

References

1. Sibley, L. D. (2004). Intracellular parasite invasion strategies. *Science*. 304, 248–53.
2. Håkansson, S. *et al.* (1999). Time-lapse video microscopy of gliding motility in *Toxoplasma gondii* reveals a novel, biphasic mechanism of cell locomotion. *Mol Biol Cell*. 11, 3539–3547.
3. Yamamoto, M. *et al.* (2011). ATF6beta is a host cellular target of the *Toxoplasma gondii* virulence factor ROP18. *J Exp Med*. 208, 1533–1546.
4. Butcher, B. A. *et al.* (2011). *Toxoplasma gondii* rhoptry kinase ROP16 activates STAT3 and STAT6 resulting in cytokine inhibition and arginase-1-dependent growth control. *PLoS Pathog*. 7, e1002236.
5. Gubbels, M. J., Duraisingh, M. T. (2012). Evolution of apicomplexan secretory organelles. *Int. J. Parasitol.* *in press*.
6. Leander, B. S., Keeling, P. J. (2003). Morphostasis in alveolate evolution. *Trends Ecol Evol*. 18, 395–402.
7. Vyas, A. *et al.* (2007). Behavioral changes induced by *Toxoplasma* infection of rodents are highly specific to aversion of cat odors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 6442–6447.
8. House, P. Landon Donovan Needs a Cat. *SLATE*. Posted Jul. 1, 2010.
9. 永宗喜三郎 (2009). “植物としてのトキソプラズマ原虫：植物ホルモンとカルシウムシグナリング” 蛋白質 核酸 酵素 54, 1047–1052.
10. Archibald, J. M., Keeling, P. J. (2002). Recycled plastids: a ‘green movement’ in eukaryotic evolution. *Trends Genet*. 18, 577–584.
11. Nagamune, K. *et al.* (2008). Abscisic acid controls calcium-dependent egress and development in *Toxoplasma gondii*. *Nature*. 451, 207–210.
12. Miranda, K. *et al.* (2010). Characterization of a novel organelle in *Toxoplasma gondii* with similar composition and function to the plant vacuole. *Mol. Microbiol.* 76, 1358–1375.
13. <http://www.matryoshka-evolution.jp/>

*Protozoological Garden Vol. 3 (2012) 4-8. Review
by Michika Fkshi, Ryuma Matsubara and Kisaburo Nagamune*

講座

食品による寄生動物感染症⁵

原虫感染症(3) トキソプラズマ症と沖縄県における
トキソプラズマの流行状況について

喜屋武向子¹, 松原 立真^{2,3}, 永宗喜三郎^{2,4}

1. はじめに

トキソプラズマ (*Toxoplasma gondii*) は、アピコンプレクサに属する一属一種の寄生性原生生物 (原虫) である。ほぼ全ての哺乳類・鳥類に感染能を持ち、全人類の1/3以上 (数十億人)、日本人の10~30%が罹患するとされるなど非常に広く蔓延していることが知られている¹⁾。本原虫は宿主細胞の中でのみ増殖可能な偏性寄生性生物である。全ての有核細胞に感染能があるとされ、特に中枢神経系への感染は脳症など深刻な病態を形成する。健常者において本原虫が問題とならないのは、免疫系の働きにより増殖が抑制可能なためであるが、一方で免疫不全者において本症は重篤な症状を示すことが知られている。特に HIV 感染者に対しては致死的なトキソプラズマ脳炎を生じることが知られており、本症で死亡する HIV 感染者は米国で全患者の10%、欧州では30%に及ぶとされる²⁾。また健常者の場合でも本原虫は完全には排除されず、不顕性のトキソプラズマ症として慢性に経過し、生涯にわたり保虫者となる。罹患者が HIV 感染や抗ガン剤治療により免疫機能が低下した際、トキソプラズマは日和見感染症として再燃する。

妊娠中の女性がトキソプラズマに初感染した場合、トキソプラズマが胎盤を通過して胎児に垂直感染する可能性がある。本原虫に感染した胎児は先天性トキソプラズマ症を発症することがあり、死産や重度障害など重篤な症状を伴うため十分な注意が必要である。一般的に、妊娠初期に感染すると死産となることが多く、妊娠後期では死産は少ないが先天性障害を伴い出生することがある。障害はトキソプラズマ脳症 (水頭症)、脈絡膜炎による視力障害等が含まれる。後期に感染した場合は発症時期が遅れ、おおそ思春期頃まで発症のリスクがあるとさ

れている。

最近発表された宮崎県での7年半にわたる計4,466例の妊婦の抗体検査による調査結果から、宮崎県では0.25%の妊婦が妊娠中に新たにトキソプラズマ感染を起こす可能性が推定された³⁾。この調査は、出生者数が年間1万人を超える宮崎県において⁴⁾、はたして統計学的に十分なサンプル数なのか、また宮崎県という地理的・文化的に隔てられた地域における結果がどれだけ普遍的なものなのかという議論はあるであろうが、著者らは数少ないトキソプラズマ調査の一例として注目に値するものとする。参考までに平成22年の全国の出生数は107万1304人であり⁴⁾、その0.25%は2,678人である。

食肉に供するためにと殺される獣畜の検査は、食品衛生上の危害の発生を防止するため、と畜場法に基づき獣医師により検査 (と畜検査) が実施されている。と畜検査でトキソプラズマの感染が認められた場合には、と殺禁止あるいは全部廃棄の措置 (以下、措置) がとられている。

と畜検査におけるブタのトキソプラズマ症の報告⁵⁾は、平成11年度以降、全国的にはほとんどなくなっている

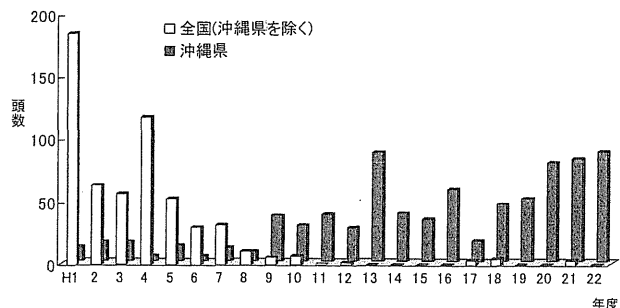


図1. と畜検査におけるトキソプラズマ症による措置数 (ブタ) 全国の件数は、H1-9は厚生労働省食品安全部監視安全課より、H10以降は食肉検査等情報還元調査による。

¹ 沖縄県衛生環境研究所 衛生科学班 〒901-1202 沖縄県南城市大里字大里2085 ☎098-945-0785

² 国立感染症研究所 寄生動物部 〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1 ☎03-4582-2693

³ 筑波大学大学院 生命環境科学研究科 〒305-8572 茨城県つくば市天王台1-1-1

⁴ 筑波大学 生命環境系 〒305-8572 茨城県つくば市天王台1-1-1

が、沖縄県では依然として発生が認められる(図1)。ブタのトキソプラズマ症は全部廃棄対象疾病の中でも上位を占め、沖縄県では注意の必要な疾病のひとつとなっている。

このような背景から、沖縄県ではトキソプラズマに対する関心は高く、ブタだけでなくその他の家畜やネコ、野生動物についても調査研究が行なわれている。そこで本稿では、トキソプラズマ原虫およびトキソプラズマ症についての概略とその生物的特徴、さらにトキソプラズマが問題となっている沖縄県を取りあげ、これまで沖縄県で調査された家畜および各種動物のトキソプラズマに関する文献を参考に、沖縄県におけるトキソプラズマ浸潤状況と、検出されたトキソプラズマの遺伝子性状について概説する。

2. トキソプラズマの生活環

トキソプラズマは幅3 μ m、長さ5-7 μ mと比較的小さな半月~三日月形の生物である(図2)。細胞内寄生性であり、環境中で単独では増殖しない。トキソプラズマの生活環は有性生殖と無性生殖のステージからなる(図3)。有性生殖はネコ科動物の腸管上皮内でのみ成立するが、無性生殖はほぼ全ての温血動物で可能である。なお、ヒトも中間宿主であるため人体内で生じる感染も無性生殖である。

中間宿主への感染は、組織シストまたはオーシストを経口摂取することにより生じる。摂取されたトキソプラズマは、消化管壁から体内に侵入して感染が成立する。

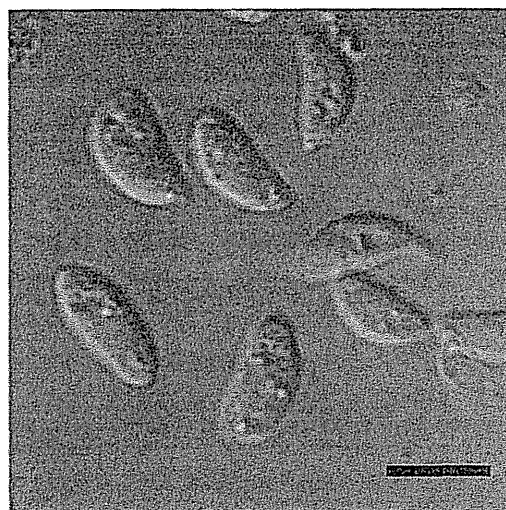


図2. トキソプラズマのタキゾイト(急増虫体)
筑波大学大学院 福士路花氏提供。Bar = 5 μ m

虫体は宿主の細胞内に侵入し、endodiogeny(内生2分裂)とよばれる特徴的な2分裂を行い活発に増殖する。このような急性感染期の虫体をタキゾイト(急増虫体)と呼ぶ。軽い風邪のような症状があることもあるが、無症状であることも多い。急性感染期は原虫が血中に出現することがあり、宿主が妊娠中であれば原虫が胎盤を通過して胎児に移行する。宿主側の免疫応答が開始されると、トキソプラズマは中枢神経系や筋肉内で組織シストと呼ばれる構造をとる。組織シストは安定な壁に覆われているため、トキソプラズマは免疫系の攻撃を受けずに生存を続ける。組織シスト内部での原虫増殖は緩やかであり、この時期の原虫をブラディゾイト(緩増虫体)と呼ぶ。ヒトを始めとする中間宿主が感染中間宿主を摂食

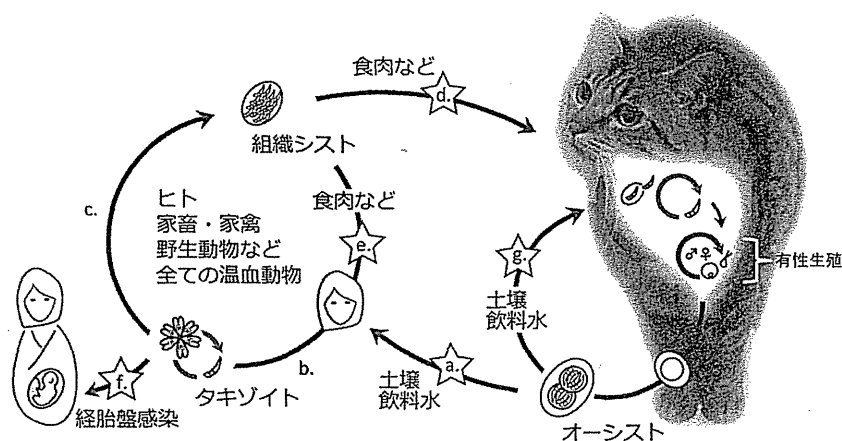


図3. トキソプラズマの生活環

☆は新たな宿主に伝播可能な経路を示す。a) 感染はネコ科動物から排出されたオーシストを経口摂取することで生じる。b) オーシストは体内に侵入し、タキゾイトとして活発に増殖する。c) 免疫系の活性化に伴い、抵抗性のある組織シストを形成して内部でブラディゾイトに分化する。d) 中間宿主を捕食することで、組織シストがネコ科動物に取り込まれると腸管内で有性生殖が起きる。e) 組織シストは中間宿主に摂取されると新たな宿主内で再びタキゾイトとなり増殖する。f) 妊娠中に初感染すると、経胎盤感染により胎児に先天性トキソプラズマ症を引き起こす。g) 伝播は終宿主であるネコ科動物同士でも可能である。

