

中平雅清, 中西憲司. アレルギー憎悪機構. 臨床免疫・アレルギー科 2010;54:224-233.

安田好文, 中西憲司. IL-33 と好塩基球、マスト細胞-免疫応答と疾患における役割-. 炎症と免疫 2010;18:585-591.

中平雅清, 中西憲司. Super Th1 細胞/IL-18 による非 IgE 炎症と気管支喘息. 呼吸 2010;29(2):115-121.

松本真琴, 中西憲司. IL-18と免疫疾患. Frontiers in Rheumatology & Clinical Immunology 2010;4(1):37-43.

中西憲司
好塩基球:新たな視点からみたアレルギー性炎症の誘導, 序. 炎症と免疫, 18(1) : 1-2, 2010.

[原著]

Kawa K, Tsutsui H, Uchiyama R, Kato J, Matsui K, Iwakura Y, Matsumoto T, Nakanishi K. IFN- γ is a master regulator of endotoxin shock syndrome in mice primed with heat-killed *Propionibacterium acnes*. Int Immunol 2010;22(3):157-66.

Nakanishi K, Tsutsui H, Yoshimoto T. Importance of IL-18-Induced Super Th1 Cells for the Development of Allergic Inflammation. Allergol Int 2010;59(2):137-141.

Kuroda-Morimoto M, Tanaka H, Hayashi N, Nakahira M, Imai Y, Imamura M, Yasuda K, Yumikura-Futatsugi S, Matsui K, Nakashima T, Sugimura K,

Tsutsui H, Sano H, Nakanishi K. Contribution of IL-18 to eosinophilic airway inflammation induced by immunization and challenge with *Staphylococcus aureus* proteins. Int Immunol 2010;561-570.

Matsuba-Kitamura S, Yoshimoto T, Yasuda K, Futatsugi-Yumikura S, Taki Y, Muto T, Ikeda T, Mimura O, Nakanishi K. Contribution of IL-33 to induction and augmentation of experimental allergic conjunctivitis. Int Immunol 2010;22(6):479-489.

Nakanishi K. Basophils are potent antigen-presenting cells that selectively induce Th2 cells. Eur J Immunol. 2010 ;40(7):1836-42.

Yoshikawa S, Iijima H, Saito M, Tanaka H, Imanishi H, Yoshimoto N, Yoshimoto T, Futatsugi-Yumikura S, Nakanishi K, Tsujimura T, Nishigami T, Kudo A, Ariei S, Nishiguchi S. Crucial role of impaired Kupffer cell phagocytosis on the decreased Sonazoid-enhanced echogenicity in a liver of a nonalcoholic steatohepatitis rat model. Hepatol Res 2010;40(8):823-831.

Tsutsui H, Imamura M, Fujimoto J, Nakanishi K. The TLR4/TRIF-Mediated Activation of NLRP3 Inflammasome Underlies Endotoxin-Induced Liver Injury in Mice. Gastroenterol Res Pract 2010:641865.

Satoh T, Takeuchi O, Vandebon A, Yasuda K, Tanaka Y, Kumagai Y, Miyake T, Matsushita K, Okazaki T, Saitoh T, Honma K, Matsuyama T, Yui K, Tsujimura T, Standley DM, Nakanishi K, Nakai K, Akira S. The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection. Nat Immunol 2010;11: 936-944.

Nakanishi K. Basophils as APC in Th2 response in allergic inflammation and parasite infection. Curr Opin Immunol 2010. 22(6):814-20.

■学会発表■
[国際学会]

Kenji Nakanishi. Innate and acquired immunity in expulsion of intestinal nematode. 14th International Congress of Immunology 2010. 8 Kobe

Makoto Matsumoto, Koubun Yasuda, Masato Kubo, Tomohiro Yoshimoto, Kenji Nakanishi. Basophils play a pivotal role in the expulsion of gastrointestinal nematode *Strongyloides venezuelensis*. 14th International Congress of Immunology 2010. 8 Kobe

Koubun Yasuda, Yuki Sasaki, Yuichi Kondo, Makoto Matsumoto, Tomohiro Yoshimoto, Kenji Nakanishi. IL-33 mediated expulsion of *Nippostrongylus brasiliensis* in the absence of adaptive immune system. 14th International Congress

of Immunology 2010. 8 Kobe

Nakahira M, Nakanishi K. Involvement of Gata3 in transcriptional regulation of *IL13* gene expression in IL-18-stimulated Th1 cells. 14th International Congress of Immunology 2010. 8 Kobe

Koubun Yasuda, Yuki Sasaki, Makoto Matsumoto, Yuuko Taki, Tomohiro Yoshimoto, Kenji Nakanishi. IL-33 mediated expulsion of *Nippostrongylus brasiliensis* and *Strongyloides venezuelensis*. The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity 2010. 9 Hyogo

[国内学会]

中西憲司. IL-1 ファミリーサイトカインと炎症. 第43回日本痛風・核酸代謝学会総会 2010. 2 大阪

安田好文, 松葉沙織, 善本知広, 弓倉静英, 高城ゆう子, 武藤太一朗, 池田誠宏, 三村治, 中西憲司. Contribution of IL-33 to induction and augmentation of experimental allergic conjunctivitis. 第75回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 2010. 6 北九州

松本真琴, 安田好文, 久保允人, 善本知広, 中西憲司. *Strongyloides venezuelensis* の感染防御における好酸球と好塩基球の役割について. 第66回日本寄生虫学会西日本支部大会 2010.11 岡山

