

トキソプラズマの細胞侵入機構の解明

研究分担者 永宗喜三郎 筑波大学大学院生命環境科学研究科 助教

研究要旨

トキソプラズマ原虫が宿主細胞に侵入する際、宿主との接触部分において、宿主の膜貫通蛋白質の多くが排除され、GPI アンカー型蛋白質が選択的に寄生体胞膜内へ取り込まれるという現象があることが知られている。このことから、GPI アンカー又は GPI アンカー型蛋白質が、トキソプラズマ感染において重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

そこで、宿主 GPI アンカーがトキソプラズマ感染に及ぼす影響を調べるために、GPI アンカー生合成経路の初期のステップと、最後のステップ、すなわち完成したアンカーを蛋白質に転位するステップに関与する遺伝子（*PIG-L* 及び *GAAI*）に変異を有する2種類の変異 CHO 細胞（M2S2 及び *Gaal(-)*）における原虫に対する感受性を野生株と比較した。その結果、野生株に対して、*Gaal(-)* は約3倍、M2S2 は約2倍感受性が上昇した。また野生株と変異株では、原虫の付着侵入過程及び感染前期の増殖においては差が認められず、感染後期の増殖のみに差が認められた。このことから、宿主の GPI アンカーあるいは GPI アンカー型蛋白質が原虫の増殖のうち、後期の増殖のみを特異的に阻害している可能性が示唆された。

A. 研究目的

トキソプラズマ原虫が宿主細胞に侵入する際、宿主との接触部分において、宿主の膜貫通蛋白質の多くが排除され、GPIアンカー型蛋白質が選択的に寄生体胞膜内へ取り込まれるという現象があることが知られている。このことから、GPIアンカー又は GPI アンカー型蛋白質が、トキソプラズマ感染において重要な役割を果たしている可能性が考えられる。そこで本研究ではトキソプラズマ感染における宿主側 GPI アンカーの役割を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

GPIアンカーの生合成に関与する遺伝子に変異を有する2種類の変異 CHO 細胞（M2S2

及び *Gaal(-)*）に対する感染性を野生株と比較した。更に感染性の差を詳細に検討するため、野生株及びこれらの変異株における原虫の侵入能及び宿主細胞内における増殖を詳細に検討した。

（倫理面への配慮）

本研究は全て既に確立されていたハムスター由来培養細胞を用いて行っているため倫理面での問題はない。

C. 研究結果

まず、トキソプラズマ原虫を野生株及び変異株に加え、48時間培養後の原虫の増殖を測定した。その結果、2種類の変異株は、野生株と比較して有意に原虫に対する感受性が增大していた。そこで、この感受性の

上昇の原因を詳細に検討するため、野生株と2種類の変異株において、原虫の細胞侵入能を比較したところ、3種の細胞株間に有意な違いは認められなかった。続いて、原虫の宿主細胞侵入後の増殖の様子をより詳細に検討した。侵入後24時間まで、野生株および変異株内での原虫の増殖に有意な差は認められなかったが、24時間以降、トキソプラズマの増殖は変異株内において野生株に比較して優位に上昇していた。

D. 考察

以上の結果から、宿主側GPIはトキソプラズマ感染において阻害的に機能していることが示唆された。また、原虫の侵入に宿主側GPIの有無は影響しなかったことから、その阻害は、本来のGPIの存在部位である細胞表面ではなく、原虫が宿主細胞に侵入した後の増殖性に影響する可能性が考えられた。事実、宿主細胞侵入後の原虫の増殖を詳細に観察すると、侵入後24時間以降、すなわち増殖後期に有意な差が認められた。現在、このGPIによる原虫増殖阻害効果のより詳細なメカニズムを解析中である。

E. 結論

トキソプラズマ原虫感染において宿主細胞側GPIは感染に阻害的に作用し、その阻害効果は宿主細胞内増殖期の後期に機能する。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Nagamune, K., Xiong, L., Chini, E. N., and Sibley, L.D. "Plant, endosymbionts and parasites, Abscisic acid and calcium signaling." *Comm. Integ. Biol.* 2008, 1, 62-65

(2) 永宗喜三郎「植物としてのトキソプラズマ原虫：植物ホルモンとカルシウムシグナリング」蛋白質核酸酵素 *in press*

2. 学会発表

(1) Tahara, M., Kinoshita, T., and Nagamune, K. "GPI-deficient mammalian mutant cell is hyper-sensitive to the infection with *Toxoplasma gondii*." *Molecular Parasitology Meeting XIX*, Woods Hole, MA, USA, September 2008

(2) Tahara, M., Kinoshita, T., and Nagamune, K. "GPI-deficient mammalian mutant cell is hyper-sensitive to *Toxoplasma gondii* infection." *Internat-*

ional Symposium on Protistology: Evolution and Diversity, Tsukuba, November 2008

(3) 田原美智留、木下タロウ、永宗喜三郎
「トキソプラズマ原虫感染における宿主細胞GPIアンカーの与える影響」第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会 2008年12月、神戸

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

国内における腸管寄生虫症の疫学的研究

研究分担者 小林 正規 慶応義塾大学医学部 講師（学部内）

研究要旨 1) 腸管寄生原虫株の分離培養には、外界環境に抵抗力があり冷蔵保存可能な嚢子からの分離培養法の確立が必須となる。本年度の成果として新規脱嚢液のデザイン、及び異なるアメーバ種（3種）の無菌培養に対応できる無菌培養用培地（YIMDHA-S）のデザインと新規脱嚢液及びYIMDHA-S 或いはジアルジア無菌培養用培地を用いた直接的アメーバ/ジアルジア無菌培養システムの確立、及び人獣共通感染性の原虫の分離培養の必要性を踏まえて、培養が困難であった動物（スナネズミ）由来の腸管寄生のアメーバ種（*Entamoeba muris*）の培養を予備的に試み成功した。

2) マウス腸アメーバ症モデルを用いたメトロニダゾール治療実験結果から、腹腔と尾静脈投与が経口投与に比べ顕著に高い治療効果を示すことが明らかとなり、メトロニダゾールが腸管腔側よりはむしろ粘膜組織内側から、粘膜に接着侵入しているアメーバに作用していることが示唆された。

3) 知的障害者更生施設3施設についてフォローアップ調査を行った。5年と11年の長期間継続調査を行ってきた2施設については新たな赤痢アメーバ感染者は見られず、施設内での感染予防策も効果的に機能しているものと考えられた。しかしながら、メトロニダゾール単独治療後、6年後に調査した1施設では、12名/101名（11.9%）の利用者に赤痢アメーバ嚢子陽性者がみられ、メトロニダゾール単独治療の困難さを示した。また、病院で腸アメーバ症と診断された患者3名から赤痢アメーバ3株が分離された。

