

応性解析から、Igl は赤痢アメーバ株に広く存在する一方で、株間における抗原性の違いも存在することが推定された。そこで、本研究では地理的由来の異なる赤痢アメーバ株について Igl 遺伝子の塩基配列を解析し、Igl 一次構造における多型性解析を試みた。

また、抗 Igl マウスモノクローナル抗体の受動免疫により、あるいは虫体から精製した native Igl でハムスターを免疫することにより、肝膿瘍形成を有意に抑制できることを既に報告している。そこで、大腸菌で作製した組換え型 Igl について、ワクチンへの応用の可能性についても検討した。

B. 研究方法

1. 赤痢アメーバ株

赤痢アメーバの HM-1:IMSS 株 (メキシコ、直腸潰瘍患者由来、Z-II)、HK-9 株 (韓国、赤痢患者由来、Z-II)、DKB 株 (英国、赤痢患者由来、Z-II)、HB-301:NIH 株 (ミャンマー、赤痢患者由来、Z-II)、200:NIH 株 (米国、赤痢患者由来、Z-II)、Rahman 株 (英国、無症候性嚢子排出者由来、Z-II)、H-303:NIH 株 (ベトナム、肝膿瘍患者由来、Z-II)、SAW1627 株 (インド、無症候性嚢子排出者由来、Z-II α -)、SAW755CR 株 (エジプト、大腸炎患者由来、Z-XIV)、NOT-12 株 (日本、大腸炎患者由来、Z-XIX)、YS 株 (日本、無症候性嚢子排出者由来、Z-XIX) を使用した。いずれも BI-S-33 培地で無菌培養した。

2. Igl 遺伝子のクローニングと塩基配列解析

赤痢アメーバ各株の栄養型虫体からゲノム DNA を単離した。HM-1:IMSS 株の Igl 遺伝子に基づいて作製されたプライマーを用い、*Pyrobest* DNA polymerase (Takara) によって、Igl 全長の遺伝子を PCR 増幅した。増幅産物を Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen) を用いてクローニングし、塩基配列を決定した。塩基配列の解析は GENETYX-MAC ver. 12 を用いて行った。

3. 組換え型 Igl の調製

赤痢アメーバ Igl1 について、N 末端と C 末端のシグナル配列を除く全長のアミノ酸 (aa 14-1088) をコードする遺伝子断片を pET19b ベクターの *Xho*I サイトに組み込み、大腸菌 BL21 StarTM(DE3)pLysS に導入して発現させた。inclusion body を refolding したのち、イオン交換クロマトグラフィーによって精製した。

4. 組換え型 Igl によるハムスターの免疫と感染実験

体重 40~50g の雄ゴールデンハムスターを購入した。初回免疫ではアジュバントとして TiterMax Gold を用い、組換え型 Igl1 の 50 μ g を後肢筋肉内に接種した。初回免疫の 3 週間後と 5 週間後に同量の Igl1 を Freund の不完全アジュバントとともに追加免疫した。最終免疫の 1 週間後に採血し、更に 1 週間後に赤痢アメーバ SAW755CR 株の栄養型虫体 5×10^5 を肝臓内に接種した。そして、1 週間後に肝膿瘍の重量を測定した。対照群では PBS とアジュバントのみで免疫し、同様の実験を行った。

5. 抗赤痢アメーバ抗体価測定

パラホルムアルデヒドで固定した HM-1:IMSS 株および SAW755CR 株虫体を貼付した 10 穴スライドガラスを用い、間接蛍光抗体法によって測定した。二次抗体は FITC 標識抗ハムスター IgG (H + L) ヤギ抗体を用いた。

6. 赤痢アメーバの Chinese hamster ovary cell (CHO cell) への接着に対する阻止活性

希釈した血清と赤痢アメーバ HM-1:IMSS 株栄養型虫体を氷上で 1 時間反応させ、PBS で洗った後に、CHO cell と氷上で 2 時間反応させ、3 個以上の CHO cell が接着した赤痢アメーバ虫体の比率を計測した。

(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. 赤痢アメーバ株間の Igl 多型解析

赤痢アメーバの 10 株について Igl1 と Igl2 の一次構造を解析したところ、Rahman 株、DKB 株、SAW755CR 株、SAW1627 株では HM-1:IMSS 株の配列と 99~100%一致した。一方、HK-9 株、HB-301:NIH 株、H-303:NIH 株、200:NIH 株、NOT-12 株、YS 株では 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。200:NIH 株の Igl1 と YS 株の Igl2 を除き、前者グループでは Igl1 が 1101、Igl2 が 1105 アミノ酸からなり、後者グループでは Igl1 が 1100、Igl2 が 1102 アミノ酸で構成されていた。即ち、地理的由来から欧州・アフリカ・中米・インド型と東・東南アジア・北米型に大別された。また、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。Igl2 よりも Igl1 における多様性が大きく、また、Igl1 において C 末端側より N 末端側で多様性が大きかった。東・東南アジア由来株の Igl2 で 1 システイン残基の挿入が認められたが、すべての CXXC モチーフは全株で保持されていた。

2. 組換え型 Igl1 のワクチン効果

対照群では 12 匹中 10 匹 (83%) で肝膿瘍が形成されたのに対し、Igl1 免疫群では 15 匹中 1 匹 (7%) しか膿瘍が形成されず、有意な抑制効果が認められた ($p = 0.0000769$)。また、膿瘍が形成されたハムスターにおいて、対照群の膿瘍平均重量は肝臓の 31%を占めたのに対し、Igl1 免疫群の 1 例では 3%にすぎなかった。

Igl1 で免疫したハムスター血清の抗体価は、HM-1:IMSS 株虫体に対して 1:64~1:512、SAW755CR 株虫体に対して 1:128~1:1024 であった (対照群では 1:16 未満)。また、免疫血清は虫体の CHO cell への接着を 10 倍希釈で対照群の 27%まで、100 倍希釈で 40%まで抑制した。

D. 考察

本研究において、Igl に多型が存在することが明らかになった。そして、それは地理的分布の違いをよく反映している可能性が示唆された。赤痢アメーバにおいて、このような蛋白質はこれまで知られていない。しかし、米国で単離された 200:NIH 株は東・東南アジア型に近いという結果もあり、今後、より多くの単離株について Igl 遺伝子を解析して、地理的分布との関係を検証していくことが必要である。Igl1 においては、特に N 末端側で多様性が大きく、C 末端側では小さかった。以前の研究において、Igl1 の C 末端側は血清診断抗原として有用である一方で、N 末端側に対する患者血清の反応性には差の大きいことを報告しているが、それは N 末端側の多様性によるものと考えられる。従って、この N 末端側の差に着目し、異なる型の抗原を調製することで、血清診断によって株の由来まで推定することが可能になるかもしれない。一方、C 末端側はこの蛋白質の機能に重要な役割を果たしている可能性が高く、また、システインは株間でよく保存されており、立体構造もこの蛋白質の機能に重要であると推定される。

これまで、組換え型の Igl では native Igl でみられたようなワクチン効果が確認できていなかったが、Freund の完全アジュバントに換えて Titermax Gold を用い、腹腔内接種から筋肉内接種に変更することによって、有意な抑制効果を得ることができた。今後、N 末端側や C 末端側などの断片を用いて免疫し、ワクチンとして有効なドメイン部分の同定を行う必要がある。今回は HM-1:IMSS 株由来の抗原で免疫し、SAW755CR 株を感染させたが、これら 2 株は同じ Igl 型であった。C 末端側のように株間の変異が少ない部分だけで十分なワクチン効果が得られるのか、株の由来に対応したワクチンが必要なのかを明らかにすることも今後の課題である。

