

平成28年度医療研究開発推進事業費補助金

(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業) 成果報告書

I. 基本情報

事業名 : (日本語) 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業
(英語) Research Program on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases

補助事業課題名 : (日本語) 原虫・寄生虫に対する監視・制御に関する研究
(英語) Study on prevention and control of protozoan and parasitic diseases

補助事業担当者 (日本語) 国立感染症研究所寄生動物部・部長・野崎 智義
所属 役職 氏名 : (英語) National Institute of Infectious Diseases,
Department of Parasitology, Director Tomoyoshi Nozaki

実施期間 : 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究課題名 : (日本語)
(英語)

補助事業分担者 (日本語)
所属 役職 氏名 : (英語)

II. 成果の概要（総括研究報告）

塚田・永田・柳川（国際医療研究センター）・泉山（感染研）らのグループとともに、赤痢アメーバの遺伝的多様性の解析を行った。赤痢アメーバの国際標準株の全ゲノム(HM-1:IMSS cl6 株)の訂正・再アノテーションを達成した。従来の標準ゲノムの問題点であったコンティグの分断(-1500)、不確定塩基を含む>100 の遺伝子などの問題点を PacBio 再解読後の修正により解消、コンティグ数を 114 まで縮小し、標準配列として登録した。また、国内株の確保(国内株 5 株)と代表 3 株(KU27, 48, 50)のゲノム配列取得を完了し、アSEMBLを行った。更に追加の国内 2 株(NA11, NA19)、海外株 2 株(Taiwan1446, 1198)のゲノム配列取得を終了した。同時に赤痢アメーバの生化学・病原性・免疫回避・代謝・薬剤開発・耐性に関する成果を納めた。また、津久井（感染研）らのグループとともに、新規抗赤痢アメーバ薬候補オーラノフィンに対して野生型の約 5 倍の薬剤耐性を持つ株 (IC₅₀=3.3 μM) を樹立し RNA-seq 解析を行った。オーラノフィンによる阻害が知られている Thioredoxin reductase 遺伝子発現量に変化はなかった。耐性株で 2 倍以上発現上昇した遺伝子には AIG1 family protein、iron-sulfur flavoprotein 等が見いだされた。した遺伝子にはメトロニダゾール (MTZ) 耐性株でも発現上昇した遺伝子が存在した。耐性株で 2 倍以上発現減少した遺伝子には AIG1 family protein、surface antigen ariell1 等が見いだされた。発現上昇・減少した遺伝子には metronidazole 耐性株でもそれぞれ発現上昇・減少した遺伝子が存在した。交差耐性のリスクを知るため、Auranofin 耐性株の MTZ 感受性を検討したが交差耐性はなかった。

塚田・永田・柳川（国際医療研究センター）らとともに腸管原虫症の診断法の検討を行った。ジアルジアとクリプトスポリジウム抗原を同時に迅速診断できるイムノクロマト法 (IC 法) により、検鏡と比較して、ジアルジア症診断件数に増加は見られなかったが、クリプトスポリジウム症診断件数は急増した。直接検鏡法による診断感度が不十分なこと、HIV 感染者におけるクリプトスポリジウム下痢症の疫学が過小評価されてきたことが示された。また、無症候性持続感染者の増加により、赤痢アメーバ症が non-HIV や女性にも急増していることを明らかにした。HIV 感染者を対象とした研究では、血清抗体陽性率が 21.3% と非常に高いにも拘らず、陽性者の 70.4% (195/277) では赤痢アメーバ症に伴う症状や赤痢アメーバ症治療歴を認めないことや、無症状の HIV 感染者の 11.3% (8/71) で内視鏡的に診断できる無症候性赤痢アメーバ持続感染を認めることを証明した。また、今までに高リスクとは考えられていなかった非 HIV 感染者や女性でも、血清抗体陽性率が上昇傾向であることを証明した。更に、赤痢アメーバ重症例の検討を行い、早期診断の難しさが原因の一端であることを明らかにした。HIV 感染者に合併した急性虫垂炎全体に対するアメーバ性虫垂炎の頻度 (固定済み切除組織標本からの PCR による *E. histolytica* 同定) は、15.8% (9/57) と高値にも拘らず、そのうち周術期にアメーバ性虫垂炎と診断される症例は 22.2% (2/9) に留まっていたことを証明した。また、アメーバ性虫垂炎の臨床像が非アメーバ性虫垂炎と極致していること、切除標本に対してルーチンで行われる H&E (ヘマトキシリン・エオジン) 染色では、組織内に浸潤した病原体を同定することが極めて困難であることを示した。

泉山・八木田（感染研）らとともに角膜炎患者分離株の *Acanthamoeba* のミトコンドリアゲノムの決定を行った。分離株間でミトコンドリアゲノムにイントロンや ORF 単位の小さくない挿入欠失を見出した。同時に、角膜炎患者のコンタクトレンズケース分離の Megavirus ゲノムを決定した。ゲノムサイズは 1.2Mb、GC 含有率は 25.4%、近縁の登録配列は Megavirus chilensis (JN258408)、コーディング配列は 1,104 遺伝子、うち *M. chilensis* と共通は 1,066 (96.6%)。1066 のうち機能もしくはドメインがあるのは 492 (44.6%)、機能未知は 574 (52.0%)。tRNA が 5 遺伝子 (His-tRNA、Cys-tRNA、Trp-tRNA、Leu-tRNA x2) あった。また、イルカ条虫症患者分離株のミトコンドリアゲノムを決定した。

八木田（感染研）らとともに、ジアルジア・クリプトスポリジウムの糞便中抗原を同時検出する迅速検査キット開発した。*Cryptosporidium parvum* の国内分離株オーシスト抗原ならびに *Giardia*

intestinalis の国内分離株シスト抗原に対するモノクロナル抗体を開発し、これを利用して下痢症における糞便中抗原検査を迅速に行う、検体前処理操作を含めおよそ 15 分程度で可能な、イムノクロマト (ICT) を作成した。感度約 80%、特異性約 100%であった。汎用性を考慮し、検査プロトコルは極めて簡易な操作にまとめた。5 類感染症として正確な発生动向と報告が求められるジアルジア症ならびにクリプトスポリジウム症の対応に、本迅速検査キットの導入と普及が期待される。

山崎・森嶋ら (感染研) とともに、幼虫移行症 (トキソカラ症・マンソン孤虫症・顎口虫症) 複合型検査 ICT キットの实用化を目指した。トキソカラ症キットに関しては、マレーシアの原住民を対象に、ICT キットは ELISA とほぼ同じ感度と特異性を示し、高い相関関係 ($k = 0.722$) が示された。マンソン孤虫症 ICT キットも同様に感度 100%、特異性 97.0%と優れた成績を示した。顎口虫症キットは、タイ・コンケン大学と共同で評価を行い、有病率 19.3%における ICT キットの感度は 93.8%、特異性 97.0%の優れた成績を示した。また、エキノコックス症 (多包虫症・単包虫症) 検査キットの評価として、多包虫症については、国産のイムノクロマトキット (ICT) とフランス製イムノブロットキット (WB) の評価を実施し、国産の ICT キットの感度は 80.0%、WB の感度は 93.3%であった。一方、単包虫症に関する評価試験では、患者陽性血清 20 検体と陰性血清 14 検体について ICT と WB の感度を比較し、ICT の感度は 25.0%と極めて低く、確定診断された単包虫症でさえ陽性反応にならない症例が多かった。一方、WB の感度は 83.3%と高く、多包虫症、単包虫症とも検査キットとしてはフランス製 WB キットが優れていた。さらに、裂頭条虫類やテニア属条虫を対象に次世代 pyrosequencing 法 (多検体を同時に短時間、低価格で解析できる) による遺伝子鑑別法を確立した。である。また、稀なイルカ裂頭条虫についても新たな遺伝子同定法を確立した。また、裂頭条虫症の感染源調査 (シロザケやサクラマス) を行い、シロザケ、サクラマスいずれからも裂頭条虫幼虫の感染は確認できなかった。

