

BbTRAP-T、BbSBP-1を用いたELISAに比較して、優れた感度と特異性を有している事がアジアやアフリカの試料を用いて明らかとなった。

次に、ウシバベシア *Babesia bovis* の膜抗原遺伝子BV5650およびBV8970を用いたnPCRについてRAP-1遺伝子との比較検討を行った。その結果、BV5650遺伝子を用いたnPCRが一番感度が高い事がアジア・アフリカの試料を用いて明らかとなった。

次に第5の人マラリア原虫として注目されて来ている *Plasmodium knowlesi* のLAMP法について検討を行った。*P. knowlesi* のb-tubulin遺伝子情報を基にプライマーを設計し、LAMP法を確立した。本LAMP法は、特異性が高く他の人マラリア原虫遺伝子と判別可能であり、また感度も通常のPCR法よりも100倍高い事が明らかとなった。

さらに、*B. microti* のBM94組換え抗原を作製し、ELISAについて検討した。その結果、BMN1-17組換え抗原を用いたELISAは、特異性が高く、マウス感染実験において、感染後約90日まで抗体検出が可能であった。

(2) バベシア症に対する治療薬の検討

trepn nerolidol 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1種類のウマバベシア原虫に対して、trepn nerolidol は増殖抑制効果を示したが、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、対照よりも低い赤血球寄生率が観察された。また、artesunate のウシ、イヌ及びウマ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ところ、濃度依存的に、バベシアの増殖を抑制した。

D. 考察

Spherical body (SB) はバベシアに特異的

な細胞小器官である。これまで、*B. bovis* に関し3種類のSB遺伝子が報告されている。最近4番目のSB遺伝子配列が報告されているが、その機能等詳細については検討されていない。本研究により、BbSBP-4 は世界的に広く保存されている遺伝子であり、コードする蛋白質は、赤血球内発育の後期に強く発現される事が明らかとなった。また、BbSBP-4 蛋白質を用いたELISAはこれまで報告されている抗原よりも感度特性が高い事がアジア・アフリカの試料を用いて明らかとなり、今後、世界的な疫学調査に有用であることが示唆された。

次に、ウシバベシア *Babesia bovis* の膜抗原遺伝子BV5650およびBV8970を用いたnPCRについて検討を行ったところ、これまで報告されているRAP-1遺伝子を用いたnPCRよりも感度が高い事が明らかとなった。今後遺伝子診断法についても、ELISAと同様にこれまで報告されている多くの遺伝子との比較検討を行い、どの遺伝子が世界的な疫学調査に適しているか検討する事が期待される。

Plasmodium knowlesi のLAMP法は、特異性が高く、またサルを用いた実験感染により従来のPCRおよびnPCRよりも感度が高い事が明らかとなった。今後、流行地での人及びサルの試料により本法の有用性について検討を行う必要が有る。

さらに、*B. microti* のBM94組換え抗原を用いたELISAは、特異性が高く、マウスの感染実験において、長期間にわたり抗体検出が可能であった。今後、流行地の人患者血清を用いて、ELISAの有用性について更に検証することが必要である。

trepn nerolidol は、マラリア原虫やリーシュマニアのイソプロテノイド合成の阻害剤である。本研究においても、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。しかし、マウスのバベシア感染実験では、trepn nerolidol により有為な原虫増殖抑制効果は示されなかった。また、抗マラリア剤として使用されている

artesunate がバベシアに対する増殖抑制効果を示したことから、今後、マラリアも治療で行われているように artesunate と他の薬剤等の併用等について検討する事により、ベシア感染に対する新たな治療効果の薬剤の開発が期待される。

E. 結論

本研究では、血清診断法として *Babesia bovis* の SBP4 組換え抗原組み換え抗原を用いた ELISA、遺伝子診断法として *Babesia bovis* の BV5650 遺伝子を標的とした nPCR を確立した。また、人獣共通原虫症として重要なサルマラリア原虫とネズミバベシアに対する遺伝子診断法及び血清診断法を開発した。更にバベシアに対する trepanerolidol および artesunate の増殖抑制効果について検討を行った。今後これらの研究成果を、バベシア病やマラリアに対する有効診断法や治療法として実用化について更に検討する事が重要である。

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Hikosaka K, Watanabe YI, Tsuji N, Kita K, Kishine H, Arisue N, Palacpac NM, Kawazu SI, Sawai H, Horii T, Igarashi I, Tanabe K. Divergence of the mitochondrial genome structure in the apicomplexan parasites, *Babesia* and *Theileria*. *Mol Biol Evol.* 27(5):1107-1116, 2010.
2. Aboulaila M, Sivakumar T, Yokoyama N, Igarashi I. Inhibitory effect of terpene nerolidol on the growth of *Babesia* parasites. *Parasitol Int.* 59(2):278-282, 2010.
3. Iseki H, Zhou L, Kim C, Inpankaew T, Sununta C, Yokoyama N, Xuan X, Jittapalpong S, Igarashi I. Seroprevalence of *Babesia* infections of dairy cows in northern Thailand. *Vet. Parasitol.* 170(3-4):193-196, 2010.
4. Aboulaila M, Yokoyama N, Igarashi I. Development and evaluation of two nested PCR assays for the detection of *Babesia bovis* from cattle blood. *Vet. Parasitol.* 172(1-2):65-70 2010.
5. Iseki H, Kawai S, Takahashi N, Hirai M, Tanabe K, Yokoyama N, Igarashi I. Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method as a tool for diagnosis of infection by the zoonotic simian malaria parasite *Plasmodium knowlesi*. *J Clin Microbiol.* 48(7):2509-2514, 2010.
6. Goo YK, Terkawi MA, Jia H, Aboge GO, Ooka H, Nelson B, Kim S, Sunaga F, Namikawa K, Igarashi I, Nishikawa Y, Xuan X. Artesunate, a potential drug for treatment of *Babesia* infection. *Parasitol Int.* 59(3):481-486, 2010.
7. Ooka H, Terkawi MA, Goo YK, Luo Y, Li Y, Yamagishi J, Nishikawa Y, Igarashi I, Xuan X. *Babesia microti*: Molecular and antigenic characterizations of a novel 94-kDa protein (BmP94). *Exp Parasitol.* 127(1):287-293 2011.
8. Terkawi MA, Huyen NX, Wibowo PE, Seuseu FJ, Aboulaila M, Ueno A, Goo YK, Yokoyama N, Xuan X, Igarashi I. Spherical body protein 4 is a new serological antigen for the global detection of *Babesia bovis* infection in cattle. *Clin Vaccine Immunol.* 18(2):337-342, 2011.

