

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、*Pbsdha* 遺伝子破壊原虫のマウスへの感染は観察されなかった。これらの結果は、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。

【アフリカトリパノソーマ】

本年度は宿主哺乳類に対するアスコフラノンとその誘導体の影響に関して知見を得るため、アスコフラノンと同様に糸状菌が産生し構造の類似しているアスコクロリンが阻害するミトコンドリア呼吸鎖複合体 II-III に対する構造活性相関解析を行った。複合体 III は TAO と同様ユビキノール結合部位を持つため、アスコクロリン同様にアスコフラノン誘導体により阻害される可能性がある。構造活性相関解析の結果、組み換え TAO に対する阻害効果を増強させる芳香環内メチル基は、複合体 II-III に対する阻害活性を低下させる事、リンカーの構造が複合体 II-III の阻害活性に大きく影響する事、培養原虫に対する阻害効果を増強させる誘導体末端のピバロイル基は、複合体 II-III に対する阻害活性には影響しないことが明らかとなった。

【アメリカトリパノソーマ】

昨年度までに解析に必要な精製標品を再現性良く大量に得られる条件を確立する目的で、原虫の培養条件を検討した結果、YE 培地で *L. tarentolae* の 10 L 培養を行うと、*T. cruzi* 10 L 培養時の 10 倍量の SQR 活性をミトコンドリア画分に分離できる事が判った。またポリエチレングリコール沈殿とイオン交換カラム

Fractogel の併用により、高純度の LtSQR 標品を mg オーダーで調製可能な大量精製系を確立する事ができた。今年度はこの方法をさらに改良した。すなわち、50 mg のミトコンドリア画分から LtSQR を非イオン界面活性剤 Sucrose monolaurate で可溶化し、ポリエチレングリコール 3350 (PEG3350) によって沈殿させると、ミトコンドリア時の 50 % の SQR 酵素活性を保ったまま比活性が 3.1 倍に上昇した。その後、イオン交換カラム DEAE sepharose に標品を吸着させ、非イオン性界面活性剤を含む緩衝液でカラムを洗浄し SQR を溶出した。溶出標品の SQR 酵素活性はミトコンドリア画分の 4.3 % で、その比活性は 23 倍 (2.65 mmol/min/mg) に上昇した。溶出画分の 4-16 % hrCNE および SDH 活性染色の結果から LtSQR の分子量は約 520 kDa と推定された。また標品の hrCNE/Tricine-SDS PAGE 二次元電気泳動を行うと、一次元目で SDH 活性染色により標識されたバンドから計 12 本のバンドが検出され、これらを MALDI-TOF-LC-MS/MS によって分析した結果、合計 9 種類の LtSQR サブユニット SDH1 (69 kDa)、SDH2_C (23 kDa)、SDH2_N (27 kDa)、SDH3 (13~15 kDa)、SDH4 (9 kDa)、SDH5 (59 kDa)、SDH6 (37 kDa)、SDH7 (23 kDa)、SDH8 (19 kDa) について、次世代シーケンサーで配列決定したゲノム上の各候補サブユニットの予想アミノ酸配列と一致する断片を確認する事ができた。

D. 考察

これまで赤血球内ステージ原虫を用いた研究では、マラリア原虫はグルコースを用いた解糖系による ATP 産生を行なっていると考えられ、TCA 回路や電子伝達系の機能は不明なままであった。本研究において蚊のステージに注目した結果、マラリア原虫 TCA 回路酵素がオーキネートからオーシスト形成にかけて

の原虫にとって必須であることを初めて示すことができた。蚊の体腔液内の糖はグルコースではなくトレハロースであり、グルコースが枯渇することにより代替炭素源として体腔液内のアミノ酸を用いている可能性がある。また、オーシストからオーキネートのステージは中町内から中腸壁細胞表面への移動が起こるため、酸素が増加する環境にあると考えられ、アミノ酸を用いた酸化リン酸化による ATP 産生を行なっていると考えられる。

我々が見出し、開発中のアスコフラノン[®]は、現在最も強力な抗トリパノソーマ薬とされ、その標的はトリパノソーマのミトコンドリアに局在するシアン耐性酸化酵素である。しかしそのタンパク質としての性質は酵素が極めて不安定であるため、ほとんど判っていなかった。酵素学的な解析に加え、結晶を得る事ができた事は鉄を 2 分子含む膜結合性の 2 核鉄 (di-iron) タンパク質としては初めての報告である。さらに今回アスコフラノンおよびその誘導体が哺乳類細胞の増殖に影響を与えない事が判った事はその実用化へ大きく前進したと考えられる。

複合体 II (コハク酸-ユビキノ還元酵素) は TCA 回路の酵素中唯一の膜結合性の酵素であり、ミトコンドリアのマーカー酵素として知られている。本酵素は呼吸鎖の脱水素酵素としてコハク酸からの還元力を呼吸鎖のユビキノに伝達し、TCA 回路と呼吸鎖を直接結ぶ重要な酵素であり、宿主哺乳類ばかりでなく、寄生虫においてもそのエネルギー代謝に大きな役割を果たしている。これまで、そのサブユニット構造はヒトから細菌まで基本的には 4 つとされていたが、我々は *T. cruzi* の複合体 II が 12 サブユニットから構成される事を明らかにし、寄生虫の持つ多様性がさらに明確になった。この構造はアフリカトリパノソーマやリーシュマニアにも共通しており、

12 サブユニットの複合体 II に対する特異的阻害剤を探索する事によって、極めて作用スペクトルの広い抗原虫薬の開発が期待される。*L. tarentolae* に関してはすでに次世代シーケンサーを用いて全ゲノムの塩基配列の情報を得ており、この解析結果からも *L. tarentolae* の複合体 II は *T. cruzi* の複合体 II 同様に 12 のサブユニットを持ち、さらに極めて類似したアミノ酸配列を持つ事を確認している。*L. tarentolae* の複合体 II の新規な立体構造を解析する事によって、これまで我々が *T. cruzi* のジヒドロオロト酸脱水素酵素で行なって来たのと同様に薬剤の分子設計が可能になると考えられる。同時に精製標品を用いた化合物ライブラリーのスクリーニングも可能となり、特異的阻害剤探索の基盤が整った。実際に *L. tarentolae* の複合体 II や *T. cruzi* の複合体 II を特異的に阻害するシッカニンを見出しており、しかも予備的な実験からシッカニンが *T. cruzi* のアマステイゴートの増殖を阻害する事が判り、リード化合物として大いに期待できる。

