

しかし昨年度および今年度の研究により、 $-80^{\circ}\text{C}$  (あるいは $-40^{\circ}\text{C}$ でさえ)長期間保持することができる抗体価と異なり、Pc循環抗原の抗原価は数ヶ月の凍結保存であっても抗原価が下がることが証明され、保存血清でのPCP診断では偽陰性が多くなり注意が必要であると考えられた。

HIV感染者の新鮮血清を用いたPc循環抗原の検討では、逆に偽陽性が増加した。偽陽性の原因としてはHIV感染者において免疫力が低下している個体では、PCP非発症例でもPcが感染増殖(コロナイゼーション)している可能性が考えられた。しかし偽陽性は被験者の免疫力をあらかずCD4陽性リンパ球数とは有意の関係無く生じることからこの仮説は否定的と考えられた。一方使用した抗体にPc以外の非特異的抗体が残存し、高ガンマグロブリン血症を呈するHIV感染者と非特異的に反応を生じた可能性も考えられた。この証明のためには抗体をより純化し、再検討する必要がある。

## 結 論

Pc循環抗原は、HIV感染者の新鮮検体では、感度は上昇するが、特異度はかなり低下する。

Pc循環抗原は保存温度が $-80^{\circ}\text{C}$ であっても抗原価は減少し陰転化する可能性があることが証明された。

$-80^{\circ}\text{C}$  (あるいは $-40^{\circ}\text{C}$ でさえ)長期間保持することができる抗体価と異なり、Pc循環抗原の抗原価は数ヶ月の凍結保存であっても抗原価が下がるので注意が必要であると考えられた。

## 健康危険情報

なし

## 研究発表

なし

## 知的財産権の出願・登録状況

なし



## *Pneumocystis carinii* の dihydropteroate synthaseの 遺伝子多型とサルファ剤感受性の相関

中村 哲也<sup>1)</sup>、高橋 孝<sup>1)</sup>、大西 健児<sup>2)</sup>、岩本 愛吉<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>東京大学医科学研究所附属病院感染免疫内科

<sup>2)</sup>都立墨東病院感染症内科

### 研究要旨

24例のカリニ肺炎症例から分離されたニューモシスチス・カリニの Dihydropteroate Synthase (DHPS)領域のアミノ酸変異を検討し、サルファ剤の治療成績との関連性を解析した。24例中6例(25.0%)において DHPS 領域のアミノ酸の変異(55Thr → Ala, 57Pro → Ser)が認められ、これらの症例はアミノ酸変異を示さないカリニ群と比較して有意にST合剤の治療効果が低下していた。したがって、ニューモシスチス・カリニにおける DHPS の変異は、サルファ剤による治療効果の低下に関与する可能性があり、カリニ肺炎に対する薬剤を選択する上で重要な因子と考えられた。

分担研究者：中村哲也

研究協力者：高橋 孝、大西健児、岩本愛吉

**Relationship between mutations in dihydropteroate synthase of *Pneumocystis carinii* f. sp. hominis isolates in Japan and resistance to sulfonamide therapy.**

Tetsuya Nakamura<sup>1)</sup>, Takashi Tajahashi<sup>1)</sup>, Kenji Ohnishi<sup>2)</sup>, Aikichi Iwamoto<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Division of Infectious Diseases & Applied Immunology, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo and

<sup>2)</sup>Department of Infectious Diseases, The Metropolitan Bokutou Hospital

## 研究目的

ニューモシスチス・カリニにおいて、サルファ剤の標的酵素である Dihydropteroate Synthase (DHPS)領域のアミノ酸変異の有無を検討して、カリニ肺炎症例に対するサルファ剤の治療成績との関連性を解析することによって、カリニ肺炎の治療成績の向上に結び付ける。

## 研究方法

24例のカリニ肺炎患者の気管支肺胞洗浄液より核酸を抽出し、PCR法を用いてニューモシスチス・カリニにおけるDHPS領域の核酸を増幅した。DHPS領域の塩基配列を決定し、サルファ剤に対する感受性との関連が推測されている23、55、57、60、111、248番目のアミノ酸変異の有無を解析した。

## 研究結果

- 24例中6例(25.0%)において、DHPS領域のアミノ酸の変異(Thr55Ala, Pro57Ser)が認められた。
- サルファ剤で治療を行った22例の治療成績とDHPS領域のアミノ酸の変異の関係を表に示す。これから明らかなように、DHPS領域のアミノ酸変異を有するカリニ肺炎症例群は、変異を示さないカリニ群と比較して有意にST合剤の治療効果が低下した。

## 考 察

ニューモシスチス・カリニにおけるDHPSの変異は、サルファ剤による治療効果の低下に関与する可能性が示唆されるため、カリニ肺炎に対する薬剤を選択する上で重要な因子と考えられる。

## 結 論

- 24例のカリニ肺炎症例より得られたニューモシスチス・カリニにおけるDHPS領域のアミノ酸配列を検討した。
- その結果、6例(25.0%)において、DHPS領域のアミノ酸の変異(55Thr→Ala, 57Pro→Ser)が認められた。
- DHPS領域のアミノ酸の変異を有するカリニ肺炎症例群は、変異を示さないカリニ肺炎症例群と比較して、有意にST合剤の治療効果が低下した。
- ニューモシスチス・カリニにおけるDHPSの変異は、サルファ剤による治療効果の低下に関与する可能性が示唆されるため、カリニ肺炎に対する薬剤を選択する上で重要な因子である。

## 健康危険情報

特記すべきことなし。

## 研究発表

### 1. 論文発表

- Takahashi, T., Hosoya, N., Endo, T., Nakamura, T., Sakashita, H., Kimura, K., Ohnishi, K., Nakamura, Y., and Iwamoto, A. Relationship between mutations in dihydropteroate synthase of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* isolates in Japan and resistance to sulfonamide therapy. *J. Clin. Microbiol.* 38:3161-3164, 2000.

### 2. 学会発表

第12回日本エイズ学会

## 知的財産権の出願・登録状況

特に予定をしていない。

DHPS アミノ酸配列	治療失敗例 (%)	治療成功例 (%)	総数
変異型*	4 (100)**	0 (0)	4
野生型	2 (11.1)**	16 (88.9)	18

\*DHPS領域に変異のあった6例中2例はサルファ剤を使用しなかった。

\*\*p=0.002



## 国立国際医療センター エイズ治療・研究開発センターにおける1996年から2001年までのアメーバ性肝膿瘍についての臨床的検討

砂川 恵伸<sup>1)</sup>、照屋 勝治<sup>1)</sup>、源河いくみ<sup>1)</sup>、立川 夏夫<sup>1)</sup>、菊池 嘉<sup>1)</sup>、安岡 彰<sup>1)</sup>、岡 慎一<sup>1)</sup>、木村 哲<sup>1,2)</sup>

<sup>1)</sup>国立国際医療センターエイズ治療研究開発センター

<sup>2)</sup>東京大学医学部附属病院感染症内科

### 研究要旨

赤痢アメーバ症は HIV 感染症患者、特に男性同性愛者において重要な消化器感染症である。今回当院における 1996 年から 2001 年までの過去 5 年間に於けるアメーバ性肝膿瘍の症例 13 例を経験したのでこれに関して、統計的、臨床的検討を行った。

13 例全例が男性同性愛者で、かつ梅毒や A 型肝炎の既往があり、性行為感染症、特に糞口感染が、その伝播に大きく関与していると思われた。臨床症状としては、腹痛(100%)、発熱(84%)などの症状が多いが、血便をきたしたのは 1 例(15%)とその割合は低かった。検査では便中嚢子の検出度 38% と低かった。血清アメーバ抗体陰性例が 13 例中 2 例みられており、抗体検査が陰性であっても本症は否定できないことが明らかとなった。単発例の 11 例ではすべて肝右葉に認められ、左葉単発例はみられなかった。ステロイド使用例 2 例に膿瘍多発例がみられ、ステロイド投与の際には注意を払う必要があると思われた。治療は通常は前医により膿瘍ドレナージが施行されていた 1 例を除き、メトロニダゾールの経口投与のみにより膿瘍の消失、縮小をみた。このことから治療のための持続ドレナージは必ずしも必要ではないことが示唆された。アメーバ性肝膿瘍は腸管外アメーバ症の大部分を占め、免疫不全が進行していない場合にも発症することがあり、HIV 感染症を示唆する上でも、初発疾患となりうる。死亡例は少ないものの重症化することもあり、今後も診断、治療に関して継続しての検討が必要と考えられた。

