

## 6. 寄生動物部

部長 久枝 一

### 概要

当部は、原虫及び蠕虫による感染症全般に係る基礎ならびに応用研究を行っている。疾患対象としては、赤痢アメーバ、ジアルジア、クリプトスポリジウムなどの腸管寄生性の原虫、トキソプラズマ、マラリア原虫などのアピコンプレクサ類原虫、アカントアメーバ等自由生活性アメーバを含む単細胞真核生物である原生生物による感染症と、アニサキス、トキソカラ、肺吸虫、条虫など多細胞真核生物である蠕虫による感染症が挙げられる。これら寄生虫感染症の検査・診断法の開発・評価、治療法の創成に繋がる基盤的な研究や国内外の現況把握のために、疫学・分子疫学調査を継続的に行った。また、これらの寄生虫症に関する依頼検査、レファレンス業務、研修、国際協力活動を行った。

第一室では、腸管原虫症、特に赤痢アメーバ症・ジアルジア症・クリプトスポリジウム症・サルコシスチス症の診断法開発や疫学・分子疫学研究を行った。また、トキソプラズマの感染機構や植物様代謝経路の解明を行った。同時に、原虫特異的代謝経路を標的とした創薬研究を行った。また、自由生活性アメーバの起こす角膜炎ならびにこれに媒介される細菌感染症に関する疫学・分子疫学・病因学的な研究を行った。

第二室においては、食品由来寄生蠕虫症（アニサキス症、肺吸虫症）、ならびに動物由来寄生蠕虫症（エキノコックス症など）を対象とし、遺伝子診断法や血清診断法開発のための基礎的研究、ならびに疫学的研究を行った。アニサキス症に関しては、感染源となる海産魚類に寄生するアニサキス種の地理的分布を調査した。肺吸虫症に関しては、国内外の症例に係わる感染源の調査を進めた。さらに、国内外の医療研究機関から送付された臨床検体については、血清検査ならびに遺伝子検査などを行い、診断のサポートを行った。

第三室ではマラリアやシャーガス病など、海外からの流入が問題とされる寄生虫症の病原・免疫機構に関する基礎的研究や診断・対策に関わる応用研究、寄生原虫の薬剤耐性に関する研究を実施している。特に、原虫の細胞内侵入や病原性と関連する膜輸送に関する研究や原虫の増殖と休眠を規

定する分子メカニズムの解析などの基礎研究を進めた。また、これらの寄生虫症の診断や治療に関する相談にあたりとともに、熱帯地域を中心として問題となっている外来寄生虫症防疫のため、国内連携の強化と、国際連携の強化を積極的に行っている。研究成果の一部は、実際に検査業務や途上国での寄生虫症対策にも応用されている。

部長室では、原虫と蠕虫に対する宿主応答の研究を行なっている。特に、マラリアの最大の死因である脳マラリアの病態の解析に関わる免疫系の関与、腸管寄生性蠕虫の免疫回避機構およびそれに派生する宿主免疫応答抑制のメカニズムに関して精力的に解明を進めている。

研究費としては日本医療研究開発機構補助金、厚生労働科学研究費補助金、文部科学省科学研究費補助金、日本学術振興会二国間交流事業費、日本予防医学協会委託事業費等を取得した。

人事面では、再任用職員として杉山広、客員研究員として山崎浩、山本徳栄、川中正憲、大前比呂志、荒木潤、小川和夫、加瀬哲男、野地元子、高宮信三郎、熊澤秀雄、記野秀人、川中正憲、野崎智義、荒井俊夫、協力研究員として渡辺恒二、柳川泰昭、川原史也、松崎素道、岡本憲明、荒川京子、別所知明、竹内直志、二瓶浩一、黒滝大翼、Ghulam Jeelani、Herbert Santos、Koushik Das、脇本優司、小林正規、吉田奈穂子、川合覚、岡本宗裕、小林航路、石川敬、吉富徹、林恭子、渡辺菜月、長谷川光子、坂西梓里、流動研究員として花館有希、研究生・実習生として、福本準平、村上正樹、谷口傑、Dwi Peni Kartikasari、窪田理恵、Nguyen Thi Nga、高木綾湖、多久和泉、川瀬航が在籍し、研究等に従事した。任期付き研究員として荒木球沙、Olia Alex、非常勤職員として伊藤薫平、梅木優子、臨時研究補助員として下河原理江子、中曾根英子、賀川千里、山本郁代、荒井絢子、長谷川早悠里、原史絵、立石祐樹が在籍し、研究等に従事した。

## 業績

### 調査・研究

#### I. 検査法・診断法・不活化法の開発

##### 1. 原虫症診断法・検出法・不活性化法の開発

###### (1) 国内赤痢アメーバ症検査整備の取り組み

2017 年末以降、保険適用可能な赤痢アメーバ症の検査が顕微鏡検査に限定された状況にある中で、赤痢アメーバ症の届出数が顕著に低下している(特に重篤化するアメーバ性肝膿瘍を主とする腸管外アメーバ症)。診断のための検査を行わず適切な治療に支障が生じている恐れもある事態と考えられ、検査法を整備することでこの問題解決に取り組んでいる。これまで新たな抗原検出キットを用いた検査法評価に関し遺伝子検査の面から研究協力を進め、2021 年本抗原検出法が保険収載の予定である。一方、抗体検査の保険再適用を目指すべく、新たに ELISA 系を利用した抗体検査法の評価も進めており、遺伝子検査の面からデータ収集を進めている。

[八木田健司、下河原理江子、柳川 泰昭、渡辺恒二(国立国際医療研究センター)]

###### (2) バラムチア脳炎の診断法開発

バラムチア脳炎診断法開発に関しては、抗原検出法としてピオチン-アビジン系による ELISA 開発をすすめ、100cell 相当タンパク/ml の検出感度を得ている。臨床的には微少アメーバの検出を要するとの判断から、診断用検体としてはアメーバ濃度が最も高いと想定される髄液の利用を考えているが、実用的使用にはさらなる高感度化を要すると考えられる。また ELISA 系と同様の抗体を用いたイムノクロマトでは、アメーバライセートに対する明瞭なバンド検出をみている。いずれの検査法にしても、臨床検体を用いて実用性を検証する必要がある。

[八木田健司、花館有希]

###### (3) 省力化配管洗浄法の開発と営業施設における実地試験

公衆浴場等における自由生活性アメーバやレジオネラ属菌の汚染を低減するには、消毒だけでなく、定期的な洗浄が必要になる。ろ過器や配管はブラシを使った物理的な洗浄ができず、過酸化水素や過炭酸ナトリウムを使用した化学的な洗浄を行っている。しかし、これらの物質は劇物や危険物であり、多量の薬剤を使つての頻回な洗浄は容易ではなかった。本研究では使用する薬剤量の低減を目的として、過炭酸ナトリウムに助剤を併用する新規の洗浄方法に

着目した。バイオフィーム中の金属によるフェントン反応により、従来より少ない薬剤量でも効率よくバイオフィームの除去が可能になると期待された。最初にステンレス製試験片上に生成したバイオフィームを効率よく除去できる洗浄条件を検討し、次に営業 4 施設の協力を得て、最適条件による新規の洗浄方法を試行した。薬剤の使用量が重量にして従来の 3 割と低減したにも関わらず、9 割以上の微生物が除去される洗浄効果が得られた。洗浄後のすすぎの回数も多くなく、従来より少ない労力で洗浄することが可能となった。本洗浄方法の活用により、洗浄頻度の向上、浴場施設の衛生の向上が期待される。

[泉山信司、長岡宏美(静岡県環境衛生科学研究所)、柳本恵太(山梨県衛生環境研究所)、森康則、永井佑樹(三重県保健環境研究所)、枝川亜希子(地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所)、山本哲司、細川賢人、田中孝典(花王株式会社)、杉山寛治、田中慶郎(株式会社マルマ)、市村祐二、茶山忠久(ケイ・アイ化成株式会社)、藤井明(株式会社ヘルスビューティー)、斎藤利明(株式会社ヤマト)、小坂浩司(国立保健医療科学院)、前川純子(細菌第一部)]

###### (4) 弱酸性の人工炭酸泉へのモノクロラミン消毒の適用

公衆浴場等における自由生活性アメーバやレジオネラ属菌の汚染への対策として、浴槽水の消毒に使われるモノクロラミンは、pH の酸性条件下で臭気のあるジクロラミンへ変化する可能性が心配されたことから、これまでのところアルカリ性や中性の泉質に適用され、酸性での適用事例がなかった。一方の遊離塩素消毒は、pH5 程度の弱酸性、例えば人工炭酸泉に用いられており、同じ塩素系の消毒方法であるモノクロラミンは、同程度の弱酸性に適用できるかもしれない。現状、アルカリ性と酸性の浴槽が同一施設内にあるなどして、モノクロラミン消毒と遊離塩素消毒を併用する場合、両消毒方法の混入によりジクロラミンやトリクロラミンによる臭気の発生する恐れがあり、2つの消毒の併用は避けたい。そこで、弱酸性の浴槽水にもモノクロラミン消毒が適用できないか検討した。まず、pH3~8 に調整した緩衝液中でモノクロラミン濃度 3 mg/L の安定性を比較したところ、pH3~4 では濃度が減少したが、pH5~8 では添加 10 分後も濃度が安定して維持されていた。次に、営業施設の人工炭酸泉、3 施設の計 4 浴槽におい

て、終濃度 3 mg/L 以上に維持したモノクロミン消毒の効果を検証した。週 1 回の換水・配管洗浄前の細菌検査では、いずれの浴槽水からもレジオネラ属菌は検出されず、モノクロミン消毒時に増殖の報告がある、従属栄養細菌数の増加もなかった。うち 2 浴槽ではフローサイトメトリーによる全菌数検査も行い、浴槽水が適正に消毒されているとの結果を得た。これまでの営業施設におけるモノクロミン消毒の実施と同様に、入浴者からの臭気等に関する苦情もなかった。以上の結果から、これまで適用されていなかった pH5 までの弱酸性にも、臭気を発生させることなくモノクロミン消毒が利用可能であること、レジオネラ属菌だけでなく、従属栄養細菌数の増殖を抑制できることが示唆された。

[泉山信司、長岡宏美（静岡県環境衛生科学研究所）、田栗利紹（長崎県環境保健研究センター）、杉山寛治、田中慶郎（株式会社マルマ）、市村祐二、茶山忠久、青木信和（ケイ・アイ化成株式会社）、前川純子（細菌第一部）]

