

humans, China. *Emerg. Infect. Dis.* 20,  
315-318, 2014

山崎 浩, アジア条虫 (Taenia  
asiatica) 感染症, *Med. Technol.*, 41,  
481-482, 2013

山崎 浩, 食品による寄生動物, 感染症  
8 蠕虫感染症 (3) 条虫, *J.*  
*Antibact. Antifung. Agents*, 41,  
227-236, 2013

川合 覚, 石原 優吾, 笹井貴子, 高橋  
史成, 桐木 雅史, 林 尚子, 山崎 浩,  
平石 秀幸, 千種雄一 生シラスの生  
食による 感染が疑われたクジラ, 複  
殖門条虫症 1 例, *獨協医誌*, 40,  
189-192, 2013

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

## II. 分担研究報告書

赤痢アメーバの分化・病原機構の解明

研究分担者： 野崎智義 国立感染症研究所 部長

研究要旨

本研究はアメーバ症に対する新たな治療・予防法の創出を目指し、本原虫の病原機構・細胞分化機構等を分子レベルで解明することを目的とする。3年度は、初-2年度に同定・解析された病原因子の細胞内輸送において中心的な役割を果たす受容体・輸送体タンパク質(システインプロテアーゼ結合ファミリータンパク質: CPBF)群のタンパク質のうち、輸送積荷(カーゴ)の同定がされていない8種類のCPBFに関して、その結合リガンドを同定し、赤痢アメーバにおけるCPBFの生理的な役割を理解に供した。CPBFは哺乳動物を始め他種生物に存在せず、赤痢アメーバを含めた数少ない生物群にのみ保存するリソソーム酵素輸送体であり、赤痢アメーバ症に対する新しい薬剤・ワクチン開発の一助となる可能性が示された。

A. 研究目的

赤痢アメーバ症は国内で最大の感染・有症者を生じる寄生虫症である。我が国では、主として、男性同性愛者(Men who have Sex with Men: MSM)及び知的障害者を中心に感染者数、感染報告数は過去10年以上にわたり増加の一途をたどっている。現在、感染集団の拡大と赤痢アメーバの病原性の増加の可能性が懸念されている。国内では感染症法の第5類に分類される全数把握・届出の義務づけられている。現在、届けられている800例程度の国内報告例の多くはMSMのものと考えられており、知的障害者における感染は過小評価されている。しかしながら、知的障害者施設を対象とした調査によれば、血清反応により明らかにされた感染既往は10-50%程度に見られ、知的障害者における感染浸淫は極めて深刻であるこ

とが示されている。海外では、主に途上国を中心として熱帯・亜熱帯・温帯の諸国に感染が定着し、マラリアに次いで死亡者数の多い原虫性の感染症と認知されている。

赤痢アメーバの診断法は商業的には抗体検査に依存しており、病原学的なPCR、抗原捕捉などの検査は一般検査室では行われず、簡便なキットの作成と配布が望まれている。一方、赤痢アメーバ症に対する予防ワクチンは存在せず、その治療は現在もつばらメトロニダゾールにより行われているが、インビトロにおける薬剤耐性の獲得は繰り返し示されている。また、関連したジアルジア、トリコモナス等の原虫ではメトロニダゾール耐性はラボレベルにも、臨床的にも良く確立しており、新しい薬剤の開発とその標的の探索は急務である。理想的な薬剤標的は

言うまでもなく、哺乳動物を含めた他種生物に存在せず、対象となる病原体だけに選択的に存在する分子・経路・機構である。

我々は初-2年度に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) を同定するとともに、CPBF1 に次いで mRNA の発現の多い CPBF6 と CPBF8 について、その積荷を同定した。本年度は、CPBF1-11 のうち未だ積荷の同定されない8種類のCPBFに関して、HA 標識をしたCPBFを発現させた形質転換体からの免疫沈降により積荷タンパク質の同定を行った。

## B. 研究方法

### 1. 培養

HM1:IMSS c16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. CPBF-HA付加体発現株の作成

初-2年度に行ったのと同様の方法を用いて、C末端にHAエピトープを付加したCPBF2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 又は11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 c16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

CPBF2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 又は11-HAを発現する形質転換体から抗HA抗原とprotein A-agaroseにより、CPBF<sub>x</sub>-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

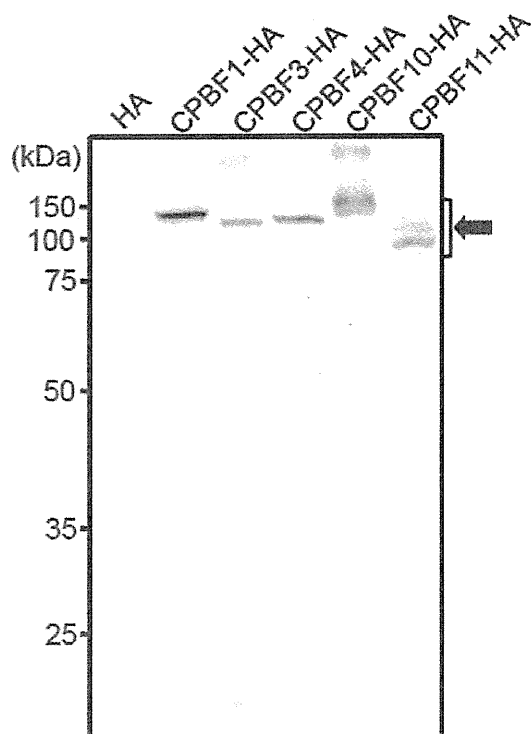
り展開し、CPBF<sub>x</sub>-HA形質転換体抽出液のみから検出されるタンパク質をLC-ToFMSを用いた質量分析に供した。

(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. CPBF2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 又は11-HAの発現の確認

CPBF2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 又は11-HAを発現した赤痢アメーバ形質転換体から目的タンパク質の発現を確認した(図1上下)。



