

Laboratory and Epidemiology Communications

Genotyping of *Giardia* Isolates from Humans in Japan Using the Small Subunit Ribosomal RNA and Glutamate Dehydrogenase Gene SequencesNiichiro Abe*, Isao Kimata¹ and Masaharu Tokoro²*Department of Microbiology, Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences, Osaka 543-0026,*¹*Department of Protozoal Diseases, Graduate School of Medicine, Osaka City University, Osaka 545-8585 and*²*Department of Parasitology, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640*

Communicated by Takuro Endo

(Accepted January 20, 2005)

The flagellate *Giardia intestinalis* (syn. *G. lamblia*, *G. duodenalis*) is a well-known intestinal parasite which causes enteric diseases in humans, livestock, and companion animals. Recent molecular studies have shown that *G. intestinalis* is composed of at least seven genetically distinct but morphologically identical assemblages (Assemblages A to G), and that most of these assemblages appear to have different host preferences, e.g., Assemblages C and D are found in dogs, Assemblage E in hoofed livestock, Assemblage F in cats, and Assemblage G in rats (1). Assemblage A, however, consists of isolates that can be classified into two genetic groups (1): genetic group A-I is isolated from a variety of animals including humans, while Assemblage A-II is isolated exclusively from humans. Assemblage B consists of a genetically diverse group of mostly human isolates, but some isolates from animals are included. Thus, the *G. intestinalis* isolates that have the potential for zoonotic transmission seem to be restricted within narrow genetic groups, specifically Assemblages A and B (1).

In Japan, giardiasis has been classified as a category V notifiable infectious disease in the National Epidemiological Surveillance of Infectious Diseases under the Law Concerning the Prevention of Infectious Diseases and Medical Care for Patients of Infections enacted in April of 1999. Although approximately one hundred cases of this infection were reported annually between 2000 and 2004 (<http://idsc.nih.gov/ja/isr/virus/virus-e.html>), the molecular epidemiology of *Giardia* in Japan remains unclear. To date, only two human isolates have been genotyped as Assemblage B in Japan (2,3). In the present study, we genotyped three isolates of *G. intestinalis* from humans in Japan using both small subunit ribosomal RNA and glutamate dehydrogenase gene sequences.

The three isolates (GH-125, GH-126 and GH-135) examined in the present study were isolated from Japanese individuals: isolates GH-125 and GH-126 were from asymptomatic individuals living in Osaka, and GH-135 came from a diarrheal HIV-positive patient in Tokyo. *Giardia* cysts were purified from each fecal sample by the sucrose centrifugal flotation method (4), and the genomic DNA was extracted and purified following the method reported previously (4,5).

Giardia diagnostic fragments were amplified by polymerase chain reaction (PCR) with the following primer pairs targeting the different gene loci: RH11 and RH4 for the *Giardia* small subunit ribosomal RNA gene (SSUrDNA) (6) and GDH1 and GDH4 for the *Giardia* glutamate dehydrogenase gene (GDH) (7). PCR amplification of SSUrDNA was performed using LA Taq polymerase with 2X GC buffer I (LA Taq) (TaKaRa Shuzo Co., Ltd., Otsu, Japan), and amplification of GDH using Ex Taq polymerase with 10X Ex Taq buffer (Ex Taq) (TaKaRa Shuzo) as reported previously (5). Sequencing of the PCR products and phylogenetic analysis were performed following the methods reported previously (2,8). The partial sequences of the SSUrDNA and GDH of each isolate were deposited in the GenBank database under accession numbers AB195219-AB195224.

SSUrDNA and GDH were successfully amplified in all isolates examined in the present study (data not shown). Partial sequences of the SSUrDNA of GH-125 and GH-126 were found to be identical to those of BAH40C11 and BAC2 that are known to belong to Assemblage A. Similarly, GH-135 had a sequence identical to those of BAH-12 and Ad-28 in Assemblage B (Fig. 1A). More precisely, analysis of GDH partial sequences (592 bp) made it possible to distinguish GH-125, which had a sequence identical to those of Ad-2 and Bris-136, from GH-126 by 3 bp differences, even though they were both classified into the anthroponotic genotype Assemblage A-II (Fig. 1B). Again, the GDH partial sequence of GH-135 was almost identical to that of BAH-12 with 2 bp differences and was grouped into zoonotic Assemblage B (Fig. 1B).

Recently, two human isolates of *Giardia*, GH-156 and GH-158, were genotyped as Assemblage B by phylogenetic analysis using GDH partial sequences in Japan (2,3). In addition, three distinct genotypes, pertaining to Assemblages A-I, D and E, have been isolated from a ferret, dogs and calves, respectively (2,5,8). Genotypes of Assemblage A-I are known to have wider range of host species and have the potential to infect humans, while Assemblages D and E are known to be host-specific and non-infective to humans. Based on the results reported in the present experiment together with those reported elsewhere (2,3,8), there are three *Giardia* genotypes present in Japan that are either of zoonotic (Assemblage A-I and Assemblage B) or anthroponotic (Assemblage A-II) potential for human infection. Further genetic analysis of both human and animal isolates of this microbe is needed to gain greater insight into the molecular epidemiology of endemic *G. intestinalis* in Japan.

*Corresponding author: Mailing address: Department of Microbiology, Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences, 8-34 Tojo-cho, Tennoji-ku, Osaka 543-0026, Japan. Tel: +81-6-6771-3147, Fax: +81-6-6772-0676, E-mail: n.abe@iphes.city.osaka.jp

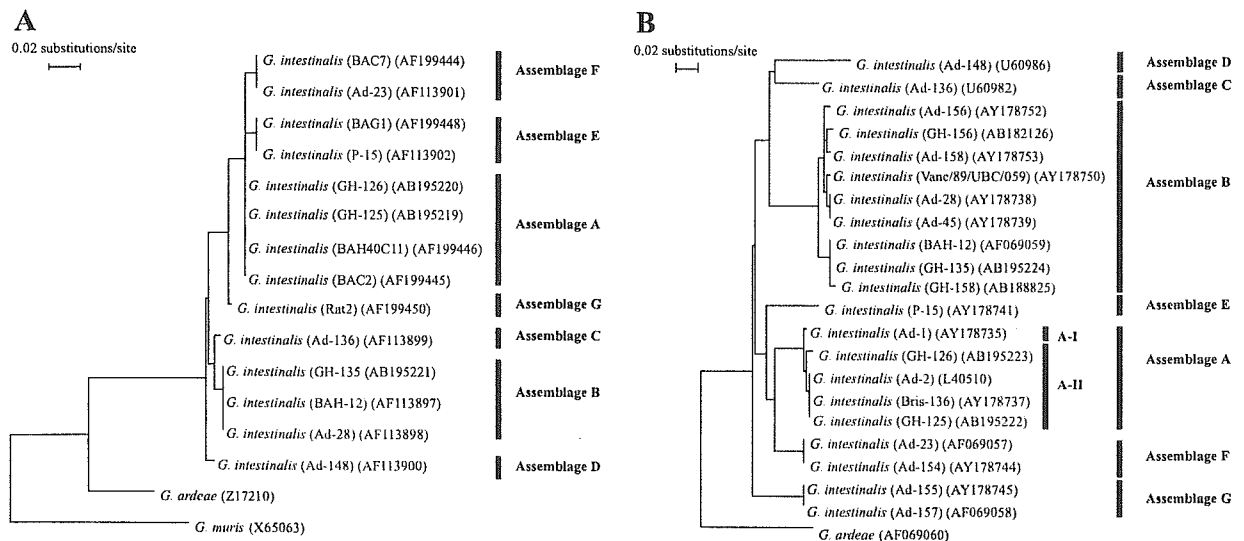


Fig. 1. Phylogenetic relationships of the isolates from humans examined in the present study to other *Giardia* spp. and *G. intestinalis* genotypes as inferred by neighbor-joining analysis, based on the nucleotide sequences of SSUrDNA (A) and GDH (B). Names of the isolates and accession numbers in GenBank are shown in parentheses.

