

4002376

新興・再興感染症として重要な
包虫症・囊虫症に関する
遺伝子・免疫迅速診断法の研究

*Molecular and Immuno-Diagnosis for Emerging/Re-Emerging
Infectious Diseases, Echinococcosis and Cysticercosis*

(研究課題番号 10557029)

平成10年度～平成11年度文部省科学研究費補助金
(基盤研究B)

研究成果報告書

平成12年3月

研究代表者 伊藤 亮

旭川医科大学医学部教授

平成10年度～11年度 科学研究費助成金
基盤研究B 研究成果報告書

課題番号

10557029

研究課題

新興・再興感染症として重要な包虫症・囊虫症

に関する遺伝子・免疫迅速診断法の研究

Molecular- and Immuno-Diagnosis for Emerging/Re-Emerging
Infectious Diseases, Echinococcosis and Cysticercosis

研究代表者 伊藤 亮

(旭川医科大学医学部教授)

目次

はしがき	1
【研究組織】	2
【研究経費】	2
【研究成果の概要】	3~26
添付資料	
1) 多包条虫のミトコンドリアゲノム (中尾 稔)	9~24
2) 有鉤囊虫症血清診断用抗原遺伝子のクローニング --組み換え蛋白質を用いた血清診断法の開発-- (迫 康仁)	25~26
【研究発表リスト】	
1. 欧文報告書 (国際誌) 23 編	27~30
2. 和文報告書 8 編	31~32
3. 口頭発表 (国際学会) 18 編	33~35
4) 参考論文 (1997 年発表) 17 編	36~38
【原著別刷の掲載】 (19 欧文誌、2 和文誌)	

はしがき

新興・再興感染症として世界的規模で流行、汚染地域拡大が年々深刻化してきている寄生虫病にテニア科条虫の幼虫が人体ならびに家畜動物に寄生することによって惹起される包虫症（単包虫症、多包虫症）と囊虫症とがある。いずれも難治性寄生虫疾患で、死の転帰を取ることが非常に多く、早期鑑別診断法の確立は緊急を要する研究課題である。申請者らはこれらの鑑別を要する寄生虫病について血清学的鑑別診断法の確立を目的とする国際共同研究を推進してきて、基本的にはこれまでで最も信頼性が高いと評価されている多包虫症、単包虫症、有鉤囊虫症それぞれについて血清学的鑑別診断が可能であることを見いだしている。本研究では ①多包虫症、単包虫症、有鉤囊虫症それぞれの鑑別診断法を抗原精製法の検討、遺伝子組換え抗原作製を試み、これまで以上に信頼性が高い血清診断法を確立し、②流行地域での疫学調査研究に供することを第一の目的とした。さらに ③病巣から摘出されるエキノコックス標本あるいは囊虫標本、さらには人体から排出されるテニア科条虫受胎片節、虫卵などを用いた遺伝子鑑別診断法の確立、④遺伝子解析に基づく分子疫学研究への展開を第二の目的とした。

本研究と表裏一体の関係にある国際共同研究「アジアにおける難治性寄生虫病（エキノコックス症等）に関する免疫・分子疫学研究」〔基盤研究・一般 A（国際）（平成 11 年度～12 年度）〕から得られた多包虫症、単包虫症、有鉤囊虫症、その他日本住血吸虫症、肺吸虫症、肝蛭症、肝アメーバ症などの貴重な多数の血清、あるいは髄液サンプルを本研究の展開に利用できたことが、本研究において大きな成果を生む原動力であったと判断している。本研究で得られた旭川医大方式の多包虫症、単包虫症、有鉤囊虫症血清診断法が鑑別を要するこれらの難治性寄生虫疾患についての血清学的鑑別診断法として現在世界で最も信頼性が高いという評価を得ている。昨年 9 月にアルゼンチンで開催された第 19 回国際エキノコックス症会議に本研究代表者、伊藤亮が「多包虫症についての血清診断法」と題する招聘講演を要請され、「幼条虫症（多包虫症、単包虫症、有鉤囊虫症）の鑑別血清診断法」(Ito A (1999) Differential serodiagnosis for larval cestode infections: cystic echinococcosis, alveolar echinococcosis and neurocysticercosis) と題する講演を行い、この発表論文が会議における最優秀論文賞に選ばれている。

【研究組織】

研究代表者：

伊藤 亮 (旭川医科大学・医学部・教授)

研究分担者：

堀井俊宏 (大阪大学微生物病研究所・教授)

岡本宗裕 (鳥取大学・農学部・助教授)

伊藤 誠 (愛知医科大学・医学部・助教授)

中尾 稔 (旭川医科大学・医学部・助手)

迫 康仁 (旭川医科大学・医学部・助手)

中谷和宏 (旭川医科大学・医学部・教務職員)

研究協力者：

橋口義久 (高知医科大学・医学部・教授)

渡辺園予 (旭川医科大学・医学部・非常勤実験助手)

【研究経費】

平成10年度 7,100,000円

平成11年度 5,200,000円

計 12,300,000円

【研究成果の概要】

新興・再興感染症として重要な包虫症・囊虫症 に関する遺伝子・免疫迅速診断法の研究

本研究の成果を下記の 1～6 としてその概要を簡潔にまとめてみる。

1. 多包虫症、単包虫症、有鉤囊虫症についての血清学的鑑別診断法

a) 多包虫症の血清学的鑑別診断法として Em18-イムノプロットが多包虫症と確定診断が付けられた症例の 90%以上を確実に検出できること、疑陽性の症例が全くないことがイギリス、フランス、中国との共同研究から判明してきている (Craig et al. 2000. Submitted)。多包虫症と単包虫症との鑑別血清診断法についての論文は Ito et al. 1999. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 60, 188-192; Ito et al. 1998. Parasitology International 47, 95-99 に発表した。スイスのチューリッヒ大学グループは 4, 5 種類の血清学的検査法を用いて多包虫症と単包虫症との鑑別を試みてきているが、Em18 に対する抗体応答の有無によって出される結論の方が常に若干感度が高いようである (Ito et al. 1998. Parasitology International 47, 95-99; Schantz et al. unpublished)。それ故、ポーランドの Pawlowski 教授は Em18 を市販する方向に持って行くべきであると強く助言し、Em2^{plus}-ELISA を市販しているスイスの会社にも検討すべきであると助言してきていると聞いている。

Em18-イムノプロットに用いる精製抗原を ELISA にも用い(Em18-ELISA)、特異性については全く問題がないが、感度が若干低い現状であり、プレートのコーティングに使用する抗原量その他の検討を加え、イムノプロットを必要としない Em18-ELISA を確立する必要がある。

今後の問題は、上記の Em18-ELISA 法の改良とこれらの方法が多包虫症の早期診断にどこまで役立つかについての検討である。これについては今後旭川医科大学病院をはじめとし、道内外、あるいは諸外国の医療機関との連携をはかり、早期症例についての検討を重ねる必要がある。なお、ラットを用いた肝、肺、脳多包虫症作出を目的とする実験感染から早期診断に役立つと期待される Em18 とは別の抗原が見つかっており、現在、経過観察中の患者血清においても確認されつつある (?) 成分であり、この 新しい抗原についての評価研究展

開も必要である。

b) 単包虫症についての血清診断法は多包虫症、単包虫症が共通に認識する Antigen B サブユニット (8 kDa) 抗原に対する抗体応答と Em18 に対する抗体応答の欠除の比較から結論を出すのが確実である(Ito et al. 1999. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 60, 188-192)。これらの検査法を用いた症例報告として Kimura et al. 1999. Journal of Travel Medicine 6, 249-253; Ito et al. 1998. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 58:790-792 に発表した。Antigen B の精製は非常に簡単である(Ito et al. unpublished)。

c) 囊虫症についての血清診断法として分離用等電点電気泳動装置を用いた簡単な方法がこれまでアメリカ国立疾病対策センター(Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta) の Tsang 博士が開発したレクチンを用いる特異抗原成分精製法よりも格段に簡単かつ容易であるとする成績を Ito et al. 1998. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 59, 291-294, Ito et al. 1999. Journal of Helminthology 73, 363-365 に発表した。この方法を用いた流行地域での疫学調査依頼が世界各国から寄せられてきている。これらの検査法を用いた有鉤囊虫症日本人症例報告として Ohsaki et al. 1999. Internal Medicine 38, 67-70; Ito et al. 1999. Parasitology International 48, 95-99 に発表した。治療後の経過観察中の国内症例も幾つかあり、適当な時期にまとめたいと考えている。

2. 旭川医大方式の血清診断法を用いた疫学調査への協力

a) 中国における多包虫症、単包虫症の鑑別調査研究として①イギリス、フランス、中国、旭川医大との協力 (Craig et al. 2000)、②アメリカ、中国、旭川医大との協力 (Schantz et al. in preparation; Qiu et al. 1999)がある。なお平成12年度からニュージーランド政府による中国におけるエキノコックス症対策協力事業が始まるが、地域住民の血清学的鑑別診断法として Em18-イムノプロット法を使うことになっている (ニュージーランド—中国覚え書き)。この2国間協定に Ito が血清診断についての技術顧問として参加を要請され、伊藤だけではなく同じ地域でこれまでエキノコックス症の調査研究を推進してきた欧米の責任者 Craig 教授、Schantz 博士をも技術顧問に加えるようニュージーランドに要請し、Ito, Craig, Schantz を国際専門技術顧問団として参加要請する形の最終協定書の作成に入っている。

b) 旧ソビエト連邦における軍需産業からの平和産業への技術移転計画(INTAS)

(ヨーロッパ連合、アメリカ、日本政府による援助)があり、現在カザフスタン、キルギスタンにおける多包虫症、単包虫症対策にアイルランドの研究者が代表となり取り組んできており、イギリス(Craig)、アメリカ(Schantz)、日本(旭川医大)も参加を要請されている。旭川の協力は血清診断疫学、ミトコンドリア DNA 解析である。

c) 有鉤囊虫症についての協力として、①インドネシア、パプアニューギニアにおける有鉤囊虫症調査 (Ito et al. submitted; Wandra et al. 2000. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 74, 1-5)、②中国における囊虫症疫学調査 (Piao et al. unpublished)、③タイにおける血清診断法の改良 (Dekmyoy et al. in preparation)、④エクアドル、メキシコにおける囊虫症疫学研究 (Ito et al. in preparation, Benitez-Ortiz et al. in preparation)、⑤南アフリカにおける囊虫症と結核との鑑別研究 (Ito et al. unpublished)がある。現在、その他モザンビーク、タンザニア、ザンビア、あるいはペルー、エクアドル、メキシコなどの研究者から血清診断法の技術指導の要請を受けている。この件については大学における文部省科学研究費で対応すべき性質ではなく、むしろ JICA 事業として推進していただく方向が妥当かと思いついている。

3. 血清診断法の抗原精製

多包虫特異診断抗原 (Em18)、エキノコックス属共通診断抗原 (Antigen B subunit 8 kDa)、有鉤囊虫症診断抗原 (Glycoproteins) それぞれの抗原精製についても大きな進展があり、モノクロナル抗体によるアフィニティ精製抗原、遺伝子組換え抗原作製も中尾稔、迫康仁が中心になって順調に進展してきている。

a) Em18 について、イギリス、中国のグループが①10% 以上の単包虫症が Em18 と交差応答を示すこと、②それでもなおかつ現在世界で最も特異性が高い多包虫症診断抗原であることを報告してきているが、③この交差反応性は抗原作製上の問題であり、④精製 Em18 抗原を用いた Em18-イムノプロット、Em18-ELISA では⑤ウルグアイ、リビア、ヨルダンで得られた単包虫症とは一例も交差しないこと、⑥多包虫症と単包虫症とが同一地域で流行している中国から得られた単包虫症のなかのごく一部の血清が交差を示すこと、⑦以上から中国における交差応答を示す単包虫症は多包虫にも暴露されている(重複感染例)か、多包虫症を単包虫症と誤診した結果であると考えられ始めている(Ito, Craig, Wang et al. in preparation)。なお、多包虫症と確定診断が付けられた血清その他を用い

