

2013/8014A

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

平成25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26 (2014) 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

平成25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26 (2014) 年 3 月

## 目 次

I. 総括研究報告	
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	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. 赤痢アメーバの分化・病原機構の解明	19
野崎 智義 (国立感染症研究所 寄生動物部)	
2. 腸管原虫の分子疫学調査に関する研究	25
渡辺 恒二 (国立国際医療研究センターエイズ治療研究開発センター)	
3. 赤痢アメーバの感染機構の研究	29
濱野 真二郎 (長崎大学・熱帯医学研究所)	
4. 分子疫学を中心としたアcantアメーバ角膜炎の実態に関する調査研究	33
井上 幸次 (鳥取大学医学部 視覚病態学)	
5. 実用型イムノクロマトによる国内ジアルジア感染リスクグループのジアルジア感染調査	37
八木田 健司 (国立感染症研究所 寄生動物部)	
6. マラリア薬剤耐性株流入のモニタリング法の開発	43
中野 由美子 (国立感染症研究所 寄生動物部)	
7. 赤痢アメーバの薬剤耐性に関する研究	47
津久井 久美子 (国立感染症研究所 寄生動物部)	
8. トキソプラズマ感染における宿主機能ハイジャック機序の解明	51
永宗 喜三郎 (国立感染症研究所 寄生動物部)	
9. 顧みられない原虫原虫類への新規遺伝学的手法の開発に関する研究	55
平井 誠 (群馬大学大学院医学研究科 国際寄生虫病)	
10. 蠕虫性幼虫移行症の病態の解明	57
丸山 治彦 (宮崎大学医学部)	
11. エキノコックスの嫌氣的呼吸鎖の生理機能の解明	63
北 潔 (東京大学大学院医学系研究科)	
12. 人獣感染症としての住血吸虫症のモニタリング法の開発	69
河津信一郎 (帯広畜産大学・原虫病研究センター)	
13. 寄生蠕虫症(条虫症)の検査・診断法開発に関する研究	71
山崎 浩 (国立感染症研究所 寄生動物部)	
14. 食品媒介性蠕虫症(線虫と吸虫)の検査・診断法開発	77
杉山 広 (国立感染症研究所 寄生動物部)	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	83
IV. 研究成果の刊行物・別刷	93

# I. 総括研究報告書

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）  
平成25年度総括研究報告書

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

研究代表者： 野崎智義 国立感染症研究所 部長

研究要旨

本研究は我が国で問題となる原虫・寄生虫症を中心として、その発生・まん延を防止するために不可欠なサーベイランス・検査・診断法の確立、治療法の開発等を目的とした。同時に、上記の目的のために不可欠な起因原虫・寄生虫の生物学的特質・感染・病理・免疫機構の解明を目的とする。最終年度も、対象とするそれぞれの原虫・蠕虫症に関して、ほぼ当初の計画通り、多面的な調査・研究を行い、多くの成果を挙げた。これらの研究成果は、サーベイランス・診断の確立に役立つと同時に、国内の寄生虫症感染情報ネットワークの強化、寄生虫学研究的強化にも資すると期待される。

研究分担者

渡辺恒二・国立国際医療研究センター・医系技官

濱野真二郎・長崎大学・教授

井上幸次・鳥取大学・教授

八木田健司・国立感染症研究所・主任研究官

中野由美子・国立感染症研究所・主任研究官

津久井久美子・国立感染症研究所・主任研究官

永宗喜三郎・国立感染症研究所・室長

平井誠・群馬大学・准教授

丸山治彦・宮崎大学・教授

北潔・東京大学・教授

河津信一郎・帯広畜産大学・教授

山崎浩・国立感染症研究所・室長

杉山広・国立感染症研究所・主任研究官

監視体制の確立、予防・治療法の開発が不可欠である。同時に、新興寄生虫症の出現に即座に対応出来るように、寄生虫症研究基盤の底上げと次世代の研究者育成が必要である。

本研究では、国内で問題となる代表的な顧みられない原虫・蠕虫症に対して、分子疫学的手法・検査・診断法・監視システムを確立することを目的とする。更に、研究者育成と基礎研究レベルの底上げを目指して、国内の代表的な原虫・寄生虫症の専門家を結集し、予防・治療法の確立に繋がる原虫・蠕虫症の感染・病理・病原・薬剤耐性機構に関する基盤的研究を行う。本研究の特色は、検査・診断法の開発、監視システムの構築から、感染・病原機構の解明に至る、極めて多角的な研究を、幅広い対象疾患に対して展開する点である。

本研究は以下の具体的な研究項目を目的としている。まず、腸管原虫症・アカ

A. 研究目的

我が国で問題となる寄生虫症の発生・まん延を防止するには、起因生物の生物学的特質・感染機構の理解、検査・診断・

ントアメーバ症の継続的な発生動向調査、分離株の型別を行う。ジアルジア症・住血吸虫症、顎口虫・条虫・アニサキス症等の免疫診断法・キットの確立し、キットの有効性に関して検証するとともに、感染動向調査へ応用する。赤痢アメーバと三日熱マラリア原虫の薬剤耐性モニタリング法を確立する。赤痢アメーバ・アカントアメーバ等の病原・分化機構を統合的に解明する。マラリア原虫・赤痢アメーバにおける薬剤耐性機構を解明する。新種腸管アメーバの病原機構・病態形成を解明する。トキシプラズマの感染における宿主調節因子注入機構を解明する。マラリア原虫等の高速な変異体作成を可能とする遺伝学手法を確立し応用する。ブタ回虫等の幼虫特異的タンパク質の病態形成における機能解明を行う。エキノコックス呼吸鎖の解明と阻害剤探索を行う。以上の研究成果を統合し、「起因生物の生物学的特質・感染機構の理解に根ざした検査・診断・監視体制の確立、予防・治療法の開発」を達成することを本研究班の長期的な目的とする。

## B. 研究方法

1. ジアルジア・回虫・肺吸虫・アニサキス・住血吸虫症・マンソン狐虫症・顎口症などの寄生虫症に対する診断法の確立  
ジアルジア診断イムノクロマトではモノクロナル抗体clone No. 4G1を塗布したテストラインより上位に、抗マウスIgGモノクロナル抗体を塗布したものを実用型とした。テストラインの反応性はジアルジアシスト壁抗原を陽性試料として用いて確認した。

