

施設内感染に係る赤痢アメーバ症等原虫疾患の
感染経路及び予防法の開発に関する疫学研究

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17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18年4月

目 次

1. 総括研究報告及び研究成果の刊行に関する一覧表	
施設内感染に係る赤痢アメーバ症等原虫疾患の感染経路及び予防法の開発に関する疫学研究	
竹内 勤（慶應義塾大学医学部）	1
2. 分担研究報告	
施設内アメーバ感染等の疫学的解析；施設内原虫感染への介入策作成と感染抑止の関連解析；感染原虫株の分離・維持	
竹内 勤（慶應義塾大学医学部）	14
アメーバ等原虫の主要表面抗原多型解析法開発と疫学研究等への応用	
橋 裕司（東海大学医学部）	18
アメーバ等原虫の蛋白網羅的解析法開発と疫学研究等への応用	
牧岡 朝夫（東京慈恵会医科大学）	22
マイクロアレイによるアメーバ等原虫遺伝子の多型解析法確立と疫学研究等への応用	
野崎 智義（群馬大学大学院医学系研究科）	26
アメーバ等原虫の病原因子との相関解析等による持続感染機構の解明；施設内原虫感染の疫学研究	
所 正治（金沢大学大学院医学系研究科）	30
施設内原虫感染等の疫学的解析；施設内感染介入策作成と感染抑止の関連解析；感染株の分離・維持	
鈴木 淳（東京都健康安全研究センター）	37

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

施設内感染に係る赤痢アメーバ等原虫疾患の感染経路及び予防法の開発に関する疫学研究

主任研究者 竹内 勤（慶應義塾大学医学部教授）

研究要旨

わが国における *Entamoeba histolytica* 等、腸管寄生性原虫感染のハイリスクグループである各種施設利用者、及び異性愛者についてフォローアップを含む疫学調査を行い、問題点を把握すると共に感染経路の把握を行い、またモデル施設においては衛生教育等、公衆衛生的介入を試み、感染予防に応用する事を企図した。更にマイクロアレイによる DNA 網羅的解析、表面抗原多型性解析、タンパク網羅的解析による分子多型性解析法の確立を試み、病態形成、感染のトレーシング等に応用する事も試みた。合わせて、施設内原虫感染の大きな特徴である持続性感染の機構の解明も行った。

今年度新しく調査の対象となった施設では *E. histolytica* の感染は見いだせなかったが、腸管寄生の他種の原虫が検出された。これに関連し、ランブル鞭毛虫の遺伝子多型性の検討方法の確立も行った。この調査により、容易にこの種の感染が拡大する素地があることが示された。フォローアップでは、luminal drug の有効性が改めて明確になった。それに伴い、集団治療後少数でも感染者が残れば、容易に感染が再拡大する事も示された。衛生教育を含む、公衆衛生的なアプローチも行われた。この成果は次年度以降評価し、他の所見と合わせガイドライン改訂に盛り込む予定である。更に、小規模な血清疫学研究であるが、女性の間に感染が拡大している事を示唆する結果を得た。この事は、異性愛行為による感染を示唆するものと思われる。今後注意深く検討すべき課題である。持続性のアメーバ感染については特異な生物学的性状を持つアメーバ株の分離・培養、及び動物モデルの作成に関して、有意義な進歩が得られた。すなわち、*E. histolytica* と *E. dispar* の中間的な性状を示すアメーバが存在する事、及びヒトの *E. histolytica* 持続性感染者から分離された *Bacteroides* がマウス腸管感染モデルにおいて有意に持続感染を促進する事を明らかにした。また、アメーバの分子多型性の検討により、表面抗原(Ig1)の多型性がアメーバの地理的分布に対応して 2 種のパターンに大別できる事、DNA マイクロアレイを使用して、HM-1:IMSS の培養株、腸管感染株のトランスクリプトーム解析を行い、7,000 個以上の遺伝子のうち 523 個に発現の変化が見られる事を示した。ProteinChip/SELDI-TOF による網羅的タンパク多型性の検討では、試供株間の殆ど全てで独立したパターンを検出できた。これらの方法は施設内アメーバ感染の病態、感染経路解明に大きく役立つ可能性がある事を示している。Ig1 の組み替えタンパクを用いて、免疫方法を変えた場合、非常に強いワクチン効果が得られる事も明らかになった。

以上、今年度は施設内腸管原虫感染の疫学的研究、また更に種々のアプローチを充実させる分子レベルの技術の進展をみた。異性愛行為によると思われる女性の血清抗体陽性者の増加も注目すべきと考えられた。

研究分担者

橘 裕司・東海大学医学部助教授
 牧岡朝夫・東京慈恵会医科大学助教授
 野崎智義・群馬大学大学院医学系研究科教授
 所 正治・金沢大学大学院医学系研究科専任講師
 鈴木 淳・東京都健康安全研究センター主任研究員

A. 研究目的

わが国におけるアメーバ感染は増加の一途を辿っているが、感染の最も大きな危険を有している集団が諸種の施設利用者である事が既に本研究班の以前行った厚生労働科学研究によって明らかになっている事で、効果的な制圧対策は種々の面で困難視されてきた。また、ここ 1~2 年の研究によって各種施設には、*Entamoeba histolytica* 以外の病原性、非病原性の腸管寄生性原虫の感染が見い出される等、新しい課題が施設内感染については提示されるに至った。今回の研究は、このような成果に基づいて、①各種施設利用者のアメーバを含む腸管原虫感染感染、及び注意を払うべき存在になりつつある異性愛者間の感染に関する疫学調査を、手法の開発と共に、地方自治体と共同して行い、特に前者に関しては、幾つかの施設のフォローアップ調査と共に既に我々が作成した感染制御ガイドラインに基づき衛生教育等、公衆衛生的な介入を行って、感染の抑止を試みる、②感染者の施設でのマッピング等、疫学手法と、特異抗原定量等など免疫学的方法を併用し、施設内原虫感染の経路の解明をモデル施設において行い、評価した上で一般化を試みる、③マイクロアレイによる網羅的遺伝子多型性解析や、原虫の表面抗原の多型性解析、タンパクレベルの網羅的な解析を施行し、総合的に解像力の高い分子疫学手法を作成し、病態形成解明やデータベースとして感染経路のトレーシング、予防策策定等に応用す

る、④施設内アメーバ感染等の大きな特徴である持続性感染のメカニズムを感染モデルでの原虫感染の様態と分離株での病原因子発現状況と関連させて明らかにする、事を研究の主要な目的としている。

本研究が実施されれば、社会復帰を必要としている各種施設利用者における腸管寄生性原虫の感染抑止の途を開き得る。また、衛生教育など、公衆衛生的な介入策の策定は他方面への波及効果も期待できる。新しい分子疫学手法の確立も影響するところが大きいものと期待される。

B. 研究方法

(1)施設内及び異性愛者間の原虫感染の疫学調査

施設内における赤痢アメーバ等、腸管原虫感染の新規対象施設における調査は、東京都管轄下にある施設を対象として実施した。検査方法は糞便検査による腸管寄生原虫の嚢子検出、*E. histolytica* II kit による糞便中の赤痢アメーバ特異抗原検出、及び赤痢アメーバに特異的な遺伝子断片を PCR によって糞便中より検出するという 3 種類の方法を使用して行った。

