

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

住血原虫症の伝播、病態、創薬に関する研究

研究協力者 北海道大学大学院・獣医学研究科 片倉 賢

研究要旨

中国の *Leishmania infantum* 29 株についてマイクロサテライト遺伝子解析を行ったところ、Pop-1 (13 株) と Pop-2 (16 株) の 2 つの集団に分かれた。系統樹解析では、Pop-1、Pop-2 とともに既知の他国の *L. infantum* や *L. donovani* の集団とは独立した集団であったことから、中国の *L. infantum* 株は、近年、他地域から輸入されたものものではなく、独自に進化した可能性が示唆された。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。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 berberin および stigmast-4-en-3-one を分離した。

A. 研究目的

(1) 中国の *Leishmania infantum* 株についてマイクロサテライト遺伝子をマーカーとするタイピング解析を行い、集団構造と株間の系統関係を明らかにする。(2) ベクターの唾液腺由来生理活性物質の性状と吸血における役割を明らかにする。(3) 天然薬用植物に由来する抗トリパノソーマ活性物質を探索する。

B. 研究方法

(1) 中国の *Leishmania infantum* 株のマイクロサテライト遺伝子解析
リーシュマニア症はアジア各地への拡大が懸念されている。マイクロサテライト DNA をマーカーとする解析方法 (MLMT, Multilocus microsatellite typing) は、同一原虫種の株間の区別や系統解析に有用である。近年、世界各地のリーシュマニア種について解析が行われているが、中国のリーシュマニア株については、解析があまり進められていない。本研究では、1950 年から 2001 年の間に分離された *Leishmania infantum* 29 株について、14 のマイクロサテライトマーカー DNA を PCR 増幅し、それらの塩基配列を決定した。得られたデータについて、集団構造は STRUCTURE software を用い、遺伝的距離は MICROSAT と POPULATIONS software を用いて解析した。系統樹は POPULATIONS and MEGA 3.1 を用いて作成し、遺伝子座の多様性は GDA software

を用いて解析した。

(2) サシガメの唾液腺由来血液凝固阻害物質の機能解析

吸血性サシガメはシャーガス病を媒介するベクターであるが、唾液腺成分は止血阻害、血管拡張、抗炎症などの作用をもち、これを宿主に注入して効率よく吸血を行う。本研究では、*Triatoma pallidipennis* 唾液腺由来のトリロンピン活性阻害物質 triabin と相同性をもつ分子、*T. dimidiata* の triabin 様タンパク (dimiconin と命名) の組換えタンパクを作製し、dimiconin が血液凝固に及ぼす影響を検討した。

(3) ミャンマー産薬用植物から分離・精製した抗トリパノソーマ活性物質

ミャンマーは薬用植物資源が豊富にあり、民間薬として様々な病気に用いられているが、科学的薬効に関する研究は少ない。これまでの研究で、ミャンマー産薬用植物のブドウ科の薬用植物である *Vites repens* のエタノール抽出物にも抗トリパノソーマ活性があることを報告してきたが、今回、有効成分を精製し、各磁気共鳴、赤外スペクトル、質量スペクトルなどの各種スペクトルデータを解析し、その構造を決定した。

C. 結果

(1) 中国の *Leishmania infantum* 株のマイクロサテライト遺伝子解析

中国の *L. infantum* 29 株の MLMT において、14 のマーカーのうち 13 のマーカーから変異が

認められ、全体としては2つの集団(Pop-1とPop-2)に分離された。Pop-1は13株、Pop-2は16株であったが、中国国内に混在して分布していた。系統樹解析から、Pop-1は、リーシュマニアの種分類の基本となっている15種類の酵素の電気泳動パターンによるzymodeme分類ではMON-1タイプに属することが示唆された。一方、Pop-2はMON-1以外のタイプの総称であるnon-MON-1タイプであり、株間変異がPop-1よりも大きかった。系統樹解析では、Pop-1、Pop-2ともに既知の他国の*L. infantum*や*L. donovani*の集団とは独立した集団であることが示された。つまり、解析した中国の*L. infantum*株は、近年、他地域から輸入されたものものではなく、独自に進化した可能性が示唆された。

