

厚生労働科学研究費補助金
地球規模保健課題推進研究事業(国際医学協力研究事業)
分担研究報告書

トリパノソーマの防御応答回避メカニズムの解析

研究分担者 嶋田 淳子 群馬大学医学部教授

研究要旨: *Trypanosoma cruzi* 感染により宿主アポトーシス抑制因子 c-FLIP 遺伝子発現が感染初期に起こることがリアルタイム PCR により明らかとなった。c-FLIP と相互作用する原虫側因子を探索するため yeast two hybrid 法を用い解析中である。

A. 研究目的

Trypanosoma cruzi 感染により宿主アポトーシス抑制因子 c-FLIP の発現上昇機構を解明する。さらに c-FLIP と相互作用する原虫側因子の探索を行う。

B. 研究方法

ヒト由来培養細胞に *T. cruzi* を感染させ、一定時間後に RNA を抽出した。cDNA に転換後、リアルタイム定量 PCR を用い c-FLIP 発現量を定量した。また、yeast two hybrid 法により原虫側因子を探索するため、bait ベクターおよび prey ベクターを作製し、スクリーニングを行った。

(倫理面への配慮)

組み換え DNA 実験は群馬大学で承認されている。

C. 研究成果

c-FLIP にはスプライシングバリエントが複数存在するが、主に発現しているのは全長をコードする c-FLIP long であり、原虫添加 12 時間後に高いピークを示した。yeast two hybrid 法では c-FLIP を bait ベクターに組み込んだが、目的とするものが得られず、c-FLIP 分子を分割した領域で作製しなおした。

D. 考察

原虫感染後、早期に c-FLIP の発現上昇が認められ、初期転写因子 NF- κ B の活性化に伴うと予想された。yeast two hybrid 法で bait ベクターに c-FLIP 全長を挿入したが、酵母への導入効率が悪く分割した c-FLIP に変更した。c-FLIP の DED 領域を用い複数のコロニーが得られ解析をさらに進めている。

E. 結論

T. cruzi 感染宿主細胞では宿主アポトーシス抑制因子 c-FLIP 遺伝子発現が感染初期に起こることがリアルタイム PCR により明らかとなった。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
第78回日本寄生虫学会大会、pp. 65, 2009

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

人獣共通寄生虫病の血清診断システムの開発と 幼虫移行症の病態解明

研究分担者 丸山治彦 宮崎大学医学部教授

研究要旨 宮崎大学医学部寄生虫学で施行した血清診断では、2009年においても肺吸虫症と回虫類の幼虫による内臓幼虫移行症が多数を占めた。血清診断の重要度が高い幼虫移行症の組換え診断抗原を得るために、ブタ回虫の体内移行期幼虫に発現している AsCTL-1 と As16 の組換えタンパク質を得た。得られた抗原の患者血清との反応から、両者ともに As16 は組換えブタ回虫症診断抗原としてきわめて有望であることが示された。また、幼虫移行症の病態解明のために、体内移行をするモデル寄生虫であるベネズエラ糞線虫のゲノムの解析をおこなった。次世代型シーケンサによる解析の結果、計 18,716 本のコンティグが得られ、ベネズエラ糞線虫のゲノムサイズは 55.4 Mb と推定された。他種線虫遺伝子との比較から約 7,000 loci のベネズエラ糞線虫の遺伝子候補を同定することができた

A. 研究目的

われわれは、multiple-dot ELISA 法による抗体スクリーニングと 96-well microtiterplate ELISA 法による精査を基本とした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きた。2000 年以降、総検体数は年間 500 前後で推移し、毎年 100-200 例を寄生虫症と診断している（表 1）。

原因寄生虫	2004	2005	2006	2007	2008	2009
イヌ回虫	100	103	82	101	77	47
ブタ回虫						
アニサキス	0	4	4	6	3	3
イヌ糸状虫	7	1	5	1	1	0
顎口虫	11	0	0	6	7	7
鉤虫	0	1	0	1	0	0
マンソン孤虫	5	4	3	6	4	4
囊虫	4	0	0	0	0	1
肺吸虫	45	30	37	46	38	38
肝蛭	5	6	2	3	0	1
住血吸虫	5	5	6	6	4	3
肝吸虫	1	0	0	0	0	0
糞線虫	11	2	1	1	1	0
回虫	0	1	1	1	2	0
広節裂頭条虫	1	0	2	0	1	0
その他	12	9	7	3	3	3
計	207	166	150	181	141	107

表 1 過去 6 年間の宮崎大学医学部寄生虫学における寄生虫疾患診断結果

これらの血清診断は、ほとんどの場合虫体の粗抗原を用いておこなわれているが、いくつかの問題点が明らかになっている。その第一は、多くの寄生虫が実験室内での維持ができないので、抗原の入手には常に困難がともなうことである。国内ではすでに入手不能のものもある。第二に、いくつかの疾患において粗抗原では擬陽性と真の陽性の判別が必ずしも容易でないことがあげられる。病歴や検査所見などから総合的に判断しているが、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、あきらかに感染の可能性がないと考えられる症例でも抗体高値を示すことがある。

そこで、血清診断における抗原入手の問題を解決すると同時に判定にまつわる曖昧さの程度をできる限り減らすために、もっとも症例数の多い幼虫移行症について、診断用組換え抗原を作製する。組換え抗原では材料の安定供給が可能であり、特異性の高い分子を選定すれば特異性も向上する。品質が一定しているのでカットオフ値の設定などが可能になり、将来的には血清診断の保険適用に道が開ける。

以上のような診断における問題点のほかに、幼虫移行症の病態はほとんど未知といってもよいので、その病態を解明するために、モデル寄生虫であるベネズエラ糞線虫の発現遺伝子解析

をおこない、寄生線虫の体内移行という寄生虫の謎の解明のメカニズムを明らかにしたい。そのためには各発育段階における発現遺伝子発現を詳細に解析することがひとつの方法だが、そのためには寄生虫のゲノム情報が不可欠である。そこで今年度は、体内移行幼虫の遺伝子発現の徹底的かつ確実な解析をおこなうため、ベネズエラ糞線虫のゲノムの概要配列を明らかにすることとした。

B. 研究方法

1. 診断用組換え抗原の作製

幼虫移行症ではブタ回虫について組換え抗原を作製した。沖縄県および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た。これをウサギに投与し、感染5-6日後にウサギ肺から幼虫を回収した。

次いで肺から回収した幼虫から polyA+ RNA を抽出・精製して逆転写反応をおこない、Creator SMART システムにより cDNA ライブラリを作製した。得られた cDNA クローンの塩基配列を決定して、公開されているブタ回虫データベースと比較した。成虫や虫卵では発現の報告がないものを診断用抗原の候補とし、組換えタンパク質を作製した。

以上の研究課題は、宮崎大学動物実験委員会、宮崎大学遺伝子組換え実験安全委員会、宮崎大学病原体等安全管理委員会、の審査を受け、機関承認を得ている。

2. 患者血清を用いた組換え抗原の検討

宮崎大学医学部寄生虫学分野において、2005年以前に動物由来の回虫類による幼虫移行症と診断された患者、およびどの寄生虫にも感染していないと判定された患者の血清を用い、前項で作製した組換え抗原の診断抗原としての有用性を酵素抗体法で検討した。

この場合問題となるのは、用いた血清が真の感染によるのか、感染であるとしてもイヌ回虫なのかブタ回虫なのかという点であった。幼虫移行症では虫体が証明されることはないので、通常の「真の陽性」を得ることは事実上不可能である。したがって、本研究では状況証拠から真の感染を絞り込み、その上でイヌ回虫幼虫の ES 抗原とブタ回虫幼虫の ES 抗原を準備し、両者への反応性から、手元にある血清がどちらに

感染した患者由来なのか推定し、ブタ回虫感染推定血清、イヌ回虫感染推定血清として用いた。

患者血清の使用に際しては、ヘルシンキ宣言の趣旨に則り、臨床研究に関する倫理指針等を遵守した。本研究は、宮崎大学医学部医の倫理委員会による審査を受け、宮崎大学医学部の承認を受けている。

2. ベネズエラ糞線虫ゲノム解析

ベネズエラ糞線虫の感染幼虫 2.8×10^6 隻からゲノム DNA を抽出し、次世代型シーケンサのひとつである 454 GS FLX を用いて塩基配列を解読した。このシーケンサを採用した理由は、ベネズエラ糞線虫の近縁種のゲノム情報が皆無であるため、ベネズエラ糞線虫のゲノムはいわゆる *de novo* 配列であり、リード長が長くないと解析不能であるためである。解読によって得られた塩基配列断片から Newbler アセンブラによってアセンブルして連続配列（コンティグ）を得た。

