

200400628 B

厚生労働科学研究研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

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

平成 14～16 年度 総合研究報告書

主任研究者 竹内 勤
(慶應義塾大学)

平成 17 年 4 月

目 次

1. 総合研究報告書
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
竹内 勤（慶應義塾大学医学部）…………… 1

2. 研究成果の刊行に関する一覧表（平成 14～16 年度）…………… 19

3. 研究成果の刊行物・別冊…………… 25

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

総合研究報告書

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

わが国で赤痢アメーバ(*Entamoeba histolytica*)感染のハイリスクグループである各種施設利用者を対象として、疫学調査等を含む予防対策開発のため、基礎・応用研究を実施し、以下の結果を得た。まず 2002 年度の対象 1 施設では、抗原定量を含む糞便検査で 28%の陽性率が得られ、活動性の感染がある事が分った。二年次から、東京都健康安全研究センターの協力の下で複数の施設の調査を行ったが、何れにおいても赤痢アメーバの感染はみられず、他の非病原性腸管寄生アメーバ及びランブル鞭毛虫の感染が検出された。モデル施設の協力で、感染予防ガイドラインの改訂、特異抗原定量キットのテストが実施され、何れも有用と思われた。高度の活動性感染があった施設では、フラジール単独では感染が制圧できず、ディオキサニド併用によって終息させる事ができた。この事は、二年間にわたるフォローで確認された。ディオキサニドの有効性は明らかである。Ethidium homodimerを使用したアメーバの virulence のリアルタイム解析法を確立した。*Entamoeba dispar* の完全無菌培養系(YIGADHA-S medium)も完成した。無症候性持続感染が観察された他の 1 施設からの分離株は、PCR にて *E. histolytica* と同定されたものの、上記蛍光色素による評価系で殆ど標的細胞に virulence を示さず、*E. dispar* 用に開発された上記培地を更に改変した培地にて monoxenic culture として確立されたところから、両種アメーバの中間的性質も持つものと思われた。両アメーバの腸管感染系も二種のマウスを用いて確立された。また、膿瘍の肉眼観察が可能な動物モデルも開発できた。150-kDa の新規レクチン(Ig1)については、両種のアメーバに遺伝子が存在し、それぞれ 2 種のアイソタイプがある事が分った。動物モデルにて、組み替え Ig1 のワクチン能を検定したが、有意な成果は得られなかった。しかし、診断には C 末側が全長蛋白と同等の効果を持ち、特に無症候性嚢子保有者のサーベイランスに有用と思われる所見を得た。診断に有用な抗 Ig1 ヒト型モノクロナル抗体作成も作成された。脱嚢、脱嚢後発育を標的にした阻害剤の探索では DNA ポリメラーゼ阻害剤、カルシウムキレート剤、カルモジュリン阻害剤、システインプロテアーゼ阻害剤、PKC 阻害剤、等が阻害作用を持つ事を明らかにした。このうち、アフィディコリンが今後リード化合物として開発できる可能性があるものと思われた。嚢子形成等の情報伝達機構を解明する目的で、G 蛋白の機能発現に関わるプレニル化を触媒するファルネシル転移酵素とゲラニルゲラニル転移酵素の性質を、遺伝子をクローニングし、組み替え蛋白を作成して検討した。その結果、両者とも哺乳細胞の酵素とは基質特異性、阻害剤感受性が異なり、薬剤開発の標的としての価値を認めた。アミノ酸代謝の研究では、メチオニン代謝、セリン代謝での重要な酵素について検討を行った。特に前者におけるメチオニンガンマリアーゼではトリフルオロメチオニンが強い阻害作用を有し、アメーバの増殖阻害能力をも示す事を見出した。赤痢アメーバの遺伝子多型性の解析では、これまでに確立した chitinase 等、4 種類の遺伝子を用いる方法によって、わが国と、タイの分離株との比較検討を行ったが、相同性は低く、わが国のアメーバ株のオリジンとして東南アジアの可能性は低いものと思われた。また、遺伝子多型性解析法の迅速化を試み、最も多型に富んでいる serine-rich *E. histolytica* protein(SREHP)遺伝子を用いて、PCR 産物の塩基配列決定を行わず、産物を制限酵素で処理後、アガロースゲルにて泳動する事によって、信頼度はやや下がるものの、十分に多型性が解析できる事を見出した。また、これら 4 種類の遺伝子を用いる方法は、病原性等、アメーバの生物学的性状に反映していないと思わ

れたので、生物学的性状を念頭においた多型性解析法を作成すべく、アイソザイム分析による病原性解析に使用された glucose phosphate isomerase (GPI) 遺伝子の多型性解析を行った。その結果、赤痢アメーバより 3 種のアイソザイムが見い出され、今後の遺伝子レベル解析の迅速化ができれば、上記 4 種の遺伝子を用いる方法との比較検討が可能となるものと思われた。

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おらず、毎年増加傾向を示してきている。例えば、国立感染症研究所の統計では、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。この増加の正確な理由も判然としていない

