

201225036A

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24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25 (2013) 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24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25 (2013) 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 -----	15
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 -----	25
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 -----	31
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カントアメーバ角膜炎の実態に関する調査研究-----	37
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 -----	41
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 -----	47
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 -----	51
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-----	53
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-----	57
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 -----	59
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 -----	65
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-----	71
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-----	73
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 -----	89
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

主任研究者： 野崎智義 国立感染症研究所 部長

研究要旨

本研究は、本邦で問題となる原虫・寄生虫症の発生・まん延を防止するために不可欠なサーベイランス・検査・診断法の確立、治療法の開発等を目指している。更に、そのために不可欠な起因原虫・寄生虫の生物学的特質・感染・病理・免疫機構の解明を目的とする。2年度は、当初の計画通り、対象とするそれぞれの原虫・蠕虫症に関して、多面的なサーベイランス・調査・研究を行い、顧みられない寄生虫症対策に資する多くの成果を挙げた。同時に本研究は国内の寄生虫学研究の強化ならびに国内寄生虫症感染情報ネットワークの強化にも資すると予想される。

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

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、国内で問題となる代表的な顧みられない原虫・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、研究者育成と基礎研究レベルの底上げを目指して、国内の代表的な原虫・寄生虫症の専門家を結集し、予防・治療法の確立に繋がる原虫・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

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

ントアメーバ症の継続的な発生动向調査、分離株の型別を行う。ジアルジア症・住血吸虫症、顎口虫・条虫・アニサキス症等の免疫診断法・キットの確立し、キットの有効性に関して検証するとともに、感染動向調査へ応用する。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・アカントアメーバ等の病原・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。以上の研究成果を統合し、「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」を達成することを本研究班の長期的な目的とする。

B. 研究方法

1. ジアルジア・マンソン孤虫・顎口虫・イヌ・ネコ回虫・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

ジアルジア嚢子特異的単クローン抗体4G1及び3H4-E7を用いて、常法によりジアルジア嚢子のイムノクロマト検出キットを作成し、評価を行った。蠕虫症に関しては、抗原調整法、血清反応に用いた血清に関しては各分担報告書に記載されて

いる。これら血清診断キットの実用化に向けた評価を行った。同時に新しい抗原の検索のためにcDNAの合成、組み換え抗原の合成も常法に従った。条虫の種内・種間鑑別はミトコンドリアcox遺伝子伝子を、肺吸虫のそれはミトコンドリア・16SリボゾームDNAを標的とした。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、感染動物（スイギュウ）血清を用いて評価を行った。

2. 腸管原虫症・アカント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、主に初診時の血清抗体価による発症の可能性と無症候感染者における大腸鏡による回盲部潰瘍の発生率についてを検討した。

昨年度から継続して全国拠点病院の眼感染症ネットワークを利用して、角膜炎検体からのアカントアメーバの分離と臨床像の収集、ならびにミトコンドリア遺伝子による分子疫学解析を行った。アカントアメーバの薬剤感受性評価法の開発を行った。

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

1984年から1998年に旧予防衛生研究所が行っていた伝染病予防法によるマラリア行政検査によって収集したマラリア輸

入例の薄層標本を用いて、Dhps変異を含む238 bpのDNA断片をネステッドPCRで増幅し、遺伝子配列を決定した。

MTZ耐性赤痢アメーバ株は標準株であるHM-1株に2 μ MのMTZを加え、対数増殖期まで培養し、続いて1 μ Mずつ濃度を上げたMTZを加えた培地での培養を続けることで耐性株の樹立を行った。

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ファミリー(cysteine protease binding family protein, CPBF1-11)をゲノムから同定した。発現をDNAマイクロアレイで確認した後、発現の最も高いもののうちCPBF8の結合タンパク質を免疫沈降法により獲得し、LC-ToFMS質量分析法によりタンパク質の同定を行った。Gene silence法により遺伝子発現を阻害し、常法に従い表現型を観察した。

野生型もしくはIFN- γ 欠損CBA/Jマウスの虫垂に *E. moshkovskii* 栄養体を接種し、各免疫臓器においてTh1ならびにTh2サイトカイン産生細胞の経時的变化をモニタした。

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)を用いてトキソプラズマ感染時のparasitophorous vacuole (PV)およびevacuole (eV)の形成を観察した。また、GPIアンカーの生合成