これまでに調査を行い、赤痢アメーバの感染が高率に認められた施設においては、上述の方法によってフォローアップ調査を行い、感染状況の推移と共に、持続性感染と判断された対象に対する化学療法 of 体系化を、いわゆる luminal drug をメトロニダゾールと併用して試みた。

異性愛者間のアメーバ感染の調査は東京都感染症サーベイランス事業における定点医療機関 1 ケ所の協力を得て、受診者（女性）を対象として ELISA による血清疫学調査を試みた。

上記の新規調査対象施設、及びフォローアップ対象施設においては、以前に作成した施設内アメーバ感染予防ガイドラインの説明と、アメーバの感染経路、疫学、病態などに関する衛生教育を行った。この成果

は明年度の KAP 調査等により解析を予定している。

(2)モデル施設における感染経路特定に関する疫学研究

特にフォローアップ調査の対象となった施設において、アメーバ感染に関して、糞便検査陽性者、糞便内抗原陽性者の分布、推移の解析を経時的に行い、感染がどのように拡大し、また対策実施によって終息に向かったかを解析した。

(倫理面への配慮)

上記(1)、(2)の研究に関しては、調査を実際に行っている東京都健康安全センターにおいて倫理委員会にて承諾を得ており、その指示に従い、インフォームドコンセントを取得した上で行った。職員に対しての衛生教育も、その意義、方法に関して事前にアウトラインを説明した上で行った。

(3)非定型 *E. histolytica* の分離法の改良

従来 *E. histolytica* の培養に使用されて来た TYI-S-33 などに適応しない赤痢アメーバ株の存在が、施設内感染株の調査から明らかになってきたので、*Entamoeba dispar* の無菌培養用に開発した YIGADHA-S 培地を使用して分離を試みた。今回は、現在も通常の *E. histolytica* 用の培地では培養が困難な A65 株を用いて検討した。

(4)腸における *E. histolytica* の持続感染機構の解明

本研究を通して確立されたマウスの腸感染モデルを使用して、*E. histolytica* 持続感染が成立する条件の検索を行った。

(5)施設内ジアルジア感染の解析法の検討

赤痢アメーバ同様、各種施設において感染が拡がっていることが既に本研究班の調査によって示されているランブル鞭毛虫 (*Giardia intestinalis*) について、感染経路の特定化、その他の目的をもって遺伝子レベルの多型性の解析方法の確立を試みた。対象した遺伝子は glutamate dehydrogenase であり、2 種の異なる PCR 法の評価と各種動物から分離されたジアルジアの遺伝子型を

決定し、ヒトへの感染の可能性と今後の感染様態の解明への応用の途を開く事を試みた。18S ribosomal RNA も同様の検討の対象とした。

(6)原虫主要表面抗原多型性の検討と応用

従来より検討を進めて来ているアメーバの主要表面抗原である 150-kDa 表面レクチン(Ig1)遺伝子の多型性を解析し、疫学的な研究に応用する事を試みた。Ig1 遺伝子は全長を PCR 増幅し、産物をクローニング後、塩基配列を決定した。この方法を地理的な背景が異なる複数の分離株に適用し、比較検討を行った。

更に Ig1 の研究の一環として、その感染防御能の検索を行った。組み替え Ig1 の調製は、C 末と N 末のシグナル配列を除く全長を pET19b ベクターに組み込み、大腸菌で発現させ、最終的にイオン交換クロマトで精製した。この組み替えタンパクのワクチン能力はハムスターの実験肝膿瘍モデルを使用して検定した。ハムスターには 50 μ g の組み替え Ig1 をアジュバントと共に 3 回接種し、最終免疫の 1 週後に採血し、その更に 1 週後に *E. histolytica* SAW755CR 株栄養型虫体 500,000 個を肝に直接注入して、1 週後に、膿瘍の形成の有無と肝重量を調べて評価した。この実験系での抗体価測定は間接蛍光抗体法によって測定し、組み替え Ig1 のアメーバ標的細胞接着阻止能力は HM-1 株と CHO 細胞の系を使用して検定した。

(倫理面での配慮)

本研究は研究担当者の所属機関の動物実験委員会の承認を得たうえで、その指針に従って施行された。

(7)タンパクの網羅的解析による多型性検討と応用

E. histolytica のタンパクの網羅的解析のため、ProteinChip/SELDI-TOF (surface enhanced laser desorption/ionization-time of flight)質量分析による複数の分離株の解析を行った。解析した株は HM-1:IMSS など国外で分離された 5 株と、HATAJI など

国内で分離された 5 株である。ProteinChip として弱陽イオン交換体の表面性質を持つ CM10 を使用し、2%CHAPS/5ml TrisHCL/E-64 でアメーバを可溶化し、遠沈後の上清を試料とし、HM-1 株のデータと比較検討した。

(8)DNA マイクロアレイを使用した多型性解析

E. histolytica のトレーシングや、わが国への流入経路、施設内感染の病態解明等を目的として、アメーバの DNA マイクロアレイを作成し、遺伝子レベルの多型性を網羅的に解析する事を試みた。使用株は HM-1:IMSS clone 6 で、これから RNA を Trizol 試薬を用いて抽出した。マイクロアレイとしては、*E. histolytica* の遺伝子データベースに登録された 9435 のタンパク質をコードする遺伝子のうちから重複を含まない 7712 の遺伝子を網羅するアフィメトリックス社のものを使用した。ハイブリダイゼーションには 50ng の RNA から SPIA リニア RNA 増幅システムにより cDNA を増幅し、ハイブリダイゼーションを行った。アレイを洗浄後、ストレプトアビジン-フィコエリスリン系で発光させ、スキャナーでシグナルを検出し、以後の解析に供した。

(倫理面での配慮)

本研究における DNA 組み替え実験の許可は当該研究機関より取得されており、その指針に従って施行された。

C. 研究結果

(1)施設内及び異性愛者間の原虫感染の疫学調査

今年度新規調査の対象となったのは 4 施設、約 450 名の施設利用者である。4 施設の内、1 施設では糞便検査で全く腸管原虫が検出されなかった。しかし、他の 3 施設においては小型アメーバ(2.6%~4.9%)、大腸アメーバ(3.8%~18.2%)、及びランブル鞭毛虫(0.29%)が見い出された。ランブル鞭毛虫は施設担当医により治療が行われた。

フォローアップ調査の対象は 2 施設であ

った。これらの施設では以前の調査で極めて高い感染率が見られ、メトロニダゾールにて繰り返し治療を施設側で行ったが、感染を制御できず、常時高い感染率が見られていた。そこで、2 年前にこのうち 1 施設側と相談の上、ジロキサニドの併用を行った結果、治療後のモニタリングで、感染が殆ど抑圧できた事が明らかになった。その後、1 年目、2 年目である今年度と注意深くモニタリングを特異抗原検出法によって行ったが、新感染者は検出できなかった。しかし、抗体価は高いままで推移している例や、特異抗原陽性者も少数残存しており、今後もモニタリングは必要であろうが、luminal drug の効果が高い事は持続性感染例が多い事と符合している。

最近に至り、感染症の統計でアメーバ症の届出数は増加の一途にあるが、感染経路の一つとして異性愛行為に伴うものが想定されている。従って本研究では、このような疫学的な状況が本当に生じているのかどうかを調べるため、東京都定点医療機関における女性のアメーバ抗体陽性率を検討した。その結果、予備的に調査した 2003 年度、2004 年度では、それぞれ 1.5%、3.7%の ELISA 陽性率であったが、2005 年には 4.8%と上昇傾向を示した。ELISA 陽性と云う所見が直ちに臨床的対応を必要とする事を意味しているわけではないが、異性愛行為によって感染が拡大している可能性を疑わせるに足るデータであると考ええる。

