

- 小林正規、鈴木 淳、竹内 勤：
Entamoeba muris の細菌共棲培養法の確立と培地内嚢子形成条件について：第77回日本寄生虫学会大会(2008)
- 橋 裕司、小林正規、柳 哲雄、竹内勤、田辺和祐：赤痢アメーバにおける2つの Igl 遺伝子の多型解析：第77回日本寄生虫学会大会(2008)
- 中村(内山)ふくみ、中村 造、古宮伸洋、大西健児、鈴木 淳、小林正規：インド旅行で感染した腸管寄生原虫症の2例：第19回日本臨床寄生虫学会(2008)
- 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セリンプロテアーゼの関与：第77回日本寄生虫学会大会(2008)及び第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会(2008)
- T Fujishima, S Nishise, M Ichihara, S Kobayashi, T Takeuchi: Difficulties in the treatment of mass-infection of Entamoeba histolytica among mentally handicapped individuals in a rehabilitation institution for intellectually impaired in Japan: XIIth International congress for tropical medicine and malaria (2008)
- Y Miyata, S Kobayashi, Y Osa, J Suzuki, S Kano, T Takeuchi: Structural modification of dibenzosuberanyl piperazine derivatives for the inhibition of drug resistance in malaria: XIIth International congress for tropical medicine and malaria (2008)
- J Suzuki, S Kobayashi, I Ise, R Murata, T Takeuchi: Seroprevalence of Entamoeba histolytica infection in female outpatients at a sexually transmitted disease sentinel clinic in Tokyo, Japan: XIIth International congress for tropical medicine and malaria (2008)
- 牧岡朝夫、熊谷正広、小林正規、竹内勤：Entamoeba の脱嚢及び発育へのセリンプロテアーゼの関与とその発現解析：第49回日本熱帯医学会大会(2008)
- 鈴木 淳、小林正規、村田理恵、保坂三継、竹内 勤：都内動物園のサルにおける赤痢アメーバ・バリアントの感染実態調査：第49回日本熱帯医学会大会(2008)
- 橋 裕司、柳 哲雄、小林正規、神原廣二：長崎市の飼育ニホンザルから分離された Entamoeba nuttalli の性状解析：第49回日本熱帯医学会大会(2008)
- T Fujishima, S Nishise, M Ichihara, S Kobayashi, T Takeuchi: Difficulties in the treatment of mass-infection of Entamoeba histolytica in a institution: Amebiasis post-meeting (43rd Annual U.S.-Japan joint conference on parasitic diseases(2008)
- 牧岡 朝夫、熊谷 正広、小林 正規、竹内 勤：セリンプロテアーゼは Entamoeba の脱嚢及び発育に関与する：第41回日本原生動物学会大会(2008)
- 小林正規、鈴木 淳、竹内 勤：施設内赤痢アメーバ集団感染に対するメトロニダゾール単独治療の有効性について：第78回日本寄生虫学会大会(2008)
- 早川 枝李、徳舛 富由樹、小林 正規、鳥居 本美、有江 隆之、竹内 勤、高桑 雄一、James A. Dvorak：異なる宿主間におけるマラリア感染赤血球膜のゼータ電位の比

- 較検討：第78回日本寄生虫学会大会(2008)
- 牧岡朝夫、熊谷正広、渡辺直熙、小林正規、竹内 勤：Entamoebaの脱嚢及び嚢子形成におけるセリンプロテアーゼの発現解析：第78回日本寄生虫学会大会(2008)
- 福田昌彦、下村嘉一、植田喜一、井上幸次、大橋裕一：コンタクトレンズ関連角膜感染症全国調査。第51回日本コンタクトレンズ学会総会、福岡、2008年7月4～6日
- 佐伯有祐、井上幸次ほか：非コンタクトレンズ装用者に生じた重症アカントアメーバ感染症の1例。第33回角膜カンファランス、大阪、2009年2月19～21日
- Yukifumi Nawa, Haruhiko Maruyama: Clinical paragonimiasis and changing patterns in Japan. XVIIth International Congress for Tropical Medicine and Malaria (Sep 29-Oct 3, 2008, International Convention Center Jeju, Jeju, Korea)
- Haruhiko Maruyama, Ayako Yoshida, Anna Nishimaki: Ascarid larva migrans: raw meat lovers' uninvited guests. XVIIth International Congress for Tropical Medicine and Malaria (Sep 29-Oct 3, 2008, International Convention Center Jeju, Jeju, Korea)
- Eiji Nagayasu, Pham Ngoc Doanh, Ana Nishimaki, Ayako Yoshida, Yoichiro Horii, Yukifumi Nawa, and Haruhiko Maruyama: Serological determination of the causative species of human paragonimiasis. Forum Cheju 14 (Oct. 2, 2008, International Convention Center Jeju, Jeju, Korea)
- Ayako Yoshida, Nobuo Ohta, and Haruhiko Maruyama: Depletion of CD4 + CD25 + FOXP3+ regulatory T cells down-regulates parasite clearance during early phase of Plasmodium chabaudi AS infection in A/J mice. 43rd. US-Japan Joint Conference on Parasitic Diseases (Jan 7-8, 2009, International Medical Center of Japan, Tokyo, Japan)
- 吉田彩子、荒木潤、畠山金太、丸山治彦「ワタリコウガイビルによる偽寄生の1例」第77回日本寄生虫学会大会(2008年4月2-4日、長崎市)
- 吉田彩子、太田伸生、丸山治彦「CD4+CD25+制御性T細胞のPlasmodium chabaudi AS感染に与える影響」第77回日本寄生虫学会大会(2008年4月2-4日、長崎市)
- 山内(川浦)稚代、丸山治彦「ヴェネズエラ糞線虫の運動能力変化を支配する栄養成分の追求」第77回日本寄生虫学会大会(2008年4月2-4日、長崎市)
- 吉田彩子、太田伸生、丸山治彦「CD4+CD25+制御性T細胞のPlasmodium chabaudi AS感染に与える影響」第38回日本免疫学会大会(2008年12月1-3日、京都市)
- 西牧亜奈、有賀俊二、安藤健二、川嶋将司、森本高太郎、兼松孝好、丸山治彦「1匹のマムシを生食し、抗体検査によってひとりはドロレス顎口虫症、ひとりは Manson 孤虫症と診断された例」第19回日本臨床寄生虫学会(2008年6月7日、京都市)
- 赤尾信明、吉川正英、丸山治彦、太田伸生、名和行文「臨床寄生虫学雑誌データベースの構築とその利

