

平成 25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 25年度分担報告書

実用型イムノクロマトによる国内ジアルジア感染リスクグループのジアルジア感染調査

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実用型を作製し、その反応性を確認後、国内のジアルジア感染リスクグループである HIV 陽性者ならびに海外渡航者の下痢症検体を用いて、各グループにおける検出率を調べた。検出率は両グループともに 12%前後であり、これは従来知られていた国内の同様のグループの感染率より高く、欧米諸国における感染率に近似した。IC は設備と経験を要しない検査法として、迅速診断およびジアルジア症発生の動向の正確な把握に有用であると考えられた。

A. 研究目的

前年度、これまでに開発した抗ジアルジアモノクロナル抗体を利用したイムノクロマト(以下 IC と省略)を試作し、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・固定試料が利用できる汎用性も示された。本年度は同試作 IC を改良した実用型 IC を作製し、ジアルジア感染リスクグループにおけるジアルジア感染調査を行った。

B. 研究方法

1. 試作 IC の改良

前年度試作した IC について、モノクロナル抗体 clone No. 4G1 を塗布したテストラインより上位に、抗マウス IgG モノクロナル抗体を塗布したものを実用型とした。テストラインの反応性はジアルジアシスト壁抗原を陽性試料として用いて確認した。

2. ジアルジア感染リスクグループ

本研究では国立国際医療研究センターエイ

ズ研究開発センター(ACC)において、下痢疾患の検査目的のために採取された糞便検体を対象として、その中より HIV 陽性患者および海外渡航歴のあるものを大別し、リスクグループとした。

3. 検体および IC による検査

リスクグループの下痢症患者便検体を検査に用いたが、採取後ジアルジアに関して直接蛍光抗体法による検査が行われたもの、あるいは行われなかったものが含まれた。検体は -20℃で保管された未固定生鮮試料で検査直前に溶解し検査に用いた。前処理を含む検査方法は前年度と同様で、実用型 IC を用いて検査した。なお、コントロールラインが出なかった検査結果は破棄し、同ラインが出た結果のみを成績とした。

C. 研究結果

1. 実用型 IC の反応性

図-1 に直接蛍光抗体法で陽性であった便検体ならびに陰性であった検体を用いた場合

のコントロールラインを含む実用型 IC の反応性を示した。結果は、陽性検体および陰性検体ともにコントロールラインの発色が認められた。発色強度は目視確認に充分であった。

2. リスクグループにおける実用型 IC 検査

表-1 に結果をまとめた。HIV 陽性のグループでは 36 検体を検査し陽性数は 4、陽性率は 11.1%であった。陽性例の中には赤痢アメーバ陽性検体が 1 例含まれており、同検体は重複感染であったことが示された。36 検体の中で直接蛍光抗体法での検査が行われたものは 27 検体で、陽性数は 2、陽性率は 8.7%であった。この 27 検体における IC 検査の結果は直接蛍光抗体法の結果と一致した。直接蛍光抗体検査数が少ないのは、赤痢アメーバ検査目的の場合の検体では直接蛍光抗体検査を行わない場合があることによる。

一方、海外渡航者のグループでは 16 検体を検査し陽性数は 2、陽性率は 12.5%であった。陽性例の中には他の原虫類との重複感染はなかった。16 検体の中で直接蛍光抗体法での検査が行われたものは 15 検体で、陽性数は 1、陽性率は 6.7%であった。この 15 検体における IC 検査の結果は直接蛍光抗体法の結果と一致した。

なお、使用した IC は全検査例ですべてコントロールラインの発色が認められ、検査結果はジアルジア抗原の有無によりのみ決定されたことを確認した。

検体の性状として便の色の濃さおよび粘性が反応に影響する要因と考えられたが、フィルター上のテストラインならびにコントロールラインの目視確認を阻害するような例、また検体に浸漬するサンプルパッドにおける検体の吸収性が、粘性のある検体で著しく阻害される例はみられなかった。

D. 考察

IC は現在、急速に普及しつつある迅速診断検査法である。前年度、ジアルジア抗原検出を目的とする IC の試作を行い、その感度・特

異性は市販される従来品 (ImmunoCard STAT! Cryptosporidium/Giardia, Merbio, USA) とほぼ同様の性能で、検体前処理を含めて 20 分程度で結果をえることが可能であり、IC に求められる迅速性に関しても条件を満たした。さらに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た。

本年度は実用型 IC を用いての検査を行い、国内におけるジアルジア感染リスクグループの感染率を調べてみたところ、HIV 陽性ならびに海外渡航者の両グループともにおよそ 12%前後の感染率であることが明らかとなった。

国内におけるジアルジア感染率調査例としては、全国の旧都市立伝染病院に 1990-2000 年の間に入院した消化器疾患患者全 9,713 例におけるジアルジア検出率が報告されており、国外感染推定が 88 例 (0.9%)、国内または不明が 10 例 (0.1%)であった。後者の多くは HIV 関連ということで、検出法は一般的な光学顕微鏡検査が用いられていたと考えられる (増田, 2001)。一方、米国・EU での HIV 陽性グループにおけるジアルジアの検出率は 3.5~55%という報告がある (Esfandiari A et al, 1995, Angarano G. et al., 1997, Esfandiari A et al, 1997, Giacometti A. et al, 2000)。また旅行者疾患サーベイランスシステム Geo-Sentinel によれば、1997-2011 年までの米国における海外渡航者 10,032 人に対し、ジアルジアが 3%検出されている (Harvey K. et al, 2013)。今回の調査を除外して、HIV 陽性者と渡航者という特定グループに限定した範囲で国内外のジアルジア検出結果には大きな乖離が見られるが、その主因は検査・診断法の違い、国外では直接蛍光抗体法が多く用いられているという点を考慮しなければならない。しかし直接蛍光抗体法には蛍光顕微鏡が必須であり、この点が国内における蛍光顕微鏡利用環境が低いという現状の中、同検査法普及の制限要因となることも考えなければならない。今回の調査結果は従来知られていた国内

