

Disease Biology, Faculty of Life Sciences, University of Copenhagen) との共同研究で実施した。感染に用いた虫卵は、イヌ回虫とネコ回虫ともに、Claudia Bohm, Institute of Parasitology, University of Veterinary Medicine, Hannover より供与いただいた。

2) 感染

虫卵は、イヌ回虫またはネコ回虫に感染したイヌまたはネコの糞便から分離し、定法により培養して幼虫包蔵卵とした。

ブタには幼虫包蔵卵を 10,000 個経口的に投与し、31-32 日後の各臓器（肺、肝臓、腸間膜リンパ節、心、脳、眼、横隔膜、舌、筋肉）から虫体を回収した。肝臓と腎臓は、破碎前に表面の白点 white spot のカウントもおこなった。感染 22、28 日後には採血して末梢好酸球を測定した。

さらに、感染早期の幼虫の移行状態を探るため、感染 4 日および 14 日後にも評価した。幼虫包蔵卵 100,000 個を経口投与して 4 日後は肺と肝臓から、14 日後には肺、肝臓、腸間膜リンパ節、脾臓、腎臓、横隔膜、脳、筋肉から虫体を回収した。

3) 虫体の回収法

臓器からの虫体回収は、消化法と寒天法のうち、あるいは両方を実施した。消化法では、1% ペプシン - HCl 人工消化液で破碎した臓器を消化し、臓器中に含まれる虫体を回収した。寒天法は、破碎した臓器を 1%寒天液に懸濁して布に塗り広げ、寒天の凝固後に布ごと緩衝液中でインキュベートして、遊出してきた虫体を回収した。

2. ベネズエラ糞線虫の感染直後に発現が上昇する遺伝子群の同定

1) ベネズエラ糞線虫の各発育段階の虫体

ベネズエラ糞線虫は当研究室で維持しているものを用いた。虫卵は感染ラットの糞便から飽和食塩浮遊法により得た。土壌幼虫 (L1/L2) は、感染ラットの糞便を濾紙糞便培養法により 27°C1 日間培養し、培養濾紙を 37°Cにてインキュベートし、バールマン法により得た。感染幼虫は、感染ラットの糞便を濾紙糞便培養法により 27°C2 日間の培養で得た。

体内移行期幼虫は、感染幼虫を ICR マウスに

感染させ、72 時間後に肺から回収（肺幼虫）あるいは 80-90 時間後に小腸から回収（粘膜幼虫）した。

培養幼虫は、感染幼虫を抗菌薬および抗真菌薬を含むリン酸緩衝液で洗浄し、DMEM（高グルコース）中に 5%CO₂、37°Cでインキュベートした。

2) RNA-seq

RNA-seq に用いたベネズエラ糞線虫の発育段階は以下の 8 通りである。

- ・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 (Ault)
- ・培養幼虫 (cultured L3i、培養 1 日または 5 日)

虫卵または虫体から TRI Reagent®, Ambion によって total RNA を抽出し、次いで poly-A RNA を精製 (Genelute™, Sigma)、RNA-seq ライブラリを作製した (Scriptseq™ v2, Epicentre)。各発育段階の断片にインデックスシーケンスを付加し (Epicentre) HiSeq2000 の 2 lanes を使用し配列情報を得た。

3) 発現量解析

HiSeq2000 により得られたリードをこれまでの研究で得られたベネズエラ糞線虫 cDNA 配列にマップし、単一の cDNA にマップされたリード数を発現量の指標とした。発現量はエクソンの長さによって補正し RPKM (reads per kilobase exon per million mapped reads) として表現した。

今回の解析ではとくに宿主侵入直後の遺伝子変化を明らかにする目的で、感染幼虫と培養 1 日後の遺伝子発現を比較した。

C. 研究結果

1. ブタにおけるイヌ回虫感染とネコ回虫感染の比較

1) 末梢血好酸球

感染後の末梢血好酸球はイヌ回虫感染群の方がネコ回虫感染群よりも有意に高かった。しかしながら、感染 28 日後には非感染群と同程度までに下がっていた (図 1)。

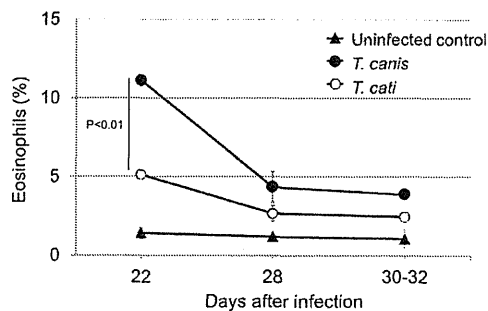


図1 トキソカラ感染ブタの末梢好酸球数の推移

2) 白点 white spot

臓器表面の白点は炎症巣を示し、感染の有無を肉眼的にとらえることができる。肝臓および腎臓表面の白点は、イヌ回虫感染群の方が明らかに多く、ネコ回虫感染群ではイヌ回虫に比して有意に少ない白点しか認めることができなかった(図2)。

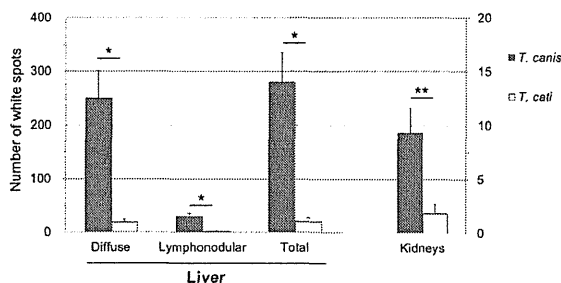


図2 肝および腎表面の白点 white spot

3) 回収虫体数

感染約1か月後における回収虫体数は表1の通りで、リンパ節はネコ回虫の方が多かったが、最も幼虫が集積していると思われた肺からは、イヌ回虫の方が多く回収された。肝臓からの回収虫体数は少なかったが、これはイヌ回虫・ネコ回虫ともに、すでに肝臓を通り抜けた後だったためと考えられた。

比較的感染早期の感染14日後では、対象のすべての臓器で回収虫体数はイヌ回虫がネコ回虫を上回り、とくに肺ではイヌ回虫はネコ回虫の倍近い値であった。またネコ回虫感染ブタの肝臓からは虫体を回収することができなかった(表2)。

以上のように、感染2週間および1ヶ月後のデータではすべてイヌ回虫の方が多く幼虫が回収された。末梢血好酸球の値もイヌ回虫感染の方が高かったことと併せると、単にネコ回虫は感染性が低いという可能性もあった。

臓器	<i>T. canis</i>	<i>T. cati</i>
肝	0.1	0
肺	3.0	0.6
腹腔リンパ節	1.7	4.2
横隔膜	0.1	0
脳	0	0
筋肉	0	0.1

表1 感染31-32日後の回収虫体数(臓器100g当たり)

臓器	<i>T. canis</i>	<i>T. cati</i>
肝	31	0
肺	122	67
腹腔リンパ節	57	54
脾臓	0	0
腎臓	0	0
横隔膜	2	0
脳	1	0
筋肉	0	0

表2 感染14日後の回収虫体数(臓器100g当たり)