REFERENCES

1. Monis, P. T. and Thompson, R. C. A. (2003): *Cryptosporidium* and *Giardia*-zoonoses: fact or fiction? *Infect. Genet. Evol.*, 3, 233-244.
2. Matsubayashi, M., Kimata, I. and Abe, N.: Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* isolates from a human and calf in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* (in press).
3. Abe, N., Nakamura, S. and Kimata, I. (2005): An imported case of mixed-infection with *Giardia* and *Cryptosporidium* parasites in Japan. *Seikatsu Eisei*, 49, 48-51.
4. Abe, N., Kimata, I. and Iseki, M. (2002): Identification of genotypes of *Cryptosporidium parvum* isolates from a patient and a dog in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, 64, 165-168.
5. Abe, N., Kimata, I. and Iseki, M. (2003): Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* isolates from dogs in Japan by direct sequencing of the PCR amplified glutamate dehydrogenase gene. *J. Vet. Med. Sci.*, 65, 29-33.
6. Hopkins, R. M., Meloni, B. P., Groth, D. M., Wetherall, J. D., Reynoldson, J. A. and Thompson, R. C. A. (1997): Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. *J. Parasitol.*, 83, 44-51.
7. Homan, W. L., Gilsing, M., Bentala, H., Limper, L. and Knapen, F. (1998): Characterization of *Giardia duodenalis* by polymerase-chain-reaction fingerprinting. *Parasitol. Res.*, 84, 707-714.
8. Abe, N., Read, C., Thompson, R. C. A. and Iseki, M.: Zoonotic genotype of *Giardia intestinalis* detected in a ferret. *J. Parasitol.* (in press).

赤痢アメーバ症の最近の動向

慶應義塾大学医学部熱帯医学・寄生虫学教授 竹内 勤

はじめに

以前から赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903) と呼ばれた原虫はアメーバ赤痢 (amebic dysentery) という疾患名と共によく知られた存在であった。しかし、1980年前後におけるロンドン大学熱帯医学研究所の Sargeant の赤痢アメーバ分離株に関するアイソザイムパターンの解析に端を発した病原株、非病原株の異同に関する論争は1997年の WHO/UNESCO/PAHO 主催の Expert Meeting にて病原性を有する赤痢アメーバを *Entamoeba histolytica* Schaudinn 1903 (Emended Walker 1913)、非病原性のものを *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925 とする事で決着をみた。そして両者が光学顕微鏡レベルでは殆ど区別が付かない事から、*E. histolytica* に特異的な方法で同定を行わなければならないこと、あるいは *E. dispar* のみの感染が確かであれば、治療は必要ないこと等が、この Expert Meeting の Recommendation として Weekly Epidemiology Record に発表された。これに伴い、臨床診断、病原機構研究、疫学研究など、広い分野にわたって再検討を有する必要性が生じた。例えば、最近でもわが国では“赤痢アメーバ”という原虫名が病原種をさすものとして使用されているが、厳密に言えばこの名称は上記の *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 に対応したものであり、わが国では今でも便宜上病原種を示すために使わ

れているに過ぎない。

本稿においては、このような変遷を念頭において、わが国における最近の疫学的な状況及び関連する進展に触れてみたい。

1. わが国におけるアメーバ症の発生状況

1999年のいわゆる感染症法の改正以前は、旧伝染病予防法の対象疾患としてアメーバ赤痢のみが挙げられており、糞便内に感染型である嚢子が出現している場合が報告対象となった。この旧法の時点でも、1980年代に至るとアメーバ症の症例の増加は著しく、筆者の教室への免疫診断依頼も急増した。この原因を明らかにすべく、数百例の症例を筆者らの教室で解析した結果、わが国でも男性同性愛者間に感染が拡大している事が主要な原因の一つである事が明らかになった。また、興味ある事に、わが国の同性愛者からは病原種である *E. histolytica* が高頻度で分離されたが、欧米の同性愛者からの分離株は非病原種である *E. dispar* が殆どであった。このため、わが国の HIV/AIDS に併合する感染症の一つとして、日和見感染ではないが、わが国では *E. histolytica* 感染が挙げられている。

上述の1999年の感染症法の改訂に伴い、アメーバ症は4類感染症として全数把握の対象となり、2003年の再改正に伴い5類感染症に再分類されたが、やはり全数把握の対象となっている。現時

学術情報

点の届出の基準は、医師の判断により、症状や所見から疑われ、病原体の検出、病原体の遺伝子の検出、あるいは病原体に対する抗体の検出等により診断がなされた場合、ということになっており、届出数は増加するものと予測された。事実届出数は、1999年に268例、2000年には359例で、増加したものの、このあたりで感染に係る要因に変化がなければ、当然届出数はプラトーに達するものと当初推定されていた。しかるに、届出数は増加の一途を辿り、2002年には453例、2003年に520例、2004年に610例、2005年には688例、2006年には第9週目までで97例が報告された。これらの数は最終的にまだ変る余地はあるものの、1999年以来明瞭な増加傾向が示されている事は間違いない。この事は、単に診断技術が一般に普及したため等の理由に由来するものではなく、明らかに何らかの要因によって感染者数が増えつつある事を示唆している。

このような状況に関連して、注目すべきなのは以前と変わらず男性同性愛者の症例が多い事と、異性愛行為によると想定される感染（特に女性の症例）が出現して来た事である。同性愛者の症例が依然として多い事は、同性愛者の HIV 感染が多い、すなわちわが国の同性愛者集団の性行動は活動性を増していると言う可能性を示唆するものかも知れない。異性愛行為による感染は、今後動向を注目してフォローする必要がある。

もう一つの注意すべきは施設内感染である。施設内感染とは、集団で生活する施設での多発感染を意味しており、例えば疥癬等はこの例として知られている。欧米では、1960年代に知的障害者更生施設などでの集団感染が報告されたが、わが国では1989年、東海大学の永倉らによって初めて知的障害者施設における *E. histolytica* の集団感染が報告された。その後1~2の散発的な報告はあったが、筆者らは厚生労働科研究費により、

1990年代より本格的に施設内アメーバ感染の調査を開始した。これまでに、地方自治体等の協力を得て、かなり多くの施設の調査を行ったが、その結果施設間でのアメーバ感染の様態に著しい差異がある事が明らかになった。例えば、糞便検査、特異抗原定量検査で、全く *E. histolytica* 感染が見い出せない施設がある反面、感染率が高い施設では ELISA で67%、特異抗原検出法で28%陽性と言う所見が得られた。また、*E. histolytica* 感染が検出されなかった施設においても、ランブル鞭毛虫等の病原性腸管寄生原虫、あるいは大腸アメーバ、小型アメーバ等、非病原性の腸管原虫の感染が2~8%程度に検出された。この所見は、*E. histolytica* の感染はなくても、糞便に汚染された手指、食物などから経口感染が起こっている事を示しており、一旦 *E. histolytica* が入り込めば容易に感染が拡大する可能性が高い事を示している。