## 2. 蠕虫症診断法・検出法の開発

(1) わが国に分布する旋毛虫 *Trichinella T9* の殺滅に有効な加熱条件の検討（続報）

わが国で発生した旋毛虫食中毒の原因物質である *Trichinella T9* の幼虫に対して、75°C で 1 分間の加熱（厚労省が野生鳥獣の安全な喫食に求める条件）を直接的に加えた上で、好適終宿主のマウスに経口投与したところ、一部の幼虫はマウスに感染するとの結果が得られたことから、この成績を追試験した。その結果、同様の実験系では同じく本虫のマウスへの感染性が完全には消失しないことが追認された。本虫の幼虫に対して直接的に 75°C、1 分間の加熱を加えるのではなく、野生鳥獣肉の調理時と同様の条件で虫体に熱を加え、耐性を検討して、現状の加熱条件で旋毛虫食中毒の発生が予防できるか否かを、さらに確認する必要があると示唆された。[杉山 広、森嶋康之、村上正樹、常盤俊大（日獣大）]

(2) 有鉤囊虫症イムノクロマトキットの開発

大腸菌発現系で作成した遺伝子組換え抗原を検討したが、糖鎖を欠くことが感度低下の原因と考えられるので、糖鎖を有する組換え抗原を作成するため、カイコ・バキュロウイルス発現系を試みた。人工的に合成したアジアと中南米の

有鉤囊虫抗原（以下、CL1 と CL2）遺伝子をそれぞれ組込んだ 2 種の Bacmid DNA を作成し、これらをバキュロウイルスに導入して組換えバキュロウイルスを作成した。次に組換えバキュロウイルスを *in vitro* 培養して増殖させ、培養液より回収したバキュロウイルスをカイコ幼虫に接種して遺伝子組換え CL1 と CL2 を発現させた。両抗原とも不溶性蛋白質として発現したため、尿素で可溶化したのち、His-Tag アフィニティ・クロマトグラフィを用いて精製した。得られた抗原は純度検定で両抗原とも分子サイズ 30~35 kDa の範囲に複数成分として精製され、これは付加された糖鎖の違いによるものと考えられた。

[山崎 浩、森嶋康之]

## (3) 寄生蠕虫の遺伝子検査

寄生蠕虫症における原因種の正確な鑑別や同定は、確定診断の根拠を与え、適切な治療を行うためにきわめて重要である。しかし、形態学的鑑別は、形態が類似した寄生虫の鑑別に高度な専門知識が要求される。さらに虫体の変性、あるいは石灰化した場合には、寄生虫の形態的特徴が失われ、同定・鑑別は一層困難となる。そこで、遺伝子解析に基づき寄生虫種を同定・鑑別する方法が最も正確であるために、臨床検体を研究材料として、網羅的な遺伝子鑑別法の確立も目的として実施してきた。今年度標的遺伝子として選択したのは、ミトコンドリア DNA の cytochrome c oxidase subunit 1 (cox1) や 12S ribosomal RNA、リボソーム DNA の ITS-1 や ITS-2 など、塩基配列に関する基礎的な情報を蓄積した。材料は国内外から検査依頼目的で送付された臨床検体とし、寄生虫の種類ごとにプライマーの設定を含めた PCR 条件を詳細に検討した。解析した寄生虫の詳細はレファレンスの項に記載した。

[森嶋康之、杉山 広、山崎 浩]

## II. 疫学・型別・分子疫学的研究

1. 原虫症等の寄生虫症の分子疫学的研究・調査

(1) 耐塩素性病原微生物の顕微鏡検査を遺伝子検査で補い、浄水場の対策に反映された例

水道におけるクリプトスポリジウム等の耐塩素性病原微生物の検査は、水道原水 10L 中のわずか 1 つを顕微鏡で検出する、容易ではない検査が行われている。ある河川水原水では、上流に民家や畜産施設がほぼ無く、クリプトスポリジウムやジ

アルジアの検出がないとされてきたが、特異蛍光抗体で染色されるジアルジア大の粒子が観察されていた。その粒子は、従来の鑑別基準での核の配置とは異なっていたので、ジアルジアとは判断されていなかった。遺伝子検査を行うと RT-PCR が陽性となり、げっ歯類で報告のある *Giardia microti* の塩基配列が得られた。その塩基配列はヒトでの感染報告例が見当たらず、直ちに高いリスクが生じるとは言われずに済むようであった。取水地点より上流を調査すると、河川水と野生のネズミの糞便から同じ塩基配列が検出された。河川の過去の冷凍試料にさかのぼって検査すると、時々の試料からクリプトスポリジウムの RT-PCR 陽性と塩基配列が得られた。耐塩素性病原微生物の排出源が想定外に明らかとなったことから、免疫不全等の健康弱者が感染し重篤化する可能性、ヒトで感染する種や株が野生動物の間で流行する可能性を考慮し、浄水処理の徹底、すなわちろ過池の濁度の監視や洗浄の徹底と、紫外線処理の導入といった対策が行われた。以上は遺伝子検査を併用して顕微鏡検査の結果を補い、野生動物由来の糞便汚染とジアルジアの流行を検知し、浄水場の対策に反映することで、水道水質の向上に資することのできた例であった。

[泉山信司、鎌田智子(神奈川県内広域水道企業団)、古川紗耶香(青森市企業局)、藤瀬大輝(川崎市上下水道局)、橋本温(県立広島大学)、黒木俊郎(岡山理科大学)、井上亘(神戸大学)、中嶋直樹(神奈川県衛生研究所)]

#### (6) 日本におけるトキソプラズマの分子疫学

ア. 日本の先天性トキソプラズマ症患者由来原虫の分離と解析

日本の先天性トキソプラズマ症由来の原虫株の分離に成功した。これは日本での由来の明らかな初の分離報告となる。生後 9 日の患児から採取された髄液を用いて分離を試みた。母体の妊娠中に抗体陽転化が認められ、児は頭蓋内石灰化、脳室拡大、両網脈絡膜炎があり、トキソ IgM 陽性が確認されていた。なお、母親の妊娠 1 年前以降の海外渡航歴はなかった。採取された検体を用いて PCR 検査を行い陽性を確認すると共に、残余検体をバイオアッセイの一環としてあらかじめデキサメサゾン投与されたマウスに接種した。接種 2 週間後、腹腔洗浄液を採取し Human foreskin fibroblast 培養中に添加し共培養した結果、原虫株の確立に成功した。この間、同一原虫はマウスでも維持されていたが、マウスに対する病原性は弱いように思われ

た。得られた株からゲノム DNA を精製し、Illumina HiSeq を用いて全ゲノム配列を決定した。得られた配列を、既知の全世界の分離株のゲノムと比較した結果、本分離株は日本で見出された特異な遺伝型ではなく、欧米で広く認められる Type II と同一のものであると思われた。現在、全ゲノム配列とマウスに対する病原性についてより詳細な解析を行っている。

[川原史也、松崎素道、永宗喜三郎、山元佳(国立国際医療研究センター)、兼重昌夫(国立国際医療研究センター)、丸山治彦(宮崎大学)]

#### イ. 日本由来トキソプラズマのゲノムワイド SNPs 解析

トキソプラズマは非常にクローナルな生物であり、世界中で 16 の遺伝型(ハプロタイプ)の存在が知られており、またハプロタイプと地理的分布や病原性が非常に相関していることも報告されている。我々は最近、日本のトキソプラズマは世界の他の地域とは異なる独自の進化を遂げている可能性を見出した。そこで日本由来トキソプラズマを多数分離して全ゲノム配列を決定、さらに病原性を調べることにより、日本におけるトキソプラズマの特異性の調査を試みている。これまでにゲノム情報を得た日本分離株 12 株のうち大部分は日本特有の新奇な集団に属しており、欧米で知られている遺伝子型は HG2 と HG3 が 1 例ずつに過ぎなかった。このことは、日本におけるヒトおよび家畜のトキソプラズマ症の臨床像を議論する上で、これまで欧米で蓄積された遺伝子型や病原性についての知見だけでは不足することを意味する。今後はさらなるサンプリングを進めるとともに、日本分離株それぞれの特性を明らかにしていく必要があると考えられる。

[川原史也、松崎素道、永宗喜三郎]

#### (7) 日本におけるトリコモナスのメトロニダゾール耐性の疫学調査

嫌気性の原虫トリコモナスによる性感染症は、わが国では感染症法の届出対象外であるため、国内流行状況は把握が困難である。しかしトリコモナス陰炎は典型的な性感染症であり、日本人の婦人科領域の感染症の多くを占める。トリコモナス症の治療には、嫌気性原虫に有効なメトロニダゾールが国内外で使用されているが、世界ではメトロニダゾール抵抗性原虫の出現の報告がある。わが国のメトロニダゾール抵抗性トリコモナスの流行状況を明らかにするために、研究協力者の医

師が所属する医療機関から患者検体を受け入れ、トリコモナスの感染の有無を確認すると共に、純粋培養株の立ち上げを開始した。先ず、産婦人科を受診し細胞診を受ける女性患者を対象に、インフォームドコンセントを得た後、患者検体を採取した。検体からのトリコモナス感染の有無は、トリコモナス培地での培養、培養コロニーの鏡検、原虫 rRNA 遺伝子を標的とする PCR ならびに増幅断片の配列決定で確定診断を行った。メロニダゾール感受性試験の *in vitro* でのトリコモナス原虫の生死の判定には、これまで論文で報告されている鏡検での原虫の運動性の有無ではなく、生細胞が産生する NADH を定量的に測定可能な WST-1 試薬を利用する条件検討を行なった。

[中野由美子、梅木優子、下川周子、久枝一、小林浩一(東京山手メディカルセンター)]

## 2. 蠕虫症等の寄生虫症の分子疫学的研究・調査

### (1) 北東北 3 県のツキノワグマおよびイノシシにおける旋毛虫の寄生状況調査

北東北 3 県で捕獲されたツキノワグマ 22 頭について、旋毛虫の寄生状況を調べたところ、岩手県で 2020 年 12 月に捕獲されたツキノワグマ 1 頭の舌から、旋毛虫 *Trichinella* T9 の幼虫が検出された。その他の検体は旋毛虫陰性であった。秋田県から提供を受けたイノシシの検体・5 頭分も同様に検査したが、旋毛虫陰性であった。

[杉山 広、森嶋康之、村上正樹、常盤俊大(日獣大)]

### (2) ウェステルマン肺吸虫の待機宿主であるイノシシやシカの感染源調査

肺吸虫症は現在も症例報告が続くわが国では重要な食品媒介寄生虫症で、九州南部では第二中間宿主の淡水産のカニよりも、待機宿主であるイノシシやシカの肉が、人への感染源として重要である。そこで本虫の陽性イノシシおよび陽性シカが生息する鹿児島県の小河川で、本虫の第二中間宿主であるサワガニとモクズガニを採集し、本虫メタセルカリアの寄生状況を調べた。その結果、本虫メタセルカリアはいずれの種類のカニからも検出され、イノシシやシカの感染源になると考えられた。カニからの肺吸虫の検出は、獣肉からの検出より容易である。そこで淡水産カニの検査が、待機宿主の検査に代替できないか、検体数を増やして検討したいと考えている。