することに伴い組織シストを経口摂取するとトキソプラズマは新たな宿主内で同様に増殖を開始する。

終宿主であるネコ科動物が感染中間宿主を捕食すると、組織内に存在した組織シストから原虫が遊離して腸管上皮に侵入する。原虫は数回の無性生殖（シゾゴニーまたはメロゴニー）を行った後、有性生殖（ガメトゴニーまたはガモゴニー）により雌性、雄性配偶子を形成する。両者は腸管内部で融合し、未成熟オーシストとして糞便などととも体外に放出される。未成熟オーシストは一定時間中に分裂し、一つのオーシストの中に8個の虫体が含まれた成熟オーシストとなる。

以上のように、トキソプラズマは他の多くの寄生原虫と同様に、生活史に中間宿主と終宿主の両方を必要とする。一方でトキソプラズマでは、中間宿主-中間宿主の感染が成立するという点が大きな特徴となっており、この形質が本原虫の急速な拡散、遺伝的均一性の増加をもたらしたと考えられている^{6,7)}。

3. トキソプラズマの防除

トキソプラズマのヒトに対する感染は、加熱の不十分な食肉に含まれる組織シスト、あるいはネコ糞便に含まれるオーシストの経口的な摂取により生じる。空気感染、経皮感染は生じない。組織シストを介した感染はトキソプラズマの最も一般的な感染経路であると考えられる。トキソプラズマは全ての温血動物に感染可能であるため、魚介類を除く獣肉・鳥肉の生食は常に感染のリスクを伴う。本原虫の不活化には、中心が67℃になるまでの加熱⁸⁾、あるいは中心が-12℃になるまでの凍結⁹⁾が有効であるとされる。電子レンジによる加熱では内部温度の十分な上昇が得られないため必ずしも安全であるとはいえない¹⁰⁾。なお冷蔵処理では原虫の感染性を低下させないため注意が必要である。

トキソプラズマの感染経路として、従来食肉中の組織シストによる伝播が注目されてきた。しかし、近年は水道や土壌由来の感染事例が散見され、特に水系伝播ではアウトブレイクが報告されるなど、食肉以外からの感染リスクも無視出来ないものとなっている¹¹⁻¹³⁾。環境からのトキソプラズマ感染は、終宿主であるネコの糞便に含まれるオーシストにより引き起こされる。オーシストは-20℃で1ヶ月程度生存可能であることが示され¹⁴⁾、また次亜塩素酸やエタノールを含む多くの消毒剤が無効である¹⁵⁾ため注意が必要である。ガーデニングなど土壌との接触、感染したネコとの接触、無処理の生水の摂取は感染の確率を上昇させる¹⁶⁾。ただし、感染したネコがオーシストを排出するのは数日から十数日間のみであり、飼いネコの感染が疑われる場合も適切な管理により防除可能である。オーシストは排出されてか

ら成熟し感染能を獲得するまでに少なくとも24時間を要するとされる¹⁷⁾ため、糞便の処理を毎日（24時間以内で）実施することにより感染力のあるオーシストとの接触を回避できる。このとき容器は熱湯で消毒することが望ましい。またオーシストは水系伝播により大規模感染を生じる危険性があり、塩素剤に代わる不活化行程の適用が求められる。現在は紫外線や放射線照射による不活化法が研究されている^{18,19)}。

4. トキソプラズマのヒトへの感染経路

調理不十分な食肉に含まれる組織シストとネコ糞便と共に排出されるオーシストの主に2種類あると考えられているトキソプラズマのヒトへの感染経路のうち、どちらが主要な経路であるかは未だ確定していない。本項ではそれを考えるヒントとなるいくつかの状況証拠を紹介する。まず、米国における抗体保有率調査から、米国では土遊びをする機会の多い10歳以下の小児の抗体保有率は非常に低く、おそらく調理不十分な肉を口に始めるであろう10代になってから急上昇しているという結果が報告された^{20,21)}。また、地理的、文化的バックグラウンドがかなり共通すると考えられる日本と韓国での最近の調査における抗体保有率は、いずれも10%程度と似通っていた^{3,22)}。しかし、韓国ではネコを嫌う文化があり、ネコの飼育数が日本よりかなり少ない^{23,24)}。つまりオーシストに接触する機会は日本に比べて韓国では非常に少ないと考えられる。ところが一方で日韓の感染率がほぼ同じということは、日韓のトキソプラズマ感染はどちらも共に組織シスト由来であろうという仮説が導かれるのかもしれない。これらの調査結果はいずれもオーシストよりむしろ組織シストが主要な感染源である可能性を示唆している。一方で、「オーシスト主犯説」を示唆するデータもいくつかあげることができる。例えば、インドでの調査結果によるとベジタリアンとそうでない人との間で抗体陽性率に有意な差が認められないという報告や、太平洋上、オーストラリア、米国にはネコのいない島があり、それらの島には抗体陽性者もいないという報告などである²⁵⁾。また米国の肉屋から購入した肉をネコに食べさせ感染の有無を調査し、市販肉類のリスクを調査した結果からは、肉類のリスクのみでは米国人の全ての抗体陽性者を感染させることは計算上不可能である、すなわち肉類以外の主要な感染源が必要であるとする報告²⁶⁾がなされたことや、前述の水系感染によるアウトブレイクの報告などもオーシストの重要性を示唆しているものと思われる。

5. トキソプラズマの分類と分布

トキソプラズマ原虫の初記載は1908年、NicolleとManceauxにより行われた²⁷⁾。本原虫の属するアピコンプレクサには寄生性生物のみが分類され、世界3大感染症の1つであり年間2億人以上が感染するマラリア原虫や、水道やプールを介した集団感染を引き起こし、日本のマスコミにもしばしば登場するクリプトスポリジウムなど、公衆衛生上問題となる多数の原虫が含まれている。トキソプラズマは*in vitro*培養系や遺伝子導入系が早期に確立されたため、これら原虫類のモデル生物として研究されてきた背景も持つ。

トキソプラズマは遺伝的な多様性が非常に低いことが知られている。本原虫の分子疫学は欧州と北米地域で詳細に調査されており、これらの地域に流布するトキソプラズマは3種のクローン(I~III型)にほぼ限定されることが報告されている^{28,29)}。これらのクローンはさらに約1万年前に他から分岐した共通のクロモゾーム(Chr Ia)を有している³⁰⁾。Chr Iaが他から分岐したその時期は、人類が農耕や牧畜を始めた時期とほぼ一致することから、これらの3クローンは人類の農耕や牧畜に対して何かしらの有利な形質を持っており、人類社会の周辺に適応、選択されたのではないかと仮説が提唱されている⁷⁾。また、各クローンはヒトやマウスに対する病原性やその分離される場所が異なることが知られている。Dardéら³¹⁾によれば、I型のトキソプラズマは強毒性系統であり、先天性感染などの急性感染患者から分離される。マウスのLD₁₀₀(100%致死量)は10⁰、すなわち1である。II型は弱毒性系統であり、ヒトではAIDS患者など慢性感染の患者から分離され、マウスのLD₅₀は10³以上である。III型は主に家畜から分離され、マウスに対する毒性は非常に低く、基本的に無毒であるといわれている。分子遺伝学的研究の進展に伴い、これら3クローンの病原性の差はロプトリーとよばれる分泌器官から分泌されるROPsというキナーゼ群のSNPにより説明できることが判明してきた。例えばI型とIII型の病原性の違いを説明する責任遺伝子としてROP18というキナーゼタンパク質が、II型とIII型の病原性の違いを説明する責任遺伝子としてROP16がそれぞれクローニングされた^{32,33)}。また最近同様に、I型とII型の違いを説明する因子としてROP5が新たにクローニングされた³⁴⁾。これらのキナーゼ群の作用メカニズムは以下のように説明されている。ROP16はトキソプラズマがマクロファージに感染した際に宿主の免疫シグナル物質であるSTAT3をリン酸化して活性化させる。活性化したSTAT3は宿主核に移行し、IL-12やTNF- α 、IFN- γ の産生を抑制し、結果としてIFN- γ 誘導性エフェクター分子など抗原虫的免疫反応の誘導を抑制する³⁵⁻³⁷⁾。一方、III型原虫はこのSTAT3活性化能が弱く、免疫反応を抑制できず、したがって宿主体内で増殖

しにくい。また、ROP18は転写因子の一種であるATF6 β の分解をリン酸化依存的に促進し、IFN- γ 産生を抑制する³⁸⁾。III型原虫はROP18を発現していないことが知られており、やはり宿主に対してIFN- γ 産生抑制能が低い。また、ROP18やROP5は細胞内でトキソプラズマを囲む膜(寄生胞膜)上に局在し、IRGsと呼ばれる免疫分子による原虫への攻撃を防いでいる³⁹⁾。I型のROP18やROP5はこの攻撃に対する防御活性が高いのである。

これまでのトキソプラズマ疫学は欧米をフィールドとしたものが大半であり、その他の地域におけるトキソプラズマの分布と系統に関わる情報はそれほど多くはない。Khanら³⁰⁾による南米のトキソプラズマ集団解析の結果は、南米のトキソプラズマの遺伝的多様性は北米および欧州地域に比べ若干大きなことを明らかにし、新たな遺伝型としてIV~XI型の計8型の存在を報告した。これらの南米独特なクローンが欧州北米型のクローンと分岐したのはおよそ100万年前と推定され、その時期は、それまで海によって隔てられていた南北アメリカ大陸が陸続きになった時期と一致するらしい。トキソプラズマはその時期に初めて南米大陸にネコ科動物と共に侵入し、現在Chr Ia型トキソプラズマが選択されつつある途上であるという仮説が提唱されている。また、Khanら⁴⁰⁾は北米に分布する4番目のサブタイプ(IX型)を報告した。このサブタイプは主に野生動物に感染するが、時にヒトへの感染も生じることが示されている。更に近年では、大規模な分子系統解析によるトキソプラズマの再分類が進められている。Suら⁴¹⁾が950種の分離株を用いて解析を行った結果、トキソプラズマは新たに6種類のクレードに分類され、従来一般的であったI~III型はそれぞれ異なるクレード内部に配置されることが判明した。これらの報告が示すように、トキソプラズマの遺伝的多様性は従来我々が考えていたよりも大きいようである。

一方、現在でもアジア地域の分子疫学調査は未だ不十分な現状であり、感染の実数調査とあわせて病原性と分子系統の詳細な解析が望まれる。我が国においても、トキソプラズマ感染の正確な件数や感染経路、サブタイプについては不明な点が多く、仮に他地域に比べ強毒株が優占していた場合は公衆衛生上重大な問題である。特に我が国は欧米諸国と地理的に隔てられており、また生肉嗜好性など食習慣も欧米人とはかなり異なっているため、先行研究で用いられた遺伝子多型による病原性判定が適用可能かについても再確認が必要である。また、食肉の安全な供給のためには家畜類の感染率調査と感染経路特定が重要であり、前提となる基礎研究を含めて速やかな対策が求められる。本稿では以下にそのような解析がなされつつある一例として、トキソプラズマが問題となっ

ている沖縄での調査結果を以下に報告する。

6. 沖縄県における動物種別のトキソプラズマ感染状況

沖縄県における動物種別の抗体保有調査結果^{4,2)}を図4に示す。

(1) ブタ

沖縄県のと畜検査におけるトキソプラズマ症の措置(と殺禁止あるいは全部廃棄の措置)数は、平成9年度より増加傾向にあり、近年では年間80頭前後となっている(図1)。

措置されるブタのほとんどは、解体後の検査でトキソプラズマ症の特徴的所見である内臓リンパ節の腫脹・出血・壊死および肝臓の出血・壊死の病変で発見される(図5)。生体検査で強いチアノーゼ症状等を呈する場合

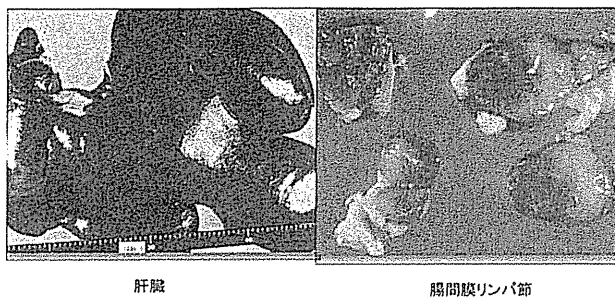


図5. 豚のトキソプラズマ症肉眼所見
沖縄県中央食肉衛生検査所提供。

はと殺禁止となるが、平成元年から22年度を合計しても数頭程度である。沖縄県では、トキソプラズマ症の発生は年間を通して認められ(図6)、集団的な発生もあれば、散発的な発生もあり、感染の状況は事例毎に様々であると考えられる。

