

201028016B

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20年度～平成22年度 総合研究報告書

研究代表者 野 崎 智 義

(国立感染症研究所)

平成23 (2011) 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20年度～平成22年度 総合研究報告書

研究代表者 野 崎 智 義  
(国立感染症研究所)

平成23 (2011) 年 3 月

## 目次

I. 総合研究報告	
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. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	43
III. 研究成果の刊行物・別刷 -----	67

# I. 総合研究報告書

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）  
総合研究報告書

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 顧みられない病気(Neglected Tropical Diseases, NTD)、特に寄生原虫・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が重要である。同時に、薬剤・ワクチン等の予防・治療法の開発が不可欠である。また、診断等のマニュアルの標準化が重要である。以上の目的を可能とするには、感染症の原因生物に関する生物学、病理学、病因学の解明と理解が重要であることは言うまでもない。本研究では大きく3つのグループにより、特に国内で問題となるNTDへの対策に資する研究を総合的に展開した。第1グループでは、国内の腸管原虫症や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1グループでは、原虫症としては、赤痢アメーバ、トキソプラズマ、マラリア原虫に関する病原機構、感染防御機構、薬剤耐性機構などの解明を、蠕虫症としては、糞線虫、エキノコックス等の病原性・分化・代謝機構の解明を行った。第3のグループでは、診断法・鑑別法の開発を行い、原虫症として赤痢アメーバ、ジアルジア症の鑑別法、簡便診断法の開発と応用を展開した。また、蠕虫症としては、住血吸虫・肺吸虫・異型吸虫等の吸虫症、トキソカラ症、アニサキス症など線虫症、裂頭条虫症等の診断法の確立を行った。いずれの研究グループにおいても、分担研究者が各々の分野において優れた成果を挙げた。一連の研究成果は、NTDの病原機構・感染防御機構・薬剤耐性の解明、並びに、検査診断法・サーベイランス体制の構築などに、顕著な貢献を果たしたと考えられる。

研究分担者

濱野 真二郎・長崎大学・教授  
小林 正規・慶応大学・助教  
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  
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  
千種 雄一・獨協医大・教授  
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

顧みられない病気(Neglected Tropical Diseases, NTD)、特に寄生原虫・蠕虫症のコントロールには、サーベイランス、診断法の開発・確立、薬剤・ワクチン等予防・治療法の開発、並びに、対策マニュアルの策定が重要である。更に、以上の目的を効率よく実現するには、感染症の原因病原体の病原機構やその生物学を深く理解することが不可欠である。本研究は、顧みられない原虫・寄生虫症NTDのうち、代表的な疾患を広く対象として、日本の研究基盤のボトムアップを図ることを目的の一つとした。また、研究者の多くは助手、准教授クラスの若い研究者であり、次世代の研究者・グループの育成を目的とした。

本研究班は、大きく3つの研究グループに分かれて活動を行った。同時に、臨床検体のやり取り、得られたデータのフィード

バック等、分担研究者間での連携を深くすることを心がけた。第1の研究グループでは、分子疫学手法を開発し、高度分解能をもった腸管原虫症（赤痢アメーバ症）とアカントアメーバ角膜炎のモニタリングを実施した。第2のグループでは、病原体の病原機構と感染防御機構に関する分子基盤の解明を目指した。このグループでは、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、エキノコックスを対象として基礎研究を展開した。第3グループでは、ジアルジア症、アカントアメーバ症、住血吸虫・肺吸虫・異型吸虫等吸虫、幼虫移行症等線虫症、条虫症の診断を確立し、診断法の標準化を図った。或は、これらの診断法の確立を目指した研究を展開した。

## 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

病原性遺伝子を特定するために、病原性の異なる株を用いてDNAマイクロアレイを用いた発現解析を行った。また、嚢子化を制御する遺伝子を解明するため、嚢子化過程の経時的発現プロファイリング解析を行った。同時に、*Entamoeba invadens* の物質転換系の開発を行った。

### 2. 赤痢アメーバ症の感染防御機構の解明

3種のヒト寄生性アメーバ(*E. histolytica*、*E. moshkovskii*、*E. dispar*) 栄養型をマウス腹腔マクロファージと共培養し、生産される炎症性サイトカインを測定した。近交系マウス(CBA/J, C3H/HeN, C3H/HeJ, C57BL/6, BALB/c)の虫垂に上記原虫栄養体を接種し、定着能、下痢原性、感染動態、ならびに赤痢アメーバ特異的IgG, IgAの動態を測定・観察した。また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行った。

