

レンブルーを用いた光線力学療法 (PDT) を評価した。

## B. 研究方法

引き続き、全国17施設を拠点として、AK由来株のDNAについてBLAST検索による既存アメーバとの相同性を調べ、Tタイピングによる分類を行った。

治療については、メチレンブルー (MB) を光感受性物質として使用したPDT (以下MB-PDT) による抗アメーバ作用を*in vitro*で検討した。実験方法としてはMB溶液とプレインキュベートしたアカントアメーバに660nmのハロゲンランプ光を一定時間照射した後、アメーバの呼吸活性をCTC (5-cyano-2, 3-ditolyl-tetrazolium chloride) 染色を指標に抗アメーバ効果を評価した。

(倫理面への配慮)

レトロスペクティブな調査として行うために、この研究による患者に対する不利益は生じない。また、患者の個人情報については連結匿名化し、外部に情報が伝わらないよう、厳重に保護される。

治療実験についてはヒトサンプルを使用しておらず、倫理面の配慮の必要はない。

## C. 研究結果

3施設からの9分離株 (角膜4、患者使用の保存液5) を解析した (表1)。角膜株には検出頻度の高いATCC30461タイプ、ATCC50370タイプに加え、メキシコからの分離例があるHC-2タイプが検出された。これらはT4に分類されたが、残りの1株はT3タイプの*A. pearcei* ATCC50435と高ホモロジー (99%) を示した。*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。保存液からの分離株はいずれも患者角膜と同じシーケンスを示した (表1ならびに図1)。

PDTの実験については、MB-PDT群の栄養体の呼吸活性率が対照群と比較して低下することが認

められた。その抗アメーバ効果はMB溶液の濃度依存性であり、さらに光照射時間 (量) 依存性であることも確認された。さらに消毒薬 (PHMB; polyhexamethylene biguanide) やアムホテリシンBとの併用効果も認められた。

## D. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

研究成果の刊行に関する一覧表参照

### 2. 学会発表

宮崎大、池田欣史、矢倉慶子、川口亜佐子、石倉涼子、井上幸次、水戸毅、白石敦、大橋裕一、檜垣史郎、板橋幹城、福田昌彦、下村嘉一、八木田健司：アカントアメーバ角膜炎における予後予測因子の多変量解析。第57回山陰眼科集談会・第86回鳥取大学眼科研究会，米子，2012/5/13

## F. 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

表 1、分離株のシーケンス解析による T タイプ分類ならびに BLAST 解析の結果

分離株 ID	試料	T タイプ	BLAST の結果
1-11-1	角膜	T4	ATCC30461 <i>A.polyphaga</i> Eye strain (100%)
9-12-1	角膜	T4	<i>A.polyphaga</i> HC-2 strain (99%)
9-12-2	CL 保存液	T4	<i>A.polyphaga</i> HC-2 strain (99%)
9-14-1	角膜	T3	ATCC50435 <i>A.pearcei</i> (99%)
9-14-2	CL 保存液(LとR)	T3	ATCC50435 <i>A.pearcei</i> (99%) L=R
11-1-1	角膜	T4	ATCC50435 <i>A.castellani</i> Ma strain (100%)
11-1-2	CL 保存液(LとR)	T4	ATCC50435 <i>A.castellani</i> Ma strain (100%) L=R

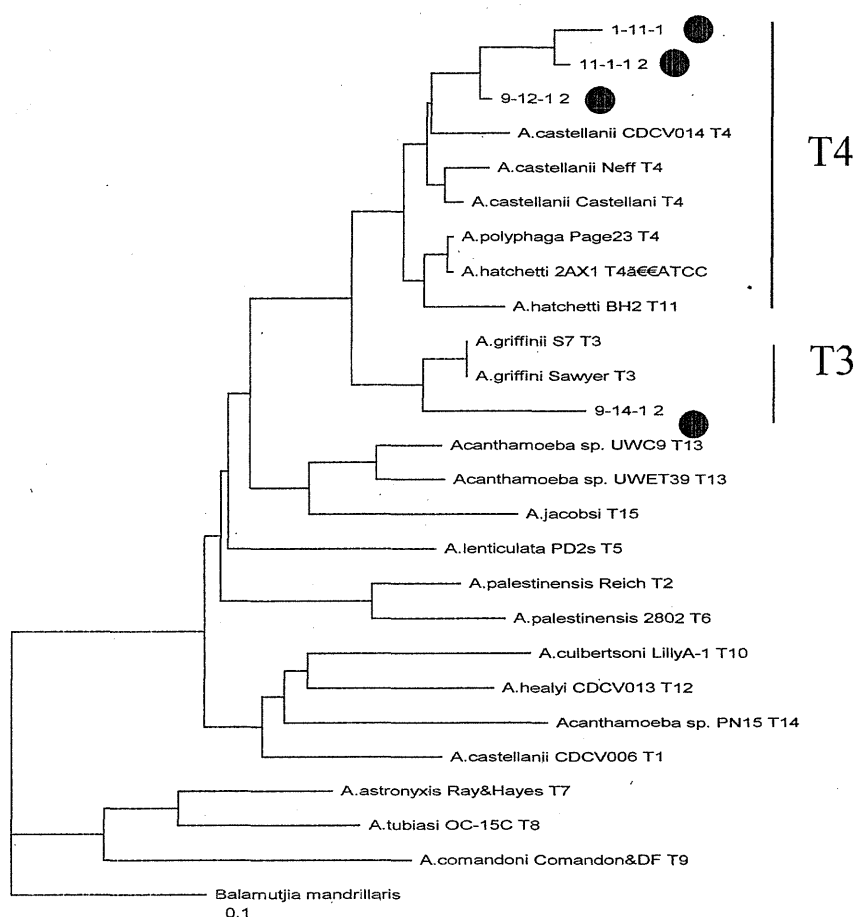


図 1、本年度調査で解析した分離株 (●) を含めた *Acanthamoeba* 属系統樹  
各 T タイプ (T1-T15) の代表的シーケンスを利用。

平成 24 年度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 年度分担報告書

消化管寄生原虫検出のための蛍光抗体試薬の開発

研究分担者:八木田 健司(国立感染症研究所 寄生動物部)  
研究協力者:泉山 信司(国立感染症研究所 寄生動物部)  
宮崎 誠生(アーク・リソース株式会社)

