

Fig 1- Sequences alignment of the ITS2 region from *P. heterotremus* (Ph), *P. westermani* (Pw) and *P. westermani*-like (PL) metacercariae. The 5' and 3' ends of the sequences include 5.8S rDNA and 28S rDNA, respectively. A dot in the *P. westermani* and *P. westermani*-like sequences indicates identity with *P. heterotremus* sequence. The locations of the *P. heterotremus*-specific forward primer (PhTF2; 5' CAAATCCGGGCGTATCCATGTTGTG 3') and *P. westermani*-specific forward primer (PwTF4; 5' TCTGCGTTCGATGCTGACCTACG 3') are underlined. The recognition sites of *Bsa*HI (GR/CGYC) are located in boxes. The numbers refer to the alignment positions.

westermani and *P. westermani*-like) remained undigested by *Bsa*HI.

DISCUSSION

We previously reported that the multiplex PCR method we developed (Sugiyama *et al*, 2005) was effective for discriminating among the five *Paragonimus* species occurring in Thailand when used in combination with *Scr*FI digestion (Sugiyama *et al*, 2006). However, this method was not applicable for discriminating among *P. heterotremus*

and two forms of *P. westermani* because the latter two forms showed identical PCR-RFLP patterns. Therefore, in this study, we treated the amplicons with *Bsa*HI chosen based on the sequence differences between these two forms of *P. westermani*. In addition, new species-specific primers were constructed to generate products that would remain uncut by *Bsa*HI digestion. The improved method was shown to be effective in discriminating among *P. heterotremus* and two forms of *P. westermani*.

Two forms of *P. westermani* were found

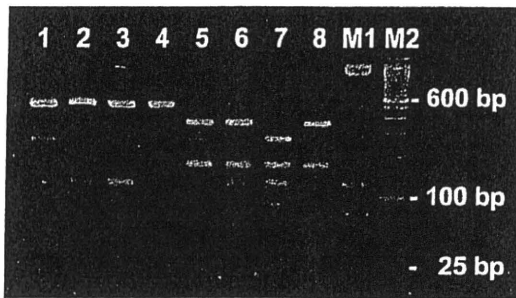


Fig 2- Multiplex PCR and multiplex PCR plus PRLP analysis of ITS2 amplification products from the metacercarial DNA samples of *P. heterotremus* (lanes 1 and 5), *P. westermani* (lanes 2 and 6), *P. westermani*-like (lanes 3 and 7) and *P. siamensis* (lanes 4 and 8). After digestion of the multiplex PCR products with *Bsa*HI, three bands were observed for *P. heterotremus* (ca. 350, 250 and 170 bp, lane 5), three bands for *P. westermani* (ca. 350, 170 and 125 bp, lane 6), four bands for *P. westermani*-like (ca. 250, 170, 125 and 90 bp, lane 7) and two bands for *P. siamensis* (ca. 350 and 250 bp, lane 8). Both the 25-bp and 100-bp DNA ladders were used to estimate the sizes of the bands (lanes M1 and M2, respectively).

to occur in Surat Thani, southern Thailand, and they both used a single crab species as the second intermediate host (Sugiyama *et al*, 2007). Possible discovery of *P. westermani*-like metacercariae were reported from crabs occurring not only in Surat Thani (Shibahara *et al*, 1995) but Nakhon Si Thammarat (Tsuzuki *et al*, 1995), the neighboring province of Surat Thani. However, little attention has been paid to *P. westermani*-like and its infection of humans has not been determined. To obtain accurate epidemiological information about the prevalence of the lung fluke species and forms in Thailand, various methods for identification are needed on parasitological materials obtained from host animals. The method developed in this study has the potential for this purpose.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported in part by a grant from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan on emerging and reemerging diseases (2007).

REFERENCES

- Binchai S, Rangsiruji A, Ketudat P, Morishima Y, Sugiyama H. Molecular systematics of a new form of *Paragonimus westermani* discovered in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2007;38 (suppl 1): 92-96.
- Blair D, Waikagul J, Honzako Y, Agatsuma T. Phylogenetic relationships among the Thai species of *Paragonimus* inferred from DNA sequences. In: Tada I, Kojima S, Tsuji M, eds. Proceedings of the Ninth International Congress of Parasitology. Bologna: Monduzzi Editore, 1998:643-7.
- Bowles J, Blair D, McManus DP. A molecular phylogeny of the human schistosomes. *Mol Phylog Evol* 1995;4:103-9.
- Kawashima K, Sugiyama H, Ketudat P. *Paragonimus* infection in crabs in Thailand. In: Kawashima K, ed. *Paragonimus in Asia: biology, genetic variation and speciation (Paragonimus Research Report, Number 2)*. Fukuoka: Kyushu University School of Health Sciences, 1989:75-9.
- Miyazaki I. Paragonimiasis. In: Miyazaki I, ed. An illustrated book of helminthic zoonoses. Tokyo: International Medical Foundation of Japan, 1991:76-146.
- Shibahara T, Iwaki T, Ketudat P, Pancha U, Kawashima K. On the lung flukes found in the southern part of Thailand. *Jpn J Parasitol* 1995;44 (suppl):126 (in Japanese).
- Srisont D, Waikagul J, Yaemput S. *Paragonimus* in Thailand. In: Srisont D, Waikagul J, Yaemput S, eds. *Paragonimus*. Bangkok: Living Trans Media, 1997:65-91 (in Thai).
- Sugiyama H, Morishima Y, Kameoka Y, Kawanaka M. Polymerase chain reaction (PCR)-based molecular discrimination between *Paragonimus westermani* and *P. miyazakii* at the metacercarial stage. *Mol*

- Cell Probes* 2002;16:231-6.
- Sugiyama H, Morishima Y, Rangsiruji A, *et al.* Molecular discrimination between individual metacercariae of *Paragonimus heterotremus* and *P. westermani* occurring in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2005;36(suppl 4):102-6.
- Sugiyama H, Morishima Y, Rangsiruji A, Binchai S, Ketudat P, Kawanaka M. Application of multiplex PCR for species discrimination using individual metacercariae of *Paragonimus* occurring in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2006;37(suppl 3):48-52.
- Sugiyama H, Morishima Y, Binchai S, Rangsiruji A, Punsin K. New form of *Paragonimus westermani* discovered in Thailand: morphological characteristics and host susceptibility. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2007;38 (suppl 1):46-50.
- Tsuzuki T, Kawashima K, Higo H, *et al.* Molecular genetics in *Paragonimus westermani* complex in Asia [Research accomplishment report, Project Number: 07041163]. Database of Grants-in Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Science, Sports, and Culture of Japan. [Cited 2007 Dec 31]. Available from: URL: <http://seika.nii.ac.jp/search/pjno.html?PJNO=07041163>

MOLECULAR ANALYSIS OF JAPANESE *ANISAKIS SIMPLEX* WORMS

Azusa Umehara^{1,2}, Yasushi Kawakami², Jun Araki³, Akihiko Uchida² and Hiromu Sugiyama¹

¹Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo;

²Laboratory of Medical Zoology, College of Environmental Health, Azabu University, Kanagawa;

³Meguro Parasitological Museum, Tokyo, Japan

Abstract. In this study, we used sequence and RFLP analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacer region to identify the sibling species of *Anisakis simplex* worms isolated in Japan as third stage larvae (L3) from fish and patients and as adults from marine mammals. Worms from North Pacific Ocean were identified as *A. simplex* s. str., while those from the southern Sea of Japan were *A. pegreffii*. Worms from patients were mainly identified as *A. simplex* s. str., even though they were obtained from southern Japan. Worms of the hybrid genotype were only detected in fish and marine mammals. We also demonstrated that our newly established RFLP method for mitochondrial *cox1* enables us to unambiguously classify members of *A. simplex*, including hybrid genotype worms, into *A. simplex* s. str. or *A. pegreffii*.

INTRODUCTION

In Japan, over 2,000 cases of human anisakiasis have been reported annually due to the high consumption of raw fish as sushi and sashimi. The nematode *Anisakis simplex* is the parasite most frequently associated with the disease. *A. simplex* is widespread worldwide with no obvious variation in morphology. However, sequencing and/or restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacer region [(rDNA ITS region; namely, 5.8S rDNA and flanking ITS regions (ITS1 and ITS2))] have demonstrated that *A. simplex* morphospecies comprises three sibling species: *A. pegreffii*, *A. simplex* sensu stricto and *A. simplex* C (Mattiucci and Nascetti, 2006). Parasites with hybrid genotype between *A. simplex* s. str. and *A. pegreffii* were also detected from waters around the Iberian Peninsula (Abollo *et al.*, 2003; Martin-Sanchez *et al.*, 2005). In this paper, we have applied

molecular methods for sibling species-level identification of Japanese *A. simplex* worms isolated from fish, marine mammals and patients with anisakiasis.

MATERIALS AND METHODS

Parasite materials

A. simplex worms were collected from fish as third stage larvae (L3) and marine mammalian hosts as adults, as well as from patients with anisakiasis as L3. Worms from fish and marine mammals were stored at -20 °C and those from human patients were stored in 80% ethanol at room temperature until analysis. Host animals, the geographical location of collection and numbers of worms examined are listed in Table 1. Species was confirmed by DNA sequencing and/or RFLP analysis as described below.

DNA amplification and sequencing

We extracted DNA samples from individual worms using QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen k. k., Japan). The entire ITS region (ITS1, 5.8S rDNA and ITS2) and mitochondrial cytochrome C oxidase 1 (*cox1*) gene was amplified by PCR using primer pairs A and B (D Amelio *et al.*, 2000) and JB3 and JB4.5 (Hu *et al.*, 2001), respectively. PCR conditions

Correspondence: Hiromu Sugiyama, Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases, Toyama 1-23-1, Shinjuku-ku, Tokyo, 162-8640, Japan.

Tel: +81-3-5285-1111; Fax: +81-3-5285-1173

E-mail: hsugi@nih.go.jp

differed for frozen and ethanol-preserved worms and were the same as those described by Umehara *et al* (2006, 2007). Amplification products were separated on agarose gels and excised bands were sequenced using BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) in an automated sequencer (ABI3100, Applied Biosystems). Sequence alignment and comparison were analyzed using GENETYX-WIN program (ver.7.0, Software Development, Japan).

