

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15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16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（慶應義塾大学医学部）	1
2. 分担研究報告	
各ハイリスク群におけるアメーバ感染の疫学・臨床的研究；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；免疫診断法の開発；アメーバの多型性解析	
竹内 勤（慶應義塾大学医学部）	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）	15
アメーバの嚢子形成・脱嚢、及び脱嚢後発育の阻害薬開発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）	19
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の疫学的研究、特に進入経路の検討、及び病原性との相関に関する研究	
野崎 智義（国立感染症研究所）	24

厚生科学研究費補助金（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14年度に実施した赤痢アメーバ症感染のハイリスク群である施設利用者に主な焦点をあて、感染状況のより一層明確な把握、迅速診断法の導入・評価、施設における感染予防ガイドラインの改訂、免疫診断法の改良、多型性同定法の改良、ワクチン開発の基礎研究、及び薬剤の新規標的の探索を目的として検討を行なった。今年度はまず、東京都の協力を得る事ができたので、500名に達する施設利用者の調査が可能となった。赤痢アメーバの感染者は見出だされなかったものの、同様の感染経路をとるランブル鞭毛虫、大腸アメーバなどが検出されたので、糞便の汚染による経口感染の危険性はあると判断した。他の1施設で繰り返し感染が継続していた集団に対して、フラジールだけでなくディロキサニドを併用することで、感染を制圧することが可能となった。これにより施設内感染の新しいdrug policyが確立できたものとする。また感染制圧ガイドラインは改訂が終了し、試行を開始した。迅速診断キットに関しては、問題と思われる点もすくなく、順調に使用されている。免疫診断の改良に関する検討では150-kDaの表面レクチン(IgI)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ELISAにて評価した。その結果、組み替え断片ではC末端側の断片が優れており、無症候性嚢子保有者の診断も可能であったことは注目すべきと思われた。ワクチン開発の基礎研究を表面レクチン(IgI)により行なったが、肝臓癌モデルでは、有意なワクチン効果は検出されなかった。しかしC3H/HeJを使用した確実な腸管感染モデルが作成されたので、今後組織内侵入阻止なども標的に入れたワクチン開発が可能となるものと期待される。また、アメーバの多型性解析では、病原性と対応するglucose phosphate isomeraseの多型性を遺伝子レベルで解明できた。これにより、簡便な病態と対応する遺伝子レベルの多型性同定法確立が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化・脱嚢、及び脱嚢後発育の阻害剤の探索を行なっており、カルシウム代謝阻害剤など、多くの阻害剤を見出だしたが、加えて今年度はcytochalasin Dが脱嚢と発育を促進することを見出だした。これにより、脱嚢後発育に際した遺伝子変化がフォローできる可能性が生じた。更に蛋白のプレニル化に関与する酵素のうち、geranylgeranyl transferaseの性質の検討を試みた。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。薬品による予防においても、上記マウスの腸管感染モデルは良い実験系になるものと期待される。

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おり、平成15年では500例以上の症例が報告されている。しかし、その対策策定には困難な点が多い。それは主に以下の理由による。まず、①感染のハイリスク集団が同性愛者や各種施設の利用者であり、疫学

調査と制圧対策実施が難しい。②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、疫学的状況を再検討する必要が生じた。③副作用の少ない薬剤の開発、ワクチンの開発等が進んでいない、他が挙げられる。特に①に関連した事項のうち施設内感染は主な対象が知的障害者などであるため、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を主な対象として疫学調査

を実施し、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、②E. 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、③E. histolytica感染の免疫診断法を改良し精度を上げること、④多型性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をワクチンとして評価すること、及びそのために適切な腸管感染モデルを開発すること、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・衛生行政面での対策が効果的に実施されなかった施設内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：今年度は東京都の協力を得て、施設におけるアメーバ感染の実態調査を約500名を対象として実施した。これまで調査とした施設のフォローアップをも行なった。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を行い、その後、評価は本研究班で実施した。また実施した環境衛生対策に基づいた感染予防策ガイドラインの試行を行い、改良を試みた。福祉・衛生行政に還元する事も本研究にて行なった。

また今年度は継続調査対象となっている施設で感染源となっている長期持続性感染に対する適切な化学療法プロトコルの作成をも試みた。今年度はある施設から分離され、抗原・遺伝子検索ではE. histolyticaと同定されたものの、極めて弱毒で、E. dispar用の無菌培養によく適応したアメーバの同定をも更にすすめ、またワクチン・薬剤開発に資するためマウス(C3H/HeJ)による腸管感染モデルの作成を試みた。

(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：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(Ig1)遺伝子を取り上げ、大腸菌にてN末端側(aa14-382)、中央部(aa294-753)、C末端側(aa603-1088)、及び全長(aa14-1088)を、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BL21StarTM(DE3)pLysSにて発現させた。抗原としての有用性は肝臓癌23例、アメーバ性大腸炎34例、無症候性嚢子排出者15名の血清を使用してELISAで検索した。

ワクチンとしての検討はIg1全長蛋白をアジュバントと共にハムスターの腹腔に3回接種し、その後栄養型虫体を肝に注射し、実験的に形成される肝臓癌の大きさを測定して評価した。

(3)多型性解析方法の開発と応用：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)を使用した同定法はアメーバの性状との比較ができず、特に病態との対応は全くできなかった。今回はアメーバの生物学的性状と遺伝子、蛋白多型性との比較を可能とするため、アイソザイム分析で最も多型性に富んでいることが明らかなglucose phosphatase isomerase (GPI)の遺伝子解析を行い、多型性を検討した。そのためにゲノムデータベース上からHM1:IMSSc16のGPI遺伝子を獲得し、センス、アンチセンスプライマーを合成し、PCRを実施し、産物をアガロースで泳動解析した。またアガロース泳動で分離した産物をクローニングし、シーケンシングを行なった。

(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、脱嚢後の発育阻害作用を検索し、その結果を新規薬剤開発に反映させることを試みた。また、昨年度に継続して、蛋白のプレニル化の検討をアメーバに関して行なっており、こちらの方面からも新規薬剤の標的の把握を試みた。

(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。また該当施設の嘱託医にも説明を行ない協力体制を作った。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、それらをクリアして後に調査を開始した。今年度の調査は東京都の施設が中心であったため、都の倫理委員会はクリアしており、データ測定も都の健康安全センターにて実施した。その他の調査に関しては、担当施設の倫理委員会に申請し、現在付帯意見に関して委員会と調整をはかっている。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のとおって行なわれた。

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

新たに調査した東京都の3施設(A, B, C)では、幸い赤痢アメーバ感染は見出されなかった。しかし、赤痢アメーバと同一の感染経路をとる大腸アメーバ、小型アメーバの感染が施設A, Bに、ランブル鞭毛虫の感染が施設Cに、2.4~8.4%の率で見られた。ランブル鞭毛虫は届け出を必要とするので、保健所に届け出ると共に治療が東京都の手によって行なわれた。

