

え、カバーガラスの角で攪拌する。カバーガラスを載せ5分間静置した後、ピントをカバーガラスの直下の液面に合わせ、浮上してきたクリプトスポリジウムのオーシスト(長径約5 μ m)を検出する。

オーシストは屈光性の違いから背景より明るく、白からピンク色に見える。

シヨ糖遠心浮遊法のほうが検出率は高い。

4) コーン染色法

アメーバや鞭毛虫の種の鑑別のために用いられる。コーン染色液の組成は次のとおり。

基本液：90%エタノール(170 ml)，100%メタノール(160 ml)，酢酸(20 ml)，液状石炭酸(20 ml)，1%リタングステン酸(12 ml)，蒸留水(618 ml)/1,000 ml

クロラゾール・ブラック E 溶液：クロラゾール・ブラック E 粉末(5 g)，基本液(1,000 ml)

コーン染色液で固定と染色を同時に行う。筆者らはカバーガラスに便を塗抹し、塗抹面を下にして表面張力を利用して染色液面に浮かせ、固定、染色を行っている。材料を基本液に保存しておく、後にコーン染色やトリクローム染色を行うことができる。

5) 抗酸染色

(1) 糞便を塗抹、乾燥、メタノール固定2~5分間。

(2) 石炭酸フクシン液[チール(Ziehl)氏カルポールフクシン液(武藤化学薬品)]で染色(5~10分間)。

(3) 水洗。

(4) 5%硫酸水で脱色(5~10秒間)。

(5) 水洗。水洗後、塗抹面の赤色が消える程度がよい。

(6) 1%メチレンブルー水溶液で後染色(1分間)。

(7) 水洗、乾燥。

(8) キシレンで透徹後、バルサム封入。オーシスト内部の構造物がピンクから濃赤色に染まる。

FITC(fluorescein isothiocyanate, フルオレセインイソチオシアネート)標識した抗クリプトスポリジウム・オーシスト壁モノクローナル抗体を用い、オーシストを検出する直接蛍光抗体法のキット[Merifluor Crypto & Giardia(Meridian Bioscience Inc.)]やクリプトスポリジウム検出

キット(和光純薬)も市販されている。

6) 抗原検出法

赤痢アメーバ、クリプトスポリジウムやランブル鞭毛虫の特異抗原検出キット[*E. histolytica* II や *Cryptosporidium* Test(TechLab), Immunocard STAT Crypto/Giardia(Meridian Bioscience)]などが市販されている。

検査上の留意事項、検体の選定法

感染が考えられる原虫種の性質を理解し、検体の選定と迅速な検査を行う。陰性の場合には他の検査法にも留意する。

1. 結果の解釈

1) 検査結果の読みかた

熱帯熱マラリアの場合、赤血球へのマラリア原虫の感染率[百分率(%)]が、重症度の指標になる。免疫のない日本人では1%を超えると多くは重症になる。

2) 異常所見と参考事例

(1) 抗マラリア薬の服薬により、マラリア原虫の形態や染色性が異常所見を示すことがある。

(2) 下剤投与により、アメーバ(栄養型)の萎縮が起こり、生検材料(病理組織切片標本)のアメーバの識別が困難となった例がある。

(3) 泌尿器以外の口腔膿瘍から脛トリコモナスが検出された症例や、ウシのトリコモナス(*Trichomonas foetus*)が、免疫不全のヒトの髄液や尿から検出された症例もある。

文 献

- 1) WHO: Learning unit 4, Blood film, Basic malaria microscopy. WHO, Geneva, pp 16-31, 1991
- 2) 遠藤卓郎, 朝日博子, 大友良光: マラリアの検査法マニュアル, 平成15年度. <http://www.nih.gov/niid/para/atlas/japanese/manual/malaria.pdf>
- 3) 記事: 両眼性アカントアメーバ角膜炎 ソフトコンタクトレンズ使用者にのみ発症. Medical Tribune(日本版) 32(2):26, 1999
- 4) 井関基弘: クリプトスポリジウム症. 最新医学 56:1969-1974, 2001
- 5) Kumagai M, Kobayashi S, Okita T, et al: Modifications of Kohn's chlorazol black E staining and Wheatley's trichrome staining for temporary wet mount and permanent preparation of *Entamoeba histolytica*. J Parasitol 87:701-704, 2001
- 6) 小林正規, 関口恒存, 竹内勤: 14. 知っておきたい基本的な原虫検査法. メディヤサークル 39:121-131, 1994

Hiroyuki Oku,* Keisuke
Kuriyama, Kazuto Omi, Keiichi
Yamada and Ryoichi KatakaiDepartment of Chemistry, Gunma University,
Kiryu, Gunma 376-8515, JapanCorrespondence e-mail:
oku@chem.gunma-u.ac.jp

Key indicators

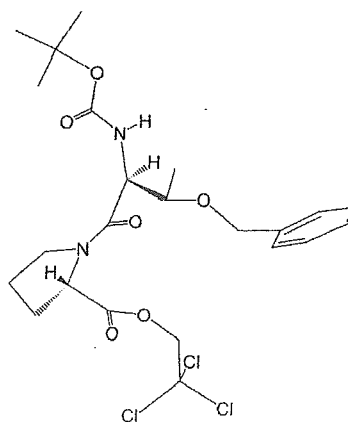
Single-crystal X-ray study
 $T = 173$ K
Mean $\sigma(\text{C}-\text{C}) = 0.009$ Å
 R factor = 0.063
 wR factor = 0.145
Data-to-parameter ratio = 13.7For details of how these key indicators were
automatically derived from the article, see
<http://journals.iucr.org/e>.O-Benzyl-N-tert-butoxycarbonyl-L-threonyl-L-proline
trichloroethyl ester [Boc-L-Thr(Bzl)-L-Pro-OTce]

The title peptide compound, $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{Cl}_3\text{N}_2\text{O}_6$, is a synthetic intermediate as a plasmodium falciparum blood-stage antigen. There is an intramolecular $\text{N}-\text{H}\cdots\text{O}$ hydrogen bond between the urethane and benzyl ether groups. The relatively low melting point is attributed to the lack of an intermolecular hydrogen-bond network.

Received 8 August 2005
Accepted 18 August 2005
Online 27 October 2005

Comment

The title compound, (I) is a key starting material (Omi *et al.*, 2005) in our continuing studies of synthetic antigens for falciparum malaria (Karasawa *et al.*, 2000; Ishiguro *et al.*, 2001; Kokubo *et al.*, 2002; Noi *et al.*, 2003).



Boc-L-Thr(Bzl)-L-Pro-OTce

(I)

Generally, in peptide synthesis, the 2,2,2-trichloroethyl group ($-\text{OTce}$) is useful for carboxyl protection and can be removed simply by treating the peptide with zinc powder in acetic acid (Marinier *et al.*, 1973; Olsen *et al.*, 1986; Pastuszak *et al.*, 1982; Yamada *et al.*, 2003; Endo *et al.*, 2003; Oku *et al.*, 2005). We often encounter oily products and poor crystallinity when we prepare *N*-protected peptide trichloroethyl esters, such as *Z*-Ala-OTce (Dhaon *et al.*, 1982), *Z*-Leu-Ala-OTce (Marinier *et al.*, 1973), Boc-Val-Leu-OTce (Yamada *et al.*, 2003) and Boc-Asp(OBzl)-Leu-OTce (Omi *et al.*, 2005). Therefore, in this paper, to assess the enantiopurity and crystallinity, we have studied the solid-state structure of (I) by X-ray crystallography.

There is one molecule in the asymmetric unit (Fig. 1). An $\text{N}-\text{H}\cdots\text{O}$ hydrogen bond (Table 2) is found between O202 of the benzyl ether and N201-H1 of the urethane group. There is no intermolecular hydrogen bond and molecules are probably connected together by van der Waals forces and dipole-dipole interactions (Fig. 2). The relatively low melting point of

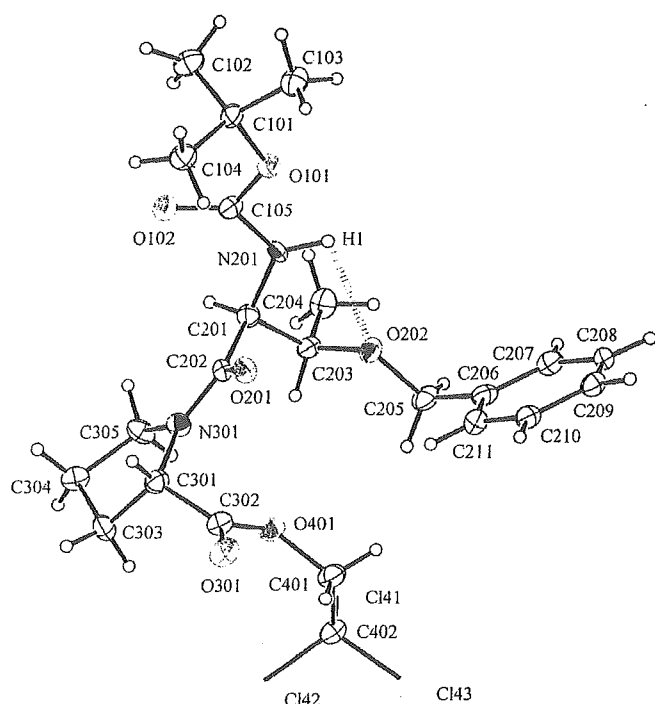


Figure 1
A view of (I) with the atomic numbering scheme. Displacement ellipsoids are drawn at the 20% probability level. The dashed line indicates a hydrogen bond.

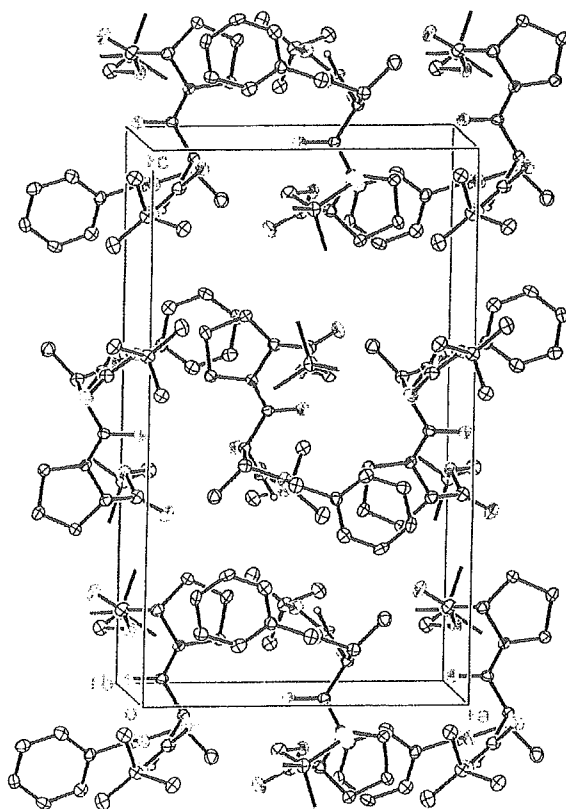


Figure 2
A packing diagram of (I). H atoms have been omitted for clarity, except for those of NH groups.

