

なかった。以上のことから、CPBF1 は EhCP-A5 のリソソームへの輸送とプロセッシングに不可欠であることが示された (データ示さず)。

D. 考察

システインプロテアーゼの病原性における役割は様々な形で示されている。システインプロテアーゼの特異的な阻害剤である E64 は哺乳動物細胞に対する赤痢アメーバの傷害性を消失させると同時に、動物感染において肝膿瘍の形成を完全に阻害する。ゲノム中に 50 以上存在するシステインプロテアーゼのうち、EhCP-A5 は、非病原性の *Entamoeba dispar* に存在しないこと、抑制により組織傷害等の傷害性が消失することから、赤痢アメーバの哺乳動物における病原性において中心的な役割を果たすと考えられてきた。

本研究では EhCP-A5 の輸送を制御する分子を同定することを目的として、生化学的手法により、EhCP-A5 の輸送体を同定することに成功した。CPBF1 はゲノム中に 10 を超える遺伝子よりなる遺伝子ファミリーを形成することから、Cysteine protease binding family と名付けられたが、CPBF と相似を示すタンパク質群は他の原核・真核生物に見付かっておらず、その由来は謎に包まれている。更にそれぞれの CPBF の機能的特性 (棲み分け) の解明も今後の重要な課題となる。

CPBF1 は EhCP-A5 のリソソームへの輸送とプロテアーゼのプロドメインの切断と活性化に不可欠であることが antisense small RNA を用いた gene silence 法により示された。一方、正常に

リソソームに輸送されなかった EhCP-A5 は以上分泌され細胞外で活性化型として検出されており、分泌の制御が失われていると考えられる。赤痢アメーバは組織侵入や哺乳動物との接触において EhCP-A5 の分泌を上方制御していると予測されるが、その制御の不能はインビボにおいて感染・組織侵入過程に問題を生むと予測される。

本研究のもうひとつの目的である細胞分化の研究に関してもいくつか進展があった。まず、嚢子化 (encystation) において発現制御を受ける遺伝子の機能を明らかにするために、*Entamoeba invadens* の形質転換系をほぼ確立した。更に、嚢子化過程における重要な代謝産物と遺伝子を同定しつつある。これらについては次年度の研究報告において詳細に記述する。

E. 結論

本研究成果は、mannose 6-phosphate 受容体と Sortillin 以外で初めて発見されたシステインプロテアーゼの輸送体の発見であり、生物学的にも進化学的にも高い意義をもつ。赤痢アメーバに選択的に存在する、しかも病原性において中心的な役割を果たす分子であり、今後その新規薬剤等標的としての解析が必要である。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文

Husain, A., Jeelani, G., Sato, D., and

- Nozaki, T. Global Analysis of gene expression in response to L-cysteine deprivation in the anaerobic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *BMC Genomics* 12, 275, 2011.
- Penuliar, G. M., Furukawa, A., Sato, D., and Nozaki, T. Mechanism of trifluoromethionine resistance in *Entamoeba histolytica*. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 2045-2052, 2011.
- Mi-ichi, F., Makiuchi, T., Furukawa, A., Sato, D., and Nozaki, T. Sulfate activation in mitochondria plays a crucial role in the proliferation of *Entamoeba histolytica*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e1263, 2011.
- Watanabe, K., Gatanaga, H., de Cadiz, A.E., Tanuma, J., Nozaki, T., Oka, S. Amebiasis in HIV-1-Infected Japanese Men: Clinical Features and Response to Therapy. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5:e1318, 2011.
- Penuliar, G. M., Furukawa, A., Nakada-Tsukui, K., Husain, A., Sato, D., and Nozaki, T. Transcriptional and functional analysis of trifluoromethionine resistance in *Entamoeba histolytica*. *J. Antimicrob. Chemother.* 67(2):375-386, 2012.
- Furukawa, A., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. Novel transmembrane receptor involved in phagosome transport of lysozymes and β -hexosaminidase in the enteric protozoan *Entamoeba histolytica*. *PLoS Pathogens* 8(2): e1002539. doi:10.1371/journal.ppat.1002539. 2012.
2. 学会報告
- Nozaki, T. A novel class of hydrolase receptors involved in the lysosomal trafficking of virulence factors in *Entamoeba histolytica*. The Second Cross-Straits and Asia Pacific International Conference on Parasites, August 31-September 2, 2011, Tainan, Taiwan. (Invited lecture)
- Nozaki, T. A novel import machinery of the highly divergent mitochondrion-related organelle from the anaerobic parasitic protist *Entamoeba histolytica*. International Union of Microbiological Societies. September 8-10, 2011, Sapporo, Japan. (Symposist and Convenor)
- Nozaki, T. Function and transport of the highly divergent mitochondrion-related organelle from the anaerobic parasitic protist *Entamoeba histolytica*. The 1st Asian Conference of Parasitology, October 3-6, 2011, Jeju, Korea (Plenary Lecture)
- Nozaki, T., Nakada-Tsukui, K., and Furukawa, A. A novel class of hydrolase receptors involved in the