E. 結論

赤痢アメーバの Ig11、Ig12 に多型が存在した。Ig1 多型により、株は欧州・アフリカ・中米・インド型と東・東南アジア型に大別され、さらに後者の中で日本型を区別できる可能性が示された。組換え型 Ig11 がアメーバ性肝膿瘍の形成阻止に有効なワクチンとなる可能性が示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Takano, J., Narita, T., Tachibana, H., Shimizu, T., Komatsubara, H., Terao, K. and Fujimoto, K. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infections in cynomolgus monkeys imported into Japan for research. *Parasitol. Res.*, 97 (3): 255-257, 2005

2. 学会発表

橘 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ーナル抗体の 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 年 4 月

程 訓佳, 良原栄策, 金田良雅, 竹内 勤, 橘 裕司. *Entamoeba moshkovskii* 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 年 4 月

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 年 6 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

アメーバ等原虫の蛋白網羅的解析法開発と疫学研究等への応用

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 赤痢アメーバの分離株を対象にした遺伝子レベルの多型分析に関してはいくつかの報告があるが、蛋白質の網羅的解析による株間の差異に関する報告はほとんどみられていない。そこで今回、赤痢アメーバ分離株の蛋白網羅的解析の一環として ProteinChip/SELDI-TOF (surface enhanced laser desorption/ionization-time of flight) 質量分析による分離株の解析を行った。ProteinChip/SELDI-TOF システムは蛋白質解析に適した様々な化学的性質を表面に持たせた ProteinChip と測定に用いられる Reader および測定・解析に使用されるソフトウェアから構成され、様々の試料から、ProteinChip に対するアフィニティーを利用して目的蛋白質を捕捉し、その質量数を測定するシステムである。Chip 上で簡便に蛋白質の解析ができ、少量の試料から短時間に結果を得ることができる利点を有する。今回、世界的に知られている国外で分離された 5 株 (HM-1: IMSS, 200NIH, HK-9, DKB, SAW755CR) および国内で分離され無菌化された 5 株 (HATAJI, FUKUROI, NOT-12, TAKEYAMA, K-14-1) を用いた。ProteinChip として弱陽イオン交換体の表面性質を持つ CM10 を用い、2% CHAPS/5 mM TrisHCl/E-64 でアメーバ分離株を可溶化し、遠心後の上清を試料とした。ほぼ全ての赤痢アメーバの研究に用いられている HM-1 を標準株とし、これと他の分離株との比較を行った。HM-1 で得られた蛋白ピーク (P) (分子量 dalton) [P1(4133.6)、P2(4233.5)、P3(4648.3)、P4(5345.6)、P5(5871.6)、P6(6409.5)、P7(8179.4)、P8(8336.2)、P9(8474.1)、P10(11439.1)、P11(11851.6)] につき他の国外株と比較した結果、200NIH は P1-2、P4 の発現量が低く、HK-9 は P1-2、P7 が低く、DKB は P1-2、P4 は低いが P3、P5 は高く、SAW755CR は P1-2、P5、P9-10 の発現量が低く、それぞれの分離株を区別することができた。同様に HM-1 と国内分離株を比較した結果、HATAJI には 2626.6Da、3026.5Da、3409.5Da のピークが現れ、P1-2、P4-6 の発現量は低く、FUKUROI は P8-9 がみられず、P5-6 が低く、NOT-12 は P1-9 の発現量がいずれも低く、TAKEYAMA は P5-6 が低く、K-14-1 は P1-6、P8-9 が低かった。次に、*E. invadens* を用い、その栄養型と嚢子を同様に比較した結果、両発育型に共通な主要蛋白質ピーク [PI(8562.1)、PVI(11396.7)、PVII(11638.8)] とともに、嚢子に特有な複数のピーク [PII(8774.5)、PIII(9285.9)、PIV(9478.9)、PV(10515.6)] が認められた。以上の結果から ProteinChip/SELDI-TOF 質量分析により分離株の識別が可能と考えられ、分離株の疫学研究に有用であることが示唆された。

A. 研究目的

赤痢アメーバの分離株を対象にした遺

伝子レベルの多型分析に関してはいくつかの報告があるが、蛋白質の網羅的解析に

よる株間の差異に関する報告はほとんどみられていない。また、アメーバの栄養型と嚢子の蛋白網羅的解析もほとんどなされていない。そこで今回、赤痢アメーバ分離株およびアメーバ栄養型・嚢子の蛋白網羅的解析の一環として ProteinChip/SELDI-TOF 質量分析による解析を行った。ProteinChip/SELDI-TOF システム (Ciphergen Biosystems) は蛋白質解析に適した様々な化学的性質を表面に持たせた ProteinChip と測定に用いられる Reader および測定・解析に使用されるソフトウェアから構成され、様々の試料から、ProteinChip に対するアフィニティーを利用して目的蛋白質を捕捉し、その質量数を測定するシステムである。Chip 上で簡便に蛋白質の解析ができ、少量の試料から短時間に結果を得ることができる利点を有する。Chip 上の捕捉された蛋白にレーザーを照射し、イオン化された蛋白がその分子量により蛋白ピークとして検出される。今回、可溶化した赤痢アメーバ分離株およびアメーバ栄養型・嚢子を試料として用い、得られた蛋白ピーク・プロファイルの解析を行った。

B. 研究方法

世界的に知られている国外で分離された赤痢アメーバ 5 株 (HM-1: IMSS、200NIH、HK-9、DKB、SAW755CR) および国内で分離され無菌化された 5 株 (HATAJI、FUKUROI、NOT-12、TAKEYAMA、K-14-1) を実験に用いた。また、栄養型と嚢子を比較するため、赤痢アメーバの嚢子形成のモデルとして重要な *E. invadens* の栄養型および *in vitro* で形成させた嚢子を用いた。ProteinChip として弱陽イオン交換体の表面性質を持つ CM10 を用いた。アメーバ分

離株の可溶化は 2% CHAPS または 2% TritonX-100/5 mM TrisHCl/E-64 を用い、遠心後の上清を試料とした。CM10 のスポットを洗浄後、試料 1 μ l (1-20 μ g) と 4 μ l の binding/washing buffer をのせ 20 分間反応させた。上記 buffer および蒸留水で洗浄後、乾燥させ、エネルギー吸収分子であるシナピン酸を重層した。この CM10 チップを ProteinChip リーダーにセットし測定を行った。ほぼ全ての赤痢アメーバの研究に用いられている HM-1 を標準株とし、これと他の分離株との比較を行った。

C. 研究結果

赤痢アメーバ分離株の比較：まず HM-1 の試料を用いて 2 種の界面活性剤を比較した結果、ほぼ同様なピーク・プロファイルが得られたが、ピークの intensity が CHAPS を用いた場合のほうが高かった。それ故、以後 CHAPS を用いて可溶化を行った。HM-1 の試料を用いて複数の Chip スポットのピーク・プロファイルを比較した結果、満足しうる再現性が得られた。スポット当りの蛋白量 1 μ g と 20 μ g のピーク・プロファイルを比較した結果、分離株によりほぼ同様な場合と、違いがみられる場合が認められた。HM-1 (20 μ g) で得られたピーク (P) (分子量: dalton) [P1 (4133.6)、P2 (4233.5)、P3 (4648.3)、P4 (5345.6)、P5 (5871.6)、P6 (6409.5)、P7 (8179.4)、P8 (8336.2)、P9 (8474.1)、P10 (11439.1)、P11 (11851.6)] につき他の国外株とその発現量を比較した。200NIH は P1-2 および P4 の発現量が低く、P3、P5 および P9 は高かった。HK-9 は P1-2 および P7 が低く、特に高いものはみられなかった。DKB は P1-2 と P4 は低い P3、P5 は高かった。SAW755CR は P1-2、P5、P9-10 の発現量が低く、P3-4

