

財団法人 日中医学協会

2012 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

2013 年 3 月 8 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 迫 康仁
所属機関名： 旭川医科大学
所属部署名： 寄生虫学講座 職名： 講師
所 在 地： 旭川市緑が丘東 2 条 1 丁目
電 話： 0166-68-2422 内線：



1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

中国で蔓延している人獣共通寄生虫症(囊虫症)の迅速・簡便な検査法の開発

3. 研究組織：

日本側研究者氏名： 迫 康仁	職名： 講師
所属機関名： 旭川医科大学	部署名： 寄生虫学講座
中国側研究者氏名： 李 調英	職名： 教授
所属機関名： 四川省疾病管理予防センター	部署名： 寄生虫病研究所

4. 当該研究における発表論文等

研究成果の一部を International Symposium on Cestode Zoonoses Control

(Oct. 29-30, Shanghai, China)および Joint International Tropical Medicine

Meetin 2012 (Dec. 12-14, Bangkok, Thailand)で口頭発表した。

現在、投稿準備中である。

中国で蔓延している人獣共通寄生虫症(囊虫症)の迅速・簡便な検査法の開発

研究代表者 迫 康仁
所属機関 旭川医科大学寄生虫学講座
中国共同研究者 李 調英
中国研究機関 四川省疾病管理予防センター

要旨：

有鉤囊虫症(cysticercosis cellulosae)は、有鉤条虫(*Taenia solium*)の幼虫である囊虫が筋肉、皮下、脳などに寄生することにより引き起こされる疾患であり、豚とヒトとの間で感染環が維持されている致死的人畜共通感染症である。また、本症は流行地域における癲癇発作の主な病因と考えられている。有鉤囊虫症の検査の一つに、ELISA法やイムノブロット法を用いて特異抗体を検出する血清検査法がある。現行の血清検査法は、信頼できる検査結果を提供するが、一方、特殊な設備とある程度の経験が必要であるため、臨床現場や流行現場で迅速な検査を行うことが出来ないという問題点がある。したがって、新たな血清検査法の開発が望まれている。最近、迅速・簡便な検査を提供できる汎用性の高い検査法として、イムノクロマトグラフィー(ICT)法が注目されている。そこで、本研究では、組換え有鉤囊虫症血清抗原を用いたイムノクロマトグラフィー法の開発を行った。その結果、従来のELISA法と同程度の検査性能を持つ血清検査法を開発することが出来た。今後、安定性・再現性に関する検討を、より多くの血清を用いて行う必要がある。

key words：有鉤囊虫症、血清検査、組換え抗原、イムノクロマトグラフィー法

緒言：

有鉤囊虫症は、有鉤条虫(*Taenia solium*)囊虫の感染に起因する疾患である。*T. solium*の終宿主はヒトであり、中間宿主は豚であるが、ヒトは偶発的に有鉤条虫の虫卵を経口摂取した場合あるいは自家感染により中間宿主となり有鉤囊虫症を引き起こす。特に神経症状を引き起こす脳有鉤囊虫症は临床上重要であり、流行地域における癲癇発作の主な病因となっている(1)。

本症の診断には、主にCT、MRIなどの画像診断が適用されており、その有用性が示されているが、寄生虫の寄生数が少ない場合あるいは典型的な画像所見を示さない場合はその感染を見逃す可能性が高い。また、コストの点より流行地域、特に発展途上国において画像診断を適用することは困難である。したがって、患者血清中の有鉤囊虫特異抗体を検出する免疫学的診断法は、確定診断を行うための補助情報を提供する重要な役割を担っている(2)。以前、我々は有鉤囊虫に特異的な組換え抗原を用いたELISA法およびイムノブロット法による血清検査法を開発し、その有用性を示した(3)。しかしながら、通常の検査で使用しているELISA法およびIB法は、特殊な器具を使用する必要があり、臨床現場で

の使用が制限されている。それに対し、イムノクロマトグラフィー法(ICT法)に基づく検査法は、特別な器具を必要とせず、さらに迅速・簡便に、病原体の抗原あるいは病原体に対する抗体を検出出来る方法として知られている。本研究では、イムノクロマトグラフィー法を用いた有鉤囊虫症の抗体検出検査法を開発し、ELISA法との検査性能に関する比較を行った。

