

い相同性でヒットし、Blastn 検索でも hypothetical protein の (XM_946885) と 6.3E-4 でヒットするなどして、機能は不明であった。

161 株は LSU rRNA 遺伝子 (*rrl* 遺伝子) の 3 つのイントロンの欠失 (755bp、860bp、753bp) を認めた (図 5)。151 株でも 1 番めと 3 番目のイントロンの欠失があり、161 との違いは 2 番目の有無であった。この欠失と先の ORF の増加が主な理由となっており、ゲノムサイズに違いが生じていた。

その他の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く、遺伝子は全て片側の鎖に存在し、逆鎖にはなかった。具体的には *rrl* 遺伝子を先頭として時計回り順に列挙すると、(LSU rRNA) , *trnI2*, *trnA*, *trnP*, *trnD*, *trnM*, SSU rRNA, *cox1/2*, 5S rRNA, *rps4*, *trnF*, *nad6*, *nad5*, *nad11*, *cox3*, *nad4*, *nad2*, *rps2*, *trnH*, *trnL2*, *atp9*, *trnY*, *cob*, *nad4L*, (ORF83) , (ORF115) , *atp1*, *nad1*, *trnW*, *rpl11*, *rps12*, *rps7*, *rpl2*, *rps19*, *rps3*, *rpl16*, *rpl14*, *rpl5*, *rps14*, *rps8*, *rpl6*, *rps13*, *rps11*, ORFB, ORF25, *nad3*, *nad9*, *nad7*, *atp6*, (ORF_Ac151) , (ORF349) , *trnQ*, *trnK*, *trnE*, *trnI1*, *trnL1* の順であった (カッコ内は差異のあった遺伝子)。

他に、機能不明な ORF には差異が認められ、151 株と 161 株ともに、*nad4L* 遺伝子の次にある ORF83 (252bp) が非コード領域に変化していた (図 6)。また、その次の ORF115 は C 末端側で拡大し、登録配列で 348bp だったものが、それぞれ 534bp (1.5 倍)、576bp (1.7 倍) であった (図 7)。161 株では、*atp6* 遺伝子の次の ORF349 (1Kbp) が非コード領域に変化していた (図 8)。

以上の通り、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。

病原性を角膜炎に限定し、151 株と 161 株の共通性が必要と考える場合、161 株で欠損した ORF349 と 151 株で新規の ORF_Ac151 は共通性がなく、病原性との関連は無視できるのかもしれない。

C4. *Megavirus*

角膜炎患者が使用していたコンタクトレンズケースより、偶然に *Acanthamoeba* に感染する *Megavirus* を分離することができた。*Megavirus* は 1Mbp のゲノムサイズに 1,000 遺伝子があるという、従来のウイルスに比べて桁違いに大きなウイルスとして知られている。このウイルスが角膜炎の病原性にどのような影響を及ぼすものなのかとても興味を持たれた。当該ウイルスのゲノム配列を取得しており、バイオインフォマティクス解析が待たれる。

C5. *Entamoeba*

赤痢アメーバは最もゲノム解析の進んでいる病原性のアメーバであり、*Acanthamoeba* と比較することは、双方にとって意味がある。当該研究では、*Entamoeba* ゲノムの解析をより充実させる目的で、いくつかの分離株の配列を追加して取得し、これについてもバイオインフォマティクス解析が待たれる。

D. 結論

アメーバ性角膜炎で問題となる *Acanthamoeba* sp. の患者分離株 2 株について、次世代シーケンサーを用いた全ゲノ

ム解析を行った。*de novo assemble* の結果、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。登録配列の *Acanthamoeba castellanii* Str. Neff の 42Mbp とは一致が低く、T4 遺伝子型のゲノムを別途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に着目し、登録配列を基準として、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それぞれ 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。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、イントロンの有無、機能不明な ORF には差異が認められた。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。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た。

E. 参考文献

1. Clarke M, Lohan AJ, Liu B, Lagkouvardos I, Roy S, Zafar N, Bertelli C, Schilde C, Kianianmomeni A, Bürglin TR, Frech C, Turcotte B, Kopec KO, Synnott JM, Choo C, Paponov I, Finkler A, Heng Tan CS, Hutchins AP, Weinmeier T, Rattei T, Chu JS, Gimenez G, Irimia M, Rigden DJ, Fitzpatrick DA, Lorenzo-Morales J, Bateman A, Chiu CH, Tang P, Hegemann P, Fromm H, Raoult D, Greub G, Miranda-Saavedra D, Chen N, Nash P, Ginger ML, Horn M, Schaap P, Caler L, Loftus BJ. Genome of *Acanthamoeba castellanii* highlights extensive lateral gene transfer and early evolution of tyrosine kinase signaling. *Genome Biol.* 2013 Feb 1;14(2):R11. doi: 10.1186/gb-2013-14-2-r11.
2. Yagita K, Endo T, De Jonckheere JF. Clustering of *Acanthamoeba* isolates from human eye infections by means of mitochondrial DNA digestion patterns. *Parasitol Res.* 1999 Apr;85(4):284-9.
3. Walochnik J, Obwaller A, Aspöck H. Correlations between morphological, molecular biological, and physiological characteristics in clinical and nonclinical isolates of *Acanthamoeba* spp. *Appl Environ Microbiol.* 2000 Oct;66(10):4408-13.

