

厚生労働科学研究費補助金  
新興・再興感染症研究事業

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

平成 17～19 年度 総合研究報告書

主任研究者 竹 内 勤

(慶應義塾大学)

平成 20 年 4 月

## 目 次

1. 総合研究報告書  
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. 研究成果の刊行に関する一覧表（平成 17～19 年度） ..... 24
3. 研究成果の刊行物・別冊 ..... 27

## 厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

## 総合研究報告書

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更正施設利用者、及び異性愛者、特に女性の感染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、またフォローアップモデル施設においては感染経路の推定や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。加えて無症候性持続性感染というアメーバ感染病態の特異性の機構解明、あるいは感染経路解明のためアメーバのタイピングを試み、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、タンパク質網羅的解析の手法の確立を試みた。更にヒト感染例及び国内の霊長類より遺伝的に定型的な赤痢アメーバと異なるアメーバを見出し、その性状の解析を試みた。ランブル鞭毛虫、サイクロスポーラの遺伝子多型性の検索も行った。

3年間の成果は、以下のように概括できる。(1)知的障害者更正施設の新規 8ヶ所を含む、延べ 16施設を調査した。新規の調査対象となった施設では赤痢アメーバ感染は見出せなかったが、大腸アメーバ、小型アメーバなど、同様の感染経路をとる腸管原虫の感染が確認できた。(2)施設内感染においてしばしば見られる難治性のアメーバの持続性感染、再発性感染をフラジールとディロキサニド等の Luminal drug の併用で根治する方法を作成した。この効果はフォローアップ調査により確認された。(3)これらに基づいて、感染予防ガイドラインの再改定を行いつつある。(4)嫌気性細菌の存在下でアメーバの持続性感染マウスモデルを作成し、アメーバの腸管での寄生様態を明らかにした。(5)施設内感染症例より遺伝子解析では赤痢アメーバと判断されるものの、通常の培養液に適合せず、かつ virulence を有しない非定型アメーバを分離、同定した。培養法の改定も行い、嫌気性細菌の存在下で試験管内での嚢子形成に効率はまだ低いが成功した。(6)女性における抗赤痢アメーバの抗体価が上昇傾向にあり、陽性者は高率でクラミジア抗体も陽性であることが示された。(7)カスタムメイド DNA マイクロアレイを使用したトランスクリプトーム解析によるアメーバの網羅的遺伝子解析法を確立した。(8)この DNA マイクロアレイ解析法を異なる条件下

より分離したアメーバに適用し、病原性（感染経過）に相関する変化を示す遺伝子群を同定した。(9)複数のアメーバ株より解糖系酵素 GPI 遺伝子のクローニング、塩基配列の決定を行い、ザイモデーム解析の分子基盤を確立した。(10)tRNA に付帯した短反復配列 (tRNA-linked STR)を用いたアメーバ症の病型に対応すると思われる新しいアメーバのタイピング法を開発した。(11)赤痢アメーバの表面に分布しているレクチン(Igl1)の遺伝子を解析し、地理分布をよく反映する多型性を確認した。これまでに 5 タイプを確認し、うち 3 タイプは国内分離株に特徴的に見出された。(12)赤痢アメーバの Igl1 の組み換えタンパクで効率よくハムスターにおける実験的肝膿瘍の形成を阻害することができた。この効果は C 末端側に集中して観察できた。(13)海外で分離されたいわゆる赤痢アメーバ標準株よりも、国内分離株から調製した組み換え Igl 断片のほうがわが国のアメーバ感染者に対して血清診断効率が優れていた。(14)わが国飼育施設の霊長類より遺伝子やアイソザイムパターンで従来の赤痢アメーバと異なる遺伝的に非定型と考えられるアメーバ（遺伝的バリエーション）を見出し、病原性を確認した。(15)Multiplex PCR による霊長類からの非定型赤痢アメーバの同定方法の確立を行い、これにより多数の霊長類の感染状況を明らかにした。これにより、この非定型アメーバが人獣感染の原因となりうることを示した。(15)ProteinChip SELDI-TOF MS による赤痢アメーバ網羅的タンパク解析法を確立し、種、株間の差異を明らかにした。(16)LC-ESI-MS/MS による赤痢アメーバタンパクの網羅的半定量法を確立し、それらの同定も可能とした。(17)PCR 法の最適化を行い、ジアルジア、サイクロスポーラなどの糞便内からの検出法を確立し、種内多型性の実態を明らかにした。

