

Sample Group	Locus	STR type							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Asymptomatic Diarrhea ALA	D-AH	3 2 0	1 3 1	2	1 9				
Asymptomatic Diarrhea ALA	AL-B	1	2 3	1 2	1 1	2 6	2 2		
Asymptomatic Diarrhea ALA	NK2-H	1	2 3	1	6 1	4 2 8	1	1 1	1
Asymptomatic Diarrhea ALA	RR-H	1	3	2	1 1	3 6 9	1	1 1	
Asymptomatic Diarrhea ALA	SQ-H	4 1	1 6	1	4 10				
Asymptomatic Diarrhea ALA	S ¹⁰⁴ D-H	1 1	1	2 1 2	1 1 1	2 4 12	1		

D. 考察

我々は本研究により tRNA-linked STR を用いたタイピングの用いた日本分離株の解析をほぼ終えることができた。残された問題点は解像度である。本研究においては得られた PCR 産物をアガロース電気泳動により展開し、分子サイズを決定しているが、準備的なシーケンス決定により、同一の鎖長の断片が必ずしも同一の配列を示すのでないことを既に示している。従って次年度以降、核酸配列決定により更に高解像度のタイピングが可能となると予想される。

我々のこれまで研究によりキチナーゼ、SREHP などのタンパク質遺伝子、タンパク質非翻訳領域に高い多型が見られることを示してきた(Haghighi et al., J. Clin. Microbiol. 2002; Haghighi et al., J. Clin. Microbiol. 2003)。しかしこれらの遺伝子座の多型には、outcome of infection との相関は有意に見いだされなかった。

本研究は、その点で、初めて outcome of infection に相関する遺伝子座の遺伝子多型を同定した可能性を示唆している。同様の報告はバングラデシュの臨床分離株からも得られており、複数の感染浸淫地で確認されたことにある。この知見をさらに普遍的なものにするため、今後、民族的背景がバングラデシュと近似しているインド、コルカタの集団で同

様の研究を継続する予定である。この研究は、日本での臨床分離株の確保が難しいこと、そのため現状での統計学的有意性の評価が困難であることを考慮すると、本邦で見つかった「outcome of infection に相関した遺伝子座」の確認のためには不可欠な計画と言える。

更に、来年度以降、tRNA-linked STR に基づくタイピングの結果を、昨年度まで展開して来たトランスクリプトーム解析の結果と総合し、統合的なタイピングプロジェクトを継続して行く予定である。

E. 結論

本研究成果により、tRNA-linked STR に基づく新しい分子タイピング法が確立された。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。来年度以降、シーケンスによる分類感度の上昇、多検体の確保、トランスクリプトーム解析との統合により、より統合的な赤痢アメーバ株のタイピングプロジェクトに発展していくと期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

英文

- i. Saito-Nakano, Y., Mitra, B. N., Nakada-Tsukui, K., Sato, D., and Nozaki, T. (2007) Two Rab7 isoforms, EhRab7A and EhRab7B, play distinct roles in biogenesis of lysosomes and phagosomes in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. Cell. Microbiol. 9, 1796-1808.
- ii. Mitra, B. N., Saito-Nakano, Y., Nakada-Tsukui, K., Sato, D., and Nozaki, T. (2007) Rab11B small GTPase regulates secretion of cysteine proteases in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. Cell. Microbiol. 9, 2112-2125.

和文
なし

2. 学会発表

- i. Escueta, A. and Nozaki, T. (2008)
Genotyping of Japanese
Entamoeba histolytica isolates.
US-Japan Cooperative Science

Program. Jan 15-17, 2008, Davis,
USA.

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(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 橋 裕司 東海大学医学部 准教授

研究要旨 赤痢アメーバの接着に関与するシステインリッチな表面蛋白質 Igl (intermediate subunit of Gal/GalNAc lectin)には、多型が存在することが明らかになってきた。今年度は、国内分離株を中心に9株について *Igl1* 遺伝子の塩基配列を決定し、計22株について多型解析を行った。新たに2つのタイプの存在が明らかになり、*Igl1*は大きく5つのタイプ(A-E)に分類できた。内訳は、Aタイプ8株、Bタイプ5株、Cタイプ1株、Dタイプ3株、Eタイプ5株であった。このうち国内分離株12株は、Aタイプが7株、Bタイプは1株、それにCタイプ、Dタイプのすべてで、Eタイプは含まれなかった。2株の施設由来株はBタイプ、Dタイプに属し、わが国に分布する多くの株とは異なる由来であることが示唆された。新たに見つかったタイプにおいてもIglのC末端側では1次構造の差は小さかった。大腸菌で作製したIgl1のC末端側タンパク質を抗原とした血清診断法を用い、中国上海市、安徽省、河南省のHIV感染者における抗赤痢アメーバ抗体陽性率を調べた。HIV感染者の抗体陽性率はHIV非感染の胃腸疾患患者の抗体陽性率より有意に高いことが明らかになった。赤痢アメーバのIglは、株間で差異の大きい部位と共通な部位にそれぞれ着目することで、疫学研究に有用な表面蛋白質であると考えられた。

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、2007年には781例を数えた。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、tRNA遺伝子などについてよく解析されている。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、虫体表面に分子量約150-kDaのガラクトース-N-アセチルガラクトサミン特異的レクチン(intermediate subunit of Gal/GalNAc lectin, Igl)の存在を明らかにした。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* 遺伝子の多型解析を試みてきた。昨年度までの研究において、地理的由来を比較的好く反映する差異が認められ、大きく西洋諸国型、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。今年度は

更に国内分離株を中心に *IgI* 遺伝子を解析し、その他のタイプが存在するかどうかについて検討した。また、大腸菌で作製した *IgI* の C 末端側タンパク質が、わが国のアメーバ症患者の血清診断に有用であることを既に報告している。今年度は、中国の HIV 感染者の血清を中心に、抗赤痢アメーバ抗体の検出を行い、疫学研究への応用を検討した。

B. 研究方法

1. 赤痢アメーバ株

国内で分離された赤痢アメーバの KU27 株(施設内無症候性嚢子排出者由来、Z-II)、KU38 株(施設内無症候性嚢子排出者由来、Z-II)、KU43 株(大腸炎患者由来、Z-II)、KU44 株(大腸炎患者由来、Z-XIV)、KU45 株(大腸炎患者由来、Z-XIV)、KU46 株(大腸炎患者由来、Z-II)株、KU47 株(大腸炎患者由来、Z-II)、KU50 株(大腸炎患者由来、Z-XIV)を使用した。また、インドネシアで無症候性嚢子排出者から分離された PNGK105 株を使用した。いずれの株の栄養型虫体も 15%親ウシ血清を含む BI-S-33 培地で無菌培養した。