### 3. 国内における腸管寄生虫症の疫学的研究

施設内腸管原虫感染の疫学調査を行った。過去のメトロニダゾール治療で完治に至ら

なかった、これまでフォローアップを行ってきた知的障害者施設3つに関して、継続的に糞便検査を行った。更に有症者から赤痢アメーバ株を分離し、無菌化した。

### 4. 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Des9の熱帯熱マラリア原虫ノックアウトを作出した。また、この遺伝子座(PFE0555w)と高いシクエンスを示す*P. berghei* PBANKA\_111070 遺伝子座のノックアウトクローン株(PbDes9 KO)を取得した。更に、感染マウス内での赤内型の増殖、感染マウスを吸血させた感染ハマダラ蚊内でのオーシストの形成能、感染ハマダラ蚊から調製したスポロゾイトのマウスへの感染能について、親株と欠損株で比較した。

### 5. 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、さらに原虫によるミトコンドリアのリクルート能、およびevacuole形成能を詳細に検討した。

### 6. 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と連携し、全国9施設を拠点として、アカントアメーバ角膜炎を分離・収集し、分子疫学的解析を行った。分離株はクローニング後、18SrRNA遺伝子のシークエンス解析を行い、BLAST検索による既存アメーバとの相同性を調べ、Tタイピングによる分類を行った。アカントアメーバクローン株の研究資源化を目的に、無菌栄養液体培地(PYGCあるいはCGVS)での無菌培養株樹立を行った。全国6施設において感染性角膜炎患者より供与されたCLケースと環境サンプルについて分子疫学的解析を行った。

## 7. 寄生原虫症の検査診断法開発

カモシカ由来 *Giardia lamblia* 株を用いて、脱シスト後、遠心上清を用いて常法によりモノクロー抗体を作成した。精製モノクロー抗体 (4B5, 4G1 ならびに 3H4-7) を蛍光色素 Alexa488 (Invitrogen) で標識後、カラム精製により標識抗体を調整した。フローサイトメトリー、抗原捕捉 ELISA 系の作成、抗体の固相化、ELISA は常法に従った。検査試料はヒト或はジアルジア由来のシストを用いた。

## 8. 赤痢アメーバの薬剤耐性機構の解明

赤痢アメーバの標準株である HM1:cl6 を用いて、0.5 $\mu$ M メタロニダゾール存在下培養し、徐々に薬剤濃度を上げ、IC50=8  $\mu$ M のメタロニダゾール耐性株を獲得した。続いて親株、薬剤存在下で培養した耐性株 (耐性株+)、7日間薬剤非存在下で培養した耐性株 (耐性株-)、の3種類のサンプルについてトランスクリプトーム解析を行った。更に、高濃度のメタロニダゾール耐性株の樹立するプロトコルを至適化した。

## 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虫卵、感染幼虫、体内移行期幼虫 (肺から回収) および成虫は常法に従い回収した。上記検体から cDNA を調製し、GS-FLX Titanium によって塩基配列を決定、アセンブル後、他種線虫に対して比較した。発現量の違いは、各 isotig にマップされるリード数によって推測した。

ブタ回虫組換え抗原を作製した。ブタ回虫の虫卵をウサギに投与し、感染 5-6 日後にウサギ肺から幼虫を回収し、cDNA ライブラリを作製した。成虫や虫卵では発現の報告がないものを診断用抗原の候補とした。もっとも有望な As16 を診断抗原に用いた。イヌ回虫の組換え抗原は、感染研より TES32 の供与を受けた。また、糞線虫に関しては L3Nie 抗原をベネズエラ糞線虫の感染幼虫ライブラリからクローニングして組換えタンパク質とし、幼虫移行症血清診断への応用した。

## 10. エキノコックス嫌氣的呼吸鎖の生理機能の解明と創薬

エキノコックス複合体の特徴を調べる目的でミトコンドリアより複合体 II の精製法を確立した。特に嫌氣的呼吸鎖を形成する NADH-フマル酸還元酵素系を中心に酵素学的解析を行った。更に、各サブユニットの N 末端解析および PCR を用いたホモロジープロービングから全てのサブユニットおよび複合体 II の生合成に関わるアセンブリーファクターの cDNA のクローニングを行なった。

## 11. 蠕虫の腸管感染排除機構の解明

好塩基球の濃縮は *Strongyloides venezuelensis* (Sv) 感染マウス脾臓から T, B 細胞を除去することで行った。好塩基球欠損マウスは正常マウスに抗 Fc $\epsilon$ R1 $\alpha$  抗体 (MAR-1) を投与し、好塩基球を除去し作成した。あるいは、好塩基球特異的 Diphtheria toxin (DT) receptor 発現マウス (Bas-TRECK) に DT を投与し、好塩基球を除去した。Sv 排虫実験では、Sv の 3 型幼虫を経皮感染させたマウスから糞便を連日採取した。Th2 型免疫応答誘導に対する好塩基球の影響は、感染 7 日目のマウスの腸間膜リンパ節細胞を採取し、抗 CD3/抗 CD28 抗体で刺激をして細胞内 IFN $\gamma$ /IL-4 を染色して FACS で調べた。Sv 感染前後の血清を経時的に採取し、血清中 IgE と mMCP-1 の値を測定した。