E. 結論

マラリア原虫やトリパノソーマなど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、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った。実用化へ向けて、次のステップへ進みたい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

- 1) Molecular interaction of the first 3 enzymes of the *de novo* pyrimidine biosynthetic pathway of *Trypanosoma*

- cruzi*. 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. (2012) **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 418, 140-143
- 2) Critical importance of the *de novo* pyrimidine biosynthesis pathway for *Trypanosoma cruzi* growth in the mammalian host cell cytoplasm. 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. (2012) **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 417, 1002-1006
 - 3) Mitochondrial fumarate reductase as a target of chemotherapy: from parasites to cancer cells. Sakai, C., Tomitsuk, E., Esumi, H., Harada, S. and Kita, K. (2012) **Biochim. Biophys. Acta** 1820, 643-651
 - 4) Crystal structure of mitochondrial quinol-fumarate reductase from the parasitic nematode *Ascaris suum*. Shimizu, H., Osanai, A., Sakamoto, K., Inaoka, D. K., Shiba, T., Harada, S. and Kita, K. (2012) **J. Biochem.** 151, 589-592
 - 5) Critical roles of the mitochondrial complex II in oocyst formation of rodent malaria parasite *Plasmodium berghei*. Hino, A., Hirai, M., Tanaka, Q. T., Watanabe, Y., Matsuoka, H. and Kita, K. (2012) **J. Biochem.** 152, 259-268
 - 6) Towards understanding the role of mitochondrial complex II in the intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*: gene targeting of the Fp subunit. Tanaka, Q. T., Hirai, M., Watanabe, Y. and Kita, K. (2012) **Parasitol. Int.** 61, 726-728
 - 7) Autophagy-related Atg8 localizes to the apicoplast of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Kitamura, K., Kishi-Itakura, C., Tsuboi, T., Sato, S., Kita, K., Ohta, N. and Mizushima, N. (2012) **PLoS ONE** 7(8), e42977
 - 8) Plasmodium cynomolgi genome sequences provide insight into Plasmodium vivax and the monkey malaria clade. Tachibana S, Sullivan SA, Kawai S, Nakamura S, Kim HR, Goto N, Arisue N, Palacpac NM, 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. (2012) **Nat Genet**, 44(9): 1051-5.
 - 9) Novel type of linear mitochondrial genomes with dual flip-flop inversion system in apicomplexan parasites, *Babesia microti* and *Babesia rodhaini*. Hikosaka, K., Tsuji, N., Watanabe, Y., Kishine, H., Horii, T., Igarashi, I., Kita, K. and Tanabe, K. **BMC Genomics**, in press
 - 10) Pharmacophore identification of ascofuranone, potent inhibitor of cyanide-insensitive alternative oxidase of *Trypanosoma brucei*. Saimoto, H., Kido, Y., Haga, Y., Sakamoto, K. and Kita, K. **J. Biochem.** in press
 - 11) Structure of the trypanosome cyanide-insensitive alternative oxidase, a promising drug target. 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. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**,
in press

学会発表

- 1) 北 潔 「化学療法の標的としての
寄生虫ミトコンドリアとその多様
性の解析」
第 53 回日本熱帯医学会大会
平成 24 年 9 月 (帯広)
- 2) Kita, Kiyoshi 「Mitochondrial fumarate
reductase as a target of chemotherapy:
from parasites to cancer cells」 The 2nd
UCL - JSPS international Symposium
Mitochondria - from the fundamental
aspects to medical importance -
2012, June (London)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

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))
分担研究報告書

アジアの三日熱マalaria原虫の遺伝的多様度と伝播動態の解明

研究分担者 狩野 繁之 国立国際医療研究センター研究所部長

研究協力者 石上 盛敏 国立国際医療研究センター研究所上級研究員

研究要旨 本研究では、1993年から再流行している韓国の三日熱マalaria (*Pv*) の遺伝的多様度と伝播動態を、同原虫のマイクロサテライト (MS) DNA 14 座位に基づき多型解析により明らかにすることを目的とした。近年、*Pv* 集団の遺伝的多様度や集団構造に関する研究が報告されはじめたが、本研究のように長期間 (1994年～2008年：15年間) にわたって *Pv* 集団の伝播動態を解析した報告はこれが初めてである。*Pv* 163 株、14 座位の MS DNA データに基づき、遺伝的多様度を調べた結果、*Pv* 集団の多様度が増加していると同時に、連鎖不平衡の度合いが減少していることが明らかとなった。さらに 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。交配のみでこれほど急激に集団が変化するとは考えにくいこと、並びに流行地域が北朝鮮との軍事境界線付近であることから、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alariaを制圧できずにいる原因だと推察された。

A. 研究目的

近年、三日熱マalaria原虫 (*Pv*) 集団の遺伝的多様度や集団構造に関する研究が、通年の流行が見られる熱帯・亜熱帯地域から報告されているが、季節性の流行を示す温帯地域からは少ない。そこで昨年度に引き続き、日本の防疫にも重要な韓国(温帯気候)の三日熱マalaria原虫集団に着目し研究を進めた。韓国では 1970 年代後半に土着の三日熱マalariaの制圧に成功しているが、1993 年から北朝鮮との軍事境界線付近に従軍した韓国軍兵士を中心に再流行が確認され、今なお流行が続いている。本年度は解析に用いる *Pv* マイクロサテライト (MS) DNA マーカーの数を、昨年度の 10 座位から 14 座位に増やし、検体数も 87 検体から 163 検体に増やし、韓国の *Pv* 集団の遺伝的多様度と伝播動態についてより精度の高い解析を行い、一度はその制圧に成功した韓国が、再流行の確認から 19 年以上経過した現在でもなお制圧出来ずにいる原因を解明することを目指した。