2)学会発表

1. ウシバベシア2種を同時に診断可能なプロテインアレイの開発。玉城志穂他6名。第149回日本獣医学会学術集会、平成22年3月26-28日、武蔵野市。
 2. 小型ピロプラズマを人工感染させたウシの病態解析。横山直明他8名。第149回日本獣医学会学術集会、平成22年3月26-28日、武蔵野市。
 3. Apical membrane antigen-1 (AMA-1): new aspects towards babesia vaccine candidate。Mohamad Alaa Terkawi 他4名。平成22年3月26-28日、武蔵野市。
 4. Apicomplexa 生物群におけるミトコンドリアゲノムの進化と多様性。彦坂健児他8名。第79回日本寄生虫学会大会、平成22年5月20-21日、旭川市。
 5. Validation and evaluation of recombinant antigens for serodiagnosis of *Babesia bovis* infection。M. Alaa Terkawi 他7名。第79回日本寄生虫学会大会、平成22年5月20-21日、旭川市。
 6. Molecular characterization of a new spherical body protein of *Babesia bovis* and evaluation of its potential use for serodiagnosis。Ikuo Igarashi 他5名。The XIIth International Congress of Parasitology、平成22年8月15-20日、シドニー。
 7. A novel molecular diagnostic tool for zoonotic simian malaria parasites *Plasmodium knowlesi* infection。S. Kawai 他6名。The XIIth International Congress of Parasitology、平成22年8月15-20日、シドニー。
 8. LAMPによる *Plasmodium cynomolgi* 遺伝子検出法の開発。高橋延之他4名。第56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、平成22年10月2-3日、札幌。
 9. 世界に分布する小型ピロプラズマ。Khukhuu Altangerel 他9名。第56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。平成22年10月2-3日、札幌。
 10. LAMPによる *Plasmodium cynomolgi* 遺伝子検出法の開発。高橋延之他4名。第51回日本熱帯医学会大会、平成22年12月3-4日、仙台。
 11. Spherical body protein 4 is a new serological antigen for the global detection of *Babesia bovis* infection in cattle。M. Alaa Terkawi 他9名。45th Annual Japan-US Joint Conference on Parasitic Diseases、平成23年1月10-11日、東京。
- 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

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

住血吸虫症の検査・診断・対策に関する研究

分担研究者 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・熱帯病寄生虫病室 教授

研究要旨 2000年代になってフィリピンで新しく報告された日本住血吸虫症の浸淫地で行われた疫学調査の結果を、従来から調査されてきた高度浸淫地での調査結果と比較した。フィリピンでは、2002年に、Gonzaga, CAGAYAN州、2005年に、Calatrava, NEGROS州と、複数の日本住血吸虫症の浸淫地が新しく報告された。その両地域で行われた免疫血清検査と腹部超音波検査を中心とする疫学調査の結果を、従来から高度浸淫地として知られる同国、SORSOGON州の浸淫地での結果と比較・分析した。虫卵抗原を用いたELISA検査では、陽性率が20歳程度まで年齢とともに増加していく傾向が、CAGAYAN州とSORSOGON州でみられた。また、年齢が進むにつれて、進行した肝線維化を示す腹部超音波所見:Network patternの比率が増加していく傾向は、3つの浸淫地全てでみられた。2000年代になって新たに確認されたフィリピンの2つの日本住血吸虫症浸淫地の気候は、日本住血吸虫の媒介貝である *Oncomelania quadrasi* が生息できる条件にあっている。また、疫学調査の結果、両地域、特にCAGAYAN州の浸淫地では、従来から日本住血吸虫症浸淫地であったと推測された。

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。また近年は、地球温暖化や水源開発に伴う環境変化による、媒介貝生息地の拡大に伴う浸淫地の拡大も懸念されている。

上記のような現状を考えると、新しく確認された住血吸虫症浸淫地については、2つの可能性、1) 住血吸虫症浸淫地の拡大 2) 従来認知されていなかった住血吸虫症浸淫地の発見 を、区別することが重要である。そこで、免疫血清診断や腹部超音波検査を利用した疫学調査で、両地域を区別する方法について検討した。

B. 研究方法

2008年から2010年にかけて、Gonzaga, CAGAYAN州と、Calatrava, NEGROS州の新しく発見された日本住血吸虫症浸淫地で行った調査の結果を、2005年から2007年にSORSOGON州の日本住血吸虫症の高度浸淫地で行った調査結果と比較して分析した。

総計3,355人の対象者について、10歳間隔に、対象地域毎に7グループに分けた（0-9歳, 10-19歳, 20-29歳, 30-39歳, 40-49歳, 50-59歳, 60歳-）。Kato-katz法による糞便検査を行う一方、採取した血清を用いて、日本住血吸虫卵抗原によるELISA抗体価を求めた。また、あわせて腹部超音波検査を行って、肝線維化の進行について評価した。

被験者には、研究目的・方法について充分説明し、成人であれば本人から、未成年者であれば保護者から書面での承諾を得た。また、糞便中の虫卵陽性者はもちろん、血清診断のみでの陽性者に対しても、検査結果の情報を提供し、プラジカンテル投与を行うよう試みた。

C. 研究結果

虫卵抗原を用いた ELISA 検査では、10 歳以降での陽性率が、SORSOGON 州では 70% 程度、CAGAYAN 州では 50% 前後となり、年齢群間の差がみられなかった（図 1-A, 図 1-B）。一方、NEGROS 州では、各年齢群で全体的に陽性率が低いうえ、陽性率もばらばらであった（図 1-C）。

