

201318014B

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23年度～平成25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23年度～平成25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26 (2014) 年 3 月

目 次

| | |
|------------------------------------|----|
| I. 総合研究報告 | |
| 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. 研究成果の刊行に関する一覧表 | 27 |
| III. 研究成果の刊行物・別刷 | 51 |

I . 総合研究報告書

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幅広い寄生虫症を対象とし、原虫・蠕虫症の発生・まん延を防止するために不可欠な、起因生物の生物学的特質・感染機構の理解と、サーベイランス・検査・診断法の確立、治療法の開発等を目指した。対象とするすべての原虫・蠕虫症に関して、顧みられない寄生虫症対策に資する様々な成果を挙げた。これらの成果は、サーベイランス・診断体制の構築に役立つと同時に、国内外の寄生虫症感染情報ネットワークの強化、寄生虫学研究基盤の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

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した。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った。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た。まず、腸管原虫症・アカ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

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・監視体制の確立、予防・治療法の開発が

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。トキソ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した。

B. 研究方法

1. ジアルジア症・アカントアメーバ症・幼虫移行症・住血吸虫症等の寄生虫症に対する診断法の確立

ジアルジアのシスト壁抗原を認識する抗ジアルジアモノクロナル抗体を蛍光抗体試薬として利用するために各クローン抗体をFITC標識し、各種消化管原虫類を用いた特異性および感度試験を行った。更に、ジアルジア迅速検査用イムノクロマト（以下ICと省略）を試作し、用いたモノクロナル抗体の有用性、糞便検体を用いた場合のキットとしての特異性と感

度、また簡便な検査法の確立を行った。更に、国内のジアルジア感染リスクグループであるHIV陽性者ならびに海外渡航者の下痢症検体を用いて、各グループにおける検出率を調べた。

アカントアメーバ検出のイムノ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、蛍光イムノクロマト法（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、アカント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。またアカント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。

トキソカラ診断を目的として、イヌ回虫第3期幼虫由来のcDNAライブラリーからトキソカラ症患者血清を用いたイムノスクリーニングによってクローン化された抗原分子（プロテオグリカンの一種）をコードするcDNAを大腸菌で発現させた。この組換え抗原をアフィニティ精製によって純度の高い抗原を得、これを用いてキットを作成した。抗原濃度、二次抗体の種類や濃度、発色基質の種類や濃度は、同一抗原を用いたELISAの検査データを基に最適化した。キットの評価は、日本人は健常者血清50検体、抗体検査、臨床症状や牛・鶏レバーの生食歴の有無などからトキソカラ症と診断された日本人患者血清（13検体）、さらに、海外の

トキソカラ症と診断された患者血清30検体、また、血清学的にボーダーラインの血清12検体、それに健常者血清7検体を用いた。

マンソン孤虫症診断には、従来から用いられていたPBS抽出粗抗原やマンソ孤虫パラミオシンと比較してシステインプロテアーゼが抗原として感度や特異性が優れていたため、システインプロテアーゼを抗原として用いた。評価には、マンソン孤虫確定患者血清（日本人13例）、陰性対照血清として、日本人健常者血清（トキソカラ症の項と同様）とタイ人健常者血清（9検体）、さらにマンソン孤虫症以外の寄生虫症患者血清（74例）を用いた。

顎口虫症の検査は有棘顎口虫第3期後期幼虫のマトリックスメタロプロテイナーゼ（matrix metalloproteinase, MMP）をRT-PCRによって増幅し、これを大腸菌で発現させて、遺伝子組換えMMPを得、これを用いてイムノクロマトキットを試作し、評価を行った。評価には、タイにおける顎口虫症流行地で採取した顎口虫症患者血清27例と陰性対照として、タイ人健常者10例と顎口虫症以外の寄生虫症患者血清23例を用いた。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し、これら血清試料を用いて、イムノクロマト法に基づく迅速診断キット（ICTキット）の反応性を検討した。

日本住血吸虫ゲノムデータベースから、分泌抗原、タンデムリピート抗原（TRP）等の血清診断抗原候補分子を選抜した。Thioredoxin peroxidase-1（SjTPx-1）と、4種類のTRP分子（Sj1TR、Sj2TR、Sj4TRお

