

- Metabolomic analysis of *Entamoeba*: applications and implications. *Curr. Opin. Microbiol.* 20C:118-124, 2014.
- (iii) 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.
- (iv) 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.
- (v) Hertz, R., Tovy, A., Kirschenbaum, M., Geffen, M., Nozaki, T., Adir, N., and Ankri, S. The *Entamoeba histolytica* Dnmt2 homolog (Ehmet) confers resistance to nitrosative stress. *Eukaryot Cell.* 13, 494-503, 2014.
- (vi) 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.
- (vii) 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.
- (viii) 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.
- (ix) 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.
- (x) 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.
- (xi) 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. *equal contribution

2. 学会発表 なし

- ### 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

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

研究協力者 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原虫症である。治療薬として一剤のみが使用されている現状であったが、2012年に抗赤痢アメーバ活性を持つ薬剤として auranofin が報告された。本研究では auranofin の臨床適用を鑑み、本薬剤に対する耐性株を実験室で作成し、その生物学的特性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旨とした。

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、現状では5-ニトロイミダゾールであるメタロニダゾール(metronidazole: MTZ; 薬剤名フラジール)一剤のみが有効とされ、日本に於いても2012年にアメーバ赤痢・ランブル鞭毛虫感染症・嫌気性菌感染症・感染性腸炎への保険適用が追加承認された。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、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。我々のこれまでの検討から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、高病原性の赤痢アメーバ株を用いても12 μ M以上の耐性を持つ株が作成できなかったことから、耐性株出現リスクは高くないような印象もある。しかし一剤に頼っ

ていること、安価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。

赤痢アメーバ症は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・障害者施設や男性同性愛者(HIV陽性者)で蔓延している。症例報告も増加の一途であり、2009年度~2011年度は800例前後であったが2012年度には900例、2013年度には1000例と、近年の増加が著しい。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

2012年に一剤使用の現状を打破すべく新たな抗アメーバ薬として auranofin が報告された(Debnath et al., Nat Med, 2012)。Auranofin はすでにリウマチ薬として承認されている有機金化合物であり、アメーバ症への有効性が確認されれば速やかに臨床適用されると考えられた。そこで本研究では auranofin の臨床適用を鑑み、auranofin 耐性赤痢アメーバを実験室で作成し、解析を行うことを目指す。耐性株の生物学的特性、耐性機構をトランスクリプトーム解析を中心として明らかにし、将来のリスクに備えることを目標とした。また、過去3年間挑戦してきたが安定

した耐性株が作成できなかったMTZについても改めて耐性株の作成を試みた。

B. 研究方法

1) auranofin耐性株の作成。

赤痢アメーバ標準株であるHM1:IMSS c16株に対してauranofinを終濃度0.2, 0.4, 0.8 μ Mとなるよう添加したBIS培地での培養を行い、auranofin耐性株を取得した。

2) auranofin耐性株の評価。

得られたauranofin耐性株と親株についてauranofin存在下での増殖度を解析した。96 well plateに 5×10^3 細胞/wellで赤痢アメーバ原虫を撒種し、auranofin 0.2~2.2 μ Mを含むBIS培地で48時間培養した。培養後、培地をOPTI-MEMに交換し生細胞を検出するWST-1試薬を100 μ L/well加え、15分後にプレートリーダーでOD450を測定した。一回の実験は各濃度についてトリPLICATEで行った。

3) MTZ耐性株作成。

動物への肝膿瘍形成能を維持したHM1株(amoebic liver abscess: ALA)株でのMTZ耐性株の作成を行った。細胞の増殖を観察しながら8, 12, 16 μ Mと段階的に濃度を上昇させたMTZ添加BIS培地で培養した。培地には*Crithidia fasciculata*を添加した。

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

1) auranofin耐性株の作成。

2013年10月25日より培養を開始し、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。0.8 μ M auranofinに対する耐性株についても樹立を目指して培養を続けたが、増殖が極端に悪く短期で死滅する状態が繰り返された。Debnathらにより報告されたauranofinの赤痢アメーバ原虫増殖に対する半数効果濃度(half-maximal effective concentration; EC₅₀)は0.5 μ Mであった。同論文ではMTZのEC₅₀は5 μ Mと算出しており、我々が以前に作成したMTZ 12Mに耐性となった株はEC₅₀の二倍以上の薬剤に対して耐性を示したことがわかる。よって今回得られたauranofin耐性株は耐性度が低い可能性が考えられた。

2) auranofin耐性株の評価

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(Fig.1)。

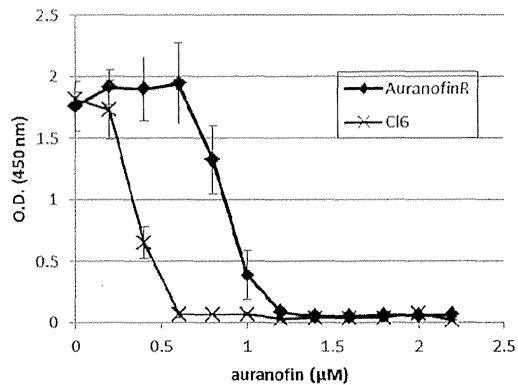


Fig.1 auranofin耐性株の評価

二回独立に行った実験の平均値をプロットし、標準偏差をエラーバーで示した。図中のAuranofinRはauranofin耐性株、Cl6は親株であるHM1:IMSS c16株

