

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

. 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

. 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

2 . 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

. 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кокクス症）の病態、診断、治療、 予防に向けた研究	伊藤 亮	89
	. 研究成果の刊行に関する一覧表		97

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））
総括研究報告書

寄生虫疾患の病態解明及びその予防・治療をめざした研究
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、エキノコッカス症、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ピ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 CD8T 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。 *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。 *hei* ANKA 感染マウスモデルでは、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かった。

【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、測定の手続きを減らし、抗体あるいは抗原結合プレートを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、ばらつきが出ることが推測された。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ース酵素で 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 papi llatum* 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 - 旅行医学における本症 - 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* *surf4.1* 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. Andiroliides 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, 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.
 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. 武藤太一朗, 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 .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/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, Sadjadi 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, Sadjadi 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疫学解析を行い、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見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*15:01 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

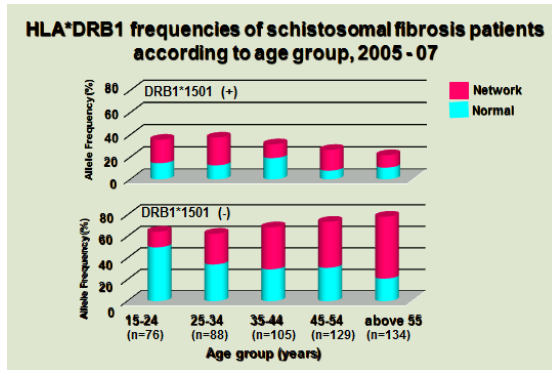
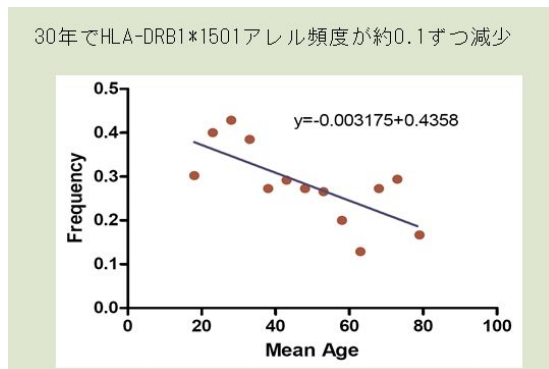


図2



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 FcγRIIIa 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, 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 IgG 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 ASTM Annual Meeting, November 11-15 2012, Atlanta Marriott

Marquis, Hilton Atlanta, Atlanta GA, USA.

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り、寄生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動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須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 プ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、後者では酸化的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パロイル基は、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)、SDH_{2c} (23 kDa)、SDH_{2N} (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的リン酸化による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、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-ユビキノン還元酵素)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ンを伝達し、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*のアマスティ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

アジアの三日熱マラリア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ラリア(*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座位に基づく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、同国が三日熱マラリア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、三日熱マラリア原虫(*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)の三日熱マラリア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ラリア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ラリア原虫(*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。

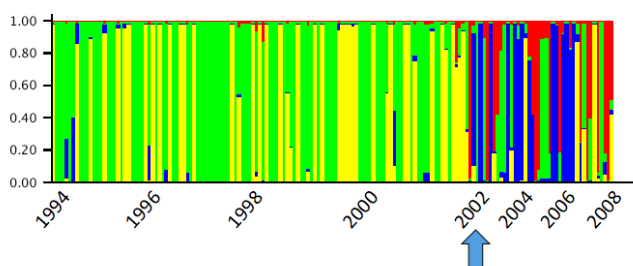


図 1 Structure 解析による集団構造の推定

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で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にて許可を得ている。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 人分と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 枝季、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 順土、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alaria原虫先端部小器官(ロプトリー)に局在する分子のスポ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alaria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alaria抵抗性ハマダラカを用いたマalaria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
スポ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、楨 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alaria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alaria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alaria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alaria赤血球期ワクチン候補抗原の探索
第10回分子寄生虫・マalaria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테인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)。

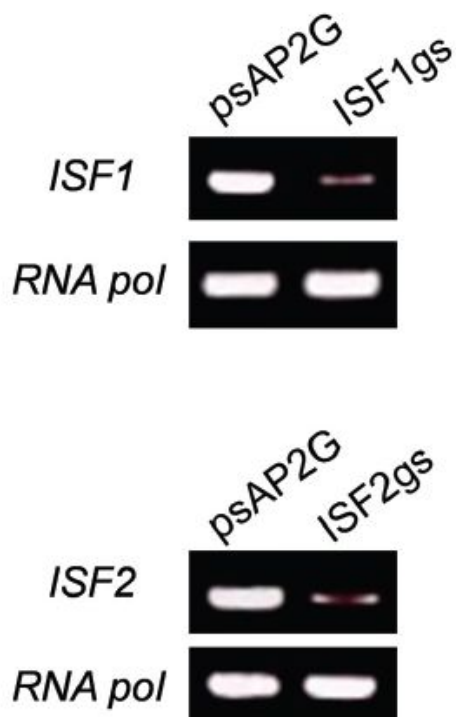


図1 ISF1, 2のgene silencing法による発現抑制のRT-PRによる確認。RNA polymeraseをcontrolとした。

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。

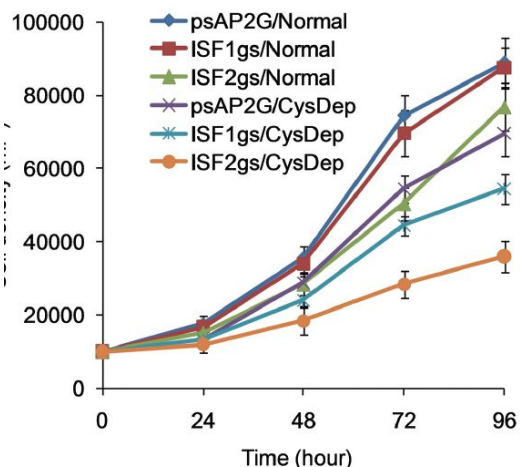


図3 ISF1, 2の発現抑制によるシステイン存在又は非存在下での栄養型の増殖。縦軸は1mlあたりの細胞数を表す。

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。

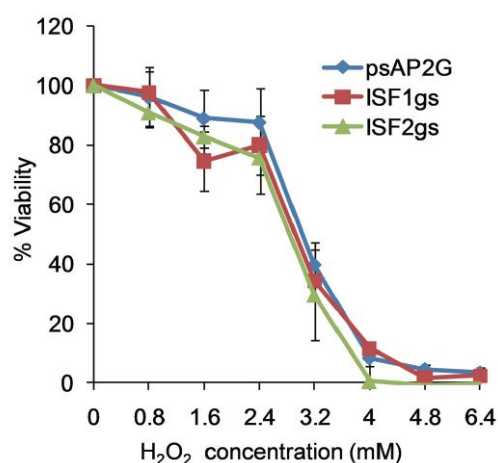


図3 ISF1, 2の発現抑制による過酸化水素に対する抵抗性の変化

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、グルタチオン生合成、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

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ミ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・伝搬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を目的とした。

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、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 あるいは 37 で保存し、反応性を継続的に検討した。その結果、37 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 (ミ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ただけではないが、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、測定の手続き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 対策をいつやめるとの判断には、夜間採血によるミ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

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（ $333.9 \pm 10.5 \text{mg}$ ）は対照群（ $353.3 \pm 4.3 \text{mg}$ ）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

分担研究者 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

ア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。線維化に關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)。

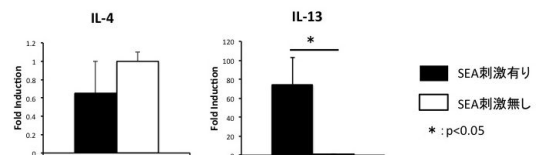


図1 SEA刺激マクロファージにおけるTh2サイトカインmRNA発現

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關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。

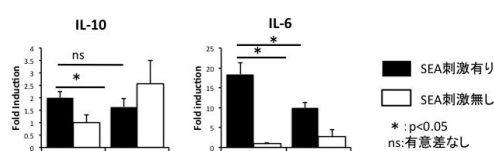


図2 SEA刺激マクロファージ由来IL-13の各種サイトカインmRNA発現に及ぼす影響

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解明が進み、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

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けていく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- と IL-1 の顕著な上昇に加え、TNF- 、 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- K0 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- 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にも長引く 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。

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

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、ウエ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。

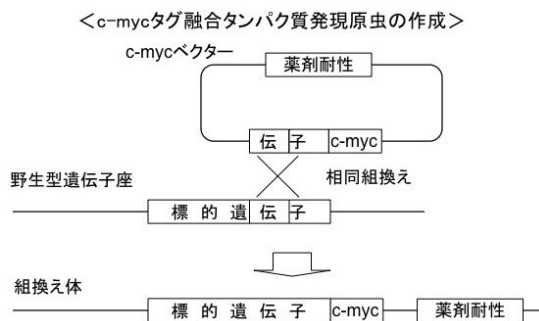
昨年度はスポロゾイトのロプトリー分子の遺伝子発現レベルの探索を RT-PCR 法で行った。蚊の唾液腺から回収した成熟したスポロゾイトを用いた場合、解析した12個のロプトリー分子の遺伝子発現は見られなかった。一方、蚊の中腸内のオーシストステージ(中腸スポロゾイト)について解析を行ったところ、12個全てのロプトリー分子の遺伝子発現が認められた。そこで本年度は、これらのロプトリー分子のタンパク質の発現と局在解析を行った。タンパク質の発現と局在解析の為に、10個のロプトリー分子についてはC末端にc-myc タグを融合した遺伝子組

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 個のロブ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 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ブ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ブトリー体部に局在すること、また RON3 がスポロゾイトのロブ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ブ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ブトリー分子がスポロゾイトのロブ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ブトリータンパク質の発現と局在解析を目的として、10 個のロブトリー分子の 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 個のロブトリー分子は、コムギ胚芽無細胞タンパク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。複数のロブトリータン

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、*N. 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、*N. 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、*N. 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/Wv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

*N. 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 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. ヲヱ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が観察した。
（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 berghei* 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

早川枝季, 徳榎富由樹, 臼倉治郎, 坪井敬文, Wellem's 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

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

マラリアにおける宿主病原体相互関係の解析

研究協力者 群馬大学・医学系研究科・国際寄生虫病学分野 久枝 一

研究要旨

我々はこれまでに赤血球型マラリア原虫の防御に CD8T 細胞が貢献していることを明らかにしてきたが、MHC class I 分子を持たない赤血球に感染するマラリア原虫に対してどのように防御能を発揮するのかは不明であった。本研究ではマウスマラリアモデルを用いて、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 CD8T 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。

A. 研究目的

マラリアは今なお世界中で猛威をふるう感染症であり、ワクチンの開発が望まれて久しい。そのためには、防御免疫を理解することは必要不可欠であるが、マラリア原虫の巧みな免疫回避機構により十分ではない。我々はこれまでに赤血球型マラリア原虫の防御に CD8T 細胞が貢献していることを明らかにしてきたが、MHC class I 分子を持たない赤血球に感染するマラリア原虫に対してどのように防御能を発揮するのかは不明であった。本研究ではマウスマラリアモデルを用いて MHC class I を持つ赤芽球が CD8T 細胞の標的となるかを明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

ネズミマラリア原虫 *Plasmodium yoelii* 17XNL 株に GFP 遺伝子を組み込み、組換え GFP-Py を作製した。また、さらに卵白アルブミン OVA を加えた GFP-OVA-Py も作製した。

マウスに GFP-Py を感染させ、脾臓あるいは骨髓細胞中の赤芽球を、赤血球系のマーカーであるグリコフォリン A、核 DNA を染色し蛍光顕微鏡、フローサイトメーターで観察した。

CD8 T細胞の応答は、OVA を認識する CD8 T細胞のみをもつ OT-I マウスの CD8 T細胞を用いて解析した。

本研究には遺伝子組換え実験、動物実験が含まれるが、いずれも所属機関での承認を受けており、実験指針にそって行われた。

C. 結果

1. マラリア原虫の赤芽球への感染の検証

GFP-Py を感染させたマウスの細胞を蛍光顕微鏡での観察を行った。末梢血中の GFP 陽性の感染赤血球には DAPI に染まるのは小さな原虫の核のみであった（図 1 上段）。一方、溶血した脾臓細胞中には、原虫の核以外の核酸を持った細胞に GFP のシグナルが認められた（図 1 下段）。これはグリコフォリン A を認識する TER119 陽性であり、赤芽球であることが確認された。

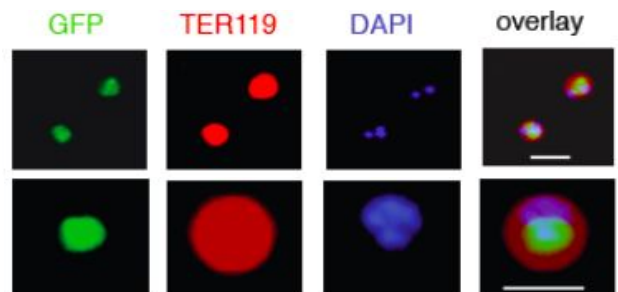


図 1 マラリア原虫感染赤芽球
GFP-Py感染マウスより
上段 末梢血中の感染赤血球
下段 脾臓中の溶血抵抗性感染赤芽球

2. CD8T 細胞による感染赤芽球の認識

マラリア原虫の赤芽球感染は証明できたが、CD8T 細胞が認識するかどうかを検討した。まずは、赤芽球が MHC class I を発現するかどうかをフローサイトメーターで確認した。非感染マウスの脾臓での溶血抵抗性 TER119 陽性赤芽球は、通常の脾細胞に比べると発現量は低いものの、MHC class I 分子を発現していた。

次いで、赤芽球が CD8 に認識されるかどうかを OT-I CD8T 細胞を用いて検討した。非感染マウスの赤芽球を精製し OVA の CD8T 細胞エピトープをパルスし、OT-I CD8T 細胞と共培養し OT-I CD8T 細胞による IFN- γ 産生、赤芽球に対する細胞傷害活性で評価した。OVA エピトープ存在下で、OT-I CD8T 細胞は IFN- γ を産生し、赤芽球に対して細胞死を誘導した。いずれも、エピトープをパルスした脾臓細胞を用いた時よりも応答は弱かった。これは、MHC class I の発現に相関していると思われる。いずれにしても、赤芽球が CD8 T 細胞に認識されることは明らかとなつて。

さらに、感染赤芽球が認識されるかどうかを検討するために GFP-OVA-Py を感染させたマウスの感染赤芽球を OT-I CD8T 細胞と共培養した。GFP-Py 感染マウスの感染赤芽球は OT-I CD8T 細胞を活性化することはなかったが、GFP-OVA-Py 感染マウスの感染赤芽球は OT-I CD8T 細胞からの IFN- γ を誘導した。このことは、感染赤芽球が抗原特異的に CD8 T 細胞に認識されることを明確にするものである。

D. 考察

マウスマラリアにおいて初めて赤芽球感染を示した。赤芽球感染の割合は低く、好適な宿主細胞ではなく、偶発的に侵入しそこでは発育できないと想定された。本研究では、感染赤芽球内でもマラリア原虫は分裂し、次の感染を起こすことも証明しており、原虫にとっても何らかの意味合いがあることが推察された。

感染赤芽球が CD8T 細胞に認識され、CD8T 細胞を活性化しうることも明らかとなった。赤芽球も通常の細胞と同様に、MHC class I に抗原を提示に関わるマシーナリーを持っていることが知られており、抗原提示できるのであろう。我々が見いだした、赤内マラリアに対する CD8T 細胞の防御メカニズムの一翼を担って

いると考えられる。しかしながら、感染赤芽球に対する細胞傷害活性が生体内でどれほどの防御効果を占めるのかについては今後の検討の課題である。

E. 結論

マウスマラリアモデルにおいて、マラリア原虫が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することを世界に先駆けて明らかにした。この結果は、CD8T 細胞を標的とした新たなワクチン戦略の可能性を示すものと期待できる。

F. 研究発表

1. 学会発表

今井孝, 石田英和, 鈴江一友, 平井誠, 谷口委代, 岡田紘子, 鈴木智久, 岩永史郎, 久枝 一 マラリア原虫は赤芽球に感染し CD8T 細胞を活性化する. 第 81 回日本寄生虫学会大会、兵庫医科大学、兵庫、平成 24 年 3 月 23 日

平井誠, 本間一, 中村昇太, 後藤直久, 美田敏宏, 鈴江一友, 今井孝, 松岡裕之, 安永照雄, 古澤満, 堀井俊宏, 久枝 一, 田邊和裕 超加速変異型ネズミマラリア原虫の創出とその順遺伝学への応用第 81 回日本寄生虫学会大会、兵庫医科大学、兵庫、平成 24 年 3 月 23 日

