

平成21年5月15日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18380178

研究課題名(和文) リーシュマニア症の伝播機構解明に向けた診断システムの確立と新規治療薬の開発

研究課題名(英文) Establishment of diagnosis systems and development of chemotherapeutic drugs for leishmaniasis

研究代表者 片倉 賢 (KATAKURA KEN)

北海道大学・大学院獣医学研究科・教授

研究者番号：10130155

研究成果の概要：リーシュマニア症はイヌや齧歯類を保虫宿主としサシチョウバエが媒介する人獣共通原虫性疾患である。本研究では、エクアドルおよびパキスタンの皮膚リーシュマニア症を診断するための抗原を解析した。パキスタン南部の皮膚リーシュマニア症の原因リーシュマニア種を明らかにした。サシチョウバエの種を同定する方法を開発した。サシチョウバエが吸血する動物種を特定した。アジア産薬用植物から抗原虫活性をもつ化合物を分離・精製し、リポソーム製剤を試作した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
2007年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2008年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学/獣医学・応用獣医学

キーワード：人獣共通感染症、リーシュマニア症、診断、治療、疫学、伝播機構、媒介昆虫

1. 研究開始当初の背景

(1) リーシュマニア症は節足動物媒介性の人獣共通原虫症であり、「顧みられない熱帯病」(Neglected Tropical Diseases)の1つとして注目されている。本症の患者数は88カ国で約1,200万人にも達する。病原体であるリーシュマニア原虫はサシチョウバエによって媒介され、イヌや齧歯類など100種類以上の脊椎動物が保虫宿主となっている。人においては多様な臨床症状を呈する。内臓型では骨髄、肝臓、脾臓のマクロファージ細胞内で原虫が増殖し、毎年数万人の命が奪われている。皮膚型ではサシチョウバエの刺咬部に醜い結節や潰瘍を形成し、皮膚に癬痕を残す。イヌは内臓型と皮膚型の

両方の症状を呈し致死性である。媒介昆虫と保虫動物対策は困難をきわめ、また、患者の多くは辺境地域に住む低所得者層や難民であるため、リーシュマニア症対策は後回しにされている。さらに、治療薬(アンチモン)耐性株の出現もみられ、ヒトとイヌを対象とする安全な治療薬の開発が急務である。

(2) 研究代表者は、過去15年間以上にわたり、エクアドル、中国西域、トルコおよびパキスタンなどでリーシュマニア症の疫学調査・研究に携わってきた。そして、患者の前で迅速に診断的確に治療を施すことが大切であること、また、保虫動物とサシチョウバエの疫学調査がリーシュマニア症の伝播経路の

解明や流行予測において重要であることを実感してきた。しかし、これらの課題はいまだ未解決のままである。

2. 研究の目的

本研究では、リーシュマニア症の総合的診断システムの確立と新規治療の開発を目的として行われた。具体的には、以下のように、われわれのこれまでの血清診断法の研究成果をさらに発展させると同時に、サシチョウバエの解析を進めた。また、リポソーム製剤の開発に着手した。

- (1) ヒトの皮膚リーシュマニア症の血清診断用抗原の特定と診断法の開発
- (2) サシチョウバエ種の DNA 同定法ならびにリーシュマニア原虫の検出法の開発と改良
- (3) サシチョウバエの吸血源動物種同定法の開発
- (4) 薬用植物からの抗原虫活性物質の探索と精製
- (5) ナノテク・リポソーム製剤による治療薬の開発

これらの研究は、わが国における輸入リーシュマニア症の予防対策に貢献し、また流行国におけるリーシュマニア症の疫学調査・研究推進のためのツールを提供することで国際医療に貢献するものである。