たブラインドテストから Em18-イムノプロットによる鑑別診断は90%以上の確定症例を確実に検出していること、疑陽性は一例も無いことが、共同研究者の1人イギリスの Craig 教授から報告され、世界各国で開発された血清診断法の比較成績についての論文が現在投稿されている段階である (Craig et al. submitted)。

外国の研究グループから、多包虫症鑑別に非常に有用という高い評価を得てきているが、Em18 が多包虫に特異的に存在する抗原であるか否かについての解析には遺伝子レベルの研究が必要であると考えている。旭川医大グループとしては多包虫症と単包虫症との病態の相違に基づく抗体応答性の違いをも可能性として考えている。いずれにせよ、多包虫症を容易に検出でき、極一部の単包虫症との交差反応性が若干問題になる血清学的検査法であると結論される。

b) 単包虫診断に有用な Antigen B サブユニット(8 kDa)を精製し、日常の検査診断に利用している(Kimura et al. 1999. Journal of Travel Medicine 6, 249-253; Ito et al. 1998. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 58, 790-792)。現在、輸入症例を一年間経過観察している。外国グループが Antigen B に対するモノクロナル抗体を作出し、遺伝子組換え抗原を作出しているので、これらの後追いをする研究には関心がないが、輸入症例が増えると予測されることから日常的検査に必要な精製抗原を常備しておきたいとは考えている。

c) 囊虫症については迫康仁が中心になり既に遺伝子組み換え抗原として特異性が高い抗原を作製している。糖鎖の修飾がない蛋白質抗原であるため、感度はこれまでのアフィニティー精製抗原あるいは等電点分画精製抗原と比べ若干低くなり、約80%である(Sako et al. unpublished)。

4. 遺伝子診断法の研究

遺伝子診断法の研究の基礎として、中尾稔が中心になってタホウジョウチュウ (*Echinococcus multilocularis*)、ユウコウジョウチュウ (*Taenia solium*) それぞれのミトコンドリア DNA 全塩基配列を世界に先駆けて解読し、分子生物学的基本命題の一つである遺伝子暗号の読み始め (ATG と GTG) と読み終え (TAG と TAA) に利用されるコドンについても条虫で初めて発見されたユニークなコドン利用が判明している(Nakao et al. in preparations)。世界で最初にこれらエキノкокクス症、有鉤囊虫症を惹起する寄生虫のミトコンドリア DNA 全塩基配列の解読を完成させた旭川医大グループに対し、世界各地で採取された多包虫

(アラスカ、日本(北海道各地)、中国、オーストリア、ドイツ、フランス、ベルギー、デンマーク、トルコ)、有鉤囊虫(エクアドル、メキシコ、ペルー、中国、インドネシア、タイ、インド、タンザニア、モザンビーク、カメルーン)が遺伝子研究材料として送付され、中尾稔ならびに岡本宗裕、迫康仁が精力的に幾つかの遺伝子について解読を進め、世界におけるこれらの条虫の拡散、進化について遺伝子レベルで初めて論ずることが可能になりつつある。

5. 遺伝子診断法の研究

ミトコンドリア DNA についての基礎研究を中心とし、各種条虫の地理的変異を含めた研究がかなり進展した。この課程で全塩基配列解読に必要として多数の遺伝子プライマーを作成しているので、これらの遺伝子解析技術とプライマーを人体から排出されるテニア科条虫片節、虫卵に対して応用することは容易であり、この方向の仕事への展開をこれからの課題の一つとしている。

6. 今後の展開と提言

基本的には人畜共通のテニア科条虫幼虫寄生によって惹起される難治性の疾患、エキノкокクス症(多包虫症、単包虫症)、有鉤囊虫症それぞれについての血清学的鑑別診断法を確立できたと判断している。今後はより簡便な方法で特別な経験が無くてもどこでも誰でもできる方向への検査法の改良が求められると考えている。そのためにも精製抗原、モノクロナル抗体を用いたアフィニティー精製抗原、遺伝子組換え抗原を実用に見える方向の努力が必要である。

遺伝子診断法については[テニア科条虫の片節を観察すれば、有鉤条虫か無鉤条虫科の鑑別はプロなら容易につく!]という意見があり、その通りであるが、現在、上記の2種類として簡単に片づけられない *Taenia asiatica* の問題もあり、遺伝子診断法の開発も無意味ではないと考えている。またエキノкокクス症についても患者がどの地域で感染したか、危険因子はなんであるかといった疫学研究に患者から摘出された病巣を用いた遺伝子診断が役立つと期待される。多包虫症、単包虫症あるいはその他の非常に minor なエキノкокクス条虫2種(*E. vogeli*, *E. oligarthrus*)をも視野に入れた世界レベルでの研究に発展させるべきであると考えている。その意味からもタホウジョウチュウのミトコンドリア DNA 全塩基配列の解読に成功し、タンホウジョウチュウ DNA についての解読への協力を要請されていることから、研究と国際協力とが大きく発展するもの

と期待される。

最後にこれまでの研究実践に基づき、以下の幾つかの提言を記してみたい。

①これまでの研究協力内容は共同研究プラス技術指導であり、JICA が積極的にサポートすべき内容も多く含まれていると推測している。JICA による技術指導も単なる技術指導に終わらせないで、各国の直接的なニーズに応えられるような共同研究を含む形のトレーニングに展開させていく必要があると提言したい。そのためにも、しばしば指摘されることがある国際的評価に耐えない、国内での既得権だけが一人歩きする形の JICA 事業から外部評価、客観評価に基づく JICA 事業の決定、実績評価法の導入が不可欠である。

②国内での多包虫症、単包虫症、有鉤囊虫症についての血清学的鑑別診断相談にも積極的に取り組んできている。エキノкокクス症が感染症新法において届け出が義務づけられる第4類感染症に含まれたことから、エキノкокクス症（多包虫症、単包虫症）の血清学的鑑別診断についてのレフェレンスセンターを確立する必要がある。エキノкокクス症（特に多包虫症）を国民病として認識せざるを得ない今日、客観評価、外部評価を導入し、誤診を減らす努力が要求される時期あると判断している。これまで北海道立衛生研究所が多包虫症についての唯一の行政サイドのレフェレンスセンターとして機能してきて、かなりしっかりした成果を上げてきている。また、旭川医科大学も輸入症例である単包虫症ならびに諸外国からの相談を含む多包虫症についての国際的レフェレンスセンターとして機能してきている。上記の時代背景とこれまでの実績を踏まえ、北海道立衛生研究所と旭川医科大学あるいはその他の複数研究機関における検査精度の向上を目的とする、より正確な検査体制を構築すべき時代であると考えている。

添付資料 (未発表)

多包条虫ミトコンドリアゲノムが完全解読された (DDBI database accession no. AB018440)。図1に要約したように、ゲノムは全長 13,738

bp であり、12種類の rRNA 遺伝子、22種類の tRNA 遺伝子が存在した。

1. 多包条虫のミトコンドリアゲノム (中尾稔) pp. 9 ~ 24

2. 有鉤囊虫症血清診断用遺伝子のクローニング—組換え蛋白質を用いた血清診断法の開発— (迫 康仁) pp. 25 ~ 26

また、遺伝暗号表には、扁形動物に当てはめられている The flatworm mitochondrial code を用いたが、若干変更を加え、ATG と GTG を開始コドンとし、TAA と TAG を終止コドンとした。遺伝子の種類は、ATP8 遺伝子を欠く点が線形動物ミトコンドリアゲノムと同様であったが、その配置様式は全く新規であった。なお、rRNA 遺伝子の全長は LSU rRNA 遺伝子が 983 bp、SSU rRNA 遺伝子が 704 bp と推定され、これらは今まで知られている生物の中で最短のものであった。

表1には、蛋白遺伝子の相同性検索の結果をまとめた。CO1、Cytb、ND1、ND5 遺伝子は他生物との相同性が高かったが、CO3、ATP5、ND2、ND3、ND4L、ND6 遺伝子では相同性が低かった。表2にはコドンの使用頻度をまとめた。多包条虫ミトコンドリアゲノムは極端に AT-リッチなため、これらの塩基が関連するコドンの使用頻度が高く、この傾向は、線形動物ミトコンドリアゲノムと同様であった。

図3には推定される tRNA の二次構造を示した。tRNA-Ser (TCN)、tRNA-Arg (CGN)、tRNA-Ser (AGN)、tRNA-Cys (TCY) は D-ループを欠く変則的な構造となった。現在までに他種生物で tRNA-Ser (AGN) の変則構造は知られているが、他は全く報告がなく、扁形動物に特有な tRNA なのかもしれない。

以上が多包条虫ミトコンドリアゲノムの概要である。全塩基配列が解読されたため、今後、遺伝子診断や疫学調査のための PCR プライマーを設計することが容易となり、今後、エキノコックス属条虫の分類や地理的変異の解析に多大な貢献をするであろう。

多包条虫のミトコンドリアゲノム

多包条虫ミトコンドリアゲノムの全塩基配列を解読した (DDBJ database accession no. AB018440)。図 1 に要約したように、ゲノムは全長 13,738 bp (A:2825, C:1044, G:3209, T:6660) で、H鎖のみに 12 種類の蛋白遺伝子、2 種類の rRNA 遺伝子、22 種類の tRNA 遺伝子が存在した。

図 2 にはその詳細な地図を示した。ND5 遺伝子上流と下流には複数のリピート領域が存在し、これらは複製や転写に関連する領域と考えられた。また、遺伝暗号表には、扁形動物に当てはめられている The flatworm mitochondrial code を用いたが、若干変更を加え、ATG と GTG を開始コドンとし、TAA と TAG を終止コドンとした。遺伝子の種類は、ATP8 遺伝子を欠く点が線形動物ミトコンドリアゲノムと同様であったが、その配置様式は全く新規であった。なお、rRNA 遺伝子の全長は LSU rRNA 遺伝子が 983 bp、SSU rRNA 遺伝子が 704 bp と推定され、これらは今まで知られている生物の中で最短のものであった。

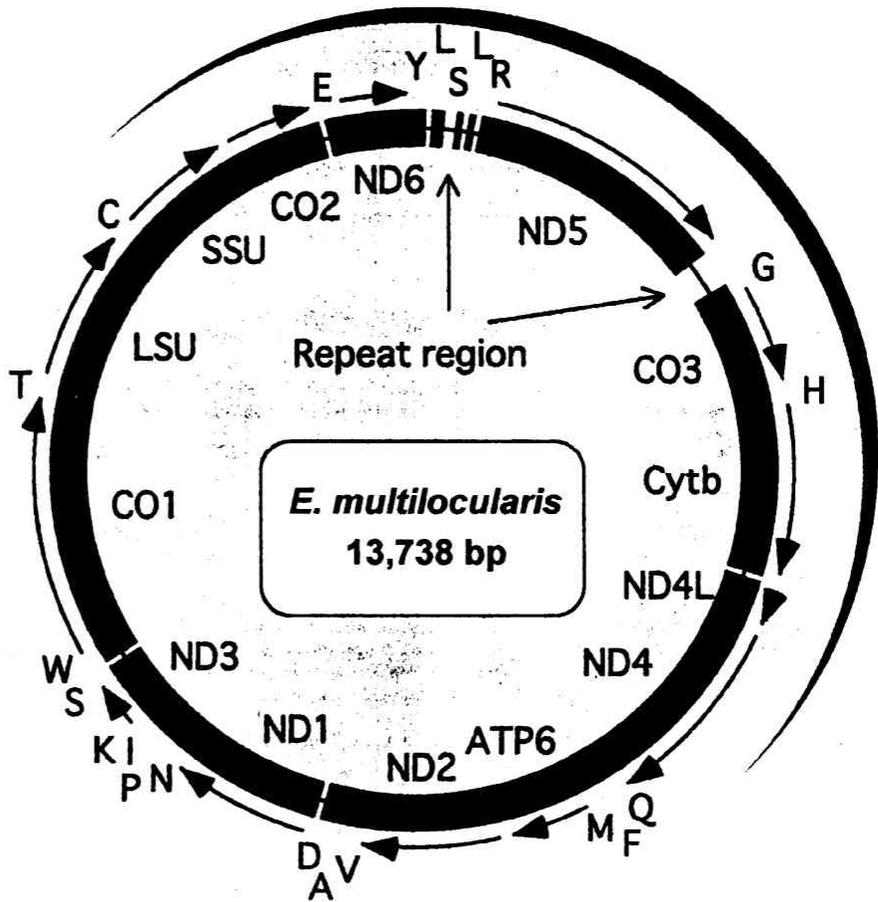
表 1 には、蛋白遺伝子の相同性検索の結果をまとめた。CO1、Cytb、ND1、ND5 遺伝子は他生物との相同性が高かったが、CO3、ATP6、ND2、ND3、ND4L、ND6 遺伝子では相同性が低かった。表 2 にはコドンの使用頻度をまとめた。多包条虫ミトコンドリアゲノムは極端に AT リッチなため、これらの塩基が関連するコドンの使用頻度が高く、この傾向は、線形動物ミトコンドリアゲノムと同様であった。