A. 研究目的

1) 赤痢アメーバ、アルジア、クリプトスポリジウム等の分離株の遺伝子多型性の解析から、ヒトからだけ分離される株或いはヒトと動物の両方から分離される株等の識別もできるようになり、人畜共通感染症である腸管寄生原虫の種や株の遺伝子分類が標準化されつつある。そこでヒトから種々の病原性腸管寄生原虫分離し、株間の疫学的特徴や virulence 及び生物学的性状を比較検討することで、その得られた情報を診断・治療に役立てることを目的とする。

2) 現在諸種の施設及びハイリスク群で深刻な問題となっている赤痢アメーバ集団感染の実態調査を行い、その結果をもとに赤痢アメーバ症のより効果的な予防と防御対策を立案する。そして、これらの対策案を今後の厚生・福祉行政へ反映させることを目的とする。

B. 研究方法

1) 腸管寄生原虫臨床株の分離：赤痢アメーバ

(*Entamoeba histolytica*) と非病原性の *Entamoeba dispar* さらにニホンザルにも寄生が認められ、ヒトへの感染と病原性も危惧される *Entamoeba nuttalli* の何れの無菌培養にも対応できるようデザインされた培地 (Suzuki *et al.*, 2008) を基に、さらに他の腸管寄生原虫の無菌培養にも応用できる培地の改良、及びジアルジア、大腸アメーバ、小形アメーバ、ハルトマンアメーバ等の脱嚢に困難が伴う原虫嚢子からの嚢子内虫体の脱嚢条件の策定と分離培養法の確立を試みた。

2) 治療実験：マウス持続感染腸アメーバ症モデルを用い、主にアメーバ症とジアルジア症の唯一の承認薬であるメトロニダゾールの投与方法と治療効果について検討した。

慶応義塾動物実験計画承認（承認番号：08036）

3) 施設内腸管原虫感染の疫学調査の実施：メトロニダゾール単独治療では、完治に到らず、

赤痢アメーバの再感染を繰り返した1施設(施設利用者76名; 糞子陽性者21名; 血清抗体陽性者51名)について2003年12月より、腸管腔内抗アメーバ薬であるジロキサニドをメトロニダゾール投与後併用する治療法が採用され被治療者は完治した。2004~2007年度のフォローアップ調査では新たな感染も見られず感染は終息したものと考えた。2008年度も引き続き他の腸管寄生虫感染状況を含め、赤痢アメーバ治療後のフォローアップ調査を行った。この調査と並行して、11年間にわたり長期間フォローアップ観察を行ってきた、他の1施設(施設利用者54名; 血清抗体陽性者15名; 有アメーバ症歴者4名; 職員感染者1名)についても上記と同様のフォローアップ調査を行った。さらに、2002年にメトロニダゾール単独でアメーバ症治療を行った1施設(施設利用者103名; 糞子陽性者29名; 血清抗体陽性者54名)のフォローアップ調査を、6年が経過した2008年度に行った。また慶應病院および他の病院施設の有症アメーバ症患者から分離された赤痢アメーバ3株の無菌培養化を行った。

慶應義塾大学医学部倫理審査申請(20-94(2))承認: 厚生労働省新興・再興感染症研究事業「顧みられない病気に関する研究(H20-新興-再興-一般016)」: 国内における腸管寄生虫症の疫学的研究

C. 研究結果

1) 腸管寄生原虫臨床株の分離: 腸管腔寄生の原虫で無菌培養が容易なのは現在、病原性の赤痢アメーバとジアルジアそして非病原性の腸トリコモナスの3種である。我々は先に無菌培養が困難であった *E. dispar* の無菌培養用培地を考案した(2005)が、*E. dispar* に特化した培地であったため、*E. histolytica*, *E. dispar*, *E. nuttalli* の3種の無菌培養に対応できる YIMDHA-S 培地を考案し実用化した(2008)。また卵黄抽出物を主成分とする Balamuth 培地(Balamuth, 1962)が非病原性の大腸アメーバや小形アメーバの培養に適していたことから、この培地成分に着目し、卵黄成分中のレンチン(リン脂質)に増殖促進効果を見出した。また、増殖促進効果とは別に、赤痢アメーバが組織内で盛んに食食する赤血球(膜)成分と脂質間の界面活性作用をもつレンチン/ジアシルグリセロールを培地に加え培養すると弱い

ながらも明らかな virulence の回復効果を認めることを見出した。そして、Balamuth 培地に大腸菌と嫌気性菌である *Bacteroides fragilis* を加え、新たに考案したリパーゼを加えた脱囊システムを用いることで、SPF マウス等の実験動物でも感染が問題となっている *Entamoeba muris*(スナネズミ由来)の培養(細菌共棲 dioxenic culture)に初めて成功した(Kobayashi et al., 2009)。

2) 赤痢アメーバ腸持続感染マウスモデルにおける薬剤治療効果: マウス腸アメーバ症モデルを用いた解析から、持続感染が成立するためには、アメーバの腸粘膜上皮内への軽度の侵入を伴う安定した接着が必要条件と推定された。ヒトの場合と異なり、糞子形成がみられないという相違点はあるが、病理組織学的にはマウスとヒトにおけるアメーバの持続感染は共通性が高いと考えられたため、唯一の抗アメーバ薬剤であるメトロニダゾールの投与方法と治療効果について検討した。その結果、メトロニダゾール(12.5mg/kg/day x 7days)の腹腔と尾静脈投与に差は見られなかったが、腸管腔内で増殖するアメーバに直接作用が期待された経口投与に比べ、これらの投与方法は顕著に高い治療効果を示した。この結果は赤痢アメーバの増殖には腸粘膜上皮への接着が必須らしいこと、そしてメトロニダゾールが腸管腔側よりはむしろ粘膜組織内側から、粘膜に接着しているアメーバにより効果的に作用していることを示した。

3) 施設内腸管原虫感染の疫学調査の実施: 知的障害者更生施設3施設についてフォローアップ調査を行った。5年と11年の長期間、継続調査を行ってきた2施設については新たな赤痢アメーバ感染者は見られず、施設内での感染予防策も効果的に機能しているものと考えた。しかしながら、メトロニダゾール単独治療後、6年後に調査した1施設では、12名/101名(11.9%)の利用者に赤痢アメーバ糞子陽性者がみられ、メトロニダゾール単独治療の困難さを示した。

施設以外で腸アメーバ症と診断された患者3名から3株の赤痢アメーバ株が分離され、現在無菌培養化段階にある。

D. 考察

1) 遺伝子診断法から、感染がヒトからヒトによるものか、或いは動物を介したものを明ら

かにすることは感染経路を知る上で極めて重要であり、動物由来の腸管寄生原虫の分離培養法の確立も今後必要になるものと考えられる。

2) マウス腸アメーバ症モデルは多くの場合アメーバの組織侵入が粘膜部分に留まるため無症候で感染が長期(最長1年~)に及ぶことから腸管内に増殖するアメーバに対する治療効果を見るためのモデルとして適しており、今後、難治性腸アメーバ症等のより効果的治療法確立のための有用なモデルとして期待される。また、アメーバの腸内での増殖部位や腸内細菌叢とメトロニダゾールの治療効果との関連及び作用機序の解析についても応用が期待される。

