

【総説】

病原性寄生原虫における分子分類の現状

Current status of molecular taxonomy in pathogenic protozoan parasites

金沢大学医薬保健研究域医学系寄生虫感染症制御学

所 正 治, 山 口 智 博, 田 中 身 和

金沢大学医薬保健研究域医学系視覚科学 (眼科)

小 林 顕

金沢医科大学医学部生体感染防御学 (医動物学)

及 川 陽 三 郎

I. はじめに

病原性寄生原虫は、古くから死に至る熱病として世界中で記録されてきたマラリア原虫から、1994年に新種記載された下痢起因原虫であるサイクロスポーラまで、様々なライフサイクル、地理的分布、宿主特異性そして病原性を保持する単細胞の真核生物である。その他代表的な病原性原虫としては、赤痢アメーバ、トリパノソーマ、リーシュマニア、トリコモナス、イソスポーラ、ジアルジア、トキソプラズマなどが知られるが、国内外に幅広く分布し、またグローバル化の中で輸入感染例が増加していることから、いずれも医師が外来においてその存在を念頭に置くべき原虫である (表1)。

分子生物学の発展にともなう遺伝子レベルでの様々な生物の種内および種間多型の解析成果は、長年にわたり形態学的なアプローチによって検出・記載されてきた生物分類に革命的な変化をもたらしてきた。また近年では、多細胞生物におけるゲノムプロジェクトに続いて進められてきたマラリア、赤痢アメーバ、クリプトスポリジウムをはじめとする様々な原虫のゲノムデータが明らかになり (表1)、各原虫の代謝経路解析とラショナルドラッグデザインのアプローチまでが可能になりつつある¹⁾。

一方、従来の形態学的分類では困難だった病原性微生物の進化的背景が、このような遺伝子データの解析による分子系統解析によって示され、原虫分類自体の再検討がなされている。例えば、従来原虫に分類されてきた微孢子虫類やニューモシチス肺炎の原因となるニューモシチス・イロヴェチイ (*Pneumocystis jirovecii*: 従来のニューモシチス・カリニはイヌに特異的とされ、ヒトに感染するニューモシチスはイロヴェチイとされ、カリニ肺炎はニューモシチス肺炎とされた) などは、未だに議論はあるものの、原虫よりは真菌に近縁とみなされている。また、人獣共通感染症としてヒトを含む多数のは乳類を宿主とする原虫では、従来の宿主特異性を基準とした種分類に疑義が呈されている。これは、幅広い宿主域を保持する系統樹解析において単系統のクラスターを形成するタイプの原虫と、各宿主に特異的なサブグループが見いだされ、宿主特異性が必ずしも分子分類と一致しない事実が明らかになったためである。つまり、形態学的に同一でも宿主域が異なることから新種記載がなされてきた多くの原虫種では、遺伝子情報に基づく再分類が必要と考えられるようになってきた²⁾。同時に、有性生殖をそのライフサイクルの一部に含みながらもクローナルな増殖を基本とする原虫類では、進化的生殖隔離の概念に基づくエルンスト・マイヤーによる生物学的種概念 (Biological

Species Concept: BSC)³⁾は必ずしも有効ではなく、原虫の分子系統解析をベースとした新たな種の定義の必要性も認識されている⁴⁾。

しかし、原虫類の種間および種内多型のデータ収集は端緒に着いたばかりであり、新たな種分類のための各原虫集団の遺伝子多型に関する知見は未だ限られている⁵⁾。このため、種分類に関するコンセンサスの確立は将来的な重要課題と目されており、病原性寄生原虫の種内多型解析は今まさに精力的に取り組まれている研究トピックである。そこで本稿では、紹介されることの少ないマラリア以外の病原性寄生原虫の中から、特に我々の取り組んでいる腸管寄生原虫と自由生活性アメーバについて、その疫学・診断・治療、分子系統解析の現状とその臨床応用の可能性をまとめる。

II. 病原性寄生原虫の分子分類

1. クリプトスポリジウム *Cryptosporidium* spp.