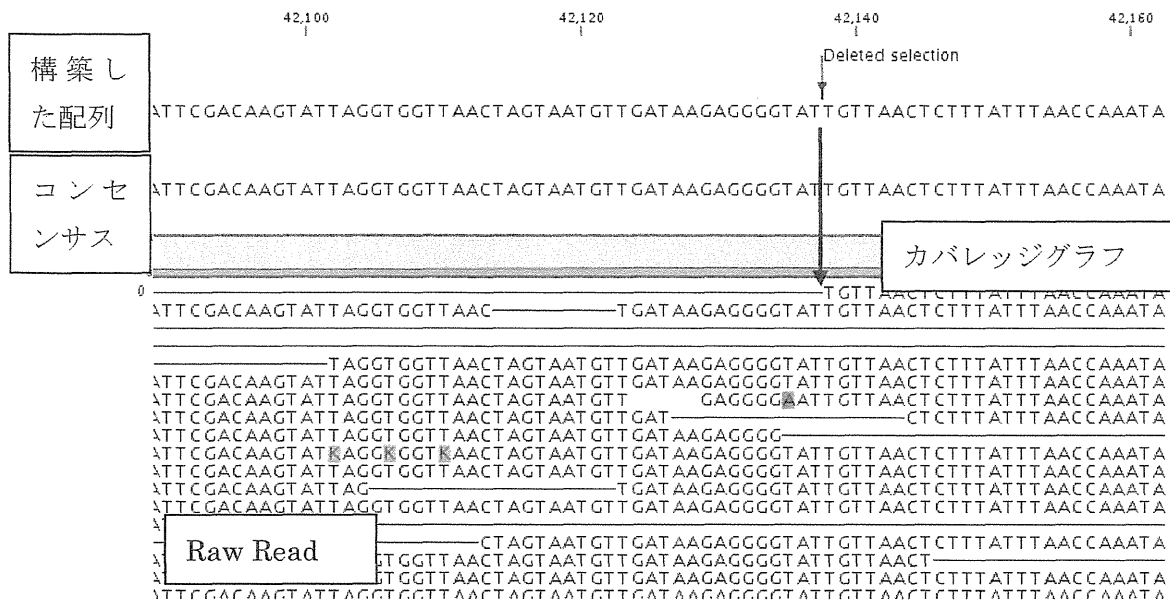
F. 研究発表

なし

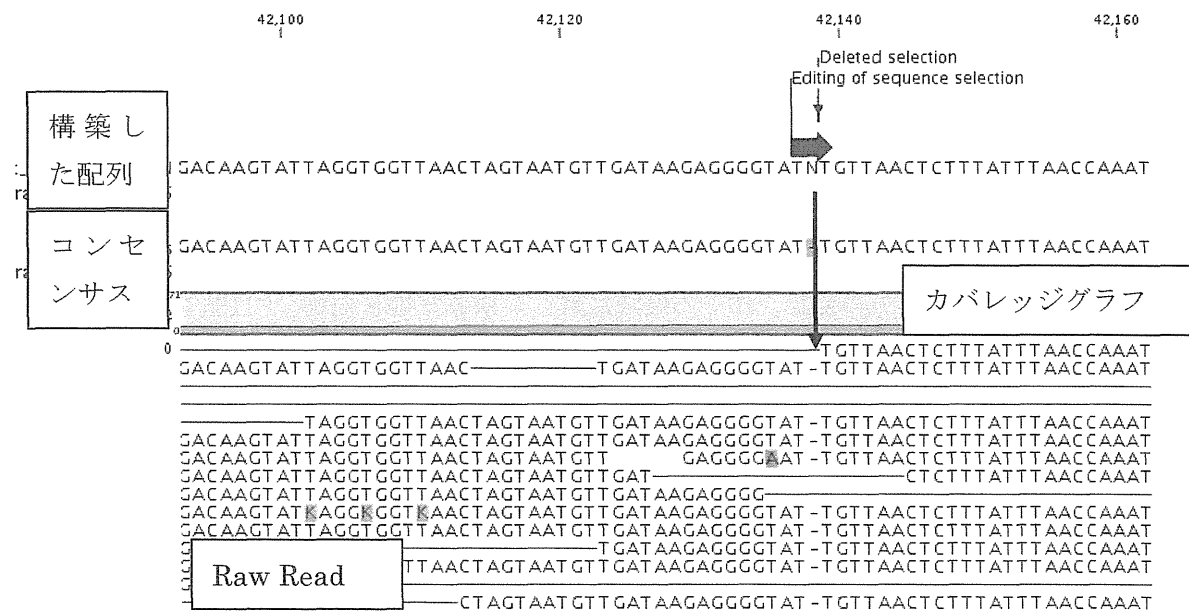
G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

A) 151株のミトコンドリアコンティグの接続部位の確認



B) 151株のミトコンドリアコンティグの接続部位に誤りがある場合の例



C) 161株のミトコンドリアコンティグの接続部位の確認



図1 ミトコンドリアコンティグの接続と Read mapping による確認

上段の配列は、コンティグを環状にした後の配列で、矢印で接続箇所を示している。矢印の上に Deleted selection とあるのは、ソフトウェアの Audit 機能により編集箇所が自動的に記録されており、この部分で編集（環状化の配列の接続）が行われていたことを意味している。下段に Read mapping によるリードが多数並列されており、装置により機械的に読まれた配列との一致の程度を表している。この接続部分で、仮に誤りがあれば、後述の B) の様に一致せず異常が生じる。B) では、比較のために N を 1 文字入れることで、異常の画面をわざと発生させている。

