

寄生虫-宿主適合メカニズム分析による熱帯寄生虫病防圧戦略

Analysis of parasite-host relationship and its application to the control strategy for tropical parasitic diseases

代表研究者 九州大学医学部寄生虫学講座教授 多田 功
Professor, Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Kyushu University
Isao Tada

共同研究者 東海大学医学部生体防御機構系教授 金田 良雅
Professor, Department of Infectious Diseases, Tokai University School of Medicine
Yoshimasa Kaneda

長崎大学熱帯医学研究所教授 青木 克己
Professor, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University
Yoshiki Aoki

産業医科大学医動物学講座教授 嶋田 雅暁
Professor, Department of Medical Zoology,
University of Occupational and Environmental Health
Masaaki Shimada

久留米大学医学部寄生虫学講座助教授 平田 瑞城
Associate Professor, Department of Parasitology, Kurume University,
School of Medicine
Mizuki Hirata

帯広畜産大学生物資源化学科助教授 吾妻 健
Associate Professor, Department of Bioresource Chemistry,
Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine
Takeshi Agatsuma

筑波大学基礎医学系講師 田中 真奈実
Lecturer, Institute of Basic Medical Sciences, University of Tsukuba
Manami Tanaka

京都大学霊長類研究所助手 平井 啓久
Assistant, Primate Research Institute, Kyoto University
Hirohisa Hirai

To determine whether communication pathways exist between parasite and host, we analyzed the genomes of several parasites and their chromosomal DNA. For our initial studies, we used schistosomes, *Trypanosoma cruzi* and *Entamoeba histolytica*. We employed modifications of the following techniques: 1) pulse field gel electrophoresis (PFGE) for the isolation of chromosomes and chromosomal DNA; 2) yeast artificial chromosome vector (YAC vector) for the cloning of large-sized DNA fragments; 3) expressed sequence tags (EST) to characterize chromosomal DNA; and 4) chromosomal *in situ* suppression hybridization (CISS) to identify genomic and chromosomal structures. Our results clearly showed that some of the parasites, especially *Schistosoma mansoni* and *Trypanosoma cruzi*, have DNA sequences encoding communicative substances in their genomes. These substances are envisioned as targets for the control of parasitic diseases. In order to control tropical parasitic diseases at this moment, however, the importance of anthropological approaches are shown based on our field studies in Kenya and Guatemala.

4-1 研究目的

現代の熱帯をおおう重篤な寄生虫病の予防のための新しい戦略を開発することが本研究の目的である。幾種かの寄生生物においては宿主ヒト細胞との間でコミュニケーションを司る何らかの情報伝達物質（機構）がその分化・生殖・増殖に必須であると想定されている。従って寄生生物-ヒト（哺乳類宿主）の相互関係を、異種生物間情報伝達の様式としてとらえ、その機構を明らかにしターゲット物質を選定し、疾病コントロールへと結びつける。

4-2 研究経過

研究目的達成のためクルーズ・トリパノソーマ、赤痢アメーバ、住血吸虫を寄生生物モデルとして選定し実験室内維持虫体により分子生物学的解析および免疫学的解析を行い、疾病コントロールに結びつけるためのフィールド調査・研究を行った。

1) 分子生物学的解析

トータルゲノムプールの完成と染色体構造解析を行うことによって、情報伝達機構の遺伝子レベルでの解明が行われた。従来の単一物質をコードした遺伝子解析では、これらの解析を行うには不十分であったため、以下の技術開発を含んだ研究が行われた。1) パルス電気泳動 (PFGE) を用いた染色体もしくは染色体サイズ DNA の分離法の確立、2) Yeast Artificial Chromosome (YAC) もしくは cosmid を用いた DNA のクローニング法の確立、3) ターゲット遺伝子群の大量解析法確立、4) 染色体上の位置関係に基づく遺伝子群機能相関検索法確立などである。

