

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18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19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） 17

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） 20

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

橘 裕司（東海大学医学部） 26

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） 30

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） 35

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） 40

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）

研究要旨

わが国における *Entamoeba histolytica*（赤痢アメーバ）等、腸管寄生性原虫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実態の解明のための疫学調査を行い、前者については更に問題点を把握するとともに感染経路の推定を行い、またモデル施設においては公衆衛生的な介入を試み、施設内感染の予防策を向上させる事を企図した。加えてアメーバ感染の病態の特異性の解明、あるいは感染経路解明のための赤痢アメーバのトレーシング法の確立、施設内赤痢アメーバ感染の大きな特徴である無症候性持続性感染のメカニズム解明のために、マイクロアレイによる DNA 多型の網羅的解析、表面抗原とその遺伝子の多型解析、タンパク質の網羅的解析の手法の確立を試みた。更にランブル鞭毛虫の遺伝子多型性の検索を行い、わが国の分離株の性状解析を試みた。

今年度の新規調査による結果は赤痢アメーバの感染を見いだす事は無かったが、代わりに非病原性腸管寄生性アメーバの高い感染率を有する施設を見いだした。この事は赤痢アメーバが一旦侵入すれば容易に感染が拡大する事を示している。フォローアップ調査では以前施行した制圧対策の有効性が確認されたが、近々予定している公衆衛生的な介入策の成果も取り入れて感染予防ガイドラインを更に改訂する予定である。マイクロアレイによる多型解析はアメーバの毒力の差異によって発現状況が異なる遺伝子がある事を示した。表面抗原である Igl の多型性に関する一連の研究は地理的な赤痢アメーバの分布に対応した差異についての所見を更に補強した。Igl の組み替え型 C 末が優れた肝膿瘍予防効果を与えた事も、今後継続検討する価値があるものと思われた。タンパク質の多型性に関する検討でも国内、国外分離株の差異が明確になり、*E. dispar* との鑑別点も明らかにされた。

研究分担者

野崎智義・群馬大学大学院医学系研究科教授

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

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

わが国の感染症法にて五類に指定されている *Entamoeba histolytica* (赤痢アメーバ) 感染症の患者届出数は近年増加の一途をたどり、原因解明や対策実施が急務となっている。筆者らはここ何年か、厚生労働科研の補助により、わが国の赤痢アメーバ感染のハイリスクグループについて多方面から研究を行い、知的障害者などの更生施設において、赤痢アメーバのみならず、ランブル鞭毛虫など他の腸管寄生性原虫の感染が拡大していると思われる事、利用者の行動特性などの点により、効果的な対策実施がかなり難しい事を既に報告した。化学療法による対応策は既に一応の方針を確立したものの、公衆衛生的なアプローチの導入も必要である事は明らかで、現場に還元できる環境保全ガイドラインの作成など、喫緊の課題も挙げられる。今回の研究は、このような状況に基づ

いて、(1)各種施設利用者における赤痢アメーバを含む腸管寄生性原虫の感染の実態を地方自治体や関係施設と共同して明らかにし、また本研究班の最近の調査によって問題となりつつある異性愛行為によると思われる赤痢アメーバ感染の疫学的な状況について女性を対象として解明する。及びこれまで調査を行った施設のフォローアップ調査を行い、別途作成しつつある施設内腸管寄生性原虫の感染予防のためのガイドラインに基づいて種々の公衆衛生的な介入策を実施し、感染抑止との関連を明らかにする。(2)施設における感染確定者のマッピングなど、種々の疫学的な手法と特異抗原検出など免疫学的トレーシング、及び遺伝子・タンパク質多型などのトレーシング方法を組み合わせ、施設内原虫感染の経路解明をモデル施設などで試行し、結果を評価した上でパッケージとして一般化を図る。(3)マイクロアレイによる遺伝多型性解析、表面抗原の多型性解析、タンパク質の多型性解析などの基盤技術を検討し、総合的に解像力の高い分子疫学ツールを開発する。この方法は上記のように感染経路解明や、株のトレーシング手法の確立、あるいは施設における予防策の策定など、種々の方面に活用を図る。(4)施設内原虫感染、特に赤痢アメーバ感染の大きな病態生理上の特徴であ

る無症候性持続感染の成立機構を実験感染モデルでの持続感染における赤痢アメーバの存在様態、あるいは分離株の病原因子の発現状況などを含む生物学的特徴、感染者の臨床免疫学的特徴などより特定化する。

以上の研究が実施されれば、これまでに社会復帰を必要としている更生施設の知的障害者などの生活を阻害する腸管寄生性原虫感染の抑圧に効果的に対処する途を開く事が可能となる。また衛生教育を含む公衆衛生的な介入策の策定とガイドライン改訂への応用は他の感染症抑圧にも応用可能となるものと期待される。遺伝子・タンパク質の多型性の解析方法の確立も多方面に資するものと思われる。