#### 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

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、感染症法改定以来、増加の一途をたどり、原因解明や対策立案・実施が急務となっている。われわれは

ここ何年か、厚生労働科学研究費により、

わが国の赤痢アメーバ感染のハイリスクグ

ループの感染状況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一応の方向が見えてきたものの、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、現場に還元できる感染予防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、化学療法の方策を決定し、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)マイクロアレイなどによる遺伝子多型性解析、表面抗原とその遺伝子の多型性解析、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。この方法を上記のように感染経路解明や、株の

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再現を試み、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レベル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益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女性における感染の疫学調査

新規施設として、東京都管轄の知的障害者更生施設 8 カ所、788 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、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を併用し、判定に必要と思われる場合は赤痢アメーバに特異的な遺伝子断片を PCR によって糞便中の嚢子より確認する。

という方法によった。ランブル鞭毛虫、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のべ8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。検査は上記同様、糞便検査と特異抗原検出によった。

このフォローアップ調査対象施設を中心として、アメーバ感染について糞便検査陽性者、特異抗原陽性者の分布状況を経時的に行い、感染がどのように拡大してゆくかに関して推定を試みた。

女性における赤痢アメーバ感染疫学調査に際しては東京都感染症サーベイランス事業に係る定点医療機関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。

初年度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、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培養法の改良

これまでの研究成果により、従来の赤痢アメーバの無菌培地に適応しないアメーバが見出されてきたので、アメーバのみならず、種々の検体より他種の腸管寄生性原虫の培養にも応用すべく、以前より使用してきた定型的な無菌培地をも含めて、特に嫌気性細菌の効果などについて検討し、改良を試みた。更に試験管内での嚢子の脱嚢、嚢子形成の条件を検討し、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組織病理学的、免疫組織化学的に検討した。

## 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

まず赤痢アメーバの遺伝子の発現解析手法の検討を行った。使用株はHM-1:IMSS cl6で、赤痢アメーバの遺伝子データベースに登録された遺伝子のうちから7712の遺伝子を網羅するアフィメトリックス社製の

DNA マイクロアレイを使用した。

この手法の結果を定量的 PCR にて確認した後、赤痢アメーバの同一株を用いて病原性の変化によって遺伝子発現状況が変化するかどうかを調べた。使用株は上記同様 HM-1:IMSS cl6 で、まずこの無菌培養株をマウスの腸管に注射して感染せしめ、その後アメーバを分離して上記同様に解析し、更に別の実験ではハムスター肝にこの無菌培養株を繰り返して passage し、形成された実験的肝膿瘍から分離したアメーバを解析した。コントロールとしては無菌培養株を使用した。この状況で HM-1:IMSScl6 は事実上毒力を失っていた。

最終年度は、2 年次までの研究で、遺伝子発現の変化は観察でき、幾つかの遺伝子の発現変化をも見ることができたが、より疾患の病型と対応する遺伝子マーカーを探索するため、国内分離株に焦点をあて、tRNA-linked short tandem repeat (STR) の PCR 増幅を行い、得られた DNA 断片のサイズをアガロースゲルで解析、比較した。  
(倫理面への配慮)

この研究に関わる DNA 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 遺伝子の多型性に関して検討を行った。初年度は無菌培養化された赤痢アメーバ株のゲノム 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。2 年次には国内の新規分離 2 株について、最終年度は国内新規分離 8 株、インドネシアで分離された 1 株を使用し、同様に塩基配列を決定し、地理的オリジンとの対応をみた。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 を測定することによった。