A)151 株での接続部分の確認、B)その接続に誤りがあった場合の例、C)161 株での接続部分の確認。

A) 151株のミトコンドリアゲノム

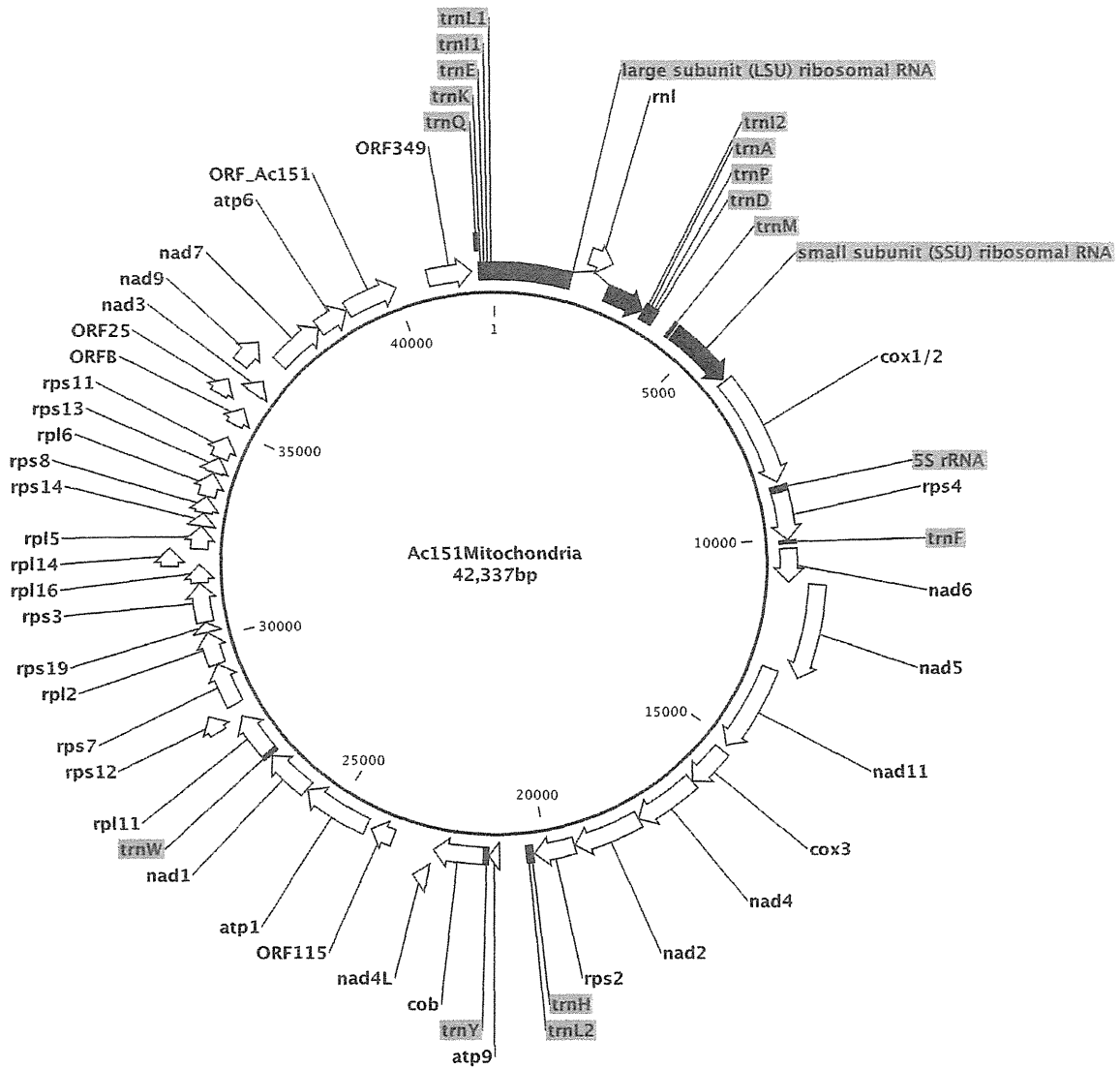
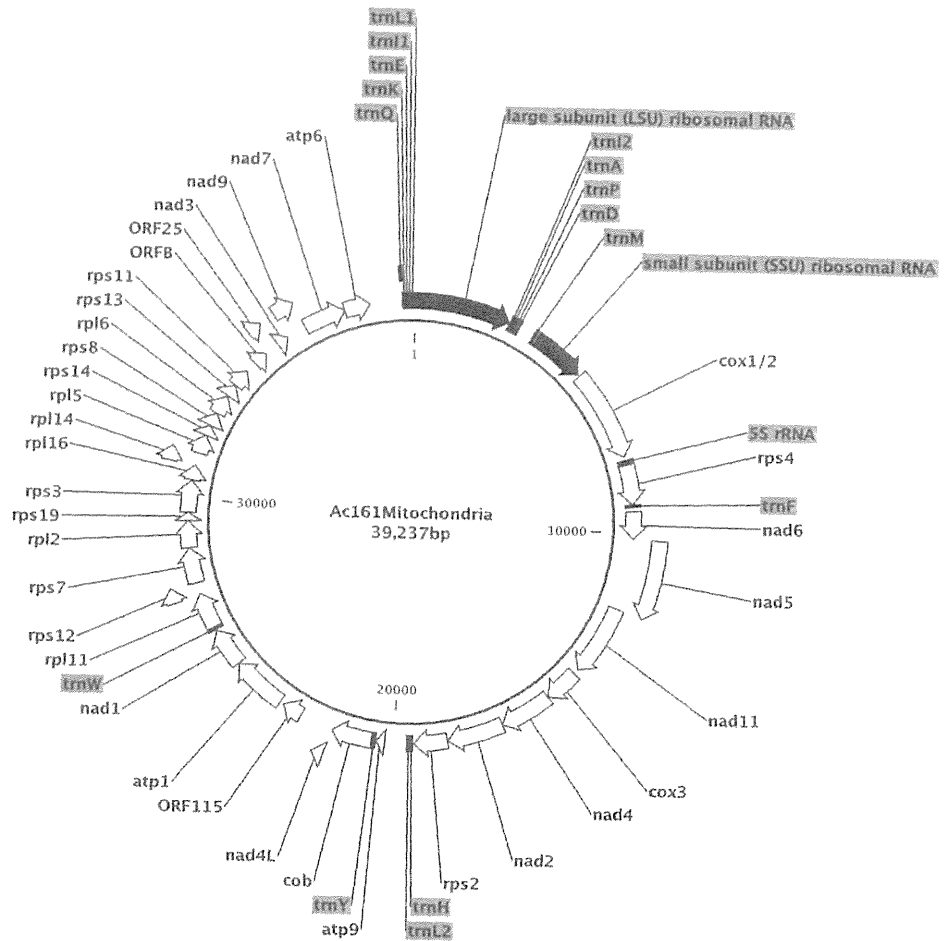


図2 完成したミトコンドリアゲノムの遺伝子地図

遺伝子コード領域は白抜き矢印、rRNA と tRNA は黒塗りの矢印で表示されている。全ての遺伝子は時計回りの方向の鎖にコードされており、逆鎖にはなかった。LSU rRNA 遺伝子の先頭を+1 に設定した。細かな配列の違いについては、図3以降で部分的に拡大して説明する。

B) 161株の
ミトコンドリアゲノム



C) 基準配列 U12386 の
ミトコンドリアゲノム
(参考)

