

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16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17年4月

目 次

1. 総括研究報告書及び研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト	
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）	13
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）	17
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）	22
赤痢アメーバの多型解析及びそれに基づくハイリスク群の疫学的研究、特に侵入経路の検討、及び病原性との相関に関する研究 野崎 智義（群馬大学大学院医学系研究科）	26

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（慶應義塾大学医学部教授）

研究要旨

今年度は東京都の施設を対象として、3施設、知的障害者 238 名に関して種々の方法をもって調査を行い、何れの施設でも赤痢アメーバの感染は見い出されなかったものの、2施設より大腸アメーバ、ランブル鞭毛虫の感染者を見い出した。2004 年 1 月までに治療とフォローアップを行った施設では、メトロニダゾールとディロキサニドの併用によって 2004 年秋に行った再調査でも完全に感染が制圧できた事が確認された。また独立した遺伝子型を持つ弱毒性赤痢アメーバの monoxenic culture 作成に成功し、*Entamoeba dispar* の腸管感染モデルも約三週間持続できた。新しい膿瘍のモデルもハムスターの cheek pouch を用いて作成できた。150-kDa 表面レクチン(Igl)に関しては Igl1、Igl2 に対するヒトモノクロナル抗体の作成が可能となり、これらは赤痢アメーバの細胞接着を阻害した。*E. dispar* における Igl 遺伝子についても解析を試み、発現量は少ないものの、抗原性の類似した Igl が確認された。何れもアメーバにおいても Igl1 の発現量は Igl2 の約 7 倍あった。また Igl に多型性が存在する事が判明し、アメーバの病原性と対応する多型性解析法が確立できる可能性が示された。組み替え型の Igl についてはマウス肝膿瘍と腸管感染の系でワクチン効果を調べたが、有意な感染防御効果は見られなかった。アメーバの感染予防のため、脱嚢・脱嚢後発育の検討を行い、その機構に関し、PKC、システインプロテアーゼ等の関与を明らかにした。セリン代謝についても哺乳細胞との差異を明らかにした。Ras 蛋白の機能発現に必要なグラニルグラニル転移酵素 I 型についても解析を行い、組み替え蛋白を作成し、基質特異性、阻害剤感受性を明らかにし、薬剤標的となり得る事を示した。赤痢アメーバの遺伝子多型性解析法の検討では、従来病原性解析に使用された GPI について検討を行い、組み替え蛋白を作成し、その酵素学的解析を行った。その結果、複数の分離株から得られた三種類のアイソザイムは異なる性質を持つ事が分り、今後迅速な病原性に対応したタイピング法が遺伝子、蛋白質レベルの解析でできる可能性が示された。

研究分担者

橋 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・群馬大学大学院医学系研究科教授

研究協力者

鈴木 淳・東京都健康安全研究センター

A. 研究目的

わが国においてはアメーバ症の届出数は、1999 年の感染症法施行以来明瞭な増加傾向を示しており、昨年法律改正以降もその傾向は変わっていない。例えば 2004 年度は年間で約 600 例前後が届け出られており、そのより一層正確な実

態把握、対策立案は急務である。しかしながら、対策策定、実施にはまだ種々の困難を伴っている。その理由を挙げると以下ようになる。①感染のハイリスク集団が同性愛者や各種施設で集団生活を行っている利用者であり、広範な疫学調査と制圧対策実施に困難を伴う。②従来赤痢アメーバとして単一種とされていた原虫が、病原性のある赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) と非病原性の *E. dispar* に分けられたため、各々の種に対する臨床的な対応、診断法、治療、疫学的状況の再検討の必要性が生じた。③副作用の少ない新規薬剤、ワクチンの開発等が進んでいない。

このうち①に挙げたハイリスク集団へ

のアプローチの困難さは、特に対象が施設内居住者である場合、知的障害者であったりするので、特別な注意、配慮を必要とし、またわが国の福祉・厚生行政面で提起している問題は大きい。

このような状況に鑑み、本研究は、①ハイリスク集団のうち、特に諸種の施設に集団で居住している利用者におけるアメーバ感染、すなわち、施設内アメーバ感染を主な対象としてとり上げ、疫学調査を広範囲に行い、制圧対策のモデル化と実施を試みる、及び感染予防ガイドラインの作成と試行を行う、②*E. dispar*の無菌培養系を確立して、鑑別診断法の作成に応用、③*E. histolytica*感染の免疫診断法の改良を行い、信頼度を上げる、④アメーバの多型性同定の方法を改良して、個々の症例対応、疫学調査への応用を計る、⑤アメーバ表層のレクチンをワクチンとして評価し、合わせて適切な腸管感染モデルを作成する、⑥感染予防法開発のため、嚢子に関わる新規薬剤の標的の開発を行う、を目的としている。

以上の研究により、これまで疫学的な状況が明確ではなかったため、効果的な制圧対策が実施できなかった施設内アメーバ感染の対応に新たなルートを開拓する事が可能となる事が期待される。また関連したアメーバの鑑別・同定法の開発や、新規腸管感染モデルの作成、ワクチン/新規薬剤標的の開発等、多分野に影響する成果が得られるものと期待される。

B. 研究方法

(1)ハイリスク集団である施設利用者のアメーバ感染の疫学調査、予防対策の実施

昨年度同様、東京都健康安全研究センターの協力を得て、2004年3月から調査を新規施設で行った。これまでに3施設、238名の知的障害者更生施設利用者を対象とし、糞便の顕微鏡的検査、糞便の特異抗原検出(*E. histolytica* IIキットによる)、及びPCRによる特異的遺伝

子断片検出を用いて調査を行った。また、これまで集団感染が見られた2施設を対象として3年にわたり上記同様の方法をもって継続調査を行い、最終的にデオキシサニドを併用する集団治療法を導入した効果を継続評価した。

(2)弱毒性の赤痢アメーバ株の培養系の作成

遺伝子多型性解析にて、定型的な赤痢アメーバとは異なるパターンを示しているのに、PCRでは赤痢アメーバと同定された低毒性のアメーバの無菌培養系の作成を持続性感染機構解明の目的をもって試みた。培地は*E. dispar*用に開発した培地を更に改変して、monoxenic cultureとして使用した。

