

(鉄-蛋白) complex であることが示唆された。そしてこれまでの結果を総合すると我々が同定しようとしている増殖促進物質は熱、超音波処理、アセトンなどの有機溶媒、2MEのような還元剤により修飾を受けることではじめて*E. dispar* に利用され得る安定した構造をもつ鉄-蛋白構成物質であることが推定された。そして、ミトコンドリア様オルガネラには電子伝達物質としての鉄-硫黄蛋白が含まれることと考え併せると抽出された物質は電子伝達物質としての鉄-硫黄蛋白の構成成分の可能性が高いように考えられた。*E. histolytica* の代謝系において鉄-硫黄蛋白である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。フェレドキシンを多量に含有する植物葉肉細胞に高い*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) 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る可能性を示している。現在この物質を免疫し抗体を作製することで、アセトンなどによる修飾を受ける前の蛋白の同定を試みている。また治療が困難な腸管腔に寄生する*E. histolytica*/*E. dispar*治療薬としてこの安定した増殖促進物質のアナログが効果を示す可能性、そして葉緑素とcomplexを形成させ高分子化させることでアメーバに貪食させより選択的にアメーバに作用させるシステムの可能性も示唆された。さらに本年度の成果を基に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この*E. dispar*の無菌培養システムを応用したいと考えている。

E. 結論

1) i) 今回は主として知的障害者更正施設の赤痢アメーバ嚢子、栄養型、特異抗原陽性者を対象として行った治療効果について調査した。その結果から全員について糞便検査を行い、治療を行っ

た施設では再陽性者は全く見られず、良好な治療効果が確認された。しかし、血清反応陽性者のみを糞便検査の対象として検査を行った施設では、血清反応陰性者から見いだされた陽性者に加え、治療を受けていた者のなかにも再陽性者がみられ再感染の可能性も示唆された。ii) 新たに行った精神障害者療養施設1施設の血清学的検査結果から17名中9名の陽性者が見られた。調査施設数が少ないためその実態の詳細は不明であるが知的障害者更正施設以外の他の諸種施設においても赤痢アメーバ集団感染の可能性が示唆され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対策確立が望まれた。

2) i) オートクレーブ(121℃,15分)処理した細菌そして種々細胞破碎液から遠沈分画法により粗精製したミトコンドリア、ヒドロゲノゾーム、葉緑体に増殖促進効果を確認した。

ii) ツククサの葉肉細胞(葉緑体)からは超音波処理以外にもアセトン、エタノールなどの有機溶媒処理そして還元剤/界面活性剤処理により水溶性分画に増殖促進物質が抽出されることがわかり、電気泳動法の解析により増殖促進物質は分子量約5,000の鉄を含む蛋白構成成分と考えられた。

iii) 鉄蛋白である精製されたフェレドキシンとツククサ葉肉細胞のフェレドキシン分画を用いたNative PAGEの結果から増殖促進物質はアセトンなどにより修飾され低分子化された、鉄蛋白の構成成分(鉄-硫黄中心のような安定性の高いcomponent)らしいことが推定された。

iv) *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フェレドキシン関連物質を増殖因子とする*E. dispar* から得られる情報が役立つものと考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(1) 論文発表

1. Kumagai, M., Kobayashi, S., Okita, T., Ohtomo, H. : Modifications of Kohn' Chlorazol Black E staining and Wheatley's trichrome staining for temporary wet mount and permanent preparation of *Entamoeba histolytica*. J Parasitol, 87, 701-704 (2001).

2. Dylan R, Pillai., Kobayashi, S., Kevin C, Kain. : *Entamoeba dispar*. Molecular characterization of the galactose/N-acetyl-D-galactosamine lectin. Exp Parasitol, 99, 226-234 (2001)

(2) 学会発表参考文献

1. 小林正規、今井栄子、田辺将信、竹内勤：葉肉細胞から抽出された*Entamoeba dispar* 増殖因子の精製 第70回日本寄生虫学会、P83.(2001)

2. 所正治、浅井隆志、小林正規、齋藤智也、前田卓哉、中沢幹、竹内勤、野崎智義：赤痢アメーバにおけるメチオニンガンマリアーゼの解析 第70回日本寄生虫学会、P89.(2001)

3. 熊谷正広、小林正規、沖田智瑞、大友弘士：腸管内寄生原虫の染色標本作製法の改良 第70回日本寄生虫学会、P89.(2001)

H. 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

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および遺伝子組換え抗原等による予防法開発

分担研究者 橋 裕司 東海大学医学部 助教授

研究要旨 赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) と形態的に鑑別困難な *Entamoeba dispar* と *Entamoeba moshkovskii* について、これまでにクローニングしたペルオキシレドキシリン遺伝子を用い、組換え蛋白質を調製した。これらの蛋白質に対してマウスモノクローナル抗体を作製したところ、*E. dispar*、*E. moshkovskii* にそれぞれ特異性の高いクローンが得られ、鑑別困難な類縁種を抗原性の違いによって同定することが可能になった。また、ワクチン候補である赤痢アメーバの 150-kDa 表面レクチンについて、遺伝子クローニングを行った。その結果、2つの遺伝子が存在し、それぞれ 1101、1105 アミノ酸をコードしており、アミノ酸レベルで 81%の相同性が認められた。約 12%のシステインが含まれており、CXXC 配列が 45 箇所も存在するユニークな蛋白質であることが判明した。今後、組換えワクチンや診断用抗原としての利用が期待できる。

A. 研究目的

赤痢アメーバ症は、わが国では男性同性愛者間や知的障害者施設における発生が注目されている。赤痢アメーバ症のワクチンはまだ開発されていないため、早期に診断して治療することが重要である。ところが、赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) とは形態的に区別できない *Entamoeba dispar* や *Entamoeba moshkovskii* も存在するため、これらの類縁種と鑑別可能な診断法を開発する必要がある。これまでに、赤痢アメーバのペルオキシレドキシリンに特異的なモノクローナル抗体を用いた抗原検出法を開発するとともに、*E. dispar* や *E. moshkovskii* のペルオキシレドキシリンについて遺伝子をクローニングし、N 末端側に差があることを明らかにした。そこで、*E. dispar* や *E. moshkovskii* 抗原の同定も可能な抗原検出系を開発するため、今年度は類縁種間の抗原性の差を認識で

きるモノクローナル抗体の作製を試みた。

また、赤痢アメーバ症の予防法開発のための基礎研究も行った。赤痢アメーバが病原性を発揮するには宿主細胞に接着することが必須であり、虫体表面に存在する 260-kDa のガラクトース・N-アセチルガラクトサミン特異的レクチンが関与していることはよく知られている。我々はこれまでに、赤痢アメーバの 150-kDa 表面蛋白質を認識するモノクローナル抗体が、虫体の宿主細胞への接着や赤血球貪食能、実験動物における肝膿瘍形成を阻止できることを見だし、モノクローナル抗体で精製した 150-kDa 蛋白質も同様の特異性をもったレクチンであることを報告した。また、精製した蛋白質で免疫することで実験動物における肝膿瘍形成を有意に抑制でき、この蛋白質がワクチン候補として有望であることを示した。しかし、精製画分に微量の 260-kDa レクチンが混入している可能性

