

わが国におけるアメーバ症の実態の解明と
対策確立に関する研究

厚生科学研究費補助金
新興・再興感染症研究事業
平成11年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 竹内 勤

(慶應義塾大学)

平成12年6月

目 次

I. 総括研究報告	
わが国におけるアメーバ症の実態の解明と対策確立に関する研究	1
竹内 勤	
II. 分担研究報告	
アメーバ症の実態の解明とアメーバの培養系の確立に関する研究	8
竹内 勤	
アメーバ症の新規免疫診断法の開発と応用	16
橘 裕司	
アメーバ症の化学療法剤の標的に関する研究	21
牧岡朝夫	
アメーバ症の新しい化学療法の標的の解明および	24
遺伝子診断法の作成についての研究	
野崎智義	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	29
IV. 研究成果の刊行物・別冊	29

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
総括研究報告書

わが国におけるアメーバ症の実態の解明と対策確立に関する研究

主任研究者 竹内 勤 慶応義塾大学医学部教授

研究要旨

1980年以来増加傾向にあり、かついわゆる感染症新法施行以来届出例数がそれまでの二倍以上に達している赤痢アメーバ症の実態解明のためハイリスクグループのうち厚生・福祉行政上問題となる知的障害者更生施設に関して疫学的調査を行なって制圧のための指針作りと対策確立のための診断・治療の新技术の開発を目指して研究を行い以下の結果を得た。まず疫学調査は西日本地区の更生施設をモデルとして取り上げ、十分なインフォームドコンセントを得たうえで糞便検査と血清学的検査を行なった結果、嚢子陽性者3名、ELISA陽性者15名（陽性率約20%）を見いだした。その他の検査結果をも勘案しメトロニダゾールによる集団治療を行い、良好な結果を得た。また別の知的障害者更生施設から以前分離したアメーバ株の同定を行い、50株全てが*E. histolytica*である事が判明した。わが国のサル類からは主に*Entamoeba dispar*が検出される事も明らかにした。*E. dispar*の無菌培養系の作成はアメーバ研究の一つのネックになっているガクコロプラストのextractを使用して明瞭にpacked cellとなる程度まで増殖させるのに成功した。免疫学的診断法の作成も試み、peroxiredoxinに対するモノクロナル抗体を使用したサンドイッチELISAの系を開発した。新規化学療法剤の開発研究では特に嚢子形成過程と硫黄含有アミノ酸代謝の研究から標的を見出す試みを行なった。その結果オリザリンが嚢子形成を阻害し、嚢子形成初期に特異的に発現する糖蛋白を見出した。またさらにアメーバのシステイン合成酵素とセリンアセチル転移酵素の遺伝子をクローニングし、大腸菌を用いて組替え蛋白として発現させることに成功した。この系を使用して阻害剤の探索を行なう予定である。

研究分担者

橘 裕司・東海大学医学部助教授
牧岡朝夫・東京慈恵会医科大学専任講師
野崎智義・国立感染症研究所室長

A. 研究の目的

わが国においてはアメーバ感染は1970年代後半より明瞭な増加傾向を示しているが、その対策には困難な点が多い。その理由としては、①ハイリスク集団が同性愛者や知的障害者などであり、疫学調査が難しい。②また赤痢アメーバが病原性の異なる二種の原虫に分けられたため、各々に対する臨床的対応、診断などが再検討されなければならなくなった。③副作用の少ない薬剤の開発が進んでいない、等が挙げられる。特に①に関連した事項は重要で、わが国の福祉・衛生行政面で提起している問題は大きい。さらにわが国の同性愛者には病原性のあるアメーバが高率に分布しているため、HIVとの混合感染も問題となり得る。以上より本研究

においては、①種々のハイリスク集団、特に問題となる知的障害者更生施設におけるアメーバ感染の疫学調査を実施してその実態を明らかにし、対策立案のモデル化を行なうこと。②合わせて無菌培養系の確立を通して*E. dispar*のvirulenceの有無を確定すること。③*E. histolytica*、*E. dispar*の多様性、サブポピュレーションの存在を細胞レベル、分子レベルで検討し、鑑別するための方法を確立して個々の症例への対応のプロトコール作成に応用すること。④上記③で確立した方法を迅速化し、疫学研究に応用して従来の方法と比較検討すること。⑤新規薬剤開発のため標的およびその阻害剤を探索すること、を目的としている。しかし初年度の研究によれば、想像以上にわが国の知的障害者の収容施設においてアメーバ感染が拡大している事が明らかになりつつあるため、更に緊急に調査規模を拡大し、調査した施設のフォローアップも行なう。このような所見に基づいて知

的障害者収容施設におけるアメーバ感染の対処方針の策定を早急に試みる。対象とする集団を知的障害者更正施設に絞り込む事としたが、これによって本研究の意図するところに本質的な変更はなく、実態が明らかでなかったためこれまで福祉・衛生行政面での対応策が効果的に実施されなかった知的障害者のアメーバ感染抑圧の途を開く事を試みる。また本研究によって、両種アメーバの抗原・抗体レベルあるいは遺伝子レベルでの新しい同定法が種またはサブポピュレーションレベルにて可能となり、かつ薬剤開発に新しい指標を与えることも期待され、臨床に影響を及ぼすものと思われる。

B. 研究方法及び倫理面への配慮

(1) ハイリスク集団におけるアメーバ感染の実態の把握：ハイリスク集団のうちから知的障害者集団を主対象として選択し実態調査を実施した。方法は糞便検査、血清学的検査、および遺伝子診断を併用して行なった。これによって実態を明らかにし、感染経路の特定化を計った。また同種施設からの分離株の性状の特定化をも行なった。これらのデータはマニュアルとして福祉・衛生行政に還元する事も試みた。サル類についても検討した。

(2) アメーバ感染の免疫学的診断法・遺伝子診断法の開発と応用：E. histolyticaに特異的なヒトモノクロナル抗体のFab断片の遺伝子工学手法による大量生産法を確立し、それによる免疫学的手法による抗原定量法の確立の検討をまず開始した。これまで申請者らが開発したモノクロナル抗体を使用したサンドイッチELISAの特徴を調べ、実地に応用をはかった。遺伝子診断ではperoxiredoxinの塩基配列に基づいて種々のプライマーを作成し、PCRによってより感度の高い方法を開発するための基礎検討を開始した。これらの方法は個々の感染例に対して評価したのち、迅速化を行なう予定である。また最近モノクロナル抗体を利用した簡便な糞便中のアメーバ抗原定量用キットが開発され、信頼度が高いことが我々の検討で明らかになったので、このキット予備的検討をも試みた。これらの方法は可能なかぎり、疫学調査に早期に応用し、糞便検査・血清診断と対比させ疫学調査のプロトコ-

ル作成に含めるようにしたい。

(3) サブポピュレーション特定化の方法の開発：申請者らにより動物細胞で初めて見いだされたシステイン合成の代謝系の諸酵素に焦点を絞り、E. histolytica、E. disparにおける遺伝子の塩基配列に基づいて、PCRによる遺伝子断片の増幅と制限酵素切断によるパターン解析によってサブポピュレーション特定化の方法を開発するため基礎的検討を開始した。今年度は特にセリンアセチル転移酵素の多様性に関して、これまで詳しい検討が行なわれたキチナーゼと比較して検討を加えた。この方法を個々の症例に応用する事で評価し、その後の疫学調査への応用の基盤とする予定である。