- 用」第 19 回日本臨床寄生虫学会
(2008 年 6 月 7 日、京都市)
- 中西憲司 アレルギー疾患の複数病
因論と Th2 細胞の誘導機序の多
彩さ (特別講演) 第 58 回日本ア
レルギー学会秋期学術大会,
11.27-29, 東京, 2008.
- Nakanishi K IL-18 and atopic
dermatitis :IL-18 might be a
therapeutic target molecule
for the treatment of infection
associated allergic
inflammation. (招待講演)
International investigative
dermatology 5.14-17, Kyoto,
2008.
- 中西憲司, 善本知広 IL1 ファミリー
サイトカインと自然型アトピー
性炎症 (シンポジウム) 第 58
回日本アレルギー学会秋季学術
大会, 11.27-29, 東京,
2008.
- 善本知広, 中西憲司 T 細胞の異常と
アレルギー: IL-18 による Super
Th1 細胞の誘導と IL-33 による
Th2 細胞増強作用. (特別シンポ
ジウム) 第 58 回日本アレルギー
学会秋季学術大会 (アレルギー,
57, 1276) 11.27-29, 東京,
2008.
- 善本知広, 中西憲司 気道炎症疾患と
自然免疫: IL-18/IL-33 による自
然型気管支喘息の誘導. (シンポ
ジウム) 第 58 回日本アレルギー
学会秋季学術大会, (アレルギー,
57, 1301) 11.27-29, 東京,
2008.
- Nakanishi, K., and Yoshimoto, T.
Basophils induce and augment
Th2 response. (シンポジウム)
第 38 回日本免疫学会総会・学術
集会, 12.1-3, 京都, 2008.
- Yoshimoto, T., Kosaka, H.,
Fujimoto, J., Nakanishi, K. IFN- γ
is a therapeutic target
molecule for prevention of
postoperative adhesion
formation. (シンポジウム) 第
38 回日本免疫学会総会・学術集
会, 12.1-3, 京都, 2008.
- Kondo, Y., Yoshimoto, T., Yasuda, K.,
Fujimoto, J., and Nakanishi, K.,
Administration of IL-33
induces airway
hyperresponsiveness and
goblet cell hyperplasia in the
lungs in the absence of
adoptive immune system. (ワ
ークショップ) 第 38 回日本免疫
学会総会・学術集会, 12.1-3, 京
都, 2008.
- Yasuda, K., Sasaki, Y., Kondo, Y., Mats
umoto, M., Yoshimoto, T., Nakani
shi, K., In vivo administration of
IL-33 induces goblet cells
capable of expelling
Nippostrongylus brasiliensis
in the absence of adaptive
immune system. (ワークショップ)
第 38 回日本免疫学会総会・
学術集会, 12.1-3, Kyoto,
2008.
- 中西憲司 術後の腸管癒着も免疫学
的機序を基盤に形成される 第
五回「免疫難病・感染症等の先進
医療技術」第 5 回 (最終) 公開シ
ンポジウム, 12.15, 東京,
2008.
- 善本知広, 小坂久, 大橋浩一郎, 中西
憲司 好塩基球は IL-4 産生能と
抗原提示能の両機能を持ち生体
内で Th2 応答を誘導、維持、増
強する。「免疫難病・感染症等の
先進医療技術」第 5 回 (最終) 公
開シンポジウム, 12.15, 東京,
2008.
- 松葉沙織, 善本知広, 杉村和久, 伊藤
祐二, 北本祥, 森本麻衣, 三村治,
中西憲司 実験的アレルギー性
結膜炎モデルにおける IL-33 の病
因論的役割の解明。「免疫難病・
感染症等の先進医療技術」第 5 回

- (最終) 公開シンポジウム, 12.15, 東京, 2008.
- 今井康友, 安田好文, 今村美智子, 林伸樹, 善本知広, 山西清文, 筒井ひろ子, 水谷仁, 中西憲司 新規 DC 免疫法: 抗原とアジュバントでパルスした樹状細胞はナイーブマウスに迅速かつ顕著な Th2 応答を誘導する. 「免疫難病・感染症等の先進医療技術」第 5 回 (最終) 公開シンポジウム, 12.15, 東京, 2008.
- 安田好文, 佐々木由紀, 近藤祐一, 松本真琴, 善本知広, 中西憲司 IL-33 のマウス生体内投与は *Nippostrongylus brasiliensis* 排虫作用を有する杯細胞を誘導する. 第 77 回日本寄生虫学会大会, 4.3-4, 長崎, 2008.
- Tarutani, M., Imai, Y., Tsuda, T., Nakaniishi, K. and Yamanishi, K. Psoriasis-like hyperplastic and inflammatory lesions produced by epidemic-specific, inducible activation of Raf in mice. *International investigative dermatology*, 5.14-17, Kyoto, 2008.
- 小坂久, 善本知広, 中西憲司, 藤元治朗 術後癒着形成は IFN- γ / STAT1 依存性の PAI 亢進による, 第 108 回日本外科学会定期学術集会, 5.15-17, 長崎, 2008.
- Kosaka, H., Yoshimoto, T., Nakaniishi, K., and Fujimoto, J., Role of NKT cell-driven IFN- γ in postoperative adhesion formation. *DDW(AGA)* :, 5.17-22, San Diego · USA, 2008.
- 今井康友, 林伸樹, 安田好文, 筒井ひろ子, 水谷仁, 中西憲司 表皮ランゲルハンス細胞は、ペプチド抗原によるナイーブ T 細胞の活性化を細胞間相互作用によって抑制する, 第 29 回日本炎症・再生学会, 7.8-10 東京, 2008.
- 安田好文, 佐々木由紀, 近藤祐一, 松本真琴, 善本知広, 中西憲司 IL-33 のマウス生体内投与は獲得免疫応答非依存性に *Nippostrongylus brasiliensis* 排虫作用を有する杯細胞を誘導する, 第 73 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会, 7.10-12, 北海道, 2008.
- 今村美智子, 安田弘文, 審良静男, 筒井ひろ子, 藤元治朗, 中西憲司 TLR を介した caspase-1 活性化における TRIF の必要性. 第 73 回インターフェロン・サイトカイン学会学術集会, 7.10-12, 北海道, 2008.
- 小坂久, 善本知広, 中西憲司, 藤元治朗 腹腔内術後癒着形成メカニズムの解明と予防, 第 63 回日本消化器外科学会総会, 7.16-18, 北海道, 2008.
- Yasuda, K., Sasaki, Y., Kondo, Y., Matsumoto, M., Yoshimoto, T., Nakaniishi, K., In vivo administration of IL-33 induces goblet cells capable of expelling *Nippostrongylus brasiliensis* in the absence of adaptive immune system. *The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity*, 9.7-11, Hyogo, 2008.
- 善本知広, 松葉沙織, 中西憲司 IL-27 による新規抗アレルギー作用; IL-27 による気管支喘息とアレルギー性結膜炎発症の抑制. 第 20 回日本アレルギー学会春季学術大会, 6.12-14, 横浜, 2008.
- 松葉沙織, 善本知広, 安田好文, 池田誠宏, 三村治, 中西憲司 RW 特異的 T 細胞株を用いたアレルギー性結膜炎モデル —IL-33 の病因的役割の解析—. 第 20 回日本アレルギー学会春季学術大会, 6.12-14, 横浜, 2008.

