

20026590

赤痢アメーバ症等寄生虫症ハイリスク群に対する  
予防法等の開発に関する研究

厚生労働科学研究費補助金  
新興・再興感染症研究事業  
平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 竹内 勤

(慶應義塾大学)

平成15年4月

## 目 次

### 1. 総括研究報告及び研究成果の刊行に関する一覧表

赤痢アメーバ症等寄生虫症ハイリスク群に対する予防法等の開発に関する研究

竹内 勤 (慶応義塾大学医学部) . . . . . 1

### 2. 分担研究報告

施設内のハイリスク群におけるアメーバ感染の疫学的研究；ガイドラインに基づいた  
感染予防・防御対策の実施、評価、改良

竹内 勤 (慶応義塾大学医学部) . . . . . 12

アメーバ症の免疫診断法の開発とワクチンによるハイリスク群の感染予防法の開発

橘 裕司 (東海大学医学部) . . . . . 16

アメーバの嚢子形成、脱嚢機構、及び関連の研究を通じたアメーバ感染予防法確立に  
関する研究

牧岡朝夫 (東京慈恵会医科大学) . . . . . 20

赤痢アメーバの多型性解析及びそれに基づくハイリスク群における感染源の特定化等  
に関する検討

野崎智義 (国立感染症研究所) . . . . . 25

3. 研究成果の刊行物・別冊 . . . . . 36

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
総括研究報告書

赤痢アメーバ症等寄生虫症ハイリスク群に対する予防法等の開発に関する研究

主任研究者 竹内 勤（慶応義塾大学医学部教授）

研究要旨

本研究では平成11~13年度にわたり実施したわが国の赤痢アメーバ症の実態の解明と対策確立に関する研究に引き続き、ハイリスク群であることが確定した各種施設利用者の感染状況のより一層明確な実態把握、迅速診断法の導入、施設における感染予防ガイドラインの改訂、免疫診断法の検討、サブポピュレーションの同定、ワクチン開発、薬剤の標的の探索を目的として検討を行なった。今年度はまず異なる2施設の利用者130名、職員87名を対象として調査を行なった。その結果新たに対象となった施設では抗原定量を含む糞便検査で27.6%が陽性、血清反応で67.1%が陽性と判定された。他の1施設は制圧対策実施後三年間のフォローアップを実施しているものであるが、新しい感染者はなくガイドライン化した環境衛生施策も有効に機能しているものと推定された。現在ガイドラインはこの施設との共同作業によって改訂が終了し、また迅速診断キットの導入をこの施設をモデルとして計っている。免疫診断の確立のため必要な*E. dispar*の無菌培養は計5株が増殖促進因子を加えず完全無菌培養化に成功した。免疫診断法に関する検討では150-kDaの表面レクチンの応用を目指して、全長と種々の断片を組み替え蛋白として作成し検討した結果、接着阻止抗体のエピトープの局在が明らかになった。この研究はワクチン開発の基礎となると考えられる。また*E. dispar*のレクチン遺伝子のクローニングを行い、*E. histolytica*と比較検討した。その結果相同性は72~73%程度で、鑑別に適用できるものと考えられた。化学的予防法としての薬剤の標的の探索については以前より継続してアメーバの嚢子形成、脱嚢の阻害剤の探索を行なっているが、今年度は更にファルネシル転移酵素の遺伝子をクローニングし、組み替え蛋白を作成してその性状の検索を行なった。その結果、高等動物の酵素との差異が明らかになり、化学的予防法開発の標的としての可能性が示された。またアメーバのサブポピュレーションの同定法の開発をこれまで行なったが、今年度は海外、特に東南アジアからの流入の可能性を探るためこの方法を適用し、わが国の分離株のパターンと比較検討した。その結果、タイの分離株とは明瞭な差異が示され、少なくとも最近タイ周辺より流入したとは考えられないと云う結果になった。この事は1980年代以来、及び数年前の感染症法の実施以来観察されたアメーバ感染者のわが国での増加は輸入株由来でなく、過去に土着した株によるResurgenceであることが推定された。

研究分担者

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

A. 研究目的

わが国においてはアメーバ症の報告例は1980年代、また数年前の感染症法施行以来より明瞭な増加傾向を示しているが、その対策策定には以前から困難な点が少なくない。その理由としては、①ハイリスク集団が同性愛者や知的障害者施設等の利用者であり、疫学調査と制圧対策実施に困難な点が多い。②また赤痢アメーバが病原性の異なる二種の原虫、すなわち*Entamoeba histolytica*、*E. dispar*に分けられたため、各々に対する臨床的対応、診断法、疫学的側面が再検討されなければならな

くなった。③副作用の少ない薬剤の開発が進んでいない、等が挙げられる。特に①に関連した事項のうち施設内感染は重要で、わが国の福祉・衛生行政面で提起している問題は大きい。以上より本研究においては、①ハイリスク集団のうち諸種施設における施設内アメーバ感染の疫学調査を実施してその実態を明らかにし、制圧対策モデル化と実施、及び感染予防ガイドライン作成、試行を行なうこと、②*E. dispar*無菌培養系の確立を通して両種アメーバの鑑別法確立に資すること、③*E. histolytica*感染の免疫同定法を改良し精度を上げること、④サブポピュレーションの同定法の開発を行い、迅速化を計ったうえで個々の症例への対応のプロトコール作成及び疫学調査に応用すること、⑤アメーバ表面レクチンの

ワクチンとしての評価を行ない、予防法として評価すること、⑥薬剤による感染予防法開発のため標的およびその阻害剤を探索すること、を目的としている。

これらの研究により実態が明らかでなかったためこれまで福祉・衛生行政面での対応策が効果的に実施されなかった諸種施設におけるアメーバ感染抑圧の途を開く事が期待できる。また両種アメーバの抗原・抗体レベルあるいは遺伝子レベルでの新しい鑑別、サブポピュレーションレベルの同定が可能となり、かつ化学療法に新しい指標を与えることも期待され、臨床に有意義な影響を及ぼすものと思われる。

## B. 研究方法

(1)施設内アメーバ感染の実態の把握と制圧：これまでの成果に基づいて、各種施設におけるアメーバ感染を対象として実態調査を継続実施した。調査は糞便検査、ELISA等による血清学的検査、*E. histolytica* II kit (Tech Lab Inc., USA)による抗原検査を併用して行った。陽性者があった場合は施設側の責任によって制圧対策を行い、その後のフォローアップは本研究班で実施した。また新しく集団感染が疑われる施設がかなり多いと云う疫学的な状況に鑑み、実施した環境衛生対策に基づいた感染予防策の立案を行い、ガイドラインとして福祉・衛生行政に還元する事も本研究にて行なった。

また今年度は施設からの分離株のvirulenceを調べ、臨床的な側面との対応を見るためこれまでマラリアの研究に使用されていたethidium homodimerを用いて、蛍光顕微鏡下で標的細胞死をリアルタイムで捉える事を試みた。観察は施設内感染からの分離株をを使用してライツ社製のコンピューター制御倒立顕微鏡下にて行なった。

(2)アメーバの免疫学的同定法の開発とワクチンへの応用：今年度はアメーバの鑑別の標的として分担研究者(橘)が初めて発見し、ワクチン候補としても検討を続けている150-kDaの表面レクチン遺伝子を取り上げ、*E. histolytica*と*E. dispar*の遺伝子のクローニングを行い、塩基配列の差異や大腸菌にて組み替え蛋白を作成し、エピトープの局在やモノクロナル抗体を使用して抗原性を調べた。

