

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460514

研究課題名(和文) 分子分類を利用した腸管寄生原虫の網羅的検出法の開発

研究課題名(英文) Development of comprehensive detection methods of protozoan parasites using molecular taxonomy

研究代表者

所 正治 (Tokoro, Masaharu)

金沢大学・医学系・講師

研究者番号：30338024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：寄生原虫の精製DNAをターゲットに各種原虫を特異的に検出可能な網羅的PCRスクリーニング法を開発し、以下の研究成果を達成した。(1)ケニアのHIV感染学童のEntamoeba属感染状況の分子疫学調査：健常児との比較においてHIV感染学童におけるアメーバ類感染の低下をみた。(2)非病原性とされてきたボレックアメーバが豚下痢症において病原性を示す可能性を提示。(3)トリコモナス属の分子疫学的調査：腸トリコモナスの人獣共通感染についてエビデンスを提示した。(4)その他、ジアルジア症、アメーバ性肝膿瘍の診断・報告、野鼠に分布するTrypanosoma属を分子同定によりT. grosiと同定。

研究成果の概要(英文)：A systemic screening method targeting protozoan parasites was developed, and applied the methods to various clinical examinations and molecular epidemiologic investigations. The achieved results are; (1) Lower prevalence of Entamoeba species in children with vertically transmitted HIV infection were observed in Western Kenya. (2) The genetic identification of Entamoeba polecki was confirmed from pigs in Japan and revealed its potential pathogenic role in the ulcerative colitis. (3) Genetic identification of various trichomonads species isolated from humans and related mammals were confirmed. The data showed the wide distribution of an specific genotype of Pentatrachomonas hominis among human and animals, and thus P. hominis is considered to be a zoonotic protozoan. (4) Other achievements; Clinical diagnoses of giardiasis and amebic liver access. The molecular epidemiologic investigation of Trypanosoma sp. among Japanese wild rodents could reveal the presence of T. grosi.

研究分野：寄生虫学

キーワード：分子分類 種内多型 DNAバーコード 原虫 アメーバ属 鞭毛虫 トリコモナス属 トリパノソーマ

1. 研究開始当初の背景

臨床における寄生原虫検査のゴールドスタンダードは未だに形態学的顕微鏡検査だが、形態的に鑑別できない病原性の赤痢アメーバと非病原性のディスパアメーバなどの存在もあり、分子分類をベースとした寄生虫診断が臨床検査においても利用されるようになってきた。しかしながら、寄生原虫の分子分類は、一部の病原性原虫でこそ確立しているものの、ヒトから検出される多くの寄生原虫、特に非病原性原虫では、ヒト由来株のレファレンス DNA 配列情報ですら登録は限定的である。したがって、ヒトから検出される多様な原虫類について、分子分類に基づく網羅的なスクリーニング検査を実現するためには、非病原性原虫を含むレファレンス収集と各原虫に関する分子分類の確立が必要である。

2. 研究の目的

ヒト寄生原虫を網羅的に検出が可能な分子生物学的スクリーニング法を確立し、臨床検査、分子疫学調査での利用を可能にする。

3. 研究の方法

各寄生原虫について以下のステップを適用し、レファレンス収集及び分子分類の確立を進めた。

(1) 臨床、疫学調査サンプルを材料に、ゲノム DNA を精製。

(2) 主に 18S 小サブユニットリボソーム RNA 遺伝子座をターゲットに各原虫を特異的に検出可能な PCR 法を確立することで、レファレンス DNA 配列を決定・収集する。

(3) 18S 小サブユニットリボソーム RNA 遺伝子座の部分シーケンス配列に基づく系統樹・アライメントをベースに、原虫グループ (Amoebozoa, Fornicata, Parabasalia, Alveolata, Stramenopiles) 毎のユニバーサル PCR を設計し、(2) の特異 PCR と組み合わせることでネステッド PCR としての原虫スクリーニング検査法を確立。

