

併用投与方法についての再検討も必要と考えられた。

E. 結論

1) 腸管寄生原虫株の多様性解析には嚢子からの分離培養のための脱嚢手技と無菌培養法の確立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マニュアル化の必要性を認識した。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Suzuki J, Kobayashi S, Murata R, Yanagawa Y, Takeuchi T. 2007. 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). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. In press.

2) 小林正規、鈴木 淳、竹内勤：日本臨床 65 [増刊：新感染症学下：赤痢アメーバ症：282-286, 2007.

3) 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, 51-58, 2006.

2. 学会発表

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

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 我が国に浸淫するアメーバ症の流入経路・感染経路を追跡する分子疫学的手法を開発することを目的として、全遺伝子の発現プロファイルを獲得し、分離株タイピングを可能とする方法を確立した。本年度は病原性の異なる 2 株をモデルとして赤痢アメーバ感染の重症度に影響を与える原虫側の生物学的多様性を明らかにした。全遺伝子発現プロファイリングにより病原性に強く関連した遺伝子が同定された。

A. 研究目的

赤痢アメーバ症は世界において全人口の 1% が感染している重要な感染症である。また、我が国においては知的障害者において高感染を起こし、精神医学衛生上の重大な問題である。また、男性同性愛者・女性 CSW にも高頻度に感染が見られるようになり、性行為感染症としての重要性はより高くなっている。したがって国内におけるアメーバ症感染の現状を理解し、感染ルートを特定し、施設内・施設間での感染伝播を防ぐために有用な方法論を確立することが重要である。

赤痢アメーバ原虫の進化はクローナルなるであり、その遺伝的多様性は極めて高い。このことは我々の関連の研究により明らかにされている (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)。本研究では DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析により、多様性の高い赤痢アメーバ分離株をグルーピングするとともに、個別の遺伝子発現と病原性との相関を明らかにし、感染に

伴う重症度や予後の予測に繋がる遺伝の同定を目的とした研究を行った。

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。この株は継続的な無菌培養によって動物感染、哺乳動物細胞の傷害性など多くの基準で病原性を喪失しており、attenuated HM1 (A-HM1) と呼ぶ。また、この A-HM1 をハムスターの肝臓に繰り返し摂取し病原性を回復・維持した株を liver-derived HM1 (L-HM1) と呼ぶ。

2. RNA の調整

RNA は Trizol 試薬・RNeasy を用いて抽出・精製した。

3. 赤痢アメーバマイクロアレイの作成

初年度作製された全赤痢アメーバの遺伝子 9435 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た。

4. ハイブリダイゼーションおよびデータ解析

通常のプロトコールにより total RNA から合成された 5µg の cRNA を用いて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 gcRNA アルゴリズム、及び Genespring を用いて解析を行った。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. 病原性の異なる株間でのトランスクリプトームの相違

無菌培養され病原性を失った A-HM1 株と、肝臓感染を繰り返し病原性を維持した L-HM1 株の両サンプルをトリプレケートで行い、株間で少なくとも 2 倍以上の発現量の相違があり、SAM 及び Student t 検定により $p < 0.05$ で有意と認められた遺伝子は、9435 の全遺伝子のうち、約 2.4% を占める 207 遺伝子であった。この 207 遺伝子のうち、L-HM1 で発現が上昇していたものは 37 遺伝子であり、逆に A-HM1 で発現上昇していたのは 170 遺伝子であった。ゲノムデータベースで注釈付けされている遺伝子のリストを末尾に添付した表に示す (表 1、L-HM1 で発現上昇している遺伝子のリスト; 表 2、A-HM1 で発現上昇している遺伝子のリスト)。

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。

2. システインプロテアーゼ遺伝子発現の変化

赤痢アメーバゲノムには 40 を超えるシステインプロテアーゼ遺伝子がコードされている。その中で CP4 だけが L-HM1 で有意に (3 倍) 発現量が上昇していた。CP4 は腸管感染でも約 30 倍発現が上昇することを我々は昨年度証明したが、Gillen らのグループは熱ショックによって CP4 の発現が上昇することを示している。昨年度腸管感染で変化の見られた CP6、CP1、CP8、CP9 には有意に発現変化が見られず、腸管感染と肝臓感染での遺伝子発現に相違が認められた。

3. その他病原性と正相関して変化の見られた遺伝子

細胞骨格の再構成に関与する Rho guanine nucleotide exchange factor を始め、エネルギー代謝に関与する Aldehyde dehydrogenase、クロマチン修飾・転写・RNA プロセッシングなどに関与する splicing factor, TFIIID, DNA methyltransferase などにも病原性と正に相関したに差が見られた。また、輸送に関与する amino acid transporter やオートファジーに関与する Atg4 などでも大きく病原性と正相関した変化が見られた。

4. その他病原性と正相関して変化の見られた遺伝子

小胞輸送の調節因子である Rab7C, RabX33 やタンパク質の修飾に関与する EF-hand calcium binding protein, 細胞分裂に関与する septin-2 などが L-HM1 で発現低下していた。興味深いことに AIG1 遺伝子群に属する 9 の遺伝子の発現が低下していた。

D. 考察

我々はこれまでいくつかのタンパク質コード遺伝子、非転写領域を用いて RFLP や核酸配列による分離株のタイピングを試みて来た。しかしながらこれまで用いた遺伝子座の多型

には、赤痢アメーバ感染の結果（有症・無症）や病気の重症度との相関を見いだすことができなかった。これは用いた遺伝子座が赤痢アメーバの病原性に直接関係していないからであると予想される。遺伝子タイピングによって分離株の病原性を予測するためには、病原性に強く相関する遺伝子群をスクリーニングしてくる必要がある。

そこで我々は全遺伝子を網羅したDNAマイクロアレイを作製し、見かけの病原性の異なる株の遺伝子発現を比較することにより病原性に強く相関する遺伝子を同定しようとした。昨年、感染モデルのひとつであるマウスの腸管から分離された原虫の遺伝子発現プロファイルを実験室で培養された株と比較した。本年度は、もうひとつの重要な感染モデルであるハムスター肝膿瘍から分離され、高い病原性を維持した株と実験室で培養され病原性を喪失した株との間で遺伝子発現プロファイルの比較を行った。

昨年度および本年度の研究成果はいずれも相補的である。病原性の変化に伴って発現の変化していた遺伝子にはこれまで病原性への関与の指摘されていたシステインプロテアーゼなど多くの既知の遺伝子が含まれると同時に、多くの機能未知な遺伝子が含まれていた。

本年度はアレイの発現結果を定量PCRあるいはノザンプロットにより確認していないが、昨年までの結果によりこの点は確認されている。

本年度の結果でも最も驚くべきは肝膿瘍を惹起しうる「強病原株」においてわずか2.4%の遺伝子のみが2倍以上の発現量の変化を示したことであった。転写レベルでの変化の小ささは昨年度の腸管感染から得られた株のトランスクリプトーム解析の結果とも良く相関していた。

