
臨床病理レビュー 特集 第 121 号 (平成 14 年 8 月) 別冊
検査データに基づく感染症の見方と感染防止対策
－ 病院, 学校, 家庭での感染防止も含めて －

第 4 章 気をつけなければならない感染症の診断と対策

2. 急性胃腸炎

C. 原虫感染症の最近の動向

竹 内 勤

第4章 気をつけなければならない感染症の診断と対策

2. 急性胃腸炎

C. 原虫感染症の最近の動向

竹内 勤*

要 旨

わが国における原虫感染症は感染にかかわる要因の変化で疫学相の多様化が著しい。男性同性愛者間のアメーバ感染、大規模な水系感染を引き起こしたクリプトスポリジウム症、あるいは輸入感染として重視されるマラリアなどはその例として挙げられる。加えて最近医療の現場で問題となっている病院感染に関連しては、種々の施設内で集団感染を起こしている腸管内寄生性原虫がある。特に赤痢アメーバが問題視される。わが国では1980年代に最初の施設内アメーバ感染の例が見いだされたが、最近の調査によっても血清学的に最も高い場合は53.5%に達する陽性率を示している。糞便中の特異抗原検出では、施設によって差異はあるものの0~34.2%の陽性率が見いだされた。このことはわが国の福祉・衛生行政上、施設内アメーバ感染は無視できない問題であることを示している。本稿においてはわが国における施設内アメーバ感染の現況に加え、筆者らが立案した感染制圧、予防対策にも言及し、その特徴を記載した。

Summary

Recent epidemiological status of protozoan infections has been dramatically changing due to a variety of factors such as new routes of transmission. For instance, sexual transmission of amebae among homosexual males, outbreak of water-borne cryptosporidiosis and imported malaria are good examples of such infections. Moreover, with regard to nosocomial infections, outbreak of intestinal protozoan infections, especially due to *Entamoeba histolytica*, should receive attention, as it is spread among institutionalized populations. The first outbreak of amebiasis among institutionalized mentally retarded populations in Japan was recognized in 1989. Recent seroepidemiologic surveillance of institutionalized populations has indicated the highest positive rate reached 53.5%, and the positive rate of specific antigen detection test ranged from 0~34.2% depending on institutions examined. These findings suggest that amebic infection among institutionalized populations is quite an important issue in hygiene and welfare in Japan. The present review deals with the current epidemiological status of such an amebic infection and infection control measures we devised.

Key words *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, 病院感染 (nosocomial infection),
施設内感染 (institutional infection)

Recent trend in protozoan infections

* Tsutomu TAKEUCHI, MD

Department of Tropical Medicine and Parasitology, Keio University School of Medicine
慶応義塾大学医学部熱帯医学・寄生虫学(〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35)

はじめに

原虫感染症(protozoan diseases)は近年、感染に関わる種々の要因の変化で、その疫学相に大幅な変化を見せている。例えば男性同性愛者間の性感染症としての赤痢アメーバ症や水系感染を起こしたクリプトスポリジウム症などにみるように、感染に関わる要因は多岐に渡ってきている。加えて最近、広義の病院感染と捉えることができようが、種々の施設における集団的な腸管寄生原虫感染(施設内感染)の実態が次第に解明され、予想以上の拡がりを見せていることも明らかになりつつある。このような施設内感染のわが国の公衆衛生上の重要性には言を要しないであろう。

また感染経路の多様化により、これまでの臨床例の診断と異なり、新しい実態把握の方法をも必要とする事態となりつつある。すなわち、原虫感染症に関わる診断法についても確実に臨床面のみならず、疫学的な知見と連動できるような診断法の導入が必要となってきている。特に従来は感染に伴う宿主側の抗体産生などをマーカーとして診断、疫学調査が行われることが多かったが、抗体産生は、例えそれが特異抗体であっても臨床的な状態を必ずしも的確に反映しているとは言い難く、また従来から行われている原虫の形態的な検出は信頼度は高いが、感度が低いため、次第に特異抗原を検出するか、遺伝子診断によって特異的な DNA 断片を検出するなどの方法が頻繁に使用されるようになってきている。何れにしろ確実な疫学的実態把握あるいは個別の診断には用いられる方法の特質をよく理解する必要がある。特に病院感染などに関しては、消化器系の原虫感染が最も関連があるが、感染源となりうる被感染者を正確に特定化する必要があり、対応する検査の性格を知っておくべきである。

本稿においては最近の原虫感染の状況を特に病院、あるいは施設内などでの感染防止に関連して、診断法の進歩も含めて概説したい。

I. 最近の傾向

病院感染を通常わが国で理解されているように狭義に捉えれば、医動物の領域で疥癬などが問題となるが、寄生性原虫で病院感染の原因となるものはほとんどない。しかしながら病院感染を広義に捉え、上記のように集団生活が行われている種々の施設に

おける集団感染、すなわち施設内感染に眼を転ずれば、赤痢アメーバ(*Entamoeba histolytica*)、ランブル鞭毛虫(*Giardia lamblia*)など、種々の腸管寄生性の原虫が問題となる。米国においては既に1960~70年代に知的障害者の更正施設、精神科患者の施設などでの高率な赤痢アメーバ感染が報告された¹⁾²⁾。この時点では *E. histolytica* と近縁の非病原種である *E. dispar* との区別はまだできておらず、米国の施設で特に糞便検査で検出されたアメーバが全て病原種であるかどうかは定かではない。一方わが国においては1980年代末に至って初めて Nagakura ら³⁾によって施設内感染の事例が報告された。この集団感染は神奈川県知事施設において起こったもので、蛍光抗体法による陽性率は38%、糞便検査の陽性率は20%に達した。そして5名の invasive amebiasis(1名の肝臓瘍例を含む)の症例が見いだされた。これ以降、神奈川県は県下の施設の検索を行ったが、17ヵ所の施設のうち7ヵ所で1,360名中33名(2.4%)に糞便検査でアメーバ嚢子を検出した。しかしこの時点では *E. histolytica* と *E. dispar* の鑑別はやはり出来ておらず、どちらの感染であるか実態は明らかではない。また1997年には大阪市の同様の2ヵ所の施設において調査が行われ、一方では糞便検査で16%に嚢子が検出され、他方では44%から検出された。これらの嚢子陽性者はまたそれぞれ血清反応で92%、62%が陽性であった⁴⁾。血清反応陽性者は恐らく *E. histolytica* 感染に起因すると考えられよう。1999年には静岡で調査が行われ、調査対象の9ヵ所の施設のうち1ヵ所で糞便検査で対象の4%に嚢子が検出され、PCRで *E. histolytica* であることが確認された⁵⁾。

筆者らはやはり数年前よりわが国のアメーバ感染の実態把握を厚生科学研究費、新興・再興感染症研究事業の一環として試みてきたが、既に7施設、延べ10回以上の調査を行い、ELISAにて最も高い場合は53.5%の陽性率を示し、糞便検査で0~16.7%、モノクローナル抗体を使用したサンドイッチELISAによる *E. histolytica* 特異抗原検出法で0~34.2%の陽性率を得た⁶⁾。また東海大学の橋らによって、これらの感染者が *E. histolytica* に感染していることは間違いないのに、ほとんど全ては消化器症状を呈しておらず、無症候の持続性感染者であることが推定された⁷⁾。しかしこれらの感染者から分離

し、無菌培養株化したアメーバはハムスター肝に大きな膿瘍を実験的に作ることが明らかになり、virulence が保たれていることも明らかになった。また分離した *E. histolytica* を更に詳しく同定するために、国立感染症研の野崎らは Locus 1-2 など種々の遺伝子の変異に富んだ部分に着目し、PCR によって subpopulation の同定を試みた⁹⁾。その結果施設より分離された *E. histolytica* 株は変異が少なく、同一の施設からの分離株は同一の感染者から拡大していったものと推測された。またこのような施設内感染にかかわる要因を考えれば容易に想定できるが、*E. histolytica* の感染率が高い施設では他の経口感染する原虫の感染もしばしば見られ、*G. lamblia*, *Entamoeba coli*, *Endolimax nana* などが検出されている。

病院感染、あるいは家庭内、職場などでの感染以外に原虫感染で最近注目されているのは水系感染、性感染、輸入感染などであろう。神奈川県、埼玉県と続けざまに水系感染が起こり、特に後者では八千名に達する感染者を出したクリプトスポリジウム、男性同性愛者に感染が性行為によって拡大しつつあるアメーバ、特に *E. histolytica*、輸入感染症としてわが国で最も重要な位置を占める感染症の一つであるマラリアなど、原虫感染は海外との交流の増加、生態の変化、環境の汚染などによってわが国の医療でも無視できない存在になっていることを銘記すべきである。

II. 検査診断

施設内感染にかかわる原虫は主にアメーバを始めとする腸管寄生原虫である。したがって本稿では腸管寄生原虫、特にアメーバの検査診断に関して最近の進歩を記載する。検査診断に際して最も重要なことは、病原種である *E. histolytica* と非病原種である *E. dispar* の確実な鑑別である。従来から行われた糞便検査による嚢子検出が依然として必要であることは間違いないが、この方法では適当な染色法を併用しても形態上類似している *E. histolytica* と *E. dispar* の鑑別は難しい。しかし疫学調査の場合には他の方法と併用すれば、嚢子検出は感染源となりうる例を特定化するのに有用である。多くの場合嚢子(図1)は有型便に検出されるので、臨床症状との関連は付けにくい。糞便検査のみで *E. histolytica* と判定できるのは下痢便中に赤血球を

