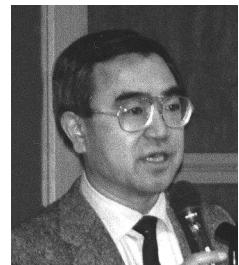


病原性寄生虫の感染防御に関する免疫薬理学的研究

最初にファイザーヘルスリサーチ振興財団に対して、私共の研究にご援助いただいたことを感謝申し上げます。

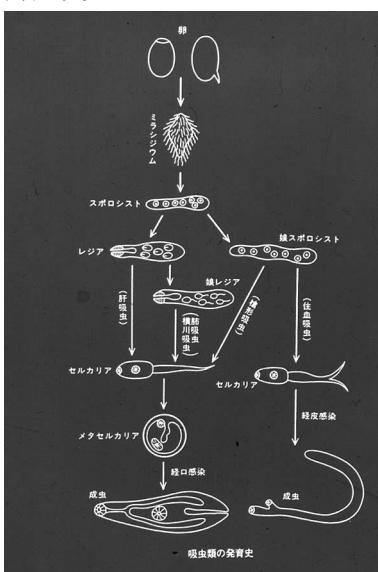
本日は渋谷 健 学長が発表するはずでしたが、会議のため共同研究者の私が発表させていただきます。



渡辺 泰雄 先生

東京医科大学
薬理学教室助教授

スライド 1



今から 20 年近く前、1980 年の初頭に米国のイリノイ大学ロックフォード校の医学部と東京医大との国際共同研究が始まりました。その一貫として中枢薬理をやり、もう一方で寄生虫薬理学の研究をずっと続けて、ようやく少しずつ知見が得られるようになってきました。研究の動機は、一方で HIV あるいはガンという恐ろしい病気もありますが、ヘルスリサーチという見地からすれば、病原寄生虫の感染も大変恐ろしいものです。そこで、もう殆ど一部のマニアックな研究者しかいない状態の中で、私共がやり始めたのが住血吸虫という、世界の人口の 20 ないし 25 % がまだ関連疾患にかかって、その対策に追われているという寄生虫です。

本日は、いわゆる対症療法ではなく原因療法ができるのではないかというところから始まった、この研究の一端を紹介させていただくものです。

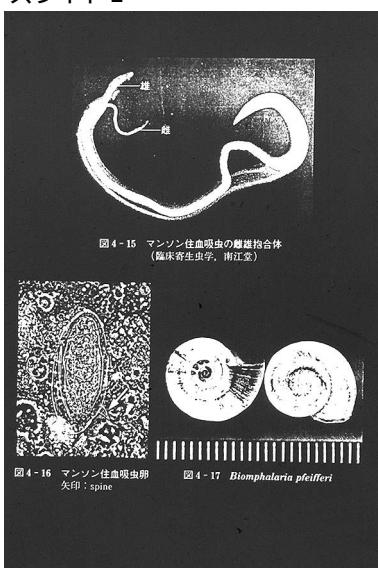
スライド 1をご覧ください。あまりご存知ないと思うのですが、いわゆる住血吸虫というのは、成虫が体内に入ってそれが卵を生みつけます。この卵は糞便となって出てきます。それがミラシジウムという形で水中に放り出され、スパロシストからセルカリアになるまでの段階までだいたい水中で生息しています。

そしてミラシジウムが中間宿主であるミズマキ貝に入っています。そのミズマキ貝でどんどん大きくなっていき、セルカリアが皮膚侵入します。この皮膚侵入するセルカリアがいわゆる発病を起こします。そしてからだの中で成虫になって、最初のうちはかゆみ程度しかないので、そのうちに肝硬変に近い状態、あるいは心血管系の循環器障害・血管閉塞のようなことを起こして、多数の方が亡くなるわけです。

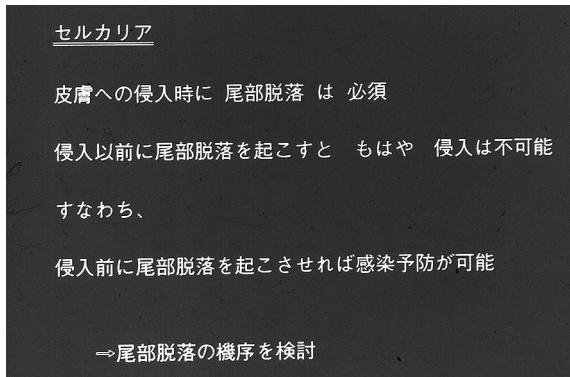
ただ一つ興味があるのは、このセルカリアは頭部と尾部からできているのですが、皮膚侵入するときにこの頭部と尾部が分かれます。一緒にときには絶対皮膚侵入せずに、分かれてはじめて皮膚侵入するということがわかっています。ですから逆に返せばここに注目をして、何か良い対策が出ないかと思って研究を始めました。