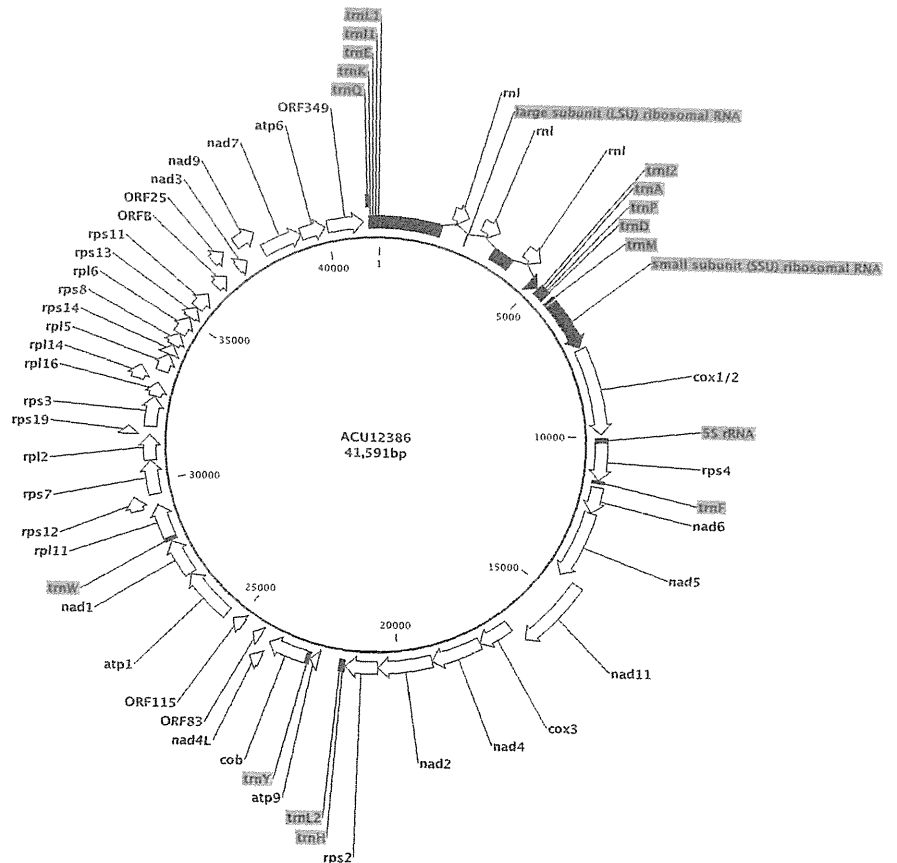


図2 (continued)
完成したミトコンドリアゲノムの遺伝子地図

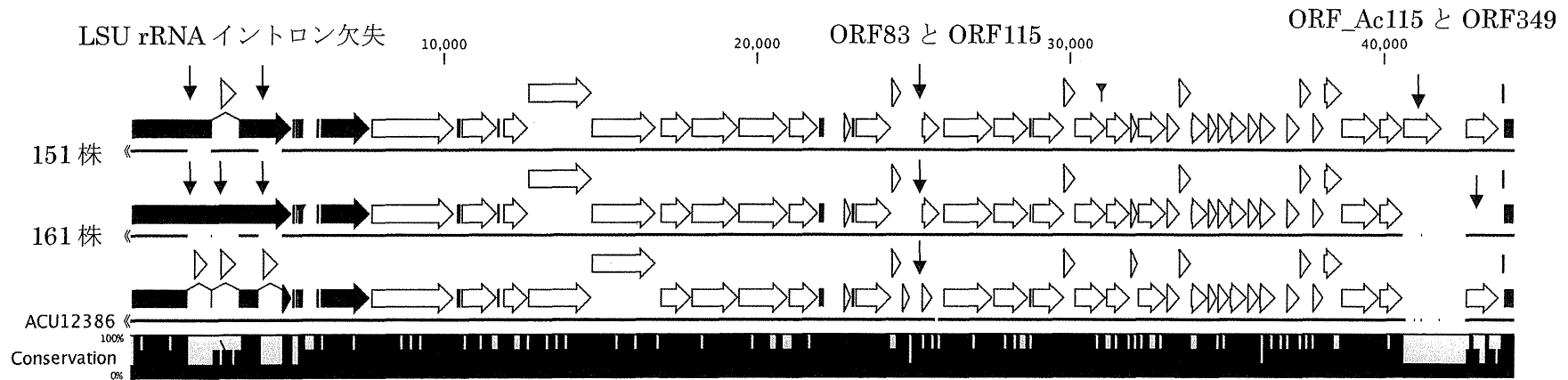


図3 151株、161株、基準配列のアライメント

左側配列の名前の右に横方向に伸びる黒い線は塩基配列を意味し、途切れている部分は、配列のギャップを意味する。先頭は左側で LSU rRNA 遺伝子から順に、全て一方向に揃って遺伝子が並んでいる。黒線の塩基配列の上に、コード領域は白抜き矢印、rRNA は黒塗りの矢印で、模式的に遺伝子の位置関係を図示してある（遺伝子地図）。これら矢印の一部は、重ならないように自動的に上下にずれた位置に表示されている。Conservation は、縦軸の 0 から 100% の範囲で、配列の相同性を表している。先頭のイントロン部分（上の図で ↓ 矢印、図 5）、中間の ORF115 辺り（同 ↓ 矢印、図 6、7）、と最後の ORF349 辺り（同 ↓ 矢印、図 4、9）で差異が大きくなり、他は遺伝子が保存されている。

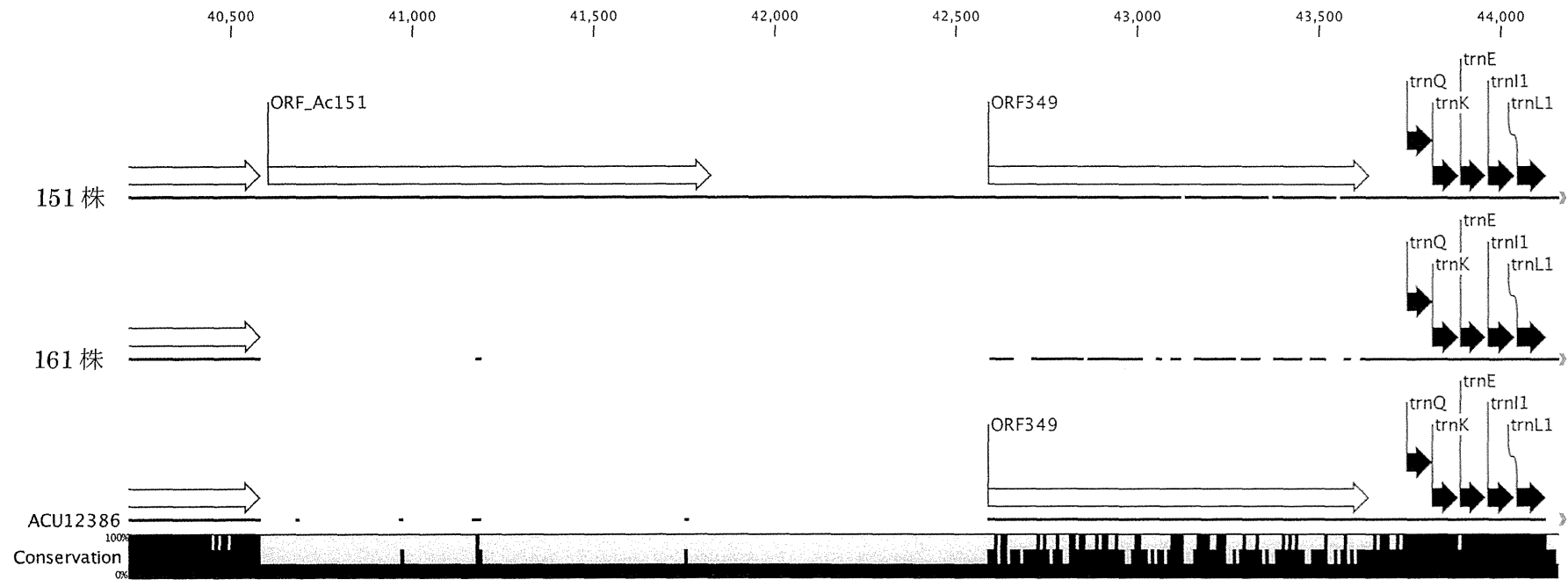


図4 151株における ORF_Ac151 の増加

atp6 遺伝子の後に、151株では ORF_Ac151 が増加していた。左側配列の名前の右に横方向に伸びる黒い線は塩基配列を意味し、途切れている部分は、配列のギャップを意味する。コード領域は白抜きの矢印、tRNA 遺伝子は黒塗りの矢印で表示されている。

