

201447009A

厚生労働科学研究委託費
新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業

原虫・寄生虫に対する監視・制御に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 野 崎 智 義

(国立感染症研究所)

平成27 (2015) 年 3 月

厚生労働科学研究委託費
新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業

原虫・寄生虫に対する監視・制御に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 野 崎 智 義

(国立感染症研究所)

平成27 (2015) 年 3 月

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託費（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業）による委託業務として、野崎 智義（受託者の名称）が実施した平成26年度「原虫・寄生虫に対する監視・制御に関する研究（契約書第1条で定めた委託業務題目）」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）	
原虫・寄生虫に対する監視・制御に関する研究-----	1
野崎 智義（国立感染症研究所 寄生動物部）	
II. 委託業務成果報告（業務項目）	
1. 赤痢アメーバの遺伝的多様性と薬剤耐性の解析-----	11
野崎 智義（国立感染症研究所 寄生動物部）	
2. 赤痢アメーバの遺伝的多様性と薬剤耐性の解析 -----	17
津久井 久美子（国立感染症研究所 寄生動物部）	
3. 腸管原虫症の感染実態調査および感受性の遺伝的解析 -----	21
渡辺 恒二（国立国際医療研究センターエイズ治療研究開発センター）	
4. 腸管原虫症の検査診断法開発 -----	27
八木田 健司（国立感染症研究所 寄生動物部）	
5. 原虫ゲノム情報の整備-----	33
泉山 信司（国立感染症研究所 寄生動物部）	
6. マラリア薬剤耐性機構・遺伝子の解析 -----	49
平井 誠（順天堂大学 医学部）	
7. マラリア薬剤耐性機構・遺伝子の解析 -----	51
中野 由美子（国立感染症研究所 寄生動物部）	
8. 寄生蠕虫症の検査診断法開発、条虫の食品汚染感染実態調査 -----	55
a. 幼虫移行症の検査診断法開発	
b. 魚類からの条虫の感染実態調査	
山崎 浩（国立感染症研究所 寄生動物部）	
9. 寄生蠕虫症の検査診断法開発、条虫の食品汚染感染実態調査 -----	61
c. エキノコックス症検査キットの評価	
山崎 浩（国立感染症研究所 寄生動物部）	
10. 蠕虫症の感染実態調査および食品汚染実態調査 -----	63
a. 蠕虫症の感染実態調査	
杉山 広（国立感染症研究所 寄生動物部）	
11. 蠕虫症の感染実態調査および食品汚染実態調査 -----	67
b. 魚類からの線虫の感染実態調査	
杉山 広（国立感染症研究所 寄生動物部）	
III. 学会等発表実績 -----	71
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	79

I. 委託業務成果報告（総括）

厚生労働科学研究委託費
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)
委託業務成果報告(総括)

原虫・寄生虫に対する監視・制御に関する研究

業務主任者 野崎 智義 国立感染症研究所 部長

研究要旨 本研究は国内で感染伝播の起こっている原虫・寄生虫症を中心として、その感染実態を詳細に把握するため、病原性や寄生様式の解明に向けた基盤的研究を行うとともに、感染実態調査等により、監視法の確立を目指す研究を行った。以下の項目に関して調査・研究を実施した。国内で問題となっている腸管原虫症の感染実態調査を行い、糞便内検出キットの開発を行った。赤痢アメーバ等について、標準株の選定に資するためのゲノム解析を行った。網羅的な幼虫移行症診断キットの開発研究を行った。魚類における蠕虫の感染実態調査を行った。条虫症の診断キットの感度・特異度の比較検討を行った。原虫症の病原・薬剤耐性機構の解析に関する研究を行った。当初の計画通り初年度順調に成果を挙げた。

業務項目及び責任者・所属機関・職

①赤痢アメーバの遺伝的多様性と薬剤耐性の解析
野崎 智義 国立感染症研究所(以下感染研) 部長
研究協力者
津久井久美子 同上・主任研究官
泉山信司 同上・主任研究官
②腸管原虫症の感染実態調査および感受性の遺伝的解析
渡辺恒二 国立国際医療研究センター
エイズ治療研究開発セ常勤医師
研究協力者 永田尚義 同上
③腸管原虫症の検査診断法開発
八木田健司 感染研 主任研究官
研究協力者
泉山信司 感染研 主任研究官
④原虫ゲノム情報の整備
泉山信司 感染研 主任研究官
⑤マラリア薬剤耐性機構・遺伝子の解析
平井誠 順天堂大学 准教授
研究協力者
中野由美子 感染研 主任研究官

⑥寄生蠕虫症の検査診断法開発、条虫の食品汚染感染実態調査

山崎浩 感染研 再任用職員
研究協力者 森嶋康之 同上・主任研究官

⑦蠕虫症の感染実態調査および食品汚染実態調査

杉山広 感染研・室長
研究協力者 森嶋康之 同上・主任研究官

A. 研究目的

国内で感染伝播の起こっている原虫・寄生虫症を中心として、その感染実態を詳細に把握するため、病原性や寄生様式の解明に向けた基盤的研究を行うとともに、感染実態調査等により、監視法の確立を目指す研究を行うことを目的とした。具体的には以下の項目に関して調査・研究を実施した。(1)国内で問題となっている腸管原虫症(赤痢アメーバ症、ジアルジア症、クリプトスポリジウム症等)の感染実態調査を行った。また、これらの腸管原虫症の糞便内検出キットの開発を行った。(2)赤痢アメーバ・アカントアメーバ臨床株について、リファレンス

株の選定に資するためのゲノム解析を行った。(3)網羅的な幼虫移行症診断キットの開発研究を行った。(4)魚類における条虫およびアニサキスの感染実態調査を行った。(5)エキノコックス症の診断キットの感度・特異度の比較検討を行った。(6)原虫症の病原・薬剤耐性機構の解析に関する研究を行った。初年度の成果を以下に示す。

B. 研究方法

1. 赤痢アメーバの遺伝的多様性と薬剤耐性の解析

国内の赤痢アメーバ臨床株のゲノム多様性の解析を目的として、国内の臨床株の分離を行い、新規標準ゲノム整備の準備を行う。ゲノム解析は Illumina 社の次世代シーケンサーにより行う。臨床分離株は国際医療研究セとの共同で行った。

