N, Palacpac NMQ, Honma H, Yagi M, Tougan T, Katakai Y, Kaneko O, Mita T, Kita K, Yasutomi Y, Sutton PL, Shakhbatyan R, Horii T, Yasunaga T, Barnwell JW, Escalante AA, Carlton JM, Tanabe K. *Plasmodium cynomolgi* genome sequences provide insight into *Plasmodium vivax* and the monkey malaria clade. Nat Genet 44(9):1051-5 (2012/09).
 25. Zhao H, Konishi A, Fujita Y, Yagi M, Ohata K, Aoshi T, Itagaki S, Sato S, Narita H, Abdelgelil NH, Inoue M, Culleton R, Kaneko O, Nakagawa A, Horii T, Akira S, Ishii KJ, Coban C. Lipocalin 2 bolsters innate and adaptive immune responses to blood-stage malaria infection by reinforcing host iron metabolism. Cell Host & Microbe 12(5), 705-16 (2012/11)
 26. Morita M, Sanai H, Hiramoto A, Sato A, Hiraoka O, Sakura T, Kaneko O, Masuyama A, Nojima M, Wataya Y, Kim H-S. *Plasmodium falciparum* endoplasmic reticulum-resident calcium binding protein is a possible target of synthetic antimalarial endoperoxides, N-89 and N-251. J Proteome Res 11(12):5704-11 (2012/12)
 27. Yahata K, Treeck M, Culleton R, Gilberger TW, Kaneko O. Time-lapse imaging of red blood cell invasion by the rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii*. PLoS ONE 7(12):e50780 (2012/12)
 28. Sakura T, Yahata K, Kaneko O. The upstream sequence segment of the C-terminal cysteine-rich domain is required for microneme trafficking of *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding antigen 175. Parasitol Int (in press)
 29. Zhu XT, Yahata K, Alexandre JSF, Tsuboi T, Kaneko O. The N-terminal segment of *Plasmodium falciparum* SURFIN_{4.1} is required for its trafficking to the red blood cell cytosol through the endoplasmic reticulum. Parasitol Int (in press)
 30. 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, 39, 127-137, 2013
 31. Morita, M., Sanai, H., Hiramoto, A., Sato, A., Hiraoka, O., Sakura, T., Kaneko, O., Masuyama, A., Nojima, M., Wataya, Y. and Kim, H.-S. *Plasmodium falciparum* endoplasmic reticulum-resident calcium binding protein is a possible target of synthetic antimalarial endoperoxides, N-89 and N-251. J Proteome Res., 11, 5704-5711, 2012
 32. Tanaka Y, Sakamoto A, Inoue T, Yamada T, Kikuchi T, Kajimoto T, Muraoka O, Sato A, Wataya Y, Kim H.-S., and Tanaka R. Andiroloides HeP from the flower of *andiroba* (*Carapa guianensis*, *Meliaceae*). Tetrahedron, 68, 3669-3677, 2012
- フィラリア症
33. Gass K, Beau de Rochars MV, Boakye D, Bradley M, Fischer PU, Gyapong J, Itoh M, Ituaso-Conway N, Joseph H, Kyelem D, Laney SJ, Legrand AM, Liyanage TS, Melrose W, Mohammed K, Pilote N, Ottesen EA, Plichart C, Ramaiah K, Rao RU, Talbot J, Weil GJ, Williams SA, Won KY, Lammie P. A multicenter evaluation of diagnostic tools to define endpoints for programs to eliminate bancroftian filariasis. PLoS Negl Trop Dis. 2012 January; 6(1): e1479.
 34. Islam MZ, Itoh M, Islam MA, Saifuddin Ekram AR, Rahman MA, Takagi H, Takesue A, Hashiguchi Y, Kimura E. ELISA with recombinant rKRP42 antigen using urine samples: a tool for predicting clinical visceral leishmaniasis cases and its outbreak. Am J Trop Med Hyg. 2012 Aug 6. [Epub ahead of print]
 35. Alam MS, Kato H, Fukushige M, Wagatsuma Y, Itoh M. Application of RFLP-PCR-Based Identification for Sand Fly Surveillance in an Area Endemic for Kala-Azar in Mymensingh, Bangladesh. J Parasitol Res. doi:10.1155/2012/467821. 2012
 36. Nagaoka F, Itoh M, Samad MS, Takagi H, Weerasooriya MV, Yahathugoda TC, Hossain M, Moji K, Kimura E. Visual detection of filaria-specific IgG4 in urine

- using red-colored high density latex beads. *Parasitol Int.* 62:32-35. 2013
37. Shintoku Y, Kadosaka T, Kimura e, Takagi H, Kondo S, Itoh M. Intestinal mast cells and eosinophils in relation to *Strongyloides ratti* adult expulsion from the small and large intestines of rats. *Parasitology*.
Doi:10.1017/S0031182012001837. 2013
38. Alim MA, Islam MK, Anisuzzaman, Miyoshi T, Hatta T, Yamaji K, Fujisaki K, Tsuji N. A hemocyte-derived Kunitz-BPTI-type chymotrypsin inhibitor, HlChI, from the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*, plays regulatory functions in tick blood-feeding processes. *Insect Biochem Mol Biol.* 42, 925-34. 2012.
39. Hatta T, Miyoshi T, Matsubayashi M, Islam MK, Alim MA, Anisuzzaman A, Yamaji K, Fujisaki K, Tsuji N. Semi-artificial mouse skin membrane feeding technique for adult tick, *Haemaphysalis longicornis*. *Parasit Vectors.* 15, 263. 2012.