## 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での日本住血吸虫症の調査では、2006~2008 年の疫学調査で、腹部超音波検査で進んだ肝線維化を示した例を対象とし、日本住血吸虫の虫卵抗原による通常の ELISA 検査を行った。メコン住血吸虫症の調査では、2010 年 4~5 月にカンボジア、Kratie 省にて血清検査および糞便検査を実施した。免疫血清検査は 6 村落の小学校児童を検査対象とした。合計 645 人から採取した。メコン住血吸虫卵抗原を用いた SMP-ELISA をおこなった。また、2006 年から 2010 年にかけてラオスの Van

Viang 地域を旅行した 13 人のイスラエル人旅行者の保存血清も用いた。

### 13. 住血吸虫症の血清診断キットの評価

*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ツ住血吸虫症患者の検体より DNA を抽出し、PCR を実施した。

### 14. 住血吸虫症の血清診断キット開発・評価

成虫の 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。更に、日本住血吸虫症患者の尿中に検出される抗体のクラス、排出虫卵数、感染動態との相関を解析した。また、SJT226 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。決定した B-cell epitope を含む人工合成抗原を作製して、免疫診断法 (ELISA および ICT) に導入して有用性を確認した。

### 15. 寄生蠕虫症(条虫症)の検査診断法開発

トキソカラ抗原の B 細胞エピトープを決定し、2 領域をペプチド抗原とした。ブラジル人のトキソカラ症患者血清、宮崎大学医学部においてトキソカラ症、あるいはブタ回虫による幼虫移行症と診断された血清を用いた。マンソン弧虫 PBS 抽出抗原と精製されたパラミオシン (以下、PM 抗原) とシステインプロテアーゼ (以下、CP 抗原) を使用した。ICT キット作成に先立ち、マンソン弧虫症、顎口虫症血清を用いて 3 種類の抗原に対する反応性を ELISA で比較検討した。ELISA で種特異性が高いと判断さ

れた抗原については ICT キットを試作し、特異性を検討した。

条虫の *cox1*, rRNA 28S 遺伝子, ITS の塩基配列解析を行った。また、ホルマリン固定病理組織標本中に検出される寄生虫の鑑別法については、プライマー領域の設定など PCR 条件を詳細に検討し、虫体や病理組織標本など臨床検体からの鑑別を行った。

### 16. 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採取されたアニサキスを用いた。リボソーム DNA の ITS 領域を標的とした RFLP 解析と塩基配列解析を行った。交雑種とされた虫体については、*cox1* 遺伝子を標的に上記を行った。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、成虫からの ES 抗原を使用した。供試血清は感染研への依頼検査により診断を実施した検体で、原因虫種を確定した検体を用いた。肺吸虫 ES 抗原の調整は既存の方法に従った。キットの評価は供試血清を用いた反応の後、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、判定ラインの発色程度に応じて強陽性、陽性、弱陽性、陰性の 4 段階に分け、供試血清の反応を表現した。得られた成績を micro-ELISA で得た成績と比較した。

### 17. 腸管寄生吸虫症の遺伝子診断法開発

野生終宿主から横川吸虫、宮田吸虫、高橋吸虫を採取し、QIAamp DNA Stool Mini Kit を用いて DNA を抽出した。臨床検体は、一般の健康診断あるいは人間ドック受診時の検査においてメタゴニムス属吸虫卵陽性と判定された関東地方南部居住者に由来する糞便であった。0.5g 糞便からホルマリンエーテル法による再検査を行い、虫卵の含有状況を確認した。検体由来 DNA から、*cox1* 領域を標的としたマルチプレックス PCR 法による鑑別を行った。

(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

比較トランスクリプトーム解析により、病原性と相関する遺伝子群が特定された。そのうち小胞輸送に関与する *ArfA2* がリソソームの生成と病原性に相関していることが示された。ヘビアメーバ *Entamoeba invadens* の嚢子化モデルを用いて、この過程で制御される 2000 を超える遺伝子群が明らかとなった。同時に、嚢子化の時期特異的に転写される *Myb* 転写因子が特定された。*Lipofectamine* を用いた *E. invadens* の形質転換系を確立した。転写プロモーター、薬剤選択マーカーが選択された。

#### 2. 赤痢アメーバ症の感染防御機構の解明

赤痢アメーバを認識する宿主の機構を解明し、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解明した。ヒトに対する病原性が未確定の *E. moshkovskii* の pathogen molecular pattern (PAMPs) が病原性赤痢アメーバや非病原性 *E. dispar* と異なることが明らかとなった。また、*E. moshkovskii* は、病原性 *E. histolytica* と同様 CBA/J や C3H/HeN、C3H/HeJ マウスの腸管に定着できた。*E. histolytica* は中程度の炎症を惹起して慢性感染に移行したのに対して、*E. moshkovskii* は下痢・粘血便を引き起こすなど激しい炎症を惹起した後、2 週間で排除された。