- lysosomal trafficking of virulence factors in *Entamoeba histolytica*. The 1st Asian Conference of Prosistology, October 3-6, 2011, Jeju, Korea (Workshop).
- Nozaki, T. Protozoan metabolism and drug development: discovery and targeting a novel pathway in the enteric parasite. Singapore-Japan Joint Forum on Emerging Concepts in Microbiology. November 15-16, 2011, Singapore.
- Nozaki, T. A novel class of hydrolase receptors involved in the lysosomal trafficking of virulence factors in *Entamoeba histolytica*. Joint International Tropical Medicine Meeting, December 1-2, 2011, Bangkok, Thailand.
- Nozaki, T. Divergent evolution of mitochondrion-related organelles under anaerobic conditions: Function and transport of mitosomes in *Entamoeba histolytica*. The 33rd Japanese Society of Molecular Biology, December 13-16, 2011, Yokohama.
- Nozaki, T. Evolutionary divergence of function and import of the mitochondria. JST Vinnova Japan-Sweden Joint Workshop, Multidisciplinary BIO, January 25, 2012, Tokyo.
- Nozaki, T. Metabolism and metabolomics in *Entamoeba histolytica*. EMBO Global Lecture Course and Symposium on 'Amoebasis: Exploring the Biology and the Pathogenesis of *Entamoeba*' March 2-3, 2012, Delhi, India. (Invited lecture)
- Nozaki, T. Metabolism, drug resistance, vesicular trafficking, virulence, and mitochondria evolution in *Entamoeba histolytica*. EMBO Global Lecture Course and Symposium on 'Amoebasis: Exploring the Biology and the Pathogenesis of *Entamoeba*' March 4-7, 2012, Khajuraho, India. (Plenary Lecture)
- Nakada-Tsukui, K., Furukawa, A., Tsuboi, K., Yamada, Y., and Nozaki, T. A novel class of cysteine protease receptors that mediate lysosomal transport in *Entamoeba histolytica*. EMBO Global Lecture Course and Symposium on 'Amoebasis: Exploring the Biology and the Pathogenesis of *Entamoeba*' March 4-7, 2012, Khajuraho, India.
- Nakada-Tsukui, K., Furukawa, A., Tsuboi, K., Yamada, Y., and Nozaki, T. A novel class of cysteine protease receptors that mediate lysosomal transport in *Entamoeba histolytica*. EMBO Global Lecture Course and Symposium on 'Amoebasis: Exploring the Biology and the Pathogenesis of *Entamoeba*' March 4-7, 2012, Khajuraho, India.
- Mase, N., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. Establishment of a transfection system for *Entamoeba invadens*. EMBO

Global Lecture Course and Symposium
on 'Amoebasis: Exploring the
Biology and the Pathogenesis of
Entamoeba' March 4-7, 2012,
Khajuraho, India.

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
分担研究報告書

腸管原虫の分子疫学調査に関する研究

研究分担者：渡辺恒二 国立国際医療研究センターエイズ治療研究開発センター

研究要旨：HIV 感染者において、赤痢アメーバ症が性感染症として拡大、症例数の増加が報告されているが、ジアルジア症やクリプトスポリジウム症など他の腸管寄生性原虫症については、実態が明らかにされていない。本研究では、HIV 感染患者におけるこれらの腸管原虫症の感染実態を明らかにして、臨床病態や疫学上の問題を解決する方策を検討する。

A. 研究目的

従来、腸管原虫症は上下水道の完備されていない地域（主に発展途上国）で糞便中に含まれるシストやオーシストに汚染された飲料水や食料を摂取することで感染する輸入感染症と考えられていた。しかし、代表的な腸管原虫症である赤痢アメーバ症の報告数が 2000 年以後急増し、性行為による感染拡大であることが分かってきた。また、同じく性感染症である HIV 感染との合併症例が増えていることも本分担研究者らの報告により明らかにされている。しかし、赤痢アメーバ以外の腸管原虫症については、現状がいまだに明らかにされていない。本研究では、赤痢アメーバ症以外の腸管原虫症について、HIV 感染者における感染実態の疫学を明らかにし、問題点の解決を検討する。

B. 研究方法

1 年目である今年、2000 年以後に当院で診断された HIV 感染合併の腸管原虫症について、診療録を用いた後方視的検討を行い、臨床的な問題点（主に診断方法と感度につ

いて）を明らかにする。2 年目以降は、1 年目の結果に基づき感度の高いスクリーニング方法を用いた感染実態の把握に努める。3 年目に、得られた検体の分子疫学的検討を行い、結果をまとめる。

（倫理面への配慮）

以上の研究は、すでに院内の倫理委員会の承認を得ており、分子疫学的研究については被験者の文書による同意を得た後に行う。

C. 研究結果

2001 年～2010 年まで当院に通院歴のある HIV 感染者で、腸管原虫症と診断された症例は、ジアルジア症 4 例、クリプトスポリジウム症 11 例のみであった。これは、同じ時期に診断された赤痢アメーバ症と比較して極めて少ない症例数であった。（図 1）
上記 15 症例の臨床的特徴を調べたところ、ジアルジア 4 症例のうち、1 症例は無症状で便検査で偶然見つかった症例であり、残りの 3 症例も定期受診の際に腹部違和感や慢性下痢症の症状を訴え便検査を行った際に診断されていた。院内で行う保険診療での検査（直接顕鏡検査）では、4 例中 1 例

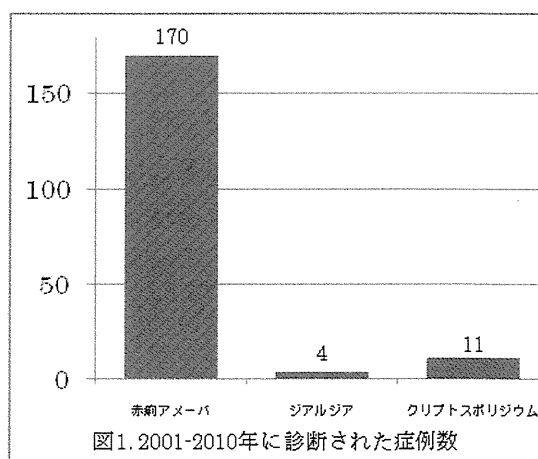
が見逃され、1例は主治医判断により感染症研究所に検体検査依頼を行い、蛍光抗体法およびPCR法で診断された症例であった。(table 1a) 治療は、全例でメトロニダゾール投与され、速やかな症状の改善と便中からの原虫除去に成功していた。

一方、クリプトスポリジウム症11例は、9症例(81.8%)で1日10回以上の激しい下痢症状を認めて受診していた。また、9症例はHIV感染に対する治療前の患者で、クリプトスポリジウム症診断後には、全例で抗HIV療法が導入(または継続)された。約半数の6症例では、抗HIV療法と対症療法で症状の改善を認め、5症例ではニタゾキサニドやアジスロマイシンなどによる治療も併用されていたが、抗HIV療法のみで症例と比較して有意な効果は得られていなかった。また、院内で行う直接顕鏡検査では、11例中5例が見逃され、5例は感染症研究所の蛍光抗体法およびPCR法で診断された。(table 1b)

