

Acknowledgments: A part of this work was supported by a Health Sciences Research Grant-in Aid for Emerging and Reemerging Infectious Diseases.

LITERATURE CITED

1. Diamond, L. S., and C. G. Clark. 1993. A redescription of Entamoeba histolytica Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from Entamoeba dispar Brumpt, 1925. *J. Eukaryot. Microbiol.* 40(3): 340-344.
2. Diamond, L. S., D. R. Harlow, and C. C. Cunnick. 1978. A new medium for the axenic cultivation of Entamoeba histolytica and other Entamoeba. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 72(3): 431-432.
3. Evangelopoulos, A., G. Spanakos, E. Patsoula, N. Vakalis, and N. Legakis. 2000. A nested, multiplex, PCR assay for the simultaneous detection and differentiation of Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar in faeces. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 94: 233-240.
4. Ghosh, S., M. Frisardi, L. Ramirez-Avila, S. Descoteaux, K. Sturm-Ramirez, O. A. Newton-Sanchez, J. I. Santos-Preciado, C. Ganguly, A. Lohia, S. Reed, and J. Samuelson. 2000. Molecular epidemiology of Entamoeba spp.: Evidence of a bottleneck (Demographic sweep) and transcontinental spread of diploid parasites. *J. Clin. Microbiol.* 38: 3815-3821.
5. Haque R., I. K. Ali, S. Akther, and W. A. Petri Jr. 1998. Comparison of PCR, Isoenzyme Analysis, and Antigen Detection for Diagnosis of Entamoeba histolytica Infection. *J. Clin. Microbiol.* 36: 449-452.
6. Kobayashi, S., E. Imai, A. Haghghi, S. A. Khalifa, H. Tachibana, and T. Takeuchi. 2005. Axenic cultivation of Entamoeba dispar in newly designed yeast extract-iron-gluconic acid-dihydroxyacetone-serum medium. *J. Parasitol.* 91:1-4.
7. Li, E., C. Kunz-Jenkins, and S. L. Stanley Jr. 1992. Isolation and characterization of genomic clones encoding a serine-rich Entamoeba histolytica protein. *Mol. Biochem. Parasitol.* 50(2): 355-357.
8. Petri, W. A. Jr., R. D. Smith, P. H. Schlesinger, C. F. Murphy, and J. I. Ravdin. 1987. Isolation of the galactose-binding lectin that mediates the in vitro adherence of Entamoeba histolytica. *J. Clin. Invest.* 80: 1238-1244.
9. Ravdin, J. I., and R. L. Guerrant. 1982. Separation of adherence, cytolytic, and phagocytic events in the cytopathogenic mechanisms of Entamoeba histolytica. *Arch. Invest. Med.* 13: 123-128.
10. Ritchie, L. S. 1948. An ether sedimentation technique for routine stool examinations.

Bull. U. S. Army Med. Dept. 8: 326.

11. Suzuki, J., S. Kobayashi, R. Murata, Y. Yanagawa, and T. Takeuchi T. 2007. Profile of a pathogenic Entamoeba histolytica-like variant with variations in the nucleotide sequence of the small subunit ribosomal RAN isolated from a primate (De Brazza's Guenon). *J. Zoo Wildl. Med.* 38(3): 471-474.

12. Tachibana, H., X. J. Cheng, S. Kobayashi, N. Matsubayashi, S. Gotoh, and K. Matsubayashi. 2001. High prevalence of infection with Entamoeba dispar, but not E. histolytica, in captive macaques. *Parasitol. Res.* 87: 114-17.

13. Tachibana, H., T. Yanagi, K. Pandey, X. J. Cheng, S. Kobayashi, J. B. Sherchand, and H. Kanbara. 2007. An Entamoeba sp. strain isolated from rhesus monkey is virulent but genetically different from Entamoeba histolytica. *Mol. Biochem. Parasitol.* 153(2): 107-114.

14. Takano, J., T. Narita, H. Tachibana, T. Shimizu, H. Komatsubara, K. Terao, and K. Fujimoto. 2005. Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar infections in cynomolgus monkeys imported into Japan for research. *Parasitol. Res.* 97:255-257.

15. Takano, J., T. Narita, H. Tachibana, K. Terao, and K. Fujimoto. 2007. Comparison of Entamoeba histolytica DNA isolated from a cynomolgus monkey with human isolates. *Parasitol. Res.* 101(3): 539-546.

16. Verweij, J. J., A. M. Polderman, and C. G. Clark. 2001. Genetic Variation among Human Isolates of Uninucleated Cyst-Producing Entamoeba Species. *J. Clin. Microbiol.* 39(4): 1644-1646.

17. Walsh, J. A. 1988. Transmission of Entamoeba histolytica Infection. In: *Amebiasis*. Wiley Medical. John Wiley and Sons, Inc., New York, New York. Pp. 106-126.

18. World Health Organization. 1995. The World Health Report 1995: Bridging the Gaps. 16: 28-29. World Health Organization, Geneva.

19. World Health Organization. 1997. Amoebiasis. *W. H. O. Weekly Epidemiol. Rec.* 72: 97-100. World Health Organization, Geneva.

20. Zaki, M., and C. G. Clark. 2001. Isolation and characterization of polymorphic DNA from Entamoeba histolytica. *J. Clin. Microbiol.* 39(3): 897-905.

CAPTIONS

Figure 1. PCR products of the DNA samples from Entamoeba histolytica, JSK2004 type E. histolytica-like variant (JSK04-Eh-V), and Entamoeba dispar differentiated by multiplex PCR.

Lane 1: mixture of the DNA templates of lanes 2, 3, and 4; Lane 2: DNA of HM-1:IMSScl6 (E. histolytica; length, 475 bp); Lane 3: DNA of JSK2004 clone 2 (JSK2004cl2; JSK04-Eh-V; length, 848 bp); Lane 4: DNA of SAW1734RclAR (E. dispar; length, 195 bp); Lane 5: Human E. histolytica DNA sample (pus from liver abscess); Lane 6: Human E. histolytica DNA sample (stool); Lane 7: JSK04-Eh-V DNA sample (pus from liver abscess) from a Geoffroy's spider monkey; Lane 8: JSK04-Eh-V DNA sample (stool) from a De Brazza's guenon; Lane 9: Human E. dispar DNA sample (stool); and Lane 10: E. dispar DNA sample (stool) from a De Brazza's guenon

Figure 2. Differentiated PCR products of the DNA samples of Entamoeba chattoni and Entamoeba hartmanni using PCRs.

