

## 研究業績

### 疫学

#### 1. クリプトスポリジウム症の血清疫学に関する研究

##### (1) ELISA における *C. parvum* の抗原特異性

ヒトクリプトスポリジウム感染症の主要病原種である *C. parvum* には、ヒト特異的な genotype 1 とヒトを含む多種類の哺乳動物に感染する genotype 2 があり、集団感染は主にこの両者によって引き起こされる。今回、genotype 1 および genotype 2 の抗原と各 genotype に感染した患者血清を用いて、ELISA による IgG 抗体価の比較を行った。その結果、スポロゾイトの PBS 抽出抗原を用いるかぎり両者の間で反応性に差が認められないことが確認された。

[八木田健司、黒木俊郎(神奈川県衛生研究所)、河橋幸恵(埼玉県衛生研究所)、遠藤 卓郎]

##### (2) 埼玉県越生のクリプトスポリジウム集団感染に関する血清抗体価調査

平成 8 年、埼玉県越生で発生したクリプトスポリジウム集団感染事例に関して、ELISA による血清抗体価調査を行った。感染初期および感染 1 ヶ月後に採取されたベア血清を調べた結果、この間に顕著な IgG 抗体価の上昇が認められ、クリプトスポリジウム感染と IgG 抗体価の関係が明確となった。また、同地域における血清疫学調査によると 1 ヶ月目の抗体価が最も高く、一年後にはすでに抗体価の著しい減少が観察された。以上のことより、ELISA による抗体検出では、比較的新しい感染が把握されるものと思われる、今後の疫学調査に有効な手法として期待される。

[八木田健司、河橋幸恵(埼玉県衛生研究所)、砂押克彦(埼玉県衛生研究所)、遠藤 卓郎]

#### 2. レジオネラの宿主アメーバに関する研究

##### レジオネラ集団感染に関連したアメーバ調査

平成 14 年夏季、宮崎県ならびに鹿児島県において大規模公衆浴場を感染源とするレジオネラ集団感染が発生した。感染源の調査の一環として、浴槽水、ろ過装置等を対象としたレジオネラ宿主アメーバの検査を行った。両事例とも、循環式浴槽ユニットの一部であるろ過装置より極めて多量のアメーバが検出され、

ろ過装置内の環境がレジオネラ増殖に極めて有利な状態にあったことが示された。さらに、源泉の貯留・加温タンク等からもアメーバならびにレジオネラが検出され、循環系全体の管理の重要性が指摘された。また、両県の事例とも開設間もない時点での事故であることから、この期間における微生物学的な挙動に注目する必要がある。

[八木田健司、河野喜美子(宮崎県衛生研究所)、吉國謙一郎(鹿児島県衛生研究所)、遠藤 卓郎]

#### 3. 温水環境における病原性アメーバ *Naegleria fowleri* の疫学ならびに病原性に関する研究

##### (1) 温水環境における *Naegleria* 属アメーバ実態調査

前年度に引き続き、国内温水環境からの *Naegleria* 属アメーバ検出を目的とした調査を行った。培養方法の改良と PCR によるマスキリングを導入し、*Naegleria* 属アメーバ検出の効率化を図った。得られた 2184 株の分離株のうち、*Naegleria* 属アメーバは約 54.2% を占め、その優占種は *N. lovaniensis* であったが、新たに *N. australiensis* が分離された。本種は文献上病原性が指摘されているもので、わが国では初めてその存在が示された。今回の調査に用いた試料水 626 検体のうちアメーバ陽性となった試料は 212 検体で、そのうち *Naegleria* 属アメーバが陽性であった試料は 141 検体(67%) におよんだ。*N. australiensis* またはそれと極めて近縁の種が検出された試料水は 54 検体を数えアメーバ陽性試料の 25%、試料水全体のおよそ 9% に相当した。その他に遺伝子型として *N. italica*, *N. philippinensis*, *N. clarki* あるいはその近縁種の存在が示されたが *N. fowleri* は不検出であった。*N. fowleri* の分布については引き続き検討している。

[八木田 健司、下河原理江子、小村麻子、泉山信司、鳥谷竜哉(愛媛県立衛生環境研究所)、黒木俊郎(神奈川県衛生研究所)、遠藤卓郎]

##### (2) *Cryptosporidium* 集団感染の遺伝子型別

平成 14 年 3 月に淡路島の高校生が修学旅行で北海道を訪れた際、*Cryptosporidium* に集団感染したことが報告されているが、感染経路は未だ不明である。集団感染より得られた *Cryptosporidium* の塩基配列決定による遺伝子型別を行い、これらの集団感染に係る分子疫学的解析を試みた。その結果、複数の遺伝子座より *C. parvum* (Genotype 1) に特有の配列が得られ、ヒト由来のオーシストの摂取による感染であることが明らかとなった。多型性が高いとされる Microsatellite 領域の塩基配列を用いた解析により汚染源の特定を試みたが、特定には至らなかった。

[押部智宏(兵庫県立健康環境科学研究所)、泉山信司、

八木田健司、朝倉登喜子、遠藤卓郎]

#### 4. アライグマ回虫による幼虫移行症の発生予防と監視

##### (1) 動物園、観光施設におけるアライグマ回虫卵汚染問題

既に報告したように社団法人日本動物園水族館協会(動水協)所属の98動物園宛に「アライグマとアライグマ回虫に関するアンケート」を送付し84の動物園から回答を得た(回答率86%)。本年度は、新たに動水協非所属の動物展示飼育施設238施設に対して同様のアンケート調査を行い159施設から回答を得た(回答率67%)。全体を集計すると、82施設でアライグマが展示用に飼育されその合計頭数は約425頭に及び事が分った。保有頭数は施設によって1頭から61頭までの幅があり、5頭以下を飼育しているのが50施設で6割を占めていた。アライグマ回虫に関しては82施設のうち33施設が陰性と答え、残る49施設では不明との回答があった。その後、46施設より実際にアライグマの糞便・排出虫体或は土壌等の送付を受けてそれらの検査を実施したところ、現在までに7施設(合計145頭保有)で寄生例が確認された。

[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実施した。検査には神奈川県と愛知県の自治体或はアライグマ駆除業者から直接送付された糞便を用いた。最近2ヵ年の検査件数を県別に挙げると、平成13年度:神奈川県158件、愛知県27件、平成14年度:神奈川県115件、愛知県2件であった。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、川中正憲、杉山 広、森嶋康之]

#### 5. スカンク由来 *Baylisascaris* 属回虫の病原性の検討

*Baylisascaris* 属には非固有宿主に致死的な神経幼虫移行症を引き起こすアライグマ回虫 *B. procyonis* が含まれ、本属の回虫類はアライグマ回虫と同様に神経幼虫移行症の原因になると推定されている。今回、シマスカンク(動物展示施設飼育個体)から *Baylisascaris* 属の回虫を得たので、神経幼虫移行症の原因種となりうるかどうかについてマウスへの感染実験によって検討した。その結果、今回の実験ではスカンク由来 *Baylisascaris* の回収虫体はアライグマ回虫と同等の発育程度を示したにもかかわらず、アライグマ回虫の感染実験で認められたような特徴的な神経症状は発現しなかった。現在、その原因を検討中である。

[森嶋康之、杉山 広、荒川京子、川中正憲]

#### 6. 東京都における肺吸虫の発生分布に関する研究

##### (1) 荒川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

大平肺吸虫のメタセルカリアは、関東地方では九十九里浜で太平洋に注ぐ河川の汽水産カニから見出されているが、東京湾に注ぐ河川のカニについては報告がない。そこで荒川下流にある東京都の7つの区に12の調査地区を定め、クロベンケイガニの採集と肺吸虫メタセルカリアの検出を試みた。その結果、採集した692匹のうち177匹(26%)が大平肺吸虫メタセルカリア陽性であることが分かった。寄生率は葛飾区四ツ木地区が最も高く(89%)、190個ものメタセルカリアが検出されたカニもいた。足立区、墨田区、江戸川区にも陽性地区が見出された。カニからの大平肺吸虫メタセルカリアの検出は、東京都ではこれが初めての報告となる。

[杉山 広、森嶋康之、荒川京子、川中正憲]

