

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） 総合分担研究報告書

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毎年 10 万人の死者を出す、世界的に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とんどない。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のは非常に難しくなっている。一方同じ東アジアにあ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 と共同研究から東ア

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

1) 日本・台湾株の分子疫学調査と系統樹の作成。

日本、台湾で得られた臨床株について6種類の tRNA sort tandem repeat (STR) を指標とした方法により遺伝子型別を行った。さらに系統解析を行い日本株、台湾株の特徴、病原性との関連を示した。さらに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、病原性と関与すると予想される ORF (AIG1-17) について、台湾株さらに日本株についても病原性との関与が見出されるか、評価を行った。

2) 比較ゲノミクスから見出された病原性に関連する ORF (AIG1-17) の機能解析

2-1) 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。

2-2) 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 $0.8\mu\text{m}$ 以上、突起の長さ $0.7\mu\text{m}$ 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。

2-3) 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。

2-4) 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 $1 \times 10^3/\text{mL}$ 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。

3) 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。

3-1) 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。

3-2) 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った。

TC1146 株と TC1189 株と陽性コントロールとしてアメーバ肝膿瘍(amoebic liver abscess: ALA)から回収して病原性を増強した HM1 株 (ALA 株) をシリアンハムスター肝臓に 1×10^6 細胞/匹で摂取し、7 日後の ALA の大きさを評価した。

C. 研究結果

1) 日本・台湾株の分子疫学調査と系統樹の作成。

1-1) 臨床株の遺伝子型別

台湾株 132、日本株 37 に関して 6 つの tRNA STR を指標とした遺伝子型別を行い、系統解析を行った。大きく 3 つのグループに分類されたことからこれをクラス A, B, C とした。クラス A には 52 株 (うち日本株 6)、クラス B には 62 株 (うち日本株 17)、クラス C には 18 株 (うち日本株 14) が含まれた。また臨床症状はクラス A では無症候 42、下痢症状 2、肝膿瘍 3、下痢と肝膿瘍 2、その他 3、クラス B では無症候 36、下痢症状 13、肝膿瘍 11、その他 2、クラス C では無症候 1、下痢症状 7、肝膿瘍 7、下痢と肝膿瘍 1、その他 2 であった。

クラス 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。また日本由来の非病原性株はクラス A に分類され、このクラスは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の一つであることが示唆された。

1-2) 病原性関連 ORF の解析

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 AIG1-17、の ORF が台湾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。AIG1-17 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、台湾株でも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。クラス A, B, C それぞれから DNA サンプルが残っているものを優先に 14、20、4 サンプルから PCR を行ったところ、各クラスで 1、5、2 の陽性クローンが確認された。この結果を症状別に整理すると無症候 29、下痢症状 5、肝膿瘍 2、その他 2 のサンプルのうち、陽性であったのは無症候 4、下痢症状 2、肝膿瘍 0、その他 2 であり、%で見ると無症候 14、下痢症状 40、肝膿瘍 0、その他 100 であった。

以前無症候株で欠損しているとして同定された AIG1-17 の ORF を PCR にて確認したところ、台湾の無症候株から 14%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。しかしクラス A に関しては PCR を行った 14 サンプル中 1 サンプルのみポジティブであり、20 サンプル中 5 サンプルがポジティブだったクラス B とは差があると考えられた。よって AIG1-17 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。

2) 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

2-1) 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 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ G418 に耐性の HA 株、AIG1-17-HA 株を確立した。

2-2)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)

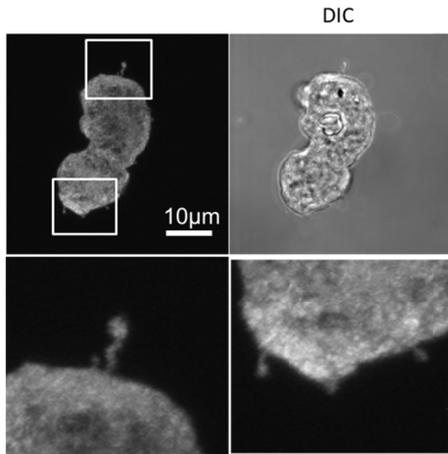


図 1 . AIG1-17-HA の protrusion

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。

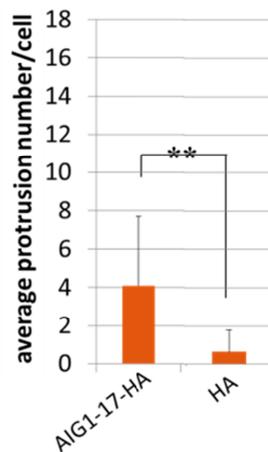


図 2 . 一細胞当たりの protrusion 数

2-3)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 は細胞運動への関与は少ないと考えられた。

2-4) 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 120 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)

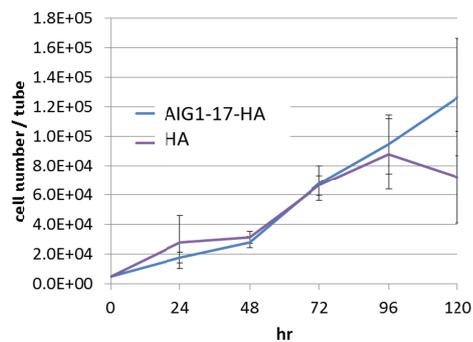
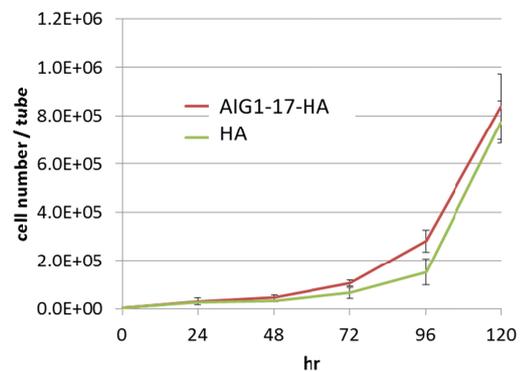


図 3. 通常培地 (上) とシステイン除去培地 (下) での増殖曲線

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、侵襲性を増す表現型へと向かわせることが考えられた。引き続き細胞骨格の変化が関与すると考えられる表現型、貪食・細胞接着について検討を行う。

3) 台湾での臨床分離株の確立と解析

3-1) 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*Criethidia 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。

3-2) 台湾株の動物モデルにおける病原性の評価。

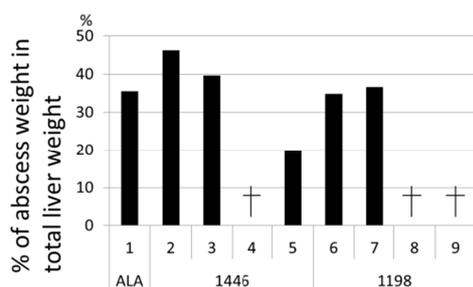


図4. TC1446株、TC1198株のALA形成

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。今後腸管へ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

該当なし

E. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

Kumiko Tsukui: Unique genomic features of an *avirulent Entamoeba histolytica* strain found in Japan

The eighth Japan-Taiwan symposium on Antibiotics resistance and foodborne diseases, October, 2011, Tokyo, Japan

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, September, 2013, Taipei, Taiwan

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 Parasitic Diseases, February, 9-13, Dhaka, Bangladeshi

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