Debnathらの論文でHM1株に対するauranofinのEC₅₀が0.5 μ Mであると報告しているが、我々の今回の実測値では0.3~0.4 μ Mであった。それに比べauranofin耐性株のEC₅₀は0.9 μ M程度であった。よってauranofinに対し2倍程度耐性がある株が得られた。MTZR株の場合も本研究室で作成した12 μ MのMTZ存在下で維持したMTZ耐性株は親株のhalf maximal inhibitory concentration (IC₅₀)が $6.5 \pm 0.3 \mu$ Mに対し $12.9 \pm 0.3 \mu$ Mであり、やはり2倍程度の耐性度であった(Penuliar et al., in preparation)。また、今回結果は示さないが試験的に作成したauranofin除去7日目のauranofin耐性株はEC₅₀が親株と耐性株の間になるようである。よってこのauranofin耐性は可逆的な表現型であると予想された。

より高い耐性度を示す株の取得にも努力を続けるが、来年度は今回得られたauranofin耐性株のRNA-seq解析を実行し、耐性に関与する遺伝子の検索を行う。

3) MTZ耐性株の作成。

2013年2月からMTZ 8 μ M存在下での培養を開始したALA株について、2013年12月から濃度を12 μ Mにして維持した。しかし以前トランスクリプトーム解析

を行った株が12 μ MのMTZに対する耐性株であったため、より高度な耐性株の作成を目指しMTZ 16 μ Mとして2014年2月15日、18日、20日、25日、3月1日に6mLで培養しているMTZ 12 μ Mの株から2.5mLを新しいチューブに加えMTZ 16 μ Mとして培養を開始したが死滅した。3月4日から18日、3月21日から4月8日、4月12日から5月4日、5月7日から9月24日、では生存する原虫が観察されたため3~4日に一度培地を交換するか2.5mLを新しく植え継ぎ耐性原虫を維持できたが2週間から4ヶ月半しか維持されなかった。

そこで2014年10月24日に新たなALA株を用い8 μ MのMTZ存在下培養を開始した。約一ヶ月MTZ 8 μ M存在下での培養が維持されたためMTZ 16 μ M存在下での培養を開始した。現在も維持はされているが増殖が悪く解析に足る細胞数を確保できなかった。この結果はこれまでの試行が再現されており、実験室条件ではMTZ耐性株の出現可能性が低いことが改めて確認された。

今回新規抗アメーバ薬である auranofin への耐性株作成を行ったが、得られた耐性株は過去 MTZ に対して得られた耐性株と相似した特長を持っていた。すなわち耐性度は2倍程度で耐性は可逆的であった。これは auranofin も赤痢アメーバに対し耐性株が出現しにくい薬剤である可能性を予想させる。しかしMTZ耐性 *G. lamblia* に auranofin が有効であるとの報告がされたことから、作用機序は異なると予想される (Tejman-Yarden et al., 2013)。さらに auranofin が研究レベルで *Schistosoma japonicum*, *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii* といった多様な原虫にも有効であることが報告されていることから、適用拡大が進むと耐性株発生のリスクも上昇する (Song et al., 2012; Caroli et al., 2012; Andreade et al., 2014)。本研究で得られた耐性株の解析を進め、将来の危機に供える必要がある。

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

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

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

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)

腸管原虫症の感染実態調査および感受性の遺伝的解析

担当責任者 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常勤医師

研究要旨：本邦では性感染症を原因とする腸管原虫症の増加が懸念されている。また、同じく性感染症として症例数が増加する HIV 感染症との合併症例が多いことが疫学的特徴として挙げられる。本研究では、HIV 感染者のコホート集団における腸管原虫症の感染状況を PCR や抗原検査などの手法を併用し、無症候性感染者を含めて、従来と比較してより詳しく解析する。また、赤痢アメーバ感染既往者については、その臨床病型や病理像を詳しく解析するとともに、宿主の遺伝子多型が臨床病像に与える影響を解析する。これらの研究結果は、個々の症例に対する適切な診断・治療に寄与するだけでなく、無症候性感染者の早期診断により公衆衛生対策にも寄与することが考えられる。

A. 研究目的

代表的な腸管原虫症である赤痢アメーバ症の報告数は 10 年間で 2 倍以上に増加している。この急速な増加は日本国内での性交渉による感染例の増加に起因していると考えられている。また、症状がないにもかかわらず、下部消化管内視鏡検査などで偶発的に見つかる無症候性赤痢アメーバ症の報告数増加が近年の疫学的特徴であり (IASR: Infectious Agents Surveillance Report, 2014 年 9 月号)、症例数の正確な把握が難しくなっている。本研究は、腸管原虫症発症リスクの高い HIV 感染者で、有症状の腸管原虫症だけでなく無症候性感染者を含めた腸管寄生原虫症の感染浸淫状況を把握することを、第 1 の目的としている。また、赤痢アメーバ症を発症した患者に関しては、感染者の臨床的および病理学的な特徴を明らかにし、無症候性の軽症例から肝膿瘍や腸管穿孔を合併する重症症例を含めてその病因に関わる因子を解析する。それにより、重症度に与える病原体・宿主因子の双方を包括的に解析すること

で、臨床現場での適切な診断・治療法を提唱することをもう 1 つの目的としている。

B. 研究方法

以下の① - ⑤の研究を行うことで、研究目的を達成できると考えた。

①HIV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(渡辺)：HIV感染合併ジアルジア症とクリプトスポリジウム症発生頻度と、臨床像の特徴を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の HIV感染患者コホートを元に解析した。

