

- 6) 物部寛子, 野村 務, 出月健夫, 郡司真理子, 堀内 啓, 森嶋康之, 武藤麻紀, 杉山 広, 山崎 浩. *Dirofilaria repens*感染による皮下結節例. *Clinical Parasitology* 23: 49-52, 2012.
- 7) 荒井俊夫, 赤尾信明, 常盤俊大, 熊谷貴, 太田伸生, 日向 眞, 山口俊和, 柴田信光, 下 正宗, 中谷信一, 松田隆秀, 高井憲治, 鈴木 登, 山崎 浩. アニサキス症の2例 - *Pseudoterranova azarasi* 幼虫感染例と糞便内に幼虫の排泄をみた例 - *Clinical Parasitology* 23: 60-63, 2012.
- 8) 三木田馨, 前田卓哉, 藤倉雄二, 三沢和央, 河野修一, 原 悠, 叶 宗一郎, 小野岳史, 宮平 靖, 山本哲久, 武藤麻紀, 山崎 浩, 川名明彦. 埼玉県で再び発生したアジア条虫症の一例と本邦での感染が強く疑われた無鉤条虫症の一例. *Clinical Parasitology* 23: 99-101, 2012.
2. 学会発表
- 1) Yamasaki H. Current status of food-borne cestodiasis in Japan. International Workshop on "Emerging parasitic zoonoses: epidemiology, diagnosis and prevention", Hanoi, Vietnam, June 25, 2012.
- 2) Yamasaki H., Muto M., Kuramochi T., Mercado R. Genetic polymorphisms of *Diphyllobothrium* species found in fishes from Lake Llanquihue, southern Chile. XVIII International Congress of Tropical Medicine and Malaria, Rio de Janeiro, Brazil, Sep. 23-27, 2012.
- 3) Yamasaki H., Muto M., Morishima Y., Sugiyama H., Okamoto M. Outbreak of *Taenia asiatica* infection in Japan. International Symposium on Cestode Zoonoses Control, Shanghai, China, Oct. 29-30, 2012.
- 4) 山崎 浩. 最近、関東地方で発生が相次いだアジア条虫症. 第81回日本寄生虫学会. 西宮, 2012年3月23-24日.
- 5) 山崎 浩, 武藤麻紀, 杉山 広, 森嶋康之, 張 唯哲, 李 懿宏, 除 家旭, 除 韶虹, 艾 淋, 張 永年, 許 学年, 周 曉農. 中国で発生した裂頭条虫症の原因種に関する分子同定. 第81回日本寄生虫学会. 西宮, 2012年3月23-24日.
- 6) 物部寛子, 野村 務, 出月健夫, 郡司真理子, 堀内 啓, 森嶋康之, 武藤麻紀, 杉山 広, 山崎 浩. *Dirofilaria repens*感染による皮下結節例. 第23回日本臨床寄生虫学会大会. 東京, 2012年6月23日.
- 7) 荒井俊夫, 赤尾信明, 常盤俊大, 熊谷貴, 太田伸生, 日向 眞, 山口俊和, 柴田信光, 下 正宗, 中谷信一, 松田隆秀, 高井憲治, 鈴木 登, 山崎 浩. アニサキス症の2例 - *Pseudoterranova azarasi* 幼虫感染例と糞便内に幼虫の排泄をみた例 - 第23回日本臨床寄生虫学会大会. 東京, 2012年6月23日.
- 8) 三木田馨, 前田卓哉, 藤倉雄二, 三沢和央, 河野修一, 原 悠, 叶 宗一郎, 小野岳史, 宮平 靖, 山本哲久, 武藤麻紀, 山崎 浩, 川名明彦. 埼玉県で再び発生したアジア条虫症の一例と本邦での感染が強く疑われた無鉤条虫症の一例. 第23回日本臨床寄生虫学会大会. 東京, 2012年6月23日.
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む) なし

豚レバー生食によるアジア条虫感染(情報共有とお願い)

豚レバーを感染源とするアジア条虫によるヒトの健康被害(食中毒)例が2010年6月以降相次いだために、病原微生物検出情報(32巻4号、2011年、<http://idsc.nih.gov.jp/iasr/32/374/kj3741.html>)により報告し、注意喚起を行いました。その後も、散発的に患者の発生が確認されており、2012年11月末現在、患者数は累計で25名(資料1)、患者発生地域は関東地方に留まっており(資料2)、患者は豚レバーを生食していました。

今般、報道によると、牛レバー生食禁止措置後、代替として豚レバーの生食が広がったとのこと。既に豚レバーの生食に対しては、E型肝炎感染などの懸念から提供中止が指導されておりますが、これまでに豚レバーの生食を行っていなかった地域でのアジア条虫の感染例の増加が懸念されるところです。

つきましては、アジア条虫症の可能性があった場合、医療機関への相談、または国立感染症研究所寄生動物部(担当:第2室長 山崎浩)まで情報提供をお願いいたします。

なお、内閣府食品安全委員会の平成24年度委託研究事業として、現在、地方衛生研究所や食肉衛生検査所との協力の下、豚レバーにおけるアジア条虫汚染状況の実態調査を行っていますが、これまでのところ、豚レバーからの検出はありません。

連絡先(照会先): 国立感染症研究所 寄生動物部第2室 山崎 浩 室長 電話: 03-4582-2692 (第2室直通)
--

平成 24 年度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）
「顧みられない寄生虫病の効果的監視法の確立と感染機構の解明に関する研究」班
分担研究報告書

食品媒介性蠕虫症（線虫と吸虫）の検査・診断法開発

研究分担者	杉山 広	国立感染症研究所寄生動物部
研究協力者	柴田勝優	国立感染症研究所寄生動物部
同	武藤麻紀	国立感染症研究所寄生動物部
同	森嶋康之	国立感染症研究所寄生動物部
同	小林行治	アドテック株式会社研究開発部
同	小林 薫	アドテック株式会社研究開発部