- Imamura, M., Tsutsui, H., Yasuda, K., Akira, S., Fujimoto, J. and Nakanishi, K. Requirement of MyD88 and TRIF but not ATP signaling for TLR4-mediated caspase-1 activation. The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity. 9.7-11. Hyogo, 2008.
- 松葉沙織, 善本知広, 安田好文, 池田誠宏, 三村治, 中西憲司 ブタクサ花粉特異的実験的アレルギー性結膜炎に対する IL-33 の病因的役割の解析. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, 12.1-3, 京都, 2008.
- 小坂久, 善本知広, 中西憲司, 藤元治朗 HGF を用いた術後腹腔内癒着形成予防法, 16th JDDW, 10.1-4, 東京, 2008.
- 川浩介, 筒井ひろ子, 松本譽之, 中西憲司 マウスエンドトキシシヨックで認める、免疫応答を基盤とした PAI-1 の発現誘導. 第 38 回免疫学会総会・学術集会, 12.1-3, 京都, 2008.
- Imamura, M., Tsutsui, H., Yasuda, K., Akira, S., Fujimoto, J. and Nakanishi, K. TLR4 を介した caspase-1 活性化における MyD88 と TRIF の必要性. 第 38 回免疫学会総会・学術集会, 12.1-3, 京都, 2008.
- 北 潔 寄生虫の生活環におけるダイナミックなエネルギー代謝の変動 第 81 回日本生化学会大会第・31 回日本分子生物学会年会 合同大会平成 20 年 12 月
- Madhavi Paranagama, Kimitoshi Sakamoto, Kiyoshi Kita Ascaris suum quinol fumarate reductase can produce high amount of reactive oxygen species. 第 81 回日本生化学会大会第・31 回日本分子生物学会年会 合同大会平成 20 年 12 月
- Y. Kido, K. Sakamoto, S. Fujioka, M. Harada, D. Ohmori, F. Yamakura, H. Saimoto, Y. Yabu, T. Suzuki, S. Harada, K. Kita Purification and crystallization of drug target trypanosome alternative oxidase (TAO) from *Trypanosoma brucei* XVIIth International Congress for Tropical Medicine and Malaria 2008, Sept. Cheju, Korea
- Morales, J., Sakamoto, K., Kita, K. Novel subunit organization of the respiratory Complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase) in *Trypanosoma cruzi* XVIIth International Congress for Tropical Medicine and Malaria 2008, Sept. Cheju, Korea
- Harada, M., Fujimoto, Y., Nakamura, K., Kido, Y., Sakamoto, K., Yabu, Y., Suzuki, T., Yoshinari, S., Kita, K. Toward anti-cryptosporidial chemotherapy by ascofuranone, specific and potent inhibitor against alternative oxidase (AOX) XVIIth International Congress for Tropical Medicine and Malaria 2008, Sept. Cheju, Korea
- Ohmae H, Olveda R, Socheat D, Sudomo M, Chigusa Y, Matsuda H. Recent situation and next steps of schistosomiasis control programs in Southeast Asia. The 27th International Conference of Tropical Medicine and Malaria, Cheju, Korea, 30 Sep – 3 Oct, 2008.
- Socheat D, Sinuon M, Tsuyuoka R, , Odermatt P, Ohmae H, Matsuda H, Antonio MS Palmer

K. A success story of Schistosomiasis integrated with deworming in Cambodia. The 27th International Conference of Tropical Medicine and Malaria, Cheju, Korea, 30 Sep - 3 Oct, 2008.

Ishikawa H, Hisakane N, Ohmae H, Kirinoki M, Chigusa Y, Pangilinan Redulla A, Sinuon M, Socheat D, Matsuda H. Modeling the dynamics and control of transmissions of Schistosoma japonicum and S. mekongi in Southeast Asia The 27th International Conference of Tropical Medicine and Malaria, Cheju, Korea, 30 Sep - 3 Oct, 2008.

朝日博子、大前比呂思、鈴木玲子、田邊将信、松田肇、山下隆夫、鹿島準子、太田伸生、日本住血吸虫感染者の尿中に認められる特異抗体の検出 第77回日本寄生虫学会大会 平成20年3月

林尚子、桐木雅史、Viroj Kitikoon、金澤保、松田肇、千種雄一。マルチプレックス PCR によるヒト寄生住血吸虫類の鑑別。第78回日本寄生虫学会大会 東京 2009年3月

桐木雅史、林尚子、千種雄一、Muth Sinuon、Doung Socheat、Viroj Kitikoon、松田肇。カンボジアにおけるメコン住血吸虫症再興の潜在的リスク。第78回日本寄生虫学会大会 東京 2009年3月

梅原梓里、川上 泰、荒木 潤、内田明彦、杉山 広。日本産 Anisakis

simplex の同胞種レベルでの分類学的解析。第145回日本獣医学会学術集会、相模原、2008年3月

梅原梓里、川上 泰、荒木 潤、内田明彦、杉山 広。同胞種レベルでみた日本産 Anisakis simplex : 感染源の特定に向けた検討。第19回日本臨床寄生虫学会大会、京都、2008年6月

田尻智子、堀川禎夫、森嶋康之、川中正憲、山崎 浩、杉山 広。喀痰から虫卵が検出され塩基配列から種同定した宮崎肺吸虫症の1例。第19回日本臨床寄生虫学会大会、京都、2008年6月

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

特許名称：Th2 細胞誘導用組成物および Th2 型疾患の治療組成物、ならびにこれらの利用。発明者名：善本知広、中西憲司 権利者名：兵庫医科大学 出願番号：特願 2008-281930 出願年月日：2008.10.31

特許名称：実験動物の腸管癒着を形成する方法、腸管癒着実験動物の製造方法、腸管癒着抑制剤のスクリーニング方法及び腸管癒着抑制剤。発明者名：善本知広、藤元治朗、中西憲司 権利者名：兵庫医科大学 国際出願番号：PCT/JP2008/05229 出願年月日：2008.2.14

2. 実用新案登録

該当せず

3. その他

該当せず

II. 分担研究報告書

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

赤痢アメーバの病原性遺伝子の同定と病原機構の解明

研究代表者 野崎 智義 国立感染症研究所 部長

研究要旨 赤痢アメーバ症はアジア等の開発途上国を中心として蔓延する重要な腸管寄生性原虫症である。本研究では、病原性の異なる複数の赤痢アメーバ分離株の遺伝子発現プロファイルを比較することにより、病原性遺伝子を抽出した後、個別の病原性遺伝子の機能解析を行い、赤痢アメーバ病原機構の全体像の解明に寄与することを目指している。本年度は国内の赤痢アメーバ分離株の遺伝的背景と分離された患者の臨床像との相関を確立することを目的として、国内分離株 37 株を対象として、tRNA 近傍の短反復配列(tRNA-STR)の多型性を利用した高解像度タイピングを行い、国内の分離株の多様性を確認するとともに、病型（下痢・赤痢、肝膿瘍）、あるいは無症候性と相関の見られる tRNA-STR 座位特異的配列型と、6 つの tRNA-STR を総合して得られる遺伝子型を明らかにした。また、次年度に使用される発現解析用の *E. histolytica*/*E. invadens* ハイブリッド DNA マイクロアレイの作製を終え、その有用性を準備的実験により確認した。以上、初年度の計画はすべて達成された。

A. 研究目的

代表的な腸管原虫症であるアメーバ赤痢（赤痢アメーバ症）は熱帯・亜熱帯の開発途上国を中心として世界の 1% が感染する重要な感染症である。年間約 10 万人が感染によって命を奪われるマラリアについて感染死者数の多い原虫感染症である。一方、我が国を含む一部先進諸国においては、知的障害者および男性同性愛者において重度の感染浸淫を引き起こしている。したがって赤痢アメーバ症は「顧みられない途上国の病気」という側面の方で、我が国が直面する厚生行政上の具体的なリスクを意味している。マラリア、クリプトスポリジウム、トリパノソーマ、リーシュマニアなどと同様に、赤痢アメーバの遺伝子地図は 2005 年の全ゲノムの解読(Lofus Nature 2005)により 標準株の全遺伝情報が解明された。したがって、赤痢アメーバ症の研究は確実にポストゲノム時代に入り、それに即応した研究アプローチが不可欠である。ゲノム

情報が明らかになっても、本原虫の病原性および寄生の分子メカニズム、更には、個別の経路やタンパク質の機能に関しては依然未解明なものが多い。そこで本研究では統合的な"omics"研究を研究の端緒として、病原性遺伝子を発見し、更に、それぞれの病原性因子の機能を詳細にマップし、病原機構の網羅的解明を行う研究を計画した。初年度は、比較発現解析（トランスクリプトーム解析）に使用する表現型の異なる、すなわち哺乳動物への病原性の異なる株の型別を達成するのに不可欠な高解像度遺伝子タイピングを標準化し、国内の臨床分離株の型別を終了した。また、次年度以降に計画しているトランスクリプトーム解析に使用するマイクロアレイのデザインと合成、ならびに予備的解析を完了した。