②無症候性赤痢アメーバ症患者の臨床的検討(渡辺・永田)：無症状かつ赤痢アメーバ抗体陽性患者と陰性患者、計1,207名のHIV感染者によるコホート研究を行い、将来的に有症状の侵襲性赤痢アメーバ症を発症するリスクに違いがあるか検討した。また、赤痢アメーバ感染のハイリスク群であるHIV感染者において、無症候性赤痢アメーバ性腸炎がどの程度存在するのか、無症状で下部消化管

内視鏡検査を行った71名のHIV感染者のデータを用いて横断的検討を行った。

③アメーバ性虫垂炎の診断と治療に関する検討（渡辺）：虫垂炎の診断で虫垂切除術を行った45症例のHIV感染者を対象として後方視的検討を行った。赤痢アメーバ感染の有無を調べるために、HE染色とPAS染色による病理検査を行うとともに、パラフィン固定検体からDNA抽出を行い、PCRによって *E. histolytica* の有無を判定する。以上の検査により、HIV感染者に発症する虫垂炎におけるアメーバ感染の頻度を明らかにし、アメーバ非感染虫垂炎症例との比較を行うことでアメーバ性虫垂炎の臨床的特徴を明らかにする。

④臨床検体から分離される病原体の特徴と臨床症状に関する検討（渡辺・永田）：研究開始後に赤痢アメーバ症を発症する患者に対する前向き研究である。赤痢アメーバ性が疑われた症例に対して、糞便・腸液・穿刺液など *E. histolytica* を含む検体を採取し、ロビンソン培地を用いて、細菌と混合感染した検体から *E. histolytica* を培養する。それをクリシミアとの共培養を経て、無菌培地で臨床株を分離する *E. histolytica* 培養系を確立する。得られた臨床分離株に対し、遺伝子解析や病原性試験、薬剤感受性検査などを行い、現在日本で流行している臨床株の特徴を明らかにする。また、得られた株の病原性や薬剤感受性が、実際の臨床症状と相関するかを解析する。

⑤宿主因子に関する検討（渡辺・永田）：赤痢アメーバ感染のハイリスク群であるHIV感染者のうち、赤痢アメーバ発症者を対象に、宿主の遺伝子解析を行い、それを赤痢アメーバ症の病型と比較する。初年度は、これまで臨床的にまとめたデータを横断的に解析した。対象症例としては、HIV感染患者のうち無症状で下部消化管内視鏡を行った57症例を対象に、アメーバ性潰瘍を認める群（7例）とアメーバ性潰瘍を認めなかった群（50例）のヒト白血球抗原（HLA）型を比較した。また、アメーバ性肝膿瘍合併群（42例）とアメーバ性肝膿瘍非合併群（29症例）のHLA型を比較した。

（倫理面への配慮）

研究を開始するにあたり、①-④については、疫学研究に関する倫理指針（平成19年文部科学省・厚生労働省告示第1号）に基づいて研究を行

っており、また、⑤についてはヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成25年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）に基づいて行っている。すべての研究は国立国際医療研究センター倫理委員会の承認の下に行われている。

C. 研究結果

①HIV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（渡辺）：2003年から、2013年までに当院で診断された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を図に示した。日本人HIV感染者かつ国内での感染が疑われた症例だけを提示している。全例が同性間性的接触のある男性であった。当施設では、同じ原虫感染症である赤痢アメーバ症は年間10例以上（多い年では年間25例）経験しているのと比較すると、どちらの原虫も診断数は非常に少ない。2012年以前は、いずれの原虫も年間5例以下であり、診断された季節もバラバラで、性感染症による感染でのアウトブレイクは今までに経験していない。当院では、試験的に2013年から、イムノクロマト法（IC法と略）による検査を検鏡検査と平行して行ってみたところ、ジアルジア症の診断件数の増加はなかったが、クリプトスポリジウム症は年間8件と急増していた。短期間（月単位）に症例数が集積するようなアウトブレイクを経験した訳ではなかったことから、IC法導入により診断感度が高まったことが診断件数増加を引き起こしたと考えている。また、IC法導入前にクリプトスポリジウム症と診断された症例を解析してみたところ、11件のうち約半数の5件は、（原虫検査には不向きな）明視野光学顕微鏡による検鏡検査で原虫が同

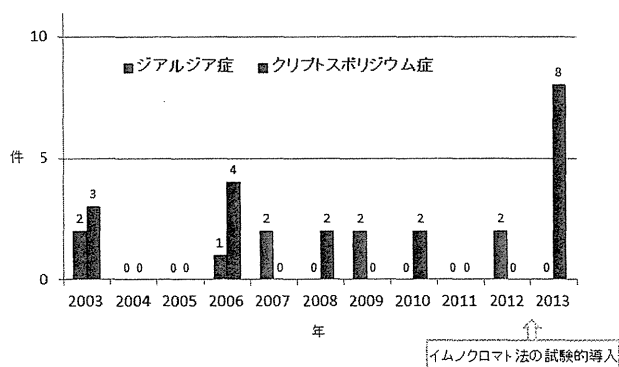


図. 年別 HIV感染合併ジアルジア症、クリプトスポリジウム症年別発症件数（国立国際医療研究センター病院エイズ治療研究開発センター単施設データ）

定されず、それでも臨床的にクリプトスポリジウム症が強く疑われたために、国立感染症研究所寄生動物部においてIC法や蛍光抗体を用いた高感度な特殊顕微鏡検査を実施した結果、クリプトスポリジウムが同定された症例であった。