概要

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。

A. 研究目的

これまでにシスト壁抗原を認識する抗ジアルジアモノクロナル抗体の開発を基盤として、蛍光抗体試薬としての開発を行い、国内における顕微鏡検査用試薬の安定供給の道を確保した。近年免疫診断の新たな手法としてイムノクロマト(以下 IC と省略)が各種病原体あるいは抗体診断の迅速検査法に応用され、その普及が進んでいる。本年度研究ではジアルジア検査用 IC 開発を目的に、試作検査キットを作成し、その実用化に向けての研究を行った。

B. 研究方法

1. 試作 IC の作製

1-1. 材料

- 1)ジアルジアモノクロ抗体 Clone No. 4G1
- 2)ジアルジアモノクロ抗体 Clone No. 3H4-E7
- 3)金コロイド
- 4)メンブレン(ニトロセルロース)、吸収パッド、コンジュゲートパッド、サンプルパッド
- 5)陽性サンプル : ジアルジアシスト壁精製抗原(0.74mg/mL)

1-2. 作製方法

1)モノクロナール抗体 Clone No. 4G1 をメンブレンに塗布し、乾燥後、ブロッキングおよび安定化処理を行い、室温にて1晩乾燥させた。使用するまで低湿保管庫にて保管を行った。

2)モノクロナール抗体 Clone No. 3H4-E7 をパペインにて処理した。pH 条件、および感作タンパク量の検討を行い、金コロイドの抗体感作条件を定めた。定めた条件により、感作金コロイドを作製し、使用まで冷蔵にて保管を行った。

3)反応性の確認の為、1)のメンブレンと2)の液上コンジュゲートを用いた反応性評価試験を実施した。2)で作製した抗体感作金コロイド溶液を最終濃度 OD=1.5 となるように調整(コンジュゲート溶液)し、終量 101  $\mu$ l に調整、96well plate に加えて反応させた。

4)2)で作製した抗体感作金コロイド溶液に、DW と金コロイド塗布バッファーを加え、攪拌した。GFCP (10x150 mm) に上記混合液を 0.8mL/枚 均等に塗布し、コンジュゲートパッドを作製した。

5) 全ての部材をアッセンブリし(フルストリップ)、ギロチンカッターを用いて幅 5mm に裁断した。各部材の構成と IC キットの形状を図 1 に示した。陽性サンプルを調整し、サンプルパッドに 100  $\mu$ l を滴下、10~15 分後に発色確認を行った。

## 2. 試作 IC の反応性試験

### 2-1. 糞便試料を用いた試験

消化管寄生性原虫類(ジアルジア、クリプトスポリジウム、サイクロスポラ、赤痢アメーバ)の感染患者糞便を陽性試料とし、一方これらの原虫を検出できなかった糞便を陰性試料として IC の反応性を調べた。なお、患者診断には原虫により直接蛍光抗体法(DFA)、抗原検出法、顕微鏡検査および PCR 検査を用い、陽性、陰性を判定した。1.5ml サンプルチューブで PBS を用い糞便を 5 倍に希釈し、その希釈液に直接 IC サンプルパッド部分を浸漬し、15 分後発色の確認を行った。なお、同一の糞便試料につき性能比較のため、ジアルジアの検査用として市販されている IC キット ImmunoCard STAT! Cryptosporidium/Giardia (Merbio, USA) で検査を行った。

### 2-2. ホルマリン固定試料を用いた試験

ジアルジア陽性糞便試料ならびに原虫陰性糞便試料に直接等量の 10%ホルマリンを添加し、固定試料とした(5%ホルマリン濃度)。この固定試料について、界面活性剤、ブロッキング剤を様々な濃度で添加し、IC キットで検査可能となる試料の前処理条件を明らかにした。なお、同一の原虫陰性試料をホルマリン固定しない条件で調整し、対照実験用の試料とした。

## C. 研究結果

### 1. フルストリップの反応性

ジアルジア抗原溶液をサンプルパッドより吸収する実際的な使用形態で試験した結果、テストラインの発色が確認され、ジアルジア精製抗原 370ng, 740ng の検出が可能であった(図 2)。発色は速やかで、数分で発色の開始

が認められた。

### 2. 糞便試料を用いた反応性試験

ジアルジア等原虫陽性試料および原虫陰性試料における IC による検査結果、ならびに同一試料における ImmunoCard STAT!による検査結果を表1にまとめた。DFAによりシストが確認されたジアルジア陽性試料 4 検体はすべて IC で陽性であった。15 分間の反応時間後でも検体によりラインの発色には差があり、糞便内抗原量の違いを示すものと思われた(図 3A)。DFA によりオーシストが確認されたクリプトスポリジウム陽性試料3検体では、1検体で IC による弱陽性反応が見られた。ジアルジアおよびクリプトスポリジウム陽性試料はいずれも ImmunoCard STAT!により、目的の原虫に対する陽性反応が確認された。自家蛍光検査でオーシストが確認されたサイクロスポラ陽性試料3検体は、IC ですべて陰性であったが、そのうち1検体は ImmunoCard STAT!でジアルジア弱陽性を示した。顕微鏡によるシスト、栄養体確認あるいは PCR で陽性となった赤痢アメーバ陽性試料3検体は、IC ですべて陰性で、ImmunoCard STAT!の結果と一致した。また、原虫陰性試料5検体についても、IC ならびに ImmunoCard STAT! の検査ですべて陰性であった(図 3B)。

