

平成28年度医療研究開発推進事業費補助金

(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) 成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 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
(英語) Research Program on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases

補助事業課題名： (日本語) 日本におけるトキソプラズマの分子疫学調査と新規診断法の開発
(英語) Molecular epidemiological study of *Toxoplasma gondii* in Japan and development of novel diagnostic method of toxoplasmosis

補助事業担当者 (日本語) 国立感染症研究所 室長 永宗喜三郎
所属 役職 氏名： (英語) National Institute of Infectious Diseases, Chief, Kisaburo Nagamune

実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究課題名： (日本語) 東日本および沖縄におけるトキソプラズマの分子疫学調査、
ゲノムおよび病原性解析
(英語) Molecular epidemiological study of *Toxoplasma gondii* in eastern part of Japan and Okinawa

補助事業分担者 (日本語) 国立感染症研究所 室長 永宗喜三郎
所属 役職 氏名： (英語) National Institute of Infectious Diseases, Chief, Kisaburo Nagamune

II. 成果の概要（総括研究報告）

・ 補助事業代表者による報告の場合

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 15 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。一方で、日本を含むアジアにおけるトキソプラズマの遺伝型についての情報はほとんど存在せず、数少ない解析も北米、欧州で分離される古典的な type I-III を前提にしたものに限られており、15 ハプロタイプという新たな知見に基づいた病原性や分子系統に関する解析が望まれている。申請者らは最近、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。そこで本研究では、日本由来トキソプラズマをさらに多数分離してハプロタイプ解析および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を調査することを目的とする。また、代表的なクローンについては全ゲノム配列を決定し既知のハプロタイプとの比較を行う。さらにこれらの結果をもとに病原性と連鎖する SNPs を絞り込むことで、日本由来トキソプラズマ独自の病原因子の同定を目指す。

本年度は、プロジェクトの初年度として、日本由来のトキソプラズマを収集し、病原性およびゲノムデータの解析を行うための実験系を確立し、次年度以降に本格的に運用できるよう整備することを目指した。実際に本年度は日本由来株として沖縄分離株を中心に 13 株を入手し、そのうち 10 株について実験室でのマウスへの再感染が確認でき、さらに 9 株が *in vitro* 培養系への導入に成功、そのうちの 6 株については次世代シーケンサーによる全ゲノム配列の決定に成功した。現在、これらのゲノムの解析を進めているが、そのうちの 1 株について先行して解析を行った。この株は、従来のタイピングによると弱病原性であるはずのタイプ II に近縁な日本独自ハプロタイプを持つにもかかわらず、マウスへの病原性は高病原性ハプロタイプであるタイプ I と同等であるという興味深いフェノタイプを持っていた。この株の既知の病原因子である ROP5, 16, 18 について解析した結果、いずれの遺伝子も高病原型と一致しており、この株の高病原性の原因の一つである可能性が示唆された（投稿準備中）。現在さらに沖縄では新たにネコ由来の 3 株が分離できつつあり、進捗は順調であると考えている。一方で、東日本地区においては、本年度は東京のネコのフンを材料に調査を行ったが計 264 検体からトキソプラズマは検出できなかった。次年度は沖縄での経験を元に方法の見直しを考えている（以上、永宗、野崎）。西日本でもネコ由来の 1 株が分離でき、解析を進めている（高島）。北日本地区でも 1 株の分離に成功しており、解析を始めた（西川）。

It is well-known that *Toxoplasma gondii* is very clonal organism. It is reported that there are 15-haprotypes in the world and that there is a close relationship between the haprotype and distribution and pathogenicity. On the other hand, there is little data for the genotyping of *T. gondii* in Asia, including Japan. Recently, the applicant's group suggest that *T. gondii* in Japan has unique genotype compared with ones in other regions. In this study, we investigate the specificity of *T. gondii* in Japan by isolating much number of *T. gondii* and analyzing the haprotypes and pathogenicities. Further, we try to determine the whole genome of the typical clones and compare with established 15 haprotypes. We also try to decide the SNPs linked with the pathogenicity to identify the responsible gene(s) for the pathogenicity of Japanese isolates.