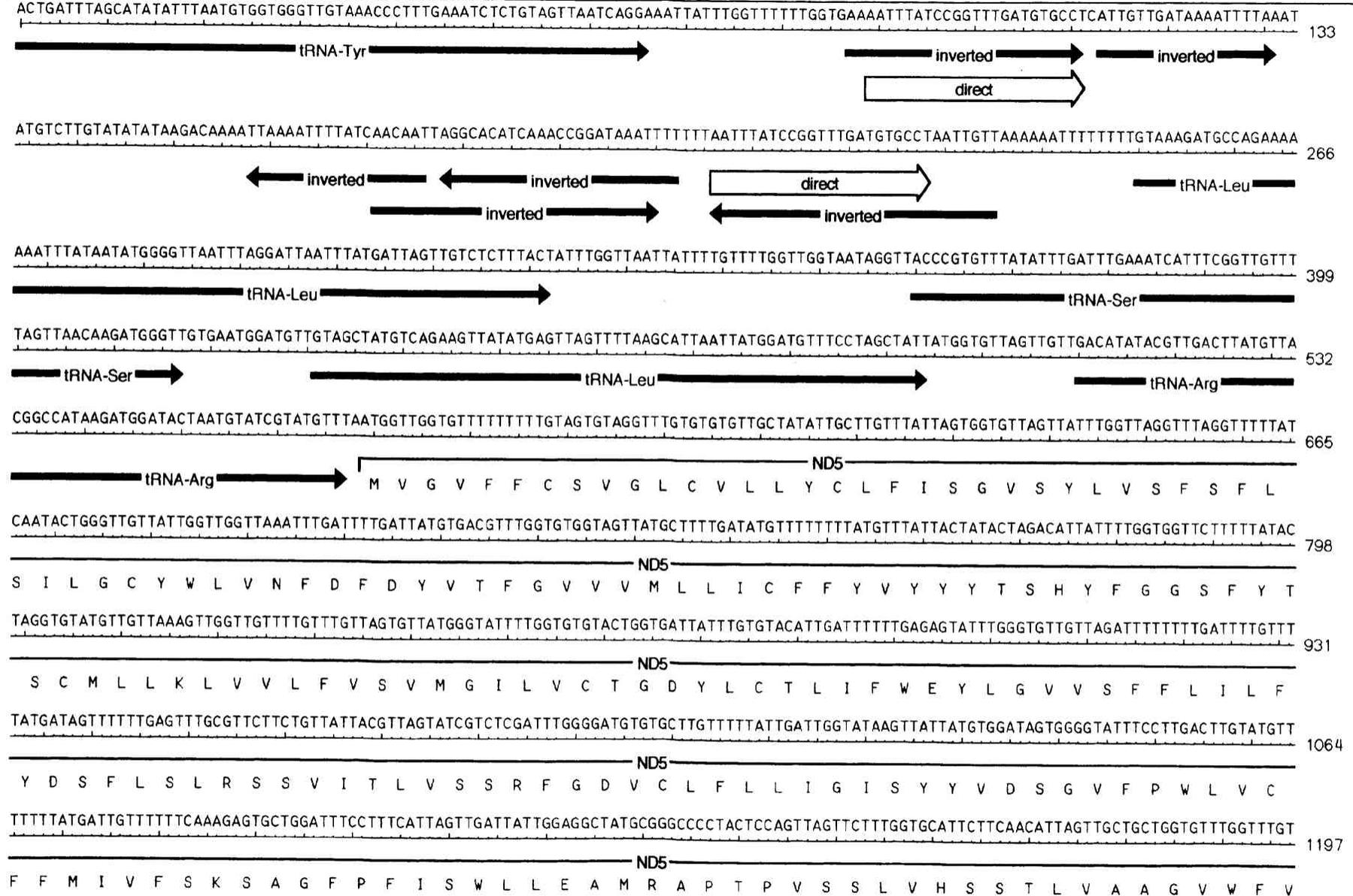
図 3 には推定される tRNA の二次構造を示した。tRNA-Ser (TCN)、tRNA-Arg (CGN)、tRNA-Ser (AGN)、tRNA-Cys (TGY) は D ループを欠く変則的な構造となった。現在までに他種生物で tRNA-Ser (AGN) の変則構造は知られているが、他は全く報告が無く、扁形動物に特有な tRNA なのかもしれない。

以上が多包条虫ミトコンドリアゲノムの概要である。全塩基配列が解読されたため、今後、遺伝子診断や疫学調査のための PCR プライマーを設計することが容易となり、今後、エキノコックス属条虫の分類や地理的変異の解析に多大な貢献をするであろう。

☒ 1 **The mitochondrial genome of *Echinococcus multilocularis***

Genes { 12 protein genes
2 rRNA genes
22 tRNA genes





11

TATGCGTTATGATTATTTGTTGCATTTTAGTAGGTC AATAATATTTTTAGTGTTATGCTTTTGTGACTGTGTTTGTAACTGGATTAGGAGGTTGTTTTTTATGATTTGAAGAAGATTGTAGCTCTGTCA 1330

ND5

M R Y D Y L L H F S S S I I I F S V M L L L T V F V T G F S S L F F Y D L K K I V A L S

ACATGTAATAATGTTTCTTGATGTGTTCTGTACTTGATTTTTGGTGATGTTATGTTGTCGTTGTTTCAATTAATAAGTCATGGTGTATCTAAGTGTATTTATTTATGTTAGTTGGTGACGTAATGAGTGGTA 1463

ND5

T C N N V S W C V L Y L I F G D V M L S L F Q L I S H G V S K C I L F M L V G D V M S G

GTGGTGGTTCTCAAGCTAGAAATTGTGATTTAGATCTCCTTTATATGGATCATGGAATATTTTTGGGTTGTTGCTGTGGTCC TTGGTTAGCTGGAGCTCCATTTATTGGAGTGT TTTTACTAAGCATT 1596

ND5

S G G S Q A S N C V F S S P L Y G S W N I F G L F A V V L G L A G A P F I G V F F T K H F

TTTATTAAGTAGTTTTATTGGTGTTGGTTAGTAATGTTGTGGTTAGTTGGTTGTTGGAATATGTGTTTTTTATCGTACTTGTATTCATTTCCGGTTGTGATTATTTTTTTGACTATAAAGAGTAGATTGCT 1729

ND5

L L S S F I G V V S N V V V S L V V G I C V F L S Y L Y S F R L C I I F C T I K S S L S

TCTGGTGATTTTTTTATTTTAGTTCAGGGTTAATGGTGTATTGTTGATTATTTGTTAATTTTTATATTTTTGCTGTTGAATGAAGTTAATTATTTAGTTGTGGTTTATAGAGTATTATTAGTTATTTGTC 1862

ND5

S G V F F Y F S S G L M V Y C W L F V N F Y I F L L L N E V N Y L V V V Y S V L L V I C

AATTTTAGCTTTATTATTATCTATTGATTTTATGATAGTTGTGTGTTTAGAATATGAAGTAGTAGGTTATTTGGGTTGATAATTTAGTTGAATGGTTTTATGAGCTATTTTATAAGATTTTATTGTTGT 1995

ND5

Q F L A L L L S I V F Y D S C V F S I W S S S L F G C D N L V E W F Y E L F Y K I L F V V

TAATTTTTTTTTGTTCCGGTGGGATTACTTAATGGTTACGTTGTTTTGTGGTGTGGTCGTTGGTAGAGTAGTTTATGGGTTGGATGATGCTTAAAAATTTTTTTATTTAGTACGTTCCGGTTTATTATATAT 2128

ND5

N F F F V R W D Y L M V T L F C G V G R V G S V V Y G W M M L N I F L F S T F G L F I Y

ACATTAGTAGTAAATAAATTTAAATGTTTATATATTATATAACAAAATATAAATATAGAACGAAAGTAAATATGTATAGTCTCAATTAATACTATACATATATGGGGAAGGGGCCCATATATGTATAGTA 2261

ND5

T L V V .

TTAATAACATTATTGATTTATGTGTGTTGTTTTGTTAAATCAATAATGGTATATTGTAATGTTGCTAGTATAAATGTTTGTATTATGTTTTTTTCCAAAAAATGATCTAGAGTTAGGCGATATAGATATG 2394

-12-



C-
M

TCTGTGGTTCCTGTGTTTGGTGGCTTCTTTTGGTGGCTTAGGTTGGTTGGGTTATTTATGTGGAAGGTTAGCTTTGTGTTTGTGTTTAAATTTGTGTTGGGTTGTTGATAGTATTTTTTTTGTATGATGGGT
 2527
 S V V P V F G A S F V G L G L V G L F M W K V S F V F V V L I C V G L L I V I F L Y D G
 TGAGTTTTATGATTCATCATTATGAATCGGCTTTTTGGTGTGTTGTTTGGAGTGAAGTAGCGATTTTTGGTAGGTTTTGACTTGTGTTCTGTTTTTTGATTGTTGATGTTATAGAAGTTTGTCTAGTTCCTT
 2660
 L S F M I H H Y E S A F W L F V L S E V A I F G S F L T C C L F F D C W C Y S S L S S S L
 GGAGATTCCTTTTGGTGGGTTGTTTGTGTTTGGTGGTCTAGGTTACTGTTACTGGTTTTTCATCATTGTTGGGTTGGCGTTTTTGTGATTGTTTTTATTTATGACTATAGTTTTAGGTTTGAGTTTTGTT
 2793
 E I P F V G C F V L L G S S V T V T G F H H L L G W R F C D L F L F M T I V L G L S F V
 GTGTTACAAATTTAGAAATGGAGGAGATTGGGTTTAAAGTAGTTGATGGTAGATTTATTCTAGTAGGTTTTGTACAGTCGGTTTTGCATTTTAGTCATGTGGTGTAGGTGTTATTGGATTAGTGACGTTGT
 2926
 V L Q I L E M E E I G F N V V D G S F Y S S S F C T V G L H F S H V V L G V I G L V T L
 TTTTCGTTGGTAGTAGTAATTTGATGTTTATAGTTGACTGTGTTGACGTGATATTGACATTTTGTGATTATATTGGCTTCTTGTATACACTGTTGTTTATGTATGTTAGATTACTAATAGGTTAGTTTA
 3059
 F F V G S S N F D V Y S C T V L T W Y W H F V D Y I W L L V Y T V V Y V C . tRNA-His
 AACTGGTAGATTGTGGTCTATTGAGTACTGTTTAGTTGATTAGTAATGGATGATTGTTTTGTTTCGACGTAATTTAATAGATTTACCAATTAATTATTCTTTGAATTATTATTGAAGTAGTGGGTTTGTAT
 3192
 tRNA-His → M I V L F R R N L I D L P I N Y S L N Y Y W S S G F V Cytb
 TGTCTATGTTTATGATTCCTCAAATTTTACTGGAGTATTGTTGCTTTTTTGTATGTAGCTGATTTTATGTGTAGATTTTTTATGGTTATGAATTTATCTAATGATTCTTTTTTACTTGATGTTTGCGTTA
 3325
 L S M F M I L Q I F T G V L L S F L Y V A D F M C S F F M V M N L S N D S F F T W C L R Y Cytb
 TTGGCATATGGTAGGTGTAATGACTGTTTATTTTGTATTCTTTTCATATGGGTATGGCTTGTATTATGGTAGTTATGTTAAGAAGGGTGTGGAAATGTTGGTTTTGTGTTATATTTGTTAGTTATGGGT
 3458
 W H M V G V N V L F I L L F F H M G M A L Y Y G S Y V K K G V W N V G F V L Y L L V M G Cytb
 GAGGCATTTACTGGTTATATTTACCTTGGCGTCAGATGTCTTATTGGGCTGCCACTGTCCTTACTTCAATTGTTGATAGTTTGGCGTTGGTGGTTCATGGTCTATAAGTATGTGGTTGGTGGATTTTCGG
 3591
 E A F T G Y I L P W R Q M S Y W A A T V L T S I V D S L P L V G S M V Y K Y V V G G F S

