

微生物側の要因

赤痢アメーバの病原性

TOKORO MASAHARU

所 正治

◎金沢大学大学院医学系研究科寄生虫感染症制御学

はじめに

従来赤痢アメーバとされた原虫は、病原性の *Entamoeba histolytica* と非病原性の *E. dispar* の 2 種類に分類される。これら 2 種のアメーバは、シストおよび栄養型の顕微鏡検査による鑑別が困難なため、すでに 1925 年にプラントによって、その可能性が示唆されていたにもかかわらず、1978 年のサージェントなどのザイモデームによる再評価をきっかけとして議論され、ようやく 1997 年になって別種として分類されることになった。

E. dispar 感染では、重症 AIDS 患者らの易感染性宿主においても病原性を示唆する報告はないため、治療の必要はない。一方、*E. histolytica* 感染においてもまた、すべてが発症するわけではなく、多くの無症候性シストキャリアの存在が知られている。しかしながら、*E. histolytica* 感染時の取扱いは *E. dispar* とは異なり、基本的に全例が治療の適応である。これは、シストキャリアの約 10% が 1 年以内に発症する¹⁾ため、したがって、ザイモデーム、PCR、便中抗原の検出などによる *E. histolytica* の同定が重要となる。

では、*E. histolytica* による感染において無症候性シストキャリアの一部が、アメーバ赤痢(腸アメーバ症)を発症し、そして、また一部が血行性に肝膿瘍、脳膿瘍、肺膿瘍などの腸管外アメーバ症を発症するのは、いかなる理由によるのだろうか。

表 1 赤痢アメーバ症の病型

- | |
|---|
| 1. 無症候性赤痢アメーバ症(シストパッサー) |
| 2. 腸アメーバ症
アメーバ赤痢(アメーバ性大腸炎) |
| 3. 腸管外アメーバ症
肝膿瘍(腸管からの血行性播種)
肺膿瘍(血行性播種または肝膿瘍からの直接の穿破)
そのほか 脳膿瘍(血行性播種)
皮膚潰瘍(肛門周囲, 陰茎など) |

か。この基本的な問いについての明確な答えはこれまでのところ得られていない。古くから、赤痢アメーバ症における発症の有無と病型の違いは宿主側の要因(アルコール摂取による肝障害、栄養状態、免疫にかかわる遺伝的要因など)に帰すると考えられてきたが、一方で、近年の赤痢アメーバの病原因子に関する研究の進展は、寄生原虫の腸管粘膜下への侵入と発症のメカニズムを徐々に明らかにしつつある。本稿では、これら寄生虫側の病原因子について概説し、臨床症状との関連について考察する。

■臨床症状

病型分類を表 1 に示した。

1. 無症候性シストパッサー

病原性赤痢アメーバの感染においても多くは自覚症状を伴わず、自然治癒する。一部は無症状の

表2 アメーバ赤痢の臨床像

1週間以上の経過	94~100%
下痢	94~100%
血便	94~100%
腹痛	12~80%
体重減少	44%
発熱	10%

文献2)より改変

まま持続性感染化し、施設内集団感染などでは、感染源となりうる点で対策が重要である。

2. 腸アメーバ症

アメーバ赤痢の発症は、数週間にわたる下痢(粘血便)と腹痛のゆっくりとした増強によることが多く、体重減少が特徴的である(表2)。一方、発熱はまれであり、比較的急性発症で発熱を伴うことの多い細菌性下痢症とは異なる。肉眼的血便を認めない場合でも、便潜血反応はほとんどの場合(+)となる。また、粘血便性下痢症を伴わないアメーバ性大腸炎もあり、潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患との鑑別が重要となる。確定診断には、便検体の顕微鏡的検査および内視鏡検査時の生検サンプルによる組織学的検査(図1)による栄養型・シスト検出がキーとなるが、1回(1カ所)のみのサンプリングでは3分の1以下の検出率なので繰り返しの検査が望ましいとされる²⁾。

3. 腸管外アメーバ症

肝膿瘍が大部分であり、肺、脳などの腸管外アメーバ症は非常にまれである。アメーバ性肝膿瘍は、成人男性に多く、典型的には発熱を伴う腹痛として発症する。他覚所見としては、右季肋部の圧痛が特徴的であり、時に咳嗽、肺音異常、黄疸を伴う³⁾(表3)。画像所見としては、CT、USで認められる肝臓における境界明瞭な占拠性病変が特徴的であり(図2)、時に胸部X線像において右横隔膜の挙上(図3)、右胸水の貯留が認められる。アメーバ性肝膿瘍の症例での糞便からの赤痢アメーバの検出は18%にとどまり、下痢症の合



図1 大腸内視鏡検査時に潰瘍底より得られた生検組織による腸アメーバ症所見(HE染色 ×400)

粘膜下組織へ浸潤した多数の栄養体が認められ、一部の栄養型の細胞質には食された赤血球(赤血球食食像)がみられる。

併も14~30%である³⁾(表3)。つまり、多くのアメーバ性肝膿瘍症例ではアメーバ赤痢の合併をみないことから、腸アメーバ症とアメーバ性肝膿瘍の病原因子は異なる可能性がある。肺膿瘍には、栄養型の血行性播種と肝膿瘍穿破による直接の波及がありうる。血行性播種としては、脳膿瘍が同様の機序で発生する。一方、肝膿瘍からは、心膜腔への穿破(特に左葉膿瘍)のほか、腹腔内への穿孔も起こりうるが、腸管の穿孔と異なり肝膿瘍の内容物は無菌的なことから腹腔内穿孔の症状は比較的マイルドである。

