

に選択的に存在する分子・経路・機構である。

我々が初年度発見したシステインプロテアーゼを輸送する細胞内受容体・輸送体 (cysteine protease binding family protein 1) はまさに、この範疇に属する原虫選択的薬剤標的であると言える。2年度は、赤痢アメーバのゲノム中に存在する 11 の CPBF のアイソタイプの個別の機能とその重複の意義を理解するために、CPBF1 と同様に高い mRNA 発現を示す CPBF8 の同定・機能解明を行った。

B. 研究方法

1. 培養

HM1:IMSS cl6の培養はDiamondのBI-S-33培地を用いた無菌培養により行った。

2. CPBF8-HA付加体発現株の作成

C末端にHAエピトープを付加したCPBF8-A5を発現するために、プラスミドを作成した。プラスミド構築は常法に従った。赤痢アメーバHM-1: IMSS cl6の培養、形質転換などは常法に従った。

3. 免疫沈降法及び質量分析

CPBF8-HAを発現する形質転換体から抗HA抗原とprotein A-agaroseにより、CPBF8-HAに結合するタンパク質をタンパク質総抽出液から沈降した。免疫沈降法は常法に従った。免疫沈降された分画をSDS-PAGEにより展開し、CPBF8-HA形質転換体抽出液のみから検出されるタンパク質をLC-ToFMSを用いた質量分析に供した。

4. CPBF8発現抑制形質転換体の作成

赤痢アメーバCPBF8のタンパク質コード領域の5'末端420bp程度を適切な制限

酵素箇所を付加したオリゴヌクレオチドを用いてPCR増幅し、pSAP2Gunma plasmidに挿入し、gene silencing plasmidを作成し、上述の方法により、CPBF8発現抑制体を作成した。

5. ファゴソームプロテオーム解析

ファゴソームの単離・精製、プロテオーム解析は既報(Okada et al., 2006)によった。

(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. 赤痢アメーバの cysteine protease binding family protein 8 (CPBF8) 結合タンパク質の同定

HA エピトープを付加した CPBF8 の細胞粗抽出液からの免疫沈降によりタンパク質を検出した (図 1)。HA だけを発現するコントロールに存在せず CPBF8-HA からだけ同定された A-F を質量分析により同定したところ、A, B, D は CPBF8 自体であった。一方、E は EHI_148130 (XM_652437) で beta hexosaminidase alpha subunit と annotate されていた。F からは EHI_199110 (XM_648202) 及び EHI_096570 (XM_651841) が同定され、いずれも lysozyme と annotate されていた。

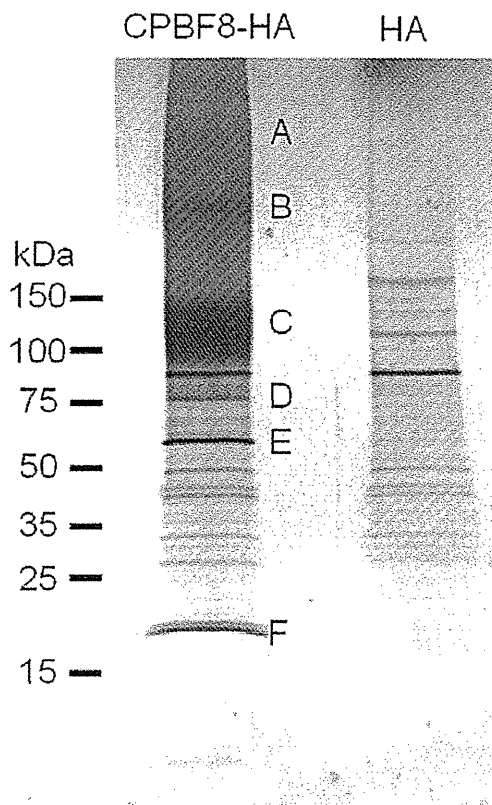


図 1 EhCPBF8-HA の免疫沈降による Cargo タンパク質の同定, lane 1, CPBF8-HA からの免疫沈降物; lane 2, control からの免疫沈降物 A-F を LC-MS/MS によるタンパク質同定に用いた

2. CPBF8 の細胞内局在

CPBF8 の細胞内での役割を知るために、細胞内局在を明らかとした (図 2)。貪食細胞 (ファゴソーム) 膜とリソソーム膜に強い局在が見られた。また、Pyridine nucleotide transhydrogenase とも強い共局在を示した (結果示さず)。したがって CPBF8 はリソソーム・ファゴソームの輸送に関与していることが示唆された。

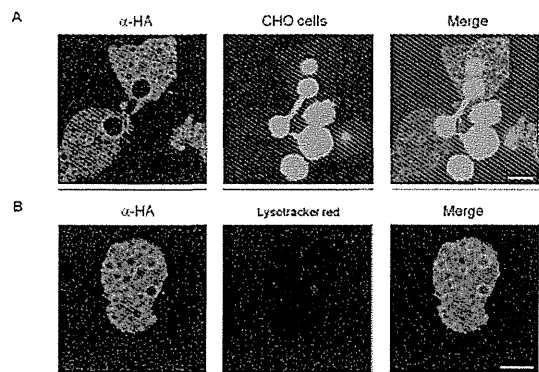


図 2 CPBF8-HA の細胞内局在 A, CHO を貪食させたもの CPBF8-HA (緑) が CHO (青) のファゴソーム膜に局在している B, LysoTracker (赤) との共局在が観察される

3. CPBF8 の遺伝子発現抑制による表現型の解析

CPBF8 を gene silencing 法を用いた antisense small RNA により抑制した。まずアイソタイプ特異的抑制を RT-PCR と qRT-PCR で確認した (図 3)。

