

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

フィラリア線虫と媒介節足動物の相互関係の解明

研究協力者 動物衛生研究所 辻 尚利

研究要旨

病原体を伝播する吸血性節足動物（ベクター）が保有する生物活性分子の機能探索から以下の成果を得た。1) 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が分かった。特に、システインプロテアーゼ機能を発揮する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 は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が示唆された。2) マダニの自然免疫機構を担うヘモサイトにおいて発現するキモトリプシンインヒビター様分子（HICHI）は、ノックダウンによって吸血行動に関与する多くの特質が抑制されたことから、マダニの恒常性維持に HICHI が不可欠であることが示された。さらに、今回、我々が独自に開発したマダニの人工吸血系が、動物を使って吸血させる *in vivo* モデルと比較して、マダニ吸血時の表現型だけでなく、吸血関連遺伝子の変動も同等であったことから、ベクターモデルとして活用できることが確認された。

A. 研究目的

フィラリア線虫などの内部寄生虫（宿主体内への寄生）とマダニなどの疾病媒介節足動物（ベクター）は宿主の生体防御反応を巧みに回避して寄生を可能としているが、その生残戦略はほとんど分かっていない。本研究では、寄生虫が独自に確立したこうした戦略を支える遺伝子産物の機能解明を実施し、これによって、線虫及びベクターの生存・繁殖・侵入・存続に欠かせない分子機構を標的とするワクチンや化合物創出の分子基盤を明らかにし、寄生虫感染症及び節足動物媒介性疾病防除技術の方策を見出すことを目的とする。

B. 研究方法

ライム病やバベシア症を媒介する吸血性節足動物のフタトゲチマダニ（*Haemaphysalis longicornis*）が産生する生物活性分子（TBM）の機能解析を生化学、細胞生物学的及び逆遺伝学的技法を用いて実施した。

（1）マダニ中腸カテプシン（HICPL-A）とヘモグロビン分解経路を構成する蛋白分解酵素とその阻害剤との相互関係の解析

HICPL ノックダウンマダニ（HICPL-A k/d）におけるヘモグロビン分解経路参画分子の蛋白分解酵素と阻害剤の発現動態を定量PCR 及び免疫蛍光抗体法を用いて解析した。

（2）ヘモサイトで発現するキモトリプシンインヒビター様分子（HICHI）ノックダウンマダニ（HICHI k/d）における吸血時の表現型の解析

マダニの血体腔に HICHI の dsRNA を注入後、ウサギ耳袋法で付着させ、吸血行動の変化を無処置マダニと比較した。

（3）マダニ人工吸血系における吸血関連遺伝子の動態解析

H. longicornis の人工吸血系におけるマダニ中腸上皮細胞で宿主血液を分解するヘモグロビン分解経路参画分子の動態を *in vivo* 吸血系と比較した。

C. 結果

（1）HICPL-A ノックダウンマダニ（HICPL-A k/d）の表現型

HICPL-A k/d では顕著な吸血阻害が確認され、約 60% のマダニ個体が死滅した。生残した個体では吸血期間の延長や飽血時体重の減少が認められた。中腸の組織学的解析から、内腔にはエオジン好性の硝子様小体が観察され、上皮細胞の機能不全が示唆された。HICPL-A k/d の飽血体重（333.9±10.5mg）は対照群（353.3±4.3mg）と比較して、吸血不全に起因して有意な減少を認めた。さらに、HICPL-A はヘモグロビン分解経路を構成する蛋白分解酵素とその阻害剤を制御することが分かった。酵素群（HICPL-B,

HISCP1, *HILgm-1*, *HILgm-2*, *longepsin*, *longipain*) と阻害剤群(*Hlcyst-1*, and *Hlcyst-2*)の発現は無処置と比較して、大きな変動が確認された。吸血開始後 24 時間では *longepsin*, *HISCP-1*, *Hlcyst-1* 及び *Hlcyst-2* の発現は減少したが、*longipain*, *HICPL-B*, *HILgm-1* 及び *HILgm-2* は増加した。*HISCP1* 発現の減少は飽血時まで持続し、*HILgm-1* 及び *HILgm-2* は吸血後 72-96 時間に増加した。

(2) HICHi k/d の表現型

HICHi の RNA が発現抑制されたマダニでは、ヘモサイトにおける内在性 HICHi の消失が確認された。吸血行動に関連する特質では、まず生存数の減少が確認された。顕著な飽血期間の延長 (HICHi: 6.8 ± 0.4 days, 無処置: 5.2 ± 0.5 days) と飽血時体重 (138.6 ± 52.9 mg, 310.3 ± 44.9 mg) の減少がそれぞれ認められた。産卵前期間 (4.97 ± 0.7 , 5.18 ± 0.7 days) に有意な差は認められなかったが、産卵総重量 (77.34 ± 26.9 mg, 189.21 ± 38.7 mg)、産卵数 (1152.48 ± 401.7 , 2865.4 ± 499.4) 及び孵化率 (50.08 ± 6.8 , 61.64 ± 4.1) は有意に減少した。

(3) 確立したマダニ人工吸血系と *in vivo* 吸血系におけるヘモグロビン分解経路参画分子の発現動態の比較

β -actin を用いた RNA 発現量の標準化を行ったが、参画分子 (*HISP*, *Longepsin*, *Longipain*, *HISCP1*, *HILgm*, *HILgm2*, *HILAP* *HILAP2*) の発現に有意な差は確認されなかった。また、中腸の恒常性維持に必要な *Hlgut-defensin* も同量発現であったことから、人工吸血系は *in vivo* 吸血系を再現していることが示された。

