

201123048A

厚生労働科学研究費補助金  
新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

# 顧みられない寄生虫病の効果的監視法の 確立と感染機構の解明に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 野 崎 智 義

(国立感染症研究所)

平成24 (2012) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金  
新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

# 顧みられない寄生虫病の効果的監視法の 確立と感染機構の解明に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 野 崎 智 義

(国立感染症研究所)

平成24 (2012) 年 3 月

## 目 次

I. 総括研究報告	
顧みられない寄生虫病の効果的監視法の確立と感染機構の解明に関する研究---	1
野崎 智義 (国立感染症研究所 寄生動物部)	
II. 分担研究報告	
1. 赤痢アメーバの分化・病原機構の解明 -----	13
野崎 智義 (国立感染症研究所 寄生動物部)	
2. 腸管原虫の分子疫学調査に関する研究 -----	21
渡辺 恒二 (国立国際医療研究センターエイズ治療研究開発センター)	
3. 赤痢アメーバの感染機構の研究 -----	25
濱野 真二郎 (長崎大学・熱帯医学研究所)	
4. 分子疫学を中心としたアcantアメーバ角膜炎の実態に関する調査研究-----	31
井上 幸次 (鳥取大学医学部 視覚病態学)	
5. 消化管寄生原虫検出のための蛍光抗体試薬の開発 -----	35
八木田 健司 (国立感染症研究所 寄生動物部)	
6. マラリア薬剤耐性株流入のモニタリング法の開発 -----	41
中野 由美子 (国立感染症研究所 寄生動物部)	
7. 赤痢アメーバの薬剤耐性機構の解明 -----	45
津久井 久美子 (国立感染症研究所 寄生動物部)	
8. トキソプラズマ感染における宿主機能ハイジャック機序の解明-----	55
永宗 喜三郎 (国立感染症研究所 寄生動物部)	
9. 原虫類への新規遺伝学的手法の開発-----	59
平井 誠 (群馬大学大学院医学研究科 国際寄生虫病)	
10. 蠕虫性幼虫移行症の病態の解明 -----	61
丸山 治彦 (宮崎大学医学部)	
11. エキノコックスの嫌氣的呼吸鎖の生理機能の解明 -----	69
北 潔 (東京大学大学院医学系研究科)	
12. 人獣感染症としての住血吸虫症のモニタリング法の開発-----	75
河津信一郎 (帯広畜産大学・原虫病研究センター)	
13. 寄生蠕虫症(条虫症)の検査・診断法開発-----	77
山崎 浩 (国立感染症研究所 寄生動物部)	
14. 食品媒介性蠕虫症(線虫と吸虫)の検査・診断法開発-----	83
杉山 広 (国立感染症研究所 寄生動物部)	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	91
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	99



# I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）  
総括研究報告書

顧みられない寄生虫病の効果的監視法の確立と感染機構の解明に関する研究

研究代表者： 野崎智義 国立感染症研究所 部長

研究要旨

本研究は、我が国で問題となる寄生虫症の発生・まん延を防止するために不可欠な、起因生物の生物学的特質・感染機構の理解と、サーベイランス・検査・診断法の確立、治療法の開発等を目指している。初年度は、幅広い原虫・蠕虫症を対象とし、多面的なサーベイランス・調査・研究を行い、短・中・長期的に顧みられない寄生虫症対策に資する成果を着実に挙げた。

研究分担者

渡辺恒二・国立国際医療研究センター・医系技官

濱野真二郎・長崎大学・教授

井上幸次・鳥取大学・教授

八木田健司・国立感染症研究所・主任研究官

中野由美子・国立感染症研究所・主任研究官

津久井久美子・国立感染症研究所・主任研究官

永宗喜三郎・国立感染症研究所・室長

平井誠・群馬大学・准教授

丸山治彦・宮崎大学・教授

北潔・東京大学・教授

河津信一郎・帯広畜産大学・教授

山崎浩・国立感染症研究所・室長

杉山広・国立感染症研究所・主任研究官

時に、新興寄生虫症の出現に即座に対応出来るように、寄生虫症研究基盤の底上げと次世代の研究者育成が必要である。

本研究では、前回の研究班で対象とされなかったり、不十分であった顧みられない原虫・蠕虫症に対して、分子疫学的手法・検査・診断法・監視システムを確立することを目的とする。更に、研究者（グループ）育成と基礎研究レベルの底上げを目指して、若手研究者を結集し、予防・治療法の確立に繋がる原虫症・蠕虫症の感染・病理・病原・薬剤耐性機構に関する基盤的研究を行う。本研究の特色は、検査・診断法の開発、監視システムの構築から、感染・病原機構の解明に至る、極めて多角的な研究を、幅広い対象疾患に対して展開する点である。

本研究は以下の具体的な研究項目を目的としている。まず、腸管原虫症・アカントアメーバ症の継続的な発生動向調査、分離株の型別を行う。ジアルジア症・住血吸虫症、顎口虫・肝蛭・有鉤囊虫・アニサキス症等の免疫診断法・キットの確

A. 研究目的

顧みられないが、我が国で問題となりうる寄生虫症の発生・まん延を防止するには、起因生物の生物学的特質・感染機構の理解、検査・診断・監視体制の確立、予防・治療法の開発が不可欠である。同