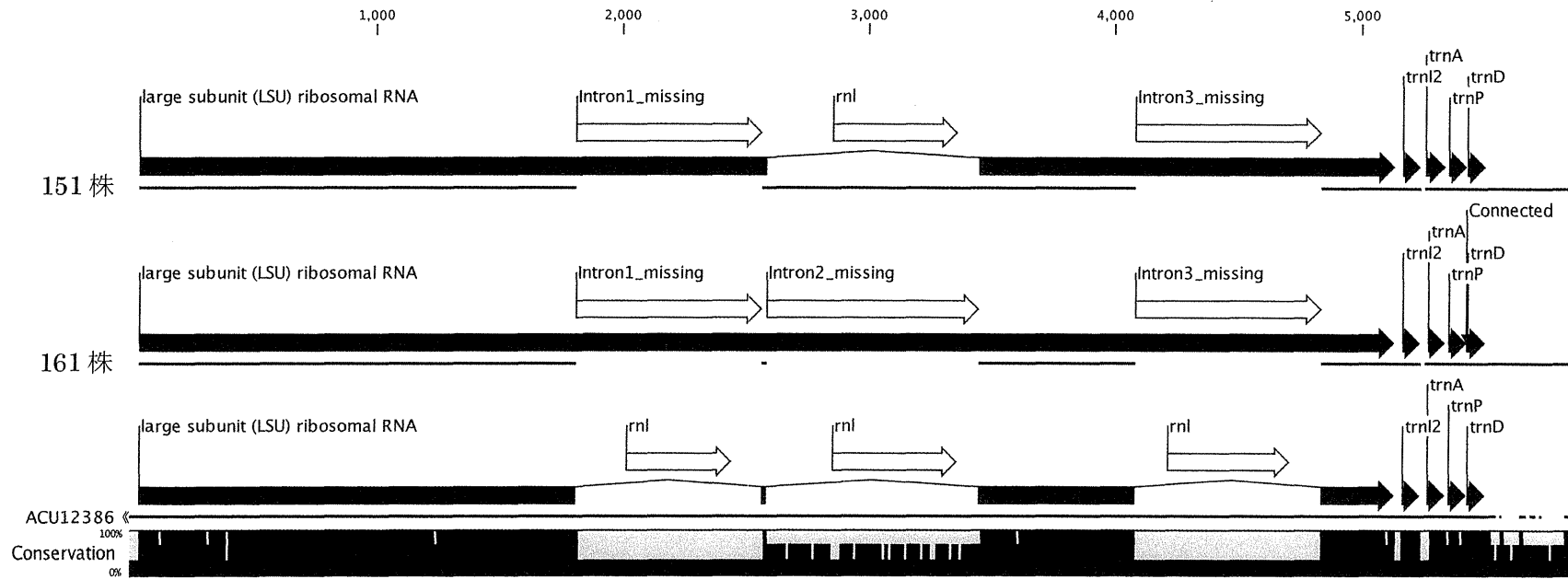


図5 151株、161株のLSU rRNA遺伝子における、イントロンの欠失

左側配列の名前の右に横方向に伸びる黒い線は塩基配列を意味し、途切れている部分は、配列のギャップを意味する。失われたイントロンの位置と、イントロン中に含まれる遺伝子 *rnl* 遺伝子によるコード領域は、白抜きの矢印で表示されている。LSU rRNA と tRNA 遺伝子は黒塗りの矢印で表示され、LSU rRNA では exon 間を細い線をつないで表示している。

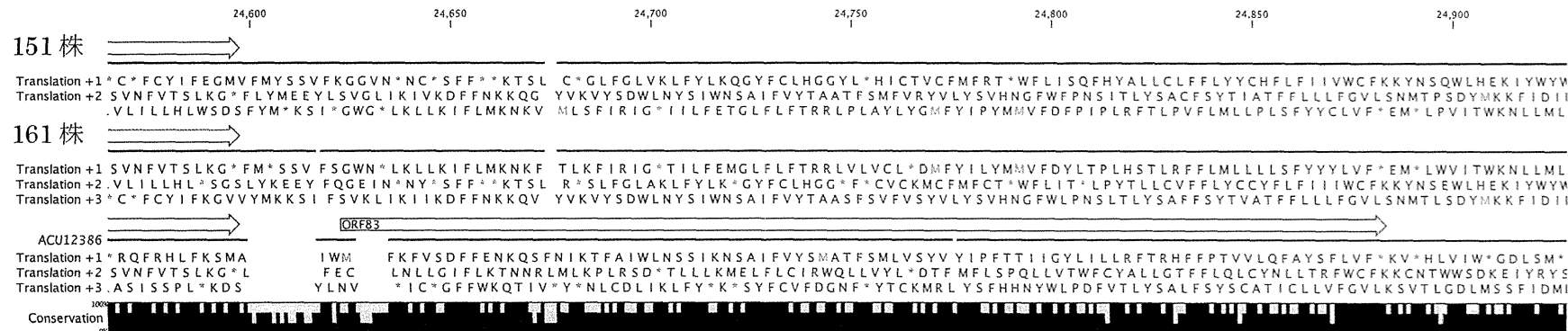


図6 151株、161株における ORF83 の消失

左側配列の名前の右に横方向に伸びる黒い線は塩基配列を意味し、その下に 3 フレーム分のアミノ酸翻訳結果が併記されている。ORF83 に相当する開始コドン（グレーあるいは緑色の M）が存在しない。終止コドンのないフレームが存在し、下流にある ORF115（図 7）とつながる可能性があるものの、ORF83 付近には開始コドンがない。

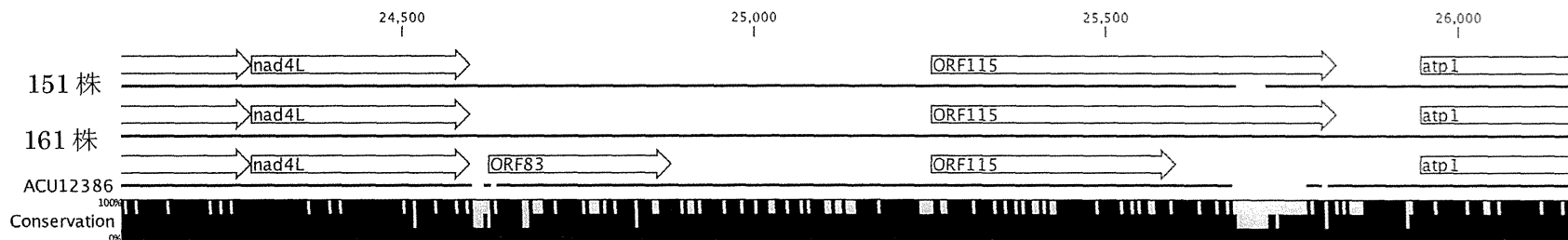


図7 151株、161株における、ORF115 の C 末端側の拡大

左側配列の名前の右に横方向に伸びる黒い線は塩基配列を意味し、その上の白抜きの矢印はコード領域を表している。図 6 に示したとおり、151株と 161株において、nad4L 遺伝子下流の ORF83 は消失した一方、さらに下流の ORF115 は C 末端側で終止コドンの位置が下流に位置して ORF が拡大した。N 末端側も、ORF83 と ORF115 の間に開始コドンがあり、さらに大きな遺伝子になる可能性がある。

