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 12 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 13 年 4 月

目　　次

1．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

2．分担研究報告

アメーバ症の実態の解明と対策確立に関する研究、及び諸診断法の応用に関する研究 . . 11

竹内　勤

アメーバ症の新規免疫診断法の開発と応用 17

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確立および遺伝子診断法の作成についての研究 25

野崎智義

3．研究成果の刊行に関する一覧表 30

4．研究成果の刊行物・別冊 33

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
本研究では1980年以来増加傾向にあり、また近年のいわゆる感染症新法施行以来改めて届け出で数が増加している赤痢アメーバ症のわが国における実態の解明のため、ハイリスクグループのうち種々の理由で知的障害者更正施設を含む、施設内のアメーバ感染に主な焦点をあてて疫学調査を実施し、このような施設内感染制圧に関する指針作成を行う。更に対策確立に資するため、診断・治療にかかわる新技術を開発しようと試みる。以上の目的に従って研究を展開し、今年度は下記の結果を得た。まず異なる4施設(5グループ)の入所者391名、職員118名を調査した結果、ELISAにて入所者116名、職員の11名が陽性と判定された。陽性率の高い施設では50%以上が陽性と判定されている。この事よりわが国ではアメーバの施設内感染は広範囲に拡がっており、今後の衛生行政上重要と思われた。一部施設においてはメトロニダゾールによる集団治療と包括的な衛生対策を実施し、抑圧に成功した。この経験は本研究事業の他研究班と共同でガイドラインとして纏められた。Ent-amoeba histolytica/E. disparの鑑別に必要なE. disparの無菌培養系の作成は昨年度の研究で植物細胞のフェレドキシン含む分画の増殖促進活性を検出したが、今年度は精製したフェレドキシンを使用し、これを超音波処理し生理活性を失わせた標品が有効である事を見いだした。またE. histolyticaに近縁のE. moshkovskiiのperxoiredoxin遺伝子のクローニングと性状解析を行い、遺伝子レベルでの鑑別方法を確立した。更にE. histoly-ticaの150-kDa 及び170-kDa表面レクチンで免疫したハムスターでは実験的肝膿瘍形成が抑制される事を見いだした。今後のワクチン開発の候補としてこれらの物質が有望であるものと思われた。また新規化学療法剤開発のためE. histolyticaの増殖阻害剤の探索とE. invadensをモデルとして嚢子形成機序の解明と阻害剤探索を試みた。その結果アクチン重合促進安定化作用を持つJasplakinolideあるいはPKC阻害剤などが栄養型の強い増殖阻害を示すのみならず、嚢子形成をも阻害する事が明らかになった。また同様の目的をもってアメーバに特異的に存在するメチオニン・システイン合成系の解析を行い、組み替え酵素の特質などを明らかにした。更に異なる遺伝子座を標的としたPCR手法を開発しE. histo-lyticaのサブポピュレーション同定の手法をも確立した。

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助教授
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各種施設入所者であり、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、すなわちEntamoeba histo-lytica、E. disparに分けられたため、各々に対する臨床的対応、診断など、

②

あるいは疫学的側面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に関連した事項のうち施設内感染は重要で、わが国の福祉・衛生行政面で提起している問題は大きい。以上より本研究においては、①種々のハイリスク集団、すなわち諸種施設における施設内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、及びガイドライン作成を行なうこと。②合わせて無菌培養系の確立を通して診断法確立とE. disparのvirulenceの有無の確定に資すること。③E. histolytica、E. disparの種の同定法、サブポピュレーションの同定法の改良・開発を行い、迅速化を計ったうえで個々の症例への対応のプロトコール作成及び疫学調査に応用すること。④アメーバ表面レクチンのワクチンとしての評価を行なうこと。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。しかしこれまでの研究によれば、想像以上にわが国の知的障害者の更正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事、さらにはこのような所見に基づいて施設内アメーバ感染の対処方針の策定を早急に試みる事とした。調査対象を施設内アメーバ感染に絞り込んだが、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諸種施設におけるアメーバ感染抑圧の途を開く事を重視する。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：これまでの成果に基づいてハイ リスク集団のうちから各種施設におけるアメーバ感染を主対象として実態調査を継続実施した。調査方法は糞便検査、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。また新しく集団感染が疑われる施設がかなり多いと云う疫学的な状況に鑑み、施設となる調査の拡充をも積極的に行い、比較検討する事により、より一層実態を明らかにしようと試みた。これらのデータはガイドラインとして福祉・衛生行政に還元する事も行なった。

(2)アメーバの免疫学的・遺伝学的同定法の開発と応用：今年度は従来より本研究班にてアメーバの同定法の開発の標的としてきたperoxiredoxin遺伝子を取り上げ、E. histolyticaに近縁のE. moshkovskiiにおける当該遺伝子のクローニングを行なった。まずcDNAライブラリーを作成した。E. histoltyicaのperoxiredoxin遺伝子の塩基配列に基づいて作成したプライマー用い、E. moshokovskiiゲノムDNAを増幅し、得られた325bpのDNA断片をプローブとしてcDNAをスクリーニングした。そして最長のインサートを含むクローンをサブクローニングして、塩基配列を決定した。不完全長の5'末端は5'-RACEによって伸長した。クローニングした遺伝子は発現ベクターに組み込んで大腸菌に導入し、組み替え蛋白を作成し、その性質を調べた。

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、昨年はTriage Microparasite Panel (Biosite社、USA)を調べたが、単価の点などで少しく問題があったので、今年度はTech LabのE. histolytica kit IIをテストした。このキットはE. histolyticaのadhesinを定量するものであり、地域によってはかなり使用されている。

諸種の診断法の作成のためE. disparの無菌培養系は昨年度開発したYIGADHA-S mediumと植物由来のフェレドキシンに富む分画との組合せを更に検討し、最適な培養系の開発を試みた。使用したE. dispar株はSAW1734cloneAR, AS21R, AS161R, CYN0009:TPC, CYN016:TPCの5株である。フェレドキシンの精製はツユクサ、サクラの葉肉細胞から、及びE. histolytica栄養型虫体から行なった。方法は何れも基本的にはMayhew (1971)の方法に従った。フェレドキシンの生理活性の測定はBuchanan and Arnon (1971)の方法に従い、分光学的に行なった。