よび、Sj7TR）を大腸菌組換え体タンパク質として発現・精製してELISAでの有用性を評価した。検査対象の虫卵陽性は、Kato-Katz法および、糞便DNAを材料としたPCR法（Stool-PCR）で判定した。TPRの寄生虫各発育期での発現を蛍光抗体法で観察した。

遺伝子検査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（以下、cox1遺伝子）を基本としたが、寄生虫種によってはリボソームRNA遺伝子（ITS領域含む）なども対象とした。検査材料の固定法や保存状態に関係なく鑑別できるよう、寄生虫の種類ごとにプライマーのデザイン、DNAポリメラーゼの種類を含めたPCR条件を詳細に検討した。肺吸虫については、ミトコンドリア・16SリボソームDNAを標的とするnested PCRの系を構築し、外国産肺吸虫の種同定や外国人肺吸虫症例の原因種同定に本法が適用できるかを調べた。

2. 腸管原虫症・アカント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、国際医療研究センターエイズ臨床センターで2000年以後に診断されたHIV感染合併の腸管原虫症について、診療録を用いた後方視的検討を行い、臨床的な問題点、主に初診時の血清抗体価による発症の可能性と無症候感染者における大腸鏡による回盲部潰瘍の発生率についてを検討した。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。

アカントアメーバの分子疫学については、眼感染症ネットワークの全国17施設を拠点として、角膜炎検体からのアカントアメーバの分離と臨床像の収集、ならびにミトコンドリア遺伝子による分子疫学解析によりアメーバ角膜炎由来株のTタイピングによる分類を行った。更に、アカントアメーバの薬剤感受性評価法の開発を行った。

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クエンスすることで、混合感染を確認した。

メトロニダゾール(MTZ)耐性赤痢アメーバ株(*Entamoeba histolytica*)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 μ Mと段階的に濃度をあげたMTZ添加、*Crithidia 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をシステインプロテアーゼの免疫沈降法により獲得し、LC-ToFMS質量分析法によりcysteine protease binding family protein 1 (CPBF1)の同定を行った。Gene silence法により遺伝子発現を阻害し表現型を常法に従い、観察した。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(CPBF1-11)をゲノムから同定した。発現をDNAマイクロアレイで確認した後、発現の最も高いもののうちCPBF8の結合タンパク質を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。Gene

silence法により遺伝子発現を阻害し、常法に従い表現型を観察した。

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 cl6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。

これまで非病原性と考えられてきた *Entamoeba moshkovskii* の病原性をヒト遺伝学とマウス腸管感染モデルと用いて解析した。野生型もしくは IFN- γ 欠損 CBA/J マウスの虫垂に *E. moshkovskii* 栄養体を接種し、各免疫臓器において Th1 ならびに Th2 サイトカイン産生細胞の経時的変化をモニタした。また CBA/J マウスに 1×10^6 の *E. 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

小胞 (evacuole, eV) 形成機構およびリクルート能の解析のために、GFPにGPIアンカー付加シグナルを付与したCHO細胞 (GFP-GPI-CHO) を用いてPVおよびeVの形成を観察した。また、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。さらに細胞種によるトキソプラズマ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およびERのリクルート能、およびeV形成能を詳細に検討した。

更にiTRAQを用いてトキソプラズマ感染により Human Foreskin Fibroblast (HFF) 細胞ミトコンドリアに結合するタンパク質を解析した。HFF細胞にトキソプラズマを感染させ、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法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。

DNAのラギング鎖およびリーディング鎖のDNA複製酵素である δ および ϵ について、その校正機能に必須なアミノ酸をアラニンに置換した変異型遺伝子をそれぞれ調製した。変異型遺伝子で野生型遺伝子を置き換えた遺伝子組み換えネズミマラリア原虫 (PbMut δ および ϵ) を作成した。組み換え原虫をマウスに継代感染をすることで、マラリア原虫ゲノム内に変異が蓄積されることを検証した。さらに一定期間の継代を経た後のPbMut δ

に抗マラリア薬Sulfadiazineを投与し、当該薬剤抵抗性原虫を単離した。薬剤耐性原虫の全ゲノムを解析し、当該薬剤の原因遺伝子として知られているDHPS遺伝子に変異が生じているかを検証することでPbMutが遺伝学ツールとして機能することを検証した。