Lane 1: The product (length, 215 bp) from an E. chattoni DNA sample (stool) from a mandrill; Lane 2: The product (length, 215 bp) from an E. chattoni DNA sample (stool) from a Japanese macaque; Lane 3: The product (length, 423 bp) from an E. hartmanni DNA sample (stool) from a Japanese macaque.

Figure 3. Comparison of the chitinase sequences of the E. histolytica-like variant strain JSK2004cl2 and E. histolytica-like variants detected from Ateles geoffroyi and Pithecia pithecia with the sequences of the reference E. histolytica-like variant strain isolated from Macaca fascicularis

JSK2004cl2: The sequence of the chitinase gene of DNA from JSK2004cl2 obtained from a De Brazza's guenon (GenBank accession no. AB426705).

*Samples: The chitinase gene sequences of DNA samples from a Geoffroy's spider monkey (1 pus sample from a liver abscess) and white-faced saki (2 stool samples); EHMfas1: The chitinase gene sequences (GenBank accession no. AB282755) of the DNA of an isolate of another type of E. histolytica-like variant isolated from a cynomolgus monkey.¹⁵

Figure 4. Comparison of the sequences in the SREHP of the E. histolytica-like variant JSK2004cl2 strain with the reference E. histolytica-like variant strains isolated from Macaca fascicularis and Macaca mulatta

JSK2004c12: The sequence of the serine-rich *E. histolytica* protein (SREHP) gene in the DNA of JSK2004c12 from a De Brazza's guenon (GenBank accession no. AB426706); EHMfas1: The sequences of the SREHP gene (GenBank accession no. AB197935) in the DNA of an isolate of another type of *E. histolytica*-like variant isolated from a cynomolgus monkey;¹⁵ P19: The sequence of the SREHP gene (GenBank accession no. AB282662) in the DNA of another type of *E. histolytica*-like variant (an established strain) isolated from a rhesus monkey.¹³

Figure 5. The growth kinetics of the axenically cultured HM-1:IMSSc16, JSK2004c12, AS 16 IR, and CYNO 09:TPC strains in the YIMDHA-S medium.

The mean numbers of amoebae in duplicate cultures have been plotted. YIMDHA-S: Yeast extract-iron-maltose- dihydroxyacetone-serum

Table 2. The results of the surveillance for the prevalence of the JSK2004 type *Entamoeba histolytica*-like variant (JSK04-Eh-V) by a newly designed multiplex PCR and microscopic examination in a zoo of Tokyo, Japan

Primate species	Common name	Number of Positive number by multiplex PCR (Symptoms)				Antigen detection	Microscopic examination
		<i>E. histolytica</i>	JSK04-Eh-V	<i>E. dispar</i>			
Old world monkeys:							
<i>Cercopithecus neglectus</i>	De Brazza's guenon	3	0	1 (Asymptomatic)	2	1	<i>E. coli</i> (3), <i>E. nana</i> (2)
<i>Colobus guereza</i>	Abyssinian colobus	11	0	2 (ALA ^c , Asymptomatic)	2	1	<i>E. coli</i> (8), <i>E. nana</i> (3), <i>G. intestinalis</i> (4)
<i>Macaca fuscata</i>	Japanese macaque	12	0	0	2	0	<i>E. chattoni</i> (7), <i>E. coli</i> (2), <i>E. hartmanni</i> (5)
<i>Mandrillus sphinx</i>	Mandrill	2	0	0	0	0	<i>E. chattoni</i> (1), <i>E. nana</i> (1)
<i>Lemur catta</i>	Ring-tailed lemur	2	0	0	0	0	<i>G. intestinalis</i> (2)
<i>Varecia variegata</i>	Ruffed lemur	2	0	0	0	0	-
<i>Nycticebus pygmaeus</i>	Lesser slow loris	1	0	0	0	0	-
New world monkeys:							
<i>Aotus trivirgatus</i>	Northern night monkey	1	0	0	0	0	<i>C. mesnili</i> (1)
<i>Ateles geoffroyi</i>	Geoffroy's spider monkey	7	0	1 (Colitis)	1	0	-
<i>Pithecia pithecia</i>	White-faced saki	5	0	2 (ALA ^c , Asymptomatic)	1	2	<i>G. intestinalis</i> (1), <i>E. coli</i> (1), <i>E. nana</i> (1)
<i>Saguinus oedipus</i>	Cotton-top tamarin	1	0	0	0	0	-
Total		47	0	6	8	4	

Table 1. Oligonucleotide primers used for PCR assays in present study

Primer name	Primer sequence (5' to 3')	Nucleotide position	Accession no.
EnthF	(forward) ATG GCC AAT TCA TTC AAT GA	198-217	X65163
EnthR	(reverse) TAC TTA CAT AAA GTC TTC AAA ATG T	648-672	X65163
Ehvf	(forward) ATT TTA TAC ATT TTG AAG ACT TTG CA	642-667	AB426549
Ehvr	(reverse) CTC TAA CCG AAA TTA GAT AAC TAC	1466-1489	AB426549
Ehvr2	(reverse) CAG ATT AAG AAA CAA TGC TTC TTC	1052-1075	AB426549
EntdF	(forward) GTT AGT TAT CTA ATT TCG ATT AGA AC	1467-1492	AB282661
EntdR	(reverse) ACA CCA CTT ACT ATC CCT ACC TA	1639-1661	AB282661
EchatF	(forward) AGG ATT TGT TTT ATA ACA AGT TC	471-493	AF149912
EchatR	(reverse) AAT AAC CTT TCT CCT TTT TCT ATC	660-685	AF149912
EhartF	(forward) GTG AAG AGA AAG GAT ATC CAA AGT	221-244	AF149907
EhartR	(reverse) ATA TCA TTT TCA ACT ACG AGC	623-643	AF149907
Chitinase	(forward) GGA ACA CCA GGT AAA TGT ATA	466-487	U78319
Chitinase	(reverse) TCT GTA TTG TGC CCA ATT	799-817	U78319
SREHP	(forward) GCT AGT CCT GAA AAG CTT GAA GAA GC	258-286	M80910
SREHP	(reverse) GGA CTT GAT GCA GCA TCA AGG T	784-806	M80910
R1 (locus1-2)	(forward) CTG GTT AGT ATC TTC GCC TGT	1-21	AF276055
R2 (locus1-2)	(reverse) CTT ACA CCC CCA TTA ACA AT	383-401	AF276055

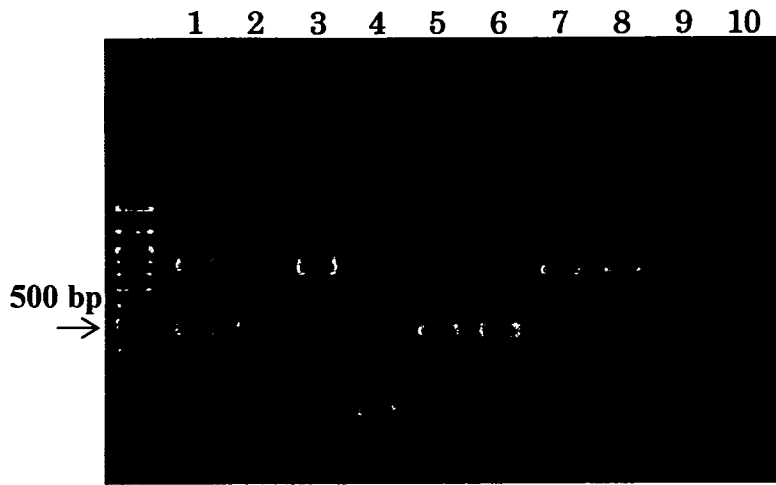


Figure 1.

