

200829045A

厚生労働科学研究費補助金
新興・再興感染症研究事業

顧みられない病気に関する研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 野 崎 智 義

(国立感染症研究所)

平成21 (2009) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金
新興・再興感染症研究事業

顧みられない病気に関する研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 野 崎 智 義

(国立感染症研究所)

平成21 (2009) 年 3 月

目次

I. 総括研究報告	
顧みられない病気に関する研究	1
野崎 智義 (国立感染症研究所 寄生動物部)	
II. 分担研究報告	
1. 赤痢アメーバの病原性遺伝子の同定と病原機構の解明	23
野崎 智義 (国立感染症研究所 寄生動物部)	
2. 赤痢アメーバ症の感染防御機構の解明	31
濱野 真二郎 (九州大学大学院医学研究院・基礎医学部門感染免疫 熱帯医学分野)	
3. トキソプラズマの細胞侵入機構の解明	37
永宗 喜三郎 (筑波大学大学院生命環境科学研究科)	
4. 国内における腸管寄生虫症の疫学的研究	39
小林 正規 (慶應義塾大学医学部熱帯医学 寄生虫学教室)	
5. アカントアメーバ角膜炎の疫学的研究	43
井上 幸次 (鳥取大学医学部感覚運動医学講座視覚病態学分野)	
6. 寄生原虫症の検査診断法開発	47
八木田 健司 (国立感染症研究所寄生動物部一室)	
7. 蠕虫遺伝子発現制御機構の解明、及び寄生虫症診断法の開発	55
丸山 治彦 (宮崎大学医学部 感染症学講座寄生虫学分野)	
8. 蠕虫の腸管感染排除機構の解明	61
中西 憲司 (兵庫医科大学免疫学 医動物学)	
9. エキノコックスの嫌氣的呼吸鎖の生理機能の解明	67
北 潔 (東京大学大学院医学系研究科国際保健学専攻 生物医化学教室)	
10. 寄生蠕虫症の病態と検査診断結果に関する解析	73
大前 比呂思 (国立感染症研究所寄生動物部 三室)	
11. 住血吸虫症の血清診断キット開発・評価	79
朝日 博子 (国立感染症研究所寄生動物部 三室)	
12. 住血吸虫症の血清診断キットの評価	87
千種 雄一 (獨協医科大学熱帯病寄生虫病センター)	
13. 寄生蠕虫症(条虫症)の検査診断法開発	91
山崎 浩 (国立感染症研究所寄生動物部二室)	
14. 食品媒介性吸虫症の検査診断法開発	97
杉山 広 (国立感染症研究所寄生動物部二室)	
15. 腸管寄生吸虫症の遺伝子診断法開発	105
森嶋 康之 (国立感染症研究所寄生動物部二室)	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	107
IV. 研究成果の刊行物・別刷	113

I. 総括研究報告書

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
総括研究報告書

顧みられない病気に関する研究

研究代表者 野崎 智義 国立感染症研究所 部長

研究要旨 顧みられない熱帯病(NTD)、特に寄生原虫・蠕虫症のコントロールには、起因生物の生物学・病因学的理解、確立された診断法に基づくサーベイランス、薬剤・ワクチン等予防・治療法の開発、感染症対策マニュアルの策定が不可欠である。本研究ではこれら目標の達成のため、寄生虫症全般の研究基盤のボトムアップ、並びに、次世代の研究者・グループの育成を目指すと同時に、NTD・寄生虫症の検査診断体制の整備を目指し研究を開始した。初年度は、代表的な原虫症・蠕虫症に関して、その病原機構・防御免疫機構を解明するための予備的な研究を行い、それぞれの分担研究において、次年度以降に必要な基盤的な知見を確保するとともに、既に様々な具体的成果を達成した。また、サーベイランスシステムの構築、診断・治療法の確立に関しても、多くの分担研究において多面的な成果を挙げた。以上、初年度の計画は予定通り達成され、次年度以降の研究基盤の準備はほぼ達成された。

研究分担者

濱野 真二郎・九州大学・助教
永宗 喜三郎・筑波大学・助教
小林 正規・慶応大学・助教
井上 幸次・鳥取大学・教授
八木田 健司・国立感染症研究者・主任研究官
丸山 治彦・宮崎大学・教授
中西 憲司・兵庫医大・教授
北 潔・東京大学・教授
大前 比呂思・国立感染症研究者・室長
朝日 博子・国立感染症研究者・主任研究官
千種 雄一・獨協医大・教授
山崎 浩・国立感染症研究者・室長
杉山 広・国立感染症研究者・主任研究官
森嶋 康之・国立感染症研究者・主任研究官

A. 研究目的

本研究班は、日本の寄生虫症の専門家を結集して構成され、顧みられない

熱帯病(neglected tropical diseases, NTD)の克服を最終的な目的としている。NTD、特に寄生原虫・蠕虫症のコントロールには、起因生物の生物学・病因学的理解、確立された診断法に基づくサーベイランス、薬剤・ワクチン等予防・治療法の開発、感染症対策マニュアルの策定が不可欠である。これらの目標の達成のためには、寄生虫症全般の研究基盤のボトムアップ、並びに、次世代の研究者・グループの育成が不可欠である。同時に、将来の国内外での新興・再興感染症の発生に即座に対応出来るように、顧みられない寄生虫症の検査診断体制を緊急に整備する必要がある。

これらの危急の課題を解決するために、顧みられない寄生虫症対策に資する多面的な研究を開始した。すべての原虫症・蠕虫症を対象とすることは困難であるため、特に生物学的に代表となる原虫症・蠕虫症を取り上げ、その病原機構・防御免疫機構を解明することを短・中期的な目標としている。同時に病原機構の分子基盤の理解に

基づき、診断・治療法を確立すること
を目標としている。

B. 研究方法

1. 赤痢アメーバの病原性遺伝子の同定と病原機構の解明

国内の赤痢アメーバ分離株 37 株の 6 つの tRNA-short tandem repeat (STR) 遺伝子座をシーケンスにより決定した。E. histolytica/E. invadens の全遺伝子を網羅した DNA マイクロアレイのプロープデザイン、製作を行った。

2. 赤痢アメーバ症の感染防御機構の解明

C57BL/6 と CBA/J マウスの F1 ♀ を CBA/J♂ マウスに戻し交配し 117 匹の N2 マウスを得た。それら N2 マウスに赤痢アメーバを感染させ感染の成否を培養と組織学的に調べた。N2 マウスの 150 のマーカー (32 のマイクロサテライトと 118 の SNPs) を用いて連鎖解析を行った。野生型もしくは MyD88 欠損マウスの腹腔浸潤マクロファージを単離し、ホルマリン固定した赤痢アメーバ原虫と共培養して上清中に産生される炎症性サイトカインを ELISA で測定した。

3. トキソプラズマの細胞侵入機構の解明

GPI アンカーの生合成に関与する遺伝子に変異を有する 2 種類の変異 CHO 細胞 (M2S2 及び Gaa1(-)) に対する感染性を野生株と比較した。更なる感染性の差を詳細に検討するため、野生株及びこれらの変異株における原虫の侵入能及び宿主細胞内における増殖を詳細に検討した。