(I) is attributed to the lack of an intermolecular hydrogen-bond network, which is an important crystallizing force for short-peptide compounds (Oku *et al.*, 2003, 2003*a,b*; Antolic *et al.*, 1999; Ashida *et al.*, 1981; Cruse *et al.*, 1982). Thus, the weak intermolecular association in the crystal structure and the thermal mobility, especially at Boc-Thr(Bzl), probably lowers the melting point of (I).

Experimental

The title compound, (I), was prepared by the coupling of Boc-Thr(Bzl)-OH (5.10 g, 16.5 mmol) and HCl-Pro-OTce (4.24 g, 15.0 mmol) as a solution-phase synthesis. Dicyclohexylcarbodiimide (3.41 g, 15.0 mmol) was used as a coupling reagent (yield 6.55 g, 81%). Crystals of (I) were successfully grown from an oil by the addition of diethyl ether or *n*-hexane and stored below 277 K overnight. The fine platelets have shown relatively low melting point, 381–382 K. Analytical data (melting point, ^1H NMR, ESI-MS and $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$) are in accordance with the expected structure; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -49.4^\circ$ (*c* 0.1, methanol).

Crystal data

$\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{Cl}_3\text{N}_2\text{O}_6$
 $M_r = 537.87$
Orthorhombic, $P2_12_12_1$
 $a = 11.311$ (9) Å
 $b = 11.693$ (7) Å
 $c = 19.417$ (12) Å
 $V = 2568$ (3) Å³
 $Z = 4$
 $D_x = 1.391$ Mg m⁻³

Cu $K\alpha$ radiation
Cell parameters from 20848 reflections
 $\theta = 3.9\text{--}67.2^\circ$
 $\mu = 3.58$ mm⁻¹
 $T = 173.1$ K
Platelet, colorless
 $0.05 \times 0.02 \times 0.01$ mm

Data collection

Rigaku R-AXIS RAPID diffractometer
 ω scans
20848 measured reflections
4647 independent reflections
2140 reflections with $F^2 > 2\sigma(F^2)$

$R_{\text{int}} = 0.071$
 $\theta_{\text{max}} = 68.2^\circ$
 $h = -13 \rightarrow 13$
 $k = -14 \rightarrow 14$
 $l = -23 \rightarrow 23$

Refinement

Refinement on F^2
 $R[F^2 > 2\sigma(F^2)] = 0.063$
 $wR(F^2) = 0.145$
 $S = 0.97$
4647 reflections
339 parameters
H-atom parameters constrained

$w = 4F_o^2/[0.0008F_o^2 + \sigma(F_o^2)]$
 $(\Delta/\sigma)_{\text{max}} < 0.001$
 $\Delta\rho_{\text{max}} = 0.74$ e Å⁻³
 $\Delta\rho_{\text{min}} = -1.01$ e Å⁻³
Absolute structure: Flack (1983), 1983 Friedel pairs
Flack parameter: 0.16 (2)

Table 1
Selected geometric parameters (°).

C101—O101—C105—N201—177.5 (5)	C202—N301—C301—C302—63.5 (7)
C401—O401—C302—C301—172.5 (5)	C301—N301—C202—C201—174.6 (5)
C105—N201—C201—C202—68.8 (6)	N201—C201—C202—N301—164.0 (5)
C201—N201—C105—O101—162.6 (5)	N301—C301—C302—O401—33.3 (7)

Table 2
Hydrogen-bond geometry (Å, °).

$D\text{--}H\cdots A$	$D\text{--}H$	$H\cdots A$	$D\cdots A$	$D\text{--}H\cdots A$
N201—H1 \cdots O202	0.95	2.25	2.601 (6)	101

H atoms were positioned geometrically and refined using a riding model, with $N-H = C-H = 0.95 \text{ \AA}$ and $U_{iso}(H) = 1.2U_{eq}(N,C)$. The absolute configuration of (I) agrees with the fact that the ^1H NMR spectroscopic data detected no racemization in the preparation.

Data collection: *RAPID-AUTO* (Rigaku/MS, 2003); cell refinement: *RAPID-AUTO*; data reduction: *CrystalStructure* (Rigaku/MS, 2003); program(s) used to solve structure: *SIR2002* (Burla *et al.*, 2003); program(s) used to refine structure: *CRYSTALS* (Betteridge *et al.*, 2003); molecular graphics: *ORTEP* (Johnson, 1965); software used to prepare material for publication: *CrystalStructure*.

HO is grateful for a Grant-in-Aid for Research on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases (H15-Shinko-22) from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan.

References

- Antolic, S., Teichert, M., Sheldrick, G., Kojic-Prodic, B., Cudic, M. & Horvat, S. (1999). *Acta Cryst.* **B55**, 975–984.
- Ashida, T., Tanaka, I. & Yamane, T. (1981). *Int. J. Pept. Protein Res.* **17**, 322–329.
- Betteridge, P. W., Carruthers, J. R., Cooper, R. I., Prout, K. & Watkin, D. J. (2003). *J. Appl. Cryst.* **36**, 1487.
- Burla, M. C., Camalli, M., Carrozzini, B., Casarano, G. L., Giacovazzo, C., Polidori, G. & Spagna, R. (2003). *J. Appl. Cryst.* **36**, 1103.
- Cruse, W. B. T., Egert, E., Viswamitra, M. A. & Kennard, O. (1982). *Acta Cryst.* **B38**, 1758–1764.
- Dhaon, M. K., Olsen, R. K. & Ramasamy, K. (1982). *J. Org. Chem.* **47**, 1962–1965.
- Endo, T., Oku, H., Yamada, K. & Katakai, R. (2003). *Peptide Science, 2002*, edited by T. Yamada, pp. 313–316. Osaka: The Japanese Peptide Society.
- Flack, H. D. (1983). *Acta Cryst.* **A39**, 876–881.
- Ishiguro, T., Oku, H., Yamada, K., Sato, K., Kano, S., Suzuki, M. & Katakai, R. (2001). *Peptide Science, 2000*, edited by T. Shioiri, pp. 293–296. Osaka: The Japanese Peptide Society.
- Johnson, C. K. (1965). *ORTEP*. Oak Ridge National Laboratory, Tennessee, USA.
- Karasawa, M., Kobayashi, K., Oku, H., Yamada, K., Sato, K., Kano, S., Suzuki, M. & Katakai, R. (2000). *Peptide Chemistry 1999*, edited by N. Fujii, pp. 295–298. Osaka: The Japanese Peptide Society.
- Kokubo, M., Oku, H., Yamada, K., Sato, K., Kano, S., Suzuki, M. & Katakai, R. (2002). *Peptide Chemistry 2001*, edited by H. Aoyagi, pp. 331–334. Osaka: The Japanese Peptide Society.
- Marinier, B., Kim, Y. C. & Navarre, J.-M. (1973). *Can. J. Chem.* **51**, 208–214.
- Noi, M., Ishiguro, T., Oku, H., Yamada, K., Sato, K., Kano, S., Suzuki, M. & Katakai, R. (2003). *Peptide Chemistry 2002*, edited by T. Yamada, pp. 309–312. Osaka: The Japanese Peptide Society.
- Oku, H., Shichiri, K., Yamada, K. & Katakai, R. (2003). *Acta Cryst.* **E59**, o1413–o1415.
- Oku, H., Yamada, K. & Katakai, R. (2003a). *Acta Cryst.* **E59**, o1130–o1132.
- Oku, H., Yamada, K. & Katakai, R. (2003b). *Acta Cryst.* **E59**, o1581–o1583.
- Oku, H., Yamada, K. & Katakai, R. (2005). *Acta Cryst.* **E61**, o3864–o3866.
- Olsen, R. K., Apparao, S. & Bhat, K. L. (1986). *J. Org. Chem.* **51**, 3079–3085.
- Omi, K., Kuriyama, K., Oku, H., Yamada, K., Sato, K., Kano, S., Suzuki, M. & Katakai, R. (2005). *Peptide Science, 2004*, edited by Y. Shimohigashi, pp. 637–640. Osaka: The Japanese Peptide Society.
- Pastuszak, J., Gardner, J. H., Singh, J. & Rich, D. H. (1982). *J. Org. Chem.* **47**, 2982–2987.
- Rigaku/MS (2003). *CrystalStructure* and *RAPID-AUTO*. Rigaku/MS, 9009 New Trails Drive, The Woodlands, TX 77381-5209, USA.
- Yamada, K., Sato, J., Oku, H. & Katakai, R. (2003). *J. Pept. Res.* **62**, 78–87.

Synthesis of Sequential Polydepsipeptide Microspheres as a Controlled Drug Delivery System

Nobu Emori, Hiroyuki Oku, Keiichi Yamada, and Ryoichi Katakai

Department of Chemistry, Gunma University, Kiryu, Gunma 376-8515, Japan
e-mail: m3c203@gs.eng.gunma-u.ac.jp

Sequential polydepsipeptides poly(X^1 - X^2 - X^3 - Y) (X =amino acid, Y =hydroxy acid) were prepared by solution-phase procedure for peptide to apply for the biodegradable microspheres. Polydepsipeptide microspheres encapsulating bovine serum albumin (BSA) were prepared by a double emulsion method [1]. These microspheres were incubated in a phosphate-buffered saline and investigated the protein release profiles.

Keywords: polydepsipeptide, solution-phase synthesis, bovine serum albumin controlled release, microsphere.