鈴江一友, 叢 岳, 平井誠, 今井孝, 谷口委代, 岡田紘子, 小安重夫, 鈴木守, 久枝 一 マラリア感染時における他感染症に対する防御能への影響. 第 81 回日本寄生虫学会大会、兵庫医科大学、兵庫、平成 24 年 3 月 24 日

Kazutomo Suzue, Yue Cong, Makoto Hirai, Takashi Imai, Tomoyo Taniguchi, Hiroko Okada, Chikako Shimokawa, Shigeo Koyasu, Mamoru Suzuki, Hajime Hisaeda. Attenuation of protective immunity against bystander infectious agents upon malaria. 第 41 回日本免疫学会総会、神戸国際会議場、兵庫、平成 24 年 12 月 5 日

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

マラリア感染における T 細胞免疫応答の研究

研究協力者 長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
感染免疫学講座・免疫機能制御学分野 由井 克之

研究要旨

マラリアは世界的に最も重要な感染症のひとつであるが、ワクチンは確立されていない。ワクチン開発の上では、長期間続く免疫記憶と有効な二次応答を誘導することが重要である。マラリア原虫感染では、免疫記憶が誘導されにくい或いは免疫抑制がかかるといわれており、これらの現象を正確に捉えメカニズムを解明することは重要である。本研究では、*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。

A. 研究目的

マラリア赤外型感染では、不活化スポロゾイトの免疫により完全な防御免疫が成立することがマウスとヒトの実験系で示されている。しかしながら赤内型感染では防御免疫応答が抑制される。さらに一度防御免疫を獲得しても、流行地を離れて原虫フリーになると防御免疫を失う例も指摘されている。即ちマラリアの記憶は、獲得しがたく失いやすいとされる。本研究では、マラリア原虫 *Plasmodium berghei* ANKA のマウス感染実験モデルを用い、マラリアに対する防御免疫の成立と記憶 T 細胞の活性化について、リステリア菌感染の場合と比較検討した。

B. 研究方法

1 . マラリア原虫感染後の免疫記憶
実験モデルでは、モデル抗原 OVA (卵白アルブミン) を発現する組換えマラリア原虫 *Plasmodium berghei* ANKA (PbA-OVA) を用いた。対象群は、OVA を発現するリステリア菌 *Listeria monocytogenes* (LM-OVA) を用いた。マウスに OVA 特異的 T 細胞受容体トランスジェニックマウス OT-I の CD8⁺ T 細胞を受け身移

入し、PbA-OVA 或いは LM-OVA を感染させた。PbA-OVA 感染群では、感染 6 日後から 2 週間にわたり抗マラリア剤で治療し、原虫を排除した。2 ヶ月にわたり末梢血中の OT-I 細胞の比率をモニターした。

2 . 記憶 T 細胞のマラリア原虫感染に対する応答

記憶 T 細胞は、*in vitro* で OT-I 細胞に抗原刺激を行い調整するか、*in vivo* で作製した OT-I 記憶細胞をソーティングにより分離して用いた。ナイーブ OT-I 細胞は、Rag ノックアウト OT-I マウス CD8⁺ T 細胞を用いた。記憶 OT-I 細胞とナイーブ OT-I 細胞とを 1 : 1 で混和し、マウスに受け身移入した。なお、記憶 T 細胞、ナイーブ T 細胞、宿主 CD8⁺ T 細胞を区別するため、CD45.1 と CD45.2 のマーカーを用いた。このマウスに PbA-OVA 或いはコントロールの LM-OVA を感染させ、末梢血や各臓器内の記憶細胞由来 OT-I とナイーブ細胞由来 OT-I 細胞の数をマウス毎に調べた。

記憶 CD8⁺ T 細胞の増殖がマラリア原虫感染において低下する機構を解明するため、PbA-OVA 感染と LM-OVA 感染マウスにおける記

憶とナイーブOT-I由来細胞の細胞表面分子の発現を調べた。

C. 結果

1. マラリア原虫感染後の免疫記憶の獲得

感染2ヶ月後、PbA-OVA感染群では38%、LM-OVA感染群では62%のマウスでOT-I細胞が末梢血中に維持されていた。これらの細胞は、細胞表面分子発現及び機能において記憶細胞であった。さらにOVAを発現する腫瘍細胞の拒絶反応においてもPbA-OVA誘導の記憶細胞はLM-OVA誘導の記憶細胞と同等の能力を示した。

2. 記憶T細胞のマラリア感染に対する応答

記憶とナイーブOT-I細胞を移入したマウスの感染実験に結果、マラリア原虫感染では脾臓、リンパ節、骨髄、脳、肝臓、末梢血においてナイーブ細胞由来のOT-I細胞が記憶細胞由来OT-I細胞よりも著名に増加していた。一方LM-OVAを感染させた場合には、脾臓、骨髄、脳、肝臓、末梢血において記憶細胞由来OT-I細胞が著名に増加していた。リンパ節では逆にナイーブ細胞由来OT-I細胞の方が多かった。応答を抑制する補助シグナル分子であるPD-1とLAG-3の発現は、PbA-OVA感染マウスでは記憶細胞由来OT-Iで亢進していた。一方LM-OVA感染マウスでは亢進していなかった。

D. 考察

少なくとも*P. berghei*感染の動物モデルにおいては、マラリア原虫感染によりCD8⁺T細胞の免疫記憶が成立することが明らかになった。さらにマラリア原虫感染においては、記憶CD8⁺T細胞のクローン増殖がナイーブCD8⁺T細胞に比べて選択的に抑制される可能性が示唆された。記憶細胞に抑制性補助シグナル分子が高発現されることが、マラリア原虫感染における記憶CD8⁺T細胞の増殖抑制に関与している可能性が示唆された。

E. 結論

マラリア原虫感染では、記憶T細胞の活性化がナイーブT細胞に比べより強く阻害される可能性が示唆された。このメカニズムについては今後さらに詳細な研究が必要であるが、ヒトマラリア感染でも同様な抑制がかかる可能性が考えられる。マラリア原虫感染におけ

る免疫制御機構に関する研究は、ワクチンの有効性を確実にするためにも推進する必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

英文論文

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.

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.

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.

2. 学会発表

モデル抗原組換えマラリア原虫を用いた肝細胞期防御免疫機構の解析、木村一美、木村大輔、都田真奈、本間季里、田村隆彦、油田正夫、由井克之、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、11月10-11日、2012年

IRF4 controls cytokine signals and plays critical roles for proliferation and differentiation of CD8⁺ T cells. M. Miyakoda, Honma, D. Kimura, K. Kimura, T. Matsuyama, K. Yui 第41回日本免疫学会学術集会、12月5-7日、2012年

CD4⁺ T cells produce EBI-3⁺ cytokine inhibiting their own protective immune responses during infection with malaria parasites. D. Kimura, M. Miyakoda, Honma, K. Kimura, H. Hara, H. Yoshida, K. Yui 第41回日本免疫学会学術集会、12月5-7日、2012年

Negative regulation of Th2-type cytokine

production by IRF4 in natural helper cells. K. Honma, D. Kimura, K. Kimura, M. Miyakoda, M. Kazuyo, S. Koyasu, T. Matsuyama, K. Yui 第 4 1 回日本免疫学会学術集会、12 月 5-7 日、2012 年

Regulation of T cell responses during infection with *P. berghei* ANKA leading to the protective immunity and pathogenesis of cerebral malaria. D. Kimura, M. Miyakoda, K. Kimura, K. Yui, The 6th Nagasaki symposium on tropical and emerging infectious diseases, The 11th Nagasaki-Singapore medical symposium. Dec. 10-12, 2012

Development of memory CD8⁺ T cells and their recall responses during blood-stage infection with *Plasmodium berghei* ANKA., M. Miyakoda, D. Kimura, K. Honma, K. Kimura, M. Yuda, K. Yui. Immunological mechanisms of vaccination, Part of the Keystone symposia global health series, Dec. 13-18, 2012.

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

マラリア原虫感染赤血球膜タンパク質輸送の解析

研究協力者 長崎大学・熱帯医学研究所・原虫学分野 金子 修

研究要旨

マラリアの中でも最も危険な悪性マラリアを引き起こす熱帯熱マラリア原虫は、病原性に関わる接着分子等を感染赤血球内に形成するマウレル裂と呼ばれる膜構造物を経て赤血球表面に輸送する。原虫分子の輸送を阻害することで病原性を軽減できるため、この分子輸送機構の解明は重要な研究課題である。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 surf 多重遺伝子族がコードする SURFIN は、熱帯熱マラリア原虫以外のマラリア原虫種にも相同体が存在し、かつ感染赤血球に局在する唯一の分子であるため、本研究では、その中でも転写量が最も多いにもかかわらず、感染赤血球へは輸送されないと報告されていた SURFIN_{4.1} について再評価を行った。その結果、組換えタンパク質 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。

A. 研究目的

マラリアはいまだに熱帯・亜熱帯地域を中心に世界に蔓延し、早急に対策を進めるべき問題である。マラリアの中でも最も危険な悪性マラリアを引き起こす熱帯熱マラリア原虫は、病原性に関わる接着分子等を感染赤血球内に形成するマウレル裂と呼ばれる膜構造物を経て赤血球表面に輸送する。原虫分子の輸送を阻害することで病原性を軽減できるため、この分子輸送機構の解明は重要な研究課題である。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 surface-associated interspersed gene (surf) 多重遺伝子族がコードする一回膜貫通型タンパク質 SURFIN は、熱帯熱マラリア原虫以外のマラリア原虫種にも相同体が存在し、かつ感染赤血球に局在する唯一の分子であるため、本研究では、マラリア原虫種を通じて保存された輸送機序を明らかにする事を念頭に、SURFIN_{4.1} と呼ばれるメンバーについて、その局在を再評価し、マウレル裂への輸送に必要な領域を明らかにすることとした。

B. 研究方法

SURFIN_{4.1} の相補的 DNA の塩基配列を複数の原虫株において決定した。SURFIN_{4.1} の全長を Ty タグ配列と緑色蛍光タンパク質(GFP)と融合した組換え全長 SURFIN_{4.1} を発現する組換え熱帯熱マラリア原虫、組換え全長 SURFIN_{4.1} から種々の領域を除去した組換え部分 SURFIN_{4.1} を発現する原虫、さらに、細胞膜領域周辺の配列を SURFIN とは関係のないタンパク質の相当領域と入れ替えた組換え SURFIN_{4.1} を発現する原虫を作製した。間接蛍光抗体法により、組換え SURFIN_{4.1} と種々の局在マーカーの共局在を検討した。精製した原虫虫体からトリトン X-100 により抽出した膜タンパク質を免疫沈降することによりタンパク質複合体形成を検討した。

C. 結果

□相補的 DNA の塩基配列の再評価を行った結果、以前の報告とは異なり、SURFIN_{4.1} は株により、細胞内領域に他の SURFIN 相同体との間で保存しているトリプトファンに富んだ領域を 2 つ含むものと全く含まないものとの

2種類があった。□3D7株の全長SURFIN_{4.1}をタグタンパク質との融合タンパク質として発現させたところ、SURFIN_{4.1}は感染赤血球へは輸送されていないとした以前の報告とは異なり、感染赤血球内のマウレル裂に局在した。□ブレフェルディンA処理により、粗面小胞体マーカーと共局在を示したため、SURFIN_{4.1}は粗面小胞体を経て細胞外へ輸送されることが示唆された。□膜貫通領域は粗面小胞体への移行に必須であった。□SURFIN_{4.1}の細胞外領域のシステインに富んだ領域とそれに続く相同体間で多様性に富んだ領域があると、内在性のSURFIN_{4.1}と複合体を形成して、マウレル裂へ輸送されてしまうことが分かった。□アミノ末端側にマウレル裂へ輸送されるシグナルが2つ存在する事が分かった。□細胞膜貫通領域と直後の細胞内領域を関係のないタンパク質に置換すると、マウレル裂への輸送効率が落ちた。

D. 考察

熱帯熱マラリア原虫が感染赤血球内へ原虫分子を輸送するシグナルとして、輸送される分子のアミノ末端側疎水性領域と5つのアミノ酸からなる *Plasmodium* export element (PEXEL)と呼ばれるモチーフを用いる PEXEL 依存性輸送と、PEXEL モチーフを持たないアミノ末端領域と膜貫通領域を用いる PEXEL 非依存性輸送が知られている。本研究によりSURFIN_{4.1}は原虫内では粗面小胞体を経由する古典的分泌経路を用い、マウレル裂への輸送はPEXELモチーフに依存しないものの、アミノ末端領域を必要とし、膜貫通領域が輸送効率に大きく影響することが明らかとなり、SURFIN_{4.1}の輸送は既知のPEXEL非依存性輸送と同じ特徴を持つ事が明らかとなった。

E. 結論

熱帯熱マラリア原虫以外のマラリア原虫種にも相同体が存在し、かつ感染赤血球に局在する唯一の分子であるSURFINの輸送がPEXEL非依存性輸送と同じ特徴を持つことは、マラリア原虫の赤血球へのタンパク質輸送においてPEXEL非依存性輸送がより古典的である事を意味するのかもしれない。

G. 研究発表

1. 論文発表

和文論文

金子修 ノーベル賞の医学の進歩・発展(3) マラリア原虫発見の歴史と今日的課題 最新医学 pp 2828-2830 (2012年 67巻 12号)

英文論文

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).

Tang J, Dai Y, Zhang H, Culleton R1, 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)

Kaewthamasorn M, Yahata K, Alexandre JSF, Xangsayarath P, Nakazawa S, Torii M, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, **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)

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).

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).

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).

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).

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)

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)

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)

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* 62(2):157-64 (2012/12)

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* 62(2):215-29 (2012/12)

2. 学会発表

Mutungi JK, Kaewthamasorn M, Culleton R, Sakaguchi M, Yahata K, **Kaneko O.** Expression of PyRON5, a *Plasmodium yoelii* rhoptry neck protein in merozoite and sporozoite. (oral) The 15th Japan-Korea Parasitologists' Seminar, Miyazaki Aoshima Palmbeach Hotel, Miyazaki, Japan (2012. May. 23-25)

金子修. 共生非依存的に進化したオルガネラによるマトリョーシカ化機構。(oral) 第1回マトリョーシカ型生物学研究会、国立感染症研究所、東京 (2012. July. 20-22)

Xangsayarath P, Kaewthamasorn M, Yahata K, Nakazawa S, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, **Kaneko O.** Positive diversifying selection on the *Plasmodium falciparum* surf_{4.1} gene in Thailand. (poster) 第53回日本熱帯医学会大会、とかちプラザ、北海道 (2012. Sep. 5-6)

Jiang N, Sakaguchi M, Alexandre J, Yahata K, Tsuboi T, Chen Q, **Kaneko O.** Role of the C-terminal region of *Plasmodium falciparum* antigen 332 on the location in the parasite-infected red blood cell. (poster) 2012 (23rd) Annual Molecular Parasitology Meeting, Marine Biological Laboratory, Woods Hole, USA (2012. Sep. 22-26)

Sakura T, Yahata K, **Kaneko O.** Involvement of the upstream of C-terminal cysteine-rich domain in the microneme trafficking of erythrocyte binding antigen-175 in *Plasmodium falciparum*. (poster) 2012 (23rd) Annual Molecular Parasitology Meeting, Marine Biological Laboratory, Woods Hole, USA (2012. Sep. 22-26)

Zhu X, Yahata K, Alexandre JSF, **Kaneko O.** Recombinant *Plasmodium falciparum* SURFIN_{4.1} protein is exported to the parasite-infected red blood cell. (poster) 2012 (23rd) Annual Molecular Parasitology Meeting, Marine Biological Laboratory, Woods Hole, USA (2012. Sep. 22-26)

佐倉孝哉、矢幡一英、**金子修**. 熱帯熱マラリア原虫EBA-175のマイクロネーム輸送に必要な領域の同定。(oral) 第72回日本寄生虫学会東日本支部会、第10回分子寄生虫・マラリアフォーラム合同大会、群馬大学医学部、群馬 (2012. Oct. 12-13)

宮崎真也、Zhu X、矢幡一英、**金子修**. マラリア原虫の赤血球へのタンパク質輸送機構に関する研究。(oral) 第1回日本細胞共生学会若手の会、下田臨海実験センター、静岡 (2012. Nov. 7-9)

Zhu X, Yahata K, Alexandre JSF, **Kaneko O.**

Deciphering the export signal of *Plasmodium falciparum* protein exported to the parasite-infected red blood cell. (oral) The 6th Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases and The 11th Nagasaki-Singapore Medical Symposium, Ryojun Auditorium, Nagasaki University, Nagasaki, Japan (2012. Dec. 10-12)

