

厚生科学研究費補助金
(新型インフルエンザ等新興・再興感染症 研究事業)
分担研究報告書

腸管系寄生虫症の解析

分担研究者 野崎 智義 国立感染症研究所 部長

研究要旨 ジアルジア症・赤痢アメーバ症・クリプトスポリジウム症はアジア・アフリカにおける重要な腸管寄生原虫症である。本研究はインド NICED との共同研究を通じて、日印の国際共同研究の基盤を確立することを目的に研究を展開している。最終年度は分子疫学的手法を用いた赤痢アメーバ症の分子疫学調査を実施した。詳細な分子疫学手法に基づき、インド赤痢アメーバ分離株の解析を行い、成果を挙げた。

A . 研究目的

腸管感染症は世界の死亡の約 4% (216 万人) を占める重要な感染症である (WHO Report, 2009)。これは HIV/AIDS、結核と同様に極めて重要な死因の一部を占める。腸管感染症のうち原虫症として重要なのは、ジアルジア症、クリプトスポリジウム症、赤痢アメーバ症、マイクロスποリジウム症、イソスポーラ症などであり、これらが原虫が原虫性下痢症の大部分を占める。赤痢アメーバ症が開発途上国を中心として世界の人口の約 1% に感染し、年間 10 万人の死者を生む重要な原虫である。一方、ジアルジア症・クリプトスポリジウム症などは特に途上国での小児の感染率は極めて高いものの、小児の発育・発達に大きな影響を与え、高い DALY の原因となる。

本研究では、インドコルカタにある Indian Council of Medical Research (ICMR) の感染症研究所のひとつである National Institute of Cholera and Enteric Diseases (NICED) と、腸管原虫症に関する共同研究を行った。その目的は、アジア、特に南アジアとの腸管原虫症研究の連携を強化し、情報ネットワークを構築することにある。更に、人的交流を通じてお互いの研究能力の向上と病原体検出の情報の早期収集に有用なネットワークを構築す

ることを目的とする。本年度はインドの赤痢アメーバ臨床株を収集し、遺伝子型別を行い、臨床症状と遺伝子型との相関を抽出した。

B . 研究方法

1. 臨床検体

51 例の赤痢アメーバ検体を解析に用いた。内訳は 26 例の下痢症例、20 例のアメーバ肝膿瘍例、5 の無症状症例であった。

2. 遺伝子型別解析

糞便または肝膿瘍穿刺液から顕微鏡法、抗原捕捉法 (E. histolytica II kit, Techlab) で陽性と診断された検体に関して、DNA stool mini kit で DNA を抽出した。すべての検体に関して Chitinase および tRNA-linked STR (tRNA に挟まれた短反復配列多型 = short tandem repeats) の 3 種の座位 (DA-H, NK2-H, R-R) に関して nested PCR を行った。方法は Escueta-de Caz Parasitol Int 2010 に記述した。得られた PCR 産物を直接シーケンシングにより配列決定した。

2. 配列・クラスター解析

遺伝子配列は Clustal W、MEGA によりアラインし、SeaView Graphical Interface により可視化した後、Epi-Info で評価した。

(倫理面への配慮) 本研究に関わる病

原体の取扱いに関する許可、ヒト臨床検体の取り扱いに関する許可は当該研究機関にて得られている。

報、IND2-9DA は今回の解析で新しく発見された遺伝子型。

C . 研究結果

1. Chitinase の多様性

51 種の臨床検体から 13 種類の遺伝子型が検出された。

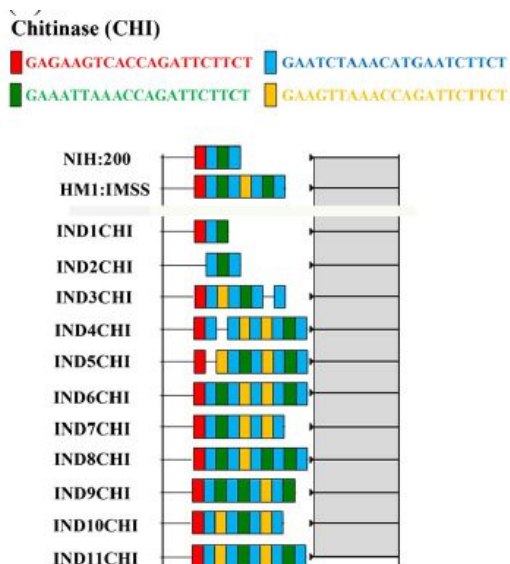


図 1 Chitinase の繰り返し配列部分の多型を模式的に示した。NIH:200, HM1:IMSS は既報、IND1-11CHI は今回の解析で新しく発見された遺伝子型。