研究要旨：「生もの嗜好」という日本人が持つ伝統的な食文化と密接に関連して、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、鶏肉や獣肉、さらにその内臓を加熱せずに生で賞味する人が増加している。この新たな食習慣も加わり、種々の食品媒介寄生蠕虫による感染事例の報告が一層目立つようになってきた。このような寄生蠕虫の中から、本邦で年間に推定 2,000 名以上の患者発生があるアニサキスと、年間の患者数は平均 50 名と少ないが、感染すれば時に重篤な症状が惹起される肺吸虫を選択し、昨年度に続けて検査法・診断法の確立に取り組んだ。まず肺吸虫については、昨年度に構築した PCR による同定鑑別法（ミトコンドリア・16S リボゾーム DNA が標的）を再検討し、本邦産の人体寄生種であるウェステルマン肺吸虫の 2 型（2 倍体型・3 倍体型）および宮崎肺吸虫に加えて、東南アジア・南アジアにおける主要人体寄生種のヒロクチ肺吸虫が、この方法で迅速・確実に同定鑑別できるかを検証した。アニサキスについては、虫体の分子同定で原因種が明らかにされた患者の血清を集積することで、アニサキス症の血清パネルを充実させた。またこれらの血清サンプルを用いて、昨年度に作製した迅速診断キットの反応性を検討した。

1. 肺吸虫の種同定・種鑑別法に関する検討
1-1. ヒロクチ肺吸虫での検討

A. 研究目的

ウェステルマン肺吸虫の 2 倍体型と 3 倍体型とは、感染が遷延した場合の病態像に相違がある。従って病態の進展を予測して治療方針を立てるには、本症の原因となる虫体の型別（2 倍体型・3 倍体型）を知ることが重要となる。このため、患者由来の虫卵（あるいは幼虫）を出発材料に、ミトコンドリア・16S リボゾーム DNA の塩基配列が解読され、型鑑別が行なわれてきた。ミトコンドリア・16S リボゾーム DNA の塩基配列は、我が国におけるもう一つの重要な人体寄生種である宮崎肺

吸虫の同定にも適用できる。そこで、ウェステルマン肺吸虫の両型（2 倍体型・3 倍体型）と宮崎肺吸虫とに共通する配列領域を特定し、両種・両型から効率的に増幅産物を得るためのプライマー・ペア（PwDTF2 および PwDTR3）を作製して nested PCR 法に用い、種鑑別・型鑑別に資する方法を構築した。今年度はこの方法が、東南アジア・南アジアに分布する主要人体寄生種のヒロクチ肺吸虫にも適用できるかを検討した。

B. 研究方法

インド・マニプール州のヒロクチ肺吸虫流行地で、本虫の中間宿主ガニを採集し、本虫のメタセルカリアを分離した。常法に従いメ

タセルカリアから DNA を調製し、これをテンプレートに、肺吸虫の 16S リボソーム DNA にユニバーサルなプライマー・ペア (T7-1 および SP6-1) で当該領域を PCR 増幅させた。得られた PCR 産物の塩基配列を解読し、昨年度に作製したプライマー・ペア (PwDTF2 および PwDTR3) の配列が、どの程度の割合で含まれているかを確認した。更にこのプライマー・ペア (PwDTF2 および PwDTR3) を用いて、ヒロクチ肺吸虫のテンプレートから予想サイズの増幅産物が、(nested) PCR 法により得られるかを検証した。

C. 研究結果

1) ヒロクチ肺吸虫の 16S リボソーム DNA の塩基配列

インド産ヒロクチ肺吸虫メタセルカリア由来の DNA をテンプレートに、T7-1 および SP6-1 で PCR 増幅した産物は、795p であった。この塩基配列を解読し、同様の方法で得たウエステルマン肺吸虫 (2 倍体型および 3 倍体型) および宮崎肺吸虫の配列と比較した。その結果、シミラリティはいずれの肺吸虫とも 70% 程度に留まった。しかしながら、ウエステルマン肺吸虫および宮崎肺吸虫との間に共に、10bp 以上の塩基が連続して共通する配列領域をヒロクチ肺吸虫の 5' 側および 3' 側に

数箇所ずつ見出した。この中に、PwDTF2 および PwDTR3 の配列が、1 塩基も相違することなく含まれる箇所を検出した。

2) PwDTF2 および PwDTR3 を用いた PCR

ヒロクチ肺吸虫の DNA をテンプレートとして、PwDTF2 および PwDTR3 を用い、PCR 増幅した。その結果、予想サイズ (464 bp) ・予想配列の増幅産物が得られた。

3) PCR-RFLP に資する制限酵素の選択

ウエステルマン肺吸虫の型別判定 (2 倍体型あるいは 3 倍体型) に有用な箇所は、16S リボソーム RNA 遺伝子の部分配列 (805bp) の中でも、わずか 2 箇所に過ぎない。すなわち、T7-1 および SP6-1 で増幅させた PCR 産物の 247 番目 (以下、Pw247 と表記) の塩基 (2 倍体型 : A ; 3 倍体型 : G) および Pw562 の塩基 (2 倍体型 : C ; 3 倍体型 : T) のみである。昨年度の検討で、Pw247 付近にある塩基配列の差異を認識し、対象とする肺吸虫の PCR 産物のみを切断する酵素として、*Sna*BI (ウエステルマン肺吸虫・2 倍体型), *Bsr*DI (ウエステルマン肺吸虫・3 倍体型), *Hha*I (宮崎肺吸虫) を特定した。そこでヒロクチ肺吸虫についても、この目的に叶う制限酵素を検索したところ、*Ape*KI が候補に上がった。

2n	261	TGCATTACGTACCGT	: <i>Sna</i> BI (TAC/GTA)
3n	261	-----G-----	: <i>Bsr</i> DI (NN/CATTGC)
Pm	267	AAT-AG---CG-TA-	: <i>Hha</i> I (CGC/G)
Ph	272	G-T-A-G---G-T-C	: <i>Ape</i> KI (G/CTGC)