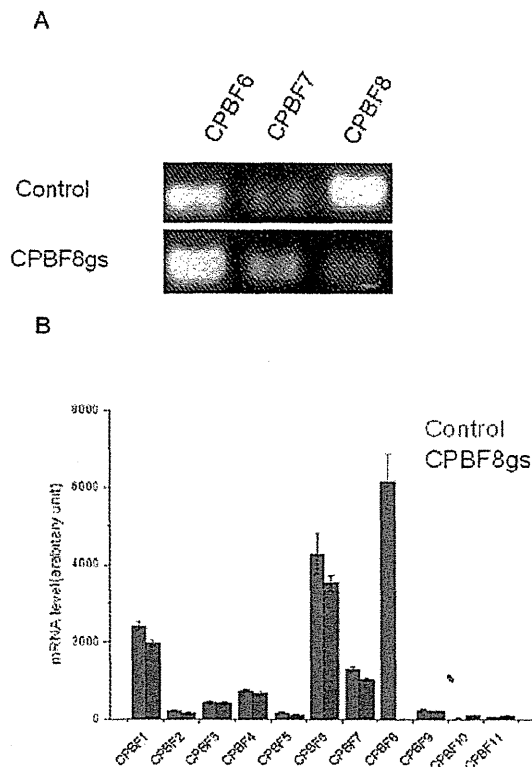


図4 CPBF8のgene silencing法による遺伝子発現抑制 A, RT-PCR; B, 定量RT-PCR いずれもCPBF8のtranscriptのみが特異的に抑制されていることが確認される。

全細胞内のMUGSを基質としたヘキサミンダーゼ活性を調べると、CPBF8のgene silencing株で大きく活性が減弱していた(図5, A, C, D)。一方、ライソザイム、アミラーゼの活性は大きく変化していなかった。しかしながら、精製されたファゴソーム中のこれら活性を調べると、ヘキサミンダーゼ活性、ライソザイム活性ともにほとんど完全に消失していた。一方、アミラーゼ活性のファゴソームへの輸送は全く影響を受けなかった(図5, E)。イムノプロットでファゴソームへ輸送されるタンパク質を定量すると上記の活性の結果とよく相関していた(図5,

F)。

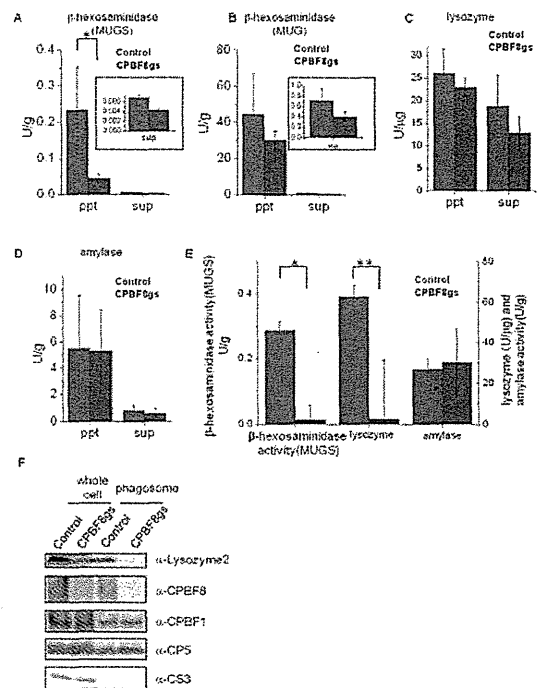


図5 CPBF8抑制による細胞内beta hexaminidaseとlysozyme活性の減少とファゴソームへの輸送の抑制。A-D, 細胞全抽出液中の活性。A, MUGSを基質に用いたhexosaminidase活性; B, MUGを基質に用いたhexosaminidase活性; C, lysozyme活性; D, amylase活性。E, 単離されたファゴソーム中のMUGSを基質に用いたhexosaminidase活性, lysozyme活性, 及びamylase活性。ppt, 全細胞ペレット画分; sup, 培養上清画分。F, 精製ファゴソーム中のlysozyme 2, CPBF8, CPBF1, CP-A5, CS3の量のCPBF8 gene silencingによる変化をイムノプロットで示す。

4. CPBF8 gene silencingによる生理的影響

CPBF8の生理機能を理解するために、gene silencing株と野生株とで、*Clostridium perfringens*の分解の速度

を比較した(図6)。Controlと比較して、CPBF6 gene silence株ではファゴソームでの細菌の分解が大きく遅延していた。

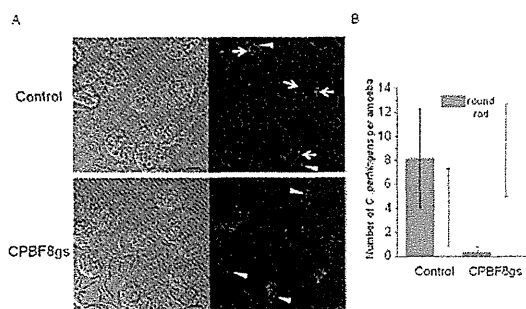


図6 CPBF8 gene silencingによる*Clostridium perfringens*の分解の抑制。A, 赤痢アメーバ栄養型に細菌を貪食後に固定し、核酸をpropidium iodideで染色したもの。形態を保持した生きた桿菌と分解された円形上の細菌が観察される。B, Round shapeのものとrod shapeの*C. perfringens*を定量したもの。

D. 考察

初年度我々は、他種生物に保存しない新規なシステインプロテアーゼ輸送体CPBF1を発見した。2年度に解析したCPBF8はアミノ酸一時配列レベルで近似を示し、タンパク質全体の構造も似ているが、その局在やカーゴが全く特異的である。このことは膜貫通領域の腔側、細胞質側いずれでも別のタンパク質と会合することを示唆している。実際CPBF8はhexosaminidase, lysozymeといった糖鎖を標的とした加水分解酵素と結合し、そのリソソーム・ファゴソームへの輸送に関与することが示されたが、大腸に寄生する際の生理的な基質や、これらの基質結合が進化の過程で選択されてきた理由は十分に理解されていない。本研究では、

少なくともgene silence法による遺伝子発現抑制によって、CPBF8に輸送される加水分解酵素が、*Clostridium*の分解に重要であることが示され、大腸内での細菌等の分解と栄養摂取に関与していると予想できる。

初年度、2年時に解析されたCPBF1, 8以外にもCOBF6はmRNAレベルで前二者と同様に高い発現レベルを示す。CPBF6のカーゴを特定するとともに、それぞれの輸送過程の特異性と基質の結合特異性を解明することが最終年度の目標となる。

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。現在結晶構造解析を同時に進めているがこれらの構造生物学的知見が、CPBFの機能及び進化に光を当てると期待される。また、それぞれのCPBFの感染における役割に関しては、動物から採取された腸をシャーレ上で展開し、赤痢アメーバのgene silence株でチャレンジするといったex vivoの実験により、腸粘膜の侵入・障害などへの関与を明らかにすることが重要である。

E. 結論

本年度、システインプロテアーゼ結合ファミリータンパク質(CPBF)のうちCPBF8の局在・機能解析を終了した。CPBF8が糖鎖を分解する少なくとも2種類の加水分解酵素のリソソーム・ファゴソームへの輸送に関与することを明らかとした。初年度の研究成果と総合して、CPBFが赤痢アメーバの生存と病原性にとって必須

なユニークな受容体ファミリーであることが一層明らかとなった。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文

Christy, N., Hencke, J., Escueta-De Cadiz, A., Nazib, F., Thien, H., Yagita, K., Ligaba, S., Haque, R., Nozaki, T., Tannich, E., Herbein, J., and Petri, W. Multi-site performance evaluation of an ELISA for the detection of *Giardia*, *Cryptosporidium*, and *Entamoeba histolytica* antigens in human stool. *J. Clin. Microbiol.* 50, 1762-1763, 2012.