#### 3. 国内における腸管寄生虫症の疫学的研究

知的障害者施設 3 カ所についてフォローアップ調査を行った結果、6-12 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が奏功していた。しかし、メトロニダゾール単剤治療後、6 年後の 2008 年度に 12% の利用者に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。

#### 4. 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 不飽和化酵素のノックアウト原虫の複数の血清培地、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。96 時間後のステージの分布に有意な差がみられた。

ネズミマラリア原虫のマウス赤内型の初期の増殖においては、KO 株と親株はほぼ同程度であったが、その後 KO の増殖に明らかかな遅延が観察された。ハマダラ蚊体内に形成されるオーシストの数、感染蚊唾液腺内の感染性スポロゾイトの数は、KO と親株との間で有意な差がなかった。感染ハマダラ蚊唾液腺内のスポロゾイトのマウス尾静脈注射では親株に比べて、KO では赤内型が観察されるマウスの頭数は著しく少なかった。以上、本遺伝子の重要性が顕著に表れるステージは、感染ハマダラ蚊の吸血によるマウスへの感染が成立する時期であることがわかった。

#### 5. トキソプラズマの細胞侵入機構の解明

GPI アンカー生合成能欠失変異 CHO 細胞(PIG-L および *Gaa1* 欠損株)の原虫への感受性を野生株と比較した。有意に感染後期の増殖に差が認められた。よって宿主の GPI アンカー又は GPI アンカー型蛋白質が、原虫の後期の増殖を阻害している可能性が示唆された。また、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。

ロプトリー蛋白質は、parasitophorous vacuole 膜 (PV 膜) の形成に関与することが知られており、原虫の宿主侵入の際に小

胞 (evacuole) として原虫から宿主に注入される。原虫による ROP1、2 及び 16 の evacuole 形成能を比較したところ、変異株で明らかに evacuole の形成が過剰になっていた。また、ROP1、2 及び 16 の過剰な evacuole の一部は、共局在していた。また、原虫のミトコンドリア・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。

#### 6. 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加療を行った患者に関して、全国調査を行った。アカントアメーバ角膜炎の分離株収集に基づくモニタリング調査を行い、近年のアメーバ角膜炎増加の要因を分子疫学的に解析した。起因アメーバはこれまで角膜炎に密接に関連することが知られる T4 という遺伝子タイプに分類された。1 株 T11 が確認されたが、角膜炎に関連する新たなタイプは確認されなかった。なお、T4 中のいくつかのシーケンスタイプのアメーバが全国的に分布する可能性が示された。アメーバ角膜炎増加の微生物学的要因としては、これまで環境中に生息しているアメーバの感染リスクが増加した可能性が想定された。またアメーバ汚染のもとになっているコンタクトレンズ保存液の細菌汚染についても検討し、分離・培養で検出されるよりはるかに多くの環境菌に汚染されていることが判明した。

#### 7. 寄生原虫症の検査診断法開発

ジアルジア分離株のシストを脱シストさせた後、遠心上清を用いて、常法によりモノクロー抗体を獲得し、得られた抗ジアルジアモノクローナル抗体の性能評価を行った。フローサイトメトリーによる糞便試料の反応性の解析からは、挟雑物と比較してシストに対する反応特異性の高さが示され、シストに対する免疫蛍光試薬としての有用性は市販製品と差がなかった。一方、糞便中のシスト壁抗原を検出することを目的とした ELISA 系の最適化に関しては、実際の糞便試料を用いた試験において、他の消化管原虫陽性試料ならびに陰性試料における低

い反応性からは ELISA 系の高い特異性が示された。以上今後のキット化が可能となった。

#### 8. 赤痢アメーバの薬剤耐性機構の解明

市場ではほぼ唯一の赤痢アメーバ・ジアルジアなどの治療薬であるメトロニダゾールに対する薬剤抵抗機構を明らかにするために、実験室で作出したメト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った。3 倍以上発現差のあった >80 遺伝子を抽出した中で、メトロニダゾールの活性化を行うことが報告された EhNO2 の発現が優位に減少していた。ピルビン酸フェレドキシン酸化還元酵素は変化していなかった。したがって、赤痢アメーバではこれまで他の原虫と異なるメトロニダゾール耐性機構が存在すると予想された。

#### 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

ヒトの線虫感染のモデルとしてネズミへのベネズエラ糞線虫の系を利用した。まず、ゲノムを新型シーケンサーで海賊師 1241Mb から系 18,716 本の contig を得た。重複度は 22 でゲノムサイズは 55.4Mb、GC は 25.6%であった。更に、幼虫のトランスクリプトームを新型シーケンサーで解析し、約 14,000 の isotig/contig を得た。そのうち、7,560 にアノテーションが付与され、1,591 については酵素活性等の機能が推定された。C. elegans タンパク質にヒットしたものは 10,569 個、統合線虫 EST データベースである NEMABASE4 には 11,367 個がヒットした。また、ブタ回虫およびイヌ回虫の組換えタンパク質を用いて患者血清との反応を調べ、今後の幼虫移行症の組換え診断システムの構築の準備とした。

#### 10. エキノコックス嫌氣的呼吸鎖の生理機能の解明と創薬

呼吸活性を維持したままでのミトコンドリア膜画分の精製法を確立し、エキノコックス感染動物から分離された囊虫から呼吸活性を確認した。更に、通常のカラムクロマトグラフィーを用いた分離法ではミトコ

ンドリア画分の量が極めて少なく、複合体 II を精製する事は困難であったため、High resolution Clear Native Electrophoresis (hrCNE)を用いた精製法を確立し、微量のタンパク質複合体を活性を保持したままの状態 で分離する事が可能となった。二次元に展開し、全てのサブユニットを分離して N 末端配列を決定した。

同時に、複合体 II を構成する Fp, Ip, CybL, CybS の 4 サブユニットとともに、細菌報告のあった複合体 II のアセンブリー因子 Succinate dehydrogenase assembly factor (SDHAF) 1, SDHAF2 のクローニングを終了し、配列を決定した。各サブユニットの N 末端のアミノ酸配列を決定した。

SDHAF1 は mitochondrial matrix protein 37 と融合していた。また 2 種の Ip アイソタイプが存在することが明らかになった。

#### 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。

好塩基球を欠損したマウスに、Sv を感染させた場合、排虫時期が野生型マウスに比べて著しく遅延した。このときの腸間膜リンパ節 T 細胞からのサイトカイン産生、血清中 IgE 産生、粘膜型肥満細胞の誘導には好塩基球の有無で変化は認められなかった。このことから、感染排除における好塩基球の重要性が改めて確認された。

#### 12. 寄生蠕虫症の病態と検査診断結果に関する解析

フィリピンで日本住血吸虫症と診断され、神経症状を示した患者を対象に、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であり、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。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、超音波検査診断の点数化による診断基準の統一は有効でないことがわかった。更に複数の感染浸淫地において継続的な感染率のモニタリングを行い、若干の変動を見た。

#### 13. 住血吸虫症の血清診断キットの評価

4 種の人体寄生住血吸虫症の 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。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 が検出であり、特に輸入症例の検査に有用であると考えられた。

#### 14. 住血吸虫症の血清診断キット開発・評価

日本住血吸虫(SJ)感染者の尿中には、診断への利用が期待できる高い抗体価が検出された。高い SJ 成虫(SWAP)および虫卵(SEA)IgG 抗体、低い抗 SEA IgA 抗体、中程度の抗 SWAP および抗 SEA IgM 抗体が特徴として挙げられた。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、診断に至適な抗原抗体の組み合わせ条件を選択することができた。

SJT226 分子内の B-cell epitope として、感染マウス、感染者の血清、尿中抗体を用いて 5 種を特定した。ペプチド配列等抗原構造の詳細は割愛する。決定した B-cell epitope を含む人工合成抗原を作製して、免疫診断法(ELISA および ICT)に導入した結果、同等あるいは優越な検出率及び特異性を確認した。

#### 15. 寄生蠕虫症(条虫症)の検査診断法開発 トキソプラズマからの簡易診断 ICT キット

トを作成し、改良を行った。外国人トキソカラ症患者血清を用いた検討では、改良型 ICT キットでは 74 % と高い検出率を示した。さらに、抗体価が低い眼部トキソカラ症血清 11 例中 7 例も検出可能となった。国内でトキソカラ症、あるいはブタ回虫幼虫移行症と診断された検体との反応に関しては、改良型 ICT では 84 % で陽性反応が示された。健常者血清の反応性を検討したところ、旧 ICT キットでは 50 検体中、非特異的反応は 1 例も検出されなかったが、改良型 ICT キットでは検出感度を上げたことによって、健常者血清 6 例で非特異的反応が認められた。更に、3 種の Manson 孤虫の PBS、CP 抗原を用いて ICT キットを試作し、反応性を評価したところ、Manson 孤虫症患者血清とはすべて陽性反応を示した。陰性対照としての健常者血清とは全く非特異的反応は認められなかった。国内外の医療機関から提供された多くの臨床検体、具体的には日本海裂頭条虫、広節裂頭条虫、アジア条虫、無鉤条虫、有鉤条虫、フィラリアの一種、肝毛細虫、Manson 孤虫、有棘顎口虫、有鉤囊虫について、cox1 遺伝子の塩基配列情報や個々の寄生虫の鑑別法を確立した。

#### 16. 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 人以上もの患者が発生するアニサキス、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、診断法の開発に関する検討を行った。アニサキスについては、保存状態が悪い臨床検体にも応用できる様なプライマーの設計・作製を終了した。また肺吸虫については、迅速で簡便な診断キットを作製し、併せてキットの精度管理に必要な試料の収集を行った。Anisakis I 型・II 型に属する少なくとも 4 種類のアニサキス虫体から特異的 PCR により分子同定ができることを明らかにした。また、ホルマリン固定が長期に及ぶ臨床検体を用いて種の同定を可能にした。肺吸虫に関しては、免疫クロマトグラフィー法に基づく迅速診断キットを、肺吸虫の ES 抗原を用いて作製し、本キットがインドなどの海外における肺吸虫症の血清診断に有用との可能性を