本年度のトランスクリプトーム解

析により病原性に強く相関する遺伝子がほぼ同定された。最終年度は国内外の分離株をもちいて、トランスクリプトーム解析とタイピングを行う。

E. 結論

本研究成果により、新しい分子タイピングに応用しうる分子標的が同定された。この成果は本研究班の目的である臨床・疫学研究への応用、現場への還元を可能とする。最終年度はこの新規タイピング法により、国内外の分離株を用いてタイピングを実施する。トランスクリプトーム解析による多型解析は、赤痢アメーバ株の流入経路、感染源の特定に有効であり、国内感染予防の方策の確立に重要である。同時に、原虫の増殖・寄生・病原性などの解明にも応用することができる。

F. 研究発表

1. 論文発表

英文

- i. Gilchrist, C. A., Houpt, E., Trapaidze, N., Fei, Z., Crasta, O., Asgharpour, A., Evans, C., Martino-Catt, S., Baba, D. J., Stroup, S., Hamano, S., Ehrenkauf, G., Okada, M., Singh, U., Nozaki, T., Mann, B. J., Petri, Jr., W. (2006) Impact of intestinal colonization and invasion on the *Entamoeba histolytica* transcriptome. *Mol. Biochem. Parasitol.* 147, 163-176.
- ii. Razmjou, E., Haghghi, A., Rezaian, M., Kobayashi, S., and Nozaki, T. (2006) Genetic diversity of glucose phosphate isomerase from *Entamoeba histolytica*. *Parasitol. Int.* 55, 307-311.

iii. Ali, V. and Nozaki, T. (2007) Current therapeutics, their problems, and sulfur-containing amino acid metabolism as a novel target against infections by “amitochondriate” protozoan parasites. Clin. Microbiol. Rev. 20, 164-187.

iv. 野崎智義 (2006) 赤痢アメーバ症 G. I. Research 14, 325-329.

2. 学会発表

i. 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、弘前 平成 18 年 5 月 19-20 日

和文

i. 野崎智義 (2006) 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、中野由美子 (2006) 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.

iii. 野崎智義 (2006) 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.

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。

Probe set	TIGR gene ID	GenBank Acc. #	Fold change	t-test p-value	SAM q-value	Gene annotation ^b
Virulence factor						
10.m00362_at	10.i00046	XM_651510	2.6	0.011	0	Cysteine protease 4
Metabolism						
11.m00328_at *	11.i00020	XM_651456	2.1	0.017	0.004	Aldehyde dehydrogenase 1
Biosynthesis						
91.m00184_at *	91.i00017	XM_648105	2.5	0.004	0	BetaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase-1 (<i>Oryza sativa</i> 4e-06)
129.m00147_at *	129.i00020	XM_647085	2.1	0.014	0.004	Elongation factor-2 kinase
Cytoskeleton organization and biogenesis						
383.m00038_at	383.i00007	XM_643739	4.1	0.009	0	Rho guanine nucleotide exchange factor
2.m00528_at	2.i00038	XM_652349	2.3	0.026	0.012	Ran-binding protein 9 (<i>Homo sapiens</i> 1e-50)
Nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism						
99.m00184_at	99.i00028	XM_647863	2.3	0.013	0.004	Splicing factor arginine/serine-rich 11 (<i>Homo sapiens</i> 5e-13)
324.m00040_at	324.i00007	XM_644183	2.2	0.002	0	Transcription initiation factor TFIID
455.m00035_at	303.i00011	XM_644341	2.1	0.008	0	DNA methyltransferase
346.m00051_at *	346.i00008	XM_643982	2.0	0.011	0.004	Ribonuclease
Transport						
165.m00054_at	165.i00001	XM_646352	5.0	0.004	0	Amino acid transporter
Intracellular transport						
134.m00147_at *	134.i00029	XM_646951	2.2	0.011	0.003	Atg4a protein (<i>Mus musculus</i> 1e-95)
Chromosome organization and biogenesis						
484.m00037_at *	484.i00004	XM_643222	2.3	0.011	0	Nuclear movement protein
Cell adhesion						
383.m00035_at *	383.i00004	XM_643743	3.0	0.029	0	Extracellular matrix protein FRAS1 (<i>Homo sapiens</i> e-114)
Not classified						
628.m00012_at	628.i00002	XM_642923	2.7	0.023	0.004	ALG1 family protein
443.m00046_at	443.i00003	XM_643428	2.6	0.012	0.003	LAG1 longevity assurance homolog 2 (<i>Homo sapiens</i> 1e-69)
628.m00011_at *	628.i00001	XM_642922	2.3	0.039	0.012	ALG1 family protein
212.m00115_at	212.i00019	XM_645459	2.1	0.019	N/A *	BspA-like leucine rich repeat protein