沖縄本島、宮古島、石垣島(図7)の食肉センターに搬入された肥育ブタ(約7ヶ月齢)の抗体保有率は、沖縄本島0.9%、宮古島9.3%、石垣島0%で、宮古島は沖縄本島、石垣島に比べ有意に高く(P<0.01)、島間の差があることが報告されている^{4,2)}。沖縄本島で調査されたブタの年齢別抗体保有率は、2~3ヶ月齢の子ブタは0%、肥育ブタ0.9%、3歳以上の繁殖ブタ14.3%であり^{4,2)}、加齢に伴い増加していた。

(2) ヤギ

ヤギのと畜頭数は沖縄県が全国でもっとも多く、近年では1,300~1,500頭/年である⁵⁾。沖縄県にはヤギを食

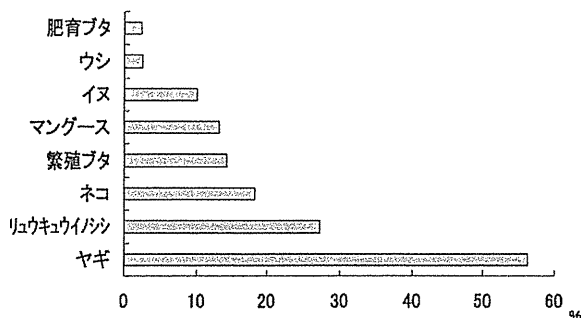


図4. 沖縄県における各種動物の抗体陽性率
抗体検査はラテックス凝集反応(榮研)により実施した。引用文献(42)より一部改変。

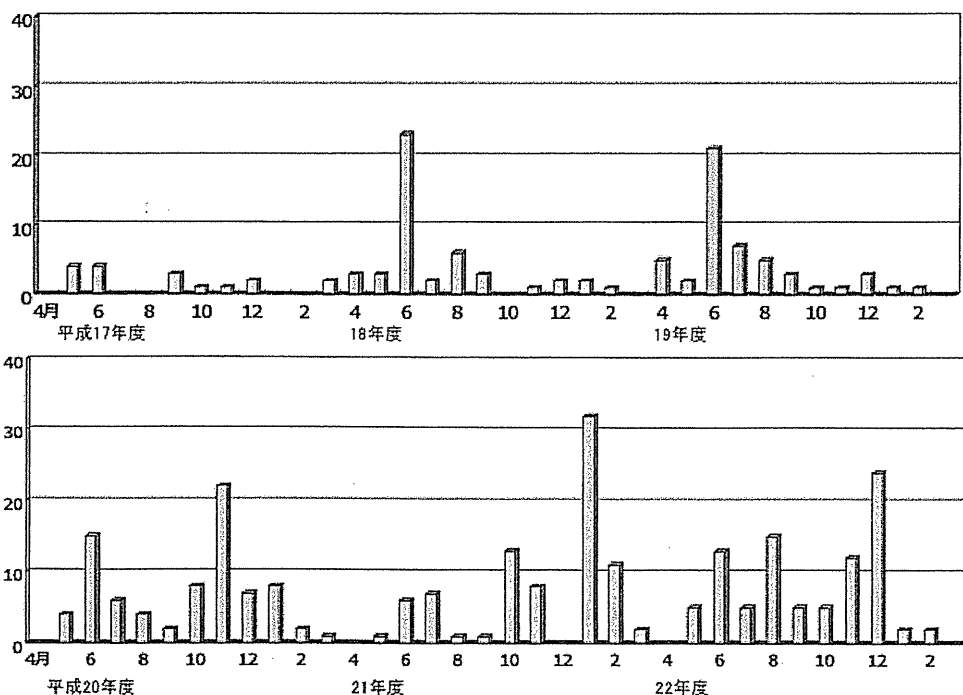


図6. 沖縄県におけるブタのトキソプラズマ症月別発生頭数(平成17~22年度)
沖縄県食肉衛生検査所事業概要より作成。

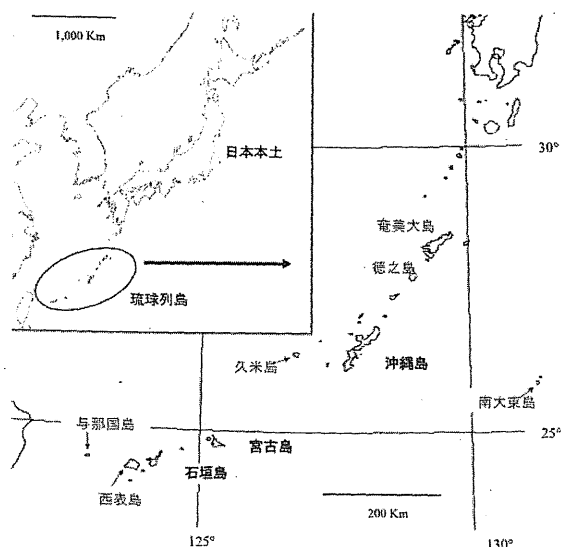


図7. 琉球列島地図

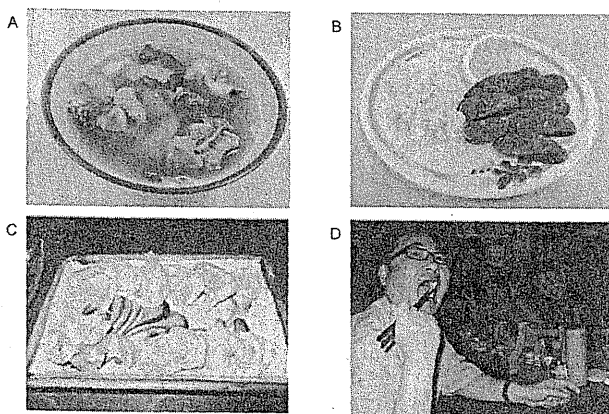


図8. 沖縄の山羊料理
 A) 山羊汁 B) 山羊のソーセージ C) 山羊刺し D) 山羊刺しを食べる著者(永宗)
 この店では山羊肉は凍結してあったそうです。ちゃんと凍結すれば大丈夫。美味しくいただきました。

する文化が根付いており、現在でも多くのヤギ料理専門店が存在する。ヤギ汁（筋肉と内臓を一緒に煮込んだ汁物）、ヤギ刺し（皮付き肉を炙り薄切りにしたもの・肉のみのもの）などが主な食べ方として親しまれている（図8）。

沖縄本島のと畜場に搬入されたヤギの抗体保有率は、1975年に56.2%、1986年に30.1%、2007年に61.5%、2008年に57.5%と報告⁴²⁻⁴⁵⁾されており、30年以上前から現代まで高い抗体陽性率で推移している。ヤギの陽性率は沖縄県で調査された動物種の中で最も高いものであった。またと畜されるヤギの月齢は24~48ヶ月齢が中心であるが、比較的若い24ヶ月齢ですでに5割以上が抗体を保有している⁴⁰⁾。島別では沖縄本島61.5%、宮古島50.6%、石垣島50.0%で、ブタとは異なり島間の差は認められていない⁴²⁾。ヤギの大半がトキソプラズマ抗体を保有しているが、と畜検査ではほとんど症状がみられない。

1977年にリンパ節（不可食部位）から分離の報告があるが⁴⁶⁾、それ以降、食肉としてのヤギ肉のリスクについて調べられたことはなく、著者らはその感染のリスクを把握するため、沖縄本島の抗体陽性および疑陽性を示したヤギの可食部位である筋肉を用いトキソプラズマ分離試験を実施した。ヤギ20頭の筋肉を4℃で18~22時間保管後、マウスによる分離（図9）を実施した。その結果、14頭分（70%）から感染力のあるトキソプラズマ（図10）が分離されたことから⁴⁷⁾、生食が感染のリスク要因となりうるということが明らかとなり、生食のリスクについて注意喚起する必要があると思われる。一方、分離に供した20頭のうち16頭の筋肉を、-20℃（家庭用冷蔵庫冷凍室で設定可能な温度）で18~22時間保管後、同様に分離を試みたところ、トキソプラズマは分離されなかった⁴⁷⁾。すなわち、これまでの報告⁹⁾と同様にトキソプラズマは冷凍に対する抵抗性は低く、食肉に際して一度凍結することが感染防止対策として有効であることが再確認された。

(3) ネコ

著者らが2011~2012年に沖縄県動物愛護管理センターに保護されたネコ136頭の抗体保有調査を実施したところ、陽性率は22.1%であった（未発表）。2006年の津田らの調査では陽性率は18.3%⁴²⁾であり、沖縄県では数年前と変わらない感染状況であることが示唆された。また、他県の報告では2~9.3%⁴⁸⁻⁵¹⁾であることから、沖縄県におけるネコの感染率は他地域と比べ高いと考え

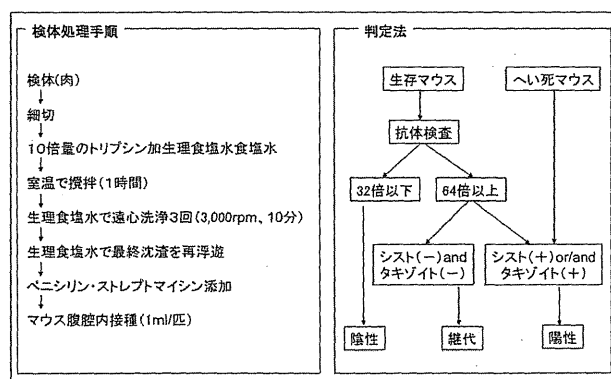


図9. マウスによるトキソプラズマ分離法と判定法

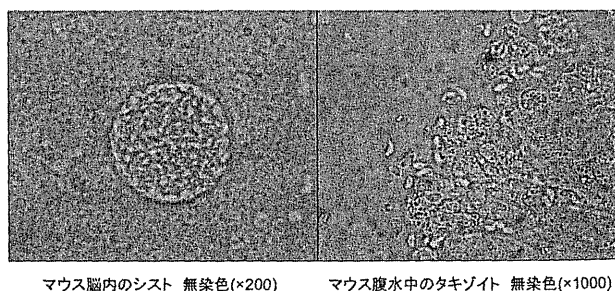


図10. ヤギから分離されたトキソプラズマ

られる。

ネコがトキソプラズマオーシストを糞便中に排出するのは初感染後の限られた期間であり、特に幼ネコの時期に多いという報告^{5,2)}もあるが、*Isospora felis*と重複感染している場合には断続的にトキソプラズマオーシストが排出されることもある^{5,3,5,4)}。筆者らは前述の抗体検査を実施したネコを、体重や抗体の有無に係わらず糞便中のオーシストを顕微鏡検査により検索したところ、形態学的に*I. felis*と思われる大型コクシジウムの排出があった個体を含め、すべてのネコでトキソプラズマオーシストの排出は認められなかった(未発表)。

(4) 小型哺乳類

沖縄本島と宮古島で捕獲(2010~2011年)された小型哺乳類(クマネズミ、ドブネズミ、リュウキュウジャコウネズミ)72匹について、ラテックス凝集試験により抗体検査を実施したところ、宮古島のクマネズミ2匹が陽性を示し、陽性率は2.8%であった。これら2個体の脳の顕微鏡検査ではシストを確認できなかったが、脳サンプルからDNAを抽出しPCRを実施したところ、トキソプラズマの特異的遺伝子(BI)が検出された(未発表)。1978年の沖縄本島でのリュウキュウジャコウネズミの赤血球凝集抑制試験による調査では抗体陽性率は52.2%で^{5,5)}、用いた検査法の違いがあるものの現在の感染率は30年前に比べ減少していると推察される。ネズミ等の感染小型哺乳類はネコへの感染源、その他の肉食動物や雑食動物の感染源になると考えられるが、現在はそれらの動物の抗体陽性率が低下していることから、沖縄県のトキソプラズマの生活環におけるこれらの動物の役割は変化している可能性が示唆された。