2. *E. histolytica* の遺伝子多型解明とその応用

筆者らの厚生労働科研究班の野崎ら（群馬大学）は、chitinase、SREHP (serine-rich *E. histolytica* protein)、locus 1-2、locus 5-6 の PCR 解析によって、high resolution な *E. histolytica* の遺伝子レベルのタイピング法を確立した。この方法は、上記同性愛者、及び施設内感染者からの分離株に応用され、興味ある結論を得る事が出来た。すなわち同性愛者からの分離株は調べた限りでは heterogeneity に極めて富んでおり、事実上全ての株は遺伝子レベルで異なっていた。それに反して、施設内感染の場合は、単一の施設からの分離株はほぼ同一の遺伝子型を示していた。また、異なる施設から同一の遺伝子型を見出す事も出来たが、施設利用者のトレーシングによって、これらは一人の感染者の移動に起因している事も明らかになった。すなわち、殆どの

学術情報

場合、施設内アメーバ感染は単一の感染者に由来していると考えられる。

また、野崎らはわが国の分離株の遺伝子型を、タイ、バングラデシュ、カンボジアなどの分離株、及び世界的に研究に頻繁に使用されている標準的な分離株と比較検討し、相同性を見出す事が出来なかった。これらの結果は、わが国の *E. histolytica* 分布が世界的に見ても特異なものである事を示唆している。

更に、筆者の教室の小林は施設内感染からの *E. histolytica* 分離株の性状について興味ある所見を見出している。小林は数年前に27%という高率な特異抗原陽性/糞便検査陽性を示したにもかかわらず、全員が無症候性の持続感染であった施設よりアメーバを分離し(A65 strain)、その性状を検討した。その結果、分離されたのは *E. dispar* ではなく、*E. histolytica* であるとPCRで判定されたが、CHO cell と蛍光色素を使用したアメーバの virulence の検索系でも殆ど細胞毒性を示さず、またハムスターの肝に注射しても膿瘍を形成しなかった。*E. histolytica* の効率良い培養に使用されて来た TYI-S-33 medium で *Crithidia* と monoxenic culture としても増殖せず、むしろ非病原種である *E. dispar* の無菌培養のために小林が開発した yeast extract-iron-gluconic acid-dihydroxyacetone-serum medium を基礎とし、gluconic acid を maltose+glycerol にかえ、更に *Pseudomonas* を culture associate として加え、その増殖を酸素濃度や抗生剤によってある程度コントロールするとようやく増殖が認められるという性状を示した(小林、未発表)。この分離株について、野崎らは上記同様の解析を行い、他のソースからの分離株には全く観察されなかった独特な遺伝子型である事を見出した。この遺伝子多型の解析方法はアメーバの virulence とは恐らく相関していない遺伝子を標的にしたも

のであるが、このような *E. histolytica* が無症候性の持続感染者のみの施設から検出された事は興味深い。

文献

- 1) World Health Organization: Amoebiasis. Weekly Epidemiology Record, 72, 97-99, 1997.
- 2) Nagakura K, Tachibana H, Tanaka T, Kaneda Y, Tokunaga M, Sasao M, Takeuchi T: An outbreak of amoebiasis in an institution for the mentally retarded in Japan. Jpn J Med Sci Biol, 42, 63-76, 1989.
- 3) Takeuchi T, Okuzawa E, Nozaki T, Kobayashi S, Mizokami M, Minoshima N, Yamamoto M, Isomura S: High seropositivity of Japanese homosexual men for amebic infection. J Infect Dis, 159, 808, 1989.
- 4) Haghghi A, Kobayashi S, Takeuchi T, Masuda G, Nozai T: Remarkable genetic polymorphism among *Entamoeba histolytica* isolates from a limited geographic area. J Clin Microbiol, 40, 4081-4090, 2002.
- 5) 竹内 勤: 赤痢アメーバ症等寄生虫症ハイリスク群に対する予防法等の開発に関する研究. 平成14~16年度厚生労働科学研究費、新興・再興感染症研究事業、総合研究報告書、2005.
- 6) Kobayashi S, Imai E, Haghghi A, Khakifa SAM, Tachibana H, Takeuchi T: Axenic cultivation of *Entamoeba dispar* in newly designed yeast extract-iron-gluconic acid-dihydroxyacetone-serum medium. J Parasitol, 91, 1-4, 2005.
- 7) Nozaki T, Kobayashi S, Takeuchi T, Haghghi A: Review Article; Diversity of

学 術 情 報

clinical isolates of *Entamoeba histolytica*
in Japan. Arch Med Res, 37, 277-279, 2006.

シンポジウム：寄生虫疾患診断に用いる検査キットの諸問題

赤痢アメーバの抗原検出法

慶應義塾大学医学部 熱帯医学・寄生虫学*
 東京大学医科学研究所 感染免疫内科**
 小林正規*・前田卓哉*、**・竹内 勤*

Key Words：アメーバ症診断，赤痢アメーバ特異抗原検出キット，*E. histolytica* II TechLab kit，特異性，感度

顕微鏡による赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) の鑑別に際しては，糞便などの検査材料から嚢子や栄養型が検出されることが前提であり，また，非病原性の *E. dispar* との形態的な鑑別が困難という問題がある。現在，*E. histolytica* (E.h) と *E. dispar* (E.d) の鑑別には遺伝子診断法 (PCR 法) と赤痢アメーバの抗原検出法が一般に用いられている。ここではキットを用いた赤痢アメーバ抗原検出法をとりあげ，世界的に汎用されている TECHLAB 社の *E. histolytica* II kit について，その検査方法の実際と検出感度や応用例について紹介する。

E. histolytica II kit の測定原理

E. h/E. d の両者の接着因子 (adhesin) に特異的で共通なエピトープに反応するポリクローナル抗体を吸着させた ELISA プレーットの well 底内壁上に，E. h あるいは E. d の adhesin 抗原を捕捉させる。次に，

ペルオキシダーゼ標識した E. h adhesin に特異的なモノクローナル抗体を加え，E. h adhesin へのみ標識抗体を結合させる。最終的に呈色反応に必要な過酸化水素と基質を加え，その吸光度を測定することで E. h adhesin の存在，すなわち E. h の感染を診断する。

検出感度・特異性

約 0.2-0.4ng/well の adhesin が検出可能とされる¹⁾。無菌培養した E. h 栄養型 (HM-1:IMSScl6 株) を用いたわれわれの実験結果では，栄養型数が 20-25 amebae 以上で明瞭な呈色反応 (OD450=0.113 ≤) を示した (図 1)。嚢子の場合には嚢子壁が嚢子内栄養型の adhesin 抗原と抗体との反応を遮断しているため，嚢子壁を破碎する必要がある。そのため事前に凍結・融解 (1 回) を行っている。特異性は発現蛋白である E. h adhesin に特異的なモノクロー





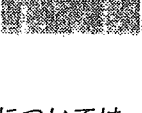
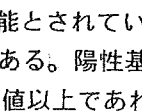
Utility of *Entamoeba histolytica*-specific Antigen Detection Kit

Seiki Kobayashi* Takuya Maeda*、** Tsutomu Takeuchi*

*Department of Tropical Medicine and Parasitology, School of Medicine, Keio University

**Division of Infectious Diseases, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo

論文請求先：小林正規 〒163-8582 新宿区信濃町35 慶應義塾大学医学部 熱帯医学・寄生虫学

<i>E. histolytica</i> HM-1:IMSS cl6 No. amoebae 40-50amoebae		OD ₄₅₀ =0.478	
20-25amoebae		OD ₄₅₀ =0.113	陽性 0.1 ≤
10-13amoebae		OD ₄₅₀ =0.062	0.06 ≤ 疑陽性 <0.1
5-7amoebae		OD ₄₅₀ =0.042	陰性 < 0.06
3-4amoebae		OD ₄₅₀ =0.038	
1-2amoebae		OD ₄₅₀ =0.038	