図 1. ウエステルマン肺吸虫 (2 倍体型:2n), 同 (3 倍体型:3n), 宮崎肺吸虫 (Pm), ヒロクチ肺吸虫 (Ph) のミトコンドリア・16S リボソーム DNA の塩基配列, ユニバーサル・プライマー (T7-1 および SP-6) による増幅産物の 241 番 (Pw241) から 255 番 (Pw255) の領域を示す。各配列の下線部分を認識する 4 種類の制限酵素でヒロクチ肺吸虫由来の PCR 産物を処理し、本虫の鑑別に PCR-RFLP が有用であることを示した。

これらの制限酵素でヒロクチ肺吸虫の PCR 産物を処理したところ、*Sna*BI, *Bsr*DI, *Hha*I では切断されず、*Ape*KI のみで予想のサイズ (522 bp および 273 bp) に切断されることが確認された。

4) nested-PCR の検討

PCR の出発材料となるヒロクチ肺吸虫メタセルカリア由来の DNA を蒸留水で 1,000 倍に希釈し、nested-PCR で同様の検討を試みた。まず T7-1 および SP6-1 で PCR 増幅を試みた。

その産物を用いて、PwDTF2 および PwDTR3 による nested-PCR 増幅を試みた。その結果は上述の検討の場合と同様で、1,000 倍に希釈したヒロクチ肺吸虫の DNA 試料からも、予想サイズ (464 bp)・予想配列の PCR 産物が得られた。またこの産物を用いた制限酵素 *ApeKI* による切断パターンも、予想によく合致した。

D. 考察

今回の検討の結果、ミトコンドリア・16S リボゾーム DNA の部分配列が、ヒロクチ肺吸虫との同定、およびウェステルマン肺吸虫や宮崎肺吸虫との鑑別に極めて有効なマーカーとなることが明らかとなった。また、昨年度に我々が構築したプライマー・ペア (PwDtF2 および PwDTR3) が、ヒロクチ肺吸虫の PCR や nested PCR に活用でき、特に後者は出発材料の DNA 濃度が低い場合でも、標的領域の増幅を可能とすることを確認した。

我々は業務の一環として、保存や管理の状態が厳しい臨床材料を対象として (例えば固定された虫卵、病理組織標本中の虫体あるいは虫卵)、肺吸虫症患者の原因種同定の依頼に応じている。このような臨床検体には、特に今回構築した nested PCR 法が有用と考えられた。

E. 結論

ヒロクチ肺吸虫のミトコンドリア・16S リボゾーム DNA の部分配列を明らかにした。昨年度に構築したプライマー・ペア (PwDtF2 および PwDTR3) が、nested PCR 法による本虫の迅速・簡便な同定法として有効であることを示した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 杉山 広. 食品による寄生動物感染症 7. 蠕虫感染症 (1) 肺吸虫. 防菌防黴誌, 41 (2), 印刷中, 2013.

2. 学会発表

1. Sugiyama, H. Current status of paragonimiasis in Japan: Infections associated with exotic dietary habits. The 7th seminar on food- and water-borne parasitic zoonoses, Bangkok, December, 2012.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許および実用新案登録共になし。

1-2. 外国人肺吸虫症例の原因種同定への応用

A. 研究目的

昨年度に構築したミトコンドリア・16S リボゾーム DNA を標的とする nested PCR 法を、血痰を主訴として受診し、画像で結節性陰影が認められたミャンマー人男性の肺吸虫症例の原因虫種の同定に応用できるのか、喀痰内虫卵を用いた検討を行なった。

B. 研究方法

症例は 28 歳のミャンマー人男性。2010 年夏に来日し、以後は日本に継続して在住している。2011 年 7 月頃から血痰を自覚し、量と頻度が増大したため、2012 年 7 月に東京歯科大学市川総合病院を受診した。胸部 X 線で左肺下葉に結節影 (2 個) を認め、喀痰検査で多数の虫卵が検出され、肺吸虫症と診断された。この虫卵を出発材料として原因虫種の同定を試みた。

C. 研究結果

原因虫種を推定するために、まず喀痰中の虫卵 (32 個) を観察・計測した。虫卵の大きさ (平均) は、長径が $88\mu\text{m}$ 、短径は $51\mu\text{m}$ であった。最大幅部の位置は、中央部の虫卵が大部分 (27 個, 84%) であった。一方で、ほとんどの虫卵において、卵殻の肥厚を無蓋端部に認めた。しかし肥厚の程度は軽く、大部分の虫卵 (28 個, 88%) では、無蓋端部卵殻の肥厚は、虫卵側部における卵殻の厚さの

2.5-3.8倍に留まった。著しい肥厚，すなわち3.8倍以上は2個(6%)に留まった。なお，肥厚が明らかでない虫卵は1個(3%)だけであった。以上の結果から，本症例の喀痰内虫卵は，その大きさが宮崎肺吸虫およびウエステルマン肺吸虫(2倍体型)よりも相当に大きく，しかし無蓋端部卵殻の肥厚の程度・頻度はウエステルマン肺吸虫(3倍体型)よりも乏しかった。このような虫卵の形態学的特徴からは，原因種の同定が困難であった。

そこで虫卵を出発材料としてDNAを調整し，ミトコンドリア・16SリボゾームDNAを標的に構築したnested PCR法を適用し，増幅産物を得て虫種同定に関する結論を導くことにした。その結果，nested PCRで464 bpの増幅産物が得られた。配列を解読したところ，インド産ヒロクチ肺吸虫の配列と完全に一致した。更にPCR産物を制限酵素 *ApeKI* で処理したところ，予想サイズ(355 bpおよび152 bp)に切断された。