■赤痢アメーバの病原因子

経口摂取された赤痢アメーバのシストは、小腸または大腸内で脱囊する。大腸粘膜上の栄養型は腸内細菌を貪食し、分裂による増殖を続けながら定着する。この定着状態から、粘膜下層への侵入までの経過と現在までに判明している関連因子の概要を図4に示した。

1. 細胞外マトリックスの突破

大腸内に定着した病原性赤痢アメーバ *E. histolytica* からは非病原性の *E. dispar* の10~1,000倍のCP(cysteine proteinase)が分泌され

表3 アメーバ性肝膿瘍の臨床像

自覚症状		他覚所見	
発熱	67~87%	発熱	87~90%
腹痛	62~88%	肝圧痛	80~90%
下痢	14~30%	肝肥大	43~77%
咳嗽	10~11%	肺音異常	43~47%
体重減少	33~53%	黄疸	10~13%

文献2), および3)より改変

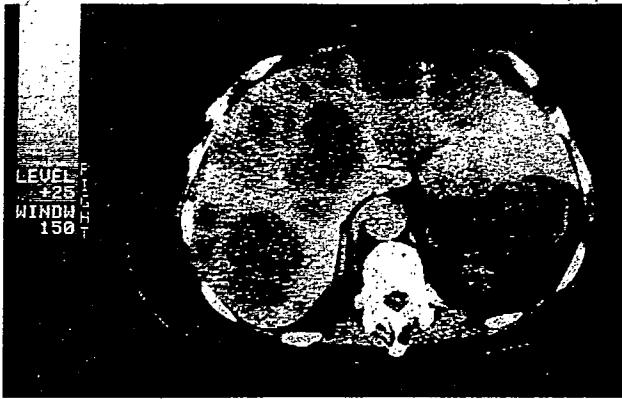


図2 アメーバ性肝膿瘍のCT像

大小の占拠性病変が右葉を中心に認められる。通常は薬剤治療により膿瘍は吸収され、ドレナージは必要ないが、左葉の肝膿瘍は心臓への穿破の危険性があり、ドレナージの適応である。

ている⁴⁾。赤痢アメーバのCPは細胞外マトリックスの成分であるコラーゲン、エラスチン、フィブリノーゲン、ラミニンに対する分解活性をもち、また、粘液中に存在する分泌型IgAも分解する。また、*E. histolytica* 感染既往患者の約80%がCPに対する抗体をもつことからCPは赤痢アメーバの病原因子として重要な役割を果たしていると考えられる²⁾。

2. 腸管粘膜上皮細胞への接着

赤痢アメーバの栄養型は、ガラクトース(およびN-acetylgalactose)に特異的に結合するGal/GalNAc lectinにより宿主細胞の細胞膜に接着する。Gal/GalNAc lectinは、粘膜上皮細胞以外にも、好中球、CHO細胞、Jurkat細胞などに接着し、接触性の細胞融解を誘導することが知られている²⁾。接触性細胞融解は、約70アミノ酸

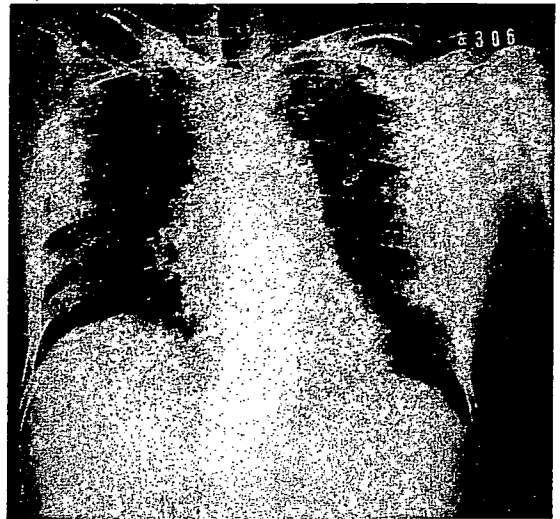


図3 肝膿瘍穿破による横隔膜下膿瘍の胸部X線像(右横隔膜の挙上)

の短いポリペプチドからなる少なくとも3種のアメーバポア(amoebic pore-forming peptides)による宿主細胞膜の透過性亢進(ペプチド分泌によるイオンチャンネル様のpore-forming)により誘導される⁵⁾。また、詳細なメカニズムは不明だが、接触性細胞融解は宿主細胞のアポトーシスの誘導によっても起こっている。

また、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(COX)-2などの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を引き起こす³⁾。