赤痢アメーバの薬剤耐性機構を理解するため、インビトロで赤痢アメーバの薬剤（オーラノフィン）耐性株を作製した。

2. 腸管原虫症の感染実態調査および感受性の遺伝的解析

HIV/AIDS のコホート集団における腸管原虫症(赤痢アメーバ症・ジアルジア症・クリプトスポリジウム症)の感染浸淫状況を鏡検、PCR 並びに抗原補足法により調査した。

腸管原虫症の臨床病理像の研究と感受性の相関を明らかにするために、国内の赤痢アメーバ感染既往者を症状に応じて集め、分類し、その感染病理を解析した。

3. 腸管原虫症の検査診断法開発

ジアルジアの糞便内検出キットの評価を行う。クリプトスポリジウム検出系の試作版を作製する。赤痢アメーバのキットを作製するのに必要な単クローン抗体を作成するのに適切な抗原の準備を行った。

4. 原虫ゲノム情報の整備

日本で発生したアカントアメーバ角膜炎症例から分離された代表的な

分離株、共存ウイルス等のゲノム解析を行った。

5. マラリア薬剤耐性機構・遺伝子の解析

熱帯熱マラリアの超高速変異導入株を作成し、変異体ライブラリーを準備した。インビトロでアルテミシニン耐性株の選択を行った。

更に、熱帯熱マラリアで近年報告されているアルテミシニン耐性への関与が指摘される SNPs が、薬剤使用以前には存在するかどうかをアーカイブサンプルで検証した。

6. 寄生蠕虫症の検査診断法開発、条虫の食品汚染等感染実態調査

陽性血清を収集すると共に、組換トキソカラ抗原および組換顎口虫抗原を調製し、診断キットを試作した。

更に、魚類からの条虫の感染実態調査として日本近海産魚介類からの虫体を検出し、季節別の寄生状況把握した。分子同定に資する配列領域を決定し、迅速同定法を開発した。

また、エキノコックス検査キットの評価のために、国内外から単包虫症・多包虫症の患者血清を収集する。既存の商業キットによる評価を行った。

7. 蠕虫症の感染実態調査および食品汚染実態調査

レセプト等の各種データベースを利用して国内の寄生蠕虫症の感染実態を解析した。

更に、魚類からの線虫の感染実態調査として日本近海産魚介類からのアニサキスを検出し、季節別の寄生状況把握した。分子同定に資する配列領域を決定し、迅速同定法を開発した。

C. 研究結果

1. 赤痢アメーバの遺伝的多様性と薬剤耐性の解析

国内の赤痢アメーバ臨床株のゲノム多様性の解析を目的として、国際医療研究セと共同で国内患者からの新たに臨床株を 4 株分離した。

また、既存の 3 株の日本由来株及び

2株の世界標準株のゲノム配列を300bpのinsertサイズをもつライブラリーを構築してIlluminaによりGAIIa及びHiSeqにより解析した。得られたリードの全塩基数は81-105億塩基であり、データベース上のHM-1の標準ゲノム配列に対して、マップされたリードはPaired readは全リードの97.9-99.5%であった。

オーラノフィン耐性原虫は約一年で0.4 μ M auranofin存在下で安定に増殖する株、auranofin resistant (AR)株の樹立に成功した。auranofin 0.4 μ Mで維持した耐性株と親株についてauranofinによる細胞増殖阻害度を検討したところ、野生株のIC50が0.3~0.4 μ Mであったのに対してAR株のEC50は0.9 μ M程度であった。次年度以降のトランスクリプトーム解析の準備が終了した。

2. 腸管原虫症の感染実態調査および感受性の遺伝的解析

HIV感染合併ジアルジア症とクリプトスポリジウム症に対する後方視的検討を行った。2003-2013年までにNCGMで診断されたHIV感染合併ジアルジア症とクリプトスポリジウム症症例数はそれぞれ計9, 19例であり、赤痢アメーバ症（多い年では年間25例）と比較すると、どちらの原虫も診断数は非常に少なかった。しかし検査にIC法を導入することにより診断件数が急に増加しており、今後診断法を考慮する必要があるとされた。

無症候性赤痢アメーバ症患者の臨床的検討に関しては、観察研究では無症候性赤痢アメーバ抗体陽性者の侵襲性赤痢アメーバ症発症リスクが1年間で20%と高値を示すのに対し、抗体陰性者の侵襲性赤痢アメーバ症発症リスクは5年間で5%以下と有意な差を示し、抗体価の推移から、無症候性赤痢アメーバ抗体陽性者は、無症候性潜伏感染を伴いその増悪により将来的に侵襲性赤痢アメーバ症をよ

り高頻度に発症することが示された。また、無症候性HIV感染者の11.3%で内視鏡的に確認できるアメーバ性腸炎を認めることが明らかとなった。これら無症候ながら内視鏡的に腸炎を認める患者では、およそ8割は赤痢アメーバ抗体が陽性であること、6割強で便潜血陽性となることが明らかとなった。

HIV感染者で虫垂炎を発症した患者45例のうちの虫垂切除標本の病理検査で、4例に栄養型*E. histolytica*を認めた。原因不明の虫垂炎の原因に赤痢アメーバ症があることが示唆された。

宿主因子に関する検討を目的として無症候で内視鏡検査を行った57症例の検討を行った。無症候性赤痢アメーバ症を有するHIV感染者には、赤痢アメーバ性潰瘍を有していないHIV感染者と比してHLA DQB1*06:01が高頻度（約7倍, p value= 0.001）に見られることが分かった。また、肝膿瘍と腸炎の症例を比較した検討では、HLA DQB1*04:01が腸炎の症例で高頻度（約2.5倍, p value= 0.042）見られることが分かった。

3. 腸管原虫症の検査診断法開発

実用型ジアルジア迅速診断用イムノクロマト (Gia-IC) を作成、使用して、インドの下痢症検体を用いて、検査・評価を行った。ジアルジア陽性検体に対しては92.2%の感度が得られたが、陰性検体に対しては、全体として27.6%の割合で陽性反応がみられ、特異性は72.4%と低かった。非特異反応あるいは抗原エピトープ差が関連するものと思われた。一方、このジアルジア検査と同時にクリプトスポリジウム検査も行う、いわゆるDual-testを目指す開発に向けて、ドットブロットおよびELISA法により抗クリプトスポリジウム抗体のスクリーニングを行い、クリプトスポリジウムIC(Cr-IC)に適する抗体クローン候補