一方、腹部超音波検査の結果では、年齢が進むにつれて、進行した肝線維化と判断される腹部超音波所見：Network pattern を示す比率が増加していく傾向が、3 つの浸淫地でみられ、特に SORSOGON 州と CAGAYAN 州の 50 歳くらいまでの年齢層で、明らかだった（図 2-A, B, C）。また、SORSOGON 州では、10 代でも進んだ線維化を示す例がみられたのに対し、Network pattern の検出例は、CAGAYAN 州では 20 歳以降、NEGROS 州では 30 歳以降で増加する傾向がみられた。

D. 考察

2000 年代になって新たに確認されたフィリピンの 2 つの日本住血吸虫症浸淫地は、日本住血吸虫媒介貝である *Oncomelania quadrasi* の生息に適した気候環境で、毎月の月間降水量がほぼ 100mm を超え、明瞭な乾季がない。また、疫学調査の結果、CAGAYAN

州で新しく発見された日本住血吸虫症浸淫地では、虫卵抗原による ELISA の陽性率が、一定の年齢層以上では、ほぼ一定となる傾向を示した。この傾向は、従来から日本住血吸虫症の高度浸淫地として知られてきた SORSOGON 州でみられる傾向と同じである。

また、腹部超音波検査の結果では、3 つの浸淫地全てで、年齢が進むにつれ、進行した肝線維化を示す例の割合が増加する傾向が確認された。住血吸虫症の浸淫地では、長期間にわたり感染と治療を繰り返す結果、加齢とともに、次第に不可逆的な肝線維化を示す例が増加すると考えられている。新しく発見された CAGAYAN 州、NEGROS 州の浸淫地でも、この年齢と肝線維化の関係が確認されたことから、両地域ではかなり前から、住血吸虫の感染が繰り返していったことが示唆された。また、CAGAYAN 州では、超音波検査で進行した肝線維化を示しながら、ELISA の結果が陰性となった例も確認されたが、一般的にこのような例は、10 年以上前に日本住血吸虫に感染し、その後の治療が不十分であった例と考えられる。

E. 結論

2000 年代になって新たに確認されたフィリピンの 2 つの日本住血吸虫症浸淫地は、日本住血吸虫の媒介貝である *Oncomelania quadrasi* が生息できる気候環境にある。また、疫学調査の結果を解析した結果、両地域、特に CAGAYAN 州の浸淫地では、従来から日本住血吸虫症浸淫地であったと判断された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shimada M, Kirinoki M, Shimizu K, Kato-Hayashi N, Chigusa Y, Kitikoon V, Pongassakulchoti P, Matsuda H. Characteristics of granuloma formation and liver fibrosis in murine schistosomiasis mekongi: a morphological comparison between *Schistosoma mekongi* and *S. japonicum* infection. *Parasitology* 2010 ; 137:1781-1789.
- 2) Kumagai T, Furushima Shimogawara R, Ohmae H, Wang TP, Lu S, Chen R, Wen L, Ohta N. Detection of early and single infections of *Schistosoma japonicum* in the intermediate host snail, *Oncomelania hupensis*, by PCR and Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) assay *Am J Trop. Med Hyg* 2010, 83:542-548.
- 3) Kirinoki M, Chigusa Y, Ohmae H, Matsumoto J, Kitikoon V, Sinuon M, Saem C, Socheat D, Matsuda H. Application of whole-blood ELISA (WB-ELISA) for a field survey of schistosomiasis mekongi *Parasitology* 2011 (in press)
- 4) Kirinoki M, Chigusa Y, Ohmae H, Matsumoto J, Kitikoon V, Sinuon M, Saem C, Socheat D, Matsuda H. Efficacy of sodium metaperiodate (SMP)-ELISA for the serodiagnosis of schistosomiasis mekongi.

Southeast Asi J Trop Med Pub Hlth
(in press)

2. 学会発表

- 1) 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・クラチエ県におけるメコン住血吸虫症疫学調査. 第 79 回 日本寄生虫学会大会 旭川市 2010 年 5 月 20 日～21 日
- 2) 福原一磨、桐木雅史、千種雄一、尾藤伴行、井上真理、中村哲、松田肇、石川洋文. ラオス・コーン島村落間ネットワークモデルに基づくメコン住血吸虫症対策の評価. 第 79 回 日本寄生虫学会大会 旭川市 2010 年 5 月 20 日～21 日
- 3) Ohmae H, Kirinoki M, Suniko LS, Boldeero NP, Viacorte EA, Solon AA, Leonard LR, Leshem E, Chigusa Y. Surveys on newly found endemic foci in Southeast Asian countries 2. The 45th Japan-US Joint Conference on Parasitic Diseases. Tokyo, Japan January 10-11, 2011