1.1 ライフサイクルと疫学的背景

病原性腸管寄生原虫クリプトスポリジウムは、経口摂取されたオーシストから脱糞したスポロゾイトが小腸の絨毛上皮細胞内に寄生することによって激しい下痢症を引き起こす (図1A)。本原虫は旅行者下痢症の原因となり、また、感染源であるオーシストが通常の塩素殺菌に対して強い耐性を保持することから、水道水汚染による集団下痢症の原因となり、大規模なアウトブレイクとしては、日本国内では1996年に埼玉県越生町において発生した約8700人の感染があり、また海外では1993年の米国ミルウォーキーでの約40万人の感染が知られている。

感染症新法の5類届出疾患 (全数把握) である本原虫症の本邦での届出件数は2007年度に6件とわずかだが、英国では3006件 (2006年)、米国では4561件 (2006年) と極めて対照的な届出件数が報告されており、日本国内での実態把握について疑問が呈されている。この乖離の説明としては、本邦において本原虫が通常の検査項目に含まれないことから、ほとんどの症例が感冒性腸炎などとして見過ごされている可能性が挙げられ、実際、我々の取り組む国内の検査検体においても先天性免疫不全 (低γグロブリン血症、高IgM症候群など) やHIV/AIDSにおける慢性下痢症において、本原虫がしばしば検出されている。また、河川等の地表水および下水での調査では、全国的な本原虫の分布が示されており、血清学的サーベイ等による実態解明とともに、本症を日常の診療における鑑別診断に加える必要性は十分にあるものと考えられる。

1.2 クリプトスポリジウム症

クリプトスポリジウム症は、先天性免疫不全、AIDS、移植手術後、抗癌剤治療時等の免疫不全状態の宿主においては慢性化・重症化し、時に死の転帰を取りうる危険な日和見感染症であり、AIDS診断の指標疾患でもある。したがって免疫不全に伴う原因不明の下痢症においてはまず念頭におくべき原虫症であり、また、本症の慢性化例では、患者の免疫学的背景のチェックは不可欠である。免疫不全状態でのクリプトスポリジウム症の特徴として腸管外クリプトスポリジウム症があり、血行性の播種あるいは嘔吐物の誤嚥による呼吸器感染や、胆管を介した十二指腸からの直接の波及により胆管・胆嚢・膵臓の慢性的な炎症をみることがある。

クリプトスポリジウムのオーシストは、糞便・十二指腸液・喀痰検体から顕微鏡的検査によって検出可能である。便中抗原検出のためのキットが各種販売されているが診断薬としては国内未承認であり、また、時に小腸粘膜上皮の刷子縁にクリプトスポリジウムの侵入像が検出されることがある(図1A)。PCRによる検出は形態学的に鑑別不能な種や遺伝子型の同定には不可欠だが、通常は実施されていない。

1.3 遺伝子型分類とその臨床応用

クリプトスポリジウムには多くの種および遺伝子型が報告されているが、形態的には鑑別不可能なものも多く、浄水・環境水および臨床糞便検体のオーシストからの種の同定には検体からの精製DNAをテンプレートとしたPCR増幅産物のPCR-RFLP

およびシーケンス法が用いられている。また、リアルタイムPCRを用いたより高感度な方法、さらに、各種および遺伝子型内での重型を検出しうるより解像度の高い方法も報告されている。これまでに用いられてきたターゲット座位はacetyl-CoA synthetase, heat shock protein 70, *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP), 18S small subunit of ribosomal RNA (18SrRNA), polythreonine等の遺伝子だが、これらのターゲット遺伝子の中では、特に18SrRNA遺伝子、COWP遺伝子について多くのリファレンスが報告され、ほぼすべての種と遺伝子型の鑑別が可能であり、事実上のスタンダードとなっている⁷⁾。

図1Bに18SrRNA遺伝子の部分配列を用いたクリプトスポリジウムの系統樹解析結果を示した。ヒトから検出されるクリプトスポリジウムは、主にヒトのみに感染する*Cryptosporidium hominis* (宿主特異性の違いから2002年12月に別種として確立、従来の*C. parvum* genotype 1あるいはhuman genotype)と、幅広い乳類を宿主とする人獣共通感染症型の*C. parvum* (genotype 2, bovine genotype)の2種であり、健康人の症例では97%以上が、また免疫不全症例においても80%以上が上記2種によって占められる。その他、現在までに命名されているクリプトスポリジウムは15種に及び、これらについてもヒトへの感染性の有無が問題とされている⁸⁾。上記2種以外のクリプトスポリジウムの中でも、*C. meleagridis*, *C. muris*, *C. canis*等では少数ではあるが健康人での感染例の報告があり、またそれ以外の種によっても特に免疫不全状態の患者では感染が起こりうることを報告