***0.2-0.4ng adhesin検出可能**

図1 キットの感度については、使用書によれば 0.2-0.4ng/well のアドヘシン抗原検出が可能とされている。アメーバ数にして1well 当たり 20 個以上あれば陽性である。陽性基準は使用書では陰性コントロールの OD 値に 0.05 を加えた値以上であれば陽性とする。われわれはアメーバ数の少ない場合も考慮して、便宜上 0.1 以上を陽性、0.06 から 0.1 までを疑陽性、0.06 未満を陰性としている。

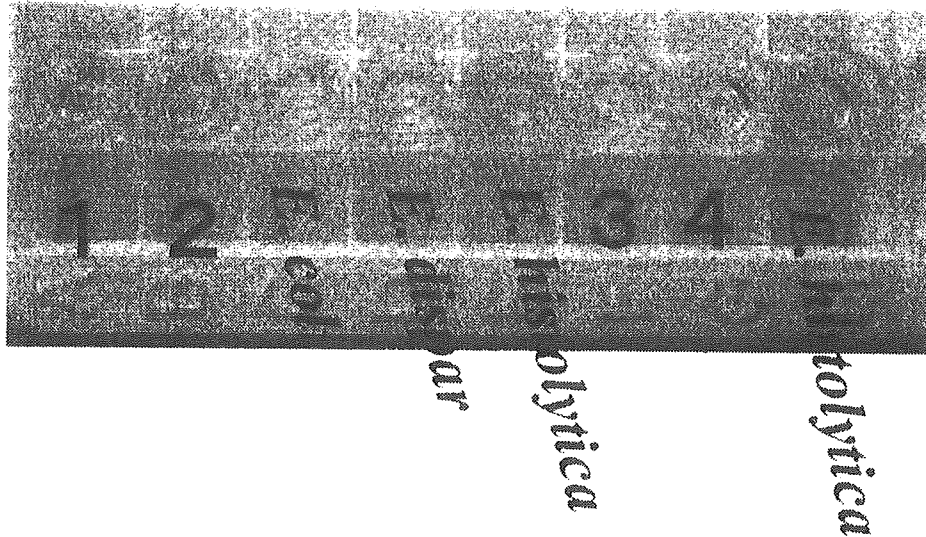


図2 1-4: 被検検体。 *E. histolytica* (*Entamoeba histolytica*)、 *E. dispar* (*Entamoeba dispar*)、 *E. coli* (*Entamoeba coli*): 培養虫体。特異性は高く *E. histolytica* とのみ反応していることがわかる (反応陽性: 黄)。

表1 メトロニダゾール治療後のフォローアップ

	No. Positives of <i>E. histolytica</i>					
	治療前	治療後				
		1st	2nd	3rd	4th	5th
顕微鏡検査	12	4	1	1	1	0
<i>E. histolytica</i> II Kit	19*	4	2	1	0	0

*輸送のため排便から検査までに2日間置いたため(冷蔵保存)、栄養型のみが検出されていた便では保存期間中に栄養型が壊れ、抗原検出検査のみで診断が可能であった検体も含まれるため、一概に顕微鏡検査に対する優位性を示す結果ではない。

ナル抗体を用いているため高い(図2)。

実際の検査成績

1) 臨床診断への応用

赤痢アメーバが感染すると、ELISA法など感度の高い方法を用いれば、症状の有無にかかわらず、多くは血清反応陽性となる。しかしながら宿主側に免疫グロブリン産生にかかわる免疫不全がある場合や、稀ではあるが、病毒性(virulence)が極めて低い赤痢アメーバ株感染も見られ、無症候で血清反応が陰性となる場合もある。このような症例では嚢子や栄養型検出とともに特異抗原の検出による診断が有用となる。また、嚢子や栄養型の検出が困難な水様性下痢や時間が経過したため栄養型の検出が困難となった嚢子排出が見られない便を検査材料とした検査、そして治療後の治療効果判定には抗原検出法がとくに有用となる(表1)。

抗原検出キットの利点

①冷凍で長期保存、冷蔵庫保存でも少なくとも2-3日は抗原検出が可能(抗原量が多い場合、便の性状(水様性便等)によるものか冷蔵保存1ヵ月後に検出された例もある)。②便以外に肝膿瘍等の膿汁からの抗原検出も可能。③治療効果判定に有用。④検査に無駄がなく個人検査から集団スクリーニングまで対応できる。

問題点

①抗原量が少ないと偽陰性となる。②well底を傷つけると偽陽性となる。③使用期限が1年と短いためコストが高くなる。④わが国では診断用として認可されていない。

結論

血清学的診断や顕微鏡検査に抗原検出検査を併用すると、赤痢アメーバの検出率や検査の信頼度は確実に上昇すると考えられる。また、抗原検出キットはPCR法のようにE.dの同定はできないが、E.h抗原とのみ反応することから赤痢アメーバを確実に鑑別できる。

文 献

- 1) Catalog No. T5017 (TECHLAB, U.S.A) (2003) : A 2nd generation monoclonal ELISA for detecting *E. histolytica* adhesion in fecal specimens. Issued.

31

発熱・右季肋部痛を主訴に来院された30歳男性

＜症例＞30歳，男性，自営業

主 訴：発熱・咳嗽・右季肋部痛。

既往歴：25歳；Ⅱ期梅毒，27歳；急性B型肝炎。

家族歴：特記すべき事項なし。

嗜好歴：タバコ20本/日，飲酒は機会飲酒程度。

嗜好歴：10月24日夜より悪寒を伴う発熱が出現。26日には咳嗽を認めたため，近医を受診し感冒と診断され処方を受けたが改善しなかった。その後も発熱は持続し，翌27日には深呼吸時や咳嗽時に右季肋部痛が増強するため，当院外来を受診された。

【入院時現症】

身長173cm，体重70kg，体温38.2℃，血圧107/57mmHg，脈拍数90/分・整，意識清明，眼瞼結膜貧血なし，眼球結膜黄疸なし，咽頭および扁桃軽度発赤，表在リンパ節触知せず，呼吸音および心音異常なし，肝を右季肋部に一横指触知，脾臓触知せず，右季肋部に圧痛認める。下腿に浮腫なし。神経学的所見なし。

なお，入院時の検査所見を次頁に示す。

【入院後経過】

右季肋部の痛みに対して腹部エコーを実施した(図1)。肝右葉に図示する病変を1カ所確認したほかは，特に異常所見を認めなかった。



図1 腹部エコー所見

以下の設問に答えなさい(正解が複数の場合もある)。



設問1. 診断を進めるにあたって，さらに把握しておくべき患者背景はどれか？

- ① 海外渡航歴
- ② 職業歴
- ③ ペット飼育歴
- ④ 男性同性愛歴
- ⑤ 施設人所歴



初診時検査成績

●末梢血	UA	5.2 mg/dl	
RBC	318 × 10 ⁴ / μl	Na	132 mEq/l
Hb	11.4 g/dl	K	4.2 mEq/l
Ht	33.5 %	Cl	99 mEq/l
WBC	7,910 / μl	T-Chol	105 mg/dl
Plt	15.5 × 10 ⁴ / μl	TG	57 mg/dl
●血液生化学	Gl	142 mg/dl	
AST (GOT)	21 IU/l	Fe	9 μg/dl
ALT (GPT)	11 IU/l	TIBC	163 μg/dl
AIP	219 IU/l	UIBC	154 μg/dl
LDH	360 IU/l	●免疫・血清	
γ-GTP	49 IU/l	CRP	16.4 mg/dl
TP	6.5 g/dl	HCV	(-)
Alb	3.7 g/dl	HBs 抗原	(-)
T-Bil	0.8 mg/dl	HBs 抗体	(+)
D-Bil	0.4 mg/dl	RPR	8倍
BUN	19.1 mg/dl	TPHA	2,560倍
Cr	0.9 mg/dl		