を完全に否定できなかった。そこで、150-kDa レクチンと 260-kDa レクチンの関係を明らかにするとともに、遺伝子組換え型のワクチン開発をめざして、今年度は 150-kDa レクチンについて、遺伝子クローニングを試みた。

B. 研究方法

1. 組換え型ペルオキシレドキシンの調製とモノクローナル抗体の作製

これまでにクローニングした *E. dispar* と *E. moshkovskii* のペルオキシレドキシンの遺伝子を、それぞれ発現ベクター pET19b に組込んで大腸菌に導入し、組換え蛋白質を産生させた。そして、His 結合レジンを用いたアフィニティクロマトグラフィーにより精製した。精製した組換え蛋白質を Freund のアジュバントとともにマウスの腹腔に 3 回免疫し、脾細胞をマウスミエローマ細胞と融合させた。スクリーニングは固定栄養型虫体を用いた間接蛍光抗体法によって行った。陽性クローンについてはマウスに接種し、腹水を調製した。

2. 150-kDa レクチンの遺伝子クローニング

モノクローナル抗体 EH3015 を用いたアフィニティクロマトグラフィーにより、赤痢アメーバ 150-kDa 蛋白質を精製し、N 末端のアミノ酸配列を決定した。それに基づいて degenerate プライマーを設計し、ゲノム DNA を PCR 増幅した。得られた 62bp 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、塩基配列を決定した。不完全長であった 5' 末端は 5'-RACE によって伸長した。また、精製蛋白質をトリプシン分解し、ペプチドのアミノ配列を決定した。

3. 免疫蛍光染色による局在観察

パラホルムアルデヒド固定した栄養型虫体を、150-kDa レクチンを認識するマウスモノクローナル抗体 EH3015 と 260-kDa レクチンを認識するウサギポリクローナル抗体で同時に免疫染色し、共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察した。2 次抗体には FITC 標識抗マウス IgG 抗体と Cy3 標識抗ウサギ IgG 抗体を用いた。また、生虫体を抗 260-kDa レクチン抗体と反応させ、キャッピングを示したところで固定し、次に EH3015 と反応させ、同様に観察した。

(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もとに指針に従って実施した。

C. 研究結果

1. *E. dispar* および *E. moshkovskii* ペルオキシレドキシンの特異的なモノクローナル抗体の作製

多数のクローンについて特異性を調べた結果、そのうちの EM147 は *E. moshkovskii* に特異的に反応したが、*E. dispar* に高い反応性を示した。また、ED48 は *E. dispar* だけでなく、*E. moshkovskii* と赤痢アメーバにも強く反応した。EM147 と ED48 では細胞質と核、ED225 では核が強く染色された。

2. 赤痢アメーバ 150-kDa レクチンの遺伝子解析

cDNA ライブラリーからクローニングされた遺伝子 (*igl1*) は 1101 個のアミノ酸をコードし、予想される蛋白質の分子量は 119,512Da、pI は 5.52 であった。興味深いことに約 12% ものシステインが含まれており、CXXC という配列が 45 箇所存在した。また、精製蛋白質の N 末端と中間部ペプチ

ドのアミノ酸配列に基づいて約 400bp の遺伝子断片をクローニングし、*igl1* の 3'側の塩基配列を用いて、別の遺伝子 (*igl2*) の塩基配列を決定した。*igl2* は 1105 アミノ酸をコードし、予想される蛋白質の分子量は 120,386Da、pI は 5.17 であった。2つの遺伝子にはアミノ酸レベルで約 81%の相同性が認められた。サザンブロット解析によって、遺伝子は2つ存在することが確認された。

また、150-kDa レクチンと 260-kDa レクチンを同時に免疫染色したところ、無処理で固定した虫体においても、抗 260-kDa レクチン抗体で処理後に固定した虫体においても、150-kDa レクチンと 260-kDa レクチンは同じ局在を示すことが観察された。

D. 考察

E. dispar, *E. moshkovskii* ペルオキシレドキシニンに対しても特異性の高い抗体が得られた。これまでに赤痢アメーバのペルオキシレドキシニン特異的なモノクローナル抗体とウサギのポリクローナル抗体を用いて、サンドイッチ ELISA による赤痢アメーバ抗原検出系を構築しているが、新たに作製した特異抗体を用いて、これら類縁種を同時に同定できる抗原検出系も開発可能と思われる。また、ウサギのポリクローナル抗体に換えて、今回得られた3種のアメーバに共通なエピトープを認識するモノクローナル抗体を用いることで、特異性が増すことも期待できる。

また、150-kDa レクチンがシステインに富んだユニークな蛋白質であることが判明した。既知の糖結合ドメインは認められなかったが、膜結合型プロテアーゼであるフューリンやランブル鞭毛虫の変異表面抗原との相同性が認められた。このレクチンはこれまでによく解析されてきた 260-kDa のレクチンと同じ局在を示しており、両者が密接に関係し

ている可能性が示唆された。今後、組換え蛋白質を作製し、この蛋白質の中で防御活性に関係する部位を明らかにする予定である。また、この蛋白質は赤痢アメーバに特異的であることから、血清診断用の抗原としても利用できる可能性がある。

E. 結論

赤痢アメーバと形態的に区別できない *E. dispar* と *E. moshkovskii* のペルオキシレドキシニンに対して、それぞれ特異性の高いマウスモノクローナル抗体を作製した。赤痢アメーバ 150-kDa レクチンの遺伝子をクローニングし、解析した。これらの成果は赤痢アメーバ症の診断法と予防法の確立につながるものである。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Cheng, X.-J., Hughes, M. A., Huston, C. D., Loftus, B., Gilchrist, C. A., Lockhart, L. A., Ghosh, S., Miller-Sims, V., Mann, B. J., Petri, W. A., Jr. and Tachibana, H. Intermediate subunit of the Gal/GalNAc lectin of *Entamoeba histolytica* is a member of a gene family containing multiple CXXC sequence motifs. *Infect. Immun.*, 69 (9):5892-5898, 2001

Tanyuksel, M., Tachibana, H., and Petri, W. A., Jr. Amebiasis, an Emerging Disease. *In: Emerging Infections 5*, Scheld, W. M., Craig, W. A. and Hughes, J. M. eds., ASM Press, Washington, D.C., pp 197-212, 2001

2. 学会発表

橘 裕司、渡辺勝臣、程 訓佳、金田良雅. 無症候性嚢子排出者由来の抗赤痢アメーバ人工抗体の作製. 第70回日本寄生虫学会・第53回日本衛生動物学会合同大会. 2001年4月

程 訓佳、金田良雅、橘 裕司. ハムスターのアメーバ性肝膿瘍形成に対する赤痢アメーバ 150-および 170-kDa 表面抗原のワクチン効果. 第70回日本寄生虫学会・第53回日本衛生動物学会合同大会. 2001年4月

Cheng, X.-J., Yoshihara, E., Kaneda, Y. and Tachibana, H. Cloning, expression and characterization of a peroxiredoxin from *Entamoeba moshkovskii*. XI International Congress of Protozoology. July, 2001.