住血原虫症

(トリパノソーマ、リーシュマニア)

40. Nara, T., Hashimoto, M. Hirawake, H., Liao, C-W., Fukai, Y., Suzuki, S., Tsubouchi, A., Morales, J., Takamiya, S., Fujimura, T., Taka, H., Mineki, R., Fan, C-K., Inaoka, D. K., Inoue, M., Tanaka, A., Harada, S., Kita, K. and Aoki, T. Molecular interaction of the first 3 enzymes of the *de novo* pyrimidine biosynthetic pathway of *Trypanosoma cruzi*. (2012) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 418, 140-143
41. Hashimoto, M., Morales, J., Fukai, Y., Suzuki, S., Takamiya, S., Tsubouchi, A., Inoue, S., Inoue, M., Kita, K., Harada, S., Tanaka, A., Aoki, T. and Nara, T. Critical importance of the *de novo* pyrimidine biosynthesis pathway for *Trypanosoma cruzi* growth in the mammalian host cell cytoplasm. (2012) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 417, 1002-1006
42. Sakai, C., Tomitsuk, E., Esumi, H., Harada, S. and Kita, K. Mitochondrial Mitochondrial fumarate reductase as a target of chemotherapy: from parasites to cancer cells. (2012) *Biochim. Biophys. Acta* 1820, 643-651
43. Shimizu, H., Osanai, A., Sakamoto, K., Inaoka, D. K., Shiba, T., Harada, S. and Kita, K. Crystal structure of mitochondrial quinol-fumarate reductase from the parasitic nematode *Ascaris suum*. (2012) *J. Biochem.* 151, 589-592
44. Hino, A., Hirai, M., Tanaka, Q. T., Watanabe, Y., Matsuoka, H. and Kita, K. Critical roles of the mitochondrial complex II in oocyst formation of rodent malaria parasite *Plasmodium berghei*. (2012) *J. Biochem.* 152, 259-268
45. Tanaka, Q. T., Hirai, M., Watanabe, Y. and Kita, K. Towards understanding the role of mitochondrial complex II in the intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*: gene targeting of the Fp subunit. (2012) *Parasitol. Int.* 61, 726-728
46. Kitamura, K., Kishi-Itakura, C., Tsuboi, T., Sato, S., Kita, K., Ohta, N. and Mizushima, N. Autophagy-related Atg8 localizes to the apicoplast of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. (2012) *PLoS ONE* 7(8), e42977
47. Hikosaka, K., Tsuji, N., Watanabe, Y., Kishine, H., Horii, T., Igarashi, I., Kita, K. and Tanabe, K. Novel type of linear mitochondrial genomes with dual flip-flop inversion system in apicomplexan parasites, *Babesia microti* and *Babesia rodhaini*. *BMC Genomics*, in press
48. Saimoto, H., Kido, Y., Haga, Y., Sakamoto, K. and Kita, K. Pharmacophore identification of ascofuranone, potent inhibitor of cyanide-insensitive alternative oxidase of *Trypanosoma brucei*. *J. Biochem.* in press
49. Shiba, T., Kido, Y., Sakamoto, K., Inaoka, D. K., Tsuge, C., Tatsumi, R., Takahashi, G., Balogun, E. O., Nara, T., Aoki, T., Honma, T., Tanaka, A., Inoue, M., Matsuoka, S., Saimoto, H., Moore, M. L., Harada, S. and Kita, K. Structure of the trypanosome cyanide-insensitive alternative oxidase, a promising drug target. *Proc. Natl. Acad. Sci.* in press.
- 新興・再興感染症（腸管寄生原虫症、腸管寄生ぜん虫症、エキノコッカス症、人獣共通感染症など）
50. 安田好文, 中西憲司. 蠕虫の排除と自然免疫・獲得免疫. *臨床免疫・アレルギー科* 2012;57(3):307-15
51. 中平雅清, 中西憲司. サイトカインのすべて, インターロイキン 18) IL-18. *臨床免疫・アレルギー科* 2012:57 (特別増刊): 125-36
52. 安田好文, 中西憲司. 自然免疫による好酸球性肺炎発症機構. *医学のあゆみ* 2012;243 (1):91-7
53. 武藤太一郎, 安田好文, 中西憲司. 寄生虫感染と肺における Th2 型自然免疫応答.