B. 研究方法

- 1) 材料は分担研究者の所属する国立国際医療研究センター研究所で保管している韓国の三日熱マalaria原虫 (*Pv*) 163 株 (1994 年～2008 年採取：韓国・仁済大学医学部の高元圭教授より分与) を用いた。
- 2) 患者血球から *Pv* DNA を抽出し、PCR 法で *Pv* MS DNA 14 座位を増幅後、ABI Genetic Analyzer 3130xl を用いてフラグメント解析を行った。得られた対立遺伝子 (アリル) データに基づき、*Pv* 集団の遺伝的多様度 (各 MS 座位に観察されるアリル数とヘテロ接合度) を算出した。次に MS 14 座位のアリルの組合せに基づき、連鎖不平衡の度合い、Structure 解析による集団構造の変化、年毎の集団間の分化度、並びにボトルネックの有無を推定した。

(倫理面への配慮)

本研究に用いた *Pv* 株の採取は、長期間で広範囲に渡っており、患者からの *Pv* 株の採取の際に、文書または口頭によるインフォームド・コンセントを取得していない。しかし、本研究分担者らは患者

からの *Pv* 株の採取に関わっておらず、なおかつ患者と *Pv* 株が連結不可能匿名可されているので、本研究によって得られる成果が、*Pv* 株の提供者に対していかなる不利益を与えることはない。また本研究は赤血球に感染したマラリア原虫の遺伝子解析を行うもので、宿主であるヒトの遺伝子解析は行っておらず、文部科学省・厚生労働省・経済産業省が共同作成した「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」には抵触しない。

C. 研究結果

15 年間(1994 年～2008 年)にわたって採取された *Pv* 集団(163 株)の遺伝的多様度が、時間の経過に伴い増加傾向にあることは、昨年度にすでに報告済みである(Iwagami *et al.*, 2012)。一方、本年度の解析で、連鎖不平衡の度合い(I_A^S)が、時間の経過に伴い減少傾向にあることが明らかとなった(例えば、1996: $I_A^S = 0.524$, 1999: $I_A^S = 0.420$, 2002-2003: $I_A^S = 0.210$, 2006-2008: $I_A^S = 0.109$, 値が大きいほど連鎖不平衡の度合いが強いことを示す)。次にベイズの確立論を応用した Structure 解析の結果、韓国の *Pv* 集団は大きく 4 つの集団に分けられ、2002 年ごろを境に遺伝的に大きく変化したことが明らかとなった(図 1)。次に年毎の集団間の遺伝的分化度(F_{ST})を推定した結果、2001 年と 2002 年の *Pv* 集団間で、大きく分化していることが明らかとなった。次にボトルネックの有無を推定した結果、1996 年と 1998 年に、ボトルネックを生じた可能性が示唆された。

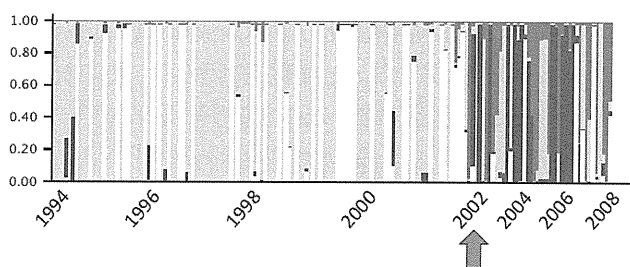


図 1 Structure 解析による集団構造の推定

各タテ棒が各個体を表し、同じ色は遺伝的な類似性を示す。

D. 考察

韓国 *Pv* 集団の集団遺伝学的特徴を経時的に解析した結果、時間の経過と共に多様度が増加傾向にあると同時に、連鎖不平衡の度合いが減少傾向にあることが観察された。この結果からよりランダ

ムな交配が進行していると推察された。さらに Structure 解析を行った結果、韓国 *Pv* 集団が 2002 年ごろを境に、遺伝的に大きく変化したことが明らかとなった(投稿論文作成中)。また年毎の集団間の分化度を推定した結果、2001 年と 2002 年の *Pv* 集団間で、大きく分化していた。一つの流行地域に分布するマラリア原虫集団が、交配のみでこれほど急激に集団の変化を生じるとは考えにくいこと、並びに流行地域が北朝鮮との軍事境界線付近であることから総合的に判断して、恐らく北朝鮮から新たな *Pv* 株が韓国に流入していると推察された。

E. 結論

韓国で 1993 年に三日熱マラリアの再流行が報告されてから 19 年以上経過した現在でもなお制圧できずにいる原因は、北朝鮮からの *Pv* 株の流入によると推察された。特に 2002 年ごろを境に、*Pv* 集団が大きく変化していたことから、韓国はそれ以前の *Pv* 集団をほぼ制圧したものの、北朝鮮から新たな *Pv* 集団が流入したと推察された。本解析方法はマラリアの対策が原虫集団に与える影響の評価や、患者数などの疫学情報からはわからないマラリアの流行状況を推定する有効な解析手法であることも明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

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

2. 学会発表

石上盛敏, Weon-Gyu Kho, PT. Rivera, EA. Villacorte, 狩野繁之. 三日熱マラリア原虫 *pvmdr1* 変異に関する遺伝疫学. 第81回日本寄生虫学会大会, 兵庫医科大学(2012年3月22-24日)

G. 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(国際医学協力研究事業)

分担研究報告書

ワクチン分子の無細胞系合成システムの確立

分担研究者 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

研究要旨： 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。以上の結果から、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系のマラリアワクチン研究への有用性が確認された。

A. 研究目的

マラリア撲滅が 2007 年に再度宣言されて依頼、マラリアワクチン開発は緊急の課題として再認識された。そのためには、既知のワクチン候補のみの研究では限界に達しており、新たなワクチン候補分子の探索が、緊急の課題となっている。申請者らは、マラリア原虫組換えタンパク質の合成に優れているコムギ胚芽無細胞タンパク質合成法を用いて熱帯熱マラリア原虫のゲノムワイドに組換えタンパク質を発現し、その中から新規抗原を同定することを目的に本研究を実施した。

B. 研究方法

1) 熱帯熱マラリア原虫メロゾイト期組換えビオチン化タンパク質アレイの合成

マラリアゲノム情報データベースより、メロゾイト期にのみ発現が示唆されている遺伝子 114 種類を選択した。熱帯熱マラリア原虫 3D7 株のメロゾ

イト期 cDNA からコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いてこれらの組換えタンパク質を合成し、ビオチン化マラリアタンパク質アレイを作製した。