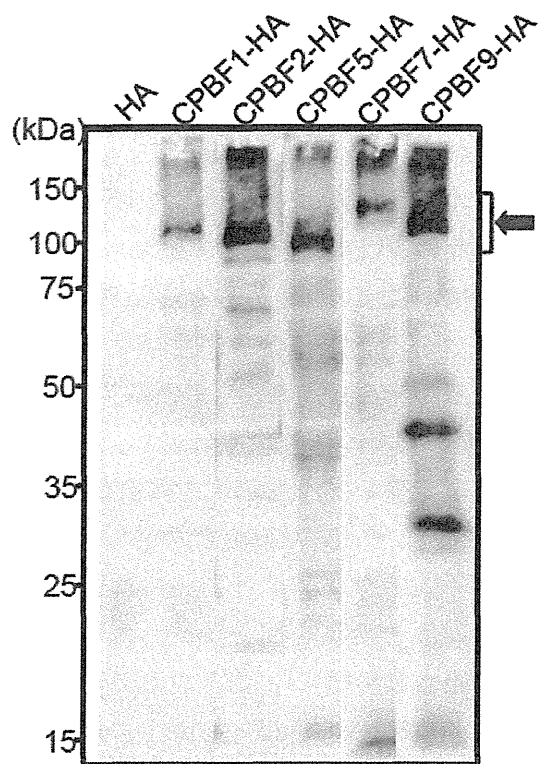


図 1 CPBF2-11-HA を発現した赤痢アメーバ形質転換株の粗抽出液を SDS-PAGE で展開後、イムノブロット解析を行った。CPBF1-HA、HA のみを発現した形質転換体を陽性・陰性対照とした。

## 2. 免疫沈降による CPBF2-11 の積荷の同定

CPBF2-11-HA を発現した形質転換体細胞の粗抽出液から HA 抗体を用いて CPBF を免疫沈降し、SDS-PAGE で展開した後、銀染色するか(図 2)、共沈したタンパク質混合物を質量分析により解析した。

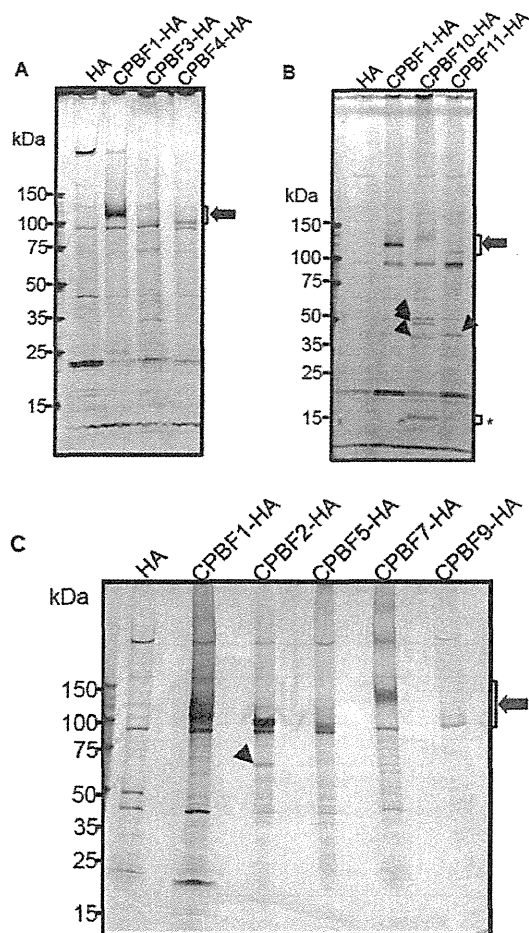


図 2 CPBF-HA 発現形質転換株から HA 抗体により CPBF-HA を免疫沈降後、SDS-PAGE し、銀染色により可視化した。矢印は HA 抗体により沈降した標的タンパク質を、矢頭は HA コントロールに見られないユニークバンドを示す。

質量分析の結果を図 1 に示す。CPBF2-11 で様々なリガンドが同定されたが、検出頻度から有意と判断されたものは CPBF2, 7, 10 であった。これらの積荷はいずれも N 末端にシグナルペプチドを有し、アミラーゼやベータヒキソースアミナーゼなど多くの種類であった。それ以外の CPBF では積荷とは考えられないが、膜蛋白 Galactose/N-acetylgalactosamine 阻害

レクチン軽鎖(CPBF4, 5)などや、ER に局在すると予測される heat shock protein 70 などが同定された。CPBF1 でシステインプロテアーゼが同定された以外、積荷として同定された積荷はすべて糖鎖分解酵素であった。

CPBF	Identified proteins	Accession number GenBank	Quantitative value <sup>1)</sup>	
			CPBF	HA
CPBF2	CPBF2	XP_653276	347.17	0
	alpha-amylase family protein	XP_656659	122.46	0
	70 kDa heat shock protein	XP_654737	3.706	0
	hypothetical protein	XP_656760	3.706	0
			CPBF3	HA
CPBF3	CPBF3	XP_649180	203.48	0
	70 kDa heat shock protein, putative	XP_654737	14.759	2.6368
	CPBF4	XP_655897	12.024	0
			CPBF4	HA
CPBF4	CPBF4	XP_655897	152.3	0
	CPBF3	XP_649180	15.488	0
	serine-threonine-isoleucine rich protein	XP_001913596	4.3023	0
	EHCP-A2	XP_650642	3.4418	0
	galactose-specific adhesin light subunit	XP_001913429	3.4418	0
			CPBF5	HA
CPBF5	CPBF5	XP_654065	172.19	0
	70 kDa heat shock protein	XP_654737	12.979	0
	galactose-inhibitable lectin 35 kDa subunit precursor	XP_656145	6.922	0
	hypothetical protein	XP_650601	3.461	0
			CPBF6	HA
CPBF6 <sup>1)</sup>	CPBF6	XP_653038		
	alpha-amylase family protein	XP_655836		
	gamma-amylase	XP_652381		
			CPBF7	HA
CPBF7	CPBF7	XP_649361	344.4	3.1408
	beta-N-acetylhexosaminidase	XP_656208	17.954	0
	beta-N-acetylhexosaminidase, beta subunit	XP_650273	16.322	0
	MPR1	XP_656907	13.058	0
	pore-forming peptide amoebapora B precursor	XP_001913832	9.7833	0
	70 kDa heat shock protein	XP_654737	8.1611	0
	hypothetical protein	XP_652382	6.5289	3.1408
	hypothetical protein	XP_650886	3.2644	1.5704
	hypothetical protein	XP_655760	3.2644	0
	hypothetical protein	XP_656261	3.2644	0
			CPBF8	HA
CPBF8 <sup>2)</sup>	CPBF8	XP_652899		
	beta-hexosaminidase alpha-subunit	657529/AJ582954 <sup>1)</sup>		
	lysozyme1	XP_653294		
			CPBF9	HA
CPBF9	CPBF9	XP_655360	100.27	0
	hypothetical protein	XP_656071	10.285	0
	70 kDa heat shock protein	XP_654737	10.285	0
	lysozyme2	XP_656933	7.7124	1.6232
			CPBF10	HA
CPBF10	CPBF10	XP_649015	63.676	0
	alpha-amylase	XP_656408	49.048	0
	alpha-amylase family protein	XP_656836	27.378	6.7656
	70 kDa heat shock protein	XP_654737	25.694	4.6108
	hypothetical protein	XP_656261	19.391	0
	beta-amylase	XP_653890	17.11	2.2054
	hypothetical protein	XP_651526	4.5626	0
			CPBF11	HA
CPBF11	CPBF11	XP_656044	89.532	0
	70 kDa heat shock protein	XP_654737	24.105	4.6108

表1 CPBF 結合タンパク質の質量分析の結果 (バッチシーケンシングの結果のみ示す) Quantitative value は CPBF-HA, HA コントロール発現体の粗抽出液からの当該タンパク質の検出の相対的な頻度・量を表す。

#### D. 考察

本研究において同定・解析された CPBF は真核生物に一般に保存されたリソソ-

ム輸送体として知られる mannose 6-phosphate receptor (MPR) や Sortilin(Vps10p) 、 plant-specific vacuolar sorting receptor (VSR) などとはタンパク質一次配列レベルでの相同性を保たない。CPBF 遺伝子・タンパク質は我々の検索によれば、Amoebozoa の一部、赤痢アメーバと嫌気性自由生活性アメーバである Mastigamoeba だけで保存している。2 年次までの研究成果により、最も高い遺伝子発現レベルを示す 3 種の CPBF である CPBF1, 6, 8 の積荷を同定し、そのリソソーム・ファゴソームへの輸送と病原性における役割を明らかにした (初・2 年度報告書参照)。一方それ以外の 8 種の CPBF の積荷の実態はインシリコ解析では全く予測できなかった。そこで本年度は残りの CPBF に関して、これまでと同様に生化学的な方法を用い、少なくとも新しい 3 種の CPBF に関して積荷の同定に成功した。

今後構造生物学的解析により、CPBF の積荷特異性を規定する分子機構を究明する予定である。更に、2-3 年次に研究成果によって明らかにされたように、積荷の同定された CPBF のうち、CPBF1 以外はすべて糖鎖の分解・代謝に関与していると予想された。糖鎖分解酵素のリソソーム輸送の寄生・病原における役割は現時点では不明であり、積荷タンパク質の機能の同定と、CPBF の遺伝子発現抑制形質転換体を用いた解析を今後予定している。感染における役割に関しては、動物から

#### E. 結論

システインプロテアーゼ結合ファミリ

一タンパク質(CPBF)のうち CPBF2, 7, 10 の積荷タンパク質を同定した。更に、積荷タンパク質のプロセッシングとソーティングに関与すると予測されるアクセサリ一タンパク質を同定した。3年度の研究成果により、初-2年度の成果と併せて、赤痢アメーバにおける病原性にとって重要な新規リソソーム輸送機構の基盤が明らかとなった。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文

- Jeelani, G., Husain, A., Sato, D., Soga, T., Suematsu, M., Nozaki, T. Biochemical and functional characterization of novel NADH kinase in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Biochimie* 95, 309-319, 2013.
- 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.
- Furukawa, A., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. Cysteine protease-binding protein family 6 mediates the trafficking of amylases to phagosomes in the enteric protozoan *Entamoeba histolytica*. *Inf. Immun.* 81, 1820-1829, 2013.
- Ali, V. and Nozaki, T. Iron sulfur clusters, their biosynthesis and biological functions in protozoan parasites. *Adv. Parasitol.*, 83, 1-92, 2013.
- Escueta- De Cadiz, A., Jeelani, G., Nakada-Tsukui, K., Caler, E., and Nozaki, T. Transcriptome analysis of encystation in *Entamoeba invadens*. *PLoS One* 8, e74840, 2013.
- Biller, L., Matthiesen, J., Kuehne, V., Lotter, H., Handal, G., Nozaki, T., Saito-Nakano, Y., Schuemann, M., Roeder, T., Tannich, E., Krause, E., Bruchhaus, I. The cell surface proteome of *Entamoeba histolytica*. *Mol Cell Proteomics*. 2013 Oct 17. PMID: 24136294. In press
- Makiuchi, T. and Nozaki, T. Highly divergent mitochondrion-related organelles in anaerobic parasitic protozoa. *Biochimie* 2013. In press
- Lee, Y. A., Nam, Y. H., Min, A., Kim, K. A., Nozaki, T., Saito-Nakano, Y., Mirelman, D., Shin, M.H. *Entamoeba histolytica*-secreted cysteine proteases induce IL-8 production in human mast cells via a PAR2-independent mechanism. *Parasite*. 2014, 21, 1. In press

#### 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 25 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：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常勤医師

研究要旨：HIV 感染者において、赤痢アメーバ症を始めとする腸管寄生性原虫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。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。

分担研究者

氏名：渡辺 恒二

所属病院名：国立国際医療研究センター

所属科：エイズ治療研究開発センター

役職：常勤医師

#### 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赤痢アメーバ抗体陽性者の疾患予後と抗体価の推移に関する研究：

HIV感染者の初診時抗体価データから、国内赤痢アメーバ感染ハイリスク群に於ける赤痢アメーバ抗体血清陽性率（seroprevalence）を算出する。既往歴の無い患者においては、赤痢アメーバに対する治療を行わない場合の侵襲性赤痢アメーバ症累積罹患率を Kaplan-Meier 法で算出する。また、侵襲性赤痢アメーバ症発症患者に於ける抗体価の推移を見て、無症候性赤痢アメーバ抗体陽性者の病態を考察する。

