

Table 1 昨年度報告した本邦におけるアメーバ性髄膜脳炎 6 例

症例	1	2	3	4	5	6
住所	東京都 板橋区	山形県 酒田市	岡山県 倉敷市	宮崎県 宮崎市	新潟県 北蒲原郡	佐賀県 鳥栖市
年齢/性	27/F	56/M	78/F	72/F	53/M	25/F
発症日時	1976年 5月21日	1986年 9月(上肢) 1987年 1月(中枢)	1989年 7月19日	1995年 5月初旬	1995年 11月下旬	1996年 11月19日
経過	8日間	約6ヶ月(上肢) 約6週間(中枢)	15日間	6・7週間	約40日間	9日間
職業	保母	元土建業 /農業	無職	不明	教師	事務員
特記事項	発症約2週間前に新潟地方の山へ旅行	左上肢蜂窩織炎 糖尿病(1979) 右腎摘出(1953)	シェーグレン症候群、プレドニゾン2.5mg、約10年間内服	HTLV-1キャリア	胃癌にて胃・脾摘出 精神的ストレス	
初発症状	発熱 頭痛	左上肢腫脹 左顔面痙攣	発熱 意識障害(2日後)	ふらつき 発熱(5月中旬)	発熱 頭痛	発熱 頭痛
髄液細胞数	745/3		5664/3	4329/3	580/3	4600/3
脳重	1290 g	1280 g	1375 g	1160 g	1320 g	1620 g
病変分布	嗅球 脳底部 脳室周囲 脳幹被蓋	右前頭頭頂葉 左頭頂葉 基底核 脳幹	脳室周囲 大脳半球 左小脳 脳幹周囲	脳幹 大脳皮質	脳室周囲 海馬海馬傍回 脳幹	嗅球 脳底部 視床
病型	PAM	GAE	GAE	GAE	GAE	PAM
アメーバ細胞膜の嗜銀性	+	±	+	+	+	-
PAS	±	+	+	+	±	-
Cyst	+	+	+	+	+	-
平均 μm	9.0	14.3	12.9	14.7	16.6	8.2
標準偏差	1.4	4.5	5.2	4.2	4.6	1.1
アメーバ種	?	<i>Acanthamoeba sp.</i>	<i>Balamuthia mandrillaris</i>	<i>Acanthamoeba?</i>	<i>Balamuthia?</i>	<i>Naegleria fowleri</i>

PAM: 原発性アメーバ性髄膜脳炎 GAE: 肉芽腫性アメーバ性脳炎

Table 2 各症例のアメーバの形態と免疫染色の結果

症例	1	2	3	4	5	6
脳重	1290 g	1280 g	1375 g	1160 g	1320 g	1620 g
病型	GAE	GAE	GAE	GAE	GAE	PAM
病変分布	嗅球 脳底部 脳室周囲 脳幹被蓋	右前頭頭頂葉 左頭頂葉 基底核 脳幹	脳室周囲 大脳半球 左小脳 脳幹周囲	脳幹 大脳皮質	脳室周囲 海馬海馬傍回 脳幹	嗅球 脳底部 視床
アメーバ 細胞膜の 嗜銀性	+	±	+	+	+	-
PAS	±	+	+	+	±	-
Cyst	+	+	+	+	+	-
核小体	小・単一	単/複	単/複	単/複	単/複	小・単一
最小径 μm	7.3	7.4	6.0	9.4	8.8	6.5
最大径 μm	14.2	24.9	25.0	29.5	24.7	10.2
平均 μm	9.0	14.3	12.9	14.7	16.6	8.2
標準偏差	1.4	4.5	5.2	4.2	4.6	1.1
R171	-	-	-	-	-	+
R146	-	+	+	+	+	-
R150	+	+	+	+	+	-
アメーバ種	<i>Acanthamoeba</i> <i>ba</i> sp.	<i>Balamuthia</i> <i>mandrillaris</i>	<i>Balamuthia</i> <i>mandrillaris</i>	<i>Balamuthia</i> <i>mandrillaris</i>	<i>Balamuthia</i> <i>mandrillaris</i>	<i>Naegleria</i> <i>fowleri</i>

PAM: 原発性アメーバ性髄膜脳炎 GAE: 肉芽腫性アメーバ性脳炎

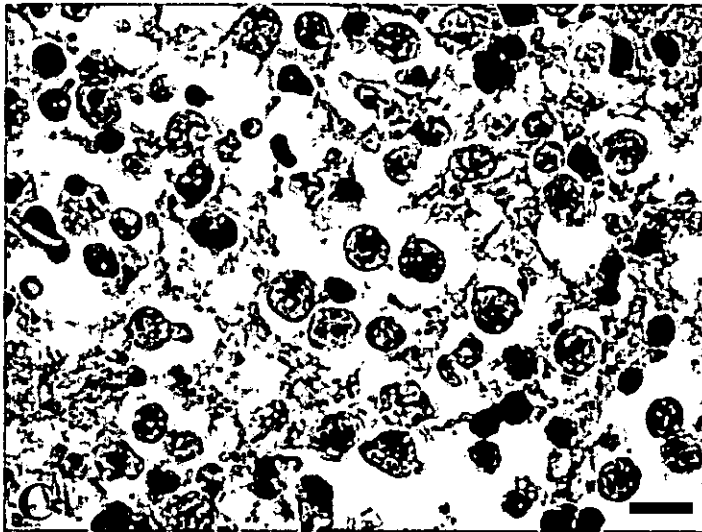
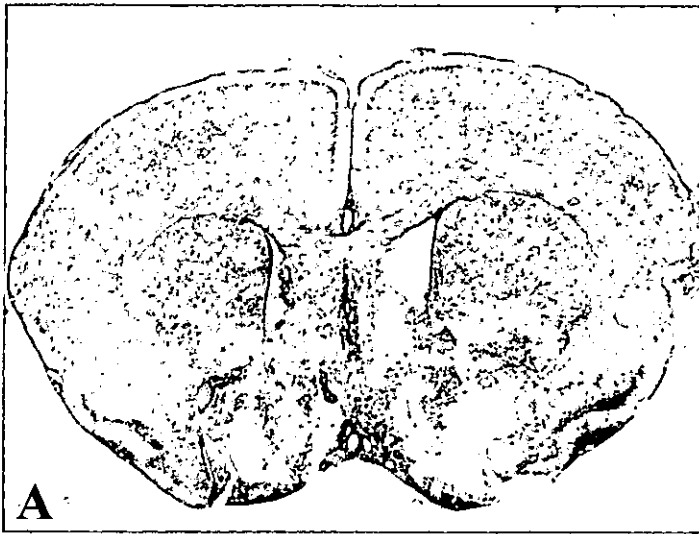


図1: *N. fowleri*感染マウス、D6発症。A: 病変は右側頭部、基底核、脳底部を主体とする。K-B染色。B: くも膜下腔から小脳実質へ及ぶ病変。HE染色。C: 壊死性病変にみとめられた*N. fowleri*栄養体。HE染色、bar 20 μ m。

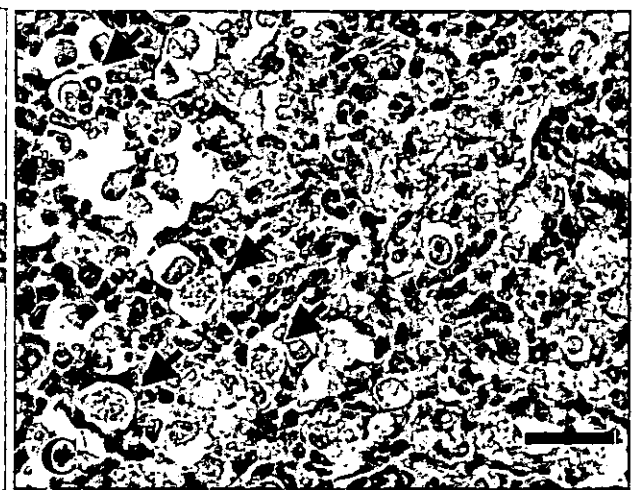
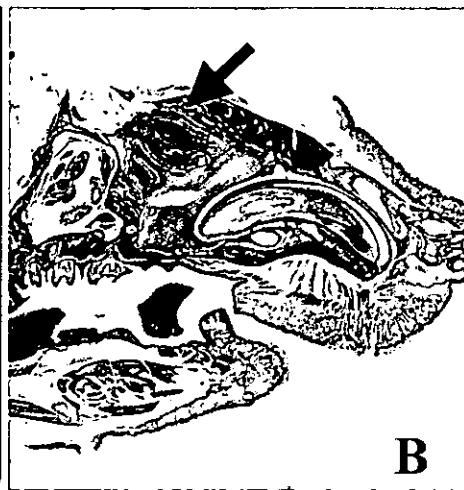


図2: *N. fowleri*感染マウス、D7発症。脳内に接種したにもかかわらず、嗅脳から嗅神経にかけて病変を認めた例。A: 脳を頭頂部より見る。両側嗅脳にbrownishな病変を認める(矢印)。B: 頭部矢状段、Azasn染色。病変は嗅脳から嗅神経に及ぶ(矢印)。C: 嗅神経では高度の炎症細胞浸潤とともに多数のアメーバ栄養体が認められる。HE染色、bar: 20 μ m。

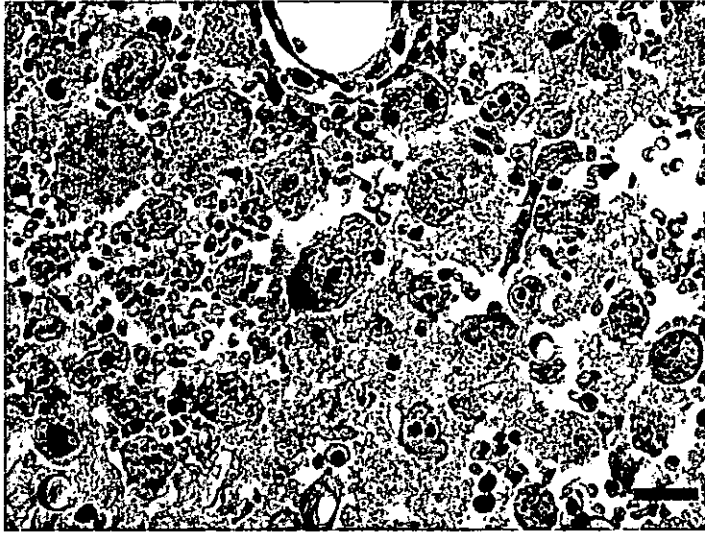
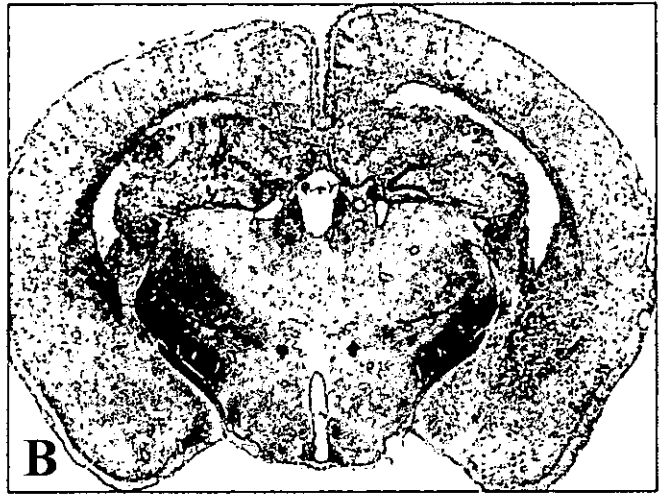