(5) リュウキュウイノシシ、マンガース

リュウキュウイノシシは、沖縄の固有亜種であり本州のイノシシに比べ小型である。主に沖縄本島北部地域と八重山地域(石垣島・西表島)に生息しており、狩猟の対象となっている。1997~2007年に狩猟された110頭の抗体陽性率は27.3%であった^{4,2)}。地域別では本島北部地域32.9%、八重山地域10.7%であり、地域間の差が認められている^{4,2)}。他県のイノシシでは、0~3.3%という報告^{5,6,5,7)}があり、これらに比べると高い陽性率であった。リュウキュウイノシシの陽性率は沖縄で報告されている動物の中ではヤギに続き2番目に高いことと、野生動物とはいえ食用となることから注意が必要である。

マンガースは1910年にハブ駆除の目的で沖縄県に導入されたが、現在では有害鳥獣のひとつとして捕獲されている。マンガースは山野だけでなく、住宅地近くにも生息しており、その姿を目撃するのは稀ではない。2001~2002年に捕獲されたマンガース60匹の抗体陽性率は

13.3%であった^{4,2)}。

7. トキソプラズマの遺伝子型と薬剤耐性

(1) 遺伝子型別

沖縄本島でと畜されたブタのトキソプラズマ病変様リンパ節49検体から抽出したDNAを用いたSAG2遺伝子(Surface antigen 2)をターゲットとする遺伝子型別では、I型、II型、III型がそれぞれ44.9%、46.9%、8.2%であり、I型とII型が同程度で支配的であった^{5,8)}。GRA6遺伝子(Dense granule antigen 6)による遺伝子型別ではI型44.8%、II型48.8%、III型6.9%であり^{5,9)}、SAG2遺伝子による型別と同様の結果であった。また、農場により特定の遺伝子型が検出される傾向が認められ、トキソプラズマが農場内あるいは農場のごく近い周辺環境から供給されているのではないかと推察された^{6,0)}。

また、ヤギから分離されたトキソプラズマのGRA6遺伝子による遺伝子型別結果は、I型6株(42.9%)、II型7株(50%)、III型1株(7.1%)であり^{4,7)}、その割合は、ブタでの報告^{5,8-6,0)}と酷似していた。

(2) サルファ剤耐性検出試験

国内で分離されるトキソプラズマについて、薬剤耐性に関する報告は少ない。一方、外国では主要な治療薬であるサルファ剤に耐性を示すヒト臨床分離株と、実験室内で作出された同薬剤耐性株が、いずれも*dhps*遺伝子の407番塩基の置換により耐性を獲得していることが確認されている^{6,1)}。

座喜味らは、この変異を簡易に検出できるPCR-RFLPキットを作成した。トキソプラズマ様病変を呈するブタのリンパ節からDNAを抽出し*dhps*遺伝子を増幅した。その後、制限酵素Cfr13Iによる切断パターンによりその一塩基置換の有無を調べたところ、供試した40検体全てで変異は認められなかった^{5,8)}。

ヤギから分離された14株においても同様に変異は認められなかった^{4,7)}。よって現時点では、沖縄県下に耐性型*dhps*遺伝子を有するトキソプラズマは出現していないと考えられた。サルファ剤に対する耐性は、家畜の感染予防・治療はもとより、耐性型がヒトへ感染した場合の治療等への影響も考えられることから、家畜の段階で広くモニタリングすることは非常に有用であり重要であると思われる。

8. おわりに

沖縄県では、様々な動物がトキソプラズマ抗体を保有しており、ブタ・ヤギ・ネズミからはトキソプラズマ遺

伝子が検出されている。すなわち、トキソプラズマは県下に広く浸潤しているものと推察される。なかでもヤギの抗体陽性率が高いが、それは世界各地のヤギの報告⁶²⁻⁶⁵⁾と同様である。筆者らは抗体陽性のヤギから高率にトキソプラズマを分離することにより、ヤギ肉の生食が感染のリスク要因であることを明らかにするとともに、感染予防対策としては、その冷凍保存が有効であることを確認した。

遺伝子型は分子疫学に利用され、前述の通り、国、地域、動物種により検出割合が異なることが知られている。沖縄県のブタとヤギ由来トキソプラズマの遺伝子型が酷似していたことは、共通の感染源を示唆している。その感染源や感染環の解明および対策には今後、特にネコの遺伝子型調査を進める必要があると思われる。最近、ヒトでのトキソプラズマ症が再び注目されてきている。ヒト由来株を加えた更なる分子疫学調査は、公衆衛生面での対策に有用な情報を提供するものと思われる。

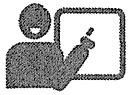
また、沖縄県における調査結果は欧米における結果とは全く異なったものであった。すなわち欧米では家畜から分離されるトキソプラズマは専らマウスに対して無毒型のⅢ型であるのに対し、沖縄県では90%以上が強毒型あるいは弱毒型の原虫であった。もちろん沖縄県における結果はある単一の遺伝子のイントロンの多系を解析したものであり、複数の遺伝子のイントロンの塩基配列を比較した欧米の解析結果をそのまま当てはめることはできない。しかし、少なくとも沖縄県は欧米とは異なった形質を持つ独特のクローンの原虫が存在しているか、あるいは欧米における高病原性の原虫が家畜にまで広く蔓延しているかのどちらかである可能性は示唆できると考えられる。沖縄県におけるより詳細な解析結果が待たれるとともに、この結果が日本、あるいはアジア地域のどの範囲にまで当てはまるのか幅広く解析する必要がある。

引用文献

- 1) Dubey, J.P. (2007) *Toxoplasma gondii*. (Weiss LM. & Kim K. ed.), pp.1-12, Academic Press, London.
- 2) Hill, D., Dubey, J.P. (2002) *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect*. 8 (10), 634-640.
- 3) Sakikawa, M., Noda, S., Hanaoka, M., Nakayama, H., Hojo, S., Kakinoki, S., Nakata, M., Yasuda, T., Ikenoue, T., Kojima, T. (2012) Anti-*Toxoplasma* Antibody Prevalence, Primary Infection Rate, and Risk Factors in a Study of Toxoplasmosis in 4,466 Pregnant Women. *Clin Vaccine Immunol*. 19, 365-367.
- 4) 独立行政法人統計センター、政府統計の総合窓口HP (<http://www.e-stat.go.jp>)
- 5) 厚生労働省、食肉検査等情報還元調査 (<http://www.mhlw.go.jp/toukei/list/113-1.html>)
- 6) Smith, D.D. (1981) The Sarcocystidae: *Sarcocystis*, *Frenkelia*, *Toxoplasma*, *Besnoitia*, *Hammondia*, and *Cystoisospora*. *J. Protozool.*, 28 (2), 262-266.
- 7) Su, C., Evans, D., Cole, R.H., Kissinger, J.C., Ajioka, J.W., Sibley, L.D. (2003) Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. *Science*. 299 (5605), 414-416.
- 8) Dubey, J.P., Kotula, A.W., Sharar, A., Andrews, C.D., Lindsay, D.S. (1990) Effect of high temperature on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. *J Parasitol*. 76 (2), 201-204.
- 9) Kotula, A.W., Dubey, J.P., Sharar, A.K., Andrews, C.D., Shen, S.K., Lindsay, D.S. (1991) Effect of freezing on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. *J. food protection* 54 (9), 687-690
- 10) Lunden, A., Uggla, A. (1992) Infectivity of *Toxoplasma gondii* in mutton following curing, smoking, freezing or microwave cooking. *Int J Food Microbiol*. 15 (3-4), 357-363.
- 11) Heukelbach, J., Meyer-Cirkel, V., Moura, R.C., Gomide, M., Queiroz, J.A., Saweljew, P., Liesenfeld, O. (2007) Waterborne toxoplasmosis, northeastern Brazil. *Emerg Infect Dis* 13 (2), 287-289.
- 12) Bowie, W.R., King, A.S., Werker, D.H., Isaac-Renton, J.L., Bell, A., Eng, S.B. and Marion, S.A. (1997) Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. *Lancet* 350, 173-177.
- 13) Benenson, M.W., Takafuji, E.T., Lemon, S.M., Greenup, R.L., Sulzer, A.J. (1982) Oocyst-transmitted toxoplasmosis associated with ingestion of contaminated water. *N Engl J Med*. 307 (11), 666-669.
- 14) Frenkel, J.K., Dubey, J.P. (1973) Effects of freezing on the viability of *toxoplasma* oocysts. *J Parasitol*. 59 (3), 587-588.
- 15) Dubey, J.P. (2004) Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. *Vet Parasitol*. 126 (1-2), 57-72.
- 16) Dumètre, A., Darde, M.L. (2003) How to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples? *FEMS Microbiol Rev*. 27 (5), 651-661.
- 17) Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Lappin, M.R. (2009) Toxoplasmosis and other intestinal coccidial infections in cats and dogs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 39 (6), 1009-1034, v.
- 18) Wainwright, K.E., Lagunas-Solar, M., Miller, M.A., Barr, B.C., Gardner, I.A., Pina, C., Melli, A.C., Packham, A.E., Zeng, N., Truong, T., Conrad, P.A. (2007) Physical inactivation of *Toxoplasma gondii* oocysts in water. *Appl Environ Microbiol*. 73 (17), 5663-5666.
- 19) Dubey, J.P., Thayer, D.W., Speer, C.A., Shen, S.K. (1998) Effect of gamma irradiation on unsporulated and sporulated *Toxoplasma gondii* oocysts. *Int J Parasitol*. 28 (3), 369-375.
- 20) Kimball, A.C., Kean, B.H., Fuchs, F. (1974) Toxoplasmosis: Risk variations in New York City obstetric patients. *Am. J. of Obstetrics and Gynecology* 119, 208-214.