②無症候性赤痢アメーバ症患者の臨床的検討（渡辺・永田）：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（Log-Rank test, p value < 0.001）を示し、侵襲性赤痢アメーバ症発症者の抗体価の推移から、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、無症状で下部消化管内視鏡検査を行ったHIV感染者を対象として行った検討では、無症状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、糞便検鏡検査では病原体は検出しきれない、もしくはシスト型 *E. histolytica* のみを認め、栄養型は認めないことなどが明らかとなった。

③アメーバ性虫垂炎の診断と治療に関する検討（渡辺）：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。病原体の数が少ないなどの理由で薄切標本に *E. histolytica* が含まれない場合には、病理検査だけでは見落とす可能性があるため、パラフィン固定検体から特殊な試薬を用いてDNA抽出を行い、特殊かつ特異的なプライマーを用いて *E. histolytica* PCR検査を行う検査系を確立することに成功した。現在は、全45症例について、DNA抽出とPCR検査を行っている状況である。

④臨床検体から分離される病原体の特徴と臨床症状に関する検討（渡辺・永田）：臨床検体の状態に対する培地の調整などを行い、2014年9月以降に臨床検体の分離を開始した。2014年末日現在で、3株のクリシジア共培養株の分離に成功している。検体の由来は、1例が下血を伴うアメーバ性腸炎か

らの糞便、1例が肝膿瘍の膿穿刺液、1例は無症候性赤痢アメーバ症患者の内視鏡で得られた腸洗浄液であった。

⑤宿主因子に関する検討（渡辺・永田）：無症状で内視鏡検査を行った57症例の検討では、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。現在は、より詳細なデータを得るために、コホート解析により、当院に5年以上通院しているHIV感染者を対象に、アメーバ性肝膿瘍発症患者、アメーバ性腸炎発症患者、アメーバ抗体陽性かつ侵襲性赤痢アメーバ症未発症者（観察期間5年）・アメーバ抗体陰性かつ侵襲性赤痢アメーバ症未発症者（観察期間5年）の4群間で、宿主因子を比較する。宿主因子としては、HLAに加えて、LEPTIN 遺伝子、LEPTIN 受容体遺伝子の遺伝子多型の頻度を比較する予定である。

D. 考察

①HIV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（渡辺）：本研究の解析からは、クリプトスポリジウム症は、明視野光学顕微鏡検査で偽陰性を呈しやすいたことが強く示唆された。つまり、（HIV感染者に限った話ではないが）明視野検鏡の診断感度が低いことが、従来のクリプトスポリジウム症の頻度を過小評価させる要因となっており、臨床現場での診療をも非常に困難にしていることが考えられた。

②無症候性赤痢アメーバ症患者の臨床的検討（渡辺・永田）：赤痢アメーバ症のハイリスク群であるHIV感染者感染者では、無症状であっても1割以上の患者に赤痢アメーバ性大腸潰瘍が存在する可能性が示された。これらの患者は、病原体保因者として重要であるだけでなく、将来的には有症状の侵襲性赤痢アメーバ症を発症するリスクが高いと考えられた。

③アメーバ性虫垂炎の診断と治療に関する検討（渡辺）：病理検査では、45例の虫垂切除標本か

ら4例(8.9%)で *E. histolytica* の感染が確認されたことから、HIV 感染者の虫垂炎ではアメーバ感染を常に鑑別する必要があることが示唆される。また、現在行っているパラフィン固定検体からの PCR 検査は今回の検討に有用であるだけでなく、すでに固定された標本から *E. histolytica* を検出する幅広い応用性があると考えられた。

④現時点では、分離株が少数であるため、日本で流行する株の特徴を検討することはできない。しかし、異なる性状の検体(下血糞便、膿瘍、腸洗浄液)からの分離に成功したことは、今後、流行株を同定するだけでなく、各分離株の病原性の違い臨床症状に与える影響を検討することを可能にすると考えられる。今年度行った信頼性の高い培養系の確立は、より多くの分離株を異なる性状の検体から分離することを可能にすると考えられる。

⑤宿主因子に関する検討(渡辺・永田)：横断的症例検討により、赤痢アメーバ症病型に宿主因子(特にHLA class II DQB1)の多型が影響している可能性が強く示唆される結果となった。今後は、これらの結果を5年間の長期コホートデータの解析により検証する。また、HLAに加えて、過去の文献で一遺伝子多型が赤痢アメーバ症に深くかかわっていると報告されているレプチンとその受容体遺伝子についても調べ、より深く幅広い知見が得られると考えられた。

E. 結論

①で行った感度の高い検査を併用して行った腸管原虫症の疫学的な検討では、従来から指摘されているクリプトスポリジウム症診断に対する明視野光学顕微鏡検査の感度の低さを明確に示し、それが感染実態の過小評価をもたらしていると考えられた。②で行った解析からは、HIV 感染者の中に無症候性赤痢アメーバ症が蔓延していることが明らかになった。これらの結果は、日本の疫学を把握する上で重要なデータとなっただけでなく、どのような検査が診断に有用かを示している。一方で、③で行った解析により、開腹手術を要する重症症例への赤痢アメーバ感染の影響が明らかになっただけでなく、病理固定標本から

病原体を検出する手法自体が赤痢アメーバ症の診断や治療に関する研究全般に貢献する技術開発の基盤的研究となり得ると考えられた。また、④⑤については今後の研究成果により、赤痢アメーバ感染の病型・重症度規定因子が明らかとなることが期待され、日本で増加する赤痢アメーバ症の早期診断・早期治療に有用な知見が得られると考えられる。①-⑤の結果を総合的に解析することで、最終的には、赤痢アメーバ症増加に歯止めをかける公衆衛生的施策をも講じられると考えられる。

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)

G. 研究発表

1. 論文発表

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.