対象と方法：

血清：解析に用いたヒト血清は、中国・四川省カンゼ・チベット族自治州雅江県(Yajiang)の有鉤囊虫症流行地に於いて行われた住民検診で採取されたものである。四川省疾病管理予防センターのスタッフにより、研究目的が住民に説明され、同意を得た住民の血清のみを使用した。本研究には、有鉤囊虫症特異抗原を用いた検査により陽性を示した血清を用いた。対照として用いた多包虫症血清、単包虫症血清および陰性コントロール血清は、四川省疾病管理予防センターが保有する血清であり、これらも住民の同意を得たものである。

組換え抗原の発現および精製：本研究で使用した抗原は、大腸菌の系を用いて発現させた。有鉤囊虫症特異的抗原である、低分子量抗原 Ag1V1 および Ag2 を用いた(3)。また、有鉤囊虫症血清の一部は、これらの抗原に弱陽性を示すため、同じファミリータンパク質に属する抗原 10kAg-3 ならびに 10kAg-9 も使用した。4 抗原を、グリシン 5 残基をスペーサーとし、連結させたキメラ抗原(Tsol4Ags)として発現させた(図 1. A)。ただし、Ag2 ならびに 10kAg-9 抗原は、全長では大腸菌に毒性を示すため、エピトープ領域解析の結果を基に、Ag2 は N 末端および C 末端領域を、10kAg-9 は中央領域を保持する形で発現させた。発現させた組換えタンパク質は、ニッケルアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。

イムノクロマトグラフィー法：精製 Tsol4Ags(1mg/ml)およびウサギ抗ヤギ IgG 抗体(1mg/ml)を、それぞれテストラインおよびコントロールラインとして、約 1mm 幅でニトロセルロース膜上に塗布した。乾燥後、1%スキムミルク溶液に浸漬してブロッキングした後、再び乾燥させた。約 5mm 幅の短冊状に切断した後、抗原塗布面を上にして台紙に貼付し、反応膜とした。その後、吸収パッドおよび基質レーザーバーと共に、サンプル添加窓と展開溶液添加窓を持つイムノクロマトグラフィーカセットに装着した。血清 10 μ l とアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ヒト IgG 抗体(0.1mg/ml)20 μ l をチューブ内で混合後、混合液 20 μ l をサンプル添加窓に添加した。添加後速やか(30 秒以内)に、展開液 200 μ l を展開溶液添加窓に添加し、静置した。20 分後、テストラインおよびコントロールライン部の発色により判定を行った。発色には、5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP)を用いた。その後、バンド強度をイムノクロマトリーダーで測定し数値化した。相対バンド強度は、テストラインのバンド強度数値をコントロールラインのバンド強度数値で割ることにより算出した。

統計学的解析：検査性能に対してはマクネマー検定およびカッパー係数の算出により比較を行い、相関の解析はスピアマンの順位相関係数を求めることを行った。

結果：

(1) 組換え抗原の発現および精製

安定した検査法を供給するには、大量の抗原が必要である。そこで、有鉤囊虫症血清診断用抗原として評価の高い、低分子量抗原 Ag1V1 および Ag2、ならびにそのファミリータンパク質 10kAg-3 および 10kAg-9 の大腸菌による発現を試みた。Ag1V1 および 10kAg-3 に関しては、大量発現に成功した。しかしながら、Ag2 および 10kAg-9 は大腸菌に対する毒性が強く、十分量の組換えタンパク質を得ることが出来なかった。Ag2 および 10kAg-9 抗原は、診断用抗原としての能力が高いため、高感度検査法を確立するには必須である。そこで、Ag2 のエピトープ領域は N-および C-末端に、10kAg-9 のエピ