TGTCGGGTGTAACATTGATTTCGTGTGTATCGGTTTCATATTTGTTTGGGGTTTGTATATTAGGATTAATGTTTGTTCATTTATTTTATCTTCATAAGAGTGGTAACAGTAATCCGTTGTTTTCATTTAATTT 3724

-----Cytb-----
V S G V T L I R V L S V H I C L G F V I L G L M F V H L F Y L H K S G N S N P L F S F N L

GTTTAATGATTTGGTGTATTTTCATTCATATTTTTCTGTTAAGGATTTAGTCTTGTATTGTTTACTTGTAGATTGGTAGTTTTTTGGTTGTTTTTGTCTCTGATTATTGGTAGATATAGAGGCATATTTA 3857

-----Cytb-----
F N D L V Y F H S Y F S V K D L V L F M F T C S L V V F W L F F A P D L L V D I E A Y L

GAGGCTGATTATCTGAAAACTCTGTTAGTATTAAGCCTGAGTGATATTTTTTAGCCTTTTATGCTATTCCTCGGTGATTAATCTAAGGTTGGGGGGTGTGTTGTTGATTTTATCTTTTATTTTTTTCTTAT 3990

-----Cytb-----
E A D Y L N T P V S I K P E W Y F L A F Y A I L R C I N S K V G G L L L I L S F I F F L

GAGTACCAACTGAGGGTGGCACTAGTGTATAGAGTTTGGCGTCAGGTTAATTTTTGGTTAGTTGTTAGTTTGTTTTTGTCATTGACTTATTTAGGTGGGTGTCACCCAGAGTATCCTTATTTGGTTATTTG 4123

-----Cytb-----
W V P T E G G T S V Y S V W R Q V N F W L V V S L F L S L T Y L G G C H P E Y P Y L V I C

TCAGTTGTTTAGGGTAGTAATGGTGTATGATGTTTGTTTTTAAGTTATATTAATTTTTTGGTGTGGTTACTTTGTTTTTATTATTTTGTCTGTAATTATGGTTAGTTATTTTTGGTTGTTGGCGTTT 4256

-----Cytb----- ND4L-----
Q L F S V V M V F M M F V F K L Y . V V T L F L L F C S V I M V S Y F L V V G R F

TTTGAATAGCTTGATTATTTTGGAGAATTTAATGTGTTAGTCTTTTGTGTTTGTGTTTCTTCATTTGATAGTCATGTTATTTTTATAGTGTGATGGTGATTCTACTGTGGAGATTATTATTAGG 4389

-----ND4L-----
L N S L I I L E N F N V L V L L F C L L F S S F D S H V I F I V L M V I S T V E I I I S

TTAACTGTATTGACTCGAGTATGGGAATGTTTCATCTTGTGTTGGAATTGGTTGATTTTTAGTTGTTATGTCAGTCTTGTGTTGTGTTTATTGTATAGGTGTTGGGATTGGTTGTTGTTGATTAGTATGGTAA 4522

-----ND4L----- ND4-----
L T V L T R V W E C S S C L E L V D F . M S V L L L C L L Y S C G I G C C W L V C G N

AGTGATAATAGTATGTTTGTGTTTGAATCTGTGTCATTTATTTGGTAATTTGGTGTAAATTTAGGGTTTTGTAGGCAGGTTATGTTTTTGGTTTGTGACTAATCGAGTTCGGTTTTTTTTGATTCT 4655

-----ND4-----
V Y N S M F V F D S V S F Y L V I L V L I L G F C S Q V M F F G L L T N R V R F F L I S

AGGTTGGTGTGTTGCTGTTGTGTCGTTTTGTATTAATCATTCGGTAGTTTTTGTAGTGTGTTATGAATTATCGATGTTCCATTATTATACTTGATTTTTAGAGAGTCTCCGATTCTGAGCGGTTTTTGGCTG 4788

-----ND4-----
S L V F A V V C F C I N H S V V F W C V Y E L S M F P L L Y L I F S E S P Y S E R F L A

GGTGGTATTTTTCTGGTTATTTGTTAAGTACTAGTCTCCGTTAATTTTGTGTTGTTATATTTATCATATGTGAAAGGGTCATTCTTTTTAGTGAGTGGTGTATAAAGGTTATGTTTCTTTAAGAATTTT 4921

-----ND4-----
G W Y F S G Y L L S T S L P L I L I L L Y L S Y V N G S F F F S E W C Y N G Y V S L S I F

TTATGTTTTGTCATTTATATTTTTTACTAAGGTTCTTTAGTTCCTTTTCATACGTGATTGCCTATAGTTCATGCTGAGGCTACTAGAGTAGTATCAATTTTTTAAAGTGGGTATATTATGAAGTTAGGTTTG
5054
ND4
Y V L S F I F F T K V P L V P F H T W L P I V H A E A T S V V S I F L S G Y I M K L G L
TTGGGTGTTTATCGTACTGTGTTTTTATTTTTGATTGACTTTTGTAGTTATTTGTTTGTGTGTTGTTGATTGCCGTTGGTTTTTTGGTTACTGCTTGTGTGGAGTTAGATGGTAAGCGTTGATTGGCGT
5187
ND4
L G V Y R T V F F I F D L T F V S Y L F V C C L I A V G F L V T A C V E L D G K R W L A
TTTTAAGTTTGTACATATAGTAGTTCCGTTTTTGGTTTTTTTGGTGGTATTGGGTAAGGTTGGGTTTTAGGTTTTTTACTGTTTAGGTCATGGGCTGAGTGCAGGTTTGGTTTTGGTTTGTGTTGTTG
5320
ND4
F L S L S H I V V P F L G F F V G D W V S L G F S F F Y C L G H G L S A G L V F G L L W C
TTTTTATGATGTTTTCGAATACTCGTAATTGAGTTTTATTAAAGTCTGGTGGTGGTATTGTTAGAATGGTATTTTAGTGTTAGTATGTTGAGGTTATGTTTCATTCCGACTACTATACAGTTTTTTTGT
5453
ND4
F Y D V S N T R N W V L L K S G V G G I V S M V I L V F S M L S L C S F P T T I Q F F C
GAGGTGTTTTAGTAAGTCAGTGTCTGGTGTGTTATTTTACTTATTGTTCTGGTTATGTTATTTATTTTTGGAGGGTTGGTTCCTTTAATTTTATGTGGTCATTTGTTAATTCGAAGTGAGTACTACGAAT
5586
ND4
E V F L V S Q C S G V L F Y L L F W L C Y L F F G G L V P L I L C G H L L I R S E Y Y E
TTCTAGTGTCTTATTACTGTTATTATTTTTTTTTATGCTTCTTAATTTTCTGGTGTATTGTTGCATAATTTGTTATAGTGATGGTTTAAAGAGGTGTTTGCATTTTATGTTTGGTCATAAAGGTGA
5719
ND4
F S S V S Y Y C Y Y F F L C F L I F W C Y F A I I L L . tRNA-Gln
TTAGTTGCCGTTAAATTTCTTTTAGCTTAATTTAAAGCATCAATTTGAAGAGTTGGGGATAACTTATGTTAGGGAGACTGGTAAGTTAATTAAGTGTGGGTTTCATGTCTCCATTTTACACTTTTTGTGTC
5852
tRNA-Gln tRNA-Phe tRNA-Met
TGGTTGAGTTTAAAGGTTATTGTGAATGATTTTGGTCTTTAATAGGTCGGGTTTATGCGTTAATCTTAAATAGTAGTGTCATATTATTATTTGTTTTATTGGTATTTGTTCTTGGGTGGTTTTTGGTTT
5985
ATP6
tRNA- M V I V N D F G S L I G R V Y A L I F N S S V S Y Y Y F V L L V F V L G W F L V
ATCGTTTACCTTACTGTATAGATTTTATTTGTTTTCTGTATTTTTGTTGGTGTAGTTTTGTAATGTTTGTGTCACATTTTTGTGTCGTGTTTTAGGGGGATTAAATAATTTCTTTGCTAGTTTTGTTCC
6118
ATP6
Y R L P Y C Y S F Y L F S V F L F G V V F V M F V S L F L C R V F S G I N N F F A S F V P

CGGTTTGCTTGTGGATGGTGATTTTTATCAGGTTACTTTAATGGTGGTTTTGGTTTTGGTTCTGGTGTTTTGGCTTATTGCTTAGTTTGTAAAGTTGCTTTTTTTGTTTTAGGTGAACGTAAGGTTT 7581

ND1
M V V F G L V S G V F G L L L S L L I V A F F V L G E R K V

TAGGTTATTCTCAGTTTCGTAAGGGTCCTAATAAGGTTGGTTTTGCTGGTTTTGTCAGAGATTTGCTGATTGTTAAAGTTAGTGATCAAGTTAAGAATTTTTATTTTCAAAGTCGTAGGTATATTGGTTT 7714

ND1

L G Y S Q F R K G P N K V G F A G L L Q S F A D L L K L V I K F K N F Y F Q S R S Y I G L

GTTGGGCGTTTTTTGTTAATAATTTGGTTATTATATATTCTTTATTTATGGTAGATATTATAGTGTTAGTTATAATAGTCTTTCAGTATTGTTGGTTTTAGCTGTTGCTAGTATTCTAGGTATTCTTTG 7847

ND1

L G V F L L I I L V I I Y S F I Y G S Y Y S V S Y N S L S V L W F L A V A S I S S Y S L

TTGTGTGCTGGTTGGGGTAGTTACAATAAATTCGTTTTTAAGTTCTGTTTCGATGTGCTTTTGGGCTGTTAGGTTTGAAGCTTGTTTTATGTGTGTGGTAATTTTTGTTCTTTGTTACTGTAGGTATA 7980

ND1

L C A G W G S Y N N Y S F L S S V R C A F G S V S F E A C F M C V V I F C S L C Y C S Y

ATTTGATTGATTTTTATTATAGTTGTTGATGAAGCTTGTGTGTTCCATTGATTTATGGATTGTTTTGGTGTGTGTGCTATGTGAGACTAATCGTATACCATTGATTATGGGGAGTCTGAAAGGGAGTT 8113

ND1

N L I D F Y Y S C W W S L L L F P L I Y G L F L V C V L C E T N R I P F D Y G E S E S E L

AGTTAGTGGGTTAATGTTGAGTATAGCGGTATATACTTTACGTGTTGTTTTGCTTGTGAGTATATAGTTGTATATGTGTTTTTCAGGTTGATTGTTGTAATGATGGTTGGTGGTTTTGTTGGTTTGT 8246

ND1

V S G F N V E Y S G I Y F T C L F A C E Y I V V Y V F S W L I V V M M V G G G F V G L F

ATGTTGTTGTTAATTTATTATTTTTATGTGAGCTCGGGCAACGTTACCTCGTTCGTTATGATTTATTTGTGAAATTTTCTGAGAGGTTTGTATGTTTACTGATTTTAGGATTTTTGTTATTGTTA 8379

ND1

M L L F N L L F F M W A R A T L P R V R Y D L F V N F F W E V C L C L L I L G F F V I V

ATTAGATTTATGGTAATCAATGTCTGTATAGATTATTTAAATCGTGATGCTGTTAACTTCAAGAAATGGTTATTTCCATTATGGTCGGTTATGCTTACTTTAGTTTAATTGTAGAATGTGGGTTTTGGGGAT 8512