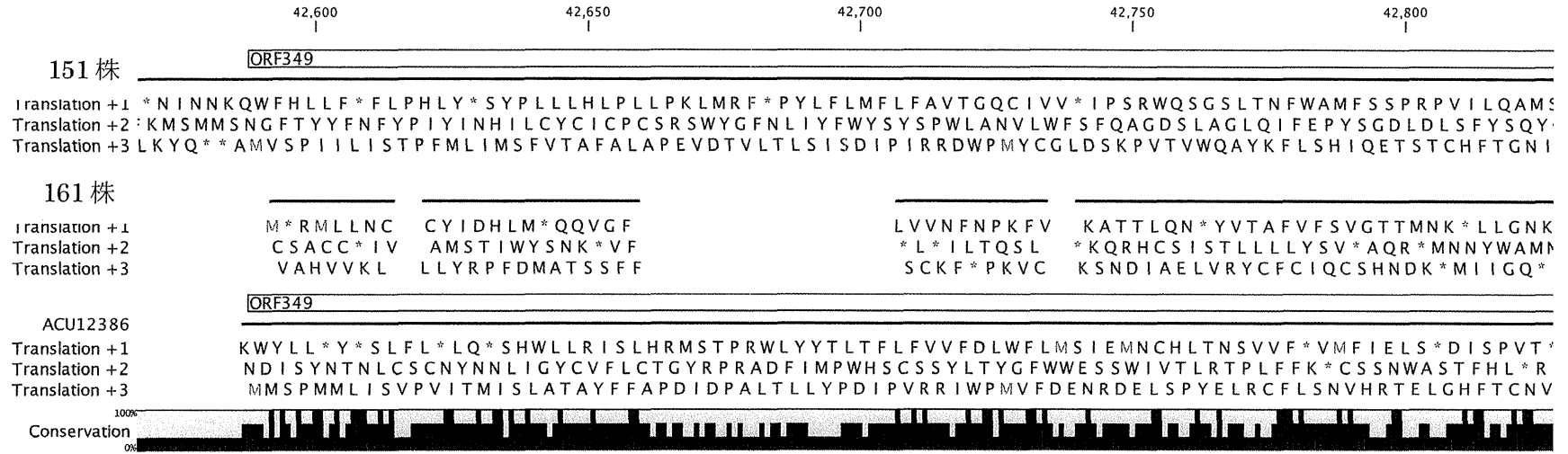


図8 161株における、ORF349の消失

161株では、この領域にストップコドンが多くあり、ORFがない。

マラリア薬剤耐性機構・遺伝子の解析

担当責任者 平井 誠 (順天堂大学・准教授)

研究要旨：マラリア治療における第一選択薬であるアルテミシニンおよび併用薬であるピペラキンに対して耐性を獲得した原虫を単離する。

A. 研究目的

高頻度突然変異マラリア原虫ライブラリ(ミューテーター)から薬剤耐性原虫を単離し、耐性機構の解明とともに診断のための分子マーカーを開発することを目的とする。

B. 研究方法

ミューテーター感染マウスに対して抗マラリア薬であるピペラキン(PQ;30mg)またはArtesunate(ART;100 mg)をそれぞれ4日間連続経口投与した。再燃したマウスから全採血し、感染赤血球を新しいマウスの腹腔内へ投与し、薬剤の経口投与を行った。これを繰り返しおこなうことでミューテーターからそれぞれの薬剤に対して耐性を獲得した原虫のスクリーニングをおこなった。尚、本研究は所属機関の遺伝子組み換え実験および動物実験委員会の承認を得た上で、法令を順守しておこなった。

C. 研究結果

PQ耐性原虫の単離：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。

Art耐性原虫の単離：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)存在下で生存する原虫集団を得ることに成功した。

D. 考察

PQ耐性原虫：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ことから、PQ耐性原虫を単離したと結論付けた。

Art耐性原虫：Art耐性原虫集団はArt(100mg)選択圧で増殖できないが死滅することはない、感染を維持できる程度の耐性を獲得した原虫集団を得た。この原虫集団に対し薬剤選択圧をさらに付加することで、より強い耐性を獲得した原虫を単離できると考える。

E. 結論

PQ耐性原虫クローンは、全ゲノム変異解析を進めている。この解析により耐性に関わる原因遺伝子変異および遺伝子産物の機能から耐性機構解明の糸口が見つかるものと考えられる。原因遺伝子変異同定に成功すれば、それは診断マーカーの開発に直結するものと期待できる。

Art耐性原虫集団から安定した耐性を示す原虫を単離し、上述のPQ耐性原虫での実験と同様のスキームで研究を遂行していく。研究は順調に進ん

でいると結論した。

F. 健康危険情報

委託業務成果報告（総括）にまとめて記入

G. 研究発表

1. 論文発表

① Direct evidence for the atovaquone action on the Plasmodium cytochrome bc₁ complex.

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. Parasitol Int. S1383-5769(14)00133-0. 2014

② Lactate retards the development of erythrocytic stages of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. Hikosaka K, Hirai M, Komatsuya K, Ono Y, Kita K. Parasitol Int. S1383-5769(14)00109-3. 2014

③ Evaluating experimental cerebral malaria using oxidative stress indicator OKD48 mice. Imai T, Iwawaki T, Akai R, Suzue K, Hirai M, Taniguchi T, Okada H, Hisaeda H. Int J Parasitol. 44(10):681-5. 2014

④ Generation of rodent malaria parasites with a high mutation rate by destructing proofreading activity of DNA polymerase δ . 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. DNA Res. 21(4):439-46. 2014.

2. 学会発表

①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

池田 美恵、平井 誠、美田 敏宏

②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

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

③ネズミマラリアにおける腸管病変と腸内細菌叢の変化

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

④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

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

以上4つの発表は、第84回日本寄生虫学会本大会（2015年3月21-22日）

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)

マラリア薬剤耐性機構・遺伝子の解析

研究協力者 中野由美子 国立感染症研究所 寄生動物部 主任研究官

研究要旨：

近年、アルテミシニン耐性の熱帯熱マラリアがタイやカンボジアなど東南アジアで出現し、今後、他の地域への拡散が懸念されている。本研究ではアルテミシニン耐性の広まりを解析し、今後の対策に役立てるために、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。その結果、アルテミシニン耐性に関与すると報告されている置換は検出されなかった。同一のサンプルからは、サルファドキシニン耐性遺伝子が検出された。よって、アルテミシニン耐性に関わる置換は2000年以前には広まっていないこと、また、サルファドキシニン耐性遺伝子の広まりの後に出現したことを示唆している。

A. 研究目的

マラリアの病原体である熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) の治療に、WHOが2001年にアルテミシニン併用療法を推奨したのに伴い、東南アジアのタイ・カンボジア国境領域で2006年までに、アルテミシニン耐性が広がった。この問題はマラリア根絶への世界的な取り組みを脅かすものである。これまで耐性の監視には、分子マーカーがないことが妨げとなってきた。近年、Takala-Harrison らは、治療開始からの原虫消失半減期に時間がかかる臨床株の大規模ゲノム解析を行い

(Takala-Harrison, 2013)、10番と13番染色体上の一ヌクレオチド置換 (SNP) が重要であることを報告した。それぞれ、10番染色体上の置換はMAL10- 688956 座にマップされ、DNAポリメラーゼdelta 触媒サブユニットの3' 非翻訳領域に存在し、13番染色体上の置換はMAL13- 1718319 座にあり、RAD5ホモログ遺伝子の中にマップされた。本研究では、アルテミシニン導入以前のアーカイブサンプルを用い

て、上記の2つのSNPが東南アジアの検体にもともと存在していたSNPでないことを確認することを目的に行った。

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 (Qiagen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。

SNPの検出にはWorld Wide Antimalarial Resistance Network (WWARN)によってnested-PCRによって増幅した300 bpの断片を制限酵素処理によって判定するPCR-RFLP (Restriction Length Fragment Polymorphism) が報告されていたが、ギムザから抽出した

DNA検体からは300bp断片が増幅不可能であったため、SNP周辺のGC-rich領域を標的に170 bpを増幅するsemi-nested PCR法を開発した。

1回目の増幅は98℃5秒、50℃20秒、68℃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℃5秒、50℃20秒、68℃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) MAL10-688956を含む170 bpの増幅には、MAL10-1F (5'-GTC ACC TCA TTA AGA ATG GAT TG -3')とMAL10-2R (5'-GAC ATA TAT TTA TAT ACA TAT GTA TAA TAC AAC CAC C-3')をouter primersとし、MAL10-1FとMAL10-3F (5'-GGA AAA TGT AAT GAA TGG GCG -3')をinner primersとした。MAL13-1718319の増幅にはMAL13-1F (3'-CAG ACG TGA AGA AGG TAT TTA AAA GTG-3')とMAL13-2R (5'-CAT CAT CTA TAT TTT TTG ATT TGG TTG AT-3)をouter primersとし、MAL13-1FとMAL13-3F (5'-GGA TGA AGA AAT TGA ATA CAA TAA TCC-3')をinner primersとした。