に参与する遺伝子に変異を有する変異CHO細胞(Gaa1(-))とその変異を相補した細胞クローン(cCHO)におけるeV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。昨年度に引き続き、PbMutator原虫をマウスに継代感染させ、継代を重ねる過程でPbMutator原虫ゲノムに変異が蓄積するかを検証した。さらに第122週PbMutator原虫クローンの表現型を詳細に解析した。全ゲノム変異解析結果と照らし合わせることで、表現型の原因遺伝子と変異部位同定を試みた。更に、リーディング鎖の複製酵素 ϵ -DNAの校正機能を低下させた原虫を第二世代PbMutator原虫として、この原虫の作成を試みた。第二世代PbMutator原虫の作成は、 ϵ -DNAの校正機能に必要であると考えられるアミノ酸二カ所(D348A, E350A)をAlaに置換した変異型PolyE遺伝子で内因性PolyE遺伝子を置き換えたネズミマラリア原虫を作成する。

6. エキノコックスの嫌氣的呼吸鎖の生理機能の解明

モデル系である回虫ミトコンドリアの複合体IIの結晶解析を行い、そのフマル酸還元活性を示すための基本構造についての情報を得た。SPRing-8にて分解能2.8Åの回折強度データを得て、ブタ複合体IIの構造をモデルにした分子置換法による構造決定と結晶学的位相精密化を行って回虫成虫QFRの結晶構造解析が可能

となった。阻害剤との複合体構造は、複合体結晶をソーキング法で調製し、高エネ研PFにてX線回折強度データの測定を行い、Native体の構造を用いて構造解析した。さらに特異的阻害剤との共結晶から、さらに強力な阻害活性を持つ薬剤の分子設計について検討した。

7. 線虫の幼虫移行における病態形成機構の解明

イヌ・ネコ回虫の由来、感染・回収実験については分担研究報告書に詳述した。以下の虫体を用いてRNA-seqにより遺伝子発現プロファイリングを行った。虫卵 (Egg)、土壌幼虫 (L1/L2)、感染幼虫 (L3i)、肺移行期幼虫 (LL3)、粘膜幼若虫 (YA)、成虫 (Adult)、培養幼虫 (cultured L3i、培養1日または5日)。RNA-seqはHiSeq200を用いて実施した。

(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

昨年度作成されたモノクロナル抗体を用いて、ジアルジア迅速診断のためのイムノクロマト検査キットを試作し、その反応性を従来品と比較した。キット形態はストリップ型で、単純に試料に浸漬する簡便な使用方法を考案した。感度・特

異性の面で従来品とほぼ同様の成績を得られ、固定試料にも使用が可能であり、高い汎用性が見込まれた。検査時間は試料前処理を含め20分程度であり、迅速性は良好であった。消化管寄生性原虫の検査診断の普及、拡大を図るために有用であった。

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、顎口虫症、ならびにトキソカラ症の迅速血清診断イムノクロマトキットの開発に関する研究を行った。マンスン孤虫症については、前年度に引き続き、キットの評価を実施し、臨床応用可能である結果が得られた。顎口虫症については、キットに用いる遺伝子組換え抗原(メタロプロテアーゼ)を大腸菌で発現させ、この遺伝子組換え抗原が顎口虫症患者血清と特異的に反応したことから、抗原候補となりうることが確認された。一方、メタロプロテアーゼ以外の抗原候補分子の検索を行うために、有棘顎口虫幼虫の cDNA library を作成し、顎口虫症患者血清を用いたイムノスクリーニングを行った。その結果、複数の陽性クローンを得ることができ、大腸菌を用いた発現系の検討中である。トキソカラ症のキットについては、すでに完成しているが、本年度はブラジルにおいてキットの評価を兼ねた試験を実施し、概ね良好な成績を得ることができた。一方、寄生蠕虫症病原体の網羅的な遺伝子診断鑑別法の確立については、臨床検体を活用することによって鑑別法を確立することができた。その特筆すべき例として、国内2例目となる *Dirofilaria repens* の確定診断、海外の医療機関から

依頼された *Onchocerca lupi* によるヒト症例（世界で4例目）が挙げられる。

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。まず肺吸虫については、昨年度に構築した PCR による同定鑑別法（ミトコンドリア・16S リボゾーム DNA が標的）を再検討し、本邦産の人体寄生種であるウェステルマン肺吸虫の 2 型（2 倍体型・3 倍体型）および宮崎肺吸虫に加えて、東南アジア・南アジアにおける主要人体寄生種のヒロクチ肺吸虫が、この方法で迅速・確実に同定鑑別できるかを検証した。アニサキスについては、虫体の分子同定で原因種が明らかにされた患者の血清を集積することで、アニサキス症の血清パネルを充実させた。またこれらの血清サンプルを用いて、昨年度に作製した迅速診断キットの反応性を検討した。

