

200931031A

厚生労働科学研究費補助金
新型インフルエンザ等新興・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21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22 (2010) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金
新型インフルエンザ等新興・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21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22 (2010) 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 (長崎大学 熱帯医学研究所寄生虫学分野)	
3. 熱帯熱マラリア原虫の脂質代謝・輸送の分子機構の解明 -----	35
三田村 俊秀 (国立国際医療センター 研究所)	
4. トキソプラズマの細胞侵入機構の解明 -----	39
永宗 喜三郎 (国立感染症研究所 寄生動物部三室)	
5. 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 -----	43
丸山 治彦 (宮崎大学医学部 感染症学講座寄生虫学分野)	
6. エキノコックスミトコンドリア呼吸鎖の機能解明と創薬 -----	51
北 潔 (東京大学大学院医学研究科)	
7. 蠕虫の腸管感染排除機構の解明 -----	57
中西 憲司 (兵庫医科大学 免疫学医動物学)	
8. 国内における腸管寄生虫症の疫学的研究 -----	63
小林 正規 (慶應義塾大学医学部 熱帯医学・寄生虫学教室)	
9. 赤痢アメーバ等腸管原虫症の薬剤耐性に係る研究 -----	67
津久井 久美子 (国立感染症研究所 寄生動物部一室)	
10. アカントアメーバ角膜炎の疫学的研究 -----	69
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)	
11. 寄生原虫症の検査診断法開発 -----	73
八木田 健司 (国立感染症研究所 寄生動物部一室)	
12. 寄生蠕虫症の病態と検査診断結果に関する解析 -----	79
大前 比呂思 (国立感染症研究所 寄生動物部三室)	
13. 住血吸虫症の血清診断キット開発・評価 -----	87
朝日 博子 (国立感染症研究所 寄生動物部三室)	
14. 寄生蠕虫症(条虫症)の検査診断法開発 -----	95
山崎 浩 (国立感染症研究所 寄生動物部二室)	
15. 食品媒介性吸虫症の検査診断法開発 -----	101
杉山 広 (国立感染症研究所 寄生動物部二室)	
16. 腸管寄生吸虫症の遺伝子診断法開発 -----	109
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 -----	111
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	123

I. 総括研究報告書

厚生科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・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 顧みられない寄生原虫・蠕虫症のコントロールには、診断法・サーベイランスの確立、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重要である。更にそのためには、起因生物の生物学・病因学的理解が不可欠である。本研究では3つのクラスターで、顧みられない寄生虫症対策に資する多面的な研究を展開した。第1クラスターは国内の赤痢アメーバ症を始めとする腸管原虫症並びにアカントアメーバ角膜炎のサーベイランス・分子疫学を展開した。第2クラスターは赤痢アメーバ、トキソプラズマ、マラリア原虫、糞線虫等線虫、エキノコックス等の病因学・感染防御の基盤解明と創薬を目指す研究を行った。第3クラスターは、アカントアメーバ症、ジアルジア症、住血・肺・異型吸虫、トキソカラ症、アニサキス症、条虫症等の診断法を確立し、診断法の標準化を図った。3つの研究クラスターは、サンプルの供与などを含めて密接に連携を図っている。2年度は、各分担研究分野においてほぼ予定通りの成果を挙げた。特に、初年度に整備されたゲノム・トランスクリプトームなど網羅的研究手法を基盤とした研究において十分な具体的成果を挙げた他、蠕虫症における感染防御に関しても優れた成果を挙げた。最終年度に向け、本研究は顧みられない寄生虫症の病因・感染防御の解明、検査診断法・サーベイランス体制の構築を果たすことが期待される。

研究分担者

濱野 真二郎・長崎大学・教授
三田村秀俊・国立国際医療センター研究所・室長
永宗 喜三郎・国立感染症研究所・主任研究官
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
小林 正規・慶応大学・助教
津久井久美子・国立感染症研究所・主任研究官
丸山 治彦・宮崎大学・教授
北 潔・東京大学・教授
中西 憲司・兵庫医大・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
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

熱帯病(neglected tropical diseases, NTD)の克服には、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極めて重要である。そのためには起因生物の生物学・病因学的理解が不可欠であることはいうまでもない。本研究では、NTDのうち、代表的な寄生原虫・蠕虫症を対象として、オールジャパンの研究グループを集め、寄生虫症全般の研究基盤のポトムアップ、並びに、次世代の研究者・グループの育成を目的とした研究を展開している。更に、新興・再興寄生虫症の将来の発生への緊

急対応を可能とするサーベイランス・検査診断体制の整備を行っている。

これらの目標を達成するために、本研究班は、大きく3つのクラスターで、顧みられない寄生虫症対策に資する多面的な研究を展開している。第1はサーベイランス・分子疫学クラスターであり、国内の赤痢アメーバ症を始めとする腸管原虫症並びにアカントアメーバ角膜炎のモニタリングを展開した。第2クラスターは病因学・感染防御の基盤解明を目指すクラスターである。このクラスターではすべての原虫症・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的な原虫症・蠕虫症、具体的には、赤痢アメーバ、トキソプラズマ、マラリア原虫、糞線虫等線虫、エキノコックス等を対象として取り上げた。第3クラスターは、病原機構の分子基盤の理解に基づき、診断・治療法を確立し、診断法の標準化を図るクラスターである。アカントアメーバ症、ジアルジア症、住血吸虫・肺吸虫・異型吸虫等吸虫症、トキソカラ・アニサキス等線虫症、条虫症を対象とした。3つの研究クラスターは、サンプルの供与などを含めて密接に連携を図っている。次年度の研究は、それぞれの研究クラスターでの年度計画通りに、順調に達成された。

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

初年度同定された病原性関連性遺伝子 ArfA2 のエピトープ付加発現体の作成、変異体の作成、系統発生解析などは常法に従った。遺伝子の過剰発現によるリソソームの形態変化等に関しても既存の方法に従った。嚢子化過程のトランスクリプトーム解析に関しては、初年度作成されたマイクロアレイを用いて常法に従い cRNA の作成、ハイブリダイゼーション、データ解析等を行った。嚢子化は常法によ