Introduction

Biodegradable microspheres as a drug delivery system have been extensively investigated. Most of microspheres are being made of poly(lactic acid) (PLA) or poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA). These polymers, however often cause the inflammation of the affected part due to their acidity, and the control of release of included drugs is difficult [2]. To improve the disadvantages of these microspheres, we studies sequential polydepsipeptides poly(AA¹-AA²-AA³-HA) (AA=amino acid, HA=hydroxy acid). Polydepsipeptides are biodegradable, and highly biocompatible. Furthermore, the degradation of the polydepsipeptides can be successfully controlled by changing amino acids and hydroxy acids [3]. Therefore, there is a possibility that the ideal microsphere could be achieved by using polydepsipeptides.

In this study, we prepared some sequential polydepsipeptides from tetradepsipeptide active-esters as a monomer obtained by solution-phase peptide synthesis (Fig. 1).

The polydepsipeptide microspheres encapsulating BSA were prepared by double emulsion method. Release of the protein *in vitro* was analyzed.

Results and Discussion

The monomer was prepared by stepwise elongation of peptide chains from a hydroxy acid benzyl ester by using *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC). The intermediates and monomers were highly purified by using column chromatography or recrystallization. The monomers were dissolved at a high concentration in a solvent and polymerized by addition of triethylamine with vigorous stirring. The stirring was

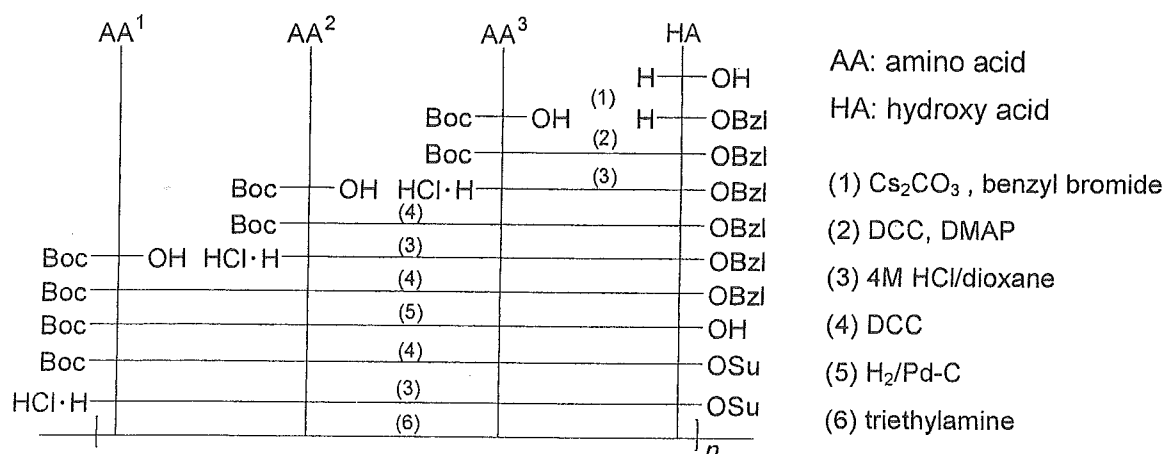


Figure 1. Synthetic procedure of polydepsipeptides.

continued for two days at room temperature. Polydepsipeptides were precipitated by distilled water and filtered.

The physicochemical properties of the polymers were dramatically changed with variation of the depsipeptide sequence. (Table 1). The polydepsipeptide containing lysine residues was highly viscous.

Polydepsipeptide microspheres were prepared by a double emulsion method (Fig. 2). Ten mg of the protein was dissolved in 150 μ L of distilled water and the solution was poured into a solution of 0.1 g polydepsipeptide in 1.5 mL methylene chloride. The mixture was sonicated for 3 min to form first inner emulsion (w/o). The emulsion was poured into 15mL of (0.5, 2.0, and 5.0%) PVA aqueous solution and sonicated for 5 min to form second emulsion (w/o/w). The resulting double emulsion was continuously stirred for 6 h at room temperature until methylene chloride was evaporated out. The microspheres were collected by centrifugation at 5,000 rpm for 30 min (HITACHI, 05P-22, Japan) and freeze-dried for 48h (IWAKI, FRD-50M, Japan) to give a powder.

We tried to prepare microspheres of poly[Glu(OEt)AlaAlaHmp] and poly[AlaLeuLys(Z)Lac], but failed to obtain the microspheres from the former polymer, probably because the viscosity of the polymer was too low to form the microspheres.

Table 1. Physicochemical data of polydepsipeptides.

polydepsipeptide	solvent	m.p. ($^{\circ}$ C)	viscosity ^a (dL/g)
[LeuLeuLeuLac] _n	DMF	145-158	0.22
[AlaLeuLys(Z)Lac] _n	DMSO	147-165	0.65
[AlaAlaGlu(OEt)Lac] _n	DMF	275-280	0.26
[Glu(OEt)Glu(OEt)Glu(OEt)Lac] _n	DMF	245-250	0.24
[AlaAlaGlu(OEt)Hmp] _n	DMF	271-279	0.31
[Glu(OEt)AlaAlaHmp] _n (1)	DMF	240-250	0.23
[Glu(OEt)AlaAlaHmp] _n (2)	DMSO	219-227	0.23
[LeuGlu(OEt)AlaHmp] _n	DMF	109-116	0.14

a) in dichloroacetic acid, c 0.5

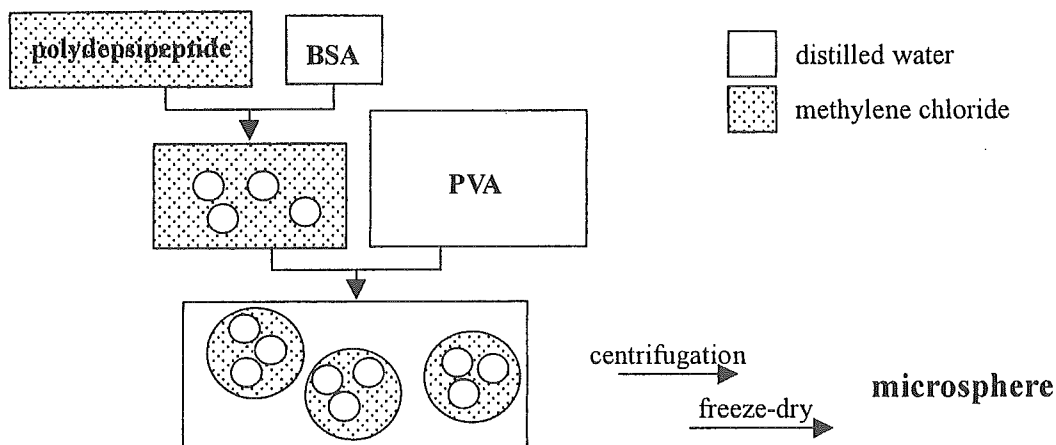


Figure 2. Double emulsion method used for the preparation of BSA-loaded polydepsipeptide microspheres.

SEM images of microspheres at different concentrations of PVA were shown in Fig. 3. When 5.0% PVA aqueous solution was used, it was not uniform in size. We suppose that the viscosity might be too high to form the homogeneous emulsion.

Loading efficiency was determined by analyzing the BSA that was not encapsulated by using the BCA protein assay kit. Effect of the concentration of PVA in the preparation of microspheres to the sphere size and loading efficiency of BSA is shown in Table 2. Loading efficiency was the highest at 0.5% concentration of PVA. The changes in the size of microspheres and efficiency of loading of BSA depended not only on the PVA concentration but also the supersonic conditions.

Finally, the *in vitro* release of BSA from the microspheres was studied (Fig. 4). Microspheres (10 mg) were suspended in 1 mL of a phosphate-buffered saline. The suspension was placed in an incubator at 37°C and continuously shaken gently. A part of the sample was periodically taken, centrifuged for 10 min at 12,000 rpm, and the supernatant was analyzed to give the amount of released BSA. Every sphere showed a similar biphasic release profiles with an initial fast release phase and a second slow release phase. The amount of protein released from the microsphere using 2.0% PVA was found to be highest. It is not clean yet whether the *in vitro* release of encapsulated protein strictly correlates with the PVA concentration.

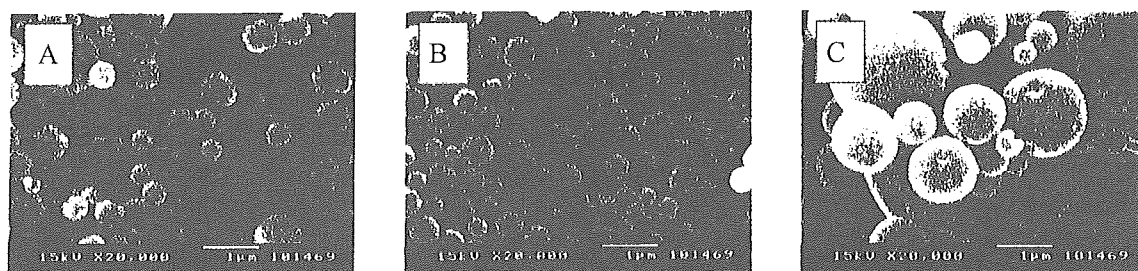


Figure 3. SEM images of microspheres at the different concentration of PVA. (A) 0.5%; (B) 2.0%; (C) 5.0% PVA aqueous solution was used for preparation of microspheres.

Table 2. Characterization of BSA-loaded microspheres.

PVA conc. (%)	sphere size (nm)	loading efficiency (%)
0.5	440±150	65
2.0	450±130	38
5.0	1470±1230	40

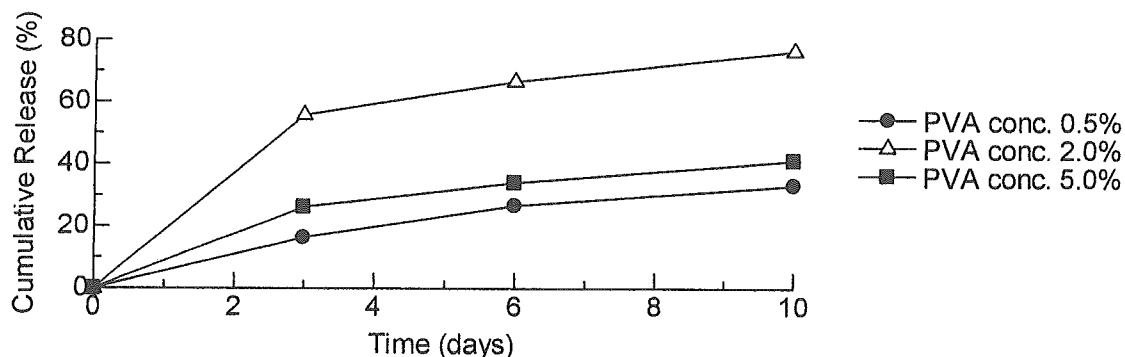


Figure 4. *In vitro* cumulative BSA release from polydepsipeptide microspheres.