(3)アメーバのレクチンのワクチンとしての可能性の検討：イムノクロマト法によって精 製した150-kDaおよび170-kDa表面蛋白10μgを、Freundのアジュバントと共にハムスターの腹腔内に2週間隔で3回接種した。また精製分画に混在する可能性がある260-kDaレクチンの影響を除くため更にSDS-PAGEを行い、目的とするバンドを切り出して免疫に用いた。この最終免疫の1週間後の血清がアメーバの標的細胞接着を阻害するかどうかを検討し、更に最終免疫から20日後に栄養型虫体を肝に注射して肝膿瘍形成の有無をみた。

(4)サブポピュレーション特定化の方法の開発：4種類の異なるプライマーを使用してPCRによるタイピングの方法を開発した。使用したプライマーは；R1, 5'CTGGTTAGTATCTTCGCCTGT3'、R2, 5'CTTACACCCCCATTAACAAT3'、R5, 5'CTAAAGCCCCCTTCTTCTAT3'、R6, 5'GTGCTAATAACGCCAGGGTC3'である。DNAは細菌共棲株あるいは無菌培養株からQIAamp Mini Stool DNA kitを用いて抽出した。

(4)新規薬剤の開発研究：アメーバに特異的に存在するメチオニン・システイン合成系の性格を明らかにし、阻害剤の探索を大腸菌に発現させた組替え蛋白を使用して行い、その結果を培養系に応用する事を試みた。また嚢子形成にかかわる代謝系を阻害剤使用によって明らかにし薬剤の標的になるかどうかの可能性を探った。

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これまでと同様特別の注意を払った。特に被収容者の家族には説明を十分に行なったが、それ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た。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可能なかぎり作った。申請者らこれまでに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。当該施設にガイドラインや倫理委員会が存在する場合には、それらをクリアーして後に調査を開始する事としている。動物実験に関してはそれぞれが所属する施設の動物実験委員会の指針にのっとって行なわれた。

C．研究結果

(1)ハイリスク集団におけるアメーバ感

染の実態調査
ELISAによる血清学的検索では延べ5施設の入所者391名中106名(27.1%)に抗体が検出され た。施設ごとの抗体陽性者の分布は11.5~53.5%にわたった。このうち糞便検査を実施した183名のうち18名(9.8%)にアメーバの嚢子が検出された。施設ごとの陽性率は0~16.7%に分布し、同時に行なった抗原検出法(E. histolytica II kit)では121名中23名(19.0%)が陽性と判定され、施設間では0~25%に分布した。この二種の検査を合わせると糞便内のアメーバ陽性者は0~34.2%に分布した。施設職員も一部検索の対象としたが、血清学的に9.3%の陽性率が見いだされた。これらの結果はわが国では施設内感染症としてE. histolyticaが広範に拡がっており、施設職員も感染の危険がある事を示している。今回の結果で糞便検査とE. histolytica II kitとを比較するのはまだ早すぎるかもしれないが、これまで海外の調査で知られている通り、糞便検査より感度は優れているものと推測できた。一部の施設では制圧の一環としてメトロニダゾールでの集団治療を2クールにわたって行なったが、有効であることが判明した。また昨年度より継続調査の対象となっている施設での疫学調査・集団治療・衛生対策の結果に基づいて、CDCの種々のガイドラインを参考として施設内アメーバ感染制圧のためのガイドラインを新興・再興感染症研究事業の他の研究班と共同で作成した。これは今後出版される予定となっている。

(2)アメーバの免疫学的、遺伝学的な同定法の開発と応用

今年度はE. histolyticaに近縁のE. moshkovskiiのperoxiredoxin遺伝子をクローニングし、蛋白の性状をも検索した。E. moshkovskiiのperoxiredoxinは分子量は24377Daで、E.histolyticaの蛋白と比較するとオーバーラップする215アミノ酸で80.9%の相同性が認められた。しかしE. histolyticaにみられるN末のシステインに富む配列は欠損しており、この点で容易に遺伝学的手法で鑑別可能である事がわかった。また組み替え蛋白の性状を調査し、E. histolyticaと同様に濃度依存性に核酸にnickが入るのを防止することが判明し、antioxidantとして機能しているものと推測された。Catalyticな性質は両者でほぼ同一であった。

アメーバの鑑別に広く応用可能なE. disparの無菌培養系の作成は今年度より確実な形をとるに至った。すなわち昨年度においては植物細胞より分離したフェレドキシンを含む分画がE. disparの無菌的な増殖に良好な促進作用を持つことを見いだし、その後市販の精製フェレドキシンを加え、検索を継続したが、期待に反して明確な増殖促進作用は見られなかった。そこで精製方法に対して検討を加えた結果、フェレドキシン分画を分離するのに使用した超音波処理が決定的な作用を有する事を見いだした。すなわちフェレドキシンを昨年報告した方法で超音波処理した場合(4℃,30min)、390nm付近のいわゆるiron-sulfur chromophoreが消失し、分光学的に測定した酸化還元能力も消失している事が判明した。しかし、このように処理したフェレドキシンはE. disparの増殖に植物細胞のフェレドキシン分画ほどではないが優れた増殖促進効果を示した。このデータはフェレドキシンがnativeな形では利用されにくい事を示唆しており、これまで想像された事態とは全く異なっている。またE. histolyticaからフェレドキシンを好気条件下で精製してそのE. disparの増殖に及ぼす効果を見てみたが、

興味あることにこのフェレドキシンもiron-sulfur clusterのdecompositionが推定されたものの確実な増殖促進効果を示した。また幾つかのE. dispar株はフェレドキシンを添加しなくともYIGADHA-S mediumに適応しつつあり、今後の広い応用をより可能とするものと思われた。

(3)アメーバのレクチンのワクチンとしての可能性の検討

イムノクロマトにて精製したレクチン、及び更にSDS-PAGEにて精製したレクチンに対する抗血清は何れもE. histolyticaの栄養型虫体のChinese Hamster Ovary Cellへの接着を免疫前血清の2%以下に抑制した。また肝膿瘍形成阻止能に関する検索において対照群では全例に膿瘍が形成されていたが、イムノクロマトで精製したレクチンで免疫した群では5/8 、更にSDS-PAGEで精製したレクチンによって免疫した群では3/9に膿瘍形成が認められたのみであった。膿瘍の平均容積も有意に減少していた。このデータは150-kDa、及び170-kDa表面レクチンがワクチンとしての可能性を有することを示している。

(4)サブポピュレーションの同定方法の開発

E. histolytica分離株13株由来のDNAを上記の種々のプライマーの組合せでPCRにて解析した結果、R1/R2で増幅される遺伝子座(Locus1/2)及びR5/R6で増幅される遺伝子座(Locus5/6)のパターンに株間での相違が見られた。これらの塩基配列を決定した結果、複数の2-16ヌクレオチドの反復配列が存在する遺伝子座であることが明らかになった。この手法は更に株数を増やして検討する必要があるものの、アメーバ症の臨床的多様性などとの関連づけなど興味ある点を含んでいる。

(5)新規薬剤の開発研究

この領域の研究は異なる幾つかのアプローチより構成される。すなわち新しい標的を探求する作業はEntamoeba invadensをモデルとした嚢子形成機構とE. histolytica/E. disparのメチオニン・システイン生合成経路の解明に基づいている。嚢子形成機構の解明では今年度はアクチン重合促進安定化剤Jasplakinolideに関して検討を加え、この物質がE. histolytica栄養型虫体の増殖を阻害するばかりでなくE. invadensの嚢子形成も強く阻害す る事を明らかにした。またPKC及びPI3-K阻害剤も栄養型の増殖、嚢子形成に強い阻害作用を示す事も見いだされた。これらの阻害剤に基づき、今後の類似化合物の探索を行ないたい。メチオニン・システイン生合成経路の検索ではシスタチオニンガンマ合成酵素、ベータリアーゼの遺伝子のクローニングに成功し、GSTとの融合蛋白を作成し、種々の性質を調べた。今後阻害剤の設計を行う予定である。

D．考察

本研究は最近のいわゆる感染症新法施行以来急速に届け出で数が増加傾向にある赤痢アメーバ症のわが国での疫学的実態の解明と対策確立に資するための基礎・応用研究を目的としたものである。E. histolyticaはこれまでのわれわれの研究で欧米諸国と異なり、男性同性愛者間に高率に分布している。これはまたわが国におけるHIV/AIDSとの関わりについて欧米諸国と対応を異にせざをる得ないという事情に結びついている。

今回の研究では当初実態調査の対象として同性愛者の性感染と施設内感染を取り上げたが、初年度の調査で知的障害者更正施設における感染率が高かった事から、施設内感染を主な調査対象

として取り上げるに至った。今年度の調査はのべ5ヵ所の知的障害者更正施設の調査を実施した。施設によって差異はあったものの血清疫学的には最高で53.5%に達する陽性率が見いだされた。また感染源として重要な糞便検査または糞便内抗原検査陽性率は最大34.2%に達した。施設の職員の中にも血清反応陽性者が次第に高率に見いだされつつある。このような施設内感染の実態は今後のわが国の衛生行政・福祉行政を考える上で極めて重要であろう。今後も検索を拡大継続して、わが国での実態を解明し、効果的な対策を立案してゆく必要があるものと思われる。
また興味ある施設内感染の特徴は糞便中抗原検査などによるデータに明らかなようにE. histolytica感染が確かに存在するにもかかわらず、事実上殆ど全ての感染者が無症状で推移しており、発症者は稀に見られるだけと言う事実である。これが施設内感染が拡大している原因として重要なものであろう。E. histolytica感染の特徴として持続的な慢性感染が実際に存在するのかどうかはアメーバ症の病態生理を考える上でも大きな問題として残っている。今後この点も併せて検討を行なうべきであろう。今年度はこれまでの調査に基づいて作成した施設内アメーバ感染制圧に関する環境・衛生施策を新興・再興感染症研究事業の他の研究班と協調してガイドライン化を試みた。このガイドラインは今後の調査の拡大によって改編される可能性はあるものの、対策確立に効果的に活用される事が期待される。また今回導入したE. histolytica Ⅱ kitの有用性も確認された。E. disparの無菌培養系の作成やサブポプレーション同定法の確立についても新しい展開が見られた。今後実際の応用に関して検索を進めたい。アメーバ表面のレクチンのワクチンとしての可能性も今後継続して検討したい。薬剤開発のための標的あるいは阻害剤の研究は前年度と同様嚢子形成過程、及び含硫アミノ酸生合成経路の検討を継続して行い、幾つかの特徴を明らかにした。今後これらの成果に基づき、阻害剤の検索の範囲を拡大して行く予定である。

E. まとめ

今年度の調査研究によって、わが国の施設内アメーバ感染が当初予測した以上に拡大していることが明らかになった。今後更に規模を拡大しつつ実態を明らかにするべきと考える。対策として衛生・環境施策のほか集団治療などが有効であることが明らかになった。新規導入された抗原定量キットの有用性も確認された。作成したガイドラインは今後種々改編される可能性はあるものの有効に活用される事が期待される。その他の対策確立のための基礎・応用研究も着実な進展を見せた。特にE. disparの無菌培養系の改良とサブポピ ュレーションの同定法の確立は今後に資するところが大きいと思われる。

F. 健康危険情報

施設内感染としてのアメーバ症は衛生・福祉行政上注意を払うべき存在である事はすでに明確になったといえる。今後の調査の動向を常に念頭に置いておくべきであろう。職員など周辺への感染も懸念されるところである。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kobayashi S, Imaia E, Hagigi A, Tachibana H & Takeuchi T : Cultivation of Entamoeba dispar:

growth promoting effect of ferredoxin. Atch Med Res, 2000, 31, s210-s211.

Dvorak JA, Kobayashi S, Abe K, Fujiwara T, Takeuchi T & Nagao E : The application of the atomic force microscope to stuides of medically important protozoan parasites. J Electron Microscopy, 2000, 49, 429-435.

Pillai DR, Kobayashi S & Kain KC : Entamoeba dispar galactose/N-acetyl-D-galactosamine lectin: evidence for differential gene expression and conformational regulation. Arch Med Res, 2000, 31, s234-s236.

Tachibana H, Cheng X-J, Kobayashi S, Fujita, Y & Udono T : Entamoeba dispar, but not E. histolytica, detected in a colony of chimpanzees in Japan. Parasitol Res, 2000, 86, 537-541.

Cheng X-J, Ihara S, Takekoshi M & Tachibana H : Entamoeba histolytica: bacterial expression of a human monoclonal antibody which inhibits in vitro adherence of trophozoites. Exp Parasitol, 2000, 96, 52-56.

Cheng X-J & Tachibana H : Molecular cloning and characterization of peroxiredoxin from Entamoeba moshkovskii. Arch Med Res, 2000, 31, s65-s66.

Cheng X-J, Watanabe K, Ihara S, Takekoshi M & Tachibana H : Bacterial expression of human monoclonal antibody that inhibits in vitro adherence of Entamoeba histolytica trophozoites. Arch Med Res, 2000, 31, s311-s312.

Tachibana H, Cheng X-J, Kobayashi S, Matsubayashi N, Gotoh S & Matsubayashi K. : High prevalence of infection with Entamoeba dispar, but not E. histolytica, in captive macaques. Parasitol Res, 2001, 87, 14-17.

Cheng X-J & Tachibana H : Protection of hamsters from amebic liver abscess formation by immunization with the 150- and 170-kDa surface antigens of Entamoeba histolytica. Parasitol Res, 2001, 87, 126-130.

Makioka A, Kumagai M, Ohtomo H, Kobayashi S & Takeuchi T : Entamoeba invadens: protein kinase C inhibitors block the growth and encystation. Exp Parasitol, 2000, 85, 288-290.

Makioka A, Kumagai M, Ohtomo H, Kobayashi S & Takeuchi T : Growth inhibition and actin aggregate formation of Entamoeba histolytica by jasplakinolide. Arch Med Res, 2000, 31, s145-s146.

Makioka A, Kumagai M, Ohtomo H, Kobayashi S, Takeuchi T : Involvement of signaling through protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase in the encystation of Entamoeba invadens. Arch Med Res, 2000, 31, s185-s186.

Makioka A, Kumagai M, Ohtomo H, Kobayashi S & Takeuchi T : Effect of jasplakinolide on the growth, encystation, and actin cytoskeleton of Entamoeba histolytica and Entamoeba invadens. J Parasitol, 2001, in press

Makioka A, Kumagai M, Ohtomo H, Kobayashi S & Takeuchi T : Inhibition of encystation of Entamoeba invadens by wortmaninn. Parasitol Res, 2001, in press

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.

Nozaki T, Sato-Nakano Y, Tokoro M & Takeuchi T : Characterization of a gene encoding cystathionine g-synthase involved in methionine biosynthesis from Entamoeba. Arch Med Res, 2000, 31, s69-s70.

Saito-Nakano Y, Yasuda T, Shigeta Y, Nakazawa M, Takeuchi T & Nozaki T : Identification and characterization of Rab5 homologue in Entamoeba histolytica. Arch Med Res, 2000, 31, s155-s156.

Sanuki J, Tokoro M, Nozaki T, Okuzawa E & Asai T : Purification and characterization of a major soluble 40-kDa antigen from Entamoeba histolytica and its use for serodiagnosis of chronic amebiasis. Parasitol Int, 2001, in press

小林正規、所　正治、竹内　勤 : 病原体別に見た迅速検査; 赤痢アメーバ. 臨床と微生物, 2000, 27(増), 152-155.

野崎智義 : 赤痢アメーバの病原性因子の分子論的理解. 現代医療, 2000, 32(増), 1280-1284.

竹内　勤 : 赤痢アメーバ抗体. 臨床検査データブック、医学書院、2000, 442-443.

竹内　勤 : 血中赤痢アメーバ抗体価(間接蛍光抗体法). 臨床検査ガイド、文光堂、2000, 898-902.

竹内　勤 : 肝寄生虫症の疫学・分子医学. 現代医療、2000, 32(増Ⅳ), 2849-2854.

2. 学会発表

Kobayashi S, Imai E & Takeuchi T : Growth promoting effect of ferredoxin like substance on Entamoeba dispar. 第69回日本寄生虫学会大会、2000年4月、松江

竹内　勤、清水泉太、小林正規、齋藤智也、前田卓哉 : わが国における施設内赤痢アメーバ感染に関する疫学調査. 第41回日本熱帯医学会大会、2000年10月、東京

竹内　勤 : 施設内感染の問題－特にアメーバ感染について. 第9回国際医療協力シンポジウム「たしかな院内感染対策」、2000年11月

Tachibana H, Cheng X-J & Kaneda Y : Cloning and characterization of peroxiredoxin genes from Entamoeba dispar. 第69回日本寄生虫学会大会、2000年4月 、松江

Rivera WL, Cheng X-L, Takekoshi M, Ihara S, Kaneda Y & Tachibana H : Expression of a recombinant Fab fragment of human monoclonal IgA specific for Entamoeba histolytica. 第69回日本寄生虫学会大会、2000年4月、松江

程 訓佳, 金田良雅, 橘 裕司 : Entamoeba moshkovskiiペルオキシレドキシンの遺伝子クローニングと性状解析. 第41回日本熱帯医学会大会、2000年10月、東京

Makioka A, Kumagai M, Ohtomo H, Kobayashi S & Takeuchi T : Effect of anti-microtubule drug oryzalin on the encystation of Entamoeba invadens. 第69回日本寄生虫学会大会、2000年4月、松江

Makioka A, Kumagai M, Ohtomo H, Kobayashi S & Takeuchi T : Effects of cytochalasin D on the growth, encystation and multinucleation of Entamoeba invadens. 第69回日本寄生虫学会大会、2000年4月、松江

Makioka A, Kumagai M, Ohtomo H, Kobayashi S & Takeuchi T : Growth inhibition and actin aggregate formation of Entamoeba histolytica by jasplakinolide. 12th Japanese-German Symposium on Protozoan Diseases, 2000年9月、ハンブルグ

Makioka A, Kumagai M, Ohtomo H, Kobayashi S & Takeuchi T : Involvement of signaling through protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase in the encystation of Entamoeba invadens. 12th Japanese-German Symposium on Protozoan Diseases, 2000年9月、ハンブルグ

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および細胞骨格に及ぼすアクチン重合促進・安定化剤Jasplakinolideの効果. 第60回日本寄生虫学会東日本大会、2000年10月、東京

牧岡朝夫、熊谷正広、大友弘士、小林正規、竹内 勤 : チューブリン重合阻害剤オリザリンによるEntamoeba invadensのシスト形成の抑制. 第41回日本熱帯医学会、2000年10 月、東京

牧岡朝夫、熊谷正広、大友弘士、小林正規、竹内 勤 : Entamoeba invadensの増殖、シスト形成、多核化に及ぼすサイトカラシンDの効果. 第41回日本熱帯医学会、2000年10月、東京

牧岡朝夫、熊谷正広、大友弘士、小林正規、竹内 勤 : チューブリン重合阻害剤オリザリンによるEntamoeba invadensのシスト形成の抑制. 第33回日本原生動物学会大会、2000年11月、金沢

牧岡朝夫、熊谷正広、大友弘士、小林正規、竹内 勤 : Entamoeba invadensの増殖、シスト形成、多核化に及ぼすサイトカラシンDの効果. 第33回日本原生動物学会大会、2000年11月、金沢

野崎智義 : 原虫におけるシステイン生合成経路の生化学的・遺伝学的解析.

第69会日本寄生虫学会大会ワークショップ、2000年4月、松江

斉藤由美子、繁田泰男、中沢　幹、竹内　勤、野崎智義：赤痢アメーバにおける分泌機構の解析. 第69回日本寄生虫学会大会、2000年4月、松江

Nozaki T, Saito-Nakano Y, Imada Y, Nakazawa M, Shigeta Y & Takeuchi T : Cloning and characterization of a gene encoding protein phosphatase 2C from Entamoeba histolytica. International Symposium on Amoebiasis, 2000年9月、ハンブルグ

Saito-Nakano Y, Yasuda T, Shigeta Y, Nakazawa M, Takeuchi T & Nozaki T : Identification and characterization of Rab GTPases in Entamoeba histolytica. International Symposium on Amoebiasis, 2000年9月、ハンブルグ

中野由美子、保田友義、繁田泰男、中沢　幹、竹内　勤、野崎友義：ファゴサイトーシ スによって誘導される赤痢アメーバRab5ホモログの細胞内局在変化. 第73回日本生化学会大会、2000年6月、横浜

野崎智義、所　正治、竹内　勤、Kruger W：原生動物における硫黄含有アミノ酸の生合成. 第56回日本寄生虫学会西日本大会ワークショップ、2000年10月、名古屋

中野由美子、保田友義、繁田泰男、中沢　幹、竹内　勤、野崎智義：赤痢アメーバRabホモログのファゴサイトーシスへの関与. 第53回日本細胞生物学会大会、2000年9月、福岡

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対策確立に関する研究、及び諸診断法の応用に関する研究

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４施設（５グループ）の園生３９１名及び職員１１８名を対象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、ELISA 法による血清学的検査から園生１０６名（27.1%)、職員１１名（9.3%) に赤痢アメーバ抗体陽性者を認め、そのうち糞便検査を行った園生１８３名中３３名から赤痢アメーバ嚢子、栄養型或いは抗原 (*E. histolytica II* kit; TechLab Inc.,USA により検出)が検出された。職員にも１名の糞便検査陽性者を検出した。これらの一部に対し包括的な制圧対策を実施した。治療はメトロニダゾールにより行い治療効果判定は糞便検査法により行った。
２）非病原性の*Entamoeba dispar* の増殖促進因子としてアメーバのエネルギー代謝にも重要な役割を担う鉄ー硫黄蛋白（フェレドキシン）と共通する構成成分をもつ細菌、植物そして近縁種の *Entamoeba histolytica* のフェレドキシンを超音波処理することなどで得られるフェレドキシンの生理活性を失った物質が増殖促進活性をもつらしいことを見出した。

A. 研究目的

１）現在諸種の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、その結果をもとに赤痢アメーバ症のより効果的な予防対策を立案し実際に試みる。そしてその予防対策をマニュアル化し、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）赤痢アメーバと近縁種で非病原性という特徴以外は遺伝子的にも類似点の多い *Entamoeba dispar* の培養系を確立し、免疫診断、遺伝子診断への応用、或いは毒力の検査に応用することを目的とする。

B. 研究方法

１）赤痢アメーバ施設内集団感染状況の実態調査：知的障害者更正施設４施設（５グループ）の園生３９１名及び職員１１８名を対象として調査を行った。

先ずELISA 法により血清学的に赤痢アメーバ抗体の有無をスクリーニングすることで抗体保有率を調査した。次に赤痢アメーバ抗体陽性者を対象として糞便の顕微鏡的検査と赤痢アメーバ抗原の有無を *E. histolytica II* kit (TechLab Inc., USA) を用いて検査した。そして糞便検査陽性者がみられた場合は赤痢アメーバ抗体の検査結果に関わらず陽性者と同室の者全ての糞便検査を実施した。赤痢アメーバ感染者が高率に見られた施設については施設側の希望により職員についても同様な検査を行った。糞便検査陽性者に対しては施設嘱託医によりメトロニダゾールによる治療が行われた。一部では衛生教育、環境衛生対策などをも実施した。治療は赤痢アメーバ嚢子、栄養型、抗原が陰性になるまで繰り返し行われた。治療効果判定は治療（１クール）

後１週間以上を経た後糞便検査により行った。

２）診断に応用するための*E. dispar*の確実な無菌培養法の確立：

① SAW1734RcloneAR ② AS2IR ③ AS16IR ④ CYN009:TPC ⑤ CYN016:TPC の*E. dispar*5株を使用した。これらの株は昨年度の成果として新たに見いだした*E. dispar* の増殖促進因子であるツユクサの葉肉細胞抽出液を加えることで無菌的に培養維持されている。培地は我々が考案したYIGADHA-S培地にグラム陰性菌などの膜成分にもみられるウロン酸のうちガラクツロン酸(0.02%) を新たに培地組成に加えたものである。

このツユクサの葉肉細胞から得られる増殖促進因子をフェレドキシンと推定し、その精製を試みた。市販のフェレドキシン精製標品として① 細菌；*Clostridium pasteurianum* フェレドキシン (SIGMA F-7629) ② ホウレンソウ；Spinach フェレドキシン (SIGMA F-5875) をreferenceとして使用した。

近縁アメーバ種からのフェレドキシン抽出材料としての *Entamoeba histolytica* 栄養型：BI-S-33 培地 (Diamond et al., 1978) で培養されたHM-1:IMSS clone 6 無菌培養株を使用した。

植物（ツユクサ、サクラ）の葉からのフェレドキシンの精製：① ツユクサ、サクラの葉を破砕して得られた葉肉細胞／Dulbecco's PBS, pH 7.4 懸濁液を同 PBS で２回遠沈洗浄し上清を除き凍結乾燥した。②乾燥重量の１２０倍の 0.1 M Tris-HCl, pH7.6 を加えマグネチック・スターラーで撹拌・抽出 (4℃, 120 分) した後 16,000 rpm, 10 分遠沈しその上清を0.2 μm pore size のメンブラン・フィルターで濾過して得られた分画を出発材料とした。この操作により超音波処理による機械的傷害を受けることなく葉肉細胞からフェレドキシン分画を抽出することができた。

③ 上記抽出液をMayhew (1971) の方法に従い 55% 硫安遠析後その上清をDEAE- トヨパール650を充填したカラムに吸着させ、40% 硫安／0.1M Tris-HCl, pH 7.6 で洗浄後 30% 硫安／0.1M Tris-HCl, pH 7.6 で溶出した。溶出して得られたフェレドキシン分画を透析後培地に加えその増殖促進効果を検討した。

E. histolytica 栄養型からのフェレドキシンの精製：BI-S-33 培地で無菌的に35.5℃で培養した３日めの HM-1:IMSS clone6 株栄養型を氷中で冷却後1,750 rpm, 6分遠沈し回収し、上記のMayhew (1971) の方法に従い、或いは Reeves et al. (1980) の方法に従いトヨパール HW-55S (Sephadex G-100の代わりに使用) 充填カラムとDEAE-トヨパール650 (DEAE-cellulose の代わりに使用)を充填したカラムを使用して精製を試みた。

植物フェレドキシン活性の測定：Buchanan and Arnon (1971) の方法により得られたフェレドキシン分画のサクラ葉緑体による NADP+の光還元を触媒する活性を分光光学的に測定した。

E. dispar 栄養型の増殖促進効果の判定：YIGADHA-S 培地で何も growth associate を加えないで無菌培養したAS2IR 株栄養型に増殖促進活性が期待される物質を加え、その増殖曲線と試験物質を加えないコントロールの増殖曲線とを比較することでその効果を判定した。判定に用いたこのAS2IR株はツユクサの葉肉細胞抽出液を加え無菌的に培養継代する過程でYIGADHA-S培地への適応が進み増殖ピークのアメーバ数は抽出液を加えた場合の 1/10 程度と少ないながら継代培養が可能となっており、増殖促進効果の判定に適した無菌培養条件への適応過程にある株である。

（倫理面への配慮）

赤痢アメーバの集団感染の実態調査及び治療の実施に当たってはInformed consent

を施設の園生の場合は家族、職員の場合は本人より得ることを前提とする。予防対策についても指導ではなく施設主導の対策への経験と知識の提供を基本とする。

C. 研究結果

1）血清学的にはELISA法で検査した全ての園生391 名中106名 (27.1%)に赤痢アメーバ抗体が検出され、そのうち糞便検査を行った183 名中33 名(18.0%) から赤痢アメーバ嚢子、栄養型或いは抗原が検出された。赤痢アメーバの感染者が見出された施設の職員118 名を対象とした血清反応の結果からも11 名 (9.3%)に赤痢アメーバ抗体陽性者がみられたが、糞便検査では1 名のみが陽性であった。また糞便検査陽性者の者でも殆どが無症候であり、検査した限りではとくに粘血便なども見られなかった。そして全体的にみると赤痢アメーバ抗体陽性者の約 70%は糞便検査陰性でアメーバ症を疑わせるような症状もみられなかった。そして施設によっては抗体陽性者において全く赤痢アメーバ感染が確認されない所もあり、血清学的検査と糞便検査との間に差異が生じた。また施設内感染の特徴として我が国では *E. dispar* の感染は現在まで確認されないが赤痢アメーバ以外に大腸アメーバ、小形アメーバの感染も同時に起きていることがあげられる。

最も高率に赤痢アメーバ感染がみられた施設A (糞便検査陽性率 34.2%) では上記２種の非病原性アメーバとともに下痢症の原因となる２例のランブル鞭毛虫感染者も確認された。

検査のために新たに導入された *E. histolytica II* kit は赤痢アメーバに特異的な抗原を検出するキットであり *E. dispar* との鑑別が容易にできること、そしてその信頼性も高いことが報告されている。また直ちに検査ができないような遠隔の地からの検体でも冷蔵（或いは冷凍）保存してあれば赤痢アメーバ嚢子が検出されなくても検査が可能である利点があり、このキットを使用することで実態調査における検査の信頼度が向上した。

２）当初フェレドキシン精製のための出発材料としてultrasonic processor (GE 50, Sonics and Materials, Inc.)による超音波処理 (4℃,30分) した葉肉細胞の抽出液を用いていた。その結果は 80% 硫安塩析分画上清への抽出までは増殖活性が認められたが、カラムクロマトグラフィーの精製過程でフェレドキシンの回収は極端に低下した。そこで超音波処理の代わりに凍結乾燥処理した葉肉細胞分画を乳鉢で細かくすり潰すことで細胞を壊し超音波処理することなくフェレドキシン分画を抽出した。この方法によりフェレドキシンの精製は進み得られた標品にフェレドキシン活性も確認された。しかしながら精製の過程を通して AS2IR 株に対する増殖促進活性はコントロールの２倍程度と低いものであった。そこで改めて超音波処理の効果について検討した結果、増殖促進効果が効率よく発現するためには超音波処理が不可欠な過程であることが判明した。そしてフェレドキシンが超音波処理により何らかの構造の変化を受けてはじめて *E. dispar* 栄養型に利用されるという仮説のもとに細菌とホウレンソウの精製されたフェレドキシン(Sigma Chem. Co., USA. 製)を血清を含まないRPMI 細胞培養液に2 μg/ml の蛋白濃度に調製し、超音波処理１０分行い培地に添加してAS2IR 株に対する増殖促進効果をみてみた。その結果0.067 μg/ml≦の濃度で増殖ピーク時においてコントロールの約５－６倍までアメーバ数の増加がみられた。また超音波処理を行った *Clostridium pasteurianum* のフェレドキシンと処理しなかったものとの吸収スペクトルを比較してみると280 nm の蛋白と 390 nm 近傍のフェレドキシンなど iron-sulfur protein に特徴的な吸収域の低下がみられることがわかった。

サクラの葉から抽出・部分精製されたフェレドキシンの超音波処理する前後でのフェレドキシン活性を比較してみると超音波処理により活性が殆ど消失することも判明した。しかしながらツユクサの葉肉細胞を超音波処理した場合に比べるとその効果はまだ弱く、増殖のピーク時のアメーバ数は1／4程度に留まっており、他の増殖促進因子の関与或いは精製されたフェレドキシンを超音波処理することでフェレドキシンが必要以上に分解され増殖促進活性が失われた可能性などが示唆された。そこで次に*E. dispar* と代謝的にも共通性をもつ*E. histolytica* のフェレドキシンの抽出と精製を試みてみた。興味あることには赤痢アメーバのフェレドキシン分画は超音波処理しなくても増殖促進効果を示すらしいことがわかり、また赤痢アメーバのフェレドキシンを培地に添加した場合、他の細菌や植物の精製されたフェレドキシンを超音波処理して培地に添加した場合に比べて増殖ピーク時において2倍程度高いアメーバ増殖が観察された。

また現在までに研究対象としている*E.dispar* 5株のうち2株 (CYN016:TPC, CYN009:TPC) がYIGADHA-S 培地に適応しツユクサ葉肉細胞抽出物などの growth associate を添加しなくても添加した場合とほぼ同等の増殖数で無菌的に継代培養が可能となった。またヒトより分離されたAS16IR株は継代時の接種アメーバ数に依存して増殖数にばらつきがみられるものの上記の2株と同様 growth associate を添加した場合に近い増殖ピークに達するまでYIGADHA-S 培地に適応してきている。SAW1734RcloneAR株は未だ何らかの growth associate なしには3代以上の継代培養ができていない。AS2IR株は方法のところで述べたようにYIGADHA-S培地に適応過程の段階にある。このような無菌的培養条件への適応力の差がみられる要因のひとつとして*E. dispar* 自身のフェレドキシンなどの iron-sulfur protein の合成能力の差が関与していることを今年度の研究成果は示唆しているように思われた。

D. 考察

（1）H.12年度は知的障害者更正施設の4施設（5グループ）を対象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、想像以上に高率の赤痢アメーバ感染があることがわかり改めて集団感染の深刻さを認識した。また赤痢アメーバの集団感染がみられる施設ではそこで働く職員にも感染する機会も少なからず存在することを調査の結果は示しているように思われた。感染予防に関しては標準的な予防策を基に個々の施設の感染状況に即した実際的な予防策の実施、感染者の把握、治療そしてそれと並行して職員に対しては赤痢アメーバ症を含めた感染症に関する正しい知識の啓蒙も必要に思われた。また我々の施設内赤痢アメーバ集団感染の実態調査の対象は現在まで知的障害者更正施設に限られているが、この調査結果にみられる感染率の高さと全国の感染症科のある病院から届け出される赤痢アメーバ感染状況の集計結果などからみても他の諸種の施設で赤痢アメーバの集団感染が起きている可能性は高いように推測された。今後さらに赤痢アメーバの施設内集団感染の実態を明らかにするため知的障害者更正施設以外の施設に関しても調査したいと考えている。

2）*E. histolytica* の代謝系においてフェレドキシンはピルビン酸のanaerobic oxidation に関与する redox protein として重要な役割を担うことが知られている。本研究の成果において植物や細菌のフェレドキシンを超音波処理することにより高い*E. dispar* の増殖促進効果が得られたことはこれらフェレドキシンの構成成分（iron-sulfur center など）が *E. dispar* の増殖に必要な物質（*E.*

dispar のフェレドキシン？）を合成するための材料として利用された可能性を示している。これに対し*E. histolytica* から抽出したフェレドキシンが実際にどのような形で増殖促進効果を示したかは不明であるが、その理由のひとつとして*E. histolytica* のフェレドキシンの不安定さによることが考えられる。即ち、そのフェレドキシンは容易にアポプロテイン（アポフェレドキシンII）に変換してしまう性質をもちフェレドキシンに特徴的な鉄ー硫黄成分に依存した390 nm 近傍の吸収の速やかな減少が起きることから超音波処理を要することなく増殖活性成分が解離したのではないかと推測した。そして 鉄ー硫黄成分が除かれたアポフェレドキシンを培地に加えても*E. dispar* の増殖促進効果が見られなかったことから、効果を持つ活性物質は鉄ー硫黄成分側に含まれる可能性も示唆されている。また*E. histolytica* のアポフェレドキシンIIは鉄と硫黄化合物を添加反応させることで容易に元のフェレドキシンに 再構成する性質をもつことから現在アポフェレドキシンIIからフェレドキシンへの再構成とそれを用いた増殖活性の局在についての検討を計画している。これと並行して*E. dispar* の無菌培養株からのフェレドキシンの精製実験も開始しており*E. histolytica* のフェレドキシンとの性状の比較についても検討したいと考えている。また細菌などの増殖促進因子に依存して増殖していた *E. dispar* もYIGADHA-S 培地のような無菌的培養条件下で時間をかけて適応させれば metabolicな growth associateを添加しなくても継代・培養ができることもわかった。このような適応の要因としては退行していた *E. dispar* の本来もっていた代謝系が賦活化されたため､或いは同じ役割を担う代償的な代謝系が働き始めたなどの可能性が考えられるが、この結果はまた条件さえ整えば組織内のような無菌的条件下でも*E. dispar* が増殖できる可能性も示している。今年度の研究成果として２株の*E. dispar* 株がYIGADHA-S 培養系において無菌株として樹立されたためこれらの株と免疫不全マウスとを用い安定した感染システムを確立したいと考えている。さらに諸種の免疫的診断や遺伝子診断への応用も試みたい。

E. 結論

１）今回の調査は偶々知的障害者更正施設を対象としたがその調査から得られた結果は極めて深刻であった。また、まだその実態は不明であるが他の諸種施設にとっても憂慮されるべき事態と考えている。そしてさらに広範な実態調査に基づく疫学的な感染経路の解明と早急な国の厚生行政レベルでの標準的な感染症予防策のマニュアル作成を含めた実際的な指導とともに検査機関の設置が望まれた。

２）*E. dispar* の株間でYIGADHA-S 培地での増殖（適応）能力に差がみられたが超音波処理した植物由来のフェレドキシン分画を加えることで増殖能力が回復した。また*E. dispar* の細菌等から供給される主要な増殖促進因子のひとつとしてフェレドキシンなどの iron-sulfur protein そのものではなくその構成成分（iron-sulfur center のような安定性の高い成分を推定している）を*E. dispar* が利用しているらしいことが判った。

F. 健康危険情報　なし

G. 研究発表

１． 論文発表

1) Seiki Kobayashi, Eiko Imai, Ali Haghighi, Hiroshi Tachibana and Tsutomu Takeuchi. Cultivation of *Entamoeba dispar*: Growth-promoting effect of ferredoxin. Arch. Med. Res., 31(4), S210-S211, 2000.

2) 小林正規、所　正治、竹内　勤.
病原微生物別に見た迅速検査；赤痢アメーバ.
臨床と微生物., 27(増刊号), 152-155, 2000

2．学会発表

1) Seiki Kobayashi, Eiko Imai, Tsutomu Takeuchi. Growth promoting effect of a ferredoxin like substance on *Entamoeba dispar.* Parasitol. Int., 49(Suppl.), 50-51, 2000.