3. 研究の方法

- (1) ヒトの皮膚リーシュマニア症の血清診断用抗原の特定

①イムノブロット

エクアドルでは *Leishmania panamensis* が主要原虫種であり、パキスタンでは *L. major* と *L. tropica* の 2 種類が主要種であるので、それぞれの流行地に特徴的なイムノブロットパターンが検出されることが期待される。そこで、これらのリーシュマニア抗原を SDS-PAGE で展開し、患者血清とプロテイン G を用いて、皮膚リーシュマニア症に特徴的なイムノブロットパターンを特定した。

②Peptide Mass Fingerprinting(PMF)解析

質量分析装置(TOF-MS, MS/MS)を用いて、患者血清が認識する寄生虫抗原ペプチドのアミノ酸配列をリーシュマニアのゲノム蛋白質データベースから検索した。

- (2) サシチョウバエ種の DNA 同定法ならびにリーシュマニア原虫の検出法

世界には 500 種類を超えるサシチョウバエ種が存在し、その中でリーシュマニアを媒介するのは数十種類とされている。しかし、形態学的には種分類がきわめて難しく、簡便な DNA 同定法が必要とされている。

① パキスタンのサシチョウバエの同定

2007年5月にパキスタンの皮膚リーシュマニ

ア症流行地であるラルカナ市周辺の4つの村からサシチョウバエ 507 個体をライトトラップにて採集した。個体別に DNA を抽出し、18S rRNA 遺伝子を標的とした PCR およびシーケンスを行った。このシーケンスデータと GenBank に登録されている *Sergentomyia* 属、*Phlebotomus* 属の 18S rRNA 遺伝子の塩基配列データを用いて、PCR-RFLP 法によるサシチョウバエ種の同定に有効な制限酵素を選定した。

②サシチョウバエからの原虫検出

原虫感染の有無を確認するため、サシチョウバエの DNA サンプルからリーシュマニアのミトコンドリア DNA や rRNA 遺伝子を標的とした PCR 法を実施した。

- (3) サシチョウバエの吸血源動物種の同定

ウエストナイル熱やマラリアでは、媒介蚊の吸血源動物同定に関する研究が進められており、ミトコンドリア・チトクローム b 遺伝子のデータベースをもとに、各種脊椎動物あるいは鳥類を区別するプライマーが設計されている。本研究では、これらの手法をサシチョウバエに応用し、吸血したメスのサシチョウバエの DNA について脊椎動物のチトクローム b 遺伝子を PCR 増幅し、TA クロノンの塩基配列を決定し、GenBank のデータと比較解析することで、吸血源動物を特定した。なお、吸血源動物としては、ヒト、イヌ、ラット、スナネズミ、ハムスターが最有力であるが、近年はウマにおけるリーシュマニアの感染例も報告されていることから、流行現場で飼育されている家畜のロバ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、スイギュウ、ニワトリおよびイヌなどから DNA を採取し、また野ネズミ類やリスを捕獲して DNA の採取を行った。

- (4) 薬用植物からの抗原虫活性物質の探索

東南アジアでは古来より薬用植物が民間薬として様々な疾患に広く利用されている。これまで、イヌ・パベシア症の病原体である *Babesia gibsoni* を標的として、in vitro における赤血球内増殖を抑制する植物を探索し、薬用植物 29 種類の抽出物のうちニガキ科の *Brucea javanica* の乾燥種子抽出物が最も強い活性を有することを見いだした。この抽出物には、抗パベシア活性をもつ有効成分として 2 種類の新規のクアシノイド (bruceantinol B と bruceine J) と既知のクアシノイド 6 種類 (bruceantinol, yadanzliolide A, bruceine A, B, C, D) が含まれていた。なお、これらの成分については、核磁気共鳴、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て構造決定を行った。本研究では、クアシノイド類の抗原虫作用をさらに明らかにするために、抗リーシュマニア活性については *L. donovani* の promastigote 型虫体を

用いて、抗トリパノソーマ活性については *Trypanosoma evansi* の trypomastigote 型虫体を用いて in vitro の増殖抑制効果ならびに Alamar Blue[®]アッセイ法により検討した。