RFLP analysis of PCR products

Amplicons of the entire ITS region were digested with *Hinf*I (D Amelio *et al*, 2000) and of mitochondrial *cox*1 with *Sfc*I. The digested samples were then separated by electrophoresis in 3.0% (w/v) agarose gels.

RESULTS

Sequence and RFLP analysis of rDNA ITS region

Amplification of the rDNA ITS region produced a single band of about 950 bp for all samples. Digestion of PCR products by *Hinf*I produced three different RFLP patterns, corresponding to that of *A. simplex* s. str. (ca. 610 and 230 bp, Fig 1 lane 1), *A. pegreffii* (ca. 330, 280 and 230 bp, Fig 1 lane 2) or the hybrid genotype (ca. 610, 330, 280 and 230 bp, Fig 1 lane 3). The RFLP pattern produced by the hybrid genotype was identical to the combination of the RFLP patterns of *A. simplex* s. str. and *A. pegreffii*.

Sequences of the ITS amplicons were almost identical among samples; only two

Table 1
Identification of *A. simplex* at the sibling species-level.

Sources of parasites	Collection site ^a	Life cycle stage	No. of parasite identified ^b as		
			As	Ap	H
Fish					
Arabesque greenling	North	L3	20	0	0
Alaska pollack	North	L3	19	0	0
Chub mackerel	North	L3	16	0	0
Surf smelt	North	L3	10	0	0
Chub mackerel	South	L3	0	37	1
(Ap-type)					
Marine mammal					
Minke whale	North	Adult	45	0	3
(2: As-type)					
(1: Ap-type)					
Human					
5 patients	NJpn	L3	5	0	0
80 patients	SJpn	L3	94	1	0

^a North = North Pacific Ocean; South = Southern Sea of Japan; NJpn = Northern Japan; SJpn = Southern Japan

^b Identification for sibling species was based on rDNA RFLP patterns. For the hybrid genotype, mtDNA RFLP patterns were used.

As = *A. simplex* s. str.; Ap = *A. pegreffii*; H = Hybrid genotype

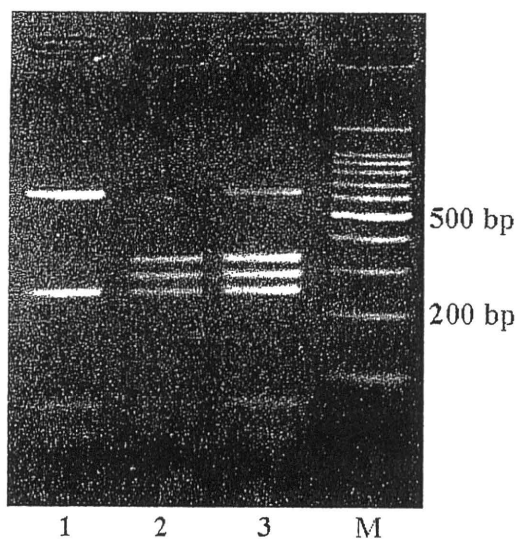


Fig 1- RFLP analysis of rDNA ITS amplicons from *A. simplex* s. str., *A. pegreffii* and hybrid genotype. Amplicons of *A. simplex* s. str. digested with *Hin*I produced two bands (ca. 610 and 230 bp, lane 1), while those of *A. pegreffii* produced three bands (ca. 330, 280 and 230 bp, lane 2). Amplicons of hybrid genotype produced four bands (ca. 610, 330, 280 and 230 bp, lane 3). A 100-bp DNA ladder marker was used to estimate the size of the bands (lane M).

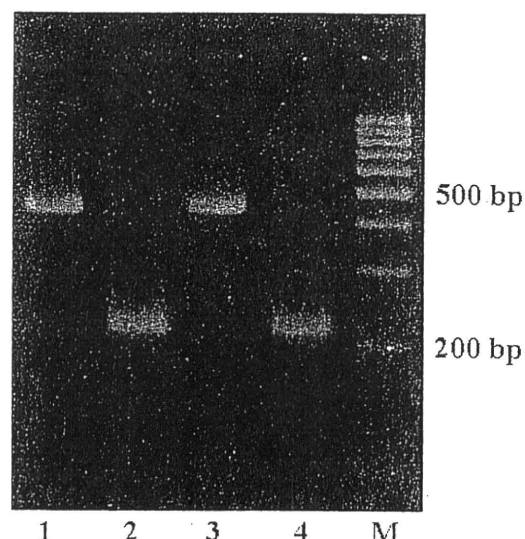


Fig 2- RFLP analysis of mitochondrial *cox1* amplicons from *A. simplex* s. str., *A. pegreffii* and hybrid genotype. Amplicons of *A. simplex* s. str. were not digested with *Sfc*I (ca. 440 bp, lane 1), whereas those of *A. pegreffii* produced a single digested band (ca. 220 bp, lane 2). Hybrid genotype amplicons were not digested (lane 3) or digested to produce two 200 bp bands (lane 4). A 100-bp DNA ladder marker was used to estimate the size of the bands (lane M).

thymine to cytosine transitions in the ITS1 region were observed between *A. simplex* s. str. and *A. pegreffii* (data not shown). Similarity searches of the GenBank/EMBL/DDBJ nucleotide database revealed that the sequences with two thymine bases and those with two cytosine bases were identical to sequence of *A. simplex* s. str. (GenBank/EMBL/DDBJ accession number: AB277822) and *A. pegreffii* (AB277823), respectively. Electropherograms of the hybrid genotype showed two double peaks at these transition sites (data not shown).

Sequence and RFLP analysis of mitochondrial *cox1*

PCR amplification of mitochondrial *cox1* produced a single band of about 440 bp for all samples. Sequence analysis revealed a high level of conservation among samples with base differences occurring at only seven

sites between *A. simplex* s. str. and *A. pegreffii* (data not shown). At the amino acid level, no differences were observed between *A. simplex* s. str. and *A. pegreffii*.

Restriction enzyme *Sfc*I was selected for RFLP analysis based on the sequence differences between *A. simplex* s. str. and *A. pegreffii*. A single undigested 440 bp band was obtained for *A. simplex* s. str. (Fig. 2, lane 1), while digested 220 bp for *A. pegreffii* (Fig. 2, lane 2). Amplicons from hybrid genotype were either not digested (Fig. 2, lane 3, *A. simplex* s. str.-type) or digested to produce two 200 bp bands (Fig. 2, lane 4, *A. pegreffii*-type).

Infection rates of sibling species of *A. simplex* in Japan

The identification of the *A. simplex* worms at the sibling species-level is summarized in Table 1. L3 larvae from fish collected in North Pacific Ocean were all identified as *A. simplex*

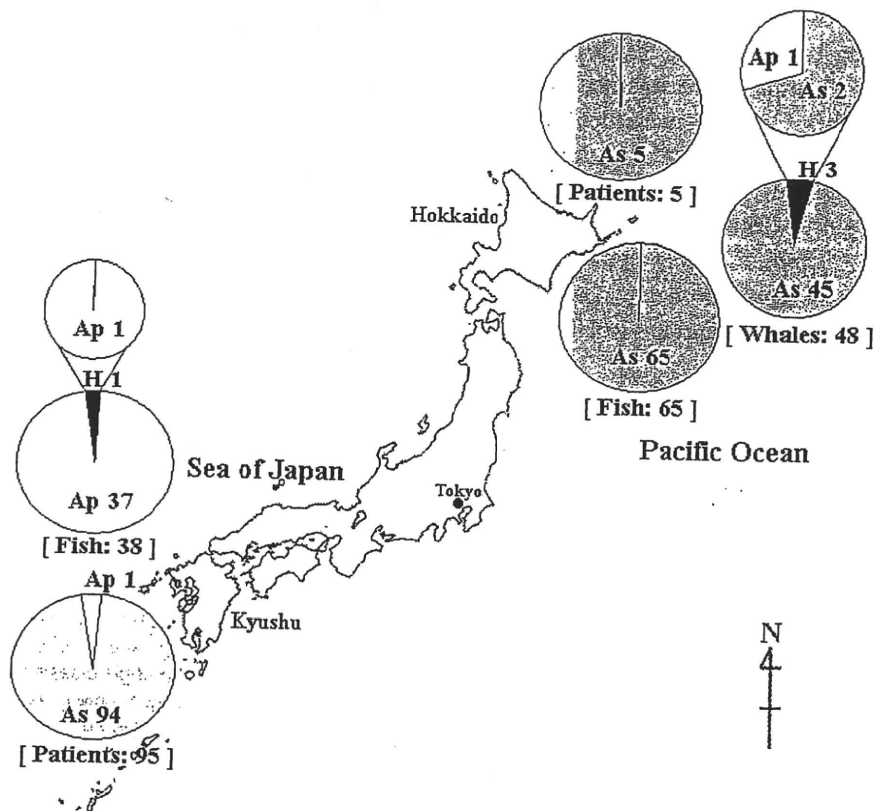


Fig 3- Distribution in Japan of *A. simplex* s. str. (As), *A. pegreffii* (Ap) and hybrid genotype (H) isolated from fish, marine mammals and patients with anisakiasis. Large pie charts show the results of identification of *A. simplex* based on analysis of the rDNA ITS region. Small pie charts show the results of typing of the hybrid genotype based on analysis of mitochondrial *cox1*. Numbers in square brackets and after the abbreviations of the species (As, Ap and H) represent the numbers of worms examined and identified, respectively.

s. str. However, almost all L3 larvae from fish captured in the southern Sea of Japan were identified as *A. pegreffii*, while only one L3 larva was identified as the hybrid genotype. However, the latter's genotype was determined to be *A. pegreffii*-type by RFLP analysis of mitochondrial *cox1*.

Adult worms from marine mammals in North Pacific Ocean were identified as *A. simplex* s. str. or the hybrid genotype. Of the three hybrid genotype worms, two were determined to be *A. simplex* s. str.-type and one *A. pegreffii*-type by RFLP analysis of mitochondrial *cox1*.