2. *IgI* 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、*IgI* 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 *IgI* の調製

赤痢アメーバ HM-1:IMSS 株の *IgI* について、C 末端(C-*IgI*, aa 603-1088)のタンパク質断片を大腸菌 BL21 Star™(DE3)pLysS で発現させた。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. 患者血清

215 名の HIV 感染者の血清は上海公衆衛生センターと安徽省および河南省の AIDS 治療センターから入手した。HIV 非感染で胃腸疾患を呈する 191 名

の患者血清は復旦大学付属華山病院から入手した。HIV に対する抗体の有無はウェスタンブロット法により確認された。また、赤痢アメーバ症の既往がなく、検便陰性の中国人健常者 60 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 の組換え型 C-*IgI* 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 400 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。

(倫理面への配慮)患者血清の解析は、人権に配慮し、検体を匿名化して実施された。

C. 研究結果

1. 赤痢アメーバ *IgI* 遺伝子の多型解析

IgI 遺伝子に関して、KU45 株、KU47 株、KU50 株の配列はこれまでに解析した NOT-12 株などと同じであったが、その他の日本由来株の配列は NOT-12 株とは異なっていた。KU38 株と KU43 株の配列は同一であり、KU46 株もそれに近い配列であった。KU44 株は全く異なる配列であり、KU27 株は HK-9 株などに近い配列であった。また、インドネシア由来の PNGK105 株は NOT-12 株などと同じの配列であった。昨年度までのデータと合わせて、22 株について解析すると、大きく 5 タイプ(A-E)に分類された。内訳は、これまで日本特異型としていた A タイプ 8 株、アジア型としていた B タイプ 5 株、C タイプ 1 株、D タイプ 3 株、西洋諸国型としていた E タイプ 5 株となった。このうち国内分離株 12 株は、A タイプが 7 株、B タイプは 1 株、それに C タイプ、D タイプのすべてで、E タイプは含まれなかった。

2. 組換え型 C-*IgI* に対する中国の HIV 感染者血清の反応性解析

C-*IgI* 抗原を用いた ELISA における cut-off 値は 0.402 であった。HIV 感染者における抗体陽性率は 7.9%であり、HIV 非感染の胃腸疾患患者の抗体陽性率(0.5%)よりも有意に高かった($P < 0.001$)。HIV 感染者において、男性の抗 C-*IgI* 抗体陽性率は 7.6%、女性では 8.5%であり、性別による差は認められなかった。また、陽性率と年齢の間にも相関は認められなかった。上海市の HIV 感染者の抗 C-*IgI* 抗体陽性率は 12.3%であり、安徽省の HIV 感染者の陽性率(5.8%)、河南省の HIV 感染者の陽性率(4.2%)に比べ高かったが、有意差はなかった($P = 0.140$, $P = 0.122$)。しかし、CD4 陽性リンパ球数が 200/ μ l 未満の HIV 感染者における抗 C-*IgI* 抗体陽性率は 17.2%であり、CD4 陽性リンパ球数 200/ μ l 以上の HIV 感染者における抗体陽性率(4.0%)に比べ、有意に高かった($P < 0.005$)。

D. 考察

昨年度までの研究により、*IgI* 遺伝子に大きく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、解析株数を増やした結果、わが国で分離された株において新たな2タイプ(C タイプ、D タイプ)が検出された。また、施設由来株は B タイプ、D タイプに分類されたことから、わが国に多く分布している赤痢アメーバ株とは異なった由来であることが予想された。今後、更に多数の赤痢アメーバ株について解析を進め、データを蓄積していくことが必要であり、疫学研究においてその意義は大きいと考えられた。

わが国や台湾では HIV 感染者に赤痢アメーバ感染が多数見られることが知られており、特に男性同性愛者間の伝播が多いと考えられている。中国の HIV 感染者は約 65 万人と推定されているが、赤痢アメーバ感染に関するデータは明らかではない。今回、中国の HIV 感染者における高い抗赤痢アメーバ抗体保有率が初めて明らかになったが、性別によ

る陽性率の差はないことから、男性同性愛者間の伝播の可能性は低いと考えられた。上海市、安徽省、河南省における検便での赤痢アメーバ/*E. dispar* 陽性率はそれぞれ 0.1%未満、0.59%、0.57%という報告があり、今回の HIV 非感染者における低い抗体陽性率と良く一致している。また、HIV 感染による細胞性免疫の低下が赤痢アメーバ感染に影響するかどうかについては様々な議論がある。しかし、CD4 陽性リンパ球数 200/ μ l 未満のグループの抗赤痢アメーバ抗体陽性率が 200/ μ l 以上のグループより高かったことから、HIV 感染が赤痢アメーバ感染のリスクファクターとなっている可能性が示唆された。赤痢アメーバ株間で *IgI* の C 末端側の差異は小さく、組換え型 C-*IgI* 抗原を用いた血清診断は、わが国だけでなく中国由来の検体に対しても有用であることが示された。

以上のように、赤痢アメーバの *IgI* に関しては、株間で異なる部位と共通な部位に着目することによって、それぞれ多型解析、特異的で高感度な血清診断に応用が可能であり、疫学研究に有用な表面抗原であると考えられた。

E. 結論

赤痢アメーバの *IgI* 遺伝子は5タイプに大別され、我が国のアメーバに特異的なタイプが存在した。*IgI* の C 末端側組換え断片を抗原とした血清診断法により、中国の HIV 感染者の抗赤痢アメーバ抗体陽性率は非感染者よりも高いことが判明した。*IgI* は疫学研究に有用な表面蛋白質である。

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 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

Cheng XJ, Hayasaka H, Watanabe K, Tao YL, Liu JY, Tsukamoto H, Horii T, Tanabe K, Tachibana H: Production of high-affinity human monoclonal antibody Fab fragments to the 19-kilodalton C-terminal merozoite surface protein 1 of *Plasmodium falciparum*. Infect. Immun., 75:3614-3620, 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

Tachibana H, Cheng XJ, 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. Parasitology, 134:1989-1999, 2007