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，ミャンマーから来日後は，肺吸虫の感染源となる淡水産のカニやイノシシ肉を非加熱・不十分加熱では摂食していないとのことであった。しかしながら来日までは，旧首都のヤンゴンに在住し，小さい頃から数カ月に1度程度の割合で，淡水産のカニを十分な加熱なしで喫食していたとのことであった。従ってミャンマーでヒロクチ肺吸虫に感染して来日し，1年以上を経過して日本で発症したものと考えられた。

ミトコンドリア・16SリボゾームDNAを標的とするnested PCR法が，ヒロクチ肺吸虫であるとの分子同定に有用であることは，既に前節で述べた。更に臨床材料への応用も可能であることが，本検討により明らかとなった。当研究部では，臨床の現場から肺吸虫症患者の原因種同定の依頼が届くことが多い。今回検討したnested PCR法も駆使して，そのような要望に積極的に応じていきたいと考えている。

E. 結論

血痰を主訴として受診し，画像で結節性陰影が認められたミャンマー人男性の肺吸虫症例の原因虫種同定に，ミトコンドリア・16SリボゾームDNAを標的に構築したnested PCR法を応用し，ヒロクチ肺吸虫が原因であることを明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許および実用新案登録共になし。

2. アニサキス症の迅速診断キット開発に向けての検討

A. 研究目的

魚介類の生食が我が国では極めて一般的なため，これに起因するアニサキス症例が，年間に2,000例以上発生すると推定されている。患者はまず，その食歴や症状などに基づいて，アニサキス症と推定される。そして，内視鏡下に生検鉗子で胃に穿入する虫体が摘出され，診断が確定される(胃アニサキス症)。一方で胃アニサキス症と強く疑われても，虫体が検出されない事例がある。このような場合には，免疫血清学的な手技が補助的な診断法として有用ではないかと考えられている。

アニサキス症の免疫血清学的な診断法として，アニサキスの第3期幼虫(感染幼虫)由来の抗原を用いたmicro-ELISA(以下，ELISA)が，患者血清中の抗体(IgG等)を検出する方法として活用されてきた。特に腸アニサキス症例および消化管外アニサキス症例の診断には実績がある。

本研究では、ELISAに代替する迅速なアニサキス症の診断法確立を目途とし、免疫クロマトグラフィ法を応用した診断キット（以下、ICTキット）を作製して、この精度管理に努めてきた。その過程で、虫体の分子同定により原因種が明らかにされた胃アニサキス症の患者血清を集積したので、昨年度に作製した迅速診断用のICTキットを用いて、その診断能力を検討した。

B. 研究方法

1) 供試虫体および血清試料

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アニサキス症例の虫体および血清試料を検討に用いた（表1）。これらの患者材料は、東京都および佐賀県に所在する各一箇所の医療機関より、2011年6月（症例1）から2012年12月（症例9）までの間に、提供を受けた。患者は医療機関の近隣に在住すると考えられるが、個人情報に関わる詳細は不明である。なお患者材料の使用は、国立感染症研究所医学研究倫理審査委員会に申請して、承認を得た。

2) 虫体材料の分子同定

患者虫体よりDNAを調整し、ユニバーサル・プライマー（NC5およびNC2）を用いてリボソームDNAのITS領域を増幅させ、産物の配列を解読して、原因虫種を分子同定した。

3) 抗原の調整と新たなキットの作製

東京の鮮魚店で購入した北海道産のスケトウダラから、アニサキス幼虫（*Anisakis simplex sensu stricto*の第3期幼虫）を採取した。得られた虫体は滅菌生食液で洗浄後、液体培地 RPMI 1640 中で飼育・培養し（12時間、37℃、5% CO₂）、遠心後に上清を回収して分泌排泄抗原（ES抗原）とした。この抗原を用いて、ICTキットの作製とELISAによる抗体価の測定を行なった。

4) ELISAによる抗体価測定とICTキットの評価

上述のES抗原を使用してELISAを行ない、

抗体価を測定した（吸光度で表示）。ICTキットに関しては、供試血清等で反応させた後、キット・デバイスのニトロセルロース膜面にある判定ラインを肉眼で観察し、発色程度を陰性（レベル0）から強陽性（レベル8）の9段階に分け、この数値（0～8）で各血清試料の反応強度を表現した。

C. 研究結果

1) 検出虫体の分子同定結果

症例1及び症例7は、検診時・健診時の内視鏡検査で虫体が検出された無症事例である。それ以外の7症例は、何れも激しい腹部症状（胃痛・心窩部痛）により来院した有症事例である。内視鏡検査の結果、症例1～症例8からは各1隻の虫体が、また症例9からは2隻の虫体が検出された。これら合計10隻の虫体は分子同定の結果、総て *Anisakis simplex sensu stricto* と同定された。

2) ELISAによる抗体価の測定結果

患者血清の抗体価をELISAにより測定したところ、吸光度は0.005から0.656までの値を示した。（表1）。

2) ICTキットによる抗体価の測定結果

患者血清のレベルは0から7を示した。ICTキットの反応は、ELISAの吸光度の傾向と良く一致した（表1）。

表1. micro-ELISAおよびICTによる胃アニサキス症患者の血清診断結果

症例	居住地	主訴	原因種 ¹⁾	ELISA ²⁾	ICT ³⁾
1	東京	無症	As	0.005	0
2	東京	腹痛	As	0.013	1
3	佐賀	腹痛	As	0.089	1
4	東京	腹痛	As	0.287	5
5	東京	腹痛	As	0.038	1
6	東京	腹痛	As	0.489	6
7	東京	無症	As	0.525	7
8	東京	腹痛	As	0.173	4
9	佐賀	腹痛	As	0.091	3

1) As: *Anisakis simplex sensu stricto*

2) 吸光度

3) レベル: 各血清試料の反応強度を示す。

D. 考察

本研究の結果、ICTキットの反応はELISAの結果と、その傾向が良く一致することが分かった。しかも興味深いことに、ELISAの吸光度とICTキットのレベルが最も低い症例、およびこれらが最も高い症例は、共に無症事例であった。胃アニサキス症の臨床症状の発現には、宿主（患者）の免疫学的な記憶が大きく関与するとの学説が示されてきた。何度もアニサキスに感染して、発症に至るとの考察である。しかし症例7は、この学説では説明できない症例ではないかと考えられた。