- 実験医学 2012;30(19)3056-61
54. 中平雅清, 中西憲司. アレルギーに対するサイトカイン I .IL-4. アレルギー・免疫 2012;19(12):12-21
 55. Yoshimoto T, Nakanishi K. Generation and characterization of mouse basophils from bone marrow and purification of basophils from spleen. *Curr Protoc Immunol* 2012;98:3.24.1-3.24.16
 56. Tsutsui H, Nakanishi K. Immunotherapeutic applications of IL-18. *Immunotherapy* 2012 Dec;4(12)1883-94
 57. Yasuda K, Muto T, Kawagoe T, Matsumoto M, Sasaki Y, Matsushita K, Taki Y, Futatsugi-Yumikura S, Tsutsui H, Ishii K, Yoshimoto T, Akira S, Nakaishi K. Contribution of IL-33-activated type II innate lymphoid cells to pulmonary eosinophilia in intestinal nematode-infected mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(9):3451-6
 58. Haenuki Y, Matsushita K, Futatsugi-Yumikura S, Ishii K, Kawagoe T, Imoto Y, Fujieda S, Yasuda M, Hisa Y, Akira S, Nakaishi K, Yoshimoto T. A critical role of IL-33 in experimental allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 130:184-94.
 59. Takahashi S, Futatsugi-Yumikura S, Fukuoka A, Yoshimoto T, Nakanishi K, Yonehara S. Fas deficiency in mice with the Balb/c background induces blepharitis with allergic inflammation and hyper-IgE production in conjunction with severe autoimmune disease. *Int Immunol* 2012 Dec 5
 60. 丸山治彦：アニサキス症（今日の治療指針 2013、山口徹、北原光夫、福井次矢編）、pp.262-263、医学書院（東京）（2013年1月1日）
 61. 丸山治彦、木村幹夫：我が国における寄生虫病・熱帯病薬物治療の実際 日本臨床 70 (12): 2205-2217, 2012
 62. 丸山治彦、名和行文：肺吸虫症と神経系神経内科 77 (3): 259-266, 2012
 63. 丸山治彦：小児にみられる吸虫症 小児科臨床 65 (3): 384-390, 2012
 64. 吉田彩子、長安英治、丸山治彦：動物由来回虫類感染症のわが国における最近の動向 *Clinical Parasitology* 23: 105-108, 2012
 65. Nagayasu E, Ogura Y, Itoh T, Yoshida A, Chakraborty G, Hayashi T, Maruyama H.: Transcriptomic analysis of four developmental stages of *Strongyloides venezuelensis*. *Parasitol Int*. 2013 Feb;62(1):57-65.
 65. 迫 康仁、伊藤 亮 (2012). 糞便中の寄生虫の核酸検査法について教えてください. 臨床検査増刊号「Q & A : 臨床検査のすべて」 56, 1254-1255.
 66. 柳町徳春、伊藤 亮 (2012). 脳囊虫症. KEY よくわかる脳 MRI 第3版. 674-677. 秀潤社
 67. 伊藤 亮、石川裕司. エキノコックス症の早期診断法. 日本医事新報 2012.8.18. No. 4608. 60-61.
 68. 伊藤 亮 (2012). 各論 12 章. 感染症・寄生虫疾患. 3. 条虫類. カラー版内科学、1903-1907. 西村書店.
 69. 伊藤 亮 (2012). 感染症辞典（平山謙二編集）. オーム社. エキノコックス症 :516-518, 囊虫症:549-552, (2012年1月発刊)
 70. 伊藤 亮、迫 康仁、石川裕司(2013). エキノコックス症. 日本臨床 2013年7月別冊.
 71. 伊藤 亮、迫 康仁、柳田哲矢(2013). 有鉤条虫症、有鉤囊虫症. 日本臨床 2013年7月別冊.
 72. 伊藤 亮、迫 康仁(2013). 4.免疫学的検査/C.感染症－抗原・抗体・遺伝子検査/④寄生虫. 抗エキノコックス抗体. 臨床検査ガイド 2013～2014. 文光堂.
 73. 伊藤 亮 (2013). [感染症、寄生虫疾患] 条虫症(腸管条虫症、腸管外条虫症). 今日の治療と看護 改訂第3版. 南江堂.
 74. Ito A, Nakao M, Sako Y, Yanagida T, Nakaya K, Knapp J, Ishikawa Y. Chapter Echinococcus and Echinococcosis. In: *Molecular Detection of Human Parasitic Pathogens* (ed. by Liu D), 247-261. 2012. CRC Press. (ISBN 9781439812426)
 75. Okamoto M, Ito A. Chapter Taenia. In: *Molecular Detection of Human Parasitic Pathogens* (ed. by Liu D), 295-305. 2012. CRC Press. (ISBN 9781439812426)
 76. Li T, Ito A, Chen X, Long C, Okamoto M, Raoul F, Giraudoux P, Yanagida T, Nakao M, Xiao N, Craig PS. Usefulness of pumpkin seeds combined with areca nut extract in community-based treatment of human taeniasis in northwest Sichuan province. *Acta Trop*. 124, 152-157. 2012.
 77. Boufana B, Stidworthy MF, Bell S, Chantrey J, Masters N, Unwin S, Wood R, Lawrence RP, Potter A, McGarry J, Jull P, Browne E, Schoniger M, Redrobe S, Killick R, Foster AP, Mitchell S, Sako Y, Nakao M, Ito A, Wyatt K, Lord B, Craig PS. *Echinococcus*