設問2. 次に行うべき検査は何か？

- | | |
|---------------------|-----------|
| ①糞便一般検査 | ⑤腹部CT |
| ②血清抗体価測定 | ⑥肝血管造影 |
| ③膿瘍試験穿刺(膿瘍一般検査, 培養) | ⑦肝シンチグラフィ |
| ④血液培養 | |

入院後、上述の問診・検査を実施した。入院日には、そのうち一部の検査項目で結果が報告された。また、追加した問診の結果は以下のものであった。

問診の結果は海外渡航歴なし、バイセクシャルであった。

当日判明した検査結果は、糞便一般検査では性状は水溶性であり、非粘血性、直接塗抹および集卵法にて原虫・虫卵を認めず。

腹部CT所見を図2に示す。

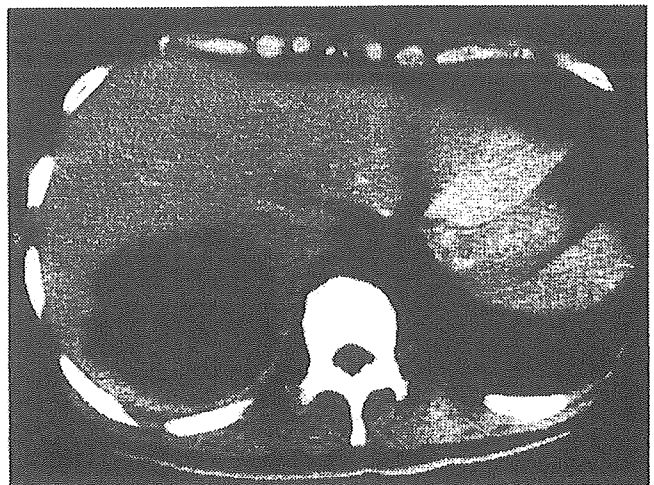


図2 腹部CT所見



設問3. 現時点での診断について誤っているのはどれか？

- ① アメーバ性肝膿瘍ではアメーバ性大腸炎を必ず合併するため、原虫陰性の非血性下痢便を伴った本症例では、アメーバ性肝膿瘍は否定できる。
- ② 細菌性肝膿瘍は右葉に好発し、通常単発のことが多い。
- ③ わが国でのアメーバ赤痢・肝膿瘍の症例は年々増加の傾向にあり、細菌性赤痢より多くの症例が報告されている。
- ④ 糞便および膿瘍に存在する栄養体は比較的安定であり、正確に診断するためには外注検査機関や研究機関に糞便、および膿瘍の直接塗抹検査を繰り返し提出すべきである。
- ⑤ 血清抗体価は大腸炎や肝膿瘍でさえも、偽陰性がみられることがある。

入院翌日、膿瘍をエコーガイド下に穿刺し、得られた膿汁から図3に示す病原体を検出した。

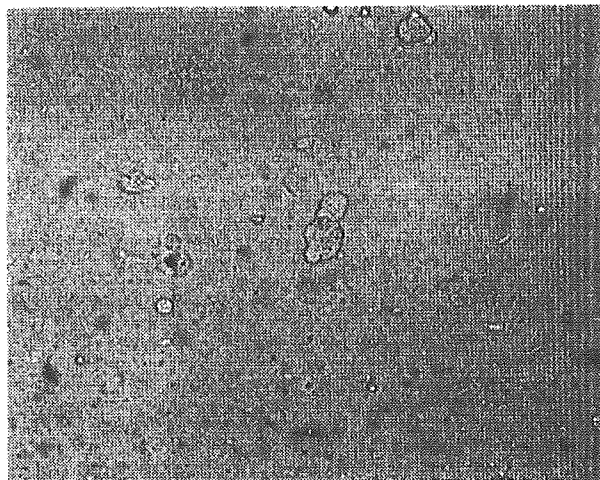


図3 検出された病原体 (※カラー口絵参照)



設問4. 膿瘍を穿刺するにあたり、誤っているのはどれか？

- ① 比較的大きな膿瘍の場合、通常は治癒を促進するためにドレーンを留置する。
- ② 膿汁内のアメーバ原虫は膿瘍壁周囲に主に存在している。
- ③ アメーバ性肝膿瘍の場合、膿汁から嚢子が検出されることはない。
- ④ 殺アメーバ薬の膿瘍内局注療法も考慮する。
- ⑤ アメーバ性肝膿瘍は細菌感染も併発していることが多いので、細菌培養は必ず実施し、広域の抗菌薬の投与も併せて実施する。



設問5. 治療について誤っているのはどれか？

- ① 近年、メトロニダゾール耐性の赤痢アメーバの報告がいくつかみられる。
- ② 肝膿瘍に対する治療の第一選択はメトロニダゾールの内服である。
- ③ アメーバ性肝膿瘍は治療後も膿瘍は縮小せず、血清抗体価が治療効果の判定に重要である。
- ④ メトロニダゾール投与中は飲酒を控えるよう指導するべきである。
- ⑤ 内服が困難な症例では、メトロニダゾールの注射薬も存在する。



設問6. アメーバ赤痢・肝膿瘍について正しいのはどれか？

- ① アメーバ赤痢・肝膿瘍は、細菌性赤痢と同じ2類感染症に相当する。

- ② 家族内での感染率が高く、同居の家族については検便などを実施する必要性が高い。
- ③ わが国では障害者施設内での集団感染が問題となっている。
- ④ アメーバ嚢子を排出する無症候性キャリアでは自覚的に症状がないため、感染源として重要である。
- ⑤ 性行為感染症 (STD) の一つである。

解 説

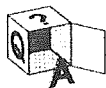
■ 診断名

アメーバ性肝膿瘍

■ 勉強のポイント

- ① 赤痢アメーバ症の病態生理
- ② 診断法
- ③ 治療法

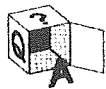
以下に設問の解答を示し、解説を行う。



1. 把握しておく患者背景

解答：①④⑤

腹部エコーでは、肝右葉に単発性の低エコー領域を認め、肝膿瘍を疑う所見である。しかも、右葉単発の膿瘍であり、アメーバ性肝膿瘍に特徴的な所見であるが、このほか細菌性肝膿瘍との鑑別が必要になる。梅毒やB型肝炎の既往は性行為感染症のリスク因子とも考えられ、特に男性同性愛者における赤痢アメーバ症やHIV感染症との合併率が高く、問診にて確認しておく必要がある¹⁾。本症例ではHIV抗体陽性であった。一方、糞口感染である赤痢アメーバ症は、熱帯から温帯地域にかけての不衛生な地域で流行がみられるほか、わが国では障害者施設内での集団感染が問題となっている²⁾。