以上の結果から、ジアルジア症は症状が軽微なために見逃されやすく、HIV感染者の場合には、抗HIV薬の副作用として高頻度に慢性下痢症が見られることから、ジアルジア症による腸炎が見逃されやすく、さらに一般検査室での見逃しがあることが考えられた。また、クリプトスポリジウム下痢症は、抗HIV療法を行っていない症例では激しい下痢症状を来すものの、抗HIV療法を行っている患者での症状は今回の検討では明確にはならなかったものの、症状は軽微である可能性があり、抗HIV療法を容易に導入できるようになった今日の診療においては、症例が見逃されている可能性が高いと考えられた。また、クリプトスポリジ

ウム下痢症を直接顕鏡検査のみで見つけることが困難であることが今回の検討からも示唆されており、検査室での見逃しも多数起っていることが予想される。

以上の結果を受けて、腸管原虫の感染症学を把握するためには、積極的な検体収集かつ感度の高い検査法の導入が必要と考えられた。その方法として、第1に、何らかの理由で大腸内視鏡検査を行ったHIV感染者からの回盲部洗浄液を採取し、腸管アメーバ(*Entamoeba histolytica, disper, moshkovskii*)、ジアルジア、クリプトスポリジウムのPCRを実施する。これにより、腸管に慢性的に感染する原虫症をスクリーニングする。このスクリーニングの結果で陽性率が高い場合には採取された核酸から遺伝子型同定を行う予定とする。第2に、一般検査室での検査に、クリプトスポリジウムとジアルジアの抗原検出IC法の簡易キットを導入し、直接顕鏡法と併せて検査を行うことで検査感度を上げ、見逃しを減らし、これまで見逃されていた原虫症が実際にどの程度あるのかを検討する予定である。



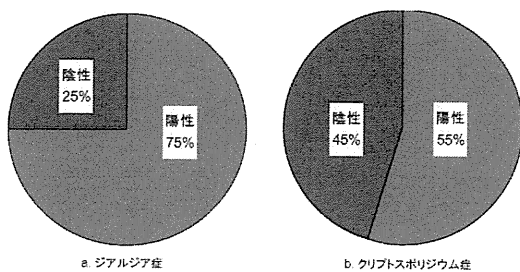


表1 直接顕微鏡法の陽性率(陰性症例は、蛍光抗体法で陽性を確認)

D. 健康危険情報

E. 研究発表

なし

F. 知的財産権の出願・登録状況

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

赤痢アメーバの感染機構の研究

研究分担者 濱野 真二郎 長崎大学・熱帯医学研究所

研究要旨

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。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、病原性発現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。

昨年度までの研究から、病原性が未確定の *E. moshkovskii* は、病原性 *E. histolytica* と同様 CBA/J や C3H/HeN、C3H/HeJ マウスの腸管に定着できることが明らかとなった。また、上記マウスにおいて *E. histolytica* は中程度の炎症を惹起して慢性感染に移行した。一方、*E. moshkovskii* は下痢症状に加えて典型的なイチゴゼリー状の粘血便を引き起こすなど激しい炎症を惹起するに止まらず、感染 8-12 日目をピークに有意な体重減少を引き起こし、およそ 2 週間で腸管から排除された。一方、非病原性アメーバ *E. dispar* は上記マウスの腸管に定着できなかった。

上記結果を踏まえて、本年度は、ヒト寄生性アメーバのマウス腸管定着後の感染の遷延・排除のメカニズムの解明を試みた。まず、脾臓と腸間膜リンパ節において代表的な Th1 および Th2 サイトカインの産生細胞の動態を調べた。脾臓においても腸間膜リンパ節においても、本刺激では、*E. histolytica* および *E. moshkovskii* 感染経過中に、IFN- γ ならびに IL-4 産生細胞を検出することはできなかった。次いでパイエル板で調べたところ、*E. moshkovskii* が腸管から排除される感染2週後まで、IFN- γ 産生 CD4 陽性細胞の誘導は顕著ではなく、両群間で有意な差は認められなかった。一方、IFN- γ 産生 CD8 陽性細胞は *E. moshkovskii* 感染で著明に増加した。誘導されてくる IFN- γ の役割を解明するために、感染1日前、当日、感染5日後に、IFN- γ に対する中和抗体を投与して、感染ならびに病態を観察したところ、IFN- γ を中和することにより、*E. moshkovskii* 感染が遷延し、一方で体重減少に代表される病態の緩和が観察された。本研究より、IFN- γ が原虫排除に機能すると共に、*E. moshkovskii* 感染で認められる病態に深く関与することが示唆された。

A. 研究目的

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、病原性発現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。

昨年度までの研究から、1)病原性が未確定の *E. moshkovskii* は病原性 *E. histolytica* と同様 CBA/J や C3H/HeN、C3H/HeJ マウスの腸管に定着できることが明らかとなった。また、上記マウスにおいて *E. histolytica* は中程度の炎症を惹起して慢性感染に移行した。また、2) *E. moshkovskii* は下痢症状に加えて典型的なイチゴゼリー状の粘血便を引き起こすなど激しい炎症を惹起するに止まらず、感染 8-12 日目をピークに有意な体重減少を引き起こし、およそチャレンジ 2 週間で腸管から排除されることが判明した。また、非病原性アメーバ *E. dispar* は上記いずれのマウスの腸管にも定着できなかった。

本年度は上記結果を踏まえて、ヒト寄生性アメーバのマウス腸管定着後の感染の遷延・排除のメカニズムの解明を試みた。

B. 研究方法

まず上述3種のアメーバの近交系マウス

腸管への定着能を調べた。基本的なデータは昨年度報告済みであるが、本年度はBALB/c、C3H/HeJ、C3H/HeN マウスなどにおける *E. dispar* の腸管定着に関し調べた。