In this study, we have successfully synthesized the sequential polydepsipeptide and prepared the polydepsipeptide microspheres. A model protein, BSA has been encapsulated in the microspheres and released under *in vitro* conditions. These results in this study demonstrate that the polydepsipeptide microspheres are applicable to form a controlled drug delivery system. The protein release profile could be controlled by further study.

References

1. Zambaux, M.F., Bonneaux, F., Gref, R., Maincent, P. and Vigneron, C. (1998) *J. Controlled Release*, **50**, 31-41.
2. Asano, M., Yoshida, M., Kaetsu, I., and Katakai, R. (1985) *J. Japanese Society for Biomaterials*, **3**, 85-94.
3. Tasaka, F., Miyazaki, H., and Ohya, Y. (1999) *Macromolecules*, **32**, 6386-6389.

Synthesis and Properties of a Thermo-Responsible Polydepsipeptide Containing Hmb (2-Hydroxy-3-Methylbutanoic Acid) Residues

Kazuaki Shichiri, Hiroyuki Oku, Keiichi Yamada, and Ryoichi Katakai

Department of Chemistry, Gunma University, Kiryu, Gunma 376-8115, Japan
e-mail: m3c213@gs.eng.gunma-u.ac.jp

We have studied a novel elastin model compound, poly(Gly¹-Val²-Gly³-Hmb⁴-Ala⁵-Pro⁶) (1), which has hydroxy acid residues, 2-hydroxy-3-methylbutanoic acid (Hmb). A monomeric fragment, Boc-Gly¹-Val²-Gly³-Hmb⁴-Ala⁵-Pro⁶-OBzl was successfully synthesized by the combined method of stepwise elongation and segment condensation in solution states. Thermoresponsive properties were analyzed by variable temperature measurements (such as optical density, ¹H NMR, and CD spectra) in H₂O.

Keywords: elastin, self-aggregation, depsipeptide, polymer, coacervation, thermoresponsibility, turbidity.

Introduction

Several water soluble polymers, such as poly(acryloyl-Pro-OMe) (2) [1], poly(methacryloyl-Ala-OEt) (3) [2], poly(*N*-isopropylacrylamide) [3], and an elastin model peptide, poly(Val¹-Pro²-Gly³-Val⁴-Gly⁵) [4], have been known to constitute thermo-responsive materials. These materials show a sharp but continuous volume phase transition from a swollen state to a shrunk state with increasing temperature. This phenomenon is also called as self-aggregation and coacervation. The transition temperature is ranging from near 0°C to over 40°C depending on each chemical structure. Our extensive studied have suggested that the phase transition temperature can be designed simply by changes in amino acid residues and protecting groups by the balancing between hydrophobic and hydrophilic groups in the polymer side chains. Similar results have been reported for elastin model peptides [4], poly(*N*-alkylacrylamide) derivatives [5] and amino acid containing polymers [1,2].

Depsipeptides are oligomers and polymers composed of hydroxy acid and amino acids linked by amide and ester bonds. This hybrid compound attracts attention for their conformational [6] and bioabsorbable properties [7]. In this paper, we have described a novel thermoresponding depsipeptide that is composed of a repetitive sequence, -Gly¹-Val²-Gly³-Hmb⁴-Ala⁵-Pro⁶- [8].

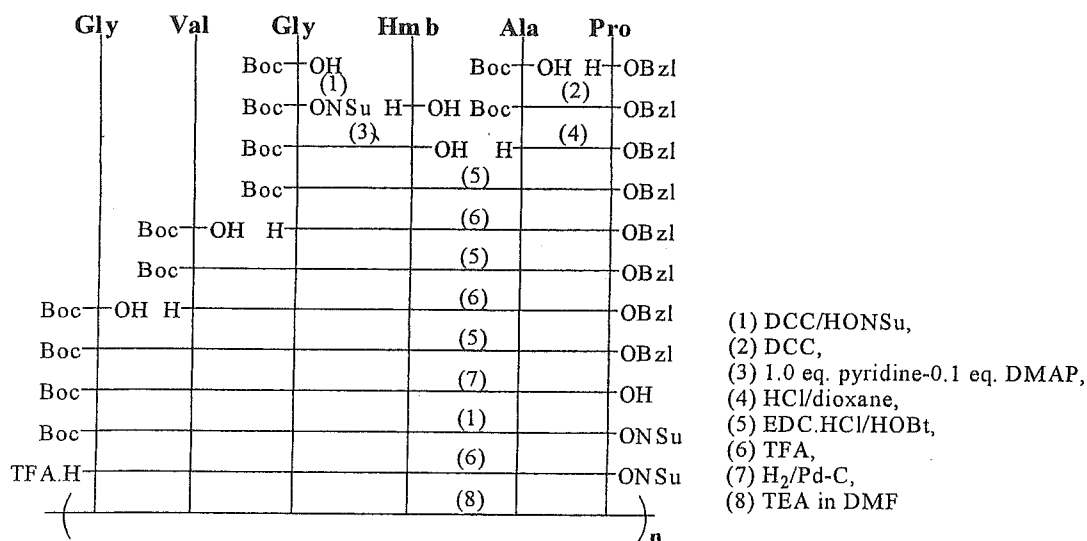


Figure 1. Synthesis of poly(Gly¹-Val²-Gly³-Hmb⁴-Ala⁵-Pro⁶) (1).

Results and Discussion

Synthesis of polydepsipeptide

All the compounds used in this study were prepared by the combination of stepwise elongation and segment-condensation methods in solution phase as shown in Fig. 1. We have chosen two protecting groups *tert*-butoxy carbonyl group (Boc-) at the N-terminal and benzyl ester (-OBzl) at the C-terminal. Boc- and -OBzl were removed by acidolysis and hydrogenolysis (Pd-C/H₂), respectively.

A monomeric fragment, Boc-Gly¹-Val²-Gly³-Hmb⁴-Ala⁵-Pro⁶-OBzl (4) was successfully prepared by the combined method of stepwise elongation and segment condensation reactions in solution states. At first of the synthesis, 2-hydroxy-3-methylbutanoate pyridinium salt (H-Hmb-OH.pyridine) was coupled with Boc-Gly³-ONSu (-ONSu = *N*-hydroxysuccinimide ester) in the presence of 0.1 eq. of dimethylaminopyridine (DMAP) in THF to form Boc-Gly³-Hmb⁴-OH, which has an ester connection between Gly³ and Hmb⁴. The fragment condensation was employed for the synthesis of a four residue fragment, Boc-Gly³-Hmb⁴-Ala⁵-Pro⁶-OBzl by the coupling of Boc-Gly³-Hmb⁴-OH and HCl.H-Ala⁵-Pro⁶-OBzl by using 1-ethyl-3-(di-methylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride (EDC.HCl) in the presence of an equimolar of 1-hydroxybenzotriazole (HOBt) to suppress racemization and for an efficient reaction.

The hexadepsipeptide free acid, Boc-Gly¹-Val²-Gly³-Hmb⁴-Ala⁵-Pro⁶-OH obtained by hydrogenolysis of 4 was derived to an active -ONSu ester by the reaction with HOSu and DCC. Boc-Gly¹-Val²-Gly³-Hmb⁴-Ala⁵-Pro⁶-ONSu (5) was obtained in 80% yield. The Boc monomer, 5 was treated with 4M HCl in dioxane to give a monomer hydrochloride, which were polymerized in dimethylsulfoxide by the addition of triethyl amine. The sequential polydepsipeptide 1 was purified by dialysis in H₂O and obtained higher molecular fraction (m.w. > 3500) was lyophilized. Colorless powder: yield 11% (calculated from 5), mp. 172-180°C.

Thermal properties of polydepsipeptide

Fig. 2 shows the temperature profiles for turbidity formation of 1 in H₂O and phosphate buffer saline (PBS). As the temperature is raised, the polydepsipeptide, 1

undergo a phase transition of aggregation in an optical cell. The onset temperature was observed at around 35-40°C in PBS and 45-50°C in H₂O. Therefore, in a physiological environment, such as in PBS, the transition occurs at lower temperature.

Broaden profile was observed in turbidity measurement. In the case of water solution, the phase transition starts relatively sharply at 44°C and continues slowly even at 55°C. Therefore a distinct transition temperature can not be defined in these cases. One explanation for the broaden behavior is due to the molecular weight distribution of 1. Actually, higher transition temperature was found for lower molecular weight compound.

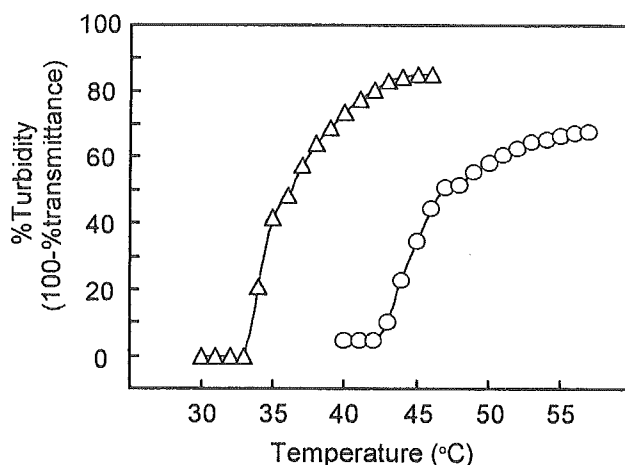


Figure 2. Turbidity measurement of poly(Gly¹-Val²-Gly³-Hmb⁴-Ala⁵-Pro⁶) (1) in phosphate buffer saline (Δ) and in H₂O (\circ) (1 mg/50 μ l, cell length=1 mm). Optical density (% transmittance) was measured at 500 nm.