分担研究者：安岡彰、岡慎一、木村哲

研究協力者：砂川恵伸

### Clinical evaluation of amoebic liver abscess in patients with human immunodeficiency virus: a review of 13 patients

Keishin Sunagawa<sup>1)</sup>, Katsuji Teruya<sup>1)</sup>, Ikumi Genka<sup>1)</sup>, Natsuo Tachikawa<sup>1)</sup>, Yoshimi Kikuchi<sup>1)</sup>, Akira Yasuoka<sup>1)</sup>, Shinichi Oka<sup>1)</sup> and Satoshi Kimura<sup>1,2)</sup>

AIDS Clinical Center, International Medical Center of Japan and <sup>2)</sup>Department of Infectious Diseases, Faculty of Medicine, Tokyo University

## 研究目的

国立国際医療センター病院における1996年から2001年までの過去5年間におけるアメーバ性肝膿瘍の症例13例に関して、統計的、臨床的検討を行った。

## 研究方法

1996年から2001年までの過去5年間における国立国際医療センター病院におけるエイズ治療研究開発センター部門での記録を中心にretrospectiveに検討した。

検討内容は、HIV患者の患者背景、CD4リンパ球数及びHIVウイルス量、アメーバ性肝膿瘍の臨床症状、診断(アメーバ虫体検出率、画像診断)、治

療、治療後の経過を検討した。集計にあたってはプライバシーに注意し個人情報を除いた形で行った。

## 研究結果

### 1. 患者背景(図1)

アメーバ抗体陽性者、A型肝炎抗体陽性者、梅毒反応陽性者、同性愛者をグラフに示した。性別は全例男性で、平均年齢は37.6歳、既往にタイへの海外渡航歴のあるものが1例あった。全13例(100%)が男性同性愛者であった。血清学的検査では梅毒反応9例(69%)で陽性、A型肝炎ウイルス抗体6例(46%)で陽性、アメーバ抗体(蛍光間接抗体法:IFA法)は11例(84%)で陽性であった。アメーバ抗体陰性者が2例みられ、膿瘍罹患前後の測定でも陰性であった。

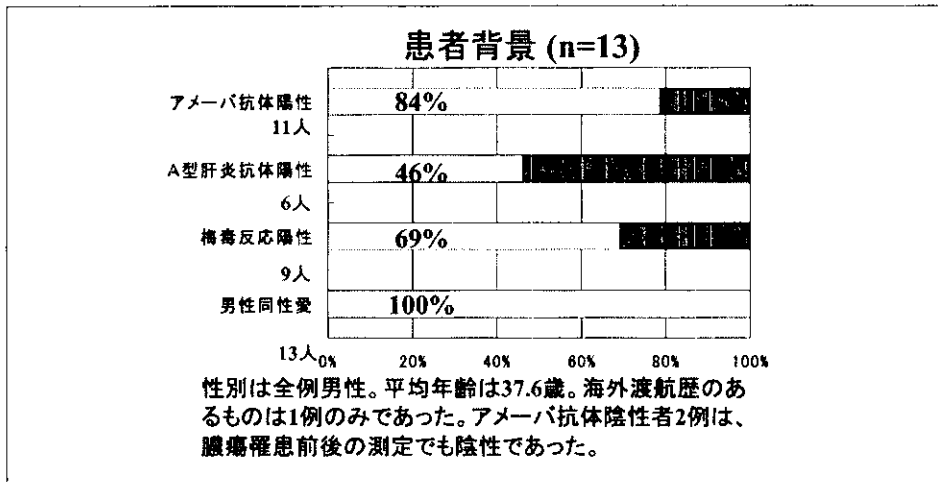


図1

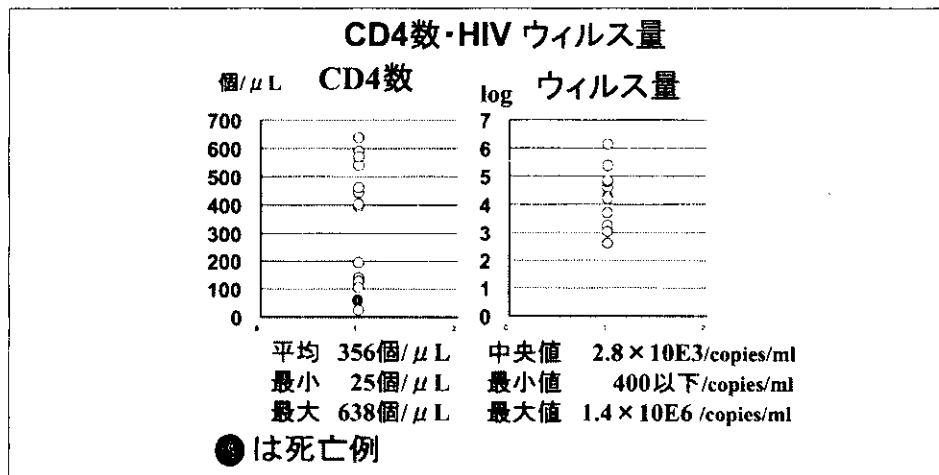


図2

## 2. CD4数とHIVウイルス量との関連(図2)

CD4数とHIVウイルス量との関連をみたグラフに示した。CD4数の平均値は356個/ $\mu$ l、最低値は25個、最高値は638個であった。HIVウイルス量は中央値が $2.8 \times 10^3$ 、最小値は400以下、最大値は $1.4 \times 10^6$ であった。AIDS発症者は3例(15%)であった。死亡例が1例(●)みられたが死因は消化管出血によるもので、アメーバ症は直接死因とはなっていなかった。

## 3. 症状(図3)

アメーバ性肝膿瘍の初発症状の特徴として、13例中腹痛は全例100%、発熱は84%にみられた。血便はわずか15%のみであった。

## 4. アメーバ虫体の検出率(図4)

アメーバ虫体の検出率を示した。便中ではわずか38% (13例中5例)のみ陽性であった。逆に肝膿瘍の膿汁中には83% (6例中5例)が陽性、胸水からは100% (3例中3例)と高率に検出された。

## 5. 膿瘍部位の特徴と大きさ(図5)

膿瘍部位の特徴と大きさ、その変化を示した。膿瘍の部位は、全例右葉にみられ、うち2例が多発性病変であった。その2例ともステロイドが使用されていた。左葉単独例は認められなかった。