を選択した。

4. 原虫ゲノム情報の整備

アメーバ性角膜炎で問題となる

Acanthamoeba sp. 株 (18S rRNA 遺伝子による T4 遺伝子型の、患者分離株の 2 株、151 株と 161 株) について、遺伝情報を網羅的に取得するため、次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析を行った。PYGC 培地を用いて継代培養した栄養体よりゲノム DNA を抽出し、ゲノム解読用ライブラリの構築後、Illumina HiSeq 2000 シーケンサーを用いて配列の読み取りを行った。結果として、151 株からは 1.5 億リード、15.4Gbase の配列、161 株から 1.4 億リード、14.5Gbase の配列が得られた。de novo assemble を行った結果、151 株の N50 が 5,067bp、最大コンティグ長が 139Kbp、総塩基長が 68.7Mbp、コンティグ数 18,704 本が得られた。161 株からは、N50 が 4,834bp、最大コンティグ長が 290Kbp、総塩基長が 68.3Mbp、コンティグ数 18,925 本が得られた。近縁の

Acanthamoeba castellanii Str. Neff の 42Mbp に対して 1.6 倍のゲノムサイズが得られたこと、Read mapping でも 7 割のリードは一致しなかったことから、T4 遺伝子型の検討には、T4 遺伝子型のゲノムを整備する必要があると考えられた。カバレッジは 200 倍あり、ペアードエンドリードのペア関係がよく維持されており、ゲノム全域の配列をほぼ取得できたと考えられた。得られた配列には、ミトコンドリアゲノム、病原性に重要とされる mannose binding protein 遺伝子の配列が含まれていた。ミトコンドリアゲノムは病原性の疫学解析に用いられていたことから、これに着目した。ミトコンドリアゲノム配列はそれぞれ 1 つのコンティグとして得られていたが、連続的な環状様の構造であることが勘案されず、末端同士が接続されていなかった。相同の配列部分を接続して環状にし、

Read mapping を実行して接続に問題ないことを確認し、配列を確定した。ミトコンドリア登録配列 (U12386、41,591bp) を基準として、それぞれアノテーションを付与した。完成したミトコンドリアゲノムの大きさは

42,337bp、39,237bp で、相互の大きさに 1 割弱程の大小の違いがあった。151 株は ORF (1.2Kbp、Blast 検索にヒット無し) の増加、161 株は LSU rRNA 遺伝子のイントロンの欠失

(860bp) が主な理由で、大きさに違いが生じていた。ミトコンドリアの主要な遺伝子の存在と並び順に大きな変化はなかったが、機能不明な ORF には差異が認められ、151 株と 161 株ともに ORF83 (252bp) が非コード領域に変化、ORF115 の拡大 (348bp→534bp、576bp)、161 株で ORF349 (1Kbp) が非コード領域に変化していた。T4 型と型別された

Acanthamoeba であっても遺伝子の増減が存在し、多様である可能性が示唆された。

5. マラリア薬剤耐性機構・遺伝子の解析

野生型マラリア原虫では生存できない高濃度の PQ (30mg) 経口投与下で生存・増殖する PQ 耐性原虫をクローン化することに成功した。マラリア原虫の薬剤耐性を規定する 2 つのポイントが定義されている。1) 薬剤選択を一定期間解除し、再び選択圧を加えても耐性が低下しないこと。2) 原虫集団から単離したクローンにおいても耐性が維持されていることである。本研究で単離した PQ 耐性原虫は、この 2 つの定義ともクリアした。

12 クール (1 クール: マウスへのミューテーターの感染・薬剤投与・再燃したマウスから感染血液を摂取して新しいマウスへの接種) の実験をおこなった結果、野生型原虫では完全に死滅する (再燃なし) 高濃度の Art (100mg) 存在下で生存する Art 耐性

原虫集団を得ることに成功した。

アルテミシニン使用前の1984年から1998年までの東南アジアのアーカイブサンプルから耐性獲得に必要なだと報告されている耐性座位の一塩基置換 (SNP) を決定した。アジア由来の55サンプルのうち10サンプルがDNAの回収とMAL10-688956とMAL13-1718319座位の決定が可能であった。東南アジアの株は10サンプルすべてがMAL10-688956とMAL13-1718319ともに野生型であった。

6. 寄生蠕虫症の検査診断法開発、条虫の食品汚染等感染実態調査

トキソカラ症キットの抗原濃度を再評価し、健常者血清での非特異的反応を排除した。最適化されたキットの性能評価では、トキソカラ症患者血清6例中5例は陽性反応を示し、健常者血清はすべて陰性であった。顎口虫症については、2種類の抗原を用いたキットを試作し、それぞれの抗原に対する反応性を比較した。その結果、rGsLiC18とrGsMMPを用いたキットの比較では、発色強度とELISAによる吸光度の相関関係もrGsLiC18抗原が優っていた。この結果から、実用化に向けた顎口虫症キットの抗原はrGsLiC18に決定した。トキソカラ症キットでは従来のalkaline phosphatase発色系に替わって金コロイド検出系に替えたが、キットの性能は変わらなかった。さらに、金コロイド系に変更したことによって、二次抗体滴下操作が不要となり、操作がより簡便となったばかりか、検査に要する時間も20分から15分に短縮することができた。顎口虫症キットは特許申請予定である。

更に、国内で発生する裂頭条虫症の感染実態調査として、人体寄生の裂頭条虫3種は容易に鑑別する方法を確立した。

既存のエキノコックス症診断キッ

トの評価を行った。肝単包性エキノコックス症患者血清24検体中、WBキットでは20検体(感度83.3%)、ICTキットでは6検体(感度25.0%)がそれぞれ陽性と判定された。WBキットはいずれの所見分類においてもICTキットの感度を上回った。患者血清24検体を用いて両キットの検査感度を調べたところ、ウェスタンブロット法は83.3%、イムノクロマト法は25.0%と算定された。