評価用血清は国立国際医療研究センターエイズ研究開発センター (ACC) において、下痢疾患の検査目的のために採取された糞便検体を対象としHIV陽性患者および海外渡航歴のあるものを大別し、リスクグループとした。

組換えブタ回虫抗原rAs16は農業食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究所・細菌寄生虫研究領域の辻尚利博士から、組換えトキシカラ抗原rT. canis Agは分担研究者山崎浩から供与された。トキシカラ診断用のウエスタンブロッティングキットはフランスLDBIO社から購入した。抗原・核酸の調整や患者血清は感染研に依頼のあったアニサキス症例の虫体および血清試料及びアニサキス幼虫

(*Anisakis simplex sensu stricto*の第3期幼虫)を用いた。液体培地 RPMI 1640 中で飼育・培養し(12時間, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>), 遠心後の上清を回収して分泌排泄抗原 (ES抗原) とした。ES抗原を使用してELISAを行ない、全症例の抗体価を改めて測定した。ICTキットによる抗体価の判定は発色程度に基づいて陰性 (レベル0) から強陽性 (レベル8) の9段階に判別した。抗アニサキスIgEの測定はImmunoCAP Lab Testsにより測定した。患者血清は、動物由来の回虫類による幼虫移行症と診断された患者、他の寄生虫疾患 (肺吸虫症とアニサキス症) と診断された患者、およびどの寄生虫にも感染していないと判定された患者の血清を用いた。

マンソン狐虫から精製されたシステインプロテアーゼを用いて操作性を向上させたデバイスを作出した。抗原量、二次抗体の種類や濃度に変更はない。評価に

は、マンソン孤虫が摘出された確定症例（日本人13症例）、また、陰性血清対象として、健常者血清(59例)とマンソン孤虫症以外の寄生虫症確定症例の患者血清(74例)、総数146血清サンプルを用いた。有棘顎口虫のメタロプロテインナーゼ

(MMP) 組換えタンパク質によるタイムノクロマトキットは大腸菌で組換えMMPを用い、試作をタイの企業に依頼した。評価に用いた血清は、タイの顎口虫症流行地で採取した顎口虫症患者血清27例、陰性対照としてタイ人健常者10例、それに顎口虫症以外の寄生虫症患者血清23例を用いた。

蠕虫の遺伝子診断の標的遺伝子はミトコンドリアゲノムにコードされる cytochrome c oxidase subunit 1 遺伝子を基本としたが、寄生虫種によっては16S, 12S rRNA遺伝子なども対象とし、肺吸虫のそれはミトコンドリア・16SリボゾームDNAを、アニサキスはribosomal RNA遺伝子の遺伝子間領域を標的としてnested PCRを行い、原因虫種の同定を試みた。日本住血吸虫症の患者およびスイギュウを対象とした昨年度までの研究で有用性を検討した5種類の組換え体抗原と同感染症陽性および各種陰性犬血清とのELISAでの反応性を、虫卵粗抗原 (SEA) での反応性と比較して評価した。

## 2. 腸管原虫症・アcantアメーバ角膜炎などの原虫症サーベイランス

赤痢アメーバ症臨床研究に関しては、HIV感染者の初診時抗体価データから、国内赤痢アメーバ感染ハイリスク群に於ける赤痢アメーバ抗体血清陽性率を算出し

た。侵襲性赤痢アメーバ症累積罹患率はカプランマイヤー法で算出した。HIV感染者に於ける下部消化管内視鏡検査データベースを用いて、下部消化管症状の無い患者で赤痢アメーバによる下部消化管潰瘍（赤痢アメーバ潜伏感染）が起こっている頻度を算定し血清赤痢アメーバ抗体価を併せて比較検討を行った。HIV感染者のうち、急性虫垂炎の診断を受け、当院で虫垂切除術を受けた45例を対象に、ホルマリン固定検体から赤痢アメーバ感染を病理診断した。また、パラフィンブロックから遺伝子抽出を行い赤痢アメーバ特異的プライマーを用いたPCRを行った。

アcantアメーバの分子疫学については、前年度と同様、全国17施設を拠点として、アメーバ角膜炎由来株のDNAについて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。免疫クロマト法については、通常の方法より感度が高いとされる、蛍光免疫クロマト法（標識ナノ粒子に蛍光シリカ粒子を用いる方法）を抗原検出法として採用した。本キットではサンプルを希釈液と混合し、プレートに滴下、30分の反応後、蛍光スコープで陽性ラインを確認することで抗原を検出する。予備的検討として、アcantアメーバ栄養体の希釈液を用いて本キットの検出限界をin vitroで検証した。またアcantアメーバ角膜炎が疑われた8症例の角膜擦過物を検体として、本キットによる抗原検出を行い、同時にPCR法、培養検査との結果の整合性を確認した。

### 3. マラリア・腸管原虫症の薬剤耐性株の国内への流入のモニタリング法の確立と薬剤耐性機構解明

1984年から1998年に旧予防衛生研究所が行っていた伝染病予防法によるマラリア行政検査によって収集したマラリア輸入例の薄層標本からDNAを回収し、sulfadoxine耐性遺伝子(Dhps)の238 bpのDNA断片は Phusion polymerase (NEB) を用いてネステッドPCRで増幅した。変異部位の残基のピークが二重であったサンプルについてはプラスミドにクローニングし、10個以上のクローンをさらにシーケンスすることで、混合感染を確認した。

MTZ耐性赤痢アメーバ株は) HM-1株をハムスター肝臓へ接種し、形成された肝膿瘍から回収された赤痢アメーバ細胞を再び肝臓へ接種する、と言う過程を繰り返し、病原性を維持させた肝膿瘍(amoebic liver abscess: ALA)株を8, 12, 16  $\mu$ Mと段階的に濃度をあげたMTZ添加、*Criethidia fasciculata*を共培養したしたBIS培地で培養し獲得した。更に、Morfら(Morf et al., *Nucleic Acids Res.*, 2013)により報告された遺伝子発現抑制法を用いて、遺伝子発現抑制のトリガーとなる配列を二種類についてcysteine protease 5 (EhCP-A5) 遺伝子発現抑制を試みた。

### 4. 赤痢アメーバの病原・感染・寄生機構の解明

赤痢アメーバの病原因子の輸送を制御する輸送体ファミリー(cysteine protease binding family protein,

CPBF1-11)のうちCPBF2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 11に関してC末端にHAエピトープを付加したタンパク質を発現する赤痢アメーバ HM-1: IMSS c16の形質転換体の作出は常法に従った。結合タンパク質を赤痢アメーバ抽出液から免疫沈降法により獲得し、LC-ToFMS質量分析法によりタンパク質の同定を行った。