- 21) Dubey, J.P., Beattie, C.P. (1988) *Toxoplasmosis of animals and man*. CRC Press Boca Raton, Florida, 220p.
- 22) Dae-Whan, S., Dong-Yeub, C., Quan J.H., Guang-Ho, C., Young-Ha, L. (2009) Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* Infection and Characteristics of Seropositive Patients in General Hospitals in Daejeon, Korea *Korean J Parasitol.* 47 (2), 125–130.
- 23) 韓国国立獣医科学検疫院 (2010) 動物保護に対する国民意識調査報告書
- 24) 一般社団法人ペットフード協会 HP (<http://www.petfood.or.jp/topics/1003.shtml>)
- 25) Dubey, J.P. 2007. The history and life cycle of *toxoplasma gondii*. (Weiss LM. & Kim K. ed.), pp.1–17, Academic Press, London.
- 26) Dubey, J.P., Hill, D.E., Jones, J.L., Hightower, A.W., Kirkland, E., Roberts, J.M., Marcet, P.L., Lehmann, T., Vianna, M.C., Miska, K., Sreekumar, C., Kwok, O.C., Shen, S.K., Gamble, H.R. (2005) Prevalence of Viable *Toxoplasma gondii* in Beef, Chicken, and Pork From Retail Meat Stores in the United States: Risk Assessment to Consumers. *J. Parasitol.* 91, 1082–1093
- 27) Nicolle, C., Manceaux, L. (1908) Sur une infection a corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *C R Acad Sci* 147, 736.
- 28) Sibley, L.D., Boothroyd, J.C. (1992) Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature.* 359 (6390), 82–85.
- 29) Howe, D.K., Sibley, L.D. (1995) *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis.* 172 (6), 1561–1566.
- 30) Khan, A., Fux, B., Su, C., Dubey, J.P., Darde, M.L., Ajioka, J.W., Rosenthal, B.M., Sibley, L.D. (2007) Recent Transcontinental Sweep of *Toxoplasma gondii* Driven by a single Monomorphic Chromosome. *PNAS* 104 (37), 14872–14877
- 31) Dardé, M.L., Ajzenberg, D., Smith, J. (2007) *Toxoplasma gondii*. (Weiss LM. & Kim K. ed.), pp.49-76, Academic Press, London.
- 32) Taylor, S., Barragan, A., Su, C., Fux, B., Fentress, S.J., Tang, K., Beatty, W.L., Hajj, H.E., Jerome, M., Behnke, M.S., White, M., Wootton, J.C., Sibley, L.D. (2006) A secreted serine-threonine kinase determines virulence in the eukaryotic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Science.* 314 (5806), 1776–1780.
- 33) Saeij, J.P., Boyle, J.P., Collier, S., Taylor, S., Sibley, L.D., Brooke-Powell, E.T., Ajioka, J.W., Boothroyd, J.C. (2006) Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis. *Science.* 314 (5806), 1780–1783.
- 34) Behnke, M.S., Khan, A., Wootton, J.C., Dubey, J.P., Tang, K., Sibley, L.D. (2011) Virulence differences in *Toxoplasma* mediated by amplification of a family of polymorphic pseudokinases. *PNAS* 108 (23), 9631–9636.
- 35) Butcher, B.A., Kim, L., Panopoulos, A.D., Watowich, S.S., Murray, P.J., Denkers, E.Y. (2005) IL-10-independent STAT3 activation by *Toxoplasma gondii* mediates suppression of IL-12 and TNF-alpha in host macrophages. *J Immunol.* 174 (6), 3148–3152.
- 36) Pollard, A.M., Knoll, L.J., Mordue, D.G. (2009) Epub 2009 Sep 9. The role of specific *Toxoplasma gondii* molecules in manipulation of innate immunity. *Trends Parasitol.* 25 (11), 491–494.
- 37) Yamamoto, M., Okuyama, M., Ma, J.S., Kimura, T., Kamiyama, N., Saiga, H., Ohshima, J., Sasai, M., Kayama, H., Okamoto, T., Huang, D.C., Soldati-Favre, D., Horie, K., Takeda, J., Takeda, K. (2012) A Cluster of Interferon- γ -Inducible p65 GTPases Plays a Critical Role in Host Defense against *Toxoplasma gondii*. *Immunity.* In press.
- 38) Yamamoto, M., Ma, J.S., Mueller, C., Kamiyama, N., Saiga, H., Kubo, E., Kimura, T., Okamoto, T., Megumi, Okuyama, M., Kayama, H., Nagamune, K., Takashima, S., Matsuura, Y., Soldati-Favre, D., Takeda, K. (2011) ATF6 β is a host cellular target of the *Toxoplasma* virulence factor ROP18. *J. Exp. Med.* 208, 1533–1546
- 39) Fentress, S.J., Behnke, M.S., Dunay, I.R., Mashayekhi, M., Rommereim, L.M., Fox, B.A., Bzik, D.J., Taylor, G.A., Turk, B.E., Lichti, C.F., Townsend, R.R., Qiu, W., Hui, R., Beatty, W.L., Sibley, L.D. (2010) Phosphorylation of immunity-related GTPases by a *Toxoplasma gondii*-secreted kinase promotes macrophage survival and virulence. *Cell Host Microbe.* 8 (6), 484–495.
- 40) Khan, A., Dubey, J.P., Su, C., Ajioka, J.W., Rosenthal, B.M., Sibley, L.D. (2011) Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. *Int J Parasitol.* 41 (6), 645–655.
- 41) Su, C., Khan, A., Zhou, P., Majumdar, D., Ajzenberg, D., Dardé, M.L., Zhu, X.Q., Ajioka, J.W., Rosenthal, B.M., Dubey, J.P., Sibley, L.D. (2012) Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. *PNAS.* 109 (15), 5844–5849.
- 42) 津田彩子, 喜屋武向子, 平良勝也, 中村正治 (2007) 沖縄県の家畜・野生動物等におけるトキソプラズマ抗体保有調査. 沖縄県獣医師会年報, p15–16.
- 43) 屋比久進, 大城章信, 名幸方光, 山本孝雄, 比嘉次郎 (1975) 北部食肉センターに搬入される豚, 牛, 山羊のトキソプラズマ HA 抗体調査成績. 沖縄県獣医師会年報, p61.
- 44) 与那原良克, 安里 学 (1986) 山羊のトキソプラズマ抗体調査. 沖縄県中央・北部食肉衛生検査所事業概要, 59–61.
- 45) 安座間夏紀, 津田彩子, 平良雅克, 仁平美咲, 小田英治 (2008) 山羊のトキソプラズマ抗体と飼育環境. 沖縄県中央・北部食肉衛生検査所事業概要, p52.
- 46) 天久勇市, 渡口政司 (1977) 沖縄県内 I と畜場において山羊より分離したトキソプラズマについて. 沖縄県中央・北部食肉衛生検査所事業概要, p61–63.
- 47) Kyan, H., Taira, M., Yamamoto, A., Inaba, C., Zakimi, S. (2012) Isolation and Characterization of *Toxoplasma gondii* Genotypes from Goats at an Abattoir in

- Okinawa. Japan. *J Infect Dis.* 65, 167–170.
- 48) 森 芳紀, 河原泰伸, 油井香織, 前野直弘, 小山雅也, 斉藤利和, 黒崎嘉子, 山本徳栄, 近真理奈, 増田純一郎, 青木敦子, 森嶋康之, 川中正憲 (2011) 埼玉県内全域におけるイヌ, ネコに関する寄生虫類の保有状況 (<http://www.pref.saitama.lg.jp/uploaded/attachment/484575.pdf>)
- 49) 愛媛県動物愛護センター (2008) トキソプラズマの抗体保有調査結果について (<http://www.pref.ehime.jp/040hokenhukushi/250doubutsuaigo/00004415040126/toxoplasma.htm>)
- 50) 神奈川県動物保護センター事業概要 (2011) (http://www.pref.kanagawa.jp/uploaded/life/420362_649550_misc.pdf)
- 51) 山口県環境生活部生活衛生課. (2011) 平成23年度動物由来感染症予防体制整備事業報告書, p38.
- 52) 松井利博, 森井 勤, 飯島利彦, 小林富美恵, 藤野隆志 (1986) 東京都多摩地区の仔ネコと仔イヌにおけるコクシジウムのオーシストの保有状況. 杏林医学会誌, 17 (1), 19–23.
- 53) Dubey, J.P. (1976) Reshedding of *Toxoplasma* oocysts by chronically infected cats. *Nature* 262, 213–214.
- 54) 及川 弘, 塩田恒三. (1992) イヌ・ネコの寄生虫学実践入門. 山水書房. P86–96.
- 55) Kinjo, T., Miyagi, N. (1978) Prevalence of *Toxoplasma gondii* Antibody in House Shrews (*Suncus murinus riukiuanus*) in Okinawa. *Sci, Bull. Coll. Agr. Univ. Ryukyus.* 25, 389–398.
- 56) 小俣吉孝, 村田浩一, 伊藤郁夫, 石黒直隆 (2005) 四国の野生イノシシにおける抗トキソプラズマ抗体保有状況. Japanese society of Zoo and Wildlife Medicine, 10 (2), 99–102.
- 57) 千葉県南部家畜保健衛生所事業実績書 (2009), p29.
- 58) Zakimi, S., Kyan, H., Oshiro, M., Sugimoto, C., Fujisaki, K. (2006) PCR-based Discrimination of *Toxoplasma gondii* from Pigs at an Abattoir in Okinawa, Japan. *J. Vet. Med Sci.* 68 (4), 401–404.
- 59) Zakimi, S., Kyan, H., Oshiro, M., Sugimoto, C., Xuenan, X., Fujisaki, K. (2006) Genetic Characterization of *GRA6* Genes from *Toxoplasma gondii* from Pigs in Okinawa, Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, 68 (10), 1105–1107.
- 60) 座喜味聡, 大城 守, 喜屋武向子 (2006) 豚由来 *Toxoplasma gondii* の遺伝子型. 沖縄県獣医師会年報, 47–50.
- 61) Aspinall, T.V., Joynson, D.H., Guy, E., Hyde, J.E., Sims, P.F. (2002) The Molecular Basis of Sulfonamide Resistance in *Toxoplasma gondii* and Implications for the Clinical Management of Toxoplasmosis. *J. Infect Dis.* 185 (11), 1637–1643.
- 62) Tizard, I.R., Harmeson, J., Lai, C.H. (1978) The Prevalence of Serum Antibodies to *Toxoplasma gondii* in Ontario Mammals. *Can. J. comp. Med.* 42 (2), 177–183.
- 63) Prelezov, P., Koinarski, V., Georgieva, D. (2008) Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* Infection Among Sheep and Goats in the Stara Zagora Region. *Bulgarian J. Vet Med.* 11 (2), 113–119.
- 64) Bartova, E., Sedlak, K. (2012) *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* antibodies in goats in the Czech Republic. *Veterinarni Medicina.* 57 (3), 111–114.
- 65) Al-Mufarrej, S.I., Hussein, M.F., Aljumaah, R.S., Gar EINabi, A.R. (2011) Toxoplasmosis in Goats in Riyadh, Saudi Arabia. *J. Animal Vet. Ad.* 10 (21), 2779–2782.



感染症の話

*本記事は、国立感染症研究所ホームページ(<http://www.nih.go.jp/hiid/ja/>)に掲載されている各疾患の説明「〇〇〇とは」を掲載しています。

◆トキソプラズマ症

トキソプラズマ症は、トキソプラズマ(*Toxoplasma gondii*)というアピコンプレクサに属する一属一種の寄生性原生生物(原虫)により起こされる感染症である。トキソプラズマはほぼ全ての温血脊椎動物(哺乳類・鳥類)に感染能を持つ。一度感染すると終生免疫が継続するが、感染率は国・地域・年齢によって異なる。食肉習慣やネコの抗体保有率、衛生状態などが複雑に関連すると考えられる。ブラジル、フランスなどで感染率が高い¹²⁾。世界的に見ると全人類の1/3以上(数十億人)が感染しているとされるなど非常に広く蔓延していることが知られている。健常者が感染した場合は、免疫系の働きにより臨床症状は顕在化しないか軽度の急性感染症状を経過した後で、生涯にわたり保虫者となる。しかし、HIV感染患者などの免疫不全者には重篤な症状を引き起こすため、十分な注意が必要である。また、妊娠中の女性が感染することにより起こる先天性トキソプラズマ症は、死産および自然流産だけではなく児に精神遅滞、視力障害、脳性麻痺など重篤な症状をもたらすことがある。

病原体

トキソプラズマは幅 $3\mu\text{m}$ 、長さ $5\text{--}7\mu\text{m}$ の半円～三日月形をした原虫である(図1)。細胞内寄生性であり、環境中で単独では増殖しない。トキソプラズマの生活環は終宿主内での有性生殖と中間宿主内での無性生殖のステージからなる(図2)。有性生殖はネコ科動物の腸管上皮内でのみ成立するが、無性生殖はヒトや家畜など全ての温血動物で可能である。

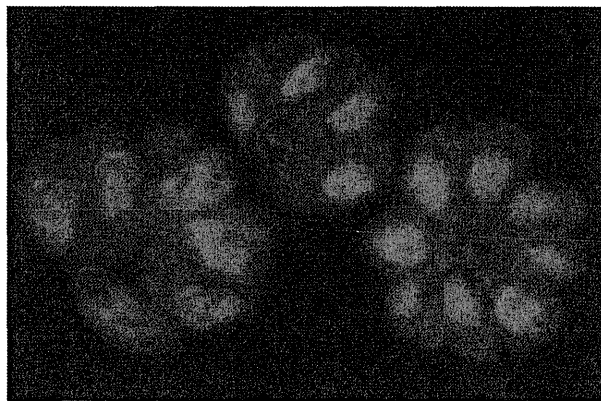


図1. トキソプラズマ

GFPを発現しているトキソプラズマ原虫。トキソプラズマは宿主細胞内でエンドダイオジェニーとよばれる独特の2分裂を繰り返し、図のように花びら状に増殖する。

中間宿主への感染は、他の中間宿主組織シストまたは終宿主であるネコ科動物のオーシストを経口摂取することによる。摂取されたトキソプラズマは、消化管壁から中間宿主の細胞内に侵入し、エンドダイオジェニー(内生2分裂)とよばれる特

徴的な2分裂を行い活発に増殖する。急性感染期に宿主が妊娠中であれば原虫が胎盤を通過して胎児に移行する。宿主側の免疫応答が開始されると、トキソプラズマは中枢神経系や筋肉内で組織シストと呼ばれる構造をとる。組織シストは安定な壁に覆われているため、トキソプラズマは免疫系の攻撃を受けずに生存を続ける。組織シスト内部での原虫増殖は緩やかであり、この時期の原虫をブラディゾイト(緩増虫体)と呼ぶ。ヒトを始めとする中間宿主が感染中間宿主を摂食することに伴い組織シストを経口摂取するとトキソプラズマは新たな宿主内で同様に増殖を開始する。

終宿主であるネコ科動物が感染中間宿主を捕食すると、組織内に存在する組織シストからトキソプラズマは遊離して腸管上皮に侵入する。原虫は数回の無性生殖を行った後、有性生殖