図 1 L-HM1 で発現上昇している遺伝子

Probe set	TIGR	GenBank	Fold	t-test	SAM	Gene annotation ^b
	gene ID	Acc. #	change	p-value	q value ^a	
Metabolism						
						Ubiquitin-conjugating enzyme E2- binding protein 1 (<i>Homo Sapiens</i> 9e-44)
470.m00038_at	470.t00007	XM_643266	0.32	0.009	0.004	
165.m00060_s_at	165.t00007	XM_646350	0.36	0.008	0.005	P-glycoprotein homologue
418.m00028_at	418.t00001	XM_643537	0.37	0.008	0.004	Hsp 70
57.m00143_s_at	57.t00001	XM_649224	0.39	0.015	0.012	Hsp 70
17.m00305_s_at	17.t00006	XM_651065	0.42	0.014	0.016	Apyrase
384.m00045_at	384.t00001	XM_643734	0.43	0.036	N/A	Alpha-aminoadipate reductase (<i>Pichia furinosa</i> e-124)
328.m00063_s_at	328.t00011	XM_644142	0.46	0.012	0.016	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase
4.m00595_at	4.t00018	XM_652056	0.46	0.022	N/A	26S proteasome regulatory subunit
485.m00038_at	485.t00006	XM_643211	0.47	0.048	N/A	Chitinase
174.m00089_s_at	57.t00003	XM_649213	0.47	0.019	0.012	Hsp 70
130.m00113_at	130.t00002	XM_647060	0.48	0.022	N/A	Sphingomyelin phospholipase 2 (<i>Homo sapiens</i> 4e-52)
315.m00040_at	315.t00004	XM_644252	0.49	0.037	N/A	Dual specificity protein phosphatase
Biosynthesis						
24.m00268_at ^c	24.t00014	XM_650580	0.34	0.006	0.004	Maltose transacetylase (<i>Bacillus stearothermophilus</i> 4e-56)
237.m00072_at ^c	237.t00012	XM_645113	0.36	0.019	0.019	Glutamine cyclotransferase
37.m00202_at	37.t00009	XM_649990	0.39	0.017	0.016	Adenosine deaminase
2.m00572_at	2.t00082	XM_652300	0.40	0.020	N/A	Glycosyltransferase
373.m00054_s_at	373.t00010	XM_643805	0.43	0.023	0.019	DEAD/DEAH box helicase
80.m00142_at	80.t00011	XM_648450	0.45	0.024	N/A	Phosphatidylinositol N-acetylglucosaminyltransferase subunit C (<i>Homo Sapiens</i> 2e-65)
131.m00124_at	131.t00001	XM_647019	0.47	0.011	0.028	DEAD/DEAH box helicase
193.m00065_at	193.t00007	XM_645809	0.47	0.019	0.028	Riboflavin kinase / FAD synthetase
312.m00037_at	312.t00003	XM_644279	0.50	0.037	N/A	Iron-sulfur flavoprotein
Intracellular transport						
122.m00143_at	122.t00028	XM_647242	0.01	0.001	0	EhRab7C
31.m00219_x_at	491.t00002	XM_643185	0.27	0.007	0.004	EhRabX33
137.m00090_at	137.t00006	XM_646893	0.45	0.004	N/A	Vps26 (<i>Homo sapiens</i> e-116)
226.m00092_at	226.t00016	XM_645246	0.46	0.011	N/A	EhRab7F
141.m00078_s_at	141.t00001	XM_646816	0.49	0.047	N/A	Clathrin heavy chain
78.m00154_at	78.t00009	XM_648483	0.50	0.020	N/A	Importin alpha subunit
Cytoskeleton organization and biogenesis						
47.m00161_at	47.t00019	XM_649577	0.32	0.041	N/A	Gelsolin
260.m00059_s_at	260.t00001	XM_644821	0.45	0.023	N/A	Phospholipase D
8.m00358_at [*]	8.t00018	XM_651653	0.49	0.035	N/A	Rho family GTPase
Protein modification						
2.m00570_at	2.t00080	XM_652298	0.14	0.003	0	EF-hand calcium binding protein
291.m00044_at [*]	291.t00005	XM_644449	0.40	0.007	0.004	Serine/threonine-protein kinase WNK3 (<i>Homo sapiens</i> 7e-33)
3.m00686_at	3.t00149	XM_652100	0.42	0.010	0.012	Casein kinase
Transport						
315.m00044_x_at	315.t00008	XM_644247	0.39	0.017	0.016	P-glycoprotein 5
315.m00045_s_at	315.t00009	XM_644246	0.42	0.023	N/A	Multidrug resistant 1 (<i>Cryptis japonica</i> 7e-21)
68.m00224_at	68.t00030	XM_648842	0.46	0.019	0.040	Intersectin-1 (<i>Homo sapiens</i> 1e-16)
209.m00110_s_at	209.t00013	XM_645500	0.46	0.015	0.040	ABC transporter ATP-binding protein (<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> 5e-59)
Cell adhesion						
12.m00272_s_at ^d	12.t00001	XM_651360	0.39	0.029	0.040	Defective in exine formation (<i>Arabidopsis thaliana</i> 2e-58)
410.m00033_x_at	429.t00008	XM_643471	0.41	0.018	N/A	Extracellular matrix protein FRAS1 (<i>Homo sapiens</i> 4e-61)
56.m00152_x_at	56.t00009	XM_649257	0.47	0.011	N/A	Transmembrane kinase (tnk) 43
Cell division, cell cycle, proliferation, and motility						
227.m00086_at ^d	227.t00014	XM_645239	0.29	0.004	0	Septin-2 (<i>Homo sapiens</i> 1e-32)
116.m00124_s_at [*]	103.t00002	XM_647761	0.40	0.011	0.016	Condensin complex subunit 2 (<i>Homo sapiens</i> 6e-42)
61.m00188_at	61.t00024	XM_649066	0.41	0.050	N/A	Alpha-actinin-4 (<i>Homo sapiens</i> 1e-69)
68.m00225_at	68.t00031	XM_648843	0.46	0.032	N/A	Ras guanine nucleotide activating protein
111.m00140_x_at ^d	111.t00025	XM_647536	0.47	0.027	0.028	Septin 2 (<i>Homo sapiens</i> 3e-26)
61.m00176_at	61.t00012	XM_649054	0.49	0.018	N/A	Serine/threonine protein (<i>Homo sapiens</i> 1e-74)
Nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism						

14.m00334_at ^d	14.t00055	XM_651217	0.35	0.025	N/A	Myb-related transcription activator (<i>Arabidopsis thaliana</i> 3e-28)
85.m00132_s_at	348.t00010	XM_643959	0.43	0.036	0.040	Step II splicing factor SLU7 (<i>Homo sapiens</i> 5e-13)
87.m00175_s_at	87.t00005	XM_648209	0.43	0.039	N/A	Pre-mRNA-splicing factor 3 (<i>Homo sapiens</i> 5e-85)
40.m00218_at	40.t00023	XM_649847	0.45	0.018	0.028	DNA replication licensing factor
404.m00038_at	404.t00005	XM_643619	0.45	0.009	0.016	Helicase
101.m00127_at	101.t00016	XM_647793	0.45	0.016	0.028	KIAA0216 (<i>Homo Sapiens</i> 2e-08)
255.m00049_at *	255.t00004	XM_644881	0.46	0.007	0.005	tRNA-specific adenosine deaminase 3 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 1e-39)
185.m00106_at	185.t00018	XM_645972	0.49	0.036	N/A	Myb family DNA-binding protein
10.m00342_at	10.t00026	XM_651489	0.50	0.037	N/A	Structural maintenance of chromosomes protein
40.m00212_s_at	40.t00010	XM_649856	0.50	0.018	N/A	DNA repair helicase
Signal transduction						
334.m00040_at ^d	334.t00001	XM_644094	0.44	0.028	0.028	Ras guanine nucleotide exchange factor
384.m00043_at	384.t00005	XM_643737	0.44	0.012	0.004	Hsp70
47.m00183_at	47.t00035	XM_649585	0.46	0.031	N/A	61)
185.m00094_at	185.t00006	XM_645960	0.48	0.039	N/A	Utp1 protease family protein
400.m00036_s_at ^c	400.t00007	XM_643638	0.48	0.038	N/A	Regulatory associated protein of mTOR (<i>Mus musculus</i> e-148)
Chromosome organization and biogenesis						
5.m00472_at	5.t00081	XM_651915	0.34	0.007	0.009	SMC5 protein
3.m00546_at	3.t00009	XM_652115	0.44	0.020	0.040	ATP-dependent chromatin remodeling protein SNF2H
Cytoplasm organization and biogenesis						
114.m00133_at	114.t00007	XM_647468	0.41	0.011	N/A	Ribosome biogenesis protein TSR1 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> e-103)
Digestion						
505.m00017_at	505.t00002	XM_643141	0.34	0.029	N/A	Acyl-CoA synthetase
211.m00077_at	211.t00008	XM_645473	0.48	0.024	N/A	O- GlcNAc transferase variant 4 (<i>Brachydanio rerio</i> 4e-48)
Not classified						
477.m00021_at ^d	477.t00001	XM_643239	0.02	0.002	0	AIG1 family protein
89.m00104_at	89.t00001	XM_648158	0.03	0.001	0	AIG1 family protein
432.m00028_at	432.t00003	XM_643464	0.05	0	0	AIG1 family protein
477.m00022_x_at	477.t00002	XM_643240	0.06	0.002	0	AIG1 family protein
599.m00017_x_at	599.t00002	XM_642959	0.21	0.004	0	AIG1 family protein
92.m00166_at	92.t00025	XM_648057	0.26	0.003	0	Cysteine-rich protein 2-binding protein (<i>Homo sapiens</i> 1e-41)
331.m00057_x_at	331.t00007	XM_644114	0.35	0.012	0.004	AIG1 family protein
489.m00025_x_at	489.t00003	XM_643194	0.35	0.003	0	AIG1 family protein
40.m000239_at ^d	40.t00044	XM_649824	0.37	0.007	0	AIG1 family protein
432.m00030_at ^d	432.t00005	XM_643462	0.40	0.011	0	AIG1 family protein
122.m00146_x_at	122.t00031	XM_647244	0.41	0.008	N/A	Variant-specific surface protein M21-1 (<i>Giardia lamblia</i> 1e-13)
615.m00022_x_at ^d	615.t00002	XM_642937	0.43	0.017	0.028	BspA-like leucine rich repeat protein
768.m00017_x_at	375.t00008	XM_643785	0.45	0.024	N/A	BspA-like leucine rich repeat protein