[杉山 広、森嶋康之、坂西梓里、川上 泰(麻布大)]

### (3) 富山県で発生したアニサキス食中毒事例に由来する虫体の分子同定

富山県で 2018 年 1 月から 6 月の間に発生したアニサキス食中毒事例の特徴と、事例由来の虫体 29 隻の分子同定結果を解析した。各事例からはアニサキス虫体が 1 隻ずつ胃より検出された。原因食品と推定された魚種は、サバが 10 件と最も多く、次いでカツオとアジが各 2 件、イワシとブリが各 1 件ずつであった(残りは原因魚種不明)。虫種の同定結果は、27 件が *A. simplex sensu stricto* (狭義の *A. simplex*、以下 *As*)、2 件が *A. pegreffii* (以下 *Ap*) で、*Ap* が検出された 2 件の原因食品はアジ(刺身)と推定された。アニサキス食中毒は *As* を原因とする事例が極めて多く、*Ap* による症例は少数に留まる。そこで富山湾で漁獲されたアジの筋肉から、*Ap* がどの程度検出されるのか、アジの危険性を推定する検討を現在進めている。

[綿引正則、内田薫、金谷潤一、加藤智子、木全恵子、磯部順子、大石和徳(富山衛研)、東崎香奈(富山県厚生部) 関口健治、堀田 和(富山県新川厚生センター)、森嶋康之、杉山 広]

### (4) 南米に分布する肝臓寄生の吸虫に関する検討：*Amphimerus* 属肝吸虫の第 1 中間宿主の決定

後睾吸虫科の *Amphimerus* 属肝吸虫はアメリカ大陸にも分布し、エクアドルでは地域住民の中に感染者を認める。同国中西部の流行地での調査では、*Ancha* と呼ばれる小型淡水魚 *Rhoadsia altipinna* に多数の本虫メタセルカリアが高率に検出された。しかも住民はこの淡水魚を非加熱で常食することから、この魚種が本虫の第二中間宿主であると考えた。しかし第一中間宿主は不明であったので、本虫メタセルカリア陽性の淡水魚 *Ancha* が多数生息する集落の河川で、4 種類(4 属)の貝を採集し、破碎してセルカリア寄生の有無を調べた。その結果、*Aroapyrgus* 属の貝から、眼点を持つ長尾セルカリアが検出された。このセルカリアを出発材料に、リボソーム DNA・ITS2 領域の塩基配列を解読したところ、*Amphimerus* 属成虫やメタセルカリアに由来する ITS2 領域の配列と一致した。*Aroapyrgus* 属の貝が本虫の第一中間宿主であることが分かった。今後は本虫セルカリアの詳細な形態観察と貝にお

ける本虫寄生状況の解析（地域差・季節変動）に取り組む予定である。

[杉山 広、高木秀和（愛知医大）、マヌエル・カルボピーナ（アメリカ大・エクアドル）]

#### (5) 愛知県におけるエキノコックス流行調査

2014年3月、愛知県阿久比町において捕獲されたイヌ1頭からエキノコックス（多包条虫）虫卵が検出され、北海道以外の都府県からは第二例目となる「犬のエキノコックス症」として届出がなされた。当該犬は知多半島において野生化したイヌの1頭であり、これらの個体群におけるエキノコックスの浸淫状況を知る目的で2015年度より流行調査を実施している。2020年度は本症定着の中心と考えられるコアエリア隣接の地域から新規に陽性1例を検出した。

[森嶋康之、八木欣平（北海道立衛生研究所）、塚田英晴（麻布大学）]

### III. 分類・同定・臨床

#### 1. バラムチアによるアメーバ性脳炎の感染マウスモデル

バラムチアによるアメーバ脳炎の病態解析を目的に経鼻感染マウスモデルを作成すすめている。経鼻感染で正常マウス（C57BL/6J）が明確な抗バラムチア IgG 増加を示したことから、体内の各臓器について免疫染色を含む顕微鏡観察、定量PCR 検査によるアメーバ検出を試みたが、アメーバは検出されなかった。発症モデルを目標に、さらに高濃度感染試験を行い、前試験時よりも高い IgG の上昇と体表変化（部分的脱毛）をみたが脳炎発症には至らなかった。現在組織学的なアメーバ解析を進めている。マウスの免疫学的な特性を考慮し、Th1 支配的とされる C57BL/6 マウスと対照的な Th2 支配的マウスの BALB/c 系統での感染実験も進めている。

[花館有希、八木田健司]

#### 2. 自由生活性アメーバ類とその共生体のヒトへの健康影響

ハウスダスト中に存在する自由生活性アメーバ類とその共生体 AAMs のヒトへの健康影響を調査、解析することを目的に、AAMs のヒト単球系細胞 THP-1 に対するサイトカイン産生作用を解析した。その結果、AAMs には THP-1 に対し、IL-1 $\beta$ 、IL-6 および TNF $\alpha$  について *Legionella.pneumophila* と同

等かそれ以上の産生反応を惹起するものがあり、AAMs 間でその産生反応には差があること、またサイトカイン産生の高い AAMs での THP-1 への細胞内感染性が示された。ハウスダスト中にはヒト免疫細胞に影響を及ぼし得る AAMs が存在し、AAMs が疾病負過のリスク要因として考慮すべき存在であることが示唆された。

[八木田健司]

#### 3. 赤痢アメーバの国内臨床単離株の動物モデルを用いた病原性評価

赤痢アメーバ症は感染者の 10%でしか発症せず、90%が腸アメーバ症や無症候性感染、10%が肝膿瘍を主とする腸管外アメーバ症となる。病態を規定する因子については、赤痢アメーバの病原性や感染宿主の免疫応答など、複雑な相互作用が影響しており、不明な点が多い。我々は国立国際医療研究センターとの共同研究から新たな無症候性・腸アメーバ症・肝膿瘍由来の国内臨床単離株の樹立に成功した。令和2年度に分離した肝膿瘍由来の臨床単離株を用いて、シリアンハムスターへの肝膿瘍感染実験で肝膿瘍形成能を確認した。また、in vitro 継代株と臨床単離株から回収した RNA を用い、RNAseq 解析を行った結果、臨床単離株間で異なる遺伝子発現パターンを示すことを明らかにした。現在、個々の遺伝子機能についての解析を行なっている。

[柳川泰昭、渡辺恒二（国立国際医療研究センター）、吉田菜穂子（順天堂大学）、津久井久美子、八木田健司、小林正規（慶応大学）、野崎智義（東京大学）、中野由美子]

### IV. 生理・生化学・分子生物学

#### 1. 原虫の病原機構・生物学にかかる研究

(1) トキソプラズマの病原機構・生物学・代謝学にかかる研究  
ア. 実験室培養系に適応したトキソプラズマの原因遺伝子の同定

我々が研究室で継代維持していたトキソプラズマ 2F 株において、増殖速度が親株よりも速くなっているクローンが存在していることを偶然見出した。そこでそのクローン (2Fevol1) について親株との遺伝的背景の違いを調べるため比較ゲノム解析を行った結果、その責任遺伝子候補として遺伝子 x を同定できた。さらに x にコードされているタンパク質の機能を解析するため、この遺伝子をノックアウトしたところ、ノックアウト原虫の宿主細胞への侵入効率およびマイクロネームタンパク質分

泌が減少し、増殖速度も有意に低下することが判明した。  
現在より詳細に表現型を解析している。

[高木綾湖、松崎素道、永宗喜三郎]

#### イ. トキソプラズマの新規ミトコンドリア・リクルート因子の同定

細胞内寄生原虫トキソプラズマにおいて、宿主のミトコンドリアや小胞体を寄生胞に引き寄せる現象 (リクルート) が知られている。しかし、その作用機序や生物学的意味は不明である。近年、ミトコンドリアに対する誘導因子 MAF1 が同定された (Pernas, L. et al., 2014) が、我々は MAF1 以外の別の誘導因子として ROP39 を同定した。本年度は ROP39 が宿主細胞内にどのように注入されるかを観察した。トキソプラズマをサイトカラシン D で処理し原虫の運動を止めたところ、ROP39 は他のロプトリータンパク質と同様、*evacuoles* とよばれる小胞に包まれた状態で宿主細胞に注入されていた。このことから ROP39 は他のロプトリータンパク質と同様、原虫の宿主細胞侵入に先立ち、原虫の侵入とは独立して分泌されることが明らかとなった。

[福本隼平(筑波大学)、永宗喜三郎]

#### (2) 赤痢アメーバの病原機構・生物学・代謝学にかかる研究

##### ア. トロゴサイトーシス誘導分子の同定

赤痢アメーバは生きた細胞をちぎり切りながら取り込み(トロゴサイトーシス)、死んだ細胞は丸呑みする(ファゴサイトーシス)。さらに若い赤血球と古い赤血球がトロゴサイトーシスとファゴサイトーシスに対応する形態で取り込まれることを見出した。この変化が赤血球表面の糖鎖に依存したことから、この糖鎖結合分子として、Gal/GalNac 特異的レクチン170kDa サブユニット(Hgl)に高い相同性を示す分子を見出した。この分子とHglの遺伝子発現抑制株の樹立を目指したが、Hglは発現抑制ができず、糖鎖結合分子のみ発現抑制株を得た。しかし、貪食効率は親株と同レベルであった。遺伝子抑制株樹立の可否からHglと糖鎖結合分子に大きな機能の違いがあることが示されたが、引き続き機能解析を行う。

[津久井久美子、野崎智義(東京大学)]

##### イ. 赤痢アメーバ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

赤痢アメーバのイノシトールリン脂質について、細胞表面からのシグナル伝達に重要な phosphatidylinositol 4,5-

diphosphate (PIP<sub>2</sub>)の前駆体として重要であり、マクロファージで貪食との関連も示された phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P)の局在を解析した。抗 PI4P 抗体と特異的結合ドメイン (SidM)を融合した蛍光タンパク質(GFP-SidM)発現株で、PI4P が細胞核に集積することが示された。核内 PI4P は赤血球や CHO 細胞との共培養により消失したが、カルボキシル化ビーズの取り込み時には変化しなかった。また、放射線ラベルと薄層クロマトグラフィー解析から赤血球取り込みに伴い PIP と PIP<sub>2</sub> 量の減少が観察されたが、抗 PIP<sub>2</sub> 抗体による観察では貪食に伴う PIP<sub>2</sub> の変化は見いだせなかった。本研究は真核細胞で PI4P の核局在を可視化した初めての報告である。貪食標的接触依存的な PI4P の局在変化を起こす分子メカニズムの解明が必要である。