の同様のグループの感染率より高く、欧米諸国における感染率に近似した。ICによる今回の調査が特定医療機関検体の成績とはいえ、ジアルジア感染が国外と同程度の可能性で生じていることを示している点は興味深い。即ち、検査法として効率的で検査が促進されれば、ジアルジア感染の年間 100 例程度と言われる現状認識を改めることになるかも知れない。IC は設備と経験を要しない検査法として、ジアルジア症検査の効率化を促し、早期診断、早期治療の医療体制に大いに資することが期待されるとともに、国内ジアルジア症発生の実態をより正確に把握するのに有用であると考えられる。

E. 結論

実用型ジアルジア迅速診断用 IC を作製し、ジアルジア感染リスクグループにおける感染率を調べた。その結果は従来国内で見られた低感染率ではなく、国外における感染率に近いことが明らかとなった。設備と経験を要しない IC がジアルジア症検査の効率化と積極的な検査の取り組みに役立つことが期待される。

F. 参考文献

増田剛太、原虫性下痢症の発生動向、病原微生物検出情報、22:162-3、2001.

Harvey A. et al, Surveillance for travel-related

disease...GeoSentinel surveillance system, United states, 1997-2011 .MMWR Surveill Summ.62:1-23, 2013.

Giacometti A. et al, Giardiasis: a parasitic disease of continued topically.Study of prevalence among a selected adult population. Infez Med, 8:82-86,2000.

Esfandiari A. et al, Clustering of giardiasis among AIDS patients in Los Angeles country.Cell Mol Biol, 43:1077-83,1997.

Angarano G. et al, Giardiasis in HIV: a possible role in patients with severe immune deficiency.Eur J Epidemiol, 13:485-7,1997.

Esfandiari A. et al, Prevalence of enteric parasitic infection among HIV-infected attendees of an inner city AIDS clinic.Cell Mol Biol. 41:S19-23,1995

G. 健康危惧情報

特になし

H. 研究発表

八木田健司、宮崎誠生、ジアルジア検査用イムノクロマトキットの開発、第 83 回日本寄生虫学会大会、愛媛

I. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

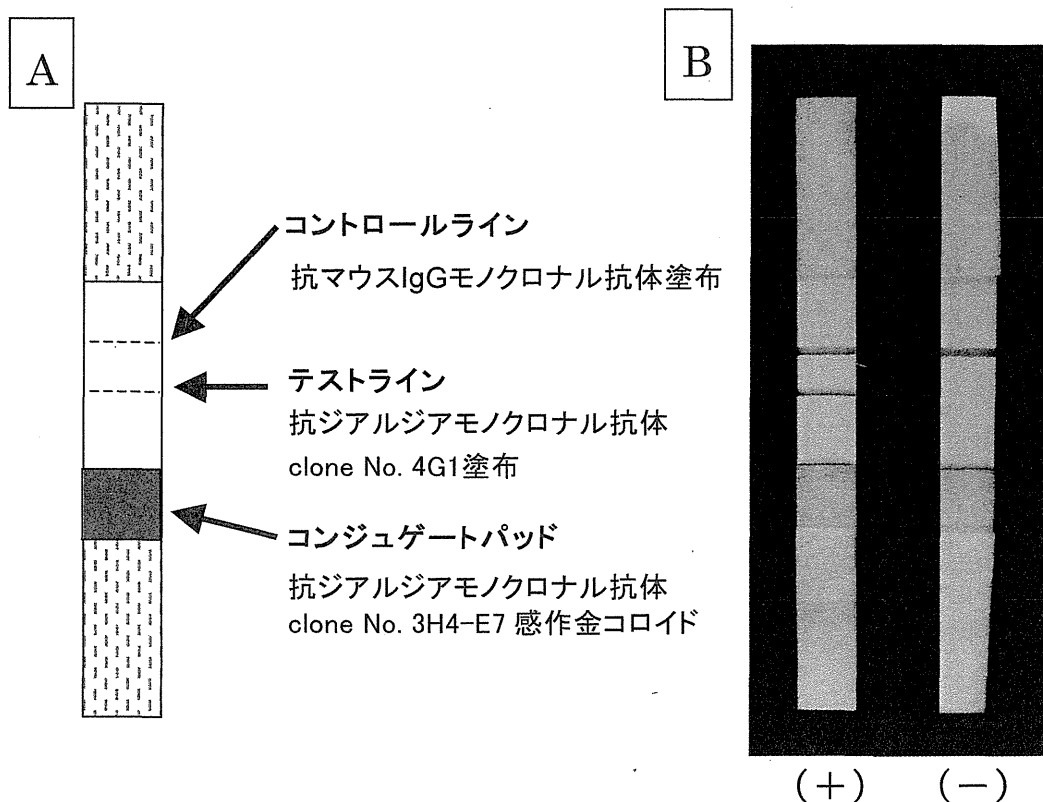


図-1. コントロールラインを含む実用型 IC の構造(A)と反応性(B)

(A)実用型ICでは抗ジアルジア抗体塗布のテストラインの上位に、抗マウスIgGモノクロナル抗体を塗布したコントロールラインを作製することで、コンジュゲートパッドから検体吸収により放出される抗ジアルジアモノクロナル抗体感作金コロイドが正しくテストラインと接触、通過したことが明確に判別できる。

(B)検体中にジアルジア抗原が存在する陽性検体の場合(+)、存在しない陰性検体の場合(-)が明確に判別できる。コントロールライン発色が見られた場合のみ陽性、陰性の判定を行う。