次いで、CBA/J マウスの虫垂に *E. histolytica* および *E. moshkovskii* 栄養体を接種し、各免疫臓器において Th1 ならびに Th2 サイトカイン産生細胞の経時的変化をモニタした。刺激に際しては、CD3 ならびに CD28 に対するモノクローナル抗体を使用し、プレフェルディン存在下でゴルジ輸送を阻害し、細胞内サイトカインならびに免疫細胞表面抗原染色を行い、フローサイトメトリーによって解析した。

さらに、*E. histolytica* ならびに *E. moshkovskii* の感染経過中に顕著な違いが見られたサイトカインに対する中和抗体を投与して、感染ならびに病態の変化を観察した。

(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

BALB/c、C3H/HeJ、C3H/HeN マウスなどにおける *E. dispar* の腸管定着に関し調べたところ、

	<i>E. histolytica</i>	<i>E. moshkovskii</i>	<i>E. dispar</i>	
BALB/c	1/15 (0%)	0/10 (0%)	0/10 (0%)	n.s.
C57BL/6	2/20 (0%)	1/18 (6%)	0/15 (0%)	n.s.
C3H/HeJ	8/15 (53%)	4/10 (40%)	0/10 (0%)	p<0.05
C3H/HeN	7/15 (47%)	6/10 (60%)	0/10 (0%)	p<0.05
CBA/J	61/90 (68%)	51/75 (68%)	0/20 (0%)	p<1x10 ⁻⁷

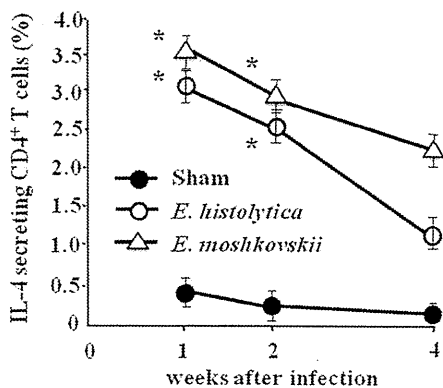
The infection was examined on day 7 after challenge.

上に示すように、非病原性アメーバ *E. dispar* は実験に使用したいずれのマウスの腸管にも定着できないことが判明した。

次いで、CBA/J マウスの虫垂に病原性 *E. histolytica* および *E. moshkovskii* 栄養体を接種し、各免疫臓器においてTh1ならびにTh2サイトカイン産生細胞の経時的変化をモニタした。

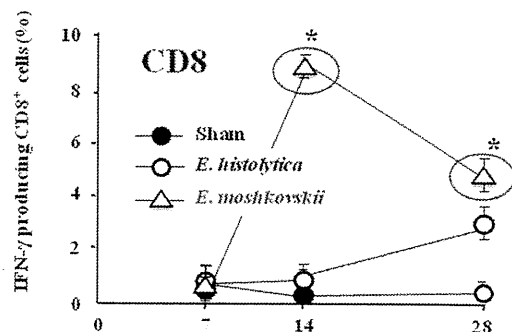
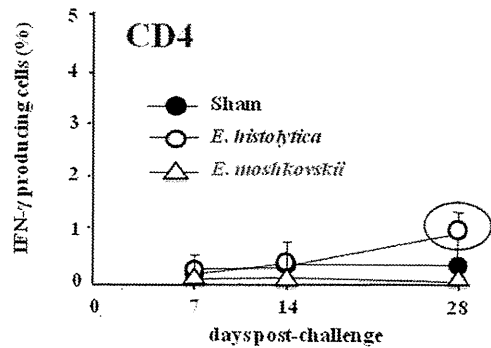
まず、脾臓と腸間膜リンパ節において代表的な Th1 および Th2 サイトカインの産生細胞の動態を調べたが、脾臓においても腸間膜リンパ節においても、本刺激では、*E. histolytica* および *E. moshkovskii* 感染経過中に、IFN- γ ならびに IL-4 産生細胞を検出することはできなかった。

次いでパイエル板で調べたところ、



上に示すように、感染1週後には IL-4産生細胞を検出することが出来たが、慢性感染に至る *E. histolytica* とチャレンジ2週目までに原虫が排除される *E. moshkovskii* 感染の間で有意な差は認められなかった。

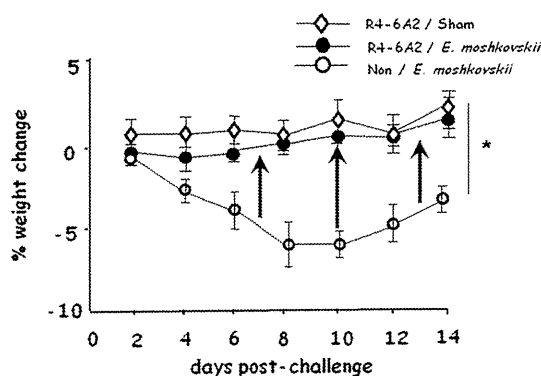
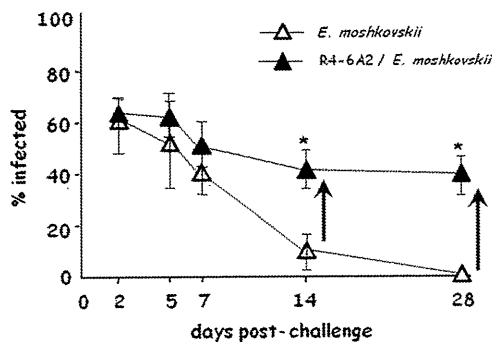
次いで、代表的な Th1 サイトカインである IFN- γ の動態をパイエル板で調べてみた。



すると、*E. moshkovskii* が腸管から排除される感染2週後まで、IFN- γ 産生 CD4 陽性細胞の誘導は顕著ではなく、両群間で有意な差は認められなかった。一方、IFN- γ 産生 CD8 陽性細胞は *E. moshkovskii* 感染で著明に増加した。