2. 学会発表

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年10月

辻 俊史, 小西英幸, 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年10月

山田 稔, 内川隆一, 手越達也, 有菌直樹, 錦織ルミ子, 橘 裕司, 畑中秀亮, 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支部大会. 2007年10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准教授

研究要旨 アメーバ分離株の蛋白網羅的解析を LC-ESI-MS/MS システムを用いて行った。即ち、培養した赤痢アメーバ 10 株（国内分離 5 株を含む）及び非病原性アメーバ *Entamoeba dispar* 2 株の CHAPS 可溶化試料を調製し、これを逆相高速液体クロマトグラフィー(LC)にかけてペプチドを分離し、電子スプレーイオン化(ESI)MS/MS によりペプチド断片の質量分析・アミノ酸配列決定を行った。Mascot 検索により同定された蛋白質の emPAI (exponentially modified protein abundance index) の値から蛋白量を推定し、比較した結果、分離株すべてで検出・同定された蛋白 (actophorin、puruvate phosphate dikinase) において、株間の emPAI 値に違いが認められ、株間の蛋白発現の様相の違いが明らかになった。また、alcohol dehydrogenase 3 及び coactosin は赤痢アメーバ分離株すべてで検出・同定されたが、*E. dispar* 2 株には認められなかった。一方、40S ribosomal protein S18 及び peroxiredoxin は *E. dispar* 2 株において検出・同定されたが、赤痢アメーバ分離株には認められず、それぞれの種に特有に検出・同定される蛋白の存在が明らかになった。次に、赤痢アメーバの蛋白網羅的解析の基盤となるトランスクリプトーム解析を、従来の方法と異なるオリゴキャップ(oligo-cap)法（真核細胞 mRNA の 5' 端に存在する特異的なキャップ構造に選択的に合成オリゴを結合させる方法）による完全長 cDNA（全長及び転写開始点を含む）ライブラリーを用いて行った。その結果、690 種類の遺伝子を得ることができ、これはアメーバの蛋白網羅的解析の基盤確立に有用と考えられた。

A. 研究目的

遺伝子情報は生命の根幹をなすが、そのみでは何も成しえない。その表現型である蛋白質が発現されて初めて機能を発現しうることから、蛋白網羅的解析の重要性はこの点にあると考えられる。赤痢アメーバには種々の分離株が存在するが、その蛋白質の網羅的解析はほとんどなされていない。我々はすでに、アメーバ分離株の蛋白網羅的解析を SELDI-TOF MS (surface-enhanced laser desorption ionization

time-of-flight mass spectrometry) ProteinChip システムを用いて解析し、その成果を報告した。今回は LC-ESI-MS/MS システムを用いた解析を行った。このシステムはペプチドの MS/MS 解析による質量分析及び Mascot 検索と連動させることにより、蛋白質の同定に威力を発揮する最新の蛋白解析法である。本研究では引き続き赤痢アメーバの種々の分離株に注目し、その蛋白網羅的解析を LC-ESI-MS/MS により行うとともに、臨床・疫学上重要な赤痢アメ

ーバと形態的な区別が難しい非病原性のアメーバ *Entamoeba dispar* の分離株についても比較検討した。この際、Mascot 検索に連動して表示される各々の蛋白の emPAI (exponentially modified protein abundance index) 値に注目した。これは最近明らかになった指標であり、蛋白量の半定量的比較に有用である。

次に、蛋白網羅的解析の基盤となるトランスクリプトーム解析を赤痢アメーバ標準株を用いて行った。従来の cDNA ライブラリー作成法ではしばしば 5' 端を欠く不完全な cDNA 合成がなされるが、今回用いたオリゴキャップ (oligo-cap) 法は真核細胞 mRNA の 5' 端に存在する特異的なキャップ構造に選択的に合成オリゴを結合させる方法であり、これにより全長並びに転写開始点を含む cDNA を得ることができ、蛋白網羅的解析の基盤確立に極めて有用である。

B. 研究方法

1. アメーバ分離株の培養及び可溶化

国外で分離され laboratory strain として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) 及び国内で分離され慶応大で無菌化された 5 株 [HATAJI (KU43)/ FUKUROI (KU46)/ NOT-12 (KU2)/ TAKEYAMA (KU38)/ K-14-1 (KU14)] 並びに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、それぞれ BI-S-33、YIMDHA-S メディウムを用いて培養した。遠心・洗浄し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。

2. LC-ESI-MS/MS 解析

試料から CHAPS を除去後、トリプシンによる消化を行い、得られたペプチドを逆相高速液体クロマトグラフィー (LC) により分離した。これを電子スプレーによるイオン化 (ESI) 後、MS/MS により質量分析した。MS/MS データを Mascot 汎用ファイルフォーマットにデータ変換し、データベース解析ソフトウェア Mascot による蛋白質同定を行った。同定された蛋白質の emPAI 値は Mascot データ上に表示された。検索でヒットした蛋白のうち *Entamoeba* 由来のもののみについて解析した。

3. 全長 cDNA ライブラリーの作成

培養により得られた赤痢アメーバ HM-1:IMSS 株の栄養型に Trizol を加えてポリロンホモジナイザーで破碎し、得られた試料を液体窒素で急速凍結し、 -80°C で保存した。菅野・鈴木のオリゴキャップ法により全長 cDNA ライブラリーを作成した。

4. シークエンス及びその解析

ライブラリーから、ランダムクローン 1 万個について ABI3730 シークエンサーを用いて両端のワンパスシークエンスを行った。ベクターの除去及びクリーンアップも行った。ゲノムシークエンスを公開データベースから入手し、3. のシークエンスをマッピングし、ゲノムブラウザーを作成した。

C. 研究結果

1. アメーバ分離株の LC-ESI-MS/MS 解析

赤痢アメーバ HM-1:IMSS 株について、この LC-ESI-MS/MS 系で解析した結果、*Entamoeba* 由来の蛋白が検出・同定され、個々の蛋白の emPAI が明らかになった。また、3 回の実験により、その再現性も確認された。同様にして他の分離株についても、

