

クローニングし、塩基配列を決定した。

(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. 抗 Igl ヒトモノクローナル抗体の性状と接着中和活性

4種類の抗 Igl 抗体を作製できた。2種類(共に IgG2)は EhIgl1 に、1種類(IgM)は EhIgl2 に特異性が高く、残りの1種類(IgM)は EhIgl1、EhIgl2 だけでなく EdIgl1 と EdIgl2 にも反応した。1種類の IgG2 抗体をのぞき、異なる特異性を持つ3種類の抗体において、虫体の CHO 細胞への接着に対して中和活性が認められた。

2. 大腸菌で作製した組換え型 EhIgl1 のワクチン効果に関する予備的検討

各実験群 5 匹、計 20 匹のマウスを用いたが、免疫や虫体接種の過程で計 7 匹が死亡した。肝臓内接種では、対照群が 4 匹中すべてに肝膿瘍が形成されたのに対し、EhIgl1 免疫群では 3 匹中 1 匹で膿瘍が認められなかった。しかし、平均膿瘍サイズは、対照群で肝臓の 9.4%、Igl1 免疫群で 8.5%を占め、両者間に差がなかった。一方、盲腸内接種では、対照群の 4 匹中 3 匹において、鏡検と抗原検出 ELISA がともに陽性であった。ELISA OD 値はそれぞれ 4.0、2.69、0.57 と 0.05 (陰性)であった。Igl1 免疫群では 2 匹中 1 匹が陽性で、ELISA OD 値は 0.31 と 0.05 (陰性)であった。

3. 酵母による組換え型 EhIgl1 の調製とその抗原性

全長の EhIgl1 については、3種類の発現ベクターと 2 株の *P. pastoris* のいずれの組み合わせでも、組換え蛋白質の産生を確認できなかった。一方、C 末端側断片 (EhIgl1-C) は目的のサイズの蛋白質産生が認められ、精製することができた。しかし、抗 Igl マウスモノクローナル抗体

とは反応せず、また、赤痢アメーバ症患者血清と健康人血清で反応性に顕著な差が見られず、大腸菌で産生された組換え Igl のような抗原性を確認できなかった。

4. 赤痢アメーバと *E. dispar* における Igl 遺伝子の発現量比較と Igl の抗原性比較

E. dispar においても、赤痢アメーバより低レベルながら Igl の発現が認められた。また、Igl1 の発現量は、*E. dispar* と赤痢アメーバのいずれにおいても Igl2 の約 7 倍であった。EhIgl2、EdIgl1、EdIgl2 の組換え蛋白質をそれぞれ大腸菌で調製できた。赤痢アメーバ症患者血清は EhIgl2 にも、また EdIgl1 と EdIgl2 に対しても反応した。

5. Igl の多型解析

赤痢アメーバ DKB 株 (英国由来) の Igl1 は HM-1:IMSS 株 (メキシコ由来) の Igl1 と 1 アミノ酸残基が異なるだけであり、Igl2 は同一のアミノ酸配列を示した。また、同じく英国由来の Rahman 株の Igl1 は HM-1:IMSS 株と同一配列であり、Igl2 は 1 アミノ酸のみが異なっていた。一方、ビルマ由来の HB-301:NIH 株やベトナム由来の H-303:NIH 株の Igl は、HM-1:IMSS 株 Igl と異なるアミノ酸配列を示し、Igl1 間のホモロジーは約 82%、Igl2 間のホモロジーは約 87%であった。HB-301:NIH 株と H-303:NIH 株の比較では、Igl1 で 1 アミノ酸が異なり、Igl2 は同一であった。すなわち、中米や欧州で単離された株とアジアで単離された株間では、Igl の一次構造に顕著な差が認められた。

D. 考察

抗 Igl ヒトモノクローナル抗体は、*in vitro* 系で虫体の宿主細胞への接着を阻止できたことから、免疫不全者におけるアメーバ症の予防や治療に応用できる可能性があり、今後 *in vivo* 系での効果を検討する必要がある。また、組換え EhIgl1 に関してワクチン効果の予備的検討を行

ったが、対照群に比べて肝膿瘍形成率、盲腸内定着率ともに低くなる傾向が認められた。しかし、統計学的有意差を確認するには至らなかった。免疫後に内臓の癒着が顕著に見られ、虫体接種が困難な個体が多かった。今後、アジュバントや接種部位などについて考慮する必要があると思われた。また、酵母による発現では、組換え蛋白質に Igl 特有の抗原性が認められなかった。理由は現在のところ不明であり、今後さらに検討する必要がある。

赤痢アメーバと形態的に差がないものの非病原性の *E. dispar* において、赤痢アメーバより少ないものの Igl が発現していることが確認された。従って、Igl は *E. dispar* の腸管粘液への接着に必須の蛋白質であると推察される。また、Igl1 と Igl2 の発現量に差があることから、この2種類の Igl の機能に違いがある可能性も考えられる。また、赤痢アメーバの組換え型 Igl が血清診断用抗原として有用であることを既に報告しているが、今後、*E. dispar* の Igl と抗原性の異なる部分に着目することで、より特異性の高い赤痢アメーバ症診断法を確立できると考えられる。

今回、Igl に多型が存在することが明らかになった。赤痢アメーバの多型解析の一つとしてザイモデーム分析があるが、その実施は容易ではなく、また地理的な分布の差をよく反映しているとは言えない。最近、Serine-rich *E. histolytica* protein (SREHP) やキチナーゼなどについて多型が明らかになっているが、主要表面抗原の多型は知られていない。本研究において、Igl の多型は地理的分布と相関する可能性が示唆された。今後、様々な単離株について解析することで、感染経路の解明にも役立つ可能性がある。また、わが国に分布する株特有の抗原性に着目することで、より適切で効果的な免疫診断法や予防法を開発することが可能になると期待される。

E. 結論

赤痢アメーバ 150-kDa レクチン (Igl1 と Igl2) に対するヒトモノクローナル抗体は虫体の宿主細胞への接着を阻止できる。*Entamoeba dispar* にも抗原性の類似した Igl1 と Igl2 が存在するが、赤痢アメーバに比べ発現量は少ない。赤痢アメーバ、*E. dispar* ともに Igl1 の発現量は Igl2 より多い。赤痢アメーバの株間で Igl の多型が存在し、地理的分布と相関する可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Tachibana, H., Matsumoto, N., Cheng, X.-J., Tsukamoto, H. and 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 (6): 1085-1088, 2004

Cheng, X.-J., Yoshihara, E., Takeuchi, T. and Tachibana, H. Molecular characterization of peroxiredoxin from *Entamoeba moshkovskii* and a comparison with *Entamoeba histolytica*. Mol. Biochem. Parasitol., 138 (2): 195-203, 2004

2. 学会発表

橘 裕司、程 訓佳、金田良雅、増田剛太、堀木紀行、竹内 勤. 赤痢アメーバ組換え型 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. 2004 年 4 月

高野淳一郎、成田豊子、藤本浩二、橘 裕司、

寺尾恵治. 輸入カニクイザルからの赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) の分離. 第 51 回日本実験動物学会総会. 2004 年 5 月

橘 裕司、程 訓佳、小林正規、竹内 勤.
Entamoeba dispar の 150-kDa システインリッ
チ表面蛋白質の解析. 第 45 回日本熱帯医学会大