図 1-A Sorsogon 州における日本住血吸虫卵抗原による ELISA 陽性率と年齢の関係

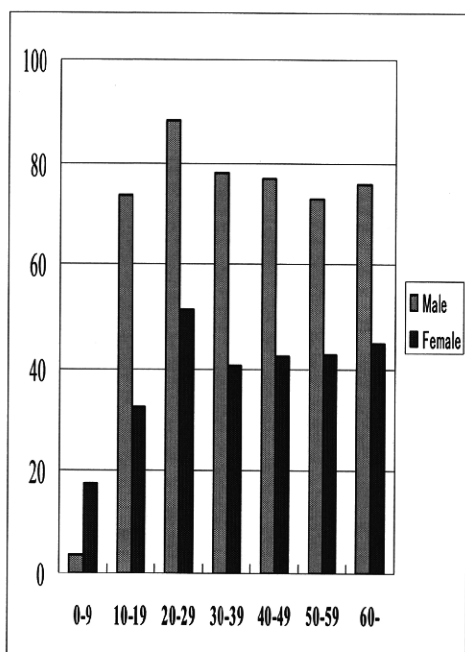


図 1-C Negros 州における日本住血吸虫卵抗原による ELISA 陽性率と年齢の関係

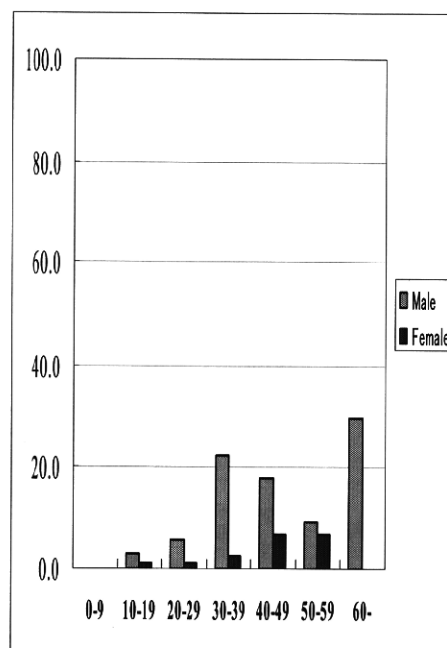


図 1-B Kagayan 州における日本住血吸虫卵抗原による ELISA 陽性率と年齢の関係

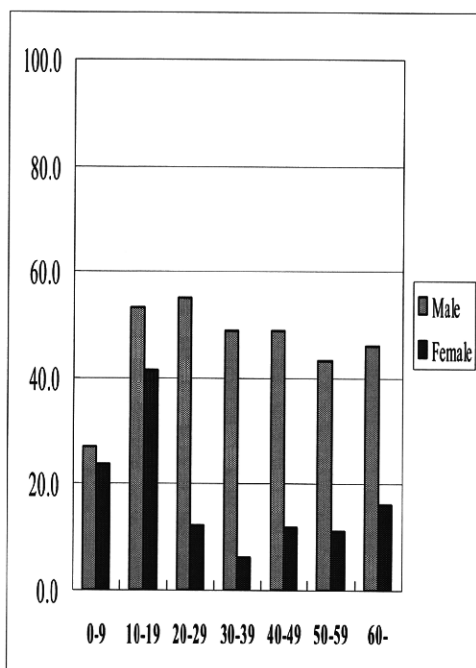


図 1-A Sorsogon 州における超音波検査による肝線維化の評価と年齢の関係

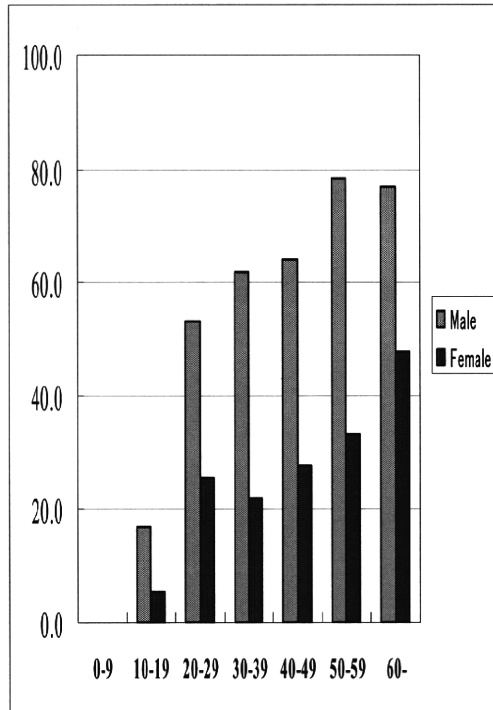


図 1-C Negros 州における超音波検査による肝線維化の評価と年齢の関係

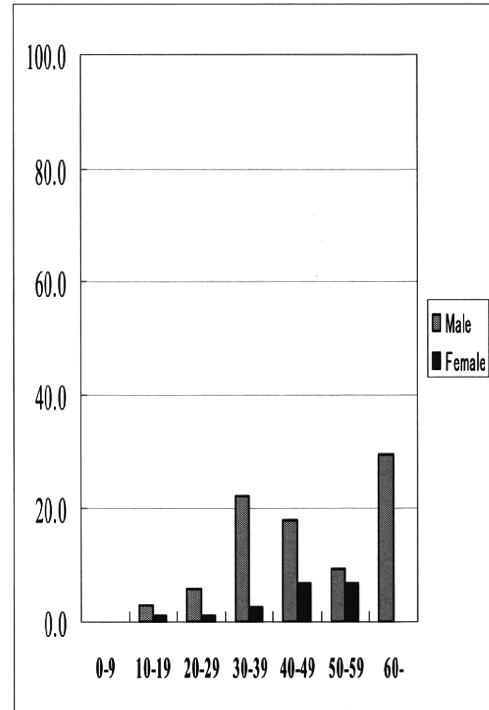
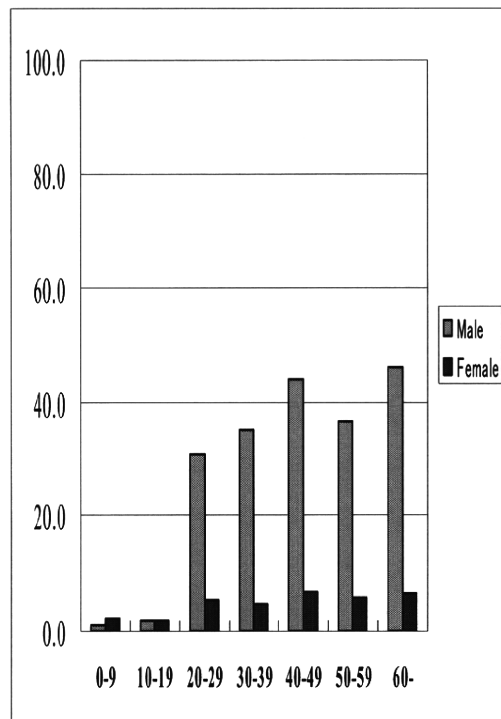


図 1-B Kagayan 州における超音波検査による肝線維化の評価と年齢の関係



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

分担研究者 奈良武司 順天堂大学大学院医学研究科 准教授

研究要旨:トリパノソーマ類を含むキネトプラスチダ類の生存に必須な特異オルガネラ、グリコソームの成立背景について解析した。その結果、近縁群のディプロネマ類では一部の解糖系酵素のペルオキシソーム移行が認められ、両生物群の共通祖先においてすでにグリコソームの原型が成立していた可能性が示唆された。

A. 研究目的

本研究は、アメリカトリパノソーマ症（シャーガス病）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。

トリパノソーマ類の生存に必須な特異オルガネラ、グリコソームは、移行シグナルの共通性などからペルオキシソームを起原とすることが示唆されているとともに、解糖系酵素や核酸代謝経路酵素の局在など、他の真核生物には無い特徴を示す。これら酵素は、ヒト酵素とは異なる局在性や生化学的性状を持つことから有望な薬剤標的と考えられる。本年度は、グリコソームの成立背景と生理的意義について解析した。ユーグレノゾア生物門のユーグレナ類、ディプロネマ類、およびトリパノソーマ類とボド類からなるキネトプラスチダ類は、進化上この順序で分岐したと考えられている。グリコソームはキネトプラスチダ類に存在する一方、ユーグレナ類には見出されていない。そこで、ユーグレナ類の分岐以降に出現したディプロネマ類について、解糖系酵素のアルドラーゼ（ALD）、およびピリミジン合成経路のオロチジン酸脱炭酸酵素（OMPDC、トリパノソーマ類ではオロト酸フォスホリボシルトランスフェラーゼ（OPRT）との融合酵素OMPDC-OPRTとしてグリコソームに局在する）の遺伝子クローニングと細胞内局在の解析を行なった。

B. 研究方法

ディプロネマ *Diplonema papillatum* (ATCC 50162) のALDについて、すでに報告されているEST部分配列に基づいてプライマーを設

計し、ORF全長をコードするcDNAをクローニングした。*D. papillatum*のOMPDCについてはすでにcDNAクローニングを終えている (Makiuchi, *et al.*, *Protist*, 159: 459-470, 2008)。ALD、OMPDCそれぞれの組換えタンパクを大腸菌で発現させ、これを用いて特異抗体を作製した。

ALDおよびOMPDCの細胞内局在について、生化学的解析および組織化学的解析を行なった。培養した *D. papillatum* を破碎後、遠心分離によって核画分、膜画分、および細胞質画分を調製し、ALDおよびOMPDC特異抗体を用いたウエスタンブロットを行ない、ALDおよびOMPDCの細胞内局在を分析した。また、ALDおよびOMPDC特異抗体を用いた免疫蛍光染色 (IFA) を行ない、ALDおよびOMPDCが局在する小胞の存在を解析した。

C. 研究結果

D. papillatum ALDにはグリコソーム局在タンパク同様、ペルオキシソーム移行シグナル (PTS) が存在した。分子系統解析はトリパノソーマ類および *D. papillatum* のALDの単系統性を示し、トリパノソーマ類と *D. papillatum* の共通祖先段階ですでにALDがペルオキシソームに局在していた可能性を強く示唆した。免疫蛍光染色 (IFA) を行なったところ、ALDはトリパノソーマ類 (*Trypanosoma cruzi*) および *D. papillatum* の両者においてドット状の蛍光パターンとして検出された。一方、*D. papillatum* OMPDCはトリパノソーマ類のOMPDCとは異なる起原を持ち (Makiuchi, *et al.*, *Protist*, 159: 459-470, 2008)、PTSを持たない。免疫蛍光染色 (IFA) を行なったところ、シグナルは細胞中に一様に観察さ

れ、OMPDCは細胞質局在性であることが示唆された。

D. 考察

本研究から、*D. papillatum*のALDはPTSを持ち、細胞内小胞に局在することが明らかとなった。これは、解糖系酵素のペルオキシソームへの移行がキネトプラスチダ類とディプロネマ類との分岐以前に既に成立していたことを示唆する最初の報告である。また、*D. papillatum*ではOMPDCとALDの細胞内局在は異なることから、ディプロネマ類のグリコソーム様オルガネラは核酸合成酵素群を欠いている可能性が高い。これは、ディプロネマ類とキネトプラスチダ類が分岐した後に系統群特異的な進化を遂げた結果、現在のような特殊化したペルオキシソーム(グリコソーム)が成立したことを示している。今後、ディプロネマ類におけるグリコソーム様オルガネラの単離および性状解析を行うことによって、難治病原体であるトリパノソーマ類が持つグリコソームの成立背景および寄生適応に果たした役割を明らかにしていきたい。

E. 結論

これまでトリパノソーマ類を含むキネトプラスチダ類に特異的と考えられてきたグリコソームの成立背景について解析した結果、近縁群のディプロネマ類との共通祖先段階ですでに解糖系酵素の一部がペルオキシソームに移行しており、グリコソームのプロトタイプがすでに成立していた可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

Tajima K, Miura K, Ishiwata T, Takahashi F, Yoshioka M, Minakata K, Murakami A, Sasaki S, Iwakami S, Annoura T, Hashimoto M, **Nara T**, Takahashi K. Sex hormones alter Th1 responses and enhance granuloma formation in the lung. *Respiration*, in press

Makiuchi T, Annoura T, Hashimoto M, Hashimoto T, Aoki T, **Nara T**. Compartmentalization of a glycolytic enzyme in *Diplonema*, a non-kinetoplastid Euglenozoan. *Protist*, in press

Kido Y, Shiba T, Inaoka DK, Sakamoto K, **Nara T**, Aoki T, Honma T, Tanaka A, Inoue M, Matsuoka S, Moore A, Harada S, Kita K. Crystallization and preliminary

crystallographic analysis of cyanide-insensitive alternative oxidase from *Trypanosoma brucei brucei*. *Acta Cryst Section F*, 66: 275-278, 2010