Tachibana, H., Cheng, X.-J., Watanabe, K. and Kaneda, Y. Recombinant human

monoclonal antibody Fab fragments specific for *Entamoeba histolytica* prepared from peripheral lymphocytes of an asymptomatic cyst passer. XI International Congress of Protozoology. July, 2001.

橘 裕司、中田雄太、程 訓佳、金田良雅、竹腰正隆. 赤痢アメーバに特異的でアルカリフォスファターゼ活性を有する組換え型ヒトモノクローナル抗体の作製. 第42回日本熱帯医学会大会. 2001年9月

程 訓佳、塚本秀雄、金田良雅、橘 裕司. 赤痢アメーバ 150-kDa レクチンの遺伝子クローニングと組換え蛋白質の性状解析. 第71回日本寄生虫学会大会. 2002年3月

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

アメーバ症の化学療法剤の標的に関する研究

分担研究者 牧 岡 朝 夫 東京慈恵会医科大学助教授

研究要旨 赤痢アメーバの感染型は嚢子であり、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は不可欠である。本年度は嚢子形成とともに、嚢子の脱嚢発育にも注目した。即ち、脱嚢ならびに脱嚢したアメーバ虫体 (metacyclic amoebae) の発育は感染にとって必須の過程であり、それ故重要な標的に成りうる。そこで本研究では、嚢子形成および脱嚢発育の阻害剤ならびにそれぞれの機構の解明を通じた薬剤開発の標的の探求を行った。まずセカンドメッセンジャーあるいはシグナル伝達分子として多くの細胞機能を担うことが明らかになっているカルシウムイオン(Ca^{2+})およびそのレセプターであるカルモデュリン(CaM)に注目し、それぞれの阻害剤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、 Ca^{2+} キレート剤 EGTA、EDTA、細胞内 Ca^{2+} flux の阻害剤 TMB-8、 Ca^{2+} チャンネルブロッカー bepridil、CaM 阻害剤 trifluoperazine (TFP)が両過程を阻害することが判明し、 Ca^{2+} 機能阻害剤の有用性が示唆された。一方、細胞内蛋白質分解において中心的な役割を担うプロテアソームに注目し、その阻害剤である lactacystin および β -lactone 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、両過程とも阻害され、プロテアソームの関与が明らかになり、薬剤開発の重要な標的になることが示唆された。また、先にアメーバの増殖および嚢子形成の阻害に非常に有効であることを明らかにしたジニトロアニリン誘導体であるオリザリンが嚢子の脱嚢発育も強く阻害することが明らかになり、この過程の有力な阻害剤に成りうるということが示唆された。

A. 研究目的

赤痢アメーバの感染型は嚢子であり、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は不可欠である。嚢子形成機構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を探求するうえで非常に重要と考えられる。一方、嚢子の脱嚢発育は感染に必須の過程であり、この過程を阻害することにより感染の成立を阻止することが期待されるが、この機構の解明も全くなされていない。そこで本年度は嚢子形成および嚢子の脱嚢発育の阻害剤ならびにそれぞれの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.カルシウム機能阻害剤のアメーバの増殖および嚢子形成に対する効果：カルシウムイオン(Ca^{2+})はセカンドメッセンジャーあるいはシグナル伝達分子として多くの細胞機能を担うことが真核生物において明らかになっている。赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*)においても、その標的細胞に対する傷害作用において Ca^{2+} が重要な役割を担うことが示されたが、その増殖および嚢子形成における Ca^{2+} の関与に関しては明らかでない。そこで今回、種々の Ca^{2+} 機能阻害

剤を用いて検討した。

2. プロテアソーム阻害剤のアメーバの増殖および嚢子形成に対する効果：プロテアソームはシグナルを提示するユビキチンをパートナーとする真核生物の ATP 依存性プロテアーゼであり、細胞内蛋白質分解において中心的な役割を果たしている。しかし、アメーバの増殖および分化におけるプロテアソームの役割に関してはまだ不明な部分が多い。そこで今回、3種のプロテアソーム阻害剤 lactacystin、 β -lactone、MG-132 を用いてアメーバの増殖、嚢子形成、脱嚢に対する効果を調べた。

3. ジニトロアニリン誘導体であるオリザリンのアメーバの脱嚢発育に対する効果：先にアメーバの増殖および嚢子形成に対する阻害効果を明らかにしたオリザリンのアメーバの脱嚢発育に対する効果を調べた。

B. 研究方法

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、光学顕微鏡ならびに電子顕微鏡による観察も

行った。脱嚢 (excystation) 実験は *in vitro* で形成させた *E. invadens* の嚢子を用い、これを栄養型培養液に戻すことにより誘導した。脱嚢したアメーバ虫体 (metacystic amoebae) 数を求め、薬剤の効果を調べた。細胞内 Ca^{2+} flux の阻害剤 TMB-8、 Ca^{2+} チャンネルブロッカー bepridil、verapamil、カルモデュリン (CaM) 阻害剤 W-7、trifluoperazine (TFP) は Sigma から、プロテアソーム阻害剤 lactacystin、 β -lactone および MG132 は Calbiochem から、オリザリンは Accustandard から購入した。

C. 研究結果

1. Ca^{2+} 機能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) Ca^{2+} キレート剤 EGTA、EDTA の及ぼす効果：種々の濃度の EGTA、EDTA 存在下で3日間培養後の赤痢アメーバの虫体数を比較した結果、濃度に依存した増殖阻害がみられ、EGTA 10 mM、EDTA 0.5 mM の濃度で増殖を完全に阻害した。EDTA の阻害効果が EGTA よりも強いことから Ca^{2+} とともに他の2価イオンも重要であることが示された。7日間培養後の *E. invadens* 栄養型の増殖についても同様な結果が得られた。一方、*E. invadens* の嚢子形成も阻害されたが、増殖よりも低い濃度で阻害され、より感受性が高いことが示された。2) 細胞内 Ca^{2+} flux の阻害剤 TMB-8 の及ぼす効果：TMB-8 の濃度に依存した赤痢アメーバ栄養型の増殖阻害がみられ、100 μ M で完全に阻害した。一方、*E. invadens* の増殖抑制には高濃度の TMB-8 が必要であり、500 μ M で完全な阻害がみられた。*E. invadens* の嚢子形成は増殖よりも高濃度で阻害された。