Lucky A, Yahata K, Iwata N, **Kaneko O**. Trafficking and assembly of malarial exported proteins in the *Plasmodium falciparum*-infected red blood cell. (poster) The 6th Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases and The 11th Nagasaki-Singapore Medical Symposium, Ryojun Auditorium, Nagasaki University, Nagasaki, Japan (2012. Dec. 10-12)

Zhu X, 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. (poster) The 6th Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases and The 11th Nagasaki-Singapore Medical Symposium, Ryojun Auditorium, Nagasaki University, Nagasaki, Japan (2012. Dec. 10-12)

Jiang N, Sakaguchi M, Alexandre J, Yahata K, Tsuboi T, Chen Q, **Kaneko O**. Role of the C-terminal region of *Plasmodium falciparum* antigen 332 on the location in the parasite-infected red blood cell. (poster) The 6th Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases and The 11th Nagasaki-Singapore Medical Symposium, Ryojun Auditorium, Nagasaki University, Nagasaki, Japan (2012. Dec. 10-12)

Yahata K, **Kaneko O**. Time-lapse imaging of red blood cell invasion by rodent malaria parasites. (poster) The 6th Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases and The 11th Nagasaki-Singapore Medical Symposium, Ryojun Auditorium, Nagasaki University, Nagasaki, Japan (2012. Dec. 10-12)

Asada M, Goto Y, Yamagishi J, Yahata K, Yokoyama N, Inoue N, **Kaneko O**, Kawazu S. *In vitro* imaging of gliding motility on *Babesia bovis* merozoites. (poster) The 6th Nagasaki

Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases and The 11th Nagasaki-Singapore Medical Symposium, Ryojun Auditorium, Nagasaki University, Nagasaki, Japan (2012. Dec. 10-12)

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

マラリア原虫に有効な新規阻害剤の探索

研究協力者 金 恵淑

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・国際感染症制御学分野・准教授

研究要旨

熱帯熱マラリア原虫に有効な新規抗マラリア薬の候補化合物を探索するために、分子内にペルオキシドを有する化合物の中から環状過酸化化合物・N-89を見出した。この化合物は *in vitro*, *in vivo* の両実験系で優れた抗マラリア活性と完治効果を併せ持つことが判った。今までの体内動態解析研究より、マラリア流行地の状況に合わせた軟膏製剤も他の懸濁剤と同様に抗マラリア薬効を発揮することを確認した。今年度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。また、*P. chabaudi* 感染マウスを用いた薬効評価系を新たに構築し、リング期の原虫、及び栄養体の原虫に阻害活性を示す化合物を特異的に選抜できることを確認した。

A. 研究目的

近年 Artemisinin をベースに他の抗マラリア薬を併用した ACT (Artemisinin-Combination Therapy) 療法が WHO を中心に展開されているが、カンボジア国境を中心にこれら ACT 耐性の熱帯熱マラリア原虫が報告され、新しい抗マラリア薬の開発の重要性が急務になっている。

私は抗マラリア新薬開発研究で得られた分子内ペルオキシド構造を含む有機合成化合物に優れた抗マラリア活性を見出し、将来抗マラリア薬として臨床の現場で使用することを念頭において研究を進めた。そこで、マラリア流行地の状況を考慮し、安価で大量に有機合成しやすい化合物を選抜する。また、*in vivo* 抗マラリア薬効解析を容易に行うことが出来る評価系を構築し、*in vitro* 評価系で見出された候補化合物の作用機序の解析研究（マラリア原虫の生育ステージを中心に）を同時に行った。

B. 研究方法

1. N-89 軟膏製剤の体内動態解析と抗マラリア薬効評価

LC/MS/MS を用いた N-89 の検出条件をもとに、新しい処方で作成した N-89 の配合率を 0~150mg/Kg まで含む種々の軟膏製剤を作成した。基剤はオイルと白色ワセリンで均一になるように混ぜた。N-89 軟膏製剤をマウスの背の毛の刈った部分に塗布し、乾燥してからケージに戻した。単回塗布、あるいは複数回塗布し、0~12 時間までの血液サンプルを用いて N-89 含有量を測定した。マウスに従来のオイル溶解した N-89 を投与する群をコントロールとした。抗マラリア薬効解析は *in vivo* 4-day suppressive test 法で行った (*P. berghei* NK65 株感染マウスを用い、1 回/日×4 日間連続薬剤投与後、次の日に感染率で阻害能を見る方法)。

2. *P. chabaudi* 感染マウスを用いた *in vivo* 薬効評価系の構築

抗マラリア薬効評価系で用いる *in vivo* 実験系は *P. berghei* NK65 株感染マウスを用いて行うが、この評価系では様々なステージの原虫が混在し、薬剤評価時に原虫の総阻害能として算出する。私たちはメラトニン添加によりマラリア

原虫の周期性が見られる論文報告から、*P. berghei* NK65 株感染マウスにメラトニン(最大 150mg/kg)を投与したが、マラリア原虫の周期性に影響する結果が得られなかった。そこで、ネズミマラリア原虫株によって周期性の相違有無を調べた。*P. chabaudi chabaudi* 感染マウスを用い、感染率の増殖カーブの作成、メラトニン添加有無による周期性の変化、及び、マラリア原虫のステージ変動を経時的に検討した。Positive control として N-89 作用時のマラリア原虫ステージの変動についても比較解析した。

2. 過酸化構造を有する化合物、及び天然生薬資源を用いた *in vitro* 薬効解析

培養熱帯熱マラリア原虫 *P. falciparum* (FCR-3 株)を用い、初期感染率 0.3%、ヘマトクリット値 3%の条件で 24 well plate に感染赤血球浮遊液を入れ、DMSO 等で溶解した化合物を添加して 72 時間培養後、感染率の変動より阻害能を算出する。

C. 研究結果

難溶性薬物の体内動態の改善とマラリア流行地の現状を考慮した剤形として N-89 軟膏製剤の可能性について検討した。軟膏の基剤としてオイル：白色ワセリン(2:8 (v/w))で N-89 を均一となるように混ぜ、マウスの毛を刈った背の部分に塗り、乾燥後にケージに戻した。健康なマウスを用いた単回、及び複数回塗布時の体内動態解析の結果、基剤として用いた溶剤が検出法に影響したか、あるいは、体内動態の検出感度以下であったために定量することが出来ない。一方、*P. berghei* NK65 感染マウスを用いた 4-day suppressive test の結果、ED₅₀ 及び ED₉₀ 値は 30mg/kg と 45mg/kg で従来の他の投与ルートと比較して同程度か劣る値であった。延命率は 150mg/kg 投与群で実験群の 80%が生存し、60 日以上生存した。この結果より N-89 軟膏製剤は抗マラリア薬効を示し、延命効果を合わせて持つが、体内動態の解析が不十分であるため、再現性の実験が必要がある。

今まで *in vitro* の熱帯熱マラリア原虫に強い阻害活性を示す化合物は、次にネズミマラリア原虫感染マウス(*P.*

berghei NK65 株)系で薬効解析を行っていたが、この評価系ではマラリア原虫の阻害能(メロゾイト期の原虫~分裂期のスカイゾント原虫を全て含む)のみ評価出来る。そのため、私たちは特定のマラリア原虫、即ち、マラリア原虫の代謝・成長が盛んな原虫(栄養体)に作用する抗マラリア薬の開発評価系が構築できれば、マラリア原虫の阻害能とマラリア原虫の作用ステージの両方が解析できるのではと考え、研究を行った。その結果、ネズミマラリア原虫(*P. chabaudi chabaudi*)を感染させたマウスの特定時期にトロポゾイト期の原虫が全原虫の 7 割以上含まれていることが分かった。この現象は *P. berghei* NK65 株を感染させたマウス系では見られない。また、メラトニンを処理しても特定ステージの割合が増えるなどの変化は見られず、これら現象は *P. chabaudi chabaudi* 原虫由来であると考えられる。コントロールとして用いた N-89 では従来の報告通りにトロポゾイト期の原虫を特異的に阻害する予備的な結果を得た。現在、最適の評価系を構築するための条件検討(原虫の感染数、原虫ステージの変動、薬剤の処理時期など)を行っている。

In vitro 薬効評価に用いた計 31 種の化合物は、いずれも 1 μ M 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かった。そのうち、天然生薬資源由来の 2 化合物については抗マラリア活性は 1 μ M と弱いものの、化合物の基本構造が抗マラリア活性を示す論文報告があることから、活性改善のために誘導体を合成してさらに評価する。

D. 考察

分子内のペルオキシド構造を有する化合物は抗マラリア活性と安全性を同時に有しており、アルテミシニンと比較して単剤で完治能力を示した。現在 WHO はアルテミシニンを主とした併用法(Artemisinin-Combination Therapy (ACT))を推奨しているが、既にカンボジアを中心とした東南アジアで ACT に耐性

を示す熱帯熱マラリア原虫の出現が報告されている。従って、ACT 耐性の克服にも N-89 は力を発揮すると考えられる。マラリア流行地でこれら環状過酸化化合物が新規抗マラリア薬として使用されるためには、現地の劣悪な環境での化合物の投与ルートと安定性維持など解決する問題点がいくつかある。そのため、安定性を含めた安全性試験の詳細も平行していく。

薬効評価系の試みとして *P. chabaudi chabaudi* 感染マウスを用いた特異的ステージの原虫を阻害する阻害剤の開発研究も構築することができたが、日周性を引き起こす機序についての解析がさらに必要になる。加えて、*in vitro* で抗マラリア薬効を示す新規阻害剤の探索研究は論文報告をもとに効率よく阻害剤の選抜を行って行く必要がある。

E. 結論

安全で簡単な構造を有する環状過酸化化合物 (N-89) は水に難溶性であるため、体内利用率を改善させた新しい製剤として軟膏製剤としても有用であることが判った。新しいマウスの薬効評価系でも N-89 はトロポゾイト基の原虫を特異的に阻害し、抗マラリア作用を示すことが確認できた。これら結果を基にマラリア流行地で使用可能で且つ作用機序の明らかな新規抗マラリア薬を開発するための解析をさらに進める。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kamata, M., Hagiwara, J., Hokari, T., Suzuki, C., Fujino, R., Kobayashi, S., Kim, H.-S. and Wataya, Y. Applications of triphenylpyrylium salt-sensitized electron transfer photo-oxygenation reactions to the synthesis of benzo-fused 1,4-diaryl-2,3-dioxabicyclo[2.2.2]octanes as new

antimalarial cyclic peroxides. *Research on Chemical Intermediate*, 39, 127-137, 2013

2. 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
3. Tanaka Y, Sakamoto A, Inoue T, Yamada T, Kikuchi T, Kajimoto T, Muraoka O, Sato A, Wataya Y, Kim H.-S, and Tanaka R. *Andirolides* HeP from the flower of *andiroba* (*Carapa guianensis*, *Meliaceae*). *Tetrahedron*, 68, 3669-3677, 2012

2. 学会発表

1. 薬剤耐性マラリアの最新の知見－新規治療薬開発研究の現況－。金 惠淑、綿矢 有佑。第60回日本化学療法学会学術集会、2012年4月26-27、長崎
2. New Antimalarial Endoperoxides - Bench to Bed for Malaria Control- Hye-Sook Kim, Masayuki Morita, Bun Kou, Akira Sato, Yusuke Wataya. New drug development research of antimalarial endoperoxide N-251. 5th Asean Congress of Tropical Medicine and Parasitology, 15-17, May, 2012, Manila
3. Morita M., Hiramoto A., Okada K., Wakimoto T., Katamoto A., Watanabe H., Takahashi T., Imada C., Sato A., Higaki K., Wataya Y., Kim H. S. Forum Cheju 15 The 15th Japan-Korea Parasitologists' Seminar、2012年5月、Miyazaki

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, 岩淵和也, 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

トリパノソーマの防御応答回避メカニズムの解析

研究協力者 群馬大学大学院・保健学研究科・生体情報検査科学分野 嶋田 淳子

研究要旨

南米型トリパノソーマ (*Trypanosoma cruzi*) は中南米に流行する寄生原虫で、感染すると宿主細胞のアポトーシスを抑制することがわかっている。宿主アポトーシス抑制因子 c-FLIP と相互作用する原虫側因子を探索するため、photo-cross-linking の実験系を確立した。

A. 研究目的

Trypanosoma cruzi 感染により宿主アポトーシス抑制因子 c-FLIP と相互作用する原虫側因子の探索を行うため、培養細胞を用い、c-FLIP の高発現細胞を樹立する。また、c-FLIP と相互作用する原虫側因子を探索することを目的とする。

B. 研究方法

ヒト由来培養細胞 HT1080 に c-FLIP 遺伝子発現細胞を樹立する。予備実験で、全長の c-FLIP 全長を発現することが困難であったため、c-FLIP を DED 領域と pseudo caspase 領域に分け、各々の遺伝子を tag 付ベクターに連結した。リポフェクションにより HT1080 細胞にトランスフェクションし、クローン化後、高発現細胞を樹立した。発現細胞に *T. cruzi* を感染させ、photo アミノ酸を含む培地で 24 時間培養し、UV 照射により photo-cross linking を行った。この方法により、高発現させたタンパク質と相互作用するタンパク質を共有結合させることができる。Photo-cross-linking の実験条件を決めるため、UV 照射条件等を検討した。最適条件で細胞ライセートを調整し、抗 tag 抗体で免疫沈降後ウエスタンブロットを行い、相互作用するタンパク質を探索した。

C. 結果

c-FLIP の pseudo caspase 領域発現細胞クローンを 5 個得ることができ、そのうちの 2 クローンで本タンパク質の発現が確認された。この細胞を用いて photo-cross-linking の実験

条件を検討したところ、波長 365 nm、照射エネルギー 2800 mW/cm²、照射距離 5 cm、16 分間が最適であることがわかった。そこで pseudo caspase 発現細胞に *T. cruzi* を感染させ、この条件下で photo-cross-linking を行ったところ、pseudo caspase より分子量が大きいバンドが複数認められた。

D. 考察

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。DED 領域を発現する細胞のクローンは未だ得られておらず、この領域はアポトーシス誘導と関連しているため、高発現細胞が得られない可能性が考えられた。また、UV 照射により pseudo caspase より分子量が大きいサイズのバンドが検出されたことから、photo-cross-linking 法の実験条件を確立することができ、相互作用するタンパク質の存在が明らかとなった。現在、MS/MS を用いて、pseudo caspase と結合したタンパク質の解析を試みている。

E. 結論

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索するためのツールとして photo-cross-linking の実験系を確立した。

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

本村玲奈、嶋田淳子 南米型トリパノソーマ
感染宿主細胞の細胞分裂とアクチンの解析
第 72 回日本寄生虫学会東日本大会・第 10 回
分子寄生虫・マラリアフォーラム合同大会
群馬大学昭和キャンパス、前橋、平成 24 年 10
月 12 13 日

高橋千由紀、嶋田淳子 *Trypanosoma cruzi*
感染細胞におけるオートファジーと原虫由来の
タンパク質との関連性の解析 第 82 回日本寄
生虫学会大会、東京医科歯科大学、東京、平
成 25 年 3 月 29 31 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

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

協力研究者 丸山治彦 宮崎大学医学部 教授

研究要旨 宮崎大学医学部寄生虫学で施行した血清診断では、2012年においても、動物由来回虫類感染症が多数あった。これらの原因虫種はイヌ回虫かブタ回虫と考えられ、これまでに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、イヌ回虫症が 90% 程度であることを示した。しかしながらこれは「トキソカラ感染症」であって、イヌ回虫かネコ回虫かは不明である。したがって、今年度は、イヌ回虫感染とネコ回虫感染に病態の違いがあるのかどうか、ブタを用いた感染実験で検討した。その結果、幼虫包蔵卵投与後は両者ともに肝臓から肺へと移行したが、ネコ回虫はイヌ回虫と比べて極めて移行速度が速く、短時間で虫体は肺より先へ到達することがわかった。このことは、臨床的に肝臓や肺に病変が強く出るのがイヌ回虫感染症、好酸球増多のみみとめて画像所見に乏しいのはネコ回虫感染症である可能性を示唆している。

A. 研究目的

われわれは、multiple-dot ELISA 法による抗体スクリーニングと 96-well microtiterplate ELISA 法による精査を基本とした寄生虫症診断システムを構築し、多くの寄生虫病の診断に関わってきた。総検体数は年間 500 前後で推移し、毎年 100-200 例を寄生虫症と診断している。

抗寄生虫抗体陽性で、臨床的に感染ありと判断される症例は年間 100 例近くにのぼり、その中では肺吸虫症と動物由来の回虫類感染症が多数を占める。動物由来の回虫とは具体的にはトキソカラとブタ回虫であり、トキソカラ症とブタ回虫症の鑑別については、これまでの研究によって組換え抗原を用いた抗体検査法である程度鑑別できる見通しが立った。