(2) サシガメの唾液腺由来血液凝固阻害物質の機能解析

大腸菌発現系を用いて作製したdimiconinの組換えタンパクは、内因系凝固活性の指標である活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)を延長させたが外因系凝固活性の指標であるプロトロンビン時間(PT)は延長させなかった。このことからdimiconinは、トロンビン活性ではなく内因系凝固の阻害物質であることが示唆された。次に、dimiconinが凝固カスケードのどの段階に作用するか検討したところ、XIIa因子(fXIIa)の活性を濃度依存的に阻害し、その下流にあるfIXaおよびfXaの活性を高濃度で阻害したことから、dimiconinは内因系凝固カスケードの初期段階であるfXIIの作用を阻害する物質であることが明らかになった。また、組換えfXIIを用いた実験から、dimiconinはfXIIaの酵素活性ではなく、fXIIからfXIIaへの活性化段階を阻害することが分かった。以上の結果から、dimiconinはサシガメが吸血する際に血液凝固の接触相を阻害する役割を果たしていると考えられた。

(3) ミャンマー産薬用植物から分離・精製した抗トリパノソーマ活性物質

*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・精製することに成功した。*Trypanosoma evansi*のtrypomastigote型虫体の*in vitro*における50%増殖阻害濃度(IC₅₀)は、それぞれ、31.4、61.2、62.8 μg/mlであった。

D. 考察

中国ではかつて都市部でも内臓リーシュマニア症が流行し、anthroponoticな*L. donovani*とzoonoticな*L. infantum*が混在するとされてきたが、国家的対策が実施され、1951年以降は患者数が激減した。しかし、2005年から2010年の間に2,000名を超える内臓リーシュマニア症患者が報告され、その約98%はXinjiang、

Gansu、Sichuanの3つの行政区に集中している。anthroponoticタイプはXinjiangに分布し、砂漠(desert)のzoonoticタイプはXinjiangとGansuに、そして山岳(mountainous)のzoonoticタイプはSichuan、Shaanxi、Shaxiに分布するとされる。今回解析した*Leishmania infantum*²⁹株は1950年から2001年の間に分離された古い株であり、また、検査数も少ないため、今後は最近の分離株についても解析し、より詳細に全体像明らかにする必要がある。

サシガメの唾液腺成分はリポカリン分子を多く含んでいる。リポカリンは疎水性物質の運搬体として名付けられた分子量1.5~2.5万の細胞外分泌タンパク質で、緑色硫黄細菌、プロテオバクテリア、脊椎動物、一部の無脊椎動物と植物に存在することが知られている。リポカリンは、フェロモンなどのリガンド輸送、感覚伝達、無脊椎動物の背地適応、膜の修復、プロスタグランジンD合成、脂質Aへのアシル基転移反応、細胞分化、細菌の感染阻止など、様々な生物機能に関わっている。*T. pallidipennis*唾液腺由来のtriabinはリポカリンの一種でトロンビン活性阻害活性を有するが、*T. dimidiata*から発見したtriabin様タンパクのdimiconinはトロンビン活性を阻害するのではなく、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こと判明した。このように、サシガメの唾液腺成分には独特な生理活性をもつ分泌タンパクが存在するため、今後、吸血における役割についてさらに検討する必要がある。

ブドウ科の薬用植物である*Vites repens*はミャンマー産薬用植物60種類をスクリーニングした中で最も強い抗エバンス・トリパノソーマ活性を示した植物であった。この根皮はミャンマーでは薬用医薬品として、潰瘍、肝炎、黄疸、腫瘍などの疾患に対して使用されている。今回、分離されたresveratrolはポリフェノールの一種でブドウの果皮などに含まれる抗酸化物質として知られている。bergeninはイソクマリン誘導体であり、抗潰瘍作用が報告されている。根皮のアルコール抽出液は細胞毒性も少なかったことから、臨床応用も期待できる。

E. 結論

中国で分離された*Leishmania infantum*株は2つの集団に分かれるが、それぞれ、独自に進化した可能性が示唆された。吸血性サシガメの唾液腺由来蛋白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明らかになった。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など3種類の化合物を分離・精製した。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

英文論文

Alam MZ, Yasin MG, Kato H, Sakurai T, Katakura K: PCR-based detection of *Leishmania donovani* DNA in a stray dog from a visceral leishmaniasis endemic focus in Bangladesh. *J Vet Med Sci* 75, 75-78, 2013