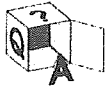


2. 次に行うべき検査

解答：①②③④⑤

赤痢アメーバ原虫は経口的に嚢子を摂取することで感染し、腸管内で栄養体となり増殖を繰り返す。肝臓への病変は、腸管内から門脈を介して拡がるとされており、糞便検査は必須である。血清のアメーバ抗体価の測定については、以前はHA法が一般的に用いられており、抗体価の推移が病勢に反映しないという問題があったが³⁾、近年のELISA法では感度も高く、治療後の判定に用いることも可能である。本症例では、入院時の抗赤痢アメーバ抗体価はIgG/IgMともに陰性であったが、入院第12日の再検査では、IgG 400倍、IgM 200倍と上昇していた。

確定診断は、膿瘍の穿刺液からの細菌培養および栄養体の検出で行われる。細菌性肝膿瘍の鑑別には、発熱時に血液培養を実施するのも有効である。



3. この時点での診断について誤っているもの

解答：①②④

理論的にアメーバ性肝膿瘍では、アメーバ性大腸炎/赤痢が先行しているものと考えられるが、実際に大腸炎症状を伴わない肝膿瘍の症例はしばしばみられる。また、粘血便(図4)も必発ではなく、水様性下痢を合併したアメーバ性肝膿瘍の症例報告もある。したがって、粘血便がみられないから、もしくは糞便から原虫が証明できないからといって、アメーバ性肝膿瘍を否定することはできない。

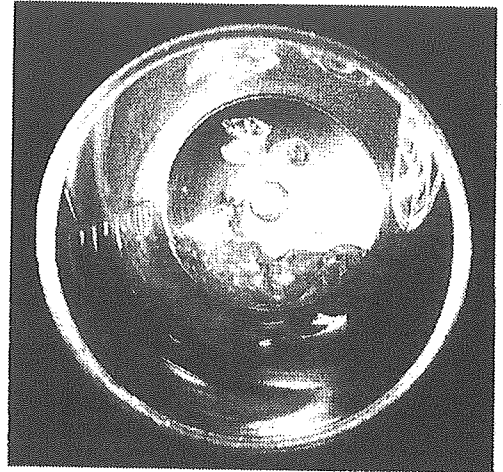
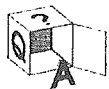


図4 アメーバ赤痢患者でみられた粘血便
(カラー口絵参照)

アメーバ性肝膿瘍の画像所見は一般的に右葉単発が多いとされ、多発する膿瘍を形成する細菌性肝膿瘍との鑑別点として有名である。診断には膿瘍からの細菌培養および栄養体の検出が重要であるが、赤痢アメーバの栄養体は非常に不安定であり、数時間で原虫は死滅し変性するため、検体採取後には速やかな診断が要求される。そのため、当該施設で栄養体の鏡検が困難な場合には、臨床経過および画像所見、血清抗体価で診断するのが望ましい。

なお、抗原検出用のキットはわが国でも入手可能であり、肝膿瘍での高い有効性はすでに証明されている。しかしながら、保険適応はなく、一部の研究機関で保管されているにすぎない。

わが国でのアメーバ症の報告は近年増加しており、細菌性赤痢をここ数年上回っている。

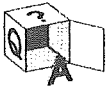


4. 膿瘍穿刺にあたり誤っているもの

解答：①④⑤

アメーバ性肝膿瘍では、抗アメーバ薬の適切な投与を行えば速やかに膿瘍は消失するので、膿瘍へのドレインの留置および膿瘍の洗浄は、通常禁忌である。また、診断を目的とした膿瘍の試験穿刺では、赤痢アメーバの栄養体は膿瘍の壁周囲に多く存在するといわれているので、検体採取時には工夫が必要である。また、腸管外アメーバ症では、感染型の嚢子を形成することはない。

肝膿瘍を含む腸管外アメーバ症の治療は、通常全身化学療法で十分であり、膿瘍内への投与は行わない。また、細菌性肝膿瘍との鑑別には膿汁の細菌培養は必須であるが、アメーバ性肝膿瘍と細菌感染の併発は通常なく、広域抗菌薬の併用は必要ではない。

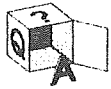


5. 赤痢アメーバ症の治療として誤っているもの

解答：①③

赤痢アメーバ症の第一選択薬はメトロニダゾールの内服であり、現在までに耐性株の報告もない。また、悪心、頭痛、めまいなどが副作用として頻度は高く、アンタビユース様作用を有することが知られている。通常、腸管からの吸収は良好であり、肝膿瘍でも第一選択薬となるが、内服困難な症例では、研究班から注射薬の供給も受けることができる¹⁾。このメトロニダゾール注射薬はデヒドロエメチン注射薬よりも有効性が高く、注射薬としても第一選択となる。

なお、治療後には膿瘍は縮小し、抗体価は治療に伴って低下するが、アメーバ赤痢の症例では、治療後も抗体価が遷延することが知られている。



6. 赤痢アメーバ症・肝膿瘍について

解答：③④⑤

アメーバ赤痢は4類感染症に分類され、診断した医師は7日以内に最寄りの保健所長を經由して都道府県知事に届けなければならない。もちろん、アメーバ性肝膿瘍もこの4類感染症に相当する。また、赤痢アメーバ症は糞口感染であるため不衛生な環境で感染が蔓延しやすく、知的障害者更正施設などでの感染の蔓延拡がり問題になっている。通常、栄養体は経口摂取されたとしても胃酸で死滅するため感染源にはならず、自覚症状のない無症候性のキャリアが排出する嚢子が感染源となりうる。



■参考文献

- 1) 前田卓哉, 今村顕史: 東京都立駒込病院での赤痢アメーバ症例—特集: アメーバ赤痢, 病原微生物検出情報(月報) 24: 81, 2003.
- 2) 小林正規, 今井栄子, 竹内 勤他: わが国における施設内赤痢アメーバ症の現況と問題点—特集: アメーバ赤痢, 病原微生物検出情報(月報) 24: 81-82, 2003.
- 3) 前田卓哉, 小林正規, 竹内 勤他: アメーバ症における血清診断法の検討—特にHA, Dot-ELISA, ELISA法との関連, およびCD4細胞数との関連について, 臨床寄生虫学会雑誌 12: 76-78, 2001.

(前田 卓哉, 小林 正規, 竹内 勤)

赤痢アメーバ原虫

——特異な含硫アミノ酸代謝を創薬につなげる

Entamoeba histolytica — Drug development exploiting its unique sulfur-containing amino acid metabolism

野崎智義 (群馬大学大学院医学系研究科国際寄生虫病生態学)
Tomoyoshi NOZAKI

赤痢アメーバ症のインパクト

アジアの最貧国のひとつバングラデシュでは、30人の子供のうち1人が5歳の誕生日前に下痢性疾患により死んでいる。この事実が開発途上国での赤痢アメーバ症のインパクトを表現するひとつのよい例である。赤痢アメーバ症は世界中のとくに熱帯の開発途上国を中心に年間4,800万人の感染者が存在し、年間の死者数は約7万人と推定されている¹⁾。一方、わが国では主として男性同性愛者間および障害者収容施設において感染例がみられる²⁾。第5類の感染症に指定されており、年間の届け出数は500~600例である。約4年間で10数例の死亡例が報告されている(図1)²⁾。これらの感染例のほとんどは海外渡航歴のない国内感染例であり、浸淫地からの輸入感染例はむしろ少ない傾向にある。これらの国内感染例の多くが男性同性愛者によるものと推定されるが、近年 commercial sex worker の女性にも徐々に感染が広がりつつある。欧米の先進国では男性同性愛者および知的障害者における感染のほとんどが非病原性関連種の *Entamoeba dispar* によるものであり、わが国のように赤痢アメーバの感染がこれらの集団に広く浸淫する状況は他の先進国にはみられず、わが国に固有の状況である。