-ND1
N .

tRNA-Asn tRNA-Pro

CCTTGGTCTCGTTGAGAGGTTTGATTAATAGGGCTGCATGGCAGGTTACTTTGATATAGTAAATTTGGAATTTATTTCCGTTAATTTTTGACTCATATATCTAATGTTGCGAAGAGCTGAGTTCTTACCTC 8645

tRNA-Pro tRNA-Ile tRNA-Lys

AGTAATGTGGTTATCACTGTGGGTTATGGTTGTTTTGTTTTTTGTTTTTTGTTTTTTGTTGGGTTTTGTTATTTATTTTTTAATCTGGGTTATTGAATAAGTTGGTGATTTGGGTTTCAGTGG 8778

tRNA-Lys ND3

M V V L F F V F F V F F L L G F V I Y F F N S G L L N K F G D F G F Q W

TGTAGTTCCTATGAGTGTGGCCTTTTTCTGCTATGGTTAATTTAAATTGTTTTAGGTTTACTTATTTTTATTGTTGGTGGTGTGTTGTTATTTTTGACTTGGAGATATCTCTGTTGTTAAATATGCCTTCTC 8911

ND3

C S S Y E C G F F S A M V N L N C F S F T Y F S L L V V F V I F D L E I S L L L N M P S

AAGGGGTTTTGTTGGTAATTTTTGGTATTATTATTTTTTTTTGTTTGTATGTTTTGGGTTTGTGTGGAGTTGTTAGTGGATATGTGCGTTGAGTTTATTAATAGGTGTGGTTAGAGAAAATTGTGGA 9044

ND3

Q G V L F G N F W Y Y Y F F L F V M F F G F V V E L F S G Y V R W V Y . tRNA-Ser

GTTACTGCTAATAATTTTGTGTCATTTAGGTTTGACTTTCTCTTTGGTTGGTGAAGATTAAGTTATTTTTGACTGTATGTTTTCAAACATTTAGGGGCTGGTTGGTCATCTTATGGATATGAGAGTGGTGT 9177

tRNA-Ser tRNA-Trp CO1
M S V V

GATTAGGTAGTTGGGTATTGACTTTGGATCATAAGCGTATTGGAGTGATTTATAGATTATTAGGTATATGGTCTGGTTTTGTTGGTTTAAGTTTTAGTTTGTGATTCTGTTAATTTTTGGAGCCTTATTA 9310

CO1

W L G S W V L T L D H K R I G V I Y S L L G I W S G F V G L S F S L L I R V N F L E P Y Y

TAATGTTATACCTTTGGATTGTTATAATTTTTGGTGACTAATCATGGTATAATAATGATCTTTTTTTTTGATGCCTATATTAATGGTGGGTTGGTAATTATTTATGCCTTTGTTGGGTGGTTTGTCT 9443

CO1

N V I P L D C Y N F L V T N H G I I M I F F F L M P I L I G G F G N Y L L P L L G G L S

GATTTGAATTTGCCACGTTTGAATGCTTTGAGTGCCTGGCTTTGATTCCCTCATTAGTTTTGTTGTTGATTAGTATGTGTTGGGTGCTGGTGTGGTTGGACTTTTTATCCTCCATTGCTTCTTCATATT 9576

CO1

D L N L P R L N A L S A W L L I P S L V L L L I S M C L G A G V G W T F Y P P L S S S Y

TTTCTAGGAGTAGTGGTGTGATTTTTGATGTTTTCTTTCATTAGCAGGTGTTCTAGAGTTTTAGTCTATAAATTTTATTTGACTTTGTATAGTTTTTATGACTAATGATTTTTCTCGGACTTC 9709

CO1

F S S S S G V D F L M F S L H L A G V S S V F S S I N F I C T L Y S V F M T N V F S R T S

TATTGTTCTTTGGTCATATTTATTTACTTCTATTTTATTGTTAGTGACGTTGCCGTGTTTTGGCTGCTGCTATTACTATGCTTTTTGTTGATCGTAAATTTGTTCTGCTTTTTTTGATCCGTTAGGTGGTGGT 9842

CO1

I V L W S Y L F T S I L L L V T L P V L A A A I T M L L F D R N F C S A F F D P L G G G

GATCCTATTCTATTTTCAGCATATGTTTTGGTTTTTTGGTCATCCGGAGGTTTATGTTTTGATTCTGCCTGGATTTGGTATAATTAGTCATATTTGTTAAGTATAAGTGGTAATTTTATGCGTTTTGGGTTTT 9975

CO1

D P I L F Q H M F W F F G H P E V Y V L I L P G F G I I S H I C L S I S G N F D A F G F

TTATAGTTGGTAGTACCTGCCCAATGTTGGTTATTAATGGCCGACAGTATATTGACTGTGCAAAGGTAGCATAATTAATTGCCTTTAATTGGAGGCTTGTGTTGAATGGTTTGACGTGATAGGTATGAATATT 11438

LSU rRNA

TGGCATTGATTGAAATGATTTTGGAGGTTTAGAATCCTTTATGTTTAATAAGACGGAAAGACCCTAGGATCTTTTATTTTTTGTGTTGGGGCAAATTGTGATATTTTATGGATATGTGACCCTGAGATGT 11571

LSU rRNA

ATTGTTTGTGAGTTAAGTTACCCTAGGGATAACAGTGATGATTAATTAGAGGCTTATCGAATTAATTGTTTCCACCTCGATGTTGACTTAGGCTGTGATCTTGGTGTAGTAGTTGAGATTTTTGGTC 11704

LSU rRNA

TGTTGACCTTTTTAGCCTCCATGAGTTGAGTTAAGACCGGCGTAAGCCAGGTCGGTTCCTATCTATTGTAGAAGTTTATCAGTACGAAAGGACAGTAGACTTTTTTGTGGAATGCGAGTAATGGTTGGTTTT 11837

LSU rRNA tRNA-Cys

GCAAAGCTGATTAGGGTTGTTGTGATTGACCCCGTGTGTTTATTTGTTAACTGTGGCAATAAGAAGTTTGCCTCATTGGCTGCATGAAGTTGTTTATTAGTTTATTGGATTATGTTTTCTGATTGATTTT 11970

tRNA-Cys SSU rRNA

ATCAGCAGTTGATTTTTGTTTGAACGAGAGTTCTATAAGGATGATGCAATTAAGGGGATAGGACACAGTGCCAGCATCTCGGTTAGTCTGTTTTCTTTGCTTTTATGTGGATTATTGGTGTGTTTTATG 12103

SSU rRNA

TGCAATGTTAGGTTAAATTTTTTGTGTTATGGTGTGTATAAATAAATTTGTTAAGATATATGTGGTGACAGGGATTAGATACCCCATTAATATATTTTGTAAAGGTTGTTCTAGTTTTGTAACAAAATGGTT 12236

SSU rRNA

TGGCAGTGAGTGATTCTTGTAGGGGAAGATGCATAGTAAAGGATGGTCCACCTATTAATTTACTCTTTTATGTTGGTGTATGCTGGTTAATATTATTGTTTAGTAATGTAAGTTTGTGATGTTTTAGTT 12369

SSU rRNA

AAGCTAAGTCTATGTGCTGCTTATAAGAGTTTTTGTGTGTTACATTGATAGGAATATTGTTGTAATATGGTATTGTTTAGGACTTAATAGTAATGTTTGAATTAGTTTGTGATGTGAATTGAGTTTAGCTCA 12502

SSU rRNA

GGTACACACCGCCGTCACCCTCGGTTATTACTGAGGTAAGTCGTAACAAGGTAACCTTAAATGAATTTGAAGTTAATTATTAGGTTGTGCTAATTAGAGTGAAATTGTCATTATTGATTATGATATTGTGT 12635

SSU rRNA CO2
V N L S L L Y Y D I V

GTTATATTGGCTGCTGTGTGTTTATTATATGTTTTGTTGATGTTTTGTTGTTGTTGGAATGTTGTGGTTGGTGTAGGTAGTGTAAATTTGGTGGGGAAAATCAGGCCGTTGAGTTGATGAACATAGT 12768

CO2
C Y I V A V C V F I I C F V Y V L L C W N V V V G V G S V N F G G E N Q A V E L I W T I V

Site and Sequence

TCCTACTTTGATTGGTGGTATGTTGCTTTGAAAGTGAATTTTACTAGAAAATTTGGATTGTTTCTCTGAGACTATAAAGATTGTTGGTCATCAGTGGTATTGGACTTATGAATATCTGATGGT
12901

-----CO2-----
P T L I V L V L C A L N V N F I T S N L D C F S S E T I K I V G H Q W Y W T Y E Y S D G
IGTTATGATCGTTCCCTGGTGATAAATTTATGGTTGATAAGCCTTGCGAATGATTTATGGTTTCCGCTACACTTAGTGGTTACGCTGGGATGTTATTCATTCGTTTTTGTGCCITCGTTGAATT
13034

-----CO2-----
C Y D S F P V G D N F M V D K P L R M I Y G L P Y H L V V T S G D V I H S F F V P S L N
TAAAGATGGATCTATCCGGGTCGCTTAATCAATTTGTTTGTCCCTCAACATGGATCAATTTGTTGGTTACTGCTGAAATATGTTGGTAAATCATGGTGTGATGCCCTATTTGTTGGAGGTTAT
13167

-----CO2-----
L K M D A I P G R L N H L F F C P S Q H G S F V G Y C A E L C G V N H G V M P I V V E V I
TGGTGATTGTTAGGTTGATGCTGTTTAGTATAATGATTAATGTTAGCTTTCGCTTAAAGATGGTTGTTTAACTGAACAGATTTATGTTGGAGGTTTAGTAGTTATGTAT
13300

-----CO2-----
G D C C .
----- tRNA-Glu -----> M L L E V L V V M Y -----ND6-----
TTTTGTGTTGGTGCCTTTTTTACTAGTCATGTATATATTGTTGTTGGTAAATCGGTTGTTGGCTGGTGTATGTTATGTTAGTTATGGTTAGTTGGTATTCCTTGCCTTTGT
13433

-----ND6-----
F C V L V L F C F T S H C I Y Y C V L L V N A L L A G C I C Y V V Y G F S W Y S L L L
GTTTAGTTATAGTGGTGTATATATTGTTTGGTGGTGTAGTCCAAATAGTATTTGTTTATATAGTGGTGTATGGGTTAGTTTATGGGTTATTTGGTTTTGGGTTATTTGT
13566

-----ND6-----
C L V Y I G G V Y I L F I F V S V F S P N S S F V L Y S G A Y G V S L W V L F G F G L F V
ATGTTGTTGTTAGTTGGTTAAAGTGGAGTTTAGAAGTGTTATGTTAGTGTAGAGAGGGTTGGTTATTTGTTGTTGTTGACTTTAGTTGGTTTTTGGTTAAAGTATTACTA
13699

-----ND6-----
C S L V C Y V L V N V E F S S V L C S A S E G W L Y L C L C L T L V F G F L V L S I I L
AGGAGTAAGGTAATAATTTTCGTTAATGGTTATATAG
13738

-----ND6-----
S S K V N F Y R .