7. 蠕虫症の感染実態調査および食品汚染実態調査

日本に固有の伝統的な食文化、特に魚介類と密接に関連して発生数が多いアニサキス症の発生状況を文献検索により症例探査を行った。その結果、劇症型アニサキス症を含めたアニサキスアレルギーの症例発生は少数ながらも報告があり、発生動向に注目する必要があることが分かった。特に本症ではアニサキス虫体の検出がない場合も多く、免疫検査の診断的意義が認められ、取り組みが必要である。更に感染実態の調査として非加熱摂食が一般的になりつつあるサンマに注目し、アニサキスI型虫体の寄生状況を詳細に調べた結果、虫体は可食部である筋肉からも検出され、しかも検出虫体は本邦での人体寄生の主要原因種と同定された。

わが国における寄生蠕虫症の発生数を推定する目的で診療報酬明細書(レセプト)データベースの活用を検討した。母集団33万人規模データベースを用い、2005~2009年の寄生蠕虫症のレセプト件数を調べ、登録数が最も多かった蟯虫症について拡大推計を試みた。同症の年間発生数は約2.8万人と推定された。この推定発生数の妥当性評価のため、発生数が最大となった年齢階級(5~9歳)について、日本寄生虫予防会の検査結果に基づく推計値との比較を行ったところ、両者は概ね一致し、レセプトデータを

用いた発生推定は有望な方法と考えられた。

D. 考察

本研究は国内で問題となる主要な原虫・寄生虫症の(1)検査・診断法キットの確立、(2)感染抵抗性・薬剤耐性機構の解明、(3)リファレンス・サーベイランスシステムの構築を目指している。初年度はいずれの分野、更に業務項目(分担研究)においても着実に成果を挙げた。

以上の研究を継続することにより、本研究が中・長期的に目指す以下の具体的成果が期待される。まず、(1)としては HIV 陽性者や知的障害者において高度に感染のひろがる腸管感染症の病原体診断迅速キットが実用化されると期待される。次に、国内で最も検査依頼の多い幼虫移行症の血清診断キットが統合・実用化されることが期待される。(2)としては、赤痢アメーバ症の易感染・感染抵抗性に関与するヒト側・病原体側因子が解明され、感染予後予測に資するマーカーが同定されることが期待される。更に、マラリア・赤痢アメーバの新規薬剤耐性機構が解明され、薬剤耐性のモニタリングが可能となることが予想される。(3)としては、検査・診断キットの実現により、国内における腸管原虫症、主要な蠕虫症のサーベイランスが確立されると期待される。また、赤痢アメーバ・アcantアメーバ等の標準株のゲノム情報が蓄積され、診断用国内標準品として国内に供与する標準株を制定されると共に診断に有効なマーカーが提示可能となることが期待される。

更に、次年度以降は特に赤痢アメーバ・アcantアメーバを含めた原虫・寄生虫ゲノム情報の拡充を強化し、細菌・ウイルス感染症で整備されつつあるのと同様な、全ゲノム情報を基盤とした分子疫学的解析が可能となるように、原虫・寄生虫ゲノム情報の整備

を強化する予定である。

E. 結論

本年度、本研究班はほぼ研究計画通りの成果を挙げるとともに、来年度への十分な準備となる研究成果を生んだ。本研究成果は、検査診断キットの開発・普及、検査診断基準のガイドラインの策定、国内の感染実態の解明に資すると期待される。また、他の寄生虫症を含めた寄生虫症の新規薬剤・ワクチン開発の基盤整備に資すると期待される。これらは WHO 等国際機関との連携に際しても極めて重要である。

F. 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) 該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

- Marumo, K.*, Nakada-Tsukui, K.*, Tomii, K., and Nozaki, T. Ligand heterogeneity of the cysteine protease binding protein family in the parasitic protist *Entamoeba histolytica*. *Int. J. Parasitol.* 44, 625-35 2014.*equal contribution.
- Jeelani, G. and Nozaki, T. Metabolomic analysis of *Entamoeba*: applications and implications. *Curr. Opin. Microbiol.* 20C:118-124, 2014.
- Jeelani, G., Sato, D., Soga, T., Watanabe, H., Nozaki, T. Mass Spectrometric analysis of L-cysteine metabolism: physiological role and fate of L-cysteine in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *MBio.* 2014 Nov 4;5(6). pii: e01995-14.
- Chandra, M., Mukherjee, M., Srivastava, V.K., Saito-Nakano, Y., Nozaki, T., Datta, S. Insights into GTP/GDP cycle of RabX3, a novel GTPase from *Entamoeba histolytica* with tandem G-domains. *Biochemistry* 53, 1191-1205, 2014.