(2)モデル施設における感染経路特定に関する疫学研究

今年度フォローアップ調査の対象となった 2 施設の中、上記以外の 1 施設で糞便検査と特異抗原検出を試み、感染者の分布のマッピングを行った。この施設は 5 ケ所の小規模な寮より構成され、それぞれが地理的には少し離れている。この内男性の寮が 3 ケ所あるが、そのうち 2 ケ所で高い感染率が見られた。殆どの場合、感染者は同室に居住しており、今年度のフォローアップ調

査の結果、メトロニダゾール単独治療により一旦検査が陰性化した者も、同じく治療を受けたものの陰性とならなかった居住者と同室にいた場合、間もなく糞便検査陽性、特異抗原陽性になったことから、極めて少数の特定の居住者が感染源となっている事が推定できた。この男性寮では感染が最近のジロキサニド導入まで、約1年半以上継続して起こっており、メトロニダゾール単独では制圧不能であった。一方女性のみが居住している寮では感染は低頻度であり、特に1ヶ所の寮では全く感染は見られなかったが、もう一方の寮では、頻度は男性の寮よりも低いものの、やはり同室居住者に感染が起こっているのが示された。この結果は、これまでの本研究班のアメーバ分離株の遺伝子多型性の解析結果ともよく符合している。男性に感染が明らかに多かった事も何らかの行動特性が関与しているためと判断できる。

(3)非定型 *E. histolytica* の分離法の改良

以前報告したように、高率の無症候性持続感染が見い出された施設からの分離株(A65株)は極めて興味ある性状を示した。すなわち、遺伝子解析では *E. histolytica* に一致するものの、virulence を全く示さず、かつ *E. histolytica* の無菌培養用に開発され、事実上全ての *E. histolytica* 株の無菌培養に使用されて来た TYI-S-33 培地に全く適応しなかった。しかし一方、非病原種である *E. dispar* の無菌培養に開発された YIGADHA-S medium では、gluconic acid を maltose に置き換え、更に 0.5% glycerol と culture associate として緑膿菌を添加し、酸素濃度や抗生剤により緑膿菌が過度に増殖しないようにしておくことで安定した monoxenic culture として維持可能となった。現在、このシステムにより培養した A65 株の性状を種々の方法で検索している。

(4)腸における赤痢アメーバの持続感染機構の解明

今年度実施したマウスの腸アメーバ症毛

デルにおいて、持続性感染が成立するためには、腸粘膜上皮へのアメーバの安定した接着が必要条件である事を見出した。これは最近指摘されているアメーバが粘膜表層のムチンと結合することが安定した commensal な状態を作り出しているという考え方に一致するが、一方難治性のヒト腸アメーバ症の症例から分離した嫌気性細菌である *Bacteroides fragilis* がアメーバの盲腸上皮接着及び増殖を促進する事を見出した。*B. fragilis* を1日1回、3日間経口投与し、更に感染マウスの糞便から分離し、*Crithidia* と共に培養した *E. histolytica* を CBA マウス盲腸内に投与し、感染後も *B. fragilis* を3-4日おきに、1日1回、計3回投与することで、持続感染率が100%近くに上昇し、1年近く継続している。

(5)施設内ジアルジア感染の解析法の検討

今年度には、アメーバと同様施設内感染が認められ、かつ病原性原虫であるランブル鞭毛虫の遺伝子多型性を検討し、疫学調査に応用する事を企図した。標的としたのは glutamate dehydrogenase(GDH) 遺伝子と 18S ribosomal RNA である。GDH 遺伝子は forward primer として2種類のプライマーを使用した semi-nested PCR と、新しく設計した2種類のプライマー及び従来より使用されている2種のプライマーを用いた nested PCR の二つの方法で解析した。18S ribosomal RNA は480bp断片を増幅するこれまでに使用されて来たプライマーセットを使用した。増幅された断片は1.5%アガロースエチジウムブロマイドゲルによる電気泳動の後でゲルより切り出し、精製後塩基配列の決定を行った。GDH 遺伝子の semi-nested PCR と 18S RNA の PCR による解析は金沢市内のイヌから分離した10株、ネパールの学童からの20株、インドネシアの乳幼児からの16株、ルーマニアでの集団発生からの2株等、合計40株を解析した。この結果、11検体では増幅断片を得る事が出来なかったが、その他の株の遺伝子型を決定できた。注意

すべきと思われたのは、インドネシアのヒト分離株よりイヌ・ネコ特異型とされてきた Assemblage C と D が検出された事である。また、この解析では sub genotype の同定まで幾つかの株では可能となったが、各 Assemblage の reference strain と 100% の相同性を示す sub genotype は殆ど見られず、逆にトレーシングに有用かも知れない事を示唆した。

2 セットの GDH に対するプライマーを用いた nested PCR は、少数の動物由来の株に応用されたが、増幅断片取得の頻度も高く、効率的に分離株の Assemblage を決定する事が出来た。

(6) 原虫主要表面抗原多型性の検討と応用

今年度は地理的に異なる *E. histolytica* 分離株の 150-kDa 表面レクチン(Ig11, Ig12) の遺伝子多型性を検討し、トレーシングに応用できるかどうかの検討を行った。その結果、reference strain である HM-1:IMSS と 99~100% の相同性を示す 4 株と、85~87% の相同性しか示さない 6 株に分類され、地理的分布を見ると、相同性の高いグループは欧州・アフリカ・中米・インド型と、低いグループは東・東南アジア・北米型と分類された。日本由来の株は後者のタイプに属するが、配列が異なる部分も存在した。この結果は、単一の株のトレーシングに、この方法は適さないかも知れないが、地域におけるアメーバの分布の特性、移動の特徴等を知るのに有用かも知れない事を示唆した。

更に、今年度は組み替え型 Ig11 のワクチンとしての効果を検定した。対照群のハムスターでは 83% に膿瘍が形成されたが、Ig11 免疫群では 15 匹中 1 匹(7%) しか膿瘍が形成されず、膿瘍の重量も対照群では肝の 31% に達したのに対し、免疫群では 3% であった。また、Ig11 で免疫したハムスター血清の抗体価は SAW755CR に対して 128~1,024 倍に上昇した。この血清はアメーバの CHO 細胞への接着を 10 倍希釈で対照の 27% にまで抑制

した。

(7) タンパクの網羅的解析による多型性検討と応用

今回は HM-1:IMSS を標準とし、国外由来の 4 株、国内由来の 5 株の比較検討を網羅的なタンパク多型性解析によって行った。HM-1 では P1(4133.6 dalton), P2(4233.5), P3(4648.3), P4(5345.6), P5(5871.6), P6(6049.5), P7(8179.4), P8(8336.2), P9(8474.1), P10(11439.1), P11(11851.6) のピークが見い出された。これと他の株のパターンを比較すると、例えば、200NIH 株では P1~2, P4 の発現量が低く、HK-9 株では P1~2, P7 が低く、DKB では P1~2, P4 は低い、P3, P5 は高い等、株に特異的なパターンが得られる事が示された。国内からの分離株も同様に鑑別が可能であった。更に、*E. invadens* を用いて、栄養型と嚢子に特異的なパターンの検索を試み、両発育型に特有な複数のピーク、嚢子のみに見られるピーク、P II (8774.5), P III (9285.9), P IV (9478.9), P V (10515.6)、が認識できた。以上の所見は、ProteinChip/SELDI-TOF 質量分析により、精細な分離株の鑑別が可能である事を示唆しており、疫学的な検討に有用であると思われた。

