

6. 寄生動物部

部長 遠藤卓郎

概要

寄生動物部における研究活動は専門性と継続性の重視と社会還元を基調とし、原虫・蠕虫類に係る疫学、生理学、生化学、分子生物学ならびに、これらに起因する疾病の予防と診断に関する研究を行っている。研究事業としては、所内関連部の協力を得つつ「食生活と環境の変化に伴う寄生虫・原虫症の対策と監視強化に関する研究」を継続している。

本年度は、原虫類としてミクロスポリジウム、クリプトスポリジウム、ジアルジア、自由生活性アメーバ類、赤痢アメーバ、マラリア、蠕虫類として多包条虫(エキノコックス)、アライグマ回虫、広東住血線虫、肺吸虫、アニサキス等々が研究・検査の対象となっており、近年の寄生虫症の多様化傾向が顕著に現れている。一方、研究手法としては全ての分野において分子生物学的手法が導入されている。寄生虫学研究にあつて研究対象、研究手法の変遷ぶりには今昔の感がある。

わが国におけるエキノコックス対策の一環として、厚生省科学研究助成による『動物由来寄生虫症の流行地拡大防止対策に関する研究』が実施されているが、当該部では飼い主の転居等により北海道から他都府県へ移動するイヌを対象に感染実態調査を実施している。また、動物展示施設あるいは、野生化・定着した地域におけるアライグマ回虫症の感染予防対策にも力を注いだ。昨年度、首都圏を流れる河川に生息する汽水性のカニに高率に大肺肺吸虫の幼虫(メタセルカリア)が寄生していることを報告したが、その寄生率は周年を通じて30%前後と一定していた。近年、都市部を流れる河川は憩いの場として復権しつつあり、不慮の感染事故を防ぐ観点から本種の人への感染性について検討する必要があるものと考えている。その他、昨年に引き続き、吸虫類の中間宿主貝の殺貝試験が行われている。赤痢アメーバ症は感染症法のもとで患者の全数把握が義務化されているが、年間の届け出数がおよそ500例ほどで推移している。当該部では赤痢アメーバの代謝経路の研究から原虫に特有の酵素系を標的とした創薬研究を続け

ている。また、赤痢アメーバではその旺盛な貪食能が病原性との関連で議論されており、当部では貪食に係る膜輸送(cytosis)について分子レベルでの機能解析を進めている。昨年度から導入したミクロスポリジウム研究では検査法開発、疫学調査、流行株の収集を行なうと共に、網羅的な蛋白解析、遺伝子情報の収集に努めている。クリプトスポリジウム等の耐塩素性原虫類による水道水汚染問題は、(1)各種排水による河川等の汚染負荷の増大、(2)水の再利用の加速、それに伴う(3)水の再生循環に要する時間の短縮、という諸要因が背景にある。わが国の立地条件および都市構造から判断すれば、今後ともこれらの汚染リスクの増大が懸念される。当該部ではこれら原虫類の活性評価法開発と各種消毒処理による不活化の効果判定および、クリプトスポリジウム/ジアルジアの特異遺伝子解析と遺伝子情報の拡充に努め、分子疫学研究への基礎資料としてきた。自由生活性アメーバは環境水中におけるレジオネラの宿主であることが判明したことで多方面からの研究の必要性が増しているが、それ自体の病原性が問題となるアメーバ種に対して改めて注目し、わが国の入浴施設等における汚染の実態調査、分離株の病原性について検討を行った。

本年度は人事面での移動はなく、現在は当部職員が10名、これに研究臨時職員4名、客員研究員、協力研究員および流動研究員22名、実習生1名の協力を得て運営されている。限られた陣容で多様化する原虫・蠕虫問題に対峙せざるを得ず、効率化を迫られる日々である。

研究業績

I. 疫学

1. 微孢子虫(Microsporidia)の感染、診断、疫学、予防に関する研究

微孢子虫(Microsporidia)は細胞内で発育・増殖する微小な病原性寄生虫で、およそ150属1000種からなる。感染宿主も昆虫・魚類・爬虫類・哺乳類等に及ぶ。ヒトに感染する微孢子虫は7属(*Enterocytozoon*、*Encephalitozoon*、*Pleistophora*、*Trachipleistophora*、*Vittaforma*、*Brachiola*、*Nosema*)が知られている。このうち、わが国で存在が確認され、流行の定着・拡大が懸念されている微孢子虫は *Encephalitozoon cuniculi* である。今のところ動物での流行が問題となっているが、新興病原体・人獣共通感染性病原体であり、また播種性疾患であることから、ヒトへの健康影響を含めた疫学調査研究が緊急の課題となってきた。そこで、*Encephalitozoon* を中心としたヒトに感染性の微孢子虫に関する検査法の開発・確立、流行株の集積と分子生物学的解析、疫学調査、流行対策などを柱とする総合的な研究を2003年度から開始している。また、腸管寄生性微孢子虫(*Enterocytozoon bienersi*、*Encephalitozoon intestinalis* など)流行株の遺伝子データの集積などを主な目的に、本虫の臨床原虫学的研究が進んでいるマレーシア国ケバングサーン大学と共同研究に向けての基礎的検討を行っている。

[古屋宏二、八木田健司、朝倉登喜子]

2. 動物における *Encephalitozoon* 感染の血清疫学

わが国の動物における *Encephalitozoon* 感染の疫学研究の一環として、関東地方におけるイヌの *Encephalitozoon* 感染の血清疫学的調査を行った。供試血清は2003年に関東地方のフィラリア検診時に収集したイヌ血清159検体であった。これらの検体(200倍希釈血清)について、まず、精製 *E. cuniculi* 胞子から抽出した可溶性抗原—ELISA法を用いてスクリーニングし、ELISA値0.5以上を示す9検体を選別した。ELISA結果は0.5以下の検体150例、0.5—1.0の検体8例、1.0以上の検体1例であった。これらのELISA値が高めな9検体について、次に、感染細胞を用いた *in situ* EIA法により *Encephalitozoon* 胞子抗体の測定を行った。その結果、胞子に対する抗体反応性が50倍希釈でも認められず、最終的に9検体全例を陰性と判定した。

今回の調査結果は、血清159検体と少ないものの、関東地方の健康なイヌの *Encephalitozoon* 感染の流行状況を反映したも

のと考えられ、最近のノルウエー、スイスでの調査研究報告と同様、健康犬には *Encephalitozoon* 胞子抗体保有犬を確認できなかったことを示すものである。今後、神経症状を有するイヌ、encephalitozoonosisを疑うイヌを対象にした調査が行われる必要があると考えられた。

[佐々木志朗(日獣大)、朝倉登喜子、古屋宏二]

3. クリプトスポリジウム症の地域集団発生事例

2002年4月北海道において、室蘭保健所管内(胆振支庁)の宿泊施設を利用した札幌市の専門学校生300名のうち170名にクリプトスポリジウム感染による集団下痢症が発生した(札幌市保健衛生部)。北海道保健福祉部保健予防課が中心となって行った原因究明のための調査と検便で、同時期に当該宿泊施設を利用した江別市の大学生にも下痢症状(153名中8名)を訴える者がいることが分かり、宿泊施設の従業員を含めた検便を実施した。その結果、検便が可能であった江別市大学生3名のうち2名、当該施設従業員350名のうち28名の便からクリプトスポリジウム・オーシストを検出。札幌市専門学校生有症者からの分離オーシストを含めて、ポリスレオニン遺伝子、COWP遺伝子を標的としたPCR-RFLP解析及び塩基配列の決定を行い、3地域の有症者を *C. parvum* genotype 1(ヒト型)の感染と判定。感染源と感染経路は特定できなかったが、宿泊施設を起点にしたヒト型 *C. parvum* による広域のクリプトスポリジウム症集団発生事例と判断された。

同年6月に千葉県でもクリプトスポリジウム感染による集団下痢症が発生した。北海道に修学旅行した高校生303名のうち、牧場で農業体験した9名中8名が下痢症を発生、検便で5名からクリプトスポリジウム・オーシストを検出。ポリスレオニン遺伝子、COWP遺伝子を標的としたPCR-RFLP解析から有症者を *C. parvum* genotype 2(ウシ型)の感染と判定。感染源と感染経路は特定には至らなかったが、牧場体験と密接なウシ型 *C. parvum* によるクリプトスポリジウム症集団発生事例と判断された。

いずれの事例も研修旅行、修学旅行、地域特性などをキーワードとする新たなタイプのクリプトスポリジウム症集団発生事例と考えられた。

[八木欣平(北海道衛研)、福島得忍(千葉衛研)、古屋宏二]

4. レジオネラの宿主アメーバに関する研究

1) 浴槽モデルを用いたアメーバ汚染のモニタリング

循環式浴槽の微生物汚染防止対策を考案する目的で、前年度に引続き、循環浴槽実験プラントを用いて宿主アメーバなら

びにレジオネラ等細菌類による汚染のモニタリングを行った。本年度は塩素、紫外線等の消毒効果の試験を行い、ろ過装置内の加熱操作(67°C、10分間、1回/日)、またろ過装置内の塩素による逆洗浄操作(5mg/L、5分間、1回/日)を行う条件では、アメーバ数の上昇は認められず、試験中は低値を持続した。その結果、レジオネラ菌数も比較的低値で推移した。バイオフィーム量としてはろ過装置内のろ材中に多量に蓄積されることから、ろ過装置を直接的に消毒する方法がアメーバの低減に効果を示したものと考えられた。