②HIV感染者に於ける赤痢アメーバ症潜伏感染に関する研究：

HIV感染者に於ける下部消化管内視鏡検査データベースを用いて、下部消化管症状の無い患者で赤痢アメーバによる下部消化管潰瘍（赤痢アメーバ潜伏感染）が起こっている頻度を算定する。赤痢アメーバ潜伏感染の有無患者群において、どのような特性があるか、血清赤痢アメーバ抗体価を併せて比較検討を行う。①の結果と併せて、ハイリスク群（HIV感染者）における赤痢アメーバ潜伏

感染の臨床的・公衆衛生的意義を考察する。下部消化管症状については、内視鏡検査施行前に行われた Gastrointestinal Symptom Rating Scale (GSRs) による問診結果を基に判定した。

③HIV感染者の虫垂炎に於ける赤痢アメーバ感染の影響を調べる研究：

HIV感染者のうち、急性虫垂炎の診断を受け、当院で虫垂切除術を受けた45例を対象に、調査を行った。ホルマリン固定検体(パラフィンブロック)から、新たに薄切標本を作製する。まず、薄切標本のHE染色とPAS染色のプレパラートを新たに作成し、病理専門医によって赤痢アメーバ感染の有無を診断する。また、同時に国立感染症研究所寄生動物部においてパラフィンブロックから遺伝し抽出を行い赤痢アメーバ特異的プライマーを用いたPCRを行い虫垂に赤痢アメーバが存在するかを判定する。以上の結果から、HIV感染合併虫垂炎に於ける赤痢アメーバ感染と定着の影響を考察する。

④HIV感染者に於けるジアルジア症とクリプトスポリジウム症の頻度と検査感度に関する研究：

研究初年度に報告したとおり、上記疾患(特にクリプトスポリジウム症)は、保険適応検査である直接検鏡法の診断感度が低く、罹患率が過小評価されている可能性がある。当院一般検査室で、イムノクロマト法によるカード式キットを一定期間導入することで、上記疾患の発症件数がどのように変化するかを検討した。

(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、同意書が必要と認められた研究(後ろ向き観察研究以外)については、被験者の文書による同意を得た上でやっている。

C. 研究結果

①赤痢アメーバ抗体陽性者の疾患予後と抗体価の推移に関する研究：

2006年から2012年の初診患者1303名を対象とした検査で、血清陽性率は21.3%(277/1303)であった。これは、エジプトの農村住民に於ける血清陽性率(24.2%)とほぼ同等であり、東京のHIV感染者(特に男性同性愛者)に赤痢アメーバ症が広く流行していることが改めて確認される結果となっ

た。その中で、既往歴のない患者に於ける抗体陽性率は、16.3%(195/1207)であった。上記既往歴のない患者1207人のうち、18人が侵襲性赤痢アメーバ症を発症し、特に初診時抗体価 x400 以上の患者では高率であることが示された(Figure 1)。また、18人の抗体価の推移を初診時と侵襲性赤痢アメーバ症発症前後で比較したところ、初診時抗体価 x200 以下の群では、侵襲性赤痢アメーバ症発症時に抗体価が一時的に上昇するのに対し、初診時抗体価 x400 以上の群では、侵襲性赤痢アメーバ症発症時の抗体価は初診時とほぼ変化無く、治療後に低下することが示された。以上の結果から、初診時抗体価 x400 以上の高値である患者群では、自覚症状はないものの赤痢アメーバの潜伏感染が起こっており、figure 1 に示したとおり、抗体価 x400 以上の患者群の20%が1年以内に顕性感染(侵襲性赤痢アメーバ症)を発症することが示唆される結果となった。

侵襲性赤痢アメーバ症累積発症リスク

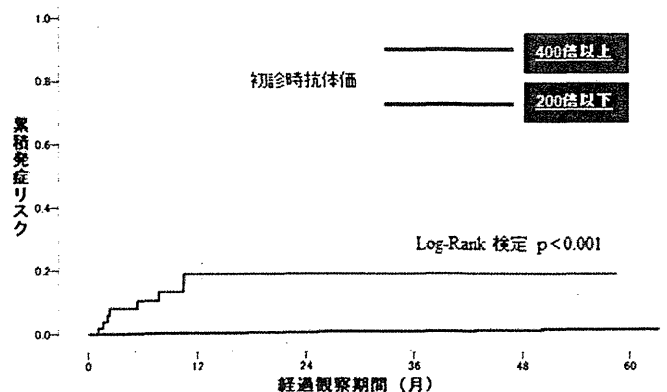


Figure 1 初診時赤痢アメーバ抗体価と侵襲性赤痢アメーバ症発症リスク

②HIV感染者に於ける赤痢アメーバ症潜伏感染に関する研究：

①で得られた仮説(赤痢アメーバ抗体高値の患者では無症状ではあるが、潜伏感染が起こっている)を検証するため、HIV感染者の内視鏡データベースを用いて、下部消化管症状のない(GSRs≤2)患者の内視鏡所見をまとめた。2010年6月から2013年6月までの期間に380件の下部消化管内視鏡検査が

IV感染者に対して行われ、そのうち71件が下部消化管症状のない患者であった（多くは大腸癌スクリーニングのために内視鏡が施行された）。71症例のうち、8例（11.3%）がアメーバ性大腸炎と診断された。また、検査当日に行った血清赤痢アメーバ抗体陽性率は、アメーバ性腸炎のある患者群で有意に高く、多くは抗体価 x400 以上であった（Table 1）。また、アメーバ性腸炎あり患者群では、HLA DQB1\*06:01 が高頻度見られた（アメーバ性腸炎あり患者群 71.4%、アメーバ性腸炎なし患者群 10.0%）。このHLAは、過去の研究で赤痢アメーバ感染に対して protective に働くということが示されており、アメーバ性腸炎あり患者が顕性感染を示さず、潜伏感染を起こしている病態に関わっていることが示唆される結果であった。本研究により、赤痢アメーバの病態生理とそれに対する宿主の免疫機構解明に繋がるヒントが示される結果となった。