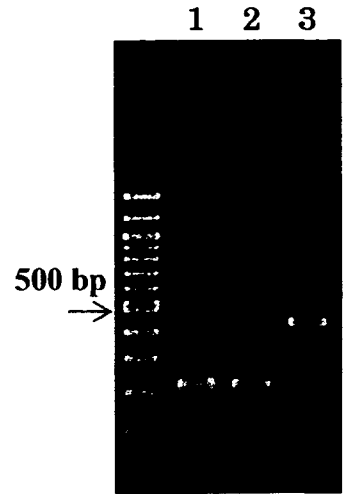


Figure 2.

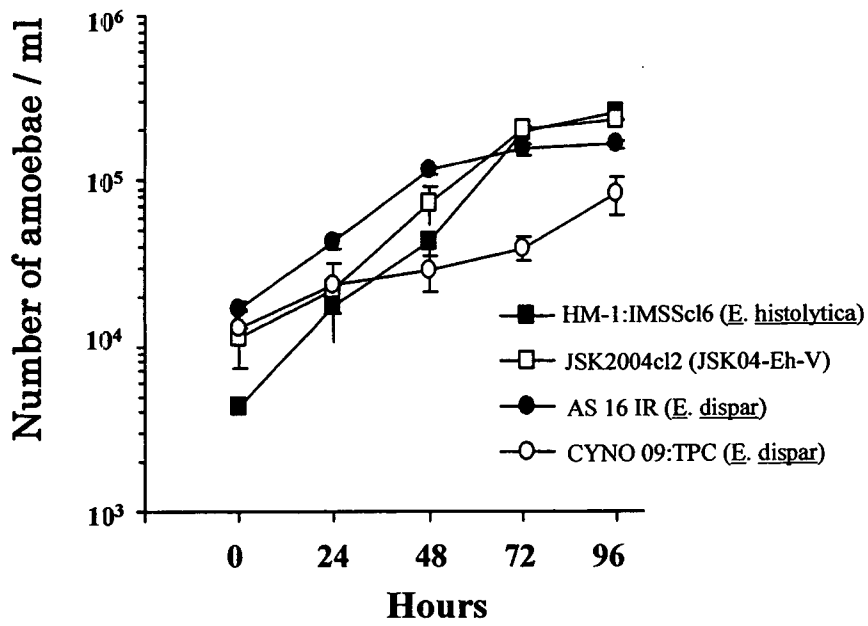


Figure 5.

```

JSK2004c12 GGA ACA CCA GGT AAA TGT ATA GGA GAA ACT GTT TGT AAA TGT GGC AGA ACA CAA TAT AAC
Samples*
EHMfas1 .....

JSK2004c12 CCT TGT GTG TGG AAT TTC CTT GAC CTT CCT GAT TGT GAA AAA AAG CCA GGT GAT TTC TTT
Samples
EHMfas1 .....

JSK2004c12 GAG AAG TCA CCA GAT TCT TCT GAA TCT AAG CAT GAA TCT TCT GAA ATT AAA CCA GAT TCT
Samples
EHMfas1 .....

JSK2004c12 TCT GAA TCT AAA CAT GAA TCT TCT GAA GTT AAA CCA GAC TCT TCT GAA TCT AAA CAT GAA
Samples
EHMfas1 .....G.....

JSK2004c12 TCT TCT GAA GTT AAA CCA GAT TCT TCT GAA TCT AAG CAT GAA TCT TCT GAA GTT AAA CCA
Samples
EHMfas1 .....A.....C.....A.....A.....

JSK2004c12 GAC TCT TCT GAA TCT AAA CAT GAA TCT TCT GAA ATT AAA CCA GAC TCT TCT GAA TCT AAA
Samples
EHMfas1 .....

JSK2004c12 CAT GAA TCT TCT GAG CCA GAA GTT AGT GTC CCA AAG AAA ACA GTT GCT TAT TAT ACT AAT
Samples
EHMfas1 .....

JSK2004c12 TGG GCA CAA TAC AGA AG (GenBank:AB426705)
Samples
EHMfas1 ..... (GenBank:AB282755)

```

Figure 3.

```

JSK2004c12 AAG AAA AAG AAA AAA GTA GCT CAG CAA AAC CAG AAT CAA GTT CAA ACA AAG ATA ATG AAG
EHMfas1
P19 .....

JSK2004c12 ATG AGG AAG ATG AAG ATG AAG ATG ATG AAG AAG ATG AAG ATG AGA ATG AAA AAG CAA GTT
EHMfas1
P19 ..A...-G...A.T.A...G.....

JSK2004c12 CAA GTG ATA AAT CAG AAG CAA GTT CAA GTG ATA AAT CAG A- -AT CAA GCT
EHMfas1
P19 .....C...C...TA ACA AAC CAG A.G...T.

JSK2004c12 CAA ATG ATA AAT CAG AAT CAA GCT CAA ATG ATA AAC CAG AAT CAA GCT CAA ATG ATA AAC
EHMfas1
P19 ...G...C...G...T...G...G...T...G...

JSK2004c12 CAG AAG CAA GTT CAA GTG ATA AAT CAG AAG CAA GTT CAA GTG ATA AAC CAG ATA ACA AAC
EHMfas1
P19 ...-A.C.C...-A.C.C...

JSK2004c12 CAG AAG CAA GTT CAA GTG ATA AAC CAG ATA ACA AAC CAG AAG CAA GTT CAA GTG ATA AAC
EHMfas1
P19 .....C.....C.....

JSK2004c12 CAG ATA ACA AAC CAG AAG CAA GTT CAA GTG ATA AGC CAG ATA ACA AAC CAG AAG CAA GCT
EHMfas1
P19 .....C...A.....T.

JSK2004c12 CAA CTA ATA AAC CAG AAG CAA GTT CAA CTA ATA AAC CAG AAG CAA GTT CAA CTA GTA ATT
EHMfas1
P19 .....

JSK2004c12 CAA -TG ATA AAT CAG AAA GTA GTT CAG ATA ATG ATA ATA ATA (GenBank:AB426706)
EHMfas1
P19 ...A... (GenBank:AB197935)
...A... (GenBank:AB282662)

```

Figure 4.