(5) ナノテク・リポソーム製剤の抗原虫活性
リーシュマニア原虫は宿主体内ではマクロファージ系細胞の細胞質内でリソームと融合した寄生虫胞内で無鞭毛型虫体として存在している。そこで、薬剤を原虫に到達させる工夫が必要であるが、1つの方法として、マクロファージ細胞内に取り込まれやすい薬剤封入機能性リポソーム製剤を設計することが考えられる。本研究では、まず、bruceine B, C, D について薬剤封入機能性リポソーム製剤を作成した。脂質組成は dipalmitoyl phosphatidylcholine : cholesterol : stearylamine = 5.5 : 4 : 0.5 (mol 比)として、封入薬剤濃度を 2 mM とした。粒子径は 150 nm とし、ゼータ電位は +60 mV とした。薬剤未封入リポソームのゼータ電位は +40 mV であった。これらの薬剤封入機能性リポソーム製剤の存在下で *L. donovani* の promastigote 型虫体および *T. evansi* の trypomastigote 虫体に対する効果を Alamar Blue アッセイ法により検討した。

4. 研究成果

(1) 皮膚リーシュマニア症の血清診断用抗原の特定

①エクアドルの皮膚リーシュマニア症の血清診断抗原の解析
エクアドルの皮膚リーシュマニア症の患者血清が認識する *L. panamensis* 抗原について、ウエスタンブロット法解析を行ったところ、75-120 KDa の原虫抗原が患者に高頻度に認識されていた。これらの抗原について PMF 解析を行い heat shock protein 70 (HSP70) と HSP83 が候補蛋白質として検索された。そこで、小麦胚芽無細胞タンパク合成系を用いて、これらの組換えタンパク質を合成・精製し、患者血清との反応性を検討した。その結果、レコンビナント HSP70 は皮膚潰瘍など活動性皮膚病変を持つほとんどの患者の血清と反応し、レコンビナント HSP83 は約半数の同患者血清によって認識された。このことから、これらの組換えタンパク質は血清診断用抗原として有望であることが示唆された。

②パキスタンの皮膚リーシュマニア症の疫学調査

パキスタンにおける皮膚リーシュマニア症の原因虫種については、患者からの分離 17 株を解析したこれまでの結果から、北西部の山岳地帯においては *L. tropica* が、新しい流行地である中南部のインダス河低地帯では *L. major* がそれぞれ主要種であることが示されていた。本研究では、さらに 69 名の患者皮膚病変のチトクローム b 遺伝子を標的にし

た DNA 診断と 144 名の患者皮膚病変のミトコンドリア・ミニサークル遺伝子を標的にした DNA 診断を行ったところ、原虫種分布に地域差があることが再度確認できた。しかし、*L. major* については、チトクローム b 遺伝子に変異が認められたことから、本地域の *L. major* の由来についてはさらなる調査が必要であると結論された。

③パキスタンの皮膚リーシュマニア症の血清診断抗原の解析

パキスタン西部山間部の Quetta 市周辺では *L. tropica* がおもに分布していることを明らかにしてきた。今回、Quetta 市周辺で、臨床的に皮膚リーシュマニア症と診断された 27 名の患者のうち、原虫が検出された患者 11 名の血清について *L. tropica* 抗原を用いてウエスタンブロットを行った。その結果、皮膚病変が重度な患者の血清では多数のバンドが検出されたが、病変が小さなものや治癒傾向にあるものでは数本のバンドが確認されたのみであった。分子量約 70, 50, 30, 12kDa の抗原はいくつかの血清で共通に認識されており、診断用抗原の候補となりうるものと考えられた。PMF 解析の結果、HSP70 が診断用抗原の候補として検索された。