In this year, as first year of the project, we have started to collect *T. gondii* in Japan, and established the analyses of the pathogenicity and genomic data, for the next years. In this year, we obtained 13 of Japanese isolates, mainly from Okinawa islands. Ten of them were able to be confirmed the infectivity to the mouse, and nine could be cultured *in vitro*, and we succeeded to determine the whole genome of six clones using by next generation sequencer. Although we are analyzing these genome data now, one of them have analyzed formerly. This isolate is similar to

weak virulent genotype, type II, but, it has high virulence to mouse like as Type I. We investigated the nucleotide sequences of ROP5, 16, and 18, which are known as responsible genes for the virulence to mouse. As the sequences of these genes were corresponding with those of high virulence strains, the possibility was suggested that these genes were responsible to the virulence to the mouse. Now, we are trying to isolate three more clones from Okinawa. On the other hand, in the east part of Japan, we could not detect *T. gondii* from 264 faces of the cat in Tokyo area. We are changing the strategy for the isolation. We could also isolate one clone from the cat in western Japan. In the Northern Japan, we succeeded to isolate one clone.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 4件、国際誌 4件)

1. Tahara, M., Andrabi, S.B., Matsubara, R., Aonuma, H., Nagamune K. “A host cell membrane microdomain is a critical factor for organelle discharge by *Toxoplasma gondii*.” *Parasitol. Int.* 2016, 65 (5), 378-388
2. Sakamoto, H, Suzuki, S., Nagamune, K., Kita, K., Matsuzaki, M. “Investigation into the Physiological Significance of the Phytohormone Abscisic Acid in *Perkinsus marinus*, an Oyster Parasite Harboring a Non-Photosynthetic Plastid.” *J. Eukaryot. Microbiol.* 2016, DOI: 10.1111/jeu.12379
3. Andrabi, S.B.A., Tahara, M., Matsubara, R., Toyama, T., Aonuma, H., Sakakibara, H., Suematsu, M., Tanabe, K., Nozaki, T., Nagamune, K. “Plant hormone cytokinins control cell cycle progression and plastid replication in apicomplexan parasites.” *Parasitol. Int.* 2017, *in press*
4. Nishiumi F, Ogawa M, Nakura Y, Hamada Y, Nakayama M, Mitobe J, Hiraide A, Sakai N, Takeuchi M, Yoshimori T, Yanagihara I. Intracellular fate of *Ureaplasma parvum* entrapped by host cellular autophagy. *Microbiologyopen.* 2017. E-pub ahead of print
5. 松原立真、永宗喜三郎 「アピコンプレクサ生物におけるカルシウム・シグナリングと植物ホルモン」 *化学療法の領域* 2016, 32: 117-126
6. 松原立真、永宗喜三郎 「アピコンプレクサ類のもつ植物様オルガネラと植物ホルモン –オルガネラ進化学から考える感染症対策」 *遺伝* 2016, 70:99-104
7. 永宗喜三郎 「お肉とネコの寄生虫、トキソプラズマってナニモノ？」 *衛生の友* 2016, 59: 2
8. 永宗喜三郎 「トキソプラズマ感染症診断法」 *小児内科* 2017, 49 印刷中

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. シンポジウム
アピコンプレクサと植物ホルモン、口頭、永宗喜三郎、第159回日本獣医学会学術集会、2016/9/6、国内
2. 招待講演
微生物の基礎知識 (その4) –原虫・寄生虫と注目される感染症–日本防菌防黴学会 製造環境における微生物汚染と対策に関する基礎講座、口頭、永宗喜三郎、2016/12/15、国内
3. トキソプラズマ集団感染例、口頭、菊地正、清水少一、安達英輔、古賀道子、永宗喜三郎、鯉渕智彦 第27回日本臨床寄生虫学会 2016/6/18、国内
4. 食中毒原因原虫 *Sarcocystis fayeri* の滑走運動および細胞内侵入性、口頭、佐倉孝哉、田原美智留、別所知明、八木田健司、永宗喜三郎、第24回分子寄生虫学ワークショップ・第14回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会、2016/8/22、国内

5. 日本におけるトキソプラズマのタイピングと病原性、口頭、福本隼平、山野安規徳、竹内史比古、松原立真、喜屋武向子、正谷達膳、松尾智英、松井利博、村上麻美、高島康弘、永宗喜三郎、第 24 回分子寄生虫学ワークショップ・第 14 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会、2016/8/23、国内
6. 日本におけるトキソプラズマの分子系統と病原性、口頭、福本隼平、山野安規徳、佐倉孝哉、松原立真、永宗喜三郎、第 49 回日本原生生物学会大会、2016/10/9、国内
7. Elucidating the mechanism of host mitochondrial recruitment of *Toxoplasma gondii*. Poster, Fukumoto J, Sakura T, Matsubara R, Nagamune K. The 13th International Colloquium on Endocytobiology and Symbiosis, 2016/9/10, 国内
8. *Toxoplasma gondii* 岐阜分離株の病原性の評価、口頭、谷口裕二、福本隼平、永宗喜三郎、斉藤大蔵、鬼頭克也、高島康弘 第 159 回日本獣医学会学術集会 2016/9/6 国内
9. マウス胎盤におけるトキソプラズマ感染白血球の挙動、口頭、高島康弘、Tatiana Batanova, 馬場みなみ、鬼頭克也、第 159 回日本獣医学会学術集会 2016/9/6 国内
10. *Toxoplasma gondii* 感染白血球の血流内および標的臓器内での挙動、口頭、馬場みなみ、Batanova Tatiana, 鬼頭克也、高島康弘、第 159 回日本獣医学会学術集会 2016/9/6 国内
11. **招待講演**
早産におけるウレアプラズマの重要性とその病原発揮機構、口頭、山本亮、柳原格、妊婦の感染と早産を考える会、2016. 5. 14、国内
12. *U.parvum* 感染とガレクチンの関係、口頭、西海 史子、柳原 格、日本マイコプラズマ学会第 43 回学術集会、2016.6.24-25、国内
13. Association between *MTHFR* C677T polymorphism with intervillous and decidual pathology in human cases with pregnancy loss, Poster, Tzvetoazar R Mehandjiev, Nodoka Tenno, Yukiko Nakura, Tetsu Wakimoto ,Kazuya Mimura ,Masahiro Nakayama, Takeshi Kanagawa, Takuji Tomimatsu, Tomio Fujita, Yoshihiro Onouchi, Makoto Takeuchi, Tadashi Kimura, Itaru Yanagihara. The 32nd Annual Meeting of European Society of Human Reproduction and Embryology、2016.7.3-6、Helsinki
14. 死産あるいは早期新生児死亡肺炎例における肺組織メタゲノム解析、ポスター、名倉由起子、中山雅弘、竹内真、柳原格、第 52 回日本周産期・新生児医学会学術集会、2016.7.16-18、国内
15. 過酸化水素による *Vibrio vulnificus* の溶菌と sulfonyl fluoride 化合物による促進、口頭、吉村芳修、吉田眞一、柳原格、日米コレラ部会（日米医学協力研究会コレラ・細菌性腸管感染症専門部会）日本側総会、2016 年度第 1 回国内コレラパネル会議、2016.8.5、国内
16. **招待講演**
デジタル PCR の高感度化と臨床診断への応用、口頭、柳原格、名倉由起子、吉村芳修、第 68 回日本生物工学会大会、2016.9.28-30、国内
17. ウレアプラズマ子宮内感染のメカニズムの解析、ポスター、柳原格、第 61 回日本新生児育成医学会・学術集会、2016.12.1-3、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 健康危険情報

健康危険情報の通報（要旨）

「死亡した妊婦の検体から *Chlamydomyces psittaci* を同定した事例について」

研究開発代表者 永宗 喜三郎

(1) 通報月日 平成 29 年 3 月 7 日

(2) 事業名 国立研究開発法人日本医療研究開発機構感染症実用化研究事業 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

(3) 研究開発代表者名 永宗 喜三郎

(4) 研究開発課題名 日本におけるトキソプラズマの分子疫学調査と新規診断法の 開発

(5) 所属施設名 国立感染症研究所

2. 日本産婦人科学会 HP

「死亡した妊婦の検体からオウム病病原体を同定した事例について」(情報提供)

平成 29 年 3 月 17 日

3. 寄生虫を観察してみよう、西川義文、第 6 回畜大ふれあいフェスティバル、2016/12/17、国内

4. トキソプラズマ感染症、永宗喜三郎、国立感染症研究所一般公開、2016.10.1、国内

5. マトリョーシカ型生物学と寄生虫、永宗喜三郎、日本大学大学院獣医学研究科 大学院特別講義、2017/1/20、国内

6. 報道他

読売新聞、2016.7.28、「妊娠時、猫のフンに注意」(コメント 永宗喜三郎)