しかしながら、このようなアメーバ症に対する対策策定、実施には、わが国ではまだ種々の困難がある。その理由を列挙す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おらず、感染予防の方法がない。

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、知的障害者等を

含むので、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おこない、制圧対策のモデル化を行い、実施する。及び感染予防ガイドラインを作成し試行する。② *E. dispar* の無菌培養系を確立して、鑑別診断法等の作成に応用する。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アメーバの遺伝子レベルで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、脱嚢、脱嚢後発育に関わる新規薬剤の標的検索を行う、等を主要な目的としている。

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

従来の成果に基づいて、各種施設、特に知的障害者の更生施設を対象として調

査を行った。二次次より東京都健康安全研究センターの協力を得られたので、ある程度系統的に調査が可能となった。感染状況の調査はインフォームドコンセントを取得した後に、糞便中の嚢子検出のための顕微鏡的検査、糞便の特異抗原検出(*E. histolytica* IIキットによる)、及び糞便中からの PCR による特異的遺伝子断片検出によって調査を行った。陽性者のある場合は、施設側の手によって治療等を実施した。治療後のフォローアップは本研究班で対応した。また、モデル施設と協同で作成した感染予防のための環境衛生ガイドラインの試行をモデル施設において行い、評価した。

これまで繰り返しての再感染が確認された施設では、適切な化学療法のプロトコルの作成を試み、特にディオキサニド併用の効果を検討した。

また、分離したアメーバの virulence を確実に評価するため、蛍光色素である ethidium homodimer を用いて、アメーバの標的細胞の変化を蛍光倒立顕微鏡(ライツ社)下でリアルタイムで捉える実験系の開発を行った。

(2)弱毒性の赤痢アメーバ、及び *E. dispar* の培養系の作成

無症候性持続感染の状態にある施設の利用者から分離され、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る低毒性のアメーバの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。

E. dispar の培養系の作成は本研究班で開発した yeast extract-iron-gluconic acid-dihydroxyacetone-serum medium (YIGADHA-S medium) を使用し、culture associate を除いても増殖、継代維持が可能な条件の検討を行った。

(3)新規感染モデルの作成

赤痢アメーバと *E. dispar* の腸管感染モデルを C3H/HeJ、CBA/JNCrj マウスを

用いて試みた。基本的には *Bacteroides fragilis* 等の共棲細菌と合わせて盲腸に投与した。また、ゴールデンハムスターの感受性が高い事が知られているので、肉眼的な観察が可能となるような膿瘍モデルの開発も cheek pouch で試みた。

(4)150-kDa 表面レクチン(Ig1)の免疫学的診断とワクチンへの応用の研究

Ig1 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。このレクチンはアメーバの病原性にも関わっている可能性があるため、まず赤痢アメーバと *E. dispar* から遺伝子のクローニングを試み、大腸菌にて組み替え蛋白を発現させ、モノクロナル抗体に対する反応性やエピトープの局在を調べた。更に免疫診断に応用するため、遺伝子の N 末側、中央部、C 末側、及び全長をコードする遺伝子断片をそれぞれ PCR にて増幅し、発現ベクターに組み込み、大腸菌で発現させた。この 4 種類の組み替え蛋白の抗原性は、アメーバ性肝膿瘍、アメーバ性大腸炎、無症候性嚢子排出者の血清を使用し、ELISA で検討した。

また、ヒト型の抗 Ig1 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 Ig1 をモノクロナル抗体 EH 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、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は 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 Ig1 による感染防御実験

Ig1 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、ハムスターの腹腔内に完全アジュバントと共に投与し、その後アメーバ栄養型(HM-1 株)を肝に注射し、肝膿瘍の形成率、重量を計測してワクチン能を評価した。また、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、追加免疫の後、2 週間経過してよりアメーバ(HM-1 株)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、赤痢アメーバ、*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 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 G 蛋白プレニル化の解析

ゲノムデータベースより相同検索により、Ras 蛋白など、いわゆる GTP 蛋白のプレニル化に関わる赤痢アメーバのファルネシル転移酵素、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、続いて産物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 G 蛋白へのファルネシルピロリン酸、あるいは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。また、各種基質の効果も検索し、哺乳細胞の酵素と比較検討した。

(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 inhibitors、あるいはアクチン機能阻害剤、DNA ポリメラーゼ阻害剤、PKC 阻害剤、カルシウムキレート剤、カルモジュリン阻害剤、などの阻害作用を検討した。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研究を、含硫アミノ酸代謝やセリン代謝に関して行った。方法としては、代謝経路上の重要な酵素の遺伝子のクローニングを行い、増幅後組み替え蛋白として分離精製し、酵素学的な解析や、阻害剤の解析を行った。

(10) アメーバ遺伝子の多型性解析法の検討

まず、従来開発した 4 種類の非翻訳領域、すなわち chitinase, serine-rich *E. histolytica* protein (SREHP)、locus 1-2、locus 5-6 の塩基配列に基づいて設計されたプライマーを使用して、PCR にて国内、あるいはタイ等からの分離株を対象として検討を行い、多型性解析を試みた。