(8) DNA マイクロアレイを使用した多型性解析

今回の解析により、7,000 をこえる全遺伝子のうち 80% 以上が無菌培養された HM-1:IMSS でも、また CBA マウス腸管に感染させ分離した同じ株でも発現している事が確認された。これらのうち、523(5.2%) の遺伝子が腸管感染により発現が変化していた。また感染経過によって発現している遺伝子に変化が起こる事も判明した。すなわち、腸管感染初期に発現している遺伝子はストレス応答に係るものである可能性があり、Hsp70、Hsp90 等のストレスタンパクは確かに上昇していたが、Hsp70 ファミリーに属する他の遺伝子等は発現が減少していた。アメーバの病原因子として最も研究が進展し

ているシステインプロテアーゼには 30 以上のメンバーが存在するが、今回用いた DNA アレイ上には 29 の遺伝子が存在し、そのうち 20 が発現していた。そのうち 12 は既に報告されているものであった。腸管感染により最も顕著に変化を示したのは CP4 であり、28~35 倍に上昇していた。CP 6 は 6~9 倍に、一方 CP8 は逆に 1/5~1/4 に減少していた。

D. 考察

わが国では 1999 年の感染症法の改訂以来、アメーバ症の届出は明瞭な増加傾向にあるが、その原因はまだ解明されていない。感染自体も拡大している事は明らかで、感染のリスクグループに対する調査、対応は急務である。以上の状況に鑑み、本研究では特異な注意を払うべきハイリスク集団である各種施設利用者のアメーバを含む腸管原虫感染、及早急に本格的な対応が必要と思われる異性愛者間の感染に関する疫学調査を行い、特に前者に関しては、幾つかの施設のフォローアップ調査と共に既に我々が作成した感染制御ガイドラインに基づき衛生教育等、公衆衛生的な介入を行って、感染の抑止を試みることで、施設内原虫感染の経路の解明をモデル施設において行い、評価した上で一般化を試みることで、また解像力の高い分子疫学手法を作成し、病態形成解明やデータベースとして感染経路のトレーシング、予防策策定等に应用すること、更には施設内アメーバ感染等の大きな特徴である持続性感染のメカニズムを感染モデルでの原虫感染の様態と分離株での病原因子発現状況と関連させて明らかにすることを目的として研究を試みた。

E. histolytica の高頻度の感染が検出された新規対象施設はなかったが、ランブル鞭毛虫や非病原性の腸管寄生アメーバが検出された。この事は殆どの施設において、糞便中の物体が経口的に摂取されている事を示しており、一旦病原性のある *E. histolytica* 感染者が入所すれば、容易に感

染は拡大する事を示している。アメーバのみならず、細菌、ウイルス等の経口病原体も同様に、施設内感染は今後も重要な厚生行政、福祉行政上の問題であり続けるものと思われる。

疫学的、公衆衛生的なアプローチはこの種の集団感染には必須のものであろうが、フォローアップ調査により luminal drug の必要性がより明確に示された事も意味がある。これに関連し、一旦検査で陰性化した利用者が、感染者が少数でも残っていれば容易に再感染が起こりうる事を示した事も、ガイドラインの改訂時に盛り込む予定である。一方、ジロキサニドが製造中止になった事の影響はかなり大きいと言えよう。

また、最近の感染症統計に異性愛行為による感染が疑われている例が報告されており、事実 1990 年代は殆ど見られなかった女性の肝臓瘍例や、commercial sex worker の感染例の報告が散見されるようになってきている。我々の血清疫学調査でも、感染者の増加が示唆される状況になっており、今後の推移を少なくともここ 1~2 年は注意して見る必要がある。もし異性間の性行為によって感染が拡大しつつある事が確実となれば、全く異なる対策を講ずる必要が出てくる可能性もある。

Virulence が見られない *E. histolytica*-like 株の存在は初めて明らかになったもので、その生物学的性状は定型的な *E. histolytica* とも *E. dispar* とも異なっている。このタイプのアメーバが持続性感染者から多数分離されているわけではないが、今後遺伝子レベルを含め種々の検討を行う価値があるものと思われる。特に野崎らが行っている DNA マイクロアレイによる解析は興味あるデータを提示する可能性がある。これに関連して、*E. histolytica* の持続性感染に係ると思われる *Bacteroides* などを発見した事は、興味深い。

遺伝子レベル、タンパクレベル等の多型性の検討は方法論的にアメーバのみならず、

ランブル鞭毛虫をも対象として有意義な結果を得た。少なくとも今年度は方法論的に適合性が示された事で、今後の展開が期待できる。表面抗原の多型性の検討も分離株の地理的な特徴に関係すると云う興味ある成果を示した。Igl1 の組み替えタンパクが従来と免疫方法を変える事で極めて優れたワクチン効果を示した事も、今後腸管感染モデルへの適用を含め、検討を継続する価値があると考ええる。

E. 結論

今年度は施設内原虫感染の種々の疫学的、病態的側面を明らかにし、*E. histolytica* 感染拡大の素地が対象となった施設の殆どすべてに存在する事を示し、今後の感染制御ガイドライン改訂に大きな示唆となる luminal drug の有効性等をも示した。しかし、今後薬剤確保が問題となる。異性愛行為によるアメーバ感染の可能性が提示された事は、注目すべきと考える。また持続性感染というアメーバ症の特異な状態の成立要因解明について幾つかの手がかりが得られた。種々の多型性解析の方法論的な検討も行い、方法の有用性を確認した。

F. 健康危険情報

調査対象となったほぼ全ての施設で、糞便内に存在する病原体が経口感染しうる状況にある事が分かったのは重要と考える。感染経路に関する検討からも、一旦治療を開始すれば luminal drug をも使用して徹底的に行うべき事も示唆された。また異性愛行為によるアメーバ感染の可能性にはもっと注意を払うべきであると考ええる。

G. 研究発表

(主任研究者、分担研究者に下線を付した)

1. 著書

竹内 勤：赤痢アメーバ症、ほか。内科学、医学書院（印刷中）、2006。

竹内 勤：原虫性疾患、アメーバ症、ほか。内科学、第9版、朝倉書店（印刷中）、2006。

野崎智義：医師が念頭に置くべき輸入感染症の世界分布。今日の治療指針、31-33、医学書院、2005。

2. 論文

Kobayashi S, Imai E, Haghighi A, Khalifa SAM, Tachibana H, Takeuchi T : Axenic cultivation of *Entamoeba dispar* in newly designed yeast extract-iron-gluconic acid-dihydroxyacetone-serum medium. *J Parasitol*, 91,1-4, 2005.

Khalifa SAM, Imai E, Kobayashi S, Haghighi A, Hayakawa E, Takeuchi T : Growth-promoting effect of iron-sulfur proteins on axenic cultures of *Entamoeba dispar*. *Parasite*, in press, 2006.