D. 考察

HICPL-A 及び HICHi は吸血行動の維持に関与していることが示唆された。また、HICPL-A はマダニヘモグロビン分解経路の構成要素である酵素群、阻害剤群と協調して発現、機能していると考えられた。このような蛋白分解酵素及びその阻害剤は、他の媒介節足動物や住血性寄生線虫類も保持していることが想定され、媒介昆虫を含めたベクター制御に貢献できると同時に、ベクター由来の新規抗寄生虫薬の標的としても有効であると考えられた。さらに、我々が確立したマダニ人工吸血系は、宿主からの吸血行動における生理反応をほぼ再現できており、ベクターによる吸血・病原体媒介のモデルとして活用可能であると考えられた。

E. 結論

本成果は、マダニをはじめとした外部寄生性節足動物の生存戦略の根幹である付着および吸血に関与する分子を標的とした新規寄生虫防圧法の開発に有効な知見であると考えられた。また、カテプシンなどは寄生線虫や他の媒介性節足動物の寄生戦略にも関与することが考えられ、これら分子を標的とする新規の抗寄生虫薬、抗マダニ薬及び外部寄生虫薬の開発が期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

英文論文

Alim MA, Islam MK, Anisuzzaman, Miyoshi T, Hatta T, Yamaji K, Fujisaki K. Tsuji N. A hemocyte-derived Kunitz-BPTI-type chymotrypsin inhibitor, HICHi, from the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*, plays regulatory functions in tick blood-feeding processes. *Insect Biochem Mol Biol*. 42, 925-34. 2012.

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.

2. 学会発表

Anisuzzaman, Alim Abdul, Islam Khyrul, Takeharu Miyoshi, Takeshi Hatta, Makoto Matsubayashi, Kozo Fujisaki, Naotohi Tsuji. Longistatin, a plasminogen activator from the tick *Haemaphysalis longicornis*, binds with RAGE and induces protective immunity. 154th Meeting of the Japanese Society of Veterinary Science. 岩手大学、盛岡、平成24年9月14~16日

八田岳士、三好猛晴、松林 誠、アニスザマン、アリム アブドール、山地佳代子、五十嵐郁男、藤崎幸蔵、辻 尚利. 人工吸血系により作出したバベシア原虫感染マダニの中腸 mRNA-seq 解析. 第 10 回分子寄生虫マラリア研究フォーラム、群馬大学、前橋、平成 24 年 10 月 12~13 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

厚生労働科学研究費補助金（国際医学協力研究事業）

分担課題：日本住血吸虫症の病態発現分子解析

研究協力者 太田伸生

（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科国際環境寄生虫病学分野）

研究協力者 熊谷 貴、関 丈典（同上）

研究要旨

日本住血吸虫(Sj)感染宿主の病理発現機序は未だ未解明の点が多いため、本年度は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た。マウスマクロファージを *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 発現を誘導する事が明らかになった。この場合の IL-13 の関与を確認するために、IL-13 ノックアウトマウスを用いて同様の観察を試みたところ、ノックアウトマウスでは IL-6 の発現上昇が低下しており、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た。日本住血吸虫感染宿主の肝臓病変は、炎症と線維化の異なったステップからなると考えてよいが、今回の観察から、炎症のトリガーや線維化に虫卵抗原刺激によるマクロファージの活性化が関与しているということが示唆され、新規の治療・予防戦略への情報となるものと考えられた

A. 研究目的

日本住血吸虫(Sj) は宿主の門脈や腸間膜静脈に寄生し、そこで産卵された虫卵は肝臓に蓄積し線維化を伴う虫卵性肉芽腫性炎症を誘導する。この Sj 虫卵抗原は Th2 サイトカインである IL-4 や IL-13 の産生を誘導し、この Th2 サイトカインが Sj に感染したヒトの肝臓で見られる線維化に関与していると考えられている。これまで分担研究者らは IL-4^{-/-}IL-13^{-/-}(DKO) マウスを用いた Sj 感染実験により、感染 6 週間後において IL-4/IL-13 が過剰な炎症性サイトカインの誘導や過剰な好中球浸潤を伴う肉芽腫性炎症の悪化を抑制している事を

明らかにしてきた。また、感染 8 週間後において線維化が見られなかった事を確認した。マンソン住血吸虫感染マウスにおいても IL-13 が線維化を誘導する事より、日本住血吸虫症においても Th2 応答、特に IL-13 が虫卵性肉芽腫炎症でみられる肉芽腫性炎症を誘導する事が示唆されている。

しかしながら、IL-13 は線維化に関与していると考えられるものの、その産生細胞や線維化のメカニズムは不明である。少なくとも、虫卵抗原が肉芽腫性炎症でみられる線維化誘導の抗原であることは間違いないので、虫卵抗原が宿主免疫担当細胞と最初に遭遇する場として、宿主のマクロフ

フェージについて焦点を絞ることとした。

本年度は、日本住血吸虫症の病態形成における宿主免疫担当細胞の初期応答として、マクロファージが担う機能について解析することとした。

B. 研究方法

1. マウスマクロファージの SEA による in vitro 刺激: 6~10 週齢の BALB/c マウス(雄)の骨髄細胞を回収し、M-CSF(10 μ g/ml)を含む RPMI(10%FCS)中で培養する事により、骨髄由来マクロファージを作製した。

5×10^5 cells/ml のマクロファージは RPMI 1640(10%FCS)中にて 25 μ g/ml の日本住血吸虫 SEA (SjSEA)と 24 時間、37°C で CO₂ インキュベータにて培養し、マクロファージから回収した RNA から各種サイトカイン遺伝子発現を測定した。

2. 日本住血吸虫虫卵抗原 (SEA): 山梨株の日本住血吸虫感染マウスの肝臓から回収した虫卵から可溶性粗抗原を抽出して用いた。

3. サイトカインアッセイ: SEA 刺激したマクロファージより RNA 回収して、サイトカインの mRNA 発現量を (IL-4, IL-6, IL-10, IL-13) をリアルタイム PCR で測定した。