[八木田健司、下河原理江子、杉山寛治(静岡県衛生研究所)、遠藤 卓郎]

2) レジオネラ症集団発生事例に関連した宿主アメーバ調査

国内で発生した客船レジオネラ症集団発生事例に関し、感染源調査の一環として宿主アメーバの調査を行った。感染源と推定された入浴施設に、附設のろ過装置内より採取されたろ材を試料として、その表面に付着するバイオフィームを回収しアメーバの分離を行った。しかしながら、ろ材回収前に消毒作業が行われていたことから、アメーバ検出には至らなかった。原因究明には現場保全がきわめて重要で、保全の義務付けに関して行政的な対応を図るべきものとする。

[八木田健司、倉 文明(細菌第一部)]

5. 北海道から移動するイヌの多包条虫感染実態調査

ヒトの多包虫症は多包条虫の幼虫寄生によって引き起こされる人獣共通寄生虫症である。わが国における常在地は現在のところ北海道であり、それ以外の都府県におけるヒト多包虫症も、少数の原発疑い例を除いて、ほとんどが北海道に関連する症例である。このため終宿主の移動もしくは人為的移入を介して多包条虫が北海道外へ伝播されることが懸念されている。そこで我々は、北海道から他都府県へ移動するイヌに注目し、2003年9月より北海道から飼い主の観光や転居によって移動するイヌの多包条虫感染状況に関する調査を開始した。2003年度末までに102検体の検査を行い、そのうち2検体の抗原陽性例を検出した。陽性2例の本来の飼育地は、それぞれ北海道および他都府県の各1例であった。

[森嶋康之・杉山 広・荒川京子・川中正憲]

6. 広東住血線虫症の疫学と予防に関する研究

1) 沖縄県での血清疫学的調査

沖縄県では1999年12月～2000年6月までの4ヶ月の間に、症状は軽微ながら感染源が特定されない10例もの広東住血線

虫(Ac)感染事例が続発した。このことは沖縄県でのAcの感染様式に何らかの変化が現われてきた可能性があり調査が必要となった。本年度は粗抗原を用いたELISA法により血清疫学的調査を実施した。検査対象とした一般住民の血清は1139本であり、これらは10市町村11箇所の地区において各地区につき約100名の住民から市町村を通じてインフォームドコンセントの手続きを経た後に提供された。これらの被験血清についてAc粗抗原によるELISAを実施した。予め既知の陰性血清群のELISAの値を求めてカットオフ値を設定したが、それを超えて陽性を示した「ELISA陽性」の被験血清は、全体の7.7%に上った。大きく3地域に分けて地域別に「ELISA陽性率」の高い順に見てみると、沖縄本島南部が3.7～13.4%(平均10.1%)、離島が3.1～20.0%(平均7.5%)、本島北部が0～9.2%(平均6.6%)であった。更に特異的なAc抗原によって検討している。

[川中正憲、荒川京子、杉山広、森嶋康之、安里龍二(沖縄衛環研)]

7. アライグマ回虫による幼虫移行症の発生予防と監視

1) 動物展示施設におけるアライグマ回虫症の感染予防対策について

動物展示施設は、レクリエーションの場であると共に、教育、調査・研究、種の保存等といった大切な使命を担っており、今日の社会において欠かせない存在となっている。しかしながら、動物展示施設の特異性から、通常、ヒトと触れあうことのない野生動物等が飼育係等の従事者や来園者と直接的・間接的に接触する可能性がある。アライグマ回虫はヒトに感染すると致死的な神経障害を惹起するが、動物展示施設においてアライグマの本種寄生例が少なからず確認されている。これらの陽性動物展示施設に対して、昨年度に策定した「アライグマに寄生するアライグマ回虫の検査等のガイドライン」に基づく検査と対策を継続している。

[川中正憲、荒川京子、杉山 広、森嶋康之]

2) 野生アライグマの糞便内虫卵検査

野生アライグマによるアライグマ回虫幼虫移行症の発生予防と監視の為に、捕獲個体の糞便内虫卵検査を継続実施している。検査には神奈川県はアライグマ駆除業者、自治体から、また愛知県は開業獣医師から、直接送付された糞便を用いた。平成15年度の検査件数を県別に挙げると、神奈川県(112)、愛知県(7)であった。現在までのところ、これらの糞便からはアライグマ回虫卵は検出されていない。

[荒川京子、杉山 広、森嶋康之、川中正憲]

8. 東京都における肺吸虫の発生分布に関する研究:大平肺吸虫メタセルカリアの寄生状況の季節消長

東京都内を流れる荒川のクロベンケイガニに、大平肺吸虫のメタセルカリアが寄生することは既に報告した。今年度はメタセルカリアの寄生状況の季節消長を調べた。調査地には冬季でもカニ採集が比較的容易であった西葛西地区(江戸川区)を選んだ。その結果、クロベンケイガニでの寄生率は7月:25%、8月:29%、12月:29%、2月:32%と、夏季と冬季とでほとんど差異がないことが判明した。

[杉山 広、森嶋康之、荒川京子、川中正憲]

II. 分類

1. *Naegleria* 属アメーバの多様性

温水環境中に生息するアメーバの *Naegleria fowleri* は原発性アメーバ性髄膜炎を引き起こすことから、温水環境中に存在する *Naegleria* 属アメーバの迅速検出法の検討を行なっている。これまでの研究では ITS1/2 領域の PCR-RFLP を行い、上述の *N. fowleri*、*N. lovaniensis*、*N. australiensis* に特化した型別を検討してきた。本年度では ITS1/2 領域ならびに 18S rRNA 遺伝子の塩基配列決定を行い、*Naegleria* 属アメーバの多様性について検討を行なった。その結果、*N. lovaniensis*、*N. australiensis*、*N. tihangensis*、*N. philippinensis*、*N. endoi*、*N. clarki*、*N. Jamiesoni*、*N. mexicana* の ITS1/2 領域と相同の配列を有する株が分離された。また、*N. italica*、*N. laresi*、*N. andersoni* と高い相同性を有する株の存在を確認した。一方、本属アメーバにおいては 18S rRNA の配列に多様性が見られ、*N. fowleri* ではわが国の患者分離株と基準株 NF66 株との間に 2 塩基の差異が認められた。また、フィリピンの臨床分離株である *N. philippinensis* は 18S rRNA 遺伝子内にイントロンを有するのに対して、わが国の分離株はイントロンを欠いていた。今後の *Naegleria* 属アメーバの研究は病原性因子の探求が重要性を増すものとする。本研究は、厚生労働科学研究費補助金健康科学総合研究事業「温泉・公衆浴場、その他の温水環境におけるアメーバ性髄膜炎の病原体 *Naegleria fowleri* の疫学と病原性発現に関する研究」(H13-生活-042)の一部として行われたもので、多数の協力研究者の協力を得て行なわれた。

[泉山信司、朝倉登喜子、下河原理江子、八木田健司]

2. 分子生物学的手法による肺吸虫種の同定・鑑別

1) マルチプレックス PCR による本邦産人体寄生性肺吸虫のメ

タセルカリアでの種鑑別

我が国には人体寄生性肺吸虫として、ウェステルマン肺吸虫(以下、ウ肺吸虫)と宮崎肺吸虫の2種が分布している。カニに寄生するメタセルカリアが感染源となるが、メタセルカリアの形態は両種で相互に酷似するため、鑑別は容易ではない。そこで両種の ITS-2 領域に認める配列の差異を利用して、同定・鑑別に関する検討を行った。ITS2 領域内の異なる部位にウ肺吸虫あるいは宮崎肺吸虫に特異的なプライマーを設計し、これと吸虫類の ITS2 領域に共通のプライマーセットを共存させて PCR(マルチプレックス PCR)を行った。その結果、ウ肺吸虫では 140bp と 520bp、宮崎肺吸虫では 300bp と 520bp、更に大平肺吸虫では 520bp の産物が増幅された。今回開発したマルチプレックス PCR により、肺吸虫類の同定(520bp)と、ウ肺吸虫(140bp)か宮崎肺吸虫(300bp)かの鑑別が、1本のチューブでの反応で行い得ることが明らかになった。

[杉山 広、森嶋康之、川中正憲、亀岡洋祐(遺伝子資源)]

2) メタセルカリアでのタイ産ヒロクチ肺吸虫の同定

タイには6種類の肺吸虫が分布するが、ヒトへの感染が証明されているのはヒロクチ肺吸虫 *Paragonimus heterotremus* だけである。本虫の ITS2 領域の配列を基にして本種に特異的なプライマーを設計し、このプライマーとタイで得た各種肺吸虫(ヒロクチの他に、ウェステルマン、ハリナスタ、タイの4種)のメタセルカリア由来 DNA をそれぞれ用いて、PCR を行った。その結果、ヒロクチ肺吸虫 DNA のみで予想サイズの PCR 産物が得られた。カニからの検出過程で脱糞してしまったメタセルカリアは、感染力を保持しているにもかかわらず、形態での種の決定が極めて困難であったが、本法で迅速・正確に種鑑別ができた。本法は、タイでの人体寄生性肺吸虫(症)の疫学調査において有効なツールになると考えられた。