アメーバ種の鑑別法作成等のための*E. dispar*の無菌培養系は初年度開発したYIGADHA-S mediumと植物由来の増殖促進物質との組合せを更に検討し、最適な培養系の開発を試みた。使用した*E. dispar*株はSAW1734cloneAR, AS21R, ASI61R, CYN0009:TPC, CYN016:TPCの5株である。とくに今年度はこれまで使用したculture associateを除去し、YIGADHA-S mediumにどの程度適応するのか検討を行なった。

(3)サブポピュレーション特定化の方法の開発：これまでに開発した4種類のプライマー(非翻訳領域のLocus 1-2、Locus 5-6、およびSREHP; serine-rich *E. histolytica* protein, chitinase遺伝子に基づいて設計した)を使用した同定法を用いてタイ、バングラデッシュなどからの分離株に関して検討を行い、わが国の分離株との比較検討を行なった。また解析法の簡易迅速化のため、PCRにて上記の方法で増幅されたSREHPの断片を制限酵素で処理しアガロースゲル電気泳動にてパターンを調べ、遺伝子の多形性が確認できるかどうかを調査した。

(4)新規薬剤による感染予防法開発：今年度も*E. histolytica*の増殖阻害、及びモデルとして*E. invadens*を使用したin vitroでの嚢子形成、脱嚢阻害作用を検索した。またあわせて新しい薬剤標的の探索を拡大し、細胞内情報伝達機構に重要な役目を果たしているファルネシル転移酵素(FT)に注目し、その遺伝子をクローニングし、組み替え蛋白を作成して、性状を高等動物のそれと比較検討し、標的としての可能性を探った。

## (倫理面への配慮)

知的障害者収容施設での調査における倫理面にはこれまでと同様の注意を払った。特に入所者の家族には説明を十分に行なったが、加えて施設職員からも同意を得てから調査を進めた。また施設の性格上、関連する地方自治体の保健所、あるいは該当施設の嘱託医にも説明を行ない協力体制を作った。本研究遂行に際してはこれまでも調査の際に現地に出向いて説明を行なって同意を求めたが、更に施設側関係者や第三者の意見を求め改善を試みた。調査対象施設にガイドラインや倫理委員会が存在する場合には、それらを

クリアーして後に調査を開始した。動物実験に関してはそれぞれが所属する施設の動物実験委員会の指針にのっとり行なわれた。また今後の疫学調査に関しては担当施設の倫理委員会に申請し、現在付帯意見に関して修正しており、近々認可の見込みである。

### C. 研究結果

#### (1) ハイリスク集団におけるアメーバ感染の実態調査と予防対策確立

これまでの三年間追跡調査を行なっている1施設では、今年度の調査でも赤痢アメーバ感染は検出されなかった。四年前にメトロニダゾールによる集団治療を嘱託医のもとで行なったが、その後実施された施設内感染予防のガイドラインに沿った対策が奏効したものであろう。今後も継続して追跡調査を行なってゆく予定である。また今年度はこれまで作成した感染予防ガイドラインをこの施設の看護・衛生担当者と共に検討して改訂した。この改訂はここ三年間のこの施設での経験と本研究班の調査結果に基づくものであり、明年度より更に広い範囲で試行を行い、確定したものとしたい。今回新しく調査に入ったのは1施設であった。ここではELISAでは67.1%、抗原定量を含む糞便検査では27.6%と云う高い陽性率が示された。この施設では本研究班の調査結果に基づき施設の責任において集団治療を行なったが、陽性者が検出されており、今後モニタリングを継続する予定である。またこの施設での分離株に関して、本研究班が開発した遺伝子多型性解析を応用してみたところ、興味あることにこの施設と昨年度調査対象とした1施設の計2施設においては、1987年の神奈川でのわが国の最初の施設内でのアウトブレイクの時と同じパターンを持つ株であることが判明した。事実神奈川からの転園者が7年前にこの両施設に入っている事も確認された。更に昨年度の解析で上記の2施設とは異なる施設からは遺伝子多形性でも異なるパターンが確認されたが、糞便の検索で30%に近い率で陽性者が確認されたのかかわらず、有症者が見いだせず、また興味ある事に分離株のうちの1株は遺伝子型もアイソザイムパターンも *E. histolytica* の一致したが、ethidium homodimerを使用したvirulenceの解析(下記)では全く標的細胞に影響を与

えず、また *E. histolytica* のみが増殖するBI-S-33 mediumではなく、*E. dispar* 用に開発したYIGADHA-S mediumの monoxenic culture に増殖速度は遅いものの適応した。継続して解析を行い、施設内感染との対応を明確にしたい。

迅速診断法の導入については *E. histolytica* II kit (Tech Lab) を選定し、既にこれまで調査した1施設にて説明を行い、同意を得た。手技の説明と所見の判定の基準に関して説明を終わっており、kitを入手後直ちに当該施設における試行を開始する事になっている。

Ethidium homodimerを使用したvirulenceの測定はCHO細胞を標的として行なったが、アメーバの標的細胞への接着後、瞬間的に細胞死が起こることがこの蛍光色素の特徴ある赤色の蛍光をフォローする事で観察できた。この方法により、殆どリアルタイムでの分離株のvirulence解析の手法が確立できたものと考えられる。

#### (2) アメーバの免疫学的同定法の開発とワクチンへの応用

アメーバの鑑別に広く応用可能な *E. dispar* の無菌培養系の作成はより確実な進展をみた。すなわち今年度はこれまで数年にわたり、オートクレーブした *Crithidia fasciculata* を culture associate として培養していた2株がフェレドキシンを含むassociateなしでもYIGADHA-S mediumで培養できることが明らかになった。この結果に基づいて、referenceとして使用したSAW1734 Clone ARを含む、ヒト由来の3株をも、ある程度濃縮して培地に継代することで同様にculture associateなしのYIGADHA-S mediumで培養することに成功した。なおクロロプラスト中の増殖因子の同定とフェレドキシンの役割の解明は継続して試みているが、YIGADHA-S mediumに適應するまでの過程でこのようなiron-sulfur proteinが必要であると云う可能性もある。

また昨年よりワクチン候補として本研究班(橘)が独自に発見した新しい150-kDaの表面レクチンの検討を開始したが、今年度は全長と様々な部分の組み替え蛋白質を作成して、各種抗体との反応性を調査した。また *E. dispar* から同様の150-kDaのレクチンをコードする遺伝子をクローニングし、*E. his-*

*tolytica*のそれと比較検討した。まず *E. histolytica*の組み替え蛋白の作成はN末のシグナル配列を除く全長、N末側、中央部、C末端側と選択し、それぞれをコードする遺伝子をPCRで増幅後、pET19bベクターのXhoIサイトに組み込み大腸菌にて発現させた。また更に小さい断片をも同様に発現させた。まず上述の全長と3種の組み替え蛋白質の断片を虫体から精製した150-kDa蛋白で免疫して得たハムスター血清を用いてドットプロットで反応性を調べた結果、全長が最も反応性が高く、次いでC末部であった。またアメーバの細胞接着を阻害する中和モノクロナル抗体とも上述のより小さい組み替え蛋白質の断片を用いて反応性を調べたが、使用したモノクロナル抗体のうちmAb2、mAb3のエピトープの局在を大体決定する事ができた。