B. 研究方法

1. 赤痢アメーバ臨床分離株の背景
これまで主任研究者ならびに分担

研究者小林らにより分離された国内の臨床分離株及び肝臓癌から直接抽出された赤痢アメーバ検体を含め、全37検体を使用した。分離日時、病態などの背景に関する詳細は以下の2論文に記述されている (Haghighi, A., Kobayashi, S., Takeuchi, T., Masuda, G., and Nozaki, T. (2002) J. Clin. Microbiol. 40,4081-90; Haghighi, A., Kobayashi, S., Takeuchi, T., Thammapalerd, N., and Nozaki, T. (2003) J. Clin. Microbiol. 41, 3748-3756)。新しい肝臓癌由来の分離株は研究協力者である東海大学橋により分与された。今回新たに使用された分離株の詳細を以下表1に示す。

No	Isolate	Classical diagnosis	Location	Isolation Date	DNA origin
1	KU45	Diarhoea	China	April 2004	Azores
2	KU46 ^a	Diarhoea	Shimoda	April 2004	Azores
3	KU47 ^a	Diarhoea	Tokyo	April 2004	Azores
4	KU50	Diarhoea	Tokyo	March 2007	Azores
5	KU48	ALA	Tokyo	May 2006	Xenac
6	C736	ALA	China	July 2006	Azores
7	ALA-1	ALA	Kanagawa	July 1991	Azores
8	ALA-2	ALA	Tokyo	Nov 1990	Azores
9	ALA-3	ALA	Itozaki	Sept 1991	Azores
10	ALA-4	ALA	Tokyo	Feb 1983	Azores
11	ALA-5	ALA	Tokyo	Feb 1983	Azores
12	ALA-6	ALA	Tokyo (Puro?)	Feb 1983	Azores
13	ALA-7	ALA	Kanagawa	March 1991	Azores
14	ALA-8	ALA	Kagawa (Europe, Africa?)	March 1991	Azores
15	ALA-9	ALA	Ethiopia	Dec 1991	Azores
16	ALA-10	ALA	Tokyo	March 1993	Azores
17	ALA-11	ALA	Tokyo	Sept 1993	Azores
18	ALA-12	ALA	Kanagawa	Oct 1994	Azores
19	ALA-14	ALA	Kanagawa	June 1995	Azores
20	ALA-15	ALA	Tokyo	April 1997	Azores
21	ALA-16	ALA	Kanagawa	Feb 1998	Azores
22	ALA-17	ALA	Kanagawa	June 1999	Azores

^a Microsatellite sequenced

^b HIV +

表1 今回新たに追加された赤痢アメーバ臨床分離株の背景 (分離された地域・年月・DNAの由来)

2. 遺伝子タイピング法

赤痢アメーバは全ゲノムの約10%にtRNAを含んだ短反復配列(short tandem repeat)を含んでいる。これは*Entamoeba*属に極めて特異な分子マーカーとして用いられている。本研究ではそのうち6マーカー(DA-H, AL-H, NK2-H, RR-H, SQ-H and STGAD-H)を用いた。DA, H, AL等はそれぞれSTRを挟んでいるtRNAのコードするアミノ酸の一字略号を示している。PCRに用いられた核酸の抽出はQiagen DNA stool kitを用いた。PCRやシーケンシングは常法に従っ

た。

3. インビボ病原性試験

ハムスター肝臓癌モデルを用いて分離株の病原性を評価した。10⁶の栄養型を3-4週齢のSyrian golden hamster (40-50 grams)に一群5頭づつ、肝臓の左葉に直接接種した。6日後、肝臓の膿瘍部と正常部位とを分離し、重量を記録した。

4. DNAマイクロアレイのデザイン並びに合成

現在The Institute of Genome Research (TIGR)とJane Clig Venure Genome Institute (Pathema)の2種類の統合されていないゲノムデータベースが存在していてどちらか一方ではすべてを網羅していない上に、両者を合わせると極めて重複が多い。そこで両者の最大公約数を重複無しに達成するデータベースを自ら作成した。

TIGRのIDは例えば12.m00345のように、PathemaのIDはEHI_123456のように与えられる、そこで新しいデータベースでは、どちらかにしかない重複のないデータの場合はそのIDを、一つのデータベース中で重複があったり、両方のデータベースにあった場合は、両者を網羅するIDをつけた。例えば、12.m00345_6.m00078、EHI_123456_789123、98.m00765_234567など。最終的に全9230のE. histolytica特異的プローブセットを作成した。また、同一のアレイで赤痢アメーバ関連種であるE. invadensを用いたencystation (嚢子化)の解析を行うために、Pathemaデータベース上の重複のないORFに関して、12385のE. invadens特異的プローブセットを用意した。発現が確認されている既知の*Entamoeba*コントロールプローブセットを25用意した。また、81のAffymetrixコントロールプローブセ

ットを用いた。1 probe set あたりの Probe Pair 数は 11 とし、Array format として 11 ミクロンの 49-7875 を用いた。

(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. 国内分離株における STR 多型の証明

代表的な分離株を用いた、6つの tRNA-STR マーカーの PCR 増幅の結果を図 1 に示す。いずれの PCR 産物も単一で、例外なく、直接 direct sequencing の供する品質であった。

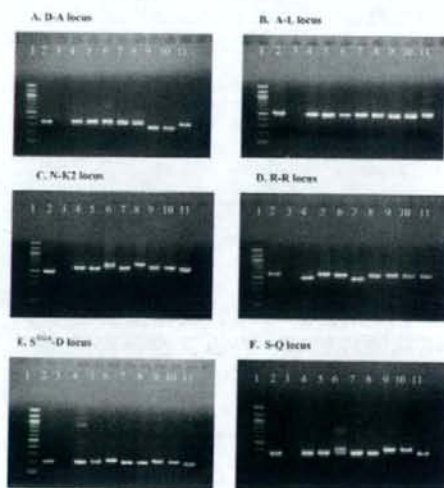


図 1 代表的な株の tRNA-STR 増幅パターン 左上から横に、D-A, A-L, N-D2, R-R, S^{TGA}-D, S-Q 座位

次に、全 37 の国内分離株の tRNA-STR の解析結果を以下の表 1 に示した。5 つの無症候例からの分離株、12 の下痢/赤痢症例からの分離株、20 の肝臓癌症例からの分離株から、それぞれの tRNA-STR 座位に関して、多くのこれまで同定されている配列型が同定された (5DA, 4AL, 10NK など)。同時にこれまで未同定だった新規配列型も発見され、これらを日本

分離株であることを示す "J" を "型" の前に配置し命名した (J1DA, J7AL, J1NK など)。すべての tRNA-STR 座位を総合すると、全 37 の国内分離株は 23 種類の全く新規な遺伝子型として同定された。