CBA/J マウスに  $1 \times 10^6$  の

*histolytica* と *E. moshkovskii* を感染させ、糞便の培養ならびにPCR法による糞便内アメーバDNAの検出により感染をモニタした。感染14日後にメトロニダゾールを経口投与して初回感染を終息確認後7日目と28日目に*E. histolytica* と *E. moshkovskii*を再感染させ、再感染防御免疫の有無を確認した。

### 5. トキソプラズマ・マラリア等の細胞侵入・感染成立機構の解明と遺伝学手法の開発

Human Foreskin Fibroblast (HFF) 細胞にトキソプラズマRH株を感染させ、感染後 3, 10, 24時間後に感染細胞および非感染細胞を回収し、非感染細胞群にはコントロールとして感染細胞内と同数の原虫を加え、各群からミトコンドリアの抽出を行った。抽出にはMitochondria isolation kit for culture cells (Thermo) を用いた。得られたミトコンドリア画分に存在するトキソプラズマ由来タンパク質を、iTRAQ方により網羅的に同定し、コントロール群と比較して、有意にタンパク量が上昇していたものを陽性とした。



ネズミマラリア原虫 (*Plasmodium berghei*) DNA複製酵素  $\delta$ -DNA polymerase (PolyDel) のエラー校正活性に関与するアミノ酸二カ所 (D311A, E313A) をAlaに置換した変異型PolyDel遺伝子で内因性PolyDel遺伝子を置き換えたネズミマラリア原虫 (第一世代 PbMutator原虫) をマウスに継代感染させ、継代を重ねる過程でPbMutator原虫ゲノムに変異が蓄積するかを検証した。一週間に一回の頻度で感染赤血球1万個を正常マウスへ継代感染し、第122週目にクローン化する。第122週PbMutator原虫クローンにおいて、本来ならば修正されるべき遺伝子変異が校正機能低下により修正されないままゲノムに蓄積することを確認する。さらに第122週PbMutator原虫クローンの表現型を詳細に解析した。リーディング鎖の複製酵素  $\epsilon$ -DNAの校正機能を低下させた原虫を第二世代PbMutatorを第一世代PbMutator原虫の作成方法に準じて作成した。 $\epsilon$ -DNAの校正機能に必要であると考えられるアミノ酸二カ所 (D348A, E350A) をAlaに置換した変異型Poly  $\epsilon$  遺伝子で内因性Poly  $\epsilon$  遺伝子を置き換えたネズミマラリア原虫を作成する。

## 6. エキノコックスの嫌氣的呼吸鎖の生理機能の解明

感染コットンラットから多包条虫を分離し、さらに原頭節を粗精製した後、常法に従いミトコンドリアを単離した。SQR (succinate quinone reductase) 活性の測定はUQ2の278 nmの吸収でモニターした。Flutolanil (抗真菌剤、農薬)、Siccanin (抗真菌剤、水虫の軟膏)、

Atpenin A5 (広域の複合体II阻害剤)、Ferulenol (AOX阻害剤)、新規薬剤 X及び誘導体のSQR阻害活性を測定した。

## 7. RNA-seqによる体内移行期のブタ回虫発現遺伝子解析

ブタ回虫卵は食肉衛生検査所から供与されたブタ回虫成虫体から定法により幼虫包蔵卵を調製した。モルモット

(Hartley系、メス) およびブタ (Danish Landrace/Yorkshire/Duroc交雑種、回虫非感染であることを確認済) には、幼虫包蔵卵を10,000個 (モルモット) と100,000個 (ブタ) 経口投与した。モルモットまたはブタにブタ回虫幼虫包蔵卵を経口投与して7日後に、ベールマン法を用いて肺移行幼虫を回収した。RNA精製にはRibo-Pure (Ambion社)、ライブラリ作製にはTru Seq (イルミナ社) を用いた。マッピングにはTopHat v2.0.10、発現量比較解析にはCufflinks v2.0.1を使用した。リファレンスゲノムは Wormbase236 a\_suum\_davisを用いた。

(倫理面への配慮) 本研究に関わるDNA組換え実験等の許可は当該研究機関にて得られている。また疫学研究に関する倫理指針、臨床研究に関する倫理指針等を遵守した。本研究における患者血清の使用に際しては、ヘルシンキ宣言の趣旨に則り、疫学研究に関する倫理指針、臨床研究に関する倫理指針等を遵守した。本研究は、所属機関の倫理委員会による審査・承認を受けた。

## C. 研究結果

## 1. 消化管寄生原虫検出のための蛍光抗体試薬の開発

既存の直接蛍光抗体法で陽性あるいは陰性であった便検体ならびに検体を用いた場合の本実用型イムノクロマト法の反応性は、陽性検体および陰性検体ともにコントロールラインの発色が認められた。発色強度は目視確認に充分であった。

HIV 陽性のグループでは 36 検体を検査し陽性数は 4、陽性率は 11.1%であった。陽性例の中には赤痢アメーバ陽性検体が 1 例含まれており、同検体は重複感染であったことが示された。36 検体の中で直接蛍光抗体法での検査が行われたものは 27 検体で、陽性数は 2、陽性率は 8.7%であった。この 27 検体における IC 検査の結果は直接蛍光抗体法の結果と一致した。一方、海外渡航者のグループでは 16 検体を検査し陽性数は 2、陽性率は 12.5%であった。陽性例の中には他の原虫類との重複感染はなかった。16 検体の中で直接蛍光抗体法での検査が行われたものは 15 検体で、陽性数は 1、陽性率は 6.7%であった。この 15 検体における IC 検査の結果は直接蛍光抗体法の結果と一致した。フィルター上のテストラインならびにコントロールラインの目視確認を阻害するような例、また検体に浸漬するサンプルパッドにおける検体の吸収性が、粘性のある検体で著しく阻害される例はみられなかった。

## 2. 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マンソン孤虫症、顎口虫症、ならびにトキソカラ症の迅速血清

診断イムノクロマトキットの開発に関する研究を行った。有病率 8.9%(13 /146)では、イムノクロマトキット、ELISA とともにマンソン孤虫症 13 例全例とも陽性であったことから、感度はいずれも 100%であった。しかし、特異性については、イムノクロマトキットでは 97.0%と ELISA の 86.5%より優れていた。さらに、陽性予測値も 76.5%と ELISA の 64.9%よりは高く、言い換えれば、イムノクロマトキットを用いた検査で陽性であれば、マンソン孤虫症である確率が高いことが判明した。今後、検査診断の標準化のための適用事例を集積することが必要であると考えられた。