赤痢アメーバ症とは？

赤痢アメーバは大腸の腸管内に寄生する嫌気性・微好気性の原虫である(図2)。ヒトへの感染

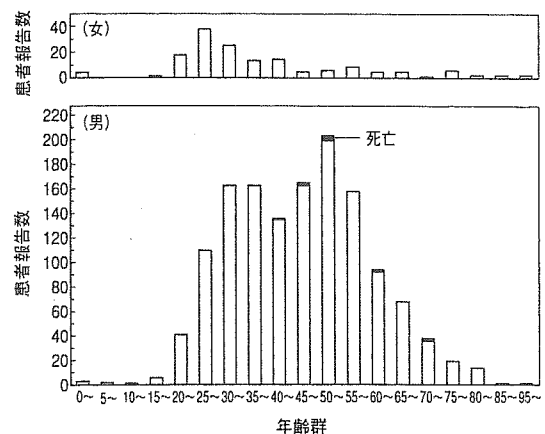


図1 赤痢アメーバ症患者の性別年齢分布 (1999年4月~2002年12月)²⁾

は嚢子(シスト)に汚染した食物や水を口から飲み込むことで起こる。嚢子は小腸で脱嚢して栄養型となり、大腸に達し、直腸、S状結腸、盲腸、上行結腸などの大腸粘膜面に潰瘍性病変を形成する(図3-A)。感染者のすべてが発症するわけではなく、症状を示すのは5~10%とされている。発症すると、粘血便、下痢、テネスマス(しぶり腹)、鼓腸、排便時の下腹部痛などの赤痢症状を示す。また、典型的症例ではイチゴゼリー状の粘血便を排出し、数日から数週間の間隔で増悪と寛解を繰り返す。増悪例では腸穿孔を起こす。また、大腸炎の症状を示すもののうち約5%が腸管外病変を示す。とくに、肝・肺・脳・皮膚などの臓器・組織に膿瘍を形成する。このうち肝膿瘍(図3-B)がもっとも頻繁にみられ、38~40℃の発熱、季肋部痛、嘔気、嘔吐、体重減少、寝汗、全身倦怠を伴う。膿瘍が破裂すると腹膜、胸膜、心外膜にも病

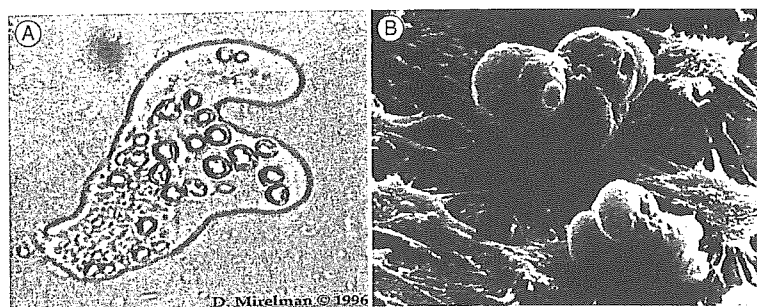


図 2 赤痢アメーバ栄養型の形態像

- A: 赤血球を食した赤痢アメーバの栄養型の光学顕微鏡像
B: 哺乳動物細胞を攻撃する赤痢アメーバ栄養型の走査型電子顕微鏡像

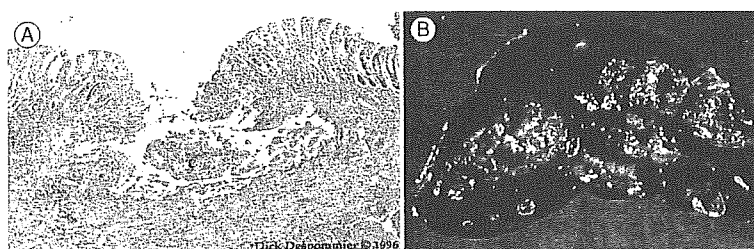


図 3 赤痢アメーバ症の病理像

- A: アメーバ性腸炎の生検検体の組織像、粘膜下に達するフラスコ状潰瘍が認められる。
B: アメーバ性肝膿瘍の病理解剖像、断面に多発性の膿瘍が認められる。

変が形成され、重篤な症状を呈する。大腸内で栄養型は被嚢し、糞便中に排出され、これを別のヒトが経口摂取することにより感染が成立する。

赤痢アメーバ症治療の問題点

赤痢アメーバ症の治療は通常メトロニダゾール(商品名、フラジール®)の経口投与により行われ、有症者への治療効果は高い。しかし、メトロニダゾールは消化管からの吸収がよく、逆に腸管内のシストに対する殺滅効果が低く、施設などを対象としたシストキャリアの集団治療での有効性に問題がある。キャリアの治療の際にはメトロニダゾールとともに、消化管からの吸収が低いとされる無認可のフロ酸ジロキサニドが用いられる。しかし、シストへの殺虫効果が十分に得られない症例が散見される。メトロニダゾールのその他の問題点は *in vitro* で簡単に耐性が獲得されることである³⁾。マラリア原虫・リーシュマニアなどの他の

原虫における耐性株の出現の現状を踏まえると、赤痢アメーバのメトロニダゾール耐性臨床株の出現は時間の問題であると予想されている。赤痢アメーバ同様嫌気的原虫であるトリコモナス原虫では、すでにメトロニダゾール耐性臨床株が報告されている。以上の状況が原虫に特異的に存在する代謝経路を見つけ、それを標的にして合理的な創薬を行うための重要な意義付けとなっている。

寄生における代謝の単純化と特殊化

寄生虫にとってもっとも理想的な寄生形態はいうまでもなく、宿主に不利益を与えずに自己の生存を全うし、つぎの世代を生むことであるから、病気を起こすことは寄生原虫にとって合目的でない。赤痢アメーバも前述のとおり、感染しても多くの場合、大腸の粘膜を破壊したり腸管外に播種したりせず、つまり病気を起こさずにいると考えられている。このような場合は、腸管内で細菌・

真菌などの微生物を食食(ファゴサイトーシス)によって取り込み、これをさまざまな消化酵素で分解して、そこから細胞分裂、増殖、分化に必要な核酸・アミノ酸・脂質・ビタミンなどさまざまな栄養素を獲得している。

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はないため食餌から摂取される。一方、寄生性原虫、たとえばマラリア原虫などをみると、極端に単純化したアミノ酸合成経路しかもっておらず、細菌など独立栄養生物の複雑な代謝経路を限界まで軽量化したものと考えられる⁴⁾。しかし、赤痢アメーバではシステイン、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、リシンなど多くの代謝経路を保存している。これらのアミノ酸代謝のなかでも含硫アミノ酸(硫黄を含んだアミノ酸)の代謝はその起源が哺乳動物と大きく異なるとともに、その生理的役割は重要である。また、同時に本稿のおもな主題でもある創薬の重要な標的として注目されている。

赤痢アメーバと哺乳動物との間での含硫アミノ酸代謝の第1の相違は、赤痢アメーバが無機硫黄からシステインを合成する能力を有している点である。この硫黄同化的システイン生合成経路は哺乳動物に存在せず、系統発生解析によると細菌・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。第2の相違は、赤痢アメーバがシステイン・メチオニンなどの含硫アミノ酸を分解する経路をもつことである。哺乳動物に存在しないこれら2つの経路は、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するわけであり、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。