スライド 2 は寄生虫の本から取り出したものです。上の写真は寄生虫。マンソン住血吸虫と書いてあります。私共がずっと米国イリノイのロック

スライド 2



スライド3



皮膚侵入が不可能である。だから侵入のときに尾部脱落を起こさないような状態を作れれば、何も対症療法で高い薬を飲ませるのではなくて、うまくいくのではないかという考えです。むしろ対症療法で住血吸虫の感染に使われている薬が、逆に副作用としてその住血吸虫の成虫の死骸を増やして、それが血管閉塞のようなことを起こして死亡させることがあります。すなわち、薬を使わないほうが良いというような状態になっています。ですから私共はそうではなくて、もう少し視点を違えて皮膚侵入防止という観点から研究を始めました。

実験はスライド4のようにマウスのしっぽをつけます。これはルイビルのほうの大学と共同でやっておりましたが、セルカリアをもらってきて、しっぽをこの中につけます。だいたい3ヶ月くらいやっていくと、人間で見られるように、腹部が膨大化して、肝硬変の悪化状態が見られます。そこでホモジナイス・肝臓を取り組織を混和して、それを水の中に受けます。図下部のヒラマキ貝が、先ほど言いました中間宿主ですけれども、そこに入れてきます。するとセルカリアが出ます。このセルカリアを実験に使います。

絵で書くと簡単ですが、このセルカリアをうまく発育させ、そして皮膚侵入まで必ず成功させる、いわゆるセルカリアの侵入を行なわせることは、マウスの状態等もあり、大変時間がかかりました。

ファイザーヘルスリサーチ振興財団の助成による研究を始める前までに分かっていることがここまで(スライド5)でした。すなわち、皮膚に存在する脂肪酸が、セルカリアの侵入を促進しているのではないか。それを実験したところ、どうもリノール酸に関係がある。リノール酸があれば、先ほど申したように頭部と尾部が離れやすくなり、頭部が体の中に入つて行く。そして感染を引き起こすのだということまでわかつております。

不飽和脂肪酸が臭いのではないか。スライドでは答えを出していますが、まあ、この点に問題を解くカギがあるのではないかということです。

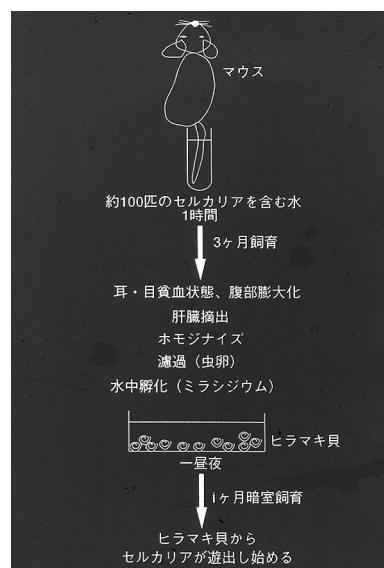
そして下から2つ目に、これも答えが出ていますけれども、侵入時のセルカリア内のエイコサノイドを増

フォードの医学部でやっていたものですが、このマンソン住血吸虫を使います。これは日本住血吸虫より少し小型ですが、胴体は全く同じです。ご覧の通り外側が雄、中側が雌になり、これが体内・特に肝臓などでよく集束しており、そこでいわゆる感染を起こしていくわけです。

右下の写真が先ほど言いました中間宿主のミズマキ貝というものです。成虫になる前のセルカリアのときここに入っています。

ここでまとめますと(スライド3)皮膚の侵入時に尾部脱落が絶対必要である。尾部脱落を起さないと皮膚侵入が不可能である。だから侵入のときに尾部脱落を起こさないような状態を作れれば、何も対症療法で高い薬を飲ませるのではなくて、うまくいくのではないかという考え方です。むしろ対症療法で住血吸虫の感染に使われている薬が、逆に副作用としてその住血吸虫の成虫の死骸を増やして、それが血管閉塞のようなことを起こして死亡させることがあります。すなわち、薬を使わないほうが良いというような状態になっています。ですから私共はそうではなくて、もう少し視点を違えて皮膚侵入防止という観点から研究を始めました。

