

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19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20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
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）	17
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）	21
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）	25
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）	34

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学的な介入を試み、施設内感染の予防ガイドラインを向上させる事を企図した。加えてアメーバ感染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(Ig11, Ig12)とその遺伝子の多型解析、タンパク質網羅的解析とタンパクの同定手法の確立を試みた。更にサイクロスポーラなどの遺伝子多型性の検索を行い、国内外の分離株の性状解析を試みた。今年度はこれまでの調査結果と他の介入策の効果も考慮するため、フォローアップ調査を中心に施行した。対象となった施設においては、以前施行した制圧対策の有効性が確認されたが、これらの所見、及び公衆衛生的な介入策の評価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。持続感染機構の解明も継続し、赤痢アメーバと *Entamoeba muris* の実験動物腸管内での競合現象を見出し、この原虫の効率よい培養法の確立も行った。アメーバの遺伝子多型解析については t-RNA-linked short tandem repeat 多型について検討し、有効性を示した。表面抗原である Ig1 遺伝子多型に関する研究は異なる 5 タイプの存在を示し、地理的なオリジンとの相関も明確にした。中国の HIV 感染者における赤痢アメーバの調査を行い、わが国と比較も行った。タンパク質の多型性に関する検討では新しく LC-ESI-MS/MS によるタンパクの同定も可能とした方法を確立した。また、18SrRNA を標的として、サイクロスポーラの遺伝子多型解析法を確立し、加えて女性における抗赤痢アメーバ抗体陽性率の明確な上昇をも初めて示し、霊長類における赤痢アメーババリエントに関する研究を進展させ、18SrRNA のバリエントが霊長類にかなり広く感染拡大が見られることを示した。このバリエントは病原性を有することも確認でき、これらが人獣感染の原因となりうる可能性をも明らかにした。

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・東海大学医学部准教授

牧岡朝夫・東京慈恵会医科大学准教授

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

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っており、増加の原因解明や対策実施が急務となっている。筆者らは従来から厚生労働科研の補助により、わが国の赤痢アメーバの感染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 Luminal drug 併用による方針を確立したものの、公衆衛生アプローチの導入も必要である事は明らかで、現場に還元できる感染防止ガイドラインの作成など、幾つかの喫緊の課題も挙げられる。今次の研究は、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解析方法を組み合わせ、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)遺伝子多型性解析、表面抗原多型性解析、タンパク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、株の移動に関する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、あるいは多数の分離株の病原因子の発現状況などを含む生物学的特徴の比較検討、感染者の臨床免疫学的特徴などより特定化する。更に霊長類などに見出された赤痢アメーバのバリエントと呼ぶうるアメーバの生物学的な特質を明確にする。

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解析方法の確立も多方面に資するものと思われる。

上記の総合的な研究目標にそって研究を展開し、3年目の最終年度を迎えた。本報告は1~2年次の成果に基づいて、より一層展開した研究の結果を纏めたものである。

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

最終年度においては、これまでに高率な赤痢アメーバ感染を見出した2施設を対象として、Luminal drugの効果のフォローなどの目的を持って調査を行った。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という2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併行して行った。

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、ここ同様に継続フォロー調査を実施した。このうちの1施設は2003年にディロ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。

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。

昨年度に実施した公衆衛生的な介入策は今年度も継続し、評価が必要と思われた部分についてはKAP研究により、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、承諾された内容に沿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、更に腸管寄生

原虫の多様性の確認に寄与する目的で、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。更にこれまで不可能とされていた赤痢アメーバの試験管内での嚢子形成機構の検討を開始し、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、今年度は特に近縁の原虫である *Entamoeba muris* との腸管における競合という視点より行った。

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、赤痢アメーバの疾患の表現型とより一致する独立マーカーを確立することを目指して、国内分離株を使用して tRNA-linked short tandem repeat (STR) と感染病型との関係の検索を実施した。実験に使用した分離株は 39 株で、キャリア分離株 6 株、腸アメーバ症分離株 12 株、肝膿瘍分離株 21 株である。tRNA-linked STR の PCR による増幅は、野崎の研究室で開発したプロトコールに従い、6 種類のプライマーを用い、genomic DNA を鋳型として行った。DNA 断片のサイズはアガロースゲル電気泳動によって決定した。