2) ハイスループット抗原抗体アッセイの実施

これらのビオチン化タンパク質アレイとマラリア免疫ヒト血清との抗原抗体反応を検出するために、申請者らが確立したアルファスクリーン法を応用した。

3) 抗体の作製と熱帯熱マラリア原虫増殖阻害アッセイ

ヒト防御抗体と特異的に反応するマラリア原虫タンパク質を同定した後、これらを実験動物に免疫して特異抗体を作製し、培養熱帯熱マラリア原虫 3D7 株に上記で作製した抗体を加え、原虫増殖阻害活性を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究で使用したタイ国におけるマラリア患者血液の採取に当たって

は、タイ国保健省の許可を得、患者への説明を十分行なった上で同意を得て実施した。また、本血清試料の利用は愛媛大学医学部臨床研究倫理審査委員会で許可を得ている。また、実験動物における抗体の作製は、愛媛大学動物実験委員会において許可を得ている。

C. 研究結果および考察

1) 熱帯熱マラリア原虫メロゾイト期組換えビオチン化タンパク質アレイの合成

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて、熱帯熱マラリア原虫タンパク質の内、マラリアゲノム情報データベース (PlasmoDB) より、メロゾイト期にのみ発現が示唆されている遺伝子 114 種類を選択し、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いてビオチン化マラリアタンパク質アレイを作製した。

2) ハイスループット抗原抗体アッセイの実施

上記のビオチン化マラリアタンパク質アレイを用いて、タイから得られた熱帯熱マラリアに対する防御抗体を含有しているヒト血清 22 人分の反応性をアルファスクリーン法を用いて検討した。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 がマラリア防御ヒト抗体と特異的に反応していることが明らかとなった。

3) 抗体の作製と熱帯熱マラリア原虫増殖阻害アッセイ

抗 PfMSPDBL1 抗体を用いて熱帯熱マラリア原虫増殖阻害アッセイを行った結果、熱帯熱マラリア原虫 3D7 株に対する増殖阻害活性を有していることが明らかとなった。また、間接蛍光抗体法を用いて PfMSPDBL1 のメロゾイトにおける局在を観察したところ、メロゾイト表面であった。

以上の結果から、PfMSPDBL1 は新規赤血球期マラリアワクチン候補となる可能性が示唆された。以上の結果から、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成法のマラリアワクチン研究への有用性が確認された。

4) 今後の課題

アルファスクリーン法で同定されたその他の新規の抗原に関しても、PfMSPDBL1 同様個別の研究を進めてゆき、新規ワクチン候補分子の同定をすすめてゆく予定である。

D. 結論

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系は、新規マラリアワクチン候補抗原の網羅的な同定に有用と考えられた。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) 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.

2) 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.
- 3) 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.
2. 学会発表
- 1) Arumugam TU, Takeo S, Yamasaki T, Thonkukiatkul A, Miura K, Otsuki H, Zhou H, Long CA, Sattabongkot J, Thompson J, Wilson DW, Beeson JG, Healer J, Crabb BS, Cowman AF, Torii M, Tsuboi T.
A new sialic acid independent invasion ligand of *Pf* merozoite is a novel blood-stage vaccine candidate antigen.
Molecular Approaches to Malaria 2012, Lorne, Australia, February 19-23, 2012.
- 2) Ito D, Yamasaki T, Takeo S, Han ET, Thonkukiatkul A, Torii M, Tsuboi T.
RALP1 is localized at rhoptry neck of *Plasmodium falciparum* merozoite and translocates to moving junction.
Molecular Approaches to Malaria 2012, Lorne, Australia, February 19-23, 2012.
- 3) Tsuboi T, Takeo S, Sakamoto H, Kaneko T, Arumugam TU, Yamasaki T, Ito D, Takashima E, Sattabongkot J, Torii M.
Two post-genome approaches for the discovery of novel malaria blood-stage vaccine candidates using wheat germ cell-free system.
Molecular Approaches to Malaria 2012, Lorne, Australia, February 19-23, 2012.
- 4) Tachibana M, Sudo M, Yokouchi Y, Ishino T, Tsuboi T, Torii M.
Identification of novel molecule that is specifically expressed on the surface of microgamete.
Molecular Approaches to Malaria 2012, Lorne, Australia, February 19-23, 2012.
- 5) Li J, Chen JH, Lu F, Cheng Y, Wang B, Kong DH, Ha KS, Lim CS, Ito D, Tsuboi T, Han ET.
Pv12, a novel putative GPI-anchored rhoptry specific protein of *Plasmodium vivax*.
Molecular Approaches to Malaria 2012, Lorne, Australia, February 19-23, 2012.
- 6) Murata E, Tokunaga N, Tachibana M, Tsuboi T, Torii M, Ishino T.
The investigation of the mechanism how malaria sporozoites invade salivary glands.
Molecular Approaches to Malaria 2012, Lorne, Australia, February 19-23, 2012.
- 7) Shinzawa N, Ishino T, Tachibana M,

- Tsuboi T, Torii M.
Functional dissection of vectorial capacity in *Plasmodium*-refractory *Anopheles stephensi*.
Molecular Approaches to Malaria 2012, Lorne, Australia, February 19-23, 2012.
- 8) Richards JS, Arumugam TU, Reiling L, Fowkes FJ, Healer J, Hodder AN, Anders RF, Takeo S, Gilson PR, Thompson JK, Beeson JG, Narum DL, Chitnis CE, Cross N, Langer C, Siba PM, King CL, Mueller I, Torii M, Crabb BS, Cowman AF, Tsuboi T, Beeson J.
Associations between protection from malaria and antibodies to known and predicted merozoite antigens.
Molecular Approaches to Malaria 2012, Lorne, Australia, February 19-23, 2012.
- 9) Tsuboi T.
From the Bench to the Field - Understanding the importance of clinical samples -
Parasitology Clinical Research Workshop, Suita, Japan, June 21-22, 2012
- 10) Tsuboi T.
Application of cell-free protein synthesis technology for production of malaria protein.
Cell-Free Protein Synthesis Workshop, Bangkok, Thailand, June 25-27, 2012.
- 11) Tsuboi T.
Identification of novel malaria vaccine candidates using wheat germ cell-free system.
The 10th Matsuyama International Symposium on Cell-Free Sciences, Matsuyama, Japan, September 25, 2012.
- 12) Arumugam TU, Tachibana M, Yamasaki T, Thonkukiatkul A, Cowman AF, Torii M, Tsuboi T.
Identification of GAMA as a multi-stage malaria vaccine candidate.
The 10th Matsuyama International Symposium on Cell-Free Sciences, Matsuyama, Japan, September 25, 2012.
- 13) Ito D, Hasegawa T, Yamasaki T, Takeo S, Han ET, Thonkukiatkul A, Torii M, Tsuboi T.
RALP1 is localized at rhoptry neck of *Plasmodium falciparum* merozoite and translocates to moving junction.
The 10th Matsuyama International Symposium on Cell-Free Sciences, Matsuyama, Japan, September 25, 2012.
- 14) Sasaoka C, Sakamoto H, Ito D, Takeo S, Sattabongkot J, Torii M, Takashima E, Tsuboi T.
Molecular characterization of hypothetical *Plasmodium falciparum* protein, PfH04.
The 10th Matsuyama International Symposium on Cell-Free Sciences, Matsuyama, Japan, September 25, 2012.
- 15) Sugino Y, Maki R, Tokunaga N,