Takano J, Narita T, Tachibana H, Shimizu T, Komastubara H, Terao K, Fujimoto K : *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infections in cynomolgous monkeys imported into Japan for research. *Parasitol Res*, 97, 255-257, 2005.

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

Makioka A, Kumagai M, Takeuchi T, Nozaki I : Characterization of protein geranylgeranyltransferase I from the enteric protist *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol*, 145, 216-225, 2006.

Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T : Effect of artificial

gastrointestinal fluids on the excystation and metacystic development of *Entamoeba invadens*. Parasitol Res, in press, 2006.

Beck DL, Boettner D, Dragulev B, Ready L, Mackey AJ, Nozaki T, Pearson WR, Petri WA Jr : Identification and gene expression analysis of a large family of transmembrane kinases related to the Gal/GalNAc lectin in *Entamoeba histolytica*. Eukaryot Cell, 4, 722-732, 2005.

Saito-Nakano Y, Loftus BJ, Hall N, Nozaki T : The diversity of Rab small GTPases in *Entamoeba histolytica*. Exp Parasitol, 110, 244-252, 2005.

Nozaki T, Kobayashi S, Takeuchi T, Haghghi A : The diversity of clinical isolates of *Entamoeba histolytica* in Japan (review). Arch Med Res, 37, 276-278, 2006.

Nozaki T, Ali V, Tokoro M : Sulfur-containing amino acid metabolism in parasitic protozoa. Advances in Parasitology, 60, 1-99, 2005.

Abe N, Kimata I, Tokoro M : Genotyping of *Giardia* isolates from human in Japan using the small subunit ribosomal RNA and glutamate dehydrogenase gene sequences. Japan J Infect Dis, 58, 57-58, 2005.

竹内 勤 : 赤痢アメーバ症の最近の動向. 東京都医師会雑誌 (印刷中), 2006.

小林正規、前田卓哉、竹内 勤 : 赤痢アメーバの抗原検出法. シンポジウム「寄生虫疾患診断に用いる検査キットの諸問題」、臨床寄生虫誌、(印刷中)、2006.

小林正規、前田卓哉、竹内 勤 : 赤痢アメーバ. 日本臨床, 63 (増刊), 278-279, 2005.
前田卓哉、小林正規、竹内 勤 : 右季肋部痛を主訴に来院された 30 歳男性. 専門医を目指すケース・メソッド、感染症, 318-323, 2006.

野崎智義 : 赤痢アメーバ原虫—特異な含硫アミノ酸代謝を創薬につなげる. 現代寄生虫病事情, 91-97、医歯薬出版, 2006.

所 正治、井関基弘 : 腸管寄生原虫検出における MIF 変法の評価. 臨床寄生虫誌, 16, 53-587, 2006.

所 正治、井関基弘 : 臨床で問題になるいくつかの“原虫”の分類に関する最近の知見. 臨床寄生虫誌, 16, 9-12, 2006.

山本徳栄、砂押克彦、山口正則、森田久男、森永安治、川名孝雄、高木正明、鳥海 宏、所 正治、井関基弘 : クリプトスポリジウム症患者におけるオーシスト排出数の推移と排出期間. 臨床寄生虫誌, 16, 73-75, 2006.

所 正治、井関基弘 : クリプトスポリジウム. 日本臨床, 63 (増刊), 256-258, 2005.

福羅国普、川原 弘、山田真善、高瀬修二郎、及川陽三郎、所 正治 : PCR 法による糞便中遺伝子検出が診断および治療効果の判定に有用であったアメーバ赤痢の 1 例. 内科, 95, 989-991, 2005.

所 正治 : 赤痢アメーバの病原性. 臨床と微生物, 32, 227-231, 2005.

鈴木 淳、村田理恵、小林正規、柳川義勢、竹内 勤 : 知的障害者更生施設における赤痢アメーバ等腸管寄生原虫の感染実態調査.

臨床寄生虫誌、印刷中、2006.

3. 学会発表

小林正規、前田卓哉、竹内 勤：赤痢アメーバの抗原検出法、シンポジウム 1、第 16 回日本臨床寄生虫学会、2005.

山田 稔、鈴木隆裕、内藤裕二、橋 裕司、小林正規、竹内 勤、内川隆一、手越達也、有菌直樹：盲腸に潰瘍を多数認めた無症候性赤痢アメーバ嚢子排出者の 1 例。第 16 回日本臨床寄生虫学会、2005.

橋 裕司、松本直久、程 訓佳、良原栄策：抗赤痢アメーバ Gal/GalNAc レクチンヒトモノクロナル抗体の 1 アミノ酸置換による親和性改良。第 74 回日本寄生虫学会大会、2005.

程 訓佳、良原栄策、金田良雅、竹内 勤、橋 裕司：*Entamoeba moshokovskii* ペルオキシレドキシンの遺伝子解析。第 74 回日本寄生虫学会大会、2005.

牧岡朝夫、熊谷正広、渡辺直熙、小林正規、竹内 勤：*Entamoeba* の脱嚢・発育への情報伝達分子プロテインキナーゼ C およびフォスファチジルイノシトール 3 キナーゼの関与。第 74 回日本寄生虫学会大会、2005.

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 II 型の解析。第 74 回日本寄生虫学会大会、2005.

Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T : Cysteine protease inhibitors block excystation and metacystic development of *Entamoeba invadens*. XII International Congress of Protozoology, 広州、2005.

牧岡朝夫、熊谷正広、小林正規、竹内 勤：*Entamoeba* の脱嚢・発育に関わる情報伝達分子の解析。第 46 回日本熱帯医学会大会、2005.

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 II 型による Rab の翻訳後脂質修飾。第 46 回日本熱帯医学会大会、2005.

熊谷正広、牧岡朝夫、竹内 勤、野崎智義：*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 38 回日本原生動物学会大会、2005.

熊谷正広、牧岡朝夫、竹内 勤、野崎智義：赤痢アメーバのプレニル転移酵素の解析。第 4 回分子寄生虫学・マラリアフォーラム、2005.

牧岡朝夫、熊谷正広、竹内 勤、野崎智義：赤痢アメーバ Rab のプレニル化を担うゲラニルゲラニル転移酵素 II 型の解析。第 28 回日本分子生物学会年会、2005.

Nozaki T : The diversity and peculiarity of Rab small GTPase in vesicular trafficking of the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. International Symposium on Vesicle Trafficking in Parasitic Protozoa, Brazil, 2005.

Nozaki T : The diversity and peculiarity of Rab small GTPase in vesicular trafficking of the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. XV Seminar on Amebiasis, Mexico, 2006.

Nakamoto K, Arai T, Iseki M, Nozaki T, Tokoro M : Characterization of S-adenosyl-L-methionine synthase from

Entamoeba histolytica. XV Seminar on Amebiasis, Mexico, 2006.

Tokoro M, Nakamoto K, Kobayashi S, Nozaki I : In vitro and in vivo effect of trifluoromethionine: a prodrug targeting methionine γ -lyase against *Entamoeba histolytica* trophozoites. XV Seminar on Amebiasis, Mexico, 2006.

所 正治、山村一志、仲本賢太郎、井関基弘 : *Giardia intestinalis* の遺伝子型解析. 第 4 回分子寄生虫・マラリアフォーラム、2005.

仲本賢太郎、所 正治、野崎智義 : 赤痢アメーバにおける S-adenosyl-L-methionine の解析. 第 4 回分子寄生虫・マラリアフォーラム、2005.