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

今年度は日本住血吸虫症の保虫宿主（スイギュウ）を対象とした酵素抗体法（ELISA）の開発を試みた。昨年度に実施した患者を対象とした研究で有用性を検討した 5 種類の組換え体抗原と同感染症陽性および各種陰性スイギュウ血清との 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。その結果、組換え体抗原 SjTPx-1 あるいは、Sj7TR の有用性が指摘され、SjTPx-1 を抗原とする患者と保虫宿主に共通の血清診断法開発の可能性が示唆された。また今回の研究から、フィリピンでの日本住血吸虫症の保虫宿主として、スイギュウが重要な役割を果たしている可能性も新たに指摘された。

5. 腸管原虫の分子疫学調査に関する研究

HIV 感染者を中心に、国内で赤痢アメーバ症症例数が性感染症として増加していることがこの 10 年間で徐々に分かってきた。本研究では、糞口感染として伝播する腸管寄生虫症（赤痢アメーバ・ジアルジア・クリプトスポリジウム）の疫学的状況を臨床症例から明らかにすることを目的としている。研究初年度は、過去の診断症例を振り返ることにより赤痢アメーバ症以外の腸管寄生虫症（ジアルジア・クリプトスポリジウム）数が過小評価されている可能性を指摘し、その原因は保険診療内で可能な直接検鏡法の感度の低さにあると推定されることを指摘した。本年度は、より簡便で感度の高いとされる ELISA 法による検査を試験的に導入してみた。しかし、残念ながら、1 年間でジアルジア 2 例（いずれも散発例）、クリプトスポリジウム 0 例で、2 例とも直接検鏡法で診断可能であった症例であり、上記 2 疾患は赤痢アメーバ症ほどの流行を見せていないことが判明した。一方、赤痢アメーバ症については、HIV 感染者の赤痢アメーバ特異抗体血清陽性率を測定

したところ、HIV 感染者全体の陽性率は 21.3% とアフリカの発展途上国農村と匹敵する高値であることが判明した。驚くべきことに、抗体陽性者のおよそ 8 割は赤痢アメーバ症の治療歴を有さないことも分かった。また、既往歴のない抗体陽性者はその後高率（1 年間に 20%）に侵襲性赤痢アメーバ症を発症することなどが明らかにされた。

6. 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

昨年度に引き続き、角膜より高頻度に検出されるシーケンスタイプが検出された他、本調査でははじめて T3 タイプのアメーバが角膜炎株として分離されたことが明らかとなった。A. pearcei ATCC50435 は米国の海洋で、海底汚泥から 1978 年に分離されたと報告されている。BLAST 検索の結果では本種の角膜からの検出例はこれまで報告がない。T4 以外のアメーバは環境中でのポピュレーションが低く、T3 の角膜検出例は少ないことが知られる。前年度調査で T11 のアメーバが角膜より分離されたことを加え、国内では T4 以外にもマイナーな T3 や T11 のアメーバも角膜炎に関連することが明らかとなった。

前年度までにアcantアメーバの感受性の新しい測定法の開発を行ったが、その方法を用いて、アcantアメーバの新規の治療法（メチレンブルーを用いた光線力学療法）を評価した。光線力学療法は、アcantアメーバの栄養体・シストの呼吸活性を抑制し、さらに、従来の抗アメーバ薬（PHMB や抗真菌薬）との併用

効果も認められた。

7. マラリア薬剤耐性株流入のモニタリング法の開発

Sulfadoxine/Pyrimethamine (SP) 耐性の熱帯熱マラリアは 1970 年代に東南アジアで出現し、現在のマラリア流行地域に流行している。本研究では SP 耐性の広まりを解析し、今後の対策に役立てるために、1984 年から 1998 年までの東南アジアのサンプルから sulfadoxine 耐性遺伝子 (dhps) の遺伝子型を決定した。その結果、SP としての合剤として使用されたのにも関わらず、dhps への変異は pyrimethamine 耐性を付与する dhfr 変異の後に導入されたことが明らかとなった。また、1990 年代の東南アジアでは、SP の耐性は出現していたが、2000 年以降に出現した高度 SP 耐性株ではないことが分かった。

8. 赤痢アメーバの薬剤耐性機構の解明

昨年度作成され、トランスクリプトーム解析された株よりも更に高い耐性を示す株を樹立することを目的とした。しかしながら、標準株である HM-1 株から MTZ 耐性株の樹立を試みたが、細胞の増殖が安定せず、耐性株樹立に至らなかった。原因として実験室で継続的に培養されている HM-1 株に、ストレス応答などに関する遺伝的変異が生じた可能性が示唆された。もう一つの説明として、MTZ への耐性が生じにくいと考えられる。これは *T. vaginalis* や *G. lamblia* では MTZ 耐性臨床株の出現、実験室内での高度耐性株の樹立と対照的である。