杉山・森嶋 (感染研) らとともに、アニサキス食中毒のサンマにおける感染源調査を実施した 118 尾のうち、22 尾に虫体の寄生を認め、計 53 匹の虫体が検出された。7 匹は筋肉からの検出で、サンマはヒトへの感染源になることから、消費者への啓発が必要なことが示された。劇症型のアニサキス症の発生状況を知るため、1991 年以降 25 年間に誌上報告された症例を医中誌 Web から抽出して検討し、報告症例 393 例のうち、劇症型は 13 例に留まることが分かった (呼吸困難 10 例、意識消失 3 例)。更に、届出義務がない寄生虫症の発生动向把握を目的として、商用レセプトデータベースを入手し、傷病名として登録された各寄生虫症について年齢階級 (5 歳)・性別基準人口に基づく拡大推計をおこなって発生数の推定を試みた。蟯虫症 (28,003 人/年, 95%CI: 22,140-33,867) やトリコモナス症 (108,821 人/年, 95%CI: 90,654-126,988) 等、レセプト数の多い寄生虫症の発生数は関連する統計からの推定値とよく一致し、レセプトデータに基づく発生推定が可能であると考えられた(30)。

平井 (順天堂大)・中野 (感染研) らとともに、マラリア治療薬ピペラキン (PQ) 耐性原虫の単離と原因遺伝子変異同定に成功した。通常より 80 倍高い変異率を示すネズミマラリアミューテーター (Mut) を開発し、Mut 原虫ライブラリーから PQ 耐性原虫の単離に成功した。PQ 耐性原虫クローンの全ゲノム SNPs 解析の結果、クロロキントランスポーター (PbCRT) に新規な変異 (PbCRT(N331D)) を発見した。ネズミマラリア原虫に最適化したゲノム編集 (CAS9/CRISPR) 技術を開発し、当該遺伝子変異のみを野生型原虫に導入した。作成した変異体は PQ 耐性を示したことから、当該遺伝子変異が PQ 耐性を決定していることを証明した。更に、ルメファントリン (LM) 耐性原虫の単離に成功した。Mut および Mut から単離した PQ 耐性原虫 (PQRMut) から、それぞれ LM 耐性原虫を単離することに成功した。驚くべきことに、PQRMut 原虫から LM 耐性原虫がより速やかに出現、単離された。更に、アルテミシニン耐性関連 SNPs の非出現を確認した。Takala-Harrison ら (2013 年) によって報告された ART 関連 SNPs に関して、アジア由来の保存検体 (1984-98 年) 10 検体を解析した結果、全て野生型であった。更に、ART 耐性関連遺伝子 Kelch protein K13 (K13) に関して、1990 年代以前に樹立された標準株において検討した。検出された SNPs

はすべて ART 耐性と無関係な K13 タンパク質の N 末端領域に検出された。ART 使用前の株では耐性に関する SNPs は検出されなかった。

大西ら（感染研）とともに腸管病原性細菌のドラフトゲノムデータ 454 株を取得した。腸管出血性大腸菌 96 株、チフス菌、パラチフス A 菌を 293 株、赤痢菌 65 株等である。腸管出血性大腸菌の比較解析はリサーチ・レジデントにより実施された。特にチフス菌の解析からはフルオロキノロン耐性株の出現は 1990 年代半ば頃であることが示唆されたが、統計的有意な解析には至っていない。更に解析菌株を増やすことを企画している。更に完全長ゲノム配列として主に EHEC21 株のデータを取得した。更に、204 種類のコレラ菌の O 抗原合成遺伝子群解析を終了した。

英語

Nozaki et al. investigated genetic diversity of *Entamoeba histolytica* in Japan, in collaboration with Tsukada, Nagata, and Yanagawa (NCGM), and Izumiyama (NIID). We completed corrections and reannotation of the world reference strain: HM-1:IMSS cl6, by PacBio sequencing. We deposited the updated information to the public databases. We also obtained genome sequence reads for several domestic strains and assembled contigs. In addition, two additional domestic and Taiwanese clinical strains were fully sequenced by HiSeq. Nozaki et al., in collaboration with Nakada-Tsukui, investigated drug resistance mechanisms against auranofin, the new potential anti-amebic drug by RNA seq analysis of the resistant strain which had been established by exposing the sensitive wild type strain to the drug and showed about 5-fold higher IC50 compared to the wild type. Among the genes upregulated in the resistant strain were included genes encoding AIG1 family protein and iron-sulfur flavoprotein, but not thioredoxin reductase, which was suggested to be the target of the drug. Among those downregulated, genes encoding AIG1 family protein and surface antigen ariell1 were included. A panel of genes were also up- or down-regulated significantly in metronidazole resistance. No cross resistance was observed between auranofin and metronidazole.

Tsukada, Nagata, and Yanagawa, National Center for Global Health and Medicine, demonstrated underestimation of cryptosporidiosis in clinical settings by comparing the sensitivity of approved diagnostic method (direct microscopic examination) with that of unapproved but sensitive laboratory diagnostic method (antigen detection by immunochromatography). On the other hand, using HIV-1 patients' cohort, we showed high seroprevalence of amebiasis (277/1303=21.3%) among HIV-1-infected men who have sex with men (MSM) and high frequency of asymptomatic chronic infection of *Entamoeba histolytica* among seropositives. Additionally, we identified that seroprevalence of amebiasis are increasing among non-HIV and heterosexual female population in this decade. These results suggest that asymptomatic chronic infection of Amebiasis increased not only among HIV-1-infected "MSM" population but also non-HIV "heterosexual" population, resulting in the increased number of domestic cases of amebiasis in Japan. Also, we found that underestimation of amebic appendicitis (*E. histolytica* infection in resected appendix) from HIV-1 patients' cohort by demonstrating much lower sensitivity of H&E pathology than *E. histolytica* specific PCR using paraffin embedded resected tissue samples, which bringing up a problem in clinical settings that critical cases of fulminant amebic colitis were misdiagnosed probably due to insufficient sensitivity of routine pathological examination with H&E stain for resected intestinal tissue samples.

Izumiyama and Yagita (NIID) completed mitochondrial genome from *Acanthamoeba spp.* isolated from the cornea of a patient with amebic keratitis. They identified numerous differences

in introns and ins/dels between the mitochondrial genomes from *Acanthamoeba spp.* They also fully sequenced the genome of Megavirus from *Acanthamoeba spp.* isolated from the contact lens container of the keratitis patient. The genome of the Megavirus was 1.2Mb, encoding 1,104 genes. Its G-C content was 25.4%, and the sequence was closest to *Megavirus chilensis* (JN258408). Approximately 45 % of the genes have identifiable functional domain(s) while the remaining 52% are hypothetical. Five tRNA genes were also identified. The whole mitochondrial genome from *Diphyllobothrium stemmacephalu* was fully sequenced in collaboration with Yamasaki.

Yagita et al. (NIID) developed rapid diagnostic kit (ICT) to detect stool antigen from *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts using monoclonal antibodies against them. The ICT kit enables rapid detection of the parasite antigens within 15 mins, and its sensitivity was about 80%, while its specificity was 100%.

Yamasaki and Morishima developed and evaluated a reliable and useful diagnostic kit for larva migrans: toxocariasis, sparganosis and gnathostomiasis. Each kit showed high sensitivity (86~94%) and specificity (90~100%). They also developed molecular diagnostic two methods for meat- and fish-borne tapeworm infections: restriction fragment length polymorphism and next generation pyrosequencing, were established for tapeworm infections. They also compared diagnostic kits for alveolar and cystic echinococcosis. Japanese and French kits for alveolar (AE) and cystic echinococcosis (CE) were assessed using serum samples from both types of echinococcosis. The sensitivity and specificity of both kits in AE diagnosis were high, while the sensitivity of Japanese kit against CE was low (43%) compared with that of French kit (86%). Thus, French kit is recommended to use for diagnosis of CE. They also surveyed the prevalence of larval Japanese broad tapeworm in salmonids, but failed to detect any positive cases.

Sugiyama and Morishima (NIID) found infection of *Anisakis* type I larvae in Sanma (*Cololabis saira*)(22 of 118), suggesting the importance of health education campaign. They also conducted literature (25 years)-based survey of severe anisakiasis, and found only a limited number of cases (13 of 393) developed severe symptoms such as dyspnea and unconsciousness). Furthermore, to estimate prevalence of parasitic diseases with no mandatory surveillance, they performed medical prescription-based survey (Japan Medical Data Center database) on enterobiasis and trichomoniasis, which well matched with estimates from other data sources.