Nakada-Tsukui, K., Tsuboi, K., Furukawa, A., Yamada, Y., and Nozaki, T. A novel class of cysteine protease receptors that mediate lysosomal transport. *Cell. Microbiol.* 14, 1299-317, 2012.

Jeelani, G., Sato, S., Husain, A., Escueta-de Cadiza, A., Sugimoto, M., Soga, T., Suematsu, M., and Nozaki, T. Metabolic profiling of the protozoan parasite *Entamoeba* revealed activation of unpredicted pathway during encystation. *PLoS ONE* 7, e37740, 2012.

Mishra, V., Kumar, A., Ali, V., Nozaki, T., Zhang, K. Y., and Bhakuni, V. Novel protein-protein interactions

between *Entamoeba histolytica* d-phosphoglycerate dehydrogenase and phosphoserine aminotransferase. *Biochimie.* 94, 1676-1686, 2012.

Husain, A., Sato, D., Jeelani, G., Soga, T., and Nozaki, T. Dramatic increase in glycerol biosynthesis upon oxidative stress in the anaerobic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1831, 2012.

Klionsky DJ, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 8, 445-544, 2012.

Makiuchi, T., Mi-ichi, F., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. Novel TPR-containing subunit of TOM complex functions as cytosolic receptor for *Entamoeba* mitosomal transport. *Scientific Reports* 3, 1129, 2013.

2. 学会報告 (国際学会のみ)

Nozaki, T. Evolution of function and import machinery of the mitochondria under anaerobic conditions: Highly divergent mitochondrion-related organelles in the parasitic protozoan *Entamoeba histolytica*. Mito 21012, Heraklion, Greece, May 9-13, 2012.

Nozaki, T. Mitosomal transport system in *Entamoeba histolytica*. Protist 2012, International Society of Evolutionary Protistology Meeting,

- Oslo, Norway, July 29–Aug 3, 2012.
- Jeelani, G., Dan, S., Husain, A., Escueta-de Cadiz, Sugimoto, M., Soga, T., Suematsu, M., and Nozaki, T. Metabolome of encystation in *Entamoeba histolytica*. Metabolomics of Protozoan parasites. Glasgow, U.K., Sep 10–14, 2012.
- Chiba, Y., Dan, S., Makiuchi, T., Jeelani, G., Soga, T., and Nozaki, T. Organelle metabolomics of *Entamoeba histolytica*. Metabolomics of Protozoan parasites. Glasgow, U.K., Sep 10–14, 2012.
- Nozaki, T. Evolution of the mitochondria under anaerobic conditions: Function and import machinery of the highly divergent mitochondrion-related organelle in the parasitic protozoan *Entamoeba histolytica*. The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan, Sep 11–14, 2012.
- Nozaki, T., Nakada-Tsukui, K., Furukawa, A., and Marumo, K. A novel class of transporters that mediate lysosomal trafficking in *Entamoeba histolytica*. International Conference of Tropical Medicine and Malaria. T. Rio de Janeiro, Brazil, Sep 23–27, 2012.
- Nozaki, T. Evolution of the mitochondria under anaerobic conditions: Function and import machinery of the highly divergent mitochondrion-related organelle in *Entamoeba histolytica*. Joint International Tropical Medicine Meeting. Bangkok, Thailand, Dec 12–14, 2012.
- 野崎智義 寄生生物ミトコンドリアの特性～嫌気環境下における多様化. J-mit, “Mitochondrial Diversity: shall we find out her multiple faces” (日本ミトコンドリア学会), Tsukuba, Ibaraki, Dec 19–21, 2012.
- Nozaki, T. A novel beta barrel transporter in the mitosome of *Entamoeba histolytica*. XVII Seminar on Amebiasis 2013, Merida, Mexico, Mar 1–5, 2013.
- Nakada-Tsukui, K., Tomii, K., Marumo, K., Sato, E., Takashima, E., Shiba, T., Horton, P., Tsuboi, T., Harada, S., and Nozaki, T. Unique lysosomal targeting system in *Entamoeba histolytica*. XVII Seminar on Amebiasis 2013, Merida, Mexico, Mar 1–5, 2013.
- Mori, M., Masuda, Y., Kasai, R., Masuma, R., Takahashi, Y., Nozaki, T., Shiomi, K., Omura, S. Inhibitors of *Entamoeba histolytica* cysteine synthase and serine acetyltransferase discovered from secondary metabolites of microorganisms. XVII Seminar on Amebiasis 2013, Merida, Mexico, Mar 1–5, 2013.
- Saito-Nakano, Y., Okadaa, M., Hanadate, Y., Gilchrist, C. A., Crasta, O.,

Petri, Jr., W. A., Fei, Z., Trapaidze, N., and Nozaki, T. Role of Arf GTPase and traffic to lysosomes in *Entamoeba* pathogenesis. XVII Seminar on Amebiasis 2013, Merida, Mexico, Mar 1-5, 2013.

Samie, A., Mahlaule, L., Mbatl, P., and Nozaki, T. Molecular detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, and *Entamoeba moshkovskii* from HIV positive and HIV negative patients in the Limpopo province, South Africa. XVII Seminar on Amebiasis 2013, Merida, Mexico, Mar 1-5, 2013.

Petri, Jr., W. A., Fei, Z., Trapaidze, N., and Nozaki, T. Role of Arf GTPase and traffic to lysosomes in *Entamoeba* pathogenesis. XVII Seminar on Amebiasis 2013, Merida, Mexico, Mar 1-5, 2013.