遺伝子組換え MMP を用いたイムノクロマトキットの評価試験の結果、顎口虫症患者では陽性反応が得られた。しかしながら、顎口虫症以外の寄生虫症患者で false positive となった血清があったことから、現時点での評価は、感度 70.4%、特異性 57.6%とまだ満足できる段階にはないことが判明した。

国内外の医療機関から提供された臨床検体は、日本海裂頭条虫、広節裂頭条虫、アジア条虫、無鉤条虫などの条虫が多く、これらについてはすでに塩基配列法や multiplex PCR 法を確立していたが、より簡便な PCR 産物の制限酵素切断パターン (RFLP) 解析法を考案した。テニア属条虫の鑑別法として新規に pyrosequencing 法を開発した。その他、*Onchocerca lupi* と動物由来オンコセルカ、鉤頭虫の一種 *Corynosoma* sp. や単包虫の一種 *Echinococcus ortleppi* の DNA sequencing 法による鑑別法を確立した。

トキソカラ症に特異的とされるウエストンブロッティング法を用いてプレート ELISA による鑑別法の検証をおこなった。

その結果、トキソカラ幼虫 ES 抗原に陽性かつ組換抗原にも陽性ならば動物由来回虫類による幼虫移行症と診断してよく、その中で ES 抗原と組換抗原への結合の違いによってブタ回虫症と判定できればブタ回虫症であり、それ以外の場合にはトキソカラ症としてよいことが分かった。実際の血清サンプルでは、動物由来回虫症のうち 8.3% がブタ回虫症で、90% 以上がトキソカラ症であった。

### 3. 食品媒介性蠕虫症（線虫と吸虫）の検査・診断法開発

肺吸虫症の病原体診断に関しては肺胞洗浄液は塗抹後に染色封入標本とされて届けられた。鏡下に観察された虫卵は数個に過ぎなかったが、これらの虫卵を標本から掻き取り、DNA を調製して nested PCR を実施したところ、463 bp の増幅産物が得られた。その配列を解読したところ、ウェステルマン肺吸虫（3 倍体型）の配列と完全に一致した。更に PCR 産物の RFLP の結果から、症例はウェステルマン肺吸虫（3 倍体型）の感染であることが判明した。ケリコット肺吸虫およびメキシコ肺吸虫に関しても PCR の系を確立した。

今年度に確認したアニサキス症有症事例の 2 例、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 2 例から分離された合計 13 隻の虫体は分子同定の結果、総て *A. simplex sensu stricto* と同定された。アニサキス症患者の血中抗体価は ICT キットの反応は、ELISA の吸光度の傾向と良く一致した。

ImmunoCAP Lab Tests によるアニサキス症患者の抗アニサキス IgE レベルは、0.28

から 34.20 までの値を示したが、この値と ELISA や ICT キットにより得られた値との間には、相関する関係はないと考えられた。なお、*C. giliakiana*（旋尾線虫 X 型幼虫）感染による症例も、高い値を得た。

### 4. 人獣感染症としての住血吸虫症のモニタリング法の開発

組換え体抗原および SEA の感度 (ST%)、特異度 (SP%)、陽性的中率 (PPV%) および、陰性的中率 (NPV%) を評価した。Sj1TR、Sj2TR および、Sj4TR は  $ST \leq 60\%$  であったため評価の対象から除外した。SjTPx-1 および、Sj7TR は  $ST \sim 80\%$  の高感度を示した。SjTPx-1 および、Sj7TR の特異度は、ともに 98% と高かった。また、それぞれ  $>80\%$  および  $>98\%$  の陽性的中率および陰性的中率を示した。

イヌ糸状虫症およびイヌバベシア症実験感染犬血清は、それぞれ、5 検体が SEA と陽性反応を示した。一方、組換え体抗原とは、後者 1 検体が SjTPx-1 と弱陽性を示したのみであった。これらの成績から、組換え体抗原 SjTPx-1 および、Sj7TR のイヌを対象とした ELISA 抗原としての有用性が示唆された。また、前年度までの研究成績とあわせて考察すると、SjTPx-1 を抗原とするヒトおよび保虫宿主での共通血清診断法開発の可能性が示唆された。一方、Sj7TR は媒介貝感染ステージで発現しており、中間宿主監視用抗原としての有用性が示唆された。

### 5. 腸管原虫の分子疫学調査に関する研究

2006年から2012年の初診患者1303名を対象とした検査で、血清陽性率は21.3% (277/1303)であった。これは、エジプトの農村住民に於ける血清陽性率(24.2%)とほぼ同等であり、東京のHIV感染者(特に男性同性愛者)に赤痢アメーバ症が広く流行していることが改めて確認される結果となった。その中で、既往歴のない患者に於ける抗体陽性率は、16.3% (195/1207)であった。上記既往歴のない患者1207人のうち、18人が侵襲性赤痢アメーバ症を発症し、特に初診時抗体価x400以上の患者では高率であることが示された。また、18人の抗体価の推移を初診時と侵襲性赤痢アメーバ症発症前後で比較したところ、初診時抗体価x200以下の群では、侵襲性赤痢アメーバ症発症時に抗体価が一時的に上昇するのに対し、初診時抗体価x400以上の群では、侵襲性赤痢アメーバ症発症時の抗体価は初診時とほぼ変化無く、治療後に低下することが示された。以上の結果から、初診時抗体価x400以上の高値である患者群では、自覚症状はないものの赤痢アメーバの潜伏感染が起こっており、抗体価x400以上の患者群の20%が1年以内に顕性感染(侵襲性赤痢アメーバ症)を発症することが示唆される結果となった。

HIV感染者の内視鏡データベースを用いて、下部消化管症状のない(GSRS $\leq$ 2)患者の内視鏡所見をまとめた。2010年6月から2013年6月までの期間に380件の下部消化管内視鏡検査がHIV感染者に対して行われ、そのうち下部消化管症状のない71症例のうち、8例(11.3%)がアメーバ性大腸炎と診断された。また、検査

当日に行った血清赤痢アメーバ抗体陽性率は、アメーバ性腸炎のある患者群で有意に高く、多くは抗体価x400以上であった。また、アメーバ性腸炎あり患者群では、HLA DQB1\*06:01が高頻度見られた(アメーバ性腸炎あり患者群71.4%、アメーバ性腸炎なし患者群10.0%)。このHLAは、過去の研究で赤痢アメーバ感染に対してprotectiveに働くということが示されており、アメーバ性腸炎あり患者が顕性感染を示さず、潜伏感染を起こしている病態に関わっていることが示唆された。

HIV感染合併虫垂炎症例で虫垂切除術を受けた45例のうち、7例に赤痢アメーバ感染が確認された。7例のうち4例は病理学的に栄養型アメーバを確認され、HIV感染合併虫垂炎症例では、赤痢アメーバの感染を常に念頭に置くべきであることが明らかになった。

## 6. 分子疫学を中心としたアcantアアメーバ角膜炎の実態に関する調査研究

平成25年度に国内アメーバ角膜炎分子疫学のために解析された株(5株、東北地域で角膜分離株が2株を含む)の型別解析の結果、T4タイプ、3株は世界的に主要な角膜分離株の遺伝子型であるATCC30461 *A. polyphaga* Eye strainの遺伝子型を示し、本遺伝子型が西日本のみならず東日本全般に分布していることが示唆された。東北地域から得られた角膜分離株の1つは角膜炎分離株としてスロバキアで報告されている *Acanthamoeba* sp. AcaVNAK05の遺伝子型を示した。

イムノクロマト法については、in vitro

では 30 分間の反応で 5 個/sample までのアカントアメーバの検出が可能であった。また、角膜炎の原因微生物である黄色ブドウ球菌、緑膿菌、カンジダにおいては陰性であり特異性が認められた。さらに、すべての臨床例(8 例)において角膜擦過物から PCR 法および本キットによりアカントアメーバが検出された。

#### 7. マラリア薬剤耐性株流入のモニタリング法の開発

東南アジアの株は 30 サンプルが野生型 (S436/A437/K540/A581) の遺伝子型、全体の 76% (30/39) を占めた。その他の遺伝子型のうち、耐性獲得に必須な A437G を持たない遺伝子型は感受性型と考えられ、耐性の広まった現在でもほとんど同定されない遺伝子型である。耐性型の A437G を持つサンプルは 12% (5/39) であった。現在、アジアに広く流行している K540E を持つ耐性型の遺伝子型は、これらの年代では得られなかった。よって、90 年代にはアジアでは高度耐性の K540E を持つ dhps 遺伝子型は出現していなかったことが推測される。

アフリカの 151 サンプルからは、81 サンプルの dhps の遺伝子型に成功した。S436/A437/K540/A581 の感受性型は 80 年代から 90 年代に存在していた。この感受性型は全サンプルの 62% (51/81) を占めた。アフリカに独特の感受性型の遺伝子型として、S436F/A437/K540/A581 (n=2) と S436A/A437/K540/A581 (n=8) が得られた。この遺伝子型も現在ではアフリカだけから同定されている。その他に感受性型の遺伝子型として

S436/A437/K540/A581G (n=6) が得られた。耐性型の遺伝子型は S436/A437G/K540/A581, S436/A437G/K540/A581G, S436A/A437G/K540/A581 が 90 年代以降のサンプルから得られた。耐性型は全サンプルの 38% (31/81) を占めた。アフリカのサンプルからでもアジアから移入したことが報告されている K540E を含む遺伝子型は同定されなかった。アジアからアフリカに移入したとされる高度 dhps 耐性株は、この年代に出現していないことが分かった。

#### 8. 赤痢アメーバの薬剤耐性機構の解明

8  $\mu$ M MTZ を添加した ALA 株は約 3 ヶ月で MTZ 非存在下で培養する ALA 株と同程度の増殖速度を持つ株として得られた。そこで MTZ 濃度を 16  $\mu$ M に上げ、高濃度の MTZ に対する耐性株の作成を目指したが、安定した耐性株は得られなかった。一方 12 月から 12  $\mu$ M MTZ での培養も開始し、この株は確立された。H23 年度に報告した耐性株も 12  $\mu$ M MTZ 耐性株での解析であり、ALA 株を使用しても高濃度 MTZ 耐性株の作成は困難であった。この結果は病原性の高低に関わらず MTZ 耐性獲得が困難であることを示す。

*E. histolytica* 病原株 HM-1:c16 株での遺伝子発現抑制方法の確立は、我々のマイクロアレイで発現情報が検討可能であった 2 遺伝子 (EHI\_197520, EHI\_048600)のうち、最初の 132 塩基をトリガーとして、cysteine synthase (CS) のプロモータにより発現制御される EhCP-A5-HA 発現プラスミド

(pEhEx-CP5-HA) の上流に挿入した (p19-trigger-CP5, p04-trigger-CP5) 結果、予想通り 04 トリガー (EHI\_048600 由来のトリガー配列) を使用したサンプルで EhCP-A5 の発現抑制が確認された。以上より HM-1 株で遺伝子発現抑制を行う手法が確立された。この技術を使って MTZ 耐性に関与するとされた遺伝子の発現抑制を行い MTZ への耐性を測る陽性コントロールとするとともに、MTZ 耐性と病原性とのかかわりを検討できる準備ができた。

#### 9. 赤痢アメーバの病原・分化機構の解明

アメーバ症に対する新たな治療・予防法の創出を目指し、本原虫の病原機構・細胞分化機構等を分子レベルで解明することを目的とした。CPBF2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 又は 11-HA を発現した赤痢アメーバ形質転換体から目的タンパク質の発現を確認した。更に、CPBF2-11-HA を発現した形質転換体細胞の粗抽出液から HA 抗体を用いて CPBF を免疫沈降し、SDS-PAGE で展開した後、共沈したタンパク質混合物を質量分析により解析した。質量分析の結果、CPBF2-11 で様々なリガンドが同定されたが、検出頻度から有意と判断されたものは CPBF2, 7, 10 であった。これらの積荷はいずれも N 末端にシグナルペプチドを有し、アミラーゼやベータヒキソースアミニダーゼなど多くの種類であった。それ以外の CPBF では積荷とは考えられないが、膜蛋白質 Galactose/N-acetylgalactosamine 阻害レクチン軽鎖 (CPBF4, 5) などや、ER に局在すると予測される heat shock protein