#### 7. 横浜市港湾地区の広東住血線虫に関する調査

広東住血線虫 *Angiostrongylus cantonensis* はネズミを終宿主、軟体動物を中間宿主とし、ヒトに感染すると好酸球性髄膜炎を引き起こす。わが国では1964年に沖縄県のネズミから初めて検出されて以来、全国各地から陽性の終宿主・中間宿主が見出されている。2001~2002年、横浜市の港湾地区で捕獲されたドブネズミを検査したところ、ネズミ族捕獲調査が実施されたすべての地区から広東住血線虫に感染した個体が発見された。これに加えて1頭のドブネズミから近縁種のマレー住血線虫 *A. malaysiensis* が検出された。マレー住血線虫は、国内では北九州市内で捕獲されたドブネズミから寄生が報告されているが、九州以北では発見されていない。現在、横浜市への移入時期を推定するため、横浜検疫所輸入食品・検査検査センターに保管されていた過去の検体を再検討中である。

[森嶋康之、川中正憲、杉山 広、今成敏夫(成田空港検疫所)、飯塚信二、青木英雄(横浜検疫所)]

#### 8. 中国西部三省の寄生虫事情

平成14年3月に青海省、広西チワン族自治区、貴州省の中国西部に位置する三省を訪れて寄生蠕虫症についての現地視察を行った。広大な牧畜地域をもつ青海省ではエキノコックス症及びテニア症などの条虫疾患が重要であり、元日本住血吸虫症流行地の広西チワン族自治区においては肝吸虫症・肺吸虫症

などの吸虫疾患が重要である。また貴州省では回虫の感染率が中国第1位(71.1%)で全国平均(44.5%)を大きく上まわり、土壌媒介線虫症が重要である。最近におけるこれら三省の寄生虫事情について感染症の専門家向けに3回分けてレポートを作成した。

[川中正憲、森嶋康之、余森海(中国予防医学科学院寄生虫病研究所)]

#### 9. 赤痢アメーバの遺伝的多型に関する研究

わが国に浸淫する赤痢アメーバ株の多様性を明らかにし、その多様性のもつ生物学的・病因学的意味を理解するために、わが国と人的交流の深い東南アジア(タイ・バングラデッシュ・インドネシア)からの赤痢アメーバ分離株の遺伝的多型を解析した。継代培養された赤痢アメーバ分離株及び患者の糞便並びに肝臓の穿刺液からゲノム DNA を分離し、赤痢アメーバ特異的プライマーを用いて PCR を行った。繰り返し配列を含み tRNA 遺伝子座にリンクした 2 種類の多型領域(遺伝子座 1/2、5/6)及び表面タンパク質 serine-rich *E. histolytica* protein (SREHP)並びにキチナーゼの核酸並びにアミノ酸レベルでの多型性を解析した。これら 4 種類の遺伝子座を組み合わせることで東南アジアの分離株は多くのサブタイプに分類された。特に SREHP の多型性が最も高く、ほとんどの分離株が異なった遺伝子型を示した。東南アジアの分離株の遺伝型とわが国の分離株の遺伝型を比較したところ、同一の遺伝型は見られなかった。

[Ali Haghghi, Nitaya Thammapalerd (Mahidol 大学)、今村顕史(都立墨東病院)、増田剛太(都立清瀬小児病院)、今田美穂子(JICA、インドネシア)、小林正規(慶応大学医学部熱帯医学寄生虫学教室)、竹内勤(同)、野崎智義]

#### 10. アメーバ症集団感染の評価

精神障害者収容施設内における集団感染例の診断・感染源の特定・感染拡大防止措置の策定・指導を行った。更に、この集団感染例 10 検体から分離された赤痢アメーバ株のタイピングを行った。この結果、感染源となった赤痢アメーバ株は 1 種類であり、10 年以上前に他の他府県で発見された株と同一の遺伝子型を示すことが明らかになり、障害者施設におけるアメーバ症治療・根絶の難しさが明らかとなった。

[Ali Haghghi, 小林正規(慶応大学医学部熱帯医学寄生虫学教室)、竹内勤(同)、野崎智義]

#### 11. 赤痢アメーバ感染の易感染性に影響を与える宿主側因子の特定に関する研究

他の多くの感染症と同様に、赤痢アメーバ感染者もその発症

は感染者のうち 5-10%に限られる。このことは宿主側の感染抵抗性、有症性に多様性がある可能性を示唆している。これまでの我々の研究により、ヒト白血球抗原(HLA)の多型が赤痢アメーバに対する宿主側の易感染性・抵抗性と関与していることが示唆されている。昨年に引き続いて、障害者施設並びに HIV 陽性の男性同性愛者からの検体から HLA のタイピングを行った。赤痢アメーバ感染者及び感染既往歴のある患者血液からインフォームドコンセントを確認した上で血液の供与を受けた。これらの血液から抽出されたゲノム DNA を用い、PCR とシーケンス特異的ハイブリダイゼーションによりタイピングを行った。これまでの結果によれば、HLA の DR9 及び A2 に易感染性の可能性が、DR15 及び DR13 に感染抵抗性の可能性が示された。

[Ali Haghghi, 小林正規(慶応大学医学部熱帯医学寄生虫学教室)、竹内勤(同)、佐治博夫(HLA 研究所)、尾林博(京都微生物研究所)、野崎智義]

#### 12. 新規に同定された 150/166 kDa のマンソン住血吸虫虫卵由来 T 細胞刺激誘導抗原

マンソン住血吸虫症は虫卵特異的ヘルパー T 細胞を介して惹起される虫卵周囲肉芽腫形成及びそれに続いて起こる組織の線維化が主要な病因となる。本研究の趣旨は抗原特異的な T 細胞応答の改変・調節を介して本症の重症化抑制を目指すもので、これまで T 細胞刺激誘導抗原の特定を行い、いくつかの主要抗原について明らかにしてきた。今回さらに SDS-ポリアクリルアミドゲル上で 150/166 kDa として検出される画分が T 細胞刺激を誘導する抗原である事が判明した。この成分は重症タイプ及び軽症タイプ双方の系統マウスで CD4+ ヘルパー細胞の増殖を刺激誘導し、Th1 及び Th2 タイプのサイトカイン産生をバランスよく促した。

[朝日博子, Stadecker, M.J.(タフツ大学)]

#### 13. *Schistosoma mansoni* 由来アルブミンプレカーサーのクローニングとレコンビナント蛋白の作製

マンソン住血吸虫感染マウスにおいてヘルパー T 細胞を刺激誘導する抗原分子として見出された 150/166 kDa 画分は、プロテナー処理後の内部アミノ酸配列に各種のアルブミン前駆体と高い相同性が認められた。*S. mansoni* の EST データベース検索から、いくつかのクローンがアルブミン前駆体ホモログをコードしていた事から、そのうちの一つをプローブとして用いて 608 のアミノ酸をコードしている領域の配列を決定した。さらに本分子のレコンビナント蛋白を作製し、免疫学的特性を調べたところ、CBA, C3H, BALB/c 及び C57Bl/6 の系統マウスを用いた感染実験において強い T 細胞刺激活性を示した。

[朝日博子, Stadecker, M.J.(タフツ大学)、LoVerde, P.T.(SUNY)]

分類

1. クリプトスポリジウムに関する分子疫学的研究

(1) 八虫類の *Cryptosporidium*

*Cryptosporidium* は塩素消毒に強い抵抗を示すことから水道を介した集団感染が問題とされている。*Cryptosporidium* の宿主特異性は明らかにではなく、ヒト以外の宿主に感染するとされる *Cryptosporidium* による人への日和見感染が徐々にではあるが知られるようになってきている。*Cryptosporidium* 感染に対する効果的な治療法は現時点で存在せず、免疫不全者での感染は致死的となる状況は改善されていない。現在、ペットショップあるいは動物園等で飼育されている八虫類の一部が斃死する事例が多発しており、それらは蛍光抗体染色および形態観察により *Cryptosporidium* 症と診断されていた。単離された *Cryptosporidium* より 18SrDNA 及び Actin 遺伝子を標的とした PCR を行い、後者より得られた産物 1kbp の塩基配列が八虫類由来の *C. saurophilum* Genbank (No.AF382349) と一致した。ヒトへの感染の可能性は低いと考えられるもののその取り扱いには注意が必要である。

[黒木敏郎(神奈川衛研)、宇根有美(麻布大学)、泉山信司、八木田健司、遠藤卓郎]