また、このような解析法の迅速化のため、SREHP の増幅された遺伝子断片を制限酵素で処理し、アガロース電気泳動にてパターンを調べ、多型性が確認できるかどうかを検討した。

更に、これらの非翻訳領域の遺伝子解析では、アメーバの生物学的な性状に対応させることが不可能なため、病原性の指標とされた幾つかの酵素のなかで、アイソザイムが最も多型性に富んでいる glucose phosphate isomerase (GPI) の遺伝子解析を行い、多型性を検討した。すなわち、赤痢アメーバ HM-1 株のゲノムデータベースから GPI 遺伝子を獲得し、プライマーを合成し、PCR にて増幅後、アガロースで泳動解析した。

更に、この PCR 断片を、塩基配列決定後、ベクターに挿入し、大腸菌で発現させ、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。組み替え GPI の電気泳動上の挙動の解析に関しては、以前報告した(Nozaki et al., 1990)のと

同様、デンプンゲル泳動によった。

(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研究センターにおいて主に行われてきた。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、施設の職員、嘱託医等に説明を行った上で協力を得た。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

初年度には、それまでに化学療法と感染予防ガイドライン試行を合わせて行ってきた施設にフォローアップをまず行った。その結果、フラジール単独でアメーバ感染は終息しているように思えたが、最近のディロキサニドの併用の効果を考えると、恐らく環境対策を主体とした感染予防策の実施も奏効したのではないかと推定される。この年度では、これまでに作成した感染予防ガイドラインの試行に基づく改訂も、モデル施設の看護・衛生担当者と協同で行った。今後、どのように拡大実施して行くかが問題となろう。

新しく調査を実施したのは、2002年度は1施設のみであったが、ここではELISAで67%、特異抗原定量を含む糞便検査で28%という高い陽性率を示した。このデータに基づき、担当医の手で集団治療が行われた。しかし、数回のフォローアッ

プ中、常に陽性者が見い出された。この事は、施設利用者の中に便を手でいじる等の性癖を持ったものが存在していた事等によると思われた。

2002年度に調査を行った上記施設での分離株について、本研究班が開発した遺伝子多型性解析を行ったところ、極めて興味ある結果が得られた。すなわち、この施設の分離株は基本的に同一の遺伝子パターンを示し、またこのパターンは1987年わが国で最初におきた神奈川県施設での集団感染に際して分離されたアメーバと同一のパターンであった。これに基づき、何年かの利用者の移動を調査した結果、1995年に神奈川県施設の当該施設からこの施設に移動してきた利用者が存在する事が判明した。恐らく、施設におけるアメーバ感染は、このように感染者が、新しい施設に移動して行く事が直接の原因であろうと思われた。

2003年度からは東京都健康安全研究センターの協力が得られ、関連施設の調査が行われた。この年度では3施設が対象となったが、赤痢アメーバ感染は見い出されなかった。しかし、同一の感染経路をとる大腸アメーバ、小型アメーバ、ランブル鞭毛虫などの感染が2~8%程度の率で検出された。

2002年度に治療にも関わらず、繰り返し感染が起こった上記1施設では、2003年度に至って、フラジールとディロキサニドを併用することによって感染終息をみた。2003~2004年にかけて、数回の再フォローアップをも実施したが、感染の再発は見られておらず、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。

2004年では前年度同様、都関連の3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3施設においては、2003年度の3施設同様赤痢アメーバ感染者は

検出されなかったが、やはりこの内の 2 施設からは大腸アメーバ、ランブル鞭毛虫、小型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。

また、迅速簡便診断系としての *E. histolytica* II キットの導入は、2002 年よりモデル施設 1 ケ所で開始された。2003 年に状況の把握を行ったところ、数人に対して使用したのみであるが、非常に使い易いと云う印象が述べられた。継続して、今後もモニタリングを行って行く予定である。

(2) アメーバの毒力の評価系の作成と弱毒性の赤痢アメーバ株の培養系の作成

初年度には、蛍光色素である ehtidium homodimer を使用し、CHO 細胞を標的として、アメーバの接着による細胞死によってアメーバの毒力を評価する系を作成した。この系ではアメーバが標的細胞に接着すると瞬間的にこの蛍光色素で細胞が着色され、殆どリアルタイムで細胞死が確認できる事が判明した。

また、YIGADHA-S medium より culture associate を除き、*E. dispar* の完全無菌化に成功した。現在 5 種以上の株を保持している。

2001 年度に高率なアメーバ特異抗原／囊子陽性者(27%)が検出されたにもかかわらず、ほぼ全員が無症候持続感染として推移している施設を見出し、分離株は PCR では *E. dispar* ではなく、赤痢アメーバと判定され、また前述の蛍光色素を用いた毒力の検定でも、殆ど標的細胞に影響を与えなかった事が判明したが、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感染との関わりで継続実施した。その結果、これまで chitinase 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、当初 *E. dispar* 培養に開発した YIGADHA-S medium にて *B. fragilis* との monoxenic culture である程度の増殖を見たが、今回 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 としてより良好な増殖培養、継代維持が可能となった