(4) 新規薬剤の開発研究：ジニトロアニリン誘導体などの抗アメーバ作用を培養系によって検索した。またアメーバのシステイン合成系、嚢子形成にかかわる代謝系の阻害剤の探索を行なった。特にシステイン合成系の検討では、酵素を組み替え蛋白として発現させその結果を培養系に応用するシステムを作成して検討を行なった。また嚢子形成にかかわる代謝系と免疫原性糖蛋白の性状を明らかにし薬剤の標的になるかどうかの可能性を探るため試験管内でのEntamoeba invadensの嚢子形成をモデルとして検討を加えた。

倫理面への配慮

知的障害者収容施設での調査における倫理面には初年度同様特別の注意を払う。特に被収容者の家族には説明を十分に行なうが、そのみならず施設職員に対する配慮も必要で、同意を得てから調査を進める。また施設の性格上、関連する地方自治体の保健所、あるいは該当施設の嘱託医、看護担当者にも説明を行ない協力体制を作る。申請者らこれまでも調査の際主任研究者自身が職員、嘱託医、看護担当者に現地に出向いて説明を行なって同意を求めており、この方向は堅持するが、更に施設側関係者や第三者の意見を求め改善を行なう予定である。

C. 研究結果

(1) 知的障害者更正施設におけるアメーバ感染の実態調査

まず知的障害者更正施設における実態

調査と対策策定のモデルとして西日本地区の中規模の施設を選定した。まずアメーバ感染の既往の具体的な調査を行い、1999年以前に既に4名のアメーバ感染が強く疑われる例が存在し、死亡例もある事も見出された。その後、まず施設の内部状況の調査を行い、次いで職員全員に対して赤痢アメーバの生物学、アメーバ症の疫学、臨床面の講義を二度にわたって行い理解を得た。その上で糞便検査、ゲル内沈降反応(GDP)、ELISAによって嚢子の検出と血清疫学データの収集を行なった。その結果、糞便検査によって赤痢アメーバ嚢子が3名に検出され、ELISAで陽性者15名(約20%)が見出された。嚢子陽性者のうち1名はこの施設の職員であった。GDPの陽性者は6名で、全員がELISAも併せて陽性であった。この検査結果に基づいて3カ月後に更に糞便内でのアメーバの存在を確認するためperoxiredoxinに対するモノクロナル抗体を使用したサンドイッチELISA(後述)、やはりperoxiredoxin遺伝子の塩基配列に基づいて設計したプライマーを使用した糞便内のアメーバDNAの検出、及び米国Biosite社製のTriage Microparasite Panelを使用してアメーバ抗原の検出を試みた。その結果何れの方法でも3名の陽性者が検出された。この一連のデータに基づいて2カ月後にメトロニタゾールによる集団治療を行なった。まず施設入所者に対しては親権者あるいは家族に文書で状況を全て通知し、治療について説明し承諾を求めた。嚢子陽性の職員に関しては別途説明の上、治療について同意を得た。その他の職員に対してはやはり説明の上、希望者についてのみ治療を行なった。環境の整備などをも含むこの一連の対策は予備的なマニュアルとしてまとめた。治療後3カ月で評価を行なったが嚢子は検出できず、ELISA陽性率も1/2以下になったので、治療は一応成功したものと判定された。また別の知的障害者更正施設より以前分離したアメーバ株について種々の方法で判定した結果、対象となった障害者は無症状であるにもかかわらず、アメーバ株は全て*Entamoeba histolytica*である事が明らかになった。

(2) *Entamoeba dispar*の無菌培養系の作成

これまでの研究で*E. dispar*の培養に適したYIGADHA-S mediumを既に開発してあ

ったが、この培地で無菌培養は可能であったものの蛋白レベルの検討を可能とするほど増殖能率は良くなく、遺伝子レベルのデータとの対応を困難としていた。今年度の研究では種々のculture associateを体系的に検索した結果、ツククサなどの植物細胞が非常に良好な増殖促進作用を示す事が明らかになった。すなわちツククサをRPMI 1640を加えて磨り潰し、さらに同一の培養液を加えて植物細胞のsuspensionとした。これを遠沈して数回洗浄し、最終的にpelletの20倍量のRPMI 1640を加えてsuspendし、30分間音波破にかけた。この抽出液を15,000gで30分遠沈し、上清をフィルター滅菌して増殖促進効果を見た結果、当初添加した*E. dispar*5株は約 10^9 /mlであったのが、培開始後72時間で 10^5 /mlにまで増殖している事が明らかになった。有効成分はその後の精製実験などよりツククサ由来のフェレドキシンと考えられるに至っている 10^5 /mlと云う数は培養のスケールにもよるが、十二分に蛋白レベルの研究を可能とする。

(3) わが国のサル類におけるアメーバ感の実態の解明

赤痢アメーバはヒトだけでなく種々の動物にも感染し得るため、わが国でもヒトへの感染源として従来から関与が疑われていた。今回は京大霊長類研究所での調査では*E. histolytica*/*E. dispar*はマカク類のみに検出され、ニホンザルでは133頭中66%に感染が見られたが、その後の分離株の調査で全て*E. dispar*であるが判明した。また熊本霊長類パークではチンパンジー107頭のうち48%に*E. histolytica*/*E. dispar*の感染が確認されたがやはり全部が*E. dispar*であると判定された。以上よりわが国ではサル類には*E. histolytica*の感染は高頻度には起こらない事が推定された。

(4) 新規免疫診断法、遺伝子診断法の確

今年度は特にperoxiredoxinの検出をサンドイッチELISAによって行なう系の確を試みた。抗原補足にはperoxiredoxinに対するウサギのポリクローナル抗体を用い、検出にはperoxidaseを標識した*E. histolytica*のperoxiredoxinのモノクロナル抗体である4G6を使用して作成したこの系で抗原捕捉抗体と抗原検出抗体の

濃度について検討し、感度、特異性を決定した。その結果特異性は十分であると思われたが感度は*E. histolytica*栄養型虫体50個程度であり、現在更に感度をあげるべく改良を試みている。

遺伝子診断法の開発は主に*E. dispar*のperoxiredoxin遺伝子の塩基配列の多様性に基づいて現在検討中であるが、従来と異なって一組のプライマーで*E. histolytica*と*E. dispar*の鑑別が可能となるPCRの手法が確立されつつある。