4. 国内における腸管寄生虫症の疫学的研究

臨床株の分離に不可欠で無菌培養にも応用できる腸管寄生原虫の培地の改良、及びジアルジア、大腸アメーバ、小形アメーバ、ハルトマンアメーバ等の脱嚢に困難が伴う原虫嚢子からの脱嚢条件の検討と分離培養法の

確立を試みた。マウス持続感染腸アメーバ症モデルを用い、メトロニダゾールの投与方法と治療効果について検討した。

施設内腸管原虫感染の疫学調査を行った。メトロニダゾール単独治療で完治に到らず、再感染を繰り返した 1 施設 (施設利用者 76 名; 嚢子陽性者 21 名; 血清抗体陽性者 51 名)、11 年間フォローアップ観察を行ってきた 1 施設 (施設利用者 54 名; 血清抗体陽性者 15 名; 有アメーバ症歴者 4 名; 職員感染者 1 名)、2002 年にメトロニダゾール単独でアメーバ症治療を行った 1 施設 (施設利用者 103 名; 嚢子陽性者 29 名; 血清抗体陽性者 54 名) について、他の腸管寄生虫感染状況を含め、赤痢アメーバ治療後のフォローアップ調査を行った。また、有症アメーバ症患者から分離された赤痢アメーバ 3 株の無菌培養化を行った。

5. アカントアメーバ角膜炎の疫学的研究

日本コンタクトレンズ学会と日本眼感染症学会が協力して、すべての日本眼科学会専門医制度認定施設に対し調査協力の可否について問い合わせを行い、全国 224 施設から参加許諾を得た各施設の担当者がホームページに書き込む形で症例の入力 (臨床所見・治療経過調査と患者用のコンタクトレンズ使用状況に関するアンケート) を行い、これを集計した。対象はコンタクトレンズ装用が原因と考えられる角膜感染症で重症者するため入院にて治療を行った症例とした。また、次年度以降計画されている分子疫学的調査に関する予備的調査を、国立感染症研究所と共同で実施した。

6. 寄生原虫症の検査診断法開発

抗 *Giardia lamblia* シストに対するモノクローナル抗体を利用し、これによりラテックスビーズの表面感作処理を行った。感作方法はデンカ生研 (株) の抗体感作ラテックス作製定法

に従った。Giardia lamblia WB株感染スナネズミより糞便とともにシストを回収し、ショ糖浮遊法で精製したシストをホルマリン固定した。凝集反応の測定方法は抗原25 μ Lと感作ラテックス25 μ Lを凝集反応板上で混合し、前後左右に傾斜させ凝集像を観察した。

Merifluorを用いてジアルジア陽性・陰性スナネズミ、子牛、ヒトの糞便検体を材料として、試作ラテックスの感度、反応性を調べた。また市販迅速検査キットの一つ Meridian社製の Immuno Card STAT!

Cryptosporidium/Giardia Test Kitを用いて、性能比較を行った。

7. 蠕虫遺伝子発現制御機構の解明、及び寄生虫症診断法の開発

ベネズエラ糞線虫の感染幼虫、体内移行期の幼虫、および腸管定着期の虫体のcDNAライブラリを作製し、それぞれのESTデータベースを構築した。ブタ回虫のメスから虫卵を分離し、ウサギ肺から幼虫を回収して、体内移行期幼虫のcDNAライブラリを作製した。ブタ回虫幼虫包蔵卵や成虫のESTデータベースから移行期幼虫に特異的な配列を抽出した。

ベネズエラ糞線虫およびブタ回虫の幼虫cDNAライブラリから診断抗原として有望なものについて組換え抗原を作製した。

8. 蠕虫の腸管感染排除機構の解明

BALB/cマウスにブラジル糞線虫(Nb)のL3幼虫を感染させ、感染10日目のマウス脾臓からc-Kit-Fc ϵ R1+の好塩基球を得た。好塩基球をIL-3存在下で培養し、各種サイトカインの産生と、Th2細胞誘導能をFACSで調べた。Nb感染マウスの腸とその周辺組織でのIL-33発現を検討した。C57BL/6 (B6) マウス、B6バックbackのRAG2KO, ST2KO, MyD88KO, IL-13KOマウスにIL-33を投与し、杯細胞の誘導を組織学的に検討した。更に、IL-33を投与したマ

ウスに経胃的(外科的)にNb成虫を投与し、24時間以内の排虫を調べた。

9. エキノコックスの嫌氣的呼吸鎖の生理機能の解明

ミトコンドリアにおけるエネルギー代謝、特に回虫などで見られる嫌氣的呼吸鎖であるNADH-フマル酸還元酵素系を中心とする呼吸系の解析を進めるため、活性を保持したミトコンドリアの単離法を確立し、各種阻害剤の効果を調べる系の構築を試みた。

10. 寄生蠕虫症の病態と検査診断結果に関する解析

フィリピンレイテ島パロの Schistosomiasis Research Hospitalの受診者を選び、病型を経年的にフォローした。また、2000年に糞便検査によって診断された18才以上の日本住血吸虫感染者の集団治療前・後の結果を比較した。保存されていた血液を用いて肝胆道系酵素の変動や日本住血吸虫卵粗抗原を用いたELISA抗体価を調べるとともに、肝線維化の進行との関係について検討した。血清を採取できた対象者は131人で、男女比は、およそ2:1であった。

11. 住血吸虫症の血清診断キット開発・評価

Schistosoma mansoni (Sm)、S. haematobium (Sh)、S. japonicum (Sj)、S. mekongi (Smek)のミトコンドリアDNAのCO1領域を標的とする特異的プライマーおよび共通プライマーを設計し、PCRを行った。ICRマウスにSmekを経皮感染し、経時的に採血・採尿し、DNAを抽出後、Smek特異的プライマーでPCRを施行した。2009年1月に関東地方の病院を受診したビルハルト住血吸虫症患者の検体よりDNAを抽出し、PCRを実施した。

12. 住血吸虫症の血清診断キットの評価

尿中に検出される日本住血吸虫(SJ)特異抗体の抗体のクラス、排出虫卵数(EPG)、治療後の動態等との関連

等を解析した。フィリピンレイテ島にある Schistosomiasis Control and Research Hospital(SCRIP)で採集された検体のなかで、糞便内虫卵陽性個体から供与された尿および血清を用いた。尿および血清中の SJ 成虫抗原 (SJ-SWAP) および虫卵抗原 (SJ-SEA) に対する特異抗体を各クラス Immunoglobulin および isotype にわたって酵素抗体法を用いて検出した。

抗体産生を刺激誘導している SJ 成分の特定を行う目的で、先に得られたモノクローナル抗体を用いて、成虫体の tegument に存在する 22.6kDa タンパク成分のレコンビナントタンパク (rSJ226) を導入して、尿および血清中の特異抗体との反応性を調べた。

13. 寄生蠕虫症(条虫症)の検査診断法開発

イヌ回虫抗原の B 細胞エピトープの検索し、5つのエピトープ候補領域を得た。2 領域をペプチド抗原候補として化学合成し、精製標品 (P-79 と P-80)、約 5 mg、純度 94~98% を得た。これらのペプチドを抗原としてイムノクロマト・スティックを作成し (アドテック株式会社に委託)、トキソカラ症抗体測定キットの特異性をトキソカラ症患者ならびに健常人血清を用いて検討した。

裂頭条虫症の遺伝子診断法の確立には、依頼検査標本、国立科学博物館動物研究部保管標本、さらに、新規採取標本を用いた。cytochrome c oxidase subunit 1 (cox1)、または ribosomal RNA (rRNA 28S/ITS-1/5.8S/ITS-2/28S) を PCR で増幅し、その塩基配列に基づいて種を同定した。鯨複殖門条虫ミトコンドリアゲノムの全塩基配列を解読し、既知の裂頭条虫種のミトコンドリアゲノムにコードされる 34 個の遺伝子と 2 個の非コード領域を比較し、最も塩基配列に種間差がある遺伝子を特定し、multiplex PCR について検討した。

14. 食品媒介性吸虫症の検査診断法開発

福岡市で購入した東シナ海産サバから虫体を光学顕微鏡下に Anisakis I 型と確認し、DNA を抽出した。次にリボソーム DNA の ITS 領域を PCR 増幅し、RFLP 解析、塩基配列の解読を行い、(同胞) 種同定を行った。マルチプレックス PCR 法による Anisakis I 型虫体の分子鑑別法の開発を行った。

実験感染させた終宿主ネコからウェステルマン肺吸虫および宮崎肺吸虫の各成虫を回収しホモジナイズ後、上清を抽出粗抗原とした。フロースルー免疫測定法に用いるニトロセルロース膜を用いて、依頼検査検体で形態同定・分子同定により原因虫種の確定された 7 血清を用いて、キットの診断能力を評価した。更に、従来型と改良型キットが診断に適用できるかを評価した。

15. 腸管寄生吸虫症の遺伝子診断法開発

野生終宿主から採集された横川吸虫 *M. yokogawai*・宮田吸虫 *M. miyatai* : キツネ、高橋吸虫 *M. takahashii* : アライグマから DNeasy Blood & Tissue Kit を用いてそれぞれ DNA を抽出した。プライマーは、既知 *cox1* 領域の配列を比較し、3 種にそれぞれ差異を認める部位に種特異的なフォワードプライマーと共通のリバースプライマーを設計した。この際、予想される増幅断片長がそれぞれ異なるよう留意した。種特異的バンドが得られるかどうかを確認した後、複数のプライマーセットを同時に用いて PCR 反応条件の最適化をはかった。

(倫理面への配慮) 本研究に関わる DNA 組換え実験、動物実験、RI 実験等に係る承認は当該研究機関にて得られている。ヒト臨床検体を用いた研究に関しては各研究機関の倫理審査を受けており、連結不可能匿名化されたものを用いた。

C. 研究結果

1. 赤痢アメーバの病原性遺伝子の同定と病原機構の解明

国内の赤痢アメーバ分離株の遺伝的背景と分離された患者の臨床像との相関を確立することを目的として、国内分離株 37 株を対象として、tRNA 近傍の短反復配列(tRNA-STR)の多型性を利用した高解像度タイピングを行い、国内の分離株の多様性を確認するまた、病型(下痢・赤痢、肝膿瘍)、あるいは無症候性と相関の見られる tRNA-STR 座位特異的配列型と、6 つの tRNA-STR を総合して得られる遺伝子型を明らかにした。また、次年度に使用される発現解析用の *E. histolytica*/*E. invadens* ハイブリッド DNA マイクロアレイの作製を終え、その有用性を準備的実験により確認した。

2. 赤痢アメーバ症の感染防御機構の解明

赤痢アメーバの感染成立機構ならびに同原虫に対する感染防御機構のこれまでの研究から、CBA/J などの系統では感染が成立しヒト同様の病理像が認められる一方で、C57BL/6 などの系統のマウスでは原虫が腸管に定着できないことを見出した。またこの差異は主として腸管上皮細胞やムチン・腸内細菌叢などの非骨髄細胞分画の違いに起因した。赤痢アメーバの腸管内定着や上皮細胞への接着・貪食には Gal/GalNAc を認識・結合するレクチンが重要である。本年度は、赤痢アメーバのレクチンのリガンドである Gal/GalNAc の腸上皮での発現に両系統間で差がないことを示した。次いで、150 の染色体マーカーを用いた連鎖解析から、赤痢アメーバの腸管内定着を阻害する因子がマウスの第 1 および 2 染色体上にコードされていることを示した。更に、CBA/J マウス大腸の病理像に着目した。大腸に肉眼的にも観察できるほどの著しい

腸壁の肥厚が認められ、好中球を始めとした顆粒球や単核球の浸潤を伴う激しい炎症が惹起されていた。顆粒球を除去するとマウスの感染率が 60% から 90% へ上昇したことより、これら innate immunity は宿主にとって防御的に働くと考えられた。更に、野生型もしくは MyD88 遺伝子欠損マウスからマクロファージや樹状細胞を単離して赤痢アメーバにて刺激したところ、赤痢アメーバの認識シグナルが MyD88 依存性に伝達されることが判明した。

3. トキソプラズマの細胞侵入機構の解明

トキソプラズマ原虫が宿主細胞に侵入する際、宿主との接触部分において、宿主の膜貫通蛋白質の多くが排除され、GPI アンカー型蛋白質が選択的に寄生体胞膜内へ取り込まれるという現象があることが知られている。このことから、GPI アンカー又は GPI アンカー型蛋白質が、トキソプラズマ感染において重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

そこで、宿主 GPI アンカーがトキソプラズマ感染に及ぼす影響を調べるために、GPI アンカー生成経路の初期のステップと、最後のステップ、すなわち完成したアンカーを蛋白質に転位するステップに関与する遺伝子 (PIG-L 及び GAA1) に変異を有する 2 種類の変異 CHO 細胞 (M2S2 及び Gaa1(-)) における原虫に対する感受性を野生株と比較した。その結果、野生株に対して、Gaa1(-) は約 3 倍、M2S2 は約 2 倍感受性が上昇した。また野生株と変異株では、原虫の付着侵入過程及び感染前期の増殖においては差が認められず、感染後期の増殖のみに差が認められた。このことから、宿主の GPI アンカーあるいは GPI アンカー型蛋白質が原虫の増殖のうち、後期の増殖のみを特異的に阻害している可能性が示唆された。

4. 国内における腸管寄生虫症の疫学

的研究

腸管寄生原虫株の分離培養には、冷蔵保存可能な嚢子からの分離培養法の確立が必須である。3アメーバ種の無菌培養に対応できる無菌培養用培地(YIMDHA-S)のデザインと新規脱嚢液を用いた無菌培養システムの確立に成功した。マウスメトロニダゾール治療実験結果から、腹腔と尾静脈投与が経口投与に比べ顕著に高い治療効果を示すことが明らかとなり、メトロニダゾールが腸管腔側よりはむしろ粘膜組織内側から、粘膜に接着侵入しているアメーバに作用していることが示唆された。

知的障害者更生施設3施設についてフォローアップ調査を行った。5年と11年の長期間継続調査を行ってきた2施設については新たな赤痢アメーバ感染者は見られず、施設内での感染予防策も効果的に機能しているものと考えられた。しかしながら、メトロニダゾール単独治療後、6年後に調査した1施設では、12名/101名(11.9%)の利用者に赤痢アメーバ嚢子陽性者がみられ、メトロニダゾール単独治療の困難さを示した。

5. アカントアメーバ角膜炎の疫学的研究

コンタクトレンズによる角膜感染症で入院治療を要した患者に関して、全国224施設にて実態調査を行い、その臨床所見・治療経過・予後・コンタクトレンズ使用状況を調査したところ、アカントアメーバによるものが多数をしめていた。アメーバ角膜炎症例に関しては全国実態調査に向けての予備調査を試行し、分子疫学的調査から角膜炎患者におけるコンタクトレンズ汚染と感染の因果関係等を明確にした。

6. 寄生原虫症の検査診断法開発

ジアルジア症の検査法の汎用性、普及性の問題を解決する方法として、ラテックス凝集反応に基づく迅速検査法の開発を目的に、ラテックス試薬を

試作し、その反応特性を動物あるいはヒト糞便検体を用いて調べた。ジアルジア感染陽性検体を凝集反応で判定することが可能であった。特性としては比較的特異性は良いものの、イムノクロマト法に比べて感度は低いという結果を得た。改善の余地は多いが、糞便検査に適用可能であるとの判断根拠を得ることができた。

7. 蠕虫遺伝子発現制御機構の解明、及び寄生虫症診断法の開発

線虫類による幼虫移行症は今日のが国で発生している蠕虫性疾患の中では多数を占め、重要な疾患群のひとつである。幼虫移行症の病態解明と血清診断精度の向上を目指し、幼虫移行症の原因寄生虫のひとつであるブタ回虫と、モデル寄生虫のベネズエラ糞線虫の幼虫からcDNAライブラリを作製し、発現遺伝子の解析を行った。ベネズエラ糞線虫において、感染幼虫では発現し成虫では発現していない遺伝子には、宿主侵入後すぐに発現が停止するものと肺ステージまで発現が持続して成虫段階で停止するものがあることがわかった。ブタ回虫では、肺ステージ特異的と考えられる遺伝子を得た。診断抗原としては、ベネズエラ糞線虫およびブタ回虫のそれぞれから有望な幼虫抗原cDNAを得た。

8. 蠕虫の腸管感染排除機構の解明

腸管寄生線虫の感染に伴い宿主マウスの脾臓内で好塩基球数の集積が誘導された。脾臓から精製した好塩基球はIL-3を含む培地内でTh2サイトカインを産生した。またMHCクラスII抗原を発現しOVAペプチドをナイーブCD4陽性T細胞に提示してOVA特異的Th2細胞を誘導した。一方、感染マウスの腸管周囲組織でIL-33陽性細胞の数が増加した。更に、C57BL/6マウスにIL-33単独投与すると杯細胞の活性化が誘導され、この様なマウスに経胃的(外科的)にNb成虫を投与したところ、24時間以内に排虫が認められた。この様なIL-33

の排虫効果は IL-13KO では認められないが RAG2KO では認められたことから、IL-33 が T/B 細胞が存在でも IL-13 を誘導し、杯細胞が誘導され排虫が誘導されることがあきらかとなった。

9. エキノコックスの嫌氣的呼吸鎖の生理機能の解明

エキノコックスを感染させたコットンラットの肝臓より原頭節を分離し、その組織・細胞を破碎して遠心分離を繰り返す事によって生化学的解析に充分耐え得るミトコンドリア画分の調製法を確立した。このミトコンドリアを用いて、嫌氣的呼吸鎖である NADH-フマル酸還元系の活性(45 nmol/min/mg)と好氣的呼吸鎖である NADH オキシダーゼ活性(9.1 nmol/min/mg)を検出した。すなわち主要な活性は嫌氣的呼吸鎖であった。更に、特異的阻害剤のスクリーニングを行った所、哺乳類より低濃度でエキノコックスの呼吸系を阻害するキナゾリン系の化合物を見出した。さらに、原頭節ミトコンドリア呼吸鎖の性質を調べるために、他の酵素活性や阻害剤の効果を検討した所、好氣的呼吸鎖の末端酸化酵素の阻害剤 KCN により NADH オキシダーゼ活性が一部阻害されることから哺乳類型のシトクロム c 酸化酵素の存在が示唆された。

10. 寄生蠕虫症の病態と検査診断結果に関する解析

集団治療による morbidity 変化が顕著に現れる住血吸虫症を対象として、住血吸虫感染者が示す病態や肝機能検査・免疫血清検査の異常を、ブラジカンテルによる集団治療が本格化する前後した。経年的に比較すると、集団治療の進展によって、肝脾腫を示す例は顕著に減少し、神経症状を示す例が相対的に増加した。また、当初は、多くの例で血清中の肝胆道系酵素の異常がみられたが、治療的介入が進むと、異常が認められるのは肝線維化の

進んだ例のみとなった。また、肝虫卵粗抗原を用いた ELISA 抗体価は、肝障害を示す群では高く、神経症状を示す群では低くなった。治療的介入が本格化すると、相対的に糞便中への虫卵排泄数が少ない感染例が多くなるが、そのような例に対しても、ELISA による検査診断は有効であり、抗体価の変動は、morbidity 評価にも利用できる可能性が認められた。

11. 住血吸虫症の血清診断キット開発・評価

住血吸虫症の PCR 検査法の開発および免疫学的検査法の改良をおこなった。4種の人体寄生住血吸虫について種特異的プライマーと共通プライマーを作製した。種特異的プライマーはマルチプレックス PCR としても使用可能であった。さらにビルハルツ住血吸虫症患者の唾液および尿からビルハルツ住血吸虫特異的 DNA が検出できた。本法は特に輸入症例の検査に有用であると考えられた。

12. 住血吸虫症の血清診断キットの評価

非侵襲的な方法を用いたヒト住血吸虫症の診断方法の開発の第1段階として、日本住血吸虫 (SJ) 感染者の尿中に検出される抗体の特徴を明らかにした。SJ 感染者の尿中には、血清中と同様、診断に役立つ事が充分に期待できる程度の高い抗体価が検出された。抗体産生の特徴としては、1) 高い SJ 成虫 (SWAP) および虫卵 (SEA) IgG 抗体、2) 低い抗 SEA IgA 抗体、3) 中程度の抗 SWAP および抗 SEA IgM 抗体が挙げられる。得られた知見をもとに特異抗体産生の特徴を、抗体クラス、EPG、年齢、病態との相互関連や治療後の動態の観点から解析し、診断に至適な抗原抗体の組み合わせ条件を選択した。

SJ 成虫体の tegument に局在し、22.6kDa の理論分子量をもつ成分のレコンビナントタンパク (rSJA226) を SJ 症の免疫診断に導入した。

rSJA226 は尿中の抗体検出に優れる事が判明した。さらに治療後早急に陰性化する特徴を有していた。

13. 寄生蠕虫症(条虫症)の検査診断法開発

寄生蠕虫症の検査診断法の開発に関連して、幼虫移行症として重要なイヌ回虫症・ネコ回虫症(以下、トキソカラ症)の迅速血清診断キット開発に関する研究、ならびに国産あるいは輸入生鮮魚類を感染源とする裂頭条虫症・複殖門条虫症(以下、裂頭条虫症)の遺伝子診断法の確立に関する研究を行った。前者については、すでにトキソカラ症血清診断抗原として同定されたイヌ回虫幼虫プロテオグリカンのコアタンパク質のアミノ酸配列に基づいてペプチド抗原を合成し、それをを用いたキットの基礎反応系と抗体測定キットの仕様について検討した。一方、裂頭条虫症については、その病因となる条虫種の形態に基づく鑑別法の困難さを補うために、遺伝子解析による鑑別法を開発した。遺伝子検査の標的遺伝子は条虫の種間で最も塩基配列に違いが認められたミトコンドリアゲノムでコードされる ATPase subunit 6 遺伝子とし、それを標的にした multiplex PCR による鑑別法を確立した。

14. 食品媒介性吸虫症の検査診断法開発

食品媒介寄生蠕虫の中から、年間に推定 2,000 人以上もの患者を発生させるアニサキスと、年間の患者数は少ないが感染時に重篤な症状を惹起する肺吸虫を選び、今年度の検討を進めた。まず前者については、アニサキス症の原因虫を同定・鑑別する為の手技の開発に取り組んだ。また後者については、簡便で迅速な診断法(診断キット)の導入・改良に取り組み、その精度を評価すると共に、精度管理に必要な試料の収集に努めた。その結果、アニサキスに関しては、本邦で水揚げされた魚から初めて *Anisakis typica* を検出

した。我々が設計したミスマッチ・プライマーを用いる事で、*A. typica* を含めた 3 種類の *Anisakis* I 型虫体(他に *A. simplex sensu stricto* および *A. pegreffii*) を迅速・簡便に鑑別する系(マルチプレックス PCR)が開発された。また肺吸虫に関しては、フロースルー免疫測定法に基づく診断キットを使用した場合、キット作製に用いた抗原の由来種と肺吸虫症患者の原因種とが一致した場合に、的確な診断結果が得られる事を明らかにした。

15. 腸管寄生吸虫症の遺伝子診断法開発

Metagonimus 属の吸虫類 3 種を正確に鑑別することを目的として、*cox1* 領域を標的部位としたマルチプレックス PCR 法による分子同定法の開発を試みた。塩基配列から予想されたとおり、宮田吸虫は 370 bp、高橋吸虫は 340 bp、横川吸虫は 181 bp の単一の特異的バンドがそれぞれ得られた。

D. 考察

NTD の克服のためにはこれまで以下のような問題点があった。すなわち、(1) 顧みられない寄生虫症の病原・寄生・感染防御機構の解明等基盤的研究が不足していること、(2) 原虫・蠕虫症での全数把握等サーベイランスシステムの構築が不可欠であること、(3) 原虫・蠕虫の遺伝子鑑別法、寄生虫症の簡易血清診断キットが不十分であることなどであった。従って、今後の寄生虫症の侵入に備えた研究グループの育成と診断システムの構築が不可欠で急務である。

そこで本研究グループは以下の具体的な研究目的を掲げて初年度の研究を開始した。(1) 赤痢アメーバ原虫の病原性・感染抵抗性の分子基盤の構築する、(2) アカントアメーバ・赤痢アメーバ・ジアルジア等のタイピング法・サーベイランスシステムの構築する、(3) トキソプラズマの感染機構

の解明する、(4) 糞線虫・回虫等の体内移行の機構の解明、糞線虫の排虫機構の解明する、(5) イヌ回虫等幼虫移行症・肺吸虫症・住血吸虫症などの簡易血清診断キットの作成する、(6) アニサキス・異型吸虫等の遺伝子型別法の確立する、(7) エキノコックスの特異的呼吸鎖の解明と創薬への応用を行う、(8) 診断キット等の臨床での評価を行う。

初年度の研究は、「方法」と「結果」で詳述された通り、ほぼ当初の研究計画に従って進められた。病原機構、感染防御に係る基盤的な計画に関しては、DNA マイクロアレイ・cDNA ライブラリー・変異体ライブラリー・精製法の確立・トランスジェニックマウス作製などを始めとした、本研究テーマの遂行に不可欠なツールの整備も進んだ。また、また診断キット創出研究に関しても、次年度以降の研究に不可欠な型別・診断に必要な PCR プライマーの条件検討、モノクローナル抗体の性状解析、タイピング法の確立などの準備的検討は終了している。また、既に一部の原虫・蠕虫診断キットの試作を終了することができた。

初年度の成果を受けて、次年度以降は以下のことを計画している。(1) 赤痢アメーバの遺伝子発現の株間比較、逆遺伝学的手法による病原機構の解明、(2) 赤痢アメーバの感染防御に関与する樹状細胞認識する原虫の PAMPs ならびに受容体を解明、感染防御に不可欠な免疫応答を解明、(3) 熱帯熱マalaria 原虫の脂肪酸代謝酵素、ならびに脂質滴構成成分の生化学的解析、トリアシルグリセロール合成酵素を標的とした新規薬剤リードの検索、(4) トキソプラズマの寄生機構の解明のため、感染抵抗性を獲得した変異 CHO 細胞ライブラリーを作製、付着・侵入・宿主細胞の修飾・増殖・脱出等のどこに抵抗性があるか解明、相補により感染耐性責任遺伝子を特定、(5) 知的障害者施設、市中

病院 (IMCJ・駒込・医科研等) と協調し、腸管原虫症・蠕虫症のサーベイランス・発生動向調査継続、分離株の確保、(6) 糞線虫・イヌ・ブタ回虫 cDNA ライブラリーから診断用抗原を探索、線虫の遺伝子ノックダウンの手法を確立し、体内移行時特異的に発現している遺伝子の機能を解明、(7) エキノコックス NADH-フマル酸還元系の阻害剤をスクリーニング、複合体 I・II の生化学的解析により宿主哺乳類との相違点を解明、両複合体間の電子伝達を行うロドキノン の生合成系について、モデル系として光合成細菌および回虫を用いて主要経路を解明、(8) 線虫排除の際重要な IL-33 の産生誘導機構において、産生細胞を同定し、誘導刺激の本体を解明、同時に IgE/IgG1 抗体・肥満細胞・好塩基球の関与を検討、(9) イヌ回虫症等幼虫移行症・住血吸虫症・肺吸虫症の血清診断キットの作成・評価、検体の採取・収集の継続、(10) 裂頭条虫ホルマリン固定検体、外来性アニサキス類線虫・異型吸虫・横川吸虫の遺伝子鑑別マルチプレックス PCR 法の改良、(11) 本研究班で開発・改良されたのキット・検査法について、従来の検査法や臨床所見との相関を確立、新規検査法の位置づけを明示する。次年度以降、以上の研究計画を忠実に遂行することにより、本研究班の掲げた当初の目的を十分に達成することが期待される。

E. 結論

初年度の研究は、研究計画に従って進められ、基礎的な成果を蓄積した。次年度以降の研究計画の遂行により、最終的に、(1) 寄生虫症検査診断キットの開発・普及、(2) 検査診断キットの供給体制の構築、(3) 検査診断基準のガイドラインの作成、(4) 腸管寄生虫症、アカントアメーバ角膜炎、蠕虫症などの寄生虫症の発生動向の把握、(5) 国内の寄生虫研究グループ・研究

者の育成、(6) 国内外の研究グループとの連携の確立などの本研究班の目的とする行政的な必要案件を達成すると期待される。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

Picazarri, K., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. (2008) Autophagy during proliferation and encystation in the protozoan parasite *Entamoeba invadens*. *Inf. Immun.* 76, 278-288.

Sato, D., Yamagata, W., Harada, S., and Nozaki, T. (2008) Kinetic characterization of methionine gamma-lyases from the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica* against physiological substrates and trifluoromethionine, a promising lead compound against amoebiasis. *FEBS J.* 275, 548-560.

Sato, D., Karaki, T., Shimizu, A., Kamei, K., Harada, S., and Nozaki, T. (2008) Crystallization and preliminary X-ray analysis of L-methionine γ -lyase 1 from *Entamoeba histolytica*. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 64, 697-699, 2008.

Hussain, S., Ali, V., Jeelani, G., and Nozaki, T. (2008) Isoform-dependent feedback regulation of serine O-acetyltransferase isoenzymes involved in L-cysteine biosynthesis of *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 163,

39-47.

Picazarri, K., Nakada-Tsukui, K., Sato, D., and Nozaki, T. (2008) Analysis of autophagy in the enteric protozoan parasite *Entamoeba*. *Methods Enzymol.* 451, 359-371.

Hamano, S., Becker, S., Asgharpour, A., Ocasio, Y.P.R., Stroup, S.E., McDuffie, M., Houpt, E.: Gender and genetic control of resistance to intestinal amebiasis in inbred mice. *Genes Immun.* 2008; 9:452-61.

Tetsutani, K., Ishiwata, K., Torii, M., Hamano, S., Hisaeda, H., Himeno, K.: Concurrent infection with *Heligmosomoides bakeri* modulates murine host response against *Plasmodium berghei* ANKA infection. *Am J Trop Med Hyg.* 2008; 79: 819-822.

Hisaeda, H., Tetsutani, K., Imai, T., Moriya, C., Tu, L., Hamano, S., Duan, X., Chou, B., Ishida, H., Aramaki, A., Shen, J., Ishii, K.J., Coban, C., Akira, S., Takeda, K., Yasutomo, K., Torii, M., Himeno, K.: Malaria parasites require TLR9 signaling for immune evasion by activating regulatory T cells. *J. Immunol.* 2008; 180: 2496-2503

Furuno, K., Ikeda, K., Hamano, S., Fukuyama, K., Sonoda, M., Hara, T., Sasazuki, T., Yamamoto, K.: Onecut transcription factor OC2 is a direct target of T-bet in type-1 T-helper cells. *Genes Immun.* 2008; 9: 302-308.

Hamano, S. and William A. Petri Jr.: Amoebiasis in "International

- Encyclopedia of Public Health” Academic Press, San Diego, 2008, Vol. 5, 335-341.
- Nagamune, K., Xiong, L., Chini, E.N., and Sibley, L.D. “Plant, endosymbionts and parasites, Abscisic acid and calcium signaling.” *Comm. Integ. Biol.* 2008, 1, 62-65
- 永宗喜三郎「植物としてのトキソプラズマ原虫：植物ホルモンとカルシウムシグナリング」蛋白質核酸酵素 in press
- Suzuki, J., Kobayashi, S., Iku, I., Murata, R., Yanagawa, Y. and Takeuchi, T. 2008. Seroprevalence of *Entamoeba histolytica* infection in female outpatients at a sexually transmitted disease sentinel clinic in Tokyo, Japan. *Jpn J Infect Dis* 61(3): 175-178.
- Suzuki, J., Kobayashi, S., Murata, R., Tajima, H., Hashizaki, F., Yanagawa, Y. and Takeuchi, T. 2008. A survey of amoebic infections and differentiation of an *Entamoeba histolytica*-like variant (JSK2004) in nonhuman primates by a multiplex polymerase chain reaction. *J Zoo Wildl Med* 39(3): 370-379.
- Kobayashi S., Suzuki J. and Takeuchi T. 2009. Establishment of a continuous system for *Entamoeba muris* and analysis of the small subunit rRNA gene. *Parasite*, 16(2) June, In press.
- 中村(内山)ふくみ、中村 造、古宮伸洋、大西健児、鈴木 淳、小林正規 (2008)：インド旅行で感染した腸管寄生原虫症の2例、*Clinical Parasitology*, 19(1), 46-48.
- 井上幸次、感染性角結膜炎、山口徹、北原光夫、福井次矢、今日の治療指針 (2008 年版)、医学書院、東京、2008、1067-106
- 井上幸次、角膜・強膜疾患、水流忠彦、「看護のための最新医学講座 [第2版] 第20巻 眼科疾患、中山書店、東京、2008、132-138
- 丸山治彦 (2008) 幼虫移行症 (イヌ糸状虫症、動物由来の回虫症、顎口虫症、旋尾線虫症を含む) (今日の治療指針 2008, pp190-191) 朝倉書店
- 丸山治彦 (2008) 人体寄生虫 (寄生と共生、石橋信義、名和行文編)、pp26-55. 東海大学出版会
- 丸山治彦 (2009) 今あぶない寄生虫 (ぜん虫編) (知りたいサイエンスシリーズ：寄生虫のふしぎ)、pp159-202. 技術評論社
- 丸山治彦 (2008) 肺吸虫症 (特集・寄生虫感染症) 化学療法の領域 24: 1343-1350.
- 丸山治彦 (2008) イヌ回虫症 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ 呼吸器症候群 (第2版) I—その他の呼吸器疾患を含めて— pp211-215
- 丸山治彦 (2008) 肺吸虫症 化学療法の領域 24: 1343-1350.
- Seki, E., Kondo, Y., Iimuro, Y., Naka, T., Son, G., Kishimoto, T., Fujimoto, J., Tsutsui, H. and Nakanishi, K. Demonstration of cooperative contribution of MET- and EGFR-mediated STAT3 phosphorylation to liver regeneration by exogenous suppressor of cytokine signalings. *J. Hepatol.*, 48, 237-245, 2008.
- Andoh, T., Kishi, H., Motoki, K., Nakaniishi, K., Kuraishi, Y. and Muraguchi, A. Protective effect of IL-18 on Kainate- and