Five larvae from 5 patients in northern Japan were all identified as *A. simplex* s. str. In contrast, 94 of 95 larvae from 80 patients

in southern Japan were identified as *A. simplex* s. str., while the remaining single larva was identified as *A. pegreffii*.

Mixed infections with the hybrid genotype and either *A. simplex* s. str. or *A. pegreffii* were found in marine mammals collected from North Pacific Ocean and in fish from southern Sea of Japan. However, no example of mixed infection with both *A. simplex* s. str. and *A. pegreffii* in a single host was detected.

Distribution of *A. simplex* sibling species in Japan

The distribution in Japan of *A. simplex* identified at the sibling species-level is shown in Fig 3. Almost all worms from fish were

classified into one of the two sibling species corresponding to the geographical location from which the samples were obtained; worms from north Pacific Ocean were all identified as *A. simplex* s. str., while almost all worms from the southern Sea of Japan were *A. pegreffii*. In contrast, worms from patients were mainly identified as *A. simplex* s. str. even though they were obtained from southern Japan where *A. pegreffii* predominates in samples isolated from fish.

DISCUSSION

A. simplex worms occurring worldwide show no obvious variation in morphology. However, Nascettii *et al* (1983, 1986) divided *A. simplex* worms isolated from Mediterranean Sea and North Atlantic Ocean into two sibling species, *A. pegreffii* and *A. simplex* s. str., respectively, based on difference observed in isozyme electrophoretic patterns. In addition to these two sibling species, Mattiucci *et al* (1997) differentiated some *A. simplex* worms showing another electrophoretic pattern as *A. simplex* C. Consequently, *A. simplex* worms have come to be regarded as a complex composed of three sibling species, namely, *A. pegreffii*, *A. simplex* s. str. and *A. simplex* C.

This classification has been generally accepted because the three sibling species were also unequivocally discriminated based on nuclear rDNA sequence differences (D Amelio *et al*, 2000). In this study, we applied molecular methods for sibling species-level identification of Japanese *A. simplex* worms and confirmed the usefulness of RFLP analysis of rDNA for this purpose. Thus Japanese *A. simplex* worms were classified into *A. simplex* s. str., *A. pegreffii* or the hybrid genotype.

It is well known that mitochondrial DNA (mtDNA) evolves at a faster rate than nuclear DNA and is useful for differentiating cryptic species (Blouin, 2002). Therefore, we used mitochondrial *cox1* in developing an RFLP method that is capable of classifying *A. simplex*

into sibling species. Initially, the enzyme *HinfI* was used for this discrimination (Umehara *et al*, 2006), but based on the detection of intraspecific variations at the recognition sites of *HinfI* in mitochondrial *cox1* sequence in one of 12 *A. pegreffii* worms examined, we selected another enzyme, *SfcI*, that discriminates between *A. simplex* s. str. and *A. pegreffii*. By sequence analysis, we confirmed that there were no intraspecific variations at the *SfcI* recognition site in the sequences of 39 worms examined so far (20 *A. simplex* s. str. and 19 *A. pegreffii* worms).

The hybrid genotype worms were clearly classified into either *A. simplex* s. str.-type or *A. pegreffii*-type by the RFLP method employing *SfcI*. Since the vast majority of mitochondrial genomes are inherited uniparentally from the female parent, the results obtained with the hybrid genotype worms were as predicted. The mitochondrial genome is effectively haploid (Moore, 1995) and, thus, may be advantageous for study of the evolutionary history of *A. simplex*.

The results of this study showed that *A. simplex* s. str. is primarily distributed in fish and marine mammals in North Pacific Ocean and *A. pegreffii* is predominantly distributed in fish in the southern Sea of Japan. However, worms from patients were identified as *A. simplex* s. str. even though they were obtained from southern Japan where *A. pegreffii* is the predominant species in fish. The reason for this discrepancy between the predominant sibling species in fish and in patients remains unresolved. Studies are now in progress to identify the fish species that is responsible for human infection. This information is crucial for initiating prevention measures against human anisakiasis, especially in southern Japan.

REFERENCES

- Abollo E, Paggi L, Pascual S, D Amelio S. Occurrence of recombinant genotypes of *Anisakis simplex* s. s. and *Anisakis pegreffii*

- (Nematoda: Anisakidae) in an area of sympatry. *Infect Genet Evol* 2003;3:175-81.
- Blouin MS. Molecular prospecting for cryptic species of nematodes: mitochondrial DNA versus internal transcribed spacer. *Int J Parasitol* 2002;32:527-31.
- D Amelio S, Mathiopoulos KD, Santos CP *et al.* Genetic markers in ribosomal DNA for the identification of members of the genus *Anisakis* (Nematoda : Ascaridoidea) defined by polymerase chain reaction-based restriction fragment length polymorphism. *Int J Parasitol* 2000;30:223-6.
- Hu M, D Amelio S, Zhu X, Paggi L, Gasser R. Mutation scanning for sequence variation in three mitochondrial DNA regions for members of the *Contracaecum osculatum* (Nematoda: Ascaridoidea) complex. *Electrophoresis* 2001;22:1069-75.
- Martin-Sanchez J, Artacho-Reinoso ME, Diaz-Gavilan M, Valero-Lopez A. Structure of *Anisakis simplex* s. l. populations in a region sympatric for *A. pegreffii* and *A. simplex* s. s. Absence of reproductive isolation between both species. *Mol Biochem Parasitol* 2005;141:155-62.
- Mattiucci S, Nascetti G, Cianchi R, *et al.* Genetic and ecological data on the *Anisakis simplex* complex, with the evidence for a new species (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). *J Parasitol* 1997;83:401-16.
- Mattiucci S, Nascetti G. Molecular systematics, phylogeny and ecology of anisakid nematodes of the genus *Anisakis* Dujardin, 1845: an update. *Parasite* 2006;13:99-113.
- Moore WS. Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. *Evolution* 1995;49:718-26.
- Nascetti G, Paggi L, Orecchia P, Mattiucci S, Bullini L. Two sibling species within *Anisakis simplex* (Ascaridida: Anisakidae). *Parassitologia* 1983;25:239-41.
- Nascetti G, Paggi L, Orecchia P, Smith JW, Mattiucci S, Bullini L. Electrophoretic studies on the *Anisakis simplex* complex (Ascaridida: Anisakidae) from the Mediterranean and North-East Atlantic. *Int J Parasitol* 1986;16:633-40.
- Umehara A, Kawakami Y, Araki J, Matui T, Uchida A. Molecular identification of *Anisakis simplex* sensu stricto and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) from fish and cetacean in Japanese waters. *Parasitol Int* 2006;55:267-71.
- Umehara A, Kawakami Y, Araki J, Uchida A. Molecular identification of the etiological agent of the human anisakiasis in Japan. *Parasitol Int* 2007;56:211-15.

6. 腸管寄生性原虫の小胞輸送 —病原機構における役割

津久井久美子, 野崎智義

細胞内小胞輸送は真核生物にユビキタスに存在する必須の物質輸送系である。基本的な輸送経路と関与する分子群, さらにその機能を調節する分子機構は, 酵母をはじめとする単細胞生物からヒト・植物まで保存されている。しかしながら, 原生生物(原虫)では小胞輸送は特殊な進化を遂げると同時に, 寄生や病原性においても重要な役割を演じるようになった。本稿ではヒトにアメーバ赤痢(赤痢アメーバ症)を起こす寄生虫である赤痢アメーバを例にとり, 独自に進化した寄生性原虫の小胞輸送の分子機構とその病原性における役割を紹介する。

はじめに

WHOの定義する低所得国・地域において感染症は死亡原因の約1/4~1/3を占め, そのうち呼吸器感染症(11.2%), 腸管感染症(6.9%), HIV/AIDS(5.7%), マラリア(3.3%)が大部分を占める¹⁾。腸管感染症の中でも赤痢アメーバ(*Entamoeba histolytica*)によって引き起こされるアメーバ赤痢^{*1}は世界で年間5,000万人が罹患, 10万人の死者を出しており, 発展途上国で5歳以下の子供たちの主な死亡原

因の1つである²⁾。日本国内でも海外渡航者にとどまらず, 知的障害者や男性同性愛者の間での蔓延が報告され, 2008年の厚生労働省への届出数が800を超えるなど, 感染者は確実に増加している³⁾。

現在の赤痢アメーバ症基礎研究の潮流は, 病原因子・病原機構, 分化, 遺伝子発現調節, オルガネラ進化, 代謝などきわめて多岐に渡るが, 2005年に開示されたゲノム情報^{4) 5)}を基盤として“-omics”を駆使した統合的な研究が実現している。その一方で, “-omics”研究の限界から, 個別の分子・経路を理解

[キーワード&略語]

赤痢アメーバ, プロテアーゼ輸送, 低分子量Gタンパク質, レトロマー複合体

AP: amoebapore (アメーバポア)

CP: cysteine protease (システインプロテアーゼ)

CPBF: cysteine protease binding protein family

ICP: inhibitor of CP (CP阻害タンパク質)

M6P: mannose 6-phosphate (マンノース6-リン酸)

MPR: M6P receptor (M6P受容体)

PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase (ホスファチジルイノシトール3キナーゼ)

PI3P: phosphatidylinositol 3-phosphate (ホスファチジルイノシトール3リン酸)

PPV: prephagosomal vacuole (前貪食胞)

TGN: trans-golgi network (トランスゴルジネットワーク)

VCA: verprolin homology, cofilin homology and acidic motif

WASP: Wiskott-Aldrich syndrome protein

するための、生化学・細胞生物学的解析の必要性は日々高まっている。そのような中でわれわれは赤痢アメーバの病原機構を、主に細胞内小胞輸送という観点から眺めて研究を行っている。

細胞内小胞輸送（膜輸送，メンブレントラフィック）は真核生物にとって必須のシステムであり，その根幹は真核生物全般に保存されている。しかしながら，進化の過程で早期に真核生物の主幹から分岐した赤痢アメーバ原虫ではその輸送システムが大きく変化している。赤痢アメーバの感染症病原体としての重要性に加え，このユニークな進化上の位置が，赤痢アメーバの細胞内小胞輸送の研究を生物学的観点から重要なものにしていく。また感染病原体に特異的・選択的に存在する分子機構の解明は，薬剤やワクチンなどの新しい標的を提供する可能性をもっている。基礎生物学における重要な発見は常に臨床応用への可能性を秘めている。本稿では赤痢アメーバの病原機構における小胞輸送の役割に関して，特に病原因子の輸送機構についてわれわれの研究を中心に紹介したい。