9. 赤痢アメーバの病原・分化機構の解明
アメーバ症に対する新たな治療・予防法の創出を目指し、本原虫の病原機構・細胞分化機構等を分子レベルで解明することを目的とした。初年度に同定・解析された病原因子の細胞内輸送において中心的な役割を果たす受容体・輸送体タンパク質(システインプロテアーゼ結合ファミリータンパク質: CPBF1)のタンパク質ファミリーを赤痢アメーバゲノム中から同定した。更に、その中で、CPBF1と同様に発現の多い CPBF8 に関して、その結合リガンドを同定し、赤痢アメーバにおける CPBF8 の生理的な役割を解明することに成功した。CPBF は哺乳動物を始め他種生物に存在せず、赤痢アメーバ症に対する新しい薬剤・ワクチン開発の合理的な標的である。

10. 赤痢アメーバの感染機構の研究

昨年度までの研究から、病原性が未確定の *E. moshkovskii* は、病原性 *E. histolytica* と同様 CBA/J や C3H/HeN、C3H/HeJ マウスの腸管に定着できることが判明した。本年度は、IFN- γ KO (CBA/J) マウスを用いて IFN- γ の役割を検証した。IFN- γ KO CBA/J マウスでは、IFN- γ に対する抗体を用いた実験と同様、原虫の排除が起こらずに感染が遷延した。この時、下痢や体重減少などの症状が緩和された。つまり *E. moshkovskii* 感染によって誘導される IFN- γ は下痢などの消化管症状を引き起こしつつ原虫の排除に機能しており、宿主にとっては諸刃の刃であることが確認された。消化管症

状の病因となりうる腸上皮細胞のアポトーシスを観察したところ、*E. moshkovskii* 感染時に亢進することが判明した。*E. moshkovskii* 感染マウスでは、アポトーシス関連分子であり腸管上皮細胞間リンパ球上に発現する NKG2D および腸管上皮細胞上に発現する RAE-1 の発現上昇が認められた。IFN- γ を中和すると、これらの分子の発現上昇は抑制された。したがって、*E. moshkovskii* 感染時に誘導される IFN- γ は、腸管において NKG2D や RAE-1 の発現上昇を介して「腸上皮のアポトーシス」を引き起こし、諸刃の刃として「消化管症状」と「原虫の排除」に機能する可能性が示唆された。

11. 原虫類への新規遺伝学的手法の開発

第 122 世代 PbMutator 原虫集団から 2 つの原虫クローン (A, B) および第 122 世代コントロール原虫クローン (C) を単離した。次世代シーケンサー HiSeq2000 を用いて 3 つの原虫クローン (A, B, C) 全ゲノムをリシーケンシング、変異解析を行った。その結果、コントロール原虫においては 2 個、PbMutator 原虫クローン A, B では 173、174 個の変異が検出された。PbMutator 原虫はコントロール原虫よりも約 90 倍高い変異発生率を示した。以上のことから、PbMutator 原虫は継代を重ねる過程でゲノム内に変異が蓄積されていることが明らかとなった。次に、クローン A と B の表現型を解析した結果、ともに生殖母体形成能を欠損していることが判明した。PbMutator 原虫クローン A と B は、共通した変異を数多く有し、その中に生殖母体欠損に関わる原因遺伝子変異

が含まれている可能性が極めて高い。以上の結果は、PbMutator が研究ツールとして極めて有用であることを強く示唆する（論文投稿中）。

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

細胞膜上には、コレステロール、スフィンゴ糖脂質などの特定の脂質成分や、GPI アンカー型タンパク質などが濃縮して局在化する、動的な脂質領域（脂質マイクロドメイン）が存在する。我々は、トキソプラズマ感染における宿主細胞の脂質マイクロドメインの役割について解析した。まず、コレステロールが原虫の parasitophorus vacuole (PV) 及び evacuole (eV) 形成に及ぼす影響を調べた。eV は、原虫が宿主細胞に付着後、侵入する前に、宿主細胞内へロプトリータンパク質を注入する際に形成される小胞である。細胞膜からコレステロールを引き抜く作用がある methyl- β -cyclodextrin (M β CD) で宿主細胞を処理し、細胞のコレステロール含量を減少させることで脂質マイクロドメインの構造を破壊したところ、原虫の侵入効率、すなわち PV 形成能力は変化しなかったが、eV 形成は明らかに減少した。また、昨年度見出した GPI 欠損変異細胞における eV の過剰形成は M β CD により相補できなかった。これらのことから、宿主の脂質マイクロドメインに存在するコレステロールと GPI は、原虫による eV の形成に対してそれぞれ独立的に作用し、正常な eV 形成にはこの 2 種類の脂質のバランスが重要であるが、PV 形成には両者は関与して

