

2. 学会発表

1. 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. 第145回日本獣医学会学術集会, 相模原, 2008年3月
2. 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. 第19回日本臨床寄生虫学会大会, 京都, 2008年6月

2. 肺吸虫症の迅速診断キット開発に向けての検討

2-1. 既存診断キットの改良と評価

A. 研究目的

肺吸虫症は我が国だけでなく、アジア・アフリカ・中南米の諸国でも動物由来寄生蠕虫症（人獣共通寄生蠕虫症）として重視され、対策の必要性が指摘されてきた。肺吸虫には20を超える種が確認されているが、我が国での人体感染種は、ウエステルマン肺吸虫と宮崎肺吸虫の2種である。これら肺吸虫の感染時における診断には、従来から免疫血清学的な手法が多用されている。特に我が国では、国立感染症研究所（以下、感染研）が国立予防衛生研究所時代から製造と供給を続けてきた診断用皮内反応抗原が、国内外における肺吸虫症の疫学調査や臨床の現場における迅速な個別診断に大きく貢献してきた。しかしながら皮内反応抗原は、1996年に法律上の事由から供給が停止されている。その結果、本症の診断は、感染研を含む一部の研究所や大学の研究室において、体外診断として実施される血清学的検査（主に micro-ELISA, あるいは dot-ELISA）に委ねられているのが現状である。この為に臨床の現

場からは、迅速で簡便な診断キットの開発を待ち望む声があると聞く。

隣国の中国では、浙江医学科学院の銭らがフロースルー免疫測定法に基づくキットを作製し、これをウエステルマン肺吸虫症の診断に供している（浙江省ではウエステルマン肺吸虫のみが人体寄生種として分布する）。このキットは、反応自体が2分以内に終了する事から、簡便性・迅速性がその特徴として挙げられている。また、ウエステルマン肺吸虫症患者の検出感度は98%と極めて高く、しかも健康人や肺吸虫以外の寄生蠕虫に感染した患者の血清とは殆ど反応せずに、特異性は95%を示す。しかしながら本キットが、ウエステルマン肺吸虫以外の肺吸虫感染、例えば宮崎肺吸虫感染の診断に適用できるのかについては、検討がなかった。そこで本研究では、まずウエステルマン肺吸虫抗原を用いて作製された従来型キット（以下、従来型キット）を譲り受け、本邦の肺吸虫症患者（ウエステルマン肺吸虫症と宮崎肺吸虫症）の診断に適用可能であるかを調べた。次に、使用抗原を宮崎肺吸虫に替えた新たなキット（以下、改良型キット）を作製し、その診断能力を評価した。

B. 研究方法

1) 抗原の調整と新たなキットの作製

実験感染させたネコ（肺吸虫の好適終宿主）からウエステルマン肺吸虫および宮崎肺吸虫の各成虫を回収した。回収された虫体は滅菌生食液で洗浄後、リン酸緩衝生食液（PBS, 0.01M, pH7.2）を加えてホモジナイズし、上清を抽出粗抗原とした。これをタンパク濃度が至適となるよう PBS で希釈し、フロースルー免疫測定法に用いるキット・デバイスのニトロセルロース膜面・中央部にスポットした。

2) 供試血清

感染研・寄生動物部において依頼検査により診断を実施した検体で、患者由来の寄生虫材料（虫

体・虫卵)を用いた形態同定・分子同定により原因虫種の確定に成功した以下の7検体を用いて、キットの診断能力を評価した。各検体の同定根拠は以下のとおりである。

A. ウェステルマン肺吸虫症患者に由来する血清検体

- ① Pw225: 摘出肺組織の病理組織標本を検索し、虫嚢内に寄生する成虫の形態と遺伝子配列により原因種を種同定(3倍体型)した患者の血清(杉山ら, Clin. Parasitol. 12, 59-62, 2001)。
- ② Pw457: 喀痰中に排出された虫卵の形態と遺伝子配列から原因種を種同定(2倍体型)した患者の血清(杉山ら, Clin. Parasitol. 15, 37-39, 2004)。
- ③ Pw0804: 喀痰中に排出された虫卵の形態と遺伝子配列から原因種を種同定(3倍体型)した患者の血清。
- ④ Pw0901: 喀痰中に排出された虫卵の形態と遺伝子配列から原因種を種同定(染色体構成は未同定)した患者の血清。

B. 宮崎肺吸虫症患者に由来する血清検体

- ① Pm467: 腹腔から検出された成虫の形態と遺伝子配列から原因種を種同定した患者の血清(杉山ら, Clin. Parasitol. 14, 57-60, 2003)。
- ② Pm0801: 喀痰中に排出された虫卵の形態と遺伝子配列から原因種を種同定した患者の血清(田尻ら, Clin. Parasitol. 19, 86-88, 2008; 次項 2-2 参照)。
- ③ Pw0807: 摘出肺組織の病理組織標本を検索し、虫嚢内に寄生する成虫の形態と遺伝子配列により原因種を種同定すると共に、喀痰中に検出された虫卵の形態と遺伝子配列から原因種を確定した患者の血清。

3) キットの評価と micro-ELISA による抗体価測定

供試血清を用いて、従来型キットと改良型キ

ットが診断に適用できるかを評価した。各キットを用いた反応の後、キット・デバイスのニトロセルロース膜面を肉眼的に観察し、赤色スポットの発色程度に応じて陽性、弱陽性、陰性の3段階に分け、供試血清の反応性を表現した。また、上述の各血清検体を用いて、micro-ELISAによる抗体価測定も行った。

C. 研究結果

1) micro-ELISA による抗体価の測定結果

患者血清の抗体価を micro-ELISA により測定したところ、患者の原因種と測定に用いた抗原の由来種とが一致した場合に、高い吸光度が得られた。一方で、異種の抗原を測定に用いた場合は、同種の抗原と同様に高い吸光度を示す場合も多かったが、その値が最大で 25%程度低下する場合もあった(例えば Pw225)。しかし後者の場合でも、肺吸虫症と診断できる十分に高い吸光度が得られた(表 1)。

表 1. micro-ELISA およびフロースルー免疫測定法に基づくキットを用いての肺吸虫症患者の血清診断

血清	micro-ELISA		キット	
	PwH	PmH	PwH	PmH
Pw225	0.830	0.616	++	+
Pw457	0.952	0.941	++	-
Pw0804	0.936	0.885	++	+
Pw0901	0.804	0.789	++	+
Pm467	1.036	1.030	++	++
Pm0801	0.991	1.015	+	++
Pm0807	0.923	0.924	+	+

1) PwH: ウェステルマン肺吸虫抽出粗抗原

PmH: 宮崎肺吸虫抽出粗抗原

2) ++: 陽性; +: 弱陽性; -: 陰性

2) 従来型キット(ウェステルマン肺吸虫抗原で作製)の評価

本邦の肺吸虫症患者の血清を用いて、従来型キットを評価した。その結果、ウェステルマン肺吸虫に感染した患者の血清は、いずれも陽性を示す事が分かった。一方、宮崎肺吸虫感染の血清は、陽性となる場合 (Pm467) の他、弱陽性となる場合 (Pm0801・Pm0807) が認められた。

3) 改良型キット (宮崎肺吸虫抗原で作製) の評価

宮崎肺吸虫抗原で作製した改良型キットに対して、宮崎肺吸虫感染の血清は、陽性 (Pm467・Pm0801)、あるいは弱陽性 (Pm0807) を示した。一方、ウェステルマン肺吸虫感染の血清は、弱陽性に留まる (Pw225・Pw0804・Pw0901) 他、陰性となる場合 (Pw457) も認められた。

D. 考察

本研究の結果、従来型キット (ウェステルマン肺吸虫抗原で作製) で、本邦のウェステルマン肺吸虫症患者が的確に診断される事が分かった。また宮崎肺吸虫抗原を用いて作製した改良型キットで、宮崎肺吸虫症患者が的確に診断される事も分かった。すなわち、キットの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が明らかとなった。

一方で、キットの作製に用いた抗原の由来種と肺吸虫症の原因種とが異なる場合 (異種の抗原で診断した場合) は、従来型キット (ウェステルマン肺吸虫抗原) と改良型キット (宮崎肺吸虫抗原) とで結果が一定しない事があった。したがってキットの作製には、患者の原因種と一致した抗原を使用すべきと考えられた。この様な知見を今後の診断キット開発に活用したいと考えている。

E. 結論

簡便で迅速な肺吸虫症免疫血清診断法の確立

を目的に、フロースルー免疫測定法に基づく診断キットを活用・作製し、本邦の肺吸虫症患者 (ウェステルマン肺吸虫症と宮崎肺吸虫症) に適用可能であるか検討した。その結果、キットの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が明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

2-2. 血清パネルの構築時に見出した排卵陽性の宮崎肺吸虫症の一例

A. 研究目的

肺吸虫症の迅速診断キット開発に関連して、血清パネルの充実に努めている。この過程で、日本在住のタイ人女性が肺吸虫に感染し、肺吸虫卵を喀痰中に排出した事例を経験した。この虫卵を出発材料として、形態と塩基配列を調べ、原因種の同定を試みた。

B. 研究方法

症例は 37 歳のタイ人女性。1991 年に来日し、以後の 17 年間は、4 回の里帰りを除いて、継続して日本に在住している。2007 年 11 月下旬に胸痛を自覚し、日本赤十字社和歌山医療センターを受診した。胸部 X 線で不整な結節影と浸潤影が、また胸部 CT では蛇行構造と浸潤影が観察された。この画像所見と血液所見 (総白血球数 9,800/ μ l、好酸球 9.4%、非特異的 IgE 8.467 IU/ml) から肺吸虫症が疑われ、喀痰から虫卵を検出して診断が確定された。この虫卵を出発材料として、原因種の同定を試みた。

C. 研究結果

原因虫種を推定する為に喀痰中の虫卵(12個)を計測・精査したところ、虫卵の大きさ(平均)は、長径が71 μ m、短径は43 μ mであった。最大幅部の位置は、中央が11個(92%)、蓋端側は0個(0%)、無蓋端側は1個(8%)であった。無蓋端部における明らかな卵殻の肥厚は、「認めない」が11個(92%)、「認める」が1個(8%)であった。長径が長くはなく、最大幅部が概ね中央部にあるという特徴から、本例の虫卵は宮崎肺吸虫ないし2倍体型のウエステルマン肺吸虫の可能性が高いと考えられた。

そこで虫卵からDNAを抽出し、PCRによる増幅、制限酵素による切断パターンの解析(RFLP)、塩基配列の解説・解析を行った。その結果、RFLPパターンから宮崎肺吸虫である事が分かった。塩基配列解説の結果も宮崎肺吸虫であった。

D. 考察

本症例の感染源に関して患者に食歴を尋ねたところ、地元(和歌山県)のタイ料理店や自宅で、サワガニ入りパパイアの千切りサラダ(「ソムタム・プー」というタイ料理)を頻回に亘って摂食しており、このサワガニが感染源と考えられた。アジア系の外国人が出身国の食習慣を我が国でも維持し、その結果として肺吸虫に感染する事例が継続して報告されているが、本事例もそれに該当した。

宮崎肺吸虫が人体内で成熟して排卵に至る事は極めて稀である。しかし本例では、頻回のサワガニ摂食で多数のメタセルカリアが患者体内に取り込まれ、虫体が肺実質で成熟、排卵を認めるに至ったと考えられた。画像検査では胸膜所見が目立たず、肺野の結節・浸潤影といった肺内所見が確認された。当初は宮崎肺吸虫よりもウエステルマン肺吸虫(3倍体型)の感染を想起したが、虫卵を用いた分子生物学的検査で、宮崎肺吸虫と確定診断された。本例の様に非典型的な臨床経過を辿る肺吸虫症例では、寄生虫材料を確保しての種同定が原因を明らかにする為に極めて重要である。

現在、肺吸虫症患者の血清パネルの充実に努めている。疑い例が検出された場合は、本事例と同様に取り組み、寄生虫材料を用いた種同定を確実に実施する事で、原因種を明らかにし、由来の明確な血清パネルを構築に努力したいと考えている。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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

1. 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. 第19回日本臨床寄生虫学会大会, 京都, 2008年6月

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

腸管寄生吸虫症の遺伝子診断法の開発

研究分担者 森嶋康之（国立感染症研究所寄生動物部）

研究協力者 杉山 広（国立感染症研究所寄生動物部）

研究要旨

横川吸虫をはじめとする異形吸虫科吸虫症は日本国内で最もよく認められる寄生蠕虫症である。その予防対策を立案する上で感染種の正確な種同定が重要であるが、本症が通常診断される糞便検査では、同科に属する吸虫類の虫卵が形態学的に類似することから、感染種を特定することが困難であった。そこで今年度はまず *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。

A. 研究目的

日本国内における各種寄生蠕虫症の発生が年々減少している中、魚介類を感染源とする異形吸虫科に属する吸虫類の感染は依然として多発している。これは、もともと日本人の魚介類に対する生食嗜好の高さに加え、低温流通体系の整備によって汚染魚が広範囲に流通するようになったことが原因と考えられている。さらに、海外旅行者が現地魚介類を生食して感染する例も多い。

感染予防対策を立案するにあたっては感染源の特定と並び、正確な感染種の同定が必須である。しかしながら、通常の糞便検査で得られた虫卵を形態学的観察のみで鑑別することは困難である。異形吸虫科吸虫の虫卵は、種間のみならず、近縁属間でも形態学的に類似するからである。

そこで今年度は、異形吸虫科に属する吸虫

類の中で国内淡水産魚類を感染源とする *Metagonimus* 属の 3 種の吸虫を対象とし、これらを迅速かつ簡易に鑑別する方法の開発を試みた。

B. 研究方法

鋳型 DNA はいずれも野生終宿主から採集されたもので（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）、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN GmbH, Germany) 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。

はじめに上記プライマーを 1 組ずつ用いて各寄生虫種について PCR を行い、種特異的バンドが得られるかどうかを確認した。次いで、複数のプライマーセットを同時に用いて PCR 反応を行い、反応条件の最適化をはかった。

C. 研究結果

まずプライマーセットを 1 組ずつ用いる通常の PCR 反応（モノプレックス PCR）を行った結果、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。複数のプライマーを同時に用いるマルチプレックス PCR 条件下では、増幅効率の低下が認められたが、アニーリング温度を低下させることでモノプレックス PCR 時と増幅効率を得ることができた。混合感染を想定して鋳型 DNA を複数添加する試行を行ったところ、増幅される種特異的バンドは鋳型 DNA の添加種数に対応してそれぞれ増加した。

D. 考察

横川吸虫をはじめとする異形吸虫科の吸虫類は、日本人から高頻度に検出される寄生蠕虫であるにもかかわらず、軽度感染では無症状であることから、正確な種同定が行われてこなかった。しかしながら、虫種によっては重症化することもあるため、正確な分子同定法が望まれていた。今回開発したマルチプレックス PCR 法は、国内での発生が知られる 3 種の *Metagonimus* 属を迅速かつ簡便に鑑別することが可能であり、疫学調査や臨床診断に際して有用なツールとなることが期待される。

E. 結論

国内発生のある異形吸虫科吸虫類のうち、*Metagonimus* 属の 3 種を迅速・簡便に鑑別する手法としてマルチプレックス PCR 法を開発した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Hamano, S. and William A. Petri Jr	Protozoan Diseases: Amoebiasis	Kris Heggenhougen and Stella Quah	International Encyclopedia of Public Health, Vol. 5	Academic Press	San Diego	2008	335-341
濱野真二 郎	寄生虫による病気		家庭の医学 第6版	保健同人社	東京	2008	1523-1535
丸山治彦	鞭虫症	山口徹、北原 光夫、福井次 夫	今日の治療指針2009	医学書院	東京	2009年1 月1日	188-189
丸山治彦	人体寄生虫	石橋信義、名和 行文	寄生と共生	東海大学出 版会	神奈川	2008年7 月5日	26・55
丸山治彦	今あぶない寄生虫 (ぜん虫編)	齋藤智也	寄生虫のふしぎ	技術評論社	東京	2009年3 月1日	159-202
丸山治彦	抗アニサキスIgG・ IgA抗体	和田攻	臨床検査ガイド 2009~2010	文光堂	東京	2009年2 月17日	865-866
井上幸次	感染性角結膜炎	山口徹、北原光 夫、福井次夫	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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Picazari, K., Nakada-Tsukui, K., Sato, D., and <u>Nozaki, T.</u>	Analysis of autophagy in the enteric protozoan parasite <i>Entamoeba</i> .	Methods Enzymol.	451	359-371.	2008
Hussain, S., Ali, V., Jeelani, G., and <u>Nozaki, T.</u>	Isoform-dependent feedback regulation of serine O-acetyltransferase isoenzymes involved in L-cysteine biosynthesis of <i>Entamoeba histolytica</i> .	Mol. Biochem. Parasitol.	163	39-47	2008
Sato, D., Karaki, T., Shimizu, A., Kamei, K., Harada, S., and <u>Nozaki, T.</u>	Crystallization and preliminary X-ray analysis of L-methionine γ -lyase from <i>Entamoeba histolytica</i> .	Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.	64	697-699	2008
Sato, D., Yamagata, W., Harada, S., and <u>Nozaki, T.</u>	Kinetic characterization of methionine gamma-lyases from the enteric protozoan parasite <i>Entamoeba histolytica</i> against physiological substrates and trifluoromethionine, a promising lead compound against amoebiasis.	FEBS J.	275	548-560.	2008
Picazari, K., Nakada-Tsukui, K., and <u>Nozaki, T.</u>	Autophagy during proliferation and encystation in the protozoan parasite <i>Entamoeba invadens</i> .	Inf. Immun.	76	278-288.	2008
<u>Hamano, S.</u> , 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	9	452-61	2008
Tetsutani, K., Ishiwata, K., Torii, M., <u>Hamano, S.</u> , Hisaeda, H., Himeno, K.	Concurrent infection with <i>Heligmosomoides bakeri</i> modulates murine host response against <i>Plasmodium berghei</i> ANKA Infection.	Am J Trop Med Hyg.	79	819-822	2008
Hisaeda, H., Tetsutani, K., Imai, T., Moriya, C., Tu, L., <u>Hamano, S.</u> , 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.	180	2496-2503	2008
Furuno, K., Ikeda, K., <u>Hamano, S.</u> , 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.	9	302-308	2008
<u>Nagamune, K. et al.</u>	Plants, endosymbionts and parasites. Abscisic acid and calcium signaling.	Comm. Integ. Biol.	1 (1)	62-65	2008

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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		2009
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	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	2008
Suzuki, J., Kobayashi, S., Iku, I., Murata, R., Yanagawa, Y. and Takeuchi, T.	Seroprevalence of <i>Entamoeba histolytica</i> infection in female outpatients at a sexually transmitted disease sentinel clinic in Tokyo, Japan.	Jpn J Infect Dis	61(3)	175-178	2008
Suzuki, J., Kobayashi, S., Murata, R., Tajima, H., Hashizaki, F., Yanagawa, Y. and Takeuchi, T.	A survey of amoebic infections and differentiation of an <i>Entamoeba histolytica</i> -like variant (JSK2004) in nonhuman	J Zoo Wildl Med	39(3)	370-379	2008
Kakimaru-Hasegawa A, Inoue Y et al.	Clinical application of real-time polymerase chain reaction for diagnosis of herpetic diseases of the anterior segment of the eye.	Jpn J Ophthalmol	52	24-31	2008
Inoue Y, Ohashi Y et al.	Preoperative disinfection of the conjunctival sac with antibiotics and iodine compounds: A prospective randomized multicenter study.	Jpn J Ophthalmol	52	151-161	2008
池田欣史、井上幸次ほか	井上幸次: 角膜穿孔をきたしたヘルペス性角膜炎に対して塩酸パラシクロビル内服が奏効した1例	あたらしい眼科	25	365-369	2008
石倉涼子、井上幸次ほか	<i>Aspergillus</i> 角膜真菌症に対する治療的角膜移植後1年で <i>Penicillium</i> 感染を起こした1例	あたらしい眼科	25	379-383	2008
井上幸次	[画像で診る感染症: 領域別感染症] ⑥ 眼科領域	感染症	38	187-197	2008
井上幸次	標準的治療における抗菌薬の外来使用の適応 眼科領域	治療	90	2889-2892	2008
Seki, E., Kondo, Y., Imuro, 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., Nakanishi, K., Kurahashi, Y. and Muraguchi, A.	Protective effect of IL-18 on Kainate- and IL-1 β -induced cerebellar ataxia in mice.	J. Immunol	180	2232-2328	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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Imai, Y., Hayashi, N., Yasuda, K., Tsutsui, H., Mizutani, H. and <u>Nakanishi, K.</u>	Freshly isolated Langerhans cells negatively regulate naive T cell activation in response to peptide antigen through cell-to-cell contact.	J Dermatol. Sc	51	19-29	2008
Kondo, Y., Yoshimoto, T., Yasuda, K., Futatsugi, Yumikura, S., Morimoto, M., Hayashi, N., Hoshino, T., Fujimoto, J. and <u>Nakanishi, K.</u>	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., <u>Nakanishi, K.</u> and Tamari, M.	Association of IL-33 level and IL-33 genetic variant with Japanese cedar pollinosis.	Clinical & Exp Allergy	38	1875-1881	2008
Iwata F., Shinjyo N., Amino H., Sakamoto K., Islam M. K., Tsuji N. and <u>Kita K.</u>	Change of subunit composition of mitochondrial complex II (Succinate-ubiquinone reductase/Quinol-fumarate reductase) in <i>Ascaris suum</i> during the migration in the experimental host.	Parasitol. Int.	57	54-61	2008
Matsumoto J., Sakamoto K., Shinjyo N., Kido Y., Yamamoto N., Yagi K., Miyoshi H., Nonaka N., Katakura K., <u>Kita K.</u> and Oku Y.	Anaerobic NADH-Fumarate Reductase System Is Predominant in the Respiratory Chain of <i>Echinococcus multilocularis</i> , Providing a Novel Target for the Chemotherapy of Alveolar Echinococcosis.	Antimicrob. Agents. Chemother	52	164-170	2008
Siregar J. E., Syafruddin D., Matsuoka H., <u>Kita K.</u> , and Marzuki S.	Mutation underlying resistance of <i>Plasmodium berghei</i> to atovaquone in the quinone binding domain 2 (Qo ₂) of the cytochrome <i>b</i> gene	Parasitol. Int.	57	229-232	2008
Matsuzaki M., Kuroiwa H., Kuroiwa T., <u>Kita K.</u> and Nozaki H	A cryptic algal group unveiled: a plastid biosynthesis pathway in the oyster parasite <i>Perkinsus marinus</i>	Mol. Biol. Evolution	25	1167-1179	2008
Hirai M., Arai M., Mori T., Kawai S., <u>Kita K.</u> , Kuroiwa T. and Matsuoka H.	Male fertility of Malaria Parasites Is Determined by GCS1, a Plant-Type Reproduction Factor	Current Biol	18	607-613	2008
Niikura M., Kamiya S., <u>Kita K.</u> and Kobayashi F	Coinfection with nonlethal murine malaria parasites suppresses pathogenesis caused by <i>Plasmodium</i>	J. Immunol	180	6877-6884	2008
Inaoka, D. K., Sakamoto, K., Shimizu, H., Shiba T., Kurisu, G., Nara, T., Aoki, T., <u>Kita, K.</u> and Harada, S	Structures of <i>Trypanosoma cruzi</i> dihydroorotate dehydrogenase complexed with substrates and products: Atomic resolution insights into mechanisms of dihydroorotate oxidation and fumarate reduction	Biochemistr	47	10881-10891	2008

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shimizu, H., Nihei, C., Inaoka, D. K., Mogi, T., Kita, K. and Harada, S	Screening of detergents for solubilization, purification and crystallization of membrane proteins: a case study on succinate:ubiquinone oxidoreductase from <i>Escherichia coli</i> .	Acta Crystallogr A	F64	858-862	2008
Mogi, T., Matsushita, K., Murase, Y., Kawahara, Miyoshi, H., Ui, H., Shiomi, K., Omura, S. and Kita, K.	Identification of New Inhibitors for Alternative NADH Dehydrogenase (NDH-II).	FEMS Microbiol. Lett	291	157-161	2009
Kawahara, K., Mogi, T., Tanaka, Q. T., Hata, M., Miyoshi, H. and Kita, K.	Mitochondrial Dehydrogenases in the Aerobic Respiratory Chain of the Rodent Malaria Parasite <i>Plasmodium</i>	J. Biochem	145	229-237	2009
Mogi, T., Ui, H., Shiomi, K., Omura, S., Miyoshi, H., Kita, K.	Antibiotics LL-Z1272 identified as novel inhibitors discriminating bacterial and mitochondrial quinol oxidases.	Biochim Biophys. Acta (Bioenergetics)	1787	129-133	2009
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	Fasting induced hypothermia and reduced energy production in mice lacking Acetyl-CoA Synthetase 2	J. Cell Metabolism			印刷中
Morales, J., Mogi, T., Mineki, S., Takashima, E., Mineki, R., Hirawake, H., Sakamoto, K., Omura, S. and Kita, K.	Novel Mitochondrial Complex II Isolated from <i>Trypanosoma cruzi</i> is Composed of Twelve Peptides Including a Heterodimeric Ip Subunit	J. Biol. Chem	284	7255-7263	2009
Ishikawa H, Ohmae H.	Modeling the dynamics and control of transmission of <i>Schistosoma japonicum</i> and <i>S. mekongi</i> in Southeast Asia.	Korean Journal of Parasitology	In press		2009
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	In press		2008
Asahi, H., Ohmae, H., Sy, O. S., Tanabe, M., Matsuda, H., Yamashita, T., Sendo, F., Kajima, J., Ohta, N.	Detection of specific antibodies in the urine as markers of human <i>Schistosoma japonicum</i> infection.		In preparation		2009
Hisakane N, Kirinoki M, Chigusa Y, Sinuon M, Socheat D, Matsuda H, Ishikawa H	The evaluation of control measures against <i>Schistosoma mekongi</i> in Cambodia by a mathematical model.	Parasitol Int.	57	379-385	2008

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sugiyama H, Morishima Y, Binchai S, Rangsiruji A.	Molecular discrimination between individual metacercariae of <i>Paragonimus heterotremus</i> and two forms of <i>P. westermani</i> occurring in Thailand.	Southeast Asian J Trop Med Public Health	39	32-36	2008
Umehara A, Kawakami Y, Araki J, Uchida A, Sugiyama H.	Molecular analysis of Japanese <i>Anisakis simplex</i> worms.	Southeast Asian J Trop Med Public Health	39	26-31	2008
Umehara A, Kawakami Y, Araki J, Uchida A.	Multiplex PCR for the identification of <i>Anisakis simplex sensu stricto</i> , <i>Anisakis pegreffii</i> and the other anisakid nematodes.	Parasitol Int	57	49-53	2008
Singh ST, Sugiyama H.	Paragonimiasis in India : a newly emerging food borne parasitic disease.	Clinical Parasitology	19	95-98	2008
杉山 広, 梅原梓里, 森嶋康之, 川中正憲, 山崎 浩	市販サワガニを対象とした肺吸虫メタセルカリアの寄生状況調査	Clinical Parasitology	19	89-91	2008
田尻智子, 堀川 禎夫, 西山秀樹, 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	19	86-88	2008
梅原梓里, 杉山 広, 川上泰, 内田明彦, 荒木 潤	同胞種レベルでみた日本産 <i>Anisakis simplex</i> -感染源の特定に向けた検討-	Clinical Parasitology	19	114-117	2008
坂本晃子, 増本久人, 平野敬之, 船津丸貞幸, 池添博士, 天草 務, 杉本昌志, 松崎祐己, 森田満雄, 山中和貴, 川上 泰, 杉山 広, 森嶋康之, 川中正憲	ウェステルマン肺吸虫による食中毒事例について -発生概要と原因に関する疫学調査-	食品衛生研究	58	39-42	2008
杉山 広, 梅原梓里, 森嶋康之, 川中正憲, 山崎 浩	食用として販売されていたサワガニからの肺吸虫メタセルカリアの検出	病原微生物検出情報	29	284-285	2008
梅原梓里, 川上 泰, 荒木 潤, 内田明彦, 杉山 広	日本産 <i>Anisakis simplex</i> 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

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Vector control in *gambiense* sleeping sickness is generally not done except during epidemics to buttress active and passive surveillance by rapidly reducing transmission or during the last phases of control targeted to small pockets of transmission.

In *rhodesiense* sleeping sickness where wild and domestic animals are the main reservoir, disease control activities are combined with treatment of animals and vector control to reduce fly density. Properly equipped health centers and appropriately trained staff in endemic areas could be sufficient to diagnose cases, provided the symptoms are recognized by the patients and lead them to seek help spontaneously at health centers.

See also: Helminthic Diseases: Onchocerciasis and Loiasis; The History of Public Health During Colonialism; Protozoan Diseases: Chagas Disease; Re-emerging Diseases: Overview; World Health Organization.

Further Reading

Barrett MP, Boykin DW, Brun R, and Tidwell RR (2007) Human African trypanosomiasis: Pharmacological re-engagement with a neglected disease. *British Journal of Pharmacology* 152(8): 1155–1171.

Fèvre EM, Picozzi K, Jannin J, Welburn SC, and Maudlin I (2006) Human African trypanosomiasis: Epidemiology and control. *Advances in Parasitology* 61: 167–221.

Gibson W (2007) Resolution of the species problem in African trypanosomes. *International Journal of Parasitology* 37(8–9): 829–838.

Maudlin I, Holmes PH, and Miles MA (2004) The Trypanosomiasis. Wallingford, UK: CABI Publishing.

Simarro P, Jannin J, and Cattand P (2008) Eliminating human African trypanosomiasis: where do we stand and what comes next. *PLoS Medicine* 5(2): e55.

World Health Organization (2006) Human African trypanosomiasis (sleeping sickness): Epidemiological update. *Weekly Epidemiological Record* 81(8): 71–80. <http://www.who.int/wer/en> (accessed January 2008).

Relevant Websites

<http://www.fao.org/ag/aginfo/programmes/er/vpaat/home.html> – African Union, Food and Agriculture Organization, World Health Organization, and International Atomic Energy Agency, Programme Against African Trypanosomiasis.

http://www.africa-union.org/Structure_of_the_Commission/clapPattec.htm – Pan African Tsetse and Trypanosomiasis Eradication Campaign.

http://www.who.int/neglected_diseases/en/ – World Health Organization, Control of Neglected Tropical Diseases.

http://www.who.int/trypanosomiasis_african/en/ – World Health Organization, Human African Trypanosomiasis.

Protozoan Diseases: Amebiasis

S Hamano, Kyushu University, Fukuoka, Japan

W A Petri Jr., University of Virginia Health System, Charlottesville, VA, USA

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

A Deadly Parasitic Disease

Amebiasis is an infection caused by the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. In contrast, nonpathogenic amoeba that infect humans include *E. dispar* and *E. moshkovskii* (both morphologically identical to and easily confused with *E. histolytica*), *E. coli*, *E. bartmanni*, and *Endolimax nana*. *Dientamoeba fragilis* and *E. polecki* have been associated with diarrhea and *E. gingivalis* with periodontal disease. Approximately 50 million illnesses and 100 000 deaths occur annually from amebiasis, making it the third-leading cause of death due to parasitic disease in humans. Long-term consequences of amebiasis in children may include both malnutrition and lower cognitive abilities. Currently there is no vaccine to prevent the childhood morbidity and mortality due to infection with this protozoan parasite. Although amebiasis is present worldwide, it is most common in underdeveloped areas, especially Central and South America, Africa, and Asia.

In the United States and other developed countries, cases of amebiasis are most likely to occur in immigrants from and travelers to endemic regions.

Epidemiology

Infection occurs via ingestion of the parasite's cyst from fecally contaminated food, water, or hands. This is a common occurrence among the poor of developing countries and can afflict populations of the developed world, as the recent epidemic in Tbilisi Georgia due to contaminated municipal water demonstrates (Barwick *et al.*, 2002). Carefully conducted serologic studies in Mexico, where amebiasis is endemic, demonstrated antibody to *E. histolytica* in 8.4% of the population. In the urban slum of Fortaleza, Brazil, 25% of all people tested carried antibody to *E. histolytica*; the prevalence of antiamebic antibodies in children aged 6–14 years was 40%. A prospective study of

preschool children in a slum of Dhaka Bangladesh has demonstrated new *E. histolytica* infection in 45%, and *E. histolytica*-associated diarrhea in 9%, of the children annually. Not all individuals are equally susceptible to amebiasis, with certain HLA DR and DQ alleles associated with resistance to infection and disease (Duggal *et al.*, 2004).

Pathogenesis

The cysts are transported through the digestive tract to the intestine, where they release their mobile, disease-producing form, the trophozoite. *E. histolytica* trophozoites can live in the large intestine and form new cysts without causing disease. But they can also invade the lining of the colon, killing host cells and causing amebic colitis, acute dysentery, or chronic diarrhea. The trophozoites can be carried through the blood to other organs, most commonly the liver and occasionally the brain, where they form potentially life-threatening abscesses (see Figure 1). Important virulence factors include the trophozoite cell surface galactose and N-acetyl-D-galactosamine (Gal/GalNAc)-specific lectin that mediates adherence to colonic mucins and host cells, cysteine proteinases that likely promote invasion by degrading extracellular matrix and serum components, and amoebapore pore-forming proteins involved in killing of bacteria and host cells.

Infection is normally initiated by the ingestion of fecally contaminated water or food containing *E. histolytica* cysts. The infective cyst form of the parasite survives passage through the stomach and small intestine. Excystation occurs in the bowel lumen, where motile and potentially invasive trophozoites are formed. In most infections, the trophozoites aggregate in the intestinal mucin layer and form new cysts, resulting in a self-limited and asymptomatic infection. In some cases, however, adherence to and lysis of the colonic epithelium, mediated by the galactose and N-acetyl-D-galactosamine (Gal/GalNAc)-specific lectin, initiates invasion of the colon by trophozoites. Once the intestinal epithelium is invaded, extraintestinal spread to the peritoneum, liver, and other sites may follow. Factors controlling invasion, as opposed to encystation, most likely include parasite 'quorum sensing' signaled by the Gal/GalNAc-specific lectin, interactions of amebae with the bacterial flora of the intestine, natural immunity, and innate and acquired immune responses of the host.

Immunity

Acquired immunity to infection and invasion by *E. histolytica* is associated with a mucosal IgA antibody response against the carbohydrate recognition domain (CRD) of the parasite Gal/GalNAc lectin (Haque *et al.*, 2001, 2006). The average duration of protection afforded

by anti-CRD IgA is under 2 years. Cell-mediated immunity in protection from invasive amebiasis, but not infection *per se*, has also been demonstrated. There is substantial evidence from *in vitro* animal model and most recently human studies revealed an important role for IFN- γ in protection from amebic colitis, acting in part by activating macrophages to kill the parasite. Invasive amebiasis rarely occurs in individuals with HIV/AIDS, even in areas where amebiasis is common, suggesting an important role also for natural resistance and/or innate immune responses in protection from infection.

Diagnosis

Historically, diagnosis of amebiasis was complicated because several areas of the body can be affected, symptoms may be similar to other conditions such as inflammatory bowel diseases, and diagnostic tests were not highly specific. Before the development of new antigen detection and polymerase chain reaction (PCR) tests, diagnosis of amebiasis was performed by examining a stool sample through a microscope to determine whether *E. histolytica* cysts were present (Figure 2(a)). However, this method often requires more than one specimen because the number of cysts in the stool is highly variable. In addition, stool microscopy has limited sensitivity and specificity. The body's own immune system produces macrophages that can look like the ameba. Moreover, three different amebas – *E. histolytica*, which causes amebiasis, and *E. dispar* and *E. moshkovskii*, which do not cause disease – look identical under a microscope (Diamond and Clark, 1993).

Amebiasis outside the intestine has been even more difficult to diagnose. Clinical manifestations of extraintestinal disease vary widely, and less than 10% of person with amebic liver abscesses have identifiable *E. histolytica* in their stools. Noninvasive diagnostic procedures such as ultrasound, computer tomographic (CT) scan, and magnetic resonance imaging (MRI) can detect liver abscesses but cannot distinguish between abscesses caused by ameba and those caused by bacteria, thus hampering proper treatment of the condition. Until recently, the most accurate diagnostic test involved examining a sample of the abscess tissue obtained by needle aspiration (Figure 2(b)), a procedure that is painful, potentially dangerous, and relatively insensitive, identifying amebic trophozoites only 20% of the time.

A stool antigen diagnostic test using polyclonal antibodies to adhesion of *E. histolytica* that allows specific and sensitive diagnosis of *E. histolytica* infection is manufactured by TechLab, Inc. This FDA-approved test is 80–90% sensitive and nearly 100% specific compared to real-time PCR. The *E. histolytica* antigen test can be performed rapidly and cheaply, and can detect infection before symptoms appear. Early presymptomatic treatment can prevent the development of invasive amebiasis

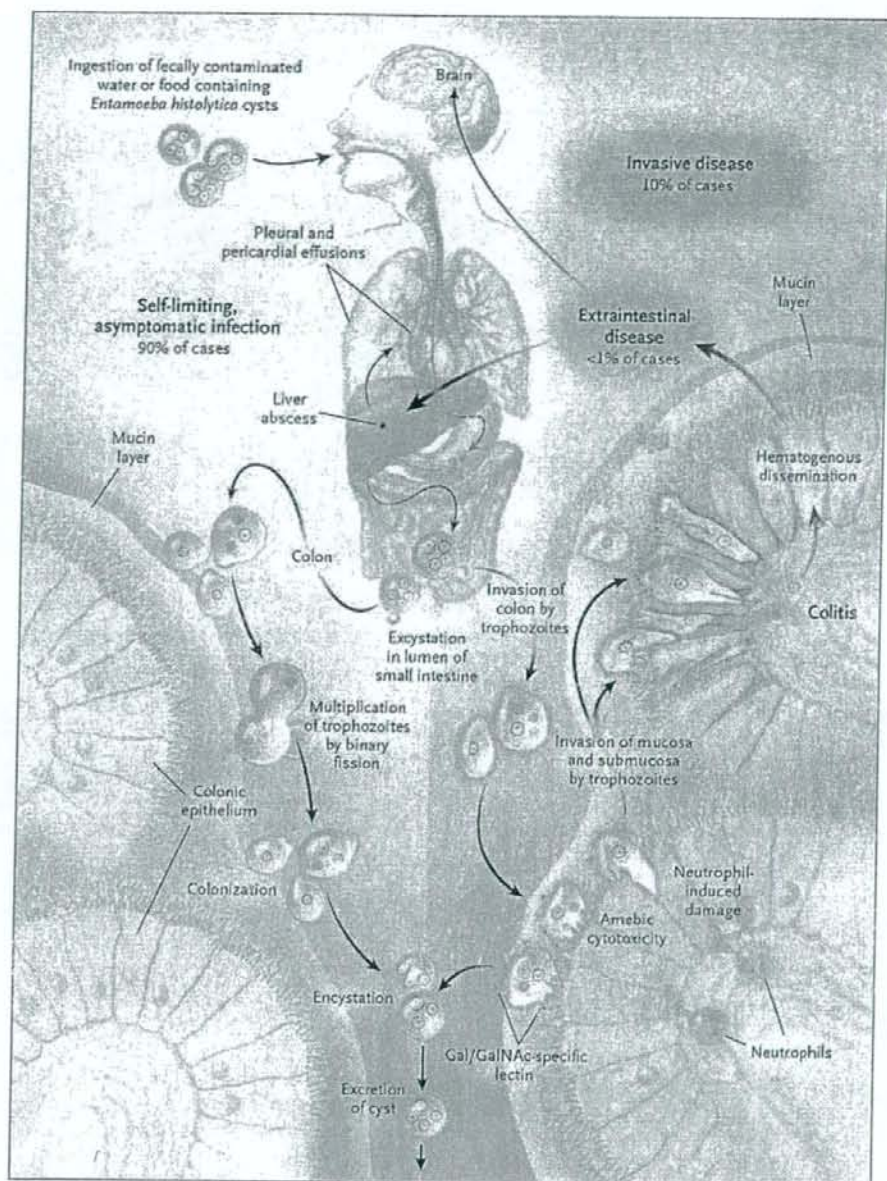


Figure 1 Process of amebiasis infection. Reproduced from Haque R, Huston CD, Hughes M, et al. (2003) Current concepts: Amebiasis. *New England Journal of Medicine* 348: 1565–1573, with permission from *New England Journal of Medicine*.

and minimize the spread of infection. Moreover, follow-up tests can be performed to confirm eradication of intestinal infection. In addition, immunohistochemical staining of ameba is useful in a case difficult to diagnose (Figure 2(c)).

Serologic tests for antiamebic antibodies are also a very useful tool in diagnosis, with sensitivity of 70–80% early in disease and approaching 100% sensitivity upon convalescence. The combined use of serology and stool antigen detection test offers the best diagnostic approach.

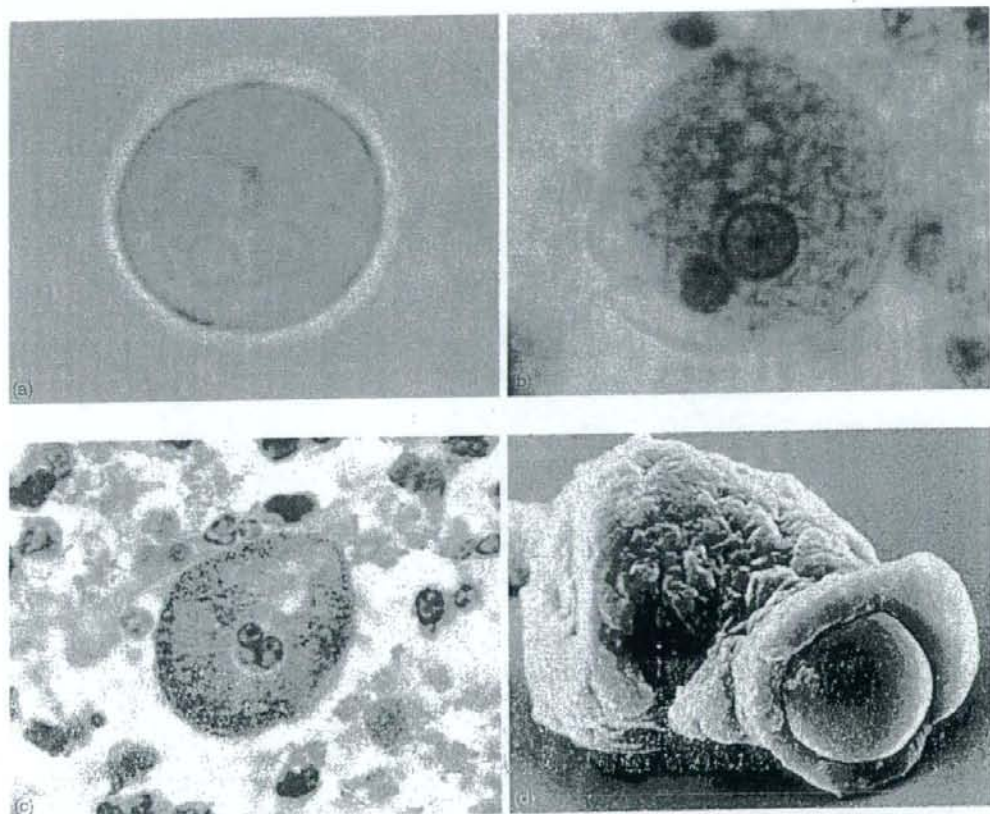


Figure 2 (a) An iodine-stained cyst from stool. *E. histolytica* cyst is quadrinucleated and two of four nuclei are clearly visible. The size of cyst is usually 10–15 μm in diameter. (b) A trichrome-stained *E. histolytica* trophozoite in the smear of exudate from skin lesion. The round nucleus with central karyosome is visible. (c) An immuno-stained trophozoite using *E. histolytica*-specific sera, which were detected in the histological sections from a patient with acute suppurative appendicitis. (d) *E. histolytica* trophozoites in tissue. Figures 2(b) and (d) are courtesy of the estate of Dr. K. Juniper, Jr. Figure 2(c) is courtesy of Prof. James S. McCarthy, Department of Infectious Diseases, Royal Brisbane Hospital, Herston Road, Herston, Australia.

What Are the Symptoms of Amebic Colitis?

Patients present with several days to weeks of gradual onset of abdominal pain and tenderness, diarrhea and occasionally bloody stools (Figure 3(a)). This is different from bacterial causes of dysentery, where patients usually only have 1 to 2 days of symptoms. Surprisingly, fever is present in only the minority of patients with amebic colitis. Colonic lesions can vary from only mucosal thickening to flask-shaped ulcerations to necrosis of intestinal wall (Figures 3(b)–3(f)). Unusual manifestations of amebic colitis include toxic megacolon (0.5% of cases, usually requiring surgical intervention), ameboma (granulation tissue in colonic lumen mimicking colonic cancer in appearance), and a chronic nondysenteric form of

infection that can present as years of waxing and waning diarrhea, abdominal pain, and weight loss (easily misdiagnosed as inflammatory bowel diseases).

A heightened suspicion of amebiasis should be present if the patient has been in a developing country in the last year (as a resident or traveler). In a patient with diarrhea, if blood is present in the stool (grossly bloody or occult blood positive; Figure 3(a)), then infectious (Shiga toxin-producing *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, and *E. histolytica*) and noninfectious (inflammatory bowel disease, diverticulosis, arteriovenous malformations, cancer) causes should be considered. The diagnosis of amebic colitis is best made by antigen detection in stool (not widely available), by colonoscopy and biopsy, and by detection of antiamebic antibodies in serum (present in most but not all patients).