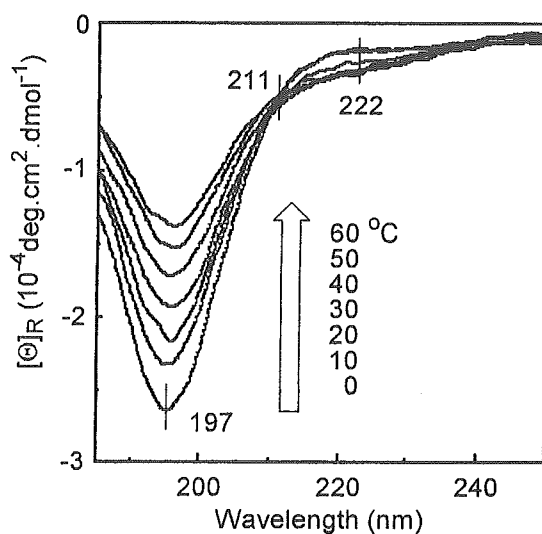


Figure 3. Variable temperature CD spectra of Poly(Gly¹-Val²-Gly³-Hmb⁴-Ala⁵-Pro⁶) (1) (in H₂O, 0.1 mg/ml, cell length=1 mm).

Circular dichroism spectra of **1** were taken in H₂O at as shown in Fig. 3. The spectrum of the poly(hexadepsipeptide) has a similar pattern as observed for pentadepsipeptide compounds, such as Boc-(Gly¹-Val²-Gly³-Hmb⁴-Pro⁵)_n-OBzl (n = 1-3) [9] and poly(Val¹-Ala²-Pro³-Gly⁴-Hmb⁵-Gly⁶) [10], which have a negative band at 197 nm and a negative shoulder at 220 nm.

The intensity of those bands were decreased when temperature was raised from 0 °C to 60 °C. A tight isochromic point was observed at 211 nm. In this polydepsipeptide, the spectral shape changes continuously. Therefore no distinct phase transition was also observed in circular dichroism spectra as found in the turbidity measurements. Discontinuous spectral change and spectral saturation are observed for several thermoresponsive polymers, such as **2** and **3**, which undergo a sharp transition behavior in increasing the temperature [1,2].

The intense circular dichroism spectrum at 0 °C suggests that the main chain in **1** have an ordered orientation, and stabilizes at the energy minimum state. The decreasing intensity with increasing temperature indicates that a conformational change occurs in the main chain. With warming the solution of **1**, molecular motion of the side chain becomes activated. The isochromic point at 211 nm indicates that this transition is in two-state equilibrium. One is the state of **1** stabilized at an ensemble of energy minimum conformations as represented in the spectrum at 0 °C. The other is that **1** with freely rotated side and main chains with energetically activated conformations.

Conclusion

We have successfully synthesized an elastin-model polymer which is soluble in organic solvents and water. The polymer with the sequence (Gly¹-Val²-Gly³-Hmb⁴-Ala⁵-Pro⁶) showed self-aggregation character. Structure of the polymer changed when elevating temperature in H₂O.

References

1. Oku, H., Ohashi, H., Fujimoto, J., Shimizu, M., Yoshida, M., and Katakai, R. (2000) *J. Polym. Sci., part A, Polym. Chem. Ed.*, **38**, 4524-4530.
2. Oku, H., Fujimoto, J., Ohyama, T., Hiroki, A., Yoshida, M., and Katakai, R. (2000) *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, **38**, 2671-2677.
3. Hirotsu, S., Hirokawa, Y., and Tanaka, T. (1987) *J. Chem. Phys.*, **87**, 1392-1395.
4. Urry, D.W. (1992) *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **57**, 23-57.
5. Feil, H., Bae, Y.H., Feijen, J., and Kim, S.W. (1993) *Macromolecules*, **26**, 2496-2500.
6. Oku, H., Ohyama, T., Hiroki, A., Yamada, K., Fukuyama, K., Kawaguchi, H., and Katakai, R. (2004) *Biopolymers*, **75**, 242-254.
7. Yoshida, M., Asano, M., Kumakura, M., Katakai, R., Mashimo, T., Yuasa, H., Imai, K., and Yamanaka, H. (1990) *J. Biomed Mater Res.*, **24**, 1173-1184.
8. *Jpn. Patent Application*, Filing No. 2004-305953.
9. Taira, T., Oku, H., Yamada, K., and Katakai, R. (2004) *Peptide Science 2003*, 177-180.
10. Arad, A. and Goodman, M. (1990) *Biopolymers*, **29**, 1651-1668.

環境改変による感染症流行の危機 — 沙漠緑化と感染症の増加 —

松本芳嗣・三條場千寿
(東京大学大学院 農学生命科学研究科)

摘 要

トルコの南東アナトリア地方、中国新疆ウイグル自治区、および中央アジア諸国では、我が国を含む国際的援助による大規模なダム建設あるいは灌漑事業が行われている。沙漠の緑化、農業開発に一定の成果を取めたものの、リーシュマニア症などのvector-born diseaseおよび人獣共通感染症が急激に増加し、早急な対策が迫られている。これらの感染症は何れも病原体である寄生性微生物の生活史にヒト、動物、媒介無脊椎動物および環境が複雑に関与している。我々の生活を豊かにするための人為的環境改変は同時に病原体を含む様々な生物の生態にも影響を及ぼし、寄生性微生物の発育に有利に働くことが多い。これら寄生性微生物の生態も視野に入れた環境対策、環境保全が行なわれなければ、望まない新たな感染症の流行、再興を来すことになる。20世紀は感染症の脅威に打ち勝つための「寄生性微生物との戦い」の歴史であった。生物学、医学、生態学の蓄積された知識は「寄生性微生物との共存」を模索する必要性を示している。

キーワード：感染症、寄生性微生物との共存、沙漠緑化、人獣共通感染症、vector-born disease

1. はじめに

病気、死に対する恐怖は人間の歴史とともに始まり、精神的、肉体的にこれを克服するために、宗教、医療を発達させて来たと言える。肉眼では見えない微小な生物が体内に入り病気の原因となるとの考えは紀元前からあったし、また繰り返し中世ヨーロッパを襲った梅毒、ペストの流行は「病気がうつる」ことの恐怖を人間に植え付けたと考えられる。顕微鏡の発明により17世紀末に様々な微生物が発見された。1836年に蚕の寄生性真菌が発見されたのを端緒に相次いで動物、ヒトの組織から微生物が発見され、19世紀後半ヘンレ、パスツール、コッホらの偉業により微生物の感染によって起こる病気、すなわち感染症の概念が確立された。微生物の病原性を対象とした医微生物学とそれに対する生体反応を扱う免疫学が興隆し、20世紀は感染症との戦いの世紀であったとされる。細菌に対する抗生物質の発見、ワクチン開発など近代科学の発達による技術革新により、感染症撲滅計画が立案され、実行された。1980年、遂にWHOは世界天然痘根絶宣言を行った。確かに一部の感染症の脅威は無くなった、あるいは、低くなったと言える。しかし、多くの感染症は現在でも人類の健康、幸福に対する最大の脅威の一つ

であり続けている。

2. 医学的感染論と生態学的感染論

地球上の多様な生物は互いに無関係に生命活動を営んでいるわけではなく、複雑に関係しあう共存系を作っている。2種の生物の関係において、栄養、住環境、防御と言った各要因を利害関係で捉えた場合、共生、寄生と言う概念が用いられるが、2種の生物の共存関係を寄生か共生か明瞭に区別することは困難である。まして、多数の生物が共存する自然界では更に複雑である。しかし一般に寄生関係は高等な生物が下等な生物により搾取される、あるいは害をもたらされる場合を指すことが多い。この場合、害を与える生物が寄生体(parasite)、害を及ぼされる生物が宿主(host)と呼ばれる。従って感染症はウイルス、細菌、リケッチア、原虫、寄生虫等々のいわゆる微生物が寄生体として、ヒト、他のほ乳動物、鳥類、魚類などの宿主にもたらす悪影響のことを言い、この悪影響の重軽が感染症の重大度を示し、医学的および獣医学的関心度を定める大きな要因となる。

2種の生物間において「寄生体と宿主の関係」は固定されておらず、様々な要因により変化する。例えば、病原微生物の感染により宿主が常

に発症する(悪影響を受ける)とは限らず、不顕性感染となる場合も多い。微生物の遺伝的背景、感染量など、あるいは宿主の健康状態、免疫状態、遺伝的背景などにより感染の転帰が大きく異なってくる。一方、普段は無害であり共生体とも考えられる常在微生物が宿主の免疫不全に乗じて宿主に悪影響をもたらす場合も多く、日和見感染症(opportunistic infection)として知られている。また、結核など過去に一旦は地球上から姿を消すかに見えた感染症の病原体が例えば、薬剤(治療薬)耐性能を獲得し、再び、しかも過去を上回る勢いで人類の脅威となっている再興感染症(reemerging disease)、AIDSのようにこれまで人類が知らなかった病原微生物による新興感染症(emerging disease)といった概念もマスコミを賑わしている。

「寄生体と宿主の関係」を決める要因は寄生体と宿主に内在するものだけでは無い。両者を取り巻く環境要因も重要である。寄生体が宿主に接触する経路(感染経路)は実に様々であり、水により病原微生物が伝播される水系感染症(water-born disease)、食品を介して伝播される感染症(food-born disease)、性行為で伝播されるsexual transmitted disease、あるいは媒介生物により伝播される vector-born disease などに分けて理解されている。また宿主への侵入経路により経粘膜感染、経皮感染、創傷感染、胎盤感染等が区

別されている。個々の感染症において感染が成立するためには、特定の感染経路を必要とする場合が多い。例えばマラリアはAnopheles属(ハマダラカ)の雌の蚊がヒト刺咬時に蚊の唾液腺に寄生しているマラリア原虫が体内に侵入することによって発症する(図1)。自然界でのマラリアはこの様式によってのみ感染すると言って過言では無い。ただし例外として、感染者の血液の輸血、感染者の肝臓および血液を含む臓器の移植、感染者の血液に汚染された注射針による感染が実際報告されている¹⁾、感染妊婦の出産時における新生児への産道感染、胎児への胎盤感染の可能性も否定されていない。熱帯地域を旅行している時にハマダラカ以外の蚊に吸血されたり、感染血に触れただけでマラリアに感染することを心配する必要はほとんど無いと言える。勿論インフルエンザのように空気感染する感染症、また、一部真菌のように直接接触することにより感染が成立する感染症も多い。伝染病と言う語の響きも手伝って、あたかも全ての感染症が感染者との直接的接触により容易に伝染するといった誤解のため、感染者に対する社会的迫害、差別が現在でもしばしば問題となっている。感染症は個の健康、あるいは医学のみならず重要な社会的、経済的課題でもある。感染症の感染様態を明らかにする学問を疫学と言うが、感染症の理解、予防のためにいかに正確な疫学情報が重要であるかが分かる。