Outbreak of infection	Isolate	Sequence type						Genotype
		D-A	A-L	N-D2	R-R	S ^{TGA} -D	S-Q	
Asymptomatic	KU71	5DA	4AL	10NK	10R2	15SD	49Q	J1
	KU74	5DA	J7AL	J1NK	3R2	J16P	49Q	J2
	KU26	J1DA*	J7AL	10NK	3R2	15SD	49Q	J3
	KU27	J1DA	J4L	J1NK	3R2	12SD	J5Q	J4
	KU21	5DA	J7AL	10NK	3R2	15SD	J5Q	J5
Diarrhea dysentery	KU71	5DA	4AL	10NK	10R2	15SD	49Q	J1
	KU71	5DA	J7AL	J1NK	3R2	J6SD	49Q	J6
	KU72	5DA	4AL	J1NK	6R2	9SD	J6Q	J7
	KU70	5DA	4AL	10NK	6R2	15SD	49Q	J8
	KU46	5DA	4AL	10NK	6R2	15SD	49Q	J9
	KU15	15DA	J7AL	J1NK	3R2	12SD	J19Q	J9
	KU16	5DA	J4L	J1NK	6R2	9SD	J19Q	J10
	KU23	4DA	J4L	10NK	3R2	15SD	49Q	J11
	KU22	5DA	J7AL	J1NK	3R2	9SD	J19Q	J12
	KU45	15DA	J7AL	J1NK	3R2	9SD	J19Q	J13
Asymptomatic diarrhea	KU47	5DA	J2AL	10NK	3R2	15SD	49Q	J14
	KU50	15DA	J7AL	J1NK	3R2	9SD	49Q	J15
	ALA-3	5DA	4AL	10NK	10R2	15SD	49Q	J1
	ALA-19	5DA	4AL	10NK	10R2	15SD	49Q	J2
	ALA-1	5DA	4AL	10NK	6R2	15SD	49Q	J3
	ALA-2	5DA	4AL	10NK	6R2	15SD	49Q	J4
	ALA-5	5DA	4AL	10NK	6R2	15SD	49Q	J5
	ALA-6	5DA	4AL	10NK	6R2	15SD	49Q	J6
	C728	15DA	J7AL	J1NK	3R2	9SD	J19Q	J10
	ALA-4	15DA	J7AL	J1NK	3R2	9SD	J19Q	J11
ALA-14	15DA	J7AL	J1NK	3R2	9SD	J19Q	J12	
KU8	15DA	J7AL	J1NK	3R2	9SD	J19Q	J13	
KU48	15DA	J7AL	J1NK	3R2	9SD	J19Q	J14	
ALA-11	5DA	4AL	10NK	10R2	15SD	J20Q	J15	
ALA-8	4DA	J4L	J1NK	3R2	9SD	J20Q	J16	
ALA-9	4DA	J4L	10NK	J1R2	15SD	49Q	J18	
ALA-17	4DA	J4L	J1NK	J1R2	15SD	49Q	J19	
ALA-7	4DA	J2AL	10NK	3R2	12SD	J20Q	J20	
KU71	15DA	J7AL	J1NK	6R2	15SD	49Q	J21	
ALA-12	15DA	J7AL	10NK	3R2	12SD	J20Q	J22	
ALA-15	15DA	J2AL	10NK	3R2	9SD	J20Q	J23	
ALA-16	15DA	J2AL	10NK	3R2	9SD	J20Q	J24	

表 2 国内分離赤痢アメーバ株の個々の tRNA-STR 座位における配列型と総合的な遺伝型 特定のグループ (例えば、無症候性グループ) に固有に見られた配列型は太字斜体で示した。またすべてのグループに見られる遺伝子型 (J1) は一重下線を、有症型 (下痢/赤痢および肝臓癌) グループに共通してみられる遺伝子型 (J8, J13) は二重線または点線を付加した。

同定された新しい配列型を模式的に示した (図 2)

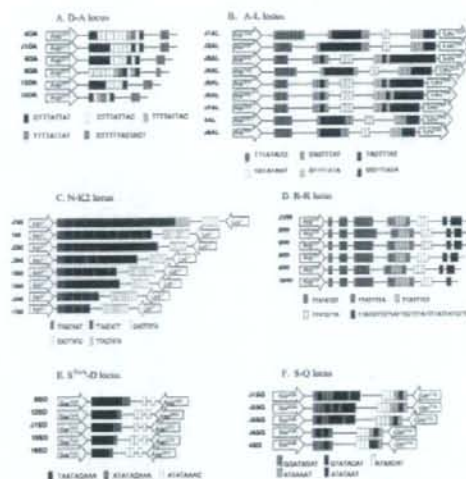


図2 本研究により新たに同定された tRNA-STR 配列型の構造 左上から横に、D-A, A-L, N-D2, R-R, S^{TGA}-D, S-Q 座位

2. tRNA-STR と病型の相関

赤痢アメーバの個別の tRNA-STR 座位に関して、いくつかの病型特異的配列型が発見された。無症候群を例にとれば、表2で示すように、13DA, J1DA, J6AL, J7AL, J1NK, 13NK, J1SD, J3SQはこのグループのみに発見された配列型であった。このうち、海外の分離株で確認されている13DA, 13NKは有症例から分離株にも見つかっており、この配列型のみで株の「非」病原性を示すものとは予想できない。同様に、下痢/赤痢グループや肝臓癌グループでもそれぞれ、特異的な配列型がそれぞれの tRNA-STR 座位において検出された(表2)。例えば下痢/赤痢グループでは J4AL, J2NK が、肝臓癌グループでは、J3AL, J1RR がその例である。すべての tRNA-STR 座位を総合すると、前述のように、23のいずれも新規の遺伝子型に分類されたが、すべてのグループに重複して同定された遺伝子型は J1 のみであり、残りの22遺伝子型はそれぞれのグループに固有であるか、2つのグループのみで重

複して見られた。J8, J13の2つの遺伝子型は有症グループに共通してみられる上に頻度の高いものであった。

3. 赤痢アメーバ遺伝子型とインビボ病原性との相関

tRNA-STR の遺伝子型解析により、赤痢アメーバの多様性が確認された一方で、それぞれの遺伝子型と病原性の相関をしめす必要がある。そこで、非病原性株である可能性のある、無症候性グループから分離された代表的な3株(KU14, KU26, KU27)を用いて、ハムスターにおける病原性を比較した。KU14, KU26が全肝臓の40%ほどを示す肝臓癌を形成するのに対し、KU27は全く肝臓癌形成能をもたなかった。

Isolates	*Body weight on day 6	Abscess weight in grams	Total liver weight	Percentage (%) of abscess
KU14	80.5 ± 2.31*	2.92 ± 0.553	8.75 ± 0.479	43.3 ± 4.40
KU26	59.8 ± 7.48	2.72 ± 0.825	6.70 ± 1.38	35.3 ± 15.2
KU27	68.6 ± 2.48	0 ± 0	4.12 ± 0.375	0 ± 0

* Average body weight (in grams) of 5 syrian hamsters after 6 days of infection.

** Mean ± standard deviation.

* p value < 0.0001

** p value 0.0006

表3 赤痢アメーバ分離株によるインビボ病原性試験 ハムスター肝臓癌モデルを用いて3つの分離株の臓癌形成能を比較した。左からハムスターの体重、臓癌部の重量、正常部位の重量、臓癌の全体に占める割合(%)を示す。

4. Entamoeba DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析の準備的検討

Entamoeba invadens の encystation モデルを用いて、嚢子化過程の複数点(0, 30, 60, 120min, 12h, 24, 120hr)におけるトランスクリプトームを予備的に解析した。その結果、12385の E. invadens 遺伝子のうち、7956の遺伝子において7点のうち少なくとも1点以上で3倍以上の優位な発現変動があることが

示された。0点を対象として行ったそれぞれの点での6比較中、3比較において3倍以上発現差のあった遺伝子を抽出すると1,693遺伝子の遺伝子が同定された。以上により新しく作成されたマイクロアレイの有用性が確認された。