および P8 は高かった。同様に HM-1 と国内分離株を比較した。この際、HM-1 を国外株と比較したときの検出された P1 よりもより低分子のピークが認められたため、低分子量域のピーク P1' (2626.6)、P2' (3026.5)、P3' (3409.5) を含む上記 P1 から P9 までのピークについて比較した。HATAJI には P1'、P2' および P3' が現れ、P1-2、P4-6 および P8-9 の発現量は低かった。FUKUROI は P8-9 がみられず、P5-6 が低く、P1' -3'、P2-3 および P7 は高かった。NOT-12 は P1' は高かったが、P1-9 の発現量がいずれも低かった。TAKEYAMA は P5-6 が低かったが、P1' -3'、P2 および P7 は高かった。K-14-1 は P1-6 および P8-9 が低く、P1'、P3' および P7 は高かった。

E. invadens の栄養型と嚢子の比較： *E. invadens* の嚢子形成系で得られた嚢子を用い、栄養型との比較を行った。その結果、特に分子量 8000Da から 12,000Da の領域の蛋白ピークに顕著な違いが認められた。PI (8562.1)、PVI (11396.7)、PVII (11638.8) および PVIII (11772.9) は両発育型に共通にみられたが、PII (8774.5)、PIII (9285.9)、PIV (9478.9) および PV (10515.6) は嚢子でいずれも高く、嚢子に特有の蛋白ピークであることが示唆された。

D. 考察

遺伝子の多型解析では個々の遺伝子について個別に解析されており、網羅的な解析はなされていない。蛋白質の網羅的解析法の一つとして二次元電気泳動法 (2-D) があるが、多くの検体を扱う場合には時間と労力を要し、ProteinChip/SELDI-TOF に比し、解析に必要な蛋白量も多いことが指摘されている。ProteinChip/SELDI-TOF 質量分析は特に蛋白質のプロファイリングと

バイオマーカーの検出に際してその有用性が明らかになっている。この点で、原虫領域への応用例はまだ少ない。その一つとしてアフリカ睡眠病の診断への応用例があり、患者血清中のトリパノソーマ特異的抗原の検出に有用であるという報告がなされている。この方法を赤痢アメーバ分離株の蛋白網羅的解析へ応用した今回の研究では、2 千から 2 万の分子量範囲で蛋白ピークが得られたが、高分子量のピークは検出されなかった。高分子量のピークがでにくいことは、2-D と比較したときの欠点として指摘されている。限られた分子量範囲ではあるが、赤痢アメーバ分離株の違いを蛋白ピーク・プロファイルの違いとして表示させることができた。同じザイモデムを示す分離株においても、ピークの発現量に違いが認められ、ザイモデムが異なる場合にはその違いがより顕著であると考えられた。また、栄養型と嚢子の解析から、特に嚢子に特有な蛋白ピークが明らかになり、これらの蛋白質の同定することは嚢子形成過程の解明に役立つと考えられる。以上の結果から ProteinChip/SELDI-TOF 質量分析により赤痢アメーバ分離株の識別が可能と考えられ、分離株の疫学研究に有用であることが示唆された。

E. 結論

蛋白網羅的解析法の一つである ProteinChip/SELDI-TOF 質量分析により無菌培養系で得られた赤痢アメーバ分離株を解析した結果、蛋白質のピーク・プロファイルの違いから、それぞれの株を区別することができることが明らかになった。また、*E. invadens* の栄養型と嚢子を同様に比較した結果、蛋白質ピーク・プロファイルの違いが顕著であった。それ故、この方

法は赤痢アメーバ分離株の疫学研究に有用であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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) Makioka A, Kumagai M, Takeuchi T, Nozaki T (2006) Characterization of protein geranylgeranyltransferase I from the enteric protist *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 145(2), 216-225.
- 3) Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T (2006) Effect of artificial gastrointestinal fluids on the excystation and metacystic development of *Entamoeba invadens*. *Parasitol. Res.* in press

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. 米子. 2005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 II 型の解析. 第74回日本寄生虫学会大会. 米子. 2005年4月.
- 3) 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年7月.

- 4) 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. 京都. 2005年10月.
- 5) 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. 京都. 2005年10月.
- 6) 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. 帯広. 2005年10月.
- 7) 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. 東京. 2005年11月.
- 8) 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. 福岡. 2005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

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

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 赤痢アメーバ感染の重症度、薬剤反応性などに影響を与える原虫側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発現を網羅的解析し、分離株をタイピングすることを可能とする方法論の確立を目的とした研究を行った。赤痢アメーバの全遺伝子を網羅した DNA マイクロアレイをデザイン、作成し、標準株を用いてその有用性を確認した。これにより、全遺伝子発現プロファイルに基づく新たな原虫タイピング法を用いるための基礎が確立された。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極めて重要である。

A. 研究目的

赤痢アメーバ症は我が国の知的障害者施設において高い感染を引き起こし、精神医学衛生上の重大な問題を引き起こしている。また、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、一般の性行為感染症としての危険性が高まっている。我が国におけるアメーバ症浸淫の現況を正確に理解するとともに、国内における感染ルート、施設内・施設利用者の移動に伴う施設間での感染を未然に防ぐことが重要である。しかしながら、そのために必要な科学的アプローチは決して確立されているとは言えず、最新の分子疫学的手法に基づく科学的手法の確立が危急である。

我々の研究グループはこれまで赤痢アメーバ原虫の遺伝的な多様性について、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, Ali, et al., EMOP, 149-154; 2004; Nozaki et al., Arch Med Res 277-279, 2006)。これら一連の研究により、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、国内外の分離株を系統分類することに成功した。これまで、赤痢アメーバ株の分類には原虫の解糖系酵素の電気泳動によるザイモデーム解析が用いられてきた。我々はそれと変わる高解像度マッピング法を開発した訳である。しかし残念ながら、この方法は時間と労力を有し、多くの分離株のタイピングには不向きである。近年多くの遺伝子を担体に固着化した DNA マイクロアレイを用いて遺伝子の多型性や遺伝子の発現レベルを網羅的に解析する方法が様々な分離株のタイピングに用いられ始めた。本研究ではこの高速・高感度な DNA マイクロアレイ法を用いて国内外の赤痢アメーバ分離株をタイピングする方法を開発することを目的として初年度の研究を行った。

B. 研究方法

1. 培養

HM1:IMSS cl6 の培養は Diamond の BI-S-33 培地を用いた無菌培養により行った。マウスの腸管感染モデルは CBA/J マウスを用いて記述の方法により行った(Haupt J Immunol 169, 4496-4503, 2002)。

2. RNA の調整

RNA は約 5×10^5 の原虫から Trizol 試薬を用いて抽出した。更に RNeasy を用いて精製した。コントロール RNA は未感染の CBA マウスから同様の手法により獲得した。

3. 赤痢アメーバマイクロアレイの作成

赤痢アメーバのゲノムデータベースに登録された 9435 のタンパク質遺伝子のうち重複を含まない 7712 の遺伝子を網羅するアフィメトリクス社製の DNA マイクロアレイを作成した。

4. ハイブリダイゼーションおよびデータ解析

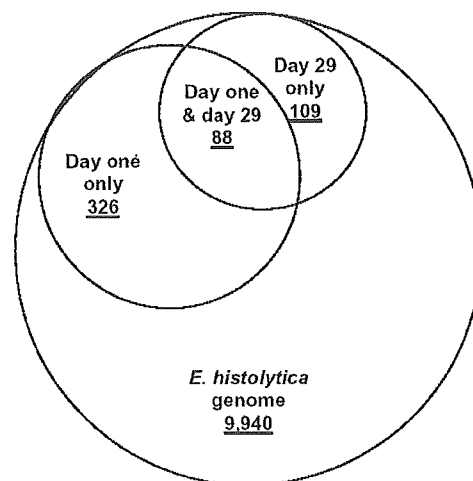
50ng の RANA サンプルから SPIA リニア RNA 増幅システムを用いて cDNA を増幅した。これにより得られた 5 μ g の cDNA を用いてアレイのハイブリダイゼーションを行った。更にアレイを洗浄後、ストレプトアビジン-フィコエリスリン系で発光させ、スキャナーでシグナルを検出した。得られたデータは gcRMA アルゴリズムにより解析し、SAM (significance analysis of microarray) 法により統計的有意性を検定した。