(2) サシチョウバエの種同定

パキスタンの 4 つの村から採集したサシチョウバエ 507 個体のうち雌は 339 個体 (66.9%)、雄は 168 個体 (33.1%) であった。肉眼的に吸血の見られなかった雌 147 個体について 18S rRNA 遺伝子の PCR-RFLP 法とシーケンス解析を行った。その結果、*Sergentomyia* 属が 130 個体 (88.4%) を占めた。*Phlebotomus* 属は 17 個体 (11.6%) で、そのうち *P. papatasi* が 10 個体 (70.6%)、*P. alexandri* と考えられる個体が 5 個体 (29.4%) であった。捕獲場所の解析により、*Sergentomyia* 属サシチョウバエは、住民の生活習慣、家畜の飼育状況、穀物の有無に左右されることなく生息していることが示唆されたのに比べ、*P. papatasi* は、ヒトの生活環境を好んで生息していることが示唆された。

(3) サシチョウバエの吸血源動物種の同定

パキスタンで採集したサシチョウバエのうち肉眼的に吸血が見られた雌 43 個体について種の同定と吸血源動物種の同定を試みた。その結果、解析に成功したのは 28 個体であった。*P. papatasi* および *P. alexandri* と考えられたのがそれぞれ 1 個体で、これらはヒト、ウシ、ヤギ、ヒツジ、イヌ、ラットを吸血していた。残りの 26 個体は *Sergentomyia* 属サシチョウバエで、*S. ghesquierei* *S. clydei*、*S. dubia*、*S. dentata* がそれぞれ 11、4、10、1 個体であった。*Sergentomyia* 属は文献的には、通常は変温動物を吸血するとされているが、

本研究ではヤモリ類からの吸血を確認できたのは後者の2種のみであった。ところが、前者3種についてはヒト、ウシ、ラット、スイギュウ、ロバ、ヤギ、ヒツジ、イヌ、インドアレチネズミなどのチトクロームb遺伝子が検出され、*Sergentomyia* 属サシチョウバエは哺乳動物を好んで吸血していること、および1個体のサシチョウバエが複数の動物種を吸血していることが明らかになった。

(4) 薬用植物に含まれる抗寄生虫活性物質の探索

ニガキ科の *Brucea javanica* の乾燥種子から抽出したC20タイプのクアシノイド類について非ツェツェバエ媒介性トリパノソーマ症の病原体である *Trypanosoma evansi* の trypomastigote 培養虫体に対する増殖阻害活性を測定した。その結果、クアシノイド11種類のうち、bruceine A, bruceantinol, bruceine C, brusatol, bruceine B が最も強い抗トリパノソーマ活性を示し、C20クアシノイドの ring A における diosphenol の存在ならびにC15側鎖の性質が活性に重要であることが明らかになった。このことから、*Brucea javanica* は広域抗寄生虫薬として開発する価値のある有望な薬用植物であることが示された。

(5) ナノテク・リポソーム製剤の抗原虫活性
bruceine B, C, Dの薬剤封入機能性リポソーム製剤は *T. evansi* の trypomastigote 虫体に対しては水溶液中の各化合物に比べ、約2倍の効果 (IC₅₀ 値が約1/2) が認められた。しかし、これらのクアシノイド類の *L. donovani* の promastigote 型虫体に対する効果はトリパノソーマに対する効果に比較すると数十倍程度も低く、同じトリパノソーマ科原虫でも原虫種によってクアシノイド化合物に対する感受性が異なることが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計16件) (すべて査読有り)

1. Yamada K, Subeki, Nabeta K, Yamasaki M, Katakura K, Matsuura H: Isolation of anti-babesial compounds from *Brucea javanica*, *Curcuma xanthorrhiza*, and *Excoecaria cochinchinensis*, **Biosci Biotechnol Biochem** 73, 776-780, 2009
2. Katakura K: Molecular epidemiology of leishmaniasis in Asia (focus on cutaneous infections). **Curr Opin Infect Dis** 22, 126-130, 2009
3. Nakao R, Mizukami C, Kawamura Y, Subeki, Bawm S, Yamasaki M, Maede Y, Matsuura H, Nabeta K, Nonaka N, Oku Y, Katakura K:

