

Fig. 9: *N. fowleri* 感染マウス脳。 A: 脳底部・第3脳室を中心に高度の炎症性病変が認められる。 B: HE染色。病変部では直径6-13 μm 、比較的大きさの揃ったアメーバ栄養体が顆粒球とともに多数浸潤している。明瞭な核小体を有する。 C: Bodian染色。アメーバ栄養体の細胞膜は嗜銀性を有さない。 D: PAS染色では胞体は陰性。

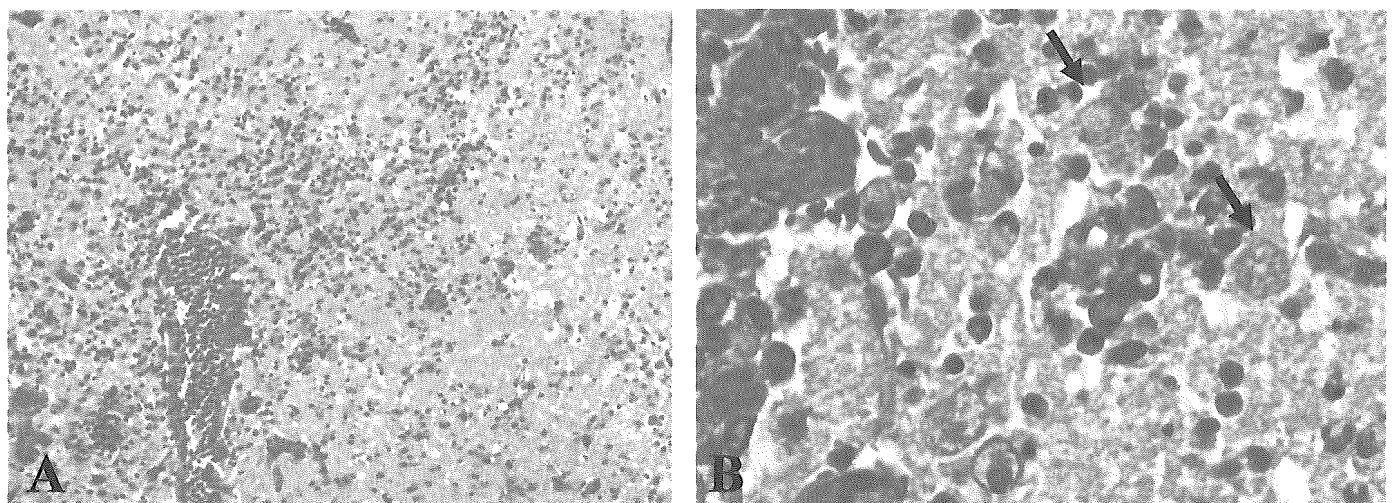


Fig. 10: *N. australiensis* 感染マウス脳。 A: HE染色。第3脳室・側脳室周囲を中心とした炎症性病変が認められる。 B: 同部の拡大。多数の顆粒球とともにアメーバ栄養体(矢印)が散見。

厚生労働科学研究費補助金(健康科学総合研究事業)
分担研究報告書

温泉・公衆浴場、その他の温水環境におけるアメーバ性髄膜脳炎の病原体
*Naegleria fowleri*の疫学と病原発現に関する研究

診断法の開発および感染経路の解明

分担研究者： 福間 利英 (久留米大学医学部寄生虫学講座)

研究協力者： 原 樹 (久留米大学医学部寄生虫学講座)
下河原理江子(国立感染症研究所寄生動物部)
小村 麻子 (国立感染症研究所寄生動物部)

自由生活性アメーバ *Naegleria fowleri* に起因する原発性アメーバ性髄膜脳炎 (PAM) の診断のため、蛍光抗体診断試薬及び早期診断法の開発を行った。

蛍光抗体診断試薬の開発では、PAM 本邦初症例の患者より分離した *N. fowleri* YT9611 株を抗原として使用し、モノクローナル抗体産生のためのマウス B 細胞ハイブリドーマを作製した。本年度の最大の特徴は、抗原として接種するアメーバに未固定の生きた虫体を使用した点である。最終的に9種のハイブリドーマクローンを得ることができ、予備的な特異性の検討結果から1種のハイブリドーマの産生するモノクローナル抗体が *N. fowleri* に高い特異性を有することが判明した。

また、早期診断法の開発では、安全かつ早期の診断が可能となる鼻腔内からのアメーバの検出方法を検討した。マウスを疾患モデル動物として用いた場合、鼻腔内洗浄毎にマウスを屠殺しないと完全な洗浄は困難であるとの結論に達した。また、アメーバ用 SCGYEM 培地を用いた長期培養の結果、アメーバの株によっては速やかな増殖が認められないケースが確認され、培養検出系の改良が示唆された。

