

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)
総合分担研究報告書(23-25 年度分)

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分子疫学、病原・寄生機構等の解明の研究を展開している。初年度はコルカタ、西ベンガル州におけるジアルジア症の感染実態を明らかにするために、疫学・分子疫学的情報を獲得した。本年度の研究成果により、ジアルジア症の感染浸淫度、季節消長、遺伝子多様性、動物由来感染症としての重要性などが明らかにされた。2年度は、ジアルジアからの感染ウイルスの特定を目指すために、西ベンガル州におけるジアルジア症の病原株の確立を目指すと共に、赤痢アメーバにおける抗酸化機構の分子機構を明らかにした。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。本研究では3年間に渡って、疫学調査、分子疫学解析、酸化ストレス応答解析といった複数の研究内容について研究を行った。

B . 研究方法

1. 培養

赤痢アメーバ株 HM-1: IMSS cl6(Louis Buddy Diamond の分離による)の培養は常法の無菌培養法に従った。

2. 検体

毎週無作為に抽出された 2 曜日に、NICED に近接する Infectious Disease Hospital (IDH)に、下痢で来院し入院した患者のうち、毎 5 人目の患者、合計 2421 人を対象とし、そのうち

Giardia lamblia 陽性者 253 人のうちの無作為抽出された 30%(58 名)を対象とした。更に、下痢症状のない 58 症例から、同様に 30%(17 名)を抽出した。これらの計 75 の糞便を対象とした。以下の PCR による確認の他に、糞便中抗原を特異的 ELISA(TechLab, Blacksburg)により検出されたことを条件に、確定診断とした。

ウシの便はインド西ベンガル州の酪農場の 180 の仔ウシ、未出産の雌ウシ、成ウシから採取された。更に、51 人の酪農場労働者からも糞便を採取した。下痢症状の有無は聴取しなかった。

赤痢アメーバの遺伝子型別解析に関しては、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。

3. 遺伝子型別解析

糞便からの核酸の抽出は Stool DNA mini kit (Qiagen)を用いた。PCR は Giardia lamblia の beta giardin, glutamate dehydrogenase, triose phosphate isomerase 遺伝子を標的とし、既報のオリゴヌクレオチドプライマーと条件を用いて行った(Khan 2011)。赤痢アメーバの型別解析に関しては 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。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。データの優位性は Student t test、ANOVA、Epi-Info 等にて検定した。

3. 配列・クラスター解析

(倫理面への配慮)本研究に関わる病原体の取扱に関する許可、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。

4. メタボローム解析

メタボローム解析はキャピラリー電気泳動飛行時間計測型質量分析法(CE-ToFMS)により行った。方法の詳細は Husain J Biol Chem 2010 に詳述した。Anion, Cation モードでの計測で、約 90 の中間代謝産物を定量した。

5. 赤痢アメーバ過剰発現体の作成

Iron sulfur flavoprotein 1 (ISF1) 及び ISF2 遺伝子の ORF の N-末端部分 420bp を pSAP2-Gunma ベクターに挿入し、gene silencing 用プラスミドを作成した。赤痢アメーバ形質転換体の作成はリポフェクションを用い、常法に従った。

C. 研究結果

1. コルカタ地区におけるジアルジアの感染実態調査

コルカタにある感染研様研究所である Niced に併設された IDH に来院した下痢症患者から無作為抽出された計 2421 人の対象のうち、顕微鏡検査、抗原捕捉試験、糞便 PCR のいずれかで Giardia 陽性と判定されたのは 253 人であった。253 人のうち 195 人が有症者、58 人が無症候であった。その年齢内訳、並び年齢別の優位性、Odds Ratio(図 1)は以下の通りである。