立し、検証する。前研究班で作成された免疫診断法(ジアルジア症・肺吸虫症等)・型別法の臨床評価し、感染動向調査への応用する。赤痢アメーバと三日熱マラリア原虫の薬剤耐性モニタリング法を確立する。赤痢アメーバ・アcantアメーバ等の病原・分化機構を統合的に解明する。マラリア原虫・赤痢アメーバにおける薬剤耐性機構を解明する。新種腸管アメーバの病原機構・病態形成を解明する。トキソプラズマの感染における宿主調節因子注入機構を解明する。マラリア原虫等の高速な変異体作成を可能とする遺伝学手法を確立し応用する。ブタ回虫等の幼虫特異的タンパク質の病態形成における機能解明を行う。エキノコックス呼吸鎖の解明と阻害剤探索を行う。

## B. 研究方法

### 1. ジアルジア・肺吸虫・アニサキス・住血吸虫症などの寄生虫症に対する診断法の確立

嚢子特異的単クローン抗体を用いて、ジアルジア検出系を確立した。蠕虫症に関しては、マンソン弧虫症の血清診断キットの実用化に向けた評価を行った。アニサキス症の免疫診断系を確立するための抗原をゲノムから選定し常法に従い組換え抗原を作成した。肺吸虫の種内・種間鑑別法を開発するためのPCRプライマーを常法に従い設計した。日本住血吸虫の分泌抗原、繰り返し配列を含む抗原の組換え体タンパク質を作製して、ヒト標準血清を用いて評価した。キットの試作の一部は検査キットの製造・販売実績を有するアドテックに委託した。

### 2. 腸管原虫症・アcantアメーバ角膜炎などの原虫症サーベイランス

国際医療研究センターエイズ臨床センターで2000年以後に診断されたHIV感染合併の腸管原虫症について、診療録を用いた後方視的検討を行い、臨床的な問題点(主に診断方法と感度について)を検討した。

全国拠点病院の眼感染症ネットワークを利用して、アcantアメーバ角膜炎の原因原虫の分離と臨床像の収集、ならびにミトコンドリア遺伝子の多型を用いた分子疫学解析を行った。アcantアメーバの薬剤感受性の標準試験法を確立した。

### 3. マラリア・腸管原虫症の薬剤耐性株の国内への流入のモニタリング法の確立と薬剤耐性機構解明

三日熱マラリア原虫の国内への流入を継続的にモニタリングするために、国立感染症研究所において過去に収集された、薬剤耐性流行地と非流行地から集められた永久標本を用いて、ピリメサミン耐性に関与する遺伝多型を解析した。

インビトロで作成されたメトロニダゾール耐性赤痢アメーバ株を用いて、Affymetrix社製のDNAマイクロアレイによるトランスクリプトーム解析を行った。

### 4. 赤痢アメーバの病原・感染・分化機構解明

赤痢アメーバの病原因子の輸送を制御する輸送体をシステインプロテアーゼの免疫沈降法により獲得し、LC-ToFMS質量分析法により同定を行った。Gene silence

法により遺伝子発現を阻害し表現型を常法に従い、観察した。

これまで非病原性と考えられてきた *Entamoeba moshkovskii* の病原性をヒト遺伝学とマウス腸管感染モデルと用いて解析した。

#### 5. トキソプラズマ・マラリア等の細胞侵入・感染成立機構の解明と遺伝学手法の開発

GFPにGPIアンカー付加シグナルを付与したCHO細胞 (GFP-GPI-CHO) を用いて寄生胞PVおよびevacuoleの形成を観察した。また、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Gaa1(-)) 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、さらに原虫によるミトコンドリアおよびERのリクルート能、およびevacuole形成能を詳細に検討した。

ゲノム複製時に生じるエラーの校正機能を欠損したDNAポリメラーゼを発現するマラリア原虫 (*Plasmodium berghei*) 変異体を相同組換えを用いて作出した。次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解読により変異率を確認した。

#### 6. エキノコックスの嫌氣的呼吸鎖の生理機能の解明

エキノコックス複合体IIの特徴を調べる目的でミトコンドリアより複合体IIの精製を試み、各サブユニットのN末端解析およびPCRを用いたホモロジープロービングから全てのサブユニットおよび複合

体IIの生合成に関わるアセンブリーファクターのcDNAのクローニングを行なった。

#### 7. 線虫の幼虫移行における病態形成機構の解明

組換えブタ回虫抗原rAs16は農業食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究所・辻尚利から、組換えトキソカラ抗原rT. canisAgは山崎浩から供与された。ブタ回虫感染ブタ血清、イヌ回虫、ネコ回虫、およびブタ回虫卵は、コペンハーゲン大学のStig Milan Thamsborgから供与された。動物感染実験・飼育は、Danish Centre for Experimental Parasitologyの個別飼育区域でおこなった。

(倫理面への配慮) 本研究に関わるDNA組換え実験等の許可は当該研究機関にて得られている。また疫学研究に関する倫理指針、臨床研究に関する倫理指針等を遵守した。

#### C. 研究結果

##### 1. 消化管寄生原虫検出のための蛍光抗体試薬の開発

消化管寄生性原虫の検査診断の普及、拡大を図るため、モノクロナル抗体を製作し、蛍光標識抗体として迅速診断用試薬の開発を行った。ジアルジアならびにクリプトスポリジウムとの反応性、他の原虫類との交差反応性、また糞便試料における感度、特異性を検討し、臨床検査目的に適う性能を確認した。その性能は市販の代表的 DFA 試薬である Merifluor C/G と同等であった。