2. tRNA-STR の多型

図 2-4 に 3 種の tRNA-STR 遺伝子座のパターンを示す。

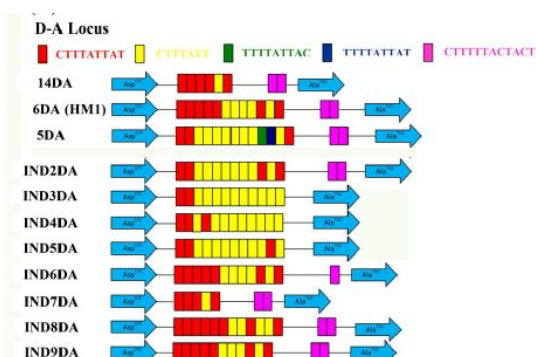


図 2 tRNA-STR の D-A locus の多型を模式的に示した。14DA, 6DA, 5DA は既

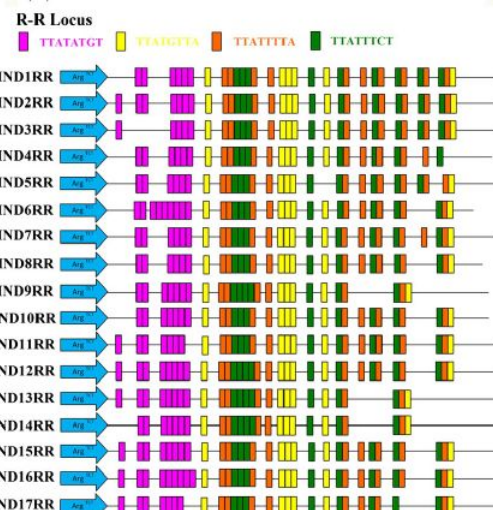


図 3 tRNA-STR の R-R locus の多型を模式的に示した。既報の遺伝子型は発見されなかった。

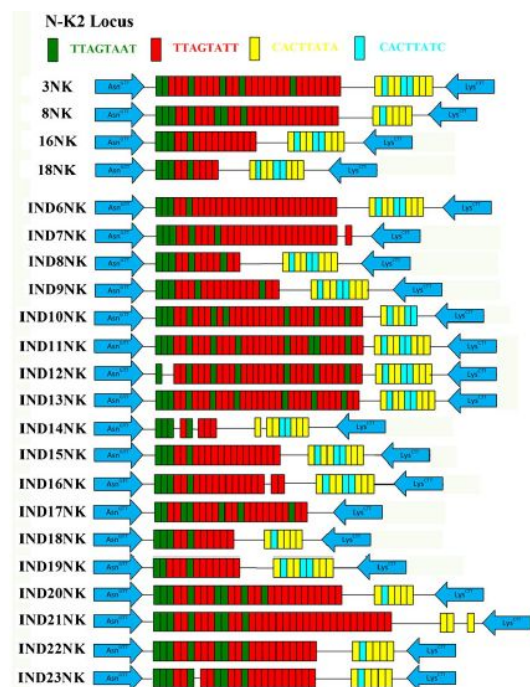


図 4 tRNA-STR の NK2 locus の多型を模式的に示した。3NK, 8NK, 16NK, 18NK は既報、IND6-23NK は今回の解析で新しく発見された遺伝子型。

3. 遺伝子型と病型との相関

上記の4遺伝子座に関して、臨床症状(下痢・肝膿瘍・無症状)と遺伝子型との相関が有意に示されるものを抽出した(表1)。

Loci	Repeat pattern	Liver abscess (LA)	Diarrheal (D)	Asymptomatic (AS)
D-AH	6DA	Co-eff: 0.507 ^a p = 0.0026 ^b	Co-eff: -0.385 ^a p = 0.029 ^b	X ^c
	14DA	Co-eff: 0.403 ^a p = 0.0096 ^b	Co-eff: -0.684 ^a p = 0.000004 ^b	Co-eff: 0.281 ^a p = 0.0026 ^b
N-K2	18NK	Co-eff: -0.404 ^a p = 0.0116 ^b	Co-eff: 0.532 p = 0.0008 ^b	X ^c
R-R	IND11RR	X ^c	Co-eff: -0.619 ^a p = 0.0004 ^b	Co-eff: 0.286 ^a p = 0.0082 ^b
Chitinase (CHI)	NIH:200	Co-eff: -0.429 ^a p = 0.0014 ^b	Co-eff: 0.577 ^a p = 0.00001 ^b	X ^c
	HM1:IMSS	X ^c	Co-eff: -0.456 ^a p = 0.0173 ^b	X ^c

表1 それぞれの遺伝子座(Loci)に関して特定の遺伝子型(Repeat pattern)が特定の病型と相関を示したものはp値を示した。相関係数がプラスなものは正の相関、マイナスなものは負の相関を示した。"X"は有意差が見られないもの。

4. 遺伝子型と病型のクラスター解析

系統解析を行い、それぞれの遺伝子座における遺伝型と病型をクラスター解析した。代表例(NK locus 及び DA-H locus)だけを示すが、肝膿瘍と無症候性として共通のクラスターを形成する亜群が存在することが示された(図5)。

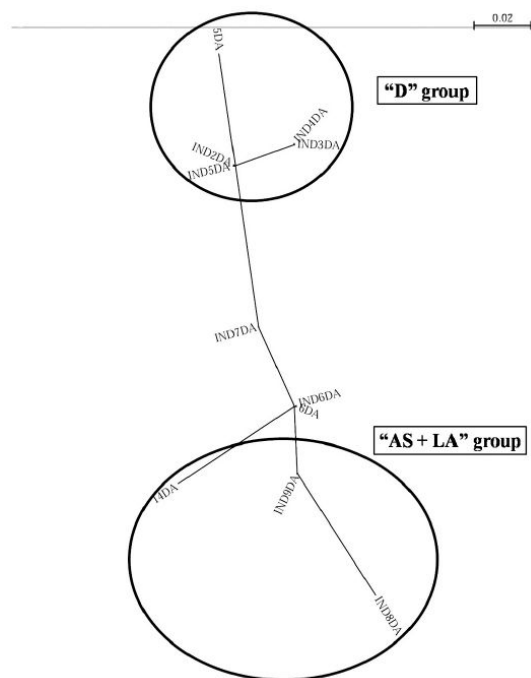
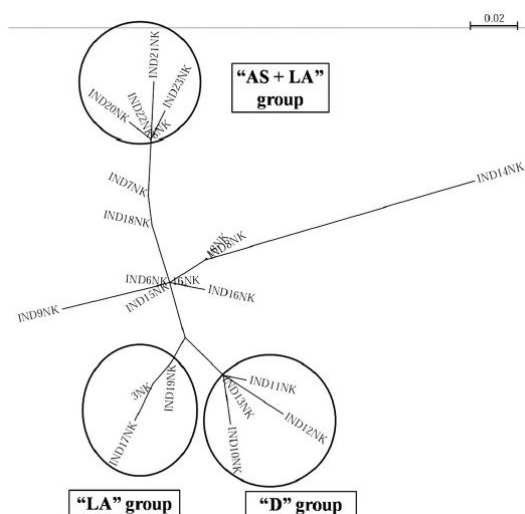


図5 NK2(上)及び DA-H (下) locus の系統解析。

D. 考察及び結論

本研究により、インドにおける赤痢アメーバの臨床株の遺伝的多様性が初めて明らかにされた。インドにおける赤痢アメーバの遺伝的多様性は野崎らが日本のMSM(男性同性愛者)で示した赤痢アメーバ株において示したと同様に、極めて高い遺伝的多様性を示していた。更に、本報告により、これまで未同定の多くの遺伝子型が発見された。このことは南アジアにおいて特殊な種内分化・多様化が起こった可能性を示している。

本研究における二つ目の重要な成果は、それぞれの遺伝子座の特定の遺伝子型が病型と相関していることを示したことである。しかしながら、病型との相関の見られた遺伝子型をもつ検体数が少ないため、相関は注意深く今後更に検討する必要がある。

以上、最終年度はインドから分離された赤痢アメーバ株の分子疫学の基盤的情報を確立することができた。こ

これらの成果は、NICED との共同研究を更に推し進めるための、必要不可欠な貢献をしたと言える。

E . 健康危険情報

該当せず

F . 研究発表

1. 論文発表

- (i) Das, K., Mukherjee, A. K., Chowdhury, P., Sehgal, R., Bhattacharya, M. K., Hashimoto, T., Nozaki, T., and Ganguly, S. Multilocus sequence typing system (MLST) reveals a significant association of *Entamoeba histolytica* genetic patterns with disease outcome. Parasitol Int, 63, 308-314, 2014.

2. 学会発表

なし

G . 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当せず。
2. 実用新案登録
該当せず