Samie, A., Mahlaule, L., Mbatlana, P., and Nozaki, T. Molecular detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, and *Entamoeba moshkovskii* from HIV positive and HIV negative patients in the Limpopo province, South Africa. XVII Seminar on Amebiasis 2013, Merida, Mexico, Mar 1-5, 2013.

H. 利益相反

研究代表者は厚生労働科学研究費補助金政策創薬マッチング研究事業（財団法人ヒューマンサイエンス振興財団）にて財団法人日本生物科学研究所と共同研究を行っているが（エイズ日和見原虫症に対する新規薬剤標的の探索と生理機能の解明：KHA1101）、本研究に関して COI は存在しない。

厚生労働科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業

「顧みられない寄生虫病の効果的監視法の確立と

感染機構の解明に関する研究」

平成 24 年度分担報告書

腸管原虫の分子疫学調査に関する研究

研究分担者

氏名：渡辺 恒二

所属病院名：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

所属科：エイズ治療研究開発センター

役職：常勤医師

研究要旨：HIV 感染者を中心に、国内で赤痢アメーバ症症例数が性感染症として増加していることがこの 10 年間で徐々に分かってきた。本研究では、糞口感染として伝播する腸管寄生虫症（赤痢アメーバ・ジアルジア・クリプトスポリジウム）の疫学的状況を臨床症例から明らかにすることを目的としている。研究初年度は、過去の診断症例を振り返ることにより赤痢アメーバ症以外の腸管寄生虫症（ジアルジア・クリプトスポリジウム）数が過小評価されている可能性を指摘し、その原因は保険診療内で可能な直接検鏡法の感度の低さにあると推定されることを指摘した。本年度は、より簡便で感度の高いとされる ELISA 法による検査を試験的に導入してみた。しかし、残念ながら、1 年間でジアルジア 2 例（いずれも散発例）、クリプトスポリジウム 0 例で、2 例とも直接検鏡法で診断可能であった症例であり、上記 2 疾患は赤痢アメーバ症ほどの流行を見せていないことが判明した。一方、赤痢アメーバ症については、HIV 感染者の赤痢アメーバ特異抗体血清陽性率を測定したところ、HIV 感染者全体の陽性率は 21.3% とアフリカの発展途上国農村と匹敵する高値であることが判明した。驚くべきことに、抗体陽性者のおよそ 8 割は赤痢アメーバ症の治療歴を有さないことも分かった。また、既往歴のない抗体陽性者はその後高率（1 年間に 20%）に侵襲性赤痢アメーバ症を発症することなどが明らかにされた。今後は、赤痢アメーバ症の病態解明、およびその病態を考慮した感染拡大予防策を講じるとともに、赤痢アメーバ症以外の腸管寄生虫症の疫学実態調査を継続する予定である。

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、問題点提起と解決策を検討するとともに、感染拡大する赤痢アメーバ症については、その病態を明らかにすることで、予防および治療介入策を提唱することを目的としている。

B. 研究方法

1 年目の研究により、赤痢アメーバ症以外の腸管寄生虫症症例数が、直接検鏡法の検査感度が低いために過小評価されていることを指摘した。2 年目である本年度は、ELISA 法による抗原検出キットを病院検査室で試験的に使用し、直接検鏡法と比較して検査感度が向上するかを調べた。また、赤痢アメーバ症については HIV 感染初診患者の赤痢アメーバ特異抗体を測定し、HIV 感染者における陽性率を見ることで赤痢アメーバ症の流行状況を血清陽性率として算出し他国との比較を行った。また、その既往歴やリスク因子などを、診

療録を用いて検討した。既往歴のない患者については、抗体価により将来的に赤痢アメーバ症を発症するリスクに違いがあるかを比較した。

（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

①赤痢アメーバ症以外の腸管寄生性原虫症の頻度について

期間中に 12 件の原虫検査依頼があり、クリプトスポリジウム陽性 0 件、ジアルジア陽性 2 件であった。ジアルジア 2 件については、直接検鏡法でも病原体が確認されており、本年度の結果からは、赤痢アメーバ症以外の原虫症の発症件数が少ないことは、検査感度の低さによる見落としではなく、症例件数が少ないことが理由であることが予想された。しかし、年間の検査件数が少ないことから、来年度も同様の検討を引き続き行うべきであると考えられた。

②赤痢アメーバ抗体血清陽性率

本検討では、2006 年 1 月から 2012 年 4 月までに HIV 感染症治療目的に受診した初診患者の血清アメーバ抗体検査結果とそのリスク因子について解析した。対象期間中に 1519 人の HIV 感染者が初診となり、1303 人に対し血清アメーバ抗体測定が行われた。アメーバ抗体陽性率は、21.3% (270/1303) であり、抗体陽性者のおよそ 8 割は赤痢アメーバ症治療歴のない患者であった。表 1

に示すとおり、アメーバ抗体陽性者は男性（特に MSM）に多く、梅毒や B 型肝炎への暴露歴が多かった。これまでの報告通り、HIV 感染者の中で特に性的に活動性の高い男性同性愛者で感染が拡大している HIV 感染者の倍以上の陽性率であった。また、発展途上国でのデータ（HIV 感染の有無は問わない住民データ）と比較すると、インドネシア東ジャワの住民より高く、エジプトの農村住民と同等レベルであった。以上から、日本の HIV 感染者において、*E. histolytica* は、HIV 感染合併赤痢アメーバ症例が増加している先進国よりも圧倒的に高いレベルで蔓延しており、上下水道が完備していない発展途上国で生活する住民と同等レベルに蔓延していることが示唆された。

表1. 初診時赤痢アメーバ抗体測定結果と患者属性

	アメーバ抗体陰性 (n=1026)	アメーバ抗体陽性 (n=277)	P value
年齢 中央値 (range)	36 (18-77)	37 (19-74)	0.06
日本国籍 (%)	921 (89.8%)	250 (90.3%)	0.81
男性 (%)	960 (93.6%)	272 (98.2%)	0.003
男性同性愛者 (%)	789 (76.9%)	245 (88.4%)	<0.001
赤痢アメーバ既往歴 (%)	22 (2.1%)	67 (24.2%)	<0.001
アメーバ抗体価 (n=277)			
< x100	1026		
x100		133	
x200		38	
x400		50	
x800		30	
x1600		19	
x3200		7	
TPHA 陽性 (%)	366/1012 (36.2%)	151/275 (54.9%)	<0.001
B型肝炎ウイルス暴露歴 (%)	524/1017 (51.5%)	187/272 (68.8%)	<0.001
HCV抗体陽性 (%)	40/1011 (4.0%)	5/273 (1.8%)	0.09