膿瘍の直径の最大例は190mmであった。

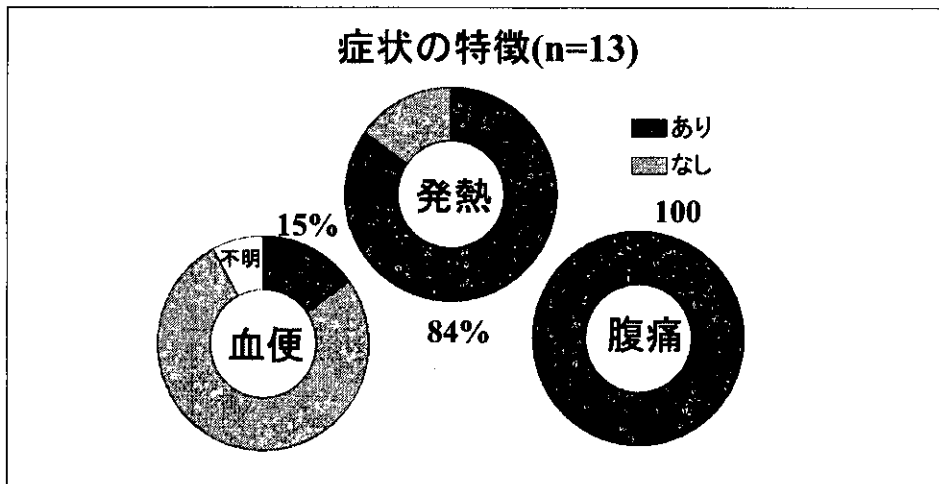


図3

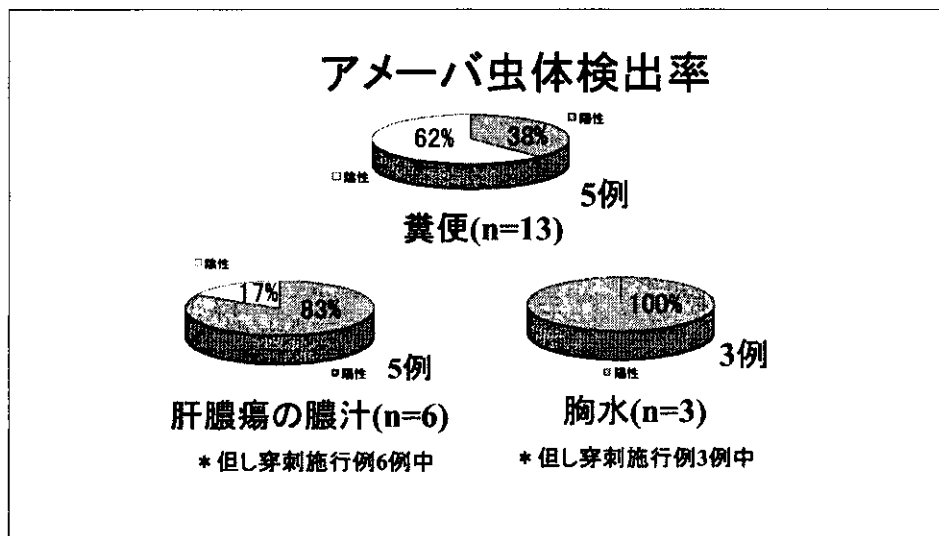


図4

## 6. 治療(図6)

膿瘍に対する治療を示した。全例にメトロニダゾールが投与されており、診断的穿刺施行例は38%であった。ドレナージ施行例は1例(7%)であったが、これは紹介先前医から既に挿入されていたものであった。当科では治療のためのドレナージ施行例はなく、全例薬物療法のみにて改善した。

## 7. 治療期間(図7)

メトロニダゾールは通常、2250mg、10日間、1クールを基本とするが、骨髄抑制、しびれ、肝機能

障害を起こした例は減量を余儀なくされることもある。当科でも23%に減量を必要とした。4クール以上の1例は減量も必要とし、治療抵抗性であり、アメーバ死ではないものの、後に死亡した。

## 8. 治療後の大きさの推移(図8)

治療後、膿瘍の92%は消失または縮小をみた。膿瘍治療後の再発例は認められなかった。

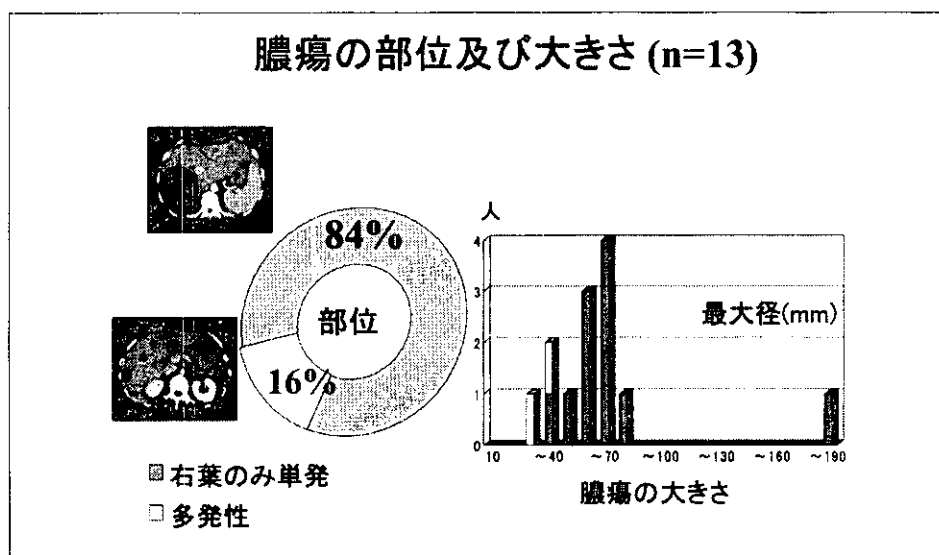


図5

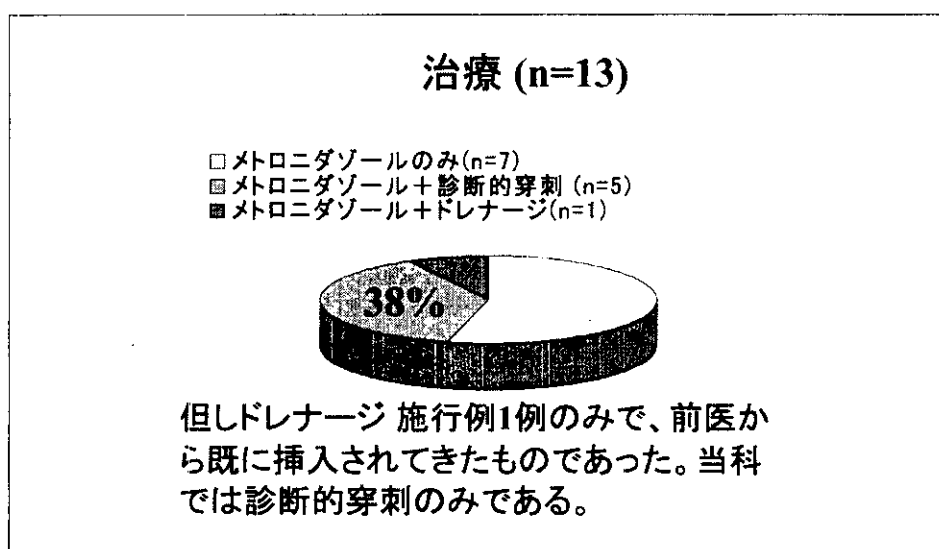


図6

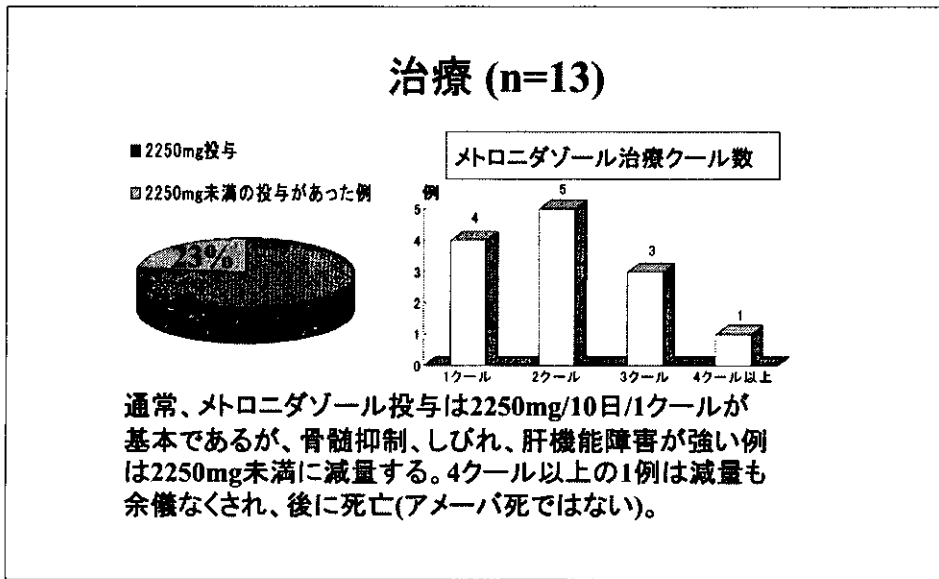


図7

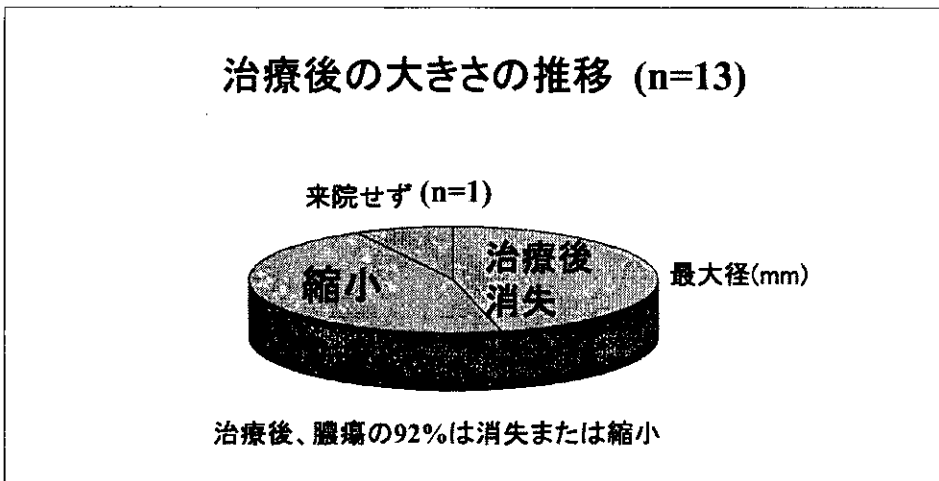


図8

## 考 察

赤痢アメーバ症は全世界人口の約10%が感染しているとされ、そのうち5000万人が組織侵襲性アメーバ症を発症し、毎年10万以上の死者が出ているとされている<sup>1)</sup>。男性同性愛者間において代表的な腸管感染症であり<sup>1)</sup>、肝膿瘍は女性に比較して、約7～12倍とされる<sup>2)</sup>。また HIV/AIDS においては、様々な寄生虫疾患による日和見感染症があり、免疫不全の進行により諸疾患を呈するが、赤痢アメーバ症は他の疾患とは異なり、CD4 リンパ球数が保たれている状態でも発病すること

がある<sup>1,3,4)</sup>。衛生状態の悪い環境で飲食物を介して感染する通常の感染経路に加えて、性行為感染症のひとつとして健全な男性同性愛者を中心に拡大される感染様式が出現したことがその背景にある。それらの感染者の多く(90%以上)が無症状嚢子保有者であるため、性的パートナーのみならずその共同生活者にまで感染を広げることがある<sup>5)</sup>。

疫学的危険因子としては、社会的経済学的低層群、流行地域からの移民者、施設特に精神発達遅延者の収容所、不特定多数の性交渉歴をもつ男性同性愛者があげられている<sup>1)</sup>。

当科で得られた13症例は症状において全例に腹



痛を、84%に発熱を認めたが、血便は15%にとどまった。Seetoらのアメーバ性肝膿瘍患者56人の症例報告によれば腹痛(84%)、発熱(80%)の順で、下痢などは29%となっており、56人中6人がHIV陽性であった<sup>6)</sup>。Myoung-donらによれば、5例のHIV陽性アメーバ性肝膿瘍患者中全例に発熱、3例が腹痛を呈したが、血便を認めたものはいなかった<sup>3)</sup>。Seetoらの報告においてもしばしば血便との併存は少なく、アメーバ性腸炎が同時に症状を呈することは低率である<sup>9)</sup>。

当科で得られた13症例は全例男性であり、梅毒反応陽性69%、A型肝炎抗体陽性46%など、男性同性愛者による性行為感染症に関連した伝播を強く示唆するものであった。Quinnらによれば男性同性愛者の実に30%に*Entamoeba histolytica*が検出されたと報告している<sup>7)</sup>。13症例中、タイへの海外渡航歴のあるものが1例あったが、男性同性愛者であり、渡航歴との因果関係は不明である。

通常肝膿瘍に代表される腸管外アメーバ症はアメーバ抗体陽性率が高いが、抗体陰性例は急性感染例の初期でみられることがある。当科でも陰性例が2例(16%)みられたが、膿瘍形成前後で測定しても陰性であった。抗体検査陽性例はJ. I. Ravdinらの報告でも85-95%とされており、当科では間接蛍光抗体法(IFA)のみで測定しているため、ゲル内沈降反応などその他の血清検査法を組み合わせることも今後検討必要と思われる。

肝膿瘍患者の84%は、右葉単発性であり、多発性病変は16%にみられた。Seetoらは23%に多発性病変を認めた、と報告している<sup>5)</sup>。

J. I. Ravdinらは重症化する増悪因子として、小児特に新生児、妊娠中あるいは出産後の女性、ステロイド使用者、担癌患者、低栄養患者を挙げている<sup>1)</sup>。当科での多発性病変を来した重症例は2例ともにステロイド使用例であった。赤痢アメーバ症とステロイドの関連は、アメーバ性腸炎が臨床的に自己免疫性炎症性腸疾患との鑑別が困難な際に使用され、その後重篤化することがある。しかし本2例は共にHIV/AIDS治療中であり、1例は初感染により神経症状が増悪したためのステロイド使用例、もう1例は抗結核薬による薬疹に対するステロイド使用例であった。赤痢アメーバの侵襲性が惹起される原因としてステロイドが誘因であ

ることは古くから知られており、免疫抑制を起こすことが推測されてきたが、その詳しい機序は不明である<sup>8,9)</sup>。

治療は全例にメトロニダゾールが使用されており、前医でのドレナージ挿入1例を除いて全て薬物治療のみで改善がみられた。J. I. Ravdinらもメトロニダゾールは肝膿瘍の初回治療として優れた薬剤であり、開腹などによる持続ドレナージは通常不要である、としている<sup>1)</sup>。薬物治療のみで本疾患の再発例もなく、またアメーバ症による直接死亡例もみられなかった。

## 結 論

HIV/AIDS患者において、男性同性愛者間での赤痢アメーバ症は、性行為感染症のひとつとして重要である。アメーバ性肝膿瘍は腸管外アメーバ症の大部分を占め、免疫不全が進行していない場合にも発症することがあり、HIV感染症を示唆する上でも、初発疾患となりうる。死亡例は少ないものの重症化することもあり、今後も診断、治療に関して継続して検討を要する。

## 健康危険情報

特になし。

## 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

## 研究発表(学会発表)

- 1) 砂川恵伸、石崎有澄美、川田真幹、中島由紀子、矢崎博久、照屋勝治、源河いくみ、立川夏夫、菊池 嘉、安岡彰、岡慎一、木村哲：アメーバ性肝膿瘍についての臨床的検討. 第15回日本エイズ学会学術集会・総会, 2001, 東京.

## 参考文献

- 1) J. I. Ravdin.; Amebiasis., *Clinical Infectious disease*; 20:1453 -1464, 1995
- 2) William A.;Diagnosis and Management of Amebiasis., *Clinical Infectious disease*; 29:1117-1125,1995

- 3) Hung CC,;Invasive amebiasis:an emerging parasitic disease in patients with HIV in an area endemic for amoebic infection, AIDS; 13:2421-2428,1999
- 4) Myoung-don.;Amoebic liver abscess in HIV-infected patients, AIDS;14:1872-1873, 2000
- 5) Erica AJ,;Entamoeba histolytica as a commensal intestinal parasite in homosexual men, N Engl J Med; 315:353-356, 1986
- 6) Seeto,;Amebic Liver abscess: epidemiology, clinical features,and outcome., West J Med;170:104-109, 1999
- 7) Quinn TC,;The polymicrobial origin of intestinal infections in homosexual men, N Engl J Med; 309: 576-582, 1983
- 8) Eisert J,;Fatal amebiasis complicating corticosteroid management of pemphigus vulgaris, N Engl J Med ; 26:843-845, 1959
- 9) Kanani SR,;Amoebic dysentery precipitated by corticosteroid,BMJ;3:114, 1969



## *Entamoeba dispar* の確実な無菌培養法の確立

竹内 勤、小林 正規、今井 栄子、Shaden Ali Kalifa

慶應義塾大学医学部熱帯医学・寄生虫学教室

### 研究要旨

本研究では初年度より *Entamoeba histolytica* と遺伝子的にも酷似するがヒトに対して病原性を示さない *Entamoeba dispar* 栄養型の無菌培養系の確立と増殖促進物質の同定・精製を試みてきた。昨年度までの成果として独自に考案した YIGADHA-S 培地を用い増殖の安定した *E. dispar* 2株の無菌培養株を樹立し、植物葉肉細胞抽出物を培地に加えることで5株を確実に無菌的に増殖させることに成功している。今年度は昨年度に引き続きこの植物(ツククサ等)の抽出物からの増殖促進物質の精製を試みた。その結果、新たに植物葉肉細胞の100%アセトン及びエタノール処理によっても、可溶性の分画に抽出されることが分かった。そして分離用電気泳動法により、増殖促進物質は分子量約3,500～6000の範囲の葉緑素・蛋白複合体と推定される分画に局在すること、水溶性分画を予め除くとアセトンによって抽出されないことそして鉄を含むことなどがわかってきた。また細菌そして細菌起原と考えられ酸化リン酸化を主な役割とするミトコンドリア、ヒドロゲノゾーム、葉緑体の粗分画を121℃,15分処理したものの、葉緑体の2-mercaptoethanol/SDS抽出液にも増殖促進効果がみられること、そしてツククサ葉肉細胞の水溶性分画にはアセトン処理でも沈降し難い電子伝達物質である鉄-硫黄蛋白(フェレドキシン)が多く存在することを考えあわせると増殖促進物質は鉄-硫黄蛋白を構成する鉄硫黄中心のような安定した物質を推定させた。本研究の成果は AIDS 患者とくに男性ホモセクシュアルの性癖を有す患者で高い感染率を示す *E. dispar* の免疫不全状態での virulence の検討に有用であり、またフェレドキシンはアメーバ症の治療薬の選択的標的としても有望と思われることからその役割を解析すること、そしてアメーバに致死的效果をもつ鉄-硫黄中心アナログと葉緑素との複合体を形成させアメーバに効率良く取り込ませるような drug delivery system を確立できれば治療が困難な腸管腔に寄生する *E. histolytica* / *E. dispar* の治療薬開発にも役立つものと考えられる。

分担研究者：竹内 勤

研究協力者：小林正規、今井栄子、Shaden Ali Kalifa

**Studies of chemotherapy of opportunistic protozoan infections: Establishment of a practical axenic cultivation of *Entamoeba dispar***

Tsutomu Takeuchi, Seiki Kobayashi, Eiko Imai, Shaden Ali Kalifa

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

## 研究目的

赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*, Schaudinn, 1903) と形態的、遺伝子の相同性、免疫学的にも高い共通性を示す *Entamoeba dispar*, Brumpt, 1925 は組織侵入性が見られず、また実験的に直接肝組織内に接種しても膿瘍の形成が見られないことから非病原性のアメーバと考えられている。欧米の男性同性愛者由来の HIV 感染者ではその多くが *E. dispar* 感染であることが知られているが、他の先進諸国に対し我が国の男性同性愛者間には *E. histolytica* が高い頻度で見出されることも判っている。しかし最近、欧米の外国の男性同性愛者が日本で *E. histolytica* に感染する症例も増えてきている。そして、この事実は逆に日本人の男性同性愛者が *E. dispar* に感染する可能性も示しているといえる。本研究は *E. histolytica* と *E. dispar* の生物学的性状の差異を明らかとし、その成果を薬剤開発に役立てること及び *E. dispar* の免疫不全時での virulence の有無を解明しようと計画した。この目的のため無菌培養が困難な *E. dispar* の確実な無菌培養法の確立を試みた。

## 研究方法

### 実験材料

#### 1. *E. dispar* (5株)

① SAW1734RcloneAR ② AS21R ③ AS161R ④ CYNO09:TPC⑤ CYNO16:TPC の5株を昨年の実験と同様使用した。これらの株は *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おり、増殖促進因子の検定にはこの葉肉細胞の抽出液を除いて3代以上継代培養したアメーバを用いた。

#### 2. 培地

我々が考案した YIGADHA-S 培地にガラクトン酸 (0.02%) を加えた培地を用いた。

## 研究方法

### 1. 細菌及びミトコンドリア様オルガネラの *E. dispar* 栄養型に対する増殖促進効果

① $10^7$ 以上の細胞を出発材料としてミトコンドリア

様オルガネラを調製した。②ミトコンドリア及びヒドロゲノゾームは Hogeboom(1955)の方法に準じ8種の細胞から、また葉緑体は Jensen and Bassham (1966)の方法に基づき1種の植物細胞から調製した。ミトコンドリア用オルガネラをもたない原虫も Hogeboom(1955)の方法に従いミトコンドリア分画を調製し比較検討した。原虫 (ミトコンドリア): i) *Criethidia fasciculata*; ii) *Trypanosoma cruzi*; iii) *Leishmania major*, iv) *Acanthamoeba castellanii*, 原虫 (ヒドロゲノゾーム): v) *Trichomonas vaginalis*; vi) *Trichomonas foetus*, ミトコンドリア様オルガネラをもたない原虫: vii) *Giardia lamblia*, 哺乳類細胞 (ミトコンドリア): viii) mouse macrophage cell line (P388D1), 植物葉肉細胞 (葉緑体): ix) Spider wort (*Commelina communis* L.), 細菌: x) *Pseudomonas aeruginosa* ③調製した各々の分画は5mlのRPMI1640に懸濁し、121℃,15分オートクレーブ滅菌した後0.2ml/6ml YIGADHA-Sになるように加え *E. dispar* の増殖への効果を調べた。

### 2. 植物(ツユクサ)の葉からのアセトン、エタノール等の有機溶媒を用いた *E. dispar* 増殖促進因子の抽出

①ツユクサの葉を破碎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。②20mg/mlになるよう各種濃度のアセトン (エタノール) を加え氷上で30分抽出した。10,000g、10分 (4℃) 遠沈し、その上清を乾燥重量の120倍になるよう2.4倍の蒸留水で希釈し、分子量3,000或いは10,000 cut offの透析チューブに入れ2日間4℃で蒸留水に対し透析した。透析後その上清分画を0.2 $\mu$ m pore sizeのメンブラン・フィルターで濾過して培地に0.1-0.4ml/6mlになるよう添加した。またこの分画は蛋白成分が極めて微量のため定量が困難なため増殖促進物質の濃度の標準化のため有機溶媒で高率に抽出される葉緑素の濃度を吸光度から算出しこの濃度を基準値として用いた。

### 3. SDS及びNative電気泳動法(SDS PAGE, Native PAGE)による増殖促進物質の解析

①7%,12%,20%のTris-glycine gel及び4-12%Bis-Tris gradient gel(NuPAGE Novex precast gel system)を用い、それぞれLaemmli (Tris-Glycine)system及び

NuPAGE (Tris-MOPS/MES)system により電気泳動を行った。②泳動材料はツユクサ葉肉細胞凍結乾燥標品を0, 20, 80, 100%のアセトン(20mg/ml)で抽出後、10,000g、10分(4℃)遠沈し、その上清分画の20μlをエバポレーターにより乾燥後10%アセトンにより(NativePAGE)、或いは4% 2-mercaptoethanol (2ME) or 50mMDTT/1.6%SDSを終濃度とするサンプルバッファー(SDSPAGE)に溶解させることで調製した。③染色は蛋白染色(Coomassie R-250、銀染色; 2D-銀染色試薬・II「第一」、第一化学薬品K.K)及び鉄-蛋白染色(Kuo C-F and Fridovich I, 1987)を行った。

#### 4. 分離用ディスク電気泳動法による増殖促進物質を含む分画の分取

Mini Prep Cell (BIO-RAD,170-2908)電気泳動装置を用いツユクサ葉肉細胞アセトン抽出液を泳動し泳動分画を分取し増殖促進活性の有無を調べた。

#### 5. *E. dispar* 栄養型の増殖促進効果の判定

YIGADHA-S 培地以外に増殖促進効果のある物質を何も加えないで無菌培養した AS16IR 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 AS16IR 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。

### 研究結果

増殖促進物質は細菌と細菌が起原と考えられているミトコンドリア、ヒドロゲノゾームや葉緑体を細胞内オルガネラにもつ哺乳類、植物、原虫などの細胞をオートクレーブ(121℃,15分)することで膜分画として得られること、また ultrasonic processor (GE 50, Sonics and Materials, Inc.)による超音波処理(4℃,30分)により葉肉細胞から水溶性分画に抽出されることは昨年までの実験結果から明らかとなっている。本年度は増殖促進物質が実際にミトコンドリア、ヒドロゲノゾーム、葉緑体に局在することを明らかにするため、これらのオルガネラの粗分画を調製し増殖促進効果を調べた (Fig. 1)。その結果から、一概に細菌そしてミトコンドリア様オルガネラの増殖促進効果の程度は比較できないが supplement を何も加えない control 及