2. 学会発表

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.

H. 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)

腸管原虫症の検査診断法開発

担当責任者:八木田 健司 国立感染症研究所 寄生動物部主任研究官

研究要旨:実用型ジアルジア迅速診断用イムノクロマト(Gia-IC)を用いて、インドの下痢症検体を検査した。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。

A. 研究目的

ジアルジア症を含む消化管原虫症は、国内外で大きな健康被害をもたらす疾患であり、その早期診断、治療が、患者個人のみならず公衆衛生的にも最も重要である。

現実的な問題として、消化管原虫症は診断の手間あるいは難しさがあり、迅速簡易な検査法の開発が問題解決の要点となる。我々がこれまでに開発したジアルジア迅速診断用イムノクロマト(Gia-IC)は、国内症例においてその有用性を示している。さらに今回は、性能評価のために、海外下痢症検体に対する反応性を調べた。またより有用性の高い Dual-test IC の開発に向けて、最も重要な抗体クローンの選択をするために、クリプトスポリジウム抗原検出系を構築し、抗クリプトスポリジウム抗体の反応性試験等を行った。

B. 研究方法

1. 海外下痢症検体を用いた Gia-IC 性能評価

国内下痢症検体を用いて実用性を検討し

てきた Gia-IC について、インドの NICED インド国立コレラ腸管感染症研究所の協力の下、分与された下痢症検体における反応性を調べた。検査対象の検体は PCR あるいは抗原検出キット(ELISA, TechLab *Giardia* II, USA)を用いて、消化管寄生原虫の有無が検査されており、今回用いたものはジアルジア陽性 14 検体、またジアルジア非検出検体としてクリプトスポリジウム陽性 5 検体、およびこれらの原虫が検出されなかった 24 検体であった。

検体前処理として、1.5ml 遠心チューブで糞便 30 μ l を 300 μ l の 0.05% Tween20 を含む PBS(-) で希釈した。これに IC ストリップを直接浸漬させ、10 分後のテストラインにおける発色を調べた。陽性対照検体として国内ジアルジア症の糞便検体を用いた。陰性対照検体には希釈用の PBS-Tween 溶液を用いた。

また、検体中の原虫を確認するため、必要に応じて ARK-Fluor Ab C/G DyLight488 (アークリソース社)を用いた DFA 検査を行った。ジアルジア抗原を確認する場合は、ImmunoCard STAT! Crypto/Giardia test

(Meridian Bioscience, USA)を用いた。

2. 抗クリプトスポリジウム抗体を用いた抗原検出系の確立

1) 抗クリプトスポリジウムモノクロナル抗体

H23 年度研究成果として報告した抗クリプトスポリジウムモノクロナル抗体(mAb)開発において作成された抗体を今回の研究で用いた。その作成の概略を述べると、抗原はクリプトスポリジウム *Cryptosporidium parvum* HNJ1 株であり、感染ヌードマウス糞便より精製したオーシストを精製し、マウス(BALB/c)を用いて免疫、定法に従いスクリーニングを行い、クローンを得た。

精製した抗クリプトスポリジウム mAb は、直接蛍光抗体法(DFA) 試薬として評価するために FITC で標識し、ジアルジア、赤痢アメーバ等他の消化管寄生原虫との交差反応性は無いことを顕微鏡検査で確認した。また、糞便中の Cr に対する反応性は、市販の DFA 試薬である Merifluor C/G (#250050、Meridian Bioscience 社)と同等であることも確認した。

今回使用した抗クリプトスポリジウム mAb は、DFA 試薬用として選択された 5D10-B2-G12(以下 5D と略)に加え、2C5(2C)、5B10(5B)、5G10-D8(5G) および 5H10(5H)の 5 クローン(いずれも IgG)であり、HRP 標識したのもも準備した。

2) 被検検体

DFA、PCR、ELISA および自家蛍光検査により原虫検査を行った国内下痢症例糞便検体を用いた。本研究ではクリプトスポリジウム陽性検体 5(検体 1-5)、ジアルジア陽性検体 2(検体 6 および 7)、赤痢アメーバ陽性検体 2

(検体 10 および 11)、陰性検体 3(検体 12-14)を用いた。また、クリプトスポリジウムのオーシストを排出している感染ヌードマウスの糞便も陽性検体(検体 15)として用いた。

3) ドットブロットによる抗体スクリーニング

クリプトスポリジウム陽性の検体 1(水様便)を用い、各抗クリプトスポリジウム mAb の抗原検出能をスクリーニングした。検体 1 を 500 μ l 分取し、オーシストが沈殿する 10,000xg、1 分間の遠心を行い、上清を回収した。この上清試料と元の水様便を各々 0.5% カゼインを含む PBS で 5 倍希釈系列を作成し、1 μ l をニトロセルロース膜にスポットした。他に精製した Cp オーシスト浮遊液(1.0x10⁶/ml)、ジアルジア陽性の検体 6 も同様にスポットした。乾燥固化後、0.5% カゼインを含む PBS でブロッキング、HRP 標識したを 4000 倍希釈して 1 時間反応後、DAB による発色を行った。

4) ELISA による抗クリプトスポリジウム mAb の糞便抗原検出能評価

先述の検体 1~15 を 0.5% カゼイン PBS で 10 倍希釈して試料とした。HRP 標識抗体による二次反応で抗体濃度を 2,000 倍希釈した他は、H22 年度の ELISA 試験法に準じた。