3) Ca^{2+} チャンネルブロッカー bepridil、verapamil の及ぼす効果：bepridil は赤痢アメ

ーバの増殖を 10 μM ではほぼ完全に阻害したが、同濃度の verapamil はまったく阻害せず、100 μM で 84%の阻害効果を示した。*E. invadens* は赤痢アメーバに比し bepridil にたいして抵抗性があり 50 μM でも増殖の完全な阻害はみられず、赤痢アメーバの場合と同様、verapamil の阻害効果は bepridil に比し弱かった。bepridil は嚢子形成も強く阻害したが、verapamil の効果は弱かった。

4) カルモデュリン(CaM)阻害剤 W-7、trifluoperazine (TFP)の及ぼす効果：赤痢アメーバおよび *E. invadens* に対する増殖阻害効果は TFP のほうが W-7 よりも強く、また嚢子形成の方が増殖よりも強く阻害された。

2. プロテアソーム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：3種のプロテアソーム阻害剤は赤痢アメーバ栄養型に対して増殖阻害効果を示した。その阻害効果は β -lactone が最も強く、次に lactacystin、MG132 は高濃度でのみ阻害効果を示した。lactacystin による増殖阻害の経過を調べた結果、1 μM および 5 μM では栄養型の細胞分裂が抑制されており、10 μM では毒性的に作用していることが明らかになった。*E. invadens* も増殖が阻害されたが、赤痢アメーバの場合よりも抵抗性が認められた。2) 嚢子形成に及ぼす効果：*E. invadens* の嚢子形成に対しても3種のプロテアソーム阻害剤は阻害効果を示し、その効果は増殖に対してよりも強かった。3種のうち β -lactone が最も強い阻害効果を示した。また、lactacystin と β -lactone につきこの効果の可逆性を調べた結果、薬剤の除去により lactacystin の場合にはわずかな回復がみられたが、 β -lactone では全く回復が認められなかった。3) アメーバ虫体内の変化：

lactacystin で処理した赤痢アメーバ栄養型虫体では核数の増加が認められ、電顕により細胞質に多数のグリコーゲン粒の蓄積が観察された。4) 脱嚢に及ぼす効果：脱嚢および脱嚢後アメーバ虫体の発育に対する効果を調べた結果、 β -lactone がわずかな阻害効果を示したが lactacystin と MG-132 には阻害効果は認められなかった。

3. オリザリンのアメーバの脱嚢発育に対する効果

種々の濃度のオリザリン存在下で嚢子の脱嚢を調べた結果、濃度に依存してアメーバ虫体数が対照に比し減少し、50 μM 以上で強い阻害効果が認められた。また、オリザリンは脱嚢したアメーバの発育も著しく阻害した。これらの効果の可逆性を調べた結果、オリザリンを除去しても回復はほとんど認められなかった。

D. 考察

Ca^{2+} 機能阻害剤によりアメーバの増殖および嚢子形成が阻害されたことから、これらの過程に Ca^{2+} およびカルモデュリンが深く関与していることが示唆された。今回用いた薬剤のなかにはすでにヒトに対して使用されている薬剤も含まれており、 Ca^{2+} 機能阻害剤の有用性が明らかになった。一方、赤痢アメーバに 20S プロテアソームの存在が報告されていることから、今回の結果はプロテアソームがアメーバの増殖に関与していることを示し、その機構として、アメーバの細胞周期の調節に影響していると考えられた。嚢子形成もプロテアソーム阻害剤により増殖よりも低濃度で阻害されたことから、この過程においてもプロテアソームが重要な役割を担っていることが明らかになった。先に我々は嚢子形成が細胞周期に依存していることを報告した

が、嚢子形成の阻害機構としてプロテアソーム阻害剤がアメーバの細胞周期の調節に影響を与えていることが示唆された。 β -lactone で処理した嚢子はそれを除去しても嚢子形成の回復が認められなかったことから、この薬剤の処理により栄養型の嚢子形成能が失われると考えられた。プロテアソーム阻害剤により赤痢アメーバに多核化が起こることが明らかになり、細胞質分裂の抑制が示唆され、この過程へのプロテアソームの関与が示唆された。lactacystin で処理した赤痢アメーバの細胞質にグリコーゲン粒の蓄積が認められたことから、プロテアソームがグリコーゲン代謝にも関係していることが示唆された。高等動物のプロテアソームと寄生原虫のプロテアソームとの違いが明らかにされつつあり、新たな薬剤開発の重要な標的になると考えられた。また、先にジニトロアニリン誘導体オリザリンがアメーバの増殖および嚢子形成の阻害に有効であることを明らかにしたが、今回、アメーバ嚢子の脱嚢発育の阻害に対しても非常に有効であることが判明した。これまでこの過程に対する阻害剤に関する報告は皆無であり、オリザリンは有力な阻害剤に成りうることが示唆された。

E. 結論

アメーバの増殖および嚢子形成に細胞外 Ca^{2+} 、アメーバ虫体の Ca^{2+} flux、 Ca^{2+} チャンネルさらにカルモデュリンが関与していることが明らかになり、 Ca^{2+} 機能阻害剤の薬剤としての有用性が示唆された。また、細胞内蛋白質分解機構として重要なプロテアソームがアメーバの増殖および嚢子形成にも関与していることが明らかになり、新たな薬剤開発の重要な標的になること

が示唆された。先にアメーバの増殖および嚢子形成の阻害に有効であることを明らかにしたオリザリンがアメーバ嚢子の脱嚢発育も阻害することが明らかになり、有力な感染阻害剤に成りうると思われた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Makioka A, Kumagai M, Ohtomo H, Kobayashi S, Takeuchi T (2001) Effect of jasplakinolide on the growth and actin cytoskeleton of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens*. J. Parasitol. 87, 399-405.

2) Makioka A, Kumagai M, Ohtomo H, Kobayashi S, Takeuchi T (2001) Inhibition of encystation of *Entamoeba invadens* by wortmannin. Parasitol. Res. 87, 371-375.

3) Makioka A, Kumagai M, Ohtomo H, Kobayashi S, Takeuchi T (2001) *Entamoeba invadens*: Enhancement of excystation and metacystic development by cytochalasin D. Exp. Parasitol. 98, 145-151.

4) Makioka A, Kumagai M, Ohtomo H, Kobayashi S, Takeuchi T (2001) Effect of calcium antagonists, calcium channel blockers and calmodulin inhibitors on the growth and encystation of *Entamoeba histolytica* and *E. invadens*. Parasitol. Res. 87, 833-837.