70 などが同定された。CPBF1 でシステインプロテアーゼが同定された以外、積荷として同定された積荷はすべて糖鎖分解酵素であった。

#### 10. 赤痢アメーバの感染機構の研究

*E. histolytica* と *E. moshkovskii* の感染によって誘導される防御免疫の有無を調べた。まず *in vitro* において *E. histolytica* と *E. moshkovskii* のメトロニダゾール感受性を調べたところ、両原虫ともにメトロニダゾールに対して同程度に量依存的な感受性を示した。次いで、マウスにおいて各原虫の感染 14 日後にメトロニダゾールを経口投与し、薬剤投与 7 日後 (初回感染 21 日後) に糞便中に原虫が認められないことを PCR 法によって確認した。初回感染の終息確認後 7 日目と 28 日目に *E. histolytica* と *E. moshkovskii* を再感染させたところ、実験的に一度感染したマウスは再感染防御能を獲得しており、それも赤痢アメーバの種特異的に防御免疫が誘導されることが判明した。

#### 11. 原虫類への新規遺伝学的手法の開発

第 122 世代 PbMutator 原虫集団から 2 つの原虫クローン (A, B) および第 122 世代コントロール原虫クローン (C) の全ゲノムをリシーケンシングにより約 90 倍高い変異発生率を PbMutator に確認した。クローン A と B の表現型を解析した結果、ともに生殖母体形成能を欠損していることが判明し、変異の中に生殖母体欠損に関わる原因遺伝子変異が含まれている可能性が極めて高い。さらに第 122 世代

PbMutator 原虫集団に抗マラリア薬である Sulfadiazine を投与し、耐性原虫を単離し、全ゲノムリシーケンシングを行った結果、本薬剤の標的と言われている DHPS 遺伝子に変異が生じていた。当該変異はヒト感染における本薬剤耐性原虫で確認されている DHPS に見られる変異と同一であった。DHPS 遺伝子変異が本薬剤に対して抵抗性を付与する原因であることを検証するため、変異型 DHPS 遺伝子で野生型遺伝子を置き換えた遺伝子組み換え原虫を作成したが、組み換え原虫は当該薬剤に対して抵抗性を示さなかった。一方、本薬剤耐性原虫のアピコプラストとミトコンドリアゲノムコピー数が 3 倍近く上昇していたことを見出した。以上の結果は、本薬剤の耐性は DHPS 遺伝子変異は必要条件ではあるが十分条件ではなく、オルガネラコピー数の上昇も本薬剤耐性獲得に必須であることを示唆する。薬剤耐性原虫におけるゲノムコピー数の上昇は、本薬剤耐性機構を解明する上で重要な新発見である（論文投稿中）。

ラギング鎖の DNA polymerase  $\epsilon$  の校正機能に必須なアミノ酸 2 か所をアラニンに置換した変異型 DNA polymerase  $\epsilon$  に成功し、第 40 世代の独立した任意の 2 クローンについて、全ゲノムリシーケンシングにより変異を確認した。

## 12. トキソプラズマ感染における宿主機能ハイジャック機序の解明

iTRAQ 法による解析の結果、最大で 135 種のトキソプラズマ由来タンパク質が宿主ミトコンドリアに結合している可能性が示された。現在、これらのタンパク質

のドメイン解析を行っており、シグナル配列などの有用なドメイン構造を有しているものを選別中である。選別されたタンパク質は順次、ミトコンドリアへの局在を確認し、強制発現株、ノックアウト株を作製し、宿主オルガネラのリクルート能を解析する予定である。

## 13. エキノコックスミトコンドリア呼吸鎖を標的とした創薬

Flutolanil（抗真菌剤、農薬）誘導体 31 化合物、Siccanin（抗真菌剤、水虫の軟膏）誘導体 6 化合物、Atpenin A5（広域の複合体 II 阻害剤）誘導体 4 化合物、Ferulenol（AOX 阻害剤）誘導体 17 化合物、新規薬剤の SQR 阻害活性を測定した結果、Atopenin A がエキノコックス SQR に対して IC<sub>50</sub> 52 nM、ブタのミトコンドリアの活性に対する IC<sub>50</sub> と比較して選択性 0.07 倍を示した。また Siccanin は 3 $\mu$ M、287 倍を示した。新規薬剤 X は 995nM、43 倍を示した。更に新規骨格をもつ X の誘導体の中には X-1, 2, 3 の用に低い IC<sub>50</sub> (94nM, X-1)、高い選択性(2200 倍、X-3)を示すものが得られた。これらは今後の創薬の有望なリードとなると予想される。

## 14. 蠕虫性幼虫移行症の病態の解明

基礎研究ではブタ回虫の体内移行現象の分子基盤を明らかにする目的で、感染 7 日後の幼虫の遺伝子発現を、RNA-seq 法を用いて好適宿主（ブタ）と非好適宿主（モルモット）において比較した。発現量が異なる遺伝子数は 134 で、モルモットで高発現しているものには、好適宿主と非好適宿主の間で有意に発現量が異なる遺

伝子数は 134 であり、そのうちブタで高発現しているものは 72 遺伝子、モルモットで高発現しているのは 62 遺伝子であった。モルモットで高発現しているものには、macrophage migration inhibitory factor、C-type lectin domain containing protein、Ov39 antigen -like のような、宿主免疫調節に関わると予想される遺伝子や、プロテアーゼインヒビター遺伝子が含まれていた。一方、ブタで高発現しているリストには、生殖や成長に関わる遺伝子群が含まれていた。

#### D. 考察

感染実態調査、モニタリング・サーベイランス構築、診断法開発、基盤研究のいずれの分野においても、最終年次の計画は、ほぼ予定通りに実施され、目的に沿った成果を確実に生んだ。

感染実態調査に関しては、特に HIV 感染者における腸管原虫症の中で最も症例数の多い赤痢アメーバ症に関して多くの、臨床疫学的な知見が得られた。渡辺らは赤痢アメーバの HIV 陽性コホート集団での陽性率が 20%と極めて高いこと、更に血清抗体陽性で無症候感染者の中に、無症状性の潰瘍が多く潜在的に存在すること、血清抗体陽性が潰瘍発症の予測因子となること、HIV に伴う虫垂炎の原因に赤痢アメーバが潜在すること、等極めて重要な臨床疫学の成果を報告した。また、アメーバ角膜炎や幼虫移行症等の蠕虫症の感染実態調査などが予定どおり順調に行われ、感染実態状況が確実に把握された。これらの感染実態調査は今後も継続的に運用される必要がある。