捕食しているアメーバ栄養型虫体(図2)を見いだした場合で、この際は臨床症状との関連を付けることが可能となる。すなわち赤血球を捕食していればそのアメーバは一時期腸管組織内に存在したことを示唆していることとなり、組織侵入能力のない *E. dispar* ではないことになる。またアメーバ症の臨床診断に内視鏡下生検がよく行われるが、生検組織内にアメーバ栄養型虫体を見いだしたら、そのアメーバには組織内侵入能力があるものと判断し、*E. histolytica* として差し支えない。

以上より分かるように、*E. histolytica* と *E. dispar* の確実な鑑別は疫学調査に際しても必須なものである。*E. dispar* のみの感染が確認されれば治療は必要ない。問題は *E. histolytica* と *E. dispar* の混合感染の場合で、従来はこのような混合感染は起こらないと思われていたが、現在は想像以上に混合感染の頻度が高いことが明らかになっている。そしてこのような混合感染の場合、糞便試料を以前よく行われていたように培養してしまうと理由は明らかにはなっていないが、*E. histolytica* と *E. dispar* の比率がかなり大幅に変化してしまう。このことが確実な疫学調査の妨げになることが既に明らかになっている。したがって施設内感染にかかわる疫学調査などでは、培養を伴わない方法で糞便中から *E. histolytica* を同定する必要が出てくる。現時点でこのようなことが可能なのはモノクローナル抗体を利用した抗原検出か、PCR による特異的な遺伝子断片の検出に多くの場合限られる。

モノクローナル抗体を用いた特異抗原検出には種々の方法があるが、最も広く行われておりキット化までされているのは、アメーバ表面の adhesin に対するモノクローナル抗体を利用した *E. histolytica* II kit (Techlab, USA) であろう。現在わが国では市場化されていないが、関東化学を通して輸入可能である。PCR に関しては嚢子の DNA を抽出してテンプレートとしなければならないため、良い方法は限られている。筆者らの研究室の Sanuki らは、この方法に関して検討を加え、まず嚢子を MGL 法によって濃縮し、その後で 1% Triton X-100 中で 90°C にて処理することによって嚢子壁を破壊し、DNA を抽出することに成功した⁹⁾。この方法で抽出した DNA を標的として peroxiredoxin の遺伝子塩基配列に基づいて設計されたプライマーを用い、PCR によって *E. histolytica*, *E. dispar* を同定することが可能



図1 赤痢アメーバ嚢子(鉄ヘマトキシリン染色様毎)
未成熟の嚢子で核を有し、両端が鈍円状の特徴的な類染色体(chromatoid body)が見られる。直径 13~18 μm 。

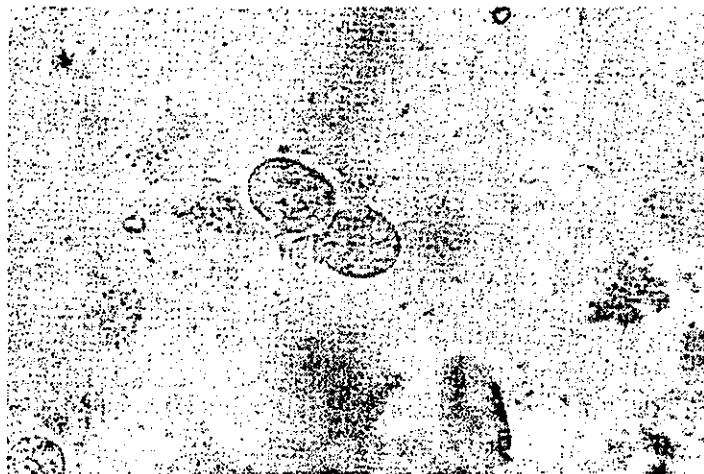


図2 赤痢アメーバ栄養型虫体(未染色)
長径 35~45 μm 程度。偽足を出して活発に運動する。

となった。また *E. histolytica*/*E. dispar*, *G. lamblia*, *Cryptosporidium parvum* をイムノクロマト法によって同時に判定できる Triage Microparasite Panel (Biosite 社, USA) というキットも一時筆者らによって使用された。1 キットあたりの単価が高いという難点があったが、施設内感染や同性愛者の性感染では上記の三種の原虫が同時に感染していることもしばしばあるため、対象によっては利用価値がある。

III. 感染対策

施設内でのアメーバ感染は特徴的な感染パターンをとる。上述の野崎らの研究にもあるように当初は恐らく単一の感染者が更正施設などに入所することにより感染が拡大すると思われる。その後は Nagakura らの最初の報告³⁾にも示されているが、集団生活といっても同じ部屋に複数の入所者が居住しているため、感染者と同室の居住者の間に感染が

拡がって行くものと想定される。米国では human-to-human transmission を疑わせる事例もあったが、逆にそれを否定する報告もあり一概に結論は下せないが、感染者の糞便中の嚢子による human-to-human transmission を含む広い意味で周囲の環境汚染が入所者の行動の特性などに基づいて引き起こされ、未感染者に感染が拡大して行くものであろう。したがって、施設内感染の対策は通常の病院感染とはまた違ったアプローチを必要とする。

筆者らは上述のように、新興・再興感染症研究事業としてわが国の施設内アメーバ感染の実態把握に努めてきたが、その活動の一環として以下に述べるように感染対策の立案・実施を試みてきた。この感染対策は筆者らの調査に協力してくれた更正施設の職員と筆者らが共同で作成したもので、他種の腸管寄生性原虫にも適用できるものと思われる。

すなわち、施設内アメーバ感染の制圧は以下に記載する5種類の基本方針より構成される⁹⁾。

- ① 感染の実態把握
- ② 感染者の治療、または集団治療
- ③ 感染予防対策の実施
- ④ 施設職員などに対する教育
- ⑤ 感染予防対策遵守の評価とその所見の予防対策改善への反映

これまでの筆者らの経験ではわが国では当初から広い範囲で施設内原虫感染についての積極的な疫学調査がなされてきて現状の把握が行われたわけではなく、実態把握のための疫学調査のきっかけになるのは多くの場合は Nagakura らの調査⁹⁾のように、施設において腸アメーバ症やアメーバ性肝膿瘍の患者発生がみられたことによるという事例がかなり多い。したがって感染の実態把握も緊急に治療を必要とするアメーバ性肝膿瘍患者の発生などがあるという場合と、症状のある例が全くなく、実態の把握のための疫学調査の実施という場合では意味合いが全く異なり、調査に主に使用する手法も異なってくる。例えばアメーバ赤痢を疑わせるような下痢、腹痛などの症例が施設に発生したら、検査に時間を要するPCRなどを使用するよりELISAなど迅速に行える血清学的な方法を使用するなどしてまず対応すべきである。施設において糞便試料を採取するのは実は容易ではなく、臨床的所見、血清反応などによってまず判断し、続いて確定診断の一助として抗原定量、PCRを実施した方がよい。疫学調査の場合は

事情が異なり、上述のようにほとんど全員が無症状で推移していることが多いので、糞便試料を数日かけて集めサンドイッチELISAなどによる抗原定量法を直接実施するという方法を探る。

感染者の治療、または集団治療には筆者らはメトロニダゾールを使用した。文献上は腸管内の嚢子を殺滅するにはデロキサニドフロエイトやパロモマイシンなどを使用するが、筆者らの経験ではメトロニダゾール投与で嚢子も糞便中からほぼ確実に消失する。ただ感染者のみに治療を行うか、集団治療を試みるかは難しい判断を迫られることがある。決まった基準があるわけではないが、筆者らは例えば感染率が低い場合や、一度集団治療を行いフォローアップにて感染継続が見いだされた場合などは他への感染源となる頻度が低いと判断し、抗原検査やPCR陽性例のみに治療を行っている。この他にも施設側の事情もあり、弾力的な対応が必要となる。

施設内感染に関する感染予防対策は従来定まった基準があるわけではない。米国CDCの病院内感染に関する標準予防策(standard precaution)および感染経路別予防策(transmission-based precaution)がある程度準用できる。ちなみにCDCによるGuideline for Isolation Precautions in Hospitals (Infection Control and Hospital Epidemiology, vol 17.1, 1996)には院内における隔離予防策の対象となる寄生虫、医動物疾患がリストされており、アメーバ症、エキノコックス症から疥癬、マラリアまで挙げられているが、全て標準予防策で対応するよう指示されている。しかし、狭義の病院感染と違い施設内感染の場合は例えばリネンが汚物で汚染されるなどといったほとんど施設内感染でしかみられない特殊な状況もあり得、より一層環境の汚染あるいはhuman-to-human transmissionの可能性が高まるので標準予防策のみで全て対応できるわけではないことは認識されるべきであろう。このような状況に鑑み、筆者らは上述のように調査に協力いただいた施設の職員と共同で、当該施設での制圧の経験をも踏まえた上でCDCの標準予防策および間接的経口・接触予防策を参照し、感染予防対策をも立案してみた。この感染予防対策は実はまだフィールドでの詳しい評価が行われておらず、法的な対処などと共に今後の課題として残っている。特に問題となるのは、リストした対策のうち、現実にはどのレベルまでが必要かつ十分であるかを確定することであろう。この