B型肝炎ウイルス暴露歴: HBs抗原、HBs抗体、HBe抗体のいずれか1つ以上が陽性

③赤痢アメーバ抗体価と赤痢アメーバ症発症予後に関する検討

研究期間中に 1519 人が HIV 感染症治療目的で

初診となり、うち赤痢アメーバ抗体測定を行わなかった患者（216 人）と赤痢アメーバ症治療歴のある患者（既往歴 73 人・初診時発症者 8 人の計 81 人）が除外された。また、赤痢アメーバ抗体価測定後抗体陽性のために赤痢アメーバ症の治療を受けた 15 名を除外し、1207 名を解析対象とした。

侵襲性赤痢アメーバ症の累積発症リスクを各抗体価で解析したところ、初診時抗体価が、x1600、x400、x800 の各グループでは、その後の侵襲性赤痢アメーバ症発症リスクが高く、Log-rank 検定では、初診時抗体価 x200 以下の群と比較して、x400 以上の群で発症リスクが高い傾向にあった。そのため、初診時の赤痢アメーバ抗体価低値群（x200 以下：<x100、x100、x200）と抗体価高値群（x400 以上：x400、x800、x1600、x3200）で侵襲性赤痢アメーバ症の累積発症リスクを比較することにした。2 群間の患者背景は表 2 に示したが、抗体価高値群で日本国籍、男性同性愛者、B 型肝炎ウイルス暴露歴、TPHA 陽性率が高い傾向にあった。

表2. 初診時赤痢アメーバ抗体価と患者属性

	抗体価 200 倍以下 (n=1151)	抗体価 400倍以上 (n=56)	P value
年齢 (range)	36 (18-77)	35 (22-72)	0.25
日本国籍 (%)	1029 (89.4%)	55 (98.2%)	0.03
男性 (%)	1081 (93.9%)	56 (100.0%)	0.06
同性愛者 (%)	893 (77.6%)	53 (94.6%)	0.002
TPHA 陽性 (%)	426/1137 (37.5%)	32/56 (57.1%)	0.003
B型肝炎ウイルス暴露歴 (%)	604/1141 (52.9%)	39/55 (70.9%)	0.003
HCV抗体陽性 (%)	42/1135 (3.7%)	0/55 (0.0%)	0.15

B型肝炎ウイルス暴露歴: HBs抗原、HBs抗体またはHBe抗体のいずれか1つ以上が陽性

経過観察期間中に 18 例が侵襲性赤痢アメーバ症を発症した。10 例が抗体価低値群、8 例が抗体価高値群からの発症であった。 Kaplan-Meier

法による侵襲性赤痢アメーバ症累積発症リスク（図1）は、抗体価高値群で1年以内の発症リスクが非常に高いことが示され、Log-rank 検定でも低値群に比較して有意に累積発症リスクが高いことが示された。

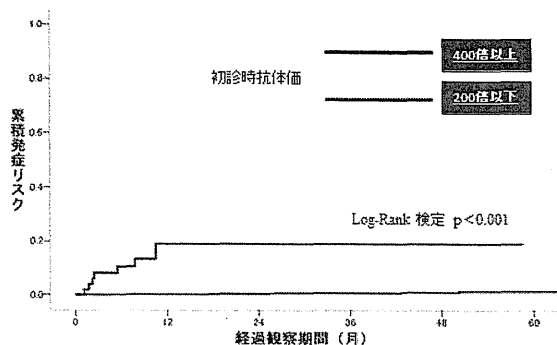


図1. 初診時抗体価と赤痢アメーバ症累積発症リスク

単変量および多変量解析（単変量解析で $p < 0.2$ の因子を解析項目として計算）の結果においてもアメーバ抗体高値群は抗体低値群と比較して20倍以上のリスク増加があることが示された（表3：多変量解析で Hazard Ratio 22.079）。

表3. 侵襲性赤痢アメーバ症発症リスク因子

	単変量解析		多変量解析	
	HR (95% CI)	p value	HR (95% CI)	p value
年齢 (1歳上昇)	0.989 (0.947-1.033)	0.624		
日本国籍	1.334 (0.305-5.840)	0.702		
男性	21.884 (0.002-241297.39)	0.516		
同性愛者	4.318 (0.573-32.518)	0.156	4.048 (0.488-33.584)	0.195
TPHA 陽性	0.901 (0.348-2.335)	0.831		
B型肝炎ウイルス暴露歴	2.183 (0.778-6.124)	0.138	1.839 (0.644-5.249)	0.255
HCV 抗体陽性	0.047 (0.000-2697.344)	0.584		
赤痢アメーバ抗体 400倍以上	20.985 (8.085-54.467)	<0.001	22.079 (7.964-61.215)	<0.001

B型肝炎ウイルス暴露歴: HBs抗原、HBs抗体またはHBc抗体のいずれか1つ以上陽性

また、侵襲性赤痢アメーバ症発症症例で初診時の赤痢アメーバ抗体価と発症時の赤痢アメーバ抗体を比較したところ、抗体価低値群では抗体価の上昇が認められたものの抗体価高値群では侵襲性赤痢アメーバ症発症時に抗体価の更なる上昇は認めない例が多かったことから、抗体高値群での侵襲性赤痢アメーバ症発症はシストの再感染よりアメーバの潜伏感染の顕在化によるものであったと考えられた。

無症状の赤痢アメーバ抗体陽性者の病態を詳しく解析するため、無症状かつ赤痢アメーバ症の既往歴なしの1222人に注目したところ、行われた検査を解析すると、1222人のうち抗体陽性者（100倍以上）は、210人で、うち57名に対して便検査が行われ、30名に対して下部消化管内視鏡検査が行われていた。結果は、図2に示した通りである。便検査では栄養型 *E. histolytica* は1例も検出されず、3例でシスト型 *E. histolytica* を