[杉山 広、森嶋康之、川中正憲、亀岡洋祐(遺伝子資源)、アチャリア・ラングジルジ、パンシン・ケツダット(スリナカリンウイロート大学・タイ国)]

III. 生理・生化学・分子生物学

1. クリプトスポリジウム等消化管寄生性原虫類に関する研究

1) HIV 感染者におけるクリプトスポリジウム症の遺伝子型解析

国内におけるクリプトスポリジウム症例の遺伝子型は、*C. parvum* ヒト型が最も多く(約 63%)、これまで調べた HIV 感染者はすべて(10 例)ヒト型という特色がある。本年度、都内および近郊の病院より HIV 感染者のクリプトスポリジウム症例が相次ぎ、集団発生の可能性が考えられた。*C. parvum* ヒト型はポリスレオニン領域の塩基配列解析から4つのサブタイプに分類され、

HIV 感染者はすべて同一のサブタイプを示した。非 HIV 感染者はそれ以外の 3 タイプに属した。また、一部の男性同性愛者間では STD としてクリプト症が広がっている可能性が示唆された。[八木田健司、泉山信司、朝倉登喜子、菊池 嘉(国立国際医療センターエイズ治療研究開発センター)、増田剛太(都立北療育医療センター)、相楽裕子(横浜市立市民病院感染症部)]

2) 旅行者下痢としてのジアルジア症の遺伝子型解析

ジアルジア症は国内での集団感染例はないが、散発的な発生はこの数年間およそ 100 例/年のレベルにある。その多くは旅行者下痢症と考えられ、国内へのジアルジアの流入が続いていると想定される。これに関連して本年度、アフリカ、東アジア、東南アジア諸国に派遣された海外青年協力隊より検出されたジアルジアの遺伝子型解析を行った。ヒト感染性の遺伝子型としては、ヒトを含めた哺乳類に広く感染性を有する Assemblage A1 および B とヒトのみに感染する A2 があるが、現在まで調べた材料はすべて A1 に限られていた。

[八木田健司、泉山信司、朝倉登喜子、朝日博子、東京都予防衛生協会]

2. 病原性関連タンパクの探索を目指した *Naegleria* 属アメーバ総タンパクのウエスタンブロット

1) *Naegleria fowleri* のモノクローナル抗体と総タンパクとの反応性

Naegleria fowleri の病原性追跡あるいは、診断法の確立のために必須となるモノクローナル抗体の作成を進めている。得られた 11 系統のクローンについて、アメーバ虫体との反応性および反応タンパクの特定を試みた。7 種のうちの 1 種(アイソタイプ IgM κ)は *N. fowleri* に対して特異的な反応パターンを示し、市販のモノクローナル抗体の示すパターンとは異なっていた。タンパクの特定のために 2D-PAGE を用いた解析では複数の spot に反応したため、さらに糖鎖に対する反応性を検討し抗体の特徴の詳細を分析中である。

[下河原理江子、小村麻子、中村 健(北里大・寄生虫学)、泉山信司、八木田健司]

2) 抗回虫アクチンポリクローナル抗体を用いた *Naegleria* 総タンパクとの反応性

Naegleria fowleri ならびに *N. lovaniensis* の生化学的特徴をプロテオーム解析し病原性特異性を明らかにする目的で、アメーバの総タンパクの 2D-PAGE を進めているが、各タンパクスポットの性質を明らかにしてゆく研究の一環として、各種抗体による性質を検討した。抗回虫アクチン抗体は、42KD の総タンパクの約 7% を占めるスポットと反応し、2D-PAGE の分離タンパクの 1

つを特定することができた。さらに弱いながら反応するスポットを 3 種認め、アクチン関連タンパクとして解析を進めている。一方、抗- α チューブリン抗体ならびにアメーバプロテウスのアクチンに特異性を示すモノクローナル抗体では反応が認められなかった。

[下河原理江子、小村麻子、中村 健(北里大・寄生虫学)、泉山信司、八木田健司]

3. GenomiPhi による *Cryptosporidium* の鑄型 DNA の増幅

Cryptosporidium 等耐塩素性微生物は水系集団感染を引き起こすことから問題となっている。実用的な *Cryptosporidium* の試験管培養系は確立されておらず、集められる試料には限りがあり、DNA の精製回収効率も高くないことから、分子疫学的解析等に用いる試料を増やす何らかの方法が求められていた。本研究ではランダムプライマーとファージ DNA ポリメラーゼを応用した GenomiPhi (Amersham Pharmacia) による非特異的な DNA 増幅を *Cryptosporidium* に適用したところ、得られた増幅産物を鑄型とした PCR が可能であることを確認した。元々の試料の純度が低い、あるいはコピー数が十分ではなかった場合では増幅産物からの PCR は成功しなかったが、限られた試料を有効に活用する方法として改良に努めている。

[田栗利紹(長崎県衛生公害研究所)、泉山信司、朝倉登喜子、八木田健司]

4. *Eimeria* オーシストの紫外線耐性

当該研究では、紫外線による耐塩素性微生物対策の有用性について検討している。すでに、*Giardia* 嚢子および、*Cryptosporidium* 嚢子は紫外線への感受性が高く、極めて低線量で不活化され、光/暗回復が確認できないことが示されている。これは、むしろ例外的と考えられることから、今年度はクリプトスポリジウムと分類学的の胞子虫類のオーシストを用いて紫外線感受性を検討した。本研究では鳥類の胞子虫である *Eimeria acervulina* を用いて評価を行った。紫外線照射した *E. acervulina* の嚢子を用いてトリへの感染実験を行った。投与嚢子数と排出嚢子数の関係を表す検量線を作成し、紫外線照射後の嚢子を投与したトリから一定期間に排出されるオーシスト数より消毒の効果を評価した。その結果、8mJ/cm² の照射で 2-log 程度の嚢子の不活化効果が得られた。すなわち、*Eimeria* においては、2-log の嚢子を不活化するのに必要な線量は *Cryptosporidium*、*Giardia* の 8 倍に相当し、微生物の不活化手段としての紫外線の照射線量の検討には慎重を期す必要があることが指摘された。[泉山信司、笹井和美(大阪府立大学)、八木田健司]

5. 2D-PAGE 及びウェスタンブロットによる *Naegleria fowleri* 総タンパク質の解析

前年度に引き続き、自由生活性アメーバで強い病原性を持つ *N. fowleri* について、2D-PAGE 解析、N 末端アミノ酸配列解析を行い、数種の抗体を用いて Western blot による 2D-PAGE スポットパターンの解析を行った。さらに N 末端ブロックのタンパク質について中間配列の解析方法を検討した。また、これまでに得られた情報をもとに *N. fowleri* の 2D-PAGE マップを作成し、データベース構築を試みた。ちなみに、今年度までに 56 個のスポットについて N 末端アミノ酸配列解析を行い、その内 30 個について 20 残基前後の N 末端アミノ酸配列が得られた。さらに 10 個のスポットについて中間アミノ酸配列解析を完了した。

[小村麻子、八木田健司、泉山信司、下河原理江子、山河芳夫(細胞化学)]

6. 真菌類より抽出された抗ネグレリア物質

Naegleria fowleri 等の病原性アメーバに対する真菌類由来の抗アメーバ物質の検索を行った。有効性評価には一般的に薬剤感受性試験に用いられるペーパーディスク法を応用し、*Naegleria lovaniensis* あるいは *Acanthamoeba castellanii* を一定密度で増殖させた大腸菌塗布寒天培地上に試料を含むディスクをのせ、形成される阻止円の大きさを調べた。検索の結果、800 試料中 2 試料に有効性が認められ、*N. lovaniensis* の方が高い感受性を示した。そのうちの F1557 株からの抽出物に関しては、*in vitro* 試験で *N. lovaniensis* に対する細胞膨化とそれに続く崩壊という細胞障害性が確認された。現在、その物質の分子構造等を詳細に解析している。

[長谷川 賢、東岸和明(玉川大農学部)、八木田健司]

7. 原虫における含硫アミノ酸合成・分解経路の解析

1) 赤痢アメーバ含硫アミノ酸分解酵素メチオニンガンマリアーゼの機能解析及び創薬

宿主哺乳動物に存在せず、原虫にだけ選択的に存在している代謝経路及び酵素は創薬の合理的標的である。我々は赤痢アメーバの含硫アミノ酸の分解において中心的な役割を果たすメチオニンガンマリアーゼの解析を継続して行った。メチオニンガンマリアーゼはメチオニン、ホモシステイン、システインを分解する一部の嫌気性細菌と原虫だけに存在する酵素である。メチオニンアナログトリフルオロメチオニンは原虫に取り込まれ、代謝され原虫を殺滅することが示された。メチオニンガンマリアーゼ特異的阻害剤プロパジルグリニンによりトリフルオロメチオ

ニンの効果は失われたことよりトリフルオロメチオニンの標的がメチオニンガンマリアーゼであることが確認された。トリフルオロメチオニンはほ乳動物培養細胞に対しての毒性を示さなかった。準備的動物感染実験によるとトリフルオロメチオニンはアメーバ性肝膿瘍の治療に優れた効果を示した。