(2) アメーバ同定の補助手段として用いる簡便で確実なアイソザイム分析の確立

病原性アメーバ実態調査で得られたアメーバ環境株のうち、無作為抽出による 154 株と、*N. lovaniensis* を除く *Naegleria* 50 株を対象として、PE (propionyl esterase) および ACP (acid phosphatase) のアイソザイム分析を実施した。調査で得られた分離株の約半数は *N. lovaniensis* であり、PE での指標となるアルカリ側に見られるバンドの存在を確認した。その他として *N. australiensis*、*N. philippinensis*、*N. italica*、*N. gruberi*、*Naegleria* spp と判断される泳動像を得た。*N. australiensis* に関しては、ACP のパターンにおけるアルカリ側の 2 本のバンドが特徴的で同定の指標とした。また、どの種とも一致しない、または PCR による種分類とは整合性のとれないパターンを示すクローンも検出されており、これらの詳細な検討には、malate dehydrogenase などアイソザイムの種類を増やして解析中である。

[下河原理江子、泉山信司、遠藤卓郎]

(3) わが国で初めて分離された *N. austriensis* 株の生物学的性状ならびに病原性

本年度調査において温泉試料等から *Naegleria* 属を分離した

ところ、各地の入浴施設からマウスに対し実験的に病原性が報告されている *N. australiensis* が分離されることが明らかとなった。その分離株について DNA 塩基配列の決定を行なった。その結果、標準株と塩基配列が 100% 一致する株と、ITS 領域 + 304 の位置に 2 つの T 塩基の挿入 (99.8%) がある株の 2 種類の存在が明らかとなった。双方についてマウスへの感染実験を行なったところ、標準株に一致する 1 分離株は、脳内接種により発症し、致死に至らしめることが確認された。他の分離株については病原性を示す株は認められなかった。病原性についてはさらに詳細に検討中である。

[泉山信司、朝倉登喜子、小村麻子、下河原理江子、烏谷竜哉(愛媛県立衛生環境研究所)、八木田健司、遠藤卓郎]

2. 分子生物学的手法によるアライグマ回虫の同定と他種回虫との鑑別

アライグマ回虫の寄生状況を調査中に、神奈川県野生化アライグマからタヌキ回虫 *Toxocara tanuki* が検出されたことは既に報告した。両種の虫卵は共に回虫類に特徴的なタンパク膜を持つが、その表面に違いがあり、形態からの虫種鑑別が可能であった。しかしながら、保存状況が悪い少数の虫卵しか観察できない場合には形態に基づく虫種判別が容易でないことを経験した。そこで種の正確な鑑別に分子生物学的手法が利用できないか、リボソーム DNA をターゲットとした PCR 法の適用を検討した。

(1) 塩基配列解読によるタヌキ回虫との虫卵での鑑別

糞便からアライグマ回虫及びタヌキ回虫の虫卵を回収し DNA を調整した。線虫のリボソーム DNA に対するコンセンサスなプライマー (NC13 および NC2) で当該領域を PCR 増幅させ、その塩基配列を解読した。その結果、1 個の虫卵を出発材料としても PCR 増幅・配列解読ができること、虫卵由来の配列は虫体由来のものとは完全に一致すること、配列は種内で良く保存されていること、両種の配列は ITS2 領域で明らかに異なること、などが分かった。すなわち、虫卵から DNA を調整してリボソーム DNA を増幅して ITS2 領域の塩基配列を解読することで種の同定・鑑別が可能であることが明らかとなった。

[杉山 広、森嶋康之、荒川京子、川中正恵、亀岡洋祐(遺伝子資源)]

(2) 制限酵素切断パターン (PCR-RFLP) に基づくタヌキ回虫との虫卵での鑑別

アライグマ回虫およびタヌキ回虫の虫卵を出発材料として得たりボゾム DNA・ITS2 領域の配列をもとに制限酵素地図を作成したところ、制限酵素 MseI が両者の鑑別に有用であると予想された。そこで PCR 産物を MseI で処理したところ、予想どおり各々の種に特異的なサイズの断片に切断されることが分かった。塩基配列を解読しなくとも、PCR 産物の制限酵素処理で両種を迅速・正確に鑑別できることが明らかとなった。

[杉山 広、森嶋康之、荒川京子、川中正憲、亀岡洋祐(遺伝子資源)]

### (3) 種特異的プライマーを用いた PCR によるタヌキ回虫との虫卵での鑑別

アライグマ回虫及びタヌキ回虫の ITS2 領域における塩基配列の違いを利用して、各々の種に特異的なプライマーを設計した。両種の虫卵から DNA を調整し、種特異的プライマーをコンセンサスなプライマー (NC2) と組み合わせて PCR 増幅させたところ、DNA の由来種とプライマーの標的種とが一致した場合にのみ、予想サイズの産物が得られることが分かった。今回設計した種特異的プライマーを用いることにより、一回の PCR で迅速・正確に両者を鑑別できることが明らかとなった。

[杉山 広、森嶋康之、荒川京子、川中正憲、亀岡洋祐(遺伝子資源)]

・ 生理・生化学・分子生物学

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

*N. fowleri* の病原性の究明、さらには診断法の確立のために、必須であるモノクローナル抗体の作成を進めている。*N. fowleri* 固定虫体および未固定虫体の腹腔感染マウスを用いたモノクローナル抗体作成を試み、得られた 11 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ている。本年は、7 クローンにつき、検討したところ、1 クローンが、ウエスタンブロット法で *N. lovaniensis* 等の異種との交叉反応がみられず、*N. fowleri* に 特異的な反応パターンを示した。反応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 に反応していた。現在さらに糖鎖に対する反応性を検討するとともに抗体の特徴の詳細を分析中である。

[原 樹(久留米大学)、下河原理江子、泉山信司、遠藤卓郎]

### 2. アメーバの定量的解析法の検討

アメーバ調査のプロジェクトにおいて、すでに簡便なアメーバ

検出の方法を確立し各地で実施中である。しかし、多様な試料に忠実に対応し、定量的なデータが得られる方法に至っていないのが現状である。簡便で定量性に富む方法の基礎データを得る目的で、アメーバの成長曲線の作成を試みた。環境中の主要アメーバである *Acnathamoeba*、*Naegleria* ならびに *Hartmannella* に関して調べた結果、アメーバによりコロニーの計数のしやすさや形成に差がみられ、1 種の曲線に収束するに至らなかった。*Hartmannella* の分裂速度は 2-3 時間/回という活発なものであった。一方、*Naegleria* の接種量と検出量であるブランク数には大きな差が生じており、その原因究明とともに検出方法の改良に着手している。

[下河原理江子、泉山信司、長谷川賢(玉川大学)、遠藤卓郎]

### 3. *N. fowleri* と *N. lovaniensis* のタンパク質の 2D-PAGE による比較

原発性アメーバ性髄膜脳炎を引き起こす *N. fowleri* と、形態的同一種非病原性の *N. lovaniensis* との類似点および相違点を網羅的に比較する手段として 2D-PAGE を用い、両者の比較を行った。これまでに *N. fowleri* 特異的あるいは 2 種間共通な約 50 個のタンパクスポットについて N 末端アミノ酸配列解析を行い、その結果 30 個のタンパクスポットについてアミノ酸配列を得た。ホモロジー検索の結果、糖代謝に関する酵素や HSP 70 等と高い相同性を認めるスポットを分離した。さらに *N. fowleri* membrane protein MP2C15 の 2D-PAGE による分離に成功した。

[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)、遠藤卓郎]

### 4. ジアルジアの紫外線不活化に関する研究

*Giardia* は強い塩素耐性を有することから、水道水を介した集団感染が世界的に報告されている。これまでの研究で *Giardia* シストは紫外線に対する抵抗性が低いことが明らかにされており、汚染防止の観点から紫外線の利用が期待されている。本研究では設置・運用に際して予見される問題点として、光回復および濁質の影響について検討を行った。紫外線を照射した *Giardia* 嚢子の光回復を試みたところ、光回復はほとんど見られないか無視できる範囲と考えられた。一方、濁質として抗体磁気ビーズを使用した、ビーズを付着させた嚢子への紫外線効果について検討を行った結果、その効果は著しく減少した。嚢子が付着物により紫外線から保護された場合、見かけの濁度が小さく紫外線透過率の減少がほとんど生じない条件下であっても、紫外線の効果は著しく減少することが実験的に示された。

[泉山信司、八木田健司、朝倉登喜子、遠藤卓郎]