荒井朋子、木俣 勲、所 正治 : 細胞培養系における感染クリプトスポリジウム増殖評価のための定量 PCR-より精度の高い薬剤スクリーニング法を目指して. 第 4 回分子寄生虫・マラリアフォーラム、2005.

所 正治 : 抗クリプトスポリジウム薬開発のアプローチ. 第 13 回分子寄生虫ワークショップ、2005.

仲本賢太郎、所 正治 : L-methionine-S-adenosyltransferase の解析-抗原虫薬としての可能性. 第 13 回分子寄生虫ワークショップ、2005.

荒井朋子、所 正治 : クリプトスポリジウムの細胞培養系における増殖評価のためのリアルタイム PCR による定量トライアル. 第 13 回分子寄生虫ワークショップ、2005.

所 正治、井関基弘 : 臨床で問題になるいくつかの“原虫”の分類に関する最近の知見 (教育講演). 第 16 回日本臨床寄生虫

学会、2005.

所 正治、井関基弘 : 腸管寄生原虫検出における MIF 法の評価. 第 16 回日本臨床寄生虫学会、2005.

所 正治、野崎智義、竹内 勤 : 赤痢アメーバにおけるメチル基転移反応制御機構. 第 74 回日本寄生虫学会大会、2005.

仲本賢太郎、所 正治、北出幸夫、木俣 勲、井関基弘 : クリプトスポリジウムにおける methionine adenosyltransferase および S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase の解析 - 抗クリプトスポリジウム薬のターゲットとしての評価. 第 74 回日本寄生虫学会大会、2005.

鈴木 淳、村田理恵、小林正規、柳川義勢、竹内 勤 : 知的障害者更生施設における赤痢アメーバ等腸管寄生原虫の感染実態調査. 第 16 回日本臨床寄生虫学会、2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

(別紙)

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
竹内 勤	赤痢アメーバ症、ほか	金沢一郎、北原光夫、 山口 徹、小俣政男	内科学、初版	医学書院	東京	2006	印刷中
竹内 勤	原虫性疾患：赤痢アメーバ症、ほか	矢崎義雄、小俣政男、 水野美邦	内科学、第9版	朝倉書店	東京	2006	印刷中
野崎智義	医師が念頭に置くべき輸入感染症の世界分布		今日の治療指針	医学書院	東京	2005	31~33

雑誌

発表者名	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 SAM, Tachibana H, Takeuchi T	Axenic cultivation of <u>Entamoeba dispar</u> in newly designed yeast extract-iron-gluconic acid-dihydroxyacetone-serum medium	J Parasitol	91	1~4	2005
Khalifa SAM, Imai E, Kobayashi S, Haghghi A, Hayakawa E, Takeuchi T	Growth-promoting effect of iron-sulfur proteins on axenic cultures of <u>Entamoeba dispar</u>	Parasite		in press	2006
Takano J, Narita T, Tachibana H, Shimizu T, Komatsubara H, Terao K, Fujimoto K	<u>Entamoeba histolytica</u> and <u>Entamoeba dispar</u> infections in cynomolgous monkeys imported into Japan for research	Parasitol Res	97	255 ~ 257	2005
Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T	<u>Entamoeba invadens</u> : cysteine protease inhibitors block excystation and metacystic development	Exp Parasitol	109	27~32	2005
Makioka A, Kumagai M, Takeuchi T, Nozaki T	Characterization of protein geranylgeranyltransferase I from the enteric protist <u>Entamoeba histolytica</u>	Mol Biochem Parasitol	145	216 ~225	2006
Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T	Effect of artificial gastrointestinal fluids on the excystation and metacystic development of <u>Entamoeba invadens</u>	Parasitol Res		in press	2006
Beck DL, Boettner D, Dragulev B, Ready L, Mackey AJ, Nozaki T, Pearson WR, Petri WA Jr	Identification and gene expression analysis of a large family of transmembrane kinases related to the Gal/GalNAc lectin in <u>Entamoeba histolytica</u>	Eukaryot Cell	4	722 ~732	2005

Saito-Nakano Y, Loftus BJ, Hall N, Nozaki T	The diversity of Rab small GTPases in <i>Entamoeba histolytica</i>	Exp Parasitol	110	244~252	2005
Nozaki T, Kobayashi S, Takeuchi T	The diversity of clinical isolates of <i>Entamoeba histolytica</i> in Japan (review)	Arch Med Res	37	276~278	2006
Nozaki T, Ali V, Tokoro M	Sulfur-containing amino acid metabolism in parasitic protozoa (review)	Advances in Parasitol	60	1~99	2005
Abe N, Kimata I, Tokoro M	Genotyping of <i>Giardia</i> isolates from human in Japan using the small subunit ribosomal RNA and glutamate dehydrogenase gene sequences	Japan J Infect Dis	58	57~58	2005
竹内 勤	赤痢アメーバ症の最近の動向	東京都医師会雑誌		印刷中	2006
小林正規、前田卓哉、竹内 勤	赤痢アメーバの抗原検出法。シンポジウム「寄生虫疾患診断に用いる検査キットの諸問題」	臨床寄生虫誌		印刷中	2006
小林正規、前田卓哉、竹内 勤	赤痢アメーバ	日本臨床	63(増)	278~279	2005
前田卓哉、小林正規、竹内 勤	右季肋部痛を主訴に来院された30歳男性-専門医を目指すケース-メソッド	感染症、日本医事新報		318~323	2006
野崎智義	赤痢アメーバ原虫-特異な含硫アミノ酸代謝を創薬につなげる	現代寄生虫病事情		91~97	2006
所 正治、井関基弘	腸管寄生虫原虫検出におけるMIF変法の評価	臨床寄生虫誌	16	53~57	2006
所 正治、井関基弘	臨床で問題になるいくつかの”原虫”の分類に関する最近の知見	臨床寄生虫誌	16	9~12	2006
山本徳栄、砂押克彦、山口正則、森田久男、川名孝雄、高木正明、島海 宏、所 正治、井関基弘	クリプトスポリジウム症患者におけるオーシスト排出数の推移と排出期間	臨床寄生虫誌	16	73~75	2006
所 正治、井関基弘	クリプトスポリジウム	日本臨床	63(増)	256~258	2005
福羅国普、川原 弘、山田真善、高瀬修二郎、及川陽三郎、所 正治	PCR法による糞便中遺伝子検出が診断および治療効果の判定に有用であったアメーバ赤痢の1例	内科	95	989~991	2005
所 正治	赤痢アメーバの病原性	臨床と微生物	32	227~231	2005
鈴木 淳、村田理恵、小林正規、柳川義勢、竹内 勤	知的障害者更生施設における赤痢アメーバ等腸管寄生虫の感染実態調査	臨床寄生虫誌		印刷中	2006

(主任研究者、分担研究者に下線を付した)