日本臨牀 65 卷 増刊号 3 (2007 年 3 月 28 日発行) 別刷

新感染症学 下

—新時代の基礎・臨床研究—

感染症学各論

II. 感染症法分類—発症・病態・診断・治療—

五類感染症(全数把握)

赤痢アメーバ症

小林正規 鈴木 淳 竹内 勤

五類感染症(全数把握)

赤痢アメーバ症

Amebiasis

小林正規¹ 鈴木 淳² 竹内 勤¹**Key words** : 赤痢アメーバ, 腸アメーバ症, 抗アメーバ薬

はじめに

感染症発生動向調査(国立感染症研究所)¹⁾による, 我が国の赤痢アメーバ症(五類感染症)の年間届出数は, ここ数年, 連続して顕著な増加傾向を示している[378例(2000年度)~688例(2005年度)]. 報告された症例をみると, 国内感染例が大半を占め, その多くが, 性感染症(男性同性愛者間の感染が依然多数を占めるが, 不特定多数の異性交遊によると推定される感染症例も増加し始めている)による. しかし著者の調査によれば, 各種施設内にも集団感染と思われる例がかなり多くみられる.

赤痢アメーバ(*Entamoeba histolytica*)の病原性は, 栄養型が大腸粘膜上皮へ接着, 侵入, 増殖することに起因する. 病型には腸アメーバ症[アメーバ赤痢, アメーバ性大腸炎, 結節状病変(ameboma)など], 腸管外アメーバ症[アメーバ性膿瘍(肝, 肺, 脳など), 皮膚アメーバ症など]があるが, 実際には無症候性の持続性感染も多く, 発症には赤痢アメーバ株の virulence, 腸内環境や宿主免疫因子などが絡み合って影響していると考えられる. 赤痢アメーバの病原因子については, 栄養型の腸粘膜への接着, 細胞融解や組織内侵入を容易にする蛋白[GalNAc adherence lectin, amoebapores, cysteine pro-

teinases]²⁾などが分子生物学的研究により, 同定されてきている. また, 遺伝子多型の解析からは個々の株の遺伝子の識別が可能となってきた³⁾. 集団感染がみられた知的障害者更生施設5施設のうち, 異なる遺伝子多型のパターンを示した3施設から分離した株について, ハムスターでの肝膿瘍形成能を指標とした virulence 比較実験を行った結果からは, 赤痢アメーバ株の中に, 臨床的にも無症候で virulence も極めて弱い株が見いだされており⁴⁾, 赤痢アメーバ株間の virulence の違いについても言及ができるようになってきている.

本稿では, 赤痢アメーバの本来の寄生部位であり, 感染力のある嚢子排出を伴う腸アメーバ症に焦点を絞り, 赤痢アメーバのマウス持続性感染モデルの病理と治療実験, および治療に困難が伴った施設内集団感染の治療成績など, 著者らの最近の調査研究所見に集中して記載する.

1. 腸アメーバ症

a. 腸アメーバ症における感染部位と無症候性持続感染

Clark⁵⁾はパナマ運河地帯で18年間にわたり, アメーバ赤痢死亡患者解剖例186例について, マクロ病理組織学的に統計的観察を行った. その結果, 潰瘍が局在性を示した63例の潰瘍形

¹Seiki Kobayashi, Tsutomu Takeuchi: Department of Tropical Medicine and Parasitology, School of Medicine, Keio University 慶應義塾大学医学部 熱帯医学・寄生虫学 ²Jun Suzuki: Department of Microbiology, Tokyo Metropolitan Institute of Public Health 東京都健康安全研究センター 微生物部

成好発部位は、盲腸(87.3%)、上行結腸(57.1%)、直腸(39.6%)、S字状部(33.3%)、虫様突起(33.3%)と、糞便停滞部位に潰瘍性病変ができやすいことを報告している。赤痢アメーバの持続性感染は極めて興味ある感染状況であるが、実験的に C3H/HeJ マウスを用いた持続感染モデル⁶⁾においても、糞便が最も停滞する盲腸に限局することが知られている。このような長期持続感染メカニズムの解析を目的とした著者らのマウス感染実験結果からは、外見上は無症状でも、病理組織学的には、粘膜上皮へ接着して増殖する栄養型、多数の栄養型が付着する剥離した粘膜上皮細胞、細胞剥離に伴うびらん、出血や粘膜の肥厚など、慢性的な大腸炎所見が観察されている。また、実験を通じて、明らかな潰瘍形成はみられなかったが、限局性の結節状病変(ヒトにおける amoeboma に類似の病変)がみられた(頻度は低い)。

Houpt ら⁶⁾によれば、無菌培養した赤痢アメーバ栄養型をいったん、ある特定の腸内細菌群と培養した後、マウス盲腸に接種した場合の栄養型の定着率は 60% 程度であり、感染成立には、下記の 3 つの因子に大きく影響を受けるとしている。すなわち、①マウスの感染感受性、②赤痢アメーバ株の virulence、③盲腸内での増殖、粘膜上皮への接着を助長する、ある group の細菌種の存在である。ヒトの場合でも、自然感染抵抗性に赤痢アメーバの接着因子(GalNAc adherence lectin)に対する IgA 抗体が関与することがバングラデシュの疫学調査をもとに報告されている⁷⁾。また、無症候性持続感染が多いベトナムの流行地において、無作為に抽出された赤痢アメーバ感染者 383 人を対象に、遺伝子多型解析(finger print 法)手法を用いて、同じ遺伝子パターンを示す株の感染持続期間についての追跡調査が行われた⁸⁾。その結果、15 カ月後には感染持続率は 50% にまで低下することが示され、特徴的な病態である無症候性感染の種々の病態生理学的な側面が明らかになって来つつある。

b. 腸アメーバ症の治療の進歩

1) Metronidazole

metronidazole は腸粘膜から組織内に吸収されやすく、組織内アメーバには著効を示すが、腸管腔内に寄生するアメーバには効果を期待しにくい薬剤である。ただし、赤痢アメーバ感染の場合、投与量の増量、長期間投与、そして腸管内アメーバに有効な抗生剤を併用することなどで、治癒する腸アメーバ症例が多いことも経験的に知られている。