(3)感染モデルの作成

*E. dispar*による腸管感染モデル作成をCBA/JNCrjマウスを用いて試みた。アメーバは*B. fragilis*と共に盲腸内に注射した。また、ハムスターのcheek pouchを膿瘍形成モデルとしてテストした。

(4)抗Iglヒトモノクロナル抗体の作成と応用

Iglは本研究班分担者(橘)が見い出した新しいアメーバの表層レクチンである。今年度はヒト型の抗Iglモノクロナル抗体の作成を試みた。まず、赤痢アメーバ(HM-1株)よりIglをモノクロナル抗体EH3015アフィニティーカラムにより精製し、ヒト抗体遺伝子を導入したマウスに免疫した。追加免疫の後に、脾細胞を分離しハイブリドーマを作成した。このハイブリドーマをSCIDマウスの腹腔に接種し、特異性をドットプロット法で検索した。この抗体のアメーバの細胞接着阻害はCHO細胞を使用して検索した。

(5)組み替えIglによる感染防御実験

Igl遺伝子からN末、C末のシグナル配列を除く全長をコードする遺伝子断片をベクターに組み込み、大腸菌で発現させた。組み替え蛋白はrefoldingの後、精製し、その15 μ gを(C3H/HeJ)マウスの腹腔内に Freundの完全アジュバントと共に投与し免疫した。その後同様に追加

免疫を行い、その 2 週間後に赤痢アメーバを肝臓内、または盲腸内に投与した。効果判定は、前者では肝臓瘍の重量で、後者では糞便中の特異抗原を *E. histolytica* II キットによって定量して行った。

(6) Igl 発現量の比較と抗原性

赤痢アメーバの Igl2(EhIgl2) と *E. dispar* の Igl1(EdIgl1)、Igl2(EdIgl2) について、上記同様シグナル配列を除く全長の組み替え蛋白を大腸菌で作成し、精製した。また、*E. histolytica*、*E. dispar* のそれぞれの二種の Igl 遺伝子に特異的な部分のプライマーと SYBR Premix Ex Taq を用いて real-time RT-PCR を行い、発現量を比較検討した。これらの組み替え蛋白の抗原性を赤痢アメーバ症患者血清との反応により解析した。

(7) 他の赤痢アメーバ株の Igl 遺伝子クローニングによる多型性解析

赤痢アメーバの DKB、HB301、H-303 等の株より Igl 遺伝子を、HM-1 株の遺伝子に基づいたプライマーにより PCR 増幅し、塩基配列を決定した。

(8) アメーバの GGT-1 の解析

ゲノムデータベースより相同検索により、Ras 蛋白の機能修飾に関わる赤痢アメーバのゲラニルゲラニル転移酵素-I の N 末と C 末の配列を得て、プライマーを設計し、cDNA ライブラリーをテンプレートとして PCR 増幅し、続いて増幅された断片のクローニングを行った。組み替え蛋白は大腸菌を用いて作成し、酵素活性は Ras 蛋白へのゲラニルゲラニルピロリン酸等の取り込みによって測定した。これにより各種阻害剤の 50% 阻害濃度を検索した。

(9) アメーバ感染の化学的予防に関わる薬剤標的の開発

前年度に引き続いて、基本的には *E. invadens* をモデルとして、cytochalasin や cysteine protease 阻害剤、PKC 阻害剤等のアメーバ脱嚢、脱嚢後発育に対する阻害効果を検討した。また、アメーバの特異的なアミノ酸代謝機構の検討を通

して、哺乳細胞との差異を明らかにすべく今年度はセリン代謝について研究を実施した。

(10) アメーバの glucose phosphate isomerase(GPI) 蛋白を標的とした多型性解析法の検討

昨年度得られた GPI 遺伝子の塩基配列に基づいて PCR プライマーをデザインし、増幅後アガロース電気泳動で分離、精製後、塩基配列を決定した。この PCR 断片は更にベクターの挿入し、大腸菌 BL21 で発現させ、分離精製を行った。組み替え蛋白の酵素活性は既存の方法によるか、G6P の定量を行って測定した。GPI の電気泳動上の解析に関しては、以前報告した(Nozaki et al., 1990)のと同様、デンブングル泳動によった。

(倫理面への配慮)

各種施設におけるアメーバ感染の疫学調査においては、これまでと同様、十分な注意を全体として払ってきた。まず、疫学調査においては、東京都の施設が対象であったため、東京都の倫理委員会の承認を得たうえで、各施設における対象者、またはその家族に説明の上、同意を取得した。従って調査そのものも、研究協力者である東京都健康安全センターにおいて主に行われている。対象となる施設に、このような調査に関するガイドラインが存在する場合は、それらを遵守して協力を得た。その他の調査研究に関しては、基本的には当該施設の責任者の手により、施設側の主体性の下で行われるようにした。動物実験に関しては、それぞれの研究担当者が所属する部署の動物実験委員会の承認を得たうえで実施した。

C. 研究結果

(1) 施設内感染の実態解明と予防法の検討、確立

2004 年では東京都管理下にある三施設に対して新たに調査を行う事が出来た。その結果、この三施設においては、2003 年度の三施設同様赤痢アメーバ感染者は

検出されなかったが、この内の二施設からは大腸アメーバ、ランブル鞭毛虫、小形アメーバが検出された。病原種であるランブル鞭毛虫に対しては担当医によって投薬が行われた。

2003年までに調査に入った施設の中で、高率な活動性感染（糞便中特異抗原、嚢子共々陽性）が見られ、原因として重度の知的障害による使いじりが考えられた施設ではフラジールとディロキサニドの併用によって治療が行われ、その後の調査で感染が制圧された事が明らかになったが、2004年に至り再度再調査を同様の方法で行った。その結果糞便検査の陽性は検出されず、感染が完全に終息した事が明らかになった。この事は、両剤併用によって感染が制圧できる可能性が高い事を示しているが、このような施設は常時新しい利用者を受け入れているため、入り口での確実な評価が必要と思われた。