認めるのみであった。それに対して下部消化管内視鏡検査では、無症状にも関わらず 30 例中 9 例で赤痢アメーバ症によると考えられる潰瘍性病変を認めた。さらに、潰瘍性病変を有する 9 例中 8 例はアメーバ抗体 400 倍以上の高値である患者であり、200 倍未満の患者と比較して高率に潰瘍性病変を有することが示された。

以上をまとめると、血清赤痢アメーバ抗体 400 倍以上の高値の患者では、無症状であっても潰瘍性病変を消化管粘膜（特に大腸）に來している頻度が高く、うち 20%が侵襲性赤痢アメーバ症を 1 年以内に発症すると考えられた。

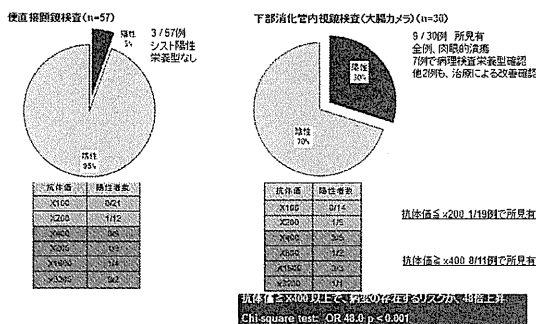


図2. 無症候性赤痢アメーバ抗体陽性者とその検査の陽性率

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

なし

2. 学会発表

第 26 回日本エイズ学会学術集会, O31-146, HIV 感染者に対する赤痢アメーバ抗体測定の意義

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

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判明した。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* は下痢症状や時に典型的なイチゴゼリー状の粘血便を伴う激しい炎症を惹起し感染 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。非病原性アメーバ *E. dispar* はいずれのマウスの腸管に定着できなかった。さらに *E. moshkovskii* 感染で誘導されてくる 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。

本年度は、IFN-g KO (CBA/J) マウスを用いてIFN-g の役割を検証した。IFN-g KO CBA/J マウスでは、IFN-g に対する抗体を用いた実験と同様、原虫の排除が起こらずに感染が遷延した。この時、下痢や体重減少などの症状が緩和された。つまり *E. moshkovskii* 感染によって誘導される IFN-g は下痢などの消化管症状を引き起こしつつ原虫の排除に機能しており、宿主にとっては諸刃の刃であることが確認された。消化管症状の病因となりうる腸上皮細胞のアポトーシスを観察したところ、*E. moshkovskii* 感染時に亢進することが判明した。*E. moshkovskii* 感染マウスでは、アポトーシス関連分子であり腸管上皮細胞間リンパ球上に発現する NKG2D および腸管上皮細胞上に発現する RAE-1 の発現上昇が認められた。IFN-g を中和すると、これらの分子の発現上昇は抑制された。したがって、*E. moshkovskii* 感染時に誘導される IFN-g は、腸管においてNKG2D や RAE-1の発現上昇を介して「腸上皮のアポトーシス」を引き起こし、諸刃の刃として「消化管症状」と「原虫の排除」に機能する可能性が示唆された。

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が第1・2染色体上にあることを連鎖解析によって示している。

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。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が、2) *E. moshkovskii* は下痢症状に加えて時に典型的なイチゴゼリー状の粘血便を伴う激しい炎症を惹起し、3) 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を見出した。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。4) 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。

本年度は上記結果を踏まえて、戻し交配により作成した IFN- γ 欠損 CBA/J マウスを用いて、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

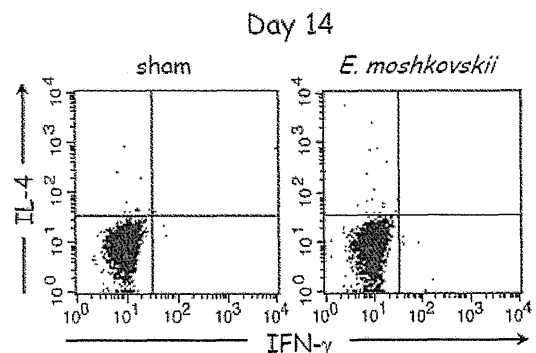
野生型もしくは IFN- γ 欠損 CBA/J マウスの虫垂に *E. moshkovskii* 栄養体を接種し、各免疫臓器において Th1 ならびに Th2 サイトカイン産生細胞の経時的変化をモニタした。刺激に際しては、1) CD3 ならびに CD28 に対するモノクローナル抗体を使用し、ブレフェルディン存在下でゴルジ輸送を阻害し、細胞内サイトカインならびに免疫細胞表面抗原染色を行い、フローサイトメトリーによって解析したり、2) アメーバ抽出液で刺激して上清中に産生されたサイトカインの総量を測定したりした。

(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。

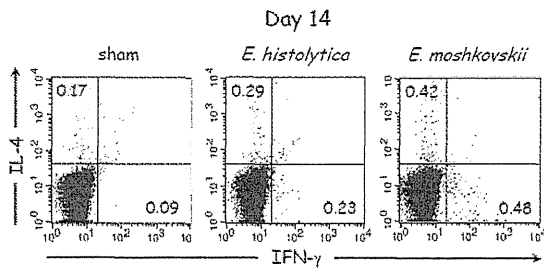
C. 研究結果

E. moshkovskii の接種後、感染14日目に脾臓や腸間膜リンパ節の免疫細胞を、CD3 & CD28 に対する抗体で刺激し、IL-4, IFN- γ , IL-10, TNF- α , IL-13 の細胞内染色を行ったが、いずれのサイトカインに関しても、陽性細胞は検出できなかった。

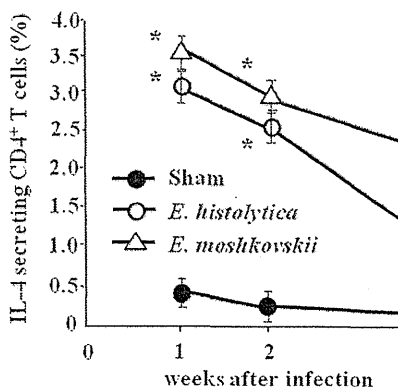


すなわち脾臓においても腸間膜リンパ節においても、本刺激では、*E. histolytica* および *E. moshkovskii* 感染経過中に、IL-4, IFN- γ , IL-10, TNF- α , IL-13 産生細胞を検出できなかった。