[渡辺菜月(東京大学)、野崎智義(東京大学)、前濱朝彦(神戸大学)、津久井久美子]

##### ウ. 赤痢アメーバリソソーム酵素輸送受容体の機能解析

我々が同定した赤痢アメーバにユニークなリソソーム酵素輸送受容体 cysteine protease binding protein family (CPBF) について、病原性との関与を明らかにする目的で各遺伝子発現抑制株のマトリゲル侵入効率を評価し、CPBF2 遺伝子発現抑制株で有意な侵入効率の低下を認めた。CPBF2 は  $\alpha$ -amylase の一つを特異的にリガンドとするが、このマトリゲル侵入活性は酵素輸送受容体としての機能とは独立した現象であった。さらに CPBF2 遺伝子発現抑制株の解析から、有意な運動能力の低下と細胞辺縁における F-actin 形成の低下が観察された。CPBF2 遺伝子発現抑制株の転写解析で細胞骨格制御に関与する遺伝子の発現低下は観察されたが、主要な分子機構は明白ではない。また、CPBF2 が運動に関与する分子の輸送に関与する可能性もあり、さらなる分子機構の解明が必要である。

[丸茂このみ(筑波大学)、高島英造、坪井敬文(愛媛大学)、志波智生、原田繁春(京都工芸繊維大学)、富井健太郎(産業技術総合研究所)、野崎智義(東京大学)、津久井久美子]

##### エ. 赤痢アメーバオートファジーの解析

オートファジーは真核生物に広く保存する細胞内大規模分解機構の一つである。このマーカー分子である Atg8 は赤痢アメーバにも保存されているが、これまでの解析から貪食胞に動員され、貪食胞の成熟に関与することが示されている。赤痢ア

メーバの2種類の食食過程、即ち死細胞を丸呑みするファゴサイトーシスと生細胞をちぎりながら取り込むトロゴサイトーシスでは、取り込まれた細胞の分解過程が異なることが予想されている。そこでこれまで食食胞への動員が知られている Atg8、レトロマー複合体の構成分子である Vps26、さらに phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P)のそれぞれの取り込み過程における局在と経時変化を検討した。CHO 細胞食食後 10, 30, 60 分後の食食胞への各分子の局在効率を検討したところ、ファゴサイトーシスとトロゴサイトーシスで Atg8, Vps26 の局在効率に変化は見られず、どちらの食食様式でも Atg8 は 10 分後では 50%の食食胞に局在するものの 30 分以降 15%以下に減少し、Vps26 は時間とともに 75、70、50%程度と緩やかに局在が減少した。一方 PI3P はトロゴ、ファゴサイトーシスそれぞれ 56, 40, 30%、70, 60, 50%程度と、トロゴソームからの離脱が有意に早いことが示された。さらに Atg8 と PI3P の初期食食胞での局在を観察すると、PI3P に先んじて Atg8 の動員が起こっていた。動物細胞で Atg8 は PI3P シグナルの下流でオートファゴソームへ conjugate されるため PI3P の後に Atg8 の局在が観察されるが、赤痢アメーバの食食過程では異なる制御が示唆された。

[津久井久美子]

#### オ. 赤痢アメーバ Rab7D の機能解析

赤痢アメーバにおいて Rab7 は最も多様化している Rab 低分子量 GTPase であり、9 種類のアイソタイプがゲノムに存在する。今回未解明であった Rab7D の解析を行った。Rab7D の高発現株ではファゴサイトーシス、トロゴサイトーシス、食食胞酸性化が阻害された一方、遺伝子発現抑制により逆の表現型を示した。さらに遺伝子抑制株はコラーゲンコートプレートへの接着や運動能力の低下が示された。Rab7D は細胞内で一部のリソソームやプレファゴソーム小胞へ局在したが、食食胞への局在は観察されなかった。赤痢アメーバ Rab7 アイソタイプのアミノ酸配列を比較すると、エフェクター結合領域に Rab7D ユニークと思われるアミノ酸置換があった。以上より、Rab7D は食食と食食胞成熟を阻害し、接着や運動を促進する機能を、エフェクター結合領域へ結合する分子を介して発揮していると考えられた。通常 Rab 低分子量 GTPase は小胞輸送を制御するが、今回の解析から Rab7D は食食に関与する細胞骨格系を負に、接着や運動に関与する細胞骨格系を正に制御するといった、細胞骨格制御に機能を持つことが示

唆された。

[中野由美子、Ratna Wahyuni (東京大学、アイルランガ大学)、津久井久美子、富井健太郎 (産総研)、野崎智義 (東京大学)]

#### カ. 薬剤耐性赤痢アメーバの迅速単離法の開発

これまで薬剤耐性研究のためのツールとして、DNA 複製酵素の校正機能 (error-prone) に変異を導入することにより、赤痢アメーバのミューテーター化に成功している。この赤痢アメーバのミューテーターの全ゲノム解析を行い置換の種類を計測したところ、プリン塩基・ピリミジン塩基間の置換である transition 変異は殆ど検出されず、プリン塩基→ピリミジン塩基あるいはピリミジン塩基→プリン塩基の変異である transversion 変異が検出され、変異の導入効率に隔たりが見られた。より効率的にミューテーターに変異を蓄積させるために、DNA 複製酵素の正確性 (fidelity) を担うアミノ酸にも変異を導入した三重変異 DNA 複製酵素を赤痢アメーバ内で発現させた。間接蛍光観察と細胞分画を行うことにより、三重変異の DNA 複製酵素も赤痢アメーバの核に局在できることを確認した。また、ウルソール酸に対する薬剤選択も可能であったことから、三重変異 DNA 複製酵素を発現させた新たなミューテーター株も薬剤選択に利用できることを示した。

[中野由美子、平井誠 (順天堂大)、泉山信司、中曾根英子、Sandipan Ganguly (インド NICED)、野崎智義 (東京大学)]

#### キ. 新規糸状菌代謝産物 ovalicin の赤痢アメーバにおける標的の探索

将来的なアメーバ赤痢新薬の開発のために約7,000 種の微生物培養液から、ヒト細胞に対する毒性が低く、かつ強力な殺赤痢アメーバ活性を示すものを探した結果、糸状菌の代謝産物 ovalicin を見出した。Ovalicin のヒトMRC-5細胞への選択毒性は4500倍であり、230倍であったメトロニダゾールの選択毒性よりも20倍選択性に優れていた。ovalicinと似た構造を有するfumagillinは、methionine aminopeptidase (MetAP) が標的であると報告されている。そこで、赤痢アメーバの EhMetAPタンパク質を出芽酵母の発現系から精製した。人工基質を用いた生化学的活性測定系により、ovalicinが EhMetAPに対する阻害定数  $K_i = 1.3 \text{ nM}$  を求めた。Ovalicin の EhMetAPの阻害様式は非可逆阻害であった。低濃度でも EhMetAPを阻害可能なovalicinは赤痢アメーバの創薬票的として有望である。

[森美穂子(北里大)、中野由美子、中曽根英子、柘植聡志、大村智、塩見和朗(北里大)、中野賢太郎(筑波大)、野崎智義(東京大学)]

#### ク. 天然物由来成分による抗原虫薬の開発

世界各地の寄生虫の流行地では、その地域社会で伝統的に使用されている薬草がある。赤痢アメーバとジアルジア原虫の流行地に位置するインド国立下痢症研究所との共同研究により、下痢症に有効な薬草 *Nyctanthes arbortristis* から赤痢アメーバとジアルジア原虫の殺滅活性を示すウルソール酸を単離した。*in vitro* の感受性試験では、ウルソール酸はメロニダゾールと同等の薬効を示した。ウルソール酸の薬効と耐性機序を理解するために、赤痢アメーバミューテーターからウルソール酸耐性株を単離した。限界希釈によりクローン化後、薬剤を除去しても耐性度が低下しないクローンを単離した。ウルソール酸耐性株は、DNA 複製酵素の *fidelity* を欠損させた新たに作出したミューテーターからも薬剤選択が可能であった。[中野由美子、梅木優子、中曽根英子、Sanjib Kumar Sarder、Sandipan Ganguly(インド NICED)]

#### (4) マラリア原虫の分子細胞生物学・生化学・病態解明に係わる分子基盤研究

ア. マラリア原虫の核・オルガネラなどの増殖分子基盤の解明  
マラリア原虫の増殖は、一細胞内に多数の核を有する「多核体形成」を行った後に、細胞分裂を行うユニークな増殖様式を行うことが知られている。特に肝内型マラリア原虫は、短時間で最大数万もの原虫に増殖することから、その制御機構は極めて興味深い。分子メカニズムは未だほとんど明らかになっていない。また肝内型原虫における休眠と増殖期におけるオルガネラの制御機構の違いは、全く明らかになっていない。これまでに我々が詳細な *in silico* 解析を実施したところ、肝内型原虫において重要な役割を担う可能性のある新規推定ヒストンメチル化酵素遺伝子を見出した。そこで、この新規推定ヒストンメチル化酵素遺伝子の機能を明らかにするため、マラリア原虫において遺伝子破壊株の作製と過剰発現株の作製を行い、肝内型発育期において増殖速度などが野生株と明確に異なることが明らかとなった。また電子顕微鏡を用いた詳細な解析を実施し、核、ミトコンドリア、アピコプラストなど、原虫の増殖に重要な役割を担うことが考えられる各種オルガネラの三次元構造解析を実施しており、良好な結果が得られて

いる。

[案浦健、荒木球沙、梅木優子、荒井絢子、原史絵、角田宗一郎(順天堂大)、立石祐樹、久枝一]

#### イ. 肝内型マラリア原虫の生存に重要な原虫特異的分子メカニズムの解明

宿主肝細胞内で増殖する肝内型マラリア原虫は、生存するために特異的な分子が必要であると考えられるが、その詳細はほとんど明らかになっていない。我々は、Loss-of-function スクリーニング解析から、肝内型原虫に特異的に必須な機能が発揮される新規機能分子 NG2 を見出し、これまでの我々の解析から、NG2 はトランスポーターである可能性が強く示された。NG2 の機能解析を行うため、培養細胞を用いて各種の NG2 強制発現細胞の作製を行い、トランジェントな NG2 の発現誘導に成功した。このトランジェントに NG2 を発現する細胞株を用いて、細胞に与える影響を検証したところ、培養細胞の増殖速度に影響を与えることが明らかとなり、NG2 を発現させ続けることによる輸送基質の同定などが困難であることが明らかとなった。今後、さらなる条件検討、異なる発現系の確立などを検討することで、NG2 の原虫細胞内局在性や輸送基質の同定を試みることで、肝内型原虫の宿主内生存に果たす NG2 の役割を明確にする。