(2)弱毒性の赤痢アメーバ株の培養系の作成

一昨年度に28%もの高率なアメーバ特異抗原/嚢子陽性者が検出されたにもかかわらず、全員が無症状で推移している施設を見出し、分離株はPCRでは赤痢アメーバと判定される事を報告したが、更に多数のこの施設からの分離株に関する検討を無症候性持続性感染との関わりで継続実施した。その結果、これまで chitinase, locus 1-2 等の遺伝子型によって分類したサブポピュレーションのうち、どの赤痢アメーバの遺伝子タイプにも該当せず、独立した特定の遺伝子型を全ての分離株が共通して示す事が明らかになった。すなわち遺伝子レベルで見ると、これらの分離株は、赤痢アメーバと判定されるものの定型的な株ではない事が示された。このアメーバの生物学的特徴を更に検索するために、培養系の作成を試みた結果、今回 *E. dispar* 用に開発した yeast extract-iron-gluconic acid-dihydroxyacetone-serum medium (YIGADHA-S medium) を更に改変し、緑膿

菌、グリセロール添加による新しい培地で monoxenic culture として培養、継代維持が可能となった

(3)感染モデルの作成

これまで赤痢アメーバ、*E. dispar* とも *B. fragilis* と共に C3H/HeJ マウスの盲腸に投与すると腸管感染モデルができる事を示したが、*E. dispar* の場合は、7~10日しか感染が持続せず、より適切なモデル系が必要であった。今回は検討の結果、C3H マウスではなく、CBA/JNCrj マウスの盲腸にやはり *B. fragilis* と共に *E. dispar* を注入すると、感染が3週間継続した。これらの系では、アメーバは何れも腸管上皮に存在しており、粘膜下に侵入しないので、持続性感染の良好なモデルとなるものと思われる。

またゴールデンハムスターの cheek pouch で膿瘍を形成する事が出来た。肉眼観察が可能なので、今後も応用域が広がる可能性がある。

(4)抗 Ig1 ヒトモノクロナル抗体の作成と応用

今回は4種類のヒトモノクロナル抗体が作成できた。このうち2種は IgG2 で、EhIg11 に、1種は IgM で EhIg12 に、残りの1種は IgM で EhIg11、EhIg12 のみならず *E. dispar* の2種の Ig1 に対しても反応した。アメーバの接着中和活性は1種の IgG2 を除く全ての抗体に見られた。

(5)組み替え型 Ig1 による感染防御実験

大腸菌で作成した組み替え型 EhIg11 で免疫したマウスでは、肝膿瘍の場合は、平均膿瘍重量にコントロールと差がなかった。一方、盲腸内接種群では、対照の75%で嚢子/特異抗原とも陽性であり、特異抗原定量系の ELISAOD は、4.0、2.69、0.57であった。一方免疫群では OD は 0.31 と 0.05 (陰性) であった。

(6)Ig1 発現量の比較と抗原性

E. dispar での Ig1 の発現量は赤痢アメーバより低い、何れにおいても Ig11 は Ig12 の約7倍の発現が認められた。これらの組み替え蛋白の全ては赤痢アメ

一バ症患者血清と反応する事が確認された。

(7) Igl の多型性解析

二種のアメーバそれぞれの Igl1、Igl2 の多型性の解析を6株の *E. histolytica* 分離株を用いて解析した。その結果、中南米、欧州で分離された株と、アジアで分離された株との間では Igl1 の塩基配列、アミノ酸の一次構造に著しい差異がある事が明らかになった。

(8) アメーバの GGT-1(geranylgeranyl transferase-1; EhGGT-1)の解析

クローニングした EhGGT-1 のβサブユニットは他種生物のサブユニットのとの相同性は非常に低く、22~30%程度であった。大腸菌で発現させた組み替え酵素は30kDaと35kDaの分子の複合体として得られた。また EhGGT-1 に対する抗血清はラットの GGT-1 とは反応せず、基質特異性についても EhGGT-1 とラットの GGT-1 との間には明瞭な差異が見られた。すなわちラットの GGT-1 はヒト H-Ras-CVLS を基質とせず、その変異体のみを基質としたのに対し、EhGGT-1 は両者を基質とした。阻害剤に対する感受性も、ラットの GGT-1 に比較して EhGGT-1 は著しく感受性が低く、この差異は GGT-1 が創薬の標的として有望である事を示唆すると思われた。

(8) アメーバ感染の化学予防に関わる薬剤標的の探索

前年度に引き続いて、化学物質による感染予防法開発のために、脱嚢、脱嚢後発育の阻害剤の探索を行った。その結果、PKC、プロテアーゼの阻害剤等がこれらの過程をブロックする事を見出した。またアクチン細胞骨格の再構成がこの過程で関与している事も見出した。

アメーバのアミノ酸代謝に関連しては、セリン代謝に関連した酵素である D-phosphoglycerate dehydrogenase の検討を行った。その結果、リン酸化代謝経路と非リン酸化代謝経路の両方をアメーバは有している事が明らかになり、哺乳細胞との有意な差異が示された。

(9) アメーバの GPI 蛋白を標的とした多型性解析法の検討

赤痢アメーバの病原性の指標の一つである GPI について、それぞれ異なったザイモデームを有する赤痢アメーバ4株から GPI 遺伝子を分離し、大腸菌 BL21 で発現させた。発現した GPI アイソタイプはそれぞれ1~2種であったが、詳しい解析にはザイモデーム II、II α -、XIV を持つ株から得た独立したアイソエンザイムを用いた。これらの酵素活性は何れも同程度で、GPI として機能する事が示された。しかし基質に対する親和性は異なり、等電点の違いも見出された。アガロースゲル電気泳動では、アメーバの粗抽出液を用いる原法と違い、移動度の低いスミア用のバンドとして検出された。この点は今後検討を必要とする。しかし、今後、労力を要するアイソザイム解析によってアメーバの病原性のタイピングを行う代わりに簡便な遺伝子、または蛋白ベースの解析で同様の解析が可能となるものと思われた。