1 赤痢アメーバの病原因子と病原機構における小胞輸送の関与

1) 確立された病原因子

赤痢アメーバ症の主要な症状（粘血性下痢，肝膿瘍）の成立に関与する病原性因子として主に3つの分子が精力的に研究されている。①宿主組織との接着に関与するGal/GalNAc 特異的レクチン（Gal/GalNAc specific lectin），②タンパク質分解酵素であるシステインプロテアーゼ（cysteine protease：CP），③膜穿孔性ペプチドであるアメーバポア（amoebapore：AP）である。赤痢アメーバの腸管上皮への接着にはレクチンが，組織侵入・障害にはCPが，宿主細胞や細菌の貪食胞での消化にはAPやCPが機能している⁶⁾。また病態形成に直接関与しないが，感染伝播に重要なシスト形成も病原機構の一部と考えられ，主要な研究テーマとなっている。

2) 病原因子と小胞輸送

リボソームで合成されたタンパク質は，一部は細胞質内にとどまり，一部はさまざまな経路を経て，細胞内の特殊なオルガネラや細胞表面，ときに細胞外へと輸送される。レクチン・CP・APを含む病原因子の機能発現のみならず，シスト化における細胞のリモデ

リングやシスト壁の合成・輸送においても適切な細胞内輸送は不可欠である。よって小胞輸送経路の統合的理解が病原機構全体の解明に資すると考えられる。

2 ゲノムからわかるユニークな小胞輸送機構

1) Rab 低分子量 GTPase の多様化

赤痢アメーバ全ゲノムの解読は終了している^{4) 5)}。そこでまずゲノム情報から予測可能な小胞輸送の分子機構に関して概説する。真核生物で中心的な小胞輸送制御分子としてRab 低分子量GTPase^{*2}がある。酵母では11，多細胞生物であるヒトでは60を超えるRabが存在する。しかし，単細胞生物である赤痢アメーバには91ものRab 遺伝子が存在する（図1）^{4) 7)}。このうち6グループ計21のRab（Rab1, 2, 5, 7, 8, 11）は他種生物と相同性をもつオーソログと予想される。一方，9グループ計30のRab（RabC, D, F, I, K, L, M, N, P）ならびにグループを形成しない40のRabは赤痢アメーバに選択的に保存していた。DNA マイクロアレイによる解析から栄養体で70%以上のRabが有意に発現していることが確認されている（中野ら未発表）。また他種生物と高い相同性を示すオーソログでも，その局在・機能がモデル生物とは異なることが示された（本稿3参照）。赤痢アメーバに保存されたRabは進化的に初期に確立したRabであると予測されるが，依然として進化の選択圧に影響されている可能性がある。また，単細胞生物における多様なRabは他の貪食性の寄生性原虫（腔トリコモナス）や自由生活性原虫（ゾウリムシやテトラヒメナ）でも発見されており，Rabの多様性が原虫の貪食を選択圧として生まれた可

※1 アメーバ赤痢（赤痢アメーバ症）

感染は赤痢アメーバ原虫のシスト（嚢子）に汚染した水・食物などの経口摂取で起こる。大腸で脱嚢した栄養体が組織に接着・侵入し，感染者の5～10%に大腸粘膜の破壊，大腸炎や粘血性の下痢を起こす。一部で肝臓・肺・脳などに播種し，膿瘍を生じ，重篤化する。また，感染者の一部は無症状シストキャリアとなり，次の感染源となる。

※2 Rab 低分子量 GTPase

20～25kDaのグアニンヌクレオチド結合タンパク質。Ras, Rho/Rac, Ran, Sar/Arf, Rabなどが知られ，さまざまな細胞内現象における制御分子として使われる。Rabは特に小胞輸送において重要であり，GTPに結合した活性化型とGDPに結合した非活性化型と異なる分子（=エフェクター）に結合し，特異的な機能を発揮する。

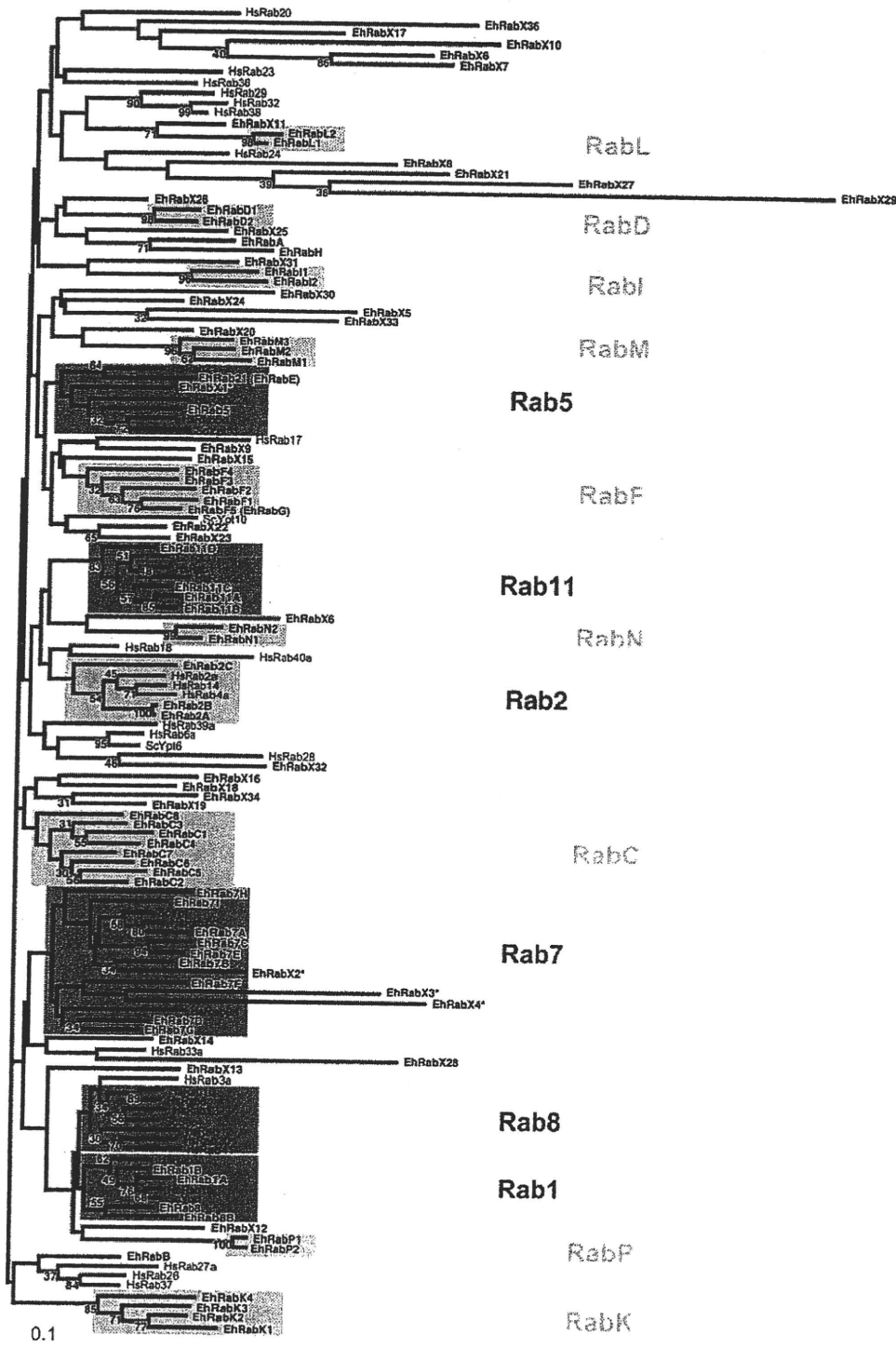


図1 赤痢アメーバ Rab の系統樹

赤痢アメーバゲノムデータベースから取得した Rab 遺伝子情報をもとに系統樹を作成した。黒字はヒトや酵母で保存されているグループ，グレーの字は赤痢アメーバ独自に形成されていたグループ。大部分の Rab が赤痢アメーバ特異的に進化していることがわかる。30%以上のブートストラップ値を図中に示し，図下のスケールバーはアミノ酸置換に基づく距離を示す（文献7より転載）

能性が示唆される (中野ら, 未発表). また, 赤痢アメーバの細胞骨格制御の特殊性がRab 依存的な小胞輸送制御系に多様性を与えたのかもしれない (本稿 2-3) 参照).

2) Rab エフェクターオーソログの欠損

Rab の機能は特異的エフェクターによって規定される. 酵母・ヒトなどでは Rab5 や Rab7 にそれぞれ EEA1, Rabaptin-5, Rabex-5 や RILP, Rabring7, Vps34 というエフェクターが存在することが知られている. これらが Rab5 や Rab7 と結合することで, それぞれ初期エンドソーム, 後期エンドソームに特異的な分子が動員され, コンパートメントの成熟が起こる^{8) 9)}. 赤痢アメーバにも Rab5 や Rab7 オーソログが保存しているが, 上記エフェクターについてはホスファチジルイノシトール3-キナーゼ (phosphatidylinositol 3-kinase : PI3K) である Vps34 以外保存されていない. よって, 赤痢アメーバにおける Rab 依存的な小胞輸送の調節機構は種特異的に分化していると考えられる (本稿 3 参照).

3) 細胞骨格の構成・制御因子の保存

活発に運動と捕食を行う赤痢アメーバにおいて, 細胞骨格の制御は重要である. 赤痢アメーバゲノムには細胞骨格分子のうちアクチンと微小管が存在するが, 微小管を介した輸送に必須なモーター分子やその制御因子が存在しないことから, 主要な細胞骨格はアクチンであると考えられている⁵⁾. アクチン制御因子はほぼすべて保存されているにもかかわらず, アクチン重合の重要な制御分子である Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (WASP) のホモログを欠損している. しかし最近, WASP の C 末側に存在する G-アクチンと Arp2/3 複合体に結合するドメイン (verprolin homology, cofilin homology and acidic motif : VCA) が単体で Arp2/3 依存的なアクチン重合を促進できること, VCA ドメインをもついくつかのタンパク質が赤痢アメーバに存在していることが明らかになり, このギャップが埋められようとしている.