いない可能性が示唆された。次に、GPI が PV 及び eV 形成に及ぼす影響について調べた。先行研究で GPI は PV に取り込まれることが報告されているため、GPI の eV へ取り込みについて解析した。GPI アンカー型 GFP 発現細胞を用い eV への GPI の取込みを観察したところ、GPI は、PV 同様 eV へも取り込まれていた。一方で GPI が存在している脂質マイクロドメインの構成蛋白質の 1 つである caveolin-1 およびマイクロドメイン局在タンパク質である Src は、eV にも PV にも取り込まれなかった。

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

得られた回虫成虫 QFR の構造は、真核生物のフマル酸還元酵素としては初めての結晶構造である。回虫成虫 QFR だけに見られる全体構造上の特徴として、膜を貫通する Cyb S サブユニットの N 末端が親水性サブユニットまで延びて Fp サブユニットと相互作用することで全体構造を安定化していた。これまでに構造が知られている呼吸鎖複合体 II や回虫成虫 QFR では、親水性サブユニット Fp と Ip サブユニットのアミノ酸配列の相同性は 70% 前後と高く、立体構造はよく一致していた。一方、疎水性サブユニットは種により多様である。ミトコンドリア型ブタ心筋およびトリ SQR や大腸菌は、回虫成虫 QFR と同様 2 本のポリペプチド鎖 (CybL、CybS) とヘム 1 つ持っている。これらのアミノ酸配列の相同性は互いに低いにもかかわらず、構造は Fp や Ip サブユニットだけでなく、CybL と CybS サブユニット

も良く一致した。このことは回虫成虫 QFR がミトコンドリア型 SQR から進化してきたものであることを裏付けるとともに、進化の過程で立体構造は不変であったことを示している。

複合体 II の阻害剤として知られるフルトラニルは回虫成虫 QFR に対して極めて選択性が高い。一方、アトペニン A5 はキノアナログとして基質結合部位に結合することが知られている。このフルトラニルの結合様式と選択性のメカニズムが回虫成虫 QFR との複合体構造によって初めて明らかとなった。すなわち、フルトラニルはキノン類と全く異なる構造をしているにもかかわらず、アトペニン A5 と同様、ロドキノール結合部位に結合し、そのイソプロピル基は Trp69C の芳香環と疎水性相互作用が認められた。この Trp69C は哺乳類由来の複合体 II では相当するアミノ酸がメチオニンになっており、宿主であるブタ、あるいは他の哺乳類由来の複合体 II との選択性発現の鍵であると考えられる。一方、このイソプロピル基を持たないカルボキシンはこの重要な Trp69C と相互作用できず、回虫成虫 QFR を阻害できないものと考えられた。

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、2012 年においても動物由来回虫類感染症が多数みられた。これらの多くはトキソカラ症と考えられたが、トキソカラ症の原因寄生虫がイヌ回虫かネコ回虫かは不明である。イヌ回虫感染とネコ回虫感染に病態の違いがあるか否かをブタを用いた感染実験で検討した結果、

幼虫は両者ともに肝臓から肺へと移行したが、ネコ回虫はイヌ回虫と比べて極めて移行速度が速く、短時間で虫体は肺より先へ到達することがわかった。このことは、臨床的に肝臓や肺に病変が強く出るのがイヌ回虫感染症、好酸球増多のみとめて画像所見に乏しいのはネコ回虫感染症である可能性を示唆している。

一方、体内移行期の蠕虫の生態を明らかにする目的で、モデル寄生虫であるベネズエラ糞線虫の体内移行期幼虫の遺伝子発現を RNA-Seq により解析した。その結果、体内に侵入してすぐに Notch シグナルに関与する転写因子の発現が急速に上昇した。今後、このシグナル系の解析が病態解明に有効であると考えられる。