## 2. 寄生蠕虫症(条虫症)の検査・診断法開発

幼虫移行症として重要なマンスン孤虫症の迅速血清診断イムノクロマトキットの開発を実施した。プレロセルコイドの PBS 抽出可溶性画分、精製したパラミオシンとシステインプロテアーゼ (CP) の 3 種類を抗原候補として、その特異性や検出感度を検討したところ、CP が特異性、検出感度とも優れていた。CP を用いたイムノクロマトキットを試作し、健常人、マンスン孤虫症患者、他の寄生虫症患者の血清を用い、マンスン孤虫症患者血清と高い特異性を示し、臨床症状が酷似した顎口虫症とも鑑別に有用であることが判明した。一方、寄生蠕虫症の網羅的な遺伝子診断鑑別法の確立でも、臨床検体を活用し鑑別法を確立した。

## 3. 食品媒介性蠕虫症(線虫と吸虫)の検査・診断法開発

食品媒介寄生蠕虫症の中から、年間に推定 2,000 名以上の患者が発生するアニサキスと年間の患者数は平均 50 名と少ないが感染すれば時に重篤な症状が惹起される肺吸虫に関して、検査法・診断法の開発検討を行った。肺吸虫の迅速鑑別を目的に、ミトコンドリア 16S リボゾーム RNA 遺伝子を標的とした nested PCR の系を構築し、ウェステルマン肺吸虫の 2 型と宮崎肺吸虫とが、迅速で確実に鑑別可能となった。アニサキスについては迅速な血清診断法の確立を目途に、*Anisakis simplex sensu stricto* の分泌排泄抗原 (ES 抗原) を用いて、イムノクロマトグラフィ法を応用した診断キットの作製を試みた。患者血清を用いてキットの反応

性を検討したところ、micro-ELISA により得られる結果と一致した。

## 4. 人獣感染症としての住血吸虫症のモニタリング法の開発

日本住血吸虫症の血清診断法の改良を目的に、ゲノムデータベースから、分泌抗原、タンデムリピート抗原等の血清診断抗原候補分子を選抜して、大腸菌組換え体抗原を応用した酵素抗体法 (ELISA) の開発を試みた。5 種類の組換え体抗原と同吸虫症陽性および、各種陰性血清との ELISA での反応性を、虫卵粗抗原 (SEA) での反応性と比較して評価した結果、組換え体抗原 SjTPx-1 あるいは、Sj7TR を用いた ELISA の有用性が示唆された。

## 5. 腸管原虫の分子疫学調査に関する研究

2001~2010 年に追跡された HIV 感染者で、腸管原虫症と診断された症例は、ジアルジア症 4 例、クリプトスポリジウム症 11 例のみであった。これは、同じ時期に診断された赤痢アメーバ症 170 例と比較して極めて少なかった。臨床像と総合した結果、ジアルジア症は症状が軽微なために見逃されやすく、抗 HIV 薬の副作用との混同から一般検査室でのジアルジア症腸炎、クリプトスポリジウム下痢症が見逃され易いことが原因であると考えられた。また、特にクリプトスポリジウム下痢症を直接検鏡検査のみで見つけることが困難であることが示唆されており、検査室での見逃しが多数起こっていること考えられた。腸管原虫の感染実態を高い精度で把握するためには、積極的な検



体収集かつ感度の高い検査法の導入が必要と考えられた。

#### 6. 分子疫学を中心としたアカントアメーバ角膜炎の実態に関する調査研究

アカントアメーバ角膜炎の分離株収集に基づくモニタリング調査を継続し、分子疫学的に解析した。本年度分離株はすべて遺伝子タイプ T4、特に ATCC50497 (Rowdon strain) と近く、これが国内優勢株である可能性が示唆された。更に、原虫 DNA コピー数と病態や予後との関係に関して、初診察時のコピー数が視力や病期（重症度）と関連していた。また経過に伴いコピー数が低下しない症例では視力予後が悪かった。細菌数は予後や初診時の視力や病期とは関連しなかった。更に呼吸活性の CTC 染色による薬剤感受性を測定する方法を開発した。

#### 7. マラリア薬剤耐性株流入のモニタリング法の開発

ピリメサミン (Pyr) はクロロキンに代わる抗マラリア薬として1990年代からアフリカで広く使用されているが、現在アフリカを含む世界中で耐性原虫が出現している。国立感染症研究所に保存されている1984年から1998年までのアフリカを由来とする検体からPyr耐性遺伝子 (dhfr) の遺伝子型を決定した。1990年代に急速に耐性型の遺伝子型が出現したことが明らかとなった。また、多数の検体で異なる耐性遺伝型の混合感染が発見された。

#### 8. 赤痢アメーバの薬剤耐性機構の解明

抗赤痢アメーバ第一選択薬であるメトロニダゾールに対する耐性株を、薬剤濃度を徐々に上昇させることにより作成した。細胞の大きさ、細胞内小胞・空胞の形成などの形態的特徴を明らかにした。また DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析により、メトロニダゾール耐性を獲得する過程で、遺伝子発現プロファイルの代償的・相補的变化で説明が可能な変化が示された。メトロニダゾール耐性の分子基盤の一端が明らかにされた。

#### 9. 赤痢アメーバの分化・病原機構の解明

病原性において中心的な役割を果たす病原因子システインプロテアーゼの細胞内輸送において中心的な役割を果たす輸送体システインプロテアーゼ結合タンパク質遺伝子 CPBF1 を、赤痢アメーバのみならず原虫において初めて、同定した。CPBF1 はシステインプロテアーゼのリソソームの輸送とプロセッシング・活性化に不可欠な分子であることが示された。本酵素の病原性における重要性を再確認すると同時に、赤痢アメーバ症に対する新しい薬剤・ワクチン開発の作用点を提供した。