遺伝子レベルでのサブポピュレーションの同定法の開発は現在後述するシステム合成系の遺伝子の塩基配列に基づいて行なう予定ため、準備段階にある。

(5) 新規薬剤開発の標的の探索に関する研究

この分野の検索は異なる幾つかのアプローチによって行なっている。まず他の原虫に対して作用することが知られている幾つかの化合物をテストした結果、ジニトロアニリン誘導体であるオリザリンに強い抗アメーバ作用がある事が明らかになった。すなわちこの化合物は100 μ Mの濃度で97%の増殖阻害効果を示した。またアメーバの伝播を考えるうえで嚢子形成が阻害できれば、それが大腸腔内で起こると思われる事から、極めて有効な薬剤となり得る事が期待される。今年度はオリザリンがモデルとして使用した*Entamoeba invadens*の試験管内での嚢子形成を阻害する事を見いだした。また嚢子形成の初期過程において強く発現される糖蛋白があり、それが恐らく嚢子壁の主成分であるキチンの合成酵素である事が推測された。このキチン合成酵素は今後化学療法の標的として有望なものの一つであろう。また今年度の研究で動物細胞にて初めて見いだされたシステム合成系のうちシステム合成酵素、セリンアセチル転移酵素の遺伝子をクローニングし、大腸菌を用いて組み替え蛋白としてこれらの酵素を産生させる事に成功した。ついでこれらの酵素の基質特異性、反応速度などの解析を行い、阻害剤開発の基礎データを得る事に成功した。特にシステム合成酵素が硫化水素のほか、種々の化合物を基質として利用できる事は重要と思われ、特にtriazole、pyrazole、isoxazoline-5-oneなどは今後の阻害剤開

発に際して有用なものと考えられた。

D. 考察

本研究は最近また増加傾向を示しつつある赤痢アメーバ症の実態解明と対策を確立するための基礎・応用研究を企図したものである。赤痢アメーバは特にハイリスクグループである男性同性愛者間には感染が広く拡がっており、HIV/AIDSとの関わりが注目される場所である。しかし本研究は主に知的障害者の更生施設を対象として検索を開始した。一般に知的障害者の収容施設では入所者を閉鎖環境においておらず、一部は外に作業に出かける者もある。このような施設で一旦赤痢アメーバの感染が拡がると長期間慢性感染のまま推移し、治療が困難になる事もある。今年度の調査では血清学的に20%もの高い陽性率が確認された事、あるいは職員にも感染が拡がり始めた事などより、入所者の集団治療および希望する職員の治療を施行したが、幸い抗体陽性者も明瞭な減少を示し、対策が効を奏したものと判断された。この間に衛生環境整備を中心とするマニュアルを作成し、それに従って寝具や入浴、食事に至るまできめ細かな対策を講じたことも感染抑圧につながったものであろう。今回の調査を通して問題として残ったのはインフォームドコンセントの取得に関連した事項であろう。このような施設の特性的のため入所者本人から取得するわけにゆかず、結局家族から取得せざるを得なくなるが、説明の際に家族が同時に施設に集まる事も出来ず、今後の更なる対応を必要としている事は明らかであろう。いわゆる施設内感染は今後のわが国でのアメーバ感染を考える際、同性愛者間の感染と並んで重視されるべきである。

診断・治療法の開発では今年度はperoxiredoxinを標的としたサンドイッチELISAを開発して評価した結果、信頼度は十分高いが、感度の点でやや改良が必要と思われた。遺伝子診断法の開発も進行している。

新規治療薬開発のための基礎・応用研究は嚢子形成機構との関係が今後注目される。これまでのアメーバ症の治療薬はアメーバの栄養型虫体を殺滅し、臨床症状を軽減させると云う方向のものが全て

であった。しかし赤痢アメーバが組織内に侵入して始めて症状が発現するため、治療薬の全ては組織内に特異的に分布する性質を有しており、腸管内のアメーバの殺滅能を有しているのはテロキサニドフロイトのみであった。このテロキサニドは従って腸管からあまり吸収されず、腸管内濃度が保たれるようになっている。しかしもし嚢子形成が効果的に阻害されている状況で、腸管内のアメーバを同時に殺滅できるのであれば伝播阻害は更に効果的に行なえる事となる。また今年度の研究で実施した治療薬の新しい標的の探求の一環として含硫黄アミノ酸、特にシステイン合成系の酵素について遺伝子のクローニングを行い、大腸菌に組み替え蛋白として発現させる事に成功した。この実験成果に基づいて、次年度以降阻害剤の探索を開始したい。

E. まとめ

わが国のアメーバ感染の実態を明らかにするため、まずこれまで本格的に調査の手が伸びず、従って福祉・厚生行政上問題視され得る知的障害者更正施設を対象として現状把握を試みた。モデルとして選定した更生施設の調査の結果、約20%に抗アメーバ抗体が確認され、感染が広がっている事が判明した。このデータに基づいて集団治療を行い、抗体陽性者の有意な減少を認めた。またモノクロナル抗体を利用したサンドイッチELISAによる抗原検出法を作成した。今後改良する余地はあるものの、実地に応用可能と思われた。新規化学療法剤開発のための研究では殺アメーバ作用をもつ化合物のスクリーニングと共に嚢子形成に影響する化合物の検索をも試みた。また動物細胞で初めて見いだされたシステイン合成系の酵素を組み替え蛋白質として得る事に成功し、今後の阻害剤探索を可能とした。

F. 健康危険情報

知的障害者更生施設の入所者などにはアメーバ感染が広がっている可能性が高い。まだ多数の施設において調査が実施されたわけではないが、施設内感染としてのアメーバ症は常に念頭に置いておく必要がある。周辺への感染の波及も懸念される。

G. 研究発表

1. 論文発表

Nozaki T, Asai T, Sanchez LB, Kobayashi S, Nakazawa M & Takeuchi T : Characterization of the gene encoding serine acetyltransferase, a regulatory enzyme of cysteine biosynthesis from the protist parasite Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar: Regulation and possible function of the cysteine biosynthetic pathway in Entamoeba. J Biol Chem, 1999, 274: 32445-32452.

Tachibana H, Cheng X-J, Watanabe K, Takekoshi M, Maeda F, Aotsuka S, Takeuchi T & Ihara S : Preparation of recombinant human monoclonal antibody Fab fragments specific for Entamoeba histolytica. Clin Diag Lab Immunol, 1999, 6: 383-387.

Makioka A, Kumagai M, Ohtomo H, Kobayashi S & Takeuchi T : DNA polymerase activity in encysting Entamoeba invadens. Parasitol Res, 1999, 85: 604-606.

Tachibana H & Cheng X-J : Entamoeba dispar: Cloning and characterization of peroxiredoxin genes. Exp Parasitol 2000, 94: 51-55.

Makioka A, Kumagai M, Ohtomo H, Kobayashi S & Takeuchi T : Appearance of a stage-specific immunodominant glycoprotein in encysting Entamoeba invadens. Parasitol Res, 2000, 86: 81-85.

Nozaki T, Tokoro M, Imada M, Saito Y, Abe Y, Shigeta Y & Takeuchi T : Cloning and biochemical characterization of genes encoding two isozymes of cysteine synthase from Entamoeba dispar. Mol Biochem Parasitol, 2000, 107: 129-133.

Tachibana H, Kobayashi S, Nagakura K, Kaneda Y & Takeuchi T : Asymptomatic cyst passers of Entamoeba histolytica but not Entamoeba dispar in institutions for the mentally retarded in Japan. *Parasitol Int*, 2000, 49: 31-35.