診断法の開発に関しても、ジアルジ検出を目的としたイムノクロマトキットが完成し、渡航者・HIV 陽性者の検体を用いて評価がなされ、有用性が確認された。今後、更にクリプトスポリジウムでも同様のキットの作成と地研・病院に対する配布を通じて、臨床診断の援助と国内の診断ネットワークの強化につなげていく必要がある。更に、アカントアメーバの簡便診断キットも試作、評価された。蠕虫診断に関しても、イヌ・ブタ回虫、マンスン狐虫、顎口虫に幼虫移行症や食生活に依存した蠕虫症であるアニサキス・肺吸虫において診断法の開発、鑑別診断の手法が確立した。今後幼虫移行症を中心としてこれら複数の蠕虫種をまとめたキットの創成が必要である。残念ながら、アニサキスの感染・発症の予測に資する血清診断法を確立するには至らず、今後の重要な課題となった。更に人獣共通感染症である住血吸虫症の診断法に関してもヒト・動物いずれにも使用することの可能な robust な診断抗原が得られ、感染浸淫地における感染実態調査に大規模に利用する準備が終了した。

基盤的研究においても成果が挙げられた。野崎らはこれまでに赤痢アメーバの新規リソソーム酵素輸送体ファミリー (Cysteine protease binding protein family) を発見し主要なファミリータンパク質 3 つに関してとその積荷と機能を明らかにしたが、本年度更に他の 3 つの CPBF タンパク質の積荷を同定し、赤痢アメーバに選択的存在するこの CPBF タンパク質群のリソソーム輸送における特殊性・選択性・生理的機能に関して堅牢な



意義を提示した。更に、中野らはマラリアの薬剤耐性の分子疫学的解析による解析を行い、世界的な伝播に関して既知の報告を裏付ける発見をした。赤痢アメーバの薬剤耐性機序の解析に関しても、次年度までに得られたメトロニダゾール耐性化に伴う遺伝子発現プロファイルの変化の理解などと併せ、有用な情報を得ることができた。今後臨床応用が予想される Aunofin などの新規赤痢アメーバ症薬剤に関しても薬剤耐性が獲得されることが予測されるため、その分子機構に関する解析が今後求められる。北らはエキノкокスの複合体 II の SQR 活性を阻害する薬剤を 50 化合物程度スクリーニングし、低 IC<sub>50</sub>、高選択性を示す優れた化合物を複数発見した。これらのリードは長く必要とされてきた新規抗エキノкокス症の治療薬の創成へと繋がる可能性を秘めている。更に、平井らによるマラリア原虫の第 1 世代高度変異体の薬剤耐性原虫における変異導入の確認、更に第 2 世代の作成も順調に展開し、薬剤耐性機構理解に不可欠なフォワードジェネティクスのツールは十分に準備されたといえる。

最終年度も計画通りに研究を展開し、当研究班が長期的に目指している「起因生物の生物学的特質・感染機構の理解に根ざした検査・診断・監視体制の確立、予防・治療法の開発」を達成していきたい。

#### E. 結論

本邦で問題となりうる原虫・寄生虫症の発生・まん延を防止するために不可欠

な、検査・診断法の確立、治療法の開発等に貢献した。更に、上記に不可欠な基盤的な病原機構等の理解に資する成果を収めた。以上、本研究班は最終年度にも、幅広い原虫・蠕虫による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、原虫・寄生虫症の発生動向の正確な把握とそれに基づいた感染症対策に大いに資する成果を達成した。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表（英文論文のみ）

- Shimokawa, C., Culleton, R., Imai, T., Suzue, K., Hirai, M., Taniguchi, T., Kobayashi, S., Hisaeda, H., Hamano, S. Species-specific immunity induced by infection with *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba moshkovskii* in mice. PLoS One 8, e82025, 2013
- Adachi, K., Osada, Y., Nakamura, R., Tamada, K., Hamano, S. Unique T cells with unconventional cytokine profiles induced in the livers of mice during *Schistosoma mansoni* infection. PLoS One 8, e82698, 2013
- Khan, M. G., Bhaskar, K. R., Salam, M. A., Akther, T., Kikuchi, M., Haque, R., Mondal, D., Hamano, S. Comparison of PCR-based diagnosis for visceral leishmaniasis in Bangladesh. Parasitol Int. 63, 327-331, 2014.
- Vallur, A. C., Duthie, M. S., Reinhart, C., Tutterrow, Y., Hamano, S.,

- Bhaskar, K.R., Coler, R.N., Mondal, D., Reed, S.G. Biomarkers for intracellular pathogens: establishing tools as vaccine and therapeutic endpoints for visceral leishmaniasis. Clin Microbiol Infect. doi: 10.1111/1469-0691.12421., 2013
- Inoue, M., Nagi, S., Chadeka, E., Mutungi F., Osada-Oka, M, Oda, T., Tanaka, M., Ozeki, Y., Kalenda D. J. Y., Ono, K., Okabe, M., Niki, M., Hirayama, Y., Fukui, M., Kobayashi, K., Matsumoto, M., Shimada, M., Kaneko, S., Ogura, H., Ichinose, Y., Njenga, S.M., Hamano, S., Matsumoto, S. Relationship between Mycobacterium tuberculosis and hookworm infections among school children in Mbita, Kenya. J Trop Dis 1, 120. doi: 10.1111/1469-0691.12421, 2013
- Ishida H, Imai T, Suzue K, Hirai M, Taniguchi T, Yoshimura A, Iwakura Y, Okada H, Suzuki T, Shimokawa C, Hisaeda H. IL-23 protection against Plasmodium berghei infection in mice is partially dependent on IL-17 from macrophages. Eur J Immunol. 43(10):2696-706, 2013
- Imai T, Ishida H, Suzue K, Hirai M, Taniguchi T, Okada H, Suzuki T, Shimokawa C, Hisaeda H. CD8(+) T cell activation by murine erythroblasts infected with malaria parasites. Sci Rep. 3:1572. 2013
- Duan X, Imai T, Chou B, Tu L, Himeno K, Suzue K, Hirai M, Taniguchi T, Okada H, Shimokawa C, Hisaeda H. Resistance to malaria by enhanced phagocytosis of erythrocytes in LMP7-deficient mice. PLoS One. 8(3):e59633, 2013
- Kondo H, Hirano S, Chiba S, Andika IB, Hirai M, Maeda T, Tamada T. Characterization of burdock mottle virus, a novel member of the genus Benyvirus, and the identification of benyvirus-related sequences in the plant and insect genomes. Virus Res. 2013 Oct;177(1):75-86.
- Makoto HIRAI. Fertilization mechanisms of the rodent malarial parasite *Plasmodium berghei*. Sawada H. Eds. Sexual reproduction, Springer, ドイツ, 2014 印刷中
- 森稔幸, 平井 誠. 動植物・原生生物の受精に共通する配偶子融合機構 澤田均編. 生物の受精, 化学同人, 日本, 2014, 印刷中.
- 稲葉昌丸、糸井素純、井上幸次ほか ソフトコンタクトレンズ消毒薬の汚染状況. 日本コンタクトレンズ学会誌, 55, 109-113, 2013
- 宮崎大、魚谷瞳、井上幸次ほか 感染性角膜炎におけるグラム・ファンギフローラ Y®二重染色の有用性, 日本眼科学会雑誌, 117, 351-356, 2013
- 井上幸次、大橋裕一、浅利誠志ほか, 感染性角膜炎診療ガイドライン(第2版), 日本眼科学会雑誌, 117, 467-509, 2013