スライド4



スライド5

従来の研究

皮膚に存在する脂肪酸がセルカリアの侵入を促進

皮膚代用品：脂肪酸を分散させた寒天
侵入促進剤：主にリノール酸

不飽和脂肪酸>>飽和脂肪酸

リノール酸：侵入時のセルカリア内のエイコサノイドを増加

リノール酸：セルカリア内へのカルシウムの取り込み増加

加させる。これは分かっていました。もちろん感染を起こしますから当り前のこと、プロスタグランジン系のエイコサノイドを増加させるのは当り前です。そしてそれが体に入って行って、人の皮膚、あるいは動物の皮膚のエイコサノイド系を活性化にさせるということを行っています。

(スライド5の)一番下も今回もう答えが出ていますが、私共が調べたところです。

尾部の切断、あるいは細胞内情報またはその免疫系等において、カルシウムそのもの、あるいは、細胞の外側のカルシウムイオンが中に入るとフリーのカルシウムイオン(Ca^{2+})という形で動きます。

こういうところを日本人の研究者がやって、アメリカとの共同となるわけです。

実際にどんな脂肪酸、あるいは不飽和脂肪酸が、皮膚侵入に影響するかというような実験をしました(スライド6)。縦軸がTail loss。しっぽが切れれば当然中に入りやすい訳ですから、しっぽが切れる状態が多ければ多いほど寄生虫感染がしやすいわけです。

横軸には3つあります。左がリノール酸、真ん中がオレイン酸、右がステアリン酸です。これらの3つは、いずれも炭素の数が18個ある脂肪酸ですが、リノール酸は不飽和結合が2つ、オレイン酸は1つ、ステアリン酸は完全な飽和脂肪酸というように典型的なものを3つ選びました。

そして濃度を同じように変えていきます。不飽和結合を2つ持つリノール酸では濃度依存的にしっぽが切れていきます。不飽和結合を1つしか持たないオレイン酸を混ぜると、やはり濃度依存的ですが、リノール酸に比べると少ない。大変興味がありますのは、不飽和脂肪酸のほうは何の影響もしない。何のしっぽも切らないということです。

残念ながら、リノール酸は皮膚にたくさんあります、たくさんあれば住血吸虫が皮膚に侵入しやすいということが分かります。

そこで今度は、この皮膚の侵入に対して細胞内情報とか、あるいは尾部を切断したりあるいはそういう情報系を活性化させるカルシウムイオンは、どんなことに影響を及ぼすかという実験を行ったのがスライド7です。

外側にカルシウムを加えておきます。そのカルシウムがどれだけ体内に入るかという実験です。3 mM(ミリモル)のリノール酸では、ご覧の通り入れて10分間で、カルシウムの取り込みがかなり増えています。すなわち10分間でTail lossがどんどん増えていきます。つまりリノール酸はしっぽを切る段階においては、かなりカルシウムが重要だということ - オレイン酸もそうですが、リノール酸の方が強いということを示しています。

スライド8は中間のまとめです。不飽和脂肪酸 - 特に不飽和結合を2つ持つリノール酸はカルシウムの流入を促進させる。それがしっぽを切るのでないかということです。

スライド6

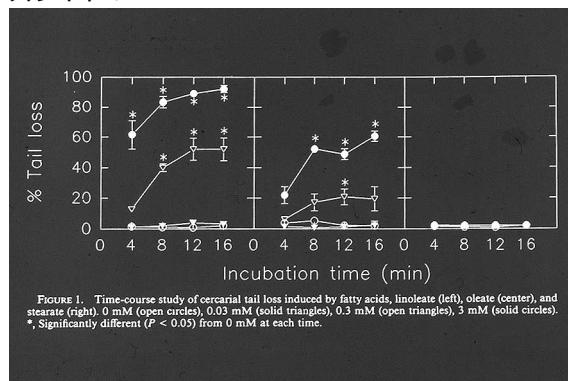


FIGURE 1. Time-course study of cercarial tail loss induced by fatty acids, linoleate (left), oleate (center), and stearate (right). 0 mM (open circles), 0.03 mM (solid triangles), 0.3 mM (open triangles), 3 mM (solid circles).