3) 施設の赤痢アメーバ集団感染を終息させるためには、組織侵入性アメーバ症治療に有効なメトロニダゾールと腸管腔内抗アメーバ薬(ジロキサニド、パロモマイシン)の併用の有用性が認識されたが、我が国では非承認薬であるため、これら薬剤を投与できる治療施設に限られ、実際はメトロニダゾール単独治療に頼らざるを得ない。そこで、メトロニダゾール単独治療の効果を高めるための抗生剤併用投与方法や感染力を有す嚢子を含む便の排出を促すビフィズス菌等のプロバイオティクスや定期的に強制的な下剤や浣腸による排除についての検討も必要と考えられた。

E. 結論

1) 腸管寄生原虫株の多様性解析のため、外界環境に抵抗力があり冷蔵保存可能な嚢子からの分離培養に必要な脱嚢手技と異なる3種のアメーバ種に対応する無菌培養法の確立、及び培養が困難であった動物(スナネズミ)由来の*E. muris*の培養に初めて成功した。

2) マウス腸アメーバ症モデルを用いたメトロニダゾール治療実験結果から、腹腔と尾静脈投与が経口投与に比べ顕著に高い治療効果を示すことが明らかとなり、メトロニダゾールが腸管腔側よりはむしろ粘膜組織内側から、粘膜に接着侵入しているアメーバに作用していることが示唆された。

3) 治療後のフォローアップの重要性と日常に無理なく行える実践的で簡便な細菌・ウイルス・寄生虫を含めた感染予防策のマニュアル化の必要性を認識した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Suzuki, J., Kobayashi, S., Iku, I., Murata, R., Yanagawa, Y. and Takeuchi, T. 2008. Seroprevalence of *Entamoeba histolytica* infection in female outpatients at a sexually transmitted disease sentinel clinic in Tokyo, Japan. *Jpn J Infect Dis* 61(3): 175-178.

2) Suzuki, J., Kobayashi, S., Murata, R., Tajima, H., Hashizaki, F., Yanagawa, Y. and Takeuchi, T. 2008. A survey of amoebic infections and differentiation of an *Entamoeba histolytica*-like variant (JSK2004) in nonhuman primates by a multiplex polymerase chain reaction. *J Zoo Wildl Med* 39(3): 370-379.

3) Kobayashi S., Suzuki J. and Takeuchi T. 2009. Establishment of a continuous system for *Entamoeba muris* and analysis of the small subunit rRNA gene. *Parasite*, 16(2) June, In press.

4) 中村(内山)ふくみ、中村 造、古宮伸洋、大西健児、鈴木 淳、小林正規(2008): インド旅行で感染した腸管寄生原虫症の2例、*Clinical Parasitology*, 19(1), 46-48.

2. 学会発表

1) 小林正規、鈴木 淳、竹内 勤: *Entamoeba muris* の細菌共棲培養法の確立と培地内嚢子形成条件について: 第77回日本寄生虫学会大会(2008)

2) 橋 裕司、小林正規、柳 哲雄、竹内 勤、田辺和祐: 赤痢アメーバにおける2つのIgl遺伝子の多型解析: 第77回日本寄生虫学会大会(2008)

3) 中村(内山)ふくみ、中村 造、古宮伸洋、大西健児、鈴木 淳、小林正規: インド旅行で感染した腸管寄生原虫症の2例: 第19回日本臨床寄生虫学会(2008)

4) 牧岡朝夫、熊谷正広、渡辺直熙、小林正規、竹内 勤: *Entamoeba* の脱嚢および脱嚢後アメーバの発育へのセリンプロテアーゼの関与: 第77回日本寄生虫学会大会(2008)及び第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会(2008)

5) T Fujishima, S Nishise, M Ichihara, S Kobayashi, T Takeuchi: Difficulties in the treatment of mass-infection of *Entamoeba histolytica* among mentally handicapped individuals in a rehabilitation institution for intellectually impaired in Japan: XIIth International congress for tropical medicine and malaria (2008)

6) Y Miyata, S Kobayashi, Y Osa, J Suzuki, S Kano, T Takeuchi: Structural modification of dibenzosuberanyl piperazine derivatives for the inhibition of drug resistance in malaria: XIIth International congress for tropical medicine and malaria (2008)

7) J Suzuki, S Kobayashi, I Ise, R Murata, T Takeuchi: Seroprevalence of *Entamoeba histolytica* infection in female outpatients at a sexually transmitted disease sentinel clinic in Tokyo, Japan: XIIth International congress for tropical medicine and malaria (2008)

8) 牧岡朝夫、熊谷正広、小林正規、竹内 勤: *Entamoeba* の脱嚢及び発育へのセリンプロテアーゼの関与とその発現解析: 第49回日本熱帯医学会大会(2008)

9) 鈴木 淳、小林正規、村田理恵、保坂三継、竹内 勤: 都内動物園のサルにおける赤痢アメーバ・バリエーションの感染実態調査: 第49回日本熱帯医学会大会(2008)

10) 橘 裕司、柳 哲雄、小林正規、神原廣二: 長崎市の飼育ニホンザルから分離された *Entamoeba nuttalli* の性状解析: 第49回日本熱帯医学会大会(2008)

11) T Fujishima, S Nishise, M Ichihara, S Kobayashi, T Takeuchi: Difficulties in the treatment of mass-infection of *Entamoeba histolytica* in a institution: Amebiasis post-meeting (43rd Annual U.S.-Japan joint conference on parasitic diseases(2008)

12) 牧岡 朝夫、熊谷 正広、小林 正規、竹内 勤: セリンプロテアーゼは *Entamoeba* の脱嚢及び発育に関与する: 第41回日本原生動物学会大会(2008)

13) 小林正規、鈴木 淳、竹内 勤: 施設内赤痢アメーバ集団感染に対するメトロニダゾール単独治療の有効性について: 第78回日本寄生虫学会大会(2008)

14) 早川 枝李、徳舛 富由樹、小林 正規、鳥居 本美、有江 隆之、竹内 勤、高桑 雄一、James A. Dvorak: 異なる宿主間におけるマラリア感染赤血球膜のゼータ電位の比較検討: 第78回日本寄生虫学会大会(2008)

15) 牧岡朝夫、熊谷正広、渡辺直照、小林正規、竹内 勤: *Entamoeba* の脱嚢及び嚢子形成におけるセリンプロテアーゼの発現解析: 第78回日本寄生虫学会大会(2008)