Hirai (Juntendo Univ) and Saito-Nakano, NIID, established a rodent malaria mutator which possesses over 80 times higher mutation rate than wild type parasite does. Resistant parasites against antimalarial piperazine (PQ) were isolated from the mutator library. Whole genome sequencing and SNPs analysis of PQ-resistant clones detected a novel type of mutation in chloroquine transporter gene PbCRT(N331I). Subsequently, CRISPR/CAS9, genome editing technology was optimized and applied to rodent malaria parasite to introduce PbCRT(N331I) into PQ-sensitive parasite. As a result, transgenic parasite line, PbCRT(N331I) showed PQ resistance. This is the concrete evidence showing that PbCRT(N331I) directly relates to PQ resistance. The resistant parasites against lumefantrine (LM) were isolated. LM-resistant parasites were screened in the mutator library as well as the above-mentioned PQ-resistant parasite (mutator background). Very interestingly, LM-resistant parasite emerged from PQ-resistant parasite with much higher efficiency than the mutator library. Several SNPs related to artemisinin resistance have been reported by Takara-Harrison et al (2013). These SNPs were investigated in 10 archive samples collected from Asia during 1984 to 1998, and no mutation was detected in them. We further examined *Kelch13* (*K13*) gene, a causative gene mutation for artemisinin resistance, in

standard parasite strains established in 1990s. The detected mutations were confined to N- but not C-terminal of K13 protein while the latter is known to be critical for artemisinin resistance. Thus, we concluded that artemisinin-related mutations did not emerge before artemisinin was employed in malaria treatment.

Ohnishi et al. (NIID) gained draft genome data from 454 enteropathogenic bacteria including 96 EHEC, 293 *Salmonella typhi* and *S. paratyphi*, and 65 *Shigella*. They also conducted genome comparison of EHEC. Comparative genomics of *S. typhi* genomes suggested the emergence of fluoroquinone resistance in the mid 90s. They also obtained complete genome from 21 EHEC. In addition, they completed analysis of genes involved in O antigens from 204 *Vibrio cholera*.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 件、国際誌 件)

2014 年度

(1) Jeelani, G., Sato, D., Soga, T., Watanabe, H., Nozaki, T. Mass Spectrometric analysis of L-cysteine metabolism: physiological role and fate of L-cysteine in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *MBio* 2014 5(6).

(2) Jeelani, G. and Nozaki, T. Metabolomic analysis of *Entamoeba*: applications and implications. *Curr. Opin. Microbiol.* 20C:118-124, 2014.

(3) Marumo, K., Nakada-Tsukui, K., Tomii, K., and Nozaki, T. Ligand heterogeneity of the cysteine protease binding protein family in the parasitic protist *Entamoeba histolytica*. *Int. J. Parasitol.* 44, 625-35 2014.

(4) Watanabe K., Aoki T, Nagata N., Tanuma J, Kikuchi Y, Oka S, Gatanaga H. Clinical significance of high anti-*Entamoeba histolytica* antibody titer in asymptomatic HIV-1-infected individuals. *J Infect Dis.* 2014; 209: 1801-1807.

(5) Watanabe K., Nagata N., Sekine K, Watanabe K, Igari T, Tanuma J, Kikuchi Y, Oka S, Gatanaga H. Asymptomatic intestinal amebiasis in Japanese HIV-1-infected individuals. *Am J Trop Med Hyg.* 2014; 91: 816-820.

(6) 渡辺恒二. 日本の HAART 時代における HIV 感染合併ジアルジア症・クリプトスポリジウム症. *IASR.* 2014; 35: 192-194.

(7) 小林泰一郎, 渡辺恒二. アメーバ赤痢. 月刊消化器内科 2014.9.

(8) 小林泰一郎, 渡辺恒二. 赤痢アメーバ症、特にアメーバ性虫垂炎について. HIV 感染症/AIDS の治療. 2014.12.

(9) Itoh, K., Yagita K., Nozaki, T., Katano, H., Hasegawa, H., Matsuo, K., Hosokawa, Y., Tando, S., Fushiki, S. An autopsy case of Balamuthia mandrillaris amoebic encephalitis, a rare emerging infectious disease, with a brief review of the cases reported in Japan. *Neuropathology.* 2014.

(10) Yamasaki H., Nakamura T., Intapan P.M., Maleewong W., Morishima Y., Sugiyama H., Matsuoka H., Kobayashi K., Takayama K., Kobayashi Y. Development of a rapid diagnostic kit that uses an immunochromatographic device to detect antibodies in human sparganosis. *Clinical and Vaccine Immunology*, 21: 1360-1363, 2014.

(11) 山崎 浩, Guita R.E., Lim P.K.C., 中村 健, Intapan P.M., Maleewong W. イムノクロマトキットを用いた幼虫移行症の迅速血清診断. 寄生虫学研究 材料と方法 2014 年版. pp.43-45, 2014.

(12) Tongjit T., Chairat T., Intapan P.M., Oranuch S., Penchom J., Viraphong L., Somjintana

T., Yamasaki H., Maleewong W. Rapid molecular identification of human taeniid cestodes by pyrosequencing approach. *PLoS One*, 9: e100611, 2014.

(13) Chen S., Ai L., Zhang Y., Chen J., Zhang W., Li Y., Muto M., Morishima Y., Sugiyama H., Xu X., Zhou X., Yamasaki H. Molecular detection of *Diphyllobothrium nihonkaiense* in humans, China. *Emerging Infectious Diseases*, 20:315-318, 2014.

(14) 山崎 浩, 坪川大悟, Mercado R., 倉持利明. ミトコンドリア DNA 解析に基づいた裂頭条虫類の簡易同定法. 寄生虫学研究 材料と方法 2014 年版. pp.47-49, 2014.

(15) 山崎 浩, 森嶋康之, 杉山 広. ホルマリン固定パラフィン包埋切片内に検出された寄生虫の分子同定. 寄生虫学研究 材料と方法 2014 年版. pp.67-72, 2014.

(16) 山崎 浩, 森嶋康之, 杉山 広. テニア属条虫 3 種の簡便な分子同定. 寄生虫学研究 材料と方法 2014 年版. pp.73-76, 2014.

2015 年度

(17) Watanabe K., Petri WA Jr. Molecular biology research to benefit patients with *Entamoeba histolytica* infection. *Mol Microbiol.* 2015; 98: 208-217.

(18) Santos, H. J.,*, Imai, K.*, Makiuchi, T., Tomii, K., Horton, P., Nozawa, A., Ibrahim, M., Tozawa, Y., and Nozaki, T. A novel mitochondrial β -barrel outer membrane protein in *Entamoeba*. *Sci Rep* 5:8545, 2015. (* equal contribution)

(19) Penuliar, G. M., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. Phenotypic and transcriptional profiling in *Entamoeba histolytica* reveal costs to fitness and adaptive responses associated with metronidazole resistance. "Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy", *Front Microbiol.* 6:354, 2015.

(20) Picazarri, K.,* Nakada-Tsukui, K.,* Tsuboi, K., Miyamoto, E., Watanabe, N., Kawakami, E., and Nozaki, T. Atg8 is involved in endosomal and phagosomal acidification in the parasitic protist *Entamoeba histolytica*. *Cell Microbiol* 17, 1510-1522, 2015

(21) Mi-ichi, F.,# Miyamoto, T., Takao, S., Jeelani, G., Hashimoto, T., Hara, H., Nozaki, T.,# and Yoshida, H. *Entamoeba* mitochondria play an important role in encystation by association with cholesteryl sulfate synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 112(22):E2884-90, 2015. (# correspondence)

(22) Mori, M., Jeelani, G., Masuda, Y., Sakai, K., Nakada-Tsukui, K., Waluyo, D., Tarwadi, Watanabe, Y., Nonaka, K., Matsumoto, A., Omura, S., Nozaki, T.#, Shiomi, K.# Identification of natural inhibitors of *Entamoeba histolytica* cysteine synthase from microbial secondary metabolites. *Front Microbiol.* 6, 962, 2015.

(23) Chiba, Y., Kamikawa, R., Nakada-Tsukui, K., Saito-Nakano, Y., Nozaki, T. Discovery of PPI-type phosphoenolpyruvate carboxykinase genes in eukaryotes and bacteria. *J Biol Chem* 290,23960-23970, 2015.