この点を確認するため、感染のさらに早期の感染4日後に、肝臓、肺、腸間膜リンパ節から体内移行幼虫を回収した。その結果、ネコ回虫感染でも肝臓から虫体が回収され、さらに、肺ではイヌ回虫よりも多数の虫体を回収することができた(表3)。

臓器	<i>T. canis</i>	<i>T. cati</i>
肝	700	60
肺	42	128*
腹腔リンパ節	3540	2240

表3 トキソカラ感染4日後の全回収虫体数

2. ベネズエラ糞線虫の感染直後に発現が上昇する遺伝子群の同定

1) RNA-seq

ベネズエラ糞線虫の6つの異なった発育段階(虫卵、L1/L2、感染幼虫、肺移行期幼虫、粘膜幼若虫、成虫)と2種の培養幼虫(培養1日または5日)のRNA-seqの結果、それぞれの発育段階ないし培養条件から38-53 x 10⁶の高品質リードペアを得ることができた。

2) 感染幼虫の培養直後に発現量が上昇する遺伝子群

これまでの研究によって、われわれはベネズ

エラ糞線虫の感染直後の虫体に起こる変化は、感染幼虫を培養液中で 37°C で培養しても再現できることを確かめている。そこでわれわれは、ベネズエラ糞線虫において宿主体内に侵入後早期に発現の上昇する遺伝子を決定するために、感染幼虫と比較して培養 1 日後の幼虫で発現量が 10 倍以上に増加しているものを選び出した。

表 4 *in vitro* 培養 1 日で発現が 10 倍以上上昇した遺伝子

fold-change	B2G_description
54.1	cre-osm-11 protein
38.2	cysteine-rich venom protein
26.7	atp dependent helicase
26.2	cre-col-144 protein
23.9	patched family protein
20.9	cre-dos-3 protein
17.4	proteinase inhibitor i4 serpin
17.2	cre-hch-1 protein
17.0	fatty acid retinoid binding protein precursor
16.1	atp dependent helicase
16.0	transthyretin-like protein 46
15.9	fatty acid retinoid binding protein precursor
15.6	cre-gst-11 protein
15.4	catechol o-methyltransferase domain-containing protein 1
15.3	abnormal dauer formation family member (daf-12)
15.2	ibr domain containing protein
14.9	hypothetical protein BRAFLDRAFT_239922 [Branchiostoma floridae]
14.8	cre-cyp-14a1 protein
14.6	fatty acid desaturase
14.5	peptidase family m13 containing protein
12.2	cre-acy-3 protein
12.0	flavin monooxygenase
11.8	gamma-butyrobetaine dioxygenase
11.5	protein hum-9
11.1	glutathione s-transferase 1
10.8	proteinase inhibitor i4 serpin
10.8	cre-osm-11 protein
10.7	metalloproteinase inhibitor tag-225
10.5	valacyclovir hydrolase
10.4	cre-mrp-4 protein
10.3	fork head domain containing protein
10.2	acyl- desaturase
10.2	alpha-aminoadipic semialdehyde mitochondrial-like
10.2	cre-unc-54 protein
10.1	double-stranded rna activated protein kinase 1

結果は表 4 の通りで、発現量の上昇が最も大きかった cre-osm-11 protein は、これまで肺移行時特異的に発現がみとめられる遺伝子のひとつとして同定されていたものである。予想される機能は、*C. elegans* において Notch シグナルに関与する転写因子とされており、陰門形成にかかわることがわかっている。ベネズエラ糞線虫においても感染幼虫から成虫へと発育が進むための鍵となるタンパク質である可能性が高い。

上記以外にも patched family protein (Hedgehog シグナル伝達)、daf-12 (ステロイドホルモン核内受容体)、fork head domain containing protein (転写因子) などの遺伝子の発現が上昇していた。

D. 考察

当教室で実施している寄生虫病血清診断の結果陽性と判定される症例の大多数は、食品媒介性の人獣共通寄生虫症である。具体的には肺吸虫症とトキソカラヤブタ回虫による内臓幼虫移行症で、両者で全体の 80% を超えている。昨年度までの研究で、トキソカラ症とブタ回虫症を血清学的に鑑別する手法はある程度確立できたので、今後は症例数を増やしてさらに検討を続ける予定である。

トキソカラ症は通常イヌ回虫症として扱われるが、実はトキソカラ症がイヌ回虫症なのかネコ回虫症なのかは、全く不明である。どちらも非好適宿主内では幼虫のまま止まるため、トリなどの食肉を介したヒトへの感染が起きる可能性は等しく存在する。近年、子犬のイヌ回虫症は減少しており、トキソカラ症の原因としてはイヌ回虫に加えてネコ回虫についても考慮する必要があるであろう。

そこで本研究では、ヒトと生理学的に近いとされるブタを用いて、イヌ回虫とネコ回虫の病態の違いを検討した。その結果、同じトキソカラとはいえ、イヌ回虫とネコ回虫では大きな違いがあることが明らかになった。

もっとも大きな違いは肝臓から回収される虫体数であり、検討した範囲 (4 日後、14 日後 31-32 日後) では常にイヌ回虫感染の方が多くの虫体が回収された。とくに感染 14 日後と 31-32 日後では、ネコ回虫感染では肝臓からは全く幼虫を回収することはできなかった。

きわめて興味深いのは感染 4 日後で、このタ

イミングでは逆に、ネコ回虫では多数の幼虫を肺から回収することができた。この結果から明らかなのは、ネコ回虫感染では幼虫は肝臓を短時間で完全に通り抜け、きわめて速やかに肺に到達していることである。一方イヌ回虫では、多くの幼虫が肺にいる時も一定数の幼虫が肝臓にとどまっている。さらに、ネコ回虫感染においても感染 4 日後には肝臓からも幼虫が回収されていることから、感染 14 日後以降にネコ回虫幼虫が肝臓から回収されないのは、肝臓を通らないのではなく速やかに肝臓を離れて肺に到達するからと考えられた。

以上のような体内移行の違いが人体内でも起こっているとすると、ネコ回虫感染では肝臓に画像上の変化が認められないことが考えられる。いわゆるトキソカラ症の中には、肺と肝臓の両方に異常陰影のある症例と、好酸球性肺炎のみを示す症例が存在する。肺炎のみ示す症例がネコ回虫症であるとする証拠は現時点ではないが、将来的に鑑別できる可能性はあろう。

モデル寄生虫であるベネズエラ糞線虫を用いた発現遺伝子解析では、肺移行時に発現がみとめられることが知られていた *cre-osm-11* protein が培養早期に発現の上昇があり、宿主侵入後の早い段階から発現が上昇すると推定された。このタンパク質は Notch シグナルに関与する転写因子と考えられることから、培養によってなんらかの因子が受容体に結合し、シグナル伝達が活性化するものと考えられる。今後は、ベネズエラ糞線虫のリン酸化タンパク質等について解析を進めていく必要がある。

E. 結論

イヌ回虫感染症とネコ回虫感染症の病態の違いをブタを用いた感染実験で明らかにすることができた。ネコ回虫感染では肝臓に炎症巣を形成しなかった。モデル寄生虫であるベネズエラ糞線虫を用いた解析では、宿主侵入後早期に発現が上昇すると考えられる転写因子を同定することができた。

F. 研究発表

著書

1. 丸山治彦：アニサキス症（今日の治療指針 2013、山口徹、北原光夫、福井次矢編）、pp.262-263、医学書院（東京）（2013 年 1 月 1

日）

総説

1. 丸山治彦、木村幹夫：我が国における寄生虫病・熱帯病薬物治療の実際 日本臨牀 70 (12): 2205-2217, 2012
2. 丸山治彦、名和行文：肺吸虫症と神経系 神経内科 77 (3): 259-266, 2012
3. 丸山治彦：小児にみられる吸虫症 小児科臨床 65 (3): 384-390, 2012
4. 吉田彩子、長安英治、丸山治彦：動物由来回虫類感染症のわが国における最近の動向 Clinical Parasitology 23: 105-108, 2012

原著論文

1. Nagayasu E, Ishikawa SA, Taketani S, Chakraborty G, Yoshida A, Inagaki Y, Maruyama H: Identification of a bacteria-like ferrocyclase in *Strongyloides venezuelensis*, an animal parasitic nematode. PLOS ONE, *in press*
2. 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. 2013 62 (1): 57-65.