(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 9 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てこれまで調査した株との比較検討を試みた。組み換え Igl の調製は Igl1 について、HM-1 株よ C 末(C-Igl,aa603-1088)のタンパク断片を大腸菌で発現させた。Inclusion body を refolding したのち、イオン交換クロマトで精製した。

中国との共同研究による HIV 感染と赤痢アメーバとの混合感染に関する検討は、中国側、当該日本側大学の倫理指針に従い、検体を匿名化した上で、215 名から分離した血清について行った。抗赤痢アメーバ抗体は組み替え C-Igl を 1 プレートの 1 穴あたり 100ng 抗原として添加し、通常の ELISA 手法に従って実施した。

(倫理面での配慮)

HIV 感染者の解析は、日中双方の指針に従い、人権に配慮し、検体全てを匿名化した上で実施した。

6.タンパク質の網羅的解析による多型性検討

今年度は LC-ESI-MS/MS による赤痢アメーバタンパク、ペプチドの網羅的解析を行い、*E. dispar* などとの比較検索を試みた。この時に Mascot 検索に連動して表示される各々のタンパクの emPAI(Exponentially

Modified Protein Abundance Index)値に注目した。

また今年度は、タンパク網羅的解析の基礎になるトランスクリプトーム解析をオリゴキャップ法を使用して試みた。

7.他の腸管寄生性原虫の遺伝子多型性検索法の確立

今年度は、分布や宿主特異性についての知見収集が急いで求められている腸管寄生原虫であるサイクロスポーラ (*Cyclospora cayetanensis*) 遺伝子多型の解析法の確立を試みた。遺伝子多型は 18S ribosomal RNA 遺伝子(18SrRNA)を標的として PCR を施行し、増幅した遺伝子の部分配列をサブクローニングし、塩基配列を決定した。対象としたのは、インドネシアなど 5 カ国のヒトから分離された 5 株、及びインドネシアのカニクイザル由来の 2 株である。

8.霊長類の赤痢アメーバ感染状況の調査と分離株の性状解析

今回は、都内動物園で飼育されているアフリカ原産の霊長類であるブラッサゲノンの糞便から赤痢アメーバまたは *E. dispar* と思われるアメーバを分離できたので、分離培養を行い、18SrRNA などの遺伝子レベルでの比較検索、分離されたアメーバの病原性解析などを行い、併せてわが国の霊長類における赤痢アメーバの感染状況の調査を、これまでに開発した赤痢アメーバ、上記研究により同定した赤痢アメーババリエント、及び *E. dispar* の 18SrRNA を標的とした

Multiplex PCR によって行った。

(霊長類に関する調査も当該施設の動物実験基準に沿って実施した)

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

今年度は、従来の調査で赤痢アメーバの見出された新規施設がなかったので、公衆衛生対策の評価、感染予防ガイドラインの改訂をも視野に入れ、フォローアップ調査を中心として実施した。調査は、これまでに明瞭、かつ高率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。これらの施設は従来から連続して数年にわたる継続調査を行ったものである、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により治療と再感染予防が可能となったと結論出来る。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や他の腸管寄生性原虫の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女性受診者の赤痢アメーバに対する抗体値の調査で、2006 年度では 5.3%の陽性率であったが、2007 年では

3.2%(6/189)と調査開始後、初めて減少した。しかし、これまでの結果(2005年には4.8%、2004年には3.7%)と比較しても、ある程度の抗体陽性率が維持されていることが示された。また注目すべきは、この6名の陽性者のうち4名がクラミジア抗体陽性であり、このうち1例は梅毒、トリコモナスの感染も確認された。年齢をみても、6例中5例は30歳代であり、赤痢アメーバの異性愛による感染を更に重視しなければならない事態に立ち至っていることは明らかである。

3.腸管寄生性原虫の臨床株分離法の改良

今年度の検討では、まずジアルジア等の脱嚢因子である炭酸ガスが赤痢アメーバの脱嚢効率をも上昇させ、また嫌気性細菌を共棲させた卵黄抽出物添加培地が分離培養高率を更に上昇させることも明らかになった。また特筆すべきは芽胞形成能力を有する嫌気性菌(*Clostridium* sp.など)共棲下でまだ効率は悪いが、赤痢アメーバの嚢子形成が初めて観察できたことである。これらの所見は、今後のアメーバ研究の最大のブレイクスルーになる可能性を有している。更にこれまで培養が不可能であった *E. muris* の培養に初めて成功した。