D. 考察

本研究の 2 年次の計画は、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、基盤研究のいずれの分野においてもほぼ予定通りに実施され、目的に向かって確実に成果を生んでいる。感染実態調査に関しては、アメーバ角膜炎の実態調査が順調に進められ、分離株の T タイピングの情報が蓄積し、国内の分子疫学の基盤が徐々に整いつつある。更に、HIV 感染者における腸管原虫症の感染実態調査や幼虫移行症等の蠕虫症の実態調査などを順調に行い、着実に感染実態状況が把握されつつある。最終年度も感染実態の現況の確実な把握に努めると同時に、分子疫学手法による感染源の多様性の調査を行うことにより、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研究成果を生み続けられ

る予想される。

診断法の確立に関しては、ジアルジア嚢子の簡便なイムノクロマトキットが完成し、生鮮・凍結・固定試料にも対応しうる高い汎用性が見込まれる。更に、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、更に人獣共通感染症である住血吸虫症の動物における感染実態調査に威力を発揮する診断法の開発を達成し、これら蠕虫症の診断法の発展に関して、有意義な進展を示した。

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つは野崎らによる赤痢アメーバの新規リソソーム酵素輸送体ファミリー (Cysteine protease binding protein family) の発見と機能解析である (Cell. Microbiol., 2012)。この CPBF タンパク質群は本原虫に選択的に存在するため、病原体特異的な薬剤やワクチンの合理的な標的であるということができる。更に、北らによる呼吸鎖の構造解析に基づく創薬に関しても大きな発展があった。蠕虫類に共通な嫌氣的呼吸鎖である NADH-フマル酸還元系の複合体 II の立体構造上の特徴が明らかになった。しかもエキノコックスの複合体 II は宿主哺乳類や回虫とは異なった性質を持ち、前年度までの結果から各サブユニットにおける相違がアミノ酸レベルで明らかになっており、これを標的とした新規薬剤開発の可能性が一層高くなった。更に、フルトラニル誘導體群を用いて検討した結果、選択性がフルトラニルに比して格段に向上した誘導體を見出され、今後の同様なアプローチによりエ

キノコックス複合体 II の特異的阻害剤を見出せる可能性が高くなった。更に、平井らによるマラリア原虫の第2世代高度変異体の作成により、更にフォワードジェネティクスに画期的なシンポをもたらした。原虫全般の薬剤耐性機構や病原機構の理解に重要な役割を果たすことが期待される。

最終年度も計画通りに研究を展開し、当研究班が長期的に目指している「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」を達成していきたい。

E. 結論

本研究班は2年度にも十分な成果を納めた。本邦で問題となりうる原虫・寄生虫症の発生・まん延を防止するために不可欠な、検査・診断法の確立、治療法の開発等に貢献した。更に、上記に不可欠な基盤的な病原機構等の理解に資する成果を収めた。以上、幅広い原虫・蠕虫による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、原虫・寄生虫症の発生動向の正確な把握とそれに基づいた感染症対策に大いに資する総合的な成果を収めている。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表 (英文論文のみ)

Christy, N., Hencke, J., Escueta-De Cadiz, A., Nazib, F., Thien, H., Yagita, K., Ligaba, S., Haque, R.,

- Nozaki, T., Tannich, E., Herbein, J., and Petri, W. Multi-site performance evaluation of an ELISA for the detection of *Giardia*, *Cryptosporidium*, and *Entamoeba histolytica* antigens in human stool. *J. Clin. Microbiol.* 50, 1762–1763, 2012.
- Nakada-Tsukui, K., Tsuboi, K., Furukawa, A., Yamada, Y., and Nozaki, T. A novel class of cysteine protease receptors that mediate lysosomal transport. *Cell. Microbiol.* 14, 1299–317, 2012.
- Jeelani, G., Sato, S., Husain, A., Escueta-de Cadiza, A., Sugimoto, M., Soga, T., Suematsu, M., and Nozaki, T. Metabolic profiling of the protozoan parasite *Entamoeba* revealed activation of unpredicted pathway during encystation. *PLoS ONE* 7, e37740, 2012.
- Mishra, V., Kumar, A., Ali, V., Nozaki, T., Zhang, K. Y., and Bhakuni, V. Novel protein-protein interactions between *Entamoeba histolytica* d-phosphoglycerate dehydrogenase and phosphoserine aminotransferase. *Biochimie.* 94, 1676–1686, 2012.
- Husain, A., Sato, D., Jeelani, G., Soga, T., and Nozaki, T. Dramatic increase in glycerol biosynthesis upon oxidative stress in the anaerobic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1831, 2012.
- Klionsky DJ, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 8, 445–544, 2012.
- Makiuchi, T., Mi-ichi, F., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. Novel TPR-containing subunit of TOM complex functions as cytosolic receptor for *Entamoeba* mitochondrial transport. *Scientific Reports* 3, 1129, 2013.
- Shimokawa, C., Kabir, M., Taniuchi, M., Mondal, D., Kobayashi, S., Ali, I. K., Sobuz, S. U., Senba, M., Houpt, E., Haque, R., Petri, Jr., W. A., Hamano, S. *Entamoeba moshkovskii* is associated with diarrhea in infants and causes diarrhea and colitis in mice. *J Infect Dis.* 206, 744–751, 2012
- Mbanefo EC, Chuanxin Y, Kikuchi M, Shuaibu MN, Boamah D, Kirinoki M, Hayashi N, Chigusa Y, Osada Y, Hamano S, Hirayama K. Origin of a novel protein-coding gene family with similar signal sequence in *Schistosoma japonicum*. *BMC Genomics.* 13, 260.
- Mito T, Suzuki T, et al. Effect of photodynamic therapy with methylene blue on *Acanthamoeba* in vitro. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53, 6305–6313, 2012.
- Ikeda Y, Inoue Y, Yagita K et al. Assessment of real-time polymerase chain reaction detection of