- Shinzawa N, Tsuboi T, Ishino T, Torii M.
RALP1 has an important role during the liver infection.
The 10th Matsuyama International Symposium on Cell-Free Sciences, Matsuyama, Japan, September 25, 2012.
- 16) Tachibana M, Sudo M, Yokouchi Y, Ishino T, Tsuboi T, Torii M.
Identification of novel molecule that is specifically expressed on the surface of microgamete.
The 10th Matsuyama International Symposium on Cell-Free Sciences, Matsuyama, Japan, September 25, 2012.
- 17) Murata E, Tokunaga N, Tachibana M, Tsuboi T, Torii M, Ishino T.
Rhoptry neck protein 2 is produced in oocyst-derived sporozoites and required for salivary gland invasion.
The 10th Matsuyama International Symposium on Cell-Free Sciences, Matsuyama, Japan, September 25, 2012.
- 18) Cherif MS, Shuaibu MN, Kurosaki T, Kodama Y, Helegbe GK, Kikuchi M, Yanagi T, Tsuboi T, Sasaki H, Yui K, Hirayama K.
Differential activation of dendritic cells by nanoparticle-coated PyMSP-1 DNA vaccine using different route of delivery.
ASTMH 61st annual meeting, Atlanta, USA, November 11-15, 2012.
- 19) Ishino T, Murata E, Tokunaga N, Tachibana M, Tsuboi T, Torii M.
Rhoptry neck protein 2 is produced in oocyst-derived sporozoites and required for salivary gland invasion.
ASTMH 61st annual meeting, Atlanta, USA, November 11-15, 2012.
- 20) Cheng Y, Wang Y, HAN ET, Tsuboi T, Ito D, Kong DH, Ha KS, Chen JH, Lu F, Li J, Wang B, Sattabongkot J.
Identification of a novel erythrocyte-binding ligand of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 paralog, PvMSP1P.
ASTMH 61st annual meeting, Atlanta, USA, November 11-15, 2012.
- 21) Kapulu MC, Yannick DF, Biswas S, Miura K, Blagborough AM, Williams AR, Draper SJ, Goodman AL, Turner AV, Nicosia A, Tsuboi T, Wu Y, Gilbert SG, Cohuet A, Sinden RE, Hill AV.
Comparative assessment of transmission blocking malaria vaccine candidate antigens using an adenovirus-MVA prime-boost regime.
ASTMH 61st annual meeting, Atlanta, USA, November 11-15, 2012.
- 22) Miura K, Takashima E, Deng B, Tullo G, Diouf A, Moretz SE, Long CA, Tsuboi T.
Functional comparison of leading *Plasmodium falciparum* transmission blocking vaccine candidates by standard membrane feeding assay.
ASTMH 61st annual meeting, Atlanta,

USA, November 11-15, 2012.

- 23) 宮田 健、原國 哲也、坪井 敬文、
Jetsumon Sattabongkot、橘 真由
美、鳥居 本美、新川 武
三日熱マラリア伝搬阻止ワクチン候補
抗原(Pvs25)の高分子量化による可
溶性凝集体構築とそのワクチン効果
第 81 回日本寄生虫学会大会、西宮
市、3/23-24、2012。
- 24) 早川 枝李、徳舛 富由樹、臼倉
治郎、坪井 敬文、Wellems Thomas、
松岡 裕之
熱帯熱マラリア感染赤血球の内部に
構築される3次元膜構造の観察
第 81 回日本寄生虫学会大会、西宮
市、3/23-24、2012。
- 25) 伊藤 大輔、長谷川 倫之、三浦
憲豊、Thongkukiatkul Amporn、竹尾
暁、鳥居 本美、坪井 敬文
熱帯熱マラリア原虫 RALP1 はロプトリ
ー頸部に局在し密着接合形成に関
与する
第 81 回日本寄生虫学会大会、西宮
市、3/23-24、2012。
- 26) 坂本 寛和、金子 隆昌、竹尾 暁、
Maier Alexander G.、Sattabongkot
Jetsumon、Cowman Alan F.、坪井
敬文
熱帯熱マラリア原虫の新規メロゾイト
表面抗原 MSPDBL1 に対する抗体は
原虫の赤血球侵入を阻害する
第 81 回日本寄生虫学会大会、西宮
市、3/23-24、2012。
- 27) 徳永 順士、村田 英理、坪井 敬
文、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タ
ンパク質の同定と発現解析
第 81 回日本寄生虫学会大会、西宮
市、3/23-24、2012。
- 28) 入子 英幸、大槻 均、蓼本 早百
合、橘 真由美、石野 智子、鳥居
本美、坪井 敬文、福本 宗嗣
熱帯熱マラリア原虫のヘモグロビン輸
送機構
第 81 回日本寄生虫学会大会、西宮
市、3/23-24、2012。
- 29) 橘 真由美、石野 智子、横内 ゆき、
坪井 敬文、鳥居 本美
ネズミマラリア原虫の蚊人工吸血法
(メンブレンフィーディング法)の確立
第 81 回日本寄生虫学会大会、西宮
市、3/23-24、2012。
- 30) 吉田 栄人、伊従 光洋、坪井 敬
文、Sattabongkot Jetsumon、Mlambo
Godfree、Blagborough Andrew、
Sinden Robert E.、Kumar Nirbhay
バキュロウイルスベクターを用いた熱
帯熱・三日熱マラリア伝播阻止ワクチ
ンの開発研究
第 81 回日本寄生虫学会大会、西宮
市、3/23-24、2012。
- 31) Cherif Mahamoud Sama、Shuaibu
Mohammed Nasir、黒崎 友亮、児玉
幸修、Helegbe Gideon Kofi、菊池
三穂子、柳 哲雄、坪井 敬文、佐々
木 均、由比 克之、平山 謙二
Nanoparticle-coated PyMSP-1
plasmid engages CD40 on DCs to
produce high levels of IL-12.
第 81 回日本寄生虫学会大会、西宮
市、3/23-24、2012。