A. 研究目的

自由生活性アメーバ *Naegleria fowleri* は温水を好んで生息するうえ、アメーバ性髄膜脳炎が我が国でも散見されるようになってきた。そこで、被害を最小限に抑えることを目的として診断方法の開発を行った。今年度は昨年度に引続き、*N. fowleri* に起因する原発性アメーバ性髄膜脳炎 (PAM) の診断のため、蛍光抗体診断試薬開発のためのモノクローナル抗体作製と早期診断法開発のための鼻腔内洗浄によるアメーバの回収方法の検討を行った。

B. 研究方法

本研究テーマでは、PAM 本邦初症例の患者より分離した *N. fowleri* YT9611 株(以下、アメーバ)を用いた。

Naegleria の培養

アメーバは、病原性を維持する目的から脳微小血管内皮細胞 (BMEC) との共培養系で継代培養を行った。10% 牛胎仔血清 (FBS) を含む MEM を用いて継代培養している BMEC がほぼ単層状態に増殖した時点で、別容器で培養中のアメーバを接種した。3-4 日後に BMEC 細胞がほぼ全て破壊され、アメーバが十分に増殖した時点で培養液を SCGYEM に交換し、さらに一晚培養を続けた。培養は全て 37°C、5% CO₂ の環境下で行った。

SCGYEM の組成

カゼイン	10 g
グルコース	2.5 g
酵母抽出物	5 g
Na ₂ HPO ₄	1.42 g
K ₂ HPO ₄	0.87 g

精製水で全量を 1,000 ml に調整しオートクレーブ滅菌後、FBS を 10% となるように加えて使用する

モノクローナル抗体作製

マウス B 細胞ハイブリドーマ作製のため、上記培養系で得られたアメーバを集めてリン酸緩衝生理的食塩水 (PBS) で 3 回洗浄し、1% ホルマリンで 4°C、1 時間固定後、さらに PBS で 3 回洗浄して感作用のアメーバ抗原とした。固定・洗浄したアメーバは PBS を用いて 10⁷/ml に再懸濁し、この 1 ml を BALB/c マウスの腹腔内へ投与した。この操作は、1 週間隔でさらに 3 回繰り返してブーストした。ホルマリン固定アメーバの最終接種から 3 日後に部分採血を行い、ある程度の抗体価の上昇を確認した後、未固定の生鮮アメーバの腹腔内接種を試みた。前述の培養系で得られたアメーバを PBS で 3 回洗浄し、生鮮な 10⁴ 台のアメーバをホルマリン固定アメーバで感作したマウスの腹腔内へ接種した。この生鮮アメーバによる免疫操作は、徐々に接種アメーバ数を増やしながら 2 週間隔でさらに 5 回繰り返してブーストし、最終的に 10⁶ の生鮮アメーバを腹腔内へ接種した。抗体産生の確認は最終免疫から 3 日後に部分採血を行い、十分に抗体価が上昇したことを確認後、マウスから脾臓を取り出し脾細胞の調製を行った。マウス骨髄腫細胞 (P3-X63) は、10% FBS を含む RPMI1640 で培養し、対数増殖期の細胞を以下の細胞融合に供した。脾細胞と P3-X63 の細胞融合は、ポリエチレングリコール法で行い、HAT 培地 (ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン、FBS を含む RPMI1640) を用いて融合細胞を選択する培養を行った。選択培養開始 2 週間後に、ハイブリドーマの増殖が良好なウェルの培養上清を採取してスクリーニングを行い、抗体価の高いウェルのハイブリドーマをクローニングした。クローニングは、培養液としてエスクローンクローニングメディアウム CM-B (HAT 添加) を用いた限界希釈法で行った。クローニングの結果、増殖が思わしくないクローンは排除し、増殖の良好なクローンについてはスクリーニングの後、2 回目のクローニングを行った。

抗体価の測定

抗体価の測定には ELISA (酵素抗体法、Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) を用いた。前述の培養系で得られたアメーバを集めて PBS で 3 回洗浄後、プロテアーゼインヒビターを含む 50 mM 炭酸緩衝液 (pH 9.6) を用いて 2×10^6 / ml に再懸濁し、凍結融解と超音波処理で細胞を破壊し抗原溶液とした。抗原溶液をマイクロタイタープレートの各ウェルに $100 \mu\text{l}$ ずつ分注し、 4°C で一晩静置して抗原を固相化した。その後、抗原を固相化した各ウェルにブロックエースを $250 \mu\text{l}$ ずつ分注し、 4°C で一晩静置することでブロッキングを行った。被検血清及び培養上清は抗原を固相化しブロッキングした各ウェルに $100 \mu\text{l}$ ずつ分注して 37°C で 2 時間反応させた後、界面活性剤 (0.05% Tween 20) を含む PBS (PBS-T) で 4 回洗浄した。その後、PBS-T で希釈したワサビペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 二次抗体を $100 \mu\text{l}$ ずつ分注し、 37°C で 2 時間反応させた。反応後、各ウェルは PBS-T で 4 回洗浄し、TMB microwell peroxidase substrate system (KPL 社) を用いて、 37°C で 30 分間酵素反応を行った。酵素反応は、 $100 \mu\text{l}$ の 1 M リン酸を加えることで停止し、マイクロプレートリーダー (吸光度 450 nm) を用いて比色定量を行った。