B.研究方法

1.腸管寄生性原虫の施設内感染及び異性間感染の疫学調査

2006年3月より、新しく東京都管轄の知的障害者更生施設4カ所、327名を対象として腸管寄生性原虫の疫学調査を実施した。検査方法はこれまでと同じく赤痢アメーバについてはホルマリン・エーテル法を用いた糞便の光学顕微鏡検査による嚢子検出、*E. histolytica* II kitによる糞便内の赤痢アメーバの特異抗原検出、及び赤痢アメーバに特異的な遺伝子断片をPCRによって糞便中の多くの場合は嚢子

より確認するという3種類の方法によった。ランブル鞭毛虫、や非病原性の腸管寄生性アメーバの検索は赤痢アメーバ嚢子の光学顕微鏡による検査と同時に併行して対象として行った。また以前よりフォローアップ調査の対象としてきた知的障害者更生施設2カ所についても、ここ数年間と同様に調査を実施した。このうちの1施設は2003年にディオキサニド併用によって集団治療を行い、2004~2005年と継続観察を行った施設であり、他方の1施設はやはり治療後9年間にわたり継続フォローアップ調査の対象としてきたものである。検査は上記同様、糞便検査と特異抗原検出によった。

異性愛者間の性行為による感染についての疫学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カ所において血清学的な方法により成人女性を対象として抗赤痢アメーバ抗体の検出を行った。方法はプレートELISAにより、抗原は赤痢アメーバHM-1:IMSS cl6の無菌培養株より調製した。

昨年度に実施した衛生教育など、公衆衛生的な介入策の効果はKAP研究により、2007年当初より調査を開始した。

(倫理面への配慮)

上記の調査研究に際しては、特に対象が施設内感染である場合、十分な配慮

を払った。この調査研究は東京都健康安全研究センターにおいて倫理委員会の承諾を取得しており、基本的にはその指示に従ってインフォームドコンセントを得た。施設内感染における公衆衛生的な介入策の実施も、対象となる施設職員に、介入策の意義、方法の概要を説明し、理解を得てから行った。

2.腸管寄生性原虫臨床分離株の取得法の改良

昨年度の研究成果に基づき、アメーバのみならず、臨床材料より他種の腸管寄生性原虫の無菌培養にも応用すべく培地の改良を試みた。更に試験管内での嚢子の脱嚢の条件を検討し、適切な培養条件の検討を行った。

3.赤痢アメーバの持続感染についての検討

これまでに作成したマウスモデルを用いて、持続感染成立機構の検討を前年度に継続して行った。

4.マイクロアレイによる遺伝子の多型性解析法の確立と応用

今年度は HM-1:IMSS cl6 を用いて毒力の異なる2種の状況の株を作成してマイクロアレイによる遺伝子発現状態を調査した。このうちの1種は上記株を BI-S-33 medium にて培養維持し

ているものをそのまま使用した。この株は培養期間中に事実上毒力を失っており、attenuated HM1 株(A-HM1)として使用した。一方この株をハムスターの肝に繰り返し passage すると毒力が上昇する事が示されているので、このようにして毒力を回復した株を作成した (Liver-Derived HM-1: L-HM1)。解析は初年度に作成された赤痢アメーバの全遺伝子9,435を網羅したアフィメトリクス社製の DNA マイクロアレイを用いて行った。得られた結果は gcRMA アルゴリズム及び Genespring を用いて解析した。

(倫理面への配慮)

この研究に関わる組み換え実験の許可は当該施設より取得した。

5.表面抗原とその遺伝子の多型性解析と応用

本研究により見いだされた赤痢アメーバの新規表面レクチンである Igl 遺伝子を地理的由来の異なる赤痢アメーバ3株のゲノム DNA から全長遺伝子として PCR 増幅し、クローニングした後に塩基配列を決定した。組み換え Igl の調製は Igl1 について、HM-1、HK-9、NOT-12 の3株より N 末と C 末のシグナル配列を除いた全長、N 末側の断片を pET19b ベクターに組み込み発現させた。HM-1 については中央部と C 末端側の組み替えタンパク

も調製した。これらの組み換え抗原とわが国の赤痢アメーバ感染者との反応性は肝膿瘍患者 21 例、アメーバ性大腸炎 29 例、無症候性嚢子排出者 9 例の血清を使用して ELISA により IgG を測定した。組み替えタンパクの肝膿瘍発現阻止能力の検討は、昨年と同様に体重 40~50g のハムスターを用い、組み替えタンパク 50 μ g を 3 回にわたり亜アジュバント（初回は TiterMax Gold、2、3 回目は Freund の不完全アジュバント）と共に後肢筋肉内に接種し免疫した 1 週間後、赤痢アメーバ SAW755CR 株栄養型虫体 500,000 個を肝臓内にチャレンジし、1 週間後に肝膿瘍の重量を測定して評価した。