(4) 臨床検査、分子疫学調査において上記スクリーニング法を実地に活用し、その有用性及び問題点を洗い出し、改善を繰り返す。

4. 研究成果

(1) *Entamoeba* 属スクリーニング法の確立: *Entamoeba histolytica* (赤痢アメーバ)、*E. dispar* (ディスパアメーバ)、*E. moshkovskii* (モシコブスキーアメーバ)、*E. coli* (大腸アメーバ)、*E. hartmanni* (ハルトマンアメーバ)、*E. polecki* (syn. *E. chattoni*) (ポレックアメーバ) を特異的に同定可能なスクリーニング法を設計、確立し、豚下痢症におけるポレックアメーバの検出(雑誌論文 3,4)

ケニアの先天性 HIV 感染児童におけるアメーバ類感染状況の研究(雑誌論文 1)で実地に活用、各々、豚の出血性下痢症におけるポレックアメーバの関与の可能性、HIV 陰性児童における高いアメーバ類感染などの新規知見を得た。

(2) トリコモナス類のスクリーニング法確立: 動物に分布する *Hypotrichomonas* 属、*Tritrichomonas* 属を含むトリコモナス類検出 PCR 法をベースにヒト由来の *Pentatrichomonas hominis* (腸トリコモナス) を鑑別・検出可能なスクリーニング系を確立し、分子疫学的なエビデンスのなかった腸トリコモナスの人獣共通感染について、明確なデータを提示した(雑誌論文 6)

(3) その他の臨床検査・疫学調査への分子同定の活用: 先天性トキソプラズマ症例における臍帯血からの PCR 検出(雑誌論文 8)、形態的に検出が困難だったジアルジアの検出(雑誌論文 7)、アメーバ性肝膿瘍の検出(雑誌論文 2)、野鼠から検出されるトリパノソーム属の同定(雑誌論文 5)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

1. Matey EJ, Tokoro M, Nagamoto T, Mizuno T, Saina MC, Bi X, Oyombra JA, Okumu P, Langat BK, Sang WK, Songok EM, Ichimura H. Lower prevalence of Entamoeba species in children with vertically transmitted HIV infection in Western Kenya. AIDS;30(5):803-805.2016(査読あり)

2. 所 正治, 菱矢直邦, 新井正伸, 有沢富康, 太田雅文, 荒山駿介, 永元健啓, 及川陽三郎. 形態的に赤痢アメーバを検出し得なかったアメーバ性肝膿瘍の 2 例. 日本臨床寄生虫学会誌;26(1);96-99.2015(査読あり)

3. Matsubayashi M, Kanamori K, Sadahiro M, Tokoro M, Abe N, Haritani M, Shibahara T. First molecular identification of *Entamoeba polecki* in a piglet in Japan and implications for aggravation of ileitis by coinfection with *Lawsonia intracellularis*. Parasitol Res;114(8):3069-73.2015(査読あり)

4. Matsubayashi M, Murakoshi N, Komatsu T, Tokoro M, Haritani M, Shibahara T. Genetic identification of *Entamoeba polecki* subtype 3 from pigs in Japan and characterisation of its pathogenic role in ulcerative colitis. Infect Genet Evol;36:8-14.2015(査読あり)

5. Nakamoto K, Tokoro M, Nakamoto T, Saito-Ito A, Oikawa Y, Takada N, Matsumura T, Arayama S, Kamaruddin M. Widespread distribution of *Trypanosoma (Herpetosoma) grosi* in Japanese field mice (Apodemus

speciosus). Jpn. J. Vet Parasitol;13(2):67-73.2014(査読あり)

6. Kamaruddin M, Tokoro M, Rahman MM, Arayama S, Hidayati AP, Syafruddin D, Asih PB, Yoshikawa H, Kawahara E. Molecular characterization of various trichomonad species isolated from humans and related mammals in Indonesia. Korean J Parasitol;52(5):471-8.2014(査読あり)

7. 松村隆弘、油野友二、寺崎修一、所正治. 低タンパク血症にみられたジアルジア症の1例. 日本臨床寄生虫学会誌;24(1);15-17.2013(査読あり)

8.所正治、山本 剛、石原温子、坂井理恵. 臍帯血および羊水からPCRによってトキソプラズマが検出された先天性トキソプラズマ症例. 日本臨床寄生虫学会誌;24(1);27-29.2013(査読あり)

〔学会発表〕(計26件)

1. 永元健啓、Tukiman Joko Hendarto、Syafruddin Din、所正治. エンテロモナスの種内多型解析. 第85回日本寄生虫学会大会, 2016.03.19-20、宮崎市民プラザ(宮崎)