Balogun EO, Inaoka DK, Kido Y, Shiba T, **Nara T**, Aoki T, Honma T, Tanaka A, Inoue M, Matsuoka S, Michels PAM, Harada S, Kita K. Overproduction, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of *Trypanosoma brucei gambiense* glycerol kinase. *Acta Cryst Section F*, 66: 304-308, 2010

Tajima K, Ohashi R, Sekido Y, Hida T, **Nara T**, Hashimoto M, Iwakami S, Minakata K, Yae T, Takahashi F, Saya H, Takahashi K. Osteopontin-mediated enhanced hyaluronan binding induces multidrug resistance in mesothelioma cells. *Oncogene* 29(13): 1941-1951, 2010

Kohama H, Harakuni T, Kikuchi M, **Nara T**, Takemura Y, Miyata T, Sato Y, Hirayama K, Arakawa T. Intranasal administration of *Schistosoma japonicum* paramyosin induced robust long-lasting systemic and local antibody as well as delayed-type hypersensitivity responses, but failed to confer protection in a mouse infection model. *Jap J Inf Dis*, 63(3): 166-172, 2010

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・治療を旨とした研究」
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前年度からの継続研究として実施した。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が、アジア型とアメリカ・アフリカ型を区別できる新しい遺伝子を見出した(業績 15)。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とが判明してきた。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で、患者が感染した地域を特定することができた(業績 7; Jongwutiwes et al. in press)。2) 人体寄生テニア属条虫 3 種の遺伝子鑑別法としてミトコンドリアならびに各遺伝子を用いる **Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)** 法を確立しているが、本年度の研究で、LAMP 法による糞便内遺伝子検査法を確立し(業績 11)、さらに流行地でのリアルタイム検査への導入条件の検討を試み、流行の現場で実施可能であることをほぼ確認した(Nkouawa et al. unpublished)。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* の交雑個体がタイ(業績 9、10)のみならず中国でも確認された(業績 11; Okamoto et al. in prep; Nkouawa et al. in prep)。4) インドで有鉤条虫に感染し、年余にわたる虫卵排出と、自家感染による囊虫症を引き起こした日本人症例に遭遇し、患者の家族ならびに会社の同僚について囊虫症の 2 次感染の有無を血清検査、テニア症について LAMP 検査その他を実施し、国内での 2 次感染予防、阻止に向けた基礎資料を準備している(Ito et al. unpublished)。5) 血清検査により流行地住民から囊虫症患者を確認することができた(業績 10,12)。6) エキノコックス属条虫について、ミトコンドリアと核の遺伝子解析に基づく分子系統学ならびに系統地理学的研究を行い、有鉤条虫同様ハプロタイプ解析により、感染地の特定が可能なことを報告した(業績 4、8)。7) 遺伝子組み換え **Em18 (RecEm18)**, **Antigen B(Rec AgB)** を用いるエキノコックス症に関する血清診断法に関する外部評価研究を展開し(業績 3、5、14)、すでに確立されている迅速イムノクロマト診断法

を用いる海外の代表的研究機関との外部評価を実施している(Knapp J et al. in prep)。8) 多包虫症に関する新しい化学療法の開発基礎研究として新規のシステインペプチターゼのクローニングと生理活性解析を行った(業績 16)。以上、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、流行の現場においてリアルタイムで役立つ検査法ならびに調査指針(業績 1、6)をほぼ確立することができた。さらに流行地における継続的な啓発と技術革新に向けた会議を主催し(業績 2)、総説 4 篇を専門書、専門誌に発表した(業績 1、2、6、13)。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(RecEm18-ELISA、RecEm18-Immunoblot)は、世界最高水準との国際評価を得ている。さらに、我々は昨年度にアドテック(株)と共同で簡便な迅速イムノクロマト診断キットを開発している。このキットは特別な経験や施設を必要とせず、受診時間内にリアルタイムで結果を出せる。30 年前に 1 度だけ 1 週間のバスツアーで北海道を訪問し、昨年、確定診断がつかずに外科治療を受け、多包虫症と確定された症例がある(Amano et al. in prep)。国内では北海道の地方病として知られているが、このような北海道以外からの観光客が北海道内で感染する症例は日本人、外国人を問わず、今後も増えることが懸念される。それゆえ、北海道外の全国病院で診断が確定しない肝疾患では多包虫症の確定あるいは除外の目的で、全国病院のベッドサイドでの迅速キットの利用が推奨される。さらに 2010 年 1 月に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受けていることから、国内での住民健診に積極的に応用すべきであろう。

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

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) すでに確立されている LAMP 法を用い、
寄生虫タイの確認なしの糞便検査への応
用の可能性を解析し、従来法の Multiplex
PCR よりも感度が格段に高くなることを
明らかにした(業績 11)。

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(業績 9,10;Okamoto
et al. in prep; Nkouawa et al. in prep)。

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
ることにより、感染地域を特定できた(業績
7; Jongwutiwes et al. in press)。

4) アジア型とアフリカ・アメリカ型の識別
に有用な新規の遺伝子を発見した(業績

15)。

5) 囊虫症の流行地域住民検診に血清検査
法を導入し、カメルーン(業績 12)、タイ(業
績 10)、インドネシア(Swastika et al. in
prep)、中国(Li et al. in prep)で患者の確認
に成功した。

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：中国
に分布している 3 種のエキノコックス条虫
のミトコンドリア遺伝子ハプロタイプ解
析から、単包条虫、多包条虫は最近チベッ
ト高地に侵入したものであり、新種 *E.
shiquicus* はチベット固有種であると結論
された(業績 8、13)。

2) 血清診断法の開発、診断学的研究：①ド
イツの Kern 教授（2009 年から WHO
informal working group on Echinococco-
sis 代表）との共同研究から、多包虫症の
病態、病勢と完全に一致する血清検査法は
旭川医科大学の Em18-ELISA であると結
論する追加論文が発表された(業績 14)。②
フランスにおいて約 20 年経過観察してき
た多包虫症症例の病勢、病態のフォローア
ップに Em18- ELISA が役立つことが判
明した(Bresson- Hadni et al. Liver
Transplantation in press)。③中国におけ
るエキノコックス症に関する画像診断と
血清診断成績が報告された(業績 3,5)。