(2) *Eimeria* の紫外線感受性

*Giardia*等の耐塩素性微生物による汚染防止対策として、水道水での紫外線の利用が期待されている。一方で、紫外線に耐性を持つ病原性原虫の出現が懸念される。本研究ではイソスポーラに近縁の*Eimeria*を用いて紫外線の感受性について検討を行った。*Eimeria*のオーシストは自家蛍光を発することが知られており、紫外線を受けて青く蛍光を発する様子が蛍光顕微鏡で観察される。*Eimeria*の紫外線感受性はオーシストのsporulationを指標として判定を行ったが、2-log阻止には、10mJ/cm<sup>2</sup>の線量を必要とした。この線量は*Giardia*シストの不活化に要する線量の10倍にあたる。抵抗性の差に関して今後とも微生物種ごとの検証が必要である。

[泉山信司、八木田健司、朝倉登喜子、遠藤卓郎]

(3) マンソン住血吸虫卵殻前駆体タンパク遺伝子(SmP34)の発現状況の検索(2)

住血吸虫の卵殻タンパクをコードする遺伝子については、我々が見出したSmP34を含めてマンソン住血吸虫で数種類がクローニングされている。このSmP34の発現状況を成虫について検討し、*in situ*ハイブリダイゼーション法で雌の卵黄腺にのみシグナルが認められることを報告してきた。本年度は幼虫(ミラシジウム・セルカリア)からも材料を調整し、RT-PCR法でSmP34の発現状況を検討した。その結果、雌成虫からテンプレートを調整した場合は、予想サイズのPCR産物が得られることが分かった。一方、ミラシジウムあるいはセルカリアでは雄成虫と同様にPCR産物は得られなかった。以上の検討により、幼虫ではSmP34は発現していないことが確認された。日本住血吸虫でも同様の知見が得られており、住血吸虫の卵殻タンパク遺伝子は成虫特異的発現と云う特徴を持つことが明らかになった。

[杉山 広、川中正憲、亀岡洋祐(遺伝子資源)、中村正彦(阪大)]

4. 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解析

哺乳動物に存在せず原虫に選択的に存在する酵素は創薬の合理的標的となる。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は赤痢アメーバにおいて2種のアイソエンザイム(EhMGL1, EhMGL2)として存在した。本酵素はプロパジルグリニンにより阻害されたが、細胞の増殖は影響を受けなかった。また、メチオニンガンマリアー

ーゼの基質となると考えられるメチオニンアナログのトリフルオロメチオニンを赤痢アメーバ栄養型の培養体に加えたところ10マイクロモル濃度で不可逆的に原虫の増殖を阻害した。従ってメチオニンガンマリアーゼが抗赤痢アメーバ薬剤開発のための有望な標的であると考えられた。

[所正治(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)、野崎智義]

(2) 赤痢アメーバのセリン生合成経路の解析

赤痢アメーバにおける含硫アミノ酸合成は特殊である。哺乳動物で活発に機能するメチオニンとシステインの間の転換は行われず、システインは解糖経路、セリン生合成経路、システイン合成経路を経て、メチオニンからではなく、解糖系の中間代謝産物と硫化物とから合成される。我々は既に赤痢アメーバにおけるシステイン生合成の重要性を明らかにしているが、その上流のセリン生合成の分子機構は全く不明である。この2つの経路はリン酸化セリン合成経路並び非リン酸化セリン合成経路と呼ばれる。これまで、赤痢アメーバのゲノムデータベースから、リン酸化セリン合成経路の主要酵素であるグリセリン酸リン酸デヒドロゲナーゼ(PGDH)、セリンリン酸アミノ転移酵素(PSAT)、更に、非リン酸化セリン合成経路のグリセリン酸キナーゼ(GK)、グリセリン酸デヒドロゲナーゼ(GDH)の遺伝子を特定している。本年度はこのうちGDHについて酵素学的解明を行った。赤痢アメーバのGDHはイブシロンプロテオバクテリア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GDHはNADPH依存性であり、一般に哺乳動物のGDHと似た酵素学的性状を示したが、細菌・哺乳動物のGDHと異なりグリオキシル酸還元活性をもたなかった。赤痢アメーバのGDHはセリン生合成でなく分解に寄与すると考えられた。

[Vahab Ali, 繁田泰男、野崎智義]

2. 原虫における鉄硫黄タンパク質生合成の解析

全ての細胞において鉄硫黄クラスターを活性中心とする鉄硫黄タンパク質の生合成は必須である。嫌気性原虫赤痢アメーバにおける電子伝達の中心的役者であるフェレドキシン・ビルビン酸フェレドキシン酸化還元酵素はいずれも鉄硫黄タンパク質である。我々は赤痢アメーバにおける鉄硫黄クラスター合成の機構を分子レベルで明らかにするために、まず中心的役割を果たす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のクローニングを行った。ゲノムデータベース解析によると、大腸菌などにみられる多コンポーネントの系は赤痢アメーバには存在せず、NifS, NifUのみが唯一の分子であることが示唆された。現在、組換えタンパク質を作成してこれらタ

ンパク質の生化学的解析を行っている。

[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]

### 3. 赤痢アメーバの貪食の分子機構の解明

#### (1) プロテオーム解析による貪食の網羅的解明

赤痢アメーバの貪食に関わるタンパク質を網羅的に獲得することを目的として、ラテックスビーズを貪食させた赤痢アメーバ虫体からショ糖密度勾配法を用いてファゴソームを単離した。精製されたファゴソームの純度を電顕を用いて確認した上で、ファゴソームタンパク質を de novo シーケンスによって網羅的に解析した。その結果、低分子量 GTP 結合タンパク質、システインプロテアーゼなど多くのタンパク質が時間依存的に動員されることが明らかとなった。現在、それぞれのタンパク質の細胞内での挙動を免疫蛍光抗体法により確認している。

[岡田麻美, 保田友義, 徳丸文恵, 櫛島麻衣, Chris Huston (University of Virginia), Barbara Mann (University of Virginia), 野崎智義]

#### (2) 貪食・病原機構に関与する Rab の機能解析

##### ア 肝膿瘍形成における *EhRab5* の機能解析

赤痢アメーバの病原性は、貪食と大きな相関があると報告されているが、実際にはどのような因子が関与しているかは明確ではない。*EhRab5* 大量発現株では赤血球の取込みが促進し、逆に *EhRab5Q67L* 変異発現株では取り込み効率が低下するため、これらの形質転換株ではハムスターにおける肝膿瘍形成効率にも影響を及ぼすと考えられた。その結果、*EhRab5* 大量発現株ではコントロールよりも大きな膿瘍を形成する事が分かり、貪食効率と病原性の相関を支持していた。しかしながら、貪食が低下していた *EhRab5Q67L* 変異発現株でも中程度の膿瘍を形成する事が分かった。このことは *EhRab5* の大量発現が、貪食だけでなく、組織内での生き残りなど別の径路にも影響を及ぼしている事を示す。現在、培養細胞への組織障害性などを解析している。

[中野由美子, 岡田麻美, 櫛島麻衣, 徳丸文恵, 繁田泰男, 野崎智義]

##### イ 貪食における *EhRab7* アイソタイプの機能解析

赤痢アメーバがファゴサイトーシスを効率良く進めるためには、*EhRab5* と *EhRab7* の機能が重要であることを明らかにしてきたが、近年の赤痢アメーバゲノムプロジェクトの終了により、赤

痢アメーバはこれまで解析してきた *EhRab7* (*EhRab7A*) の他に 5 つのアイソタイプ (B-F) が存在することが判明した。まず、クローニングに成功した *EhRab7B* ならびに *EhRab7D* のファゴサイトーシスにおける機能を解析した。*EhRab7A* と共局在する事が分かっている Vps26 をマーカーとして細胞内局在を観察した結果、*EhRab7B* と *EhRab7D* は *EhRab7A* と共局在しないことが分かった。また、*EhRab7B* は定常状態でも大きな空胞上に局在し、空胞内にはアメーバポアが入っていることが容易に観察された。また、*EhRab7D* の大量発現が赤血球の取込み効率を低下させた。このことは、少なくとも 2 つの *EhRab7* アイソタイプがファゴサイトーシスの異なる場所で別々の機能を担っている事を示している。

[中野由美子, 岡田麻美, 櫛島麻衣, 徳丸文恵, 繁田泰男, 野崎智義]