図3: *B. mandrillaris*感染マウス、D6発症。A: 病変は右側頭部、海馬を主体とする。B: 病変は高度の壊死性病変。海馬、K-B染色。C: 壊死性病変にみとめられた*B. mandrillaris*栄養体。大小不同で明瞭な核小体を有するものも多く、胞体内には豊富な顆粒・小胞を容れる。HE染色、bar 20 μ m。

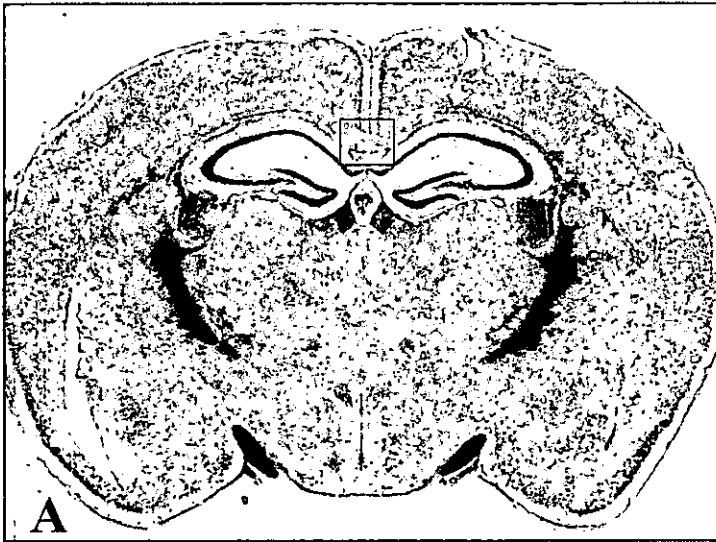


図4: *A. culberstoni*感染マウス、D2未発症。A: 明らかな病変は認められない。K-B染色。B: 脳梁部(右図四角)拡大。ごく少数ながら散在性にアメーバ栄養体を認める。周囲に組織の反応は認められない。HE染色、bar: 10 μ m。

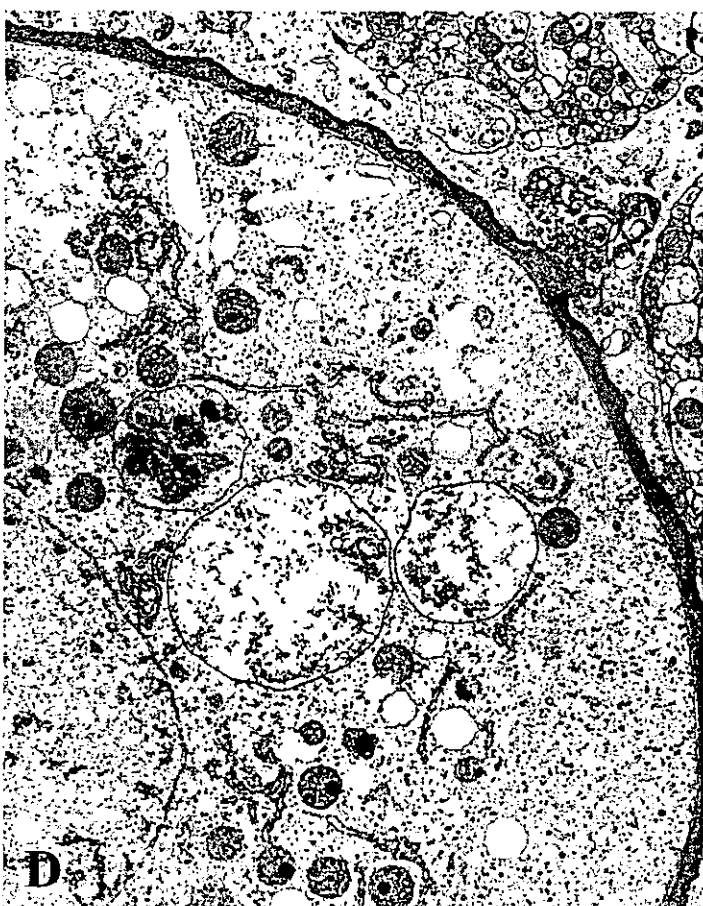
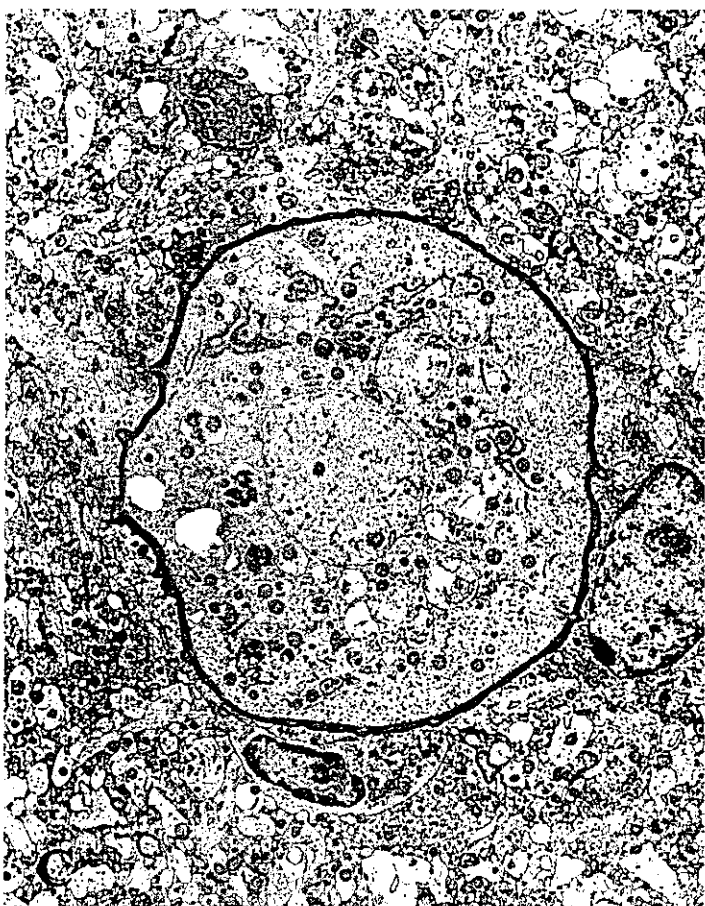
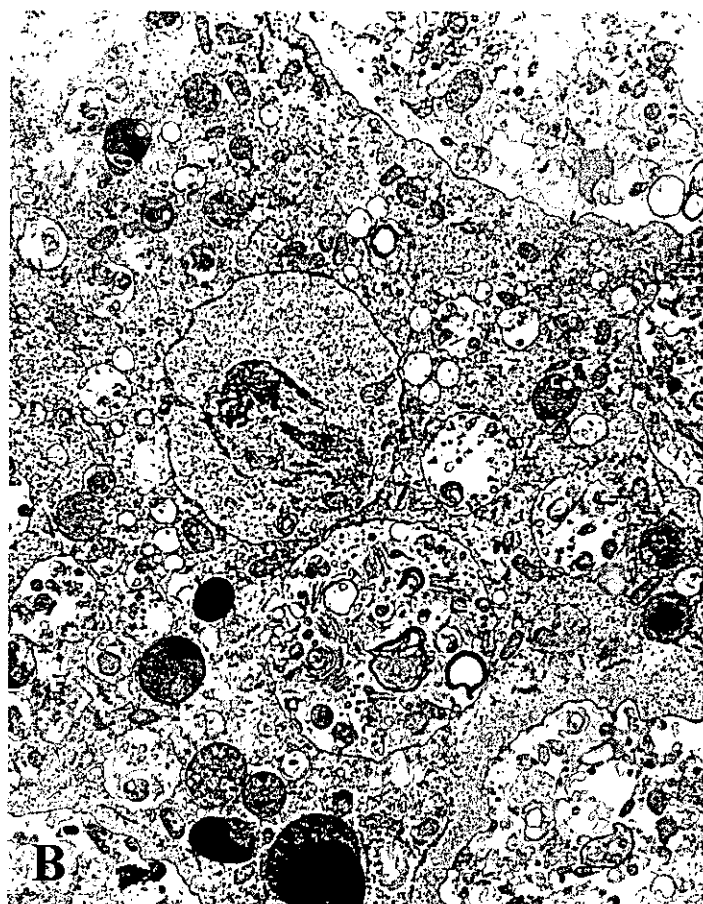
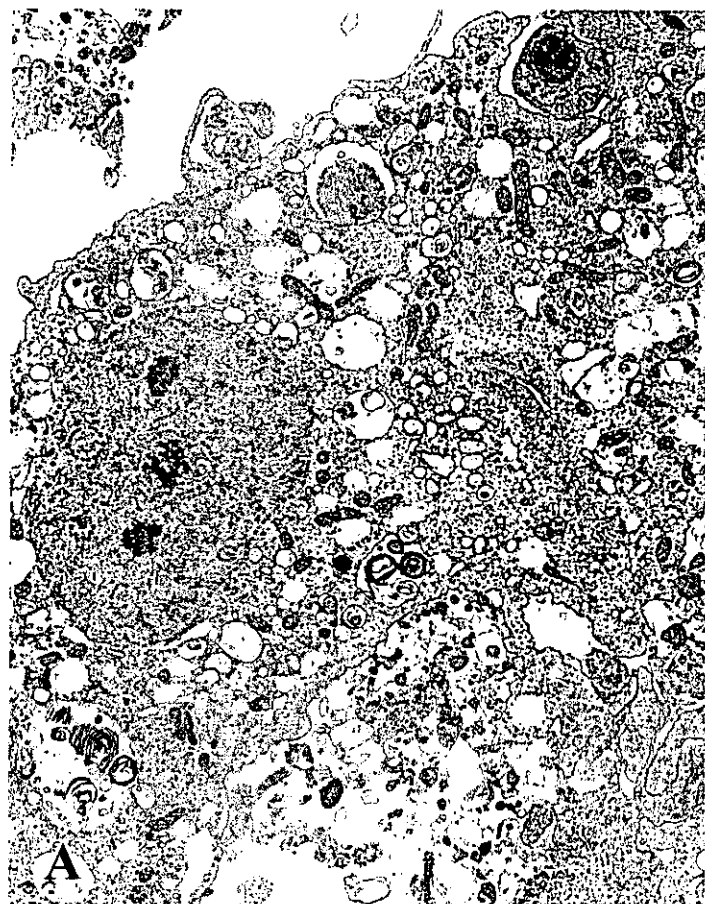