C. 研究結果

1. 海外下痢症検体を用いた Gia-IC 性能評価

試験結果を表 1 に示した。ジアルジア陽性 14 検体における IC 陽性数は 13 で、陽性率は 92.2%であった。ジアルジア非検出検体に関しては、クリプトスポリジウム陽性 5 検体で IC 陽性数は 3、また原虫非検出の 24 検体では IC 陽性数は 5 であった。ジアルジア非検出検体総数 29 の中で、IC 陽性数は 8 となり、陽性率は 27.6%、特異性としてみると 72.4%であった。原虫非検出の 24 検体に関しては IC 試験を 2 回行い、2 回の結果は一致した。陽性となった 5 検体の中でも 3 検体に関しては、試験開始後 3 分以内に強陽性を示した。同 3 検体について ARK-Fluor Ab C/G DyLight488 で DFA を行ったが、ジアルジアシストあるいはその断片を含め、特異的

に染色される構造物は顕微鏡的に確認されなかった。一方、抗原確認のためにこれら24検体を ImmunoCard STAT で調べた結果、いずれも陰性であった。なお、陽性対照検体は10倍希釈検体の64倍希釈まで陽性反応が見られた。また陰性対照の PBS-Tween 溶液では発色ラインは確認されなかった。

2. 抗クリプトスポリジウム mAb を用いた糞便抗原検出系の確立

ドットブロットによる抗体スクリーニング

既に、特異性の高さから DFA 用を選択されている 5D を検出用抗体として利用することを考慮し、IC において抗原標識に適する抗体クローンをドットブロット法でスクリーニングした。結果を表-2 に示した。調べた5クローンの抗体はいずれも検体1の遠心上清およびその元検体ともに陽性を示した。その陽性反応は上清にも元検体よりおよそ5倍低いが、抗原の存在が示された。

精製クリプトスポリジウムオーシストに対しては、2C、5D および 5G が陽性で、5D が最も強度が高かった。一方、ジアルジア陽性の便検体6に対して、2Cのみが陽性反応を示した。

ELISA による抗クリプトスポリジウム mAb の糞便抗原検出

ドットブロット試験で5Dの抗原結合性および特異性が確認されたことから、5D を検出用に用いることとして、IC を想定した抗原検出のための抗体組み合わせを ELISA で検討した。5D 以外の4クローンを固相化したときの ELISA の結果は、5B および 5H は予備実験で反応性が極めて低いことが示したことから、2C および 5G についてさらに検討をすすめることとした。同一プレート内の領域を等分し、2C と 5D の両抗体をそれぞれ固相化し、同一検体をアプライし、5D-HRP で同時に抗原検出した。結果は、表-3 に示したが、2C 固相条件の方がやや強い反応を示したが、各検体に対する反応性は 2D と 5D で大きな差は見られなかった。

各検体に対する反応性をみると、クリプト陽性の検体1-5において0.1以上の吸光度を示した検体数は3、残り2検体の吸光度は最大でも0.05以下であった。この2検体については ImmunoSTAT のテストでも陰性であったことから、DFA で当初 Cp は陽性であったものの、現在までに抗原が消失したものと考えられた。クリプトスポリジウム以外の原虫に対しては、ジアルジア陽性の検体7の吸光度が0.14-0.15、またサイクロスポラ陽性であった検体10が0.03-0.05の吸光度の上昇を示した。一方感染マウスの糞便より100倍希釈に調整した上清検体および元検体は、両者とも高い吸光度を示し、ELISA でも糞便希釈液上清中の抗原の存在が確認された。

D. 考 察

これまで、実用型 Gia-IC を用いて国内におけるジアルジア感染リスクグループである HIV 陽性ならびに海外渡航者の両グループを調査し、ともにおよそ陽性率12%前後というこれまでにない高いジアルジア感染実態が存在することを明らかにした。迅速診断における有用性は、様々な検体において評価されるべきであるが、今回は、ジアルジア感染が世界的にも高率な地域のひとつとなっているインドの下痢症検体を検査する機会を得た。国外症例においても、IC が有用であるか検証することは重要な点である。

今回、PCRあるいはELISAで原虫検査がなされた検体を用いて、感度、特異性を調べたが、感度としては国内症例検体に対する結果と同様、良好な成績を得た。一方、特異性に関しては、国内症例検体に対しては約93%の特異性が見られるが、インドの検体では80%に満たない点で問題が示されたと思われる。特に原虫非検出検体の中に、強陽性の検体が3つは存在し、これらが蛍光抗体染色によるDFAで陰性、市販されている ImmunoCard STAT で抗原陰性という結果を考え合わせると、国外症例において擬陽性反応がより多く生ずる可能性が考えら

れる。その原因については、ジアルジアとは無関係の非特異反応か、あるいは Gia-IC と国外の抗原検査試薬に利用される抗体の認識エピトープの差などが推測される。Gia-IC に使う mAb は、ジアルジアシスト壁の可溶性成分を抗原として用いているので、この点が検査試薬の反応性に関連していることも想定される。

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 を目指す開発は、下痢症検査診断用 IC の有用性をより高めることにつながる。ドットプロットおよび ELISA の結果から、現在 DFA に用いられ、特異性も高い 5D クローン抗体に加え、2C および 5D クローン抗体が Cr-IC 用に適するものと考えられた。これらの抗体で試作 IC を作成し、性能評価をすすめる予定である。今回の研究で、クリプトスポリジウム症患者の糞便中には、ジアルジア感染の場合と同様、オーシストのみならず可溶化、あるいは微小に断片化されたようなオーシスト壁成分が検出可能な抗原として存在することが確認された。Cr-IC においてもこの糞便抗原