により雌性、雄性配偶子を形成する。両者は腸管内部で融合し、未成熟オーシストとして糞便などととも体外に放出される。未成熟オーシストは一定時間中に分裂し、一つのオーシストの中に8個の虫体が含まれた成熟オーシストとなる。

以上のように、トキソプラズマは他の多くの寄生原虫と同様に、生活史に中間宿主と終宿主の両方を必要とする。一方でトキソプラズマでは、中間宿主-中間宿主の感染が成立するという点が大きな特徴となっており、この形質が本原虫の急速な拡散、遺伝的均一性の増加をもたらしたと考えられている。

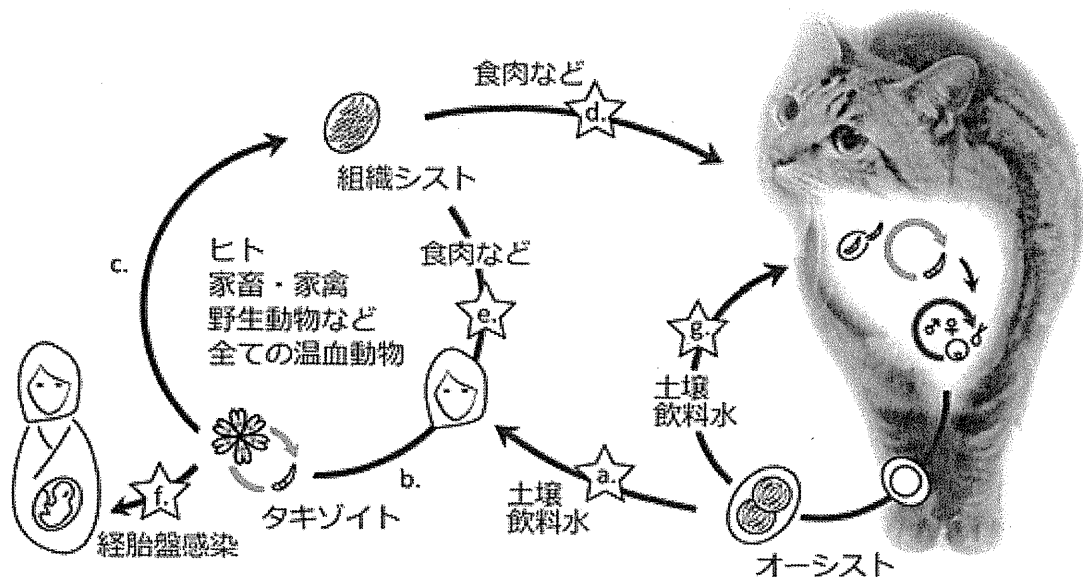


図2. トキソプラズマの生活環

筑波大学大学院松原立真氏提供。☆は新たな宿主に伝播可能な経路を示す。a) 感染はネコ科動物から排出されたオーシストを経口摂取することで生じる。b) オーシストは体内に侵入し、タキゾイトとして活発に増殖する。c) 免疫系の活性化に伴い、抵抗性のある組織シストを形成して内部でブラディゾイトに分化する。d) 中間宿主を捕食することで、組織シストがネコ科動物に取り込まれると腸管内で有性生殖が起きる。e) 組織シストは中間宿主に摂取されると新たな宿主内で再びタキゾイトとなり増殖する。f) 妊娠中に初感染すると、経胎盤感染により胎児に先天性トキソプラズマ症を引き起こす。g) 伝播は終宿主であるネコ科動物同士でも可能である。青矢印は無性生殖、赤矢印は有性生殖を示す。

ヒトへの感染

トキソプラズマのヒトに対する感染は、加熱の不十分な食肉に含まれる組織シスト、あるいはネコ糞便に含まれるオーシストの経口的な摂取により生じる。眼瞼結膜からも感染するが、空気感染、経皮感染はしない。

日本では主な感染源として従来豚肉が重要視されてきた。ブタのトキソプラズマ症の報告については少なくなってきたものの、依然として報告例があり、特に沖縄県においてはむしろ発生数に増加傾向が見られ、注意が必要である³⁾。沖縄県においてブタのトキソプラズマ症は、

と畜検査における全部廃棄対象疾病の中でもいまだ上位を占めている。ブタに限らずトキソプラズマは全ての温血動物に感染可能であるため、魚介類を除き、哺乳類である鯨を含めた獣肉や鳥肉の生食や加熱不十分は常に感染のリスクを伴う。妊婦もしくはその可能性のある方は、肉の生食は控えるとともに、肉を調理する際には、中心部まで十分に加熱することやまな板を肉用とその他用に分けるなどの対応が必要である。なお、食肉中のシストの不活化には、中心が67°Cになるまでの加熱⁴⁾、あるいは中心が-12°Cになるまでの凍結⁵⁾が有効であるとされる。電子レンジによる加熱では内部温度の十分な上昇が得られないため必ずしも確実であるとはいえない⁶⁾。なお冷蔵処理では原虫の感染能を排除できないため注意が必要である。

食肉以外にも、近年は水や土壌由来の感染事例が散見され、特に水系伝播ではアウトブレイクが報告されるなど、環境からの感染リスクも無視出来ないものとなっている⁷⁾。環境からのトキソプラズマ感染は、終宿主であるネコの糞便に含まれるオーシストにより引き起こされる。オーシストは-20°Cで1ヶ月程度生存可能であることが示され¹⁰⁾、また次亜塩素酸やエタノールを含む多くの消毒剤が無効であるため注意が必要である。ガーデニングやすな場など土壌との接触、感染したネコとの接触、井戸水、わき水等の無処理の生水の摂取は感染の確率を上昇させる。感染したネコがオーシストを排出するのは、初感染後数日からおよそ2週間までの間のみであり、また、排出されたオーシストが成熟し感染能を獲得するまでに少なくとも24時間を要するとされるため、糞便の処理を毎日(24時間以内で)実施することにより感染力のあるオーシストとの接触を回避できる(このときトイレ容器は熱湯で消毒することが望ましい)。よって、妊娠を理由に飼いネコを処分する必要はないが、猫の糞便の処理は妊婦以外の者が行うことが望ましい。

臨床症状・診断

トキソプラズマの臨床症状は感染時期や感染者の状況に大きく左右される。そこで病型ごとに分けて症状を記載する。また診断は臨床症状と血清診断、遺伝子検査が主なものとなる。最近発表された1997年7月から2004年12月までの約7年半にわたる宮崎県での計4,466例の妊婦の抗体検査による調査結果では、妊婦の抗体保有率は全体で10.3%、35歳以下の若年者で9.6%であることが報告されており¹¹⁾、妊娠中の女性や免疫不全者は、感染予防に留意が必要である。

1. 先天性トキソプラズマ症

妊娠中の女性がトキソプラズマに初感染した場合、トキソプラズマが胎盤を通過して胎児に垂直感染する可能性がある。胎児への感染率は妊娠末期になるほど上がるが、胎内感染が起こった場合の重症度は妊娠初期ほど高い¹²⁾。胎内感染の転帰は、不顕性から流死産まで様々であり、顕性感染の場合でもその重症度は様々である。先天性トキソプラズマ症では、水頭症、脈絡膜炎による視力障害、脳内石灰化、精神運動機能障害が4大徴候として知られている。その他、リンパ節腫脹、肝機能障害、黄疸、貧血、血小板減少等が見られることもある。不顕性感染となった場合も、眼病変などはおおよそ思春期頃まで遅発性の発症のリスクがあるとされている。

妊婦の感染を疑う場合、妊婦の抗体検査(IHA法、LA法など)、IgM抗体検査(ELISA法など)やIgGアビディティ(avidity, 結合力)検査で、胎児の感染リスクを評価する。高リスクの場合は、羊水から原虫遺伝子をPCR法により検出することにより胎児感染診断を試みることもあるが、確実な方法ではない。出生後の診断のためには移行抗体消失後に児の血清検査を行

う。IgGアビディティ(avidity, 結合力)検査やPCR法による検査は未承認であり、今後の確立が求められる。

2 後天性トキソプラズマ症

(1) 急性感染

健康成人または小児が後天的にトキソプラズマに感染した場合、多くは無症状で経過する。発症した場合、発熱や倦怠感やリンパ節腫脹などの非特異的な一過性の症状が起こり、時に伝染性単核症様の病態を呈する。通常、特異的IgGとIgMの抗体価測定により血清学的な診断を行う。

(2) 眼トキソプラズマ症

眼に孤発して発症する。先天性感染の再活性化で生じることが多く、後天性感染で発症することは稀である。症状としては、視力障害、眼痛、羞明などが見られる。

(3) 日和見トキソプラズマ感染症

免疫不全者では、体内に潜伏感染していたトキソプラズマが再活性化し、脳炎や肺炎や脈絡網膜炎などの重篤な症状を引き起こす。トキソプラズマ脳炎の臨床症状としては意識障害、けいれん、視力障害などがあげられる。また、頭部造影CTやMRIで、病変はリング状に造影される腫瘤として認められる。

トキソプラズマ脳炎の診断は、PCRによる髄液からの原虫遺伝子の検出によるが、感度が低く、陰性であっても感染は否定されない。

治療

2012年11月現在、海外で使用されるピリメタミンやスルファジアジンなどは日本では未承認となっている。また、スピラマイシンの類薬であるアセチルスピラマイシンなどの国内承認薬もトキソプラズマ症が適応症となっていない。そのため、適応外使用や個人輸入により治療が行われており、今後国内での開発が期待される。海外での実際は文献12に詳しい。

疫学

1. トキソプラズマ症の疫学

前述の宮崎県における妊婦の抗体検査による調査結果では、0.25%が妊娠期間中にトキソプラズマ抗体が陰性から陽性へと陽転しており、妊娠中のトキソプラズマ感染が推定された¹¹⁾。先天性トキソプラズマ症の発生が疑われるが、前述の通り、不顕性遅発性の先天性感染は妊娠中や出生時の画像や肉眼所見による診断が困難であり、検査の確立やフォローが課題となっている。

また、トキソプラズマはHIV感染者に致死的な脳炎を引き起こして患者を死に至らしめることが知られており、アメリカでの統計によるとHIV感染患者の18-25%がトキソプラズマ脳炎を発症することが報告されており¹³⁾、本症で死亡するHIV感染者は米国で全患者の10%、欧州では30%に及ぶとされる¹⁴⁾。また、CD4細胞数が $100/\text{mm}^3$ 以下に低下したHIV感染者の約30%にトキソプラズマの再燃が見られたとの報告もある。本邦においては、2011年までの日本国籍AIDS患者累計(5,153件)において、トキソプラズマ脳症は94例(1.8%)報告されている¹⁵⁾。

2 トキソプラズマ原虫の分子疫学

トキソプラズマは遺伝的な多様性が非常に低いことが知られている。本原虫の分子疫学は欧州と北米地域で詳細に調査されており、これらの地域に流布するトキソプラズマは3種のクローン(I~III型)にほぼ限定されることが報告されている¹⁶⁾。これらのクローンは約1万年前に出現したと推定されており、またその時期は人類が農耕や牧畜を始めた時期とほぼ一致することから、これらの3クローンは人類の農耕や牧畜に対して何かしらの有利な形質を持っており、人類社会の周辺に適応、選択されたのではないかとの仮説が提唱されている。また、各クローンはヒトやマウスに対する病原性やその分離される場所が異なることが知られている。I型のトキソプラズマは強毒性系統であり、先天性感染などの急性感染患者から分離される。マウスのLD₁₀₀ (100%致死量)は10²、すなわち1である。II型は弱毒性系統であり、ヒトではAIDS患者など慢性感染の患者から分離され、マウスのLD₅₀は10³以上である。III型は主に家畜から分離され、マウスに対する毒性は非常に低く、基本的に無毒であることが知られている。

しかしながらこれらのトキソプラズマ分子疫学は欧米のヒトおよび家畜を対象としたものが大半であり、その他の地域や野生動物におけるトキソプラズマの分布と系統に関わる情報はほとんど明らかになっていない。事実、南米のトキソプラズマの遺伝的多様性は北米および欧州地域に比べ大きく異なっていることや¹⁷⁾、北米には主に野生動物に感染する新たな第4番目のサブタイプが存在し、ヒトへの感染源になり得ること¹⁸⁾など、最近新たな知見が次々と見出されている。このような中で日本を含むアジア地域におけるトキソプラズマの詳細な分子疫学調査はほとんど行われておらず、感染経路を含む感染の実数調査および病原性と分子系統の詳細な解析が望まれる。特に我が国は欧米諸国と地理的に隔てられており、また生肉嗜好性など食習慣も欧米人とはかなり異なっているため、欧米で用いられている遺伝子多型による病原性判定が適用可能かについても再確認が必要であるものと考えられる。