分子疫学を中心としたアcantアメーバ角膜炎の実態に関する調査研究

研究分担者 井上 幸次 鳥取大学医学部視覚病態学教授

研究協力者 八木田 健司 国立感染症研究所 寄生動物部

研究協力者 江口 洋 徳島大学医学部 眼科学分野

研究要旨：平成 20-22 年度にわたりアcantアメーバ角膜炎の分離株収集に基づくモニタリング調査を行い、近年のアmeーバ角膜炎増加の要因を分子疫学的に解析した。起因アmeーバはこれまで角膜炎に密接に関連することが知られる T4 という遺伝子タイプに分類された。1 株 T11 が確認されたが、角膜炎に関連する新たなタイプは確認されなかった。なお、T4 の中のいくつかのシーケンスタイプのアmeーバが全国的に分布する可能性が示された。アmeーバ角膜炎増加の微生物学的要因としては、これまで環境中に生息しているアmeーバの感染リスクが増加した可能性が想定された。

またアmeーバ汚染のもとになっているコンタクトレンズ保存液の細菌汚染についても検討し、分離・培養で検出されるよりはるかに多くの環境菌に汚染されていることが判明した。

A. 研究目的

アcantアmeーバ角膜炎は環境中の自由生活性のアcantアmeーバによる角膜感染症で稀な症例として知られていたが、最近、コンタクトレンズ (CL) 使用者による感染が増加しているという実態が示されてきたことから、分子生物学的にその実態を調査し、増加要因を微生物学的に解明することを目的とした。

B. 研究方法

1) 全国 9 施設を拠点として、アcantアmeーバ角膜炎より分離されたアmeーバ株を国立感染症研究所に集積し、分子疫学的解析をおこなう。分離株はクローニング後、18SrRNA 遺伝子のシーケンス解析を行い、

BLAST検索による既存アmeーバとの相同性を調べ、Tタイピングによる分類を行う。

2) アcantアmeーバクロン株の研究資源化を目的に、無菌栄養液体培地 (PYGCあるいはCGVS) での無菌培養株樹立を行う。

3) 全国6施設において感染性角膜炎患者より供与されたCLケースと環境サンプルについて分子疫学的解析をおこなう。

C. 研究結果

1) 分子疫学調査 (表-1)

・平成20-22年度の集計として、6施設からの44株が解析された。分離試料別に分けると、角膜分離が27株、CL保存液が15株、MPSボトル内液が1株および環境分離が1株であった。
・分離株の18SrRNA 遺伝子のシーケンス解析による遺伝子タイピングの結果では、上記44株中43株はこれまで角膜炎に密接に関

連することが知られるT4に分類され、角膜分離の1株のみT11に分類された。

・今回調べた分離株のシーケンスのほとんどは、既に国外において角膜炎より分離されているものとほとんどが一致した。

・角膜分離株のシーケンスタイプは15タイプに分かれ、中には国内複数施設より複数検出されるものがみられた(ATCC30461 Eye strain タイプは4施設より5株, ATCC50497 Rowdon strainタイプは2施設より4株, KA/E6 strain タイプは3施設3株など)

・保存液分離株のシーケンスタイプは10タイプに分かれ、患者の角膜と一致する場合はほとんどであった。

・患者、CL保存液さらに使用したMPSボトル内液の各検体より同一シーケンスのアメーバが検出される場合があった。

2) 分離株の研究資源保存

・試料より分離されたアメーバはクローニングにより遺伝的に単一な細胞集団として培養された。樹立した44株中で、PYGCあるいはCGVS等の栄養液体培地で39株(88.6%)が無菌培養に成功し保管された。

・無菌培養株で細胞内共生細菌類の検索を行い、角膜ならびに保存液各1株において共生微生物を顕微鏡的に検出した。

3) CL保存液の汚染菌とその由来

・分離・培養でCL保存ケースから2属2種の細菌を分離した。

・環境サンプルからは5属8種の細菌を分離した。

・DNAクローンライブラリー解析では、CL保存ケースから少なくとも18属の細菌の混入の痕跡を確認した。

・パルスフィールドゲル電気泳動ではCL保存ケースから分離された菌と近縁種の存在を環境サンプルにて確認できなかった。

・アcantアメーバ角膜炎2症例からもCL保存ケースを回収し、そのDNAクローンライブラリー解析では、各々12種、11種の細菌の混入の痕跡が確認できた。

D. 考察

分子疫学調査により、国内起因アメーバはT4タイプだが、特定のシーケンスタイプには収束しないことが明らかとなった。

近年のアメーバ性角膜炎の増加は、新たな高病原性タイプあるいは株の出現ではなく、これまで環境中に生息している多くのタイプのアメーバの感染リスクが増加した可能性が想定された。

分子生物学的な同定はより正確で、かつ信頼性が高く、流行株や難治性タイプの同定や他の菌・アメーバとの関係の特定を可能とする。集団発生の解析、発生予防さらには治療に有用な情報を得ることが期待される。また、得られたアメーバ株は無菌培養株として、薬剤感受性試験等、今後の課題における有用な研究資源として活用されることが期待される。

E. 結論

アメーバ性角膜炎の国内流行実態を分子疫学的に正確に解明した。モニタリングの継続は、流行防止の有用な戦略と考えられる。

CL関連角膜感染症症例のCL保存ケースは、分離・培養で検出されるよりはるかに多くの環境菌に汚染されている。

F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

研究成果の刊行に関する一覧表参照

2. 学会発表

Inoue Y: Contact lens-related microbial keratitis. The 25th Asia-Pacific Academy of Ophthalmology Congress, Beijing, China, 2010/9/16-20

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表-1、アミーバ性角膜炎関連分離株の 18SrRNA 遺伝子タイピングの結果