### 3. ホルマリン固定試料を用いた反応性試験

一般的にホルマリン固定では5-10%終濃度で使われることから、10%ホルマリン固定試料(水溶液状態)について IC を使うことを想定し、固定試料を最小限の希釈ですむように PBS で2倍希釈して調整し、試験に供した。この5%ホルマリン試料を界面活性剤およびブロッキング剤無添加の条件で検査した場合、ホルマリン固定しない対照実験ではテストラインに発色がないのに対し、明確なラインの発色が見られた。この結果は、ホルマリンのアルデヒド基によるタンパク質の架橋反応の結果と考えられたことから、これを抑制するために界面活性剤およびブロッキング剤添加による試料の前処理を行った。各種濃度条件を検討した結

果、5%ホルマリン試料に対し、4倍量の前処理液(0.5%界面活性剤、0.02%ブロッキング剤)を添加し希釈調整することで、IC検査でテストラインの発色は抑えられ、対照実験と同様に陰性反応が示された。この前処理条件により、ジアルジア陽性試料の反応性は影響されないことを確認した。

#### D. 考察

ICは迅速診断検査用に現在、急速に普及しつつある検査法である。インフルエンザやHIVと異なりジアルジアははじめ寄生虫の検査目的には、マラリアを除きまだ一般的ではない。世界的な感染者数の多さ、また集団感染を引き起こすリスクのあるジアルジアにおいては、基本的な検査が顕微鏡検査で、煩雑で熟練した技能が求められることから、検査診断の不徹底が指摘され下痢症の原因として正確に把握されているとは言いがたい現状にある。ICはこれらの問題点を解決し、また検査へのインテンシブを上げる効果があると期待される方法であることから、本研究において国産ICキットの開発を進めた。現在、世界的にはジアルジア検査用のICキットがImmunoCard STAT!はじめ、いくつか市販されている。形態としてはImmunoCard STAT!のようにハウジングされたもの以外に、本研究で作成したストリップのみのディップ式使用のものもある。いずれのICキットも国外製品としてコスト面での問題があり、およそICを用いたときの1検査あたりのコストは1,000円を超えるので、国内での普及が進んではいない。

本研究では試作段階のキットではあるが、その感度・特異性は従来品とほぼ同様の性能があるものと期待される結果を得た。従来品との差はそれぞれの抗体が認識するエピトープの違いが主たる原因と思われる。実用化に向けては、検査時間は試料の簡単な前処理を含めて20分程度であること、またホルマリン固定試料でも使用可能な成績が得られ、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。コスト面では量産化で低コスト化を実現できると考えられる。今後は栄養体のみが検出

される症例もあることから、栄養体のみを試料を調整し反応を確認する。最終的には正常な抗原抗体反応が行われたことを示すコントロールラインを加えた上で、流行地等で採取された糞便試料を用いたバリデーション試験を行い、市販製品化、普及を目指す。

#### E. 結論

ジアルジア迅速診断のためのICを試作、従来品と性能を比較した。感度・特異性の面で従来品と同様の成績を得た。また生鮮・凍結・固定試料の使用が可能であり、汎用性が見込まれた。

#### F. 参考文献

Garcia L.S., Shimizu R.Y., Novak S., Carro M. and Chan F. (2003) Commercial assay for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens by rapid solid-phase qualitative immunochromatography. *J Clin Microbiol.*, 41:209-212.

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

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

#### G. 健康危機情報

特になし

#### H. 研究発表

特になし

#### I. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

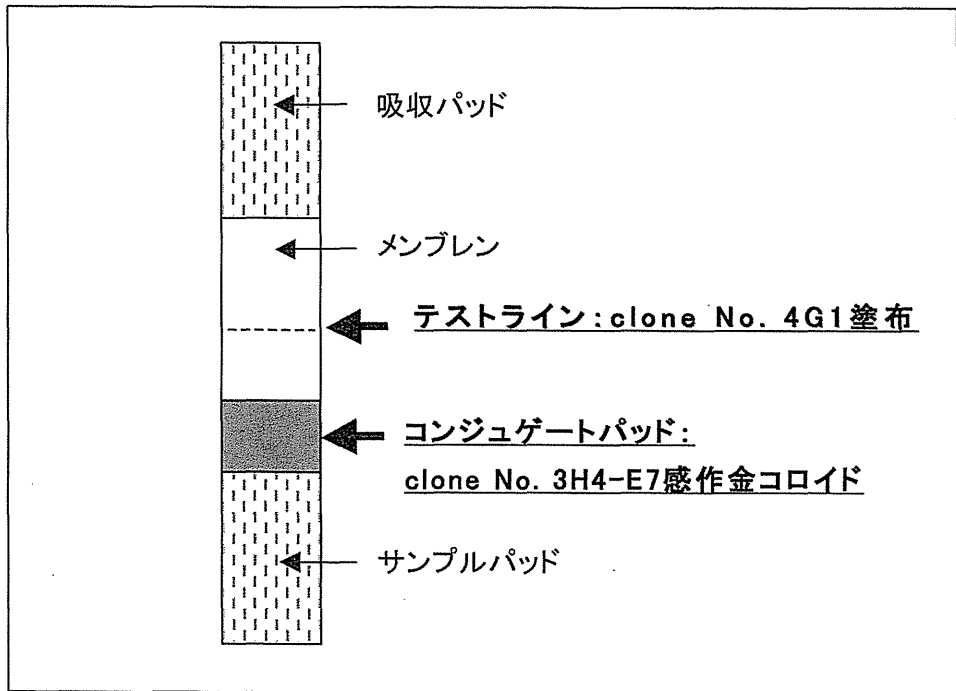


図 1、試作 IC キットの部材構成と全体の形状 (フルストリップ)