学会発表

1. Nagayasu E, Ogura Y, Ito T, Yoshida I, Chakraborty G, Hayashi T, Maruyama H: Genome and transcriptome analysis of *Strongyloides venezuelensis*, an animal parasitic nematode. International Symposium on Genome Science “Expanding Frontiers of Genome Science (2013.1), Tokyo, Japan.
2. Nagayasu E, Ishikawa S, Taketani S, Chakraborty G, Yoshida A, Inagaki Y, Maruyama H: Bacteria-like ferrocyclase in animal parasitic nematodes. The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity (2012.9), Awaji, Japan.
3. Yoshida A, Nejsum P, Skallerup P, Thamsborg SM, Maruyama H: Serological diagnosis of Ascarid Visceral Larva Migrants with recombinant antigens. ESCCAP Toxocara 2012, 3-5 October 2012, Budapest

4. Yoshida A, Poulsen CS, Skallerup P, Maruyama H, Thamsborg SM, Nejsum P: Migratory pattern of *Toxocara cati* and *Toxocara canis* in pigs. ESCCAP Toxocara 2012, 3-5 October 2012, Budapest

5. 吉田彩子、辻尚利、山崎浩、丸山治彦：ブタ回虫症血清診断抗原候補分子としてのリコンビナント As16 の有用性 第 65 回日本寄生虫学会南支部大会・第 62 回日本衛生動物学会南支部大会 合同大会、2012 年 11 月 10 - 11 日、長崎市

6. 長安英治、小椋義俊、伊藤武彦、吉田彩子、林哲也、丸山治彦：ゲノム概要配列が未知の寄生虫研究における次世代型シーケンサの活用方法。第 10 回日本寄生虫学会東日本支部会、第 10 回分子寄生虫マラリアフォーラム合同大会 (2012.10) , 前橋市

7. 長安英治、丸山治彦：ゲノム/トランスクリプトーム情報に基づく動物寄生関連遺伝子の検索。第 10 回日本寄生虫学会東日本支部会、第 10 回分子寄生虫マラリアフォーラム合同大会 (2012.10) , 前橋市

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案特許

なし

3. その他

なし

エキノкокスの嫌氣的呼吸鎖の生理機能の解明

分担研究者 北 潔 東京大学大学院医学系研究科

研究要旨 寄生原虫のミトコンドリア呼吸鎖は宿主哺乳類のミトコンドリアと大きく異なった性質を持ち、しかもその増殖に必要な不可欠である事から特異的阻害剤による抗寄生虫薬の重要な標的となる。本研究はエキノкокスに特異的な代謝系を標的とする治療薬の開発を目的としている。これまでの研究で蠕虫類に共通な嫌氣的呼吸鎖でフマル酸呼吸と呼ばれる NADH-フマル酸還元系がエキノкокスにおいてもその生存に必須である事を見出した事から、特異的な阻害効果を示すリード化合物を見出す可能性は高い。

A. 研究目的

われわれは寄生適応に必須な基本的要素である各種代謝系のなかでも特にエネルギー代謝系に焦点を絞り、寄生虫ミトコンドリアが宿主と極めて異なったエネルギー代謝系を作動させる事によって宿主内の環境に適応している事を明らかにしてきた。この成果をふまえ蠕虫のモデル系としての回虫、また寄生原虫としてマラリア原虫やトリパノソーマのミトコンドリア電子伝達系の特異性を解析する事により、最終的に化学療法 of 標的として捉えたいと考えている。

エキノкокス症はわが国でも患者数が減少せず、一方北海道におけるキタキツネの感染率は50%を超えている。この条虫感染症の最大の問題点は効果的な治療薬がない事であり、病原体である多包虫を殺滅する薬剤の開発は性質の類似している単包虫も含め、国際的な視野からも意義深い研究である。本研究では、これまでに我々が得て来た寄生原虫ミトコンドリアに特異的なエネルギー代謝系を標的とした薬剤開発を進

め、エキノкокス症に対する有効な治療薬のリード化合物を見出す事を目的としている。

B. 研究方法

条虫類に属するエキノкокスは同じく寄生蠕虫に属する線虫類の回虫と同様に腸管寄生虫であり、その生活環から考えて、低酸素の環境下に嫌氣的呼吸鎖を利用している可能性があると予想された。実際にこれまでの研究でミトコンドリアにおけるエネルギー代謝、特に回虫などで見られる嫌氣的呼吸鎖である NADH-フマル酸還元酵素系を中心とする呼吸系の解析を進めるため、活性を保持したミトコンドリアの単離法を確立し、研究の進んでいる回虫成虫ミトコンドリアとその性質を比較した。その結果エキノкокスでは実際に NADH-フマル酸還元酵素系が機能し、阻害剤の効果から少なくとも幼虫の生存に必須である事が明らかになった。しかも NADH-フマル酸還元酵素系の末端酸化酵素である複合体 II のフマル酸還元酵素活性は回虫成虫の活性

よりさらに高い値を示した。そこでエキノコックス複合体 II の特徴を調べる目的で昨年までに、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い、その一次構造上の性質を明らかにした。そこで本年度は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。さらに特異的阻害剤とも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。

(倫理面への配慮)

本研究は大部分が *in vitro* の実験系であり、倫理面の問題はない。また、コットンラットを用いた感染実験は北海道大学、北海道立衛生研究所の動物実験倫理規定に基づいて行った。

C. 研究結果

1. 回虫成虫複合体 II の精製法の確立

複合体 II は細菌では細胞質膜に、また真核生物ではミトコンドリア内膜に局在しており、基本的に 4 つのポリペプチドから構成されている。分子量約 70 kDa の最も大きいサイズのサブユニット (Fp) は補欠分子族として FAD を含み、これと分子量約 30 kDa で 3 種の異なるタイプの鉄-イオウクラスターを含む Ip サブユニットから比較的親水性の触媒部位が形成されている。この触媒部位は SQR ではコハク酸からフェナジンメトスルフェート (PMS) など水溶性の電子受容体への、逆に QFR では水溶性の電子供与体である還元型メチルピオロゲ