- Hertz, R., Tovy, A., Kirschenbaum, M., Geffen, M., Nozaki, T., Adir, N., and Ankri, S. The *Entamoeba histolytica* Dnmt2 homolog (EhmetH) confers resistance to nitrosative stress. *Eukaryot Cell*. 13, 494-503, 2014.
- Valdés, J., Nozaki, T., Sato, E., Chiba, Y., Nakada-Tsukui, K., Villegas-Sepúlveda, N., Winkler, R., Azuara-Liceaga, E., Mendoza-Figueroa, M. S., Watanabe, N., Santos, H. J., Saito-Nakano, Y., Galindo-Rosales, J. M. Proteomic analysis of *Entamoeba histolytica* in vivo assembled pre-mRNA splicing complexes. *J Proteomics*. 2014 Aug 8. pii: S1874-3919(14)00388-1.
- Anwar, S., Dikhit, M. R., Singh, K. P., Kar, R. K., Zaidi, A., Sahoo, G. C., Roy, A. K., Nozaki, T., Das, P., and Ali, V. Interaction between Nbp35 and Cfd1 proteins of cytosolic Fe-S cluster assembly reveals a stable complex formation in *Entamoeba histolytica*. *PLoS One* 9, e108971, 2014.
- Itoh, K., Yagita, K., Nozaki, T., Katano, H., Hasegawa, H., Matsuo, K., Hosokawa, Y., Tando, S., Fushiki, S. An autopsy case of *Balamuthia mandrillaris* amoebic encephalitis, a rare emerging infectious disease, with a brief review of the cases reported in Japan. *Neuropathology*. 2014 in press.
- Lee, Y. A., Saito-Nakano, Y., Kim, K. A., Min, A., Nozaki, T., Shin, M. H. Modulation of endogenous cysteine protease inhibitor (ICP) 1 expression in *Entamoeba histolytica* affects amoebic adhesion to extracellular matrix proteins. *Exp Parasitol*. 2014 Dec 8;149C:7-15.
- Emmanuel, M., Saito-Nakano, Y., Nozaki, T., and Datta, S. Small GTPase Rab21 mediates Fibronectin induced actin reorganization in *Entamoeba histolytica*: implications in pathogen invasion. *PLoS Pathog* 2015 in press.
- Santos, H. J.,*, Imai, K.*, Makiuchi, T., Tomii, K., Horton, P., Nozawa, A., Ibrahim, M., Tozawa, Y., and Nozaki, T. A novel mitochondrial β -barrel outer membrane protein in *Entamoeba*. *Sci Rep* in press.
- Watanabe K, Aoki T, Nagata N, Tanuma J, Kikuchi Y, Oka S, Gatanaga H. Clinical significance of high anti-entamoeba *histolytica* antibody titer in asymptomatic HIV-1-infected individuals. *J Infect Dis*. 2014; 209: 1801-1807.
- Watanabe K, Nagata N, Sekine K, Watanabe K, Igari T, Tanuma J, Kikuchi Y, Oka S, Gatanaga H. Asymptomatic intestinal amebiasis in Japanese HIV-1-infected individuals. *Am J Trop Med Hyg*. 2014; 91: 816-820.
- 小林正規, 柳川泰昭, 渡辺恒二. 劇症型アメーバ症の診断および治療. 日本集中治療医学会雑誌 2015 in press.
- 渡辺恒二. 日本の HAART 時代における HIV 感染合併ジアルジア症・クリプトスポリジウム症. *IASR*. 2014; 35: 192-194.
- Siregar JE, Kurisu G, Kobayashi T, Matsuzaki M, Sakamoto K, Mi-Ichi F, Watanabe YI, Hirai M, Matsuoka H, Syafruddin D, Marzuki S, Kita K. Direct evidence for the atovaquone action on the *Plasmodium* cytochrome bc1 complex. *Parasitol Int*. S1383-5769(14)00133-0. 2014
- Hikosaka K, Hirai M, Komatsuya K, Ono Y, Kita K. Lactate retards the development of erythrocytic stages of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Int*.

- S1383-5769(14)00109-3. 2014
- Imai T, Iwawaki T, Akai R, Suzue K, Hirai M, Taniguchi T, Okada H, Hisaeda H. Evaluating experimental cerebral malaria using oxidative stress indicator OKD48 mice. *Int J Parasitol.* 44(10):681-5. 2014
- Honma H, Hirai M, Nakamura S, Hakimi H, Kawazu S, Palacpac NM, Hisaeda H, Matsuoka H, Kawai S, Endo H, Yasunaga T, Ohashi J, Mita T, Horii T, Furusawa M, Tanabe K. Generation of rodent malaria parasites with a high mutation rate by destructing proofreading activity of DNA polymerase δ . *DNA Res.* 21(4):439-46. 2014.
- Masayuki Oki, Satom Asai, Yumiko Saito-Nakano, Taira Nakayama, Yumiko Tanaka, Hiroshi Tachibana, Hiroshi Ohmae, Tomoyashi Nozaki, Hayato Miyachi. (2014) A case of quadruple malaria infection imported from Mozambique to Japan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 90(6):1098-101.
- Saenseeha S, Janwan P, Yamasaki H, et al. A dot-ELISA test using a *Gnathostoma spinigerum* recombinant matrix metalloproteinase protein for the serodiagnosis of human gnathostomiasis. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 45:990-996, 2014.
- 山崎 浩, Rubinsky-Elefant G, Lim PKC, 他. イムノクロマトキットを用いた幼虫移行症の迅速血清診断. *寄生虫学研究 材料と方法* 2014 版. pp. 43-45, (印刷中). 2015 年 2 月.
- 坪川大悟, 生野 博, 武井勝明, 他. 裂頭条虫の簡易同定法について. *Clin. Parasitol.*, 25:89-91, 2014.
- 山崎 浩, 坪川大悟, Mercado R, 倉持利明. ミトコンドリア DNA 解析に基づいた裂頭条虫類の簡易同定法. *寄生虫学研究材料と方法* 2014 版. pp. 47-49, (印刷中). 2015 年 2 月.
- 山崎 浩, 森嶋康之, 杉山 広. ホルマリン固定パラフィン包埋切片内に検出された寄生虫の分子同定. *寄生虫学研究 材料と方法* 2014 版. pp 67-72, (印刷中). 2015 年 2 月.
- 田中照久, 平田哲生, 東新川実和, 岸本一人, 外間 昭, 金城福則, 林 裕樹, 尾下陽大, 石野信一郎, 白石祐之, 西巻 正, 森嶋康之, 杉山 広, 山崎 浩, 藤田次郎. 2014. ネパール人留学生の単包虫症の 1 例. *Clinical Parasitology* 25, 95-98.
- 森嶋康之, 市村静江, 山崎 浩, 杉山 広. ネパール人の単包虫症: *Echinococcus ortleppi* による心寄生例. 2014. *Clinical Parasitology* 25, 99-101.
- 森嶋康之, 山崎 浩. 2014. 蟯虫症, 腸管内条虫症. *臨床と微生物* 41, 347-351.
- 杉山 広, 生野 博, 武井勝明, 森嶋康之, 柴田勝優, 市村静江, 山崎 浩. 本邦で 2012 年に発生したアニサキス症例の原因虫に関する分類学的検討. *Clinical Parasitology* (日本臨床寄生虫学会誌), 25, 77-79, 2014.