表1. 病原性原虫一覧

	原虫名	寄生部位	疾患名/主症状	Genome project
消	クリプトスポリジウム	小腸 (胆嚢・胆管、肺)	クリプトスポリジウム症/水様下痢、腹痛、吐気、嘔吐、 免疫不全患者で消化管外	完了
化	赤痢アメーバ	大腸 (肝臓、肺、脳)	腸管アメーバ症/アメーバ赤痢、アメーバ性大腸炎 腸管外アメーバ症/肝膿瘍など	完了
管	ランブル鞭毛虫 (ジアルジア)	小腸上部(胆嚢・胆管)	ジアルジア症/下痢・胆嚢炎	完了
	大腸バラネチジウム	大腸	バラネチジウム症/下痢、血便	-
	ヒトプラストシスチス	大腸	プラストシスチス症/下痢?	-
寄	サイクロスポーラ	小腸	サイクロスポーラ症/下痢、腹痛、嘔吐	-
生	戦争イソスポーラ	小腸(胆嚢・胆管)	イソスポーラ症/下痢、腹痛、嘔吐、胆嚢炎	-
	肉胞子虫	小腸	肉胞子虫症/下痢、腹痛、嘔吐	-
	バベシア	赤血球	バベシア症/発熱・貧血・脾腫	進行中
	リーシュマニア			
	[内臓型]		内臓型リーシュマニア症/ カラ・アザール/腹部の皮膚の黒変、発熱、肝脾腫、 下痢 など	完了
	・ <i>L. infantum</i> , <i>L. donovani</i> etc.	肝臓、脾臓、骨髄などの 細網内皮系細胞		
血	[皮膚型]		皮膚型リーシュマニア症/ 旧世界/腫瘍、潰瘍などの皮膚病変	完了
	・ <i>L. major</i> , <i>L. tropica</i> etc.	皮膚		
液	・ <i>L. mexicana</i> etc.		新世界/耳介のチクレロ潰瘍や顔面の病変	進行中
	[粘膜皮膚型]		粘膜皮膚型リーシュマニア症/ 粘膜皮膚破壊 (エスプンディア)	完了
	・ <i>L. brasiliensis</i> etc.	粘膜皮膚		
組	マラリア原虫			
	・ 三日熱マラリア原虫	肝細胞、赤血球	マラリア/発熱、貧血、脾腫 など	完了
	・ 熱帯熱マラリア原虫			進行中
織	トリパノソーマ			
	アフリカトリパノソーマ			
	・ <i>T. brucei gambiense</i>	血中、脳脊髄液	アフリカトリパノソーマ症 (アフリカ睡眠病)/ウイン ターボトム徴候・髄膜脳炎・精神障害・昏睡 など	進行中
	・ <i>T. brucei rhodesiense</i>			
生	アメリカトリパノソーマ		アメリカトリパノソーマ症 (シャーガス病)/ローマーニ ャ徴候、心不全・巨大食道症・巨大結腸症 など	進行中
	・ <i>T. cruzi</i>	心筋、消化管神経細胞		
	トキソプラズマ	網脈絡膜、胎児、リンパ 節、肝、肺、脳 など	・ 先天性トキソプラズマ症/・後天性トキソプラズマ 症/リンパ節腫大、肺炎、脳炎 など	進行中
	臈トリコモナス	臈(前立腺、尿道)	トリコモナス症/臈炎、外陰炎、尿道炎	進行中
	自由生活性アメーバ			
そ	・ アカントアメーバ属	角膜、脳	アカントアメーバ角膜炎/角膜炎 アメーバ性肉芽腫性脳炎/肉芽腫脳炎	-
の	・ バラムシア属	脳	アメーバ性肉芽腫性脳炎/肉芽腫脳炎	-
他	・ ネグレリア属	脳	原発性アメーバ性髄膜脳炎/原発性髄膜脳症	-

され、年々その種数が増加していることから警戒が必要である。

一方、クリプトスポリジウム属全体の分類上の帰属についての混乱も見られる。クリプトスポリジウムは長らくアピコンプレックス門コクシジウム亜綱(他にマラリア原虫、トキソプラズマ、肉胞子虫等が含まれる)に位置づけられてきた。ところが、分子系統解析によってグレガリナ亜綱との近縁関係が報告されるとともに⁹⁾、細胞接着部位の構造の特殊性および宿主細胞への侵入後の早期に認められるアピカルコンプレックスの消失などいくつかの形態的な類似点が報告され¹⁰⁾、さらに、2004年に報告されたクリプトスポリジウムの無細胞培養系におけるグレガリナ様構造の出現などによって¹¹⁾、その分類上の位置付けについて見直しの必要性が議論されてきた。しかし、これらのエビデンスには、構造的な類似を除いては、いずれも疑義が呈されている。そもその議論の発端であった分子系統解析の結果は、複数の遺伝子座を用いたより詳細な解析では有意な結論が得られず¹²⁾、また、無細胞培養系についても、他の研究グループによる追試では確認がとれていない¹³⁾。このため、クリプトスポリジウムの上位分類はこれまでのところはコクシジウム亜綱にとどまり、その再評価は分子系統解析における今後の課題である。

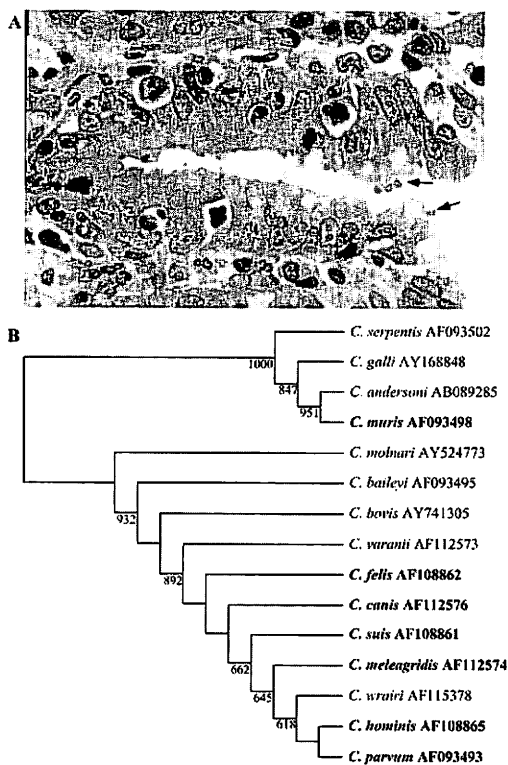


図1. A) スナネズミのクリプトスポリジウム感染モデル 腸粘膜上皮細胞の刷子縁に侵入したメロント(矢印)がみられる(HE染色) B) クリプトスポリジウムの18SrRNA遺伝子部分配列を用いた系統樹解析結果

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

2.1 ライフサイクルと疫学的背景

ジアルジアは、糞便に排出される嚢子と小腸上部で脱囊し空回腸の粘膜上皮に吸着して寄生する栄養型(図2A)の2つの形態を持つ。栄養型の組織への浸潤はなく基本的に腸管腔に留まり、下痢を主症状とするジアルジア症を引き起こす。本原虫は、特に熱帯・亜熱帯地域では小児の慢性下痢・栄養障害の原因原虫として最も一般的に検出される。また、旅行者下痢症、施設・

プールでの経口感染や水を介した集団発生が先進国からも報告され、水道水の供給において常時警戒されている原虫でもある。また、本原虫症はヒトを含む幅広いほ乳類を宿主とする *G. intestinalis* による人獣共通感染症であり、家畜・コンパニオン動物からの感染リスクが懸念されている。本症は感染症法の5類届出疾患(全数把握)に指定されているが、国内での報告数は53件(2007年)に留まり、クリプトスポリジウムと同様、英国での2,945件(2006年)および米国での20,075件(2005年)との比較から、臨床における下痢症の鑑別診断に本原虫症が含まれず、検査自体が実施されていない可能性が危惧されている。

2.2 ジアルジア症

感染者の大部分は無症候性嚢子排出者となるが、発症のリスク要因、発症率などは未確定である。発展途上国の流行地域では年齢に関わらず、しばしばジアルジアの感染が認められるが、発症はほとんどが乳幼児に限定されている。一方、先進国からの旅行者の初感染では比較的高率に発症をみることから、獲得免疫による発症抑制が指摘され、実際、イヌ・ネコのワクチンは実用化され主に米国で使用されている¹⁴⁾。本症は一旦発症すると泥状・水様の下痢(しばしば脂肪性)、腹痛、鼓腸、おくび・放屁(強い硫化水素臭)とともに悪心・嘔吐をみる。胆道感染による胆管・胆嚢炎、また、慢性感染においては吸収不良・体重減少をみることがあるが、血便や高熱は通常認められない。

診断には、新鮮な下痢便や十二指腸液を材料に、直接鏡検によって活発に運動する栄養型を検出する。また、嚢子は下痢・有形便とともに検出可能であり、集嚢子法/ヨード染色法/特異蛍光抗体法によって検出される。便中抗原検出のためのキットが各種発売されているが、診断薬としては国内未承認である。血清特異抗体価の測定、PCRによる特異検出は通常実施されていない。

特効薬としては、メトロニダゾールが用いられているが、先天性および後天性免疫不全では再発がしばしば認められ難治であり、メトロニダゾールに対する耐性株の報告もある。このためメトロニダゾール治療で改善が認められない場合には即座にアルベンダゾールなどの他治療薬への変更が必要である。

2.3 遺伝子型分類とその臨床応用

従来、宿主特異性に基づいて分類されてきたジアルジア属の中で、ヒトに病原性を示す唯一のジアルジアが *Giardia intestinalis* だが、近年の分子生物学の進歩は、本原虫の種内に形態学的には区別のできない複数の遺伝子型の存在を明らかにしてきた(図2B)。遺伝子型は現在までに7タイプ(AからG)が報告され、そこには、ヒトを含む多くのほ乳類に感染するAおよびBのような人獣共通感染症型や、各種ほ乳類に特異的とされるC, D, E, F, Gのような異なる宿主特異性を示すタイプが含まれ、また、ヒトに感染する遺伝子型AとBの中にも多様な亜型の存在が報告されてきた。遺伝子型解析のためのPCRでは、glutamate dehydrogenase (GDH)、18S ribosomal RNA (18SrRNA)、elongation factor 1- α およびtriosephosphate isomerase等の様々なターゲット座位の解析が実施されているが、中でもGDH遺伝子と18S ribosomal RNA遺伝子については最も多くのリファレンス配列が報告され、上記7遺伝子型の全てが鑑別可能である¹⁵⁾。

一方、本原虫には、1) 先進国から発展途上国まで世界中に分布し、2) 比較的重症化せず、3) 有効な治療薬が存在する、という研究材料として最適な特徴が備わっている。そこで我々は、ジアルジアをターゲットとし、感染率の高いインドネシアをフィールドに「病原性寄生原虫によるヒト寄生の起源の解明」

および「病原性原虫集団に対する人為的淘汰圧付与による進化誘導介入の可能性評価」の研究を実施している。

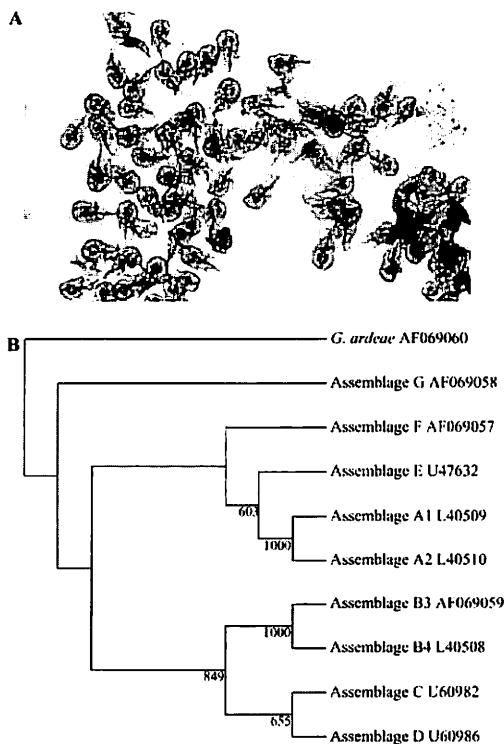


図2. A) ジョージア無菌培養系の栄養型(ギムザ染色) B) ジョージアのGDH遺伝子部分配列を用いた系統樹解析結果

3. アカントアメーバ *Acanthamoeba* spp.

3.1 ライフサイクルと疫学的背景

アカントアメーバ属の原虫は赤痢アメーバと同様に活発に2分裂を繰り返す栄養型と、環境中での耐性のある嚢子の2タイプの形態(図3A)によって構成されるライフサイクルをもつ。特に嚢子は通常使用される塩素消毒では死滅せず、水道水やプール等のレクリエーション施設、また、身のまわりの埃、土壌中からも高率に培養可能であり、文字通りユビキタスに分布する自由生活性原虫である。

アカントアメーバは寄生生活とは無縁のライフサイクルを特徴としているため、自由生活性アメーバと呼ばれるが、時にヒトへの偶発寄生をみる。中でもアカントアメーバ角膜炎は、コンタクトレンズ装用者10万人あたり0.1-14.9件/年の発生率が世界中から報告されており、日本国内で1500万人を超えるとされるコンタクトレンズ使用者においても毎年数百件以上が発生していると推定される。また、近年の使い捨てタイプのコンタクトレンズやカラーコンタクトレンズの普及と、それにとまう不適切使用例(2週間連続装用レンズの数ヶ月に渡る使用や水道水でのレンズ洗浄など)の増加によって、アメーバ角膜炎のリスクは確実に増加している。本症では、治療が遅れると非可逆的な視力の低下や失明に至る危険性があるため、確実な診断と早期治療が重要である。

3.2 アカントアメーバ角膜炎

アカントアメーバには組織浸潤性は無く、角膜表面の微小な傷を足がかりに角膜への感染を成立させる。特にソフトコンタクトレンズ装着者における発症率が高い。毛様充血、眼痛を生じ、偽樹枝状潰瘍、放射状角膜神経炎などを特徴とし、放置すると角膜潰瘍、穿孔に至る。

診断には角膜病変の擦過小片をスライドガラスに塗抹あるいは

は圧平し、顕微鏡検査によって二重壁を有する特徴的嚢子を検出する。また、培養法による検出(図3A)、さらに近年は、レーザー光源角膜共焦点顕微鏡による角膜炎内のアカントアメーバの直接検出も実施されている¹⁶⁾。

治療には、フルコナゾールやミコナゾール等の抗真菌薬の点眼および内服による全身投与、随時の外科的病巣掻爬が実施される。病巣掻爬は感染巣の栄養型・嚢子を物理的に除去し、薬剤の浸透を補助する効果もあり、特に初期には有効である。また、上記の薬剤では嚢子への効果が認められないことから、ビグアナイド系消毒薬であるポリヘキサメチレン・ビグアナイドまたはグルコン酸クロルヘキシジンの点眼も使用されている¹⁷⁾。

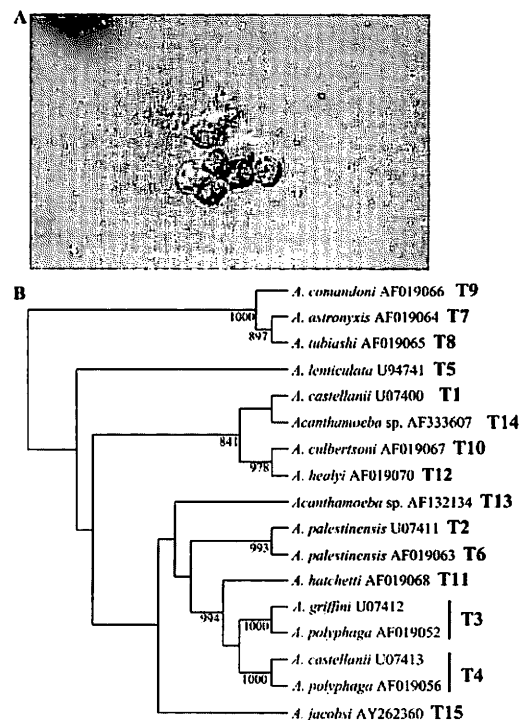


図3. A) アカントアメーバの嚢子と脱嚢直後の栄養型(微分干涉像) B) アカントアメーバの18SrRNA遺伝子部分配列を用いた系統樹解析結果

3.3 遺伝子型分類とその臨床応用

*Acanthamoeba castellanii*や*A. polyphaga*などの多くの種名がアカントアメーバ角膜炎の起因原虫としてこれまでに報告されてきたが、ほとんどの従来の報告は嚢子壁の特徴(二重壁かどうか、突起の数など)やサイズなどによって分類されたものである。しかしながら、単離した培養アカントアメーバにおいて、栄養状態等の環境要因によると考えられる多様な形態が観察され、また、近年の分子系統解析による評価では、American Type Culture Collection(ATCC)に保存されたリファレンス株においてすら、異なる種名に分類されていたアカントアメーバが単系統に示されたり、また逆に、同一種と認識されていたいくつかの分離株が多系統に分離されたりといった矛盾が示されている²⁰⁾(図3B)。

現在、アカントアメーバ属においては分子系統解析によりT1-T15の遺伝子型が知られているが、角膜炎患者から分離された遺伝子型はそのうちの5種類のみ(T3, T4, T5, T6, T11)に限られている¹⁸⁾。実際、角膜炎患者より分離・培養されたアカントアメーバ検体について我々の実施している遺伝子型解析の結果は、角膜炎起因遺伝子型を限定した従来の報告を支持し、T4優位であるという点も一致した。また同時に、従来実施されて

きたダイレクトシーケンスによるアcantアメーバの遺伝子型解析では見逃されてきた特徴として、多くの検体において異なる遺伝子型による混合感染が検出された。つまり、本原虫の臨床検体における種内多型解析には、より厳密な分子生物学的解析手法を用いた遺伝子型同定による評価が必要と考えられる。

遺伝子型による分子疫学的解析は、感染経路推定、治療薬選択などの様々なアプリケーションに利用可能なアcantアメーバのフィンガープリンティングを提供する。今後、コンタクトレンズケース等から検出されるアcantアメーバの評価を含め、感染予防対策を構築する手段として、幅広く利用されていくことが期待される。また、ここで示したように、現在のアcantアメーバの種名および分類は、明らかに分子系統解析による分類と矛盾を来しており、リファレンスデータの蓄積と分類体系の整理・再構築は、本原虫研究における重要な課題である。

4. おわりに

4.1 臨床検査における意義

検査における分子生物学的手法の導入は、数多くの感度・特異度に優れたアプリケーションを生み出してきた。特に、PCR (リアルタイムPCRを含む) をベースにした病原体のDNAあるいはメッセンジャーRNAの特異的検出や、ユニバーサルプライマーを用いた網羅的な検索は、従来の形態学的な検査においては検出不能であった低レベルの原虫を、組織・血液・喀痰・糞便・角膜掻爬材料といった臨床材料から検出・同定可能とし、日和見感染・潜伏感染している多くの原虫感染の存在を明らかにできる。

また、このような汎用のプロトコルによる検出の実用化は、ウイルス・細菌・寄生虫・真菌といった専門分野の垣根を取り払い、簡便なプロトコルによる臨床検査での特殊病原体検出を可能とする。手法およびリファレンスDNAの整備と標準化が今後の課題だが、専門家による形態学的分類を必要とせずに病原性微生物の同定を可能とするこのようなアプローチは、今後さらに普及していくものと期待される。この点は、医学関連領域ばかりでなく、生物学研究における重要な視点でもあり、DNAバーコーディングとして種同定の新たな潮流となりつつある。

4.2 臨床・公衆衛生対策構築における意義

魔法の弾丸として世界中で使用されてきた抗生剤による感染症対策は、拡大する薬剤耐性の報告の中で再構築を迫られている。一方、このような薬剤耐性の蔓延は人為的な淘汰圧の付与による病原体集団に対する進化的介入の実例でもある。ワクチンによる予防のアプローチが原虫感染症では未だ成功していないことは、単細胞レベルの病原体に対する感染症対策を非常に困難なものにしてきたが、原虫感染症の蔓延している地域での血清学的サーベイランスの結果は、ある種の獲得免疫による発症予防の可能性を示唆しており、人為的な淘汰圧付与による非病原性株の選択的増加による流行地域住民における獲得免疫維持といった方法は、将来的に実施可能と考えられる。また、分子分類自体の特性として、選択する遺伝子座の解像度によって、原虫集団中の任意のレベルでのフィンガープリンティングが可能であり、分離株のリスク評価、治療選択、感染経路解析など臨床・疫学におけるさらなる活用が可能と期待している。