(3) 腸管感染モデルの作成

これまで *E. histolytica*、*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* を投与すると、感染が 3 週間以上継続した。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。

(4) アメーバの免疫学的同定法の開発とワクチンへの応用

まず、アメーバの鑑別に広く応用可能な *E. dispar* の無菌培養系は上述の YIGADHA-S medium にて当初オートクレーブで殺虫した *Crithidia* 等を culture associate として行っていたが、ようやくこのような associate なしで完全無菌培養が可能となった。培養株によって、維持する際にやや適応性に差異があるが、適応が良くない株もある程度多数のアメーバを継代することで確実に完全無菌培養として維持する事が可能となった。

今回の研究では、本研究班(橘)が独自に発見した新しい 150-kDa 表面レクチン(IgI)について、その診断、感染予防における有効性を検索しているが、2002 年度は、全長と様々な部分(N 末側、中央部、C 末側)の組み替え蛋白を作成して、各種抗体との反応性を比較検討した。また、*E. dispar* から IgI 遺伝子をク

ローニングし、赤痢アメーバと比較した。上述の全長と3種の断片は、Iglで免疫して得たハムスター血清とドットプロットで反応させてみたが、全長が最も反応性が高く、ついでC末側であった。

E. dispar の遺伝子のクローニングの結果、この遺伝子は1,110個のアミノ酸をコードしており、予想分子量は120,886Daであった。この遺伝子の構造に基づいてRT-PCRによって別の遺伝子の塩基配列の決定を行ったが、予想分子量は120,276Daで、両者間にはアミノ酸レベルで76%の相同性があった。赤痢アメーバとは72~73%の相同性を示した。これらの全長、及び蛋白の断片については、アメーバ症患者の血清に対してもELISAで反応性を検索した。その結果、全長蛋白では患者血清の全例が陽性と判定された。しかし、一部に偽陽性が見られた。3種の断片の内ではC末側が最もELISAのODが高く、ついで中央部、N末の順であった。C末側はアメーバ性大腸炎の2例が偽陰性(感度97%)を、マラリアの1例が偽陽性(特異性99%)を示した。無症候性の嚢子保有者にはC末側が全長とほぼ同程度の感度、特異性を示した。

2004年度はヒト型モノクロナル抗体の作成を試みた。結果として、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、EhIgl1に、1種はIgMでEhIgl2に、残りの1種はIgMでEhIgl1、EhIgl2のみならず*E. dispar*の2種のIgl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Iglによる感染防御実験

まず、大腸菌で作成した組み替え型EhIgl1で免疫したハムスター、マウスでは、肝膿瘍の場合、ハムスターのみで膿瘍形成率の低下が免疫群で見られたが、ハムスター、マウスとも膿瘍平均膿瘍重量についてはコントロールと差がなかった。一方、マウスの盲腸内接種群では、対照の75%で嚢子/特異抗原とも陽性で

あり、後者のELISAのOD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)Igl発現量の比較と抗原性

*E. dispar*でのIglの発現量は*E. histolytica*より低いが、何れにおいてもIgl1はIgl2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ー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

2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G蛋白プレニル化の解析

まず最初はプレニル化に関わる酵素のうち、ファルネシル転移酵素(FT)の解析を行った。まず、FT α 、FT β のC末、N末の塩基配列をゲノム・データベースより取得し、PCRで全長を増幅後、組み替え蛋白を作成して性状解析を行った。その結果、アメーバのFT α 、FT β はヒト等の酵素との相同性は22~36%に過ぎず、基質特異性、阻害剤に対する反応性もヒト等の酵素とは異なる事が分かった。

次いで、ゲラニルゲラニル転移酵素(GGT-1)の検討を行った。クローニングしたアメーバ酵素(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の間には明瞭な差異が見られた。すなわちラットのGGT-1がヒト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、この差異のため創薬のターゲットとして有望と思われた。

(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、オリザリン、DNA ポリメラーゼ阻害剤であるアフディコリン、カルシウムキレート剤、カルモジュリン阻害剤、カルシウムチャンネルブロッカー、PKC、PI3Kの阻害剤、及びアクチン機能阻害剤である latrunculin A がこれらの過程をブロックする事を見出した。一方、類似の作用を持つと思われた cytochalasin D が両過程を促進する事も明らかになった。また、4核の嚢子から1核の栄養型に変化する際に遺伝子の再構成が起こる事もアフディコリンを用いた実験で明らかになった。これらの化合物の内、アフディコリンは人体使用が可能と思われ、今後リード化合物としての可能性があるものと思われた。

アメーバのアミノ酸代謝に関連しては、含硫アミノ酸であるメチオニン代謝、及びセリン代謝に関連した酵素の検討を行った。まずメチオニン代謝に関しては、含硫アミノ酸の分解に主要な役割を果たしていると思われた methionine γ -lyase の検討を行った。その結果、2種のアイソザイムが確認され、両者間の相同性は69%であった。また、組み替え蛋白を使用して調べた結果、この酵素はトリフルオロメチオニンによって強く阻害される事が明らかになった。培養系を使用した増殖阻害実験でも、この化合物はアメーバの増殖を強く抑制する事が示された。また、セリン代謝系において重要な 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。この点も、この酵素が新規薬剤の標的となりうるかも知れない事を示している。