ここで誘導される IFN- γ の役割を解明するために、感染1日前、当日、感染5日後に、IFN- γ に対する中和抗体を投与して、感染ならびに病態の変化を観察した。

以下がその結果である。IFN- γ を中和することにより、感染が遷延し、一方で体重減少に代表される感染病態の緩和が観察された。



D. 考察

昨年度までの研究より *E. moshkovskii* が潜在的に病原性を有しており、少なくともマウスにおいては病原性 *E. histolytica* と同様の宿主域を示し、下痢と体重減少を主体とした臨床症状を引き起こすことが判明し、さらに、*E. histolytica* と *E. moshkovskii* がマウス腸管において全く異なる感染動態を示すことが明らかとなった。一旦感染が成立した後、*E. histolytica* は慢性持続性感染に移行するが、*E. moshkovskii* は感染14日目までに排除された。この現象は一義的には *Entamoeba* spp. の違いによるものであり、非病原性アメーバ *E. dispar* も加えた病原性因子の探索に道を拓くものである。一方、宿主サイドから見ると、CBA/J マウスにおける *E. histolytica* 感染はアメーバが持続感染する系を、*E. moshkovskii* 感染はアメーバが排除される典型的な系を提供す

るものであり、赤痢アメーバに対する感染防御機構を研究する上、非常に有用な研究基盤をなす知見である。

本研究では両系を用いて、代表的なサイトカイン産生細胞の動態をモニタし、*E. moshkovskii* 感染系において IFN- γ 産生細胞が有意に増加することが解明された。さらに、IFN- γ に対する中和抗体を投与する実験を通して、IFN- γ が原虫排除に機能すると共に、*E. moshkovskii* 感染で認められる病態に深く関与することが示唆された。

昨年までの研究で、*E. histolytica* ならびに *E. moshkovskii* の表面に存在するPAMPs は共に免疫系に認識され、そのシグナルは MyD88 依存性に伝達されるものの、炎症性サイトカインの産生パターンの違いから、両種の PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) の構成が異なることが示唆されている。一方、非病原性 *E. dispar* には炎症性サイトカインの産生誘導能がなく、これら PAMPs による免疫応答の誘導が、原虫の腸管内定着や病原性ならびに感染防御とどのような関係にあるのかを明らかにしていく必要がある。

E. 結論

IFN-g が原虫排除に機能すると共に、*E. moshkovskii* 感染で認められる病態に深く関与することが示唆された。

G. 研究発表

論文発表

1. Shimokawa, C., Kabir, M., Taniuchi, M., Mondal, D., Kobayashi, S., **Ali, I.K.**, Sobuz, S., Senba, M., Houpt, E., Haque, R., Petri, W.A., Hamano, S.: *Entamoeba moshkovskii* is associated with diarrhea in infants and causes diarrhea and colitis in mice. **J. Infect. Dis.** in press
2. Matsuzaki, C.M., Tu, L., Ishida, H., Imai, T., Suzue, K., Hirai, M., Tetsutani, K., Hamano, S., Shimokawa, C., Hisaeda, H.: A critical role for phagocytosis in resistance to malaria in iron-deficient mice. **Eur. J. Immunol.** 2011; 41(5):1365-75.
3. Nakaya, M., Hamano, S., Yoshida, H., Yoshimura, A., Kobayashi, T.: Aberrant IL-4 production by SOCS3-overexpressing T cells during infection with *Leishmania major* exacerbates disease manifestations. **Int. Immunol.** 2011; 23(3): 195-202.

教科書、一般書執筆

1. 原田倫世、濱野真二郎: アメーバ赤痢やクリプトスポリジウム症の現状と最新の知見、**化学療法の領域** 2011; 27(4): 72-79.
2. 下川周子・濱野真二郎: ジアルジア症、自由生活性アメーバ症、赤痢アメーバ症、**感染症事典**、481-494.
3. 濱野真二郎: トキソプラズマ症、リーシュ

マニア症、**感染症事典**、495-497、510-512.

4. 濱野真二郎: アニサキス症、疥癬症、蟻虫症、日本海裂頭条虫症、**感染症事典**、514-515、519、526-527、547-548.

学会発表

1. 第48回日本アフリカ学会学術大会、弘前、2011年5月、シンポジウム『もし眠り病の特効薬ができたなら -病気への学際的アプローチ-』、濱野真二郎、「熱帯感染症の克服を目指して～眠り病からのアプローチ」
2. 第5回蠕虫研究会、宮崎、2011年7月、安達圭志、濱野真二郎、マンソン住血吸虫感染時に肝臓内で誘導される免疫反応についての解析
3. 第80回日本寄生虫学会大会、東京、2011年7月、Chikako Shimokawa, Seiki Kobayashi, Masachika Senba, Eric Houpt, William A Petri Jr., Rashidul Haque, Shinjiro Hamano: Pathogenicity of *Entamoeba moshkovskii* in human and mice.
4. 第80回日本寄生虫学会大会、東京、2011年7月、Kentaro Kato, Shinjiro Hamano: A comparative study on glycosylation patterns of mucus glycoprotein between CBA and C57BL/6 mice.
5. 第52回日本熱帯医学会、東京、2011年11月、ミニシンポジウム『熱帯医学からの発信』、濱野真二郎、「病原性アメーバの再発見: -フィールド・ラボ双方向からのアプローチ」
6. 第40回日本免疫学会学術集会、幕張、2011年11月、Chikako Shimokawa, ,