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今年度は、前述の *E. muris* の培養系の作成に伴って、赤痢アメーバと *E. muris* との混合感染マウス持続性感染モデルを作成し、

赤痢アメーバの腸管内での推移を観察した。その結果、*E. muris* が併せて感染している場合は、赤痢アメーバの腸管への定着、感染が著しく阻害されることが明らかになった。このような所見は大腸腔内の細菌だけでなく、他の近縁原虫も赤痢アメーバの感染成立に何らかの影響を及ぼす可能性があることを示している。

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

今年度は赤痢アメーバ症の病型と対応する遺伝子マーカーの検索を目指し、tRNA-linked STR の多様性を多数の国内分離株を用いて検索した。その結果、DA-H、AL-H、NK2-H、RR-H、SQ、SD-Hと、6種類の異なった遺伝子座について4-8種類の異なったサイズのバンドが見られた。この所見と臨床病型との相関を検索すると、3病型のそれぞれに属する各分離株は異なるタイプに属する事が示された。更に多数の株について検索することが求められるものの、本法は初めて病型と対応する遺伝子タイピング法となる可能性が高い。

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9株の Igl1 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。その KU45、KU47、KU50 の3株はこれまでに解析した NOT-12 株などと同一であったが、その他の株は異なっていた。KU38、KU43 は同一

の配列を示しており、一方 KU44 は全く異なる配列を示していた。昨年解析したデータを併せて 22 株について考えると、この遺伝子は大きく A~E の 5 対応に分類されることが分かった。従来日本特異な形と判定されていた A は 8 株、アジア型である B~D タイプ 9 株、欧米型と思われた E が 3 株という結果になった。国内からは A が 7 株、B が 1 株、C の全て (1 株)、と D の全て (3 株) が同定された。

今年度はまた、わが国のアメーバの分布特性を知るために、中国の HIV 感染者からなる赤痢アメーバ抗体陽性率を ELISA にて検索した。その結果、HIV 陽性者のアメーバ抗体陽性率は 7.9% であり、HIV 非感染者より有意に高いことが示された。陽性率と年齢との相関も見出せなかった。

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

今年度よりタンパクの同定をも可能とする LC-ESI-MS/MS と Mascot 解析を用いて赤痢アメーバ分離株のタンパク網羅的解析を行った。その結果、複数のタンパクが検出・同定され、それぞれの emPAI も明らかにされた。例えば、赤痢アメーバの標準株として広く用いられている HM-1 では emPAI 値が最も高いのは enolase で、この特徴は HM-9、SAW755CR、KU46、KU14 及び *E. dispar* の AS161R に共通して観察された。一方 200:NIH、KU43、KU2 などでは actophorin が最も高かった。また、alcohol dehydrogenase 3、及び簿 coactosin は赤痢

アメーバの全株について観察されたが、*E. dispar* 株においては見出せなかった。一方 40S ribosomal proteinS18 は *E. dispar* には検出されたが、赤痢アメーバには見出せなかった。このように近縁のアメーバ間のみならず株間でもタンパクプロファイルに差異があった。

また、タンパク多型性と比較検討するため、和えきりアメーバの全長 cDNA ライブラリーの 5000 クローンについて両端ワンパスシークエンスを行い、3146 配列をアセンブルすることができた。これらを相同検索したところ、690 種の遺伝子が同定可能であった。これらの所見はアメーバのタンパク網羅的解析の基盤となりうるものとする。

8. サイクロスポーラの遺伝子多型性解析法の検討

今年度はこれまで遺伝子多様性に関して広く検討が行われてきていないサイクロスポーラについて 18SrRNA の部分配列を比較検討することによって、多様性に検討を試みた。その結果、全てのサンプルが異なる遺伝子型の混合感染の所見を示した。地域特異性を検出することはできなかったが、アジアからアフリカまで広い範囲に分布する遺伝子型が存在することを示した。このことはこの原虫がヒトの移動に伴って極めえ早期より広い範囲に拡散したことを示唆している。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。