り誘導した。

2. 赤痢アメーバ症の感染防御機構の解明

野生型の腹腔マクロファージを単離し、10%ホルマリンで固定した各種赤痢アメーバ原虫 (*E. histolytica*, *E. moshkovskii*, *E. disper*) と共に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。また、*E. moshkovskii* のマウス腸管への定着能を調べた。さらに次年度以降の *in vivo* の研究に備えて、各種遺伝子欠損マウスの CBA/J バックグラウンドへの戻し交配を進めた。

3. 熱帯熱マラリア原虫の脂質代謝・輸送の分子機構の解明

ステアリン酸-CoA 不飽和化酵素の赤血球期原虫の増殖における役割を明らかにするために、ノックアウト原虫の作成と解析を行った。シングルクロスオーバーを介した遺伝子破壊が期待できるノックアウトコンストラクトを用いて、複数のノックアウトクローン候補株を取得した。それらについて、gDNA を用いた PCR, total RNA を用いた RT-PCR、さらには 14C-ステアリン酸を用いた代謝ラベル実験などを常法に従いおこなった。

4. 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。更に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。更に、原虫の宿主感染時におけるミトコンドリアや ER のリクルートを常法に従い、野生株と GPI 欠損株とで比較した。

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昨年度行ったコンタクトレンズ(CL)関連角膜炎感染症全国調査の結果を統計解析して発症及び重症化のリスクファクターを求めた。また、全国9施設よりアカントアメーバ角膜炎の原因となった株を集積し、タイピングを継続した。

6. ジアルジア症迅速診断キット開発に向けた抗ジアルジアモノクロナル抗体の作製

Giardia lamblia/カモシカ由来株の脱シスト後、遠心上清サンプルを用いて、常法に従いモノクロナル抗体を作成した。様々な原虫を用いてその特異性を間接蛍光抗体法で確認した。結果を既存の直接蛍光抗体法と比較した。

7. 国内における腸管寄生虫症の疫学的研究

知的障害者更生施設3施設については、昨年度と同様にフォローアップ調査を行った。国内の異なる生息地のニホンザルから霊長類寄生の赤痢アメーバ近似種である *Entamoeba nuttalli* を分離し、遺伝的多型を調査した。更に、培養が困難で、実験動物への感染が問題となっている *Entamoeba muris* の培養を2種細菌共棲のプロトコルにより至適化した。

8. 赤痢アメーバのメタロニダゾール耐性のトランスクリプトーム解析

メタロニダゾール耐性赤痢アメーバ株は通常のBI-S-33培地に致死濃度以下の薬剤で長期間原虫を培養し、少しずつ濃度を上昇させることにより、8microMの薬剤に耐性の原虫株を得た。この耐性株と感受性標準株のトランスクリプトーム解析を上記の方法でトリプリケートで行った。

9. 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2.8 x 106隻からゲノムDNAを抽出し、次世代型シーケンサのひとつである454 GS FLXを用いて塩基配列を解読した。解読によって得られた塩基配列断片をNewblerアセンブラによってアSEMBルし、連続配列(コンティグ)を得た。次に、コンティグの塩基配列を、初年度に作製したベネズエラ糞線虫感染幼虫のEST、*Caenorhabditis elegans*ゲノムやネズミ糞線虫のさまざまな発育段階のESTと比較した

幼虫移行症診断のための組換え抗原の作製と有用性の検討

ブタ回虫幼虫からクロンテック社のCreator SMARTシステムによりcDNAライブラリを作製し、ブタ回虫データベースと比較した。作製した組換え抗原の診断抗原としての適否を、幼虫移行症と診断され保管されていた患者血清を用いて検討した。

10. エキノコックスの嫌氣的呼吸鎖の生理機能の解明

条虫類に属するエキノコックスは同じく寄生蠕虫に属する線虫類の回虫と同様に腸管寄生虫であり、その生活環から考えて、低酸素の環境下に嫌氣的呼吸鎖を利用している可能性があるかと予想された。そこで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、研究の進んでいる回虫成虫ミトコンドリアとその性質を比較した。

11. 蠕虫の腸管感染排除機構の解明

好塩基球の濃縮は正常マウスあるいは、*Strongyloides venezuelensis*を感染させたマウスの脾臓から、T細胞とB細胞を除去することで、好塩基球を濃縮する。次に、これらの中から

Fc ϵ R1+cKit-細胞を選別濃縮することで好塩基球を得た。in vitro における Th2 細胞の誘導では、初めに好塩基球が MHC class II を細胞表面に発現することを FACS で、更に IL-4 を産生することを ELISA で検討した。次に、好塩基球が in vitro で Th2 細胞を誘導するか検討した。OVA 特異的ナイーブ CD4+ T 細胞を、抗原提示細胞と抗原(OVA 蛋白、OVA ペプチド、あるいは DNP-OVA/ 抗 DNP-IgE 複合体)で刺激する際、IL-4 非存在下(中立培養条件)あるいは存在下(Th2 細胞誘導条件)で培養し、Th2 細胞が誘導されるか検討した。in vivo における Th2 細胞の誘導では、微量の DNP-OVA/ 抗 DNP-IgE 複合体をナイーブなマウスに投与することで、マウスが有する内因性の好塩基球の作用で Th2 細胞が選択的に誘導されるか検討した。

12. 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、レイテ島の

Schistosomiasis Research Hospital を受診した、他覚的にはっきりした神経症状を示した日本住血吸虫症患者 270 名を対象とした。プラジカンテル治療(50~60 mg/kg/日、3分服)の後、定期的に神経症状をチェックするとともに、虫卵検査、血清免疫検査を行った。

また、カンボジアのクラチ省のメコン住血吸虫症浸淫地では、虫卵陽性者 32 人を対象として、3人の独立した検査者による超音波検査診断の一致率を、点数とパターンの面からみた。また、同じ対象者について、糞便中の虫卵排泄数と虫卵抗原に対する血清抗体価の関係についても調べた。

13. 住血吸虫症の血清診断キット開発・評価

抗原として有用であろうと推測された成虫体の tegument に存在する 22.6kDa タンパク成分(SJT226)の

レコンビナントタンパク(rSJT226)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。さらに当該タンパクのアミノ酸配列に基づいてペプチドライブラリーを作製し、特異的モノクローナル抗体(SJA111 mAb)、感染マウス血清、感染者血清および尿中抗体と反応する B-cell epitope を決定した。