- and *Taenia* spp. from captive mammals in the United Kingdom. *Vet Parasitol.* 190:95-103. 2012.
78. Yanagida T, Mohammadzadeh T, Kamhawi S, Nakao M, Sadjjadi SM, Hijjawi N, Abdel-Hafez SK, Sako Y, Okamoto M, Ito A. Genetic polymorphisms of *Echinococcus granulosus* in the Middle East. *Parasitol Int.* 61, 599-603. 2012.
79. Nkouawa A, Sako Y, Li T, Chen X, Nakao M, Yanagida T, Okamoto M, Giraudoux P, Raoul F, Nakaya K, Xiao N, Qiu J, Qiu D, Craig PS, Ito A. A loop-mediated isothermal amplification method for a differential identification of *Taenia* tapeworms from human: application to a field survey. *Parasitol Int.* 61, 723-725. 2012.
80. Konyaev SV, Yanagida T, Ingovatova GM, Shoikhet YN, Nakao M, Sako Y, Bondarev AY, Ito A. Molecular identification of human echinococcosis in Altai region, Russia. *Parasitol Int.* 61, 711-714. 2012.
81. Hailemariam Z, Nakao M, Menkir S, Lavikainen A, Yanagida T, Okamoto M, Ito A. Molecular identification of unilocular hydatid cysts from domestic ungulates in Ethiopia: implications for human infections. *Parasitol Int.* 61, 375-377, 2012.
82. Yanagida T, Sako Y, Nakao M, Nakaya K, Ito A. Mini Review: Taeniasis and cysticercosis due to *Taenia solium* in Japan. *Parasit Vectors*, 5, 18, 2012.
83. Mohammadzadeh T, Sako Y, Sajjadi SM, Sarkari B, Ito A. Comparison of the usefulness of hydatid cyst fluid, native antigen B and recombinant antigen B8/1 for serological diagnosis of cystic Echinococcosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 106, 371-375, 2012.
84. Yamane K, Suzuki Y, Tachi E, Li TY, Chen XW, Nakao M, Nkouawa A, Yanagida T, Sako Y, Ito A., Sato H, Okamoto M. Recent hybridization between *Taenia asiatica* and *Taenia saginata*. *Parasitol Int.* 61, 351-355, 2012.
85. Swastika K, Dewiyani CI, Yanagida T, Sako Y, Sudamaja M, Sutisna P, Wandra T, Dharmawan NS, Nakaya K, Okamoto K, Ito A. An ocular cysticercosis in Bali, Indonesia caused by *Taenia solium* Asian genotype. *Parasitol Int* 61, 378-380. 2012.
86. Ma J, Wang H, Lin G, Craig PS, Ito A., Cai Z, Zhang T, Han X, Ma X, Zhang J, Liu Y, Zhao Y, Wang Y. Molecular identification of *Echinococcus* species from eastern and southern Qinghai, China, based on the mitochondrial cox1 gene. *Parasitol Res.* 111, 179-184. 2012.
87. Konyaev SV, Yanagida T, Ivanov MV, Sako Y, Nakao M, Ito A. The first report on cystic echinococcosis in a cat caused by *Echinococcus granulosus* sensu stricto (G1). *J Helminthol.* 20, 1-4, 2012.
- 媒介昆虫
88. Matsuoka H., Sano G, Hattori R, Tomita H, Yamamoto DS, Hirai M: One injection of DsRed followed by bites from transgenic mosquitoes producing DsRed in the saliva elicits a high titer of antibody in mice. *Trop Med Health* 40(2): 47-53, 2012
89. 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): 223-233, 2012
90. Hayashi H, Kyushiki H, Nagano K, Sudo T, Matsuoka H., Yoshida S: Effects of recombinant anopheline anti-platelet protein from a malaria vector mosquito has anti-thrombotic effects *in vivo* without compromising hemostasis. *Thrombosis Res* 129(1): 169-175, 2012
91. Reza M, Yamamoto DS, Matsuoka H.: Low-concentration copper solution jeopardizes larval movement and ability to survive predation: new insight into malaria eradication via vector control. *Med Entomol Zool* 63(3): 217-222, 2012
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定をふくむ）
なし
1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

分担研究概要報告書

日本住血吸虫性肝線維症感受性と関連する
HLA-DRB1*15:01遺伝子頻度の高齢者での減少

長崎大学・熱帯医学研究所・免疫遺伝学分野 平山 謙二

研究要旨

フィリピン国ルソン島南端ソルソゴン州は日本住血吸虫高度流行地で超音波診断で明らかな肺線維症を呈する患者が10才台で12.3%、20才以上では55.3%存在する。これら肝線維症患者集団でのHLA-DRB1*15:01頻度は、35才未満の群で、有意に増加していたことから、早期肝線維化症発症にはHLA-DRB1*15:01が感受性因子として働いていると考えられた。感受性を示したDRB1*15:01陽性者の若年層と高齢者層でのアレル頻度をさらに詳細に統計解析し、明らかな高齢者での頻度の減少がこのアレルに特徴的に観察されることが示された。

A. 研究目的

フィリピン国ソルソゴン州で観察された若年性肝線維症発症に関わる免疫応答性を制御するHLAクラス2の特定のアレルについて更なる遺伝学解析を行い、HLAの関与する発症機序の本態を明らかにし発症の予防・治療法の開発、あるいは高リスク患者の早期発症に寄与することを目的とした。