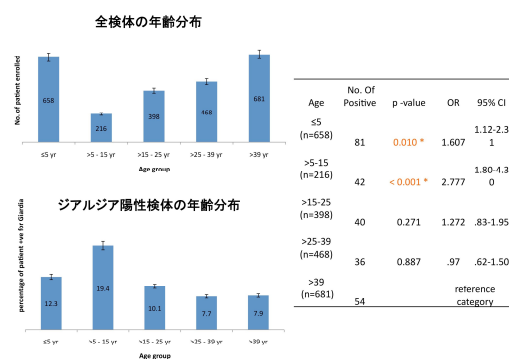


図 1 ジアルジア感染者の年齢分布と年齢別リスク

月毎の全体のモニター数、そのうち Giardia 陽性者数、陽性者の割合を集計した。6-10月の post-monsoon 期に感染数と感染率の上昇が見られた。

Giardia 感染者の 74% に他の細菌或いはウイルスとの混合感染が見られた(図 2)。

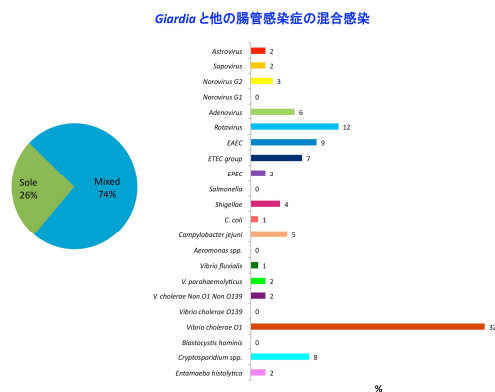


図 2 Giardia 感染における混合感染

2. コルカタ地区下痢症患者から分離された Giardia 株の遺伝子型別解析

Giardia 陽性者で有症者から無作為抽出された 30% (58 名)、下痢症状のない 58 症例から、同様に 30% (17 名) を抽出し、遺伝子型別を行った(表 1)。有症例・無症候例いずれからも Assemblage A 及び B が検出された。有症例・無症候例いずれからも Assemblage A では AIII と AIV が、Assemblage B では BIII と BIV が、発見された。サンプルサイズのため特定の遺伝子型への偏りは優位であると証明されなかった。

有症例からの 59 株

	Assemblages					
	A		B		D	E
No. of Samples	21		35			
Sub assemblage	All	AIV	BIII	BIV	--	--
No. of Samples	12	9	29	6	1	2

無症例からの 17 株

	Assemblages			
	A		B	
No. of Samples	6		11	
Sub assemblage	All	AIV	BIII	BIV
No. of Samples	2	4	7	4

表 1 コルカタで分離された Giardia の遺伝子型別

3. 西ベンガル州の酪農場での家畜と人の感染実態調査

計 180 の仔ウシ、未出産の雌ウシ、成ウシから採取された糞便のうち、全体で、7% (12/180) のウシに Giardia 感染が見られた。特に仔ウシに高い感染 (20/112, 18%) が見られた。検出された Assemblage は主に Assemblage E であったが、A も発見された。複数の Assemblage の同時感染も 3 例検出された。

一方酪農場の労働者でも高い感染が見られた (14/51, 27%)。Assemblage は A および、家畜からは発見されなかった B であった。E は発見されなかった。

4. 赤痢アメーバ分離株における 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。

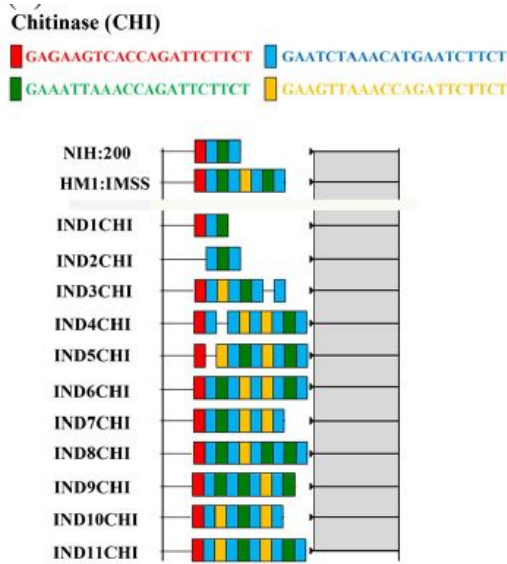


図3 Chitinaseの繰り返し配列部分の多型を模式的に示した。NIH:200, HM1:IMSS は既報、IND1-11CHI は今回の解析で新しく発見された遺伝子型。

5. 赤痢アメーバ分離株における tRNA-STR の多型

D-A, R-R, NK2 遺伝子座の遺伝子配列を決定し、反復配列の近似性をもとに分類を行った。代表的な locus NK2 を例に図4に示す。

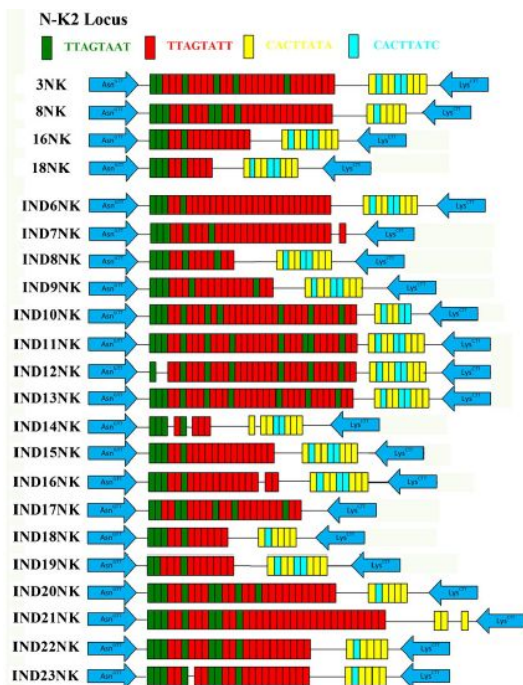


図4 tRNA-STRのNK2 locusの多型を模式的に示した。3NK, 8NK, 16NK, 18NK は既報、IND6-23NK は今回の解析で新しく発見された遺伝子型。