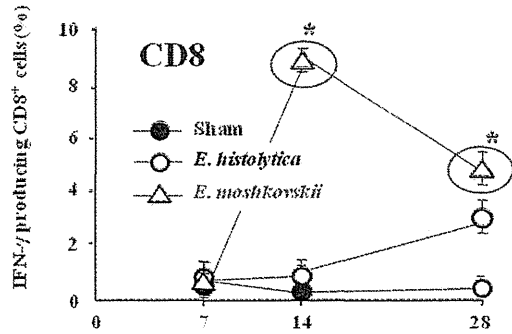
次いでパイエル板で調べたところ、下図のように、*E. histolytica* および *E. moshkovskii* 感染14日目に IFN- γ ならびに IL-4 産生細胞共に有意な増加が認められた。



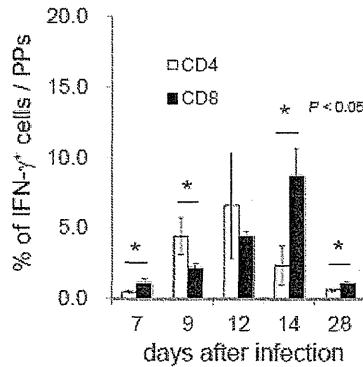
パイエル板に着目すると、両群において感染1週間には IL-4 産生細胞を検出することが出来たが、慢性感染に至る *E. histolytica* 感染と原虫が排除される *E. moshkovskii* 感染の間で IL-4 産生細胞に関して有意な差は認められなかった。



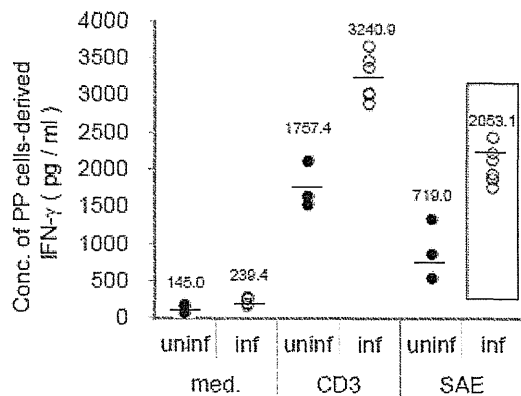
次いで、代表的な Th1 サイトカインである IFN- γ の動態をパイエル板で調べてみた。



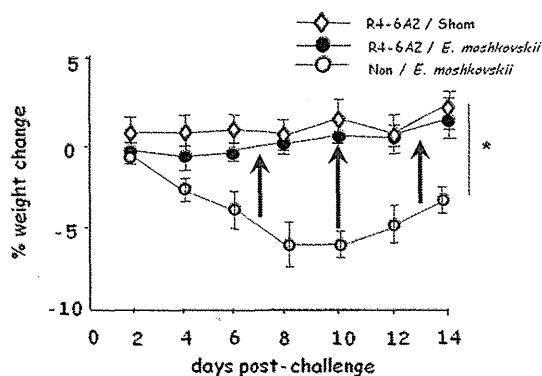
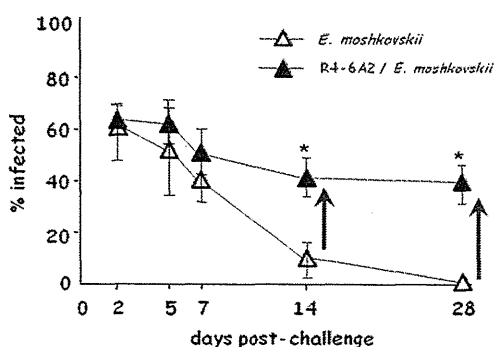
すると、IFN- γ 産生 CD8 陽性細胞は *E. moshkovskii* が排除される感染2週後をピークに著明に増加したが、*E. histolytica* 感染では同現象は認められなかった。以下は、*E. moshkovskii* 感染で、IFN- γ 産生 CD4 ならびに CD8 陽性細胞の推移を調べたものである。



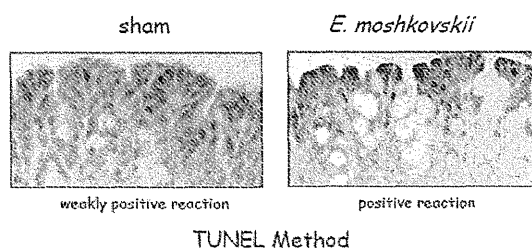
次いで、リンパ球を *E. moshkovskii* 抗原と共培養したところ、*E. moshkovskii* 抗原特異的に IFN- γ が産生されることが判明した。



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ところ、以下の実験結果が得られた。これは昨年度にすでに報告したものである。



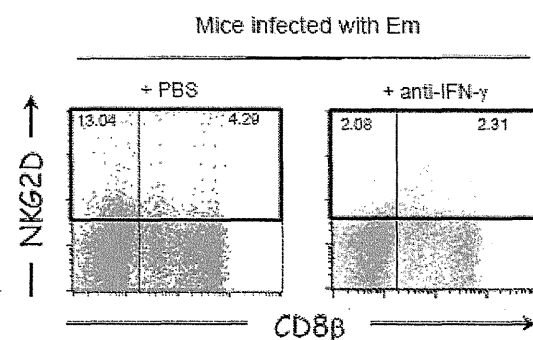
IFN- γ KO マウスを用いた研究でも同様のことが示された。



IFN- γ 産生がピークを迎える *E. moshkovskii* 感染14日目には、上に示すように実際にアメーバが存在する腸管では TUNEL 陽性腸

上皮細胞の増加し、アポトーシスの亢進が示唆された。

IFN- γ を中和した際に、腸管のアポトーシス関連分子の発現の推移を調べてみたところ、感染マウスではアポトーシス関連分子である腸管上皮細胞間リンパ球上の NKG2D および腸管上皮細胞上の RAE-1 の発現上昇が認められた。これらの分子の発現上昇は IFN- γ 中和マウスでは抑制されていた。



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* 感染系においてパイエル板における IFN- γ 産生細胞が有意に増加することが見いだされた。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。

さらに*E. moshkovskii* 感染マウスではアポトーシス関連分子であり腸管上皮細胞間リンパ球上に発現される NKG2D および腸管上皮細胞上に発現される RAE-1 の発現上昇が認められた。IFN- γ に対する中和抗体を投与したマウスでは、これらの発現上昇は抑制されていた。したがって、*E. moshkovskii* 感染時に誘導される IFN- γ は、腸管においてNKG2D や RAE-1の発現上昇を介して「腸上皮のアポトーシス」を引き起こし、諸刃の刃として「消化管症状」と「原虫の排除」に機能する可能性が示唆された。