2. Tukimin Joko Hendarto、荒山駿介、永元健啓、Syafruddin Din、所正治. Characterization of culture-isolated Retortamonas spp. Collected in Sumba Island, Indonesia. 第85回日本寄生虫学会大会, 2016.03.19-20、宮崎市民プラザ(宮崎)

3. 芝原友幸、鈴田史子、金森健太、村越奈穂子、小松徹也、松林誠、阿波仁一郎、播谷亮、所正治. 豚の大腸から見出された Entamoeba 属原虫の種および遺伝子型の同定と病理組織学的解析. 第85回日本寄生虫学会大会, 2016.03.19-20、宮崎市民プラザ(宮崎)

4.所正治、永元健啓、Tukiman Joko H、荒山駿介、Syafruddin Din. Intra-species diversity of flagellates: Zoonosis or not? 第85回日本寄生虫学会大会 2016.03.19-20、宮崎市民プラザ(宮崎)

5. Joko Hendarto Tukimin, Shunsuke Arayama, Takehiro Nagamoto, Din Syafruddin, Masaharu Tokoro. Various Fornicata and Parabasalia species distributed in Sumba, Indonesia. 第71回日本寄生虫学会西日本支部大会, 2015.10.25、奈良女子大(奈良)

6.所正治、菱矢直邦、新井正伸、有沢富康、太田雅文、荒山駿介、永元健啓、及川陽三郎. 形態的に赤痢アメーバを検出し得なかったアメーバ性肝膿瘍の2例. 第26回日本臨床寄生虫学会, 2015.6.20、栃木県総合文化センター(宇都宮)

7. 永元健啓、所正治、Din Syafruddin. Pig has a potential reservoir of *Entamoeba moshkovskii*. 第84回日本寄生虫学会大会, 2015.03.21-22、杏林大学三鷹キャンパス(東京)

8. 松村隆弘、山本 徳栄、近 真理奈、大山 龍也、大山 通夫、所正治. ハクビシンとアライグマから検出されたクリプトスポリジウムの分子疫学的解析. 第84回日本寄生虫学会大会, 2015.03.21-22、杏林大学三鷹キャンパス(東京)

9.所正治、ディン シャフルディン、吉川 尚男、永元 健啓. Intra-species diversity of minor flagellates: Chilomastix sp., Enteromonas sp., and Retortamonas sp. 第84回日本寄生虫学会大会, 2015.03.21-22、杏林大学三鷹キャンパス(東京)

10. Masaharu Tokoro, Takehiro Nagamoto, Din Syafruddin, Hisao Yoshikawa. Molecular identification of non-pathogenic flagellates in Indonesia. 13th Asian-Pacific Congress for Parasitic Zoonoses, 2014 Nov 29-30. Taipei Medical University, Taipei, Taiwan

11. 永元健啓、所正治. 非病原性とされる腸管寄生鞭毛虫の遺伝子解析. 第70回日本寄生虫学会西日本支部大会, 2014.10.18、神戸医療大学ポートアイランドキャンパス(神戸)

12. 荒山駿介、所正治. 糞便検出から得られる原虫類の形態解析. 第70回日本寄生虫学会西日本支部大会, 2014.10.18、神戸医療大学ポートアイランドキャンパス(神戸)

13. 阿部郁里、所正治. 鞭毛虫類のPCR検出トライアル. 第32回北陸病害動物研究会, 2014.6.21、丸三製薬バイオテック株式会社本社(富山)

14. 荒山駿介、所正治. 腸トリコモナスの形態学的解析. 第32回北陸病害動物研究会, 2014.6.21、丸三製薬バイオテック株式会社本社(富山)

15. 真嶋ちはる、所正治. アメーバ類のPCR検出の可能性と問題点について. 第32回北陸病害動物研究会, 2014.6.21、丸三製薬バイオテック株式会社本社(富山)

16. 永元健啓、所正治. PCRを用いた腸管寄生原虫の網羅的検出法の開発. 第32回北陸病害動物研究会, 2014.6.21、丸三製薬バイオテック株式会社本社(富山)