図5: アメーバ栄養体の透過電顕像。A, B: *B. mandrillaris*。いびつで複数個の核小体を有し、ectoplasmには細線維の集簇像が認められる。Endoplasmには大小の電子密度の高い構造物や多数のvesicles、アメーバに特徴的なtubularな構造を持つミトコンドリアが認められる。C, D: *A. culbertsoni*。小型球状の核小体を有し、ectoplasmは電子密度の高い線維の集簇からなる。Endoplasmには多数のvesiclesおよびtubularな構造を持つミトコンドリアが認められる。

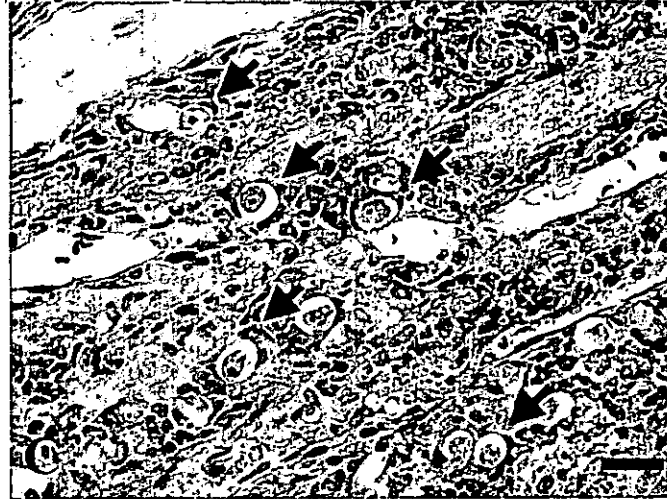
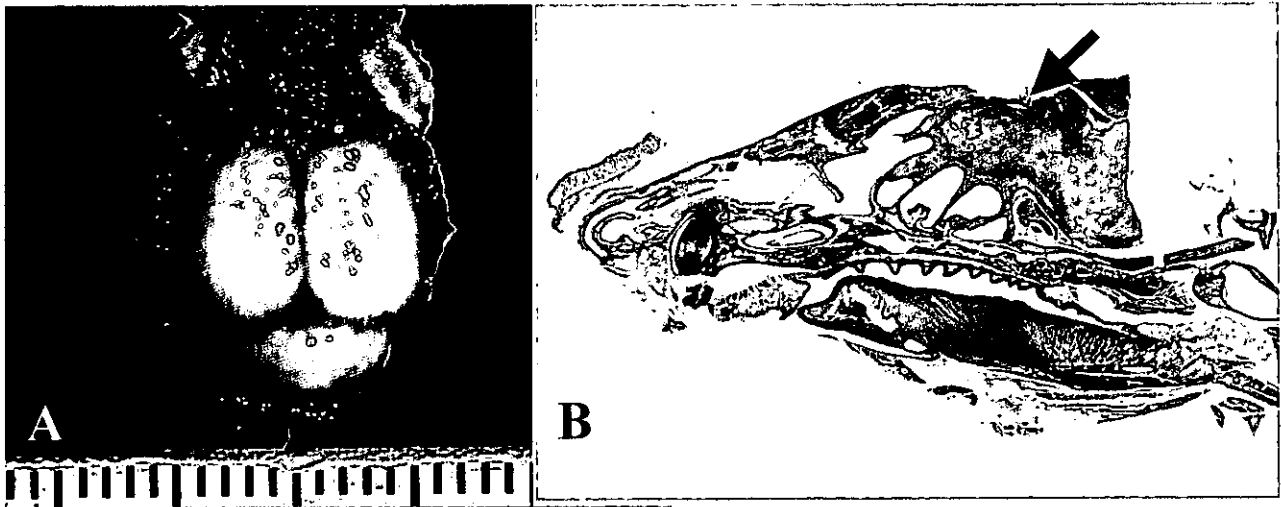


図6: *N. fowleri*感染マウス、D6発症。A: 両側嗅脳から前頭葉前方にかけて、高度の病変が認められる。B: 頭部矢状断Azan染色標本。嗅神経から嗅脳・前頭葉前方にかけて高度の炎症性病変が認められる(矢印)。C: 上記部位には多数の炎症細胞浸潤とともにアメーバ栄養体が認められる。HE染色、bar 20 μ m。

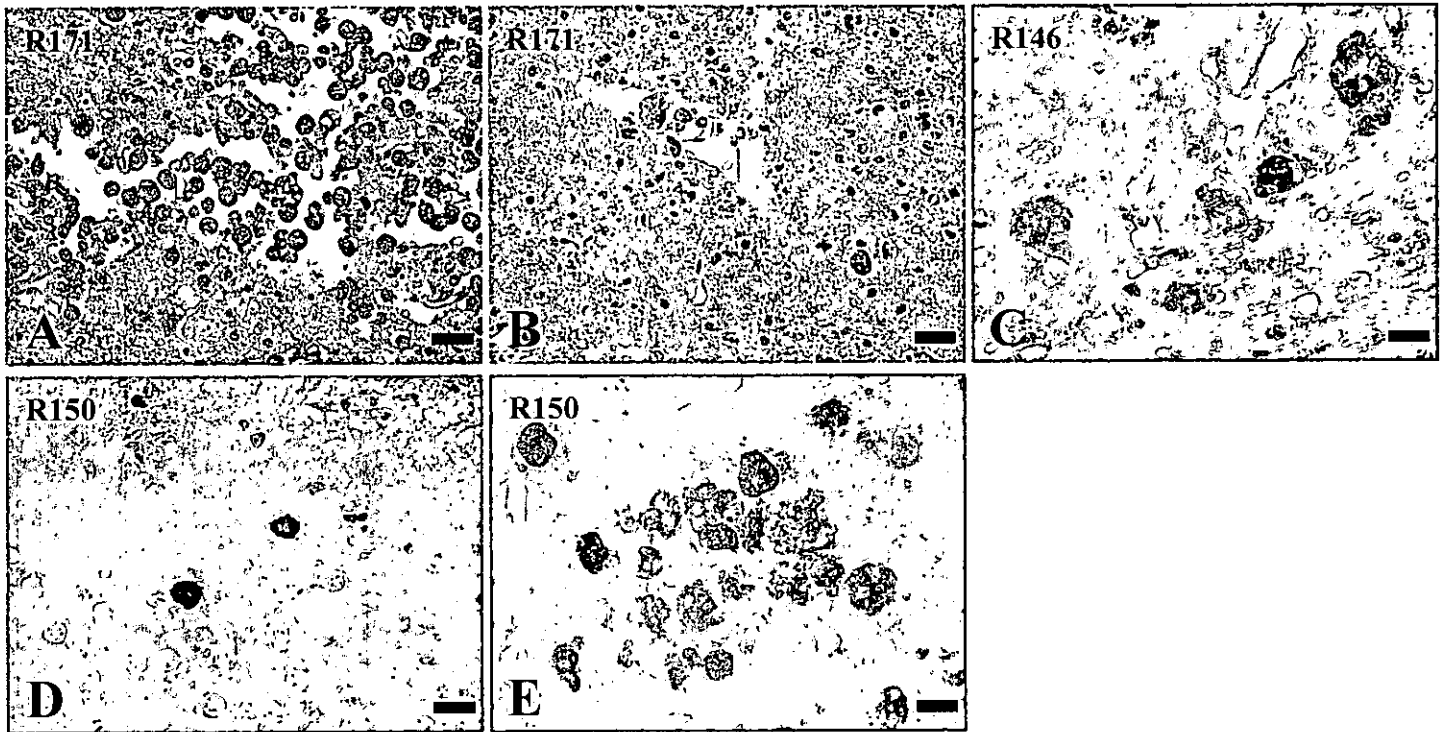


図7: 各種アメーバ特異抗体による免疫染色 (感染マウス脳)、bar 20 μ m。A, B: R171。 *N. fowleri*栄養体の細胞膜および胞体が染色される(A)。 *N. australiensis*の栄養体でも同様の陽性像が認められる(B)。 C: R146。 *B. mandrillaris*栄養体の細胞膜および胞体が染色される。 D, E: R150。 *A. culberstoni*栄養体の細胞膜および胞体が染色されるとともに(D)、 *B. mandrillaris*栄養体も陽性を示す(E)。

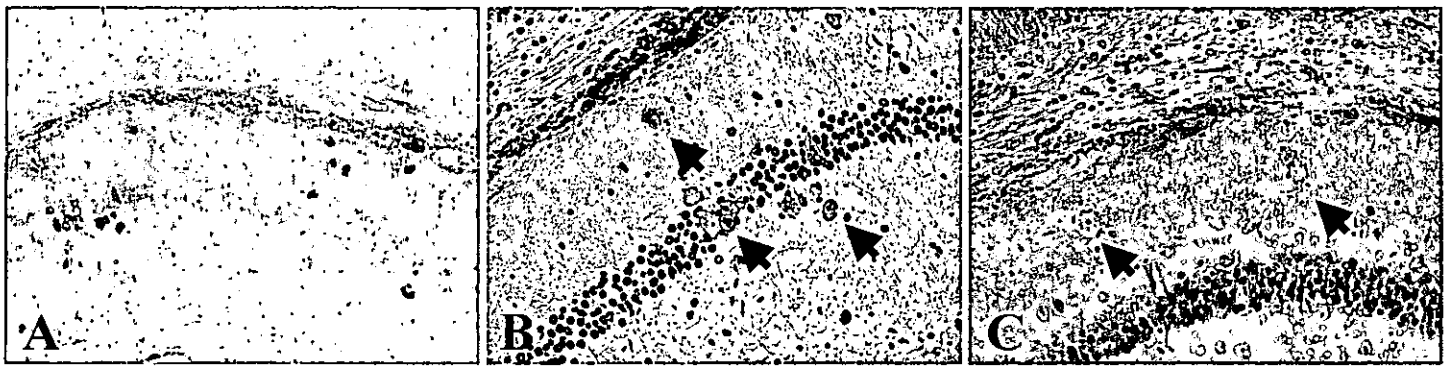


図8: *B. mandrillaris*感染マウス。D2、未発症。A: R150陽性のアメーバ栄養体が海馬に少数散在性に認められる。同部をBodian染色(B)、HE染色(C)で観察するとアメーバ栄養体の周囲にはほとんど細胞反応がなく、脳実質にアメーバ栄養体が細胞単位で浸潤している(矢印)。