診断法への応用のため *E. dispar*の遺伝子をクローニングしたが、この遺伝子は1110個のアミノ酸をコードし、予想分子量は120,886Daであった。更にこの遺伝子の配列に基づいてRT-PCRにて別の遺伝子の塩基配列の決定を行なった。この遺伝子は1106アミノ酸をコードし、予想分子量は120,276Daであった。これらの間にはアミノ酸レベルで76%の相同性があった。これらは *E. histolytica*とは72~73%の相同性を示した。またこれらの遺伝子はRT-PCRによって *E. histolytica*におけるのと同程度程度の発現を示していることが判明した。これにより150-kDaのレクチンが免疫学的同定に応用可能であろうと推定された。

#### (4) サブポピュレーションの同定方法の開発と応用

今年度はこれまでに確立した方法を用いて、わが国のアメーバの由来及び1980年代以来のアメーバ感染の疫学的背景の原因をも探るため、タイ等の分離株との比較検討を試みた。その結果用いた4種の遺伝子のうち、Locus 5-6、SREHPに関しては地域間で大きな差異が見られた。例えばLocus 5-6に関しては、A5v、A5v/Cv、A8などが日本の分離株でのみ見られたのに反して、タイからの分離株ではA7/Cvが有意に高い頻度で見られた。地域間で最も分布のパターンが異なっていたのはSREHPであった。日本とタイの分離株では同一のSREHP

のパターンを示したのは1株のみで、なおかつ他のパターンは違っていた、すなわち日本とタイの分離株はこの遺伝子型で見るとかぎり、全く同一のパターンは存在しなかった。また今年度はアメーバ分離株の遺伝子多型をマクロレベルで示すため、SREHP遺伝子の詳しい検討を行なった。その結果SREHPの多型性は非常に高く、アミノ酸レベルで見るとタイ由来の27株に関して言えば、5種のLocus 1-2、7種のLocus 5-6、6種類のchitinaseのタイプが見られたが、SREHPは13種類の異なるパターンが見られた。この事からSREHPを標的とした迅速多型性同定法の作成が可能と思われる。今回はこの目的のため、PCRによって増幅されたSREHP遺伝子断片をシーケンシングする事なしに、AluIで消化したのちにアガロースゲル電気泳動を行なって多型性の解析を行なった。その結果この方法で同定できた遺伝子型はシーケンシングによる解析の70%程度の能率を示した。更に手法そのものを改変し、簡便かつ迅速に多型性を同定する方法を検討中である。

#### (5) 新規薬剤による予防法開発のための標的に関する開発研究

新しい薬剤による予防法開発のための標的を探る作業は *Entamoeba invadens*をモデルとした嚢子形成・脱嚢阻害とまず適合するモデルとして、及び *E. histolytica*の増殖阻害をマーカーとして行なわれてきた。今年度はこの方向の解析は主にoryzalinとaphidicolinの脱嚢過程と脱嚢後の分化・発育に及ぼす影響に関して調べた。その結果これらの化合物がこの二つの過程を強く阻害することが明らかになり、これまでのデータとあわせ考えると、今後発展的に検討する価値があるものと思われた。

更に今年度は薬剤の標的の探索範囲を拡大して、蛋白の翻訳後に脂質分子による修飾、すなわちファルネシル化、を触媒するファルネシル転移酵素(FT)の性状の検討を試みた。この過程は情報伝達分子であるRasの機能発現にも必要なので、嚢子形成などにかかわる可能性もある。まずFT $\alpha$ 、FT $\beta$ のC末、N末の塩基配列構造をアメーバのゲノム・データベースより取得し、PCRで全長を増幅後解析を行なった。ついでこの遺伝子のORFをプラスミドに組み込み大腸

菌で発現させ、組み替え蛋白質の性状を比較検討した。その結果、アメーバのFT $\alpha$ 、FT $\beta$ はヒトなどの蛋白と24~36%の相同性を示した。組み替え蛋白はヒトのRas(-CVLS)に対して活性を示し、アメーバから調製した4種のRasの組み替え体のうちRas4(-CVVA)のみ高い基質活性を示した。またヒトのFT $\alpha$ 、FT $\beta$ とは阻害剤に対する反応に著しい差異がある事が判明した。

#### D. 考察

本研究は1980年代、あるいは1999年の感染症法施行以来、それぞれ急速に届け出で数が増加を示した赤痢アメーバ感染に関し、わが国でのハイリスクグループである諸種施設内利用者での疫学的実態の解明と対策確立に資するための基礎・応用研究を目的としたものである。E. histolyticaは従来の本主任研究者を中心とした研究で欧米諸国と異なり、男性同性愛者間に高率に分布していたり、また想像以上に各種施設内での感染が拡がっていることが明らかになっている。これらの実態はわが国の衛生行政上、アメーバ感染症が無視できない問題である事を示している。

今回の研究では平成11~13年度厚生科学研究費によって実施した調査を継続すると共に、研究開始直後より調査を継続して行い、集団治療・環境衛生施策を行なっている1施設におけるフォローアップ調査、及び共同で作成し試行したガイドラインの改訂を試みた。フォローアップ調査の結果はアメーバ感染は抑圧された状態にあり、新感染と思われる状況には立ち至っていない事が示された。上述のようにこの施設では本報告に含まれている感染予防ガイドラインを試行してきているので、ここ何年かの新しい利用者にアメーバ感染者がいなかったと云う可能性も排除されたわけではないが、化学療法との併用で有効にアメーバ感染が抑圧できた事も推察できる。また他施設では依然として新しい感染が拡大している事を示すデータも得られており、加えるに集団治療がやはり1回では十二分に効果を示さなかった事も明瞭になった。このような施設内感染の実態は今後のわが国の衛生行政・福祉行政を考える上で極めて重要であろう。今後も継続してわが国での実態を解明し、効果的

な対策を立案してゆく必要があるものと思われる。幸い本研究班は地方自治体の衛生研究所の幾つかとリンクを現在形成しつつあり、協力体制を構築しながら、実態解明を行ないたいと考えている。

またE. histolytica感染が確かに存在するにもかかわらず、事実上殆ど全ての感染者が無症状で推移していると言う事実を検証するのに極めて興味ある分離株が今年度得られた。更に同様の生物学的特徴を備えているアメーバ株が見いだせるかどうか、今後の課題である。以上に加え、昨年度開発した遺伝子多型を解析する技術を応用して、活動性の感染が起こっている施設での分離株が1987年神奈川でのアウトブレイクに由来しており、7年前に神奈川の施設より当該施設に移ってきた利用者があることから、昨年度も述べたように感染は恐らく一人の感染者から拡大してゆくものであるが、たった7年間で高い感染率を示すまでになったことは注目に値する所見であると思われる。

これまでの調査に基づいて作成した施設内アメーバ感染制圧に関する環境衛生施策を新興・再興感染症研究事業の他の研究班と協調してガイドライン化を試みたが、上述のように今年度は現場の経験に基づいてその改訂を計った。更に広く試用され、より信頼度の高いガイドラインとなるようにしたい。またE. histolytica II kitの有用性に鑑み、施設の職員レベルでも確実に実施できるようにすればより一層実態把握が容易に行なえるものと思われる。現在準備段階にあり近々試用が開始される予定である。

E. disparの無菌培養系の作成や、種・サブポプレーション同定法の確立についても新しい展開が見られた。特に全くculture associateの添加が必要ない5株ものE. disparの完全無菌培養株が確立されたことは今後広く応用されるものと期待される。クロロプラストの有する増殖促進因子の同定も継続して行なわれることが期待される。サブポピュレーションの同定法も簡易化の手がかりを得つつあり、またタイなどの分離株と著しい遺伝子多型の差異があったことより、わが国における最近のアメーバ感染者の増加が少なくともタイなど東南アジアからの流入によるものではないらしいことが提示された

ことは、今後の疫学的な研究に対して大きな示唆を与えたものと云えよう。今後調査対象、範囲を拡大して検討することが望まれる。アメーバ表面のレクチンの検討も遺伝子レベルに及び、兩種アメーバでの差異も明確になった事から、診断への応用も期待される。また今年度の成果は次年度以降ワクチン候補としてこのレクチンを評価するのに大きな意義を有すると考える。薬剤による予防法開発のための新しい標的あるいは阻害剤の研究は前年度と同様嚢子形成・脱嚢過程、及び増殖阻害をマーカーとして継続し、幾つかの特徴を明らかにした。また更にファルネシル転移酵素に関して遺伝子、組み替え蛋白の検索を行い、薬剤の標的となりうる事を明らかにした。今後これらの成果に基づき阻害剤を検索し、リード化合物としての可能性を検討したい。

#### E. 結論

今年度の研究によって、これまで集団感染があった施設でも、集団治療、環境衛生施策の実施によって長い期間アメーバの新感染を抑圧できることが明らかになった。そのためのガイドラインも改訂され、今後の衛生行政に寄与するものと思われた。今後規模を維持しつつ疫学調査を継続実施する必要があるが、近い将来何らかの行政的なアプローチが必要となる可能性もあるものと推測される。抗原定量キットの施設への試験的導入も近々予定されており、このような体制が拡大されて行くことを望みたい。感染抑圧あるいは予防対策確立のための基礎・応用研究も進展を見せたと云うことができよう。特に *E. dispar* の完全無菌培養化は今後に資するところが大きい。また加えてサブポピュレーションの同定法の応用、及び新しい免疫学的同定法の開発とワクチンへの応用、化学予防を目指した薬剤の標的の探索も成果を挙げつつであると評価できると思われる。

#### F. 健康危険情報

施設内感染としてのアメーバ症は衛生・福祉行政上注意を払うべき存在である事は依然としてかわらない。むしろ調査の拡大により、感染の頻度が非常に高い施設がかなりあり、単純な化学療法のみでは抑圧が難しいかもしれない事に注意を払わねばならないと考

える。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Kobayashi S, Imai E, Haghghi A, Khalifa A, Tachibana H & Takeuchi T : Axenic cultivation of *Entamoeba dispar* in newly developed YIGAD HA-S medium. (submitted for publication)

Dvorak JA, Kobayashi S, Nozaki T, Takeuchi T & Matsubara C : Induction of permeability changes and death of vertebrate cells is modulated by the virulence of *Entamoeba* spp. isolates. *Parasitol Int*, 2003 (in press)

Fukao T, Yamada T, Tanabe M, Terauchi Y, Ota T, Takayama T, Asano T, Takeuchi T, Kadowaki T, Hata J & Koyasu S : Selective loss of gastrointestinal mast cells and impaired immunity in PI3K-deficient mice. *Nature Immunol*, 2002, 3, 295-304.

Haghghi A, Kobayashi S, Takeuchi T, Thammapalerd N & Nozaki T : Geographic diversity of genotypes among *Entamoeba histolytica* isolates. (submitted for publication)

Haghghi A, Kobayashi S, Takeuchi T, Matsuda G & Nozaki T : Remarkable genetic polymorphism among *Entamoeba histolytica* isolates from a limited geographic area. *J Clin Microbiol*, 2002, 40, 4081-4090.

Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S & Takeuchi T : *Entamoeba invadens*: Inhibition of excystation and metacystic development by aphidicolin. *Exp Parasitol*, 2003 (in press)

Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S & Takeuchi T : Possible role of calcium ion, calcium channel and calmodulin in excystation and metacystic development of *Entamoeba invadens*. *Parasitol Res*, 2002, 88, 837-843.



Makioka A, Kumagai M, Ohtomo H, Kobayashi S & Takeuchi T : Effect of proteasome inhibitors on the growth, encystation, and excystation of Entamoeba histolytica and Entamoeba invadens. Parasitol Res, 2002, 88, 454-459.

Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S & Takeuchi T : Inhibition of excystation and metacystic development of Entamoeba invadens by the dinitroaniline herbicide oryzalin. J Parasitol, 2002, 88, 994-999.

竹内 勤、小林正規、今井栄子 : 寄生虫の院内(施設内)感染対策。エビデンスに基づいた感染制御(改訂版)、小林寛伊、吉倉 廣、荒川宣親編集、メジカルフレンド社、2003(印刷中)

竹内 勤 : 赤痢アメーバ症。内科学、第8版、朝倉書店、2003、pp438-440.

竹内 勤 : 血中赤痢アメーバ抗体価(間接蛍光抗体法)。臨床検査ガイド、文光堂、2003、907-911

竹内 勤 : 原虫・寄生虫感染症。エクセルナース(感染症編)、永武 毅、小林初子編集、メジカルビュー社、2002、pp80-88.

竹内 勤 : グローバル時代の感染症学—原虫感染症概論。日本臨床、2003、61(増)、585-591.

竹内 勤 : 原虫感染症の最近の動向。臨床病理レビュー、2003、121、156-161.

野崎智義、竹内 勤 : 寄生性原虫における硫黄含有アミノ酸生合成・分解経路—新しい抗原虫感染症薬剤の開発標的。蛋白質核酸酵素、2002、47、21-29.

野崎智義 : アメーバ症。小児科診療、2002、65、2132-2135.

## 2. 学会発表

小林正規、清水泉太、堀 宏治、今井栄子、斎藤智也、前田卓哉、竹内 勤 : わが国における施設内赤痢アメーバ

感染に関する疫学調査。第71回日本寄生虫学会大会、ワークショップ「新興・再興寄生虫症の疫学」、2002.

Khalifa A, Kobaayshi S, Imai E & Takeuchi T : Axenic cultivation of Entamoeba dispar: chloroplast extract promotes the growth. 第71回日本寄生虫学会大会、2002.

Takeuchi T : Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar: Unresolved enigma. 北里柴三郎生誕150年記念シンポジウム、2002.

所 正治、浅井隆志、小林正規、田辺将信、竹内 勤、野崎智義 : 赤痢アメーバメチオニンガンマリアーゼの生理機能。第71回日本寄生虫学会大会、2002.

所 正治、浅井隆志、小林正規、田辺将信、竹内 勤、野崎智義 : 赤痢アメーバメチオニンガンマリアーゼの解析 ; 腸管内寄生原虫における含硫アミノ酸代謝。第75回日本生化学会、2002.

橘 裕司、程 訓佳、金田良雅 : 赤痢アメーバ150-1Daレクチン(Ig1)の組み替え蛋白質調製と性状解析。第43回日本熱帯医学会大会、2002.

中野由美子、保田友義、繁田泰男、竹内 勤、野崎智義 : 赤痢アメーバのRab変異発現株を用いたファゴサイトーシスの解析。第71回日本寄生虫学会大会、2002.

Haghighi A, Zaki M, Clark G, Kobayashi S, Takeuchi T, Masuda G & Nozaki T : Highly polymorphic DNA of the Entamoeba histolytica isolates from Japan. 第71回日本寄生虫学会大会、2002.

Nozaki T : Proteome analysis of phagocytosis in Entamoeba histolytica. Amitochondria Protozoan Genome Projects; Entamoeba histolytica, Trichomonas vaginalis and Giardia lamblia. UK, 2002

野崎智義 : 赤痢アメーバ貪食におけるRabエフェクター分子の解析。第10回分子寄生虫学ワークショップ、2002.

Nozaki T, Saito-Nakano Y, Okada M, Nudeshima M, Shigeta Y, Hughes MA, Huston CD, Mann BM & Petri, Jr WA : Isolation and partial characterization of Rab-interacting proteins from Entamoeba histolytica. 37th Joint Conference on Parasitic Diseases, US-Japan Cooperative Medical Science Program, 2002.

Haghighi A, Kobayashi S, Takeuchi T, Thammapalerd N, Masuda G & Nozaki T : DNA fingerprinting of Entamoeba histolytica isolates. 37th Joint Conference on Parasitic Diseases, US-Japan Cooperative Medical Science Program, 2002.

Okada M, Saito-Nakano Y, Yasuda T & Nozaki T : Proteome analysis of phagocytosis in Entamoeba histolytica isolates. 37th Joint Conference on Parasitic Diseases, US-Japan Cooperative Medical Science Program, 2002.

岡田麻美、中野由美子、保田友義、野崎智義：プロテオーム解析による赤痢アメーバの食食機構の解析。第75回日本生化学会、2002。

Nozaki T : Proteome analysis of phagocytosis in Entamoeba histolytica. Forum-Cheju-8, 2002.

中野由美子、保田友義、繁田泰男、野崎智義：赤痢アメーバのファゴサイトーシスにおけるRab機能の特殊性。第25回日本分子生物学会年会シンポジウム、2002。

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、2002。

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の解析。第75回日本生化学会、2002。

Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S & Takeuchi T : Inhibition of excystation and metacystic development

of Entamoeba invadens by the dinitroaniline herbicides oryzalin. Conference on Amebiasis and the Biology of Entamoeba histolytica, 2002.

Kumagai M, Makioka A, Takeuchi T & Nozaki T : Molecular characterization of farnesyltransferase of Entamoeba histolytica. Conference on Amebiasis and the Biology of Entamoeba histolytica, 2002.

Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S & Takeuchi T : Possible role of calcium ion, calcium channel and calmodulin in excystation and metacystic development of Entamoeba invadens. 10th International Congress of Parasitology, 2002.

Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S & Takeuchi T : Inhibition of excystation and metacystic development of Entamoeba invadens by aphidicolin. 37th Joint Conference on Parasitic Diseases, US-Japan Cooperative Medical Science Program, 2002.

Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S & Takeuchi T : Inhibition of excystation and metacystic development of Entamoeba invadens by aphidicolin. 13th Japan-German Symposium on Protozoan Diseases, 2002.

Kumagai M, Makioka A, Takeuchi T & Nozaki T : Molecular cloning of farnesyltransferase of Entamoeba histolytica. 13th Japan-German Symposium on Protozoan Diseases, 2002.

牧岡朝夫、熊谷正広、大友弘士、小林正規、竹内 勤：Entamoebaの増殖および分化へのプロテアソームの関与。第43回日本熱帯医学会大会、2002。

牧岡朝夫、熊谷正広、竹内 勤、野崎智義：赤痢アメーバのファルネシル転移酵素の解析。第43回日本熱帯医学会大会、2002。

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし

## 別紙

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
竹内 勤、 小林正規、 今井栄子	寄生虫の院内（施設内）感染対策	小林寛伊、吉倉 廣、 荒川宣親	エビデンスに基づいた感染制 御（改訂版）	メディカルフレンド社	東京	2003	印刷中
竹内 勤	赤痢アメーバ症、他	小俣政男、他	内科学	医学書院	東京	2003	印刷中
竹内 勤	赤痢アメーバ症、他	杉本恒明、他	内科学	朝倉書店	東京	2003	438~ 439
竹内 勤	血中赤痢アメーバ抗体価（間接蛍光 抗体法）	和田 攻、他	臨床検査ガイド 2003~ 2004	文光堂	東京	2003	907~ 911
竹内 勤	アメーバ症	多賀須幸男、他	今日の治療指針	医学書院	東京	2003	印刷中
竹内 勤	アメーバ症、他		薬科微生物学	丸善	東京	2003	142~ 143

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Kobayashi S, Imai E, Haghghi A, Khahifa A, Tachibana H & Takeuchi T	Axenic cultivation of <u>Entamoeba</u> <u>dispar</u> in newly developed YIGADHA-S medium	submitted			
Dvorak JA, Kobayashi S, Nozakzi T, Takeuchi T & Matsubara C	Induction of permeability changes and death of vertebrate cells is modulated by the virulence of <u>Entamoeba</u> spp. isolates	Parasitol Int		in press	2003
Fukao, T, Yamada T, Tanabe M, Ota T, Takayama T, Asano T, Takeuchi T, Kadowaki T, Hata J & Koyasu S	Selective loss of gastrointes- tinal mast cells and impaired immunity in PI3K-deficient mice	Nature Immunol	3	295~ 304	2002
Haghghi A, Kobayashi S, Takeuchi T Thammapalerd N & Nozaki T	Geographic diversity of genotypes among <u>Entamoeba</u> <u>histolytica</u> isolates	submitted			

Haghighi A, Kobayashi S, Takeuchi T, Masuda G & Nozaki T	Remarkable genetic polymorphism among <u>Entamoeba histolytica</u> isolates from a limited geographic are	J Clin Microbiol	40	4081~ 4090	2002
Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S & Takeuchi T	<u>Entamoeba invadens</u> : Inhibition of excystation and metacystic development by aphidicolin	Exp Parasitol		in press	2003
Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S & Takeuchi T	Possible role of calcium ion, calcium channel and calmodulin in excystation and metacystic development of <u>Entamoeba</u> <u>invadens</u>	Parasitol Res	88	837~ 843	2002
Makioka A, Kumagai M, Ohtomo H, Kobayashi S & Takeuchi T	Effect of proteasome inhibitors on the growth, encystation and excystation of <u>Entamoeba</u> <u>histolytica</u> and <u>Entamoeba</u> <u>invadens</u>	Parasitol Res	88	454~ 459	2002
Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S & Takeuchi T	Inhibition of excystation and metacystic development of <u>Entamoeba invadens</u> by the dinitroalanine herbicides oryzalin	J Parasitol	88	994~ 999	2002
竹内 勤	グローバル時代の感染症学-原虫感染症概論	日本臨床	61 (増)	585~ 591	2003
竹内 勤	原虫感染症の最近の動向	臨床病理レビュー	121	156~ 161	2003
野崎智義、竹内 勤	寄生性原虫における硫黄含有アミノ酸生成・分解経路-新しい抗原 虫感染症薬剤開発標的	蛋白質核酸酵素	47	21~29	2002
野崎智義	アメーバ症	小児科診療	65	2132~ 2135	2002

## 厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

## 分担研究報告書

## 施設内のハイリスク群におけるアメーバ感染の疫学的研究：ガイドラインに基づいた

## 感染予防・防御対策の実施、評価、改良

分担研究者 竹内 勤 慶應義塾大学医学部熱帯医学・寄生虫学教室教授

研究要旨 1) 知的障害者更正施設2施設の利用者130名及び職員87名を対象として赤痢アメーバ集団感染の実態調査と治療後のフォローアップ調査を行った。また分離培養株の遺伝子多型性のパターン解析から株の同一性の同定が可能となったため施設に集団感染しているアメーバ株の比較検討を行った。1施設で立案された感染予防策をもとに共同で検討・立案され4年間にわたり実施されてきた予防対策の効果について施設側と協議を行い、より実践的な予防対策の見直しと立案を行った。その結果、本年度新たに調査対象となった1施設については赤痢アメーバ嚢子、栄養型或いは抗原 (*E. histolytica* II kit; TechLab Inc.により検出)の陽性者21名/76名(27.6%)と血清反応(ELISA法)陽性者51名/76名(67.1%)を対象に治療と検査が繰り返されたが未だ1名の抗原陽性者を認め感染の終息までには到らなかった。他の1施設については治療後3年間感染は認められていない。遺伝子多型性の独立のパターンを示した株が分離された1施設では29名/103名(28.2%)の赤痢アメーバ嚢子或いは抗原陽性者が検出されたにもかかわらず有症候者が見られず、ELISA法による抗体価(OD値)も低値を示し、実験動物に対するvirulenceも示さないなど他の施設分離株と比較して異なる特徴が見られた。2) 非病原性の *Entamoeba dispar* の無菌培養のために考案した YIGADHA-S 培地に増殖促進因子として、オートクレーブ(121°C, 15分)した *Crithidia fasciculata* (住血鞭毛虫)を加え4年間にわたり継代培養することで培地への適応が進みカニクイザル(蠶長類)から分離された2株と標準株(SAW1734CIAR)1株を含む、ヒトより分離された3株がその増殖数に差は認められるものの、何も増殖因子としての supplement を加えることなしに無菌的培養が可能となった。

## A. 研究目的

1) 現在諸種の施設で深刻な問題となっている赤痢アメーバ集団感染の実態調査を行い、その結果をもとに赤痢アメーバ症のより効果的な予防対策を立案し実際に試行する。そしてその予防対策をマニュアル化し、他施設へ還元すること及び今後の厚生・福祉行政へ反映させることを目的とする。

2) 赤痢アメーバと近縁種で非病原性という特徴以外は遺伝子的にも類似点の多い *Entamoeba dispar* の培養系を確立し、病原性の *Entamoeba histolytica* との生物学的性状を明らかにすることそして得られた情報を治療薬の開発、免疫診断、遺伝子診断に応用応用することを目的とする。

## B. 研究方法

1) 赤痢アメーバ施設内集団感染状況の実態調査と治療後のフォローアップ調査：治療後、感染が見られなくなってから3年間追跡調査を行っている1施設(利用者54名、職員27名)、及び本年度新たに集団感染を認め診断・治療を行った知的障害者更正施設1施設利用者76名及び職員60名を対象として治療の有無にかかわらず全員を対象として調査を行った。

施設利用者、職員全員の血清学的検査(ELISA法、ゲル内沈降反応)及び糞便の顕微鏡的検査と赤痢アメーバ抗原の有無を *E. histolytica* II kit (TechLab Inc., USA) を用いて検査した。糞便検

査陽性者に対しては施設嘱託医によりメトロニダゾールによる治療が行われた。治療は赤痢アメーバ嚢子、栄養型、抗原が陰性になるまで繰り返し行われた。治療効果判定は治療（1クール）後2週間以上を経た後、糞便検査により行った。新たに集団感染が見られた施設についてはアメーバ症についての説明と環境衛生対策についての説明と協議を行った。4年間にわたり追跡調査を行っている1施設は独自に感染予防策を立案・実施してきたモデル施設であり、この施設で立案された予防策をもとに施設側と協議・立案された標準的な予防策の見直しを同施設の職員と協議することで行い、より実践的な予防策の立案を行った。分離培養株の遺伝子多型性のパターン解析から株の同一性の同定が我々の研究班の感染研のグループの研究(Ali et al., 2002)から可能となったため施設に集団感染しているアメーバ株の遺伝子的同一性について比較検討を行った。また集団感染が見られた各施設から分離培養された *E. histolytica* 株の virulence を判定するための手段として *E. histolytica* が *in vitro* の系において培養細胞(CHO cell line 等)と接触することで誘導される細胞死の瞬間を Ethidium homodimer 蛍光染色法(Dvorak et al., 2003)で visual 化する技法を用いコンピューター制御倒立顕微鏡下で各分離培養株が細胞死を誘導するかどうかを観察した。

2) *E. dispar* の確実な無菌培養法の確立：SAW1734RCIAR, AS2IR, AS16IR, CYNO09:TPC, CYNO16:TPC の *E. dispar* 5株を使用した。これらの株は *E. dispar* の増殖促進因子である *Crithidia fasciculata* (昆虫住血鞭毛虫)をオートクレーブ(121°C, 15分)して加えることで monoxenic culture として培養維持されている。培地は我々が考案した YIGADHA-S 培地にグラム陰性菌などの膜成分にもみられるウロン酸のうちガラクトウロン酸(0.02%)を新たに培地組成に加えたものである。

*E. dispar* 栄養型の無菌培地適応能力の判定：*E. dispar* を上記 monoxenic culture から何も supplement を加えない fresh な

YIGADHA-S 培地に継代を繰り返し培養することで *E. dispar* 株が無菌培養条件で増殖能力が獲得されたかどうかを判定した。

### C. 研究結果

1) 3年間追跡調査を行っている1施設については1年毎、3年間の調査を通して新たな陽性者は見られていない。但し治療が困難な非病原性の大腸アメーバ嚢子陽性者は4名見られている。この施設は予防対策を4年間にわたり実施してきたモデル施設であり、同施設職員の意見をもとに今までの標準的な予防策の見直しと立案を行った。この成果については“エビデンスに基づいた感染制御：9. 寄生虫院内(施設内)感染対策”(メヂカルフレンド社)の改訂版において掲載される予定である。本年度新たに調査を行い血清学的にはELISA法で51名陽性/76名(67.1%)の高い陽性率を示し、糞便検査でも21名陽性76名(27.6%)と高い陽性率を示した1施設について上記陽性者全員に対して治療を行った。しかしながら糞便検査陽性者については陰転化するまで繰り返し治療が行われたにもかかわらず半年後のフォローアップ検査では9名の糞便検査陽性者が検出された。現在再感染の可能性、感染者の見落としなどの検査体制の見直しと治療効果等について検討しながら陽性者について治療を行っている。また、遺伝子多型性の解析から他の1施設とともにこの施設から分離された株は神奈川の施設で分離された株と同一のパターンを示すことが判明し、実際、神奈川の施設の利用者で赤痢アメーバ症既往歴もある2名が本施設開設と同時に入園していることもわかっている。現在まで3タイプの異なる遺伝子多型性のパターンを示す株が分離されているが同一施設からは同一のパターンをもつ株しか分離されていないことから同一の株による集団感染であることが推定された。また独立した異なるタイプの遺伝子多型性のパターンを示す株が分離された1施設では29名/103名(28.2%)の高率の赤痢アメーバ嚢子或いは抗原陽性者が検出されたのにもかかわらず症候

者が見られず、ELISA 法による抗体価(OD 値)も低値を示し、実験動物に対する virulence も示さないなど他の施設分離株に比較して異なる特徴が見られた。

CHO 細胞に対する細胞死誘導の有無について5施設の分離培養株について検討した。その結果からも上記1施設からの分離培養株1株の細胞死の誘導は確認されず他の4株では細胞死の誘導を確認した。