图 3

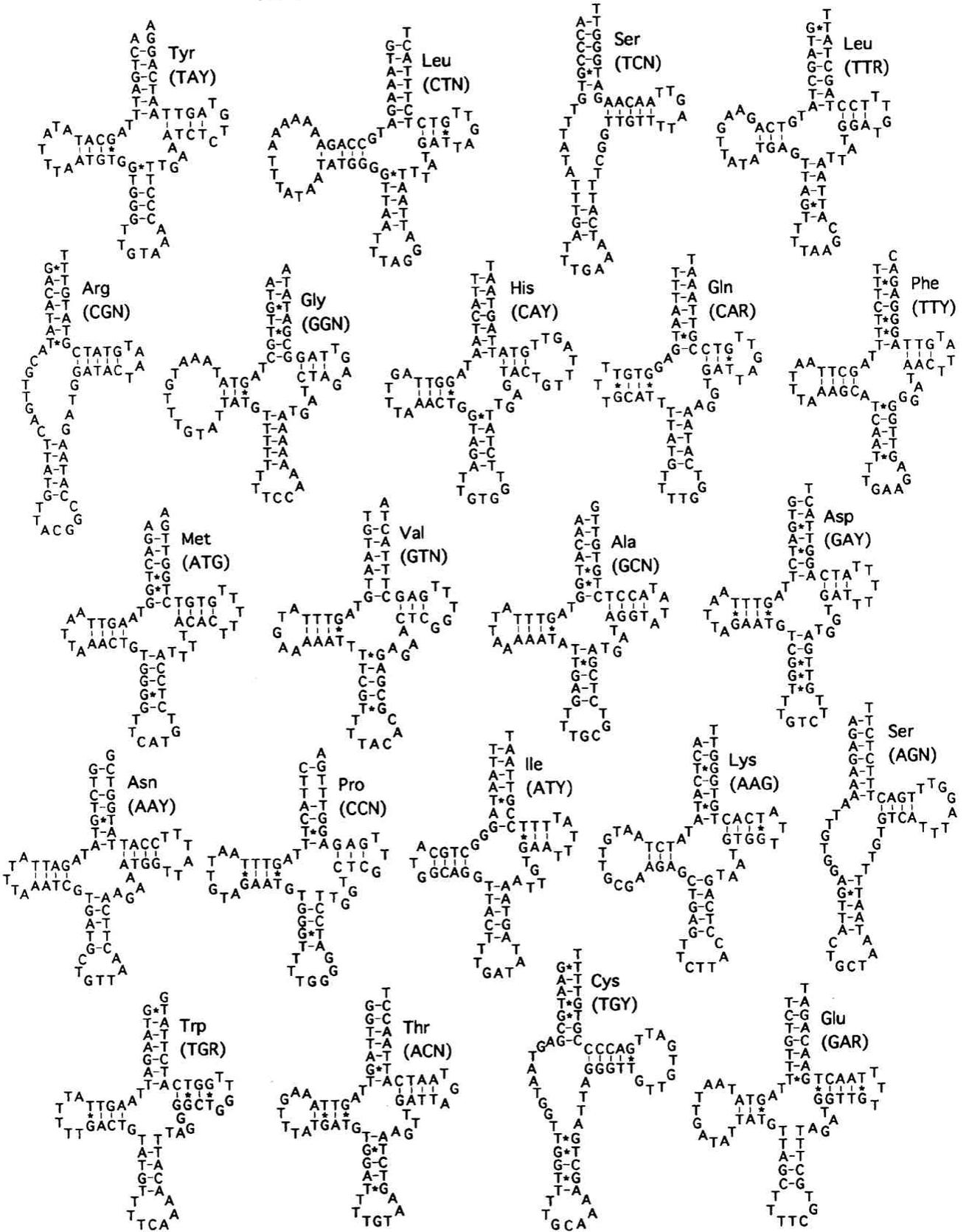


表 1

Similarity of predicted genes of *E. multilocularis* mtDNA to other sequences in protein database

Protein genes (size)	Localization of the gene	BLAST homology search*		
		Score	Description (Phylum)	Accession no.
CO1 (535 aa)	9165-10772	522	<i>Drosophila yakuba</i> (Arthropoda), CO1	PIR, ODF1Y
CO2 (194 aa)	12602-13183	132	<i>Lumbricus terrestris</i> (Annelida), CO2	PIR, S58986
CO3 (215 aa)	2392-3039	94	<i>Mus musculus</i> (Vertebrata), CO3	PIR, OTMS3
Cytb (355 aa)	3111-4178	287	<i>Equus grevyi</i> (Vertebrata), Cytb	PIR, S17410
ATP6 (171 aa)	5865-6380	53	<i>Katharina tunicata</i> (Mollusca), ATP6	PIR, S50330
ND1 (297 aa)	7491-8384	187	<i>Katharina tunicata</i> (Mollusca), ND1	PIR, S50336
ND2 (293 aa)	6389-7270	53	<i>Ascaris suum</i> (Nematoda), ND2	PIR, S26018
ND3 (115 aa)	8671-9018	63	<i>Caenorhabditis elegans</i> (Nematoda), ND3	PIR, S26036
ND4 (404 aa)	4455-5669	122	<i>Ascaris suum</i> (Nematoda), ND4	PIR, S26021
ND4L (86 aa)	4189-4449	35	<i>Albinaria coerulea</i> (Mollusca), ND4L	PIR, S59145
ND5 (524 aa)	569-2143	194	<i>Caenorhabditis elegans</i> (Nematoda), ND5	PIR, S26037
ND6 (151 aa)	13271-13726	50	<i>Artemia franciscana</i> (Arthropoda), ND6	PIR, S60647

* PIR protein sequence database release 61 was used. The metazoan sequences showing the highest BLAST score to each query sequence were described.

表 2

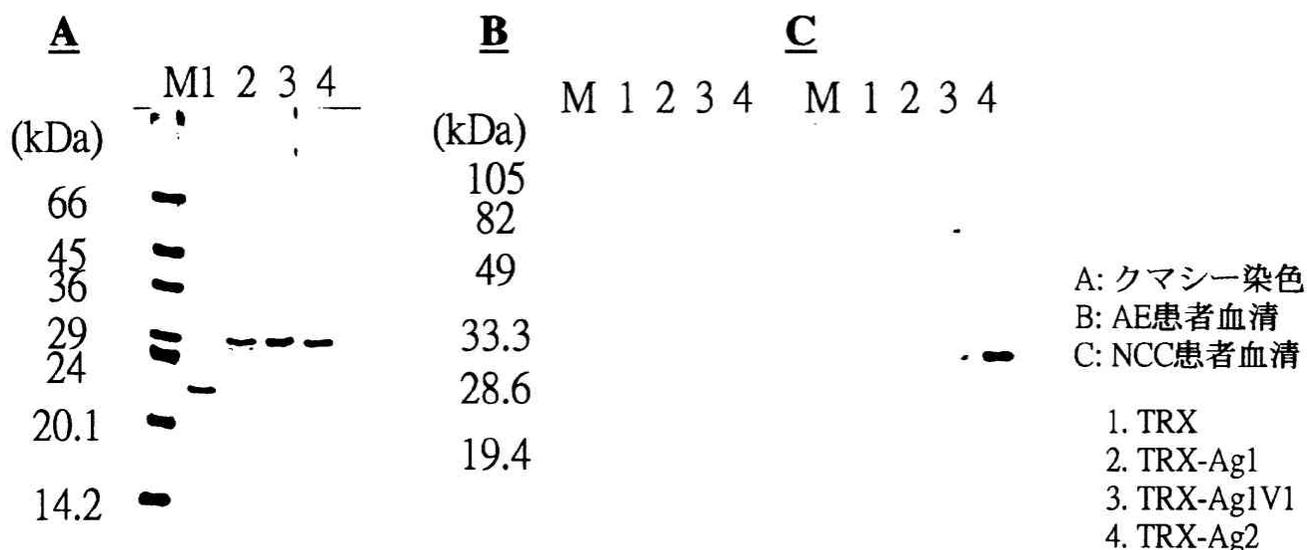
Codon usage in 12 mitochondrial protein genes of *E. multilocularis* and *A. suum*

	<i>E.m.</i>		<i>A.s.</i>		<i>E.m.</i>		<i>A.s.</i>		<i>E.m.</i>		<i>A.s.</i>	
TTT	402 (Phe)	484 (Phe)	TCT	99 (Ser)	144 (Ser)	TAT	193 (Tyr)	154 (Tyr)	TGT	144 (Cys)	60 (Cys)	
TTC*	13 (Phe)	9 (Phe)	TCC	2 (Ser)	3 (Ser)	TAC*	19 (Tyr)	16 (Tyr)	TGC*	4 (Cys)	0 (Cys)	
TTA*	181 (Leu)	142 (Leu)	TCA*	36 (Ser)	6 (Ser)	TAA	4 (ter)	2 (ter)	TGA*	33 (Trp)	27 (Trp)	
TTG	271 (Leu)	304 (Leu)	TCG	21 (Ser)	9 (Ser)	TAG	8 (ter)	7 (ter)	TGG	59 (Trp)	48 (Trp)	
CTT	24 (Leu)	57 (Leu)	CCT	45 (Pro)	72 (Pro)	CAT	46 (His)	53 (His)	CGT*	34 (Arg)	30 (Arg)	
CTC	0 (Leu)	0 (Leu)	CCC	0 (Pro)	0 (Pro)	CAC*	3 (His)	1 (His)	CGC	1 (Arg)	0 (Arg)	
CTA*	7 (Leu)	4 (Leu)	CCA*	13 (Pro)	1 (Pro)	CAA*	10 (Gln)	17 (Gln)	CGA	7 (Arg)	1 (Arg)	
CTG	14 (Leu)	6 (Leu)	CCG	13 (Pro)	10 (Pro)	CAG	14 (Gln)	26 (Gln)	CGG	9 (Arg)	2 (Arg)	
ATT	148 (Ile)	200 (Ile)	ACT	65 (Thr)	86 (Thr)	AAT	87 (Asn)	107 (Asn)	AGT	114 (Ser)	127 (Ser)	
ATC*	4 (Ile)	10 (Ile)	ACC	0 (Thr)	7 (Thr)	AAC*	1 (Asn)	5 (Asn)	AGC*	7 (Ser)	4 (Ser)	
ATA	67 (Ile)	44 (Met)	ACA*	9 (Thr)	8 (Thr)	AAA	18 (Asn)	29 (Lys)	AGA	32 (Ser)	29 (Ser)	
ATG*	90 (Met)	131 (Met)	ACG	14 (Thr)	6 (Thr)	AAG*	43 (Lys)	65 (Lys)	AGG	33 (Ser)	34 (Ser)	
GTT	238 (Val)	263 (Val)	GCT	59 (Ala)	92 (Ala)	GAT	74 (Asp)	70 (Asp)	GGT	155 (Gly)	144 (Gly)	
GTC	9 (Val)	9 (Val)	GCC	4 (Ala)	5 (Ala)	GAC*	2 (Asp)	6 (Asp)	GGC	5 (Gly)	6 (Gly)	
GTA*	75 (Val)	37 (Val)	GCA*	8 (Ala)	5 (Ala)	GAA*	17 (Glu)	25 (Glu)	GGA*	19 (Gly)	18 (Gly)	
GTG	114 (Val)	67 (Val)	GCG	11 (Ala)	2 (Ala)	GAG	46 (Glu)	50 (Glu)	GGG	54 (Gly)	39 (Gly)	

Data for *A. suum* (Okimoto *et al.*, 1992) were utilized for comparison. Amino acids and termination codon are shown in parentheses. Asterisks indicate the codons corresponding to tRNA genes present in *E. multilocularis* mtDNA.