モノクローナル抗体の特異性

得られたモノクローナル抗体の反応性・特異性をウェスタンブロットにより検討した。

一次元 SDS-PAGE、2D-PAGE とともに、*N. fowleri* Nf66 株および KURUME 株、近縁種 *N. lovaniensis* Aq/9/1/45D 株を SCGYEM 培地で 2 日間培養して得られたアメーバ (約 4.5×10^5 個) を TCA によりタンパク抽出したものを試料とした。一次元 SDS-PAGE の泳動は、約 2 時間 80V 室温で行った。2D-PAGE の場合は、タンパク量 $50 \mu\text{g}$ を、一次元目 18cm IPGphor pH3-10 イモビリンストリップ (Amersham Pharmacia 社) を用いて 35,000Vhr で泳動、2 次元目は、 $24 \times 20 \times 0.1 \text{cm}$ プレートの 12.5% ポリアクリルアミドゲルを用いて、25mA、16hr 泳動した (バイオクラフト社)。ブロッテイングはどちらも定法により、80V、2 時間の条件で、タンパクを PVDF 膜へ転写した。10% BlockAse を用いた 2 時間室温でのブロッキング後、一次抗体として、市販の単クローン抗体および本単クローン抗体作成により得られ、すでに抗体反応を確認している C15(03-01) をそれぞれ、200、50 倍希釈したものを、2 時間、室温で作用させた。2 次抗体はアルカリフォスファターゼ (AP) 標識の抗マウス抗体を、1 時間、室温で反応させ、十分洗浄した後、NBT/BCIP 発色検出系により、抗原タンパクの分布特性を明らかにした。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は、久留米大学および国立感染症研究所の動物実験指針に従って計画・実行された。必要があれば、実験施設管理責任者の許可のもとに可能な限り苦痛を与えない方法で処理が行われた。

C. 研究結果

1. マウス B 細胞ハイブリドーマの作製

ホルマリン固定アメーバの接種に引続き、未固定の生鮮アメーバをマウス腹腔内へ投与しハイブリドーマ作製に十分な抗体価の上昇が確認された後、脾細胞と P3-X63 を細胞融合させ、HAT 培

地を用いてハイブリドーマを選択した。ELISAを用いたスクリーニングの結果、いくつかの抗体産生陽性のハイブリドーマが得られたので、それらを2回のクローニングに供し、最終的に9クローンのB細胞ハイブリドーマを樹立することができた。

2. モノクローナル抗体の特異性

ウェスタンブロットによる特異性検討の結果、複数個の反応ドットを含む分布結果が得られた。

一次元の SDS-PAGE の抗原タンパクとして、凍結融解を繰り返す細胞破碎法により調製した試料の上清(可溶画分)を用いたウェスタンブロッティングによる単クローン抗体の特性を示した結果を図 1-b に示した。左から Nf66 と KURUME の抗原に対応し、どちらもラダーの発色パターンが得られた。バンドは分子量の大小広い範囲に示されていることから、このクローン抗体が、糖タンパクを認識している可能性を示唆した。現在、糖の特定を検討中である。すでに、市販されている抗体を用いた場合も、このパターンに近いラダーのバンドパターンを示した。本単クローン抗体を用いた反応は、2株の *N. fowleri* に強く観察され、*N. lovaniensis* では、クロス反応を示すたいへん弱いバンドが1本(約 120kDa)観察されるのみであり、また、*N. australiensis* PP397、*N. gruberi* EG および *Balamuthia* の可溶性抗原に対してもクロスバンドは示さず、本単クローン抗体の *N. fowleri* 特異性が確認された。

2次元電気泳動には TCA 処理試料を用いた。昨年度試みた破碎処理のみの試料は、総タンパクの分離パターンが不安定だったため、2次元には、TCA 処理により回収されるタンパクを用いている。さらに、TCA 処理試料の濃度、使用抗体濃度の検討を加え、現在は安定した泳動パターンから良好な抗原抗体反応確認できた。

本単クローン抗体を用いた 2D-PAGE のウェスタンブロッティングの結果、抗体は複数のスポットに対して反応し、分布は図 1-a のようなパターンを示し、一次元の結果を確認することができた。発色スポットは、タンパクの全体、分子量サイズに関わらず広く分布していた。これは、一次元の結果同様、糖鎖もしくは何らかの修飾基を認識した抗体が作成できたことを裏付けている。反応スポットには、膜タンパク Mp2CL5 のように、最近報告され、その性質が検討されているタンパクも含まれていた。抗体と強く反応した *N. fowleri* のスポット、例えば、中性 pH 付近の MW 50-80 kDa のスポットまたは MW 25-30 kDa のスポット、酸性 pH 側に点在する MW 20,25,32 kDa のスポットなどについて、順次、N 末アミノ酸配列解析を進める予定である。*N. fowleri* のタンパク分子に関わる研究は、13.3 kDa あるいは膜タンパク由来の 17 kDa、または Ca⁺⁺非依存的な膜結合性 Phospholipase 80 kDa の報告などがあり、これらと反応したタンパクとの異同を確認し、抗体の反応特性を検討したい。

3. 早期診断法の検討

マウスをモデル動物とした鼻腔内の洗浄方法を検討した。まず、投与したアメーバの一部が鼻腔内の比較的浅部に残存していれば、スワブからの検出も可能ではないかと考え検出方法を検討した。入手可能な綿棒は最も小さいものでも1ミリ程度の太さがあるため、マウス鼻腔内への挿入が困難であり、無理に挿入すると鼻腔内に損傷を与える。また、タコ糸や手術用結索糸を用いたマウス鼻腔内の拭き取りは、挿入は可能であるものの十分なふき取りが困難であった。一方、PBS の注入による鼻腔内洗浄法は、生きたままのマウスでは困難であり、検査毎にマウスを屠殺する必要がある。

った。

加えて、検出系の検討ではアメーバを SCGYEM で継代培養すると、アメーバの株によっては増殖性が著しく低下する現象が確認された。

D. 考察

N. fowleri に起因する PAM の診断のため、蛍光抗体診断試薬開発を目指すモノクローナル抗体作製を行った。昨年度に得たハイブリドーマの2クローンが産生するモノクローナル抗体は、いずれも約 250 kDa の巨大タンパク質を認識する抗体であった。そこで今年度は、生きたアメーバを抗原として接種したマウスからのハイブリドーマ作製を実施した。まず、 10^7 台の生鮮アメーバをマウス腹腔内へ接種した結果、PAM は発症しないものの、おそらくアメーバの分泌する細胞障害性因子に起因する多臓器障害と思われる原因でマウスが死亡してしまうことが判明した。そこで、最初にホルマリン固定アメーバを接種してマウスを予備免疫した後に、生鮮アメーバを 10^4 台から徐々に数を増やしながらか腹腔内へ接種する方法を試みた。その結果、マウスに特別な異常を認めることなく、ハイブリドーマ作製に十分な抗体価の上昇を確認することができた。引続き実施したハイブリドーマ作製の結果、9種のクローンを得ることに成功した。現時点で、全てのクローンの産生するモノクローナル抗体についての詳細な解析は終了していないが、1種については、*N. fowleri* に非常に特異性の高いモノクローナル抗体であることが判明している。

鼻腔内からのアメーバの検出については、マウスをモデル動物として用いることは困難であるとの結論に至った。加えて、培養法によるアメーバの検出についても株によって増殖に差異が認められたため、従来の SCGYEM を用いた培養法の適用は再考を要する。

E. 結論

今年度は、蛍光抗体診断試薬開発のためのモノクローナル抗体作製において、マウスへの抗原投与方法を改良し、新たにモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを9クローン得ることに成功した。今後、これらの抗体を利用した蛍光抗体診断試薬の開発が期待される。

一方、早期診断法の開発については、検出系確立の後に再度考察するのが賢明であろうとの結論に至った。

F. 健康危険情報

関連事項なし

G. 研究発表

論文発表

1. Tatsuru Hara, Toshihide Fukuma (2002) Reliability and evaluation of genetic diagnosis. *Clinical Parasitology*, **13**: 16-18.
2. Toshihide Fukuma (2003) Cases, diagnosis, and therapy of meningoencephalitis due to pathogenic free-living amoeba – utility of PCR method -. *Antibiotics & Chemotherapy*, **19**: 51-58.