図2 A-HM1 で発現上昇している遺伝子

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、新たに我が国で単離された2株について150-kDa表面レクチン(Ig1)の遺伝子をクローニングし、Ig1の一次構造を比較解析した。これらの株のIg1もこれまでに解析した国内単離株の配列と完全に一致し、他のアジア地域や西欧諸国由来株とは異なっていた。そこで、標準株であるHM-1:IMSS株(メキシコ由来)の他に、HK-9株(韓国由来)、NOT-12株(日本由来)の組換え型全長Ig1及びN末端側Ig1を調製し、我が国のアメーバ症患者血清との反応性をELISAで比較した。その結果、NOT-12株とHK-9株のIg1抗原を用いた方が、標準株抗原に比べて感度が高かった。血清診断用抗原にはHM-1:IMSS株が使用されることが多いが、地理的由来を考慮した組換えIg1の利用により、我が国の実状にあった優れた血清診断法を開発できると考えられた。また、大腸菌で発現させたIg1のN末端側、中央部、C末端側組換えタンパク質でハムスターを免疫し、肝膿瘍形成抑制効果を比較したところ、C末端側のみ有意な抑制効果が認められ、この部分が防御免疫の誘導に重要であることが明らかになった。

A. 研究目的

我が国の赤痢アメーバ症は報告数が年々増加しており、2006年には700例を超えた。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などが注目されている。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。

分担研究者らは、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, Ig1)の存在を明らかにした。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Ig1遺伝子の塩基配列を解析し、Ig1一次構造における多型性解析を試みた。昨年度の研究において、地理的由来を反映する差異が認められ、大きく西欧諸国型、アジア型、日本特

異型の3つのタイプに分類できる可能性が示唆された。そこで、更に国内単離株について、検証を行った。また今年度は、このような株間での一次構造の違いが、Igl1をアメーバ症患者の血清診断用抗原として利用する際に、どのように影響するのかについて検討した。

これまでに抗Igl1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 Igl1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報告している。昨年度は、大腸菌で作製した組換え型の全長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Igl1をワクチンとして利用できる可能性が示された。今年度は、組換え断片を用いて、Igl1のどの部分が防御に有効であるのかについて検討した。

B. 研究方法

1. 赤痢アメーバ株

2006年に国内で単離された赤痢アメーバのYI株(肝膿瘍患者由来、Z-XIV)とTM株(大腸炎患者由来、Z-XIV)を使用した。いずれもBI-S-33培地で無菌培養した。

2. Igl1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、Igl1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Igl1の調製

赤痢アメーバIgl1について、HM-1:IMSS株に加え、HK-9株、NOT-12株のN末端とC末端のシグナル配列を除く全長[F-Igl1; aa 14-1088 (HM-1:IMSS株), aa 14-1087 (HK-9株, NOT-12株)]とN末端側の断片[N-Igl1; aa 14-382 (HM-1:IMSS株, NOT-12株), aa 14-383 (HK-9

株)]をコードする遺伝子をPCR増幅した。pET19bベクターのXhoIサイトに組み込み、大腸菌BL21 Star™(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。HM-1:IMSS株については、Igl1の中央部(M-Igl1, aa 294-753)とC末端側(C-Igl1, aa 603-1088)の組換えタンパク質も調製した。

4. 赤痢アメーバ症患者血清

赤痢アメーバ感染者血清は、国内の医療機関で採取された肝膿瘍患者由来21検体、肝転移のない大腸炎患者由来29検体、無症候性嚢子排出者由来9検体を使用した。有症者の確定診断は、臨床症状、間接蛍光抗体法での血清アメーバ抗体陽性、画像診断、内視鏡検査、検便、メトロニダゾールの治療効果などに基づいて行った。また、無症候性嚢子排出者では、PCRによって嚢子が*Entamoeba dispar*ではなく、赤痢アメーバであることを確認した。また、赤痢アメーバ症の既往がなく、検便陰性の健康人20名の血清を陰性対照として用いた。

5. ELISA

ELISAプレート1穴当たり100ngの組換えIgl1を加え、4°Cで一晩感作した。1%スキムミルクでブロックした後、PBSで500倍または2000倍に希釈した患者血清の100 μ lを1時間反応させた。2次抗体は、ペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG(H+L)ヤギ抗体を1時間反応させた。発色にはo-phenylenediamineを用い、30分後に反応を止め、490nmのOptical density (OD)を測定した。健康人由来の対照血清の平均OD値+3SDをcut-off値とした。データはPrism version 4.0を用いて解析した。

6. 組換え型Igl1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32匹を使用した。初回免疫ではアジュバントとしてTiterMax Goldを用い、HM-1:IMSS株の組換え

型 N-Ig1、M-Ig1、C-Ig1 の各 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 週間後に同量の組換えタンパク質を 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。

(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. 赤痢アメーバ株の Ig1 多型解析

赤痢アメーバの国内単離株、YI 株と TM 株について Ig11 と Ig12 の塩基配列を解析したところ、いずれも昨年度に解析した国内単離株 NOT-12 株及び YS 株の配列と完全に一致した。

2. 地理的由来の異なる赤痢アメーバ株の組換え型 Ig1 に対するアメーバ症患者血清の反応性

3 種類の F-Ig1 に対する反応を血清希釈 500 倍で測定した。肝膿瘍患者由来や大腸炎患者由来で OD 値が測定上限値に達した検体については、2000 倍希釈で再測定した。その結果、HM-1:IMSS 株の F-Ig1 抗原での感度は 97%であったのに対し、HK-9 株の F-Ig1 では 100%、NOT-12 の F-Ig1 では 98%であった。