ンからフマル酸への電子伝達を担っている。この触媒部位が膜に安定に局在するためには 2 つの小さな疎水性のサブユニットが必要であり、多くの生物種の酵素でヘム *b* を含むことからシトクロム *b* サブユニット (CybL および CybS) と呼ばれている。シトクロム *b* は複合体 II とユビキノンやロドキノンなど膜中に存在する疎水性の電子伝達成分との電子の受け渡しに必要であり、複合体としてはシトクロム *b* が膜アンカーとして膜内に局在し触媒部位はマトリック側へ突出した形をとっている。

良質の結晶を得るには活性と純度の高い標品が必要である。これまでに回虫ミトコンドリアからの複合体 II の精製については、1986 年の Takamiya らの方法が報告されていたが、さらに純度や活性の高い複合体 II を得る目的で、精製法を検討し、最も回収率が高く、また純度の高い複合体 II を得る条件を確立する事ができた。以下にその概要を説明する。

回虫ミトコンドリアを sucrose monolaurate (SML) で処理した結果、ほぼ全活性が可溶化され、次に DEAE-sepharose fast flow カラムを用いて、陰イオン交換クロマトグラフィーを行った結果、活性の回収率は 75% と高く、比活性は SML の可溶化画分と比べて 3.2 倍に上昇した。次にピークフラクションから polyethyleneglycol 3350 (PEG3350) 処理によって、複合体 II を沈殿させたのち、再び溶解して SOURCE15Q カラムを用いた陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。比活性は、前のステップから 1.3 倍となり、また、純度も約 70% と前のステップから 1.4 倍上がっていた。さらに、ここで得られたピークフラクションを polyethyleneglycol 3350 (PEG3350) に

よって、複合体 II を沈殿させて緩衝液に溶解したのち、再度 SOURCE15Q カラムを用いた陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。比活性は、前のステップから 1.5 倍となり、最終的にコハク酸脱水素酵素活性の比活性は 4.5 m mol/min/mg タンパク質であり、出発原料のミトコンドリアと比べ、比活性は 15 倍となった。これは、以前の Takamiya らの報告と比べ、約 4 倍高い値であった。また、純度は SDS-PAGE の CBB 染色の像で、Fp、Ip、CybL、CybS の 4 つのサブユニットに対応する分子量 70,000、30,000、15,000、13,000 の 4 本のバンドのみが観察されるまでに高くなっていった。これを polyethyleneglycol 3350 (PEG3350) によって、複合体 II を沈殿させたのち沈殿のまま保存した。沈殿として保存した場合に、長期にわたって活性を保持する事がわかった。

2. 回虫複合体 II の結晶化、構造解析

前項で述べた膜タンパク質のサンプル調製と界面活性剤に関する知見を有効に活用し、回虫複合体 II のサンプル調製や結晶化条件のスクリーニングを進めた。回虫成虫 QFR の可溶化と精製に SML を用いることで、回虫成虫 QFR に強く結合したリン脂質だけを含む結晶化に適したサンプルを得た。様々な非イオン性界面活性剤を使って結晶化条件のスクリーニングを行った結果、 $C_{12}E_8$ を用いて微結晶の集合体を得られた。さらに別の種類の界面活性剤を添加剤に用いて結晶化条件の最適化を行った結果、 $C_{12}E_8$ と $C_{12}M$ を重量比 3:2 で含む混合界面活性剤を使った時、数日後に 10 m m 程度の小さな結晶を得た。回虫成虫 QFR の結晶を大きく成長させるには微量透析法が有効で、100-200 m m の十分な大きさの結晶

を得て X 線回折実験と構造解析を行った。SPring-8 にて分解能 2.8 Å 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。

3. 回虫成虫 QFR の結晶構造

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 (文献 4)。

4. 特異的阻害剤フルトラニルについて

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、ロドキニ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。(文献 13)

D. 考察

エキノコックス症はその治療にアルベンダゾールなどが一部用いられているが、特効薬と呼ぶにはほど遠い。途上国に限らず、先進国にもその感染は多く見られ、わが国でも北海道の多包条虫症はキタキツネの高い感染率と相まって、大きな問題となっている。このエキノコックスの特異的な代謝系を標的として新規の薬剤開発をめざすのが本研究の最終的目的である。

この目的のためにエキノコックスの生活環を考えると、ほとんど酸素を利用していないと考えられる。すなわち成虫は酸素分圧の低い腸管に寄生し、また唯一外界に接する虫卵のステージはエネルギーを必要とする発生は終わっているため酸素は必要と

しない。また幼虫の生息する肝臓などの環境も包虫の状態では酸素の供給は低い。そこで低酸素環境下で機能する NADH-フマル酸還元系が生活環を通してエキノコックスの生存に必須であり、化学療法の好適な標的と考えられる。

今回報告した様に、我々は回虫成虫の酵素に関して、京都工芸繊維大学の原田繁春教授のグループとの共同研究によって結晶解析を進めており、昨年度予想した様に回虫成虫複合体 II を特異的に阻害するフルトラニルが回虫 CybL の Trp69 と C-H π 相互作用している事を今回明確に示したが、エキノコックスでは哺乳類同様に Met であった。これはエキノコックス幼虫からミトコンドリアを調製し調べたコハク酸-ユビキノ還元酵素活性が低濃度のフルトラニルで阻害されない結果と一致する。一方、エキノコックスや Manson 住血吸虫に特徴的なアミノ酸配列も見出されるので、エキノコックスの複合体 II に選択的な阻害剤開発が期待できる。

すでに昨年度までにエキノコックス複合体 II の全てのサブユニットの cDNA の配列を明らかにしており、今後の解析により構造予測からエキノコックスの酵素を特異的に阻害する化合物をインシリコで分子設計する事が可能となった。

E. 結論

本研究はエキノコックスに特異的な代謝系を標的とする治療薬の開発を目的としている。本研究の結果、蠕虫類に共通な嫌氣的呼吸鎖である NADH-フマル酸還元系の末端酸化酵素であるフマル酸還元酵素活性を持つ複合体 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。実際に現在これまでに得られた情報からフルトラン誘導体群を用いて検討した結果、選択性がフルトランの800倍から20,000倍に上昇した誘導体を見出す事ができている。同様なアプローチでエキノコックス複合体IIの特異的阻害剤を見出す事をめざしたい。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Molecular interaction of the first 3 enzymes of the *de novo* pyrimidine biosynthetic pathway of *Trypanosoma cruzi*. 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. (2012) **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 418, 140-143
- 2) Critical importance of the *de novo* pyrimidine biosynthesis pathway for *Trypanosoma cruzi* growth in the mammalian host cell cytoplasm. 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. (2012) **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 417, 1002-1006
- 3) Mitochondrial fumarate reductase as a target of chemotherapy: from parasites to cancer cells. Sakai, C., Tomitsuk, E., Esumi, H., Harada, S. and Kita, K. (2012) **Biochim. Biophys. Acta** 1820, 643-651
- 4) Crystal structure of mitochondrial quinol-fumarate reductase from the parasitic nematode *Ascaris suum*. Shimizu, H., Osanai, A., Sakamoto, K., Inaoka, D. K., Shiba, T., Harada, S. and Kita, K. (2012) **J. Biochem.** 151, 589-592
- 5) Critical roles of the mitochondrial complex II in oocyst formation of rodent malaria parasite *Plasmodium berghei*. Hino, A., Hirai, M., Tanaka, Q. T., Watanabe, Y., Matsuoka, H. and Kita, K. (2012) **J. Biochem.** 152, 259-268
- 6) Towards understanding the role of mitochondrial complex II in the intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*: gene targeting of the Fp subunit. Tanaka, Q. T., Hirai, M., Watanabe, Y. and Kita, K. (2012) **Parasitol. Int.** 61, 726-728
- 7) Autophagy-related Atg8 localizes to the apicoplast of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Kitamura, K., Kishi-Itakura, C., Tsuboi, T., Sato, S., Kita, K., Ohta, N. and Mizushima, N. (2012) **PLoS ONE** 7(8), e42977
- 8) *Plasmodium cynomolgi* genome sequences provide insight into *Plasmodium vivax* and the monkey malaria clade. 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. (2012) **Nat Genet.** 44(9): 1051-5.