4) オートファジーの単純化

近年盛んに研究されているオートファジーの過程も赤痢アメーバでユニークに進化している. 細胞質タンパク質やオルガネラをリソソームへ送るこのシステムは栄養飢餓時の応答のみならず, 細胞分化時のリモデリングにおいても重要な役割をもつことがわかってい

る. オートファジーの過程は, ①開始シグナル, ②preautophagosomal structure (PAS) 形成, ③オートファゴソーム膜形成にかかわる2つのユビキチン様因子の結合, ④ホスファチジルイノシトール-3-リン酸 (phosphatidylinositol 3-phosphate : PI3P) 形成の制御系の大きく4つの分子群の関与が知られる. 赤痢アメーバには他種生物で①, ②, ④の過程に関与することの知られる遺伝子のほとんど (Atg1, 2, 6, 9, 13, 14, 17, 18, 29) が存在しない. さらに③の過程にある Atg8 と Atg12 という2つのユビキチン様タンパク質の結合系のうち Atg8 系 (Atg3, 4, 7, 8) しか保存されていない. このことはオートファジーあるいはその元となる細胞機能において, Atg8 とその修飾機構が初期から保存されていたことを示唆している. オートファジー, ならびに Atg8 の遺伝子発現がシスト化過程で強く誘導されること, PI3K 阻害剤がシスト化とオートファゴソーム形成の両者を同時に阻害することが *Entamoeba* のシスト化のモデルである *E. invadens* で示されている¹⁰⁾. シスト化に伴う細胞構造のリモデリングに原始的なオートファジーが関与するのか, あるいは, Atg8 経路がオートファジー様の新規な分子機構として働いているのかまだ明らかでないが, いずれにせよシスト化にかかわる重要な機構であると考えられる.

3 病原因子にかかわる小胞輸送経路

赤痢アメーバゲノムからいくつかの小胞輸送関連因子や機構が特異的な進化を遂げたことを紹介した. 次に, 病原性・組織傷害において中心的な働きをする CP の輸送にかかわる分子機構について解説する.

1) 一般的なリソソーム酵素輸送系

他種生物では CP などのリソソーム酵素は一般にどのように輸送されるのだろうか? 代表的な, マンノース-6-リン酸 (mannose 6-phosphate : M6P) とその受容体 (M6P receptor : MPR) を介した系を図2に示す. リソソームに輸送されるプロテアーゼは, まず N 末端のシグナル配列により選別され Sec61 複合体により小胞体内部へ移送され, さらに, ゴルジ体で M6P 修飾を受ける. これがトランスゴルジネットワーク (TGN) で MPR に認識され, アダプタータンパク質 (アダプター) 複合体とクラスリンにより濃縮, 出芽し, 輸送小胞が形成される. 輸送小胞はエンドソーム

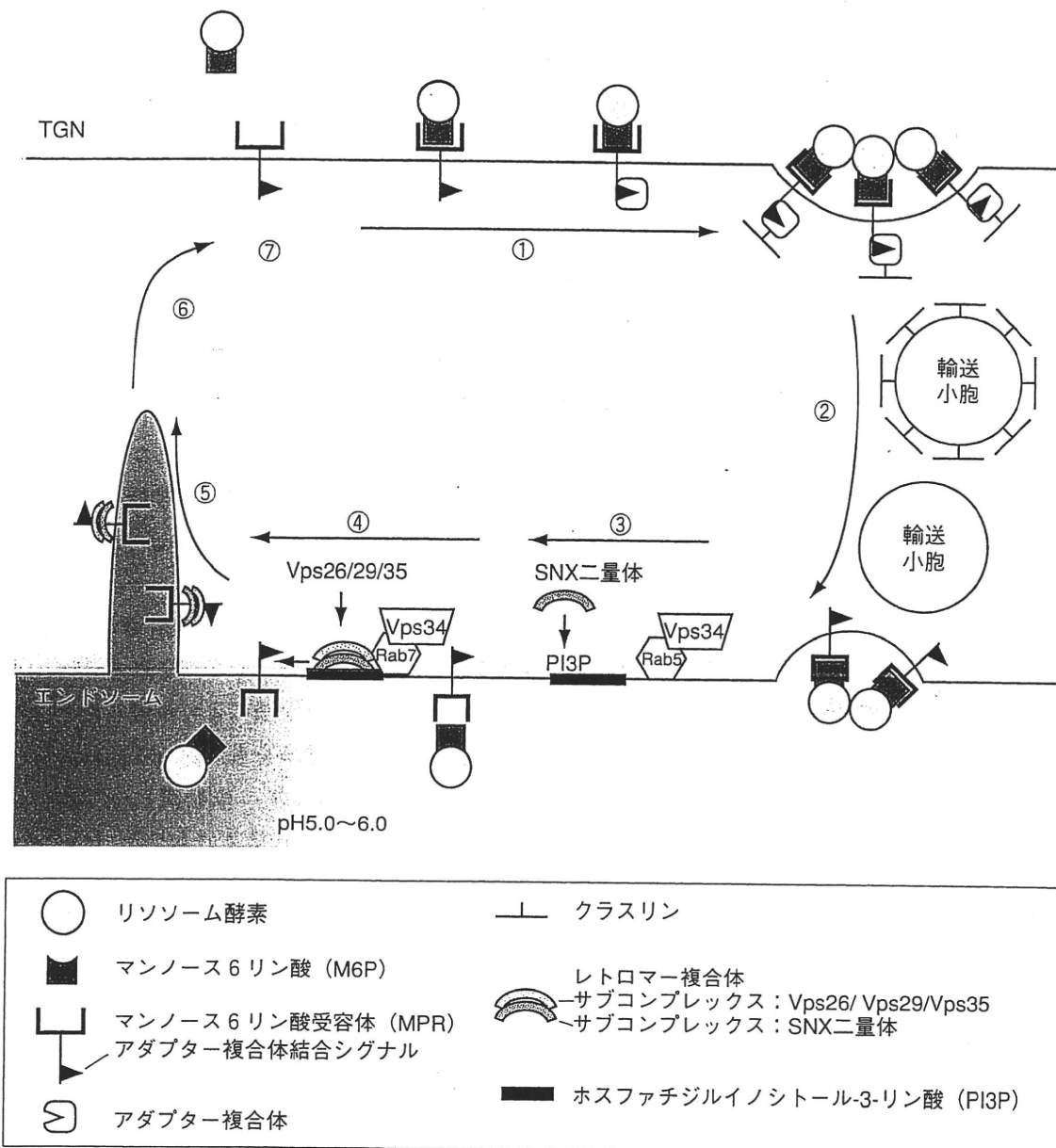


図2 他種生物におけるリソソーム酵素輸送系

MPRを介したリソソーム酵素輸送系。①M6P修飾を受けたリソソーム酵素はMPRによって認識され、MPRの細胞質側にアダプタータンパク質複合体が動員される。②アダプタータンパク質複合体を介してクラスリンが動員され、MPRとリソソーム酵素が濃縮された輸送小胞が形成される。クラスリンコートが外れ、エンドソーム膜と結合、融合する。③初期エンドソームではRab5とそのエフェクター (Vps34) の働きでPI3Pが産生され、そこにレトロマー複合体の一部であるSNX二量体が動員される。④エンドソームに運ばれたリソソーム酵素は後期エンドソームへの成熟に伴う酸性化 (pH5.0~6.0) によりMPRから外れる。⑤後期エンドソームにはRab7が動員され、引き続きVps34の働きによりPI3Pを産生しSNX二量体の安定化を図るとともにVps26、29、35からなるサブコンプレックスの動員を行う。⑥積み荷を降ろしたMPRの細胞質側にレトロマー複合体が結合、チューブ状のエンドソームを形成、TGNへの逆行輸送を行う。⑦MPRがTGNにリサイクルされ、次の輸送に備える

ム膜に結合・融合し、エンドソームは成熟・酸性化する。エンドソームの酸性化に伴い、プロテアーゼはMPRから解離する。プロテアーゼはリソソームに留まる一方で、MPRはレトロマー複合体によりTGNへ再び回収される。すなわち、この輸送機構はプロテアーゼに付加されるM6Pをタグ（荷札）とした受容体依存的認識・輸送システムである。

2) Rab7ファミリーとリソソーム形成における役割

Rab7は一般に後期エンドソームやリソソームに局在し、エンドソームからリソソームへの成熟過程（あるいは輸送）を制御する。赤痢アメーバでは病原因子APやCPがリソソームで貯蔵され機能すること、さらに、貪食と貪食胞成熟が病原性に必須であることから、Rab7の機能解明が病原機構の理解に重要であった。赤痢アメーバには9つのRab7アイソタイプ（Rab7A～I）が存在する¹¹⁾。そのうちRab7AとRab7Bの局在と機能は明らかになっており、その働きは他種生物と異なるものであった^{11) 12)}。Rab7Aは定常状態でリソソームに局在せず、貪食開始時に貪食胞と独立して形成される前貪食胞（prephagosomal vacuole：PPV、赤痢アメーバに特異的に観察される）とファゴリソソームに局在した。PPVはAPやCPを含んでいたことから、Rab7AがPPV、貪食胞へのリソソーム酵素の輸送に重要な分子であることが示唆された。一方Rab7Bはリソソームに恒常的に存在していた¹¹⁾。Rab7Bの活性化型変異体を強制発現させるとドミナントネガティブ効果が観察され、リソソームの減少とCPの過剰な分泌が観察された¹¹⁾。以上の結果から、Rab7A、Rab7Bはリソソーム形成において哺乳動物等とまったく異なった機能を担うこと、アイソタイプは機能的棲み分けをすることが示唆された。