- IL-1 β -induced cerebellar ataxia in mice. *J. Immunol.*, 180, 2322-2328, 2008.
- Kosaka, H., Yoshimoto, T., Fujimoto, J. and Nakanishi, K. Interferon- γ is a therapeutic target molecule for prevention of postoperative adhesion formation. *Nat. Med.*, 14, 437-441, 2008.
- Imai, Y., Hayashi, N., Yasuda, K., Tsutsui, H., Mizutani, H. and Nakanishi, K. Freshly isolated Langerhans cells negatively regulate naive T cell activation in response to peptide antigen through cell-to-cell contact. *J Dermatol. Sci.*, 51, 19-29, 2008.
- Kondo, Y., Yoshimoto, T., Yasuda, K., Futatsugi-Yumikura, S., Morimoto, M., Hayashi, N., Hoshino, T., Fujimoto, J. and Nakanishi, K. Administration of IL-33 induces airway hyperresponsiveness and goblet cell hyperplasia in the lungs in the absence of adaptive immune system. *Int. Immunol.*, 20, 791-800, 2008.
- Sakishita, M., Yoshimoto, T., Hirota, T., Harada, M., Ohkubo, K., Osawa, Y., Fujieda, S., Nakamura, Y., Yasuda, K., Nakanishi, K., and Tamari, M. Association of IL-33 level and IL-33 genetic variant with Japanese cedar pollinosis. *Clinical & Exp Allergy*, 38, 1875-1881, 2008.
- 中西憲司 IL-18で誘導されるユニークなアレルギー性炎症. *医学のあゆみ*, 227, 367-371, 2008.
- 中西憲司 アトピー性皮膚炎と気管支喘息において Super Th1 が果たす役割. *アレルギー* 57 (8), 989-994, 2008
- 今村美智子, 筒井ひろ子, 藤元治朗, 中西憲司. TLRシグナルによるIL-1とIL-18と分泌機序. *臨床免疫・アレルギー科*, 50, 147-153, 2008
- 松葉沙織, 近藤祐一, 善本知広, 中西憲司. IL-33とアレルギー. *臨床免疫・アレルギー科*, 50, 323-332, 2008.
- Iwata F., Shinjyo N., Amino H., Sakamoto K., Islam M. K., Tsuji N. and Kita K. (2008) Change of subunit composition of mitochondrial complex II (Succinate-ubiquinone reductase/Quinol-fumarate reductase) in *Ascaris suum* during the migration in the experimental host. *Parasitol. Int.* 57, 54-61
- Matsumoto J., Sakamoto K., Shinjyo N., Kido Y., Yamamoto N., Yagi K., Miyoshi H., Nonaka N., Katakura K., Kita K. and Oku Y. (2008) Anaerobic NADH-Fumarate Reductase System Is Predominant in the Respiratory Chain of *Echinococcus multilocularis*, Providing a Novel Target for the Chemotherapy of Alveolar Echinococcosis. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 52, 164-170
- Siregar J. E., Syafruddin D., Matsuoka H, Kita K., and Marzuki S. (2008) Mutation underlying resistance of *Plasmodium berghei* to atovaquone in the quinone binding domain 2 (Qo2) of the cytochrome b gene. *Parasitol. Int.* 57, 229-232

- Matsuzaki M., Kuroiwa H., Kuroiwa T., Kita K. and Nozaki H. (2008) A cryptic algal group unveiled: a plastid biosynthesis pathway in the oyster parasite *Perkinsus marinus*. *Mol. Biol. Evolution* 25, 1167-1179
- Hirai M., Arai M., Mori T., Kawai S., Kita K., Kuroiwa T. and Matsuoka H. (2008) Male fertility of malaria parasites is determined by GCS1, a plant-like reproduction factor. *Current Biol.* 18, 607-613
- Niikura M., Kamiya S., Kita K. and Kobayashi F. (2008) Coinfection with nonlethal murine malaria parasites suppresses pathogenesis caused by *Plasmodium berghei* NK65. *J. Immunol.* 180, 6877-6884
- Inaoka, D. K., Sakamoto, K., Shimizu, H., Shiba, T., Kurisu, G., Nara, T., Aoki, T., Kita, K. and Harada, S. (2008) Structures of *Trypanosoma cruzi* dihydroorotate dehydrogenase complexed with substrates and products: Atomic resolution insights into mechanisms of dihydroorotate oxidation and fumarate reduction. *Biochemistry* 47, 10881-10891
- Shimizu, H., Nihei, C., Inaoka, D. K., Mogi, T., Kita, K. and Harada, S. (2008) Screening of detergents for solubilization, purification and crystallization of membrane proteins: a case study on succinate:ubiquinone oxidoreductase from *Escherichia coli*. *Acta Crystallographica F* 64, 858-862
- Mogi, T., Matsushita, K., Murase, Y., Kawahara, Miyoshi, H., Ui, H., Shiomi, K., Ōmura, S. and Kita, K. (2009) Identification of New Inhibitors for Alternative NADH Dehydrogenase (NDH-II). *FEMS Microbiol. Lett.* 291, 157-161
- Kawahara, K., Mogi, T., Tanaka, Q. T., Hata, M., Miyoshi, H. and Kita K. (2009) Mitochondrial Dehydrogenases in the Aerobic Respiratory Chain of the Rodent Malaria Parasite *Plasmodium yoelii yoelii*. *J. Biochem.* 145, 229-237
- Mogi, T., Ui H., Shiomi, K., Ōmura, S., Miyoshi, H. and Kita, K. (2009) Antibiotics LL-Z1272 identified as novel inhibitors discriminating bacterial and mitochondrial quinol oxidases. *Biochim Biophys. Acta (Bioenergetics)* 1787, 129-133
- Sakakibara, I., Fujino, T., Ishii, M., Tanaka, T., Shimosawa, T., Miura, S., Zhang, W., Tokutake, Y., Yamamoto, J., Awano, M., Iwasaki, S., Motoike, T., Okumura, M., Inagaki, T., Kita, K., Ezaki, O., Naito, M., Kuwaki, T., Chohnan, S., Yamamoto, T., Hammer, R. E., Kodama, T., Yanagisawa, M. and Sakai, J. (2009) Fasting induced hypothermia and reduced energy production in mice lacking Acetyl-CoA Synthetase 2. *Cell Metabolism* 9, 191-202
- Novel Mitochondrial Complex II Isolated from *Trypanosoma cruzi* is Composed of Twelve Peptides Including a Heterodimeric lp Subunit.

- Morales, J., Mogi, T., Mineki, S., Takashima, E., Mineki, R., Hirawake, H., Sakamoto, K., Omura, S. and Kita, K. (2009) *J. Biol. Chem.* 284, 7255-7263
- Ishikawa H, Ohmae H. Modeling the dynamics and control of transmission of *Schistosoma japonicum* and *S. mekongi* in Southeast Asia. *Korean Journal of Parasitology* 2009 (in press)
- 大前比呂思, 朝日博子, Orlando S Sy, 桐木雅史, 千草雄一. 肝胆道系酵素の測定は、住血吸虫症の診断に役立つのか。 *Clinical Parasitology* 2008 (in press)
- Hisakane N, Kirinoki M, Chigusa Y, Sinuon M, Socheat D, Matsuda H, Ishikawa H. The evaluation of control measures against *Schistosoma mekongi* in Cambodia by a mathematical model. *Parasitol Int.* 2008 Sep; 57 (3): 379-385.
- Umehara, A., Kawakami, Y., Araki, J., Uchida, A. Multiplex PCR for the identification of *Anisakis simplex sensu stricto*, *Anisakis pegreffii* and the other anisakid nematodes. *Parasitology International* 57, 49-53, 2008.
- Umehara, A., Kawakami, Y., Araki, J., Uchida, A., Sugiyama, H. Molecular analysis of Japanese *Anisakis simplex* worms. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 39 (Supplement 1), 26-31, 2008.
- 梅原梓里, 川上 泰, 荒木 潤, 内田明彦, 杉山 広. 日本産 *Anisakis simplex* の同胞種レベルでの分類学的解析. *獣医寄生虫学会誌*, 7, 36, 2008
- 梅原梓里, 川上 泰, 荒木 潤, 内田明彦, 杉山 広. 同胞種レベルでみた日本産 *Anisakis simplex* : 感染源の特定に向けた検討. *Clinical Parasitology* (日本臨床寄生虫学会誌), 19, 114-117, 2008
- 田尻智子, 堀川禎夫, 森嶋康之, 川中正憲, 山崎 浩, 杉山 広. 喀痰から虫卵が検出され塩基配列から種同定した宮崎肺吸虫症の1例. *Clinical Parasitology* (日本臨床寄生虫学会誌), 19: 86-88, 2008
- ## 2. 学会発表
- 見市文香, Yousuf Mohammad Abu, 中田-津久井久美子, 野崎智義 赤痢アメーバ原虫マイトソームの生化学的解析 第77回日本寄生虫学会大会 平成20年4月3-4日, 長崎.
- 津久井久美子, 山田陽子, 古川敦, 野崎智義 赤痢アメーバ新規システムプロテアーゼ受容体候補分子の同定 第77回日本寄生虫学会大会 平成20年4月3-4日, 長崎.
- 佐藤暖, 唐木剛, 清水顕, 原田繁春, 野崎智義 赤痢アメーバ原虫含硫アミノ酸分解酵素メチオニンガンマリナーゼの結晶構造解析 第77回日本寄生虫学会大会 平成20年4月3-4日, 長崎.
- Sato, D., Yamagata, W., Karaki, T., Harada, S., and Nozaki, T. Kinetic characterization of methionine gamma-lyase from *Entamoeba histolytica* against physiological substrates and trifluoromethionine. The 4th International Conference on Anaerobic Protists: The Systems Biology of Anaerobic Protozoa. 12-16 May, 2008, Taipei, Taiwan.