意味で本稿に記載した施設内感染予防策が今後改編される可能性があることを指摘しておきたい。

おわりに

わが国における諸種施設での腸管寄生性原虫，特に赤痢アメーバの感染は施設によって差異はあるものの決して無視できる問題ではない。今後の福祉・厚生行政の在り方からみても提示している問題は大きい。寄生虫学の面からもアメーバの無症候性持続感染のメカニズムなど，今後の検討を要する問題は少なくない。このような施設内感染への注意を喚起したい所以である。

文 献

- 1) Jeffrey GM : A three year epidemiologic study of intestinal parasites in a selected group of mental patient. *An J Hyg* 71 : 1~8, 1960
- 2) Sexton DJ, Krogstad DJ, Spencer HC : Amebiasis in a mental institution : serologic and epidemiologic studies. *Am J Epidemiol* 100 : 414~423, 1974
- 3) Nagakura K, Tachibana H, Tanaka T, et al : An outbreak of amebiasis in an institution for the mentally retarded in Japan. *Jpn J Med Sci Biol* 42 : 63~76, 1989
- 4) 阿部仁一郎, 西川禎一, 安川 章 : 大阪市内の知的障害者施設における赤痢アメーバ症の集団発生. *Parasitol Int* 46(suppl) : 92, 1997
- 5) 寺井克哉, 増田高志, 宮本秀樹 : 静岡県内の知的障害者更正施設における赤痢アメーバの感染状況. *感染症誌* 73 : 626~627, 1999
- 6) 竹内 勤, 今井栄子, 小林正規 : 寄生虫の院内(施設内)感染対策. エビデンスに基づいた感染制御(小林寛伊, 吉倉 廣, 荒川宣親, 編), メジカルフレンド社, 2002. p141~148
- 7) Tachibana H, Kobayashi S, Nagakura K, et al : Asymptomatic cyst passers of *Entamoeba histolytica* but not *Entamoeba dispar* in institutions for the mentally retarded in Japan. *Parasitol Int* 49 : 31~35, 2000
- 8) 野崎智義 : わが国のアメーバのサブポピュレーションの同定に関する研究. 厚生科学研究費補助金, 新興・再興感染症研究事業, わが国におけるアメーバ症の実態の解明と対策確立に関する研究, 平成13年度総括・総合研究報告書, 2002. p30~41
- 9) Sanuki J, Asai T, Okuzawa E, et al : Identification of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* cysts in stool by polymerase chain reaction. *Parasitol Res* 83 : 96~98, 1997

寄生性原虫における硫黄含有アミノ酸 生合成・分解経路

新しい抗原虫感染症薬剤の開発標的

野崎智義・竹内 勤

硫黄含有アミノ酸(以下,含硫アミノ酸)は原核・真核生物において,蛋白質合成,メチル化反応,ポリアミン・グルタチオン合成などの重要な合成反応に関与しており,その生合成・代謝は厳密に調節されている。筆者らは,寄生性原虫と哺乳動物宿主の含硫アミノ酸生合成・分解機構の差異を利用して抗原虫薬剤を開発することを目的として研究を行なっている。哺乳動物は必須アミノ酸であるメチオニンを摂取し,逆トランスサルフェーション経路によりシステインを得ている。一方,寄生性原虫である赤痢アメーバ,トリパノソーマは硫化水素とセリンとからシステインを *de novo* 生合成することができる。原核生物,植物にも存在するこの経路は硫黄同化的システイン生合成経路とよばれ,哺乳動物には存在しないことから,抗原虫薬剤開発の有望な標的である。本稿では,原虫における含硫アミノ酸生合成・代謝の哺乳動物との相違点,原虫種間での多様性,生化学的・生物学的意義について概説する。

Key words 硫黄含有アミノ酸 硫黄同化 寄生

はじめに

寄生虫が“寄って生きる虫”とよばれるには理由がある。寄生[→今月のKey Words(p.4)]とは「他者に依存せずひとりで生きていける状態(独立栄養状態)」から脱却して,「他者に寄り添い,その栄養を奪って生きる状態」を選び取った生物進化の結果である。その過程で寄生虫の合成・代謝経路,とくに核酸合成・アミノ酸合成などエネルギー対価の高い合成経路の多くは捨てられ,単純化されている。同時に宿主のものを効率的に奪い取るために必要な機構が発達している。さらに,寄生の成立には宿主免疫機構から回避することが不可欠であり,そのためのさまざまな機構を進化させている。その最も有名な例はおそらくアフリカトリパノソーマ主要表面糖蛋白質の変異であろう(本特集 永宗・木下の項参照)。

本稿で概説する含硫アミノ酸*1(図1)の生合成・代

謝経路も寄生虫が寄生適応の過程で発達させた特殊な代謝経路の1つの例である。いうまでもなく哺乳動物も従属栄養性であり,栄養素の多くを食餌に依存している。動物種により異なるが8~11種類のアミノ酸は必須アミノ酸とよばれ,哺乳動物にその合成経路がないため食餌から摂取される。一方,寄生性原虫[→今月のKey Words(p.4)],たとえば赤痢アメーバ*2を例にとると,寄生適応の結果,システイン,アラニン,アスパラギン,アスパラギン酸,グルタミン,グルタミン酸,リシン以外のすべてのアミノ酸の合成能力が欠損している。寄生虫のアミノ酸合成経路は基本的に哺乳動物の経路をさらに軽量化したものと考えられがちだが,赤痢アメーバの場合1つの例外がある。それは後述する無機硫黄からシステインを合成する能力である。この硫黄同化的システイン生合成経路は哺乳動物では存在せず,系統発生解析によ

Tomoyoshi Nozaki, 国立感染症研究所寄生動物部 E-mail: nozaki@nih.go.jp

Tsutomu Takeuchi, 慶應義塾大学医学部熱帯医学・寄生虫学教室 E-mail: takeuchi@sc.itc.keio.ac.jp

Sulfur-containing amino acid metabolism in parasitic protozoa

ると細菌・植物あるいはその先祖生物から水平転移により獲得されたと考えられる。哺乳動物に存在しないシステイン生合成経路は、いうまでもなく寄生虫に特異的に作用する薬剤を開発するための合理的なターゲットである。さらに、“寄生適応”と“生物進化”という生物学における大きな命題を理解するための優れたツールを提供し、それが基礎研究および応用研究両方の興味と目的を満たす理由となる。

I. 硫黄含有(含硫)アミノ酸の重要性

1. なぜ含硫アミノ酸は生物にとって重要なのか？

メチオニンはS-アデノシルメチオニンを介してコリン、クレアチンなどのメチル化合物の生合成に関与する。さらに、核酸塩基、蛋白質のアルギニン、ヒスチジン、リシン残基、ホスファチジルコリンなどのリン脂質のメチル化反応の際のメチル基供与体として作用する(図2)。さらにプロピルアミンの供与体としてスペルミジン、スペルミンなどのポリアミンの生成に関与する。また、細菌のtRNAのウリジル酸基へのアミノカルボキシル基の転移に作用する。一方、システインは蛋白質の2次・3次構造の決定、活性・触媒の調節に重要な役割を担うだけでなく、真核生物の主要抗酸化物であるグルタチオンの基質となる。これらの含硫アミノ酸が分子機能、細胞機能にとって必須である反面、ホモシステインをはじめとする他の含硫アミノ酸はヒトも含め多くの生物にとって有害である。ヒトのシスタチオニンβ-シターゼ(CBS)欠損によりホモシステインを異化できないホモシチン血症・尿症は常染色体劣性遺伝形式をとる遺伝性疾患であり、知能障害、痙攣発作、水晶体脱臼、心血管系病変、血栓症、くも様指を呈する。したがって、巧妙な含硫アミノ酸の代謝調節が生物にとって必須であることがわかりいただけると思う。