2) 免疫学的解析

住血吸虫症の解析のため虫体から産出された虫卵に対する宿主の過敏型反応の調節機序を明らかにするために行われた生体モデルではその解析に限界があるため試験管内反応を確立し特にサイトカインの調節機構並びに宿主、寄生虫関係の生理学適応について検討を進めた。

3) フィールド調査・研究

流行地住民の人類遺伝学的分散・適応性の遺伝学的背景を知り、かつ病気に対する認識・習慣・行動 (Knowledge, Attitude, and practice) を知る為に実施した。1) ケニア

の村 Mwachinga で、住民の住血吸虫症の認識およびそれに対する習慣行動を調査し、次いでビデオおよび現地雇いの教育者による家庭訪問によって住民に住血吸虫症の感染経路、症状、予防治療対策等について教育した。1年後に KAP 調査を行い、両 KAP 調査結果と毎年行っている検尿参加率で衛生教育の効果を判定した。

2) グアテマラの Santa Maria Ixhuatan におけるシャーガス病の流行の実態を明らかにした。続いて、シャーガス病感染の社会文化的要因を明らかにするため、同地域の各家庭の長にシャーガス病及びサシガメに関する聞き取りおよびアンケート調査を行った。

4-3 研究成果

1) 住血吸虫の分子生物学的解析

住血吸虫類はゲノムサイズ 10.7×10^8 bp (ヒトの第一染色体全長にほぼ相当) が、7対の常染色体と1対の性染色体上に構造的に安定して存在することが明らかになった。このようなゲノム構造から YAC ライブラリーおよび cosmid ライブラリーの作成が行われた。これらは種・株別変異、性分化の分子生物学的解析に有用であることから High density filter grids として全世界に配布されるようになった。

同時に Expressed Sequence Tags (EST) 解析によると構造遺伝子規模で 2,419 個の遺伝子が記載された。これらの YAC、cosmid ライブラリーを HDF grids として作成し、周囲 200~300 kb 範囲での遺伝子システム解析に利用可能となった。一方、これらの YAC、cosmid ライブラリーは *in situ* hybridization の手法に利用することによって、染色体上の相対的位置関係決定に用いられ、染色体マップ作成が進められている。また、Chromosomal *in situ* suppression hybridization (CISS) の技法開発が進み、マンソン住血吸虫での世界各地にみられる株間のゲノム構造・染色体構造が比較検討され、有意差がないことが明らかになった。情報伝達物質の単離に関しては、宿主由来の混在物の排除の結果、細胞周期の制御と情報伝達に密接な関連を持つ Cyclin、P21^{ras}、Net (ets gene family)、ESL-1 (growth hormone receptor)、p53、sex hormone receptor などが単離同定され、Yeast を用いた実験系で機能検索を行っている。

2) 住血吸虫の免疫学的解析

調節に参与するサイトカインとしてTNF, IL-1JL-2, IFNg, また接着分子としてICAM-1について検討した。抗TNF, IL-1では両者とも明らかに肉芽腫形成を抑制した。また、その効果はTNFでより顕著であることを認めた。試験管内肉芽腫形成でIL4は抑制作用を示し、抗体を加えると逆に形成能は増加した。また、抗IL-4は線維化を顕著に認めなかった。ICAM-1を中和する肉芽腫形成は明らかに抑制された。以上の結果はTNF, IL-4, IL-1, ICAM-1が肉芽腫形成に重要であることを示す。慢性機には肉芽腫は退縮するが、その機構を感染血清を投与して調べた。全血清で著明な抑制作用をし、抗体成分、抗原成分にわけて検討すると抗原成分で抑制効果があった。抗原投与マウスではICAM-1が肝血管全体に著明に発現し、対照マウスでは発現は虫卵の沈着部位に局所的であった。これらの結果は、慢性的肉芽腫の退縮機構の一つとして、流血虫の抗原による全身的ICAM-1発現の結果、局所的肉芽腫形成の抑制が生じることが上げられる。