組み替えタンパクの肝膿瘍発現阻止能力は、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  $\mu$ g を 3 回にわたりアジュバント (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。

また最終年度は、わが国の赤痢アメーバ感染のオリジンを知る目的で、中国の HIV 感染者における赤痢アメーバ抗体の状況を調査した。このために、日中両国の担当研究

機関の倫理指針に従い、検体を匿名化したうえで、Igl の C 末端側組み換えタンパクを抗原として ELISA により抗体値を測定した。

(倫理面での配慮)

上述のように関係する日中の機関の倫理基準に従って実施した。

#### 6.タンパク質の網羅的解析による多型性検討

初年度～2 年度は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。

最終年度は、タンパクの同定をも可能とする LC-ESI-MS/MS を用いて得られたデータに、Mascot 解析を行い、これに連動して表示される表示される各タンパクの emPAI (Exponentially Modified Protein Abundance Index) に注目した。

また、このような赤痢アメーバタンパク多型性解析の基盤として、トランスクリプトーム解析をオリゴキャップ法に基づいて実施した。

#### 7.他種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スする事によって評価した。

サイクロスポーラの遺伝子多型は 18S ribosomal RNA 部分領域を用い、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。

#### 8.霊長類からの非定型赤痢アメーバの分離と性状の検討

2 年次より、国内の施設で飼育されているブラッサゲノンなどの霊長類からアメーバを見出したので、分離培養を行い、18SrRNA などの遺伝子レベルでの検索、病原性の検定などを行い、併せてわが国の霊長類の感染状況を知るために 18SrRNA を標的とした Multiplex PCR を開発し、調査した。

#### 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

3 年間を通して新規調査の対象となったのは 8 施設、約 800 名の利用者であったが、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、更に、ランブル鞭毛虫、大腸アメーバと小型アメーバがのべ6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%)が大腸アメーバ、小型アメーバとも陽性と判定された。この施設において、両種アメーバとも同一の生活棟に検出された事は、一旦赤痢アメーバの感染者が近隣環境に入れば、直ちに感染が拡大することを示唆しているものと思われる、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。初年度には、調査の一環として糞便検査と特異抗原検出による感染者の施設内でのマッピングを、フォローアップ調査に入っている施設を対象として行った。対象施設は5ヶ所の小施設より構成され、地理的にそれぞれが離れているが、このうち男性が生活している2ヶ所の施設のみで高率な赤痢アメーバの感染が見出された。興味あることに感染者は殆ど特定の部屋に集中しており、初年度実施したメトロニダゾール単独治療により一旦アメーバが見出されなくなった例でも、同室に感染者が居住しているとまもなく再感染と思われる状況に立ち至ることが明らかになった。一方女性のみが居住している施設では感染は低いレベルに抑えられていたが、やはり同室に集積する傾向は明らかであった。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、ディロキサニ

ドなどの Luminal drug 併用をはじめ、衛生教育など種々の対策が実施されたのべ4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公衆衛生介入策を含めた制圧方法が正当であったと結論出来ると考えられた。特に施設内感染においては、ディロキサニドの有用性は高い。これらは現在2回目の改訂が施行中である感染予防ガイドラインに反映される予定である。

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

同一の定点医療施設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。しかし、最終年度にも同様の調査を行った189名中では6名のみ陽性で、3.2%とという陽性率が得られ、観察開始後初めて減少した。しかし、最終年度に始めて性感染のマーカーの意味合いも含めてクラミジア抗体の測定を行ったところ、上記6名中4名が陽性と判定され、またそのうち1例は梅毒、トリコモナス症にも罹患していることが明らかになった。一方赤痢アメー

バ抗体陰性血清のクラミジア抗体陽性率は有意に低かった。このようなデータに基づき、2006年以前の血清も調査したが、40名のアメーバ抗体陽性者虫24名がクラミジア抗体陽性と判定された。以上の所見は、明らかに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。