- 32) 石野智子、村田英理、徳永順士、橘真由美、坪井敬文、鳥居本美
マラリア原虫先端部小器官(ロプトリー)に局在する分子のスプロゾイトにおける機能解析
第 81 回日本寄生虫学会大会、西宮市、3/23-24、2012。
- 33) 入子英幸、大槻 均、橘真由美、石野智子、鳥居本美、坪井敬文、福本宗嗣
熱帯熱マラリア原虫の物質輸送機構
第20回分子寄生虫学ワークショップ、神戸市、8/26-29、2012。
- 34) 新澤直明、石野智子、橘真由美、坪井敬文、鳥居本美
マラリア抵抗性ハマダラカを用いたマラリア原虫媒介機構の解明
第20回分子寄生虫学ワークショップ、神戸市、8/26-29、2012。
- 35) 石野智子、徳永順士、杉野 友香、野崎 守、橘真由美、坪井敬文、鳥居本美
スプロゾイトロプトリー分子の機能分担
第20回分子寄生虫学ワークショップ、神戸市、8/26-29、2012。
- 36) 杉野 友香、榎 利衣、徳永順士、新澤直明、坪井敬文、石野智子、鳥居本美
ロプトリータンパク質(RALP1)は宿主肝臓への感染に関わる
第20回分子寄生虫学ワークショップ、神戸市、8/26-29、2012。
- 37) 高島英造、アルムガム T ウマサンカール、坪井敬文
コムギ無細胞系を利用したヒト/マラリア原虫タンパク質相互作用のゲノムワイド探索の試み
第20回分子寄生虫学ワークショップ、神戸市、8/26-29、2012。
- 38) 笹岡千紗、伊藤大輔、高島英造、坪井敬文
無症状マラリア原虫感染者において強い抗原性を有する原虫タンパク質 H04
第20回分子寄生虫学ワークショップ、神戸市、8/26-29、2012。
- 39) 伊藤大輔、長谷川倫之、山崎勤、三浦憲豊、Amporn Thongkukiatkul、竹尾暁、鳥居本美、坪井敬文
マラリア原虫メロゾイトの赤血球侵入におけるロプトリー頸部分子 RALP1の機能解析
第20回分子寄生虫学ワークショップ、神戸市、8/26-29、2012。
- 40) 坪井敬文、山崎 勤、Arumugam Thangavelu U.、伊藤大輔、高島英造、鳥居本美
機能予測に基づくポストゲノム熱帯熱マラリア赤血球期ワクチン候補抗原の探索
第10回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム、前橋市、10/12-13、2012。

厚生科学研究費補助金(国際医学協力研究事業)
分担研究報告書

赤痢アメーバの病原機構の解明

分担研究者 野崎 智義 国立感染症研究所 部長

研究要旨 赤痢アメーバ症を始めとする腸管原虫症はアジア・アフリカにおける重要な感染症である。本研究では、赤痢アメーバをモデルとして、本原虫における代謝経路の全容の解明を目的として、網羅的遺伝子発現解析を継続的に行った。赤痢アメーバ栄養型は寄生・組織侵入時に様々な酸化ストレスに暴露し、その応答が生存に必須であり、この点を解析の中心とした。その一助として、赤痢アメーバのアミノ酸飢餓下での応答の解析を行った。更にその遺伝子の一部に関して機能解析を行った。

A. 研究目的

赤痢アメーバ症(アメーバ赤痢並びに腸管外アメーバ症)は熱帯・亜熱帯の開発途上国を中心に世界の人口の約1%が感染する重要な原虫性腸管感染症である。我が国では、男性同性愛者および知的障害者において高い感染率を示し、問題となっている。その遺伝子情報は、全ゲノムの読了により明らかにされ(Lofus Nature 2005)、本原虫の研究に不可欠な核酸情報の基盤的は明らかにされている。一方、原虫が感染過程で暴露される様々な宿主由来の酸化ストレス応答等に関しては、未解明な点が多く、網羅的遺伝子解析による俯瞰的理解が不可欠である。

本年度は昨年度同定された鉄イオウフラビンタンパク質 ISF の役割について解明した。

B. 研究方法

1. 培養

赤痢アメーバ株 HM-1: IMSS cl6(Louis Buddy Diamond の分離による)の培養は常法の無菌培養法に従った。

2. 過剰発現体の作成

Iron sulfur flavoprotein 1 (ISF1)及び ISF2 遺伝子の ORF の N-末端部分 420bp を pSAP2-Gunma ベクターに挿入し、gene silencing 用プラスミドを作成した。赤痢アメーバ形質転換体の作成はリポ

フェクションを用い、常法に従った。

(倫理面への配慮)本研究に関わる病原体の取扱に関する許可は当該研究機関にて得られている。

C. 研究結果

1. ISF 遺伝子の発現抑制による細胞増殖への影響

赤痢アメーバの栄養型をシステイン枯渇下で発現上昇の見られた 2 種の ISFs (ISF1, EHI_138480; ISF2, EHI_025710) の生理的役割を明らかにするために、これらの遺伝子の発現抑制体を epigenetic transcriptional gene silencing 法により作成した。本方法は antisense small RNA を介した転写レベルでの制御により目的遺伝子の発現を抑制する方法である。RT-PCR でこれら遺伝子の発現抑制を確認したところ、ISF1, 2 共に RNA は大きく減少していた(図 1)。一方、その他の遺伝子に対する影響は極めて少なかった(データ示さず)。