またこれまで調査対象とした施設の集団治療で、抵抗性の感染者が見出された。すなわち、一度フラジールで治療しても、便をいじるなどの性癖のため、再感染が繰り返し起こり、かつ周囲の特定のポピュレーションにも感染が拡大してゆく傾向がみられたので、フラジールだけの治療を変更し、フラジールとディオキサニドの併用を行なった。この併用療法は良好な効果を示した。その後のフォローアップ調査では感染が終息していることが確認された。既に我々は以前の報告で持続性感染はフラジールに低感受性のためではないかと記載したが、それが裏付けられた形となった。

更に従来の解析で遺伝子型もアイソザイムパターンも*E. histolytica*の一致しているものの、ethidium homodimerを使用したvirulenceの解析では全く標的細胞に影響を与えず、また*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株を分離、検討を行なった。今回の解析では嫌気性菌の*Bacteroides fragilis*がYIGADHA-S mediumでのこの株の増殖に良好な影響を与えることがわかり、更にcharacterizationを継続する予定である。ま

た、この*B. fragilis*はC3H/HeJマウスでの腸管感染モデル作成にも良好な影響を与え、*E. histolytica*と共棲させてマウスの腸管内に投与することで、持続性感染がほぼ100%達成できた。この事は今後の研究進展に大きな影響を与えるものと思われる。

また昨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。この改訂が今年度出版されたので、数施設に対して説明を行い、試行を開始した。更に当初より調査に協力して頂いている施設で、*E. histolytica* II kit(Tech Lab)の試用を行なった。数人の新しい利用者に対して行なったのみであったが、現場の担当者からは使い易いという意見が聞かれているので、今後も徐々に利用範囲を拡大したい。

(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

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(Igl)の診断、ワクチンへの応用の検討を今年度は行なった。*E. histolytica* Igl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末端側を抗原として検討した結果、まず粗抽出抗原ではアメーバ感染者の全例が陽性であった。しかし他種原虫感染者4例、及び陰性対照として用いた健常人の血清1例が陽性であった。感染者の場合、3種の断片ではC末側が最もELISAのOD値が高く、ついで中央部、N末側の順であった。C末側を抗原として用いた場合は、大腸炎の2例が偽陰性(感度97%)、マラリア1例が偽陽性を示した(特異性99%)のみで、粗抽出抗原を使用した場合と最も優れた相関関係を示した。無症候性嚢子排出者に対しても優れた感度を示した。

ワクチンとしての検討はハムスターでの実験的肝膿瘍をモデルとして行なった。全長のIgl免疫群でも膿瘍形成は64%(9/14)に見られ、対照群の80%(8/10)より低いものの、統計的な有意差は見られなかった。

(3) アメーバの多型性解析方法の開発と応用

今回は4種類の代表的なザイモデーム有する株、HM1:IMSS cl6(zymodeme II)、SAW1627(IIa-), SAW755(XIV)、KU2(XIX)を使用してGPI遺伝子の全長をシーケンスした。その結果、それぞれの株に2種類の対立遺伝子と考えられる遺伝子が見出だされ

た。塩基の多型は8カ所でみられ、対立遺伝子の2型はザイモデームの異なる3株に見出された。この結果はまた4株のうちGPIアイソザイムが3種類存在する事を示した。pIは6.73から7.15であった。これらの結果はアイソザイム分析とGPIがホモ、あるいはヘテロ二量体を作るとするとよく説明可能であった。この解析法はこれまでの病原株同定の最も簡易な方法であったアイソザイム分析の分子基盤となるものと思われる。

(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求する作業は*Entamoeba invadens*をモデルとした嚢子形成・脱嚢阻害、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、アクチン機能阻害剤、カルシウムキレート剤、カルモジュリン阻害剤、DNAポリメラーゼ阻害剤、PKC阻害剤、及びPI3K阻害剤の評価を目的として行なった。その結果アクチン機能阻害剤であるlatrunculin A等は脱嚢・発育を阻害したので、これらに対するアクチンの関与が推察されたが、同様の作用を持つと思われたcytochlasin Dは両過程を促進した。またカルシウムキレート剤、細胞内カルシウムfluxの阻害剤、カルシウムチャンネルブロッカー、カルモジュリン阻害剤は何れも脱嚢・発育過程を阻害した。これらの過程はまたDNAポリメラーゼ阻害剤であるaphidicolinによって阻害されたが、合わせて4核のアメーバから1核の虫体に細胞分裂が起こる際に遺伝子発現の変化が起こることが明らかになった。また、やはり阻害実験の結果、これらの過程にPKC、PI3Kの関与があることも推定された。

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、2003年度には500例を越え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のうち、主に諸種施設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*は従来の本研究班を中心とした研究で想像以上に各種施設内での感染が広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。また、もう一つのリスク因子は同性愛行為であるが、最近の統計では異性愛行為によって感染したと推定される症例も報告されており、今後の調査の拡大が必要である。本研究班では、予備的に妊産婦における調査も東京都と共同で開始したが、まだ確実に報告する段階ではない。

今回の研究では平成14年度厚生労働科学研究費によって実施した調査を継続すると共に、東京都と共同研究を開始する事により、一躍調査対象人数が増大した。地方自治体との共同研究は今後も拡大したいと考えている。調査結果はアメーバの感染を疑わせるものはなかったが、同一の感染経路をとる腸管寄生性原虫の感染が確認され、感染を起こす危険性はかなりあるものと推定された。これまでの研究でも、1名の感染者が利用者となれば、そこから拡大して行くことは認識されており、注意を怠るべきではないと考える。また今回の調査で、繰り返し再感染を起こしている近縁の集団が、殆ど1名のフラジール治療に反応しない特定の行動性癖を有している利用者由来しており、この特定の利用者の治療がディロキサニドを併用することで達成されたことは、重要な所見であると思われる。赤痢アメーバには自然界でフラジールに耐性な株はまだ本当には見出だされいないが、持続性感染とフラジール低感受性との関わりも合わせ、今後検討して行く必要がある。

研究開始直後より調査を継続して行い、集団治療から環境衛生施策を行なっている1施設の成果に基づいて2002年度改訂し、2003年度に出版された感染予防ガイドラインを更に複数の施設で説明を行い、信頼性を確認する作業を開始した。*E. histolytica* II kitも迅速診断法として現場の担当者には無理なく受け入れられていると思われた。

ワクチンの開発は、今後更に種々の検討を行なうべき段階ではあるが、今回C3H/HeJマウスを用いて確実な腸管感染モデルが作成できたことは大きな進歩と思われる。これまでの感染モデルでは同一のマウスを使用しているものの60%程度のみでしか達せず、必ずしも再現性が良いというわけではなかったが、今年度の*B. fragilis*との共棲培養に基づく感染モデルはほぼ100%の率で持続性感染が再現できた。