- Nakada-Tsukui, K. and Nozaki, T. A FYVE and RhoGEF domain-containing protein involved in phagocytosis of a mammalian cell by *Entamoeba histolytica*. The 4th International Conference on Anaerobic Protists: The Systems Biology of Anaerobic Protozoa. 12-16 May, 2008, Taipei, Taiwan.
- 清水 頭、唐木 剛、佐藤 暖、亀井 加恵子、野崎智義、原田繁春 赤痢アメーバ *Entamoeba histolytica* 由来メチオニン γ -リアーゼの X 線結晶構造解析 第 8 回日本蛋白質科学会年会、平成 20 年 2008 年 6 月 10 日-12 日、東京
- 佐藤 暖、山形 渉、唐木 剛、原田 繁春、野崎智義 腸管寄生性アメーバ原虫のメチオニン γ -リアーゼと薬剤リード化合物の反応機構の解明 日本ビタミン学会第 60 回大会 平成 20 年 6 月 13-14 日、仙台
- Nakada-Tsukui, K. and Nozaki, T. A FYVE domain and RhoGEF domain-containing protein involved in phagocytosis of a mammalian cell by *Entamoeba histolytica*. 第 60 回細胞生物学会大会 横浜 2008 年 6 月 29 日~7 月 1 日
- 中野由美子、中野賢太郎、野崎智義 原虫におけるメンブレントラフィックの多様性 第 10 回日本進化学会大会、2008 年 8 月 22-24 日、東京
- 見市 文香、野崎智義 赤痢アメーバ原虫のミトコンドリア残存オルガネラ mitosome の特殊性~その機能と役割~第 10 回日本進化学会大会、2008 年 8 月 22-24 日、東京
- Husein, A., Jeelani, G., Bilal, A. S., Sato, D., Mi-ichi, F., Hishiki, T., Gilchrist, C. A., Suematsu, M., Petri, Jr., W. A., and Nozaki, T. Metabolomic and transcriptomic analysis of sulfur-containing amino acid metabolism in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji, Sept 7-11, 2008.
- Sato, D., Yamagata, W., Karaki, T., Shimizu, A., Harada, S., and Nozaki, T. Characterization of methionine gamma-lyases from enteric protozoan parasite, *Entamoeba histolytica*, as a potential drug target against amoebiasis". The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji, Sept 7-11, 2008.
- Nozaki, T. Regulation of cysteine protease secretion and phagocytosis in *Entamoeba histolytica*. XVIIth International Congress for Tropical Medicine and Malaria (Invited talk in the symposium). Jeju, Korea, Sept 29-Oct 3, 2008.
- 佐藤暖、Afzal Husain, 曾我朋義、末松誠、野崎智義 寄生性原虫の含硫アミノ酸代謝の重要性ーメタボローム解析からのアプローチ 第 3 回メタボロームシンポジウムーメタボロミクスが解き明かす生命のシステムー 平成 20 年 10 月 30 日-11 月 1 日.
- Mi-ichi, F., Abu, Y. M., Nakada-Tsukui, K., Kawai, S., and Nozaki, T. The mitochondria-related organelle in the anaerobic parasitic protozoan *Entamoeba*

- histolytica. International Symposium on Protistology: Evolution and Diversity. Tsukuba, Japan, Nov 8-9, 2008
- 佐藤 暖、唐木 剛、原田繁春、柴田哲男、融 健、野崎智義 含硫アミノ酸 分解酵素・メチオニン γ-リアーゼを標的とした新規抗赤痢アメーバ薬の開発」BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会) 平成 20 年 12 月 9-13 日、神戸
- Mi-ichi, F., Abu, Y. M., Nakada-Tsukui, K., Kawai, S., and Nozaki, T. The mitochondria-related organelle in the anaerobic protist *Entamoeba histolytica*. International Symposium: Bacteria made organelles made eukaryotic cells. Tokyo, Japan, Nov 29-30, 2008.
- 唐木剛、清水頭、佐藤暖、亀井加恵子、原田繁春、野崎智義 硫黄含有 アミノ酸合成・分解経路を標的とする抗赤痢アメーバ薬の開発ーメチオニンγリアーゼの立体構造と阻害剤の結合様式ー第 7 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム 松山、平成 20 年 10 月 10-11 日
- Nozaki, T., Furukawa, A., Jeelani, G., Sato, D., Karaki, T., and Harada, S. Role of sulfur-containing amino acid metabolism: characterization of two isotypes of methionine gamma-lyase in *Entamoeba histolytica*. XVI Seminario Sobre Amibiasis and EMBO Workshop. Amoebiasis: Molecular Approaches in an Important but Neglected Disease. Guanajuato, Mexico. February 24-28, 2009
- Nakada-Tsukui, K., Furukawa, A., Yamada, Y., and Nozaki, T. Identification of a putative receptor of the major virulence factor cysteine protease in the enteric protist *Entamoeba histolytica*. XVI Seminario Sobre Amibiasis and EMBO Workshop. Amoebiasis: Molecular Approaches in an Important but Neglected Disease. Guanajuato, Mexico. February 24-28, 2009
- Picazarri, K., Furukawa, A., Sato, D., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. Autophagy in *E. histolytica*. XVI Seminario Sobre Amibiasis and EMBO Workshop. Amoebiasis: Molecular Approaches in an Important but Neglected Disease. Guanajuato, Mexico. February 24-28, 2009
- Tahara, M., Kinoshita, T., and Nagamune, K. "GPI-deficient mammalian mutant cell is hyper-sensitive to the infection with *Toxoplasma gondii*." Molecular Parasitology Meeting XIX, Woods Hole, MA, USA, September 2008
- Tahara, M., Kinoshita, T., and Nagamune, K. "GPI-deficient mammalian mutant cell is hyper-sensitive to *Toxoplasma gondii* infection." International Symposium on Protistology November 2008
- 田原美智留、木下タロウ、永宗喜三郎 "トキソプラズマ原虫感染における宿主細胞 GPI アンカーの与える影響" 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会 2008 年 12 月、神戸