施設	試料	試料 ID	T type	BLAST で相同性の高かった(99-100%)株の配列	左記配列の分離試料
1 鳥取大	角膜	1-1-1	T4	ATCC50497 <i>Acanthamoeba</i> sp. Rowdon strain	keratitis
1 鳥取大	角膜	1-2-1	T4	ATCC50497 <i>Acanthamoeba</i> sp. Rowdon strain	keratitis
1 鳥取大	角膜	1-3-1	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp S2.JDP	soil
1 鳥取大	保存液	1-3-2	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp S2.JDP	soil
1 鳥取大	保存液	1-4-2	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. S15	keratitis
1 鳥取大	角膜	1-5-1	T4	ATCC30461 <i>A. polyphaga</i> Eye strain	keratitis
1 鳥取大	保存液	1-5-2	T4	ATCC30461 <i>A. polyphaga</i> Eye strain	keratitis
1 鳥取大	角膜	1-6-1	T4	ATCC50497 <i>Acanthamoeba</i> sp. Rowdon strain	keratitis
1 鳥取大	保存液	1-6-2	T4	ATCC50497 <i>Acanthamoeba</i> sp. Rowdon strain	keratitis
1 鳥取大	角膜	1-7-1	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. KA/E10	keratitis
1 鳥取大	保存液	1-7-2	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. KA/E10	keratitis
1 鳥取大	角膜	1-8-1	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. KA/E6	keratitis
1 鳥取大	角膜	1-9-1	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. Vazaldua	keratitis
3 愛媛大	角膜	3-1-1	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. CDC #V390	brain,skin
3 愛媛大	保存液	3-1-2	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. KA/E6	keratitis
3 愛媛大	角膜	3-2-1	T4	ATCC30461 <i>A. polyphaga</i> Eye strain	keratitis
3 愛媛大	保存液	3-2-2	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. CDC #V390	keratitis
3 愛媛大	角膜	3-3-1	T4	ATCC 50370 <i>A. castellanii</i> Ma strain	keratitis
3 愛媛大	角膜	3-4-1	T4	ATCC 50374 <i>A. castellanii</i> Castellani	yeast culture
3 愛媛大	保存液	3-5-2	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. KA/E6	keratitis
3 愛媛大	角膜	3-7-1	T4	ATCC 50370 <i>A. castellanii</i> Ma strain	keratitis
4 京都府大	角膜	4-1-1	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. CDC # V390	brain,skin
4 京都府大	保存液	4-2-2	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. CDC # V390	brain,skin
4 京都府大	角膜	4-3-1	T4	ATCC50497 <i>Acanthamoeba</i> sp. Rowdon strain	keratitis
4 京都府大	角膜	4-4-1	T4	ATCC30461 <i>A. polyphaga</i> Eye strain	keratitis
4 京都府大	角膜	4-5-1	T4	<i>A. castellanii</i> CDC #V042	keratitis
6 徳島大	保存液	6-1-3	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. CDC #V062	keratitis?
6 徳島大	角膜	6-2-1	T4	ATCC30461 <i>A. polyphaga</i> Eye strain	keratitis
6 徳島大	保存液	6-2-2	T4	ATCC30461 <i>A. polyphaga</i> Eye strain	keratitis
6 徳島大	MPS	6-2-3	T4	ATCC30461 <i>A. polyphaga</i> Eye strain	keratitis
6 徳島大	環境	6-4-3	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. KA/E10	keratitis
6 徳島大	角膜	6-5-1	T4	ATCC30461 <i>A. polyphaga</i> Eye strain	keratitis
6 徳島大	保存液	6-5-2	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. CDC #V014	keratitis
6 徳島大	保存液	6-10-2	T4	ATCC30461 <i>A. polyphaga</i> Eye strain	keratitis
6 徳島大	保存液	6-11-2	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. KA/E10	keratitis
7 山口大	角膜	7-1-1	T11	<i>A. hatchetti</i> 4RE	keratitis
7 山口大	角膜	7-2-1	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. KA/E24	keratitis
7 山口大	角膜	7-3-1	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. KA/E6	keratitis
7 山口大	角膜	7-4-1	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. UIC 1060 voucher	keratitis
7 山口大	角膜	7-5-1	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. CDC #V014	keratitis
9 東京女子医*	角膜	9-1-1	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. CDC #V062	keratitis
9 東京女子医	角膜	9-2-1	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. CDC #V062	keratitis
9 東京女子医	角膜	9-3-1	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. KA/E6	keratitis
9 東京女子医	保存液	9-4-1	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. CDC #V042	keratitis

* 東医療センター

平成 22 年度厚生労働科学研究費補助金 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
「顧みられない病気に関する研究」

平成 22 年度分担報告書

抗ジアルジアモノクロナール抗体の性能評価と ELISA 法への応用

分担研究者： 八木田 健司 国立感染症研究所 寄生動物部

協力研究者： 泉山 信司 国立感染症研究所 寄生動物部
宮崎 誠生 アーク・リソース株式会社

概要

前年度開発に成功した抗ジアルジアモノクロナール抗体の性能評価を継続して行った。フローサイトメトリーによる糞便試料の反応性の解析からは、挟雑物と比較してシストに対する反応特異性の高さが示され、シストに対する免疫蛍光試薬としての有用性は市販製品と差がなかった。一方、糞便中のシスト壁抗原を検出することを目的とした ELISA 系の最適化に関しては、実際の糞便試料を用いた試験において、他の消化管原虫陽性試料ならびに陰性試料における低い反応性からは ELISA 系の高い特異性が示された。しかしながら感度に関しては不十分であったことから、実用化に向けて試料、また増感方法の条件設定あるいは改良が必要であることが示された。

A. 研究目的

ジアルジア症に関して国内ならびに国外でも実用的な検査法が必要と考えられる中で、本研究では検査コストの経済性を一つの条件に、ジアルジア糞便検査における抗原検出法の開発とそのキット化を目指している。前年度の成果として、シスト壁抗原に対するマウスモノクロナール抗体の作製に成功し、生産性の高い 3 クローンをまず樹立した。これらはいず

れも間接蛍光抗体法として用いた場合、市販抗体と同様の染色像を示し、また各種原虫類への反応性から *G.lambli*a 特異性が高いことを確認した。本年度はこれらの特異抗体の利用度を高めるために、各抗体の特異性をフローサイトメトリーで確認するとともに抗原結合における競合反応性を調べた。また表面抗原検出法以外の応用として、糞便内のジアルジア抗原検出を目的とした ELISA 系の開発をすす