また、F-Ig1 に対して用いられたのと同じ希釈条件を用いて、3 種類の N-Ig1 に対する患者血清の反応性を比較した。HM-1:IMSS 株由来の抗原では感度が 58%であったのに対し、HK-9 株由来の N-Ig1 抗原では 78%、NOT-12 株由来の N-Ig1 抗原では 71%の感度であった。

3. 肝膿瘍形成に対する赤痢アメーバ組換え Ig1 断片によるワクチン効果

対照群では 8 匹中全例で肝膿瘍が形成され、膿瘍平均重量は肝臓の 26.5%を占めた。これに対

して、C-Ig1 で免疫したグループでは、8 匹中肝膿瘍が形成された個体はなく、有意な抑制効果が示された ($P = 0.000078$)。M-Ig1 で免疫したグループでは、8 匹中 2 例で肝膿瘍が形成されなかったが、対照群と比べて有意な差ではなかった。また、膿瘍が形成された 6 個体における膿瘍の平均重量も 25.2%を占め、対照群と差がなかった。N-Ig1 免疫群では 8 匹すべてで膿瘍が認められ、その平均重量も 25.7%を占め、対照群と差がなかった。

D. 考察

昨年度の研究により、Ig1 に大きく 3 つの多型が存在し、それらが地理的分布を反映している可能性が示唆された。今年度に解析された国内単離株についての結果も、それを支持するものであった。また、米国で単離された 200:NIH 株はアジア株に近く、例外的と考えられていたが、実はインド由来であることが確認できた。従って、赤痢アメーバ株は、西欧諸国型、アジア型、日本特異型という 3 つのグループに分類できるという可能性がより高まった。そして、インドには西欧諸国型とアジア型の両方が混在すると考えられた。

このような 3 つの地域を代表する株の組換え Ig1 抗原を作製し、我が国の患者血清の反応を比較したところ、HM-1:IMSS 株抗原よりも、HK-9 株や NOT-12 株抗原に対しての感度が高いことが確認できた。世界的な標準株である HM-1:IMSS 株が血清診断用抗原に用いられることが多いが、我が国では、アジア地域で単離された株由来の抗原を用いた方が良いことを示している。Ig1 の C 末端側、C-Ig1 が血清診断用抗原として優れていることはすでに報告しているが、それはこの部分のアミノ酸配列に株間で差が少ないことによると思われる。また、HM-1:IMSS 株の N-Ig1 抗原では感度が低かったが、HK-9 株や NOT-12 株の N-Ig1 抗原でも陰性の検体が存在することから、我が国には、これまでに明らかになっていない別

のアミノ酸配列を示す株が存在する可能性も否定できない。このようなN末端側の構造の差を利用し、血清診断によって株の由来まで推定することも可能であるかもしれない。

また、今年度の研究において、3つのIgl断片の中で、C-Iglのみに肝膿瘍形成阻止効果が認められたことから、この部分が宿主細胞への接着に関して重要な役割を果たしている可能性が高いと考えられる。C-Iglの構造は異なる地域の株にもほぼ共通であることから、すべての地域で有効なワクチンとなる可能性が示唆された。今後、更に有効なエピトープを含む部分を絞り込んでいく必要があると考えられる。

E. 結論

赤痢アメーバは、Igl多型により、西欧諸国型、アジア型、日本特異型に大別された。我が国のアメーバ症患者の血清診断には、標準株である西欧諸国型より、アジア型や日本特異型のIgl抗原を用いた方が、感度が高かった。IglのC末端側組換え断片による免疫で、ハムスターにおけるアメーバ性肝膿瘍の形成を阻止できた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Tachibana, H., Yanagi, T., Pandey, K., Cheng, X., Kobayashi, S., Sherchand, J. B. and 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. and Fujimoto, K. Comparison of *Entamoeba histolytica* DNA isolated from a cynomolgus monkey with human isolates. Parasitol. Res., in press, 2007

2. 学会発表

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. 2006年4月

渡辺和良, 橘 裕司, 堤 寛. トリコモナス膿胸の1例. 第80回日本感染症学会総会. 2006年4月

橘 裕司, 柳 哲雄, Pandey Kishor, 程 訓佳, 神原廣二. 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. 2006年10月

橘 裕司, 柳 哲雄, Pandey Kishor, 程 訓佳, Jeevan B. Sherchand, 神原廣二. アカゲザル由来病原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年3月

程 訓佳, 橘 裕司. 地理的由来の異なる赤痢アメーバ3株の組換え型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年3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 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 に、様々の試料から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蛋白網羅的解析法の一つである ProteinChip/SELDI-TOF (surface enhanced laser desorption ionization-time of flight) 質量分析システムを用いて、赤痢アメーバを対象にした蛋白質の網羅的解析による分離株間の差異の解析を引き続き進めた。今年度は赤痢アメーバと形態的に酷似しているが非病原性である *Entamoeba dispar* についても解析した。国外で分離され世界的に知られている 5 株 (HM-1:IMSS/200:NIH/HK-9/DKB/SAW755CR)、国内で分離され無菌化された 5 株 (HATAJI/FUKUROI/NOT-12/TAKEYAMA/K-14-1) および国外で分離され無菌化された *E. dispar* の 2 株 (AS16IR/CYNO 09:TPC) について 2% CHAPS 液で可溶化した試料を ProteinChip 弱陽イオン交換体 CM10 を用い、分子量 2,000-20,000 dalton の範囲で調べた。HM-1 を標準株とし、これと他の分離株との比較を行った結果、蛋白ピークの違いが再現性よく検出され、蛋白ピーク相互の類似性から作成した系統樹により、株間の類似性も明らかになった。一方、*E. dispar* の 2 株には赤痢アメーバにはみられない蛋白ピーク (4855/8246/11734 Da) が共通に認められ、CYNO 09:TPC にはこれに加えて、特有の蛋白ピーク (5877/7571Da) も認められた。逆に、*E. dispar* 株には検出されず赤痢アメーバ株にのみ共通に検出される蛋白ピーク (4718/10827 Da) 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であり、構成蛋白発現レベルにおける株間相互関係が系統樹から推察された。また、*E. dispar* に特有にみられた蛋白ピークは赤痢アメーバとの識別に有用と考えられた。

A. 研究目的

赤痢アメーバの分離株に関して、その蛋白質の網羅的解析はほとんどなされていないことから、ProteinChip/SELDI-TOF 質量分析システムを用いた分離株間の差異の解析をさらに進めた。この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 に、様々の試料から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蛋白網羅的解析法の一つである。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。今年度は赤痢アメーバ分離株について引き続き詳細に解析するとともに、赤痢アメーバと形態的に酷似しているが非病原性である *Entamoeba dispar* についても解析し、両者を比較検討した。さらに、個別の蛋白のアミノ酸配列に基づく系統樹作成はよく行

