

2003年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

－調査・共同研究に対する助成－

2004 年 01 月 21 日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

研究代表者氏名 長 野 功 
所属機関名 岐阜大学 医学部
部署・役職 感染制御学分野・助教授
所在地 〒500-8705 岐阜市司町 40 番地
電話 (058) 265-1241 内線 2252

1. 研究テーマ

肝吸虫免疫診断用組換え蛋白抗原の検討と中国における肝吸虫症患者診断への応用

2. 研究期間 自 2003 年 8 月 1 日 ～ 至 2004 年 3 月 15 日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 長 野 功
所属機関 岐阜大学医学部感染制御学分野 職名 助教授

中国側研究者氏名 方 悦 怡
所属機関 広東省疾病予防控制
中心寄生虫病防治研究所 職名 副所長

4. 研究報告書

別紙「研究報告書の作成について」の体裁に倣い、指定の用紙で作成し添付して下さい。

※研究成果を発表する場合は、発表原稿・抄録集等も添付して下さい。

※発表に当っては、日中医学協会助成金による旨を明記して下さい。

肝吸虫免疫診断用組換え蛋白抗原の検討と中国における肝吸虫症患者診断への応用

日本側研究者氏名 長野 功

所属機関 岐阜大学医学部感染制御学分野助教授

中国側研究者氏名 方 悦怡

所属機関 広東省疾病予防控制中心寄生虫病防治研究所副所長

要旨

肝吸虫症は、中国東南部においては極めて重要な感染症のひとつである。一方、肝吸虫症の免疫学的診断は肝吸虫成虫抗原に対する抗体を検出する方法が広く行われているが、抗体価は一般に低い場合が多く、また、他の吸虫類との交差反応も問題となっている。我々は肝吸虫の cysteine proteinase をクローニングし、その組換え蛋白を合成して ELISA 用の抗原としての有用性の検討を行った。

大腸菌で発現させた肝吸虫の cysteine proteinase を抗原として Western blot を行った結果、肝吸虫患者血清と強く反応した。また、抗 cysteine proteinase 血清を用いて肝吸虫成虫の免疫染色を行った結果、cysteine proteinase 抗原は主に成虫の腸管上皮に認められた。

肝吸虫の cysteine proteinase および肝吸虫成虫抗原を ELISA 用の抗原として用いるための条件設定を行った後、肝吸虫感染患者血清、肝吸虫以外の寄生虫感染患者血清について ELISA での抗体価の検討を行った。その結果、cysteine proteinase を用いた ELISA 法の感度は高く、また他の寄生虫感染患者血清との交差反応もほとんど認められず、cysteine proteinase は ELISA 用の抗原として十分有用であると考えられた。

Key Words 肝吸虫症、cysteine proteinase、組換え蛋白、ELISA

緒言

肝吸虫感染症はモツゴ、コイ、フナなどの淡水魚の生食で感染し、多数感染では最終的に肝硬変や肝ガンに移行することもある極めて危険な寄生虫感染症である。日本においては衛生環境の整備、衛生教育の充実等によって患者発生数はここ数十年でかなり減少しているが、中国東南部においてはまだ肝吸虫感染症は極めて重要な感染症のひとつである(1)。肝吸虫感染症の確定診断は糞便検査で虫卵を検出することであるが、一匹あたりの虫卵産生数が少なく集卵法を用いても虫卵が検出されないことも多い(2)。一方、免疫学的診断法として肝吸虫成虫抗原に対する抗体価を検出する方法が行われているが、肝吸虫は組織内に侵入することが少ないために抗体価は一般に低い場合が多い。肝吸虫感染症に対しては、現在では非常に有効な治療薬があり、早期に患者を発見できれば治療は困難ではない。

広東省寄生虫防治研究所では最近の肝吸虫症患者発生数の増加により、一度に多数の検体を処理することが求められるようになってきた。そのため、肝吸虫感染症の診断は手間のかかる糞便検査ではなく肝吸虫成虫抗原を用いた免疫学的診断によって行われているのが現状である。しかし、低抗体価感染者における診断の問題、および当地方はかつては日本住血吸虫侵淫地でもあり、日本住血吸虫抗原と肝吸虫抗原との交差反応も大きな問題点のひとつである。よって、肝吸虫の確実な免疫学的診断には特異性が高く、かつ感度の高い肝吸虫由来抗原を用いる必要がある。今回、吸虫類

の免疫学的診断に有用な抗原と考えられている cysteine proteinase の組換え蛋白を合成して ELISA 用の抗原とし、その有用性の検討を行った。

研究対象と方法

1. 報告されている肝吸虫の cysteine proteinase の DNA 塩基配列に基づいて、その DNA を増幅するように PCR primer を設計した。中国の患者より採取した肝吸虫虫体から作製した cDNA を鋳型として DNA の増幅を行い、中国産肝吸虫 cysteine proteinase の塩基配列を決定した。
2. 増幅された cysteine proteinase DNA を大腸菌発現ベクターに組み込み大腸菌内で蛋白を発現させ、アフィニティー精製した。
3. 発現蛋白とプール肝吸虫症患者血清との反応性を Western blot にて確認した。また、精製蛋白はマウスに免疫してその抗血清を得、それを用いて肝吸虫内の cysteine proteinase の分布を Western blot および成虫虫体の免疫染色にて確認した。
4. 組換え蛋白の診断における有用性を、肝吸虫感染患者血清 10 検体、日本住血吸虫感染患者血清 5 検体および健常者血清 5 検体を用いて、Western blot にて検討した。
5. 組換え蛋白を ELISA 用の抗原として用いるための条件設定を行い、組換え蛋白の抗原としての至適濃度を決定した。また、健常者血清 48 検体を用いて ELISA 吸光度の cut-off 値を設定した。条件設定後、広東省寄生虫防治研究所において中国人の肝吸虫感染患者血清 50 検体、肝吸虫以外の寄生虫感染患者血清 26 検体の ELISA 吸光度を測定した。また、比較として肝吸虫成虫抗原についても同時に検討を行った。

成績

1. 中国産肝吸虫の cysteine proteinase の塩基配列はすでに報告されているものとほとんど同一であったが、一部に違いが見られた。また、肝吸虫と肺吸虫、日本住血吸虫および肝蛭の cysteine proteinase のアミノ酸ホモロジーはそれぞれ 58%、48% および 40% であった。
2. 肝吸虫の cysteine proteinase は大腸菌体内で多量に発現し、アフィニティー精製した蛋白は SDS-PAGE においてシングルバンドとして認められた (図 1)。
3. 肝吸虫の cysteine proteinase はプール肝吸虫症患者血清と強く反応して Western blot にて予想される位置にバンドが確認された。また、プール日本住血吸虫症患者血清とも弱く反応した (図 2A)。
4. 肝吸虫成虫抗原と抗 cysteine proteinase 血清との反応では予想される位置および成熟蛋白であろうと考えられる位置とに計 2 本のバンドが観察された (図 2B)。また、成虫の免疫染色を行った結果、cysteine proteinase の特異抗原が成虫の腸管上皮および虫卵に認められた (図 3)。
5. 肝吸虫の cysteine proteinase と肝吸虫感染患者血清、日本住血吸虫感染患者血清および健常者血清との反応性を Western blot にて検討した結果、肝吸虫感染患者血清では強く反応が認められた。また、日本住血吸虫感染患者血清においても弱く反応が観察された (図 4)。
6. 肝吸虫の cysteine proteinase および肝吸虫成虫抗原を ELISA 用の抗原として用いるための条件設定を行った結果、使用抗原の蛋白濃度を $5\mu\text{g/ml}$ 、血清希釈は 200 倍、cut-off 値を cysteine proteinase では 0.126、肝吸虫成虫抗原では 0.234 と決定した。その条件で肝吸虫感染患者血清 50 検体、肝吸虫以外の寄生虫感染患者血清 26 検体の吸光度を測定した (図 5)。その結果 cysteine proteinase では肝吸虫感染患者血清 50 検体中 2 検体が陰性 (4%)、肝吸虫以外の寄生虫感染患者血清においては、26 検体中顎口虫感染患者血清の 1 検体が陽性 (3.8%) を示した。また、肝吸虫成虫抗原では 50 検体中 6 検体が陰性 (12%)、肝吸虫以外の寄生虫感染患者血清においては、26 検体中陽性を示した検体はなかった。

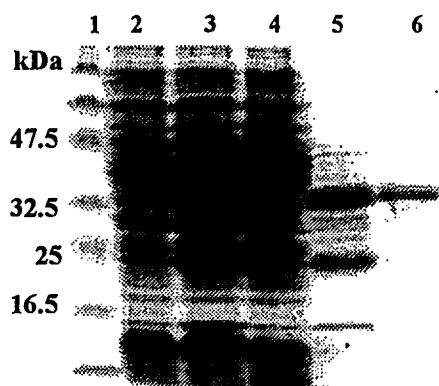


図 1. 肝吸虫組換え cysteine proteinase の SDS-PAGE 電気泳動解析

(2. 誘導前の大腸菌菌体、3. 誘導後の大腸菌菌体、4. 大腸菌破碎サンプルの上清、5. 大腸菌破碎サンプルの沈渣、6. アフィニティー精製後のサンプル)

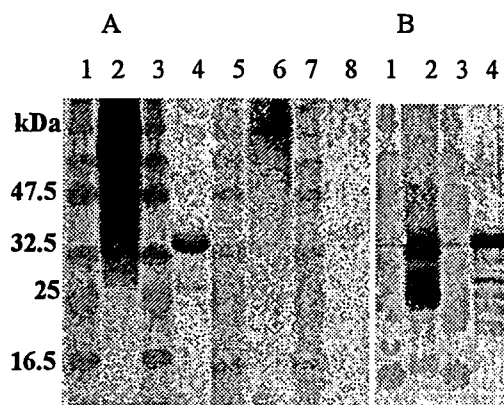


図 2. 肝吸虫組換え cysteine proteinase の Western blot 解析

(A2.肝吸虫患者血清と肝吸虫成虫抗原との反応、A4. 肝吸虫患者血清と肝吸虫組換え cysteine proteinase との反応、A6.日本住血吸虫患者血清と肝吸虫成虫抗原との反応、A8. 日本住血吸虫患者血清と肝吸虫組換え cysteine proteinase との反応、B2. 抗 cysteine proteinase 血清と肝吸虫成虫抗原との反応、B4. 抗 cysteine proteinase 血清と肝吸虫組換え cysteine proteinase との反応)

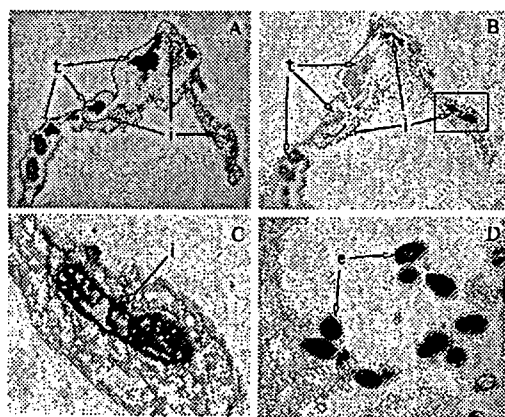


図 3. 肝吸虫 cysteine proteinase の成虫虫体内分布

(A. ヘマトキシリン・エオジン染色、B. C. D. 抗肝吸虫 cysteine proteinase 血清による免疫染色) i:腸管; e:虫卵; t: 精巣

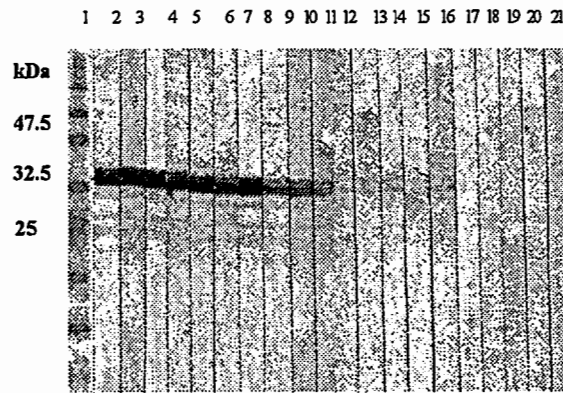


図 4. 肝吸虫 cysteine proteinase の肝吸虫患者血清、日本住血吸虫患者血清および健常者血清との Western blot における反応性

(2-11.肝吸虫患者血清、12-16.日本住血吸虫患者血清、17-21. 健常者血清)

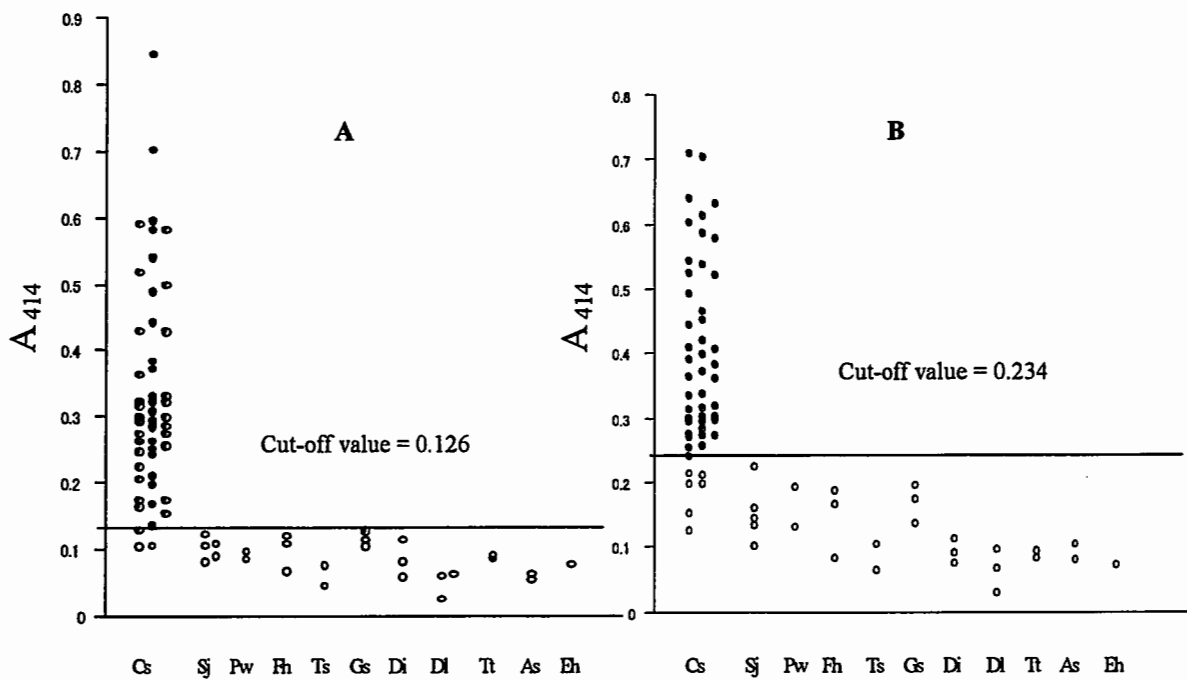


図 5. 各寄生虫感染患者血清の cysteine proteinase 抗原(A)および肝吸虫成虫抗原(B)における ELISA 吸光度の分布、[*Clonorchis sinensis* (Cs), *Schistosoma japonicum* (Sj), *Paragonimus westermani* (Pw), *Fasciola hepatica* (Fh), *Taenia solium* (Ts), *Gnathostoma spinigerum* (Gs), *Dirofilara immitis* (Di), *Diphyllbothrium latum* (Dl), *Trichuris trichiura* (Tt), *Anisakis simplex* (As), and *Entamoeba histolytica* (Eh)]

考察

近年、種々の寄生虫感染症の診断において、免疫学的診断法が多く用いられるようになってきた。今回、肝吸虫 cysteine proteinase の ELISA 用抗原としての有用性を中国広東省の肝吸虫症患者血清を用いて検討した。

Cysteine proteinase は多くの寄生虫において持続的に分泌されるプロテアーゼであり、寄生虫感染患者では cysteine proteinase に対して、一般に高い抗体価を示す。そのために cysteine proteinase

は種々の寄生虫感染症において免疫診断用抗原として極めて有用であると報告されている(3.4.5)。また、肝吸虫においてもメタセルカリア、成虫の各発育段階において cysteine proteinase が分泌されることが報告されている(6)。今回行った成虫の免疫染色でも cysteine proteinase の特異抗原が成虫の腸管上皮および虫卵に認められた。肝吸虫 cysteine proteinase は腸管上皮で生成され、腸管内に分泌されて、感染宿主に高い抗原性が付与されるものと考えられる。

肝吸虫 cysteine proteinase のアミノ酸配列と肺吸虫、日本住血吸虫および肝蛭 cysteine proteinase のアミノ酸配列のホモロジーは低く、このことは、肝吸虫 cysteine proteinase は肺吸虫、日本住血吸虫および肝蛭感染患者血清とは交差反応が少ない可能性を示唆している、実際に、肝吸虫の組換え cysteine proteinase を用いた ELISA において、これらの感染患者血清とは交差反応は見られず、顎口虫感染患者血清の 1 検体のみが陽性を示したのみであった。一方、対照として用いた肝吸虫成虫抗原は偽陽性を示した検体はなかったが、肝吸虫感染患者血清において 12% が陰性であり、感度において問題点が多かった。

以上の結果から肝吸虫の cysteine proteinase は ELISA 用の診断用抗原として十分に使用可能であると考えられた。しかし、感度において cysteine proteinase は肝吸虫成虫抗原よりも優れているものの偽陽性があったこと、供試検体が少数であったことなどの課題が残された。今後は cysteine proteinase の診断用抗原としての有用性をさらにサンプル数を増やして検討していきたい。

参考文献

1. Crompton, D. W. 1999. How much human helminthiasis is there in the world? J. Parasitol. 85:397-403.
2. Rim, H. J. 1986. The current pathology and chemotherapy of clonorchiasis. Korean J. Parasitol. 24 (suppl.):78-85.
3. Chappell, C. L., M. H. Dresden, B. Gryseels, and A. M. Deelder. 1990. Antibody response to *Schistosoma mansoni* adult worm cysteine proteinases in infected individuals. Am. J. Trop. Med. Hyg. 42:335-341.
4. Ikeda, T., Y. Oikawa, and T. Nishiyama. 1996. Enzyme-linked immunosorbent assay using cysteine proteinase antigens for immunodiagnosis of human paragonimiasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 55:435-437.
5. Carnevale, S., M. I. Rodriguez, E. A. Guarnera, C. Carmona, T. Tanos, and S. O. Angel. 2001. Immunodiagnosis of fasciolosis using recombinant procathepsin L cystein proteinase. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 41:43-49.
6. Song, C. Y., and A. A. Rege. 1991. Cysteine proteinase activity in various developmental stages of *Clonorchis sinensis*: a comparative analysis. Comp. Biochem. Physiol. B. 99:137-140.

発表論文

Nagano, I., F. Pei, Z. Wu, J. Wu, H. Cui, T. Boonmars, and Y. Takahashi. 2004. Molecular expression of a cysteine proteinase of *Clonorchis sinensis* and its application to enzyme-linked immunosorbent assay for immunodiagnosis of clonorchiasis. Clin. Diagn. Lab. Immunol. (in press)