含硫アミノ酸の生理的重要性

メチオニンは、Sアデノシルメチオニンを介して核酸塩基、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。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。一方、システインは、蛋白質の二次・三次構造の決定、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を合成する基質となる。また、窒素固定・光合成・電子伝達などで重要な働きをする鉄硫黄蛋白質の鉄硫黄クラスター生合成の基質となる⁵⁾。以上のようにこれらの含硫アミノ酸は細胞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含硫アミノ酸は多くの生物にとって有害である。たとえばシスタチオニンβ-シクターゼ欠損によりホモシステインを異化できないホモシスチン血症・尿症は常染色体劣性遺伝形式をとる遺伝的疾患であり、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。これは含硫アミノ酸の代謝調節が生物にとってきわめて重要であることを示す一例である。

赤痢アメーバ原虫における含硫アミノ酸の重要性

赤痢アメーバ・ランブル鞭毛虫・トリコモナスなどの原虫は通常、ヒトの小腸・大腸・膾など比較的嫌気的環境に寄生している。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と考えられている原虫である。ミトコンドリアを進化の過程で二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合成酵素、酸化還元酵素を欠損している⁶⁾。通常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。一方、これらの原虫は代りに高い濃度のシステインをもつ。さらに、赤痢アメーバおよびランブル鞭毛虫はその*in vitro*培養に高濃度のシステイン(~5 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、接着、酸化ストレス応答に必須であることが示されている⁷⁾。

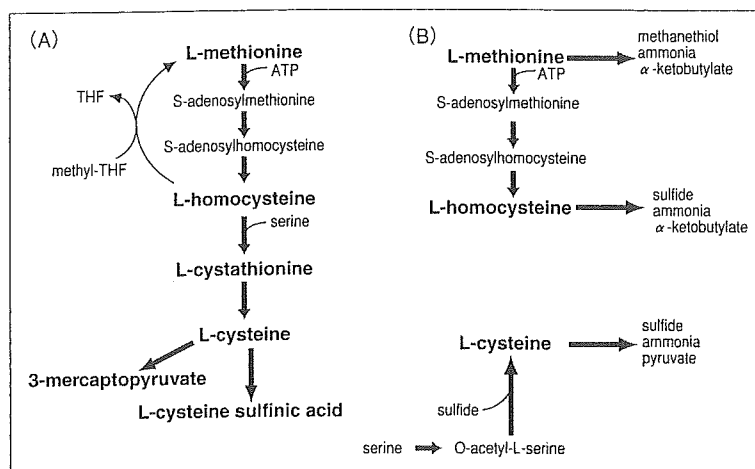


図 4 哺乳動物および赤痢アメーバにおける含硫アミノ酸代謝の相違
 A: 哺乳動物における含硫アミノ酸の代謝経路
 B: 赤痢アメーバにおける含硫アミノ酸の代謝経路

赤痢アメーバ原虫におけるシステイン生成経路の特殊性

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し、ヒトに存在しないことが理想となる。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が必須アミノ酸として食物から摂取される。その後、逆トランスサルフェーション経路とよばれる経路でメチオニンからシステインを生成する(図 4-A)。一方、赤痢アメーバでは逆トランスサルフェーション経路はホモシステインに至る経路までしか機能していない⁸⁾。これは、本経路の中心的役割を果たすシスタチオンβ-シンターゼ、シスタチオンγ-リアーゼが赤痢アメーバに存在しないためである⁴⁾。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。そのか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^{9,10)}。

硫黄同化的システイン生合成経路はその名前の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。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 4)。細菌・酵母・植物では無機硫酸を取り込む輸送体、活性化酵素(ATP スルフィラーゼ、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、さらに最終酵素であるシステイン合成酵素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も硫酸輸送体および還元酵素を除くほとんどが分子レベルで明らかにされている^{4,7-12)}。赤痢アメーバに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、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せず、システイン生合成には貪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⁻)を得ていると考えられる。

原虫におけるシステイン生合成の普遍性と生理的役割

著者らのゲノムデータベース解析によると赤痢アメーバ、ランブル鞭毛虫、トリコモナス、マラ

リア原虫, クリプトスポリジア, トリパノソーマブルセイ, トリパノソーマクルージ, リーシュマニアなどゲノム情報が完備あるいは比較的完全になった原虫のうちで, 赤痢アメーバ, トリコモナス, トリパノソーマクルージの3種の原虫のみが本経路をもっていた⁴⁾. 本経路が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興味深い. 今後の詳細な解析により本代謝経路と寄生適応に伴う生物進化との関係が明らかにされるかもしれない.

赤痢アメーバは嫌気性・微好気性原虫であり, 通常酸素分圧の低い環境に生存している. しかし, フェレドキシンをおもな構成因子とした電子伝達系を利用して微量に存在する細胞内 O_2 を還元し, エネルギー代謝に役立てている. その電子伝達の過程で赤痢アメーバ細胞内にさまざまな酸素ラジカルが生じている. また, 腸管内からいったん哺乳動物の組織に侵入すると高い酸素分圧に曝される. 同時に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曝されている. したがって, 赤痢アメーバはこれらの細胞内外からのさまざまな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. しかし, 前述のように赤痢アメーバには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存在しない. その代り赤痢アメーバではシステインが抗酸化機能の一部を担っている.

著者らは本経路の生理機能を明らかにすることを目的として, システイン生合成経路の主要酵素であるシステイン合成酵素を大量発現する形質転換株を作製した. この株ではチオール濃度が1.7~2.5倍に上昇した. それに伴い, 活性酸素群のうち *in vitro* で殺アメーバ作用を示す過酸化水素に対する感受性が有意に低下した. したがって, 本経路の活性が細胞内チオール濃度と過酸化水素感受性と相関することが示された¹⁰⁾. 以上の結果はシステインあるいはその誘導体が赤痢アメーバ細胞内レドックス調節に関与している可能性を強く示唆している.

システイン合成酵素を標的とした創薬

システイン合成酵素は硫化水素以外のさまざまな分子をアラニル基転移の受容体にする. システイン生合成過程においては受容体はO-アセチルセリンである. 植物においては, 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, ピラゾールなど多くの化合物がアラニル基の受容体となっていることが示されている. これらの化合物はすでに一部抗真菌剤, 除草剤として利用されている. 赤痢アメーバのシステイン合成酵素も *in vitro* で1,2,4-トリアゾール, イソキサゾリン-5-on, 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明らかにされた⁹⁾. これらの化合物をそのまま抗赤痢アメーバ薬剤として用いることは現実的でないが, これらを創薬のシーズとして利用することは十分に可能である.

含硫アミノ酸の分解経路

前述のとおりホモシステインをはじめとする含硫アミノ酸には毒性がある. したがって, 含硫アミノ酸の濃度はその生成だけでなく, 分解によっても厳密に調節されている. 哺乳動物ではメチオニン, ホモシステインは逆サルフェーション経路によりシステインに変換された後, 主としてミトコンドリアにおいてシステインスルフィン酸を経由する異化経路により分解される(図4-A). この反応経路でのキーとなる反応を触媒するシステインジオキシゲナーゼは赤痢アメーバには存在しない. その代り赤痢アメーバはメチオニン・ホモシステイン・システインの分解に関与する酵素(メチオニン γ -リアーゼ)とよばれる珍しい酵素をもつ⁸⁾. メチオニン γ -リアーゼは, メチオニンを基質とした場合には, α -, γ -脱離反応により2-オキソ酪酸, アンモニア, メタンチオールを生成する. システインを基質にした場合には α -, β -脱離反応によりピルビン酸, アンモニア, 硫化水素を生成する. 生成された2-オキソ酪酸はエネルギー代謝などに, 硫化水素はシステインの再合成など