- 9) Novel type of linear mitochondrial genomes with dual flip-flop inversion system in apicomplexan parasites, *Babesia microti* and *Babesia rodhaini*. Hikosaka, K., Tsuji, N., Watanabe, Y., Kishine, H., Horii, T., Igarashi, I., Kita, K. and Tanabe, K. (2012) **BMC Genomics**, 13, 622
- 10) Pharmacophore identification of ascofuranone, potent inhibitor of cyanide-insensitive alternative oxidase of *Trypanosoma brucei*. Saimoto, H., Kido, Y., Haga, Y., Sakamoto, K. and Kita, K. (2013) **J. Biochem.** 153, 267-273
- 11) 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. Goto, M., Amino, H., Nakajima, M., Tsuji, N., Sakamoto, K. and Kita, K. (2013) **Gene** 516, 39-47
- 12) Structure of the trypanosome cyanide-insensitive alternative oxidase, a promising drug target. 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. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, in press
- 13) Parasite complex II: unique characteristics and potential as drug targets. Harada, S., Inaoka, D. K., Ohmori, J. and Kita, K. (2013) **Biochim. Biophys. Acta (Bioenergetics)**, in press
2. 学会発表
- 1) 北 潔 「化学療法の標的としての寄生虫ミトコンドリアとその多様性の解析」
第 53 回日本熱帯医学会大会
平成 24 年 9 月 (帯広)
- 2) Kita, Kiyoshi 「Mitochondrial fumarate reductase as a target of chemotherapy: from parasites to cancer cells」 The 2nd UCL-JSPS international Symposium Mitochondria - from the fundamental aspects to medical importance - 2012, June (London)
- 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 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

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

研究分担者 河津信一郎 帯広畜産大学・原虫病研究センター 教授

研究要旨 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。

A. 研究目的

日本住血吸虫は、中間宿主となる淡水産巻貝（オンコメラニア属貝）から泳ぎ出した感染型幼虫（セルカリア）がヒトを含む哺乳類終宿主に経皮感染し、日本住血吸虫症の原因となる。患者は、腸間膜静脈に寄生す成虫が産出した虫卵が肝臓に蓄積し、肝硬変を経て、死に至る。日本住血吸虫症は、かつてわが国でも広島県や甲府盆地などの農村を中心に流行したが、住民、地方行政組織、および寄生虫病研究者の感染症撲滅に向けた連携によって、1996年に終息した。即ちわが国は、アジア諸国の中で、日本住血吸虫症撲滅の経験を唯一有する。日本住血吸虫症の制御・撲滅には、住民の検診と治療、中間宿主貝対策、および保虫宿主（ヒト以外の宿主動物）対策を並行しておこなう必要がある。一方、同感染症が蔓延する東南アジア諸国では、スイギュウ、イヌおよび野鼠が保虫宿主として重要視されているが、それらの感染ベースラインも調査されておらず、保虫宿主対策の著しい遅れが問題となっている。ヒトでの集団検診に用いられる糞便検査法（ゼロファン厚層塗抹法）も感度が低くまた特殊な技能を必要とすることから、これに代わる、汎用性が高くかつ高感度な診断法が開発が待たれている。

このような背景から、この分担課題では、東南アジアにおける日本住血吸虫症流行の疫学的背景を整理して的確な感染症情報を入手するため、また新興寄生虫症の出現に対応するため、ヒトおよび動物での同感染症の流行を正確かつ

同時にモニタリングする手法を開発することを目的とする。

B. 研究方法

今年度はスイギュウを対象とした血清診断法（ELISA法）の開発を試みた。抗原には、昨年度の患者を対象とした研究で有用性を検討したThioredoxin peroxidase-1（SjTPx-1）と、4種類のタンデムリピート抗原（TRP）分子（Sj1TR、Sj2TR、Sj4TRおよび、Sj7TR）を使用した。これら抗原を大腸菌組換え体タンパク質として発現・精製してELISAでの有用性を以下の血清サンプルを用いて評価した。（1）フィリピンカガヤン州（住血吸虫症流行地）で飼育されていた虫卵陽性スイギュウの血清 23 検体（陽性血清）（2）同地域で飼育されていた虫卵陰性スイギュウの血清 27 検体（流行地陰性血清）（3）フィリピンバタンガス州（住血吸虫症非流行地）のスイギュウ血清 18 検体（陰性血清）（4）他の吸虫症感染動物血清（肝蛭実験感染ヤギ血清）3 検体。組換え体抗原の濃度は 200ng/well、対照として使用した虫卵粗抗原（SEA）の濃度は 1 μ g/well、血清希釈は 1 : 200 倍、各抗原の陰性限界値（cutoff OD value）は陰性血清 18 検体の ELISA OD 値の mean+3SD とした。その他 ELISA の方法は定法でおこなった。虫卵陽陰性は糞便 DNA を材料として、寄生虫ミトコンドリア NADH 脱水素酵素（SjND1）遺伝子を標的とする PCR 法（Stool-PCR）で判定した。

（倫理面への配慮）

これらの研究は、分担研究者が所属する研究機

関で定めた動物実験指針、遺伝子組換え実験指針および倫理規定等を遵守するとともに、あらかじめ当該研究機関の長等の承認、届出、確認等が必要な研究については、研究開始前に所定の手続をおこなって実施した。

C. 研究結果

(1) Stool-PCR 法で評価したカガヤン州でのスイギュウの日本住血吸虫症感染率は高く (46%)、この動物の同感染症疫学での重要性が新たに指摘された。(2) 組換え体抗原および SEA の感度 (ST%)、特異度 (SP%)、陽性的中率 (PPV%) および、陰性的中率 (NPV%) を Table 1 に示した。Sj2TR、Sj4TR および、Sj7TR は ST \leq 60% であったため評価の対象から除外した。SjTPx-1 および、Sj1TR は ST \sim 80% の高感度を示したが、SEA の ST は 70% に留まった。SjTPx-1 および、Sj7TR の特異度は、それぞれ 97% および、93% と高かった。これらの組換え体抗原は、それぞれ 95% および $>$ 85% の陽性的中率および陰性的中率を示した。(3) 肝蛭感染ヤギ血清は、2 検体が SEA と陽性反応を示した。一方、それらの組換え体抗原に対する ELISA OD 値は全て陰性を示した。