14. 寄生蠕虫症(条虫症)の検査診断法開発

レコンビナント抗原を用いた抗トキシカラ抗体測定キットに絞り、抗原濃度等のキットの評価と改良を行った。更に検出感度の向上のために二次抗体の種類や濃度について検討した。また、依頼検査として送付されてくる裂頭条虫検体(n=27)、国立科学博物館(以下、科博)で保管されている標本(n=7)、さらに裂頭条虫症の流行地である南米チリで採取した標本

(n=65)計 99 サンプル(成虫、幼虫、虫卵;70~80%エタノール又はホルマリン固定標本)からゲノム DNA を抽出、PCR によって増幅された cox1 遺伝子の塩基配列に基づいて裂頭条虫を分子同定し、cox1 遺伝子の多型について検討した。

15. 食品媒介性吸虫症の検査診断法開発

日本海産と東シナ海産のサバからアニサキス虫体を摘出し、DNA を抽出した。次に、リボソーム DNA の ITS 領域を標的として PCR 増幅し、制限酵素 HinfI による RFLP 解析と塩基配列を行った。交雑種とされた虫体については、ミトコンドリア DNA の cox1 遺伝子を標的に上記を行った。更に、虫種鑑別に用いる PCR 法のためプライマーを設計・作製し、特異性を検討した。肺吸虫症診断キットの作成では、感染動物から成虫を回収し、常法に従い、ES 抗原を得、これを新型キットの作製に使用した。供試血清としては

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を確定した以下の検体を用いた。

16. 腸管寄生吸虫症の遺伝子診断法開発

本研究で用いた臨床検体はいずれも健康診断や人間ドックの糞便検査でメタゴニムス属吸虫の虫卵が証明されたものである。これらの検体からの寄生虫 DNA の抽出は常法に従った。実験感染材料はシラウオから回収されたメタゴニムス属メタセルカリア約 1,000 個を健常人ボランティア 1 名に経口感染させ、経時的に糞便を採取した。感染後 14 日目にプラジクアンテルの経口投与による駆虫を行い、感染を終了させた。上記実験感染で得られた糞便材料は、マルチプレックス PCR 法の検出感度に関する評価に用いるとともに、市販の糞便検体用精製カラムによる DNA 抽出法の最適化にも利用した。

（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機能解析と細胞分化の遺伝子発現調節の解明

初年度までの研究で発見された病原性に相関する遺伝子 ArfA2 を含め、ゲノム中の Arf の遺伝子解析と発現解析を行った。この解析により、ArfA2 だけが 8 種のアイソタイプのうち特異的に高病原株で発現が高かった。また、ArfA2 の野生型ならびに変異体の導入株を用いた研究により、ArfA2 が

リソソームの合成或は輸送に関与していることが明らかになった。更に、初年度作製された *E. histolytica*/*E. invadens* ハイブリッド発現解析用 DNA マイクロアレイを用いて、嚢子化過程の経時的発現プロファイリングを行い、感染に必須な栄養型から嚢子への分化に関わるの約 2000 の遺伝子群を、経時的に明らかにした。

2. 赤痢アメーバ症の感染防御機構の解明

本研究の目的は宿主が赤痢アメーバを認識するメカニズムを解明し、さらにはその認識が感染病態や防御に果たす役割を個体レベルで明らかにすることにある。昨年度までの研究より、赤痢アメーバ認識のシグナルが MyD88 依存性に伝達されることが明らかとなった。本年度は炎症性サイトカインの産生誘導能と病原性の関連が示された。すなわち、病原性 *Entamoeba histolytica* では IL-6、TNF- α といった炎症性サイトカインの産生が誘導されたが、非病原性アメーバ *E. dispar* では誘導されなかった。一方、*E. moshkovskii* でも炎症性サイトカインの産生が誘導され、*E. moshkovskii* にも PAMPs

(Pathogen Associated Molecular Patterns) が存在することが示唆された。*E. moshkovskii* 認識時の炎症性サイトカインの産生パターンは、IL-6 の産生が極端に低く TNF- α 優位のサイトカイン産生が認められるなど、*E. histolytica* 認識時とは異なり、*E. moshkovskii* における PAMPs の組成が *E. histolytica* とは明らかに異なることが示唆された。

3. 熱帯熱マラリア原虫の脂質代謝・輸送の分子機構の解明

マラリアの治療戦略につなげることを念頭に、臨床症状・病理の主因である赤血球期熱帯熱マラリア原虫の細胞増殖を支える脂質代謝の分子基

盤に関する研究を継続している。これまでに明らかにしてきた結果から、赤血球期原虫の増殖において、血清中脂肪酸のオレイン酸は欠くことのできない因子であると推定している。本研究では、ステアリン酸からオレイン酸を合成する脂肪酸不飽和化酵素であるステアリン酸-CoA 不飽和化酵素の赤血球期原虫の増殖における役割を明らかにするために、ノックアウト原虫の作成と解析を行った。ステアリン酸-CoA 不飽和化酵素候補遺伝子の破壊により、その転写産物が消失し、さらにはステアリン酸からオレイン酸を産生する活性が消失しているクローン株が2株確立できた。ノックアウトクローン株とそれらの親株について、複数の血清培地、ならびに無血清培地における細胞増殖レベルを比較したところ、増殖率に有意な差は見出されなかった。しかし、幾つかの培地において、96時間後のステージの分布に有意な差がみられた。これらは、ステアリン酸-CoA 不飽和化酵素遺伝子の破壊は、赤血球期熱帯熱マラリア原虫の細胞周期進行に何らかの影響を与えていることを示唆している。

4. 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、変異細胞は約2-3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。

一方、トキソプラズマ原虫は宿主細胞内での増殖の際、自身の周囲に宿主のミトコンドリアや ER をリクルートしてくるという現象が知られている。そこでこれらの細胞内における原虫の宿主ミトコンドリア・リクルート能を比較したところ、明らかに変異株内でのリクルートが増加していた。次にミトコンドリアや ER のリクルートメントの原因であると考えられているロプトリータンパク質に着目した。ロプトリータンパク質は原虫の細胞内への侵入に先立ち、独立した小胞 (evacuole) として原虫から宿主細胞に注入されることが知られている。原虫による evacuole の形成能を宿主の GPI の有無で比較したところ、GPI 生合成能欠失変異株では明らかに evacuole の形成が過剰になっていた。