D. 考察

本研究は1999年の感染症法施行以来、また昨年法律改正以降も急速に届出数が増加しつつある(2005年、11週目で131例)5類感染症のアメーバ症の感染に関わるハイリスクグループのうち、特に行政対応上注意を必要とする諸種施設の利用者における感染の実態の解明と感染予防法の確立に向けた基礎・応用研究を企図したものである。赤痢アメーバはこれまでの本研究班の調査によって、従来考えられた以上に錯綜した形で諸種施設利用者に感染が拡がっており、また臨床的にも多様な性状を呈する事が明らかになってきている。

また、本研究では最近の届出例の中に散見され始めている、異性愛行為による赤痢アメーバ感染についても調査を行っているが、まだ確実な所見を報告する段階に立ち至っていない。

今年度の研究では、平成14、15年度

の研究を継続実施し、特に昨年度より開始された東京都の健康安全研究センターとの共同研究を更に拡大し、これまで調査、制圧を行った施設のフォローアップと共に、新しい施設の調査も行った。その結果、今年度の三施設では赤痢アメーバの感染者は見いだせず、非病原性アメーバとランブル鞭毛虫が検出されたのみであったが、従来の所見と考え合わせてみると、施設間の差異が著しく大きい事が認められる。すなわち、どの施設に対しても単一なアプローチを行う事は殆ど意味がなく、画一的な見方をあらゆる施設に対して行う事の危険性が示唆される。換言すれば、施設により余りにも差異が大きいが故に、各施設の検査を一応行ってみないと現状の把握が出来ないと云う事になる。どの施設でも活動性のアメーバ感染が起こっているのであれば、いわゆるブランク的な薬剤投与も行なえるが、そうではないので検査による状況把握が必要となる。この事は、今後の行政上の対応に対して念頭に置くべき事である。

また、今年度継続フォローアップを行った、高率の活動性感染がみられた施設においては、フラジール、ディオキサニド併用直後と同様、感染が完全に終息した状況が維持されている事が明らかになった。このコンビネーションによる化学療法施設の施設内感染に対する優越性が確認できた事は、今後多施設への応用を考える際に重要となろう。そのためにも、ディオキサニドの認可が待たれる所である。

赤痢アメーバであると PCR によって同定されたものの、それ用に開発された培地では全く発育せず、また蛍光色素を使用した virulence の測定でも、殆ど細胞に対して virulence を示さなかったアメーバは、高率な感染が見られたものの、ほぼ全員が無症候性の持続性感染の状態にあると判断された特定の施設から分離された。この施設からは複数の株が分離されたが、基本的には同一の性状を呈していた。従来、本研究班で開発した

chitinase などの遺伝子の多型性に基づいた同定法でも、定型的な赤痢アメーバのパターンとは違う遺伝子型を示す事が明らかになっている。このアメーバの特質を明らかにする事は、アメーバの無症候性持続性感染のメカニズムを解明するのに寄与すると思われる。今年度は、*E. dispar* の無菌培養用に開発した YIGADHA-S medium を更に改変した培地を使用し、緑膿菌との monoxenic culture を作成するのに成功した。このシステムは今後の応用に寄与するものとする。

アメーバの腸管感染モデルの作成も、赤痢アメーバに関しては、既に具体的な実験に応用できるレベルにまで達した。今年度は従来使用されているマウスとは異なった系統を使用し、*E. dispar* の腸管感染モデルを作成できた。このモデルも、以前のモデルと合わせ、アメーバ感染と発症の機構解明等に応用できる。新しい膿瘍モデルも作成できた。

150-kDa の新規レクチンである Igl の応用研究は今年度も継続して行われた。ワクチンとしての応用には、まだ工夫すべき点が認められるが、診断用にはヒトモノクロナル抗体の作成等、直ちに適用できる成果が得られている。また、複数の分離株を対照として Igl 遺伝子の多型性が認められた事は、今後更に多数の株を対象として検討すべき余地を残しているものの、アジアと中南米/欧州の分離株で違った塩基配列が認められたため、アメーバの病原性のみならず地域差をも反映する同定法の確立の可能性があり、アメーバの伝播、疫学的な特性の検討に応用できるものと考えられた。

また、脱囊、脱囊後発育のメカニズムに基づいた化学的予防策の開発の研究では、これまでの *E. invadens* のモデルによって PKC や PI3K の阻害剤がこのような過程をブロックする事を見出したが、これまで見出した阻害剤と共に、総合的に検討して、リード化合物を同定する時期にきていると考えている。

種々の細胞内情報伝達に重要な役割を果たす G 蛋白の機能発現に必須なプレニル化を触媒する FT については昨年報告したが、今年度はやはり同様の機能を有する GGT-1 について検討を行った。その結果、EhGGT-1 の基質特異性や阻害剤に対する感受性の点で哺乳類の GGT-1 とは大きく異なっている事が示された。今後更に G 蛋白の脱囊、脱囊後発育における役割に関しては、感染予防薬剤開発を可能とするためには、より詳しい検討を必要とするが、少なくともこのプレニル化を阻害する事で、新しい薬剤の開発の可能性が示されると言えよう。

赤痢アメーバの多様性の解析は、これまで chitinase、locus 1-2 など、遺伝子の塩基組成の変異が大きい部分に着目して方法を確立し、例えば同一の施設に分布している株は殆ど全てが同一の遺伝子型を持つ事を明らかにしてきた。しかしながら、この方法はアメーバのフィンガープリントとして、トレーシングには有効であったが、4 種類もの遺伝子を対象とし、なおかつアメーバの病原性とは全く関連がない同定法で、分離株の病原性の指標を評価するには適切ではなかった。従って、無症候性の持続感染の原因を解明すると云った目的のためには、ある程度病原性の指標になり、かつ多型性を示す遺伝子解析が必要であった。このために、病原性の指標となる GPI 蛋白を対象として検討を行ってきたが、異なったザイモデームの株から 3 種のアイソザイム遺伝子を分離できた。しかし、それらの組み替え蛋白はデンプンゲル泳動上単一の明瞭なバンドを示さず、この点を解決するべく、更に検討を行っている段階にある。しかし、この点が解決されれば、これまでの煩雑なアイソザイム分析に代わり、簡便な遺伝子解析による病原性を指標とした多型性解析法が確立できる可能性がある。