4. IL-13 ノックアウトマウス: IL-13 ノックアウト(KO)マウスは星野友昭博士(久留米大学)より供与されたものを用いた。上記と同様の試験に用いて、ワイルドタイプの結果と比較した。

倫理面への配慮: 本研究は東京医科歯科大学の動物実験委員会による承認を得て実施した。

C. 研究結果

1. In vitro での SEA 刺激によるマウスマクロファージのサイトカイン産生

マウスのマクロファージは in vitro の SEA 刺激により、活性化され、いくつかのサイトカイン遺伝子発現上昇が確認された。線維化に関与すると考えられる IL-13 mRNA 発現増加が見られた。一方、IL-4 mRNA の発現上昇は見られなかった (図 1)。

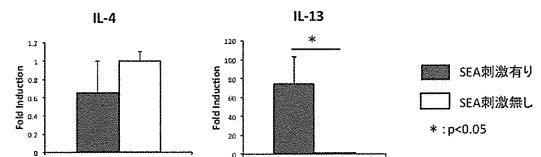


図1 SEA刺激マクロファージにおけるTh2サイトカインmRNA発現

2. IL-13 産生マクロファージによるサイトカインmRNA 発現調整

次に活性化マクロファージの炎症調節機能に関する検討のために、抑制性サイトカインおよび炎症性サイトカイン遺伝子の発現を検討した。

抑制性サイトカインである IL-10 は、日本住血吸虫症患者において線維化抑制に関与していると考えられている。SEA 刺激により WT 由来マクロファージにおける IL-10 の mRNA 発現量は増加したが、SEA 刺激を受けた IL-13KO マウス由来マクロファージとの間で有意な差はみられなかった。

一方で炎症性サイトカインである IL-6 は重度の線維化を呈する日本住血吸虫症患者において高い値を示している事が知られている。

SEA 刺激 WT 由来マクロファージでは、

無刺激のものとは比べて IL-6 の mRNA 発現量は有意に増加していた。さらに SEA 刺激 WT と IL-13 由来マクロファージにおける IL-6 の mRNA 発現量を比較したところ IL-13KO マウスでは IL-6 の mRNA 発現量が有意に低下していた(図 2)。

この結果より、マクロファージは SEA 刺激により IL-13 産生が誘導される事が示唆され、IL-13 がマクロファージを刺激する事により IL-6 の産生を誘導し、日本住血吸虫症における線維化に関与している事が示唆された。

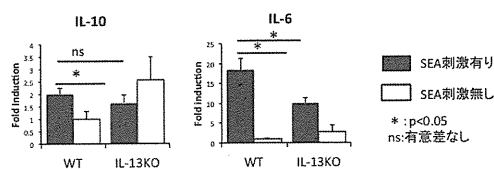


図2 SEA刺激マクロファージ由来IL-13の各種サイトカインmRNA発現に及ぼす影響

D. 考察と結論

これまで、分担研究者らは IL-4/IL-13 が日本住血吸虫感染マウスにおける肉芽腫性炎症の悪化を抑制する事を明らかにしてきた。しかしながら、今回は日本住血吸虫症においては、IL-13 が虫卵抗原刺激マクロファージからの炎症性サイトカイン産生増強をもたらすことを示唆する結果が観察された。この場合は IL-4 の関与は認められなかったため、IL-13 自身が、日本住血吸虫感染宿主においては、虫卵肉芽腫の炎症反応を抑制する一方で炎症や線維化を促進する一見相反する現象に関与する事が示唆されたことになる。

IL-4 と IL-13 の機能は相当部分でオーバーラップするが、肉芽腫性炎症から線維化に進展する日本住血吸虫症においては

IL-13 の機能がより重要である可能性が考えられ、今回のデータからは、SEA 刺激によるマクロファージからの IL-13 発現上昇が肉芽腫炎症の促進に働くことが考えられた一方で、IL-13 がさらに誘導されてくる Th17 細胞に対する抑制効果を担う事から、高度に過ぎる炎症を抑え、線維化の動向を調節することになっていることが推定された。

今回の研究は in vitro での事象観察に止まったため、実際に in vivo で起こっている現象を観察する必要がある。そのデータを得た上で、日本住血吸虫感染における虫卵肉芽腫反応のイニシエーションフェーズにおける宿主免疫細胞の関与について明らかに出来るものと期待している。

今回の結果をもとに、日本住血吸虫感染時の病態発現に影響する因子の特定と説明が進み、将来の治療的応用にむけて研究が進むことが期待される。

(ア) 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

原著論文

- (1) 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)
- (2) 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.

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

寄生蠕虫の寄生適応および免疫修飾機構の研究

研究協力者 産業医科大学 免疫学・寄生虫学 金澤 保

研究要旨

昨年度我々は、*Heligmosomoides polygyrus* (Hp) およびマンソン住血吸虫 (Sm) がマウスにおける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こと、その作用はSTAT6やIL-10に依存しないことを報告した。本年度は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た。STZ投与T1D誘発マウスの膵リンパ節においては、無処置マウスに比べIFN- γ 、IL-1 β 、TNF- α 、FasL、IL-6の発現上昇が観察された。これに対しさらにSmを感染させたマウスにおいては、上記サイトカインのほとんどの発現が抑制され、IL-4やArg-1などT1Dを抑制する因子の上昇が確認された。また、抗体でTregを抑制してもT1D抑制作用には影響が見られなかった。