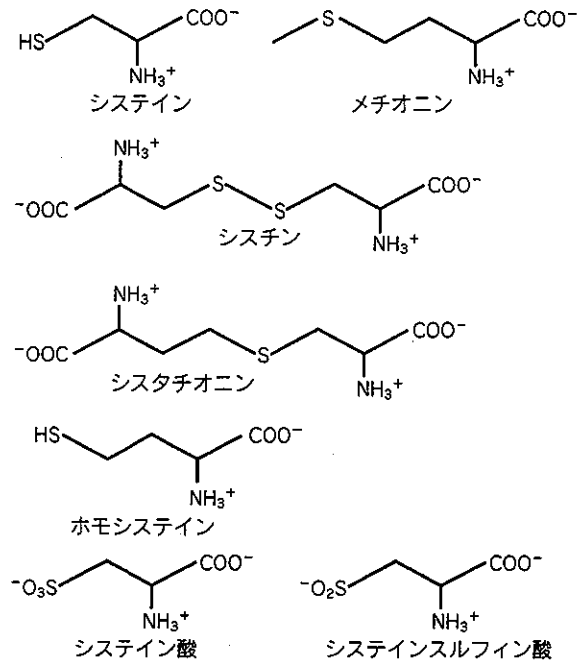


図1 生体内のおもな含硫アミノ酸とその構造
最下部のシステイン酸とシステインスルフィン酸はシステインの代謝中間体である。

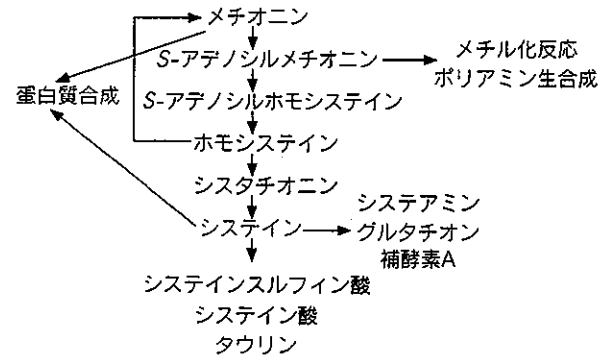


図2 哺乳動物におけるシステイン合成経路および関連経路
これらの経路から生じる重要な反応および化合物を示した。本経路は逆トランスサルフェーション経路ともよばれる。

- *1 分子中に硫黄を含むアミノ酸の総称である。蛋白質の構成成分となるものでは、メチオニン、システイン、シスチン(図1)がある。また代謝中間体として、ホモシステイン、システインスルフィン酸、システイン酸、シスタチオニンなどが含まれる。
- *2 赤痢アメーバは大腸腔内に寄生し感染者の多くでは無症候性に経過する。栄養型が組織に侵入すると血便、潰瘍、穿孔といった消化管症状、さらに血行性に多臓器に播種し、肝・肺・脳・皮膚などで膿瘍を形成し、重篤な症状を呈する。わが国においては3つの感染集団があり、障害者収容施設、男性同性愛者、さらに海外渡航者である。男性同性愛者の感染者ではHIVとの混合感染例も多く、エイズ関連感染症の性質が強い。現在、アメーバ症に用いられているメトロニダゾールを中心とした薬剤は催奇形性が高いうえ、メトロニダゾール耐性株の出現もすでに報告されている。また、経口投与されたメトロニダゾールは組織内に侵入した赤痢アメーバに対してのみ有効であり、感染の伝播を担う嚢子に対して無効であるため、嚢子キャリアーに対しては腸管吸収の低いジロキサニドフルエイトが用いられているが、治療効果は低い。また、ワクチンの実用化も見込まれていない。したがって、アメーバ症に対して、より高い殺虫効果を示す、副作用のない新規薬剤の開発およびそのための標的分子・代謝経路の解析が望まれている。

2. 原虫における含硫アミノ酸の重要性

筆者らがおもな解析対象としている赤痢アメーバは、通常ヒトの大腸腔内に寄生している。ヒトの大腸腔内は嫌気的な環境である。人体寄生性の嫌気性・微好気性原虫には赤痢アメーバ以外にもいくつかの医学的に重要な原虫が含まれる。小腸に寄生し小児の下痢の原因となるランブル鞭毛虫と、膣などの泌尿生殖器に寄生し炎症の原因となる臍トリコモナスが代表的である。これらの原虫は生物進化の過程で比較的早期に真核生物の主幹から分岐した原虫である。進化の過程でミトコンドリアを2次的に消失しているばかりか、他の真核生物で主要な抗酸化物であるグルタチオン、ならびにグルタチオン生成酵素、酸化還元酵素を欠損している¹⁾。通常の細胞では、グルタチオンは細胞内最高濃度のチオール(SH)化合物である。グルタチオンをもたない原虫、たとえば赤痢アメーバではその代わりシステインが最高濃度(0.4 mM)のチオール化合物である。さらに赤痢アメーバおよびランブル鞭毛虫はその *in vitro* 培養に大量のシステイン(約 10 mM)を必要とすることがよく知られている。また細胞外システインは *in vitro* での赤痢アメーバの細胞運動およびマトリックスへの接着に必須であることが示されている²⁾。これらのデータは、システインが嫌気性原虫において重要な生理作用をもつことを示唆している。

また、キネトプラスト科に属し、ミトコンドリアの集合体であるキネトプラストというオルガネラを有する一連の原虫(トリパノソーマ、リーシュマニア、クリシジアなど)はグルタチオンとスペルミジンとから合成されるトリパノチオン³⁾という抗酸化作用をもつユニークなチオール化合物をもっている。さらにキネトプラスト科原虫はこのトリパノチオンを合成・代謝する一連の独立した酵素をもっており、含硫アミノ酸合成および代謝はトリパノチオンを中心とした抗酸化機構に強く影響すると考えられている。

II. 原虫における含硫アミノ酸生成の特殊性

1. システイン生成経路における哺乳動物と原虫との相違

創薬の標的として代謝経路を考えたとき、標的となる代謝経路が原虫に選択的に存在することが理想となる。

原虫の含硫アミノ酸の生合成経路はこの条件をよく満たしている。哺乳動物ではメチオニンは必須アミノ酸として食物から摂取される。その後、図2に概略した経路でシステインを生成する。この経路は逆トランスサルフェーション経路とよばれ、細菌に存在するシステインからメチオニンを生成するトランスサルフェーション経路を逆向きに進行する。一方、赤痢アメーバでは哺乳動物型の逆トランスサルフェーション経路は働いていない。これは本経路の中心的役割を果たすCBSが赤痢アメーバに存在しないためである。したがって、赤痢アメーバは細胞外から取り込んだメチオニンからシステインを生成することができない。その代わり赤痢アメーバは、細菌・植物に比較的広く存在する硫黄同化的システイン生合成経路を有している。

2. 硫黄同化的システイン生合成経路とは?

硫黄同化的システイン生合成経路はその名前のとおり無機硫黄を有機物に固定しシステインを合成する経路である。この経路が最も解析されている細菌および植物での全体像は以下のとおりである。まず無機硫黄(通常は硫酸)を細胞内に取り込み、活性化し、さらに硫化水素に還元する。同時に、解糖経路、セリン生合成を経て得られたセリンをアセチル化してO-アセチルセリンを合成する。さらに、O-アセチルセリンと硫化水素とから最終的にシステインが生成される(図3)。細菌・酵母・植物では無機硫黄を取り込む輸送体、活性化酵素(ATP-スルフリラーゼ、APSキナーゼ)、ならびに還元酵素(PAPS還元酵素、亜硫酸還元酵素など)、調節酵素であるセリンアセチル転移酵素(SAT)、さらに最終酵素であるシステイン合成酵素(CS)などすべての蛋白質が酵素学的に解析されその遺伝子が同定されている。赤痢アメーバにおいては筆者らの研究により、ATP-スルフリラーゼ⁴⁾、APSキナーゼ(筆者ら:未発表)、SAT⁵⁾、CS^{6,7)}が存在することは明らかとなった。しかしながら、99%以上の遺伝子を網羅している赤痢アメーバゲノムデータベースの検索によると、既知の硫酸輸送体および還元酵素類と有意なホモロジーを有する遺伝子断片は存在しない。したがって、赤痢アメーバでは取り込まれた硫酸を活性化し、硫酸エステルを合成する経路は存在するが、他種生物とは異なる硫酸輸送体で硫酸を細胞内へ取り込んでいること、さらに、活性化された硫酸を還元して硫化物をつくる経路は存在しないことが示唆される。シス

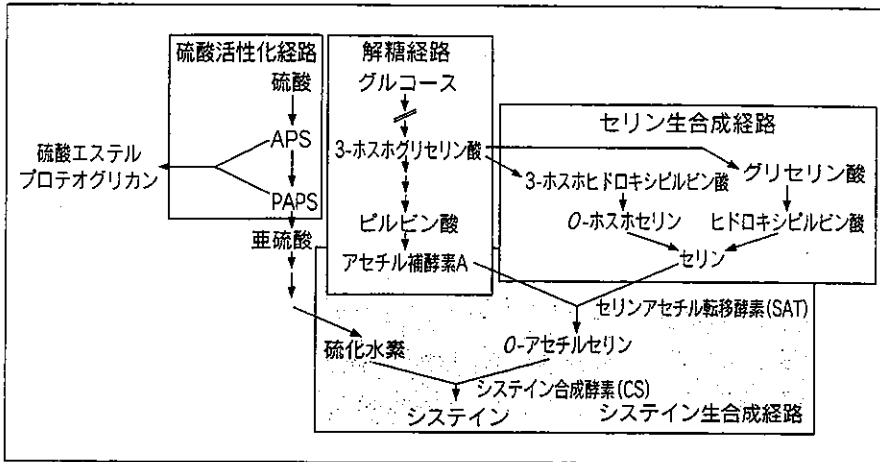


図3 赤痢アメーバにおける硫黄同化的システイン生合成経路ならびにその上流に存在する経路
 硫酸活性化経路、解糖経路、セリン生合成経路を示した。硫酸活性化経路に続く活性化硫酸の還元経路は確認されていない。