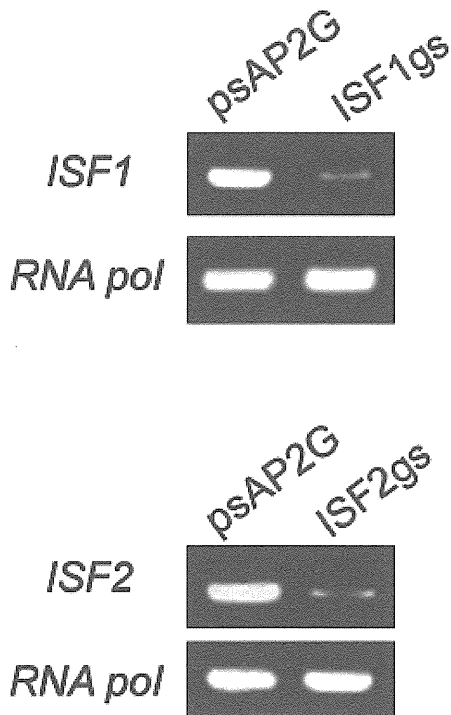


図1 ISF1, 2 の gene silencing 法による発現抑制の RT-PCR による確認。RNA polymerase を control とした。

次に、ISF1, 2 の発現抑制による増殖への影響を増殖動態の解析により明らかにした(図2)。通常の in vitro 培養条件では pSAP2 の control に比べて ISF1 gene silence 株では増殖に変化がなかった。一方 ISF2 では軽微な増殖阻害が見られた。またシステインの枯渇下では、control に比べて ISF1 gene silence により軽微な、ISF1 の抑制により重篤な増殖阻害が観察された。

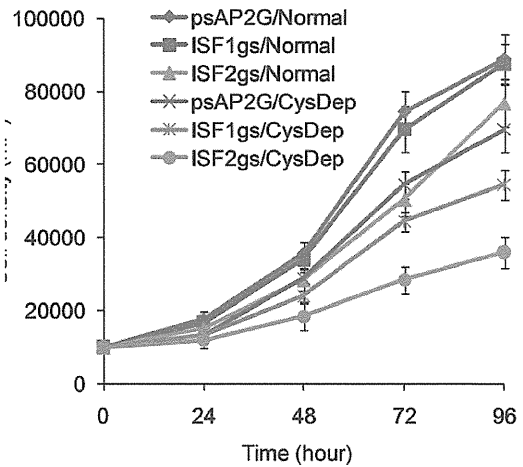


図3 ISF1, 2 の発現抑制によるシステイン存在又は非存在下での栄養型の増殖。縦軸は 1ml あたりの細胞数を表す。

2. ISF 遺伝子の発現抑制による酸化ストレスへの抵抗性の変化

ISF1 及び ISF2 の発現抑制による参加ストレス応答への影響を知るために、これらの発現抑制体の過酸化水素に対する抵抗性を評価した(図3)。0.8-6.4 mM の過酸化水素に対するこれら発現抑制体の感受性はコントロールと比較していずれの濃度でも差が見られなかった。

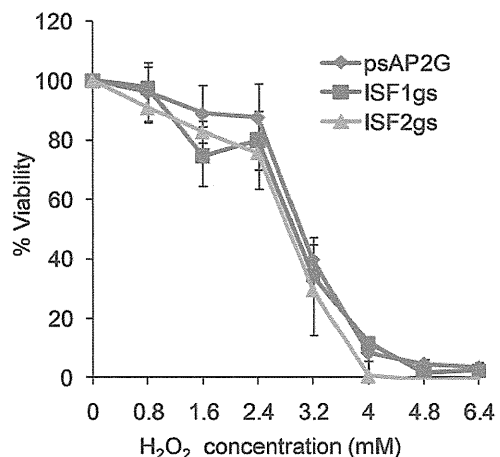


図3 ISF1, 2 の発現抑制による過酸化水素に対する抵抗性の変化

D. 考察及び結論

赤痢アメーバは主要な抗酸化物質で

あるグルタチオン並びに、グルタチオン合成、還元系を持たない。一方で一部の細菌の有す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 タンパク質群を多く有している。更に本原虫に選択的に存在する NADPH 依存性酸化還元酵素(EhNO1, 2)などに代表される特殊な酸化ストレス防御機構を有している。これらは一般の原核・真核生物と異なる進化的に重要な生物学的な特徴である。

本年度はこれまでの網羅的発現解析により同定された ISF 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。このことは ISF1, 2 の単独の過剰発現は過酸化水素への抵抗の賦与には不十分であることを示す一方で、ISF1, 2 の抗酸化ストレス応答への関与の否定には不十分であると考えられた。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。

E. 健康危険情報

該当せず

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当せず。

2. 実用新案登録

該当せず

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」

研究協力者 報告書

フィラリア症の疫学研究（診断法の開発と野外応用）

研究協力者 愛知医科大学医学部 伊藤 誠

研究要旨

これまでに開発した尿免疫診断法に改良を加えることにより、測定の手続きを減らし、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。これまでの調査地以外でも、尿診断法がフィラリア症対策の評価に有用であることを示すことができた。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。

A. 研究目的

WHO主導による「フィラリア症制圧プログラム」は、リンパ系フィラリア症流行地の多くで5回の集団治療を完了し、有病率は激減した。現在、征圧確認のための方法の選択ならびに、再燃の早期発見のための監視機構の構築が重要な課題となっている。

感染者がほとんど無くなった地域では、従来の夜間採血による末梢血中のマイクロフィラリア検出法は住民の協力が得難く、活動を続けるのは容易でない（大規模な集団検血などはますます困難になるであろう）。そこで、住民に迷惑をかけずにフィラリア症の感染・伝播情報を収集するために、これまでに開発した方法の改良を図ること、また、これまでの調査地域外のフィラリア症流行地にも調査範囲を広げることが目的とした。