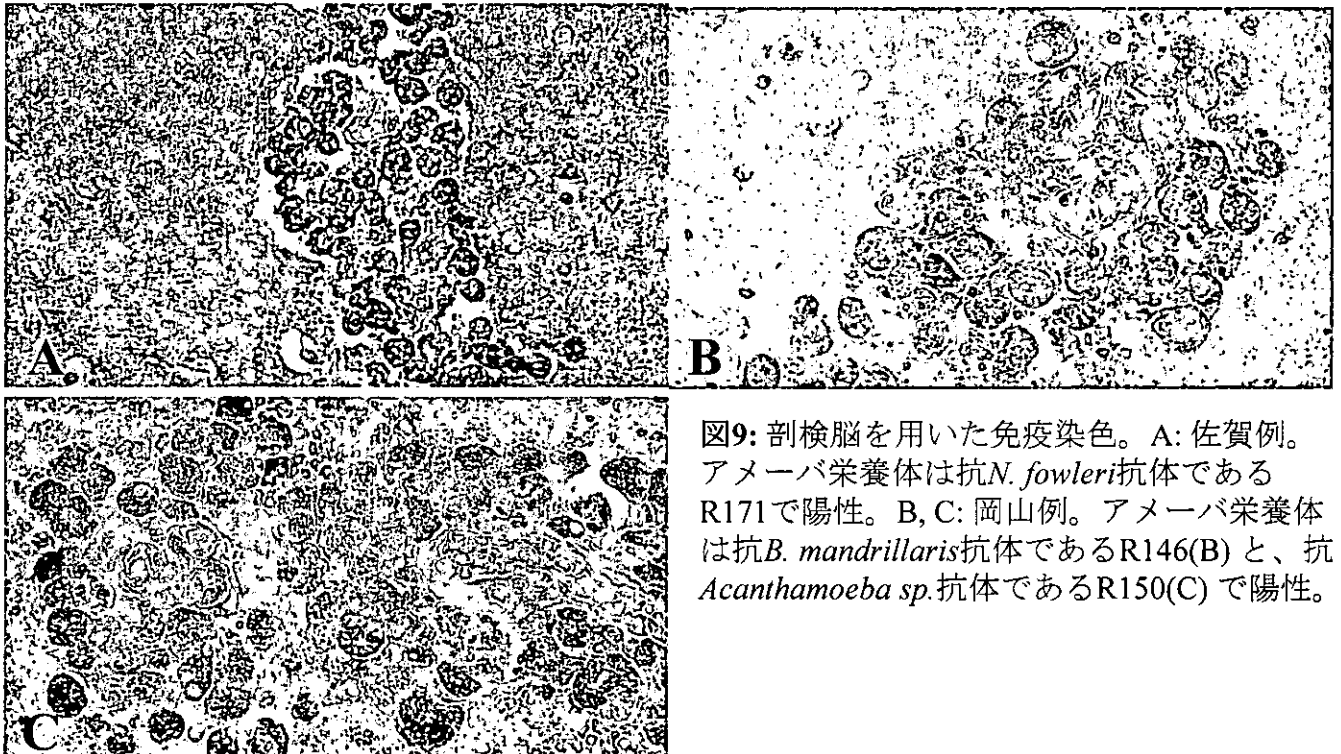


図9: 剖検脳を用いた免疫染色。A: 佐賀例。アメーバ栄養体は抗*N. fowleri*抗体であるR171で陽性。B, C: 岡山例。アメーバ栄養体は抗*B. mandrillaris*抗体であるR146(B)と、抗*Acanthamoeba sp.*抗体であるR150(C)で陽性。

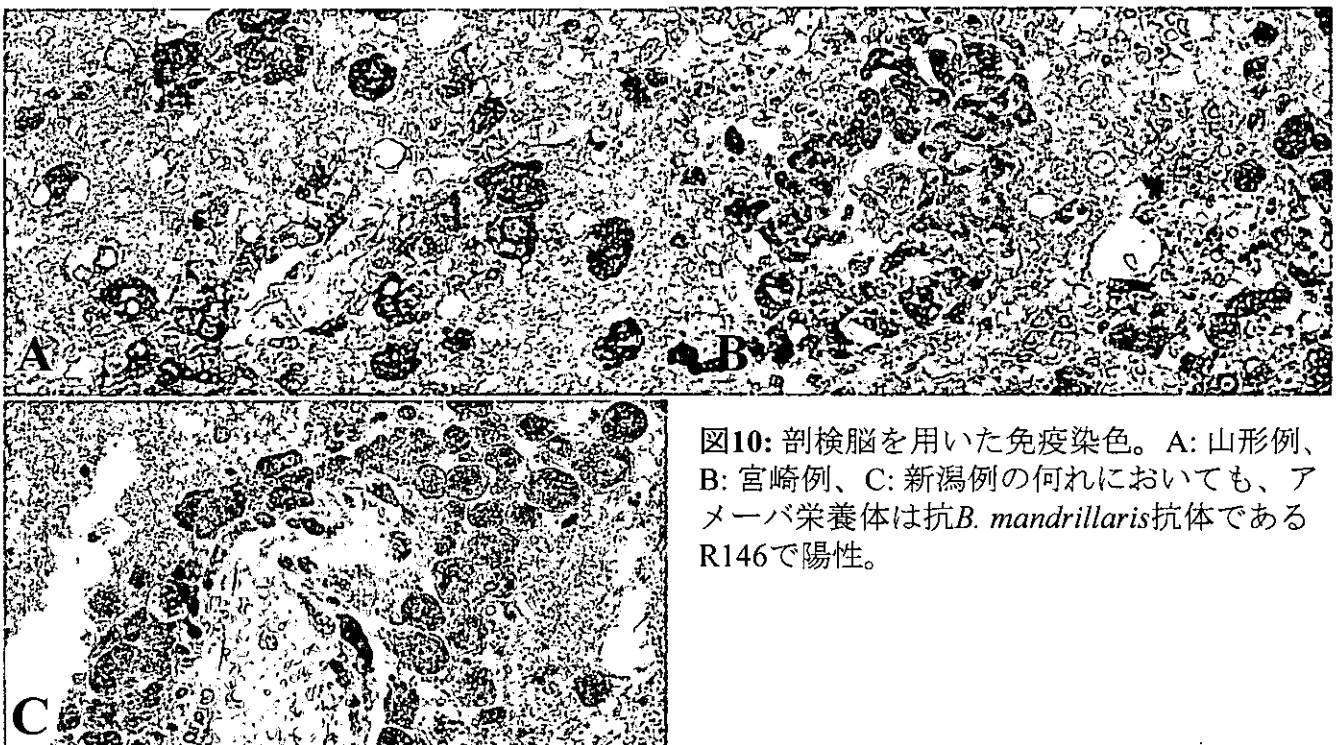


図10: 剖検脳を用いた免疫染色。A: 山形例、B: 宮崎例、C: 新潟例の何れにおいても、アメーバ栄養体は抗*B. mandrillaris*抗体であるR146で陽性。

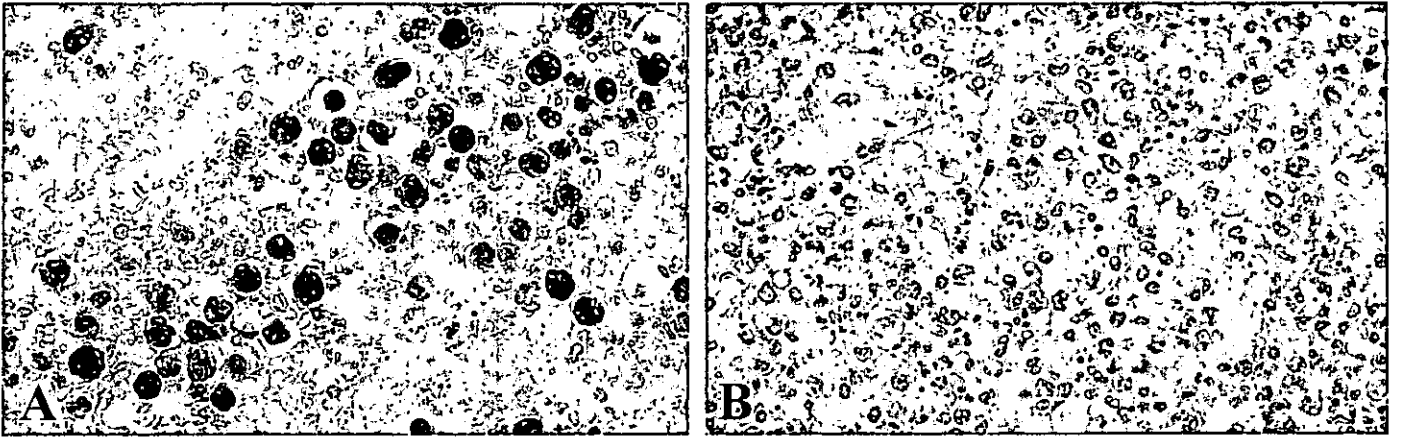


図11: 東京例。アメーバ栄養体は抗*Acanthamoeba sp.*抗体であるR150で陽性(A)、抗*B. mandrillaris*抗体であるR146で陰性(B)を示す。

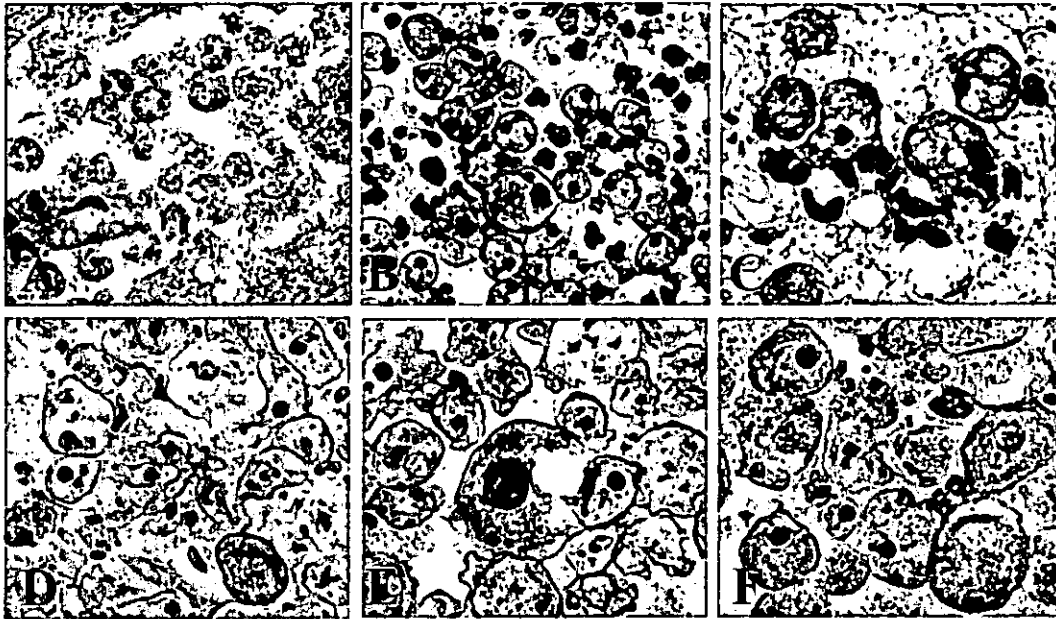


図12: 剖検脳アメーバ栄養体のBodian染色。A: *N. fowleri*(佐賀例)、B: *Acanthamoeba sp.*(山形例)、C-F: *B. mandrillaris*、山形例(C)、岡山例(D)、宮崎例(E)、新潟例(F)。*N. fowleri*は嗜銀性を有さず、小型円形である。*B. mandrillaris*は細胞膜に嗜銀性を有し、大型で大小不同が著しい。

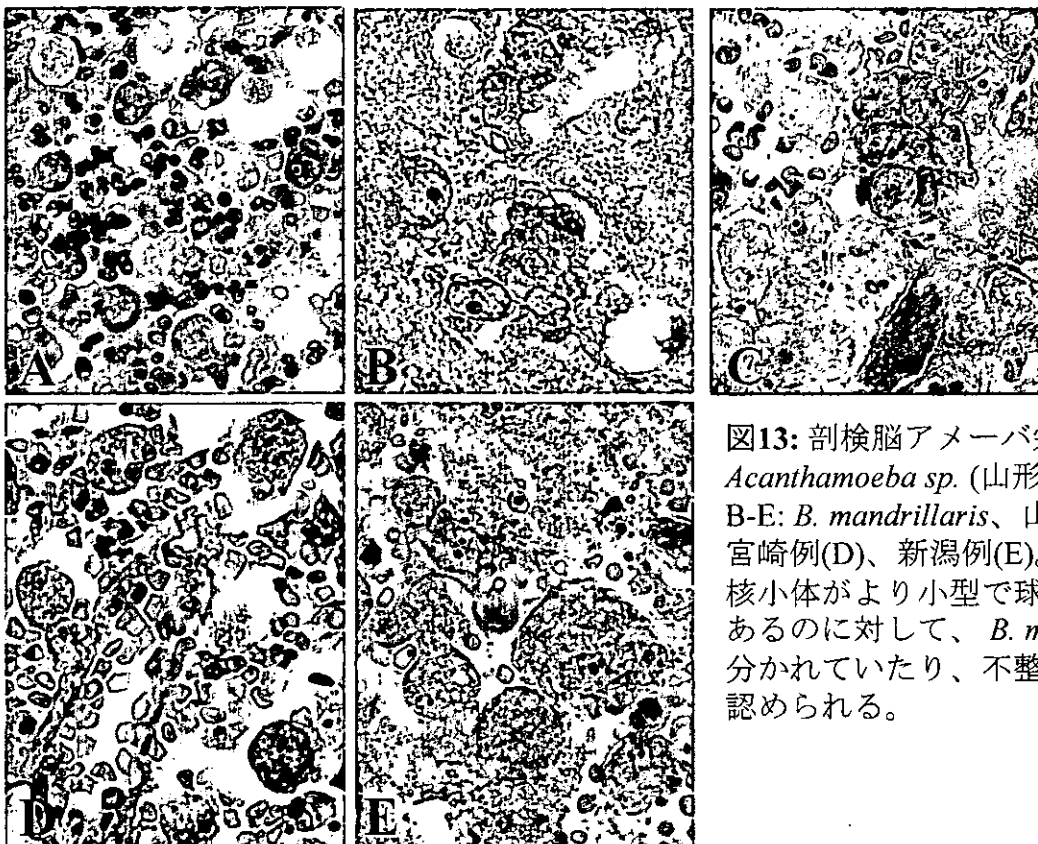


図13: 剖検脳アメーバ栄養体のGiemsa染色。A: *Acanthamoeba sp.*(山形例)、B-E: *B. mandrillaris*、山形例(B)、岡山例(C)、宮崎例(D)、新潟例(E)。*Acanthamoeba sp.*では核小体がより小型で球状のものがほとんどであるのに対して、*B. mandrillaris*では複数個に分かれていたり、不整形のものが多い傾向が認められる。

厚生労働科学研究費補助金(がん予防等健康科学総合研究事業)
分担研究報告書

温泉・公衆浴場、その他の温水環境におけるアメーバ性髄膜脳炎の病原体
Naegleria fowleri の疫学と病原性発現に関する研究

診断法の開発

分担研究者： 福間 利英 (久留米大学医学部寄生虫学講座)

研究協力者： 原 樹 (久留米大学医学部寄生虫学講座)
下河原理江子 (国立感染症研究所寄生動物部)
小村 麻子 (国立感染症研究所寄生動物部)

昨年度までに得られた計 11 種のマウスB細胞ハイブリドーマの産生するモノクローナル抗体のうち、特異性や反応性の特徴から C015-03-01 クローンが産生するモノクローナル抗体(C015)を選択し、抗体生産方法の検討を含めた診断試薬開発へ向けた最終的な検討を行った。まず、抗体生産方法についてマウス腹水から得る方法とハイブリドーマの培養上清から得る方法を検討した結果、培養上清から抗体を得る方法が計画的生産に適していると判断した。次に、モノクローナル抗体のラベル化等のために必要となる抗体精製法の検討のため、C015を含む全 11 種のモノクローナル抗体のアイソタイプを決定した。その結果、C015を含む7種がIgM(κ)で、残り4種はIgG2b(κ)であった。IgMの精製は一般に困難とされているが、球状ピロリン酸マグネシウム樹脂を用いることで、培養上清中に含まれるほぼ全ての夾雑タンパク質を除去できることが判った。また、エピトープを決定するための予備的な検討結果から、C015は糖鎖を認識していることを示唆する結果が得られた。

A. 研究目的

自由生活性アメーバ *Naegleria fowleri* は温水を好んで生息するうえ、アメーバ性髄膜脳炎が我が国でも散見されるようになってきた。しかしながら、アメーバ性髄膜脳炎の臨床経過は他の髄膜脳炎との相違点が殆ど認められず、臨床経過のみで診断を下すのは極めて困難である。加えて、髄膜脳炎を引き起こす自由生活性アメーバとして、*Naegleria*、*Acanthamoeba* および *Balamuthia* が知られているが、病理組織標本による3種のアメーバの形態的な鑑別診断は困難を極めている。そこで、検体に認められたアメーバの鑑別診断や環境から分離されたアメーバの鑑別のためのモノクローナル抗体を用いた診断・検査試薬の開発を行った。また、発症後の早期に非侵襲的で安全な検査が期待できる鼻腔内スワブ法の検討も実施した。

今年度は、診断・検査試薬の開発ではモノクローナル抗体の生産方法や精製方法を含めた最終的な検討を行った。一方、早期診断法の開発では昨年度までの結果をふまえて今年度は検討を見送った。

B. 研究方法

本研究テーマでは、*N. fowleri*として原発性アメーバ性髄膜脳炎の本邦初症例の患者より分離した YT9611 株を用いた。

Naegleria の培養

N. fowleri YT9611 株は、病原性を維持する目的から脳微少血管内皮細胞 (BMEC) との共培養系で継代培養を行った。10% 牛胎仔血清 (FBS) を含む MEM を用いて継代培養している BMEC がほぼ単層状態に増殖した時点で、別容器で培養中のアメーバを接種した。3-4 日後に BMEC 細胞がほぼ全て破壊され、アメーバが十分に増殖した時点で培養液を SCGYEM に交換し、さらに一晚培養を続けた後、各種実験に供した。培養は全て 37°C、5% CO₂ の環境下で行った。

N. lovaniensis Aq/9/1/45D 株の培養は、SCGYEM を用いて 37°C で行った。

SCGYEM の組成

カゼイン	10 g	Na ₂ HPO ₄	1.42 g
グルコース	2.5 g	K ₂ HPO ₄	0.87 g
酵母抽出物	5 g		

精製水で全量を 1,000 ml に調整しオートクレーブ滅菌後、FBS を 10% となるように加えて使用する

Acanthamoeba の培養

A. castellanii ATCC30011 株の培養は、PPYG を用いて 27°C で行った。

PPYG の組成

ペプトン	10 g	Na ₂ HPO ₄	1.5 g
グルコース	18 g	K ₂ HPO ₄	0.2 g
酵母抽出物	2.5 g	NaCl	8 g
KCl	0.2 g		

精製水で全量を 1,000 ml に調整しオートクレーブ滅菌して使用する

マウスB細胞ハイブリドーマの培養

ハイブリドーマの培養は、エスクロン:クローニングメディウム CM-B (CM-B: 三光純薬) を用いて、37°C、5% CO₂ の環境下で行った。

腹水の採取

腹水の採取には BALB/c マウス (♀、7 週齢) を用いた。まず、マウス腹腔内に 1 匹当たり 0.5 ml の tetramethyl pentadecane を 2 週間前と 1 週間前に注射した。次に、CM-B を用いて培養した C015-03-01 ハイブリドーマを PBS で洗浄後、5×10⁶/ml に再懸濁し 1 ml ずつをマウス腹腔内へ接種した。ハイブリドーマ接種後、腹水の貯留が認められたマウスから 2-3 日おきに腹水の採取を行った。採取した腹水は 1,500×g で 10 分間遠心分離し、上清を -40°C に保存した。

抗体価の測定

抗体価の測定には ELISA (酵素抗体法、Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) を用いた。前述の培養系で得られた *N. fowleri* を集めて PBS で 3 回洗浄後、プロテアーゼインヒビターを含む