示した。

#### 17. 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 領域を標的的部位としたマルチプレックス PCR 法による分子同定法を確立した。更に、臨床検体の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 例同定された。実験感染 14 日間の検出感度は、検体加熱温度、最終溶出液の濃縮、DNA 抽出法の改良などの至適化により、60%まで向上した。

また、虫卵陽性検体を用いて感染虫種の鑑別を実施したところ、宮田吸虫が 50 例 (40.3%)、横川吸虫が 58 例 (46.8%)、両種混合が 16 例 (12.9%) と判定された。

#### D. 考察

国内外における顧みられない病気(NTD)、特に寄生虫症に関する対策の策定においては、様々な重要な障壁が存在する。まず、感染症の発生動向を把握するために重要な、全数把握等のサーベイランスシステムが、寄生虫症に関して十分に存在していないことが挙げられる。更に、サーベイランス・モニタリングを可能とする簡便で安価な原因寄生虫の鑑別法、寄生虫症の診断法が不十分であり、その整備が遅れていることが挙げられる。更に、上記の目的を達成するためには、寄生虫感染における寄生虫の病原機構や寄生・感染防御の分子機構を深く理解する基盤的研究能力の開発が極めて重要である。

本研究では、研究班を大きく 3 つの研究グループに分けて展開した。第 1 の研究グループでは、分子疫学手法を開発し、赤痢アメーバ株の高解像度の型別法を用いて、国内の臨床分離株の多様性が明らかにされた。更に、知的障害者に浸淫する株の遺伝型の特殊性と継続感染性が明らかにされた。また、国内で初めて、国内の拠点病院を結んだ眼感染症ネットワークを利用したアカントアメーバ角膜炎のモニタリングシステムが構築され、検体の集約・解析が十分に進められた。同時に、確立された分離株の

型別により臨床株の遺伝型が明らかにされた。これらの分子疫学常法は今後の国内での原虫症のサーベイランスにおいて極めて重要な基盤的情報となる。

第2の研究グループでは、病原体の病原機構と感染防御機構に関する分子基盤の解明を目指した。このグループでは、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、エキノコックスを対象として基礎研究を展開した。赤痢アメーバに関しては、赤痢アメーバの病原性を規定する候補遺伝子が特定されるとともに、細胞分化の青地図が明らかにされた。また、*Entamoeba* 種間での感染能、PAMPs、宿主の免疫応答惹起の能力などにおける顕著な相違が明らかにされた。更に、赤痢アメーバのメトロニダゾール耐性機構の一端が解明された。また、アピコプラスト科に属するトキソプラズマ・マラリア原虫の侵入・ハイジャック機構、脂肪酸代謝機構に関しても宿主 GPI アンカーの感染防御における重要性や、マラリア原虫の脂肪酸不飽和化過程の哺乳動物及び昆虫宿主における役割が明らかにされた。蠕虫の基礎研究に関しても、ベネズエラ糞線虫をモデルとしたゲノム・転写解析が十分な成果を生み、今後の線虫感染症病態の理解と診断法の開発に有用な複数の遺伝子が発見された。また、エキノコックスの創薬に関しても、標的酵素の生化学的性質、特に宿主との相違が示された。

第3グループでは、ジアルジア症、アカントアメーバ症、住血吸虫・肺吸虫・異型吸虫等吸虫、幼虫移行症等線虫症、条虫症の診断・型別法を確立し、診断法の標準化を図ることができた。ジアルジア症では、作成した単クローン抗体の性状解明が十分に進められ、今後の原虫簡易検出キットの作成が可能となった。また、トキソカラ症や顎口症に関しては、診断抗原を確定し、簡易 ICT キットを作成し、評価を終了することができた。幼虫移行症・食品媒介性蠕虫症の診断システム構築に向けて十分な進展を達成した。また、住血吸虫症の診断法もほぼ目処がたち、今後のキット化が可能となった。アニサキスや異型吸虫、条虫の

型別に関しても PCR 法を確立した。

以上、本研究はグループ 1-3 のいずれの研究内容に関しても、ほぼ当初の研究計画通りに進められ、各分担研究項目に関して予定通り十分な成果を収めることができた。

## E. 結論

本研究は、当初の研究計画にほぼ従って進められ、期待された成果を生んだ。本研究の成果は、今後、更に展開され、NTD の検査診断キットの開発・普及、検査・診断のガイドラインの作成、寄生虫症の発生動向の把握、寄生虫症の感染・寄生機構、免疫の知的基盤の整備、寄生虫研究グループ・研究者の育成などに貢献することが期待される。