アメーバの表面に存在する新しいレク

チン(IgI)は本研究班によって見出だされたもので、病原機構や診断に対する意義の検討は急務であるが、今年度は種々の断片を組み替え蛋白として発現させ、ELISAでの血清診断システムへの応用を試みた。C末端側の断片は粗抽出蛋白に匹敵する感度、信頼度を示した。特に無症候性嚢子保有者に対する効果は今後の疫学調査に有用と思われた。またC末端側と中央部分に関しては偽陰性が認められたのは大腸炎のみであったので、この部分に存在するエピトープが虫体の組織内侵入を阻止する可能性があるものと思われ、ワクチン候補として検討する可能性を示唆した。

赤痢アメーバの多型性同定法の確立は、感染経路の特定化や、アメーバの分布経路の追跡などにも確かに有用であったが、余りにも細分化しすぎてアメーバ自身の生物学的な特徴や、病態との連携が全く見られないという事態となった。今回はアイソザイムによって型別を判定し、病原性をよく反映するGPIの多型性について検討し、アイソザイム分析の所見の分子論的裏付けを得る事ができた。今後、煩雑な核酸の塩基配列の決定なしに、ザイモデーム決定にいたる簡便な方法を目指すべく検討を開始している。

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。今年度は特にアクチン関連の阻害剤として使用したcytochalasin Dが促進効果を脱嚢・発育に対して示したことは、今後脱嚢の関連遺伝子を同定するために良い手段となりうるものと思われた。これらの阻害剤は、上記のマウスモデルと組合せてリード化合物としての検索を開始したい。

E. 結論

今年度は初めて地方自治体(東京都)との共同研究が展開され、多数の施設利用者の検索が可能となった。今後、地方自治体との連携の拡大を視野に入れて検討を進めて行きたい。感染制圧ガイドラインや迅速診断キットなど、現場からの協力が多く得られており、この点には感謝したいが、それだけに施設内アメーバ感染が現場の人たちにとって、切実な問題である事が認識できる。今年度はほぼ100%に達する良好な腸内感染モデルが確立できたことが特筆されよう。ワクチン、

あるいは薬剤による予防法開発に資する所は極めて大きいといえよう。今後も今年度の成果を踏まえ、この線にそって研究を展開し、今や年間500人を越え、施設内感染のみならず異性間の感染も示唆されるに至っているアメーバとアメーバ症の研究を推進して行きたいと考えている。

F. 健康危険情報

施設内アメーバ感染は衛生・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、感染率は低いものの、同一の感染経路をとる原虫が拡がっていたりする施設があり、調査の大幅な拡充が必要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 (主任研究者、分担研究者を
下線で示す)

- Kobayashi S, Imai E, Haghghi A, Khalifa SA, Tachibana H, Takeuchi T : Axenic cultivation of Entamoeba dispar in newly designed YIGADHA-S medium. (Submitted for publication)
- Beg MA, Kobayashi S, Hussainy A, Hamada A, Okuzawa E, Smego RA Jr, Hussain R, Takeuchi T : An experimental model for amebic abscess production in the cheek pouch of the Syrian golden hamster, Mesocricetus auratus. *Parasitol Int* (in press)
- Tokoro M, Asai T, Kobayashi S, Takeuchi T, Nozaki T : Identification and characterization of two isoenzymes of methionine gamma-lyase from Entamoeba histolytica. *J Biol Chem*, 2003, 278, 42717-42727.
- Dvorak JA, Kobayashi S, Nozaki T, Takeuchi T, Matsubara C : Induction of permeability changes and death of vertebrate cells is modulated by virulence of Entamoeba spp. isolates. *Parasitol Int*, 2003, 52, 169-173.
- Tachibana H, Cheng X-J, Masuda G, Horiki N, Takeuchi T : Evaluation of recombinant fragments of Entamoeba histolytica Gal/GalNAc lectin intermediate subunit for serodiagnosis of amebiasis. *J Clin Microbiol*, 2004, 42, 1069-1074.
- Tachibana H, Takekoshi M, Cheng X-J, Nakata Y, Takeuchi T, Ihara S : Bacterial expression of a human monoclonal antibody-alkaline phosphatase conjugate specific for Entamoeba histolytica. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2004, 11, 216-218.
- Tachibana H, Watanabe K, Cheng X-J, Tsukamoto H, Kaneda Y, Takeuchi T, Ihara S, Petri WA, Jr : VH3 gene usage in neutralizing human antibodies specific for Entamoeba histolytica Gal/GalNAc lectin heavy subunit. *Infect Immun*, 2003, 71, 4313-4319.
- Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T : Different effects of cytochalasins on the growth and differentiation of Entamoeba invadens. *Parasitol Res* (in press)
- Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T : Entamoeba invadens: cysteine and serine protease inhibitors block the excystation and metacystic development (submitted for publication)
- Kumagai M, Makioka A, Takeuchi T, Nozaki T : Molecular cloning and characterization of a protein farnesyltransferase from the enteric protozoan parasite Entamoeba histolytica. *J Biol Chem*, 2004, 279, 2316-2323.
- Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T : Entamoeba invadens: inhibition of excystation and metacystic development by aphidicolin. *Exp Parasitol*, 2003, 103, 61-67.
- Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T : Involvement of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase in the excystation and metacystic development of Entamoeba invadens. *Parasitol Res*, 2003, 91, 204-208.
- Saito-Nakano Y, Yasuda Y, Nozaki T : Unique role of Rab5 and Rab7 in phagocytosis of the enteric protozoan parasite Entamoeba histolytica. *J Cell Sci* (revised and re-submitted)
- Ali V, Shigeta Y, Tokumoto U, Takahashi Y, Nozaki T : An intestinal parasitic protist Entamoeba histolytica possesses a non-redundant NIF-like system for iron-sulfur cluster assembly under anaerobic condition. *J Biol Chem* (in press)
- Ali V, Shigeta Y, Nozaki T : Molecular and structural characterization of NADPH-dependent D-glycerate dehydroge-

nase from the enteric parasitic protist Entamoeba histolytica. *Biochem J*, 2003, 375, 729-736.

Haghighi A, Kobayashi S, Takeuchi T, Thammapalerd N, Nozaki T : Geographic diversity among genotypes of Entamoeba histolytica field isolates. *J Clin Microbiol*, 2003, 41, 3748-3756.

竹内 勤、今井栄子、小林正規 : 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。第1集－基礎編、改訂第2版、メジカルフレンド社、小林寛伊、吉倉 廣、荒川宣親 編集、2003, pp 144-152.