Evaluation of efficacy of bruceine A, a natural quassinoid compound extracted from a medicinal plant, *Brucea javanica*, for canine babesiosis. **J Vet Med Sci** 71, 33-41, 2009

4. Bawm S, Matsuura H, Elkhateeb A, Nabeta K, Subeki, Nonaka N, Oku Y, Katakura K: *In vitro* antitrypanosomal activities of quassinoid compounds from the fruits of a medicinal plant, *Brucea javanica*. **Vet Parasitol** 158, 288-294, 2008
5. Elkhateeb A, Yamasaki M, Maede Y, Katakura K, Nabeta K, Matsuura H: Anti-babesial quassinoids from the fruits of *Brucea javanica*. **Nat Prod Commun** 3, 145-148, 2008
6. Myint CK, Asato Y, Yamamoto Y, Kato H, Bhutto AM, Soomro FR, Memon MZ, Matsumoto J, Maco JD, Oshiro M, Katakura K, Hashiguchi Y, Uezato H: Polymorphism of cytochrome *b* gene in *Leishmania* parasites and their relation to types of cutaneous leishmaniasis lesions in Pakistan. **J Dermatol** 35, 76-85, 2008
7. Matsumoto J, Sakamoto K, Shinjyo N, Kido Y, Yamamoto N, Yagi K, Miyoshi H, Nonaka N, Katakura K, Kita K, Oku Y: Anaerobic NADH-fumarate reductase system is predominant in the respiratory chain of *Echinococcus multilocularis*, providing a novel target for the chemotherapy of alveolar echinococcosis. **Antimicrob Agents Chemother** 52, 164-170, 2008
8. Bhutto AM, Soomro FR, Katakura K: Leishmaniasis in Sindh, Pakistan: outbreak and review of the literature. **J Pak Assoc Dermatol** 18, 212-219, 2008
9. Inoue T, Nonaka N, Mizuno A, Morishima Y, Sato H, Katakura K, Oku Y: Mitochondrial DNA phylogeography of the red fox *Vulpes vulpes* in northern Japan. **Zool Science** 24, 1178-1186, 2007
10. Subeki, Matsuura H, Takahashi K, Nabeta K, Yamasaki M, Maede Y, Katakura K: Screening of Indonesian medicinal plant extracts for anti-babesial activity and isolation of new quassinoids from *Brucea javanica*. **J Nat Prod** 70, 1654-1657, 2007
11. Matsuura H, Nomura S, Subeki, Yamada K, Yamasaki M, Yamato O, Maede Y, Katakura K, Trimurningsih, Chairul, Yoshihara T, Nabeta K: Anti-babesial compounds from *Curcuma xanthorrhiza*. **Nat Prod Res** 21, 328-33, 2007
12. Elkhateeb A, Matsuura H, Yamasaki M, Maede Y, Katakura K, Nabeta K: Anti-babesial compounds from *Rosa damascena*. **Nat Prod Commun** 2, 765-769,

2007

13. Elkhateeb A, Yamada K, Takahashi K, Matsuura H, Yamasaki M, Maede Y, Katakura K, Nabeta K: Anti-babesial compounds from *Berberis vulgaris*. *Nat Prod Commun* 2, 173-175, 2007
14. Kawai S, Ikeda E, Sugiyama M, Matsumoto J, Higuchi T, Zhang H, Khan N, Tomiyoshi K, Inoue T, Yamaguchi H, Katakura K, Endo K, Matsuda H, Suzuki M: Enhancement of splenic glucose metabolism during acute malarial infection: correlation of findings of FDG-PET imaging with pathological changes in a primate model of severe human malaria. *Am J Trop Med Hyg* 74, 353-360, 2006
15. Marco JD, Bhutto AM, Soomro FR, Baloch JH, Barroso PA, Kato H, Uezato H, Katakura K, Korenaga M, Nonaka S, Hashiguchi Y: Multilocus enzyme electrophoresis and cytochrome *b* gene sequencing-based identification of *Leishmania* isolates from different loci of cutaneous leishmaniasis in Pakistan. *Am J Trop Med Hyg* 75, 261-266, 2006
16. Namikawa K, Watanabe M, Lynch J, Sugaki Y, Kitai T, Sunaga F, Katakura K, Ogata M: A canine case of *Leishmania infantum* infection in Japan. *Jpn J Vet Dermatol* 12, 11-15, 2006