- Shinjiro Hamano: IFN- γ -mediated protection against *Entamoeba moshkovskii* infection.
7. 第40回日本免疫学会学術集会、幕張、2011年11月、Keishi Adachi, Shinjiro Hamano: Analysis of the unique immunological reactions in the liver after *Schistosoma mansoni* infection in mice.
 8. The 60th annual meeting of American society of tropical medicine and hygiene、Philadelphia、2011年12月、Chikako Shimokawa, Mamum Kabir, Mami Taniuchi, Dinesh Mondal, Seiki Kobayashi, Ibne Karim M. Ali, Masachika Senba, Eric Hoput, Haque Rashidul, William A. Petri Jr., Shinjiro Hamano: *Entamoeba moshkovskii* is pathogenic and causes intestinal symptoms.
 9. 第5回 寄生虫感染免疫研究会、大阪、2012年3月、Shinjiro Hamano, Chikako Shimokawa: *Entamoeba moshkovskii* is associated with diarrhea in infants and causes diarrhea and colitis in mice.
 10. 第5回 寄生虫感染免疫研究会、大阪、2012年3月、Chikako Shimokawa, , Shinjiro Hamano: Double-edged effects of IFN- γ in mice infected with *Entamoeba moshkovskii*.
 11. 第5回 寄生虫感染免疫研究会、大阪、2012年3月、Keishi Adachi, Shinjiro Hamano: *Schistosoma mansoni* infection induces the unique T cell populations in the livers of mice
 12. 第81回 日本寄生虫学会総会、神戸、2012年3月、Chikako Shimokawa, Mamum Kabir, Mami Taniuchi, Dinesh Mondal, Seiki Kobayashi, Ibne Karim M. Ali, Masachika Senba, Eric Hoput, Haque Rashidul, William A. Petri Jr., Shinjiro Hamano: *Entamoeba moshkovskii* is associated with diarrhea in infants and causes diarrhea and colitis in mice.
 13. 第81回 日本寄生虫学会総会、神戸、2012年3月、Chikako Shimokawa, , Shinjiro Hamano: Double-edged effects of IFN- γ in mice infected with *Entamoeba moshkovskii*.
 14. 第81回 日本寄生虫学会総会、大阪、2012年3月、Keishi Adachi, Shinjiro Hamano: *Schistosoma mansoni* infection induces the unique T cell populations in the livers of mice.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

分子疫学を中心としたアcantアメーバ角膜炎の実態に関する調査研究

研究分担者 井上 幸次 鳥取大学医学部 視覚病態学

研究協力者 八木田 健司 国立感染症研究所 寄生動物部

研究協力者 鈴木 崇 愛媛大学医学系研究科 視機能外科学

研究要旨：引き続きアcantアメーバ角膜炎の分離株収集に基づくモニタリング調査を行い、わが国のアcantアメーバ角膜炎の起因アメーバについて分子疫学的に解析した。本年度に追加された分離株はすべて T4 という遺伝子タイプに分類された。ATCC50497 (Rowdon strain) の割合が高く、これが国内優勢株である可能性が示唆された。

アcantアメーバ角膜炎におけるアcantアメーバの DNA コピー数と病態や予後との関係について解析した。その結果、初診察時のコピー数が視力や病期(重症度)と関連していた。また経過に伴いコピー数が低下しない症例では視力予後が悪かった。細菌数は予後や初診時の視力や病期とは関連しなかった。

呼吸活性を CTC 染色で測定することによりアcantアメーバの薬剤感受性を測定する方法を開発した。

A. 研究目的

アcantアメーバ角膜炎 (AK) は環境中の自由生活性のアcantアメーバによる角膜感染症で稀な症例として知られていたが、最近、コンタクトレンズ (CL) 使用者による感染が増加しているという実態が示されてきたことから、分子生物学的にその実態を調査し、増加要因を微生物学的に解明することを目的とした。

また、AKの病態解析とアメーバ感受性の新しい測定法の開発も行った。

B. 研究方法

1) 全国17施設を拠点として、AK由来株のDNA

についてBLAST検索による既存アメーバとの相同性を調べ、Tタイピングによる分類を行う。

2) AK患者の角膜擦過物に含まれるアメーバと細菌のDNAコピー数と初診時視力・病期・視力予後との関係を統計学的に解析する。

3) アcantアメーバの生死をCTC (5-cyano-2,3-ditolyl-tetrazolium chloride) formazanにて染色することで呼吸活性の有無で検出し、薬剤感受性を測定する方法を開発する。

(倫理面への配慮)

レトロスペクティブな調査として行うために、この研究による患者に対する不利益は生じない。また、患者の個人情報については連結匿名化し、

外部に情報が伝わらないよう、厳重に保護される。

C. 研究結果

1) 分子疫学調査 (表-1)

・従来9施設であった協力施設を17施設に拡大した。平成23年度の集計として、新たに5施設からの25株が解析された(角膜分離が21株、環境由来株が4株)。今年度、東北や中部地方の由来株が新たに追加された。遺伝子型はすべてT4タイプであったが、ATCC50497(Rowdon strain)と一致した株が7株(33.3%)と多かった。

ATCC50497(Rowdon strain)については22年度までの解析でもある程度検出されたが、今年度も多数認められたことから、わが国のAKにおいて優勢株である可能性が示唆された。

2) AK患者の角膜擦過物のアメーバコピー数は初診時の視力や病期と関連していたが、細菌のコピー数には関連は認められなかった。Logistic regression analysisにて視力予後不良と関連する因子として初診時アメーバコピー数と初診時病期が、治療によるコピー数減少不良と関連する因子として初診時病期が有意と判定された。

AKの病態を検討する上で real-time PCR を用いてアメーバ及び細菌のコピー数を調べたが、統計学的には細菌の関与を示すデータは得られなかった。しかし、アcantアメーバが角膜のような所で感染を確立するにあたっては、それに先んじて細菌の感染が多少とも起こっており、その細菌を餌にして、アメーバが増加してAKになるのではないかという機序を疑わせる症例も中にはあり、また、形を変えて今後検討する必要がある。

また、アメーバのコピー数が初診時の視力や病期(重症度)と関連するという当たり前の結果が統計学的に出たが、個々の症例では少ないコピー数であるにもかかわらず、角膜混濁が強く、視力が悪い症例があり、そのような症例では免疫反応が病態の主体を成していると思われる。

3) 生きているアメーバでは呼吸活性があるので、それによってCTCが蛍光性のCTC formazanに還元された。これを蛍光マイクロプレートリーダーで蛍光強度を測定することによって、アメーバの生死を判別でき、そのことによって従来よりも短時間でアメーバに対する薬剤感受性を測定することができた。