##### ウ ファゴソーム形成における *EhRab11* アイソタイプの機能解析

赤痢アメーバのエンドソーム系には *EhRab11* が局在することが報告されていたが、我々は *EhRab11B*, *EhRab11C* という 2 つのアイソタイプを RT-PCR 法によってすでに同定している。またラテックスビーズを用いて精製したファゴソーム上には *EhRab11B* が特異的に検出されているため、*EhRab11* アイソタイプの機能についても明らかにしようと試みた。まず、3 種の *EhRab11* アイソタイプをそれぞれ発現する形質転換株を作製した。間接蛍光抗体法をもちいた観察により、*EhRab11* アイソタイプのいずれも *EhRab7*, Vps26, アメーバポア, など既知のマーカータンパク質との共局在は観察されず、*EhRab11* アイソタイプがこれまで解析してきたコンパートメントと異なる場所に局在していることが分かった。また、*EhRab11B* の大量発現は他の 2 種の *EhRab11* アイソタイプと異なり、エンドサイトーシスも活性化させることも分かった。現在、*EhRab11B* が特異的に 2 つの径路に関与する意味について解析を進めている。

[中野由美子, 岡田麻美, 櫛島麻衣, 徳丸文恵, 繁田泰男, 野崎智義]

### 4. トリパノソーマ・リーシュマニア原虫におけるプロスタグランジン合成の解析

我々は既にキネトプラスチド科に属する原虫に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。本年度はトリパノソーマ・リーシュマニアにおけるプロスタグランジン F<sub>2</sub> シンターゼ (PGFS) の精製と機能解析を継続して行った。その結果、トリパノソーマ・リーシュマニアの昆虫型虫体エビマシチゴートから PGFS を精製し、その遺伝子を特定した。得られたトリパノソーマ・リーシュマニアの PGFS は細菌の Old Yellow Enzyme と高い相同性を示した。このタンパク質はこれまでプロスタグラ

ンジン合成との関与が全く推測されていなかった新規のチアミン依存性タンパク質であった。更に、酵素学的な解析を行い、本酵素がキノンなど抗トリパノソーマ薬剤の標的であることを明らかにした。また、リーシュマニア原虫からもトリパノソーマブルセイ PGFS のホモログを同定し、その酵素学的解析を行った。更に、PCR、免疫蛍光抗体法により *L. major*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. donovani* で細胞質内の発現を確認した。

[Bruno K. Kubata(大阪バイオサイエンス研究所)、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]

#### 5. トリパノソーマクルージ細胞表面主要糖タンパク質の機能解析

トリパノソーマクルージの 72kDa 糖タンパク質(Gp72)は細胞表面、特に鞭毛と細胞体の接合部分に存在し、両者の接着に寄与している。Gp72 の細胞における機能を明らかにするために、我々は欠損変異体を作成し、実験動物への感染性の変化を観察した。通常の BALB/c マウスに対する感染は両者ともほとんど見られなかった。BALB/c 胸腺除去マウスを用いると、Gp72 欠損変異体では、野生型虫体に比べて、これら免疫不全マウスへの感染性が著しく減弱していた。以上のことから、Gp72 は免疫力のあるマウスへの潜在的感染の確立に不可欠であることが示唆された。

[Miguel A. Basombrio (Universidad Nacional de Salta)、野崎智義、George A. M. Cross (The Rockefeller University)]

#### 6. マラリア原虫における抗酸化機構の解析

マラリア原虫のヘモグロビン代謝・抗酸化ストレス応答に重要な働きをする新規抗酸化ペロキシレドキシンの生理機能を明らかにすることを目的として、ネズミマラリア原虫の発現プロファイルの解析を行った。ネズミマラリア原虫 *P. yoelii* では熱帯熱マラリア原虫と同様に、二種類のアイソタイプが存在した。組換えタンパク質を用いてインビトロにおけるペロキシダーゼ活性を確認した。更に組換えタンパク質に対する抗血清を用いて発現を調べた。2-cys 型ペロキシレドキシンはほ乳類型虫体並びに蚊内型虫体のどの細胞型にもあまねく発現していた。一方、1-cys 型ペロキシレドキシンは赤血球内型の栄養体に高い発現が認められた。以上の結果から、マラリア原虫が生理機能を異にする多様な抗酸化機構を利用していることが明らかとなった。

[河津信一郎(国立国際医療センター)、坪井敬文(愛媛大学医学部寄生虫学教室)、鳥居本美(同)、野崎智義]

#### 7. 日本住血吸虫症の肝線維化評価に有用な血清マーカーの検討

日本住血吸虫症においてその重症度を評価する手段として、血清マーカーを使用して門脈域を中心とした肝線維化を測定する方法が応用されている。いくつかのマーカーがこの目的に有用であると報告されているが、本症の病態を最も良く反映するマーカーについて検討した。フィリピン国の日本住血吸虫感染者を対象として、血中の P-III-P(プロコラーゲン) もしくは IV 型コラーゲン、ヒアルロン酸等との相関、ウイルス性肝炎との関連について調べた結果、P-III-P や IV 型コラーゲンのマーカーが日本住血吸虫症の病態を早期から評価するのに適していると考えられた。

[大前比呂思(筑波大学)、朝日博子、Orlando S. Sy(フィリピン国、住血吸虫症コントロール病院)、松田 肇(獨協医科大学)]

#### 免疫

##### 1. 新規に同定された 25 kDa の Manson 住血吸虫卵由来 T 細胞抗原

Manson 住血吸虫症は虫卵特異的ヘルパー T 細胞を介して惹起される虫卵周囲肉芽腫形成およびそれに続いて起こる組織の線維化が主要な病因となる。このことから特異的ヘルパー T 細胞を刺激誘導する抗原分子に着目し、これまでいくつかの抗原を特定し、一部は抗原エピトープまで解析した。今回更に見かけ上 25kDa として検出される成分が T 細胞刺激性の抗原である事が判明した。この抗原は感染マウス由来 CD4 陽性のヘルパー T 細胞の増殖を促したが、マウスの系統により特徴的に異なる免疫応答を誘導した。

[朝日博子、Stadecker, M.J. (タフツ大学)]

##### 2. Manson 住血吸虫卵由来 25 kDa の T 細胞抗原の 1 次構造と免疫学的特性

Manson 住血吸虫感染マウスにおいてヘルパー T 細胞を刺激誘導する虫卵由来抗原分子として見い出された 25kDa の成分(Sm-p25)はその部分アミノ酸配列から、ヒトの好塩基球から IL-4 産生を誘導する物質(IPSE)であることが判明した。134 アミノ酸からなる全配列をマルトース結合型にしてレコンビナント蛋白を作製し、免疫学的特性を調べた。レコンビナント Sm-p25 はヘルパー T 細胞を刺激してその増殖を促し、病態が重症化することで知られる CBA マウスにおいてより強い応答が認められた。B 細胞応答は、感染後 5-6 週の産卵開始時期と一致して上昇を始め、9-15 週で最高値に達した。

[朝日博子、Williams, D(イリノイ大学)、Stadecker, M.J. (タフツ大学)]

検査・診断

1. ポリ塩化アルミニウム凝集剤および炭酸カルシウムを用いた病原微生物濃縮装置

水道水中に混入する病原微生物、特にクリプトスポリジウムオーシストや細菌芽胞等の濃縮回収を目的とした装置の開発を行った。基本原理はポリ塩化アルミニウム凝集剤を用いて水中の濁質を凝集沈殿させ、連続的に遠心回収するもので、フロック形成を促すために炭酸カルシウムを添加した。本システムでは、回収されたフロックを酸処理により凝集剤と炭酸カルシウムを溶解・除去することで、濁質の単離・回収が可能となる。得られた試料をPCR、顕微鏡観察、培養等に供し、病原体検出を行う。[泉山信司、八木田健司、遠藤卓郎]