A. 研究目的

蠕虫症の蔓延する熱帯地では、細菌・ウイルス・真菌・原虫など多くの他の感染症もまた蔓延している。寄生蠕虫はその生体内適応の過程で、自身に対する宿主の免疫応答のみならず、他の抗原に対する免疫応答をも修飾することが知られている。たとえば、住血吸虫感染宿主は一般的に他の蠕虫に対しては防御能が亢進する一方、原虫やウイルス感染に対しては防御能が低下することが知られている (Osada et al., 2011)。したがって蠕虫感染が他の疾患に与える影響を解明することは、熱帯地における公衆衛生政策決定に際して重要な情報を与えると考えられる。一方先進諸国ではアレルギーや自己免疫疾患が増加傾向にあり、これには微生物への曝露機会の減少が関係しているのではないかという仮説が唱えられている (衛生仮説)。微生物だけではなく蠕虫感染に関してもアレルギーや自己免疫疾患の発症を抑制するという実験報告があるが、蠕虫感染がもたらす免疫学的修飾 (Th2の誘導、Tregの誘導、M2マクロファージの誘導、B細胞の増殖など)のうち、いずれが疾患抑制作用において必要で十分であるかという点はまだ明らかにされてはいない。

我々は、寄生蠕虫の免疫修飾作用および抗炎症効果のメカニズムの解明を通じ、左記の様々な保健衛生上の問題への解決の糸口を見つめることを目的として研究を行っている。一昨年度までに、住血吸虫感染が実験的関節炎およびTh17応答の抑制作用をもつことを報告した。昨年度より我々は、1型糖尿病 (T1D) に対する蠕虫感染の影響を検討している。マンソン住血吸虫 (Sm) や *H. polygyrus* (Hp) がNODマウス (T1D自然発症モデル) におけるT1D抑制作用を示すことは既に報告されているが、NODマウスの系では遺伝子欠損マウス (その多くはC57BL/6背景) を用いた実験が行いにくいいため、抑制作用に関与する因子の解析に不便である。そこで我々は、C57BL/6マウスに対して低用量のストレプトゾトシン (STZ) を多回投与することで、ヒトと同じく「免疫学的機序」の関与するT1Dを誘発し、寄生虫感染の効果を検討している。昨年度までに、HpおよびSmのいずれもがNODマウスのT1Dと同様に誘発型モデルのT1Dも抑制すること、そしてその作用はSTAT6およびIL-10に依存しないことを明らかにしてきた。本年度は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た。

また、Sm の T1D 抑制作用に対する Treg の関与についても検討を行った。

B. 研究方法

Sm 100 隻を経皮感染させ、6 週後に STZ 50mg/kg を連続 5 日間腹腔内投与した。初回投与 1 週間後（最終投与 3 日後）の膵臓を採取しリアルタイム PCR を行った。Treg の関与を解析する実験では、STZ 初回投与前日より 1 週おきに PC61 抗体をマウス 1 匹当たり 0.2mg を腹腔内投与した。

[倫理面への配慮]

実験動物に苦痛を与える処置の際は必ず麻酔を使用した。産業医科大学動物実験及び飼育倫理審査において承認を受けている（承認番号：AE06-003）。なお本研究では人体材料は用いていない。

C. 結果

STZ 投与マウスの膵リンパ節では、無処置マウスに比べ IFN- γ と IL-1 β の顕著な上昇に加え、TNF- α 、FasL、IL-6 の発現上昇が観察された。これに対し Sm 感染マウスにおいては、上記サイトカイン（IL-6 を除く）と iNOS の発現が抑制されていた。また感染マウスでは IL-4 や Arg-1 など T1D 抑制因子の上昇が確認された。膵実質においても同様の傾向が観察された。Treg の実験では、PC61 投与群においても対照群と同等以上の血糖値抑制作用が観察された。

D. 考察

膵臓において β 細胞破壊に関わる多くのメディエーターの発現が住血吸虫感染によって抑制されることが明らかになった。しかし IFN- γ KO マウスにおいても T1D が発症し STAT6KO においても住血吸虫の T1D 抑制効果は減弱しないことが判明しているため、膵リンパ節において観察された IFN- γ の抑制や IL-4 の上昇は本抑制作用に必須ではないと考えられた。また、Treg を抑制しても T1D 抑制効果は減弱しなかったため、Treg も本抑制作用に必須ではないと思われる。

E. 結論

住血吸虫感染によって T1D 促進因子の発現上昇が抑制され、T1D 抑制因子が増強されていたが、

いずれの変化が essential であるかは未だ不明であり、今後の研究で明らかにしていきたい。

G. 研究発表

1. 論文発表

和文論文

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.

英文論文

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 Jun 20;13:260.

2. 学会発表

長田良雄、山田壮亮、金澤保.

寄生蠕虫の抗糖尿病効果に関与する因子の解析.

第 81 回日本寄生虫学会大会、兵庫医大・西宮キャンパス、西宮、平成 24 年 3 月 23-24 日.

Osada Y, Yamada Y, Kanazawa T.

Helminths reduce severity of experimental type 1 diabetes in mice via STAT6- and IL-10- independent mechanisms.

Forum Cheju 15. The 15th Japan-Korea Parasitologists' Seminar. Current Trends in Parasitology Research in Japan and Korea. 青島パームビーチホテル、宮崎、平成 24 年 5 月 23-25 日.

長田良雄、山田壮亮、金澤保.

STZ 投与マウス膵臓の炎症メディエーター発現に対する寄生蠕虫の効果.

第 65 回日本寄生虫学会南日本支部大会・第 62 回日本衛生動物学会南日本支部大会合同大会、長崎大学医学部ポンペ会館、長崎、平成 24 年 11 月 10-11 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

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

慢性フィラリア症対策に関する疫学研究

研究協力者 筑波大学・医学医療系・臨床試験・臨床疫学分野 我妻 ゆき子

研究要旨

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。フィールドを訪問し、バングラデシュでの倫理委員会承認を得ての実施となった。農業や長時間立位や歩行を伴う職業や、低温暴露などを伴う職業についてのリスク、栄養状態や二次感染のリスクなどを、サーベイメソッドで調査した。フィールドとしては、バングラデシュで最も罹患率の高い北部県にて行った。現在、解析が進行しており、本報告書ではこれまでの結果を示した。将来的には、リスク予防や早期治療のための介入を目指す。