[案浦健、荒木球沙、梅木優子、長谷川早悠里、荒井絢子、今井賢一郎、富井健太郎(産総研)、久枝一]

#### ウ. 休眠期マラリア原虫の解析にむけた分子基盤の解明と新たな感染実験系の作出

マラリアは、原虫種により肝臓内に休眠体を形成することが知られており、根治しない限り再発を繰り返すため撲滅の大きな障害となっている。休眠期を生じる三日熱マラリア原虫 (*P. vivax*) は、感染できる宿主動物が極めて限定的であるため感染モデル生物が限られており、新たな休眠期対策・研究開発を行う上で大きな障害となっている。そこで本研究では、*P. vivax* と様々な点で類似するサルマラリア原虫 *P. cynomolgi* (ゲノムの相同性が 90%以上、肝内型休眠体の形成や赤内期増殖サイクルなど生物学的性状も極めて類似) を用いて、霊長類を用いた新たなマラリア感染の *in vivo* と *in vitro* モデル作出を、獨医大と霊長類医科学研究センターと連携することで実施した。その結果、*P. cynomolgi* がハマダラカ体内で高効率に増殖できる実験系の作出に成功し、肝内期・休眠期の解析

に必須であるスポロゾイトを大量に産生できる系の確立に成功した。これらの実験系を用いて、肝内型休眠期に関する *in vivo* と *in vitro* の系を確立することができ、更にこれらの材料を用いて、電子顕微鏡を用いた詳細な解析を実施し報告した。また更に本研究をさらに発展させるため、休眠期を有する *P. cynomolgi* に遺伝子導入を行うことで、恒常的に蛍光タンパク質を発現する原虫の作製を試みた結果、陽性原虫が得られた。今後、本原虫の詳細な表現型解析などを実施し詳細な解析を行った後に、各種の応用実験などにも用いることで、新薬開発・ワクチン開発の発展に付与する分子基盤の解明に貢献する。

[案浦健、荒木球沙、荒井絢子、原史絵、川合覚(独協医大)、保富康宏(霊長類医学科学研究センター)、角田宗一郎(順天堂大)、久枝一]

#### エ. マラリア原虫のヒストン制御機構と分子基盤の解明

一般の真核生物の増殖には様々な制御機構が報告されているが、ヒストンのエピジェネティックな制御はその中心的な役割を担うことが知られている。一方で、マラリア原虫においては、メチル化阻害剤を用いた研究から発育ステージ間により異なる制御を担う可能性が示唆されているが、詳細はほとんど明らかとなっていない。これまでに我々は、特にマラリア原虫の肝内型に特化した制御機構を、ヒストン修飾酵素の側から主に解析を実施してきたが、原虫の発育期の違いにより大きく異なることが明らかとなり、基質であるヒストン本体の詳細な解析が必要であることが示唆された。そこで、本研究ではマラリア原虫の全ての発育期が比較的容易に解析で、また遺伝子導入に関しても様々な手法を用いることができるネズミマラリア原虫を用いて、各種解析を展開した。これまでの解析から、マラリア原虫のヒストンは、一般的な真核生物のヒストンとはアミノ酸の保存性や2次構造において異なる箇所が複数存在することが明らかとなった。そこで代表的なヒストン分子に着目し、遺伝子導入によるタグ付加分子として発現させることを検討している。

[案浦健、立石祐樹、荒木球沙、荒井絢子、川合覚(独協医大)、久枝一]

#### オ. 非ヒト霊長類を用いたマラリア病態機構の解明

マラリア原虫の感染に起因する重症マラリアの病態は、増悪化へのプロセスには様々な要因が複雑に関連することが示唆

されているが、その詳細は未だ不明な点が多い。特に感染赤血球の接着分子などの原虫側の要因のみならず、サイトカインストームなどに代表される宿主側応答と複雑に関連することから、各種の実験動物を用いた感染 *in vivo* モデルの作製や解析が必要となる。そこで本研究では、ニホンザルやアカゲザルなどのマカク類のみならず、リスザル・ヨザル・マーモセットなどの新世界ザルを用いたマラリア感染実験、その病態機構の解明を試みた。各種の *in vitro* と *in vivo* における感染実験は、非常に良好な結果が得られており、現在、詳細な解析を行っている。今後、これらの新規マラリア感染モデルを用いた病態機構の解明のみならず、*in vivo* における新規化合物の抗マラリア効果の判定や新規ワクチン候補分子の効果を判定することで、より有益な実験系としての発展を試みる。

[案浦健、荒木球沙、立石祐樹、梅木優子、荒井絢子、長谷川早悠里、原史絵、川合覚(独協医大)、岡本宗裕(京大霊長研)、横田伸一(東大医科研)、真下知士(東大医科研)、水上修作(長大熱研)、久枝一]

#### カ. マラリア原虫を標的とした新規薬剤開発、新規ターゲット分子の探索、重症化回避機構の解明

新規の抗マラリア対策のため、原虫を標的とした新規薬剤スクリーニングのみならず、新規ターゲット分子の探索、新規の重症化回避機構の探索といったマルチアングルなアプローチにより、新規の候補化合物の検討を実施した。新規の抗原虫薬の開発を目指して理化学研究所と、宿主側の重症化機構の解明と候補化合物の検討を筑波大学とNIMS(国立研究開発法人 物質・材料研究機構)との共同研究として行った。新たな化合物を用いた抗マラリア原虫活性を測定したところ、既存の抗マラリア薬と同等の低濃度で殺原虫を示す化合物を新しく5種得ることができた。また全く新しい化合物を用いた実験から、マラリアの重症化を軽減できる可能性がある化合物が見出され、病態分子メカニズムの解明につながる知見が得られる可能性が示唆された。現在、本化合物が原虫の増殖に与える影響の詳細な解析と、マラリア感染時の宿主応答に与える変化の詳細な解析を展開している。

[案浦健、吉富徹(NIMS)、林恭子、荒木球沙、中野由美子、梅木優子、多久和泉、長谷川早悠里、荒井絢子、菊地正樹(理研)、梅原崇史(理研)、長崎幸夫(筑波大)、久枝一]

キ. 赤内型マラリア原虫の感染赤血球経への輸送機構の解

析

赤血球の中に寄生するマラリア原虫は、感染赤血球に多くの抗原タンパク質を輸送するが、感染赤血球への抗原タンパク質の輸送機構は十分に解明されていない。マラリア原虫を含むアピコンプレクサ門原虫には、N 末端側がアシル化された特殊な Rab5b GTPase が存在する。PfRab5b に制御される特殊な輸送経路の同定を目指し、共免疫沈降法による結合タンパク質の網羅的探索を試みたところ Arf1 と Rab1 GTPase を得た。Arf1 もしくは Rab1b の不活性化型変異を発現させたところ、Arf1 変異でのみ AK2 の輸送が阻害され、AK2 の輸送には Arf1 の機能が必要であることを示した。一方で、Arf1 変異と Rab1b 変異は PEXEL を含む Rifin の感染赤血球への輸送も阻害した。以上の結果から、Rab5b と Arf1 が小胞体近傍から AK2 を特異的に寄生胞膜へと輸送することに加え、小胞体から離れた膜に局在する Rab1b が Rifin の輸送に関与することがわかった。本成果は初めて N-ミリスチル化タンパクの輸送制御を発見した報告となる。[多久和泉、平井智浩 (筑波大学)、新澤直樹 (医科歯科大学)、岩永史朗 (大阪大学)、牧内貴志 (東海大学)、案浦健、永宗喜三郎、野崎智義 (東京大学)、中野由美子]

## V. 免疫学的検討

### 1. 脳マラリアの病態形成に関わる宿主因子の探索

マラリアの死亡の原因の大部分は熱帯熱マラリアで見られる合併症の脳マラリアである。脳マラリアは感染のごく初期のマラリア原虫が少ない時期に発症することから、宿主の免疫応答も病態に関与していることが知られている。本研究では、脳マラリアの病態に関連する宿主因子を検討した。ウガンダで得た脳マラリア患者、軽症マラリア患者、健常者の血清サンプル中の 106 種の宿主タンパク質を、HQ-PLEX 法という蛍光ビーズとフローサイトメーターを用いる方法で網羅的に定量した。多くのタンパク質が感染により著しく増減していることがわかり、マラリアの炎症の強弱が見て取れた。その中でも、脳マラリア患者血清中で増加し、軽症患者や健常者で変化しない 28 のタンパク質を同定した。これらのいずれもが、脳マラリア患者の治療後の血清中では元のレベルに戻ることも確認でき、重症化因子あるいは脳マラリアのバイオマーカー候補であることを見出した。

これら分子に含まれるインターロイキン33 (IL-33)、Thymic stromal lymphopoietin (TSLP)について、ヒトで得られた知見

がマウスモデルでも見られるのか、また、脳マラリアの病態形成に関わっているのについて検討を行った。C57BL/6 マウスに *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) を感染させると感染後 10 日ほどで中枢神経症状を呈し死に至り、脳マラリアモデルとなる。感染マウスでは血清中に IL-33、TSLP が検出されることはなかった。ついで、IL-33 欠損マウスおよび TSLP 欠損マウスに PbA を感染させたところ、野生型マウスと同様に脳マラリアを起こし、速やかに致死性となることが明らかとなった。以上の結果から、IL-33 も TSLP も脳マラリアの発症にはほとんど関与しないことが明らかとなった。

[下川周子、Olia Alex、伊藤薫平、案浦健、久枝一]

### 2. 腸管内寄生性蠕虫の宿主免疫変調効果の検討

腸管内寄生性蠕虫は、我々寄生虫学者の絶え間ぬ努力により、我が国を含め先進国で見られることはほとんどなくなった。一方で、衛生環境の向上による蠕虫感染症をはじめとする感染症との暴露の減少がアレルギー疾患などの炎症性疾患の増加の原因とする「衛生仮説」も広く認知されるようになってきた。中でも腸管内寄生性蠕虫は長期間に渡って無症候性感染を起こし、自らの生存のために宿主の排除機構を回避するため免疫を抑制することが知られており、衛生仮説の主役であることが想定されている。そこで、我々は腸管内寄生性蠕虫の炎症性疾患抑制効果をマウスモデルで検証することとした。