5) Makioka A, Kumagai M, Ohtomo H, Kobayashi S, Takeuchi T (2002) Effect of proteasome inhibitors on the growth, encystation, and excystation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens*. Parasitol. Res. in press

6) Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S,

Takeuchi T (2002) Inhibition of excystation and metacystic development of *Entamoeba invadens* by the dinitroaniline herbicide oryzalin. J. Parasitol. in press

2. 学会発表

1) Makioka A, Kumagai M, Ohtomo H, Kobayashi S, Takeuchi T. *Entamoeba invadens* の増殖、シスト形成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70回日本寄生虫学会大会. 山形. 2001年4月.

2) Makioka A, Kumagai M, Ohtomo H, Kobayashi S, Takeuchi T. プロテインキナーゼC阻害剤による *Entamoeba invadens* の増殖およびシスト形成の抑制. 第70回日本寄生虫学会大会. 山形. 2001年4月.

3) Makioka A, Kumagai M, Ohtomo H, Kobayashi S, Takeuchi T. Enhanced excystation and metacystic development of *Entamoeba invadens* by cytochalasin D. 11th International Congress of Protozoology. Salzburg. 2001年7月.

4) 牧岡朝夫, 熊谷正広, 大友弘士, 小林正規, 竹内 勤. Cytochalasin D による *Entamoeba invadens* の脱嚢促進. 第41回日本熱帯医学会大会. 東京. 2001年9月.

5) 牧岡朝夫, 熊谷正広, 大友弘士, 小林正規, 竹内 勤. *Entamoeba invadens* の増殖および嚢子形成へのシグナル伝達分子の関与. 第41回日本熱帯医学会大会. 東京. 2001年9月.

6) 牧岡朝夫, 熊谷正広, 大友弘士, 小林正規, 竹内 勤. *Entamoeba* の増殖および嚢子形成へのカルシウムイオンの関与. 第61回日本寄生虫学会東日本大会. 東京. 2001年10月.

7) 牧岡朝夫, 熊谷正広, 大友弘士, 小林

正規, 竹内 勤. Cytochalasin D による *Entamoeba invadens* の脱嚢促進. 第34回日本原生動物学会大会. 神戸. 2001年11月.

8) Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T. Inhibition of excystation and metacystic development of *Entamoeba invadens* by the dinitroaniline herbicide oryzalin. Conference on Amebiasis and the Biology of *Entamoeba histolytica*. Agra. 2002年2月.

9) Kumagai M, Makioka A, Takeuchi T, Nozaki T. Molecular characterization of farnesyltransferase of *Entamoeba histolytica*. Conference on Amebiasis and the Biology of *Entamoeba histolytica*. Agra. 2002年2月.

10) 牧岡朝夫, 熊谷正広, 大友弘士, 小林正規, 竹内 勤. *Entamoeba* の増殖、嚢子形成および脱嚢に及ぼすプロテアソーム阻害剤の効果. 第71回日本寄生虫学会大会. 伊勢原. 2002年3月.

11) 熊谷正広, 牧岡朝夫, 竹内 勤, 野崎智義. 赤痢アメーバのファルネシル転移酵素遺伝子のクローニングと発現. 第71回日本寄生虫学会大会. 伊勢原. 2002年3月.

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

わが国におけるアメーバのサブポピュレーションの同定に関する研究

分担研究者 野崎 智義 国立感染症研究所寄生動物部 室長

研究要旨 我が国に浸淫するアメーバ症の多様性と遺伝子タイプと臨床像との相関を明らかにすることを目的として赤痢アメーバ分離株の遺伝的多型性を解析した。障害者施設並びに男性同性愛者から獲得した 30 株の分離株から得られた DNA を用いて、多型性の知られる 4 つの DNA の領域 (Locus 1-2, 5-6, SREFP, キチナーゼ) の核酸配列の決定を行った。その結果、男性同性愛者から得られた赤痢アメーバ 19 株はいずれも異なった遺伝子型を示した。一方、男性同性愛者から得られた株における多型性と比較すると、施設から得られた 11 株の分離株の多型性は低かった。また、同一の施設から得られた株は同一の遺伝子タイプを示し、施設における流行が一つの遺伝子タイプによることが明らかになった。以上の結果より、我々の分離株タイピング法が我が国に浸淫する分離株の特定化にきわめて有用であることが明らかとなった。また、男性同性愛者および障害者施設に浸淫する赤痢アメーバ株の多型性が異なることより、両集団における赤痢アメーバの感染の頻度がことなることが想像された。

A. 研究目的

赤痢アメーバの感染者のうち、およそ 5-10%のみが症状を呈することはよく知られているが、その理由については原虫の病原性の多様性、宿主の免疫・感受性の多様性により机上で説明されているのみである。赤痢アメーバの種内での多様性については、解糖系酵素のアイソエンザイム解析により赤痢アメーバ種の中には少なくとも 3 種類の亜型が存在することが知られている。しかしながら、その亜型の多様性は実際には更に複雑であると想像され、赤痢アメーバ株のタイピング法の開発が必要となっている。我々は、昨年度、ポリメラーゼチェーンリアクション (PCR) を用いた DNA 多型解析により赤痢アメーバ株の遺伝的多型を明らかにする方法を開発した。

我々が遺伝的多型の解析に用いたのは非翻訳領域の Locus 1-2, 5-6 並びにタンパク質をコードする SREHP (serine-rich E. histolytica protein)、キチナーゼである。これらはいずれも高い遺伝的多型を示すことを Clark, Samuelson らが既に報告している。昨年度はこのうち Locus 1-2, 5-6 の解析を赤痢アメーバ標準株を用いて行った。本年度は更に、遺伝子座を 4 つに増やし、実際に我が国の二つの感染集団から分離された赤痢アメーバ株を用いて本邦に浸淫する赤痢アメーバ株の多様性の解析を行った。

B. 研究方法

1. 赤痢アメーバ株の獲得

用いた赤痢アメーバ株の一覧を表 1 に示す。3 株は達成された無菌培養株、24 株は細菌共生株、2 株は糞

便から直接抽出された DNA、1 株は肝膿瘍液から抽出された DNA を用いた。

2. 赤痢アメーバ株からの DNA の抽出

細胞は 1000 g、5 分の遠心で沈渣とした。糞便並びに膿瘍液はそのまま用いた。抽出にはキアゲンの QIAamp Mini Stool DNA kit を用いた。