#### 10. 赤痢アメーバの感染機構の研究

マウス腸管定着後の感染の遷延・排除機構の解明を試みた。*E. histolytica* および *E. moshkovskii* 感染中に脾臓・腸間膜リンパ節において Th1 および Th2 サイトカインの産生細胞の動態を調べた。IFN-g、IL-4 産生細胞は検出されなかった。パイエル板では、*E. moshkovskii* が

腸管から排除される感染2週後まで、IFN- $\gamma$  産生 CD4 陽性細胞の誘導は両群間で有意な差は認められなかった。一方、IFN- $\gamma$  産生 CD8 陽性細胞は *E. moshkovskii* 感染で著明に増加した。誘導された IFN- $\gamma$  の役割を解明するために、IFN- $\gamma$  に対する中和抗体を投与した。IFN- $\gamma$  中和により、*E. moshkovskii* 感染が遷延し、一方で病態緩和が観察された。本研究より、IFN- $\gamma$  が原虫排除や *E. moshkovskii* 感染における病態に深く関与することが示唆された。

#### 11. 原虫類への新規遺伝学的手法の開発

ネズミマラリア原虫 (*Plasmodium berghei*) DNA 複製酵素  $\delta$ -DNA polymerase (PolyDel) 遺伝子をクローニングし、エラー校正活性に関与するアミノ酸2か所を Ala に置換した (D311A, E313A) 組換えプラスミド DNA を作成した。組換えプラスミドで内在性  $\delta$ -DNA polymerase 遺伝子を入れ換えた原虫を作成した (PbMutator 原虫)。PbMutator をマウスに継代感染する。第 122 週目において PbMutator を限界希釈法によりクローン化した。次世代シーケンサー-HiSeq2000 を用いて、第 122 週 PbMutator 原虫 2 クローン、およびコントロール原虫クロンの全ゲノムをシーケンシングし、変異解析を行った。本来ならば修正されるべき遺伝子変異が校正機能低下により、PbMutator 原虫は継代によりゲノム内に変異が蓄積されていることが明らかとなり、ミュータントライブラリーが構築できた。

#### 12. トキソプラズマ感染における宿主機能ハイジャック機序の解明

トキソプラズマと宿主細胞表面との相互作用には、原虫が宿主表面へ付着した後にロプトリー蛋白質が小胞 (evacuole) として宿主内へ注入されるステップと、原虫自身の侵入の際に原虫を囲む parasitophorous vacuole (PV) が形成されるステップの2つが考えられる。GPI-GFP を発現する CHO 細胞を用い、evacuole と PV への GPI の取込みを観察すると、GPI はそれらの両方に取り込まれた。一方、ラフトの構成タンパク質の1つである caveolin-1 は、evacuole にも PV にも取り込まれなかった。このことから、PV 形成時の選択的取り込みが、evacuole 形成時においても行われている可能性が示唆された。また、methyl- $\beta$ -cyclodextrin によりラフト構造を破壊したところ、GPI は PV に取り込まれたが evacuole には取り込まれなかった。この結果から正常な evacuole の形成には正常なラフト構造の存在が必須であることが示唆された。また複数のロプトリー蛋白質の局在を指標に、evacuole の形成を GPI アンカー生合成能欠失変異 CHO 細胞と野生株間で比較すると、変異株で明らかに evacuole の形成が過剰になっていた。さらに、過剰形成された evacuole 内で、ロプトリー蛋白質は共局在していた。一方、宿主 GPI の有無は、PV 形成 (原虫の侵入) には影響を与えなかった。PV 膜への宿主のミトコンドリアや ER のリクルート能を GPI 生合成変異株と野生株間で比較した。変異株内で両オルガネラのリクルートが増加していた。また、GPI 変異体での原虫

の増殖の上昇は、感染後期のみが認められた。以上、変異株では、原虫による evacuole 形成が過剰になり、PV 膜へのミトコンドリアと ER のリクルートが増加した結果、増殖が増大した可能性が示唆された。

### 13. エキノコックスミトコンドリア呼吸鎖を標的とした創薬

ミトコンドリア呼吸鎖複合体を活性を保持したままの状態を分離するを目的に High resolution Clear Native Electrophoresis を用いた精製法の確立した。SDS-PAGE で全てのサブユニットを分離した後 N 末端アミノ酸配列分析を行ない、全サブユニットの N 末端配列を決定した。

コットンラットに感染させて得た宿主組織を含むエキノコックス幼虫から cDNA を調製し、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 II を構成する Fp, Ip, CybL, CybS の 4 つのサブユニットおよび 2 つのアッセンブリーファクター SDHAF1, SDHAF2 についてサンガー研究所の EST データおよびゲノムデータをもとに ORF の特異的プライマーにより増幅し、完全長 cDNA の塩基配列を決定した。各サブユニットの配列は住血吸虫の配列に最も近かった。Fp は最も保存性が高く、FAD を共有結合している His も保存されていた。Ip に関しては 2 種の存在 (EmIp1 および EmIp2) が明らかになったが、両者の配列の中では鉄イオウクラスターの結合に関わる 3 カ所の Cys に富む領域に違いが見つかった。置換により鉄イオウクラスターの酸化還元電位が変化し、キノールからフマル酸への