新しい感受性検査の方法を開発したことにより、今後分子疫学をおこなった株について感受性検査をおこない、その相関を検討していくことができる。

D. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

E. 研究発表

1. 論文発表

研究成果の刊行に関する一覧表参照

2. 学会発表

井上幸次,八木田健司,野崎智義 ほか: わが国のアcantアメーバ角膜炎関連分離株の分子疫学多施設調査. 第48回日本眼感染症学会, 京都, 2011/7/8-7/10

F. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表-1. AK関連分離株の18SrRNA 遺伝子タイピングの結果 (23年度追加分)

試料 ID	試料	T type	BLAST
1-10-1	角膜	T4	ATCC 50374 <i>A. castellanii</i> Castellani strain (100%)
2-1-1	角膜	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. KA/E6 (99%)
7-6-1	角膜	T4	ATCC50497 <i>Acanthamoeba</i> sp. Rowdon strain (100%)
14-2-1	角膜	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. AcaVNAK05 < AK, Slovakia (100%)
15-2-1	角膜	T4	ATCC30871 <i>A. polyphaga</i> Page23 strain (100%)
15-3-1	角膜	T4	ATCC50497 <i>Acanthamoeba</i> sp. Rowdon strain (100%)
15-4-1	角膜	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. 283<AK, Brazil (100%)
15-5-1	角膜	T4	<i>A. griffini</i> strain H37 <AK (100%)
15-6-1	角膜	T4	ATCC50497 <i>Acanthamoeba</i> sp. Rowdon strain (100%)
15-7-1	角膜	T4	ATCC 50496 <i>Acanthamoeba</i> sp. (99%)
15-8-1	角膜	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. S22<AK,France (100%)
15-9-1	角膜	T4	ATCC50497 <i>Acanthamoeba</i> sp. Rowdon strain (100%)
15-10-1	角膜	T4	ATCC50497 <i>Acanthamoeba</i> sp. Rowdon strain (100%)
15-11-1	角膜	T4	ATCC30461 <i>A. polyphaga</i> Eye strain (100%)
15-12-3	環境	T4	<i>A. castellanii</i> . CDC # V014 (100%) < AK,India
15-14-1	角膜	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. S22<AK,France (100%)
15-15-1	角膜	T4	ATCC50497 <i>Acanthamoeba</i> sp. Rowdon strain (100%)
15-16-1	角膜	T4	<i>A. castellanii</i> . CDC # V014 (100%) < AK,India
15-17-3	環境	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. KA/E6 (100%)
15-18-1	角膜	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. KA/E24 (99%)
15-19-3	環境	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. KA/E24 (99%)
15-20-1	角膜	T4	ATCC50497 <i>Acanthamoeba</i> sp. Rowdon strain (100%)
15-22-1	角膜	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. KA/E21 (99%)
15-23-3	環境	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. KA/E24 (99%)
15-25-1	角膜	T4	ATCC 50374 <i>A. castellanii</i> Castellani strain (100%)

消化管寄生原虫検出のための蛍光抗体試薬の開発

分担研究者： 八木田 健司 国立感染症研究所 寄生動物部

協力研究者： 泉山 信司 国立感染症研究所 寄生動物部
宮崎 誠生 アーク・リソース株式会社

概要

消化管寄生性原虫であるジアルジアならびにクリプトスポリジウムの検査診断の普及、拡大を図るため、両原虫に対するモノクロナル抗体を作製し、蛍光標識抗体として迅速診断用試薬の開発を行った。ジアルジアならびにクリプトスポリジウムと、その他主要な消化管寄生性原虫類との交差反応性、またヒト糞便試料を用いた感度、特異性を検討し、臨床検査目的に適う性能を確認し、またその性能は市販の代表的 DFA 試薬である Merifluor C/G と同等であった。国内の検査試薬開発は検査コストの低減化を可能にし、今後の保健医療向上、原虫症の発生動向の正確な把握等、感染症対策に大いに資するものと考えられる。

A. 研究目的

これまでにジアルジア症検査に関する抗体試薬開発を先行的に進め、シスト壁抗原を認識する抗ジアルジアモノクロナル抗体の開発に成功した。本年度は、並行的に進めてきたクリプトスポリジウム検出のためのモノクロナル抗体開発が進展し、両原虫の抗原検査が可能な状況となった。今後、これらの抗体を様々な疫学診断・検査に応用していくにあたり、当初の

目的として、現在国際的にも汎用的に利用されている免疫検査のひとつである蛍光抗体試薬としての開発を目的に、市販の代表的試薬との性能比較を行うことで、その性能評価を行った。

B. 研究方法

1) 抗クリプトスポリジウム・モノクロナル抗体の開発

クリプトスポリジウム *Cryptosporidium parvum* HNJ1 株をヌードマウス BALB/c nu/nu に感染させ糞便に排出されるオーシストをシヨ糖浮遊法で粗精製し、さらに塩化セシウムを用いた遠心沈殿法で精製した。マウス(BALB/c)、5週、♀3頭に精製したオーシストを皮下接種した。免疫は抗体価の上昇度を見ながら7回まで行い、細胞融合、スクリーニングは定法に従った。産生された抗体は市販抗体精製キットを用いて精製し、実験に供した。

2)モノクロナル抗体の標識

精製した抗ジアルジアならびに抗クリプトスポリジウムモノクロナル抗体は、直接蛍光抗体法(DFA)試薬として評価するために、汎用蛍光色素であるFITCを用いて標識した。

3)標識抗体の特異性評価

Giardia intestinalis 及び *Cryptosporidium parvum* 以外に、交叉反応の可能性が考えらる得る原虫類等、即ち *G. muris*、*C. hominis*、*C. meleagridis*、*C. feris*、*C. muris*、*Cyclospora cayentanensis*、*Entamoeba histolytica*、*Entamoeba coli*、*Eimeria magna*、*Chilomastix*、*Retortamonas* のシストあるいはオーシストのホルマリン固定標本を用いて染色性を調べた。染色は上記原虫標本をPBSにて遠心洗浄しホルマリンを除去し、原虫浮遊液(PBS中)と標識抗体液を20 μ lずつ混合した。その適量をスライドグラスに移してカバーグラスをかけ直ちに蛍光顕微鏡にて検鏡した。なお、染色性の比較対照として直接蛍光抗体法として市販されているMerifluor C/G(#250050、Meridian Bioscience社)を用いて、今回のモノクロナル抗体との性能比較を行った。