(24) Mi-ichi, F.*, Nozawa, A.*, Yoshida, H., Tozawa, Y.#, Nozaki, T.# Evidence that *Entamoeba histolytica* mitochondrial carrier family links mitochondrial and cytosolic pathways through exchange of PAPS and ATP. *Eukaryot Cell* 14(11):1144-1150, 2015

(25) 小林正規, 柳川泰昭, 渡辺恒二. 劇症型アメーバ症の治療および治療. 日本集中治療. 2015; 22: 184-185.

(26) Weitzel T, Sugiyama H., Yamasaki H., Ramirez C, Rosas R, Mercado R, Human Infections with *Pseudoterranova cattani* Nematodes, Chile. *Emerg Infect Dis.* 21, 1874-1875, 2015.

(27) Sugiyama H., Shibata K, Arakawa K, Morishima Y., Yamasaki H., Gokudan M, Iwakiri T, Fukumori J, Paragonimiasis due to the consumption of wild boar meat in Japan:

Contamination levels of lung fluke larvae in muscle samples of wild boars caught in the Kagoshima Prefecture. *Jpn J Infect Dis*, 68, 536-537, 2015.

(28) Singh TS, Sugiyama H, Devi KR, Singh WA, First case of *Paragonimus westermani* infection in a female patient in India. *Indian J Med Microbiol*. 33 (Suppl), 156-159, 2015.

(29) Calvopina, M., Cevallos, W., Atherton, R., Saunders, M., Small, A., Kumazawa, H., Sugiyama, H. High prevalence of the liver fluke *Amphimerus* sp. in domestic cats and dogs in an area for human amphimeriasis in Ecuador. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(2):e0003526, 1-9, 2015.

(30) 杉山 広, 柴田勝優, 川上 泰, 御供田睦代, 森嶋康之, 山崎 浩. 野生鳥獣肉 (ジビエ) を介した肺吸虫症の感染リスク. *Clinical Parasitology* 2016, 27, 40-42.

(31) Calvopina M, Romero-Alvarez D, Macias R, Sugiyama H. Severe Pleuropulmonary Paragonimiasis Caused by *Paragonimus mexicanus* Treated as Tuberculosis in Ecuador. *Am J Trop Med Hyg*, 94, 97-99, 2016

(32) 森嶋康之, 杉山 広, 山崎 浩. レセプトデータを用いた蟯虫症発生数の推定. *Clin Parasitol* 26:43-45, 2015.

(33) Lim P.K.C., Yamasaki H, Mak J.W., Wong S.F., Chong C.W., Yap I.K.S., Ambu S., Kumarasamy V. Field evaluation of a rapid diagnostic test to detect antibodies in human toxocariasis. *Acta Tropica*, 148:32-37, 2015.

(34) 山崎 浩, 森嶋康之, 杉山 広, 齋藤典子, 土田孝信, 関川喜之, 織田錬太郎, 本郷偉元. イルカ裂頭条虫 *Diphyllobothrium stemmacephalum* による人体寄生例. *Clin Parasitol*, 26:121-124, 2015.

(35) Santos, H. J., Imai, K., Hanadate, Y., Fukasawa, Y., Oda, T., Mi-ichi, F., Nozaki, T. Screening and discovery of lineage-specific mitosomal membrane proteins in *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 209(1-2):10-17, 2016.

(36) Jeelani, G., Nozaki, T. *Entamoeba* thiol-based redox metabolism: a potential target for drug development. *Mol. Biochem. Parasitol.* 207(2):56-60, 2016.

(37) Pineda, E., Vázquez, C., Encalada, R., Nozaki, T, Sato, E., Hanadate, Y., Néquiz, M, Olivos-García, A., Moreno-Sánchez, R., Saavedra, E. Roles of acetyl-CoA synthetase (ADP-forming) and acetate kinase (PPi-forming) in ATP and PPi supply in *Entamoeba histolytica*. *Biochim. Biophys. Acta* 1860:1163-1172, 2016.

(38) Hanadate, Y., Saito-Nakano, Y., Nakada-Tsukui, K., Nozaki, T. Endoplasmic reticulum-resident Rab8A GTPase is involved in phagocytosis in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Cell Microbiol.* 18:1358-73, 2016

(39) Chiba, Y., Makiuchi, T., Jeelani, G., Nozaki, T. Heterogeneity of the serine synthetic pathway in *Entamoeba* species. *Mol Biochem Parasitol.* 207:56-60, 2016.

(40) Ishikane, M., Arima, Y., Kanayama, A., Takahashi, T., Yamagishi, T., Yahata, Y., Matsui, T., Sunagawa, T., Nozaki, T, and Oishi, K. Epidemiology of domestically-acquired amebiasis in Japan, 2000-2013. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 94(5):1008-14, 2016.

(41) Nakada-Tsukui, K., Nozaki, T. Immune response of amebiasis and immune evasion by *Entamoeba histolytica*. *Front Immunol.* 7:175, 2016.

(42) Yanagawa Y, Nagata N, Watanabe K, Tsukada K, Teruya K, Kikuchi Y, Gatanaga H, Akiyama J, Uemura N, Oka S. Increases in *Entamoeba histolytica* antibody-positive rates in human immunodeficiency virus-infected and noninfected patients in Japan: a 10-year hospital-based study of 3,514 patients. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*95: 604-609, 2016.

- (43) Watanabe K, Petri WA Jr. Environmental Enteropathy: Elusive but Significant Subclinical Abnormalities in Developing Countries. *EBioMedicine*. 2016; 10: 25-32.
- (44) 渡辺恒二, 濱野真二郎. アメーバ赤痢. 化学療法の領域 2016年9月号
- (45) 渡辺恒二, 濱野真二郎. アメーバ赤痢. 化学療法の領域 「特集 消化管感染症発症のメカニズム」. 2016, 32, 1696-1705.
- (46) 小林泰一郎, 渡辺恒二. アメーバ性虫垂炎. 病原体微生物検出情報. 2016, 37, 245-246.
- (47) 柳川泰昭, 永田尚義. アメーバ性腸炎の内視鏡診断. 病原体微生物検出情報. 2016, 37, 246-248.
- (48) 渡辺恒二. 血清抗赤痢アメーバ抗体検査: 潜伏性赤痢アメーバ持続感染者スクリーニングとしての可能性. 病原体微生物検出情報. 2016, 37, 248-249.
- (49) Kobayashi T, Watanabe K, Yano H, Murata Y, Igari T, Nakada-Tsukui K, Yagita K, Nozaki T, Kaku M, Tsukada K, Gatanaga H, Kikuchi Y, Oka S. Underestimated Amoebic Appendicitis among HIV-1-Infected Individuals in Japan. *J Clin Microbiol*. 2016, 55, 313-320.
- (50) Watanabe K, Petri WA Jr. Environmental Enteropathy: Elusive but Significant Subclinical Abnormalities in Developing Countries. *EBioMedicine*. 2016, 10, 25-32.
- (51) Yanagawa Y, Nagata N, Watanabe K, Tsukada K, Teruya K, Kikuchi Y, Gatanaga H, Akiyama J, Uemura N, Oka S. Increases in Entamoeba histolytica Antibody-Positive Rates in Human Immunodeficiency Virus-Infected and Noninfected Patients in Japan: A 10-Year Hospital-Based Study of 3,514 Patients. *Am J Trop Med Hyg*. 2016, 95, 604-609.
- (52) Tokiwa T, Sugiyama H, Taira K, Yoshikawa Y, Une Y. Prevalence of baylisascaris roundworm in captive kinkajous in Japan. *J Parasitol*, 102(2):293-294, 2016
- (53) Calvopina M, Romero-Alvarez D, Macias R, Sugiyama H. Severe Pleuropulmonary Paragonimiasis Caused by Paragonimus mexicanus Treated as Tuberculosis in Ecuador. *Am J Trop Med Hyg*, 94, in press, 2016
- (54) 杉山 広, 柴田勝優, 川上 泰, 御供田睦代, 森嶋康之, 山崎 浩. 野生鳥獣肉(ジビエ)を介した肺吸虫症の感染リスク. *Clin Parasitol*, 27:印刷中, 2016.
- (55) Sanpool O, Rodpai R, Intapan PM, Sadaow L, Thanchomnang T, Laymanivong S, Maleewong W, Yamasaki H. Genetic diversity of *Taenia saginata* (Cestoda: Cyclophyllidae) from Lao People's Democratic republic and northeastern Thailand based on mitochondrial DNA. *Parasites & Vectors*. 2016, 10, 141.
- (56) Fujita T, Waga E, Kitaoka K, Imagawa T, Komatsu Y, Takanashi K, Anbo T, Katuki S, Ichihara S, Fujimori S, Yamasaki H, et al. Human infection by acanthocephalan parasites belonging to the genus *Corynosoma* found from small bowel endoscopy. *Parasitology International*. 2016, 65, 491-493, 2016.
- (57) Janwan P., Intapan P.M., Yamasaki H, Rodpai R., Laummauwai P., Thanchomnang T., Kobayashi K., Takayama K., Kobayashi Y., Maleewong W. Development and usefulness of an immunochromatographic device to detect antibodies for rapid diagnosis of human gnathostomiasis. *Parasites and Vectors*, 9: 14, 2016.
- (58) Morishima Y., Tomaru Y., Fukumoto S., Sugiyama H., Yamasaki H, Hashimoto C., Harada K. Canine echinococcosis due to *Echinococcus multilocularis*: a second notifiable case from mainland Japan. *Jpn J Inf Dis*, 69:448-449, 2016.
- (59) 倉井華子, 森嶋康之, 山崎 浩, 杉山 広, 石井隆弘. 大腸内視鏡検査で発見された *Hymenolepis* 属条虫について. *Clinical Parasitology*. 2016, 27, - .
- 石井 明, 山崎 浩. 無鉤条虫症の2例. *Clinical Parasitology*. 2016, 27, -