3. 疫学研究

①モンゴルにおいて、多包虫症患者と多包
条虫の遺伝子多型が確認された(業績 4)。

②カメルーン、タイの囊虫症流行地で血清
疫学研究を展開し、感染者の特定に成功し
た(業績 10,12)。

4. 研究指針等の総説

上記の研究に関する総説(業績 1、13)、ガイドライン(業績 6)を発表した。

D. E. 考察・結論

人獣共通幼条虫症(脳囊虫症、エキノコックス症)ならびに条虫症(テニア症)に関する分子、遺伝子から流行の現場までを網羅する総合的な研究を展開してきた。病理標本が入手できる症例では感染地の特定が可能であった。アジアを中心に、テニア症感染の実態が判明し始めており、我々が開発した免疫学的検査法、遺伝子検査法が流行地の特定、感染者の発見、患者特定に非常に大きく役立ってきていると評価できよう。さらにエキノコックス症(多包虫症、単包虫症)迅速診断キットの開発は、治療を要する活性病巣を有している患者の96%を20分以内に1度の検査でほぼ100%間違いなく確認できることから、病院での外来患者の診断や治療経過の観察のみならず、地域住民検診にも大きく役立つことが期待される。

米国疾病情報対策センターより、旭川医科大学で開発されたエキノコックス症に関する血清検査法(RecEm18、RecAgB8/1を用いるELISA法)を米国民に対する住民スクリーニング、確認検査法として採用したいので協力してほしいという要請が届いている。またフランス、フレンチコムテ大学病院(WHO collaboration center for clinical echinococcosis)からもRecEm18、RecAgB8/1の提供を要請されている。さらに、フレンチコムテ大学と迅速診断キットの外部評価研究が現在展開されており、フランス、ドイツからヨーロ

ッパでの市販の可能性について問い合わせが来ている。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

著書

1. Flisser A, Craig PS, Ito A. Chapter 51: Cysticercosis and Taeniosis: *Taenia solium*, *Taenia saginata* and *Taenia asiatica*. In: Oxford Textbooks of Zoonoses (eds. By Palmer SR, Lord Soulsby, Torgerson PR, Brown DWG), 627-644. Oxford University Press, 2011.

論文

2. Gurbadam A et al. Mongolian and Japanese Joint Congress on "Echinococcoses: diagnosis, treatment and prevention in Mongolia" June 4, 2009. *Parasites and Vectors* 2010; 3: 1/8-3/8.
3. Li T et al. Specific IgG Responses to Recombinant Antigen B and Em18 in Cystic and Alveolar Echinococcosis in China. *Clinical and Vaccine Immunology* 2010; 17: 40-475.
4. Ito A et al. Histopathological, Serological and Molecular Confirmation of Indigenous Alveolar echinococcosis cases in Mongolia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2010; 82: 266-269.
5. Li T et al. Widespread co-endemicity of human cystic and alveolar echinococcosis on the eastern Tibetan plateau, northwest Sichuan/southeast Qinghai, China. *Acta Tropica* 2010; 113: 248-256.
6. Brunetti E et al. Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. *Acta Tropica*

- 2010;114: 1-16.
7. Yanagida T et al. Neurocysticercosis: Assessing where the infection was acquired from. *Journal of Travel Medicine* 2010; 17:206-208.
 8. Nakao M et al. Genetic polymorphisms of *Echinococcus* tapeworms in China as determined by mitochondrial and nuclear DNA sequences. *International Journal for Parasitology* 2010; 40: 379-385.
 9. Okamoto M et al. Evidence of hybridization between *Taenia saginata* and *Taenia asiatica*. *Parasitology International* 2010; 59: 70-74.
 10. Anantaphruti MT et al. Molecular and serological survey on taeniasis and cysticercosis in Kanchanaburi Province, Thailand. *Parasitology International* 2010; 59: 326-330.
 11. Nkouawa A et al. Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method using fecal specimens for differential detection of *Taenia* species from humans. *Journal of Clinical Microbiology* 2010a; 48: 3350-3352.
 12. Nkouawa A et al. Serological studies of neurologic helminthic infections in rural areas of Southwest Cameroon: toxocariasis, cysticercosis and paragonimiasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2010b; 4: e732.
 13. Nakao M et al. State-of-the-art *Echinococcus* and *Taenia*: Phylogenetic taxonomy of human-pathogenic tapeworms and its application to molecular diagnosis. *Infection, Genetics and Evolution* 2010; 10:444-452.(総説)
 14. Tappe D et al. Immunoglobulin G subclass responses to recombinant Em18 in the follow-up of patients with alveolar echinococcosis in different clinical stages. *Clinical Vaccine Immunology* 2010; 17: 944-948.
 15. Sato MO et al. A possible nuclear DNA marker to differentiate the two geographic genotypes of *Taenia solium* tapeworms. *Parasitology International* 2011; 60: 108-110.
 16. Sako Y et al. *Echinococcus multilocularis*: identification and functional characterization of cathepsin B-like peptidases from metacestode. *Experimental Parasitology* 2011; in press.
3. 学会発表
省略
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑 誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kohama H, Harakuni T, Kikuchi M, Nara T, Takemura Y, Miyata T, Sato Y, <u>Hirayama K</u> , Arakawa T.	Intranasal Administration of <i>Schistosoma japonicum</i> Paramyosin Induced Robust Long-Lasting Systemic and Local Antibody as well as Delayed-Type Hypersensitivity Responses, but Failed to Confer Protection in a Mouse Infection Model.	Jpn J Infect Dis	63(3)	166-72	2010
Kido, Y., Sakamoto, K., Nakamura, K., Harada, M., Suzuki, T., Yabu, Y., Saimoto, H., Yamakura, F., Ohmori, D., Moore, A., Harada, S. and Kita, K.	Purification and kinetic characterization of recombinant alternative oxidase from <i>Trypanosoma brucei</i> <i>brucei</i> .	Biochim Biophys. Acta (Bioenergetic s)	1797	443-450	2010
Kido, Y., Shiba, T., Inaoka, D. K. Sakamoto, K., Nara, K., Aoki, T., Honma, T., Tanaka, A., Inoue, M., Matsuoka, S., Moore, A., Harada, S. and Kita, K.	Crystallization and preliminary crystallographic analysis of cyanide- insensitive alternative oxidase from <i>Trypanosoma brucei</i> <i>brucei</i>	Acta Crystallograp hica	F66	275-278	2010
Hikosaka, K., Watanabe, Y., Tsuji, N., Kita, K., Kishine, H., Arisue, N., Palacpac, N. M. Q., Kawazu, S., Sawai, H., Horii, T., Igarashi, I. and Tanabe, K.	Divergence of mitochondrial genome structure in the apicomplexan parasites, <i>Babesia</i> and <i>Theileria</i>	Mol. Biol. Evolution	27	1107-1116	2010