9. 霊長類における赤痢アメーバ感染の状況

と分離株の性状解析

今回初めて都内動物園で飼育されているアフリカ原産の霊長類であるブラッサゲノンから赤痢アメーバまたは *E. dispar* と同定されたアメーバを見出し、無菌培養、クローン化に成功し、その性状を調べた結果、18SrRNA の塩基配列での赤痢アメーバとの相同性は 99.3% であり、同様の解析を *E. dispar* との比較で行ったところ、この分離株は赤痢アメーバと *E. dispar* との中間に系統樹上位置していることを確認した。アイソザイム解析でもこれまで知られていない新しいタイプで、無菌クローンをハムスター肝に注射したところ、肝膿瘍を形成し、病原性も有することが示された。以上より、このアメーバは赤痢アメーバのバリエーションと考えるのが妥当と思われた。続いて実施した Multiplex PCR ではこのタイプのアメーバが霊長類 11 種、47 頭の中で 4 種、6 頭に検出できた。

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。感染のハイリスク要因を見ると、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はされていないものの、知的障害者を中心とした各種の更生施設における持続感染も公衆衛生上、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。このことは一旦赤痢アメーバ感染者が周囲に入り込むと容易に感染が拡大する素地があることを示している。

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、治療法を確立した。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り、クラミジアなど性感染を疑わせるマーカーも併せて陽性化しているなど、最近わが国では上記の異性愛行為による赤痢アメーバ感染が起こっていることを示唆するものと言える。

これらのことは、極めて重要な所見であり、厚生労働行政上も格別の注意を払う必要があるデータと言えよう。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、今後継続調査の上、感染防御ガイドラインに取り入れる予定である。

他方、遺伝子、タンパクレベルの多型性の検討から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、臨床病形に対応できる遺伝子多型性

解析法、表面抗原に基づく地理的なオリジンを推定できる手法、及びタンパクの同定が可能な網羅的解析法が開発されつつある事は重要である。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、また恐らく初めての試験管内での嚢子形成を可能とする培養条件を確立しつつあることは大きな展開を示す可能性を示唆する。

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。フォローアップ対象の施設では、従来の治療・感染抑圧法が間違いなかったことを示しており、今後のモデル化に大きな意義を有するものといえる。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を含めて、感染予防ガイドラインの再改訂に応用する予定である。施設内感染制御に関わる基盤技術面の研究もそれぞれ有意義な進展を見せた。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間違いなく起っていると想定せざるを得ないという所見も得られた。今後も継続した調査を必要とすることを強調しておきたい。

F. 健康危険情報

女性における抗体値が依然として有意なレベルにあり、クラミジアなどの感染も高率

に合併していることから、異性愛行為による赤痢アメーバ感染という新しい感染経路が示唆される。

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、第9版、朝倉書店(印刷中)、2008.

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.

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.

2. 論文

Suzuki J, Kobayashi S, Murata R, Yanagawa Y, Takeuchi T Profiles of a pathogenic-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, 27, 33-40, 2007.

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.

Saito-Nakano Y, Mitra BN, Nakada-Tsukii K, Saito D, Nozaki T Two Rab7 isotypes, EhRab7A and EhRab7B play distinct roles in biogenesis of lysosomes and phagosomes in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. Cell Microbiol, 9, 1879-1888, 2007.

Mitra BN, Saito-Nakano Y, Nakada-Tsukii K, Saito D, Nozaki T Rab11B small GTPase regulates secretion of cysteine proteases in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. Cell Microbiol, 9, 2112-2125, 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, 153, 107-114, 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, 101, 539-546, 2007.

Tachibana H, Cheng X-J, Kobayashi S, Okada Y, Itoh J, Takeuchi T Primary structure, expression and localization of two intermediate subunit lectins of *Entamoeba dispar* that contain multiple CXXC motifs. Parasitol, 134, 1989-1999, 2007.

Chen Y, Zhang Y, Yang B, Qi T, Lu H, Cheng X, Tachibana H Seroprevalence of *Entamoeba histolytica* infection in HIV-infected patients in China. Am J Trop Med Hyg, 77, 825-828, 2007.

Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T Differences in protein profiles of the isolates of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* by surface-enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF MS) ProteinChip assays. Parasitol Res, 102, 103-110, 2007.

Suzuki J, Kobayashi S, Ise I, Murata R, Yanagawa Y, Takeuchi T Seroprevalence of *Entamoeba histolytica* infection in female outpatients at a

sexually transmitted disease sentinel clinic in Tokyo, Japan. *Jpn J Inf Dis* (in press), 2008

Suzuki J, Kobayashi S, Murata R, Tajima H, Hashizaki F, Yanagawa Y, Takeuchi T
A survey of amoebic infection and differentiation of an *Entamoeba histolytica*-like variant (JSK2004) in nonhuman primates by a multiplex polymerase chain reaction. *J Zoo Wildlife Med* (in press), 2008.

所 正治 消化器・泌尿生殖器寄生の原虫症. 今日の治療指針, pp184-186, 2008.

仲本賢太郎, 所 正治 世界的にみた感染症の検査法—赤痢アメーバ, クリプトスポリジウム. *臨床と微生物*, 34, 329-334, 2007.

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. 寄生虫症薬物治療の手引き、改訂第 6.0 版、pp11-14、熱帯病治療薬の開発研究班、2007

鈴木 淳、伊瀬 郁 性感染症としての赤痢アメーバ症—特に女性における赤痢アメーバ抗体保有率について. *ISAR*, 28, 108-109, 2007,

小林正規、鈴木 淳、竹内 勤 腸管感染症のすべて—腸管原虫症の迅速診断.

化学療法の領域、23, 153-159, 2007.

鈴木 淳、小林正規、竹内 勤 性行為感染症—赤痢アメーバ症. *臨床と研究*, 84, 53-56, 2007.

3.学会発表

小林正規、鈴木 淳、竹内 勤 無菌培養が困難であった赤痢アメーバ分離株に対する卵黄レシチンの増殖効果. 第 76 回日本寄生虫学会大会、2007

小林正規、鈴木 淳、竹内 勤 霊長類 (シロガオサキ) 由来ジアルジアの無菌培養株樹立とその遺伝子型について. シンポジウム、第 67 回日本寄生虫学会大会東日本支部大会、2007.

Escueta A, Nozaki T Genotyping of Japanese *Entamoeba histolytica* isolates. US-Japan Cooperative Medical Science Program, 2008.

橋 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, 橋 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.

橘 裕司、程 訓佳、小林正規、竹内 勤
Entamoeba dispar における 2 つの
intermediate subunit lectin の解析. 第
48 回日本熱帯医学会大会、2007.

辻 俊史、小西秀幸、曾我幸一、若林直樹、
光藤章二、片岡慶正、山田 稔、内川隆一、
手越達也、有菌直樹、橘 裕司 定期健
康診断で赤痢アメーバの栄養型と嚢子が検
出された 1 例. 第 63 回日本寄生虫学会西
日本支部大会、2007.

山田 稔、内川隆一、手越達也、有菌直樹、
錦織ルミ子、橘 裕司、畠中秀亮、梅本博
公、梅本博公 今年経験した赤痢アメ
ーバ感染症 3 例について. 第 63 回日本
寄生虫学会西日本大会、2007.

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
及ぼす人工胃液及び人工腸液の効果. 第
76 回日本寄生虫学会大会、2007.

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及び
Entamoeba dispar の株間の違い. 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
人工胃液による *Entamoeba* の脱嚢促進.

第 48 回日本熱帯医学会大会、2007.

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は *Entamoeba* の
脱嚢及び発育に関与する. 第 39 回日本原
生動物学会大会、2007.

Tokoro M, Yamaguchi T, Hussein AIA,
Syafuruddin D, Iseki M Study on
intra-species diversity of *Giardia*
intestinalis: molecular epidemiological
analysis as a powerful tool. Open
Science Meeting 2007 Towards a
Sustainable World, 2007.

Yoshida T, Tanaka M, Syafuruddin D,
Yamada M, Arizono N, Tokoro M
Genotyping of *Cyclospora cayentanensis*:
an assessment of zoonosis potential.
Open Science Meeting 2007 Towards a
Sustainable World, 2007.