- (60) 森嶋康之, 山崎 浩, 大前比呂思, 杉山 広. わが国における単包虫症：現状ならびに市販血清診断キットの診断精度. *Clinical Parasitology*, 27: 2016 (印刷中) .
- (61) Thanchomnang T., Tantrawatpan C., Intapan P.M., Sanpool O., Janwan P., Lulitanond V., Tourtip S., Yamasaki H., Maleewong W. Rapid identification of nine species of diphylobothriidean tapeworms by pyrosequencing. *Sci Rep*, 6:37228, 2016.
- (62) Yamasaki H., Sekikawa Y., Oda R., Hongo I., Tsuchida T., Kumazawa H., Saito N., Morishima Y., Sugiyama H. First confirmed human case of *Diphylobothrium stemmacephalum* infection and molecular verification of the synonymy of *Diphylobothrium yonagoense* with *D. stemmacephalum* (Cestoda: Diphylobothriidea). *Parasitol Int*, 65: 412-421, 2016.
- (63) Honma H, Niikura M, Kobayashi F, Horii T, Mita T, Endo H, Hirai M. Mutation tendency of mutator Plasmodium berghei with proofreading-deficient DNA polymerase δ . *Sci. Rep.* 6:36971, 2016
- (64) Ebine K, Hirai M., Sakaguchi M, Yahata K, Kaneko O, Saito-Nakano Y. Plasmodium Rab5b is secreted to the cytoplasmic face of the tubovesicular network in infected red blood cells together with N-acylated adenylate kinase 2. *Malar J.* 15:323. 2016
- 山崎
- (65) Kudo T, Fujioka A, Korenaga M, Yamasaki H., et al. Molecular identification of intramuscular and subcutaneous *Spirometra erinaceieuropaei* sparganosis in a Japanese patient. *Journal of Dermatology*. 2017, doi: 10.1111/1346-8138.13739.
- (66) Yamasaki H., Izumiyama S, Nozaki T. Complete sequence and characterization of the mitochondrial genome of *Diphylobothrium stemmacephalum* (Cestoda: Diphylobothriidae) using next generation sequencing. *Parasitology International*. 2017 (in press).
- (67) Thanchomnang T, tantrawatpan C, Intapan PM, Sanpool O, Ianwan P, Lilitanond V, Tourtip S, Yamasaki H., Maleewong W. Rapid identification of nine species of diphylobothriidean tapeworms by pyrosequencing. *Scientific Reports*. 6: 37228.
- (68) Mita, T., Tahibana, S., Hirai, H. *Plasmodium falciparum* Kelch13: A potential molecular marker for tackling artemisinin-resistant malaria parasites. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 14(1):125-35. 2016
- (69) Ishijima, N., Lee, K., Kuwahara, T., Nakayama-Imaohji, H., Yoneda, S., Iguchi, A., Ogura, Y., Hayashi, T., Ohnishi, M., Iyoda, S. Identification of a new virulent clade in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H11/H⁻ sequence type 29. *Sci Rep*. 7, 43136, 2017

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Molecular verification of the synonymy of *Diphyllobothrium yonagoense* with *Diphyllobothrium stemmacephalum* (Cestoda: Diphyllbothriidae). Yamasaki H, et al. ポスター, The 14th International Congress of Tropical Medicine and Malaria, 2016/9/18~9/22, Brisbane, Australia, 国外.
2. Rapid identification of nine species of diphyllbothriidean tapeworms by pyrosequencing. Thanchomnang T, tantrawatpan C, Intapan PM, Sanpool O, Ianwan P, Lilitanond V, Tourtip S, Yamasaki H, Maleewong W. ポスター, The 14th International Congress of Tropical Medicine and Malaria, 2016/9/18~9/22, Brisbane, Australia, 国外.
3. Molecular evidence for the invalidity of *Diphyllobothrium yonagoense* as a species. 口頭, 山崎 浩 他. 第 85 回日本寄生虫学会大会, 宮崎市, 2016/3/19-3/20, 国内.
4. 大腸内視鏡検査で発見された *Hymenolepis* 属条虫について. 口頭, 倉井華子, 森嶋康之, 山崎 浩, 杉山 広, 石井隆弘. 第 27 回日本臨床寄生虫学会大会, 金沢, 2016/6/18, 国内.
5. 無鉤条虫症の 2 例. 口頭, 石井 明, 山崎 浩. 第 27 回日本臨床寄生虫学会大会, 金沢, 2016/6/18, 国内.
6. わが国における単包虫症: 現状ならびに市販血清診断キットの診断精度. 口頭, 森嶋康之, 山崎 浩, 大前比呂思, 杉山 広. 第 27 回日本臨床寄生虫学会大会, 金沢, 2016/6/18, 国内.
7. 平井誠・池田恵美・橘真一郎・美田敏宏 『高頻度突然変異マラリア原虫を用いた薬剤耐性機構解明への挑戦』シンポジウム「生殖系列変異から捉える生物進化」第 39 回日本分子生物学会年会 (2016 年 11 月 30 日。於: パシフィコ横浜)
8. 全ゲノム情報を基盤とした感染性腸炎の調査研究とその展望、口頭、大西真、第 56 回日本感染性腸炎学会、2017/3/11、国内
9. 腸管出血性大腸菌 O111 における全ゲノム配列を用いた分子疫学解析、ポスター、李謙一、木全恵子、関塚剛史、石原朋子、伊豫田淳、黒田誠、大西真、EHEC Working group、第 90 回日本細菌学会総会、2017/3/19、国内
10. 腸管出血性大腸菌 O111 の全国サーベイランスにおける全ゲノム型別と疫学情報との関連性、ポスター、李 謙一、石原朋子、伊豫田淳、関塚剛史、黒田誠、大西真、EHEC ワーキンググループ、第 20 回 EHEC 研究会・シンポジウム、2016/11/10、国内
11. アメーバ性肝膿瘍重症化リスクに関する後方視的検討、口頭、柳川泰昭, 渡辺恒二, 塚田訓久, 上村悠, 小林泰一郎, 水島大輔, 西島健, 青木孝弘, 木内英, 三神信太郎, 永田尚義, 照屋勝治, 湯永博之, 菊池嘉, 柳瀬幹雄, 岡慎一, 第 30 回日本エイズ学会学術集会, 2016/11/24
12. Diagnostic Accuracy of Amebic Colitis by Colonoscopy, Poster presentation, Yanagawa Y, Watanabe K, Nagata N, Tsukui K, Kobayashi S, Nozaki T, Gatanaga H, Kikuchi Y, Oka S, ASTMH 65th Annual Meeting, 2016/11/13, 国外.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当なし

(4) 特許出願
該当無し

(様式10)

【16fk0108309j0103】

平成29年5月31日

平成28年度医療研究開発推進事業費補助金

(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業) 成果報告書

I. 基本情報

事業名 : (日本語) 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業
(英語) Research Program on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases

補助事業課題名 : (日本語) 原虫・寄生虫に対する監視・制御に関する研究
(英語) Study on prevention and control of protozoan and parasitic diseases

補助事業担当者 (日本語) 国立感染症研究所・主任研究官・山崎 浩
所属 役職 氏名 : (英語) Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases
Senior researcher, Hiroshi Yamasaki

実施期間 : 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究課題名 : (日本語)
(英語)

補助事業分担者 (日本語)
所属 役職 氏名 : (英語)

II. 成果の概要（総括研究報告）

補助事業代表者：国立感染症研究所寄生動物部・野崎智義 総括研究報告を参照。

分担研究開発課題名：寄生蠕虫症（条虫・線虫）の検査・診断法開発と条虫感染実態調査

1. 幼虫移行症複合型検査キットの作成と評価：幼虫移行症として重要なトキソカラ症・顎口虫症・孤虫症を対象にこれら3疾患が同時に鑑別診断できるイムノクロマトキットを開発し、その評価を実施した。トキソカラ症キットの評価は133名を対象に行い、感度86%、特異性90%であった。孤虫症の評価は146名を対象に行い、感度100%、特異性97%であった。顎口虫症については166名を対象に実施し、感度94%、特異性97%といずれのキットとも信頼性の高いキットであることが判明した。
2. 条虫の検査・診断法開発：
食品媒介の条虫類（テニア属、裂頭条虫属など）を鑑別するための方法（制限酵素切断法とパイロシーケンス法）を開発した。
3. エキノコックス症検査キットの評価：国産キットと仏製キットを用いて、多包虫症(n=30)、単包虫症(n=30)、その他の寄生虫症患者血清(n=27)、健常者(n=23)の反応性を評価した。その結果、多包虫症については国産キットの感度と特異性は80%、100%、仏製キットでは93%と100%であった。一方、単包虫症に対する感度と特異性は国産キットで43%、100%であったのに対し、仏製キットの感度と特異性は86%、100%であったことから、単包虫症の検査に関しては仏製キットによる信頼性が高かった。
4. サケ・マスにおける裂頭条虫の感染実態調査：国内で最も頻発する日本海裂頭条虫症の感染源として、北海道産シロザケ（トキシラズ、アキザケを含む）38尾と青森・新潟産サクラマス17尾について、幼虫の寄生状況を調査したが、裂頭条虫の幼虫は検出されなかった。

（英語） Development of diagnostic tools for parasitic helminthiasis (cestodiasis, nematodiasis) and prevalence survey of larval Japanese broad tapeworm in salmonids.

1. Development and evaluation of a diagnostic kit for larva migrans : The diagnostic kit for 3 larva migrans including toxocariasis, sparganosis and gnathostomiasis was developed and diagnostic reliability of the kit was evaluated. In evaluation of toxocariasis kit using 133 serum samples, the sensitivity and specificity were 86% and 90%, respectively. In sparganosis kit, the sensitivity and specificity in 146 subjects were 100% and 97%, respectively. The sensitivity and specificity for gnathostomiasis kit using 166 subjects were 94% and 97%, respectively. These results have revealed that the diagnostic kit is highly reliable and useful for diagnosis of larva migrans.
2. Development of molecular methods for diagnosis of tapeworm infections :
Molecular methods, restriction fragment length polymorphism coupled with PCR and pyrosequencing, were established for meat- and fishborne cestodiasis.
3. Comparative evaluation of diagnostic kits for alveolar and cystic echinococcosis:
Japanese and French kits for two types of echinococcosis were assessed using serum samples from 30 each of alveolar (AE) and cystic echinococcosis (CE) and 50 serum samples from other parasitic infections and healthy persons. The specificity in both kits for AE and CE was 100%. However, the sensitivity of Japanese and French kits for AE was 80% and 93%, respectively, while the sensitivity for CE was 43% and 86% in Japanese and French kits, respectively, indicating that French kit is recommended to use for CE.

4. Prevalence survey of larval Japanese broad tapeworm in salmonids:

Fishborne diphyllbothriosis is the most frequent cestodiosis in Japan and the prevalence of larvae of Japanese broad tapeworm was examined in salmonids as source of infection. Although 38 chum salmon called *tokishirazu* and *akizake* from Hokkaido and 17 cherry salmon from Aomori and Niigata were examined, no larvae were detected in both viscera and edible flesh.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 4 件、国際誌 6 件）

1. Kudo T, Fujioka A, Korenaga M, Yamasaki H, et al. Molecular identification of intramuscular and subcutaneous *Spirometra erinaceieuropaei* sparganosis in a Japanese patient. *Journal of Dermatology*. 2017, doi: 10.1111/1346-8138.13739.
2. Yamasaki H, Sekikawa Y, Oda R, Hongo I, et al. First confirmed human case of *Diphyllbothrium stemmacephalum* infection and molecular verification of the synonymy of *Diphyllbothrium yonagoense* with *D. stemmacephalum* (Cestoda: Diphyllbothriidae). *Parasitology International*. 2016, 65, 412-21.
3. Sanpool O, Rodpai R, Intapan PM, Sadaow L, Thanchomnang T, Laymanivong S, Maleewong W, Yamasaki H. Genetic diversity of *Taenia saginata* (Cestoda: Cyclophyllidae) from Lao People's Democratic republic and northeastern Thailand based on mitochondrial DNA. *Parasites & Vectors*. 2016, 10, 141.
4. Fujita T, Waga E, Kitaoka K, Imagawa T, Komatsu Y, Takanashi K, Anbo T, Katuki S, Ichihara S, Fujimori S, Yamasaki H, et al. Human infection by acanthocephalan parasites belonging to the genus *Corynosoma* found from small bowel endoscopy. *Parasitology International*. 2016, 65, 491-493, 2016.
5. Yamasaki H, Izumiyama S, Nozaki T. Complete sequence and characterization of the mitochondrial genome of *Diphyllbothrium stemmacephalum* (Cestoda: Diphyllbothriidae) using next generation sequencing. *Parasitology International*. 2017 (in press).
6. Thanchomnang T, tantrawatpan C, Intapan PM, Sanpool O, Ianwan P, Lilitanond V, Tourtip S, Yamasaki H, Maleewong W. Rapid identification of nine species of diphyllbothriidean tapeworms by pyrosequencing. *Scientific Reports*. 6: 37228.
7. 倉井華子, 森嶋康之, 山崎 浩, 杉山 広, 石井隆弘. 大腸内視鏡検査で発見された *Hymenolepis* 属条虫について. *Clinical Parasitology*. 2016, 27, - .
8. 石井 明, 山崎 浩. 無鉤条虫症の 2 例. *Clinical Parasitology*. 2016, 27, - .
9. 森嶋康之, 山崎 浩, 大前比呂思, 杉山 広. わが国における単包虫症：現状ならびに市販血清診断キットの診断精度. *Clinical Parasitology*. 2016, 27, - .

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Molecular verification of the synonymy of *Diphyllbothrium yonagoense* with *Diphyllbothrium stemmacephalum* (Cestoda: Diphyllbothriidae). Yamasaki H, et al. ポスター, The 14th International Congress of Tropical Medicine and Malaria, 2016/9/18~9/22, Brisbane, Australia, 国外.
2. Rapid identification of nine species of diphyllbothriidean tapeworms by pyrosequencing. Thanchomnang T, tantrawatpan C, Intapan PM, Sanpool O, Ianwan P, Lilitanond V,

Tourtip S, Yamasaki H, Maleewong W. ポスター, The 14th International Congress of Tropical Medicine and Malaria, 2016/9/18~9/22, Brisbane, Australia, 国外.