しかしながら、未だにトキソカラがイヌ回虫なのかネコ回虫なのかという問題が残されている。イヌ回虫とネコ回虫は同属に分類されている通りきわめて近縁であり、抗体での鑑別は少なくとも現時点では不可能である。また、ネコ回虫の遺伝子やタンパク質についての情報は限定的にしか得られていないため、イヌ回虫とネコ回虫で、それぞれに特異的な抗原を探すのは

困難である。

そこで、イヌ回虫症とネコ回虫症の違いを病態の面から明らかにするために、ヒトと生理学的に近いとされるブタを用いて感染実験を実施した。ブタで幼虫の体内移行などにおける病態の違いを明らかにできれば、ヒトで発生している幼虫移行症の病態解明に大きく貢献できることになる。

B. 研究方法

1. ブタと寄生虫

ブタの感染実験は、コペンハーゲン大学獣医学部 Stig Milan Thamsborg 教授（Danish Centre for Experimental Parasitology, Department of Veterinary Disease Biology, Faculty of Life Sciences, University of Copenhagen）で実施した。虫卵はイヌ回虫とネコ回虫ともに、Claudia Bohm, Institute of Parasitology, University of Veterinary Medicine, Hannover より供与いただいた。

2. 感染

虫卵は、イヌ回虫またはネコ回虫に感染したイヌまたはネコの糞便から分離し、定法により

培養して幼虫包蔵卵とした。

1) 感染 31-32 日後の評価

ブタには幼虫包蔵卵を 10,000 個経口的に投与し、31-32 日後の各臓器（肺、肝臓、腸間膜リンパ節、心、脳、眼、横隔膜、舌、筋肉）から虫体を回収した。肝臓と腎臓は、破碎前に表面の白点 white spot のカウントもおこなった。感染 22、28 日後には採血して末梢好酸球を測定した。

2) 感染 4 日および 14 日後の評価

幼虫包蔵卵 100,000 個を経口投与して 4 日後は肺と肝臓から、14 日後には肺、肝臓、腸間膜リンパ節、脾臓、腎臓、横隔膜、脳、筋肉から虫体を回収した。

3. 虫体の回収法

臓器からの虫体回収は消化法と寒天法のどちらか、あるいは両方を実施した。消化法は人工消化法を用いた。1% ペプシン HCl 人工消化液で破碎した臓器を消化し、臓器中に含まれる虫体を回収した。寒天法は、破碎した臓器を 1% 寒天液に懸濁して布に塗り広げ、寒天の凝固後に布ごと緩衝液中でインキュベートして、遊出してきた虫体を回収した。

虫体回収は、感染 4 日後、14 日後、31-32 日後に実施した。31-32 日後では、

C. 研究結果

1. 感染 31-32 日後（虫卵 10,000 個投与）

1) 末梢血好酸球

感染後の末梢血好酸球はイヌ回虫感染群の方がネコ回虫感染群よりも有意に高かった。しかしながら、感染 28 日後には非感染群と同程度までに下がっていた（推移は図 1 の通り）。

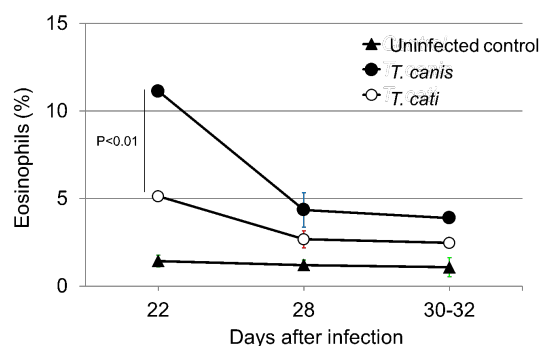


図 1 末梢好酸球数

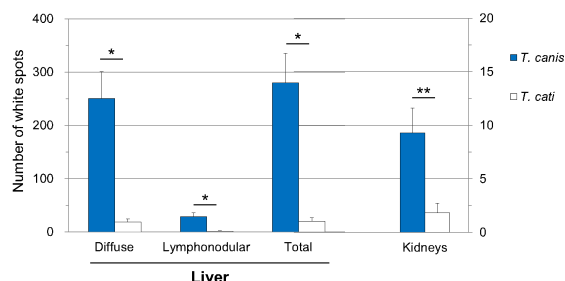


図 2 肝および腎表面の白点 white spot

2) 白点

臓器表面の白点は炎症巣を示し、感染の有無を肉眼的にとらえることができる。肝臓および腎臓表面の白点は、イヌ回虫感染群の方が明らかに高い値を示し、ネコ回虫感染群は有意に少ない数の白点しか認めることができなかった。

3) 回収虫体数

感染約 1 か月後における回収虫体数は下表の通りで、リンパ節はネコ回虫の方が多かったが、最も幼虫が集積していると思われた肺からは、イヌ回虫の方が多く回収された。肝臓からの回収虫体数が少ないのは、イヌ回虫・ネコ回虫ともに、すでに肝臓を通り抜けた後だったためと考えられた。

Organ	<i>T. canis</i>	<i>T. cati</i>
Liver	0.1	0
Lungs	3.0	0.6
LN	1.7	4.2
Diaphragm	0.1	0
Brain	0	0
Muscle	0	0.1

表 1 感染 31-32 日後の回収虫体数（臓器 100 g 当たり）

2. 感染 14 日後（虫卵 100,000 個投与）

感染 14 日後は、対象のすべての臓器で回収虫体数はイヌ回虫がネコ回虫を上回り、とくに肺ではイヌ回虫はネコ回虫の倍近い値であった。またネコ回虫感染ブタの肝臓からは虫体を回収することができなかった（表 2、図 3、図 4）。

Organ	<i>T. canis</i>	<i>T. cati</i>
Liver	31	0
Lungs	122	67
LN	57	54
Spleen	0	0
Kidneys	0	0
Diaphragm	2	0
Brain	1	0
Muscles	0	0

表 2 感染 14 日後の回収虫体数 (臓器 100g 当たり)



図 3 イヌ回虫感染 14 日後のブタの肝臓



図 4 ネコ回虫感染 14 日後のブタの肝臓

3. 感染 4 日後 (虫卵 100,000 個投与)

感染 31-32 日後および感染 14 日後にはネコ回虫を肝臓から回収することができなかった。その理由として、ネコ回虫が肝臓をバイパスしていることが考えられたため、もっと早期の感染 4 日後に肝臓、肺、腸間膜リンパ節から体内移行幼虫を回収した。

その結果、ネコ回虫感染でも肝臓から虫体が

回収され、さらに、肺ではイヌ回虫よりも多数の虫体を回収することができた (表 3)。

Organ	<i>T. canis</i>	<i>T. cati</i>
Liver	700	60
Lungs	42	128*
LN	3540	2240

表 3 感染 4 日後の全回収虫体数

D. 考察

当教室で実施している寄生虫病血清診断の結果陽性と判定される症例の大多数は、食品媒介性の人獣共通寄生虫症である。具体的には肺吸虫症とトキソカラやブタ回虫による内臓幼虫移行症で、両者で全体の 80%を超えている。

昨年度までの研究で、トキソカラ症とブタ回虫症を血清学的に鑑別する手法はある程度確立でき、症例数を増やして検討を続ける予定である。しかしながら、新たな問題として、トキソカラ症の実態がイヌ回虫症なのかネコ回虫症なのかという点が残されている。どちらも非好適宿主内では幼虫のまま止まるため、トリなどの食肉を介したヒトへの感染が起きる可能性は等しく存在する。近年、子犬のイヌ回虫症は減少しているため、トキソカラ症の原因としてイヌ回虫に加えてネコ回虫についても考慮する必要があるであろう。

ブタ回虫とトキソカラは交差反応が強いとはいえ一定以上抗原性に違いがあり、抗体による鑑別が可能であった。実際 As16 抗原はホモログがイヌ回虫には存在しない。イヌ回虫とネコ回虫の場合は、抗原性はもっと近いと考えられるので、抗体による鑑別はきわめて難しいと予想される。しかもネコ回虫は EST やゲノム情報に乏しく、特異的な診断抗原の探索もできない。

そこで本研究では、ヒトと生理学的に近いとされるブタを用いて、イヌ回虫とネコ回虫の病態の違いを検討した。その結果、同じトキソカラとはいえ、イヌ回虫とネコ回虫では大きな違いがあることが明らかになった。

もっとも大きな違いは肝臓から回収される虫体数であり、検討した範囲 (4 日後、14 日後 31-32 日後) では常にイヌ回虫感染の方が多くの虫体が回収された。とくに感染 14 日後と 31-32 日後では、ネコ回虫感染では肝臓からは全く幼虫を回収することはできなかった。

3. Yoshida A, Nejsum P, Skallerup P, Thamsborg SM, Maruyama H: Serological diagnosis of Ascarid Visceral Larva Migrans with recombinant antigens. ESCCAP Toxocara 2012, 3-5 October 2012, Budapest
 4. Yoshida A, Poulsen CS, Skallerup P, Maruyama H, Thamsborg SM, Nejsum P: Migratory pattern of *Toxocara cati* and *Toxocara canis* in pigs. ESCCAP Toxocara 2012, 3-5 October 2012, Budapest
 5. 吉田彩子、辻尚利、山崎浩、丸山治彦：ブタ回虫症血清診断抗原候補分子としてのリコンビナント As16 の有用性 第 65 回日本寄生虫学会南支部大会・第 62 回日本衛生動物学会南支部大会 合同大会、2012 年 11 月 10 11 日、長崎市
 6. 長安英治、丸山治彦：線虫類における動物寄生関連遺伝子の探索 第 20 回分子寄生虫ワークショップ (2012.8), 神戸市
 7. 長安英治、小椋義俊、伊藤武彦、吉田彩子、林哲也、丸山治彦：ゲノム概要配列が未知の寄生虫研究における次世代型シーケンサの活用 法 第 10 回日本寄生虫学会東日本支部会、第 10 回分子寄生虫マラリアフォーラム合同大会 (2012.10), 前橋市
 8. 長安英治、丸山治彦：ゲノム/トランスクリプトーム情報に基づく動物寄生関連遺伝子の探索 第 10 回日本寄生虫学会東日本支部会、第 10 回分子寄生虫マラリアフォーラム合同大会 (2012.10), 前橋市
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案特許
なし
 3. その他
なし

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

住血吸虫症の検査・診断・対策に関する研究

研究協力者 国立感染症研究所・寄生動物部・大前 比呂思

研究要旨 カンボジア国内での寄生蠕虫感染状況を、メコン住血吸虫症対策が進んでいるクラチエ（Kratie）省と隣接するカンポンチャム（Kampong Cham）省、カンポントム（Kampong Tom）省とで比較した。タイ肝吸虫症の感染率は、メコン住血吸虫に対する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%となり、Kampong Cham省：4.9～65.1%、Kampong Tom：10.6、48.6%と比較して有意に低値を示した。一方、鉤虫の感染率は、Kampong Cham省の一部の村落で低く、Kampong Tom省の一部の村落で高くなったほかは、各村落の感染率は5.7～18.0%で同じような傾向を示した。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、土壌伝播蠕虫対策のため併せて投与されてきたメベンダゾールは、鉤虫感染にはあまり効果がなかった可能性が高い。また、住民の健康意識に関する調査でも、Kratie省では寄生虫感染に関する知識や行動について、他の地域よりも良い傾向を示し、寄生蠕虫症対策のエントリーポイントとして住血吸虫症対策は有効であると判断された。

A. 研究目的

メコン住血吸虫は、ラオス - カンボジア国境付近のメコン河中流域に分布する寄生虫だが、カンボジアでは、対策が進んだ結果、発生数の大幅な減少が得られた。メコン住血吸虫症対策としては、用量 40 mg/kg でのプラジカンテル一斉投与が、感染リスクが増す乾季の初めに行われてきた。プラジカンテルと同時に、土壌伝播蠕虫対策としてメベンダゾール

も、年1回ずつ投与されたが、これらの集団治療にあわせて、様々な媒体を用いた健康教育も行われてきた。

タイ肝吸虫は、タイやラオス、カンボジアなどの国々で感染率が高く、慢性の胆道炎症から胆道癌に進展することがある、公衆衛生上重要な寄生蠕虫である。メコン住血吸虫症の有病地では、タイ肝吸虫の感染率も高く、ラオスでは、2種類の寄生蠕虫が同時に感染することで起

こす重篤な肝胆道系病変も問題となっている。そこで、カンボジア国内のメコン住血吸虫症対策が進んだ地域と隣接する他の地域で、タイ肝吸虫の感染状況や土壌伝播蠕虫の感染状況を比較し、住血吸虫以外の寄生蠕虫の感染率から、住血吸虫症対策の効果を検討することとした。

B. 研究方法

メコン住血吸虫症対策が行われてきた Kratie 省では、7 村落で 2012 年 4 月に Kato-katz 法による糞便検査を行い、タイ肝吸虫：*Opisthorchis viverrini* を中心に虫卵検出を試みた。また、Kratie 省に隣接する Kampong Tom 省と Kampong Cham 省では、各々 2 村落と 4 村落で、2012 年 5 月に同様な検査を行った。また、あわせて、魚の生食や水への接触行動など、健康意識や行動についても、質問紙法による調査を行った。

C. 研究結果

Kratie 省での調査では、7 村落中 5 村落でタイ肝吸虫卵陽性者を認めず、感染者のいた村落であっても、Sambo では 1/165 で 0.6%、Sre Khoeun では 2/112 と非常に低くなった (Table 1)。一方、Kampong Tom 省の 2 村落では、タイ肝吸虫感染率は、11/104 (10.6%) と 89/183 (48.6%) と高くなった。Kampong Cham 省の 4 村落でも、82/126 (65.1%)、22/165 (21.0%)、5/102 (4.9%)、47/165 (28.5%) と、バラツキは大きいものの、

総じて高くなる傾向を示した。

土壌伝播蠕虫については、回虫や鞭虫の感染率は、各々の村落で 3% 以下と低くなった一方、鉤虫の感染率は、5.7 ~ 36.5% と、Kampong Cham 省の 2 村落 (Kamplak と Banteay) を除き、総じて高くなった (Table 1)。また、淡水魚の生食に関する質問では、Kratie 省の村落群では、全く生食しないと返答した住民の比率が 29.7 ~ 50.5% だったのに対し、Kampong Tom 省と Kampong Cham 省の村落群は、1 ヶ月に 1 回以上生食すると返答した住民の比率が、50% を超えた。

D. 考察

メコン住血吸虫症対策が進み、プラジカンテルによる集団治療が進んでいる地域では、隣接地域に比してタイ肝吸虫の感染率も低くなった。メコン住血吸虫症対策としての、用量 40 mg / kg でのプラジカンテル一斉投与が、タイ肝吸虫の駆虫にも有効であると同時に、集団治療とあわせて行われる健康教育の結果、淡水魚の生食に対する行動変容も促された可能性も指摘される。

カンボジアでは、2002 年以降、学童を中心にメベンダゾールの年 2 回投与による集団治療を中心とした土壌伝播蠕虫症対策が進められている。1990 年代は高かった回虫感染率は、2000 年代になると速やかに改善するものの、鉤虫や糞線虫の感染率は、比較的高いまま残るという傾

向は、今回対象となった地域以外でも確認されている (Table 2 & 3)。今後は、鉤虫の感染経路・予防に対する健康教育を強化すると同時に、鉤虫に対する駆虫効果が、メベンダゾールよりも高いアルベンダゾールを集団治療での選択薬とすることを検討する必要があると思われる。手法の開発が望まれる。

E. 結論

カンボジアにおける寄生蠕虫症対策の結果、用量 40 mg / kg でのプラジカンテル集団治療は、メコン住血吸虫症対策のみならず、タイ肝吸虫症対策にも有用である可能性が示された。また、メベンダゾールの一斉投与で、回虫や鞭虫の感染率は低下するが、鉤虫の感染率はあまり低下せず、さらなる健康教育の推進やアルベンダゾールへの薬剤の変更が望まれた。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1 論文発表

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)

大前比呂思 輸入寄生虫病
日本獣医学会雑誌 2012;65 : 101 - 105

大前比呂思 食品媒介寄生虫症 -
旅行医学における本症 -
防菌防黴雑誌 2012;40 : 649 - 656 .