B. 研究方法

フィリピン国ルソン島南端ソルソゴン州で住血吸虫症患者を対象とし共同研究を行っている独協大・千種教授、フィリピン大学・レオナルド教授、ソルソゴン県保健チームらの協力して、超音波診断、血清抗体価、Kato-Katzを施行した。

現地調査及び採血、遺伝子解析等については、長崎大学・熱帯医学研究所・研究倫理委員会及びフィリピン大学での承認を得て行った。「フィリピンにおける住血吸虫性肝線維化症の遺伝的調節機構の解析」承認番号04031002 長崎大学・熱帯医学研究所・研究倫理委員会。

C. 結果

1. ソルソゴンでの住血吸虫症の肝線維化

調査（表1）

表1に示すように2005年345名、2007年294名の互いにオーバーラップしない集団の抗体陽性率、虫卵検査結果、およびネットワークパターンの有無について調査した。この二つの集団を対象としてHLA-DRB1のアレルタイピングを行った。

表1

Year	Total No. of Patients	ELISA + (%)	Kato-Katz + (%)	Network Formation	
				NW+ (%)	NW- (%)
2005	345	291 (85.1)	39 (11.6)	210 (60.9)	135 (39.1)
2007	294	153 (52.9)	11 (3.9)	107 (36.4)	187 (63.6)

2. HLA-DRB1*15:01頻度の若年齢層での感受性の上昇

ネットワークパターンを示す重症化群でのHLA-DRB1*15:01頻度が、34歳以下の集団では有意に上昇するが、35歳以上では逆に低下することが明らかになった。ハーディーワインバークの法則によれば世代間での遺伝子頻度は淘汰圧がなければ一定であるので、この感受性HLAの対象者全体での遺伝子頻度の動向についてさらに解析した。

3. 10歳幅の区間ごとのHLA-DRB1*15:01の頻度 (%) (図1)

図1に示すように HLA-DRB1*15:01 陽性の人の集団中での頻度は 35 歳以上で減少傾向があることが観察された。さらに、区間を半分にして頻度をプロットしその年齢との相関を観察したのが、図2である。この解析により、30 年で HLA-DRB1*1501 アレル頻度が約 0.1 ずつ減少していることが示された。

図 1

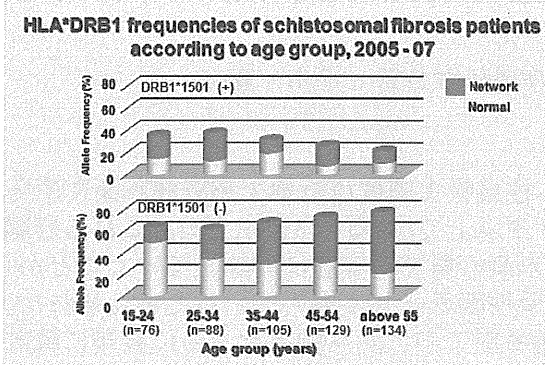
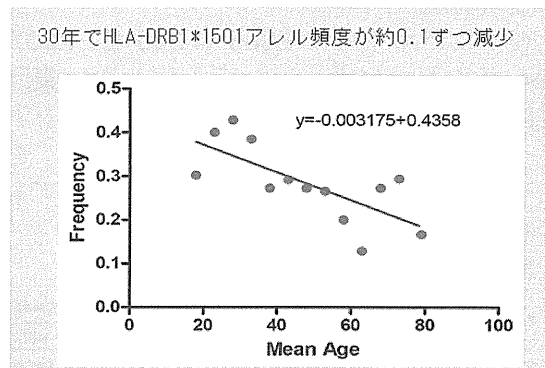


図 2



D. 考察

35 才以下の若年層で明らかな DRB1*15:01 と肝線維症の相関が認められた ($p < 0.02$, $OR = 2.83$; 2005, $p < 0.02$, $OR = 3.4$; 2007)。しかし、35 才以上の群では有意差が認められなかった。

DRB1*15:01 の陽性者の頻度は 30 歳以降の高齢者では直線的に減少する傾向が有意に認められた。肝線維症は非可逆性に進行するため、若年発症群では早期に死亡した可能性がある。しかし、減少するのが生殖年齢を過ぎてからであるため、遺伝子頻度に影響することはないと予想される

ここで観察された HLA-DR2 グループの主要なアレルである HLA-DRB1*15:01 とすでに日

本で抵抗性との関連が報告されている HLA-DRB1*15:02-DQB1*06:01 について、まとめた。この結果を総合すると、HLA-DRB1*15:01 アレルの感受性が顕著であること、日本で優位に抵抗性を支配する DQB1*06:01 がこの感受性アレルに対しては優位に働かない可能性を示唆する結果となった。

この研究は以下の研究グループとの共同研究である。

千種雄一、林尚子 (獨協医科大学・熱帯病寄生虫センター)

吾妻健 (高知大学医学部・環境保健学)

Edelwisa M. Segubre-Mercado (RITM, Philippines)

Lydia R Leonardo (UP Manila)