- Acanthamoeba* and prognosis determinants of acanthamoeba keratitis. *Ophthalmology*. 119, 1111-1119, 2012.
- 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
- Hino A, Hirai M, Tanaka TQ, Watanabe Y, Matsuoka H, Kita K. Critical roles of the mitochondrial complex II in oocyst formation of rodent malaria parasite *Plasmodium berghei*. *J Biochem*. 152, 259-68, 2012.
- Matsuoka H, Sano G, Hattori R, Tomita H, Yamamoto DS, Hirai M. One injection of DsRed followed by bites from transgenic mosquitoes producing DsRed in the saliva elicits a high titer of antibody in mice. *Trop Med Health*. 40, 47-52, 2012.
- Duan, X., Imai, T., Chou, B., Tu, L., Himeno, K., Suzue, K., Hirai, M., Taniguchi, T., Okada, H., Shimokawa, C., and Hisaeda, H. Resistance to malaria by enhanced phagocytosis of erythrocytes in LMP7-deficient mice. *PLoS ONE*, in press.
- Nagayasu E, Ishikawa SA, Taketani S, Chakraborty G, Yoshida A, Inagaki Y, Maruyama H. Identification of a bacteria-like ferrochelatase in *Strongyloides venezuelensis*, an animal parasitic nematode. *PLOS ONE*, in press.
- Nagayasu E, Ogura Y, Itoh T, Yoshida A, Chakraborty G, Hayashi T, Maruyama H. Transcriptomic analysis of four developmental stages of *Strongyloides venezuelensis*. *Parasitol Int*. 62, 57-65, 2013.
- 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*. 418, 140-143, 2012.
- 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*. 417, 1002-1006, 2012.
- 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 1820, 643–651, 2012.
- Shimizu, H., Osanai, A., Sakamoto, K., Inaoka, D. K., Shiba, T., Harada, S. and Kita, K. Crystal structure of mitochondrial quinol-fumarate reductase from the parasitic nematode *Ascaris suum*. J. Biochem. 151, 589–592, 2012.
- Tanaka, Q. T., Hirai, M., Watanabe, Y. and Kita, K. Towards understanding the role of mitochondrial complex II in the intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*: gene targeting of the Fp subunit. Parasitol. Int. 61, 726–728, 2012.
- Kitamura, K., Kishi-Itakura, C., Tsuboi, T., Sato, S., Kita, K., Ohta, N. and Mizushima, N. Autophagy-related Atg8 localizes to the apicoplast of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. PLoS ONE 7(8), e42977, 2012.
- Tachibana S, Sullivan SA, Kawai S, Nakamura S, Kim HR, Goto N, Arisue N, Palacpac NM, Honma H, Yagi M, Tougan T, Katakai Y, Kaneko O, Mita T, Kita K, Yasutomi Y, Sutton PL, Shakhbatyan R, Horii T, Yasunaga T, Barnwell JW, Escalante AA, Carlton JM, Tanabe K. *Plasmodium cynomolgi* genome sequences provide insight into *Plasmodium vivax* and the monkey malaria clade. Nat Genet, 44, 1051–1055, 2012.
- Hikosaka, K., Tsuji, N., Watanabe, Y., Kishine, H., Horii, T., Igarashi, I., Kita, K. and Tanabe, K. Novel type of linear mitochondrial genomes with dual flip-flop inversion system in apicomplexan parasites, *Babesia microti* and *Babesia rodhaini*. BMC Genomics, 13, 622, 2012.
- Saimoto, H., Kido, Y., Haga, Y., Sakamoto, K. and Kita, K. Pharmacophore identification of ascofuranone, potent inhibitor of cyanide-insensitive alternative oxidase of *Trypanosoma brucei*. J. Biochem. 153, 267–273, 2013.
- Goto, M., Amino, H., Nakajima, M., Tsuji, N., Sakamoto, K. and Kita, K. Cloning and characterization of hypoxia-inducible factor-1 subunits from *Ascaris suum* - a parasitic nematode highly adapted to changes of oxygen conditions during its life cycle. Gene 516, 39–47, 2013.
- Shiba, T., Kido, Y., Sakamoto, K., Inaoka, D. K., Tsuge, C., Tatsumi, R., Takahashi, G., Balogun, E. O., Nara, T., Aoki, T., Honma, T., Tanaka, A., Inoue, M., Matsuoka, S., Saimoto, H., Moore, M. L., Harada, S. and Kita, K. Structure of the trypanosome cyanide-insensitive alternative oxidase, a promising drug target. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, in press
- Harada, S., Inaoka, D. K., Ohmori, J. and Kita, K. Parasite complex II: unique characteristics and potential as drug targets. Biochim. Biophys. Acta (Bioenergetics), 2013,