2) Paromomycin (luminal drug)

paromomycin は経口投与された場合、腸粘膜組織に吸収されにくい抗アメーバ薬で、腸管腔内の赤痢アメーバ栄養型に有効な luminal drug である。従来、輸入治験薬(厚生労働省科学研究費補助:「熱帯病に対するオーファンドラッグ開発研究」班供給)として有用であった luminal drug の diloxanide furoate が現在、製造中止であるため、同等の効果が期待される paromomycin が、治験薬として輸入されることとなった経緯がある。次に述べるように無症候性持続性感染の治療にはこのような luminal drug が必須のものと著者らは考えている。

c. 施設内赤痢アメーバ集団感染の治療

多くが無症候性持続性感染の形を取る施設内赤痢アメーバ感染の集団治療には、最終的に metronidazole(1.5g/日×10日)投与に引き続いて、diloxanide furoate(1.5g/日×10日)の投与が有効であることを著者らは見いだしている。以下にこのような感染を終息させることができた知的障害者更生施設内集団感染例について紹介する。調査対象となったある施設では、感染者に約 1 年間、適切な間隔を置いて繰り返された metronidazole 単剤の治療では、糞便から赤痢アメーバ嚢子や赤痢アメーバ特異抗原(GalNAc adherence lectin) [*E. histolytica* II kit (TechLab, VA, USA) により検査]は一時的に消失するが、3 カ月後には行動範囲が広く、かつ便弄癖を有する利用者の周辺から感染の拡大が再び確認され、血清抗体価(ELISA 法⁹⁾)は下降することなく、かえって上昇傾向を示した(図 1-a)。抗体価上昇の原因としては、治療に

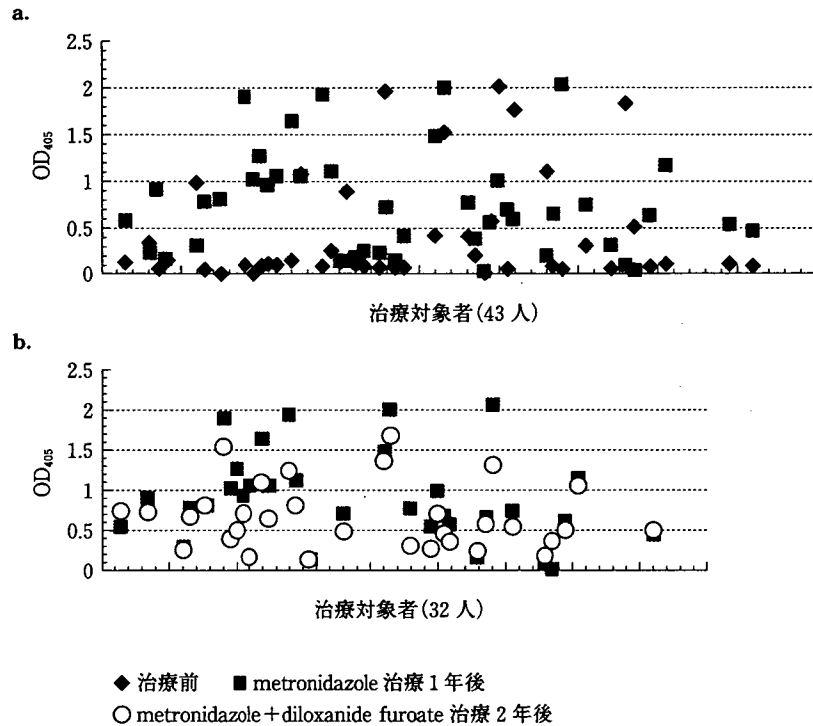


図 1 施設内赤痢アメーバ集団感染治療における metronidazole 単独, および metronidazole と diloxanide furoate 併用投与後の血清抗体価 (ELISA 法) の変動

糞便検査および血清学的検査陽性者における metronidazole 投与前と投与後 (a), および引き続き実施された metronidazole と diloxanide furoate 併用投与後 (b) の, 治療対象者 (横軸) 個々についての赤痢アメーバ血清抗体価 (ELISA 法) (縦軸) の変動を示している。

より破壊された赤痢アメーバ栄養型から抗原成分が曝露されたことに加え, 生残あるいは再感染した赤痢アメーバが抗原刺激となったことなどが考えられる。そのため, metronidazole と luminal drug である diloxanide furoate の併用投与療法が採用され, その結果, 現在 4 年近くを経過するが, 定期的実施された集団検査からは, 1 例の赤痢アメーバ感染も確認されておらず, 血清抗体価も徐々にではあるが減少傾向を示している (図 1-b)。この結果は, 便弄癖のある知的障害者を含む集団生活者という高い感染のリスクを有するグループの持続性感染の治療に metronidazole と luminal drug の併用投与が有効であったことを示すとともに, 感染終息にも有効であることを示した。

d. 赤痢アメーバ腸管持続感染マウス (C3H/HeJ) モデルを用いた metronidazole 治療実験

予備的ではあるが, 赤痢アメーバ感染 (盲腸) C3H/HeJ マウスを用いて, 異なる 2 つの投与方法 (経口および腹腔投与) により, metronidazole 投与 (12.5 mg/kg × 7 日: 腸管アメーバ症に適応される最少投与量) を行った治療実験結果 [*E. histolytica* II kit (TechLab, VA, USA) により評価] からは, 腸管腔内アメーバに直接作用しにくい腹腔投与群の治癒率 (75%) の方が, 経口投与群の治癒率 (33%) よりも高いことが示された。腹腔投与した metronidazole の作用機序として, 吸収された metronidazole がマウス腸管腔内の腸粘膜上皮に接着, 増殖している栄

養型に対して、粘膜上皮の組織側から作用した可能性と腸管腔内のアメーバについては便とともに自然排出した可能性が示された。

e. 腸内嫌気性菌の赤痢アメーバ増殖促進効果

赤痢アメーバの増殖促進効果をもつ、腸内嫌気性菌群 (*Clostridium symbiosum*; ATCC 14940 など¹⁰⁾ が分離されて以来、赤痢アメーバや非病原性の *Entamoeba dispar* の monoxenic culture のための共棲細菌としても応用されてきた^{11,12)}。著者らも繰り返しの metronidazole 治療により、治癒しなかった腸アメーバ症患者の便から分離した *Bacteroides fragilis* に、類似の赤痢アメーバ増殖促進効果を見いだした。更に、この分離した *B. fragilis* 株とともに赤痢アメーバ栄養型をマウス盲腸に passage することで盲腸での増殖適応性を高めた再分離培養株を、あらかじめ感染7日前より2日ごとに3回経口的に *B. fragilis* を投与した C3H/HeJ マウスに、*B. fragilis* とともに、マウス盲腸に接種すると赤痢アメーバの盲腸内持続感染率が大きく上昇することも見いだしている。