（倫理面での配慮）

上記実験は当該施設の動物実験委員会の承諾を取得した後に、指針に従って行った。

6. タンパク質の網羅的解析による多型性検討

昨年度に引き続き、国外で分離されて広く使用されている赤痢アメーバ 5 株と、国内で得られた分離株 5 株（Hataji/Fukuroi/NOT-12/Takeyama/K-14-1）、及び国外で分離され慶大にて無菌化された *Entamoeba dispar* の 2 株(AS16IR/CYNO09:TPC)を用いて ProteinChip によりタンパク質多

型性の網羅的解析を試みた。Chip には弱陽イオン交換体である CM10 を引き続いて使用した。標準株としては最も広く各種実験に使用されている HM-1:IMSS 株を用いた。

7. 他の腸管寄生性原虫の遺伝子多型性検索法の確立

まずランブル鞭毛虫の遺伝子多型の解析は 18S ribosomal RNA 遺伝子 (18SrRNA) とグルタミン酸脱水素酵素(GDH)遺伝子、トリオースリン酸イソメラーゼ(TPI)遺伝子を標的として PCR を施行し、増幅産物を直接シーケンシングすることによって評価した。再クロスポーラの遺伝子の多型性は 18S ribosomal RNA (rRNA) 領域を用い、PCR は Orlandi による Multiplex PCR によって増幅産物を得た。これらはすべてサブクローニングを行い、全長配列を決定し、比較検討した。

C. 研究結果

1. 施設内アメーバ感染の実態調査、フォローアップ調査

今年度新規調査の対象となったのは 4 施設であるが、いずれの施設からも赤痢アメーバの感染は検出できなかった。しかし、このうち 1 施設においては PCR にて *E. dispar* の感染が認められた。また、非病原性の腸管寄生性アメーバのうち大腸アメーバと小型ア

メーバが3施設より検出された。このうちの1施設では150名の検査対象者中22名(14.7%)が陽性と判定された。この施設においては両種アメーバとも同一の生活棟に検出された事は重要と考えられた。また、今回の調査で *E. histolytica* II kit の偽陽性を示唆する所見が得られたが、これまでも経験された事実であり、このキットの場合ロットに十分注意を払うべきである事が示された。

フォローアップ調査は、これまでに明瞭な赤痢アメーバ感染がみられ、Luminal drug 適用をはじめ、衛生教育など種々の対策が実施された2施設を対象として行ったが、特異抗原同定、ホルマリン・エーテル法による嚢子検出とも陰性が維持されていた。一部に実施した ELISA でも抗体値の下降が観察された。これらによりこれまで採用してきた制圧方法が正当であったと結論出来ると考えられた。またフォローアップ調査の一環としてクリプトスポリジウムの抗原検索をも実施したが、陽性例は見いだせなかった。

2. 定点調査による女性の抗体陽性率について

同一の定点における赤痢アメーバに対する抗体値の調査で、2006年度では5.3%の陽性率であった。これまでの結果(2005年には4.8%、2004年に

は3.7%)と比較すると抗体陽性率の上昇が明確に認められた。この抗体値の上昇が直ちに臨床的な対応に結びつくとは思われないし、ELISAの抗体値の意味するところも更に検討は必要ではあろうが、新しい性行為による赤痢アメーバ感染を疑わせるものとして十二分に注意を払うべき所見である事は間違いないものと思われる。

3. 腸管寄生性原虫の臨床分離株の確立法の改良

今年度の検討では、卵黄抽出物が Balamuth 培地における大腸アメーバ、小型アメーバ等、腸管寄生性のアメーバの増殖を促進する事から、卵黄抽出物の主成分であるレシチンに着目し、その増殖促進効果を検討した結果、これらの非病原性アメーバのみならず動物由来のランブル鞭毛虫の培地での増殖を促進する事を見いだした。また、レシチン/ジアシルグリセロールを赤痢アメーバの培地に添加すると弱いながら毒力が回復する事も見いだされた。これらの所見は腸管寄生性の原虫、特に非病原性のアメーバの感染疫学、株の生物学的性状の解明などに貢献するものと思われた。非病原性アメーバも赤痢アメーバと同様の感染経路を取る事から、感染疫学を考える上での意味は大きい。

4.腸管における赤痢アメーバの持続感染機構の解明

昨年度より継続して本研究により開発したマウスモデルを使用して持続感染成立に関わる諸条件を検討した。昨年度既に難治性赤痢アメーバ症の患者から分離した嫌気性細菌である *Bacteroides fragilis* が赤痢アメーバのマウス大腸粘膜への接着を促進する事を見いだしたが、今年度はこの嫌気性細菌が高栄養無菌培地に適応し、事実上毒力が低下している赤痢アメーバ無菌培養株を大腸内容に近い低栄養条件に近い培地に効果的に適応させる能力を有している事を見いだした。この事は赤痢アメーバの大腸内での生息に関わる諸条件の一つをクリアしたもので、今後の応用が広く見込まれる。このように培養した無菌培養株はマウス盲腸への定着率が安定して維持できる事も見いだした。