2) 竹内　勤、清水泉太、小林正規、斎藤智也、前田卓哉. 我が国における施設内赤痢アメーバ感染に関する疫学調査.　日本熱帯医学会雑誌., 28 (増刊号), 100, 2000.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得　　なし
2. 実用新案登録　　なし
3. その他　　なし

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　赤痢アメーバ（*Entamoeba histolytica*）と病原性のないアメーバを鑑別することは、アメーバ症の診断において重要である。赤痢アメーバと形態的に区別できない*Entamoeba moshkovskii*の同定を可能にする目的で、*E. moshkovskii*ペルオキシレドキシンの遺伝子クローニングと性状解析を行った。*E. moshkovskii*のペルオキシレドキシンは217アミノ酸からなり、分子量は約24kDaであった。赤痢アメーバで認められるN末端の配列が欠失していたが、二種のアメーバ間でその活性に有意な差はなく、発現量は共に多かった。一方で、両種のペルオキシレドキシンには抗原性の差が認められた。従って、*E. moshkovskii*の場合にもペルオキシレドキシンやその遺伝子を検出することで、確実に同定できると考えられた。アメーバ症の予防法開発についても検討した。赤痢アメーバの150-kDa及び170-kDa表面レクチンで免疫したハムスターでは、赤痢アメーバによる肝膿瘍形成が有意に抑制され、このタンパク質がワクチン候補として有望であることが明らかになった。

A．研究目的

赤痢アメーバ症は、わが国では輸入感染症として、また男性同性愛者間における性行為感染症として注目されている。しかし、ワクチンはまだ開発されていないため、早期に診断し治療することが重要である。最近、赤痢アメーバと形態的に差のない*Entamoeba dispar*の存在が明らかになったが、従来行われている検便だけでは両者の鑑別はできない。また、*Entamoeba moshkovskii*や*Entamoeba polecki*なども赤痢アメーバと形態的に鑑別困難であり、少ないものの人体寄生例が報告されている。そこで本研究課題では、赤痢アメーバに特異的な抗原を、抗原抗体反応を用いて簡便に検出できる系を確立することを目的としている。その目的のために、赤痢アメーバの細胞質に多量に存在するペルオキシレドキシンに着目した。昨年度までに、ポリクローナル抗体と種特異的エピトープを認識するモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISAによって、ペルオキシレドキシンの検出が可能であることを明らかにした。そこで、非病原性アメーバについてもペルオキシレドキシンの活性や抗原性を明らかにするとともに、これらのアメーバの同定も可能な診断系を確立したいと考えて、本年度の研究を行った。

この他に、本年度は赤痢アメーバ症のワクチン療法の開発をめざした基礎研究にも取り組んだ。筆者らはこれまでに、モノクローナル抗体（EH3015）によって同定された赤痢アメーバの150-kDaおよび170-kDaの表面タンパク質が、ガラクトース特異的なレクチンであることを明らかにしている。これらのタンパク質は、既によく解析されている260-kDaレクチンのheavy subunitとは異なるものであり、また、EH3015での受動免疫により、ハムスターの肝膿瘍形成を阻止できるこ

とを報告している。そこで、150-および170-kDaレクチンがアメーバ症の予防に応用できるかどうか検討した。

B．研究方法

E. moshkovskii の中でヒトから単離され、かつて *E. histolytica*-like Laredoと呼ばれていた株の栄養型虫体を無菌培養した。mRNAを抽出してcDNAを合成し、λgt11をベクターとしてcDNAライブラリーを作製した。赤痢アメーバのペルオキシレドキシン遺伝子の配列に基づいて作製したプライマーを用いて、*E. moshkovskii* のゲノムDNAを増幅し、得られた352bpのDNA断片をプローブとして、cDNAライブラリーをスクリーニングした。最長のインサートを含むクローンをpUC19にサブクローニングして、塩基配列を決定した。また、不完全長であった5' 末端は5'-RACEによって伸長した。クローニングした遺伝子を発現ベクターpET19bに組み込んで大腸菌に導入し、組み換えタンパク質を作製した。この組み換えタンパク質について、過酸化水素を基質として酵素活性を調べた。また、thiol mixed-function oxidation (MFO) 法によって活性を比較した。組換えタンパク質をマウスに数回接種し、ポリクローナル抗体を得た。この抗体で*E. moshkovskii*栄養型虫体を免疫染色し、抗原の局在を共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察した。

イムノアフィニティクロマトグラフィーによって精製した150-kDaおよび170-kDa表面タンパク質10μgを、Freundのアジュバントとともにハムスターの腹腔内に2週間間隔で3回接種した（グループ1）。また、精製画分に混在する可能性のある260-kDaレクチンの影響を排除するため、更にSDS-PAGEを行った後に目的のバンド部分を切り出して免疫に用いた（グループ2）。最終免疫の1週間後に採取した血清で赤痢アメーバ栄養型虫体を前処理し、チャイニーズハムスター卵巣細胞に対する接着活性を調べた。さらに、最終免疫から20日後に虫体を肝臓内に接種し、1週間後に膿瘍の大きさを測定した。

（倫理面への配慮）動物実験は所属機関の動物実験委員会の承認の下に、指針に従って実施した。

C．研究結果

1．*E. moshkovskii*ペルオキシレドキシンの性状解析

*E. moshkovskii*のペルオキシレドキシンは217アミノ酸からなり、分子量は24377Da、等電点は7.02であると予想された。この配列をFastAプログラムで赤痢アメーバの配列と比較すると、オーバーラップする215アミノ酸において80.9％の相同性が認められた。顕著な違いは、赤痢アメーバで認められるシステインを多く含むN末端付近の配列が*E. moshkovskii*では認められないことであった。

組み換えタンパク質を調製し、His結合レジンを用いて精製したところ、SDS-PAGEにおいて予想されるサイズのタンパク質が得られた。このタンパク質について過酸化水素を基質として活性を調べたところ、*E. moshkovskii*ペルオキシレドキシンのV_{max}は0.070μmol/min.mg、K_mは35μMであった。また、赤痢アメーバのペルオキシレドキシンについても同様に組換えタンパク質を作製して活性を調べたところ、それぞれ0.046μmol/min.mgと36μMであった。

さらに、プラスミドDNAを用いてMFO法によって活性を調べたところ、ペルオキシレドキシン濃度に依存して、核酸にnickが入るのを防ぐことができた。

赤痢アメーバと*E. moshkovskii*について、等量のmRNAをノーザンブロットし、両種のゲノムDNAをPCR増幅したプローブとハイ