2 . 学会・研究会発表

Screening and monitoring of
helminthiasis in Japan
- a comparison of schistosomiasis and
echinococcosis -

Ohmae H, Morishima Y, Yamasaki H,
Kironoki M, Chigusa H. 12th
International Workshop of Regional
Network Asian Schistosomiasis +
October 2012, Hanoi, Vietnam

A clinical trial for detection of active
schistosome infection by cell-free
circulating schistosome DNA in
chronic patients in the schistosomiasis
japonica highly endemic area in the
Philippines

Kato-Hayashi Leonardo LN, Arevalo
LN, Kirinoki M, Kikuchi M, Ohmae H,
Haruki K, Chigusa Y 12th
International Workshop of Regional
Network Asian Schistosomiasis +
October 2012, Hanoi, Vietnam

H . 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきものはない

Table 1 The prevalence of *Opisthorchis viverrini* infections in targeted province of mass treatment with praziquantel to schistosomiasis,(Kratie province in April, 2012) non-targeted province(Kampong Tom and Kampong Cham provinces in May, 2012)

Province	Commune	Village	Number	<i>O.viverrini</i> (%)	<i>Hook worm</i> (%)
Kratie	Rokakandal	Rokakandal	134	0	11(8.2)
	Sambok	Sambok	137	0	8(5.8)
	Sanan	Sre Khoeun	112	2(1.8)	10(8.9)
		Chartnol	149	0	11(7.4)
	Sambo	Sambo	165	1(0.6)	17(10.3)
		Kampong Krabei	121	0	16(13.2)
		Achen	121	0	12(9.9)
Kampong Thom	Tnaot	Kang Meas	183	89 (48.6)	33 (18.0)
	Tipau	Thlok	104	11 (10.6)	38 (36.5)
Kampong Cham	Srak	Lpeak	126	82 (65.1)	16 (12.7)
	Preak Krabao	Pousalapi	105	22 (21.0)	6 (5.7)
	Baray	Kamplak	102	5 (4.9)	0
		Banteay	165	47 (28.5)	3 (1.8)

Table 2 Epidemiological profile of intestinal helminthiases in Cambodia
 - The results of initial surveys conducted in the 1990's -

Helminth Place, Year	<i>Ascaris</i> <i>limbricoides</i>	<i>Trichuris</i> <i>trichiura</i>	<i>Hookworm</i>	<i>Echinostoma</i> <i>sp.</i>	<i>Strongyloides</i> <i>stercoides</i>	<i>Hymenolepis</i> <i>nana</i>
Kratie province 1998 1)	49.0	3.2	28.9			1.0
Stung Treng province 1998 1)	8.8	3.8	11.7			
Menh Chey city 1998 1)	47.1	6.4	27.7			3.2
1998 1)	41.7	13.4	3.6			1.1
						-
Phnom Penh city 1996 1)*	62.2	29.7	15.8		3.2	19.8
1998 1)	47.1	6.4	27.7			7.8
Kandal province 1995 2)**	15.4	13.4	21.8	1.1	14.6	2.3
Kampong Chhang province 1998 1)	32.5	6.4	27.7			3.2
Provinces around Tonle Sap Lake 1998, 1999 3)**	29.7	4.4	29.7		20.2	5.0

Examined by Kato-Katz method, Formalin-ether concentration method or modified one*, Fomalin-ether method and agar plate method**

Sinuon M et al, 2003 1), Koga-Kita K, 2004 2), Chhakda T et al, 2006 3),

Table 3 Epidemiological profile of intestinal helminthiasis in Cambodia
 - The results of initial surveys conducted in the 2000s –

Helminth Place, Year	<i>Ascaris</i> <i>limbricoides</i>	<i>Trichuris</i> <i>trichiura.</i>	<i>Hookworm</i>	<i>Echinostoma</i> <i>sp.</i>	<i>Str.ongyloides</i> <i>stercoides</i>	<i>Hymeneo-</i> <i>lepis. nana</i>
Kampong Cham city 2002 1)*	26.3	0.4	6.4	15.6	2.4	
Battambang Province 2004 2)*			3.4	4.8	1.3	1.3
Pursat province 2007 3)		0.2	4.9	11.9		

Examined by Kato-Katz method, Formalin-ether concentration method or modified one*, Fomalin-ether method and agar plate method**

Lee KJ et al, 2002 1), Park SK et al, 2004 2), Sohn MK et al, 2011 3)

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

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

研究協力者 順天堂大学大学院医学研究科 生体防御寄生虫学教室 奈良武司

研究要旨

寄生原虫トリパノソーマを含む分類群であるキネトプラスチダ類に特有のオルガネラ、グリコソームは、特殊化したペルオキシソームであり、解糖系 10 酵素のうちの初段 7 酵素や核酸合成酵素群を含むという特徴を持つ。これらの酵素は生存に必須であることから、トリパノソーマ症の薬剤標的として有望である。本研究では、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。これらの結果と生化学的解析結果を合わせ、ディプロネマ類とキネトプラスチダ類の共通祖先で起きた代謝経路の再編成について考察する。

A. 研究目的

新興・再興感染症のなかでもトリパノソーマ症や日本住血吸虫症などの人獣共通寄生虫症では、保虫宿主の存在が流行地での対策を困難なものにしている。本研究では、これら寄生原虫・蠕虫の持つ特異な生物学的特徴を同定・解析し、そこから得られた成果を応用して新規治療薬開発およびワクチン開発を行なうことを最終目的とする。

我々は、寄生原虫トリパノソーマを対象として代謝経路とオルガネラの共進化、特に代謝経路酵素の局在が変わることの生理的意義、およびオルガネラの機能転換が起こる際の進化の原動力、特に遺伝子水平転移の果たす役割の解明を目指して研究を進めている。寄生原虫トリパノソーマを含むキネトプラスチダ類にのみ存在するオルガネラ、グリコソームは、10 酵素からなる解糖系の初段 7 酵素や核酸合成酵素群を含み、これらのグリコソーム局在性酵素はヒトのオルソログとは異なる局在性や生化学的性状を持つことから、トリパノソーマ症治療薬の標的として有望視されて

いる。グリコソームはペルオキシソームと共通する移行シグナル（PTS）を持つなど、両者の生化学的類縁性が示唆されている。

これまでの研究から、我々はキネトプラスチダ類とともにユーグレノゾア生物群に分類され、キネトプラスチダ類と共通祖先を持つディプロネマ *Diplonema papillatum* (ATCC 50162) において、解糖系第 4 酵素 fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBPA) がペルオキシソーム様オルガネラに局在することを明らかにした (Makiuchi, *et al.*, *Protist* 126: 482, 2011)。一方、トリパノソーマの解糖系 10 酵素のうち最初の 7 酵素がグリコソーム局在性であるのに対し、ディプロネマでは FBPA のみが小胞局在であり、グリコソーム成立の前段階として解糖カスケードの遮断が起きた可能性が示唆される (未発表)。そこで本年度は、トリパノソーマ類とディプロネマとの比較ゲノミクス的アプローチから、酵素群の局在変更の生理的意義の解明を試みた。

B. 研究方法

ディプロネマ *Diplonema papillatum* (ATCC 50162)より核ゲノムDNAを精製した。培養した *D. papillatum* を破碎後、遠心分離法を用いて核画分を調製後、DNAを抽出した。得られたDNAは、核DNAに加えミトコンドリアDNAと考えられる短鎖長のDNAを大量に含んでいたため、改めてアガロースゲル電気泳動を行ない、核DNAに相当するゲル片を回収後、DNAを生成した。得られた *D. papillatum* 核DNAを用いたゲノム配列の決定は、タカラバイオ(株)に委託した。塩基配列の決定はHiSeqシステム(イルミナ社)を用いた。

C. 結果

ディプロネマの推定ゲノムサイズは176 Mbであった。残念ながら、塩基配列決定に用いたHiSeqはペアエンドリード長が短く(100 bp)、得られた平均コンティグ長は4.8 Kb、最大コンティグ長は62 Kbであった。ディプロネマのゲノムサイズは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。遺伝子のアノテーションについては、参照ゲノムとしてトリパノソーマ類3種(*Trypanosoma cruzi*, *T. brucei*, *Leishmania major*)のゲノム配列を用いた。残念ながら、特に多数のイントロンを含む遺伝子ではアノテーションが不十分であったため、目的遺伝子の同定に際してはマニュアルでBLAST検索を行なった。最終的に、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の遺伝子を同定し、酵素の一次構造の特徴を解析した。

解糖系酵素については、第6酵素 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)を除く初段6酵素および glucokinase が、トリパノソーマ酵素同様にPTSを持つことが明らかとなった。他の糖代謝関連酵素については、糖新生経路の重要な酵素である fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase)にもPTSが存在していた。

ペルオキシソームには局在せず、グリコソームにのみ局在する酵素群として、核酸合成関連酵素が挙げられる。興味深いことに、トリパノソーマではPTSが付加されている酵

素(adenine phosphoribosyltransferase (APRT)、 hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT)、 inosine-5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH)、 adenylate kinase (ADK)、 orotate phosphoribosyltransferase (OPRT)、 deoxyribose-phosphate aldolase (DERA))は、ディプロネマではHGPRTを除きPTSが検出されなかった。

次に、キネトプラスチダ類とディプロネマ類とともにPTSを持つ酵素が共通起原を持つかどうかを明らかにするため、分子系統樹を作成した。解糖系第3酵素 phosphofructokinase (PFK)、GAPDHおよびFBPaseの分子系統解析の結果、キネトプラスチダ類とディプロネマ類は単系統を示さず、どちらかのグループで特異的に遺伝子水平転移が起きたことが明らかとなった。

D. 考察

本研究において、ディプロネマの糖代謝関連遺伝子群の同定に成功した。そのうち解糖系第1酵素 hexokinase (HK)、第2酵素 glucose phosphate isomerase (GPI)、第3酵素 PFK、第4酵素 FBPA、第5酵素 triose-phosphate isomerase (TIM)および第7酵素 phosphoglycerate kinase (PGK)は、トリパノソーマ酵素と同様にPTSを持つことが明らかとなった。PTSにはタンバクのN端部のPTS2およびC末端のPTS1の2タイプが存在し、キネトプラスチダ類とディプロネマの両者に共通してHK、FBPAにPTS2が、GPI、PFK、TIM、PGKにPTS1が、それぞれ存在する。これらの結果は、キネトプラスチダ類とディプロネマ類の共通祖先において、解糖系酵素群のペルオキシソーム移行が起きたことを強く示唆している。興味深いことに、PFK(PTS1タイプ)およびGAPDH(PTS無し)は、キネトプラスチダ類とディプロネマ類の間で異なる起原を持つことが示唆される。また、糖新生関連酵素のうちFBPaseはキネトプラスチダ類とディプロネマのどちらもPTS1を持つ一方、酵素遺伝子の起原は異なることが強く示唆された。これらは、両群の間で異なる代謝プロファイルを発達させる過程で獲得されたものと考えられる。

キネトプラスチダ類では解糖系初段7酵素に加えて、他の代謝経路酵素がペルオキシソームに特異的に局在することが知られている。核酸合成関連酵素について、ディプロネマでは

HGPRT においてのみ PTS1 が検出された。以上の結果を合わせて考えると、ユーグレノゾア生物群の進化過程で、キネトプラスチダ類とディプロネマ類の共通祖先において最初に解糖系酵素のペルオキシソーム移行が起こり、他の代謝関連酵素はそれに引き続いて移行したと考えられる。特に核酸合成関連酵素についてはキネトプラスチダ類の分岐後に特異的に局在変更が起きたことが示唆される。

E. 結論

本研究から、キネトプラスチダ類とディプロネマ類の共通祖先において、解糖系酵素のペルオキシソーム移行が起きたことが強く示唆された。一方で、本研究で明らかとなった解糖系酵素の一次構造は、生化学的解析結果を支持しない。タンパクのペルオキシソーム移行には peroxins と呼ばれる一群のタンパクが必須であり PTSs の認識、ペルオキシソーム上での足場の形成、タンパクの挿入という一連の反応に深く関与しているが、ディプロネマでは PTSs の認識機構がキネトプラスチダ類とは異なる可能性が考えられる。実際に、一部の peroxin オルソログはディプロネマゲノム上に検出できない。現在、糖代謝関連酵素群の機能発現の「場」を詳細に解析するため、現在解糖系酵素特異的抗体を作製し、免疫蛍光法等を用いた局在解析を進めている。

G. 研究発表

1. 論文発表 和文論文

英文論文

1. Hashimoto M, Morales J, Fukai Y, Suzuki S, Takamiya S, Tsubouchi A, Inoue S, Inoue M, Kita K, Harada S, Tanaka A, Aoki T, Nara T. Critical importance of the de novo pyrimidine biosynthesis pathway for *Trypanosoma cruzi* growth in the mammalian host cell cytoplasm. *Biochem Biophys Res Commun* 417(3): 1002-1006. 2012
2. Nara T, Hashimoto M, Hirawake H, Liao CW, Fukai Y, Suzuki S, Tsubouchi A, Morales J, Takamiya S, Fujimura T, Taka H, Mineki R, Fan CK, Inaoka DK, Inoue M, Tanaka A, Harada S, Kita K,

Aoki T. Molecular interaction of the first 3 enzymes of the de novo pyrimidine biosynthetic pathway of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun* 418(1): 140-143. 2012

3. Fan CK, Liao CW, Lyu SY, Sukati H, Ji DD, Cho CM, Jien JY, Huang YC, Chang PWS, Chiu WT, Nara T, Tsubouchi A, Huang YH, Tu CC, Lan SJJ, Chao JCJ. Prevalence of intestinal parasitic infections among primary school children in areas devoid of sanitation in northwestern Kingdom of Swaziland, Southern Africa. *Pathog Glob Health* 106(1): 60-62. 2012
4. Annoura T, Makiuchi T, Sariego I, Aoki T, Nara T. SUMOylation of paraflagellar rod protein, PFR1, and its stage-specific localization in *Trypanosoma cruzi*. *PLoS ONE* 7(5): art. no. e37183. 2012
5. Fan CK, Lee LW, Liao CW, Huang YC, Lee YL, Chang YT, Da Costa NDSRJ, Gil V, Chi LH, Nara T, Tsubouchi A, Akinwale OP. *Toxoplasma gondii* infection: Relationship between seroprevalence and risk factors among primary schoolchildren in the capital areas of Democratic Republic of São Tomé and Príncipe, West Africa. *Parasit Vectors* 5(1): art. no. 141. 2012
6. Minakata K, Takahashi F, Nara T, Hashimoto M, Tajima K, Murakami A, Nurwidya F, Yae S, Koizumi F, Moriyama H, Seyama K, Nishio K, Takahashi K. Hypoxia induces gefitinib resistance in non-small-cell lung cancer with both mutant and wild-type epidermal growth factor receptors. *Cancer Sci* 103(11): 1946-1954. 2012
7. Hashimoto M, Enomoto M, Morales J, Kurebayashi N, Sakurai Y, Hashimoto T, Nara T, Mikoshiba K. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor regulates replication, differentiation, infectivity, and virulence of the parasitic protist

Trypanosoma cruzi. Mol Microbiol, in press.

2. 学会発表

1. 奈良武司、ホルヘモラレス、茂木浩子、山下由莉、坪内暁子、橋本宗明．トリパノソーマの特異オルガネラ、グリコソームの起原を探る：*Diplonema papillatum* の解糖系酵素の一次構造と特徴．第 72 回日本寄生虫学会東日本支部会・第 10 回分子寄生虫マラリアフォーラム合同大会、前橋市、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

厚生労働科学研究補助金（社会保障国際協力推進研究事業
「寄生虫疾患の病態解明及びその予防・治療を旨とした研究」）
研究協力者 報告書

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

研究協力者 旭川医科大学寄生虫学講座 伊藤 亮

研究要旨

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は、地球規模で環境汚染と流行拡大が年々深刻化しており、WHO によって狂犬病その他とともに Neglected Zoonotic Diseases にリストアップされている。本研究では、これらの寄生虫疾患についての免疫、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。

A. 研究目的

人獣共通幼条虫症として地球規模で深刻な問題を提示している疾患は、脳囊虫症とエキノコックス症（単包虫症ならびに多包虫症）である。人体寄生テニア属条虫として3種(*Taenia solium*、*Taenia saginata*、*Taenia asiatica*)が知られているが、これらの中で人体脳囊虫症を引き起こすのは *T. solium* 1種である。本研究では1. テニア症・囊虫症研究、2. エキノコックス症研究、3. 疫学研究その他、4. 研究者ネットワーク強化の観点から下記の研究を展開することを目的とした。

1) テニア条虫 3種が同所的に分布している地域（タイ、中国）の発見と、3種類遺伝子鑑別法の開発および改善、2) *T. solium* と他の2種テニア条虫との分子系

統学的評価、3) 囊虫症流行地での患者、患畜検出方法の開発と改善と新しい抗原精製法の開発、4) 遺伝子解析により患者の感染地域を特定する試みについて研究を展開する。また5) エキノコックス症に関しても同様な遺伝子解析による分類の再検討、種内変異解析、種の起源と地理拡散、血清診断法の改良と評価を試みる。さらに6) 予防の観点から、アジアにおける専門家間でのネットワーク強化を試みる。

B. 研究材料、方法

材料：テニア属条虫症：テニア条虫感染者から駆虫された虫体、糞便、血清ならびに野生動物寄生テニア属条虫虫体
囊虫症：患者ならびに患畜から摘出された病巣（囊虫）、血清（患者、患畜）、髄液（患

者)

エキノコックス症：世界各国（ロシア、中国、モンゴル、エチオピア、ヨルダン、イラン）において画像診断ならびに外科手術により確定診断がついた単包虫症、多包虫症患者から得られた血清、パラフィン包埋病理標本ならびに野生動物から得られたエタノール固定原頭節、虫卵と成虫

方法：旭川医科大学寄生虫学講座で開発された遺伝子検査（Multiplex PCR、LAMP、簡便 LAMP）、血清検査法（各種遺伝子組み換え抗原を用いてイムノブロット、ELISA、迅速イムノクロマトキット）。

C. 結果

1. テニア症・囊虫症研究

1) 流行の現場で特別な装置なしに実施可能な LAMP 法を開発し、現場でその有効性を確認した(業績 11)。

2) 遺伝子解析に基づくテニア条虫(*Taenia saginata*、*Taenia asiatica*)の交雑個体の確認：これまでに既に確認されているタイ以外に、中国からも交雑個体が確認された(業績 16; Nkouawa et al. in prep.)。

3) 囊虫症の流行地域住民検診に血清検査法を導入し、インドネシアで眼囊虫症症例を確認した(業績 17)。

4) マダガスカルに分布している有鉤条虫のミトコンドリア並びに核遺伝子を解析した結果、アジア型が太平洋側に、アフリカ型がアフリカ川に分布していること、さらにアジア型とアフリカ型の交雑個体も発見された(Yanagida et al. in prep.)

5) 中国ならびにタイでそれぞれ 20 隻(Ito et al. submitted)、19 隻の有鉤条虫多数寄生例が見つかった(Kusolsuk et al. in

prep.)。

6) テニア症患者からの駆虫薬として漢方（カボチャの種とビンロウジュの抽出液）の再評価が試みられた（業績 8）。

9) インドネシア、中国の流行地で、肥育されているブタの個体識別調査、抗体検査を実施し、抗体検査に基づき、患畜個体を確認できた(Dharmawan et al. in prep.; Li et al. in prep.)。

10) 囊虫症診断抗原の新しい簡便な精製法(Sako et al. in prep.)と血清と髄液とでの抗体応答に関する比較解析結果が得られた(Sako et al. in prep.)。

11) ヒトならびにブタに利用できる囊虫症に関する迅速イムノクロマトグラフィ - キットの基本形を開発し（Sako et al. unpublished）ヒトに対する迅速キットを完成させ、市販にこぎつけた（E. 資料）。

2. エキノコックス症研究

遺伝子解析：

1) 分子系統学的研究：中近東（ヨルダン、イラン）、中国、ペルーから得られた単包条虫(G1)サンプルのミトコンドリア遺伝子多形解析を実施し、中近東由来の寄生虫の遺伝子多型が非常に大きいことが判明し、G1 の起源を中近東と推定した（業績 10）。

2) エチオピアのラクダから採取された単包虫のミトコンドリア遺伝子解析から、G6 が確認された（業績 13）。

3) ロシアの飼い猫から単包虫症(G1)が確認された（業績 19）。

4) ロシア、アルタイ地方で確認された多包虫症、単包虫症患者の肝病巣を用いる遺伝子解析を実施した（業績 12）。

血清診断学的研究：

1) 血清診断法の開発、診断学的研究： スイスで市販されている Em2plus-ELISA と迅速イムノクロマトキットを用い、感度、特異性に関する比較解析研究からイムノクロマトキットの信頼性が非常に高いことが判明した(Knapp et al. in prep.)。 遺伝子組み換え Antigen B8/1 を用いたイラン人を対象とした単包虫症血清診断成績を報告した(業績 15)。 多包虫症、単包虫症、嚢虫症の 3 疾患に関する迅速キットが 2012 年 12 月に市販された(製造:(株)アドテック、大分、宇佐市、販売:(株)ICST、埼玉、さいたま市)(資料 1)。

3. 疫学研究その他

1) 2011 年 1 月と 9 月に実施したインドネシア、バリ島の僻村で、眼嚢虫症患者(業績 17)、有鉤条虫感染者を確認し、同地域でのリアルタイムブタ検査法の導入に踏み切った。その結果、有鉤条虫症患者の隣の家で肥育されていたブタが濃厚感染していることが検査から強く疑われ、剖検によりそれが確認された(Dharmawan et al. in prep.)。

2) インドで有鉤条虫に感染し、年余にわたる虫卵排出と、自家感染による嚢虫症を引き起こした日本人症例に遭遇し、患者の家族ならびに会社の同僚について嚢虫症の 2 次感染の有無を血清検査、テニア症について LAMP 検査その他を実施し(Kobayashi et al. submitted)、国内での 2 次感染予防、阻止に向けた基礎資料として、日本における嚢虫症症例報告を解析し、現在の日本の状況と問題点を考察する総説をまとめた(業績 14)。

4. 研究者ネットワーク強化

1) アジア、世界におけるネットワーク強化

のため、マレーシア熱帯医学・寄生虫学会年次総会(クアラルンプール)、第 5 回 ASEAN 熱帯医学会議(マニラ)、第 3 回アジア免疫・微生物学会議(ウランバートル)、アジア科学者会議(ボゴール)、第 18 回国際熱帯医学・マラリア会議(リオデジャネイロ)に参加した。

2) 国際シンポジウムを中国、タイで主催した。人獣共通条虫症対策国際会議(旭川医科大学、中国 CDC 寄生虫病研究所共催) 10 月 29, 30 日、上海、アジアにおける人獣共通条虫症シンポジウム: 日本からの過去、現在、未来における国際貢献(旭川医科大学主催) 第 7 回食品媒介人獣共通寄生虫病国際セミナー、12 月 12-14 日、バンコック。 の報告書は英国の国際専門誌、Parasitology の special issue として 2013 年度内に出版を予定している。

D. 考察・結論

患者、患畜確認に必要な血清抗体検査法、遺伝子検査法の改善、開発に取り組み、感染者と感染動物の検出精度が大きく向上し、流行の現場においてリアルタイムで役立つ検査法を確立し、市販にこぎつけた(業績 6,7)。グローバル化の波により、途上国から先進国への病原体の持ち込みが日常的に起こり得る時代である。嚢虫症対策には流行地でのリアルタイムの検査、確認、住民ならびに保健所関係者への啓発が不可欠である(業績 14)。

北海道の地方病であるエキノコックス症について我々が確立した検査法(RecEm18-ELISA、-Immunoblot)は、欧米の専門機関との共同研究から世界最高水準との国際評価を得ている。さらに、ア

ドテック(株)と共同で開発した簡便な迅速イムノクロマト診断キットの外部評価が得られ(Knapp et al. in prep.) 国内外で市販される運びになった。このキットは特別な経験や施設を必要とせず、受診時間内にリアルタイムで結果を出せる。国内症例で、陽性であればほぼ 100%多包虫症と診断できる精度である。30 年前に 1 度だけ 1 週間のバスツアーで北海道を訪問し、1 昨年、確定診断がつかずに外科治療を受け、多包虫症と確定された症例がある(Amano et al. in prep.)。

多包虫症は国内では北海道の地方病として知られているが、北海道全域で環境汚染が進んでしまった現状から鑑みて、道民の感染者増加のみならず、道外から北海道を訪問するすべてのヒト(観光客、ビジネスマン、他)が北海道内で感染する機会は日本人、外国人を問わず、今後急増することが懸念される。それゆえ、北海道外の全国病院で診断が確定しない占拠性肝疾患では、北海道旅行歴の有無を確かめ、多包虫症の確定あるいは除外の目的で、全国病院のベッドサイドでの迅速キットの利用が推奨される。また北海道内での住民健診に積極的に応用すべきであろう。

格段に信頼性が向上した技術が開発され、特殊な専門家、施設を必要としない時代であり、合理化、効率化が求められる現在、技術の進展を客観的に評価すべき時代であろう(業績 3)。市販キットの評価が求められる。

さらに、2010~2011 年にロシア、モスクワ市内の動物園で、外部環境とは完全に隔離されている飼育室内で生まれ育った小型のサル仲間(Galago)が多数感染、死亡

しており、餌となる植物に虫卵が混入していたと推測されている。多包虫症は北海道の地方病であるが、北海道から持ち出されたイヌから成虫が検出された例(関東)、北海道から移送され、肥育されていた競走馬が多包虫に感染していた例(山形県)、必ずしも北海道との関連が確認されていないが、肥育されていた豚が多包虫に感染していた例(青森県)などの報告がある。これまではイヌを含め、北海道で感染した動物個体が本州などに移送され後に感染が確認されたと推測されているが、2011 年 3 月 11 日に発生した東日本大震災直後の原発爆発による環境汚染、汚染地域にいたイヌを含む動物の野生化、北海道から移送された家畜用牧草への虫卵の混入、野ネズミの混入の可能性など、北海道以外でも環境汚染が期せずして起こり得るかもしれない。北海道での流行拡大実態から類推して、定着してしまえば本州全域への汚染拡大は容易に予測できる。その意味で、北海道での蔓延の原因解析、東北地方における野生動物、家畜、住民における多包虫症の動向には注意が必要であろう(伊藤亮他、日本臨床 2013 年 7 月別冊より抜粋)。

E. 迅速キット資料:(株)ICST Co. Ltd.

アドテック社製 ADAMU 発売に関するお知らせ

- 1) エキノコックス症(単包虫症)キット
- 2) エキノコックス症(多包虫症)キット
- 3) システィセルコーシス(囊虫症)キット

当社は、アドテック社と旭川医科大学との協力により、全世界のエキノコックス症(多包虫症、単包虫症)並びにシスティセルコー

シス(囊虫症)診断を正確な確定診断を行うキット(研究試薬)の販売代理店を締結し、発売を開始しましたのでお知らせいたします。

診断抗原として最も信頼性が高いと国際的に評価されている遺伝子組み換え Em18 (多包虫症)と Antigen B8/1(単包虫症)を用いるエキノコックス症の迅速キット開発は、文部科学省「橋渡し研究支援推進プログラム」事業(2007～2011年度)における支援研究として北海道臨床開発機構(札幌医科大学、北海道医科大学、旭川医科大学で構成)の支援を得て協同開発されました。システィセルコーシス(囊虫症)キットは文部科学省科学技術戦略推進費(2010～2012年度)により、旭川医科大学で開発されました。

エキノコックス症・システィセルコーシスは人獣共通寄生虫疾患、食品媒介寄生虫疾患、土壌伝搬性寄生虫疾患であり、地球規模で環境汚染、流行域が拡大し、患者数が増えている難治生の寄生虫疾患です。詳しくは、カタログをご覧ください(埼玉県さいたま市、tel: 048-857-8026, fax:048-857-8041)。

F. 研究発表

1. 論文発表

和文総説・論文

1. 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.
2. 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
3. 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.

4. 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.
5. 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)すでに印刷、公表された上記総説・論文以外に現在、印刷されている下記の4総説がある。
 - ・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.
 - ・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.
 - ・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/ 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.
 - ・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.

英文総説

6. 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)
7. Okamoto M, Ito A. Chapter Taenia. In: Molecular Detection of Human Parasitic Pathogens (ed. by Liu D), 295-305. 2012. CRC Press. (ISBN 9781439812426)

英文論文

8. 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.
9. 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.
10. 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.
 11. 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.
 12. Konyaev SV, Yanagida T, Ingotatova 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.
 13. 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.
 14. 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.
 15. 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.
 16. 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.
 17. Swastika K, Dewiyani CI, Yanagida T, Sako Y, Sudamaja M, Sutisna P, Wandura 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.
 18. 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.
 19. 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.
- ## 2 . 学会発表
1. Akira Ito. Overview in the borderless world of cestode zoonoses in Asia: Japanese contribution towards future and further collaboration. *JITMM2012 & FBPZ7*, Bangkok, 12-14 Dec, 2012.
 2. Yasuhito Sako, Akira Ito. Advances in technology for EBM. *JITMM2012 & FBPZ7*, Bangkok, 12-14 Dec, 2012.
 3. Tetsuya Yanagida, Yasuhito Sako, Minoru Nakao, Kazuhiro Nakaya, Akira Ito. Molecular phylogeography of zoonotic taeniid tapeworms. *JITMM2012 & FBPZ7*, Bangkok, 12-14 Dec, 2012.
 4. Paron Dekumyoy, Teera Kusolsuk, Wallop Pakdee, Surapol Sanguankiat, Kittipong Chaisiri, Nirundorn Homsuwan, Tetsuya Yanagida, Yasuhito Sako, Minoru Nakao, Munehiro Okamoto, Akira Ito. Joint projects on taeniasis and cysticercosis in Thailand. *JITMM 2012 & FBPZ7*, Bangkok, 12-14 Dec, 2012.
 5. Akira Ito. International collaboration and cooperation towards control of cestode zoonoses in Asia. *International Symposium on Cestode Zoonoses Control*, Shanghai, 29,30 Oct, 2012.
 6. Sergey Konyaev, Tetsuya Yanagida, Minoru Nakao, Yasuhito Sako, Valeriy Odnokurtcev, Galina Ingotatova, Oleg Andreyanov, Akira Ito. Genetic diversity of *Echinococcus* spp. in Russia. *International Symposium on Cestode Zoonoses Control*, Shanghai, 29,30 Oct, 2012.
 7. Minoru Nakao, Tetsuya Yanagida, Sergey Konyaev, Antti Lavikainen, Akira Ito. Mitochondrial phylogeny of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae) with emphasis on relationships among *Echinococcus canadensis* genotypes. *International Symposium on Cestode Zoonoses Control*, Shanghai, 29,30 Oct, 2012.

8. Patrick Giraudoux, Francis Raoul, Eve Afonso, Iskender Ziadinov, Yurong Yang, Li Li, Tiaoying Li, Jean-Pierre Quere, Nicolas Tete, Xiaohui Feng, Qian Wang, Hao Wen, Akira Ito, Philip S Craig. Spatial approach of *Echinococcus multilocularis* transmission ecology in continental Asia. International Symposium on Cestode Zoonoses Control, Shanghai, 29,30 Oct, 2012.
9. Francis Raoule, Patrick Giraudoux, Tiaoying Li, Tetsuya Yanagida, Changping Long, Xingwang Chen, Munehiro Okamoto, Minoru Nakao, Yasuhito Sako, Akira Ito. Taeniasis/cysticercosis in farmer communities of Western Sichuan, China: a spial study. International Symposium on Cestode Zoonoses Control, Shanghai, 29,30 Oct, 2012.
10. Yasuhito Sako, Akira Ito. Recent advances in immunodiagnosis of cysticercosis. International Symposium on Cestode Zoonoses Control, Shanghai, 29,30 Oct, 2012.
11. Tiaoying Li, Akira Ito, Xingwang Chen, Dongchuang Qiu. Current status of taeniasis/cysticercosis in Tibetan populations of Sichuan province, China. International Symposium on Cestode Zoonoses Control, Shanghai, 29,30 Oct, 2012.
12. Kadek Swastika, Toni Wandra, Made Sudrmaja, Nyoman S Dharmawan, DAA Sri Laksemi, Luh Putu Eka Diarthini, Tetsuya Yanagida, Yasuhito Sako, Munehiro Okamoto, Akira Ito. Taeniasis/cysticercosis in Karangasem, Bali, Indonesia. International Symposium on Cestode Zoonoses Control, Shanghai, 29,30 Oct, 2012.
13. Nyoman S. Dharmawan, Kadek Swastika, I Ketut Suardita, I Negah Kepeng, Yasuhito Sako, Munehiro Okamoto, Tstsuya Yanagida, Toni Wandra, Akira Ito. Pig cysticercosis in Karangasem, Bali, Indonesia. International Symposium on Cestode Zoonoses Control, Shanghai, 29,30 Oct, 2012.
14. Paron Dekumyoy, Teera Kusolsuk, Surapol Sa-Nguankiat, Kittpong Chaisiri, Nirundorn Homsuwan, Tetsuya Yanagida, Yasuhito Sako, Minoru Nakao, Munehiro Okamoto, Akira Ito. Taeniasis and cysticercosis on the Thai-Myanmar border: an update. International Symposium on Cestode Zoonoses Control, Shanghai, 29,30 Oct, 2012.
15. Anu Davaasuren, Temuulen Dorjsuren, Tetsuya Yanagida, Abmed Davaajav, Yasuhito Sako, Nyamkhuu Dulmaa, Akira Ito. Taeniasis in Mongolia, 2002-2011. International Symposium on Cestode Zoonoses Control, Shanghai, 29,30 Oct, 2012.
16. Akira Ito, Yasuhito Sako, Sonoyo Itoh, Yuji Ishikawa, Hiromitsu Akabane. Recent advances in serodiagnosis of both alveolar and cystic Echinococcosis and monitoring of progression of AE. International Symposium on Cestode Zoonoses Control, Shanghai, 29,30 Oct, 2012.
17. Tiaoying Li, Akira Ito, Xingwang Chen, Changping Long, Munehiro Okamoto, Francis Raoul, Patrick Giraudoux, Tetsuya Yanagida, Minoru Nakao, Yasuhito Sako, Ning Xiao, Philip S Craig. Usefulness of pumpkin seed combined with areca nut extract in community-based treatment of human taeniasis in northwest Sichuan Province, China. International Symposium on Cestode Zoonoses Control, Shanghai, 29,30 Oct, 2012.
18. Akira Ito and working group members working in Asia. What can we provide through molecular and immunological approaches? Round Table: Taeniasis and Cysticercosis Complex. The 18th International Congress of Tropical Medicine and Malaria. 23-27 Sep 2012. Rio de Janeiro, Brazil.
19. Akira Ito, Toni Wandra, Munehiro Okamoto, Nyoman S Dharmawan, Yasuhito Sako, Kadek Swastika, Tetsuya Yanagida, Kazuhiro Nakaya, Hemma Yulfi, Dewi Masyithah Darlan, Putu Sutisna. Intervention of food-borne parasitic zoonoses, taeniasis due to 3 species of human *Taenia* and cysticercosis due to *Taenia solium* in people and pigs, Indonesia. Conference of the 12th Science Council of Asia International Symposium, 11,12 July, 2012. Bogor, Indonesia.