## 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. Autophagy during proliferation and encystation in the protozoan parasite *Entamoeba invadens*. *Inf. Immun.* 76, 278-288, 2008.
- Sato, D., Yamagata, W., Harada, S., and Nozaki, T. 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, 2008.
- Sato, D., Karaki, T., Shimizu, A., Kamei, K., Harada, S., and Nozaki, T. Crystallization and preliminary X-ray analysis of L-methionine  $\gamma$ -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. Isoform-dependent feedback

- regulation of serine O-acetyltransferase isoenzymes involved in L-cysteine biosynthesis of *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 163, 39–47, 2008.
- Picazarri, K., Nakada-Tsukui, K., Sato, D., and Nozaki, T. Analysis of autophagy in the enteric protozoan parasite *Entamoeba*. *Methods Enzymol.* 451, 359-371, 2008.
- 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.* 9, 452-61, 2008.
- 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.* 79, 819-822, 2008.
- 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.* 180, 2496-2503, 2008.
- 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.* 9, 302-308, 2008.
- Hamano, S. and William A. Petri Jr. Amoebiasis in "International Encyclopedia of Public Health" Academic Press, San Diego, 2008, 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.* 1, 62-65, 2008
- 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. Seroprevalence of *Entamoeba histolytica* infection in female outpatients at a sexually transmitted disease sentinel clinic in Tokyo, Japan. *Jpn J Infect Dis* 61, 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 *Entamoeba histolytica*-like variant (JSK2004) in nonhuman primates by a multiplex polymerase chain reaction. *J Zoo Wildl Med* 39, 370-379, 2008.
- Kobayashi S., Suzuki J. and Takeuchi T. Establishment of a continuous system for *Entamoeba muris* and analysis of the small subunit rRNA gene. *Parasite*, 16, 2009, 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 インド旅行で感染した腸管寄生原虫症の2例、*Clinical Parasitology*, 19, 46-48, 2008.
- 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、医学書院、東京、1067-106, 2008.
- 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、132-138, 2008
- 丸山治彦 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）pp190-191 朝倉書店、2008
- 丸山治彦 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、2008.
- 丸山治彦 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, 2009
- 丸山治彦 肺吸虫症 (特集・寄生虫感染症) 化学療法の領域 24: 1343-1350, 2008.
- 丸山治彦 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, 2008.
- 丸山治彦 肺吸虫症 化学療法の領域 24: 1343-1350, 2008.
- 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 signaling. *J. Hepatol.*, 48, 237-245, 2008.
- Andoh, T., Kishi, H., Motoki, K., Nakanishi, K., Kuraishi, Y. and Muraguchi, A. Protective effect of IL-18 on Kainate- and IL-1 $\beta$ -induced cerebellar ataxia in mice. *J. Immunol.*, 180, 2322-2328, 2008.
- Kosaka, H., Yoshimoto, T., Fujimoto, J. and Nakanishi, K. Interferon- $\gamma$  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, 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. 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, 2008.
- Matsumoto J., Sakamoto K., Shinjyo N., Kido Y., Yamamoto N., Yagi K., Miyoshi H., Nonaka N., Katakura K., Kita K. and Oku Y. 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, 2008.
- Siregar J. E., Syafruddin D., Matsuoka H, Kita K., and Marzuki S. 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, 2008.
- Matsuzaki M., Kuroiwa H., Kuroiwa T., Kita K. and Nozaki H. A cryptic algal group unveiled: a plastid biosynthesis pathway in the oyster parasite *Perkinsus marinus*. *Mol. Biol. Evolution* 25, 1167-1179, 2008.
- Hirai M., Arai M., Mori T., Kawai S., Kita K., Kuroiwa T. and Matsuoka H. Male fertility of malaria parasites is determined by GCS1, a plant-like reproduction factor. *Current Biol.* 18, 607-613, 2008.
- Niikura M., Kamiya S., Kita K. and Kobayashi F. Coinfection with nonlethal murine malaria parasites suppresses pathogenesis caused by *Plasmodium berghei* NK65. *J. Immunol.* 180, 6877-6884, 2008.
- Inaoka, D. K., Sakamoto, K., Shimizu, H., Shiba, T., Kurisu, G., Nara, T., Aoki, T., Kita, K. and Harada, S. 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, 2008.
- 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 *Escherichia coli*. *Acta Crystallographica F* 64, 858-862, 2008
- Mogi, T., Matsushita, K., Murase, Y., Kawahara, Miyoshi, H., Ui, H., Shiomi, K., Ōmura, 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 *Plasmodium yoelii yoelii*. *J. Biochem.* 145, 229-237, 2009.
- Mogi, T., Ui H., Shiomi, K., Ōmura, S., Miyoshi, H. and 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. and Sakai, J. Fasting induced hypothermia and reduced energy production in mice lacking Acetyl-CoA Synthetase 2. *Cell Metabolism* 9, 191-202, 2009.
- Novel Mitochondrial Complex II Isolated from *Trypanosoma cruzi* is Composed of Twelve Peptides Including a Heterodimeric Ip Subunit. Morales, J., Mogi, T., Mineki, S., Takashima, E., Mineki, R., Hirawake, H., Sakamoto, K., Ōmura, S. and Kita, K. *J. Biol. Chem.* 284, 7255-7263, 2009.
- 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.* 57, 379-385, 2008.
- 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
- Hussain, S., Ali, V., Jeelani, G., and Nozaki, T. Isoform-dependent feedback regulation of serine O-acetyltransferase isoenzymes involved in L-cysteine biosynthesis of *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 163, 39-47, 2009.
- Nakada-Tsukui, K., Okada, H., Mitra, B. N., and Nozaki, T. Phosphatidylinositol-phosphates mediate cytoskeletal reorganization during phagocytosis via a unique modular protein consisting of RhoGEF/DH and FYVE domains in the parasitic protozoan *Entamoeba histolytica*. *Cell. Microbiol.* 11, 1471-1491, 2009.
- Sato, D. and Nozaki, T. Methionine gamma-lyase: the unique reaction mechanism, physiological roles, and therapeutic applications against infectious diseases and cancers. *IUBMB Life*, 61, 1019-1028, 2009.
- Mi-ichi, F., Yousuf, M. A., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. Mitosomes in *Entamoeba histolytica* contain a sulfate activation pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 106, 21731-21736, 2009.
- 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. Cytotoxic effect of amide derivatives of trifluoromethionine to the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 35, 56-61, 2010.
- Escueta-de Cadiz, A., Kobayashi, S., Takeuchi, T., Tachibana, H., and Nozaki, T. Identification of an avirulent *Entamoeba histolytica* strain with unique tRNA-linked short tandem repeat markers. *Parasitol. Int.* 59, 75-81, 2010.
- Maralikova, B., Ali, V., Nakada-Tsukui, K., Nozaki, T., van der Giezen, M., Henze, K., and Tovar, J. Bacterial-type oxygen detoxification and iron-sulphur cluster assembly in amoebal relict mitochondria. *Cell. Microbiol.* 12, 331-342, 2010.
- Husain, A., Jeelani, G., Sato, D., Ali, V., and Nozaki, T. Characterization of two isotypes of L-threonine dehydratase from *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 170, 100-104, 2010.