H. 知的財産権の出願・登録状況
関連事項なし

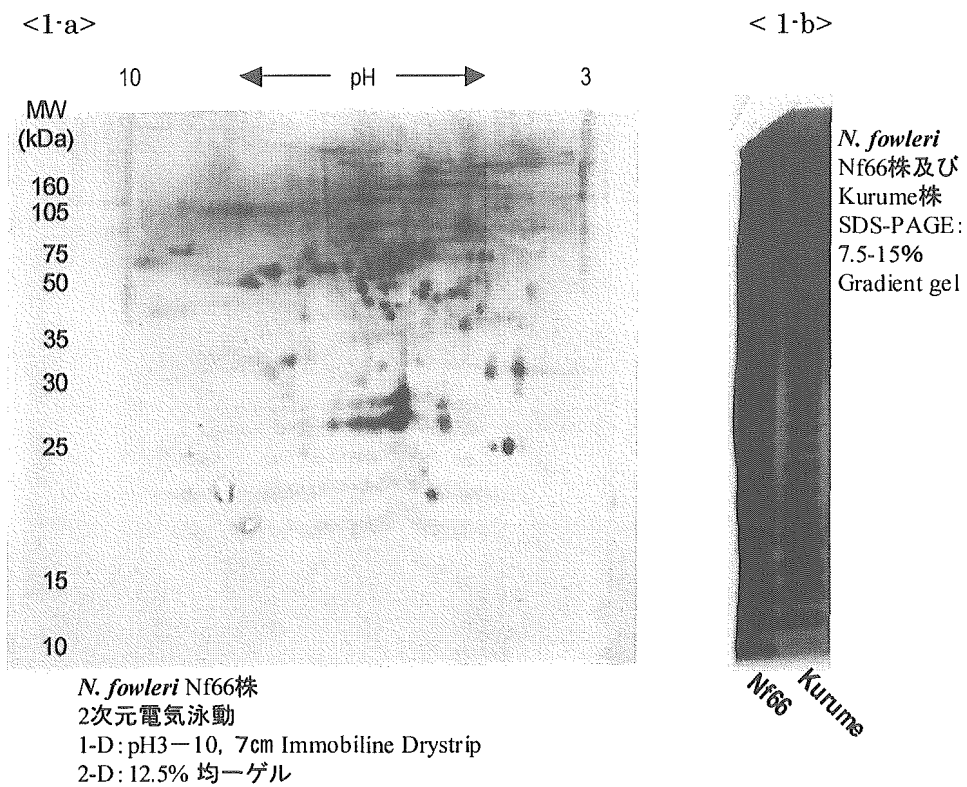


図1 単モノクローナル抗体[C15(03-01)]を用いたウエスタンブロッティング

厚生労働科学研究費補助金(健康科学総合研究事業)
分担研究報告書

温泉・公衆浴場、その他の温水環境におけるアメーバ性髄膜脳炎の病原体
Naegleria fowleri の疫学と病原性発現に関する研究

Naegleria fowleri 及びその近縁種 *N. lovaniensis* における蛋白組成の比較

分担研究者: 八木田健司 (国立感染症研究所 寄生動物部)
遠藤 卓郎 (国立感染症研究所 寄生動物部)

研究協力者: 小村 麻子 (国立感染症研究所 寄生動物部)
泉山 信司 (国立感染症研究所 寄生動物部)
下河原理江子 (国立感染症研究所 寄生動物部)

病原性を有する *Naegleria fowleri* と形態的同一種の *N. lovaniensis* の比較を行うべく、プロテオーム解析を試みた。その結果 *N. fowleri* で 228 個、*N. lovaniensis* で 246 個の種内共通蛋白(スポット)が得られたが、両者の相同率は予想に反し 38.6%と低く、蛋白レベルでは明らかに違いを見せた。N-末アミノ酸配列解析によって、得られた蛋白画分のうち 1 個のスポット (No.16) については *N. fowleri* の Membrane protein MP2CL5 と高い相同性を示すことが示された ($E < 10^{-5}$)。MP2CL5 は *N. fowleri* Lee 株で遺伝子が特定され、組み替え蛋白が作成されており、さらに組み替え蛋白に対する抗体を用いた免疫染色によって *N. fowleri* の膜に局在する約 17kDa の膜蛋白として報告されている。今回分離された Nf66 株の蛋白画分と MP2CL5 は分子量、生物種とも一致しており、本研究によって初めて特定の遺伝子産物が 2 次元電気泳動による分離に成功した例となった。その後の解析により、*N. lovaniensis* においても N 末端から 20 残基まで MP2CL5 と同じアミノ酸配列を持つ蛋白スポットが存在することが確認された。その他、データベースに登録されたアミノ酸配列と相同性が認められた 7 個のスポットを確認したが、分子量や生物種が異なっていることなどから、結論を得るには今後の詳細な解析が待たれる。さらに、データベースと関連性の得られなかった蛋白画分については中間配列の解析を加えて既存の蛋白との相同性の検討を行う予定である。

A. 研究目的

自由生活性の小型アメーバである *Naegleria* 属アメーバは淡水環境中に広く棲息するが、*N. fowleri* など数種のアメーバは 26°C 以上の温水環境に好んで棲息する。本属原虫の生活環にはアメーバ期、鞭毛期と嚢子期の 3 つのステージが知られている。本属 *N. fowleri* は強い病原性し、ヒトにおける感染は鼻腔粘膜に裸出する嗅神経末端から侵入して経神経的に脳へ達することによることが知られている。神経系に対する親和性や組織侵入性に係る因子の発現機構は現在のところ不明である。また、病原性発現と生活史上の発育ステージとの関係も明らかとなっていない。本研究ではこれらの各ステージにおける蛋白の発現およびその調整について解析を試みるものである。具体的には *N. fowleri* と生態学的にも形態学的にも分別ができないとされ、わずかに数種のアイズイムに違いが認められているに過ぎない非病原種の *N. lovaniensis* との蛋白発現を比較することで *N. fowleri* の病原性発現に係る蛋白発現調整の糸口を探ろうとするものである。