テイン生合成には、食食により取り込まれた腸管内細菌由来の硫化水素、あるいはフェレドキシンなど豊富な鉄-硫黄蛋白質から直接硫化物(S²⁻)を得ていると思われる。しかしながら、未同定の硫酸還元酵素が存在する可能性も残されている。

3. 赤痢アメーバにおける硫黄同化的システイン生合成経路

A. 赤痢アメーバの硫黄同化的システイン生合成経路の解析戦略

筆者らは、大腸菌に硫黄同化的システイン生合成経路があることを利用して、レスキューにより赤痢アメーバのCSならびにSAT遺伝子を獲得した^{5,6)}。ゲノム情報が十分でなかった数年前には、このレスキューによる遺伝子の獲得が機能的蛋白質を解析するうえでの効率的かつ論理的な戦略であった。ゲノム情報の完結が間近となった現在でも、他種生物を用いたレスキューは機能的蛋白質を直接得るための最短の方法である。赤痢アメーバのCSおよびSATのcDNAクローンの出現頻度がそれぞれ2%、0.02~0.1%と高かったことも幸運であった。同時にこれらの酵素cDNAの発現量の多さが本経路の生物学的重要性を示唆していると思われる。

B. 赤痢アメーバの硫黄同化的システイン生合成経路の特殊性

硫黄同化的システイン生合成経路は細菌・植物にも存在するが、赤痢アメーバの経路は他の生物に見られないいくつかのユニークな特徴をもっている。将来創薬の標的として考慮する際には、赤痢アメーバが同居する腸管内の他の微生物のエコロジーに影響を与えないことが理想的である。したがって、細菌・植物などヒト以外の生

物との相違の検証は常に大切であろう。赤痢アメーバと他種生物との間に3つの大きな相違点が見つかった。まず第1に、他種生物ではCSとSATはCS複合体とよばれるヘテロ多量体を形成している。しかしながら、赤痢アメーバのCSとSATは相互作用しない。これは精製酵素を用いたアフィニティー共精製、酵母ツーハイブリッド系で確認された⁶⁾。第2の特徴として、赤痢アメーバのSATは他種のどの生物にも見られず、後述のトリパノソーマ、それにシアノバクテリアのプラスミドにコードされたSATだけに共通する特異的な挿入部位があった。このことは原虫のSATがシアノバクテリアと祖先を共有していることを示唆している⁶⁾。一方、CSにはシアノバクテリア由来を裏づける証拠はなく⁵⁾、CSとSATはおそらく別の先祖生物から由来していると考えられる。これが赤痢アメーバ内でCSとSATとが相互作用しない1つの理由かもしれない。他種生物ではCSとSATとの相互作用は生成物(基質)の効率的な受け渡し(チャネリング)に有利に働くと考えられている。したがって、赤痢アメーバにおいてCS/SATの相互作用がないことは、細菌、植物と原虫とでは硫黄同化的システイン生合成経路の酵素ならびに中間代謝物の細胞内局在、局所濃度などが異なる可能性を示している。第3の特徴として、赤痢アメーバのSATは他種のSATと異なり、システインだけでなく酸化型のシスチンによっても同程度に阻害を受けた。したがって、赤痢アメーバのSATは細胞内の酸化還元状態にかかわらず、細胞内総システイン濃度をモニターしていると考えられる。しかしながら、原虫と他種生物の阻害様式の相違の生理的意義は不明である。

III. 原虫におけるシステイン生合成の普遍性と多様性

1. トリパノソーマ原虫と赤痢アメーバとのシステイン生合成の類似点ならびに相違点

A. 赤痢アメーバおよび *Trypanosoma cruzi* における生活環の相違

硫黄同化的システイン合成経路は赤痢アメーバなどの嫌気性原虫にだけに存在するわけではない。鞭毛をもつ原虫である *Trypanosoma cruzi**³(以下、トリパノソーマ)にもこの経路は存在する。赤痢アメーバと違ってトリパノソーマは哺乳動物と昆虫を宿主とする複雑な生活環をもつ(図4)。哺乳動物の中では細胞内寄生し、細胞質内で増殖する。一方、昆虫内では腸管内に寄生している。したがって、その生活環のなかで急激な栄養素および酸化ストレスの変化を受けている。しかしながら、生活環の一部においては、昆虫の腸管内という赤痢アメーバの生活環と似た環境で生育している。

B. トリパノソーマにおける硫黄同化的システイン合成経路

筆者らは硫黄同化的システイン合成経路が昆虫内ステージで発現していると予想し、昆虫内型虫体から作製したcDNAライブラリーとCS欠損大腸菌株を用いてトリパノソーマCS cDNAを獲得しようとした⁴。しかし得られたcDNAはCSではなく以下に述べるCBSであった。さらにトリパノソーマのゲノムおよびESTデータベースを検索しても既知のCSと有意に相同性をもつ蛋白質は見つからなかった。次にネイティブのCS活性を確認するために、トリパノソーマ昆虫内型虫体の粗抽出液をDEAE陰イオン交換クロマトグラフィーで展開した。CS活性は2峰性のピークとして観察された。低イオン強度で溶出されたCS活性はCBS活性と完全に一致したが、高イオン強度で溶出されたCS活性にはCBS活性は含まれなかった。したがってこの2つ目のCS活性は他種生物のCSとアミノ酸レベルの相同性をもたない新規CS蛋白質であると思われる。この新規CSは高塩濃度で溶出され、pIが低いことが予想されるが、別の酵素(たとえば鉄-硫黄クラスター形成に関与するシ

ステイン脱硫酵素など)の副反応の可能性もある。総合すると、トリパノソーマ昆虫内型虫体では独立した少なくとも2種類の蛋白質(CBSと新規CS)が硫黄同化的システイン生合成経路の最終段階を触媒すると考えられる。この重複の意義はわかっていないが、ノックアウトを含めた遺伝学的手法で明らかになるとと思われる。

C. トリパノソーマにおけるトランスサルフェーション経路: トリパノソーマCBSの *in vitro*, *in vivo* 機能

トリパノソーマでは赤痢アメーバとは異なり、システイン合成は上記の硫黄同化的システイ

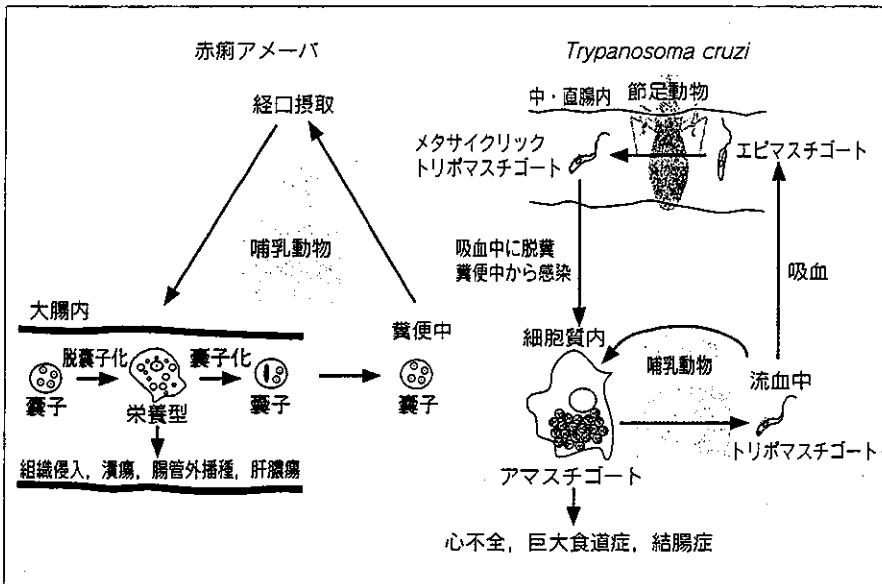


図4 赤痢アメーバおよび *Trypanosoma cruzi* の生活環 これら原虫の惹起する反応、症状、病気を併記した。

*3 トリパノソーマ科原虫の起こす病気にはおもにアフリカ睡眠病とシャーガス病とがある。*Trypanosoma cruzi* は後者の原因原虫である。シャーガス病は中南米に浸淫している。シャーガス病の病態ははまだ明らかになっていないが、哺乳動物細胞の細胞質内での原虫の増殖とそれに伴う細胞破壊が直接の病因である。さらに自己免疫が病理に関与しているとされる。心筋および食道・大腸の平滑筋が主要な標的組織であり、心不全、巨大消化管症をひき起こす。

ン生合成経路のほかに、逆トランスサルフェーション経路(図2)を通じて行なわれる。筆者らは上記のとおり逆トランスサルフェーション経路の主要酵素であるCBSをクローニングし、ネイティブおよび組換え酵素の酵素学的解析を行なった⁹⁾。CBSはホモシステインとセリンとからシスタチオンを生成する反応を触媒する酵素で逆トランスサルフェーション経路の中心的酵素である。トリパノソーマCBSは多重遺伝子としてゲノム上にクラスターとなって存在し、しかも微小多型を示す少なくとも6種類のアイソザイムcDNAとして発現していた。発現量を増加させるために遺伝子コピー数を増やすのはトリパノソーマ、リーシュマニアの遺伝子に比較的頻繁に見られる現象であるが、これまで多重遺伝子にコードされ、アイソザイムとして機能するCBSは知られておらず、酵素多型の生理的意義は興味深い。ネイティブならびに組換えCBSは*in vitro*で単一サブユニットからなる4量体を形成し、CSならびにCBSの活性を有した。さらに、*in vivo*での機能を大腸菌CS欠損株、酵母CBS欠損株で確認するとトリパノソーマCBSがこれらの欠損株の生育阻害をレスキューすることが判明し、トリパノソーマCBSが他種生物でCSならびにCBSとして機能する2機能酵素であることが判明した。