4)ヒト糞便試料を用いた感度評価

消化管原虫の依頼検査目的で寄生動物部に送られ検査後-20 $^{\circ}$ Cで凍結保管されていたものを用いた。なお、保管されていたヒト由来試料は平成20年度第2回国立感染症研究所、ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会において課題番号③として承認された研究計画に基づいて、研究資源としての利用が認められているものである。これらの糞便試料の中で先述のMerifluor C/G 蛍光抗体試薬によりジアルジア・シスト陽性、またはクリプトスポリジウム・オーシスト陽性であったもの、およびこれら両原虫に加えて赤痢アメーバ検査、サイクロスポラ検査で原虫陰性であった試料を感度試験に用いた。検査に際しては水様性便の場合、そのままピペットで20 μ lを採取し、軟便・固便の場合はPBSで5倍程度に溶かした後その20 μ lを採取し、同量の開発した蛍光抗体試薬あるいはMerifluor C/Gと混合し、ただちに蛍光顕微鏡にて検鏡した。

C. 研究結果

1)抗クリプトスポリジウムモノクロナル抗体産生ハイブリドーマの樹立

ジアルジアのモノクロナル抗体開発時と同様に、IgG(3頭中2頭)ならびにIgM(3頭すべて)の抗体価上昇が見られた。試薬開発の有利さや反応性を考慮し、IgGモノクロナル抗体産生ハイブリドーマ作成を進めた。クローンは複数樹立され、その中で抗体産生能および産生抗体のオーシスト染色性(特にシスト壁染色における均一な染色性)を吟味し、試薬開発用クローンを選択した。

2)抗ジアルジアおよび抗クリプトスポリジウム・モノクロナル抗体の染色特異性

抗ジアルジア抗体については既に間接蛍光

抗体法で抗体としての特異性は確認しているが、DFA 法に用いる場合の評価は未確認であったので、抗クリプトスポリジウム抗体とあわせて本研究で評価を行った。DFA 用試薬としては両原虫の同時検出を目的とするので、その使用条件に合わせて両原虫の FITC 標識モノクロナル抗体を混合し、One-drop 形式で染色可能な形態で使用した。

表-1 に各種原虫類に対する染色性の結果をまとめた。ヒトへの感染が確認されている *G. intestinalis*、*C. parvum*、*C. hominis*、*C. meleagridis* および *C. feris* ではシスト、オーシスト壁の均一でシャープな染色性と十分な強度が示され(図-1)、染色態度は Merifluor C/G と同様であった。げっ歯類感染性の *G. muris* および *C. muris* は *G. muris* での染色性が Merifluor C/G よりも強く *G. intestinalis* とほぼ同等であった。その他の調べた原虫類で ha 開発した試薬では染色が認められなかった。

3) ヒト糞便試料を用いた感度評価

結果を表-2 にまとめた。Merifluor C/G の検査でジアルジア陽性だった 6 検体、クリプトスポリジウム陽性だった 7 検体、および原虫陰性であった 10 検体を本研究で開発した抗体試薬で検査を行ったところ、Merifluor C/G の成績に対して感度、特異性ともに両原虫の検査結果は 100% であった。検鏡中蛍光の退色が速やかな試料もあったが、その程度は 2 種類の蛍光抗体試薬間で差は見られなかった。

D. 考察

これまでジアルジアならびにクリプトスポリジウムの抗原検査試薬としては国内開発され、市販流通しているものはなく、これが同原虫類の検査コストの低減化を阻む主たる要因であり、また原虫検査に対するインセンティブがあがら

ない背景にもなっている。本研究では両原虫に対するモノクロナル抗体開発が進んだことで、現在 golden standard として利用される蛍光抗体試薬 Merifluor C/G と同等の性能を有する蛍光抗体試薬の国内開発を優先した。これは、臨床検査以上に需要が高く、またコスト高の問題を抱える水道の微生物検査分野での国内検査試薬開発への要望もあり、目的は異なるが、国内で原虫検査の必要な分野への試薬供給体制の整備が急がれたためである。開発した抗体試薬はジアルジア症ならびにクリプトスポリジウム症を正確に検査するのに適した性能を示し、臨床的にも有用であることを示した。蛍光顕微鏡の使用条件があるものの、地方衛生研究所、その他医療機関等での試験的検査利用を次年度以降進めていき、汎用性を高める研究を進めていく計画である。検査のコスト面に関しては、本研究で開発した試薬は市販化の準備を進めており、Merifluor C/G のコスト(50 テスト用、抗体試薬液量 2.0ml、その他器材含み \$ 816、2012 現在)を考慮し、1 テストあたりのコストが少なくとも 1/2 程度になることを見込んでおり、コスト面で検査現場における原虫検査へのインセンティブ向上につながる事が期待される。

さらにイムノクロマト等迅速検査法に関しても、国内での検査試薬および検査キット開発を進め、ジアルジア症ならびにクリプトスポリジウム症の検査診断ツールを拡充していくことが重要である。

E. 結論

ジアルジアならびにクリプトスポリジウムの抗原検査試薬として、両原虫に対する個別モノクロナル抗体を作成、FITC 標識抗体試薬として開発した。その性能は代表的な市販試薬である Merifluor C/G と同等であることを確認した。

F. 参考文献

なし

ール抗体の作製、第80回日本寄生虫学会大会、2011年7月、東京

G. 健康危険情報

なし

I. 知的財産権の出願・登録状況

なし

H. 研究発表

八木田健司、泉山信司、宮崎誠生、迅速診断を目的とした抗ジアルジアモノクロナ