小林正規、今井栄子、竹内 勤、野崎智義、Haghighi A : わが国における施設内赤痢アメーバ症の現況と問題点。病原微生物検出情報, 2003, 24, 81-82.

野崎智義 : アメーバ赤痢、動物由来感染症；その診断と対策、神山・山田編、真興交易、2003, pp244-249.

野崎智義 : 赤痢アメーバのゲノムと病原遺伝子。細胞工学、2003, 11, 1160-1163.

野崎智義 : 話題の抗微生物薬をめぐって、赤痢アメーバ症。臨床と微生物、2003, 30, 631-636.

竹内 勤 : 原虫性疾患－赤痢アメーバ症、内科学、第8版、朝倉書店、2003, pp438-440.

竹内 勤 : 赤痢アメーバ、内科学、第2版、文光堂、2003, pp2080-2082.

竹内 勤 : 赤痢アメーバ症。総合臨床、52(増), 2003, 989-994.

2. 学会発表（主任研究者、分担研究者を下線で示す）

小林正規、Haghighi A、野崎智義、竹内 勤 : 無病毒性赤痢アメーバ分離株の性状解析とその病原性について。第72回日本寄生虫学会大会、2003.

所 正治、浅井隆志、小林正規、竹内

勤、野崎智義 : トリフルオロメチオニン：メチオニンアナログを用いた赤痢アメーバ特異的殺原虫効果。第72回日本寄生虫学会大会、2003.

竹内 勤 : 赤痢アメーバ症の最近の発生状況と問題点。新興・再興感染症研究事業研究成果発表会「今話題の新興・再興感染症 現状と今後を考える」、ヒューマンサイエンス振興財団、2004.

橋 裕司、程 訓佳、金田良雅 : Entamoeba dispar 150-kDaレクチンの遺伝子クローニングと解析。第72回日本寄生虫学会大会、2003.

Beck D, Tachibana H, Petri WA Jr : Structure and function of the Entamoeba histolytica Gal/GalNac adherence lectin. 103rd Annual Meeting of the American Society for Microbiology, 2003.

Tachibana H, Watanabe K, Cheg X-J, Kaneda Y, Takeuchi T, Ihara S, Petri WA Jr : Molecular characterization and expression of neutralizing human antibodies specific for the Entamoeba histolytica Gal/GalNac lectin heavy subunit. 10th International Conference on Human Antibodies and Hybridomas, 2003.

Tachibana H, Takekoshi M, Cheng X-J, Takeuchi T, Ihara S : Bacterial expression of a human monoclonal antibody-alkaline phosphatase conjugate specific for Entamoeba histolytica. 10th International Conference on Human Antibodies and Hybridomas, 2003.

Beck DL, Hout E, Tachibana H, Petri WA Jr : The role of Entamoeba histolytica Gal/GalNac lectin in adherence and cell killing. 52nd Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 2003.

Tachibana H, Takekoshi M, Cheng X-j, Takeuchi T, Ihara S : Bacterial expression of a human monoclonal antibody-alkaline phosphatase conjugate specific for Entamoeba histolytica. 11th

International Congress on Infectious Diseases, 2004.

Tachibana H, Cheng X-J, Masuda G, Horiki N, Takeuchi T : Evaluation of recombinant fragments of Entamoeba histolytica Gal/GalNac lectin intermediate subunit for serodiagnosis of amebiasis. 11th International Congress on Infectious Diseases, 2004.

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(2). 第72回日本寄生虫学会大会、2003.

Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T : Inhibitory effect of aphidicolin on the excystation and metacystic development of Entamoeba invadens. International Conference on Anaerobic Protist, 2003.

Makioka A, Kumagaki M, Takeuchi T, Nozaki T : Molecular cloning and characterization of geranylgeranyl transferase type I from Entamoeba histolytica. 第38回日米医学協力寄生虫疾患専門部会、合同会議、2003.

牧岡朝夫、熊谷正広、小林正規、竹内 勤 : Entamoebaの脱嚢および発育へのカルシウムイオンおよびカルモジュリンの関与。第44回日本熱帯医学会大会、2003.

Makioka A, Kumagai M, Takeuchi T, Nozaki T : Molecular cloning and characterization of geranylgeranyl transferase-I from Entamoeba histolytica. 第76回日本生花学会大会、2003.

牧岡朝夫、熊谷正広、小林正規、竹内 勤 : Entamoebaの脱嚢および発育へのカルシウムイオンおよびカルモジュリン阻害剤の効果。第36回日本原生動物学会大会、2003.

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26回日本分子生物学会大会、2003.

Huston CD、中野由美子、保田友義、Mann

BJ、野崎智義 : プロテオーム解析による赤痢アメーバのファゴソームタンパク質の同定。第72回日本寄生虫学会大会、2003

中野由美子、岡田麻衣、ぬで島麻衣、野崎智義 : 赤痢アメーバの病原因子の輸送に關与するEhRab7アイソタイプにおける機能特異性。第72回日本寄生虫学会大会、2003.

中野由美子、岡田麻美、ぬで島麻衣、野崎智義 : 赤痢アメーバの食食におけるEhRab7およびEhRab11アイソタイプ。第56回日本細胞生物学会大会、2003.

Nozaki T : Functional characterization of complex associated with small GTPase Rab7, which plays an important role in phagocytosis. EMBO Workshop on Pathogenesis of Amebiasis, 2003.

Ali V, Shigeta Y, Nozaki T : Molecular and biochemical characterization of phosphoglycerate dehydrogenase and D-glycerate dehydrogenase of serine metabolic pathway from the enteric parasitic protist Entamoeba histolytica. 第3回淡路島感染症・免疫フォーラム、2003.

Nozaki T, Ali V, Tokumoto U, Takahashi Y : Molecular and biochemical characterization of iron-sulfur cluster biosynthesis in the parasitic protist Entamoeba histolytica. 第3回淡路島感染症・免疫フォーラム、2003.

Nozaki T, Okada M, Nakada-Tsutsui K, Shigeta Y, Nudeshima M, Tokumaru F, Saito-Nakano Y : Functional characterization of roles of Rab7 isoforms and Rab7-binding proteins during phagocytosis. 第38回日米医学協力寄生虫疾患専門部会、合同会議、2003.

Okada M, Saito-Nakano Y, Huston CD, Mann BJ, Nozaki T : Proteomics analyses of phagosome proteins from Entamoeba histolytica. 第38回日米医学協力寄生虫疾患専門部会、合同会議、2003.

Saito-Nakano Y, Okada M, Nakada-Tsukui K, Shigeta Y, Nozaki T : Rab5 and Rab

7 play unique roles in phagocytosis of Entamoeba histolytica. 14th Annual Meeting of Molecular Parasitology, 2003.