Doi J, Hirota J, Morita A, Fukushima K, Kamijyo H, Ohta H, Yamasaki M, Takahashi T, Katakura K, Oku Y: Intestinal *Tritrichomonas suis* (= *T. foetus*) infection in Japanese cats. *J Vet Med Sci* 74, 413-417, 2012

Elkhateeb A, Tosa Y, Matsuura H, Nabeta K, Katakura K: Antitrypanosomal activities of acetylated bruceines A and C; a structure-activity relationship study. *J Nat Med* 66, 233-240, 2012

Fujita M, Kato H, Cáceres AG, Gomeze EA, Mimori T, Zhang F, Iwata H, Korenaga M, Sakurai T, Katakura K, Hashiguchi Y: Genotyping of sand fly species in Peruvian Andes where leishmaniasis is endemic. *Acta Tropica* 121, 93-98, 2012

Ichikawa M, Kondoh D, Bawn S, Maw NN, Htun LL, Thein M, Gyi A, Sunn K, Katakura K, Itagaki T: Morphological and molecular characterization of *Explanatum explanatum* from cattle and buffaloes in Myanmar. *J Vet Med Sci* in press

Ishimaru Y, Gomez EA, Zhang F, Martini-Robles L, Iwata H, Sakurai T, Katakura K, Hashiguchi Y, Kato H: Dimiconin, a novel coagulation inhibitor from the kissing bug, *Triatoma dimidiata*, a vector of Chagas disease. *J Exp Biol* 215, 3597-3602, 2012

Kato H, Jochim, RC, Gomez EA, Uezato H, Mimori T, Korenaga M, Sakurai T, Katakura K, Valenzuela JG, Hashiguchi H: Analysis of salivary gland transcripts of the sand fly *Lutzomyia ayacuchensis*, a vector of Andean type cutaneous leishmaniasis. *Infect Genet Evol* 13, 56-66, 2013

Nyunt KS, Elkhateeb A, Tosa Y, Nabeta K, Katakura K, Matsuura H: Isolation of antitrypanosomal compounds from *Vitis repens*, a medicinal plant of Myanmar. *Nat Prod Commun* 7, 609-610, 2012

Tiwananthagorn S, Bhutto AM, Baloch JH, Soomro FR, Kawamura Y, Nakao R, Aoshima K, Nonaka N,

Oku Y, Katakura K: Zoophilic feeding behaviour of phlebotomine sand flies in the endemic areas of cutaneous leishmaniasis of Sindh Province, Pakistan. *Parasitol Res* 111, 125-133, 2012

Tiwananthagorn S, Iwabuchi K, Ato M, Sakurai T, Kato H, Katakura K: Involvement of CD4⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells in persistence of *Leishmania donovani* in the liver of alymphoplastic *aly/aly* mice. *PLoS Negl Trop Dis* 6, e1798, 2012

2. 学会発表

Alam Mohammad, 中尾亮, 櫻井達也, 加藤大智, Chang K.-P., Schönián Gabriele, 片倉 賢. Genetic polymorphism of Chinese *Leishmania infantum* strains revealed by multilocus microsatellite analysis. 第154回日本獣医学会学術集会、岩手大学、盛岡、平成24年9月14-16日

加藤大智, 石丸由佳, 櫻井達也, 片倉 賢, 橋口義久. 吸血性サンガメ *Triatoma dimidiata* 唾液腺由来の新規血液凝固阻害物質 dimiconin. 第154回日本獣医学会学術集会、岩手大学、盛岡、平成24年9月14-16日

櫻井達也, 土佐祐輔, 清水耕平, 廣田淳一, 近朋之, 加藤大智, 片倉 賢. ミャンマー連邦におけるピロプラズマ病の疫学調査. 第154回日本獣医学会学術集会、岩手大学、盛岡、平成24年9月14-16日

サルダー・ティワナンタゴン, 加藤大智, 櫻井達也, 岩渕和也, 阿戸 学, 片倉 賢. 免疫不全 *aly/aly* マウスの内臓リーシュマニア症における肝臓内原虫存続と制御性T細胞. 第154回日本獣医学会学術集会、岩手大学、盛岡、平成24年9月14-16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