を利用できるので、Gia-IC 同様、高感度な Cr-IC の実現が期待できる。現在、赤痢アメーバに関しても、ジアルジア症やクリプトスポリジウム症と同様、糞便抗原の利用に基づいた抗原検出系の開発を計画しており、今後の研究課題とする予定である。

E. 結論

国産の Gia-IC は、ジアルジア感染症例の多い国外流行地でも利用可能な検査手段となり得ることが示された。一方、Dual-IC 開発に向けて、クリプトスポリジウム診断用抗体を選定し、試作 Cr-IC 作成への準備を整えた。より実用的な迅速診断 IC の開発を目指す。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

(資料)

表-1、Gia-IC を用いたインド下痢症検体検査結果

NICED 分与検体	検体数	NICED 検査 法	Gia-IC 陽性数 (陽性率%)	ImmunoCard STAT 陽性数
ジアルジア 陽性	14	PCR/EL ISA	13(92.9)	実施せず
クリプトスポリ ジウム陽性	5	PCR/EL ISA	3(60.0)	実施せず
原虫非検出	24	PCR	5(20.8)	0

表-2、ドットブロット法による抗クリプトスポリジウム mAb の抗原反応性スクリーニング

モノクロナル 抗体クローン	検体 1 遠心上清	検体 1	Cp オーシス ト	ジアルジア 陽性検体 6
2C	+	+	+	+
5B	+	+	-	-
5D	+	+	+	-
5G	+	+	+	-
5H	+	+	-	-

＋：陽性　－：陰性

表-3、ELISA による抗クリプトスポリジウム mAb の糞便抗原検出

検体の種類	検体 No.	固相化抗原による吸光度		ImmunoCard STAT 検査
		クローン 2C	クローン 5G	
クリプトスポリ ジウム陽性	1	0.440	0.361	+
	2	0.033	0.032	-
	3	0.012	0.001	-
	4	0.233	0.146	+
	5	0.282	0.101	+
ジアルジア陽性	6	0.008	0.008	-
	7	0.142	0.155	-
赤痢アメーバ 陽性	8	0.021	0.020	-
	9	0.004	0.000	-
サイクロスポラ 陽性	10	0.052	0.033	-
	11	0.015	0.008	-
原虫非検出	12	0.007	0.005	-
	13	0.037	0.011	-
	14	0.014	0.003	-
感染ヌード マウス Cp 陽性	15a	0.495	0.274	-
	15b	0.575	0.317	-

＋：陽性　－：陰性

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)

原虫ゲノム情報の整備

担当責任者	泉山 信司	(国立感染症研究所 寄生動物部)
担当責任者	八木田 健司	(国立感染症研究所 寄生動物部)
研究協力者	黒田 誠	(国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター)
研究協力者	竹内 史比古	(国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター)
研究協力者	関塚 剛史	(国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター)
研究協力者	津久井 久美子	(国立感染症研究所 寄生動物部)
研究協力者	村上 裕子	(国立感染症研究所 寄生動物部)
研究協力者	岡崎 隆三	(国立感染症研究所 寄生動物部)
研究協力者	Avik Kumar Mukherjee	(国立感染症研究所 寄生動物部)

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。

Acanthamoeba 以外では、赤痢アメーバと、*Acanthamoeba* に感染するウイルスのゲノム解析に着手し、配列の取得や一部解析を進めた。

A. 研究目的

近年のゲノム解析は、次世代シーケンサーの実用化後に飛躍的に発展し、重要な研究手法の一つとなっている。寄生虫学的な研究はリソースが限られているが、そのような条件下であればなおさらにゲノム解析が有効と考えられ、寄生虫ゲノムの基盤整備が求められている。寄生性原虫類の病原因子を明らかにし、医薬品を開発するなどの対策を講じる事が最終的な病原体研究の目標となるが、そのようなゴールに至るには相当の困難がある。限られた研究リソースを有効に活用しながらゴールに至るには、例えば他の微生物との比較が有効であり、本研究で目的としたゲノム解析は比較生物学的な解析を可能にする。また、その途中で得られた情報は、PCR 法による検査試薬の開発や病原因子の探索に有用である。

基礎的な研究が進められている赤痢アメーバ症であってもそのような基盤整備は途中であり、角膜炎やアメーバ性脳炎で問題となる *Acanthamoeba* では極めて少ない¹⁾。

本年度は基盤に乏しい *Acanthamoeba* のゲノム解析を優先して行い、加えて赤痢アメーバと、*Acanthamoeba* に感染するウイルスのゲノム解析にも着手し、配列の取得や一部解析を進めた。

Acanthamoeba の病原因子を明らかにする目的で、分子疫学的な解析による病原性株の解析、すなわち遺伝子型別による分類が行われ、古くはミトコンドリアゲノムの RFLP パターン、近年では実験手技の容易さから 18S rRNA 遺伝子配列の PCR シーケンスがよく用いられている^{2,3)}。当該研究では環境や患者分離株としてよく見出される、18S rRNA の T4 遺伝子型の分離株 2 株を用いて、そのゲノムの比較を試みることにした。結果として、ミトコンドリアゲノムの配列を決定できたことから、アノテーションを行い、その内容を比較したので詳細について報告する。