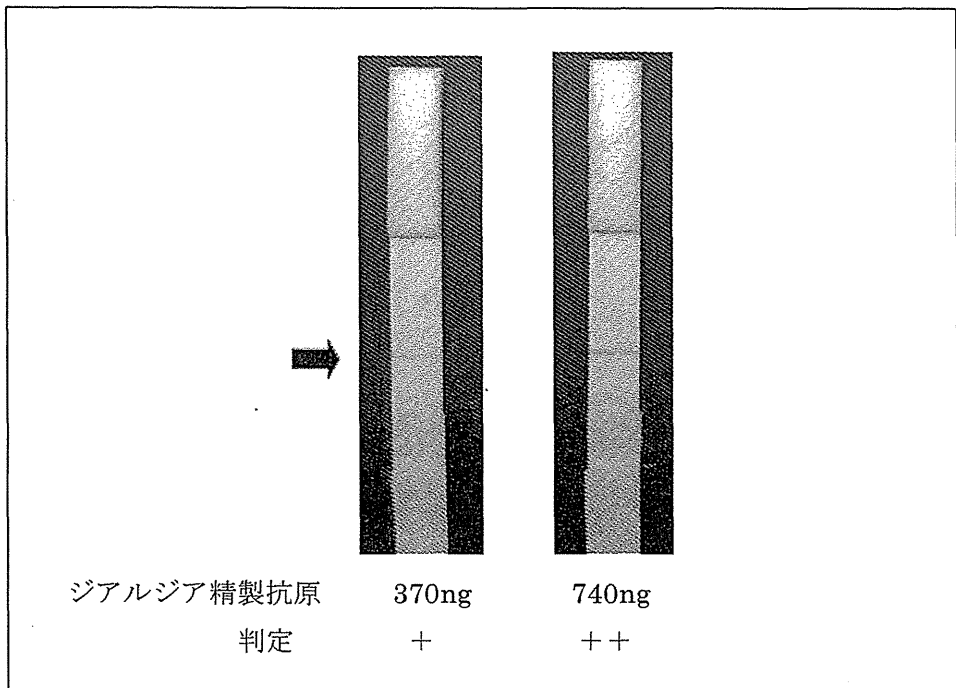


図 2、フルストリップを用いた精製抗原に対する反応性

表 1、消化管原虫類陽性糞便試料および陰性試料を用いた試作 IC キットの  
反応性試験結果

sample	IC	ImmunoCard. STAT!	protozoa positive	Detection method
A105	Gir +	Gir +	Gir +	DFA
A124	Gir +	Gir +	Gir +	
A157	Gir +	Gir +	Gir +	
A170	Gir +	Gir +	Gir +	
A94	—	Cp +	Cp +	
A113	—	Cp +	Cp +	
A164	Gir +	Cp +	Cp +	
A79	—	Gir +	Cyclo+	Auto Fluorescence
A106	—	—	Cyclo+	
A123	—	—	Cyclo+	
A10	—	—	E.h +	Microscopy, PCR
A109	—	—	E.h +	
A156	—	—	E.h +	
A169	—	—	—	
A173	—	—	—	
A174	—	—	—	
A176	—	—	—	
A177	—	—	—	

Gir: *Giardia*

Cp: *Cryptosporidium*

Cyclo: *Cyclospora*

E.h: *Entamoeba histolytica*

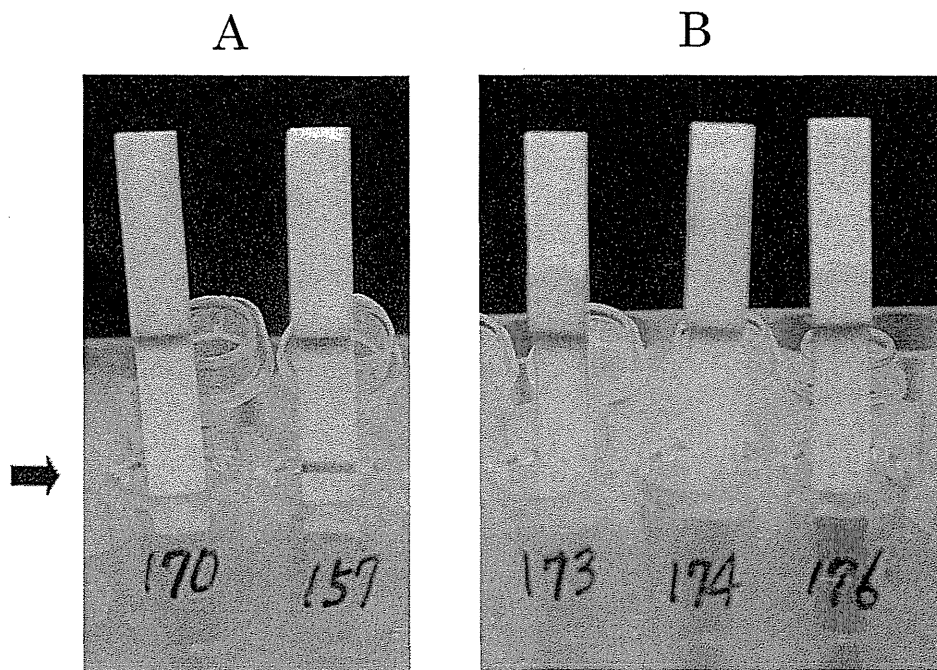


図 3、試作 IC キットを用いた糞便試料検査結果の例

A:ジアルジア陽性糞便試料、B:原虫陰性糞便試料  
試料 # 170 は弱陽性でラインは薄い。# 157 は強陽性で  
明確なラインが確認できる。# 173-176 はライン上の発色が  
見られない。→はテストライン位置。



厚生労働科学研究費補助金 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 年度分担報告書

マラリア薬剤耐性株流入のモニタリング法の開発

研究分担者 中野由美子 国立感染症研究所 主任研究官

#### 研究要旨：

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。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。