A. 研究目的

リンパ系フィラリア症は72か国1億人以上が感染し、そのほとんどが人間開発指数の低い貧困国に分布する **Neglected Tropical Diseases(NTD)** である。バングラデシュでは、64 県中 34 県が感染地域であり、2000 万人が感染している。2001 年より伝搬遮断を目的とした **Mass Drug Administration (MDA)** が開始されが、薬物治療後も慢性フィラリア症の症状であるリンパ浮腫の進行は続いている。慢性有病や **Disability** について、その重症化を予防する公衆衛生学的方法がないのが現状である。

そこで本研究では、フィラリア症蔓延地域において、慢性フィラリア症の重症化とそのリスクファクターを明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

基礎調査で患者数の最も多かったニルファマリ県ジョルダカ郡からランダムに選択した5つの行政区の全世帯を訪問し、急性症状、及び慢性症状を発症している患者を抽出の上、基本属性や発症部位、病歴・治療歴、職業を含む社会経済状況に関して構造化面接を実施した。

本研究は、筑波大学医の倫理委員会と、**Bangladesh Medical Research Council (BMRC)** の倫理承認を得て行った。

C. 結果

4,584 世帯において 728 人の患者を同定した。対面でフィラリア症の症状を確認の上、面接の承諾を得られた 10 歳以上の患者 540 人のうち、性別と発症部位の記載に問題のあったものを除き、537 人のデータを分析した。発症部位は陰嚢水腫が 410 人と最も多く、次いで下肢のリンパ浮腫が 111 人であった。調査対象者の年齢は正規分布に従い、平均年齢は下肢のリンパ腫で 50 歳、陰嚢水腫で 44 歳であった。また、10-14 歳の小児患者 24 人のうち、22 人が陰嚢水腫を発症しており、12 人にはリンパ系フィラリア症の家族歴が見られた。

D. 考察

職業性リスクファクターの分析は、現在進行中であるが、本研究により、慢性フィラリア症の有病像が明らかとなった。特に注目すべきは、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ことである。また、下肢のリンパ浮腫の進行は年齢の上昇に関連していることが示さ

れた。このことは、慢性フィラリア症の発症部位や年齢、その他のリスクファクターによって、重症化にばらつきがあることが推測される。さらなる解析を継続し、結果を蔓延国の政策決定のために広く国際社会に還元してゆく予定である（1年以内に論文発表予定）。

E. 結論

慢性フィラリア症の重症化のメカニズムとリスク要因とのかかわりを明らかにし、重症化を予防する方法を明らかにする必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

和文論文

なし。

英文論文

なし。

2. 学会発表

Trends in morbidity for lymphatic filariasis in the most affected area of Bangladesh. Midori Morioka, Moazzem Hossain, kazuhiko Moji, 我妻ゆき子. The 3rd Neglected Tropical Disease Conference, Dhaka, Bangladesh. 平成24年9月1日。

Morbidity control for lymphatic filariasis in Bangladesh: Midori Morioka, Moazzem Hossain, Kazuhiko Moji, 我妻ゆき子, Nezam Uddin Biswas. 第27回日本国際保健医療学会、岡山、平成24年11月4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。

マラリア原虫の宿主細胞認識と侵入機序の解析

研究協力者 愛媛大学・大学院医学系研究科・寄生病原体学分野 鳥居本美

研究要旨：

マラリア原虫の生活環において、スポロゾイトは肝細胞、メロゾイトは赤血球にそれぞれ寄生胞を形成して侵入し寄生する。この2つの侵入ステージ原虫のみが先端部にロプトリーと呼ばれる先端部小器官を有することから、その小器官に局在するタンパク質が細胞寄生に重要な役割を果たすことが推測される。しかし、スポロゾイトやメロゾイトが標的細胞に侵入する分子機構、特にロプトリーに局在する分子機能の解析は全く進んでいない。本年度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。10個のロプトリー分子各々について、C末端に c-Myc タグを融合した遺伝子改変マラリア原虫を作製した。また2個のロプトリー分子については特異抗体を作製した。12個のロプトリータンパク質について、抗 c-Myc 抗体および特異抗体を用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、ウェスタンブロッティング法、間接蛍光抗体法、免疫電子顕微鏡法を用いて詳細に解析した結果、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が確認された。

A. 研究目的

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

マラリア原虫のスポロゾイトは肝細胞に、メロゾイトは赤血球にそれぞれ寄生胞を形成して侵入し寄生する。この2つの侵入ステージ原虫のみが先端部にロプトリーと呼ばれる先端部小器官を有する事から、その小器官に局在するタンパク質の細胞寄生への関与が推測されている。実際、メロゾイトのロプトリー分子のいくつかは、赤血球侵入時

に形成される足場(moving junction)に局在することから、侵入への関与が強く示唆されてきた。一方、スポロゾイトが肝細胞に侵入する分子機構、特にロプトリーに局在する分子の解析は全く進んでいない。

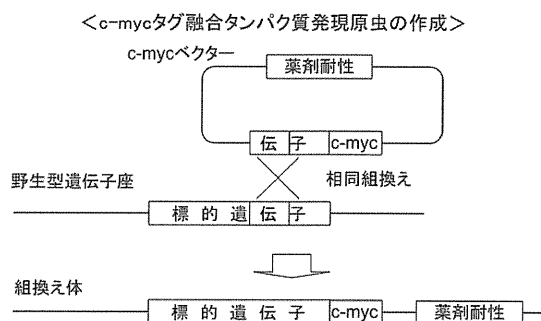
昨年度はスポロゾイトのロプトリー分子の遺伝子発現レベルの探索を RT-PCR 法で行った。蚊の唾液腺から回収した成熟したスポロゾイトを用いた場合、解析した12個のロプトリー分子の遺伝子発現は見られなかった。一方、蚊の中腸内のオーシストステージ(中腸スポロゾイト)について解析を行ったところ、12個全てのロプトリー分子の遺伝子発現が認められた。そこで本年度は、これらのロプトリー分子のタンパク質の発現と局在解析を行った。タンパク質の発現と局在解析の為に、10個のロプトリー分子についてはC末端に c-myc タグを融合した遺伝子組