3. 腸管上皮細胞の崩壊

これらのメディエーターによる刺激は周辺の宿主細胞を活性化し(おそらく部分的にはnuclear factor- κ Bを介して)、また、CPはpIL-1 β の

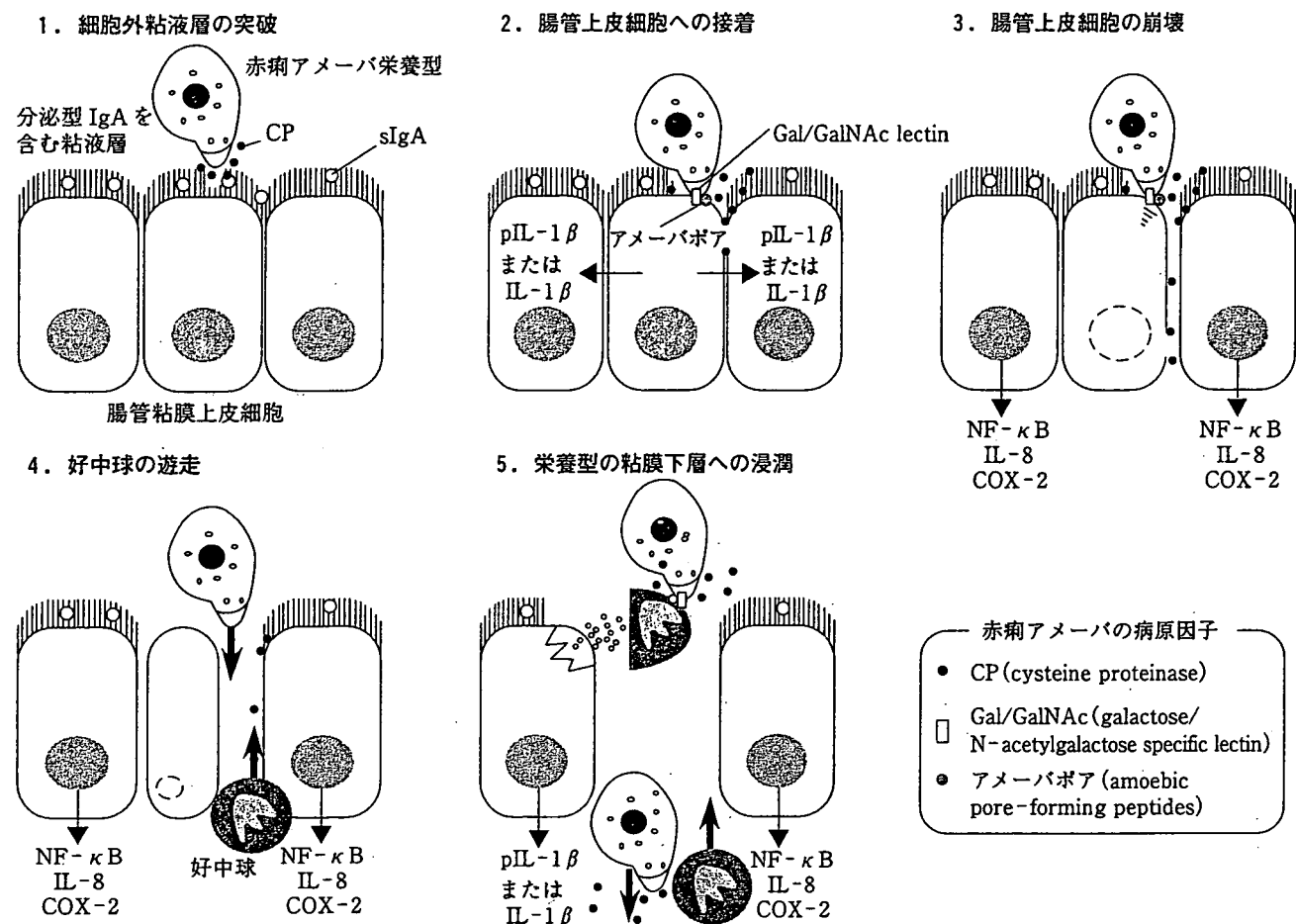


図4 赤痢アメーバによる組織侵入のスキーム

IL-1 β への変換を触媒し、さらにこの効果を高める⁶⁾。以上のプロセスを通じて腸管上皮細胞の細胞外マトリックスはCPによる溶解作用を受け、隣接細胞とのタイトジャンクションの間隙から栄養型の侵入が可能となる。

4. 好中球の遊走

炎症局所への好中球の遊走により、宿主細胞間のタイトジャンクションはさらに崩壊する。

5. 栄養型の粘膜下層への侵入

局所へ遊走した好中球は赤痢アメーバ栄養型の接触性細胞融解作用によって崩壊し、さらなる炎症局面拡大の原因となる。このように、局所においては宿主による炎症反応が赤痢アメーバによる粘膜上皮へのダメージに関与することが示されているが、同時に、アメーバの感染のコントロール

にはこの宿主免疫応答が重要であることもまた示唆されている³⁾。例えば、潰瘍性大腸炎と誤診されステロイドを投与された例では、局所の炎症の軽減と同時に、病期は明らかに延長する⁷⁾。

アメーバ性肝膿瘍の形成における赤痢アメーバによる接触性の細胞融解の役割ははっきりしていない。むしろ、炎症性細胞(マクロファージ、好中球など)による初期炎症反応が膿瘍形成において重要な役割を果たすことが示唆されている⁸⁾。実際、膿瘍内容物から赤痢アメーバの栄養型が検出されることはまれで、膿瘍周辺の組織に栄養型の浸潤像が認められることが多い。