(9)アメーバ遺伝子の多型性解析法の検討

本研究においては、まずこれまでに確立した多型性解析法(chitinase、SREHP、locus 1-2、locus 5-6 のPCR解析による)によって、施設内感染のアメーバの特性を調べた。その結果、極めて興味ある事に、特定の施設ではほぼ同一のパターンが見られ、感染が恐らく一人から拡大して行った事が示唆された。特に、2002年に高率の活動性感染を見出した1施設の分離株は、1987年の神奈川でのわが国の最初の施設内アウトブレイクの株と同一のパターンで、これを支持する利用者の移動も裏付けられた。これに反し、同性愛者からの分離株は多様性に富んでおり、トレーシングは不可能であった。

わが国のアメーバの由来を探るため、タイ等からの分離株との比較検討を試みた。その結果、用いた4種の遺伝子の内、locus 5-6 と SREHP に関しては、地域的に大きな差異が見られた。例えば、locus 5-6 に関しては、A5v、A5v/Cv、A8 等が日本の分離株で見られたの対し、タイからの分離株では A7/Cv が高い頻度で検出された。地域間で最も分布パターンが違っていたのは SREHP であった。日本とタイの間では、SREHP 遺伝子に関しては、全く同一のパターンは存在しなかった。

以上のデータの基づいた SREHP の多型性の検索を更に詳しく行った。その結果、タイ分離株については、5種の locus 1-2 が見られたのに対して SREHP は13の異なるパターンがあり、また他の2種の遺伝子よりも変異は、はるかに多く見られた。以上の結果は、SREHP 単独でアメーバのタイピングが可能かも知れない事を示していると思われたので、SREHP 遺伝子を増幅後、AluI で消化した後にアガロース泳動を行い、多型性を検討した。その結果、この方法はシークエンシングによる解析能率の70%程度の高率を示した。

上記の方法は、アメーバのトレーシングには効果を発揮したが、標的が病原性

の指標となる遺伝子ではないため、従来から病原性の指標の一つとされてきた GPI の多型性をも検索した。まず、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 遺伝子全長をクローニングし、塩基配列を決定した。その結果、それぞれの株に 2 種類の対立遺伝子と思われる遺伝子が見い出された。塩基の多型は 8 ケ所で検出され、対立遺伝子の 2 型はザイモデームの異なる 3 株より見い出された。この事は、4 株の内には 3 種類のアイソザイムが存在する事を示している。続いて、GPI 遺伝子の組み替えタンパクを得る目的で、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、等電点の違いも見い出された。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、移動度の低いスメ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と考えられ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。今後、各種施設利用者の社会復帰等が推進されるなか、利用者のケアにより一層注意を払うべき情勢にあり、本研究が福祉・厚生行政に資する所は大きいものと言えよう。

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。

今期の研究では、前期研究の成果に基づき、幾つかの研究を発展継続し、更に 2003 年度より東京都の健康安全研究センターとの共同研究を実施し、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、2003 度から調査を行った複数の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をなさず、逆に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きているのであれば、いわゆるブランケット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。更に加えて、赤痢アメーバの感染がなくても、同様嚢子の経口摂取によって感染が成立する原虫が検出された事は、施設の保健衛生の点で検討すべき部分が残っている事を示唆しており、1 名でも嚢子を排出している感染者が周囲に入れば、容易に感染が拡大して行く事から、保健衛生について注意を怠るべきではない。

また、今年度継続フォローアップを行

った、従来フラジール単独では、恐らく利用者の行動特性のゆえ感染抑圧が不可能で、高率の活動性感染が継続してみられた施設においては、フラジール、ディロキサニド併用後から最終年度のフォローまで感染が見られず、恐らく間違いなく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、ディロキサニドの認可が待たれる所である。

また、今次研究によって改訂された感染予防ガイドラインは、モデル施設においては、フォローの結果も合わせて見れば有効に機能したものと考える。今次研究の最終年度に至り、このガイドラインの試行を行いたいと云う施設もある事から、拡大実施が見込める状況にある。モデル施設における特異抗原検出キットも現場の評価は良好で、何とか市場化にむけた努力をディロキサニド同様行う事が必要かも知れない。

E. histolytica 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 *E. histolytica* のパターンとは違う独立した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。現在、この系を用いて分離されたアメーバの特性を調べている。

アメーバの腸管感染モデルの作成も、*E. histolytica* 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、今次研究の間に達した。2004 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も作成できた。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。更に、肉眼観察が可能な膿瘍モデルが作成された事も、研究の発展に寄与するものと思われた。