#### A. 研究目的

Sulfadoxine/Pyrimethamine (SP) 耐性の熱帯熱マラリア原虫は、アフリカとアジアでそれぞれ 1970 年代と 1980 年代から *in vivo* での耐性が報告されて以降、その分布域を広げ、現在ほぼすべてのマラリア流行地域に存在している。SP への高度な耐性化は、原虫葉酸合成経路酵素の *dhfr* (pyrimethamine) と *dhps* (sulfadoxine) に変異が蓄積することにより得られ、さらにそれらの変異が蓄積することにより高度な耐性を示すことが報告されている。しかし、どのような順番で *dhfr* と *dhps* への変異が蓄積し、耐性化が進行するのかわからない。なぜなら、*dhfr* と *dhps* が同定される 1990 年代以前の遺伝学的データが殆ど存在しないことが挙げられる。これまで、研究分担者は 1984 年から 1998 年にかけて熱帯熱マラリア原虫に感染した国内輸入例のアーカイブサンプルを用いて *dhfr* 遺伝子型を同定した結果、1980 年代の東南アジアでは高度な *dhfr* 耐性型が存在していたが (Saito-Nakano et al., 2008)、アフリカでは 1980 年代は *dhfr* 感受性型のままであり、1990 年代になってから耐性型の *dhfr*-S108N

変異が広まったことを報告した (Saito-Nakano et al., 2011)。そこで今回は、*dhps* の遺伝子型の東南アジアのサンプルを基に同定を試みた。

#### B. 研究方法

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た。

ギムザ染色のアーカイブ標本はメタノールで脱色したのち、QIAamp DNA Blood Mini Kit (Quiagen 社) で DNA を回収した。バルサム封埋した標本はキシレンに一昼夜浸すことによりカバーガラスを除去したのち、メタノールで脱色を行った。*Dhps* 変異を含む 238 bp の DNA 断片は Phusion polymerase (NEB) を用いてネステッド PCR で増幅した。1 回目の増幅は 98℃ 5 秒、45℃ 20 秒、72℃ 20 秒の増幅を 40 サイクル行い、2 回目のネステッド PCR には 1 回目の PCR で得られたサンプルを 1ul 用い、98℃ 5 秒、45℃ 20 秒、72℃ 20 秒の増幅を 30 サイクル

行った。使用したプライマーの配列は(i) アミノ酸 436 と 437 番を含む 238bp の増幅には 21Fc (5' -GAA TGT TTG AAA TGA TAA ATG AAG GTG CTA GTG -3' ) と 22Rc (5' -CAT TAT CAA CAC ATT CTT TAA AAA CAT TAT AGT TAA TTG TAT-3' ) を outer primers とし, 23Fc (5' -GGT GCT AGT GTT ATA GAT ATA GGT GGA GAA TC-3' ) と 24Rc (5' -CAT TAT AGT TAA TTG TAT CAA TAC TTA TAA TTG GTT TCG C-3' ) を inner primers とした。シーケンスプライマーは 25Rc (5' -CCA TTC TTT TTG AAA TAA TTG TAA TAC AGG TAC TAC-3' ) を用いた。(ii) アミノ酸 540 と 581 番を含む 230bp の増幅には 26F (5' -CAA ATT CTA TAG TGT AGT TCT AAT GCA T -3' ) と 27R (5' -CAT ATA CAT GTA TAT TTT GTA AGA GTT TAA TAG -3' ) を outer primers とし, 28F (5' -TGT AGT TCT AAT GCA TAA AAG AGG AAA TCC ACA TAC -3' ) と 29R (5' -TGT AAG AGT TTA ATA GAT TGA TCA TG -3' ) を inner primers とした。PCR 産物の配列決定は、オペロンバイオテクノロジー (株) に外部委託した。

シーケンスの結果、変異部位の残基のピークが二重であったサンプルについては、pT7blue プラスミド (Novagen) にクローニングし、10 個以上のクローンをさらにシーケンスすることで、混合感染を確認した。2 種の PCR 産物間で、変異の linkage が確認できないものについては、解析結果から除外した。

*dhfr* と *dhps* の薬剤耐性遺伝子の分布は Fisher の有為検定を行った。p 値が 0.05 以下の場合、有為であると見なした。

(倫理面への配慮)

該当せず

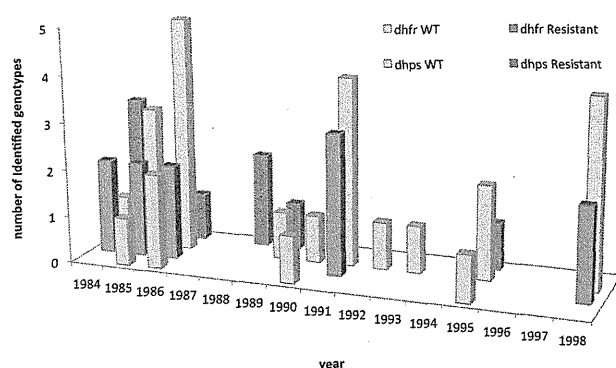
### C. 研究結果

アジア由来の 55 サンプルのうち 26 サンプルが DNA の回収と *dhps* locus の増幅が可能であった。ダイレクトシーケンスとプラスミドにクローン化したシーケンスの結果では、東南アジアの株は 17 サンプルが野生型 (S436, A437, K540, A581)

の単独感染であり、全体の 65% を占めた。その他の 7 サンプルは複数の遺伝子型の混合感染であった。遺伝子型としては 1984 年と 1989 年のタイサンプル、1986 年と 1995 年の PNG サンプルから S436-A437-K540-A581G と野生型の混合が同定された。また、1995 年のフィリピンサンプルから S436-A437G-K540-A581 と野生型の混合感染が同定された。1984 年と 1988 年のタイサンプルから S436-A437G-K540-A581 と S436-A437G-K540-A581G の混合感染が同定された。いずれのサンプルも、高い SP 耐性を付与する K540E 変異は同定されなかった。

今回、*dhps* 遺伝子型を決定したサンプルの幾つかは *dhfr* の遺伝子型も決定されている。16 サンプルから、野生型の *dhfr* 遺伝子型が 5 サンプル、耐性型の *dhfr* S108N 変異を有するものが 11 サンプルある。その中にはピリメサミンに高度耐性を付与する三重変異も 3 サンプル存在していた。このことは *dhps* よりも *dhfr* の方が先に変異が導入されることを示している (p < 0.01, Fisher 有為検定)。