表-1. ジアルジア感染リスクグループにおける実用型 IC 検査結果

グループ	IC キット	直接蛍光抗体	備考
HIV 陽性	36 検体 陽性率 11.1%	27 検体 陽性率 8.7%	陽性 1 検体は赤痢 アメーバ陽性
海外渡航者	16 検体 陽性率 12.5%	15 検体 陽性率 6.7%	

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 25 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：国立感染症研究所 主任研究官 中野由美子

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とアフリカのサンプルから 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* 変異の後に獲得されていた。アジアからアフリカに移入したとされる高度 *dhps* 耐性株は、この年代に出現してい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* の遺伝子型を東南アジアとアフリカ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°C 5 秒、45°C 20 秒、72°C 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°C 5 秒、45°C 20 秒、72°C 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。シークエンスプライマーは 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) に外部依頼した。

シークエンスの結果、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クエンスすることで、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。

(倫理面への配慮)
該当せず

C. 研究結果

アジアのサンプルについては、昨年の報告に追加して、さらに多くのアジア由来の *dhps* 遺伝子型

を決定した。最終的に 55 サンプルのうち、39 サンプルが DNA の回収と *dhps* 遺伝子型を決定した。ダイレクトシークエンスとプラスミドにクローン化したシークエンスの結果では、東南アジアの株は 30 サンプルが野生型 (S436/A437/K540/A581) の遺伝子型、全体の 76% (30/39) を占めた。その他の遺伝子型として、S436G/A437/K540/A581, S436/A437/K540/A581G, S436/A437G/K540/A581, S436/A437G/K540/A581G が得られた。このうち、耐性獲得に必須な A437G を持たない遺伝子型は感受性型と考えられ、耐性の広まった現在でもほとんど同定されない遺伝子型である。耐性型の A437G を持つサンプルは 12% (5/39) であった。現在、アジアに広く流行している K540E を持つ耐性型の遺伝子型は、これらの年代では得られなかった。よって、90 年代にはアジアでは高度耐性の K540E を持つ *dhps* 遺伝子型は出現していなかったことが推測される。

アフリカの 151 サンプルからは、81 サンプルの *dhps* の遺伝子型に成功した。S436/A437/K540/A581 の感受性型は 80 年代から 90 年代に存在していた。この感受性型は全サンプルの 62% (51/81) を占めた。アフリカに独特の感受性型の遺伝子型として、S436F/A437/K540/A581 (n=2) と S436A/A437/K540/A581 (n=8) が得られた。この遺伝子型も現在ではアフリカだけから同定されている。その他に感受性型の遺伝子型として S436/A437/K540/A581G (n=6) が得られた。耐性型の遺伝子型は S436/A437G/K540/A581, S436/A437G/K540/A581G, S436A/A437G/K540/A581 が 90 年代以降のサンプルから得られた。耐性型は全サンプルの 38% (31/81) を占めた。アフリカのサンプルからでもアジアから移入したことが報告されている K540E を含む遺伝子型は同定されなかった。

D. 健康危険情報

現在、アジアに広く流行している K540E を持つ耐性型の遺伝子型は、80 年代と 90 年代のアジアとアフリカのサンプルでは同定されなかった。よって、90 年代にはアジアでは高度耐性の *dhps* 遺伝子型

は出現していなかったことが推測され、2000年以降にアジアで出現した耐性型がアフリカに移入したことが推測される。

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

中野 由美子、美田 敏宏 (2014) サルファドキシシンとピリメサミン耐性熱帯熱マラリアはアジアからアフリカに異なる時代に移入した：アーカイブ血液スメア標本による解析. 第83回日本寄生虫学会大会. 2014年3月26-28. 松山

太田 昭生, 高木 績, 大前 比呂思, 中野 由美子, 藤井 充 (2013) 発熱で受診した生殖母体を有する輸入熱帯熱マラリア患者の一例. 第24回日本臨床寄生虫学会. 2013年6月15日. 奈良市

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 25 年度分担報告書

赤痢アメーバの薬剤耐性に関する研究

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。しかし治療薬として一剤のみが使用されている現状であり、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治療において、5-ニトロイミダゾールであるメタロニダゾール(metronidazole: MTZ)が使用されている。MTZ による治療は腸管内、腸管外アメーバ症双方に適用され、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が報告されていること、現在 MTZ 一剤のみが使用されて続けていることから薬剤耐性獲得への懸念がある。実際、*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。MTZ は上記のような多様な嫌気性代謝を行う病原体に対して使用され、また安価な薬剤であるため途上国によっては病原体の同定を待たずに濫用される現実がある。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る。

主に衛生状態の悪い発展途上国の病気と思われがちであるが、日本を含む先進国でも老人・障

碍者施設や男性同性愛者（H I V陽性者）で蔓延している。男性に感受性が高いことから日本でも男性患者が主であるが、最近女性患者の増加があり、これは多様な性サービスを行う性風俗に従事する女性に感染が広がっている可能性を示していると考えられている。よって男性・女性を問わず性感染症としての蔓延が懸念される。このような状況を反映するように、近年国内のアメーバ症例は増加傾向にあり、2012 年度は過去 3 年間 800 例前後で推移していたところ 100 例ほど上回る 900 例の発症が報告された。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

過去二年結果より、実験室で作成した 12 μ 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と、耐性度の高い株の作成が実験室株では困難であることが見出された。そこで本研究では動物実験により肝膿瘍を形成するより病原性の高い株で MTZ 耐性株の作成を試みた。さらにこれまで報告された MTZ 耐性に関与する遺伝子として知

られる遺伝子の発現抑制を行い、その MTZ 耐性を知る準備として、HM-1 株における遺伝子発現抑制技術の確立を行った。

B. 研究方法

1) 赤痢アメーバ HM-1 株をハムスター肝臓へ接種し、形成された肝臓瘍から回収された赤痢アメーバ細胞を再び肝臓へ接種する、と言う過程を繰り返し、病原性を維持させた肝臓瘍 (amoebic liver abscess: ALA) 株を 8 μ M, 16 μ M と段階的に濃度をあげた MTZ 添加 BIS 培地で培養した。培地に *Crithidia fasciculata* を添加した。また、12 μ M MTZ 耐性株の作成も行った。