検出・同定される蛋白が明らかになった。各分離株の emPAI 値の最も高い蛋白は HM-1:IMSS、HK-9、SAW755CR、KU46、KU14、*E. dispar*AS16IR で enolase、200:NIH、KU43、KU2 で actophorin、DKB、*E. dispar* CYN09:TPC で glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase、KU38 で peptidyl-prolyl cis-trans isomerase であった。HM-1:IMSS、DKB、SAW755CR 及び KU46 は上位 3 位までに含まれる蛋白 (enolase、puruvate phosphate diikinese、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) が共通であった。*E. dispar* の 2 株は emPAI 値の高い上位 3 蛋白に共通なものが含まれていなかった。分離株すべてで検出・同定され emPAI のついた蛋白において、emPAI 値の違いが認められた。即ち、actophorin については 200:NIH、KU43、KU2、KU14 で他の株よりも emPAI 値が約 2 倍高く、puruvate phosphate dikinese の emPAI 値 200:NIH で他の株よりもかなり低かった。また、alcohol dehydrogenase 3 及び coactosin は赤痢アメーバ分離株すべてにおいて検出・同定されたが、*E. dispar* 2 株には認められなかった。一方、40S ribosomal protein S18 及び peroxiredoxin は *E. dispar* 2 株において検出・同定されたが、赤痢アメーバ分離株には認められなかった。

2. 全長 cDNA ライブラリーを用いた赤痢アメーバのトランスクリプトーム解析

全長 cDNA ライブラリーの 5000 クローンについて、両端ワンパスシーケンスを行い、そのうち 3146 配列 (平均塩基長 1124bp) をアセンブルすることができた。相同検索の結果、690 種の遺伝子に分けられた。更に、得られた遺伝子を機能分類したところ、catalytic activity (酵素類) : 24%、

binding (リガンド等) : 23%、cellular component (細胞膜、骨格等) : 17%、transpoter (輸送関連) : 1%、regulator (制御因子全般) : 2% 及び hypothetical proteins: 33% の割合であった。

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。そのためにはトランスクリプトーム解析及び蛋白網羅的解析が必要とされる。

我々は先に SELDI-TOF MS ProteinChip システムを用いたアメーバ分離株の蛋白解析を報告した。今回は同じ分離株を用いて LC-ESI-MS/MS 解析を行った。この方法は蛋白のペプチド断片の MS/MS 解析から質量及びアミノ酸配列を明らかにし、その情報を相同検索することにより蛋白を同定する最新の方法である。さらに、最近、検出されたペプチド断片数に由来する emPAI 値が Mascot 検索に導入され、この emPAI 値から蛋白量を半定量化できる点は極めて有用である。今回の実験条件下でこの値から各分離株における蛋白発現量の相対的な比較を行うことができた。共通に発現されている蛋白においても emPAI 値の違いが認められたことから、これから発現量の違いが推定され、分離株間の蛋白発現の様相の違いが明らかになった。また、赤痢アメーバと *E. dispar* との比較で、それぞれに特徴的に検出・同定される蛋白が明らかになったことは興味深い。

蛋白網羅的解析の基盤としてトランスクリプトーム解析は不可欠である。この解

析は mRNA 由来の cDNA ライブラリーを用いてなされるが、通常の方法で得られる cDNA はその 5' 端が欠失していることがほとんどである。これを補うため、オリゴキャップ法が開発され、完全長 cDNA ライブラリーの作成が可能となった。菅野・鈴木（東大医科研）によって開発されたオリゴキャップ法は、完全長の mRNA の 5' 端に存在するキャップ (cap) 構造を利用して完全長の mRNA をクローニングするもので、発現遺伝子を効率よく網羅的に解析することが可能である。発現遺伝子の全構造を正確に決定できるだけでなく、クローンの 5' 端が mRNA の先端に一致するためゲノム塩基配列と比較することで、遺伝子転写制御の解明に必須なプロモーター領域を正確に同定することが可能である。従来の転写開始点決定法である S1 マッピング、プライマー伸張法、5' RACE 法といった方法は、技術的に困難であり、またしばし不正確な転写開始点情報を与える。これに対し、オリゴキャップ法により得られた完全長 cDNA 配列を元に転写開始点を決定する手法は大規模に正確な転写開始点情報を蓄積するのに適している。今回、この方法を赤痢アメーバ HM-1:IMSS 標準株 cDNA ライブラリーの構築に応用し、cDNA ライブラリーによる発現遺伝子の網羅的な解析を行い、アメーバの蛋白網羅的解析の基盤構築を目指した。完全長 cDNA ライブラリーは、我が国が世界に誇る技術で、ゲノムシーケンスを補完するものとして活用が求められている。現在進行中のゲノムシーケンスの再解釈にとって、発現遺伝子の実体を表す全長

cDNA のシーケンスは不可欠の情報であり、我が国における研究が国際的にも特に期待されているところである。得られたシーケンスデータは、データベース化しインターネットで公開し、研究者の利用に供する。また、シーケンスされた全長 cDNA クローンは、さまざまな実験に利用可能なリソースとして、研究者に供与することが可能である。このように今回得られた全長 cDNA ライブラリーはトランスクリプトーム解析並びに蛋白網羅的解析の強力な基盤として有用であると考えられる。

E. 結論

蛋白網羅的解析法である LC-ESI-MS/MS 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、発現している蛋白質が検出・同定されるとともに、その emPAI 値の違いから各分離株間の蛋白発現の様相の違いが明らかになった。また、赤痢アメーバと *E. dispar* との比較で、それぞれに特徴的に検出・同定される蛋白も明らかになった。

赤痢アメーバの蛋白網羅的解析の基盤となるトランスクリプトーム解析を、従来の方法と異なるオリゴキャップ法による完全長 cDNA (全長及び転写開始点を含む) ライブラリーを用いて行い、690 種類の遺伝子を得ることができた。これはアメーバの蛋白網羅的解析の基盤確立に有用と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S,

Takeuchi T (2007) 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(1), 103-110.

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. 大阪. 2007年3月.

2) 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.

3) 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. 別府. 2007年10月.