Napoleon L Arevalo, Ronald R Lim, Lea M

Agsolid (MOH Sorsogon, Philippines)

E. 結論

フィリピンの若年性住血吸虫性肝線維症と関連する HLA-DRB1*15:01 は年齢が上がると淘汰される可能性がある。しかし、すでに次世代を再生産した後の世代が淘汰されるため、集団中の遺伝子頻度を低下させることはないと考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

著書

平山謙二: その他の吸虫症 (肺吸虫症、肝吸虫症、横川吸虫症、肝蛭症). *Today's Therapy 2013*, 今日の治療指針 2013 版 (Volume 55)—私はこう治療している. Pp266-267., 医学書院, 総編集; 山口徹、北原光夫、福井次矢, 2013, (2013 年 1 月 1 日発刊)

英文論文

Takaki A, Yamazaki A, Maekawa T, Shibata H, Hirayama K, Kimura A, Hirai H, Yasunami M. Positive selection of Toll-like receptor 2 polymorphisms in two closely related old world monkey species, rhesus and Japanese macaques. *Immunogenetics*. 2012 Jan;64(1):15-29. Epub 2011 Jul 9.

Furuta T, Murao LA, Lan NT, Huy NT, Huong VT, Thuy TT, Tham VD, Nga CT, Ha TT,

Ohmoto Y, Kikuchi M, Morita K, Yasunami M, Hirayama K, Watanabe N. Association of mast cell-derived VEGF and proteases in dengue shock syndrome. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(2):e1505. doi: 10.1371/journal.pntd.0001505. Epub 2012 Feb 21.

Del Puerto F, Nishizawa JE, Kikuchi M, Roca Y, Avilas C, Gianella A, Lora J, Velarde FU, Miura S, Komiya N, Maemura K, Hirayama K. Protective Human Leucocyte Antigen Haplotype, HLA-DRB1*01-B*14, against Chronic Chagas Disease in Bolivia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012 Mar;6(3):e1587. Published online 2012 March 20. doi: 10.1371/journal.pntd.0001587

Mbanefo EC, Chuanxin Y, Kikuchi M, Shuaibu MN, Boamah D, Kirinoki M, Hayashi N, Chigusa Y, Osada Y, Hamano S, Hirayama K. Origin of a novel protein-coding gene family with similar signal sequence in *Schistosoma japonicum*. *BMC Genomics*. 2012, 13:260 doi: 10.1186/1471-2164-13-260

Omar AH, Yasunami M, Yamazaki A, Shibata H, Ofori MF, Akanmori BD, Shuaibu MN, Kikuchi M, Hirayama K. Toll-like receptor 9 (TLR9) polymorphism associated with symptomatic malaria: a cohort study. *Malar J*. 2012 May 17;11:168. doi: 10.1186/1475-2875-11-168.

Omar AH, Shibata H, Yasunami M, Yamazaki A, Ofori MF, Akanmori BD, Shuaibu MN, Kikuchi M, Hirayama K. The rs150311303 polymorphism in FcγRIIa enhances IgG binding capacity. *Scand J Immunol*. 2012 Aug;76(2):167-74. doi: 10.1111/j.1365-3083.2012.02715.x.

Men TT, Huy NT, Trang DT, Shuaibu MN, Hirayama K, Kamei K. (2012) A simple and inexpensive haemozoin-based colorimetric method to evaluate anti-malarial drug activity. *Malar J*. 2012 Aug 9;11:272. doi: 10.1186/1475-2875-11-272.

Boamah D, Kikuchi M, Huy NT, Okamoto K, Chen H, Ayi I, Boakye DA, Bosompem KM, Hirayama K. Immunoproteomics Identification of Major IgE and IgG4 Reactive

Schistosoma japonicum Adult Worm Antigens Using Chronically Infected Human Plasma. *Trop Med Health*. 2012 Sep;40(3):89-102. doi: 10.2149/tmh.2012-16. Epub 2012 Oct 24.

Huy NT, Thao NT, Tuan NA, Khiem NT, Moore CC, Thi Ngoc Diep D, Hirayama K. (2012) Performance of thirteen clinical rules to distinguish bacterial and presumed viral meningitis in vietnamese children. *PLoS One*. 2012;7(11):e50341. doi: 10.1371/journal.pone.0050341. Epub 2012 Nov 28.

Huy NT, Hang le TT, Boamah D, Lan NT, Van Thanh P, Watanabe K, Huong VT, Kikuchi M, Ariyoshi K, Morita K, Hirayama K. (2012) Development of a single-tube loop-mediated isothermal amplification assay for detection of four pathogens of bacterial meningitis. *FEMS Microbiol Lett*. 2012 Dec;337(1):25-30. doi: 10.1111/1574-6968.12002. Epub 2012 Oct 5.