会. 2004 年 10 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

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

分担研究者 牧 岡 朝 夫 東京慈恵会医科大学助教授

研究要旨 赤痢アメーバのヒトへの感染は成熟嚢子の経口摂取によるが、摂取された嚢子の脱嚢・発育により栄養型が形成され感染が成立する。即ち、脱嚢ならびに脱嚢したアメーバ (metacystic amoebae) の発育は感染にとって必須の過程であり、それ故感染予防の重要な標的に成ると考えられる。我々は各種阻害剤を用いて脱嚢・発育機構の解明を行い、その情報伝達に関し、protein kinase C (PKC) 及び phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) の関与を明らかにし、また、アクチン細胞骨格の再構成が起こることも明らかにした。情報伝達系でこれらの分子の上流に位置し、機能制御するのが Ras スーパーファミリー低分子量 G タンパク質 (Ras small GTPase) であり、その機能発現にはプレニル化と呼ばれる翻訳後脂質修飾が必須である。この修飾にはファルネシル化とゲラニルゲラニル化があり、ファルネシル転移酵素 (FT)、ゲラニルゲラニル転移酵素 I 型 (GGT-I) および II 型によって触媒される。これらの酵素は α および β サブユニットからなり、FT と GGT-I の α サブユニットは同一であることが知られている。我々は、赤痢アメーバの増殖と分化における制御分子ならびに標的分子として注目し、先に FT の 1 次構造および組換え酵素の性状を明らかにした。今回は、赤痢アメーバ (Eh) の GGT-I (EhGGT-I) について解析した。クローニングした EhGGT-I の β サブユニットは 337 アミノ酸からなり、他種生物との相同性は 22～30% と低かった。大腸菌で発現させた組換え酵素は 38kD と 35kD の複合体として得られた。抗 EhGGT-I 血清は EhGGT-I と反応したが、ラット GGT-I とは反応せず、抗原性の違いが認められた。ラット GGT-I が、ヒト H-Ras-CVLS を基質とせず、変異体 H-Ras-CVLL のみを基質としたのに対し、EhGGT-I は両方を基質とした。また、EhFT は EhRas-CVVA のみしか基質としなかったのに対し、EhGGT-I は広い基質特異性を示し、Rac ばかりでなく、Ras も基質とすることが明らかになった。哺乳類の GGT-I 阻害剤に対する感受性も、EhGGT-I はラット GGT-I に比べて著しく低く、抵抗性であった。以上の結果から、赤痢アメーバと高等生物 GGT-I の相違が明らかになり、創薬標的分子としての可能性が示唆された。

A. 研究目的

Ras スーパーファミリーの低分子量 G タンパク質 (Ras small GTPase) は細胞内の分子スイッチとして、細胞の増殖、分化、細胞内小胞輸送等の制御に関与している。Ras は情報伝達経路において protein

kinase C (PKC) 及び phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) の上流に位置し、これらの分子の機能発現を制御している。また、Ras small GTPase に属する Rho/Rac はアクチン細胞骨格の再構成に関与していることが明らかになっている。これら Ras small

GTPase の細胞内膜構造への結合および機能発現には、プレニル化とよばれる翻訳後脂質修飾が必須である。プレニル化にはファルネシル基が転移されるファルネシル化とゲラニルゲラニル基が転移されるゲラニルゲラニル化があり、それぞれファルネシル転移酵素(FT)、ゲラニルゲラニル転移酵素 I 型および II 型(GGT-I, GGT-II)により触媒される。これらの酵素は α および β サブユニットからなる 2 量体で、FT と GGT-I の α サブユニットは同一である。Ras および Rho/Rac ファミリーの低分子量 G タンパク質はその C 末に CaaX モチーフ (C はシステイン、a は脂肪族アミノ酸、X は何らかのアミノ酸)をもち、このシステインにプレニル基が結合する。Ras ファミリーでは X は主として S、M、Q で FT によってファルネシル化され、Rho/Rac ファミリーでは X は L、F で GGT-I によってゲラニルゲラニル化される。一方、GGT-II は Rab (CC または CXC モチーフ)に特異的に作用する。我々は赤痢アメーバの増殖と分化における制御因子として、また、化学療法の特標的分子として、プレニル化酵素の解析を行っており、先に、FT の 1 次構造および組換え酵素の性状について報告した。今回は赤痢アメーバの GGT-I について解析した。

B. 研究方法

赤痢アメーバの ゲノム・データベースから相同検索により EhGGT-I の N 末端と C 末端の配列を得、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 を実施し、産物のクローニングを行なった。組換え EhGGT-I は、発現用プラスミド pQE31 を用いて作成した組換えプラスミドを大腸菌に導入して発現させ、N 末端

に付加したヒスチジン・タグを用いて精製した。酵素活性は低分子量 G タンパク質への [3 H]ゲラニルゲラニル・ピロリン酸あるいは [3 H]ファルネシル・ピロリン酸の取り込みによって測定した。SDS-PAGE 及びイムノブロットリングは常法に従って行った。阻害剤の効果については、種々の濃度の阻害剤存在下での酵素活性の低下率から IC₅₀ を求めた。近隣結合法による系統樹は Clustal W と TreeView を用いて作成した。

C. 研究結果

GGT-I の α サブユニットは FT と共通である。EhGGT-I の β サブユニットは、337 アミノ酸からなり、他種生物と 22 から 30% の相同性を示した。系統解析を行なったところ、EhGGT-I の β サブユニットは他種生物 β サブユニットとは同じクレードを形成せず、独自に進化をしたものと考えられた。大腸菌に発現させた組換えタンパク質は、38 kD と 35 kD の複合体として精製された。ウサギを免疫して得た抗 EhGGT-I 血清は EhGGT-I と反応したが、ラット GGT-I とは反応せず、抗原性に違いが認められた。ラット GGT-I がヒト変異型 H-Ras-CVLL を基質とし、野生型 H-Ras-CVLS を基質としないのに対し、EhGGT-I は両方を基質とし、H-Ras-CVLS に対しても H-Ras-CVLL と同等の活性を示した。哺乳類では、Ras small GTPase のうち Ras は FT によってファルネシル化され、Rho/Rac は GGT-I によってゲラニルゲラニル化されるのに対し、EhGGT-I は EhRacA-CLLF、EhRacC-CALL、EhRacG-CSLF のような Rac のみならず、EhRas-CIMF や EhRas-CELL のような Ras もゲラニルゲラニル化した。また、EhGGT-I は EhRas-CELL 及び H-Ras-CVLL に対して

ラット GGT-I に比し、より高いファルネシル化活性を示した。哺乳類の GGT-I 阻害剤 GGTI-287 及び GGTI-297 を用い、EhRas-CELL、H-Ras-CVLL に対する阻害効果を調べた結果、EhGGT-I はラット GGT-I に比し、8 から 500 倍抵抗性であった。