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

施設内アメーバ感染等の疫学的解析；施設内原虫感染への介入策作成と感染抑止の関連解析；
感染原虫株の分離・維持

分担研究者 竹内 勤 慶応義塾大学医学部 教授

研究要旨 1. 赤痢アメーバ分離培養法の改良：従来の培地では、分離が困難な非定型的な性質を持つ赤痢アメーバや非病原性の *Entamoeba dispar* の分離にも対応できるような培地作製を目的として、従来の培地を基に培地組成のデザインを行った。良好な結果を得た改変培地を株の分離に応用し、*E. dispar* 4株、赤痢アメーバ2株を分離した。2. 腸アメーバ症の持続感染機構の解明：マウス腸アメーバ症モデルを用いた解析から、持続感染の成立には、腸粘膜上皮へのアメーバの安定した接着が必要条件として推定された。また、難治性のヒト腸アメーバ症患者から分離された腸内嫌気性菌 (*Bacteroides fragilis*) が、マウス盲腸粘膜上皮へのアメーバの接着及び増殖を促進する作用をもつことを見出した。3. 施設内腸管原虫感染の疫学調査の実施：赤痢アメーバの集団感染が見られた、知的障害者更生施設2施設についてフォローアップ調査を行った。メトロニダゾール単独治療では完治せず、再感染を繰り返した1施設における、赤痢アメーバ嚢子陽性者21名、抗体陽性者51名について、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、その後、2年にわたり、追跡調査された。その結果、赤痢アメーバ施設内集団感染は終息したものと考えたが、今年度の調査において、依然、高い血清抗体価を示すものが見られ、極めて少数ながら持続的な抗原（検査）陽性者も見られた。抗原（検査）陽性者については、遺伝子診断を含め、種々の検査を数回行ったが、赤痢アメーバ感染を証明することはできなかった。4. 新規調査施設、及びフォローアップ調査を行った施設を対象として、感染防御ガイドラインの説明、関連事項の教育を、研究分担者の鈴木と共同で職員に対して行った。感染状況との対応は明年度以降調査する予定である。

A. 研究目的

1) 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、その同一性が比較できるようになってきた。この遺伝子的に識別された異なる赤痢アメーバ分離株間の virulence 及び生物学的性状を比較検討し、得られた情報を診断・治療に役立てることを目的とする。

2) 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、調査対象施設ではガイドラインを含む衛生教育を実施し、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、これらの対策案を今後の厚生・福祉行政へ反映させることを目的とする。

B. 研究方法

1) 赤痢アメーバ分離培養法の改良：アメーバ株の分離は主に細菌共棲培地と *Crithidia* 原虫を添加した無菌培地 (TYI-S-33 培地, Diamond, 1978) を用いて行われてきた。しかしながら、これらの培地では継代培養が困難な赤痢アメーバ株が存在することも本年度までの研究から分かってきた。そこで、今まで分離培養されず、看過されてきた、非定型的な

性質を持つ赤痢アメーバや *E. dispar* の分離にも対応できるような培地のデザインを試み、同時にアメーバの培養に適した yeast extract の検索も行った。

2) 腸アメーバ症の持続感染機構の解明：マウス腸アメーバ症モデルを用い、持続感染が成立する条件を検討した。

3) 施設内腸管原虫感染の疫学調査の実施：メトロニダゾール単独治療では、完治に到らず、赤痢アメーバの再感染を繰り返した 1 施設（施設利用者 76 名；嚢子陽性者 21 名；血清抗体陽性者 51 名）について 2003 年 12 月より、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。2004 年度の調査では、新たな感染は見られず、2005 年度も引き続きクリプトスポリジウム感染の調査項目を加え、赤痢アメーバ感染のフォローアップ調査を行った。この調査と並行して、赤痢アメーバ施設内集団感染は終息したが、8 年間にわたり長期的なフォローアップ観察を行ってきた、他の 1 施設（施設利用者 54 名；血清抗体陽性者 15 名；有アメーバ症歴者 4 名；職員感染者 1 名）についても引き続き、上記と同様のフォローアップ調査を行った。施設への原虫疾患の感染経路の解明は困難であるが、一つの試みとして、我が国で赤痢アメーバ感染を含め腸管寄生原虫感染の温床となっている男性ホモセクシュアルを標的として、慶應病院 AIDS 外来における AIDS(男性ホモセクシュアル)患者の赤痢アメーバ及び他の原虫症の寄生状況についての調査も行った。また、上記のフォローアップ調査の対象施設と、分担研究者の鈴木が中心となって調査した新規対象では、以前作成した施設内アメーバ感染防御ガイドラインの説明と、アメーバとその感染について職員に対して教育を鈴木と協力して行った。

C. 研究結果

1) 赤痢アメーバ分離培養法の改良：現在尚、培養が極めて困難である施設分離株 (A65 株) の無菌培養を目的としてデザインした改変培地 (YIMDHA-S 培地；*E. dispar* の無菌培養用培地 (YIGADHA-S) の組成のうち、グルコン酸 (GA) をマルトース (M) に置き換えた培地) を株の分離に応用し、*E. dispar* 4 株、赤痢アメーバ 2 株を分離した。A65 株については、アメーバの増殖促進効果をもつ原虫 (*Crithidia*

fasciculata) を supplement とした monoxenic culture から、さらに YIMDHA-S に 0.5% glycerol を添加し、*C. fasciculata* の代わりに緑膿菌を supplement とする、より増殖がよく、安定した monoxenic culture で、現在、継代培養を行っている。同時に無菌培養の試みも継続している。分離した赤痢アメーバ 2 株については、既に YIMDHA-S により、無菌培養されている。

2) 腸アメーバ症の持続感染機構の解明：マウス腸アメーバ症モデルを用いた解析から、持続感染が成立するためには、腸粘膜上皮へのアメーバの安定した接着が必要条件と推定された。難治性のヒト腸アメーバ症患者から分離した、腸内嫌気性菌 (*Bacteroides fragilis*) が、マウス盲腸粘膜上皮へのアメーバの接着及び増殖を促進する作用をもつことを見出した。予め、*B. fragilis* を経口投与 [1回/日 x 3日] し、さらに赤痢アメーバ感染マウスの便より分離・*Crithidia* を加え培養したアメーバをマウス盲腸に感染させ、感染後も 3-4 日間隔で *B. fragilis* を経口投与 [1回/日 x 3日] を行うことで、持続感染率が 100% 近くに上昇し、血球貪食アメーバを含む粘血便も見る、高密度感染が成立した。但し、組織侵入性腸アメーバ症モデルとなるスナネズミの盲腸へ、同様に *B. fragilis* とアメーバを接種したが組織侵入力の促進は見られなかった。

3) 施設内腸管原虫感染の疫学調査の実施：知的障害者更生施設 2 施設についてフォローアップ調査を行った。高い集団感染率が見られた 1 施設において、組織に速やかに吸収されるメトロニダゾール治療単独では、便弄癖をもつ重度の知的障害者においては再感染を繰り返し、治療後の 3~6 ヶ月には感染者は治療前の状況に近い感染率にまで拡大した。再感染のパターンは興味あるもので、感染者が残ると、同室の者から拡大して行った。そこで、このうち、1 施設では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ジロキサニド併用投与を行い、2 年にわたり、フォローアップ調査した結果、新たな赤痢アメーバ感染者は見られず、施設内集団感染は終息したものと考えた。しかし、今年度の調査において、依然、高い血清抗体価を示すものが見られ、極めて少数ながら持続的な抗原 (検査) 陽性者も見られた。抗原 (検査) 陽性者については、遺伝子診断を含め、種々の検査を数回行ったが、赤痢アメーバ感染を