50 mM 炭酸緩衝液(pH 9.6)を用いて 2×10^6 /ml に再懸濁し、凍結融解と超音波処理で細胞を破壊し抗原溶液とした。抗原溶液を96穴マイクロタイタープレートの各ウェルに100 μ l ずつ分注し、37°Cで2時間静置して抗原を固相化した。その後、抗原を固相化した各ウェルにブロックエース(雪印乳業)を250 μ l ずつ分注し、4°Cで一晩静置することでブロッキングを行った。試料は抗原を固相化しブロッキングした各ウェルに100 μ l ずつ分注し37°Cで2時間反応させた後、界面活性剤(0.05% Tween 20)を含むPBS(PBS-T)で4回洗浄した。その後、PBS-Tで希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体(Sigma社)を100 μ l ずつ分注し、37°Cで2時間反応させた。反応後、各ウェルはPBS-Tで4回洗浄し、TMB Microwell Peroxidase Substrate System(KPL社)を用いて、37°Cで30分間酵素反応を行った。酵素反応は、100 μ l の1 M リン酸を加えることで停止し、マイクロプレートリーダー(吸光度 450 nm)を用いて比色定量を行った。

モノクローナル抗体のアイソタイプ決定

アイソタイプは、Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit(HyCult biotechnology b. v. 社)を使用し、試料として培養上清を用いて決定した。

SDS-PAGE およびウェスタンブロット

細胞などの試料は必要に応じてPBSで3回洗浄後、等量のSDS-PAGE用サンプルバッファーに懸濁し、直ちに96°Cで5分間の加熱処理を行った。SDS-PAGEは4-20%グラジエントゲル(第一化学薬品)を用いて、40 A、2時間の泳動を行った。PVDF膜へのタンパク質の転写は、セミドライプロット法により行った。転写後のPVDF膜は、ブロックエースを用いて4°Cで一晩穏やかに振盪することでブロッキングした。一次抗体には各ハイブリドーマの培養上清を10%ブロックエースを含むTBS-T(20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4, 0.1% Tween 20)で希釈して用いた。一次抗体反応後、PVDF膜はTBS-Tで3回洗浄した。二次抗体にはペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体(Sigma社)を用い、反応後はTBS-Tで4回洗浄し、化学発光(Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate, PIERCE社)によりX線フィルム上に検出した。

ツニカマイシン処理

C015の認識するエピトープが糖鎖であるか否かを検討するため、ツニカマイシン処理を行った。SCGYEMを用いて培養している*N. fowleri*に終濃度10 μ g/mlのツニカマイシンを添加し、24時間培養して解析に供した
(倫理面への配慮)

全ての動物実験は、久留米大学および国立感染症研究所の動物実験指針に従って計画・実行された。必要があれば、実験施設管理責任者の許可のもとに可能な限り苦痛を与えない方法で処理が行われた。

C. 研究結果

モノクローナル抗体生産方法の検討

マウス腹水化によるモノクローナル抗体産生は広く用いられている方法であるが、抗体の産生をマウスに依存する性質上、計画的な生産には不向きである。そこで、計画的かつ工業的にモノクローナル抗体を生産可能な培養法による生産を試みた。まず、マウス腹水および培養上清の抗体価をELISAで測定した結果、それぞれ410,000倍および2,400倍と約200倍の抗体濃度差が判明した。つまり、マウス1匹当たりの腹水回収量は平均して約5 mlであることから、ハイブリドーマの培養スケールを1 Lにすることでマウス1匹に相当するモノクローナル抗体を回収できることになる。

ハイブリドーマ作製・クローニングおよびハイブリドーマの培養に使用しているCM-Bは非常に高価であるうえに、アルブミンをはじめとするタンパク質が高濃度で含まれている。そこで、市販されている種々のハイブリドーマ抗体産生用培養液を検討した結果、Irvin Scientific社の無血清培養液

IS シリーズが最適であると判断した。

培地	タンパク	価格	用途
CM-B	> 1mg/ml	500 ml=45,000 円	ハイブリドーマ作製
IS GRO	50 μ g/ml	10 L=120,000 円	馴化・抗体産生
IS PRO	1 μ g/ml	10 L=110,000 円	抗体産生
IS MAB-V	0 μ g/ml	1 L=12,600 円	医薬品用抗体産生

IS GRO への馴化の段階で各培養液中における抗体産生量を ELISA で比較した結果、CM-B での産生量と同程度の抗体価が認められた。

モノクローナル抗体のアイソタイプ解析

全 11 種のハイブリドーマの産生するモノクローナル抗体のアイソタイプを解析した結果、C015 を含む 7 種が IgM (κ)、4 種が IgG2b (κ) であった。

抗体名	サブクラス	軽鎖
3G	IgG2b	κ
9D	IgG2b	κ
C015	IgM	κ
C016	IgM	κ
C031	IgM	κ
C132	IgG2b	κ
C133	IgG2b	κ
C134	IgM	κ
C179	IgM	κ
C215	IgM	κ
R031	IgM	κ

C015 精製方法の検討

IgM 抗体は IgG 抗体と比較して精製が煩雑で困難なうえ、構造上、凝集しやすい性質を有する。つまり、酸性条件下で溶出を行うアフィニティークロマトグラフィーや濃縮操作が必要になるゲル濾過グラフィーを精製操作に含めることを避けたほうが比較的容易な精製と回収率の向上を期待できる。IgM 精製用樹脂は数種類しか市販されていないが、球状ピロリン酸マグネシウム樹脂 (イムノアシスト MG-PP、関東化学) は中性付近の pH のままイオン強度を変化させることでイムノグロブリンの分離精製を行える利点を有する。そこで、イムノアシスト MG-PP を用いて、培養上清からのモノクローナル IgM 抗体の精製を試みた。

緩衝液 1 (300 mM NaCl を含む 10 mM リン酸緩衝液、pH 6.8) で平衡化した MG-PP カラムに、終濃度 150 mM となるように NaCl を溶解した C015:CM-B 培養上清を添加した。培養上清添加後、緩衝液 1 を用いて吸光度 (UV 280 nm) が充分低くなるまで夾雑タンパク質を溶出した。結合した IgM は緩衝液 2 (300 mM リン酸緩衝液、pH 6.8) を用いて溶出した。溶出画分の SDS-PAGE による解析の結果 (Fig. 1)、ほぼ全ての夾雑タンパク質を除去できることが確認できた。

Fig. 1 MG-PP による C015 の精製

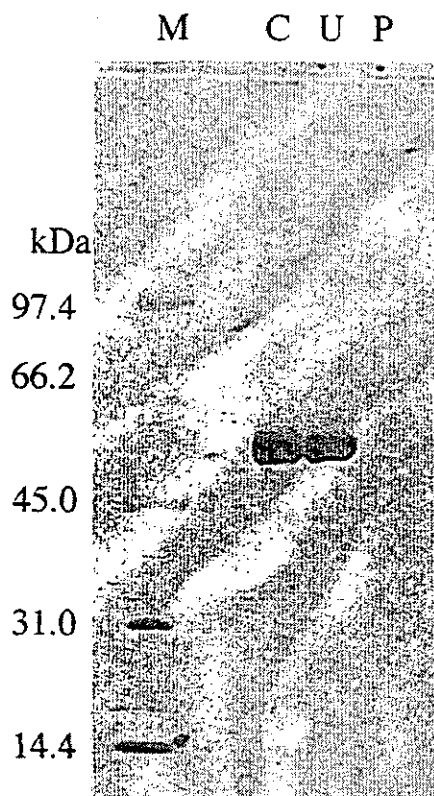
SDS-PAGE gel: 4-20% gradient
アプライ量: 10 μ l/lane

M: MW marker

C: C015 culture supernatant

U: unbound fraction

P: purified C015 IgM fraction



C015 のエピトープ解析および反応特異性

昨年度に実施したウェスタンブロットによる特異性の検討から、C015 は *N. lovaniensis* と弱い交差反応を認めたものの、*Acanthamoeba* や *Balamuthia* とは全く交差反応を認めず *N. fowleri* に高い特異性を有することを確認している。また、*N. fowleri* 可溶性タンパク質に対する C015 の反応パターンは、高分子から低分子領域にかけての連続したラダー状を示し、C015 の認識するエピトープが糖鎖である可能性を示唆する結果を得た。そこで、N-結合グリコシル化を阻害するツニカマイシン存在下で *N. fowleri* を培養し、C015 との反応パターンを解析した。また、*Acanthamoeba*、BMEC、SCGYEM、および大腸菌についても交叉反応性を検討した。

ツニカマイシン処理を施した試料と通常の *N. fowleri* 試料とを比較すると、高分子領域で軽度の反応性の低下や複数のバンドのシフトは認められたものの (Fig. 2、レーン N&T)、明瞭な反応の消失は確認できなかった。

N. fowleri 以外の試料と C015 との交叉反応性については、*N. lovaniensis* において高分子領域で軽度の交差反応が認められた (Fig. 2、レーン L)。ただし、X線フィルムへの露光時間を 30 分間に延長しても *N. lovaniensis* の低分子領域では交差反応は認められなかった (図省略)。その他の試料、*Acanthamoeba* (Fig. 2、レーン A)、BMEC (Fig. 2、レーン B)、大腸菌 (Fig. 2、レーン E)、SCGYEM (Fig. 2、レーン S) については、交差反応は全く認められず C015 の高い特異性が確認された。

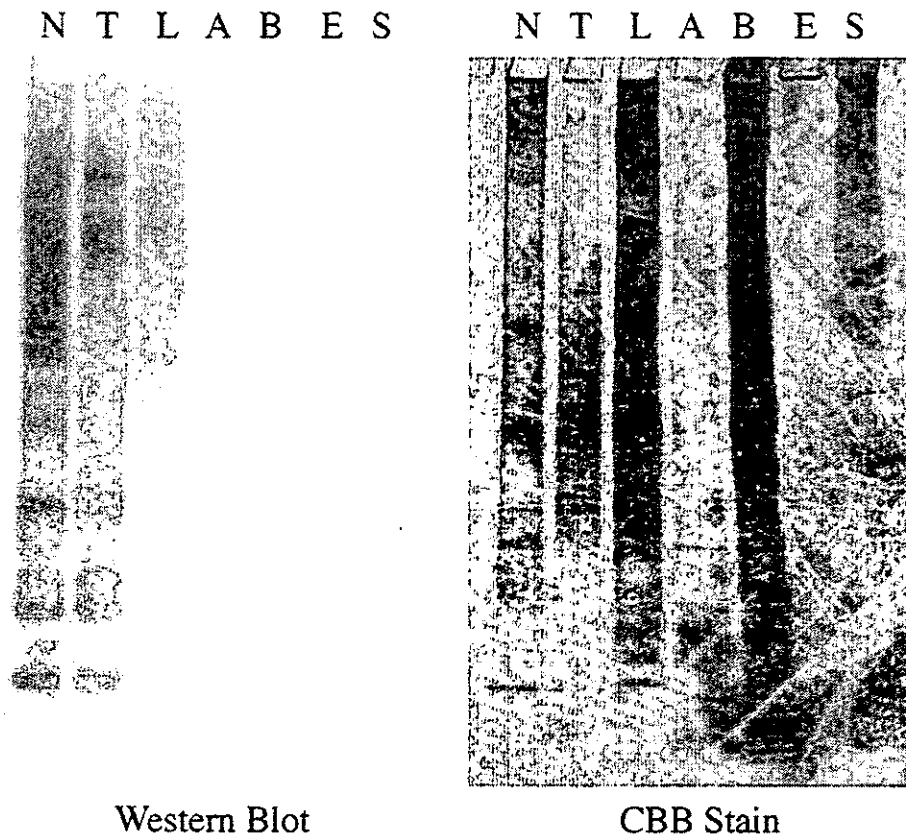


Fig. 2 C015 の反応性の検討

SDS-PAGE: 4-20% gradient gel
 アプライ量: 6 μ g protein/lane (non-reduced)
 一次抗体: C015 (培養上清) 500 倍希釈、室温、2時間
 二次抗体: 50,000 倍希釈、室温、1時間
 露光時間: 5秒

