

infections. Trend in Parasitology, In Press, 2007.

学会発表

1. Yoshimoto, T., Sasaki, Y. and Nakanishi, K. (2006) IL-18 protects against *Strongyloides venezuelensis* infection by activating mucosal mast cell-dependent type-2 innate immunity. 11<sup>th</sup> international congress of parasitology. Scotland. 8.6-11.

中西憲司：IL-18: 多彩な生物活性と医学的意義. 第71回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、2006年7月 西宮.

澤木潤子、筒井ひろ子、安田好文、林伸樹、谷澤隆邦、審良静男、中西憲司：NK細胞のTLRリガンドによる活性化. 同上

井野口卓、山本麻子、華 常祥、堤 善多、高橋澄夫、森脇優司、筒井ひろ子、中西憲司、山本徹也：痛風発作時および尿酸塩結晶(MSU)刺激によるIL-18についての検討. 同上

石川百合子、善本知広、中西憲司：IL-18誘導性自然型T細胞活性化が原因で起こるムチン分泌亢進を伴った気道炎症と気道過敏性亢進. 同上

濱崎隆之、内田俊輔、橋口周平、伊東祐二、中西憲司、中島敏博、杉村和久：ヒトIL-18シグナルを阻止するヒト抗体、h18-108の確立. 同上

藤盛好啓、糸井久幸、松井 聖、筒井ひろ子、岡村春樹、中西憲司：急性移植片対宿

主病(GVHD)におけるIL-18の役割. 同上

Nakanishi, K. The role of IL-18 in intrinsic allergic diseases. RCAI-JSI International symposium of Immunology, June 2006, Yokohama.

Yoshimoto, T., Ishikawa, Y. and Nakanishi, K. Contribution of IL-18-induced innate T cell activation to airway inflammation with mucus hypersecretion and airway hyperresponsiveness. *Ibid.*

善本知広、石川百合子、中西憲司：IL-18のマウスへの吸入暴露によって誘導される自然型気管支喘息の解析. 第56回日本アレルギー学会秋季学術大会、2006年11月、東京

中西憲司：アレルギー性炎症と Super Th1. 第三回「免疫難病・感染症等の先進医療技術」公開シンポジウム. 2006年12月、東京

中西憲司：寄生虫感染と宿主応答. 特定領域研究「感染現象のマトリックス」第一回シンポジウム. 2007年1月、東京

Omoto, Y., Tokime, K., Yamanaka, K., Morioka, T., Kurokawa, I., Tsutsui, H., Yamanishi, K., Nakanishi, K. and Mizutani, H. Effective conversion of human proIL-18 into a novel functional IL-18 by human mast cell chymase. 67th Annual Meeting of the Society

for Investigative Dermatology, May 2006, Philadelphia.

尾本陽一、時女和也、山中恵一、森岡竜彦、黒川一郎、筒井ひろ子、山西清文、中西憲司、水谷 仁：マスト細胞キマーゼによる新活性型 IL-18 分子の産生。日本研究皮膚科学会第 31 回年次学術大会・総会。2006 年 5 月京都。

Tsutsui, H., Terada, M. and Nakanishi, K. (2006) Contribution of interleukin-18 to atopic dermatitis-like skin inflammation induced by *Staphylococcus aureus* product in mice. The 6<sup>th</sup> Awaji international forum on infection and Immunity. September 2006, Hyogo, JAPAN.

尾本陽一、時女和也、山中恵一、森岡竜彦、黒川一郎、筒井ひろ子、山西清文、中西憲司、水谷 仁：肥満細胞キマーゼによる新活性型 IL-18 分子の産生。第 56 回日本アレルギー学会秋季学術大会、2006 年 11 月、東京。

Yoshimoto, T., Yoshimoto, T., Yasuda, K., Mizuguchi, J. and Nakanishi, K. IL-27 inhibits Th2 responses in vitro and in vivo by suppressing GATA-3 expression; demonstration of its protective role against Leishmaniasis. 第 36 回日本免疫学会総会, 2006 年 12 月 大阪。

Imamura, M., Yasuda, K., Fujimoto, J., Tsutsui, H. and Nakanishi, K. Requirement of TLR4

and TRAM for caspase-1-dependent IL-18 secretion after stimulation with LPS. 同上

Adachi, K., Tsutsui, H., Taniguchi, M. and Nakanishi, K. : Requirement of IL-18 and invariant NKT (iNKT) cells for development of IgE response in lethal mouse malaria. 同上

Kuroda, M., Hayashi, N., Tanaka, H., Sano, H. and Nakanishi, K. : A new experimental asthma model in which endogenous IL-18 is critically involved as a causative factor. 同上

Sugimura, K., Hamasaki, T., Uchida, S., Hashiguchi, S., Ito, Y., Nakanishi, K. and Nakashima, T. :Establishment of human anti-human Interleukin-18 antibody, h18-108. *Ibid*

田中英久、林 伸樹、黒田麻衣、佐野 統、杉村和久、中西憲司：ヒト末梢血単核球移入免疫不全マウスを用いた Th1 型喘息に対する抗ヒト IL-18 抗体の治療効果の検討。同上

善本知広：IL-18 と気管支喘息。第三回「免疫難病・感染症等の先進医療技術」公開シンポジウム。2006 年 11 月、東京。

中西憲司：IL-18 と痛風。第三回「免疫難病・感染症等の先進医療技術」公開シンポジウム。2006 年 12 月、東京

## H. 知的所有権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

1. 発明の名称：気管支喘息発症モデル動物およびその作製方法、並びにその利用

発明者名：中西憲司、善本知広

権利者名：科学技術振興機構

工業所有権の種類：特許

番号：特願 2006-124354

出願年月日：2006年4月27日

2. 発明の名称：Th2型アレルギー性疾患治療薬及び感染症治療薬

発明者名：善本知広、中西憲司、善本隆之、水口純一郎

権利者名：科学技術振興機構

工業所有権の種類：特許

番号：特願 2006-305852

出願年月日：2006年11月10日

3. 発明の名称：実験動物の腸管癒着を形成する方法、腸管癒着実験動物の製造方法、腸管癒着抑制剤のスクリーニング方法及び腸管癒着抑制剤

発明者名：善本知広、中西憲司、藤元治朗

権利者名：科学技術振興機構

工業所有権の種類：特許

番号：特願 2007-033904

出願年月日：2007年2月14日

## ハマダラカにおけるキサンツレン酸含量の定量分析

分担研究者 松岡 裕之 自治医科大学・教授

研究要旨 マラリア原虫の生殖体形成は、ヒトからハマダラカへの伝播の最初の段階であり、トリプトファンの代謝産物であるキサンツレン酸 (XA) によって誘導される。HPLC-ECD 分析によりハマダラカ (*Anopheles stephensi*) に含まれる微量の XA を測定したところ、幼虫～蛹では 1 匹あたり 20～50ng、成虫では 10～50ng であった。蛹および羽化直後のメスの含有量が最も高く 50ng であった。XA は羽化後急速に減少し、4 日目には 12ng になった。これはハマダラカのマラリア伝播効率と密接に関係していると思われた。

### A. 研究目的

何故ハマダラカだけがマラリアを媒介できるのか、という疑問を解決することを通じて、マラリアを媒介しないハマダラカを創製できるかもしれない。マラリア原虫の生殖体形成は、ヒトからハマダラカへの伝播の最初の段階であり、トリプトファンの代謝産物であるキサンツレン酸 (XA) によって誘導される。本年度はハマダラカの生活史を通じて XA 含有量を追跡した。

### B. 研究方法

ハマダラカ (*Anopheles stephensi*) の幼虫・蛹・成虫をサンプルとし HPLC-ECD を用いて（詳細は昨年度報告書に記載）各ステージの蚊の XA 含有量を測定した。

### C. 研究結果

XA 含有量は幼虫～蛹では 1 匹あたり 20-50ng、成虫では 10-50ng であった。羽化直後のメス成虫は 50ng/匹であるのに、羽化後 2 日で 25ng、4 日目には 12ng と減少した。

