

別紙 3

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症 研究事業） 分担研究報告書

アジアの感染症担当研究機関とのラボラトリーネットワークの促進と 共同研究体制の強化に関する研究（H23 - 新興 指定 020）

赤痢アメーバに関する研究

研究分担者 津久井久美子 国立感染症研究所 主任研究官

研究要旨

赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) 感染により起こるアメーバ症は近年日本においても報告が増加している重要な原虫感染症である。本研究では日本と感染様式が類似している台湾と共同研究を行うことで、東アジアにおけるアメーバ症の分子疫学調査方法の確立と病原性を規定する遺伝子の発見を目指す。

A 研究目的

赤痢アメーバにより発症するアメーバ症は全世界で毎年 10 万人の死者を出すマラリアに次ぐ重要な原虫感染症である。アメーバ症は飲食物の衛生管理が行き届かない発展途上国においては水系感染により生じる下痢の主要原因の一つであるが、日本を含めた先進国では海外渡航者の他、自己の衛生環境を保てない障害者や老人施設、糞口感染の可能性がある男性同性愛者 (man sew with man: MSM) や commercial sex worker の女性が主なリスク群となる。また、*E. histolytica* 感染を疑う場合、形態学的に見分けられない、非病原性の *E. dispar* 感染との鑑別が問題となる。*E. dispar* であれば便中に栄養体やシストが検出されても治療の必要はないとされるが、無症候性の *E. histolytica* 感染者も多く存在するため確実な鑑別と適正な治療が必要である。

欧米では MSM におけるアメーバ感染は *E. histolytica* と *E. dispar* の両方が同定されるため特に鑑別が重要とされている。しかし日本においては *E. dispar* が同定されることはほぼ無い。この事実は日本に独特な要因が存在することを示唆しているが、研究対象とすることが可能な症例数が限られる状況では研究を進めることが困難であった。また、現在の日本では症状のある患者が来院した場合にアメーバ症と診断され、検体を得る機会が生じるが、無症候性のキャリアからの検体を募ることは倫理面から非常に困難である。一方同じ東アジアに存在する台湾ではアメーバ症のリスク群は日本と同じであり、*E. dispar* 感染がほとんど見られないという状況も一致している。しかし台湾では外国人労働者に寄生虫検査を課していることから検査対象が非常に広く、多様な遺伝子型や株の取得が可能であ

る。

本研究では台湾 CDC と共同で日本と台湾から得られた臨床株の遺伝子型の特定と系統解析、さらに病原性に関与する遺伝子の同定と解析を行い、アジアにおけるアメーバ症の特徴を理解することを目指した。

B 研究方法

日本の臨床分離株を使った比較ゲノミクスで見出された、病原性に関与すると予想される ORF について、昨年度行った複数の台湾株での評価に加え、日本株においてもその存否が病原性や系統上のグループと関連するか評価を行った。系統解析は昨年度行った日本・台湾で得られた臨床株を tRNA sort tandem repeat (STR) を指標とした遺伝子型別により分類し、これをもとに行った系統解析の結果に準じた。

C 研究結果

1) 病原性関連 ORF の日本株における解析

日本国内で分離された非病原性株と病原性株との比較ゲノミクスにより以前我々の研究室で見出した、AIG1 family protein (EHI_176590): 以降 AIG17、の ORF が日本株にどの程度存在するのか、ゲノム DNA を鋳型にした PCR により検討した。AIG17 は非病原性株に存在していない ORF として同定されたため、無症候性株には存在せず、患者由来の株に存在がみられることが期待された。以前遺伝子型別がなされ、ゲノム DNA サンプルが存在していたものを優先に肝膿瘍、下痢症、無症候それぞれ 16, 11, 5 サンプルについて解析を行った。ゲノム DNA をテンプレートとして PCR により AIG17 の ORF の存在を検討したところ各症状別に 10, 7, 1 サンプルで陽性が確認された。これを

系統解析で分類すると A, B, C 各グループより 5, 14, 13 のサンプルを検討し、0, 8, 10 の陽性サンプルが確認された。

D 考察

1) 日本株の遺伝子型別と系統解析
系統解析によりグループ分けされた A, B, C を比較するとクラス C は日本株が大半を占め、さらに無症候は 1 しかないことから、日本に多い病原性の高い遺伝子型が存在することが示唆された。また日本由来の 5 つの非病原性株はグループ A に 3 株分類され、このグループは台湾株の情報と合わせると無症候株が一番多いことから、日本の無症候株はアジアに広く存在する無症候株であることが示唆された。

2) 病原性関連 ORF の解析

以前無症候株で欠損しているとして同定された AIG17 の ORF を PCR にて確認したところ、日本の無症候株では 5 株のうち 1 株から検出された。よってすべての無症候株に共通の特徴ではないと考えられた。しかし肝膿瘍株、下痢症株ではそれぞれ 10/16, 7/11 の陽性株が存在していた。症状別に PCR 陽性サンプルを%で考えると無症候性、肝膿瘍、下痢症でそれぞれ 20, 62.5, 63.6% であり、昨年度行った台湾株での結果を合わせると下痢症と無症候性サンプル間で t-test で有意差を見出した。肝膿瘍株に関しては台湾株のサンプルが 2 株しかなく、母集団が確保されなかったため有意差を見出すことができなかったと考える。日本株では肝膿瘍、下痢症ともに 60%程度の陽性率を示すため、下痢症と無症候間でも有意差は存在すると考えられる。

系統解析から考察すると、日本株の結果はグループ A, B, C それぞれ 0/5, 8/14,

10/13 の陽性株が存在していた。%にするとグループ A, B, C で 0, 57, 77% が陽性であった。昨年度の台湾株での結果と合わせるとグループ A と C の間で t-test で有意差を見出した。グループ B に関しては台湾株では陽性率が 25% と比較的 low、日本株との差が大きく有意差を見いだせなかったと考える。少なくとも AIG17 の存在はグループ A とグループ C で差があり、その存在が赤痢アメーバの系統に依存する可能性が示唆された。今後サンプル数を増やし、検討を重ねる必要がある。

E 結論

日本・台湾由来臨床株の遺伝子型の系統解析から、日本で見出された非病原性株は台湾で多く見出された非病原性株と系統が似ていること、病原性に関与する可能性が示唆されていた AIG1 family protein (EHI_176590) が東アジア株の解析から実際の病態に関与する可能性が示された。また、AIG1 family protein (EHI_176590) の分布は赤痢アメーバの系統に依存することも示唆された。

日本とリスクグループが共通であり、人種も近い台湾との共同研究は東アジアのアメーバ症疫学研究に有益であり、協力して臨床株の解析を行うことで日本だけでは不可能な疫学調査と研究を進展させることができる。今後も協力関係を続け、新たに樹立された臨床株のゲノム解析を行い、AIG1 family protein PRF が赤痢アメーバの病原性にどのように関与するのか、明らかにしていきたい。

G 研究発表

1 論文発表

該当なし

2 学会発表

Kumiko Tsukui, Genomic features of *Entamoeba histolytica* Japanese clinical isolates The 9th Taiwan-Japan Symposium on Preparedness, Surveillance and Response to New Emerging, Re-emerging Infectious Diseases and Infectious Diseases Associated with Disaster、2012年9月

H 知的財産権の出願・登録状況

該当なし