赤痢アメーバ感染を有する虫垂炎症例の特徴を見いだすことは出来なかった。しかしながら、本研究により、HIV感染合併虫垂炎症例（特に男性同性愛者）では、赤痢アメーバの感染を常に念頭に置くべきであることが明らかになった。

	アメーバ性腸炎あり (n=8)	アメーバ性腸炎なし (n=63)	p value
年齢	39 (27-62)	51 [26-81]	0.07
男性	8/8 (100%)	56/63 (88.9%)	1.00
男性同性愛性交渉	8/8 (100%)	44/63 (69.8%)	0.10
赤痢アメーバ既往	0/8 (0%)	7/63 (11.1%)	1.00
CD4, / $\mu$ L	301 (70-584)	436 (21-1697)	0.28
HIV-RNA, IC/ml	4.02 (UD-5.41)	UD (UD-5.85)	0.09
アメーバ抗体陽性	7/8 (87.5%)	11/63 (17.5%)	< 0.001
<x100	1	52	
x100	1	5	
x200	0	3	
x400	3	2	
x800	1	1	
x1600	2	0	
感染部位			
Cecum	5		
Ascending	3		
Transverse	1		
Descending	0		
Sigmoid	1		
Rectum	4		

Table 1. 潜伏性赤痢アメーバ腸炎の有無と患者特性

③HIV感染者の虫垂炎に於ける赤痢アメーバ感染の影響を調べる研究：

HIV感染合併虫垂炎症例で虫垂切除術を受けた45例のうち、7例に赤痢アメーバ感染が確認された。7例のうち4例は病理学的に栄養型アメーバを確認することが出来た（Figure 2）。赤痢アメーバ感染の有無で臨床症状や検査所見などを比較したが、

## アメーバ虫垂炎

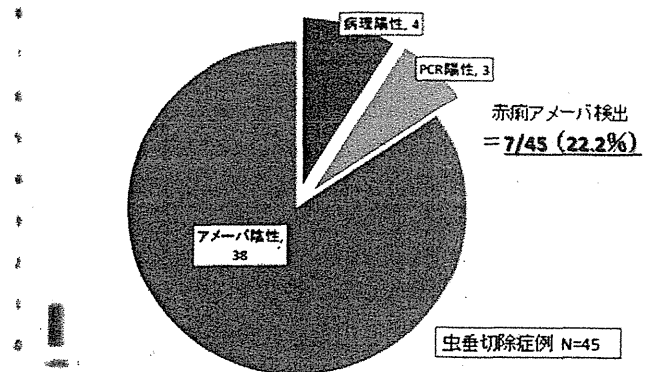


Figure 2. HIV感染合併虫垂炎に於ける赤痢アメーバ感染の頻度

④HIV感染者に於けるジアルジア症とクリプトスポリジウム症の頻度と検査感度に関する研究：

当院一般検査室で、イムノクロマト法によるカード式キットを一定期間導入した結果、ジアルジア診断件数は、増加しなかったものの、2013年のクリプトスポリジウム診断件数は飛躍的に増加した（Figure 3）。導入から1年であり、現時点では解析は出来ないものの、カード式キット導入前には相当数のクリプトスポリジウム症が見逃されていた可能性が示唆された。本研究は今後も継続すべきと考えられ、データ集積を行い、検鏡検査以外の診断感度の高い簡便な検査方法を保険診療で可能となるような提言をすべきと考えられた。

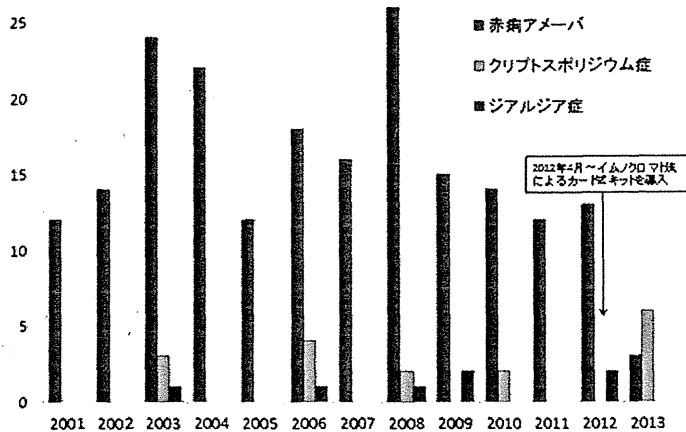


Figure 3. HIV 感染者に於ける腸管寄生虫症診断件数

### 染合併虫垂炎症例におけるアメーバ性虫垂炎の頻度とその特徴

53<sup>rd</sup> ICAAC in Denver, Entamoeba histolytica in a Japanese HIV cohort and clinical significance of asymptomatic but seropositive anti Entamoeba histolytica antibody status,

日本性感染症学会第 26 回学術大会日本エイズ学会合同シンポジウム, HIV 感染者でよく見る STI

#### 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

第 27 回日本エイズ学会学術集会口頭発表, HIV 感

#### 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

「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 25 年度分担報告書

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* と同様に 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も定着できなかった。さらに、*E. moshkovskii* 感染ではパイエルパッチにおいて *E. histolytica* 感染時と比べて有意に高い IFN- $\gamma$  の産生が誘導されることが判明した。IFN- $\gamma$  の中和実験によって、*E. moshkovskii* 感染時に誘導される IFN- $\gamma$  は、腸管において諸刃の刃として「消化管症状」と「原虫の排除」の両方に機能する可能性が示唆された。