次年度は、腸アニサキス症および消化管外アニサキス症患者の血清を手に入れて、ICTキットの診断能力評価を更に進めたいと考えている。

E. 結論

アニサキス虫体 (*A. simplex sensu stricto*) のES抗原を用いて作製したICTキットに関して、アニサキス症患者の血清を用いてその反応性を検討し、ELISAにより得られた結果と比較したところ、両者は良く一致することが分かった。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 特許および実用新案登録共になし。

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
濱野真二郎	51章 消化管および泌尿生殖器寄生原虫、54章 条虫、56章 線虫	吉開泰信・西山幸廣	レビンソン微生物学・免疫学	丸善出版	東京	2012	362-367、383-388、394-405
井上幸次	II. 眼科疾患 5.角膜感染症	門脇孝、小室一成、宮地良樹監修	診療ガイドライン UP-TO-DATE [2012-2013]	メジカルビュー社	東京	2012	106-116

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Christy, N., Hencke, J., Escueta-De Cadiz, A., Nazib, F., Thien, H., Yagita, K., Ligaba, S., Haque, R., Nozaki, T., Tannich, E., Herbein, J., and Petri, W.	Multi-site performance evaluation of an ELISA for the detection of Giardia, Cryptosporidium, and Entamoeba histolytica antigens in human stool.	J. Clin. Microbiol	50	1762-1763	2012
Nakada-Tsukui, K., Tsuboi, K., Furukawa, A., Yamada, Y., and Nozaki, T.	A novel class of cysteine protease receptors that mediate lysosomal transport. Cell.	Microbiol.	14	1299-317	2012
Jeelani, G., Sato, S., Husain, A., Escueta-de Cadiza, A., Sugimoto, M., Soga, T., Sue-matsu, M., and Nozaki, T.	Metabolic profiling of the protozoan parasite Entamoeba revealed activation of unpredicted pathway during encystation	PLoS ONE 7		e37740	2012
Mishra, V., Kumar, A., Ali, V., Nozaki, T., Zhang, K. Y., and Bhakuni, V.	Novel protein-protein interactions between Entamoeba histolytica d-phosphoglycerate dehydrogenase and phosphoserine aminotransferase.	Biochimie.	94	1676-1686	2012
Husain, A., Sato, D., Jeelani, G., Soga, T., and Nozaki, T.	Dramatic increase in glycerol biosynthesis upon oxidative stress in the anaerobic protozoan parasite Entamoeba histolytica.	PLoS Negl.Trop. Dis.	6	e1831	2012
Klionsky DJ, et al.	Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy.	Autophagy	8	445-544	2012
Makiuchi, T., Mi-ichi, F., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T.	Novel TPR-containing subunit of TOM complex functions as cytosolic receptor for Entamoeba mitosomal transport.	Scientific Reports	3	1129	2013
Shimokawa, C., Kabir, M., Taniuchi, M., Mondal, D., Kobayashi, S., Ali, I.K., Sobuz, S., Senba, M., Houpt, E., Haque, R., Petri, W.A., Hamano, S.	<i>Entamoeba moshkovskii</i> is associated with diarrhea in infants and causes diarrhea and colitis in mice.	J. Infect. Dis.	206(5)	744-51	2012

Mbanefo, E.C., Chuanxin, Y., Kikuchi, M., Shuaibu, M.N., Boamah, D., Kirinoki, M., Hayashi, N., Chi- gusa, Y., Osada, Y., Hamano, S., Hirayama, K.:	Origin of a novel protein-coding gene family with similar signal sequence in <i>Schistosoma japonicum</i> .	BMC Genomics.	13	260.	2012
濱野真二郎	忘れてはならない輸入感染症と稀少感染症(4)、トリパノソーマ症、リーシュマニア症	化学療法の領域	28(10)	2094-2098	2012
Mito T, Suzuki T, et al.	Effect of photo-dynamic therapy with methylene blue on <i>Acanthamoeba</i> in vitro	Invest Ophthalmol Vis Sci	53	6305-6313	2012
Ikeda Y, Inoue Y, Yagita K et al.	Assessment of real-time polymerase chain reaction detection of <i>Acanthamoeba</i> and prognosis determinants of acanthamoeba keratitis	Ophthalmology	119	1111-1119	2012
井上幸次、八木田健 司、野崎智義ほか	わが国のアcantアメーバ角膜炎関連分離株の分子疫学多施設調査(中間報告)	あたらしい眼科	29	397-402	2012
稲葉昌丸、井上幸次、 大橋裕一ほか	コンタクトレンズケース汚染の現状	日本コンタクト レンズ学会誌	54	31-40	2012
Toyama, T., Tahara, M., Nagamune, K., Arimitsu, K., Hama- shima, Y., Palacpac, N.M.Q., Kawaide, H., Horii, T., and Tanabe, K.	Gibberellin Biosynthetic Inhibitors Make Human Malaria Parasite <i>Plasmodium falciparum</i> Cells Swell and Rupture to Death.	PLoS ONE	7 (3)	e32246	2012
永宗喜三郎	アピコンプレクス門原虫が産生する植物ホルモン様物質とその作用	日生研たより	58 (2)	24-28	2012
福士路花、松原 立真、永宗喜三郎	<i>Toxoplasma gondii</i>	原生動物園	3	3-7	2012
喜屋武向子、松原立 真、永宗喜三郎	トキソプラズマ症と沖縄県におけるトキソプラズマの流行状況について	防菌防黴	41 (1)	19-28	2013
永宗喜三郎	トキソプラズマ症	感染症週報	15 (3)	20-25	2013