### D. 考察

ハマダラカは幼虫の時期からすでに XA を持っていることが分かった。また羽化後 3-4 日でその含有量が大きく減少することが分かった。このことはハマダラカのマラリア伝播

効率が、羽化後日を経るにしたがって低下してゆくことを予想させる。

### E. 結論

蚊が保有しているマラリア原虫活性化物質であるキサンツレン酸 (XA) の含有量は、幼虫～蛹では 20-50ng/匹、成虫では 10-50ng/匹であった。羽化直後から XA は急速に減少し 4 日目には 1/4 になってしまう。

### G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表

松岡裕之, 平井 誠, 服部隆太, 笠原優一, 吉田 元, 新井明治: ハマダラカ成虫の唾液腺におけるキサンツレン酸含量とマラリア伝播効率 第 58 回日本衛生動物学会大会 2006 年 4 月 6-8 日 (学会抄録集 p47)

Matsuoka H, Hirai M, Arai M: The role of tryptophan and its derivatives for development of malaria parasite in vector mosquito. 11<sup>th</sup> Meeting of International Study Group of Tryptophan Research, 4-7 July, 2006(Abstract p32)

### 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) 分担研究報告書

細胞内寄生を可能にする遺伝子(群)の検索: *Trypanosoma cruzi* 感染細胞のトランスクリプトーム解析

分担研究者 青木孝 (順天堂大学医学部教授)

**研究要旨:** *T. cruzi* はシャーガス病を引き起こす細胞内寄生原虫であり、心筋等の細胞質で分裂・増殖する。そのために宿主細胞因子に依存、あるいは、それらを積極的に利用すると考えられるが、このような観点からの研究はない。今回我々は、約 47,000 個の transcripts をスポットしたマイクロアレイを用いて、細胞内寄生を可能にする遺伝子(群)の同定を目指した。その結果、*T. cruzi* 感染細胞において 3 倍以上 upregulate された遺伝子 41 個、downregulate された遺伝子 23 個を見出した。その内、細胞増殖促進遺伝子 7 個はすべて downregulate され、同抑制遺伝子 3 個はすべて upregulate されていた。以上より、*T. cruzi* 感染は宿主細胞の分裂速度を低下させる(本報告)とともにアポトーシスを抑制する(以前の報告)ことによって、本原虫は宿主細胞内で安定した寄生生活を長期間継続し、そのことが原虫の増殖を保障し、病原性へとつながると考えられた。

### A. 研究目的

*T. cruzi* は中南米でシャーガス病を引き起こす寄生原虫であり、各種有核細胞(特に心筋)の細胞質で分裂・増殖する。このことが本原虫による Chagas 病の根本原因の一つとして重要視されている。すなわち、本原虫は本質的に細胞内寄生性であり、そのために宿主細胞因子に依存、あるいは、それらを積極的に利用していると我々は考えている。しかし、このような観点から分子レベルにおける研究はほとんどなされていない。そこで今回我々は、マイクロアレイを用いて宿主細胞の遺伝子発現をゲノムワイドに解析し、細胞内寄生を可能にする遺伝子(群)を同定することを目的として解析をおこなった。

### B. 研究方法

非感染 HeLa 細胞および *T. cruzi* 感染細胞から RNA を抽出して cRNA を合成し、それぞれの cRNA サンプルを個別にヒトゲノムチップ(約 47,000 個の転写産物のスポットを含む Affymetrix Human Genome U133 plus 2.0 Array)にハイブリダイズさせた。定法に従い GeneSpring ソフトウェアを用いてノーマライズした後、感染細胞と非感染細胞を比較し、3 倍以上 upregulate された遺伝子および downregulate された遺伝子を検索した。

**倫理面への配慮:** 本研究では人体サンプル(と個人情報)は使用していないので、人権擁護上の配慮等に関する倫理面の問題はない。また、実験動物は使用していない。

### C. 研究結果

本研究では我々は、非感染細胞に比して *T. cruzi* 感染細胞において 3 倍以上 upregulate された遺伝

子を 41 個、downregulate された遺伝子を 23 個見出すことができた( $p < 0.05$ ,  $n=3$ )。感染細胞には本原虫由来の RNA も含まれるので原虫 RNA から cRNA を合成し、クロス・ハイブリダイズするヒト転写産物を探索したが、わずかに 2 個のヒト転写産物が交差反応したのみであった。すなわち、47,000 個のスポットの特異性はきわめて高いことが判った。この 2 個の遺伝子については以降の解析から除外した。上記 64 個の遺伝子の内、代表的遺伝子 10 個を選びリアルタイム PCRをおこなった結果、マイクロアレイのデータと良く一致したことから、前者のデータの信頼性は高いことが確認された。

64 個の遺伝子には *IL6*、*IL8* などのサイトカインや細胞増殖に関わる遺伝子の割合が高かった。細胞増殖に関連する遺伝子について詳しく調べたところ、感染細胞において細胞増殖を促進する遺伝子(*WISP2*、*FGFR2* などの 7 個)はすべて downregulate され、細胞増殖を抑制する遺伝子(*TFPI*、*EMPI* などの 3 個)はすべて upregulate されていた。

### D. 考察

*T. cruzi* 感染によって宿主細胞の分裂は抑制されることが報告されているが、今回の解析により、その分子メカニズムの重要な部分が明らかになった。一方、感染細胞ではデスレセプターを介するアポトーシスが抑制されることを我々は以前に報告した。以上より、*T. cruzi* 感染は宿主細胞の分裂速度を低下させるとともにアポトーシスも抑制することによって、本原虫に対する免疫応答反応を回避することが可能となり、宿主細胞内で安定した寄生生活を長期間継続し、そのことが原虫の増殖を保障し、病

原性へとつながると考えられる。(論文投稿中)

## E. 結論

*T. cruzi* 感染細胞では、非感染細胞に比べ、細胞増殖促進因子は downregulate され、抑制因子は upregulate されることがマイクロアレイ法によって明らかとなった。今後これらの遺伝子のノックダウン (RNAi) などにより、それぞれの役割の解明を進めるとともに、全体を統御する上位遺伝子の探索などをおこなう予定である。その結果として、*T. cruzi* による増殖阻害およびアポトーシス抑制の分子機構はより明確となり、病原性や薬剤標的の基盤データが得られることが期待される。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Sariego I, Annoura T, Nara T, Hashimoto M, Tsubouchi A, Iizumi K, Makiuchi T, Murata E, Kita K, Aoki T (2006): Genetic diversity and kinetic properties of *Trypanosoma cruzi* dihydroorotate dehydrogenase isoforms. *Parasitol Int*, 55, 11-16

2) Iizumi K, Mikami Y, Hashimoto M, Nara T, Hara Y, Aoki T (2006): Molecular cloning and characterization of ouabain-insensitive Na<sup>+</sup>-ATPase in the parasitic protist, *Trypanosoma cruzi*. *Biochim Biophys Acta-Biomembranes*, 1758, 738-746

3) Nara T, Iizumi K, Ohmae H, Tsubota S, Tanabe M, Kojima S, Aoki T (2006): Anti-body isotype responses to paramyosin, a vaccine candidate for schistosomiasis, and their correlations with resistance and fibrosis in *Schistosoma japonicum* patients in Leyte, Philippines. *Am J Trop Med Hyg*, in press.