### 3.腸管寄生性原虫の臨床分離株確立法の改良

初年度にはアメーバ持続性感染例から特異な性状をもつ赤痢アメーバの分離培養法の検討を行った。このアメーバは遺伝子解析では定型的な赤痢アメーバと判定されたが、むしろ *E. dispar* 用に開発された培地で、成分を例えば gluconic acid を maltose に変換するなど modify するとよく増殖し、赤痢アメーバのために開発された TY-I-S-33 では全く増殖しなかった。

2年次の検討では、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。その結果、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。

最終年度は、まずジアルジアの脱囊効率を促進する炭酸ガスがアメーバの脱囊効率を

も上昇させることを見出した。更に芽胞形成能力を有するある種の嫌気性菌 (*Clostridium* sp. など) が試験管内における赤痢アメーバの嚢子形成を起こすことを見出した。試験内の嚢子形成は赤痢アメーバの生物学的課題の残された最大のものであり、この所見が大きく寄与する可能性がある。

### 4.腸管における赤痢アメーバの持続感染機構の解明

初年度には、CBA マウスを用いて、これに持続性感染を起こしているヒト症例から分離した *Bacteroides fragilis* を経口投与することにより、1年以上も持続感染を継続しているモデルを作成することに成功した。組織病理的に、アメーバはこのモデルでは大腸粘膜上皮に接着した形で存在しており、この細菌がその過程を促進しているものと思われた。

2年次には、上記のように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。まず、持続性感染モデル作成に効果があった嫌気性細菌である *B. fragilis* 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う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が安定して維持できる

事も見いだした。

最終年度は、高率にマウスなどの腸管に寄生している *Entamoeba muris* の細菌共棲状態での培養に初めて成功した。このアメーバはまた、試験管内、マウス腸管において赤痢アメーバと何らかの形で競合し、赤痢アメーバの腸管上皮への接着などを阻害することも明らかにした。

#### 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

初年度の解析により、7000以上に達する赤痢アメーバの全遺伝子のうち80%以上が無菌培養された HM-1 株でも、あるいは CBA マウスに感染させた同一株でも発現していることが示された。これらのうち 523 の遺伝子発現状況が変化し、また感染経過に伴って発現している遺伝子に変化が起こることが示された。アメーバの病原因子として知られているシステインプロテアーゼ (CP) 遺伝子も 29 遺伝子が見出されたが、そのうち CP4 が腸管感染により約 30 倍に発現が増加していた。

2 年次には、肝臓を passage させたアメーバについて検索した。その結果、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 (肝感染株) で発現が上昇していた遺伝子は 37 で、残りは A-HM1 (無菌培養で維持していた株) で上昇していた。また初年度同様、システインプロテアーゼ遺伝子のうち、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。

最終年度は、よりよくアメーバ症の臨床病型に対応する遺伝子マーカーの探索を試み、tRNA-linked STR の多型性の検索を国内分離株を用いて実施した。その結果、DA-H など 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。これらを臨床所見と比較すると、明らかに嚢子キャリア、腸アメーバ症、肝膿瘍という 3 病型のそれぞれに属する分離株は異なる遺伝子タイプに属することが明らかになった。

#### 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

初年度より 3 年次にいたるまで、地理的にオリジンの異なる赤痢アメーバ株を対象として表面レクチンである Igl1 の遺伝子の塩基配列を決定し、地理分布を反映するかどうかを検索した。その結果、Igl1 遺伝子は A~E の 5 タイプに分けられることが示され、A タイプが本来のわが国に特異的に分布している株と考えられた。一方 B~D はアジア型、E は欧米型と思われた。わが国の分離株からは A をメインとして B~D が検出できるが、E は全く検出できなかった。

2 年次に見出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 の全長組み替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 末側の組み替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。

組み替え Igl による肝膿瘍形成阻止能の検定では Igl の C 末側の組み替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 匹のハムスターで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。