*. Significantly different ($P < 0.05$) from 0 mM at each time.

スライド7

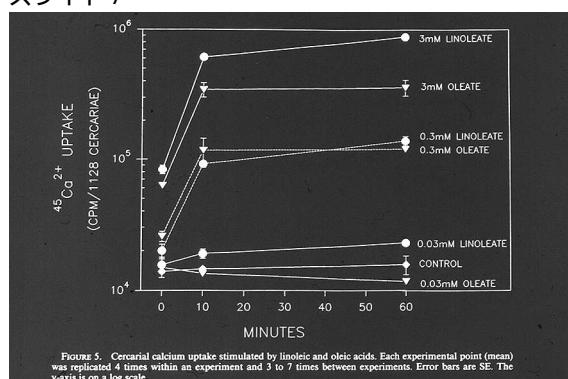
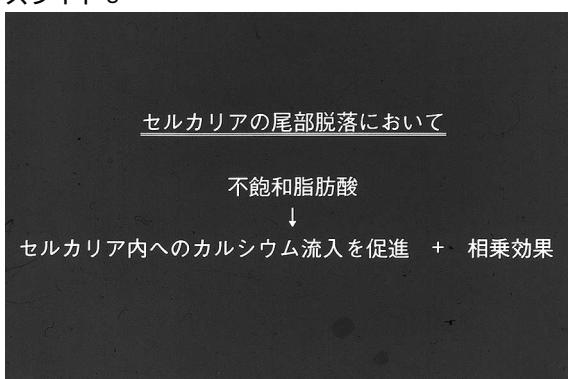


FIGURE 5. Cercarial calcium uptake stimulated by linoleic and oleic acids. Each experimental point (mean) was replicated 4 times within an experiment and 3 to 7 times between experiments. Error bars are SE. The y-axis is on a log scale.

スライド8



実際にどうか。今度は拮抗させるものを使います(スライド9)。EGTA、EDTA、色々なものを使いましたが、やはりEGTAはカルシウムイオンに対して非常に強力にキレートを起こします。外側のカルシウムを全部くっつけます。EGTAの濃度をどんどん上げていくと、リノール酸もオレイン酸も全て著明にEGTAによってブロックされていきます。

すなわちカルシウムが外側に無いと入らない。いくらリノール酸があっても入りづらくなるということを示しています。

ということは、リノール酸が中に入るときにカルシウムを増やせる。そのカルシウムは水の中にあるカルシウムを引っぱってくる、あるいは皮膚の側にあるカルシウムを引っぱってくるということです。それが本当かどうか。

今度は大変専門的ですが(スライド10) calcium ionophore という細胞内のカルシウムだけを増やすものがあります。外側のカルシウムを無視して、まず細胞内のカルシウムイオンを増やすとどうなるかという実験にもっていきます。

スライドはリノール酸3 mMとカルシウムを増やすA 23187ですが、このcalcium ionophoreを混ぜると、尾部切断の割合が上がっていきます。そして、リノール酸3 mMに比べて、どんどん上がっていきます。

ということはやはり、細胞内のカルシウムが増えれば、かなり尾部脱落が起きるということがわかります。

これを、今度はEGTAを使います(スライド11)。外側にEGTAがないときとあるとき - すなわち外側のカルシウムが存在するときに、こういうキレート剤を処置します。すると、スライド10のグラフと全く同じですが、増えます。ところが、外側のカルシウムを段々減らしていくと、いくら細胞内のカルシウムを増やしたとしても限度が出てくる。ということは外側にEGTAのようなカルシウムのキレート剤をまいておけば、かなり尾部脱落を防ぐ、すなわち侵入を防ぐことができるというデータです。

スライド12はエイコサノイドの関連です。

スライド10

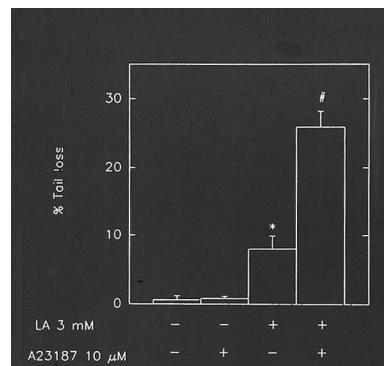


FIGURE 5. Effect of calcium ionophore A23187 (A23187) on cercarial tail loss induced by linoleate (LA) at 3 mM in the presence of ethyleneglycol-bis-(β -aminoethyl ether) *N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EGTA). Data are expressed as means \pm SE. The + and - indicate the addition and omission of substances, respectively. *: Significantly different ($P < 0.05$) from the group without LA and A23187; #: significant interaction ($P < 0.001$) between LA and A23187.