D. 考察

これまで調べられた寄生性原虫 *Trypanosoma*、*Leishmania*、*Plasmodia*、*Toxoplasma*、*Cryptosporidium*、*Giardia* には FT のみで GGT-I は存在せず、この点で赤痢アメーバにおける GGT-I の存在はこの原虫特有の Ras small GTPase の翻訳後脂質修飾における特性を示唆する。赤痢アメーバ GGT-I は他種生物の場合と同様に、その α サブユニットを FT と共有することから、GGT-I の機能特性はその β サブユニットに依存している。GGT-I β の系統解析の結果、赤痢アメーバ GGT-I β は他種生物 GGT-I β とクレードを形成せず、独立して進化したものと考えられた。先に明らかにした赤痢アメーバ FT においては α 及び β サブユニットはそれぞれ独立して同じ速度で共進化し、両サブユニットの系統樹は同様であったが、GGT-I β の系統関係は FT の場合とは明らかに異なっており、これらの酵素の共進化の概念に対しては否定的であった。赤痢アメーバ GGT-I の基質特異性の結果は、CaaX 末端を持つ Ras small GTPase の中の X が L、F、M、A あるいは S を基質に示すことを示し、赤痢アメーバ GGT-I が極めて広範囲の基質特異性を有することが明らかである。これは EhFT が EhRas-CVVA しか基質にしないこととは対照的であり、赤痢アメーバにおいては GGT-I によるグラニルグラニル化が CaaX 末端の Ras small GTPase のほとんどすべて

においてなされていることが示唆される。哺乳類 GGT-I および FT の三次元構造の解析から、CaaX 末端の X 基ならびにその側鎖が結合する‘特異性ポケット’の形状及び容量が基質特異性に重要であることが指摘されている。哺乳類 GGT-I において基質との結合に関与する 12 個のアミノ酸のうち 4 個のアミノ酸が EhGGT-I では異なっており、また、GGPP との結合部位についても 17 個のアミノ酸のうち 5 個でアミノ酸の置換が起こっている。これらの変化によってもたらされた‘特異性ポケット’の変化が EhGGT-I のユニークな基質特異性をもたらし、また GGT-I 阻害剤に対する感受性の変化の要因になっていると考えられた。以上のことから、赤痢アメーバにおいて EhGGT-I は EhFT に比し、より重要な機能を担っていると考えられ、抗アメーバ薬の重要な標的分子になりうることを示唆された。

E. 結論

赤痢アメーバの GGT-I は先に報告した EhFT とは対照的にその基質特異性が広く、CaaX 末端構造をもつ Ras small GTPase の大部分をグラニルグラニル化（またはファルネシル化）することが明らかになった。また、哺乳類 GGT-I とはその基質特異性が明らかに異なり、これは基質結合部位の構造上の違いを反映していることが示唆された。これらの結果から、EhGGT-I は抗アメーバ薬開発の重要な標的分子になりうると思われた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kumagai M, Makioka A, Takeuchi T, Nozaki T (2004) Molecular cloning and characterization of a protein farnesyl transferase from the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. J. Biol. Chem. 279(3), 2316-2323.

2) Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T (2004) Different effects of cytochalasins on the growth and differentiation of *Entamoeba invadens*. Parasitol. Res. 93(1), 68-71

3) Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T (2005) *Entamoeba invadens*: cysteine protease inhibitors block excystation and metacystic development. Exp. Parasitol. 109(1), 27-32.

2. 学会発表

1) 牧岡朝夫、熊谷正広、渡辺直熙、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 年 4 月.

2) 熊谷正広、牧岡朝夫、渡辺直熙、竹内 勤、野崎智義. 赤痢アメ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 年 4 月.

3) 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 年 9 月.

4) Kumagai M, Makioka A, Takeuchi T, Nozaki T. Molecular cloning and

characterization of a protein geranyl geranyltransferase type II from *Entamoeba histolytica*. 14th Japanese-German Cooperative Symposium on Protozoan Diseases. Dusseldorf. 2004 年 9 月.

5) 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 年 10 月.

6) 熊谷正広、牧岡朝夫、竹内 勤、野崎智義. 赤痢アメ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 年 10 月.

7) 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 年 11 月.

8) 熊谷正広、牧岡朝夫、竹内 勤、野崎智義. 赤痢アメ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 年 11 月.

9) 牧岡朝夫、熊谷正広、竹内 勤、野崎智義. 赤痢アメ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 年 12 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 |

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

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、特に進入経路の検討、及び病原性との相関に関する研究

分担研究者 野崎 智義 群馬大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨 我が国に浸淫する赤痢アメーバ症の原因原虫の生物学的多様性を明らかにすることを目的として、赤痢アメーバ原虫の遺伝子或いはタンパク質の多型を利用して分離株のタイピングを可能とする基礎研究を行った。昨年度は、解糖系酵素のひとつであるグルコースリン酸イソメラーゼ (GPI) を用いたタイピングに不可欠である GPI 遺伝子及びアミノ酸配列を決定を行い、予想されたザイモデームパターンが原虫粗抽出液で見られる結果と良く相関することを示した。本年度は、得られた GPI タンパク質の生化学的性状を解明し、将来のタンパク質タイピングを可能とすることを目的として、GPI 組換えタンパク質を作製し、その酵素学的な解析を行った。複数の分離株から得られた3種類のアイソザイムは異なった性質を示し、これにより、将来を時間・労力・経験を必要としたザイモデーム解析を、将来、簡便な遺伝子或いはタンパク質ベースの解析によって代替出来る可能性が示唆された。以上の結果は、我が国に浸淫するアメーバ症の国内への流入経路並びに国内での感染経路を簡便に追跡する分子疫学的手法を開発する基盤として重要であると考えられる。

A. 研究目的

我が国において、赤痢アメーバ症は知的障害者施設において重大な問題を引き起こしている。同時に、これまで知られていたように男性同性愛者においても濃厚な感染を示すだけでなく、近年女性コマーシャルセックスワーカーにも感染が見られるようになり、男性同性愛者だけでなく、一般の性行為感染症としての危険性も指摘され始めている。アメーバ症浸淫の現況、特に施設における濃厚な感染に鑑み、感染経路・流入経路を特定し、感染を未然に防ぐ方法を可能とする科学的手法を確立することが急な課題のひとつとなっている。

赤痢アメーバ症の流行予防の困難な理由の一つは、感染者の多くが顕著な症状を示さない不顕性キャリアとして存在することである。感染者

のほんの一部のみが赤痢アメーバ症を発症することは既知であるが、原虫の病原性の多様性、宿主の免疫・感受性の多様性といった理由付けはもっぱら仮説に過ぎず、科学的な証明はなされていない。赤痢アメーバ原虫の遺伝的な多様性について、我々の研究グループはこれまで様々な重要な研究成果を上げてきた (Ali et al., J Clin Microbiol 40, 4081-4090, 2002; Ali et al., J Clin Microbiol 41, 3748-3756, 2003)。一連の研究により、細胞表面タンパク質をコードするセリンリッチタンパク質、キチナーゼ並びに非翻訳領域の Locus 1-2, 5-6 を対象とした高分離遺伝子タイピング法により、国内外の分離株を詳細に分離することが出来た。従来、歴史的に赤痢アメーバ株のタイピングには培養原虫の粗抽出液を材料として用いた、電気泳動による解糖系酵素のザイモデーム解析が用い