[学会発表] (計7件)

1. Katakura K, Kawamura Y, Nakao R, Aoshima K, Tiwananthagorn S, Nonaka N, Oku Y, Uezato H, Kato H, Bhutto AM, Baloch JH, Soomro FR, Hashiguchi Y: Diagnosis and molecular epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Ecuador and Pakistan. 17th International Congress for Tropical Medicine and Malaria, 2008年9月30日(韓国)
2. Bawm S, Subeki, Nakao R, Matsuura H, Elkhateeb A, Takahashi K, Nabeta K, Nonaka N, Oku Y, Katakura K: Antibabesial and antitypanosomal activity of quassinoid compounds isolated from the medicinal plant *Brucea javanica*. 17th International Congress for Tropical Medicine and Malaria, 2008年9月30日(韓国)
3. 川村悠太、中尾亮、青島圭介、小寺亜由美、Baloch JH、Bhutto MK、Soomro FR、Bhutto AM、野中成晃、奥祐三郎、片倉賢: パキスタンの皮膚リーシュマニア症流行地におけるサシチョウバエの分子疫学調査. 第77回日本寄生虫学会、2008年4月3日(長崎市)
4. Bawm S, Subeki, Nakao R, Matsuura H, Takahashi K, Nabeta K, Matsumoto J, Nonaka N, Oku Y, Katakura K: *In vitro* antitypanosomal activity of quassinoid

compounds isolated from the medicinal plant *Brucea javanica*. 第77回日本寄生虫学会、2008年4月3日(長崎市)

5. 川村悠太、吉川功、片倉賢: 日本国内で発症した犬リーシュマニア症. 第144回日本獣医学会、2007年9月3日(江別市)
6. 中尾亮、水上智秋、川村悠太、Subeki、Bawm S、山崎真大、前出吉光、松浦英幸、高橋公咲、鍋田憲助、片倉賢: 薬用植物由来天然化合物の bruceine A のイヌ・バベシア症に対する治療効果. 第76回日本寄生虫学会、2007年3月29日(吹田市)
7. 谷口祥介、長内由利子、松本淳、上里博、加藤大智、Bhutto AM、Soomro FR、Marco JD、Barroso PA、橋口義久、片倉賢: パキスタンにおける皮膚リーシュマニア症の血清診断と抗原分析. 第142回日本獣医学会、2006年9月22日(山口市)

[図書] (計2件)

- ① 片倉賢 (岸本寿男、山田章雄監修)、*メディカルサイエンス、ズーノーシスハンドブック*、2009年、919
- ② 片倉賢 (前出吉光監修)、*ディーリマン、主要症状を基礎にした犬の臨床*、2007年、232

[その他]

研究室ホームページ

<http://www.vetmed.hokudai.ac.jp/parasitology01.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片倉賢 (KATAKURA KEN)
北海道大学・大学院獣医学研究科・教授
研究者番号: 10130155

(2) 研究分担者

野中成晃 (NONAKA NARIAKI)
北海道大学・大学院獣医学研究科・講師
(2006~2007)

研究者番号: 50281853

松本淳 (MATSUMOTO JUN)

北海道大学・大学院獣医学研究科・博士研究員 (2006~2007)

日本大学・生物資源学部・講師 (2008)

研究者番号: 70296169

森本一洋 (MORIMOTO KAZUHIRO)

北海道薬科大学・薬学部・教授

研究者番号: 10113135

(3) 連携研究者

野中成晃 (NONAKA NARIAKI)

宮崎大学・農学部獣医学科・准教授 (2008)

研究者番号: 50281853