### 2. 学会発表

1) 橋本宗明・飯泉恭一・三上由祐子・奈良武司・原諭吉・青木孝 (2006): *Trypanosoma cruzi* におけるウアバイン非感受性 Na<sup>+</sup>-ATPase の遺伝子クローニングとその生化学的解析。第 75 回日本寄生虫学会大会、弘前、2006 年 5 月、プログラム・抄録集 p.60

2) 案浦健・Idalia Sariego・橋本宗明・奥村俊之・青木孝 (2006): *Trypanosoma cruzi* の SUMO (Small ubiquitin-related modifier) による翻訳後修飾。第 75 回日本寄生虫学会大会、弘前、2006 年 5 月、プログラム・抄録集 p.60

3) 奈良武司・Sariego Idalia・案浦健・牧内貴志・村田英理・青木孝 (2006): *Trypanosoma cruzi* の dihydroorotate dehydrogenase 遺伝子における一塩基置換 (SNPs) とその分子進化的意義。第 75 回

日本寄生虫学会大会、弘前、2006 年 5 月、プログラム・抄録集 p.65

4) 鳴原貴子・橋本宗明・進藤典子・青木孝 (2006): トリパノソーマ感染による HeLa 細胞の遺伝子発現変動: マイクロアレイおよびリアルタイム PCR による解析。順天堂医学、Vol. 52, p.477

5) 奈良武司・鈴木重雄・野口芳江・牧内貴志・青木孝 (2006): *Trypanosoma cruzi* におけるピリミジン生合成第 4 酵素 DHOD の遺伝的多様性。日本熱帯医学会、長崎市、2006 年 10 月

6) Iizumi K, Mikami Y, Hashimoto M, Nara T, Hara Y, Aoki T (2006): Novel ouabain-insensitive Na<sup>+</sup>-ATPase in *Trypanosoma cruzi* cell membranes. The Twelfth Chorea-Japan Parasitologist's Seminar (Forum Cheju-12), 東京大学、2006 年 11 月、抄録集 p.15

7) Nara T, Suzuki S, Noguchi Y, Makiuchi T, Annoura T, Aoki T (2006): Genetic diversity of dihydroorotate dehydrogenase in *Trypanosoma cruzi*. The Twelfth Chorea-Japan Parasitologist's Seminar (Forum Cheju-12), 東京大学、2006 年 11 月、抄録集 p.16

8) 鳴原貴子・橋本宗明・進藤典子・青木孝 (2006): 細胞内寄生を可能にする遺伝子(群)の解析: *Trypanosoma cruzi* 感染細胞のトランスクリプトーム解析。日本分子生物学会フォーラム 2006、名古屋市、2006 年 12 月

9) 牧内貴志・奈良武司・案浦健・橋本哲男・青木孝 (2006): トリパノソーマ類に特異的なピリミジン生合成第 4 遺伝子および第 6-第 5 融合遺伝子の分子進化: 近縁生物群 diplomids の第 4、第 5、第 6 酵素遺伝子の解析。日本分子生物学会フォーラム 2006、名古屋市、2006 年 12 月

H. 知的財産権など なし

分担研究報告書

エキノкокスの増殖・分化の分子基盤と治療薬の開発

分担研究者 片倉 賢 北海道大学大学院獣医学研究科教授

研究要旨

エキノкокスの増殖・分化に関する基盤的研究をエキノкокス症の新規治療薬開発に結びつけることを目的として、エキノкокス原頭節からミトコンドリアを単離し呼吸鎖を解析した。その結果、原頭節由来ミトコンドリアは高い NADH-フマル酸還元活性を示し、キノンの大部分がロドキノンであったことから、原頭節が宿主体内の嫌気的環境における生存に適応した独自のミトコンドリア呼吸鎖を利用していることが示された。また、キナゾリン（8-OH 誘導体）は、この NADH-フマル酸還元活性を選択的に阻害し、培養原頭節に対して高い殺滅効果を示した。以上より、エキノкокスのミトコンドリア呼吸鎖はエキノкокス症に対する選択的薬療法の標的となりうることを、そして、キナゾリンが新規治療薬開発におけるリード化合物として有望であることが示唆された。

A. 研究目的

エキノкокス（多包条虫）は北海道のほぼ全域に蔓延し、その幼虫（多包虫）は人体に致死的な疾患（エキノкокス症）をもたらしている。エキノкокス症の根治薬は未だ開発されておらず、その研究・開発は急務である。

ミトコンドリアは細胞のエネルギー転換反応において中心的役割を果たすオルガネラであるが、寄生虫は宿主とは異なる特性を示すミトコンドリアを保持し、独自のエネルギー代謝系を用いて環境に適応していることが、豚回虫などで明らかにされている。すなわち、寄生虫の種類によっては、宿主体内の酸素を利用せずに、基質レベルおよび酸化的リン酸化以外の系を用いてエネルギーを産生するものが存在する。このように寄生虫が独自に持つ嫌気的なミトコンドリア呼吸鎖に関わる酵素群は、選択的な薬療法の標的としても有望であると考えられる。

本研究は、エキノкокスの増殖・分化の分子基盤として各発育期のエキノкокスが持つミトコンドリア呼吸鎖の特性を明らかにし、選択性の高い新しいエキノкокス症治療薬を探査することを目的として行われた。

B. 研究方法

エキノкокス幼虫を実験感染させたコットラットから虫体シスト（根室株）を摘出し、シスト内に含まれる原頭節を分離した。原頭節は洗浄したのち、ガラス-ガラスホモジナイザーを用いて破碎し、遠心分画法によりミトコンドリアを単離した。得られたミトコンドリアを材

料として、ミトコンドリア呼吸鎖の主要な酵素の活性を測定した。具体的には、嫌気的呼吸鎖および好氣的呼吸鎖の中心を担う酵素活性として NADH-フマル酸還元活性および NADH-酸素還元活性をそれぞれ測定し、ミトコンドリア呼吸鎖を構成する種々の酵素複合体の酵素活性をそれぞれ個別に測定した。すなわち、測定用キュベット内で原頭節由来ミトコンドリアと各種反応基質を反応させ、指標となる化合物濃度の変化を分光光度計で経時的に測定した。

また、ミトコンドリア呼吸鎖における低分子電子運搬体として機能するキノン分子種の組成を、HPLC 分析法および質量分析法により解析した。

次に、原頭節由来ミトコンドリア呼吸鎖の主要な活性に対する阻害剤を探査した。ここでは、NADH-フマル酸還元活性に対する阻害効果を指標として、種々の化合物による阻害活性を評価した。候補化合物として、ブタ回虫由来ミトコンドリアの酵素複合体 I に対する阻害剤として報告されているキナゾリンおよびその誘導体（Yamashita *et al.* 2004）を中心に検討した。

原頭節ミトコンドリアの主要な活性に対して高い阻害効果を示す化合物については、培養原頭節に対する殺滅効果を評価した。ここでは、5 $\mu$ M および 50 $\mu$ M の濃度で被検化合物を添加した培地中で原頭節を培養し、経時的に生存率を算出した。虫体の生死判定は、トリパンブルー染色による染色性の有無によって行った。

### C. 研究結果・考察

1. エキノコックス原頭節ミトコンドリアの単離にあたり、ブタ回虫虫体からのミトコンドリア単離法を改変することにより、新しい方法を確立した。得られたミトコンドリアについて、呼吸鎖に関与する種々の酵素活性を測定した結果、一般に嫌氣的呼吸鎖の中心を担うと考えられている NADH-フマル酸還元活性が主要な活性として検出された。さらに、原頭節由来ミトコンドリアに含まれるキノンの大部分は、ロドキノンであることが明らかとなった。ロドキノンは、他の真核細胞生物の嫌氣的呼吸鎖において電子伝達体として利用される脂溶性の低分子である。また、原頭節由来ミトコンドリアの酵素複合体 I は、ユビキノンと比較してロドキノンに対してより高い反応選択性を示すこと、酵素複合体 II は、嫌氣的呼吸鎖の一部であるロドキノール-フマル酸還元酵素として有利に機能することが、酵素学的解析により明らかとなった。これらの結果は、原頭節由来のミトコンドリア呼吸鎖が、主に嫌氣的呼吸鎖として機能していることを示す。つまり、エキノコックス原頭節は、ヒトとは異なる独自のエネルギー代謝システムに依存していることが示唆された。