6. エキノコックスの嫌氣的呼吸鎖の生理機能の解明

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、エキノコックス原頭節から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。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。

エキノコックス複合体IIの特徴を調べる目的でミトコンドリアより複合体IIの精製を試み、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い、その一次構造上の性質を明らかにした。さらにモデル系である回虫ミトコンドリアの複合体IIの結晶解析を行い、そのフマル酸還元活性を示すための基本構造についての情報を得た。

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・自由生活性原虫検出試薬の開発

FITC 標識したジアルジア抗体は、両原虫に対する特異的な反応を示し、糞便中に存在する原虫に対しても代表的な市販蛍光抗体試薬である Merifluor C/G と同等な検出能力を示すことを確認した。

試作ジアルジア検査用 IC は簡便なストリップ型で、単純に試料に浸漬する簡便な使用方法を考案した。2 種類のモノクロナル抗体を用いた点が本 IC の特徴で、ポリクロナル抗体を用いた場合のロット差の問題の解消を図った。感度・特異性は抗原検出用の従来品とほぼ同様の結果を示し、前処理を工夫することで固定試料も使用が可能な汎用性を確保した。検査時間は試料前処理を含め 20 分程度であり、迅速性は良好であった。試作 IC にコントロールラインを加えた実用型 IC を用いて各グループにおける検出率を調べた結果、両グループともに 12% 前後の検出率を示した。これは従来知られていた国内の同様のグループの感染率より高く、欧米諸国における感染率に近似した。

アカントアメーバ検出 IC では 30 分間の反応で栄養体 5 個/sample までのアカントアメーバの検出が可能であり、臨床例の角膜擦過物からもアカントアメーバを検出することができた。

2. 寄生蠕虫症（幼虫移行症）の血清診断法開発

幼虫移行症として重要なマンスン孤虫症、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。トキソカラ症と診断された患者血

清のイムノクロマトキットによる発色強度（8 段階）と ELISA の吸光度との間には高い相関がみられ、相関関係を表す Spearman 係数 (Rs) は 0.799 と高い値を示した。すなわち、ELISA の吸光度が高ければ、発色強度も高く、ELISA でボーダーラインと判定された血清では、発色強度は低下した。健常者のなかで false positive となった症例は日本人、ブラジル人ともいなかった。

イムノクロマトキットと ELISA では、マンスン孤虫症 13 例全例が陽性となり、感度はいずれの方法でも 100% であった。しかしながら、イムノクロマトキットの特異性は 97.0% と ELISA の特異性 86.5% より優れていた。さらに、有病率 8.9% (13/146) での陽性予測値はイムノクロマトキットで 76.5%、ELISA で 64.9% と、イムノクロマトキットが検査結果の信頼性が高いことが示された。

遺伝子組換え MMP を用いたイムノクロマトキットの評価の結果、顎口虫症患者では陽性反応がみられたが、顎口虫症以外の寄生虫症患者の一部で false positive が検出された。現時点でのキットの感度は 70.4%、特異性は 57.6% と低かった。

アニサキスでは、患者の血中抗体価を ELISA により測定し、ICT キットの反応と比較した。その結果、両者の測定結果は良く一致することが分かった。

3. 食品媒介性蠕虫症の遺伝子検査・診断法開発

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解析法を考案した。テニア属条虫の鑑別には pyrosequencing 法による鑑別法を確立した。この方法は、従来の電気泳動法とは異なり、段階的に相補鎖を合成し、その反応副産物であるピロリン酸を ATP sulfurylase によって ATP に変え、ルシフェラーゼ存在下でルシフェリンと反応させ、化学発光の強度から塩基配列を決定するものである。その他、動物由来のオンコセルカ、単包虫の一種、有棘顎口虫と二核顎口虫、*Dirofilaria repens* と *Dirofilaria immitis*、*Echinococcus ortleppi* と *Echinococcus granulosus*、あるいは鉤頭虫の一種、*Corynosoma sp.*などの鑑別法を確立した。中には、*D. repens* や *E. ortleppi* のように国内初となる症例の鑑別診断に至った例もあった。