[小林正規(慶応大学医学部熱帯医学寄生虫学教室)、浅井隆志(同)、竹内勤(同)、所正治(金沢大学医学部寄生虫学教室)、野崎智義]

2) 赤痢アメーバのセリン生合成経路の解析

寄生原虫は一般に単純化された生合成経路をもつが、赤痢アメーバはその中でも例外的に比較的自己充足的なアミノ酸合成経路をもっている。上述の含硫アミノ酸の生合成はそのもっともよい一例である。我々は含硫アミノ酸生合成経路の調節機構を明らかにすることを目的として、上流に存在するセリン代謝経路を解明することを目指した。赤痢アメーバにはリン酸化並び非リン酸化セリン代謝経路と呼ばれる2つの独立した経路が存在する。本年度は昨年度の遺伝子同定に次ぎ、リン酸化セリン代謝経路のグリセリン酸リン酸デヒドロゲナーゼ(PGDH)について酵素学的解明を行った。赤痢アメーバの PGDH はバクテオリデスから水平転移によって遺伝子を獲得したと考えられた。赤痢アメーバの PGDH の酵素学的性状から、非リン酸化セリン代謝経路がセリンの分解と糖新生に機能するのに対して、本経路はセリンの生合成の方向に機能していることが示された。従って、セリン代謝経路はいずれも下流のシステイン生合成経路の基質濃度を調節する重要な役割を果たすと考えられた。

[Vahab Ali, 橋本哲男(筑波大学)、繁田泰男、野崎智義]

8. 原虫における鉄硫黄タンパク質生合成の解析

鉄硫黄クラスターを活性中心とする鉄硫黄タンパク質は電子伝達・窒素同化・光合成など様々な役割を果たすし、すべての細胞にとって必須である。嫌気性原虫赤痢アメーバにおいてはフェレドキシン、フェレドキシン・ピルビン酸フェレドキシン酸化還元酵素などが鉄硫黄タンパク質と嫌氣的電子伝達において重要な役割を果たす。赤痢アメーバにおける鉄硫黄クラスター生合成は Nif と呼ばれるもっとも単純な系で行われる。システインから硫黄原子を遊離させる活性をもつ酵素コンポーネント NifS と遊離した硫黄原子を一時的に捕捉する足場コンポーネント NifU の二つのタンパク質だけで機能することが示された。また、鉄硫黄クラスター生合成能を欠損した大腸菌株を用いた発現機能解析により、赤痢アメーバの NifS, NifU は多種生物内で嫌氣的条件下でのみ鉄硫黄クラスター合成を行えることを明らかにし、赤痢アメーバの嫌氣的代謝の理由のひとつが明らかとなった。

[Vahab Ali, 繁田泰男, 徳本梅千代(大阪大学理学系大学院)、高橋康弘(大阪大学理学系大学院)、野崎智義]

9. 赤痢アメーバの食食の分子機構の解明

1) プロテオーム解析による食食の網羅的解明

赤痢アメーバの食食における分子機構を包括的に理解することを目的として、ファゴソームタンパク質の網羅的プロテオーム解析を行った。細胞表面レセプター、加水分解酵素、低分子量 GTP 結合タンパク質、細胞骨格タンパク質などが時間依存的に動員されることが明らかとなった。更に、経時的に頻度の変化する代表的なタンパク質に関して免疫蛍光抗体法によりプロテオーム解析の結果を確認した。現在更に分離株間のファゴソームタンパク質のプロファイルの相違を解析している。

[岡田麻美, Chris Huston (University of Virginia), Barbara Mann (University of Virginia), 野崎智義]

2) 食食・病原機構に関与する Rab の機能解析

ア 食食における *E/Rab7* アイソタイプの機能解析

Rab7 はリソソーム及び後期末ソームで機能する低分子量 GTP 結合タンパク質である。他種生物とは異なり赤痢アメーバには8種類のアイソタイプが存在する。赤痢アメーバが単細胞生物であること、その細胞分化が他の真核生物と比較して単純であることを考慮すれば、この Rab7 アイソタイプの多様性の生物学的意義は興味深い。現在 *E/Rab7A-H* の8つのアイソタイプの細胞内局在、食食、リソソーム酵素の輸送、病原性などへの関与に関して、詳細な解析を行っている。

[中野由美子, 津久井久美子, 岡田麻美, めで島麻衣, 徳丸文恵, 繁田泰男, 野崎智義]

イ *E/Rab7A* の結合タンパク質の解析

赤痢アメーバ *E/Rab7A* は食食胞に消化酵素を運搬するのに重要な Rab タンパク質である。微生物や宿主細胞の食食と分解に必須な Rab の機能調節機構を理解することを目的として、*E/Rab7A* に結合するタンパク質をアフィニティ精製し、タンパク質を同定した。これは哺乳動物と酵母でレトロマーと呼ばれる複合体であった。この複合体は他種生物では5つのコンポーネントからなるが赤痢アメーバではそのうち3つの分子しか同定されなかった。また、Rab7A との結合も他種生物では例がなかった。現在、細胞内局在、機能を詳細に解析している。

[津久井久美子, 中野由美子, 岡田麻美, 徳丸文恵, 繁田泰男, 野崎智義]

ウ 食食の分子機構の可視化

赤痢アメーバにおける食食の過程、ファゴソームの成熟過程

の分子機構を詳細に明らかにすることを長期的目的とした研究を行った。高感度・高解像度生細胞観察システムを用いて、生きた赤痢アメーバ細胞の食食と食食後の分解の過程をリアルタイムで解析できるシステムを構築した。様々なオルガネラマーカールと緑色蛍光タンパク質で標識した Rab5, Rab7A タンパク質を用いて、食食後のオルガネラの pH の変化、Rab の動員、加水分解酵素の輸送などを明らかにしようとしている。本年度は観察システム、観察条件の至適化、食食胞の酸性化の過程を明らかにした。

[ピスワ ミトラ, 津久井久美子, 中野由美子, 野崎智義]

10. リーシュマニア原虫におけるプロスタグランジン生合成の解析

キネトプラスチド科に属する原虫はトリパノソーマやリーシュマニアなどが含まれ、これらの原虫に起因する疾病に関しては、いずれも安全で有効な治療法が開発されていない。我々はすでにこれらのプロスタグランジンを合成する能力があることを明らかにしてきた。本年度はリーシュマニア原虫に関して詳細の解析を行い、*Leishmania major* からプロスタグランジン F 合成酵素遺伝子を単離するとともに、タンパク質の酵素学的同定を行った。更に、PCR、免疫蛍光抗体法により本酵素が *L. major*, *L. donovani*, *L. infantum* などの旧世界リーシュマニアに選択的に存在することを明らかにした。リーシュマニア原虫の産生するプロスタグランジンが宿主の生理と病理を修飾している可能性が示唆された。

[Bruno K. Kubata(ケニア医学研究所), Zakai Kubata (大阪バイオサイエンス研究所), 裏出良博(同), 早石修(同), 河津信一郎(国立国際医療センター), 野崎智義]

11. 赤痢アメーバの低分子量 GTP 結合タンパク質の脂質修飾酵素の同定と解析

赤痢アメーバの Rab の膜への局在に不可欠なカルボキシル末端部のイソプレニル化の分子機構解析を長期的目的として、まず、Ras, Rac, Rho などの低分子量 GTP 結合タンパク質のファルネシル化酵素を解析した。

[牧岡朝夫(慈恵医科大学), 熊谷正広(同), 野崎智義]

12. SYBR Green I を用いたフローサイトメトリーによるマラリア血球感染率測定

マラリアのコントロールには臨床分離株における薬剤感受性

のモニタリングや新規薬剤の開発等が重要であり、これらの目的には信頼性が高く、かつ簡便迅速な測定法が求められる。そのような測定法の1つとして、フローサイトメトリーによる感染率測定が挙げられる。フローサイトメトリーは顕微鏡と良く相関した結果が得られることが多くの研究者より報告されているが、利用される機会は多くない。従来の染色法では高価なUVレーザーが必要であること、バックグラウンドが高いことなどがその障害となっている。本研究では染色試薬、染色条件、および試料の保存方法の検討を行い、簡便で信頼性の高い改良法を確立した。詳細な染色条件の検討から、1mlの1×SYBR Green I / 0.85% NaCl - 20mM Tris緩衝液(pH8.8)と0.5%の血球濃度に希釈した感染赤血球 16 μ lを混合し、5分間室温で静置する方法が良好であった。試料の固定は、1%Paraformaldehydeを含むAlsever液を用いる方法が良好で、1週間以上の保存が可能であった。全血を用いた場合でも白血球の影響を受けることなく測定が可能と考えられた。一例として、Chloroquineを用いた薬剤感受性試験の結果をフローサイトメトリーと顕微鏡計数との間で比較したところ、感染赤血球の計数およびIC₅₀の評価において、同等の結果が得られた。方法は、簡便迅速であること、また原虫の発育段階に関する情報も同時に得られること等々の利点があり、薬剤のスクリーニングや薬剤感受性試験等への応用が期待される。

[泉山信司、朝日博子]