赤痢アメーバの病原性の評価は、*E. histolytica* と *E. dispar* のように今となっては明らかな病原性株と非病原性株の分類上の取扱いの決定にすら時間がかかったことに象徴されるように、非常に

困難な仕事である。臨床からの *E. histolytica* 分離株の病原性は、培養期間の長さや培養条件(無菌培養かどうかなど)によって変化し、また、腸管壁への侵入と膿瘍の形成は必ずしも同一の病原性によって評価できるわけではなさそうである。しかしながら、本稿で示したように、多くの病原性因子がすでに解明され、また、宿主による炎症反応の病原性に果たす役割の一端も明らかになってきた。したがって、遠くない将来、病原性のメカニズムに基づいた、より効果的な治療、さらには感染および発症予防のアプローチが実現可能であろうと期待している。

- 1) Gathiram V, Jackson TF : A longitudinal study of asymptomatic carriers of pathogenic zymodemes of *Entamoeba histolytica*. *S Afr Med J* 72 : 669-672, 1987.
- 2) Petri WA Jr. : Recent advances in amebiasis. *Crit Rev Clin Lab Sci* 33 : 1-37, 1996.
- 3) Stanley SL Jr. : Amoebiasis. *Lancet* 361(9362) :

1025-1034, 2003.

- 4) Que X, Reed SL : Cysteine proteinases and the pathogenesis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev* 13 : 196-206, 2000.
- 5) 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 : 516-521, 2004.
- 6) Zhang Z, Wang L, Seydel KB *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 : 542-548, 2000.
- 7) Reed SL : Clinical Manifestations and Diagnosis, AMEBIASIS, Series of Tropical Medicine : Science and Practice-Vol.2, p113-125, Ravdin JI eds., Imperial College Press, London, 2000.
- 8) Eckmann L, Reed SL, Smith JR *et al.* : *Entamoeba histolytica* trophozoites induce an inflammatory cytokine response by cultured human cells through the paracrine action of cytolytically released interleukin-1 alpha. *J Clin Invest* 96 : 1269-1279, 1995.

予防接種の手びき

〈第十版〉

木村三生夫・平山宗宏・堺 春美 著 A5判630頁 定価6,825円(本体6,500円+税5%)

05年4月施行の「結核予防法」、「定期予防接種実施要領」に全面对応

◎BCGの定期予防接種が、0~6カ月未満の乳児へ

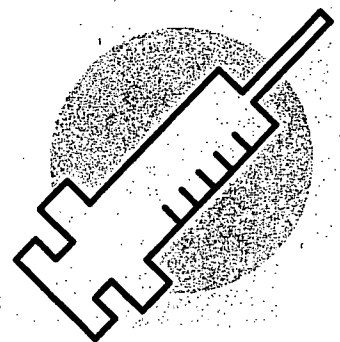
ツ反を廃止して、直接接種にした理由

接種を躊躇するときの考え方

接種局所の浸潤、膿瘍への対応、ほか

◎今後の予防接種の展望

◎付録 予防接種関連法令・通知を最新のものに更新



近代出版

〒150-0002 東京都渋谷区渋谷2-10-9
TEL 03-3499-5191 FAX 03-3499-5204
<http://www.aya.or.jp/~kindai-s>

腸管寄生原虫検出における MIF 変法の評価

金沢大学大学院 医学系研究科寄生虫感染症制御学
所 正治・井関基弘

腸管寄生原虫検出における MIF 変法の評価

金沢大学大学院 医学系研究科寄生虫感染症制御学

所 正治・井関基弘

Key Words : Merthiolate-Iodine-Formalin, mercurochrome, intestinal protozoa

緒言

MIF (Merthiolate-Iodine-Formalin) 染色固定法は、1951年に Sapero らによって報告されて以来¹⁾、虫卵、シスト等の簡便な染色固定法として知られてきたが、近年はあまり使用されなくなってきた。その原因としては、原法で赤色色素の染色材料として提示されていた Tincture Merthiolate No. 99, 1:1000 (Lilly 社) が製造中止となり、替わって使われるようになった Eosin Y による変法が原法に比較して染色性の点で問題があったことが挙げられ、実際に、糞便検体における赤痢アメーバ、ジアルジア (ランブル鞭毛虫) 等のシストの Eosin Y による染色が黄褐色となり、ヨード染色とのコントラストが付きにくいことをわれわれも経験してきた。しかしながら、本法は、染色と固定を簡便な手技によって同時に行うことが可能であり、また、これにより数年の保存に耐える半永久標本を作成可能な点、原虫の栄養型に関しても検出可能である点など、迅速診断およびフィールドでの検体処理検査に非常に重要な利点を備えている。そこで、この染色性の改

善のために、われわれは Eosin Y の Br のひとつを Hg に置換した構造を持つ Mercurochrome (図 1) に注目し、原法の Merthiolate (tincture of merthiolate) を Mercurochrome に変更した Mercurochrome-Iodine-Formalin 法 (MIF 変法) による腸管寄生原虫検出の評価を実施した。

材料と方法

MIF 変法には I 液および II 液：ルゴール液 (10% ヨードカリウム・5% ヨード液) をあらかじめ作成し (表 1)、使用直前に I 液 (940 μ l) と II 液 (60 μ l) を混合したものに約 100 μ l (0.1g) の濾過済みの糞便検体を添加混合し、30 分後から沈渣部分を使用