4) 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. 富山. 2007年11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： サイクロスポーラ・カエタネンシス (*Cyclospora cayetanensis*) による輸入食品を介したアウトブレイクは、これまでにアメリカ、カナダ、ドイツなどで報告されてきた。また、サイクロスポーラは、わが国においても旅行者下痢症の起原虫として報告されており、感染源不明の症例も知られていることから、集団発生に対する備えが必要である。本研究では、帰国者下痢症患者及び、熱帯地域のカニクイザルから検出されたサイクロスポーラサンプルを用い、サブクローニングの手法を用いた遺伝子型解析を実施した。これにより、PCRを用いた糞便検体からのサイクロスポーラ検出法を確立し、さらに詳細なフィンガープリンティングによる感染経路解析が実施可能であることを示すことができた。また、従来ヒトのみを宿主とすると考えられてきた *C. cayetanensis* の人獣共通感染症の可能性が示唆され、輸入動物についても病原性腸管寄生原虫感染について評価の必要性があるものと考えられた。

A. 研究目的

サイクロスポーラ・カエタネンシス (*Cyclospora cayetanensis*) は1994年に新種記載された新興感染症に分類される病原性腸管寄生原虫であり、成熟オーシストの経口摂取によって、サイクロスポーラ症として知られる腹部膨満や水様性下痢を引き起こす。

疫学的には、熱帯・亜熱帯のネパールやペルーにおいて約20%の感染率が報告され、多くの先進国では、おそらく国内での定着はないものの、輸入食品を介したアウトブレイクや旅行者下痢症の原因原虫として注目されている。

本原虫は、当初ヒトのみから検出されたために、リザーバ(待機宿主)となりうる他の哺乳類は存在しないとされてきた。しかし、1999年に複数の霊長類から遺伝的に近縁な

関連種が報告され、さらに2004年にネパールのアカゲザルから *C. cayetanensis* の遺伝子型が同定されるに至り、その宿主特異性についての分子疫学的な再評価の必要性が認識されている。

一方、本原虫の遺伝子型については、18S ribosomal RNA (18S rRNA) 遺伝子の部分塩基配列およびリボソーム RNA 遺伝子上の internal transcribed spacer (ITS) 領域の塩基配列による解析が行われてきたが、サイクロスポーラの培養系、動物モデルがともに確立していないことから、リファレンス情報は限られている。

そこで、本研究では、遺伝的多型解析による遺伝子型の地理的分布および宿主特異性の解明を目指し、多地域由来のヒトのサイクロスポーラ症例から収集したサンプルとともにインドネシアで検出されたカニクイザル由来の本原虫サンプルを用い、18SrRNA 遺伝子領域の解析を実施した。

B. 研究方法

サイクロスポーラのサンプルとしては、インドネシア、メキシコ、ネパール、フィリピン、インド由来のヒトサイクロスポーラ症例、5サンプルと、インドネシアで採取されたカニクイザル (*Macaca fascicularis*) の無症候性感染例2サンプルを使用した。

遺伝子型解析には、各サンプルからの精製ゲノムDNAを使用し、PCRにより増幅した18SrRNA遺伝子の部分配列を、プラスミド構築によりサブクローニングし、各サンプルについて6クローン以上の全長塩基配列を決定することで、増幅産物の塩基配列について詳細な解析を実施した。すべての配列は、GenBankに登録されているリファレンス配列 (*C. cayetanensis* 2種、霊長類型5種) とともに、近隣接合法によるアライメントおよび系統樹解析に供され、最終的に遺伝子型を同定した。

C. 研究結果

ヒト由来サンプルの18SrRNA遺伝子部分配列598bpには、3箇所の1塩基多型が見出され、その組み合わせにより5種類の遺伝子型が同定された。この内の2遺伝子型は *C. cayetanensis* リファレンス配列と100%の相同性を示したが、残りはすべて新規検出遺伝子型だった。ヒト由来の5サンプルはすべてこの5種類の遺伝子型の2ないしは3種類混合の遺伝子型構成を示し、すべてのサンプルが異なる構成を保持していた。

各遺伝子型の地理的な分布については、幅広く東南アジア大陸部(ネパール、インド)、東南アジア島嶼部(フィリピン、インドネシア)、中南米(メキシコ、ペルー、グアテマラ、ハイチ)に分布するタイプと、地域的に限定されるタイプが見出された。

一方、カニクイザルの2サンプルからは、ともに単独の遺伝子型が検出され、上記の *C. cayetanensis* の遺伝子型の1つと新規霊長類型がそれぞれ同定された。

系統樹解析では、上記5種類のヒト由来配列と、本研究で見出したカニクイザル由来株を含む6種類の霊長類由来の配列は、それぞれ、99.4%および61.4%のブートストラップ値によって支持される単一系統の *C. cayetanensis* クラスタと霊長類クラスタを形成し、さらに *C. cayetanensis* クラスタ内には、3種の種内亜型の存在が示唆された。

D. 考察

現在までに同定されているサイクロスポーラの遺伝子情報が合計5種類にすぎないことから、地域特異性を断定するのは困難だが、少なくともアジアからアメリカまで広域に分布する遺伝子型の存在することが確認された。この事実は、近縁種がヒト以外の霊長類に存在する事実とともに、本原虫が他の霊長類とヒトが種分岐する以前に共通祖先を持ち、したがって、ヒトの世界中への拡散に際しても同道していた可能性の高いこと。すなわち、本原虫は、新興感染症として認識されているものの、ヒトへの寄生について古い起源を保持する原虫であることを示唆する。

また、カニクイザルから検出された *C. cayetanensis* の遺伝子型は、従来の研究で示されたマカク属の霊長類がリザーバとなりうる可能性を支持する結果だが、オーシストの偶発摂取による機械的な通過の可能性は除外できず、実験感染と組織学的検索による本原虫の細胞内侵入と定着の確認が将来的な課題である。

一方、全てのヒトサンプルが異なる遺伝子型による混合感染の知見を示したのは、分子疫学的に重要であり、本研究で実施したよう

なサブクローニングによる分離なくしては、本原虫の詳細な遺伝子型解析は困難であることが明らかになった。

E. 結論

本研究では、新興感染症である *C. cayetanensis* が、ヒトの種分岐以来ヒトと共進化してきた古い起源をもつ病原性腸管寄生原虫である可能性が明らかになった。

また、本原虫のヒト以外の保虫宿主については、旧世界ザルが候補として示された。

一方、サイクロスポーラ症の臨床検体においては、複数遺伝子型による混合感染が特徴的であり、厳密な分子疫学的な解析にはサブクローニングによる各遺伝子型の分離が不可欠であることが明らかになった。

サイクロスポーラに関する分子疫学的な研究は端緒についたばかりであり、その種内多型の構成、宿主特異性、病原性、さらに進化的な背景は多くの点で未解明である。したがって、このような未解決の課題を解明していく今後の研究において、本研究で用いたサブクローニングによる遺伝子型解析の手法は、全長配列のシーケンス決定およびデータベースへの登録とともに情報の共有・リファレンス構築の観点から極めて重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

(和文)

1) 所 正治

消化管・泌尿生殖器寄生の原虫症
今日の治療指針-私はこう治療している
2008.1 (医学書院) :184-186

2) 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 2007.7; 34(4): 329-334

3) 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, 11-14, 熱帯病治療薬研究班.