- 津久井久美子、野崎智義腸管寄生性原虫の小胞輸送一病原機構における役割  
実験医学 27, 1548-1556, 2009.
- Chung Chau Hon, Kumiko Nakada-Tsukui, Tomoyoshi Nozaki and Nancy Guillén  
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.* 16, 209-214, 2009.
- 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.* 39, 2822-2830, 2009.
- 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、54, 1059-1065, 2009.
- 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、16, 708-714, 2009.
- Hirakawa, Y., Nagamune, K., and Ishida, K. "Protein targeting into secondary plastids of chlorarachniophytes." *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 12820-5, 2009.
- 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 54, 1047-1052, 2009.
- 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，東京，111，2009.
- Kobayashi S, Suzuki J, Takeuchi T. Establishment of a continuous system for *Entamoeba muris* and analysis of the small subunit rRNA gene. *Parasite*, 16, 135-139, 2009.
- Tachibana H, Yanagi T, Akatsuka A, Kobayashi S, Kanbara H, Tsutsumi V. Isolation and characterization of a potentially virulent species *Entamoeba nuttalli* from captive Japanese macaques. *Parasitology*, 136, 1169-1177, 2009.
- 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, 2009.
- 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 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), 2009.
- 丸山治彦 鉤虫症 (十二指腸虫症) (今日の治療指針, 山口徹、北原光夫、福井次矢編), pp.214-215, 医学書院 (東京), 2010.
- Senba Y, Tsuda K, Maruyama H, Kurokawa I, Mizutani H, Taniguchi Y. Case of creeping disease treated with ivermectin. *J Dermatol*. 36, 86-89, 2009.
- Enko K, Tada T, Ohgo KO, Nagase S, Nakamura K, Ohta K, Ichiba S, Ujiike 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, 2009.
- Mogi, T., Matsushita, K., Murase, Y., Kawahara, Miyoshi, H., Ui, H., Shiomi, K., Ōmura, 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 *Plasmodium yoelii yoelii*. *J. Biochem.* 145, 229-237, 2009.
- Mogi, T., Ui H., Shiomi, K., Ōmura, S., Miyoshi, H. and 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. and Sakai, J Fasting induced hypothermia and reduced energy production in mice lacking Acetyl-CoA Synthetase 2. *Cell Metabolism*, 9, 191-202, 2009.
- Morales, J., Mogi, T., Mineki, S., Takashima, E., Mineki, R., Hirawake, H., Sakamoto, K., Ōmura, S. and Kita, K. Novel Mitochondrial Complex II Isolated from *Trypanosoma cruzi* is Composed of Twelve Peptides Including a Heterodimeric Ip Subunit. *J. Biol. Chem.* 284, 7255-7263, 2009.

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