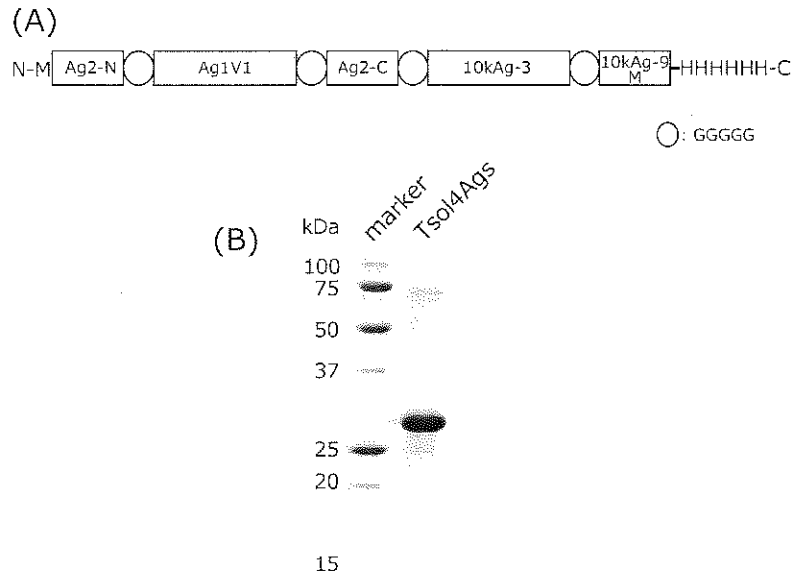


図1. Tsol4Agsの構造(A)と精製組換え Tsol4Agsの SDS-PAGE 像(B)

トープ領域は中央部に存在していることが判明していたため(未発表データ)、両抗原エピトープ領域のみの発現を試みた。また、4種の抗原をそれぞれ発現させるのではなく、全抗原を、グリシン残基をスペーサーとして連結させたキメラ抗原(Tsol4Ags)として発現させた(図1. A)。特に、Ag1V1 抗原を Ag2 抗原の中央部位に挿入し、Ag2 の立体構造の破壊を行うことにより、大腸菌に対する毒性を減弱することが出来るのではないかと予測し、発現実験を行った。その結果、予測分子サイズ 30kDa の組換え抗原の大量発現に成功した(図1. B)。

(2) イムノクロマトグラフィー法に基づく有鉤囊虫症血清検査法の開発

イムノクロマトグラフィー法を用いた血清検査の構築時に、予備実験として、有鉤囊虫の包虫液より精製した native 抗原と組換え Tsol4Ags 抗原との比較を行った。その結果、イムノクロマトグラフィー法の抗原としては、組換え Tsol4Ags が適していることが明らかとなった(未発表データ)。そこで、以降の実験には組換え Tsol4Ags 抗原を用いた。イムノクロマトグラフィー法では、図2に示すように、血清検査陽性の場合テストラインおよびコントロールラインに発色が、血清検査陰性の場合コ

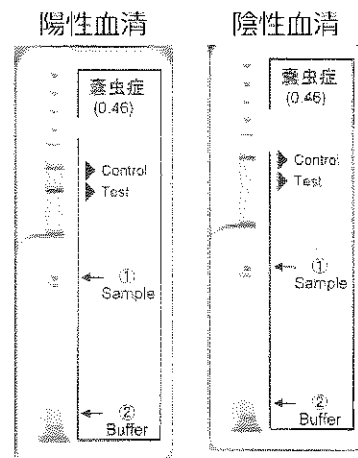


図2. 陽性血清および陰性血清を用いた ICT 法の結果

血清検査陽性の場合テストラインおよびコントロールラインに発色が、血清検査陰性の場合コ

ントロールラインのみに発色が観測される。

(3) イムノクロマトグラフィー法の評価

本研究で開発したイムノクロマトグラフィー法の有鉤囊虫症血清検査としての評価を、有鉤囊虫症、多包虫症、単包虫症および陰性コントロール血清を用いて行った(表1および表2)。多包虫血清および単包虫症血清は、それぞれの血清診断抗原 Em18 (4)およびAntigenB (5)に強陽性を示したものを使用した。その結果、全ての有鉤囊虫症血清、13.3%の多包虫血清および40%の単包虫症血清が陽性と判断された。また、全ての陰性コントロールは、陰性であった。

検査性能に関して、従来の血清検査法である ELISA 法との間に統計学的差は認められなかった($P = 0.371$)。

また、ELISA 法との一致率は 93.1% (κ 係数 = 0.859) であった。これより、イムノクロマトグラフィー法の有用性が示された。さらに、イムノクロマトグ

ラフィー法で得られた相対バンド強度は、ELISA で得られた吸光度と強い相関を示した(図3. $R_s = 0.732$, $P = 0.0000215$)。

表1. 各血清に対する ICT 法と ELISA 法の結果

血清由来	検体数	ICT 法	ELISA 法
		陽性数(%)	陽性数(%)
有鉤囊虫症	22	22 (100)	22 (100)
多包虫症	15	2 (13.3)	3 (20.0)
単包虫症	15	6 (40.0)	8 (53.3)
陰性コントロール	20	0	0

多包虫症血清および単包虫症血清は、それぞれの診断抗原に強陽性を示しものを使用した。

表2. ICT 法と ELISA 法との比較

ICT 法	陽性数	ELISA 法 陰性数	合計
陽性数	29	1	30
陰性数	4	38	42
合計	33	39	72

一致率 = 93.1% ; κ 係数 = 0.859

考察 :

本研究では、大腸菌に対する毒性が強かったために、大量調製が困難であった有鉤囊虫症診断用抗原の大量発現に成功した。また、それを用いたイムノクロマトグラフィー法に基づく迅速・簡便な有鉤囊虫症血清検査法を開発した。

開発したイムノクロマトグラフィー法の検査性能を、有鉤囊虫症血清、多包虫症血清、単包虫血清および陰性コントロール血清を用いて評価した

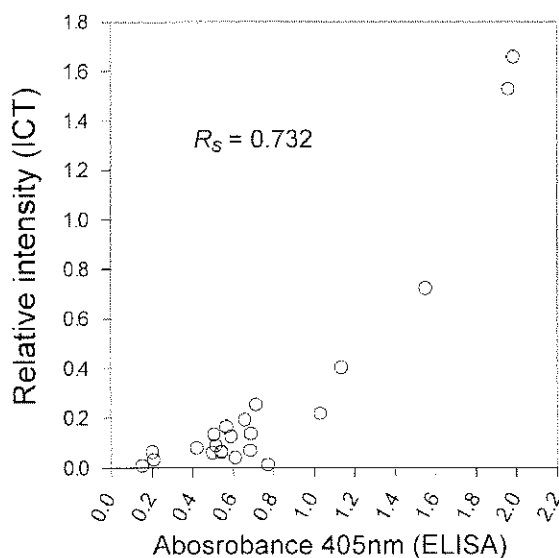


図3. 相対バンド強度(ICT法)と吸光度(ELISA法)の散布図
有鉤囊虫症血清 (20例) を用いた結果。スピアマン順位相関係数($R_s = 0.732$)

ところ、従来の血清検査に用いられている ELISA 法と同程度の検査性能を持つことが明らかとなった。本研究で用いた血清は、それぞれの血清診断抗原に陽性を示すものである。つまり、血清選択の際に、ある程度のバイアスが存在しており、本来の各疾患の集団を反映しているものではない。したがって、今後、さらに多くの血清を用いて評価を行わなければならない。

イムノクロマトグラフィー法は、①専門知識、経験および特別な器具が必要ない、②比較的短時間(20 分)で検査結果を得ることが出来る、などの利点を持っている。そのため、イムノクロマトグラフィー法は、臨床現場における迅速かつ適切な治療の提供を可能とする検査法であり、また、設備の乏しい流行地現場でのスクリーニングツールとして使用できる検査法であると考えられる。今後、イムノクロマトグラフィー法の安定性・再現性に関して検討しなければならない。

参考文献：

1. Mahanty, S., Garcia, H.H. (2010) Cysticercosis and neurocysticercosis as pathogens affecting the nervous system. *Prog Neurobiol* 91, 172-184.
2. Ito, A., Craig, P.S. (2003) Immunodiagnostic and molecular approaches for the detection of taeniid cestode infections. *Trends Parasitol* 19, 377-381.
3. Sako, Y., Nakao, M., Ikejima, T., Piao, X.Z., Nakaya, K., Ito, A. (2000) Molecular characterization and diagnostic value of *Taenia solium* low-molecular-weight antigen genes. *J Clin Microbiol* 38, 4439-4444.
4. Sako, Y., Nakao, M., Nakaya, K., Yamasaki, H., Gottstein, B., Lightowers, M.W., Schantz, P.M., Ito, A. (2002) Alveolar echinococcosis: characterization of diagnostic antigen Em18 and serological evaluation of recombinant Em18. *J Clin Microbiol* 40, 2760-2765.
5. Mamuti, W., Yamasaki, H., Sako, Y., Nakao, M., Xiao, N., Nakaya, K., Sato, N., Vuitton, D.A., Piarroux, R., Lightowers, M.W., Craig, P.S., Ito, A. (2004) Molecular cloning, expression, and serological evaluation of an 8-kilodalton subunit of antigen B from *Echinococcus multilocularis*. *J Clin Microbiol* 42, 1082-1088.