Tokoro M, Hussein AIA, Nakamoto K,
Syafuruddin D, Iseki M Genotyping of
Giardia intestinalis: phylogenetic
analysis using multiple gene locus. 第
76 回日本寄生虫学会大会、2007.

Nakamoto K, Tokoro M, Nozaki T
Characterization of
S-adenosyl-L-methionine synthase from
Entamoeba histolytica: expression
analysis of native enzyme in trophozoites.

第 76 回日本寄生虫学会大会、2007.

Hussein AIA, Yamaguchi T, Nakamoto K,
Tokoro M Genotyping of clinical
isolates of *Giardia intestinalis* from
Palestine. 第 76 回日本寄生虫学会大会、
2007.

Arai T, Kimata I, Nakamoto K, Iseki M,
Tokoro M An *in vitro* growth
assessment method of *Cryptosporidium*
parvum using quantitative real-time
PCR. 第 76 回日本寄生虫学会大会、
2007.

Yoshida T, Tanaka M, Syafruddin D,
Yamada M, Arizono N, Tokoro M
Genotyping of *Cyclospora cayentanensis*:
an assessment of zoonosis potential. 第
76 回日本寄生虫学会大会、2007.

H. 知的所有件の取得状況

1. 特許取得

特許登録第 04061410 号 (平成 20 年 1 月
11 日) 「クリプトスポリジウム症の治療又
は予防薬」、所 正治、北出幸夫、野崎智義・
国立大学法人金沢大学、国立大学法人岐阜
大学、国立感染症研究所長

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：ジアルジアの脱囊因子として知られる炭酸ガスを他の腸管寄生原虫の脱囊システムに応用することで脱囊効率が改善された。また、嫌気性菌を共棲させた卵黄培地を用いることで、より株分離効率の高い原虫培養法を確立できた。さらに芽胞形成能をもつような嫌気性菌 (*Clostridium sp.* 等) の共棲下で少数ながら腸管寄生のアメーバ類の培地内被囊が起きることを見出した。2. 腸アメーバ症の持続感染機構の解明：霊長類においては赤痢アメーバと非病原性の *Entamoeba dispar* の混合感染が成立し難いことが知られているが、マウス腸アメーバ症モデルにおいても、盲腸に *Entamoeba muris* の感染がみられたマウスでは、実験的に赤痢アメーバを感染させることができなかった。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 施設についてアメーバ症のフォローアップ調査 [施設 K: 10 年目、施設 Y: 4 年目] を行った。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後は、本年度を含め、赤痢アメーバ陽性者は全くみられていない。

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なり、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：赤痢アメーバと *E. dispar* の無菌培養法を基に、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囊に困難が伴う原虫囊子からの囊子内虫体の脱囊条件の策定と分離培養法の確立を昨年引き続き試みた。

2) 腸アメーバ症の持続感染機構の解明：マウスに

自然感染していた非病原性アメーバ *Entamoeba muris* の分離培養と赤痢アメーバの感染への影響を検討した。

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。2004～2006 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。2007 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、10 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。

C. 研究結果

1) 腸管寄生原虫臨床株の分離：ジアルジアの脱嚢因子として知られる炭酸ガスを他の腸管寄生原虫の脱嚢システムに応用することで脱嚢効率が改善された。また、嫌気性菌を共棲させた卵黄培地を用いることで、より分離効率の高い原虫培養法を確立できた。さらに芽胞形成能をもつような嫌気性菌 (*Clostridium sp.* 等) の共棲下で少数ながら腸管寄生のアメーバ類の培地内被嚢が起きることを見出した。また、卵黄培地に予め大腸菌を増殖させ、嫌気条件とし、アメーバの増殖促進効果を有す嫌気性菌 (*Bacteroides fragilis*) を共棲させることで *E. muris* の培養に初めて成功した。

2) 腸アメーバ症の持続感染機構の解明：昨年までの成果から持続感染が成立するためには、アメーバのマウス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が、今回マウス盲腸内に *E. muris* の感染がある場合、実験的に赤痢アメーバを感染させることが困難となる現象がみられ、種の異なるアメーバ同士の競合が起り得ることもわかった。

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。連続して長期の（施設 K:10 年、施設 Y:4 年）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、施設内での赤痢アメーバ感染は治療と再感染予防が可能であることが、この調査を通じて証明できた。

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表層部分に限られるため、無症候で感染が長期（最長 1 年～）に及ぶことから、腸管腔寄生の *E. dispar* 等の他の非病原性アメーバとの重複感染のモデルとして、また薬剤やプロバイオテイクスを用いた治療実験系にも用いることができ、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。

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システム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.