Okada M, Huston C, Saito-Nakano Y, Yasuda T, Mann BJ, Nozaki T : Identification of phagosomal proteins in Entamoeba histolytica. 第76回日本生化学会大会、2003.

Nozaki T, Ali V, Tokumoto U, Takahashi Y : Molecular analysis of iron-sulfur cluster formation in the enteric parasitic protist Entamoeba histolytica. 第76回日本生化学会大会、2003.

津久井久美子、中野由美子、岡田麻美、繁田泰男、野崎智義 : 赤痢アメーバRab結合分子の検索。第26回日本分子生物学会大会、2003.

野崎智義 : 腸管寄生原虫赤痢アメーバの含硫アミノ酸代謝の解明と創薬。第5回感染症フォーラム、2004.

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	原虫性疾患—赤痢アメーバ症	杉本恒明、小俣政男、水野美邦	内科学、第8版	朝倉書店	東京	2003	438 ~440
竹内 勤	赤痢アメーバ症	黒川 清、松沢佑次	内科学、第2版	文光堂	東京	2003	2080 ~2082
竹内 勤、今井栄子、小林正規	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—基礎編、改訂2版	メジカルフレンド社	東京	2003	144 ~152
野崎智義	アメーバ赤痢	神山恒夫、山田章義	動物由来感染症：その診断と対策	真興交易	東京	2003	244 ~249

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	発表年
Kobayashi S, Imai E, Haghghi A, Khalifa SA, Tachibana H, Takeuchi T	Axenic cultivation of <i>Entamoeba dispar</i> in newly designed YIGADHS-S medium			submitted	
Beg MA, Kobayashi S, Hussainy A, Hamada A, Okuzawa E, Smego RA Jr, Hussain R, Takeuchi T	An experimental model for amebic abscess production in the cheek pouch of the Syrian golden hamster, <i>Mesocricetus auratus</i>	Parasitol Int		in press	2004
Tokoro M, Asai T, Kobayashi S, Takeuchi T, Nozaki T	Identification and characterization of two isoenzymes of methionine γ -lyase from <i>Entamoeba histolytica</i>	J Biol Chem	278	42717 ~42727	2003
Dvorak JA, Kobayashi S, Nozaki T, Takeuchi T, Matsubara C	Induction of permeability changes and death of vertebrate cells is modulated by virulence of <i>Entamoeba</i> spp.	Parasitol Int	52	169~ 173	2003
Tachibana H, Cheng X-J, Masuda G, Horiki N, Takeuchi T	Evaluation of recombinant fragments of <i>Entamoeba histolytica</i> Ga/GaINAc lectin intermediate subunit for serodiagnosis of amebiasis	J Clin Microbiol	42	1069 ~1074	2004
Tachibana H, Takekoshi M, Cheng X-J, Nakata Y, Takeuchi T, Ihara S	Bacterial expression of a human monoclonal antibody-alkaline phosphatase conjugate specific for <i>Entamoeba histolytica</i>	Clin Diagn Lab Immunol	11	216 ~218	2003
Tachibana H, Watanabe K, Cheng X-J, Tsukamoto H, Kaneda Y, Takeuchi T, Ihara S, Petri WA Jr	VH3 gene usage in neutralizing human antibodies specific for <i>Entamoeba histolytica</i> Gal/GaINAc lectin heavy subunit	Infect Immun	71	4313 ~4319	2003

Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T	Different effects of cytochalasins on the growth and differentiation of <u>Entamoeba invadens</u>	Parasitol Res		in press	2004
Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T	<u>Entamoeba invadens</u> ; cysteine and serine protease inhibitors block the excystation and metacystic development			submitted	
Kumagai M, Makioka A, Takeuchi T, Nozaki T	Molecular cloning and characterization of a protein farnesyltransferase from the enteric protozoan parasite <u>Entamoeba histolytica</u>	J Biol Chem	279	2316~2323	2003
Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T	<u>Entamoeba invadens</u> ; inhibition of excystation and metacystic development by aphidicolin	Exp Parasitol	103	61~67	2003
Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T	Involvement of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase in the excystation and metacystic development of <u>Entamoeba invadens</u>	Parasitol Res	91	204~208	2003
Saito-Nakano Y, Yasuda Y, Nozaki T	Unique role of Rab5 and Rab7 in phagocytosis of the enteric protozoan parasite <u>Entamoeba histolytica</u>	J Cell Sci		resubmitted	
Ali V, Shigeta Y, Tokumoto U, Takahashi Y, Nozaki T	An intestinal parasitic protist <u>Entamoeba histolytica</u> possesses a non-redundant NIF-like system for iron-sulfur cluster assembly	J Biol Chem		in press	
Ali V, Shigeta Y, Nozaki T	Molecular and structural characterization of NADPH-dependent D-glycerate dehydrogenase from the enteric parasitic protist <u>Entamoeba histolytica</u>	Biochem J	375	729~736	2003
Haghighi A, Kobayashi S, Takeuchi T, Thammapalerd N, Nozaki T	Geographic diversity among genotypes of <u>Entamoeba histolytica</u> field isolates	J Clin Microbiol	41	33478~3756	2003
竹内 勤	赤痢アメーバ症	総合臨床	52 (増)	989~994	2003
小林正規、今井栄子、竹内 勤、野崎智義、Haghighi A	わが国における施設内赤痢アメーバ症の現況と問題点	微生物検出情報	24	81~82	2003
野崎智義	赤痢アメーバのゲノムと病原遺伝子	細胞工学	11	1160~1163	2003

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

各ハイリスク群におけるアメーバ感染の疫学・臨床的研究：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：免疫診断法の開発：アメーバの多型性解析
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) 赤痢アメーバ施設内集団感染の実態調査：東京都知的障害者更生施設数施設（500名～）を対象として新たに2003年11月より調査が開始され、2004年3月現在3施設、415名の糞便検査（顕微鏡検査、赤痢アメーバ抗原検出、PCR法による遺伝子診断）が終了している。検査した3施設からは赤痢アメーバ感染者は検出されなかったが、3つの夫々の施設において赤痢アメーバと感染経路を同じくする腸管寄生原虫である大腸アメーバと小形アメーバ或いはランブル鞭毛虫の感染が見られた。ランブル鞭毛虫症に関しては届け出義務により保健所に届け出されるとともに治療がなされた。2) 赤痢アメーバ施設内集団感染者に対する対策と治療：施設利用者76名のうち赤痢アメーバの感染が確認された陽性者21名を含む抗体陽性者51名について2002年5月より2004年1月にかけて治療とフォローアップを行った。メトロニダゾール治療で多くはアメーバの消失が確認されたが、便弄癖をもつ重度の知的障害者においては再感染を繰り返し、治療後の3～6ヶ月には感染者は治療前の状況に近い感染率を示した。そこで腸管内のアメーバの完全な駆虫と再感染の予防効果が期待される腸アメーバ症のための lumen drug であるジロキサニドをメトロニダゾール投与後併用する治療法が採用された。その結果、治療対象者及び感染の有無にかかわらず、赤痢アメーバ感染既往のある施設利用者に対して行った治療後2回のフォローアップ検査からは糞便検査陽性者は見られておらず、赤痢アメーバ感染は現在終息しつつある。3) アメーバの多型性解析：28.2%の高い赤痢アメーバ糞便検査陽性率を示しながら有症例が全く見られず、低レベルの血清抗体保有者しか見られない一施設から分離された株は、他施設からの分離株とは遺伝子多型性のパターンが異なり、従来の方法では無菌培養が困難で実験動物に対しても極めて弱毒な株であることがわかってきた。これらの結果から赤痢アメーバとして分類されるアメーバ種の中にも virulence の極めて弱い subpopulation が存在するらしいことが推定された。4) マウス腸アメーバ症モデル作製：Clostridium 属の嫌気性菌が腸管寄生アメーバ分離培養株の増殖を促進することはよく知られていたが、新たに赤痢アメーバを Bacteroides fragilis と共にマウス盲腸に接種すると腸管内にアメーバが定着・増殖しマウスの腸アメーバ症モデルを作製できることがわかった。

A. 研究目的

- 1) 現在諸種の施設及びハイリスク群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と防御対策を立案する。そしてこれらの対策を実施、評価、改良し、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) 赤痢アメーバとして分類される分離株の遺伝子多型性の解析から分離された株間でその同一性を比較できるようになってきた。この遺伝子多型性の異なる赤痢アメーバの virulence 及び生物学的性状を比較検討すること、そして得られた情報を診断・治療に役立て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：知的障害者更生施設数施設（500名～）を対象として新たに2003年11月より調査が開始され、2004年3月現在3施設、415名の糞便検査（顕微鏡検査、赤痢アメーバ抗原検出、PCR法による遺伝子診断）を終了した。
- 2) 赤痢アメーバ施設内集団感染者に対する対策と治療：集団感染が見られた1施設を対象に、施設利用者76名のうち赤痢アメーバの感染が確認された陽性者21名を含む抗体陽性者51名について2002年5月より2004年1月にかけて2年にわたり、治療とフォローアップを行った。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と最終的にメトロニダゾールとジロキサニドの併用治療が行われた。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。3) 分離培養株の遺伝子多型性のパターン解析: 遺伝子多型性解析において独立したパターンを示した株の virulence とその生物学的性状について検討した。4) マウス腸アメーバ症モデルの解析: Hout et al. (2002) により報告された手法に基づき C3H/HeJ マウスを用いた腸アメーバ症モデルの作製を試みた。

C. 研究結果

1) 新たに検査した3施設(A, B, C)からは赤痢アメーバ感染者は検出されなかったが、3つの夫々の施設において赤痢アメーバと感染経路を同じくする腸管寄生原虫である大腸アメーバと小形アメーバ(A, B)及びランブル鞭毛虫(C)の集団感染が見られた。ランブル鞭毛虫症に関しては届け出義務により保健所に届け出されるとともに治療がなされた。これら原虫感染者の内訳は施設A:大腸アメーバ; 7/83(8.4%)、小形アメーバ; 2/83(2.4%)、施設B:大腸アメーバ; 11/162(6.8%)、小形アメーバ; 5/162(3.1%)、施設C:ランブル鞭毛虫; 6/170(3.5%)である。2) メトロニダゾール治療で多くは赤痢アメーバ虫体および特異抗原の消失が確認されたが、便弄癖をもつ重度の知的障害者においては再感染を繰り返し、治療後3~6ヶ月を経て再検査を行うと感染者は治療前の状況に近い感染率を示した。但し、再感染者の調査から再感染する施設利用者が同一のpopulationに限定されていることも分かった。そして特定の伝播者を介した幾つかの感染経路の存在や利用者の便弄癖と感染とが主要な感染要因であることも明確となってきた。結果的に組織に速やかに吸収されるメトロニダゾール単独治療では大量に赤痢アメーバ嚢子を摂取する便食者に対しては駆虫が困難であるとの結論に到

った。そこで腸管内のアメーバの完全な駆虫と再感染の予防効果が期待される lumen drug であるジロキサニドをメトロニダゾール投与後併用する治療法が採用された。その結果、治療対象者及び感染は確認されなかったが、再感染する可能性をもつ赤痢アメーバ感染既往のある全ての施設利用者に対して行った治療後の2回のフォローアップ検査からは糞便検査陽性者は見られておらず、赤痢アメーバ感染は終息しつつあるものと現在考えている。3) 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。さらにこの分離株は従来の方法では無菌培養が困難であること、細菌共棲下でも *Bacteroides fragilis* のような嫌気性菌の存在下で初めて増殖することも新たに確認された。これらの結果から赤痢アメーバとして分類されるアメーバ種の中にも virulence の極めて弱い subpopulation が存在するらしいことが推定された。4) *Clostridium* 属の嫌気性菌が腸管寄生アメーバの分離株の増殖を促進することはよく知られていたが、新たに赤痢アメーバを *B. fragilis* と共にマウス盲腸に接種すると *B. fragilis* 共棲下で赤痢アメーバが腸管内で増殖・定着しマウスの腸アメーバ症モデルを作製できることがわかった。また *B. fragilis* は赤痢アメーバ以外にも *E. dispar* を7~10日と短期間ながらマウス盲腸に定着させる効果も確認された。*B. fragilis* のそれ以外の効果として無血清条件下での *E. histolytica* / *E. dispar* の継代培養を可能とし、また *E. dispar* の嚢子形成誘導効果も確認されている。

D. 考察

1) 2003年度は新たに知的障害者更正施設の2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うことができた。その結果、赤痢アメーバの新たな集団感染は現在まで確認されていないが、同様の感染経路をとる大腸アメーバ、小形アメー

