

厚生労働科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業
「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）」
平成 25 年度分担報告書

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 寄生動物部 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。本研究では日本と赤痢アメーバ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 (*Entamoeba histolytica*) 感染により発症するアメーバ症は全世界で毎年 10 万人の死者を出す重要な原虫感染症である。飲食物の衛生管理が行き届かない発展途上国での病気と考えられがちであるが、近年日本でも症例が増加している。途上国では赤痢アメーバ嚢子(シスト)に汚染された飲食物の摂取が原因となる食中毒であるが、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での蔓延が重要である。さらに近年問題となっているのは性感染症としてのアメーバ症である。糞口感染の可能性のある男性同性愛者 (man sew with man: MSM) コミュニティーでのリスクの高さは以前から知られており、HIV キャリアーの下痢ではアメーバ症を可能性として考慮することが常識である。さらに近年多様な性サービスを提供

する風俗店に働く女性に赤痢アメーバ感染が増加していると考えられている。詳細な統計データは出ていないものの、2011 年まで 800 例程度で推移していたアメーバ症が 2012 年度では 900 例程度に増加したことは看過できない。

本研究では東アジアに位置し、人種や地理的条件、さらにもに先進国でありリスクグループを同じくする台湾 CDC と共同研究を行い、東アジアの赤痢アメーバ症の疫学調査方法と新たな病原因子の発見を目指す。

B. 研究方法

B-1. 比較ゲノミクスから見出された病原性に関連する ORF の機能解析

これまで日本国内分離株の比較ゲノムから AIG1 family protein をコードする 3 つの ORF (EHI_176580, EHI_176590, EHI_176700) が非

病原性株で欠損していること、この欠損は台湾由来日病原性株でも有意に欠損していたことを明らかにしてきた。そこでこの遺伝子産物の機能解析を行った。

見出された 3ORF のうち、特に最初に見出された EHI_176590 について解析を行った。以降この遺伝子を AIG1-17 とする。

B-1-1. AIG1-17 強発現株の作成。

E. histolytica HM1:cl6 株に pEhExHA, pEhExHA-AIG1-17 プラスミドをリポフェクション法により導入し、G418 による薬剤選択を行い、AIG1-17-HA, HA 株を樹立した。

B-1-2. AIG1-17 強発現株の形態変化の検討。

AIG1-17-HA 株と HA 株を CellTracker Green で染色し、形態を観察した。すると突起 (protrusion) が AIG1-17-HA 株で多く形成されているように観察された。そこで突起の幅 0.8 μ m 以上、突起の長さ 0.7 μ m 以上、さらに長さが幅の 1.5 倍以上という条件で各細胞種につき 60 個の細胞を観察する実験を 3 回行った。

B-1-3. AIG1-17 強発現株の運動能力の検討。

AIG1-17-HA 株と HA 株を CellTracker Green で染色し、共焦点顕微鏡 (LSM510META, Zeiss) で観察し、その運動の様子を画像データとして取得した。40 倍対物レンズを用い、1.57 秒/フレームの速度で一画像を撮り、5 秒ごとに 10 分、合計 120 フレームの画像としてデータを得た。この画像を ICY (Quantitative Image Analysis Unit, Institut Pasteur) の Active contours と Track Manager Plug In を用いて解析した。

B-1-4. AIG1-17 強発現株の酸化ストレス条件下での増殖速度の検討。

AIG1-17-HA 株と HA 株を通常の BIS 培地またはシ

ステインを除去した BIS 培地で培養し、増殖速度を検討した。各細胞 1x10³/mL を各培地に調製し、24 時間ごとにトリパンブルー染色にて生細胞のみ計測した。

B-2. 台湾での臨床分離株の確立と解析

台湾 CDC に送られてくる外国人労働者からの便検体は寄生虫調査のために採取されるためアメーバ症の症状がないシストキャリアーサンプルを見出すことが比較的容易である。日本では健康な人物から便検体の供与を受けることや、そこにシストキャリアを見つけることはほぼ不可能であり、台湾 CDC の赤痢アメーバ検体は非病原性赤痢アメーバ株の研究に必須な材料である。よって台湾 CDC における臨床分離株の確立とその解析を行った。