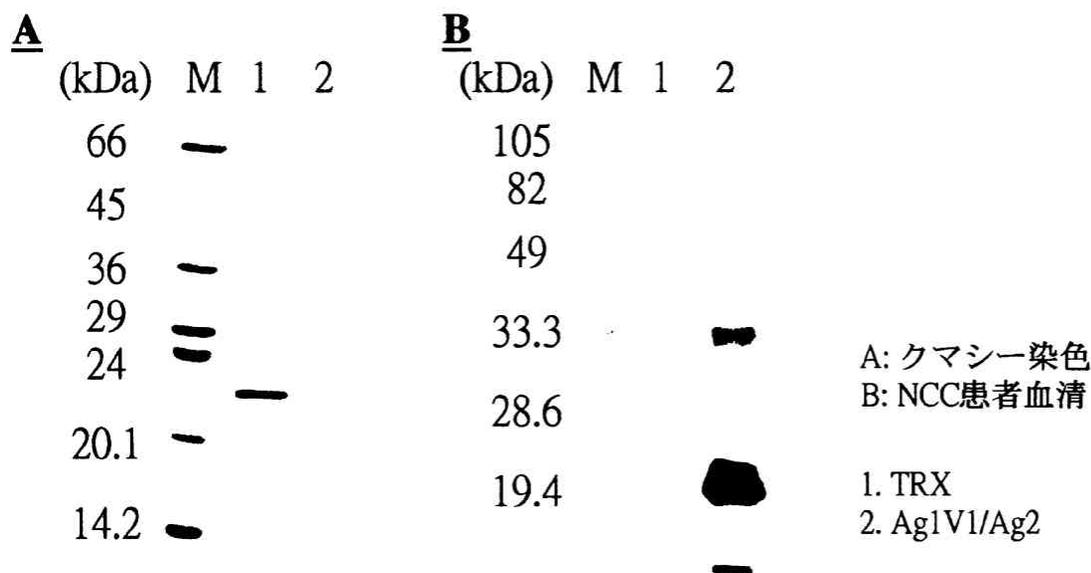
有鉤囊虫症血清診断用抗原遺伝子のクローニング —組換え蛋白質を用いた血清診断法の開発—

1) 組換え蛋白質の発現およびイムノブロット解析

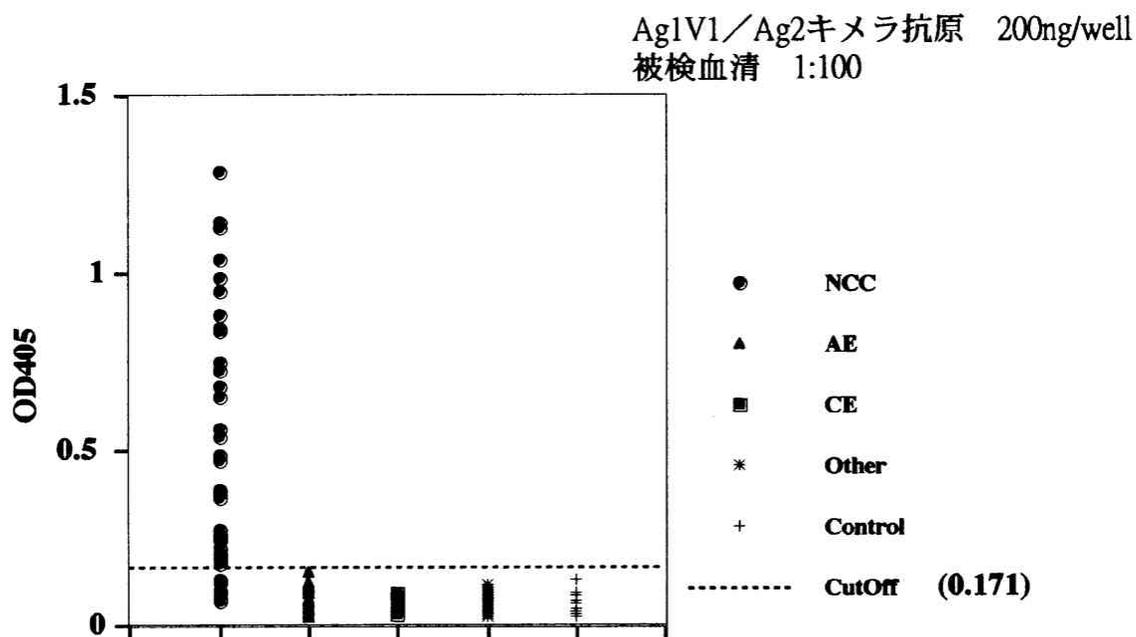


有鉤囊虫cDNAライブラリーより得られた診断用抗原候補遺伝子が大腸菌により発現させ、患者血清を用いたイムノブロット解析を行った。抗原遺伝子はThioredoxin(TRX)融合蛋白質として発現させた。

組換え蛋白質はNCC患者血清に特異的に認識され、診断用抗原としての有用性が示された。しかし、抗原Ag1は患者血清に認識されるものの、その抗原性は他の2種の抗原に比較して極めて低いことが明らかとなった(結果上)。そこで、血清診断用抗原としてAg1V1およびAg2を使用することとし、Ag1V1とAg2の融合蛋白質を発現させイムノブロット解析を行った(結果下)。この組換え蛋白質はTRXを含んでいない。



2) Ag1V1/Ag2キメラ抗原を用いたELISA



NCC: neurocysticercosis (40)

AE: alveolar echinococcosis (35)

CE: cystic echinococcosis (10)

Other: other parasitic diseases (70): clonochiasis (10) sparganosis (10)

fascioliasis (8) paragonimiasis (32)

schistosomiasis (10)

Control: healthy human (10)

	陽性数/被検数	%
NCC患者血清 :	35/40	87.5
AE患者血清 :	0/35	0
CE患者血清 :	0/10	0
他寄生虫症患者 :	0/70	0
Healthy :	0/15	0

【研究発表リスト】

欧文報告書（国際誌）（Peer Reviewed International Journals）

- 1) Ito A, Margono SS, Simanjuntak GM, T. Taufa, Flew SS (2000)
Neurocysticercosis in Irian Jaya and Papua New Guinea. *Lancet* (submitted).
- 2) Subahar R, Hamid A, Purba W, Suroso T, Watanabe S, Nakao M, Sako Y, Nakaya K, Margono SS, Ito A (2000)
Taenia solium neurocysticercosis in Irian Jaya, Indonesia: Serological survey of pigs in Jayawijaya District 1999. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* (submitted).
- 3) Craig PS, Giraudoux P, Shi D, Bartholomot B, Barnish G, Delattre P, Quere JP, Harrage S, Wang Y, Lu F, Ito A, Vuitton DA (2000)
An epidemiological and ecological study of human alveolar echinococcosis transmission in south Gansu, China (submitted).
- 4) Andreassen J, Ito A, Ito M (2000)
Hymenolepis microstoma: direct life cycle in NMRI-nude and NOD-scid mice. *International Journal for Parasitology* (submitted).
- 5) Ito A, Nakao M, Sako Y, Nakaya K (2000)
Neurocysticercosis and echinococcosis in Asia: Recent advances in the establishment of highly reliable differential serodiagnosis for international collaboration. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* (Supplement) (in press).
- 6) Wandra T, Subahar R, Simanjuntak GM, Margono SS, Suroso T, Okamoto M, Nakao M, Sako Y, Nakaya K, Schantz PM, Ito A (2000)
Resurgence of cases of epileptic seizures and burns associated with cysticercosis in Assologaima, Jayawijaya, Irian Jaya, Indonesia, 1991-95. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **94**, 1-5.

- 7) Ito A, Plancarte A, Nakao M, Nakaya K, Ikejima T, Piao ZX, Kanazawa T, Margono SS (1999)
ELISA and immunoblot using purified glycoproteins for serodiagnosis of cysticercosis in pigs naturally infected with *Taenia solium*. *Journal of Helminthology* **73**, 363-365.
- 8) Qiu JM, Liu FJ, Wang H, Ito A, Schantz PM (1999)
A survey of hydatid disease (echinococcosis) in Tibetan populations in China: Correlation of ultrasound and radiologic imaging and serologic results. *International Archives of Hydatidosis* **33**, 211-213.
- 9) Ito A (1999)
Differential serodiagnosis for larval cestode infections: cystic echinococcosis, alveolar echinococcosis and neurocysticercosis. *International Archives of Hydatidosis* **33**, 166-170.
- 10) Kimura M, Nakamura T, Iwamoto A, Nishimura Y, Egawa T, Ito A (1999)
Cystic echinococcosis in a Jordanian patient: albendazole in a short-term immigrant. *Journal of Travel Medicine* **6**, 249-253.
- 11) Wang IC, Ma YX, Guo JX, Chung WC, Lu SC, Ito A, Fan PC (1999)
Oncospheres of *Taenia solium* and *T. saginata asiatica* develop into metacestodes in normal and immunosuppressed mice. *Journal of Helminthology* **73**, 183-186.
- 12) Willingham III AL, Johansen MV, Bøgh HO, Ito A, Andreassen J, Lindberg R, Christensen NØ, Nansen P (1999)
Congenital transmission of *Schistosoma japonicum* in pigs. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **60**, 311-312.
- 13) Ito A, Ito M (1999)
Human *Taenia* in Severe Combined Immunodeficiency (SCID) mice. *Parasitology Today* **15**, 64-67.

- 14) Ohsaki Y, Matsumoto A, Miyamoto K, Kondoh N, Araki K, Ito A, Kikuchi K (1999)
Neurocysticercosis without detectable specific antibody. *Internal Medicine* **38**, 67-70.
- 15) Ito A, Nakao M, Ito Y, Yuzawa I, Morishima H, Kawano N, Fujii K (1999)
Neurocysticercosis case with a single cyst in the brain showing dramatic drop in specific antibody titers within 1 year after curative surgical resection. *Parasitology International* **48**, 95-99.
- 16) Ito A, Ma L, Schantz PM, Gottstein B, Liu YH, Chai JJ, Abder-Hafez SK, Altintas N, Joshi DD, Lightowlers MW, Pawlowski ZS (1999)
Differential serodiagnosis for cystic and alveolar echinococcosis using fractions of *Echinococcus granulosus* cyst fluid (antigen B) and *E. multilocularis* protoscolex (Em18). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **60**, 188-192.
- 17) Ito A, Plancarte A, Ma L, Kong Y, Flisser A, Cho YS, Liu YH, Kamhawi S, Lightowlers MW, Schantz PM (1998)
Novel antigens for neurocysticercosis: simple method for preparation and evaluation for serodiagnosis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **59**, 291-294.
- 18) Niwa A, Asano K, Ito A (1998)
Eosinophil chemotactic factors from cysticercoids of *Hymenolepis nana*. *Journal of Helminthology* **72**, 273-275.
- 19) Yang HJ, Chung JY, Yun DH, Kong Y, Ito A, Ma L, Liu YH, Lee SC, Kang SY, Cho SY (1998)
Immunoblot analysis of a 10 kDa antigen in cyst fluid of *Taenia solium* metacestodes. *Parasite Immunology* **20**, 483-488.
- 20) Kong Y, Ito A, Yang HJ, Chung YB, Kasuya S, Kobayashi M, Liu YH, Cho SY (1998)
Immunoglobulin G (IgG) subclass and IgE responses in human paragonimiasis

caused by three different species. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **5**, 474-478.

21) Ito A, Ma L, Paul M, Stefaniak J, Pawlowski ZS (1998)

Evaluation of Em18-, Em16-, Antigen B-Western blots, Em2^{plus}-ELISA and four other tests for differential serodiagnosis of alveolar and cystic echinococcosis patients in Poland. *Parasitology International* **47**, 95-99.

22) Ito A, Okamoto M, Ishiguro T, Ma L, Suzuki H, Yasui A, Ahigeta H, Matsuura T, Hosokawa T, Chai JJ (1998)

An imported case of cystic echinococcosis in Japan diagnosed by imaging and serology with confirmation of *Echinococcus granulosus*-specific DNA sequences. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **58**, 790-792.

23) Ito A, Sakakibara Y, Ma L, Asano K, Takiguchi M, Yasuda J, Hashimoto A (1998)

Ultrasonographic and serologic studies of experimental cysticercosis in rats infected with *Taenia taeniaeformis*. *Parasite Immunology* **20**, 105-110.

24) Nakaya K, Oomori Y, Kutsumi H, Nakao M (1998)

Morphological changes of larval *Echinococcus multilocularis* in mice treated with albendazole or mebendazole. *Journal of Helminthology* **72**, 349-354.

25) Sato Y, Nakao M, Nakaya K, Ito A (1998)

Experimental infection of larval *Echinococcus multilocularis* in the rodent brain as a model for cerebral alveolar echinococcosis. *Journal of Helminthology* **72**, 59-64.

和文報告書 (Nos. 1, 6 のみを集録)

1) 伊藤 亮 (1999)

条虫感染における免疫 (2) 組織寄生 (幼条虫) 日本における寄生虫学の研究 第7巻6章. 319-329.

2) 辻守康、近藤力王至、伊藤 亮 (1999)

寄生蠕虫症の免疫診断 日本における寄生虫学の研究第 6巻5章. 441-454.

3) 伊藤 亮、中尾 稔、迫康 仁、中谷和宏 (1999)

東南アジア、アフリカにおける難治性寄生虫病 (有鉤囊虫症、エキノコックス症) : 伝統的生活習慣のイリアン・ジャヤ (インドネシア)、青海省、四川省 (中国)、ケニア、タンザニアからの話題。熱帯病予防対策に効果を及ぼす文化と環境・開発の均衡要因に関する研究 (平成11年度長崎大学熱帯医学研究所研究集会研究報告書) pp. 81-84.