わが国の赤痢アメーバ分布の特性を調べるために実施した中国の HIV 感染者における赤痢アメーバ抗体陽性率を調べたが、HIV 感染者のアメーバ抗体陽性率は 7.9%であり、年齢と相関しなかった。従ってわが国の感染経路とは異なる可能性が高いことが示された。

#### 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

初年度～2 年次にわたって、赤痢アメーバのタンパクレベルでの多型性の網羅的解析を行うため、ProteinChip/SELDI-TOF による検討を施行した。初年度は赤痢アメーバの確立された複数の株について検討を行い、HM-1 を対照として、国内由来 5 株、国外分離 4 株について検討を加えた。2 年次は解析対象を拡大し、赤痢アメーバに極めて近縁の *E. dispar* も調査対象とした。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、一方 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った事である。

最終年次は、タンパクの同定も可能とすべく LC-ESI-MS/MS と Mascot 解析を用いて検索した。その結果、複数のタンパクの検出・同定が可能であり、それらの emPAI 値も明らかにされた。例えば、赤痢アメーバの HM-1 株で emPAI 値が最も高いのは enolase で、この特徴は HK-9、SAW755CR、KU46、KU14 及び *E. dispar* の AS161R に共通して見られた。また alcohol dehydrogenase 3、coacotsin は赤痢アメーバの全ての株に検出されたが、*E. dispar* には見出せず、この解析法はタンパクプロファイルを株間、種間で差異を検索し、なおかつ同定するのに極めて有用であると思われる。

#### 8. ランブル鞭毛虫、サイクロスポーラの遺伝子多型解析法の検討

まずランブル鞭毛虫遺伝子多型性の検索を行い、初年度は GDH と 18SrRNA の、2 年次には TPI 遺伝子の多型性を検討した。初年度はこの解析により *Assemblage* を決定できたが、注目すべきはインドネシアのヒト分離株より従来イヌ・ネコ特異型とされた *Assemblage C* と *D* が検出されたことであった。2 年次に解析した 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。

3 年次にはサイクロスポーラの遺伝子解析を行い、18SrRNA の部分配列を決定し、分離株の比較検討を行った。解析結果は全てのサンプルが混合感染のパターンであることを示しており、さらに詳しい解析が必要ではあるが、アジア、アフリカまで広範囲にわたる遺伝子型が存在する可能性を示唆するものとも考えられた。

#### 9. 霊長類における非定型赤痢アメーバの感染状況と分離株の性状解析

今回初めて国内施設において飼育されている霊長類から赤痢アメーバ様のアメーバを検出し、無菌培養に成功し、その性状を詳しく調べたところ、18SrRNA の塩基配列での赤痢アメーバ標準株との相同性は 99.3% で、同様の解析を *E. dispar* についても行い比較したところ、霊長類から分離されたア

メーバは赤痢アメーバと *E. dispar* との間に位置していることが分かった。アインザイムも新しいパターンであり、また無菌化されたクローン株をハムスター肝に注射したところ、肝膿瘍が形成されたので病原性を有していると判断された。この遺伝子データに基づいて、Multiplex PCR を作成し、霊長類 11 種、47 頭を調べたところ、4 種、6 頭にこの非定型赤痢アメーバが検出された。今後、人獣感染の可能性を考慮する必要がある。

#### 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が疑われるという形で報告されるケースが散見される。他方、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別な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 3 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、従って糞便による環境の汚染が起っていること

が想定され、一度赤痢アメーバが周囲に侵入すると、容易に感染が拡大してゆく可能性がある事が示された。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、メトロニダゾール単独より、ディロキサニドなど Luminal drug の併用の方が感染制圧に際して有用であることを明確にした。また東京都の定点施設において、女性の赤痢アメーバ抗体値を測定し、2006年まで明確な上昇傾向にある事などをも併せて明らかにした。一方この抗体値は2007年には低下したものの、3年を通してアメーバ抗体陽性者ではクラミジア抗体陽性者が著しく多いことも明らかにした。このようなデータより考慮すると、上記の異性愛行為による赤痢アメーバ感染は間違いなく起こっているものと考えられる。今後とも、従来とは異なった方向の注意が必要である。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、現在実施中のガイドラインの第2回目改訂に取り入れる予定である。