B-2-1. 台湾での臨床分離株確立

日本からプロトコールの提供と YIMDAH 培地用の試薬 (Yeast Extract) の供与を行い、台湾 CDC での臨床分離株の確立を行った。

B-2-2. 台湾株の動物モデルにおける病原性の評価。

2 種類の台湾由来非病原性臨床分離株 (TC1446 株, TC1198 株) について、ハムスターを用いた肝膿瘍形成実験を行い、病原性を検討した。

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

C-1. 比較ゲノミクスから見出された病原性に関連する ORF の機能解析

C-1-1. AIG1-17 強発現株の作成。

トランスフェクションと薬剤 (G418) 選択により 10 μ g/mL G418 に耐性の HA 株、AIG1-17-HA 株を確

立した。

C-1-2. AIG1-17 強発現株の形態変化の検討。

AIG17-HA 株には多くの protrusion が観察された (図 1)。

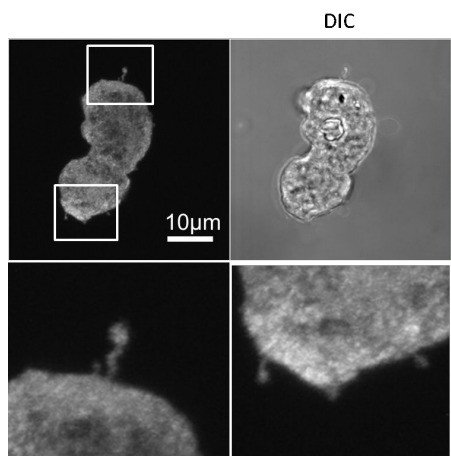


図 1 . AIG1-17-HA の protrusion

そこで研究方法に記述した基準に合った protrusion の数を 60 細胞について 3 回計測した。この結果、HA 株に比べ AIG1-17-HA 株で有意に protrusion の数が増していたことが明らかとなった ($P < 0.01$) (図 2.)。よって AIG1-17-HA 発現は細胞骨格の制御に関与があると考えられた。

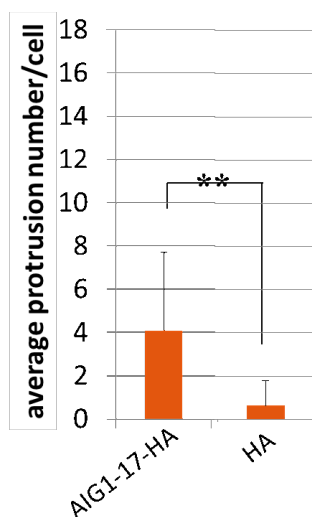


図 2 . 一細胞当たりの protrusion 数

C-1-3. AIG1-17 強発現株の運動能力の検討。

AIG1-17-HA 株と HA 株の細胞運動を数値化し、20 細胞程度の観察を 4 回行い比較した。しかし HA, AIG1-17-HA 株どちらも $0.6\mu\text{m}/\text{sec}$ 程度の移動能力を示し、有意差は見られなかった。よって AIG1-17 は最簿運動への関与は少ないと考えられた。

C-1-4. AIG1-17 強発現株の酸化ストレス条件下での増殖速度の検討。

通常培地とシステイン除去培地での細胞増殖を検討した。下に示すように通常培地で HA 株、AIG1-17-HA 株に差は見られなかったが、システイン除去培地で。時間の培養の後 AIG1-17-HA 発現株で HA 株より増殖が改善する傾向が見られた (図 3)