3. Molecular evidence for the invalidity of *Diphyllbothrium yonagoense* as a species. 口頭, 山崎 浩 他. 第 85 回日本寄生虫学会大会, 宮崎市, 2016/3/19-3/20, 国内.
4. 大腸内視鏡検査で発見された *Hymenolepis* 属条虫について. 口頭, 倉井華子, 森嶋康之, 山崎 浩, 杉山 広, 石井隆弘. 第 27 回日本臨床寄生虫学会大会, 金沢, 2016/6/18, 国内.
5. 無鉤条虫症の 2 例. 口頭, 石井 明, 山崎 浩. 第 27 回日本臨床寄生虫学会大会, 金沢, 2016/6/18, 国内.
6. わが国における単包虫症: 現状ならびに市販血清診断キットの診断精度. 口頭, 森嶋康之, 山崎 浩, 大前比呂思, 杉山 広. 第 27 回日本臨床寄生虫学会大会, 金沢, 2016/6/18, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

(4) 特許出願

(様式10)

【16fk0108309j0203】

平成 29年 5月 31日

平成 28年度医療研究開発推進事業費補助金

(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業) 成果報告書

I. 基本情報

事業名 : (日本語) 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業
(英語) Research Program on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases

補助事業課題名 : (日本語) 原虫・寄生虫に対する監視・制御に関する研究
(英語) Study on prevention and control of protozoan and parasitic diseases

補助事業担当者 (日本語) 国立感染症研究所寄生動物部 室長 杉山 広
所属 役職 氏名 : (英語) Hiromu Sugiyama, Chief, Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases

実施期間 : 平成28年4月1日 ~ 平成29年3月31日

分担研究課題名 : (日本語)
(英語)

補助事業分担者 (日本語)
所属 役職 氏名 : (英語)

II. 成果の概要（総括研究報告）

補助事業代表者： 国立感染症研究所・寄生動物部・野崎智義 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 1 件、国際誌 1 件）

1. 杉山 広, 柴田勝優, 川上 泰, 御供田睦代, 森嶋康之, 山崎 浩. 野生鳥獣肉（ジビエ）を介した肺吸虫症の感染リスク. *Clinical Parasitology* 2016, 27, 40-42.
2. Calvopina M, Romero-Alvarez D, Macias R, Sugiyama H. Severe Pleuropulmonary Paragonimiasis Caused by *Paragonimus mexicanus* Treated as Tuberculosis in Ecuador. *Am J Trop Med Hyg*, 94, 97-99, 2016

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 野生鳥獣肉（ジビエ）を介した肺吸虫症の感染リスク. 口頭, 杉山 広, 柴田勝優, 川上 泰, 御供田睦代, 森嶋康之, 山崎 浩. 第 27 回日本臨床寄生虫学会, 2016/6/18, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

特になし

(4) 特許出願

特になし

平成28年度医療研究開発推進事業費補助金

(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業) 成果報告書

I. 基本情報

事業名 : (日本語) 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業
(英語) Research Program on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases

補助事業課題名 : (日本語) 原虫・寄生虫に対する監視・制御に関する研究
(英語) Study on prevention and control of protozoan and parasitic diseases

補助事業担当者 (日本語) 国立感染症研究所寄生動物部 部長 野崎智義
所属 役職 氏名 : (英語) Dept. of Parasitol., Natl. Inst. of Infect. Dis. Japan
Department Manager Tomoyoshi Nozaki

実施期間 : 平成28年4月1日 ~ 平成29年3月31日

分担研究課題名 : (日本語) 寄生原虫症のゲノム解析
(英語) Genome analysis of protozoan parasites

補助事業分担者 (日本語) 国立感染症研究所寄生動物部 主任研究官 泉山信司
所属 役職 氏名 : (英語) Dept. of Parasitol., Natl. Inst. of Infect. Dis. Japan
Senior researcher Shinji Izumiyama

II. 成果の概要 (総括研究報告)

補助事業代表者 : 国立感染症研究所・寄生動物部・野崎智義 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 0 件)

1. 該当なし

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 該当なし

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 該当なし

(4) 特許出願

該当なし

平成28年度医療研究開発推進事業費補助金

(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業) 成果報告書

I. 基本情報

事業名 : (日本語) 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業
(英語) Research Program on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases

補助事業課題名 : (日本語) 原虫・寄生虫に対する監視・制御に関する研究
(英語) Study on prevention and control of protozoan and parasitic diseases

補助事業担当者 (日本語) 国立感染症研究所寄生動物部・部長・大西 真
所属 役職 氏名 : (英語) National Institute of Infectious Diseases,
Department of Bacteriology I, Director Makoto Ohnishi

実施期間 : 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究課題名 : (日本語)
(英語)

補助事業分担者 (日本語)
所属 役職 氏名 : (英語)

II. 成果の概要（総括研究報告）

補助事業代表者：国立感染症研究所寄生動物部・部長・野崎 智義 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 1 件）

1. Nozomi Ishijima, Ken-ichi Lee, Tomomi Kuwahara, Haruyuki Nakayama-Imahiji, Saori Yoneda, Atsushi Iguchi, Yoshitoshi Ogura, Tetsuya Hayashi, Makoto Ohnishi & Sunao Iyoda. Identification of a New Virulent Clade in Enterohemorrhagic Escherichia coli O26:H11/H- Sequence Type 29. Sci Rep. 2017, 7, 43136

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 全ゲノム情報を基盤とした感染性腸炎の調査研究とその展望、口頭、大西真、第 56 回日本感染性腸炎学会、2017/3/11、国内
2. 腸管出血性大腸菌 O111 における全ゲノム配列を用いた分子疫学解析、ポスター、李謙一、木全恵子、関塚剛史、石原朋子、伊豫田淳、黒田誠、大西真、EHEC Working group、第 90 回日本細菌学会総会、2017/3/19、国内
3. 腸管出血性大腸菌 O111 の全国サーベイランスにおける全ゲノム型別と疫学情報との関連性、ポスター、李 謙一、石原朋子、伊豫田淳、関塚剛史、黒田誠、大西真、EHEC ワーキンググループ、第 20 回 EHEC 研究会・シンポジウム、2016/11/10、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

特記なし

(4) 特許出願

該当なし

平成28年度医療研究開発推進事業費補助金

(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業) 成果報告書

I. 基本情報

事業名 : (日本語) 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業
(英語) Research Program on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases

補助事業課題名 : (日本語) 原虫・寄生虫に対する監視・制御に関する研究
(英語) Study on prevention and control of protozoan and parasitic diseases

補助事業担当者 (日本語) 国立感染症研究所寄生動物部・部長・野崎 智義
所属 役職 氏名 : (英語) National Institute of Infectious Diseases,
Department of Parasitology, Director Tomoyoshi Nozaki

実施期間 : 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究課題名 : (日本語) 腸管原虫症の検査診断法の開発
(英語) Research for diagnostics of intestinal protozoan diseases

補助事業分担者 (日本語) 国立感染症研究所寄生動物部・主任研究官・八木田 健司
所属 役職 氏名 : (英語) National Institute of Infectious Diseases,
Department of Parasitology, Senior Researcher, Kenji Yagita

成果の概要（総括研究報告）

補助事業代表者： 国立感染症研究所寄生動物部・部長・野崎 智義 総括研究報告を参照。

<消化管寄生原虫症の迅速診断用イムノクロマトキットの開発>

本研究では、迅速診断法として有用なイムノクロマトの消化管寄生原虫症診断への導入を図っている。先行開発したジアルジア用イムノクロマトは、下痢症検体等を用いて感度、特異性を評価し、非特異反応あるいは抗原エピトープの差異などの問題が若干想定されるものの、有用性は高いと判断された（H26年度）。このジアルジア検査と同時にクリプトスポリジウム検査も行う、いわゆる Dual-test に向けてさらに開発を進め、クリプトスポリジウムに関しては *C.parvum* のオーシストを抗原として得られたマウスモノクロナール抗体より、イムノクロマト用に最も優れた組み合わせを選択し、既に開発されたジアルジア用抗体セットと上記クリプトスポリジウム用抗体セットを単一のキットに組み込んだ、ジアルジア・クリプトスポリジウム同時検出キットを試作した。反応条件の最適化、特異性の検討を加え、各原虫特異的検出また両原虫同時検出が、検査試料調整を含めおよそ 15 分程度で可能であることを確認するとともに、臨床的に重要なジアルジア、クリプトスポリジウム種および遺伝型の検出に本キットが有用であることが示された（H27年度）。さらに同時検出キットにコントロールラインを加えた完成型を作成した。未凍結新鮮便の中に非特異反応が増強する場合があったことからブロッキングの条件に改良を加えた。希釈糞便試料への抗原添加試験による感度評価を行った結果では、ジアルジアでは $0.5 \mu\text{g}$ タンパク/0.5ml、またクリプトスポリジウムでは $10 \mu\text{g}$ タンパク/0.5ml が検出限界と考えられ、臨床陽性検体中の抗原量の推定が可能となった。糞便試料によっては高速遠心で除去される微粒子が抗原抗体反応を阻害する可能性が示され、その対処法を検討中である。なお本年度完成型 IC を外部機関で評価する予定であったが、IC 作成時期の都合により本年度は実施せず、次年度の課題とした（H28年度）。