また、新しく霊長類より病原性を有している非定型赤痢アメーバが検出・同定されたことも重要と思われる。何よりも人獣感染を疑わざるを得ないし、その場合の診断・治療など今後の課題である。

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。特に詳細な分離株のタイピ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探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。加えて、表面抗原である 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

施設内腸管寄生原虫の疫学的解析、感染制圧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。新規調査対象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原虫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られる。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と恐らくヒトにも病原性を示す非定型赤痢アメーバの霊長類におけるかなり高い感染率が挙げられる。今後赤痢アメーバ症に対する対応を考える際に、併せて必要な配慮を払わざるを得ない状況になりつつある事を指摘しておきたい。

## F.健康危険情報

新規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、糞便による周辺環境の汚染を示唆しており、赤痢アメーバの感染拡大の可能性を示すものとして、留意すべきである。それと共に女性における異性愛行為による赤痢アメーバ感染と霊長類における非定型赤痢アメーバ感染が今後一層の問題を提起するかもしれない。

## 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、2007。

### 2.論文

Kobayashi S, Imai E, Haghghi A, Khalifa SAM, Tachibana H, Takeuchi T Axenic

cultivation of *Entamoeba dispar* in newly designed yeast extract-gluconic acid-dihydroxyacetone-serum medium. J Parasitol, 91, 1-4, 2005.

Beck DL, Boettner D, Dragulev B, Ready L, Mackey AJ, Nozaki T, Pearson WR, Petri WA Jr Identification and gene expression analysis of a large family transmembrane kinase related to the Gal/GalNAc lectin in *Entamoeba histolytica*. Eukaryote Cell, 4, 722-732, 2005.

Saito-Nakano , Loftus BJ, Hall N, Nozaki T The diversity of Rab small GTPase in *Entamoeba histolytica*. Exp Parasitol, 110, 244-252, 2005.

Nozaki T, Ali V, Tokoro M Sulfur-containing amino acid metabolism in parasitic protozoa (review). Adv in Parasitol, 60, 1-99 2005

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

Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S,

- Takeuchi T *Entamoeba histolytica*: cysteine protease inhibitors block excystation and metacystic development. *Exp Parasitol*, 109, 27-32, 2005.
- Abe N, Kimata I, Tokoro M Genotyping of *Giardia* isolates from human in Japan using small subunit ribosomal RNA and glutamate dehydrogenase gene sequences. *Japan J Infect Dis*, 58, 57-58, 2005.
- 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.
- Nozaki T, Kobayashi S, Takeuchi T The diversity of clinical isolates of *Entamoeba histolytica* in Japan. *Arch Med Res*, 37, 276-278, 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.
- 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 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.

小林正規、前田卓哉、竹内 勤 赤痢アメーバの抗原検出法、シンポジウム「寄生虫疾患に用いる検査キットの諸問題」、*Clin Parasitol*, 16, 16-18, 2005.

小林正規、前田卓哉、竹内 勤 赤痢アメーバ、*日本臨床*, 63(増), 278-279, 2005.

所 正治、井関基弘 クリプトスポリジウム。 *日本臨床*, 63(増), 256-258, 2005

福羅国普、川原 弘、山田真善、高瀬修二郎、及川陽三郎、所 正治 PCR 法による糞便中遺伝子検出が診断及び治療効果の

判定に有用であったアメーバ赤痢の一例。 *内科*, 95, 989-991, 2005.

所 正治 赤痢アメーバの病原性。 *臨床と微生物*, 32, 227-231, 2005.

野崎智義 赤痢アメーバ原虫 - 特異な含硫アミノ酸代謝を創薬につなげる。 *現代寄生虫病事情*, 91-97, 2006.