3) Rab7A結合タンパク質：レトロマー複合体

Rab7AがPPV、貪食胞へのリソソーム酵素輸送を調節することが明らかになったので、Rab7Aのエフェクター分子を探索した¹²⁾。GTP型Rab7A特異的に結合する分子群をタンパク質相互作用をもとに精製したところ、Vps26、Vps29、Vps35の3分子が同定された。これらは酵母やヒトでレトロマーと呼ばれる5分子からなる複合体の一部であった（図3）。レトロマー複合体は他種生物においてMPRに結合し、MPRのエンドソームからTGNへの逆行輸送を行う分子である（図2）。赤痢アメーバでは5分子のうち、精製・同定さ

れた3分子しかゲノム上に保存されておらずSNX※3分子を欠いていた。レトロマーと結合するMPRのホモログも存在しなかった。またRab7Aとレトロマー複合体との結合はVps26の種特異的なC末端延長配列を介しており、全く前例がなかった。赤痢アメーバにおいてRab7Aの強発現により起こるCP分泌の低下がVps26との共発現でキャンセルされたことから、Rab7Aとレトロマー複合体の相互作用がCP輸送を調節することが示唆された（図3）^{11) 13)}。他種生物ではMPRとVps35が結合することが示されているため、これに代わるCP受容体の同定が重要となった。最近、哺乳動物でRab7とレトロマー複合体とが、Rab7とVps35との直接的な結合により相互作用することが報告された¹⁴⁾。

4) CP受容体の同定

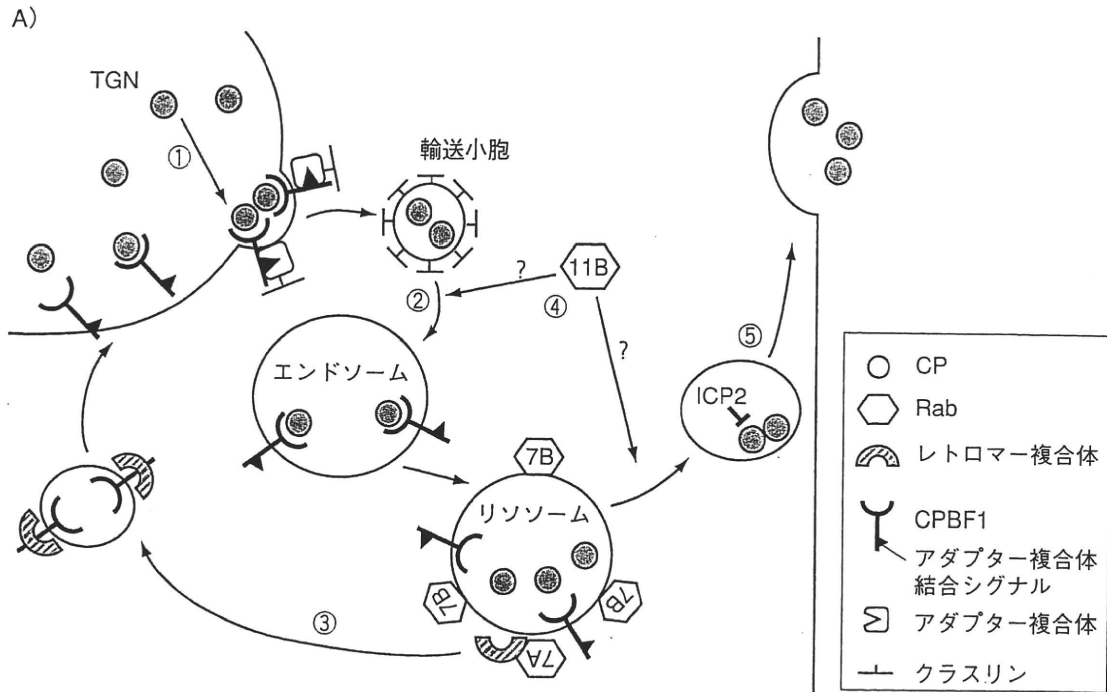
赤痢アメーバのCP遺伝子の中でも発現量が多く、病原性への直接的な関与の示唆されるCP5に結合する分子を、生化学的手法により単離したところ、シグナル配列と膜貫通領域をもつ約100 kDaの分子が同定された（中田-津久井、未発表）。このタンパク質（CPBF1）はゲノム中でファミリー（cysteine protease binding protein family：CPBF）として存在しており、ほとんどが細胞質側にYxxLというアダプター複合体との結合モチーフを保存していた。赤痢アメーバにはアダプターとクラスリンが保存されており、これらの分子メカニズムが予想通り共同してCP輸送にかかわるのか、赤痢アメーバ特異的役割を果たすのか、今後の解析が必要であるが、CP受容体の発見はCP輸送の分子メカニズムの解析を大きく進めると期待される。

5) CP分泌の主要調節因子Rab11

赤痢アメーバのCP輸送を調節するRabが明らかになる一方で、細胞外への分泌を調節する分子は未同定であった。通常リサイクルエンドソームに局在し、輸送分子のリサイクルに関与するとされるRab11は赤痢アメーバに4種類のアイソタイプ（Rab11A～D）と

※3 SNX

sorting nexinの略称。ホスファチジルイノシトール-3-リン酸（PI3P）に結合するphox homology（PX）ドメインと、弓状の構造を取り湾曲した膜に結合するbin-amphiphysin-rvs（BAR）ドメインを有するタンパク質。この特徴からPI3P依存的に膜に動員され、曲率を上げることで膜をチューブ化する。SNX1、2、5、6がレトロマー複合体のサブコンプレックスになりうる。



B) レトロマー複合体

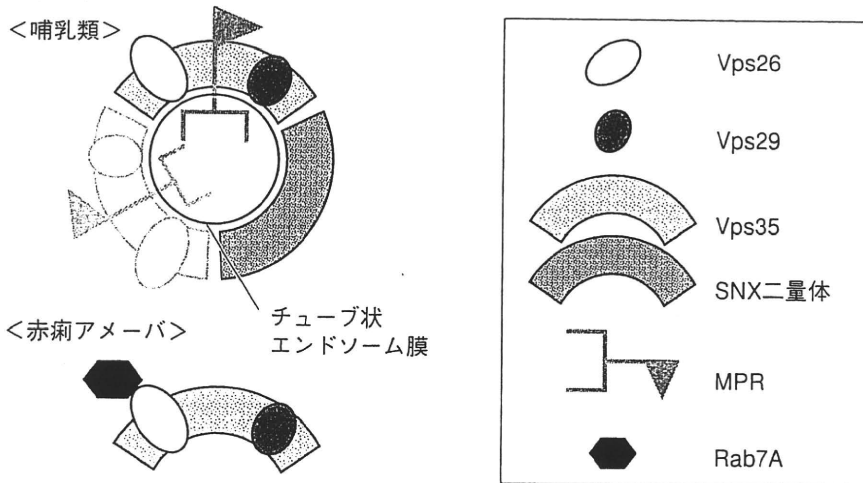


図3 赤痢アメーバにおけるCP輸送関与分子

A) 赤痢アメーバのCP輸送。CPは小胞体で合成されゴルジ体を通り、TGNへ送られる(①)。②CPはさらにTGNからエンドソームへアダプター複合体結合モチーフをもつCPBF1によりリソソームへと輸送され、③CPBF1はリソソームから再びTGNへリサイクルされると考えられる。この逆行輸送はRab7Aとレトロマー複合体により制御されると予想されるが、現在CPBF1とレトロマーの直接の結合を示唆する結果はない。また約半数のCPで糖鎖修飾部位が予想されていないことから、糖鎖非依存的輸送機構も存在すると考えられる。さらに赤痢アメーバレトロマー複合体は膜結合サブユニットであるSNXを欠いており、小胞膜への結合様式は不明である。また、細胞外へはリソソームを経て分泌されるか、あるいはポストゴルジ輸送小胞から直接分泌されるかは不明である。④Rab11Bは細胞外への分泌を正に制御するが、作用点は不明である。⑤リソソームにはICP2があり、CPの活性ならびに輸送を負に制御していると考えられる。ICP1については細胞質に存在する分子であることから、小胞体への移行時など、TGNに入る前の段階のCP活性と輸送を制御すると考えている。B) 哺乳類と赤痢アメーバでのレトロマー複合体の相違。哺乳類ではレトロマー複合体は5分子からなる。立体構造解析から5分子が会合することでエンドソームをらせん状に取り囲みチューブ状に形成する働きがあることが明らかにされた。またVps35が受容体分子と直接結合する。赤痢アメーバでは5分子のうち3分子(Vps26, Vps29, Vps35)が保存されており、Rab7AがVps26と直接結合し、CP輸送に関与していた。しかしチューブ状の形態をとることに重要なSNX分子のホモログがないことから、その輸送機構はユニークなものと考えられる。最近動物細胞でRab7とレトロマー複合体の関係が解明され、Vps35とRab7が結合することが示された