朝日新聞、2016.11.4、「生肉・猫のふんに注意を」(コメント 永宗喜三郎)

河北新報総合面、2016.3.25、「英世の研究写真 3000 枚発見」(コメント 柳原格)

高知新聞社会面、2016.3.25、「野口英世の研究写真発見」(コメント 柳原格)

福井新聞社会面、2016.3.25、「野口英世の研究写真発見」(コメント 柳原格)

(4) 特許出願

平成28年度医療研究開発推進事業費補助金

(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) 成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 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
(英語) Research Program on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases

補助事業課題名：(日本語) 日本におけるトキソプラズマの分子疫学調査と新規診断法の開発
(英語) Molecular epidemiological study of *Toxoplasma gondii* in Japan and development of novel diagnostic method of toxoplasmosis

補助事業担当者 (日本語) 国立感染症研究所寄生動物部・部長・野崎 智義
所属 役職 氏名：(英語) National Institute of Infectious Diseases,
Department of Parasitology, Director Tomoyoshi Nozaki

実施期間：平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究課題名：(日本語) ゲノムおよび病原性解析
(英語) Analysis of genome and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* in Japan

補助事業分担者 (日本語) 国立感染症研究所寄生動物部・部長・野崎 智義
所属 役職 氏名：(英語) National Institute of Infectious Diseases,
Department of Parasitology, Director Tomoyoshi Nozaki

II. 成果の概要（総括研究報告）

補助事業代表者： 国立感染症研究所寄生動物部・室長・永宗 喜三郎 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 件、国際誌 件）

1. 該当なし

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 該当なし

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 該当なし

(4) 特許出願

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 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
(英語) Research Program on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases

研究開発課題名： (日本語) 日本におけるトキソプラズマの分子疫学調査と新規診断法の開発
(英語) Molecular epidemiological study of *Toxoplasma gondii* in Japan and development of novel diagnostic method of toxoplasmosis

研究開発担当者 (日本語) 国立感染症研究所 寄生動物部 室長 永宗 喜三郎
所属 役職 氏名： (英語) Kisaburo Nagamune, Head, Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases

実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成31年3月31日

分担研究 (日本語) ヒト臨床サンプルにおけるトキソプラズマの分子疫学調査
開発課題名： (英語) Molecular and Epidemiological Analysis of Human Toxoplasmosis

研究開発分担者 (日本語) 大阪母子医療センター研究所 免疫部門 部長 柳原 格
所属 役職 氏名： (英語) Itaru Yanagihara, Head, Department of Developmental Medicine, Research Institute, Osaka Women's and Children's Hospital.

II. 成果の概要（総括研究報告）

研究開発代表者： 国立感染症研究所 寄生動物部 室長 永宗 喜三郎

総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 1 件）

Nishiumi F, Ogawa M, Nakura Y, Hamada Y, Nakayama M, Mitobe J, Hiraide A, Sakai N, Takeuchi M, Yoshimori T, Yanagihara I. Intracellular fate of *Ureaplasma parvum* entrapped by host cellular autophagy. Microbiologyopen. 2017. E-pub ahead of print

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 山本亮、柳原格、「早産におけるウレアプラズマの重要性とその病原発揮機構」、妊婦の感染と早産を考える会、福岡、2016/5/14、招待講演 国内
2. 西海 史子、柳原 格、「*U. parvum* 感染とガレクチンの関係」、日本マイコプラズマ学会 第 43 回学術集会、長崎、2016/6/24-25、口頭 国内
3. Tzvetozar R Mehandjiev, Nodoka Tenno, Yukiko Nakura, Tetsu Wakimoto, Kazuya Mimura, Masahiro Nakayama, Takeshi Kanagawa, Takuji Tomimatsu, Tomio Fujita, Yoshihiro Onouchi, Makoto Takeuchi, Tadashi Kimura, Itaru Yanagihara、「Association between *MTHFR* C677T polymorphism with intervillous and decidual pathology in human cases with pregnancy loss」、The 32nd Annual Meeting of European Society of Human Reproduction and Embryology、2016/7/3-6、Helsinki、poster 国外
3. 名倉由起子、中山雅弘、竹内真、柳原格、「死産あるいは早期新生児死亡肺炎例における肺組織メタゲノム解析」第 52 回日本周産期・新生児医学会学術集会、富山、2016/7/16-18、ポスター 国内
4. 吉村芳修、吉田眞一、柳原格、「過酸化水素による *Vibrio vulnificus* の溶菌と sulfonyl fluoride 化合物による促進」、日米コレラ部会（日米医学協力研究会コレラ・細菌性腸管感染症専門部会）日本側総会、2016 年度第 1 回国内コレラパネル会議、京都、2016/8/5、口頭 国内
5. 柳原格、名倉由起子、吉村芳修、「デジタル PCR の高感度化と臨床診断への応用」第 68 回日本生物工学会大会、富山、2016/9/28-30、招待講演 国内
6. 柳原格、「ウレアプラズマ子宮内感染のメカニズムの解析」、第 61 回日本新生児育成医学会・学術集会、大阪、2016/12/1-3、ポスター 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 健康危険情報