(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. 赤痢アメーバ遺伝子の発現解析

7000 を越える全遺伝子のうち、80%以上が無菌培養された HM-1 株でも、腸管感染から得られた HM-1 株でも発現していることが確認された。523 の遺伝子 (5.2%) が腸管感染により、その発現が変化していた。無菌培養株と比較した場合、326 の遺伝子が腸管感染 1 日目に発現が変化していた。109 の遺伝子は腸管感染 29 日目に、88 の遺伝子は両方の時点で発現が変化していた。これらの遺伝子のうち 45% の遺伝子は "hypothetical" と注釈付けされており機能未知であった。



2. アレイデータの定量 PCR による確認

代表的な 11 の遺伝子に関して定量 PCR によって確認を行ったところ DNA マイクロアレイのデータと高い相関を示し、DNA マイクロアレイのデータの確かさが確認された。

LOCUS REPRESENTED BY PROBE SET	Length of time in vivo (days)	Array*		qRT-PCR**		Gene Annotation
		fold difference	SAM q value	fold difference	p value (t test)	
34.m00259	29	8.29	0	6.2	0.0006	hypothetical protein
56.m00149	29	5.45	9	23.2	0.017	Cobalamin binding protein
395.m00028	1	14.65	0.0165	2.2	0.01	EMFSL1
347.m00051	1	2.57	0.0482	1.49	0.64	typhlophorase
613.m00022	1	-1.86	0.018	-2.37	0.01	URE3-BP
2.m00532	1	2.54	0.010	0.94	0.84	cysteine protease 5
147.m00095	1	1.07	0.51	1.02	0.87	RNA polymerase II L
1.m00673	1	-1.62	0.09	-1.1	0.73	LgB5
176.m00112	29	1.52	0.68	1.2	0.55	TSA
344.m00043	29	1.12	0.7	-1.03	0.86	RNA polymerase II subunit 13
132.m00118	29	1.14	0.7	1.05	0.85	cysteine protease 10

3. 腸管寄生において変化する遺伝子群の解明

腸管感染 1 日目で変化した多くの遺伝子が 29 日目に通常の発現に戻っていた。したがってこれら 1 日目に発現の変化する遺伝子はストレス応答の結果である可能性がある。Hsp70, Hsp90 などのストレスタンパクは確かに上昇していることが明らかとなった。しかしながら、Hsp70 ファミリーに属する他の 2 遺伝子や DnaJ, Rad52 などのストレス応答遺伝子の発現は逆に感染 1 日目に低下していた。

3. 病原性遺伝子システインプロテアーゼ群の発現解析

赤痢アメーバの病原性関連因子としてもっともよく研究されているシステインプロテアーゼには30を越えるメンバーが存在する。このアレイ上に存在し、システインプロテアーゼと注釈された29の遺伝子のうち、20が発現していた。そのうち12は既にBruchhausらにより報告されている。腸管感染によりもっとも顕著に変化したのはCP4であり、28-35倍の上昇を認めた。次いで、CP6が6-9倍、CPIが1.7-2.4倍の上昇を示した。一方CP8は逆に5-14分の1に発現が低下した。CP9も同様に2-3倍程度の発現の減弱を認めた。

Probe set	Day one in vivo		Day 29 in vivo		in vitro Ameba	Annotation of gene represented by probe set ^a
	fold difference	SAM q value	fold difference	SAM q value		
06m00342_at	28.53	8.59	35.41	0.69	87	cysteine protease 4 ^b related
21m00546_at	9.4	0.29	6.44	0.11	97	cysteine protease 6 ^b related
241m00078_s_at 25m00156	1.7	0.69	2.38	0.04	5403	cysteine protease 1 ^b
501m00219_s_at	-14.31	0.51	-4.88	0.02	1994	cysteine protease 3 ^b
21m00532_at	7.94	0.32	2.89	0.41	72	cysteine protease 19 ^b
162m00118_at	1.24	0.16	1.11	0.75	853	cysteine protease 19 ^b
190m00101_at	1.2	0.48	1.01	0.70	278	cysteine protease 17 ^b
222m00081_at	1.11	0.41	-1.04	0.61	8	cysteine protease 16 ^b
24m00271_at	1.05	0.51	-1.11	0.60	23	cysteine protease 19 ^b
241m00066_at	-1.49	0.17	1.09	0.70	510	cysteine protease, putative
140m00041_at	-1.65	0.06	-1.5	0.28	36	cysteine protease 13 ^b
191m00117_at	-1.48	0.06	-1.2	0.47	2827	cysteine protease 5 ^b related
21m00122_at	-1.09	0.39	-1.1	0.60	255	cysteine protease, putative
24m00493_at	-1.25	0.29	1.47	0.60	1356	peptidase, putative
25m00145_at	1.11	0.51	1.27	0.53	295	C1H4-like cysteine protease, putative
31m00597_at	1.06	0.51	1.2	0.69	142	calpain-like cysteine protease, putative
109m00092_at	N/A	N/A	2.98	0.06	8	cysteine protease H-related ^b
27m00133_at	-1.55	0.02	-1.63	0.40	36	cysteine protease, putative cp11 ^b

3. 水平転移により獲得された赤痢アメーバ独特な遺伝子の発現パターンの解析

赤痢アメーバの代謝に関与するタンパク質・遺伝子の多くが真性細菌・古細菌の祖先生物から水平転移(Lateral gene transfer, LGT)によって獲得されたことが知られている。そこでこれらの遺伝子の発現パターンが統合的な制御を受けている可能性を確認した。96のLGTを受けたことの知られる遺伝子のうち84が発現していた。そのうちの11は腸管感染により少なくとも2倍以上減少し、6は2倍以上上昇していた。

Probe set	Day one in vivo		Day 29 in vivo		Annotation of gene represented by probe set
	fold difference	SAM q value	fold difference	SAM q value	
295m00056_at	-2.65	0.02	-2.83	0.05	hexylhydrolase, putative
22m00281_at	-1.15	0.36	-2.01	0.02	lysosteine aminolysase, putative
955m00028_s_at	14.05	0.02	1.35	0.70	melibiose aminohydrolase
247m00051_at	2.64	0.04	1.33	0.69	hyaluronidase, putative
25m00254_at	-2.68	0.02	-1.65	0.25	nicotinate phosphoribosyltransferase, putative
201m00078_s_at	-3.20	0.01	-5.95	0.00	serine acetyltransferase
36m00222_s_at	2.01	0.01	1.42	0.60	serine transferase, putative
782m00013_s_at	-1.16	0.01	-1.79	0.00	D-3-phosphohydroxypyruvate dehydratase, putative
51m00195_at	-2.63	0.01	1.41	0.70	hydroxyphospho-dependent phosphotransferase
31m00425_at	5.53	0.01	2.05	0.02	link-1,4-beta-glucanase, putative
10m00031_at	-2.95	0.01	-2.06	0.09	2,1,7-triphospho-3-oxoacid synthase, putative
10m00253_s_at	-3.5	0.02	-1.22	0.53	hydroxyornithine aminotransferase
169m00068_s_at	2.48	0.01	1.57	0.14	hydroxyindolease, putative
21m00283_at	-3.10	0.00	-1.18	0.57	5c5S chaperone protein HPII, putative
100m00145_at	-10.53	0.00	-1.08	0.07	tyrosine synthase, putative
78m00132_s_at	2.82	0.02	1.82	0.14	threonine synthase small subunit, putative
140m00041_at	-2.65	0.00	-1.25	0.63	serforitin-aminonitrilase, putative