13. 新規 GPI アンカー阻害剤の抗マラリア作用

高速スループットスクリーニング法で自然界の物質から見い出された GPI アンカー阻害効果のある新規構造物の抗マラリア作用について試験した。In vitro 試験は熱帯熱マラリア原虫を用いて、新規に標準化した Flow cytometry により評価した。誘導体 9 種の中で2種が比較的高い増殖抑制効果を示し、50%抑制濃度が 0.6-1.7 μ g/ml であった。ネズミマラリアをた予備的な in vivo 試験では、100mg/kg の高い投与量においても治療効果は得られなかった。マラリア原虫特異的な GPI アンカー阻害を誘導する薬剤開発のリード化合物として注目される。

[朝日博子、泉山信司]

IV. 検査・診断

1. クロモトロープ染色変法による下痢症患者便中 microsporidia 胞子の検出

Microsporidia 症と診断された患者凍結糞便 10 試料を融解して、クロモトロープ染色変法による microsporidia 胞子の検出を試み

た。凍結患者便約 0.5g を融解し、精製水 10 mL に懸濁。ガーゼ濾過、酢酸エチル処理後、遠心沈渣をスライドに塗布・風乾した。次にスライドを gentian violet 液、Gram's iodine 液にそれぞれ1分間浸漬、脱染色液及び水で洗浄した。スライドを更にクロモトロープ染色液に5分間浸漬、90%酸アルコール、95%エチルアルコール及び100%エチルアルコールで洗浄・乾燥後油浸で鏡検した。

全ての便試料にグラム陽性で卵形の、中央部にペルト様ストライプを有する胞子を認めた。凍結前の塗抹染色標本に較べ、ガーゼ濾過、酢酸エチルによる前処理のせいか、バックグラウンドはある程度きれいになったものの、胞子数は明らかに減少していた。

[C.Fatmah (Universiti Kebangsaan Malaysia)、N. Moktar (UKM)、古屋宏二]

2. 病原性アメーバ類に関する研究

1) 温水環境における *Naegleria* 属アメーバ実態調査

前年度に引続き、国内温水環境における *Naegleria* 属を中心とする病原性アメーバ調査を行った。本年度は調査地域数を25に拡大、全アメーバクローン数 3,167 に関して解析した。試料総数 1,173 に対する *Naegleria* 属アメーバの検出率は 14.7%であり、非病原種の *N. lovaniensis* とともに、実験的ではあるが病原性をもつ *N. australiensis* が全国的に検出されたことが特筆される。その他の病原性種として *N. italica*、*N. philippinensis* が低い検出率ではあるが、国内に定着していることが再確認された。なお最も病原性の強い *N. fowleri* は非検出であった。

[八木田健司、下河原理江子、小村麻子、朝倉登喜子、泉山信司、黒木俊郎(神奈川県衛生研究所)]

2) 国内アメーバ性脳髄膜炎症例に関する免疫組織学的再検討

これまで国内にて報告されたアメーバ性脳髄膜炎全6症例の病理組織標本について、*Naegleria fowleri*、*Acanthamoeba* sp. ならびに *Balamuthia mandrillaris* に対する特異抗体による免疫組織学的再検討を行った。その結果、各症例における原発性アメーバ性脳病変の病原アメーバは明確に識別され、全6症例は *N. fowleri* および *Acanthamoeba* sp. による感染が各1例、そしてこれまで同定が困難であった3例を含む4例が実際には *B. mandrillaris* によるものであることが判明した。*B. mandrillaris* 感染に関しては、国内におけるその生息域、分布、ヒトとの接触機会等についてほとんど解っておらず、早急な調査が必要であると考えられた。

[林 森太郎、高橋 均(新潟大学脳研究所病理学分野)、八木田健司、下河原理江子]

3) バラムチア *Balamuthia* の分離培養に関する研究

バラムチア (*Balamuthia mandrillaris*) は、*Naegleria fowleri* および *Acanthamoeba* 属アメーバと並んで、重篤、致死性の中枢神経感染症を引起す病原性アメーバである。世界的にはおよそ 100 例、国内でも致死性感染例の報告がある。注意すべきは、未だにその感染源が特定されないことで、環境からの検出は国外での数例に限られる。通常のアメーバ用大腸菌塗布寒天培地では分離増殖不能なため、細胞系を栄養とした培養系が必要とされる。現在、自然環境からの分離方法を確立するために、栄養、イオン環境等の培養条件を調べており、小型原虫類を栄養とする寒天培地培養法を確立しつつある。

[八木田健司、泉山信司]

3. 組織標本を用いた包虫症鑑別法の検討

包虫症のおもな原因種は単包条虫と多包条虫の 2 種である。一般的に両種は特徴的な発育像により鑑別できる。しかし、幼虫が発育途中で自然死したり、通常とは異なる発育型(多嚢型単包虫など)を示す組織標本では両種の鑑別が困難な場合がある。PAS 反応(組織化学)や抗胚層抗体を用いる免疫染色は「包虫症」の診断には有用であるが、両種の鑑別はできない。この点が組織標本のみしか保管されていない過去の症例を調べる上での問題であった。そこでこのような組織標本につき、PCR 法を用いることで原因虫種を鑑別する方法について検討した。既報にもとづきプライマーを作製、試験感染動物由来の組織標本からテンプレート DNA を調整し、12S rDNA 領域を標的部位とした nested PCR 法を行った。その結果、多包虫から増幅があることで鑑別可能なことが示唆された。本法は包虫症の原因虫種の同定に有用な補助的方法であると考えられたので、臨床材料に加え、研究機関・検査機関に保存されている材料を対象としてさらに検索を加える予定である。

[森嶋康之・杉山 広・川中正憲・古屋宏二・土井陸雄(横浜市大医学部)]

4. 市販エキノコックス症血清診断キットの評価

北海道の多包虫症の血清検査については、これまで自家製抗原の製造・調製が可能な二三の研究・検査機関でのみ検査が実施されてきた。しかしながら最近、同症の患者が多いとされるヨーロッパからの市販キットが入手可能となり一般の臨床衛生検査所でも検査ができる状況になってきた。そこで、最近販売された多包虫症のみならず単包虫症も診断可能とするフランス製の高感度イムノブロットアッセイキットについて、北海道の患者血清材料を用いた場合の感度と免疫染色パターンを調べた。こ

の結果を、北海道立衛生研究所が 1987 年から 1993 年の間に実施した自家製抗原によって得られた結果と比較検討し、臨床検査的評価を行った。その結果、本キットは高感度で有用な試験法であると結論付けられた。

[古屋宏二、川中正憲、山野公明、佐藤直樹(北大病院)本間寛(道衛研)]

5. 魚介類摂食後の食物アレルギーに関与する寄生虫アニサキスの研究:原因虫種の検討

魚介類の摂食後に発症するアレルギーは、実は魚介類に寄生するアニサキスを真の原因とする、このような知見が 1990 年頃から我が国で認知されるようになってきた。一方ヨーロッパでも、魚食量の多いスペイン・イタリアで、アニサキスアレルギーと考えられる症例が 1995 年以降多数報告されるようになってきた。その病態は我が国の症例とは異なり、多彩でしかも重症化するものが多い。病態の違いが、病因となる虫体の系統分類学上の差異に起因しているのではないかと推察し、太平洋産(日本・中国)と大西洋産(米国・スペイン)のアンコウからアニサキス *Anisakis simplex* の幼虫を得て検討を加えた。各虫体から DNA を調整し、線虫類のリボソーム DNA・ITS2 領域をターゲットとするコンセンサスなプライマーで PCR 増幅して、得られた産物の配列を解読した。その結果、増幅産物はいずれも 465bp で、配列も相互に完全に一致することが分かった。更に詳細な解析を行うため、現在 ITS1 領域等の解読を進めている。また最近アニサキスアレルギーが精製され、アミノ酸配列・塩基配列も報告されたので、これをターゲットとした解析にも取り組む予定である。

[杉山 広、森嶋康之、川中正憲]

6. 平成15年度・依頼血清の寄生虫抗体の検査

検査は通常、酵素抗体法(DOT-ELISA)により実施した。抗原として、線虫類6種(日本顎口虫、犬回虫成熟虫卵、アニサキス、豚回虫、犬糸状虫、広東住血線虫)、条虫類3種(広節裂頭条虫、マンソン孤虫、エキノコックス)、吸虫類4種(ウエステルマン肺吸虫、宮崎肺吸虫、肝蛭、日本住血吸虫)の 13 種類を用いた。酵素抗体法で得られた結果のみでは判断がつけがたい場合は、上記以外の抗原も含め、ウエスタンブロット法、ゲル内沈降反応、あるいは薄切標本を用いた酵素抗体法などをあわせて行った。本年度は 28 検体(18 人)の検査を実施し、そのうち抗体陽性が 18 件(10 人)、陰性が 10 件(8人)であった。陽性の内訳はウエステルマン又は宮崎肺吸虫:2件(2人)、有鉤囊虫症:4件(3人)、旋尾線虫症:6件(1人)、日本住血吸虫症:2件(2人)、ビル

ハルツ住血吸虫症:2件(1人)、顎口虫症:2件(1人)であった。

[荒川京子、杉山 広、森嶋康之、川中正憲]

V. その他

1. 国内で分離されたネグレリア病原種の病原性確認試験

国内実態調査で検出率の高かった *N. australiensis* は16株中6株(10地域中6地域)が脳内接種で致死的病原性を示した。剖検マウスより再分離されたアメーバを用い、経鼻および皮下接種を行ったが、異常は認められなかった。また、他の3株は行動異常のみを呈する非致死的病原性を示し、感染1ヶ月時点でアメーバの再分離を試みたが回収できなかった。今後はさらに長期的な感染の影響を検討する予定である。*N. philippinensis* は1株を試験し、脳内接種で致死的病原性を確認し、剖検によりアメーバを再分離した。*N. italica* は2株について試験したが病原性は認められなかった。

[八木田健司、泉山信司、下河原理江子]

2. 植物由来殺菌剤の検討

1) ブタクサ由来セスキテルペンのミヤイリガイ殺滅作用

エジプト産ブタクサ(*Ambrosia maritime*)には充血吸虫の中間宿主貝である *Biomphalaria alexandria* や *Bulinus truncates* を殺滅する作用が知られており、セスキテルペンである damsine や ambrosin が分離精製されてそれぞれ8.5から13.5ppmの濃度で殺滅効果があることが報告されている。我々は、同種植物から ambrosin を精製し、*Biomphalaria glabrata* とミヤイリガイ(*Oncomelania nosophora*)について殺滅効果を検討したところ、LC50及び95%信頼限界はそれぞれ6.14 mg/L [5.04, 7.53] と4.2 mg/L [3.5, 5.3] という結果を得た。

[川中正憲、荒川京子、折原裕、Sameh Abou Zid(東大・薬)]

2) ブタクサ毛状根抽出物由来ポリアセチレンの殺菌活性

エジプト産ブタクサ(*Ambrosia maritime*)の毛様根からの代謝産物としてポリアセチレンである Thiarubrine A とその前駆体が知られている。これらの代謝産物にはバクテリア、真菌、ウイルス、昆虫などへ殺滅効果があることが報告されているが殺菌活性については調べられていない。そこで、Thiarubrine A の *Biomphalaria glabrata* とミヤイリガイに対する殺滅効果を検討した。また、Thiarubrine A の前駆体である Thiarubrine A diol と Thiarubrine A epoxide の *Biomphalaria glabrata* への殺滅効果についても検討している。

[川中正憲、荒川京子、折原裕、Sameh Abou Zid(東大・薬)]

VI 症例

1. 喀痰から虫卵が検出され形態と塩基配列から種同定したウエステルマン肺吸虫症の1例

持続性血痰を主訴とし、硬化性病変を右肺上葉に認めた外国人女性の喀痰から、肺吸虫卵が検出された。虫卵の形態を精査し、また虫卵を出発材料としてリボソームDNA・ITS2領域の塩基配列を解読したところ、2倍体型ウエステルマン肺吸虫と同定できた。排卵を認める肺吸虫症例は3倍体型ウエステルマン肺吸虫を原因とすることが多く、本例は貴重な症例と考えられた。

[杉山 広、森嶋康之、荒川京子、川中正憲、亀岡洋祐(遺伝子資源)、鈴木雄二郎、西山秀樹(日赤和歌山医療センター呼吸器)]

VII 発表業績一覧

I 誌上発表

1. 欧文発表

- Shinji Izumiyama, Kenji Yagita, Rieko Furushima-Shimogawara, Tokiko Asakura, Tatsuya Karasudani and Takuro Endo.: Occurrence and Distribution of *Naegleria* Species in Thermal Waters in Japan. *J.Eukaryot. Microbiol.*, 514-513, 2003.
- P.R.Hunter, Y.Andersson, C.H.Von Bonsdorff, R.M.Chalmers, E.Cifuentes, D.Deere, T. Endo, M.Kadar, T.Krogh, L.Newport, A.Prescott and W.Robertson. Surveillance and Investigation of Contamination Incidents and Waterborne outbreaks. Chapter 7. Assessing Microbial Safety of Drinking Water—Improving Approaches and Methods. World Health Organization, OECD, 205-236, 2003.
- W.Koster, T.Egli, N.Ashbolt, K.Botzenhart, N.Burlion, T.Endo, P.Grimont, E.Guillot, C.Mobilat, L.Newport, M.Niemi, P.Payment A.Prescott, P.Renaud and A.Rust. Analytical Methods for Microbiological Water Quality Testing. Chapter 8. Assessing Microbial Safety of Drinking Water—Improving Approaches and Methods. World Health Organization, OECD, 237-292, 2003.
- M. Omura, R. Furushima-Shimogawara, K.Yagita, S. Izumiyama, and T. Endo: 2D-PAGE protein profiles of pathogenic and non-pathogenic *Naegleria* species., Xth International Meeting on the Biology and Pathogenicity of Free-Living Amoebae Proceedings., pp115-123.

5. Mako OMURA, Kenji YAGITA, Shinji IZUMIYAMA, Rieko SHIMOGAWARA and Takuro ENDO. Comparative study of protein profiles on pathogenic and nonpathogenic *Naegleria* species by 2D-PAGE. (in preparation)
6. Murahashi, H., Azuma, H., Zamzami, N., Furuya, K., Ikebuchi, K., Yamauchi, M., Yamada, Y., Sato, N., Fujihara, M., Kroemer, G., Ikeda, H.: Possible contribution of apoptosis-inducing factor (AIF) and reactive oxygen species (ROS) to UVB-induced caspase-independent cell death in the T cell line Jurkat. *Journal of Leukocyte Biology*, 73, 399-406, 2003.
7. Yu, S.H., Kawanaka, M., Li, X.M., Xu, L.Q., Lan C.G., Lin.R., Epidemiological investigation on *Clonorchis sinensis* in human population in an Area of South China. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 56, 168-171, 2003.
8. Rangsiruji, A., Sugiyama, H., Morishima, Y., Kawanaka, M., Binchai, S. and Ketudat, P.: Genetic diversity of lung flukes in central and southern Thailand. *Srinakharinwirot Univ. Sci. J.* 25, 1-11, 2003.
9. Sugiyama, H., Morishima, Y., Kameoka, Y. and Kawanaka, M.: A multiplex PCR for discrimination between *Paragonimus westermani* and *P. miyazakii* at the metacercarial stage. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 35(Suppl. 2), 77-80, 2004.
10. Sugiyama, H., Morishima, Y., Kameoka, Y., Arakawa, K. and Kawanaka, M.: *Paragonimus ohirai* metacercariae in crabs collected along the Arakawa River in Tokyo, Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 66, 927-931, 2004.
11. Tsuchida, K., Jouni, Z.E., Gardetto, J., Kobayashi, Y., Tabunoki, H., Azuma, M., Sugiyama, H., Takada, N., Maekawa, H., Banno, Y., Fujii, H., Iwano, H., Wells, M.A.: Characterization of the carotenoid-binding protein of the Y-gene dominant mutants of *Bombyx mori*. *J. Insect. Physiol.*, 50, 363-372, 2004.
12. Haghghi, A., Kobayashi, S., Takeuchi, T., Thammapalerd, N., and Nozaki, T. (2003) Geographic diversity of genotypes among *Entamoeba histolytica* field isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 41, 3748-3756.
13. Dvorak, J.A., Kobayashi, S., Nozaki, T., Takeuchi, T., and Matsubara, C. (2003) Induction of permeability changes and death of vertebrate cells is modulated by the virulence of *Entamoeba* spp. Isolates. *Parasitol. Int.* 52, 169-173.
14. Kawazu, S., Nozaki, T., Tsuboi, T., Nakano, Y., Komaki-Yasuda, K., Ikenoue, N., Torii, M., and Kano, S. (2003) Expression profiles of peroxiredoxin proteins of the rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii*. *Int. J. Parasitol.* 33, 1455-1461.
15. Ali, V., Shigeta, Y., and Nozaki, T. (2003) Molecular and structural characterization of NADPH-dependent D-glycerate dehydrogenase from the enteric parasitic protist *Entamoeba histolytica*. *Biochem. J.* 375, 729-736.
16. Tokoro, M., Kobayashi, S., Takeuchi, T., and Nozaki, T. (2003) A novel sulfur-containing amino acid degradation enzyme methionine γ -lyase from the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.* 278, 42717-42727.
17. Ghosh, S., Chan, J., Lea, C.R., Meints, G.A., Lewis, J.C., Tovian, Z., Flessner, R., Loftus, T.C., Bruchhaus, I., Fradley, K.L., Kendrick, H., Croft, S., Kemp, R., Kobayashi, S., Nozaki, T., and Oldfield, E. (2004) Effects of Bisphosphonates on the Growth of *Entamoeba* and *Plasmodium* species *in vitro* and *in vivo*. *J. Med. Chem.* 47, 175-187.
18. Kumagai, M., Makioka, A., Takeuchi, T., and Nozaki, T. (2004) Molecular cloning and characterization of a protein farnesyltransferase from the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.* 279, 2316-2323.
19. Asahi, H. and Stadecker, M.J. Analysis of egg antigens inducing hepatic lesions in schistosome infection (review). *Parasitol. Internat.* 52, 361-367, 2003.
20. Stadecker, M.J., Asahi, H., Finger E., Hernandez, H.J. Rutitzky, L.I. and Sun, J. The immunobiology of Th1 polarization in high pathology schistosomiasis. *Immunol. Rev.*, in press, 2004.
21. Asahi, H., Kanazawa, T., Hirayama, N., and Kajihara Y. Investigating serum factors promoting erythrocytic growth of *Plasmodium falciparum*. *Exp. Parasitol.* In press, 2004.