引用文献

- 1) 川名尚、小島俊行: 母子感染, 金原出版, 2011
- 2) Dubey, J.P.: The history and life cycle of *Toxoplasma gondii*. in: *Toxoplasma gondii* (Weiss, L.M. and Kim, K. ed.), Academic Press, 2007
- 3) 喜屋武尚子、松原立真、永宗喜三郎: トキソプラズマ症と沖縄県におけるトキソプラズマの流行状況について. 防菌防黴 41: 19-28, 2013
- 4) Dubey, J.P., Kotula, A.W., Sharar, A., Andrews, C.D., Lindsay, D.S.: Effect of high temperature on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. J. Parasitol. 76: 201-204, 1990
- 5) Kotula, A.W., Dubey, J.P., Sharar, A.K., Andrews, C.D., Shen, S.K., Lindsay, D.S.: Effect of freezing on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. J. Food Protection 54: 687-690, 1991
- 6) Lunden, A., Uggla, A.: Infectivity of *Toxoplasma gondii* in mutton following curing, smoking, freezing or microwave cooking. Int. J. Food Microbiol. 15: 357-363, 1992
- 7) Heukelbach, J., Meyer-Cirkel, V., Moura, R.C., Goniade, M., Queiroz, J.A., Saweljew, P., Liesenfeld, O.: Waterborne toxoplasmosis, northeastern Brazil. Emerg. Infect. Dis. 13: 287-289, 2007
- 8) Bowie, W.R., King, A.S., Werker, D.H., Isaac-Renton, J.L., Bell, A., Eng, S.B., Marion, S.A.:

- Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. *Lancet* 350: 173-177, 1997
- 9) Benenson, M.W., Takafuji, E.T., Lemon, S.M., Greenup, R.L., Sulzer, A.J.: Oocyst-transmitted toxoplasmosis associated with ingestion of contaminated water. *New Engl. J. Med.* 307: 666-669, 1982
 - 10) Frenkel, J.K., Dubey, J.P.: Effects of freezing on the viability of toxoplasma oocysts. *J. Parasitol.* 59: 587-588, 1973
 - 11) Sakikawa, M., Noda, S., Hanaoka, M., Nakayama, H., Hojo, S., Kakinoki, S., Nakata, M., Yasuda, T., Ikenoue, T., Kojima, T.: Anti-Toxoplasma Antibody Prevalence, Primary Infection Rate, and Risk Factors in a Study of Toxoplasmosis in 4,466 Pregnant Women. *Clin. Vaccine Immunol.* 19: 365-367, 2012
 - 12) Montoya, J.G., Liesenfeld, O.: Toxoplasmosis. *Lancet* 363: 1965-1976, 2004
 - 13) Kasper, L.H., Buzoni-Gatel, D.: Some opportunistic parasitic infections in AIDS: candidiasis, pneumocystosis, cryptosporidiosis, toxoplasmosis. *Parasitol. Today* 14: 150-156, 1998
 - 14) Hill, D., Dubey, J.P.: *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin. Microbiol. Infect.* 8: 634-640, 2002
 - 15) 平成23年エイズ発生動向年報 http://api-net.jfap.or.jp/status/2011/11nenpo/hyo_11.pdf
 - 16) Howe, D.K., Sibley, L.D.: *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J. Infect. Dis.* 172: 1561-1566, 1995
 - 17) Khan, A., Fux, B., Su, C., Dubey, J.P., Darde, M.L., Ajioka, J.W., Rosenthal, B.M., Sibley, L.D.: Recent Transcontinental Sweep of *Toxoplasma gondii* Driven by a single Monomorphic Chromosome. *PNAS* 104: 14872-14877, 2007
 - 18) Khan, A., Dubey, J.P., Su, C., Ajioka, J.W., Rosenthal, B.M., Sibley, L.D.: Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. *Int. J. Parasitol.* 41: 645-655, 2011

トキソプラズマ感染と妊娠へのリスク

健常な成人がトキソプラズマに感染した場合、殆どが無症状、あるいは風邪に似た軽微な症状がでる程度であり問題にはなりません。しかし女性が妊娠中に初めて感染すると、胎児も感染することがあり流産や水頭症など先天性障害を引き起こす可能性があります。妊娠前のブライダルチェックや、妊娠後の健診などでトキソプラズマ感染の有無をチェックしましょう。

→詳しくは感染研HP(<http://www.nih.go.jp/niid/ja/diseases/ta/toxoplasma/2211-para/3010-toxo-pregnant.html>)をご覧ください。

(国立感染症研究所・寄生動物部 永宗喜三郎)

Critical roles of the mitochondrial complex II in oocyst formation of rodent malaria parasite *Plasmodium berghei*

Received May 1, 2012; accepted May 16, 2012; published online May 23, 2012

Akina Hino^{1,*}, Makoto Hirai^{2,3,*†}, Takeshi Q. Tanaka^{1,‡}, Yoh-ichi Watanabe¹, Hiroyuki Matsuoka³ and Kiyoshi Kita^{1,§}

¹Department of Biomedical Chemistry, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan; ²Department of Parasitology, Graduate School of Medicine, Gunma University, 3-39-22 Maebashi City, Gunma 371-8511, Japan and ³Division of Medical Zoology, Department of Infection and Immunity, School of Medicine, Jichi Medical University, Shimotsuke City, Tochigi 329-0498, Japan

*These authors contributed equally to this study.

†Makoto Hirai, Department of Parasitology, Graduate School of Medicine, Gunma University, 3-39-22 Maebashi City, Gunma 371-8511, Japan. Tel: +81-27-220-8023, Fax: +81-27-220-8025, email: makotohirai@gunma-u.ac.jp

‡Present address: Laboratory of Malaria and Vector Research, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Rockville, MD 20892, USA.

§Kiyoshi Kita, Department of Biomedical Chemistry, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan. Tel: +81-3-5841-3528, Fax: +81-3-5841-3444, email: kitak@m.u-tokyo.ac.jp

It is generally accepted that the mitochondria play central roles in energy production of most eukaryotes. In contrast, it has been thought that *Plasmodium* spp., the causative agent of malaria, rely mainly on cytosolic glycolysis but not mitochondrial oxidative phosphorylation for energy production during blood stages. However, *Plasmodium* spp. possesses all genes necessary for the tricarboxylic acid (TCA) cycle and most of the genes for electron transport chain (ETC) enzymes. Therefore, it remains elusive whether oxidative phosphorylation is essential for the parasite survival. To elucidate the role of TCA metabolism and ETC in malaria parasites, we deleted the gene for flavoprotein (Fp) subunit, *Pbsdha*, one of four components of complex II, a catalytic subunit for succinate dehydrogenase activity. The *Pbsdha*(-) parasite grew normally at blood stages in mouse. In contrast, ookinete formation of *Pbsdha*(-) parasites in the mosquito stage was severely impaired. Finally, *Pbsdha*(-) ookinetes failed in oocyst formation, leading to complete malaria transmission blockade. These results suggest that malaria parasite may switch the energy metabolism from glycolysis to oxidative phosphorylation to adapt to the insect vector where glucose is not readily available for ATP production.

Keywords: complex II/malaria parasite/mitochondria/*Plasmodium berghei*.

Abbreviations: AP, alkaline phosphatase; BCIP, 5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphatase *p*-toluidine salt; Cyt *b*, cytochrome *b*; Cyt *c*, cytochrome *c*;

DHOD, dihydroorotate dehydrogenase; ETC, electron transport chain; FAD, flavin adenine dinucleotide; FBS, fetal bovine serum; Fp, flavoprotein; FRD, fumarate reductase; HRP, horse radish peroxidase; Ip, iron–sulphur cluster protein; MQO, malate–quinone oxidoreductase; MV, methylviologen; NAD, nicotinamide adenine dinucleotide; NBT, nitroblue tetrazolium chloride; NDH2, type2 NADH–ubiquinone oxidoreductase; Q, quinone; QFR, quinol–fumarate reductase; SDH, succinate dehydrogenase; SQR, succinate–ubiquinone reductase; TBS, tris buffered saline; TCA, tricarboxylic acid.

Malaria is one of the most serious diseases in the world. It causes one million infant deaths and over 500 million clinical cases annually, of which 85% is in sub-Saharan Africa (1). The drugs such as pyrimethamine/sulphadoxine, chloroquine or artesunate are the common treatment against malaria, but there is the emergence and spread of drug-resistant malaria parasites throughout the world (2), resulting in an urgent need for new drug.

The mitochondrion of *Plasmodium* species is obvious target of antimalarial drugs, but the physiological importance of this organelle is poorly understood. In other eukaryotes, pyruvate dehydrogenase is localized in mitochondria where it links the glycolysis metabolic pathway to TCA cycle, while it is localized in the apicoplast in *P. falciparum* (3). Therefore, it has been unclear until recently how glycolysis metabolism is connected to the tricarboxylic acid (TCA) cycle. Blood-stage *P. falciparum* have only a single mitochondrion without crista (4). Such morphologically immature mitochondrion suggests that, unlike other eukaryotes, the blood stage *P. falciparum* relies mainly on cytoplasmic glycolysis for their energy metabolism but not on mitochondrial oxidative phosphorylation (5, 6). Beside, recent omics-based studies showed that *P. falciparum* expressed all TCA cycle enzyme genes and most ones for the electron transport chain (ETC), and that *P. falciparum* produced the intermediates of the TCA cycle (7). Moreover, the genes for TCA cycle are upregulated at mosquito stages (8). The gametocytes, precursor cells of gametes possess mitochondria with cristae (9). These data suggest that mitochondrial energy metabolism may have more crucial roles in insect stages than blood stages,

which have not been intensively investigated until recently.

The mitochondrial complex II (succinate-ubiquinone reductase: SQR) oxidizes succinate to produce fumarate as a TCA cycle member enzyme. In the anaerobic electron transfer system, complex II carries out fumarate reduction using quinol as an electron donor (quinol-fumarate reductase; QFR), which is the reverse reaction of SQR. Complex II consists of four subunits, flavoprotein (Fp), iron-sulphur cluster protein (Ip) and two small membrane anchor subunits, cytochrome *b* large (CybL) and small (CybS) subunits. The Fp with molecular mass of 70 kDa has a flavin adenine dinucleotide (FAD) covalently bound to a highly conserved histidine (His) residue. Fp and Ip form catalytic portion of the complex and this portion acts as a succinate dehydrogenase (SDH), catalyzing the oxidation of succinate by water-soluble electron acceptors such as phenazine methosulphate in SQR, while it acts as a fumarate reductase (FRD), catalyzing electron transfer from water-soluble electron donors such as reduced methylviologen (MV) to fumarate in QFR. FAD in the Fp receives the reducing equivalents from succinate and then transfers it to quinone by SQR activity where the two small membrane anchor subunits are indispensable (10). Thus, complex II functions as a link between the TCA cycle and the ETC, directly. While complex II has such critical roles in energy metabolisms, and Fp and Ip subunits genes are substantially conserved in various organisms (3, 11), two small membrane anchor subunit genes are diverse and had not been detected in the genomes of *Plasmodium* spp., suggesting that plasmoidal complex II is nonfunctional. However, recently our intensive database mining has identified putative plasmoidal anchor subunit genes (12). Moreover, biochemical studies revealed that SQR activity of complex II was detected in the mitochondrial fraction of *P. yoelii* and *P. falciparum*, and the activity was inhibited by the ubiquinone-binding site inhibitor, atopenin A5 (13–15).

In this work, we took genetic approach to understand the physiological role of the parasite complex II using *P. berghei* as a model because the whole parasite life cycle can be monitored using mosquito and mouse as hosts. We generated transgenic *P. berghei* (Pbsdha(-)) in which the Fp subunit gene (*Pbsdha*) of complex II was deleted to inactivate complex II activities. By infecting mice and mosquitoes with the Pbsdha(-) parasites, we followed phenotype of the Pbsdha(-) parasite during the whole life cycle and found that complex II is essential for oocyst formation in the mosquito.