Florencia del Puertoa, Mihoko Kikuchia, b, Juan Eiki Nishizawac, Yelin Rocad, Cinthia Avilasd, Alberto Gianellad, Javier Lorad, Freddy Udalrico Gutierrez Velardee, Kenji Hirayama, 21-Hydroxylase gene mutant allele CYP21A2*15 strongly linked to the resistant HLA Haplotype B*14:02-DRB1*01:02 in Chronic Chagas Disease. *Human Immunology* Available online 31 January 2013

2. 学会発表

Mihoko Kikuchi, Lydia R. Leonardo, Yuichi Chigusa, Edelwisa M, Segubre-Mercado, Noriko Kobayashi, Naoko Hayashi, Tetsu Inoue, Napoleon L. Arevalo, Ronald R. Lim, Lea M. Agsolid, Ken Agatsuma, Kenji Hirayama. Immunogenetic analysis of Patients with early onset schistosomal fibrosis in Sorsogon Province, the Philippines. *Forum Cheju 15, The 15th Japan-Korea Parasitologists' Seminar, Current Trends in Parasitology, Research in Japan and Korea.*, May 23-25, 2012, Miyazaki Aoshima Palm Beach Hoel, Aoshima, Miyazaki, Japan

Mihoko Kikuchi, Natasha Andrea Fernandez, Lydia R. Leonardo, Yuichi Chigusa, Naoko Hayashi, Tetsu Inoue, Napoleon L. Arevalo,

Ronald R. Lim, Lea M. Agsolid, James Chua, Marquis, Hilton Atlanta, Atlanta GA, USA.
Ken Agatsuma, Kenji Hirayama.

Surveillance on for schistosomal fibrosis in Sorsogon Province, the Philippines. 第 53 回日本熱帯医学会大会, 2012 年 9 月 5 日(水)~6 日(木), とかちプラザ, 帯広

菊池三穂子, Lydia R. Leonardo, 千種雄一, Edelwisa M. Segubre-Mercado, 小林典子, 林尚子, Napoleon L. Arevalo, Ronald R. Lim, Lea M. Agsolid, 我妻健, 平山謙二. フィリピンの若年性住血吸虫性肝線維症と HLA-DRB1*15:01 との相関. 第 21 回日本組織適合性学会大会, 平成 24 年 9 月 15 日-17 日、明治大学駿河台キャンパス リバティホール、東京

平山 謙二: 熱帯感染症と HLA. 第 21 回日本組織適合性学会大会, 平成 24 年 9 月 15 日-17 日、明治大学駿河台キャンパス、リバティホール、東京

Daniel Boamah, Mihoko Kikuchi, Ngyen Tien Huy, Kenta Okamoto, Honggen Chen, Irene Ayi, Daniel Adjei Boakye, Kwabene Mante Bosompem, Kenji Hirayama. Immunoproteomics Identification of Major IgE and Ig4 Reactive Schistosoma japonicum Adult Worm Antigens Using Chronically Infected Human Plasma. HUPO 11th Annual World Congress, September 9-13, 2012, Hynes Convention Center, Boston, Massachusetts, USA.

平山 謙二: 淘汰圧としての熱帯感染症, シンポジウム 7 感染症の遺伝学: ゲノムと環境の相互作用 日本人類遺伝学会第 57 回大会 平成 24 年 10 月 24 日-27 日、京王プラザホテル、東京都

Evaristus C. Mbanefo, Yu Chuanxin, Mihoko Kikuchi, Mohammed N. Shuaibu, Daniel Boamah, Masashi Kirinoki, Naoko Hayashi, Yuichi Chigusa, Yoshio Osada, Shinjiro Hamano and Kenji Hirayama: Origin, Diversity and Molecular characterization of a Novel Protein-Coding Gene Family with Similar Signal Sequence in Schistosoma japonicum. 61st ASTMH Annual Meeting, November 11-15 2012, Atlanta Marriott

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

厚生科学研究費補助金（研究事業）

分担研究報告書

原虫症治療標的分子の機能解析

分担研究者 北 潔 東京大学大学院医学系研究科

研究要旨 寄生原虫のミトコンドリア呼吸鎖は宿主哺乳類のミトコンドリアと大きく異なった性質を持ち、しかもその増殖に必要な不可欠である事から特異的阻害剤による抗寄生虫薬の重要な標的となる事が明らかになりつつある。我々はマラリア原虫およびトリパノソーマのミトコンドリアを薬剤標的として捉え、特に呼吸鎖電子伝達系に関して、その特異的な性質を明らかにした。

A. 研究目的

我々は寄生適応に必須な基本的要素である各種代謝系のなかでも特にエネルギー代謝系に焦点を絞って、寄生原虫ミトコンドリアが宿主と極めて異なったエネルギー代謝系を作用させる事によって宿主内の環境に適応している事を明らかにしてきた。この成果をふまえてマラリア原虫やトリパノソーマのミトコンドリア電子伝達系の特異性を解析する事により、最終的に化学療法標的として捉えたいと考えている。そこで、熱帯熱マラリア原虫におけるエネルギー代謝系を先端的なエネルギー転換系研究の視点から追求し、さらにトリパノソーマなど他の寄生原虫も含め寄生現象全般に共通する適応戦略の分子基盤とその多様性を明らかにする事を目的として研究を進めている。

B. 研究方法

赤血球内型マラリア原虫ミトコンドリアの呼吸鎖電子伝達系は化学療法剤の標的として期待されている。しかしマラリア原虫ミトコンドリアに関する情報は非常に限られたものであり、これが研究の進展を妨げている。そこで活性を保持したミトコンドリアの単離法