めた。

B. 研究方法

1) フローサイトメトリーによる直接標識抗体の評価

各精製モノクロー抗体(4B5, 4G1 ならびに 3H4-7)を蛍光色素 Alexa488(invitrogen)で標識後、カラム精製により標識抗体を調整した。

ジアルジア感染者の糞便試料 10% ホルマリンで固定後、ホルマリンを洗浄除去した。PBS で 10 倍希釈した標識抗体と固定糞便試料液を 10 μ l ずつ混合し、30 分間反応後、PBS で希釈し 700 μ l に調整した。フローサイトメトリーを用いて SSC (側方散乱光) および FL1 (Alexa488 緑色蛍光) を測定した。

2) 各モノクローナル抗体の競合性の確認

精製した 3 クローンの未標識抗体を使ってジアルジアシスト表面の抗原をブロッキング後、標識抗体で染色操作することで抗体相互の反応競合性を調べた。

感染スナネズミ糞便よりシストを精製し、シスト浮遊液 40 μ l、PBS40 μ l および未標識抗体液 4 μ l を混合し室温で 30 分反応させた。

ブロッキング後のシストを洗浄し PBS に再浮遊した液 5ul と染色試薬(作製抗体は 100 倍希釈、市販抗体は希釈なし) 5ul とを混合し、直ちに蛍光顕微鏡下で観察した。さらに染色以外の方法として、ブロッキングされたシスト液 10ul と抗ジアルジア免疫磁気ビーズ (Dynabeads GC-combo, invitrogen) 10ul を混合し、30 分間室温で回転、顕微鏡下で磁気ビーズとシストの結合性を調べた。

3) 抗原捕捉 ELISA 系の作成

抗体の固相化

精製モノクローナル抗体を抗原希釈液(炭酸バッファー、pH9.4)で 1 μ g/100 μ l に希釈し、100 μ l を 96 ウェル-マイクロプレートの各ウェルに分注、4°C で O/N 静置し抗体を固相化した。洗浄は 250 μ l の洗浄液(PBS-0.05% Tween80)で 3 回行った。カゼインタンパクを主成分とするブロックエース(大日本製薬)を 1% に調整し、各ウェルに 200 μ l を入れ、37°C、2 時間のブロッキングを行った。

検査試料

ジアルジアシストを排出している感染スナネズミの新鮮な糞便を蒸留水で 5 倍に溶解したものを陽性試料とした。

ヒトの糞便試料に関しては、消化管原虫の依頼検査目的で寄生動物部に送られ検査後 -20°C で凍結保管されていたものを用いた。なお、保管されていたヒト由来試料は平成 20 年度第 2 回国立感染症研究所、ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会において課題番号③として承認された研究計画に基づいて、研究資源としての利用が認められているものである。これらの糞便試料は以下の方法で原虫検査がなされた。1) 蛍光抗体染色によるジアルジアシストまたはクリプトスポリジウムオーシスト検査、2) 顕微鏡による栄養体の検出、あるいは PCR、ELISA により遺伝子または抗原を検出する赤痢アメーバ検査、3) オーシストの自家蛍光によるサイクロスポラ検査。以上の検査で原虫類は検出されなかった試料は陰性試料とした。本研究ではジアルジア陽性試料 7、クリプトスポリジウム陽性試料 4、赤痢アメーバ陽性試料 5、サイクロスポラ陽性試料 3、陰性試料 17 を用いた。

ELISA

水様便、固形便に関わらず、糞便試料は容量として 0.4%ブロッカーで 10 倍希釈し、その 100 μ l を抗体を固相化したウェルに入れた。37°C で 1 時間反応させた後、250 μ l の洗浄液 (PBS-0.05% Tween80) で 5 回洗浄した。検出抗体として HRP 標識されたモノクロナル抗体 (1mg1/ml) を 0.4%ブロッカーで 8,000 倍に希釈調整し、100 μ l を各ウェルに入れた。37°C で 30 分間反応後、250 μ l の洗浄液 (PBS-0.05% Tween80) で 5 回洗浄した。発色基質として ABTS を用いた発色液を 100 μ l 加え室温で 15 分静置、反応停止液 (NaF) を 50 μ l 加えて反応を停止、415nm で吸光度を測定した。

C. 研究結果

1) フローサイトメトリーによる直接標識抗体の評価

シストを含む糞便試料の Alexa488 標識抗体による直接蛍光抗体染色したときのフローサイトメトリーの結果を図-1 に示した。染色されたシストは市販の蛍光抗体試薬と同様の高い蛍光強度および高い染色特異性を示した。特に未消化物および雑菌等糞便中のきょう雑物の存在下でも高い S/N 比がみられ、低いバックグラウンドの中でシストが特異的に染色されることが示された。糞便試料における抗原抗体反応性の高さは、これらの抗体の ELISA への応用の可能性を十分に示しうるものであった。

2) 各モノクロナル抗体の競合性の確認

ELISA を用いて抗原を検出するには、ある抗原に対して異なるエピトープを認識する 2 種類のモノクロナル抗体が必要となる。3 種類の抗体の抗原検出 ELISA への利用に関して相

互の反応競合性を調べた結果を表-1 および図-2 に示した。3 種類の抗体はブロッキング処理による相互の結合阻害を起さなかったことから、これらの抗体は互いに異なるエピトープを認識することが示された。また 4G1 に関しては市販抗体と同様のエピトープ認識をすることも示唆された。競合性試験の結果から、3 種類の抗体より固相化抗体ならびに検出抗体を選択し、抗原検出 ELISA 系を考案することとした。

3) 抗原検出 ELISA 系の作成

競合性の解析結果より、固相化抗体と検出抗体の組合せ (6 種類) を数種類の陽性、陰性試料を用いて予備的に調べた。その結果、4B5 は検出抗体として用いるとスナネズミ試料のみと反応することが判明した。また、検出抗体としての 4G1 はヒトのジアルジア陽性試料とも反応したが、特異性の面で *G.muris* にも交差反応が起こる可能性があり、4G1 は固相化のみに使用を限定することが妥当と判断された。以上の予備実験の結果から固相化抗体としては 4G1 を、検出用抗体としては 3H4-7 を使用し、これらの抗体を用いた抗原検出 ELISA についてその感度、特異性に関する試験を行った。

96 ウェル-マイクロプレートによる抗原検出 ELISA の結果の 1 例を図-3 に示した。試料とした糞便は水様便から固形便まで多様で、固形便の場合は 10 倍に溶解してもかなりの挟雑物が含まれていたが、本研究では前処理として遠心による除去は行わなかった。ジアルジア陽性の 8 試料に関しては 5 試料で明確な発色が認められた。一方、その他のジアルジア以外の原虫陽性例を含む 29 試料の中で、赤痢アメーバ陽性試料中 1 例で陽性反応が見られ

た。該試料は栄養体が確認された血便試料であった。図-4 は吸光度を各原虫陽性別および陰性試料に分けてプロットしたものである。ジアルジア陽性における最大吸光度は約 OD=0.39 で、1 つはヒト試料(保存期間2ヶ月、多数のシストが含まれる)、別の 1 例はスナネズミ試料であった。ジアルジア試料では 3 試料が OD=0.05~0.2、残り 3 試料は OD<0.05 であった。赤痢アメーバ試料で明確な発色があった試料の OD は約 0.2 でジアルジア陽性試料の値に相当した。その他のジアルジア以外の原虫が陽性だった試料ではいずれも OD<0.05 であった。また陰性試料は全例 OD<0.05 であった。

D. 考 察

本研究で作製された 3 種類のモノクローナル抗体は、FITC あるいは Alexa 等の蛍光色素を標識することで、直接蛍光抗体試薬として糞便中のジアルジアシストの検出に利用できることが確認された。その蛍光強度ならびに特異性はほぼ現在市販の抗体試薬と同等の性能を有しており、極めて微量に含まれるシストの検出にも有用であった。検査室等検査現場において利用されれば、その評価は市販抗体と同等のものが得られることが期待される。

一方、ジアルジア抗原検出系の技術としては他に ELISA およびイムノクロマトがあり、現在樹立されている 3 種類の抗体の組合わせで、サンドイッチ式の抗原検出が可能な状況にある。試料が糞便で抗体との交差反応物質がどの程度含まれるのか不明な条件で、現状ではポリクローナルな抗体の使用よりは特異性の明確なモノクローナル抗体の利用を優先した。本年度は ELISA 系の最適化を進めたが、標準的なプロトコールでの結果はジアルジア以外の

消化管寄生性原虫類との交叉反応性は低いこと、陰性試料での反応が低いことから特異性は高いと判断された。しかし陽性検出力である感度が十分とは言えない結果であった。抗原検出の場合は、シストのみならず、同時に糞便中に存在する分散された可溶性のシスト壁抗原の方が反応においてより重要であり、各種ジアルジア診断キットの比較からは、シストの検出性能と抗原検出性能の間には差がみられることが知られている。反応が陰性試料と差がなかったジアルジア陽性試料では、凍結保存が 2 年以上で便量が極少量という条件であった一方、ELISA 陽性だった試料は、凍結保存が 2 年であっても多量に保管されているといった保管環境の違いがあった。保管環境がシスト壁抗原の抗原性に影響を及ぼす可能性に関して、本研究で実験的なエビデンスを得ていないので、この点は今後検討すべき課題である。新鮮便であることの必要性、固定剤で処理された試料の適応性等も含め、実用的 ELISA に求められる検査試料の条件は、適確に示しておく必要がある。以上に加え ELISA の感度向上に関しては、検出抗体にポリクローナル抗体を用いる方法もあるが、抗体ロットの変更毎に感度、特異性の再検討が求められるというデメリットとのバランスを考えなければならない。検出抗体(モノクロ)のビオチン化等による増感の有用性は検討すべき点と考えられる。

国内での検査試薬および検査キット開発と供給は、コスト面で検査現場における原虫検査へのインセンティブを上げる要因につながり、ジアルジア感染症における公衆衛生ならびに保健医療上の問題を解決することが期待される。

E. 結論

国内で開発に成功した抗ジアルジアモノクロナル抗体は、蛍光抗体試薬としてキット化への応用が見込まれた。糞便中抗原検出を目的とした ELISA は、特異性は良好だが、感度不足を解決する必要があるが示された。問題点は明確であり、ELISA 条件を最適化し、イムノクロマト法への応用にもつなげることを次年度の計画とする。

F. 参考文献

Johnston,S.P.J.et al., J. Clin. Microbiol., 41(2):623-626, 2003

Oster,N., et al., Eur. J. Clin. Microbiol.