Makioka A, Kumagai M, Ohtomo H, Kobayashi S & Takeuchi T : Effect of dinitroaniline herbicides on the growth of Entamoeba histolytica. *J Parasitol*, 2000, in press

Makioka A, Kumagai M, Ohtomo H, Kobayashi S & Takeuchi T : Effect of cytochalasin D on the growth, encystation, and multinucleation of Entamoeba invadens. *Parasitol Res*, 2000, in press

Tachibana H, Cheng X-J, Kobayashi S, Fujita Y & Uono T : Entamoeba dispar, but not E. histolytica, detected in a colony of chimpanzees in Japan. *Parasitol Res*, 2000, in press

小林正規、竹内 勤 : 微生物 (感染症) 検査 : 赤痢アメーバ. 検査と技術、1999、27 (増刊) : 902-905.

竹内 勤 : 性感染症の治療学的展望 : 赤痢アメーバ. 化学療法の領域、1999、15(S-1) : 197-291.

竹内 勤 : 感染症の診断・治療のガイドライン : アメーバ赤痢. 日本医師会雑誌、1999、122 (臨時増刊) : 84-87.

田辺将信、小林正規、竹内 勤 : 赤痢アメーバ. 日本臨床、1999 (増) : 241-244.

2. 学会発表

Makioka A, Kumagaya M, Ohtomo H, Kobayashi S & Takeuchi T : Appearance of a stage-specific immunodominant glycoprotein in encysting Entamoeba invadens. 第68回日本寄生虫学会大会、1999年4月、栃木

Kobayashi S, Imai E, Haghigi A & Takeuchi T : Axenic cultivation of Entamoeba dispar and study on its virulence. 第68回日本寄生虫学会大会、1999年4月、栃木

Makioka A, Kumagaya M, Ohtomo H, Kobayashi S & Takeuchi T : Effect of antimicrotubule herbicides on the growth of Entamoeba histolytica. 第68回日本寄生虫学会大会、1999年4月、栃木

Nozaki T, Asai T, Kobayashi S, Nakazawa M & Takeuchi T : Regulation of cysteine biosynthesis in Entamoeba histolytica. 第68回日本寄生虫学会大会、1999年4月、栃木

Tachibana H, Cheng X-J, Kaneda Y & Ihara S : Preparation of a recombinant human monoclonal antibody Fab fragment recognizing a surface antigen of Entamoeba histolytica. 第68回日本寄生虫学会大会、1999年4月、栃木

Kaneda Y, Horiki N, Cheng X-J & Tachibana H : Serological analysis of asymptomatic individuals infected with Blastocystis hominis. 第68回日本寄生虫学会大会、1999年4月、栃木

野崎智義、繁田泰男、中沢 幹、竹内 勤 : 赤痢アメーバにおける細胞内輸送の解析. 第7回分子寄生虫学ワークショップ、1999年8月、群馬

牧岡朝夫、熊谷正広、大友弘士、小林正規、竹内 勤 : Entamoeba invadens のシスト形成時に出現する強い免疫原性を持つ糖蛋白についての検討. 第40回日本熱帯医学会大会、1999年9月、東京

牧岡朝夫、熊谷正広、大友弘士、小林正規、竹内 勤 : 赤痢アメーバの増殖に及ぼすジニトロアニリン除草剤の抑制効果. 第40回日本熱帯医学会大会、1999年9月、東京

南義伸子、小林正規、竹内 勤：赤痢アメーバの無菌的増殖に伴う培養上清中チオール(-SH)の量的変動について。第40回日本熱帯医学会大会、1999年9月、東京

Nozaki T, Asai T, Sanchez LB, Kobayashi S, Nakazawa M & Takeuchi T : Characterization of the gene encoding serine acetyltransferase, a regulatory enzyme of cysteine biosynthesis from the protist parasite Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar. 10th Molecular Parasitology Meeting, 1999年9月、米国

牧岡朝夫、熊谷正広、大友弘士、小林正規、竹内 勤： Entamoeba invadens のシスト形成時に出現する強い免疫原性を持つシスト特異的糖蛋白。第32回日本原生動物学会大会、1999年11月、宮城

牧岡朝夫、熊谷正広、大友弘士、小林正規、竹内 勤：赤痢アメーバの増殖に及ぼすジニトロアニリン除草剤の抑制効果。第32回日本原生動物学会大会、1999年11月、宮城

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

アメーバ症の実態の解明とアメーバの培養系の確立に関する研究

分担研究者 竹内 勤 ・ 慶應義塾大学医学部熱帯医学・寄生虫学教室教授

研究要旨 1) 知的障害者更正施設1施設をモデルケースとして赤痢アメーバ集団感染の実態調査を行った。その結果、職員1名を含む赤痢アメーバシスト陽性者3名、血清反応陽性者15名（陽性率約20%）がみられたため、直ちに治療を実施するとともに新たな感染を予防すべく実際の予防対策が検討された。その対策は直ちに実施に移され、数カ月後の評価では効果を挙げるとともにアメーバ症に対する施設側の理解も深まったものと判断された。本研究の結果は今後の同様の集団感染に対して適用可能と思われた。

2) 赤痢アメーバと鑑別の難しい非病原性の*Entamoeba dispar* 複数株の生物学的性状および virulence の比較検討には不可欠な無菌培養法の確立にはじめて成功した。

A. 研究目的

1) 現在知的障害者更正施設で深刻な問題となっている赤痢アメーバ集団感染の実態調査を行い、施設と共同してこの感染症に対する診断・治療・予防対策を実際に試みること、そしてその経験をマニュアル化し、他施設へ還元すること及び今後の厚生・福祉行政へ反映させることを目的とする。

2) 非病原性のアメーバである *Entamoeba dispar* が免疫不全状態の宿主で virulence を示し得るか否かを実験的に明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

1) (i)赤痢アメーバ施設内集団感染状況の詳細の把握：調査に理解の得られた施設をモデルケースとして施設と共同して実際の現場に即した赤痢アメーバ感染の予防対策を講じ、実践と改善を試みることにより有効な感染予防対

策方法を見いだす。(ii)診断・治療：早期診断・治療のための定期的検査の検討と実施。集団治療による施設内感染経路の遮断。(iii)治療効果の判定：定期的検査・診察（予後観察）(iv)再感染の予防：感染予防対策の日常的实施と新入所者の検査および定期的検査を依頼できる信頼性のある検査施設の確保。

2) (i)*E. dispar* の無菌培養法の確立：組織侵入能力がみられず腸内細菌に依存した従属栄養アメーバであることから無菌培養が困難であったが逆に細菌の供給する栄養を同定することで無菌培養法の可能性を検索した。(ii)*E. dispar* の virulence を *in vivo* の系で判定するための動物実験系の確立：免疫的背景の明らかな免疫不全のマウスでの腸管内感染系の確立を目指した。(iii)*E. dispar* の virulence の解析：免疫不全と *E. dispar* の virulence との関係、単一宿主内での赤痢アメーバとの共存の可能性等の解析を試みる。

(倫理面への配慮)

(1) Informed consent を入所者の場合は家族、施設職員の場合は本人より得ることを前提として調査・検査診断・治療を行う。予防対策についても指導ではなく施設主体の対策へ参加することを基本とする。