また *B. fragilis* を含め腸内嫌気性菌の多くは、metronidazole に感受性があり、これら嫌気性菌に metronidazole が代謝され、薬剤効率の低下をもたらす可能性が考えられている。更に、赤痢アメーバ自身の metronidazole 代謝も、細菌の代謝に影響を受けやすい腸内環境では、組織内環境と比べ metronidazole 感受性が低下している可能性がある。実際、*in vitro* 薬剤感受性試験において、赤痢アメーバの metronidazole 感受性は細菌共棲条件下では無菌条件下に比べ2~3倍程度低下する。

2. 腸赤痢アメーバ感染から腸管外アメーバ症へ

スナネズミ盲腸に virulence の高い赤痢アメーバ栄養型 (10^6 個~) を接種すると、速やかに組織に侵入し、潰瘍を形成する。多くの場合、10日以内に劇症の大腸炎により死に至るが、25日以上生存すると、門脈を経て転移した栄養型による肝膿瘍形成がみられる。この時期、

興味あることに腸管内から栄養型は消失し、潰瘍も治癒する。ヒトの場合でも赤痢アメーバ栄養型や嚢子が糞便内から検出されず、腸の原発病巣も確認されない、アメーバ性肝膿瘍や脳膿瘍症例をみることがある。

C3H/HeJ マウスとスナネズミの赤痢アメーバに対する感染感受性の違いは主に免疫システムの違いによると考えられるが、T-cell と B-cell の産生が抑制される免疫不全の rag 遺伝子ノックアウトマウス (C3H rag^{-/-}) で行った著者らの感染実験からは、盲腸に赤痢アメーバの感染を成立させることができず、液性・細胞性免疫の代償的に働く免疫系 (natural killer cell など) が感染排除へ働いた可能性が考えられた。ヒトの場合でも免疫不全者に合併したアメーバ症が必ずしも重症化しないことが知られているが、他方潰瘍性大腸炎、癌、白血病などに合併した赤痢アメーバ症患者が、副腎皮質ステロイドや抗癌剤投与後、重症化することや妊娠によって症状が増悪することも知られており、ヒトのアメーバ症の臨床免疫学的側面は今後とも検討が必要である。少なくとも、現時点では免疫能の低下や免疫抑制する治療がアメーバ症を増悪させる可能性があることには注意が必要である。

おわりに

赤痢アメーバ症は無症候性感染から致死的な劇症型まで病態は多様であり、また他の疾病との合併症例もあるため診断と治療には注意を要する。我が国における赤痢アメーバ症は、一般に比較的限られた population (便弄癖者、男性同性愛者、不特定多数を相手とする男性および女性風俗従事者と客) が感染ハイリスクグループである。感染は嚢子排出を伴う赤痢アメーバ腸持続性感染者が原因となることが強く示唆されるため、このようなハイリスクグループを対象とした定期検査を行うことで、実際の感染の動向の把握と予防ができる可能性がある。腸アメーバ症治療には流行の終息のためにも metronidazole と luminal drug の併用投与が望ましく、引き続き paromomycin などの luminal drug の安定した供給が望まれる。

■ 文 献

- 1) 国立感染症研究所: IDWR; 感染症情報センター 感染症報告数一覧. (<http://idsc.nih.go.jp/idwr/ydata/report-Ja.html>)
- 2) Ramakrishan G, Petri WA Jr: Pathogenesis and molecular biology. In: Amebiasis (ed by Ravdin JI), p91-112, Imperial College Press, London, 2000.
- 3) Haghghi A, et al: Remarkable genetic polymorphism among *Entamoeba histolytica* isolates from a limited geographic area. J Clin Microbiol 40: 4081-4090, 2002.
- 4) Nozaki T, et al: Diversity of clinical isolates of *Entamoeba histolytica* in Japan. Arch Med Res 37: 276-278, 2006.
- 5) Clark HC: The distribution and complications of amoebic lesions found in 186 postmortem examinations. Am J Trop Med 5: 157, 1925.
- 6) Houpt ER, et al: The mouse model of amebic colitis reveals mouse strain susceptibility to infection and exacerbation of disease by CD4+ T cells. J Immunol 169: 4496-4503, 2002.
- 7) Haque R, et al: Amebiasis and mucosal IgA antibody against the *Entamoeba histolytica* adherence lectin in Bangladeshi children. J Infect Dis 183: 1787-1793, 2001.
- 8) Blessman J, et al: Longitudinal study of intestinal *Entamoeba histolytica* infections in asymptomatic adult carriers. J Clin Microbiol 41: 4745-4750, 2003.
- 9) Takeuchi T, et al: Application of a micro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detection of anti-amebic antibody in various forms of amebic infection. Jpn J Exp Med 58: 229-232, 1988.
- 10) Shaffer JG, Frye WW: Studies on the growth requirements of *Entamoeba histolytica*. I. Maintenance of a strain of *E. histolytica* through one hundred transplants in the absence of an actively multiplying bacterial flora. Am J Hyg 47: 214-221, 1948.
- 11) Diamond LS: A new liquid medium for xenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other lumen-dwelling protozoa. J Parasitol 68: 958-959, 1982.
- 12) Vargas MA, et al: Non-pathogenic *Entamoeba histolytica*: functional and biochemical characterization of a monoxenic strain. Mol Biochem Parasitol 40: 193-201, 1990.

日本臨牀 65 卷 増刊号 3 (2007 年 3 月 28 日発行) 別刷

新感染症学 下

—新時代の基礎・臨床研究—

感染症学各論

III. 微生物の病原因子

腸管寄生原虫の病原因子

所 正治 仲本賢太郎

腸管寄生原虫の病原因子

Pathogenesis and virulence factors associated
with intestinal protozoan parasites

所 正治 仲本賢太郎

Key words : 腸管寄生原虫, 病原因子, ジアルジア, クリプトスポリジウム, 赤痢アメーバ

はじめに

ヒトの腸管に寄生し病原性を示す原虫としては多くの種が知られている(表1)。各原虫は、特異な寄生部位・寄生様式・生活環をもち、様々なレベルの下痢症状を主徴とする多様な病像をもたらす。例えば腸管腔内寄生原虫のうち腸管壁へ侵入し血便を生じるのは赤痢アメーバと大腸バランチジウムのみであり、他の原虫性下痢症では血便を認めないのが普通である。また、ともに小腸寄生性のジアルジア、クリプトスポリジウム、イソスポーラ、サイクロスポーラのうち、腸管腔内に寄生し組織侵入性を一切示さないジアルジアと粘膜上皮細胞内において発育するそれ以外の種とでは、異なる病原性のメカニズムが示唆されている。一方、プラストシスチスは下痢症患者における高い感染率が報告されているが病原性に関しては不明な点が多い。

本稿では、これら多彩な原虫のうち比較的研究の進んでいる、赤痢アメーバ、ジアルジア、クリプトスポリジウムの3種の原虫を中心に近年の分子生物学的研究の進展とともに明らかにしてきた病原因子を網羅的に記載する。

1. 接着・定着に関する因子

他の宿主において高い病原性を示す寄生原虫

であっても、ヒトへ定着できなければ基本的にはヒトに対する病原性は生じない。つまり、広義には宿主特異的な接着・定着はヒトに対する病原因子の一端を担う。このようなヒト細胞への特異的接着・定着因子は、下痢症状を示す原虫症においてばかりでなく、腸管を侵入経路として感染し横紋筋での炎症や癒着性線維化を生じるヒトを終宿主としないタイプの肉胞子虫の偶発感染のような原虫症においても重要である。いずれにせよ腸管内でシストやオーシストから脱囊した原虫がヒトに感染するためには、まずムチンおよび分泌型IgAを含む粘膜バリアー、更に細胞外マトリックスを突破し、腸管上皮細胞へ付着あるいは侵入しなければならない。

a. 赤痢アメーバ

赤痢アメーバにおいては、粘膜上皮細胞に対するムチン過剰分泌の誘導(結果としてムチンの枯渇を誘導)¹⁾や、栄養型から外分泌され細胞外マトリックスを分解する様々な分解酵素(コラゲナーゼ²⁾やシステインプロテアーゼ³⁾)が、粘膜バリアー突破に有効に働き、ガラクトースおよびアセチルガラクトースに特異的に結合するレクチンによって宿主細胞の細胞膜に接着する⁴⁾。

b. ジアルジア

ジアルジアでは、腸管壁へ接着するための吸

表1 病原性腸管寄生原虫一覽

寄生様式	種名	宿主	感染部位	
			腸管	腸管外
腸管腔内	赤痢アメーバ <i>Entamoeba histolytica</i>	ヒト・類人猿	大腸(浸潤)	肝・肺・脳
	ジアルジア(ランブル鞭毛虫) <i>Giardia intestinalis</i>	ヒト・哺乳類	小腸	胆管・胆嚢
	ヒトプラストシスチス <i>Blastocystis hominis</i>	ヒト	大腸	—
	腸トリコモナス <i>Pentatrichomonas hominis</i>	ヒト	大腸	—
	大腸バラランチジウム <i>Balantidium coli</i>	ヒト・ブタ・サル	大腸	—
	腸管上皮細胞内	クリプトスポリジウム <i>Cryptosporidium parvum/hominis</i>	ヒト・哺乳類 /ヒトのみ	小腸
戦争イソスポーラ <i>Isospora belli</i>		ヒト	小腸	—
サイクロスポーラ <i>Cyclospora cayetanensis</i>		ヒト	小腸	—
肉胞子虫 <i>Sarcocystis hominis/suihominis</i>		ヒト(中間宿主: ウシ/ブタ)	小腸	—

着円盤が栄養型細胞の腹面にあり、腹部鞭毛の運動による陰圧を利用した宿主腸管内皮細胞への物理的接着の可能性が論じられている⁹⁾。更にマンノースに特異的に結合する栄養型表面のレクチンを介した宿主腸管上皮細胞との結合が知られている⁹⁾。

c. 接着・定着によって誘導される病原性

腸管腔における常在細菌叢がヒトに対する病原性を示さないのと同様、腸管寄生原虫においても腸管腔への寄生自体は必ずしも病原性とは結びつかない。

例えば、非病原性の赤痢アメーバとして知られる *Entamoeba dispar* は、病原性赤痢アメーバ以上にしばしば臨床検体から見いだされ腸管内での定着が確認されているが、有症例は報告されておらず抗アメーバ薬による治療も不要とされている。病原性の赤痢アメーバについても組織に侵入せずに栄養型が腸管内に定着しているシストキャリアの存在が知られているが、通常この場合は無症状である。

また、ジアルジア症では非病原性と病原性を

分けるジアルジアの遺伝子型の違いや宿主因子は不明ではあるものの、大部分が無症候性持続感染となり、感染すなわち発症とはならない。一方、ジアルジアは組織内への侵入を見ないにもかかわらず、腹痛、腹部膨満感、嘔気、嘔吐、食欲不振、微熱、頭痛、目眩、脂肪便、乳糖不耐症、吸収不良症候群、そして特に小児で問題となる低栄養の原因と目されている。

組織学的には、粘膜固有層への炎症細胞、好酸球の広範な浸潤、腸絨毛の平坦化と萎縮が認められ、ジアルジアの腸管壁への接着による物理的な吸収のブロック、機械的な刺激、宿主免疫、特にT細胞およびサイトカイン関連の炎症反応、栄養型から分泌される蛋白分解酵素の関与など様々な原因が複合的にこれらの変化をもたらす可能性が指摘されてきた⁷⁾。

また、近年の培養細胞を用いた研究からは、更に栄養型の接着によって誘導される腸管上皮細胞における膜透過性の亢進⁹⁾、アポトーシスの誘導による腸管上皮細胞自体と細胞間隙の破壊⁹⁾、宿主細胞の細胞骨格の再構築¹⁰⁾などが腸

管上皮細胞そのものの消化吸収機能を阻害する可能性が示唆されている。

2. 腸管上皮細胞および粘膜固有層への侵入

細胞内寄生原虫においては、腸管上皮細胞内は原虫の生活環における定着増殖の場である。侵入によって原虫は宿主細胞質から増殖のための栄養分を確保し、同時に宿主免疫による排除から逃れることが可能となる。一方、赤痢アメーバのような病原性原虫による組織侵入が原虫にとってどのような利点をもつのかは明らかではない。ただ、肝・肺・脳などにおける膿瘍形成をもたらす腸管外アメーバ症の病原因子として組織への侵入因子は重要である。

a. クリプトスポリジウム

クリプトスポリジウムなどの細胞内寄生原虫では宿主細胞への接着・侵入は、アピカルコンプレックスと呼ばれるスポロゾイトの先端部の構造に発現する糖蛋白質と宿主細胞膜上のレセプターの結合¹³⁾により始まり、次いでアクチンなどの構造蛋白質の再重合・再構築によって誘導される運動性によって宿主細胞へ侵入し¹²⁾、宿主細胞内に形成される寄生体胞 (parasitophorous vacuole) の内部に定着する。

b. 赤痢アメーバ

宿主細胞の細胞膜に接着した赤痢アメーバの栄養型は、膜透過性に変性をもたらすアメーバポア (amebapore) と呼ばれる少なくとも 3 種の短鎖のペプチドを分泌し、接触性の細胞融解を誘導する¹³⁾。死に瀕した宿主細胞からは IL-1 β の前駆体 (pIL-1 β)、IL-1 β 、IL-8 および cyclooxygenase-2 などの炎症性メディエーターが放出され、感染局所への好中球およびマクロファージの遊走を含む宿主免疫応答が誘導される¹⁴⁾。また、栄養型から分泌されるシステインプロテアーゼは pIL-1 β から IL-1 β への変換をも触媒し¹⁵⁾、更にこの効果を高め、細胞外マトリックスの崩壊とともに局所の腸管上皮細胞の脱落・崩壊を誘導し、栄養型の粘膜下固有層への浸潤を可能とする。

c. 腸管上皮細胞および粘膜固有層への侵入による病原性

クリプトスポリジウムの腸管上皮細胞内 (微絨毛内) への侵入によって起こる組織学的な変化としては、陰窩過形成、絨毛の平坦化や融合が知られているが、機能面への影響としては、上皮表面積の減少に伴う粘膜結合性の消化酵素の喪失に伴う栄養素および電解質吸収能の障害が指摘されている¹⁶⁾。一方、下痢症の原因としては、クリプトスポリジウムが産生するエンテロトキシン様の物質が腸上皮細胞の Cl⁻分泌を亢進させ¹⁷⁾、また、上皮細胞間の細胞間隙の崩壊によって分泌性の下痢を誘導する可能性¹⁸⁾などが報告されてきた。一方、赤痢アメーバ感染においては、いったん粘膜固有層に侵入した栄養型は、局所に遊走してきた好中球に対しても接触性細胞融解作用による脱顆粒を誘導し、更なる炎症局面拡大をもたらす。このように、赤痢アメーバ症においては宿主免疫による炎症作用が病原性を考えるうえでの重要なファクターの一つと考えられている。また、粘膜組織下へ侵入した赤痢アメーバは血行性に多臓器への播種が可能となり多彩な腸管外アメーバ症を引き起こすが、そのメカニズムは不明である。

おわりに

クリプトスポリジウム症にみられるような 1 日数リットルに及ぶ激しい下痢症は果たして宿主の防御反応なのか、あるいはオーシストの播種によって次世代の感染を広げていくタイプの本原虫において、何らかの未同定の病原因子が進化的に選択された結果として病原性を発達させてきたのか。このように基本的だが治療法の選択に直接関係し得る重要な疑問点への解答を我々はまだ手にしていない。しかしながら本稿に示したように、分子生物学的な研究手法による病原因子の詳細な研究は、短い期間に実に数多くの事実を明らかにしてきた。今後の研究成果の蓄積により、感染症の予防・治療に貢献し得るものと期待している。

 ■ 文 献

- 1) Chadee K, et al: Mucin and nonmucin secretagogue activity of *Entamoeba histolytica* and cholera toxin in rat colon. *Gastroenterology* 100(4): 986-997, 1991.
- 2) Serrano JJ, et al: *Entamoeba histolytica*: electron-dense granule secretion, collagenase activity and virulence are altered in the cytoskeleton mutant BG-3. *Mol Microbiol* 11(4): 787-792, 1994.
- 3) Navarro-Garcia F, et al: *Entamoeba histolytica*: increase of enterotoxicity and of 53- and 75-kDa cysteine proteinases in a clone of higher virulence. *Exp Parasitol* 80(3): 361-372, 1995.
- 4) Petri WA Jr: Recent advances in amebiasis. *Crit Rev Clin Lab Sci* 33(1): 1-37, 1996.
- 5) Holberton DV: Attachment of *Giardia*—a hydrodynamic model based on flagellar activity. *J Exp Biol* 60(1): 207-221, 1974.
- 6) Inge PM, et al: Attachment of *Giardia lamblia* to rat intestinal epithelial cells. *Gut* 29(6): 795-801, 1988.
- 7) Farthing MJ: Diarrhoeal disease: current concepts and future challenges. Pathogenesis of giardiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 87(Suppl 3): 17-21, 1993.
- 8) Scott KG, et al: Intestinal infection with *Giardia* spp. reduces epithelial barrier function in a myosin light chain kinase-dependent fashion. *Gastroenterology* 123(4): 1179-1190, 2002.
- 9) Chin AC, et al: Strain-dependent induction of enterocyte apoptosis by *Giardia lamblia* disrupts epithelial barrier function in a caspase-3-dependent manner. *Infect Immun* 70(7): 3673-3680, 2002.
- 10) Teoh DA, et al: *Giardia lamblia* rearranges F-actin and alpha-actinin in human colonic and duodenal monolayers and reduces transepithelial electrical resistance. *J Parasitol* 86(4): 800-806, 2000.
- 11) McDonald V, et al: Localization of parasite antigens in *Cryptosporidium parvum*-infected epithelial cells using monoclonal antibodies. *Parasitology* 110(Pt 3): 259-268, 1995.
- 12) Sibley LD: Intracellular parasite invasion strategies. *Science* 304(5668): 248-253, 2004.
- 13) Leippe M, Herbst R: Ancient weapons for attack and defense: the pore-forming polypeptides of pathogenic enteric and free-living amoeboid protozoa. *J Eukaryot Microbiol* 51(5): 516-521, 2004.
- 14) Stanley SL Jr: Amoebiasis. *Lancet* 361(9362): 1025-1034, 2003.
- 15) Zhang Z, et al: *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases with interleukin-1 beta converting enzyme (ICE) activity cause intestinal inflammation and tissue damage in amoebiasis. *Mol Microbiol* 37(3): 542-548, 2000.
- 16) Buret AG, et al: Infection of human and bovine epithelial cells with *Cryptosporidium andersoni* induces apoptosis and disrupts tight junctional ZO-1: effects of epidermal growth factor. *Int J Parasitol* 33(12): 1363-1371, 2003.
- 17) Guarino A, et al: Human intestinal cryptosporidiosis: secretory diarrhea and enterotoxic activity in Caco-2 cells. *J Infect Dis* 171(4): 976-983, 1995.

日本臨牀 65 卷 増刊号 3 (2007 年 3 月 28 日発行) 別刷

新感染症学 下

—新時代の基礎・臨床研究—

感染症学各論

II. 感染症法分類—発症・病態・診断・治療—
五類感染症(全数把握)

クリプトスポリジウム症

井関基弘 所 正治