

第18回日本エイズ学会 ECC 山口メモリアルエイズ研究奨励賞受賞研究

性感染症として HIV 感染者に拡大する赤痢アメーバ症の制圧を目指した研究

Research on Amebiasis : Evidences from HIV Cohort

渡 辺 恒 二

Koji WATANABE

国立国際医療研究センター病院エイズ治療研究開発センター

AIDS Clinical Center, National Center for Global Health and Medicine

日本エイズ学会誌 20 : 109-116, 2018

1. はじめに

赤痢アメーバ症は、腸管寄生性原虫の *Entamoeba histolytica* による腸管原虫感染症であり、アメーバ赤痢とも呼ばれる。教科書的には、しぶり腹と表現される激しい腹痛と腸管粘液と出血を含むいちごゼリー状便を呈する重症腸炎、または、血行性に肝臓内に巨大膿瘍を発症するアメーバ性肝膿瘍などが特徴とされており、重症度が高く、比較的容易に診断可能な疾患のイメージがある。しかし、実際には、腸管感染者の8~9割はほとんど症状を来さない無症候性感染であり、アメーバ性肝膿瘍を発症した場合においても、緩徐な発症であることから持続する発熱のために不明熱と誤診されることもあり、診断の難しさが以下に解説するような現場の問題点の要因となっている¹⁾。本稿では、赤痢アメーバ症の制圧というテーマを、疫学的な制圧と臨床的な制圧という側面から取り組んできた活動を報告したい。

2. 疫学的な制圧を目指して行ってきた研究

赤痢アメーバ症は、感染症法で5類感染症に指定され、診断例は全数報告される。統計が開始された2000年には378例の報告であったものが、2013年に初めて年間1,000件が報告されるようになり、以降も毎年1,000件以上(2016年1,151件)が報告されている。このように、今世紀に入ってから急速に赤痢アメーバ症が感染拡大してきている現状を受けて、感染拡大を抑制するための研究活動を行ってきた。現時点では、具体的な対策までは至っていないが、感染伝播様式が徐々に明らかになり、将来的な展望がみえつつある状態である。

まず、赤痢アメーバ感染のハイリスク層を同定するために、病院データベースを基にした疫学的研究を行った²⁾。こ

の研究では、国立国際医療研究センター病院で2003年から2009年に行われた10,930件の下部消化管内視鏡検査のデータを用いた横断解析を行った。その結果、54件が下部消化管内視鏡検査でアメーバ性腸炎と診断された。回帰解析で赤痢アメーバ症感染リスクに関する解析を行ったところ、女性に比して圧倒的に男性でリスクが高いこと(Odds ratio 11.4, 95%信頼区間 [6.1-22.4])、HIV感染者(OR 66.2 [36.6-120.7])、B型肝炎ウイルスキャリア: hepatitis B surface antigen 陽性(OR 9.0 [3.4-20.4])、梅毒既感染: *Treponema pallidum* hemagglutination test 陽性(OR 19.6 [10.2-36.2])が赤痢アメーバ感染のハイリスクであることを報告し、特にHIV感染者では高頻度でアメーバ性腸炎が診断されることを証明した。

上記のように、赤痢アメーバ症が他の性感染症と高率に合併していることが明らかにされ、感染ハイリスク層がある程度把握できた。一方で、性感染症として赤痢アメーバ症がどのように感染拡大しているのかを明らかにする必要があった。その感染拡大様式を明らかにするために、赤痢アメーバ症感染ハイリスク層かつ、継続的なフォローアップが可能であるHIV感染者のコホートを対象にした研究を開始した³⁻⁵⁾。HIV感染者での血清抗体陽性率を検討した解析⁴⁾では、1,303名のHIV初診患者を対象として、抗赤痢アメーバ抗体(間接蛍光抗体法)を測定した。HIV初診患者での血清抗体陽性率は初診時の抗赤痢アメーバ抗体陽性率は21.3%(277/1,303)と非常に高値であった。抗体価測定法が統一されていないため、他国からのデータとの厳密な比較はできないが、血清抗体陽性率2割以上という結果は、発展途上国のスラム地域の住民と同等レベルである⁶⁻⁸⁾。また、興味深いことに277名の抗体陽性者のうち7名が初診時に侵襲性赤痢アメーバ症と診断され、60名には過去に赤痢アメーバ症として治療歴があったものの、残る210名は赤痢アメーバ症の既往を有さず、赤痢アメーバ症を想起させる臨床症状がなかった。すなわち、抗体陽性者のうち75.8%(210/277)は無症候性抗赤痢アメーバ抗体陽

著者連絡先: 渡辺恒二 (〒162-8655 東京都新宿区戸山1-21-1 国立国際医療研究センター病院エイズ治療研究開発センター)

2018年3月14日受付

性者であることが分かった。そこで、無症候性抗赤痢アメーバ抗体陽性者の臨床的意義を解析するために、無症候性抗赤痢アメーバ抗体陽性者が将来的に有症状の侵襲性赤痢アメーバ症を発症する頻度を解析したところ、中央値 25.3 カ月の経過観察期間で、抗体陰性者が侵襲性赤痢アメーバ症を発症するリスクは 1% 程度であり、そのほとんどが新規感染だったのに対し、無症候性抗赤痢アメーバ抗体陽性者では約 2 割が侵襲性赤痢アメーバ症を発症し、発症者のほとんどは初診から 1 年以内に侵襲性赤痢アメーバ症を発症していたこと、侵襲性赤痢アメーバ症を発症した際の抗赤痢アメーバ抗体価は、初診時と変化なし、もしくは低下している症例が多かったこと、が明らかになった。この結果から、初診時に無症候性抗赤痢アメーバ抗体陽性者では、その時点で *E. histolytica* の無症候性持続感染が起こっている可能性があり、経過観察中（特に初診から 1 年以内）に 20% が臨床病型を変化させて、侵襲性赤痢アメーバ感染が起こっていることが示唆された。一方、これらの解析では、潜伏感染がどの部位で、どのように潜伏持続感染が生じているのか、その病態は、明らかにされなかった。