2. 学会発表

1) Masaharu Tokoro, Tomohiro Yamaguchi, Amjad I. A. Hussein, Din Syafruddin, Motohiro Iseki. Study on intra-species diversity of *Giardia intestinalis*: molecular epidemiological analysis as a powerful tool

Open Science Meeting 2007 Towards a Sustainable World, Nov. 2007, Denpasar, Indonesia

2) Tomoyo Yoshida, Miwa Tanaka, Din Syafruddin, Minoru Yamada, Naoki Arizono, Masaharu Tokoro. Genotyping of *Cyclospora cayetanensis*: An assessment of zoonosis potential

Open Science Meeting 2007 Towards a Sustainable World, Nov. 2007, Denpasar, Indonesia

3) 山口智博、Amjad I. A. Hussein、所 正治

ジアルジアの遺伝子型間の混合感染に関する考察

第 25 回北陸病害動物研究会、2007.6、金沢

4) 田中身和、仲本賢太郎、所 正治

赤痢アメーバ、クリプトスポリジウムの PCR・市販キットによる検出の有用性

第 25 回北陸病害動物研究会、2007.6、金沢

5) 荒井朋子、仲本賢太郎、Amjad I. A. Hussein、吉田知代、田中身和、山口智博、所正治

発展途上国のフィールド調査で見られる多
彩な腸管寄生原虫

第 25 回北陸病害動物研究会、2007. 6、金沢

6) 吉田知代、及川陽三郎、高田伸弘、所 正
治

野鼠から検出されるトリパノソーマはヒトへ
感染するのか?

第 25 回北陸病害動物研究会、2007. 6、金沢

7) 及川陽三郎、吉田知代、所 正治、高田
伸弘

野鼠血液中バベシアの検出法に関する考察

第 25 回北陸病害動物研究会、2007. 6、金沢

8) 及川陽三郎、高田伸弘、矢野泰弘、吉田
知代、所 正治

野鼠の赤血球に寄生するバベシアの形態学
的特徴と遺伝子型との関係

第 15 回ダニと疾患のインターフェースに関
するセミナー(SADI 綾の照葉樹大会)、2007. 5、
宮崎

9) Masaharu Tokoro, Amjad I. A. Hussein,

Kentaro Nakamoto, Din Syafruddin,

Motohiro Iseki

Genotyping of *Giardia intestinalis*:

Phylogenetic analysis using multiple gene
loci

第 76 回日本寄生虫学会大会、2007. 3、大阪

10) Kentaro Nakamoto, Masaharu Tokoro,
Tomoyoshi Nozaki

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. 3、大阪

11) Amjad I. A. Hussein, Tomohiro Yamaguchi,

Kentaro Nakamoto, Masaharu Tokoro

Genotyping of clinical isolates of *Giardia
intestinalis* from Palestine

第 76 回日本寄生虫学会大会、2007. 3、大阪

12) Tomoko Arai, Isao Kimata, Kentaro

Nakamoto, Motohiro Iseki, Masaharu Tokoro

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. 3、大阪

13) Tomoyo Yoshida, Miwa Tanaka, Din
Syafruddin, Minoru Yamada, Naoki Arizono,
Masaharu Tokoro

Genotyping of *Cyclospora cayetanensis*: an
assessment of zoonosis potential

第 76 回日本寄生虫学会大会、2007. 3、大阪

G. 知的所有権の取得状況

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

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) 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：2003年から2006年の抗体陽性率では、それぞれ1.5%, 3.7%, 5.0%, 5.4%と上昇傾向が見られたが、2007年の赤痢アメーバ抗体陽性率は3.2% (6/189) とはじめて減少した。陽性6例のうち、4例がクラミジア抗体陽性者（1例は梅毒，トリコモナス陽性）であったことから、異性間の性行為を通して感染する女性の赤痢アメーバ感染により、今後も赤痢アメーバの感染拡大が危惧された。

2) 霊長類の赤痢アメーバ感染実態調査と分離株の確保：都内動物飼育施設の霊長類（サル）4種6頭から病原性を有し、赤痢アメーバと18S rRNAの遺伝子配列が異なる赤痢アメーバ・バリエーションを発見し、分離培養に成功した。

A. 研究目的

我が国における赤痢アメーバ症は、主に男性同性間の性行為や海外流行地での飲食物を介した感染により年々増加していると考えられている。しかしながら、近年ではそれらが原因と考えられない事例や女性の報告例が増加するなど、新たな感染経路の解明と感染拡大防止対策が必要となってきた。厚生行政のバックボーンとなるため、2005年からの2年間では、自ら感染防止対策を行うことが困難な集団が利用する知的障害者施設内における赤痢アメーバ等腸管寄生性原虫の感染実態を把握し、施設内の蔓延防止と衛生管理の向上に寄与することを目的に、8施設、計788名（男性525名、女性263名）の感染実態調査を行ってきた。

最終年は、これまで十分な調査が実施されていない集団に対する疫学調査、病原体の詳細な解析、迅速な検査法の開発などを目的に、

1) 異性間の性的接触による赤痢アメーバの蔓延状況の把握、2) 霊長類の赤痢アメーバ感染実態調査と分離株の確保を実施した。

B. 研究方法

1) 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

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)を対象に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:IMSSc16)を抗原として、プレートELISA(IgG)法により行った。また、現在、マイクロプレートELISA法による*E. histolytica*抗体検出検査に用いられている抗原は、無菌培養したHM-1:MISSc16(HM-1)株を超音波破碎し、遠心分離後の上澄みを粗抗原としたものが広く用いられている。しかしながら、このHM-1

は長期間継代培養されているために病原性が消失し、*E. histolytica* の抗原性に変化が生じている可能性がある。そこで、HM-1 をハムスターの肝臓に接種し、肝膿瘍を形成させ病原性を回復させた LHM-1 株と国内の肝膿瘍の患者から分離培養した LA526 株に関して同様に病原性を回復させた LLA526 株より抗原を作成し、HM-1 株を抗原とした場合と比較した。

2) 霊長類の赤痢アメーバ感染実態調査と分離株の確保

ヒトを除く霊長類における赤痢アメーバ症は、下痢、無菌性肝膿瘍などの赤痢アメーバ症に特徴的な症状と便や病変部から得られた検体の顕微鏡検査で形態的に *E. histolytica* を検出することにより赤痢アメーバ症と診断された報告例はあるが、*E. histolytica* の特異遺伝子検出例や分離培養例の報告は見られない。