D. 考察

本研究は、病原性の異なる赤痢アメーバ分離株を出発材料として、トランスクリプトーム解析を研究手法として、病原性に強く相関する遺伝子を発見することを研究前期の目標に設定した。初年度は、トランスクリプトーム解析に用いる株を選定することを目的として、これまで国内で分離された赤痢アメーバ分離株を用いて、複数の遺伝子座を用いて詳細なタイピングを行った。tRNA-STRを用いた解析は、既に先行研究により、その高解像能と簡便さが確認されている。本年度の研究成果により、国内の赤痢アメーバ分離株が極めて高い遺伝的多様性をもつことを確認した。また、感染の表現型、すなわち"outcome of infection"と相関の見られる特定のtRNA-STR配列型や全tRNA-STRを総合して判断される遺伝子型が同定された。これらのSTR配列型ならびに遺伝子型の病型との相関については、今後症例数を増やしてさらに検討の必要がある。

更に、動物感染モデルを用いて無症候例から分離されたKU27株がインビボで病原性を有さないことを示した。この株のもつそれぞれのtRNA-STR配列型(J1DA, J6AL, J1NK)、ならびに遺伝子型J4は非病原性赤痢アメーバ株のマーカーとして用いることができると期待される。初年度同定された、インビボ病原性の明瞭に異なる分離株は、次年度以降のトランスクリプトーム解析に用いられる。

また、本年度の準備的検討により、本年度作成した*E. histolytica*/*E. invadens* DNAマイクロアレイのプロトタイプデザイン、作製、更にRNA抽出、ハイブリダイゼーション、データ解析等が問題なくできることが確認され、次年度以降の病原性遺伝子の同定への準備は十分に達成された。

E. 結論

初年度の研究は、「方法」と「結果」で詳述した通り、ほぼ研究計画に従って進められ、基礎的な成果を蓄積した。次年度以降の研究計画の遂行により、「病原性因子を網羅的に同定し、病原機構の全体像を解明する」という目標が達成されると期待される。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

- (i) Picazarri, K., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. (2008) Autophagy during proliferation and encystation in the protozoan parasite *Entamoeba invadens*. *Inf. Immun.* 76, 278-288.
- (ii) Sato, D., Yamagata, W., Harada, S., and Nozaki, T. (2008) Kinetic characterization of methionine gamma-lyases from the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica* against physiological substrates and trifluoromethionine, a promising lead compound against amoebiasis. *FEBS J.* 275, 548-560.
- (iii) Sato, D., Karaki, T., Shimizu, A., Kamei, K., Harada, S., and

- Nozaki, T. (2008) Crystallization and preliminary X-ray analysis of L-methionine γ -lyase 1 from *Entamoeba histolytica*. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 64, 697-699, 2008.
- (iv) Hussain, S., Ali, V., Jeelani, G., and Nozaki, T. (2008) Isoform-dependent feedback regulation of serine O-acetyltransferase isoenzymes involved in L-cysteine biosynthesis of *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 163, 39-47.
- (v) Picazarri, K., Nakada-Tsukui, K., Sato, D., and Nozaki, T. (2008) Analysis of autophagy in the enteric protozoan parasite *Entamoeba*. *Methods Enzymol.* 451, 359-371.
- ## 2. 学会発表
- (i) 見市文香、Yousuf Mohammad Abu, 中田-津久井久美子、野崎智義 (2008) 赤痢アメーバ原虫マイトソームの生化学的解析 第77回日本寄生虫学会大会 平成20年4月3-4日, 長崎.
- (ii) 津久井久美子、山田陽子、古川敦、野崎智義 (2008) 赤痢アメーバ新規システインプロテアーゼ受容体候補分子の同定 第77回日本寄生虫学会大会 平成20年4月3-4日, 長崎.
- (iii) 佐藤暖、唐木剛、清水顕、原田繁春、野崎智義 (2008) 赤痢アメーバ原虫含硫アミノ酸分解酵素メチオニンガンマリナーゼの結晶構造解析 第77回日本寄生虫学会大会 平成20年4月3-4日, 長崎.
- (iv) Sato, D., Yamagata, W., Karaki, T., Harada, S., and Nozaki, T. (2008) Kinetic characterization of methionine gamma-lyase from *Entamoeba histolytica* against physiological substrates and trifluoromethionine. The 4th International Conference on Anaerobic Protists: The Systems Biology of Anaerobic Protozoa. 12-16 May, 2008, Taipei, Taiwan.
- (v) Nakada-Tsukui, K. (2008) A FYVE and RhoGEF domain-containing protein involved in phagocytosis of a mammalian cell by *Entamoeba histolytica*. The 4th International Conference on Anaerobic Protists: The Systems Biology of Anaerobic Protozoa. 12-16 May, 2008, Taipei, Taiwan.
- (vi) 清水 顕、唐木 剛、佐藤 暖、亀井加恵子、野崎智義、原田繁春 (2008) 赤痢アメーバ *Entamoeba histolytica* 由来メチオニン γ -リアーゼのX線結晶構造解析 第8回日本蛋白質科学会年会、平成20年2008年6月10日-12日、東京
- (vii) 佐藤 暖、山形 涉、唐木 剛、原田繁春、野崎智義 (2008) 腸管寄生性アメーバ原虫のメチオニン γ -リアーゼと薬剤リード化合物の反応機構の解明 日本ビタミン学会第60回大会 平成20年6月13-14日、仙台

- (viii) Nakada-Tsukui, K. and Nozaki, T. (2008) A FYVE domain and RhoGEF domain-containing protein involved in phagocytosis of a mammalian cell by *Entamoeba histolytica*. 第 60 回細胞生物学会大会 横浜 2008 年 6 月 29 日~7 月 1 日
- (ix) 中野由美子、中野賢太郎、野崎智義 (2008) 原虫におけるメンブレントラフィックの多様性 第 10 回日本進化学会大会、2008 年 8 月 22-24 日、東京
- (x) 見市 文香、野崎智義 (2008) 赤痢アメーバ原虫のミトコンドリア残存オルガネラ mitosome の特殊性~その機能と役割~第 10 回日本進化学会大会、2008 年 8 月 22-24 日、東京
- (xi) Husein, A., Jeelani, G., Bilal, A. S., Sato, D., Mi-ichi, F., Hishiki, T., Gilchrist, C. A., Suematsu, M., Petri, Jr., W. A., and Nozaki, T. (2008) Metabolomic and transcriptomic analysis of sulfur-containing amino acid metabolism in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji, Sept 7-11, 2008.
- (xii) Sato, D., Yamagata, W., Karaki, T., Shimizu, A., Harada, S., and Nozaki, T. (2008) Characterization of methionine gamma-lyases from enteric protozoan parasite, *Entamoeba histolytica*, as a potential drug target against amoebiasis". The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji, Sept 7-11, 2008.
- (xiii) Nozaki, T. (2008) Regulation of cysteine protease secretion and phagocytosis in *Entamoeba histolytica*. XVIIIth International Congress for Tropical Medicine and Malaria (Invited talk in the symposium). Jeju, Korea, Sept 29-Oct 3, 2008.
- (xiv) 佐藤暖、Afzal Husain, 曾我朋義、末松誠、野崎智義 (2008) 寄生性原虫の含硫アミノ酸代謝の重要性—メタボローム解析からのアプローチ 第 3 回メタボロームシンポジウム—メタボロミクスが解き明かす生命のシステム—平成 20 年 10 月 30 日—11 月 1 日.
- (xv) Mi-ichi, F., Abu, Y. M., Nakada-Tsukui, K., Kawai, S., and Nozaki, T. (2008) The mitochondria-related organelle in the anaerobic parasitic protozoan *Entamoeba histolytica*. International Symposium on Protistology: Evolution and Diversity. Tsukuba, Japan, Nov 8-9, 2008
- (xvi) 佐藤 暖、唐木 剛、原田繁春、柴田哲男、融 健、野崎智義:「含硫アミノ酸 分解酵素・メチオニン γ -リアーゼを標的とした新規抗赤痢アメーバ薬の開発」BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会) 平成 20 年 12 月 9-13 日、神戸
- (xvii) Mi-ichi, F., Abu, Y. M.,

Nakada-Tsukui, K., Kawai, S., and Nozaki, T. (2008) The mitochondria-related organelle in the anaerobic protist *Entamoeba histolytica*. International Symposium: Bacteria made organelles made eukaryotic cells. Tokyo, Japan, Nov 29-30, 2008.