2) Morf ら (Morf et al., Nucleic Acids Res., 2013) により報告された *E. histolytica* における遺伝子発現抑制の分子機構に習い、遺伝子発現抑制のトリガーとなる配列を二種類について cysteine protease 5 (EhCP -A5) 遺伝子発現抑制を試みた。*E. histolytica* の遺伝子発現抑制方法として、すでに病原因子である *amoeba pore a* 遺伝子の発現抑制が起きている G3 株 (Bracha et al., Mol. Microbiol., 1999) を用いた方法が使用されてきた (Mi-ichi et al., PLoS Negl. Trop. Dis., 2011; Furukawa et al., PLoS Pathog., 2012; Nakada-Tsukui et al., Cell. Microbiol., 2012; Furukawa et al., Infect. Immun., 2013)。G3 株ではすでに動物モデルで病気を起こすことができないことから遺伝子と病変との関連を示すことができない欠点があった。しかし HM-1 株での発現抑制が可能となれば病態との関連をより詳細に検討することができるようになる。

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

1) ALA 株における MTZ 耐性株の作成。
8 μ M MTZ を添加した ALA 株は 2013 年 2 月 11 日から培養を開始し、5 月 17 日までの約 3 ヶ月で MTZ 非存在下で培養する ALA 株と同程度の増殖速度を持つ株として得られた。そこで MTZ 濃度を 16 μ M に上げ、高濃度の MTZ に対する耐性株の作成を目指した。8 μ M MTZ 存在下での増殖がまだ遅い段階の 2、3、4 月に週一回のペースで 16 μ M MTZ に濃度をあげたサン

プルを作成した観察したが、ほぼ一週間後には増殖の停止と細胞死が起こり培養の継続が不可能であった。しかし 16 μ M MTZ で増殖が安定した 5 月から培養を開始した株については 9 月まで培養が継続した (5 月 7 日から 9 月 24 日) が、再び死滅してしまった。そこで現在まで 9 月 27 日より開始した 16 μ M MTZ での培養株を維持している。しかし増殖は遅く、実験に使用できるまで安定していない。一方 12 μ M から 12 μ M MTZ での培養も開始し、これは順調な増殖を見せている。H23 年度に報告した耐性株も 12 μ M MTZ 耐性株での解析であり、ALA 株を使用しても高濃度 MTZ 耐性株の作成は困難であった。

この結果は病原性の高低に関わらず MTZ 対背株の作成が困難であることを想像させる。患者から耐性株の発生が報告されないことと *E. histolytica* が実験室で MTZ 耐性を得にくいということはよく一致する現象である。しかし、どこに耐性獲得の機会があるかは特定できず、選択薬が一剤だけである現在、耐性株出現への監視は怠るべきではない。

2) *E. histolytica* HM-1:cl6 株での遺伝子発現抑制方法の確立。

Morf らの報告を参考に、アンチセンス低分子量 RNA 合成のトリガーとする ORF を検索した。論文で 3 種類のがあっていた候補遺伝子のうち、我々のマイクロアレイで発現情報が検討可能であった 2 遺伝子 (EHI_197520, EHI_048600) の発現量を検討した。すると RNA polymerase II の発現量を 100% としたとき、EHI_197520 は 45.0% (\pm 48.2)、EHI_048600 は 0.79% (\pm 0.68) とばらつきは大きいものの EHI_048600 で顕著に発現量が低かった。

EHI_197520, EHI_048600 の最初の 132 塩基をトリガーとして、cysteine synthase (CS) のプロモータにより発現制御される EhCP-A5-HA 発現プラスミド (pEhEx-CP5-HA) の上流に挿入した (p19-trigger-CP5, p04-trigger-CP5)。各プラスミドをリポフェクション法により導入し、G418 による選択を行い 10 μ g/mL G418 耐性となる株を樹立した。これらの株と pEhExHA プラスミドの導入株 (negative control) から細胞粗抽出液を調整し抗 CP5 抗体、抗 CS 抗体、抗 HA 抗体でのウエスタンブロットを行い、CP5 発現抑制を検討した。

結果、予想通り 04 トリガー (EHI_048600 由来の

と病原性とのかかわりを検討できる準備ができた。

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

Functional analysis of the AIG1 family proteins that were originally identified as virulence-related genes in comparative genomic analysis in *Entamoeba histolytica*.

Kumiko Nakada-Tsukui, Emi Sato, Tomoyoshi Nozaki 第36回日本分子生物学会年会 兵庫県神戸市 2013年12月3日～6日 ポスター発表

F. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

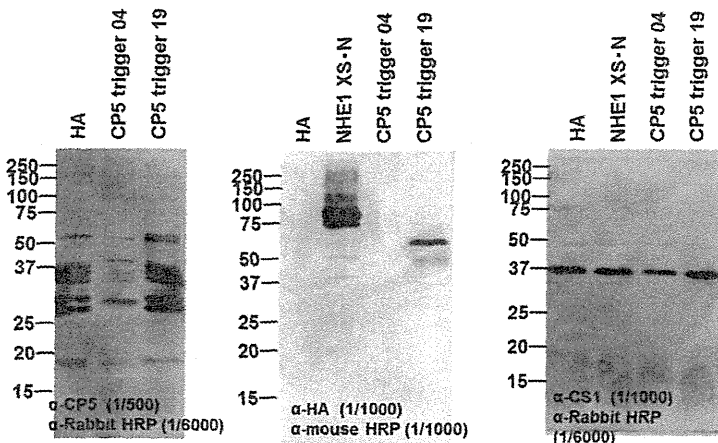
該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし



トリガー配列)を使用したサンプルでEhCP-A5の発現抑制が確認された。一方内因性の発現が高かった19トリガーのサンプルでは19-trigger-CP5-HAと思われるポリペプチドの発現が抗HA抗体による染色で明らかとなり、遺伝子発現抑制を目指したトリガーには不適切であることが明らかとなった。各サンプルの1レーン当たりのロード量が一定であることは等量発現していると期待されるCSの抗CS抗体による染色が各レーンで一致していることで示した。

以上よりHM-1株で遺伝子発現抑制を行う手法が確立された。この技術を使ってMTZ耐性に関与するとされた遺伝子の発現抑制を行いMTZへの耐性を測る陽性コントロールとするとともに、MTZ耐性

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 25 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：

トキソプラズマと宿主細胞表面との相互作用には、原虫が宿主表面へ付着した後にロプトリータンパク質が小胞 (evacuole) として宿主内へ注入されるステップと、また原虫自身の侵入の際に原虫を囲む parasitophorous vacuole (PV) が形成されるステップの 2 つが知られている。これらのうち、evacuole によって宿主細胞に注入されるロプトリータンパク質は様々な形で宿主細胞機能をハイジャックしていることが報告されている。今回、分担者はこれらのハイジャックのうち、原虫増殖の際、PV 膜に宿主のミトコンドリアや ER がリクルートされることに着目し、トキソプラズマ感染細胞および非感染細胞よりミトコンドリアを抽出し、それぞれに結合しているトキソプラズマ由来タンパク質のプロトテオーム解析を行った。

その結果、トキソプラズマ感染細胞由来ミトコンドリアでは最大 135 種のトキソプラズマ由来タンパク質が存在する可能性が考えられた。現在さらにスクリーニングを実施中である。

A. 研究目的

トキソプラズマと宿主細胞表面との相互作用には、原虫が宿主表面へ付着した後にロプトリータンパク質が小胞 (evacuole) として宿主内へ注入されるステップと、また原虫自身の侵入の際に原虫を囲む parasitophorous vacuole (PV) が形成されるステップの 2 つが知られている。これらのうち evacuole によって、宿主細胞に注入されるタンパク質 (ロプトリータンパク質) は様々な形

で宿主細胞機能をハイジャックしていることが報告されている。昨年度までに分担者はこの evacuole の形成機構を解析し、その過程において、宿主への evacuole 注入が過剰となると、宿主ミトコンドリアや ER の PV 膜へのリクルートが上昇する、つまり、トキソプラズマが宿主へ注入するロプトリータンパク質が宿主オルガネラのリクルートを司っていることを示唆してきた。今回、分担者はトキソプラズマによる宿主機能ハイジャック機構の一端を理解するため、原虫増殖の際、

PV 膜に宿主のミトコンドリアや ER がリクルートされることに着目し、トキソプラズマ感染細胞および非感染細胞よりミトコンドリアを抽出し、それぞれのトキソプラズマ由来タンパク質のプロトテオーム解析を行った。

B. 研究方法

Human Foreskin Fibroblast (HFF) 細胞にトキソプラズマRH株を感染させ、感染後 3, 10, 24時間後に感染細胞および非感染細胞を回収し、非感染細胞群にはコントロールとして感染細胞内と同数の原虫を加え、各群からミトコンドリアの抽出を行った。抽出にはMitochondria isolation kit for culture cells (Thermo) を用いた。得られたミトコンドリア画分に存在するトキソプラズマ由来タンパク質を、iTRAQ方により網羅的に同定し、コントロール群と比較して、有意にタンパク量が上昇していたものを陽性とした。

(倫理面への配慮)

本研究は全て既に確立されているヒト繊維芽細胞を用いて行っているため倫理面での問題はない。

C. 研究結果

iTRAQ法による解析の結果、最大で135種のトキソプラズマ由来タンパク質が宿主ミトコンドリアに結合している可能性が示された。現在、これらのタンパク質のドメイン解析を行っており、シグナル配列などの有用なドメイン構造を有しているものを選別中である。選別されたタンパク質は順次、ミトコンドリアへの局在を確認し、強制発現株、ノックアウト株を作製し、宿主オルガネラのリクルート能を解析していきたい。

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) Fkshi, M., Sakura, T., Tahara, M., Aonuma, H., Matsubara, R., Andrabi, S.B.A., and Nagamune, K. “The Acidic organelle in extracellular *Toxoplasma gondii*.” 12th International Congress on Toxoplasmosis, Oxford, UK, June 2013

(2) Symposium

Nagamune, K. “Extracellular Maturation in *Toxoplasma gondii* of Plant-like Vacuoles, Essential Organelles of Apicomplexan Parasites.” International Symposium on Matryoshka-type Evolution of Eukaryotic Cells, July 2013, Kyoto

(3) 坂本寛和、畑昌幸、永宗喜三郎、北潔、松崎素道 “貝類寄生虫パーキンサスにおける二次共生葉緑体の機能” 第2回マトリョーシカ型生物学研究会 2013年7月、京都

(4) 松尾恵梨子、神川龍馬、矢崎裕規、田原美智留、佐倉孝哉、永宗喜三郎、稲垣祐司 “*Karenia* 属渦鞭毛藻類における進化起源の異なる葉緑体型 GAPDH の細胞内局在” 第2回マトリョーシカ型生物学研究会 2013年7月、京都

(5) 山野安規徳、永宗喜三郎 “シストにも有効

な抗トキソプラズマ薬シード候補の探索” 第 21 回分子寄生虫学ワークショップ 2013 年 8 月、神戸

(6) 福士路花、矢幡一英、佐倉孝哉、金子修、永宗喜三郎 “トキソプラズマやマラリアが持つ植物液胞様オルガネラ” 第 21 回分子寄生虫学ワークショップ 2013 年 8 月、神戸