本年度は *E. histolytica* と *E. moshkovskii* の感染によって誘導される防御免疫の有無を調べた。まず *in vitro* において *E. histolytica* と *E. moshkovskii* のメトロニダゾール感受性を調べたところ、両原虫ともにメトロニダゾールに対して同程度に量依存的な感受性を示した。次いで、マウスにおいて各原虫の感染 14 日後にメトロニダゾールを経口投与し、薬剤投与 7 日後（初回感染 21 日後）に糞便中に原虫が認められないことを PCR 法によって確認した。初回感染の終息確認後 7 日目と 28 日目に *E. histolytica* と *E. moshkovskii* を再感染させたところ、実験的に一度感染したマウスは再感染防御能を獲得しており、それも赤痢アメーバの種特異的に防御免疫が誘導されることが判明した。

## A. 研究目的

バングラデシュはダッカの子供におけるコホート研究から赤痢アメーバ特異的 IgA の有無が再感染防御と相関を示すことが報告されている。しかしながら、赤痢アメーバの感染によって誘導される再感染防御機構に関する情報は不十分である。我々は、感染によって誘導される防御免疫を調べる目的で、モデルマウスを用いて *E. histolytica* と *E. moshkovskii* の感染実験を行った。

## B. 研究方法

CBA/J マウスに  $1 \times 10^6$  の *E. histolytica* と *E. moshkovskii* を感染させ、糞便の培養ならびに PCR 法による糞便内アメーバ DNA の検出により感染をモニタする。

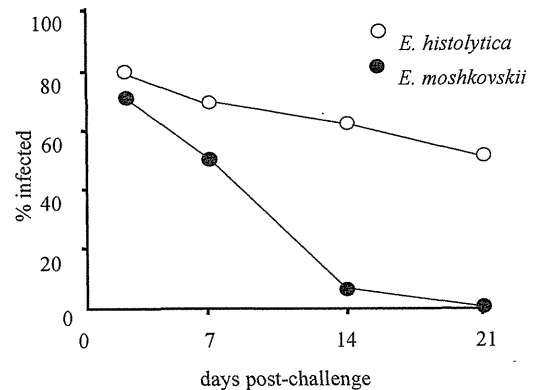
- 1) *in vitro* において、*E. histolytica* および *E. moshkovskii* のメトロニダゾールに対する感受性を確認する。
- 2) *E. histolytica* および *E. moshkovskii* の栄養対をマウスの虫垂に接種し、感染14日後にメトロニダゾールを経口投与して初回感染を終息させる。
- 3) 薬剤投与7日後（初回感染21日後）に糞便中に原虫が認められないことをPCR法によって確認する。
- 4) 初回感染の終息確認後7日目と28日目に *E. histolytica* と *E. moshkovskii* を再感染させ、再感染防御免疫の有無を確認する。

（倫理面への配慮）

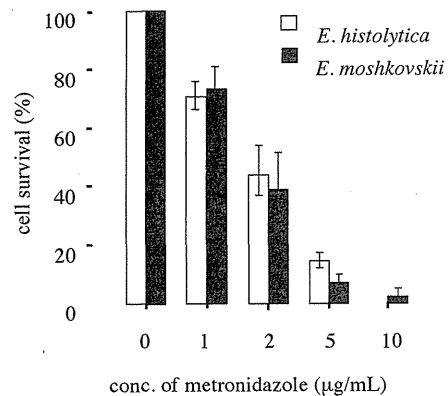
実験動物へ与える苦痛が最小限となるように努めた。

## C. 研究結果

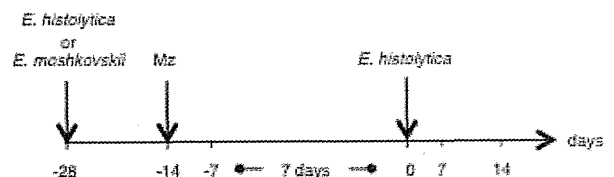
CBA/J マウスに  $1 \times 10^6$  の *E. histolytica* と *E. moshkovskii* を感染させると、以下に示すように、*E. histolytica* は慢性感染に至り、*E. moshkovskii* は感染14日目頃までに排虫された。

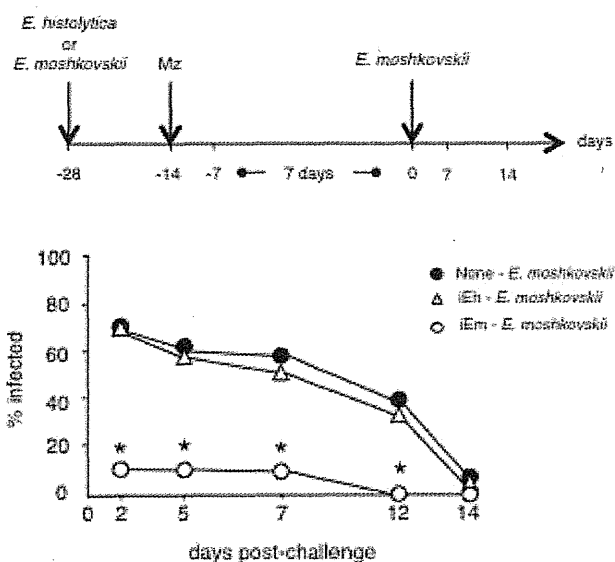
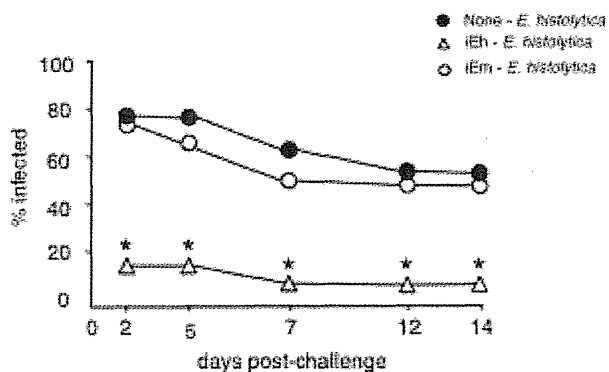


次いで *in vitro* において、*E. histolytica* および *E. moshkovskii* のメトロニダゾールに対する感受性を確認したところ、以下に示すように、いずれもメトロニダゾールに対して同程度に量依存的な感受性を示した。



初回感染の感染 14 日後にメトロニダゾールを経口投与し、薬剤投与 7 日後（初回感染 21 日後）に糞便中に原虫が認められないことを PCR 法によって確認した。次いで、初回感染の終息確認後 7 日目と 28 日目に *E. histolytica* を再感染させた。