換え原虫を作製し抗 c-myc 抗体を用いて解析を行った。

B. 研究方法および結果

本研究では、ネズミマラリア (*Plasmodium berghei* ANKA 株) および媒介蚊であるハマダラカ (*Anopheles stephensi*) を用いて以下の研究を実施した。

研究対象とする 10 個のロプトリータンパク質については、下図に示すような方法により、各々のタンパク質について C 末端に c-myc タグを付加した遺伝子組換え原虫を作製した。



野生型原虫および各遺伝子組換え原虫の感染赤血球を BALB/c マウス (8 週令) に静脈内または腹腔内投与した 4 日後に、羽化 6 日後のハマダラ蚊の雌成虫に吸血させた。十分吸血したものを選別し、20°C で飼育した。上記の遺伝子組換え実験については機関内承認を得た上で実施した。また、マラリア原虫感染血液や抗血清を得るための動物実験に関しても、愛媛大学動物実験委員会において実験計画の承認を得、指針を遵守して実施した。

タンパク質発現解析用のサンプルには以下のものを用いた。肝細胞への感染能をもつ成熟スポロゾイトが採取可能となる吸血後 21 から 24 日目に蚊を解剖して、スポロゾイトを含む唾液腺を採取した。同時に蚊の中腸を取り出し、中腸外壁のオーシスト内スポロゾイトを中腸とともに採取した。更に、スポロゾイトの形成が始まる時期に相当する吸血後 13-17 日目のオーシストが付着する中腸を採取して免疫電子顕微鏡用のサンプルを作製した。

また、C 末端に GPI アンカーを持つと予測

された 2 つの分子については、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成法によって作製した組換えタンパク質でウサギを免疫し特異抗体を作製した。

吸血後 21-24 日目の感染蚊から取り出したスポロゾイトを含む唾液腺および感染中腸を材料として、ウエスタンブロッティング法によるタンパク質発現の確認をおこなった。c-myc タグを付加した 10 個の分子については抗 c-myc ウサギ抗体、他の 2 分子は其々の分子に対する特異抗体を用いた。その結果、RON2、RON3、RON4、RON5、RON6、RALP1、RAP1、RhopH2、RhopH3、ASP、RAMA の各タンパク質が唾液腺および中腸オーシスト内のスポロゾイトで発現していることが明らかとなった。

次に、吸血後 21-24 日目の感染中腸および唾液腺を用いた間接蛍光抗体法によりロプトリータンパク質の局在を確認した。その結果、RON2、RON3、RON4、RON5、RALP1、RAP1、RAMA の各タンパク質がスポロゾイトの先端部に局在して反応することが明らかとなった。さらに免疫電子顕微鏡法を用いて、より詳細なタンパク質の局在を解析したところ、RON2、RON4、RON5、RALP1、RAP1、RAMA の各分子がスポロゾイトのロプトリー体部に局在すること、また RON3 がスポロゾイトのロプトリー周囲の細胞膜に局在することが確認された。

以上の研究により、これまでメロゾイトのロプトリーに発現することが報告されながら、スポロゾイトでの発現について全く解析が進んでいなかった複数のロプトリー分子がスポロゾイトのロプトリーに局在することを明らかにすることができた。

E. 結論

スポロゾイトにおけるロプトリータンパク質の発現と局在解析を目的として、10 個のロプトリー分子の C 末端に c-myc タグを融合した遺伝子組換え原虫を作製し、抗 c-myc 抗体を用いて解析を行った。C 末に GPI アンカーを有する 2 個のロプトリー分子は、コムギ胚芽無細胞蛋白質合成系を用いて作製した組換えタンパク質を用いて特異抗体を作製して解析を行った。複数のロプトリータン

パク質が実際にスポロゾイトにおいて発現していることをウエスタンブロッティング法により明らかにし、また蛍光抗体法、免疫電子顕微鏡法によってこれらのロプトリータンパク質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。

G. 研究発表

2. 学会発表

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、西宮市、2012年3月23-24日

Tokunaga T, Nozaki M, Murata E, Tsuboi T, Ishino T, Torii M Screening for sporozoite rhoptry proteins in *Plasmodium*. Malaria, Keystone symposia on Molecular and Cellular Biology. New Orleans, USA, January 20-25, 2013

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきものはない

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

寄生虫感染で誘導される肺好酸球の防御機能の解明

研究協力者 兵庫医科大学 免疫学医動物学 中西憲司

研究要旨

寄生虫に感染すると、われわれ動物はTh2型免疫応答を発動して感染防御にあたる。Th2細胞はIL-4、IL-5、IL-13といったTh2型サイトカインを産生する。その結果、IgG1/IgE産生誘導、好酸球増多、腸粘膜上皮における粘膜型肥満細胞の増多等が起こる。本研究では、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。

A. 研究目的

腸管寄生線虫である *Nippostrongylus brasiliensis* (*N. brasiliensis*) の排除は、腸粘膜上皮に存在する杯細胞の作用によると考えられている。一方、別種の腸管寄生虫である *S. venezuelensis* の排除は活性化された粘膜型肥満細胞の作用が重要と考えられている。本研究では、以上の作業仮説が正しいか否かを検証するとともに、IgG1とIgEがこれらの蠕虫の排除に緊密に関わるか否かを検討した。また、*S. venezuelensis* の排除に肥満細胞が必須か否かも検討した。

B. 研究方法

C57BL/6マウスとC57BL/6を背景とするAID欠損マウスに、あるいは全身の肥満細胞を欠損するW/W^vマウスに *S. venezuelensis* あるいは *N. brasiliensis* のL3幼虫を感染させた後に、Th2型免疫応答の誘導、IgG1とIgEの産生、腸管内寄生虫の虫体数、さらに糞便中の虫卵数等を測定した。