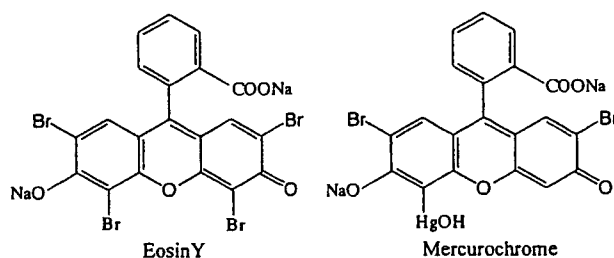


図 1 色素成分の構造

Assessment of Modified Merthiolate-Iodine-Formalin (MIF) Stain Method for Detecting Intestinal Protozoan Parasites : Efficacy of Replacement of Merthiolate with Mercurochrome

Masaharu Tokoro Motohiro Iseki

Department of Parasitology, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University

論文請求先：所 正治 〒920-8640 金沢市宝町 13-1 金沢大学大学院 医学系研究科寄生虫感染症制御学

表 1 MIF 変法の試薬調整

<u>I液. "MF" solution:</u>
20ml 0.2% mercurochrome solution*
2.5ml Formaldehyde solution
0.5ml Glycerine
25ml distilled water
Total 48ml
<u>II液. Fresh Lugol's iodine solution (5% Iodine)</u>
1.0g Potassium iodine
0.5g Powdered iodine crystals
10ml distilled water
Total 10ml
I液、II液ともに褐色ビンで室温保存。 使用直前にI液とII液を94:6の割合で混合し、10の割合の便検体と混合する。 *日本薬局方2%マーキュロクロム液を蒸留水で希釈して作成するか、または、 mercurochrome (mercury dibromofluorescein) 結晶がSigmaより購入可能。

して顕微鏡下での観察を行った。栄養型としては、TYI-S-33培地での無菌培養ジアルジア (portland-I株) および、BI-S-33培地での無菌培養赤痢アメーバ (HM1:IMSS c16株) を用いた。また、シストには、重クロム酸カリウム液に保存されていたジアルジア、赤痢アメーバ各陽性検体を用いた。

結果

栄養型、シストともにMIF変法によるサンプルは鏡検による同定が可能だった。赤痢アメーバの栄養型においては、赤褐色に染色された微細細胞質内構造をともなう偽足とともに核内のカリオソームが認められ (図2a), また、シストでは、核、類染色質体 (図2b, c) が確認された。一方、ジアルジアにおいては、栄養型における吸着円盤、鞭毛、カリオソームをともなう核を認め (図2d, e), シストでは、赤褐色に染まった細胞質構造内に黄褐色に明