以上の実験より、実験的に一度感染したマウスは再感染防御能を獲得しており、それも赤痢アメーバの種特異的に防御免疫が誘導されることが判明した。この再感染防御能は、再感染を初回感染の終息確認後 28 日目に行っても、基本的には同様に認められた。

マウスにおける赤痢アメーバ感染実験では、自然感染により種特異的な再感染防御能が誘導された。本モデルは再感染防御機構を研究する上で有用なプラットフォームを提供すると考えられる。

#### 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

##### 1. Shinjiro Hamano and Chikako Shimokawa:

Intestinal inflammatory mediated clearance of *Entamoeba moshkovskii* is dependent on IFN- $\gamma$ .  
Forum Cheju 16, Seoul National University, Seoul, Korea, 2013年8月31日 (国際学会)

##### 2. Shinjiro Hamano and Chikako Shimokawa:

Intestinal inflammatory mediated clearance of *Entamoeba moshkovskii* is independent on IFN- $\gamma$ .  
第12回 あわじしま感染症免疫フォーラム、Session 5: Mucosal Immunity and Infection、兵庫、2013年9月12日 (国際学会)

##### 3. 谷川智洋、藤井仁人、三浦雅史、濱野真二郎、風幸世、NZOU SAMSON、MWAU MATILU、金子聰：マルチプレックスアッセイ法を用いたマンソン住血吸虫由来組換え抗原の抗原性評価、第54回 日本熱帯医学会大会、長崎、2013年10月4日～5日 (国内学会)

##### 4. 井上学、岡真優子、仁木満美子、尾関百合子、一瀬休生、濱野真二郎、松本壮吉：ケニア共和国 Mbita 地区の児童における結核菌感染と鉤虫感染の関連、第54回 日本熱帯医学会大会、長崎、2013年10月4日～5日 (国内学会)

##### 5. 風幸世、CHADEKA EVANS、砂原俊彦、CHAVES LUIS FERNANDO、JUSTIN

YOMBO K. DAN、金子聰、一瀬休生、松本壮吉、嶋田雅暁、濱野真二郎：Risk Factors and Spatial Distribution of *Schistosoma mansoni*

- Infection among Primary School Children in Western Kenya、第54回 日本熱帯医学会大会、長崎、2013年10月4日～5日（国内学会）
6. Kalenda Yombo Dan J, Kentaro Kato, Yasuyuki Goto, Yoshito Fujii, Shinjiro Hamano: Application of tandem repeat recombinant proteins as potential antigens for the sero-diagnostic test of *Schistosoma mansoni* infection、第54回 日本熱帯医学会大会、長崎、2013年10月4日～5日（国内学会）
7. 安達圭志、長田良雄、中村梨沙、玉田耕治、濱野真二郎：Unique T cells with unconventional cytokine profiles induced in the livers of mice during *Schistosoma mansoni* infection、第54回 日本熱帯医学会大会、長崎、2013年10月4日～5日（国内学会）
8. Kalenda Yombo Dan J, Kentaro Kato, Yasuyuki Goto, Yoshito Fujii, Shinjiro Hamano: Application of tandem repeat recombinant proteins as potential antigens for the sero-diagnostic test of *Schistosoma mansoni* infection、Asia-Africa Research Forum on Emerging and Reemerging Infections (AARF) 2014、仙台、2014年1月20日～22日（国際学会）
9. Shinjiro Hamano and Chikako Shimokawa: Species-specific immunity induced by infection with *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba moshkovskii* in mice. US-Japan panel meeting、Dhaka, Bangladesh、2014年2月11日（国際学会）
10. Kalenda Yombo Dan J, Kentaro Kato, Yasuyuki Goto, Yoshito Fujii, Shinjiro Hamano: Application of tandem repeat recombinant proteins as potential antigens for the sero-diagnostic test of *Schistosoma mansoni* infection、第3回 感染症若手フォーラム、長崎、2014年2月14日（国内学会）
11. Nagi S, Hamano S: Risk factors and spatial distributions of *Schistosoma mansoni* infection among primary school children in Mbita district, western Kenya. 第83回日本寄生虫学会大会、愛媛、2014年3月27日～28日（国内学会）
- 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

「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 25 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：分子疫学については、本年度はこれまでの調査ではじめて東北地域で角膜分離株が 2 株得られた。角膜分離株はいずれも T4 タイプであり、東北地域の 1 分離株を含む 3 株は世界的に主要な角膜分離株の遺伝子型である ATCC30461 *A. polyphaga* Eye strain の遺伝子型を示し、本遺伝子型が西日本のみならず東日本全般に分布していることが示唆された。

前年度までにアcantアメーバの感受性の新しい測定法やア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）の開発を行った。本年度は、アcantアメーバ抗体を用いた迅速診断キットの開発を行い、*In vitro*において、高感度にアcantアメーバを検出が可能であり、臨床においてもアcantアメーバを 30 分と短時間で検出することが可能であった。

#### A. 研究目的

アcantアメーバ角膜炎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る。近年、国内でみられたコンタクトレンズ（CL）使用者による感染拡大の実態に対し、分子生物学的に調査を行い、その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アメーバ角膜炎は難治性角膜感染症であり、早期診断・治療が重要とされる。診

断根拠となるアcantアメーバの検出には、角膜擦過物の鏡検・培養や polymerase chain reaction (PCR) 法などが用いられるが、一方で、専門的な技術や特殊な機器を必要としない迅速診断法へのニーズもある。免疫クロマトグラフィ（immunochromatography: IC）法はラテックス粒子などで標識した特異抗体を用いて目的とする抗原を検出する検査法で、操作が簡便であり、判定にかかる時間も 30 分以内と、迅速診断が可能なることを特徴とし、眼科領域ではアデノウイルス

抗原検出がよく用いられている。今回、IC法を用いたアカントアメーバ抗原の迅速検出キットの開発し、その有用性につき評価した。

## B. 研究方法

分子疫学については、前年度と同様、全国17施設を拠点として、アメーバ角膜炎由来株の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った。