- Angeles, JM., and Kawazu, S. Recent advances in the diagnosis and control of *Schistosoma japonicum* infection in animals. *Jpn. J. Vet. Parasitol.* 12(1): 44-50 (2013)
- Angeles, JM., and Kawazu, S. Insights into animal schistosomiasis: From surveillance to control. In A. Miele (Ed.) *Schistosomiasis: Epidemiology, Diagnosis and Treatment*. New York: Nova Publishing Inc., in press.
- Nagayasu E, Ishikawa SA, Taketani S, Chakraborty G, Yoshida A, Inagaki Y, Maruyama H: Identification of a Bacteria-Like Ferrochelatase in *Strongyloides venezuelensis*, an Animal Parasitic Nematode. *PLOS ONE* 8 (3): e58458, 2013
- Kikuchi T, Koga M, Shimizu S, Miura T, Maruyama H, Kimura M: Efficacy and safety of paromomycin for treating amebiasis in Japan. *Parasitol Int.* 62 (6): 497-501, 2013
- 丸山治彦、大前比呂思：吸虫症 別冊日本臨牀 神経症候群(第2版)907-911. 2013年12月30日
- Kawahara, F., Zhang, G., Suzuki, T., Iwata, A., Nagamune, K., and Nunoya, T. Characterization of *Eimeria brunetti* isolated from a poultry farm in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 2013, in press
- 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、防菌防衛, 41, 19-28, 2013
- 永宗喜三郎, トキソプラズマ症, 感染症週報, 15, 20-25, 2013
- Jeelani, G., Husain, A., Sato, D., Soga, T., Suematsu, M., Nozaki, T. Biochemical and functional characterization of novel NADH kinase in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Biochimie* 95, 309-319, 2013.
- 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.
- Furukawa, A., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. Cysteine protease-binding protein family 6 mediates the trafficking of amylases to phagosomes in the enteric protozoan *Entamoeba histolytica*. *Inf. Immun.* 81, 1820-1829, 2013.
- Ali, V. and Nozaki, T. Iron sulfur clusters, their biosynthesis and biological functions in protozoan parasites. *Adv. Parasitol.*, 83, 1-92, 2013.
- Escueta- De Cadiz, A., Jeelani, G., Nakada-Tsukui, K., Caler, E., and Nozaki, T. Transcriptome analysis of encystation in *Entamoeba invadens*. *PLoS One* 8, e74840, 2013.
- Biller, L., Matthiesen, J., Kuehne, V., Lotter, H., Handal, G., Nozaki, T., Saito-Nakano, Y., Schuemann, M.,

- Roeder, T., Tannich, E., Krause, E., Bruchhaus, I. The cell surface proteome of *Entamoeba histolytica*. Mol Cell Proteomics. 2013 Oct 17. PMID: 24136294. In press
- Makiuchi, T. and Nozaki, T. Highly divergent mitochondrion-related organelles in anaerobic parasitic protozoa. Biochimie 2013. In press
- Lee, Y. A., Nam, Y. H., Min, A., Kim, K. A., Nozaki, T., Saito-Nakano, Y., Mirelman, D., Shin, M.H. Entamoeba histolytica-secreted cysteine proteases induce IL-8 production in human mast cells via a PAR2-independent mechanism. Parasite. 2014, 21, 1. In press
- Watanabe, K. et al. Clinical Significance of high anti-*Entamoeba histolytica* antibody titer in asymptomatic HIV-1-infected individuals. J Inf Dis, 2014
- 山崎 浩 抗寄生虫 IgG 抗体, 和田 收, 大久保昭行, 矢崎義雄, 大内尉義, 臨床検査ガイド, 文光堂, 東京, 2013, 878-880
- Yamasaki H. Current status and perspectives of cysticercosis and taeniasis in Japan. Korean J. Parasitol. 51, 19-29, 2013
- Janwan P., Intapan P., Yamasaki H., Laummaunwai P., Sawanyawisuth K., Wongkham C., Tayapiwatana C., Kitkhuandee A., Lulitanond V., Nawa Y., Maleewong W. Application of recombinant *Gnathostoma spinigerum* matrix metalloproteinase-like protein for serodiagnosis of human gnathostomiasis by immunoblotting. Am. J. Trop. Med. Hyg., 89, 63-67, 2013
- Deniz H. I., Yaman A., Morishima Y., Sugiyama H., Muto M., Yamasaki H., Hasegawa H., Lebe B., Bajin M.S. *Onchocerca lupi* infection in Turkey: A unique case of a rare human parasite, Acta Parasitol., 58, 384-388, 2013
- Boonyasiri A., Cheunsuchon P., Srirabheebhat P., Yamasaki H., Maleewong W., Intapan P.M. Sparganosis presenting as cauda equine syndrome with molecular identification of the parasite in tissue sections. Korean J. Parasitol. 51, 739-742, 2013
- Janwan P., Intapan P.M., Yamasaki H., Laummaunwai P., Sawanyawisuth K., Wongkham C., Tayapiwatana C., Kitkhuandee A., Lulitanond V., Nawa Y., Maleewong W. A recombinant matrixmetalloproteinase pro-tein from *Gnathostoma spinigerum* for serodiagnosis of neurognathostomiasis. Korean J. Parasitol. 51, 751-754, 2013
- Chen S., Ai L., Zhang Y., Chen J., Zhang W., Li Y., Muto M., Morishima Y., Sugiyama H., Xu X., Zhou X., Yamasaki H. Molecular detection of *Diphyllobothrium nihonkaiense* in