Hino A, Hirai M, Tanaka TQ, Watanabe Y, Matsuoka H, Kita K.	Critical roles of the mitochondrial complex II in oocyst formation of rodent malaria parasite Plasmodium berghei.	J Biochem.	152(3)	259-68	2012
Matsuoka H, Sano G, Hattori R, Tomita H, Yamamoto DS, Hirai M.	One Injection of DsRed Followed by Bites from Transgenic Mosquitoes Producing DsRed in the Saliva Elicits a High Titer of Antibody in Mice.	Trop Med Health	40(2)	47-52	2012
Xuefeng Duan, Takashi Imai, Bin Chou, Liping Tu, Kunisuke Himeno, Kazutomo Suzue, Makoto Hirai, Tomoyo Taniguchi, Hiroko Okada, Chikako Shimokawa, Hajime Hisaeda	Resistance to Malaria by Enhanced Phagocytosis of Erythrocytes in LMP7-deficient Mice	PLoS ONE	In press		
丸山治彦、木村幹夫	我が国における寄生虫病・熱帯病薬物治療の実際	日本臨床	70 (12)	2205-2217	2012
丸山治彦、名和行文	肺吸虫症と神経系	神経内科	77 (3)	259-266	2012
丸山治彦	小児にみられる吸虫症	小児科臨床	65 (3)	384-390	2012
吉田彩子、長安英治、丸山治彦	動物由来回虫類感染症のわが国における最近の動向	Clinical Parasitology	23	105-108	2012
Nagayasu E, Ishikawa SA, Taketani S, Chakraborty G, Yoshida A, Inagaki Y, Maruyama H	Identification of a bacteria-like ferroxidase in Strongyloides venezuelensis, an animal parasitic nematode.	PLoS ONE	In press		
Nagayasu E, Ogura Y, Itoh T, Yoshida A, Chakraborty G, Hayashi T, Maruyama H.	Transcriptomic analysis of four developmental stages of Strongyloides venezuelensis	Parasitol Int	62 (1)	57-65	2013

Nara, T., Hashimoto, M., Hirawake, H., Liao, C-W., Fukai, Y., Suzuki, S., Tsubouchi, A., Morales, J., Takamiya, S., Fujimura, T., Taka, H., Mineki, R., Fan, C-K., Inaoka, D. K., Inoue, M., Tanaka, A., Harada, S., Kita, K. and Aoki, T.	Molecular interaction of the first 3 enzymes of the <i>de novo</i> pyrimidine biosynthetic pathway of <i>Trypanosoma cruzi</i> .	Biochem. Biophys. Res. Commun.	418	140-143	2012
Hashimoto, M., Morales, J., Fukai, Y., Suzuki, S., Takamiya, S., Tsubouchi, A., Inoue, S., Inoue, M., Kita, K., Harada, S., Tanaka, A., Aoki, T. and Nara, T.	Critical importance of the <i>de novo</i> pyrimidine biosynthesis pathway for <i>Trypanosoma cruzi</i> growth in the mammalian host cell cytoplasm.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	417	1002-1006	2012
Sakai, C., Tomitsuka, E., Esumi, H., Harada, S. and Kita, K.	Mitochondrial fumarate reductase as a target of chemotherapy: from parasites to cancer cells.	Biochim. Biophys. Acta	1820	643-651	2012
Shimizu, H., Osanai, A., Sakamoto, K., Inaoka, D. K., Shiba, T., Harada, S. and Kita, K.	Crystal structure of mitochondrial quinol-fumarate reductase from the parasitic nematode <i>Ascaris suum</i> .	J. Biochem.	151(6)	589-592	2012
Tanaka, Q. T., Hirai, M., Watanabe, Y. and Kita, K.	Toward understanding the role of mitochondrial complex II in the intraerythrocytic stages of <i>Plasmodium falciparum</i> : gene targeting of the Fp subunit.	Parasitol. Int.	61	726-728	2012
Kitamura, K., Kishi-Itakura, C., Tsuboi, T., Sato, S., Kita, K., Ohta, N. and Mizushima, N.	Autophagy-related Atg8 localizes to the apicoplast of the human malaria parasite <i>Plasmodium falciparum</i> .	PLoS ONE	7(8)	e42977	2012

Tachibana, S., Sullivan, S., Kawai, S., Nakamura, S., Kim, H.R., Goto, N., Arisue, N., Palacpac, N.M.Q., Honma, H., Yagi, M., Tougan, T., Katakai, Y., Kaneko, O., Mita, T., Kita, K., Yasutomi, Y., Sutton, P.L., Shakhbatyan, R., Horii, T., Yasunaga, T., Barnwell, J.W., Escalante, A.A., Carlton, J.M. and Tanabe, K.	<i>Plasmodium cynomolgi</i> genome sequences provide insight into <i>Plasmodium vivax</i> and the monkey malaria clade.	Nature Genetics	44(9)	1051-1055	2012
Hikosaka, K., Tsuji, N., Watanabe, Y., Kishine, H., Horii, T., Igarashi, I., Kita, K. and Tanabe, K.	Novel type of linear mitochondrial genomes with dual flip-flop inversion system in apicomplexan parasites, <i>Babesia microti</i> and <i>Babesia rodhaini</i> .	BMC Genomics	13	622	2012
Saimoto, H., Kido, Y., Haga, Y., Sakamoto, K. and Kita, K.	Pharmacophore identification of ascocofuranone, potent inhibitor of cyanide-insensitive alternative oxidase of <i>Trypanosoma brucei</i> .	J. Biochem.	153(3)	267-273	2013
Goto, M., Amino, H., Nakajima, M., Tsuji, N., Sakamoto, K. and Kita, K.	Cloning and characterization of hypoxia-inducible factor-1 subunits from <i>Ascaris suum</i> – A parasitic nematode highly adapted to changes of oxygen conditions during its life cycle.	Gene	516	39-47	2013
Harada, S., Inaoka, D.K., Ohmori, J. and Kita, K.	Diversity of parasite complex II	Biochim. Biophys. Acta	In press		2013
Shiba, T., Kido, Y., Sakamoto, K., Inaoka, D.K., Tsuge, C., Tatsumi, R., Takahashi, G., Balogun, E.O., Nara, T., Aoki, T., Honma, T., Tanaka, A., Inoue, M., Matsuoka, S., Saimoto, H., Moore, A.L., Harada, S. and Kita, K.	Structure of the trypanosome cyanide-insensitive alternative oxidase.	PNAS	In press		2013