2. エキノコックス原頭節の嫌氣的ミトコンドリア呼吸鎖の主要な活性である NADH-フマル酸還元活性に対して高い阻害効果を示し、かつ宿主哺乳類ミトコンドリアに対する阻害効果の低い化合物を探索した結果、キナゾリンの 8-OH 誘導体が、比較的選択性の高い化合物として見いだされた。原頭節ミトコンドリアの NADH-フマル酸還元活性（嫌氣的）およびウシ心筋ミトコンドリアの NADH-酸素還元活性（好氣的）に対する  $IC_{50}$  は、それぞれ 72nM および 180nM であった。次に、キナゾリン（8-OH 誘導体）による原頭節殺滅効果を検討した。その結果、溶媒のみ添加の対照群虫体は培養 10 日目においても 90% 以上の高い生存率を維持したのに対して、50 $\mu$ M キナゾリン（8-OH 誘導体）処理原頭節は、処理 3 日目から急激に死滅するようになり、処理 5 日目には全滅した。この抗原頭節効果は、農薬として使われているロテノンによる効果と同程度の高いものであった。

### D. 結論

1. エキノコックス原頭節由来ミトコンドリアの特性を解析した結果、NADH-フマル酸還元活性が高い活性を示すとともに、含有キノンのほとんどがロドキノンであることが明らかとなった。これらの結果から、エキノコックス原頭節

は宿主体内の嫌氣的環境に適応した独自のミトコンドリア呼吸鎖を利用しており、エキノコックスの分化・増殖において嫌氣的呼吸鎖が重要な役割を果たしていることが示唆された。

2. 原頭節由来ミトコンドリアの主要な酵素活性である NADH-フマル酸還元活性に対して比較的选择性の高い阻害剤として、キナゾリン（8-OH 誘導体）を見いだした。この化合物は、培養原頭節に対しても高い殺滅効果を示し、その効果は、呼吸鎖を標的とする農薬であるロテノンとほぼ同程度であった。これらの結果から、エキノコックスの嫌氣的ミトコンドリア呼吸鎖は、エキノコックス症に対する選択的薬療法の新たな標的として有望であることが示唆された。

### E. 研究発表

#### 1. 学会発表

1) 松本 淳, 坂元君年, 新庄記子, 城戸康年, 山本菜緒, 北 潔, 三芳秀人, 八木欣平, 野中成晃, 片倉賢, 奥 祐三郎. 多包条虫原頭節ミトコンドリア呼吸鎖の特性解析. 第 75 回日本寄生虫学会, 2006 年 5 月 (弘前).

2) 松本 淳, 坂元君年, 新庄記子, 城戸康年, 北 潔, 三芳秀人, 八木欣平, 野中成晃, 片倉 賢, 奥 祐三郎: 多包条虫原頭節のミトコンドリア呼吸鎖の特性. 第 53 回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会北日本支部合同大会, 2006 年 10 月 (帯広).

3) 山本菜緒, 松本 淳, 坂元君年, 北 潔, 三芳秀人, 八木欣平, 野中成晃, 片倉 賢, 奥 祐三郎: 多包条虫に対するミトコンドリア呼吸鎖阻害剤の効果. 第 53 回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会北日本支部合同大会, 2006 年 10 月 (帯広).

4) Matsumoto J, Sakamoto K, Shinjyo N, Kido Y, Kita K, Yagi K, Miyoshi H, Yamamoto N, Nonaka N, Oku Y, Katakura K: Anaerobic NADH-fumarate reductase system is predominant in the respiratory chain of *Echinococcus multilocularis* protoscoleces, providing a novel drug target. Japan-United States Cooperative Medical Science Program, Parasitic Diseases Panel 41st Annual Meeting. February 2-3, 2007, Tokyo, Japan.

### F. 研究協力者

奥祐三郎, 野中成晃, 松本淳, 山本菜緒, 水上智秋 (北海道大学大学院・獣医学研究科・寄生虫学教室); 北 潔, 坂元君年, 新庄記子, 城戸康年 (東京大学大学院・医学系研究科・生物医学化学教室); 三芳秀人 (京都大学大学院・農学研究科・応用生命科学専攻); 八木欣平 (北海道立衛生研究所)



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

住血原虫症の免疫学

分担研究 研究者 五十嵐郁男 帯広畜産大学 教授

研究要旨

動物並びに人獣共通感染症としても重要なバベシア症に関して、バベシア原虫の赤血球への侵入・増殖機構、診断法の開発について検討を行った。その結果、バベシア原虫の赤血球への侵入には、カルシウムイオン、プロテインキナーゼが関与している事が明らかとなった。また、イムノクロマト法や LAMP 法などの血清学のおよび遺伝子診断法の開発が行われた。

A. 研究目的

赤血球寄生原虫であるバベシアはダニの媒介により動物に感染し、発熱、貧血、黄疸などの症状を引き起こし、世界的に甚大な経済的な被害を与えている。また、人に感染するバベシア原虫も報告されている。しかし、バベシア原虫の分子レベルでの赤血球への侵入、赤血球内での原虫の増殖のメカニズムなど不明な点が多く、また有効な治療・予防法や診断法の開発も遅れている。そこで、本研究ではバベシア原虫の侵入機構や新たな診断法の開発を目的とした。

B. 研究方法

(1) バベシア原虫の侵入・増殖機構の解析

ウシバベシア原虫 *B. bovis* の in vitro 培養にプロテインキナーゼ阻害剤を加えてバベシア原虫の増殖に対する影響を検討した。また、ウマバベシア原虫 *B. caballi* と *B. equi* の in vitro 培養系にカルシウムキレート剤を添加し、バベシア原虫の増殖に対する影響を検討した。

(2) バベシア症に対する診断法の検討

ウマバベシア原虫 *B. caballi* と *B. equi* の組み換え抗原を用いてイムノクロマト法の検討を行った。また、ウマバベシア原虫に対する新規の遺伝子診断である

LAMP 法について検討した。

C. 研究結果

(1) バベシア原虫の侵入機構、増殖機構の解析

ウシバベシア原虫 *B. bovis* の in vitro 培養系で、にプロテインキナーゼ阻害剤 (staurosporine, Ro-31-7549, and KN-93) を加えてバベシア原虫の増殖に対する影響を検討したところ、staurosporine が一番高い増殖抑制効果を示した。また、赤血球外の原虫数増加も認められた。次にウマバベシア原虫 *B. caballi* と *B. equi* の in vitro 培養系にカルシウムキレート剤 (EGTA) を添加すると、両バベシア原虫の増殖が阻害された。また、カルシウムイオンを追加すると、増殖抑制効果は失われた。

(2) バベシア症に対する診断法の検討

ウマバベシアの *B. caballi* の Bc48 抗原と *B. equi* の EMA-2 抗原の組換え蛋白質を用いて、両原虫に対する抗体を同時に検出可能なイムノクロマト法を開発した。また、*B. caballi* と *B. equi* を一つの温度設定で遺伝子の増幅が可能な LAMP 法が開発され、PCR 法と同等の感度が得られた。

#### D. 考察

プロテインキナーゼ阻害剤である、staurosporine は *B. bovis* に対する一番高い増殖抑制効果を示し、赤血球外の原虫数増加も認められた。また、KN-93 は赤血球内の原虫発育を抑制することが認められた。ウマバベシア原虫の培養系にカルシウムキレート剤 (EGTA) を加えると、原虫増殖阻害効果が認められた。また、赤血球外の原虫数の増加がみとめられたことにより、カルシウムイオンは原虫の赤血球への侵入時に必要であることが明らかになった。これらの結果は、バベシア原虫の赤血球への侵入、赤血球内増殖に関する新たな知見を与えた。

また、ウマバベシア原虫に対す抗体を同時に検出可能なイムノクロマト法と、新たな迅速遺伝子診断法である LAMP 法が開発された、これらの方法は、これまでの血清診断法や遺伝子診断法に同等以上の感度を有しており、高額で精密な機材を必要としない実用的な技術であり、今後益々必要と予想される正確で迅速な診断に役立つものと期待される。

#### E. 結論

バベシアの赤血球への侵入に関する新たな知見や、新規の血清学および遺伝子診断法の開発は、バベシア症の新たな治療や診断法の実用化に貢献するものと期待される。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Erythrocyte invasion by *Babesia* parasites: Current advances in the elucidation of the molecular interactions between the protozoan ligands and host receptors in the invasion stage. *Vet. Parasitol.* 138:22-32. 2006
2. Immunochromatographic Test for the simultaneous serodiagnosis of *Babesia caballi* and *B. equi* Infections

*caballi* and *B. equi* Infections in horses. *Clin Vaccine Immunol.* 13:553-5554. 2006.