5.マイクロアレイによる赤痢アメーバ遺伝子多型性の解析と応用

A-HM1 株と L-HM1 株とのトランスクリプトームの相違を解析を行い、全遺伝子 9,435 のうち SAM 及び Student t 検定により発現量に有意差が見られた遺伝子は 207 であった。このうち、L-HM1 で発現が上昇していた遺伝子は 37 で、残りは A-HM1 で上昇していた。また赤痢アメーバの病

原性に関わる可能性のある遺伝子としてシステインプロテアーゼがあるが、この酵素の 40 以上の遺伝子のうち、CP4 のみが L-HM1 で有意に上昇していた。その他では細胞骨格に関与する Rho guanine nucleotide exchange factor はじめ幾つかの遺伝子が同定された。

6.赤痢アメーバの表面抗原とその遺伝子の多型性解析と応用

まず、赤痢アメーバ国内分離株 2 株の Igl1 と Igl2 の遺伝子塩基配列を決定し、昨年度の国内分離株と比較検討した結果、完全に一致している事を見いだした。今回作成した地理的オリジンの異なる赤痢アメーバ 3 株より作成した 3 種類の組み換え Igl の患者血清に対する反応性を検索した結果、肝膿瘍、大腸炎の血清とも抗体値が高い場合希釈倍数を増やして検討したところ、HK-9 の全長組み換えタンパクに対する反反応性が最も高く 100%に達した。同様に N 末側の組み換えタンパクに対する反応性を調査したが、HM-1 株由来の抗原が最も感度が低く 58%にしか過ぎなかった。他の抗原は 70%以上に達した。組み換え Igl による肝膿瘍形成阻止能の検定では Igl の C 末側の組み換えタンパクで免疫した場合のみが有意に阻止能が観察でき、実験群の 8 匹のハムスター中膿瘍が形成さ

れたものは皆無であった。N 末側ではすべてのハムスターに肝膿瘍が形成され、対照と差異を認めなかった。

7. 赤痢アメーバのタンパク質の網羅的解析による多型性検討と応用

継続して ProteinChip/SELDI-TOF によるタンパク質の網羅的解析を施行した。対象を拡大し、今年度は赤痢アメーバに極めて近縁の *E. dispar* も調査対象とした。標準株としては HM-1 を使用した。その結果、共通して赤痢アメーバの国外分離株には 4305Da と 8274Da 近縁の分子量を持つタンパク質群が認められた。HM-1 はまた分子量 3000~6000Da 未満の領域では有意に peak intensity が高く、特に HM-1 で高かった 5423Da のタンパクは 200:NIH、DKB では検出できず、HK-9、SAW755CR でも極めて低い intensity を示すのみであった。更に国内分離株については、この領域では総じて HM-1 より低い peak intensity を示したのは NOT-12 のみであった。また上記の 5423Da のピークは NOT-12 以外のすべての株で検出できた。*E. dispar* について特徴的であったのは、赤痢アメーバ分離株に共通してみられる 8274Da の主要なピークが全く観察できなかつた事である。これらの所見は遺伝子の多型性のみならず、その表現系としてのタンパ

クの多型も重要なマーカーになりうる事を示している。

8. ランブル鞭毛虫、サイクロスポーラの遺伝子多型性の解析法の検討

ランブル鞭毛虫の TPI 遺伝子の多型性はこれまで検討してきた GDH 遺伝子よりも遥かに高く、解像力も上昇する事が想定できた。しかし、このためサンプルによる増幅効率の差異が著しく、18SrRNA と GDH で増幅された 3 サンプルでは増幅できず、今後の検討課題として残った。サイクロスポーラの遺伝子解析では今回使用した Multiplex PCR によると 2nd PCR の産物では十分な系統樹解析が出来ず、従って 1st PCR 産物の全長配列を使用して施行した。その結果十分な解析が可能となり、今後の適用拡大が見込まれた。

D. 考察

赤痢アメーバ症は感染症法の改訂以来極めて明瞭な届出数の増加を示しつつ今日に至っている。感染に係る要因を概観すると、男性同性愛者間の感染が目立っているが、最近では女性例の報告が異性愛行為による感染を疑われて報告されるケースが見られる。これに加え、臨床症状が明瞭ではないという点で報告例には多くの場合上っていないが、知的障害者を中心とし