図、アジアのサンプルから同定された *dhps* と *dhfr* 変異の遺伝子型の数



### D. 考察

今回の解析で、*dhfr* S108N 変異を有していても *dhps* は野生型を示すサンプルが数多く存在した。また、*dhps* 変異は A437G から導入されやすく、中～高度 sulfadoxine 耐性を与える *dhps* K540E 変異は全てのサンプルから同定されなかった。以

上の結果は、*dhfr* の後に *dhps* への変異が導入されること、また *dhps* には A437G 変異 から導入され、K540E は変異蓄積課程の後半に導入されることを示している。

タイでは1975年から1984年まで、SPをマラリアの一次選択薬として使用した歴史がある。その結果、1980年代中頃には、SPの治療効果は低下し、1985年以降はメフロキンに転換せざるをえなかった。本解析に使用したアーカイブサンプルでも、1984年のサンプルで*dhfr*の三重変異が得られていることはSP抵抗性を獲得したことを示しているが、2000年以降から現在では、タイに存在する熱帯熱マラリアは*dhfr* 4重変異を有し、SP抵抗性がさらに進行したことを示している。今回得られた*dhps*の遺伝子型の結果は、高度SP耐性を与える*dhps* K540E変異の出現は、*dhfr* が4重変異を獲得する2000年以降に出現したのではないかと推測される。本検討での *dhps* の遺伝子型の同定は、これまででも最も古い年代であり、SP 耐性進化の解明にあたり重要な知見を与えるものである。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

中野由美子, 中曽根英子, 美田敏宏 (2013) アーカイブ血液スメア標本による熱帯熱マラリア原虫 Sulfadoxine/Pyrimethamine 耐性遺伝子型の同定. Genetic identification of *dhfr/dhps* genotypes in *Plasmodium falciparum* using archive blood smears 第82回 日本寄生虫学会大会. 2013年3月28日-31日. 東京

## F. 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

厚生労働科学研究費補助金 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 年度分担報告書

赤痢アメーバの薬剤耐性機構の解明

研究分担者 津久井久美子 国立感染症研究所 寄生動物部 主任研究官

**研究要旨**：赤痢アメーバ症は発展途上国のみならず、日本においても重要な腸管寄生原虫症である。しかし選択薬が少なく、薬剤耐性株の出現が危惧される。本研究では抗赤痢アメーバ薬として使用されるメタロニダゾールに対する耐性株を実験室で作成し、その性質の変化と遺伝子発現の変化から、薬剤耐性株出現機構を明らかにすることを目指した。

#### A. 研究目的

*Entamoeba histolytica* 感染によって起こるアメーバ症には投薬治療が必須である。現在アメーバ症治療に用いられる薬剤のうち、5-ニトロイミダゾールであるメタロニダゾール(metronidazole: MTZ)が第一選択薬として広く用いられている。MTZによる治療は通常非常に効果的であり、高濃度の薬剤に対する耐性株の報告は現在までされていない。しかし治療抵抗性の患者の存在は報告されている。さらに実験室での *E. histolytica* MTZ 耐性株作成についての議論はすでにされている。同時に *Trichomonas vaginalis*, *Giardia lamblia*, *Blastocystis spp*, *Neisseria gonorrhoeae* や、いくつかの嫌気性細菌で臨床や実験室での MTZ 耐性が報告されている。このような状況から、赤痢アメーバについても MTZ 耐性株出現が危惧されている。もしこのような状況にな

れば人々の健康や経済に及ぼす影響は大きい。近年毎年世界で 500 万の感染例があり、そのほとんどが感染症に対して脆弱な発展途上国の子供たちである。また、日本においてもアメーバ症は増加傾向にあり、年間 800 例程度の報告がある。これらの治療はやはり MTZ により行われるため、耐性株の出現は世界のみならず、日本においても脅威である

昨年度の結果より、12 $\mu$ M の MTZ に耐性な赤痢アメーバ株 (MTZR 株) のトランスクリプトーム解析では MTZ 耐性特異的に顕著な発現制御がなされる遺伝子の発見に至らなかった。これは耐性度が弱いことが原因であると考え、本研究ではより高濃度の MTZ への耐性株の作成を試みた。

#### B. 研究方法

MTZ耐性赤痢アメーバ株は標準株であるHM-1株に2 $\mu$ MのMTZを加え、対数増殖期まで培養し、続いて1 $\mu$ 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目指した。

(倫理面への配慮)

該当なし。

## C. 研究結果

### 1. MTZ 耐性株の樹立

標準株である HM-1 株で 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。昨年度の研究に使用していた MTZR 株を凍結保存サンプルより解凍し、再生を試みたがこれも樹立に至らなかった。

### 2. 考察

今年度、MTZR 株樹立に至らなかった原因の一つには使用した HM-1 株に何らかの変化が起きたことが考えられる。実験室で継続的に培養を続けているため通常の増殖に問題は見られなかったが、ストレス条件下の応答に変化が起きたと考えられる。

もう一つの原因として、赤痢アメーバの MTZ への耐性を生じにくい性質があると考えられる。昨年度の結果からも MTZR 株で MTZ 特異的と考えられる顕著な遺伝子発現レベル変化が見られなかった。*T. vaginalis* や *G. Lamblia* では MTZ 耐性臨床株の出現とともに高濃度の MTZ 耐性株が実験室で樹立され、研究がおこなわれている。一方赤痢アメーバでは薬剤耐性臨床株の出現は報告されていない。

今回の結果から赤痢アメーバでは MTZ 耐性の出現が難しい可能性が考えられた。しかし一方で、作用点の異なる抗赤痢アメーバ薬候補である trifluoromethionine (TFM) に対する耐性株の作成を実験室で試みると TFM の標的酵素である L-methionine  $\gamma$ -lyase (MGL) の発現がほぼ完全に