3. Effects of protein kinase inhibitors on the in vitro growth of *Babesia bovis*. *Parasitology.* 24;1-5.2006.
4. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays with recombinant antigens for the serodiagnosis of equine *Babesia* infections. *Vet. Parasitol.* 140:158-161. 2006.
5. Calcium-ion is involved in erythrocyte invasion by equine *Babesia* parasites. *Parasitology.* 133:289-294. 2006.
6. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for diagnosis of equine piroplasmosis. *Vet Parasitol.* 143:155-160. 2007..

##### 2. 学会発表

1. 原虫感染症に対するオリゴマンノース糖鎖リポソームワクチンの評価、横山直明ほか7名、横山直明ほか6名、第75回日本寄生虫学会、2006年5月、弘前
2. A cysteine protease inhibitor(cystatin) from *hemaphysalis longicornis* is involved in tick innate immunity. J. Zhou 他4名、第75回日本寄生虫学会、2006年5月、弘前
3. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for diagnosis of equine piroplasmosis. A. Alhassan ほか11名。第11回世界寄生虫学会、2006年8月、グラスゴー。
4. Cyclin-dependent protein kinase 阻害剤による *Babesia bovis* の増殖抑制効果  
中村一哉ほか2名、第142回日本獣医学会、平成18年9月、山口

- 5.LAMP(Loop-mediated isothermal amplification) 法を用いたウシバベシア症の簡易迅速遺伝子診断法の開発。井関博ほか 4 名、第 142 回日本獣医学会，平成 18 年 9 月、山口
- 6.Development of immunochromatographic test for serodiagnosis of bovine babesiosis。C. Kim ほか 5 名、第 142 回日本獣医学会，平成 18 年 9 月、山口
- 7.抑制性 T 細胞消失マウスにおける住血性原虫の感染病態について。横山直明ほか 7 名、第 142 回日本獣医学会，平成 18 年 9 月、山口

厚生労働科学研究費補助金（国際井垣協力研究事業）

寄生虫の宿主適応機構の分子情報解明に基づく新しい治療戦略開発及びその  
寄生虫対策への応用に関する研究

分担研究報告

クリプトスポリジウム症の水系集団感染調査における検査体制と情報の活用について

分担研究者 遠藤卓郎 国立感染症研究所 寄生動物部  
協力研究者 泉山信司 国立感染症研究所 寄生動物部

概要： 通常の食中毒検査では当該原虫を含めて寄生虫検査が行なわれていない。しかしながら、世界の趨勢から下痢症において病原体検索に腸管寄生性原虫類を加える必要性が増している。そこで、わが国最初の水泳プールを介した集団感染の調査から、検査体制や疫学調査方法について考察した。

当該事例は事前にクリプトスポリジウムに感染した児童が水泳合宿に参加し、宿泊施設のプール並びに体育館の一部を汚染したもので、多くの自治体を跨いで患者が発生した。そのため、関係自治体間の協力が必須であったが、長野県を中心に統括できた。集団感染事例等における疫学調査では、事前に得られる情報が結果を左右する。当該事例では、患者検体を扱った病院検査科の職員のいわば直感的な洞察により、極めて早い段階でクリプトスポリジウムが疑われたことがその後の原因究明に大きく貢献した。患者の発生動向から暴露の形態（単一暴露か、連続した暴露か）、暴露日の推定および、汚染場所が推定された。また、遺伝子解析による種並びに遺伝子型の特特定が後の疫学調査の範囲を限定する上で有用で、今後の疫学調査には必須の資料となると考えられた。以上、検査室情報を活用することで後の疫学調査が極めて迅速・効果的に推移することが示された典型例となった。

A. 研究目的

クリプトスポリジウムは孢子虫類に属する原虫で、ヒトには主に *Cryptosporidium parvum* の bovine genotype 及び human genotype (syn *Cryptosporidium hominis*) が寄生する。クリプトスポリジウムは単一の宿主内で無性生殖および有性生殖からなる生活環を完結させる。有性生殖によりオーシストが産生され、患者（患畜）の糞便

中に多量に排出される。オーシストは塩素消毒などに対して耐性で、水泳プールや水道水を介した集団感染が問題となる。当該研究ではわが国最初の水泳プールを介した集団感染の調査から、検査体制や疫学調査方法について考察した。

B. 研究方法

2004年8月末に長野県の宿泊施設で発

生したクリプトスポリジウム症の集団感染に係る調査の経緯を整理し、疫学調査の要点をまとめた。あわせて、当該事例に関与した各機関からの複数の報告書を参照した。

本事例は長野県北信保健所管内のプール、体育館等の運動施設を持つ宿泊施設の利用客 288 名が下痢等の消化器症状を呈したもので、同年 9 月 1 日に長野県衛生部食品環境課から関係自治体に食中毒の疑いとして調査依頼が出され、検便に応じた患者からはクリプトスポリジウムのオーシストが検出された。

当該調査においては患者の発生状況調査、水飲料水検査、検便、クリプトスポリジウム分離株の遺伝子型別、現場における聞き取り調査、現場における検体採取等が同時並行的に実行された。

#### 微生物学的検査

発症者便、調理従事者便、Z 宿泊施設で調理した食品を対象に、常法により食中毒原因細菌およびノロウイルスの分離を試みた。細菌学的検査においては、必要に応じて増菌培養を併用し、選択培地による分離培養を行い、平板上の疑わしい集落を生化学的性状ならびに市販抗血清による同定を行った。

#### クリプトスポリジウム

顕微鏡観察： 調理従事者ならびに、発症者の検便については発症者の居住地を管轄する自治体に検査を依頼した。また、便は埼玉県衛生研究所に検査を依頼した。便中の原虫検索は遠心沈殿法、密度勾配遠心浮遊法、ならびに免疫磁気ビーズ法を併用してオーシストを分離・精製し、蛍光抗体法および微分干渉顕微鏡による観察を行った。

宿泊施設の水道水、施設の調理室で製氷した氷、および井戸の原水を対象とした検査は水道におけるクリプトスポリジウム暫定対策指針に準拠した。

プールのろ過砂上の凝集沈殿物、プール排水溝沈殿物、浴場へアーキチャー内残渣、プールに隣接した池の底泥、下痢便に汚染された体育館手洗い場の床材および同場所の清掃に用いたタオルからのオーシス

トの分離は、攪拌・洗浄により得られた洗浄液を対象に遠心沈殿法、密度勾配遠心浮遊法ならびに免疫磁気ビーズ法を併用した。プールのろ過砂上の凝集沈殿物は塩酸あるいは硫酸酸性下で沈殿物を溶解し、その上清を用いて遠心沈殿法、免疫磁気ビーズ法により分離した。

糞便汚染の確認された足拭きマットに関しては、汚染箇所 (15cm×15cm) を 0.1% Tween80 加 PBS に浸し、薬匙でマット表側の植毛部分から内層までを強く拭き洗いをし、洗浄液を回収した。次いで、細切したマットを 5 分間のストマッカー処理を行い、洗浄液を回収した。それぞれの回収液をを試料として、上述の方法によりオーシストの分離を行った。

得られた精製物を蛍光抗体法、および微分干渉顕微鏡によりオーシストの確認を行った。

遺伝子解析： 各患者グループから得られたクリプトスポリジウム臨床分離株および環境由来株を用いて遺伝子解析を行った。DNA stool mini kit (Qiagen) を用いて DNA を抽出し、これを鋳型としてポリスレオン遺伝子の一部領域 (Poly-T 領域) ならびに 18S rRNA を標的とした PCR を行い、予定された断片長の PCR 産物を得た。すなわち、Poly-T 領域を標的とした PCR では約 520bp の PCR 増幅産物を得た。18S rRNA 遺伝子の増幅は Xiao et al. (1999) の方法に従い Nested PCR を行なった。すなわち、一次反応には約 1.3kbp を増幅領域とし、二次反応には一次反応液を鋳型とし、約 840bp の PCR 増幅産物を得た。得られた PCR 産物より BigDye Terminator Cycle Sequencing kit V1.1 ならびに ABI Prism 310 Genetic Analyzer

(Applied Biosystems) を用いて直接塩基配列決定を行なった。

#### 倫理面への配慮

当該研究所に搬送された患者由来の検査試料は患者を所轄する県並びに市等の担当部局により分離されたクリプトスポリジウムオーシストで、疫学調査の基礎資料とすべく遺伝子型別を公的に依頼されたものに

限られた。それらの試料は全て無記名で患者に関する個人情報を含まない形で搬入された。なお、いずれの検査試料も所轄において検査の目的を説明し、患者の了解を得て採取したもので、個人情報等に関しては各機関で適正に管理された。

### C. 研究結果 経緯

2004（平成16）年8月31日に「8月20日～24日の間、長野県の宿泊施設で水泳合宿をしたAスポーツで下痢等の患者が多数発生した。」との情報が長野県北信保健所に寄せられた。これを受けて、長野県衛生部の統括のもとで関係自治体により利用者の健康状態並びに発症状況、喫食状況および行動調査、施設従事者の健康状態および喫食状況、調理施設、給水施設、客室および共同浴場調査、微生物学的検査が進められた。9月2日には千葉県およびさいたま市の発症者便からクリプトスポリジウムのオーシストが検出された。クリプトスポリジウム検出のきっかけは担当した病院検査課のアドバイスによるもので、本人はオーシストを確認できなかったものの疑いが強いことを適切に指摘したことによる。このアドバイスを機に、確認作業が行なわれた結果速やかに患者検体からのオーシスト検出がなされた。また、宿泊施設での飲料水を中心としたクリプトスポリジウムの検査が実施された。また、得られた情報を参照しつつ、9月7日～8日には厚生労働省水道水質管理室を中心とした調査団が来県し長野県との合同調査がなされた。

### 検査結果

1. 患者の発生動向調査によると、本件の患者発生は8月27日をピークとした一峰性の分布をしており、短一暴露患者の発症日の発生動向と極めてよく一致した（図1）。これより、本件の患者は全て同一日に暴露されたものと推測され、その暴露日は8月21日と推定された。
2. 通常の食中毒調査で対象となる、ウイルス及び細菌類は検出されなかった。
3. 宿泊施設の従業員、ならびに近隣地域

において患者の発生が見られないことが確認された。

4. 関係自治体による検査結果から、水泳プールの利用者の84%が下痢症に罹患したことが明らかとなった。
5. プールの使用歴のない、他の3グループにおいて下痢症患者の発生が見られた。これらのグループはいずれもプールに隣接する体育館の利用者であった。
6. 検便に応じた74名全てにおいてクリプトスポリジウムのオーシストが検出された。
7. 千葉県、千葉県、埼玉県、ならびにさいたま市から送付された計33株の患者分離株の遺伝子解析の結果、全てが*C. parvum human genotype (syn C. hominis)*であることが確認された（図2）。
8. 宿泊施設の飲料水調査結果ではクリプトスポリジウムが検出されなかった。

以上の検査結果を基礎資料とし、原因究明に向けた調査が行われた。その結果、以下のことが明らかとなった。

1. 8月21日前後を中心に従業員の聞き取り調査を行い、8月21日に水泳プールに隣接する体育館のトイレ付近の廊下で糞便の失禁事故があったことを確認した。
2. 環境試料として採取した、水泳プールろ過装置のろ過物、失禁場所のカーペット、処理に用いた雑巾からオーシストが検出され、カーペット由来のオーシストが*C. parvum human genotype (syn C. hominis)*であることが確認された（図2a、b）。
3. プールの使用歴のない、3グループはいずれもトイレ前の流しを使用し、自前でスポーツドリンクを調整、飲用していた。
4. 千葉県において感染児童を介して2ヶ所の水泳プールでクリプトスポリジウム症の集団感染が続発した。しかしながら、速やかな措置により、被害は最小限に抑えられた。

以上のことから、当該事例は事前にクリプ

トスポリジウムに感染した児童が水泳合宿に参加し、宿泊施設のプール並びに体育館の一部を汚染したものと考えられた。当該調査を通じて、検査室データの迅速な集積が後の疫学調査に極めて有効に機能することが証明されたものと考えられる。すなわち、患者の発生動向から暴露の形態（単一暴露か、連続した暴露か）、暴露日の推定および、汚染場所の推定が可能となった。遺伝子解析からクリプトスポリジウムの種が特定されたことで、家畜との関連施設を調査対象から削除するなど調査範囲を限定することができた。また、千葉県内での二次的なプールの汚染から新たな集団感染が発生したが、短時間で把握し、対策が講じられた点も評価できる。

#### D. 考察

集団感染事例等における疫学調査では、事前に得られる情報が結果を左右する。当該事例では、患者検体を扱った病院検査科の職員のいわば直感的な洞察により、極めて早い段階でクリプトスポリジウムが疑われたことがその後の原因究明に大きく貢献した。また、遺伝子解析による分離株の種ならびに遺伝子型の同定は、疫学調査の範囲の絞り込み、ひいては汚染源調査に大きく貢献することが実証された。クリプトスポリジウム症では潜伏期に関する資料が存在し、当該事例において有効活用されたこと、遺伝子解析により疫学調査範囲が狭められたこと、発生動向調査の解析により推定暴露日があらかじめ絞られていたこと、体育館での失禁事故という記憶にのこるイベントが発生していたことも結果的に原因究明に貢献した。

近年では広域集団感染が頻発しており、病原体の遺伝子情報（種、遺伝子型）が必須の情報となっている。今回の事例も広域集団感染であるが、調査の初期段階で単一

の汚染源であることが明らかにされ、関係自治体間の調査協力が良好に構築された。関連自治体による統制の取れた調査協力がなされ、原因究明に大きく寄与したと判断される。

通常の食中毒検査では当該原虫を含めて寄生虫検査が行われていないのが現実であるが、当該事例を教訓として食中毒検査には腸管原虫症を対象とすることの重要性を付記する。

#### E. 結論

当該事例では調査の初期段階でクリプトスポリジウムの感染が示唆されたこと、クリプトスポリジウムの関する基礎情報が充実しつつあること、広域集団感染において、遺伝子解析情報がそれらが同一の汚染源であることを示し、汚染源調査に活用されたこと、また、関連自治体間で良好な協力体制が速やかに構築されたことなど、多くの面で今後の疫学調査の体制作りの参考となったと考える。地方衛生研究所において微生物担当の専門家の数が限られ、寄生虫関連の専門家の配属が望めない状況にある。その中であって、国を含め、自治体間あるいは衛生研究所間での協力体制の重要性が確認された事例となった。

#### F. 研究発表

1. 遠藤卓郎、泉山信司、八木田健司。2007。水泳プールを介したクリプトスポリジウム症感染。科学療法の領域（印刷中）
2. Jongwutiwes S., Iwasaki T. & Endo T. 2007. Morphologic and molecular characterization of *Isospora belli* oocysts from patients in Thailand. *Am Trop Med Hyg.*, (Accepted).