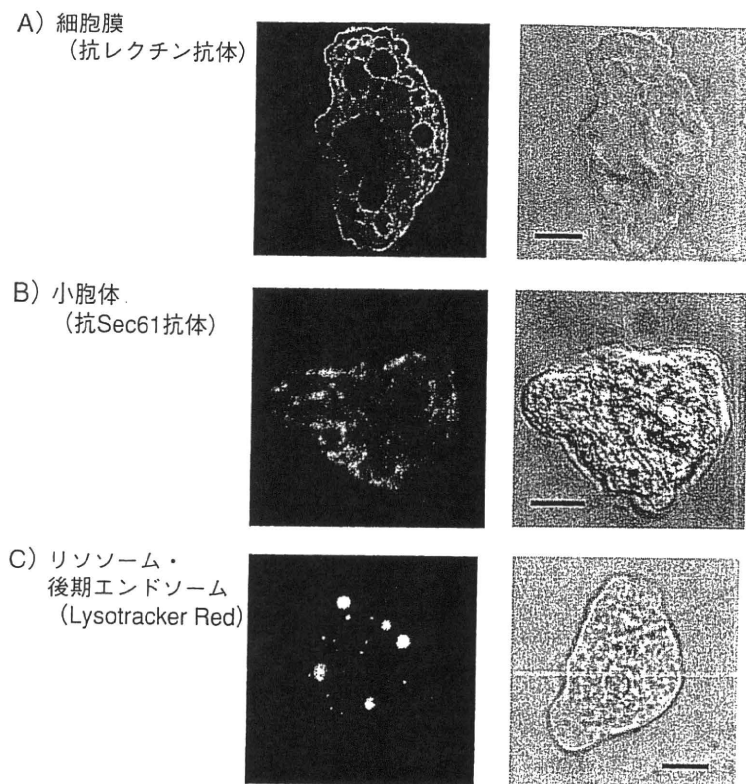


図4 赤痢アメーバのオルガネラ

赤痢アメーバを細胞表面レクチン (Igl) 抗体 (A), Sec61 抗体 (B), リソソーム集積性の色素 (Lysotracker Red) (C) で染色し, 共焦点レーザー顕微鏡で観察した. A) 細胞表面一面にレクチン分子が分布する様子が観察される. また位相差像から細胞内部は大小の小胞からなることがわかる. これら小胞のいくつかがレクチン抗体で染色されることから, レクチン分子が細胞表面と内部小胞を行き来していることがわかる. B) Sec61 はシグナル配列をもつタンパク質を小胞体内に転送する際の小孔をつくる, 小胞体局在性タンパク質である. 赤痢アメーバの小胞体は小胞の形態をとらず, ネットワークのように細胞全体に広がっている. これがより小さい小胞の集合なのか, 他の形態をもつネットワークなのか, いまだ議論のあるところである. C) リソソーム・後期エンドソームは大小の小胞として観察される. 赤痢アメーバでファゴサイトーシスやエンドサイトーシスの実験を行うとファゴソームやエンドソームが時間とともに酸性化されることが観察される (スケールバー: 10 μm)

して存在していた. 報告された Rab11A の機能¹⁵⁾ は不明瞭であったので, Rab11A に次いで mRNA 発現量の多い Rab11B の解析を行ったところ Rab11B の強発現により CP の過剰な分泌が起こることが明らかになった¹⁶⁾. Rab11B は小胞体 (図4) のようなネットワーク状に観察されたが, Sec61 との共局在は観察されなかった. また一部エンドソームと共局在するものの, リソソームとの共局在は観察されなかった. よって Rab11B は Rab7A/7B とは異なるメカニズムで CP 輸送を制御していると考えられる. 既知の Rab11 のエフェクター分子も赤痢アメーバには保存しておらず, どのような分子メカニズムが存在するのか, 今後の解析が待たれる.

6) CP の内因性阻害タンパク質 ICP

inhibitor of CP (ICP) は CP の活性中心に結合する内因性の CP 阻害タンパク質である. ICP はもともと他の寄生性原虫である *Leishmania* や *Trypanosoma brucei* で発見された^{17) 18)} が, 赤痢アメーバでの存在はゲノム開示により明らかとなった. 赤痢アメーバには, シグナル配列をもたない細胞質局在の ICP1 とシグナル配列をもつリソソーム局在の ICP2 の 2 分子が存在する. 興味深いことに, 2 種類の ICP どちらの過剰発現によっても CP の分泌が大きく抑制されること, 細胞中の ICP の分子数は CP の 1/1000 であること, 約 2 倍の ICP の強発現により 70 ~ 90% の CP 活性の減少が起きることから, この分泌抑制は CP の活性阻害

ではなくCP輸送の制御により起こったと考えられた¹⁹⁾。CPの内因性阻害タンパク質がCP輸送を制御するとの報告はなく、きわめて重要な知見である。しかしながら、未だに細胞質内・小胞内それぞれにおけるICPのCP活性化抑制機構の分子メカニズムの詳細は明らかでなく、ICPの生理的役割とともに今後の解析が待たれる。

おわりに

赤痢アメーバは主に発展途上国で医学的インパクトの高い病原体であり、その病気の克服、例えばワクチンや薬剤の創成は重要な研究テーマである。しかし同時に、真核生物の進化の過程で初期に分化した生物としてユニークな生物現象や分子機構を備えている。本稿で紹介したように、真核生物によく保存されている小胞輸送、細胞骨格、オートファジー等のさまざまな細胞内メカニズムの進化を理解し、その普遍性と特殊性を解明するためにきわめて魅力的な研究材料である。紙面の都合上、本稿で紹介できたユニークな分子機構は、近年解明された重要な知見のごく一部に過ぎない。ここ1、2年ほどでも、遺伝子発現のエピジェネティック制御機構 (gene silencing)、microRNAによる転写制御、膜内プロテアーゼによるレクチン分子のプロセッシング、免疫回避機構など生物学的にきわめて価値の高い新発見が次々と報告されている。また赤痢アメーバは嫌気的原虫であり、ミトコンドリア (マイトソームと呼ばれる) は高度に退化しているが、他種生物とは全く異なる代謝経路を区画化していることが徐々に明らかとなっている。赤痢アメーバ研究には研究者人口の少ないデメリットもあるが、顕微鏡下で盛んに動き回る様子は研究者の飽くなき探究心をくすぐり続ける。その魅力を若い研究者・学生や他分野の研究者にわかってもらえれば、原虫感染症学には常に新しい研究展開が生まれ続けると信じている。

文献

- 1) WHO fact sheet 2007 : <http://www.who.int/media-centre/factsheets/fs310.pdf>
- 2) Haque, et al. : N. Engl. J. Med., 348 : 1565-1573, 2003

- 3) 感染症発生動向調査速報データ, 2008年12月24日, 国立感染症研究所感染情報センター : <http://idsc.nih.gov/jp/index.j.html>
- 4) Loftus, B. et al. : Nature, 433 : 865-868, 2005
- 5) Clark, C. G. et al. : Adv. Parasitol., 65 : 51-190, 2007
- 6) 野崎智義 : 細胞工学, 22 : 1160-1163, 2003
- 7) Saito-Nakano, Y. et al. : Exp. Parasitol., 110 : 244-252, 2005
- 8) Harrison, R. E. et al. : Mol. Cell Biol., 23 : 6494-6506, 2003
- 9) Lindmo, K. & Stenmark, H. : J. Cell Sci., 119 : 605-614, 2006
- 10) Picazzari, K. et al. : Infect. Immun., 76 : 278-288, 2008
- 11) Saito-Nakano, Y. et al. : Cell Microbiol., 9 : 1796-1808, 2007
- 12) Nakada-Tsukui, K. et al. : Mol. Cell Biol., 16 : 5294-5303, 2005
- 13) Nozaki, T. & Nakada-Tsukui, K. : Parasitol. Res., 98 : 179-183, 2006
- 14) Rojas, R. et al. : J. Cell Biol., 183 : 513-526, 2008
- 15) Walter, B. H. et al. : Mol. Biochem. Parasitol., 140 : 161-173, 2005
- 16) Mitra, B. N. et al. : Cell Microbiol., 9 : 2112-2125, 2007
- 17) Sanderson, S. J. et al. : FEBS Lett., 542 : 12-16, 2003
- 18) Besteiro, S. et al. : Mol. Microbiol., 54 : 1224-1236, 2004
- 19) Sato, D. et al. : FEBS Lett., 580 : 5306-5312, 2006

<著者プロフィール>

津久井久美子 : 東邦大学大学院理学研究科生物分子科学専攻修了, 理学博士。バージニア州立大学 (Dr. Kodi S. Ravichandran) にてポストドクの後, 野崎智義博士のもとで赤痢アメーバの貪食, 貪食胞成熟の分子機構の研究を開始。2005年10月群馬大学助教, '08年11月より国立感染症研究所寄生動物部主任研究官。研究者人口の少ない生物で研究を行うハンデをメリットに変え, 一般生物学へインパクトを与えられるような研究を展開したい。

野崎智義 : 慶應義塾大学医学部卒。1987年慶應義塾大学医学部熱帯医学・寄生虫学助手。'88年JICA派遣専門家でブラジルレシフェで医療協力。'99年よりLPD, NIAID, NIH (James Dvorak 博士) とロックフェラー大学 (George Cross 教授) で, トリパノソーマの薬剤耐性・ゲノム可塑性・遺伝子発現調節・鞭毛接着タンパク質の研究に従事する。'96年帰国後, 赤痢アメーバの病原性・代謝・創薬の研究を開始し, '99年より国立感染症研究所第3室長, 2005年より群馬大学大学院医学系研究科国際寄生虫病学教授, '08年7月より国立感染症研究所寄生動物部長。

Diphyllobothrium spp. (sparganosis)
Spirometra mansonoides (sparganosis)

TREMATODES

INTESTINAL

These organisms are uncommon within the United States except for four species of *Alaria*, which are endemic within North America.

Current Name

Fasciolopsis buski (giant intestinal fluke)
Echinostoma ilocanum
Eurytrema pancreaticum
Heterophyes heterophyes
Metagonimus yokogawai
Alaria spp.

LIVER AND LUNG

These organisms are not seen commonly within the United States; however, some Southeast Asian refugees do harbor some of these parasites.

Current Name

Clonorchis (Opisthorchis) sinensis (Chinese liver fluke)
Opisthorchis viverrini
Fasciola hepatica (sheep liver fluke)
Paragonimus westermani (lung fluke)
Paragonimus spp.
Metorchis conjunctus (North American liver fluke)

BLOOD

The schistosomes are acquired by penetration of the skin by the cercarial forms that are released from fresh-water snails. Although they are not endemic within the United States, occasionally patients are seen who may have these infections.

Current Name

Schistosoma mansoni
Schistosoma haematobium

Schistosoma japonicum
Schistosoma intercalatum
Schistosoma mekongi

ARTHROPODS

See Tables 220–1 and 220–2.