E. 結論

今年度は昨年度以来の協力体制に基づ

いて、東京都管理下にある施設を都健康安全センターと協調して調査したが、これまで推測されていたように、赤痢アメーバの施設内感染は施設によって感染の度合いに大きな差異がある事が明らかになった。今後、行政施策上注意を払うべきである。また、無症候性持続感染のみが起こっていると考えられた施設からの分離株は *E. histolytica* と *E. dispar* の中間の性状を示した。今後、詳しく検討する価値があるものと言える。Igl の研究も「ヒト型のモノクロナル抗体の作成など進歩を見せた。化学的予防策の検討では GGT-1 の性質が明らかになり、今後嚢子関連の現象解明、及び新薬開発への応用が期待できる。アメーバの多型性解析では、Igl が地域によって異なると云う予備的データが得られた。病原性に関連した多型性解析では GPI の三種のアイソザイムの組み替え蛋白を得たが、泳動上従来のバンドとは異なった性状を示した。しかし、何れについても今後の進展が期待できると考えられた。

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変わらない。むしろ、調査の拡大によって、施設間の感染状況の差異が大きく、単一のアプローチはとりにくい事が示唆されるようになってきている。入所時の予防策実施を含め、各々の施設の状況に対応したきめ細かい対策が必要と考えられる。

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)

1. Kobayashi S, Imai E, Haghghi A, Khalifa SA, Tachibana H, Takeuchi T : Axenic cultivation of *Entamoeba dispar* in newly designed yeast extract-iron-gluconic acid-dihydroxyacetone-serum medium. J Parasitol (in press).

2. Iwashita J, Sato Y, Kobayashi S, Takeuchi T, Abe T : Isolation and functional analysis of a chk2 homologue from *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Int*, 54, 21-27 (2005).
3. 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*, 53, 247-254 (2004).
4. Tachibana H, Matsumoto N, Cheng X-J, Tsukamoto H, Yoshihara E. : Improved affinity of a human anti-*Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin Fab fragment by a single amino acid modification of the light chain. *Clin Diagn Lab Immunol*, 11, 1085-1088 (2004).
5. Cheng X-J, Yoshihara E, Takeuchi T, Tachibana H : Molecular characterization of peroxiredoxin from *Entamoeba moshkovskii* and a comparison with *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol*, 138, 195-203 (2004).
6. 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*, 42, 1069-1074 (2004).
7. Kumagai M, Makioka A, Takeuchi T, Nozaki T : Molecular cloning and characterization of a protein farnesyl transferase from the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *J Biol Chem*, 279, 2316-2323 (2004).
8. Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T : Different effects of cytochalasins on the growth and differentiation of *Entamoeba invadens*. *Parasitol Res*, 93, 68-71 (2004).
9. Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T : *Entamoeba invadens*: cysteine protease inhibitors block excystation and metacystic development. *Exp parasitol*, 109, 27-32 (2005).
10. 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 conditions. *J Biol Chem*, 279, 16863-16874 (2004).
11. Ali V, Shigeta Y, Hashimoto T, Nozaki T : Molecular and biochemical characterization of D-phosphoglycerate dehydrogenase from *Entamoeba histolytica*: a unique protozoan parasite that possesses both phosphorylated and non-phosphorylated serine metabolic pathways. *Eur J Biochem*, 271, 2670-2681 (2004).
12. Saito-Nakano Y, Yasuda T, Nakada-Tsukii K, Leippe M, Nozaki T : Rab5-associated vacuoles play a unique role in phagocytosis in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *J Biol Chem*, 279, 49497-49507 (2004).
13. Nozaki T, Ali V, Tokoro M : Review, Sulfur-containing amino acid metabolism in parasitic protozoa. *Adv in Parasitol* (in press).
13. 竹内 勤 : アメーバ赤痢. 感染症の診断・治療ガイドライン、日本医師会雑誌 (臨時増刊)、132, 182-185 (2004).
14. 竹内 勤 : 寄生虫感染症. 実践抗生物質・抗菌薬療法ガイド、402-407、文光堂 (2005).
15. 竹内 勤 : 血中赤痢アメーバ抗体価. 臨床検査ガイド、813-817、文光堂 (2005).
16. 竹内 勤 : アメーバ赤痢 (赤痢アメーバ症). 感染症予防必携、第 2 版、

231-233、日本公衆衛生協会 (2005).

17. 竹内 勤：赤痢アマーバ抗体. 臨床検査データブック、488-489、医学書院 (2005).

18. 野崎智義：医師が念頭におくべき輸入感染症の世界分布. 今日の治療指針、1098-1101 (2004).

(2)学会発表 (主任研究者、分担研究者を下線で示す)

1. 小林正規、今井栄子、前田卓哉、竹内 勤：腸アマーバ症に対するメトロニダゾール治療の有効性について. 第 45 回日本熱帯医学会大会、東京 (2004).

2. 小林正規、今井栄子、竹内 勤：赤痢アマーバのマウス腸内感染を助長する腸内細菌の同定とその増殖促進効果について. 第 73 回日本寄生虫学会大会、前橋 (2004).

3. 橋 裕司、程 訓佳、金田良雅、堀木紀行、竹内 勤：赤痢アマーバ組み替え型 Gal/GalNAc レクチン intermediate subunit の血清診断用抗原としての評価. 第 73 回日本寄生虫学会大会、前橋 (2004).

4. 橋 裕司、程 訓佳、小林正規、竹内 勤：*Entamoeba dispar* の 150-kDa システインリッチ表面蛋白の解析. 第 45 回日本熱帯医学会大会、東京 (2004).

5. 牧岡朝夫、熊谷正広、小林正規、竹内 勤：*Entamoeba* の脱嚢・発育に対する DNA ポリメラーゼ阻害剤アフィディコリンの効果. 第 73 回日本寄生虫学会大会、前橋 (2004).