17. カマルディン ムディアワティ、ディン シャフルディン、川原 栄、所正治. Genetic identification of various trichomonads species isolated from humans and related mammals in Indonesia. 第83回日本寄生虫学会大会, 2014.03.27-28、愛媛大学城北キャンパス(愛媛)

18.所正治、RAHMAN Md Moshir, 及川陽三郎、小林 顕. 核/ミトコンドリア DNA をターゲットとした角膜炎分離アカントアメーバの遺伝子型解析. 第69回日本寄生虫学会西日本支部大会, 2013.10.20、アルファあなぶきホール(高松)

19. M. Tokoro, H. Yoshikawa, D. Syafruddin. A comprehensive molecular analysis for various intestinal protozoan parasites. Annual Molecular Parasitology Meeting

2013 (24th), Sep 8-12, Marine Biology Laboratory, Woods Hole, MA, United States

20. 所 正治. 寄生虫検査依頼の動向(2012年6月~2013年6月). 第31回北陸病害動物研究会, 2013.7.6, 金沢医科大学(金沢)

21. 河合 顕太郎, 所 正治. サルコシスチスの疫学および体内分布調査について 第31回北陸病害動物研究会, 2013.7.6, 金沢医科大学(金沢)

22. 松村隆弘, 油野友二, 寺崎修一, 所 正治
低タンパク血症にみられたジアルジア症の1例. 第31回北陸病害動物研究会, 2013.7.6, 金沢医科大学(金沢)

23. 永元 健啓, 所 正治. 腸管寄生原虫の網羅的検査法確立を目指して. 第31回北陸病害動物研究会, 2013.7.6, 金沢医科大学(金沢)

24. 及川陽三郎, 松村隆弘, 所 正治. 石川県のClinostomum sp. 症例について. 第23回日本臨床寄生虫学会, 2013.6.15, 東大寺鐘撞ホール(奈良)

25. 松村隆弘, 油野友二, 寺崎修一, 所 正治. 低タンパク血症にみられたジアルジア症の1例. 第23回日本臨床寄生虫学会, 2013.6.15, 東大寺鐘撞ホール(奈良)

26. 所 正治, 山本 剛, 石原 温子, 坂井理恵. 臍帯血および羊水からPCRによってトキソプラズマが検出された先天性トキソプラズマ症例. 第23回日本臨床寄生虫学会, 2013.6.15, 東大寺鐘撞ホール(奈良)

〔図書〕(計8件)

1. 所 正治(分担). 消化管・泌尿生殖器寄生原虫の原虫症. 今日の治療指針 私はこう治療している 2016.1(医学書院):288-289.

2. 所 正治(分担). トキソプラズマ症. 今日の診断指針 第7版 2015.3(医学書院):1429-1431.

3. 所 正治(分担). トキソプラズマ症. 今日の治療指針 私はこう治療している 2015.1(医学書院):266-267.

4. 児玉義勝, ラハマン・ショフィクル, 梅田浩二, ヌグエン・バン・サー, 寺本勲, 所 正治. クリプトスポリジウム P23 糖タンパク質抗原に対する機能性リベチン (Immunoglobulin Yolk: IgY) を用いた経口受動免疫の野外応用. 臨床獣医 2014.8.1(緑書房). 32(8): 41-45

5. 松村隆弘, 所 正治. 消化器症状を主症状とする寄生虫感染症 ジアルジア症, クリプトスポリジウム症, サイクロスポーラ症. 臨床と微生物 41(4)見逃すな, 寄生虫感染症 2014.7(近代出版): 21-25

6. 所 正治. リーシュマニア症. 今日の治療指針 私はこう治療している 2014.1(医学書院):260-262

7. 及川陽三郎, 所 正治, 小林 顕. 液体培地を用いたアカントアメーバの簡易培養と容器付着性シストの検出. 寄生虫学: 材料と

方法 2013 年版 2013.12.10 三恵社: 41-15

8. 所 正治. 消化管原虫症. 日本臨牀別冊 感染症症候群(下)(第2版)2013.9.30 日本臨牀社: 331-335.

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ
<http://www.parasitology.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
所 正治 (TOKORO MASA HARU)
金沢大学・医学系・講師
研究者番号: 30338024

(2) 研究分担者 ()

研究者番号:

(3) 連携研究者 ()

研究者番号: