

**Figure 6 | Formation of a 240-kDa EhMBOMP30 complex.** (a) Immunoprecipitation of organelle fraction solubilized in 2% digitonin, followed by Blue Native (BN)-PAGE and anti-HA immunostaining (left panel) and silver staining (right panel). (b) Anti-HA immunoblots of BN-PAGE and (c) SDS-PAGE of subsequent immunoprecipitations using solubilized organelle fractions from amoeba overexpressing MBOMP30 with HA-tagging at either ends of the protein, with or without the putative  $\beta$ -signal. Tom40-HA was used as a control.

membrane compared to the cytoplasm, regardless of the presence or absence of the  $\beta$ -signal, suggesting that this sequence may not be exclusively essential for proper integration of the protein to the mitochondrial membrane but may serve other potential roles.

Incidentally, data from our immunoprecipitation experiments using showed that the deletion of the  $\beta$ -signal in MBOMP30 disrupted the formation of the ~240 kDa complex. Similarly, abolishment of the formation of a 600 kDa TOM complex was observed in *Entamoeba* Tom40 lacking the  $\beta$ -signal (Fig. 6b), suggesting that the  $\beta$ -signal may be required for sorting, formation, and/or stability of complex formation in *Entamoeba* MBOMPs. Although an exact role of the  $\beta$ -signal in the MBOMP30 complex formation remains unknown, different mechanisms for recognition, sorting, and integration of  $\beta$ -barrel proteins possibly exist in the mitosomes of *Entamoeba*. It is plausible that MBOMP30 release from either Tom40 or Sam50 is blocked by the deletion of its  $\beta$ -signal, preventing it to properly forming the ~240 kDa complex on the outer membrane. A similar phenomenon was observed when truncation of some residues of the  $\beta$ -signal in yeast Tom40, Mdm10, and porin, did not impair binding to Sam50, but prevented formation of the TOM complex on the outer membrane<sup>38</sup>. It is tempting to speculate that, with the minimal components for protein import, especially BOMP assembly, the *Entamoeba* mitosome has developed simplistic alternative mechanisms of membrane protein translocation and

integration, and/or that possible functional homologs of “missing” components associated with protein import, are yet to be discovered.

*Entamoeba* mitosomes compartmentalize enzymes required for sulfate activation. Since *Entamoeba* mitosomes transport substrates and produce intermediary metabolites of sulfate activation, such as sulfate, adenosine phosphates, phosphate, and 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate (PAPS), it is expected that they possess suitable transporters in their membranes. However, a sensitive hidden Markov model-based similarity search failed to find an *Entamoeba* homolog of VDAC, the usual channel for metabolites in the outer membrane of mitochondria<sup>43</sup>. Without VDAC, it is unclear how metabolites are transported across the outer membrane in this organism. This study is partially motivated by our speculation that novel transporters may serve this role, although it is also possible that Tom40 serves as the transporter of both proteins and metabolites, as it is known to transport some small molecules in yeast<sup>44,45</sup>. In the same manner, there is also a possibility that MBOMP30 has roles similar to those of the MBOMPs, Mdm10 or Tac40. In yeasts, Mdm10 tethers the mitochondria to the ER and is involved in the ERMES<sup>12</sup>. Several cellular processes are associated with this BOMP, including the maintenance of mitochondrial morphology, and  $\text{Ca}^{2+}$  transport and lipid exchange between the ER and mitochondria. Although there are no detectable *Entamoeba* homologs of the proteins comprising ERMES<sup>46</sup>, such as the Maintenance of



Mitochondrial Morphology protein 1 (Mmm1), Mdm12, and Mdm34<sup>12</sup>, it is conceivable that MBOMP30, like Mdm10, may be involved in linking the mitosome to the ER via unknown functional homologs, or to other *Entamoeba* organelles, or even to cytoskeletal proteins, as Mdm10 binds to actin<sup>47</sup> and Tac40 attaches to the basal body of the *T. brucei* flagellum<sup>14</sup>.

Our repeated attempts at knocking down expression of MBOMP30 by gene silencing have failed, suggesting that the protein is central and essential to the survival of *E. histolytica* trophozoites, and in good contrast to the fact that the knockdown of chaperonin 60, ADP/ATP carrier, and three enzymes involved in sulfate activation was not lethal<sup>25</sup>. We have also attempted to identify the components of the ~240 kDa complex. Several ER and cytoplasmic proteins were detected in the MS-MS analysis. Converse immunoprecipitation yielded a complex with almost identical size, however MS-MS sequencing did not detect the presence of MBOMP30. There is a possibility that the protein exists as a homo-oligomer, like bacterial BOMPs such as MspA, a porin uniquely found in *Mycobacterium smegmatis* that forms a homo-octameric complex<sup>48</sup>.

In conclusion, the discovery of MBOMP30 represents only the seventh class of eukaryotic MBOMPs and therefore significantly increases our understanding of the range of sequence and phylogenetic distribution possible for this structural class of eukaryotic proteins. Although BOMPs are numerous and diverse in bacteria<sup>49</sup>, systematic attempts to find them in eukaryotic genomes have not yielded novel MBOMPs<sup>26,27,50</sup> so far. However, it is important to remember that the diversity of eukaryotes, and consequently the diversity of mitochondria and MROs, remains hidden in organisms whose genomes are yet to be completely sequenced. This study could potentially aid and stimulate further searches for novel MBOMPs. In addition to shedding light on MBOMPs in general, discovery of the lineage-specific MBOMP30 will help guide experiments to elucidate its function and better understand the biology and evolution of the Amoebozoa.

## Methods

**MBOMP prediction pipeline.** For MBOMP prediction we used a modified version of our Support Vector Machine (SVM)-based predictor developed for a previous study<sup>27</sup>. Like other BOMP predictors<sup>51,52</sup>, our predictor considers physicochemical features reflecting BOMP structural motifs (such as  $\beta$ -strands with alternating hydrophobic residues) expected to be found in the  $\beta$ -barrel region. Unique to our predictor is the consideration of sorting signals; e.g. the  $\beta$ -signal, which MBOMPs might be expected to have, and signal peptides which MBOMPs are expected not to have (Fig. 1). For this study we trained our predictor on a dataset including mitochondrial and hydrogenosomal BOMP sequences, to improve its ability to detect novel MBOMPs in MROs. Although not packaged for easy use, the source code for our predictor is available upon request.

The first step in our pipeline requires a relatively high MBOMP probability score (probability > 0.7) from our MBOMP classifier. We additionally require the secondary structure composition as predicted by PSI-PRED<sup>53</sup> to be at least 25%  $\beta$ -strand and no more than 25%  $\alpha$ -helix.

**Training dataset.** We prepared a dataset of 81 MBOMP sequences (including presumed MBOMPs inferred by sequence similarity), consisting of 71 mitochondrial BOMPs and 10 MRO-BOMPs: Tom40 and Sam50 from *E. histolytica*, *E. invadens*, *Giardia intestinalis*, *Encephalitozoon cuniculi*, *Cryptosporidium parvum*, *Trichomonas vaginalis* and *Blastocystis hominis*. No pair of positive examples shared more than 40% identity. For negative examples we used 2464 non-MBOMP yeast proteins with clear Uniprot annotation and less than 20% mutual sequence identity. The sequence data were obtained from Uniprot and EuPathDB<sup>54,55</sup>. This dataset is available upon request.

**Newly integrated  $\beta$ -signal and physicochemical sequence features.** As shown in Supplementary Fig. S5, we observed that most MRO-BOMPs in our training set contained matches to the  $\beta$ -signal, therefore we decided to add  $\beta$ -signal-inspired features to our MBOMP predictor via two representations: Position Weight Matrix (PWM) and regular expression. To define our PWM based  $\beta$ -signal inspired features, we first divided our 81 training MBOMPs by protein family and used MAFFT<sup>56</sup> to obtain four multiple alignments (one for each MBOMP family). We then extracted a total of 81 aligned regions (octomers) matching the  $\beta$ -signal from the multiple alignments and discarded duplicate octomers to obtain 71  $\beta$ -signal examples. We then defined a PWM based on those 71 examples and background frequencies as described in our previous study<sup>27</sup>. Finally, we defined two features derived from this

PWM; its maximum value over the C-terminal 50 residues and over the entire sequence.

We also defined five binary features based on the occurrence of matches in the C-terminal 50 residues to regular expressions representing the  $\beta$ -signal motif. For these regular expressions we used the original pattern  $P_o x G x H_x x H_x$ , as proposed by Kutik et al.<sup>38</sup> and four variants:  $P_o H_x G H_x x H_x x H_x$ ,  $P_o H_x G H_x H_x x H_x$ ,  $H_x H_x G H_x x H_x$  and  $H_x H_x G H_x H_x x H_x$ , proposed in our previous work<sup>27</sup>. In these expressions  $x$  is any residue,  $H_y$ ,  $h_y$  and  $P_o$  denote [VLMIFYW], [ACVLMIFYW], and [KRHSTNQ], respectively, and  $H_y$  matches any residue not included in  $H_x$ .

To integrate physicochemical sequence features, we employed an easily implemented method, potentially enabling the SVM to automatically learn the characteristics of various sorting signals based on the physicochemical properties of sequence segments. We partitioned the amino- and carboxyl-terminal 90 residues into 6 blocks of 15 residues, and then computed the average hydrophobicity,  $\alpha$ -helical periodicity score<sup>57</sup>, and the density of positive, negative, and aromatic residues for each block. These features are also relevant to structural motifs.

**MBOMP30 homolog search, sequence comparison and topology prediction.** We searched for MBOMP30 homologs in other organisms using the JackHMMER and HHblits algorithms<sup>51,58</sup>. We computed pairwise alignments and E-values of MBOMP30 homologs among *E. histolytica*, *E. dispar* and *E. invadens* with the SSEARCH program<sup>58</sup>, and built multiple alignments with Clustal omega<sup>59</sup>. For topology prediction of MBOMP30 and its homologs, we used BOCTOPUS and TM-BETAPRED-RBP<sup>33</sup>.

**Cell-free synthesis of EhMBOMP30 proteoliposomes.** The open reading frame of the *E. histolytica* MBOMP30 gene EHL\_178630 was codon-optimized for wheat-germ expression, and cloned to pY08 vector using *SpeI* and *Sall* restriction sites. Messenger RNA was synthesized by *in vitro* transcription as previously described<sup>60</sup>. EhMBOMP30 was synthesized by wheat-germ expression system<sup>60</sup>, in the presence of 0.5 mg/mL DPhc liposomes (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL).

### Far-UV and circular dichroism spectroscopy analysis of MBOMP30 proteoliposomes.

Synthesized *E. histolytica* MBOMP30 proteoliposomes were pelleted, then washed twice with CD buffer (25 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0) by centrifugation at 15,000 rpm at 4°C for 20 min. The pellet was resuspended in 150  $\mu$ L CD buffer and sonicated briefly until translucent. Recombinant His-tagged GFP was used as a positive control. CD measurements were performed using a Jasco J-820 Spectropolarimeter, and the samples were loaded onto a quartz cuvette with 0.1-cm path length (Starna Cells, Inc, Atascadero, CA). The far-UV spectra (185 to 250 nm) were obtained by taking the average of 9 consecutive scans with a resolution of 1 nm, a scanning speed of 200 nm/min and a response time of 2 s. The secondary structure was predicted by the CONTIN algorithm<sup>61,62</sup> using a 42-protein set database available through the Dichroweb online tool<sup>63,64</sup>.

**Plasmid construction.** Total RNA was isolated from various strains by TRIZOL<sup>®</sup> reagent (Invitrogen, Carlsbad, San Diego, CA). mRNA was purified using GenElute<sup>™</sup> mRNA Miniprep Kits (Sigma-Aldrich, Japan). cDNA was synthesized from mRNA using SuperScript<sup>™</sup> III RNase H<sup>-</sup> reverse transcriptase (Invitrogen), and oligo(dT)<sub>20</sub> primer (Invitrogen). The *E. histolytica* gene EHL\_178630 was PCR-amplified from cDNA using Phusion DNA polymerase (New England Biolabs, Beverly, MA) using the following primer sets (sense primer; 5'- GTTCCCGGGATGTTGGTAAACCTGC -3' and antisense primers; 5'- GAACTCGAGTTAAAGTGATAAATCAATTCCA -3' or 5'- GAACTCGAGTTAGACTTGATTTTTCTGGTCTT -3') for full length (HA-MBOMP) or  $\beta$ -signal-truncated (HA-MBOMP30 <sup>$\Delta$ 275-282</sup>) inserts respectively. After restriction digestion, amplified fragments were ligated into pEhEx/HA<sup>65</sup> using Ligation-Convenience Kit (Nippongene, Tokyo, Japan).

**Cell culture and amoeba transformation.** Trophozoites of *Entamoeba histolytica* HM-1:IMSS cl6<sup>66</sup> and G3<sup>67</sup> strains were cultivated axenically in Diamond BI-S-33 medium<sup>66</sup>. Lipofection of amoebic trophozoites, selection, and maintenance of transformants were performed as previously described<sup>18</sup>.

**Preparation of organelle fraction.** Amoeba strains that expressed HA-MBOMP30, Tom40-HA<sup>39</sup>, AAC-HA<sup>18</sup>, and APSK-HA<sup>18</sup> proteins, and also the mock transformant, pEhEx/HA, were washed three times with 2% glucose/PBS. After resuspension in lysis buffer (10 mM MOPS-KOH, pH7.2, 250 mM sucrose, protease inhibitors), cells were disrupted mechanically by a Dounce homogenizer. Unbroken cells were removed by centrifugation at 5,000 g for 10 min, and the supernatant centrifuged at 100,000 g for 60 min to separate the organelle and cytosolic fractions. The 100,000 g organelle fractions were resuspended with lysis buffer, and were recollected by centrifugation at 100,000 g for 60 min.

**Percoll-gradient and sodium carbonate-mitochondrial membrane fractionation and immunofluorescence assay.** Percoll-gradient fractionation<sup>18</sup>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> treatment of mitochondrial membrane fractions<sup>39</sup> was performed as previously described but using anti-Cpn60 as a soluble mitosome protein marker. IFA<sup>18,68</sup> was performed as previously described.

**Proteinase K protection assay.** Proteinase K assay was performed following the previous protocol with some modifications<sup>39</sup>. Briefly, organelle fractions (100  $\mu$ g protein each) were prepared, then treated with proteinase K (the final concentration



was 3.125 µg/ml) (Roche) for 15 min at 4°C. A control sample without proteinase K was likewise prepared. Samples were run on SDS-PAGE followed by immunoblot analysis using anti-HA mouse monoclonal antibody and HRP-conjugated anti-mouse antibody (Thermo Scientific) as primary and secondary antibodies respectively. Quantitation of band intensities was performed using the Analysis Toolbox in ImageQuant TL software (GE Healthcare).

**Immunoelectron microscopy.** Sample preparation was carried out as previously described<sup>25</sup> with some modifications. Trophozoites overexpressing HA-MBOMP30 and HA-MBOMP30<sup>Δ275–282</sup> in BIS medium were incubated with gold disks at 35.5°C for 15 minutes to allow for attachment. The disks carrying amoebae were then frozen in liquid propane at –175°C. Once frozen, the samples were freeze-substituted with 0.2% glutaraldehyde in ethanol and 3% distilled water at –80°C overnight. Sample fixation and sectioning were performed as described previously<sup>25</sup>. The disks were then double-stained using anti-HA mouse and anti-Cpn60 rabbit antibodies in 1% BSA-PBS for 90 min at room temperature, then rinsed with 1% BSA-PBS 3 times for 1 min each. Then, they were reacted with secondary anti-mouse and anti-rabbit IgG antibody conjugated to gold particles for 1 hr at room temperature. They were rinsed and placed in 2% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer before drying. Then, the grids were stained with 2% uranyl acetate for 15 min, and secondary-stained with lead stain solution at room temperature for 3 min. The grids were observed at Tokai Microscopy Inc. (Nagoya, Japan), using a transmission electron microscope (JEM-1400 Plus, JEOL Ltd.), at an acceleration voltage of 80 kV. Digital images (2048 × 2048 pixels) were taken with a CCD camera (VELETA, Olympus Soft Imaging Solution GmbH).

**Immunoprecipitation of the EhMBOMP30 complex.** Organelle fractions of HA-MBOMP30 and HA-MBOMP30<sup>Δ275–282</sup> overexpressing strains, and pEHEx-HA control were prepared. Immunoprecipitation was performed as previously described, followed by Blue-native PAGE and immunoblot analysis<sup>39</sup>.

- Heinz, E. & Lithgow, T. Back to basics: A revealing secondary reduction of the mitochondrial protein import pathway in diverse intracellular parasites. *Biochim Biophys Acta*, doi:10.1016/j.bbamcr.2012.02.006 (2012).
- Lithgow, T. & Schneider, A. Evolution of macromolecular import pathways in mitochondria, hydrogenosomes and mitosomes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **365**, 799–817, doi:10.1098/rstb.2009.0167 (2010).
- Makiuchi, T. & Nozaki, T. Highly divergent mitochondrion-related organelles in anaerobic parasitic protozoa. *Biochimie* **100**, 3–17, doi:10.1016/j.biochi.2013.11.018 (2014).
- Baker, K. P., Schaniel, A., Vestweber, D. & Schatz, G. A yeast mitochondrial outer membrane protein essential for protein import and cell viability. *Nature* **348**, 605–609, doi:10.1038/348605a0 (1990).
- Hill, K. *et al.* Tom40 forms the hydrophilic channel of the mitochondrial import pore for preproteins. *Nature* **395**, 516–521, doi:10.1038/26780 (1998).
- Wiedemann, N. *et al.* Machinery for protein sorting and assembly in the mitochondrial outer membrane. *Nature* **424**, 565–571, doi:10.1038/nature01753 (2003).
- Paschen, S. A. *et al.* Evolutionary conservation of biogenesis of beta-barrel membrane proteins. *Nature* **426**, 862–866, doi:10.1038/nature02208 (2003).
- Kozjak, V. *et al.* An essential role of Sam50 in the protein sorting and assembly machinery of the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem* **278**, 48520–48523, doi:10.1074/jbc.C300442200 (2003).
- Colombini, M. VDAC: the channel at the interface between mitochondria and the cytosol. *Mol Cell Biochem* **256–257**, 107–115 (2004).
- Sogo, L. F. & Yaffe, M. P. Regulation of mitochondrial morphology and inheritance by Mdm10p, a protein of the mitochondrial outer membrane. *J Cell Biol* **126**, 1361–1373 (1994).
- Yamano, K., Tanaka-Yamano, S. & Endo, T. Mdm10 as a dynamic constituent of the TOB/SAM complex directs coordinated assembly of Tom40. *EMBO Rep* **11**, 187–193, doi:10.1038/embor.2009.283 (2010).
- Kornmann, B. *et al.* An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. *Science* **325**, 477–481, doi:10.1126/science.1175088 (2009).
- Pusnik, M. *et al.* Mitochondrial preprotein translocase of trypanosomatids is a bacterial origin. *Curr Biol* **21**, 1738–1743, doi:10.1016/j.cub.2011.08.060 (2011).
- Schnarwiler, F. *et al.* Trypanosomal TAC40 constitutes a novel subclass of mitochondrial beta-barrel proteins specialized in mitochondrial genome inheritance. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**, 7624–7629, doi:10.1073/pnas.1404854111 (2014).
- Gentle, I. E., Burri, L. & Lithgow, T. Molecular architecture and function of the Omp85 family of proteins. *Mol Microbiol* **58**, 1216–1225, doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04906.x (2005).
- Gentle, I., Gabriel, K., Beech, P., Waller, R. & Lithgow, T. The Omp85 family of proteins is essential for outer membrane biogenesis in mitochondria and bacteria. *J Cell Biol* **164**, 19–24, doi:10.1083/jcb.200310092 (2004).
- Stegmeier, J. F., Gluck, A., Sukumaran, S., Mantele, W. & Andersen, C. Characterisation of YtfM, a second member of the Omp85 family in *Escherichia coli*. *Biol Chem* **388**, 37–46, doi:10.1515/BC.2007.004 (2007).
- Mi-ichi, F., Abu Yousuf, M., Nakada-Tsukui, K. & Nozaki, T. Mitosomes in *Entamoeba histolytica* contain a sulfate activation pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 21731–21736, doi:10.1073/pnas.0907106106 (2009).
- Reinders, J., Zahedi, R. P., Pfanner, N., Meisinger, C. & Sickmann, A. Toward the complete yeast mitochondrial proteome: multidimensional separation techniques for mitochondrial proteomics. *J Proteome Res* **5**, 1543–1554, doi:10.1021/pr050477f (2006).
- Meisinger, C., Sickmann, A. & Pfanner, N. The mitochondrial proteome: from inventory to function. *Cell* **134**, 22–24, doi:10.1016/j.cell.2008.06.043 (2008).
- Ali, V., Shigeta, Y., Tokumoto, U., Takahashi, Y. & Nozaki, T. An intestinal parasitic protist, *Entamoeba histolytica*, possesses a non-redundant nitrogen fixation-like system for iron-sulfur cluster assembly under anaerobic conditions. *J Biol Chem* **279**, 16863–16874, doi:10.1074/jbc.M313314200 (2004).
- van der Giezen, M., Cox, S. & Tovar, J. The iron-sulfur cluster assembly genes *iscS* and *iscU* of *Entamoeba histolytica* were acquired by horizontal gene transfer. *BMC Evol Biol* **4**, 7, doi:10.1186/1471-2148-4-7 (2004).
- Maralikova, B. *et al.* Bacterial-type oxygen detoxification and iron-sulfur cluster assembly in amoebal relic mitochondria. *Cell Microbiol* **12**, 331–342, doi:10.1111/j.1462-5822.2009.01397.x (2010).
- Gill, E. E. *et al.* Novel mitochondrion-related organelles in the anaerobic amoeba *Mastigamoeba balamuthi*. *Mol Microbiol* **66**, 1306–1320, doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05979.x (2007).
- Mi-ichi, F., Makiuchi, T., Furukawa, A., Sato, D. & Nozaki, T. Sulfate activation in mitosomes plays an important role in the proliferation of *Entamoeba histolytica*. *PLoS NTD* **5**, e1263, doi:10.1371/journal.pntd.0001263 (2011).
- Imai, K., Gromiha, M. M. & Horton, P. Mitochondrial beta-barrel proteins, an exclusive club? *Cell* **135**, 1158–1159, doi:10.1016/j.cell.2008.12.017 (2008).
- Imai, K., Fujita, N., Gromiha, M. M. & Horton, P. Eukaryote-wide sequence analysis of mitochondrial beta-barrel outer membrane proteins. *BMC Genomics* **12**, 79, doi:10.1186/1471-2164-12-79 (2011).
- Wang, Z., Xu, C. & Benning, C. TGD4 involved in endoplasmic reticulum-to-chloroplast lipid trafficking is a phosphatidic acid binding protein. *Plant J* **70**, 614–623, doi:10.1111/j.1365-313X.2012.04900.x (2012).
- Dolezal, P. *et al.* The essentials of protein import in the degenerate mitochondrion of *Entamoeba histolytica*. *PLoS Pathog* **6**, e1000812, doi:10.1371/journal.ppat.1000812 (2010).
- Remmert, M., Biegert, A., Hauser, A. & Soding, J. HHblits: lightning-fast iterative protein sequence searching by HMM-HMM alignment. *Nat Methods* **9**, 173–175, doi:10.1038/nmeth.1818 (2012).
- Finn, R. D., Clements, J. & Eddy, S. R. HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic Acids Res* **39**, W29–37, doi:10.1093/nar/gkr367 (2011).
- Hayat, S. & Elofsson, A. BOCTOPUS: improved topology prediction of transmembrane beta barrel proteins. *Bioinformatics* **28**, 516–522, doi:10.1093/bioinformatics/btr710 (2012).
- Ou, Y. Y., Chen, S. A. & Gromiha, M. M. Prediction of membrane spanning segments and topology in beta-barrel membrane proteins at better accuracy. *J Comput Chem* **31**, 217–223, doi:10.1002/jcc.21281 (2010).
- Greenfield, N. & Fasman, G. D. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry-US* **8**, 4108–4116 (1969).
- Shanmugavadivu, B., Apell, H. J., Meins, T., Zeth, K. & Kleinschmidt, J. H. Correct folding of the beta-barrel of the human membrane protein VDAC requires a lipid bilayer. *J Mol Biol* **368**, 66–78, doi:10.1016/j.jmb.2007.01.066 (2007).
- Fujiki, Y., Fowler, S., Shio, H., Hubbard, A. L. & Lazarow, P. B. Polypeptide and phospholipid composition of the membrane of rat liver peroxisomes: comparison with endoplasmic reticulum and mitochondrial membranes. *J Cell Biol* **93**, 103–110 (1982).
- Chan, K. W. *et al.* A novel ADP/ATP transporter in the mitosome of the microaerophilic human parasite *Entamoeba histolytica*. *Curr Biol* **15**, 737–742, doi:10.1016/j.cub.2005.02.068 (2005).
- Kutik, S. *et al.* Dissecting membrane insertion of mitochondrial beta-barrel proteins. *Cell* **132**, 1011–1024, doi:10.1016/j.cell.2008.01.028 (2008).
- Makiuchi, T., Mi-ichi, F., Nakada-Tsukui, K. & Nozaki, T. Novel TPR-containing subunit of TOM complex functions as cytosolic receptor for *Entamoeba* mitochondrial transport. *Sci Rep* **3**, 1129, doi:10.1038/srep01129 (2013).
- Kall, L., Krogh, A. & Sonnhammer, E. L. A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *J Mol Biol* **338**, 1027–1036, doi:10.1016/j.jmb.2004.03.016 (2004).
- Nozawa, A., Fujimoto, R., Matsuoka, H., Tsuboi, T. & Tozawa, Y. Cell-free synthesis, reconstitution, and characterization of a mitochondrial dicarboxylate-tricarboxylate carrier of *Plasmodium falciparum*. *Biochem Biophys Res Co* **414**, 612–617, doi:10.1016/j.bbrc.2011.09.130 (2011).
- Struyve, M., Moons, M. & Tommassen, J. Carboxy-terminal phenylalanine is essential for the correct assembly of a bacterial outer membrane protein. *J Mol Biol* **218**, 141–148 (1991).
- Dolezal, P. *et al.* The essentials of protein import in the degenerate mitochondrion of *Entamoeba histolytica*. *PLoS Pathog* **6**, e1000812, doi:10.1371/journal.ppat.1000812 (2010).
- Budzinska, M., Galganska, H., Karachitos, A., Wojtkowska, M. & Kmita, H. The TOM complex is involved in the release of superoxide anion from mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* **41**, 361–367, doi:10.1007/s10863-009-9231-9 (2009).



45. Kmita, H. & Budzinska, M. Involvement of the TOM complex in external NADH transport into yeast mitochondria depleted of mitochondrial porin1. *Biochim Biophys Acta* **1509**, 86–94 (2000).
46. Wideman, J. G., Gawryluk, R. M., Gray, M. W. & Dacks, J. B. The ancient and widespread nature of the ER-mitochondria encounter structure. *Mol Biol Evol* **30**, 2044–2049, doi:10.1093/molbev/mst120 (2013).
47. Boldogh, I., Vojtov, N., Karmon, S. & Pon, L. A. Interaction between mitochondria and the actin cytoskeleton in budding yeast requires two integral mitochondrial outer membrane proteins, Mmm1p and Mdm10p. *J Cell Biol* **141**, 1371–1381 (1998).
48. Faller, M., Niederweis, M. & Schulz, G. E. The structure of a mycobacterial outer-membrane channel. *Science* **303**, 1189–1192, doi:10.1126/science.1094114 (2004).
49. Wimley, W. C. The versatile beta-barrel membrane protein. *Curr Opin Struct Biol* **13**, 404–411 (2003).
50. Remmert, M., Linke, D., Lupas, A. N. & Soding, J. HHomp--prediction and classification of outer membrane proteins. *Nucleic Acids Res* **37**, W446–451, doi:10.1093/nar/gkp325 (2009).
51. Park, K. J., Gromiha, M. M., Horton, P. & Suwa, M. Discrimination of outer membrane proteins using support vector machines. *Bioinformatics* **21**, 4223–4229, doi:10.1093/bioinformatics/bti697 (2005).
52. Berven, F. S., Flikka, K., Jensen, H. B. & Eidhammer, I. BOMP: a program to predict integral beta-barrel outer membrane proteins encoded within genomes of Gram-negative bacteria. *Nucleic Acids Res* **32**, W394–399, doi:10.1093/nar/gkh351 (2004).
53. McGuffin, L. J., Bryson, K. & Jones, D. T. The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* **16**, 404–405 (2000).
54. The UniProt Consortium. Reorganizing the protein space at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res*, **40**(Database issue), D71–D75, doi:10.1093/nar/gkr981 (2012).
55. Aurrecochea, C. *et al.* EuPathDB: a portal to eukaryotic pathogen databases. *Nucleic Acids Res* **38**, D415–419, doi:10.1093/nar/gkp941 (2010).
56. Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K. & Miyata, T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res* **30**, 3059–3066 (2002).
57. Imai, K. a. M. S. Mechanisms of secondary structure breakers in soluble proteins. *Biophysics* **1**, 55–65 (2005).
58. Pearson, W. R. Searching protein sequence libraries: comparison of the sensitivity and selectivity of the Smith-Waterman and FASTA algorithms. *Genomics* **11**, 635–650 (1991).
59. Sievers, F. *et al.* Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* **7**, 539, doi:10.1038/msb.2011.75 (2011).
60. Nozawa, A. *et al.* A cell-free translation and proteoliposome reconstitution system for functional analysis of plant solute transporters. *Plant Cell Physiol* **48**, 1815–1820, doi:10.1093/pcp/pcm150 (2007).
61. Provencher, S. W. & Glockner, J. Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry-US* **20**, 33–37 (1981).
62. van Stokkum, I. H., Spoelder, H. J., Bloemendal, M., van Grondelle, R. & Groen, F. C. Estimation of protein secondary structure and error analysis from circular dichroism spectra. *Anal Biochem* **191**, 110–118 (1990).
63. Whitmore, L. & Wallace, B. A. DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res* **32**, W668–673, doi:10.1093/nar/gkh371 (2004).
64. Whitmore, L. & Wallace, B. A. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. *Biopolymers* **89**, 392–400, doi:10.1002/bip.20853 (2008).
65. Nakada-Tsukui, K., Okada, H., Mitra, B. N. & Nozaki, T. Phosphatidylinositol-phosphates mediate cytoskeletal reorganization during phagocytosis via a unique modular protein consisting of RhoGEF/DH and FYVE domains in the parasitic protozoan *Entamoeba histolytica*. *Cell Microbiol* **11**, 1471–1491, doi:10.1111/j.1462-5822.2009.01341.x (2009).
66. Diamond, L. S., Harlow, D. R. & Cunnick, C. C. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **72**, 431–432 (1978).
67. Bracha, R., Nuchamowitz, Y., Anbar, M. & Mirelman, D. Transcriptional silencing of multiple genes in trophozoites of *Entamoeba histolytica*. *PLoS Pathog* **2**, e48, doi:10.1371/journal.ppat.0020048 (2006).
68. Nakada-Tsukui, K., Saito-Nakano, Y., Ali, V. & Nozaki, T. A retromerlike complex is a novel Rab7 effector that is involved in the transport of the virulence factor cysteine protease in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol Biol Cell* **16**, 5294–5303, doi:10.1091/mbc.E05-04-0283 (2005).

## Acknowledgments

We acknowledge support of this work by the Grants-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas (“Matryoshka-type evolution”, No. 3308) and the Platform for Drug Discovery, Informatics, Structural Life Science from Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT), Japan.

## Author contributions

H.S. did the biochemical and cell biological experiments. K.T. and K.I. performed the *in silico* analyses. P.H. contributed to planning the *in silico* part of this study. H.S., T.M. and T.N. designed the study and analyzed data. H.S., M.I., A.N. and Y.T. performed cell-free expression and CD spectroscopy experiments. H.S., K.T., K.I., P.H., T.M. and T.N. wrote the paper.

## Additional information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/scientificreports>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Santos, H.J. *et al.* A Novel Mitosomal  $\beta$ -Barrel Outer Membrane Protein in *Entamoeba*. *Sci. Rep.* **5**, 8545; DOI:10.1038/srep08545 (2015).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder in order to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



## 解説

# アメーバ赤痢\*

小林泰一郎\*\* 渡辺恒二\*\*

**Key Words :** *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*), amebiasis, oral-anal sex, men who have sex with men (MSM), sexually transmitted infections (STIs)

### はじめに

赤痢アメーバ症は発展途上国からの輸入感染症として広く認識されてきたが、もう一つの重要な患者背景を以下に述べる。

- ・発展途上国への渡航歴がない患者でも赤痢アメーバ症に感染しうる。
- ・日本では、性感染症としての国内感染例が急増している。

つまり、赤痢アメーバ症の多くは輸入感染症ではない。臨床現場で赤痢アメーバ症を想起したとき、発展途上国への渡航歴を聞くのみでは不十分である。性交渉歴(特に男性同性間性的接触歴やoral-anal sexual contactの有無)を詳細に聞くことも同様に重要である。そして、赤痢アメーバ症は、海外からの渡航者を診る外来だけで遭遇する特別な疾患ではない。一般外来でも遭遇しうる疾患である。

### 疫学と感染経路

赤痢アメーバ症は、*Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*)の嚢子(シスト)を経口摂取することにより伝播する腸管寄生性原虫症である。そのため、上下水道の完備していない発展途上国では、糞便に汚染された水や食物を介して季節を問わず流行がみられる。赤痢アメーバ症を発症すると、発展途上国では致死的であり、世界で年間10万人が赤痢アメーバ症により命を落とすと推

計され<sup>1)</sup>、これは寄生虫・原虫症の中では2番目に多い数字である(寄生虫症死亡原因疾患の第1位はマラリア)。日本でも1960年以前は人糞を肥料としていた地域で流行がみられていたものの、それ以後は症例数が減少し続けていた。しかし、1990年以降症例数が徐々に増えていることが懸念され始めていた。ただし、1999年以前の伝染病予防法では「赤痢」に「細菌性赤痢」と「アメーバ性赤痢」が含まれて届け出られていたため、実数は不明であった。しかし、1999年4月に感染症法が施行されてからは、アメーバ性赤痢が独立した疾患として5類全数把握疾患となり報告数が明らかになった。国立感染症研究所(Infectious Agents Surveillance Report; IASR)から報告されている赤痢アメーバ症の報告数と感染地域を図1に示した。まず、報告数をみると、1999年度が276件であったものが、2007年度には約3倍の801件に急増している。図1には示されていないが、2013年の報告数は1,000件を超えた。また、東京都の調べでは、全数報告に指定されている感染症のうち、赤痢アメーバ症が2011年から2013年までの3年間連続して上位5位までにランクインしていることも報じられている(URL: <http://idsc.tokyo-eiken.go.jp/>)。2000年当初は、発展途上国への旅行者増加がこの原因と考えられていたが、図1に示してあるとおり、発症患者の感染地域内訳をみると、2007年度801件中、国外で感染したと考えられた症例は146件のみであり、

\* *Entamoeba histolytica* infection in Japan.

\*\* Taiichiro KOBAYASHI, M.D., D.T.M.&H., M.C.T.M. & Koji WATANABE, M.D., Ph.D.: 国立国際医療研究センターエイズ治療研究開発センター(〒162-8655 東京都新宿区戸山1-21-1); AIDS Clinical Center, National Center for Global Health and Medicine, Tokyo 162-8655, JAPAN

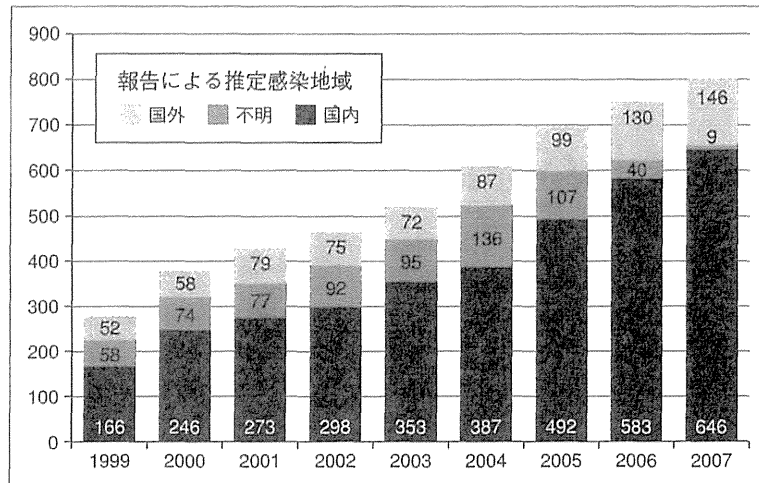


図1 アメーバ赤痢の年別感染地域別報告状況  
国立感染症研究所 (Infectious Agents Surveillance Report ; IASR)

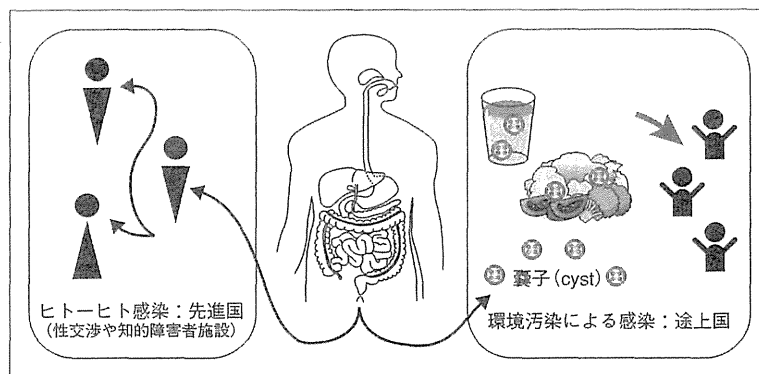


図2 アメーバ赤痢の感染経路(模式図)

残りの655件は国内感染が疑われる(646件)もしくは感染地域が特定できない(9件)症例であった。感染経路では、性的接触による感染が多数を占め特に男性間の性的接触が多いことが特徴であったが、一方で女性患者数の増加も懸念されている。女性患者の背景としては、性風俗で働く女性に赤痢アメーバ症が拡大している可能性が指摘されている。筆者は、東京都内のHIV感染症診療の拠点病院で勤務しているが、赤痢アメーバ症を契機にHIV感染が判明する症例も数多く経験している。また、韓国や台湾などの東アジアやオーストラリアからも、赤痢アメーバ症がHIV感染者の間で拡大していることが多数報告されている<sup>2)-4)</sup>。日本国内でも赤痢アメーバ症を診療する際には、性感染症としての感染経路を想定し

たアプローチが必要であり、HIV感染などの性感染症を合併していないかも精査すべきである。

図2に、感染経路の模式図を示した。発展途上国では環境を介して感染が広がる一方で、日本では、ヒト-ヒト感染により感染が拡大している。HIVスクリーニング無料検査場で行われた台湾の研究<sup>5)</sup>では、年齢が高いことや教育レベルが低いことなどが赤痢アメーバ感染のリスク因子であり、性交渉のうち「男性同性間性的接触がある」ことだけでなく、「肛門を舐めること(oral-anal sex)がある」ことがリスク因子としてあげられている(表1)ことから、女性であっても肛門に対するサービスを行うような性風俗で働いていないかなどが重要な問診事項となることがわかる。

表1 台湾のHIVスクリーニング検査場で行われた赤痢アメーバ感染のリスク因子の検討

	オッズ比	95%信頼区間
男性である	0.930	0.089~9.692
年齢が高い(+1歳)	1.098*	1.036~1.165
大学卒業以上の教育を受けた	0.359*	0.152~0.846
性交渉の相手が複数いる	0.990	0.947~1.034
HIV感染がある	2.217	0.621~7.912
男性同性間性的接触がある	8.382*	2.050~34.266
肛門をなめること(oral-anal sex)がある	4.016*	1.711~9.427
性器をなめること(oral-genital sex)がある	1.493	0.470~4.739
肛門性交(anal sex)がある	1.153	0.434~3.064
血清学的梅毒既感染(TPHA陽性)である	1.747	0.271~11.254

\* P value &lt; 0.05

(文献<sup>9)</sup>より引用改変)

## 赤痢アメーバ症の臨床

### 1. 潜伏期間と慢性持続感染

輸入感染症や性感染症など、感染機会を特定しやすい感染症で重要なことが、潜伏期間(病原体への曝露後、症状が発現するまでの期間)である。しかし、赤痢アメーバ症の場合、*E. histolytica*の曝露後、感染が成立した後も症状が発現せず、感染は起こっているが無症状の状態：慢性持続感染(多くはこの時期にシストを排出するため無症候性シストキャリアと呼ばれることも多い)が長く続くこともあるため、潜伏感染について語られることは稀である。すなわち、潜伏期間についての詳細は不明である。まず、シスト曝露から体内で*E. histolytica*感染が成立するまでの期間が不明である。一方で、感染成立後の症状発現までの期間は、短いもので数日程度、長い場合には数年かかることが、自施設からの研究を含めた過去のコホート研究で明らかになっている<sup>6)~8)</sup>。また、感染が成立したとしても80%以上の感染者は、不顕性感染で終わりシストキャリアも治療することなく数年以内には症状発現なしに自然治癒することが多いこともわかっている<sup>9)</sup>。この慢性持続感染の特徴としては、無症状にもかかわらず、血清IgG抗体(日本ではIFA法が保険適用)高値であり、下部消化管内視鏡を行うと回盲部に潰瘍性病変を認めることが多い<sup>9)10)</sup>ものの、便検査でシストを同定することは熟練した検査技師でも難しい。

以上、赤痢アメーバ症の潜伏期間はいまだ不

明で、渡航期間や性交渉の期日から感染時期を推定または除外することは難しい。病歴上、数年間シスト曝露がなくとも鑑別診断から除外してはならない。

### 2. 病型と臨床症状

病型は、大きく腸管赤痢アメーバ症と腸管外赤痢アメーバ症に分けられる。小腸内で脱囊した*E. histolytica*は病原性のある栄養体となり、大腸粘膜に潰瘍性病変をきたし腸管赤痢アメーバ症をひき起こす。教科書的には、粘血便やしぶり腹と表現されるような血便を伴う激しい腸炎症状が赤痢アメーバ症に特徴的とされている<sup>11)12)</sup>。しかし、前節で述べた無症状の慢性持続感染が成立するほか、バングラデシュで行われた研究結果のデータを参考にすると、*E. histolytica*病原体が分離された住民の下痢持続期間は平均3.7日でほとんどが自然軽快していることも示されている<sup>13)</sup>。医療機関で診断される赤痢アメーバ症であっても慢性下痢症や無症状の血液混入便のような軽度の症状で見つかる例が多いとされている<sup>14)15)</sup>。また、日本では、健診で便潜血陽性のために下部消化管内視鏡検査を受検し偶発的に見つかる無症候性感染例もあることも報告されている<sup>16)</sup>。筆者の所属施設で経験した症例の臨床症状のデータを解析した結果でも、肉眼的血便を伴う症例は50%程度、腹痛を伴う症例は30%にも満たないことが示されている<sup>17)</sup>。一方で、重症化した場合には、壊死性虚血性腸炎や巨大結腸症を合併する致死的病態も起こりうる(図3)<sup>18)~20)</sup>。また、近年赤痢アメーバによる回盲部腸炎が虫

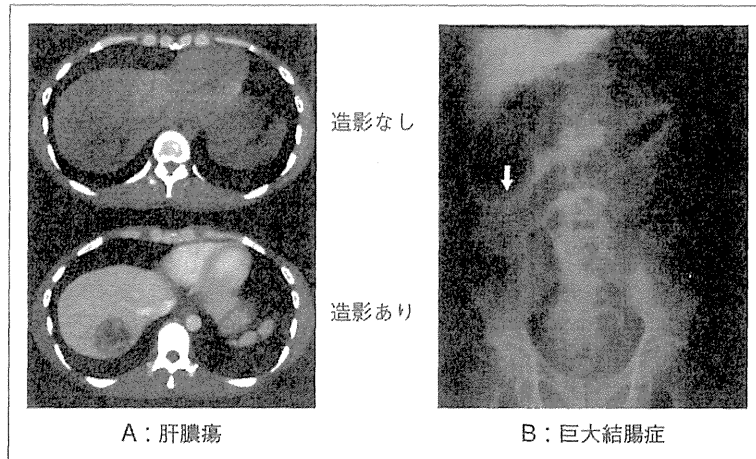


図3 赤痢アメーバ感染による肝膿瘍と巨大結腸症

A: 典型的には肝右葉に単発多房性膿瘍をきたすことがアメーバ性肝膿瘍の特徴とされている。B: 矢印は巨大結腸症を呈したアメーバ性腸炎でみられた粘膜の炎症性肥厚による偽腫瘍(pseudopolyp)である。

(国立国際医療研究センターエイズ治療研究開発センター)

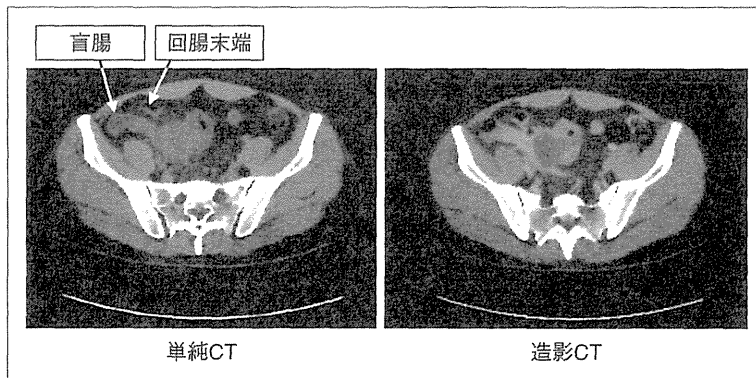


図4 赤痢アメーバ感染による虫垂炎・虫垂穿孔

(国立国際医療研究センターエイズ治療研究開発センター)

垂を巻き込んで炎症を起し、虫垂炎の診断で外科的切除を受けたのち、赤痢アメーバに対する治療が不十分ため縫合不全を起し、回盲部切除になる症例などが国内外から報告されている(図4)<sup>21)22)</sup>。現時点では、一般的に認識されているわけではないが、赤痢アメーバ症例数増加に伴い、虫垂炎様のアメーバ性回盲部腸炎が今後日本でも増加する可能性がある。以上のように、アメーバ性腸炎の症状は非常に多彩で入院加療を必要とする重症例から治療を必要としない軽症例までさまざまである。

一方、大腸腸管壁に侵入した*E. histolytica*の血

管浸潤が起こると血流に乗って腸管外赤痢アメーバ症となる。最も頻度の高い腸管外病変としては、肝膿瘍があげられる(図3)。このほか、脳膿瘍なども報告されているが<sup>23)24)</sup>、有効な治療薬であるメトロニダゾールが汎用されるようになってからは、きわめて稀な病態と考えられている。肝膿瘍が横隔膜下に形成された場合には、炎症が波及または横隔膜を穿破し胸膜炎や心外膜炎を合併する場合もある。肝膿瘍は、*E. histolytica*が門脈を介して血行性に転移して病変を形成するため、病変が肝表面まで到達しない限り、腹痛などの症状をきたさず、発熱以外の臨床症状



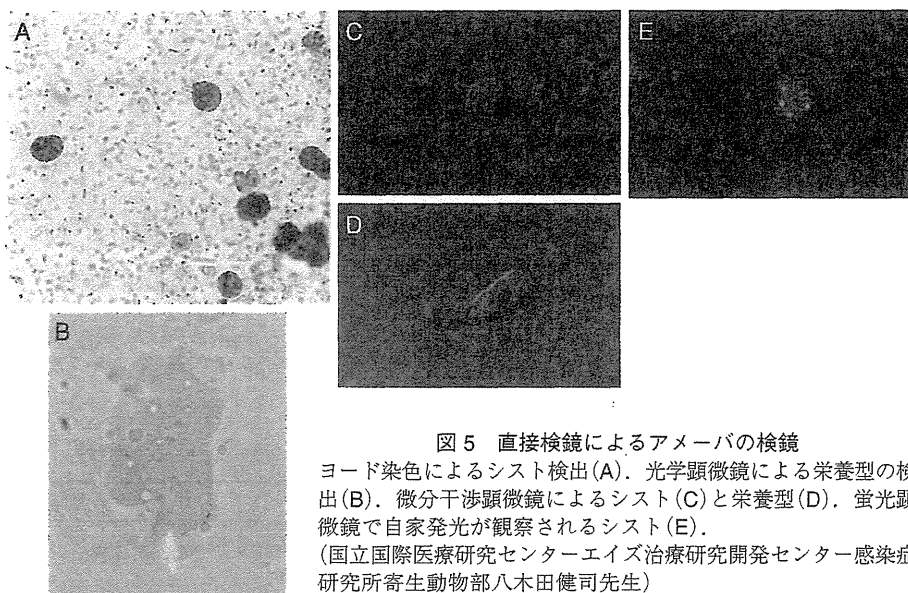


図5 直接検鏡によるアメーバの検鏡

ヨード染色によるシスト検出(A)．光学顕微鏡による栄養型の検出(B)．微分干渉顕微鏡によるシスト(C)と栄養型(D)．蛍光顕微鏡で自家発光が観察されるシスト(E)．  
(国立国際医療研究センターエイズ治療研究開発センター感染症研究所寄生動物部八木田健司先生)

に乏しいことが多い。腸炎を合併する場合には比較的診断に至りやすいが、発熱以外の症状がない場合には、不明熱の精査中に肝臓内の膿瘍が発見されることもある。また、合併した胸膜炎による胸痛や乾性咳嗽を主訴として来院するケースもある。

赤痢アメーバに特徴的な症状を特定することは腸管、腸管外アメーバ症ともに難しい。症状や検査に加えて、患者背景(海外渡航歴や糞口曝露歴など)を的確に捉えることが大切と考えられる。

### 3. 診断と検査

現在、保険適用内で施行可能な検査は、糞便または穿刺膿の直接検鏡法である。便を直接もしくは生理食塩水で懸濁した糞便を100 µl程度、スポイトでスライドガラスに滴下し、カバーガラスをかいた後に、100倍から400倍の倍率で多核を有する不定形の栄養体を探す(図5)。下痢便の場合には比較的容易に検出することが可能であるが、固形便や膿検体の場合には見逃す場合も多い。また、栄養体の*E. histolytica*は好気条件ですぐに死滅することや低温に弱いことなどから、採取した検体を速やかに検鏡しなければならない。以上から、糞便の直接検鏡法は、感度は低く(条件や検鏡を行う人の習熟度に強く依存するため)、臨床現場での検査感度は10%以下という報告もある<sup>25)</sup>。

そのため、糞便検査で原虫が確認されなくとも赤痢アメーバ症の除外はできない。また、日本国内ではあまり問題とならないが、形態では病原性の低い*E. dispar*や*E. moshkovskii*との鑑別ができないため、これらの病原体が蔓延する地域では特異度も低くなる。一方、血液検査による補助的診断法としては、血清赤痢アメーバ抗体検査(間接蛍光抗体法)が認可されている。この方法では、*E. histolytica*特異的な抗体を検出するため、*E. dispar*や*E. moshkovskii*との鑑別には有用である。しかし、急性期には抗体が上昇していない場合(感度が低下)もあるため、基礎疾患のはっきりしない若年者の肝膿瘍などの症例で赤痢アメーバ感染の可能性が高い場合には、急性期を過ぎた後(具体的には発症から約2週間後)に抗体価を再検することが勧められる<sup>11)12)</sup>。一方で、一度上昇した抗体価はその後1年以上抗体高値が持続するため、過去の検査と区別がつかないこと(特異度が低下)などがあり、蔓延地やハイリスク患者群(男性同性愛者や性風俗で勤務している女性など)では抗体陽性であっても、結果の解釈には注意を要する。筆者の施設に通院するHIV感染者でアメーバ抗体陽性率を測定したデータでは、抗体陽性率は約20%で、うち8割は赤痢アメーバ症の治療歴を有さない無症候性抗体陽性者であった<sup>8)</sup>。アメーバ性腸炎の診断方

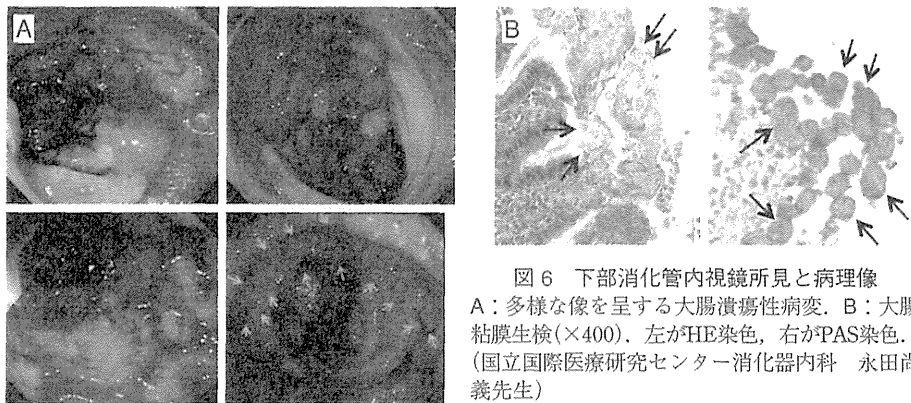


図6 下部消化管内視鏡所見と病理像  
A:多様な像を呈する大腸潰瘍性病変。B:大腸粘膜生検(×400)。左がHE染色, 右がPAS染色。  
(国立国際医療研究センター消化器内科 永田尚義先生)

表2 赤痢アメーバ症に対する標準治療(侵襲性または無症候性シストキャリア)

治療薬	日本での使用	治療量	治療期間
①メトロニダゾール(内服)	保険適用内で使用可	1回 750 mg, 1日 3回	10~14日間
②チニダゾール(内服)	赤痢アメーバに対しては, 保険適用外使用	1回 2 g, 1日 1回	3~5日間
③メトロニダゾール(点滴)	研究班*から入手	1回 500 mg, 1日 3回	7~10日間(経口摂取可能となつた場合, ①に変更する)
④パロモマイシン(内服)	保険適用内で使用可	1回 500 mg, 1日 3回	10日間

\*熱帯病治療薬研究班より入手。ホームページ <http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/parasitology/orphan/index.html>。  
・侵襲性赤痢アメーバ症(経口摂取可能例): ① or ②治療終了後④  
・侵襲性赤痢アメーバ症(経口摂取不能例): ③経口摂取可能となれば, ① or ②に変更し, 治療終了後④  
・無症候性シストキャリア: ④ (文献<sup>11)</sup>より引用改変)

法としては, 下部消化管内視鏡検査で潰瘍性病変から生検を行い, 大腸粘膜および粘膜下組織に*E. histolytica*を確認できれば確定診断となる。HE染色でも確認でき, PAS染色された検体の場合には感度が上がる(図6)。しかし, 検鏡時に赤痢アメーバ症を疑っていないければ, 病理検体から, *E. histolytica*を同定することはきわめて困難であるため, 臨床的に疑わしい場合には, その旨を病理医に伝えPAS染色を追加してもらうべきである。このように, 大腸粘膜生検は, 特異度の高い検査であるが, 検体が確実に病変部位から採取される必要があること, 疑っていない場合には検鏡時に見落とす可能性が高いことなどから, 感度の高い検査とはいえない。

以上, 日本で保険認可されている検査は, 問題点が多い。以下は, 海外もしくは日本の研究施設で行われている感度・特異度の高い検査である。感度の高い検査としては, PCR検査や抗原

検出検査などがある。これらの検査は感度が高いだけでなく, *E. dispar*や*E. moshkovskii*との鑑別も可能であるため, 診断に非常に有用とされる。筆者らは, 感染症研究所寄生動物部と共同で, 臨床検体から*E. histolytica* DNAの抽出を行い, PCRを行っているが, 糞便・膿・生検凍結検体(固定前)において, 高い感度で診断可能であることを確認している。抗原検出検査は, Techlab *E. histolytica* IIとしてキット化されており, 比較的簡便に行うことができる。問題点は, 1キットの価格が高く(96ウェルプレートで輸入価格約5万円)まとめて大量の検査を行う必要があることである。発展途上国でのコホート研究には有用であるが, 症例数の少ない日本の臨床診断には不向きである。クリプトスポリジウムやジアルジアでは, 感度・特異度の高いカード式イムノクロマトキット(個包装で1検体ずつ使用)があるが, 赤痢アメーバに対して感度・特異度の高

いカード式イムノクロマトキットは開発されていない。

#### 4. 治療について

表2に一般的な治療法を記載した。治療は、2つのフェーズに分かれる。第一に侵襲性病変に対する治療(メトロニダゾールまたはチニダゾール)であり、第二は侵襲性病変治療後のシスト駆除薬投与である。侵襲性病変に対する第1選択薬は、メトロニダゾールであり、日本でも赤痢アメーバ症に対する治療が正式に認可された(2012年)。メトロニダゾールは嘔気などの副作用が強いため、メトロニダゾール不耐例にはチニダゾールが選択されるが、チニダゾールは赤痢アメーバ症に対する治療が保険認可されておらず、現状は使用が難しい。メトロニダゾールは、赤痢アメーバ症に非常に有用であり、現時点では臨床症例としてのメトロニダゾール耐性*E. histolytica*は報告されていない。また、メトロニダゾールは腸管吸収率や組織移行性がきわめて高いため、肝膿瘍症例に対しても非常に有用である。切迫破裂や診断目的を除いて、肝膿瘍ドレナージを行う必要はなく<sup>11)12)15)</sup>、メトロニダゾールによる内科的治療で肝膿瘍は完治することが多い。また、メトロニダゾール投与期間は通常10~14日間で十分であり、治療終了後も画像上膿瘍が遷延するものの吸収されるまでには1年以上を要する場合もあるため、発熱などの臨床症状や炎症反応の改善がみられれば、画像のフォローアップは不要で、治療期間を完遂すれば治療は終了してよい。

一方で、メトロニダゾールは腸管吸収がきわめて良好なために、腸管内濃度が上昇せず、腸管内のシストに対しては無効である。過去の報告では、肝膿瘍発症患者でメトロニダゾール投与後の腸管シスト残存率は、56%(20/36例)と報告された<sup>7)</sup>。そのため、メトロニダゾール(またはチニダゾール)投与後にシスト駆除薬(パロモマイシンなど)を投与することが標準的治療とされてきた<sup>11)12)</sup>。しかし、残存シストへの治療が実際に赤痢アメーバ症発症または再発を防ぐ効果または周囲への感染拡大を阻止するのかの検討は、ほとんど行われていなかった。筆者らの行った研究では、メトロニダゾール治療後のシスト

駆除薬投与群・非投与群での侵襲性赤痢アメーバ症再発率は、両群ともに5年間に10%と統計学的に差はなく、再発は残存シストによる再燃ではなく、新たなシストの再感染の可能性が高いことを報告した<sup>17)</sup>。現時点で、再感染リスクの高い集団(日本であれば、男性同性愛者や性風俗で働く女性など)に対して、再発予防のためにシスト駆除することについての有用性は不透明である<sup>15)</sup>。また、残存シストへの治療が、周囲で生活している人への感染を予防するかの検討もなされていない。しかし、東京都感染症情報センターが出した報告(URL: <http://idsc.tokyo-eiken.go.jp/epid/y2007/tbkj2810/>)によると、侵襲性赤痢アメーバ症を発症した患者周辺で生活する人(家族や同僚)の便検査などの調査では、周辺で生活する人には、10年を超える調査で1例も感染伝播は確認されていない。そのため、以降は東京都の追跡調査が中止されている。このような報告からは、通常の生活では赤痢アメーバは伝播しないことが強く示唆され、シスト駆除が周辺で生活する人への感染率を低下させる可能性は低そうである。少しでも赤痢アメーバの流行を鎮静化させるため、侵襲性赤痢アメーバ症発症患者へシスト駆除薬を投与する考えもあるかもしれないが、前述のとおり赤痢アメーバ感染者の多くは、慢性持続感染を経て自然軽快または発症するため、侵襲性赤痢アメーバ症発症患者のみをターゲットにしたシスト駆除薬投与が日本の赤痢アメーバの流行を沈静化できるとは考えがたい。パロモマイシンが2012年12月に正式に認可されたことから、シスト駆除薬投与が容易となった。今後は、その投与による効果を検証し、いかにシストキャリアを減らすかが公衆衛生上の課題と思われる。少なくとも臨床現場では、赤痢アメーバを発症した患者に対してリスク行為(男性同性間性的接触やoral-anal sex)についての知識供与を行い、感染リスクからの回避を促すことが、シスト駆除薬投与に優先して行われるべきである。

#### 赤痢アメーバ症に対する宿主免疫とワクチン開発の可能性

「赤痢アメーバ症の臨床」の項で示したとおり、

赤痢アメーバ症の重症度・臨床像は多彩である。これらの臨床像を規定している因子について、世界中で研究が進んでいる。第一に*E. histolytica* (病原体)の病原性の違いによるということがいわれている。イギリスの研究グループは、長らく病原体遺伝子多型と臨床像の関連について調べており、t-RNAの近傍にある繰り返し配列と臨床像の間に相関があることを報告している<sup>26)</sup>。しかしながら、繰り返し配列自体は、蛋白をコードしない無機能遺伝子であり、なぜ特定の繰り返し配列を持った*E. histolytica*の病原性が高い(または低い)のかは明らかになっていない。一方で、アメリカの研究グループは、宿主(ヒト)の抗*E. histolytica*免疫と臨床像の関連について多数の報告を出している。先天性の因子としては、HLA class II DR 06:01が赤痢アメーバ症の発症と逆相関している(防御的に働く)こと<sup>27)</sup>や、肥満遺伝子として有名なレプチン遺伝子の受容体遺伝子(LEPR遺伝子)の一塩基多型が赤痢アメーバの発症リスクと相関することなどが示されており、レプチンとその受容体に関する研究は、遺伝子変異を導入した動物での感染実験により、その働きが徐々に明らかになっている<sup>28)</sup>。レプチンがかかわる腸管免疫については、*E. histolytica*感染だけでなく他の細菌やウイルスに対しても重要な役割を果たすことが明らかになっており、腸管病変を起こす病原体に対する腸管免疫の研究領域ではトピックとなっている。一方で獲得免疫については、*E. histolytica*の表面抗原(レクチン)に対する抗体で、感染者の腸管内に分泌される抗レクチンIgA抗体に関する研究が進んでいる。赤痢アメーバ症を発症した患者では抗レクチンIgA抗体が分泌されている間には再感染が起こりづらく、IgA抗体の分泌が低下すると再感染を起こすことがバングラデシュの成人のデータで示されている<sup>29)</sup>。また、乳汁中に抗レクチンIgA抗体を多く含む母親によって育てられた乳児では、乳汁中の抗レクチンIgA抗体が低い母親によって育てられた乳児と比較して、赤痢アメーバ感染が起こりにくいことも示されている<sup>30)</sup>。この抗レクチンIgA抗体をワクチンにより誘導できないかという試みは、動物実験レベルでは行われているものの、ヒトでの臨床試験は行われていない。

一度感染を起こした人間でも時がたてば再感染することからもわかるように、一度摂取しただけで長期間有効となるワクチンの開発には時間がかかりそうであるが、病原体・宿主の感染機構・防御機構に関する研究は日進月歩であり、今後の研究成果が待たれるところである。

### おわりに

冒頭に示したとおり、発展途上国の病気、熱帯輸入感染症と考えられていた赤痢アメーバ症は、性感染症として、急速に国内での感染拡大を起こしている。性感染症といっても、通常の性感染症の感染経路と異なり、リスクはoral-anal sexである。男性同性愛者のようにanal sexを行う特殊な感染症と捉えられがちであるが、*E. histolytica*は糞口感染の形式をとって伝播するため、男性同性愛者特有の感染症ではなく女性の感染者も増加している。リスク行為を正確に捉えた問診が診断のカギとなる。検査の項で示したとおり、感度や特異度が高い検査が乏しいため、リスク行為の有無を評価することが大切である。実際には、リスクのある患者で、赤痢アメーバ症を疑った場合には、確定診断にはこだわりすぎず、メトロニダゾールを投与し症状の経過をみることも少なくない。また、赤痢アメーバ症を契機にHIV感染が判明することも多いため、赤痢アメーバ症を診断した場合には、併せてHIV感染を含めた他の性感染症の合併にも注意すべきである。

### 文 献

- 1) Walsh JA. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis : estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. Rev Infect Dis 1986 ; 8 : 228.
- 2) James R, Barratt J, Marriott D, et al. Seroprevalence of *Entamoeba histolytica* infection among men who have sex with men in Sydney, Australia. Am J Trop Med Hyg 2010 ; 83 : 914.
- 3) Park WB, Choe PG, Jo JH, et al. Amebic liver abscess in HIV-infected patients, Republic of Korea. Emerg Infect Dis 2007 ; 13 : 516.
- 4) Hung CC, Deng HY, Hsiao WH, et al. Invasive ame-

- bias as an emerging parasitic disease in patients with human immunodeficiency virus type 1 infection in Taiwan. *Arch Intern Med* 2005 ; 165 : 409.
- 5) Hung CC, Wu PY, Chang SY, et al. Amebiasis among persons who sought voluntary counseling and testing for human immunodeficiency virus infection : a case-control study. *Am J Trop Med Hyg* 2011 ; 84 : 65.
  - 6) Blessmann J, Ali IK, Nu PA, et al. Longitudinal study of intestinal *Entamoeba histolytica* infections in asymptomatic adult carriers. *J Clin Microbiol* 2003 ; 41 : 4745.
  - 7) Iruen EM, Jackson TF, Simjee AE. Asymptomatic intestinal colonization by pathogenic *Entamoeba histolytica* in amebic liver abscess : prevalence, response to therapy, and pathogenic potential. *Clin Infect Dis* 1992 ; 14 : 889.
  - 8) Watanabe K, Aoki T, Nagata N, et al. Clinical significance of high anti-*entamoeba histolytica* antibody titer in asymptomatic HIV-1-infected individuals. *J Infect Dis* 2014 ; 209 : 1801.
  - 9) Nagata N, Shimbo T, Akiyama J, et al. Diagnostic accuracy of indirect immunofluorescence assay for intestinal invasive amebiasis and impact of HIV infection in a non-endemic country. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012 ; 74 : 374.
  - 10) Nagata N, Shimbo T, Akiyama J, et al. Predictive value of endoscopic findings in the diagnosis of active intestinal amebiasis. *Endoscopy* 2012 ; 44 : 425.
  - 11) Haque R, Huston CD, Hughes M, et al. Amebiasis. *N Engl J Med* 2003 ; 348 : 1565.
  - 12) Petri WA Jr, Haque R. Principles and Practice of Infectious Diseases. 7th ed. Philadelphia : Mandell, Douglas, and Bennett's ; 2010. pp. 3411-25.
  - 13) Haque R, Mondal D, Kirkpatrick BD, et al. Epidemiologic and clinical characteristics of acute diarrhea with emphasis on *Entamoeba histolytica* infections in preschool children in an urban slum of Dhaka, Bangladesh. *Am J Trop Med Hyg* 2003 ; 69 : 398.
  - 14) Hung CC, Ji DD, Sun HY, et al. Increased risk for *Entamoeba histolytica* infection and invasive amebiasis in HIV seropositive men who have sex with men in Taiwan. *PLoS Negl Trop Dis* 2008 ; 2 : e175.
  - 15) Hung CC, Chang SY, Ji DD. *Entamoeba histolytica* infection in men who have sex with men. *Lancet Infect Dis* 2012 ; 12 : 729.
  - 16) Okamoto M, Kawabe T, Ohata K, et al. Amebic colitis in asymptomatic subjects with positive fecal occult blood test results : clinical features different from symptomatic cases. *Am J Trop Med Hyg* 2005 ; 73 : 934.
  - 17) Watanabe K, Gatanaga H, Escueta-de Cadiz A, et al. Amebiasis in HIV-1-infected Japanese men : clinical features and response to therapy. *PLoS Negl Trop Dis* 2011 ; 5 : e1318.
  - 18) Adams EB, MacLeod IN. Invasive amebiasis. I. Amebic dysentery and its complications. *Medicine (Baltimore)* 1977 ; 56 : 315.
  - 19) Aristizábal H, Acevedo J, Botero M. Fulminant amebic colitis. *World J Surg* 1991 ; 15 : 216.
  - 20) Ellyson JH, Bezmalinovic Z, Parks SN, Lewis FR Jr. Necrotizing amebic colitis : a frequently fatal complication. *Am J Surg* 1986 ; 152 : 21.
  - 21) Gotohda N, Itano S, Okada Y, et al. Acute appendicitis caused by amebiasis. *J Gastroenterol* 2000 ; 35 : 861.
  - 22) 奥村憲二, 李 哲柱, 遠藤善裕, ほか. 虫垂炎として発症したアメーバ性大腸炎の1例. *日本消化器外科学会雑誌* 2006 ; 39 : 1547.
  - 23) Orbison, JA, Reeves N, Leedham CL, Blumberg JM. Amebic brain abscess ; review of the literature and report of five additional cases. *Medicine (Baltimore)* 1951 ; 30 : 247.
  - 24) Ohnishi K, Murata M, Kojima H, et al. Brain abscess due to infection with *Entamoeba histolytica*. *Am J Trop Med Hyg* 1994 ; 51 : 180.
  - 25) Fotedar R, Stark D, Beebe N, et al. Laboratory diagnostic techniques for *Entamoeba* species. *Clin Microbiol Rev* 2007 ; 20 : 511-32, table of contents.
  - 26) Ali IK, Mondal U, Roy S, et al. Evidence for a link between parasite genotype and outcome of infection with *Entamoeba histolytica*. *J Clin Microbiol* 2007 ; 45 : 285.
  - 27) Duggal P, Haque R, Roy S, et al. Influence of human leukocyte antigen class II alleles on susceptibility to

- Entamoeba histolytica* infection in Bangladeshi children. J Infect Dis 2004 ; 189 : 520.
- 28) Duggal P, Guo X, Haque R, et al. A mutation in the leptin receptor is associated with *Entamoeba histolytica* infection in children. J Clin Invest 2011 ; 121 : 1191.
- 29) Haque R, Ali M, Sack RB, et al. Amebiasis and mucosal IgA antibody against the *Entamoeba histolytica* adherence lectin in Bangladeshi children. J Infect Dis 2001 ; 183 : 1787.
- 30) Korpe PS, Liu Y, Siddique A, et al. Breast milk parasite-specific antibodies and protection from amebiasis and cryptosporidiosis in Bangladeshi infants : a prospective cohort study. Clin Infect Dis 2013 ; 56 : 988.

\* \* \*

## 赤痢アメーバ症, 特にアメーバ性虫垂炎について

*Amoebiasis, especially "Amoebic appendicitis" among HIV-infected patients*独立行政法人国立国際医療研究センター エイズ治療・研究開発センター 小林 泰一郎, 渡辺 恒二  
Tajichiro Kobayashi Koji Watanabe

## Summary

HIV感染症の診療医にとって*Entamoeba histolytica*(*E. histolytica*)はcommonな病原体の1つであるが, 急性虫垂炎を呈することはあまり知られていない。赤痢アメーバ症は先進国ではシストキャリアからの糞口感染を主な感染経路とし, 日本では男性同性愛者(MSM)や性風俗産業従事者(CSW)を中心に患者数が増加しているとされている。これらはHIV感染症のリスク因子と重なり, HIV感染者の急性虫垂炎ではアメーバ性虫垂炎の占める割合が高い。アメーバ性虫垂炎を自覚症状や画像所見などから疑うことは難しいが, 赤痢アメーバ症のリスク因子や重度の術後合併症から*E. histolytica*の関与を積極的に疑い, 切除虫垂のPAS染色やポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を施行することで確定診断できる。アメーバ性虫垂炎の虫垂切除術後に高頻度に合併する穿孔や腹腔内膿瘍などを防ぐために, 抗アメーバ薬の併用が有用である。

## Key words .....

- *Entamoeba histolytica*
- 赤痢アメーバ症
- 虫垂炎
- 男性同性愛者(MSM)
- 性行為感染症(STI)

## 緒言

急性虫垂炎は一般的な外科疾患であり, 感染症科医が主体となって診療することは少ない。しかし, HIV感染者は性行為感染症(sexually transmitted infection; STI)のハイリスク群であり, 特殊な患者背景を有している。すなわち, HIV感染者の急性虫垂炎の感染症診療は非HIV感染者のそれとは異なる部分があり, 感染症科医の適切な介入が必要となる。

本稿では, common diseaseである急性虫垂炎がHIV感染者に合併した際に, 外科医と協力して診療するために必要となる赤痢アメーバ症の知識についてまとめた。

## 赤痢アメーバ症の疫学

赤痢アメーバ症は, ヒトの糞便中に排出される*Entamoeba histolytica*(*E. histolytica*)の「シスト」を経口摂取することで伝播する消化管寄生性原虫症である。図1に, *E. histolytica*の生活環を示した。上下水道の整備が行き届かない発展途上国では感染者の糞便に汚染された食品や水などを介して経口感染する一方, 日本などの先進国では感染者の糞便を性交渉などで直接糞口感染することで流行している。赤痢アメーバ症は, 特に発展途上国では致命的疾患で世界で年間10万人が死亡しており<sup>1)</sup>, 寄生虫疾患ではマラリアに次いで2番目に多い。以前は日本でも広く流行していたが, 1960年代以降は減少した。しかし, 1990年代から徐々に再興し, 1999年度の報告数は276件であった

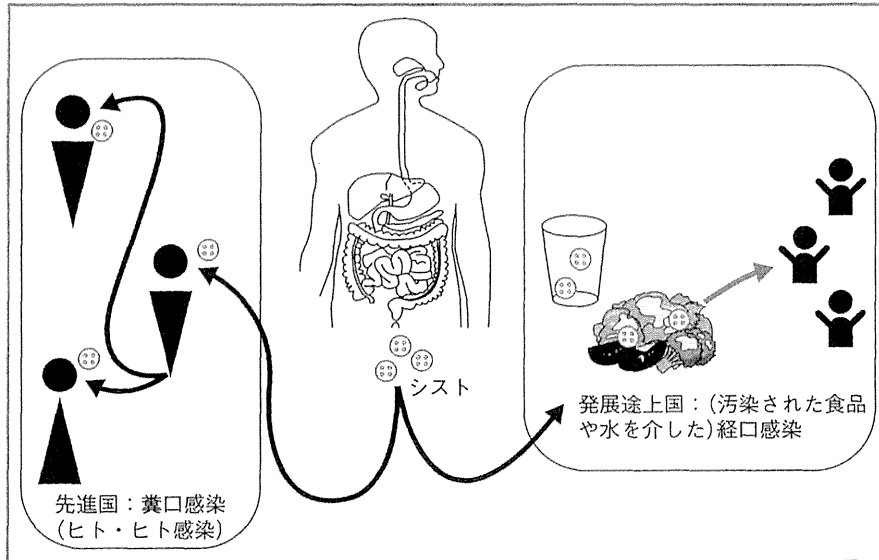


図1. *E. histolytica*の感染経路

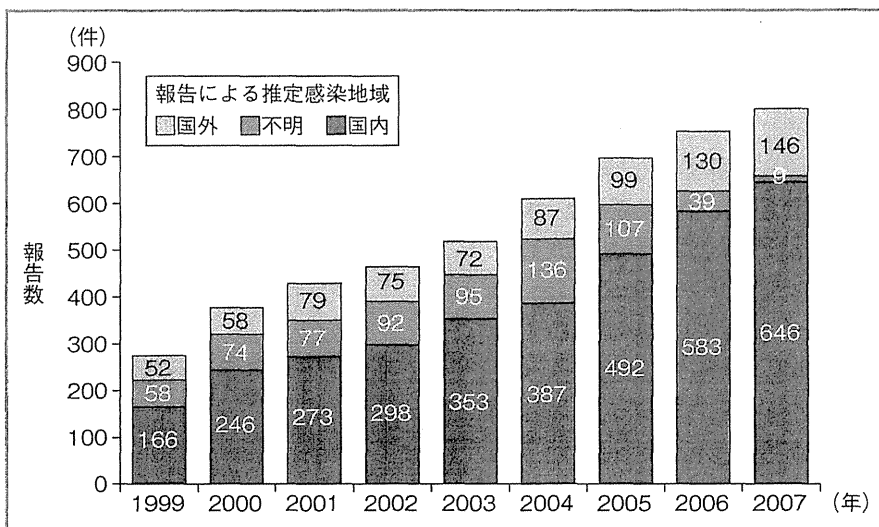


図2. 赤痢アメーバ症の年別感染地域別報告

(文献2)より引用)

が、2013年度は1,000件を超えた(図2)<sup>2)4)</sup>。当初は発展途上国への旅行者の増加が赤痢アメーバ症増加の原因と考えられたが、国内感染例の増加が国外感染例に比して顕著であり、日本国内での症例増加が日本での全体的な赤痢アメーバ症増加の主因である(図2)<sup>2)</sup>。感染経路では性的接触が多数を占め、特に男性同性間の性的接触が多い。一方、女性患者も増加傾向で、性

風俗産業で働く女性を中心に感染拡大している可能性が指摘されている。そして、男性同性愛者(MSM)や性風俗産業従事者(commercial sex worker; CSW)を共通のリスク因子とするHIV感染者では赤痢アメーバ症の発生頻度が高く、日本の他に台湾や韓国、オーストラリアなどからも赤痢アメーバ症がHIV感染者の間で拡大していることが報告されている<sup>5)7)</sup>。



## 赤痢アメーバ症の病態

赤痢アメーバ症は大腸粘膜に*E. histolytica*が感染成立したあとも無症状の状態、すなわちシストキャリアの状態が年余に渡り、その後発症することがある。また、感染が成立しても80%以上の感染者は不顕性感染のまま自然治癒する<sup>8)</sup>。そのため、潜伏期間の詳細は不明で、シストの曝露が数年間なくとも鑑別診断から除外してはならない。

病型は、腸管赤痢アメーバ症と腸管外赤痢アメーバ症に大別される。シストとして経口感染したあと、小腸で脱嚢した*E. histolytica*は病原性を有する「栄養体」となり、大腸粘膜に潰瘍性病変をきたし、腸管赤痢アメーバ症を引き起こす。粘血便やテネスマス、腹痛など大腸型の下痢症状が典型的とされている<sup>9)10)</sup>。しかし、慢性下痢症や無症状の血液混入便のような軽微な症状も多いとされている<sup>11)12)</sup>。また、日本では健康診断時の便潜血陽性のために下部消化管内視鏡検査を施行され、偶発的にみつかると無症候性感染例も報告されている<sup>13)</sup>。自験例でも、肉眼的血便を伴う症例は50%程度、腹痛を伴う症例は30%未満であることが示されている<sup>14)</sup>。一方で、重症化した場合には壊死性虚血性腸炎や巨大結腸症などの致死性病態も起こるとされる<sup>15)17)</sup>。また、回盲部から上行結腸を好発部位とする*E. histolytica*が虫垂を中心に炎症をきたすこともある<sup>18)19)</sup>。以上のように、腸管赤痢アメーバ症の病態は非常に多彩である。

一方、大腸粘膜に侵入した*E. histolytica*が血管浸潤すると血行性に播種し、腸管外赤痢アメーバ症をきたす。最も頻度の高い腸管外病変は肝膿瘍である。血行性播種による脳膿瘍や肺膿瘍などの報告もあるが<sup>20)21)</sup>、メトロニダゾール(MNZ)などの抗アメーバ薬が普及してからはきわめて稀である。その他、横隔膜下の肝膿瘍の炎症波及または横隔膜穿破から胸膜炎や心外膜炎を合併することもある。肝膿瘍が大腸炎を合併する場合は比較的診断は容易であるが、*E. histolytica*は門脈行性に肝臓の比較的深部に初期病巣を形成するため、肝表面まで進展しない限り腹痛などの臓器特異的の症状を呈さず、多くは発熱以外の症状に乏しい。また、合併した胸膜炎や心外膜炎による咳嗽や胸痛を主訴として受診する例もある。

赤痢アメーバ症に特異的な徴候は腸管・腸管外赤痢アメーバ症ともに乏しく、一般的な問診と診察の他に、MSMやCSWなどの患者背景から赤痢アメーバ症を鑑別として考慮することが肝要である。

## 急性虫垂炎とHIV感染症

急性虫垂炎は急性腹症の主要な原因の1つで、その罹患率は10万人あたり年間233人、女性より男性に多く、若年層に多い疾患である<sup>22)</sup>。虫垂壁の壊死・穿孔から腹膜炎や腹腔内膿瘍を形成し、適切な治療が行われなければ死に至ることもある。HIV感染症は急性虫垂炎のリスク因子である可能性が指摘されており、罹患率は10万人あたり年間337人と報告され、この米国の研究では非HIV感染者と比較して有意に高い約4倍の罹患率を呈していた<sup>23)</sup>。

一般的に、急性虫垂炎は盲端に終わる虫垂の根部が糞石や腫瘍、リンパ濾胞過形成、異物などで閉塞し、虫垂内圧が上昇して虫垂内での腸内細菌の異常増殖や虫垂壁の浮腫から発症すると考えられている。しかし、実際に虫垂が閉塞している症例は半分以下とされ、その発症メカニズムの詳細は不明である。ただ、急性虫垂炎の基本病態は感染症であり、一般的には腸内細菌科(*Escherichia coli*や*Klebsiella* spp.など)や嫌気性菌(*Bacteroides* spp.)、グラム陽性球菌(*Enterococcus* spp.や*Streptococcus* spp.など)など消化管の正常細菌叢を構成する複数菌が関与しているとされる<sup>24)</sup>。ただし、HIV感染者の急性虫垂炎では16.8~30%において*E. histolytica*やサイトメガロウイルス(cytomegalovirus; CMV)感染、カポジ肉腫や悪性リンパ腫による虫垂根部の閉塞が指摘されており、特異的な発症機序を呈する場合もある<sup>24)</sup>。また、*E. histolytica*による急性虫垂炎は、非HIV感染者においても報告されている<sup>18)19)</sup>。

基本的な治療方針は虫垂切除術と抗菌薬治療で、抗菌薬治療にはセフメタゾールやスルバクタム/アンピシリンなど腸内細菌を広くカバーする一般抗菌薬が推奨されている<sup>25)</sup>。

## アメーバ性虫垂炎

本項目では、特に*E. histolytica*による急性虫垂炎

について解説する。急性虫垂炎は既述の通り、虫垂根部の閉塞に端を発し、腸内細菌の異常増殖により発症すると考えられているが、閉塞のない症例も多い。アメーバ性虫垂炎も糞石の存在は必須ではなく<sup>26)</sup>、*E. histolytica*の直接侵襲によるところが大きいと考えられる。アメーバ性虫垂炎のリスク因子として、赤痢アメーバ症全般に共通するMSMやCSWとの性的接触が想定されるが、エビデンスとしては示されていない。しかし、MSMが82.2%を占めるHIVコホートでの急性虫垂炎の起炎微生物のうち、15.6%を*E. histolytica*が占める一方、*E. histolytica*流行地域での症例報告をレビューした報告では*E. histolytica*の占める割合が1.4%しかないことから、アメーバ性虫垂炎でもMSMがリスク因子であることが示唆される<sup>26)27)</sup>。現時点ではあまり問題視されていないが、日本全体での赤痢アメーバ症の増多に伴い、MSMが主体である日本のHIV感染者においてアメーバ性虫垂炎も増加していく可能性は高い。

アメーバ性虫垂炎の自覚症状に特異的な症状や所見は乏しい。右下腹部痛は98%にみられ、有痛期間は中央値で2日、下痢は14%のみにみられ、87%が発熱を呈したとされる<sup>27)</sup>。CT所見は、7例の自験例全例で急性虫垂炎に特徴的な腫大虫垂を呈し、限局性腹膜炎や虫垂穿孔、腹腔内膿瘍を合併した症例もあったが(図3)、放射線診断学的に*E. histolytica*感染を強く示唆する特異的所見は指摘し得なかった<sup>26)</sup>。そのため、

MSMやCSWなどのリスク因子から疑うことはできても、比較的頻度の低いアメーバ性虫垂炎を術前に診断することは困難である。ただ、術後に腸管穿孔や創部感染などの合併症をきたすことが多く25.4%もあるとされ<sup>27)</sup>、このような場合にはアメーバ性虫垂炎を鑑別の上位に置くべきである。自験例や本邦からの報告例でも、術前に*E. histolytica*感染が診断されることはなく、虫垂切除術施行後に一般抗菌薬のみで経過をみたのち、やや遅れて(術後10日以上経過してから)縫合不全や腸管穿孔、腹腔内膿瘍などの合併症をきたし、再手術を要する例が多い。術後管理に難渋することがアメーバ性虫垂炎の特徴の1つと考えられる。また、153例のアメーバ性虫垂炎の術中所見では26.1%で虫垂穿孔の所見がみられたとの報告があり、アメーバ性虫垂炎は術前から虫垂穿孔しているリスクが高い可能性が示唆される<sup>27)</sup>。

*E. histolytica*の組織診断において、Periodic acid-Schiff(PAS)染色は栄養体の細胞質の染色性の点でHematoxylin-Eosin(HE)染色に勝るため、アメーバ性虫垂炎を疑った際にはPAS染色を追加することが非常に有用である(図4)。しかし、一般に病理検査は虫垂根部が悪性腫瘍によって閉塞している可能性を否定するために提出されることが多く、HE染色のみ施行することが慣例である。HE染色で*E. histolytica*を検出することは非常に難しく、感染症科医からのPAS染色追加の提案の意義は大きい。実際に、自施設に保

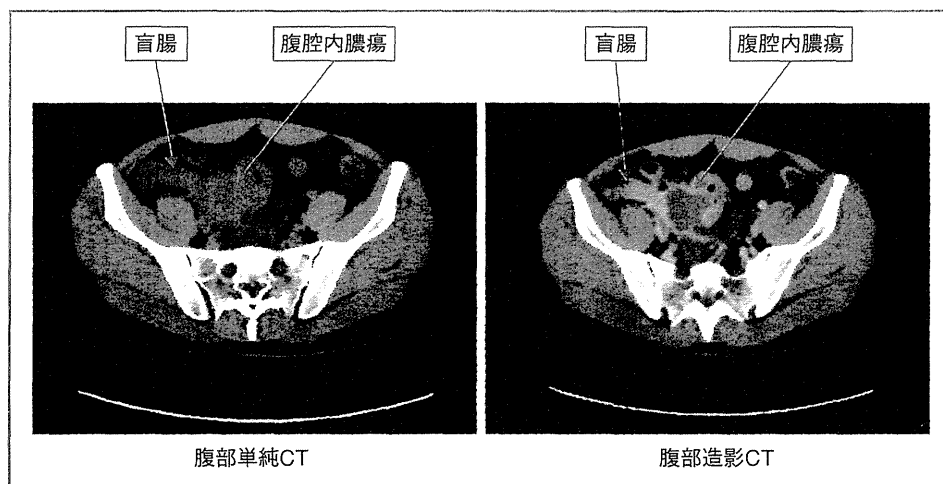


図3. アメーバ性虫垂炎・虫垂穿孔例の画像所見

(自験例)

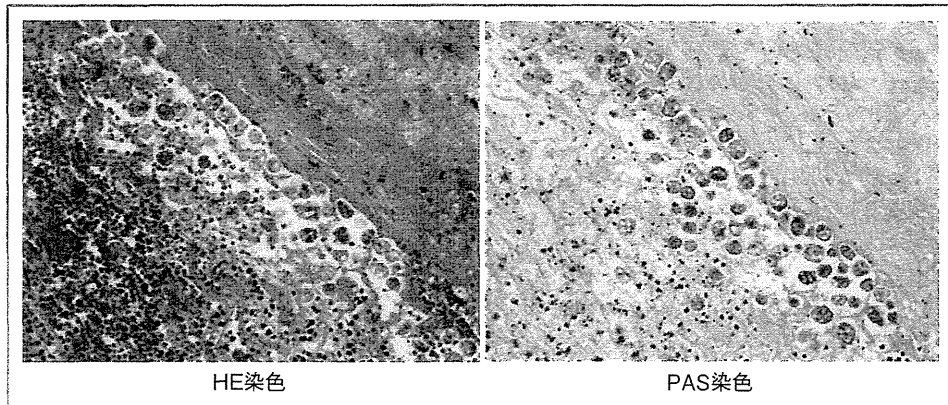


図4. アメーバ性虫垂炎の病理所見

(自験例)

存されていた45例のHIV合併急性虫垂炎の切除標本に対し後方視的にPAS染色を追加したところ、新たに3例をアメーバ性虫垂炎と診断し得た<sup>28)</sup>。また、切除虫垂組織の*E. histolytica*特異的ポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction ; PCR) によってアメーバ性虫垂炎を診断しうることも経験している<sup>26)</sup>。抗赤痢アメーバ抗体はアメーバ性虫垂炎と非アメーバ性虫垂炎で陽性率に有意な差はなく、検査特性としても偽陽性が多いため、臨床上的有用性は少ない<sup>26)</sup>。

術前診断が困難であることもあり、手術適応などの基本的な治療方針は一般的な急性虫垂炎に準じるべきである。ただし、MSMやCSWなどの患者背景からアメーバ性虫垂炎の可能性も考慮される場合には、切除虫垂の病理検査でPAS染色を追加するなど*E. histolytica*特異的な検査を追加すべきである。虫垂切除術での虫垂根部の縫合部位に残存する*E. histolytica*による炎症部位が術後の穿孔や腹腔内膿瘍などの合併症を惹起している可能性も考えられ、アメーバ性虫垂炎の診断が得られた際には術後抗菌薬治療として一般抗菌薬の他にMNZを併用することが望ましいと考えている。自験例では7例のアメーバ性虫垂炎のうち、6例が虫垂切除術にMNZを併用することで合併症なく治癒している。残りの1例は後方視的検討の時点で*E. histolytica*感染が判明した症例であるが、MNZ投与なく虫垂切除術のみで治癒しており、合併症や再発はみられなかった<sup>26)</sup>。

### まとめ

HIV感染者に多いMSMやCSWなど赤痢アメーバ症のリスク患者や難治性の術後合併症を呈する急性虫垂炎患者の診療において、*E. histolytica*の関与も考慮されるべきであり、感染症科医からの積極的な提案が有用であることは少なくない。ただし、赤痢アメーバ症、特にアメーバ性虫垂炎については未解明な部分が多く、知見の集積が必要である。

### 文献

- 1) Walsh JA : Problems in recognition and diagnosis of amebiasis ; estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev Infect Dis* 8 : 228-238, 1986
- 2) 国立感染症研究所感染症情報センター : アメーバ赤痢 2007年. (<http://idsc.nih.go.jp/disease/En-histolytica/sokuho0848/sokuho01.gif>)
- 3) 国立感染症研究所 : 発生動向調査年別報告数一覧. (<http://www.nih.go.jp/niid/ja/all-surveillance/2085-idwr/ydata/4405-report-ja2012.html>)
- 4) 国立感染症研究所 : 感染症発生動向調査週報2013年第52週 (12月23日 ~12月29日). (<http://www0.nih.go.jp/niid/idsc/idwr/IDWR2013/idwr2013-52.pdf>)
- 5) James R, Barratt J, Marriott D, et al : Seroprevalence of *Entamoeba histolytica* infection among men who have sex with men in Sydney, Australia. *Am J Trop Med Hyg* 83 : 914-916, 2010
- 6) Park WB, Choe PG, Jo JH, et al : Amebic liver abscess in HIV-infected patients, Republic of Korea. *Emerg*

- Infect Dis **13** : 516-517, 2007
- 7) Hung CC, Deng HY, Hsiao WH, et al : Invasive amebiasis as an emerging parasitic disease in patients with human immunodeficiency virus type 1 infection in Taiwan. Arch Intern Med **165** : 409-415, 2005
  - 8) Watanabe K, Aoki T, Nagata N, et al : Clinical significance of high anti-entamoeba histolytica antibody titer in asymptomatic HIV-1-infected individuals. J Infect Dis **209** : 1801-1807, 2014
  - 9) Haque R, Huston CD, Hughes M, et al : Amebiasis. N Engl J Med **348** : 1565-1573, 2003
  - 10) Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ : Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (8th ed). Saunders, 982-985, 2014
  - 11) Hung CC, Ji DD, Sun HY, et al : Increased risk for Entamoeba histolytica infection and invasive amebiasis in HIV seropositive men who have sex with men in Taiwan. PLoS Negl Trop Dis **2** : e175, 2008
  - 12) Hung CC, Chang SY, Ji DD : Entamoeba histolytica infection in men who have sex with men. Lancet Infect Dis **12** : 729-736, 2012
  - 13) Okamoto M, Kawabe T, Ohata K, et al : Amebic colitis in asymptomatic subjects with positive fecal occult blood test results ; clinical features different from symptomatic cases. Am J Trop Med Hyg **73** : 934-935, 2005
  - 14) Watanabe K, Gatanaga H, Escueta-de Cadiz A, et al : Amebiasis in HIV-1-infected Japanese men ; clinical features and response to therapy. PLoS Negl Trop Dis **5** : e1318, 2011
  - 15) Adams EB, MacLeod IN : Invasive amebiasis. I. Amebic dysentery and its complications. Medicine (Baltimore) **56** : 315-323, 1977
  - 16) Aristizabál H, Acevedo J, Botero M : Fulminant amebic colitis. World J Surg **15** : 216-221, 1991
  - 17) Ellyson JH, Bezmalinovic Z, Parks SN, et al : Necrotizing amebic colitis ; a frequently fatal complication. Am J Surg **152** : 21-26, 1986
  - 18) Gotohda N, Itano S, Okada Y, et al : Acute appendicitis caused by amebiasis. J Gastroenterol **35** : 861-863, 2000
  - 19) 奥村憲二, 李 哲柱, 遠藤善裕, 他 : 虫垂炎として発症したアメーバ性大腸炎の1例. 日消外会誌 **39** : 1547-1552, 2006
  - 20) Orbison JA, Reeves N, Leedham CL, et al : Amebic brain abscess ; review of the literature and report of five additional cases. Medicine(Baltimore) **30** : 247-282, 1951
  - 21) Ohnishi K, Murata M, Kojima H, et al : Brain abscess due to infection with Entamoeba histolytica. Am J Trop Med Hyg **51** : 180-182, 1994
  - 22) Addiss DG, Shaffer N, Fowler BS, et al : The epidemiology of appendicitis and appendectomy in the United States. Am J Epidemiol **132** : 910-925, 1990
  - 23) Crum-Cianflone N, Weekes J, Bavaro M : Appendicitis in HIV-infected patients during the era of highly active antiretroviral therapy. HIV Med **9** : 421-426, 2008
  - 24) Flum DR, Steinberg SD, Sarkis AY, et al : Appendicitis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. J Am Coll Surg **184** : 481-486, 1997
  - 25) 青木 眞 : レジデントのための感染症診療マニュアル (第2版). 東京, 医学書院, 725-729, 2007
  - 26) Kobayashi T, Watanabe K, Murata Y, et al : Amoebic Appendicitis among HIV-1 Infected Individuals in Japan. 54th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, DC., Sept 2014
  - 27) Otan E, Akbulut S, Kayaalp C : Amebic acute appendicitis ; systematic review of 174 cases. World J Surg **37** : 2061-2073, 2013
  - 28) 渡辺恒二, 小林泰一郎, 石金正裕, 他 : HIV感染合併虫垂炎症例におけるアメーバ性虫垂炎の頻度とその特徴, 第27回日本エイズ学会学術集会・総会, 熊本市, 2013年11月