D. トリパノソーマCBSと新規CSの生活環における発現制御

筆者らはトリパノソーマ昆虫内型虫体と赤痢アメーバとの生活環境の相似から、硫黄同化的システイン生合成経路はトリパノソーマ昆虫内型虫体で選択的に発現されていると予想していた。しかし予想に反して、硫黄同化的システイン生合成経路は昆虫型および哺乳動物型の両方で発現していた⁹⁾(図5)。それに対して、哺乳動物型システイン合成経路のCBS活性は発育ステージ特異的な調節を受けていた。昆虫型虫体エピマスチゴートでの単位蛋白質あたりの活性は、哺乳動物型虫体アマスチゴートおよびトリボマスチゴートにおける活性に比べ8~9倍高かった。哺乳動物の細胞質内では、システインを含めた多くの栄養素は宿主から直接“scavenge”できると思われる。このためメチオニンからシステインを合成する必要がないのかもしれない。一方、硫黄同化的システイン生合成経路はどちらのステージでも同程度に発現しており、ハウスキーピングな役割を担うと考えられる。

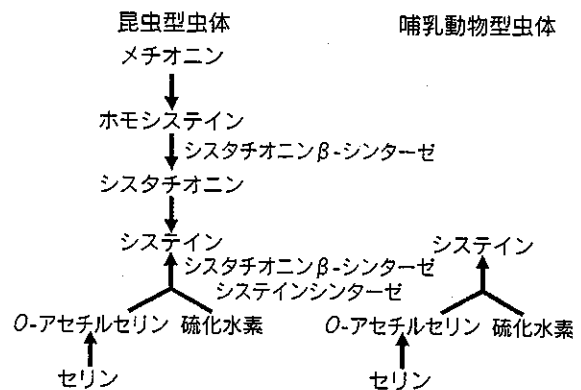


図5 *Trypanosoma cruzi* 昆虫型ならびに哺乳動物型虫体におけるシステイン合成経路の相違

2. その他の原虫におけるシステイン合成経路

ゲノムデータベースが拡充しつつあるその他の原虫において、硫黄同化的システイン生合成経路の主要酵素CS、SATおよび逆トランスサルフェーション経路主要酵素CBSのオーソログの存在を調べてみると、トリパノソーマ属に分類されアフリカ睡眠病の原因原虫となる*T. brucei*ではCBSはあるが、CSならびにSATは存在しない。一方、属は異なるが同じキネトプラスト科に属するリーシュマニア(*L. major*および*L. tarentolae*)ではCBSおよびSATのオーソログが存在する。一方、マラリア原虫、トキソプラズマ、クリプトスポリジウムなど医学的に重要な原虫を含むアピコンプレックス門では、トリの腸管内に寄生するアイメリア(*Eimeria tenella*)のスポロゾイトのESTにCBSのエントリーが認められるが、それ以外の原虫ではCS、SAT、CBSのオーソログの存在は明らかとなっていない。また、前述の嫌気性原虫では、ランブル鞭毛虫でCSならびにSAT活性が認められている⁹⁾。一方、トリコモナスでは活性、遺伝子いずれのレベルでもシステイン生合成経路の存在は確認されていない。しかしながら、前述したような嫌気性原虫の生物学的類似性から本経路が嫌気性原虫全般に存在する可能性が高いと考えられる。今後ゲノム情報の拡充に伴いゲノミクスから得られる代謝学の情報は増え、硫黄同化的システイン合成経路をもつ生物の範囲は広がっていくと考えられるが、現段階では、本経路は赤痢アメーバ、ランブル鞭毛虫とトリパノソーママクルージ、リーシュマニアに限って存在しているといえる。本経路が生

物学的特徴の異なる一部の寄生性原虫に限って保存されているという事実は注目に値する。今後、寄生性・自然生活性原虫におけるシステイン合成経路の多様性を比較することにより寄生適応と原虫の進化(退化)の相関を理解することに役立つと考えられる。

IV. 含硫アミノ酸生成・分解経路の調節機構 ならびに生理的役割

1. 硫黄同化的システイン生成経路の調節機構

A. 調節酵素 SAT による調節

硫黄同化的システイン生成経路の蛋白質レベルでの調節は SAT が中心的役割を果たす。原虫においても細菌・植物と同様に SAT は最終産物のシステインによって阻害を受ける。細菌・植物においてはこの SAT の阻害はシステインの酸化還元状態に依存しているが、赤痢アメーバの SAT は他種生物の SAT と異なり、システインならびにその酸化型のシスチン(図 1)により同程度に阻害を受ける。また、トリパノソーマの SAT はさらにグルタチオンにより阻害を受ける。酸化型のシスチンならびにグルタチオンによる阻害は他種生物由来の SAT では見られず、これが原虫と他種生物との SAT との重要な質的相違である。さらに阻害機構も他種生物と異なり、原虫 SAT ではシステインがセリンと競合的阻害を起こすのに対して、植物由来の細胞質型 SAT ではアセチル CoA に対して競合的に、セリンに対しては非競合的阻害を起こす¹⁰⁾。今後、生物間の阻害機構ならびに蛋白質の構造の詳細な比較により阻害機構の分子論的理解が進むと考えられる。

B. 上流の代謝中間体による CS の調節

さらに、*E. histolytica* のシステイン生成は上流にある解糖経路ならびにセリン生成経路(図 3)により調節を受けている。両経路の中間産物の CS 活性への影響を調べたところ、ピルビン酸、ヒドロキシピルビン酸、*O*-ホスホセリンが CS をミリモル濃度で阻害することが明らかとなった(筆者ら:未発表)。興味深いことに、後者の2つはセリン生成経路の最終ステップの基質である。セリン生成経路の酵素のアロステリックな調節は未解明ながら今後の解析が待たれる。

C. 含硫アミノ酸の分解経路

言うまでもなく、含硫アミノ酸の濃度はその生成だけ

でなく、分解によっても調節されている。筆者らはアミノ酸代謝に関与する多くの酵素がピリドキサルリン酸依存性であることを利用して、ピリドキサルリン酸結合部位のアミノ酸配列で赤痢アメーバのゲノムデータベースを検索し、他種生物由来のシスタチオニン合成あるいは分解に関与する酵素(シスタチオニン γ -シクターゼ、シスタチオニン β -リアーゼ)、およびメチオニンの分解に関与する酵素(メチオニン γ -リアーゼ)と 20~40% の同一性を有する 2 種類のアイソエンザイムをコードする cDNA を獲得した¹¹⁾。筆者らはこれらをメチオニン γ -リアーゼ(MGL)1/2 とよんだ。MGL1/2 はメチオニンを基質として α -、 γ -脱離反応により α -ケト酸、アンモニア、メタンチオールを生成する。赤痢アメーバ MGL1/2 の基質特異性を調べると、いずれも 1~5 mM の K_m で MGL1 はメチオニンを選択的に分解するのに対して、MGL2 はメチオニン、システイン、ホモシステインを広く分解することが明らかとなった(筆者ら:未発表)。したがって、赤痢アメーバには含硫アミノ酸を特異的に分解する経路が存在することが明らかになった。赤痢アメーバのゲノム情報によれば、哺乳動物で主としてシステインの分解に関与するシステインスルフィン酸を経由する異化経路の酵素は赤痢アメーバには存在しない。したがって、トリコモナス、赤痢アメーバなどの嫌気性原虫に存在する MGL を中心とした含硫アミノ酸分解経路は原虫の含硫アミノ酸濃度調節に重要な役割を果たすと考えられる。

2. 硫黄同化的システイン生成経路の生理的役割

嫌気性原虫である赤痢アメーバは通常酸素分圧の低い環境に生存している。しかしながら、組織に侵入した際には宿主組織内の高い酸素分圧にさらされる。同時に宿主免疫担当細胞の産生する過酸化水素、スーパーオキシド、酸素ラジカルなどの酸化ストレスにさらされる。また、赤痢アメーバはミトコンドリアの電子伝達経路をもたないが、フェレドキシン、ピルビン酸フェレドキシン酸化還元酵素を中心とした電子伝達を行ない、 O_2 を還元する。その過程でさまざまな酸素ラジカルが生じる。したがって、嫌気的生物といえどもこれらの酸素ストレスに対する防御機構をもたなくてはならない。真核生物において比較的普遍的に抗酸化機能を担うグルタチオン酸化還元系が赤痢アメーバには存在しない。システインは前述のとおり赤痢アメーバ内で最高濃度のチオール化