肺吸虫の種鑑別に関しては、nested PCR により、ウェステルマン肺吸虫（2倍体型・3倍体型）、宮崎肺吸虫、ヒロクチ肺吸虫、ケリコット肺吸虫、メキシコ肺吸虫の DNA から産物が増幅され、その配列解読により種が同定できた。この nested PCR を臨床材料へ適用し、在日外国人の肺吸虫症例を診断した（ミャンマー人のヒロクチ肺吸虫症例およびタイ人姉妹のウェステルマン肺吸虫（3倍体型）症例）。

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 SjTPx-1 および、Sj7TR の患者診断用 ELISA 抗原としての有用性が示唆された。また、これらの抗原を用いた ELISA では、虫卵排泄中の患者と治療後の虫卵陰性者を識別できる可能性も

示唆された。組換え体抗原 SjTPx-1 および、Sj1TR のスイギュウを対象とした ELISA 抗原としての有用性が示唆された。Stool-PCR 法で評価したスイギュウの日本住血吸虫症感染率は 46% と高かった。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。Sj7TR が媒介貝感染ステージで発現することが蛍光抗体法で確認された。

5. 腸管原虫の分子疫学調査に関する研究
2001～2010 年に追跡された HIV 感染者で、腸管原虫症と診断された症例は、ジアルジア症 4 例、クリプトスポリジウム症 11 例のみであった。これは、同じ時期に診断された赤痢アメーバ症 170 例と比較して極めて少なかった。臨床像と総合した結果、ジアルジア症は症状が軽微なために見逃されやすく、抗 HIV 薬の副作用との混同から一般検査室でのジアルジア症腸炎、クリプトスポリジウム下痢症が見逃され易いことが原因であると考えられた。また、特にクリプトスポリジウム下痢症を直接検鏡検査のみで見つけることが困難であることが示唆されており、検査室での見逃しが多数起こっていること考えられた。腸管原虫の感染実態を高い精度で把握するためには、積極的な検体収集かつ感度の高い検査法の導入が必要と考えられた。

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 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カントアメーバ角膜炎の実態に関する調査研究

わが国の **AK** の原因となるアメーバには主要な **7** 種のタイプがあり、特に **ATCC30461** ならびに **ATCC50497** が多かった。しかし、地域や年次による違いは特に認められなかった。定量による評価では、視力予後不良や治療によるアメーバコピー数減少不良は初診時のアメーバのコピー数と病期（重症度）に相関していた。アメーバ角膜炎治療薬のスクリーニング開発に役立つアッセイ法に関しては、呼吸活性でアメーバの生死を判別でき、そのことによって培養で行うよりも短時間でアメーバに対する薬剤感受性を測定することができた。

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

12 μ M MTZ耐性株を樹立し行ったトランスクリプトーム解析からは、既知のMTZ耐性株で発現抑制が知られる遺伝子(Ferredoxin)の発現低下や、発現上昇が予想された遺伝子(peroxiredoxin, superoxide dimustase)の有意な発現変化は見られなかった。一方でHP-1(hypothetical protein-1, EHI_006850), ISF1(Iron-Sulfer flavoprotein-1, EHI_138480), ISF2(Iron-Sulfer flavoprotein-2, EHI_025710), ISF4(Iron-Sulfer flavoprotein-4, EHI_022600)の4遺伝子について発現上昇が見られたためHA-tagとの融合タンパク質として高発現株の作成を行ったが、これらの株のMTZ耐性度は非常に弱く、また過酸化水素水に対しても弱い耐性を示した。

また細胞の表現型では細胞サイズの増加、接着能・食食効率の低下、細胞障害活性の低下、プロテアーゼ含有量の低下、グルコース代謝活性の低下、他種抗アメーバ薬への耐性が見られた。

まず、赤痢アメーバ準株であるHM-1株に2 μ MのMTZを加え、対数増殖期まで培養し、続いて1 μ Mずつ濃度を上げたMTZを加えた培地での培養を続けることで耐性株の樹立を目指したが、12 μ M以上の耐性度を持つ株を得ることができなかった。そこで同様の手法で肝膿瘍から回収したamoebic liver abscess(ALA)株で耐性株の確立を目指したが、これも12 μ M