2. 学会発表

- 津久井久美子, 丸茂このみ, 富井健太郎, 野崎智義 腸管寄生性原虫赤痢アメーバにおけるリソソーム酵素輸送受容体分子ファミリー (CPBF) のリガンド多様性とドメイン構造の解析 第 37 回日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 25 日 (火) ~ 27 日 (木) 横浜市 渡辺菜月, 野崎智義, 津久井久美子,

腸管寄生性原虫 *Entamoeba histolytica* におけるフォスファチジルイノシトール 4 リン酸の局在
第 87 回日本生化学会大会 2014 年 10 月 15 日 (水) ~18 日 (土)
京都市

津久井久美子、丸茂このみ、中野由美子、野崎智義 寄生性原虫赤痢アメーバにユニークなリソソーム酵素輸送受容体群 第 66 回日本細胞生物学会大会 2014 年 6 月 11 日 (水) ~13 日 (金) 奈良県奈良市、シンポジウム「比べてみよう:細胞ダイナミクスの共通性と独自性」招待講演

渡辺恒二、永田尚義、柳川泰昭、小林泰一郎、水島大輔、西島健、青木孝弘、木内英、本田元人、田沼順子、塚田訓久、瀧永博之、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一. HIV 感染患者における赤痢アメーバの潜伏感染についての検討. 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会

小林泰一郎、渡辺恒二、古川恵太郎、柴田怜、柳川泰昭、谷崎隆太郎、水島大輔、西島健、青木孝弘、木内英、本田元人、田沼順子、照屋勝治、塚田訓久、瀧永博之、菊池嘉、岡慎一. HIV 合併アメーバ性肝膿瘍の発症リスクとしての HLA 対立遺伝子の解析. 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会

Kobayashi T, Watanabe K, Aoki T, Nagata N, Tanuma J, Kikuchi Y, Oka S, Gatanaga H. Clinical significance of high anti-entamoeba histolytica antibody titer in asymptomatic HIV-1-infected individuals. 54th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), Washington D.C. USA.

Kobayashi T, Watanabe K, Murata Y, Gatanaga H, Kikuchi Y, Yano H, Igari T, Oka S. Amoebic

Appendicitis among HIV-1 Infected Individuals in Japan. 54th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), Washington D.C. USA.

池田 美恵、平井 誠、美田 敏宏 マラリアミューテーターを用いたピペラキン耐性原虫の迅速単離と耐性機構の解明 第 84 回日本寄生虫学会本大会

鈴江 一友、平井 誠、今井 孝、谷口 委代、岡田 紘子、小安 重夫、久枝 一 マラリア感染宿主における皮膚炎症状軽快化の分子メカニズム 第 84 回日本寄生虫学会本大会

谷口 委代、宮内 栄治、中村 昇太、平井 誠、鈴江 一友、今井 孝、岡田 紘子、大野博司、堀井 俊宏、久枝 一 ネズミマラリアにおける腸管病変と腸内細菌叢の変化 第 84 回日本寄生虫学会本大会

本間 一、平井 誠、新倉 保、美田 敏宏、小林 富美恵、堀井 俊宏、遠藤 弘良 ミューテーターマラリア原虫を用いた突然変異蓄積パターンの解析 第 84 回日本寄生虫学会本大会

坪川大悟、生野 博、武井勝明、他. 裂頭条虫の簡易同定法について. 第 25 回日本臨床寄生虫学会大会. 2014 年 6 月, 東京.

Yamasaki H, Ichimura S, Kuramochi T, Mercado R. Phylogenetic analysis of *Diphyllobothrium dendriticum* from Chile based on mitochondrial DNA. XIII International Congress of Parasitology, August, 2014. Mexico City.

田中照久、平田哲生、東新川実和、岸本一人、外間 昭、金城福則、林 裕樹、尾下陽大、石野信一郎、白石祐之、西巻 正、森嶋康之、杉山 広、山崎 浩、藤田次郎. 2014. ネパール人留学生の単包虫症の 1 例. 第 26 回日本臨床寄生虫学会大会

(東京).

森嶋康之, 市村静江, 山崎 浩, 杉山 広.
2014. ネパール人の単包虫症：
Echinococcus ortleppi による心
寄生例. 第 26 回日本臨床寄生虫
学会大会 (東京).

森嶋康之. 2014. エキノコックス症.
平成 26 年度動物由来感染症 (狂
犬病予防含む) 対策技術研修会
(東京).

森嶋康之. 2015. 北海道以外の都府県
におけるエキノコックス症. 平成
26 年度日本獣医師会学術学会年
次大会市民公開シンポジウム (岡
山).

杉山 広, 森嶋康之, 山崎 浩, 増え
ているのか、アニサキス等の寄生
虫性食中毒. 衛生微生物技術協議
会第 33 回研究会, 平成 26 年 5 月
30 日, 東京.

杉山 広, 生野 博, 武井勝明, 森嶋
康之, 柴田勝優, 市村静江, 山崎
浩, 本邦で 2012 年に発生したア
ニサキス症例の原因虫に関する
分類学的検討. 第 23 回日本臨床
寄生虫学会大会, 平成 26 年 6 月
14 日, 東京.

H. 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

II. 委託業務成果報告（業務項目）

厚生労働科学研究委託費
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)
委託業務成果報告(業務項目)

赤痢アメーバの遺伝的多様性と薬剤耐性の解析

担当責任者 野崎 智義 国立感染症研究所 部長

研究要旨 赤痢アメーバ症は国内で最も多くの報告数をもつ寄生虫・原虫症であり、その発生動向調査と感染予後と薬剤感受性等の予測に繋がる新規診断・型別法の開発は重要である。本研究ではその知的基盤を確立することを目的として、赤痢アメーバの臨床分離株及び標準株のゲノム配列取得を行い、ゲノム情報基盤を確立することを目的としている。本年度は標準株 2 株、国内臨床分離株 3 株のゲノム配列の獲得とデータベース登録された標準株に対するマッピングを行った。更に、新たに赤痢アメーバ臨床分離株を 4 株分離することに成功した。

A. 研究目的

本研究は本邦で感染症法に指定される最も重要な原虫・寄生虫疾患のひとつであり、年間届出数の最も多い赤痢アメーバ症に関する研究を行う。下痢症は世界の主要な死亡原因のひとつであり、消化管感染症は全死亡の約 4% (216 万人) を占める重要な疾患群であり、HIV/AIDS、結核と同様に極めて重要な死因の一部を占める(WHO Report, 2009)。消化管感染症のうち原生生物による感染症として重要なのは、赤痢アメーバ症、ジアルジア症、クリプトスポリジウム症、ブラストシスチス症などであり、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。

我々は国内に流行する赤痢アメーバ症の隆盛を監視し、アウトブレイクなどを早期感知し、拡散を防止するとともに、治療薬の選択や効果、感染予後などを予見できるシステムの構築を長期的に目指し、それらの情報基盤となる赤痢アメーバ国内分離株の全ゲノム情報の収集と解析を行うこととした。初年度は、これまでに確立さ