化合物であり、その抗酸素作用が示唆されていた。そこで筆者らは、システイン生合成経路の主要酵素を大量発現する形質転換株を作製した⁹⁾。調節酵素 SAT ならびに最終酵素 CS を大量に発現した株では、酵素活性がそれぞれ 12 倍、3 倍上昇し、それに伴ってチオール濃度が 1.7 倍、2.5 倍上昇した。活性酸素群のうち *in vitro* で殺アメーバ作用を示すのは過酸化水素だけなので、CS、SAT 過剰発現株の過酸化水素に対する感受性の変化を調べた。CS を過剰発現した形質転換体では SAT あるいはコントロール蛋白質を発現する形質転換体に比べ、10~100 mM の過酸化水素に対して有意に耐性の増強を示した。したがって、CS の蛋白量および酵素活性が細胞内チオール濃度ならびに過酸化水素感受性と相関することが示されたわけである。赤痢アメーバの過酸化水素耐性に直接関与するチオール化合物の実態は明らかでないが、未同定の化合物が赤痢アメーバに存在するのかもしれない。あるいはシステインが還元型チオールを含む蛋白質の酸化還元状態を調節するのに関与している可能性もある。

V. 創薬の標的として

1. CS を標的とした創薬

赤痢アメーバにおけるシステインシンターゼの *in vivo* での生理的反応は、O-アセチルセリンのアラニル基の硫化水素への転移である。植物においては多くの化合物が *in vivo* で硫化水素の代わりにアラニル基の受容体となっている。実際に 1,2,4-トリアゾール、3-アミノ-1,2,4-トリアゾール、5-メチルイソキサゾリン-3-one などは CS の基質となることが示されており、これらは抗真菌剤、除草剤として利用されている。赤痢アメーバの CS も *in vitro* で 1,2,4-トリアゾール、イソキサゾリン-5-one、ピラゾールなどを含めたいくつかの化合物をアラニル基の受容体とすることがわかっており⁵⁾、これらの化合物が創薬のシーズとして利用できるかもしれない。

2. MGL を標的とした新規阻害剤

赤痢アメーバ MGL を標的とした阻害剤の開発はいまだ準備段階にあるが、プロバギルグリシンが約 20~40 μ M 程度の K_i で MGL2 を阻害することが確認されている(筆者ら:未発表)。また、注目すべきは隣トリコモナ

スの MGL を標的とした創薬シーズである。メチオニンの誘導体であるトリフルオロメチオニンは *in vitro* で、さらにマウスを使った *in vivo* 実験でトリコモナスの増殖阻害活性をもつことが示されている¹²⁾。トリフルオロメチオニンによる作用点は実験的に明らかにされていないが、プロドラッグであるこの化合物から MGL によりトリフルオロメタンチオール (CF_3SH) がつくられ、非酵素的にカルボノチオニックジフルオリド (CSF_2) ができ、これが殺虫作用を示すと説明されている。哺乳動物には MGL は存在せず、しかも本プロドラッグから代謝された CSF_2 は哺乳細胞より前に原虫細胞の重要生体分子に結合するという 2 点が本化合物を有望な抗トリコモナス薬剤のリードとして考慮する根拠となっている。トリフルオロメチオニンのほかの嫌気性原虫に対する増殖阻害効果の有無が興味深い。

■ おわりに

以上、原虫の含硫アミノ酸生合成・代謝経路について概説したが、硫黄同化的システイン生合成経路および含硫アミノ酸分解酵素は哺乳動物に存在しないので、合理的な創薬の標的である。実際の創薬が可能かどうかは阻害剤の特異性、とくに他のピリドキサリリン酸依存性酵素への影響が重要である。さらに腸管内原虫に対する創薬の標的として考慮する際には、寄生虫が共存する腸管内の他の微生物のエコロジーに影響を与えないことが理想的であり、寄生原虫と細菌・真菌との質的相違を明らかにすることも考慮する必要があると思われる。

文献

- 1) Fahey, R. C., Newton, G. L., Arrick, B., Overdank Bogart, T., Aley, S. B.: *Science*, 224, 70-72 (1984)
- 2) Gillin, F. D., Diamond, L. S.: *Exp. Parasitol.*, 52, 9-17 (1981)
- 3) Fairlamb, A. H., Blackburn, P., Ulrich, P., Chait, B. T., Cerami, A.: *Science*, 227, 1485-1487 (1985)
- 4) Nozaki, T., Arase, T., Shigeta, Y., Asai, T., Leustek, T., Takeuchi, T.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1429, 284-291 (1998)
- 5) Nozaki, T., Asai, T., Kobayashi, S., Ikegami, F., Noji, M., Saito, K., Takeuchi, T.: *Mol. Biochem. Parasitol.*, 97, 33-44 (1998)
- 6) Nozaki, T., Asai, T., Sanchez, L. B., Kobayashi, S., Nakazawa, M., Takeuchi, T.: *J. Biol. Chem.*, 274, 32445-32452 (1999)
- 7) Nozaki, T., Tokoro, M., Imada, M., Saito, Y., Abe, Y.,

- Shigeta, Y., Takeuchi, T.: *Mol. Biochem. Parasitol.*, 107, 129-133 (2000)
- 8) Nozaki, T., Shigeta, Y., Saito-Nakano, Y., Imada, M., Kruger, W. D.: *J. Biol. Chem.*, 276, 6516-6523 (2001)
- 9) Lujan, H. D., Nash, T. E.: *J. Eukaryot. Microbiol.*, 41, 169-175 (1994)
- 10) Noji, M., Inoue, K., Kimura, N., Gouda, A., Saito, K.: *J. Biol. Chem.*, 273, 32739-32745 (1998)
- 11) Nozaki, T., Saito-Nakano, Y., Tokoro, M., Takeuchi, T.: *Arch. Med. Res.*, 31, S69-70 (2000)
- 12) Coombs, G. H., Mottram, J. C.: *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45, 1743-1745 (2001)

野崎智義

略歴：1987年慶應義塾大学医学部を卒業し、同年同大寄生虫学教室助手、1989年米国 NIH, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Laboratory of Parasitic Diseases にて Visiting Fellow/Associate, さらに1992年より米国 Rockefeller 大学にて助手、1996年に帰国後、1999年より国立感染症研究所寄生動物部外来寄生動物室室長。研究テーマ：原虫性寄生虫疾患の特異的代謝機構の解析と創薬。



公募

**国立精神神経センター神経研究所
疾病研究第6部
研究員・実験技術員 若干名**

研究内容：アルツハイマー病および他の神経変性疾患の分子病態解明のための生化学的・分子生物学的研究
 応募資格：理系大学院修士課程修了(見込も含む)以上で、生化学、分子生物学等の実験経験がある方
 提出書類：①履歴書、②職務経歴書(形式自由)、③研究業績リスト、④推薦者(2名程度)の連絡先
 応募締切：平成14年1月末日
 採用時期：平成14年4月
 連絡先：〒187-8502 東京都小平市小川東町4-1-1
 国立精神神経センター神経研究所 疾病研究第6部
 荒木 亘 Tel. 042-341-2711 ext. 5163
 FAX 042-346-1747 E-mail: araki@ncnp.go.jp



公募

特許技術者

募集要項：32歳以下の分子生物学、生化学などのバイオ分野または有機化学分野の専門知識を有する方で、博士または修士の学位を有する方(卒業見込可)
 応募方法：(1)履歴書、(2)志望動機(具体的に詳しく)、(3)英語能力を示す客観的な資料(可能なら)を下記に郵送してください。(メールでの応募も可能)
 締切：平成14年1月21日必着
 参考資料：<http://www.tit-bls.org/snz1.htm>
 連絡先：〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6F(筑波研究学園都市内)
 清水橋本国際特許事務所
 Tel. 0298-41-2001 FAX 0298-41-2009/2012
 E-mail: shimpo@biopat.gr.jp

●training

理研 BSI サマープログラム

開催期日：2002年7月23日(火)～8月2日(金)講義コース
 2002年7月11日(木)～9月13日(金)インターンシップコース
 場所：理化学研究所脳科学総合研究センター(埼玉県和光市)
 概略：サマープログラムには、2カ月の間 BSI の1つの研究室に滞在し研究を実体験するインターンシップコースと、10日間の集中講義コースの2つがあります。今回は、脳の活動の可視化をテーマに、様々な先端的科学技術の極意に触れ、それらがわれわれの脳に対する理解をいかに深めてきたか、または深めていくのかを考える場とします。
 問合せ先：サマープログラム実行委員会
 E-mail: info02@brain.riken.go.jp FAX 048-462-4914
<http://summer.brain.riken.go.jp/>

●training

第14回 日本体力医学会スポーツ医学研修会

日時・研修カリキュラム
 基礎コース：平成14年7月5日(金)・6日(土)
 応用コース：平成14年8月30日(金)・31日(土)
 会場：東京慈恵会医科大学
 定員：各コース40名
 受講料：各コース25,000円
 申込方法：葉書またはFAXで下記までご連絡ください
 申込・問合せ先：〒113-8622 東京都文京区本駒込5-16-9
 (財)日本学会事務センター内
 日本体力医学会スポーツ医学研修会 係
 Tel. 03-5814-5800 FAX 03-5814-5823