次に、HIV 感染者における赤痢アメーバ症潜伏持続感染の頻度とその病態を明らかにする必要がある。 *E. histolytica* の潜伏持続感染については、無症候性シストキャリアが一般的に知られている。無症候性シストキャリアは、自覚症状が欠如しているにもかかわらず、糞便中にシスト型 *E. histolytica* を持続的に排出している状態を指す。赤痢アメーバ症が流行している発展途上国では、無症候性シストキャリアに関する多数の研究が行われており、ベトナムで行われた研究では、症状を有さない健康な地域住民 383 人のうち 43 人の糞便中に *E. histolytica* が検出されること、その無症候性感染者 43 人を 18 カ月間にわたり、2 カ月に 1 回の定期的な便検査を行い、 *E. histolytica* 持続感染の有無とその遺伝子型（ゲノタイプ）の経時的変化を観察したところ、同一の遺伝子型を持つ *E. histolytica* を持続的に排出し続ける期間が平均 12.9 カ月であることを報告している⁹⁾。このことは、赤痢アメーバ症流行地域では不顕性感染が高頻度に起こっていること、不顕性感染は平均で 1 年程度の長期間にわたり持続しうることが示唆される。そこで、われわれは、①日本の HIV 感染患者のようなハイリスク層では慢性不顕性感染が高頻度に起こっているのではないか、また、② *E. histolytica* は人の大腸粘膜でしか増殖できないために慢性持続感染者では必ず大腸病変を持つはずである、という 2 つの仮説を立て、無症状の HIV 感染者でのアメーバ性腸炎の頻度を下部消化管内視鏡検査のデータを用いて横断的解析を行った⁵⁾。この研究では、内視鏡施行前の Gastrointestinal Symptom Rating Scale という問診項目で下部消化管症状がないことを確認した 71 人の

HIV 感染者の下部消化管内視鏡検査でアメーバ性腸炎が発見される頻度を調査した。71 人の研究対象者のうち 8 人（11.3%）で、肉眼的に大腸潰瘍を伴うアメーバ性腸炎が認められた。8 人の無症候性感染者のうち 7 人では、検査時に抗赤痢アメーバ抗体陽性であったことから、無症候性赤痢アメーバ感染患者であっても、高頻度で血清抗体陽性となることが証明され、すでに紹介した前研究⁹⁾における無症候性抗赤痢アメーバ抗体陽性者では、高頻度で大腸粘膜に病変をもつ無症候性持続感染を来していること、無症候性抗赤痢アメーバ抗体陽性者で無症候性持続感染を鑑別するために、下部消化管内視鏡検査がきわめて有用であることが示された。一方、8 人の無症候性感染者のうち内視鏡検査前に糞便の直接検鏡による寄生虫検査が行われた 4 人のうち、3 人は寄生虫陰性であり、1 人でシスト型アメーバ陽性であった。このことから、無症候性持続感染者の診断に対する糞便直接検鏡検査の感度が非常に低いこと、下部消化管内視鏡検査で診断される無症候性赤痢アメーバ感染者と途上国などで診断される無症候性シストキャリアが同義である可能性が高いこと、が示唆された。さらに、この研究では、内視鏡検査を行った被験者のヒト白血球抗原（HLA）と赤痢アメーバ症感染者の相関関係を観察し、無症候性持続感染者では、HLA-class II DQB1*06:01 が高頻度に認められることが示された。この HLA allele は、バングラデシュの住民コホート研究でも赤痢アメーバ症に感染しやすいことが示されている¹⁰⁾。興味深いことに、HLA-class II DQB1*06:01 という HLA allele は、性感染症として赤痢アメーバ症の流行が報告されている東アジア（韓国、台湾、日本）¹¹⁾ やオーストラリア¹²⁾ には 10~30% の高頻度で観察されるものの、それ以外の国ではほとんどみられない HLA allele である。以上を鑑みると、東アジアやオーストラリア以外の国では、性感染症として赤痢アメーバ症がほとんど流行していない原因は、遺伝的素因を背景にした宿主の特性（感染拡大に必要な病原体保有者：無症候性持続感染の起こりやすい特性を持つ宿主）が関わっている可能性が示唆される。このような宿主因子については、今後、詳細な免疫学的機序の解明を行う必要があると考えている。

以上の研究結果をまとめると、日本で性感染症として赤痢アメーバ症が流行している理由は、いったん感染が成立しても無症状のまま経過し年単位で感染が持続する無症候性赤痢アメーバ持続感染者が一定の割合（HIV 感染者の場合、約 1 割）で存在し、そこを感染源としてヒト-ヒト感染により感染拡大が起こっていることが分かった（図 1）。今後、赤痢アメーバ症の流行や感染拡大を抑えるためには、有症状の侵襲性赤痢アメーバ症を治療するだけでなく、無症候性持続感染者を効率的に発見し治療することが必要であることが分かってきた。一方で、無症候性持続感