われているが、このシステムで得られた蛋白質ピーク・パターンの類似性に基づく系統樹の作成も試みた。

B. 研究方法

昨年度に引き続き、国外で分離され世界的に知られている赤痢アメーバ 5 株 (HM-1:IMSS/200:NIH/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) を用いるとともに、今回、国外で分離され慶応大で無菌化された *Entamoeba dispar* の 2 株 (AS16IR/CYNO 09:TPC) も用いた。ProteinChip として弱陽イオン交換体の表面性質を持つ CM10 を引き続き用いた。アメーバ分離株の可溶化は 2% CHAPS/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 1-5 μ l (1 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。それぞれのアメーバ株について 3 回の別々の培養により得られた虫体から試料を調製した。検出された個々の蛋白について平均および標準誤差を求め、有意差検定を行った。

C. 研究結果

赤痢アメーバ標準株 HM-1 : 3 回の試料を用いて解析したところ、分子量 4305 Da ならびに 8274 Da を中心とした蛋白のピーク群が共通に認められた。検出された蛋白についてそれぞれの peak intensity の平均 \pm

標準誤差を求めた。その変動幅は最大で 13.3 ± 1.0 の範囲であった。他の国外分離株についても 3 回の別々の試料について、検出された 53 個の蛋白について、その peak intensity の平均 \pm 標準誤差を求めて、HM-1 と比較した。分子量 3000-6000 Da 未満の領域では、HM-1 は他の 4 株に比し、有意に peak intensity が高かった。特に HM-1 で高い intensity を示した 5423 Da 蛋白は 200:NIH/DKB では検出されず、HK-9/SAW755CR においても極めて低かった。分子量 6000-8000 Da 未満の領域では 5 株とも総じて検出されたピークは低いものが多く、特に、DKB は HM-1 に比し、検出されないものが多かった。分子量 8000-10000 Da 未満の領域では、8216/8274/8510 Da のピークが HM-1 では他の 4 株よりも有意に高く、一方、8568/8791 Da のピークは 4 株で有意に高かった。分子量 10000-15000 Da 未満の領域では、総じて高いピークは認められなかった。

同様に HM-1 と国内分離株を比較した。分子量 3000-6000 Da の領域では、国外分離株で認められた HM-1 よりも総じて低いピークを示したものは NOT-12 のみであった。また、HM-1 以外の国外分離株でほとんど認められなかった 5423 Da のピークは NOT-12 以外の株すべてで検出された。主要ピーク 4305 Da の intensity も NOT-12 以外は HM-1 と同等かやや高かった。分子量 6000-8000 Da 未満の領域では、国内分離株も総じて低いピークを示したが、NOT-12 は他の国内 4 株に比し、高いものがいくつか認められた。分子量 8000-10000 Da 未満の領域では、8216/8274/8327 Da のピークは株による違いがみられ、FUKUROI/NOT-12 ではいずれも HM-1 よりも有意に低く、HATAJI では 8274/8327 Da のみ、TAKEYAMA では 8274

Da のみ低く、K-14-1 ではいずれも有意差は認められなかった。8510 Da ピークについては、NOT-12 のみ有意に低く、8568 Da ピークは FUKUROI/NOT-12 のみ HM-1 よりも有意に高かった。分子量 10000-15000 Da 未満の領域では、国外分離株と同様に、総じて高いピークは認められなかった。各株相互の peak similarity を求め、この値から系統樹を作成した。その結果、HM-1 は他のどの株ともクレイド(clade)をつくらず単独の位置にあり、他の 9 株は 5 株と 4 株の二つクレイドに分かれた。5 株は更に 3 株(DKB/SAW/HK-9)と 2 株(200:NIH/NOT-12)のクレイドに分かれ、3 株は 2 株(DKB/SAW)と 1 株(HK-9)に分かれた。一方、最初の 4 株はまず 1 株(FUKUROI)と他の 3 株(HATAJI/TAKEYAMA/K-14-1)に分かれ、次に 1 株(HATAJI)と 2 株(TAKEYAMA/K-14-1)に分かれた。

次に、HM-1 と *E. dispar* 2 株を比較した。分子量 3000-6000 Da 未満の領域では、*E. dispar* 2 株とも HM-1 よりも総じて低いピークを示したものが多かった。HM-1 以外の国外分離株と同様に、4305 Da の主要ピークならびに 5423 Da のピークは 2 株とも低かった。一方、5877 Da のピークは CYN0 09 にのみ認められた。分子量 6000-9000 Da 未満の領域では、赤痢アメーバ分離株と同様に、低いピークのもものがほとんどであったが、その中であって、7571 Da のピークは CYN0 09 にのみ認められた。分子量 8000-10000 Da 未満の領域では、赤痢アメーバ分離株に共通にみられる 8274 Da の主要ピークがみられず、分子量の小さい 8246 Da のピークが 2 株ともに認められた。また、HM-1 以外の赤痢アメーバ国外分離株と同様に、8510 Da のピークは検出されず、8568 Da のピークは有意に高かった。分子量

10000-15000 Da 未満の領域では、赤痢アメーバ分離株では認められなかった 11531/11734 Da のピークが 2 株ともに認められた。

D. 考察

遺伝子 DNA の塩基配列は根本的でかつ安定であり最も重要なものであるが、それだけでは最終的な表現型である蛋白の様相・動態は明らかにならない。そのためにはプロテオーム解析が必要とされる。用いている 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。検出された蛋白ピークのアミノ酸配列の決定により最終的に蛋白が同定される。CIPHERGEN 社のマニュアルによれば個々のピークの精製過程を ProteinChip で捉えながら、蛋白を精製する必要がある。蛋白ピークのアミノ酸配列の決定がこのシステムの延長として、連続的になされることが今後最も望まれる点であり、開発が待たれる。これにより、このシステムはより強力な蛋白網羅的解析法になりうると考えられる。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。この方法を赤痢アメーバ等の原虫の蛋白網羅的解析に応用したのは今回が初めてである。分離株の蛋白網羅的解析へ応用した今回の研究では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再現性よく表示させることができた。*E. dispar* に関しては用いた株が少ない点は考慮されるべきであるが、赤痢アメーバ分離株との蛋白ピークの違いが検出されたことは重要と考えられる。蛋白ピークの類似性を指標にした系統樹を描くことができ、分離株間の相対的な位置関

係を把握することができた。これにより、HM-1 の他の分離株からの独立、また、DKB と SAW、200:NIH と NOT-12、TAKEYAMA と K-14-1 の類似性等が明らかになったことは興味深い。

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並びに *E. dispar* 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り、また、両種アメーバそれぞれに特有の蛋白ピークが認められた。赤痢アメーバ分離株の蛋白ピーク・プロファイルから作成した系統樹から、構成蛋白発現レベルにおける株間の相互類似性が明らかになった。それ故、この方法は赤痢アメーバ及び *E. dispar* 分離株の表現型としての蛋白発現の相互関係を系統樹として解析できる点においても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, Takeuchi T, Nozaki T (2006) Characterization of protein geranylgeranyltransferase I from the enteric protist *Entamoeba histolytica*. Mol. Biochem. Parasitol. 145(2), 216-225.
- 2) Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T (2006) Effect of artificial gastrointestinal fluids on the

excystation and metacytic development of *Entamoeba invadens*. Parasitol. Res. 98(5), 443-446.