文 献

1) Tokoro M, Asai T, Kobayashi S, Takeuchi T, Nozaki T. Identification and characterization of two isoenzymes of methionine gamma-lyase from *Entamoeba histolytica*: a key enzyme of sulfur-amino acid degradation in an anaerobic parasitic

protist that lacks forward and reverse trans-sulfuration pathways. *J Biol Chem* 278(43): 42717-42727, 2003

2) Nozaki T, Ali V, Tokoro M. Sulfur-containing amino acid metabolism in parasitic protozoa. *Adv Parasitol* 60: 1-99, 2005

3) Thompson RC, Monis PT. Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. *Adv Parasitol* 58: 69-137, 2004

4) Mayr E. *The Growth of Biological Thought*. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, 1982

5) Tibayrenc M. The species concept in parasites and other pathogens: a pragmatic approach? *Trends Parasitol* 22(2): 66-70, 2006

6) 所 正治, 井関基弘. 臨床で問題になるいくつかの“原虫”の分類に関する最近の知見. *日本臨床寄生虫学会誌*16(1): 9-12, 2005.

7) Tokoro M, Nakamoto K, Hussein AIA, Arai T. Genotyping of *Cryptosporidium* species: current status and future direction. *Parasitic Zoonoses in Asian-Pacific Regions* 1(1): 3-7, 2006

8) Xiao L, Fayer R, Ryan U, Upton SJ. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clin Microbiol Rev* 17 (1): 72-97, 2004

9) Carreno RA, Martin DS, Barta JR. *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitol Res* 85(11): 899-904, 1999

10) Valigurova A, Hofmannova L, Koudela B, Vavra J. An ultrastructural comparison of the attachment sites between *Gregarina steini* and *Cryptosporidium muris*. *J Eukaryot Microbiol* 54(6): 495-510, 2007

11) Hijawi NS, Meloni BP, Ng'anzo M, Ryan UM, Olson ME, Cox PT, Monis PT, Thompson RC. Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cell-free culture. *Int J Parasitol* 34(7): 769-77, 2004

12) Leander BS, Clopton RE, Keeling PJ. Phylogeny of gregarines (Apicomplexa) as inferred from small-subunit rDNA and beta-tubulin. *Int J Syst Evol Microbiol* 53 (Pt 1): 345-354, 2003

13) Girouard D, Gallant J, Akiyoshi DE, Nunnari J, Tzipori S. Failure to propagate *Cryptosporidium* spp. in cell-free culture. *J Parasitol* 92(2): 399-400, 2006

14) Olson ME, Ceri H, Morck DW. *Giardia* vaccination. *Parasitol Today* 16(5): 213-217, 2000

15) Hussein AIA, Nakamoto K, Yamaguchi T, Yoshida T, Tokoro M. Technical notes for the genotyping of *Giardia intestinalis*. *Parasitic Zoonoses in Asian-Pacific Regions*. 1(1): 10-13, 2006

16) Kobayashi A, Ishibashi Y, Oikawa Y, Yokogawa H, Sugiyama K. In vivo and ex vivo laser confocal microscopy findings in patients with early-stage *Acanthamoeba* keratitis. *Cornea* 27(4): 439-45, 2008

17) 石橋康久, 宮永嘉隆. アcantアメーバ角膜炎. *日本の眼科* 79(6): 11-16, 2008

24) Liu, H., E. K. Moon, et al. Evaluation of taxonomic validity of four species of *Acanthamoeba*: *A. divionensis*, *A. paradiivionensis*, *A. mauritaniensis*, and *A. rhysodes*, inferred from molecular analyses. *Korean J Parasitol* 43(1): 7-13, 2005

18) Seal, D. V. *Acanthamoeba keratitis* update-incidence, molecular epidemiology and new drugs for treatment. *Eye* 17(8): 893-905, 2003