染者は特異的な症状を来さず、無症候の被験者から定期的な糞便検査を行うことは事実上困難であること、糞便検査を行ったとしても、直接検鏡による寄生虫検査では十分な感度が得られないことなどを考えると、これらの無症候性持続感染者を糞便でスクリーニングして治療することは、現実的ではない。他方、われわれが行ってきた研究で示されたとおり、無症候性持続感染者では、高率に血清抗赤痢アメーバ抗体陽性となる。そのため、ハイリスク層と考えられる人々を対象に、血清抗赤痢アメーバ抗体検査でスクリーニングを行い、陽性者には下部消化管内視鏡検査を行うことで、無症候性持続感染者を診断・治療する計画を立案している(図2)¹³⁾。すでに、日本の HIV 感染者とくに男性同性間性的接触のある人々は、赤痢アメーバ感染ハイリスク層であることは前述のとおりであるが、最近の病院受診者の傾向として、non-HIV や女性(特に性風俗で勤務する女性)での抗赤痢アメーバ抗体陽性率が上昇傾向にあることが、われわれの研究¹⁴⁾や全国統計の報告¹⁵⁾からも明らかになりつつある。現在は、東京都内の性感染症検査受検者での抗赤痢アメーバ抗体血清陽性率のデータを解析中であり、non-HIV や女性において、どのように赤痢アメーバ感染ハイリスク層を拾い上げていくかを検討していく予定である。将来的には、ハイリスク層をターゲットとした抗赤痢アメーバ抗体検査と陽性者に対する内視鏡診断による無症候性持続感染者の同定と治療を大規模に行い、日本で性感染症として拡大する赤痢アメーバ症の疫学的な制圧を目指す予定である。

3. 臨床的な制圧を目指す研究(赤痢アメーバ症による死亡症例をゼロにするための研究)

赤痢アメーバ症の治療方法は確立しており、侵襲性感染に対してはニトロイミダゾール系薬剤であるメトロニダゾールやチニダゾール(日本ではメトロニダゾールのみが赤痢アメーバ症に対する治療薬として認可)を投与し、治療後に残存シストに対する治療として、パロモマイシンなどのシスト駆除薬を投与する。実験室では、メトロニダゾール耐性 *E. histolytica* 株を誘導することが可能であるが¹⁶⁾、臨床的には赤痢アメーバ症に対する薬物療法での治療耐性は報告されていない。すなわち、治療抵抗性による重症化は考えづらい疾患である。一方で、日本国内の統計をみると、赤痢アメーバ症は時に致死的事であることが分かる。国立感染症研究所からの報告によると、赤痢アメーバ症による死亡件数は全数報告となった1999年4月から2016年12月までの時点で、65件と報告されている。また、最近10年間(2007~2016年)の年間平均死亡件数は3.80件/年であり、それ以前(1999~2006年)の死亡件数3.37件/年と比較してほぼ変化がない(感染症情報センター報告)。

つまり、赤痢アメーバ症が重症・致死的原因が、薬剤耐性以外にあることが考えられる。また、どのような臨床病型が重症化するのかを考える上で重要な事項として、急性虫垂炎と類似した病型を示すアメーバ性腸炎(以下、アメーバ性虫垂炎と記す)の重症報告が、症例報告として日本から多数報告されている^{17~21)}ことがある。アメーバ性虫垂炎では、発症時に赤痢アメーバ感染が見落とされ、術後縫合不全などの合併症が起こる可能性が高く、致死となる可能性が指摘されている^{22,23)}。このような背景を受けて、われわれは赤痢アメーバ症のハイリスク群である HIV 感染者でアメーバ性虫垂炎の頻度とその診断に関する以下のような検討を行った²⁴⁾。

この研究では、赤痢アメーバ症ハイリスク群である HIV 感染者に発症した急性虫垂炎手術症例での赤痢アメーバ症発症率を把握するため、国立国際医療研究センターで虫垂切除術が行われた HIV 感染者 57 症例を対象にして解析を行った。まず、57 件の虫垂切除保存検体(パラフィン包埋病理固定標本)から、脱パラフィン後に DNA 抽出と濃縮を行った。得られた DNA template を *E. histolytica* 特異的かつ効率的に増幅できるように、200 bp 程度と短い増幅産物が得られるように、transfer RNA (tRNA) 領域の繰り返し配列(short tandem repeats: STR)である tRNA STR S¹⁰⁰-D をターゲットにした primer set で polymerase chain reaction (PCR) を行い、増幅産物をシーケンス解析により、その繰り返し配列を確認した。その結果、15.8% (9/57) で、*E. histolytica* PCR 陽性すなわち虫垂標本中に *E. histolytica* に特異的な遺伝子の存在を確認した。他方、57 症例の診療録の解析を行ったところ、周術期に切除病理の HE 染色でアメーバ性腸炎と確定診断された症例は、2 例のみであり、7 例では赤痢アメーバ感染が診断されておらず、7 例中 1 例は術後 14 日目に縫合不全および盲腸穿孔を発症し、その時点で手術検体の病理を再検することで赤痢アメーバ感染が判明し、メトロニダゾール治療を行うも盲腸皮膚瘻が残存したために、最終的には術後 130 日目に回盲部広汎切除を行い治癒していたことが明らかになった。残り 6 例のうち 3 例は、臨床医の判断でメトロニダゾール治療が行われ、3 例では虫垂切除のみが行われたが、術後合併症など認めることなく、治癒していた。

次に、なぜ急性虫垂炎の周術期にアメーバ感染が見逃されてしまうのかを検討するために、PCR で虫垂切除標本に *E. histolytica* が検出されたアメーバ性虫垂炎 9 症例とそれ以外の 48 症例の臨床所見などを比較したところ、発症時の総白血球数がアメーバ性虫垂炎で高いこと(アメーバ性虫垂炎 13,760/μL vs 非アメーバ性虫垂炎 10,385/μL, *p* value 0.02, 中央値を Mann-Whitney *U* 検定で比較)以外は、赤痢アメーバ症の既往歴、抗 HIV 療法の有無、CD4 数、HIV-