られてきた。しかしながら、上記マーカーとザイモデーム解析との相関は得られていなかった。昨年度赤痢アメーバの分離株より解糖系酵素の中でザイモデーム解析レベルで最も多型性の高いグルコースリン酸イソメラーゼ(GPI)を標的として、そのザイモデーム解析に取って代わる簡便なタイピング法を開発するための研究を開始し、まず、手始めとして4種の株から相同染色体に存在する2種類の遺伝子のコードする遺伝子のうち3種類の GPI タンパク質を大腸菌組換え体として作製し、その酵素的特質を解析した。

B. 研究方法

1. 培養

4種類の代表的ザイモデームを有する株、HM1:IMSS cl6 (zymodeme II), SAW1627 (II α -), SAW755 (XIV), KU2 (XIX)を用いた。培養はDiamondのBI-S-33培地を用いた無菌培養及びRobinson培地を用いた細菌共生培養により行った。

2. 赤痢アメーバ株 GPI 遺伝子の獲得

無菌培養或いは細菌共生培養された細胞は1000g、5分の遠心で沈渣とした。抽出にはキアゲンのQIAamp Mini Stool DNA kitを用いた。

昨年度得られた GPI 遺伝子の核酸配列情報をもとに PCR プライマーをデザインした。プライマーには大腸菌組換え体作成用に制限酵素部位を入れておいた。PCR 反応液は 50 μ l で、0.1 μ g DNA, 1 mM プライマー, 2.5 mM MgCl₂, 0.1 mg/ml bovine serum albumin, 100 mM of each deoxynucleoside triphosphate, 1.5 unit HotStarTaq DNA polymerase を含む。用いた cycling parameter は以下の通り。1) Taq activation at 95°C for 15 min, 2) denaturation at 94°C for 30 s; annealing at 50°C

(SREHP and locus 5-6) or 45°C (chitinase and locus 1-2) for 30 s; extension at 72°C for 1 min; 30 cycles; and 3) extension at 72°C for 10 min。生成された PCR 産物は 2% NuSieve 3:1 agarose (BioWhittaker Molecular Applications)上で電気泳動した。

3. GPI 組換えタンパク質の合成のためのプラスミドの作製

PCR 産物はアガロース電気泳動で分離した後、GeneClean kit II (BIO101)を用いて精製した後、BKL kit (Takara)で処理し、pBluescript(Stratagene)にクローニングした。シーケンス反応は ABI PRISM BigDye terminator cycle sequencing ready reaction kit (PE Applied Biosystems)を用いて行い、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer で解析した。得られたシーケンスは DNASYS software (Hitachi)を用いて解析した。得られた PCR 断片を制限酵素処理し pET15b に挿入し pEhGPI を作製した。

3. GPI 組換えタンパク質の作製

pEhGPI で大腸菌株 BL21(DE3)を形質転換し、1 mM isopropyl b-D-thiogalactoside の存在下で 37°C で 2 時間培養した。細胞を生理的リン酸緩衝液で洗浄した後、超音波破碎し、大腸菌の粗抽出液を得た。組換え蛋白は NTA カラムで精製した。ヒスチジン標識付きタンパク質は酵素アッセイに供するまで緩衝液中で 50%グリセロールとともに-80°C で保存した。

4. 酵素アッセイ及びデンプンゲル電気泳動法

GPI の活性の測定は既存の方法により行った。また、逆反応により生成したグルコース 6 リン酸のを定量した。1 unit の活性は 37°C 1 分間に 1 μ mole のグルコース 6 リン酸を生成する酵素量と定義した。デンプンゲル電気泳動は既存の方法により行っ

た(Nozaki et al. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 83, 525, 1989; Nozaki et al. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 84, 387-388, 1990)。

(倫理面への配慮) 本研究に関わる DNA 組換え実験の許可は当該研究機関にて得られている。

C. 研究結果

1. 赤痢アメーバ GPI アイソエンザイムの発現と精製

我々は上記の4つの赤痢アメーバ分離株からそれぞれ1-2種のアイソタイプを発現させた。いずれも SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で評価する限り95%以上の精製度を示した。またゲル上での見かけ上の移動度は核酸配列から予想された分子量にアミノ末端にヒスチジン標識をしたものとよく一致した。その後の解析にはザイモデーム II, II α , XIV をしめす株から得られたそれぞれ独立した3種類のアイソエンザイム(A, B, C と呼ぶ)だけを用いた。これらのアイソエンザイムのネイティブ(ヒスチジン標識のない場合)タンパク質の等電点は6.9, 7.2, 6.7であった。

2. 赤痢アメーバ GPI アイソエンザイムの活性の証明

>95%の精製度を示す酵素標品を用いて酵素活性の証明を行った。いずれのアイソエンザイムもグルコース6リン酸を間接的に定量するカップリングアッセイによりほぼ同程度の酵素活性を示し、いずれもアクティブな GPI 酵素であることが明らかとなった。一方、準備的な実験結果によれば基質に対する親和性には3つのアイソエンザイム間で有意な差がみられ、等電点の違いとともに、アイソエンザイム間での機能・局在などの相違が示唆された。現在、基

質親和性、阻害剤に対する感受性、基質・生成物によるフィードバック阻害の有無などに関して詳細な酵素学的解析を行っている。

3. 赤痢アメーバ GPI 組換え体を用いたザイモデーム解析

赤痢アメーバ原虫の粗抽出液を用いた結果と本研究により得られた組換えを比較することを目的として、アガロースゲル電気泳動を行った。コントロールである原虫粗抽出液では予想されたバンドが得られたのに対して、組換え酵素では移動度の低いスメア様の活性が見られた。(図1)。従って大腸菌組換え酵素は原虫内で存在しているのと異なる形態を取っていることが示唆された。またヘテロなタンパク質を発現する II α -や XIX の株で存在することが確認された2種類のアイソエンザイムを混合して泳動しても改善されなかった。これらはオリゴマー化、沈殿など様々な可能性が考察され、今後解決すべき問題点が明らかとなった。

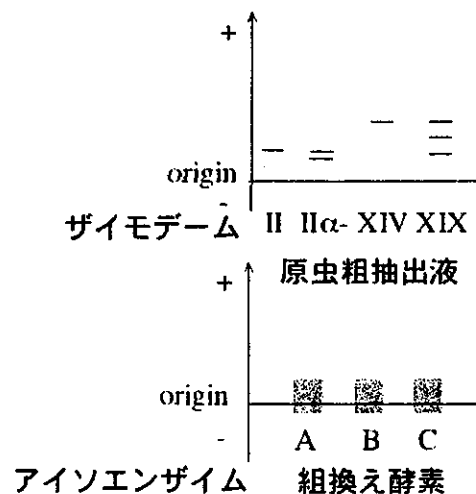


図1 原虫粗抽出液及び組換え酵素

を用いた得られたアイソエンザイム
パターンの schematic diagram

D. 考察

我々は昨年度 4 種類の代表的なザイモデームを示す 4 株から計 6 種類の対立遺伝子を得た。これらの遺伝子群は、予測上の分子量と等電点の異なる 3 種類の GPI タンパク質をコードしていた。予測された等電点から予測するとこれらの結果は原虫粗抽出液を用いたザイモデーム解析の結果と非常によく相関していた。本年度は昨年度予想された GPI アイソエンザイムの生化学的特質を明らかにすることを目的として、大腸菌組換え酵素の作製とその準備的解析を行った。その結果、これらの組換え体が活性をもつタンパク質として作製できることを示した。更に重要なことに、これらのアイソエンザイムは異なった基質親和性を示した。従って、アイソエンザイム間で明瞭な差が存在することが明らかとなった。現在のところこの GPI の酵素学的差異が株間でのエネルギー代謝の相違に反映されているかは不明であるが、解糖経路が赤痢アメーバ原虫のエネルギー代謝にとって中心的な役割をしていることを考慮すれば、GPI の酵素学的相違が原虫の増殖・寄生・病原といった、病気としての赤痢アメーバ症に関与する生物学的特質に関与している可能性が示唆される。