150-kDa の新規レクチンである Igl は本研究班によって初めて同定されたもので、その独創性は高い。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、免疫診断には、種々の断片の有効性の検討や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。特に c 末側の断片は無症候性嚢子保有者に対し有効であった事から、特定の集団のサーベイランスに用いられる可能性がある。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、アメーバの地域差を反映する同定法の確立の可能性がある。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、脱嚢、脱嚢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、*E. invadens* のモデルによって多種の情報伝達分子の機能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。特にアフィニコリンに、今後開発に値するかも知れない効果を見出ししている。

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、GGT-1 について検討を行った。その結果、FT、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酵素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の解明には、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たと言える。

E. histolytica の多様性の解析において、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認し、わが国のアメーバ分布の特性を明らかにした事は、有意義であったと思われる。また、わが国のアメーバ分離株の特性は、タイのそれと著しく、特に SREHP の構造において異なっており、わが国の特異なアメーバ分布の様態を示している。

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ブング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

今次研究は、それまでの調査対象施設

のフォローアップと、東京都管理下にある施設を都健康安全研究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き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 G 蛋白の機能発現関わるプレニル化をおこなう酵素群の性質が明らかになり、メチオニン、セリン代謝の重要な酵素の性質も明らかにした。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事が分り、またわが国の分布の特性に関して有意な知見を得た。病原性に関わる GPI の多様性についても検索を行った。

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. Fukao T, Yamada T, Tanabe M, Ota T, Takayama T, Asano T, Takeuchi T, Kadowaki T, Hata J, Koyasu S : Selective loss of gastrointestinal mast cells and impaired immunity in

- PI3K-deficient mice. *Nature Immunol*, 3, 295-304 (2002).
2. Haghghi A, Kobayashi S, Takeuchi T, Masuda G, Nozaki T : Remarkable genetic polymorphism among *Entamoeba histolytica* isolates from a limited geographic area. *J Clin Microbiol*, 40, 4081-4090 (2002).
 3. Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T : Possible role of calcium ion, calcium channel and calmodulin in excystation and metacystic development of *Entamoeba invadens*. *Parasitol Res*, 88, 837-843 (2002).
 4. Makioka A, Kumagai M, Ohtomo H, Kobayashi S, Takeuchi T : Effect of proteasome inhibitors on the growth, encystation and excystation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens*. *Parasitol Res*, 88, 454-459 (2002).
 5. Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T : Inhibition of excystation and metacystic development of *Entamoeba invadens* by the dinitroaniline herbicide oryzalin. *J Parasitol*, 88, 994-999 (2002).
 6. Tokoro M, Asai T, Kobayashi S, Takeuchi T, Nozaki T : Identification and characterization of two isoenzymes of methionine γ -lyase from *Entamoeba histolytica*. *J Biol Chem*, 278, 42717-42727 (2003).
 7. 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. *Parasitol Int*, 52, 169-173 (2003).
 8. 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*, 11, 216-218 (2003).
 9. Tachibana H, Watanabe K, Cheng X-J, Tsukamoto H, Kaneda Y, Takeuchi T, Ihara S, Petri Jr WA : VH3 gene usage in neutralizing human antibodies specific for *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin heavy subunit. *Infect Immun*, 71, 4313-4319 (2003).
 10. Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T : *Entamoeba invadens*; inhibition of excystation and metacystic development by aphidicolin. *Exp Parasitol*, 103, 61-67 (2003).
 11. 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*, 91, 204-208 (2003).
 12. Ali V, Shigeta Y, Nozaki T : Molecular and structural characterization of NADPH-dependent D-glycerate dehydrogenase from the enteric parasitic protist *Entamoeba histolytica*. *Biochem J*, 375, 729-736 (2003).
 13. Haghghi A, Kobayashi S, Takeuchi T, Thammapalerd N, Nozaki T : Geographic diversity among genotypes of *Entamoeba histolytica* field isolates. *J Clin Microbiol*, 41, 3748-3756 (2003).
 14. 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).
 15. 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).
 16. 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).
17. 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).
18. 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).
19. 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).
20. 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).
21. 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).
22. Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T : *Entamoeba invadens*: cysteine protease inhibitors block excystation and metacystic development. *Exp Parasitol*, 109, 27-32 (2005).
23. 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).
24. 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).
25. 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 *Entamoeba histolytica*. *J Biol Chem*, 279, 49497-49507 (2004)
26. Nozaki T, Ali V, Tokoro M : Review, Sulfur-containing amino acid metabolism in parasitic protozoa. *Adv in Parasitol* (in press).
27. 野崎智義, 竹内 勤 : 寄生性原虫における硫黄含有アミノ酸生合成・分解経路—新しい抗原虫感染症薬剤開発標的。蛋白質核酸酵素, 47, 21-29 (2002).
28. 野崎智義 : アメーバ症. 小児科診療, 65, 2132-2135 (2002).
29. 竹内 勤 : 血中赤痢アメーバ抗体価. 臨床検査ガイド, 907-911, 文光堂 (2003).
30. 竹内 勤 : アメーバ症. 薬科微生物学, 丸善, 142-143 (2003).
31. 竹内 勤 : グローバル時代の感染症学—原虫感染症概論. 日本臨床, 61(増), 585-591 (2003).
32. 竹内 勤 : 原虫感染症の最近の動向. 臨床病理レビュー, 121, 156-161 (2003).
33. 竹内 勤 : 寄生虫疾患—赤痢アメー