バ及びランブル鞭毛虫の感染が確認されたことから、赤痢アメーバの集団感染の発生素地があることを再認識した。従って、他の腸管寄生原虫を含め、赤痢アメーバの施設内集団感染実態調査を引き続き実施する必要性を認識した。赤痢アメーバの施設内集団感染における治療とフォローアップ調査から、組織へ速やかに吸収されるメトロニダゾール治療単独では再感染を繰り返す便弄者、便食者の感染者に対しては治療が不完全になりやすいこともわかり、わが国では治験薬として入手可能な lumen drug のジロキサニドの併用治療が試された。メトロニダゾールとジロキサニドの併用治療は実際に顕著な治療効果を示したことから、今後わが国におけるジロキサニド治療の治験症例数の蓄積とより容易な入手経路の確立が期待された。赤痢アメーバ分離株の中に遺伝子多型性のパターンの異なる極めて virulence の弱い株が見出された。未だこの株の病原性については不明であるが、感染者は無症候の場合が多く、血清アメーバ抗体も検出され難いため、今後、赤痢アメーバ伝播者としての cyst carrier の増加が懸念される。また、実験的に嫌気性菌の *B. fragilis* と共棲させた赤痢アメーバを C3H/HeJ マウス盲腸に直接接種することでマウス腸アメーバ症モデルを作製することが可能となった。マウス腸アメーバ症モデルは多くの場合アメーバの組織侵入が粘膜部分に留まるため無症候で感染が長期（最長1年〜）に及ぶことから腸管内に増殖するアメーバに対する治療効果を見るためのモデルとして適しており、今後、難治性腸アメーバ症等のより効果的治療法確立のための有用なモデルとして期待される。また、嚢子を排出する腸アメーバ症において、メトロニダゾール単独でも治療が奏効する例も多いことからアメーバの腸内での増殖部位や腸内細菌叢とメトロニダゾールの治療効果との関連及び作用機序の解析についても応用が期待される。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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*, 52, 169-173 (2003).
- 2) Beg MA, Kobayashi S, Hussainy A, Hamada A, Okuzawa E, Smego RA Jr, Hussain R and Takeuchi T.: An experimental model for amebic abscess production in the cheek pouch of the Syrian golden hamster, *Mesocricetus auratus*. *Parasitol Int*, in press (2004).
- 3) Kobayashi S, Imai E, Haghghi A, Khalifa SA, Tachibana H, and Takeuchi T.: Axenic cultivation of *Entamoeba dispar* in newly designed YIGADHA-S medium. Submitted for publication.

2. 学会発表

- 1) 小林正規, Ali Haghghi, 野崎智義, 竹内勤: 無病毒性赤痢アメーバ分離株の性状解析とその病原性について 第72回日本寄生虫学会 (2003)

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 橘 裕司 東海大学医学部 助教授

研究要旨 赤痢アメーバの 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研究を行った。この蛋白質の全長 [シグナル配列を除く アミノ酸 (aa) 14-1088]、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) を大腸菌で作製し、患者血清との反応性を ELISA で調べた。抗原は 100ng/well を感作し、血清はアメーバ性肝膿瘍やアメーバ性大腸炎などの患者由来 (57 検体)、無症候性赤痢アメーバ嚢子排出者由来 (15)、他種原虫感染者由来 (40)、健康人由来 (50) を用いた。健康人対照血清の吸光度平均値+3SD を cut-off とした結果、全長蛋白質を用いた際の感度は 90%、特異性は 94%であった。また、3 つの断片を用いた場合の感度は、N 断片で 56%、M 断片で 92%、C 断片では 97%であった。一方、特異性は、N 断片では 96%、M 断片と C 断片では 99%であった。以上の結果から、このレクチンは有症者だけでなく、無症候性の嚢子排出者においてもよく認識されており、特に組換え C 断片は、血清診断用の抗原として有用であると考えられた。また、全長の組換え蛋白質でハムスターを免疫し、肝膿瘍形成阻止効果についても検討したが、有意な効果は認められなかった。

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、特に男性同性愛者や知的障害者施設における発生が注目されている。簡便で特異的な診断法の開発や、ワクチンなどによる感染予防法の開発が望まれている。

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 表面蛋白質も同様の特

異性をもったレクチン (intermediate subunit, Igl) であることを報告した。さらに、精製蛋白質で免疫することによって、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。Igl には 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、その多くが CXXC モチーフを形成するユニークな蛋白質であることが判明した。昨年度は、*Igl1* について接着中和エピトープが 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を明らかにしている。

今年度は、大腸菌によって発現させた組換え型 *Igl* について、患者血清との反応性を調べ、診断用抗原としての利用について検討する。また、

組換え Igl のワクチン効果についても検討する。

B. 研究方法

Igl1 について、N 末端と C 末端のシグナル配列を除く全長のアミノ酸 (F-Igl, aa 14-1088)、N 末端側 (N-Igl, aa 14-382)、中央部 (M-Igl, aa 294-753)、C 末端側 (C-Igl, aa 603-1088) をコードする遺伝子断片を pET19b ベクターの XhoI サイトに組み込み、大腸菌 BL21 Star™(DE3)pLysS に導入して発現させた。inclusion body の回収と refolding は、Protein Refolding Kit (Novagen) を用いて行った。組換え Igl の電気泳動は SDS-ポリアクリルアミドゲルを用い、還元条件下で行った。F-Igl については、電気泳動後、PVDF 膜に転写し、PBS で 100 倍希釈した患者血清と反応させた。2 次抗体はペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG (H + L) ヤギ抗体を用い、コニカイムノステインを基質として発色させた。

赤痢アメーバ感染者血清は、肝膿瘍患者 23 名、肝転移のない大腸炎患者 34 名、無症候性嚢子排出者 15 名由来を使用した。有症者の確定診断は、臨床症状、間接蛍光抗体法での血清アメーバ抗体陽性、画像診断、内視鏡検査、検便、メトロニダゾールの治療効果などに基づいて行った。また、無症候性嚢子排出者では、PCR によって嚢子が *Entamoeba dispar* ではなく、赤痢アメーバであることを確認した。この他、ヒトブラストシスチス感染者 23 名、マラリア 7 名、トキソプラズマ症 7 名、ジアルジア症 3 名の血清 40 検体を、別種原虫感染者由来として使用した。また、赤痢アメーバ症の既往がなく、検便陰性の健康人 50 名の血清を陰性対照として用いた。

ELISA プレート 1 穴当たり 100ng の組換え Igl を加え、4℃で一晩感作した。また、粗抽出抗原として、培養栄養型虫体を超音波破碎し、その遠心上清を 1 穴当たり 1 μg の濃度で用いた。患者血清は PBS で 400 倍希釈し、100 μl を 1 時

間反応させた。2 次抗体は、ペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG (H + L) ヤギ抗体を 1 時間反応させた。発色には o-phenylenediamine を用い、30 分後に反応を止め、490nm の Optical density (OD) を測定した。健康人由来の対照血清の平均 OD 値 + 3 SD を cut-off 値とした。OD 値は Prism version 4.0 を用いて解析した。

F-Igl を Freund のアジュバントとともにハムスターの腹腔に 3 回接種した。最終免疫の 2 週間後に栄養型虫体を肝臓に直接接種し、1 週間後に肝膿瘍の大きさを測定した。