#### (1) 腸管内寄生性線虫 *Heligmosomoides polygyrus* の肥満抑制効果

*Heligmosomoides polygyrus* (Hp) はマウスの十二指腸に寄生する線虫で、症状を起こすことなく3ヶ月ほど寄生し続ける。近年、増加が著しい肥満は、脂肪組織での微小炎症が増悪因子であることが示され、炎症性疾患の一面を持つ。そこで、腸管寄生性蠕虫の肥満抑制効果およびそのメカニズムを検証するためにマウスに高脂肪食を与えるのと同時に Hp を感染させ、その影響を検討した。

Hp の感染は高脂肪食による体重増加、高脂血症、インスリン抵抗性を抑制したことから、肥満の防止に働くことが明らかとなった。Hp 感染マウスでは、1型マクロファージから2型マクロファージへの変換、2型自然免疫リンパ球の誘導が見られた。さらには、これらの2型免疫応答を誘導する IL-33 の発現が認められ、カロリー消費に必須であるミトコンドリアに存在する脱共役タンパク質 UCP1 の高発現も同様に増強していた。IL-

33 の高肥満作用を調べるために、IL-33 欠損マウスに高脂肪食を与えるとともに Hp を感染させると、2型応答、UCP1 の高発現が見られなくなり、体重増加が認められた。以上の結果から、Hp による肥満制御機構には IL-33 が重要な役割を果たしていることが明らかになった。

[下川周子、Olia Alex、伊藤薫平、久枝一]

## (2) Hp の自己免疫性糖尿病の抑制効果

Hp の免疫抑制効果の一環として、自己免疫性糖尿病の抑制効果も検討した。前年度までに スレプトゾトシン投与による自己免疫性糖尿病モデルにおいて、Hp が高血糖、インスリン値低下、膵臓ベータ細胞の破壊を抑えることを見出した。今年度は Hp による自己免疫性糖尿病を抑制するメカニズムを検討した。

Hp 感染マウスでは CD4+T 細胞(CD4Treg)、および CD8+制御性 T 細胞(CD8Treg)が増加していることが明らかになった。そこで糖尿病を誘導したマウスに Hp を感染させる前に CD4Treg、あるいは CD8Treg を除去し、これら細胞の関与を調べた。CD4Treg の除去では糖尿病を抑制する能力に変化はなかったが、CD8Treg を除去すると Hp の糖尿病抑制効果がなくなった。このことから CD8Treg の重要性が明らかとなった。さらに、Hp 感染による CD8Treg 誘導メカニズムを検討するために、腸管環境の主たる構成成分の1つである腸管内の代謝産物を網羅的に解析した。Hp が感染したマウスでは、多くの物質が増加していたが、最も増加していたのがトレハロースであった。トレハロースは、Hp 虫体が発現していることも見出した。トレハロースの重要性は、トレハロースを飲水投与することで、Hp と同様に、CD8Treg を誘導し糖尿病抑制効果を発揮することから明らかとなった。二糖類であるトレハロースが腸内細菌に作用することが知られており、Hp、さらにはトレハロースの糖尿病抑制効果に腸内細菌が関与していることが想定された。そこで、Hp 感染、あるいはトレハロース飲水と同時に抗生物質を投与し腸内細菌を除去することで、腸内細菌の関与を検討した。抗生物質を投与することで、Hp とトレハロースの糖尿病抑制効果は見られなくなったことから、腸内細菌の重要性が明らかとなった。中でもルミノコッカスの関与が大きいことも確認した。

ヒトにおいても同様の傾向があるのかの検討を目指した。本来であれば、寄生虫感染の有無で糖尿病患者の割合を調べるべきであったが、日本国内では寄生虫感染症がなく、困難

であった。マウスにおいて Hp 感染で CD8Treg の増加により糖尿病を抑制したことから、糖尿病患者では CD8Treg が少ないのではないかと想定のもと、患者血中の CD8Treg を解析した。小児糖尿病患者では健常者に比べて、明らかに CD8Treg が減少していた。これらのことから、自己免疫性の糖尿病の発症の一端に CD8Treg の減少があることが示唆された。

[下川周子、Olia Alex、伊藤薫平、久枝一]

## (3) 腸管内寄生性条虫 *Hymenolepis microstoma* の SLE 抑制効果

*Hymenolepis microstoma* (Hm) は頭節をマウスの胆管に吸着させ体節を小腸から大腸へと伸ばす条虫で、無症状で長期間に渡って寄生する。この条虫の免疫抑制効果も検討し、昨年度までに自然発症 SLE モデルである NZBWF1 マウスを用いて、Hm が自然発症 SLE を抑制することを見出した。NZBWF1 マウスは8ヶ月齢になると、自己抗体が出現し、タンパク尿などの腎症状を呈するようになり、10ヶ月齢程度になると死に至る。2ヶ月齢時に Hm を感染させるとほとんどの症状がみられず、80%近くのマウスが15ヶ月齢を超えても生存するようになる。

今年度は Hm の SLE の抑制メカニズムを検討した。まずは、SLE の原因となる自己抗体の産生に関わる B 細胞、さらには B 細胞を活性化する CD4+T 細胞のサブセットである Tfh について解析した。発症前の NZBWF1 マウスに比べて、発症したのちの高齢マウスでは活性化 B 細胞、形質細胞が著しく増加していた。また、Tfh も増加しており、活性化状態にあるものの割合も多かった。Hm を感染させた NZBWF1 マウスでは B 細胞、活性化形質細胞、活性化 Tfh の増加が顕著に抑制されていた。以上のことから、Hm は自己抗体産生に関わる一連の B 細胞系の活性化が起こらないことが示された。Hm の免疫抑制に制御性 T 細胞の関与が想定されたので、CD4+Treg と CD8+Treg の解析を行ったところ、Hm を感染させた NZBWF1 マウスでは非感染のマウスに比べて CD4+Treg と CD8+Treg の有意な増加が確認できた。今後、これらの細胞群の SLE 抑制での役割の詳細を検討する。

[Olia Alex、下川周子、伊藤薫平、久枝一]

## 3. アレルギーとしての胃アニサキス症の免疫学的解析

アニサキス症はアニサキス亜科(Anisakidae)の線虫の幼

虫による食品由来の寄生虫感染症である。アニサキス幼虫が感染しているアジやサバなどの生食により感染する。アニサキスを摂食後、数時間内に激しい心窩部痛、嘔吐、吐き気を呈する、胃アニサキス症が主な病態である。一方で、内視鏡による健診が一般的になったことで、無症候性のアニサキス感染も多く見られるようになった。アニサキス幼虫が胃壁に突き刺さっているにも関わらず、症状を出さないヒトがいるということである。また、胃アニサキス症を発症するヒトは繰り返し発症する。これらの事実は、胃アニサキス症がアレルギーである可能性を示唆するものである。アニサキスアレルギーのメカニズムを明らかにするために、まずはモデル動物の構築に着手した。

太平洋から水揚げされたサバの内臓からアニサキス幼虫を回収し、C57BL/6 マウス、BALB/c マウスの雄雌両方に各 2 隻ずつ感染させ、その後、胃内にアニサキス虫体が存在しているかどうかを確認した。すると、C57BL/6 マウスも BALB/c マウスも同様に感染 3 日後もアニサキス虫体が存在しており、性差も認められなかった。しかしながら、アレルギーモデルの重要な指標となる血中 IgE 濃度は BALB/c でより高値を示したため、今後の実験には全て BALB/c マウスを使用することにした。

次に、アニサキス虫体の分泌抗原(ES)を回収し、BALB/c マウスに週 1 回、合計 4 回免疫した。4 回目の免疫後、翌日にアニサキス虫体でチャレンジすると、免疫していないマウスと比べて、免疫したマウスでは脾臓や胃のサイズが大きくなり、細胞数も増加していた。さらに免疫細胞を詳細に解析すると、IgE 産生に関わる形質細胞が顕著に増加していることが分かった。形質細胞は形質芽細胞から分化する細胞であり、その分化には形質細胞様樹状細胞(pDC)が必須である。また、pDC は腸内細菌によって活性化することがこれまでに知られていたことから我々はアニサキスアレルギーの IgE 産生増加には腸内細菌が関与している可能性を考え、抗生物質を投与して一連の実験を行なった。すると、抗生物質を投与したマウスでは、IgE がさらに上昇することが明らかになった。これは、なんらかの腸内細菌によって IgE 産生が抑えられていることを示唆する結果であり、その腸内細菌を今後同定することで、アニサキスアレルギーの新規治療法、または予防法の開発が期待できる基礎データである。現在、アニサキスアレルギーのモデルマウスの腸内細菌叢を次世代シーケンサーで解析中である。

さらに、免疫する物質を分泌抗原(ES)だけでなく粗抗原(CA)も加えて、さらなる解析を行なっている。

[下川周子、杉山 広、久枝一]

## レファレンス業務

### I. 衛生微生物技術協議会・レファレンスセンター会議

第 41 回衛生微生物技術協議会研究会に関連して寄生虫に関するレファレンスセンター会議をメールベースで行った。

[永宗喜三郎、八木田健司、森嶋康之、杉山 広]

### II. 原虫類のレファレンス活動

感染研および外部共同研究機関（医療機関、地方衛生研究所等）の行う調査研究から得られる材料をもとに各種原虫類の分離株の収集を行っている。具体的には分離株の遺伝子型を調べ、その結果を共同研究者側に還元するとともに、固定標本、DNA あるいは培養可能な場合は病原体として保存を行っている。

[八木田健司、泉山信司、津久井久美子、永宗喜三郎]

台湾 CDC・陽明大学との共同研究として、台湾でアメーバ性角膜炎および環境中から分離されたアカントアメーバ株の系統解析とその共生細菌について解析を進めた。角膜炎由来 7 株、環境由来 4 株について遺伝子型を決定したところ、角膜炎はすべて T4、環境からは T3, T4, T5 が同定された。T4 は既知の高病原性の遺伝子型であり、角膜炎株から見出されたことはこれまでの報告と矛盾しない。角膜炎株のうち 2 株は共生細菌の存在が示唆されており、引き続き解析を進める。

[津久井久美子、Lau Jie Yu (陽明大学)、Dar-der Ji (陽明大学)]

リーシュマニアについては、外部の医療機関からリーシュマニアの検査依頼と診断についての相談を 1 件受け入れ、形態検査の再確認と遺伝子検査を併用して同定した。

[案浦健、中野由美子、後藤康之]

