

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(図-3)。しかしながらツ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。現在、まだ精製過程の段階であるが超音波処理したフェレドキシン分画にも同様に *E. dispar* 栄養型(AS2IR 株)に対して増殖促進効果を認めた。さらに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示唆されている。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。現在赤痢アメーバのフェレドキシンをさらに精製してその増殖促進効果とともに intact なフェレドキシンで効果がみられたことから *E. dispar* のエネルギー代謝(糖代謝)におけるフェレドキシンの作用機序についての検討も計画している。

他の本研究に関わる成果として現在までに研究対象としている *E. dispar* 5株のうち2株(CYNO16:TPC, CYNO09:TPC)が YIGADHA-S 培地に適応しツ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より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

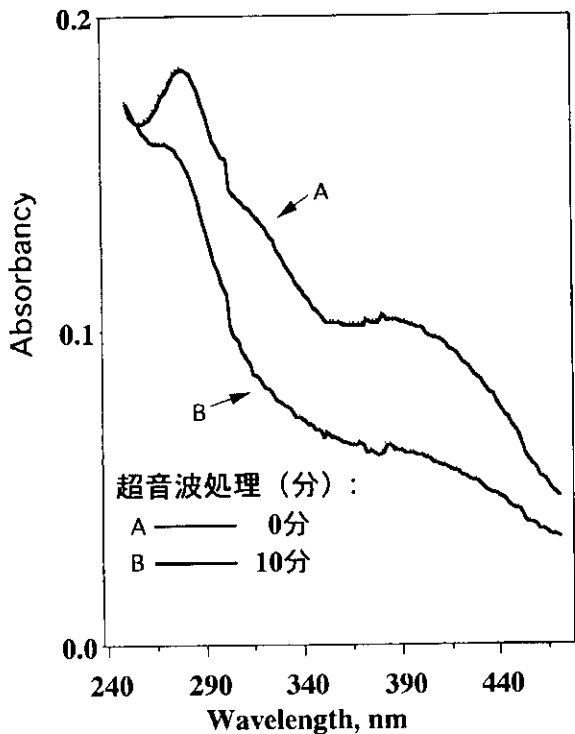


図2 超音波処理後の *Clostridium pasteurianum* フェレドキシンの吸収スペクトルの変化
**Clostridium pasteurianum* フェレドキシン, type V, (SIGMA F-7629), 30 μ g/ml H₂O

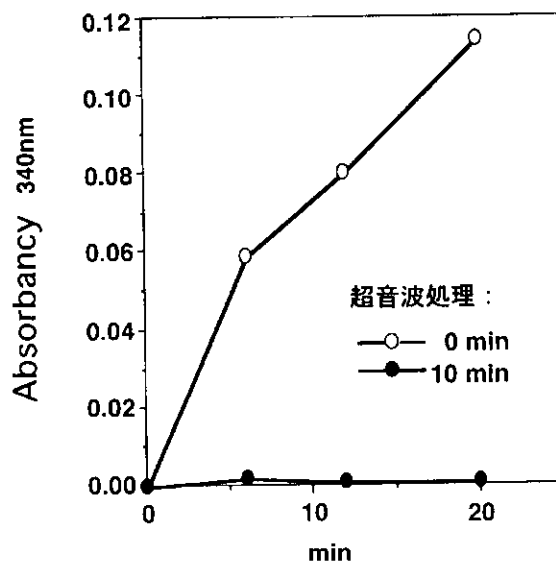


図3 サクラの葉から抽出・部分精製されたフェレドキシンのサクラ葉緑体による NADP⁺ の光還元を触媒する活性に対する超音波処理の効果

示唆しているように思われた。

考 察

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 intact な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* と *E. dispar* のフェレドキシンの構造の共通性が高かったために超音波処理の必要がなかったのではないかと考えている。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を対象とした薬剤のスクリーニング及びフェレドキシン代謝の解析とフェレドキシンを標的とした合成阻害薬の開発に応用したいと考えている。

結 論

1) 従来困難と考えられていた *E. dispar* の無菌培養が細菌の糖代謝を参考としてグルコースをグルコン酸に置き換えた YIGADHA-S 培地を用いることで可能となった。

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。

3) *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。

4) *E. histolytica* / *E. dispar* のフェレドキシンを標的とするような選択的な薬剤の開発に YIGADHA-S 培地を用いて培養した *E. dispar* から得られる情報が役立つものと考えられた。

健康危険情報

研究発表

(1) 論文発表

1. Seiki Kobayashi, Eiko Imai, Ali Haghghi, Hiroshi Tachibana and Tsutomu Takeuchi. Cultivation of *Entamoeba dispar*: Growth-promoting effect of ferredoxin. Arch. Med. Res., 31(4), S210-S211, 2000.
2. Dylan R. Pillai, Seiki Kobayashi and Kevin C. Kain. *Entamoeba dispar* galactose/N-acetyl-D-galactosamine lectin: Evidence for differential gene expression and conformational regulation. Arch. Med. Res., 31(4), S234-S236, 2000.

(2) 学会発表参考文献

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

知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

- (1) 特許取得
- (2) 実用新案登録
- (3) その他



日和見原虫感染症の治療に関する研究 —新規ailanthone誘導体の抗アメーバ作用に 関する実験的研究—

竹内 勤、小林 正規、今井 栄子、藤原 達司

慶應義塾大学医学部熱帯医学・寄生虫学教室

研究要旨

側鎖を改変して合成された新規ailanthone誘導体の抗アメーバ作用を強毒株であるHM-1:IMSS株を用いて*in vitro* cultureと生後4～5週のハムスター新生児を使用したアメーバ性肝膿瘍を実験モデルとして用いて検索した。テストした16種類のgroup Aに属するailanthone誘導体のうち15β-[(2E)-3-methyl-2-octenoyloxy]ailanthone(SUN2071)と15β-[(2E)-dodecenoyloxy]ailanthone(SUN0234)が最も強い*in vitro*での殺虫作用を示し、本実験条件下でMICはいずれも0.5μg/mlと算定された。標準として比較に使用したmetronidazoleは2.0μg/mlおよびailanthoneそのものはMIC2μg/ml以上であった。実験的肝膿瘍に対する治療効果はSUN2071のみを使用して行った。薬剤はdimethyl sulfoxideに溶解し、7.5mg/kg/dayの投与量で5日間連続経口投与を行った。この治療効果はmetronidazoleの高投与量(35mg/kg/day、5日間)の場合とほぼ同等の効果がある事が推測された。以上のデータは少なくともSUN2071は更にアメーバ感染に対して治療効果に関する検討を進める価値があることを示している。

分担研究者：竹内 勤

研究協力者：小林正規、今井栄子、藤原達司

Studies of chemotherapy of opportunistic protozoan infections : Anti-amebic efficacy of newly synthesized ailanthone derivatives

Tsutomu Takeuchi, Seiki Kobayashi, Eiko Imai, Tatsushi Fujiwara,

Department of Tropical Medicine and Parasitology, School of Medicine, Keio University

目 的

Entamoeba histolytica 感染によるアメーバ症は現在もお開発途上国では大きな公衆衛生上の問題となっている。また先進諸国では同性愛者の性感染症として、あるいは施設内感染症として重要な存在である事は間違いない。他方、本来病原性である *E. histolytica* は最近の研究で形態的には非常に似ているが非病原性である *Entamoeba dispar* と別種とされたため、アメーバ感染に関する疫学、診断、治療などに関して再検討を要する事態となっている。これに関連し、わが国では同性愛者間に欧米と異なり高率に *E. histolytica* が分布しているため、同性愛者間に invasive amebiasis が多発している。従ってわが国では HIV と *E. histolytica* との混合感染がかなりの頻度で起こっており、この混合感染に関する詳細な臨床的検討は早急に行なわれるべきであろう。また *E. histolytica* の化学療法そのものも現在第一選択薬剤とされている metronidazole を含む 5-nitroimidazole 製剤が実験的に発癌性、変異原性を有している事から新規薬剤の開発を含む再検討を必要とする状況となっている。更に *E. histolytica* に近縁の原虫である *Trichomonas vaginalis* には 5-nitroimidazole に対する薬剤耐性株も出現している。

筆者らの研究室では以前よりアメーバ感染に対する新規化学療法の研究を行ってきたが、今回は Simaroubaceae 科の植物の成分である quassinoid の一種である ailanthone とその側鎖を種々改変した誘導体の抗アメーバ作用を検索した。quassinoid はその構造によって A、B、C の三グループに分ける事ができる。group A、B に属する quassinoids のうち少数のものはこれまでも抗アメーバ作用に関して検討された事があるが、動物モデル作成の困難さ、あるいは副作用などのためその後の十分な検討が行なわれたものはない。今回テストした ailanthone 誘導体は group A quassinoids に大多数が属し、一部のみ group B に属した。

方 法

今回の実験で使用したのは *E. histolytica* strain HM-1:IMSS である。このアメーバは 6ml 容量のス

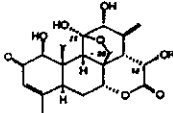
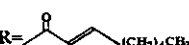

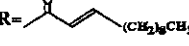
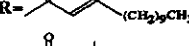
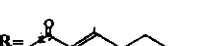
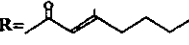
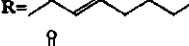

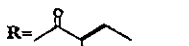

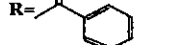
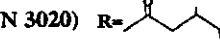
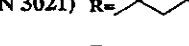


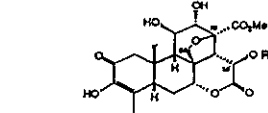
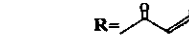
クリューキャップ付き培養用試験管に 15% adult bovine serum を含む BI-S-33 培地 (Diamond et al. 1978) を気相が殆どなくなるまで加えた培養系で 35.5℃、72 時間培養した。アメーバは従来の方法 (Takeuchi et al. 1977) に従って遠心して分離洗浄後、実験目的に従ってプロセスした。

実験的化学療法に使用した ailanthone 及び誘導体の化学構造は Table 1 にまとめて示した。これらの誘導体の化学合成は以前に記載した方法 (Honda et al. 1987) で行なった。本研究で使用した他の化合物は市販の最高級の品質のものを使用した。

In vitro での ailanthone 誘導体の抗アメーバ作用の検討は以下のように行なった。まずこれらの誘導体の stock solution を dimethyl sulfoxide (DMSO; 10%) にて 300 µg/ml に調製し、0.2 µm の pore size を有する membrane filter で濾過して滅菌した。滅菌した stock solution は使用まで 4℃ に保存した。これらの化合物の抗アメーバ作用は無菌培地における minimum lethal concentration (MLC) を決めることで評価した。方法そのものは以前に報告した方法 (Takeuchi et al. 1984) によった。すなわち 0.1 ml の BI-S-33 medium に suspend した 2×10^5 個のアメーバ栄養型虫体を 6ml 容量のスクリーキャップ付き培養用試験管に入れた 5.9 ml の 15% bovine serum albumin を含む BI-S-33 medium に添加した。この培地を 35.5℃ にて 24 時間培養し、均一にした培養液 50 µl をとり、そのうち 5 µl を光学顕微鏡下で観察してアメーバ栄養型の数を算定した。その直後に 0.1、0.25、0.5、1.0、1.5、2.0 µg/ml の濃度を含む各 ailanthone 誘導体溶液 50 µl を添加した。コントロールとしては同量の 10% DMSO を使用した。その後、24、48、72 時間経過後に上記同様にアメーバ数を算定した。MLC は 72 時間後に全てのアメーバを殺滅できる最小濃度をもって表示した。アメーバの viability は光学顕微鏡下で容易に判定可能であるが、更に確実に viability を評価するために培地を遠心し、pellet を一回洗浄した後新しい BI-S-33 medium に suspend して続く 5 日間増殖の有無を検索することで行なった。

実験的肝膿瘍の治療実験では jird が 0.5 mg/kg と云う低投与量で死亡したため、生後 4～5 週間のオスハムスターのみを使用した。ハムスターでの

Table 1 Minimum Lethal Concentrations (MLCs) of Novel Ailanthone Derivatives, Brusatol, Bruceantin and Ailanthone against *Entamoeba histolytica* in BI-S-33 medium

Ailanthone Derivatives	(Names as trial drugs)	Chemical Structures	MLCs* (μg/ml)
Chemical Names			
Group A			
Ailanthone			2.0<
15β-[(2E)-2-octenoyloxy]ailanthone	(SUN 1303)	R= 	1.0
15β-[(2E)-2-undecenoyloxy]ailanthone	(SUN 0237)	R= 	1.0
15β-[(2E)-2-dodecenoyloxy]ailanthone	(SUN 0234)	R= 	0.5
15β-[(2E)-2-tridecenoyloxy]ailanthone	(SUN 1004)	R= 	2.0
15β-[(2E)-3,7-dimethyl-2,6-octadienoyloxy]ailanthone	(SUN 1304)	R= 	1.0
15β-[(2E)-3-methyl-2-hexanoyloxy]ailanthone	(SUN 2070)	R= 	1.0
15β-[(2E)-3-methyl-2-octenoyloxy]ailanthone	(SUN 2071)	R= 	0.5
15β-[(2E)-3-methyl-2-decenoyloxy]ailanthone	(SUN 2036)	R= 	1.0
15β-[2-methyloctanoyloxy]ailanthone	(SUN 2102)	R= 	1.0
15β-[2-methyldecanoyloxy]ailanthone	(SUN 2103)	R= 	1.0
15β-[(2E)-2-methyl-2-butenoyloxy]ailanthone	(SUN 2118)	R= 	2.0
15β-[p-butylbenzoyloxy]ailanthone	(SUN 2099)	R= 	1.0
15β-[benzoyloxy]ailanthone	(SUN 2101)	R= 	1.0
15β-[(2E)-3,4-dimethyl-4-hydroxy-2-pentenoyloxy]ailanthone	(SUN 3020)	R= 	1.0
15β-[(2E)-3,4-dimethyl-4-acetoxy-2-pentenoyloxy]ailanthone	(SUN 3021)	R= 	2.0
15β-hydroxyailanthone	(SUN 1294)	R=H	2.0<
Group B			
Brusatol			2.0<
Bruceantin			1.0
Metronidazole			2.0

*MLC was determined from the data of three independent determinations. Each experiment was done in duplicate. The most frequent values of the lowest lethal concentrations were regarded as MLC.

肝膿瘍は *E. histolytica* 栄養型 を直接以前記載した方法(Kobayashi 1994)で肝左葉に注射して作成した。ailanthone 誘導体は 1.0mg/ml の濃度で 10%DMSO に溶解し、予備的な実験に基づいて軽い麻酔下で 7.5mg/kg/day の容量をアメーバ注射後 14 日目に肝膿瘍形成を確認した後、次の日から 5 日間連日経口投与した。比較のため metronidazole を蒸留水に溶解して使用したが、投与量はヒトのアメーバ性肝膿瘍の治療量に対応して 35mg/kg/day に設定した。治療効果の評価は Matternand Keister (1977)の方法によって average liver lesion score を使用して実験治療終了後 5 日目に行った。治療成績の統計的な分析は Mann-Whitney Test によった。この実験は慶応義塾大学医学部の動物実験のガイドラインに沿って行なわれた。

結果

最初に 0.5 μ g/ml の濃度で *in vitro* における ailanthone 誘導体の抗アメーバ作用のスクリーニングを行ない、72 時間アメーバと接触させると 15 β -[(2E)-3-methyl-2-octenoyloxy]ailanthone (SUN2071)と

15 β -[(2E)-2-dodecenoyloxy]ailanthone (SUN0234)が最も強い抗アメーバ作用を有する事が示された(データ提示せず)。

この予備データに基づいて、16種類の ailanthone 誘導体と近縁の quassinoid の MLC を決定して、より詳細な比較検討を行なった。その結果は Table 1 に示したが、予備実験と同様に SUN2071 と SUN0234 の MLC が最も低く 0.5 μ g/ml で、metronidazole よりも低い値を示した。group B quassinoid である brusatol、bruceantin 及び ailanthone そのものの MLC は何れも 1.0 μ g/ml 以上であった。この結果に基づいて SUN2071 を以後の実験に使用した。

Figure 1 には SUN2071 による殺アメーバ作用の時間経過を示した。SUN2071 は 0.1 μ g/ml と云う低濃度でもアメーバの増殖を阻害したが、本実験条件下では上述のように 0.5 μ g/ml 以上の濃度でアメーバを完全に殺滅できた。殺アメーバ作用は SUN2071 添加後 24 ~ 48 時間のあいだで明確になり、これまで我々が見いだした殺アメーバ作用を有するハロゲン化ビスフェノールなどに比べると遅効性と思われた。しかしアメーバ培養後 24 時間

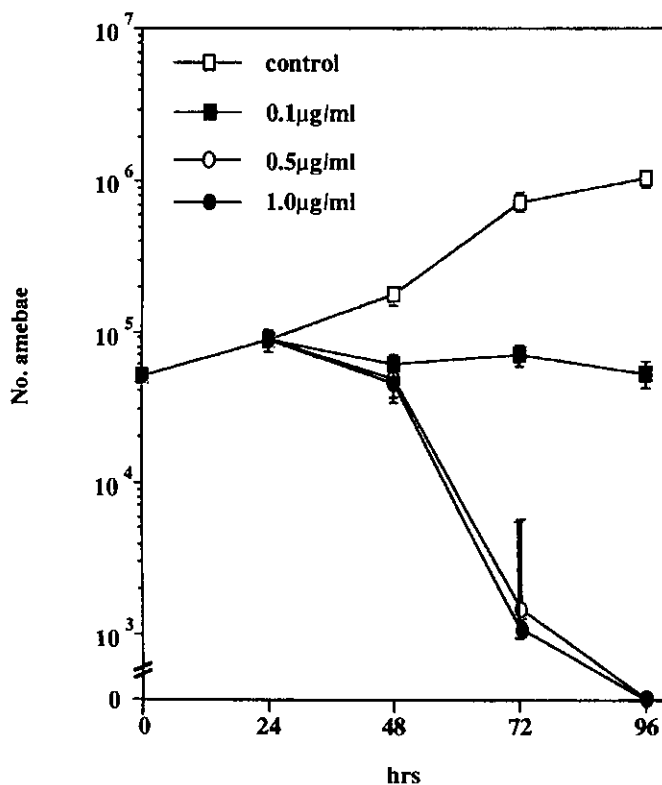


Figure 1

経過しても確実に殺虫作用を示すので、SUN2071の抗アメーバ作用は高いものと推測される。

ハムスターにおけるアメーバ性肝膿瘍の実験治療は現在の第一選択薬である metronidazole と比較する形で検討した。実験データはTable 2に示したが、予備的に幾つかのailanthone誘導体をテストした限りでも SUN2071 の治療効果は average liver lesion score の減少が SUN0234 と並んで最も大きく、*in vitro* の検索と一致していた (データ提示せ

ず)。また metronidazole の治療効果と比較した場合、少なくとも metronidazole の lower dose (35mg/kg/day、3日間)より有効であることが示唆された。また SUN2071 による average liver lesion score の減少は metronidazole を同量で5日間投与した場合の score の減少とほぼ同等であろうと推測された。本実験条件下では実験に使用したハムスターに副作用と思われる変化は見いだせなかった。

Table 2 Therapeutic Efficacy of SUN2071 against Experimental Amebic Liver Abscess in Hamster and Comparison with that of Metronidazole

	No. Positive /No. Inoculated ^a	Liver Lesion Scores					Average Liver Lesion Scores	Statistical Difference ^{b,c}
		0	1 ⁺	2 ⁺	3 ⁺	4 ⁺		
Control	(3/3)	(0)	(0)	(1)	(0)	(2)	(3.3)	
	3/3 ^a	0	0	0	1	2	3.7	
SUN2071	(13/13)	(0)	(3)	(3)	(7)	(0)	(2.5)	
	10/13	3	7	0	3	0	1.2	p<0.05
Metronidazole ^b	(12/12)	(0)	(2)	(3)	(5)	(2)	(2.6)	
	12/12	0	2	4	4	2	2.5	p>0.05
Metronidazole ^c	(4/4)	(0)	(0)	(0)	(4)	(0)	(3.0)	
	4/4	0	0	4	0	0	2.0	p<0.05

The numbers inside the parentheses means the data of hamsters on the 14 days of inoculation of amebae, i.e., one day before initiating administration of either SUN2071 or metronidazole, and those without parentheses the data on the 5th day after the completion of administration. Other details as in the text.

^aStands for the ratio of the number of hamsters with confirmed amebic liver abscess to those inoculated with trophozoites of *E. histolytica* into the liver.

^bStatistical analyses were made between the scores of hamsters before (values in the parentheses) and after either SUN2071 or metronidazole administration (values without parentheses).

^cAdministered with 10% DMSO as described in the text.

^bAdministered with 35 mg/kg once daily for 3 consecutive days.

^cAdministered with the same dose as above for 5 consecutive days.

考 察

確かに metronidazole は現在アメーバ症治療の第一選択薬剤であり、多くの症例に投与されてきたが、metronidazole を含む 5-nitroimidazole には実験的には発癌性、変異原性がある事が既に明らかになっている。このような副作用が確実に認識された人体症例はまだ見出されていないが、新規化学療法剤の開発の必要性は明白であろう。

これまでに Simaroubaceae 科に属する植物から分離された quassinoid のうちのあるものは強い抗アメーバ作用を有する事が見出されている。例えば Gillin ら(1982)は group A と B の quassinoids を調べ bruceantin が最も有効であり、 IC_{50} と MLC はそれぞれ $0.018 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.076 \mu\text{g/ml}$ であったと報告している。また ailanthone の MLC は $0.92 \mu\text{g/ml}$ とされている。明らかに今回の実験と MLC の値に関して差が見られるが、これは恐らく実験条件の差異に由来しているものと考えられる。Gillin らの実験系では培養開始時には既に quassinoid が培養液中に存在しており、今回の実験のようにアメーバが24時間も増殖を行ってから添加したものではない。今回の実験では ailanthone、bruceantin 共に比較検討しており、少なくとも SUN2071 などが ailanthone、bruceantin より抗アメーバ作用が低いというデータは得られていない。

また SUN2071 が経口投与で実験的肝膿瘍に対して強い治療効果を示したことは重要と思われる。これまで実験モデルの安定性など、種々の理由で quassinoid が肝膿瘍に対しての治療効果を検索されたことはなく、今回が初めてのものである。

副作用に関してのこれまでの検討によればマウスに対しては重篤のものは確認されていない。わずかに BDF1 マウスに対しては SUN2071 が白血球減少作用を有する事が報告されている(Kato et al. 1988)が、投薬中止と共に回復している。またこの研究では SUN2071 は腹腔内投与されており、今回の実験条件と異なっている。経口投与された場合は恐らく副作用の出現は低く押さえられる事が予想でき、今回認めうべき副作用がなかった事は投与方法も関係している可能性がある。

副作用に関しては更に検討を要するものの、今回の実験データは少なくとも ailanthone 誘導体は

アメーバ感染症の治療に関して更に検討する価値があることを示した者と思われる。

結 論

今回テストした一連の group A quassinoid の中で 15β -[(2E)-3-methyl-2-octenoyloxy]ailanthone (SUN2071) と 15β -[(2E)-2-dodecenoyloxy]ailanthone (SUN0234) が最も低い MLC を示した。この値は metronidazole より低い事が明らかになった。ハムスターにおける実験的肝膿瘍の治療でも SUN2071 は統計的に有意な average liver lesion score の減少を示した。この結果は group A quassinoid は更にアメーバ症の新規化学療法剤として検索する価値がある事を示唆している。

健康危険情報

研究発表

(1)論文発表

S. Kobayashi, E. Imai, T. Fujiwara and T. Takeuchi: Inhibition of the growth of *Entamoeba histolytica* by semi-synthesized ailanthone derivatives and their chemotherapeutic efficacy against experimental amebic liver abscess. (submitted)

(2)学会発表参考文献

知的財産権の出願・登録状況

- (1)特許取得
- (2)実用新案登録
- (3)その他



日和見原虫感染症の治療に関する研究 —アメーバの嚢子形成機構の解明を通じた 薬剤開発の標的の研究—

牧岡 朝夫¹⁾、竹内 勤²⁾

¹⁾ 東京慈恵会医科大学熱帯医学教室

²⁾ 慶応大学医学部熱帯医学寄生虫学教室

研究要旨

赤痢アメーバ症は栄養型によって引き起こされるが栄養型は感染型ではなく嚢子が感染型である。それ故、エイズに合併した場合も含めてアメーバ症対策において栄養型の殺滅とともに嚢子対策が重要な課題であり、これはまた嚢子キャリアーの問題とも関連している。そこで本研究では嚢子形成の阻害剤ならびにその形成機構の解明を通じた薬剤開発の標的の探求を行った。Jasplakinolide(Jas)は海綿の一種 *Jaspis* sp. 由来の cytotoxin でアクチンの重合を促進し、形成されたF-アクチンを安定化する作用があり細胞膜透過性である。その抗真菌、抗腫瘍活性がすでに明らかになっている。そこで、Jasのアメーバの増殖および嚢子形成に対する効果を調べた結果、両過程を抑制し虫体内にF-アクチン aggregate を形成させる効果があることが判明した。一方、プロテインキナーゼC(PKC)は情報伝達系分子として種々の蛋白をリン酸化することにより細胞増殖、細胞分化を担い、フォスファチジルイノシトール3-キナーゼ(PI 3-K)はその作用により産生された脂質産物が特定の蛋白に作用し、多くの細胞機能を担うことが明らかになっている。そこで、アメーバの増殖および嚢子形成に対するPKCおよびPI 3-K 阻害剤の効果を調べた結果、両過程とも抑制され、PKCならびにPI 3-K の関与が明らかになり、これらが薬剤開発の重要な標的になることが示唆された。

分担研究者：竹内 勤

研究協力者：牧岡朝夫

Studies on targets for drug development against *Entamoeba* encystation through elucidation of its mechanism

Asao Makioka ¹⁾ and Tsutomu Takeuchi ²⁾

¹⁾ Department of Tropical Medicine, Jikei University School of Medicine and ²⁾ Department of Tropical Medicine and Parasitology, Keio University School of Medicine

目 的

赤痢アメーバ症は栄養型によって引き起こされるが栄養型は感染型ではなく、腸内で形成され糞便とともに外界に排出された嚢子が感染型である。それ故、エイズに合併した場合も含めてアメーバ症対策において栄養型の殺滅とともに嚢子対策が重要な課題であり、これはまた嚢子キャリアーの問題とも関連している。嚢子形成機構に関してはまだ不明な部分が多く、この機構の解明は薬剤開発の新たな標的として重要と考えられる。そこで今回、嚢子形成阻害剤ならびにその形成機構の解明を通じた薬剤開発の標的の探求を目的として以下の実験を行った。

1. アクチン重合促進安定化剤jasplakinolideのアメーバの増殖および嚢子形成に対する効果

アクチンフィラメントは真核生物において細胞骨格として細胞運動に関連した多くの機能を担い、アメーバにおいてもその標的細胞への接着および破壊に関与している。Jasplakinolide(Jas)は海綿の一種 *Jaspis* sp. 由来のcytotoxinでアクチンの重合を促進し、形成されたF-アクチンを安定化する作用があり、同様な作用があるファロイジン(phalloidin)と異なり、細胞膜透過性である。その抗真菌、抗腫瘍活性が明らかになっている。そこで今回、このJasのアメーバの増殖、嚢子形成および細胞骨格に及ぼす効果につき検討した。

2. シグナル伝達分子プロテインキナーゼCおよびフォスファチジルイノシトール3-キナーゼ阻害剤のアメーバの増殖および嚢子形成に対する効果

プロテインキナーゼC(PKC)は情報伝達系分子として種々の蛋白をリン酸化することにより細胞増殖、細胞分化を担い、フォスファチジルイノシトール3-キナーゼ(PI 3-K)はその作用により産生された脂質産物が特定の蛋白に作用し多くの細胞機能を担うことが明らかになっている。そこで今回、アメーバの増殖および嚢子形成に対するPKCおよびPI 3-K阻害剤の効果を調べた。

方 法

赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) HM-1 株および *E. invadens* IP-1株栄養型の無菌培養はBI-S-33培養液を用いて行った。薬剤による増殖阻害効果はこの培養系に薬剤を加え、3日間 (*E. histolytica*) または7日間 (*E. invadens*) 培養後の虫体数を対照の虫体数と比較することにより増殖阻害効果として表した。赤痢アメーバの *in vitro* 嚢子形成系は確立されていないことから嚢子形成実験は赤痢アメーバ嚢子形成のモデルとして重要な *E. invadens* の *in vitro* 嚢子形成系を用いた。即ち、BI-S-33培養液中で増殖させた *E. invadens* 栄養型を嚢子形成液(47%LG)に移すことにより嚢子形成を誘導し、3日間培養後嚢子と栄養型の虫体数を求め、嚢子形成率を算出した。栄養型と嚢子の形態的变化を観察するためコーン染色を施し、光学顕微鏡により観察し、電子顕微鏡による観察も行った。また、虫体アクチン蛋白の動態を調べるため、SDSゲル電気泳動(SDS-PAGE)およびイムノブロッティングを行った。JasplakinolideはMolecular Probeから購入し、PKC阻害剤として用いたstaurosporine、chelerythrine、calphostin Cおよび *D-erythro-sphingosine* はSigmaから購入した。前2者はPKCのcatalytic domainに作用し、後2者はregulatory domainに作用することが明らかになっている。PI 3-K阻害剤としてはwortmannin(Sigma)を用いた。

結 果

1. アクチン重合促進安定化剤 jasplakinolide (Jas)のアメーバの増殖および嚢子形成に対する効果

1)増殖に及ぼす効果:種々の濃度のJas存在下で3日間培養後の赤痢アメーバ栄養型の虫体数を比較した結果、濃度に依存した増殖抑制がみられ、1 μ Mの濃度で増殖を完全に抑制した。一方、*E. invadens*はJasに対してより抵抗性がみられた(Fig.1)。2)嚢子形成に対する効果:Jasは*E. invadens*の増殖および嚢子形成を抑制したが、嚢子形成を低濃度でより強く抑制した(Fig. 1)。3)細胞骨格への影響:Jas(0.5 μ M)存在下で培養後生残した赤痢アメーバ栄養型をコーン染色した結果、虫体内に

平均直径10 μ mの円形構造が観察された。電子顕微鏡観察ではその構造内部は均一な granular material で占められていた (Fig. 2)。FITC- ファロイジンで染色したところ、強く蛍光染色され、F-アクチンのaggregateであることが確認された。3) 細胞骨格中のF-アクチン量: Jasで処理した赤痢アメーバ栄養型から調製した細胞質分画と細胞骨格分画をSDS-PAGEおよびイムノブロットングにより調べた結果、対照に比し、F-アクチンaggregateの存在に対応して細胞骨格に含まれるF-アクチン量が増加していることが明らかになった。また、Jasで処理した *E. invadens* 栄養型から形成された嚢子にも F-アクチン aggregate が確認された (Fig. 3)。以上の結果から、Jasはアメーバの増殖および嚢子形成を抑制し、虫体内にF-アクチンaggregateを形成させる効果があることが判明した。

2. シグナル伝達分子プロテインキナーゼC (PKC) 阻害剤のアメーバの増殖および嚢子形成に対する効果

1) 増殖に及ぼす効果: 種々の濃度の阻害剤存在下で7日間培養後の *E. invadens* 栄養型の虫体数を比較した結果、staurosporineとchelerythrineが増殖を抑制した (Fig. 4)。2) 嚢子形成に及ぼす効果: 増殖の場合と同様、staurosporineとchelerythrineが嚢子形成を抑制した。chelerythrineによる嚢子形成の抑制は増殖抑制よりも強かった (Fig. 4)。staurosporineは最も強い効果を示したが、PKC以外のキナーゼに対する作用も明らかになっており、以後chelerythrineを実験に用いた。3) 効果の可逆性: chelerythrineの効果の可逆性を検討した結果、栄養型の増殖に対しては可逆的であったが、嚢子形成に対しては非可逆的であった (Fig. 5)。以上の結果から、アメーバの増殖ならびに嚢子形成にPKCの関与が明らかになった。

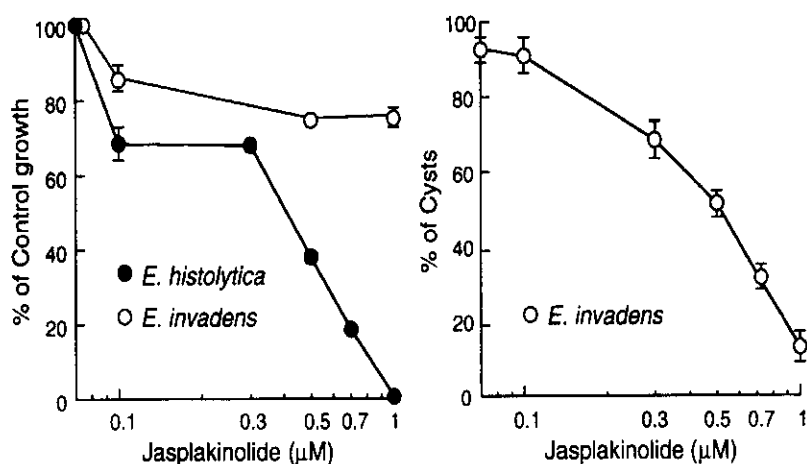


Fig. 1 Effect of jasplakinolide on the growth (left) and encystation (right) of *E. histolytica* and *E. invadens*

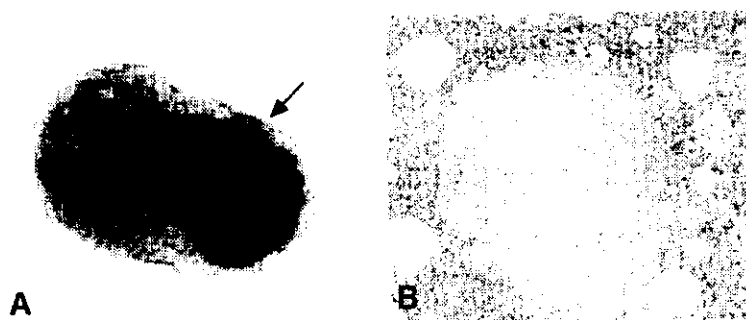


Fig. 2 A. Light microscopy of modified Kohn-stained trophozoites of *E. histolytica* treated with jasplakinolide, including a large round structure (arrow).
B. Electron microscopy of the large round structure, showing a round area of granular materials free of any other organelles.

3. シグナル伝達分子フォスファチジルイノシトール3-キナーゼ(PI3-K) 阻害剤 wortmanninのアメーバの増殖および嚢子形成に対する効果

1)増殖に及ぼす効果：種々の濃度の wortmannin 存在下で7日間培養後の *E. invadens* 栄養型の虫体数を比較した結果、濃度に依存した増殖抑制が認められた(Fig. 6)。2)嚢子形成に及ぼす効果：増殖

の場合と同様、wortmanninは嚢子形成を抑制した(Fig. 6)。また、その抑制の経過を調べたところ、wortmannin存在下では多数の栄養型が嚢子に変わることなく生残した(Fig. 7)。3)効果の可逆性：wortmanninの効果の可逆性を検討した結果、嚢子形成に対しては非可逆的であった。以上の結果から、アメーバの増殖ならびに嚢子形成にPI 3-Kの関与が明らかになった。

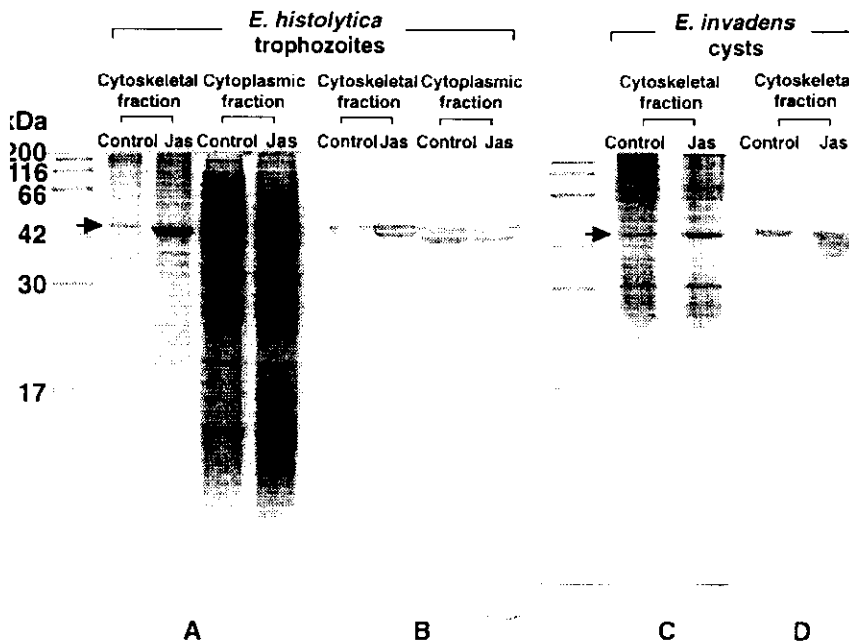


Fig. 3 Increased F-actin content in *E. histolytica* trophozoites treated with jasplakinolide and in *E. invadens* cysts from trophozoites treated with the drug. A, C. Protein staining. B, D. Immunostaining with monoclonal anti-actin antibodies.

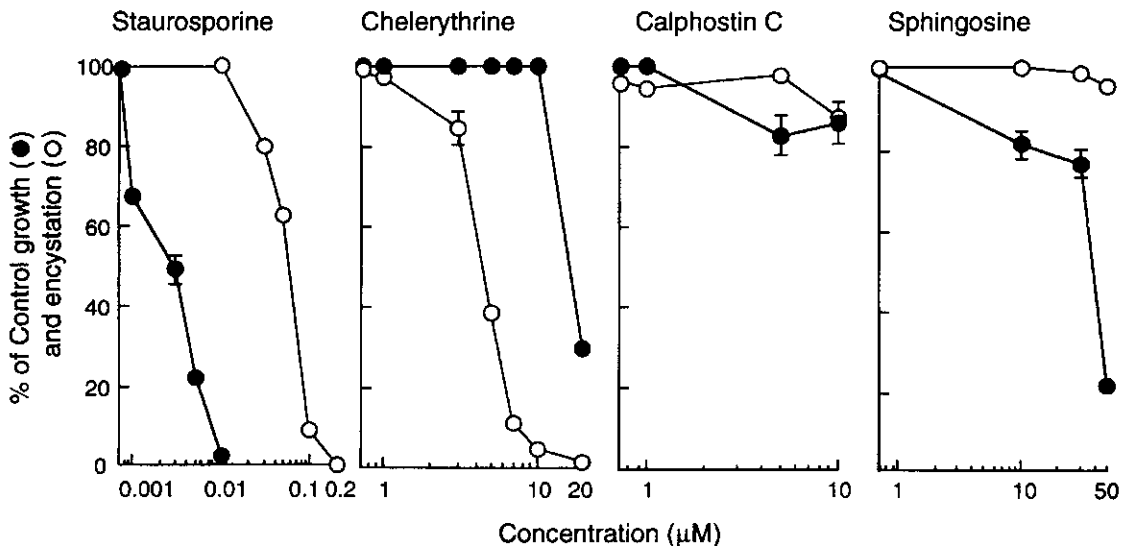


Fig. 4 Effect of PKC inhibitors on the growth and encystation of *E. invadens*

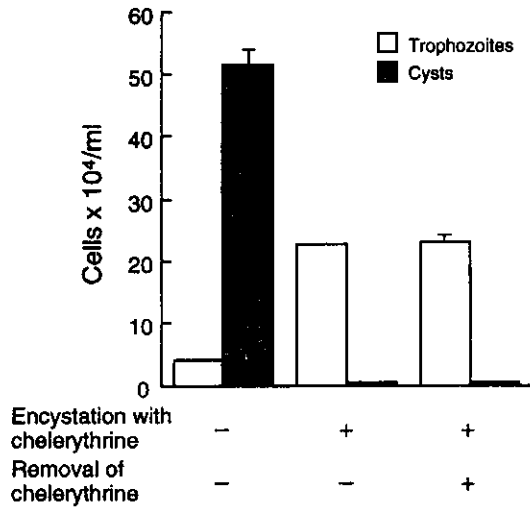


Fig. 5 Effect of removal of chelerythrine on the encystation of *E. invadens*

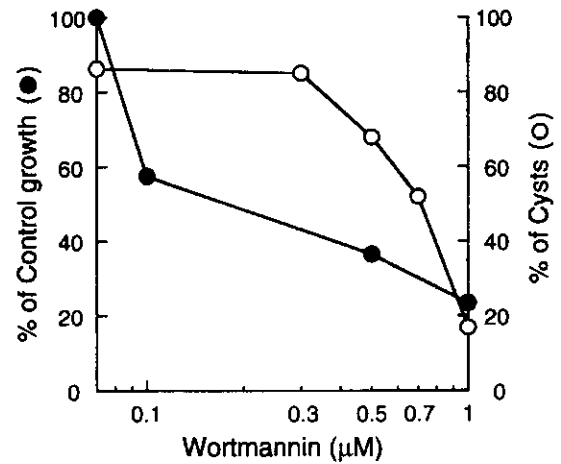


Fig. 6 Effect of wortmannin on the growth and encystation of *E. invadens*

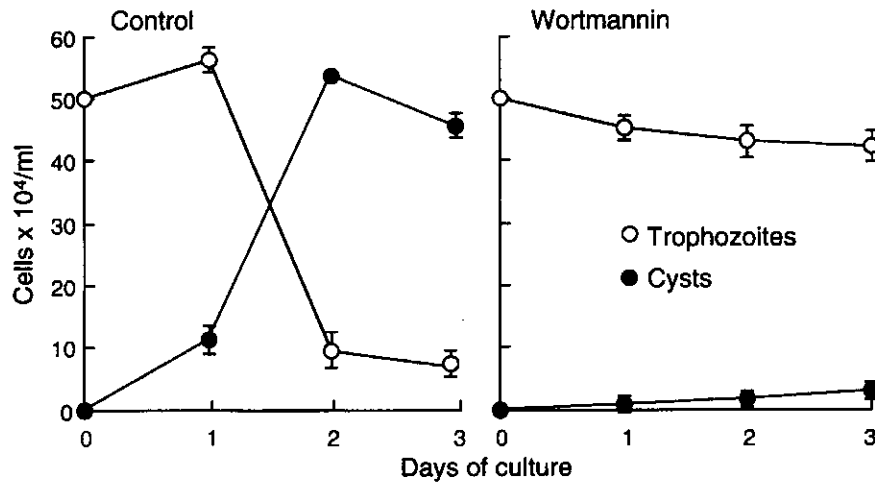


Fig. 7. Time course of inhibition of encystation of *E. invadens* by wortmannin

考 察

アクチン重合促進安定化剤 jasplakinolide(Jas)はアメーバの増殖および嚢子形成の抑制に有効であることが明らかになった。Jasの標的はアメーバのアクチン細胞骨格であり、本来、アクチンは正常状態ではその重合・脱重合により機能を発揮するが、JasのF-アクチンへの結合により脱重合が阻害されF-アクチンのaggregateが形成されると考えられる。正確な機構は不明であるが、その形成ならびに存在がアメーバの増殖にとって不適になると思われる。一方、PKC阻害剤およびPI3-K阻害

剤によるアメーバの増殖および嚢子形成の阻害はこれらが両過程に関与していることを示し、特にこの*in vitro*嚢子形成におけるシグナル伝達系に関しては、本研究においてPKCおよびPI3-Kの関与が初めて明らかになった。

結 論

Jasはアメーバの増殖および嚢子形成を抑制し、虫体内にF-アクチンaggregateを形成させる効果があることが判明した。また、アメーバの増殖ならびに嚢子形成にPKCならびにPI3-Kの関与が明ら

かになり、これらが薬剤開発の重要な標的になることが示唆された。

健康危険情報

なし

研究発表

(1) 論文発表

- 1) 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. 86, 599-602. 2000.
- 2) Makioka, A., Kumagai, M., Ohtomo, H., Kobayashi, S., Takeuchi, T.: Effect of the antitubulin drug oryzalin on the encystation of *Entamoeba invadens*. Parasitol. Res. 86, 625-629. 2000.
- 3) Makioka, A., Kumagai, M., Ohtomo, H., Kobayashi, S., Takeuchi, T.: *Entamoeba invadens*: Protein kinase C inhibitors block the growth and encystation. Exp. Parasitol. 95, 288-290. 2000.
- 4) Makioka, A., Kumagai, M., Ohtomo, H., Kobayashi, S., Takeuchi, T.: Growth inhibition and actin aggregate formation of *Entamoeba histolytica* by jasplakinolide. Arch. Med. Res. 31, S145-S146. 2000.
- 5) 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. 31, S185-S186. 2000.
- 6) 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
- 7) Makioka, A., Kumagai, M., Ohtomo, H., Kobayashi, S., Takeuchi, T.: Inhibition of encystation of *Entamoeba invadens* by wortmannin. Parasitol. Res. 2001.in press

(2) 学会発表

- 1) Makioka, A., Kumagai, M., Ohtomo, H., Kobayashi, S., Takeuchi, T.: Effect of anti-microtubule drug oryzalin on the encystation of *Entamoeba histolytica*. 第69回日本寄生虫学会大会. 2000年4月.
- 2) 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.
- 3) 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.

- 4) 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.
- 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.
- 6) 牧岡朝夫, 熊谷正広, 大友弘士, 小林正規, 竹内勤: チュープ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回日本熱帯医学会大会. 2000年11月.
- 7) 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回日本熱帯医学会大会. 2000年11月.
- 8) 牧岡朝夫, 熊谷正広, 大友弘士, 小林正規, 竹内勤: チュープ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.
- 9) 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.
- 10) Makioka, A., Kumagai, M., Ohtomo, H., Kobayashi, S., Takeuchi, T.: Growth inhibition and actin aggregate formation of *Entamoeba histolytica* by jasplakinolide. XIV Seminar on Amebiasis. 2000年11月.
- 11) 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*. XIV Seminar on Amebiasis. 2000年11月.

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



日和見原虫感染症の治療に関する研究 —赤痢アメーバの接着を阻止する遺伝子組換え型 ヒトモノクローナル抗体の作製—

橘 裕司¹⁾、竹内 勤²⁾

¹⁾ 東海大学医学部感染症学部門

²⁾ 慶應義塾大学医学部熱帯医学寄生虫学教室

研究要旨

赤痢アメーバ症は、男性同性愛のHIV感染者における合併症として、わが国では特に重要な疾病である。赤痢アメーバの感染は虫体が腸管粘膜に接着することによって成立し、虫体が宿主細胞を傷害する際にも接着は必須の過程である。従って、この過程を阻止することが赤痢アメーバ症の予防に有効であると考えられる。本研究では、虫体の接着を阻止できるようなヒトモノクローナル抗体Fab断片の大腸菌による作製を試みた。アメーバ性肝膿瘍患者の少量の末梢リンパ球よりRNAを抽出し、RT-PCRによって抗体遺伝子を増幅した。この遺伝子断片を発現ベクターに組み込んで大腸菌に導入し、抗体遺伝子ライブラリーを作製した。赤痢アメーバ抗原と患者の抗体を用いてスクリーニングし、陽性クローンを得た。この内の1クローンが産生する抗体は、赤痢アメーバの細胞表面に存在する分子量260kDaのガラクトース特異的レクチンを認識していた。この抗体で虫体を前処理することによって、*in vitro*における虫体のヒト赤血球への接着が阻止できた。このような活性を持った抗体や、抗体を産生する大腸菌は、赤痢アメーバ症の予防や治療に応用できる可能性がある。

分担研究者：竹内 勤

研究協力者：橘 裕司

A recombinant human monoclonal antibody which inhibits *in vitro* adherence of *Entamoeba histolytica* trophozoites

Hiroshi Tachibana¹⁾ and Tsutomu Takeuchi²⁾

¹⁾ Department of Infectious Diseases, Tokai University School of Medicine and ²⁾ Department of Tropical Medicine and Parasitology, School of Medicine, Keio University

目 的

わが国では、赤痢アメーバ症は男性同性愛者における性行為感染症として、特に注目されている。最近ではHIVとの混合感染の症例が増加してきており、赤痢アメーバ症の発症が契機となってHIV感染が判明した例も報告されている。HIV感染者では赤痢アメーバ症が重症化することも考えられ、日和見感染症の一つとして考慮する必要がある。

赤痢アメーバがヒトに感染するには虫体が腸粘膜やムチンに接着することが必要であり、また、宿主細胞に傷害性を発揮するにも接着は必須の過程である。この過程に関与しているのが虫体表面に存在するレクチンであり、主要なものとして260-kDaのガラクトース及びN-アセチルガラクトサミンに特異的なレクチン(Gal/GalNAcレクチン)が知られている。従って、もしこのような抗原に対するヒト抗体を作製できれば、赤痢アメーバ症の予防や治療に応用できると考えられる。しかしながら、細胞融合法ではヒトモノクローナル抗体の作製は困難である。

最近、マウス抗体をヒト化したり、ヒト抗体の断片をファージに発現させてスクリーニングする方法が報告されている。我々も新たに開発した発現ベクターを用いて、赤痢アメーバに特異的なマウスやヒトの抗体Fab断片を大腸菌で産生できることを報告してきた。本研究では、抗体遺伝子のスクリーニング方法を改良することによって、より多くのクローンをスクリーニングし、赤痢アメーバの接着を阻止できるヒトモノクローナル抗体の作製を試みた。

方 法

1. 細胞培養

赤痢アメーバ10株(HM-1:IMSS, HK-9, 200:NIH, HB-301: NIH, H-302: NIH, H-303: NIH, DKB, C-3-2-1, SAW1627, SAW755CR 株)の栄養型虫体、*Entamoeba moshkovskii* Laredo 株の栄養型虫体はBI-S-33培地で無菌培養した。*E. dispar* SAW1734RclAR 株の栄養型虫体はBCS1-S培地で*Pseudomonas aeruginosa*と共棲培養した。

2. 抗体遺伝子ライブラリーの作製

アメーバ性肝膿瘍患者の末梢血液約10mlからリンパ球を分離し、RNAを単離した。既知のヒト抗体遺伝子の塩基配列に基づいて作製したプライマーを用い、RT-PCRによって抗体L鎖(κ , λ)の全領域とH鎖(γ)のFd領域をコードする遺伝子をそれぞれ増幅した。発現ベクターpFab1-His2の2つのクローニング部位に、増幅されたL鎖、H鎖のDNA断片を組み込んで大腸菌JM109に導入し、抗体遺伝子ライブラリーを作製した。

3. 抗体遺伝子の発現と抗赤痢アメーバ抗体産生クローンのスクリーニング

寒天プレートに形成させた大腸菌コロニーをニトロセルロース膜に移しとり、isopropyl- β -D-thiogalactopyranosideを含むプレートの上に置いて30℃で6時間発現を誘導した。菌を溶解した後、赤痢アメーバ抗原(HM-1:IMSS株)、ペルオキシダーゼ標識したリンパ球ドナー由来の抗体、基質を順次反応させ、陽性クローンのスクリーニングを行った。陽性クローンについては赤痢アメーバ栄養型生虫体を用いた間接蛍光抗体法によって2次スクリーニングを行った。

4. 抗体Fab断片の精製

陽性クローンを1Lの培地で培養した。ヒトIgGFabに対するヤギ抗体を結合させたProtein G Sepharose 4FFを用い、イムノアフィニティクロマトグラフィーによってFabを精製した。

5. 抗体の特異性検討

ホルマリン固定した各種アメーバ虫体を抗原とし、間接蛍光抗体法を行った。ウェスタンブロットは、HM-1:IMSS株の粗抽出画分、精製されたGal/GalNAcレクチン画分(260-、170-及び150-kDa)を抗原として用いた。

6. 虫体と赤血球の接着に対する効果

赤痢アメーバHM-1:IMSS株栄養型虫体(10^4 個)を抗体によって37℃で10分間前処理した後、ヒト赤血球と4℃で5分間反応させた。固定染色後、少なくとも3個の赤血球が接着した虫体の比率を計測した。

結果

1. 抗赤痢アメーバ抗体の遺伝子クローニング

肝臓癌患者由来の抗体遺伝子ライブラリーから約 5×10^4 のクローンをニトロセルロース膜上でスクリーニングしたところ、27個が陽性反応を示した。これらのクローンについて、赤痢アメーバ生虫体を用いた間接蛍光抗体法で2次スクリーニングを行った結果、1クローンのみが陽性であった。このクローン(LA-01)について塩基配列を決定した(図1)。V領域のアミノ酸配列を Kabat データベースの配列と比較したところ、H鎖は

VH6ファミリーに属し、L鎖はVk1ファミリーに属していた。

2. LA-01の精製

クローン(LA-01)を大量培養し、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。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)で解析したところ、24-kDaと25-kDaのバンドが認められた。ウェスタンイムノプロットにおいて、24-kDaのバンドは抗κ鎖抗体により、25-kDaのバンドはHis-tagと結合するNi-NTAにより認識され、それぞれがκ鎖とH鎖であることが確

Heavy chain	
1	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTC Q V Q L V Q S G G G V V Q P G R S L R L
61	TCCTGTGAAGTCTCTGGAATCACCTTCAAGGGCTATCCTATGCACTGGGTCCGCCAGGCT S C E V S G I T F K <u>G Y P M H W</u> V R Q A CDR1
121	CCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATTTCAAATGATGGAAGAAATGAGGACTAC P G K G L E W V A <u>V I S N D G R N E D Y</u> CDR2
181	GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCCACATCTCCAGAGACAATCCAATAACACGCTGTAT <u>A D S V K G R F T I S R D N S N N T L Y</u>
241	CTGCAAATGAACAGCCTGACAGCTGAGGACACGGCTCTGTATTTTGTGCGAGGAGTACT L Q M N S L T A E D T A L Y F C A R <u>S T</u>
301	GGGAGAAGATACTATATGGACGCTCTGGGGCAAGGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA 357 <u>G R R Y Y M D V W G K G T T V T V S S</u> CDR3
Light chain	
1	GACATCGTGTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC D I V L T Q S P S S L S A S V G D R V T
61	ATCACTTGCCGGTCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCA I T C <u>R S S Q S I S S Y L N W Y Q Q K P</u> CDR1
121	GGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA G K A P K L L I Y <u>A A S S L Q S G V P S</u> CDR2
181	AGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGTAGTCTGCAACCT R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
241	GAAGATCTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTATCCCTCTCACCTTCGGCCAG E D L A T Y Y C <u>Q Q S Y S I P L T F G Q</u> CDR3
301	GGGACACGACTGGAGATTAACGA 324 G T R L E I K R

図1 遺伝子組換え型ヒト抗体LA-01におけるV領域遺伝子の塩基配列と予想されるアミノ酸配列

認められた (図2)。

3. LA-01の反応性

LA-01は間接蛍光抗体法で赤痢アメーバの標準株10株すべてと反応したが、病原性のない *Entamoeba dispar*、*E. moshkovskii*とは反応せず、赤痢アメーバに対する特異性が確認された。また、ウェスタンブロットによると、非還元条件下で260-kDaのバンドを認識していた (図3)。この分子量の抗原は患者血漿中の抗体が最も強く反応するものであり、Gal/GalNAcレクチンであると

考えられた。そこで精製レクチン抗原を用いて、ウェスタンブロットを行った。その結果、260-kDa Gal/GalNAcレクチンと反応することが確認された (図4)。

4. 虫体の接着に対するLA-01の効果

赤痢アメーバ栄養型虫体を50 μ gのLA-01で前処理することにより、ヒト赤血球への接着はPBS処理に比べて79%抑制された (図5)。有意な抑制効果は1 μ gの抗体濃度まで認められた。

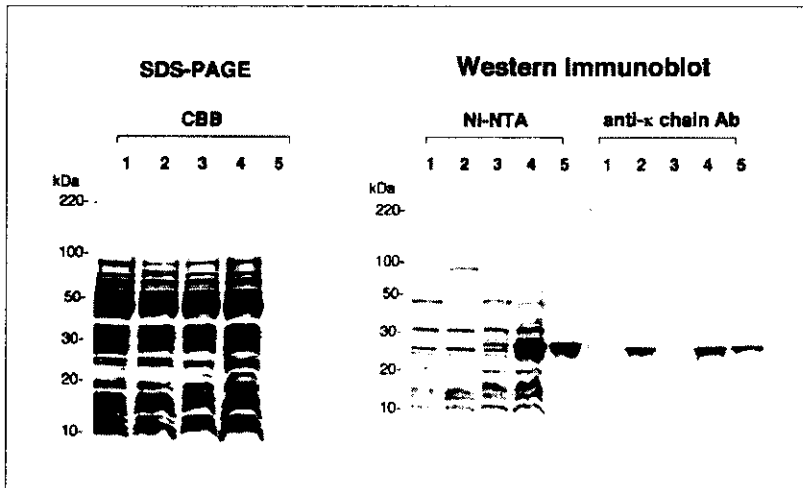


図2 LA-01のSDS-PAGEとウェスタンブロットによる検出
 レーン1: 大腸菌 (ベクターのみのコントロール)、レーン2: L鎖を発現させた大腸菌、レーン3: H鎖 Fdを発現させた大腸菌、レーン4: Fabを発現させた大腸菌、レーン5: 精製した Fab

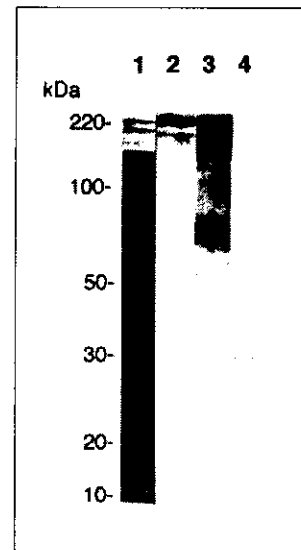


図3 赤痢アメーバ栄養型を抗原としたLA-01のウェスタンブロット解析
 レーン1: CBB染色、レーン2: LA-01、レーン3: リンパ球ドナーの血漿、レーン4: 大腸菌抽出液 (ベクターコントロール)

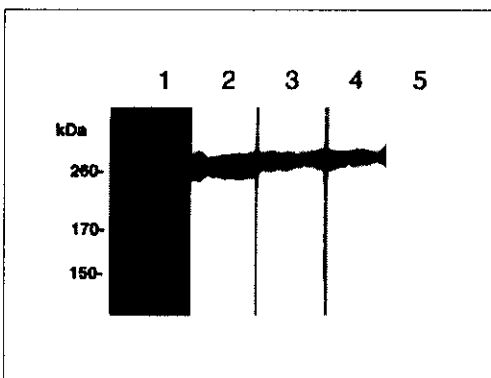


図4 赤痢アメーバGal/GalNAcレクチンを抗原としたLA-01のウェスタンブロット解析
 レーン1: CBB染色、レーン2: LA-01、レーン3: 260-kDa Gal/GalNAcレクチンに対するウサギ抗体、レーン4: 260-kDa Gal/GalNAcレクチンに対するマウスモノクローナル抗体、レーン5: 大腸菌抽出液 (ベクターコントロール)

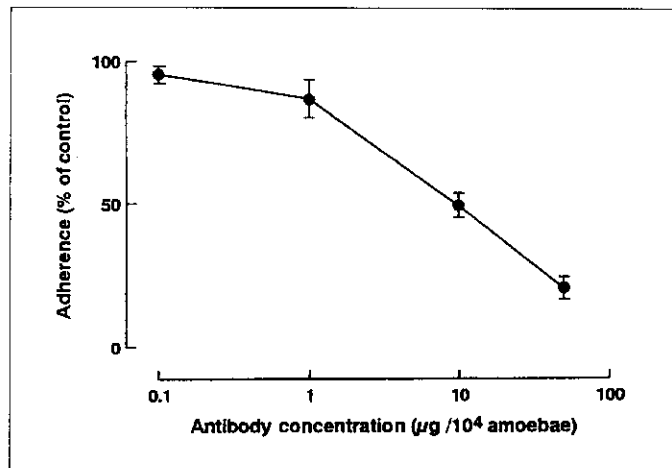


図5 赤痢アメーバとヒト赤血球の接着におけるLA-01の阻止効果
 PBS処理のコントロール群でみられた接着率を100%とした

考 察

組換え型ヒトモノクローナル抗体LA-01は赤痢アメーバに特異的に反応し、虫体の接着を中和できることが明らかになった。寄生虫に対して中和活性を持った組換え型ヒト抗体としてはこの抗体が最初のものである。赤痢アメーバの接着に関わる260-kDaのGal/GalNAcレクチンは大小2つのサブユニットからなり、大きなサブユニットに接着中和エピトープの存在が知られている。LA-01はこの260-kDa Gal/GalNAcレクチンを認識していた。

LA-01を臨床に応用する方法として2つの可能性が考えられる。一つは抗体産生大腸菌をそのまま用いる方法である。LA-01を産生する大腸菌を、常在菌としてヒトの腸内に導入できれば、赤痢アメーバが腸粘膜に接着してコロニーを形成するのを阻止することができると思われる。もう一つは抗体を精製してから用いる方法である。最近、いくつかの赤痢アメーバ抗原に対するウサギ抗体やマウスモノクローナル抗体を接種した実験動物において、赤痢アメーバによる肝膿瘍形成を阻止できたという報告がある。従って、ヒトモノクローナル抗体で受動免疫を付与できる可能性がある。わが国では、男性同性愛者においてHIVと赤痢アメーバの混合感染が報告されているが、抗赤痢アメーバ抗体が検出されなかったAIDS患者の例が報告されている。従って、HIV感染者において、組換え型ヒト抗体によって赤痢アメーバ症の発症を防ぐことが可能かもしれない。今後、抗体のFc部分を含めて完全な抗体分子として組み換えタンパク質を調製すれば、より強い防御効果が期待できると考えられる。

結 論

赤痢アメーバの260-kDa表面レクチンを認識し、*in vitro*で虫体の宿主細胞への接着を阻止するヒトモノクローナル抗体Fab断片を大腸菌で作製した。

健康危険情報

なし

研究発表

(1) 論文発表

- 1) Tachibana, H., Cheng, X.-J., Kobayashi, S., et al.: *Entamoeba dispar*, but not *E. histolytica*, detected in a colony of chimpanzees in Japan., *Parasitol. Res.*, 86:537-541, 2000
- 2) Cheng, X.-J., Ihara, S., Takekoshi, M. and Tachibana, H.: *Entamoeba histolytica*: Bacterial expression of a human monoclonal antibody which inhibits *in vitro* adherence of trophozoites., *Exp. Parasitol.*, 96: 52-56, 2000
- 3) Cheng, X.-J. and Tachibana, H.: Molecular cloning and characterization of peroxiredoxin from *Entamoeba moshkovskii*., *Arch. Med. Res.*, 31:S65-S66, 2000
- 4) Cheng, X.-J., Watanabe, K., Ihara, S., et al.: Bacterial expression of a human monoclonal antibody that inhibits *in vitro* adherence of *Entamoeba histolytica* trophozoites., *Arch. Med. Res.*, 31:S311-S312, 2000
- 5) Tachibana, H., Cheng, X.-J., Kobayashi, S., et al.: High prevalence of infection with *Entamoeba dispar*, but not *E. histolytica*, in captive macaques., *Parasitol. Res.*, 87:14-17, 2001
- 6) Cheng, X.-J. and 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.*, 87:126-130, 2001

(2) 学会発表

- 1) Rivera, W. L., Cheng, X.-J., Takekoshi, M., et al.: 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.

知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

- (1) 特許取得 特になし
- (2) 実用新案登録 特になし
- (3) その他 特になし



クリプトスポリジウム症の化学療法に関する基礎的研究

—SCID マウス実験感染モデルを用いた アジスロマイシンおよびクラリスロマイシンの 抗クリプトスポリジウム効果の評価—

井関 基弘¹⁾、木俣 勲²⁾、竹内 勤³⁾

1) 金沢大学医学部寄生虫学

2) 大阪市立大学医学部医動物学

3) 慶応大学医学部熱帯医学・寄生虫学

研究要旨

SCID マウスを用いてアジスロマイシンとクラリスロマイシンの抗クリプトスポリジウム効果の評価した。*Cryptosporidium parvum* の新鮮オーシスト 1×10^5 個を経口投与用金属カテーテルで胃内に直接投与し、効果の判定には、各マウスについて1日当たりのオーシスト排出数を経日的に4週間計数し、オーシスト排出パターンを無投薬対照群と比較した。両薬剤とも1回の投与量を40mg/kgとし、投薬はオーシスト投与の6時間前、直前、6時間後、および18時間後の計4回、カテーテルで胃内に注入した。両薬剤とも感染を完全に抑えることはできなかったが、オーシスト排出数は対照群に比べて1/100程度に抑制された。しかし、投薬をオーシスト投与の2週間後に開始した場合は、オーシスト排出数は無投薬群と同程度であり、オーシスト産生抑制効果は認められなかった。これらのことから、両薬剤は予防内服的に使用すればある程度の発症抑制効果はあるものの、濃厚感染したあとの治療効果は期待できないと考えられた。まだ実験例数が少なく、予備的データしか得られていない。今後、オーシスト投与数や投薬量、投薬期間などを変えて、さらに検討する必要がある。

分担研究者：竹内 勤

研究協力者：井関基弘、木俣 勲

Evaluation of anticryptosporidial activity of azithromycin and clarithromycin in SCID mice

Motohiro Iseki¹⁾, Isao Kimata²⁾ and Tsutomu Takeuchi³⁾

¹⁾ Department of Parasitology, Kanazawa University School of Medicine, ²⁾ Department of Medical Zoology, Osaka City University Medical School and ³⁾ Department of Tropical Medicine and Parasitology, School of Medicine, Keio University