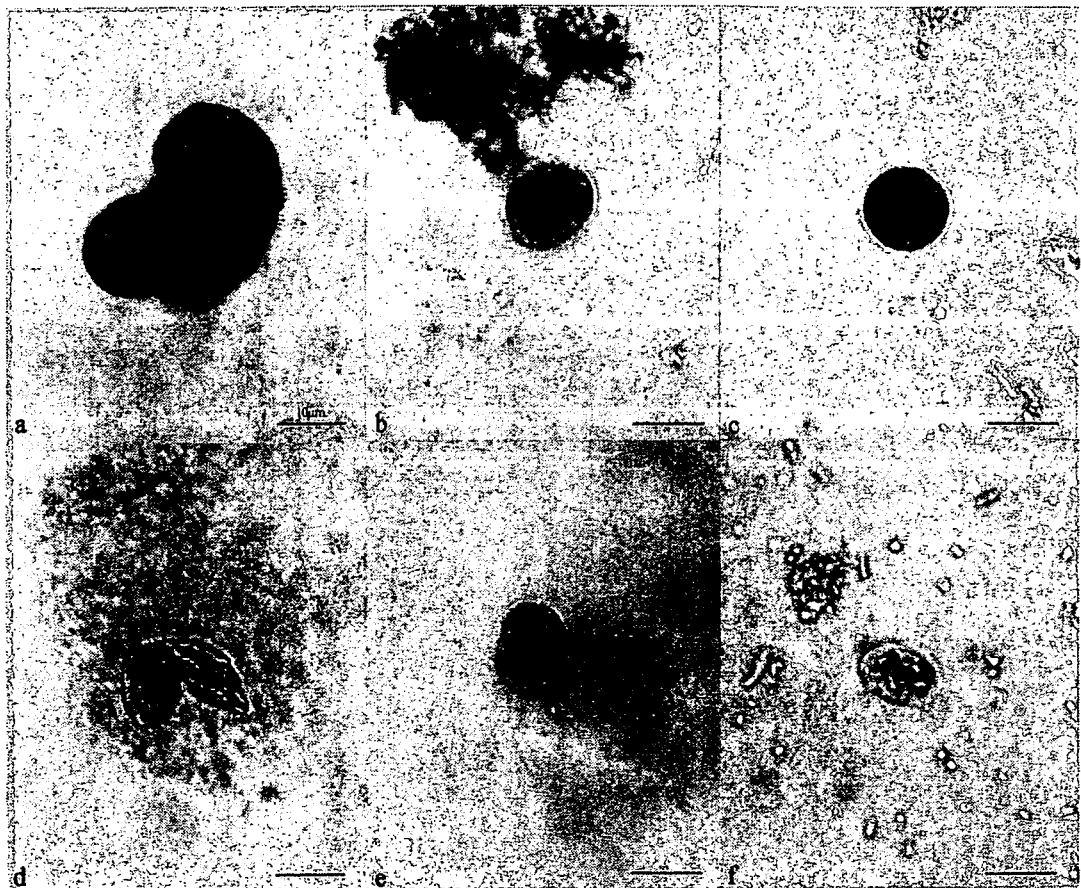


図 2 MIF 変法による染色固定象

赤痢アメーバ：a. 栄養型, b. シスト, c. シスト, ジアルジア：d. 栄養型, e. 栄養型 (分裂中の2個体), f. シスト

るく染まった曲刺を認めた (図 2 f)。

考察

本法においては、いくつかの重要な注意点のあることも確認された。

1) MIF の I 液と II 液混合後の染色性低下の問題
ルゴール液との混合後、20 分ほどで MIF 液内に沈殿が生じる。原法においても指摘されている点だが²⁾、これによりヨードの染色性は極端に低下するため、用時調整が望ましい。

2) 栄養型の固定後の変性

シストに関しては長期の観察が可能だが、栄養型については、固定後、急速に変性が始まる。特に赤痢アメーバの栄養型では 48 時間程度で、辺縁部が凝集するように不明瞭化したものが出現し始める。したがって、栄養型の観察は、可能な限り固定後早期に行うことが望ましい。

3) フォルマリンによる DNA 変性

MIF 変法により固定した標本からの DNA 抽出、PCR での検出トライアルでは、24 時間後のサンプルであっても、フォルマリンによる DNA 損傷が無視できないことが判明した。しかしながら、

mercurochrome による染色は Eosin Y による染色時に問題となる細胞質内構造の染色によるコントラストを改善し、鏡検時の観察に有用であることが確認された。糞便検体においては、薄赤色に染まったバックグラウンドの中に原虫の栄養型・シストが明瞭に浮かび上がるように認められ、倍率 100 倍での鏡検においても十分に検出可能である。したがって、上記の制限を念頭に本法を使用することで、MIF 変法は腸管寄生原虫の検出において非常に有用なツールとして活用可能である。

謝辞：MIF 原法に関する資料、サンプルをご提供いただいた京都府立医科大学大学院寄生病態学、山田 稔先生に感謝いたします。

文 献

- 1) Sapero, J. J. *et al.* (1951) : An improved iodine-staining technique for routine laboratory diagnosis of intestinal protozoa. *Science*, 114 (2969), 550-551.
- 2) Sapero, J. J. *et al.* (1953) : The MIF stain-preservation technique for the identification of intestinal protozoa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2, 613-619.

臨床で問題になる腸管寄生 原虫の分類に関する知見

金沢大学大学院 医学系研究科寄生虫感染症制御学
所 正治・井関基弘

教育講演 I

臨床で問題になる腸管寄生
原虫の分類に関する知見

金沢大学大学院 医学系研究科寄生虫感染症制御学
所 正治・井関基弘

Key Words : genotype, *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Entamoeba*, taxonomy

近年、原虫類の分類は従来の形態学的分類から遺伝子型解析に基づく分類へと大きく変わりつつある。遺伝子型の決定 (genotyping) による種の鑑別をはじめとして、種内での詳細な亜型分類が実施されるようになり、これまで解明されていなかった病型と遺伝子型の相関解析や、地理的分布の解析を含めた多様なアプローチが可能となってきた。また、疫学的にも、フィンガープリンティングによる感染源の特定や、人獣共通感染症でのリスク評価など、遺伝子型同定の重要性が認識されつつある。本稿では、腸管寄生原虫の中からクリプトスポリジウム、ジアルジア (ランブル鞭毛虫) およびアメーバ類の遺伝子型決定のアプリケーションに関して、近年の知見を紹介する。

クリプトスポリジウム *Cryptosporidium* spp.

ほ乳類に寄生するクリプトスポリジウムの種と宿主およびオーシストのサイズを表1に示した。ヒ

トから分離される株は、主にヒトにのみ感染する *C. hominis* と、幅広いほ乳類を宿主とする *C. parvum* bovine genotype であり、その他に鳥類から分離される *C. meleagridis* の感染例も報告されている。これらの種を形態的に鑑別することは不可能であり、同定には遺伝子型解析が必須である。クリプトスポリジウムの種および遺伝子型の鑑別は *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene¹⁾, small subunit of ribosomal RNA (SSUrRNA) gene²⁾, Polythreonine (polyT) gene³⁾ 等をターゲットに設計されたPCR用プライマーを用い、オーシストから抽出された genomic DNA をテンプレートにした PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) 法, あるいは PCR-ダイレクトシーケンス法によって行われている。ここにあげた遺伝子の塩基配列についてはほぼすべての遺伝子型のリファレンスが GeneBank から利用可能である。クリプトスポリジウムにおいては、臨床検体から分離される genomic DNA の配

Recent Progress on Genotyping in Pathogenic Intestinal Protozoan Parasites

Masaharu Tokoro Motohiro Iseki

Department of Parasitology, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University