2) 非病原性の *Entamoeba dispar* の無菌培養のために考案した YIGADHA-S 培地に増殖促進因子として、オートクレーブ(121°C, 15 分)した *C. fasciculata* を加え4年間にわたり継代培養する過程でカニクイザル(霊長類)から分離された2株は1年後までに *C. fasciculata* を加えることなしに無菌培養が可能となった。そこで標準株(SAW1734CIAR)1株を含む、ヒトより分離された3株についても遠沈により濃縮することで一定数以上のアメーバ数を継代することで無菌培養の可能性について検討した。その結果、増殖数に大きく差は認められるものの、何も増殖因子としての supplement を加えることなしに無菌培養が可能であることが確認された。

#### D. 考察

(1) H.1 4年度は新たに知的障害者更正施設の1施設を対象として赤痢アメーバ集団感染の実態調査を行った。その結果、この施設が開設されてまだ7年しか経過していない新しい施設であり、また施設側が前向きに赤痢アメーバを含め集団感染症の予防対策に取り組んでいることもあり、十分な協力が得られ有用な情報を得ることができた。その結果利用者の履歴と赤痢アメーバ分離培養株の遺伝子多型性のパターンの解析が可能となり、施設開設と同時にアメーバ症が感染者を中心に徐々に広がっていったことも推定できた。そして赤痢アメーバの集団感染に対して施設利用者全員に対し予防対策を講じなければ知的障害者更正施設のような場合7年後には70%近い利用者が抗体陽性となることも示された。この間有症候者に対する処置が迅速でありアメーバ性大腸炎を発症

した3名に留まったため、大事には至らなかったが改めて集団感染の深刻さと予防対策の有用性を認識した。感染予防に関しては標準的な予防策を基に個々の施設の感染状況に即した実地的な予防策の実施、感染者の把握、治療そしてそれと並行して職員に対しては赤痢アメーバ症を含めた感染症に関する正しい知識の啓蒙により感染の拡大を未然に防ぎ嘱託医の協力のもと感染を終息させることができることが1施設の4年にわたるフォローアップを通して確信できた。また我々の施設内赤痢アメーバ集団感染の実態調査の対象は現在まで知的障害者更正施設に限られているが、この調査結果にみられる感染率の高さと、感染症新法に改正されて以来、届け出される赤痢アメーバ症患者の集計結果の届け出数の増加率などからみても他の諸種の施設で赤痢アメーバの集団感染が起きている可能性は高いように推測された。今後さらに赤痢アメーバの施設内集団感染の実態を明らかにするため知的障害者更正施設以外の施設に関しても調査したいと考えている。

2) *E. dispar* の無菌培養法の確立は *E. dispar* の代謝欠損を補うような物質を探索したり supplement としての細菌や原虫から増殖促進物質を同定することで行ってきた。本年度は本来 *E. dispar* がもつ潜在的な適応能力を誘導する方向で無菌培養の可能性について検討した。その結果時間をかけて適応させれば可能な範囲であれば適応能力を引き出せることがわかった。また *E. histolytica* の施設分離株の無菌培養化を通して *E. histolytica* の株の中にも極めて無菌培養の困難な株があることが初めて見いだされた。この分離株は *E. dispar* に似た代謝の欠損があるようで、*E. dispar* のためのジヒドロキシアセトンを加えた培地で緑膿菌との monoxenic culture が継代できる程度には可能であるが、*E. histolytica* と *E. dispar* の両種について無菌化の第一段階として利用される *C. fasciculata* を添加した BI-S-33 monoxenic culture システムでは全く増殖が見られない。そして現在までの解析から培養の困難さ以外の性質として virulence の極めて低い *E.*



*histolytica* であるらしいことが感染者に有症候者がみられないこと、抗体産生が弱いこと、実験動物への感染実験結果などから推定されている。もしこの分離株の無菌培養法が確立され、その後も他の *E. histolytica* 株と異なる性質を保持していることが証明されれば *E. dispar* 以外にも極めて病原性の低い *E. histolytica* の存在が証明されることになり興味深い発見となる。

#### E. 結論

1) 今回新たに実態調査の対象となったのは1施設のみであったが、得られた情報は多くアメーバの遺伝子多型性解析をもとに感染経路も特定できた。また他の1施設について行ったフォローアップ調査から予防対策の有用性が示された。各施設から分離された培養株の virulence を調べた結果からは株によっては全く実験動物に病変（肝臓病）を形成しないものも見られ variation があることが示された。2) *E. dispar* の無菌培養を試みてきた5株全てについてオートクレーブした *C. fasciculata* などの supplement を加えない YIGADHA-S 培地への適応（増殖）能力について検討した結果、増殖数には大きな差が見られるものの *E. dispar* の5株全てが YIGADHA-S 培地で無菌培養が可能であることがわかった。

F. 健康危険情報 なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 竹内勤、今井栄子、小林正規：9. 寄生虫の院内（施設内）感染対策；エビデンスに基づいた感染制御、編集；小林寛伊、吉倉廣、荒川宜親、編集協力；厚生労働省医薬局安全対策課、メヂカルフレンド社、p.141-148. (2002).

2) Dvorak JA, Kobayashi S, Nozaki T, Takeuchi T, Matsubara C. : Induction of permeability changes and death of vertebrate cell is modulated by the virulence of *Entamoeba* spp. isolates. *Parasitol Int*, *in press* (2003).

3) Haghghi A, Kobayashi S, Takeuchi T, Masuda G, Nozaki T: Remarkable genetic polymorphism among *Entamoeba histolytica* isolates from a limited geographic area. *J Clin Microbiol*, 40(11),4081-4090 (2002).

##### 2. 学会発表

1) Shaden Ali Kalifa, Seiki Kobayashi, Eiko Imai, Tsutomu Takeuchi : Axenic cultivation of *Entamoeba dispar*: chloroplast extract promotes the growth. 第71回日本寄生虫学会 (2002)

2) Ali Haghghi, Mehreen Zaki, C. Graham Clark, Seiki Kobayashi, Tsutomu Takeuchi, Ghoti Masuda, Tomoyoshi Nozaki : Highly-polymorphic DNA of the *Entamoeba histolytica* isolates from Japan. 第71回日本寄生虫学会 (2002)

3) 小林正規、清水泉太、堀宏治、今井栄子、齋藤智也、前田卓哉、竹内勤：ワークショップ。我が国における施設内赤痢アメーバに関する疫学調査 第71回日本寄生虫学会 (2002)

#### 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 |

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

アメーバ症の免疫診断法の開発とワクチンによるハイリスク群の感染予防法の開発

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*) の 150-kDa 表面レクチンについて、アメーバ症の診断や予防への応用をめざして解析を行った。全長と様々な断片を組換え蛋白質として大腸菌で作製し、各種抗体との反応性を調べた。その結果、N 末端側に比べて C 末端側の抗原性が高いこと、接着阻止抗体のエピトープが、603 から 753 番目アミノ酸の間、および 989 から 1088 番目アミノ酸の間に存在することが明らかになった。また、形態的に区別できない非病原性の *Entamoeba dispar* について、このレクチン遺伝子のクローニングを行った。その結果、*E. dispar* にも 2 つの遺伝子が存在し、それぞれ 1106、1110 アミノ酸をコードしていた。2 つの遺伝子には、アミノ酸レベルで 76% の相同性が認められた。赤痢アメーバのレクチンとの相同性は 72-73% であったが、システイン残基はすべて保存されていた。赤痢アメーバと *E. dispar* における 150-kDa レクチンの抗原性の差や遺伝子塩基配列の差は、種の鑑別診断に利用できると考えられる。