本研究事業では前年度から引き続いてこの両者の蛋白レベルでの相同性について、網羅的な把握および、両者に特徴的あるいは共通する蛋白のスクリーニングを行うとともに、これらの情報の得られた蛋白スポットについて N 末端アミノ酸配列解析を行った。

B.研究方法

1) 2次元電気泳動条件、スポット検出方法および、アベレージゲル作成条件

前年度までに、*N. fowleri* および *N. lovaniensis* 両者の全蛋白における相同性を網羅的に比較するための蛋白抽出から泳動条件までの各工程の条件設定を行ってきた。また、これまでに得られた 2 次元電気泳動の結果から、同種内においても株により泳動像に差異を生ずることが確認されたので、これらの株差を踏まえ表1のアメーバ種を対象として 2 次元電気泳動を行った。アメーバは SCGYEM 培地を用いて 35°C で無菌培養し、それぞれ約 10⁷ 個の虫体をサンプルとして用いた。

表1. 供試検体

アメーバ	株	アメーバ	株
<i>N. fowleri</i>	Nf66	<i>N. lovaniensis</i>	Aq/9/1/45D
	KUL		TS
	Kurume		
	Lee		
	76/14/S3		

得られた虫体を凍結融解し、TCA (10%) 沈殿により得られたタンパク画分を用いて 2 次元電気泳動を行った。電気泳動後 CBB で染色した。

2 次元電気泳動の条件は下記のとおりである。

1 次元目: Amersham biosciences 社 IPG phor

pH3-10、18cm イモビリンストリップ、35,000Vhr

2 次元目: バイオクラフト社製縦型泳動装置 24×20×0.1cm

12.5%ポリアクリルアミドゲル 25mA、16hr

2) 画像解析

染色後のゲルはスキャナを用いて画像を取り込み、Image Master 2D Elite ver.3.0 (Amersham-biosciences 社) で画像解析を行った。

同種間の株差によるスポットのばらつきを平均化するため、同一種ごとにアベレージゲルを作成し、*N. fowleri* と *N. lovaniensis* の種間の相同性について検討した。また、*N. fowleri* 特異的なタンパクスポットを検出する為、*N. lovaniensis* 2 株のタンパクスポットを足し合せたゲルを作成し、*N. fowleri* アベレージゲルと比較した。

3) アミノ酸配列解析

2 種間共通あるいは非共通の主要なスポットについて、アミノ酸配列解析を行った。2 次元電気泳動後のゲルを PVDF 膜 (ProBlott: Applied Biosystems 社製) に以下の条件でブロッティングした。

ブロッキングバッファー組成 : 48mM Tris, pH9.2, 39 mM Glycine, 20% Methanol, 0.1% SDS
転写条件: タンク式ブロッキング装置 (Mini Trans-Blot, BioRad 社) 80V, 350 mA, 2 時間

メンブレンを CBB で染色し、目的のスポットを切出し、気相シーケンサー (ProCise cLC494、Applied Biosystems 社製) のエドマン反応槽に直接挿入してアミノ酸配列解析を行った。

C. 結果および考察

1) 種内共通スポットの選出と、2 種間における主要な蛋白スポットパターン同士の相同性の検討

各種内に特徴的に共通するスポットを選出するため、*N. fowleri* で 5 株、*N. lovaniensis* で 2 株をそれぞれ 1 つのゲルグループとして Max absence = 0 (種内のすべての株に出現するスポットのみ真のスポットとする) の条件でアベレージゲルを作成した。この操作により各種内で株差によるスポットのばらつきを取除くことができ、その結果 *N. fowleri* で 228 個、*N. lovaniensis* で 246 個の種内共通スポットが得られた。この両者を比較した結果、相同率は 38.6% と予想に反し低かった。

2) *N. fowleri* 特異的スポットの選出

2 種のアベレージゲル同士による比較では、株差を排除して両種の特徴的な泳動像の相同性について検討することが可能であった。次に *N. fowleri* 特異的と考えられるスポットを選出するために、比較の対象とする *N. lovaniensis* の株差を排除せず、2 株で得られた蛋白スポットを全て足し合せた Reference gel (スポット数 528 個) を作成し、②-1 で作成した *N. fowleri* のアベレージゲルとマッチングを行った。その結果相同率は 55% となり、②-1 の両種間の比較では検出できなかった *N. lovaniensis* Aq/9/1/45 株及び TS 株のいずれかに共通する蛋白を検出することができた。これらを *N. fowleri* 5 株共通スポットから差引くことにより、102 個の *N. fowleri* 種特異的スポットの情報が得られた (図1)。