論文請求先: 所 正治 〒920-8640 金沢市宝町13-1 金沢大学大学院 医学系研究科寄生虫感染症制御学

表1 ほ乳類に寄生する *Cryptosporidium* の種および遺伝子型の一覧

種名	宿主と寄生部位	オーシストの大きさ (μm)
<i>C. hominis</i>	ヒト (腸)	5.2×4.9 (5.9-4.4×5.4-4.4)
	ヒト、ウシ、ブタなど (腸)	
	[遺伝子型]	
<i>C. parvum</i>	ウシ、サル、マウス、 フェレット、有袋類型など	5.0×4.5 (5.4-4.5×5.0-4.2)
<i>C. felis</i>	猫 (腸)	5.0×4.5
<i>C. wrairi</i>	モルモット (腸)	5.2×4.6 (6.0-4.5×5.3-4.2)
<i>C. suis</i>	ブタ (腸)	4.6×4.2 (4.9-4.4×4.3-4.0)
<i>C. canis</i>	犬 (腸)	5.0×4.7 (5.9-3.7×5.9-3.7)
	マウス (胃)	
<i>C. muris</i>	ドブネズミ (胃) ヒト (胃?)	7×4.5
<i>C. andersoni</i>	ウシ (胃)	7.4×5.6 (7.9-6.6×6.5-5.3)

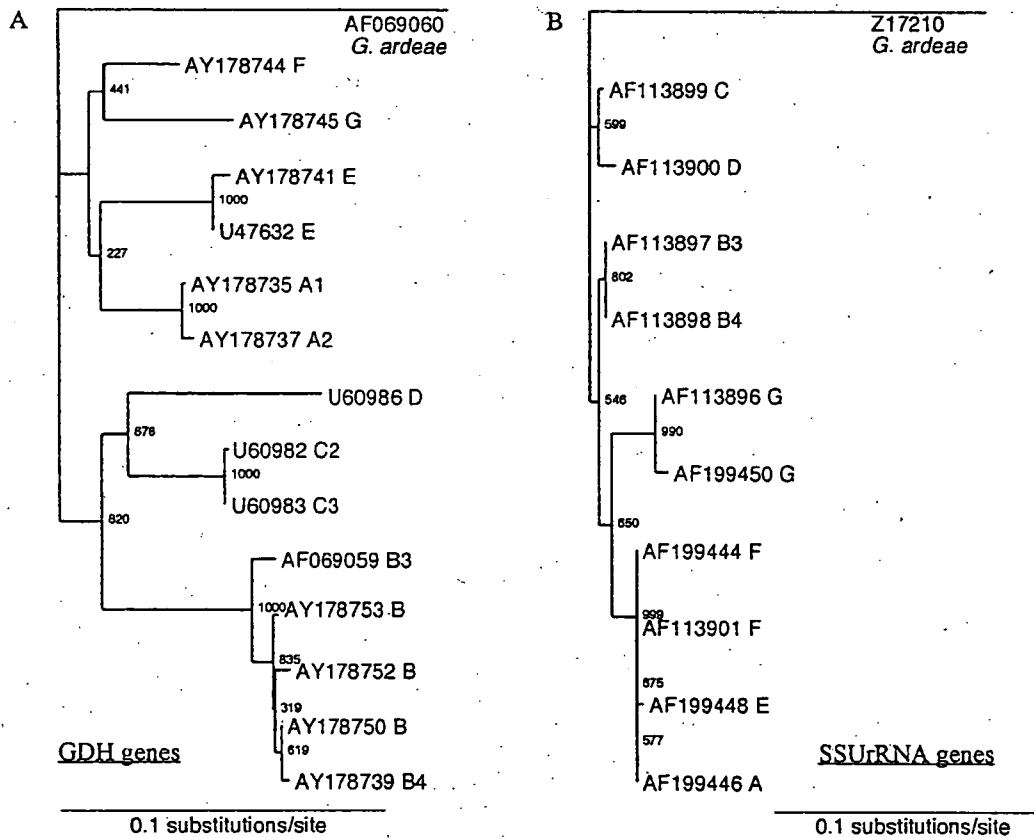


図1 リファレンスの塩基配列を用いたジアルジアの系統樹解析

- (A) glutamate dehydrogenase (GDH) gene,
 (B) small subunit of ribosomal RNA (SSUrRNA) gene, 各項目は accession no. および Assemblage をしめす。解析には CLUSTAL W (ver. 1.83) を使用し, Neighbor-Joining 法, アウトグループとして *G. ardeae* を用いた。各ノードの数字はブートストラップ値 (1000 replicates) を示す。

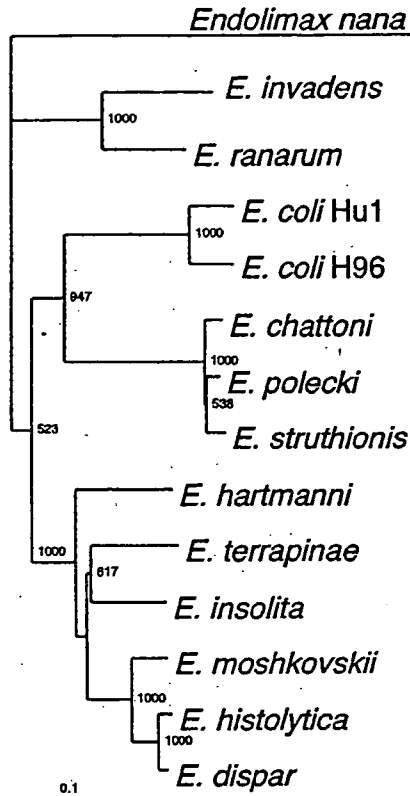


図2 リファレンスの SSUrRNA gene 塩基配列を用いた *Entamoeba* 属の系統樹解析
アウトグループとして小形アメーバ (*Endolimax nana*) を用いた (方法, 図1参照)。