### III. 蠕虫類のレファレンス活動

令和 2 年度には計 47 件の寄生虫症依頼検査があり、うち 34 件が寄生虫症と確定診断された。

(1) 免疫学的方法による寄生虫症検査

線虫 8 種（ドロレス顎口虫、犬回虫、犬鉤虫、アニサキス、豚回虫、犬糸状虫）、条虫 4 種（有鉤囊虫、マンソン弧虫、多包虫、単包虫）、吸虫 6 種（ウェステルマン肺吸虫、宮崎肺吸虫、肝蛭、肝吸虫、日本住血吸虫、マンソン住血吸虫）の抗原を用いた抗体検査が可能であるが、エキノコックス症と有鉤囊虫症、旋毛虫症については、それぞれウェスタンブロット法による市販キットを用いた。トキソカラ症、肺吸虫症、およびマンソン孤虫症に関しては、当部で開発したイムノクロマト迅速血清検査キットを用いた。免疫学的検査依頼件数 16 件のうち、肺吸虫症とアニサキス症で各 3 件、有鉤囊虫症と単包性エキノコックス症で各 1 件に特異抗体が検出された。

[森嶋康之、杉山 広、山崎 浩]

## (2) 遺伝子解析等による寄生虫症検査

各種臨床検体中に見出された虫体（様物）の同定依頼数は 31 件あり、遺伝子の塩基配列解析結果もしくは形態学的観察に基づいて種の同定を行った。その結果 26 件が寄生虫で、条虫：*Dibothriocephalus nihonkaiensis* (9)、*Taenia saginata* (8)、*Diphyllobothrium balaenopterae* (1)、*Taenia solium* (1)、線虫：*Anisakis simplex sensu stricto* (3)、*Anisakis pegreffi* (2)、*Enterobius vermicularis* (1) 吸虫：*Parasgonimus westermani* (1) であった。

[森嶋康之、杉山 広、山崎 浩]

## 研修業務・審議会など

「令和 2 年度水道におけるクリプトスポリジウム等検出技術に関するオンライン講座」国立保健医療科学院、令和 3 年 2 月  
[八木田健司、泉山信司]

「トキソプラズマ症」動物由来感染症講習会、令和 3 年 1 月、オンライン

[永宗喜三郎]

## 発表業績一覧

### I. 誌上発表

#### 1. 原著論文、総説(欧文)

- 1) [Shimokawa C](#), Kato T, Takeuchi T, Ohshima N, Furuki T, Ohtsu Y, Suzue K, Imai T, [Obi S](#), [Olia A](#),

Izumi T, Sakurai M, Arakawa H, Ohno H, [Hisaeda H](#). CD8<sup>+</sup> regulatory T cells are critical in prevention of autoimmune-mediated diabetes. Nat. Commun., 11 (1): 1922, 2020.

- 2) Ngo-Thanh H, Sasaki T, Suzue K, Yokoo H, Isoda K, Kamitani W, [Shimokawa C](#), [Hisaeda H](#), Imai T. Blood-cerebrospinal fluid barrier: another site disrupted during experimental cerebral malaria caused by *Plasmodium berghei* ANKA. Int. J. Parasitol., 50: 1167-1175, 2020.
- 3) Imai T, Suzue K, Ngo-Thanh H, [Shimokawa C](#), [Hisaeda H](#). Potential and limitations of cross-protective vaccine against malaria by blood-stage naturally attenuated parasites. Vaccines 8(3): 375, 2020.
- 4) [Obi S\\*](#), [Shimokawa C\\*](#), Katsuura M, [Olia A](#), Imai T, Suzue K, [Hisaeda H](#). IL-33 is essential to prevent high fat diet-induced obesity in mice infected with an intestinal helminth. Parasite Immunol., 42: e12700, 2020. (\*equal contribution)
- 5) [Olia A](#), [Shimokawa C](#), Imai T, Suzue K, [Hisaeda H](#). Suppression of systemic lupus erythematosus in NZBWF1 mice infected with *Hymenolepis microstoma*. Parasitol. Int., 76: 102057, 2020.
- 6) [Araki T](#), Kawai S, Kakuta S, Kobayashi H, [Umeki Y](#), [Saito-Nakano Y](#), Sasaki T, [Nagamune K](#), Yasutomi Y, Nozaki T, Franke-Fayard B, Khan SM, [Hisaeda H](#), [Annoura T](#). Three-dimensional electron microscopy analysis reveals endopolygeny-like nuclear architecture segregation *Plasmodium* oocyst development. Parasitol. Int., 76: 102034, 2020.
- 7) Aoki R, Sakakima T, Asuka O, hashi A, Niwa R, Matsuyama M, Etori F, Watanabe N, [Yagita K](#), Tanaka T, A Japanese case of amoebic meningoencephalitis

- initially diagnosed by cerebrospinal fluid cytology, Clin. Case Rep., 8(9):1728-1734, 2020.
- 8) Yanagawa Y, Shimogawara R, Endo T, Fukushima R, Gatanaga H, Hayasaka K, Kikuchi Y, Kobayashi T, Koga M, Koibuchi T, Miyagawa T, Nagata A, Nakata H, Oka S, Otsuka R, Sakai K, Shibuya M, Shingyochi H, Tsuchihashi EE, Watanabe K. and Yagita K, Utility of the Rapid Antigen Detection Test E. histolytica Quik Chek for the Diagnosis of Entamoeba histolytica Infection in Nonendemic Situations. J. Clin. Microbiol., 58(11):e01991-20, 2020.
  - 9) Yanagawa Y, Nagata N, Yagita K, Watanabe K, Okubo H, Kikuchi Y, Gatanaga H, Oka S, Watanabe K. Clinical features and gut microbiome of asymptomatic Entamoeba histolytica infection. Clin. Infect Dis., ciaa820, 2020.
  - 10) Kawano-Sugaya T, Izumiyama S, Yanagawa Y, Saito-Nakano Y, Watanabe K, Kobayashi S, Nakada-Tsukui K, Nozaki T. Near-chromosome level genome assembly reveals ploidy diversity and plasticity in the intestinal protozoan parasite Entamoeba histolytica. BMC Genomics. 21(1): 813, 2020.
  - 11) Mori Y, Yanagimoto K, Yamamoto T, Nagai Y, Yoshimura H, Akachi S, Yamagami T, Uematsu K, Hisada Y, Nishio M, Yagi J, Izumiyama S, Initial Trials of Monochloramine Disinfection of Circulating Bathtub Water at Public Hot Spring Facilities and Determining its Efficacy. J Hot Spring Sci., 70:50-60, 2020.
  - 12) Saito-Nakano\* Y, Wahyuni, R\*, Nakada-Tsukui, K\*, Tomii, K, & Nozaki, T. Rab7D small GTPase is involved in phago-, trogocytosis and cytoskeletal reorganization in the enteric protozoan *Entamoeba histolytica*. Cell. Microbiol., 23:e13267, 2021. (\*equal contribution)
  - 13) Nakada-Tsukui K\*#, Marumo K\* & Nozaki T#. A lysosomal hydrolase receptor, CPBF2, is associated with motility and invasion of the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. Mol. Biochem. Parasitol., 239: 111299, 2020. (\*equal contribution, #correspondence)
  - 14) Watanabe N, Nakada-Tsukui K, Maehama T & Nozaki T. Dynamism of PI4-Phosphate during Interactions with Human Erythrocytes in *Entamoeba histolytica*. Microorganisms, 8; 1050, 2020.
  - 15) Fukumoto J, Yamano A, Matsuzaki M, Kyan H, Masatani T, Matsuo T, Matsui T, Murakami M, Takashima Y, Matsubara R, Tahara M, Sakura T, Takeuchi F, Nagamune K. Molecular and biological analysis revealed genetic diversity and high virulence strain of *Toxoplasma gondii* in Japan. PLoS One, e0227749, 2020.
  - 16) Taku I, Hirai T, Makiuchi T, Shinzawa N, Iwanaga S, Annoura T, Nagamune K, Nozaki T, Saito-Nakano Y. Identification of Arf1 as an N-myristoylated Rab5b GTPase associated protein: an Arf1-dependent transport of adenylate kinase 2 from the endoplasmic reticulum in *Plasmodium falciparum*, Front. Cell. Infect. Microbiol., 10: 610200, 2020.
  - 17) Azofeifa BC, Segura VZ, Padilla FQ, Wielen EV, Solis FV, Iwaki T, Sugiyama H, Jimenez A, Acuna JAM. First report of the trematode *Platynosomum illiciens* (Trematoda: Digenea) in *Felis catus* in Costa Rica, Central America., J. Vet. Sci. (Rev Ciencias Veterinarias). 39:1-8, 2021.
  - 18) Yamasaki H, Morishima Y, Sugiyama H, Okamoto M. Current situation of human

- Taenia asiatica* taeniosis in Japan., Parasitol. Int. 83:102340, 2021.
- 19) Banzai A, Sugiyama H, Hasegawa M, Morishima Y, Kawakami Y. *Paragonimus westermani* metacercariae in two freshwater crab species in Kagoshima Prefecture, Japan, as a possible source of infection in wild boars and sika deer. J. Vet. Med. Sci. 83:412-418, 2021.
  - 20) Kasahara S, Ohari Y, Jin S, Calvopina M, Takagi H, Sugiyama H, Itagaki T. Molecular characterization revealed *Fasciola* specimens in Ecuador are all *Fasciola hepatica*, none at all of *Fasciola gigantica* or parthenogenic *Fasciola* species., Parasitol. Int. 80, 102215, 2021.
  - 21) Watahiki M, Uchida K, Kanatani J, Kato T, Kimata K, Isobe J, Oishi K, Tozaki K, Sekiguchi K, Horita Y, Morishima Y, Sugiyama H. Molecular identification of parasites isolated from the stomach of patients with *Anisakis* food poisoning in Toyama Prefecture, Japan, in 2018. Jpn. J. Infect. Dis., 74:85-86, 2020.
  - 22) Liu GH, Sun MM, Elsheikha HM, Fu YT, Sugiyama H, Ando K, Sohn WM, Zhu XQ, Yao CQ, Human gnathostomiasis: a neglected food-borne zoonosis. Parasites Vectors 13:616, 2020.
  - 23) Sugiyama H, Morishima Y, Kagawa C, Araki J, Iwaki T, Ikuno H, Miguchi Y, Komatsu N, Kawakami Y, Asakura H. Current incidence and contamination sources of ascariasis in Japan. Food. Hyg. Safety. Sci., 61:03-108, 2020.
  - 24) Romero-Alvarez D, Valverde-Muñoz G, Calvopina M, Rojas M, Cevallos W, Kumazawa H, Takagi H, Sugiyama H. Liver fluke infections by *Amphimerus* sp. (Digenea: Opisthorchiidae) in definitive and fish intermediate hosts in Manabí province, Ecuador. PLOS NTD 14(6): e0008286. 2020.
  - 25) Rosa BA, Choi YJ, McNulty SN, Jung H, Martin J, Agatsuma T, Sugiyama H, Le TH, Doanh PN, Maleewong W, Blair D, Brindley PJ, Fischer PU, Mitreva M. Comparative genomics and transcriptomics of 4 *Paragonimus* species provide insights into lung fluke parasitism and pathogenesis. Gigascience 9:1-16, 2020.
  - 26) Takahashi T, Kabeya H, Sato S, Yamazaki A, Kamata Y, Taira K, Asakura H, Sugiyama H, Takai S, Maruyama S. Prevalence of *Yersinia* among wild Shika deer (*Cervus nippon*) and boars (*Sus scrofa*) in Japan. J. Wildlife Dis., 56:270-277, 2020
  - 27) Yamazawa E, Ohno M, Satomi K, Yoshida A, Miyakita Y, Takahashi M, Satomi N, Asanome T, Maeshima A, Shiotsuka M, Iwata S, Yamasaki H, Morishima Y, Sugiyama H, Narita Y. First case of human neurocoenurosis caused by *Taenia serialis*: a case report. Int. J. Infect. Dis. 92:171-174, 2020.
  - 28) Kuroki K, Morishima Y, Neil J, Beerntsen BT, Matsumoto J, Stich RW. Intestinal echinococcosis in a pet dog from Missouri. J. Am. Vet. Med. Assoc. 256:1041-1046, 2020.
  - 29) Kouguchi H, Furuoka H, Irie T, Matsumoto J, Nakao R, Nonaka N, Morishima Y, Okubo K, Yagi K. Adult worm exclusion and histological

data of dogs repeatedly infected with the cestode *Echinococcus multilocularis*. Data Brief 29, 105353, 2020.