6. 熊谷正広、牧岡朝夫、竹内 勤、野崎智義：赤痢アマーバのゲラニルゲラニル転移酵素 I 型の解析. 第 73 回日本寄生虫学会大会、前橋 (2004).

7. Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T : Molecular cloning and characterization of a protein geranyl geranyltransferase type I from *Entamoeba histolytica*. 14th Japanese-German Cooperative Symposium

on Protozoan Diseases, Dusseldorf (2004).

8. Kumagai M, Makioka A, Takeuchi T, Nozaki T : Molecular cloning and characterization of a protein geranyl geranyl transferase type II from *Entamoeba histolytica*. 14th Japanese-German Cooperative Symposium on Protozoan Diseases, Dusseldorf (2004).

9. 牧岡朝夫、熊谷正広、小林正規、竹内 勤：*Entamoeba* の脱嚢および発育過程に対する DNA ポリメラーゼ阻害剤アフィディコリンの効果. 第 45 回日本熱帯医学会大会、東京 (2004).

10. 熊谷正広、牧岡朝夫、竹内 勤、野崎智義：赤痢アマーバのゲラニルゲラニル転移酵素 I 型の解析. 第 45 回日本熱帯医学会大会、東京 (2004).

11. 牧岡朝夫、熊谷正広、小林正規、竹内 勤：*Entamoeba* の脱嚢・発育に対する DNA ポリメラーゼ阻害剤アフィディコリンの効果. 第 37 回日本原生動物学会大会、山口 (2004).

12. 熊谷正広、牧岡朝夫、竹内 勤、野崎智義：赤痢アマーバのゲラニルゲラニル転移酵素 I 型の解析. 第 37 回日本原生動物学会大会、山口 (2004).

13. 牧岡朝夫、熊谷正広、竹内 勤、野崎智義：赤痢アマーバのゲラニルゲラニル転移酵素 I 型の解析. 第 27 回日本分子生物学会年会、神戸 (2004).

14. 野崎智義：腸管寄生性原虫赤痢アマーバの病原機構解明のためのゲノミクスおよびプロテオミクスアプローチ. 第 12 回分子寄生虫ワークショップ、蓼科 (2004).

15. 所 正治、小林正規、井関基弘、野崎智義：赤痢アマーバにおけるメチオニン代謝の解析. 第 12 回分子寄生虫ワークショップ、蓼科 (2004).

16. Ali V, Nozaki T : Serine metabolic pathways in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. The Awaji International Forum on Infection

and Immunity, Awaji (2004).

17. Ali V, Nozaki T : Biochemical and functional analysis of serine metabolism in *Entamoeba histolytica*. EMBO Workshop on Pathogenesis of Amoebiasis, From Genomics to Diseases, Israel (2004).

別紙4

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編纂者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
竹内 勤	寄生虫感染症	和田 攻、大久保昭行、矢崎義雄、他	実践抗生物質・抗菌薬療法ガイド	文光堂	東京	2005	402~407
竹内 勤	血中赤痢アメーバ抗体価	和田 攻、大久保昭行、矢崎義雄、他	臨床検査ガイド	文光堂	東京	2005	813~817
竹内 勤	赤痢アメーバ抗体	黒川 清、春日雅人、北村 聖	臨床検査データブック	医学書院	東京	2005	488~489
竹内 勤	アメーバ赤痢(赤痢アメーバ症)	山崎修道、井上 榮、牛尾光宏、岡部信彦、他	感染症予防必携 第2版	日本公衆衛生協会	東京	2005	231~233
野崎 智義	医師が念頭におくべき輸入感染症の世界分布	山口 徹、北原光夫	今日の治療指針	医学書院	東京	2004	1098~1101

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	発表年
Kobayashi S, Imai E, Haghghi A, Khalifa SA, Tachibana H, Takeuchi T	Axenic cultivation of <u>Entamoeba dispar</u> in newly designed yeast extract-iron-gluconic acid-dihydroxyacetone-serum medium	J Parasitol		in press	2005
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, <u>Mesocricetus auratus</u>	Parasitol Int	53	247~254	2004
Iwashita J, Sato Y, Kobayashi S, Takeuchi T, Abe T	Isolation and functional analysis of a <u>chk2</u> homologue from <u>Entamoeba histolytica</u>	Parasitol Int	54	21~27	2005
Tachibana H, Matsumoto N, Cheng X-J, Tsukamoto H, Yoshihara E	Improved affinity of a human anti- <u>Entamoeba histolytica</u> Gal/GalNAc lectin Fab fragment by a single amino acid modification in the light chain	Clin Diagn Lab Immunol	11	1085~1088	2004
Tachibana H, Cheng X-J, Masuda G, Horiki N, Takeuchi T	Evaluation of recombinant fragments of <u>Entamoeba histolytica</u> Ga/GalNAc lectin intermediate subunit for serodiagnosis of amebiasis	J Clin Microbiol	42	1069~1074	2004

Cheng X-J, Yoshihara E, Takeuchi T, Tachibana H	Molecular characterization of peroxiredoxin from <u>Entamoeba moshkovskii</u> and a comparison with <u>Entamoeba histolytica</u>	Mol Biochem Parasitol	138	105~203	2004
Kumagai M, Makioka A, Takeuchi T, Nozaki T	Molecular cloning and characterization of a protein farnesyl transferase from the enteric protozoan parasite <u>Entamoeba histolytica</u>	J Biol Chem	279	2316~2323	2004
Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T	Different effects of cytochalasins on the growth and differentiation of <u>Entamoeba invadens</u>	Parasitol Res	93	68~71	2004
Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T	<u>Entamoeba invadens</u> ; cysteine protease inhibitors block the excystation and metacystic development	Exp Parasitol	109	27~32	2005
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 under anaerobic condition	J Biol Chem	279	16863~16874	2004
Ali V, Shigeta Y, Hashimoto T, Nozaki T	Molecular and biochemical characterization of D-phosphoglycerate dehydrogenase from <u>Entamoeba histolytica</u> : a unique protozoan parasite that possesses both phosphorylated and non-phosphorylated serine metabolic pathways	Eur J Biochem	271	2670~2681	2004
Saito-Nakano Y, Yasuda T, Nakada-Tsukui K, Leippe M, Nozaki T	Rab5-associated vacuoles plays a unique role in phagocytosis of the enteric protozoan parasite <u>Entamoeba histolytica</u>	J Biol Chem	279	49497~49507	2004
Nozaki T, Ali V, Tokoro M	Review, Sulfur-containing amino acid metabolism in parasitic protozoa	Adv in Parasitol		in press	2005
竹内 勲	感染症の診断・治療ガイドライン:アメーバ赤痢(赤痢アメーバ症)	日本医師会雑誌	132(増)	182~185	2004