4) 伊藤 亮、中尾 稔 (1999)

単包性エキノコックス症と多包性エキノコックス症との鑑別のための血清診断. 病原微生物検出情報 20, 5.

5) 伊藤 亮 (1999)

現在進行中の有鉤囊虫症関連の国際協力。熱帯医学分野に連携した技術協力の社会環境変化に及ぼす影響 (平成10年度長崎大学熱帯医学研究所共同研究集会報告書) pp. 52-54.

6) 伊藤 亮 (1998)

囊虫症の新しい血清診断法. 検査と技術 26, 391-393.

7) 伊藤 亮 (1998)

アジアにおける包虫症、囊虫症に関する国際協力の事例 : 特に中国、インドネシアについて。熱帯病による経済的損失 (平成10年度長崎大学熱

帯医学研究所研究集会報告書) pp. 81-86.

8) 伊藤 亮 (1998)

アジアにおける伝統的食文化と人畜共通寄生虫病、テニア症との関わり。
日産科学振興財団研究報告書 **21**, 57-60.

口頭発表（外国、国際学会）

- 1) Schantz PM, Liu FJ, Qiu JM, Wang H, Ito A (1999)
Echinococcosis in Tibetan populations in China: an urban focus of *Echinococcus multilocularis*. 48th Annual Meeting of American Society of Tropical Medicine and Hygiene. (Washington DC, 28 November-2 December).
- 2) Ito A. (1999)
Differential serodiagnosis for larval cestode infections: cystic echinococcosis, alveolar echinococcosis and neurocysticercosis. 19th International Congress of Hydatidology (San Carlos de Bariloche, 20-24 September).
- 3) Qiu JM, Liu FJ, Wang H, Ito A, Schantz PM (1999)
A survey of hydatid disease (echinococcosis) in Tibetan populations in China: correlation of ultrasound and radiologic imaging and serologic results. 19th International Congress of Hydatidology (San Carlos de Bariloche, 20-24 September).
- 4) Nakao M, Yokoyama N, Fukunaga T, Ito A (1999)
The complete mitochondrial DNA sequence of *Echinococcus multilocularis* and its contribution to the phylogeny of platyhelminthes. 19th International Congress of Hydatidology (San Carlos de Bariloche, 20-24 September).
- 5) Feng, Fu, Ito A, Craig PS, Wen H (1999)
Serological study of human echinococcosis survey in Habahe Country, North Xinjiang, China. 19th International Congress of Hydatidology (San Carlos de Bariloche, 20-24 September).
- 6) Hamid A, Subahar R, Nakaya K, Margono SS, Nakao M, Purba W, Ito A (1999)
Secondary epilepsy possibly caused by neurocysticercosis in Jayawijaya, Irian Jaya, Indonesia (a preliminary report). International Symposium on Epilepsy (Prague, Czecho, 12-17 September).

口頭発表（外国、国際学会）

- 1) Schantz PM, Liu FJ, Qiu JM, Wang H, Ito A (1999)
Echinococcosis in Tibetan populations in China: an urban focus of *Echinococcus multilocularis*. 48th Annual Meeting of American Society of Tropical Medicine and Hygiene. (Washington DC, 28 November-2 December).
- 2) Ito A. (1999)
Differential serodiagnosis for larval cestode infections: cystic echinococcosis, alveolar echinococcosis and neurocysticercosis. 19th International Congress of Hydatidology (San Carlos de Bariloche, 20-24 September).
- 3) Qiu JM, Liu FJ, Wang H, Ito A, Schantz PM (1999)
A survey of hydatid disease (echinococcosis) in Tibetan populations in China: correlation of ultrasound and radiologic imaging and serologic results. 19th International Congress of Hydatidology (San Carlos de Bariloche, 20-24 September).
- 4) Nakao M, Yokoyama N, Fukunaga T, Ito A (1999)
The complete mitochondrial DNA sequence of *Echinococcus multilocularis* and its contribution to the phylogeny of platyhelminthes. 19th International Congress of Hydatidology (San Carlos de Bariloche, 20-24 September).
- 5) Feng, Fu, Ito A, Craig PS, Wen H (1999)
Serological study of human echinococcosis survey in Habahe Country, North Xinjiang, China. 19th International Congress of Hydatidology (San Carlos de Bariloche, 20-24 September).
- 6) Hamid A, Subahar R, Nakaya K, Margono SS, Nakao M, Purba W, Ito A (1999)
Secondary epilepsy possibly caused by neurocysticercosis in Jayawijaya, Irian Jaya, Indonesia (a preliminary report). International Symposium on Epilepsy (Prague, Czecho, 12-17 September).

- 7) Ito, Nakao, Nakaya, Subahar, Wandra, Hamid, Purba, Simanjuntak, Suroso, Margono (1999)
Serodiagnosis of cysticercosis in humans and pigs in Irian Jaya, Indonesia. 17th World Association of the Advancement of Veterinary Parasitology (Copenhagen, 15-19 August).
- 8) Ito A, Nakao M, Sako Y, Nakaya K (1999)
Neurocysticercosis and echinococcosis in Asia: Recent advances in the establishment of highly reliable differential serodiagnosis for international collaboration. Joint International Tropical Medicine Meeting 1999 (Bangkok, 4-6 August).
- 9) Kanazawa T, Ito A (1998)
Present status of alveolar echinococcosis in Japan. International Symposium on Echinococcosis. (Urumqi, China, 31 August – 1 September).
- 10) Ito A, Kanazawa T (1998)
Serodiagnosis of alveolar echinococcosis: Comparison of antigenicity of protoscolex and micro vesicle of *Echinococcus multilocularis* prepared from rats. International Symposium on Echinococcosis. (Urumqi, China, 31 August – 1 September).
- 11) Willingham A, Johansen M, Bøgh H, Lindberg R, Ito A, Christensen N, Nansen P (1998)
Congenital *Schistosoma japonicum* infection in pigs. 9th International Congress of Parasitology. (Makuhari, Japan. 24-28 August).
- 12) Kong Y, Ito A, Cho SY (1998)
IgG subclass and IgE responses in human paragonimiasis caused by three different species. 9th International Congress of Parasitology. (Makuhari, Japan. 24-28 August).
- 13) Ito A (1998)

Novel diagnostic antigens for cysticercosis in humans and pigs. 9th International Congress of Parasitology. (Makuhari, Japan. 24-28 August).

14) Schantz PM, Liu FJ, Qiu JM, Wang H, Ito A, Delker C (1998)

A survey of hydatid disease (echinococcosis) in Tibetan populations in China. Preliminary results. 9th International Congress of Parasitology. (Makuhari, Japan. 24-28 August).

15) Okamoto M, Ito A (1998)

Intraspecific variation and the phylogenetic position of *Taenia solium* inferred from the nucleotide sequence of the cytochrome c oxidase subunit I gene. International Symposium on Environmental Adaptation of Echinococcus. (Sapporo, Japan. 18-20 August).

16) Schantz PM, Liu FJ, Qiu JM, Wang H, Ito A, Delker C (1998)

A survey of hydatid disease (echinococcosis) in Tibetan populations in China: Preliminary results. International Symposium on Environmental Adaptation of Echinococcus. (Sapporo, Japan. 18-20 August).

17) Ito A (1998)

International collaboration trials for the control of parasitic diseases in Asia. 26th IATSA Forum. (Suzuka, Japan. 18-20 August).

18) Wandura T, Subahar R, Simanjuntak GM, Suroso T, Margono SS, Ma L, Ito A (1998)

Cysticercosis in Irian Jaya, Indonesia, as an emerging disease: a sero-epidemiological study. International Conference on Emerging Infectious Diseases. (Atlanta, USA. 8-11 March).

参考論文(1997 年発表)

- 1) Ito A (1997)
Serodiagnosis of alveolar echinococcosis: Detection of antibody against Em18 in patients and rodents. *In: Food-borne Parasitic Zoonoses: Current problems, epidemiology, food safety and control* (edited by Waikagul J, Cross JH, Supavej S). *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* **28**, 117-124 (Supplement)
- 2) Ito A (1997)
Differential serodiagnosis of cysticercosis. *In: Forum Cheju-3*, pp 33-38.
- 3) Ito A (1997)
Serodiagnosis of cysticercosis in humans. *In: International Workshop on Cysticercosis*, pp. 100-102.
- 4) Okamoto M, Agatsuma T, Kurosawa T, Ito A (1997)
Phylogenetic relationships of three hymenolepidid species inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA sequences. *Parasitology* **115**, 661-666.
- 5) Blair D, Agatsuma T, Watanobe T, Okamoto M, Ito A (1997)
Geographical genetic structure within the human lung fluke, *Paragonimus westermani*, detected from DNA sequences. *Parasitology* **115**, 411-417.
- 6) Ito A (1997)
Basic and applied immunology in cestode infections: from *Hymenolepis* to *Taenia* and *Echinococcus*. *International Journal for Parasitology* **27**, 1203-1211.
- 7) Ito A, Ma L, Sato Y (1997)
Cystic metacestodes of a rat-adapted *Taenia taeniaeformis* established in the peritoneal cavity of scid and nude mice. *International Journal for Parasitology* **27**, 903-905.

- 8) Ito A, Ito M, Eom KS, Chung WC, Chen CC, Ma L, Endo S, Fan PC (1997)
In vitro hatched oncospheres of Asian Taenia from Korea and Taiwan develop into cysticerci in the peritoneal cavity of female scid (severe combined immunodeficiency) mice. *International Journal for Parasitology* **27**, 631-633.
- 9) Simanjuntak GM, Margono SS, Okamoto M, Ito A (1997)
Taeniasis/cysticercosis in Indonesia as an emerging disease. *Parasitology Today* **13**, 321-323.
- 10) Ma L, Ito A, Liu YH, Wang XG, Yao YQ, Yu DG, Cheng YT (1997)
Alveolar echinococcosis: Em2^{plus}ELISA and Em18-Western blots for follow-up after treatment with albendazole. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **91**, 476-478.
- 11) Fan PC, Chung WC, Eom KS, Ito A (1997)
Vaccination trials against Taiwan Taenia eggs in pigs injected with frozen oncospheres of Taiwan Taenia, Korea Taenia, *T. saginata* or *T. solium*. *Parasitology* **114**, 541-544.
- 12) Nakaya K, Nakao M, Ito A (1997)
Echinococcus multilocularis: mouse strain difference in hydatid development. *Journal of Helminthology* **71**, 53-56.
- 13) Ito A, Wen H, Craig PS, Ma L, Nakao M, Horii T, Pang XL, Okamoto M, Itoh M, Osawa Y, Wang XG, Liu YH (1997)
Antibody responses against Em18 and Em16 serodiagnostic markers in alveolar and cystic echinococcosis patients from northwest China. *Japanese Journal of Medical Science and Biology* **50**, 19-26.
- 14) Ma L, Ito A, Liu YH, Wang XG, Yao YQ, Yu DG (1997)
Evaluation of the diagnostic value of Em18 and Em16 antigens in *Echinococcus multilocularis* by Western blotting. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases* **15**, 65-68.

- 15) Ito A, Chung WC, Chen CC, Ito M, Endo S, Okamoto M, Fan PC (1997)
Human *Taenia* eggs develop into cysticerci in scid mice. *Parasitology* **114**, 85-88.
- 16) Ito A, Ma L, Itoh M, Cho SY, Kong Y, Kang SY, Horii T, Pang XL, Okamoto M, Yamashit T, Lightowlers MW, Wang XG, Liu YH (1997)
Immunodiagnosis of alveolar echinococcosis by enzyme-linked immunosorbent assay using a purified Em18/16 enriched fraction. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **4**, 57-59.
- 17) Kong Y, Chung JY, Yun DH, Kim LS, Kang SY, Ito A, Ma L, Cho SY (1997)
Variation of antigenic proteins of eggs and developmental stages of *Paragonimus westermani*. *Korean Journal of Parasitology* **35**, 197-202.