2. クリプトスポリジウム症の血清診断法の開発

クリプトスポリジウム症の ELISA による血清診断法の開発を行った。陽性血清としては平成 6 年の神奈川県平塚市における集団発生事例ならびに国内散发例のものを、また陰性血清としては下痢症を示さない一般健康者の血清を用いた。抗原、ブロッキング試薬、検出用抗体、洗浄等の諸条件を検討した結果、抗原としては仔牛由来のオーシスト(遺伝型はウシ型)より分離したスポロゾイト抽出抗原を用いること、被検血清は 200 倍希釈とし、検出用二次抗体(抗ヒト IgG - POD 標識抗体)は 4000 倍で使用する、ブロッキング試薬にカゼイン系タンパク質溶液を用いることで良好な成績を得た。患者血清及び陰性血清の抗体価分布からカットオフ値を OD=0.3(感度 92%、特異度 100%)に設定した。本法では、既に糞便中オーシストが陰転した後しばらくの期間にわたり高い抗体価が見られ、疫学調査への有用性も示された。

[八木田健司、黒木俊郎(神奈川県衛生研究所)、遠藤卓郎]

3. 平成 14 年度・依頼血清の寄生虫抗体の検査

検査に際して毎回使用する抗原は、線虫類 5 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)、糸虫類 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 12 種類で、方法は酵素抗体法(DOT-ELISA)を用いている。結果の確認のため場合によって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も実施した。本年度は 36 検体(29 人)の検査を実施し、そのうち抗体陽性が 8 件(8 人)、陰性が 28 件(21 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:5 件(5 人)、エキノコックス:1 件(1 人)、有鉤囊虫症:1 件(1 人)、旋尾線虫

症:1 件(1 人)であった。

[荒川京子、杉山 広、森嶋康之、川中正憲]

4. ホタルイカからの旋尾線虫幼虫 TypeX の検出状況

富山県を中心とする生食用ホタルイカの水揚げは、毎年 3 月中旬から 5 月下旬までの概ね 12 週間に限定されている。2002 年と 2003 年のこの時期、都内で市販された生食用ホタルイカから旋尾線虫幼虫 TypeX の検出を試みた。検査はこの期間中毎週 1 回行い、各回ごとに約 100 尾、各年で 11 回にわたった。その結果、2002 年は 1.7%、2003 年は 2.2%という平均寄生率が得られた。

[荒川京子、川中正憲、杉山 広、森嶋康之]

5. エキノコックス症新規診断法の開発

エキノコックス症の新規診断法を開発することを目的として、多胞虫の主要抗原遺伝子・タンパク質を解析・応用した。一昨年度得られた 6 つの新規抗原遺伝子のうち、抗原性が高く、診断抗原としての価値の高いと考えられるペロキシレドキシンの虫体における局在、組換えタンパク質を用いた酵素活性を明らかにした。多胞虫のペロキシレドキシンは 2-cys 型であり、チオレドキシン系と共役することでペルオキシダーゼ活性を示した。現在、組換えペロキシレドキシンを抗原とした ELISA 法を用いて、診断抗原としての感度および特異性を評価している。

[藤田修(獣医科学部)、荒木國興(国立公衆衛生院衛生微生物学)、神谷晴男(弘前大学医学部寄生虫学教室)、野崎智義]

6. 日本住血吸虫症の簡易診断法の開発:レコンピナント蛋白抗原の利用

日本住血吸虫感染者の尿中には抗成虫及び虫卵特異抗体が検出でき、簡易診断法に尿を利用出来る可能性が高い事を先に報告した。診断用抗原として十分量を維持する事が困難な成虫および虫卵の代わりに、成虫の tegument 成分である 22.6kDa のレコンピナント蛋白の有用性を試験した。その結果、血清抗体との反応では陽性率は 37.1%と低い率に留まるのに対し、尿を用いた場合には 97.3%で陽性反応を得た。すなわち、本レコンピナント抗原は尿中に出現する抗体とよく反応し、新たな抗体検出系として適用が期待される。

[朝日博子、山下隆夫(山形県立保健医療大学)、大前比呂思(筑波大学)]

その他

1. 浴槽モデルを用いたアメーバ汚染のモニタリング

循環式浴槽のレジオネラ汚染防止対策の一環として、実験プラントを用いてアメーバならびにレジオネラ等細菌類による汚染状況の継時変化を追った。モニタリングは入浴終了後、塩素を不活化した時点から開始した。塩素消失直後より一般細菌数の急激な上昇、次いでアメーバ数の上昇、さらにレジオネラ菌数の上昇という一連の現象が再現された。この間、レジオネラの増殖に要する日数は、わずか3日程度であった。現在、各種配管素材表面への着生、膜による微生物除去、紫外線その他による消毒効果等に関する検討を行っている。  
[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. 疫学調査マニュアル完成を目指したアメーバ株の保存法の改良について

アメーバの疫学調査において、生態学的・衛生的に注目される *N. fowleri* 以外のクローンを多数得ている。大多数は現在寒天プレート上での継代培養により維持されているが、Virulence の変化に関する問題やクローン数増加に伴い、しかるべく保存法の検討を試みた。すでに、アメーバの保存に関しては、多くの報告があり、Glycerol 溶液での保存は6ヵ月以上の保存が可能であることを確認した。さらに操作の簡略化と効率の向上をはかるため、DMSO を用いた方法を検討している。現在のところ、10% DMSO、および20% FBS を加えた系で良好な結果を得ている。解凍の手順は、迅速解凍後ただちに大腸菌プレートに移殖し、滅菌水を加える。  
[下河原理江子、泉山信司、遠藤卓郎]

## 3. 植物由来殺菌剤の検討

### (1) 茶種子由来精製サポニンのミヤイリガイ殺滅作用

茶種子由来の粗サポニンから2種の精製サポニンが精製され、それぞれTeasaponinE1及びTeasaponinE2と同定された。これらのミヤイリガイに対する殺滅活性を求めたところ、前者のLC50は2.2ppm[95%信頼限界:[1.34, 3.36]]であるのに対して、後者は8.9ppm [6.38, 13.33]であった。二つのサポニンは立体構造にわずかな差異しかない構造異性体であるが、両者の間で4~5倍もの活性濃度の差異がある。化学構造と殺菌活性との関連を解明する上で興味ある知見であると思われる。  
[川中正憲、荒川京子、大東肇(京大・農)]

### (2) フィリピン産植物 (*Jatropha curcas*) 殺菌剤由来のEBV活性化試験

フィリピンの日本住血吸虫症有病地においては、この土地に

自生する *Jatropha curcas* の抽出物を殺菌剤として応用する事が推奨されている。近年タイ産の *Jatropha curcas* について、発癌プロモーターであるホルポールエステルの含有の事実が報告された。そこで、フィリピンのレイテ島産 *Jatropha curcas* の種子、果実、葉を採集しそれぞれのエタノール、ブタノール抽出成分についてEBV(Epstein-Barr virus)活性化試験を行った。その結果、種子では両方の抽出成分に、果実及び葉ではブタノール抽出成分だけに発癌プロモーター活性が認められた。この事は殺菌剤として *Jatropha curcas* の種子を取り扱うに際して相応の注意が必要である事を示している。  
[川中正憲、荒川京子、大東肇(京大・農)]

## 症例

### 1. 開腹術により腹腔から虫体が検出され塩基配列で種を同定した肺吸虫の腹腔内異所寄生の1例

急性虫垂炎の疑いで開腹術が施行された外国人女性から、術中に大網に付着する楕円形の構造物(赤褐色・長径約3mm)が採取された。組織学的検索により構造物は寄生蠕虫であることが明らかにされたので、虫種の正確な同定を試みた。連続薄切標本を新たに作製して観察したところ、構造物は肺吸虫の成虫であり、卵巣が複雑に分岐する種であることが分かった。そこで薄切虫体を出発材料にしてリボゾームDNA・ITS2領域の塩基配列を解読・検索したところ、宮崎肺吸虫の配列と完全に一致することが分かった。本種は本邦固有の人体寄生性肺吸虫で卵巣は複雑に分岐する特徴的な形態を有し、上述の観察結果とよく符号する。以上の結果から、患者の腹腔から摘出された寄生蠕虫を宮崎肺吸虫と同定した。本例は本虫成虫によることが明らかにされた腹腔内異所寄生の初めて症例となる。

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

## 発表業績一覧

### 誌上発表

#### 1. 欧文発表

1) Shinji Izumiyama, Ichiro Furukawa, Toshiro Kuroki, Shiro Yamai, Hiromu Sugiyama, Kenji Yagita and Takuro Endo. Prevalence of *Cryptosporidium parvum* Infections in Weaned Piglets and Fattening Porks in Kanagawa Prefecture, Japan. Japanese Journal of Infectious Disease. 54:23-26, 2001.

2) Kazuo Ono, Hidetaka Tsuji, Shiba K. Rai, Akio Yamamoto,

- Kuniyoshi Masuda, Takuro Endo, Hak Hotta, Takashi Kwamura and Shoji Uga. Contamination of River Water by *Cryptosporidium parvum* Oocysts in Western Japan. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(9):3832-3836, 2001.
- 3) Szenasi Zsuzsanna dr., Endo Takuro dr., Yagita Kenji dr., Vereb Ilona dr. es Nagy Erzsebet dr. A legionellak epidemiologiaja es laboratoriumi diagnosztikaja (Epidemiology and laboratory diagnostics of legionellae. *Orvosi Hetilap*. 142(20):1035-1043, 2001.
- 4) Sugiyama, H., Morishima, Y., Kameoka, Y. and Kawanaka, M.: Polymerasechain reaction (PCR)-based molecular discrimination between *Paragonimus westermani* and *P. miyazakii* at the metacercarial stage. *Mol. Cell. Probes*, 16, 229-234 (2002).
- 5) Tsukada, H., Hamazaki, K., Ganzorig, S., Iwaki, T., Konno, K., Lagapa, J.T., Matsuo, K., Ono, A., Shimizu, M., Sakai, H., Morishima, Y., Nonaka, N., Oku, Y. and Kamiya, M. 2002. Potential remedy against *Echinococcus multilocularis* in wild red foxes using baits with anthelmintic distributed around fox breeding dens in Hokkaido, Japan. *Parasitology* 125, 119-129.
- 6) Jiwajinda, S., Santisopasri, V., Murakami, A., Kawanaka, M., Sugiyama, H., Gasquet, M., Blansard, G., Ohigashi, H. *In vitro* anti-tumor promoting and ant-parasitic activities of the quassinoids from *Eurycoma longifolia*, a medical plant in Southeast Asia. *J. Ethnopharmacol*, 82, 55-58 (2002)
- 7) Tabunoki, H., Sugiyama, H., Tanaka, Y., Fujii, H., Bunno, Y., Jouni, Z. E., Kobayashi, M., Sato, R., Maekawa, H., Tsuchida, K., Isolation, characterization, and cDNA sequence of a carotenoid binding protein from the silk gland of *Bombyx mori* larvae. *J. Biological Chemistry*, 277(35), 32133-32140 (2002)
- 8) Okamoto, M., Lo, C.T., Tiu, W.U., Qui, D.C., Hadidjaja, P., Upatham, S., Sugiyama, H., Taguchi, T., Hirai, H., Saitoh, Y., Habe, S., Kawanaka, M., Hirata, M., Agatsuma, T. Phylogenetic relationships of the genera *Oncomelania* and *Tricula* infected from the mitochondrial 12S rRNA gene. *Jpn. J. Trop. Med. Hyg.*, 31(1), 5-10 (2003)
- 9) Saito, T., Maeda, T., Nakazawa, M., Takeuchi, T., Nozaki, T., and Asai, T. Characterization of hexokinase in *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Int. J. Parasitol.* 32, 961-967. (2002)
- 10) Haghighi, A., Kobayashi, S., Takeuchi, T., Masuda, G., and Nozaki, T. (2002) Remarkble genetic polymorphism among *Entamoeba histolytica* isolates from a limited geographic area. *J. Clin. Microbiol.* 40, 4081-90.
- 11) Basombrio, M., Gomez, L., Padilla, A.M., Ciaccio, M., Nozaki, T., and Cross, G.A.M. (2002) Targeted deletion of the Gp72 gene decreases the infectivity of *Trypanosoma Cruzi* for mice and insect vectors. *J. Paraistol.* 88, 489-493
- 12) Kabututu, Z., Martin, S.K., Nozaki, T., Kawazu, S., Okada, T., Munday, C.J., Duszenko, M., Lazarus, M., Urade, Y., and Kubata, B.K. (2002) Prostaglandin production from arachidonic acid and evidence for a 9,11-endoperoxide prostaglandin H<sub>2</sub> in *Leishmania*. *Int. J. Parasitol.* 32, 1693-1700
- 13) Asahi, H., Ohmae, H., Sy, O.S., Tanage, M., Matsuda, H., Kanazawa, T., Yamada, K., Kajima, J., and Ohta, N. Detection of specific antibodies in the urine as markers of human *Schistosoma Japonicum* Infection. *Proceedings of the 10<sup>th</sup> International Congress of Parasitology*, 303-305, 2002.
- 14) Asahi, H., Stadecker, M.J. Analysis of egg antigens inducing hepatic lesions in schistosome infection (review). *Parasitology International* 52, inpress.

和文発表

- 1) 遠藤卓郎、八木田健司、泉山信司. 原虫類と食品衛生 (Protozoa and Food Hygiene) 食品衛生学雑誌. 43(6):J343-J347, 2002.
- 2) 鈴木敦子、市瀬正之、松江隆之、天野祐次、寺山 武、泉山信司、遠藤卓郎. 各種生活環境水からのレジオネラ属菌検出状況. 感染症学雑誌. 76(9):703-710, 2002.
- 3) 遠藤卓郎、八木田健司、泉山信司. 飲料水と健康 現在問題となっている飲料水を介した感染症 公衆衛生. 66(6): 458-461, 2002.
- 4) 遠藤卓郎、八木田健司、泉山信司. 水系によるクリプトス

## 寄生動物部

ポリジウムとジアルジア感染の実態. 用水と廃水.  
44(4):14-18, 2002.

- 5) 杉山 広、森嶋康之、川中正憲、小澤武文、赤尾信明、虫体の薄切標本を抗原とした酵素抗体法による旋尾線虫症の血清診断、*Clinical Parasitology*, 13(1), 98-101 (2002)
- 6) 川中正憲、杉山広、坂本京子、森嶋康之、升秀夫、村田以和夫、鈴木淳、霞ヶ浦地方のシラウオに寄生する横川吸虫メタセルカリアの調査、*Clinical Parasitology*, 13(1), 132-135 (2002)
- 7) 川中正憲、坂本京子、杉山広、森嶋康之、動物園、観光施設でのアライグマ回虫卵汚染問題、病原微生物検出情報、Vol.23, No.8, 10-11, 2002
- 8) 川中正憲、杉山広、森嶋康之、アライグマ回虫による幼虫移行症、*IDWR*、通巻第4巻第42号、16-18, 2002
- 9) 杉山 広、気をつけたい食品寄生虫、*食と健康*、Vol.46(7) 8-15, 2002
- 10) 川中正憲、森嶋康之、中国西部寄生虫紀行(1)青海省のエキノコックス、*BMSA 会誌*、Vol.14, No.2, 15-20, 2002
- 11) 川中正憲、森嶋康之、中国西部寄生虫紀行(2)日本住血吸虫症の元流行地: 広西チワン族自治区の寄生虫症、*BMSA 会誌*、Vol.14, No.3, 15-21, 2002
- 12) 川中正憲、森嶋康之、中国西部寄生虫紀行(3)貴州省の土壤媒介線虫対策とバイオガストイレ、*BMSA 会誌*、Vol.14, No.4, 19-25, 2003,
- 13) 川中正憲、「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」(厚生労働科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業「動物展示施設における人と動物の共通感染症対策ガイドライン」作成に関する研究) 分担研究報告書、平成15年3月
- 14) 野崎智義 (2002) アメーバ症 小児科診療 診断と治療社 第65巻, 12号, 2132-2135.
- 15) 野崎智義 医師が念頭におくべき輸入感染症の世界分布 今日の治療指針 医学書院 pp1010-1012, 2002.