N: *N. fowleri*, T: *N. fowleri* ツニカマイシン処理
 L: *N. lovaniensis*, A: *A. castellanii*
 B: BMEC, E: 大腸菌, S: SCGYEM

モノクローナル抗体の反応性の検討

昨年度までに検討した 3G、9D および C015 以外の 8 種のモノクローナル抗体についてウェスタンブロットによる *N. fowleri* との反応性を解析した。

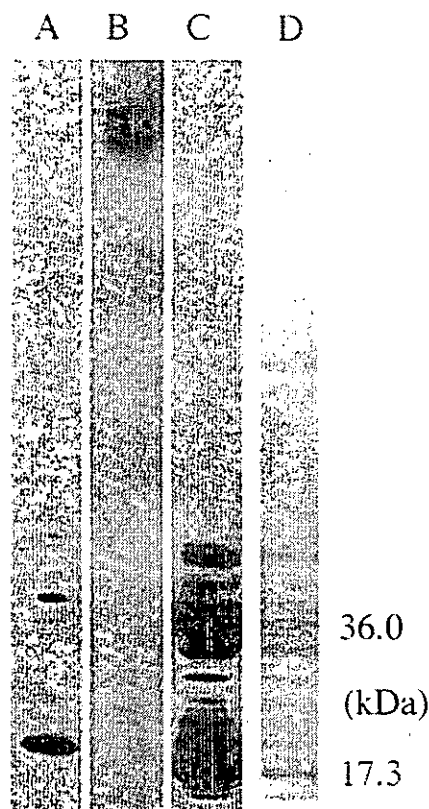
その結果、Fig.3 に示すように 3 種 (C016、C031、R031) のモノクローナル抗体についてはそれぞれ 17.3 kDa、>200 kDa、17.3 & 36 kDa に *N. fowleri* との強い反応が認められた。残念ながら残る 5 種のモノクローナル抗体についてはウェスタンブロット上での反応は認められなかった (図省略)。

Fig. 3. モノクローナル抗体の反応性

SDS-PAGE: 4-20% gradient gel
 アプライ量: 50,000 cells/lane

一次抗体: 2-8倍希釈
 室温、2時間
 二次抗体: 50,000倍希釈
 室温、1時間
 露光時間: 5秒

A: C016, B: C031
 C: R031, D: CBB stain



D. 考察

今年度は、昨年度までに得られた 11 種のモノクローナル抗体のうち、C015 を用いて診断試薬を開発すべく最終的な検討を行った。まず、工業的な生産を視野に入れたモノクローナル抗体の産生方法においては、ハイブリドーマの培養上清から回収する方法を選択した。理由としては腹水化による採取の欠点、(1) 計画的産生が困難、(2) 多大な時間を要する、(3) スケールアップはマンパワーに頼らざるを得ない、を培養法による回収の長所、(1) 計画的産生が容易、(2) 時間的およびマンパワーの面からスケールアップが容易、でカバー可能と判断した点が挙げられる。これらの判断から、ハイブリドーマの培養液の選択を実施し、Irvin Scientific 社の無血清培養液 IS シリーズが最適であると判断した。IS シリーズの培養液は、添加されている場合でもタンパク質濃度が極めて低いうえに種類と濃度も公表されている。これに対して、ハイブリドーマ作製に使用した CM-B は、タンパク質濃度や種類などが非公表であり、加えて本研究での使用中にロット間の品質の相違も経験した。また、費用的側面でも同量の抗体を生産する場合、今回の検討結果では腹水化より IS シリーズを用いた培養法に利点があることもわかった。以上の結果をふまえて、実際にスピナーフラスコを用いた工業的生産を実施すべく、CM-B から IS GRO への馴化を実施している。

培養法による抗体産生と間接酵素抗体法を用いる場合には必要性は低いですが、検出法として直接法やサンドイッチ法を実施する場合には、抗体ラベル化に伴ったモノクローナル抗体の精製が必要になる。一般に IgM 抗体は精製が困難とされているが、数年前に製品化されたピロリン酸マグネシウムを主成分とするイムノアシスト MG-PP を用いた予備的な検討結果は良好であり、培養上清中に含まれるアルブミンをはじめとする夾雑タンパク質のほぼ全てを除去可能であった。ただし、ELISA による精製 IgM の抗体価の測定結果から、今回の精製条件では IgM の回収率が思わしくなかったため、今後、緩衝液のイオン強度や pH の条件を微調整し回収率の向上を検討する余地がある。

昨年度に実施した C015 の反応性の検討から、エピトープが糖鎖である可能性が考えられたため、ツニカマイシン処理による反応性の相違を検討した。ツニカマイシンは N-結合グリコシル化を阻害

することで、N-グリコシド型のタンパク質・糖質結合の形成を阻害する抗生物質である。今回は、10 μ g/mlで24時間の処理を行ったが、軽度の反応性低下しか認められなかった。これらの原因として、(1)C015 が認識する糖鎖は N-グリカンの一部ではあるものの半減期が非常に長いために 24 時間の処理では顕著な減少が認められなかった、(2)C015 が認識する糖鎖は O-グリカンやプロテオグリカン、グリコリピドの一部でありツニカマイシン処理では生合成が十分に阻害できなかったなどの可能性が考えられる。今後、化学的糖鎖除去法などを用いて引続きエピトープ解析を実施予定である。

C015 の特異性の検討では、*N. lovaniensis* に対してのみ弱い交叉反応が認められたが、ヒト由来細胞 (BMEC) や *Acanthamoeba* などとは全く交差反応を認めず、C015 の *N. fowleri* に対する高い特異性を再確認した。*N. lovaniensis* に対して認められた弱い交叉反応については、現時点では問題はないと考えているが、検査対象 (組織、フィルター、分離アメーバなど) や検出方法 (直接、間接など) を決定後に再確認する予定である。

C015 以外のモノクローナル抗体についても、ウェスタンブロットを用いて *N. fowleri* との反応性を検討した。その結果、5種についてはウェスタンブロットによる反応性が認められなかったものの、既に報告している 3G (250 kDa)、9D (250 kDa)、C015 (ラダー) に加え C016 (17.3 kDa)、C031 (>200 kDa)、R031 (17.3&36 kDa) に強い反応が認められた。これらのモノクローナル抗体が認識するエピトープ解析や特異性は引続き解析予定である。

鼻腔内からのアメーバの検出については、実現すれば PAM 発症後の初期段階で安全かつ簡便に診断が可能になることから種々の検討を行った。しかしながら昨年度までの結果から、生きたマウスをモデル動物として用いることが困難であることが判明し、加えて、健常人の鼻腔や口腔から病原性 *N. fowleri* が分離されたとする報告がなされたことから、本検出法の実現は困難であるとの結論に至った。

E. 結論

本研究期間を通じて、計 11 種の抗 *N. fowleri* モノクローナル抗体を作製することが出来た。特異性や反応性の検討結果から診断試薬用に採用することが決定した C015 については、製品化へ向けた工業的生産と精製方法について具体的な見通しをつけることが出来た。今後、検査対象や検出方法の検討は残されているが、近い将来に診断・検査用試薬として製品化されることが期待される。

F. 健康危険情報

関連事項なし

G. 研究発表

Tatsuru Hara, Toshihide Fukuma : Diagnosis using PCR of the primary amoebic meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri*. (投稿準備中)

H. 知的財産権の出願・登録状況

関連事項なし

厚生労働科学研究費補助金(がん予防等健康科学総合研究事業)
分担研究報告書

温泉・公衆浴場等、その他の温水環境におけるアメーバ性髄膜脳炎の病原体
Naegleria fowleri の疫学と病原性発現に関する研究

Naegleria fowleri 及びその近縁種 *N. lovaniensis* におけるタンパク組成の比較

分担研究者: 泉山信司 (国立感染症研究所 寄生動物部)
八木田健司 (国立感染症研究所 寄生動物部)

研究協力者: 小村麻子 (国立感染症研究所 寄生動物部)
下河原理江子 (国立感染症研究所 寄生動物部)

概要

今年度は N 末端ブロックのタンパク質について中間配列の解析方法を検討し、質量分析によるタンパク質解析を試みた。さらに数種の抗体を用いて、2D-PAGE によるウェスタンブロット解析を行った。総まとめとして、これまでに得られた情報をもとに *N. fowleri* の 2D-PAGE マップを作成し、データベース構築を試みた。

アミノ酸配列解析では N 末端および中間配列解析合わせて 59 個のスポットを解析し、その内 34 個について 20 残基前後の N 末端アミノ酸配列を得、相同性検索の結果 14 個が既知のタンパク質と高い相同性を認めた。得られたアミノ酸配列は UniProt データベースに登録することとし、現在 17 個のアミノ酸配列を公開した。質量分析では 25 個のスポットについて LC-MS/MS による解析を行い、アクチンおよび MP2CL5 を同定した。さらに MS/MS データから DeNovo シークエンシングを試み 5 残基程度のアミノ酸配列情報を得た。各タンパクスポットのさらなる特徴づけとして、2D-PAGE によるウェスタンブロット解析を行い、アクチン関連タンパク質および *N. fowleri* モノクローナル抗体 Nf-5D12u に反応するスポットを分離した。