20. Akira Ito, Yasuhito Sako, Sonoyo Itoh, Hiromitsu Akabane, Yuji Ishikawa. Alveolar Echinococcosis: The rapid and remarkable decrease in antibody titers after curative resection of hepatic lesions. at 3rd International Conference “Current Advances in Immunology and Microbiology”, 21-22 June 2012, Ulaanbaatar, Mongolia.
21. Akira Ito, Munehiro Okamoto, Yasuhito Sako, Toni Wandra, Tiaoying Li, Paron Dekumyoy, Tetsuya Yanagida, Minoru Nakao, Kazuhiro Nakaya, Nyoman S Dharmawan, Kadek Swastika, Teera Kusolsk, Wallop Pakdee, Agathe Nkouawa. After 30 years: towards control of cysticercosis in Southeast Asia through multilateral collaboration and cooperation. 5th Asean Congress of Tropical Medicine and Parasitology, 15-17 May 2012, Manila, Philippines.
22. Akira Ito and the working group members from Japan, Indonesia, Thailand, China, France and UK. Towards Control of Cysticercosis due to *Taenia solium* in Southeast Asia: International Joint Project for the Establishment of Molecular and Immunological Tools Applicable in the Field. The 48th Annual Scientific Conference of the Malaysian Society of Parasitology and Tropical Medicine 2012. 27-28 March 2012. Kuala Lumpur, Malaysia.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

研究分担者

雑 誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takaki A, Yamazaki A, Maekawa T, Shibata H, <u>Hirayama K</u> , 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.	Immunogenetic s.	64(1)	15-29	2011
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, <u>Hirayama K</u> , Watanabe N.	Association of mast cell-derived VEGF and proteases in dengue shock syndrome.	PLoS Negl Trop.	6(2)	e1505 doi: 10.1371/jou rnal.pntd.0 001505.	2012
Del Puerto F, Nishizawa JE, Kikuchi M, Roca Y, Avilas C, Gianella A, Lora J, Velarde FU, Miura S, Komiya N, Maemura K, <u>Hirayama K</u> .	Protective Human Leucocyte Antigen Haplotype, HLA- DRB1*01-B*14, against Chronic Chagas Disease in Bolivia.	PLoS Negl Trop	6(3)	e1587 doi: 10.1371/jo urnal.pntd. 0001587	2012
Mbanefo EC, Chuanxin Y, Kikuchi M, Shuaibu MN, Boamah D, Kirinoki M, Hayashi N, Chigusa Y, Osada Y, Hamano S, <u>Hirayama K</u> .	Origin of a novel protein-coding gene family with similar signal sequence in <i>Schistosoma</i> <i>japonicum</i> .	BMC Genomics.	13	260 doi: 10.1186/14 71-2164- 13-260	2012
Omar AH, Yasunami M, Yamazaki A, Shibata H, Ofori MF, Akanmori BD, Shuaibu MN, Kikuchi M, <u>Hirayama K</u> .	Toll-like receptor 9 (TLR9) polymorphism associated with symptomatic malaria: a cohort study.	Malar J.	11	168 doi: 10.1186/14 75-2875- 11-168.	2012

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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.	76(2)	167-74 doi: 10.1111/j.1365-3083.2012.02715.x.	2012
Men TT, Huy NT, Trang DT, Shuaibu MN, <u>Hirayama K.</u> , Kamei K.	A simple and inexpensive haemozoin-based colorimetric method to evaluate anti-malarial drug activity.	Malar J.	11	272 doi: 10.1186/1475-2875-11-272.	2012
Boamah D, Kikuchi M, Huy NT, Okamoto K, Chen H, Ayi I, Boakye DA, Bosompem KM, <u>Hirayama K.</u>	Immunoproteomics Identification of Major IgE and IgG4 Reactive Schistosoma japonicum Adult Worm Antigens Using Chronically Infected Human Plasma.	Trop Med Health.	40(3)	89-102. doi: 10.2149/tmh.2012-16.	2012
Huy NT, Thao NT, Tuan NA, Khiem NT, Moore CC, Thi Ngoc Diep D, <u>Hirayama K.</u>	Performance of thirteen clinical rules to distinguish bacterial and presumed viral meningitis in vietnamese children.	PLoS One.	7(11)	e50341 doi: 10.1371/journal.pone.0050341..	2012
Huy NT, Hang le TT, Boamah D, Lan NT, Van Thanh P, Watanabe K, Huong VT, Kikuchi M, Ariyoshi K, Morita K, <u>Hirayama K.</u>	Development of a single-tube loop-mediated isothermal amplification assay for detection of four pathogens of bacterial meningitis.	FEMS Microbiol Lett.	337(1)	25-30 doi: 10.1111/1574-6968.12002	2012
Florencia del Puertoa, Mihoko Kikuchia, Juan Eiki Nishizawac, Yelin Rocad, Cinthia Avilasd, Alberto Gianellad, Javier Lorad, Freddy Udalrico Gutierrez Velardee, <u>Kenji Hirayama,</u>	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	In press		

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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., <u>Kita, K.</u> and Aoki, T.	Molecular interaction of the first 3 enzymes of the <i>de novo</i> pyrimidine biosynthetic pathway of <i>Trypanosoma cruzi</i> .	Biochem. Biophys. Res. Commun.	418	140-143	2012
Hashimoto, M., Morales, J., Fukai, Y., Suzuki, S., Takamiya, S., Tsubouchi, A., Inoue, S., Inoue, M., <u>Kita, K.</u> , Harada, S., Tanaka, A., Aoki, T. and Nara, T.	Critical importance of the <i>de novo</i> pyrimidine biosynthesis pathway for <i>Trypanosoma cruzi</i> growth in the mammalian host cell cytoplasm.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	417	1002-1006	2012
Sakai, C., Tomitsuk, E., Esumi, H., Harada, S. and <u>Kita, K.</u>	Mitochondrial fumarate reductase as a target of chemotherapy: from parasites to cancer cells.	Biochim. Biophys. Acta	1820	643-651	2012
Shimizu, H., Osanai, A., Sakamoto, K., Inaoka, D. K., Shiba, T., Harada, S. and <u>Kita, K.</u>	Crystal structure of mitochondrial quinol-fumarate reductase from the parasitic nematode <i>Ascaris suum</i> .	J. Biochem.	151	589-592	2012
Hino, A., Hirai, M., Tanaka, Q. T., Watanabe, Y., Matsuoka, H. and <u>Kita, K.</u>	Critical roles of the mitochondrial complex II in oocyst formation of rodent malaria parasite <i>Plasmodium berghei</i> .	J. Biochem.	152	259-268	2012

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tanaka, Q. T., Hirai, M., Watanabe, Y. and <u>Kita, K.</u>	Towards understanding the role of mitochondrial complex II in the intraerythrocytic stages of <i>Plasmodium falciparum</i> : gene targeting of the Fp subunit.	Parasitol. Int.	61	726-728	2012
Kitamura, K., Kishi-Itakura, C., Tsuboi, T., Sato, S., <u>Kita, K.</u> , Ohta, N. and Mizushima, N.	Autophagy-related Atg8 localizes to the apicoplast of the human malaria parasite <i>Plasmodium falciparum</i> .	PLoS ONE	7(8)	e42977	2012
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, <u>Kita K.</u> , Yasutomi Y, Sutton PL, Shakhbatyan R, Horii T, Yasunaga T, Barnwell JW, Escalante AA, Carlton JM, Tanabe K.	<i>Plasmodium cynomolgi</i> genome sequences provide insight into <i>Plasmodium vivax</i> and the monkey malaria clade	Nat Genet	44(9)	1051-5	2012
Hikosaka, K., Tsuji, N., Watanabe, Y., Kishine, H., Horii, T., Igarashi, I., <u>Kita, K.</u> and Tanabe, K.	Novel type of linear mitochondrial genomes with dual flip-flop inversion system in apicomplexan parasites, <i>Babesia microti</i> and <i>Babesia rodhaini</i> .	BMC Genomics	in press		
Saimoto, H., Kido, Y., Haga, Y., Sakamoto, K. and <u>Kita, K.</u>	Pharmacophore identificatio of ascofuranone, potent inhibitor of cyanide-insensitive alternative oxidase of <i>Trypanosoma brucei</i> .	J. Biochem.	in press		

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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 <u>Kita, K.</u>	Structure of the trypanosome cyanide-insensitive alternative oxidase, a promising drug target.	Proc. Natl. Acad. Sci. USA	in press		
Iwagami M, Fukumoto M, Hwang SY, Kim SH, Kho WG, <u>Kano S.</u>	Population structure and transmission dynamics of <i>Plasmodium vivax</i> in the Republic of Korea based on microsatellite DNA analysis.	PLoS Neglected Tropical Diseases	6	e1592	2012
Tachibana M, Sato C, Otsuki H, Sattabongkot J, Kaneko O, Torii M, <u>Tsuboi T</u>	<i>Plasmodium vivax</i> gametocyte protein Pvs230 is a transmission-blocking vaccine candidate	Vaccine	30	1807	2012
Sakamoto H, Takeo S, Maier AG, Sattabongkot J, Cowman AF, <u>Tsuboi T</u>	Antibodies against a <i>Plasmodium falciparum</i> antigen PfMSPDBL1 inhibit merozoite invasion into human erythrocytes	Vaccine	30	1972	2012
Ord RL, Rodriguez M, Yamasaki T, Takeo S, <u>Tsuboi T</u> , Lobo CA	Targeting sialic acid dependent and independent pathways of invasion in <i>Plasmodium falciparum</i>	PLoS One	7(1)	e30251	2012

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
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）。	総編集；山口徹、北原光夫、福井次矢	Today ' s The rapy 2013、今日の治療指針2013版（Volume 55）私はこちら治療している。	医学書院	東京	2013年	266-267.

研究協力者

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Gass K, Beau de Rochars MV, Boakye D, Bradley M, Fischer PU, Gyapong J, <u>Itoh M</u> , 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.	6(1)	e1479	2012
Islam MZ, <u>Itoh M</u> , 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	Epub ahead of print		2012
Alam MS, Kato H, Fukushige M, Wagatsuma Y, <u>Itoh M</u> .	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, <u>Itoh M</u> , 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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shintoku Y, Kadosaka T, Kimura e, Takagi H, Kondo S, <u>Itoh M.</u>	Intestinal mast cells and eosinophils in relation to Strongyloides ratti adult expulsion from the small and large intestines of rats.	Parasitology.	Doi:10.1 017/S003 1182012 001837.		2013
Alim MA, Islam MK, Anisuzzaman, Miyoshi T, , Hatta T, Yamaji K, Fujisaki K. <u>Tsuji N.</u>	A hemocyte-derived Kunitz-BPTI-type chymotrypsin inhibitor, H1ChI, from the ixodid tick <i>Haemaphysalis longicornis</i> , plays regulatory functions in tick blood-feeding processes.	Insect Biochem Mol Biol	42	925-934	2012
Hatta T, Miyoshi T, Matsubayashi M, Islam MK, Alim MA, Anisuzzaman A, Yamaji K, Fujisaki K, <u>Tsuji N.</u>	Semi-artificial mouse skin membrane feeding technique for adult tick, <i>Haemaphysalis longicornis</i> .	Parasit Vectors	15	263	2012
ElMalky M, Lu SH, El=Beshbish SN, Saundy NS, Ohta N.	Effect of mirazid in <i>Schistosoma japonicum</i> -infected mice: parasitological and pathological assessment.	Parasitol Res,	112	373-7	2013
Okumura-Noji K, Miura Y, Lu R, Asai K, <u>Ohta N.</u> Brindley PJ, Yokoyama S.	CD36-related protein in <i>Schistosoma japonicum</i> : candidate mediator of selective cholesteryl ester uptake from high-density lipoprotein for egg maturation.	FSAEB J	Epub ahead of print		2012
<u>金澤保</u> 長田良 雄	日本住血吸虫と神経 系	神経内科	77 (3)	267-273	2012
Yoshimoto T, <u>Nakanishi K.</u>	Generation and characterization of mouse basophils from bone marrow and purification of basophils from spleen.	Curr Protec Immunol	98:3.24	1-3	2012
Tsutsui H, <u>Nakanishi K.</u>	Immunotherapeutic applications of IL-18	Immunotherapy	Dec;4(12)	1883-94	2012

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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, <u>Nakaishi K.</u>	Contribution of IL-33- activated type II innate lymphoid cells to pulmonary eosinophilia in intestinal nematode- infected mice.	Proc Natl Acad Sci USA	109(9)	3451-6	2012
Haenuki Y, Matsushita K, Futatsugi- Yumikura S, Ishii K, Kawagoe T, Imoto Y, Fujieda S, Yasuda M, Hisa Y, Akira S, <u>Nakaishi K.</u> Yoshimoto T.	A critical role of IL-33 in experimental allergic rhinitis	J Allergy Clin Immunol	130	184-94	2012
Takahashi S, Futatsugi- Yumikura S, Fukuoka A, Yoshimoto T, <u>Nakanishi K.</u> 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	5		2012
Reza M, Yamamoto DS, <u>Matsuoka H</u>	Low-concentration copper solution jeopardizes larval movement and ability to survive predation: new insight into malaria eradication via vector control	Med Entomol Zool	40(2)	217-222	2012
Hayashi H, Kyushiki H, Nagano K, Sudo T, <u>Matsuoka H.</u> Yoshida S	Effects of recombinant anopheline anti-platelet protein from a malaria vector mosquito has anti-thrombotic effects <i>in vivo</i> without compromising hemostasis	Thrombosis Res	129(1)	169-175	2012

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamamoto DS, Sumitani M, Nagumo H, Yoshida S, <u>Matsuoka H</u>	Induction of anti-sporozoite antibodies by biting of transgenic <i>Anopheles stephensi</i> delivering malarial antigen via blood feeding	Insect Mol Biol	21(2)	223-233	2012
<u>Matsuoka H</u> , 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
Chapman, L.M., Aggrey, A.A., Field, D.J., Srivastava, K., Ture S., <u>Yui, K.</u> , 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
Inoue M., Jianxia T., Miyakoda M., Kaneko O., <u>Yui, K.</u> , 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
Miyakoda, M., Kimura, D. , Honma, K., Kimura, K., Yuda, M., <u>Yui, K</u>	Development of memory CD8+ T cells and their recall responses during blood-stage infection with <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	J. Immunol	189(9)	4396-4404	2012
<u>金子修</u>	ノーベル賞の医学の進歩・発展 (3) マラリア原虫発見の歴史と今日的課題	最新医学	67(12)	2828-2830	2012
Tang J, Dai Y, Zhang H, Culleton R1, Liu Y, Zhao S, Wang X, Guan X, <u>Kaneko O</u> , Zhu Y	Positive diversifying selection on <i>Plasmodium vivax</i> RON2 protein	Parasitology	139(6)	709-715	2012