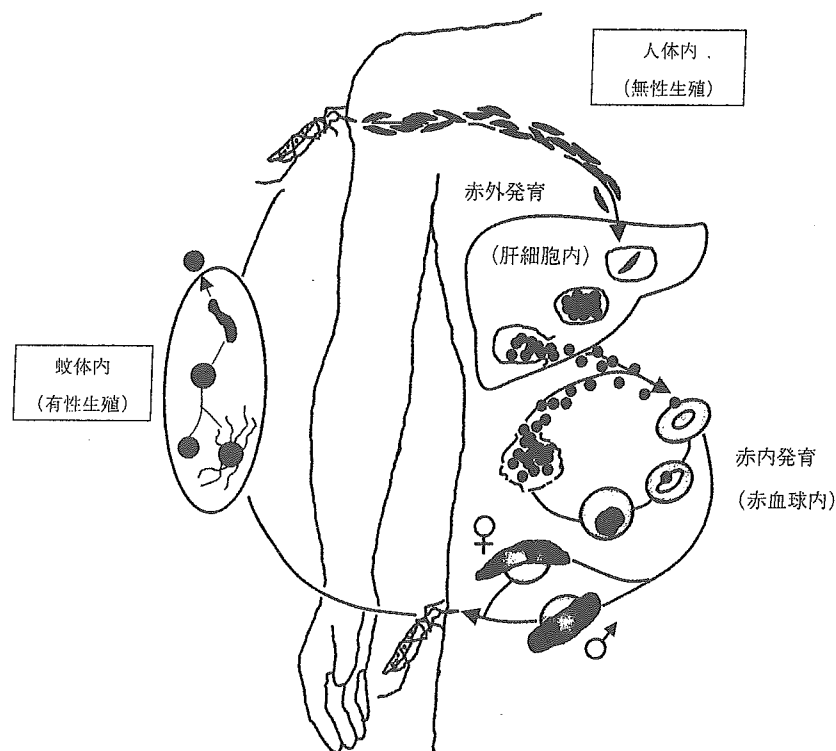


図1 マラリア原虫の生活史。(Science, Vol.234, P.1350を一部改変)

これまで感染症は医学、獣医学の扱う対象として、主に宿主の被害影響を中心に述べられている。しかし、疫学では感染症を環境、寄生体、宿主間で見られる生態学的現象として捉える必要がある。多くの微生物にとってその発育、増殖の場が必ずしも生物である必要は無いし、ましてヒトである必要も無い。しかしマラリア原虫のように、その微生物の生活史に複数の宿主生物の体内に侵入し、発育、増殖することを必須とする偏性寄生体も多い。

3. 宿主と寄生体の共存

微生物が他の生物に侵入するのは容易なことでは無く、多くの場合は生物の持つ様々な防御機構により侵入が阻止される。人間で言うならば皮膚は微生物の侵入に対する強靱な物理的障壁であるし、仮に皮膚からの侵入を許した場合も免疫機構などの生体防御機構がこれを補って微生物のさらなる侵入、増殖を阻止する。侵入した微生物がそこで増殖、あるいは少なくとも生存が許されて初めて、「寄生体-宿主関係」が発生する。すなわち、一定の共存関係が成立した場合に寄生という語が使われる。マラリア原虫も蚊の刺咬により体内に侵入し、宿主の免疫機構を回避して、内部寄生体としてまず肝細胞内で発育、増殖を始める(図1)。

ヒトを安定した宿主とするマラリア原虫として4種類が知られている(表1)。熱帯熱マラリアは悪性マラリアとも呼ばれ、アフリカなど浸淫地域、すなわち、成人はそれまでの感染に耐過し免疫を獲得している地域でも、小児、すなわち免疫を獲得していないヒトに感染した場合、しばしば致死である。年間200万人の子供が熱帯熱マラリアの犠牲になっていると推定されている²⁾。非マラリア常在地である我が国の成人が感染した場合も、適切な治療が施されなければ致死である。熱帯熱マラリアはヒトの脅威となっている感染症の筆頭に挙げられる。しかし、熱帯熱マラリア原虫は多くの感染者の体内で発育を全うし、再び蚊に吸血されることにより生活環を完結する。熱帯熱マラリア原虫、および宿主であるヒトの双方に被害が生ずるにせよ一定の共存が成立してい

る。ところが、ヒトを宿主とするマラリア原虫の中で四日熱マラリア原虫はヒトに対して致死的是無いし、何ら症状を示さないことも多い。すなわち、安定した共存関係が成立していると考えられる。

アジアの多くのサルには、表1に示した4種のヒトマラリア原虫とは異なる様々なサルマラリア原虫が内部寄生体として知られている。自然界でサルと共存しているサルマラリア原虫が偶発的に(多くの場合は事故として)ヒトに侵入し感染することがあり、時に劇症を呈することもある³⁾。通常は棲息域が異なるため、共存関係をもたない微生物が偶発的に侵入することにより、迅急性に宿主が発症、死に至る場合があり、新興感染症と位置付けられる。エボラ出血熱等の病原体であるウイルスも恐らく、野生動物と共存していたウイルスが偶発的にヒトに感染したためと考えられている⁴⁾。自然界に寄生性微生物を持たない生物はならず、寄生性微生物は病気を起こすことによってはじめて人間に認識されると言える。

宿主に死がもたらされると、偏性内部寄生体もその住環境を失うことになる。従って、宿主の生体防御機構により排除される寄生体、そして宿主に致死である寄生体は子孫を残すことが出来ない。寄生体にとって最も好ましいのは、自らは宿主から排除されず、かつ宿主も安定した住環境として維持されることである。すなわち、宿主に侵入でき、宿主で増殖あるいは生存でき、しかも宿主に死をもたらさないという安定した共存関係を持たない遺伝的背景を持った寄生体は子孫を残し難い。人回虫(*Ascaris lumbricoides*)は人類の多く(WHOによると9億人)に寄生しているが、人回虫の寄生が原因で人が死に至ることは稀であり、病原性は高く無い。寄生虫の代表のように考えられている人回虫とヒトの間に安定した共存関係が成立していると言える。寄生体が偶発的に新たな宿主を見だし、共存関係をつくる過程を寄生適応と言う。寄生体は何世代にもわたる世代交代を経て寄生適応し、やがて宿主に大きな影響を与えない共生体に至ると考えられ、寄生現象は寄生性生物および宿主双方の多様化、進化の一つの原動力となっている。

表1 ヒトのマラリア.

病原体	疾患名	
<i>Plasmodium falciparum</i>	Falciparum malaria	熱帯熱マラリア
<i>Plasmodium vivax</i>	Vivax malaria	三日熱マラリア
<i>Plasmodium ovale</i>	Ovale malaria	卵形マラリア
<i>Plasmodium malariae</i>	Quartan malaria	四日熱マラリア

4. zoonosisとvector-born disease

偏性内部寄生体にとって必須の住環境である宿主は、必ずしも一種類の生物である必要は無い。一種類の寄生体が多く種の宿主とする場合の方がむしろ多いと言える。この場合も、(1)同一の発育期の寄生体が様々な宿主に寄生する場合と(2)寄生体の発育期によって異なる宿主を必要とする場合とがある。WHOは自然界においてヒトと他の脊椎動物との間で同一の病原体の伝播が起こる感染症をzoonosis(人獣共通感染症)と定義している⁵⁾。この場合、ヒト以外の宿主はヒトの病気の供給源と認識されreservoir host(保菌宿主あるいは保虫宿主)と呼ばれる。しかし、実際はどちらも寄生性微生物の生活史の中に位置付けられ

る宿主であり、互いに他の宿主に対して寄生体の供給源としての役割を担っている。宿主が脊椎動物とは限らない。マラリアは病原体であるマラリア原虫がハマダラカをvector(媒介者)として人に感染することによって起こるvector-born diseaseである。マラリア原虫はハマダラカの中腸内で有性生殖を行うので生物学的には蚊が終宿主であり、ヒト体内では無性(増員)生殖のみが見られるのでヒトは中間宿主である。zoonosisおよびvector-born diseaseなどの感染症は、複数の生物の複雑な共存関係の上に成り立っていることがわかる。実際、ヒトの感染症の病原体として知られている偏性内部寄生体は、その生活史を全うするため、ヒト以外の生物も宿主とするものが多い。

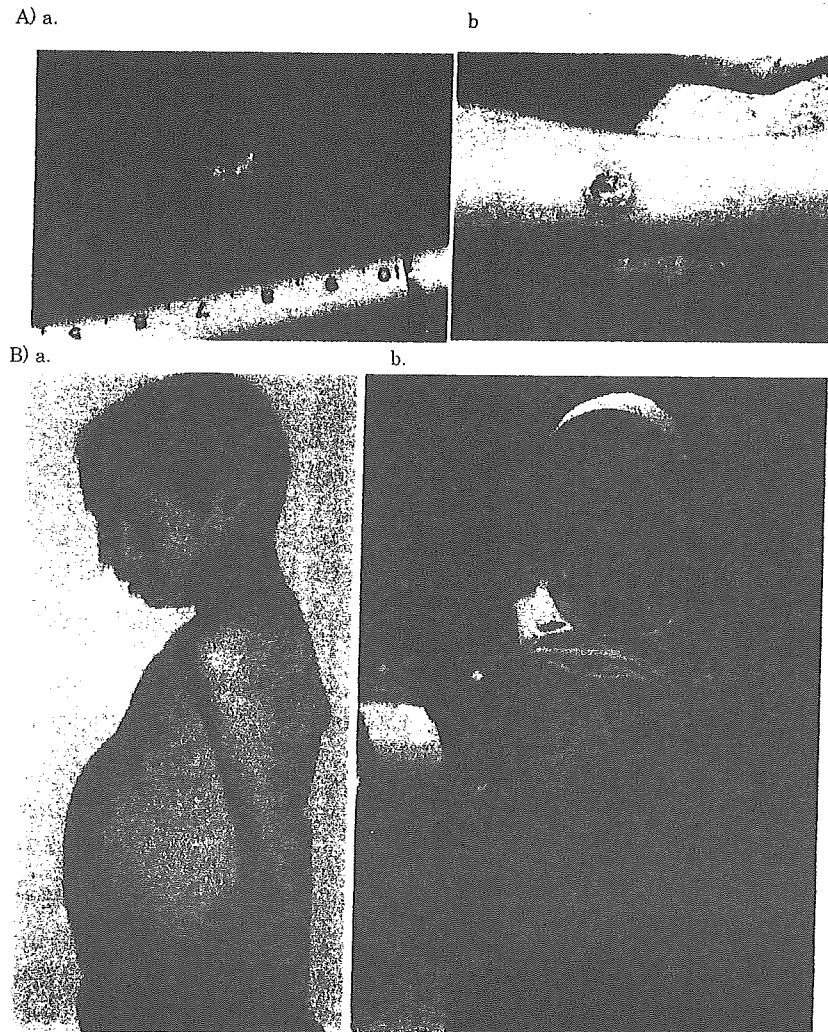


図2 リーシュマニア症。
 A) 皮膚型リーシュマニア症。 a ; トルコ, サンリウルフア市の少年の頬部に見られた典型的リーシュマニア性潰瘍。 b ; エクアドルの成人男性脚部に見られたリーシュマニア性潰瘍。
 B) 内臓型リーシュマニア症。 a ; トルコの少年で見られた脾腫による腹部膨満。 b ; 内臓型リーシュマニア症のため脾臓摘出術を受けた中国新疆ウイグル自治区の少年