ザイモデーム解析はこれまで Clark や我々が開発・応用した分子タイピング法が存在するまでは、赤痢アメーバ株タイピングの標準的方法であると考えられてきた。今回の我々の研究により世界で初めてザイモデーム解析の分子論的基盤が確立されたということが出来る。第 3 期以降これら一連の結果を応用し、タンパク質レベルでアイソエンザイムの相違に着目して赤痢アメーバ株のタイピ

ングを容易にする方法を構築したい。これにより、PCR・塩基配列の決定・PCR 後の制限酵素処理による RFLP の解析・ザイモデーム解析などが不要で、簡便で安価なタイピング法が開発できることを目指している。

E. 結論

我々の研究の目的は、臨床・疫学研究への応用が期待できる「分子基盤の構築」であるが、本研究が提供した様々なタイピング法は、我が国に浸淫する赤痢アメーバ株の国内への流入経路、国内における感染源の特定に有効であるだけでなく、今後の更なる疫学解析と、国内における感染の予防法の策定にとって極めて重要である。繰り返して述べるなら、本年度の研究により、ザイモデーム解析の分子基盤が確立された。

F. 研究発表

1. 論文発表

英文

- i. Kumagai, M, Makioka, A., Takeuchi, T., and Nozaki, T. (2004) Molecular cloning and characterization of a protein farnesyltransferase from the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.* 279, 2316-2323.
- ii. Ali, V., Shigeta, Y., Tokumoto, U., Takahashi, Y., and Nozaki, T. (2004) 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.
- iii. Ali, V., Shigeta, Y., Hashimoto, T., and Nozaki, T. (2004) Molecular and biochemical characterization of D-phosphoglycerate

- dehydrogenase from *Entamoeba histolytica*: a unique enteric protozoan parasite that possesses both phosphorylated and non-phosphorylated serine metabolic pathways. *Eur. J. Biochem.* 271, 2670-2681.
- iv. Saito-Nakano Y, Yasuda T, Nakada-Tsukui K, Leippe M, Nozaki T. (2004) Rab5-associated vacuoles play a unique role in phagocytosis of the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.* 279, 49497-49507.
- v. Nozaki, T., Ali, V., and Tokoro, M. (2005) Sulfur-containing amino acid metabolism in parasitic protozoa. *Adv. Parasitol. Review* (in press).
- vi. Loftus, B., Anderson, I., Davies, R., Alismark, U. C. M., Samuelson, J., Amedeo, P., Roncaglia, P., Berriman, M., Hirt, R. P., Mann, B. J., Nozaki, T., Suh, B., Pop, M., Duchene, M., Ackers, J., Tannich, E., Leippe, M., Hofer, M., Bruchhaus, I., Willhoeft, U., Bhattacharya, A., Chillingworth, T., Churcher, C., Hance, Z., Harris, B., Harris, d., Jagels, K., Moule, S., Mungall, K., Ormond, D., Squares, R., Whitehead, S., Guillen, N., Gilchrist, C., Stroup, S. E., Bhattacharya, S., Lohia, A., Foster, P. G., Sicheritz-Ponten, T., Weber, C., Singh, U., Mukherjee, C., Petri, W. A. J., Clark, C. G., Embley, T. M., Barrell, B., Fraser, C. M., and Hall, N. (2005). The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature* (in press)
- vii. Okada, M., Huston, C. D., Mann, B. J., Petri, Jr., W. A., Kita, K., and Nozaki, T. (2005) Proteomic analysis of phagocytosis in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Eukaryot. Cell* (in press).
- viii. Saito-Nakano, Y., Loftus, B. J., Hall, N., and Nozaki, T. (2005) The diversity of Rab small GTPases in *Entamoeba histolytica*. *Exp. Parasitol.* (In press).
- 和文
- i. 野崎智義 (2004) 医師が念頭におくべき輸入感染症の世界分布 in 今日の治療指針 医学書院 pp1098-1101.
- ii. 野崎智義 (2004) 寄生虫・原虫で起こる感染症(アメーバ赤痢、マラリア、トキソプラズマ症、ジアルジア症、カラアザール、クリプトスポリジア症、ニューモシスチス・カリニ肺炎) in 家庭医学大全科 法研, pp2756-2763.
- iii. 野崎智義 (2005) 原虫症・寄生虫症 in ネオエスカ 感染症・アレルギーと生体防御 同文書院
2. 学会発表
- i. Vahab Ali, 繁田泰男, 徳本梅千代, 高橋康弘, 野崎智義 (2004) Fe-S cluster assembly in the parasitic protist *Entamoeba histolytica* under anaerobic conditions. 第73回日本寄生虫学会大会 2004年4月3-4日、前橋
- ii. 中野由美子, 岡田麻美, 津久井久美子, ぬで島麻衣, 徳丸文恵, 野崎智義 (2004) 赤痢アメーバのファゴソーム成熟過程における EhRab7 アイソタイプの解析 第73回日本寄生虫学会大会 2004年4月3-4日、前橋
- iii. 津久井久美子, 中野由美子, 岡田麻美, 繁田泰男, 野崎智義 (2004) 赤痢アメーバ Rab7 結合分子 第73回日本寄生虫学会大会 2004年4月3-4日、前橋

- iv. 牧岡朝夫, 熊谷正広, 渡辺直熙, 竹内勤, 野崎智義 (2004) 赤痢アメ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 2004年4月3-4日、前橋
- v. Saito-Nakano, Y., Okada, M., Nakada-Tsukui, K., Mitra, B. N., Nudeshima, M., Tokumaru, F., Shigeta, Y., and Nozaki, T. (2004) Roles of EhRab7 isoforms on phagocytosis in *Entamoeba histolytica*. 第57回日本細胞生物学会大会 2004年5月26-28日大阪
- vi. Nozaki, T. (2004) Pathway for prostaglandin biosynthesis in *Leishmania*: A potential target for new prophylactic and chemotactic strategies. Meeting on *Leishmania* Exoantigens diagnosis, treatment, and vaccine development. Supported by USA Medical Research Unit and Kenya Medical Research Institute, June 1-4, 2004, Mombasa, Kenya
- vii. 岡田麻美, Christopher D. Huson, Barbara J. Mann, William A. Petri, Jr., 北潔, 野崎智義 (2004) 赤痢アメーバにおけるファゴソームタンパク質の株間の比較 第12回分子寄生虫ワークショップ、2004年8月1-4日、蓼科
- viii. 津久井久美子, 中野由美子, 岡田麻美, 野崎智義 (2004) 赤痢アメーバ Rab7A と細胞内 pH の制御 第12回分子寄生虫ワークショップ、2004年8月1-4日、蓼科
- ix. 野崎智義 (2004) 腸管寄生性原虫赤痢アメ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、2004年8月1-4日、蓼科
- x. 所正治, 小林正規, 井関基弘, 野崎智義 (2004) 赤痢アメ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、2004年8月1-4日、蓼科
- xi. Nozaki, T. (2004) Iron-sulfur cluster formation in the enteric protozoan *Entamoeba histolytica*: unique non-redundant nitrogen fixation (NIF)-like system in the anaerobic parasite. The Awaji International Forum on Infection and Immunity, Aug 30-Sept 2, 2004, Awaji, Japan.
- xii. Nozaki, T. (2004) Iron-sulfur cluster formation in the enteric protozoan *Entamoeba histolytica*: unique non-redundant nitrogen fixation (NIF)-like system in the anaerobic parasite. The Awaji International Forum on Infection and Immunity, Aug 30-Sept 2, 2004, Awaji, Japan.
- xiii. Ali, V. and Nozaki, T. (2004) Serine metabolic pathways in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. The Awaji International Forum on Infection and Immunity, Aug 30-Sept 2, 2004, Awaji, Japan.
- xiv. Nozaki, T. (2004) *Entamoeba histolytica* phagosome proteome “Genomics and Biology of the Amitochondriates” Set 18-19, 2004, Woods Hole.
- xv. Ali, V., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. (2004) Roles of the iron-sulfur cluster formation in the enteric protozoan *Entamoeba histolytica*:

- Functional characterization of non-redundant nitrogen fixation (NIF)-like system in the anaerobic parasite. The XVth Molecular Parasitology Meeting, Sept 19-23, 2004, Woods Hole, U.S.A.
- xvi. Beck, D. L., Ready, K., Dragulev, B., Mackery, A., Nozaki, T., Fox, J., Pearson, W., Petri, Jr., W. A. (2004) Expression analysis of a large family of *Entamoeba histolytica* transmembrane kinase proteins with homology to giardia variant surface proteins. The XVth Molecular Parasitology Meeting, Sept 19-23, 2004, Woods Hole, U.S.A.
- xvii. Nakada-Tsukui, K., Ali, V., Saito-Nakano, Y., and Nozaki, T. (2004) *Entamoeba histolytica* Rab7A regulates the transport of a virulence factor cysteine protease via a specific interaction with the retromer-like complex. The XVth Molecular Parasitology Meeting, Sept 19-23, 2004, Woods Hole, U.S.A.
- xviii. 佐藤暖、岡田麻美、繁田泰男、竹尾暁、坪井敬文、野崎智義 (2004) 赤痢アメーバシステインプロテアーゼ及びシステインプロテアーゼ様分子の発現と解析 第 77 回日本生化学会大会 Oct 13-16, 2004, 横浜
- xix. 熊谷正広、牧岡朝夫、竹内勤、野崎智義 (2004) 赤痢アメ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, Oct 15-16, 東京
- xx. 中野由美子、津久井久美子、岡田麻美、ぬで島麻衣、徳丸文恵、繁田泰男、野崎智義 (2004) EhRab7B は赤痢アメーバの病原因子システインプロテアーゼの細胞内輸送に関与する 第 64 回日本寄生虫学会東日本支部大会・第 3 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会 Oct 30-31, 2004.
- xxi. Nozaki, T., Nakada-Tsukui, K., Mitra, B. N., Okada, M., Saito-Nakano, Y., Huston, C. D., Mann, B. J., and Petri, Jr., W. A. (2004) Vesicular trafficking in phagocytosis of *Entamoeba histolytica*. EMBO Workshop on Pathogenesis of Amoebiasis: From Genomics to Disease, Nov 16-20, 2004, Ein Gedi, Israel.
- xxii. Avli, V. and Nozaki, T. Biochemical and functional analysis of serine metabolisms in *Entamoeba histolytica*. EMBO Workshop on Pathogenesis of Amoebiasis: From Genomics to Disease, Nov 16-20, 2004, Ein Gedi, Israel.
- xxiii. 野崎智義 (2004) 腸管寄生性原虫赤痢アメーバの病原機構解明のためのプロテオミクス及びポストプロテオミクスアプローチ 第 27 回日本分子生物学会年会 Dec 8-12, 2004, 神戸
- xxiv. 津久井久美子、中野由美子、Vahab Ali、岡田麻美、徳丸文恵、野崎智義 (2004) 腸管寄生原虫赤痢アメーバ Rab7A の機能解析 第 27 回日本分子生物学会年会 Dec 8-12, 2004, 神戸
- xxv. Okada, M., Huson, C. D., Mann, B. J., Petri, Jr., W. A., Kita, K., and Nozaki, T. (2004) Proteomic analysis of phagosome biogenesis: Comparison of phagosome protein profiles between virulent and avirulent *Entamoeba histolytica* strains. The 39th Joint Conference on Parasitic Diseases. The Japan-United States Cooperative

Medical Science Program, Dec 7-10, 2004, Kyoto.

- xxvi. Nakada-Tsukui, K., Ali, V., Saito-Nakano, Y., Okada, M., and Nozaki, T. (2004) Rab7A small GTPase regulates the transport of cytolitic cysteine protease via a specific interaction with the retromer-like complex in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica* strains. The 39th Joint Conference on Parasitic Diseases. The Japan-United States Cooperative Medical Science Program, Dec 7-10, 2004, Kyoto.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
該当せず。
2. 実用新案登録
該当せず。

実地診療にすぐ役立つ

実践 抗生物質・抗菌薬療法ガイド

感染症別・原因菌別・薬剤別 個別診療のすべて

縮刷版

編集：

和田 攻 東京大学名誉教授

大久保昭行 国立印刷局東京病院顧問

矢崎 義雄 独立行政法人国立病院機構理事長

大内 尉義 東京大学教授

文光堂

寄生虫感染症

竹内 勤

はじめに ■

わが国では寄生虫感染症のうち蠕虫感染の多く、例えば土壌伝播線虫症、住血吸虫症、フィラリア症などがすでに根絶されて今日に至っている。しかし原虫疾患は赤痢アメーバ症、マラリアを始めとして、種々の疾患が新興感染症としてみられたり、疫学相の変化を伴った再興感染症として臨床的にも重要な位置を占めている。

本稿では原虫疾患として赤痢アメーバ症、蠕虫疾患として化学療法に関連して対応が問題となっている多包虫症 alveolar hydatid disease を取り上げ、生物学的側面、疫学的現況、治療の実際などに関して概説する。赤痢アメーバ症の届け出例数は増加傾向にあるし、多包虫症は北海道に存在し、次第に分布域が拡大してきている。いずれも病態によっては治療に困難を覚える寄生虫疾患である。この二つの疾患は2003年に改正された「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」でそれぞれ五類、四類感染症に指定され、全数把握の対象となった¹⁾。したがって赤痢アメーバ症は患者、多包虫症では患者と無症候性病原体保有者の届出が必要となった。

赤痢アメーバ、多包虫の生物学と感染経路 ■

赤痢アメーバとは *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) を意味しており、形態は類似しているが非病原性の *E. dispar* とは異なる²⁾。すなわち赤痢アメーバ症とは病原性である *E. histolytica* の感染による。生活環は栄養型 trophozoite と嚢子 (シスト; cyst) から構成される。感染能力を有するのは成熟嚢子のみである。径 15~19 μm ほどで、当初未成熟の形で糞便中に排出されるが、外界で核分裂が起こり4核の成熟嚢子となる。経口摂取された成熟嚢子は小腸で内部の虫体が出現し、核分裂