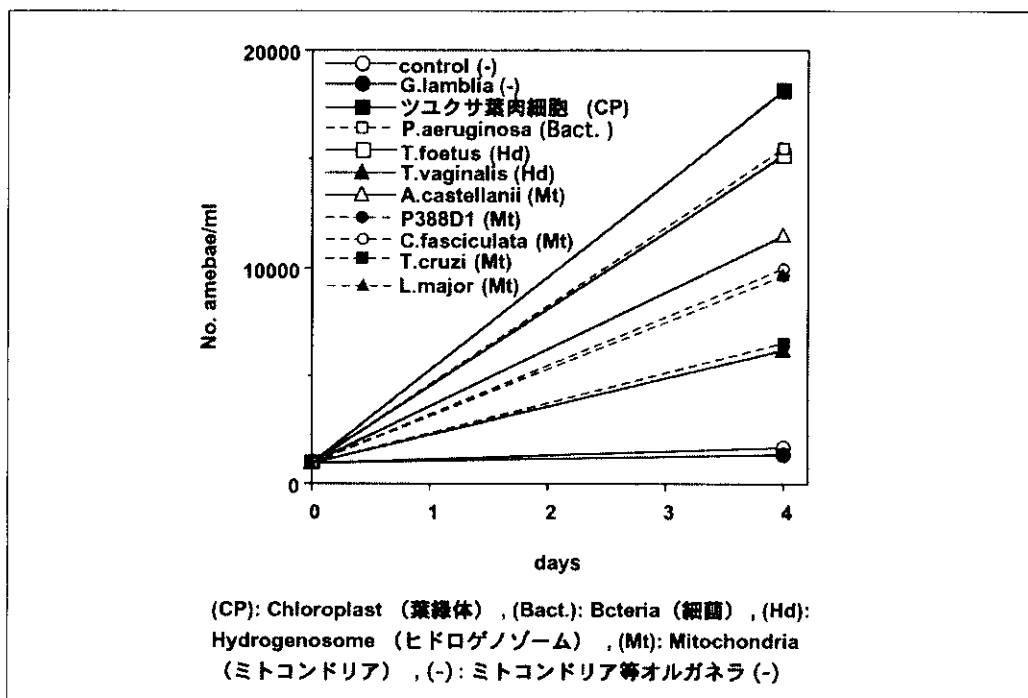


Fig. 1

びミトコンドリア様オルガネラをもたない *G. lamblia* の細胞分画を加えた培地に比べ、明らかに *E. dispar* の増殖数が増加していることから、これらの分画に増殖促進物質が局在していることがわかる。また、ツエクサの葉肉細胞の凍結乾燥標品からは超音波処理による以外にアセトン、エタノールなどの有機溶媒や2-mercaptoethanol/SDSやDTT/SDSなどの還元剤/界面活性剤によっても抽出できることがわかってきた。Fig. 2に0, 20, 40, 80, 100%アセトン抽出試料、そして100%エタノール抽出試料のSDSPAGE(4-12%Bis-Tris gradient gel, NuPAGE Novex precast gel system)の結果(銀染色)を示した。80%,100%アセトン抽出試料では葉緑

素と complex を形成していると考えられる分子量 3,500~6,000の蛋白バンド以外は殆ど見られなくなっていることがわかる。そして分離用ディスク電気泳動法により分取したこの葉緑素を含む約分子量 6,000  $\geq$  の分画に増殖促進物質が含まれていることも確認された。また0%, 20%, 40%, 80%, 100%アセトン抽出分画を透析後、増殖促進効果を調べた結果80%,100%アセトン抽出分画とともに0%アセトン(蒸留水)抽出分画ではみられない約分子量 5,000の蛋白バンドが出現している20%アセトン抽出分画にも80%アセトン抽出分画に匹敵する増殖促進効果がみられた(Fig. 3)。そしてこの蛋白バンドが濃く出現している分画ほど増殖促

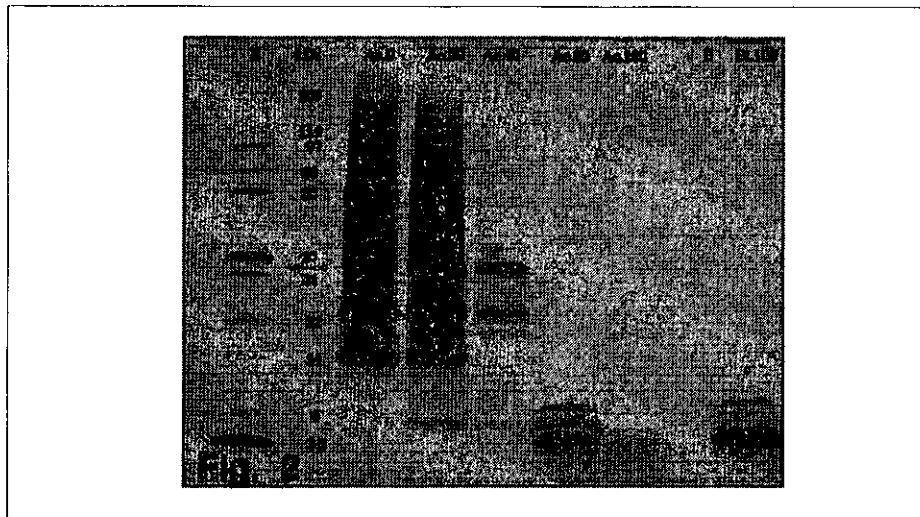


Fig. 2

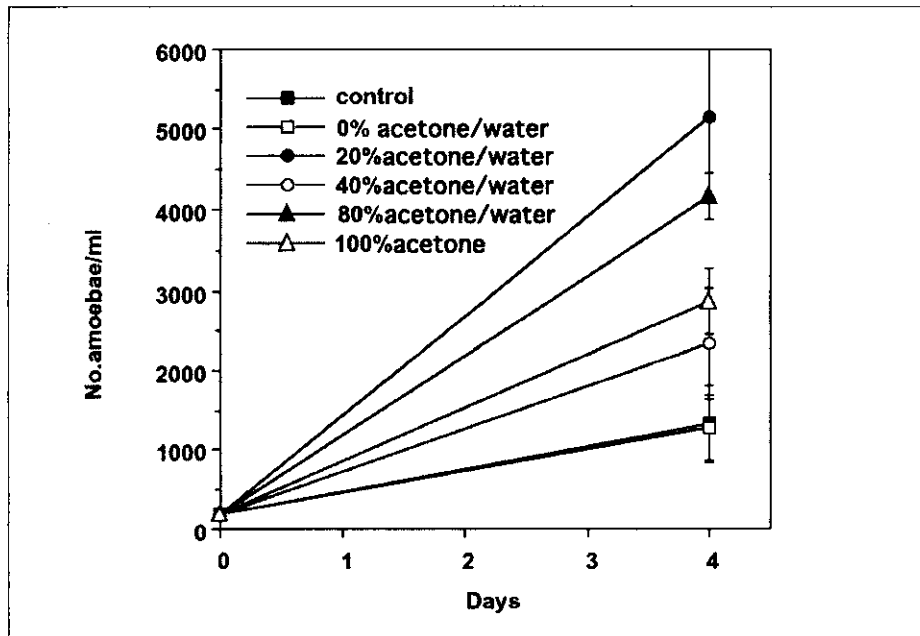


Fig. 3

進効果が高かった。これらの結果からこの分子量 5,000 の蛋白が増殖促進物質である可能性が示唆された。またこの分子量 5,000 前後の蛋白と葉緑体バンドしか見られない 80% と 100% アセトン分画に鉄が含まれているらしいことが diaminobenzoate の  $H_2O_2$  による酸化を触媒する鉄の性質を利用した反応から示唆された。さらに 4% 2-ME / 1.6% SDS でも増殖促進物質が抽出されこの分子量 5,000 前後のバンドも出現することがわかった。NativePAGE の結果からは鉄-硫黄蛋白であるホウレンソウの精製されたフェレドキシン (Sigma Chem. Co., USA, F-3013) とツクサ葉肉細胞凍結乾燥標品の 80% 抽出分画ではフェレドキシンと推定されるバンドの消失がみられた。これらの結果から分子量 5,000 前後の蛋白は intact な蛋白というよりはアセトン処理により修飾され低分子化されたその構成 (蛋白) ユニットと考えられた。