(7) Presentation Prize 受賞

Sakamoto, H., Nagamune, K., Kita, K. and Matsuzaki, M. “Characterization of secondary plastid membrane transporter homologs in *Perkinsus marinus*.” International Colloquium on Endocytobiology and Symbiosis, August 2013, Halifax, Canada

(8) ワークショップ

松尾恵梨子、神川龍馬、矢崎裕規、田原美智留、佐倉孝哉、永宗喜三郎、稲垣祐司 “*Karenia* 属渦鞭毛藻における進化的起源の異なる葉緑体型 GAPDH の進化と細胞内局在” 第 15 回日本進化学会 2013 年 8 月、つくば

(9) Tahara, M., Fkshi, M., Sakura, T., Matsubara, R., Yamano, A., Yamagishi, J., and Nagamune, K. “Primaquine-resistance in *Toxoplasma gondii* is associated with the mutations in chloroquine resistance transporter (CRT), which are different from chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*.” Molecular Parasitology Meeting XXIV, Woods Hole, MA, USA, September 2013

(10) 坂本寛和、永宗喜三郎、北 潔、松崎素道 “アブシジン酸生合成阻害剤フルリドンは貝類寄生虫 *Perkinsus marinus* の増殖を阻害する” 第 77 回日本植物学会 2013 年 9 月、札幌

(11) 松原立真、小嶋美紀子、田原美智留、Syed Bilal Ahmad Andrabi、福士路花、川原史也、山野安規徳、榊原均、永宗喜三郎 “寄生性原虫が産生する植物ホルモンの機能解析” 第 2 回日本細胞共生学会若手の会 2013 年 9 月、京都

(12) 福士路花、矢幡一英、佐倉孝哉、田原美智留、松原立真、金子修、永宗喜三郎 “細胞外ステージのトキソプラズマが持つ植物液胞様オルガネラ” 第 11 回分子寄生虫学・マラリアフォーラム 2013 年 10 月、長崎

(13) 福士路花、矢幡一英、佐倉孝哉、田原美智留、松原立真、金子修、永宗喜三郎 “細胞外ステージのトキソプラズマが持つ植物液胞様オルガネラの構造と機能” 第 46 回日本原生動物学会大会 2013 年 11 月、広島県東広島市

(14) 松原立真、小嶋美紀子、田原美智留、Syed Bilal Ahmad Andrabi、福士路花、川原史也、山野安規徳、榊原均、永宗喜三郎 “寄生性原虫が産生する植物ホルモンの機能解析” 第 46 回日本原生動物学会大会 2013 年 11 月、広島県東広島市

(15) ワークショップ

永宗喜三郎 “寄生・共生におけるゾンビ化機構

の分子生物学的解析” 第 36 回日本分子生物学会 2013 年 12 月、神戸
会 2013 年 12 月、神戸

(16) ワークショップ

田原美智留、Syed Bilal Ahmad Andrabi、青沼宏
佳、木下タロウ、永宗喜三郎 “トキソプラズマ
による宿主細胞ゾンビ化タンパク質群（ロプトリ
ー蛋白質群）注入における宿主細胞膜マイクロド
メインの役割” 第 36 回日本分子生物学会 2013

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 25 年度分担報告書

顧みられない原虫原虫類への新規遺伝学的手法の開発に関する研究

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 δ -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 ϵ -DNA の校正機能を低下させた原虫を第二世代 PbMutator 原虫として、その作成に取り組む。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。 ϵ -DNA の校正機能に必要であると考えられるアミノ酸二カ所 (D348A, E350A) を Ala に置換した変異型 Poly ϵ 遺伝子で内因性 Poly ϵ 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2つの原虫クローン (A, B) 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。さらにγ-Scan法により、変異のホットスポット解析を試みたところ、合計4か所に有意なホットスポットを同定した。しかし、さらに複数個のPbMutator原虫クローンの変異解析を追加し、再解析を行っても同様の結果であることを確認する必要があると考える。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。さらに第122世代PbMutator原虫集団に抗マラリア薬であるSulfadiazineを投与したところ、当該薬剤に対して抵抗性を示す原虫を単離した。単離した薬剤耐性原虫の全ゲノムリシーケンシングを行った結果、本薬剤の標的と言われているマラリア原虫のDHPS遺伝子に変異が生じており、その変異はマラリア流行地における本薬剤耐性原虫で確認されているDHPSに見られる変異と同一であった。DHPS遺伝子変異が本薬剤に対して抵抗性を付与する原因であることを検証するため、変異型DHPS遺伝子で野生型遺伝子を置き換えた遺伝子組み換え原虫を作成したが、組み換え原虫は当該薬剤に対して抵抗性を示さなかった。一方、本薬剤耐性原虫のアピコプラストとミトコンドリアゲノムコピー数が3倍近く上昇していたことを見出した。以上の結果は、本薬剤の耐性はDHPS遺伝子変異は必要条件ではあるが十分条件ではなく、オルガネラコピー数の上昇も本薬剤耐性獲得に必須であることを示唆する。薬剤耐性原虫におけるゲノムコピー数の上昇は、本薬剤耐性機構を解明する上で重要な新知見である。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)。

ラギング鎖のDNA polymerase ε の校正機能に必

須なアミノ酸2か所をアラニンに置換した変異型DNA polymerase εを調製した。変異型遺伝子で野生型遺伝子を置き換えた原虫を作成することに成功し、これを第二世代ミューテーターとした。第二世代ミューテーターを継代感染して第40世代まで得た。第40世代の独立した任意の2クローンについて、全ゲノムリシーケンスに続き変異解析を行った結果、それぞれ26個と28個の変異が確認された。以上のことから、作成した原虫が第二世代ミューテーターとして機能しうることを確認した。今後、さらに継代を続けて得た原虫クローンの変異解析を行い、第一世代との比較を行う予定である。さらに、第一世代と第二世代の両方の特徴を持つ、すなわちリーディング鎖とラギング鎖の両方の校正機能を欠損するスーパーミューテーター作成の前段階に到達することができた。