れた患者の背景・病状などの異なる日本由来株 3 部と標準株 2 株に関してゲノム解読を行った。その解析経過に関して報告する。更に、新規分離株を臨床例から 4 株獲得した。

B. 研究方法

1. ゲノム解析に供した赤痢アメーバ臨床株および標準株

ゲノム解読に供した日本由来株は以下の通りである。KU27, 無症候性患者から分離された。知的障害者施設の治療抵抗性症例から分離された株であり(J Clin Microbiol 4081, 2002)、同一の遺伝子型が同一患者から繰り返し分離されている(Genotype J4)。KU48, 肝膿瘍穿刺液から分離された(Parasitol Int 59, 75, 2010)(Genotype J13)。KU50, 赤痢症状のある患者便から分離された(Parasitol Int 59, 75, 2010)(Genotype J15)。標準株は以下の通りである。HM-1: IMSS cl6, メキシコの下痢患者の便から分離された世界中で用いられている標準株である。Jaig Craig Venter Institute, Sanger Institute のゲノム解読でも用いられた。G3, HM-1: IMSS cl6 由来の株であり、amoebapore 遺伝子の発現が epigenetic silencing により抑圧され

ている。

2. ゲノム配列取得解析

ゲノム DNA は QIAamp DNA Mini Kit または Blood and Cell Culture DNA midi kit(Qiagen)を用いて抽出した。得られたゲノム DNA は 250-300bp の平均インサートサイズをもつペアドライブラリーを作成し、Genome Analyzer IIs (GAIIx)または HiSeq (Illumina)を用いて配列取得した。

3. 赤痢アメーバ臨床株の確立

国立医療研究センター、エイズ研究センターの外来を受診する患者の中から Robinson 培地を用いて細菌共棲状態(xenic)で常法に従い(Trans R Soc Trop Med Hyg 62, 285, 1968)、分離・培養を行った。更に、Kobayashiらの開発した Yeast extract, iron, maltose, dihydroxyacetone, serum (YIMDHA)medium(J Parasitol 91, 1, 2005)を用いて *Crithidia fasciculata* との二者培養(monoxenic)を行い、赤痢アメーバ 4 株を分離した。

(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。

C. 研究結果

1. 標準株 HM1:IMSS cl6 のゲノム解読

HM1:IMSS cl6 (以下 HM-1)のゲノム DNA の 300bp 平均長のインサートサイズのライブラリーの解読結果を図 1, 2 にまとめた。paired end が読めた配列数が 8100 万、読了した総ヌクレオチド数は 81 億であった。JCVI のデータベースの配列にマップを行ったところ、99.5%の read がマップされた。Paired read は全リードの 97.6%であった。作成された contig の N75, N50, 数, 最長、全塩基数はそれぞれ 2835, 5584, 3944, 66,417, 13,301,781 であった。

Read mapping of HM1 sequencing data

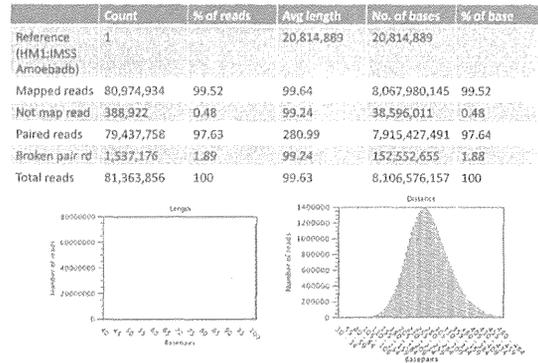


図 1 HM1 株の Illumina による NGS の結果

2. 標準株 G3 のゲノム解読

G3 は HM-1 の誘導株であり、遺伝的に HM-1 と同一或いは近似と考えられる。しかしながら、独立して維持されてきたこと、更にイスラエルのワイズマン研究所からの分与株であること、逆遺伝学的手法に多用されるため遺伝的情報が不可欠であること、などの理由から標準株のひとつとして全ゲノム解析を行うこととした。G3 のゲノム DNA の 300bp 平均長のインサートサイズのライブラリーの解読結果を図 2 にまとめた。paired end が読めた配列数が約 1 億、読了した総ヌクレオチド数は 101 億であった。JCVI のデータベースの配列にマップを行ったところ、99.5%の read がマップされた。Paired read は全リードの 97.4%であった。作成された contig の N75, N50, 数, 最長、全塩基数はそれぞれ 2700, 5711, 5793, 51,440, 14,118,527 であった。

Read mapping of G3 sequencing data

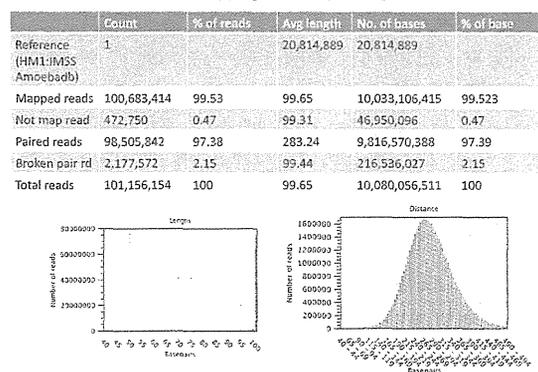


図 1 G3 株の Illumina による NGS の結果

3. 日本臨床分離株 KU27 のゲノム解読

KU27 は日本人の無症候の知的障害者から分離された株である。KU27 のゲノム DNA の 300bp 平均長のインサートサイズのライブラリーの解読結果を図 1, 2 にまとめた。paired end が読めた配列数が 9300 万、読了した総ヌクレオチド数は 105 億であった。JCVI のデータベースの配列にマップを行ったところ、97.9%の read がマップされた。Paired read は全リードの 88.8%であった。作成された contig の N75, N50, 数, 最長、全塩基数はそれぞれ 4113, 8216, 3188, 60580, 13,992,478 であった。