Angeles, JM., Goto, Y., Kirinoki, M., Asada, M., Leonardo, L., Rivera, PT., Villacorte, E., Inoue, N., Chigusa, Y., and Kawazu, S.	Utilization of ELISA using thioredoxin peroxidase-I and tandem repeat proteins for diagnosis of <i>Schistosoma japonicum</i> infection among water buffaloes.	PLoS Neglected Tropical Diseases	6(8)	e1800	2012
Angeles, JM., Goto, Y., Kirinoki, M., Asada, M., Hakimi, H., Leonardo, L., Rivera, PT., Villacorte, E., Inoue, N., Chigusa, Y., and Kawazu, S.	Localization and expression profiling of a 31kDa antigenic repetitive protein Sjp_0110390 in <i>Schistosoma japonicum</i> life stages.	Molecular & Biochemical Parasitology	187	98-102	2013
Yamasaki H.	Current status and perspectives of cysticercosis and taeniasis in Japan	Korean J. Parasitology	51	19-29	2013
Yamasaki H., Mu-to M., Yamada M., Aizono N., Rausch R.L.	Validity of the bear tapeworm <i>Diphyllobothrium ursi</i> (Cestoda: Diphylobothriidae) based on morphological and molecular markers	Journal of Parasitology	98	1243-1247	2012
Ikeda T., Tamura D., Sato Y., Ichi-hashii K., Matsuo-ka H., Yamasaki H.	Two pediatric cases of <i>Diphyllobothrium nihonkaiense</i> Infection in Summer (July-August) 2010	Pediatrics International	54	163-165	2012
山崎 浩	ペットからの感染症 10 イヌ・ネコ回虫症 (トキソカラ症)	小児科	54	65-72	2012
藤森俊二, 武藤麻紀, 山崎 浩, 坂本長逸	カプセル内視鏡で遭遇した小腸寄生虫の2例	Clinical Parasitology	23	20-22	2012
物部寛子, 野村 務, 出月健夫, 郡司真理子, 堀内 啓, 森嶋 康之, 武藤 麻紀, 杉山 広, 山崎 浩	<i>Dirofilaria repens</i> 感染による皮下結節例	Clinical Parasitology	23	49-52	2012
佐藤 亮, 三角祐生, 上見葉子, 下川恒生, 檜田直也, 岡本浩明, 加志崎史大, 石井真理, 相佐好伸, 神谷一徳, 吉津 晃, 吉田幸子, 武藤麻紀, 山崎 浩, 杉山 広	特発性好酸球増多空洞陰影を呈したウエステルマン肺吸虫症の一例	Clinical Parasitology	23	53-56	2012
杉山 広, 柴田勝優, 森嶋康之, 山崎 浩, 川上 泰	肺吸虫の感染を予防するためのサワガニ冷凍条件の検討	Clinical Parasitology	23	57-59	2012

荒井俊夫, 赤尾信明, 常盤俊大, 熊谷 貴, 太田伸生, 日向 眞, 山口俊和, 柴田信光, 下 正宗, 中谷信一, 松田隆秀, 高井憲治, 鈴木 登, 山崎 浩	アニサキス症の2例 - <i>Pseudoteraanova azarasi</i> 幼虫感染 例と糞便内に幼虫の排泄をみた例	Clinical Parasitology	23	60-63	2012
三木田馨, 前田卓哉, 藤倉雄二, 三沢和央, 河野修一, 原 悠, 叶 宗一郎, 小野岳史, 宮 平 靖, 山本哲久, 武 藤麻紀, 山崎 浩, 川名明彦	埼玉県で再び発生したアジア条虫症 の一例と本邦での感染が強く疑われ た無鉤条虫症の一例	Clinical Parasitology	23	99-101	2012
Takeda, M., Sugiyama, H., Singh, T.S.	Some freshwater crabs from northeast India bordered on Myanmar.	Journal of Tei- kyoHeisei Univer- sity	23	199-213	2012
Singh, T.S., Devi, K.H.R., Singh, S.R., Sugiyama, H.	A case of cutaneous paragonimiasis presented with minimal pleuritis.	Tropical Parasi- tology	2	142-144	2012
Singh, T.S., Sugiyama, H., Rangsiruji, A.	<i>Paragonimus</i> and paragonimiasis in India.	Indian Journal ofMedical Re- search	136	192-204	2012
Taira, K., Saitoh, Y., Okada, N., Sugiyama, H., Kappel, C.M.O.	Tolerance to low temperatures of <i>Toxocara cati</i> larvae in chicken muscle tissue	Veterinary Parasi- tology	189	383-386	2012
Li, J., Zhao, G.H., Zhou, D.H., Sugiyama, H., Nisbet, A.J., Li, X.Y., Zou, F.C., Li, H.L., Ai, L., Zhu, X.Q.	Retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism, an electrophoretic approach for studying genetic variability among <i>Schistosoma japonicum</i> geographical isolates.	Electrophoresis	33	2859- 2866	2012
杉山 広, 武藤麻紀, 大前比呂思, 森嶋康 之, 山崎 浩, 銭 宝 珍	中国のタチウオから検出されたア ニサキス型幼虫の分子同定.	獣医寄生虫学会 誌	11	31	2012
杉山 広, 柴田勝優, 森嶋康之, 山崎 浩, 川上 泰	肺吸虫の感染を予防するためのサ ワガニ冷凍条件の検討.	Clinical Parasitology	23	57-59	2012