- バ症. 内科学, 第 8 版, 朝倉書店, 438-440 (2003).
34. 竹内 勤: 赤痢アメーバ症. 内科学, 第 2 版, 文光堂, 2080-2082 (2003).
35. 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—基礎編, 改訂 2 版, メジカルフレンド社, 144-152 (2003).
36. 野崎智義: アメーバ赤痢. 動物由来感染症: その診断と対策. 真興交易, 244-249 (2003).
37. 竹内 勤: 赤痢アメーバ症. 総合臨床, 52 (増), 3748-3756 (2003).
38. 小林正規, 今井栄子, 竹内 勤, 野崎智義, Haghghi 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).
39. 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).
40. 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).
41. 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).
42. 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).
43. 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

1. 小林正規, 清水泉太, 堀 宏治, 今井栄子, 斎藤智也, 前田卓哉, 竹内 勤: わが国における施設内赤痢アメーバ感染に関する疫学調査. 第 71 回日本寄生虫学会大会, ワークショップ「新興・再興感染症の疫学」(2002).
2. Khalifa A, Kobayashi S, Imai E, Takeuchi T: Axenic cultivation of *Entamoeba dispar*; chloroplast extracts promotes the growth. 第 71 回日本寄生虫学会大会 (2002).
3. Takeuchi T: *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba disp*: Unresolved enigma. 北里柴三郎生誕 150 記念国際シンポジウム (2002).
4. 所 正治, 浅井隆志, 小林正規, 田辺将信, 竹内 勤, 野崎智義: 赤痢アメーバのメチオニンガンマリアーゼの生理機能. 第 71 回日本寄生虫学会大会 (2002).
5. 所 正治, 浅井隆志, 小林正規, 田辺将信, 竹内 勤, 野崎智義: 赤痢アメーバメチオニンガンマリアーゼの解析; 腸管内寄生原虫における含硫アミノ酸代謝. 第 75 回日本生化学会大会 (2002).
6. 橋 裕司, 程 訓佳, 金田良雅: 赤痢アメーバ 150-kDa レクチン(Ig1)の組み替え蛋白調製と性状解析. 第 43 回日本熱帯医学会大会 (2002).
7. 中野由美子, 保田友義, 繁田泰男, 竹内 勤, 野崎智義: 赤痢アメーバの Rab 変異発現株を用いたファゴサイトーシスの解析. 第 71 回日本寄生虫学会大会 (2002).
8. Haghghi A, Zaki M, Clark G, Kobayashi S, Takeuchi T, Masuda G, Nozaki T: Highly polymorphic DNA of the *Entamoeba histolytica* isolates from Japan. 第 71 回日本寄生虫学会大会 (2002).
9. Nozaki T: Proteome analysis of phagocytosis in *Entamoeba histolytica*. Amitochondria Protozoan Genome Project; *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis* and *Giardia lamblia*, UK (2002).
10. 野崎智義: 赤痢アメーバ貪食における Rab エフェクター分子の解析. 第 10 回分子寄生虫学ワークショップ (2002).
11. Nozaki T, Saito-Nakano Y, Okada M, Nudeshima M, Shigeta Y, Hughes MA, Huston CD, Mann BM, Petri Jr WA: Isolation and partial characterization of Rab-interacting