2. 和文発表

1. 遠藤卓郎、八木田健司、泉山信司. レジオネラ汚染とその対策. 環境技術 32(6), 29-33, 2003.
2. 黒木俊郎、宇根有美、遠藤卓郎. 爬虫類のクリプトスポリジウム感染. Jpn. J. Zoo Wildl. Med. 8(1):27-34, 2003.
3. 八木田健司、泉山信司、遠藤卓郎. レジオネラ属菌の水系感染—宿主アメーバの果たす役割. 水環境学会誌. 26(1):14-19, 2003.
4. 河野喜美子、東 美香、齊藤信弘、鈴木 泉、倉 文明、前川純子、渡辺治雄、八木田健司、遠藤卓郎. <特集関連情報>循環式温泉入浴施設を入浴施設を発生源としたレジオネラ症集団感染事例—宮崎県 病原性微生物検出情報. 24(2), 3-5, 2003.
5. 八木田健司、泉山信司、遠藤卓郎. <特集関連情報>温水環境におけるレジオネラ宿主アメーバ類 病原性微生物検出情報. 24(2), 8-9, 2003.
6. 遠藤卓郎、八木田健司、泉山信司. 新世紀の感染症学(上)—ゲノム・グローバル時代の感染症アップデート—原虫感染症 ジアルジア症. 61 (Suppl 2), 2003.
7. 佐藤直樹、内野純一、小笠原和宏、藤堂省、古屋宏二: 肝エキノコックス症の病態と予防—とくに職業との関連において— 日本職業・災害医学会会誌 第 51 巻 17-23, 2003.
8. 日本原生動物学会第 36 回大会、「2D-PAGE 及びウェスタンブロットによる *Naegleria fowleri* の総タンパク質の解析」, (遠藤卓郎,小村麻子,八木田健司,泉山信司,下河原理江子,中村健(北里大))2003 年 11 月 22~24 日,抄録集21 頁
9. 福井大祐、坂東元、小菅正夫、山口雅紀、中岡祐司、古屋宏二、村田浩一:動物園飼育カイウサギにみられたエンセファリトゾーン症の臨床および病理学的検索、日本獣医師会雑誌 第 56 巻 464-469, 2003.
10. 八木欣平、伊東拓也、山野公明、古屋宏二:2002 年、北海道で集団発生したクリプトスポリジウム症の原因となった *Cryptosporidium parvum* の遺伝子型について、道衛研所報、53、39-42、2003.
11. 福嶋得忍、日野隆信、後藤史子、進藤悦男、古屋宏二:牧場体験した高校生のクリプトスポリジウム症集団発生事例、千葉衛研報告、27、70-72、2003.
12. 土井陸雄、伊藤 亮、山崎 浩、森嶋康之。2003. 単包虫症—わが国における患者発生動向と対策。日本公衆衛生雑誌, 50, 1066-1076.
13. 杉山 広、森嶋康之、坂本京子、川中正憲、亀岡洋祐、鈴木雄二郎、西山秀樹:開腹術により腹腔から虫体が検出され塩基配列で種同定した宮崎肺吸虫症の 1 例、Clinical Parasitol., 14、57-60、2003.
14. 杉山 広、森嶋康之、坂本京子、亀岡洋祐、川中正憲:幼虫移行症の原因としてのアライグマ回虫、獣医寄生虫学会誌、2、13-19、2003.
15. 川中正憲:イヌ・ネコ・アライグマ回虫による幼虫移行症、「動物由来感染症 その診断と対策」267-271、真興交易(株)医書出版部、2003.
16. 川中正憲:エキノコックス症、「動物由来感染症 その診断と対策」272-275、真興交易(株)医書出版部、2003.
17. 川中正憲:アニサキス、旋尾線虫幼虫、裂頭条虫、旋毛虫、肺吸虫、有鉤(囊虫)条虫、その他淡水魚由来の寄生蠕虫、「HACCP:衛生管理計画の作成と実践 改訂データ編」226-240、中央法規出版、2003.
18. 川中正憲:国内施設で「アライグマ回虫」検出、野生化アライグマにひそむ危険、自然保護、No.474, p19, 2003.
19. 杉山 広:寄生虫. 食品衛生責任者ハンドブック 日本食品衛生協会 pp78-79, 2004.
20. 野崎智義 (2003) 赤痢アメーバのゲノムと病原遺伝子細胞工学 第 22 巻, 11 号, 1160-1163.
21. 野崎智義 (2003) 話題の抗微生物薬をめぐって 赤痢アメーバ症 臨床と微生物 第 30 巻, 631-636.
22. 野崎智義 (2003) アメーバ赤痢 in 動物由来感染症 その診断と対策 神山恒夫・山田章雄編 真興交易、pp244-249.
23. 野崎智義 (2003) 医師が念頭におくべき輸入感染症の世界分布 in 今日の治療指針 医学書院 pp1010-1012.

24. 野崎智義 (2004) 医師が念頭におくべき輸入感染症の世界分布 in 今日の治療指針 医学書院 pp1098-1101.
25. 大前比呂思、朝日博子、千種雄一、松田肇、輸入感染症としての日本住血吸虫症をどう捉えるか。Clinical Parasitology 13(1):148-150, 2002.

II 学会発表

1. 国際学会

1. Shinji Izumiyama, Kenji Yagita, Reiko Furushima-Shimogawara, Tokiko Asakura, Tatsuya Karasudani And Takuro Endo: Occurrence and Distribution of Naegleria Species in Thermal Waters in Japan, VIII International workshops on opportunistic protists and the international conference on anaerobic protists (Hawaii), 2003年7月
2. Shinji Izumiyama, Kenji Yagita, Rieko Furushima-Shimogawara, Tokiko Asakura, Mako Omura, Tatsuya Karasudani, Takuro Endo: Characterization of the Naegleria Isolates from Thermal Waters in Japan. Xth International conference on the biology and pathogenicity of free-living amoebae (Ciudad Obregon, Sonora, Mexico), October 5-10, 2003.
3. M. Omura, R. Furushima-Shimogawara, K. Yagita, S. Izumiyama, and T. Endo. 2D-PAGE protein profiles of pathogenic and non-pathogenic *Naegleria* species. Xth International Meeting on the Biology and Pathogenicity of Free-Living Amoebae Proceedings. (Ciudad Obregon, Sonora, Mexico.) October 5-10, 2003.
4. Sugiyama, H., Morishima, Y., Kameoka, Y. and Kawanaka, M.: A multiplex PCR for discrimination between *Paragonimus westermani* and *P. miyazakii* at the metacercarial stage. The 4th Seminar on Food- and Water-borne Parasitic Zoonoses, Bangkok, 2-4 Dec. 2003.
5. Nozaki, T. (2003) Functional characterization of a complex associated with small GTPase Rab7, which plays an important role in phagocytosis. EMBO Workshop on pathogenesis of amebiasis: from genomics to disease Paris, May 19-21, 2003.
6. Ali, V., Shigeta, Y., and Nozaki, T. (2003) Molecular and biochemical characterization of phosphoglycerate dehydrogenase and D-glycerate dehydrogenase of serine metabolic pathway from the enteric parasitic protist *Entamoeba histolytica*. 第3回あわじしま感染症・免疫フォーラム 淡路島 Aug 25-28, 2003.
7. Nozaki, T., Ali, V., Tokumoto, U., and Takahashi, Y. (2003) Molecular and biochemical characterization of iron-sulfur cluster biosynthesis in the enteric parasitic protist *Entamoeba histolytica*. 第3回あわじしま感染症・免疫フォーラム 淡路島 Aug 25-28, 2003.
8. Makioka, A., Kumagai, M., Takeuchi, T., and Nozaki, T. (2003) Molecular cloning and characterization of geranylgeranyltransferase I from *Entamoeba histolytica*. Thirty-eighth Joint Conference on Parasitic Diseases, The Japan-United States Cooperative Medical Science Program, Charlottesville, Virginia, U.S.A., Sept 8-9, 2003.
9. Nozaki, T., Okada, M., Nakada-Tsukui, K., Shigeta, Y., Nudeshima, M., Tokumaru, F., and Saito-Nakano, Y. (2003) Functional characterization of roles of Rab7 isoforms and Rab7-binding proteins during phagocytosis. Thirty-eighth Joint Conference on Parasitic Diseases, The Japan-United States Cooperative Medical Science Program, Charlottesville, Virginia, U.S.A., Sept 8-9, 2002.
10. Okada, M., Saito-Nakano, Y., Huston, C.D., Mann, B.J., and Nozaki, T. (2003) Proteomics analyses of phagosome proteins from *Entamoeba histolytica*. Thirty-eighth Joint Conference on Parasitic Diseases, The Japan-United States Cooperative Medical Science Program, Charlottesville, Virginia, U.S.A., Sept 8-9, 2003.
11. Saito-Nakano, Y., Okada, M., Nakada-Tsukui, K., Shigeta, Y., and Nozaki, T. (2003) Rab5 and Rab7 play unique roles in phagocytosis of *Entamoeba histolytica*. The 14th Annual Molecular Parasitology Meeting, Woods Hole, MA, U.S.A., Sept 14-18, 2002.
12. Asahi, H., Ohmae, H., Sy, O.S., Tanabe, M., Matsuda, H., Kanazawa, T., Yamada, K., Kajima, J. and Ohta, N. Characteristics of specific antibodies in urine from *Schistosoma japonicum*-infected individuals. The 10th International Congress of Parasitology, August 2002.