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 |
| 3. その他 | なし |

アカントアメーバ角膜炎の疫学的研究

研究分担者 井上 幸次 鳥取大学医学部視覚病態学教授

研究協力者 八木田 健司 国立感染症研究所 寄生動物部

研究要旨:コンタクトレンズによる角膜感染症で入院治療を要した患者に関して、全国224施設にて実態調査を行い、その臨床所見・治療経過・予後・コンタクトレンズ使用状況を調査したところ、アカントアメーバによるものが多数をしめていた。アメーバ角膜炎に関しては全国実態調査に向けての予備調査を試行し、分子疫学的調査から角膜炎患者におけるコンタクトレンズ汚染と感染の因果関係等を調べた。

A. 研究目的

アカントアメーバの人への感染は珍しいが、角膜炎を起こすことが知られている。最近、コンタクトレンズ使用者による感染が増加していることから、その実態を把握することを目的とした。

B. 研究方法

日本コンタクトレンズ学会と日本眼感染症学会が協力して、すべての日本眼科学会専門医制度認定施設に対し調査協力の可否について問い合わせを行い、全国224施設から参加許諾を得た各施設の担当者がホームページに書き込む形で症例の入力（臨床所見・治療経過調査と患者用のコンタクトレンズ使用状況に関するアンケート）を行い、これを集計した。

対象はコンタクトレンズ装着が原因と考えられる角膜感染症で重症者するため入院にて治療を行った症例とした。倫理面への配慮）患者情報はすべて連結可能匿名化されている。

また、次年度以降計画されているアメーバ性角膜炎発生の全国実態調査の1課題である分子疫学的調査に関する予備的調査を、国立感染症研究所と共同で実施した。

C. 研究結果

コンタクトレンズ関連角膜感染症で入院加療を要した症例でアカントアメーバは緑

膿菌に次いで多く、全体の24%をしめていた。そのうち80%が定期交換コンタクトレンズ使用者であり、73%がコンタクトレンズ消毒にMPS(multi-purposesolution)を使用していた。

分子疫学的調査では、検査マニュアルの作成（図-1）とそれに準じた検査を試験的に行った。角膜炎疑い患者の検体3例について角膜擦過物培養陽性2例、およびコンタクトレンズ保存液陽性3例という結果を得た。患者の角膜分離株と使用したレンズ保存液株のタイプが遺伝学的に一致すること、また同タイプが国外角膜炎起因アメーバと同一のタイプであること等の疫学的情報を得た。

D. 考察

アカントアメーバ角膜炎はコンタクトレンズ関連の重症角膜感染の主要起炎菌となっており、現状のコンタクトレンズの使用方法や消毒方法はその防止には不十分と考えられる。使用方法に関する啓発の徹底と、消毒法の改善が必要である。また発生動向を監視する疫学調査をすすめるとともに、起因アメーバを分子生物学的に正確に同定することで流行株や難治性タイプの特定が容易になるなど、発生予防、治療に有用な情報を得ることが期待される。

E. 結論

アカントアメーバ角膜炎はコンタクトレンズを介して特に若い人に重大な視力障害をもたらしており、このままでは更なる増加が危惧される。

F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

研究成果の刊行に関する一覧表参照

2. 学会発表

福田昌彦、下村嘉一、植田喜一、井上幸次、大橋裕一：コンタクトレンズ関連角膜炎感染症全国調査。第51回日本コンタクトレン

ズ学会総会、福岡、2008年7月4～6日

佐伯有祐、井上幸次ほか：非コンタクトレンズ着用者に生じた重症アカントアメーバ感染症の1例。第33回角膜カンファレンス、大阪、2009年2月19～21日

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

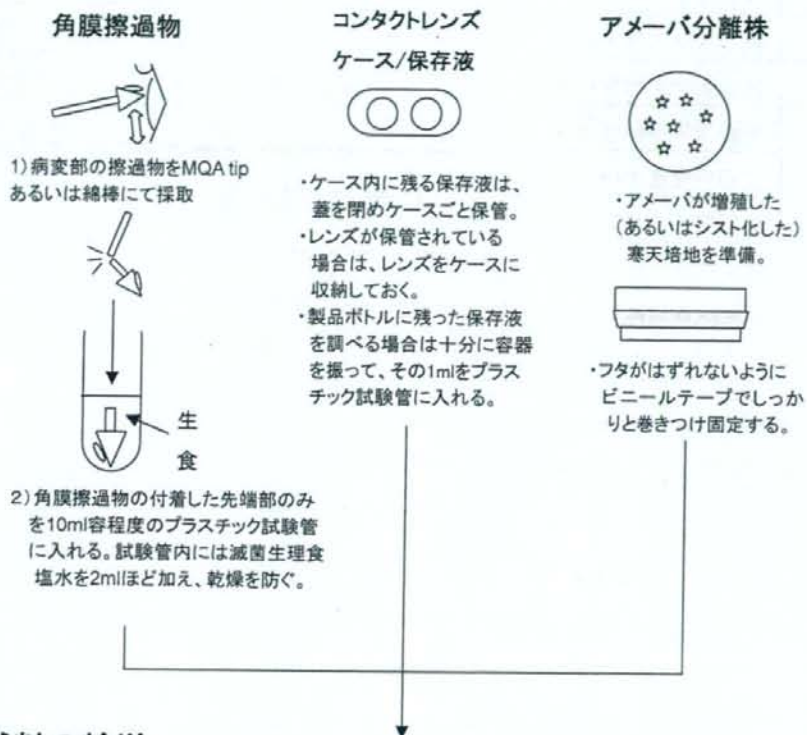
なし

3. その他

なし

アカントアメーバ検査マニュアル(案)

I. 試料の採取



II. 試料の輸送

- ・試料輸送用容器(注)に試料を入れ梱包。
- ・宅急便として感染研あて発送(着払い)。
- ・輸送は常温。
- ・臨床材料は、採取後2日間以内に発送が
望ましい。

注: 臨床材料が輸送できる市販専用梱包キットを利用する。
予め、参加機関に配布しておく

Ⅲ . 試料ID番号の付け方

- ◆ 試料には、3つの番号を列記したID番号を記し、試料が特定できるようにする。

例： 1-1-2

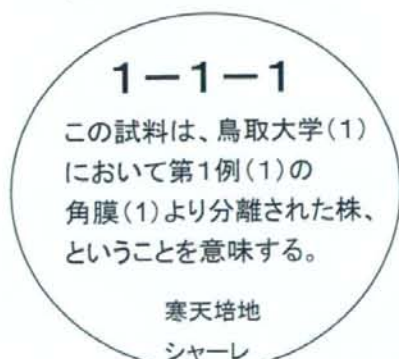
ID	参加施設
1	鳥取大学医付属病院
2	近畿大学医付属病院
3	愛媛大学医付属病院
4	京都府立医大付属病院
5	北海道大学付属病院
6	徳島大学医付属病院
7	山口大学医付属病院
8	西葛西井上眼科病院
9	東京女子医科第2病院