証明することはできなかつた。現在、新鮮材料について抗原検査と遺伝子診断を再試行している。他の1施設も、最近ジロキサニド投与を行った。クリプトスポリジウム感染についてはクリプトスポリジウム特異抗原検出キットを用い調査した結果では、ある種真菌に対する非特異反応が見られた以外、全て陰性であった。消化器症状のため検査を依頼された男性 AIDS 患者 5 名のうち、2 名の赤痢アメーバ感染者と 1 名のランブル鞭毛虫感染者を検出し、赤痢アメーバ 1 株を分離した。有症外来患者とはいえ、予想以上の高率な感染であった。感染防御ガイドラインの説明と関連衛生教育を行った施設における感染様態の追跡は明年度に予定している。

4) マウス腸アメーバ症モデルにおける治療実験:アメーバ症治療薬として我が国で実際に使用が可能な薬剤はメトロニダゾールのみであるため、その作用機序についてマウス腸アメーバ症モデルを用いて検討を試みた。その結果、経口投与した場合より、腹腔投与した方が、治療効果が高いことがわかり、メトロニダゾールは一旦、吸収された後、組織に侵入或いは腸粘膜に接着増殖する赤痢アメーバに対し薬剤効果を示すらしいことが改めて推定された。

D. 考察

1) 遺伝子診断法からも、赤痢アメーバとして同定される株の中にも、病原性や virulence が大きく異なるものが存在するらしいことが、施設分離株(A65 株)の生物学的性状が明らかになるに伴い、明らかになってきた。これら非定型的赤痢アメーバ株の存在が、今まで明らかにできなかった原因として、A65 株のように細菌共棲条件で分離培養するためには、ある種の腸内嫌気性菌の共棲が必須であるという培養条件の特殊性と無菌培養の困難さが考えられる。我々が行った培養法の改良は、未だ不十分ながら、従来の方法に比べ分離効率は高く、分離後培地への適応期間が短く、速やかに増殖し、赤痢アメーバと *E. dispar* 両種に共通の無菌培地としても用いることができる利点がある。

2) 施設の赤痢アメーバ集団感染を終息させるためには、組織侵入性のアメーバ症治療に有効なメトロニダゾールと lumen drug (ジロキサニド、パロモマイシン)の併用の有用性が認

識されたが、ジロキサニドの製造中止に伴い、メトロニダゾール単独治療の効果を高める抗生剤併用投与方法についての再検討も必要と考えられた。この所見は感染防御ガイドラインの改訂に際して取り入れる必要を認めている。更に衛生教育の結果は、明年度の調査に待たねばならないが、更に強化する必要性もあるものと考えている。

3) 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、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。

E. 結論

1) 赤痢アメーバの株の多様性解析には培養法の改良が必須と考えられた。

2) 持続感染機構の解明、治療効果判定などにマウス腸アメーバ症モデルは有用で、本年度確立した確実な感染システムの応用度は高いと考える。

3) 治療後のフォローアップ法の検討と、その方法のガイドラインへの導入の必要性を認識した。衛生教育の効果は今後追跡調査する予定である。

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 S. A., Tachibana H., Takeuchi T.: Axenic cultivation of *Entamoeba dispar* in newly designed yeast extract-iron-gluconic acid-dihydroxyacetone-serum medium. *J Parasitol*, 91,1- 4, 2005.

2) Khalifa S. A. M., Imai E., Kobayashi S., Haghghi A., Hayakawa E., Takeuchi T.: Growth-promoting effect of iron-sulfur proteins on axenic cultures of *Entamoeba dispar* Parasite, 13(1), 2006 (in press).

3) 小林正規、前田卓哉、竹内勤: シンポジウム[寄生虫疾患診断に用いる検査キットの諸問題]-1 赤痢アメーバの抗原検出法、日本臨

床寄生虫学会誌, 16, 2005, 印刷中.

4) 小林正規、前田卓哉、竹内 勤：日本臨床 63[増刊：広範囲血液・尿化学検査、免疫学的検査 3]：277-279, 2005.

5) 前田卓哉、小林正規、竹内 勤：CASE31 発熱・右季肋部痛を主訴に来院された30歳男性：専門医を目指すケース・メソッド・アプローチ 12：感染症[第4版]：日本医事新報社：318-323, 2006.

2. 学会発表

1) 小林正規、前田卓哉、竹内 勤：シンポジウム-1；赤痢アメーバの抗原検出法
第16回日本臨床寄生虫学会 (2005)

2) 山田稔、鈴木隆裕、内藤裕二、橘裕司、小林正規、竹内 勤、内川隆一、手越達也、有菌直樹：盲腸に潰瘍を多数認めた無症候性赤痢アメーバ嚢子排泄者の一例
第16回日本臨床寄生虫学会 (2005)

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

アメーバ等原虫の主要表面抗原多型解析法開発と疫学研究等への応用

分担研究者 橘 裕司 東海大学医学部 助教授

研究要旨 赤痢アメーバ株間の表現型における多型を解析するため、異なる地域由来の赤痢アメーバ株について 150-kDa 表面レクチン (Igl) の遺伝子をクローニングし、Igl の一次構造を比較した。Rahman 株 (英国由来)、DKB 株 (英国由来)、SAW755CR 株 (エジプト由来)、SAW1627 株 (インド由来) では HM-1:IMSS 株 (メキシコ由来) の配列と 99~100% 一致した。一方、HK-9 株 (韓国由来)、HB-301:NIH 株 (ミャンマー由来)、H-303:NIH 株 (ベトナム由来)、200:NIH 株 (米国由来)、NOT-12 株 (日本由来)、YS 株 (日本由来) では HM-1:IMSS 株と 85~87% の同一性しか認められず、赤痢アメーバ株は大きく 2 つのグループに分類された。さらに後者のグループにおいて、日本由来株のみで配列が異なる箇所も存在した。また、Igl1 における多様性は N 末端側で大きく、C 末端側では小さかった。Igl 多型に基づく赤痢アメーバ株のタイピングは、ザイモデーム分析などと異なり、地理的分布の違いをよく反映しており、赤痢アメーバの由来や感染経路の解明に有用である可能性が示された。また、大腸菌で発現させた組換え型の Igl1 でハムスターを免疫したところ、赤痢アメーバによる肝膿瘍形成に対して有意な抑制効果が認められ、組換え型 Igl がワクチンとして利用でき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、輸入症例に加えて、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。また、感染経路や地理的な由来を解明するため、赤痢アメーバ株の多型解析法の確立が求められている。

赤痢アメーバの表現型における多型に関しては、ザイモデーム分析法が知られている。特に、glucose phosphate isomerase の電気泳動パターンによって、Z-II, Z-II α -, Z-XIV, Z-XIX などに分類する方法がある。しかし、ザイモデーム分析は実施が容易ではなく、また地理的分布を反映す

るものではない。最近になって、いくつかの遺伝子について多型の存在が明らかになってきた。特に、セリンリッチ蛋白質遺伝子、キチナーゼ遺伝子、マイクロサテライトのローカス 1-2、ローカス 5-6 などについてよく解析されてきている。中でも、セリンリッチ蛋白質遺伝子には非常に多くの多型が見つかっており、他の遺伝子多型と組み合わせれば、詳細に株を同定することが可能である。しかし、この解析法では逆に細かく分類されすぎてしまう嫌いがある。

研究分担者らは最近、虫体表面に 150-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 (intermediate subunit of Gal/GalNAc lectin, Igl) の存在を明らかにした。これまでに、複数の抗 Igl マウスモノクローナル抗体の反