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kaewthamasorn M, Yahata K, Alexandre JSF, Xangsayarath P, Nakazawa S, Torii M, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, <u>Kaneko O</u>	Stable allele frequency distribution of the polymorphic region of SURFIN _{4.2} in <i>Plasmodium falciparum</i> isolates from Thailand	Parasitol Int	61(2)	317-323	2012
Asada M, Goto Y, Yahata K, Yokoyama N, Kawai S, Inoue N, <u>Kaneko O</u> , Kawazu S-I	Gliding motility of <i>Babesia bovis</i> merozoites visualized by time-lapse video microscopy	PLoS ONE	7(4)	e3522720 12	2012
Alexandre JSF, Xangsayarath P, Kaewthamasorn M, Yahata K, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, <u>Kaneko O</u>	Stable allele frequency distribution of the <i>Plasmodium falciparum</i> <i>clag</i> genes encoding components of the high molecular weight rhoptry protein complex	Trop Med Health	40(3)	71-77	2012
Xangsayarath P, Kaewthamasorn K, Yahata K, Nakazawa S, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, <u>Kaneko O</u>	Positive diversifying selection on the <i>Plasmodium falciparum</i> <i>surf</i> _{4.1} gene in Thailand	Trop Med Health	40(3)	79-89	2012
Inoue M, Tang J, Miyakoda M, <u>Kaneko O</u> , 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)	859-870	2012

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tachibana S, Sullivan SA, Kawai S, Nakamura S, Kim HR, Goto N, Arisue N, Palacpac NMQ, Honma H, Yagi M, Tougan T, Katakai Y, <u>Kaneko O</u> , Mita T, Kita K, Yasutomi Y, Sutton PL, Shakhbatyan R, Horii T, Yasunaga T, Barnwell JW, Escalante AA, Carlton JM, Tanabe K	<i>Plasmodium cynomolgi</i> genome sequences provide insight into <i>Plasmodium vivax</i> and the monkey malaria clade	Nat Genet	44(9)	1051-1055	2012
Morita M, Sanai H, Hiramoto A, Sato A, Hiraoka O, Sakura T, <u>Kaneko O</u> , Masuyama A, Nojima M, Wataya Y, Kim H-S	<i>Plasmodium falciparum</i> endoplasmic reticulum-resident calcium binding protein is a possible target of synthetic antimalarial endoperoxides, N-89 and N-251	J Proteome Res	11(12)	5704-5711	2012
Yahata K, Treeck M, Culleton R, Gilberger TW, <u>Kaneko O</u> .	Time-lapse imaging of red blood cell invasion by the rodent malaria parasite <i>Plasmodium yoelii</i>	PLoS ONE	7(12)	e50780	2012
Zhao H, Konishi A, Fujita Y, Yagi M, Ohata K, Aoshi T, Itagaki S, Sato S, Narita H, Abdelgelil NH, Inoue M, Culleton R, <u>Kaneko O</u> , 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)	705-716	2012

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sakura T, Yahata K, <u>Kaneko O</u>	The upstream sequence segment of the C-terminal cysteine-rich domain is required for microneme trafficking of <i>Plasmodium falciparum</i> erythrocyte binding antigen 175	Parasitol Int	62(2)	157-164	2012
Zhu XT, Yahata K, Alexandre JSF, Tsuboi T, <u>Kaneko O</u>	The N-terminal segment of <i>Plasmodium falciparum</i> SURFIN _{4.1} is required for its trafficking to the red blood cell cytosol through the endoplasmic reticulum	Parasitol Int	in press		
Kamata, M., Hagiwara, J., Hokari, T., Suzuki, C., Fujino, R., Kobayashi, S., <u>Kim, H.-S.</u> 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
Morita, M., Sanai, H., Hiramoto, A., Sato, A., Hiraoka, O., Sakura, T., Kaneko, O., Masuyama, A., Nojima, M., Wataya, Y. and <u>Kim, H.-S.</u>	<i>Plasmodium falciparum</i> 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
Tanaka Y, Sakamoto A, Inoue T, Yamada T, Kikuchi T, Kajimoto T, Muraoka O, Sato A, Wataya Y, <u>Kim H.-S.</u> and Tanaka R.	Andirolides HeP from the flower of <i>andiroba</i> (<i>Carapa guianensis</i> , <i>Meliaceae</i>).	Tetrahedron	68	3669-3677	2012

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Doi J, Hirota J, Morita A, Fukushima K, Kamijyo H, Ohta H, Yamasaki M, Takahashi T, <u>Katakura K</u> , Oku Y	Intestinal <i>Tritrichomonas suis</i> (= <i>T. foetus</i>) infection in Japanese cats	J Vet Med Sci	74	413-417	2012
Elkhateeb A, Tosa Y, Matsuura H, Nabeta K, <u>Katakura K</u>	Antitrypanosomal activities of acetylated bruceines A and C; a structure–activity relationship study	J Nat Med	66	233-240	2012
Fujita M, Kato H, Cáceresc AG, Gomeze EA, Mimori T, Zhang F, Iwata H, Korenaga M, Sakurai T, <u>Katakura K</u> , Hashiguchi Y	Genotyping of sand fly species in Peruvian Andes where leishmaniasis is endemic	Acta Tropica	121	93-98	2012
Ishimaru Y, Gomez EA, Zhang F, Martini-Robles L, Iwata H, Sakurai T, <u>Katakura K</u> , Hashiguchi Y, Kato H	Dimiconin, a novel coagulation inhibitor from the kissing bug, <i>Triatoma dimidiata</i> , a vector of Chagas disease.	J Exp Biol	215	3597-3602	2012
Ishimaru Y, Gomez EA, Zhang F, Martini-Robles L, Iwata H, Sakurai T, <u>Katakura K</u> , Hashiguchi Y, Kato H:	Dimiconin, a novel coagulation inhibitor from the kissing bug, <i>Triatoma dimidiata</i> , a vector of Chagas disease.	J Exp Biol	215	3597-3602	2012
Tiwananthagorn S, Bhutto AM, Baloch JH, Soomro FR, Kawamura Y, Nakao R, Aoshima K, Nonaka N, Oku Y, <u>Katakura K</u>	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, <u>Katakura K</u>	Involvement of CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ regulatory T cells in persistence of <i>Leishmania donovani</i> in the liver of alymphoplastic <i>aly/aly</i> mice	PLoS Negl Trop Dis	6	e1798	2012

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Alam MZ, Yasin MG, Kato H, Sakurai T, <u>Katakura K</u> :	PCR-based detection of <i>Leishmania donovani</i> DNA in a stray dog from a visceral leishmaniasis endemic focus in Bangladesh.	J Vet Med Sci,	75	75-78	2013
Kato H, Jochim, RC, Gomez EA, Uezato H, Mimori T, Korenaga M, Sakurai T, <u>Katakura K</u> , Valenzuela JG, Hashiguchi H:	Analysis of salivary gland transcripts of the sand fly <i>Lutzomyia ayacuchensis</i> , a vector of Andean type cutaneous leishmaniasis.	Infect Genet Evol	13	56-66	2013
Nyunt KS, Elkateeb A, Tosa Y, Nabeta K, <u>Katakura K</u> , Matsuura H	Isolation of antitrypanosomal compounds from <i>Vitis repens</i> , a medicinal plant of Myanmar.	Nat Prod Commun	7	609-610	2012
Nagayasu E, Ogura Y, Itoh T, Yoshida A, Chakraborty G, Hayashi T, <u>Maruyama H</u>	Transcriptomic analysis of four developmental stages of <i>Strongyloides venezuelensis</i> .	Parasitology International	62 (1)	57-65	2013
吉田彩子、長安英治、 <u>丸山治彦</u>	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 (1)	105-108	2012
<u>丸山治彦</u> 、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	日本臨牀	70 (12)	2205-2217	2012
<u>丸山治彦</u> 、名和行文	肺吸虫症と神経系	神経内科	77 (3)	259-266	2012
<u>丸山治彦</u>	小児にみられる吸虫症	小児科臨床	65 (3)	384-390	2012
<u>大前比呂思</u>	輸入寄生虫病	日本獣医学会雑誌	65	101 - 5	2012
<u>大前比呂思</u>	食品媒介寄生虫症 - 総論・旅行医学における本症 -	防菌防黴雑誌	40	649-56	2012
Hashimoto M, Morales J, Fukai Y, Suzuki S, Takamiya S, Tsubouchi A, Inoue S, Inoue M, Kita K, Harada S, Tanaka A, Aoki T, <u>Nara T.</u>	Critical importance of the de novo pyrimidine biosynthesis pathway for <i>Trypanosoma cruzi</i> growth in the mammalian host cell cytoplasm.	Biochem Biophys Res Commun	417 (3)	1002-1006.	2012

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nara T, Hashimoto M, Hirawake H, Liao CW, Fukai Y, Suzuki S, Tsubouchi A, Morales J, Takamiya S, Fujimura T, Taka H, Mineki R, Fan CK, Inaoka DK, Inoue M, Tanaka A, Harada S, Kita K, Aoki T.	Molecular interaction of the first 3 enzymes of the de novo pyrimidine biosynthetic pathway of <i>Trypanosoma cruzi</i> .	Biochem Biophys Res Commun	418 (1)	140-143	2012
Fan CK, Liao CW, Lyu SY, Sukati H, Ji DD, Cho CM, Jien JY, Huang YC, Chang PWS, Chiu WT, Nara T, Tsubouchi A, Huang YH, Tu CC, Lan SJJ, Chao JCI.	Prevalence of intestinal parasitic infections among primary school children in areas devoid of sanitation in northwestern Kingdom of Swaziland, Southern Africa.	Pathog Glob Health	106 (1)	60-62	2012
Annoura T, Makiuchi T, Sario I, Aoki T, Nara T.	SUMOylation of paraflagellar rod protein, PFR1, and its stage-specific localization in <i>Trypanosoma cruzi</i> .	PLoS ONE	7 (5)	art. no. e37183	2012
Fan CK, Lee LW, Liao CW, Huang YC, Lee YL, Chang YT, Da Costa NDSRJ, Gil V, Chi LH, Nara T, Tsubouchi A, Akinwale OP.	<i>Toxoplasma gondii</i> infection: Relationship between seroprevalence and risk factors among primary schoolchildren in the capital areas of Democratic Republic of São Tomé and Príncipe, West Africa.	Parasit Vectors	5 (1)	art. no. 141	2012
Minakata K, Takahashi F, Nara T, Hashimoto M, Tajima K, Murakami A, Nurwidya F, Yae S, Koizumi F, Moriyama H, Seyama K, Nishio K, Takahashi K.	Hypoxia induces gefitinib resistance in non-small-cell lung cancer with both mutant and wild-type epidermal growth factor receptors.	Cancer Sci	103 (11)	1946-1954	2012

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hashimoto M, Enomoto M, Morales J, Kurebayashi N, Sakurai Y, Hashimoto T, <u>Nara T</u> , Mikoshiba K.	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor regulates replication, differentiation, infectivity, and virulence of the parasitic protist <i>Trypanosoma cruzi</i> .	Mol Microbiol		In press	2013
迫 康仁、 <u>伊藤亮</u>	糞便中の寄生虫の核酸検査法について	臨床検査	増刊号	1254-1255	2012
<u>伊藤 亮</u> 、迫康仁、石川裕司	エキノкокクス症 .	日本臨床 .	In press		2013
<u>伊藤 亮</u> 、迫康仁、柳田哲矢	有鉤条虫症、有鉤囊虫症 .	日本臨床	In press		2013
<u>伊藤 亮</u> 、石川裕司	エキノкокクス症の早期診断法	日本医事新報	2012.8.18	60-61	2012
Li T, <u>Ito A</u> , 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, China	Acta Trop	124	152-157	2012
Boufana B, Stidworthy MF, Bell S, Chantrey MJ, 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, <u>Ito A</u> , Wyatt K, Lord B, Craig PS	Echinococcus and <i>Taenia</i> sp. From captive mammals in the United Kingdom	Vet Parasitol	190	95-103	2012
Yanagida T, Mohammadzadeh T, Kamhawi S, Nakao M, Sadjjadi SM, Hijjawi N, Abdel-Hafez SK, Sako Y, Okamoto M, <u>Ito A</u>	Genetic polymorphisms of <i>Echinococcus granulosus</i> sensu stricto in the Middle East	Parasitol Int	61	599-603	2012

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nkouawa A, Sako Y, Li T, Chen X, Nakao M, Yanagida T, Okamoto M, Gifaudoux P, Raoul F, Nakaya K, Xiao N, Qiu J, Qiu D, Craig PS, <u>Ito A</u>	A loop-mediated isothermal amplification method for a differential identification of <i>Taenia</i> tapeworms from human: application to a field survey	Parasitol Int	61	723-725	2012
Konyaev SV, Yanagida T, Ingovatova GM, Shoikhet YN, Nakao M, Sako Y, Bondarev AY, <u>Ito A</u>	Molecular identification of human echinococcosis in Altai region, Russia	Parasitol Int	61	711-714	2012
Hailemariam Z, Nakao M, Menkir S, Layikainen A, Yanagida T, Okamoto M, <u>Ito A</u>	Molecular identification of unilocular hydatid cysts from domestic ungulates in Ethiopia: implications for human infections	Parasitol Int	61	375-377	2012
Yanagida T, Sako Y, Nakao M, Nakaya K, <u>Ito A</u>	Taeniasis and cysticercosis due to <i>Taenia solium</i> in Japan	Parasit Vectors	5	18	2012
Mohammadzadeh T, Sako Y, Sadjjadi SM, Sakari B, <u>Ito A</u>	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
Yamane K, Suzuki Y, Tachi E, Li TY, Chen X, Nakao M, Nkouawa A, Yanagida T, Sako Y, <u>Ito A</u> , Sato H, Okamoto M	Recent hybridization between <i>Taenia asiatica</i> and <i>Taenia saginata</i>	Parasitol Int	61	351-355	2012
Swastika K, Dewiyani CI, Yanagida T, Sako Y, Sudamaja M, Stisna P, Wandra T, Dharmawan NS, Nakaya K, Okamoto M, <u>Ito A</u>	An ocular cysticercosis in Bali, Indonesia caused by <i>Taenia solium</i> Asian genotype	Parasitol Int	61	378-380	2012

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ma J, Wang H, Lin G, Craig PS, Ito A, Cai Z, Zhang Y, Han X, Ma X, Zhang J, Liu Y, Zhao Y, Wang Y	Molecular identification of <i>Echinococcus</i> species from eastern and southern Qinghai, China, based on the mitochondrial cox1 gene	Parasitol Res	111	179-184	2012
Konyaev SV, Yanagida T, Ivanov MV, Sako Y, Nakao M, Ito A	The first report on cystic echinococcosis in a cat caused by <i>Echinococcus granulosus sensu stricto</i> (G1)	J Helminthol.	20	1-4	2012

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
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	科学評論社	東京	2012	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):	科学評論社	東京	2012	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	医歯薬出版株式会社	東京	2012	91-7
武藤太一朗, 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	羊土社	東京	2012	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 IL-4. アレルギー・免疫		アレルギー・免疫 2012;19(12):12-21				2012;19(12):12-21
久枝 一	寄生虫学 血液・組織寄生性原虫まれな原虫病原体吸虫	吉開泰信 西山幸廣	レビンソン微生物学・免疫学	丸善出版	東京	2011	361 368-79 380-2 389-93
丸山治彦	アニサキス症	山口徹、北原光夫、福井次矢	今日の治療指針2013	医学書院	東京	2013年1月1日	262-263
大前比呂思	住血吸虫症	山口徹、北原光夫、福井次矢編	今日の治療指針 2013版	医学書院	東京	2012	265-6

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
伊藤 亮	感染症・寄生虫疾患	門脇 孝、永井良三編	カラー版内科学	西村書店	東京	2012	1903-1907
伊藤 亮	エキノコックス症	感染症辞典編集委員会編	感染症辞典	オーム社	東京	2012	516-518
伊藤 亮	囊虫症	感染症辞典編集委員会編	感染症辞典	オーム社	東京	2012	549-552
柳町徳春、伊藤 亮	脳囊虫症	青木茂樹、相田典子、井田正博、大場 洋編	KEYよくわかる脳MRI第3版	秀潤社	東京	2012	674-677
Ito A, Nakao M, Sako Y, Yanagida T, Nakaya K, Knapp J, Ishikawa Y	Echinococcus and Echinococcosis	Liu D	Molecular Detection of Human Parasitic Pathogens	CRC Press	Boca Raton	2012	249-263
Okamoto M, Ito A	Taenia	Liu D	Molecular Detection of Human Parasitic Pathogens	CRC Press	Boca Raton	2012	295-305
伊藤 亮、迫 康仁	4.免疫学的検査 /C.感染症 - 抗原・抗体・遺伝子検査/ 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	東京	In press	
伊藤 亮	[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.	東京	In press	