6. 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3)。

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 ^a : 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3 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。

7. 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で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。

8. 赤痢アメーバにおける酸化ストレスによる細胞死と細胞内活性酸素種の産生

赤痢アメーバにおける酸化ストレス応答をモニターした。パラコートや過酸化水素に対して感受性を示した。更に、1mMのパラコートによる処理により時間依存的に細胞内のROSが上昇することが示された。

9. 代謝産物のプロファイリング

パラコート、過酸化水素を加え、継続的に1, 3, 6, 12時間後の代謝産物を抽出し、CE-ToFMS解析により、全代謝産物を計測した。図5に示すように、パラコート及び過酸化水素の処理により様々な代謝物の増減が観察された。多くの変化はパラコートと過酸化水素に共通していたが、いずれかに選択的に観察された変化も見られた。

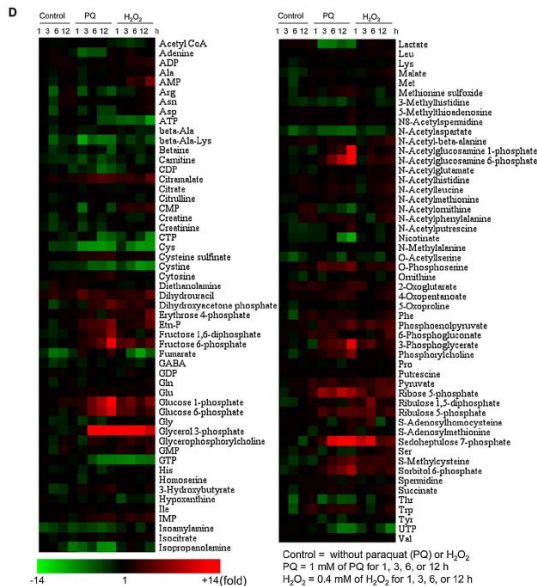


図5 計測された全代謝産物の経時変化(ヒートマップ: time 0を基準に減少を緑で増加を赤で示す) Control(無処理)、パラコート、過酸化水素処理でそれぞれ1, 3, 6, 12時間後の代謝産物の変化を示す

10. 赤痢アメーバの酸化ストレスによる中心炭素代謝、ヌクレオチドリン酸、エネルギー量への影響

図6に上記データのうち、中心代謝(解糖経路を中心として)を示した。パラコートで過酸化水素に比してより高度な変化が見られたが、増減の方向は多く近似していた。解糖経路の中間代謝物、特に上流の代謝物の多くは、酸化剤への暴露により、上昇した。更に Dihydroxyacetone phosphate

(DHAP)が高度に蓄積した。

N-acetylglucosamine 6-phosphateを始めとして中心代謝は多くキチンの生合成経路に redirect されていた。この傾向は特にパラコート処理により顕著で、酸化ストレスが細胞分化の誘因因子であることが示された。

更に Erythrose 4-phosphate, Sedoheptulose 7-phosphate, Ribose 5-phosphate などペントースリン酸経路への流入が増加していた。

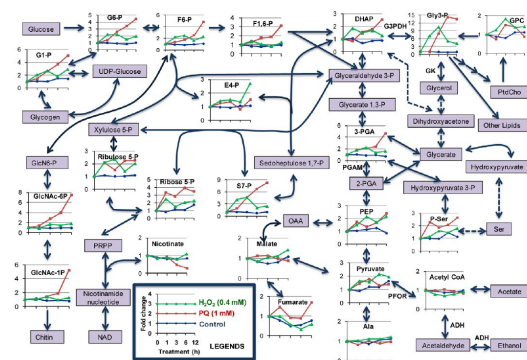


図6 酸化ストレス(赤, パラコート; 緑, 過酸化水素)による中心炭素代謝物の変化を示す

酸化ストレスのヌクレオチドリン酸への影響は、パラコートと過酸化水素で似ていたが、増減は過酸化水素により、より強く見られた。過酸化水素暴露では、特に ATP が増減し、ADP, AMP は時依存的に減少した。同時に Energy charge は過酸化水素処理により、40-50%減少し、細胞内でのエネルギーの枯渇が生じていることが確認された。