C. 研究結果

(1) (i)赤痢アメーバ施設内集団感染状況の詳細の把握：極めて協力的で調査期間を通してより高い信頼関係も成立した施設での感染状況の実態調査を行うことができた。施設に蔓延したアメーバ症の実態も集団感染の典型的なモデルケースとなりうるものであった。(ii)診断・治療：顕微鏡的検査、血清学的検査とともにサンドイッチELISA、PCR法の有用性についても検討した。その結果赤痢アメーバシスト陽性者3名、血清反応陽性者15名がアメーバ症として診断された。陽性者を対象として治療を加えたうえで、集団治療による感染源としてのアメーバの撲滅も試みた。(iii)治療効果の判定：赤痢アメーバシストの消失を第1の指標として治療効果を判定した。治療効果判定の信頼度を上げるためにイムノクロマト法に基づく抗原検出のための高感度キットを導入し結果の信頼度を高めた。ペア血清による治療前と後の抗体価の推移についても検討した。

(iv)再感染の予防：消毒・感染予防対策の徹底・アメーバ症に関する教育・定期検査の実施と新入所者の入所前検査の徹底など今回の調査により実際の予防対策の骨子がマニュアル化された。

(2) (i)*E. dispar*の無菌培養法の確立：*E. dispar*と増殖促進効果をもつ細

菌および昆虫の住血寄生原虫である *Crithidia fasciculata* の糖代謝の解析過程において *E. dispar* がこれら共棲細菌等の糖代謝物質を直接的に利用しているらしいことが理解されてきた。その結果ケト3炭糖であるジヒドロキシアセトンが無菌的条件下でも *E. dispar* の増殖を促進することを見だし、これを加えた新たな培地をデザインし1株の *E. dispar* の無菌培養に成功した。さらにアメーバのエネルギー代謝に不可欠なフェレドキシンに代表される鉄硫黄蛋白がやはり細菌から供給され増殖促進効果を示しているらしいことが推定され、実際植物の葉肉細胞のフェレドキシンを多量に含む抽出液が高い増殖促進効果を示したことから5株の *E. dispar* の安定した無菌培養も可能となった。(ii)*E. dispar* のvirulenceを *in vivo* の系で判定するための動物実験系の確立：正常なT-cell, B-cellの機能をもたないRag遺伝子ノックアウトマウス(BALB/c rag^{-/-})の盲腸腔内に短期間(3日間)ながら *E. dispar* を感染させることができた。

(iii)*E. dispar* のvirulenceの解析：*In vivo* のBALB/c rag^{-/-}系での病理組織学的な所見からは組織内でのアメーバの増殖は観察されなかった。

D. 考察

(1) 知的障害者更正施設での赤痢アメーバ集団感染対策の実態は感染予防の困難さひとつをみても極めて深刻であった。さらに施設職員とその家族の不安と施設周辺住民に与える社会的影響も極めて大きいことが改めて認識させられた。しかしながら施設の長と職員そして入所者およびその家族との

間に相互の理解と信頼関係があり、施設入所者の健康を管理する医師や看護婦そして専門家の協力が得られれば共同して最善の対策を講じることができるとも今回の調査で明らかとなった。

(2) アメーバ症は性病としての側面ももち特に男性ホモセクシュアル間での感染が我が国では主要な感染経路となっており、AIDS 患者での症例も多い。非病原性の *E. dispar* が免疫不全の AIDS 患者等で組織侵入能力を獲得した症例の報告はないが、*in vitro* の系では virulence が認められており、実験動物では細菌共棲下で *E. dispar* が肝臓内で増殖しアメーバ主導の膿瘍を形成する例もあることから極度の免疫不全に陥った場合にはヒト *E. dispar* 症例においても組織内増殖を伴う有症例をみる可能性は十分に考えられる。

E. 結論

(1) 我が国の知的障害者更正施設における赤痢アメーバ集団感染の実態は極めて深刻で、その予防対策の困難さに加え治療のための感染者の家族への十分な説明を行い informed consent を得ること、及び職員とその家族がアメーバ症に対する正しい知識を得ること、そして施設周辺住民への慎重な対応を試みることなど、ひとつひとつの対応が大きな社会問題ともなりかねない不安定要素を含み、早急な国の厚生行政レベルでの指導要綱の作成と検査機関の養成が望まれた。

(2) *E. dispar* は非病原性のアメーバであるが極度に免疫力の低下した宿主では virulence が高まる可能性は十分にあり、新たな新興感染症ともなりかねない。今回 *E. dispar* の無菌培養法を

確立し得たことははじめて *E. dispar* がもつ本来の virulence を理解する上での出発点に到達したものと考えられ、赤痢アメーバと対比させることで今後種々の情報が得られることが期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Makioka A, Kumagai M, Ohtomo H, Kobayashi S, Takeuchi T. DNA polymerase activity in encysting *Entamoeba invadens*. Parasitol. Res. 1999; 85(7): 604-606.

2) 小林 正規、竹内 勤. 5. 微生物 (感染症) 検査 2) 免疫学的検査 d) 原虫感染症 赤痢アメーバ. 検査と技術 (増刊号). 1999; 27(7): 902-905.

3) Makioka A, Kumagai M, Ohtomo H, Kobayashi S, Takeuchi T. Appearance of a stage-specific immunodominant glycoprotein in encysting *Entamoeba invadens*. Parasitol. Res. 2000; 86(1): 81-85.

4) Tachibana H, Kobayashi S, Nagakura K, Kaneda Y, Takeuchi T. Asymptomatic cyst passers of *Entamoeba histolytica* but not *Entamoeba dispar* in institutions for the mentally retarded in Japan. Parasitol. Int. 2000; 49: 31-35.

2. 学会発表

- 1) 牧岡 朝夫、熊谷 正広、大友 弘士、小林 正規、竹内 勤.
Appearance of a stage-specific immunodominant DNA polymerase activity in encysting *Entamoeba invadens*. 第68回日本寄生虫学会大会. 1999; 4.
- 2) 牧岡 朝夫、熊谷 正広、大友 弘士、小林 正規、竹内 勤.
Effect of antimicrotubule herbicides on the growth of *Entamoeba histolytica*. 第68回日本寄生虫学会大会. 1999; 4.
- 3) 小林 正規、今井 栄子、Haghighi Ali, 竹内 勤. Axenic cultivation of *Entamoeba dispar* and study on its virulence. 第68回日本寄生虫学会大会. 1999; 4.
- 4) 牧岡 朝夫、熊谷 正広、大友 弘士、小林 正規、竹内 勤.
Entamoeba invadens のシスト形成時に出現する強い免疫原生を持つシスト特異的蛋白質. 第40回日本熱帯医学会大会. 1999; 9.
- 5) 牧岡 朝夫、熊谷 正広、大友 弘士、小林 正規、竹内 勤. 赤痢アメーバの増殖に及ぼすジニトロアニリン除草剤の抑制効果. 第40回日本熱帯医学会大会. 1999; 9.
- 6) 南義 伸子、小林 正規、竹内 勤. 赤痢アメーバの無菌的増殖に伴う培養上清中チオール(-SH)の量的変動について. 第40回日本熱帯医学会大会. 1999; 9.
- 7) 牧岡 朝夫、熊谷 正広、大友 弘士、小林 正規、竹内 勤.
Entamoeba invadens のシスト形成時に出現する強い免疫原生を持つシスト特異的蛋白質. 第32回日本原生動物学会大会. 1999; 11.
- 8) 牧岡 朝夫、熊谷 正広、大友 弘士、小林 正規、竹内 勤. 赤痢アメーバの増殖に及ぼすジニトロアニリン除草剤の抑制効果. 第32回日本原生動物学会大会. 1999; 11.