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 supplement 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こと、そして AS2IR 株と AS16IR 株が YIGADHA-S 培地に適応過程の段階にあることは昨年度までの成果として既に述べたが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昨年度の成果と同様今年度の研究成果も示唆しているように思われた。

### 考 察

本研究の成果においてオートクレーブ (121°C, 15 分) 処理した細菌そして粗精製した細菌起原と考えられているミトコンドリア、ヒドロゲノゾーム、葉緑体に増殖促進効果を確認した。また、ツクサの葉肉細胞 (葉緑体) からは超音波処理、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最終的に水溶性分画に増殖促進物質が抽出されることがわかった。そして 80, 100% アセトン抽出分画の SDS-PAGE と分

離用ディスク電気泳動法の結果から増殖促進物質が葉緑素と約 5,000 の蛋白 (鉄-蛋白) complex であることが示唆された。NativePAGE の結果からは S-S 結合を切断する作用のある 2ME とともに 80% アセトン処理により鉄-硫黄蛋白 (フェレドキシン) が修飾され低分子化することがわかった。これらの結果から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フェレドキシンのような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る。

*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。

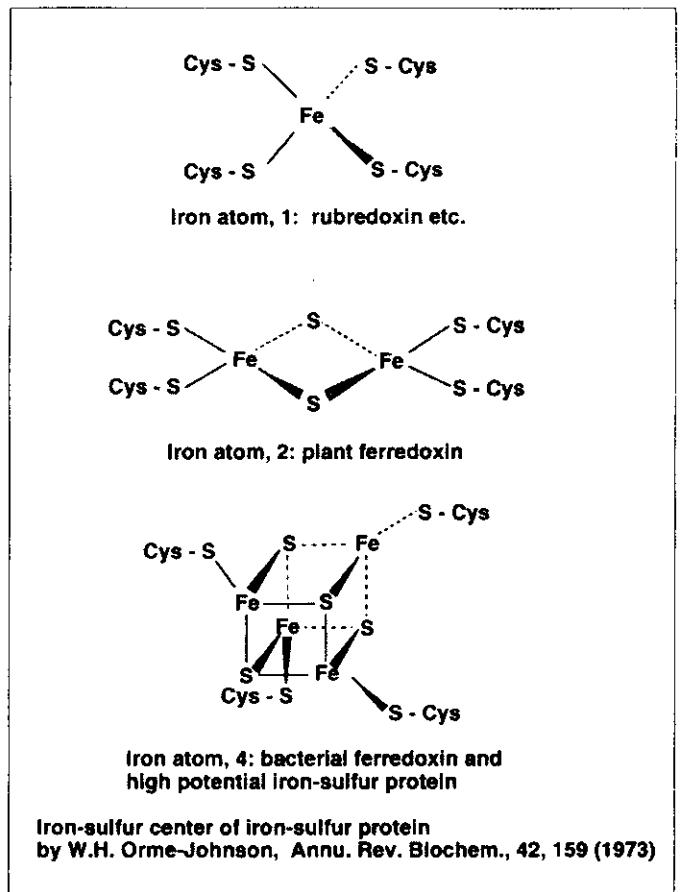


Fig. 4

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 など、Fig.4)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。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昨年までの成果としてわかっている。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ツユクサの葉肉細胞から増殖促進因子をはじめてより純度の高い物質として抽出することができた。現在この物質を免疫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の貪食能を利用してより選択的にアメーバに作用させることができるような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無菌培養システムを応用したいと考えている。

## 結 論

- 1) オートクレーブ(121℃,15分)処理した細菌そして種々細胞破砕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。
- 2) ツユクサの葉肉細胞(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。

- 3) 鉄蛋白である精製されたフェレドキシンとツユ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)を *E. dispar* が利用しているらしいことが推定された。
- 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。

## 健康危険情報

なし

## 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).

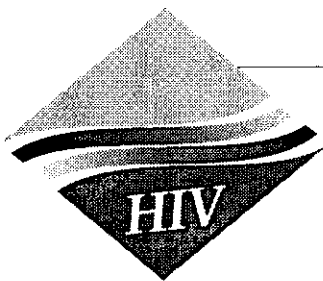
### 2. 学会発表参考文献

- 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)

## 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





## 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<sup>1)</sup>、竹内 勤<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 東京慈恵会医科大学熱帯医学教室

<sup>2)</sup> 慶応大学医学部熱帯医学寄生虫学教室

### 研究要旨

赤痢アメーバの感染型は嚢子であり、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は不可欠である。そこで本研究では昨年度にひきつづき、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( $\text{Ca}^{2+}$ )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、 $\text{Ca}^{2+}$ キレート剤EGTA、EDTA、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$  fluxの阻害剤TMB-8、 $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルブロッカーbepridil、CaM阻害剤trifluoperazine (TFP)が両過程を抑制することが判明し、 $\text{Ca}^{2+}$ 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 $\beta$ -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、両過程とも抑制され、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。

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<sup>1)</sup>, Tsutomu Takeuchi<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Tropical Medicine, Jikei University School of Medicine and <sup>2)</sup>Department of Tropical Medicine and Parasitology, Keio University School of Medicine

## 研究目的

赤痢アメーバの感染型は嚢子であり、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として重要と考えられる。そこで昨年度にひきつづき、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. 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( $\text{Ca}^{2+}$ )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 $\text{Ca}^{2+}$ 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 $\text{Ca}^{2+}$ の関与に関しては明らかでない。そこで今回、種々の $\text{Ca}^{2+}$ 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、 $\beta$ -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。

## 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 $\text{Ca}^{2+}$  fluxの阻害剤 TMB-8、 $\text{Ca}^{2+}$ 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、 $\beta$ -lactone および MG132 は Calbiochem から購入した。

## 研究結果

### 1. $\text{Ca}^{2+}$ 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)  $\text{Ca}^{2+}$ 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抑制がみられ、EGTA 10 mM、EDTA 0.5 mMの濃度で増殖を完全に抑制した(Fig. 1A)。EDTAの抑制効果がEGTAよりも強いことから $\text{Ca}^{2+}$ 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(Fig. 1B)。一方、*E. invadens*の嚢子形成も抑制されたが、増殖よりも低い濃度で抑制され、より感受性が高いことが示された(Fig. 1B)。
- 2) 細胞内 $\text{Ca}^{2+}$  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抑制がみられ、100  $\mu\text{M}$  で完全に抑制した(Fig. 2A)。一方、*E. invadens*の増殖抑制には高濃度のTMB-8が必要であり、500  $\mu\text{M}$  で完全な抑制がみられた(Fig. 2B)。*E. invadens*の嚢子形成は増殖よりも高濃度で抑制された。
- 3)  $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルブロッカー bepridil、verapamilの及

ばす効果: bepridil は赤痢アメーバの増殖を 10  $\mu\text{M}$  でほぼ完全に抑制したが、同濃度の verapamil はまったく抑制せず、100  $\mu\text{M}$  で 84% の抑制効果を示した (Fig. 3A)。 *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  $\mu\text{M}$  でも増殖の完全な抑制はみられず、赤痢アメーバの場合と同様、 verapamil の抑制効果は bepridil に比し弱かった (Fig. 3B)。 bepridil は嚢子形成も強く抑制したが、 verapamil の効果は弱かった (Fig. 3B)。

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* に対する増殖抑制効果は 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抑制された (Fig. 4A, B)。