A. 研究目的

赤痢アメーバ症はわが国では増加傾向にあり、特に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。早期に診断して治療することが重要であるが、赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) とは形態的に区別できない *Entamoeba dispar* など存在するため、これらの類縁種と簡便に鑑別できる診断法が必要である。また、ワクチンなどの予防法の開発も望まれている。

赤痢アメーバの感染が成立して病原性を発揮するには、虫体が宿主細胞に接着することが必須の過程であり、それには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。260-kDa レクチンは、170-kDa の heavy subunit と呼ばれる膜貫通蛋白質と 31/35-kDa の GPI

アンカー型膜蛋白質である light subunit が S-S 結合している。一方我々は、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。さらに、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が示唆された。最近、このレクチンの遺伝子クローニングを行ったところ、2 つの遺伝子 (*Igl1*, *Igl2*) が存在し、それぞれ 1101、1105 アミノ酸をコードしていた。約 12% も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。

そこで今年度は、このレクチンについて組換え蛋白質断片を調製し、それぞれの断片の抗原性や接着への関与について解析を行った。また、*E. dispar* についても 150-kDa レクチンの遺伝子をクローニングし、赤痢アメーバとの差についての解析を試みた。

## B. 研究方法

### 1. 赤痢アメーバ 150-kDa レクチンの組換え蛋白質断片の調製

赤痢アメーバの 150-kDa レクチン (Igl1) について、N 末端のシグナル配列を除く全長のアミノ酸 (aa 14-1101)、N 末端側 (aa 14-382、N 断片)、中央部 (aa 294-753、M 断片)、C 末端側 (aa 603-1088、C 断片) をコードする遺伝子を PCR で増幅した。それぞれの遺伝子断片を pET19b ベクターの *Xho*I サイトに組み込み、大腸菌に導入して発現させた。inclusion body を回収した後、refolding を行った。また、さらに小さい組換え断片である C1 断片 (aa 749-873)、C2 断片 (aa 877-975)、C3 断片 (aa 989-1088)、C01 断片 (aa 603-873)、C23 断片 (aa 877-1088) も、同様にして作製した。

### 2. 抗 150-kDa レクチン抗体の反応性解析

赤痢アメーバの培養虫体から、マウス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、150-kDa 蛋白質を精製した。この蛋白質を Freund のアジュバントとともにハムスターの腹腔に数回接種し、抗血清を得た。また、これまでに作製したマウスモノクローナル抗体の中から、組換え型 150-kDa 蛋白質に反応する抗体を選別した。それぞれの抗体について、赤痢アメーバ栄養型虫体のチャイニーズハムスター卵巣細胞への接着に対する阻止活性の有

無を調べた。ドットプロット解析は、ニトロセルロース膜に組換え蛋白質を 1  $\mu$ g ずつプロットし、抗レクチン抗体、標識 2 次抗体、基質を順次反応させ、発色させて行った。

### 3. *E. dispar* 150-kDa レクチンの遺伝子クローニングと解析

赤痢アメーバの 150-kDa レクチン遺伝子に基づいてプライマーを設計し、*E. dispar* のゲノム DNA を PCR 増幅した。得られた DNA 断片をプローブとして、SAW1734RclAR 株の 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。*E. dispar* と赤痢アメーバの mRNA から、150-kDa レクチン遺伝子とアクチン遺伝子を RT-PCR で増幅し、発現量を比較した。また、*E. dispar* のゲノム DNA を *Dra*I、*Taq*I、*Hind*III で切断した後、サザンプロット解析を行った。

(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. 赤痢アメーバ 150-kDa レクチンの組換え断片における抗原性解析と接着阻止抗体のエピトープ解析

150-kDa レクチン蛋白質を N 末端側 (N 断片)、中央部 (M 断片)、C 末端側 (C 断片) に分けて、組換え蛋白質を作製した。また、N 末端側のシグナル配列のみ除いた全長の組換え蛋白質も調製した。これらの組換え蛋白質と、虫体から精製した 150-kDa 蛋白質で免疫したハムスターの血清との反応性をドットプロットで調べたところ、全長の組換え蛋白質の反応性が最も強く、ついで C 断

片、M断片、N断片の順であった。

また、赤痢アメーバの宿主細胞への接着を阻止できる4種類の中和モノクローナル抗体 (mAb 1~4) と接着阻止活性のない1種類のモノクローナル抗体 (mAb 5) について、組換え蛋白質との反応性を調べた。これらの抗体はいずれも全長の組換え蛋白質と反応したが、mAb 1 と mAb 4 は3つの断片とは反応せず、高次構造を認識していると考えられた。また、mAb 2 はC断片に反応し、mAb 3 はM断片とC断片の両方と反応した。一方、中和活性のない mAb 5 はN断片と反応した。mAb 2 と mAb 3 について、エピトープの位置をさらに絞り込むため、C断片をさらに3つに分けた C1、C2、C3断片を調製した。また、M断片とC断片のオーバーラップする箇所とC1を含む断片 (C01断片)、C2とC3を含む断片 (C23断片) を作製し、モノクローナル抗体との反応性を調べた。その結果、mAb 2 はC3とC23断片に反応し、mAb 3 はC01断片のみと反応した。以上の結果から、mAb 3 のエピトープはaa 603とaa 753の間、mAb 2 のエピトープはaa 989とaa 1088の間に存在すると考えられた。

## 2. *E. dispar* 150-kDa レクチンの遺伝子解析

*E. dispar* SAW1734Rc1AR株のcDNAライブラリーをスクリーニングし、150-kDa レクチン遺伝子をクローニングした。この遺伝子は1110個のアミノ酸をコードし、その配列から予想される蛋白質の分子量は120,886Da、等電点は5.50であった。さらに、この遺伝子の配列に基づいてRT-PCRを行い、別の遺伝子の塩基配列を決定した。この遺伝子は1106アミノ酸をコードし、予想される蛋白質の分子量は120,276Da、等電点は4.91であった。2つの遺伝子には、

アミノ酸レベルで76%の相同性が認められた。N末端側の13アミノ酸とC末端側の13アミノ酸には疎水性のシグナル配列が認められ、*E. dispar* のレクチンも赤痢アメーバと同様にGPIアンカー型の膜糖タンパク質であると考えられた。赤痢アメーバの150-kDaとはアミノ酸レベルで72-73%の相同性を示したが、135箇所のシステイン残基はすべて保存されていた。*E. dispar* に2つの遺伝子が存在することは、サザンブロット解析によって確認された。また、RT-PCRによると、この遺伝子は*E. dispar* においても赤痢アメーバとほぼ同レベルで発現していることが示された。

## D. 考察

赤痢アメーバの260-kDaレクチンでは、heavy subunitのシステインリッチな領域に糖認識部位が存在する。150-kDaレクチンもシステインリッチな蛋白質であるが、糖認識部位と考えられるような既知の配列は認められていない。しかし今回、組換え蛋白質断片と接着阻止抗体の反応性から、接着に関わると推定されるエピトープの局在を明らかにすることができた。今後、組換え断片について、ワクチンとして利用できるかどうか、動物実験によって検討していく必要がある。また、組換え蛋白質が調製されたことから、このレクチンに対してヒトモノクローナル抗体を作製することも可能になると考えられる。

150-kDaレクチンは、当初、赤痢アメーバに特異的に反応するモノクローナル抗体によって同定された。しかし、類似の蛋白質が病原性のない*E. dispar*にも存在することが明らかになった。260-kDaレクチンも*E. dispar*に存在することが知られており、これらの蛋白質は非病原アメーバにおいても、虫体の腸粘膜への接着に重要な役割を果たし