電子伝達をより進行しやすくしている可能性が示された。

### 14. 蠕虫性幼虫移行症の病態の解明

宮崎大学医学部寄生虫学で施行した血清診断では、2011 年においても肺吸虫症と回虫類の幼虫による幼虫移行症が多数を占めた。幼虫移行症の原因虫種の確定法確立を目的として、組換えブタ回虫抗原の As16 と組換えトキソカラ抗原 TcAg によってブタ回虫感染とイヌ回虫感染を鑑別できるのか、ブタ回虫感染動物が産生する抗体が As16 特異的エピトープを認識するのかを検討した。ブタ回虫に感染したブタが産生する抗 As16 抗体は As16 特異的でありイヌ回虫抗原には結合せず、両者の組み合わせによる鑑別診断はおそらく可能であることが明らかとなった。また、ブタを用いた感染実験により、どちらもトキソカラ属に属するイヌ回虫とネコ回虫では、感染後の体内移行経路が大きく違うことが示唆された。

### D. 考察

初年度本研究は基盤研究、感染実態調査、モニタリング・サーベイランス構築、診断法開発等のいずれの分野においてもほぼ予定通りの進展を示し、確実に成果を生んだ。基盤的研究においては、いくつか特筆すべき成果が挙げられた。その 1 つは濱野らによる *Entamoeba moshkovskii* のヒトに対する病原性の存在の証明である。*E. moshkovskii* が少なくともマウスにおいては病原性 *E. histolytica* と同様の宿主域を示し、下痢と体重減少を主体とした臨床症状を引き

起こすことが判明した。更に、*E. histolytica*と*E. moshkovskii*がマウス腸管において全く異なる感染動態を示すことを明らかとした(JID in press)。この発見はこれまでのアメーバ症の疫学像を根本から変える可能性のある重要な発見と言える。また、野崎らによる赤痢アメーバの病原性因子の輸送機構の解明(PLoS Pathogen, 2012; 論文投稿中)も病原機構の分子基盤の理解に極めて重要な貢献をしたと言える。更に、平井らによるマラリア原虫の高度変異体(ミューター)作成の成功は、フォワードジェネティクスを切り開く画期的な研究成果であり、マラリア原虫の薬剤耐性機構や病原機構の理解に極めて重要な役割を果たす成果であるといえることができる。

一方、感染実態調査に関しても、HIV感染者における腸管原虫症の調査やアメーバ角膜炎の実態調査、幼虫移行症等の蠕虫症の実態調査などに関して、着実に研究の進展が見られた。また、アカントアメーバ・マラリア原虫・赤痢アメーバの薬剤耐性のモニタリング法の確立なども着実に成果を挙げた。次年度以降もサーベイランスを継続し、感染実態の現況の把握に努めると同時に、分子疫学手法による感染源の特定、生物学・遺伝学的特徴の理解を継続的に行うことにより、国内で問題となる顧みられない寄生虫症の実態の把握に資すると期待される。

診断法の確立に関しても、マンソン狐虫・回虫などによる幼虫移行症、肺吸虫・アニサキス等食生活に依存した蠕虫症、住血吸虫症、更にジアルジア・クリプト

スポリジウム等腸管原虫症の新規診断系の確立と応用に関して、着実な進展を見せた。

次年度以降も計画に従い研究を展開することにより、当研究班の目指す、「起因生物の生物学的特質・感染機構の理解に根ざした検査・診断・監視体制の確立、予防・治療法の開発」が達成されると期待される。

## E. 結論

本研究班の初年度の成果は、我が国で問題となりうる寄生虫症の発生・まん延を防止するために不可欠な、起因生物・感染機構の理解、検査・診断法の確立、治療法の開発等に貢献した。幅広い原虫・蠕虫症を対象とし、短・中・長期的に顧みられない寄生虫症対策に資する多面的な研究が確実に展開されており、今後の保健医療向上、原虫症の発生動向の正確な把握等、感染症対策に大いに資すると考えられる。

## F. 健康危機情報

なし

## G. 研究発表(英文論文のみ)

- Husain, A., Jeelani, G., Sato, D., and Nozaki, T. Global Analysis of gene expression in response to L-cysteine deprivation in the anaerobic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. BMC Genomics 12, 275, 2011.
- Penuliar, G. M., Furukawa, A., Sato, D., and Nozaki, T. Mechanism of