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、井関基弘 腸管寄生原虫における MIF 変法の評価。 *Clin Parasitol*, 16, 53-57, 2006.

所 正治、井関基弘 臨床で問題となるいくつかの”原虫”の分類に関する最近の知見。 *Clin Parasitol*, 16, 9-12, 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。

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

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。

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。

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。

### 3.学会発表

小林正規、前田卓哉、竹内 勤 赤痢アメーバの抗原検出法。第 16 回日本臨床寄生虫学会、2005、

山田 稔、鈴木隆裕、内藤裕二、橘 裕司、小林正規、竹内 勤、内川隆一、手越達也、有菌直樹 盲腸に潰瘍を多数認めた無症候性赤痢アメーバ嚢子排出者の 1 例。第 16 回日本臨床寄生虫学会、2005。

Nozaki T The diversity and peculiarity of Rab small GTPase in vesicular trafficking of the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. Int Symposium on Vesicle Trafficking in Parasitic Protozoa, Brazil, 2005.

橘 裕司、松本直久、程 訓佳、良原栄策  
抗赤痢アメーバ Gal/GalNAc レクチンヒト  
モノクロナル抗体の 1 アミノ酸置換による  
親和性改良. 第 74 回日本寄生虫学会大会、  
2005.

程 訓佳、良原栄策、金田良雅、竹内 勤、  
橘 裕司 *Entamoeba moshkovskii* ペ  
ルオキシレドキシンの遺伝子解析. 第 74  
回日本寄生虫学会大会、2005.

牧岡朝夫、熊谷正広、渡辺直熙、小林正規、  
竹内 勤 *Entamoeba* の脱囊・発育への  
情報伝達分子プロテインキナーゼ C 及びフ  
ォスファチジルイノシトール 3 キナーゼの  
関与. 第 74 回日本寄生虫学会大会、2005.

熊谷正広、牧岡朝夫、渡辺直熙、竹内 勤  
赤痢アメーバのゲラニルゲラニル転移酵素  
II 型の解析. 第 74 回日本寄生虫学会大会、  
2005.

Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S,  
Takeuchi T Cysteine protease  
inhibitors block excystation and  
metacystic development of *Entamoeba*  
*invadens*. XII Int Congress of Protozool,  
2005.

牧岡朝夫、熊谷正広、小林正規、竹内 勤  
*Entamoeba* の脱囊・発育にかかわる情報伝  
達分子の解析. 第 46 回日本熱帯医学会大  
会、2005.

牧岡朝夫、熊谷正広、竹内 勤、野崎智義  
赤痢アメーバのゲラニルゲラニル転移酵素  
II 型による Rab の翻訳後脂質修飾. 第 46  
回日本熱帯医学会大会、2005.

熊谷正広、牧岡朝夫、竹内 勤、野崎智義  
*Entamoeba* の脱囊・発育に対する DNA ポ  
リメラーゼ阻害剤アフィディコリンの効果.  
第 38 回日本原生動物学会大会、2005.

熊谷正広、牧岡朝夫、竹内 勤、野崎智義  
赤痢アメーバのプレニル転移酵素の解析.  
第 4 回分子寄生虫学・マラリアフォーラム、  
2005.

熊谷正広、牧岡朝夫、竹内 勤、野崎智義  
赤痢アメーバの Rab のプレニル化を担うゲ  
ラニルゲラニル転位酵素 II 型の解析. 第  
28 回日本分子生物学会年会、2005.

所 正治、山村一志、仲本賢太郎、井関基  
弘 *Giardia intestinalis* の遺伝子型解析.  
第 4 回分子寄生虫学・マラリアフォーラム、  
2005.

仲本賢太郎、所 正治、野崎智義 赤痢  
ア メ ー バ に お け る  
S-adenosyl-L-methionine synthase の解析.  
第 4 回分子寄生虫学・マラリアフォーラム、  
2005.

荒井朋子、木俣 勲、所 正治 細胞培  
養系における感染クリプトスポリジウム増