学会発表

### 1. 国際学会・集会

- 1) Izumiyama, S., Yagita, K., Hirata, T., Fujiwara, M. and Endo T. Inactivation of *Giardia lamblia* cysts by Ultraviolet Irradiation. 1<sup>st</sup> Asia Regional Conference on Ultraviolet Technologies for Water, Wastewater & Environmental Applications.(Singapore) Nov. 2002.
- 2) Kawanaka, M. and Ohigashi, H., Laboratory evaluation of potential plant molluscicides using *Oncomelania nosophora* . Emerging & Reemerging Parasitic Zoonosis in the Pacific Rim, Shanghai, 30.Oct – 2. Nov. 2002
- 2) Nozaki, T. (2002) Proteome analysis of phagocytosis in *Entamoeba histolytica*. Amitochondriate Protozoan Genome Sequencing Projects: *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis*, and *Giardia lamblia*. Cambridge, U.K., May 20-21, 2002
- 3) Nozaki, T., Saito-Nakano, Y., Okada, M., Nudeshima, M., Shigeta, Y., Hughes, M.A., Huston, C.D., Mann, B.M., and Petri, Jr., W.A. (2002) Isolation and partial characterization of Rab-interacting proteins from *Entamoeba histolytica* toward the molecular understanding of Rab functions during phagocytosis. Thirty-seventh Joint Conference on Parasitic Diseases, The Japan-United States Cooperative Medical Science Program, Nagasaki, Aug 20-23, 2002.
- 4) Haghighi, A., Kobayashi, S., Takeuchi, T., Thammapalerd, N., Masuda, G., and Nozaki, T. (2002) DNA fingerprinting of *Entamoeba histolytica* isolates. Thirty-seventh Joint Conference on Parasitic Diseases, The Japan-United States Cooperative Medical Science Program, Nagasaki, Aug 20-23, 2002.
- 5) Okada, M., Saito-Nakano, Y., Yasuda, T., and Nozaki, T. (2002) Proteome analysis of phagocytosis in *Entamoeba histolytica* isolates. Thirty-seventh Joint Conference on Parasitic Diseases, The Japan-United States Cooperative Medical Science Program, Nagasaki, Aug 20-23, 2002.
- 6) Nozaki, T. and Ali, V. (2002) Molecular analysis of iron-sulfur cluster formation in parasitic protozoa. The 2nd Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji Island, Aug 24-27, 2002.

## 寄生動物部

- 7) Kubata, B., Kabututu, Z., Nozaki, T., Lazarus, M., and Urade, Y. (2002) A key role for *Trypanosoma cruzi* old yellow enzyme in the metabolism of trypanocidal drugs. The 2nd Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji Island, Aug 24-27, 2002.
- 8) Nozaki, T. (2002) Proteomic analysis of phagocytosis in *Entamoeba histolytica*. Forum Cheju -8, The 5th Korea-Japan Parasitologists Seminar, Oct 5-6, 2002
- 9) Asahi, H., Osman, A., LoVerde, P.T., and Stadecker, M.J. : Albumin precursor homologue is a novel T helper cell immunogenic egg component in murine infection with *Schistotoma mansoni*. The 50<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene, USA, November 2001.
2. 国内発表
- 1) 八木田健司、泉山信司、相楽裕子、坂本光男、黒木俊郎、遠藤卓郎. *C.parvum* 遺伝子型 1 および遺伝子型 2 によるヒト重複感染例. 第 76 回日本感染症学会 2002 年 4 月.
- 2) 泉山信司、下河原理江子、八木田健司、遠藤卓郎. 高温耐性アメーバ類の浴槽からの検出. 第 2 回環境技術研究協会 2002 年 6 月.
- 3) 遠藤卓郎、八木田健司、泉山信司. クリプトスポリジウムと遺伝子型別. 衛生微生物技術協議会第 23 回研究会 2002 年 7 月.
- 4) 下河原理江子、八木田健司、泉山信司、小村麻子、朝倉登喜子、遠藤卓郎. PCR と IEF による温水環境から得られた自由生活性 *Naegleria* 属アメーバの検出法の検討とその実際. 第 75 回日本生化学学会 2002 年 10 月.
- 5) 泉山信司、八木田健司、朝倉登喜子、遠藤卓郎. 紫外線によるジアルジアシストの不活化試験. 第 35 回日本原生動物学会 2002 年 11 月.
- 6) 小村麻子、八木田健司、泉山信司、下河原理江子、遠藤卓郎. *Naegleria fowleri* と *N.lovaniensis* のタンパク質の 2D-PAGE による比較(2). 第 35 回日本原生動物学会 2002 年 11 月.
- 7) 朝倉登喜子、八木田健司、泉山信司、下河原理江子、遠藤卓郎. わが国で初めて分離された *Naegleria australiensis*. 第 35 回日本原生動物学会 2002 年 11 月.
- 8) 八木田健司、泉山信司、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連した ELISA による抗体価調査. 第 72 回日本寄生虫学会大会 2003 年 3 月.
- 9) 小村麻子、八木田健司、泉山信司、下河原理江子、遠藤卓郎. *Naegleria fowleri* と *N.lovaniensis* のタンパク質の 2D-PAGE による比較(2). 第 72 回日本寄生虫学会大会 2003 年 3 月.
- 10) 泉山信司、八木田健司、朝倉登喜子、平田 強、藤原正弘、遠藤卓郎. 紫外線による *Giardia* シストの不活化試験. 第 72 回日本寄生虫学会大会 2003 年 3 月.
- 11) 遠藤卓郎、朝倉登喜子、八木田健司、泉山信司、下河原理江子、小村麻子. わが国の温水環境より初めて分離された *Naegleria australiensis*. 第 72 回日本寄生虫学会大会 2003 年 3 月.
- 12) 杉山 広、森嶋康之、川中正憲、小澤武文、赤尾信明: 虫体の薄切標本を抗原とした酵素抗体法による旋尾線虫症の血清診断. 第 13 回日本臨床寄生虫学会大会, 2002 年 6 月
- 13) 川中正憲、坂本京子、杉山 広、森嶋康之、ミヤイリガイの実験室内殺虫効果試験法の改良. 第 62 回日本寄生虫学会東日本大会, 2002 年 10 月、新潟
- 14) 森嶋康之、杉山 広、川中正憲、アライグマ回虫による幼虫移行症の病原性: 移行部位による発育差の検討, 第 72 回日本寄生虫学会大会, 2003 年 3 月、久留米
- 15) 川中正憲、坂本京子、杉山 広、森嶋康之、動物園、観光施設におけるアライグマ回虫卵汚染問題. 第 72 回日本寄生虫学会大会, 2003 年 3 月、久留米
- 16) 杉山 広、森嶋康之、川中正憲、東京 23 区を流れる荒川でのクロベンケイガニの採集と大平肺吸虫の検出. 第 72 回日本寄生虫学会大会, 2003 年 3 月、久留米
- 17) 中野由美子、保田友義、繁田泰男、竹内勤、野崎智義 (2002) ファゴサイトーシス初期に形成される EhRab5 と EhRab7 が局在する空胞は病原性因子の輸送に關する. 第 55 回日本細胞生物学会大会 May 22, 2002

## 寄生動物部

- 18) 野崎智義 (2002) 赤痢アメーバ貪食における Rab エフェクター分子の解析 第 10 回分子寄生虫学ワークショップ July 29-Aug 1, 2002.
- 19) 岡田麻美 (2002) プロテオーム解析による赤痢アメーバ貪食機構の解析 第 10 回分子寄生虫学ワークショップ July 29-Aug 1, 2002.
- 20) 岡田麻美、中野由美子、保田友義、野崎智義 (2002) プロテオーム解析による赤痢アメーバの貪食機構の解析 第 75 回日本生化学会大会、京都、Oct 14-17, 2002. (口頭、ポスター)
- 21) 所正治、浅井隆志、小林正規、田辺将信、竹内勤、野崎智義 (2002) 赤痢アメーバメチオニンガンマリアーゼの解析:腸管内寄生原虫における含硫アミノ酸代謝 第 75 回日本生化学会大会、京都、Oct 14-17, 2002. (ポスター)
- 22) 熊谷正広、牧岡朝夫、竹内勤、野崎智義 (2002) 赤痢アメーバのファルネシル転移酵素の解析 第 75 回日本生化学会大会、京都、Oct 14-17, 2002. (ポスター)
- 23) 野崎智義 (2002) 赤痢アメーバにおける鉄-硫黄クラスター生成の特殊性 第 1 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム 松山、Oct 12-13, 2002
- 24) 中野由美子、保田友義、繁田泰男、野崎智義 (2002) 赤痢アメーバのファゴサイトーシスにおける Rab 機能の特殊性 第 25 回日本分子生物学会年会 シンポジウム 横浜、Dec 11-14, 2002
- 25) 中野由美子、保田友義、岡田麻美、棚島麻衣、野崎智義 (2003) 赤痢アメーバに特異的なファゴサイトーシスを調節する Rab GTPase の解析 感染症若手研究者沖縄フォーラム 宜野湾、沖縄 平成 15 年 1 月 22-23 日