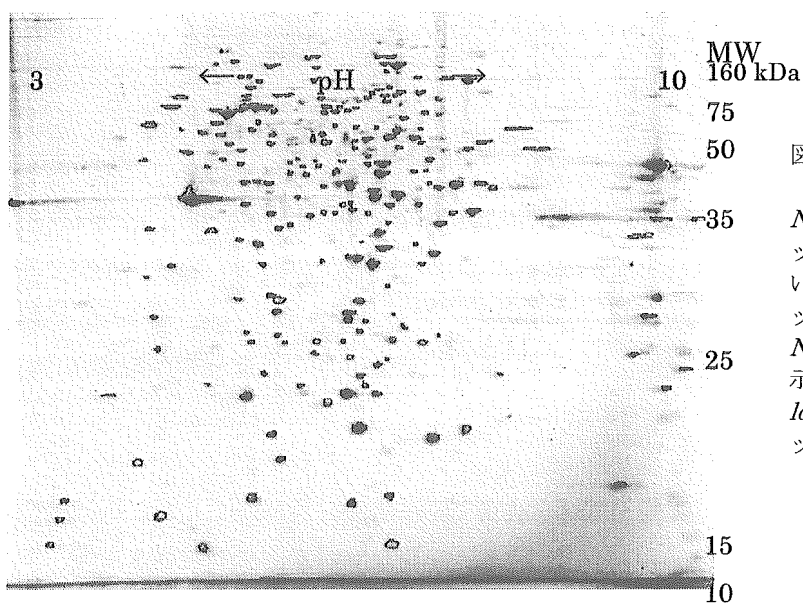


図1. *N. fowleri* 特異的スポットの解析結果

N. fowleri Nf66 株の 2D-PAGE 画像上にスポット解析画像を重ねた。全てのマークされている蛋白スポットは *N. fowleri* 5 株共通スポットであり、その内塗りつぶしたスポットが *N. fowleri* 特異的な蛋白スポット (102 個) を示す。アウトラインで示したものは *N. lovaniensis* 2 株のいずれかに共通するスポットであった。

3) アミノ酸配列解析

現在までに *N. fowleri* Nf66 株の主要なスポットについてアミノ酸配列解析を行っており、得られた N 末端アミノ酸配列については FASTA で SWISS-PROT データベースを用いてホモロジー検索を行った。検索の結果 Expectation value が 0.1 以下の相同性を有するスポットは 10 個であった(図2)。