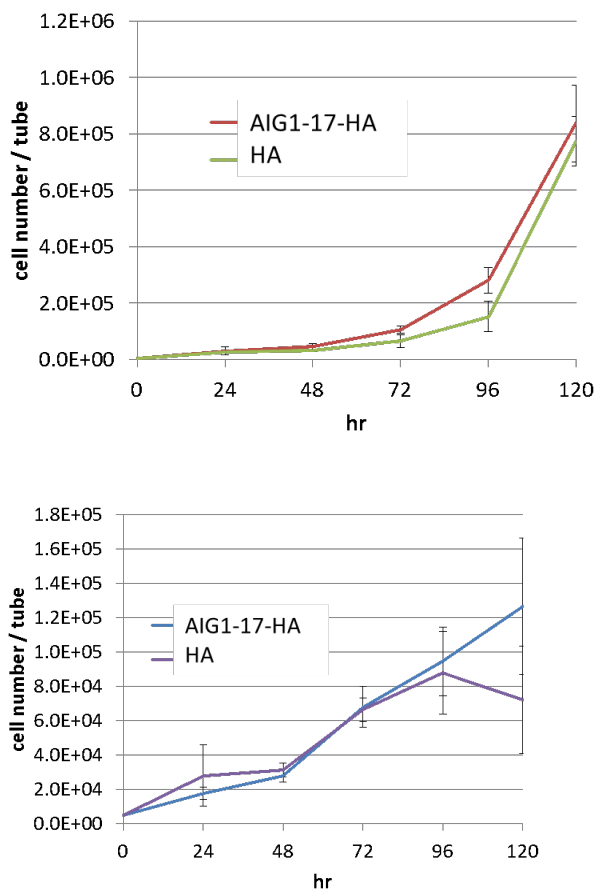


図 3. 通常培地 (上) とシステイン除去培地 (下) での増殖曲線

よって AIG1-17-HA 強発現により酸化ストレス条件下での増殖が改善する可能性が示された。

以上より、AIG1-17 の強発現は細胞運動に関与はないものの、protrusion 形成が促進されること、システイン除去培地での増殖が改善する傾向を示すことが明らかとなった。赤痢アメーバの病原性にはさまざまな表現型が関与することが知られている。AIG1-17 が全ての表現型を強く変化させるわけではないが、ストレスに強い傾向や細胞骨格の活性が強い傾向が協調的に働き、宿主組織内での生存に有利であったり、侵襲性を増す表現系へと向かわせることが考えられた。

C-2. 台湾での臨床分離株の確立と解析

C-2-1. 台湾での臨床分離株確立

2013 年 10 月、台湾で分離培養に成功した二株の供与を受けた。TC1146 株と TC1198 株。両者とも *Crithidia fasciculata*(Cf) と共培養されていた。日本での培養も順調に開始され、ゲノム解析に向け、Cf を除いた培養を確立すべく Cf 量を減らした培地での培養を開始している。

C-2-2. 台湾株の動物モデルにおける病原性の評価。

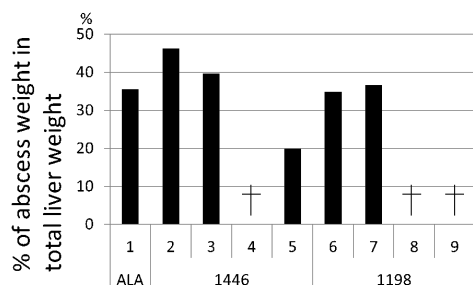


図 4. TC1446 株、TC1198 株の ALA 形成

TC1146 株と TC1189 株をシリアンハムスター肝臓に 1×10^6 細胞/匹摂取し、7 日後のアメーバ肝膿瘍 (amoebic liver abscess: ALA) の大きさを評価し

た (図 4)。

陽性コントロールである ALA 株が肝臓の 35% 程度の大きさの膿瘍を形成した一方、二つの台湾株も TC1446 株の一つが 20% 程度であった以外、全ての動物で 35~45% 程度の ALA を形成した。図 4 で十字で示した動物は手術翌日に志望した個体であり、摂取した株の病原性が高かったことを示すと考えられる。

以上より、今回台湾より供与された非病原性株はハムスターに対して ALA 形成能を有していた。これはヒトへの病原性とハムスターへの病原性が異なる、または腸管と肝臓への病原性が異なるという二つの可能性があると考えている。今後 *in vitro* での病原性の評価方法を確立する必要がある。一つはマウスの盲腸へ接種して腸アメーバ症を模した病態を作らせるマウス腸管モデルでの評価、もう一つはまだ確立途中であるが、屠殺されたブタの大腸を用いた *ex-vivo* での評価系があり、これらを用いた検討を考えている。

台湾で無症候性患者からの赤痢アメーバ株が確立できるようになったことは大きな進歩であった。今後ヒトに症状を示さない赤痢アメーバ株の解析を、特に AIG1-17 に注目しながら展開していきたいと考えている。

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

Functional analysis of the AIG1 family proteins that were originally identified as virulence-related genes in comparative genomic analysis in *Entamoeba histolytica*. Kumiko Nakada-Tsukui, Emi Sato, Tomoyoshi Nozaki, The 10th Japan-Taiwan Symposium on Vaccine Preventable Diseases and Vector-Borne Diseases & Cooperative Project Report, September

12-13, 2013, Tokyo, Japan

Functional analysis of the AIG1 family proteins that were originally identified as virulence-related genes in comparative genomic analysis in *Entamoeba histolytica*. Kumiko Nakada-Tsukui, Emi Sato, Tomoyoshi Nozaki, 16th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim Antimicrobial Drug Resistance in Bacterial and P

arasitic Diseases, February, 9-13, Dhaka, Bangladesh

F . 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし