

条虫の石灰小体の性状とその機能

長内理大 神谷晴夫

抄録 すべての条虫類は、石灰小体と呼ばれるミネラルを多量に含む構造物を持っている。これが条虫の生存・寄生適応に深くかかわっている可能性が強く示唆されている。しかしながら、その機能については分子生物学的な側面からの知見も含め未知の部分が多い。この総説では、これまでの知見を基に、今後、石灰小体に係わるタンパク質や遺伝子発現などの研究がどのように進んでいくか考察した。

弘前医学 56:37-44, 2005

キーワード: 条虫; エキノコックス; 石灰小体; 機能.

REVIEW

PROPERTIES AND FUNCTIONS OF CESTODE CALCAREOUS CORPUSCLES

Arihiro Osanai and Haruo Kamiya

Abstract All cestodes contain mineral concretions termed calcareous corpuscles and these concretions are likely to be involved in the parasite survival in host environment. Nevertheless, the precise function of calcareous corpuscles is still unclear and has not been studied from the view of biochemistry and molecular biology. This review intends to summarize the published literatures about the properties, formation and function of calcareous corpuscles and to discuss how the biochemical and molecular biological approaches on calcareous corpuscles will be concerned in the host-parasite relationship.

Hirosaki Med. J. 56:37-44, 2005

Key words: cestode; *Echinococcus* spp.; calcareous corpuscles; function.

1. 緒言

石灰小体 (Calcareous corpuscles) は、条虫を特徴付ける構造物である。古くは、18世紀にすでに石灰小体に関する記述があるが¹⁾、実際に生物学的な研究が始まったのは1950年以降で、構成成分、形態、形成過程、化学的性状などについての報告がなされてきた。しかし、石灰小体が、条虫の寄生・生存にいかなる役割を果たしているのか、つまりその機能についてはほとんど明らかに

されていない。今後、エキノコックス症など難治性幼条虫症の駆虫薬開発のために、条虫の巧みな寄生戦略を解析し、その機能を明らかにする過程は避けて通れない。この総説においては、これまでの石灰小体に関わる情報を整理し、また最近少しずつ報告されるようになってきた石灰小体とタンパク質との係わりについてまとめ、さらに石灰小体という条虫特有な構造を標的とした駆虫薬の開発の可能性を探りたい。なお、石灰小体の生理学的研究に関しては、簡潔にかつ網羅的にまとめ

Department of Parasitology, Hirosaki
University School of Medicine
Correspondence: H. Kamiya
Received for publication, January 20, 2005
Accepted for publication, January 31, 2005

弘前大学医学部医学科寄生虫学講座
別刷請求先: 神谷晴夫
平成17年1月20日受付
平成17年1月31日受理

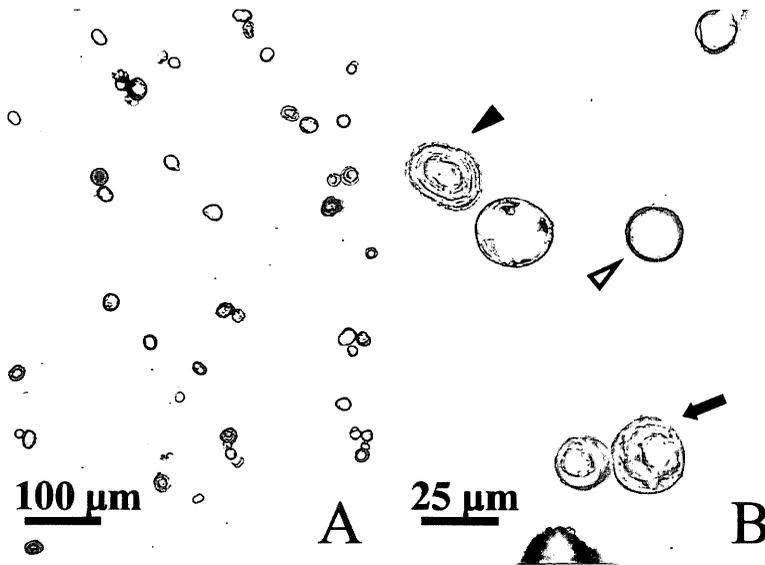


図1 多包虫より精製された石灰小体.

(A)さまざまな大きさや形状の石灰小体が見られる.

(B)層状の膜構造が見られるもの(▲), 形成途中と思われるもの(↑), 内部が層状ではなく空洞様に見えるもの(△)などさまざまな構造の石灰小体が見られる.

られた総説があるのでそちらも参考にさせていただきたい¹⁾.

2. 石灰小体の性状

2-1 石灰小体の大きさや形

石灰小体の大きさについては, 異なる条虫種間で, あるいは同じ種の中であっても, 地域や宿主の違いなどにより変異があるとされるが, 一般的に7~34 μmである²⁾. ただし, 有鉤囊虫(*Cysticercus cellulosae*)の石灰小体は小さく1.5~6 μmであり, これは後述するその形成過程の違いにも関連があると考えられる³⁾.

形状については, 球形または卵形であるが, すべてが平滑な表面ではなく, でこぼこや突起があるものもある^{2,4,5)}(図1).

2-2 石灰小体の形成過程

石灰小体の形成については, 幾種類かの条虫について詳細に研究されている. これまで報告のある条虫では有機物を介して石灰成分が条虫細胞内に蓄積・沈着し, 細胞内部に多重の膜構造が形成されると同時に, 細胞としての機能が失われていく, というプロセスで形成される⁴⁻⁹⁾. 例外として, 排泄管の内腔で細胞を介さずに石灰小体の形成が起こる有鉤囊虫があり³⁾, 前述のように大きさが小さいことから虫体内で異なる機能を果たし

ている可能性が考えられる.

2-3 石灰小体を構成する成分

石灰小体の構成成分について本格的な検討が行われ始めたのは, 1960年代初頭で, ネコ条虫 *Taenia taeniaeformis*の成虫ならびにその幼虫形である帯状囊虫を用いて詳細に検討されている^{2,10-14)}. その後, *Mesocestoides corti*を用いて, 石灰小体が形成される際に使われる無機成分の由来についても詳細に検討されているが¹⁵⁻¹⁷⁾, この項では主としてネコ条虫を用いた研究について述べ, 次項で *M. corti*を用いた仕事について触れる.

2-3-1 無機成分

ネコ条虫の石灰小体内無機成分の同定では, 石灰小体をアルカリ処理, もしくは400度以上に加熱することにより, 有機物を除去した後, X線結晶学的に成分の分析が行われ, カルシウム, マグネシウム, リン, 炭酸が主要構成成分として示されている¹⁰⁻¹²⁾. 各無機成分の割合は, 全無機成分を100とした場合, 帯状囊虫ではカルシウム成分が25, マグネシウム成分が22, リン酸成分が4, 炭酸成分が32, 残りはそれ以外の成分, 一方, 成虫ではカルシウムが28, マグネシウムが17, リン酸成分が11, 炭酸成分が28で残りはそれ以外の成分とされている¹⁰⁾. この中では, リン酸含有量が幼虫と成虫で大きく異なっている.

これは、後に機能の項で述べるように、石灰小体に蓄えられたリン酸が幼虫の発育の際に利用されている、という説を支持する結果である。von Brandら²⁾は、このあと種々の条虫類の石灰小体についてリン酸含有量を調べているが、ネコ条虫の成虫の場合、感染したネコの個体によって石灰小体のリン酸含有量が異なるという結果があり、石灰小体の構成成分に宿主の栄養状態との関連が強く示唆されている。

ただし、石灰小体の無機成分については種間で少しずつ異なっている。例えば、大複殖門条虫 *Diplogonoporus grandis* では、カルシウムに富んだ石灰小体と鉄に富んだ石灰小体があることが、X線解析によって示されているし¹⁸⁾、*Trilocularia acanthiaevulgaris* ではカルシウムに富んでいるがマグネシウムはなく、硫黄が含まれるという報告もある⁹⁾。ただし、それぞれの金属が存在する意義についてはこれからの課題であり、また、各条虫においてすべての石灰小体と同じ金属イオン組成を持つのか、別の金属イオン組成を持つ石灰小体が混在するのかも検討する必要がある。

2-3-2 有機成分

ネコ条虫石灰小体の有機成分に関しては、ガラス製ホモジナイザーを用いて機械的に組織を破碎した後、遠心とろ過を繰り返して精製した石灰小体を用い、常法にしたがって各成分の含量が検討されている¹⁴⁾。炭水化物に関しては、ムコ多糖類は確認されるがグリコーゲン様の糖質は確認されていない。ただし、水溶性の多糖類は石灰小体の調製過程で失われた可能性があり実際にどのような多糖類が含まれるかは検討されていない¹⁴⁾。

脂質については、680mgの石灰小体から477 μ gの脂質が抽出されたという記述があり、含有量0.07%という数字は、条虫全体の比率に比べ小さい。また、その内訳では、通常細胞を構成する脂質二重膜の主構成成分であるリン脂質が全脂質の19%であり、虫体細胞における50%に比べて少ない。これは、石灰小体が細胞膜で囲まれていないことに起因すると考えられている¹⁴⁾。

タンパク質については、窒素含量にして0.29~0.61%であり、これもまた微量である。アミノ酸組成を調べると、虫体の細胞の組成とよく似ているが、カルシウムと相互作用し骨を形成する基盤

となるコラーゲンに含まれるヒドロキシプロリンが検出されず、コラーゲンは存在しないとされている。最近、筆者らは多包虫の石灰小体に存在するタンパク質を酸によって抽出し、さらに濃縮したサンプルを用いてSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、バンドパターンを調べた。その結果、包虫組織全体から抽出したタンパク質を電気泳動した場合と異なり、特に分子量、64kDa、16kDa、10kDa、8.5kDa付近に特に濃いバンドが検出された(長内ら、投稿準備中、図2)。これらのタンパク質の機能については、現在進展しているアミノ酸配列の解析や、分子生物学的手法により明らかになっていくと期待される。

2-4 *Mesocostoides corti*について

これまでは、ネコ条虫を用いた研究を中心に石灰小体の構造・構成成分について述べてきたが最後に *Mesocostoides corti* を用いて行われた実験について簡単に触れる。基本的な構造や構成成分は変わらないが、重要な点は、*M. corti* の幼虫型テトラチリジウムを感染させたマウスの飲み水に、プローブとしてストロンチウムを添加すると、石灰小体の成分にストロンチウムが検出されることである¹⁶⁾。これは、*in vitro*で培地に加えた場合にも同様で、他に砒素、ベリリウム、カドミウム、鉛、ウランなどをプローブとして用いた場合も同様に石灰小体に取り込まれる¹⁷⁾。このことは、条虫が石灰小体の形成に必要な金属を、宿主もしくは環境中から取り込んでいることを示唆する非常に興味深い実験結果である。これと関連して、当研究室でも多包虫を感染させたマウスでは血清中のカルシウム濃度が高いという知見を得ており(塩谷ら、未発表)、エキノкокクス虫体が宿主に働きかけてカルシウムを供給させ取り込みを促進している可能性を推測させる。

3. 石灰小体の機能の考察

これまで述べたように、石灰小体は特徴的な構成をしており、また一部の吸虫、線虫に類似の構造物が見いだされるものの、すべての条虫に必須の構造物であり、条虫の生存に重要な役割を果たしていることが予想される。しかし石灰小体の機能に関する研究は、構成成分が解明されてから50年近く経った現在でもほとんど皆無に等しい。

(A) 12.5%ゲルを用いたSDS-PAGE (B) トリス-トリシンSDS-PAGE

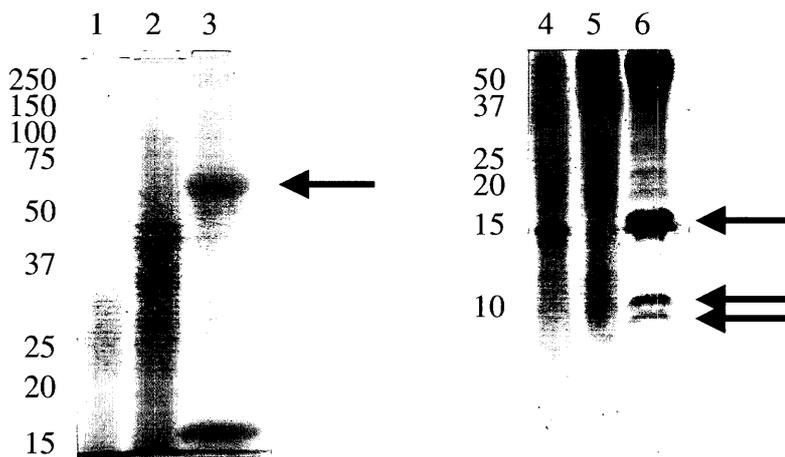


図2 多包虫石灰小体に存在するタンパク質。
 レーン1, 4 包虫由来のタンパク質
 レーン2, 5 原頭節由来のタンパク質
 レーン3, 6 石灰小体由来のタンパク質
 石灰小体に特徴的なタンパク質(←)が存在する。

ただし、その機能については間接的な実験によって、いくつかの推測がなされている。ここでは、石灰小体の機能を示唆する研究について、筆者らのグループの知見も含めて考察したい。

石灰小体の性状と同様、機能についてもネコ条虫を用いた研究が行われている¹⁰⁾。さまざまな培養系でネコ条虫の成虫、幼虫を培養し、その中で、石灰小体の数がいかに変動するかが検討されている。幼虫形については、培地のpHと酸素濃度について、弱酸性・弱アルカリ性、通常酸素濃度・低酸素を組み合わせた培養を行なったところ、弱アルカリ性より弱酸性、通常の酸素濃度より低酸素濃度の方が石灰小体の消費が速いことが明らかにされている。この結果より、石灰小体が酸の中和に使われており、また、低酸素濃度で消費量が速いことは、嫌気的なエネルギー産生で生じたコハク酸や酢酸などの酸を中和するのに、石灰小体が使われている可能性が考えられる。さらに、ネコ条虫に感染したマウスにRI標識したリン酸を投与すると、それらが石灰小体に取り込まれるという知見もある¹²⁾。これらをまとめると、石灰小体は、幼虫の発育期などでATPが必要な時期にリン酸を迅速に供給するための格納庫であり、また宿主に侵入する際の胃酸の攻撃や、低酸素に

適応して嫌気的なエネルギー産生時に生成されるコハク酸などの中和をおこなうという機能が推測される。さらに、これらはいずれも条虫が宿主環境に適応するために重要な現象であり、石灰小体が条虫の生存に重要な役割を果たしていることを強く示唆する知見である。

上記の知見に加えて、2価金属イオンのキレート剤であるヒノキチオール(β -thujaplicin)を多包虫原頭節の*in vitro*培養系に作用させると、石灰小体に作用をすることを観察し、それと同時に多包虫原頭節の死亡率が増加することも示されている(神谷ら、未発表)。これも、石灰小体が虫体の生存に必須な2価金属イオンを供給する役割を果たしていることを示唆する知見として興味深い。また、補体によるエキノコックス虫体の溶解作用が報告されているが¹⁹⁾、石灰小体には補体活性化作用があり、虫体の生存戦略の観点から注目される。

4. エキノコックスと石灰小体

エキノコックス(*Echinococcus* spp.)は重要な動物由来寄生虫症である包虫症を惹起する。代表的なものとして、多包(条)虫(*Echinococcus multilocularis*)と単包(条)虫(*Echinococcus*

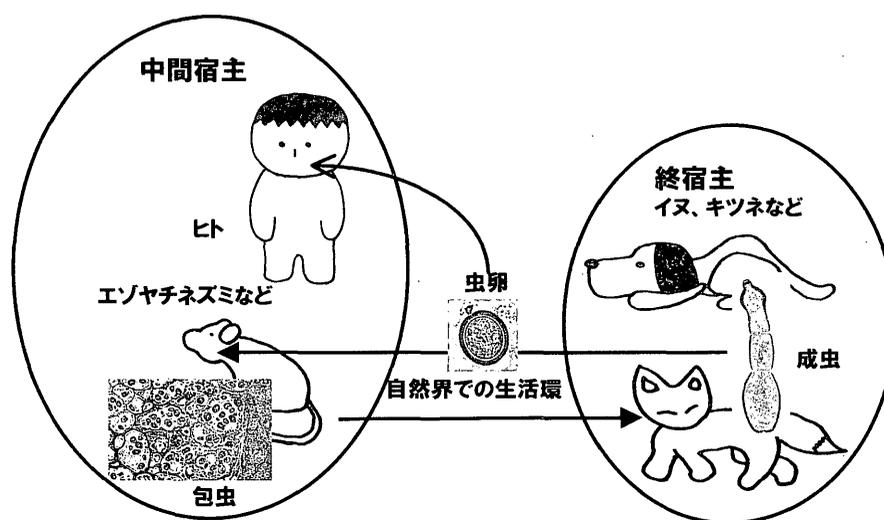


図3 多包(条)虫の生活環。
日本では北海道において、主に終宿主としてキタキツネと中間宿主としてエゾヤチネズミの間で生活環が保たれている。

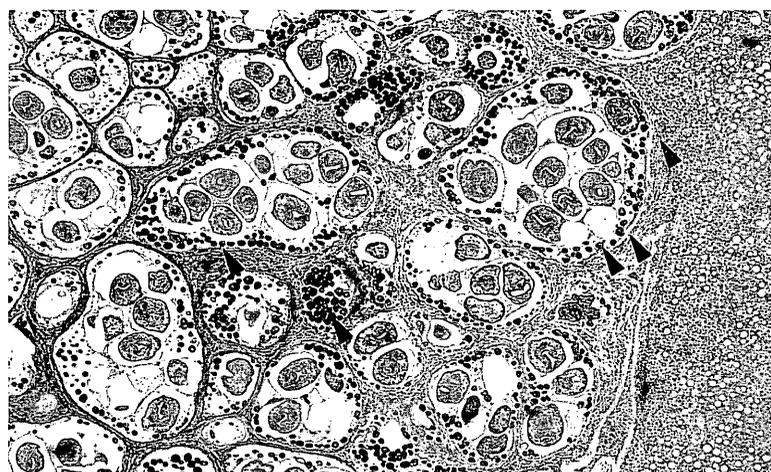


図4 多包虫により侵されたスナネズミ肝病巣の組織切片 (H-E染色)。
石灰小体(▲)が多数見受けられる。

granulosus) がある。ここでは、特に国内においても多発する多包虫症についてのみ述べる。多包条虫はキツネやイヌなどを終宿主、自然界に生息しているエゾヤチネズミ *Clethrionomys rufocanus bedfordiae* などを中間宿主として生活環が成立している(図3)。キツネやイヌの糞便中に排出された虫卵を、ヒトが何らかの形で経口摂取することにより感染がおこる。中間宿主であるヒトでは、成虫ではなく包虫化、つまり幼虫の状態を増殖を続け、極端な例では肝臓の大半を占めるまでに発育する場合もある。現在、治療は外科的な病巣の切

除に依存しており、有効な化学療法剤の開発が待たれている寄生虫症の1つである^{20,21)}。

このエキノコックスの増殖、分化において石灰小体はいかに関わっているのだろうか? 石灰小体は、胚芽層、繁殖胞ならびに原頭節で認められるが(図4)、形成は胚芽層ならびに繁殖胞で起こる⁸⁾。胚芽層ならびに繁殖胞に存在する石灰小体は大きさが30 μ mと大きく(図1)、原頭節に存在するものはそれに比して小さい^{2,8,22)}。エキノコックスの石灰小体に関しては生理学的な研究がされており、多包虫原頭節の *in vitro* 培養を続けると、ネコ

条虫の場合と同様、石灰小体が縮小する。これは片節形成を伴って成虫になる場合でも、包虫化する場合でも共に見られる現象である²³⁾。以上を考えると、エキノコックスにおいても発育期の栄養の供給源としてはたらいっている可能性が強く示唆される。

5. 石灰小体の機能に関与するタンパク質

これまで述べたように、石灰小体の研究は結晶学的解析を用いた構成成分の研究、顕微鏡を用いた形態学的な研究に限られていたが、最近になって、石灰小体に何らかの係わりを持つタンパク質が同定され始めている。単包虫症患者血清を用いたcDNAライブラリーのスクリーニングによってEF-handと呼ばれるカルシウム結合モチーフを持ったタンパク質のcDNAが単離され、組み換えタンパク質を用いて作製された抗体で、単包虫の原頭節の切片に対し免疫染色をおこなったところ、石灰小体が染色された²⁴⁾。このタンパク質についてはアミノ酸の部分配列のみ示されているが、16個のEF-handモチーフを持ち、実際にSDS-PAGE後、⁴⁵Caを用いた実験において、カルシウムに結合することが示されている²⁴⁾。このタンパク質については、患者血清を用いたスクリーニングでとられてきたと言う点も興味深く、生理的な機能が明らかになることが期待される。また、マンソン裂頭条虫の幼虫（マンソン孤虫、*Sparganum mansoni*）抽出物からも、疎水性相互作用を利用したクロマトグラフィーによってカルシウムに結合する10kDaのタンパク質が精製され、前述の実験と同様、抗体を作製して幼虫内の石灰小体に局在することが見いだされている²⁴⁾。

さらに、マンソン孤虫の石灰小体をFicollを用いて精製し、これと同幼虫抽出物とを反応させて、結合するタンパク質の存在を調べる実験も行われている²⁶⁾。これによって、マンソン孤虫の抽出物の中に、石灰小体と結合するタンパク質が複数存在すること、さらにマンソン孤虫以外でも、有鉤囊虫やウェステルマン肺吸虫（*Paragonimus westermanii*）などの抽出物の中にもマンソン孤虫由来の石灰小体に結合するタンパク質が存在することが明らかになった²⁶⁾。このように種を越えて石灰小体に結合するタンパク質が存在することは

系統発生的に石灰小体が普遍的に何らかの重要な機能を果たしていることを推測させる。

筆者らは、多包虫の石灰小体ならびに原頭節抽出物を用いて同様の実験を行い、確かに原頭節には石灰小体に結合するタンパク質が存在することを示している（投稿準備中）。

最近になって、単包虫でEgA31というタンパク質が石灰小体にも存在することが報告された²⁷⁾。このタンパク質が、単包虫の中でどのような機能を果たしているかは興味深い。

多包虫の石灰小体には、2-3-2の項で述べたように、特異的なタンパク質が存在する（投稿準備中；図2）。これらのタンパク質は、石灰小体に存在する全タンパク質に対する割合が非常に高く何らかの役割を担う可能性が推測されるが、実際どのような機能を持つタンパク質か、現在アミノ酸配列解析などによって解析が進んでいる。

これまで、石灰小体はタンパク質のかかわりからの研究・議論がされることは少なかった。それは「タンパク質含有量は少ない」という結果が、生化学的な研究を遅らせた原因かもしれない。しかし、このように石灰小体に局在するタンパク質が発見されてきており、これらのタンパク質の性状を分子生物学的に詳細に調べることは、新たな石灰小体関連タンパク質の探索とあわせて、重要な発展的課題となってくるととらえている。

6. 今後の方向性

エキノコックスには効果的な既存の殺虫薬はない。その一因として包虫の最外層がクチクラ成分で構成され、構造的に薬剤が包虫の内部に浸透しないことによるとも考えられている²⁰⁾。ただ、アルベンダゾール（albendazole）などのベンズイミダゾール系薬剤は包虫病巣を縮小させる²⁸⁾。エキノコックスは、不顕性感染時期を経て発症するが、その時には病巣が大きくなっており、唯一の完治法としての外科的手術による侵襲も大きい。このような背景から、病巣を効果的に小さくする、あるいは完全に死滅させる抗エキノコックス薬の開発が切望される。化学療法剤の開発では、まず、標的分子を定めることが望まれる。したがって、石灰小体の機能に必須なタンパク質を同定できれば、そのタンパク質の阻

害剤が抗エキノコックス薬の候補となる可能性は高い。現在では、コンピューターを用いたSBDD (Structure Based Drug Design) によって、タンパク質の3次元構造から薬剤の設計をおこなう技術が進展し、活用されている²⁹⁾。また、タンパク質がある程度しぼられ、またそのタンパク質の遺伝子クローニングができればRNAi (RNA interference, RNA干渉法) を用いて、求めるタンパク質の遺伝子の発現を抑え、そのタンパク質の生体内での機能を予想することも可能である。エキノコックスの場合、RNAiに関しては方法論が確立していないが、住血吸虫や線虫などですでに報告があり³⁰⁻³⁴⁾、この系はエキノコックスにも応用可能であろう。

石灰小体の機能の解明は、宿主-寄生虫相互関係という観点から生物学的にとらえても非常に興味深いし、治療という観点から医学的にとらえてもとても魅力的である。今後、石灰小体の研究が、分子レベルで進展することを大いに期待したい。

本総説は、2003年第2回弘前医学会優秀発表賞受賞対象の研究を敷衍し考察した。

文 献

- 1) Vargas-Parada L, Laclette JP. Role of calcareous corpuscles in cestode physiology: A review. *Rev Latinoam Microbiol* 1999;41:303-7.
- 2) von Brand T, Nylen MU, Martin GN, Churchwell FK, Stites E. Cestode calcareous corpuscles: Phosphate relationships, crystallization patterns and variations in size and shape. *Exp Parasitol* 1969;25:291-310.
- 3) Vargas-Parada L, Merchant MT, Willms K, Laclette JP. Formation of calcareous corpuscles in the lumen of excretory canals of *Taenia solium* cysticerci. *Parasitol Res* 1999;85:88-92.
- 4) Pawlowski ID, Yap KW, Thompson RCA. Observations on the possible origin, formation and structure of calcareous corpuscles in taeniid cestodes. *Parasitol Res* 1988;74:293-6.
- 5) Smith SA, Richards KS. Ultrastructure and microanalyses of the calcareous corpuscles of the protoscoleces of *Echinococcus granulosus*. *Parasitol Res* 1993;79:245-50.
- 6) McCullough S, Fairweather, I. The structure, composition, formation and possible functions of calcareous corpuscles in *Trilocularia acanthiaevulgaris* Olsson 1867 (Cestoda, Tetraphyllidea). *Parasitol Res* 1987;74:175-82.
- 7) Yamane Y, Bylund G, Abe K, Osaki Y, Hirai K, Torii M. X-ray microanalysis of calcareous corpuscles and trace element content in diphyllbothriid cestodes. *Parasitol Res* 1988;74:498-500.
- 8) Ohnishi K, Kutsumi H. Possible formation of calcareous corpuscles by the brood capsule in secondary hepatic metacestodes of *Echinococcus multilocularis*. *Parasitol Res* 1991;77:600-1.
- 9) Chowdhury N, De Rycke PH. Structure, formation and functions of calcareous corpuscles in *Hymenolepis microstoma*. *Z parasitenk* 1977;53:159-69.
- 10) von Brand T, Mercado TI, Nylen MU, Scott DB. Observations on function, composition, and structure of cestode calcareous corpuscles. *Exp Parasitol* 1960;9:205-14.
- 11) Scott DB, Nylen MU, von Brand T, Pugh MH. The mineralogical composition of the calcareous corpuscles of *Taenia taeniaeformis*. *Exp Parasitol* 1962;12:445-58.
- 12) von Brand T, Weinbach EC. Incorporation of phosphate into the soft tissues and calcareous corpuscles of larval *Taenia taeniaeformis*. *Comp Biochem Physiol* 1965;14:11-20.
- 13) Nieland ML, von Brand T. Electron Microscopy of cestode calcareous corpuscle formation. *Exp Parasitol* 1969;24:279-89.
- 14) von Brand T, Nylen MU. Organic matrix of Cestode calcareous corpuscles. *Exp Parasitol* 1970;28:566-76.
- 15) Kegley LM, Brown BW, Berntzen AK. *Mesocestoides corti*: Inorganic components in calcareous corpuscles. *Exp Parasitol* 1969;25:85-92.

- 16) Kegley LM, Baldwin J, Brown BW, Berntzen AK. *Mesocestoides corti*: Environmental cation concentration in calcareous corpuscles. *Exp Parasitol* 1970;27:88-94.
- 17) Baldwin JL, Berntzen AK, Brown BW. *Mesocestoides corti*: Cation concentration in calcareous corpuscles of tetrathyridia grown *in vitro*. *Exp Parasitol* 1978;44:190-6.
- 18) Ishii AI. Fe-rich corpuscles in *Diplogonoporus grandis* detected using X-ray microanalysis. *Z parasitenk* 1984;70:199-202.
- 19) 神谷晴夫, 神谷正男, 大林正士. 多包虫感染に対する宿主抵抗性因子の解析 2. 補体による多包虫・多包条虫に対する溶解作用とその作用機序. *寄生虫学雑誌* 1980;29:169-79.
- 20) 山下次郎. エキノコックス—その正体と対策. 増補版. 北海道: 北海道大学図書刊行会; 1997. p.56-158.
- 21) Thompson RCA, Lymbery AJ. Echinococcus and hydatid disease UK: CAB INTERNATIONAL; 1995. p1-47.
- 22) Sakamoto T, Kotani T. Studies on echinococcosis XX. Preliminary observations on the *in vivo* cultivation of larval tissue of *Echinococcus multilocularis* in culture-chamber of porous membrane. *Jpn J Vet res* 1967;15:165-9.
- 23) 坂本司. エキノコックスのすべて—包虫学ダイジェスト. 岩手: 雀羅書房; 1997. p.52-5.
- 24) Rodrigues JJS, Ferreira HB, Farias SE, Zaha A. A protein with novel calcium-binding domain associated with calcareous corpuscles in *Echinococcus granulosus*. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;237:451-6.
- 25) Chung YB, Kong Y, Cho SY, Yang HJ. Purification and localization of a 10kDa calcareous corpuscle binding protein of *Spirometra mansoni* plerocercoid. *Parasitol Res* 2003;89:235-7.
- 26) Yang HJ. Separation of calcareous corpuscles from plerocercoids of *Spirometra mansoni* and their binding proteins. *Parasitol Res* 2000;86:781-2.
- 27) Saboulard D, Lahmar S, Petavy AF, Bosquet G. The Echinococcus granulosus antigen EgA31: localization during development and immunogenic properties. *Parasite Immunol* 2003;25:489-501.
- 28) Stettler M, Rossignol JF, Fink R, Walker M, Gottstein B, Merli M, Theurillat R, et al. Secondary and primary murine alveolar echinococcosis: combined albendazole/nitazoxanide chemotherapy exhibits profound anti-parasitic activity. *Int J Parasitol* 2004;34:615-24.
- 29) Anderson AC. The process of structure-based drug design. *Chem Biol* 2003;10:787-97.
- 30) Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998;391:806-11.
- 31) Montgomery MK, Xu S, Fire A. RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:15502-7.
- 32) Hussein AS, Kichenin K, Selkirk ME. Suppression of secreted acetylcholinesterase expression in *Nippostrongylus brasiliensis* by RNA interference. *Mol Biochem Parasitol* 2002;122:91-4.
- 33) Boyle JP, Wu XJ, Shoemaker CB, Yoshino TP. Using RNA interference to manipulate endogenous gene expression in *Schistosoma mansoni* sporocysts. *Mol Biochem Parasitol* 2003;128:205-15.
- 34) Skelly PJ, Da'dara A, Harn DA. Suppression of cathepsin B expression in *Schistosoma mansoni* by RNA interference. *Int J Parasitol* 2003;33:363-9.