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Balogun, O. E., Inaoka, D. K., Kido, Y., Shiba, T., Nara, T., Aoki, T., Honma, T., Tanaka, A., Inoue, M., Matsuoka, S., Michels, P. AM., Harada, S. and Kita, K. Acta Crystallographica	Overproduction, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of <i>Trypanosoma brucei</i> <i>gambiense</i> glycerol kinase	Acta Crystallograp hica	F66	304-308	2010
Masuda, I., Matsuzaki, M. and Kita, K.	Extensive frameshift at all AGG and CCC codons in the mitochondrial cytochrome <i>c</i> oxidase subunit 1 gene of <i>Perkinsus marinus</i> (Alveolata; Dinoflagellata)	Nucleic Acids Research	38	6186-6194	2010
Nakamura, K., Fujioka, S., Fukumoto, S., Inoue, N., Sakamoto, Hirata, H., Kido, Y., Yabu, Y., Suzuki, T., Watanabe, Y., Saimoto, H., Akiyama, H. and Kita, K.	Trypanosome alternative oxidase, a potential therapeutic target for sleeping sickness, is conserved among <i>Trypanosoma</i> <i>brucei</i> subspecies	Parasitol. Int.	59	560-564	2010
Hikosaka, K., Nakai, Y., Watanabe, Y., Tachibana, S., Arisue, N., Palacpac, N. M., Toyama, T., Honma, H., Horii, T., Kita, K. and Tanabe, K.	Concatenated mitochondrial DNA of the coccidian parasite <i>Eimeria tenella</i> .	Mitochondrio n,	11	273-278	2010

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Moritoshi Iwagami, Seung-Young Hwang, Megumi Fukumoto, Toshiyuki Hayakawa, Kazuyuki Tanabe, So-Hee Kim, Weon-Gyu Kho, Shigeyuki Kano	Geographical origin of <i>Plasmodium vivax</i> in the Republic of Korea: haplotype network analysis based on the parasite's mitochondrial genome	Malaria Journal	9 巻	184-188	2010
Tsuboi T, Takeo S, Arumugam TU, Otsuki H, Torii M	The wheat germ cell-free protein synthesis system: a key tool for novel malaria vaccine candidate discovery	Acta Trop.	114	171-176	2010
Miyata T, Harakuni T, Tsuboi T, Sattabongkot J, Kohama H, Tachibana M, Matsuzaki G, Torii M, Arakawa T	<i>Plasmodium vivax</i> ookinete surface protein, Pvs25, linked to cholera toxin B subunit induces potent transmission-blocking immunity by intranasal as well as subcutaneous immunization	Infect Immun.	78	3773-3782	2010
Blagborough AM, Yoshida S, Sattabongkot J, Tsuboi T, Sinden RE	Intranasal and intramuscular immunization with baculovirus dual expression system-based Pvs25 vaccine substantially blocks <i>Plasmodium vivax</i> transmission	Vaccine	28	6014-6020	2010
Jeelani, G., Husain, A., Sato, D., Ali, V., Suematsue, M., Soga, T., and Nozaki, T.	Two Atypical L-cysteine-regulated NADPH-dependent oxidoreductases involved in redox maintenance, L-cystine reduction, and metronidazole activation in the enteric protozoon <i>Entamoeba histolytica</i> .	J. Biol. Chem.	285	26889-26899	2010

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yousuf, M. A., Mi-ichi, F., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T.	Localization and targeting of unusual pyridine nucleotide transhydrogenase in Entamoeba histolytica..	Eukaryot. Cell	9	926-933	2010
Kimura E.	The Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis: History and achievements with special reference to annual single-dose treatment with diethylcarbamazine in Samoa and Fiji.	Tropical Medicine and Health	39	1-14	2011
Anisuzzaman, Islam MK, Miyoshi T, Alim MA, Hatta T, Yamaji K, Matsumoto Y, Fujisaki K, Tsuji N.	Longistatin, a novel EF-hand protein from the ixodid tick <i>Haemaphysalis longicornis</i> , is required for acquisition of host blood-meals.	Int J Parasitol.	40	721-729.	2010
Kumagai T, Furushima- Shimogawara R, Ohmae H, Wang TP, Lu S, Chen R, Wen L, <u>Ohta N.</u>	Detection of early and single infections of <i>Schistosoma japonicum</i> in the intermediate host snail, <i>Oncomelania hupensis</i> , by PCR and loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay.	Am J Trop Med Hygiene	83:(3)	542-8	2010
長田良雄	寄生虫とアレルギー の親密な関係	Medical Practice	27 (9)	1541-1542	2010
Shimizu S, Osada Y, Kanazawa T, Tanaka Y, Arai M.	Suppressive effect of azithromycin on <i>Plasmodium berghei</i> mosquitostage development and apicoplast replication.	Malaria Journal	9:73.	-	2010
Khan MGM, Alam MS, Podder MP, Itoh M, Jamil KM, Haque R, Wagatsuma Y	Evaluation of rK-39 strip test using urine for diagnosis of visceral leishmaniasis in an endemic area in Bangladesh.	Parasites and Vectors	3	114	2010