(xviii) 唐木剛、清水顕、佐藤暖、亀井加恵子、原田繁春、野崎智義 (2008) 硫黄含有 アミノ酸生合成・分解経路を標的とする抗赤痢アメーバ薬の開発—メチオニンγリアーゼの立体構造と阻害剤の結合様式—第7回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム 松山、平成20年10月10-11日

(xix) Nozaki, T., Furukawa, A., Jeelani, G., Sato, D., Karaki, T., and Harada, S. (2009) Role of sulfur-containing amino acid metabolism: characterization of two isotypes of methionine gamma-lyase in *Entamoeba histolytica*. XVI Seminario Sobre Amibiasis and EMBO Workshop. Amoebiasis: Molecular Approaches in an Important but Neglected Disease. Guanajuato, Mexico.

February 24-28, 2009

(xx) Nakada-Tsukui, K., Furukawa, A., Yamada, Y., and Nozaki, T. (2008) Identification of a putative receptor of the major virulence factor cysteine protease in the enteric protist *Entamoeba histolytica*. XVI Seminario Sobre Amibiasis and EMBO Workshop. Amoebiasis: Molecular Approaches in an Important but Neglected Disease. Guanajuato, Mexico. February 24-28, 2009

(xxi) Picazarri, K., Furukawa, A., Sato, D., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. Autophagy in *E. histolytica*. XVI Seminario Sobre Amibiasis and EMBO Workshop. Amoebiasis: Molecular Approaches in an Important but Neglected Disease. Guanajuato, Mexico. February 24-28, 2009

H. 知的所有権の出願・登録状況

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）
顧みられない病気に関する研究
分担研究報告書
赤痢アメーバ症の感染防御機構の解明

研究分担者 濱野 真二郎 九州大学大学院医学研究院

研究要旨

我々は赤痢アメーバの感染モデル系を確立し同原虫の感染成立機構ならびに同原虫に対する感染防御機構の研究を展開している。これまでの研究から、CBA/J やC3H/HeJ、C3H/HeN など一部の系統では過半数以上のマウスで感染が成立しヒト同様の病理像が認められる一方で、C57BL/6 や BALB/c マウスなど、その他多くの系統のマウスでは原虫が腸管に定着できず感染が成立しないことを見出してきた。また両系統間の差異は主として腸管上皮細胞やムチン・腸内細菌叢などの非骨髄細胞分画の違いに起因することを明らかにしており、その差異を規定する因子に関しては遺伝学的・生化学的なアプローチを続けている。

赤痢アメーバの腸管内定着や上皮細胞への接着・貪食には Gal/GalNAc を認識・結合するレクチンが重要である。本年度は、赤痢アメーバのレクチンのリガンドである Gal/GalNAc の腸上皮での発現に両系統間で差がないことを示した。次いで、150 の染色体マーカーを用いた連鎖解析から、赤痢アメーバの腸管内定着を阻害する因子がマウスの第 1 および 2 染色体上にコードされていることを示した。

本研究では原虫の定着が認められる CBA/J マウスの大腸の病理像に着目した。原虫が定着した大腸を観察すると、肉眼的にも観察できるほどの著しい腸壁の肥厚が認められ、好中球を始めとした顆粒球や単核球の浸潤を伴う激しい炎症が惹起されていることが判明した。顆粒球を生体内から除去するとマウスの感染率が 60% から 90% へ上昇したことより、これら innate immunity は宿主にとって防御的に働くと考えられた。赤痢アメーバの認識がTLRに依存するかどうかを調べる目的で、野生型もしくは MyD88 遺伝子欠損マウスからマクロファージや樹状細胞を単離して赤痢アメーバにて刺激したところ、赤痢アメーバの認識シグナルが MyD88 依存性に伝達されることが判明した。今後は赤痢アメーバの認識に関わる Toll like receptors (TLRs) の同定、ならびに赤痢アメーバの Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) の同定を行っていく予定である。

A. 研究目的

赤痢アメーバ症は発展途上国における小児下痢症の主要原因である。適切なモデル感染系がないために、赤痢アメーバの感染成立機構ならびに腸赤痢アメーバ症に対する感染防御機構の研究は国の内外を問わず大きく立ち後れてきた。我々は赤痢アメーバの感染モデル系を確立し同原虫の感染成立機構ならびに同原虫に対する感染防御機構の研究を展開している。これまでの研究から、1) CBA/J や C3H/HeJ、C3H/HeN など一部の系統のマウスでは感染が成立しヒト同様の病理像が認められる一方で、C57BL/6 や BALB/c マウスなど、その他多くの系統のマウスでは原虫が腸管に定着できず、つまりは感染が成立しないこと (innate resistance) を見出し、2) 骨髄キメラマウスを用いた研究から両系統間の差異は主として非骨髄細胞分画の違いに起因することを明らかにしてきた。この差異はヒトで認められる赤痢アメーバ感受性の個体差を理解する糸口の一つになると考えるに至っており、その差異を規定する因子に関して遺伝学的・生化学的なアプローチを続けている。

本研究では赤痢アメーバが腸管に定着した後に発動する innate immunity から adoptive immunity に至るまでの感染防御機構の全体像を理解することを目的とする。研究の焦点は宿主が認識する赤痢アメーバの PAMP (Pathogen-associated molecular patterns) の同定とその認識・活性化機構の解明、ならびに PAMPs によって活性化するであろう innate immunity が感染防御に果たす役割を個体レベルで明らかにすることにある。

B. 研究方法

Innate resistance に関する生化学的および遺伝学的アプローチ

赤痢アメーバのレクチンを単離しマウス虫垂への結合を観察した。次いで C57BL/6 と CBA/J マウスの F1 において原虫が定着できるかどうかを調べた。F1 ♀ を CBA/J ♂ マウスに戻し交配し 117 匹の N2 マウスを得た。それら N2 マウスに赤痢アメーバを感染させ感染の成否を培養と組織学的に調べた。また、それぞれの N2 マウスの肝臓から DNA を抽出し、Y 染色体を除く 20 本全ての染色体に対して 150 のマーカー (32 のマイクロサテライトと 118 の SNPs) を用いて連鎖解析を行い、原虫の感染不成立という表現系と相関を示す染色体部位を同定した。

赤痢アメーバの PAMPs, 赤痢アメーバ認識に関わる TLRs, および innate immunity の機能解析

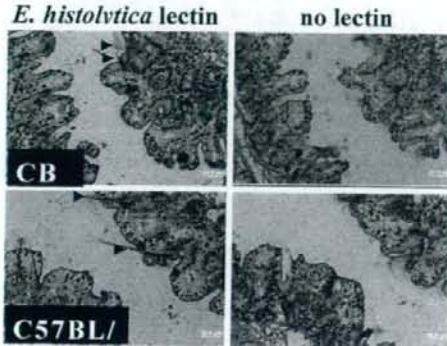
innate immunity の役割を明らかにする目的で、CBA/J マウスへの原虫チャレンジ時に抗顆粒球抗体を投与して、その後の感染率や病態を観察した。次いで野生型もしくは MyD88 欠損マウスに 4% チオグリコレートを腹腔内投与し、投与 3-4 日目に腹腔浸潤マクロファージを単離した。上記、腹腔浸潤マクロファージをホルマリン固定した赤痢アメーバ原虫と共培養して上清中に産生される炎症性サイトカインを ELISA で測定した。また次年度以降の in vivo 研究に備えて、各種遺伝子欠損マウスの CBA/J バックグラウンドへの戻し交配を進めた。