MTZ に対する耐性株は得られたが高濃度 MTZ 耐性を獲得することはなかった。

9. 赤痢アメーバの病原・分化機構の解明

病原性において中心的な役割を果たす病原因子システインプロテアーゼの細胞内輸送において中心的な役割を果たす輸送体システインプロテアーゼ結合タンパク質遺伝子 CPBF1 を赤痢アメーバのみならず原虫において初めて同定した。

CPBF1 はシステインプロテアーゼのリソソームの輸送とプロセッシング・活性化に不可欠な分子であることが示された。

CPBF1 のタンパク質ファミリーを赤痢アメーバゲノム中から同定した。更に、その中で、CPBF1 と同様に発現の多い CPBF8 に関して、その結合リガンドを同定し、赤痢アメーバにおける CPBF8 の生理的な役割を解明することに成功した。

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。CPBF は哺乳動物を始め他種生物に存在せず、赤痢アメーバ症に対する新しい薬剤・ワクチン開発の合理的な標的である。

10. 赤痢アメーバの感染機構の研究

マウス腸管定着後の感染の遷延・排除機構の解明を試みた。*E. histolytica* および *E. moshkovskii* 感染中に脾臓・腸間膜リンパ節において Th1 および Th2 サイトカインの産生細胞の動態を調べた。IFN- γ 、IL-4 産生細胞は検出されなかった。パイエル板では、*E. moshkovskii* が腸管から排除される感染 2 週後まで、IFN- γ 産生 CD4 陽性細胞の誘導は両群間で有意な差は認められなかった。一方、IFN- γ 産生 CD8 陽性細胞は *E. moshkovskii* 感染で著明に増加した。誘導された IFN- γ の役割を解明するために、IFN- γ に対する中和抗体を投与した。IFN- γ 中和により、*E. moshkovskii* 感染が遷延し、一方で病態緩和が観察された。IFN- γ が原虫排除や *E. moshkovskii* 感染における病態に深く関与することが示唆された。

更に IFN- γ KO (CBA/J) マウスを用いて IFN- γ の役割を検証したところ、*E. moshkovskii* 感染によって誘導される IFN- γ は下痢などの消化管症状を引き起こしつつ原虫の排除に機能しており、宿主にとっては諸刃の刃であることが確認された。消化管症状の病因となりうる腸

上皮細胞のアポトーシスに関して、*E. moshkovskii* 感染時に誘導される IFN- γ は、腸管において NKG2D や RAE-1 の発現上昇を介して「腸上皮のアポトーシス」を引き起こし、諸刃の刃として「消化管症状」と「原虫の排除」に機能する可能性が示唆された。

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。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

高頻度突然変異発生型ネズミマラリア原虫 (PbMut δ および ϵ) の構築に成功した。PbMut δ の全ゲノムシーケンシングと変異解析を行った結果、変異発生率が野生型原虫の約 80 倍上昇していることを確認した。さらに PbMut δ から薬剤耐性原虫を単離することに成功し、標的遺伝子であると予想される DHPS 遺伝子に変異が挿入されていることを確認した。PbMut ϵ の作成に成功し、変異が挿入されていることを確認した。

DNA 複製酵素の校正機能を欠損したマラリア原虫は、予想通りマウスへの継代感染により遺伝子変異を蓄積した。さら

に PbMut δ から薬剤耐性原虫を容易に単離することも確認できた。以上のことから、本研究課題で創出した突然変異発生型ミューテーターマラリア原虫は、新規遺伝学的ツールとして機能しうると考えた。さらに突然変異率を上昇させるスーパーミューテーターを作成すること、そしてこの新規遺伝学的手法を他の原虫類へ適応することが今後の課題である。

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

GFP-GPI-CHO 細胞を用い、eV と PV への GPI の取込みを観察したところ、GPI はそれらの両方に取り込まれていた。一方で GPI が存在している脂質マイクロドメインの構成蛋白質の 1 つである caveolin-1 およびマイクロドメイン局在タンパク質である Src は、eV にも PV にも取り込まれなかった。これらの結果から、eV の構成要素として宿主細胞膜成分が存在すること、トキソプラズマにおいて PV 形成の際に認められるタンパク質のソーティングと呼ばれる現象が、eV 形成時にも行われていること、が示唆された。