今回、都内動物園で飼育されているアフリカ原産のブラッサゲノン (*Cercopithecus neglectus*) の糞便中に形態的には *E. histolytica* または *Entamoeba dispar* の何れかの種と同定されたシストを検出し、既報の *E. histolytica* の特異遺伝子検出検査および特異抗原検出検査を試みた。また、ブラッサゲノンに認められたアメーバのシストについての 18S rRNA の遺伝子解析、検出方法の開発、検出したアメーバの病原性、アイソザイム解析、培養法の開発などを行うとともに、サルにおける赤痢アメーバの感染実態調査を行った。

C. 研究結果

1) 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

2003 年から 2006 年の赤痢アメーバ抗体陽性率では、それぞれ 1.5%, 3.7%, 5.0%, 5.4% と上昇傾向が見られたが、2007 年の赤痢アメーバ抗体陽性率は 3.2% (6/189) とはじめて減少した。陽性 6 例のうち、4 例がクラミジア抗体陽性例で、そのうち 1 例は梅毒、トリコモナスへの感染も遺伝子検査により確認された。また、5 年間の調査ではじめて梅毒の重複陽性例が認められた。年代別赤痢アメーバ抗体陽性者は、20 歳代 1 例、30 歳代 5 例と比較的若い年代に陽性例が多く認められた。

HM-1 をハムスターの肝臓に接種し、肝膿瘍を形成させ病原性を回復させた LHM-1 株と国内の肝膿瘍の患者から分離培養した LA526 株に関して同様に病原性を回復させた LLA526 株より抗原を作成し、抗体価が高いアメーバ性肝膿瘍の患者血清 5 検体と抗体価が低い腸アメーバ患者またはシストキャリアの血清 5 検体を用いて、HM-1 株を抗原とした場合と比較した。その結果、405nm における吸光度比 (S/N 値) は LHM-1, LLA526 とともに、HM-1 と比較して、アメーバ性肝膿瘍の血清検体で 1.324 倍から 1.254 倍 ($p < 0.05$ by *t*-test), 腸アメーバ患者またはシストキャリアの血清検体の場合では 1.048 倍から 1.006 倍に上昇し ($p > 0.05$ by *t*-test), OD 値の低い腸アメーバ患者またはシストキャリアの場合に顕著な上昇が認められた。また、LHM-1, LLA526 を用いたプレート ELISA 法により、前述の *E. histolytica* 抗体陽性 40 検体についての S/N 値の変動を調べたところ、HM-1 によるスクリーニングで陰性コントロールに対する抗体価比 (S/N 比) が 10 倍以下の検体では、LHM-1 では平均 1.49 倍、LLA526 が 1.44 倍の

上昇が認められた ($p < 0.01$ by t -test) のに対し, S/N 比が 10 以上の場合では, 平均 1.07 倍, LLA52 では 1.05 倍の上昇にとどまった ($p > 0.01$ by t -test)。

2) 霊長類の赤痢アメーバ感染実態調査と分離株の確保

霊長類ブラッザゲノンの糞便より無菌培養を行い, さらにクローン化を行った赤痢アメーバ・バリエント (JSK2004c12 株) と HM-1:IMSSc16 株の 18S rRNA の塩基配列における相同性は 99.3% (14bp/1, 946bp) であり, JSK2004c12 株と SAW1734Rc1AR 株との相同性は 98.7% (26bp/1, 946bp) であった。一方, *E. histolytica* (HM-1:IMSSc16 株) と *E. dispar* (SAW1734Rc1AR 株) の 18S rRNA の塩基配列における相同性は, 98.4% (32bp/1, 945bp) であることから, JSK2004c12 株は系統樹解析の結果, *E. histolytica* と *E. dispar* の間にあることが判明した。

共棲細菌に影響を受けない無菌培養条件下における *E. histolytica* のザイモデームは Z-II, Z-II α -, Z-XIII, Z-XIV, Z-XIX の 5 つが知られているが, いずれの *E. histolytica* の 18S rRNA における塩基配列も Z-XIII (不明) を除き, 一致している。今回の JSK2004c12 株のザイモデームは, ヘキソキナーゼでは *E. histolytica* タイプと非常に近いパターンを示したが, ホスホグルコムターゼでは *E. dispar* タイプのパターンを示した。また, グルコースリン酸イソメラーゼでは γ バンドが一本のみのパターンを示し, これまで報告されているどのザイモデームにも属さないことが判明した。また, JSK2004c12 株をハムスター (雌 3-4 週齢) の肝臓 (左葉) に 1×10^6 を接種した結果, 肝膿瘍の形成が見られ, 実験的に病原性が確

認できた。その結果, JSK2004 株は病原性を有する *E. histolytica* の性質に近い *E. histolytica*-like variant (Eh-V) であると考えた。

E. histolytica, Eh-V, *E. dispar* の 18S rRNA を標的とし, 3 種のアメーバに特異的なプライマーを設定した multiplex PCR 法により, 同時に 3 種の検出方法を開発した。期待される *E. histolytica*, Eh-V, *E. dispar* の PCR 増幅産物は, それぞれ 475 bp, 848 bp, 195 bp である。この multiplex PCR 法により, ヒト糞便およびヒトアメーバ性肝膿瘍肝臓組織中の *E. histolytica*, サル糞便およびサルアメーバ性肝膿瘍肝臓組織中の Eh-V, ヒト糞便およびサル糞便由来の *E. dispar* を用いて, その有用性を検討した結果, いずれの検体においても良好な PCR 増幅産物が得られた。

都内動物園で飼育されている霊長類 11 種, 計 47 頭の Eh-V を中心とした腸管寄生原虫の寄生実態調査を行った結果, JSK2004 株を検出した個体を含め, 旧世界ザルであるアビシニアンコロブス (*Colobus guereza*), ブラッザゲノンおよび新世界ザルであるジェフロイクモザル (*Ateles geoffroyi*), シロガオサキ (*Pithecia pithecia*) の 4 種 6 頭に Eh-V の感染が認められた。

D. 考察

1) 定点医療機関受診者における女性の赤痢アメーバ抗体保有率調査では, 2003 年からの 2007 年の 5 年間, 2007 年を除き, 赤痢アメーバ抗体保有率に上昇傾向も見られており, 異性間の性行為による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。したがって, 梅毒, クラミジアなどと同様に性行為感染症の検査項目に赤

痢アメーバ抗体検査を導入し、赤痢アメーバ症の拡大を防止することが必要である。

2) アビシニアンコロブスとシロガオサキの肝膿瘍を主原因として死亡した各一頭は、肝臓病変組織より、multiplex PCR法により Eh-V特異遺伝子を検出し、本原虫によるアメーバ性肝膿瘍が死因であることをはじめて明らかにした。また、本調査により Eh-Vが旧世界ザル、新世界ザルともに感染することが判明した。実験的にも、飼育されているサルにおいても Eh-Vが、病原性を有する赤痢アメーバ・バリエーションであることが判明したことから、人獣共通感染症となりうることが示唆されたことより、広範囲な霊長類の感染実態調査が必要と考えられた。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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(4), 108-109, 2007.