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

アメーバ症の実態の解明とアメーバの培養系の確立に関する研究

分担研究者 竹内 勤 慶應義塾大学医学部熱帯医学・寄生虫学教室教授

研究要旨 1) 知的障害者更正施設1施設をモデルケースとして赤痢アメーバ集団感染の実態調査を行った。その結果、職員1名を含む赤痢アメーバシスト陽性者3名、血清反応陽性者15名（陽性率約20%）がみられたため、直ちに治療を実施するとともに新たな感染を予防すべく実際の予防対策が検討された。その対策は直ちに実施に移され、数カ月後の評価では効果を挙げるとともにアメーバ症に対する施設側の理解も深まったものと判断された。本研究の結果は今後の同様の集団感染に対して適用可能と思われた。

2) 赤痢アメーバと鑑別の難しい非病原性の*Entamoeba dispar* 複数株の生物学的性状およびvirulenceの比較検討には不可欠な無菌培養法の確立にはじめて成功した。

A. 研究目的

1) 現在知的障害者更正施設で深刻な問題となっている赤痢アメーバ集団感染の実態調査を行い、施設と共同してこの感染症に対する診断・治療・予防対策を実際に試みることで、そしてその経験をマニュアル化し、他施設へ還元すること及び今後の厚生・福祉行政へ反映させることを目的とする。

2) 非病原性のアメーバである*Entamoeba dispar*が免疫不全状態の宿主でvirulenceを示し得るか否かを実験的に明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

1) (i)赤痢アメーバ施設内集団感染状況の詳細の把握：調査に理解の得られた施設をモデルケースとして施設と共同して実際の現場に即した赤痢アメーバ感染の予防対策を講じ、実践と改善を試みることでより有効な感染予防対

策方法を見いだす。(ii)診断・治療：早期診断・治療のための定期的検査の検討と実施。集団治療による施設内感染経路の遮断。(iii)治療効果の判定：定期的検査・診察（予後観察）(iv)再感染の予防：感染予防対策の日常的实施と新入所者の検査および定期的検査を依頼できる信頼性のある検査施設の確保。

2) (i)*E. dispar*の無菌培養法の確立：組織侵入能力がみられず腸内細菌に依存した従属栄養アメーバであることから無菌培養が困難であったが逆に細菌の供給する栄養を同定することで無菌培養法の可能性を検索した。(ii)*E. dispar*のvirulenceを*in vivo*の系で判定するための動物実験系の確立：免疫的背景の明らかな免疫不全のマウスでの腸管内感染系の確立を目指した。(iii)*E. dispar*のvirulenceの解析：免疫不全と*E. dispar*のvirulenceとの関係、単一宿主内での赤痢アメーバとの共存の可能性等の解析を試みる。

(倫理面への配慮)

(1) Informed consent を入所者の場合は家族、施設職員の場合は本人より得ることを前提として調査・検査診断・治療を行う。予防対策についても指導ではなく施設主体の対策へ参加することを基本とする。

C. 研究結果

(1) (i)赤痢アメーバ施設内集団感染状況の詳細の把握：極めて協力的で調査期間を通してより高い信頼関係も成立した施設での感染状況の実態調査を行うことができた。施設に蔓延したアメーバ症の実態も集団感染の典型的なモデルケースとなりうるものであった。(ii)診断・治療：顕微鏡的検査、血清学的検査とともにサンドイッチELISA、PCR法の有用性についても検討した。その結果赤痢アメーバシスト陽性者3名、血清反応陽性者15名がアメーバ症として診断された。陽性者を対象として治療を加えたうえで、集団治療による感染源としてのアメーバの撲滅も試みた。(iii)治療効果の判定：赤痢アメーバシストの消失を第1の指標として治療効果を判定した。治療効果判定の信頼度を上げるためにイムノクロマト法に基づく抗原検出のための高感度キットを導入し結果の信頼度を高めた。ペア血清による治療前と後の抗体価の推移についても検討した。

(iv)再感染の予防：消毒・感染予防対策の徹底・アメーバ症に関する教育・定期検査の実施と新入所者の入所前検査の徹底など今回の調査により実際の予防対策の骨子がマニュアル化された。

(2) (i)*E. dispar*の無菌培養法の確立：*E. dispar*と増殖促進効果をもつ細

菌および昆虫の住血寄生原虫である *Crithidia fasciculata* の糖代謝の解析過程において *E. dispar* がこれら共棲細菌等の糖代謝物質を直接的に利用しているらしいことが理解されてきた。その結果ケト3炭糖であるジヒドロキシアセトンが無菌的条件下でも *E. dispar* の増殖を促進することを見だし、これを加えた新たな培地をデザインし1株の *E. dispar* の無菌培養に成功した。さらにアメーバのエネルギー代謝に不可欠なフェレドキシンに代表される鉄硫黄蛋白がやはり細菌から供給され増殖促進効果を示しているらしいことが推定され、実際植物の葉肉細胞のフェレドキシンを多量に含む抽出液が高い増殖促進効果を示したことから5株の *E. dispar* の安定した無菌培養も可能となった。(ii)*E. dispar* の virulence を *in vivo* の系で判定するための動物実験系の確立：正常な T-cell, B-cell の機能をもたない Rag 遺伝子ノックアウトマウス (BALB/c rag^{-/-}) の盲腸腔内に短期間 (3日間) ながら *E. dispar* を感染させることができた。

(iii)*E. dispar* の virulence の解析：*In vivo* の BALB/c rag^{-/-} 系での病理組織学的な所見からは組織内でのアメーバの増殖は観察されなかった。

D. 考察

(1) 知的障害者更正施設での赤痢アメーバ集団感染対策の実態は感染予防の困難さひとつをみても極めて深刻であった。さらに施設職員とその家族の不安と施設周辺住民に与える社会的影響も極めて大きいことが改めて認識させられた。しかしながら施設の長と職員そして入所者およびその家族との

間に相互の理解と信頼関係があり、施設入所者の健康を管理する医師や看護婦そして専門家の協力が得られれば共同して最善の対策を講じることができるとも今回の調査で明らかとなった。

(2) アメーバ症は性病としての側面ももち特に男性ホモセクシュアル間での感染が我が国では主要な感染経路となっており、AIDS患者での症例も多い。非病原性の*E. dispar*が免疫不全のAIDS患者等で組織侵入能力を獲得した症例の報告はないが、*in vitro*の系ではvirulenceが認められており、実験動物では細菌共棲下で*E. dispar*が肝臓内で増殖しアメーバ主導の膿瘍を形成する例もあることから極度の免疫不全に陥った場合にはヒト*E. dispar*症例においても組織内増殖を伴う有症例をみる可能性は十分に考えられる。