<赤痢アメーバ診断用抗原の解析と抗体開発>

本研究では国内赤痢アメーバ患者臨床株を利用した抗原ならびに抗体開発を目指すこととした。下痢症診断用抗原として有用と考えられるシスト壁抗原は、グルコース濃度、pHなどの栄養環境条件、また消化管内でのアメーバ生育環境を考えた培養細胞との共培養によってもシスト誘導が難しく（H27年度）、現状では低グルコース条件下で栄養体内カルコフロー陽性粒子が蓄積する、また細胞周囲の染色（キチンの存在を示唆する）が、一部であるが認められシスト化誘導の可能性が示されるに止まっている。培養細胞 vero cell との共培養で通常増殖培地とは異なる栄養環境での生存ストレスを加えることでシスト化誘導を図っており、培地を選択することで短期間の生存が可能であった。さらにシスト形成時の native な抗原分子の解析を進める。一方、組織内アメーバの診断も重要であり、その抗原としてタンパク質と並んで抗原性を規定する分子である細胞表面の糖鎖に注目した研究を進めている。レクチンを用いた臨床分離株と標準株 Hm1 を比較した結果では、共通して強い反応を示す ConA のほか、臨床株のみに反応が見られるレクチンもあり、糖鎖分子がアメーバの抗原性に大きな影響を与える可能性が示された。糖鎖解析法なども駆使し診断上重要な抗原を明らかにし、その作成と抗体開発を目指す（H28年度）。

成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 件、国際誌 件）

1. なし

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. ジアルジアおよびクリプトスポリジウム同時検査用イムノクロマトキットの開発、口頭、八木田 健司、泉山 信司、宮崎 誠生、第 85 回日本寄生虫学会大会、2016 年 3 月、宮崎
2. ジアルジア検査用イムノクロマトキットの開発、口頭、八木田 健司、泉山 信司、宮崎 誠生、第 83 回日本寄生虫学会大会、2014 年 3 月、愛媛

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. なし

(4) 特許出願

なし

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発研究事業
(英語) Research Program on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases

研究開発課題名： (日本語) 原虫・寄生虫に対する監視・制御に関する研究
(英語) Study on prevention and control of protozoan and parasitic diseases

研究開発担当者 (日本語) 国立感染症研究所 寄生動物部 部長 野崎智義
所属 役職 氏名： (英語) National Institute of Infectious Diseases, Parasitology Department
Department Chief, Tomoyoshi Nozaki

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 腸管寄生虫の感染実態調査及び感受性の遺伝的解析
開発課題名： (英語) Study on epidemiology and genetics of protozoa infection

研究開発分担者 (日本語) 国立国際医療研究センター エイズ治療研究開発センター
医療情報室長 塚田訓久
所属 役職 氏名： (英語) AIDS Clinical Center, National Center for Global Health and Medicine
Chief, Division of AIDS Medical Information, Kunihisa Tsukada

II. 成果の概要 (総括研究報告)

研究開発代表者： 国立国際医療研究センター エイズ治療研究開発センター
医療情報室長 塚田訓久 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 4 件、国際誌 3 件)

1. 渡辺恒二, 濱野真二郎. アメーバ赤痢. 化学療法の領域「特集 消化管感染症発症のメカニズム」. 2016, 32, 1696-1705.
2. 小林泰一郎, 渡辺恒二. アメーバ性虫垂炎. 病原体微生物検出情報. 2016, 37, 245-246.
3. 柳川泰昭, 永田尚義. アメーバ性腸炎の内視鏡診断. 病原体微生物検出情報. 2016, 37, 246-248.
4. 渡辺恒二. 血清抗赤痢アメーバ抗体検査: 潜伏性赤痢アメーバ持続感染者スクリーニングとしての可能性. 病原体微生物検出情報. 2016, 37, 248-249.
5. Kobayashi T, Watanabe K, Yano H, Murata Y, Igari T, Nakada-Tsukui K, Yagita K, Nozaki T, Kaku M, Tsukada K, Gatanaga H, Kikuchi Y, Oka S. Underestimated Amoebic Appendicitis

among HIV-1-Infected Individuals in Japan. J Clin Microbiol. 2016, 55, 313-320.

6. Watanabe K, Petri WA Jr. Environmental Enteropathy: Elusive but Significant Subclinical Abnormalities in Developing Countries. EBioMedicine. 2016, 10, 25-32.
7. Yanagawa Y, Nagata N, Watanabe K, Tsukada K, Teruya K, Kikuchi Y, Gatanaga H, Akiyama J, Uemura N, Oka S. Increases in Entamoeba histolytica Antibody-Positive Rates in Human Immunodeficiency Virus-Infected and Noninfected Patients in Japan: A 10-Year Hospital-Based Study of 3,514 Patients. Am J Trop Med Hyg. 2016, 95, 604-609.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. アメーバ性肝膿瘍重症化リスクに関する後方視的検討, 口頭, 柳川泰昭, 渡辺恒二, 塚田訓久, 上村悠, 小林泰一郎, 水島大輔, 西島健, 青木孝弘, 木内英, 三神信太郎, 永田尚義, 照屋勝治, 湯永博之, 菊池嘉, 柳瀬幹雄, 岡慎一, 第30回日本エイズ学会学術集会, 2016/11/24, 国内.
2. Diagnostic Accuracy of Amebic Colitis by Colonoscopy, Poster presentation, Yanagawa Y, Watanabe K, Nagata N, Tsukui K, Kobayashi S, Nozaki T, Gatanaga H, Kikuchi Y, Oka S, ASTMH 65th Annual Meeting, 2016/11/13, 国外.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

なし

(4) 特許出願

なし

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業
(英語) Research Program on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases

研究開発課題名： (日本語) 原虫・寄生虫に対する監視・制御に関する研究
(英語) Study on prevention and control of protozoan and parasitic diseases

研究開発担当者 (日本語) 学校法人順天堂 順天堂大学 准教授 平井 誠
所属 役職 氏名： (英語) Juntendo University・Associate Professor・Makoto HIRAI

実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

II. 成果の概要（総括研究報告）

- ・ 研究開発分担者による報告の場合

研究開発代表者： 国立感染症研究所・寄生動物部・野崎智義 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

- (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 件、国際誌 件）

1. Ebine K, Hirai M, Sakaguchi M, Yahata K, Kaneko O, Saito-Nakano Y. Plasmodium Rab5b is Secreted to the Cytoplasmic Face of the Tubovesicular Network in Infected Red Blood Cells Together with N-acylated Adenylate Kinase 2. **Malaria J.** (2016) 15:323.
2. Honma H, Niikura M, Kobayashi F, Horii T, Mita T, Endo H, Hirai M. Mutation tendency of mutator *Plasmodium berghei* with proofreading-deficient DNA polymerase δ . **Sci Rep.** 15;6:36971. 2016
3. Toshihiro Mita, Shinichiro Tahibana, Makoto Hirai: Plasmodium falciparum Kelch13: A potential molecular marker for tackling artemisinin-resistant malaria parasites. **Expert Review of Anti-infective Therapy** 14(1):125-35. 2016

- (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 平井誠・池田恵美・橘真一郎・美田敏宏 『高頻度突然変異マラリア原虫を用いた薬剤耐性機構解明への挑戦』シンポジウム「生殖系列変異から捉える生物進化」第39回日本分子生物学会年会（2016年11月30日。於：パシフィコ横浜）

- (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

- (4) 特許出願