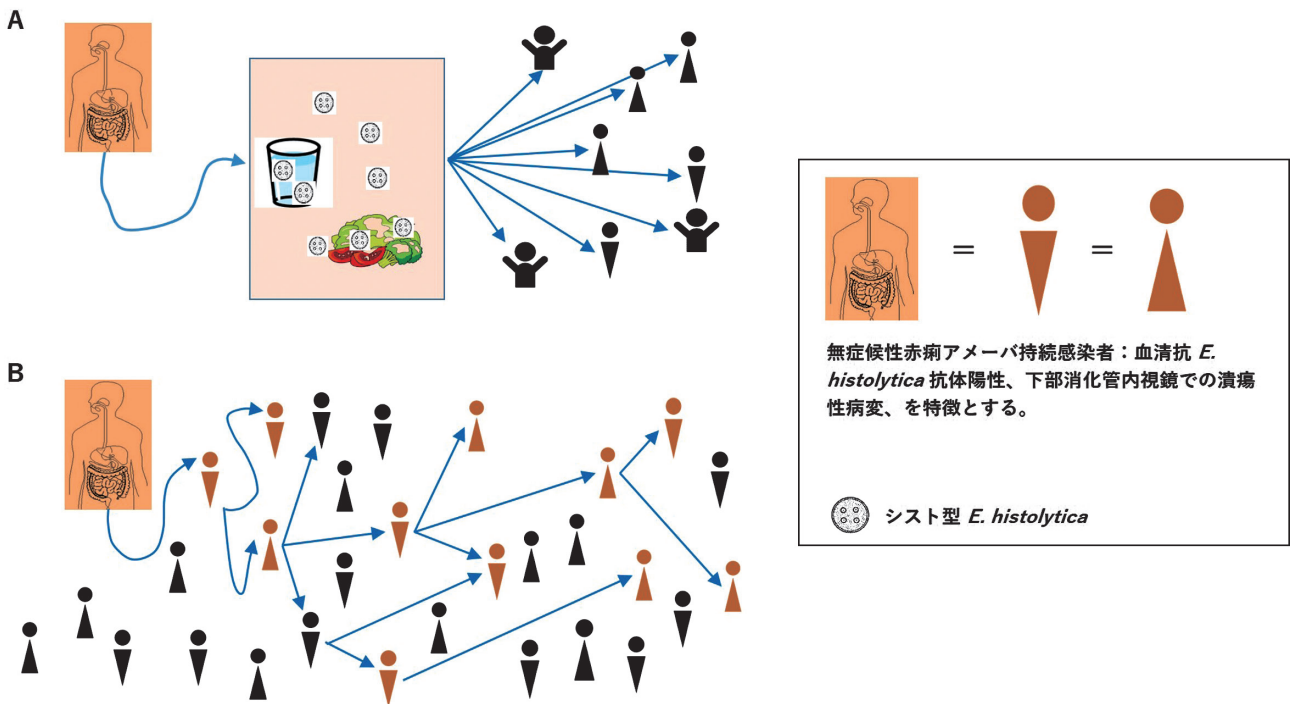


図 1 赤痢アメーバ症の感染経路

発展途上国のように、上下水道の設備が不十分な場所では、飲料水や食物がヒトの糞便に汚染されやすい。そのため、*E. histolytica* のシストを含む糞便によって汚染された水や食物が赤痢アメーバ症感染のリザーバーとなり、それを経口摂取することで、感染の拡大が起こる (A)。一方、日本を含む東アジアやオーストラリアなどの先進国で感染拡大する性感染症による赤痢アメーバ症では、飲料水や食物がリザーバーとはならず、無症候性赤痢アメーバ持続感染者が感染のリザーバーとなり、oral-anal sexual contact 等の性行為によりヒトからヒトへの直接感染で感染伝播が起こる。また、無症候性赤痢アメーバ持続感染者を効率的に発見・治療するためには、血清抗体検査陽性者に対する下部消化管内視鏡検査が有用だと考えられる (B)。