ID	検体の種類
1	角膜擦過物
2	コンタクトレンズ(保存液含)
3	その他(ボトルの保存液な)

症例番号(送付順)

この例では、鳥取大学(1)においてサーペランス開始1番目の症例(1)のコンタクトレンズケース(2)の試料、ということの意味する。

◆ ID番号付け方の例



分離株の送付



角膜擦過物の送付



レンズケースの送付

- ・シャーレの培地で培養した分離株に関しては、検体の試料の別が分かるようにする(古い分離株についても、どこから分離されたかでナンバリングする)
- ・アメーバが試料より分離された場合は、このID番号が株の名称となる。
- ・採取した日付も付記する。
- ・ラベルも予め、参加機関に配布しておく

寄生原虫症の検査診断法開発

分担研究者： 八木田 健司 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
権平 文夫 デンカ生研株式会社

概要

ジアルジア症は国内外で重要な消化管寄生性原虫であるが、検査法の汎用性、普及性の問題から、適切に検査が行われていないという問題がある。本研究は、検査法に関する問題解決の方法として、ラテックス凝集反応に基づく迅速検査法の開発を目的に、ラテックス試薬を試作し、その反応特性を実際の動物あるいはヒトの糞便検体を用いて調べた。ラテックス試薬はラテックスビーズに市販抗ジアルジアシスト・モノクロナール抗体を感作させ作製した。本研究で調べた検体数は限られているが、ジアルジア感染陽性検体を凝集反応で判定することが可能であった。特性としては比較的特異性は良いものの、イムノクロマト法に比べて感度は低いという結果を得た。改善の余地は多いが、糞便検査に適用可能であるとの判断根拠を得ることができた。次年度以降は、感度向上のためのモノクロナール抗体開発、検査現場で求められる感度、特異性の吟味、地研レベルでのラテックス検査法の試用(発生動向調査での原虫検査目的)等、実用性を確認する研究を計画している。

1. 研究目的

ジアルジア症は、世界的にみてアジア、アフリカ、南米を中心に約 2 億人の有症者、毎年 50 万人の新規感染(WHO、1996)が存在すると推定される、原虫疾患の中でも依然として重要度の高い存在である。診断法としては、顕微鏡検査、PCR、抗原検査等、多様な方法が使用可能であるが、コスト、利便性、汎用性の面から、実際の検査においては必ずしもジアル

ジア等原虫を念頭に入れた下痢の原因究明が積極的に行われている訳ではない。ジアルジア症は、集団感染の脅威、再興感染症の病原体としての位置づけがありながら、実際には顧みられない病気の一つとして捉えられる。検査のあり方は、その対象疾患の重要性に大きな影響を与える。検査が普及しなければ、仮に重要な疾患であっても、その重要性は無視されるという側面がある。ジアルジア症に関し

でも、国内ならびに国外でも実用的な検査法が必要と考えられる。その中で、本研究では検査コストの経済性を一つの条件として、これまで開発の眼が向けられてこなかったラテックス凝集反応を方法論として、ジアルジア糞便検査における抗原検出法の開発とそのキット化を目指すこととした。本年度は、まずラテックス試薬の試作と糞便検査に利用した場合の反応特性等に関する検討を行った。

2. 材料および方法

1) ラテックス試薬の試作

既に市販されている抗 *Giardia lamblia* シストに対するモノクローナル抗体を利用し、これによりラテックスビーズの表面感作処理を行った。感作濃度はモノクローナル抗体:1.0 (=OD280)とした。感作方法はデンカ生研(株)の抗体感作ラテックス作製法に従った。

2) 抗原に対する反応性および感度

Giardia lamblia WB 株(ATCCxxxxx)感染スナネズミより糞便とともにシストを回収し、ショ糖浮遊法で精製したシストをホルマリン固定した。実験前に蒸留水で固定シストを遠心洗浄し、ホルマリンを除去した。凝集反応の測定方法は抗原 25 μ L と感作ラテックス 25 μ L を凝集反応板上で混合し、前後左右に傾斜させ凝集像を観察した。

判定方法は以下の基準に従った。

- 3+: 黒い背景に強い凝集塊が観察されたもの
- 2+: わずかに白色を帯びた背景に凝集塊が観察されるもの
- 1+: 乳白色の背景に明らかなラテックス粒子の凝集塊が観察されるもの
- : 均一な乳濁を示し、凝集塊が観察されないもの

反応性試験は、この標本(無希釈)を抗原とし、継時的(1~5 分間)に凝集像を確認した。感度試験では、蒸留水2倍階段希釈抗原($\times 2 \sim 64$)を用いて力価を確認した。継時的(1,2 分間)に凝集像を確認した。

2) 糞便検体を用いた感度、特異性試験

Meridian 社製の DFA キットである Merifluor を用いてジアルジア陽性が確認された、あるいは陰性が確認された動物(スナネズミ、子牛)ならびにヒトの糞便検体を材料として、試作ラテックスの感度、反応性を調べた。また市販迅速検査キットの一つで、イムノクロマト法を原理とする Meridian 社製の Immuno Card STAT! Cryptosporidium/Giardia Test Kit (Immuno Card STAT!)を用いて、ラテックス試薬との性能比較を行った。糞便試料は直接的にラテックス試薬とは混和できないため、前処理として蒸留水により糞便を重量比 5 倍に希釈したものを希釈元液とし、これを被検試料とした。なお、糞便は採取直後、4 $^{\circ}$ Cあるいは-20 $^{\circ}$ Cにて保存されたものを用いた。またヒト臨床検体(糞便検体)の研究利用目的に関しては、患者の同意を得たものを使用した。

3. 結果

1) 試薬の試作

S. aureus (Cowan 1) のプロテイン A と IgG 抗体との反応性を利用し、感作ラテックスの IgG 結合を確認した。またラテックスビーズの自己凝集性は認められなかった。顕微鏡的にはラテックスビーズはジアルジアシストよりも極めて小さく、シスト表面に結合、即ちシスト壁抗原と反応し、抗原を介してシスト同士が凝集する像が観察された。また、おそらくシスト壁の断片が剥離浮遊することが原因と考えられるが、シスト以外でもラテックス凝集が起こることが観察さ

れた(図-1)。

2) 抗原に対する反応性および感度

(図-2)。試作ラテックス試薬は、自己凝集がない作製条件で、反応時間 1 分後に 3+ の凝集が観察され、更に抗原希釈系列では 16 倍希釈まで凝集が観察され、この反応は抗原濃度依存であった。特異性確認として、大腸菌、サルモネラを用いて試験したが、1 分間反応後は凝集は認められなかったが、2 分間反応させた後に弱い凝集を生じていることが確認された。

3) 糞便検体を用いた感度、特異性試験

ジアルジア感染スナネズミの採取直後の糞便検体を用いた試験結果を図-3 に示した。DFA 検査での陽性検体はラテックス反応で 3+、陰性検体では-、さらにクリプトスポリジウム(*C. parvum*)感染のヌードマウス(BALB/c nu/nu)の検体も-であり、同一試料を用いて行った Immuno Card STAT!による検査結果もこれと一致した。被検試料の 2 倍希釈系列を作成して感度を調べた結果(図-4)では、8 倍で 3+、16 倍で 1+ は明らかであった。Immuno Card STAT!による検査では、32 倍希釈でも陽性であり、ラテックス検査法の感度は Immuno Card STAT! よりも低いことが示された。一方、当該試験では希釈倍率 4 倍の試料においてシスト数の実測を行い、糞便希釈液中に 1.3×10^3 シスト/25 μ l 濃度でシストが含まれていたが、ラテックス法の感度からは反応液(ラテックスと糞便希釈液の混合液) 50 μ l 中におよそ 700 シストが存在する条件で、明確な陽性を検出が可能であった。図-5 に、4°C で保存されたジアルジア感染子牛の糞便検体を用いた試験結果を示した。ジアルジア感染子牛 1-2 月齢 Immuno Card STAT! で陽性 3 例の中で、1 検体にて +1 の陽性例を確認した。ジアルジ

ア非感染子牛 1-2 週齢 Immuno Card STAT! で陰性 3 例では、ラテックス反応はすべて陰性であった。動物検体を用いた試験では、ラテックス法の特異性に関しては比較的良い結果を得た。

次に -20°C にて保存したヒト糞便検体を用いた結果を図-5 に示した。ジアルジア感染陽性例(AIDS 患者、Immuno Card STAT! +、DFA +)はラテックス反応で明確な陽性 2+ を示した。一方、同患者のメロニダゾール治療後検体(Immuno Card STAT! -, DFA -)では、ラテックス反応は陰性であった。他のジアルジア陰性検体(Immuno Card STAT! -, DFA -)として、赤痢アメーバ感染例(AIDS 患者)、原虫陰性下痢症例(AIDS 患者)の検体を調べたが、いずれもラテックス反応は陰性であった。ヒト糞便検体についてもラテックス法の特異性は比較的良い結果を得た。

4. 考 察

ジアルジア症の検査キットの中で、個別迅速検査を目的とする検査キットが近年市販されるようになった。いわゆる、イムノクロマト法に基づく各種キットが購入可能な現状にある。感度、特異性に関しては数々の評価が報告されており(Garcia ら 1997、2003、Johnston ら 2003、Weitzel ら 2006、小林ら 2007)、今後 Golden Standard とされる DFA 検査と並んで主要な検査法となることが予想される。国外では抗原検査法の結果も national surveillance における診断基準となっている場合があり、迅速検査法の比重は高まりつつある。

迅速検査法は、DFA による検査が難しい環境(主に蛍光顕微鏡が設置されていない)で、その有用性は明らかである。しかしながら検査コストの点において必ずしも一般的な利用は、特に検査の経済的負担が問題となる途上国で

は、難しいというのが現状と考えられる。迅速検査法で、イムノクロマト法あるいはマイクロプレート ELISA 法に基づくキットの価格は、国内価格でみておよそ 1 検体あたり千円～数千円であり(小林ら 2007)、これが一般化するには、例えば国内であつても保険薬価の承認を待つことが条件となる。さらに流行地である途上国においては、あつても利用できないのが実情と想定される。

これらの実情を勘案し、より低コストで迅速診断の性能を備える検査法を開発するという目的で、本研究ではラテックス凝集系の応用を考えた。ラテックス法は、その長所としてコストが割安となる可能性があり実用的なことに加え、特許面などの問題も少ないと考えられるが、短所としては特異性、感度は他の迅速検査法と比較して低い可能性が指摘される。本研究では、ラテックス法という方法論がこれまでに原虫糞便検査には用いられてこなかった経緯を踏まえ、まずこの方法が糞便検査に利用可能かどうか、その妥当性を検討した。市販されているジアルジアシスト特異的抗体を利用して試作したラテックス試薬は、動物およびヒトの糞便検体を、単純に希釈して検査すること、その検体は新鮮便、4℃あるいは-20℃凍結保存条件という、前処理作業を省力化したプロトコルで使用された。結果として、調べた検体数は限られているが、感染陽性検体を凝集反応で判定することは可能であった。特性としては比較的特異性は良いものの、感度は低い(対イムノクロマト法)という結果であった。改善の余地は多いが、ラテックス法は方法論として糞便検査に適用可能であるとの判断根拠を得ることができた。感度の問題は用いる抗体の性質に大きく影響されることから、感度向上を目的とした高力価な抗ジアルジアシストモノクロー抗体を開発することでこれを解決する。次年度以降は、

モノクロー抗体開発とともに、検査現場で求められる感度、特異性の吟味、地研レベルでのラテックス検査法の試用(発生动向調査での原虫検査目的)等、実用性を確認する研究を計画している。

5. 結 論

ジアルジア症の迅速検査法の一つとして、ラテックス凝集反応系を考案し、試作ラテックス試薬による糞便検査を試みた。調べた検体数は限られているが、感染陽性検体を凝集反応で判定することは可能で、方法論としての妥当性を確認した。感度には問題はあるが、高力価モノクロー抗体開発により解決可能と考えられた。さらにラテックス検査法の開発を進めることで実用性を高めることを今後の目標とする。

6. 参考文献

- 小林 正規、鈴木 淳、竹内 勤(2007) 寄生虫・ウイルスを原因とする腸管感染症 3. 腸管原虫症の迅速診断、腸管感染症のすべて、化学療法の領域、医薬ジャーナル社 23(S-1):141-147.
- Garcia L.S. and Shimizu R.Y. (1997) Evaluation of nine immunoassay kits(enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. J Clin Microbiol.,35:1526-1529.
- Garcia L.S., Shimizu R.Y., Novak S., Carro M. and Chan F. (2003) Commercial assay for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens by rapid solid-phase qualitative

immunochromatography. J Clin Microbiol., 41:209-212.

Johnston S.P., Ballard M.M., Beach M.J.
Causer L. and Wilkins P.P. (2003) Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organisms in fecal specimens. J Clin Microbiol., 41:623-626.

Weitzel T., Dittrich S., Mohl I., Adusu E. and Jelinek T. (2006) Evaluation of seven commercial antigen detection tests for *Giardia* and *Cryptosporidium* in stool samples. Clin Microbiol Infect., 12:656-659.