と細胞質分割を経て8個の後被囊期栄養型 metacystic trophozoite が形成される。この後被囊期栄養型は盲腸で成熟し、径 30~45 μm 程度で活発にアメーバ状運動をする栄養型虫体となる。この栄養型虫体が病原性を発揮する。栄養型虫体は大腸腔内に生息している限り臨床症状を起こすことはほとんどなく、感染者は原則として無症候性のキャリア asymptomatic cyst carrier となる。発症するためには栄養型虫体が大腸組織内に侵入することが必要条件である。嚢子は大腸腔内で形成されるがその詳しい機構はまだ明らかになっていない。近縁の *E. invadens* を用いた慈恵医大の牧岡らの研究³⁾ が近年精力的に行われているが、種々のシグナル伝達を介した調節機構が関与していることが判明しつつある。

多包虫 alveolar hydatid cyst とは多包条虫 *Echinococcus multilocularis* の幼虫名で中間宿主体内で形成される。本来成虫である多包条虫は終宿主であるイヌ、キツネ (キタキツネ) の小腸に寄生している体長 1.2~3.7 mm 程度の小さな条虫である。片節の数は2~5個であり、近縁の単包条虫 *E. granulosus* とは形態的に鑑別できる。生活環は上記の終宿主と中間宿主である野ネズミなどの齧歯類 (北海道ではエゾヤチネズミ) との間で形成されている。ヒトも外界に排出された虫卵を何らかの要因により経口摂取することで感染し、中間宿主的な存在となっている。ヒトを含む中間宿主が虫卵を経口摂取すると、小腸で内部の六鉤幼虫が脱出して腸壁に侵入し、経門脈的に肝に到達してそこで包虫 hydatid cyst として発育する。多包条虫の包虫を多包虫と呼んでいる。自然界での生活環では食物連鎖に従ってネズミが終宿主に捕食されることでサイクルが成立している。ヒトの場合、多包虫が主に肝で浸潤性の発育をすることが多包虫症の病原機序の根幹をなしている。

赤痢アメーバ症と多包虫症の疫学 ■

赤痢アメーバ症の場合、伝染病予防法の時代には糞便中に感染能力のある嚢子が見出された場合のみ届け出が必要とされていたが、1999年および2003年の法改正以来、診断が確定した患者の届け出が必要となった。すなわち、しばしば嚢子が糞便中に確認されないアメーバ性肝膿瘍の場合も届け出を必要とすることになった。この結果、伝染病予防法が施行されていた1980年代初頭以降、わが国でも本症は増加傾向にはあったものの、年間100例を越えるくらいの症例しか報告されていなかったのが、年間400例前後の症例が記録されるに至った。この原因としては診断法の進歩と、法律の改変との二つが考えられるが、注意を払わなければならないのは、1999年の上記法施行より今日に至るまでやはり届け出数が年々増加傾向を示していることである。1999年には268例、2000年には359例だった届け出数が2002年には457例に達し、2004年には第49週(11月29日～12月5日)でもう534例の届け出がある(国立感染症研究所の感染症動向調査 <http://idsc.nih.go.jp/index-j.html> または東京都感染症週報 www.tokyo-eiken.go.jp/IDSC/ を参照されたい)。このような傾向がすべて上記の二つの要因によるのかどうか現時点では明らかではない。また異性愛行為で感染したと思われる症例も記載されており、今後注目すべき事例であると考えられる。

わが国の赤痢アメーバ感染の危険因子には男性同性愛行為、開発途上国への旅行、および施設内での集団生活があげられる。わが国では筆者らの以前の調査で欧米と異なって同性愛者には病原性である *E. histolytica* の高率な感染が認められている⁴⁾。また上述のように最近では異性愛行為で感染したと思われる症例も記録されている。またこのためわが国の同性愛者には赤痢アメーバとHIVなどの感染がしばしば合併してみられる。施設内感染は本稿では詳述しないが、異なる公衆衛生的な問題を提起しており⁵⁾、やはり今後の動向に注意すべきである。

多包虫症は分布域が比較的限定されており、北

緯38°以北の寒冷地にみられる。日本以外ではアラスカ、ドイツ、フランス、ロシア、オーストリア、スイス、中国などに分布する。他の欧州諸国からの報告もみられる。わが国では1936年に礼文島出身の28歳の女性が肝腫瘍のため北大病院で手術を受けたのが最初の症例といわれているが、1965年ごろより北海道東部地方から感染者が報告され、分布域の拡大が明らかになった。事実、北海道大学病院の佐藤ら⁶⁾のまとめたところによれば、1987～1989年の15症例のすべては道東に分布し、1990～1992年の27例は主に道東、ついで道南にみられている。これでもわかるように北海道でも分布域は年を追うごとに拡大してきている。しかし現在道東からの新患者の発生はなく、むしろ道央、道南地域に集中してきているといわれている。佐藤らは終宿主であるキツネの分布域の変化が疾患の分布に影響していると推測している。ちなみに北海道における終宿主であるキツネの多包条虫感染率は約18%、主要な中間宿主である野ネズミの包虫保有率は1.4%と推定されており、患者の95%前後はキツネとの接触圏内にいたことが報告されている。また佐藤ら⁶⁾はキツネとほとんど接触がない環境下に居住している患者も見出されていることを指摘しており、キツネの都市部への侵入などを危惧している。

赤痢アメーバ症と多包虫症の臨床像 ■

赤痢アメーバ症の病型は腸アメーバ症 intestinal amebiasis(図1)と腸外アメーバ症 extra-intestinal amebiasis とに大別できる。腸アメーバ症はさらにアメーバ赤痢 amebic dysentery とアメーバ性大腸炎 amebic colitis とに分けることができる。腸外アメーバ症のほとんどすべての病型はアメーバ性肝膿瘍 amebic liver abscess(図2)である。腸アメーバ症の基本的な臨床症状は下痢と腹痛である。発症は通常はゆるやかで、アメーバ赤痢の場合は粘血便を伴う下痢を呈し、1日数回から十数回に達する。好発部位が盲腸なので腹痛は右下腹部のことが多い。この部位の圧痛を訴えることもある。アメーバ性大腸炎の場合は下痢の回数も少なく、性状も粘液便、血便など多様

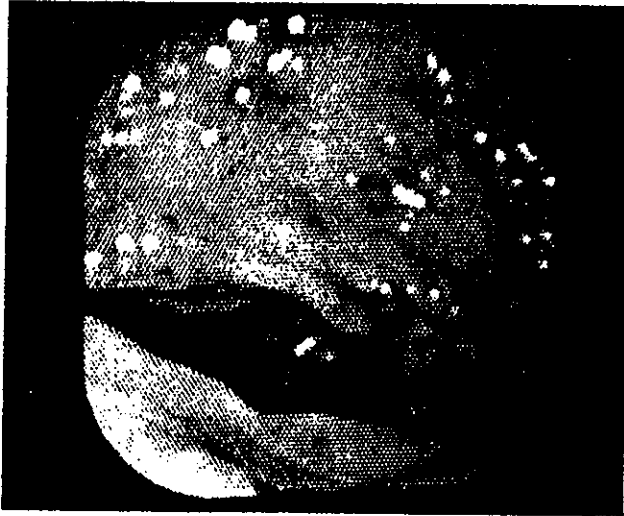


図1 腸アメーバ症の内視鏡所見(慶大病院例)
不規則な小出血斑がみられる。



図2 肝膿瘍(アメーバ性)
多発性の膿瘍巣がみられる。(東京都立北療育医療センター増田博士のご厚意による)