D. 考察

我々は多くの赤痢アメーバ分離株のタイピングを簡便にしかも高解像度で行うことができるように、DNA マイクロアレイを用いた解析法を開発した。そのために国際標準であるアフィメトリクス社のDNA マイクロアレイのプラットフォームを用いて、赤痢アメーバの全遺伝子を網羅したアレイを作成した。更に初年度はその実用化を目指して、Proof of Conceptを確認する予備的な実験を行い、その有用性を確認した。

我々は作成したアレイの結果を独立した方法で証明するために代表的意見に関して定量PCRを行ったが、その結果はDNA マイクロアレイ法の確かさを証明することとなった。しかしながら発現の違いの相対値(何倍の変化か?)は必ずしも一致せず、発現の有無による定性的な評価が分離株のタイピングの際には安全だと考えられる。

DNA マイクロアレイによる解析によると、赤痢アメーバの全遺伝子のうち80%が発現されていた。この知見は驚きであったが、同時に高い解像度をもつマッピングをすることを可能とすると予想される。今後、DNA マイクロアレイは赤痢アメーバ分離株のタイピングにも用いられる他、原虫の増殖・寄生・病原性などの解明にも応用できると考えられる。

本年度の我々の研究によりDNA マイクロアレイを用いた発現解析法がほぼ確立され、同時にこの手法を用いた赤痢アメーバ分離株のタイピング法が可能とな

った。次年度以降この結果を応用し、国内外の赤痢アメーバ株のタイピングを実行したい。

E. 結論

本研究の目的である、臨床・疫学研究への応用が期待できる新規タイピング法の構築は、初年度に順調に成果を挙げ、赤痢アメーバのDNAマイクロアレイを用いた世界初の解析が行われた。次年度以降この方法論を利用し、国内外の分離株を用いてタイピングを実施する予定である。最後に、本研究が提供した新規タイピング法は、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。更に国内における感染予防法の確率にとって重要な貢献をすると予想される。

F. 研究発表

1. 論文発表

英文

- i. Beck, D.L., Boettner, D., Dragulev, B., Ready, L., Mackey, A.J., Nozaki, T., Pearson, W.R., and Petri, Jr., W.A. (2005) 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.
- ii. Saito-Nakano, Y., Loftus, B. J., Hall, N., and Nozaki, T. (2005) The diversity of Rab small GTPases in *Entamoeba histolytica*. *Exp. Parasitol.* 110, 244-252
- iii. Nozaki, T., Kobayashi, S., Takeuchi, T., and Haghghi, A. (2006) The diversity of clinical isolates of *Entamoeba histolytica* in Japan. (review) *Arch. Med. Res.* 37, 276-278.

和文

- i. 野崎智義 (2005) 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 pp31-33.

- ii. 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
- iii. 野崎智義 (2006) 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 in 現代寄生虫病事情 医歯薬出版 pp91-97

2. 学会発表

- i. 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. Nov 7-9, 2005, Caxambu, MG, Brazil.
- ii. Nozaki, T. The diversity and peculiarity of Rab small GTPase in vesicular trafficking of the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. XV Seminar on Amebiasis. Jan 31-Feb 3, 2006, Oaxaca, Mexico.

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。

厚生労働科学研究費補助金
分担研究報告書

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

分担研究者 所 正治 金沢大学大学院医学系研究科 講師

研究要旨:国内外からのヒトおよび動物由来のジアルジアを検体として、遺伝子型解析による評価を実施した。その結果、国内コンパニオンアニマルからは遺伝子型 C と D が検出され、また、国内外からのヒト由来の検体においては主に遺伝子型 A と B、そして、インドネシアサンプルの一部から C と D が検出された。ヒト由来の検体において見いだされたイヌ・ネコ特異的とされてきた遺伝子型 C と D は、感染機会があれば、コンパニオンアニマル由来のジアルジアがヒトへも感染しうる危険性を示唆する。また、同定されたゲノム上のターゲット塩基配列の大部分は、報告されているリファレンス配列とはわずかに異なる多型 (microheterogeneity) の存在を示し、このため、ターゲット配列のシーケンスおよび系統樹解析によるクラスタリングがジアルジアの遺伝子型決定には不可欠と考えられた。ジアルジアにおける遺伝子型決定法については、プラスミドへのサブクローニングを実施することで、異なる遺伝子型間での混合感染サンプルからも各遺伝子型の決定が可能なが確認された。しかしながら、ジアルジアのゲノムにおける特性 (GC contents > 70%) を原因とする PCR での増幅不良が見られ、GC-rich テンプレートのための専用キットの使用と、DMSO 等の添加によるプロトコルの微調整が必要だった。したがって、施設内感染の評価のために、現在使用されている遺伝子型決定法を国内各所の検査室において実施していくためには、最適化による標準法の確立とその普及が重要である。

A. 研究目的

ジアルジア *Giardia intestinalis* (Syn. *G. duodenalis* and *G. lamblia*) は、旅行者下痢症の原因原虫として注目されているが、先天性および後天性免疫不全症例での慢性化・劇症化に認められる症状の厳しさと共に、欧米における、プール、水道水を介したアウトブレイクの多数の報告から、国内においてもクリプトスポリジウムとともに水系感染によ

る大量発生に対する警戒が必要な原虫の一つと考えられる。また、本原虫症は、ヒトを含む幅広いほ乳類 (41 種が報告されている) を宿主とする形態学的には同一の *Giardia intestinalis* による人獣共通感染症であり、コンパニオンアニマルや家畜等からのヒトへの感染のリスクが懸念されている。そこで、本研究においては、施設内感染に係わる原虫症としてジアルジア症をターゲットとし、

- 1) 集団感染解析のためのツールとしてのジアルジアにおける遺伝子型解析法の確立
- 2) コンパニオンアニマルおよび国内外のヒトに分布する本原虫の疫学データ収集の2点を目的とし、分子疫学的アプローチによる研究を実施した。

B. 研究方法

動物由来のジアルジアとしては、金沢市内の複数のペットショップの347頭のイヌの糞便検体を顕微鏡的に検査し、ジアルジア陽性となった検体(87頭、25.1%)からランダムに10サンプルを選択したものをを用いた。また、ヒト由来のジアルジアについては、ネパールの学童(6-12歳)から採取されたジアルジア陽性の20サンプル、インドネシアの乳幼児から採取されたジアルジア陽性の16サンプル、また、ルーマニアの孤児院での集団発生例のジアルジア陽性の2サンプル、国内での海外帰国者1サンプル、免疫不全症例1サンプル、計40サンプルを用いた。各糞便サンプルからのジアルジアのシストの精製はシヨ糖遠心浮遊法によって実施し、QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN) を用いてDNAを抽出した。遺伝子型解析のためのPCRは、現在、もっとも多くのリファレンス配列の報告されている *G. intestinalis* の glutamate dehydrogenase (GDH) 遺伝子と18S ribosomal RNA 遺伝子をターゲット遺伝子としたプライマーセットを(表1)を使用した。PCRは、TAKARA LA Taq with GC Buffer (TAKARA) の標準プロトコルにおいて、GC buffer I を用い、アニーリング温度 50°C、伸長時間 40 秒、サイクル数 30 回、5% DMSO 添加の条件で実施した。増幅産物は、1.5% アガロースエチジウムブロマイドゲルを用いて電気泳動によって確認後、ゲル内から切り出し、Quantam Prep Freeze 'N squeeze DNA Gel Extraction Spin Columns (Bio-Rad) およびエタノール沈殿に

よって精製を行った。PCR 増幅産物の DNA 配列決定には、BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) および ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いた。得られたシーケンスの解析は CLISTAL W (ver. 1.8) を使用したマルチプルシーケンスアライメントおよび系統樹解析 (Neighbor-Joining 法) によって実施した。また、異なる遺伝子型の混合感染がシーケンス波形より疑われたサンプルに関しては、PCR 後の増幅産物を TaKaRa BKL Kit (TaKaRa) を用いてベクター (pBluescript IIKS+, STRATA GENE) にサブクローニングし、上記と同様にシーケンス・解析した。

表1 使用したプライマーセット

GDH 遺伝子については seminested-PCR のために external forward primer (eF) と internal forward primer (iF) を用いた。

Target gene	Product size	Primer sequence
GDH	455 bp	eF : TCAAGGTYAAYCGYGGYTTCCGT
	432 bp	iF : CAGTACAACICXGCTCTGG
		R : GTTTCCTTCGACATCTCC
18S rRNA	480 bp	F : TCCGGYAGATCTCCCGG
		R : CTGGATTACCGCGGCTGCT

C. 研究結果

イヌ由来サンプルでは7検体、ヒト由来サンプルではインドネシア13検体、ルーマニア2検体、ネパール9検体、国内2検体において、GDHもしくは18SrRNAのPCR増幅産物のシーケンス決定を行うことができた(表2)。しかしながら、イヌサンプルの3検体、ヒトにおいては、インドネシアの3検体、ネパールの11検体において、PCRによる増幅産物を得ることができなかった。

また、混合感染を疑う波形を示したサンプルとしてインドネシアの1検体 (Indonesia13) について、サブクローニン

グを実施し、得られた 10 プラスミドから 2 種の遺伝子型を決定した (Assemblage B と C による混合感染)。表 2 および図 1 に見られるように、イヌ由来サンプルからはイヌ・ネコを宿主とするタイプである Assemblage C と D が検出された。また、ヒト由来サンプルからは人獣共通感染の原因となる Assemblage A と B の他、インドネシアのヒト検体より GDH 遺伝子を対象とした解析にてイヌ・ネコ特異遺伝子型とされてきた Assemblage C と D が検出された。

これらの解析は、現在までに決定された 208bp (GDH) および 384bp (18SrRNA) の各ターゲット遺伝子の共通部分配列を用いた系統樹解析によって実施されたが、GDH と比較すると、シーケンス決定された部分が長いにもかかわらず、18SrRNA における多型は B3、B4 といった亜型の詳細を解析するレベルの解像度を示さなかった (Data not shown)。しかしながら、今回のサンプルの解析結果において、ターゲットとする遺伝子座によって遺伝子型分類に矛盾が生じるような結果は、見いだされなかった。

表 2 にある亜型 (Sub-genotype) とは、各 Assemblage のリファレンスの塩基配列と 100% の相同性を示さないものの、系統樹解析において統計的に有意なクラスタリングがリファレンスの各 Assemblage との間で認められたサンプルを意味する。表 2 に見られるように、ほとんどのサンプルにおいて、リファレンスと 100% の相同性を認めることはなく、ジアルジアのゲノムには幅広い多型の存在が認められることが確認された。

遺伝子解析のための方法としての問題点は、PCR 増幅産物がしばしば得られない点だった。通常の検査で用いられている TAKARA の EX Taq では、ほとんどの検体において増幅産物が得られなかったが、この点は、方法で示した TAKARA の LA Taq with GC buffer を 5% DMSO とともに使用することで、大幅に

改善された。また、GDH のシーケンスにおいて、PCR 産物は 432bp にもかかわらず、208bp の部分配列のみが解析に使われていることに示されているように、シーケンスにおいてもジアルジアのゲノム遺伝子を材料とした配列決定には、しばしば困難をとめない、現在まで、全長の決定に至っていない。

表 2 ジアルジアサンプルとその遺伝子型 GDH, 18SrRNA の両方あるいはいずれかで遺伝子型を決定できたサンプルを示した。Sub は、データベース上のリファレンス配列と 100% の相同性を示さなかった亜型を、また、N. D. : not determined は、主に PCR による増幅産物が得られず解析ができていないことを示す。

Place	Sample	Host	Assemblage	
			GDH	18S rRNA
Kanazawa (7 samples)	Dog01	dog	Sub D	Sub D
	Dog02	dog	N. D	Sub C
	Dog03	dog	Sub C	N. D
	Dog04	dog	C2	Sub C
	Dog05	dog	N. D	Sub D
	Dog06	dog	Sub D	Sub D
	Dog07	dog	Sub D	D
Indonesia (13)	Indonesia01	human	N. D	Sub B
	Indonesia02	human	N. D	Sub B
	Indonesia03	human	Sub B	Sub B
	Indonesia04	human	Sub B	Sub B
	Indonesia05	human	B4	Sub B
	Indonesia06	human	Sub B	Sub B
	Indonesia07	human	N. D	Sub B
	Indonesia08	human	Sub D	N. D
	Indonesia09	human	Sub C	A
	Indonesia10	human	N. D	Sub B
	Indonesia11	human	Sub B	Sub B
	Indonesia12	human	A2	N. D
	Indonesia13	human	Sub B	Sub B
Nepal (9 samples)	Nepal01	human	B4	Sub B
	Nepal02	human	Sub B	Sub B
	Nepal03	human	Sub B	N. D
	Nepal04	human	Sub B	Sub B
	Nepal05	human	Sub B	Sub B
	Nepal06	human	Sub B	Sub B
	Nepal07	human	Sub B	Sub B
	Nepal08	human	B4	Sub B
	Nepal09	human	Sub B	N. D
Romania (2 samples)	Romania01	human	A	A
	Romania02	human	N. D	A
Japan (2 samples)	Japan01	human	Sub B	Sub B
	Japan02	human	Sub B	Sub B