スライド11

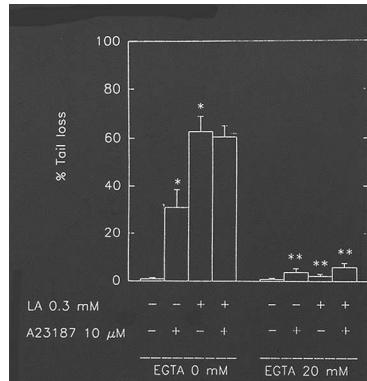


FIGURE 4. Effect of calcium ionophore A23187 (A23187) on cercarial tail loss induced by linoleate (LA) at 0.3 mM in the presence and absence of ethyleneglycol-bis-(β -aminoethyl ether) *N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EGTA). Data are means \pm SE. The + and - indicate the addition and omission of substances, respectively. *: Significantly different ($P < 0.01$) from the group without LA and A23187 in the absence of EGTA; **: significantly different ($P < 0.01$) from the corresponding treated groups in the absence of EGTA.

スライド9

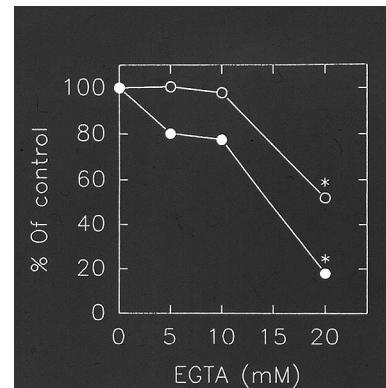
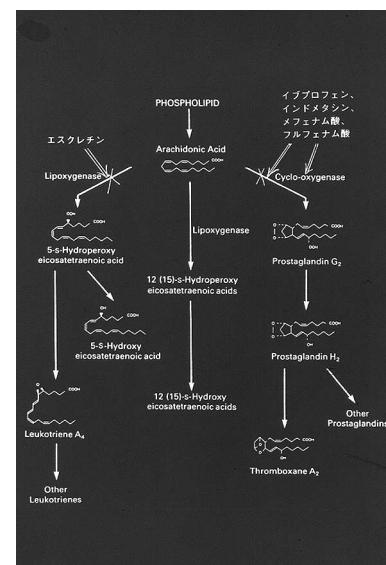
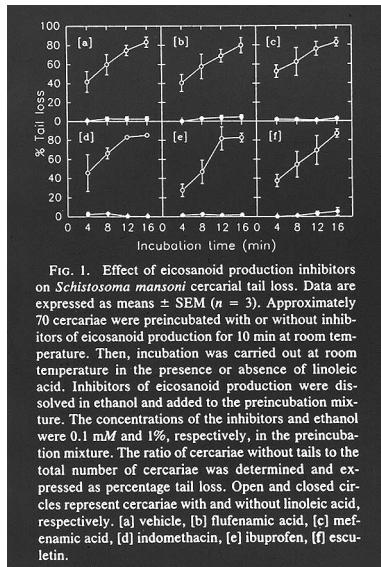


FIGURE 2. Effect of ethyleneglycol-bis-(β -aminoethyl ether) *N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EGTA) on cercarial tail loss induced by 3-mM linoleate. Closed and open circles indicate the groups with and without preincubation for 5 min, respectively. Data are expressed as a percentage of control without EGTA. *: Significantly different ($P < 0.05$) from the group without EGTA.