これらの成績から、組換え体抗原 SjTPx-1 および、Sj1TR のスイギュウを対象とした ELISA 抗原としての有用性が示唆された。また、前年度の研究成果とあわせて考察すると、SjTPx-1 を抗原とするヒトおよび保虫宿主での共通血清診断法、例えば ELISA やイムノクロマト法などの簡易血清診断法開発の可能性が示唆された。

Table 1. Sj-ELISA 抗原の特性

抗原	ST (%)	SP (%)	PPV (%)	NPV (%)
SEA	70	87	80	79
TPx1	83	97	95	88
1TR	78	93	95	85

ST: Sensitivity; SP: Specificity

PPV: Positive Predictive Value

NPV: Negative Predictive Value

E. 研究発表

1. 論文発表

1) 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)

2) 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)

2. 学会発表

1) Angeles JM., Goto Y., Kirinoki M., Asada M., Leonardo L., Rivera PT., Villacorte E., Inoue N., Chigusa Y., and Kawazu S. Serological comparison of recombinant TPx-1 and tandem repeat proteins for detection of human and animal *Schistosoma japonicum* Human infection. 第 81 回日本寄生虫学会 2012 年 3 月 24 日 兵庫

2) Angeles JM., Goto Y., Kirinoki M., Asada M., Leonardo L., Rivera PT., Villacorte E., Inoue N., Chigusa Y., and Kawazu S. Evaluation of recombinant thioredoxin peroxidase-1 and tandem repeat proteins as antigens for serodiagnosis of *Schistosoma japonicum* infections. 第 5 回 ASEAN 熱帯医学寄生虫学会議 2012 年 5 月 17 日 Manila, Philippines

3) Angeles JM, Goto Y., Kirinoki M., Asada M., Leonardo L., Tongol-Rivera P., Villacorte E., Inoue N., Chigusa Y., and Kawazu S. Evaluation of recombinant proteins for *Schistosoma japonicum* infection diagnosis among water buffaloes in two new endemic foci in the Philippines. 第 53 回日本熱帯医学会大会 2012 年 9 月 6 日 帯広

4) Angeles JM., Goto Y., Kirinoki M., Asada M., Leonardo L., Tongol-Rivera P., 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. 第 61 回米国熱帯医学会年会 2012 年 11 月 13 日 Atlanta, GA, USA

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(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

(総括・分担) 研究報告書

寄生蠕虫症(条虫症)の検査・診断法開発

研究分担者 山崎 浩 国立感染症研究所寄生動物部 室長

研究協力者 中村 健 北里大学医学部予防医学系

研究協力者 松岡裕之 自治医科大学医動物学教室

研究協力者 Wanchai Maleewong タイ・コンケン大学医学部寄生虫学教室

研究協力者 Pewpan Maleewong タイ・コンケン大学医学部寄生虫学教室

研究協力者 Guita Rubinsky Elefant ブラジル・サンパウロ大学熱帯医学研究所

研究委託者 小林行治・小林 薫・高山勝好 アドテック株式会社研究開発部

研究要旨: 寄生蠕虫症の検査診断法の開発に関連して、幼虫移行症として重要なマンソン孤虫症、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。マンソ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を確認された。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。

(1) 幼虫移行症としてのマンソン孤虫症
迅速血清診断キットの開発

A. 研究目的

マンソン孤虫症はマンソン裂頭条虫 (*Spirometra erinaceieuropaei*) の幼虫 (= プレロセルコイド) が寄生した地鶏・ヘビ・カエルなどの肉を加熱不十分な状態で摂取する

ことによって惹起される寄生蠕虫症である。上記の食習慣を有するアジアを中心に患者が発生し、わが国でも最近の 10 年間に 80 例近い症例が報告されている。マンソン孤虫は、脳、皮下組織、乳房、胸腔、腹腔、眼部、鼠径部など全身に寄生するので、寄生部位によって症状は様々である。

本症の検査診断は、血清中の抗マンソン孤虫抗体を検出するのが有効であるために、マンソン孤虫由来のPBS可溶性画分が血清診断用抗原として汎用されてきた。しかし、このPBS抗原の検出感度は高いが、マンソン孤虫症以外の寄生虫症と交差反応を起こすために、特異性の面で問題があった。そこで、PBS抗原に替わって、より特異性が高く、検出感度も高い抗原開発を目的として、マンソン孤虫由来のパラミオシン(PM)とシステインプロテアーゼ(CP)を比較検討したところ、CPが検出感度、特異性とも優れている結果が得られた。そこで、本年度には、CPを用いたイムノクロマトキットを作成し、従来、汎用されてきたELISAとの比較を含め、キットの評価を行った。

B. 研究方法

CPはマンソン孤虫をアセトン処理して凍結乾燥した虫体からトリス緩衝液(pH 7.6)で抽出し、飽和硫酸分画、酸処理(pH 4.0)など生化学的手法によって精製された。精製されたCPは酸処理によって自己消化し、不活性型が活性型に変換したことにより、夾雑物も消化され、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動では見かけ上、単一の成分として得られた。この精製CPを用いてイムノクロマトキットを試作し、日本人とタイ人の健常者血清、マンソン孤虫症患者血清やその他の寄生虫症患者血清を用いて、イムノクロマトキットとCPを用いたELISAと比較することによってキットの評価を行った。

C. 研究成果

1) イムノクロマトキットとELISAの比較: マンソン孤虫症患者血清(15検体)を用いて

イムノクロマトキットにおけるバンドの強度とELISAにおける吸光度との関係を調べたところ、イムノクロマトキットによる強度(8段階)はELISAの吸光度とほぼ相関し、相関関係を示すSpearman係数(R_s)は0.789と高い値を示した(図1)。

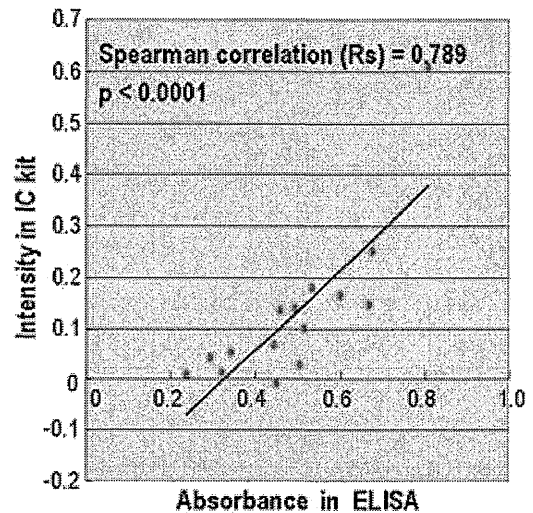


図1. イムノクロマトキットとELISAにおける反応性の比較。

2) イムノクロマトキットを用いた特異性の検討: マンソン孤虫症と臨床症状が類似することから鑑別診断が必要な顎口虫症患者血清の反応性を検討したところ、29例中4例で陽性反応が見られた。抗体価が高い場合、この4例のように非特異的反応が見られることが判明したが、キットとしては概ね良好な成績であった。図2には、マンソン孤虫症イムノクロマトキットを示しており、デバイス、血清希釈液、二次抗体溶液、それに展開液で構成されている。現在、本キットは国立感染症研究所寄生動物部で保管管理しており、必要に応じて分与できる体制を取っている

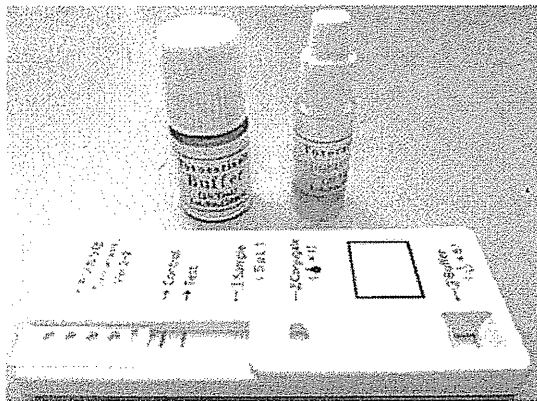


図 2. 開発したマンソン孤虫症イムノクロマトキット.