IC法については、通常のIC法より感度が高いとされる、蛍光IC法（標識ナノ粒子に蛍光シリカ粒子を用いる方法）を抗原検出法として採用した。本キットではサンプルを希釈液と混合し、プレートに滴下、30分の反応後、蛍光スコープで陽性ラインを確認することで抗原を検出する。予備的検討として、アカントアメーバ栄養体の希釈液を用いて本キットの検出限界を*in vitro*で検証した。またアカントアメーバ角膜炎が疑われた8症例の角膜擦過物を検体として、本キットによる抗原検出を行い、同時にPCR法、培養検査との結果の整合性を確認した。

### （倫理面への配慮）

人サンプルの使用については、ヘルシンキ宣言に従い、説明と同意（インフォームド・コンセント）を行った。なお、本試験は愛媛大学倫理審査委員会の承認を経て行っている。

## C. 研究結果

平成 25 年度に国内アメーバ角膜炎分子疫学のために解析された株は5株（角膜炎4株、レンズ保存液1株）であった（表-1）。本年度はこれまでの調査ではじめて東北地域で角膜分離株が2株得られた。角膜分離株はいずれも T4 タイプであり、東北地域の1分離株を含む3株は世界的に主要な角膜分離株の遺伝子型である ATCC30461 *A. polyphaga* Eye strain の遺伝子型を示し、本遺伝子型が西日本のみならず東日本全般に分布していることが示唆された。東北地域から得られた角膜分離株の1つは角膜炎分離株としてスロバキアで報告されている *Acanthamoeba* sp. AcaVNAK05 の遺伝子型を示した。

アカントアメーバには細菌類をはじめとする共

生体symbiontが検出されているが、本年度得られた角膜分離株の中に、近年その存在があきらかとなった巨大核細胞質ウイルスに分類される Megavirus と考えられるウイルスが検出された（図-1）。ゲノムサイズは1,2 MbでMimivirusに近いが、Megavirusに高い相同性を示した。これまでMegavirusはアメーバが自然宿主であることが想定はされていたが、アメーバより検出されたのは本例が世界で初めてと考えられる。今回得られたMegavirusは、宿主のアカントアメーバに対して激しい細胞内増殖を起し致死性であった。また培養ヒト角膜実質細胞に対しては細胞剥離を主とする細胞変性を起こしたが、その細胞内増殖は明らかではなかった。

IC法については、*in vitro*では30分間の反応で5個/sampleまでのアカントアメーバの検出が可能であった。また、角膜炎の原因微生物である黄色ブドウ球菌、緑膿菌、カンジダにおいては陰性であり特異性が認められた。さらに、すべての臨床例(8例)において角膜擦過物からPCR法および本キットによりアカントアメーバが検出された。

## 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

1. 井上幸次：細隙灯顕微鏡による鑑別。教育セミナー2「角結膜感染症の鑑別診断とエビデンスに基づいた治療法の選択」第117回日本眼科学会総会、東京、2013/4/4-4/7

2. 八木田健司、井上幸次：角膜炎症例より分離された Megavirus 感染アカントアメーバ。第46回原生動物学会大会、2013/11/8-11/10、広島

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、平成 25 年度におけるアメーバ角膜炎分子疫学調査

試料	試料 ID	地域	type	BLAST
角膜	1-11-1	鳥取	T4	ATCC30461 <i>A. polyphaga</i> Eye strain ( 100% )
角膜	1-12-1	鳥取	T4	ATCC30461 <i>A. polyphaga</i> Eye strain ( 100% )
角膜	14-5-1	宮城	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. AcaVNAK05( 100% )
角膜	14-6-1	宮城	T4	ATCC30461 <i>A. polyphaga</i> Eye strain ( 100% )
保存液	1-11-2	鳥取		培養不能
保存液	1-12-2	鳥取	T4	ATCC30461 <i>A. polyphaga</i> Eye strain ( 100% )

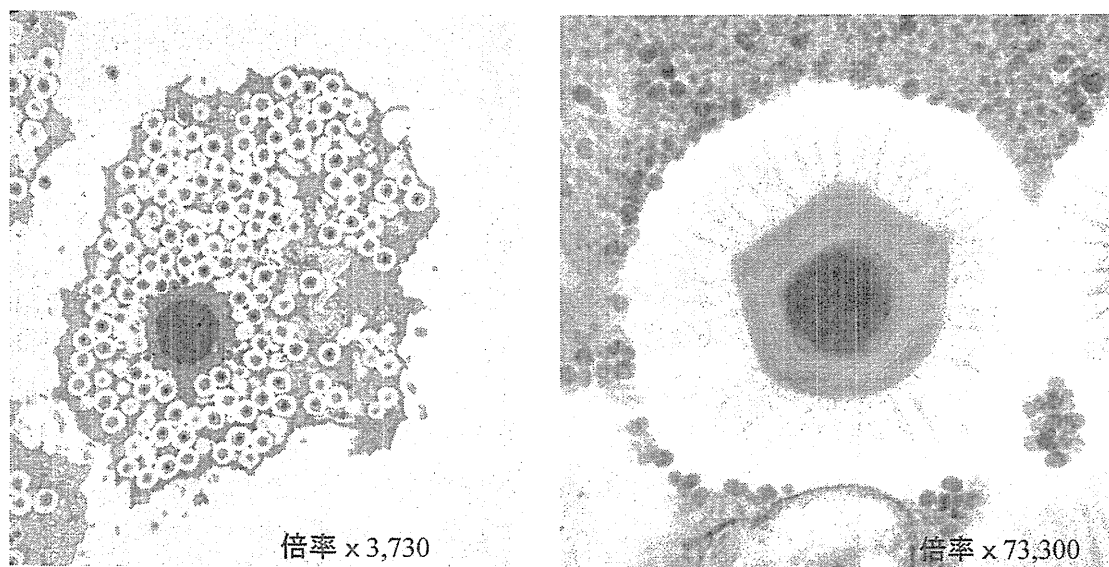


図-1、宿主アcantアメーバ内に検出された Megavirus