5. アカントアメーバ角膜炎の疫学的研究

昨年度よりコンタクトレンズによる角膜感染症で入院加療を多なった患者に関して、コンタクトレンズ (CL) 関連角膜感染症全国調査を継続している。昨年度行った結果の統計解析により、CL 保存ケースの汚染調査では多くの検体が細菌とアカントアメーバに汚染されていた。CL 消毒に用いる MPS の各銘柄がアカントアメーバに対する十分な消毒効果を有していないことを確認した。アカントアメーバ角膜炎の原因となった株を全国9施設より集積し解析中である。

6. ジアルジア症迅速診断キット開発に向けた抗ジアルジアモノクロナル抗体の作製

国内でのジアルジア免疫診断キットの開発を目的として、抗ジアルジアモノクロナル抗体を作製した。シスト壁成分である 65 kD タンパクを抗原として、定法によりモノクロナル抗体産生の 3 クローン得た。間接蛍光抗体法を用いて、得られた抗体の染色性ならびに特異性を検討した。その結果、開発した抗体は市販抗体と同様の染色像を示し、各種原虫類への反応性からは *G.lambli*a 特異性が高いことを確認した。

7. 国内における腸管寄生虫症の疫学的研究

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。6 年と 12 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剤治療後、6 年後の 2008 年度にフォローアップ調査を行い、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た 1 施設では、再度長期間(1.5g/日, 20 日間)のメトロニダゾール単剤治療が実施されたが、2009 年度も 9 名の嚢子陽性者がみられ、メトロニダゾール単剤治療の困難さを示した。

霊長類寄生の赤痢アメーバ近似種 *Entamoeba nuttalli* の無菌培養化を試みた結果、生息地によってニホンザルから分離された *E. nuttalli* の多様性が明らかになった。培養が困難な *Entamoeba muris* の培養を 2 種細菌共棲下 (dixenic culture) により達成した。

8. 赤痢アメーバのメトロニダゾール耐性のトランスクリプトーム解析

アメーバ症の第一選択薬であるメ

タロニダゾールは発展途上国においても安価で処方しやすい薬であるため、その濫用から耐性株の出現が危惧される。さらに通常のメタロニダゾール処方 (2250mg/day, 10 日) で改善しにくい症例が散見されていることからメタロニダゾール耐性に対する危機感がある。実験室で作出したメタロニダゾール耐性赤痢アメーバのトランスクリプトーム解析を行い、耐性機構の解明を行った。統計解析の結果メタロニダゾール耐性株と親株では 1802 の遺伝子で有意な発現の違いが確認された。メタロニダゾールは Pyruvate Ferredoxin

Oxidoreductase (PFOR) により活性化され、赤痢アメーバの抗酸化作用を阻害することで毒性を発揮すると考えられている。発現に差のある遺伝子には抗酸化作用に関わる分子が存在したが PFOR は含まれていなかった。また、機能不明な遺伝子も多く含まれており、より詳細な検討が必要である。

9. 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

寄生蠕虫の病態解明のためには寄生虫側の因子としての発現遺伝子分析が必須であり、そのためには蠕虫ゲノム情報の取得が不可欠である。モデル寄生虫のひとつであるベネズエラ糞線虫のゲノムを新型シーケンサで解析し、総解読塩基数 1241 Mb から計 18,716 本のコンティグを得た。解読の redundancy は約 22 で、ベネズエラ糞線虫の推定ゲノムサイズは 55.4 Mb、GC 含量は 25.6% であることが明らかになった。また EST 配列との比較で、コンティグの塩基配列は真の塩基配列に十分に近いと考えられた。さらに、*C. elegans* ないし *ネズミ糞線虫* の遺伝子情報を基に、約 7,000 のベネズエラ糞線虫遺伝子候補が同定できた。ゲノム解析と同時に幼虫移行症の血清診断法のため組換え抗原を作製し、診断抗原としての有用性を

確認した。

10. エキノコックスの嫌氣的呼吸鎖の生理機能の解明

寄生原虫のミトコンドリア呼吸鎖は宿主哺乳類のミトコンドリアと大きく異なった性質を持ち、しかもその増殖に必要不可欠である事から特異的阻害剤による抗寄生虫薬の重要な標的となる。本研究はエキノコックスに特異的な代謝系を標的とする治療薬の開発を目的としている。本年度の研究の結果、蠕虫類に共通な嫌氣的呼吸鎖である NADH-フマル酸還元系がエキノコックスにおいてもその生存に必須である事を見出し、特異的な阻害効果を示すリード化合物を見出す可能性は高い。

11. 蠕虫の腸管感染排除機構の解明

細胞内寄生原虫が感染すると、これを排除するため Th1 型の免疫応答が誘導される。一方、蠕虫が感染すると、Th2 型の免疫応答が誘導される。Th1 細胞の誘導は樹状細胞の作用によるが、Th2 細胞の誘導にどの自然免疫系細胞がどの様に関与するのか不明であった。そこで、本研究では Th2 細胞を誘導する自然免疫系細胞の同定に努めた。その結果、好塩基球が、Th2 細胞の誘導および/または増加に寄与する抗原提示細胞であることを明らかにした。

12. 寄生蠕虫症の病態と検査診断結果に関する解析

フィリピンの日本住血吸虫浸淫地で、日本住血吸虫症と診断され、神経症状を示した 270 人を対象に、プラジカンテル治療後の経過観察を行った。麻痺や痙攣といった神経症状のうち約 90% は 3 ヶ月以内に消失し、抗痙攣剤など補助的な薬剤の使用も不要になった。従来、日本住血吸虫による神経症状の消失には、1 年以上かかる例も多いとされてきたが、プラジカ

ンテルの治療効果は速やかに現れることがわかった。また、同時に行われた腹部超音波検査の結果、神経症状の程度と、治療効果と腹部超音波検査結果の間には、特に相関はみられなかった。また、カンボジアのメコン住血吸虫浸淫地での調査では、マンソン住血吸虫やビルハルツ住血吸虫で試みられている超音波検査診断の点数化による診断基準の統一は、検査者による違いが大きくなり実際的ではないことがわかった。