2) 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.

3) 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(5), 53-56, 2007.

4) Jun Suzuki, Seiki Kobayashi, Rie Murata, Yoshitoki Yanagawa and Tsutomu Takeuchi: 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, 38(3), 471-474, 2007.

5) Jun Suzuki, Seiki Kobayashi, Iku Ise, Rie Murata, Yoshitoki Yanagawa and Tsutomu Takeuchi: Seroprevalence of *Entamoeba histolytica* Infection in Female Outpatients at a Sexually Transmitted Disease Sentinel Clinic in Tokyo, Japan, Japanese Journal of Infectious Diseases, in print.

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 |

PROFILES OF A PATHOGENIC *ENTAMOEBIA HISTOLYTICA*-LIKE VARIANT WITH VARIATIONS IN THE NUCLEOTIDE SEQUENCE OF THE SMALL SUBUNIT RIBOSOMAL RNA ISOLATED FROM A PRIMATE (DE BRAZZA'S GUENON)

Jun Suzuki, Seiki Kobayashi, Ph.D., Rie Murata, Yoshitoki Yanagawa, D.V.M., Ph.D., and Tsutomu Takeuchi, M.D., Ph.D.

Abstract: A pathogenic *Entamoeba histolytica*-like variant (JSK2004) with genetic variations and a novel isoenzyme pattern was isolated from a De Brazza's guenon. A homology of 99.1% was found between the clones of *E. histolytica* (HM-1:IMSS) and JSK2004 in the 1,893 nucleotide bases of the small subunit rRNA (SSU-rRNA) gene. The DNA of the pathogenic amoeba species was also extracted from two sterile liver abscesses during the autopsies of an Abyssinian colobus and a Geoffroy's spider monkey occurring in the same institution in which JSK2004 was isolated, and the homology of the nucleotide sequences in the SSU-rRNA gene of the DNAs was identical to that of JSK2004.

Key words: *Entamoeba histolytica*-like variant, pathogenic isolate, primate, SSU-rRNA gene, De Brazza's guenon.

BRIEF COMMUNICATION

Entamoeba histolytica (pathogenic) and *Entamoeba dispar* (nonpathogenic) are parasitic amoebic species in humans and nonhuman primates, and they show significant genetic similarity.^{2,12} Since it is difficult to morphologically differentiate the latter from the former, the detection of species-specific hexokinase (HK) and phosphoglucosyltransferase (PGM) isoenzyme bands⁹; the detection of proteins by monoclonal antibodies⁶; and the detection of DNAs by a polymerase chain reaction (PCR)^{4,10} have been used for identification. Previously, a pathogenic *E. histolytica* variant was detected with isoenzyme bands characteristic of both *E. histolytica* PGM and *E. dispar* HK. This exceptional isoenzyme pattern [zymodeme XIII (Z-XIII)] was detected in human cases in South Africa and Tanzania; however, the genetic profile of this variant has not been described.⁹ In this study, we isolated a pathogenic *E. histolytica*-like strain (JSK2004) from a De Brazza's guenon (*Cercopithecus neglectus*). This strain did not satisfy the criteria for zymodeme classification; however, the isoenzyme bands were characteristic of both *E. histolytica* HK and *E. dispar* PGM that were inverse patterns of Z-XIII.

Prior to the isolation of JSK2004, the DNA of

the pathogenic amoeba species was extracted from two sterile liver abscesses during the autopsies of an Abyssinian colobus (*Colobus guereza*) and a Geoffroy's spider monkey (*Ateles geoffroyi*). DNA was also extracted from the feces, including cysts, of a De Brazza's guenon without distinct symptoms and was identified as that of *E. histolytica* by using the *E. histolytica* II kit (TechLab, Blacksburg, Virginia 24060, USA); JSK2004 was isolated from the same individual. The above-mentioned three primate species were born and bred for several generations in Japan. The infection source could not be definitively identified. The specimens were subjected to PCR and multiplex PCR by using two primer sets targeting the 30-kDa proteins¹⁰ and the small subunit rRNA (SSU-rRNA) genes⁴ of *E. histolytica* and *E. dispar*, respectively. The expected 101-base pair (bp) fragments of the *E. histolytica* gene were produced by PCR. However, no fragment was produced by the multiplex PCR (data not shown).

A JSK2004 axenic culture was established in TYI-S-33 medium¹; subsequently, four clones (JSK2004 cl1 to cl4) were obtained by the classical methods of Diamond.¹ Each clone was confirmed to possess the same genetic polymorphism⁵ and zymodeme⁹ profiles. We sequenced 1,893 bases of the SSU-rRNA gene of one clone (JSK2004 cl2). The gene was PCR-amplified using the *Entamoeba* species-specific primer set [Entam1 (forward: 5'-GTT GAT CCT GCC AGT ATT ATA TG-3') and Entam2 (reverse: 5'-CAC TAT TGG AGC TGG AAT TAC-3')]¹¹ and two primer sets [Ent2F (forward: 5'-GTA ATT CCA GCT CCA ATA GTG-3') and Ent2R (reverse: 5'-ACA CCA CTT ACT ATC CTT AAT-3'), Ent3F (forward: 5'-GTT ATC TAA

From the Division of Clinical Microbiology, Department of Microbiology, Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, 3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan (Suzuki, Murata, Yanagawa); and the Department of Tropical Medicine and Parasitology, School of Medicine, Keio University, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan (Kobayashi, Takeuchi). Correspondence should be directed to Dr. Seiki Kobayashi (skobaya@sc.itc.keio.ac.jp).