A. 研究の目的

自由生活性の小型アメーバである *Naegleria* 属アメーバは淡水環境中に広く棲息するが、*N. fowleri* など数種のアメーバは 26°C 以上の温水環境に好んで棲息する。本属原虫の生活環にはアメーバ期、鞭毛期と嚢子期の 3 つのステージが知られている。本属 *N. fowleri* は強い病原性を示す。ヒトへの感染は鼻腔粘膜に裸出する嗅神経末端から侵入して経神経的に脳へ達することが知られている。神経系に対する親和性や組織侵入性に係る因子の発現機構は不明である。また、病原性発現と生活上の発育ステージとの関係も明らかとなっていない。本研究ではこれらの各ステージにおけるタンパクの発現、およびその調整について病原性発現との関連で解析を試みるもので、具体的には *N. fowleri* と生態学的にも形態学的にも分類が不可能とされ、わずかに数種のアイソザイ

ムの違いが認められているに過ぎない非病原種の *N. lovaniensis* とのタンパク発現を比較することで *N. fowleri* の病原性発現に係るタンパク発現調整の糸口を探ろうとするものである。あわせてそのタンパク抗原を特定したいと考える。

これまでに両者の総タンパク質の 2D-PAGE 解析によって、*N. fowleri* の総タンパク質から本種に特徴的なタンパクスポット 102 個と 2 種間共通タンパクスポット 88 個を分離することができ、これらの内いくつかのタンパク質については N 末端アミノ酸配列分析を行った。今年度は N 末端ブロックのタンパク質について中間配列の解析方法について検討し、質量分析によるタンパク質解析を試みた。さらに数種の抗体を用いて、2D-PAGE によるウェスタンブロット解析を行った。総まとめとしてこれまでに得られた情報をもとに *N. fowleri* の 2D-PAGE マップを作成し、データベース構築を試みた。

B. 研究方法

1. 供試検体および 2D-PAGE 条件

N. fowleri Nf66 株から総タンパク質を抽出し、1 次元目は pH3-10、18cm イモビリンストリップ (Amersham biosciences 社)、2 次元目は 12.5%ポリアクリルアミドゲルを用いて 2D-PAGE を行った。

電気泳動条件: 1 次元目: Amersham pharmacia 社 IPG phor
pH3-10、18cm イモビリンストリップ、35,000Vhr
2 次元目: バイオクラフト社製縦型泳動装置 24×20×0.1cm
12.5%ポリアクリルアミドゲル 25mA、16hr

2. エレクトロブロットイング

2D-PAGE 後のゲルを PVDF 膜 (ProBlott (Applied Biosystems 社)) に以下の条件でブロットイングした。

ブロットイングバッファー組成: 48mM Tris, pH9.2, 39 mM Glycine, 20% Methanol, 0.1% SDS
ブロットイング条件: タンク式ブロットイング装置 (Mini Trans-Blot, BioRad 社)
80 V, 350 mA, 2 時間

3. N 末端アミノ酸配列解析

前年度までに行った、*N. fowleri* と *N. lovaniensis* の 2D-PAGE 画像解析で得られた情報をもとに、2 種間共通あるいは非共通の主要なスポットについて、N 末端アミノ酸配列解析を行った。2D-PAGE 後タンパクスポットを PVDF 膜に転写し、メンブレンを CBB 染色して目的のスポットを切出し、気相シーケンサー (Procise cLC494 (Applied Biosystems 社)) のエドマン反応槽に直接挿入してアミノ酸配列解析を行った。

4. クリーブランド法を用いた中間アミノ酸配列解析

2D-PAGE 後 CBB 染色したゲルを乾燥させた後、目的のスポットを切り出し細かく切断した。これをスタッキングゲルの高さを 5cm とした SDS-PAGE ゲル (20%) のウェルに入れた。各ウェルに 10% グリセロールを含むトリス-SDS 緩衝液 (125mM Tris-HCl (pH6.8), 0.1% SDS, 10% Glycerol, 5%

2-ME)を加えゲル片を1時間膨潤した。5%グリセロールを含むトリス-SDS緩衝液(125mM Tris-HCl(pH6.8),0.1% SDS, 5% Glycerol)に *S. aureus* V8 プロテアーゼを溶解し、溶液をプロテアーゼが1サンプルにつき2 μ gになるように各ウェルに重層して電気泳動を開始した。サンプルがスタッキングゲルの下端に濃縮されたところで1時間泳動を停止してタンパク質の部分酵素分解を行った。その後泳動を再開し、電気泳動終了後にPVDF膜に転写を行い、メンブレンをCBB染色した。得られたペプチドのバンドを切り出し気相シーケンサー(Procise cLC494 (Applied Biosystems 社))のエドマン反応槽に直接挿入してアミノ酸配列解析を行った。

5. 質量分析によるタンパクスポット解析

5-1. タンパク質のゲル内消化

2D-PAGE 後 CBB 染色したゲルから目的のスポットを切り出し、アセトニトリルで脱水した後、超純水で再膨潤した。この操作を3回繰り返してゲルスポットを洗浄した後、アセトニトリルで脱水し、濃縮遠心器で乾燥させた。10mM DTT を含む 100mM 重炭酸アンモニウム溶液をゲル片が覆われる程度に加え、56°Cで1時間インキュベートして還元した。溶液を取り除き、55mM ヨードアセトアミドを含む 100mM 重炭酸アンモニウム溶液を同様に加え、暗条件下で45分間反応させアルキル化を行った。ゲル片を100mM 重炭酸アンモニウム溶液で10分間洗浄し、アセトニトリルを加えて脱水し、100mM 重炭酸アンモニウム溶液を再度加えて膨潤した。この操作を2回繰り返し、アセトニトリルを加え脱水した後、濃縮遠心器で乾燥させた。5mM 塩化カルシウムを含む 50mM 重炭酸アンモニウム溶液にトリプシンを25ng/ μ lになるよう溶解し、溶液を各ゲル片が覆われる程度に加え、氷中で45分膨潤した。膨潤後余分なトリプシン溶液を捨て、5mM 塩化カルシウムを含む 50mM 重炭酸アンモニウム溶液を10 μ l加えて37°Cで一晩浸漬した。ゲル片を20mM 重炭酸アンモニウム10 μ lで1回洗い溶液を新しいチューブに回収した後、5%ギ酸を含む50%アセトニトリル溶液でペプチドを3回抽出した。回収液を濃縮してペプチドサンプルとした。

5-2. MALDI-TOF MSによる質量分析

マトリックス支援レーザー脱離イオン化/飛行時間型質量分析計(MALDI-TOF MS)による質量分析には Applied Biosystems 社製 Voyager DE-STR を用いた。2-5-1で濃縮したペプチド溶液を ZipTip C18(Millipore 社製)を用いて脱塩し、マトリックス溶液(10mg/ml α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid(CHCA)/50%アセトニトリル、0.1%トリフルオロ酢酸)で直接サンプルプレート上に溶出した。サンプルはリフレクターモードで測定し、得られたマススペクトルからピークリストを作成して MS-Fit によるデータベース検索を行った。

5-3. LC-MS/MSによる解析

LC-MS/MS解析にはHPLC部にMAGIC2002 (Michrom BioResources社)、質量分析部にはエレクトロスプレーイオン源/4重極イオントラップ型質量分析計(ESI-IT MS)のLCQ-Deca XP (Thermo Eletron社)を用いた。2-5-1で濃縮したペプチド溶液に0.1%トリフルオロ酢酸溶液を加えて20 μ lとして、オートサンプラーに設置した。サンプルをHPLCで分離しながら、その溶出液を直接 ESI でイオン化し、IT部でイオン化された成分についてデータディペンデントにMS/MS測定を行った。得られたMS/MSデータは Sequestプログラムを用いてNCBI NRデータベースと照合した。

6. ウェスタンブロット解析

2D-PAGE 後ゲルを PVDF 膜にブロットニングした後、DyeChrome Western Blot Stain kits(Molecular Probes 社)を使用して、ウェスタンブロット解析を行った。同一メンブレン上で総タンパク質と特異的タンパク質を蛍光染色して検出し、総タンパクスポットパターン上で特異的タンパク質の位置を特定した。1 次抗体は回虫体壁斜紋筋精製アクチンを抗原とした家兎抗アクチン抗体と *N. fowleri* モノクローナル抗体(以下 Nf-5D12u, Indicia Biotechnology 社)、2 次抗体はアルカリフォスファターゼ標識抗体を用いた。

7. データベース構築

Naegleria の 2D-PAGE 解析およびアミノ酸配列解析の結果をデータベース化するために以下の処理を行った。

画面表示用の画像を作成する為、TIFF 形式で保存した 2D-PAGE ゲルのイメージに Illustrator (Adobe)を用いてサイズマーカーならびにスポット位置を表す標識(+印)等を書きこんだ後、TIFF 形式で保存した。作成した画像を最終的に JPEG 形式に変換して画面表示に使用した。この方法では Web ページ上での表示がブラウザに依存しないことからマーカーや標識等の位置が安定し、加えて再編集や出力解像度の変更が容易になるという利点がある。

クリックブルマップにはクライアントサイド・イメージマップの方法を用い、ゲルイメージ上にスポット情報へのハイパーリンクを設定して、スポットをクリックすると対応するスポット情報が表示されるようにした。

各タンパクスポットに関する情報は CSV 形式で作成し、Perl/Apache 上でカスタマイズした Listgen (<http://yugen.main.jp/about/listgen/>)を用いて動的に作成した。動的に作成された html ファイルは Irvine (<http://hp.vector.co.jp/authors/VA024591/>)を用いて一括保存した。さらにスポット情報のページには SWISS PROT や PubMed 等のデータベースへのリンクを設定した。

Web サーバーはセキュリティーを重視し、研究所で運営されているものを使用した。加えてアクセスログの取得を行い、異常なアクセスがないことを確認できるようにした。スポットファイルを生成する Web サーバーは個人用の端末を利用し、Active Perl ならびに Apache をインストールし、利用している。

html ファイルの作成にはテキストエディタ (MKEditor (<http://www.mk-square.com/>))を利用した。実際の表示は Windows2000 上で Internet explorer V5.0 (Microsoft)、Netscape V7.1 (Netscape)、Opera V7 (Opera)を用いて確認した。

C. 結果および考察

1. N 末端アミノ酸配列解析

N. fowleri Nf66 株の主要な 59 個のスポットについて N 末端アミノ酸配列解析を行っており、そのうち 21 個は N 末端のブロックが疑われた。5 個は 2 次元電気泳動時の分離が不十分であった。残りの 33 個について 20 残基前後の N 末端アミノ酸配列が得られた。得られた N 末端アミノ酸配列については FASTA で SWISS-PROT データベースを用いて既存のタンパク質とのホモロジー検索を行った。検索の結果 Expectation value が 0.1 以下の相同性を有するスポットは 11 個で、その内 10 個はこれまでの画像解析により 2 種間共通とされたスポットであった。一方 N 末端アミノ酸