列はいずれかのリファレンス配列とほぼ 100% の同一性を示し, したがって, これらの遺伝子型分類はほぼ確立していると考えられる。

ジアルジア (ランブル鞭毛虫) *Giardia intestinalis* (sny. *G. lamblia*, *G. duodenalis*)

クリプトスポリジウムと比較して, ジアルジアにおける遺伝子型分類は発展途上にある。その理由のひとつに, 分離される *G. intestinalis* の種々の遺伝子に認められる microheterogeneity の存在があげられる。ほ乳類由来のジアルジアは, 形態的にはすべて同一であるが, その遺伝子型は Assemblage A ~ G の 7 種に分類され, ヒトのみ, ヒトと動物の両方, および動物のみから検出される型がある。さらに, われわれの経験では, これらのリファレンス配列と臨床検体のシストから分離された genomic DNA の

ターゲット遺伝子の塩基配列はしばしば一致せず, 図1に示したような系統樹解析を用いた遺伝子型解析が必要となる。現在, リファレンス配列が最も多く報告されているのは, glutamate dehydrogenase (GDH) gene⁴⁾ と SSUrRNA gene⁵⁾ であり, この2種の遺伝子では A から G のすべての遺伝子型のリファレンスが参照可能である。この他にも, triose phosphate isomerase (TPI), beta-giardin, elongation factor 1 alpha (ef 1 alpha) などの遺伝子をターゲットとした遺伝子型決定の報告があるがリファレンスの数が少なく, 一部の遺伝子型のみしか用いることが出来ない。ジアルジアに関してはこの分類体系は暫定的なものであり, 今後, 遺伝子型決定の報告の増加につれて現在の分類体系を発展させていく中で, 臨床症状, 地理的分布などとの相関の知見が蓄積されていくものと考えられる。

アメーバ類 *Entamoeba* spp.

病原性の *Entamoeba histolytica* については, 非病原性の *E. dispar* と形態的に鑑別できないことから, SSUrRNA gene をターゲットとした特異的プライマーセットによるマルチプレックス PCR による鑑別が用いられている⁶⁾。一方, しばしば臨床糞便検体中に認められる *E. histolytica*/*E. dispar* 以外のシスト (大腸アメーバ, 小形アメーバなど) については, 核の数や構造およびシストのサイズなどに頼った形態学的な鑑別が行われてきたが近年, *Entamoeba* 属各種および小形アメーバ (*Endolimax nana*) の SSUrRNA gene のシーケンス情報が報告され⁷⁾, PCR とダイレクトシーケンスによる同定が可能となってきた (図2)。基本的に, 非病原性とされてきたこれらアメーバ類のヒトでの感染状況はこれまでのところほとんど報告されてこなかった。しかし同定方法の確立により, 今後, 報告の増加とそれにとまなう新たな知見が期待される。

遺伝子型解析による分類法は, 形態的に鑑別不可能な種内の亜型の存在を明らかにするが, 病原性や病型, 薬剤感受性等の評価を可能にするには, 一部を除いては未だ十分なデータが得られているとは言えない。しかしながら, 糞便検体に見出される原虫の遺伝子型同定を, 病原性の有無にかかわらず進め

ていく地道な作業を通じて、将来、臨床現場において治療・診断の有用なツールとなりうる遺伝子型分類体系を築き上げることは十分可能なものと期待している。

文 献

- 1) Spano, F. *et al.* (1997) : PCR-RFLP analysis of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene discriminates between *C. wrairi* and *C. parvum*, and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. *FEMS Microbiol. Lett.*, 150, 209-217.
- 2) Xiao, L. *et al.* (1999) : Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 3386-3391.
- 3) Carraway, M. *et al.* (1997) : A new restriction fragment length polymorphism from *Cryptosporidium parvum* identifies genetically heterogeneous parasite populations and genotypic changes following transmission from bovine to human hosts. *Infect. Immun.*, 65, 3958-3960.
- 4) Read, C.M. *et al.* (2004) : Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. *Infect. Genet. Evol.*, 4, 125-130.
- 5) Thompson, R.C.A. *et al.* (2000) : Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. *Parasitology Today*, 16, 210-213.
- 6) Evangelopoulos, A. *et al.* (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.
- 7) Jeffrey, D.S. *et al.* (1999) : Phylogeny of the genera *Entamoeba* and *Endolimax* as deduced from small-subunit ribosomal RNA Sequences. *Mol. Biol. Evol.*, 16, 1740-1751.

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なっ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瘢痕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覧

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
	ヒトブラストシスチス <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	胆管・胆嚢 ・気道
	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	—
	肉孢子虫 <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⁹⁾。

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⁹⁾。

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收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¹¹⁾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巻 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