なくなる TFM 耐性株が出現する。よって適切な環境を整えば MTZ に対しても高度な耐性を獲得できる可能性はあると考えられる。

### 3. 今後の展開

今年度行った MTZ 耐性株の樹立方法は高濃度 MTZ に対する耐性を獲得させるのに適さないと考えられたため、培養条件の検討や作成する株の変更を検討する。すなわち栄養が豊富な BIS 培地ではなくより腸管の環境に近いと考えられる Robinson's 培地や、臨床から分離されて間もない株やモルモット肝臓瘍モデルから回収された病原性の高い株を用いた MTZ 耐性株の樹立を検討する。

## D. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

研究成果の刊行に関する一覧表参照

### 2. 学会発表

該当なし。

## F. 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

厚生労働科学研究費補助金 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 年度分担報告書

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

研究分担者 永宗喜三郎 国立感染症研究所 寄生動物部 室長

**研究要旨：**

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- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ 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 $\beta$ 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。

## A. 研究目的

トキソプラズマが宿主細胞に侵入する際、宿主との接触部分において、宿主の膜貫通蛋白質の多くが排除され、GPI アンカー型蛋白質が選択的に寄生体胞膜内へ取り込まれる sorting と呼ばれる現象が知られている。また、細胞膜上には、コレステロール、スフィンゴ糖脂質など特定の脂質成分や、GPI アンカー型タンパク質などが濃縮して局在化した、動的な脂質領域（脂質マイクロドメイン）が存在する。以上のことから、GPI アンカーやマイクロドメインがトキソプラズマ感染において重要な役割を果たしている可能性が考えられる。そこで本研究ではトキソプラズマ感染における宿主細胞の脂質マイクロドメインの役割について解析した。

## B. 研究方法

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（Gaal(-)）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。

（倫理面への配慮）

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

## C. 研究結果

GFP-GPI-CHO細胞を用い、eVとPVへのGPIの取込みを観察したところ、GPIはそれらの両方に取り込まれていた。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。これらの結果から、トキソプラズマにおいてPV形成の際に認められるタンパク質のsortingと呼ばれる現象が、eV形成時にも行われている可能性が示唆さ

れた。

次に細胞をmethyl- $\beta$ -cyclodextrin（MBCD）で処理しマイクロドメイン構造を破壊した状態でPVおよびeVの形成を観察したところ、MBCD処理はPV形成には影響を与えないが、eVの形成を有意に阻害していた。これらの結果から正常なeV形成には正常なマイクロドメイン構造の存在が必須であることが示唆された。そこで昨年度見出した、GPI欠失変異株におけるeVの過形成がMBCD処理により相補できるかを検討したところ、相補できず、二つの現象は全く独立した事象であることが示唆された。

## D. 健康危険情報

（分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入）

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

研究成果の刊行に関する一覧表参照

### 2. 学会発表

(1) 永宗喜三郎、 “アピコンプレクス門原虫が産生する植物ホルモンの意義” 第1回マトリョーシカ型生物学研究会、2012年7月、東京

(2) 富士路花、青沼宏佳、田原美智留、Syed Bilal Ahmad Andrabi、永宗喜三郎 “細胞外トキソプラズマにおける未知の酸性オルガネラについて” 第1回マトリョーシカ型生物学研究会、2012年7月、東京

(3) 田原美智留、Syed Bilal Ahmad Andrabi、青沼宏佳、木下タロウ、永宗喜三郎 “宿主アンカーがトキソプラズマ感染に及ぼす影響” 第1回マトリョーシカ型生物学研究会、2012年7月、東京

(4) Symposium

Nagamune, K., Andrabi, S. B. A., and Matsubara, R. “Apicomplexan parasites and plant hormones” Protist 2012, July 2012, Oslo

(5) 福士路花、青沼宏佳、田原美智留、Syed Bilal Ahmad Andrabi、永宗喜三郎 “細胞外トキソプラズマにおける未知の酸性オルガネラについて” 第20回分子寄生虫学ワークショップ 2012年8月、神戸

(6) 田原美智留、Syed Bilal Ahmad Andrabi、青沼宏佳、木下タロウ、永宗喜三郎 “宿主マイクロドメインがトキソプラズマ感染に及ぼす影響” 第20回分子寄生虫学ワークショップ 2012年8月、神戸

(7) サイエンスカフェ

永宗喜三郎 “あなたの知らない寄生虫のセカイ～トキソ、マラリア、マトリョーシカ～” 第63回バイオeカフェ 2012年9月、つくば

(8) Nagamune, K., Tahara, M., Andrabi, S. B. A., Aonuma, H., and Kinoshita, T. “The effect of host GPI to *Toxoplasma gondii* infection.” Molecular Parasitology Meeting XXIII, Woods Hole, MA, USA, September 2012

(9) Fkshi, M., Aonuma, H., Matsubara, R., Tahara, M., Andrabi, S. B. A., and Nagamune, K. “The acidic organelle in extracellular *Toxoplasma gondii*.” Molecular Parasitology Meeting XXIII, Woods Hole, MA, USA, September

2012

(10) 田原美智留、Syed Bilal Ahmad Andrabi、青沼宏佳、木下タロウ、永宗喜三郎 “宿主細胞膜マイクロドメインがトキソプラズマ感染に与える影響” 第72回日本寄生虫学会東日本支部会・第10回分子寄生虫学・マラリアフォーラム合同大会 2012年10月、前橋

(11) シンポジウム

松原立真、永宗喜三郎 “アピコンプレクサ生物の植物ホルモンとその生理機能” 第45回日本原生動物学会大会 2012年11月、兵庫県姫路市

(12) シンポジウム

永宗喜三郎、福士路花 “アピコンプレクサ生物の滑走運動とカルシウム・シグナリング” 第45回日本原生動物学会大会 2012年11月、兵庫県姫路市

(13) 松原立真、永宗喜三郎 “マラリア原虫が持つ植物ホルモンの網羅的検出と機能解析” 第1回日本細胞共生学会若手の会 2012年11月、下田

(14) 田原美智留、Syed Bilal Ahmad Andrabi、青沼宏佳、木下タロウ、永宗喜三郎 “宿主細胞膜マイクロドメインがトキソプラズマ感染に及ぼす影響” 第1回日本細胞共生学会若手の会 2012年11月、下田

F. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)



- |           |        |
|-----------|--------|
| 1. 特許取得   | なし     |
| なし        | 3. その他 |
| 2. 実用新案登録 | なし     |

厚生労働科学研究費補助金 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 年度分担報告書

原虫類への新規遺伝学的手法の開発

研究分担者 平井 誠 群馬大学 大学院医学研究科 国際寄生虫病 講師

**研究要旨：**ネズミマラリア原虫をモデルとして新規遺伝学的手法を開発する。この技術を他の原虫感染症病原体へ移転し、顧みられない原虫感染症制圧に向けた基盤的研究を強化する。

#### A. 研究目的

原虫感染症制圧に向けた基盤的研究は、その研究解析手法が未成熟であることが原因し、他の感染症と比較して大きく立ち遅れている。このことは顧みられない原虫感染症においては言うまでもない。本研究課題は、ネズミマラリア原虫をモデル生物として用いて順遺伝学的ツールを開発する。具体的には、高頻度に突然変異が発生するネズミマラリア原虫 (PbMutator) を作成し、この技術を本研究班において赤痢アメーバ等の他の原虫類へ技術移転する。これにより顧みられない原虫感染症制圧に向けた基盤的研究を強化することが本研究課題の目的である。

#### B. 研究方法

ネズミマラリア原虫 (*Plasmodium berghei*) DNA 複製酵素  $\delta$ -DNA polymerase (PolyDel) のエラー校正活性に関与するアミノ酸二カ所 (D311A, E313A) を Ala に置換した変異型 PolyDel 遺伝子で内因性 PolyDel 遺伝子を置き換えたネズミマラリア原虫を昨年度の本研究班において作成した (第一世代 PbMutator 原虫)。本年度は昨年度に引き続き、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する。具体的には、一週間に一回の頻度で感染赤血球 1 万個を正常マウスへ継代感染する。第 122 週目において PbMutator 原虫を限界希釈法によりクローン化する。第 122

週 PbMutator 原虫クローンにおいて、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修正されないままゲノムに蓄積することを確認する。さらに第 122 週 PbMutator 原虫クローンの表現型を詳細に解析する。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る。第一世代 PbMutator 原虫は、DNA 二本鎖のうちラギング鎖の複製酵素の校正機能を低下させたものである。リーディング鎖の複製酵素  $\epsilon$ -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、この原虫の作成に取り組む。第二世代 PbMutator 原虫の作成は第一世代 PbMutator 原虫の作成方法に準じる。 $\epsilon$ -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。

(倫理面への配慮)

本研究課題は群馬大学動物実験安全委員会および組換えDNA実験安全委員会の承認を受けており、法令に基づいて研究を行っている。

#### C. 研究結果

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)。

#### D. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

研究成果の刊行に関する一覧表参照

##### 2. 学会発表

① 平井誠・安彦真文・岡本龍司・本間一・鈴江一友・今井孝・堀井俊宏・田邊和祐・久枝一

「比較トランスクリプトームによるマalaria原虫受精因子の探索」第72回日本寄生虫学会東日本支部会、第10回分子寄生虫・マalariaフォーラム合同大会(2012年10月13日 於:群馬大学医学部)

② Hirai M. Sexual reproduction of malaria parasites; A critical target for antimalarial strategy.

International Symposium on the Mechanisms of Sexual Reproduction in Animals and Plants (Joint Meeting of the 2nd Allo-authentication Meeting and the 5th Egg-coat Meeting (MCBEEC)). (招待講演)(2012年11月12日-16日 於:名古屋)

#### F. 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

## 蠕虫性幼虫移行症の病態の解明

分担研究者 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、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。

### 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 microtiter plate 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。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。

抗寄生虫抗体陽性で臨床的に感染ありと判断される症例は年間 100 例近くで、その中では肺吸虫症と動物由来の回虫類感染症が多数を占める。動物由来の回虫とは具体的にはトキソカラとブタ回虫であり、トキソカラ症とブタ回虫症の鑑別については、これまでの研究によって組換え抗原を用いた抗体検査法である程度鑑別できる見通しが立った。

しかしながら、トキソカラがイヌ回虫なのかネコ回虫なのかという問題は依然残されている。イヌ回虫とネコ回虫は同属に分類されている通りきわめて近縁であり、抗体での鑑別は現時点では不可能である。また、ネコ回虫の遺伝子やタンパク質についての情報は限定的にしか得られていないため、イヌ回虫とネコ回虫で、それぞれに特異的な抗原を探すのは困難である。

そこで、イヌ回虫症とネコ回虫症の違いを病態の面から明らかにするために、ヒトと生理学的に近いとされるブタを用いて感染実験を実施した。ブタで幼虫の体内移行などにおける病態の違いを明らかにできれば、ヒトで発生している幼虫移行症の病態解明に大きく貢献できることになる。

一方で、前年度までの研究により、われわれはモデル寄生虫であるベネズエラ糞線虫が宿主に侵入し、肺へ移行する段階で発現が上昇している遺伝子群を次世代型パイロシーケンサを用いて明らかにすることができた。今年度は遺伝子発現をより大規模かつ網羅的に解析するために HiSeq2000 による RNA-Seq を実施し、体内侵入後ごく早期に発現が上昇する遺伝子群の同定を試みた。

### B. 研究方法

#### 1. イヌ回虫とネコ回虫

##### 1) ブタと寄生虫

ブタの感染実験は、コペンハーゲン大学獣医学部 Stig Milan Thamsborg 教授 (Danish Centre for Experimental Parasitology, Department of Veterinary