- in press. (July-August) 2010. *Pediatr. Int.* 54, 163-165, 2012.
- Angeles, JM., Goto, Y., Kirinoki, M., Asada, M., Leonardo, L., Rivera, PT., Villacorte, E., Inoue, N., Chigusa, Y., and Kawazu, S. Utilization of ELISA using thioredoxin peroxidase-1 and tandem repeat proteins for diagnosis of *Schistosoma japonicum* infection among water buffaloes. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6(8): e1800, 2012.
- Angeles, JM., Goto, Y., Kirinoki, M., Asada, M., Hakimi, H., Leonardo, L., Rivera, PT., Villacorte, E., Inoue, N., Chigusa, Y., and Kawazu, S. Localization and expression profiling of a 31kDa antigenic repetitive protein Sjp_0110390 in *Schistosoma japonicum* life stages. *Mol. Biochem. Parasitol.* 187, 98-102, 2013.
- Yamasaki H. Current status and perspectives of cysticercosis and taeniasis in Japan. *Korean J. Parasitol.* 51, 19-29, 2013.
- Yamasaki H., Muto M., Yamada M., Aizono N., Rausch R.L. Validity of the bear tapeworm *Diphyllobothrium ursi* (Cestoda: Diphyllobothriidae) based on morphological and molecular markers. *J. Parasitol.* 98, 1243-1247, 2012.
- Ikeda T., Tamura D., Sato Y., Ichihashi K., Matsuoka H., Yamasaki H. Two pediatric cases of *Diphyllobothrium nihonkaiense* infection in summer
- 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

本研究はアメーバ症に対する新たな治療・予防法の創出を目指し、本原虫の病原機構・細胞分化機構等を分子レベルで解明することを目的とする。2年度は、初年度に同定・解析された病原因子の細胞内輸送において中心的な役割を果たす受容体・輸送体タンパク質(システインプロテアーゼ結合ファミリータンパク質: CPBF1)のタンパク質ファミリーを赤痢アメーバゲノム中から同定した。更に、その中で、CPBF1と同様に発現の多いCPBF8に関して、その結合リガンドを同定し、赤痢アメーバにおけるCPBF8の生理的な役割を解明することに成功した。CPBFは哺乳動物を始め他種生物に存在せず、赤痢アメーバ症に対する新しい薬剤・ワクチン開発の合理的な標的である。

A. 研究目的

赤痢アメーバ症は国内で最大の感染・有症者を生じる寄生虫症である。我が国では、主として、男性同性愛者(Men who have Sex with Men: MSM)及び知的障害者を中心に感染者数、感染報告数は過去10年以上にわたり増加の一途をたどっている。現在、感染集団の拡大と赤痢アメーバの病原性の増加の可能性が懸念されている。国内では感染症法の第5類に分類される全数把握・届出の義務づけられている。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。海外では、主に途上

国を中心として熱帯・亜熱帯・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。

赤痢アメーバの診断法は商業的には抗体検査に依存しており、病原学的なPCR、抗原捕捉などの検査は一般検査室では行われず、簡便なキットの作成と配布が望まれている。一方、赤痢アメーバ症に対する予防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し示されている。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。理想的な薬剤標的は言うまでもなく、哺乳動物を含めた他種生物に存在せず、対象となる病原体だけ