13. 住血吸虫症の血清診断キット開発・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を目途として、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、診断に役立つ事が十分に期待できる程度の高い抗体価が検出された。尿中に検出された抗体の特徴としては、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。次に 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 (rSJT226) を SJ 症の免疫診断に導入した。rSJT226 は尿中の抗体検出に優れる事が判明した。治療後早急に陰性化する特徴を有していた。さらに当該分子中に特異的モノクローナル抗体の epitope としてアミノ酸配列 1 種、および感染マウス、感染者の血清、尿中抗体の epitope としてアミノ酸配列 4 種を特定した。SJT226 循環抗原を検出した結果、高率に循環抗原として存在することが判明した。これらの結果から rSJT226 および epitope ペプチドを用いた簡易診断法作出が期待できた。

14. 寄生蠕虫症(条虫症)の検査診断

法開発

幼虫移行症として重要なイヌ回虫症・ネコ回虫症（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）の遺伝子診断キット開発に関する研究を行った。前者については、前年度に引き続いて遺伝子組換え抗原を用いた診断キットを試作し、健康人血清とトキソカラ症患者血清を用いて評価を行った。後者については、cytochrome c oxidase subunit 1 (cox1) 遺伝子をターゲットとした遺伝子診断法を確立するために、国内外で収集、採取した裂頭条虫標本を用いて cox1 遺伝子の多型や種内変異を解析し、cox1 遺伝子の増幅に必要な種特異的プライマー設計の基礎的情報を得た。

15. 食品媒介性吸虫症の検査診断法開発

「生もの嗜好」という日本人が持つ伝統的な食習慣と密接に関連して、本邦では食品媒介寄生蠕虫症の発生数が多い。特に昨今では、魚介類を寿司・刺身で楽しむだけでなく、鶏肉・獣肉を（時に内臓も）加熱せずに生で賞味する人が増加していることに起因して、種々の食品媒介寄生蠕虫による感染事例の報告が目立つようになってきた。このような食品媒介寄生蠕虫の中から、年間に推定 2,000 人以上もの患者が発生するアニサキスと、年間の患者数は少ないが重篤な症状を惹起する肺吸虫を選び、昨年度に継続して、診断法の開発に関する検討を進めた。まずアニサキスについては、近年の国際的な研究成果の適用を鑑み、我が国で発生するアニサキス症の主要原因虫種を同胞種レベルで同定する為の手法の開発・改良に取り組んだ。また肺吸虫については、迅速で簡便な診断キットの作製に取り組み、併せてキットの精度管理に必要な試料

の収集に努めた。その結果、新たに構築したミスマッチ・プライマーを PCR に用いれば、Anisakis simplex の同胞種・交雑種が容易に鑑別できることを明らかにした。また肺吸虫に関しては、ES 抗原を用いた原因種別の診断キット（免疫クロマトグラフィー法）を作製し、本キットが感染の診断に有用であることを示した。

16. 腸管寄生吸虫症の遺伝子診断法開発

臨床検体 19 例についてマルチプレックス PCR 法による種同定を行った結果、宮田吸虫感染が 9 例、横川吸虫感染が 7 例、両種の混合感染例が 3 例であった。

実験感染 14 日間の検出感度は、従来法によって得た DNA 溶液を用いた場合には感染全期間を通じて 40% であった（プリパテント期 14%、パテント期 57%）。そこで、検体加熱温度の上昇、最終溶出液の濃縮、PCR 反応液への BSA 添加等により DNA 抽出法の改良と検出系の至適化を試みたところ、検出感度は 60% まで向上させることができた（プリパテント期 43%、パテント期 71%）。

D. 考察

NTD の克服のためには様々な障壁が存在する。第一に、原虫・蠕虫症での全数把握等サーベイランスが存在しないこと。第二に、そのために不可欠な原虫・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整備であることである。これらの目的を達成するためには原因寄生虫症の病原・寄生・感染防御機構の解明等基盤的研究が不可欠であることはいまでもない。

次年度の研究は、ほぼ当初の研究計画に従って進められ、十分な発展を見せた。特に、赤痢アメーバのトランスクリプトーム解析、糞線虫のゲノム解析に代表されるように、初年度に整

備を終えた研究方法基盤にのった研究展開において、特段の進展を示した。また、感染防御の基盤研究でも、蠕虫感染における Th2 型の免疫応答において Th2 細胞を誘導分化し、抗原提示する細胞が好塩基球であることを明らかにするなど、顕著な研究成果を達成した。それ以外の基盤研究項目に関しても、次年度以降追加された研究項目を含め、順調に成果を生み始めており、最終年度以降に向けて発展が期待できる。また原虫症・蠕虫症診断システムの作成も順調に進み、トキソカラ症、肺吸虫症に関しては、具体的な試作キットの作成もなされた。上記の通り、研究領域によって若干の進展の早遅があるため、最終年度には適切な調整を行うことを計画している

初～2年度の成果を受けて、最終年度は以下のことを計画している。(1) 赤痢アメーバの病原遺伝子の機能を証明。薬剤耐性をトランスクリプトーム解析で解明；(2) 病原性・非病原性赤痢アメーバの PAMPs の同定と、その免疫応答、病態形成に果たす役割の解明；(3) 赤痢アメーバ・アカントアメーバの発生動向調査、分離株の確保、型別・生物学的性状分析の継続；(4) 熱帯熱マラリア原虫の脂肪酸不飽和化反応の赤血球サイクルにおける役割の解明；(5) トキソプラズマの感染における宿主 GPI の役割の解明、トキソプラズマ感染耐性変異細胞の樹立；(6) 同定されたベネズエラ糞線虫・ブタ回虫遺伝子の機能解析、診断抗原としての有用性の検討；(7) 好塩基球の機能を制御することで、線虫感染に対する防御機能を変化出来るかを検討；(8) エキノコックス NADH-フマル酸還元系の阻害剤スクリーニング、宿主哺乳類との相違点を解明；(9) ジアルジア症・イヌ回虫症等幼虫移行症・肺吸虫症・アニサキス症の血清診断キットの評価。住血吸虫症の検査診断法マニュアル作成と、人工抗原・特異単抗体による住血吸虫症キッ

トの作成・検証；(10) 裂頭条虫・アニサキス・異型・横川吸虫の multiplex PCR 鑑別法の対応種数・精度・確度の向上；(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。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

2年度の研究は、研究計画に従って進められ、予定通り成果を蓄積した。本研究計画の遂行により、(1) 顧みられない原虫症・寄生虫症の検査診断キットの開発・普及・供給体制の構築；(2) 検査・診断基準のガイドラインの作成；(3) 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；(4) 寄生虫症の感染・寄生機構、免疫に関する幅広い知的基盤の整備；(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、本研究班の当初の目的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

- Hussain, S., Ali, V., Jeelani, G., and Nozaki, T. (2009) Isoform-dependent feedback regulation of serine O-acetyltransferase isoenzymes involved in L-cysteine biosynthesis of *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 163, 39-47.
- Nakada-Tsukui, K., Okada, H., Mitra, B. N., and Nozaki, T. (2009) Phosphatidylinositol-phosphat

- es 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.
- Sato, D. and Nozaki, T. (2009) Methionine gamma-lyase: the unique reaction mechanism, physiological roles, and therapeutic applications against infectious diseases and cancers. *IUBMB Life*, 61, 1019-1028.
- Mi-ichi, F., Yousuf, M. A., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. (2009) Mitosomes in *Entamoeba histolytica* contain a sulfate activation pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 106, 21731-21736.
- Sato, D., Kobayashi, S., Yasui, H., Shibata, N., Toru, T., Yamamoto, M., Tokoro, G., Ali, V., Soga, T., Takeuchi, T., Suematsu, M., and Nozaki, T. (2010) Cytotoxic effect of amide derivatives of trifluoromethionine to the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 35, 56-61.
- Escueta-de Cadiz, A., Kobayashi, S., Takeuchi, T., Tachibana, H., and Nozaki, T. (2010) Identification of an avirulent *Entamoeba histolytica* strain with unique tRNA-linked short tandem repeat markers. *Parasitol. Int.* 59, 75-81.
- Maralikova, B., Ali, V., Nakada-Tsukui, K., Nozaki, T., van der Giezen, M., Henze, K., and Tovar, J. (2010) Bacterial-type oxygen detoxification and iron-sulphur cluster assembly in amoebal relict mitochondria. *Cell. Microbiol.* 12, 331-342.
- Husain, A., Jeelani, G., Sato, D., Ali, V., and Nozaki, T. (2010) Characterization of two isotypes of L-threonine dehydratase from *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 170, 100-104.
- 津久井久美子、野崎智義 (2009) 腸管寄生性原虫の小胞輸送—病原機構における役割 *実験医学* 27, 1548-1556.
- Chung Chau Hon, Kumiko Nakada-Tsukui, Tomoyoshi Nozaki and Nancy Guillén (2010) Dissecting the Actin Cytoskeleton of *Entamoeba histolytica* from a Genomic Perspective. In "Anaerobic Parasitic Protozoa: Genomics and Molecular Biology" Edited by C. Graham Clark, Patricia J. Johnson and Rodney D. Adam. Caister Academic Press, ISBN: 978-1-904455-61-5, March 2010.
- Buss, S.N., Hamano, S., Vidrich, A., Evans, C., Zhang, Y., Crasta, O.R., Sobral, B.W., Gilchrist, C.A., Petri, W.A. Jr. : Members of the *Entamoeba histolytica* transmembrane kinase family play non-redundant roles in growth and phagocytosis. *Int J Parasitol.* 2010.
- Watanabe, K., Kishihara, K., Hamano, S., Koga, M., Nomoto, K., Tada, I.: *Strongyloides ratti*: implication of mast cell-mediated expulsion through FcεRI-independent

- mechanisms. *Parasite*. 2009; 16(3): 209-214.
- Tetsutani, K., Ishiwata, K., Ishida, H., Tu, L., Torii, M., Hamano, S., Himeno, K., Hisaeda, H. : Concurrent infection with *Heligmosomoides polygyrus* suppresses anti-*Plasmodium yoelii* protection partially by induction of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) Treg in mice. *Eur J Immunol*. 2009; 39(10): 2822-2830.
- Hamano, S. and William A. Petri Jr.: Chapter 209: Amoebiasis in "Feigin, Cherry, Demmler, Kaplan: Textbook of Pediatric Infectious Disease, 6th edition" Elsevier, London, in press.
- 吉田裕樹・濱野真二郎：原虫感染とIL-12 サイトカインファミリー、蛋白質核酸酵素、2009; 54(8):1059-1065
- 小林隆志・川澄みゆり・濱野真二郎：感染症制御における制御性T細胞、アレルギー・免疫、2009; 16(5): 708-714.
- Hirakawa, Y., Nagamune, K., and Ishida, K. "Protein targeting into secondary plastids of chlorarachniophytes." *PNAS* 2009, 106, 12820-5
- 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 2009, 54: 1047-1052
- 青沼宏佳、田原美智留、永宗喜三郎 "トキソプラズマ、増殖の仕組み." 医事新報 in press
- Araki-Sasaki K, Inoue Y et al. *Candida albicans* keratitis modified by steroid application. *Clinical Ophthalmology* 3, 1-3, 2009
- Miyanaga M, Inoue Y et al. Changes in drug susceptibility and the quinolone-resistance determining region of *Staphylococcus epidermidis* after administration of fluoroquinolones. *J Cataract Refract Surg* 35, 1970-1978, 2009
- 池田欣史、井上幸次ほか. 鳥取大学における若年者の角膜感染症の現状. あたらしい眼科 26, 815-819, 2009
- 稲田耕大、井上幸次ほか. コリネバクテリウムが起炎菌と考えられた感染性角膜炎の1例. あたらしい眼科, 26, 1105-1107, 2009
- 佐伯有祐、井上幸次ほか. In vitro 薬剤感受性検査によるトスフロキサシン単剤投与有効性の検証. あたらしい眼科, 26, 1393-1399, 2009
- 井上幸次. コンタクトレンズ関連角膜感染症の診断と治療. 日本の眼科, 80, 687-691, 2009
- 井上幸次. 「感染性角膜炎診療ガイドライン」のポイントと補足. あたらしい眼科, 26, 899-904, 2009
- 井上幸次. 最近の感染性角膜炎の日本での動向は? あたらしい眼科, 26 臨増, 51-52, 2009
- 井上幸次. ソフトコンタクトレンズ用消毒剤のアカントアメーバに対する消毒性能—使用実態調査も踏まえて—. 独立行政法人 国民生活センター, 平成 21 年 12 月 16 日
- 井上幸次. 感染性角膜炎サーベイランス (眼感染症学会) 大橋裕一編 眼感染症の謎を解く, 文光堂, 東京, 2009, 111
- Kobayashi S, Suzuki J, Takeuchi T. 2009. Establishment of a continuous system for *Entamoeba muris* and analysis

- of the small subunit rRNA gene. *Parasite*, 16, 135-139.
- Tachibana H, Yanagi T, Akatsuka A, Kobayashi S, Kanbara H, Tsutsumi V. (2009) Isolation and characterization of a potentially virulent species *Entamoeba nuttalli* from captive Japanese macaques. *Parasitology*, 136, 1169-1177.
- Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T. Involvement of serine proteases in the excystation and metacystic development of *Entamoeba invadens*. *Parasitol Res*, 105, 977-987.
- 小林正規. 赤痢アメーバ. 日本臨床 (増刊号), 広範囲血液・尿化学検査, 免疫学的検査(3) —その数値をどう読むか—, 2010, 印刷中.
- 丸山治彦 (2009) 胆道寄生虫症 (内科学書改訂第7版 vol.4 消化管・腹膜疾患・肝・胆道・膵疾患. p.334-335.) 中山書店 (東京)
- 丸山治彦 (2010) 鉤虫症 (十二指腸虫症) (今日の治療指針 2010、山口徹、北原光夫、福井次矢編)、pp.214-215、医学書院 (東京)
- Senba Y, Tsuda K, Maruyama H, Kurokawa I, Mizutani H, Taniguchi Y. (2009) Case of creeping disease treated with ivermectin. *J Dermatol*. 36: 86-89.
- Enko K, Tada T, Ohgo KO, Nagase S, Nakamura K, Ohta K, Ichiba S, Ujike Y, Nawa Y, Maruyama H, Ohe T, Kusano KF. Fulminant eosinophilic myocarditis associated with visceral larva migrans caused by *Toxocara canis* infection. *Circ J*. 73: 1344-1348.
- 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
- Morales, J., Mogi, T., Mineki, S., Takashima, E., Mineki, R., Hirawake, H., Sakamoto, K., Ōmura, S. and Kita, K. (2009) Novel Mitochondrial Complex II

- Isolated from *Trypanosoma cruzi* is Composed of Twelve Peptides Including a Heterodimeric Ip Subunit. *J. Biol. Chem.* 284, 7255-7263
- Osanai, A., Harada, S., Sakamoto, K., Shimizu, H., Inaoka, D. K., and Kita, K. (2009) Crystallization of mitochondrial rhodoquinol-fumarate reductase from the parasitic nematode *Ascaris suum* with specific inhibitor, flutolanil. *Acta Crystallographica*, F65, 941-944
- Mogi, T. and Kita, K. (2009) Identification of mitochondrial Complex II subunits SDH3 and SDH4 and ATP synthase subunits a and b in *Plasmodium* spp. *Mitochondrion*, 9, 443-453
- Matoba, K., Nara, T., Aoki, T., Honma, T., Tanaka, A., Inoue, M., Matsuoka, S., Inaoka, D.K., Kita, K. and Harada, S. (2009) Crystallization and preliminary X-ray analysis of aspartate transcarbamoylase from the parasitic protist *Trypanosoma cruzi*. *Acta Crystallographica*, F65, 933-936
- Maréchal, A., Kido, Y., Kita, K., Moore, A. and Rich, P. (2009) Three redox states of *Trypanosoma brucei* alternative oxidase identified by infrared spectroscopy and electrochemistry. *J. Biol. Chem.* 284, 31827-31833
- Sasaki, N., Hirai, M., Maeda, K., Yui, R., Itoh, K., Namiki, S., Morita, T., Hata, M., Murakami-Murofushi, K., Matsuoka, H., Kita, K., Sato, S., (2009) The *Plasmodium* HU homolog, which binds the plastid DNA sequence-independent manner, is essential for the parasite's survival. *FEBS Lett.* 583, 1446-1450
- Kido, Y., Shiba, T., Inaoka, D. K., Sakamoto, K., Nara, K., Aoki, T., Honma, T., Tanaka, A., Inoue, M., Matsuoka, S., Moore, A., Harada, S. and Kita, K. (2010) Crystallization and preliminary crystallographic analysis of cyanide-insensitive alternative oxidase from *Trypanosoma brucei brucei*. *Acta Crystallographica* F66, 275-278
- Balogun, O. E., Inaoka, D. K., Kido, Y., Shiba, T., Nara, T., Aoki, T., Honma, T., Tanaka, A., Inoue, M., Matsuoka, S., Michels, P. AM., Harada, S. and Kita, K. (2010) Overproduction, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of *Trypanosoma brucei gambiense* glycerol kinase. *Acta Crystallographica* F66, 304-308
- Kido, Y., Sakamoto, K., Nakamura, K., Harada, M., Suzuki, T., Yabu, Y., Saimoto, H., Yamakura, F., Ohmori, D., Moore, A., Harada, S. and Kita, K. (2010) Purification and kinetic characterization of recombinant alternative oxidase from *Trypanosoma brucei brucei*. *Biochim Biophys. Acta (Bioenergetics)* 1797, 443-450
- Paranagama, M. P., Sakamoto, K., Amino, H., Awano, M., Miyoshi,