- 30) Nagaraja S, Cai MW, Sun J, Varet H, Sarid L, Trebicz-Geffen M, Shaulov Y, Mazumdar M, Legendre R, Coppée JY, Begley TJ, Dedon PC, Gourinath S, Guillen N, Saito-Nakano Y, Shimokawa C, Hisaeda H, Ankri S. Queuine is a nutritional regulator of *Entamoeba histolytica* response to oxidative stress and a virulence attenuator. *mBio*. 12(2):e03549-20. 2021.

- 31) Nurkanto A, Jeelani G, Santos HJ, Rahmawati Y, Mori M, Nakamura Y, Goto K, Saikawa Y, Annoura T, Tozawa Y, Sakura T, Inaoka DK, Shiomu K, Nozaki T. Characterization of *Plasmodium falciparum* Pantothenate Kinase and Identification of Its Inhibitors from Natural Products. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11:639065, 2021.

## 2. 原著論文、総説(和文)

- 1) 久枝一 中枢神経病態を呈する寄生虫感染症. *Neuroinfection*, 25:55-59, 2020.
- 2) 泉山信司 最近の感染確率に基づく、水道水からクリプトスポリジウムを除去・不活化する目標の再計算、水道協会雑誌、89(8):2-7, 2020.
- 3) 橋本温、中本佳奈、鈴木裕之、土岡宏彰、泉山信司 ハイドロキシアパタイト粉体ろ過法の効率と大腸菌試験への適用性、環境技術、49(2):31-37, 2020.
- 4) 森 康、赤地重宏、永井佑樹、吉村英基、泉山信司 温泉付随ガス分離設備におけるレジオネラ属菌の実態調査と対策. *温泉科学*, 69:192-201, 2020.
- 5) 大河内由美子、泉山信司、前川純子 紙上ミニシ

ポジウム I～水の衛生管理～3.貯水槽水道で滞留した水道水からのレジオネラ属菌および関連微生物の検出状況、日本防菌防黴学会誌、48(8): 377-382, 2020.

- 6) 杉山 広、森嶋康之、児玉文宏 北海道札幌市において2019年に発生した旋毛虫集団食中毒症例 *Clin. Parasitol.* 31, 49-51, 2020.
- 7) 森山 充、吉澤誠一郎、藤本博昭、赤羽大悟、勝呂多光子、山田晃子、長盛親、井上理恵、森嶋康之、後藤明彦 悪性リンパ腫の治療中に低栄養を契機に診断された日本海裂頭条虫症、臨床血液 61, 750-752, 2020.

## 3. 書籍(和文)

- 1) 津久井久美子 赤痢アメーバ「寄生虫のはなし—このすばらしき、虫だらけの世界—」永宗喜三郎、脇司、常盤俊大、島野智之・編 朝倉書店 2020
- 2) 永宗喜三郎、脇 司、常盤俊大、島野智之 “寄生虫ってなに？”永宗喜三郎、脇 司、常盤俊大、島野智之 編「寄生虫のはなし—このすばらしき、虫だらけの世界—」朝倉書店、1-28, 2020
- 3) 永宗喜三郎 “寄生虫学で用いられる用語について”永宗喜三郎、脇 司、常盤俊大、島野智之 編「寄生虫のはなし—このすばらしき、虫だらけの世界—」朝倉書店、29, 2020
- 4) 永宗喜三郎 “役に立つ(ことになるかもしれない)寄生虫”永宗喜三郎、脇 司、常盤俊大、島野智之 編「寄生虫のはなし—このすばらしき、虫だらけの世界—」朝倉書店、138-142, 2020
- 5) 永宗喜三郎 “新興再興寄生虫症”永宗喜三郎、脇 司、常盤俊大、島野智之 編「寄生虫のはなし—このすばらしき、虫だらけの世界—」朝倉書店、134-135, 2020

- 6) 案浦健 “マラリア原虫” 永宗喜三郎、脇 司、常盤俊大、島野智之 編「寄生虫のはなし—このすばらしき、虫だらけの世界—」朝倉書店、110-117, 2020.
- 2) 泉山信司、井上亘、橋本温、国内の水道原水におけるクリプトスポリジウムの検出状況、環境技術学会、2020年6月、京都市、オンライン開催

## II. 学会発表

### 1. 国際学会

- 1) Inoue M, Izumiyama S, Suzaki T. Semi-permeability assay of *Cryptosporidium* oocyst wall using saturated sodium chloride solution. Joint online meeting of the Japan Society of Protistology and Korean Society of Protistologists. Nov. 2020, Kobe, Japan (Online meeting)
- 2) Nakada-Tsukui K, Marumo K, Nozaki T, A lysosomal hydrolase receptor, CPBF2, is associated with motility and invasion of the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*, Cell Bio Virtual 2020 an online ASCB|EMBO Meeting, Dec. 2020, Online.
- 3) Annoura T. The mechanism learning from zoonotic malaria: molecular dissection of host adaptation, pathogenicity and dormancy. Celebrating 30 years of IPB Primate Research Center: The 1st Online Summer Course: Glossary of Scientific Studies to Support Primates Ecology and Conservation. Oct. 2020 (Invited Lecture Speaker として招待を受け講演)
- 3) 中野由美子、泉山信司、平井誠、川野哲郎、中曽根英子、梅木優子、Sandipan Ganguly、野崎智義 赤痢アメーバミューテーターを利用したミルテフオン耐性株の迅速単離と全ゲノム解析による耐性遺伝子変異の同定、日本寄生虫学会、2020年5月、帯広市(紙上発表)
- 4) Nakada-Tsukui K, Somlata, Suzuki M, Nozaki T, Molecular basis of trophocytosis in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*, ワークショップ「細胞が細胞をかじる！？—Frontiers in “trophocytosis”」シンポジスト、オーガナイザー 第43回日本分子生物学会年会 2020年12月、オンライン開催
- 5) 津久井久美子 腸管寄生性原虫赤痢アメーバにおけるオートファジータンパク質の機能解明 文部科学省新学術領域「マルチモードオートファジー」第2回班会議、2020年10月 オンライン開催
- 6) 津久井久美子、渡辺菜月、柴田久美子、野崎智義 腸管寄生性原虫赤痢アメーバにおいてファゴソームとトロゴソームは異なるメカニズムで成熟する Atg8 is differentially recruited to two types of phagosomes in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytic* 第89回日本寄生虫学会大会 2020年5月、誌上開催

### 2. 国内学会、シンポジウム、ワークショップ、市民公開講座など

- 1) Shimokawa C, Kato T, Takeuchi T, Ohno H, Hisaeda H, CD8<sup>+</sup> regulatory T cells play a critical role in prevention of autoimmune-mediated diabetes, 第89回日本寄生虫学会学術集会、2020年5月、帯広市
- 7) 谷口裕二、小倉淳、嶺井隆平、永宗喜三郎、松崎素道、福本隼平、鬼頭克也、高島康弘 “ロングリードシーケンサーを用いた *Toxoplasma gondii* 日本分離株の病原性遺伝子解析” 第89回日本寄生虫学会大会 2020年5月、誌上開催
- 8) 及川 亮、山出美穂子、記野秀人、森嶋康之、山

- 崎 浩、中島謙治、大澤 恵、古田隆久、宮嶋裕明、  
杉本 健 ガストログラフィンにより駆虫し得た  
クジラ複殖門糸虫症の一例、日本内科学会第 242  
回東海地方会 2020 年 10 月、オンライン開催
- 9) 森嶋康之 本州におけるエキノコックス症、第 20  
回人と動物の共通感染症研究会学術集会 2020  
年 10 月、オンライン開催
- 10) 荒木球沙、川合覚、菊地正樹、梅原崇史、中野由  
美子、久枝一、案浦健 マラリア原虫のヒストン  
制御メカニズムの解明と新規薬剤開発の可能性。  
第 89 回日本寄生虫学会大会。2020 年 5 月、帯広  
市
- 11) 荒木球沙、川合覚、角田宗一郎、小林宏尚、梅原  
崇史、中野由美子、久枝一、案浦健 マラリア原  
虫の増殖機構の解明：電子顕微鏡を用いたオルガ  
ネラの 3D 構造解析。第 43 回日本分子生物学会  
大会。2020 年 12 月、横浜市
- 12) Yudhistira R. M., Mori S, Sumi Y, Mori M,  
Umeki Y, Saito-Nakano Y, Nozaki T, Shibata  
N. Development of Fluorinated Fumagillin  
Analogues towards Anti-amoebic Active  
Compounds. 日本農薬学会第 46 回大会。2021  
年 3 月、オンライン開催
- 13) Yudhistira R. M., Mori S, Sumi Y, Mori M,  
Umeki Y, Saito-Nakano Y, Nozaki T, Shibata  
N. Development of Fluorinated Fumagillin  
Analogues towards Anti-amoebic Active  
Compounds. 日本化学会第 101 春季年会。  
2021 年 3 月、オンライン開催
- 14) 森 聡一朗、Yudhistira R.M.、森 美穂子、梅木  
優子、中野 由美子、住井 裕司、野崎 智義、柴  
田 哲男 赤痢アメーバ薬の開発を指向した含フ  
ッ素フマギリン誘導体の合成と活性。日本薬学  
会第 141 年会。2021 年 3 月、広島市