3) 住血吸虫のフィールド調査・研究

a) ケニアでのKAP研究で次の事が明らかとなった。住血吸虫症はこの村では重篤な疾患とみなされている(住民の97%)が、住血吸虫症の原因、感染経路、症状、治療法、予防対策について正しい知識を有す人(56-64%の住民)の数は少ない。71%の住民は毎年検査を受けると答え(実際は50%)、対策事業へ非協力的な特別な理由はない。安全水の利用率が低い理由としては、安全水までの距離(徒歩5分で安全水に達すこと)の山来る住民はわずか29%)が主で経済的理由をあげる人は少ない。便所の利点は理解されているが、資金、労働力、時間不足で便所は11%の家庭にあるだけである。教育を受けた人は住民の73%にすぎず、ビデオをみた人は42%であった。

c) 衛生教育の結果多くの住民が住血吸虫症についての正しい知識を有す様になった。以上の結果は衛生教育は少なくとも住民に知識を与え、住民の行動の一部を変化させるが、すべての行動変化を短期間に住民に期待するのは出来ないことを示唆した。

4) クルーズ・トリパノソーマにおける分

子生物学的解析

シャーガス病の病原体であるクルーズ・トリパノソーマを用いたゲノムプロジェクトにおいても、YAC/cosmidライブラリーの完成、PFGEを用いた染色体パターンによる種・株別変異の解析、EST解析(200)による大規模遺伝子記載が行われた。その結果、この虫体の無性生殖性が明らかになったこと、蛋白分解酵素 Cysteine proteinase による防御は無効であったこと、宿主の神経節細胞および心筋細胞より分泌される物質の受容体が虫体のゲノムにコードされていることなどが明らかとなった。この物質の受容体はヒトの腸管細胞に存在し、シャーガス病の特徴的的症状である巨大結腸症の原因物質となっていることから、この物質の阻害剤による治療実験には期待がかけられる。

5) シャーガス病のフィールド調査・研究
シャーガス病の病原体トリパノソーマに対する住民の陽性率は、間接赤血球凝集反応を用いた血清学的検査で男性9.5%女性12.7%であったが、陽性率は年令と共に直線的に上昇し、心電図異常を示すことでシャーガス病と考えられる者は陽性者に有意に高く、トリパノソーマの感染とシャーガス病の関係が強く示唆された。しかも、男性では40才の陽性者で心電図異常を示す者の割合が低く、同地域の働き盛りの男性の死因のひとつがシャーガス病である可能性が認められた。これまで他地域でトリパノソーマ感染のリスクファクターとして重要視されていた現金収入、教育レベル、家屋構造などは本地域では血清反応陽性率と無関係であった。一方で、ベクターであるサシガメに対して住民が日常的に使う呼称と陽性率の間に関係が認められた。サシガメがシャーガス病の原凶であることを知らない状況で、サシガメにある特定の呼称を使う者で特に陽性率が高いのは、病原体のヒトへの感染とそれによって引き起こされる病気が、従来の病気の生物学モデルとは独立した文化的要因によっても修飾され得ることを示す具体的事例と考えられる。

6. 赤痢アメーバの分子生物学的解析

PFGEによる染色体解析の結果、1Mb~2Mbの範囲に7~10個の染色体を持ち、株別に大きく変異することが示された。EST解析(150個)では、Histone、リボゾーム

蛋白質などの High Frequency 遺伝子が多く記載され、その相当数がラットに類似しているという知見が得られている。

4-4 今後の課題と発展

1) 本研究成果により、外環境変化（異宿主への転移をも含む）に対して大きな適応能力をもつ寄生生物ゲノムの種・株別の特徴が明らかになるとともに、哺乳類宿主との間の情報交換機構と伝達物質系の抽出が行われた。異種生物の共存が何らかの情報伝達物質を介して行われるという独創的仮定は YAC、cosmid、EST などの手法を用いた大規模な遺伝子解析の結果によって裏打ちされ、この物質系の更なる解析・応用は寄生虫・宿主適応関係についての生物進化の新しい概念を打ち立てるものである。今後の寄生虫病対策に画期的な解決策を付与するものであると確信する。なお、本研究で開発された技術、YAC/cosmid クローニング、CISSなどは今秋アルゼンチンで開かれる寄生生物ゲノムワークショップで発表する予定であり、Analysis of Parasite Genome としてマニュアルテキストブックを上梓の予定である。