健康危険情報の通報（要旨）

「死亡した妊婦の検体から *Chlamydomphila psittaci* を同定した事例について」

研究開発代表者 永宗 喜三郎

- (1) 通報月日 平成 29 年 3 月 7 日
- (2) 事業名 国立研究開発法人日本医療研究開発機構感染症実用化研究事業 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
- (3) 研究開発代表者名 永宗 喜三郎
- (4) 研究開発課題名 日本におけるトキソプラズマの分子疫学調査と新規診断法の 開発
- (5) 所属施設名 国立感染症研究所

2. 日本産婦人科学会 HP

「死亡した妊婦の検体からオウム病病原体を同定した事例について」(情報提供)
平成 29 年 3 月 17 日

3. 報道他

河北新報総合面、2016.3.25、「英世の研究写真 3000 枚発見」(コメント 柳原格)
高知新聞社会面、2016.3.25、「野口英世の研究写真発見」(コメント 柳原格)
福井新聞社会面、2016.3.25、「野口英世の研究写真発見」(コメント 柳原格)

(4) 特許出願
関連特許なし

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：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

Research Program on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases

研究開発課題名：日本におけるトキソプラズマの分子疫学調査と新規診断法の開発

Molecular epidemiological study of *Toxoplasma gondii* in Japan and development of novel diagnostic method of toxoplasmosis

研究開発担当者 国立大学法人帯広畜産大学 原虫病研究センター 准教授 西川 義文

所属 役職 氏名： National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Associate Professor, Yoshifumi Nishikawa

実施期間：平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

II. 成果の概要（総括研究報告）

研究開発代表者：永宗 喜三郎 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 0件）

該当なし

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

該当なし

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 寄生虫を観察してみよう、西川義文、第6回畜大ふれあいフェスティバル、2016/12/17、国内

(4) 特許出願

該当なし

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 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
(英語) Research Program on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases
- 研究開発課題名： (日本語) 日本におけるトキソプラズマの分子疫学調査と新規診断法の開発
(英語) Molecular epidemiological study of *Toxoplasma gondii* in Japan and development of novel diagnostic method of toxoplasmosis
- 研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人岐阜大学 応用生物科学部 准教授 高島 康弘
所属 役職 氏名： (英語) Gifu University, Faculty of Applied Biological Sciences, Associate Professor,
Yasuhiro Takashima
- 実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日
- 分担研究 (日本語) 西日本における トキソプラズマの分子疫学調査
開発課題名： (英語) Molecular epidemiological study of *Toxoplasma gondii* in Western Japan
- 研究開発分担者 (日本語)
所属 役職 氏名： (英語)

成果の概要（総括研究報告）

研究開発代表者：国立感染症研究所・寄生動物部・永宗喜三郎 総括研究報告を参照。

II. 成果の外部への発表

- (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 0 件）
- (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表
 1. *Toxoplasma gondii* 岐阜分離株の病原性の評価，口頭，谷口裕二，福本準平，永宗喜三郎，斉藤大蔵，鬼頭克也，高島康弘 第 159 回日本獣医学会学術集会 2016/9/6 国内
 2. マウス胎盤におけるトキソプラズマ感染白血球の挙動，口頭，高島康弘，Tatiana Batanova，馬場みなみ，鬼頭克也，第 159 回日本獣医学会学術集会 2016/9/6 国内
 3. *Toxoplasma gondii* 感染白血球の血流内および標的臓器内での挙動，口頭，馬場みなみ，Batanova Tatiana，鬼頭克也，高島康弘，第 159 回日本獣医学会学術集会 2016/9/6 国内
- (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
なし
- (4) 特許出願
なし