- H. and Kita, K. (2010) Contribution of the FAD and quinone binding sites to the production of reactive oxygen species (ROS) from *Ascaris suum* mitochondrial complex II. *Mitochondrion*, 10, 158-165
- 中西憲司, 山本一彦 編著. アレルギー疾患の免疫機構. 実験医学 (増刊) 東京:羊土社, 2009
- Imamura M, Tsutsui H, Yasuda K, Uchiyama R, Yumikura-Futatsugi S, Mitani K, Hayashi S, Akira S, Taniguchi S, Van Rooijen N, Tschopp J, Yamamoto T, Fujimoto J, Nakanishi K. Contribution of TIR domain-containing adapter inducing IFN-beta-mediated IL-18 release to LPS-induced liver injury in mice. *J Hepatol*; 51:333-341, 2009
- Yoshimoto T, Yasuda K, Tanaka H, Nakahira M, Imai Y, Fujimori Y, Nakanishi K. Basophils contribute to TH2-IgE responses in vivo via IL-4 production and presentation of peptide-MHC class II complexes to CD4+ T cells. *Nat Immunol*; 10:706-712, 2009
- Harada M, Obara K, Hirota T, Yoshimoto T, Hitomi Y, Sakashita M, Doi S, Miyatake A, Fujita K, Enomoto T, Taniguchi M, Higashi N, Fukutomi Y, Nakanishi K, Nakamura Y, Tamari M. A functional polymorphism in IL-18 is associated with severity of bronchial asthma. *Am J Respir Crit Care Med*; 180:1048-1055, 2009
- 中西憲司. 新しいアレルギーの概念. アレルギー疾患の免疫機構. 実験医学 (増刊号) 27:12-17 (3208-3213), 2009.
- 松井聖, 佐野統, 中西憲司. IL-18. 炎症と免疫 17:75-82, 2009.
- 善本知広, 中西憲司. 腸管寄生虫感染と宿主応答. 感染現象. 蛋白質・核酸・酵素 (増刊号) 54:1066-1072. 2009.
- 安田好文, 善本知広, 中西憲司. 寄生虫感染時のサイトカイン動態. 感染症. 225-231, 実験医学 (増刊号) 27:225-231(1665-1671), 2009.
- 安田好文, 中西憲司. アレルギーとアジュバント. アレルギー疾患の免疫機構. 実験医学 (増刊号) 27:94-100(3290-3296), 2009
- 安倍正史, 白倉哲郎, 中村文規, 木村聡, 関 忠之, 仲村美佐子, 福富裕之, 朝日博子, 八木田健司, 塩川 章, 病理解剖用遺体に認められた原虫について. *Clinical Parasitol.* 19, 49-54, 2008.
- Asahi, H.: *Plasmodium falciparum*: Chemically defined medium for continuous intraerythrocytic growth using lipids and recombinant albumin. *Exp. Parasitol.* 121, 22-28, 2009.
- Izumiyama, S., Omura, M., Takasaki, T., Ohmae, H. and Asahi, H.: *Plasmodium falciparum*: Development and validation of a measure of intraerythrocytic growth using SYBR Green I in a flow cytometer. *Exp. Parasitol.* 121, 144-150, 2009.
- Yamasaki H, Kuramochi T. (2009) A case of *Diphyllobothrium nihonkaiense* infection possibly linked to salmon consumption in New Zealand. *Parasitology Research* 105: 583-586.
- Mercado R, Yamasaki H, Kato M, Muñoz V, Sagua H, Torres P,

- Castillo D. (2010) Molecular identification of the *Diphyllobothrium* species causing diphyllobothriasis in Chilean patients. *Parasitology Research* (印刷中).
- Shirakawa K, Yamasaki H, Ito A, Miyajima H. (2010) Cerebral sparganosis: The wandering lesion. *Neurology* 74:180.
- 山崎 浩, 川中正憲, 荒川京子, 森有加, 杉山 広, 森嶋康之, Ruben Mercado, 加藤基恵 (2010) 南米チリより DNA 鑑別依頼のあった裂頭条虫について. *Clinical Parasitology* 20: 27-29.
- 小出照子, 山崎 浩, 渡辺伸元, 木許泉, 河邊太加志 (2010) 虫体の遺伝子解析により診断された日本海裂頭条虫症の兄妹例. *日本小児科学会雑誌* 114: (印刷中).
- 姜 朱美, 住田菜穂子, 福田 均, 杉山 広, 山崎 浩 (2009) 皮膚二核顎口虫症. *皮膚科診療* 31:977-980.
- 梅原 梓里, 荒木 潤, 川上 泰, 内田 明彦, 杉山 広. アニサキスの分類学的解析: 人への感染源の特定に向けたサバ由来虫体の検索. *獣医寄生虫学会誌*, 8:52, 2009.
- Sugiyama, H., Umehara, A., Morishima, Y., Yamasaki, H. and Kawanaka, M. Detection of *Paragonimus metacercariae* in Japanese freshwater crabs, *Geothelphusa dehaani*, bought at retail fish markets in Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 62: 324-325, 2009.
- 杉山 広. 食習慣を背景に発生する我が国の肺吸虫症. *Clinical Parasitology* (臨床寄生虫学会誌) 20: 9-11, 2009.
- 寺島 剛, 竹内英二, 西尾久明, 石川将史, 山本徳栄, 荒木 潤, 杉山 広. 肺切除で宮崎肺吸虫の虫嚢内寄生を認めた 1 例. *Clinical Parasitology* (臨床寄生虫学会誌) 20: 43-45, 2009.
- 杉山 広. 食品媒介寄生虫による食中毒. *日本食品微生物学雑誌*, 27: 印刷中, 2010.

2. 学会発表

野崎智義 赤痢アメーバ症新規創薬 第 147 回日本獣医学会学術集会 宇都宮、April 2-4, 2009. (シンポジウム招待講演)

野崎智義 寄生虫と感染症 知の市場 早稲田大学、東京、June 30, 2009

古川敦、津久井久美子、野崎智義 システインプロテアーゼ輸送体の機能解析 第 17 回分子寄生虫ワークショップ 草津 August 6-9, 2009.

Jeelani, G., Husain, A., Sato, D., Suematsu, M., Ali, V., and Nozaki, T. Biochemical and physiological function of a novel reductase from the microaerophilic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji, September 8-11, 2009.

Husain, A., Jeelani, G., Sato, D., Mi-ichi, F., Soga, T., Suematsu, M., Ali, V., and Nozaki, T. MEtabolomic and transcriptomic analysis of sulfur-containing amino acid metabolism in enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji, September 8-11, 2009.

Furukawa, A., Nakada-Tsukui, K., Yamada, Y., and Nozaki, T.