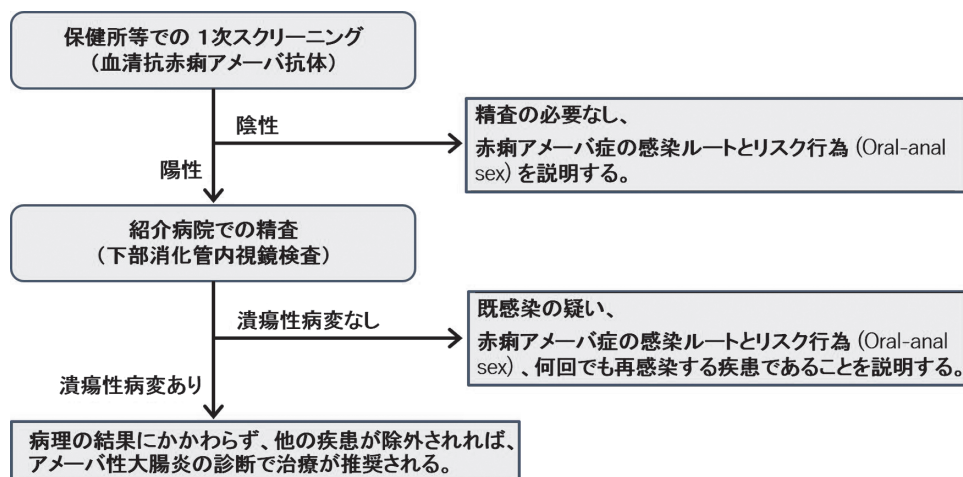


図 2 潜伏性持続感染者をターゲットにした赤痢アメーバ症感染コントロール案

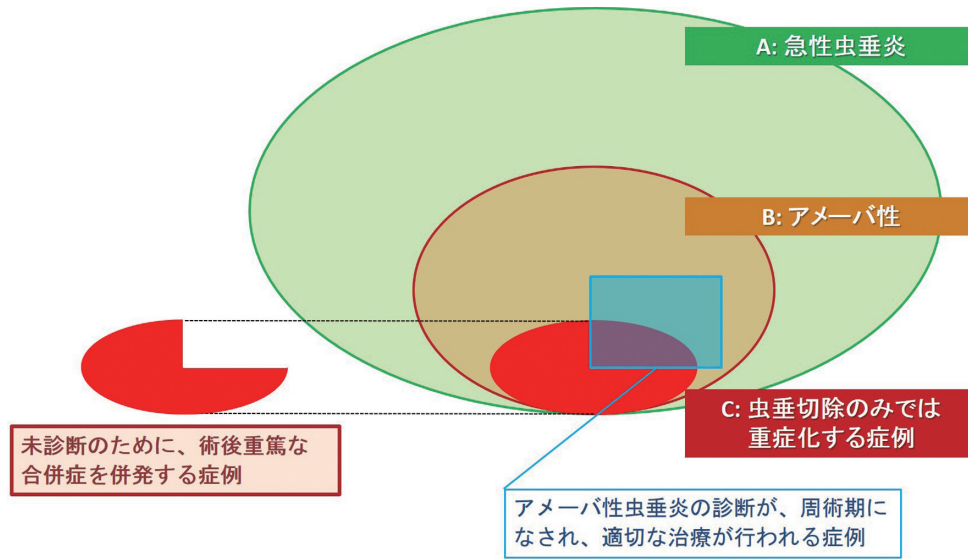


図 3 赤痢アメーバ症ハイリスク群で発症する急性虫垂炎に占めるアメーバ性虫垂炎の臨床的意義
 赤痢アメーバ症ハイリスク群（発展途上国の住民や本邦の男性同性愛者や性風俗で働く女性など）では、高頻度に赤痢アメーバ症がみられるため、急性虫垂炎発症者（A：緑円）の中にある程度の頻度で、アメーバ性虫垂炎（B：橙色円）がみられる。一方、アメーバ性虫垂炎のうち、虫垂切除のみでは術後縫合不全などを発症して重症化してしまう症例（C：赤円）は、アメーバ性虫垂炎の一部にとどまると考えられることから、アメーバ性虫垂炎の頻度は実際よりも過小評価されやすい。また、アメーバ性虫垂炎の診断は難しいため、周術期に適切な診断が行われる症例（青四角）は、比較的稀であり、多くの重症化した症例は、術後重篤な合併症を併発することで、症例報告される。

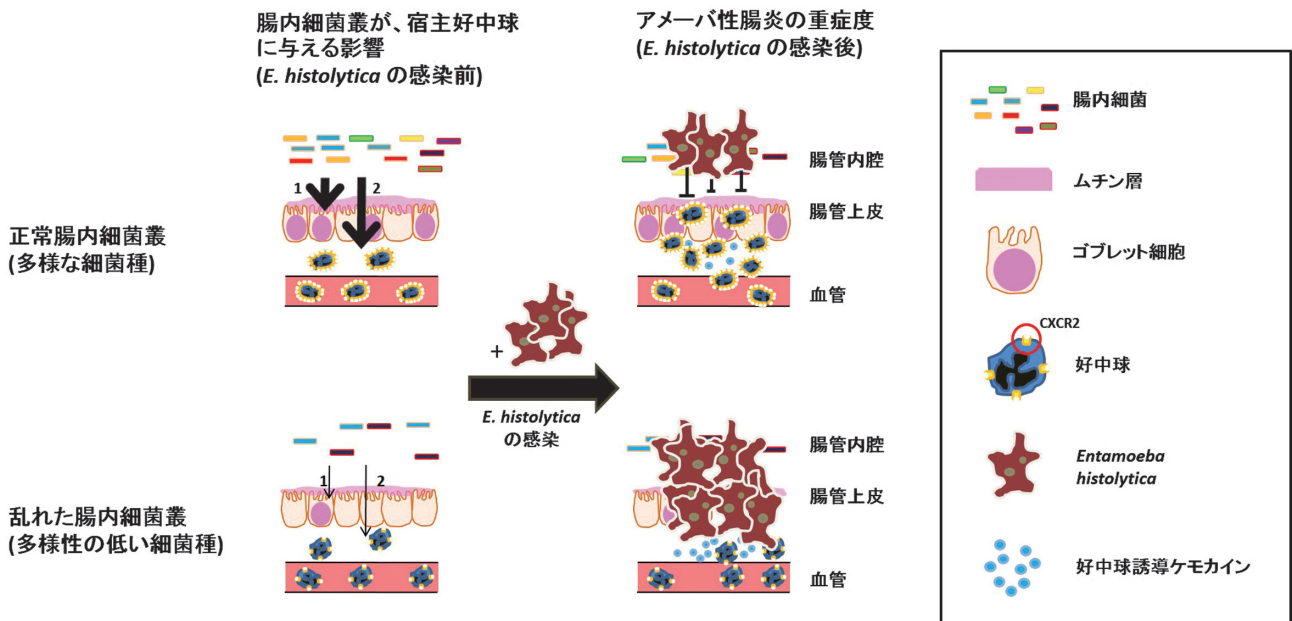


図 4 腸内細菌叢から宿主好中球への刺激とアメーバ性腸炎に対する感染防御
 赤痢アメーバ非感染時に、正常かつ多様性の高い腸内細菌叢を有している場合、腸管上皮（1）や好中球（2）への持続的な刺激が加わることで、 goblet 細胞からのムチン分泌が亢進し、好中球表面のケモカイン受容体（CXCR2）の発現を高め、赤痢アメーバのような外来病原微生物に曝露された際、速やかな感染防御反応が起こる。一方、腸内細菌叢が乱れ、その多様性が失われた状態であると、腸内細菌叢から腸管上皮細胞や好中球への刺激が減弱し、外来微生物に対する速やかな防御反応が起こらず、当該微生物による感染症の重症化を招いてしまう。