- trifluoromethionine resistance in *Entamoeba histolytica*. J. Antimicrob. Chemother. 66, 2045-2052, 2011.
- Mi-ichi, F., Makiuchi, T., Furukawa, A., Sato, D., and Nozaki, T. Sulfate activation in mitochondria plays a crucial role in the proliferation of *Entamoeba histolytica*. PLoS Negl. Trop. Dis. 5, e1263, 2011.
- Watanabe, K., Gatanaga, H., de Cadiz, A.E., Tanuma, J., Nozaki, T., Oka, S. Amebiasis in HIV-1-infected Japanese men: clinical features and response to therapy. PLoS Negl. Trop. Dis. 5, e1318, 2011.
- Penuliar, G. M., Furukawa, A., Nakada-Tsukui, K., Husain, A., Sato, D., and Nozaki, T. Transcriptional and functional analysis of trifluoromethionine resistance in *Entamoeba histolytica*. J. Antimicrob. Chemother. 67, 375-386, 2012.
- Furukawa, A., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. Novel transmembrane receptor involved in phagosome transport of lysozymes and  $\beta$ -hexosaminidase in the enteric protozoan *Entamoeba histolytica*. PLoS Pathogens 8, e1002539, 2012.
- Shimokawa, C., Kabir, M., Taniuchi, M., Mondal, D., Kobayashi, S., Ali, I.K., Sobuz, S., Senba, M., Houpt, E., Haque, R., Petri, W.A., Hamano, S.: *Entamoeba moshkovskii* is associated with diarrhea in infants and causes diarrhea and colitis in mice. J. Infect. Dis. in press
- Matsuzaki, C.M., Tu, L., Ishida, H., Imai, T., Suzue, K., Hirai, M., Tetsutani, K., Hamano, S., Shimokawa, C., Hisaeda, H.: A critical role for phagocytosis in resistance to malaria in iron-deficient mice. Eur. J. Immunol. 41, 1365-75, 2011.
- Nakaya, M., Hamano, S., Yoshida, H., Yoshimura, A., Kobayashi, T.: Aberrant IL-4 production by SOCS3-overexpressing T cells during infection with *Leishmania major* exacerbates disease manifestations. Int. Immunol. 23, 195-202, 2011.
- Takeda S, Inoue Y et al. Roles played by toll-like receptor-9 in corneal endothelial cells after herpes simplex virus type 1 infection. Invest Ophthalmol Vis Sci, 52, 6729-6736, 2011.
- Saito-Nakano, Y., Tanabe, K., Mita, T. Identification of pyrimethamine- and chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* in Africa between 1984 and 1998: genotyping of archive blood samples. Malaria Journal 10, 388, 2011.
- Yamamoto, M., Ma, J.S., Mueller, C., Kamiyama, N., Saiga, H., Kubo, E., Kimura, T., Okamoto, T., Megumi, Oku-yama, M., Kayama, H., Nagamune, K., Takashima, S., Matsuura, Y., Soldati-Favre, D., and Takeda, K.



- ATF6  $\beta$  is a host cellular target of the *Toxoplasma* virulence factor ROP18. *J. Exp. Med.* 208, 1533-46, 2011
- Nakatani, F., Morita, Y.S., Ashida, H., Nagamune, K., Maeda, Y., and Kinoshita, T. Identification of a second catalytically active trans-sialidase in *Trypanosoma brucei*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 415, 421-5, 2011.
- Toyama, T., Tahara, M., Nagamune, K., Arimitsu, K., Hamashima, Y., Palacpac, N.M.Q., Kawaide, H., Horii, T., and Tanabe, K. Gibberellin biosynthetic inhibitors make human malaria parasite *Plasmodium falciparum* cells swell and rupture to death. *PLoS ONE* 7, e32246, 2012.
- Suga Y, Nagita A, Takesako R, Tanaka I, Kobayashi K, Hirai M, and Matsuoka H. A new glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency variant, G6PD Mizushima, showing increases in serum ferritin and cytosol leucine aminopeptidase levels. *J Pediatr Hematol Oncol.* 33, 15-7, 2011.
- Matsuzaki-Moriya C, Tu L, Ishida H, Imai T, Suzue K, Hirai M, Tetsutani K, Hamano S, Shimokawa C, and Hisaeda H. A critical role for phagocytosis in resistance to malaria in iron-deficient mice. *Eur J Immunol.* 41, 1365-75, 2011.
- Yoshida A, Nagayasu E, Horii Y, and Maruyama H: A novel C-type lectin identified by EST analysis in tissue migratory larvae of *Ascaris suum*. *Parasitol Res DOI* 10.1007/s00436-011-2677-9, 2011.
- Izumikawa K, Kohno Y, Izumikawa K, Hara K, Hayashi H, Maruyama H, and Kohno S: Eosinophilic pneumonia due to visceral larva migrans possibly caused by *Ascaris suum*: a case report and review of recent literatures. *Jpn J Infect Dis.* 64, 428-32, 2011.
- Yamazaki H, Yamaguchi K, Iwase T, Niki T, Kusunose K, Tomita N, Taketani Y, Yamada H, Soeki T, Wakatsuki T, Fukunaga Y, Nakanishi H, Maruyama H, Matsuoka H, and Sata M: A patient who developed toe necrosis due to poor blood circulation after an interdigital tick bite. *J Cardiol Cases* 4, e106-e109, 2011.
- 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 *Eimeria tenella*. *Mitochondrion*, 11, 273-278, 2011.
- Hikosaka, K., Watanabe, Y., Kobayashi, F., Waki, S., Kita, K. and Tanabe, K. Highly conserved gene arrangement of the mitochondrial genomes of 23 *Plasmodium* species. *Parasitol. Int.* 60, 175-180, 2011.
- Mori, M., Morimoto, H., Kim, Y-P., Ui, H., Nonaka, K., Masuma, R., Sakamoto,

- S., Kita, K., Tomoda, H., Shiomi, K., and Ōmura, S. Ukulactones A and B, new NADH-fumarate reductase inhibitors produced by *Penicillium* sp. FKI-3389. *Tetrahedron*, 67, 6582-6586, 2011.
- Nara, T., Hashimoto, M. Hirawake, H., Liao, C-W., Fukai, Y., Suzuki, S., Tsubouchi, A., Morales, J., Takamiya, S., Fujimura, T., Taka, H., Mineki, R., Fan, C-K., Inaoka, D. K., Inoue, M., Tanaka, A., Harada, S., Kita, K. and Aoki, T. Molecular interaction of the first 3 enzymes of the de novo pyrimidine biosynthetic pathway of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* in press.
- Hashimoto, M., Morales, J., Fukai, Y., Suzuki, S., Takamiya, S., Tsubouchi, A., Inoue, S., Inoue, M., Kita, K., Harada, S., Tanaka, A., Aoki, T. and Nara, T. Critical importance of the de novo pyrimidine biosynthesis pathway for *Trypanosoma cruzi* growth in the mammalian host cell cytoplasm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in press.
- Sakai, C., Tomitsuk, E., Esumi, H., Harada, S. and Kita, K. Mitochondrial fumarate reductase as a target of chemotherapy: from parasites to cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta*, in press
- Angeles, JM., Goto, Y., Kirinoki, M., Leonardo, L., Rivera, PT., Villacorte, E., Inoue, N., Chigusa, Y., and Kawazu, S. Human antibody response to thioredoxin peroxidase-1 and tandem repeat proteins as immunodiagnostic antigen candidates for *Schistosoma japonicum* infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 85, 674-679, 2011.
- Yamasaki H., Ohmae H., and Kuramochi T. Complete mitochondrial genomes of *Diplogonoporus balaenopterae* and *Diplogonoporus grandis* (Cestoda: Diphyllbothriidae) and clarification of their taxonomic relationships. *Parasitol. Int.*, 61, in press.
- Ikeda T., Tamura D., Sato Y., Ichihashi K., Matsuoka H., and Yamasaki H. Two pediatric cases of *Diphyllbothrium nihonkaiense* infection in summer 2010. *Pediatrics Int.*, 54, in press.
- Koonmee S., Intapan P.M., Yamasaki H., Sugiyama H., Muto M., Kuramochi T., Kularbkeaw J., Kanpittaya J., Maleewong W., and Nawa Y. Molecular identification of a causative parasite species using formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) tissues of a complicated human pulmonary sparganosis case without decisive clinical diagnosis. *Parasitol. Int.* 60, 460-464, 2011.
- Sugiyama, H., Singh, T.S. and Rangsiruji, A. *Paragonimus* in "Molecular Detection of Human Parasitic Pathogens", Liu, D.Y., (ed.), CRC press, Boca Raton,

421-433, 2012.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## Ⅱ. 分担研究報告書

赤痢アメーバの分化・病原機構の解明

研究分担者： 野崎智義 国立感染症研究所 部長

研究要旨

本研究は新たな治療・予防法の創出を目指し、赤痢アメーバの分化・病原機構を分子レベルで解明することを目的とする。初年度は、赤痢アメーバの病原性において中心的な役割を果たす病原因子の細胞内輸送において中心的な役割を果たす分子を、赤痢アメーバのみならず原虫において初めて同定することに成功した。赤痢アメーバのシステインプロテアーゼの輸送に必須な輸送体の同定と機能解析は、本酵素の病原性における重要性を再確認すると同時に、赤痢アメーバ症に対する新しい薬剤・ワクチン開発の作用点を提供すると期待される。

A. 研究目的

赤痢アメーバ症は感染症法の第5類に分類される重要な原虫性感染症である。国内で、知的障害者及び男性同性愛者(MSM)を中心に感染者数、感染報告数は過去10年以上にわたり増加の一途をたどり、感染集団の拡大と病原性の変化が懸念される。海外では、主に途上国を中心として熱帯・温帯の諸国に感染が定着し、マラリアに次いで死亡者数の多い原虫性の感染症と認知されている。

現在、届けられている800例程度の国内報告例の多くはMSMのものと考えられており、知的障害者における感染は過小評価されている。しかしながら、知的障害者施設を対象とした調査によれば、血清反応により明らかにされた感染既往は10-50%程度に見られ、知的障害者における感染浸淫は極めて深刻であることが示されている。

赤痢アメーバ症に対するワクチンは存

在せず、その治療は現在もつばらメトロニダゾールにより行われているが、インビトロにおける薬剤耐性の獲得は繰り返示されている。また、関連したジアルジア、トリコモナス等の原虫ではメトロニダゾール耐性はラボレベルにも、臨床的にも良く確立しており、新しい薬剤の開発とその標的の探索は急務である。

本研究では、赤痢アメーバの病原機構や細胞分化の機構を分子レベルで明らかにすることにより、本原虫に選択的に存在する新規ワクチン・創薬標的の発見に繋がる基盤的・応用的研究を行う。初年度は、赤痢アメーバにおいて中心的な役割を果たすシステインプロテアーゼの輸送を制御する輸送体を同定した。この発見は赤痢アメーバの病原性の表現に不可欠な分子同定として極めて重要であり、研究コミュニティにも高く評価された。

B. 研究方法



## 1. 培養

HM1:IMSS c16の培養はDiamondのBI-S-33培地を用いた無菌培養により行った。

## 2. Cysteine protease 5 (EhCP-A5)-HA付加体発現株の作成

C末端にHAエピトープを付加したEhCP-A5を発現するために、プラスミドを作成した。プラスミド構築は常法に従った。赤痢アメーバHM-1: IMSS c16の培養、形質転換などは常法に従った。

## 3. 免疫沈降法及び質量分析

EhCP-A5-HAを発現する形質転換体から抗HA抗原とprotein A-agaroseにより、EhCP-A5-HAに結合するタンパク質をタンパク質総抽出液から沈降した。免疫沈降法は常法に従った。免疫沈降された分画をSDS-PAGEにより展開し、EhCP-A5-HA形質転換体抽出液のみから検出される>100kDaタンパク質をLC-ToFMSを用いた質量分析に供した。

## 4. CPBF1発現抑制形質転換体の作成

赤痢アメーバCPBF1のタンパク質コード領域の5'末端420bp程度を適切な制限酵素箇所を付加したオリゴヌクレオチドを用いてPCR増幅し、pSAP2Gunma plasmidに挿入し、gene silencing plasmidを作成し、上述の方法により、CPBF1発現抑制体を作成した。

(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. 赤痢アメーバの病原因子システイン

### プロテアーゼ A5 (EhCP-A5) 結合タンパク質の同定

HA エピトープを付加した EhCP-A5 の細胞粗抽出液からの免疫沈降により>100kDaのタンパク質を検出した(図1)。このタンパク質を質量分析により同定し、Cysteine protease binding family protein 1 (CPBF1) と名付けた。CPBF1 は N 末端にシグナル配列、C 末端近くに膜貫通領域をもつタンパク質であった。

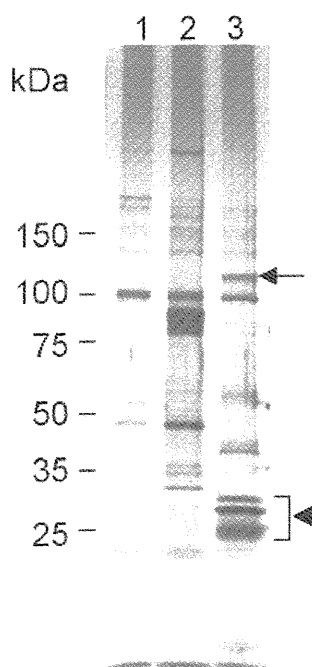


図1 EhCP-A5 (矢頭) の免疫沈降と CPBF1 (矢印) の同定, lanes 1-2, control; lane 3, EhCP-A5 発現株

### 2. CPBF1 の免疫沈降によるシステインプロテアーゼの同定

上述の EhCP-A5 と CPBF1 の相互作用を確認するために、CPBF1-HA を発現する形質転換体から HA 抗体を用いて免疫沈降を行い、イムノブロットにより、CPBF1 と相互作用するシステインプロテアーゼを同

定した (図 2)。主に CP-A5 が同定されたが、同時に他の主要なシステインプロテアーゼの一つである CP-A1 も CPBF1 に結合することが確認された。システインプロテアーゼはプレ、プロ領域をもつが、主に完全にプロセッシングを受けた成熟活性化型が検出された。

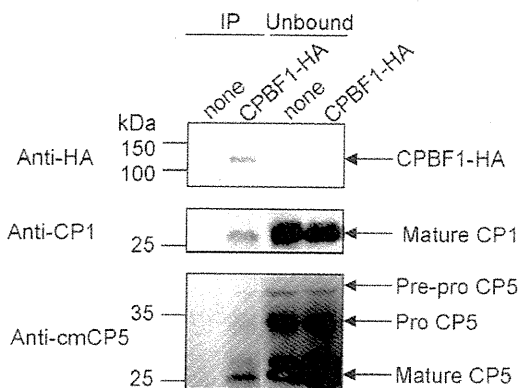


図 2 CPBF1-HA 発現体からの CPBF1 の免疫沈降による CP の同定

### 3. CPBF1 の遺伝子発現抑制による表現型の解析

CPBF1 を gene silencing 法を用いた antisense small RNA により抑制した。免疫ブロットにより細胞内と培養液中に分泌されたシステインプロテアーゼの量を調べたところ、細胞内 EhCP-A5 は大きく減少し、細胞外に分泌されることが明らかになった (図 3)。一方、EhCP-A1 は CPBF1 gene silencing の影響をあまり受けなかった。このことは CPBF1 が EhCP-A5 を恐らく唯一の輸送体とすること、一方 EhCP-A1 は他の輸送体によっても輸送される可能性を示している。コントロールである細胞質タンパク質システイン合成酵素 (CS) は gene silence の影響を受けなかった。

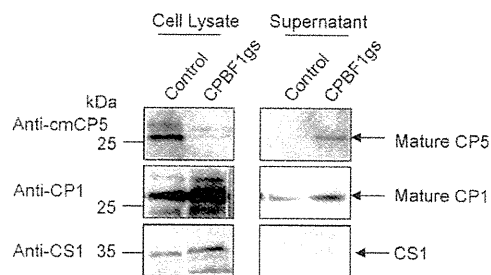


図 3 CPBF1 抑制によるシステインプロテアーゼの細胞外への分泌促進

### 4. CPBF1 gene silencing による EhCP-A5 のプロセッシングの抑制

テトラサイクリンにより発現誘導される EhCP-A5 発現株を元に、更に CPBF1 を発現株 (CPBF1gs-CP5-HA) を作成し、EhCP-A5 の発現誘導後のプロセッシングを SDS-PAGE と免疫ブロットで解析した (図 4)。pSAP2-CP5-HA および CP5-HA はそのコントロールである。CPBF1 gene silencing により、EhCP-A5 の pre-pro 型から成熟型への転換はほぼ完全に消失した。このことから CPBF1 は EhCP-A5 のプロセッシングと成熟に不可欠であることが示された。

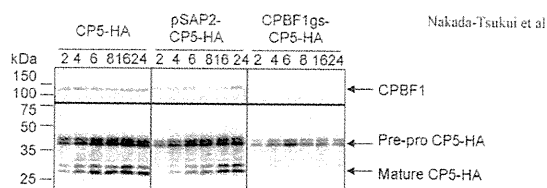


図 4 CPBF1 gene silencing による EhCP-A5 のプロセッシングの抑制

更に、CPBF1 gene silencing による EhCP-A5-HA の局在を間接蛍光法で確認したところ、EhCP-A5 の発現誘導後 24 時間たっても、リソソームへの輸送が起こら