次に、ロプトリータンパク質である ROP1,2 および 16 を指標に eV 形成能を野生株と GPI 欠失変異株で比較したところ、変異株で明らかに eV の形成が過剰になっていた。したがって、トキソプラズマは宿主 GPI を eV 形成における負の調節因子として用いている可能性が示唆された。

さらに細胞をコレステロール抽出剤である methyl- β -cyclodextrin (M β CD) で処

理しマイクロドメイン構造を破壊した状態でPVおよびeVの形成を観察したところ、MβCD処理はPV形成には影響を与えないが、eVの形成を有意に阻害していた。すなわち正常なeV形成には正常なマイクロドメイン構造の存在が必須であり、トキソプラズマはマイクロドメイン構造をeV形成の正の調節因子として用いている可能性が示唆された。

原虫が宿主細胞内で増殖する際、PV膜に宿主のミトコンドリアやERがリクルートされることが知られており、またそれらのリクルートにはロプトリー蛋白質の関与が考えられている。そこでGPI欠失細胞におけるeV過剰注入の表現型を検討するため、原虫の宿主細胞ミトコンドリアのリクルート能をMitoTrackerあるいは抗COX IV抗体により、またERのリクルート能を抗KDEL抗体による染色で比較した。その結果、野生株と比較して、明らかに変異株内でのリクルートが増加していた。

トキソプラズマ原虫を野生株及び変異株に加え、48時間培養後の原虫の増殖を測定した。その結果、2種類の変異株は、野生株と比較して有意に原虫に対する感受性が增大していた。そこで、この感受性の上昇の原因を詳細に検討するため、野生株と2種類の変異株において、原虫の細胞侵入能を比較したところ、3種の細胞株間に有意な違いは認められなかった。続いて、原虫の宿主細胞侵入後の増殖の様子をより詳細に検討した。侵入後24時間まで、野生株および変異株内での原虫の増殖に有意な差は認められなかったが、24時間以降、トキソプラズマの増殖は変

異株内において野生株に比較して優位に上昇していた。以上の結果から、宿主GPI欠失によるロプトリータンパク質群の過剰注入は宿主ミトコンドリアやERのPVへのリクルートを亢進し、結果として原虫の増殖を誘導した。

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。

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

複合体IIはミトコンドリア内膜に局在しており、基本的に4つのポリペプチドから構成されている。分子量約70 kDaの最も大きいサイズのサブユニット(Fp)は補欠分子族としてFADを含み、これと分子量約30 kDaで3種の異なるタイプの鉄-イオウクラスターを含むlpサブユニットから比較的親水性の触媒部位が形成されている。この触媒部位はSQRではコハク酸からフェナジンメトスルフェート(PMS)など水溶性の電子受容体への、逆にQFRでは水溶性の電子供与体である還元型メチルビオロゲンからフマル酸への電子伝達を担っている。この触媒部位が膜に安定に局在するためには2つの小さな疎水性のサブユニットが必要であり、多くの生物種の酵素でヘムbを含むことからシトクロムbサブユニット(CybLおよびCybS)と呼ばれている。シトクロムbは複合体IIとユビキノンやロドキノンなど膜中に存在する疎水性の電子伝達成分との電子の受け渡しに必要であり、複合体としてはシトクロムbが膜アンカ

一として膜内に局在し触媒部位はマトリックス側に突出した形をとっている。

薬剤標的としてのエキノコックス複合体 II の特徴を明確にする目的で、全てのサブユニットとアセンブリーファクターである SDHAF1、SDHAF2 の完全長 cDNA の塩基配列を決定した。これらの配列は報告されている同じ扁形動物に属する住血吸虫の配列に最も近かった。

各サブユニットに関してさらに詳しく調べた所、Fp は最も保存性が高く、FAD を共有結合している His も保存されていた。Ip に関しては 2 種の存在 (Emlp1 および Emlp2) が明らかになった。また Ip とともにキノン結合部位を形成する CybL と CybS は Fp、Ip に比較して種特異性が高い傾向があり、これは他の生物種のアンカーサブユニットと同様の性質であった。