## 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抑制効果を

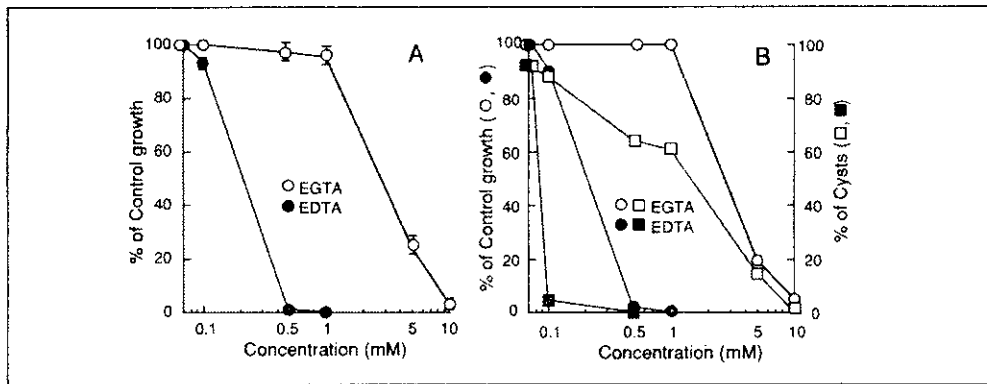


Fig. 1 Effect of EGTA and EDTA on the growth of *Entamoeba histolytica* (A) and the growth and encystation of *E. invadens* (B)

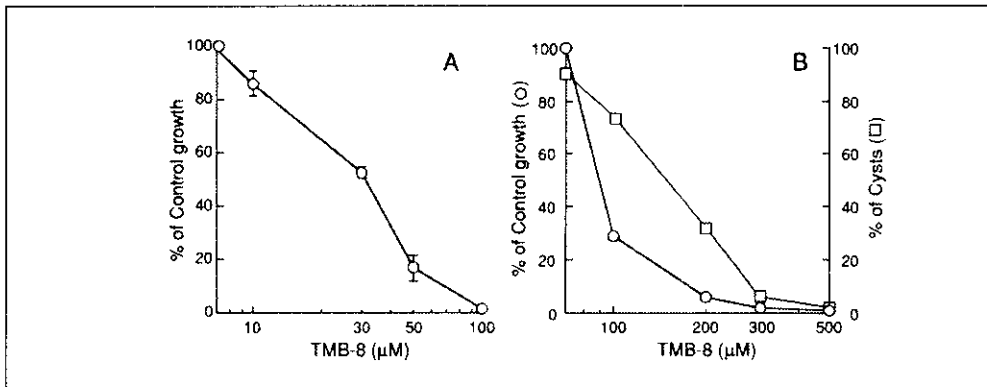


Fig. 2 Effect of TMB-8 on the growth of *E. histolytica* (A) and the growth and encystation of *E. invadens* (B)

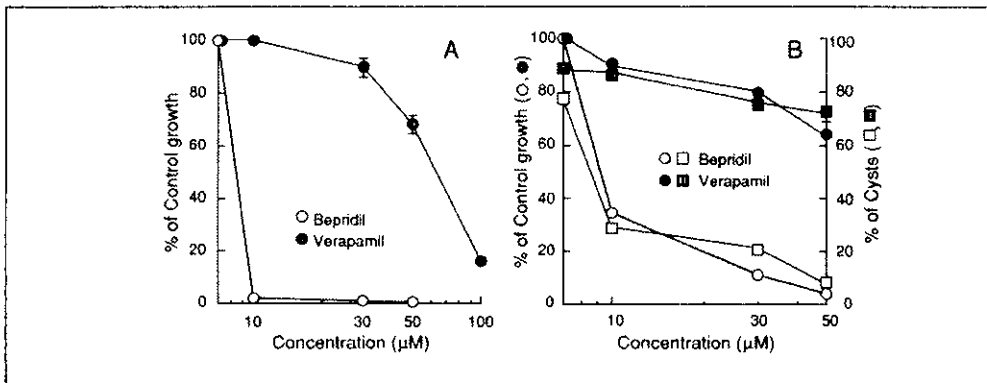


Fig. 3 Effect of bepridil and verapamil on the growth of *E. histolytica* (A) and the growth and encystation of *E. invadens* (B)

示した。その抑制効果は $\beta$ -lactoneが最も強く、次にlactacystin、MG132は高濃度でのみ抑制効果を示した(Fig. 5A)。lactacystinによる増殖抑制の経過を調べた結果、 $1\mu\text{M}$ および $5\mu\text{M}$ では栄養型の細胞分裂が抑制されており、 $10\mu\text{M}$ では毒性的に作用していることが明らかになった。*E. invadens*も増殖が抑制されたが、赤痢アメーバの場合よりも抵抗性が認められた(Fig. 5B)。

- 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抑制効果を示し、その効果は増殖に対してよりも強かった。3種のうち $\beta$ -lactoneが最も強い抑制効果を示した(Fig. 6)。また、lactacystinと $\beta$ -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、 $\beta$ -lactoneでは全く回復が認められなかった(Fig. 7)。
- 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(Fig. 8)、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、 $\beta$ -lactoneがわずかな抑制効果を示したがlactacystinとMG132には抑制効果は認められなかった(Fig. 9)。

## 考 察

$\text{Ca}^{2+}$ 機能阻害剤によりアメーバの増殖および嚢子形成が抑制されたことから、これらの過程に $\text{Ca}^{2+}$ およびカルモデユ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、 $\text{Ca}^{2+}$ 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抑制されたことから、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

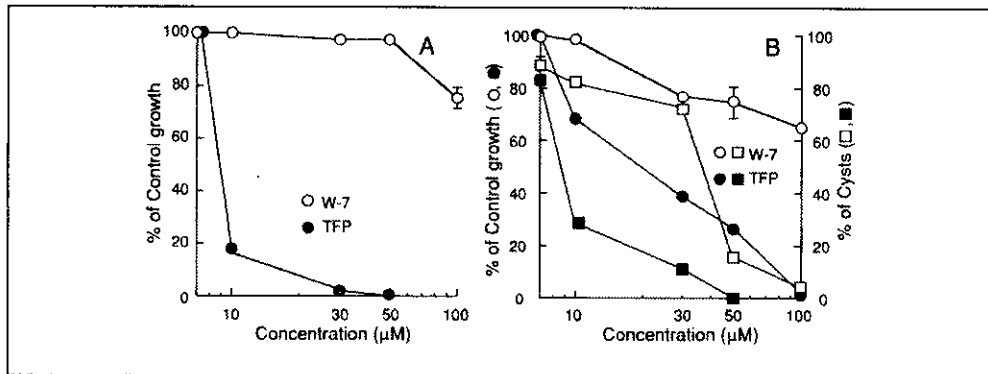


Fig. 4 Effect of calmodulin inhibitors W-7 and TFP on the growth of *E. histolytica* (A) and the growth and encystation of *E. invadens* (B)

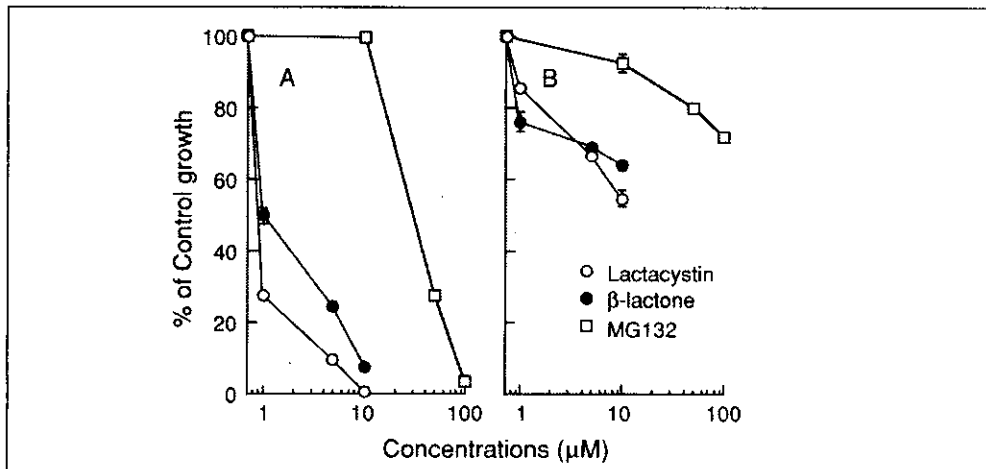


Fig. 5 Effect of proteasome inhibitors on the growth of *Entamoeba histolytica* (A) and *E. invadens* (B)