スライド12



スライド 13



細胞内で炎症が起きる。その炎症が起きるときにProstaglandinや、HETE、またはLeukotrieneが動きます。あるいはThromboxaneが動きます。このときにそういうカルシウムと、これから続していく免疫系の反応にも影響があるかどうかということを見るために抗炎症剤を使います。

ご存知のように、LipoxygenaseとCyclo-oxygenaseです。これによりLeukotriene、Thromboxane、Prostaglandinが出ますが、これらのブロッカーを使います。これは先生方がお使いになっております非ステロイド製の抗炎症薬です。これを処置したときに、効果があればもう簡単な話です。かなり安く手に入るようになりましたから、これを飲ませればいいのではないかと思って、全く単純な方法でやってみました。

ところが残念ながら、スライド 13 のように、先ほどの薬物をやっても全然効かないのです。

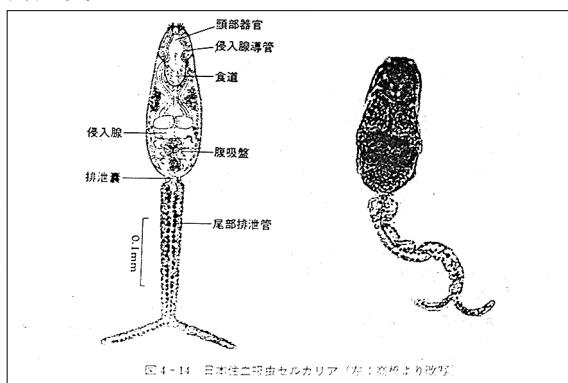
リノール酸をやらないときは全然出ません。ところがリノール酸をやってしまいと、どんどんTail lossが起きます。そのTail lossに対して、残念ながら、時間を増やすことによってどの抗炎症薬も効かない。すなわちエイコサノイドの産生をどんなにブロックしようとしても関係ない。いわゆるカルシウム系が動いている。

もうひとつトライします。

スライド 14 をご覧ください。頭部があります。この頭部のところに吻孔がありますが、これが皮膚にくっつきます。このくっつくときに何か体内ではばらばらになって、リノール酸との関連で尾部が脱落するのではないか。

そこで、このくっつくところにブロッカーとして硝酸銀を処置したときのデータを見てみます。スライド 15 です。結果として、硝酸銀をやってもTail lossは変わらない。

スライド 14



スライド 15

| TABLE I Effect of Silver Nitrate on <i>Schistosoma mansoni</i> Cercarial Tail Loss | | |
|---|-----------------|----------------|
| Silver nitrate (μM) | % Tail loss | |
| | Control | Linoleic acid |
| 0 | 3.1 \pm 0.6 | 90.6 \pm 1.7 |
| 30 | 17.7 \pm 3.2† | 89.4 \pm 4.4 |
| 60 | 17.6 \pm 2.8† | 88.0 \pm 3.0 |

Note. Data are expressed as means \pm SEM ($n = 4$). Approximately 70 cercariae were preincubated with or without silver nitrate at room temperature for 5 min. Then, incubation was carried out for 16 min at room temperature in the presence or absence of linoleic acid. The ratio of cercariae without tails to the total number of cercariae was determined and expressed as percentage tail loss.
† Statistically significant difference (t test, $P < 0.05$) from the corresponding group without silver nitrate.

以上をまとめます(スライド16)

セルカリアの突起の化学受容体 - すなわち皮膚に結合するところ(これはリノール酸が関与するのですが)をブロックしても、どうしても尾部脱落は起きてしまう。エイコサノイドでもない。ということは何をしたらいいかと言うと、逆にするわけです。

不飽和脂肪酸があるとカルシウムがどんどん促進する。これが相乗効果となって結果的に皮膚侵入が増えてくる。皮膚侵入が増えることによって寄生虫感染が起こるということです。従って逆に言うと、尾部脱落によって皮膚侵入する殆どのものについて(今他にもう一つ鉤虫類もやっていますけれども、この鉤虫類も含めて)外側のカルシウムをキレートで抑えると、かなり皮膚侵入を抑えられるということです。

おそらく外側のカルシウムが不飽和脂肪酸とくっつくことによって、この尾部脱落を促進する。ということはカルシウムのキレート剤は病原体 - いわゆる病原寄生虫の予防になるのではないかという一つのアイデアが出ました。

この一貫として、免疫系のものが出てきました。その免疫系のものは何かというと、スライド17をご覧ください。これはJournal of Anti-Inflammatoryという国際誌で最近発表したものです。

ちょうど私共の大学院から行ったグループが行っていますが、その彼等のデータによると、IL-1ra(インターロイキン-1のra)というものが体内に存在します。その抗炎症物質が、皮膚侵入するときに、反応を起す寸前のいわゆる皮膚疹瘡(皮膚がかゆくなる状態)のときに発現する状態が長ければ長いほど、それ以上の疾患が起きてこないのではないかというところまで今見つかっています。