Infect Dis., 25:112-115, 2006

G. 健康危惧情報

なし

H. 研究発表

八木田健司、泉山信司、ジアルジアの糞便性抗原は 65-kDa シスト壁タンパク質由来であるか？ 第 79 回日本寄生虫学会大会、2010 年 5 月、旭川

I. 知的財産権の出願・登録状況

なし

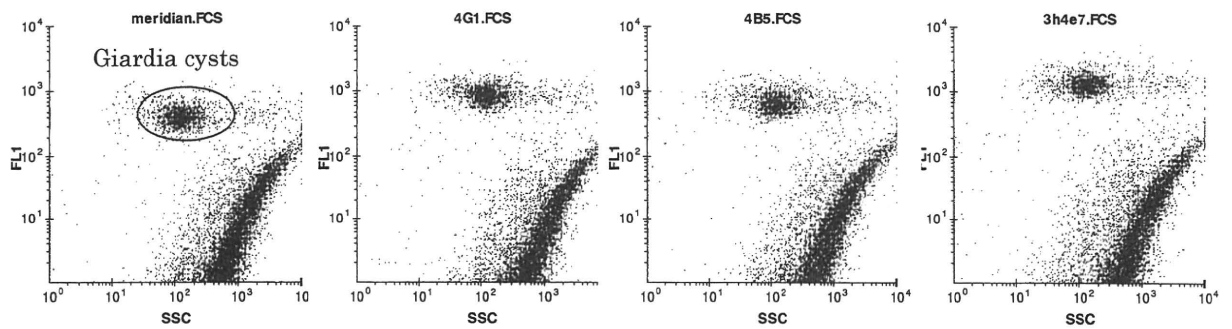


図-1、市販蛍光抗体試薬 Merifluor および Alexa488 で標識した 3 種類の抗ジアルジアモノクローナル抗体によりジアルジアシストを含む糞便試料を直接蛍光抗体染色したときのフローサイトメリーの結果

染色試薬	ブロッキング試薬		
	3H4-E7	4G1	4B5
4B5Alexa488	+	+	-
4G1Alexa488	+	-	+
3H4E7Alexa488	-	+	+
Merifluor	+	-	+
EasyStain	+	-	+
GiardiaGlo	+	-	+
免疫磁気ビーズ	+	-	+-

表-1、3 種類の抗ジアルジアモノクローナル抗体および市販蛍光抗体試薬を使った反応競合試験

- (+) 標識抗体による染色は阻害されず(ブロッキング効果なし)
- (-) 標識抗体による染色は阻害された(ブロッキング効果あり)

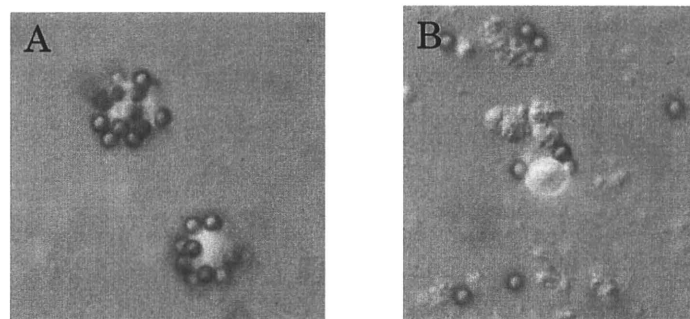


図-2、Alexa488 標識モノクローナル抗体でブロッキング後、市販免疫磁気ビーズ (抗ジアルジアシスト) で反応させた糞便試料

A: 3H4E-7 でブロッキング、B: 4G1 でブロッキング

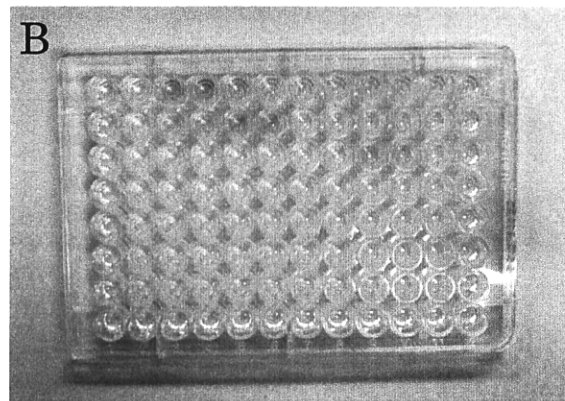
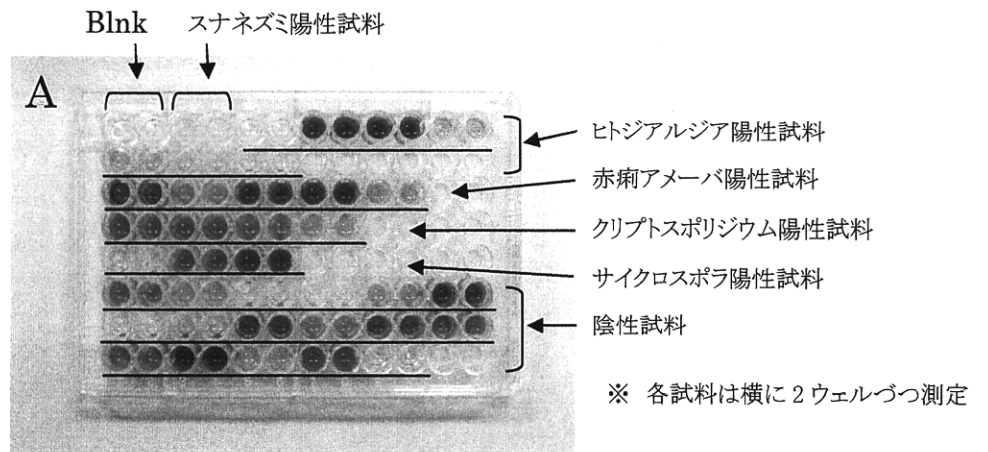