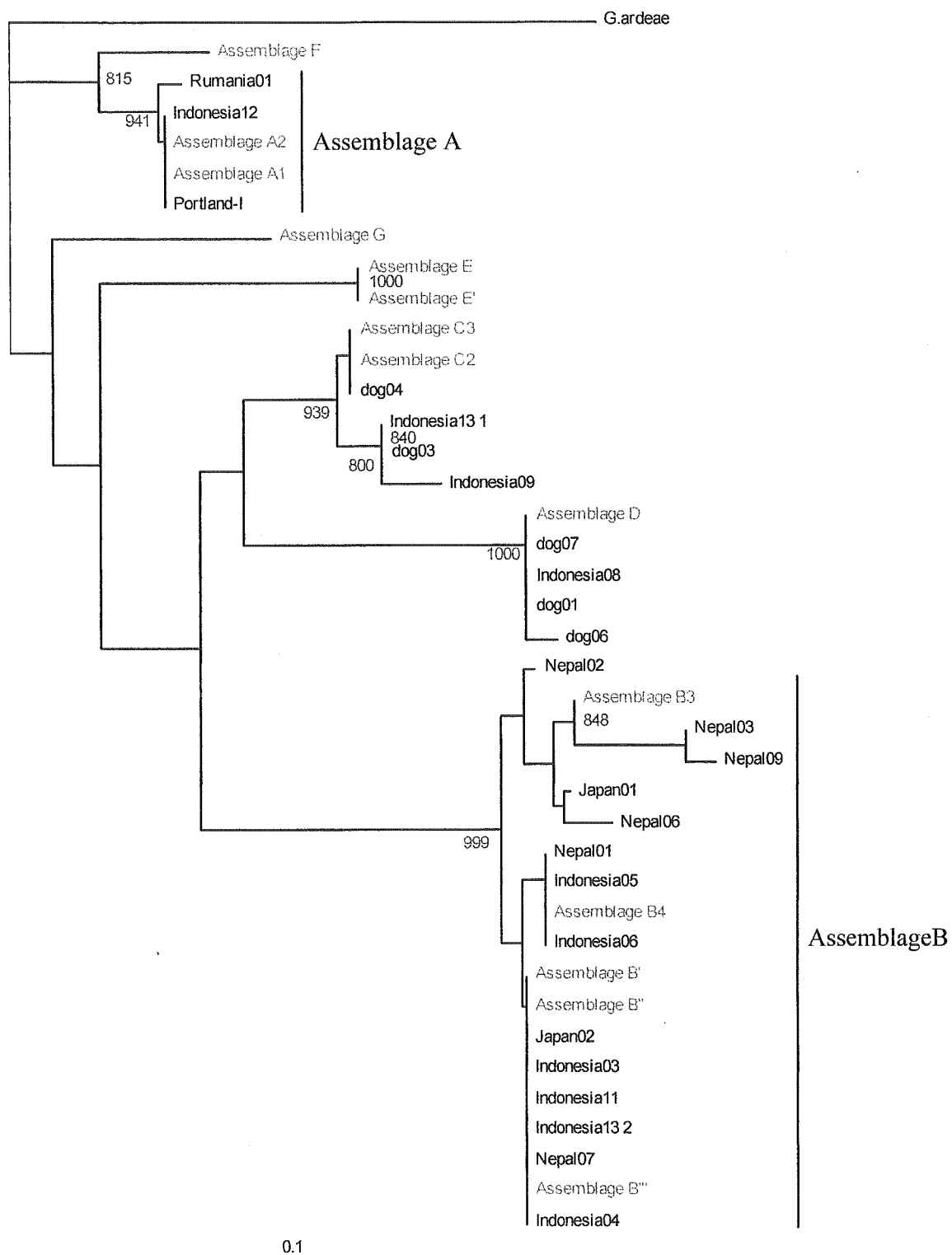


図1 *Giardia intestinalis* の glutamate dehydrogenase 遺伝子を用いた系統解析結果 (N-J法)
 黒文字で本研究で同定したサンプルの配列を、グレーの文字でリファレンスの配列を示した。
 NJ tree by 208bp GDH partial sequences. Bootstrap value with 1000 replications.
 Out-group; *G. ardeae* (鳥類由来のジアルジア).

D. 考察

ジアルジアは形態学的特徴および宿主の違いにより、両生類型である *G. agilis*、げっ歯類型である *G. muris*、鳥類型である *G. ardeae*、そしてほ乳類型である *G. intestinalis* と分類されてきた。中でも *G. intestinalis* は下痢を主症状とするジアルジア症の原因となる腸管寄生原虫であり、その宿主はヒトに限定されず、ペットや家畜などの幅広い哺乳動物に感染することが知られている。近年の研究成果は、各種哺乳動物から検出される *G. intestinalis* は形態学的にこそ区別はつかないが、遺伝学的には異なることを示唆し、遺伝子解析による系統樹の知見に基づいた新たな分類が試みられるようになってきた。現在、主に使用されているのは glutamate dehydrogenase (GDH) と 18S ribosomal RNA (18S rRNA) の 2 種の遺伝子を用いた系統樹解析による方法であり、これまでに Assemblage A, B, C, D, E, F, G の 7 つのタイプが報告されている。このうち、A と B がヒトを含む多くのは乳類に感染し、zoonosis の原因となると考えられ、C と D がイヌとネコ、E が家畜、F と G がそれぞれネコとネズミの宿主特異性を示すことが知られている。

本研究においては、これらの 7 つの遺伝子型のうち、4 種を見いだすことができた。これらの DNA サンプルは、今後、ジアルジアの遺伝子型解析を進めていくためのリファレンスサンプルとして利用可能である。また、これらの 4 遺伝子型 A, B, C, D はすべてヒトから分離されたが、中でも C と D は、金沢市内のペットショップのイヌの約 25% から検出された遺伝子型であり、ヒトへの感染性を示しうるとの今回の結果は、重要である。これまでに C, D 型のヒトからの検出例はインドの紅茶栽培地域での疫学調査が知られている。この場合には、ヒトとイヌとの居住

地域における密接な接触が指摘されており、この点は今回のインドネシアにおけるサンプル採取部落における状況においても同様だった。先進国における C, D 型のヒトからの分離例は知られていない。しかしながら、屋内飼育犬の存在もあり、コンパニオンアニマルからヒトへのジアルジアの感染の危険性は、先進国においても十分に認識されるべきである。

本研究では、また、ジアルジアの種内における幅広い遺伝子多型の存在が明らかになった。したがって、本研究で示した PCR による遺伝子型決定法による分子疫学的評価は、施設内でのアウトブレイクが発生した場合の、感染ルートの推定等の対策構築のための基礎データ収集に有用なツールとなりうる。

しかしながら、ジアルジアにおける遺伝子型決定法は、方法論的に問題点のあることもまた、明らかになった。本原虫の持つ 70% 以上の GC 含有率を示すゲノム DNA は、PCR 産物の増幅においても、また、サイクルシーケンスの反応においても、しばしば反応を阻害し、適切な条件設定が不可欠である。

E. 結論

従来の形態分類では鑑別不能であった *G. intestinalis* の種内での多型解析が PCR とシーケンスを用いた遺伝子型決定によって可能であることが示された。本遺伝子型決定法には、ジアルジア特異的な問題点が存在するが、最適条件の設定によって分子疫学的な評価において有用なツールとなりうる。また、ヒト以外の動物に特異的に感染すると考えられてきた遺伝子型においてもヒトへの感染例が見いだされ、本遺伝子型決定法による病型や宿主特異性と遺伝子型の関連については、十分なデータが未だ得られていないことが示された。したがって、今後のさらなるデータ収集、解析による評価は、本法を有用

なツールとして使用していく上での重要な課題である。

F. 健康危険情報

金沢市内のペットショップで飼育されるイヌの約25%からジアルジアが検出された。遺伝子型はCおよびDであり、先進国でのヒト症例の報告されていないタイプだが、発展途上国では、本研究でも示したように時にヒトから検出される。コンパニオンアニマルからヒトへのジアルジア感染の危険性について、留意されたい。

G. 研究発表

1. 論文発表

(英文)

1) Nozaki T, Ali V, Tokoro M

Sulfur-containing amino acid metabolism in parasitic protozoa.

Advances in Parasitology. 2005;60:1-99.

2) 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 Journal of Infectious Disease 2005; 58:57-58

(和文)

1) 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
日本臨床寄生虫学会誌 2006. 3;16(1):53-57

2) 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

日本臨床寄生虫学会誌 2006. 3;16(1):9-12

3) 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

日本臨床寄生虫学会誌 2006. 3;16(1):73-75

4) 所 正治、井関基弘

クリプトスポリジウム

広範囲血液・尿化学検査・免疫学的検査—その数値をどう読むか—[第6版]

日本臨床 2005. 7;63(7)増刊号:256-258

5) 福羅匡普、川原 弘、山田真善、高瀬修二郎、及川陽三朗、所 正治

PCR法による糞便中遺伝子の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 2005. 5. 1;95(5):989-991

6) 所 正治

赤痢アメーバの病原性

臨床と微生物 2005. 5;32(3):227-231

2. 学会発表

1) Kentaro Nakamoto, Tomoko Arai, Motohiro Iseki, Tomoyoshi Nozaki, Masahuro Tokoro
Characterization of

S-adenosyl-L-methionine synthase from *Entamoeba histolytica*

XV SEMINAR ON AMEBIASIS, Oaxaca, Mexico, January 31 to February 3, 2006

2) Masaharu Tokoro, Kentaro Nakamoto, Seiki Kobayashi, Tomoyoshi Nozaki

In vitro and in vivo effect of trifluoromethionine: a prodrug targeting methionine gamma-lyase, against *Entamoeba histolytica* trophozoites

XV SEMINAR ON AMEBIASIS, Oaxaca, Mexico, January 31 to February 3, 2006

3) 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. 11、東京

4) 仲本賢太郎、所 正治、野崎知義
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alariaフォーラム、
2005. 11、東京

5) 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リアルタイム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alariaフォーラム、
2005. 11、東京

6) 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. 8、
帯広

7) 仲本賢太郎、所 正治
L-methionine-S-adenosyltransferase の解析：抗原虫薬ターゲットとしての可能性
第13回分子寄生虫ワークショップ、2005. 8、
帯広

8) 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による定量トリアル
第13回分子寄生虫ワークショップ、2005. 8、
帯広

9) 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. 6、東京

10) 所 正治、井関基弘
腸間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. 6、東京

11) 所 正治、野崎知義、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. 4、米子）

12) 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. 4、米子）

H. 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。

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

分担研究者 鈴木 淳 東京都健康安全研究センター微生物部病原細菌研究科

研究要旨 1) 赤痢アメーバ施設内集団感染の実態調査：2004年度に調査を終了した東京都知的障害者更生施設6施設に加え、2005年7月より新たに同じ東京都および近県の施設について2006年2月現在、知的障害者更生施設4施設、461名の糞便検査（顕微鏡検査、赤痢アメーバ抗原検出、PCR法による遺伝子診断）が終了している。いずれの施設からも赤痢アメーバ感染者は検出されなかったが、3つの施設において腸管寄生原虫である大腸アメーバ、小形アメーバおよびランブル鞭毛虫へのいずれかの感染が認められた。2) PCR法によるジアルジア検出法の改良：ジアルジアのGDH遺伝子を標的としたジアルジアの遺伝子型の効率的な決定方法を検討した結果、新たに設定したGDHF1 primerとGDHB4 primerによる一回目のPCRと、これまで報告されているGDHF3とGDHB5 primer二回目のPCRによるnested PCRにより、効率的に遺伝子型を決定することが可能となった。3) 東京都定点医療機関受診者(女性)の赤痢アメーバ抗体保有率調査：2005年度の赤痢アメーバ抗体陽性率は4.8%であった。2003年と2004年度の抗体陽性率が、それぞれ1.5%と3.7%であることから、この3年間、抗体保有率に上昇傾向が見られ、ヘテロセクシュアル間の性行為を通して感染する女性の赤痢アメーバ感染者数が増加していることが示唆された。

A. 研究目的

1) 施設内腸管寄生原虫の感染実態調査：

下痢症の原因となる腸管寄生性原虫の人への感染は、主に無症状感染者の糞便中に排出される感染型原虫（シストまたはオーシスト）を手指や飲食物を介して経口摂取することにより成立する。そのため、適切な糞便の処理や手洗いによりその感染防止が可能であるが、自ら感染防止対策を行うことが困難な人が利用する施設においては、感染者の存在が施設内での集団下痢症につながるものが危惧される。そこで、知的障害者施設における赤痢アメーバ等の腸管寄生原虫の感染実態調査を行い、その結果をもとに赤痢アメーバ症のより効果的な予防と防御対策を立案する。そしてこれらの対策を実施、評価、改良し、他施設へ還元すること及

び今後の厚生・福祉行政へ反映させることを目的とする。

2) PCR法によるジアルジア検出法の改良：

これまでジアルジアのクルタミン酸デヒドロゲナーゼなどを標的としたPCR法と得られたPCR増幅産物の塩基配列の解析結果から、Assemblage AからGの遺伝子型に分類されている。しかし、糞便中のジアルジア数やジアルジアの遺伝子型によっては、これまで報告されているプライマーでは効率的にPCR増幅産物が得られない場合がある。そこで、それらの問題点を解決するために、新たにプライマーを設計し、効率的にジアルジアの遺伝子型を決定することを目的とする。

3) 東京都定点医療機関受診者(女性)の赤痢アメーバ抗体保有率調査：ヘテロセクシュアル間

の性行為感染症としての赤痢アメーバ症の実態調査を目的とする。

B. 研究方法

1) 赤痢アメーバ等の腸管寄生原虫の施設内感染状況の実態調査と治療後のフォローアップ調査: 東京都の知的障害者更生施設を対象として新たに 2005 年 7 月から東京都健康安全研究センターにより調査が開始され、2006 年 2 月現在 4 施設、461 名の糞便検査 (顕微鏡検査、赤痢アメーバ抗原検出、PCR 法による遺伝子診断) を終了した。

2) 新たなプライマーによるジアルジア遺伝子の検出法: グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GDH) 遺伝子約 1,120bp のうち、新たに設計した GDHF1 primer (5' -GCTGGACGCATCAACGTCA A) GDHB4 primer (3' - GTTGCCTTGCACATCTCCT) による一回目の PCR 反応を行った後、これまで報告されている GDHF3 と GDHB5 primer による二回目の PCR 反応による nested PCR により得られた PCR 増幅産物の塩基配列を解析し、ジアルジアの遺伝子型を決定した。

3) 東京都感染症サーベイランス事業における東京都定点医療機関 (1 箇所) の協力を得て、受診者 (女性) を対象として、血清学的に赤痢アメーバ抗体保有率の調査を行った。検査方法は赤痢アメーバ無菌培養株 (HM-1:IMSS, c16) を抗原として、プレート ELISA (IgG) 法により行った。

C. 研究結果

1) 新たに検査した 4 施設 (G, H, I, J) からは 2004 年度までに調査した 6 施設と同様、赤痢アメーバ感染者は検出されず、4 施設中 1 施設については検便から腸管寄生の原虫が全く検出されなかった。しかしながら 3 施設において

は前回の調査でも検出された大腸アメーバ、小形アメーバおよびランブル鞭毛虫へのいずれかの感染が見られた。これら原虫感染者の内訳は施設 G: 腸管寄生原虫; 0/44 (0%)、施設 H: 小形アメーバ; 1/39 (2.6%)、施設 I: 大腸アメーバ; 6/33 (18.2%)、施設 I: ランブル鞭毛虫; 1/345 (0.29%)、大腸アメーバ; 13/345 (3.8%) 小形アメーバ; 17/345 (4.9%) である。ランブル鞭毛虫の感染者に関しては、施設担当医の判断で投薬による治療が行われ、治療後のフォローアップ検査の結果、陰性であった。

2) ジアルジアの GDH 遺伝子を標的としたジアルジアの遺伝子型の効率的な決定方法に関しては、GDHF1 primer と GDHB4 primer による一回目の PCR と GDHF3 と GDHB5 primer 二回目の PCR による nested PCR により、これまで困難だったネコやウシのジアルジアや糞便中のジアルジア数が少ないものも、効率的に遺伝子型を決定することが可能となった。

3) 対象となった東京都定点医療機関における 2005 年度の赤痢アメーバ抗体陽性率は 4.8% であった。また、2003 年と 2004 年度の抗体陽性率が、それぞれ 1.5% と 3.7% であることから、この 3 年間、抗体保有率に上昇傾向も見られており、ヘテロセクシュアル間の性行為を通して感染する、女性の赤痢アメーバ感染者数が増加していることが示唆された。

D. 考察

1) 2005 年度は新たに東京都および近県の知的障害者更正施設の 4 施設 (男性: 225 名、女性: 120 名) を対象として赤痢アメーバ等の腸管寄生原虫の感染実態調査を行うことができた。その結果、赤痢アメーバの集団感染は現在まで確認されていないが、大腸アメーバ、