抗原虫薬開発の標的としての GPI アンカー生合成経路

永宗喜三郎・木下タロウ

GPI(glycosylphosphatidylinositol)アンカーは真核生物に存在する蛋白質の膜結合様式の1つで、哺乳動物や酵母と同様、下等真核生物である原虫類にも存在している。GPI アンカー型蛋白質は多くの原虫の生存や感染に重要な働きをしている。また、哺乳動物と原虫の GPI の構造や生合成経路を比較すると、両者は基本的に共通であるが明らかな違いも認められる。これらのことから GPI アンカー生合成経路は抗原虫薬開発のよい標的となると考えられている。本稿では原虫での GPI アンカー型蛋白質の役割と、哺乳動物との生合成経路の違いについて概説する。

Key words GPI アンカー 原生動物 翻訳後修飾

はじめに

真核細胞の膜蛋白質のなかにはその蛋白質自体が膜を貫通しているもの以外に glycosylphosphatidylinositol (GPI) とよばれる糖脂質により細胞膜に結合しているものが知られている¹⁾。これら GPI アンカー型蛋白質の基本構造は、蛋白質の C 末端とエタノールアミンリン酸のアミノ基がアミド結合を介して結合しており、さらにひき続いて3分子のマンノース、1分子のグルコサミン、イノシトールリン脂質が結合し、この脂質部分で細胞膜にアンカーリングしている。この基本骨格 EtN-P-6 Man α 1-2 Man α 1-6 Man α 1-4 GlcN α 1-6 myo-inositol-phospholipid は広く真核生物で保存されているが、この基本骨格以外は、生物種あるいは細胞種特異的な修飾を受けている¹⁾。

GPI アンカー型蛋白質は酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においてその生存に必須である²⁾。また、哺乳動物において GPI は細胞レベルでは必須ではないが、GPI 生合成遺伝子の1つである *PIG-A* をマウスでノックアウトすると胎生期致死であるので、個体発生のレベルでは GPI は必須である³⁾。また、後天的に血液幹細胞の *PIG-A* に突然変異が起り、血球系の細胞において GPI が欠損することで起こる発作性夜間血色素尿症 (paroxys-

mal nocturnal hemoglobinuria ; PNH) という疾病が知られている⁴⁾。

一方、原虫 [→今月の Key Words (p.4)] において、最近筆者らはアフリカ睡眠病を起こすアフリカトリパノソーマ (*Trypanosoma brucei*) において GPI の生合成遺伝子の1つ、*TbGPI10* をノックアウトすることにより、哺乳動物血液内での増殖型である血流型では GPI が必須であることを証明した⁵⁾。したがって、*T. brucei* において GPI の生合成系は治療薬開発のよいターゲットである。また *T. brucei* 以外の他の原虫においても GPI は大量に存在し、原虫の生存や感染における重要性が指摘されている。本稿では原虫類における GPI の構造とその役割、そしてヒトとの生合成経路の違いを概説し、GPI の抗原虫薬開発のターゲットとしての可能性を議論したい。

I. GPI の構造とその役割

1. アフリカトリパノソーマ

図1に種々の原虫における主要な GPI の構造を示した。*T. brucei* の表面は大量の GPI アンカー型蛋白質に

Kisaburo Nagamune, Taroh Kinoshita, 大阪大学微生物病研究所免疫不全疾患研究分野 E-mail: nagamune@biken.osaka-u.ac.jp
GPI biosynthetic pathway as a target for antiprotozoan drugs

小児科診療〔第65巻・第12号〕別刷

2002年12月1日発行

発行所 株式 診断と治療社

II. 各論

アメーバ症—アメーバ赤痢・アメーバ性膿瘍—

野崎 ともよし 国立感染症研究所寄生動物部

要旨

アメーバ症は寄生性原虫赤痢アメーバによってひきおこされる、下痢、粘血便などを主症状とする感染症である。国内における感染集団は男性同性愛者、障害者施設収容者、海外渡航者であるが、小児科領域ではとくに障害者施設からの患者に注意する必要がある。本稿では、アメーバ症の診断・治療・その他、小児科診療において注意すべき点について概略する。

はじめに

アメーバ症は、寄生性の原生動物である赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) の感染によりひきおこされる。主として熱帯の開発途上国を中心に年間5,000万人の感染者が存在し、年間死亡者数は約10万人と推定されている¹⁾。わが国においては海外浸淫地からの輸入感染例がみられるほか、海外渡航歴のない男性同性愛者²⁾ および障害者収容施設³⁾ における感染例が多くみられる(総説は文献4)を参照のこと)。赤痢アメーバは通常栄養型 (trophozoite) として大腸に寄生する。感染者の一部においてこれら栄養型が大腸上皮細胞を傷害し、赤痢様症状・腸穿孔をおこしたり、経門脈的に播種し、肝臓・肺・脳など大腸以外の臓器に膿瘍を形成し、重篤な症状を呈する。他の個体への感染は、大腸内で栄養型から分化した嚢子 (シスト) が糞便中に排出され、これを別の個人が経口摂取することにより成立する。ヒトの腸管に寄生するアメーバには大腸アメーバ (*Entamoeba coli*)、小型アメーバ (*Endolimax nana*)、ヨードアメーバ (*Iodamoeba buetschlii*)、*Entamoeba dispar* などがあるが、このうち *Entamoeba dispar* は形態学的にも系統発生的にも赤痢アメーバと非常に近い。しかしながら赤痢アメーバ以外のこれら腸管寄生性アメーバはヒトに病原性を示さない。

Key Words

赤痢アメーバ
障害者施設
診断
治療

アメーバ症の臨床症状

アメーバ性大腸炎は、粘血便・下痢・テネスマスを主症状とし、肝膿瘍などの合併症を伴わない場合には発熱をみることは少ない。多くの症例では自然に寛解し慢性化・シストキャリア化することも多い。

腸管外に赤痢アメーバが播種した場合、もっとも多くみられるのが肝膿瘍である。小児における肝・肺・脳膿瘍の症例は多くないが、発熱・上腹部痛・肝腫大がおもな症状となる。臨床的にはかぜ症候群と誤診されやすい。上腹部痛から画像診断の適応となり、肝膿瘍が発見されることが多い。下痢・血便などの腸症状を伴わない症例が肝膿瘍の約半数にみられるので注意の必要がある。

アメーバ症の診断

アメーバ性赤痢では細菌性赤痢・腸炎ならびに潰瘍性大腸炎との鑑別診断が必要である。また、腸管外アメーバ症（膿瘍）の場合には、細菌性の膿瘍ならびに悪性腫瘍との鑑別が必要である。臨床検査を含めた診断では大きく分けて三つの診断法がある。形態学的（顕微鏡的）診断、病原学的検査、血清学的検査である。前二者は糞便ならびに膿瘍液、感染組織検体を対象とし、原虫自体の存在を証明する方法である。一方、後者は感染者の血清を対象とし、感染者の赤痢アメーバ感染に対する免疫応答の結果を間接的に検出するものである。なお、下記各種検査法のプロトコールの詳細は国立感染症研究所から得ることができるので、筆者に連絡いただきたい。

腸アメーバ症の場合、粘血便中に赤血球を貪食した、活発に運動する栄養型が顕微鏡下で観察されれば、これが確定診断となる。しかしながら、ヒト白血球、植物・孢子などが栄養型と

誤認され、アメーバ症と誤診される例が多く、下記に示す客観的な診断法との併用をすすめる。重要なのは栄養型を含んだ生鮮材料を直接塗抹法により迅速に検鏡することである。冷蔵した検体では通常運動する栄養型は観察されない。一方、無症候性キャリア（ほとんどの症例で固形便を排出する）からは、シストをホルマリンエーテル法で集め観察するが、赤痢アメーバと *E. dispar* との鑑別、他種アメーバとの鑑別は熟練しないとむずかしい。内視鏡的には潰瘍底に白苔を伴うアフタ様潰瘍として観察されることが多い。病変部位はパッチ状で病原部位の間は正常である。潰瘍部のバイオプシーから病理的に栄養型を証明することも可能である。なお、糞便中からの原虫の検出感度を増すために検便を1回の検査に留めず、連続3日間程度の集中検査で検出精度を高めることが推奨される。

腸管外アメーバ症による膿瘍では約半数で腸症状を欠き、糞便中に赤痢アメーバ虫体が確認されないことも多い。アメーバ性膿瘍ではしばしば発熱・上腹部痛を伴い、腹部・胸部超音波診断、CTで初めて膿瘍が確認されることが多い。典型例では右葉を中心とした、内部の溶解を伴う膿瘍が認められる。メトロニダゾール投与による症状の改善により間接的にアメーバ症と診断される場合もある。

また、さらに簡便で感度のよい病原学的検査法として、ポリメラーゼ連鎖反応法（PCR）ならびに抗原補足法（antigen capture ELISA）があげられる。ポリメラーゼ連鎖反応法は患者から採取した糞便、膿瘍液または組織からDNAを分離・抽出し、このDNAを鋳型として、赤痢アメーバ特異的プライマーを用いてPCRを行う。感度は上記の形態学的同定法よりも高く、下記の抗原補足法と同等あるいはやや良好な感度が得られる。詳細は国立感染症研究所からのプロトコールを参照されたい。

糞便ならびに膿瘍中の赤痢アメーバ抗原を検