図-3、96 ウェル-マイクロプレートによる抗原検出 ELISA
 A: 検査試料添加時、 B: ABTS 反応による発色時

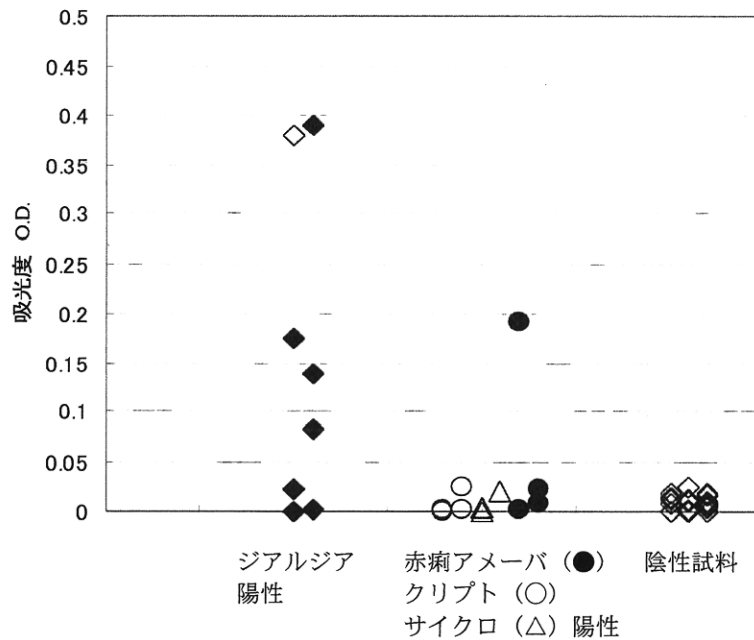


図-4、96 ウェル-マイクロプレート抗原検出 ELISA における
 試料別吸光度の分布

ジアルジア陽性試料の◇はジアルジア感染スナネズミ試料
 OD値は各試料2ウェルの平均測定値

平成 22 年度厚生労働科学研究費補助金 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
分担研究報告書

顧みられない病気に関する研究
寄生蠕虫症の病態と検査診断法に関する研究

分担研究者	大前 比呂思	国立感染症研究所 寄生動物部
研究協力者	千種 雄一	獨協医科大学 熱帯病寄生虫病室
研究協力者	Eyal Leshem	The Center for Geographic Medicine and Tropical Diseases, Chaim Sheba Medical Center, ISRAELI

研究要旨 住血吸虫症における免疫血清診断の用途と意義について、異なった幾つかの事例で検討した。カンボジアのメコン住血吸虫症有病地で、過ヨウ素酸ナトリウム (sodium metaperiodate) で処理した虫卵抗原を用いた新しい免疫診断法 (SMP-ELISA) は、虫卵陽性者を確実に検出し、フィールド調査でも有用であることを検証した。また、ラオス旅行中に、従来メコン住血吸虫症の報告がない Van Vieng 地域での罹患が疑われたイスラエル人旅行者の保存血清を SMP-ELISA で検査したところ 13 人中 6 人が陽性となった。

日本住血吸虫症については、フィリピンで新しく報告された有病地、Gonzaga, CAGAYAN 州 (2002 年) と Calatrava, NEGROS 州 (2005 年) で実施した腹部超音波検査と日本住血吸虫卵を用いた ELISA の結果を照合して解析した。腹部超音波検査で日本住血吸虫症特有の進んだ肝線維化を指摘されながらも、ELISA で陰性となった例がみられたが、このような例は、比較的低浸淫地ではあるものの、以前から長期間にわたり日本住血吸虫症有病地であった地域で多くみられる。血清疫学調査の結果からも、両地域、特に CAGAYAN 州の浸淫地は、従来から日本住血吸虫症の有病地であったことが強く疑われる結果となった。患者の個人レベルでの検査診断や病態把握にとどまらず、免疫血清検査と超音波検査を組み合わせることで、日本住血吸虫症やメコン住血吸虫症の有病地の現状を、的確に評価できることがわかった。

A. 研究目的

住血吸虫症の場合、糞便中の虫卵排泄数が少ない軽症例の診断や低浸淫地での疫学調査では、様々な免疫検査が利用されることが多い。成虫抗原や虫卵抗原を用いた免疫検査で粗抗原を用いた場合、メコン住血吸虫では、日本住血吸虫に比して、偽陽性になる例が多く問題とされていた。過ヨウ素酸ナトリウム (sodium metaperiodate) で処理した虫卵抗原を用いた場合、偽陽性の例が減ることは、実験的には確認されていたが、実際のフィールド調査での評価は

されていなかった。そこで、今回は、カンボジアのメコン住血吸虫症有病地でのフィールド調査で、過ヨウ素酸ナトリウムで処理した虫卵抗原を用いた新しい免疫診断法 (SMP-ELISA) の有用性を検証した。

また、最近、ラオスやフィリピンの一部では、これまで住血吸虫の感染リスクがないとされていた地域で、住血吸虫への感染が疑われた例が報告されている。このような事例の検査診断や、地域での疫学調査に際し、住血吸虫症の免疫診断法が果たす役

割と可能性についても、検討して整理する必要がある。

B. 研究方法

メコン住血吸虫症の調査では、2010年4～5月にカンボジア、Kratie省にて血清検査および糞便検査を実施した。免疫血清検査は6村落(Achen, Kompong Krabei, Srekhoeun, Chatnol, Kbal Chuor, Sambok)の小学校児童を検査対象とした。合計645人から指先穿刺により血液を採血濾紙に採取し、乾燥させて日本に持ち帰った。検体は抽出緩衝液により抽出し、メコン住血吸虫卵抗原を用いたSMP-ELISAをおこなった。

また、2006年から2010年にかけてラオスのVan Vieng地域を旅行し、帰国後に腹痛や血性下痢などの住血吸虫症様症状を示した13人のイスラエル人旅行者の保存血清でも、上述のメコン住血吸虫卵抗原によるSMP-ELISAをおこなった。これらの旅行者は、ラオス旅行中、以前よりメコン住血吸虫症有病地として知られるラオス南部のコーン島周辺には、全く立ち寄っていない。

一方、フィリピンでの日本住血吸虫症の調査では、2006～2008年のGonzaga, CAGAYAN州とCalatrava, NEGROS州の疫学調査で、腹部超音波検査の結果、進んだ肝線維化を示した例を対象とした。保存されていた対象例の血清を用いて、日本住血吸虫の虫卵抗原による通常のELISA検査を行った。

(倫理面への配慮)

なお、これらの臨床研究は、全てフィリピン共和国保健省やカンボジア王国保健省

が行う住血吸虫症対策事業の一環として行われた。また、被検者の健康増進に利するよう検査結果を個別に伝えると同時に、検査結果の研究への利用については、書面で同意を得て行った。