11. 酸化ストレスによる解糖経路及び発酵に関する酵素の活性、グリセロール、エタノール、酢酸の細胞内濃度への影響

パラコートにより、解糖経路及び発酵(特にエタノール・酢酸発酵)に関する酵素の活性が影響されるか、検証した。特に、Phosphoglycerate mutase 及び Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase が強い活性阻害を受けた。パラコート暴露はエタノール量を約半分に減らした、一方、グリセロ

ールは14倍蓄積した。酢酸量は変化が見られなかった。

D. 考察及び結論

ジアルジア症・クリプトスポリジウム症・赤痢アメーバ症は世界でも国内でも腸管原虫症の中で最も感染者が多く、注視すべき原虫感染症である。しかし、その病原機構・酸化ストレス耐性機構・細胞分化・遺伝子発現制御を始め不明な点が多い。更に、感染後発症を決定する因子・マーカーは特定されていない。従って、分子疫学的解析が極めて重要であり、本研究では東インドコルカタ周辺における腸管原虫症の感染実態を明らかにした。

ジアルジア症に関する重要な知見は第1に、約10%の人の下痢症例からジアルジアが発見され、下痢の主要な原因病原体であった。第2に多くの感染例が他の病原細菌・ウイルスとの混合感染であり、他の病原体の感染の発症や重症度などを修飾する可能性が示唆された。第3に、人の感染は主に15才以下の小児に検出され、小児の栄養不良・身体と知育の成長障害の要因となる可能性が確認された。第4に、酪農場のウシ並びに労働者から高い感染が確認され、コルカタ周辺地域でも動物由来感染症としての像が確認された。しかしながらウシから検出された遺伝子型と酪農場労働者から検出された遺伝子型とは大きな偏りがあり、酪農場でもAssemblage A及びBのヒト-ヒト感染が主要であると考えられた。

更に、赤痢アメーバに関する有意義な成果を収めた。特にインドにおける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、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た。

更に、赤痢アメーバのマーカー遺伝子座の特定の遺伝子型が病型と関連していることは画期的な発見であった。しかしながら、病型との関連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症例数を増やして検討する必要がある。

ジアルジア・赤痢アメーバの病原機構・酸化ストレス耐性機構に関しても日印共同で研究を推進した。CE-ToFMSを用いた代謝産物の網羅的同定により2種類の酸化ストレスに暴露された赤痢アメーバ栄養型から約100の極性を有する代謝物の同定・定量が達成された。代謝物を抽出し、CE-ToFMSを用いて網羅的代謝プロファイリングを行った。これにより、極めて新規性の高い多くの発見をした。第一に、酸化ストレスにより解糖経路が停止し、その代謝フラックスがキチン合成、ペントースリン酸経路へ方向転換されることを発見した。同時に細胞内エネルギー量が減少し、総合すると、酸化ストレスにより、エネルギーを消費するとともに、新規エネルギー合成を解糖経路で行わなくなることが示された。第二に、酸化ストレスにより、グリセロール3リン酸を介したグリセロールの合成、同時にATPの合成が行われることが明らかとなった。これにより、解糖経路、エタノール発酵によるATP合成がグリセロール発酵によるATP発酵に転化されていることが明らかとなった。今後これらの代謝変化が、ジアルジア等他の嫌気的原虫でも見られるかを、同様の方法により、NICEDとの共同研究により確認することができれば、嫌気的腸管原虫全般における代謝の抗酸化ストレス応答を一般化・普遍化できると予想される。

以上、本研究はジアルジア症・赤痢アメーバ症に関して、疫学・分子疫学・酸化ストレス応答の機構解析など様々な分野で優れた成果を挙げるこ

とができた。本研究班により得られた成果を時期研究班で更に発展させることにより、NIID と Niced との原虫症のモニタリングと病原機構解明や代謝解析の基盤的プラットフォームの共有、共同研究の推進を果たしたい。

E . 健康危険情報

該当せず

F . 研究発表

1. 論文発表

- (i) Khan, S. M., Debnath, C., Pramanik, A. K., Xiao, L., Nozaki, T., and Ganguly, S. (2011) Molecular evidence for zoonotic transmission of *Giardia duodenalis* among dairy farm workers in West Bengal, India. *Vet Parasitol.* 178, 342-345.
- (ii) Husain, A., Sato, D., Jeelani, G., Soga, T., and Nozaki, T. Dramatic increase in glycerol biosynthesis upon oxidative stress in the anaerobic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1831, 2012.
- (iii) Mishra, V., Kumar, A., Ali, V., Nozaki, T., Zhang, K. Y., and Bhakuni, V. Novel protein-protein interactions between *Entamoeba histolytica* d-phosphoglycerate dehydrogenase and phosphoserine aminotransferase. *Biochimie.* 94, 1676-1686, 2012.
- (iv) 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