新たなフィラリア症感染の阻止だけでなく、象皮病などの症状を軽減するための対策も同時に進行させる。

B. 研究方法

「住民に優しい」疫学調査の実施法を確立する

小学生を対象とする尿免疫診断と、媒介蚊の調査を基本とし、これらの結果に基づいて必要な地域を選定し住民検査（採血も含む）を実施する。

尿免疫診断法の改良

従来の尿ELISAおよび目視判定できるビーズ法の野外応用を容易にするために、常温で長期間保存可能な抗原あるいは抗体吸着プレートを作成する。

媒介蚊調査

ルフナ大学チームと共同し、トラップによる媒介蚊の採集、LAMP法を用いた媒介蚊のフィラリア感染率調査を実施する。また、フィラリアDNAの定量化を行う。

尿による調査地域の拡大

尿による調査地域はこれまで長い協力関係にあるスリランカが中心であった。しかし

WHO 主導の集団駆虫 (MDA) によるフィラリア症対策はアジアの国々を含む多くの地域で実施されており、これらの地域での尿診断法の応用は有益である。ベトナムへも調査地を拡大し、この方法の有用性を確かめる。

象皮病に関する研究 (従来のテーマ継続)

スリランカのルフナ大学チームにより、登録された象皮病患者 (約 100 人) の治療が継続中である。また、発症に関わる遺伝的因子の解明を行う。

(倫理面への配慮)

本研究は、愛知医科大学倫理委員会の審査を経て実施された。スリランカ、バングラデシュ、ベトナムにおける共同研究者は、その所属機関において同様の審査・承認を得ている。被検者には十分な説明を行い同意を得ている。

C. 結果

「住民に優しい」疫学調査の実施法の確立

小学生を対象とした調査は今年度は実施できなかったが、そのための尿診断法や LAMP 法の改良を重点的に行った。

尿免疫診断法の改良

流行地での ELISA やビーズ法の実施のためには、用いる材料が常温で、できるだけ長期間保存できることが必要である。ELISA 用には *Wuchereria bancrofti* のリコンビナント抗原、SXP1、を結合させた ELISA プレートを、またビーズ法のためには抗ヒト IgG4 抗体を結合させたプレートを作成、種々のコーティング剤で処理したのちに 4°C あるいは 37°C で保存し、反応性を継続的に検討した。その結果、37°C で少なくとも半年は性能の低下なく保存可能な抗原結合プレートと、抗体結合プレートを作成することができた。

媒介蚊調査

CDC Gravid Trap をスリランカの調査地に設置し、効率よく吸血蚊を採取するための条件を模索中である。媒介蚊 (*Culex quinquefasciatus*) から *W. bancrofti* 幼虫を検出する高感度な LAMP 法はすでに開発済みであり、今回さらに定量的 LAMP 法を用いることにより、蚊に含まれるフィラリアの DNA 量を測定することが可能となった。蚊の採取ができ次第調査できる準備を整えることができた。

尿による調査地域の拡大

尿によるフィラリア症の診断法を、これまでの調査地 (スリランカ、中国) 以外でも利用するために、ベトナムからの尿検体について、抗体検査をした。かつての流行地であるカンホア省 (マイクロフィラリア陽性率が 5% 以上、1998 年のデータ) からの尿 415 検体を調べたところ、尿中抗体陽性率は 5.1% (21 検体) と低いものであった。5 歳以下の陽性者がいたことから、感染が完全にはなくなっていないが、この地域におけるフィラリア症対策は進んでいるものと考えられた。

象皮病に関する研究

スリランカにおいてこれまでに登録された象皮病患者の治療が継続され、症状の軽減と QL の向上が観察された。

D. 考察

フィラリア尿診断法の改良

診断法は感度・特異性を保ちつつ、できるだけ簡便な方がより実用的である。マイクロタイタープレートへの抗原や抗体をあらかじめ結合しておくことは、測定の手数を減らすのみならず、冷蔵あるいは冷凍すべき試薬数を減らすことになる。今回行った研究から、抗原あるいは抗体結合プレートが Cold chain の確保が難しい場所でも長期間保存できるようになった。

媒介蚊調査

媒介蚊中にフィラリアの DNA を LAMP 法で検出する方法は既に報告している。今回、リアルタイム濁度測定装置を用いることにより、*filaria* 由来 DNA を LAMP 法で定量することができた。媒介蚊中のフィラリア幼虫をさらに精度よく定量できる可能性が示された。

フィラリア症調査地域の拡大

フィラリア症の MDA 対策をいつやめるかの判断には、夜間採血によるマイクロフィラリアの検査、あるいは ICT による血液中のフィラリア由来抗原の検査による調査が用いられてきている。我々が開発した尿診断法は、これまでに、スリランカや中国において、MDA 対策の評価に住民に受け入れやすい方法として使えることを示すことができた。この方法をベトナムのかつての流行地に適用し、これまで通りの成果を上げることができた。さらに応用範囲を拡大する予定である。

象皮病に関する研究

フィラリアの感染がなくなった後にも、象皮病に苦しむ患者のケアは重要なフィラリア症対策である。現在スリランカで進行中の象皮病研究を通じて得られる情報は、今後の象皮病対策に役立つものと期待される。

E. 結論

日本発の尿診断法とフィラリア伝播の確認のための、これも日本発の 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。

G. 研究発表

1. 論文発表

英文論文

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, Pilotte 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.

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]

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

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

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

2. 学会発表

Makoto Itoh. Using anti-P. knowlesi antibodies for epidemiological surveys. The 2nd International Symposium on Human and Monkey Malaria in

Vietnam, "Forest Malaria: from Monkey to Man".
March 6-7. 2012. Nha trang City, Vietnam

Makoto Itoh. Mass-survey of parasitic diseases
with urine samples. 第一回「寄生虫学臨床研究
ワークショップ」2012年6月

Mohammad Sohel Samad, Makoto Itoh, Kazuhiko
Moji, Moazzem Hossain, Dinesh Mondal,
Mohammad Shafiul Alam, Eisaku Kimura.
Application of ELISA to detect urinary IgG4 for
the mass-survey of lymphatic filariasis in
Bangladesh. 12th Asian-Pacific Congress for
Parasitic Zoonosis. Oct 6-7. 2012. Kobe

伊藤 誠、砂原俊彦、Zahidul Mohammad Islam、
Mohammad Sohel Samad、木村英作 Analysis
of location of visceral leishmaniasis by SATscan.
兵庫医科大学 第81回日本寄生虫学会、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
2. 実用新案登録
なし