E. 結論

(1) 我が国の知的障害者更正施設における赤痢アメーバ集団感染の実態は極めて深刻で、その予防対策の困難さに加え治療のための感染者の家族への十分な説明を行いinformed consentを得ること、及び職員とその家族がアメーバ症に対する正しい知識を得ること、そして施設周辺住民への慎重な対応を試みることなど、ひとつひとつの対応が大きな社会問題ともなりかねない不安定要素を含み、早急な国の厚生行政レベルでの指導要綱の作成と検査機関の養成が望まれた。

(2) *E. dispar*は非病原性のアメーバであるが極度に免疫力の低下した宿主ではvirulenceが高まる可能性は十分にあり、新たな新興感染症ともなりかねない。今回*E. dispar*の無菌培養法を

確立し得たことははじめて*E. dispar*がもつ本来のvirulenceを理解する上での出発点に到達したものと考えられ、赤痢アメーバと対比させることで今後種々の情報が得られることが期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Makioka A, Kumagai M, Ohtomo H, Kobayashi S, Takeuchi T. DNA polymerase activity in encysting *Entamoeba invadens*. Parasitol. Res. 1999; 85(7): 604-606.

2) 小林 正規、竹内 勤. 5. 微生物(感染症)検査 2) 免疫学的検査 d) 原虫感染症 赤痢アメーバ. 検査と技術(増刊号). 1999; 27(7): 902-905.

3) Makioka A, Kumagai M, Ohtomo H, Kobayashi S, Takeuchi T. Appearance of a stage-specific immunodominant glycoprotein in encysting *Entamoeba invadens*. Parasitol. Res. 2000; 86(1): 81-85.

4) Tachibana H, Kobayashi S, Nagakura K, Kaneda Y, Takeuchi T. Asymptomatic cyst passers of *Entamoeba histolytica* but not *Entamoeba dispar* in institutions for the mentally retarded in Japan. Parasitol. Int. 2000; 49: 31-35.

2. 学会発表

- 1) 牧岡 朝夫、熊谷 正広、大友 弘士、小林 正規、竹内 勤.
Appearance of a stage-specific immunodominant DNA polymerase activity in encysting *Entamoeba invadens*. 第68回日本寄生虫学会大会. 1999; 4.
- 2) 牧岡 朝夫、熊谷 正広、大友 弘士、小林 正規、竹内 勤.
Effect of antimicrotuble herbicides on the growth of *Entamoeba histolytica*. 第68回日本寄生虫学会大会. 1999; 4.
- 3) 小林 正規、今井 栄子、Haghighi Ali, 竹内 勤. Axenic cultivation of *Entamoeba dispar* and study on its virulence. 第68回日本寄生虫学会大会. 1999; 4.
- 4) 牧岡 朝夫、熊谷 正広、大友 弘士、小林 正規、竹内 勤.
Entamoeba invadens のシスト形成時に出現する強い免疫原生を持つシスト特異的蛋白質. 第40回日本熱帯医学会大会. 1999; 9.
- 5) 牧岡 朝夫、熊谷 正広、大友 弘士、小林 正規、竹内 勤. 赤痢アメーバの増殖に及ぼすジニトロアニリン除草剤の抑制効果. 第40回日本熱帯医学会大会. 1999; 9.

- 6) 南義 伸子、小林 正規、竹内 勤. 赤痢アメーバの無菌的増殖に伴う培養上清中チオール(-SH)の量的変動について. 第40回日本熱帯医学会大会. 1999; 9.
- 7) 牧岡 朝夫、熊谷 正広、大友 弘士、小林 正規、竹内 勤.
Entamoeba invadens のシスト形成時に出現する強い免疫原生を持つシスト特異的蛋白質. 第32回日本原生動物学会大会. 1999; 11.
- 8) 牧岡 朝夫、熊谷 正広、大友 弘士、小林 正規、竹内 勤. 赤痢アメーバの増殖に及ぼすジニトロアニリン除草剤の抑制効果. 第32回日本原生動物学会大会. 1999; 11.

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

アメーバ症の新規免疫診断法の開発と応用

分担研究者 橘 裕司 東海大学医学部助教授

研究要旨 従来形態的に赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) と同定されていたものには病原性のない *Entamoeba dispar* が含まれているため、赤痢アメーバ症の実態解明には、まず両者の鑑別に基づいた調査が必要である。そこで、神奈川県知的障害者施設で単離した50株について、ザイモデーム分析、モノクローナル抗体による抗原性解析、PCRによる遺伝子型解析を行った。その結果、全株が無症状の嚢子排出者から単離されたにもかかわらず、*E. histolytica* であることが判明した。また、赤痢アメーバ症は人獣共通感染症であり、特に霊長類における感染はヒトへの感染源として重要である。そこで、国内で飼育されているサル類における腸管寄生アメーバの調査を行った。ニホンザルなどのマカク類やチンパンジーでは高率に *E. dispar* が検出されたが、*E. histolytica* は認められず、わが国のヒトにおける *E. histolytica* 分布の特殊性が確認された。また、赤痢アメーバ症に特異的な新規免疫診断法を確立するため、*E. histolytica* のペルオキシレドキシンを標的とした抗原検出系について検討した。サンドイッチELISA法によって、*E. histolytica* を特異的かつ高感度に検出できることが明らかになった。

A. 研究目的

わが国では最近、赤痢アメーバ症が益々増加傾向にある。特に、海外渡航歴のない男性同性愛者や知的障害者施設入所者における患者発生が注目されている。しかし、わが国における赤痢アメーバ感染の実態は十分に解明されていない。赤痢アメーバの感染者は全世界で5億人と推定されていたが、嚢子の形態から赤痢アメーバと同定されてきたものには、病原性の *Entamoeba histolytica* と非病原性の *E. dispar* が存在することが明らかになり、*E. histolytica* による感染が赤痢アメーバ症で、*E. dispar* 感染のみの場合には治療の必要がないと考えられるようになった。従って、*E. histolytica* による感染者数の把握が求められている。しかし、*E. histolytica* 感染でも必ずしも発症するとは限らず、逆に、消化器症状を呈する患者から検出されたからといって、*E. histolytica* であると断定することもできない。*E. histolytica* 感染か *E. dispar* 感

染かの鑑別は虫体の生物学的性状に基づいて行われる必要がある。

我々はこれまでに、*E. histolytica* と *E. dispar* の鑑別に応用できるようなモノクローナル抗体の作製やDNA診断法の開発に取り組んできた。本研究では、これらの方法を応用して、わが国に分布するアメーバの種を明らかにする。特に、これまでに知的障害者施設で無症状の嚢子排出者から分離してきた株について解析を行う。また、赤痢アメーバ症は人獣共通感染症であり、ヒト以外の霊長類における感染は、ヒトへの感染源としても重要であると考えられる。そこで、わが国に広く分布するニホンザルについて、感染しているアメーバ種を明らかにする。また、比較のために外国由来のサル類におけるアメーバの感染状況を調査する。これらの解析によって、わが国における赤痢アメーバ感染の実態が明らかになり、今後の対策を確立する上で重要な手がかりが得られると考える。また、赤痢