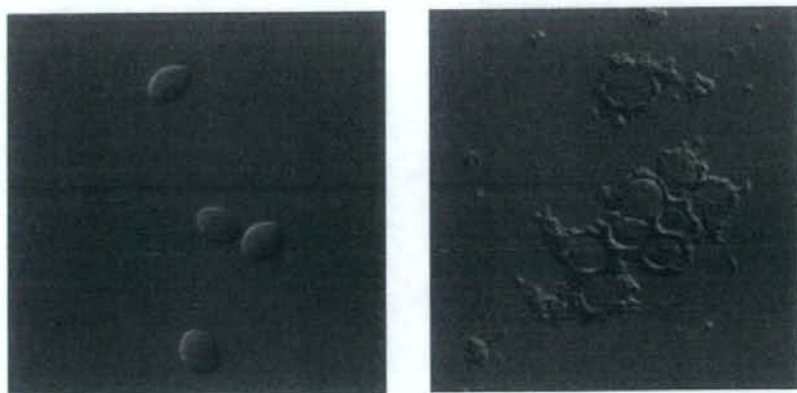


図-1、試作ラテックス試薬の抗原結合性を示す顕微鏡所見

- A: スナネズミ糞便より精製したジアルジア (*G. lamblia* WB 株)シスト
 B: 同精製シストをラテックス試薬と混和した状態。

・シスト周辺にビーズの付着が確認される。また、シスト以外でもビーズの凝集が見られる。

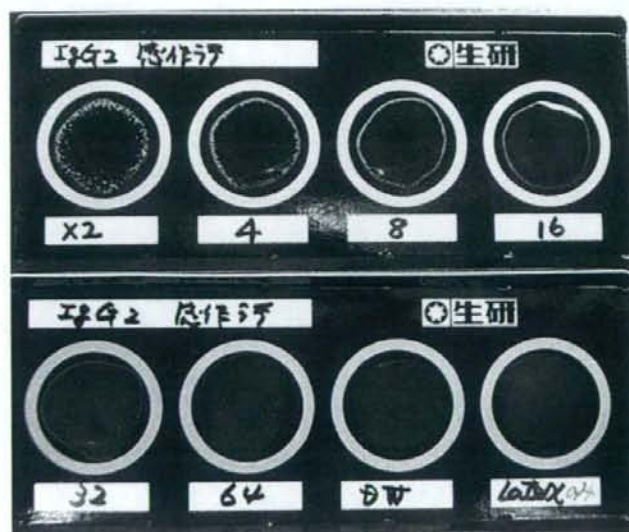


図-2、試作ラテックス試薬による抗原との凝集性

- ・抗原にはジアルジア (*G. lamblia* WB 株)シストのホルマリン固定標本を使用した。ホルマリンを遠心洗浄で除去し、ラテックス試薬と混和した。
- ・16 倍希釈まで凝集は確認できた。

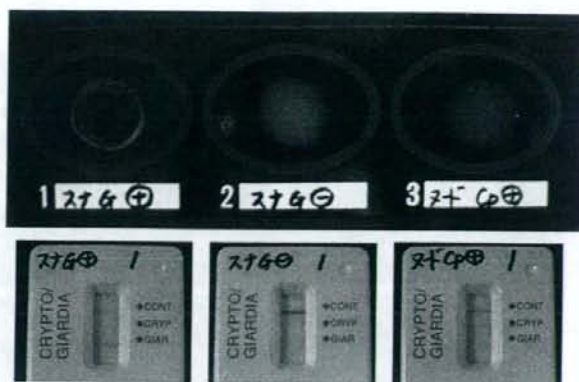


図-3、感染動物糞便検体を用いた特異性試験

上段はラテックス試薬を用いた反応結果。
下段は Immuno Card STAT!を用いた反応結果

- 1: *G. lamblia* 感染スナネズミ糞便検体
2: *G. lamblia* 非感染スナネズミ糞便検体
3: *C. parvum* 感染ヌードマウス糞便検体

ラテックス 試薬			
Immuno Card	+	+	+
シスト数	5.2×10^3	2.6×10^3	1.3×10^3
ラテックス 試薬			
Immuno Card	+	+	+
シスト数	6.5×10^2	3.3×10^2	1.7×10^2

図-3、感染動物糞便検体を用いた感度試験

上段はラテックス試薬を用いた反応結果。
中段は Immuno Card STAT!を用いた反応結果
下段は 4 倍希釈時の 25μ あたりのシスト数を実測し、
他の希釈濃度試料では、これを基に計算値を算出した。

- *G. lamblia* 感染スナネズミ糞便を 5 倍希釈したものを被検試料とし (x1)、その 2 倍希釈系列を作成した。
- 8 倍希釈までは明確な凝集反応がみられた。
- 感度は ImmunoCard よりも低いことが示された。



図-5、ジアルジア感染子牛の糞便試料を用いた凝集試験

上段:ジアルジア感染子牛、1-2月齢、ImmunCard 全例陽性
 下段:ジアルジア非感染子牛、1-2週齢、ImmunCard 全例陰性

- ・糞便検体は4℃にて保存したもの。糞便の5倍希釈したものを被検試料とした。
- ・子牛 No.287(陽性検体)において明確な凝集反応がみられた。
- ・非感染個体ではラテックス反応陰性であった。



図-6、ジアルジア感染ヒト糞便試料を用いたラテックス凝集試験

A:ジアルジア感染陽性例、AIDS患者、ImmunCard+、DFA+
 B:患者A、メロニダゾール治療後、ImmunCard-、DFA-
 C:赤痢アメーバ感染陽性例、AIDS患者、ImmunCard-、DFA-
 D:原虫陰性下痢症例、AIDS患者、ImmunCard-、DFA-

- ・糞便検体は-20℃にて凍結保存したもの。糞便の5倍希釈したものを被検試料とした。
- ・陽性検体(A)のみに凝集反応がみられた。

蠕虫遺伝子発現制御機構の解明および寄生虫症診断法の開発

研究分担者 丸山治彦 宮崎大学医学部教授

研究要旨 線虫類による幼虫移行症は今日のわが国で発生している蠕虫性疾患の中では多数を占め、重要な疾患群のひとつである。われわれは、幼虫移行症の病態解明と血清診断精度の向上を目指し、幼虫移行症の原因寄生虫のひとつであるブタ回虫と、モデル寄生虫のベネズエラ糞線虫の幼虫から cDNA ライブラリを作製し、発現遺伝子の解析をおこなった。その結果、ベネズエラ糞線虫において、感染幼虫では発現し成虫では発現していない遺伝子には、宿主侵入後すぐに発現が停止するものと肺ステージまで発現が持続して成虫段階で停止するものがあることがわかった。ブタ回虫では、肺ステージ特異的と考えられる遺伝子を得た。診断抗原としては、ベネズエラ糞線虫およびブタ回虫のそれぞれから有望な幼虫抗原 cDNA を得ることができた。

A. 研究目的

幼虫移行症とは、ヒト体内で成虫になれない寄生虫の幼虫が人体各所をさまよひ、年余にわたって種々の症状を引き起こす一群の疾患のことである。われわれは、multiple-dot ELISA 法によるスクリーニングと 96-well microtiterplate ELISA 法による精査を基本とした抗体検査による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いるが、近年では診断症例の多数を幼虫移行症が占めている（図1）。すべて人獣共通感染症であり、生肉などの食品によって感染することが多い。

原因寄生虫はイヌ回虫やブタ回虫が多数を占

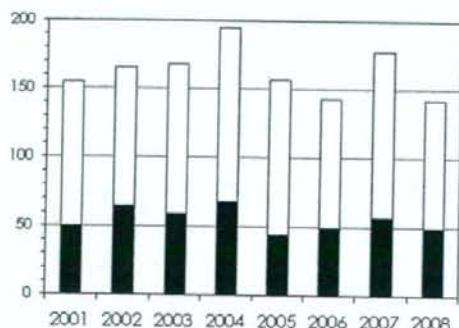


図1 宮崎大学医学部寄生虫学の血清検査における幼虫移行症の割合の推移 ヒト内で成熟できる寄生虫(■)とヒト体内で成虫になれない寄生虫(□)。ほぼ一定して幼虫移行症が全体の約3分の2を占めている。

め、顎口虫などがこれに続く（図2）。有効とされる薬剤はあるが服薬期間が長期であったり、虫種によっては有効な薬剤が全く存在しないものもある。

幼虫移行症の原因寄生虫の多くは本来の宿主では腸管内に寄生し、病原性は低い。一方ヒト体内では、これらの線虫は腸管外のさまざまな臓器へ迷入して肺炎やぶどう膜炎、あるいは脊髄炎などを引き起こす。その原因は不明だが、ひとりの理由として、ヒト体内では正常な発育過程をとらないということが考えられる。よって、本研究では、腸管寄生虫が体内移行の途上で、どのような発育シグナルを宿主から得て、どのようなメカニズムで発育しているのかを、遺伝子発現を分析することで明らかにしたい。

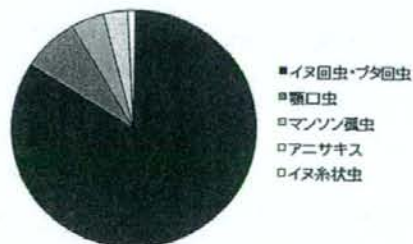


図2 幼虫移行症の原因寄生虫 宮崎大学寄生虫学分野で幼虫移行症と診断した2008年の症例の寄生虫による内訳。イヌ回虫またはブタ回虫によるものが大多数を占める。

具体的には、ヒトで内臓幼虫移行症をおこすブタ回虫と、体内移行をする腸管寄生線虫として動物実験系が確立しているベネズエラ糞線虫を用い、体内移行時にどのような遺伝子を発現しているのかを調べ、遺伝子ノックダウンによりその機能を解明する。

さらに本研究では、研究過程で同定される寄生虫タンパクについて、診断抗原としての有用性も検討する。なぜならば、蠕虫性疾患の抗体検査は現在粗抗原を使っているが、抗原の入手が次第に困難になりつつあるという問題点と、とくに動物由来の回虫類による幼虫移行症および糞線虫症では、擬陽性と真の陽性の判別が必ずしも容易でない場合があるという問題点があるからである。これらの問題点を一挙に解決するためには、特異性の高い組換え抗原を用いた検査系の確立が望まれる。

B. 研究方法

1. 腸管寄生線虫の体内移行メカニズム

ベネズエラ糞線虫の感染幼虫、体内移行期の幼虫、および腸管定着期の虫体の cDNA ライブラリを作製し、それぞれの EST データベースを構築する。サブトラクションによってそれぞれの発育段階特異的な遺伝子を同定し、組換えタンパクを作製して局在などを調べるとともに、RNAi による遺伝子ノックダウンの手法を確立して遺伝子機能を *in vivo* で明らかにする。

ブタ回虫については、宮崎県内で採取されたブタ回虫のメスから虫卵を分離して幼虫包蔵卵を形成させ、ウサギに投与する。感染 5-6 日後にウサギ肺から幼虫を回収して、体内移行期幼虫の cDNA ライブラリを作製する。ブタ回虫では幼虫包蔵卵や成虫の EST データベースが公表されているので、それらを参照し、移行期幼虫に特異的な配列を抽出する。

2. 血清診断用組換え抗原の作製

ベネズエラ糞線虫およびブタ回虫の幼虫から cDNA ライブラリを作製して塩基配列を決定し、診断抗原として有望なものについて組換え抗原を作製する。有用性の検定には、連結不可能匿名化処理された陽性血清を用いる。

C. 研究結果

1. 腸管寄生線虫の体内移行メカニズム

1) ベネズエラ糞線虫

ベネズエラ糞線虫の感染幼虫から cDNA ライブラリを作製し、470 クローンについて塩基配列を決定した。ユニークなクラスタが 194 個得られ、その中の 89 個が有意の注釈付けが可能であった。その中には、外界で宿主を待つ感染幼虫にとって重要と考えられる遺伝子が含まれていた (表 1)。すなわち各種シャペロンタンパク、DNA 修復酵素、オートファジー関連タンパク、抗菌ペプチドなどである。

表1 ベネズエラ糞線虫の感染幼虫が発現している遺伝子の一部

Tentative annotation	E-value
autophagy-related protein LC3	3×10^{-7}
<i>Caenorhabditis</i> bacteriocin family member (cnc-8)	8×10^{-5}
<i>Calectin</i> family member (cax-1)	5×10^{-93}
<i>S. stercoralis</i> immunodiagnostic antigen (NIE)	7×10^{-84}
<i>S. stercoralis</i> metalloproteinase precursor	5×10^{-90}

これらの遺伝子の発育ステージにおける発現を RT-PCR で検討した。その結果、発現パターンは 3 つに分けられることがわかった。1) 感染幼虫から成虫まで同程度の発現がみられるもの、2) 感染幼虫から肺のステージまで発現が見られるが成虫では発現が確認できないもの、3) 感染後急速に発現が低下して肺の段階ですでに検出できないもの、である。

最初のグループには呼吸系タンパクやプロテアソームタンパクなどのハウスキーピング遺伝子が含まれていた。2 番目の、幼虫時代を通じて発現が確認できたものには、オートファジー関連タンパク、一部のヒートショックプロテイン、チロシンアミノトランスフェラーゼなどがあつた。最後の感染後急速に発現が低下するものには、後述するマトリックスメタロプロテアーゼと糞線虫の診断抗原候補として報告された NIE が含まれていた。

[感染幼虫メタロプロテアーゼ]

ベネズエラ糞線虫の感染幼虫が発現している遺伝子の中から、われわれはとくにヒト糞線虫 *S. stercoralis* で報告されている分子量約 40kDa のメタロプロテアーゼと相同性のあるタンパクに注目し解析を加えた。なぜならば、われわれは感染幼虫のメタロプロテアーゼは糞線虫の経