次に、コンティグの塩基配列がベネズエラ糞線虫ゲノム上に実際に存在するかどうかを、初年度に作製したベネズエラ糞線虫感染幼虫の EST と比較すること、および基本的な代謝系の酵素など、存在が確実な遺伝子の塩基配列が存在するかどうかを検討した。また、すでに公開されている *Caenorhabditis elegans* ゲノムやネズミ糞線虫のさまざまな発育段階の EST と、今回得られたベネズエラ糞線虫のゲノムコンティグを比較し、ベネズエラ糞線虫の遺伝子候補を明らかにした。

C. 研究結果

1. ブタ回虫組換え抗原の作製

ブタ回虫の体内移行期幼虫の cDNA ライブラリを作製した。クローン数は 1.412×10^6 で、平均インサート長は 670bp であった。ランダムに 1722 クローンの塩基配列を決定したところ、175 種類のユニークな配列が得られた（表 2）。

これらの配列データを、ブタ回虫の幼虫包蔵

Classification	No. of contigs
<i>A. suum</i>	123
Other nematodes	17
Non-nematodes	4
No significant similarity	31
Total	175

表 2 ブタ回虫体内移行期幼虫の EST 解析

卵や成虫および他種線虫の EST データベースと比較したところ、ブタ回虫以外の線虫類と相同性を有するものや、これまで公開されているどの配列とも有意の相同性がないものが得られた(表 2)。公開データベースにブタ回虫体内移行期幼虫の EST はないことから、これらはブタ回虫の肺移行期幼虫に特異的な配列と考えられた(表 3)。

われわれは、イヌ回虫の C-タイプレクチン(Tc-CTL-1 および Tc-CTL-4) のブタ回虫ホモログと考えられるタンパク質と、ブタ回虫感染に対するワクチン候補 As16 に特に注目して組換え抗原を作製した。

このふたつのタンパク質を選んだ理由は、両者とも肺から回収した幼虫の cDNA ライブラリ中のクローンの出現頻度が高く、患者の免疫系が強く感作されている可能性が高いと考えたからである。

実際にイヌ回虫の C-タイプレクチンはいわゆる分泌排泄抗原(ES 抗原)であり、As16 もブタ回虫の幼虫の分泌抗原である。さらに、C-タイプレクチンでは、すでにイヌ回虫 C-タイプレク

チンの全長がクローニングされているので、イヌ回虫とブタ回虫の相同タンパク質を同時に幼虫移行症の患者血清と反応させることで、両者を鑑別できる系が確立できる可能性があると考えたからである。

以上の理由により、EST の塩基配列を基にブタ回虫 C-タイプレクチン(As-CTL-1) と As16 の全長をクローニングし、組換えタンパク質を作製した。

2. 患者血清を用いた組換え抗原の検討

組換えブタ回虫抗原の幼虫移行症患者血清との反応を酵素抗体法で検討した。患者血清は、宮崎大学医学部寄生虫学分野において 2005 年以前に診断目的で送付され-80℃に保管されていた血清で、この中から抗体検査の結果に加えて、病歴、各種画像、生食歴等から、確実に動物由来の回虫類による幼虫移行症であろうと診断された 48 症例を選んだ。選択後は対応表を破棄し、連結不可能匿名化して使用した。

これら患者血清の、イヌ回虫第 3 期幼虫の ES 抗原(TcES)ならびにブタ回虫体内移行期幼

Identification	Closest species	E value
Ribosomal protein L35a	<i>M. yessoensis</i>	3.0E-69
Excretory/secretory mucin MUC-5	<i>T. canis</i>	5.0E-19
Aspartyl protease protein 6	<i>C. elegans</i>	2.0E-31
Novel transcript	-	-
Novel transcript	<i>T. stromaticum</i>	3.0E-08
C-type lectin Tc-ctl-4	<i>T. canis</i>	2.0E-20
Novel transcript	-	-
Novel transcript	-	-
Novel transcript	-	-
Hypothetical protein Bm1_33605	<i>B. malayi</i>	2.0E-11
Novel transcript	-	-
Novel transcript	-	-
Serum- and Glucocorticoid- inducible kinase homolog	<i>C. elegans</i>	4.0E-25
Protein unc-22	<i>B. malayi</i>	1.0E-62
CBR-MEC-2 protein	<i>C. briggsae</i>	3.0E-28
Novel transcript	<i>T. canis</i>	2.00E-14
Novel transcript	<i>T. canis</i>	0.0
Novel transcript	<i>P. suffruticosa</i>	1.0E-52
Aspartyl protease protein 6	<i>C. elegans</i>	2.0E-11
Keratin associated protein 16-1	<i>M. musculus</i>	4.0E-06
Putative glycoprotein hormone-beta5	<i>B. malayi</i>	9.0E-37
Hypothetical protein CBG18583	<i>C. briggsae</i>	9.0E-14
Novel transcript (single clone)	-	-

表 3 ブタ回虫遺伝子と相同性のない新規 EST

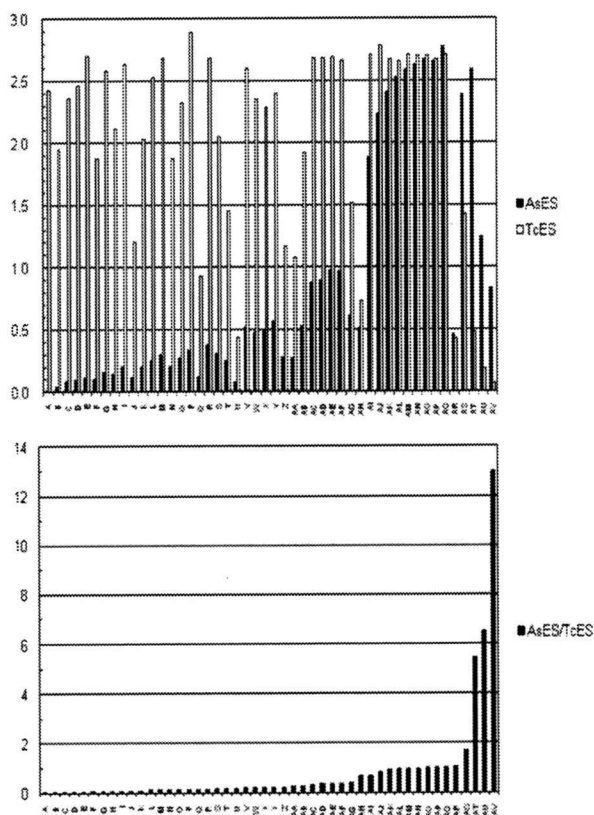


図1 内臓幼虫移行症患者血清とイヌ回虫/ブタ回虫幼虫ES抗原との反応
 上段: AsESとTcESに対する結合(単位は吸光度)
 下段: As-LL3ESとTc-ESの吸光度の比

虫 ES 抗原 (AsES) に対する結合を図 1 上段に示した。吸光度で比較すると、AsES よりも TcES に強く反応したものが 33 サンプル、AsES と TcES に同程度に反応したものが 11 サンプル、AsES の方に強く結合したものが 4 サンプルあった。

これを吸光度そのままではなく、ブタ回虫抗原 AsES に対する吸光度とイヌ回虫抗原 TcES に対する吸光度の比であらわしたものが図 1 下段である。幼虫 ES 抗原は診断的価値がきわめて高いとされ、原因虫種の推定に役立つ。図 2 から、AsES と TcES の比が 5.0 を超える 3 サンプルはブタ回虫感染患者の血清であり、残りのサンプルはイヌ回虫 (もしくはトキソカラ) 感染患者の血清であることが強く示唆された。つまり、内臓幼虫移行症患者のうち、約 6%がブタ回虫症であると推定された。

次にこれらのサンプルの、組換えブタ回虫抗原 As-CTL-1 と As16 への結合を示したのが図 2 である。吸光度の比較では、トキソカラ感染推定血清とブタ回虫感染推定血清との結合に有意な差はみとめられなかった (図 2 上段)。しかしながら、図 1 と同様にイヌ回虫幼虫の ES 抗原

との比をとると、ブタ回虫感染血清と推定された 3 サンプルでは高い値をとることが示された (図 2 下段)。As-CTL-1 と As16 の比較では As16 の方が高い値を示しており、診断用抗原としてより優れていると考えられた。

2. ベネズエラ糞線虫ゲノム解析

ベネズエラ糞線虫の感染幼虫 2.8×10^6 隻から計 $42.3\mu\text{g}$ のゲノム DNA が得られた。そのうち $15\mu\text{g}$ を次世代型シーケンサ 454 GS FLX の 3 ランに用いた。