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

研究協力者 鈴木 淳 東京健康安全研究センター・病原細菌研究科主任研究員

研究要旨 1) 赤痢アメーバ施設内集団感染の実態調査：2003年度に調査を終了した東京都知的障害者更生施設3施設に加え、2004年3月より新たに同じ東京都の施設について東京都健康安全研究センターにより調査が行われ、2005年2月現在、知的障害者更生施設3施設、238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。検査した何れの3施設からも赤痢アメーバ感染者は検出されなかったが、2つの施設において腸管寄生原虫である大腸アメーバとランブル鞭毛虫、そしてそのうちの1施設に小形アメーバの感染が見られた。2) 赤痢アメーバ施設内集団感染者に対する対策と治療：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い、メトロニダゾール単独治療では、便弄癖をもつ重度の知的障害者においては再感染を阻止できなかったため、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行われた。その結果、治療後2004年5月と11月に行った2回の施設利用者及び職員全員を対象としたフォローアップ検査からは1年以上経過しても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たものと考えられた。

3) アメーバの多型性解析：2003年度の成果から、独立した遺伝子多型性のパターンをもつ virulence の極めて弱い株は従来の方法では無菌培養が困難であったため、同じく無菌培養が困難で、幾つかの解糖系代謝欠損が見られた *Entamoeba dispar* 無菌培養用にデザインした培地を基に新たな培地のデザインを試みた。その結果、生きた緑膿菌を用いた monoxenic culture で継代培養が可能となり、無菌培養確立のため代謝欠損部位の解析を行っている。4) マウス腸アメーバ症モデル作製：2003年までに赤痢アメーバを *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が、新たに *E. dispar* でも短期間ながらマウス腸に増殖・定着させることができた。

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：東京都の知的障害者更生施設を対象として新たに2004年3月から東京都健康安全研究センターにより調査が開始され、2005年2月現在3施設、238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2施設を対象に、1998年～2004年の6年及び2002年より2004年にかけて3年にわたり、治療とフォローアップを行ってきた。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主になされたが、再感染を繰り返した1施設では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低virulent株1株の生物学的性状検討ため無菌培養法の確立を試みた。4) マウス腸アメーバ症モデルの解析：Haupt et al. (2002) により報告された手法に基づき C3H/HeJ 及び CBA/JNcrj マウスを用いて腸と肝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(D, E, F)からは2003年度に調査した3施設(A, B, C)同様、赤痢アメーバ感染者は検出されず、1施設については検便からは腸管寄生の原虫は全く検出されなかった。しかしながら2施設においては前回の調査でも検出された大腸アメーバとランブル鞭毛虫(E, F)及び小形アメーバ(F)の感染が見られた。

これら原虫感染者の内訳は施設D:腸管寄生原虫; 0/42(0%)、施設E:大腸アメーバ; 2/73(2.7%)、ランブル鞭毛虫; 1/73(1.4%)、施設F:大腸アメーバ; 8/123(6.5%)、ランブル鞭毛虫; 1/123(0.8%)、小形アメーバ; 4/123(3.3%)である。ランブル鞭毛虫の感染者2名に関しては、施設担当医の判断で投薬による治療が行われ、治療後のフォローアップ検査の結果、2名とも陰性であった。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。そして、その後の全ての施設利用者と職員における2年に亘るフォローアップ検査の結果からは、その治療以降、糞便検査陽性者は見られず、赤痢アメーバ感染は終息した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などの生物学的特長の詳細な解析のため無菌培養法の確立を試みた。その結果、幾つかの解糖系代謝欠損が見られた *Entamoeba dispar* 無菌培養用にデザインした培地を基に新たな培地のデザインを行った結果、緑膿菌、グリセロール等を用いた monoxenic culture で継代培養が可能となり、代謝欠損の解析を現在試みている。4) 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、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ていたが、新たにCBA/JNcrjマウスを用いると21日まで感染が成立することが確認された。また、マウス腸アメーバ症モデルを用いたメトロニダゾール治療実験から、経口投与された場合より腹腔投与された場合の方が治療効果が高いことなどの薬物動態も確認できたことから、抗アメーバ薬の作用機序の解明にも

このシステムが応用できるものと考えられた。

D. 考察

1) 2004年度は新たに同じく東京都の知的障害者更正施設の3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、赤痢アメーバの集団感染は現在まで確認されていないが、大腸アメーバ、ランブル鞭毛虫及び小形アメーバの感染は2003年度の調査結果と同様、広範に確認され、施設から施設への腸管寄生原虫感染の伝播の可能性が考えられたことから、赤痢アメーバの集団感染の発生素地が十分あることを再認識した。この結果から改めて、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、再感染を繰り返す便弄者、便食者の感染者に対しては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が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療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極めて弱いため、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、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) Kobayashi S, Imai E, Haghghi A, Khalifa SA, Tachibana H, and Takeuchi T.: Axenic cultivation of *Entamoeba dispar* in newly designed YIGADHA-S medium. In press (2005).
- 2) Iwashita J, Sato Y, Kobayashi S, Takeuchi T, Abe T. Isolation and functional analysis of a chk2 homologue from *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Int*, 54, 21-27, (2005).
- 3) 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*, 53, 247-254, (2004)