5. リーシュマニア症

リーシュマニア症はイヌ、ジャッカル、オオカミなどイヌ科動物、およびスナネズミ、ハムスターなどのげっ歯類を保虫宿主とする人獣共通感染症であり、また吸血性の昆虫であるサシチョウバエを媒介者とする vector-born disease である。ヒトに感染した場合、病原種により皮膚型リーシュマニア症 (cutaneous leishmaniasis) (図 2 A) あるいは、内臓型リーシュマニア症 (visceral leishmaniasis) (図 2 B) に大別される様々な症状をもたらす。近代医学の発達する前から認識されていた病気であり、インドの Dum-Dum 熱、kala azar、シリアの Aleppo button、南米の Uta、Chiclero など様々な地域名をもっている。皮膚型は皮膚に病変が局限し、抗生物質に反応しない慢性頑固な皮膚潰瘍として認識される。免疫の獲得後は自然治癒し癒痕を残す。致死性では無いが顔に大きな潰瘍が形成されたり、あるいは自然治癒しても一生涯消える事の無い癒痕が残る。中央アジアでは、皮膚型リーシュマニア症の患者の皮膚病変部に形成された痂皮の一部を子供の手腕部に接種し、人為的に感染させる事により、その後の感染に抵抗性を付与させる民間医療が、種痘が行われる遥か以前から行われていたと言う。現在でも、中央アジアのウズベキスタンでは、無菌施設で調整された原虫を用いた生ワクチン (Leishmanization) が用いられている。リーシュマニア原虫が肝臓、脾臓、あるいは骨髄と言った深部臓器、組織に転移し、増殖すると、肝脾腫を伴う貧血、削瘦が顕著となり、内臓型リーシュマニア症と呼ばれる。医療施設が十分でない地域ではしばしば致死性である。効果が明らかで信頼でき

る近代型ワクチンは現在のところ開発されておらず、治療薬として用いられるアンチモン製剤は副作用が強く、また高価であるため使用が制限される事が多い。

6. リーシュマニア原虫の生態

アジア、アフリカ、南米、さらに南ヨーロッパの広大な地域にリーシュマニア症は浸淫している。熱帯、温帯に限らず、一部寒帯に至る広い地域に分布する (図 3)。リーシュマニア症とは病気の名前で、一般にはヒトの病気、あるいは獣医領域では主としてイヌの病気に対して用いられる。従って、病原体という呼称もこれらの宿主に悪影響を与える種類ということになる。リーシュマニア症の分布はサシチョウバエの分布と保虫宿主の分布が重なり、さらにヒトが生活する場所である。ヒトに寄生するリーシュマニア原虫を媒介するサシチョウバエは、主に旧大陸では *Phlebotomus* 属、新大陸では *Lutzomyia* 属のサシチョウバエである。これらのサシチョウバエは、アマゾンの熱帯降雨林から中央アジアの半沙漠の乾燥地帯までその棲息域が広範囲にわたる。

リーシュマニア症の病原体は真核生物である単細胞の *Leishmania* 属原虫であり、ヒトに感染する種は 20 種以上知られている。実はリーシュマニア原虫の種類ははるかに多種が知られていて、は虫類にも多種のリーシュマニア原虫が感染している。また、中央アジアの半乾燥地帯に棲息するオオスナネズミ (*Rhombomys opimus*) には *L. turanica*、および *L. gerbilli* というリーシュマニア原虫が寄生している (図 4)⁶⁾。これらの原虫による人体寄生例の報告はまだない。これらの原

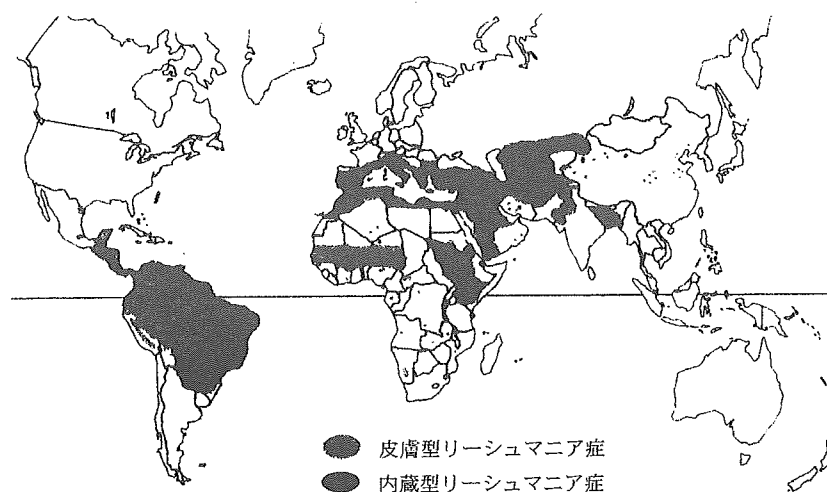


図 3 リーシュマニア症の世界における浸淫地域。
(WHO report, 2000 を一部改変)

虫をオオスナネズミ間で媒介しているのもサシチョウバエであり、これらのサシチョウバエはヒトがいればヒトを吸血する。しかし中央アジアの半乾燥地帯の人口密度は極めて低いため、感染サシチョウバエがヒトを刺咬する機会は少ないと考えられる。一方、オオスナネズミに感染している割合は非常に高い。これはオオスナネズミの巣穴

の中で親から仔へとサシチョウバエを介して感染が成立するためと考えられる。しかしながら、オオスナネズミの病理組織学的解析を行っても、極めて少数のリーシュマニア原虫が認められるにすぎず、多くの場合病変は観察されない。従って、これらのリーシュマニア原虫は宿主であるオオスナネズミに対し病原性は低いと考えられる。すなわち中央アジアでは、リーシュマニア原虫とサシチョウバエ、オオスナネズミの三者間で良好な共存関係が形成されていると言える。ヒトに病気を起こさない限り、これら微生物の生態が注目される事は無い。

リーシュマニア原虫とサシチョウバエには安定した共存系が確立され、また保虫宿主として多様な生物が感染し得ることから、各地域におけるリーシュマニア原虫の生態は極めて複雑であることが推測される。

7. 6大感染症

1980年にWHOは世界天然痘根絶宣言を行い、UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR) では引き続き、表2に示したごとくマラリア、フィラリア症、住血吸虫症、レプラ(ハンセン病)、リーシュマニア症、トリパノソーマ症を6つの標的感染症として挙げ、その根絶に向け様々な対策を講じている²⁾。感染症の危険度、脅威は死亡者数、感染者数、致命率、発症率、社会的影響、経済損失等々、様々な要因をもとに評価されていて「6大感染症」という表現は必ずしも適切では無いと思う。しかし、表2に示したように感染危険地域の広さ、感染者数の多さから、何れも人類の脅

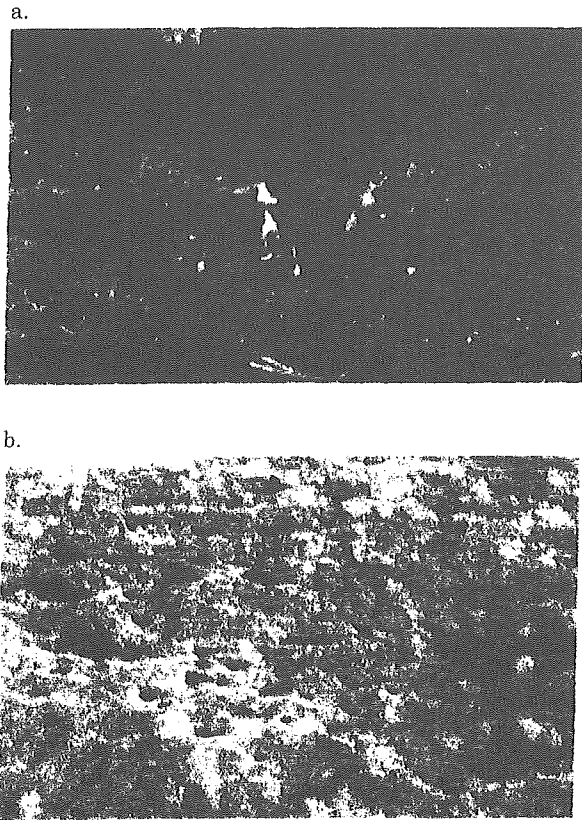


図4 中央アジアにおける主要な皮膚型リーシュマニア症の保虫宿主である。
a ; オオスナネズミ (*Rhombomys opimus*)、(中国新疆ウイグル自治区)(伊藤守博士の好意による)
b ; その巣穴(トルクメニスタン)。

表2 6大感染症.(2002-2004)

感染症名	患者数 (100万)	病原体	汚染国	危険地域の 人口 (100万)	Zoonosis*	Vector-born disease
Malaria	273	<i>Plasmodium spp.</i> (真核生物)	100	>2,100	○	○
Schistosomiasis	200	<i>Schistosoma spp.</i> (真核生物)	74	600	○	○
Filariasis						
Lymphatic filariasis	120	<i>Wuchereria bancrofti</i> <i>Brugia malayi etc.</i> (真核生物)	>80	1,100	—	○
Onchocerciasis	>17.7	<i>Onchocerca volvulus</i> (真核生物)	34	120	—	○
Leprosy	0.534	<i>Mycobacterium leprae</i> (原核生物)	85	1,600	—	—
Tripanosomiasis		<i>Trypanosoma spp.</i> (真核生物)				
African trypanosomiasis	0.3-0.5		36	60	○	○
Chagas disease	13		18	120	○	○
Leishmaniasis	1.5-2	<i>Leishmania spp.</i> (真核生物)	88	350	○	○