2. 学会発表

1) 小林正規、鈴木 淳、竹内 勤：無菌培養が困難であった赤痢アメーバ分離株に対する卵黄レシチンの増殖促進効果：第76回日本寄生虫学会大会(2007)

2) 小林正規、鈴木 淳、竹内 勤：霊長類(シロガオサキ)由来ジアルジアの無菌分離培養株樹立とその遺伝子型について(シンポジウム)：第67回日本寄生虫学会東日本支部大会(2007)

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た研究を継続した。本年度は、マイクロアレイを用いた全遺伝子の発現プロファイルと病原性との相関を確立するために不可欠な、独立した、病原性と相関する新規マーカーの獲得を目的として、tRNA 遺伝子に近接した短反復配列の多様性を日本の分離株間で比較した。その結果疾患像と相関する遺伝子座と予想されるものが得られた。

A. 研究目的

赤痢アメーバ症は全世界人口の1%が感染している腸管寄生虫感染症である。日本では、知的障害者施設において高頻度の感染を起こし、精神医学保健上重大な問題となっている。また、男性同性愛者にも高頻度に感染が見られ、近年女性の性労働者にも感染が高まり、性行為感染症としての側面も極めて重要視されている。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未然に防ぐに利する技術確立することが危急に求められている。

赤痢アメーバ原虫の遺伝的多様性は極めて高い。我々はこれまでの関連分野での研究により、赤痢アメーバ原虫株間での遺伝的背景の相違を明瞭に明らかにしている(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)。本研究では初-2年度に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、赤痢アメーバ分離株のタイピングを確立した他、いくつかの遺伝子の発現と病原性、或は疾患の表現型(outcome of infection)が相関することを、限られた例を用い示した。今後この研究ラインを継

続するために、疾患の表現型と相関する、独立したマーカーを同定することは極めて重要である。最終年度はこれを目的として、赤痢アメーバ国内分離株の tRNA-linked short tandem repeat (STR)の多型と outcome of infection の相関を解析した。

B. 研究方法

1. 分離株

本研究に用いたられた国内分離株は表1に示す。無症候キャリアから得られた6株、赤痢/大腸炎から得られた12株、アメーバ性肝臓瘍から得られた21株から計39株を用いた。

2. 培養

HM1:IMSS cl6 を始めとする無菌培養株の培養はDiamondのBI-S-33培地を用いて行った。KU3を始めとする細菌共棲培養はRobinson培地を用いて常法に基づき行った。

3. DNA の調整

DNA はDNA stool mini kit を用いて抽出・精製した。

4. tRNA-linked STR の PCR 増幅

既存のプロトコール(Ali et al., J. Clin. Microbiol. 45, 285-289, 2007)に基づき、6種類のSTRプライマーを用い、与えられた条件で、genomic DNA を鋳型としてPCRを行った。アガロースゲル電気泳動