アメーバ症に特異的で簡便な診断法の開発が必要であることから、ペルオキシレドキシンを標的とした抗原検出系について検討する。

B. 研究方法

神奈川県内の知的障害者のための3施設で、これまでに単離した*E. histolytica*/*E. dispar*50株と感染者の血清を解析に用いた。虫体はロビンソン培地による便培養から分離された。ザイモデーム分析はSargeantの方法で行った。ホルマリン固定した虫体に対するモノクローナル抗体の反応は間接蛍光抗体法によって調べた。使用したモノクローナル抗体は、4G6 (*E. histolytica*特異的)、ED17 (*E. dispar*特異的)、3F7 (*E. histolytica*/*E. dispar*特異的)である。また、DNAを抽出し、プライマーp11とp12 (*E. histolytica*特異的)、p13とp14 (*E. dispar*特異的)を用いてPCRを行った。血清の抗赤痢アメーバ抗体価は間接蛍光抗体法によって調べた。

京都大学霊長類研究所で飼育されている20種のサル類268頭と、三和化学研究所熊本霊長類パークで飼育されているチンパンジー107頭について、ホルマリン・エーテル法による検便を行うとともに、その沈査からDNAの抽出を行った。培養、ザイモデーム分析、モノクローナル抗体の反応性、PCR、血清抗体検査は上述の方法に準じて行った。

*E. histolytica*ペルオキシレドキシンの検出は、サンドイッチELISAによって行った。抗原捕捉にウサギのポリクローナル抗体を用い、抗原検出にペルオキシダーゼ標識4G6を用いた。

(倫理面への配慮)

知的障害者施設における検便と抗体検査は、インフォームド・コンセントのもと入所者家族と施設からの依頼によって行われた。

C. 研究結果

1. 知的障害者施設で単離された株の解析
ザイモデーム分析の結果、解析された27株

はすべてZ-IIに分類された。モノクローナル抗体との反応性では、50株すべてが4G6と3F7に反応し、ED17とは反応しなかった。また、PCRではプライマーp11とp12により、全株で100塩基対の増幅産物が認められたが、p13とp14では増幅産物は認められなかった。以上の結果から、50株はすべてが*E. histolytica*であり、*E. dispar*の混合感染は存在しないことが明らかになった。また、50名のうち38名では、虫体を排出した時点、あるいは3～6カ月後に行われた再検査において抗体陽性であることが確認された。2回の検査結果が得られた27名中、いずれも抗体陰性だったのは3名のみであった。

2. サル類における *E. histolytica*/*E. dispar*感染の検索

i) 京都大学霊長類研究所で飼育されているサル類268頭において、*E. histolytica*/*E. dispar*は53%において検出され、大腸アメーバ(34%)、ハルトマンアメーバ(34%)、ヨードアメーバ(25%)、小形アメーバ(8%)などと比べて高率であった。*E. histolytica*/*E. dispar*はすべてマカク類において検出され、ニホンザルでは133頭中88頭(66%)で検出された。PCRによる解析では、141検体中137検体で*E. dispar*DNAが検出されたが、*E. histolytica*は検出されなかった。培養で得られた8株の解析でも、ザイモデーム分析とモノクローナル抗体の反応性によって*E. dispar*であることが確認された。血清が得られた93例中3例だけが抗体陽性であったが、抗体価は低く、偽陽性である可能性が高かった。

ii) 三和化学研究所熊本霊長類パークで飼育されているチンパンジー107頭の検便において、*E. histolytica*/*E. dispar*は48%から検出された。これは大腸アメーバ(88%)について多く、ハルトマンアメーバ(15%)、ヨードアメーバ(8%)、小形アメーバ(4%)などよりも高い感染率であった。PCRにより、検便で検出された51例の*E.*

histolytica/*E. dispar*はすべて*E. dispar*であることが判明した。また、検便で*E. histolytica*/*E. dispar*陰性で他種アメーバ陽性のうち、9検体から*E. dispar*DNAが検出された。しかし、*E. histolytica*DNAはいずれの検体からも検出されなかった。また、培養で得られた10株のザイモデーム分析の結果も、虫体が*E. dispar*であることを示していた。血清が得られた104例中、間接蛍光抗体法で1例だけが抗体陽性と判定された。

3. 診断のためのペルオキシレドキシシン検出系の開発

抗原捕捉抗体と抗原検出抗体の濃度について検討し、適切な条件を設定した。その結果、ELISAプレート1穴あたり栄養型虫体50個に相当する*E. histolytica*抗原でも検出可能であった。これに対して、*E. dispar*では10⁴個相当の抗原が存在しても陽性反応は認められず、*E. histolytica*に対する高い特異性が示された。また、肝臓瘍液や嚢子陽性の糞便などの臨床検体について予備的な検討を行ったところ、PCRの結果と相関性が認められた。

D. 考察

*E. histolytica*に感染しても必ずしも発症するとは限らず、無症状の嚢子排出者となる場合がある。50名の嚢子排出者において、解析された虫体が検出された時点で、明らかな症状を認めたケースはなかった。嚢子は感染源となるため、集団発生を防ぐには定期的に検便を行うことが重要であり、更に*E. histolytica*/*E. dispar*の鑑別も必要となる。50名中少なくとも38名では抗赤痢アメーバ抗体が検出されたことから、嚢子排出者においても抗体検査は診断上有効であると思われる。しかし、3名では抗体陰性であったことから、虫体自体の解析がより重要であるといえる。50株という比較的多数の単離株がすべて*E. histolytica*であり、最近、他県の知的障害者施設で単離されたアメーバ数株についても*E. histolytica*であることを確認しており、

わが国の知的障害者施設には、*E. dispar*でなく*E. histolytica*が分布していると考えられる。わが国では男性同性愛者において検出される虫体も、主任研究者らの従来の研究から*E. histolytica*であることが知られており、わが国では*E. histolytica*が広く分布していると思われた。これらのコミュニティのアメーバの由来や関係を明らかにするために、今後は株間のサブタイプの違いを解明していく必要があると考えられる。

また、今年度の研究において、マカク類やチンパンジーに高率に*E. dispar*感染が認められ、*E. histolytica*は検出されなかった。特にニホンザルは本州各地のコロニーに由来しており、わが国のサルには*E. dispar*が広く分布していると考えられる。このことはニホンザルのアメーバがヒトへの感染源となっている可能性は低いことを示唆している。

今回、*E. histolytica*と*E. dispar*の鑑別は、培養によって単離した栄養型やホルマリン・エーテル法によって集めた嚢子を、更にPCRなどで解析することによって行った。今後は、一般の検査施設で簡便に*E. histolytica*の検出を行えるような方法を確立することが必要であり、赤痢アメーバのペルオキシレドキシシンを標的とした抗原検出系は、その候補になりうると思われる。

E. 結論

わが国の知的障害者施設で嚢子排出者から単離されたアメーバは*E. histolytica*であった。一方、ニホンザルやアフリカ由来のチンパンジーでは高率に*E. dispar*感染を認めた。*E. histolytica*の検出に、ペルオキシレドキシシンを標的とした抗原検出系は有効である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Tachibana, H., Cheng, X.-J.,