WHO member states: 192 countries/World population : 6.2 billion (2004)

*WHO Technical Report Series, No. 378, 1967 (Zoonoses) による

威である感染症であることは疑いようもない。医療技術、バイオテクノロジーの進歩した現在、なぜこのように多くの人間が未だ感染症の脅威に曝されているのであろうか。その原因を開発途上国の経済力の低さにのみ求めるのは正しくない。むしろ、これら感染症に対する有効な防疫策がないためである。これら「6大感染症」は、人類が有効なコントロールの方法を見いだしていない感染症の代表とも言える。ハンセン病以外のコントロールが困難な5つの感染症には、いくつかの共通の理由が挙げられる。ここではその中で(1)真核生物が病原体であることと(2)病原体の生活史にヒト以外の生物が生物学的媒介者=ベクター、あるいは保虫宿主(reservoir host)として介在することを取り上げ、これら感染症のコントロールのための戦略について述べてみたい。

我が国でマラリア、日本住血吸虫症、フィラリア(糸状虫)症等の感染症が常在していたことは今では過去の事と認識されている。あるいは、常在していたことを認識していない人も多くなった⁷⁾。‘おこり(瘡)’あるいは‘わらやみ’として有史以来、我が国に常在していたと考えられる土着マラリア(三日熱マラリア)が流行を終息したのは1965年以降である。四日熱、および熱帯熱マラリアも宮古、八重山諸島に常在していた。広島県片山地方、および甲府盆地に古くから知られていた日本住血吸虫症も、流行終息宣言がされたのは1990年代末のことである。象皮病、陰囊水腫を起こすバンクロフト糸状虫によるフィラリア症は青森県から沖縄県までほぼ全国に分布し、九州、奄美諸島は世界的にも濃厚浸淫地域とされていた。現在のところ、新規感染は見られないが古くからの患者は存在する。一方、東京都の八丈小島にはマレー糸状虫によるフィラリア症が分布していた。6大感染症のうちマラリア、住血吸虫症、フィラリア症、およびハンセン病の4つまでが常在し、その全てのコントロールに成功した稀な国として、我が国が高い評価を得ていることもあまり知られていない現状である。

我が国ではどのような方法を用いてこれら感染症の防圧に成功したのであろうか。我が国は環境衛生教育の徹底と、蚊が媒介するマラリア、フィラリア症対策として殺虫剤の噴霧による蚊の駆除を行った。また、貝が媒介する住血吸虫症対策では殺貝剤の投与、水路の改修による貝駆除など、生物環境の人為的改変を徹底的に行った。さらに、媒介蚊が越冬できないなど気候の特徴や工業化による水質の汚染が媒介蚊、貝の繁殖に悪影響を与えたことなどが相まって、これら感染

症のコントロールに成功したと言える。八丈小島に分布していたマレー糸状虫によるフィラリア症は1969年の八丈小島全島離村により結果的に消滅した。皮肉なことに高度成長期にもたらされた工業化による公害、都市集中化、環境破壊が我々に悪影響をもたらしたのと同時に、寄生体、媒介動物、保虫動物といった他の生物にとっても好ましく無い影響を与え、結果として感染症のコントロールを成功に導いたと言える。

6大感染症に対するワクチンは未だどれも開発されていない。しかし、感染症のコントロールはワクチンおよび治療薬の開発を含む個々の健康を守るための医療技術の向上だけでは成功させることはできない。寄生体、宿主および、それらの生息する環境をも含めた社会医学、環境医学、さらに生態学的理解とアプローチが必要なのは明白である。感染症コントロールに向けた人類の歴史がそれを物語っているし、現在でも、WHOによるこれらvector-born diseaseのコントロールの主役は未だvector-controlである²⁾。

8. 環境の変化と感染症

感染症が生物の営みの結果としてもたらされるのであれば、それら生物の棲息する環境の変化に大きく左右されるのは明らかである。最近、蚊が媒介するマラリア、デング熱の流行がエルニーニョ現象と密接に関連することが指摘されている⁸⁾。地球温暖化等により様々な気候変動が見られ、また現在、5年で日本の総面積に匹敵する土地から草一本残らず消え去るという速度で沙漠化が進んでいる。生態系の変化に当然寄生体の生態の変化が伴うことは想像に難くない。スマトラ沖地震後の生物相の変化により感染症の流行が起こるのでは、といった危惧は関係各国の迅速な医療対策、給水対策のおかげで、現在のところ大事には至っていない。しかし、筆者らの2005年2月の調査では、被災者の移動、冠水地に残る水たまりの形成、生物の棲息域の変化等が起きており、今後、zoonosis および vector-born disease 等の流行に関しては引き続き警戒する必要がある。これらの生態系の変化は人為的にも起きている。外来生物の人為的導入が生態系にもたらす影響も少なくない。筆者らは1996年以来、中央アジア諸国、トルコ、中国の半乾燥地帯で前述した「6大感染症」であるリーシュマニア症、およびマラリアの流行が新しい地域で発生したり、これまでの浸淫地域で患者数が著しく増加していることに注目して調査を行って来た^{6),9)}。次章以下では環境の人

為的变化がリーシュマニア症および、マラリアの流行に及ぼした影響を例として具体的に述べてみる。

9. 中国新疆ウイグル自治区におけるリーシュマニア症の流行

リーシュマニア症について、我が国にはヒトおよびイヌの輸入例の報告はあるものの、幸いなことに国内感染例の報告は無い。他の動物からのリーシュマニア原虫分離の報告も無いことから、これは媒介可能なサシチョウバエが存在しないためと考えたい。ところが、隣国中華人民共和国は、古くからリーシュマニア症の浸淫地域(endemic area)であり、現在、むしろ患者数の増加が見られる地域もある¹⁰⁾。リーシュマニア症は人獣共通感染症である。ヒト、保虫宿主、媒介昆虫の分布・生態は地域により異なり、その疫学を一概に論ずることはできない。従って、リーシュマニア症に対する防疫対策も地域により多様とならざるを得ず、成果の達成度も大きく異なる。図5に示すように、これら生物相の違いと感染症コントロールの達成度により、3種類の地域に分けて述べることにする。1950年代までは黄河、長江の下流平野部に広がる地域は*L. donovani*による内臓型リーシュマニア症(kala-azar)の浸淫地域であり、患者は主として5才以下の小児であった(10,000人あたり1年間に29.7~50.4例)。人口密度の高い地域でありイヌの感染は極めて稀であった(anthroponotic)。このため殺虫剤(DDTおよびBHC)の噴霧によるサシチョウバエの駆除および患者の治療により、1970年以降は20例以下の症例が報告されているにすぎない。四川省、甘肅省、陝西省、山西省、および北京北部の山岳、丘陵地域でも5才以下の小児のkala-azarが浸淫し

ていた(10,000人あたり1年間に0.1~16.0例)。この地域ではイヌが主要な保虫宿主であり、1950年代には0.65%~7.3%のイヌに感染が見られた。タヌキにも感染が見られ、家畜だけではなく野生動物も保虫宿主としてヒトへの伝播に参与していた(anthropozoonotic)可能性がある。このため殺虫剤(DDTおよびBHC)の噴霧によるサシチョウバエの駆除および患者の治療に加え、感染犬の駆除を行ったが、現在でも患者が散発的に報告されている。イヌの感染率にこの間大きな減少は見られていない。一方、典型的な半乾燥地帯である新疆ウイグル自治区では1950年代には人口が稀薄であり、また調査が行われていなかったこともあり、大きな問題とはなっていなかった。近年に至り、*L. donovani*および*L. infantum*による内臓型リーシュマニア症の発症がむしろ増加している。散在性に見られることから、おそらく野生動物が保虫宿主として関与していると考えられるが、我々の調査でも保虫宿主は発見できなかった。中国新疆ウイグル自治区では近年、国策として大規模灌漑事業を行い半乾燥地帯を農業可能な地域に変え、あるいは地下資源の探索を行っている。これらの開発事業の進行に伴い、これまで人口密度の希薄であった地域に、急激に移民が流入している。リーシュマニア症の増加は近年の屯田開墾事業および、この地域への移民の増加により、サシチョウバエと野生動物の間で感染環が営まれていた(enzoonotic)場所に人間が侵入したことによりもたらされた結果と考えられている。移民の多くはこれまでリーシュマニアに感染したことの無い、すなわち非免疫者であり、感受性の高い宿主がリーシュマニア原虫の生活環に組み込まれたことになる。この地域ではリーシュマニア症に限らず、エキノコックス、タリム出血熱ウイルスなど、おそらく野生動物と共存していた様々な微生物による感染症も増加している。この地域の野鼠にはペスト菌も常在している。中国新疆ウイグル自治区におけるリーシュマニア症対策には他の地域において一定の成果を納めてきた方法に加え、野生動物対策を講ずる必要がある。しかし事実上、有効な方法は無い。

中央アジア諸国では、広く*L. major*による皮膚型リーシュマニア症が浸淫している⁶⁾。この地域の半乾燥地帯に高密度に棲息するオオスナネズミおよびキツネ、ジャッカルの野生動物が主要な保虫宿主である(図4)。トルクメニスタンではリーシュマニア症の防疫対策としてオオスナネズミの駆除を行なっているが、その方法は原野に原油を撒き巣穴ごと焼き払うというものである。ス

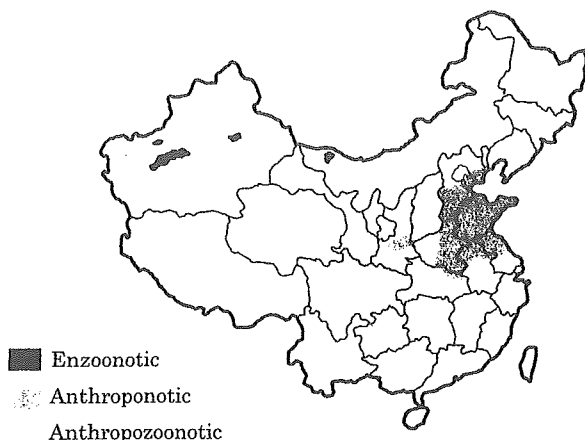


図5 中国におけるリーシュマニア症の分布。