3 回のランによる総リード数は 3,328,633 リード、平均リード長は 373 塩基であった。リード長のピークは 420 塩基であり、おおよ予想されるリードが得られたことがわかる。

これらの配列を Newbler アセンブラによってアセンブルし、計 18,716 本のコンティグが得られた。平均コンティグ長は 2,958 塩基、N50 コンティグ長 (これより長いコンティグに総塩基数の 50%が含まれる) は 11,789 塩基、最長コンティグ長は 200,865 塩基であった。また、全コンティグの GC 含量は 25.6%であった。

コンティグに含まれる塩基配列の総計は約 55.4 Mb であり、これがベネズエラ糞線虫のゲノムサイズと推定された。解読塩基総数が約 1241 Mb であったので、解読の redundancy は約 22 であると計算された。実際に、コンティグの厚み (同じ配列が何回出現するか) を調べると、ある程度以上の長さのコンティグでは 22 回に収束することが示された。

以上より、現段階で取得している配列データは、ベネズエラ糞線虫の全ゲノムを十分にカバーしているであろうと考えられた。

次に、ゲノムコンティグの品質を検定するために、これまでの研究で取得していたベネズエラ糞線虫の感染幼虫の EST データと、今回得られたゲノムコンティグを比較した。ベネズエラ糞線虫の感染幼虫から得られた 194 個の EST のうち、500bp 以上の長さを持つものを問い合わせ配列として、カットオフ値を $1e-30$ に設定してゲノムコンティグデータを Blastn 検索した。その結果、85 配列のうち 84 配列 (99%) がヒットし、現段階で得られているゲノムコンティグの塩基配列は、ベネズエラ糞線虫のゲノム上に実在すると考えてよいことがわかった。

ゲノムコンティグの配列をさらに検討するた

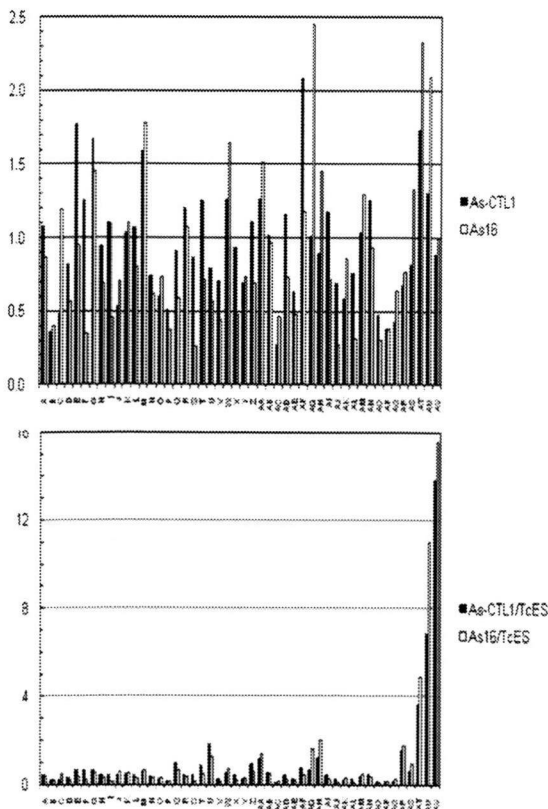


図2 内臓幼虫移行症患者血清と組換えブタ回虫ES抗原との反応
上段: As-CTL1とAs16に対する結合(単位は吸光度)
下段: As-CTL1/TcESとAs16/TcESに対する吸光度の比

め、ベネズエラ糞線虫のゲノムコンティグと他種生物遺伝子とを比較した。最初に、*C. elegans* に存在する 24 種類の解糖系/糖新生系酵素の検索をベネズエラ糞線虫コンティグに対しておこなったところ、aldose 1-epimerase と alcohol dehydrogenase 以外の酵素は、ベネズエラ糞線虫のゲノムコンティグ中に全て見つかった (図 3)。*C. elegans* のタンパク質コード遺伝子全般については、20,236 遺伝子のうち 12,122 本をベネズエラ糞線虫ゲノムコンティグ中 4,995 箇所にもマップすることができた。

近縁種であるネズミ糞線虫のさまざまな発育段階の EST との比較では、ネズミ糞線虫 EST 配列 27,366 本 (平均 521bp) のうち 23,919 個を約 5,000 のベネズエラ糞線虫ゲノムコンティグ中にマップすることができた。ベネズエラ糞線虫ゲノム上にマップできた *C. elegans* のタンパク質コード遺伝子とネズミ糞線虫遺伝子では両者の約 6 割に当たる 3,000 loci ほどが重なっており、冗長性を除去すると、約 7,000 loci のベネズエラ糞線虫の遺伝子候補を同定することができたことになる。

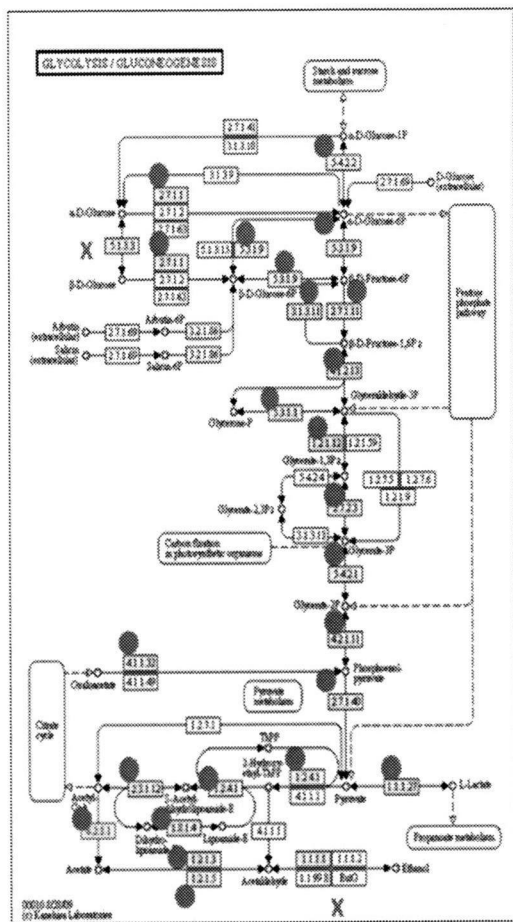


図3 ベネズエラ糞線虫ゲノムに見出される解糖系/糖新生系酵素

D. 考察

当教室で実施している寄生虫病血清診断の結果陽性と判定される症例の大多数は、食品媒介性の人獣共通寄生虫症である。具体的には肺吸虫症とイヌ回虫やブタ回虫による内臓幼虫移行症である。例年、両者で全体の 80% を超えている (表 1)。

現行の血清診断では、抗原として虫体粗抗原と一部分泌排泄抗原 (ES 抗原) を用いているが、いくつかの問題点を含んでいる。まず第一に、抗原の供給が安定していないことである。寄生虫、とくに蠕虫類は試験管内で培養できず、実験室内での維持もできないものがほとんどである。したがって、抗原を調製するためには野生動物や家畜ないしペットから採取された虫体を入手するしかなく、品質が一定の抗原を大量に準備することができない。これは、将来体外診断キットの保険適用などを目指す際の大きな障害である。さらに最悪の事態として、抗原の枯渇による検査停止という事態の可能性も否定できない。

二番目の問題点は、抗体陽性と判定される場合でも、それが真の感染によるのか、あるいは何らかの原因で産生された抗体が偶然結合しただけなのか判断できないことがあることである。例えば、血清中のトキシカラ抗原に対する抗体濃度が高い場合でも、生活歴や症状等から、感染の可能性が限りなく低いと考えざるを得ない症例に遭遇することがある。このような場合には、感染ではなさそうであってもなかなか否定することはできない。現在もっとも信頼度の高い診断抗原は幼虫の分泌排泄抗原 (ES 抗原) であるとされ、われわれもイヌ回虫については幼虫 ES 抗原を用いているが、特異性は十分とは言えない。

以上のような、幼虫移行症の血清診断における問題点を解決するために、われわれは診断用組換え抗原を調製することとした。組換えタンパク質であれば一定の品質の抗原を大量に準備することが可能であり、供給は安定する。さらに、用いるタンパク質を注意深く選ぶことで、真の感染のみを検出する系を確立することも可能であると考えられるからである。

ブタ回虫の体内移行幼虫の cDNA ライブラリを作製してクローンの塩基配列を網羅的に決定し、ブタ回虫 C タイプレクチン As-CTL-1 と、

ワクチン候補分子である As16 を選定して組換えタンパク質を作製した。これらのタンパク質の患者血清との結合を精査した結果、As-CTL-1 と As16 は非常に似通った結合特性を持っていることがわかった。すなわち、両者とも単純な結合アッセイではトキソカラ感染とブタ回虫感染を区別できなかったが、同一血清のトキソカラ ES 抗原への結合との比をとると、ブタ回虫感染血清と考えられるサンプルを特定することができたのである (図 2)。