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* の脱嚢および脱嚢後アメーバ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. 弘前. 2006年5月.
- 2) Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T: Effect of artificial gastrointestinal fluids on the excystation and metacytic development of *Entamoeba invadens*. XI International Congress of Parasitology. Glasgow. 2006年8月.
- 3) 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* の脱嚢及び脱嚢後アメーバの発育の抑制. 第47回日本熱帯医学会大会. 長崎. 2006年10月.
- 4) 牧岡朝夫, 熊谷正広, 渡辺直熙, 小林正規, 竹内 勤: *Entamoeba* の増殖及び分化に対する各種サイトカラシンの効果の違い. 第74回日本寄生虫学会東日本支部大会. 東京 2006年10月.
- 5) 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* の脱嚢及び発育の抑制. 第39回日本原生動物学会大会. 2006年11月.
- 6) 牧岡朝夫, 熊谷正広, 渡辺直熙, 小林正規, 竹内 勤: *Entamoeba* の脱嚢・発育に及ぼす人口胃液及び人口腸液の効果. 第76回日本寄生虫学会大会. 大阪. 2007年3月.
- 7) 熊谷正広, 牧岡朝夫, 渡辺直熙, 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. 大阪. 2007 年 3 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
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： 腸管寄生原虫の持続感染機構の解明を目的として原虫のゲノムDNAをターゲットとしたPCRによる遺伝子型同定法の確立と評価を実施した。

1. ジアルジア： 1) 18S リボゾーマルRNA 遺伝子とグルタミン酸脱水素酵素遺伝子に加えトリオースリン酸イソメラーゼ遺伝子をターゲットとした遺伝子型決定法を確立し、感染経路推定や人獣共通感染のリスク評価のより詳細な解析が可能となった。2) インドネシア、ネパールの無症候性持続感染例に加えてパレスチナの下痢症例のヒトサンプルについて遺伝子型同定を実施し、病原性特異的と考えられる遺伝子型がジアルジアでは認められないことを確認した。

2. サイクロスポーラ： 帰国者下痢症のサンプルを使用し、遺伝子型解析法の評価を実施し、混合感染を検出可能なレベルの遺伝子型同定法を確立した。

A. 研究目的

主に旅行者下痢症や施設内集団感染の危険性が報告されているジアルジア *Giardia intestinalis* (Syn. *G. duodenalis* and *G. lamblia*)は、感染症法5類に分類されるが、年間82件(2005年)と報告はわずかである。この数字はアメリカにおける2005年の9.7件/10万人(Annual Report 2005: CDC)と比較してもあまりに低く、また、ジアルジアの嚢子が全国の下水から検出されている事実とも矛盾しており、無症候性感染の多いことと、ほとんどの検査室において原虫検出が実施されていないために実数が把握されていない可能性が示唆される。

一方、サイクロスポーラ *Cyclospora cayentanensis* は1994年に新種のヒトの下痢起因原虫として命名された新興感染症である。米国・カナダでは、1996年以降毎年のように、グアテマラなどから輸入されたラズベリーやバジルの摂食が原因と思われる集団

感染が発生し、CDC、FDA、および米国農務省をあげて本症の対策に乗り出している。本邦では、本原虫は未だ国内に定着していないものと考えられてきたが、1996年に都立駒込病院で見いだされた海外帰国者の第1症例以来2004年までに13例が報告され、その中には感染源不明のものも含まれる。しかしながら、上記のジアルジアと同様の事情により国内の感染の実態は明らかになっていない。

本研究では、主にジアルジアをターゲットとしたPCRとシーケンスによる遺伝子型解析法の評価を実施し標準法を確立してきた。本年度は、さらに詳細な遺伝子型解析を目指したトリオースリン酸イソメラーゼ遺伝子をターゲットとした遺伝子型決定法の評価確立とともに下痢症を示したジアルジアサンプルを用いた遺伝子型解析を実施し、病原性特異的遺伝子型鑑別について評価をおこなった。また、旅行者下痢症の2症例のサイクロスポーラについて遺伝子型同定を実施し、技術的な評価と共に、旅行者下痢症で認

められるサイクロスポーラの分子疫学的評価をおこなった

B. 研究方法

ジアルジアの遺伝子型同定評価：パレスチナ西岸地区ナブロスのクリニックに下痢症を主訴として訪れた患者糞便 69 検体をサンプルとし、ショ糖遠心浮遊法後の鏡検によってジアルジア陽性となった 8 検体 (11.6%) を遺伝子型解析に使用した。遺伝子型解析には、18S リボゾーマル RNA (18SrRNA) 遺伝子とグルタミン酸脱水素酵素 (GDH) 遺伝子に加えトリオースリン酸イソメラーゼ (TPI) 遺伝子をターゲットとした PCR を実施し、ダイレクトシーケンスによって増幅産物の全長を決定した。また、2 サンプルについては、混合感染が疑われたため、GDH についてサブクローニングを実施し、各 10 クローンについて全長配列を決定した。

サイクロスポーラの遺伝子型同定評価：インドネシアおよびネパールへの旅行者下痢症患者由来の 2 検体を用いた。糞便からのオーシストについては発育テストを実施し、形態的に特徴的なスポロシストの形成によってサイクロスポーラと同定した。系統樹解析のためのシーケンスとしては 18S ribosomal RNA (rRNA) 領域を用い、PCR には Orlandi らによって 2003 年に報告された nested-multiplex PCR を実施した。プライマーおよび PCR 条件は原法に従った (Orlandi P. A. et al, 2003)。本法は、ユニバーサルプライマーを用いた 1st PCR によって、*Cyclospora* spp. および *Eimeria* spp. 由来の増幅産物 (636bp) を検出可能であり、また 2nd PCR では *Cyclospora cayetanensis* に特異な増幅産物 (298bp)、*C. cercopitheci*、*C. colobi*、*C. papionis* に特異な増幅産物 (361bp)、そして、*Eimeria* spp. に特異な増幅産物 (174bp) のいずれかを検出可能なマ

ルチプレックス PCR 法である。各増幅産物はすべてサブクローニングによって全長配列を決定した。

C. 研究結果

1) ジアルジア遺伝子型同定における TPI 遺伝子の評価：TPI 遺伝子領域をターゲットとした PCR 増幅産物 (580bp) の塩基配列は、GDH 遺伝子領域と比較しても多様な変異を認め、極めて高い解像度が系統樹解析において見込めることが判明した。しかし、おそらくこの高い置換率によるプライマー領域の変異によって、サンプルによる増幅効率の差が著しく、18SrRNA および GDH で増幅産物の得られた 3 サンプルで、TPI 領域の増幅産物を得ることができず、汎用性には問題があることが判明した。