さらに複合体 II の立体構造上の特徴をモデル系である回虫の酵素を用いて明らかにし、キノン類と電子伝達を行う部位が標的として有望である事が明確になった。この結論に基づき、エキノコックス幼虫のミトコンドリアを用いて当研究室の持つキノン部位阻害剤ライブラリーのスクリーニングを行った結果、フルトラニルとその誘導体、抗真菌薬シッカニン、複合体 II の強力で特異的な阻害剤アトペンニン A5、フェルレノールとその誘導体に加え、新規薬剤とその誘導体の中に選択性および阻害効果で極めて有望な化合物を複数見出した。

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。

幼虫移行症の原因虫種の確定法確立を目的として、組換えブタ回虫抗原の As16 と組換えトキソカラ抗原 TcAg によってブタ回虫感染とイヌ回虫感染を鑑別できるのか、ブタ回虫感染動物が産生する抗体が As16 特異的エピトープを認識するのかを検討した。ブタ回虫に感染したブタが産生する抗 As16 抗体は As16 特異的でありイヌ回虫抗原には結合せず、両者の組み合わせによる鑑別診断はおそらく可能であることが明らかとなった。また、ブタを用いた感染実験により、どちらもトキソカラ属に属するイヌ回虫とネコ回虫では、感染後の体内移行経路が大きく違うことが示唆された。

D. 考察

本研究において、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、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、赤痢アメーバ症・ジアルジア症・クリプトスポリジウム症が重要であるが、そ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、ジアルジア症・クリプトスポリジウム症は国内で利用出来る低価格の診断系が存在しないことから、診断の場で過小評価されていることも明らかとなった。今後これらの腸管原虫症の国内発の診断キットの創成が望まれる。

アメーバ角膜炎についても、国内の主要な医療機関と関連学会とが連携し、サーベイランスシステムが強固に構築され、今後のアcantアメーバ感染症の監視が強化された。また、幼虫移行症等の蠕虫症の感染実態も確実に蓄積されたが、今後もこれらの希少感染症は継続的に監視を続ける必要性があり、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、ジアルジア検出を目的としたイムノクロマトキットが

完成し、臨床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されると同時に、赤痢アメーバとの統合キットとなって、全国の拠点地研・病院等に対して配布され、臨床診断援助と国内の診断ネットワークの強化につなげることが求められる。アcantアメーバ角膜炎の簡便病原体診断キットも作成・評価され、今後臨床の場で用いられることが期待される。蠕虫診断に関しても、イヌ・ブタ回虫、マンソン狐虫、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。今後さらに、アニサキスの重症化の予測に資する血清診断法を確立することが今後求められる。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可能なユニバーサル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ことが可能となった。

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、その積荷の多様性を示し、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。CPBF は赤痢アメーバに選択的に存在するタンパク質であり、新規の治療薬・ワクチン等の合理的

な標的のひとつである。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、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等薬剤耐性の出現に備えて不可欠な理解が達成された。今後臨床応用が予想される **Auronofin** 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、その分子機構に関しての解析が今後求められる。北らは蠕虫の複合体 II の構造を明らかにするとともに、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 **IC50**、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。今後マラリアで問題となる薬剤耐性の獲得機序、予測等を行う画期的なツールが用意されたことになる。また、トキソプラズマの宿主適応機構や線虫のステージ変移の分子機構に関しても、3 年間では結果しなかったが、今後確実に優れた成果に結びつきうる結果を生んだといえることができる。

以上本研究班は計画通りに多面的研究を展開し、優れた研究成果を生んだ。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）

Husain, A., Jeelani, G., Sato, D., and Nozaki, T. Global Analysis of gene expression in response to L-cysteine deprivation in the anaerobic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *BMC Genomics* 12, 275, 2011.

Penuliar, G. M., Furukawa, A., Sato, D., and Nozaki, T. Mechanism of trifluoromethionine resistance in *Entamoeba histolytica*. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 2045-2052, 2011.

Mi-ichi, F., Makiuchi, T., Furukawa, A., Sato, D., and Nozaki, T. Sulfate activation in mitochondria plays a crucial