C. 研究結果

C57BL/6マウスとC57BL/6を背景とするAID欠損マウスに *S. venezuelensis* あるいは *N. brasiliensis* を感染させたところ、C57BL/6野生型マウスでと同様に、AID欠損マウスで

も正常にTh2細胞が誘導された。次に腸管内寄生虫体数を経時的に調べたところ、*M. brasiliensis*の排除の程度は、C57BL/6野生型とAID欠損マウスにおいて違いは認めなかった。以上のことから、*M. brasiliensis*の排除に抗体が必要でないことが明らかとなった。一方、*S. venezuelensis*の排除であるが、C57BL/6野生型に比して、AID欠損マウスにおいて著明に遅延していた。このことから抗体が排除に必要なことが示唆された。そこで、*S. venezuelensis*に二度感染したマウスの血清をAID欠損マウスに移入したところ、正常に*S. venezuelensis*を排除する能力を獲得していた。一方、*M. brasiliensis*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ても*S. venezuelensis*の排除能は回復しなかった。即ち、抗*S. venezuelensis*抗体が必要なが示された。次に、感染マウスの血清中にあるIgG1とIgEが*S. venezuelensis*の排除に必須であることを明らかにするため、AID欠損マウスに*S. venezuelensis*特異的IgG1とIgEを移入した。その結果、どちらの抗体を移入したAID欠損マウスにおいても、*S. venezuelensis*の排除能は回復していた。最後に、肥満細胞を欠損したマウスW/W^vは、*S. venezuelensis*の排除能力が著明に低いこと、そしてたとえ*S. venezuelensis*特異的IgG1とIgEを移入したとしても、*S. venezuelensis*の排除は遅延したままであ

った。

D. 考察

S. venezuelensis 特異的IgG1とIgEを結合した肥満細胞を、*S. venezuelensis*由来の抗原で刺激することで肥満細胞が活性化され*S. venezuelensis*の排除が促進されることが明らかとなった。

E. 結論

*M. brasiliensis*の排除はTh2細胞依存的に誘導された杯細胞の作用で十分であるが、*S. venezuelensis*の排除は、肥満細胞が*S. venezuelensis* 特異的IgG1とIgEを介した活性化が必要なこと、そして活性化は*S. venezuelensis* 由来の抗原刺激で誘導されることが明らかとなった。

G. 研究発表

1. 論文発表

和文論文

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

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

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

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
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

英文論文

1. 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
2. Tsutsui H, Nakanishi K. Immunotherapeutic applications of IL-18. *Immunotherapy* 2012 Dec;4(12)1883-94
3. 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
4. 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

5. 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

2. 学会発表

(国際学会)

1. Nakanishi K, Function of natural adjuvant of helminth in induction of pulmonary eosinophilic infiltration. The 34th NAITO CONFERENCE 2012. 10 Sapporo

(国内学会)

2. 武藤太一郎, 安田好文, 河越龍方, 松本真琴, 松下一史, 石井健, 善本知広, 審良静男, 中西憲司. ChitinはIL-33依存症に好酸球性肺炎を誘導する. 第81回日本寄生虫学会大会 2012. 3 西宮
3. 松本真琴, 佐々木由紀, 安田好文, 善本知広, 中西憲司. 抗体によるヴェネズエラ糞線虫排除機構. 第81回日本寄生虫学会大会 2012. 3 西宮
4. 中西憲司. アレルギーに関与する基礎免疫の進歩 1-IL-18とIL-33で誘導されるアレルギー性炎症. (特別講演) 第24回日本

- アレルギー学会春季臨床大会 2012.5 大阪
5. 松本真琴, 佐々木由紀, 安田好文, 善本知広, 中西憲司. ヴェネズエラ糞線虫に対する抗体依存性排虫機構. 第77回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 2012.6 神戸
6. Yasuda K, Muto T, Kawagoe T, Matsumoto M, Sasaki Y, Matsushita K, Taki Y, Futatsugi-Yumikura S, Tsutsui H, Ishi K, Yoshimoto T, Akira S, Nakanishi K. Contribution of IL-33-activated type II innate lymphoid cells to pulmonary eosinophilia in intestinal nematode-infected mice. 第77回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 2012.6 神戸
7. Nakahira M, Nakanishi K. Requirement of GATA binding protein 3 for *IL13* gene expression in IL-18-stimulated Th1 cells. 第77回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 2012.6 神戸
8. 中西憲司. Type II Innate Cell とアレルギー性炎症. (シンポジウム) 第42回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会 2012.7 長野
9. 安田好文, 武藤太一郎, 松本真琴, 中西憲司. 蠕虫感染による好酸球性肺炎は自然免疫応答で誘導される. 第68回日本寄生虫学会西日本支部大会 2012.10 奈良
10. 今井康友, 善本隆之, 中西憲司, 山西清文, 善本知広. IL-27 は Tc17 誘導を抑制して接触過敏症を減弱させる. 第62回日本アレルギー学会秋季学術大会 2012.11 大阪
11. 萌拔陽子, 久 育男, 中西憲司, 審良静男, 善本知広. アレルギー性鼻炎モデルマウスにおける内因性 IL-33 の病因的役割. 第62回日本アレルギー学会秋季学術大会 2012.11 大阪
12. Futatsugi-Yumikura S, Matsushita K, Fukuoka A, Yoshimoto T, Yonehara S, Nakanishi K. Balb/c FasKO mice develop severe autoimmunity, allergy and highly activated Tfh cells. 第41回日本免疫学会学術集会 2012.12 神戸
13. Matsumoto M, Sasaki Y, Yasuda K, Muramatsu M, Honjo T, Yoshimoto T, Nakanishi K. Antibody-mediated expulsion of *Strongyloides venezuelensis* in a primary infection. 第41回日本免疫学会学術集会 2012.12 神戸
14. Muto T, Yasuda K, Kawagoe T, Matsumoto M, Sasaki Y, Matsushita K, Futatsugi-Yumikura S, Tsutsui H, Ishi K, Yoshimoto T, Akira S, Nakanishi K. Chitin induces lung eosinophilia dependently on IL-33. 第41回日本免疫学会学術集会 2012.12 神戸
15. Yasuda K, Muto T, Kawagoe T, Matsumoto M, Sasaki Y, Matsushita K, Futatsugi-Yumikura S, Tsutsui H, Ishi K,