2) 病原性ジアルジアの遺伝子型分布：下痢症状を示すジアルジアサンプルの遺伝子型は、Assemblage A2 が 6 検体に対して、Assemblage B の亜型が 2 検体となった。病原性特異的な遺伝子型の分布は、これまでの無症候性感染タイプとの比較によっても明らかではなかった。

3) サイクロスポーラの遺伝子解析：PCR での検出試験では、2 検体ともユニバーサルプライマーを用いた 1st PCR によって増幅産物が得られ、また、種鑑別のための 2nd PCR では *C. cayetanensis* に特異的な増幅産物を得た。しかし、シーケンスの結果、2nd PCR の増幅産物では、十分な系統樹解析が実施できないことが判明し、系統樹解析は 1st PCR の増幅産物の全長配列を用いて実施し、ともに *C. carytanensis* のリファレンス配列との有意なクラスター形成が確認された。

D. 考察

1) これまでに報告されたジアルジアの遺伝

子型解析と病型との相関は、相反するデータの一覧の様相を呈しているため、高病原性株や非病原性株が存在するかどうかについては定説がない。本研究の結果は、病原性株に特異的な遺伝子型の存在を否定するものであり、ジアルジアにおいては、無症候性感染が寄生因子よりもむしろ宿主因子によって決定される可能性が示唆された。また同時に、現在用いられているリボゾームRNAやGDH、TPIのようなエッセンシャルな酵素の遺伝子領域を用いる遺伝子型の決定方法自体に問題点がある可能性は否定できず、より病原性と直接的に関連するターゲット遺伝子での遺伝子型同定法について検討の必要性がある。

2) *C. cayetanensis* が1994年に新種として記載されて以来、本原虫はヒトのみを宿主とするとされてきた。しかし、近年エチオピアにおいて、African green monkey、colobus monkeyそしてolive baboonの3種の霊長類から*C. cayetanensis*と形態的に鑑別不可能な*Cyclospora* spp.が見出され、遺伝子解析での*C. cayetanensis*との違いを理由に、それぞれに*C. cercopithecii*、*C. colobi*、*C. papionis*との新種名が提案された。ヒトから分離され形態的観察で*C. cayetanensis*とされてきたこれまでの臨床検出例に、果たしてこれらの*C. cayetanensis*近縁種が含まれるか否かは、分子疫学的なアプローチによる報告がわずかである現状では不明だが、この点を評価していく上で、今回評価を行った18S rRNA遺伝子をターゲットとした1st PCRプライマーセットによる増幅産物は、その塩基配列内に上記の*Cyclospora* spp. およびを鑑別可能な変異を含むことから、種鑑別の上で非常に有用な検査法と考えられる。しかしながら、2nd multiplex PCRによる種特異的な鑑別は、*C. cayetanensis*と上記の3種の*C. cayetanensis*近縁種および*Eimeria* spp.のみを特異的に検出可能であり、存在する可能

性のある上記3種以外の*C. cayetanensis*近縁種を見逃す危険性がある。つまり、臨床から分離されるサイクロスポアにおける*C. cayetanensis*近縁種の存在を確実に検出するためには、1st PCRによる増幅産物の全長配列決定が必須と考えられる。

E. 結論

ジアルジアについては、本研究で標準法としてきた遺伝子型同定法によって臨床分離株の詳細なプロファイリングが可能であり、感染経路の推定、人獣共通感染のリスク評価に有用と考えられる。今回導入したTPI遺伝子領域は、さらにその解像度を高める極めて有望なターゲットである。しかし、本法によるプロファイリングは、ジアルジアの分離株における病原性の評価については問題のあることが判明した。病原性の高低が株間に存在するかどうかの評価を含め、今後の重要な課題である。

一方、人獣共通感染症の可能性が指摘され始めたサイクロスポアについては、ようやく分子疫学的なアプローチによる詳細な解析が実施可能となってきた。本研究によってその有効性が示されたOrlandiらのPCR法は、従来見出されてきたヒト特異型のサイクロスポアを類人猿型と十分に鑑別可能であり、本法を用いたリファレンス情報の蓄積は、本原虫の分子疫学的解析のためのベースとして有用と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

(英文)

1) Tokoro M, Nakamoto K, Hussein AIA Genotyping of *Cryptosporidium* species: current status and future direction.

Parasitic Zoonoses in Asian-Pacific Regions 2006:3-7

2) 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

(和文)

1) 所 正治、仲本賢太郎

腸管寄生原虫の病原因子。

日本臨床：増刊新感染症学 -新時代の基礎・臨床研究- (下) 2007.3;65(増刊号3):470-473.

2) 井関基弘、所 正治

クリプトスポリジウム症。

日本臨床：増刊新感染症学 -新時代の基礎・臨床研究- (下) 2007.3;65(増刊号3):287-290.

3) 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。

日本臨床寄生虫学会誌 2006. 3. ;17(1):145-148.

4) 所 正治

ジアルジア症 (ランブル鞭毛虫症)・クリプトスポリジウム症

寄生虫薬物治療の手引き (2007年)改訂第6.0版 (熱帯病治療薬研究班):11-14

5) 所 正治、井関基弘

クリプトスポリジウム症：特集/消化管寄生虫症の最近の話題。

G. I. Research 2006. 8;14(4):336-341.

2. 学会発表

1) 所 正治、Amjad IA Hussein、春木宏介、木村憲司、Din Syafruddin、Tudor R Olariu、井関基弘

多地域由来のジアルジアの遺伝子型解析：複数遺伝子座による系統樹解析

第47回日本熱帯医学会・第21回日本国際保健医療学会合同会 (2006.10、長崎)

2) Tokoro M、Yamaguchi T、Kimura K、Olariu TR、Iseki M

Study of intra-species diversities in *Giardia intestinalis*: What is the driving force in the formation of various genotypes

The 9th Asian-Pacific Congress for Parasitic Zoonoses, Gifu, Aug. 2006

3) Nakamoto K、Kimata K、Abe N、Iseki M、Tokoro M

A novel one step polymerase chain reaction method to detect major human clinical isolates of *Cryptosporidium*

The 9th Asian-Pacific Congress for Parasitic Zoonoses, Gifu, Aug. 2006

4) Hussein AIA、Yamaguchi T、Nakamoto K、Tokoro M

Genotyping of clinical isolates of *Giardia intestinalis* from Palestine: A phylogenetic analysis using multiple gene loci

The 9th Asian-Pacific Congress for Parasitic Zoonoses, Gifu, Aug. 2006

5) Arai T、Kimata I、Ichimura H、Iseki M、Tokoro M

A trial for the detection of intestinal protozoan parasites by real-time PCR