REFERENCES

1. Beaver, C. B., Jung, R. C., and Cupp, E. W.: Clinical Parasitology. Philadelphia, Lea & Febiger, 1984.
2. Cox, F. E. G.: Classification of the parasitic protozoa. In Cox, F. E. G., Despommier, D. D., Gillespie, S., and Wakelin, D. (eds.): Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections. 10th ed. Part 6. Parasitology. London, Arnold, 2005, pp. 186–199.
3. Edman, J. C., Kovacs, J. A., Masur, H., et al.: Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the fungi. *Nature* 334:519–522, 1988.
4. Fayer, R.: *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Boca Raton, FL, CRC Press, 1997.
5. Garcia, L. S.: Diagnostic Medical Parasitology. 5th ed. Washington, D.C., ASM Press, 2007.
6. Gibson, D. I.: Nature and classification of parasitic helminths. In Cox, F. E. G., Despommier, D. D., Gillespie, S., and Wakelin, D. (eds.): Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections. 10th ed. Part 6. Parasitology. London, Arnold, 2005, pp. 573–599.
7. Hartskeerl, R. A., Van Gool, T., Schuitema, A. R. J., et al.: Genetic and immunological characterization of the microsporidian *Septata intestinalis* Cali, Kotler, and Orenstein, 1993: Reclassification to *Eucephalitozoon intestinalis*. *Parasitology* 110:277–285, 1995.
8. Levine, N. D.: Veterinary Parasitology. Minneapolis, Burgess Publishing, 1978.
9. Molina, J. M., Oksenhendler, E., Beauvais, B., et al.: Disseminated microsporidiosis due to *Septata intestinalis* in patients with AIDS: Clinical features and response to albendazole therapy. *J. Infect. Dis.* 171:245–249, 1995.
10. Meyers, W. M., Neafie, R. C., Marty, A. M., et al. (eds.): Pathology of Infectious Diseases. Vol. 1, Helminthiases. Washington, D.C., Armed Forces Institute of Pathology, 2000.
11. Murray, P. R., Baron, E. J., Pfaller, M. A., et al. (eds.): Manual of Clinical Microbiology. 8th ed. Washington, D.C., ASM Press, 2003.
12. Ortega, Y., Sterling, C. R., Gilman, R. H., et al.: *Cyclospora* species: A new protozoan pathogen of humans. *N. Engl. J. Med.* 328:1308–1312, 1993.
13. Pape, J. W., Verdier, R. I., Boney, M., et al.: *Cyclospora* infection in adults infected with HIV: Clinical manifestations, treatment, and prophylaxis. *Ann. Intern. Med.* 121:654–657, 1994.
14. Stringer, S. L., Hudson, K., Blase, M. A., et al.: Sequence from ribosomal RNA of *Pneumocystis carinii* compared to those of four fungi suggests an ascomycetous affinity. *J. Protozool.* 36:145–165, 1989.
15. Wirtner, M., and Weiss, L. M.: The Microsporidia and Microsporidiosis. Washington, D.C., ASM Press, 1999.
16. Zierdt, C. H.: *Blasocystis boninis*: Past and future. *Clin. Microbiol. Rev.* 4:61–79, 1991.

SUBSECTION 1

Protozoa

A. Amebae

CHAPTER

221

AMEBIASIS

Shinjiro Hamano • William A. Petri, Jr.

Diarrheal diseases continue to be major causes of morbidity and mortality in children in developing countries. In Bangladesh, 1 in 30 children dies of diarrhea or dysentery by age 5 years.⁷³ Amebiasis is an infection caused by the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. Infection occurs via ingestion of the parasite's

cyst from fecally contaminated food, water, or hands. Approximately 50 million illnesses and 100,000 deaths occur annually from amebiasis, rendering it the third leading cause of death by parasitic disease in humans.⁷⁵ Long-term consequences of amebiasis in children include malnutrition and reduced cognitive

abilities.^{69,93} Although amebiasis is present worldwide, it occurs most commonly in underdeveloped areas, especially Central and South America, Africa, and Asia. In the United States and other developed countries, cases of amebiasis are most likely to occur in immigrants from and travelers to endemic regions, but it can affect populations of the developed world, as shown by the epidemic that occurred in Tbilissi, Republic of Georgia, caused by contaminated municipal water.¹³ Currently, there is no vaccine to prevent the childhood morbidity and mortality resulting from infection with *E. histolytica*.

ETIOLOGY

E. histolytica is named for the pathologic evidence of "lysis" of tissues. The first demonstration of the organism in human tissues was made by Lambl in 1859 in the postmortem examination of the colon of a child who died as a result of having excessive diarrhea.^{16,71} No connection of the organism with the disease was made until 1875, when Losch, in St. Petersburg, Russia, found the organism at autopsy in the colon of a woodcutter. Losch induced diarrhea and ulcerations in a dog given feces from the patient.⁵⁹ He did not think, however, that a connection existed between the organism and the disease. The first patient described in the United States was a physician treated by Osler for an amebic liver abscess in 1890.⁷¹ Councilman and Lafleur described the organism and the disease in 1891.^{20,42} Further investigation of the disease was delayed until a better understanding of the life cycle of *E. histolytica* could be obtained.²⁶ In recent years, the application of modern molecular biology techniques to the study of *E. histolytica* and *Entamoeba dispar* has resulted in an explosion of information about the mechanisms of virulence, pathogenicity, and immune responses to these organisms.^{85,87}

E. histolytica is the pathogenic species, having the capacity to invade tissue and cause symptomatic disease, whereas *E. dispar* (and *E. histolytica*) is associated with the asymptomatic carrier state.^{66,85} More recently, a study revealed that all genotypes of *E. histolytica* are not equally capable of causing disease.⁶ Morphologically distinct members of the genus *Entamoeba*, such as *Entamoeba coli* and *Entamoeba bartmanni*, also are nonpathogenic. *Dientamoeba fragilis* and *Entamoeba polecki* have been associated with diarrhea, and *Entamoeba gingivalis* has been associated with periodontal disease.

Members of the genus *Entamoeba*, which are protozoan organisms belonging to the subphylum Sarcodina and close to *Dictyostelium discoideum* on one of the lowest branches of the eukaryotic tree, have trophozoite and cyst forms.³⁷ The cysts of *E. histolytica* and *E. dispar* are almost spherical, being surrounded by a cell wall composed of chitin. The cysts may have one to four nuclei, although quadrinucleate cysts are most typical. This feature allows differentiation from *Escherichia coli*, which usually has 6 to 8 nuclei in the cysts and may have 32 nuclei.⁷² Cysts of *E. histolytica* are 5 to 20 μm in diameter (average 12 μm) and have a greenish tint in the unstained condition.⁶⁰ Young cysts contain chromatoid bodies, which are composed of ribosome particles in crystalline arrays.¹² The cysts of *E. bartmanni* appear identical to those of *E. histolytica* except for being a smaller size (4 to 10 μm). *E. histolytica* cysts can survive for days in the dried state at 30° C or for months at 0° C to 4° C. They can be killed by temperatures greater than 50° C retained for 5 minutes.⁴² They are completely resistant to the concentrations of chlorine used in water supplies, but may be killed with hyperchlorination or with iodine solutions.^{60,72} They are filtered from water supplies that pass through a sand filtration phase. They resist acids well.

When these quadrinucleate cysts are ingested, they resist the acid pH of the stomach and ultimately excyst in the alkaline environment of the bowel. The process of excystation results in the release of four trophozoites that divide by binary fission to

produce eight trophozoites. The usual trophozoites have a diameter of 25 μm (range 10 to 60 μm).^{26,85} They have a single nucleus that is 3 to 5 μm in diameter and contains fine peripheral chromatin with a slightly eccentric karyosome. They have a granular endoplasm that typically contains vacuoles in which bacteria and debris can be seen. Some glycogen is present and can be stained with periodic acid-Schiff stain.

Although amebae were thought to lack organelles, such as mitochondria, endoplasmic reticulum, and Golgi apparatus, evidence to the contrary is coming to light. The existence of nuclear-encoded mitochondrial genes and a remnant mitochondrial organelle was reported more recently.^{61,94} The presence of ingested erythrocytes is a characteristic feature of *E. histolytica*, but not *E. dispar*.⁸⁵ Movement is accomplished by extension of clear pseudopodia. Replication is by binary fission. These protozoa live in the colon of humans and other mammals. Trophozoites die quickly outside the body and are quite sensitive to acid—they generally are not considered to be infective.³¹ When cooled (as when feces are expelled and gradually cooled from body temperature) or stimulated by as-yet-undefined luminal conditions, the trophozoites form cysts that can remain viable for weeks to months on excretion.⁸⁵

Trophozoites of *E. coli* are 15 to 50 μm in diameter; have much more sluggish motility than the trophozoites of *E. histolytica*; and have blunt pseudopodia, rather than the sharp, finger-like pseudopodia of *E. histolytica*. Trophozoites of *E. bartmanni* are 4 to 14 μm in diameter and have much less glycogen than the trophozoites of *E. histolytica*.²⁶

EPIDEMIOLOGY

Amebiasis is distributed throughout the world. The number of people infected with either *E. histolytica* or *E. dispar* per year is estimated to be 500 million. Although most individuals remain asymptomatic, perpetuating the natural cycle of the organism through fecal excretion of infective cysts, approximately 50 million people experience the severe morbidity associated with invasive disease, with an estimated 100,000 dying annually.^{73,92} In the United States, 50 percent of amebiasis is observed in Hispanic/Asian/Pacific Islanders. Travelers from developing countries, men, and residents of institutions for the mentally retarded are considered to be at higher risk for amebiasis (Table 221-1).

During the 1990s, enough evidence had accumulated to support the formal separation of two morphologically identical species of ameba: the nonpathogenic *E. dispar* from the potentially pathogenic *E. histolytica*.^{1,14,29,30,92} Morbidity and mortality data in absolute numbers that existed before this time pertaining to cases of invasive disease were not greatly affected by this reclassification because all invasive disease was known to be caused by *E. histolytica*.⁹² Because most prevalence and incidence data previously collected pertained to asymptomatic individuals, however, and it was clear that most asymptomatic individuals with cysts detected in their stool were infected with nonpathogenic *E. dispar*, the true prevalence and incidence of *E. histolytica* became a matter of speculation.⁹²

TABLE 221-1 Risk Factors for Amebiasis in the United States

Hispanic/Asian/Pacific Islanders—50% of U.S. cases reported to CDC
Travelers—0.3% incidence in one study
Institutions for mentally retarded
Men who have sex with men
Men—90% amebic liver abscesses in men, but rare in children

CDC, Centers for Disease Control and Prevention.