RNA量、症状が出現してから手術までの日数、臨床症状（発熱の有無、下痢、血便の有無）、CRP値、抗アメーバ抗体陽性率、CT所見（糞石の存在、腹膜炎の合併）などに、両群間で差を認めなかった。すなわち、急性虫垂炎発症時の臨床所見から、アメーバ性と非アメーバ性を判別することはきわめて困難であることが分かった。一方、病理検鏡検査による *Entamoeba* の検出感度を知らするために、ホルマリン固定後パラフィン包埋病理固定 57 標本から HE 染色と PAS 染色標本を新たに作製し、病理医による診断を行ったところ、HE 染色では前述の 3 例のみで *Entamoeba* が同定された一方で、PAS 染色標本では新たに 3 例（合計 6 例）で *Entamoeba* が同定された。しかし、PCR 陽性の 9 例のうち 3 例では、PAS 染色や HE 染色では *Entamoeba* を同定することができなかった。すなわち、急性虫垂炎に対する切除標本に対して、通常行われる病理検査（虫垂癌などの閉塞機転となる疾患の鑑別を行うための HE 染色による病理検鏡診断）では、高率にアメーバ感染に関して高率に見落としが起ってしまうこと、PAS 染色を用いてもアメーバ感染を完全に除外することができないことが、明らかにされたのである。以上の研究結果より、アメーバ性虫垂炎の診断は非常に困難であることが分かる。アメーバ性虫垂炎が必ず重症化するとは限らず、多くのアメーバ性虫垂炎は虫垂切除術により治癒するものの、急性期や周術期に診断されなかった一部の症例が重症化してしまい、時には剖検で診断されることもあるということが予想される（図 3）。国立病院機構大阪医療センターからの報告では、HIV 感染者における虫垂炎症例 14 例中 5 例がアメーバ性虫垂炎であり、そのうち術後縫合不全などの合併症を来した症例が 5 例あり、そのうち 4 例がアメーバ性虫垂炎であることが報告されている²²⁾。また、未診断のまま死亡した症例は、統計上赤痢アメーバ症として報告されていない可能性があり、赤痢アメーバ症による死亡は過小評価されている可能性もある。

このように、われわれの研究結果は、赤痢アメーバ症の診断が、臨床所見や病理検査からは困難であること、簡便かつ高感度に赤痢アメーバ症を診断もしくは除外する検査方法の開発が必要であることを示している。現在、われわれは赤痢アメーバに特異的な抗原を検出する実験系を模索して、研究を行っている。すでに、欧米では、栄養型アメーバの表面タンパクであり、宿主細胞への接着因子として働く、レクチンをターゲットにした ELISA もしくはイムノクロマトグラフィ法による抗原検査が糞便検査として臨床的に実用化されている。また、ELISA 検査系を血清診断として用いた検討も行われているが、肝膿瘍の血清診断としては高い感度が得られる一方で、アメーバ性腸炎の血清診断としては十分な感度が得られないことが示唆されており、

より感度の高い血清抗原診断法が必要と考えられる。また、筆者らは、動物実験レベルで赤痢アメーバが特異的に分泌するサイトカイン類似物質 (*E. histolytica* Macrophage migration inhibitory factor : EhMIF) が、赤痢アメーバ性腸炎の粘膜下組織中に分泌されることを、モノクローナル抗体 (anti-EhMIF) を用いた実験系で確認²⁵⁾ しており、このような分泌タンパクに対する特異的モノクローナル抗体を用いた血清抗原検出系開発に向けて、研究を進めていきたいと考えている。

このように、筆者らの研究は、重症かつ致命的となり得る赤痢アメーバ症では、臨床所見、一般生化学検査や通常の病理検査では診断困難である場合が多く、診断の遅れが重症化を招くことを明らかにしてきた。今後は、簡便かつ高感度に赤痢アメーバ症を血清診断できる技術の開発に力を注ぎ、赤痢アメーバ症で死亡する症例をゼロとすることを目標としたい。

4. 重症化機序の解明：腸内細菌と好中球による感染防御に関する研究

筆者らは、これまで述べてきたような疫学や臨床的な解析の他に、*in vitro* 実験系やハムスターやマウスを用いた *in vivo* 実験系の解析により、赤痢アメーバ症の重症化機序に関する研究を行っている^{25~28)}。

赤痢アメーバ症の重症度は、病原体である *E. histolytica* の病原性、感染宿主であるヒトの遺伝的素因に加えて、*E. histolytica* を取り巻く腸内環境、すなわち腸内細菌叢によっても大きく影響を受けることが、近年になって理解されるようになってきている²⁹⁾。また、腸内細菌叢の存在は、腸管での免疫活性化において注目を集めている。筆者自身も含めた研究グループによって、赤痢アメーバ症に関しても、特定の腸内細菌が定着していることが、アメーバ性腸炎の重症度（無症候性と有症状の腸炎の比較）に影響を与えていることを、異なる 2 カ国（バングラデシュと南アフリカ共和国）で行った研究により証明している^{30,31)}。また、下部消化管内視鏡検査で無症候性抗赤痢アメーバ持続感染を診断された患者が、内視鏡検査の 1 週間後から頻回の下痢を伴う激しい腸炎を発症した症例では、無症候性感染期と有症状の腸炎の時期で、感染していた *E. histolytica* の遺伝子型が同一であることを証明し、内視鏡前の下剤処置による腸内細菌叢の乱れが無症候性赤痢アメーバ症持続感染を有症状のアメーバ性腸炎に変えるトリガーとなったことを経験している (unpublished data, under review)。それらの疫学的なデータの理論的な裏付けを行うため、バージニア大学国際感染症免疫学講座に留学し、アメーバ性腸炎マウスモデルを用いた腸内細菌叢が宿主免疫に与える影響とアメーバ性腸炎の臨床病型に与える影響に関する研究を行った²⁵⁾。

この *in vivo* 実験モデルでは、腸内細菌の役割を調べるため、前処置として4種類の抗菌薬カクテル（アンピシリン・ネオマイシン・バンコマイシン・メトロニダゾール）を2週間経口投与することで、腸内細菌の大部分を除去した *dysbiosis mouse* を作製した。この *dysbiosis mouse* に対して、*E. histolytica* を盲腸内に直接注入し、アメーバ性腸炎を引き起こし、腸炎の重症度や免疫細胞の活性を観察し、抗菌薬の前処置を行っていない *control mouse* 群と比較することで、腸内細菌叢の役割を検証した。このような実験モデルでアメーバ性腸炎の重症度を検証したところ、*dysbiosis mouse* では、*control mouse* と比較して、高度の腸管粘膜破壊を伴う重篤なアメーバ性腸炎が惹起されていることが示された。しかし、高度の粘膜破壊がある一方で、*E. histolytica* の感染24時間での腸管粘膜組織における好中球数や好中球活性は、*dysbiosis mouse* で低下していることも分かった。一般的に、感染組織での好中球の誘導は、マクロファージなどの抗原提示細胞が抗原認識後に放出する CXCL1 (KC) や CXCL2 (MIP-2) などのケモカインを、好中球表面のケモカインレセプターにより認識され、好中球が組織へ遊走することで生じる³²⁾。そこで、われわれは腸管粘膜下組織に放出されているケモカイン濃度を ELISA で測定するとともに、好中球表面のケモカインレセプターの発現を Flow Cytometry で精査した。*Dysbiosis mouse* では、抗原提示細胞から分泌される炎症性サイトカインやケモカイン (IL-1 β , CXCL1, CXCL2) が多量に放出されている一方で、血中や組織中の好中球表面のケモカインレセプター (CXCR2) 発現が *control mouse* と比較して低下していることが分かった。つまり、*E. histolytica* 非感染時における、腸内細菌叢からの好中球への持続的な刺激が、好中球表面のケモカインレセプター発現を含む好中球の前活性化に関与しており、そのような前活性化が *E. histolytica* などの病原体に曝露された際の速やかな感染防御を可能にしていることが示唆される (図4)。このような、腸内細菌叢による好中球活性化は、鎌状赤血球症などの非感染性疾患では報告がある^{33,34)} もの、好中球を介した病原体への感染防御に関しては過去に報告がなく、われわれの研究成果は、赤痢アメーバ感染症にかぎらず、好中球が感染防御に与える影響に関する重要な知見を与える報告となった。現在は、このような現象がヒト好中球でも起こりえるのかを検証するための *ex vivo* の実験系を開発中であり、今後、腸内細菌叢の刺激がどのように好中球を活性化するのか、その分子学的機序を明らかにする予定である。

上記のような研究を通じて、赤痢アメーバ症に対する感染防御や重症化の機序を解明するための研究を行っている。前述のように、赤痢アメーバ症の重症化には、腸内細菌や宿主免疫だけでなく、病原体 (*E. histolytica*) 自体の

病原性も関わっている。われわれは、高度な技術を要する臨床検体からの *E. histolytica* 無菌培養株の分離にも尽力しており、その無菌培養株を用いた病原性因子の解析や薬剤耐性機序の解明などの研究も推進しているところである。将来的には、これらの研究を統合して、重症化機序をターゲットにした薬剤の開発や、ワクチン開発に寄与する研究成果を報告していく予定である。

5. 結 語

このように、われわれの研究グループは、国内で感染拡大し、時に致死的となる赤痢アメーバ症を制圧するために、赤痢アメーバ症のハイリスク群である HIV 感染患者のコホートを用いて、さまざまな研究を行ってきた。今後も、赤痢アメーバ症の症例数を減らすこと、赤痢アメーバ症で亡くなる患者さんをゼロにすること、を目標に研究活動を継続していきたい。

謝辞

最後に、これらの研究活動を支援していただいたきた、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の岡慎一センター長および医療スタッフの皆様、共同研究者として長年ご指導いただいた東京大学大学院 野崎智義先生およびラボスタッフ、国立感染症研究所寄生動物部 八木田健司先生およびラボスタッフ、慶應義塾大学 小林正規先生への御礼を申し上げます。また、主に疫学の研究と病原性因子の研究を行ってきた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の柳川泰昭先生、アメーバ性虫垂炎の研究と重症化機序の解明に関する研究を行ってきた駒込病院感染症科の小林泰一郎先生、アメリカ留学中に公私にわたりご指導いただいた William A. Petri Jr. 教授ならびにラボスタッフの皆様にも感謝を申し上げます。

利益相反：本研究において利益相反に相当する事項はない。

文 献

- 1) Watanabe K, PWJ : AMEBIASIS. *Conn's Current Ther* : 479-481, 2017.
- 2) Nagata N, *et al* : Risk factors for intestinal invasive amebiasis in Japan, 2003-2009. *Emerg Infect Dis* 18 : 717-724, 2012.
- 3) Watanabe K, *et al* : Amebiasis in HIV-1-infected Japanese men : clinical features and response to therapy. *PLoS Negl Trop Dis* 5 : e1318, 2011.
- 4) Watanabe K, *et al* : Clinical significance of high anti-*Entamoeba histolytica* antibody titer in asymptomatic HIV-1-infected individuals. *J Infect Dis* 209 : 1801-1807, 2014.

- 5) Watanabe K, *et al* : Asymptomatic intestinal amebiasis in Japanese HIV-1-infected individuals. *Am J Trop Med Hyg* 91 : 816-820, 2014.
- 6) Stauffer W, *et al* : Prevalence and incidence of *Entamoeba histolytica* infection in South Africa and Egypt. *Arch Med Res* 37 : 266-269, 2006.
- 7) del Carmen Sanchez-Guillen M, *et al* : Seroprevalence of anti-*Entamoeba histolytica* antibodies by IHA and ELISA assays in blood donors from Puebla, Mexico. *Arch Med Res* 31 (4 Suppl) : S53-54, 2000.
- 8) Yang B, *et al* : Seroprevalence of *Entamoeba histolytica* infection in China. *Am J Trop Med Hyg* 87 : 97-103, 2012.
- 9) Blessmann J, *et al* : Longitudinal study of intestinal *Entamoeba histolytica* infections in asymptomatic adult carriers. *J Clin Microbiol* 41 : 4745-4750, 2003.
- 10) Duggal P, *et al* : Influence of human leukocyte antigen class II alleles on susceptibility to *Entamoeba histolytica* infection in Bangladeshi children. *J Infect Dis* 189 : 520-526, 2004.
- 11) Hung CC, *et al* : *Entamoeba histolytica* infection in men who have sex with men. *Lancet Infect Dis* 12 : 729-736, 2012.
- 12) James R, *et al* : Seroprevalence of *Entamoeba histolytica* infection among men who have sex with men in Sydney, Australia. *Am J Trop Med Hyg* 83 : 914-916, 2010.
- 13) 渡辺恒二 : 血清抗赤痢アメーバ抗体検査 : 潜伏性赤痢アメーバ持続感染者スクリーニングとしての可能性. *IASR* 37 : 248-249, 2016.
- 14) Yanagawa Y, *et al* : Increases in *Entamoeba histolytica* antibody-positive rates in human immunodeficiency virus-infected and noninfected patients in Japan : a 10-year hospital-based study of 3,514 patients. *Am J Trop Med Hyg* 95 : 604-609, 2016.
- 15) Ishikane M, *et al* : Epidemiology of domestically acquired Amebiasis in Japan, 2000-2013. *Am J Trop Med Hyg* 94 : 1008-1014, 2016.
- 16) Penuliar GM, *et al* : Phenotypic and transcriptional profiling in *Entamoeba histolytica* reveal costs to fitness and adaptive responses associated with metronidazole resistance. *Front Microbiol* 6 : 354, 2015.
- 17) 出井秀幸, ほか : 虫垂腫瘍を疑い結腸右半切除後にアメーバ性虫垂炎と診断した1例. *日本腹部救急医学会雑誌* 37 : 53-56, 2017.
- 18) 中村雅憲, ほか : 虫垂炎にて発症したアメーバ性大腸炎の1例. *日本外科系連合学雑誌* 39 : 954-958, 2014.
- 19) 森大輔, ほか : 虫垂炎症状にて発症した劇症型アメーバ性腸炎の1剖検例. *診断病理* 32 : 88-92, 2015.
- 20) 園生智弘, ほか : 右下腹部痛で発症し, 腸管壊死, 穿孔, 腹腔内出血を繰り返して死亡した劇症型アメーバ症の1例. *通信医学* 64 : 213-221, 2012.
- 21) 古城都, ほか : 急性虫垂炎から発症し, 多発性肝膿瘍, 敗血症にて死亡したアメーバ赤痢合併 AIDS 患者の1例. *日本外科感染症学会雑誌* 8 : 387-391, 2011.
- 22) 末田聖倫, ほか : 外科手術を施行した HIV 陽性急性虫垂炎における術後合併症の検討. *日本外科感染症学会雑誌* 8 : 199-203, 2011.
- 23) Ito D, *et al* : Amebiasis presenting as acute appendicitis : report of a case and review of Japanese literature. *Int J Surg Case Rep* 5 : 1054-1057, 2014.
- 24) Kobayashi T, *et al* : Underestimated amoebic appendicitis among HIV-1-infected individuals in Japan. *J Clin Microbiol* 55 : 313-320, 2017.
- 25) Watanabe K, *et al* : Microbiome-mediated neutrophil recruitment via CXCR2 and protection from amebic colitis. *PLoS Pathog* 18 : e1006513, 2017.
- 26) Noor Z, *et al* : Role of eosinophils and tumor necrosis factor alpha in interleukin-25-mediated protection from amebic colitis. *MBio* 8, 2017.
- 27) Burgess SL, *et al* : Role of serum amyloid A, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and bone marrow granulocyte-monocyte precursor expansion in segmented filamentous bacterium-mediated protection from *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun* 84 : 2824-2832, 2016.
- 28) Noor Z, *et al* : Interleukin-25 mediated induction of angiogenin-4 is interleukin-13 dependent. *PLoS One* 11 : e0153572, 2016.
- 29) Burgess SL, *et al* : The intestinal bacterial microbiome and *E. histolytica* infection. *Curr Trop Med Rep* 3 : 71-74, 2016.
- 30) Gilchrist CA, *et al* : Role of the gut microbiota of children in diarrhea due to the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis* 213 : 1579-1585, 2016.
- 31) Ngobeni R, *et al* : *Entamoeba* species in South Africa : correlations with the host microbiome, parasite burdens, and first description of *Entamoeba bangladeshi* outside of Asia. *J Infect Dis* 216 : 1592-1600, 2017.
- 32) Soehnlein O, *et al* : Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 10 : 427-439, 2010.
- 33) Zhang D, *et al* : Neutrophil ageing is regulated by the microbiome. *Nature* 525 : 528-532, 2015.
- 34) Casanova-Acebes M, *et al* : Rhythmic modulation of the hematopoietic niche through neutrophil clearance. *Cell* 153 : 1025-1035, 2013.