た各種の更生施設における集団感染は公衆衛生上、あるいは行政面からも格別の注意が必要であろう。

本研究はこのような感染のハイリスクグループである各種施設利用者の赤痢アメーバ及び近縁の腸管寄生性原虫に焦点をあてたもので、この2年間の調査研究により、赤痢アメーバの感染は施設によって大きな差異がある事、しかし、一般にほとんどの施設で腸管寄生原虫の感染は認められ、糞便による環境の汚染などが想定できる事が示された。これまで対応策を実施してきた施設の幾つかに対してはフォローアップ調査をも行い、ディロキサニドなど Luminal drug の感染制圧における大きな意義などを明確にした。また東京都の定点施設においては女性の抗体値を測定し、それがここ数年明確な上昇傾向にある事なども併せて明らかにした。この所見は上記の異性愛行為による感染を強く指示するデータと言えよう。今後注意を払う必要がある。これらの調査とともに、公衆衛生的な介入策の策定も行いつつあり、最終年度に評価の上ガイドラインに取り入れる予定である。

他方、遺伝子、タンパク質レベルの多型性の検討から感染株のトレーシングなど、種々の疫学的研究のための基盤技術の整備も有意義な進歩を示した。特に詳細なフィンガープリンティ

ング技術のみならず、地理的なオリジンを推定できる手法が開発されつつある事は意味があるものと言える。培養法の改良を含む持続性感染のメカニズムの検索も動物モデルの開発に基づく新しい成果を生み出した。

上述のように、非病原性ではあるが腸管寄生性の原虫感染が施設によってはかなりの頻度で見いだされた事は、従来より指摘しているように、一旦赤痢アメーバの感染者が入居すれば糞便による環境の汚染等を通して容易に感染は拡大し行く可能性を示している。今後ともモニタリングの必要性は高い。

施設内感染制御に関わる基盤研究のうち、遺伝子・タンパク質レベルの多様性に関わる成果以外にも、Igl の組み替えタンパクが有意な肝膿瘍形成阻止能力を賦与できたという所見は今後ワクチンの開発の可能性を表すものとして継続検討に値するものとする。腸管感染モデルも作成され、Igl 自身は腸管組織内侵入に関わると想定されるだけに、感染成立阻止を目指したワクチンとして発展する事も想定される。

E. 結論

今年度も継続して施設内腸管寄生性原虫の疫学的解析、感染制御のための基盤技術の開発と応用、あるいは公衆

衛生的な介入策の有用性の検討などを試みた。新規対象となった施設では赤痢アメーバの感染は見られなかったものの、高率に非病原性腸管寄生性アメーバの感染があった事は、赤痢アメーバの感染も容易に拡大する素地がある事を示唆しており、今後継続してモニタリングを適切に行うべきと考える。公衆衛生的な介入策の評価も予定しているが、これらを総合して感染予防ガイドラインの再改訂に適用する予定である。施設内感染制御に関わる基盤技術面の研究もそれぞれ進展を見せた。また、新しく注意を払う必要のあるものとして異性愛行為による女性の赤痢アメーバ感染がより可能性高く想定せざるを得ない状況になりつつある事も指摘しておきたい。

F.健康危険情報

新規に調査対象施設となった所で非病原性の腸管寄生性アメーバの高率な感染が見いだされた事は、赤痢アメーバの感染拡大の可能性を示すものであり、留意すべきである。それと共に女性における抗体値が上昇している事を異性愛行為による感染を示唆するものとして指摘しておきたい。

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、2006.

竹内 勤：赤痢アメーバ。医学大辞典、南山堂、1403-1404、2006.

竹内 勤：赤痢アメーバほか。薬科微生物学、第4版、丸善、2006.

竹内 勤：血中赤痢アメーバ抗体価。臨床検査ガイド、823-827、文光堂、2007.

竹内 勤：赤痢アメーバ症、ほか。内科学、第9版、朝倉書店（印刷中）、2007.

2.論文

Khalifa SAM, Imai E, Kobayashi S, Haghghi A, Hayakawa E, Takeuchi T : Growth-promoting effect of iron-sulfur proteins on axenic culture of *Entamoeba dispar*. Parasite, 13, 51-58, 2006.

Gilchrist CA, Houpt E, Trapaidze N, Fei Z, Crasta O, Asgharpour A, Evans C, Martino-Catt S, Baba DJ, Stroup S, Hamano S, Ehrenkauf G, Okada M, Singh U, Nozaki T,

- Mann B, Petri Jr W : Impact of intestinal colonization and invasion on the *Entamoeba histolytica* transcriptome. Mol Biochem Parasitol, 147, 163-176, 2006.
- Razmjou E, Haghghi A, Rezaian M, Kobayashi S, Nozaki T : genetic diversity of glucose phosphate isomerase from *Entamoeba histolytica*. Parasitol Int, 55, 307-311, 2006.
- Ali V, Nozaki T : Current therapeutics, their problems and sulfur-containing amino acid metabolism as a novel target against infections by "amitochondriate" protozoan parasite. Clin Microbiol Rev, 20, 164-187, 2007.
- Tachibana H, Yanagi TY, Pandey K, Cheng X-J, Kobayashi S, Sherchand JB, Kanbara H : An *Entamoeba* sp. strain isolated from rhesus monkey is virulent but genetically different from *Entamoeba histolytica*. Mol Biochem Parasitol (in press), 2007.
- Takano J, Narita T, Tachibana H, Terao K, Fujimoto K : Comparison of *Entamoeba histolytica* DNA isolated from a cynomolgus monkey with human isolates. Parasitol Res (in press), 2007.
- Makioka A, Kumagai M, Takeuchi T, Nozaki T : 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, 98: 443-446, 2006.
- Tokoro M, Nakamoto K, Hussein AIA : Genotyping of *Cryptosporidium* species: current status and future direction. Parasitic Zoonoses in Asian-Pacific Regions 2006, 3-7, 2006.
- Hussein AIA, Nakamoto K, Yamaguchi T, Tokoro M : Technical notes for the genotyping of *Giardia intestinalis*. Parasitic Zoonoses in Asian-Pacific Regions 2006, 10-13, 2006.

Suzuki J, Kobayashi S, Murata RR, Yanagawa Y, Takeuchi T : Profiles of a pathogenic *Entamoeba histolytica*-like variant with variations in the nucleotide sequence of the small subunit ribosomal RNA isolated from a primate (De Brazza's Guenon). *J Zoo Wildlife Med* (in press), 2007.

小林正規、鈴木 淳、竹内 勤 : 赤痢アメーバ症. *日本臨床 (新感染症学、下巻)*、65 (増刊)、282-286、2007.

野崎智義、中野由美子 : 寄生虫への進化 : 驚くべき寄生虫のメンブレントラフィック. *細胞工学*、25、672-676、2006.

野崎智義 : クリプトスポリジウム症とイソスポラ症. *化学療法の領域*、22、1225-1229、2006.

野崎智義 : 赤痢アメーバ症. *GI Research*. 14、325-329、2006.

所 正治、仲本賢太郎 : 腸管寄生原虫の病原因子. *日本臨床 (新感染症学、下巻)*、65 (増刊)、470-473、2007.

井関基弘、所 正治 : クリプトスポリジウム症. *日本臨床 (新感染症学、下*

巻)、65 (増刊)、287-290、2007.

所 正治、吉田知代、荒井朋子、井関基弘、古川 博、小松八千代 : PCR法によるサイクロスポーラの検出と種の同定. *Clin Parasitol*、17、145-148、2006.

所 正治、井関基弘 : クリプトスポリジウム症. *GI Research*、8、336-341、2006.

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. *Clin Parasitol*、17、52-55、2006.

3.学会発表

小林正規、鈴木 淳、竹内 勤 : 知的障害者更生施設における腸アメーバ症に際しての metronidazole と diloxanide 併用の有効性について. 第75回日本寄生虫学会大会、2006.

岡田麻美、野崎智義 : 赤痢アメーバにおける DNA マイクロアレイによる病原因子の同定. 第75回日本寄生虫学会大会.

橘 裕司、小林正規、程 訓佳、竹内 勤 : 赤痢アメーバ株間における

150-kDa システインリッチ表面タンパク質の多型. 第75回日本寄生虫学会大会.

橘 裕司、柳 哲雄、Kishor P、程 訓佳、神原広二：アカゲザルから単離された赤痢アメーバ株の性状解析. 第47回日本熱帯医学会大会.

橘 裕司、柳 哲雄、Kishor P、程 訓佳：アカゲザル由来病原赤痢アメーバ株の赤痢アメーバとの遺伝子的差異について. 第76回日本寄生虫学会大会、2007.

程 訓佳、橘 裕司：地理的由来の異なる赤痢アメーバ 3 株の組み替え型 Igl と我が国のアメーバ症患者血清との反応性. 第76回日本寄生虫学会大会、2007.

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の発育へのシステインプロテアーゼの関与. 第75回日本寄生虫学会大会、2006.

Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T : Effect of artificial gastrointestinal fluid on the excystation and metacystic development of *Entamoeba invadens*. 11th Int Cong Parasitol,

2006.

牧岡朝夫、熊谷正広、小林正規、竹内勤：システインプロテアーゼ阻害剤による *Entamoeba* の脱嚢および脱嚢後アメーバの発育の阻害. 第47回日本熱帯医学会大会、2006.

牧岡朝夫、熊谷正広、小林正規、竹内勤：情報伝達分子阻害剤による *Entamoeba* の脱嚢及び発育の阻害. 第39回日本原生動物学会大会、2006.

熊谷正広、牧岡朝夫、渡辺直瀬、小林正規、竹内 勤：SELDI-TOF-MS ProteinChip システムによる赤痢アメーバおよび *Entamoeba dispar* の株間の違い. 第76回日本寄生虫学会大会、2007.

所 正治、Hussein AIA、春木宏介、木村憲司、Syafuruddin D、Olariu T、井関基弘：多地域由来のジアルジアの遺伝子型解析. 第47回日本熱帯医学会大会、2006.

仲本賢太郎、坪井敬文、所 正治、野崎智義：赤痢アメーバにおける S-adenosyl-L-methionine synthase および S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase の解析. 第75回日本寄生虫学会大会、2006.

所 正治、仲本賢太郎、荒井朋子、井関基弘：ジアルジアの遺伝子型における多型解析. 第75回日本寄生虫学会大会、2006.

荒井朋子、仲本賢太郎、木俣 勲、北出幸夫、坪井敬文、所 正治：リアルタイム PCR を用いたアデノシンアナログのクリプトスポリジウム増殖抑制効果の評価. 第75回日本寄生虫学会大会、2006.

(別紙)

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

(主任研究者、分担研究者に下線を付す)

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
<u>竹内 勤</u>	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	
<u>竹内 勤</u>	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	2007	印刷中
<u>竹内 勤</u>	血中赤痢アメーバ抗体値		臨床検査ガイド	文光堂	東京	2007	823-827

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
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	13	51-58	2006
Gilchrist CA, Houpt E, Trapaidze N, Nozaki T, Petri Jr W et al	Impact of intestinal colonization and invasion on the <u>Entamoeba histolytica</u> transcriptome	Mol Biochem Parasitol	147	163-176	2006
Razmjou E, Haghghi A, Rezaian M, Kobayashi S, Nozaki T	Genetic diversity of glucose phosphate isomerase from <u>Entamoeba histolytica</u>	Parasitol Int	55	307-311	2006
Ali V, <u>Nozaki T</u>	Current therapeutics, their problems and sulfur-containing amino acid metabolism as a novel target against infections by "amitochondriate" protozoan parasite	Clin Microbiol Rev	20	164-187	2007
<u>Tachibana H</u> , Yanagi T, Pandey K, Cheng X-J, Kobayashi S, Sherchand JB, Kanbara H	An <u>Entamoeba</u> sp. strain isolated from rhesus monkey is virulent but genetically different from <u>Entamoeba histolytica</u>	Mol Biochem Parasitol	in press		2007
Tanano J, Narita T, <u>Tachibana H</u> , Terao K, Fujimoto K	Comparison of <u>Entamoeba histolytica</u> DNA isolated from a cynomolgus monkey with human isolates	Parasitol Res	in press		2007

Makioka A, Kumagai M, Takeuchi T, Nozaki T	Characterization of protein geranylgeranyltransferase I from the enteric protist <i>Entamoeba histolytica</i>	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 <i>Entamoeba invadens</i>	Parasitol Res	98	443-446	2006
Tokoro M, Nakamoto K, Hussein AIA	Genotyping of <i>Cryptosporidium</i> species: current status and future directions	Parasitic Zoonoses in Asian-Pacific Region, 2006		3-7	2006
Hussein AIA, Nakamoto K, Yamaguchi T, Tokoro M	Technical notes for the genotyping of <i>Giardia intestinalis</i>	Parasitic Zoonoses in Asian-Pacific Region, 2006		10-13	2006
Suzuki J, Kobayashi S, Murata R, Yanagawa Y, Takeuchi T	Profiles of a pathogenic <i>Entamoeba histolytica</i> -like variant with variations on the nucleotide sequence of the small subunit ribosomal RNA isolated from a primate (De Brazza's Guenon)	J Zoo Wildlife Med	in press		2007
小林正規、鈴木 淳、竹内 勤	赤痢アメーバ症	日本臨床：新感染症学	65増	282-286	2007
野崎智義、中野由美子	寄生虫への進化：驚くべき寄生虫のメンブレントラフィック	細胞工学	25	672-676	2006
野崎智義	クリプトスポリジウム症とイソスポラ症	化学療法領域	22	1225-1229	2006
野崎智義	赤痢アメーバ症	GI Research	14	325-329	2006
所 正治、仲本堅太郎	腸管寄生原虫の病原因子	日本臨床：新感染症学	65増	470-473	2007
井関基弘、所 正治	クリプトスポリジウム症	日本臨床：新感染症学	65増	287-290	2007
所 正治、吉田知代、荒井朋子、井関基弘、古川 博、小松八千代	PCR法によるサイクロスポーラの検出と種の同定	臨床寄生虫誌	17	145-148	2006
所 正治、井関基弘	クリプトスポリジウム症	GI Resaerch	8	336-341	2006
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-E. disparの施設内感染を中心として	臨床寄生虫誌	17	33-35	2006

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. 腸管寄生原虫臨床株の分離：脂質分解に関与するリパーゼが脱嚢にも効果を示すことを見出し、動物由来のジアルジア1株と大腸アメーバ1株を嚢子から分離培養した。非病原性の腸管腔寄生原虫種の培養においては血清成分以外の supplement として卵黄成分中のレシチン（リン脂質）に増殖促進効果を見出した。また、赤痢アメーバが組織内で盛んに貪食する赤血球（膜）成分と脂質間の界面活性作用をもつレシチン/ジアシルグリセロールを培地に加え培養すると弱いながらも明らかな virulence の回復効果を認めた。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、アメーバの腸粘膜上皮内への軽度の侵入を伴う安定した接着が必要条件と推定された。また、腸内嫌気性菌（*Bacteroides fragilis*）が、マウス盲腸内での低栄養条件下で無菌培養に適応した赤痢アメーバの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：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。3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。内視鏡検査でアメーバ症と診断された患者3名、アメーバ性肝膿瘍患者2名のうち3株の赤痢アメーバ株が分離され2株が無菌培養化された。

A. 研究目的

1) 赤痢アメーバを始めジアルジアやクリプトスポリジウムの分離株の遺伝子多型性の解析から、ヒトからだけ分離される株或いはヒトと動物の両方から分離される株等の識別もできるように、人畜共通感染症である腸管寄生原虫の種や株の遺伝子分類が基準化されつつある。そこでヒトから種々の病原性腸管寄生原虫分離し、株間の疫学的特徴や virulence 及び生物学的性状を比較検討することで、その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、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) 腸管寄生原虫臨床株の分離：昨年度の研究成果（赤痢アメーバと *E. dispar* の無菌培養何れにも対応できるような培地のデザイン）を基に、さらに他の腸管寄生原虫の無菌培養にも応用できる培地の改良、及びジアルジア等の脱嚢に困難を伴う原虫嚢子からの嚢子内虫体の脱嚢条件の策定と分離培養法の確立を試みた。

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被治療者は完治した。2004～2005年度のフォローアップ調査では新たな感染も見られず感染は終息したものと考えた。2006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、赤痢アメーバ治療後のフォローアップ調査を行った。この調査と並行して、9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）についても上記と同様のフォローアップ調査を行った。また慶應病院外来および入院患者を中心とした有症アメーバ症患者から分離された赤痢アメーバ株の無菌培養化も行った。

C. 研究結果

1) 腸管寄生原虫臨床株の分離：腸管腔寄生の原虫で無菌培養が容易なのは病原性の赤痢アメーバとジアルジアの2種である。これら原虫の無菌培養用培地には血清成分が重要な増殖促進効果をもつ。しかしながら、非病原性の腸管腔寄生の原虫種の培養においては血清成分以外の supplement が必要な場合も多い。卵黄抽出物を主成分とする Balamuth 培地 (Balamuth, 1962) が非病原性の大腸アメーバや小形アメーバの培養に適していたことから、この培地成分に着目し、卵黄成分の中のレシチン（リン脂質）に増殖促進効果を見出した。また、増殖促進効果とは別に、赤痢アメーバが組織内で盛んに貪食する赤血球（膜）成分と脂質間の界面活性作用をもつレシチン／ジアシルグリセロールを培地に加え培養すると弱いながらも明らかな virulence の回復効果を認めた。さらに、脂質分解に関与するリパーゼが脱囊にも効果を示すことも見出した。

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、持続感染が成立するためには、アメーバの腸粘膜上皮内への軽度の侵入を伴う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*) は大腸管腔環境に近い低栄養培養条件でも高栄養無菌培地に適応した赤痢アメーバ株を増殖させることができる数少ない共棲細菌であることを本年度新たに見出した。そして、この低栄養培養条件下で *B. fragilis* とともに培養した赤痢アメーバをマウス盲腸内に接種することでマウス盲腸へ

の持続感染成立の確立が安定して高くなることを見出した。これに加えて、昨年度見出した感染手法（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）を併用させると、持続感染率が100%近くに上昇し、感染部位も盲腸から結腸部にまで拡大し、血球貪食アメーバを含む粘血便を見る持続感染が成立した。

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。3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。また今年度の調査において、血清抗体価の減少傾向が見られた。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。内視鏡検査でアメーバ症と診断された患者3名、アメーバ性肝膿瘍患者2名のうち3株の赤痢アメーバ株が分離され2株が無菌培養化された。

D. 考察

1) 遺伝子診断法から、感染がヒトからヒトによるものか、動物を介したもののかを明らかにすることは感染経路を知る上で極めて重要であり、動物由来の腸管寄生原虫の分離培養法の確立が今後必要になると考える。

2) 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。

3) 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