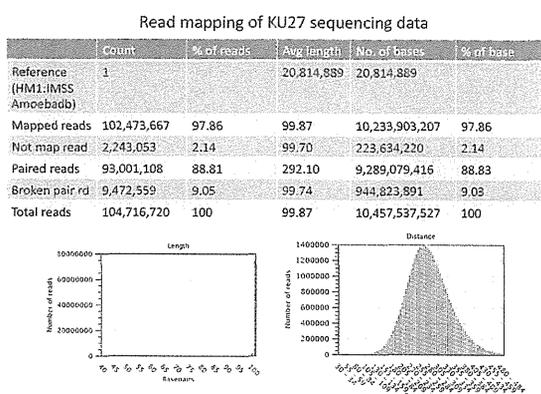


図 3 KU27 株の Illumina による NGS の結果

4. 標準株 KU48 のゲノム解読

KU48 は肝膿瘍患者の膿瘍液から分離された希少な分離株である。KU48 のゲノム DNA の 300bp 平均長のインサートサイズのライブラリーの解読結果を図 4 にまとめた。paired end が読めた配列数が 9100 万、読了した総ヌクレオチド数は 105 億であった。JCVI のデータベースの配列にマップを行ったところ、99.7%の read がマップされた。Paired read は全リードの 91.1%であった。作成された contig の N75, N50, 数, 最長、全塩基数はそれぞれ 3116, 6554, 3683, 50,191, 13,531,012 であった。

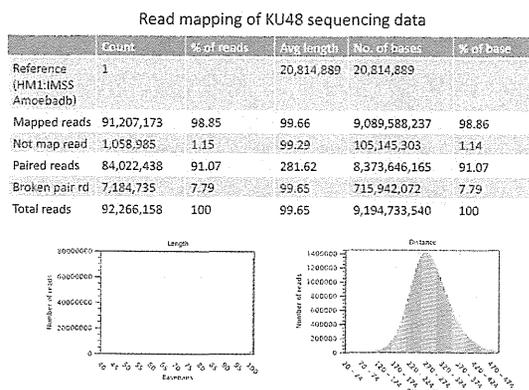


図 4 KU48 株の Illumina による NGS の結果

5. KU50 のゲノム解読

KU50 は赤痢・腸炎の患者の便から分離された株である。KU50 のゲノム DNA の 300bp 平均長のインサートサイズのライブラリーの解読結果を図 4 にまとめた。paired end が読めた配列数が 9100 万、読了した総ヌクレオチド数は 92 億であった。JCVI のデータベースの配列にマップを行ったところ、98.9%の read がマップされた。Paired read は全リードの 91.1%であった。作成された contig の N75, N50, 数, 最長、全塩基数はそれぞれ 1877, 4184, 10,256, 50515, 19,825,889 であった。

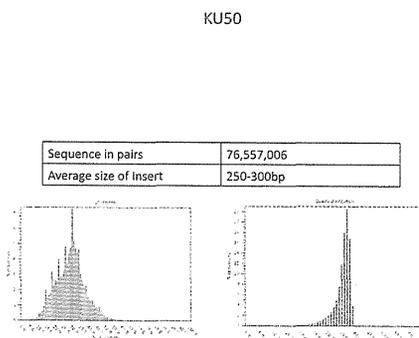


図 5 KU50 の Illumina による NGS の結果

6. 臨床検体からの新規赤痢アメーバ分離株の確立

以下の分離株を分離した。NA-11, HIV 陽性の 40 才代の日本人男性

(MSM)より、大腸内視鏡検査の際の腸洗浄液から分離された。NA-19, 40才代の HIV 陰性の日本人女性(CSW)の肝膿瘍穿刺液から分離された。NA-21, 40才代の HIV 陽性日本人男性(bisexual)の便(水様下痢)から分離された。NA-22, 30才代の HIV 陽性の日本人男性の正常便中の囊子から分離された。現在いずれも Robinson medium 中で培養されている。このうち NA-11, NA-19 の 2 株に関して monoxenic 培養が確立している。

D. 考察

我々は赤痢アメーバ症の国内における流行をモニターし、病原機構の理解に根ざした遺伝子タイピング法を開発し、感染予後・治療の必要性・予後などを予測することを可能とする検査システムを構築することを長期的な目的として研究を行っている。そのために本研究では、遺伝子診断の基礎となる全ゲノム情報の整備を行った。初年度は結果に示したとおり、標準株 2 株、既存の日本由来株 3 株を NGS を用いて配列取得した。得られた塩基数は十分であるが、現時点では contig 数、supercontig 数が多く、まだ合理的な scaffold への assembly を行うことができていない。今後 PAGIT 等のプログラムの利用により gap を埋め、株間比較が可能なゲノム情報の整備に努めたい。我々のこれまでの先行研究によりタンパク質をコードしない高度に多型を示す領域 tRNA 近傍短反復配列(t-RNA-linked short tandem repeat、以下 tRNA-STR)の 5 種の座位を標的とした多型解析によって、日本由来株を型別したところ高度の多様性が得られている。例えば MSM 由来の 19 株の 5 遺伝子座の解析によれば全株は clonal であり、別の lineage にあるとされた(Haghighi J Clin Microbiol 2002, 2003)。したがってこれらの株を含めその全ゲノムレベルでの相違・多様性を明らかにする

ことは重要である。そうすることにより非タンパク質コード領域である tRNA-STR の多型解析では結びつけることのできなかった表現型(臨床像)における多型への影響を遺伝子レベルで明らかにすることができると予想される。

更に、ゲノム情報と同時に得られた株を用いて遺伝子発現解析(RNA seq)やプロテオーム解析を行うこと、更に動物感染モデルやブタ大腸 ex vivo 感染モデルを用いて、実際の病害性に関しての知見を蓄積することが重要である。その目的で国立国際医療研究センターとの共同研究により新規分離株を獲得した。今後も毎年 5-8 株の新規分離株を獲得し、ゲノム解析・病原性解析を行うことにより、病原性・臓器特異性・薬剤応答性などに直接関連する遺伝子を特定することを目指している。

E. 結論

本年度、赤痢アメーバ標準株および分離株のゲノム配列取得は順調に終了した。今後ゲノム配列の完成と株間比較を目指しアセンブルを継続する。更に、新しい赤痢アメーバ臨床分離株の獲得も順調に展開し、本研究の当初の目的を確実に達成している。

F. 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) 該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

- (i) Marumo, K.*, Nakada-Tsukui, K.*, Tomii, K., and Nozaki, T. Ligand heterogeneity of the cysteine protease binding protein family in the parasitic protist *Entamoeba histolytica*. Int. J. Parasitol. 44, 625-35 2014. *equal contribution.
- (ii) Jeelani, G. and Nozaki, T.