E. 結論

IFN- γ が「消化管症状」と「原虫の排除」に諸刃の刃として機能する可能性が示唆された。

G. 研究発表

論文発表

1. Shimokawa C, Kabir M, Taniuchi M, Mondal D, Kobayashi S, Ali IK, Sobuz SU, Senba M, Houghton E, Haque R, Petri WA Jr, Hamano S: *Entamoeba moshkovskii* is

associated with diarrhea in infants and causes diarrhea and colitis in mice. **J Infect Dis.** 206: 744-751, 2012 (IF: 6.410)

<http://jid.oxfordjournals.org/content/206/5/744.long>

2. Mbanefo EC, Chuanxin Y, Kikuchi M, Shuaibu MN, Boamah D, Kirinoki M, Hayashi N, Chigusa Y, Osada Y, Hamano S, Hirayama K: Origin of a novel protein-coding gene family with similar signal sequence in *Schistosoma japonicum*. **BMC Genomics.** 13:260.

doi: 10.1186/1471-2164-13-260. 2012 (IF: 4.073)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3434034/>

教科書、一般書執筆

1. 濱野真二郎：忘れてはならない輸入感染症と稀少感染症、トリパノソーマ症・リーシュマニア症. **化学療法の領域** 28: 114-119. 2012
2. 濱野真二郎：51章 消化管および泌尿生殖器寄生原虫, 54章 条虫, 56章 線虫. 吉開泰信、西山幸廣 (監修). レビンソン微生物学・免疫学 原書 11 版 (Lange Textbook シリーズ). 2012

学会発表

1. Chikako Shimokawa, Masachika Senba, Shinjiro Hamano: IFN- γ up-regulates NKG2D expression on intestinal intra epithelial cells in mice infected with amoebic parasites.、第11回 あわじしま感染症免疫フォーラム、兵庫、2012年9月11日～9月14日 (国際学会)

2. Chikako Shimokawa, Shinjiro Hamano: IFN- γ is necessary for clearance of pathogenic amoebae from the intestine of mice、第41回 日本免疫学会、大阪、2012年12月5日～12月7日(国内学会)
 3. Chikako Shimokawa, Shinjiro Hamano: IFN- γ is necessary for clearance of pathogenic amoebae from the intestine of mice、第6回 長崎熱帯病新興感染症シンポジウム、長崎、2012年12月10日～12月12日(国際学会)
 4. Shimokawa C, Hamano S: *Entamoeba moshkovskii* is associated with diarrhea in infants and causes diarrhea and colitis in mice. International Workshop on Enteric Protozoan infections. 東京、2013年2月22日(国際学会)
 5. Shimokawa C, Kabir M, Taniuchi M, Mondal D, Kobayashi S, Ali IK, Sobuz SU, Senba M, Houpt E, Haque R, Petri WA Jr, Hamano S: *Entamoeba moshkovskii* is associated with diarrhea in infants and causes diarrhea and colitis in mice. The XVII Amibiiasis Meeting, Merida, Mexico, 2013年3月1日～3月5日(国際学会)
 6. 下川周子, 小林正規, 千馬正敬, 鈴江一友, 平井誠, 今井孝, 谷口委代, 久枝一, 濱野真二郎: Double-edged effects of IFN- γ in amoeba infection of mice, 第82回 日本寄生虫学会, 東京, 2013年3月29日～31日(国内学会)
 7. 安達圭志、濱野真二郎、 Manson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、第6回 蠕虫研究会、宮崎、2012年7月
 8. 安達圭志、濱野真二郎、 Manson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、The 10th Molecular Parasitology & Malaria Forum、群馬、2012年7月
 9. 安達圭志、濱野真二郎、 Manson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、第41回 日本免疫学会、神戸、2012年12月
 10. 安達圭志、濱野真二郎、 Manson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、GCOE symposium、Nagasaki、2012年12月
 11. 安達圭志、濱野真二郎、 Manson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、第82回寄生虫学会、東京、2013年3月29日～31日(国内学会)
 12. Dinesh Mondal, Shinjiro Hamano: カラアザールの発症危険因子ならびに治療前後の免疫応答に関する研究、第6回 寄生虫感染免疫研究会、大分、2013年3月
 13. Nagi S, Hamano S: Risk factors and spatial distributions of *Schistosoma mansoni* infection among primary school children in western Kenya. International Workshop on Enteric Protozoan infections. 東京、2013年2月22日(国際学会)
- 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

厚生労働科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業

「顧みられない寄生虫病の効果的監視法の確立と

感染機構の解明に関する研究」

平成 24 年度分担報告書

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：アcantアメーバに関する分子疫学を引き続き行い、これまでと同様、角膜より高頻度に検出されるシークエンスタイプが検出された他、本調査でははじめて T3 タイプのアメーバが角膜炎株として分離されたことが明らかとなった。*A. pearcei* ATCC50435 は米国の海洋で、海底汚泥から 1978 年に分離されたと報告されている。BLAST 検索の結果では本種の角膜からの検出例はこれまで報告がない。T4 以外のアメーバは環境中でのポピュレーションが低く、T3 の角膜検出例は少ないことが知られる。前年度調査で T11 のアメーバが角膜より分離されたことを加え、国内では T4 以外にもマイナーな T3 や T11 のアメーバも角膜炎に関連することが明らかとなった。

前年度までにアcantアメーバの感受性の新しい測定法の開発を行ったが、その方法を用いて、アcantアメーバの新規の治療法（メチレンブルーを用いた光線力学療法）を評価した。光線力学療法は、アcantアメーバの栄養体・シストの呼吸活性を抑制し、さらに、従来の抗アメーバ薬（PHMB や抗真菌薬）との併用効果も認められた。

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、アcantアメーバ角膜炎を引き起こすアcantアメーバには特効薬がなく、現在のところ治療としては消毒薬、抗真菌薬の使用が標準的とされる。しかしながらたとえこれらの治療を行ったとしても重症化し、最終的に角膜移植術が必要となるケースもあるため、異なる視点からの新しい治療法の開発が急務とされる。今回、アcantアメーバに対するあたらしい治療法としてメチ