図3 多包虫症の腹腔鏡所見
不規則な病巣の集簇が多数みられる。(千葉大学医学部寄生虫学教室のご厚意による)

であることが多い。一般には発症しても症状は自然に寛解し、不定の期間後に再発する。このような経過を経て、多くの場合、慢性腸炎に移行する。病型にかかわらず全身症状は比較的良好に保たれ、発熱も通常なく、末梢血の多核球増多もみない。しかしときに下痢のため急速に脱水症状に陥る腸アメーバ症劇症型があったり、放置した場合、穿孔から腹膜炎を起こしたり、直腸に病変があつて、皮膚に穿通したりすることもある。

このような経過中にアメーバが血行性に転移して腸外アメーバ症を起こすわけであるが、上述のようにほとんどの場合は肝膿瘍という形で現れる。肝膿瘍は悪心、食欲不振、発熱、肝腫大、右季肋部痛・圧痛などの症状を呈する。末梢血中の多核白血球増多もみられる。また膿瘍が形成される局所によっては黄疸や肝機能障害が強く現れる。肝膿瘍を放置すると肺、脳などに二次的な転移病巣を形成したり、直接進展して横隔膜下膿瘍、肺膿瘍などを形成し、あるいは皮膚に穿通して難治性の病変を形成する。

多包虫症は基本的には包虫が外生出芽で発育するため、いわゆる space occupying lesion (SOL) による症状が主体となる。経門脈的に肝に到達した包虫は定着するとゆっくりと発育し、小さい胞嚢が不規則に集まった硬い腫瘍様の病変を形成する(図3)。この病巣は肉眼的に容易に識別可能で、上述のように外生出芽で浸潤性発育するために、肝実質を破壊しつつ増大する。しかし定着箇所にもよるが、SOLとして症状が発現しはじめるのに数年から十数年を要する。その後、上腹部の膨満感・不快感、上腹部痛、肝腫大が現れ、徐々に進行し黄疸、発熱、肝腫大の進行といった症状を呈するようになる。さらに進行して末期に至ると、閉塞性黄疸、下大静脈閉塞、門脈圧亢進、腹水などの症状を示す。また単包虫症と異なり胚層細胞 germinal cell が静脈を経由して遠隔転移を起こすことがあり、このため肝の悪性腫瘍と同等の取り扱いを必要とする。転移は肺、脳などにみられるが、特に脳転移は急速に臨床症状が発現するため緊急の対応を必要とする。肝の症状がみられない場合でも、佐藤ら⁹⁾によれば15%

くらいが肝門部に、10%程度が下大静脈に、9%程度が横隔膜に浸潤していたと報告されている。発症後に治療を行わなければほとんど全例が致命的になる。

診 断 ■

赤痢アメーバ症の診断に際して重要なのはまず感染の危険因子があるか確認することである。上述のようにわが国では感染は同性愛を含む性的な接触によるか、開発途上国への旅行が通常の場合の危険因子である。施設内感染は広く拡がっているものと思われ、また別の問題を提起している。

診断の基本方針は *E. histolytica* を特異的な方法で同定することであるが、方法の特徴を認識したうえで適用すべきである。また *E. dispar* のみの感染であれば症状を呈することはなく、感染者は無症候性のキャリア asymptomatic cyst carrier として推移することになる。HIV 感染との合併があっても発症しないことが知られているが、*E. histolytica* 感染でもおそらく持続性の無症候性感染があるものと推測されるので、臨床症状の有無は診断の決め手にはならない。具体的な方法として糞便検査による嚢子検出が依然として必要であることは間違いないが、この方法では適当な染色法を併用しても *E. histolytica* と *E. dispar* の鑑別はむずかしい。糞便検査のみで *E. histolytica* と判定できるのは下痢便中に赤血球を捕食している栄養型虫体を見出した場合である。すなわち赤血球を捕食していればそのアメーバは一時期組織内に存在したことを強く示唆していることとなり、組織侵入能力のない *E. dispar* ではないことになる。またアメーバ症の診断に内視鏡下生検がよく行われるが、生検組織内にアメーバ栄養型虫体を見出したら、同様に判断して *E. histolytica* とする。

間接蛍光抗体法、ゲル内沈降反応、間接赤血球凝集反応、ELISA、dot-ELISA など血清学的方法も多用される。*E. dispar* は腸管内に寄生しているのみで感染した場合も抗体産生をほとんど起こさない。したがって明瞭な特異抗体産生がみられたら *E. histolytica* 感染を考えてもよい。し

かし血清学的なデータの評価にあたっては幾つか注意すべき点がある。まず化学療法によって *E. histolytica* の活動性の感染がなくなっても抗体産生が継続することもあることに注意する。また腸アメーバ症と腸外アメーバ症とでは血清学的方法の意義が少し異なっている。すなわち腸外アメーバ症の場合は抗体価も陽性率も高い。画像診断で肝膿瘍を疑い、血清反応が明瞭に陽性であったら、アメーバ性肝膿瘍と診断してもほとんどの場合、問題はない。一方、腸アメーバ症の場合は、活動性の感染があっても抗体価は陽性下限に近く、また陽性率も低い。このような血清反応の性質を考えると、遺伝子診断または特異抗原を定量して診断する方向が今後採用されるようになろう。しかし、*E. histolytica* と *E. dispar* の混合感染の場合、糞便試料をいったん培養してしまうと理由は明らかにはなっていないが、*E. histolytica* と *E. dispar* の比率がかなり大幅に変化してしまう。このことが確実な検査診断の妨げになることがすでに明らかになっている。したがって検査に際しては培養を伴わない方法で糞便中から *E. histolytica* を同定する必要がある¹⁾。現時点でこの目的に利用できるのはモノクロナル抗体による抗原検出か、特異的遺伝子断片の PCR による検出に限られる。モノクロナル抗体を用いた特異抗原検出には種々の方法があるが、キット化され最も広く利用されているのはアメーバ表面の adhesin へのモノクロナル抗体を利用した *E. histolytica* II kit (Techlab, USA) であろう。わが国では市場化されていないが、輸入可能である。PCR に関しては嚢子内の虫体の DNA を抽出し標的としなければならないため多数の方法が報告されている割に良い方法はそう多くはない。筆者らの研究室の Sanuki ら²⁾ はこの点に関して検討を加え、MGL 法によって濃縮したアメーバ嚢子を 1% Triton X-100 中で 90°C にて処理することによって嚢子壁を破壊し、DNA を抽出することに成功した。この方法で抽出した DNA を標的として peroxiredoxin の遺伝子塩基配列に基づいたプライマーを用い、PCR によってアメーバの種を培養を経ないで同定することが可能と