13. Asahi, H. and Stadecker, M.J. : Analysis of egg antigens inducing hepatic lesions in schistosome infection. Centenary Symposium to Celebrate the Discovery of *Schistosoma japonicum*. March 2003.
 14. Asahi, H., Oke, T., Lopes da Rosa J., Williams D.L., and Stadecker M.J. Sm-p25: A new egg component stimulating T cell and antibody responses in murine schistosome infection. The 52nd annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene, December 2003.
2. 国内学会
1. 八木田健司、黒木俊郎、遠藤卓郎:国内クリプトスポリジウム集団感染事例に関する ELISA による抗体価調査. 第 77 回日本感染症学会総会(福岡県・久留米)、2003 年 4 月.
 2. 朝倉登喜子、下河原理江子、八木田健司、烏谷竜哉:わが国の温水環境より初めて分離された *Naegleria australiensis*、環境技術研究会、2003 年 6 月.
 3. 泉山信司、八木田健司、遠藤卓郎、藤原正弘:紫外線照射による *Giardia* の不活化、環境技術研究会、2003 年 6 月.
 4. Rieko Furushima-Shimogawara, Kenji Yagita, Shirji Izumiyama, Mako Omura, Tokiko Asakura and Takuro Endo. Characterization of Japanese *Naegleria* environmental strains by ITS sequences and several marker proteins. 第 76 回日本生化学会大会(横浜)、2003 年 10 月.
 5. 佐々木志朗、朝倉登喜子、澤田拓士、古屋宏二:関東地方におけるイヌの *Encephalitozoon* 感染の血清疫学的調査、日本原生動物学会第 36 回大会(東京)、2003 年 11 月.
 6. 小村麻子、八木田健司、泉山信司、下河原理江子、中村健、遠藤卓郎:2D-PAGE 及びウェスタンブロットによる *Naegleria fowleri* と総タンパク質の解析、日本原生動物学会第36回大会(東京)、2003 年 11 月.
 7. 朝倉登喜子、八木田健司、下河原理江子、泉山信司、遠藤卓郎:温水環境より分離した *Naegleria* 属アメーバの遺伝子型別、日本原生動物学会第36回大会(東京)、2003 年 11 月.
 8. 杉山 広、森嶋康之、川中正憲、亀岡洋祐:東京の荒川河川敷で採集したクロベンケイガニからの大平肺吸虫メタセルカリアの検出、第 135 回日本獣医学会学術集会(東京)、2003 年 4 月.
 9. 杉山 広、森嶋康之、坂本京子、川中正憲、亀岡洋祐、鈴木雄二郎、西山秀樹:開腹術により腹腔から虫体が検出され塩基配列で種同定した宮崎肺吸虫症の 1 例、第 14 回日本臨床寄生虫学会大会 2003 年 6 月、長崎
 10. 杉山 広:動物由来寄生蠕虫症:幼虫移行症の原因としてのアライグマ回虫、平成 15 年度希少感染症診断技術研修会 2004 年 2 月、東京
 11. 森嶋康之:動物由来寄生蠕虫症:エキノコックス症、平成 15 年度希少感染症診断技術研修会 2004 年 2 月、東京
 12. 森嶋康之、杉山 広、川中正憲、今成敏夫、飯塚信二、青木英雄、横浜市港湾区域のドブネズミに寄生する広東住血線虫に関する調査、日本寄生虫学会東日本大会、2003.
 13. 藤田 修、河津信一郎、野崎智義(2003)多包虫組織より分離した 2-Cys 型ペルオキシレドキシンの生化学的性状及び機能について 第 72 回日本寄生虫学会大会 久留米 Mar 28-30, 2003.
 14. 野崎智義、Vahab Ali、高橋康弘(2003)赤痢アメーバにおける鉄-硫黄クラスターの生合成の分子論的解析 第 72 回日本寄生虫学会大会 久留米 Mar 28-30, 2003.
 15. 岡田麻美、保田友義、Barbara J. Mann、野崎智義(2003)プロテオーム解析による赤痢アメーバのファゴソームタンパク質の同定 第 72 回日本寄生虫学会大会 久留米 Mar 28-30, 2003.
 16. 中野由美子、岡田麻美、ぬで島麻衣、野崎智義(2003)赤痢アメーバの病原性因子の輸送に関与する EhRab7 アイソタイプにおける機能特異性 第 72 回日本寄生虫学会大会 久留米 Mar 28-30, 2003.
 17. 小林正規、Ali Haghighi、野崎智義、竹内 勤(2003)無病毒性赤痢アメーバ分離株の性状解析とその病原性について 第 72 回日本寄生虫学会大会 久留米 Mar 28-30, 2003.
 18. 所 正治、浅井隆志、小林正規、竹内 勤、野崎智義(2003)トリフルオロメチオニン:メチオニンアナログを用いた赤痢アメーバ特異的殺原虫効果の解析 第 72 回日本

寄生動物部

寄生虫学会大会 久留米 Mar 28-30, 2003.

19. 熊谷正広、牧岡朝夫、渡辺直熙、竹内 勤、野崎智義 (2003) 赤痢アメーバファルネシル転移酵素の解析(2) 第72回日本寄生虫学会大会 久留米 Mar 28-30, 2003.
20. 中野由美子、岡田麻美、ぬで島麻衣、野崎智義 (2003) 赤痢アメーバの貪食におけるEhRab7ならびにEhRab11アイソタイプ 第56回日本細胞生物学会大会 大津 May 14-16, 2003.
21. 野崎智義 (2003) 赤痢アメーバゲノミクス 第11回分子寄生虫学ワークショップ 蓼科 Aug 2-5, 2003.
22. 岡田麻美、Chris D. Huston, 中野由美子、Barbara Mann、野崎智義 (2002) 赤痢アメーバのファゴソームバイオジェネシス 第11回分子寄生虫学ワークショップ 蓼科 Aug 2-5, 2003.
23. 津久井久美子、中野由美子、岡田麻美、野崎智義 (2002) 赤痢アメーバの貪食の調節機構の解明 第11回分子寄生虫学ワークショップ 蓼科 Aug 2-5, 2003.
24. Makioka, A., Kumagai, M., Takeuchi, T., and Nozaki, T. (2003) Molecular cloning and characterization of geranylgeranyltransferase I of *Entamoeba histolytica*. 第76回 日本生化学会大会 2003年10月15-18日、横浜.
25. Okada, M., Huston, C., Saito-Nakano, Y., Yasuda, T., Mann, B., and Nozaki, T. (2003) Identification of phagosomal proteins in *Entamoeba histolytica*. 第76回 日本生化学会大会 2003年10月15-18日、横浜.
26. Nozaki, T., Ali, V., Tokumoto, U., and Takahashi, Y. (2003) Molecular analysis of iron-sulfur cluster formation in the enteric parasitic protist *Entamoeba histolytica*. 第76回 日本生化学会大会 2003年10月15-18日、横浜.
27. 野崎智義, Vahab Ali, 徳本梅千代, 高橋康弘 (2003) 腸管寄生原虫赤痢アメーバの鉄硫黄クラスター生合成マシナリーの同定と機能解析 第2回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム 2003年10月31日、金沢.
28. 牧岡朝夫, 熊谷正広, 竹内 勤, 野崎智義 (2003) 赤痢アメーバのファルネシル転移酵素の解析 第26回日本分子生物学会年会 2003年12月10-13日、神戸.
29. 津久井久美子, 中野由美子, 岡田麻美, 繁田泰男, 野崎智義 (2003) 赤痢アメーバ Rab 結合分子の検索 第26回日本分子生物学会年会 2003年12月10-13日、神戸.
30. 野崎智義 (2004) 腸管寄生原虫赤痢アメーバの含硫アミノ酸代謝の解明と創薬 第5回感染症フォーラム 2004年1月19-20日、東京.
31. 大前比呂思、朝日博子、千種雄一、松田 肇 輸入感染症としての日本住血吸虫をどう捉えるか。第13回臨床寄生虫学会大会、2002年6月.
32. 朝日博子: Detection of specific antibodies in the urine as markers of human *S. japonicum* infection. 長崎大学熱帯医学研究所共同利用研究集会 2002年8月.
33. 大前比呂思、千種雄一、Orlando S. Sy, Gerundio P. Portillo, 朝日博子、田辺将信、松田 肇: 日本住血吸虫症における肝線維化マーカーの有用性 第72回日本寄生虫学会大会、2003年3月.
34. 長田良雄、熊谷 貴、奈良武司、朝日博子、竹尾 暁、羽藤真理子、鈴木高史、小島荘明、太田伸生、金澤 保住 血吸虫の防御免疫機構に関する解析(シンポジウム) 第63回日本寄生虫学会 東日本支部大会、2003年10月.
35. 泉山信司、朝日博子、遠藤卓郎: SYBR Green I を用いたフローサイトメトリーによるマラリア血球感染率測定 第63回日本寄生虫学会 東日本支部大会、2003年10月.