(倫理面への配慮)

実験動物へ与える苦痛が最小限となるように努めた。

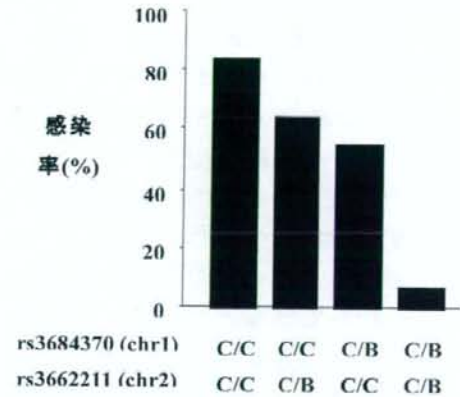
C. 研究結果

赤痢アメーバの腸管内定着や上皮細胞への接着・貪食には Gal/GalNAc を認識・結合するレクチンが重要である。本年度は、赤痢アメーバのレクチンのリガンドである Gal/GalNAc の腸上皮での発現に両系統間で差がないことを示した（下図参照）。



両系統間で腸上皮での Gal/GalNAc の発現に差が認められなかったため、遺伝学的なアプローチを試みた。C57BL/6 と CBA/J マウスの F1 においてチャレンジ感染を試みるところ、F1 では雌雄にかかわらず感染が成立せず、感染不成立の表現型は優性遺伝を示した。さらに F1 ♀ を感染が成立する CBA/J ♂ へ戻し交配して得た 117 匹の N2 マウスでは 31% で感染が成立した（♂42%、♀15%）。前述した遺伝子マーカーを用いた連鎖解析から、腸管内定着を阻害する遺伝子座がマウス第 1 および 2 染色体上にあることが示唆され（Chr1: rs3684370, 16,188,620 bp and Chr1: rs3695988, 30,064,384 bp, 共に $\chi^2=10.39$, $P=0.0006$ 、Chr2: rs3662211, 129,970,691 bp, $\chi^2=7.00$, $P=0.0041$ ）、その有意性は permutation test で確認された。マウス第 1 および 2 染色体上の遺伝子は感染

防御に相乗的に作用することが示唆された（下図参照）。



遺伝学的アプローチによって、1) ある条件下では赤痢アメーバの感染が ♂ においてより成立しやすいこと 2) マウス系統間で見られる赤痢アメーバの感染の成立・不成立の差異が比較的少ない遺伝子によって制御されていることが示唆された。

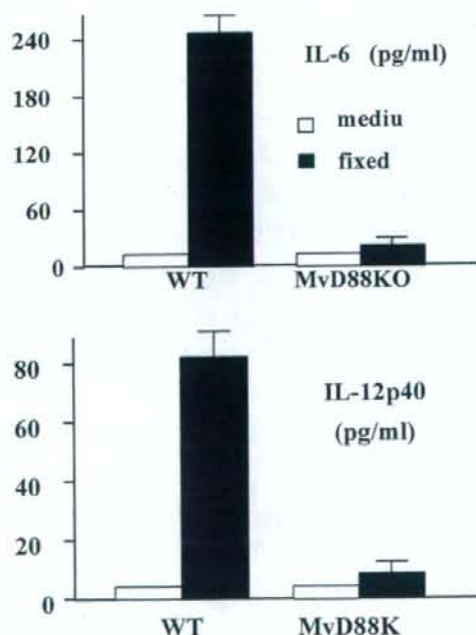
次いで原虫の定着が認められる CBA/J マウスの大腸の病理像に着目した。原虫が定着した大腸を観察すると、肉眼的にも観察できるほどの著しい腸壁の肥厚が認められ、好中球を始めとした顆粒球や単核球の浸潤を伴う激しい炎症が惹起されていることが判明した（下図参照）。



感染不成立

感染成立

顆粒球を生体内から除去するとマウスの感染率が 60% から 90% へ上昇したことより、これら innate immunity は宿主にとって防衛的に働くと考えられた。赤痢アメーバの認識が Toll like receptors (TLRs) に依存するかどうかを調べる目的で、野生型もしくは MyD88 遺伝子欠損マウスからマクロファージや樹状細胞を単離してホルマリンで固定した赤痢アメーバにて刺激した。固定赤痢アメーバと共培養すると、野生型腹腔マクロファージで認められる炎症性サイトカインの産生が MyD88 遺伝子欠損マウス由来の腹腔マクロファージでは著明に低下した。以上の実験より赤痢アメーバの認識シグナルが MyD88 依存性に伝達されることが判明した (下図参照)。



D. 考察

細胞外寄生性原虫である赤痢アメーバの認識には MyD88 依存性のシグナルが重要であることが明らかとなった。MyD88 の上流では TLRs が機能していることが予測される。次年度以降は、1) 認識される赤痢アメーバの PAMPs と TLRs の同定、ならびに 2) そのシグナルが赤痢アメーバに対する感染防御に果たす役割を明らかにする。

E. 結論

赤痢アメーバの膜表面分子は免疫系に認識され、そのシグナルは MyD88 依存性に伝達される。今後は赤痢アメーバの認識に関わる TLRs の同定、ならびに赤痢アメーバの PAMPs の同定を行っていく予定である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Hamano, S., Becker, S., Asgharpour, A., Ocasio, Y.P.R., Stroup, S.E., McDuffie, M., Houpt, E.: Gender and genetic control of resistance to intestinal amebiasis in inbred mice. *Genes Immun.* 2008; 9:452-61.
- ② Tetsutani, K., Ishiwata, K., Torii, M., Hamano, S., Hisaeda, H., Himeno, K.: Concurrent infection with *Heligmosomoides bakeri* modulates murine host response against *Plasmodium berghei* ANKA infection. *Am J Trop Med Hyg.* 2008; 79: 819-822.

- ③ Hisaeda, H., Tetsutani, K., Imai, T., Moriya, C., Tu, L., Hamano, S., Duan, X., Chou, B., Ishida, H., Aramaki, A., Shen, J., Ishii, K.J., Coban, C., Akira, S., Takeda, K., Yasutomo, K., Torii, M., Himeno, K.: Malaria parasites require TLR9 signaling for immune evasion by activating regulatory T cells. **J. Immunol.** 2008; 180: 2496-2503
- ④ Furuno, K., Ikeda, K., Hamano, S., Fukuyama, K., Sonoda, M., Hara, T., Sasazuki, T., Yamamoto, K.: Onecut transcription factor OC2 is a direct target of T-bet in type-1 T-helper cells. **Genes Immun.** 2008; 9: 302-308.

2. 教科書、一般書執筆

- ① Hamano, S. and William A. Petri Jr.: Amoebiasis in **“International Encyclopedia of Public Health”** Academic Press, San Diego, 2008, Vol. 5, 335-341.
- ② 濱野真二郎、寄生虫による病気 in 家庭の医学 第6版、2008、1523-1535.

3. 学会発表

- ① 第77回日本寄生虫学会
 ② 病原体のトロピズム決定機構研究会
 ③ 第8回あわじしま感染症免疫フォーラム
 ④ 第17回国際熱帯医学マラリア会議
 ⑤ 第38回日本免疫学会
 ⑥ 第2回原虫感染免疫研究会

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