2) 熱帯病の現場での住民行動の分析は、新技術が当面無力であることを考案すれば重要であり、更なる展開が必要であることを示唆している。

文献

1) Fox, A, Li W B, Tanaka M, et al. (1993): Molecular characterization of the largest subunit of *Plasmodium falciparum* RNA polymerase I. Mol. Biochem. Parasitol., 61: 37-48.

2) Hirai H, Tanaka M, and LoVerde P T (1993): *Schistosoma mansoni*: Chromosomal localization of female-specific genes and a female-specific DNA element. Exp. Parasitol., 76: 175-181.

3) Hirai H, and LoVerde P T (1995): FISH techniques for constructing physical maps on schistosome chromosomes. Parasitol. Today, (in press).

4) Hirata M, Takayshima M, Kage M, Fukuma T (1993): Comparative analysis of hepatic, pulmonary, and intestinal granuloma formation around freshly laid *Schistosoma japonicum* eggs in mice. Parasitol. Res., 79: 316-321.

5) Mei H, Hirai H, Tanaka M, et al. (1995): *Schistosoma mansoni*: Cloning and characterization of a gene encoding cytosolic Cu/Zn superoxide dismutase. Exp. Parasitol., 80: 250-259.

6) Shimada M, Escoba A, Saito H, Molina P A (1993): Investigacion epidemiologica y antropologica de enfermedad de chagas en el area pilot, Santa Maria Ixhuanan. Enfermedades Tropicales en Guatemala 93, pp. 118-126.

7) Taguchi T, Hirai H, Habe S, et al. (1995): Comparative chromosomal studies of *Neotricula aperta* (alpha, beta, and gamma races), the snail intermediate hosts of *Schistosoma mekongi*. J. Med. Appl. Malacol., (in press).

8) Tanaka M (1992): The developmental regulation of p53 gene expression in schistosomes. Memorias do Instituto Oswald Cruz, 787: 71-79.

9) 田中真奈実 (1993): 寄生生物ゲノムプロジェクト展望. 医学のあゆみ, 166: 829.

10) Tanaka M, Hirai H, LoVerde P T, et al. (1995): Yeast artificial chromosome (YAC)-based genome mapping of *Schistosoma mansoni*. Mol. Biochem. Parasitol., 69: 41-51.

11) Tanaka M and Tanaka T (1995): Completely DNA sequencing: Expressed sequence tags (ESTs) and gene project of *Trypanosoma cruzi*. Gene, (in press).

12) Tanaka M, Tanaka T, Inazawa J, et al. (1995): Chromosomal *in situ* suppression hybridization exhibits homogeneous structure and genome organization in *Schistosoma mansoni* strains. Mol. Biochem. Parasitol., (in press).

13) Tanaka M and Tanaka T (1995): cDNA cloning of *Entamoeba histolytica* histone 2B and 4 with divergent primary structures. Biochem. Biophys. Acta, (in press).

14) Tanaka T, Kaneda Y, Iida A and Tanaka M (1994): Homologous cysteine proteinase genes located on two different chromosomes from *Trypanosoma rangeli*. Internat. J. Parasitol., 24: 179-188.

15) Velasquez G E, Yamashita K, Santizo J A, et al. (1993): Cambios electrocardiograficos en habitantes de un area endemica para la enfermedad de chagas en Guatemala. Enf. Tropicales en Guatemala 93, pp. 82-89.