3. 赤痢アメーバ株のタイピング法
我々が遺伝的多型の解析に用いたのは Clark らがすでに報告している非翻訳領域の Locus 1-2, 5-6 並びに、Samuelson らが報告しているタンパク質をコードする SREHP (serine-rich E. histolytica protein)、キチナーゼ (chitinase) である。用いたプライマーは表 2 に示す。50 μ l の反応液は以下のものを含む。0.1 μ g DNA, 1 mM プライマー, 2.5 mM $MgCl_2$, 0.1 mg/ml bovine serum albumin, 100 mM of each deoxynucleoside triphosphate, 1.5 unit HotStarTaq DNA polymerase。用いた cycling parameter は以下の通り。1) Taq activation at 95°C for 15 min, 2) denaturation at 94°C for 30 s; annealing at 50°C (SREHP and locus 5-6) or 45°C (chitinase and locus 1-2) for 30 s; extension at 72°C for 1 min; 30 cycles; and 3) extension at 72°C for 10 min。生成された PCR 産物は 2% NuSieve 3:1 agarose (BioWhittaker Molecular Applications) 上で電気泳動した。

4. 核酸配列の決定

ゲル上で単一のバンドを示す PCR 産物は Pre-Sequencing kit (USB Corporation) で処理した後、直接シーケンスを行った。ゲル上で複数のバンドを示す PCR 産物は上記のとおりアガロース電気泳動で分離した後、GeneClean kit II (BIO101) を用いて精製した後、シーケンスに供した。シーケンス反応は ABI PRISM BigDye terminator cycle

sequencing ready reaction kit (PE Applied Biosystems) を用いて行い、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer で解析した。得られたシーケンスは DNASYS software (Hitachi) を用いて解析し、それぞれの核酸配列データは GenBank/ EMBL/ DDBJ database に accession numbers AB075701-AB075737 として登録した。

(倫理面への配慮) 該当せず。

C. 研究結果

1. アガロースゲル電気泳動による株間の遺伝的多型

図 1 に示したとおり、Locus 1-2, Locus 5-6, SREHP, chitinase のいずれでも一本あるいは二本のバンドの、株間で異なったパターンで認められた。Locus 1-2 は常に単一のバンドであり、この遺伝子座のホモ接合性を示している。一方、Locus 5-6 および SREHP は一本または二本のバンドを与え、これらの遺伝子座が株によってはヘテロ接合体であることを示唆している。

2. 非翻訳領域マーカーのシーケンス多型性 (Locus 1-2, Locus 5-6)

上記 PCR 産物をした結果をまとめたものを図 2-5 に示す。Locus 1-2 の遺伝子座における多様性 (図 2) は反復配列の種類・位置・数における相違よっていた。日本の 30 の分離株は 6 種類の独立したタイプ (B-G) に分類された。B が最も優位なタイプで 37% を占めた。

一方、Locus 5-6 に相当する PCR バンドは株により一本あるいは二本見られた。Locus 5-6 における株の多型性は主としても GTATGTATATTTCTAT の 16 ヌクレオチド反復配列の数によって起こっていた (図 3)。Locus 5-6 におけるタイプ名は第一に GTATGTTTCTAT 反復配列の有無、第二にこの 16 ヌ

クレオチド配列の重複回数、第三に保存領域におけるヌクレオチド置換の有無(A5v, Cv)により付けられた。

3. タンパク質コード領域マーカーのシーケンス多型性(SREHP, chitinase)

Chitinase 遺伝子の多型は反復領域含有領域の反復配列の種類、場所、数に見られた(図4)。Chitinaseは4種類の多型遺伝子のうちでもっとも多型性が低かった。日本由来の分離株は全部で6タイプに分けられ、そのうち、タイプCが全体の66%を占めた。

SREHPのPCR増幅産物は分離株により一つあるいは二つのバンドを示した(図1, 5)。株間の多型は反復配列の種類、場所、数に見られた。

4. 遺伝的多型と分離株の由来の相関

表1に総括したように、男性同性愛者から分離された株は施設から分離された株よりも明らかに高度の多型性を示した。更に、タイプにはバイアスが存在した。すなわち、施設感染でのみ観察されたタイプ、男性同性愛者からのみ分離されたタイプが存在した。施設感染でのみ観察されたタイプにはLocus 1-2/タイプC、及びF、Locus 5-6/タイプA5v/Cv、SREHP/タイプA, H、及びKが見られた。一方、Locus 1-2/タイプD、E及びG、Locus 5-6/タイプA13/A5、A10/A5、A8、A8/Cv、A6/Cv、A5、及びA5v、chitinase/タイプA, B, D及びF、SREHP/タイプB/L, E, F, G/M, I、及びMは男性同性愛者からのみ分離された。

D. 考察

我々の予想を大きく覆して我が国に浸淫する赤痢アメーバ株の多様性は大きかった。本研究で解析したLocus 1-2, 5-6並びにSREHP、chitinaseすべてを総合して考えると、男性同性愛者から得られたすべての分離株は異なったタイプを示した。このことはこの集団における感染赤

痢アメーバが非常に多様であるとともに他の個体への感染の機会が高いであろうことを伺わせる。

一方、障害者施設から得られた赤痢アメーバ株の多様性は男性同性愛者から得られた株の多様性に比較して低かった。特に、同一の施設から得られた複数の分離株は全く同一のタイプを示した。このことは一つの施設での感染は多くの場合、一つの感染源から起こることを示唆している。同時に、施設間での頻繁な感染は男性同性愛者間感染に比較して低頻度であることが予想される。

我々が解析した標準株の遺伝子タイプは他のグループに解析報告されたそれと同一であった。よって、赤痢アメーバの遺伝子型は時間と地理的距離を超えて比較的安定であるといえることができる。これは本研究で用いられたタイピング法を赤痢アメーバの「指紋(finger print)」として用いる場合には不可欠である。このような「指紋」の解析は、我が国に浸淫する赤痢アメーバ株の由来を明らかにするのに役立つだけでなく、一人の患者が2度アメーバ症を発症した際に、それが別の株による再感染なのか、昔の感染の再燃なのかを明らかにすることができる。

E. 結論

本研究により赤痢アメーバ分離株の多型性をPCRとシーケンスによって解析する方法論がほぼ確立したといえる。これにより、アメーバ株のサブポピュレーションの特定化がほぼ実用化された。今後の疫学解析と、施設における感染の予防法の策定が容易になると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