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平井誠 マラリア原虫の受精制御因子探索 (招待講演) 動植物アロ認証公開シンポジウム (2014年1月8-10日 名古屋大学)

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、2013 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、ブタ回虫症との鑑別は予防対策のために必要であり、血清による鑑別法の確立が求められる。初年度に幼虫分泌排泄抗原と組換えタンパク質を組み合わせたプレート ELISA でトキソカラ症とブタ回虫症の鑑別が可能であることを示したが、今年度はトキソカラ症に特異的とされるウエスタンブロッティング法を用いてプレート ELISA による鑑別法の検証をおこなった。その結果、トキソカラ幼虫 ES 抗原に陽性かつ組換え抗原にも陽性ならば動物由来回虫類による幼虫移行症と診断してよく、その中で ES 抗原と組換え抗原への結合の違いによってブタ回虫症と判定できればブタ回虫症であり、それ以外の場合にはトキソカラ症としてよいことが分かった。実際の血清サンプルでは、動物由来回虫症のうち 8.3% がブタ回虫症で、90% 以上がトキソカラ症であった。

基礎研究ではブタ回虫の体内移行現象の分子基盤を明らかにする目的で、感染 7 日後の幼虫の遺伝子発現を、RNA-seq 法を用いて好適宿主（ブタ）と非好適宿主（モルモット）において比較した。発現量が異なる遺伝子数は 134 で、モルモットで高発現しているものには宿主免疫調節に関わると予想される遺伝子やタンパク分解酵素インヒビター遺伝子が含まれていた。一方、ブタで高発現しているのは生殖や成長に関わる遺伝子が含まれていた。

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 穴プレートを用いたプレート 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 400 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。平成 25 年実績でも、動物由来回虫症が 35 例、肺吸虫症が 29 例であった（表 1）。動物由来の回虫とは具体的にはトキソカラ（イヌ回虫またはネコ回虫）とブタ回虫である。

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幼虫の分泌排泄抗原（ES 抗原）と組換え抗原を組み合わせたプレート ELISA 法で、ある程度鑑別できる見通しが立っていたが、これらの疾患については確定検査法が存

在しないため、われわれの鑑別法の正否について検証することができなかった。そこで今年度は、ヨーロッパでトキソカラ症の確定検査として用いられているウエスタンブロッティング法（LDBIO 社、フランス）をスタンダードに用いて、ELISA による血清鑑別法の検証をおこなった。

また、幼虫移行症の病態解明のために、ブタ回虫の幼虫が、好適宿主と非好適宿主ではどのような遺伝子発現の違いをみせるのかを、RNA-seq 法により明らかにした。

B. 研究方法

1. プレート ELISA 法およびウエスタンブロッティング法による幼虫移行症の虫種決定

(1) 抗原

組換えブタ回虫抗原 rAs16 は農業食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究所・細菌寄生虫研究領域の辻尚利博士から、組換えトキソカラ抗原 rT. canisAg は国立感染症研究所・寄生動物部・蠕虫室

の山崎浩博士から供与いただいた。トキソカラ診断用のウエスタンブロッティングキットはフランスLDBIO社から購入し説明書にしたがって使用した。

表 1 宮崎大学医学部における寄生虫症血清検査結果

寄生虫症	2009	2010	2011	2012	2013
トキソカラ症	49	48	48	34	35
ブタ回虫症					
アニサキス症	2	2	3	4	1
イヌ糸状虫症	0	0	0	0	1
顎口虫症	9	3	4	9	3
鉤虫・イヌ鉤虫症	1	1	1	0	0
マンソン孤虫症	5	2	4	8	3
有鉤囊虫・糸虫症	1	0	0	0	0
肺吸虫症	38	45	35	30	29
肝蛭症	1	3	2	2	1
住血吸虫症	4	3	6	6	2
肝吸虫症	0	1	3	1	4
糞線虫症	0	2	0	2	2
回虫症	0	0	0	0	2
日本海裂頭条虫症	0	4	2	0	1

(2) 患者血清

患者血清は、宮崎大学医学部寄生虫学分野において2005年以前に動物由来の回虫類による幼虫移行症と診断された患者、他の寄生虫疾患（肺吸虫症とアニサキス症）と診断された患者、およびどの寄生虫にも感染していないと判定された患者の血清を用いた。

本研究における患者血清の使用に際しては、ヘルシンキ宣言の趣旨に則り、疫学研究に関する倫理指針、臨床研究に関する倫理指針等を遵守した。本研究は、宮崎大学医学部医の倫理委員会による審査を受け、宮崎大学医学部の承認を受けている。

(3) 幼虫ES抗原および組換え抗原に対する患者血清の結合

抗体と血清の結合は通常酵素抗体法により評価し、非感染者血清の吸光度の平均+3SDをカットオフ値とした。患者が感染したのがトキソカラなのかブタ回虫なのかという判定は、それぞれの抗原に対する吸光度の比をとって、吸光度（イヌ回虫抗原）／吸光度（ブタ回虫抗原）が2.0以上であればイヌ回虫、吸光度（ブタ回虫抗原）／吸光度（イヌ回虫抗原）が2.0以上であればブタ回虫とした。

2. RNA-seqによる体内移行期のブタ回虫発現遺伝子解析

(1) 感染および感染動物の飼育管理

ブタ回虫卵は食肉衛生検査所から供与されたブタ回虫成虫体から定法により幼虫包蔵卵を調製した。モルモット（Hartley系、メス）およびブタ（Danish Landrace/Yorkshire/Duroc交雑種、回虫非感染であることを確認済）には、幼虫包蔵卵を10,000個（モルモット）と100,000個（ブタ）経口投与した。

(2) ライブラリ作製とシーケンス

モルモットまたはブタにブタ回虫幼虫包蔵卵を経口投与して7日後に、ベールマン法を用いて肺移行幼虫を回収した。RNA精製にはRibo-Pure（Ambion社）、ライブラリ作製にはTru Seq（イルミナ社）を用いた。

シーケンスは宮崎大学フロンティア科学実験総合センターのMiSeqを使用した。シーケンスは2回おこない、1回目は151 bp、2回目は251 bpのペアエンドで実施した。ただし、リプライケイト間の条件をそろえるため、MiSeq2回目のリードは251 bpから151 bpに切りそろえた。

(3) 発現解析

マッピングにはTopHat v2.0.10、発現量比較解析にはCufflinks v2.0.1を使用した。リファレンスゲノムはWormbase236 a_suum_davisを用いた。

C. 研究結果

1. 抗体検査によるトキソカラ症とブタ回虫症の鑑別

臨床経過およびブタ回虫成虫抗原への結合性から動物由来回虫類感染症と考えられた120症例の血清サンプルを連結不可能匿名化処理し、以下の研究に用いた。

最初にウエスタンブロッティングとELISAの比較をおこなった（どちらも抗原はイヌ回虫の幼虫ES抗原）。結果は表2の通りで、用いた120サンプルのうち、トキソカラ特異的なバンドを示したのが102サンプル、特異的バンドが見られなかったものが18サンプルであった。

ウエスタンブロッティングで陽性だった102サンプルはすべてELISAでも陽性であり、感度は100%であったが、ウエスタンブロッティングで陰

性だった 18 サンプルのうち 17 サンプルが ELISA では陽性であり、プレート ELISA は特異性の点では十分でないと考えられた。

次にこれらの血清にわれわれのプレート ELISA 法を適用した。すなわち、最初に幼虫 ES 抗原を用いた ELISA によってトキソカラ抗原への反応性の方が強いもの、ブタ回虫抗原への反応性の方が強いもの、どちらと判定できないものに分け、次いで、幼虫 ES 抗原ではどちらとも判定できないサンプルについて、組換え抗原への結合性の強さを比較した。これらの結果を総合して、使用した 120 サンプルのうち、トキソカラ症が 90 症例 (75.0%)、ブタ回虫症が 10 例 (8.3%)、虫種不明が 20 例 (16.7%) とプレート ELISA では推定された。

これら 120 サンプルについて、トキソカラ症の確認試験に用いられているウエスタンブロッティングキット (トキソカラ幼虫 ES 抗原を使用し特異的バンドの有無で判定) でトキソカラ感染の有無を確認し、幼虫 ES 抗原と組換え抗原による ELISA の信頼性を評価した。

結果は表 3 の通りで、トキソカラ症と判定された 90 サンプルのうち 7 サンプルがウエスタンブロッティングでは陰性であった。これらの「擬陽性」は幼虫 ES のみに結合し、組換え抗原への結合は陰性であった。

表 2 患者血清のイヌ回虫幼虫 ES 抗原への結合性

ウエスタンブロッティング		ELISA	
陽性	102	陽性	102
		陰性	0
陰性	18	陽性	17
		陰性	1
計	120		120

一方、ELISA でブタ回虫症と判定されたサンプルはすべてウエスタンブロッティングでは陰性であった。また、ELISA では判定できなかった 20 サンプルのうち 19 サンプルがウエスタンブロッティングキットではトキソカラ感染であることが分かった。

以上の結果をまとめると、幼虫 ES 抗原と組換え抗原を組み合わせた ELISA によってトキソカラ症とブタ回虫症を鑑別することは可能で、ELISA

によってブタ回虫症と判定されるものはブタ回虫症としてよい。一方、組換え抗原陰性で幼虫 ES 抗原だけで判定したもの (7.8%) は、真のトキソカラ感染でないものを含むということになる。

表 3 ELISAによる虫種判定とウエスタンブロッティングの比較

	幼虫 ES 抗原と組換え抗原による判定	ウエスタンブロッティング陽性
トキソカラ症	90	83
ブタ回虫症	10	0
決定不能	20	19
計	120	102

2. RNA-seqによる体内移行期のブタ回虫発現遺伝子解析

ブタ回虫の幼虫を好適宿主 (ブタ) または非好適宿主 (モルモット) から回収して RNA-seq をおこない、非好適宿主内で高発現している遺伝子、あるいは好適宿主で高発現している遺伝子の同定を試みた。ランは 2012 年と 2013 年に実施した。

マッピングソフト TopHat を用いて、リファレンスゲノムへマッピングした結果、2012 年のランでは 52~53%、2013 年のランでは 80% 程度のリードがマップされた (表 4)。2012 年のランのマップ率が低いのは、サンプルの品質が原因であろうと考えられた。

次いで、ゲノム上の各遺伝子へマッピングされたリード数を Cufflinks パッケージを用いて計算した。公開されているブタ回虫ゲノムの遺伝数は 15,260 であるが、今回の RNAseq データはそのうち 14,048 遺伝子へのマッピングが確認された。ところが、公開ゲノムで遺伝子領域とされている部位以外の領域にマッピングされたリードから作

表 4 ブタ回虫体内移行幼虫発現遺伝子のマップ率

Host	ID	# reads AF	#mapped	%mapped	Median insert size
Pig2012	G1	2457702	1370513	55.8%	590
	G4	2341798	1322224	56.5%	577
Pig 2013	Pig1	24747336	20614491	81.9%	421
	Pig2	23563964	19540651	81.9%	420
Guineapig 2012	G2	3103888	1630713	52.5%	302
	G5	2376434	1273085	53.6%	341
Guineapig 2013	Gip1	20342216	16687572	79.2%	319
	Gip2	19292886	15775388	79.3%	317