Yoshimoto T, Akira S, Nakanishi K.
Contribution of IL-33-activated type II
innate lymphoid cells to pulmonary
eosinophilia in *Strongyloides*
venezuelensis-infected mice. 第41回日
本免疫学会学術集会 2012.12 神戸

16. Haenuki Y, Matsushita K,
Futatsugi-Yumikura S, Hisa Y, Akira S,
Nakanishi K, Yoshimoto T. Ragweed
pollen-driven IL-33 contributes to the
development of allergic rhinitis. 第41
回日本免疫学会学術集会 2012.12 神戸

17. Fukuoka A, Futatsugi-Yumikura S,
Takahashi S, Iyoda T, Yoshimoto T, Inaba
K, Nakanishi K, Yonehara S. A novel type
of type 2 innate immunocytes with ability
to enhance IgE production found in Balb/c
FasK0 mice with allergic blepharitis. 第
35回日本分子生物
学会年会 2012.12 福岡

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

41回日本免疫学会学術集会 2012.12 神戸
18. 中西憲司. 蛋白抗原で免疫されたマウ
スを経気道的に同一抗原でチャレンジする
とき IL-18 が共存すると気道過敏性と気

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

遺伝子導入マラリア原虫による有用蛋白質供給の研究

研究協力者： 自治医科大学・医動物学部門・松岡裕之

研究要旨

マラリア原虫は旺盛な増殖能と蛋白質産生能をもつため、何らかの蛋白質を産生させて寄生宿主の血液に供給させることができるはずである。ヒトの凝固因子（第 IX 因子）をモデルとし、これをマラリア原虫に作らせ血友病モデルマウスに感染させたところ、止血時間の短縮が得られた。人類の敵として扱われてきたマラリア原虫を、人類のために有用なタンパク分子を産生する道具として利用できるかもしれない。

A. 研究目的

マラリアは発熱や貧血を引き起こし、宿主をついには死に追いやるため、人類の敵として永らく扱われて来た。一方でマラリア原虫は旺盛な増殖能と蛋白質産生能をもつため、何らかの蛋白質を産生させて寄生宿主の血液に供給させることもできるはずである。我々のラボではマラリア原虫に任意の遺伝子を導入することができるので、ヒトの凝固因子（第 IX 因子）をモデルとし、これをマラリア原虫に作らせ、血友病モデルマウスに感染させて止血時間の短縮を期待した。

B. 研究方法

野生型のネズミマラリア原虫(*Plasmodium berghei*) にエレクトロポレーション法によりヒトの第 IX 血液凝固因子遺伝子を組込んだ。組換え原虫をマウスに注射してマラリア原虫を増やし、血液中で増殖した原虫からヒトの第 IX 血液凝固因子が産生されることを観察した。また第 IX 血液凝固因子遺伝子を破壊したマウスを入手し、このマウスに組換え原虫を感染させ、血液の止血時間あるいは凝固時間の短縮が起きるかどうか観察した。

（倫理面への配慮）本研究は自治医科大学遺伝子組換え実験安全委員会および動物実験委員会に事前に計画書を提出し、審査を受け、承認を得たうえで実施した。

C. 結果

ヒトの第 IX 血液凝固因子遺伝子を組込んだ組換えマラリア原虫の作成に成功した。この原虫はヒトの第 IX 血液凝固因子を産生していることを確認した。第 IX 遺伝子の破壊されたマウスに感染させると、止血時間が短縮された。しかし凝固時間の短縮は認めなかった。

D. 考察

止血能力が向上するのは、原虫濃度が 15%以上になってからである。もっと少数の原虫により凝固を向上させるため、さらに質の高い凝固因子を産生させる必要がある。

E. 結論

マラリア原虫を利用して、ヒトにとって必要なタンパク分子を産生させられることを、血友病マウスを利用して示した。

G. 研究発表

1. 論文発表

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

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

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

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

2. 学会発表

Sugo T, Hirai M, Stafford DW, Monohan T, Matsuoka H: Expression of recombinant human factor IX protein in mouse erythrocytes by using a transgenic rodent malaria parasite, *Plasmodium beghei* as an expression vector. XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July 24-28, 2011

山本大介, 横峰隆志, 八木馨太, 松岡裕之, 吉田栄人: 分泌型ルシフェラーゼ融合 AAPP タンパク質を発現する遺伝子組換えハマダラカ 第 81 回日本寄生虫学会大会、西宮市、2012 年 3 月 23 - 24 日

早川枝李, 徳榊富由樹, 臼倉治郎, 坪井敬文, Wellem 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 次元構造の観察 第 81 回日本寄生虫学会大会、西宮市、2012 年 3 月 23 - 24 日

Reza M, Yamamoto D, Matsuoka H: Low concentration of copper jeopardizes larval movement and survival ability to predator: new insight in malaria eradication via vector control. The 15th Japan-Korea Parasitologists' Seminar, Miyazaki, May23-25, 2012

Reza M, Yamamoto D, Matsuoka H: Utilizing a domestic larvivorous fish "Medaka" with low concentrations of copper: An alternative method for biological control of mosquito larvae. 第 72 回

日本寄生虫学会東日本支部大会 第 10 回分子寄生虫・マラリアフォーラム合同大会、前橋市、2012 年 10 月 12-13 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