ということは、外側のカルシウムをはずすことと、もう一つは、(住血吸虫特有なものかどうかはわかりませんが)少なくとも皮膚侵入の時に生体で反応する内在性免疫抑制物質(この場合においてはIL-1raですが)が防御反応として作用する - ということは逆に返せば、そういうものを増やす薬物が出てくれれば、免疫機序として、あるいは病原寄生虫の感染の予防に使えるのではないかという、かすかな明りが灯ってまいりました。

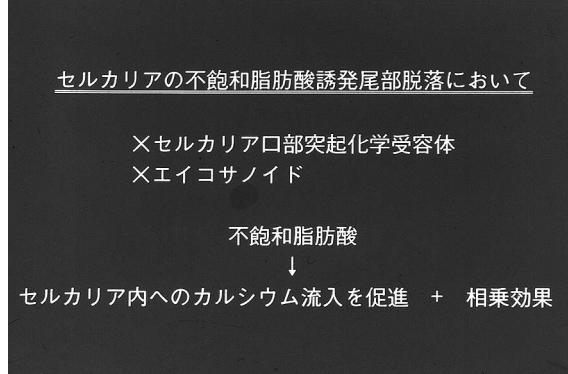
質疑応答

Q: 脂肪酸のことだろうと思うのですが、(オメガスリー)の系統ですね、EPA等プラスタグラジンのできかたも違ったりしますから、それによってはこのTail lossというのは違うのでしょうか。

A: 素晴らしい質問ありがとうございます。おっしゃる通りで、ただ、何故かのほうが効くんですね、これは、そのへんのところを私共も今チェックしなければならないと思うのですが、先ほどのスライドでも言っておきましたが、どうもエイコサノイドそのものが、あまり影響しているのではないのではないかということの関連かもしれません。

もうちょっと続けたいと思います。

スライド16



スライド17

Secretion of an Anti-Inflammatory, Immunomodulatory Factor by Schistosomulae of *Schistosoma mansoni*

K. Rameshwar, B. Salihi, Sungh Park, Y.-X. He, Han-Woo Li, and T. Shibusawa
Department of Biomedical Sciences, College of Medicine, University of Illinois, Rockford, Illinois (K.R., B.S., S.P., Y.-X.H., J.-W.L.); Department of Pharmacology, Tokyo Medical College, Tokyo, Japan (T.S.)

KEYWORDS:
schistosomulae
immunomodulation
IL-1ra
keratinocyte

Penetration and migration of schistosomulae of *Schistosoma mansoni* induce an anti-inflammatory response especially after a moderate infection. Previous studies have identified the mechanisms by which schistosomulae of *S. mansoni* induce an anti-inflammatory response in human skin showed that the excretory-secretory (ES) products of *S. mansoni* contain activities that induce production of the anti-inflammatory cytokine IL-1ra from human keratinocytes. In the present study we have demonstrated that schistosomulae of *S. mansoni* induce IL-1ra secretion from *S. mansoni* to identify the IL-1ra inducing activity. We demonstrate that this anti-inflammatory activity is associated with a protein of mol wt 16.8 kDa. This protein, designated Sm 16.8, is the major IL-1ra inducing activity in the ES products. A comparison of the proteins in the ES products of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* showed that Sm 16.8 is absent in the ES products of *S. haematobium*. Interestingly, ES products of schistosomulae of *S. mansoni* are potent inducers of IL-1ra in human keratinocytes, whereas ES products of schistosomulae of *S. mansoni* induce little or no IL-1 β secretion from keratinocyte. Functional studies show that Sm 16.8 suppress antigen induced IL-2 secretion from peripheral blood mononuclear cells and spleen or axillary lymph node cell cultures resulted in a significant reduction in antigen induced IL-2 secretion. These studies show that schistosomulae of *S. mansoni* secrete an anti-inflammatory, immunomodulatory factor that may help the parasite to evade host immune responses in the skin. Given the capabilities of Sm 16.8 to induce IL-1ra in human keratinocytes, its therapeutic application may also have a potential use as a therapeutic agent for inflammatory skin disorders. © 1996 Wiley-Liss, Inc.

INTRODUCTION

Schistosomiasis is a life threatening infection of humans in many tropical and subtropical parts of the world [1]. According to the World Health Organization (WHO) estimates, currently over 200 million people are infected with this

/m4993S0001 11-29-95 13:39 15 wifl W: Infant INF-387