Dhps 変異を含む238 bpのDNA断片はネステッドPCRで増幅した。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。シーケンスプライマーは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。

シーケンスはPCR断片を直接シーケンエンスしたほか、PCR断片をpCR-Blunt-TOPOプラスミド(Invitrogen)にクローニングし、10個以上のクローンをさらにシーケンエンスすることで、変異部位を確認した。

(倫理面への配慮)

該当せず

C. 研究結果

現在までに、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。それぞれの予測される感染国は、パプアニューギニア(4サンプル)、フィリピン(3サンプル)、タイ(2サンプル)、インドネシア(1サンプル)であった。ダイレクトシーケンスとプラスミドにクローン化したシーケンスの結果では、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。一方で、同一サンプルからはサルファドキシン耐性の原因遺伝子である*Dhps*変異を、タイ(2サンプル)とフィリピン(2サンプル)から検出した。2サンプルのタイの*Dhps*の遺伝子型は、一重変異と二重変異の混合感染と、野生型と一重変異の混合感染であった。またフィリピンからの2サンプルの*Dhps*の遺伝子型は、野生型と一重変異の混合感染であった。

表：アジアのサンプルから同定されたMAL10-688956、MAL13-1718319と*dhps*遺伝子型

Table. Polymorphisms of *Plasmodium falciparum* genotypes involved in artemisinin or sulfadoxine resistant

Year	Country	MAL10	MAL13	<i>Pfdhps</i> Genotypes
1985	Philippines	wt	wt	wt/ single
1986	PNG	wt	wt	wt
	Philippines	wt	wt	wr
1988	Thailand	wt	wt	single/ double
	PNG	wt	wt	n.d.
1989	Thailand	wt	wt	wt/ single
	PNG	wt	wt	n.d.
1990	Philippines	wt	wt	wt/ single
1998	PNG	wt	wt	wt
	Indonesia	wt	wt	wt

D. 考察

今回の解析で、アルテミシニン導入以前のアジアのアーカイブサンプルからは、アルテミシニン耐性に相関があると報告されていたMAL10-688956とMAL13-1718319のSNPは野生型が検出された。

タイでは1975年から1984年まで、サルファドキシシンとピリメサミンの合剤 (SP) をマラリアの一次選択薬として使用した。その結果、1980年代中頃には、SPの治療効果は低下し、1985年以降はメフロキンに転換せざるをえなかった。2000年以降はアジア全体でSPやメフロキンの治療効率が低下したために、アルテミシニンによる治療を開始した。本解析に使用したアーカイブサンプルでも、Dhps耐性型が得られたタイとフィリピンのサンプルからはMAL10-688956とMAL13-1718319の耐性型が検出されなかったことは、MAL10-688956とMAL13-1718319は2000年以降に出現した変異であること、またアルテミシニン耐性と相関があることを示している。しかしながら、MAL10-688956とMAL13-1718319の耐性型は、アルテミシニンが導入される前にミャンマーから単離された V1/S line (Udeinya IJ 1983) にも存在していることを考慮すると、本来アジアの株に広く存在していたSNPがアルテミシニンの使用拡大に伴って拡散してきた可能性も否定できない。今後は解析の対象とするサンプルの数を増やすとともに、近年、新たなアルテミシニン耐性遺伝子として報告のあった13番染色体上の13番染色体上の *P. falciparum* kelch 蛋白遺伝子 (kelch13) のSNP

とも併せて解析を進める必要である。本検討でのMAL10-688956とMAL13-1718319の遺伝子型の同定は、これまででも最も古い年代であり、耐性の解明にあたり重要な知見を与えるものである。

E. 研究発表

1. 論文発表

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.

2. 学会発表

なし

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)

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

- 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

担当責任者 山崎 浩 国立感染症研究所 寄生動物部 主任研究官

研究要旨：わが国では多くの寄生蠕虫症の発生が見られるが、検査・診断キットは極めて少なく、寄生蠕虫症の検査診断が困難な現状がある、本研究では、幼虫移行症として重要なトキソカラ症と顎口虫症の検査のための、国産の診断キットを創成することによって、幼虫移行症の検査診断や感染実態調査に資する研究を行った。また、魚類の条虫については、国内発生例の多い裂頭条虫症を標的に感染源となる魚類における感染実態調査を行うために、まず裂頭条虫種の鑑別に資するための DNA 検査法を確立した。

a. 幼虫移行症の検査法開発

A. 研究目的

国内で発生する寄生蠕虫症の発生動向調査や監視体制強化のためには信頼性のある検査診断法の確立が求められている。国内で感染者が散見される幼虫移行症、とりわけトキソカラ症と顎口虫症の検査・診断には、抗体検出による血清診断が有効であることから迅速検査診断キットの必要性が考えられた。本研究では、幼虫移行症の臨床診断や感染実態調査に資する研究を行うことを目的に、イムノクロマトデバイスを用いた迅速診断キットの実用化に向けた研究開発を行った。

B. 研究方法

抗体検出用の診断抗原として、トキソカラ症の遺伝子組換え抗原 (rTcCSPG533)は国立感染症研究所寄生動物部(以下、感染研)で作製した。顎口虫抗原は、タイ・コンケン大学医学部と感染研との共同研究によって新規に 2 種類の遺伝子組換え抗原 (rGsLiC18 と rGsMMP)を開発した。トキソカラ症キットについては、alkaline phosphatase を用いた発色系キットをすでに開発していたが、検査手順をより簡便にし、検査時間も短縮する目的で alkaline phosphatase による検出系から金コロイドの検出系に変更し、その性能を改めて検討した。なお、キットの試作と改良はアドテック株式会社 研究開発部と共同で行った。金コロイド系トキソカラ症キットの再評価

には、トキソカラ症患者血清 6 検体、健常者血清 3 検体を用いて行った。また、顎口虫症キットについては、タイ人顎口虫症患者血清 5 検体とタイ人健常人血清 5 例を用いて基礎条件を検討し、最適化後、顎口虫症患者血清 32 検体に加え、顎口虫症以外の寄生虫症患者血清 58 検体、計 90 検体を用いて 2 種類の抗原に対する感度と特異性を比較検討した。

倫理面への配慮について：

ヒト血清の使用については、国立感染症研究所「ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会」(承認番号 177)、およびタイ・コンケン大学医学部倫理審査委員会(承認番号 HE561396)で承認された指針に準拠した。すなわち、血清材料の供与については研究対象者の個人情報には匿名化されること、不利益を被ることがないこと、など主治医から患者に対して同意を得た上で検査するなど配慮した。

C. 研究結果

トキソカラ症キットの再評価：抗原濃度が高くなると、健常者血清で非特異的反応が見られるたが、これは濃度を低く設定することによって解決できた。次に、最適化された抗原濃度で作成し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。陰性と判定された 1 例のトキソカラ症患者血清は酵素抗体法(ELISA)でも吸光度は低く、キットにおける発色強度と ELISA における吸光度との間には高い相関関係が見られた。