- proteins from *Entamoeba histolytica*. 37th Joint Conference on Parasitic Diseases, US-Japan Cooperative Medical Science Program (2002).
12. Haghghi A, Kobayashi S, Takeuchi I, Thammapalerd N, Masuda G, Nozaki T : DNA fingerprinting of *Entamoeba histolytica* isolates. 37th Joint Conference on Parasitic Diseases, US-Japan Cooperative Medical Science Program (2002).
13. Okada M, Saito-Nakano Y, Yasuda T, Nozaki T : Proteome analysis of phagocytosis in *Entamoeba histolytica* isolates. 37th Joint Conference on Parasitic Diseases, US-Japan Cooperative Medical Science Program (2002).
14. 岡田麻実、中野由美子、保田友義、野崎智義 : プロテオーム解析による赤痢アメーバ貪食機構の解析. 第 75 回日本生化学会大会 (2002).
15. Nozaki T : Proteome analysis of phagocytosis in *Entamoeba histolytica*. Forum-Cheju-8 (2002).
16. 中野由美子、保田友義、繁田泰男、野崎智義 : 赤痢アメーバのファゴサイトーシスにおける Rab 機能の特殊性. 第 25 回日本分子生物学会年会シンポジウム (2002).
17. 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クローニングと発現. 第 71 回日本寄生虫学会大会 (2002).
18. 熊谷正広、牧岡朝夫、竹内 勤、野崎智義 : 赤痢アメーバのファルネシル転移酵素の解析. 第 75 回日本生化学会大会 (2002).
19. Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T : Inhibition of excystation and metacystic development of *Entamoeba invadens* by dinitroaniline herbicide oryzalin. Conference on Amoebiasis and the Biology of *Entamoeba histolytica* (2002).
20. Kumagai M, Makioka A, Takeuchi T, Nozaki T : Molecular characterization of farnesyltransferase of *Entamoeba histolytica*. Conference on Amoebiasis and the Biology of *Entamoeba histolytica* (2002).
21. Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T : Possible role of calcium ion, calcium channel and calmodulin in excystation and metacystic development of *Entamoeba invadens*. 10th International Congress of Parasitology (2002).
22. Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T : Inhibition of excystation and metacystic development of *Entamoeba invadens* by aphidicolin. 37th Joint Conference on Parasitic Diseases, US-Japan Cooperative Medical Science Program (2002).
23. Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T : Inhibition of excystation and metacystic development of *Entamoeba invadens* by aphidicolin. 13th Japanese-German Symposium on Protozoan Diseases (2002).
24. Kumagaki M, Makioka A, Takeuchi T, Nozaki T : Molecular cloning of farnesyltransferase of *Entamoeba histolytica*. 13th Japanese-German Symposium on Protozoan Diseases (2002).
25. 牧岡朝夫、熊谷正広、大友弘士、小林正規、竹内 勤 : *Entamoeba* の増殖及び分化へのプロテアソームの関与. 第 43 回日本熱帯医学会大会 (2002).
26. 牧岡朝夫、熊谷正広、竹内 勤、野崎智義 : 赤痢アメーバのファルネシル転移酵素の解析. 第 43 回日本熱帯医学会大会 (2002).
27. 小林正規、Haghghi 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).
28. 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虫効果。第 72 回日本寄生虫学会大会 (2003)。

29. 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)。

30. 橋 裕司、程 訓佳、金田良雅：*Entamoeba dispar* 150-kDa レクチン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)。

31. Bech D, Tachinaba H, Petri Jr WA : Structure and function of the *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc adherence lectin. 103rd Annual Meeting of the American Society for Microbiology (2003)。

32. 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)。

33. Beck DL, Houpt E, Tachibana H, Petri Jr WA : 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)。

34. 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 of Infectious Diseases (2004)。

35. Tachibana H, Chgeng 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)。

36. 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)。

37. 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)。

38. Makioka A, Kumagai M, Takeuchi T, Nozaki T : Molecular cloning and characterization of geranylgeranyl transferase type 1 from *Entamoeba histolytica*. 38th Joint Conference on Parasitic Diseases, US-Japan Cooperative Medical Science Program (2003)。

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

40. Makioka A, Kumagai M, Takeuchi T, Nozaki T : Molecular cloning and characterization of geranylgeranyl transferase type 1 from *Entamoeba histolytica*. 第 76 回日本生化学会大会 (2003)。

41. 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)。

42. 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年会 (2003)。

43. 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ゾームタンパク質の同定. 第 72 回日本寄生虫学会大会 (2003).

44. 中野由美子、岡田麻実、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).

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

46. Ali V, Shigeta Y, Nozaki I : 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).

47. Nozaki I, Okada M, Nakada-Tsutsui K, Shigeta Y, Nudeshima M, Tokumasu F, Sato-Nakano Y : Functional characterization of role of Rab7 isotypes and Rab7-binding protein during phagocytosis. 第 3 回淡路島感染症・免疫フォーラム (2003).

48. Okada M, Saito-Nakano Y, Huston CD, Mann BJ, Nozaki I : Proteomics analyses of phagosome proteins from *Entamoeba histolytica*. 38th Joint Conference on Parasitic Diseases, US-Japan Cooperative Medical Science Program (2003).

49. Saito-Nakano Y, Okada M, Nakada-Tsukui K, Shigeta Y, Nozaki I : Rab5 and 7 play unique roles in phagocytosis of *Entamoeba histolytica*. 14th Annual Meeting of Molecular Parasitology (2003).

50. Nozaki I, 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).

51. 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).

52. 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).

53. 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).

54. 橘 裕司、程 訓佳、金田良雅、堀木紀行、竹内 勤：赤痢アメーバ組み替え型 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 (2004).

55. 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の解析. 第 45 回日本熱帯医学会大会 (2004).

56. 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 (2004).

57. 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 73 回日本寄生虫学会大会 (2004).

58. 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 Symposium on Protozoan Diseases (2004).

59. Kumagai M, Makioka A, Takeuchi T, Nozaki I : Molecular cloning and characterization of a protein geranyl

geranyl transferase type II from *Entamoeba histolytica*. 14th Japanese-German Symposium on Protozoan Diseases (2004).

60. 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 (2004)。

61. 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 (2004)。

62. 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 (2004)。

63. 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 (2004)。

64. 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 (2004)。

65. 野崎智義：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)。

66. 所 正治、小林正規、井関基弘、野崎智義：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)。

67. Ali V, Nozaki I : Serine metabolic pathways in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. The Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji (2004).

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