検討し、その結果ネズミマラリア原虫の系を用いて生化学的な解析が可能な量のミトコンドリアの調製法を確立した。またマラリア原虫にはアピコプラストと呼ばれる 35 kb の環状 DNA を持つオルガネラが存在し、マラリア原虫の増殖に必要な機能を有している。電子顕微鏡による観察から両者が細胞の中で常に近傍に局在している事が報告されている。そこでこの2つのオルガネラの相互作用を調べ、さらにそれぞれの機能を独立に解析する目的で細胞分画における挙動を調べて来た。昨年度までに確立した方法により、同一容量の培地から高島、見市らの以前の方法で調製した熱帯熱マラリア原虫ミトコンドリア（約 1 mg）に比べ3倍以上の粗ミトコンドリアを得る事が可能となり、複合体 II のコハク酸-ユビキノン還元酵素の比活性も3倍以上に上昇した。これは河原らによるネズミマラリア原虫 (*P. yoelii*) の場合のマウス5匹分に相当し、熱帯熱マラリア原虫ミトコンドリアの生化学的な解析に十分な高活性の粗ミトコンドリア調製法が確立できた。また、Percoll による分離の後の Western ブロットおよび各種酵素活性の解析からミトコンドリアとアピコプラストを再現性良く分離している事が明らかとなった。実際にこのミトコンドリア画分

を用いる事によって初めて複合体 II の Clear native electrophoresis が可能となり、コハク酸脱水素酵素活性による染色でウシ心筋複合体 II と同様なサイズを示す事が判った。そこで本年度はこのミトコンドリアのマーカー酵素としても知られている複合体 II の生理的意義を明らかにする目的でネズミマラリア原虫を用いて Fp サブユニットの遺伝子破壊を行ない、その効果を調べた。

また、アフリカトリパノソーマに関しては、極めて低濃度で効果を示す抗トリパノソーマ薬アスコフラノンの標的であるシアン耐性酸化酵素のタンパク質としての性質を調べる目的で、これまでに組換え酵素を用い高純度で高活性の酵素の精製法を確立し、この精製標品を用いてアスコフラノンやその誘導体との共結晶を得てその結合様式を明らかにできた。そして昨年度は実際にこれらの誘導体の培養型のトリパノソーマの増殖阻害について調べた。そこで今年度はこのアスコフラノンの実用化をめざし、その安全性を確認するために哺乳類細胞について増殖阻害を調べた。

また 中南米のトリパノソーマ症 Chagas 病の病原体である *Trypanosoma cruzi* のレドックス調節に関わる酵素群の立体構造に基づく薬剤の分子設計を進めているが、ミトコンドリアの複合体 II (SQR) に関して精製を試みたところ *T. cruzi* 酵素は 12 種類のサブユニット (7.3~62 kDa) で構成される二量体酵素 (286.5 kDa x 2) で、哺乳類や出芽酵母の 4 サブユニット型酵素 (約 130 kDa) とは大きく異なっていた。また本酵素は複合体 II の特異的阻害剤に対する感受性が哺乳類の酵素と大きく異なっており、実際に酵素活性を最も強く阻害するアトペニン原虫の増殖を抑制する事から、薬剤標的として極めて有望と考えられた。そこでその立体構造を解析する目的で大量培養が可能でヒトへの感染の危険

性がないトリパノソーマ科鞭毛虫類の一種で爬虫類に寄生する *Leishmania tarentolae* を用いる事とした。これまでに *L. tarentolae* の培養において液体培地 10 L 当たりから 3 g 以上の大量のミトコンドリアを得る条件を確立し、複合体 II (LtSQR) の精製を検討したところ *T. cruzi* 同様に 10~12 のサブユニットの部分精製標品を得る事ができた。本年度はさらにその精製法を改良し、純度の高い標品の精製法を試み、この標品を用いて各サブユニットのアミノ酸配列を決定した。

(倫理面への配慮)

本研究はほとんどが *in vitro* の実験系であり、またネズミマラリア原虫の実験は東京大学医学部の動物実験指針に従って行ったもので、倫理面の問題はない。

C. 研究結果

【マラリア原虫】

多くの真核生物においてミトコンドリアは TCA 回路および電子伝達系を通じた酸化的リン酸化による ATP 産生の場として、エネルギー代謝における重要な役割を担っている。しかし、赤血球内期マラリア原虫は細胞質における解糖系のみによってエネルギー代謝を行なっていると考えられてきた。一方で、マラリア原虫は TCA 回路および電子伝達系に必要な酵素のほぼ全ての遺伝子を持ち合わせており、酸化的リン酸化のマラリア原虫における生理的意義は明らかになっていなかった。マラリア原虫 TCA 回路および電子伝達系の役割を明らかにするため、マウスマラリア原虫を用い、ミトコンドリアのマーカー酵素で TCA 回路と電子伝達系を直接結ぶ複合体 II (コハク酸-ユビキノン還元酵素) の触媒部位である Fp サブユニット遺伝子 (*Pbsdha*) 破壊株を作製し、その表現型解析を行った。*Pbsdha* 遺