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 を用いたキットでは、感度は 88.2%、特異性は 96.4%であった。一方、rGsMMP を用いたキットでは、感度は 88.9%であったが、特異性は 70.4%と低かった。また、キットでの発色強度と 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。完成したトキソカラ症キットと顎口虫症キットは

図 1 と図 2 にそれぞれ示した。顎口虫症キットについては、特許取得申請予定であるために、キットのデザインのみを図示した。

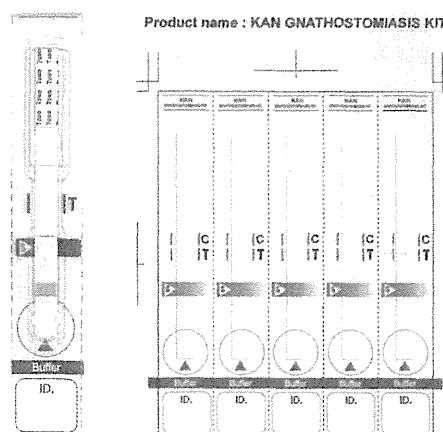


図 1. トキソカラ症キット (左) と顎口虫症キット (右). プラスティック製台紙上に検査用イムクロマトストリップが貼付されている。T ラインに赤いバンドが出現すれば陽性、でなければ陰性と判定。希釈血清注入孔。Buffer ▲, 展開液注入孔。

D. 考察

幼虫移行症として重要なトキソカラ症と顎口虫症の検査キット試作品が完成した。今後は、検査キットとして実用化（製品化）に向けた作業を行うとともに、本キットを用いた検査法が標準検査法として国内外で普及するよう、国内外の医療機関に分与する体制を構築するなどしてキットの普及に努める必要があると考えられた。

E. 結論

代表的な幼虫移行症について、抗体検出を目的とした検査キットが実用化に向けて大きく前進したことにより、今後、幼虫移行症検査法の標準化や感染実態調査など厚生労働行政として感染症対策上極めて重要なツールとして機能することが期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 山崎 浩, Rubinsky-Elephant 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.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

顎口虫症検査キット (予定)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

b. 魚類からの条虫の感染実態調査

A. 研究目的

国内で発生する寄生蠕虫症の中で、サケ・マスが感染源とされる裂頭条虫症は日本人の生食習慣を反映して、患者の発生が多い。本研究では、その感染源とされるサケ・マス（国産、輸入）における裂頭条虫の幼虫の寄生状況を調査し、感染予防に資する情報を提供するために、まずDNA解析に基づいた裂頭条虫の簡便な種鑑別法を確立することを目的とした。

B. 研究方法

検査材料としての裂頭条虫の成虫は、感染研に依頼検査目的で国内外の医療研究機関から送付されたもの、あるいは民間の検査会社から分与された個体である。また、広節裂頭条虫と *Diphyllobothrium dendriticum* の幼虫はニジマスやギンザケの内臓や筋肉内から採取した。虫体は採取後、70%エタノール、または 10%ホルマリンで固定され、DNA は市販のキットを用いて調製した。DNA 検査では、ミトコンドリアゲノムにコードされる cytochrome *c* oxidase

subunit I (cox1) 遺伝子を PCR によって増幅した。ホルマリン固定標本由来の DNA を用いる場合には DNA の分解を考慮して、249 bp の短い cox1 遺伝子断片を増幅した。用いたプライマーは F880 (5'-ACAGTGGGTTTAGATGTAAAGACGGC-3') と R1128 (5'-AGCTACAACAAACCAAGTATCATG-3') である。エタノール固定標本由来の DNA を用いる場合には、全長の cox1 遺伝子を含む領域 (~1.7 kb) を増幅するために trnW/F (5'-CACTAAGTGATGTAAGGTCATTGATG-3') と trnT/R (5'-AGTATTCTAATTAATAAAGCC-3') のプライマーを用いた。なお、遺伝子増幅に用いた DNA polymerase はホルマリン固定材料由来の DNA には KOD FX DNA polymerase、エタノール固定材料の DNA には Ex Taq DNA polymerase をそれぞれ用いた。PCR のプロトコルは 94°C, 30 sec; 58°C, 30 sec; 72°C, 90 sec; 35 cycles plus 72°C, 5 min とした。

増幅された cox1 遺伝子はその後、種特異的な制限酵素処理を行い、その切断パターンで種を同定する Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 法を適用した。近縁種との鑑別マーカーとなる種特異的な制限酵素切断部位はこれまでの研究で蓄積してきた DNA 塩基配列データに基づいて特定した。

C. 研究結果

国内で発生する裂頭条虫症のほとんどは日本海裂頭条虫による感染例であり、日本海裂頭条虫の cox1 遺伝子は BspHI による切断部位を有することが判明した。実際、国内症例について解析した結果 (図 2)、cox1

遺伝子断片(249 bp)は BspHI によって2つの断片に切断された。また、輸入症例として国内でまれに見いだされる広節裂頭条虫では、BspHI では切断されず、BtsI で切断された。また、人体寄生例は少ない *D. dendriticum* の場合には、BspHI と AgeI で切断され、人体寄生の裂頭条虫 3 種は容易に鑑別することができた。

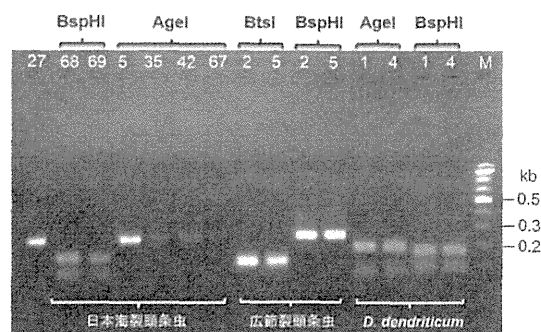


図 2. Cox1 遺伝子(249 bp)の RFLP 解析例。

また、cox1 遺伝子全長 (~1.7 kb) の場合も同様 (図 3)、日本海裂頭条虫 (Dn) は BspHI のみで切断されるが (図 3A, 左から 2 列目)、AfeI や AgeI では切断されない (図 4A, 右側 2, 3 列目)。一方、広節裂頭条虫 (DI) は AgeI や BsaI では切断はされないが (図 3B, C)。 *D. dendriticum* (Dd) は AgeI や BsaI で消化された (図 3B, C)。

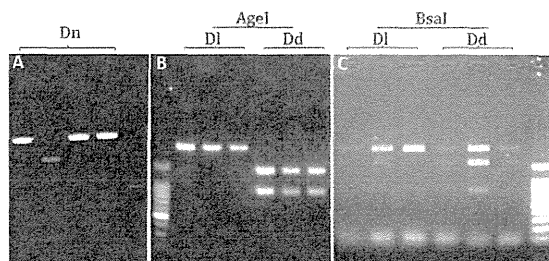


図 3. 全長 cox1 遺伝子の RFLP 解析例。

D. 考察

簡便な DNA 検査法が確立されたことにより、裂頭条虫症の感染源となるサケ・マ