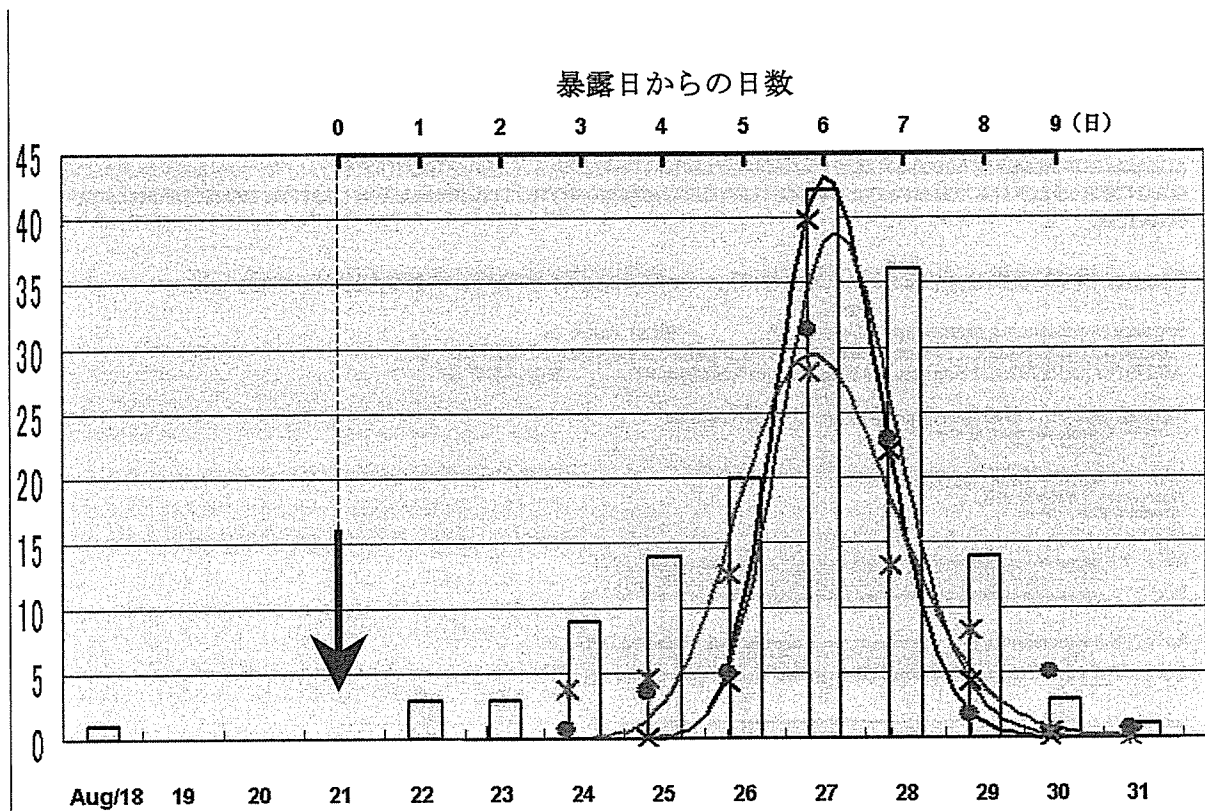


図 1. 患者発生動向

クリプトスポリジウムの潜伏期は 3 から 9 日で、中央値は 6 日である。当該事例において、プール利用者における下痢症の発症状況（棒グラフ）に短一暴露した場合の患者発生動向（潜伏期曲線）を重ねると、その分布が良く一致する。このことから、当該事例における暴露は単一であったことが指摘される。さらに、曲線から暴露日は 8 月 21 日と推定される。



## 図2 塩基配列情報

a : Poly-T 配列 (480bp)

```
CAACAACCTAAAAACCGACAACAACAACAACAAGGTTCCAGGCAAGCCCAATAGCCACAACAACGAACATTGAAGCCAATAGTTACAACAACAACAACAAGCAACA
ACAACAACAACAACAAGTCCACAACAACAACAACAATAAGAGAGACGAAATGACAACAACAACAACACCATTACCTGATATCGGTGACATTGAAATTACACCAATCCCA
ATTGAAAAGATGTTGGATAAGTATACAAGAATGATTATGACTATAACAGTGGTTTATTATTAGACTCTAATGATGAACCAATCCAGGTTCTCAAGCAGGACAAATAGCTGATACAA
GCAATTATTCCCAACTCAAACCTACAAGAGTACTGGTTTACCAATTGATCCAATGGTTGGTCTCCATTGATCAAATCAGGTAATTTAGTACATCCATATACCAATCAACAATG
TCTGGTTTAT
```

Blastn 検索結果上位は以下の通りで、一位の配列と 99% (479/480) 一致した。

```

                Score E
Sequences producing significant alignments: (bits) Value N
AB126002 | AB126002.1 Cryptosporidium parvum gene for polythre... 942 0.0 4
AR279261 | AR279261.1 Sequence 4 from patent US 6514697. 563 e-177 6

```

```
>AB126002|AB126002.1 Cryptosporidium parvum gene for polythreonine
protein, partial cds.
Length = 479
```

```
Score = 942 bits (475), Expect = 0.0
Identities = 478/479 (99%)
Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 2 aacaactcaaaaaccgacaacaacaacaacaagaagttccaggcaagccaccaatagc 61
|||||
Sbjct: 1 aacaactcaaaaaccgacaacaacaacaacaagaagttccaggcaagccaccaatagc 60
```

```
Query: 62 cacaacaacgacacattgaagccaatggttacaacaacaacaacaagaagcaacaacaac 121
|||||
Sbjct: 61 cacaacaacgacacattgaagccaatggttacaacaacaacaacaagaagcaacaacaac 120
```

```
Query: 122 aacaacaacaacagtgccaacaacaacaacaactactaagagagacgaaatgacaacaac 181
|||||
Sbjct: 121 aacaacaacaacagtgccaacaacaacaacaactactaagagagacgaaatgacaacaac 180
```

```
Query: 182 aacaacaccaccattacactgatctggtagcattgaaattacaaccaatccaattgaaaa 241
|||||
Sbjct: 181 aacaacaccaccattacactgatctggtagcattgaaattacaaccaatccaattgaaaa 240
```

```
Query: 242 gatgttgataagtatacaagaatgatttactataacagtggtttattattagactc 301
|||||
Sbjct: 241 gatgttgataagtatacaagaatgatttactataacagtggtttattattagactc 300
```

```
Query: 302 taatgatgaaccaattocaggttctcaagcaggacaaatagctgatacaagcaattatt 361
|||||
Sbjct: 301 taatgatgaaccaattocaggttctcaagcaggacaaatagctgatacaagcaattatt 360
```

```
Query: 362 cccaactcaaaactcaagagtaactggtttaccaattgacaaatggttgcttccatt 421
|||||
Sbjct: 361 cccaactcaaaactcaagagtaactggtttaccaattgacaaatggttgcttccatt 420
```

```
Query: 422 tgatccaaaatcaggtaatttagtacctccatataccaatcaacaatgcttggtttat 480
|||||
Sbjct: 421 tgatccaaaatcaggtaatttagtacctccatataccaatcaacaatgcttggtttat 479
```

b : 18S rRNA 配列 (775bp)

```
ATATAATTGGTGACTCATAATACTTTACGGATCACAATTAATGTGACATATCATTCAAGTTCTGACCTCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCTACCGTGCAATGACGGGTAA
CGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGTACCACATCTAAGGAAGCGAGCAGGCGCGCAAATTAACCAATCCTAATACAGGGAGGTAGTGAACAAGAAATA
ACAATACAGGACTTTTTGGTTTTGTAATTGGAATGAGTAAAGTATAAACCCCTTACAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCG
TATATTAAGTTGTTGCAGTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTAATAATTTATATAAAATATTTTGATGAATATTTATATAATTAACATAATTCATATTACTATTTTTTTTT
TAGTATATGAAATTTACTTTGAGAAAATAGAGTCTAAAGCAGGCATATGCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATATAAGATTTTTATCTTTTATTGGTTCTAAGATAAG
AATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGCATTGTATTAAACAGTCAGAGGTGAAATCTTAGATTGTTAAAGACAAACTAATGCGAAAGCATTGCCAAGGATGTTTTCTAAT
CAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCTAGTCTTAACATAAACTATGCCA
```