佐藤 亮, 三角裕生, 上見葉子, 下川恒生, 檜田直也, 岡本浩明, 加志崎史 大, 石井真理, 相佐 好伸, 神谷一徳, 吉 津 晃, 吉田幸子, 武 藤麻紀, 山崎 浩, 杉 山 広	特発性好酸球増多症候群としてス テロイド投与中に両肺多発空洞陰 影を呈したウエステルマン肺吸虫 症の一例.	Clinical Parasitology	23	53-56	2012
--	--	--------------------------	----	-------	------

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Multisite Performance Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of *Giardia*, *Cryptosporidium*, and *Entamoeba histolytica* Antigens in Human Stool

Nathaniel C. V. Christy,^a Janice D. Hencke,^b Aleyla Escueta-De Cadiz,^c Forida Nazib,^d Heidrun von Thien,^e Kenji Yagita,^c Segni Ligaba,^a Rashidul Haque,^d Tomoyoshi Nozaki,^{c,f} Egbert Tannich,^e Joel F. Herbein,^b and William A. Petri, Jr.^a

Division of Infectious Diseases and International Health, University of Virginia School of Medicine, Charlottesville, Virginia, USA^a; TechLab Inc., Blacksburg, Virginia, USA^b; Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan^c; International Center for Diarrhoeal Disease Research, Bangladesh, Dhaka, Bangladesh^d; Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, Hamburg, Germany^e; and Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki, Japan^f

A novel fecal antigen detection assay for fresh and frozen human samples that detects but does not differentiate *Giardia* spp, *Cryptosporidium* spp, and *Entamoeba histolytica*, the Tri-Combo parasite screen, was compared to three established enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) at three international sites. It exhibited 97.9% sensitivity and 97.0% specificity, with positive and negative predictive values of 93.4% and 99.1%, respectively. The Tri-Combo test proved a reliable means to limit the use of individual parasite ELISAs to positive samples.

While death from diarrheal infections has decreased, levels of morbidity have not declined in comparison to historical levels and thus remain a significant health problem, especially in the developing world (7, 11). Three of the most common causes of protozoan-associated diarrheal infections are *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., and *Entamoeba histolytica* (16). All three of these parasites are transmitted via a classical fecal-oral cycle (1). *Cryptosporidium* spp. are common throughout both the developed and developing world and can cause persistent diarrhea in HIV-infected individuals (2, 12, 19). Control of this organism can prove difficult due to its resistance to standard disinfection methods (e.g., chlorination of water sources) (3). *E. histolytica* is a single-cell amoeba that is the cause of amoebiasis (20). Clinical manifestations include diarrhea, dysentery, toxic megacolon, and liver abscess (5). The incidence of disease due to *Cryptosporidium* spp. and *E. histolytica*, and possibly *Giardia* spp., is increased with malnutrition (13, 14). Repeated infections are common and can cause developmental delay in children (6, 15). Because treatment regimens for these infections are available, there is a need for rapid and cost-effective diagnostic screening methods (8, 10, 16, 17).

The Tri-Combo parasite screen test (TechLab, Blacksburg, VA), intended for clearance by the U.S. Food and Drug Administration (FDA), is an enzyme-linked immunosorbent assay developed to simultaneously detect *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., and *E. histolytica* antigens in human fecal specimens. The microtiter plate format allows the rapid screening of large numbers of clinical specimens. Similar to other immunoassay-type tests for these three parasites, the Tri-Combo test is not designed for use with fixed fecal specimens. When a clinical sample is positive by the Tri-Combo test, additional testing for the presence of *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., and/or *E. histolytica* parasites is indicated, as the test does not distinguish between these parasites.

A panel of 618 diarrheal and nondiarrheal human fecal specimens from male and female subjects aged 4 months to 89 years were tested with the Tri-Combo test at three international sites: 87 clinical samples at the National Institute for Infectious Disease (NIID) in Tokyo, Japan; 297 clinical samples at the International Center for Diarrheal Disease Research, Bangladesh (ICDDR,B), in

Dhaka, Bangladesh; and 234 clinical samples at the Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine (BNI) in Hamburg, Germany. All samples were tested with the FDA-approved individual *Giardia* II, *Cryptosporidium* II, and *E. Histolytica* II ELISAs (TechLab, Blacksburg, VA) as reference standards for the detection of each parasite. Samples for which the results differed between the Tri-Combo and the reference tests were reanalyzed with all tests, and if the final results still differed, the sample was recorded as a discrepant sample. Clinical samples that were positive in both the Tri-Combo and the corresponding reference standard test were scored as positive for parasite antigen. Samples discrepantly positive and negative on the Tri-Combo test versus the reference tests were considered false positives and false negatives, respectively.

The Tri-Combo parasite screen was performed following the manufacturer's directions. All incubations were performed on the benchtop, and the results were analyzed on an ELISA-format spectrophotometer with the spectrophotometer absorbance set to read at 450 nm. The individual *Giardia* II, *Cryptosporidium* II, and *E. Histolytica* II tests were performed according to established protocols.

For the combined panel of samples tested at all three sites, the Tri-Combo test had a sensitivity of 97.9%, specificity of 97.0%, positive predictive value of 93.4%, and negative predictive value of 99.1% (Table 1). One hundred ninety-six samples were positive in the Tri-Combo test. According to the reference tests, the distribution of positive samples by organism was similar at the various sites; most samples were positive for *Giardia* spp. At the Tokyo site, 8 samples were *Giardia* positive, 4 were *Cryptosporidium* positive, and 3 were *E. histolytica* positive. At the Dhaka site, 68 sam-

Received 23 November 2011. Returned for modification 8 January 2012.

Accepted 23 February 2012.

Published ahead of print 29 February 2012.

Address correspondence to William A. Petri, Jr., wap3g@virginia.edu.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JCM.06483-11