2. 学会発表

- 1) 小林正規、今井栄子、前田卓哉、竹内 勤：腸アメーバ症に対するメトロニダゾール治療の有効性について 第45回日本熱帯医学会大会 (2004)
- 2) 小林正規、今井栄子、竹内 勤：赤痢アメーバのマウス腸内感染を助長する腸内細菌の同定とその増殖促進効果について 第73回日本寄生虫学会大会 (2004)

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 橋 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 (Igl) 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。Igl に対するヒトモノクローナル抗体の作製を試み、Igl1 と Igl2 にそれぞれ特異性の高い抗体が得られた。虫体の宿主細胞への接着に対するこれらヒトモノクローナル抗体の効果を *in vitro* 系で検討したところ、抗 Igl1 抗体、抗 Igl2 抗体ともに有意な抑制作用を示した。一方、大腸菌で作製した組換え型の Igl1 についてマウスモデルでワクチン効果を検討したが、明確な防御効果の確認には至らなかった。また、Igl1 の酵母 *Pichia pastoris* による作製を試み、目的の分子量の組換え蛋白質は得られたが、Igl 特有の抗原性は認められなかった。赤痢アメーバと形態的に類似する非病原性の *Entamoeba dispar* について Igl 遺伝子を解析し、赤痢アメーバと比較した。発現量は少ないものの抗原性の類似した *E. dispar* Igl の存在が確認された。赤痢アメーバと *E. dispar* のいずれにおいても、Igl1 の発現量は Igl2 の約 7 倍であった。また、赤痢アメーバ Igl に多型が存在することが明らかになり、株の地理的分布と相関する可能性が示された。

A. 研究目的

わが国の赤痢アメーバ症は報告数が年々増加しており、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。従って、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、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。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、マウスモノクローナル抗体の受動免疫により、あるいは精製蛋白質で免疫することにより、実験動物における肝膿瘍形成を有意に抑制できたことから、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った。本研究課題において、これまでに Igl1 について接着中和エピトープの位置を明らかにするとともに、組換え型 Igl1 の診断用抗原としての有用性を証明している。

今年度は、組換え型 Igl のワクチン効果について検討するとともに、Igl に対するヒトモノクローナル抗体の作製を試みた。また、2 つの Igl について、*Entamoeba dispar* と発現量や抗原性の比較を行うとともに、赤痢アメーバ株間の多型性の有無についても検討した。

B. 研究方法

1. ヒトモノクローナル抗体の作製と *in vitro*

接着中和実験

赤痢アメーバ HM-1:IMSS 株栄養型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カラムクロマトグラフィーにより、native Igl を精製した。そして、Freund の完全アジュバントとともにヒト抗体遺伝子導入マウスの腹腔に免疫した。2 週間後と 5 週間後に精製 Igl を Freund の不完全アジュバントとともに追加免疫し、さらに 3 週間後に Igl のみで免疫し、4 日後に脾細胞をマウスミエローマ細胞と融合させた。パラホルムアルデヒド固定した栄養型虫体を用いた間接蛍光抗体法でスクリーニングし、限界希釈法でクローニングした。ハイブリドーマを SCID マウスの腹腔に接種し、腹水を得た。抗体の特異性を間接蛍光抗体法及びドットプロット法で検討した。ドットプロット法では組換え型 Igl 300 ng をニトロセルロース膜に吸着させ、抗体を反応させた後に、ペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG (H + L) ヤギ抗体とコニカイムノステインによって検出した。精製した抗体で赤痢アメーバ栄養型虫体を前処理した後、CHO 細胞と反応させて抗体の接着中和活性を調べた。

2. 組換え Igl によるマウスの免疫と感染実験

赤痢アメーバ 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 (EhIgl1, aa 14-1088) 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 を refolding したのち、イオン交換クロマトグラフィーによって精製した。精製した EhIgl1 15 µg を Freund の完全アジュバントとともに C3H/HeJ マウスの腹腔に免疫した。4 週間後に同量の EhIgl1 を Freund の不完全アジュバントとともに追加免疫し、その 2 週間後に、赤痢アメーバ栄養型虫体 5×10^5 を肝臓内に、または 7.5×10^5 を盲腸内に接種した。対照群は PBS とアジュバントのみで免疫した。肝

臓内接種群では、8 日後に肝膿瘍の重量を測定した。一方、盲腸内接種群では、8 日後に糞便中の赤痢アメーバ抗原をサンドイッチ ELISA キット *E. histolytica* II (TechLab) で検出した。

3. 酵母による組換え Igl の作製

EhIgl1 およびその C 末端側 (EhIgl1-C, aa 603-1088) をコードする遺伝子断片をベクター pPIC3.5K、pPIC9K、pAO815 (Invitrogen) の EcoRI サイトに組み込み、酵母 *Pichia pastoris* の GS115 株及び KM7 株に導入した。組換え Igl を SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、PVDF 膜に転写し、PBS で 100 倍希釈した赤痢アメーバ症患者血清あるいは抗 EhIgl1 マウスモノクローナル抗体と反応させた。2 次抗体はペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG (H + L) ヤギ抗体またはペルオキシダーゼ標識抗マウス 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。

4. 大腸菌による各 Igl の作製と遺伝子発現量解析

赤痢アメーバの Igl2 と *E. dispar* の Igl1、Igl2 について、シグナル配列を除く全長の組み換え蛋白質 (EhIgl2, EdIgl1, EdIgl2) を EhIgl1 同様に大腸菌で作製し、精製した。また、赤痢アメーバと *E. dispar* の total RNA から cDNA を合成した後、*EhIgl1*、*EhIgl2*、*EdIgl1*、*EdIgl2* それぞれの遺伝子に特異的な配列部分に対応するプライマーと SYBR Premix Ex Taq (Takara) を用いて、ABI PRISM 7700 による real-time RT-PCR を行い、発現量を比較した。

5. 他株 Igl 遺伝子のクローニング

赤痢アメーバの DKB 株、Rahman 株、HB-301:NIH 株、H-303:NIH 株からゲノム DNA を単離した。HM-1:IMSS 株の Igl 遺伝子に基づいてプライマーを作製し、*Pyrobest* DNA polymerase (Takara) を用いた PCR にて全長の遺伝子を増幅した。増幅産物を Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen) を用いて