(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. 組換え型 Igl の発現と精製

Igl1 について、N 末端側だけでなく C 末端側のシグナル配列も除いた全長の F-Igl と、3 つの断片を大腸菌で発現させた。これらの蛋白質はいずれも inclusion body として産生された。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において、N-Igl は 53-kDa、M-Igl は 67-kDa、C-Igl は 85-kDa の単一のバンドとして検出されたが、精製 F-Igl では 150-kDa のバンドの他に数本の minor なバンドも検出された。ウェスタンイムノプロットによって、赤痢アメーバ症患者血清との反応性を調べたところ、150-kDa のバンドと特異的に反応することが確認された。また、ジアルジア症の患者血清は、健康人血清同様に 150-kDa バンドと反応しなかった。

2. ELISA における組換え型 Igl とアメーバ症患者血清の反応

粗抽出抗原を用いた場合には、赤痢アメーバ感染者の血清は全例陽性であった (感度 100%) が、他種原虫感染者由来の 4 検体と健康人由来の 1 検体が偽陽性であった (特異性 94%)。F-Igl では無症候性赤痢アメーバ嚢子排出者の血清は

全例陽性であったが、肝膿瘍患者の2検体と大腸炎患者の5検体が偽陰性であった(感度90%)。陰性対照群ではヒトブラストシスチス感染者の4検体と健康人の1検体が偽陽性を示した(特異性94%)。3つの断片を抗原とした場合、赤痢アメーバ感染者における平均OD値はC-Igl>M-Igl>N-Iglであった。N-Iglを用いた場合には、無症候性嚢子排出者の9検体、肝膿瘍患者の6検体、大腸炎患者の17検体が偽陰性であり(感度56%)、陰性対照群では4検体(マラリア3、ブラストシスチス感染1)が偽陽性であった(特異性96%)。M-Iglでは偽陰性は大腸炎患者の6検体(感度92%)、偽陽性はブラストシスチス感染の1検体のみであった(特異性99%)。また、C-Iglでの偽陰性は大腸炎患者の2検体のみ(感度97%)、偽陽性はマラリア患者1検体のみであった(特異性99%)。粗抽出抗原とC-Iglを用いたELISAの間には、有意な相関関係が認められた($r=0.8115, p<0.0001$)。

3. 肝膿瘍形成に対するF-Igl免疫の効果

F-Igl免疫群における肝膿瘍形成は64%(9/14)に見られ、対照群の80%(8/10)に比べると低かったが、有意差はなかった。形成された膿瘍の大きさにも有意差は認められなかった。

D. 考察

組換えIgl抗原を100ng用いた場合のOD値は、粗抽出抗原1 μ gを用いた時とほぼ一致しており、組換えIglは高い抗原性を有していると考えられる。また、粗抽出抗原に比べ、M-IglとC-Iglを用いたELISAは特異性に優れていた。特に、Iglに見られるCXXCモチーフは同じく腸管寄生原虫である*Giardia intestinalis*のvariant-specific surface antigenにも存在することから、両者間に共通抗原が存在する可能性も考えられたが、ジアルジア症血清は反応しなかった。また、赤痢アメーバの主要抗原である170-kDaレクチン

の組換え蛋白質を用いたELISAの感度は90~95%と報告されており、別の組換え蛋白質を用いたELISA系と比較しても、C-Iglの感度(97%)はかなり高いと言える。

本研究では、興味深いことに3つの断片において赤痢アメーバ感染者血清に対して異なる反応性が認められた。すなわち、N-Iglは約半数の血清にしか認識されず、N末端側のアミノ酸配列には株間の多様性が存在する可能性も考えられた。これに対して、M-IglとC-Iglでは偽陰性が認められたのは大腸炎患者のみであった。従って、この部分に存在するエピトープを認識する抗体が虫体の組織侵入の阻止に有効である可能性が考えられた。一方、ハムスターにおける肝膿瘍形成に対して、F-Iglの有意な抑制効果が認められなかったことから、ワクチン効果を発揮するには糖鎖上のエピトープが重要である可能性も考えられ、今後、酵母を用いた組換え蛋白質の調製なども検討していく必要があると思われる。

E. 結論

赤痢アメーバ150-kDaレクチンの組換え蛋白質は、赤痢アメーバ感染者血清においてよく認識されており、特にC末端側の組換え蛋白質を用いたELISAは、特異性の高いアメーバ症の血清診断として有用である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Tachibana, H., Watanabe, K., Cheng, X.-J., Tsukamoto, H., Kaneda, Y., Takeuchi, T., Ihara, S. and Petri, W. A., Jr. VH3 gene usage in neutralizing human antibodies specific for the *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin

heavy subunit. *Infect. Immun.*, 71 (8): 4313-4319, 2003

Tachibana, H., Takekoshi, M., Cheng, X.-J., Nakata, Y., Takeuchi, T. and Ihara, S. Bacterial expression of a human monoclonal antibody-alkaline phosphatase conjugate specific for *Entamoeba histolytica*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 11 (1): 216-218, 2004

Tachibana, H., Cheng, X.-J., Masuda, G., Horiki, N. and Takeuchi, T. Evaluation of recombinant fragments of *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin intermediate subunit for serodiagnosis of amebiasis. *J. Clin. Microbiol.*, 42 (3): in press, 2004

2. 学会発表

Beck, D., Tachibana, H. and Petri, W. A., Jr. Structure and function of the *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc adherence lectin. 103rd General Meeting of the American Society for Microbiology. 2003年5月

山田 稔, 橘 裕司, 有蘭直樹. 人間ドック検診でアメーバ嚢子が検出され抗体検査や PCR 法により *Entamoeba histolytica* 単独感染または *E. histolytica* と *E. dispar* の混合感染を示唆された3例. 第14回日本臨床寄生虫学会. 2003年6月

Tachibana, H., Watanabe, K., Cheng, X.-J., Kaneda, Y., Takeuchi, T., Ihara, S. and Petri, W. A., Jr. Molecular characterization and expression of neutralizing human antibodies specific for the *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin heavy subunit. 10th International Conference on Human

Antibodies and Hybridomas. 2003年10月

Tachibana, H., Takekoshi, M., Cheng, X.-J., Takeuchi, T. and Ihara, S. Bacterial expression of a human monoclonal antibody-alkaline phosphatase conjugate specific for *Entamoeba histolytica*. 10th International Conference on Human Antibodies and Hybridomas. 2003年10月

Beck, D. L., Houpt, E., Tachibana, H. and Petri, W. A., Jr. The role of *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin in adherence and cell killing. 52nd Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2003年12月

Tachibana, H., Takekoshi, M., Cheng, X.-J., Takeuchi, T. and Ihara, S. Bacterial expression of a human monoclonal antibody-alkaline phosphatase conjugate specific for *Entamoeba histolytica*. 11th International Congress on Infectious Diseases. 2004年3月

Tachibana, H., Cheng, X.-J., Masuda, G., Horiki, N. and Takeuchi, T. Evaluation of recombinant fragments of *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin intermediate subunit for serodiagnosis of amebiasis. 11th International Congress on Infectious Diseases. 2004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