英文

- i. Nozaki T., Shigeta Y., Saito-Nakano Y., Imada M., and Kruger

- W.D. (2001) Characterization of transsulfuration and cysteine biosynthetic pathways in the protozoan haemoflagellate, *Trypanosoma cruzi*: Isolation and molecular characterization of cystathionine β -synthase and serine acetyltransferase from trypanosoma. J. Biol. Chem. 276: 6516-6523.
- ii. Sanuki, J., Tokoro, M., Nozaki, T., Okuzawa, E., and Asai, T. (2001) Purification and identification of a major soluble 40-kDa antigen from *Entamoeba histolytica* and its use for serodiagnosis of chronic amebiasis. Parasitol. Int. 50, 73-80.
- iii. Saito-Nakano, Y., Nakazawa, M., Shigeta, Y., Takeuchi, T., and Nozaki, T. (2001) Identification and characterization of genes encoding novel Rab proteins from *Entamoeba histolytica*. Mol. Biochem. Parasitol. 116, 219-222.
- 和文
- i. 野崎智義 (2001) 医師が念頭にお輸入感染症の世界分布 今日の治療指針 医学書院 pp27-29.
- ii. 野崎智義、竹内勤 (2002) 寄生性原虫における硫黄含有アミノ酸生合成・分解経路-新しい抗原虫感染システム合成酵素方薬剤の開発標的-蛋白質核酸酵素 共立出版 47(1):21-29.
2. 学会発表
- i. 野崎智義 (2001) 原虫における硫黄含有アミノ酸の生合成の多様性と意義 第70回日本寄生虫学会・第53回日本衛生動物学会合同大会 シンポジウム
- ii. 中野由美子、保田友義、繁田泰男、中沢幹、竹内勤、野崎智義 (2000) 赤痢アメーバが食食する際の Rab5 の機能解析 第70回日本寄生虫学会・第53回日本衛生動物学会合同大会 ワークショップ
- iii. 所正治、浅井隆志、小林正規、齋藤智也、前田卓哉、中沢幹、竹内勤、野崎智義 (2000) 赤痢アメーバにおけるメチオニンガンマリアーゼの解析 第70回日本寄生虫学会・第53回日本衛生動物学会合同大会
- iv. 中野由美子、保田友義、繁田泰男、中沢幹、竹内勤、野崎智義 (2000) 赤痢アメーバの形成における Rab5 と Rab7 の役割 第54回日本細胞生物学会大会
- v. Nozaki, T. (2001) Functional analysis of sulfur-containing amino acid metabolism in *Entamoeba histolytica*. Thirty-sixth Joint Conference on Parasitic Diseases. The Japan-United States Cooperative Medical Science Program. Bethesda, MD, U.S.A.
- vi. Nozaki, T., Shigeta, Y., Saito-Nakano, Y., Imada, M., Kruger, W.D. (2001) Characterization of transsulfuration and cysteine Biosynthetic Pathways in *Trypanosoma cruzi*: Isolation and molecular characterization of cystathionine beta-synthase and serine acetyltransferase from *Trypanosoma*. Woods Hole, MA., Molecular Parasitology Meeting.
- vii. Saito-Nakano, Y., Yasuda, T., Shigeta, Y., Nakazawa, M., Takeuchi, T., Nozaki, T. (2001)

- The mechanism of phagosome formation in *Entamoeba histolytica*. Woods Hole, MA., Molecular Parasitology Meeting.
- viii. Tokoro, M, Asai, T., Kobayashi, S., Takeuchi, T., Nozaki, T. (2001) Sulfur-amino acid metabolism in *Entamoeba histolytica*: characterization of two isozymes of methionine gamma-lyase. Woods Hole, MA., Molecular Parasitology Meeting.
- ix. 野崎智義、繁田泰男、中野由美子、今田美穂子、Warren Kruger (2001) 寄生性原虫トリパノソームにおけるトランスサルフェーション及びシステイン生合成経路の解析 第74回日本生化学会大会 シンポジウム
- x. Bruno Kubata, Tomoyoshi Nozaki, Zakayi Kabututu, Michael Lazarus, Craig Munday, Michael Duszenko, Toshihiro Horii, Osamu Hayaishi, Yoshihiro Urade. (2001) Evidence of enzymatic production of prostaglandins in Kinetoplastida. 第74回日本生化学会大会
- xi. Bhattacharya, A., Clark, G., Guillen, N., Nozaki, T., Samuelson, J., Singh, U., Tannich, E. Organized by Mann, B. (2001) The *Entamoeba histolytica* genome project: progress and new directions. The 50th annual meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene.
- xii. Fujita, O., Araki, K., Ito, A., Nozaki, T. (2001) Biological characterization of a novel antigen, a actin modulator protein, from *Echinococcus multilocularis* metacestode. The 50th annual meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene.
- xiii. 野崎智義 (2001) 寄生性原虫における硫黄含有アミノ酸生合成経路の多様性 ワークショップ 第24回日本分子生物学会年会
- xiv. Saito-Nakano, Y., Yasuda, T., Shigeta, Y., Takeuchi, T., Nozaki, T. (2002) The mechanism of phagosome formation in *Entamoeba histolytica*. Conference on amebiasis and the biology of *Entamoeba histolytica*. Agra, India.
- xv. Masaharu Tokoro, M., Asai, T., Kobayashi, S., Tanabe, M., Takeuchi, T., Nozaki, T. (2002) Characterization of methionine γ -lyase from *Entamoeba histolytica*: a key enzyme of sulfur-containing amino acid degradation. Conference on amebiasis and the biology of *Entamoeba histolytica*. Agra, India.
- xvi. Kumagai, M., Makioka, A., Takeuchi, T., Nozaki, T. (2002) Molecular characterization of farnesyltransferase of *Entamoeba histolytica*. Conference on amebiasis and the biology of *Entamoeba histolytica*. Agra, India.
- xvii. Haghghi. A., Kobayashi, S., Takeuchi, T., Masuda, G., Nozaki, T. (2002) Analysis of highly-polymorphic DNA of the

Entamoeba histolytica isolates from Japan. Conference on amebiasis and the biology of *Entamoeba histolytica*. Agra, India.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
該当せず。
2. 実用新案登録
該当せず。