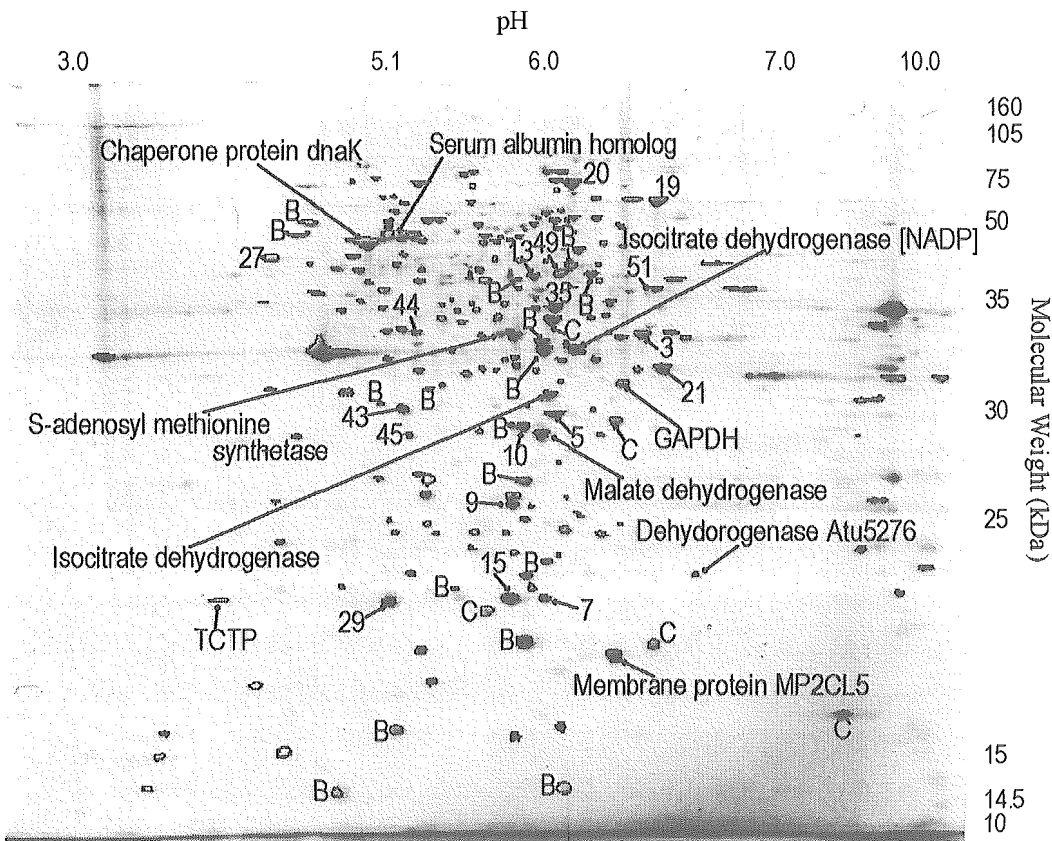


図.2 *N. fowleri* 蛋白スポットのアミノ酸配列に対する FASTA による相同性検索結果
それぞれのスポットで $E \leq 0.1$ の相同性を有する機能的に類似した蛋白が多数ヒットした場合に、それらの中から E-value が一番低いものを記載した。B:N 末端ブロック、C:複合スポット、数字のついたスポットはアミノ酸配列は得られたが、未知のタンパクであるもの

これらのうち 1 個のスポット (No.16) については *N. fowleri* の Membrane protein MP2CL5 と高い相同性を示した ($E < 10^{-5}$)。MP2CL5 は *N. fowleri* Lee 株で遺伝子が特定され、その組替蛋白が作成されている。さらに組替蛋白に対する抗体を用いた免疫染色により、*N. fowleri* の膜に局在する約 17kDa の膜蛋白の一種として報告されている。今回分離した Nf66 株のスポットと MP2CL5 は分子量、生物種とも一致しており、本研究によって今回初めて 2 次元電気泳動による蛋白の分離に成功した例と考えられた。またその後の解析により、*N. lovaniensis* においても N 末端から 20 残基まで同じアミノ酸配列を持つ蛋白スポットが存在することを確認した。その他、データベースに登録されたアミノ酸配列と相同性が認められた 7 個のスポットを確認したが、分子量や生物種が異なっていることなどがあり、確実な同定にはさらに詳細な解析が必要と判断された。

これらの他にデータベースと関連性の得られなかったアミノ酸配列においても、中間配列の解析を加えることで既存の蛋白と同定できる可能性が考えられるので、目的蛋白のゲル内消化を行って、ペプチドを HPLC で分別した後、中間アミノ酸配列の解析を行う予定である。N 末端ブロック

が疑われるスポットとについても中間アミノ酸配列解析を行う予定である。また、分離不十分なスポットについては1次元目のpH勾配を狭くして、2次元電気泳動を行う予定である。

D. 学会発表

口頭発表

1. 小村麻子、八木田健司、泉山信司、下河原理江子、遠藤卓郎 (2002) *Naegleria fowleri* と *N. lovaniensis* のタンパク質の2D-PAGEによる比較(2) 第35回日本原生動物学会(高知県高知市 11月)
2. 小村麻子、八木田健司、泉山信司、下河原理江子、遠藤卓郎 (2003) *Naegleria fowleri* と *N. lovaniensis* のタンパク質の2D-PAGEによる比較(2) 第72回日本寄生虫学会大会(福岡県久留米市 3月)

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

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
遠藤卓郎	原虫類	監訳 丸山 務 熊谷 進	カラーグラフィック 図説 食品汚染病原微生物 ■健康危害と予防のための衛生管理■	(株) 廣川書店	東京	2003	557 (373-386)
遠藤卓郎	クリプトスポリジウム、ジアルジア、その他原虫類	熊谷 進	HACCP：衛生管理計画の作成と実践 改訂データ編	中央法規出版(株)	東京	2003	424 (241-245)

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
Yagita K. 他 9 名	Molecular characterization of Cryptosporidium isolates obtained from human and bovine infections in Japan	Parasitol. Res.	87	950-955	2001
Szenasi Z. 他 4 名	Epidemiology and laboratory diagnostics of legionellae.	Orv. Hetil.	142	1035-1043	2001
遠藤卓郎 他 2 名	原虫類と食品衛生 (Protozoa and Food Hygiene)	食品衛生学雑誌	43	J343-J347	2002
鈴木敦子 他 6 名	各種生活環境水からのレジオネラ属菌検出状況	感染症学雑誌	76	703-710	2002
遠藤卓郎 他 2 名	飲料水と健康－現在問題となっている飲料水を介した感染症－	公衆衛生	66	458-461	2002
原 樹	遺伝子同定法の信頼性と問題点	日本臨床寄生虫学誌	13	16-18	2002
福間利英	病原性自由生活アメーバ感染による髄膜脳炎の症例・診断・治療～PCRの有用性～	化学療法の領域	19	51-58	2003