Materials and Methods

Maintenance of mosquitoes and parasites

Anopheles stephensi (SDA 500 strain) and *P. berghei* (ANKA clone 2.34) were maintained as described previously (16). *P. berghei*-infected mosquitoes were fed on naïve mice (Balb/c), and the resulting infected mice were referred to as passage 0 (P0). The P0 blood was injected intraperitoneally to the naïve mice and the passage one (P1) mice were used in the experiments. The experiments using animals and recombinant DNA were performed under the guidelines of

the committee in Jichi University, and assigned permission no. is 08-14.

Generation of Pbsdha::AGFP parasites

The two fragments covering the 5'UTR and the first 60 amino acids (-3229 to +180 bp), and 3' UTR (1025 bp) of *Pbsdha* gene (PBANKA_051820) were amplified with primer pairs 5'UTRB4F/5'UTRB1R and 3'UTRB2F/3'UTRB3R, and *P. berghei* genomic DNA as template. The *Azami Green Fluorescent Protein* gene (*AGFP*) was amplified with the primers AzamiB1F/AzamiB2R. Each PCR fragment was cloned into *pDONRP4-PIR*, *P1-P2R* and *P2-P3R* vectors by BP clonase reaction (Invitrogen) to generate entry vectors (5'UTR/P4P1, *AGFP/P1P2* and 3'UTR/P2P3). An R4-R3 fragment (Invitrogen) was inserted into *HindIII* site of *pBS-DHFR* vector (17) to generate an acceptor plasmid (*R4R3/pBS-DHFR*). The inserts of entry vectors were transferred to the acceptor plasmid by LR reaction using the Multisite Gateway Three-Fragment Vector Construction Kit (Invitrogen). In the final plasmid (*Pbsdha::AGFP*), 5' UTR and the first 60 amino acids of *Pbsdha* were fused to the *AGFP* gene. Thus, the expression of the *AGFP* reporter gene is under the control of the *Pbsdha* gene promoter. For parasite transfection, the plasmid was digested by *BstXI*, and the linearized plasmid was integrated into the parasite genome by single crossover homologous recombination. The parasite transfection and subsequent cloning were performed as described elsewhere (18). Correct integration events in *Pbsdha::AGFP* parasites clones were confirmed by Southern blot as described later in the text. The genomic DNA (10 µg) of Wild Type (WT) and *Pbsdha::AGFP* parasites was digested with *PacI* and *HpaI*, separated by 0.8% (w/v) agarose gel and transferred to the Hybond-N+ membrane (GE healthcare). PCR fragment (F1-HindIII/R1-HindIII) was labeled with AlkPhos Direct Labeling Reagent Kit (GE Healthcare) and used as probe for hybridization. The hybridization and washing were performed by following the manufacturer's protocol.

The expression of the *AGFP* gene at each developmental stage in *Pbsdha::AGFP* parasites was investigated as follows. To prepare the parasites at blood stages, the mouse blood (1 ml) infected with *Pbsdha::AGFP* parasites was collected, mixed with 120 ml RPMI1640 containing 25% fetal bovine serum (FBS) and cultured at 37°C for 16 hr by the candle-jar method (19). The parasites synchronized to schizonts were partially purified by Nycoprep 1.077 (18) and injected intravenously into mice tail veins. At 4 hr and 33 hr after injection, the parasites were synchronized to ring and trophozoite stages, respectively. A drop of tail blood was collected at these time points, and the *AGFP* signal in rings, trophozoites, and *in vitro* cultured schizonts was observed. For the analysis of *AGFP* expression in mosquito-stage parasites, the ookinetes were prepared *in vitro* as described in 'Examination of *Pbsdha*(-) parasite development'. The mosquitoes were fed on mice carrying *Pbsdha::AGFP* parasites and dissected on day 14 and 16 after the feeding. The *AGFP* signal in the oocysts (on midguts) and sporozoites (in salivary glands) as well as *in vitro*-cultured ookinetes was observed. The parasite was stained with 10 nM of MitoTracker Orange CMTM Ros (Molecular Probes) and DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole) (Dako) to label mitochondria and nuclei, respectively. The fluorescent signal of MitoTracker, DAPI and *AGFP* was detected at 540 nm, 452 nm and 520 nm, respectively.

Targeted disruption of the Pbsdha gene

Two regions of the *Pbsdha* gene were amplified by PCR using primer pairs F1-HindIII/R1-HindIII and F2-EcoRI/R2-BamHI, and *P. berghei* genomic DNA as template. The PCR fragments were digested with respective restriction enzymes and cloned to *pBS-DHFR* to give a targeting plasmid, *pPbsdha*(-). The *pPbsdha*(-) plasmid was digested with *Clal* and *BamHI*, and the plasmid was introduced in *P. berghei* by electroporation. The correct recombination event of the clones was confirmed by diagnostic PCR using two primer sets, K1 (K1-F and R) and K2 (K2-F and R). Correct integration was also checked by Southern blot analysis as described earlier in the text. The genomic DNA of WT and *Pbsdha*(-) parasites was digested with *PacI*, and a PCR fragment (F1-HindIII/R1-HindIII) was used as probe. The contamination of WT parasites in *Pbsdha*(-) parasite clone was checked by PCR with primer set W (W-F and R). Two clones from two independent transfection experiments were isolated and analyzed further. All primer sequences are described in supplementary information.

Western blot analysis of mitochondrial fraction

The mitochondrial fractions were prepared from mouse leucocytes, *in vitro* cultured *P. falciparum*, and WT and *Pbsdha(-)* of *P. berghei* by N₂ cavitation methods (13, 14). The mitochondrial fractions of mouse liver (10 µg/lane), WT and *Pbsdha(-)* of *P. berghei* (20 µg/lane) and *P. falciparum* (10 µg/lane) were loaded onto 10% SDS polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a nitrocellulose membrane (Whatman). The membrane was blocked with SuperBlock (Pierce) and washed with TBS-T (150 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween 20, 10 mM Tris-HCl; pH 7.5). To detect the Fp subunit, the membrane was hybridized with antiserum against the *P. falciparum* Fp peptide (20) as primary antibody (1/1,000 dilution) and alkaline phosphatase (AP) conjugated anti-rabbit IgG antiserum as secondary antibody (1/10,000 dilution). The AP enzyme activity on the membrane was visualized by a chromogenic method using NBT and BCIP. To confirm the equal loading of the samples on the gel, *P. berghei* heat shock protein 70 (HSP70) was used as internal control. The same membrane used in Fp detection was rehybridized with anti-HSP70 antiserum as primary antibody (1/100 dilution) and horse radish peroxidase (HRP) conjugated anti-mouse IgG antiserum as secondary antibody (1/10,000 dilution). HRP enzyme activity was detected as chemiluminescent signal by the Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore).

Measurement of SQR activity in mitochondrial fraction

The SQR enzyme activity assay was performed at 25°C with a V-660 spectrophotometer (JASCO, Tokyo, Japan). The enzyme activity of SQR was determined as quinone-mediated succinate: 2,4-dichlorophenolindophenol (DCIP) reductase in 30 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing 10 mM potassium succinate, 100 µM ubiquinone-2 and 45 µM DCIP ($\epsilon^{600nm} = 21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) in the presence of 2 mM KCN and 0.1 µM Atpenin A5 (Alexis Biochemicals). Atpenin A5 was proven to be a novel inhibitor specific to mouse leukocytes but not parasitic SQR activity at this concentration in our previous study (13).

Examination of *Pbsdha(-)* parasite development

To assess the growth rate of the parasites in mice, the red blood cells (RBC) (10⁶) infected with either WT or *Pbsdha(-)* parasites were intravenously injected into tail vein of each of the four naïve mice. Subsequently, the tail blood was taken every 24 hr and the number of infected RBCs was counted. To investigate the male gametogenesis, the infected blood (10 µl) was added to 1 ml of fertilization medium (10% (v/v) FBS in RPMI1640 (pH 8.2)) at 21°C. The sample (10 µl) was taken at 15 min and the number of exflagellating male gametes was counted. The rest of the sample was further incubated for 16 hr and the number of ookinetes was counted. The fertilization rate was calculated by the conversion rate of female gametocytes into ookinetes.

Infectivity of *Pbsdha(-)* parasite to mosquito and transmission to mouse

The tail blood of WT- and *Pbsdha(-)*-infected mice was taken and the number of exflagellating male gametes was counted. Only the mice whose blood contained over 2 exflagellating centers per 10⁴ RBC were used for the mosquito feeding. Female mosquitoes (4–7 days old) were fed on the infected mice, and fully engorged mosquitoes were collected. Sixteen days after blood feeding, midguts and salivary glands were isolated. The number of oocysts in the midgut was counted and the presence of sporozoites in the salivary gland was examined to assess the infectivity of the parasites to mosquitoes. To investigate the transmission efficiency to mice, more than 20 mosquitoes carrying WT or *Pbsdha(-)* parasites were fed on naïve mice. The transmission of the parasites to mice was examined by checking mouse blood smears until 2 weeks after the mosquito feeding.

Results

Identification and expression analysis of *Pbsdha*

We found PBANKA_051820 being annotated as a putative Fp subunit gene of complex II in PlasmoDB, and hereafter it is referred to '*Pbsdha*'. It is known that amino acid sequences of Fp are highly conserved

among various organisms. As such, the amino acid sequence of *P. berghei* Fp (PbFp) shows high identity to those of other organisms including *P. falciparum* Fp, which we have reported previously (11). Especially, histidine in the FAD binding site in the catalytic domain is completely conserved in PbFp (Fig. 1).

To investigate *Pbsdha* gene expression during parasite life cycle, we generated *Pbsdha::AGFP* parasites as a reporter line, in which *AGFP* reporter gene expression is regulated by the endogenous *Pbsdha* gene promoter (Fig. 2A). It is reported that the first 60 amino acids of *P. falciparum* Fp (PfFp) contain a functional mitochondrial targeting signal (21) and the corresponding amino acid sequence of PbFp shows 75% identity to that of PfFp (11), suggesting the same function in the corresponding region of PbFp. To investigate the cellular localization and developmental expression of AGFP during the parasite life cycle, the first 60 amino acids of PbFp was fused to AGFP (*Pbsdha::AGFP*). The WT parasites were transfected with the *Pbsdha::AGFP* plasmid and the correct integration event in *Pbsdha::AGFP* parasite clone was confirmed by Southern blot (Fig. 2B). For the analysis of cellular localization of AGFP, the *Pbsdha::AGFP* parasites were stained with MitoTracker Orange to label the mitochondrion. As shown in Fig. 2C, AGFP signals colocalized with MitoTracker Orange signals, indicating that the N-terminal sequence of PbFp possesses a functional mitochondrial targeting signal. Next, we investigated the reporter gene expression at each developmental stage of parasites in red blood cell. AGFP signal was detected in trophozoite and schizont (Fig. 2D) but not in the ring form stage (data not shown). To investigate the AGFP expression in the parasites at mosquito stages, *Pbsdha::AGFP* parasites were fed to mosquitoes. As shown in Fig. 2E, the signal was detected in *in vitro*-cultured ookinetes, and oocysts and sporozoites in mosquitoes. These results indicate that *Pbsdha* was expressed in both blood stages and mosquito stages.

Disruption of the *Pbsdha* gene

Then, to study the *P. berghei* complex II functions, we generated *Pbsdha(-)* parasites by replacing the *Pbsdha* gene with *TgDHFR* (Fig. 3A). Two independent clones (KO-a and KO-b) were established by independent transfection experiments. The correct targeting event in each clone was confirmed by Southern blot analysis (Fig. 3B) and diagnostic PCR (Fig. 3C). Following the confirmation of *Pbsdha* gene disruption, we further checked the deletion of the PbFp protein and SQR enzyme activity in *Pbsdha(-)* parasites by Western blot and enzyme activity assay, respectively. For these experiments, we prepared the crude mitochondrial samples from WT, *Pbsdha(-)* parasites, *in vitro* cultured *P. falciparum*, and naïve mouse liver. To detect the Fp peptide by Western blot analysis, we used the anti-PfFp antiserum (20) because the amino acid sequence of PfFp shows high identity to those of PbFp (90.5%) and mice Fp (63.3%). It is thus anticipated that the antiserum may cross-react to both PbFp and mice Fp proteins. As shown in Fig. 3D, the antiserum reacted to the peptides with expected size of