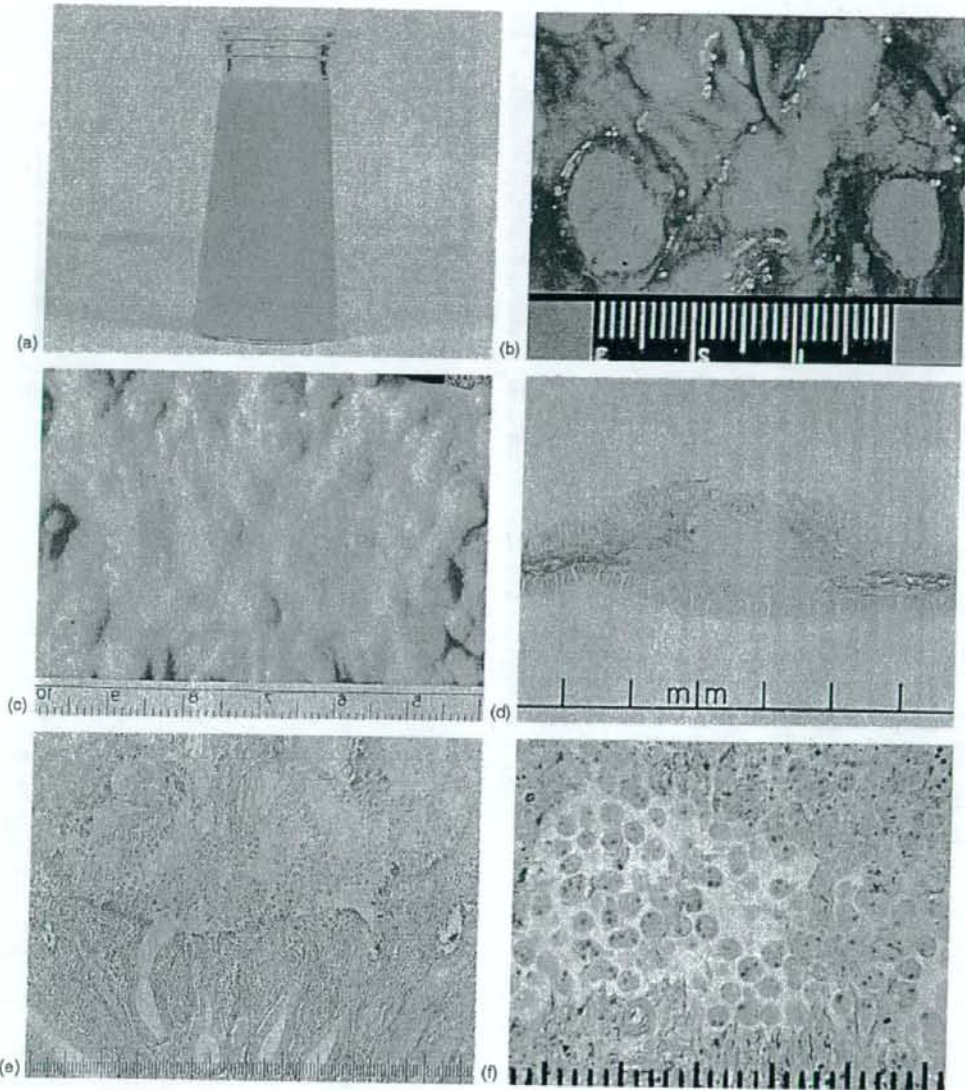


Figure 3 (a) An empyema fluid from amebic liver abscess. (b) Several typical ulcers. (c) Typical early amebic ulcers with various sizes in colon. (d) Ulcer with typical flask-shape appearance caused by *E. histolytica* infection. (e) and (f) Superficial ulceration with trophozoites. Figures 3(a)–3(d) are courtesy of the estate of Dr. K. Juniper, Jr.

How Does a Patient with Amebic Liver Abscess Present?

The typical patient with an amebic liver abscess in the United States is an immigrant, usually a Hispanic male, 20–40 years old, who presents with fever, right upper quadrant pain, leukocytosis, abnormal serum transaminases and alkaline phosphatase, and a defect on hepatic

imaging study. Roughly 90% of patients with liver abscess are males. The abscess is usually single and is in the right lobe of the liver 80% of the time (Figure 4(d)) (Katzenstein *et al.*, 1982).

Most frequently, patients will present with liver abscess without concurrent colitis, although a history of dysentery within the last year can often be obtained. Ameba are infrequently seen in the stool at the time of diagnosis of

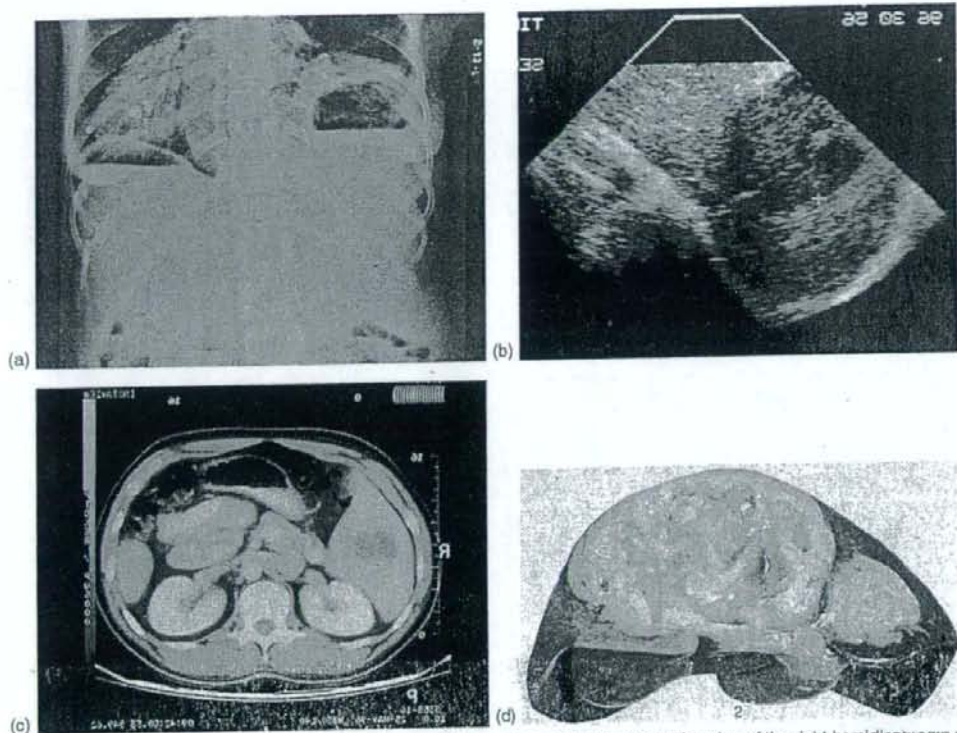


Figure 4 (a) Abdominal radiography of a patient with amebic liver abscess, with marked elevation of the right hemidiaphragm and air-fluid level in the liver abscess after aspiration. (b) and (c) Ultrasound scan and computed tomography scan of amebic liver abscess, respectively. (d) Amebic liver abscesses. Figures 4(a), 4(c), and 4(d) are courtesy of the estate of Dr. K. Juniper, Jr.

liver abscess (Adams and MacLeod, 1977). Liver abscess can present acutely with fever, right upper abdominal tenderness, and pain, or subacutely with prominent weight loss and, less frequent, fever and abdominal pain. The peripheral white blood cell count is elevated, as is the alkaline phosphatase level in many patients. Early evaluation of the hepatobiliary system with ultrasound or CT is essential to demonstrate the abscess in the liver (Figure 4). The differential diagnosis of the lesion in the liver would include pyogenic abscess (less likely if the gallbladder and ducts appear normal), hepatoma, and echinococcal cyst. Aspiration of the abscess is occasionally required to diagnose amebiasis. (Although ameba are visualized in the pus in only the minority of cases, if the abscess is pyogenic the responsible bacteria will be seen and/or cultured.) Antibodies to *E. histolytica* are present in the serum of 92–97% of patients upon acute presentation with amebic liver abscess, and therefore are very useful diagnostically. Unusual extraintestinal manifestations of amebiasis include direct extension of the liver abscess to pleura or pericardium, and brain abscess.

In a patient who presents with right upper quadrant pain, an ultrasound, CT, or MRI should be performed

to examine the liver and gallbladder. If a space-filling defect in the liver is observed, the differential diagnosis includes: (1) amebiasis (most common in adult males with a history of travel or residence in a developing country), (2) pyogenic or bacterial abscess (suspect in women, patients with cholecystitis, the elderly, individuals with diabetes, and in patients presenting with jaundice), (3) echinococcal cysts (this would be an incidental finding as echinococcal cysts should not cause pain or fever, unless secondarily infected), and (4) cancer. Most patients with amebic liver abscess will have detectable circulating antigen in serum, as well as serum antiamebic antibodies.

How Should Amebiasis Be Treated?

Invasive amebiasis should be treated with metronidazole or tinidazole plus a 'luminal' agent such as diloxanide furoate, paromomycin, or diiodohydroxyquin. Metronidazole or tinidazole alone does not eliminate intestinal colonization in up to 50% of patients with invasive amebiasis, leaving patients open to the real possibility of a