D. 考察

マンソン孤虫症イムノクロマトキットに用いた CP は虫体より簡便な方法で多量に精製することが可能であった。また、イムノクロマトキットによる検出感度、特異性とも、CP を用いた ELISA による検査結果に匹敵したことから、有用なキットであると考えられた。

E. 結論

今後、第三者医療機関に本キットを分与することにより、検査診断の標準化のための適用事例を集積することが必要であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 山崎 浩 感染症・免疫血清診断(34) 抗寄生虫 IgG 抗体. 臨床検査ガイド 2011-2012.

2. 学会発表

- 1) Yamasaki H. Current status of food-borne cestodiasis in Japan. International

Workshop on “Emerging parasitic zoonoses: epidemiology, diagnosis and prevention”, Hanoi, Vietnam, June 25, 2012.

- 2) Yamasaki H., Nakamura T, Muto M, Morishima Y, Sugiyama H, Intapan PM, Maleewong W, Matsuoka H, Kobayashi K, Takayama K, Kobayashi K. Development of a simple and rapid diagnostic kit to detect antibodies in human sparganosis. 第82回日本寄生虫学会大会、東京. 2013年3月29-31日.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

なし

(2) 幼虫移行症としての顎口虫症の迅速血清診断キットの開発

A. 研究目的

顎口虫 (*Gnathostoma* spp.) の幼虫寄生によって惹起される顎口虫症は幼虫移行症として世界的に重要な寄生虫症で、タイ・中国を含む東南アジア～東アジア、またメキシコやペルーなど伝統的に生魚料理を食する習慣のある国で患者が多く発生している。わが国でも輸入ドジョウを感染源とする顎口虫症事例や海外渡航先で感染し、帰国後、発症する、いわゆる輸入寄生虫症例として無視できない存在である。顎口虫症の検査・診断は類似症状を呈するマンソン孤虫症との鑑別が治療薬選択に当たり重要であり、その鑑別診断には血清中の顎口虫に対する IgG 抗体検出が有効である。しかし、その検査法は検査機関によって異なり、標準化された方法はない。そこで、本研究

では、タイ・コンケン大学医学部寄生虫学教室、同大・新興感染症診断研究センターの協力を得て、顎口虫症の検査法の標準化を目的として、遺伝子組換え抗原を用い顎口虫症の迅速検査キットの開発を試みた。

B. 研究方法

1) 遺伝子組換え顎口虫抗原の調製: 有棘顎口虫第3期後期幼虫は実験的に感染させたハムスターの筋肉から回収した。得られた幼虫よりタンパク質を抽出し、二次元電気泳動後、タンパク質スポットを電気的にメンブランに転写し、顎口虫症患者血清とイムノブロットを行った。患者血清と反応したタンパク質スポットについて、質量分析とアミノ酸配列を調べたところ、マトリックスメタロプロテナーゼ (matrix metalloproteinase, MMP) と高いホモロジーを示した。そこで、DNA データベースから顎口虫の MMP 遺伝子をコードする配列情報を得、PCR によって増幅された MMP 遺伝子を大腸菌で発現させ、遺伝子組換え MMP の抗原としての特異性を検討した。

2) 有棘顎口虫第3期後期幼虫の cDNA library のイムノスクリーニング: 前項の MMP 以外の抗原分子検索のために、同幼虫の total RNA を用いた SMART (Switching Mechanism At 5' end of RNA Transcript) 法によって cDNA library を構築し、顎口虫症患者血清を用いたコロニーハイブリダイゼーション法によって抗原候補分子のクローニングを行った。

C. 研究成果

1) 遺伝子組換え MMP の発現と抗原としての特異性: PCR によって増幅された 747

bp の MMP 遺伝子は、大腸菌用発現ベクター pET-43.1b(+) に挿入し、IPTG 存在下で発現させた。遺伝子組換え MMP タンパク質は NusA タンパク質との融合タンパク (分子サイズ 102kDa) として発現した。この組換えタンパク質はニッケル樹脂カラムを用いてアフィニティ精製し、顎口虫症患者血清、健常者血清と特異性を比較した。

その結果、遺伝子組換え MMP は顎口虫症患者血清と特異的な反応が見られ、健常者血清のほか、有鉤囊虫症、広東住血線虫症、肺吸虫症、肝蛭症などの患者血清とは反応しなかったことから、特異性の高さが示された (図3)。

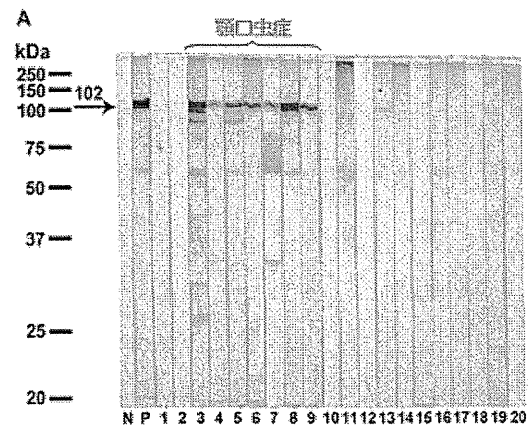


図3. 組換え MMP を用いたイムノブロット法による特異性の検討。

2) 有棘顎口虫幼虫の cDNA library 構築と顎口虫症患者血清を用いたイムノスクリーニング: SMART 法を用いて合成された cDNA は pMD20T プラスミドベクターに挿入し、結果的に約 1.0×10^7 cfu のライブラリーが構築された。さらに、タイ人顎口虫症患者血清を用いた抗体スクリーニングによって、最終的に6つの陽性クローンを得ることができた。このクローン化された cDNA は現在、大腸菌における発現や患者

血清との反応性を検討している段階である。

D. 考察

遺伝子組換え MMP は大腸菌における発現量も多く、また抗原としての種特異性が高いことが明らかになったことから、顎口虫症検査キットの抗原として有用であることが示唆された。また、cDNA ライブラリーからクローン化された遺伝子については、今後の解析結果が待たれる。

E. 結論

遺伝子組換え MMP の抗原としての特異性から、今後、イムノクロマトキット作成に応用する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 山崎 浩 感染症・免疫血清診断(34) 抗寄生虫 IgG 抗体. 臨床検査ガイド 2011-2012.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