表1 赤痢アメーバ分離株の性状、遺伝型など

番号	分離株名	培養	臨床診断	zymodeme	Locus 1-2		Locus 5-6		Chitinase		SREHP	
					サイズ(bp)	タイプ	サイズ(bp)	タイプ	サイズ(bp)	タイプ	サイズ(bp)	タイプ
1	KU 1	細菌共生	腸炎	II	411	B	440	A7	214	F	ND	混合
2	KU 2	無菌	腸炎	XIX	411	B	440	A7	298	C	ND	混合
3	KU 3	無菌	腸炎	II	411	B	424/326	A6/Cv	382	A	469	M
4	KU 4	細菌共生	不明	XIX	411	B	456	A8	298	C	505	F
5	KU 5	無菌	無症状	II	411	B	424/326	A6/Cv	382	A	469	M
6	KU 7	細菌共生	腸炎/肝膿瘍	II	411	B	456	A8	298	C	ND	混合
7	KU 8	細菌共生	腸炎/肝膿瘍	XIV	348	E	494/408	A10/A5	382	B	ND	混合
8	KU 9	細菌共生	不明	II	411	B	440	A7	298	C	505/469	G/M
9	KU 10	細菌共生	腸炎	II	411	B	456/326	A8/Cv	382/298	A/C*	ND	混合
10	KU 11	細菌共生	肝膿瘍	XIV	348	E	408	A5	298	C	517/481	B/L
11	KU 15	細菌共生	腸炎	XIX	348	E	408	A5v	382	B	505	E
12	KU 16	細菌共生	腸炎	XIX	402	D	408	A5v	298	C	ND	混合
13	KU 23	細菌共生	腸炎	XIX	402	D	536/408	A13/A5	382	B	505	F
14	KU 30	細菌共生	無症状	II	406	G	408	A5v	382	B	505	E
15	KU 31	細菌共生	無症状	II	406	G	408	A5	298	C	505	E
16	KU 32	細菌共生	腸炎	XIV	406	G	408	A5	382	B	505	E
17	KU 13 ^a	細菌共生	無症状	XIX	411	B	440	A7	298	C	505	H
18	KU 14 ^a	細菌共生	無症状	XIX	411	B	440	A7	298	C	505	H
19	KU 18 ^b	細菌共生	不明	II	391	F	408/326	A5v/Cv	298	C	481	K
20	KU 19 ^b	細菌共生	不明	II	391	F	408/326	A5v/Cv	298	C	481	K
21	KU 20 ^b	細菌共生	不明	II	391	F	408/326	A5v/Cv	298	C	481	K
22	KU 21 ^b	細菌共生	不明	II	391	F	408/326	A5v/Cv	298	C	481	K
23	KU 22 ^b	細菌共生	不明	II	391	F	408/326	A5v/Cv	298	C	481	K
24	KU 26 ^c	細菌共生	無症状	II	391	F	408/326	A5v/Cv	298	C	481	K
25	KU 27 ^d	細菌共生	無症状	II	411	C	440	A7	298	C	541	A
26	KU 28 ^d	細菌共生	無症状	II	411	C	440	A7	298	C	541	A
27	KU 29 ^d	細菌共生	無症状	II	411	C	440	A7	298	C	541	A
28	KH 5 ^e	糞便	HIV陽性/腸炎	ND	406	G	440	A5v	298	C	505	I
29	KH 9 ^e	糞便	HIV陽性/腸炎	ND	411	B	456	A8	ND	ND	ND	ND
30	KH 15 ^e	膿瘍液	HIV陽性/肝膿瘍	ND	402	D	424/326	A6/Cv	298	D	ND	ND
31	HM-1:IMSS cl6 ^f	無菌	肛門潰瘍/腸炎	II	402	D	472/424	A9/A6	298	C	541/517	O/P
32	SAW755 ^f	無菌	腸炎	XIV	402	D	424	A6	298	C	517/409	C/N
33	SAW1627 ^f	無菌	不明	II α -	420	A	392/326	A4/Cv	256	E	493	J
34	SAW1453 ^f	細菌共生	不明	XIV	420	A	440	A7	298	C	517	D

^{a-d}: 分離株は異なった施設の集団感染から得られた

^e: 糞便及び肝膿瘍穿刺液より得られた

^f: 標準株

*: 混合感染の可能性が否定できない

ND: 解析できず

图 1

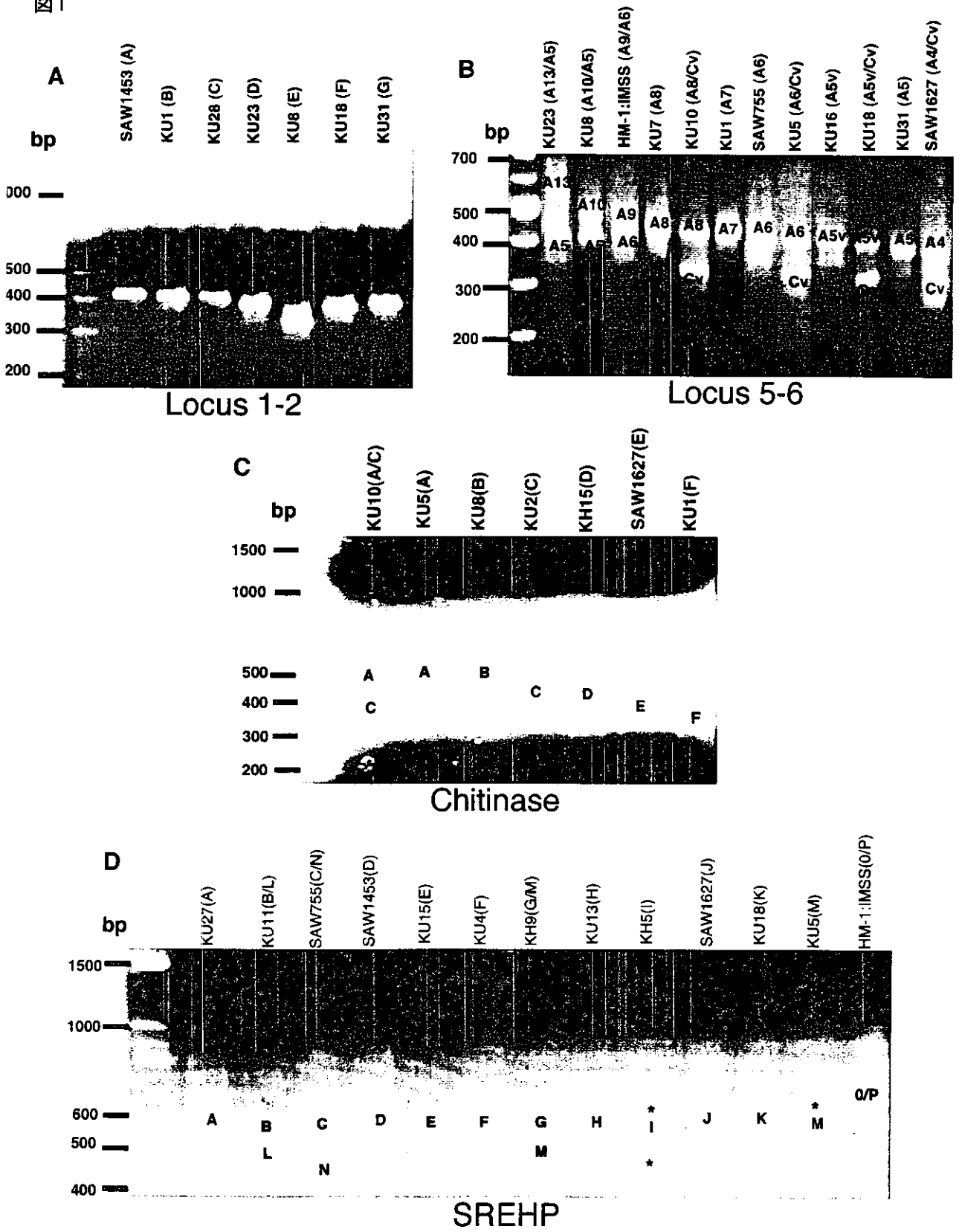


图 2