で DNA 断片のサイズ決定を行った。

図1

本研究で用いた臨床分離株、outcome of infection、各遺伝子座の type、分類された genotype

Outcome of Infection	Isolate	Loci						Genotype
		DA-H	AL-H	NK2-H	RR-H	SQ-H	S ^{GA} D-H	
Asymptomatic	KU-5	1	4	5	7	4	5	1
	KU-14	1	4	6	5	4	4	2
	KU-26	3	5	5	5	4	5	3
	KU-40	3	5	5	3	4	5	3
	KU-27	1	4	1	5	3	3	4
KU-32	2	5	5	5	2	3	5	
Diarrhea/Dysentery	KU-1	1	4	3	1	4	6	5
	KU-2	1	5	4	4	2	1	7
	KU-3	1	6	5	7	4	5	8
	KU-10	1	3	2	4	4	5	9
	KU-15	4	5	4	5	1	3	10
	KU-16	1	4	4	4	1	1	11
	KU-23	1	2	7	5	4	5	12
	KU-32	2	5	4	5	1	1	13
	KU-46	1	6	2	6	4	5	14
	KU-45	4	5	4	5	1	1	15
KU-47	2	2	5	5	4	4	16	
KU-92	2	5	4	5	4	1	17	
Amebic Liver Abscess	ALA-3	1	4	5	7	4	5	1
	ALA-10	1	4	5	7	4	5	1
	C726	4	5	4	5	1	1	15
	ALA-1	1	4	2	4	4	5	18
	ALA-2	1	4	2	4	4	5	18
	ALA-5	1	4	2	4	4	5	18
	ALA-13	1	4	5	7	2	5	19
	ALA-6	1	5	2	4	4	5	20
	ALA-8	1	4	4	5	2	1	21
	ALA-11	1	1	5	2	4	5	22
	ALA-9	1	3	7	2	4	5	23
	ALA-17	1	3	5	2	4	5	24
	ALA-7	2	2	5	5	2	3	25
	ALA-14	4	5	4	5	1	1	26
	KU-8	4	5	4	5	1	1	26
KU-12	4	5	4	4	4	5	27	
KU-48	4	5	4	7	1	2	28	
ALA-12	4	5	5	5	2	3	29	
ALA-4	4	6	4	5	1	1	30	
ALA-16	4	2	5	5	2	1	31	
ALA-15	4	2	5	5	2	1	31	

(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。

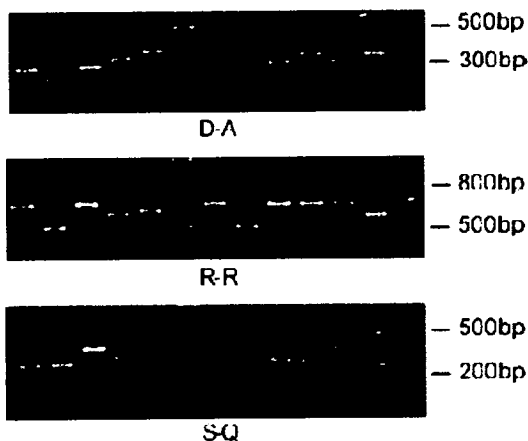
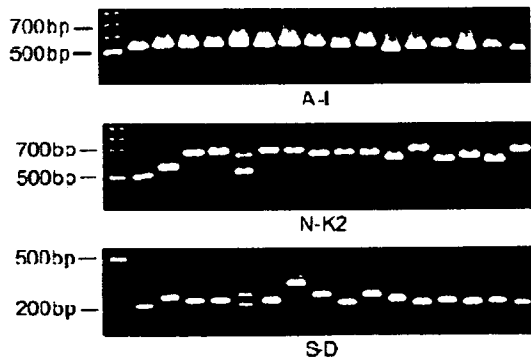
C. 研究結果

1. 増幅されたマーカーのサイズ多型

得られた PCR 産物の代表的なものを図1に示す。各遺伝子座の PCR 増幅産物は高い多型性を示した。

図1

各遺伝子座の増幅産物のサイズ多型



2. 各遺伝子座のグルーピング

表2に結果をまとめる。6つの遺伝子座に関して、4-8種類の異なるサイズのDNAバンドが認められた。以下のように分類し、各タイプの名称を与えた。

図2 tRNA-linked STRに基づくタイピング。6つの遺伝子座(DA-H, AL-H, NK2-H, RR-H, SQ, SD-H)に関する断片サイズの多型

DA-H	AL-H	NK2-H	RR-H	SQ	S ^{GA} D-H
1=132	1=248	1=384	1=272	1=130	1=97
2=111	2=232	2=328	2=264	2=129	2=88
3=93	3=224	3=320	3=252	3=122	3=87
4=78	4=208	4=256	4=224	4=82	4=79
	5=200	5=232	5=208		5=78
	6=192	6=216	6=192		6=69
		7=184	7=178		
		8=160			

3. 各遺伝子座と outcome of infection の相関

以下の表3に示すように、3つの病型に属する各分離株は異なるタイプに分類された。それぞれの病型(outcome of infection)にタイプの偏りが見られた。

表3 各病型の示す tRNA-linked STR マーカーのタイピングの結果