Blastn 検索結果上位は以下の通りで完全一致 (775/775) した。

```
Score E
Sequences producing significant alignments: (bits) Value N
L16997|L16997.1 Cryptosporidium parvum 18S ribosomal RNA gen... 1536 0.0 1
AJ493536|AJ493536.1 Cryptosporidium parvum partial 18S rRNA... 1536 0.0 1
```

```
>L16997|L16997.1 Cryptosporidium parvum 18S ribosomal RNA gene.
complete.
Length = 1750
```

```
Score = 1536 bits (775), Expect = 0.0
Identities = 775/775 (100%)
Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1 atataattggtgactcataataactttaacggatcacaataatgtgacatatacattcaag 60
Sbjct: 224 atataattggtgactcataataactttaacggatcacaataatgtgacatatacattcaag 283
```

```
Query: 61 tttctgacctatcagctttagacggtagggtattggcctaccgtggcaatgacgggtaac 120
Sbjct: 284 tttctgacctatcagctttagacggtagggtattggcctaccgtggcaatgacgggtaac 343
```

```
Query: 121 ggggaattagggttcgattccggagagggagcctgagaaaogctaacacatctaaggaa 180
Sbjct: 344 ggggaattagggttcgattccggagagggagcctgagaaaogctaacacatctaaggaa 403
```

```
Query: 181 ggcagcaggcogcacaattaccocaaatcotaatacaggaggtagtgacaagaaatacaaa 240
Sbjct: 404 ggcagcaggcogcacaattaccocaaatcotaatacaggaggtagtgacaagaaatacaaa 463
```

```
Query: 241 tacaggactttttggtttgtaattggaatgagttaagtataaacccotttacaagtatc 300
Sbjct: 464 tacaggactttttggtttgtaattggaatgagttaagtataaacccotttacaagtatc 523
```

```
Query: 301 aattggaggcaagtctgggtccagcagcccggttaattccagctccaatagctatatt 360
Sbjct: 524 aattggaggcaagtctgggtccagcagcccggttaattccagctccaatagctatatt 583
```

```
Query: 361 aaagtgttgagcttaaaaagctcgtagttgattctgtaataattatataaaatat 420
Sbjct: 584 aaagtgttgagcttaaaaagctcgtagttgattctgtaataattatataaaatat 643
```

```
Query: 421 tttgatgaatatttataataataacataattcattactatttttttttagtata 480
Sbjct: 644 tttgatgaatatttataataataacataattcattactatttttttttagtata 703
```

```
Query: 481 tgaattttactttgagaaaattagagtgottaaagcagcatatgcottgaatactcca 540
Sbjct: 704 tgaattttactttgagaaaattagagtgottaaagcagcatatgcottgaatactcca 763
```

```
Query: 541 gcatggaataatattaagattttatctttttattggttotaagataagaataatgat 600
Sbjct: 764 gcatggaataatattaagattttatctttttattggttotaagataagaataatgat 823
```

```
Query: 601 taataggacagttggggcatttatttaacagtcagaggtgaaattcttagattgt 660
Sbjct: 824 taataggacagttggggcatttatttaacagtcagaggtgaaattcttagattgt 883
```

```
Query: 661 taagacaaactaatgcaagcatttccaaggatgttttcattaatcaagaacgaag 720
Sbjct: 884 taagacaaactaatgcaagcatttccaaggatgttttcattaatcaagaacgaag 943
```

```
Query: 721 ttaggggatogaagacatcagataccgtogtagtcttaaccataaactatgcaa 775
Sbjct: 944 ttaggggatogaagacatcagataccgtogtagtcttaaccataaactatgcaa 998
```

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

赤痢アメーバの分子疫学に関する研究

分担研究者 野崎 智義 群馬大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨 赤痢アメーバ症は腸管寄生性原虫症であり、開発途上国のみならず、本邦でも、知的障害者と男性同性愛者において流行を引き起こしている。本研究では赤痢アメーバ症の分子疫学研究に応用されるべき、多様性の高い遺伝子群として、赤痢アメーバの病原機構において重要な役割を果たす SNARE タンパク質群をゲノム情報をもとに網羅的に同定した。更に今後の遺伝子多様性の解析に供するために注釈付けを行った。

## A. 研究目的

赤痢アメーバ症は熱帯・亜熱帯の開発途上国を中心として世界の1%が感染する重要な感染症である。同時に、先進国である我が国においても、知的障害者および男性同性愛者において重度の感染浸淫を引き起こしている。赤痢アメーバの全ゲノムの解読(Lofus Nature 2005)により HM1 標準株における全遺伝子・タンパク質が明らかになり、赤痢アメーバ原虫の寄生ならびに病原性の分子機構が次第に明らかになって来た。一方ゲノムの解読終了後にも、アノテーションは不備であり、個々の研究者による注釈付けが不可欠であった。そこで我々は、本年度病原性因子放出と食食における小胞輸送の際に、重要な分子である SNARE(soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor receptor protein)の多様性をゲノム情報に整理した。

## B. 研究方法

### 1. 遺伝子の獲得

酵母およびヒトの既知の SNARE タンパク質を用いて TIGR の *Entamoeba histolytica* genome database から相同性を示す遺伝子をスクリーニングした。更に得られた配列は NCBI の non-redundant database に対して blastp 検索を行うとともに、SNARE タンパク質

特有のアルファヘリックス構造の保存性、膜貫通領域の保存性を確認した。

(倫理面への配慮) 本研究に関わる DNA 組換え実験の許可は当該研究機関にて得られている。

## C. 研究結果

### 1. 赤痢アメーバ株 SNARE タンパク質の遺伝的多様性

赤痢アメーバゲノムに 27 の SNARE が見つかった。このうち 17 は Q-SNARE(t-SNARE)であり、10 は R-SNARE(v-SNARE)であった。この多様性は酵母、ハエ、線虫とほぼ同程度であり、哺乳動物や植物の多様性より低かった。このうち他種生物との相同性から機能的なホモログと予想出来るのは Qa SNARE では Syntaxin1A-C, Syntaxin5, Syntaxin16 の 5 種類であった。また、Qb/Qc SNARE と分類されたものでは局在および機能は想像出来なかった。また R SNARE の分類される Vamp に関しても分類されたものでは局在および機能は想像出来なかった。アミノ酸同一性は 16-32%であり、低い同一性はこれらの SNARE が赤痢アメーバに特異的なタンパク質であることを示唆していた。

### 2. 赤痢アメーバ SNARE のタンパク

### 質配列上の特徴

赤痢アメーバにおける SNARE の特殊性の一つは SNAP25 のように 2 つの結合ヘリックス (Qb 及び Qc SNARE) をもつ分子が存在しなかった。以上のことは赤痢アメーバにおける SNARE に制御される膜融合の分子機構の特殊性を反映しているのかもしれない。

### 3. 赤痢アメーバ SNARE の注釈付け

系統解析とタンパクレベルでの同一性に基づき、これらの SNARE 遺伝子を分類し、命名した。詳細は、赤痢アメーバデータベース(pathema; <http://pathema.tigr.org/tigr-scripts/pathema/GenomeHomePage.cgi?genus=Entamoeba%20histolytica>)参照のこと。

### D. 考察及び結論

赤痢アメーバの感染者のうち、僅かに 5-10%のみが発症することはよく知られているが、その理由については原虫の病原性の多様性、宿主の免疫・感受性の多様性により説明されているが、それぞれの貢献度は不明である。本研究の結果が赤痢アメーバ原虫に存在する病原機構における必須分子の多様性に関する知見を与えた。さらに SNARE 遺伝子・タンパク質群に明瞭な名前と注釈が与えられたことは今後の病原機構の解明に重要であった。今後、以上のデータをもとに赤痢アメーバの病原メカニズムならびに病原機構に関わる分子の多様性に関しての研究を継続していく予定である。これらの研究成果は同時に赤痢アメーバの分子疫学的ツールを提供することができる。

### E. 健康危険情報

該当せず

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- i. C. Graham Clark, C.G., Cecilia, U., Alsmark, M., Hofer, M., Saito-Nakano, Y., Ali, V., Marion, S., Weber, C., Mukherjee, C., Bruchhaus, I., Tannich, E., Leippe, M., Sicheritz-Ponten, T., Foster, P. G., Samuelson, J., Noel, C. J., Hirt, R. P., Embley, T. M., Gilchrist, C. A., Mann, B. J., Singh, U., Ackers, J. P., Bhattacharya, S., Bhattacharya, A., Lohia, A., Guillen, N., Duchene, M., Nozaki, T., and Hall, N. (2007) Structure and Content of the *Entamoeba histolytica* Genome. *Adv. Parasitol.* in press.

#### 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  
該当せず。