幼虫移行症では虫体が検出できず、いわゆる真の感染症例を用いた検定ができない。しかしながら、信頼性が高い幼虫 ES 抗原の結果と一致するということは、As-CTL-1 と As16 はブタ回虫感染症診断のための抗原として、きわめて有望であるということの意味する。今後はトキソカラの組換え抗原 (Tc-CTL-1 ないし Tc-CTL-4 等) を組み合わせたアッセイ系を組み立て、組換え抗原を用いた幼虫移行症診断システムを完成させる。

一方、基礎的な研究として取り組んでいる幼虫移行症の病態解明でも、今年度はきわめて重要な知見が得られた。すなわち、モデル腸管寄生線虫であるベネズエラ糞線虫のゲノムを次世代型シーケンサで解析し、これまでまったく報告のなかったゲノム情報の一端を得ることができたのである。

今回の解析において、ベネズエラ糞線虫ゲノムの重要な特徴がいくつか明らかになった。まず第一に、ゲノムサイズが 55.4 Mb 前後と推定されたことである。これは自由生活線虫の *C. elegans* や *C. brigssae* のおよそ半分であり、植物寄生線虫の *Meloidogyne hapla* と同程度である。

生物一般の特徴として、寄生種は自由生活種と比べてゲノムサイズが小さい傾向にある。糞線虫類は寄生世代と自由生活世代を持つので、そのゲノムは非常に興味を持たれるところであるが、今回の結果は、自由生活世代があっても、比較的小さなゲノムで対応できていることを示唆している。

ベネズエラ糞線虫ゲノムの他の特徴として、GC 含量が 25.6%ときわめて低いことがあげられる。これはマラリア原虫に匹敵する値であり、今後ゲノムの構造を詳細に決定するときの障害になることが予想される。例えば、今回の解析では、redundancy は約 22 と計算されるにもかか

わらずコンティグは 18,716 本もある。これは AT に富む繰り返し配列部分でコンティグが分解されているのが、少なくとも原因の一部と考えられる。454 GS FLX が採用しているパイロシーケンシングはホモポリマー部分の解読を苦手とするので、AT に富む配列が解析を阻害する可能性は高い。

しかしながら、以上のような困難があっても、ゲノムコンティグと EST や他種生物遺伝子との比較から、現段階でベネズエラ糞線虫遺伝子のほとんどの配列がすでに得られていると考えられる。従来、未知の真核生物ゲノムの解析は、きわめて膨大なコストと時間を必要とすることから、単一研究室レベルではおよそ実行不可能なプロジェクトであった。次世代型新型シーケンサの登場は de novo ゲノム解析を一気に加速するとの見方があったが、われわれの研究はこれを裏付けることとなった。今後は cDNA の配列データを加えてスーパーコンティグを構築し、ベネズエラ糞線虫ゲノムの概要配列を決定する予定である。

E. 結論

ブタ回虫の体内移行期に発現している ES 抗原の組換えタンパク質 As-CTL-1 と As16 を調製し、幼虫移行症の診断用抗原としての有用性を患者を用いて検討した。その結果、これらのタンパク質はブタ回虫感染症の診断抗原としてきわめて有望であることがわかった。

モデル腸管寄生線虫であるベネズエラ糞線虫を用いた幼虫移行症の病態解明では、これまでまったく情報のなかったベネズエラ糞線虫のゲノムの配列情報を 18,716 本のコンティグとして取得し、ゲノムサイズ 55.4Mb、GC 含量 25.6%と推定することができた。また、7000 個程度のベネズエラ糞線虫遺伝子の同定をおこなうことができた。

F. 研究発表

著書

1. 丸山治彦 (2009) 胆道寄生虫症 (内科学書 改訂第 7 版 vol.4 消化管・腹膜疾患・肝・胆道・膵疾患. p.334-335.) 中山書店 (東京)
2. 丸山治彦 (2010) 鉤虫症 (十二指腸虫症) (今日の治療指針 2010、山口徹、北原光夫、福井次矢編)、pp.214-215、医学書院 (東京)

症例報告

1. Senba Y, Tsuda K, Maruyama H, Kurokawa I, Mizutani H, Taniguchi Y. (2009) Case of creeping disease treated with ivermectin. *J Dermatol.* 36: 86-89.
2. Enko K, Tada T, Ohgo KO, Nagase S, Nakamura K, Ohta K, Ichiba S, Ujike Y, Nawa Y, Maruyama H, Ohe T, Kusano KF. Fulminant eosinophilic myocarditis associated with visceral larva migrans caused by *Toxocara canis* infection. *Circ J.* 73: 1344-1348.

学会発表

1. 長安英治、吉田彩子、西牧亜奈、柳川紗弥香、丸山治彦. ベネズエラ糞線虫の感染幼虫に発現している遺伝子の解析 (ワークショップ「寄生蠕虫の宿主内環境への適応」) 第 78 回日本寄生虫学会大会、2009 年 3 月 27-28 日、法政大学市ヶ谷キャンパス (東京)
2. 吉田彩子、長安英治、太田伸生、丸山治彦 CD4+CD25+ 制御性 T 細胞の *Plasmodium chabaudi* AS 感染における原虫排除機構に対する影響 第 78 回日本寄生虫学会大会、2009 年 3 月 27-28 日、法政大学市ヶ谷キャンパス (東京)
3. 丸山治彦 皮膚病変を来す寄生虫症 (教育講演: ハンセン病、抗酸菌感染症と寄生虫感染症) 第 108 回日本皮膚科学会総会、2009 年 4 月 24-26 日、福岡国際会議場 (福岡市)
4. 長安英治、吉田彩子、丸山治彦. 発現遺伝子解析によるベネズエラ糞線虫の感染幼虫の生物学的分析. 日本分子生物学会 第 9 回春季シンポジウム、2009 年 5 月 10-12 日、ワールドコンベンションセンターサミット (宮崎市)
5. 吉田彩子、堀井洋一郎、丸山治彦 ブタ回虫肺移行期幼虫 cDNA ライブラリーの構築と解析~新規 C-type レクチン遺伝子の同定~ 第 20 回日本生体防御学会学術総会、2009 年 7 月 25-26 日、東京医科歯科大学湯島キャンパス (東京)
6. Ayako Yoshida, Eiji Nagayasu, Yoichiro Horii, Haruhiko Maruyama: Gene expression analysis of lung stage larvae of *Ascaris suum*, the swine large intestinal roundworm. 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Sep. 8-11,

Awaji Yumebutai International Conference Center,
Awaji, Japan

7. 丸山治彦 臨床検査で遭遇する寄生虫 (特別講演) 平成 21 年度日本臨床衛生検査技師会形態検査部門研究会、2009 年 9 月 20-21 日、宮崎大学医学部 (宮崎県清武町)
 8. 丸山治彦 寄生虫の謎に挑む (シンポジウム) 第 62 回日本寄生虫学会南日本支部大会、2009 年 11 月 7-8 日、福岡大学 (福岡市)
 9. 長安英治、吉田綾子、丸山治彦. Analyses of an astacin-like zinc metalloprotease of *Strongyloides venezuelensis*, an animal parasitic nematode. 第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 9-12 日、パシフィコ横浜 (横浜市)
 10. 吉田彩子、大岡唯祐、長安英治、堀井洋一郎、林哲也、丸山治彦 Analysis of expressed sequence tags from the migratory larvae cDNA library of the parasitic nematode *Ascaris suum*. 第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 9-12 日、パシフィコ横浜 (横浜市)
 11. 長安英治、伊藤武彦、小椋義俊、吉田彩子、林哲也、丸山治彦. 第 2 世代シーケンサによるベネズエラ糞線虫ゲノムの解析 第 8 回感染症沖縄フォーラム、2010 年 2 月 11-13 日、沖縄国民年金健康センター (宜野湾市)
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案特許
なし
 3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進研究事業（国際医学協力研究事業））

「寄生虫疾患の病態解明及びその予防・治療をめざした研究」

分担研究報告書

住血原虫症の診断学

分担研究者 五十嵐郁男 帯広畜産大学教授

研究要旨

バベシア病は、バベシア原虫がダニの媒介により動物に感染し、世界的規模で畜産業に莫大な経済的被害を与えている。また、人獣共通原虫病としても重要である。本研究では、バベシア病に対する新規遺伝子を用いた診断法と新たな薬剤開発について検討を行った。その結果、血清診断法として *Babesia bigemina* 200 kDa 組み換え抗原を用いた ELISA、遺伝子診断法として *Babesia bovis* の SBP2 遺伝子を標的とした nPCR を確立した。また、人に感染する *B. microti* の BMN1-17 組換え抗原を用いた ICT は、特異性が高く、ハムスター感染実験において、IFAT と同等の抗体検出感度を示し、日本で初めて検出されたヒト患者の血清にも陽性反応を示した。更に、バベシア原虫に対する有効薬剤候補のスクリーニングを行い、エポキシマイシンとカテキンが新規薬剤候補になりうることを示した。これらの研究成果は、バベシア病に対する有効診断法や治療法の実用化に向け、今後の更なる検討が必要である。

A. 研究目的

バベシア病は、バベシア原虫がダニの媒介により動物に感染し、世界的規模で畜産業に莫大な経済的被害を与えている。また、人に感染するバベシア原虫も報告されている。バベシア病を制圧し経済的な損失を最小するためには、適切な診断法と治療・予防策の開発が重要である。本研究では、バベシア病に対する新規遺伝子を用いた診断法と新たな薬剤開発について検討を行った。

B. 研究方法

(1) バベシア症に対する診断法の検討
最初にウシバベシア原虫 *Babesia bigemina* 200 kDa 組み換え抗原を用いた ELISA の確立について検討を行った。次にウシバベシア原虫 *Babesia bovis* の spherical body protein 2 (SBP2) 遺伝子を用いて nested PCR (nPCR) について検討を行った。更に、*Babesia microti* に

よるヒトバベシア症の簡易迅速血清診断法（イムノクロマト法、ICT）の開発について検討を行った。

(2) バベシア症に対する治療薬の検討
バベシア原虫に対する新たな治療薬を開発する目的で、ユビキチン-プロテオソーム系を阻害するエポキシマイシンおよび緑茶の成分であるカテキンである (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) のバベシア原虫に対する増殖抑制効果について、培養原虫及びネズミバベシアモデル系を用いて検討を行った。

C. 研究結果

(1) バベシア症に対する診断法の検討
最初に不溶性で蛋白質の産生が低い *B. bigemina* の P200 の断片化について検討した。その結果、C 末端を含む部分を断片化することにより、可溶性で P200 組換え蛋白質の高い産生が可能となった。この断片化 P200 蛋白質を用いた ELISA は、*B. bovis* の抗体との交差反応が認め

られず、*B. bigemina*に対する高い特異性を示した。

次に、*B. bovis* の SBP2 遺伝子を用いた nPCR について検討した結果、本法は特異性が高く、従来の方法よりも感度が高いことが示された。また、モンゴル、ガーナ、ブラジルの牛血液から採取された DNA を用いて検討した結果、これまで報告されている結果よりも高い *B. bovis* の感染率が認められた。

更に、*B. microti* の BMN1-17 組換え抗原を作製し、ICT の開発について検討した。その結果、BMN1-17 組換え抗原を用いた ICT は、特異性が高く、ハムスター感染実験において、IFAT と同等の抗体検出感度を示した。また、日本で初めて検出されたヒト患者の血清にも陽性反応を示した。

(2) バベシア症に対する治療薬の検討

エポキシマイシンのウシ及びウマバベシア原虫に対する増殖抑制効果について培養原虫を用いて検討を行った。その結果、培養を用いた実験系では、3種類のウシバベシア原虫及び2種類のウマバベシア原虫に対して、エポキシマイシンは既存の薬剤よりも低い濃度で増殖抑制効果を示した。また、マウスのバベシア原虫を用いた感染実験系では、エポキシマイシン接種により、対照よりもて有為に低い赤血球寄生率が観察された。

次に、カテキンである EGCG のバベシア原虫に対する増殖抑制効果について検討を行った。その結果、培養を用いた実験系により、EGCG は、2種類のウシバベシア原虫に対して顕著な増殖抑制効果を示した。更に、マウスのバベシア原虫を用いた感染実験では、顕著な原虫増殖抑制効果が観察された。

D. 考察

B. bigemina の P200 組換え蛋白質は不溶性で蛋白質の産生が低いため、診断用

抗原としての改良が求められていた。今回、*B. bigemina* の P200 遺伝子の断片化により、より高い産生量が得られる方法について検討した。その結果、P200 遺伝子の T 末端部分を除去し、C 末端部分を含む領域だけ断片化することにより、可溶性で産生の高い P200 蛋白質の産生法を確立することができた。この断片化 P200 蛋白質を用いた ELISA は、*B. bigemina* 感染に対し高い特異性を示した。今後の流行地域での応用のため、従来抗原との更なる比較検討が必要とされる。

Spherical body はバベシア原虫に特異的な細胞小器官である。今回 *B. bovis* の SBP2 遺伝子として有用か否かについて検討を行った。その結果、SBP2 遺伝子を用いた nPCR は従来の方法よりも感度が高く、モンゴル、ガーナ、ブラジルにおいて従来よりも高い *B. bovis* の感染率が認められ、世界的な疫学調査に有用であることが示唆された。

B. microti の BMN1-17 組換え抗原を用いた ICT は、特異性が高く、ハムスターの感染実験において、IFAT と同等の抗体検出感度を示した。また、日本のヒト患者の血清にも陽性反応を示し、今後、患者の多いアメリカ東北部の人患者血清を用いて、ICT の有用性について更に検証することが必要である。

エポキシマイシンは、ユビキチンプロテオソーム系の酵素阻害剤であり、ウシ及びウマの培養バベシア原虫に対して増殖抑制効果が認められた。また、カテキンである EGCG はウシバベシア原虫に対して、顕著な増殖抑制効果が認められた。更に、マウスのバベシア原虫を用いた感染実験では、EGCG はエポキシマイシンよりも顕著な原虫増殖抑制効果を示した。今後、バベシア感染に対する新たな薬剤としての応用が期待される。

E. 結論

本研究では、血清診断法として *Babesia*

bigemina 200 kDa 組み換え抗原を用いた ELISA、遺伝子診断法として *Babesia bovis* の SBP2 及び BV5650 遺伝子を標的とした nPCR を確立した。また、バベシア原虫に対する有効薬剤候補のスクリーニングを行い、エポキシマイシンとカテキンが新規薬剤候補になりうることを示した。これらの研究成果は、バベシア病に対する有効診断法や治療法の実用化に向けた研究を一步前進させたものであり、今後の更なる検討が必要である。

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Altangerel K, Alhassan A, Iseki H, Sivakumar T, Boldbaatar D, Yokoyama N, Igarashi I. Evaluation of *Babesia bigemina* 200 kDa recombinant antigen in enzyme-linked immunosorbent assay. *Parasitol Res* 105:249-254, 2009.
 2. Ota H, Mizuno D, Kuboki N, Igarashi I, Nalamura Y, Yamashina H, Hanzaike T, Fujui K, Onoe S, Hata H, Kondo S, Matsui S, Koga M, Matsumot K, Inokuma H, Yokoyama N. Epidemiological survey of *Theileria orientalis* infection in grazing cattle in the eastern part of Hokkaido, Japan. *J Vet Med Sci.* 71:937-944, 2009.
 3. Aboulaila M, Nakamura K, Govind Y, Yokoyama N, Igarashi I. Evaluation of the in vitro growth-inhibitory effect of epoxomicin on *Babesia* parasites. *Vet Parasitol.* 167: 19-27, 2010.
 4. Aboulaila M, Yokoyama N, Igarashi I. Inhibitory effects of (-)-Epigallo catechin-3-gallate from green tea on the growth of *Babesia* parasites. *Parasitology* (2009), doi:10.1017/S0031182009991594.
 5. Aboulaila M, Yokoyama N, Igarashi I. Development and evaluation of a nested PCR based on spherical body protein 2 gene for the diagnosis of *Babesia bovis* infection. *Vet Parasitol.* (2009), doi:10.1016/j.vetpar.2009.12.013.
- ### 2) 学会発表
1. ピロプラズマ類 (*Babesia* 及び *Theileria*) 原虫におけるミトコンドリアの多様性。彦坂健児他5名。第78回日本寄生虫学会、平成21年3月27-28日、東京。
 2. Inhibitory effect of (-) Epigallo catechin-3-gallate from green tea on the growth of *Babesia* parasites. Mahmoud Abou-laila 他2名。第78回日本寄生虫学会、平成21年3月27-28日、東京。
 3. バベシア感染に対するオリゴマンノース糖鎖被覆リポソームワクチンの評価。横山直明他5名。第78回日本寄生虫学会、平成21年3月27-28日、東京。
 4. ヒトバベシア症の簡易迅速血清診断法の開発。井関博他6名。第147回日本獣医学会、平成21年4月2-4日、宇都宮市。
 5. バベシア症に対するオリゴマンノース糖鎖被覆リポソームワクチンの効果。横山直明他9名、第147回日本獣医学会、平成21年4月2-4日、宇都宮市。
 6. *Babesia microti* 新規抗原 Bm94 の同定と性状解析。大岡秀雄他6名、第147回日本獣医学会、平成21年4月2-4日、宇都宮市。
 7. LAMPによる *Plasmodium cynomolgi* 遺伝子検出法の開発。高橋延之他4名、第147回日本獣医学会、平成21年4月2-4日、宇都宮市。

8. Development of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid diagnosis of *Babesia microti* infection. Iseki Hiroshi 他4名。XXII Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology、平成21年8月8-13日、カルガリー。
9. 北海道十勝・日高管内における生息マダニの小型ピロプラズマの保有調査。横山直明他9名。第148回日本獣医学会、平成21年9月25-27日、鳥取市。
10. Molecular characterization of a new spherical body protein of *Babesia bovis* and evaluation its potential use for serodiagnosis. Terkawi M. Alaa 他5名。第148回日本獣医学会、平成21年9月25-27日、鳥取市。
11. 人獣共通サルマラリア・*Plasmodium knowlesi*に対する遺伝子簡易検出法の開発。井関博他3名。第148回日本獣医学会、平成21年9月25-27日、鳥取市。

厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進研究事業）

分担研究報告書

寄生虫疾患の病態解明及びその予防・治療をめざした研究

フィールドで利用しやすい住血吸虫免疫診断法改良に関する研究

研究分担者 大前比呂思 国立感染症研究所・寄生動物部 室長

研究協力者 千種 雄一 獨協医科大学・熱帯病寄生虫病センター 教授

研究要旨 住血吸虫症の免疫学的検査法の改良をおこない、メコン住血吸虫症有病地において疫学調査を継続した。

住血吸虫症有病地における本症対策の現場で使用可能な高感度免疫検査法の開発にむけて、TSP-ELISA の導入を進めた。本年度は、ELISA の 2 次反応試薬について検討し、HRP-Protein G が、従来使用してきた HRP-抗ヒト IgG よりも約 10 倍高い希釈倍率で使用可能なことがわかった。フィールドでの使用のために開発した迅速法である whole blood-ELISA では通常より高濃度の 2 次抗体を使用するので、HRP-Protein G を使用できれば経済的な負担の軽減が期待される。

また、2009 年 4～5 月にカンボジア、クラチェ県にてメコン住血吸虫症調査を実施した。血清検査（ELISA）を実施した 8 村落の抗体陽性率は 6.7%～72.5%であった。高い抗体陽性率を示した 2 村落では其々 10%および 30%の児童に糞便内虫卵が確認された。対象地域は、2005 年に行った Kato-katz 法による虫卵検査では、陽性者が検出されなかったが、今年度の調査で、未だ感染の機会が多い地域が、点在していることがわかった。

A. 研究目的

住血吸虫症は現在でも世界的に重要な寄生虫性疾患であり、有病地においては住民の健康被害のみならず、社会経済的な問題ともなっている。現在、多くの有病地で、集団治療を根幹とした本症の対策が進められているが、対策の成果に伴う感染強度の低下により、従来本症対策の現場で使用されてきた診断法（Kato-Katz 法）では検出感度が不十分であることが指摘されている。そのため有病地のフィールドで容易に実施できるような、高感度で廉価な検査法の開発が求められている。

上記の現状を踏まえ、これまでにフィールドで使用可能な免疫学的検査法として、

whole blood-ELISA を開発し、日本住血吸虫症およびメコン住血吸虫症検査への応用を試みてきた。本研究では、さらに容易に本法が実施できるように、ELISA 操作の簡易化を目指し、TSP (transferred solid phase)-ELISA の導入を検討した。

B. 研究方法

TSP-ELISA では、マイクロプレートの蓋状のプレートに 96 本の樹脂製の突起が固定された“イムノ TSP”（Nunc 社）を用いる。各突起は 96 穴マイクロプレートの各穴に入るように配置されている。ELISA を施行する際この突起に抗原を吸着させておき、あらかじめ血清や標識抗体を分注した 96 穴プレートにイムノ TSP を移動させること

で反応を進めていく。この方法が実施できれば、分注作業に必要な時間が節約できると同時に、施行者の技術の差異が ELISA 結果に与える影響を回避できる。今年度は、主に酵素標識試薬（2次反応試薬）について検討し、2次抗体として従来使用している HRP-抗ヒト IgG（ヤギ血清：55252 Cappel 社；以降 HRP-IgG）と、HRP-Protein G（101223, Invitrogen）の違いについて、ELISA（従来法および TSP-ELISA）で比較した。抗原には日本住血吸虫卵抗原およびメコン住血吸虫卵抗原を用いた。陰性対照血清として日本人プール血清と、非有病地に住むカンボジア人プール血清を用いた。また、陽性対照血清としては各住血吸虫症患者プール血清を用いた。

さらに、メコン住血吸虫症の疫学調査として、2009年4～5月にカンボジア、クラチェ県にて血清検査および糞便検査を行った。検査はカンボジア保健省 Center for Parasitology, Entomology and Malaria Control(CNM)による本症対策の一環として実施した。血清検査はクラチェ県の8村落の小学校児童を検査対象とし、濾紙採血検体を日本に持ち帰って ELISA をおこなった。糞便検査は2村落の小学校について、Kato-Katz 法（KK法）およびホルマリン・デタージェント法（FD法）を実施した。

C. 研究結果

改良した免疫検査法による結果と従来法によるメコン住血吸虫症での検査結果を比較して示す（図1）。陽性対照血清（黒丸）では、HRP-Protein Gが15000～20000倍希釈で、従来法の HRP-IgG（2000倍希釈）に相当する ELISA 値を示した。また、陰性対照

血清（カンボジア人：白丸、日本人：三角）は HRP-Protein G でより低い値を示した。日本住血吸虫抗原でも同様の結果が得られた。TSP-ELISA においても、HRP-Protein G は HRP-IgG と比して、約10倍の希釈倍率で同等の反応を示した。

また、カンボジア、クラチェ省の村落における疫学調査の結果では、従来血清を用いた ELISA 陽性率は6.7%～72.5%とかなり幅のある結果となった（表1）。陽性率の高かった2村落について糞便検査を実施したところ、メコン住血吸虫卵陽性率はそれぞれ FD法で30.2%、10.2%、KK法で10.4%、0%であった（表2）。

D. 考察

今回、HRP-Protein G の2次反応試薬としての利用について検討した結果、HRP-IgG よりも高い希釈倍率で使用可能なことがわかった。通常の ELISA では HRP-IgG は問題なく使用できるが、現地調査用に開発した whole blood-ELISA では、従来法の約10倍濃度で2次反応試薬を使用するため、HRP-Protein G が使用できれば、検査のコスト削減につながる。また、HRP-IgG はヤギ血清であるため、ロットによる力価の差を考慮し補正して使用しなければならないが、HRP-Protein G はリコンビナントの Protein G なので、ロット差は少ないと考えられる。

カンボジアでは10年以上にわたる対策事業の成果により、メコン住血吸虫の有病率は激減した。2005年に行った KK法による糞便検査では、クラチェ省のいずれの村落でも、糞便中の虫卵陽性者はみられなかった。しかし、その後数年で、隣接した村落であっても、かなり大きな違いが生まれ、

今回、高い抗体陽性率を示した村落では、多くの児童で糞便内虫卵が確認された。メコン住血吸虫の感染は、現在、狭い範囲に限局されているが、未だ継続していると考えられる。

また、メコン住血吸虫症の低浸淫地における糞便検査法として KK 法の感度が不十分であることは、幾つかの文献で指摘されているが、今回の検査結果においても FD 法に比較して KK 法での検出率は低かった。一方で、FD 法には KK 法に比して多くの器材、労力、時間を要するという欠点がある。糞便検査に代わりえる、より簡便で高感度・廉価な検査法が開発される意義は大きいと思われる。

E. 結論

HRP-Protein G の 2 次反応試薬としての利用について検討した結果、HRP-IgG よりも高い希釈倍率で使用可能なことがわかった。今後は、従来法との整合性を含め、HRP-Protein G を用いた ELISA の特性を検証していく必要がある。

プラジカンテルによる集団治療を中心とした対策の進展により、カンボジアのメコン住血吸虫症有病率は劇的に減少した。しかし一部の村落では未だに高い ELISA による抗体陽性率および虫卵陽性率を示した。今後は、狭い範囲に点状に残る感染源の対策を重点的に行う必要があると思われる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ishikawa H, Ohmae H.

Modeling the dynamics and control of transmission of *Schistosoma japonicum* and *S. mekongi* in Southeast Asia. *Korean J of Parasitol* 47: 1-5, 2009.

2) Kato-Hayashi N, Kirinoki M, Iwamura Y, Kanazawa T, Kitikoon V, Matsuda H, Chigusa Y.

Identification and differentiation of human schistosomiasis by PCR. *Exp Parasitol*. 124: 324-329, 2010.

2. 学会発表

1) Ohmae H., Kirinoki M, Matsumoto J, Chigusa Y., Blas BL, Ducusin B, Sinuon M, Socheat D, Matsuda H. Comparison of schistosomiasis control programs in Southeast Asia; Control of schistosomiasis japonica in Philippines and that of schistosomiasis mekongi in Cambodia.

The 1st international meeting of Asian Developing Bank for control of parasitic diseases in the Southeast Asian countries, Vientiane, Laos PR. October 29-31 2009.

2) 桐木雅史、林尚子、Muth Sinuon、Doung Socheat、Viroj Kitikoon、千種雄一、松田肇. カンボジアにおける集団駆虫対策下のメコン住血吸虫症再流行. 第 50 回 日本熱帯医学会大会 宜野湾市 2009 年 10 月

図1 メコン住血吸虫症 ELISA における酵素標識抗体 (2次抗体) の比較

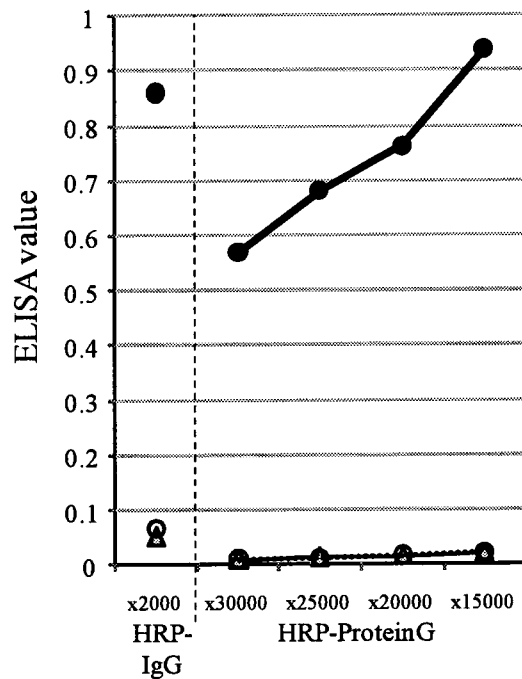


表1 カンボジア・クラチェ県の8村落におけるメコン住血吸虫症の抗体検査結果

Village	ELISA	
	positive / examined	positive rate(%)
Kompong Krabei	68 / 130	52.3
Achen	9 / 127	7.1
Sambo	19 / 180	10.6
Sre Khoeun	38 / 125	30.4
Chatnol	10 / 150	6.7
Kbal Chuor	95 / 131	72.5
Sambok	68 / 291	23.4
Rokakandal	16 / 150	10.7

表2 カンボジア・クラチェ県の2村落における糞便検査結果

Kompong Krabei n=88	<i>Schistosoma mekongi</i>	<i>Ascaris lumbricoides</i>	hookworm	<i>Trichuris trichiura</i>
FD positive	9	0	24	2
KK positive	0	0	19	0
both positive	0	0	13	0
total	9	0	30	2
rate (%)	10.2	0.0	34.1	2.3

Kbal Chuor n=96	<i>Schistosoma mekongi</i>	<i>Ascaris lumbricoides</i>	hookworm	<i>Trichuris trichiura</i>
FD positive	29	0	12	2
KK positive	10	2	9	1
both positive	10	0	4	1
total	29	2	17	2
rate (%)	30.2	2.1	17.7	2.1

FD 法：ホルマリンエーテル法

KK 法：Kato-Katz 法

人獣共通寄生原虫・蠕虫症の寄生適応に関する分子生物学的解析

研究分担者 奈良武司 順天堂大学大学院医学研究科 准教授

研究要旨：シャーガス病の病原体*Trypanosoma cruzi*における遺伝的多様性創出機構を解明することを目的として、dihydroorotate dehydrogenase (DHOD) 遺伝子の多型を解析した。DHOD遺伝子は調べた分離株全てで3-4コピー存在した。塩基配列の比較から、分離株間よりも同一個体内に存在する遺伝子コピー間で塩基置換が多い系統が存在した。従来*T. cruzi*では、有性生物に見られるように個体内での遺伝的多様度が極めて小さいと報告されていたが、本研究で初めて無性生物に特有の進化的特徴が見い出された。

A. 研究目的

本研究は、シャーガス病（アメリカトリパノソーマ症）や日本住血吸虫症など、人獣共通寄生虫症を引き起こす病原体の特異な分子機構を同定し、新規治療薬開発およびワクチン開発を行なうことを目的とする。

中南米に広く分布する風土病、シャーガス病は、多様な病態を示す疾患である。急性期では心筋炎が致命的になるほか、急性期を経ずに感染後10数年経って心筋炎や巨大結腸を発症する場合（慢性期シャーガス病）や、一生無症候のまま経過する場合もある。このような多様な病態の成因や薬剤耐性の出現機構を考える上で、その病原体である寄生原虫*Trypanosoma cruzi*における遺伝的多様性の創出機構の解明は非常に重要である。そこで本年度は、*T. cruzi*における遺伝子の多型解析および分子進化的解析を行ない、遺伝的多様度を明らかにすることを目的として研究を進める。最終的に、*T. cruzi*の遺伝的多様性を生成する遺伝機構のモデルを確立し、集団遺伝学的意義付けと治療薬開発への応用について考察する。

B. 研究方法

ピリミジンヌクレオチド生合成経路の第4酵素dihydroorotate dehydrogenase (DHOD) 遺伝子をモデル遺伝子として、*T. cruzi*分離株よりDHOD遺伝子の単離・同定を行なった。用いた*T. cruzi*株は、SylvioX10 CL4（系統I）、CANIII CL2株（系統IIa）、Esmeraldo CL3およびY CL2（系統IIb）、TulahuenおよびCL Brener（ともに系統IIe）である。このうち系

統IIeは、IIbとIIcのハイブリッドと考えられている。各*T. cruzi*株よりDNAを抽出し、ゲノムDNAライブラリーを作製した。得られたゲノムDNAライブラリーについて、DHOD遺伝子をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行ない、陽性DNAクローンを複数得た。各*T. cruzi*株についてDHOD遺伝子の制限酵素地図を作製し、タイピングを行ない、それぞれのタイプについてDHOD遺伝子の塩基配列を決定した。

C. 研究結果

*T. cruzi*は2倍体の生物であり、多くの遺伝子は1対存在することが知られている。一方、Tulahuen株にはDHOD遺伝子が3コピー、それ以外の5株ではそれぞれ4コピー存在することが明らかとなった。塩基配列を決定した計23遺伝子コピー（4コピー×5株+3コピー×1株）の比較からDHODのコード領域942塩基中61箇所の塩基置換が認められた。系統IIbに属するEsmeraldo CL3およびY CL2の間では、同じ塩基配列を持つ遺伝子コピーの存在も明らかとなった。また、系統IIeに属するTulahuenの3遺伝子コピーの塩基配列は、CL Brenerの4コピーのうち3コピーのそれと完全に一致し、TulahuenとCL Brenerが非常に近縁であることが明らかとなった。

また、*T. cruzi*のDHOD遺伝子における塩基置換の d_N/d_S 比を求めたところ、0.149 (< 1) となり、DHOD遺伝子は負の淘汰（機能制約）を受けていることが明らかとなった。

次に、DHOD遺伝子の塩基配列について近隣結合法を用いた無根系統樹を作成した。そ

の結果、系統Iおよび系統IIaの配列はそれぞれ単系統を形成し、系統Iのcladeには系統IIeの配列の一部が含まれた。系統IIbの配列は系統IIeの残りの配列とともに単系統群を形成したが、株ごとの単系統性は支持されず、系統IIbではむしろ株内の遺伝子コピー間で塩基多型度が大きいことが明らかとなった。また、Esmeraldo CL3とY CL2（ともに系統IIb）の間で同一の配列を持つ遺伝子コピーについては両株の分岐以前にオルソログスであると考えられたが、残りの3コピーについてオルソログスなのかパラログスなのかを示すデータは得られなかった。

D. 考察

本研究より、*T. cruzi*の個体内（株内）では単一遺伝子のコピー間の塩基配列は全く同一か、塩基置換はあっても著しく少ないとする従来の知見と矛盾し、無性生物に特徴的な塩基多型の創出が起きていることが強く示唆された。

一般に無性増殖を行なう生物では、厳密な意味で相同染色体やアレルといった遺伝学的概念が成立しない。また、*T. cruzi*が2倍性の生物であるとする根拠は実は曖昧で、いくつかの単一遺伝子が個体内に1対（2コピー）存在することから提唱されているにすぎず、多くの場合単一遺伝子は「サイズの異なる2本の染色体DNA」上に局在している。したがって、塩基多型の成因として相同組換えを想定した場合それがどのような機構によって起こるのか全く不明である。一方、本研究で用いたDHOD遺伝子は個体内（株内）に4コピー存在し、それぞれのコピーは異なる染色体DNA上に位置することから、単一遺伝子というよりもむしろ*T. cruzi*ゲノムに2コピー（2対）存在する遺伝子と捉えることができる。そのために従来の方法では検出できなかった遺伝子コピー間の塩基置換を検出することができた可能性がある。また、この特徴は解析した*T. cruzi*全ての系統で保持されていることから、DHOD遺伝子のコピー数の変動は起こりにくいと予想される。したがって、DHODを標的とした薬剤開発を進める際に遺伝子重複による薬剤耐性株の出現は低いものと考えられる。

E. 結論

本研究では、DHOD遺伝子の全てのコピーが系統を超えてオルソログスである証拠は得られず、個体内で遺伝子組み換えが起きてい

る可能性は否定できない。*T. cruzi*の遺伝学的特徴を明らかにするためには今後系統とその株数を増やし、より詳細な解析を行なっていく必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

Matoba K, Nara T, Aoki T, Honma T, Tanaka A, Inoue M, Matsuoka S, Inaoka DK, Kita K, Harada S. Crystallization and preliminary X-ray analysis of aspartate transcarbamoylase from the parasitic protist *Trypanosoma cruzi*. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 65: 933-936, 2009

Bao Y, Weiss L, Hashimoto M, Nara T, Huang H. Protein kinase A regulatory subunit interacts with P-type ATPases in *Trypanosoma cruzi*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 80 (6): 941-943, 2009

Abdel-Hafeez EH, Kikuchi M, Watanabe K, Ito T, Yu C, Chen H, Nara T, Arakawa T, Aoki Y, Hirayama K. Proteome approach for identification of schistosomiasis japonica vaccine candidate antigen. *Parasitol Int*, 58 (1): 36-44, 2009

H. 知的財産権の出願・登録状況 特になし

厚生労働科学研究補助金（地球規模保健課題推進研究事業（国際医学協力研究事業））

「寄生虫疾患の病態解明及びその予防・治療をめざした研究」

分担研究報告書

人獣共通幼条虫症（脳囊虫症、エキノコックス症）の病態、診断、治療、予防に向けた
研究

研究分担者 伊藤 亮 旭川医科大学寄生虫学講座

研究要旨

人獣共通寄生虫疾患である脳囊虫症とエキノコックス症は、地球規模で環境汚染と流行拡大が年々深刻化しており、WHO によって狂犬病その他とともに Neglected Tropical Diseases にリストアップされている。本研究では、これらの寄生虫疾患についての免疫、遺伝子診断法の改善と、病原体である寄生虫の遺伝子多型解析ならびに解析結果に基づく感染地域の特定についての研究を実施した。1) 世界各地で囊虫症を引き起こしている有鉤条虫(*Taenia solium*)は、ミトコンドリア DNA の遺伝子解析により大きくアジア型とアメリカ・アフリカ型に分けることができる(Nakao et al. 2002, Parasitology 124) が、アジアではさらに国や地域ごとに特徴的なハプロタイプが存在する。このような寄生虫の遺伝子情報と患者の旅行歴とを照らし合わせることにより、患者が感染した地域を特定することができた。2) Loop-mediated isothermal amplification(LAMP) 法を用い、人体寄生テニア属条虫 3 種の遺伝子鑑別法を確立した。3) 上記 1)、2) の研究から、アジア各地に分布している人体寄生テニア条虫、*Taenia asiatica* と *Taenia saginata* の交雑個体が確認された。4) エキノコックス属条虫について、ミトコンドリア DNA と核の遺伝子に基づく分子系統学ならびに系統地理学的研究を行った。4) 囊虫症に関する新しい簡便な診断抗原精製法を確立した。5) エキノコックス症に関する迅速診断法を確立した。これらの基礎研究成果に基づき、6) 患者確認に必要な血清抗体検査法、遺伝子検査法の改善、開発に取り組み、感染者と感染動物の検出精度が大きく向上し、流行の現場で役立つ調査指針をほぼ確立することができた。今後は、抗体応答解析や遺伝子多型解析に基づいて、致死的な人獣共通幼条虫症を引き起こす一群の条虫による国内での突発的な流行（脳囊虫症）等が発生する場合にもリアルタイムで対応し、対策を講じることが可能と期待される。また、北海道の地方病であるエキノコックス症について我々が確立した検査法は、世界最高水準との国際評価を得ている。さらに、我々が開発した迅速診断キットは特別な経験や施設を必要としないため、国内での住民健診にも応用できると考えている。7) 米国疾病情報対策センター（CDC）から米国内でのエキノコックス症住民健診、確定検査法として旭川医科大学で開発した血清診断用抗原(RecEm18、RecAgB8/1)を正式採用したいという協力要請を 2010 年 1 月に受けている。

A. 研究目的

人獣共通幼条虫症として地球規模で深刻な問題を提示している疾患は、脳囊虫症とエキノコックス症（単包虫症ならびに多包虫症）である。人体寄生テニア属条虫として3種(*Taenia solium*、*Taenia saginata*、*Taenia asiatica*)が知られているが、これらの中で人体脳囊虫症を引き起こすのは *T. solium* 1種である。本研究では1) これら3種が同所的に分布している地域（タイ、中国）の発見と、3種鑑別法の改善および開発、2) *T. solium* と他の2種の分子系統学的評価、3) 囊虫症流行地での患者検出方法の改善と新しい抗原精製法の開発、4) 遺伝子解析により患者の感染地域を特定する試みについて研究を展開した。エキノコックス症に関しても同様な遺伝子解析による分類の再検討、種内変異解析、病原性と病態転換（内生出芽と外生出芽）、宿主転換（イヌ科動物とネコ科動物）と血清診断法の改良と評価を試みた。

B. 研究方法

材料：テニア属条虫症：テニア条虫感染者から駆虫された虫体、糞便、血清
囊虫症：摘出病巣（囊虫）、血清、髄液
エキノコックス症：世界各国において画像診断ならびに外科手術により確定診断がついた単包虫症、多包虫症、その他の包虫症患者から得られたエタノール固定原頭節、血清、ならびに野生動物から得られたエタノール固定原頭節、虫卵と成虫
裂頭条虫症：国内外の魚類から採取され、アルコール固定された幼虫と患者から排出されアルコール固定された成虫
方法：寄生虫体（虫卵、幼虫、成虫）なら

びに宿主糞便から DNA を抽出し、ミトコンドリア DNA と核の遺伝子を解析した。また、新たに LAMP 法の導入を試みた。抗体検査についても各種遺伝子組み換え抗原を用いてイムノブロット、ELISA、さらに迅速キットを用いる迅速検査を実施した。

C. 研究結果

1. テニア症・囊虫症研究

- 1) 新しい遺伝子鑑別法の開発:すでに確立していた遺伝子検査法により鑑別した3種条虫を用い、新しい簡便な遺伝子鑑別法(LAMP法)を確立した(論文19)。さらに、患者から得られた糞便を用いてLAMP法の評価を試みた結果、従来法である Multiplex PCR よりも感度が格段に高くなることを明らかにした(国際学会発表9)。
- 2) 遺伝子解析に基づくテニア条虫の雑種の確認:タイならびに中国で採集されたテニア条虫から無鉤条虫とアジア条虫の交雑個体が確認された(論文8,19;国際学会発表5,9,15)。
- 3) 遺伝子解析に基づく感染地の特定:国内で外科治療を受けた症例において、大脳から摘出された病理標本を用いた遺伝子解析の結果と患者の旅行歴と照らし合わせることで、感染地域を特定できた(論文6)。

2. エキノコックス症研究

- 1) 分子系統学的、分子検査学的研究:①ペルーの家畜並びに患者から得られた単包虫病巣を用いた遺伝子解析により、遺伝子型 G1, G6, G7 が確認された(論文16)。
- ②トルコで採集されたエキノコックス条虫の遺伝子解析により G7 を確認した(論文15)。
- ③北半球に分布している多包条虫