B. 研究方法

Acanthamoeba sp. の患者分離株である

151 株と 161 株は、アメーバ性角膜炎の分子疫学の調査の際に取得したもので、いずれも大腸菌寒天培地での培養と分離後に、PYGC 培地で無菌培養している。いずれも 18S rRNA の塩基配列より、環境中や患者から高頻度に分離される T4 型であることを確認している。培養後の栄養体より、QiaAmp DNA mini kit (Qiagen) を使用して核酸を抽出した。核酸の定量には、Qubit dsDNA HS Assay kits (Invitrogen) を使用し、ライブラリ構築に必要な DNA 量 (30 μ g) を得た。ゲノム配列の取得には、HiSeq2000 (Illumina) を使用した。ライブラリ構築とシーケンスリード読み取りは Operon にて行い、100base+100base のペアードエンドリードを取得した。151 株と 161 株は、6 塩基のインデックスを付加しておくことで、1 レーンを使って同時に読み取りを行い、インデックスリードに基づき配列を分離した。なお、インデックスに 1 塩基以上のミスマッチが含まれるリードは、除去した。アダプター配列、クォリティーの低いリード及び塩基は、trimmomatic (ver. 0.32) を使用して除去した。

初期の Read mapping には BWA (ver. 0.7.5a) を使用し、クリーニングにより得られたリードを、AmoebaDB より得たリファレンスシーケンスの *Acanthamoeba castellanii* Str. Neff (GenBank Whole Genome Sequence の AHJI01) にマッピングした。

De novo assemble に CLC Genomics Workbench (Ver.7.5.1) を使用した。計算条件は、最終的にコンティグ長を 1,000bp 以上とし、また Word size を 64bp に設定した。その他、Blast 検索、Read mapping、

アノテーション操作、アライメント作成等にもこのソフトウェアを使用した。

ミトコンドリアゲノムのアノテーション付加には、Microbial genome finishing module (CLC) を用いた。すなわち、決定した 151 株あるいは 161 株のミトコンドリア配列と、基準配列とのアライメントを作成し、ソフトウェアの機能により自動的に相同領域のアノテーションを付加した。ORF の N 末と C 末の位置、イントロンの有無など、自動的に処理されない部分は目視で確認し、必要により修正を行った。tRNA の位置は、最初に基準配列に従い、自動的に決まらなかった部分は、tRNAscan の Web サービス (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>) の結果に従って微調整した。アミノ酸翻訳は Invertebrate Mitochondrial を指定し、TAA、TAG を終止コドン、TGA をトリプトファン (Trp) として扱った。

(倫理面への配慮)

検査材料の研究利用に関して、研究所の研究倫理委員会の審査と承認を得ている。

C. 研究結果および考察

C1. *Acanthamoeba castellanii* Str. Neff に対する Read mapping

151 株からは 1.52 億リード、161 株から 1.44 億リードが得られ、この配列よりアダプターや低品質のリードと塩基を除去すると、リード数はそれぞれ 1.28 億リード (84.2%)、1.22 億リード (84.7%) となった。これらを BWA を用いて基準株の *A. castellanii* Str. Neff に対してリードマッピングを行うと、マッピングされたのは 0.38 億リード (29.7%、除去後のクリーンな配

列に対する割合)、0.34 億リード (27.9%、同様) と、7 割は配列が一致しないとの結果に陥った。結果には示さないが、ジャンク領域で不一致するのではなく、遺伝子部分でも不一致箇所が多いことを目視で確認した。*A. castellanii* は元々は土壌中に多く見出される種類で、T4 遺伝子型とは異なるが、病原性の報告もあり、ある程度の共通性があるものと期待していた。しかし直接比較は困難で、患者由来の T4 型の研究によって、この基準株はあまり適していないことが判明した。これ以後は、151 株と 161 株の間での異同を検討することとした。

C2. 151 株、161 株の *de novo* assemble

これら 2 株の *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。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、ゲノム全域の配列がほぼ取得できたと考えられた。

近縁の *A. castellanii* Str. Neff の 42Mbp に対して、1.6 倍のゲノムサイズが得られ、相当の違いが推察された。

一方、151 株で得られたコンティグ 18704 本に対して、161 株のリードをマッピングすると、リードの 73.9% がマップされて不一致は 3 割にとどまり、151 株と 161 株は比較ができると考えられた。

C3. ミトコンドリアゲノム

De novo assemble で得られたコンテ

ィグには、分子疫学でよく用いられるミトコンドリアゲノムの配列が含まれていることを、ミトコンドリア配列 (U12386、*A. castellanii* Str. Neff) を用いた Blast 検索で見出した。ミトコンドリアゲノムの配列は、151 株、161 株のいずれも 1 つのコンティグとして得られていたが、環状であることが勘案されていないことから、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、配列を確定させた (図 1)。完成したミトコンドリアゲノムの大きさはそれぞれ 42,337bp、39,208bp で、相互の大きさに 1 割弱程の大小の違いがあった。

ミトコンドリア登録配列 (U12386、41,591bp) を基準として、151 株にアノテーションを付与した。161 株では、登録配列と 151 株を基準にして作業した。具体的には、Microbial genome finishing module を用いて基準配列と決定したミトコンドリア配列のアライメントを作成し、自動的にアノテーションの付加を行った。ORF の N 末と C 末の位置、ORF の増減、イントロンの有無、tRNA や rRNA の位置など、自動的に処理しきれない部分は、目視で確認したり、tRNAscan や Blast 検索を利用したりすることで確認をしながら修正を行った。完成したミトコンドリアゲノムを図に示す (図 2)。比較のために、3 株のアライメントを図に示す (図 3)。

151 株は *atp6* 遺伝子の直後に ORF (1.2Kbp、ここでは ORF_Ac151 とする) の増加を認めた (図 4)。この ORF は、tBlastx で hypothetical protein (WP_032114602) と E-value が 0.39 の低