(3) トキソカラ症迅速イムノクロマト血清検査キットの海外における評価試験

A. 研究目的

トキソカラ症はトキソカラ属のイヌ回虫 (*Toxocara canis*) やネコ回虫 (*Toxocara cati*) の幼虫がヒトに寄生することによって惹起される幼虫移行症の一つで、世界中で患者発生が見られる。トキソカラ症の診断はイヌ回虫やネコ回虫に対する特異的 IgG 抗体を検出する血清検査が有効であることから、遺伝子組換え抗原を用いた簡易で、かつ迅速なイムノクロマト血清検査キットをすでに開発した。本研究では、イムノクロマトキットのグローバルな評価を行うことを目的として、ブラジル・サンパウロ大学熱帯医学研究所血清免疫部門の協力を得て、ELISA による検査結果との比較を行った。

B. 研究方法

ブラジル・サンパウロ大学で血清学的、臨床所見などからトキソカラ症と診断された患者血清 30 検体、血清学的にボーダーラインの血清 12 検体、それにブラジル人健常者血清 7 検体を用いて、イムノクロマトキットにおける反応性を調べた。同時に、キットに用いた同じ遺伝子組換えイヌ回虫抗原を用いた ELISA も実施し、イムノクロマトキットにおけるバンドの強度と ELISA による吸光度との相関について検討した。

C. 研究成果

トキソカラ症と診断された患者血清については、イムノクロマトキットによるバンドの強度 (8 段階) と ELISA における吸光度とはよく相関し、相関関係を表す Spearman 係数 (R_s) は 0.799 と高い値を

示した。ELISA でボーダーラインと判定された血清や健常者血清においても、免疫クロマトキットの強度は低下し、相関関係が示された (図 4)。

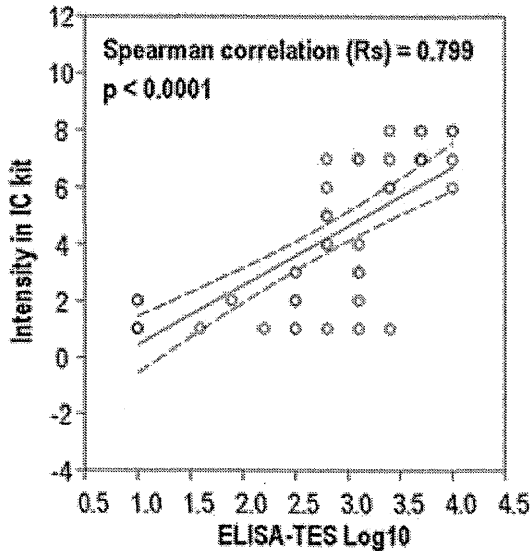


図 4. トキソカラ症免疫クロマトキットと ELISA との相関関係。

D. 考察

トキソカラ症免疫クロマトキットは ELISA による検査結果ともよく相関し、ブラジルにおいてもキットの有用性が示されたことから、トキソカラ症検査診断に適用可能であることが示された。

E. 結論

トキソカラ症の免疫クロマトキットはその操作の簡便さから、今後、わが国のみならず広く海外においても普及することが期待された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 山崎 浩. ペットからの感染症 10 イヌ・ネコ回虫症 (トキソカラ症). 小児科 54:65-72, 2013.
- 2) 山崎 浩 感染症・免疫血清診断(34) 抗寄生虫 IgG 抗体. 臨床検査ガイド 2011-2012.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む) なし

(4) 寄生蠕虫症の遺伝子診断法の確立

A. 研究目的

寄生蠕虫症における原因種の正確な鑑別や同定は、確定診断の根拠を与え、適切な治療を行うためにきわめて重要である。しかし、形態学的に類似した寄生虫の鑑別には高度な専門知識が要求される。また、虫体の変性、あるいは石灰化した場合には寄生虫の形態的特徴が失われ、形態学的鑑別は一層困難となる。そこで、遺伝子解析に基づいて、寄生虫種を同定・鑑別する方法が最も正確であるために、臨床検体を研究材料として、網羅的な遺伝子鑑別法の確立を目的とした。

B. 研究方法

遺伝子診断の標的遺伝子はミトコンドリアゲノムにコードされる cytochrome *c* oxidase subunit 1 遺伝子 (以下、cox1 遺伝子) を基本としたが、寄生虫種によっては 12S rRNA 遺伝子なども対象とし、塩基配列に関する基礎的な情報を蓄積した。研究材料は国立感染症研究所寄生動物部に依頼検査目的

で送付された臨床検体(虫体や病理組織標本)を用いた。さらに、ホルマリン固定病理組織標本中に検出される寄生虫の鑑別法についても、寄生虫の種類ごとにプライマーの設定を含めた PCR 条件を詳細に検討した。

C. 研究成果

国内外の医療機関から提供された臨床検体は、日本海裂頭条虫、広節裂頭条虫、アジア条虫、無鉤条虫などの条虫類が多く、これらについてはすでに確立した方法を用いて解析した。本研究では新に、動物由来のフィラリア (*Dirofilaria repens*, *Onchocerca lupi*) 感染による国内外でも希少な症例の原因になった寄生虫種について鑑別診断法を確立することができた。

D. 考察

昨今の食習慣の多様化や国際的な人的移動など生活環境の変化に伴い様々な寄生虫感染症が発生している。また、当該部では、国内外の医療機関から遺伝子解析に基づいた寄生虫鑑別の依頼件数も年々増加しており、検査診断のサポートする観点からも確立すべき重要な検査法と考えられた。

E. 結論

ミトコンドリア DNA を標的にした PCR と塩基配列解析によって、同定可能になった寄生虫種の範囲がさらに広まった。国内 2 例目となる *D. repens* による症例や世界で 4 番目となった *O. lupi* によるトルコの症例が確定診断されたことは特筆できる。

F. 健康危険情報

近年、関東地方で発生が相次いでいるアジア条虫症に関する研究成果について、本症は豚レバーの生食が原因と考えられることから、厚生労働省の食中毒調査支援システム(National Epidemiological Surveillance of Food-borne Diseases, NESFD)を利用して各自治体に情報提供を行った(添付資料 1 を参照)。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamasaki H. Current status and perspectives of cysticercosis and taeniasis in Japan. Korean Journal of Parasitology 51: 19-29, 2013.
- 2) 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. Journal of Parasitology 98:1243-1247, 2012.
- 3) Ikeda T., Tamura D., Sato Y., Ichihashi K., Matsuoka H., Yamasaki H. Two pediatric cases of *Diphyllobothrium nihonkaiense* Infection in Summer (July-August) 2010. Pediatrics International 54:163-165, 2012.
- 4) Nonomura Y., Otsuka A., Endo Y., Fujisawa A., Nakajima N., Minamiguchi S., Miyagawa-Hayashino A., Yamada M., Tegoshi T., Yamasaki H., Kabashima K., Miyachi Y., Tanioka M. Sparganosis mansonii on abdominal skin, mimicking folliculitis and diagnosed by analysis of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 gene, using polymerase chain reaction. European Journal of Dermatology 22: 806-807, 2012.
- 5) 藤森俊二, 武藤麻紀, 山崎 浩, 坂本長逸. カプセル内視鏡で遭遇した小腸寄生虫の 2 例. Clinical Parasitology 23:20-22,2012.