C. 結果

メコン住血吸虫症の虫卵陽性者と対照者(流行地での居住歴がないカンボジア人対照者及び健康な日本人)で、メコン住血吸虫卵抗原を用いた通常のELISAとSMP-ELISAの結果を比較すると、SMP-ELISAでは、従来のELISAに比して、血清中の抗体価測定の特異度が高くなり、偽陽性例が減少することがわかっている(図)。今回の血清検査における村落毎のELISA陽性率は5.1%～50.8%と幅があったが(表1)、2009年度の調査で高い虫卵陽性率(30%)を示した村落(Kbal Chuor)では、50.8%と高いELISA陽性率を示した。一方、ラオスのVan Vieng地域での感染が疑われたイスラエル人旅行者については、13人中6人が陽性を示した(表2)。

フィリピンの日本住血吸虫症有病地での調査では、Gonzaga, CAGAYAN州で以前行った超音波検査の結果、進行した肝線維化を示した167例中、5例は日本住血吸虫卵によるELISAの結果が陰性となった。また、Calatrava, NEGROS州では、同様な87例中、2例がELISAで陰性となった。

D. 考察

メコン住血吸虫症の免疫血清診断で、従

来の虫卵粗抗原を使った ELISA よりも、過ヨウ素酸ナトリウムで処理した虫卵抗原を用いる SMP-ELISA の方が、偽陽性例も少なく有用であることが、フィールドでも検証された。そして、実際に村落ごとの SMP-ELISA 陽性率をみると、Kompong Krabei および Kbal Chuor の ELISA 陽性率はそれぞれ 26.8%, 50.8% で、高い水準にあったが、それらと 500m 程度で隣接する Achen や Sambok では、8% 程度の陽性率にとどまった。メコン住血吸虫の感染リスクは、隣接する村でもかなり異なり、流行も局所的に起こることが、SMP-ELISA を利用した調査でより明確になった。

また、ラオス旅行中の外国人旅行者の感染例の検査結果からは、従来メコン住血吸虫症の報告がない Van Vieng 地域での罹患が強く疑われた。今後は、同地域を中心に、媒介貝の調査や糞便検査と並んで、広い範囲で住民の血清疫学調査を行うべきと判断された。

さらに、今世紀になって確認されたフィリピンの日本住血吸虫症有病地において、腹部超音波検査の結果と、ELISA の結果を照合して解析した。住血吸虫症の有病地では、年齢が進むにつれ、進行した肝線維化を示す例の割合が増加する傾向があるが、これは、長期間にわたり感染と治療を繰り返し、加齢とともに、次第に不可逆的な肝線維化を示す例が増加するからと考えられる。新しく発見された CAGAYAN 州、NEGUROS 州の浸淫地でも、この年齢と肝線維化の関係が、腹部超音波検査を利用した疫学調査

で確認された。また、超音波検査で進行した肝線維化を示しながら、ELISA の結果が陰性となった例もみられたが、このような例は、かつ日本の有病地でも多く確認されており、10 年以上前に日本住血吸虫に感染し、その後の治療が不十分であった例と考えられてきた。

E. 結論

メコン住血吸虫症の免疫検査で、過ヨウ素酸ナトリウム (sodium metaperiodate) で処理した虫卵抗原を用いた診断法 (SMP-ELISA) は、虫卵陽性者を確実に検出し、フィールド調査でも有用であることがわかった。また、ラオス旅行中の外国人旅行者の感染例の検査結果から、従来メコン住血吸虫症の報告がない地域でも、感染リスクが疑われた。また、超音波検査の結果と ELISA の結果を照合することにより、2000 年代になって新たに確認されたフィリピンの 2 つの日本住血吸虫症浸淫地は、従来から有病地であったことが強く疑われる結果となった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kumagai T, Furushima-Shimogawara R, Ohmae H, Wang TP, Lu S, Chen R, Wen L, Ohta N. Detection of early and single infections of *Schistosoma*

japonicum in the intermediate host snail, *Oncomelania hupensis*, by PCR and Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) assay *Am J Trop. Med Hyg* 2010, 83:542-548.

- 2) Kirinoki M, Chigusa Y, Ohmae H, Matsumoto J, Kitikoon V, Sinuon M, Saem C, Socheat D, Matsuda H. Efficacy of sodium metaperiodate (SMP)-ELISA for the serodiagnosis of schistosomiasis mekongi. *Southeast Asi J Trop Med Pub Hlth* 2011, 42:25-33.

2. 学会発表

- 1) 桐木雅史、林尚子、Muth Sinuon、Doung Socheat、Viroj Kitikoon、千種雄一、大前比呂思、松田肇. カンボジア・クラチェ県におけるメコン住血吸虫症疫学調査. 第79回日本寄生虫学会大会 旭川市2010年5月20日～21日
- 2) 福原一磨、桐木雅史、千種雄一、尾藤伴行、井上真理、中村哲、松田肇、石川洋文. ラオス・コーン島村落間ネットワークモデルに基づくメコン住血吸

虫症対策の評価. 第79回日本寄生虫学会大会 旭川市2010年5月20日～21日

- 3) 大前比呂思、千種雄一、Sy OS, Keang H, Olveda R. 東南アジアの住血吸虫症の超音波検査診断基準の国際的標準化における問題点. 第70回日本寄生虫学会東日本支部大会 栃木県壬生町 2010年10月2日
- 4) Ohmae H, Kirinoki M, Suniko LS, Boldeero NP, Viacorte EA, Solon AA, Leonard LR, Leshem E, Chigusa Y. Surveys on newly found endemic foci in Southeast Asian countries 2. The 45th Japan-US Joint Conference on Parasitic Diseases. Tokyo, Japan January 10-11, 2011

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし

表 1 カンボジア, Kratie 省のメコン住血吸虫症有病地における SMP-ELISA の結果 (2010 年 4, 5 月)

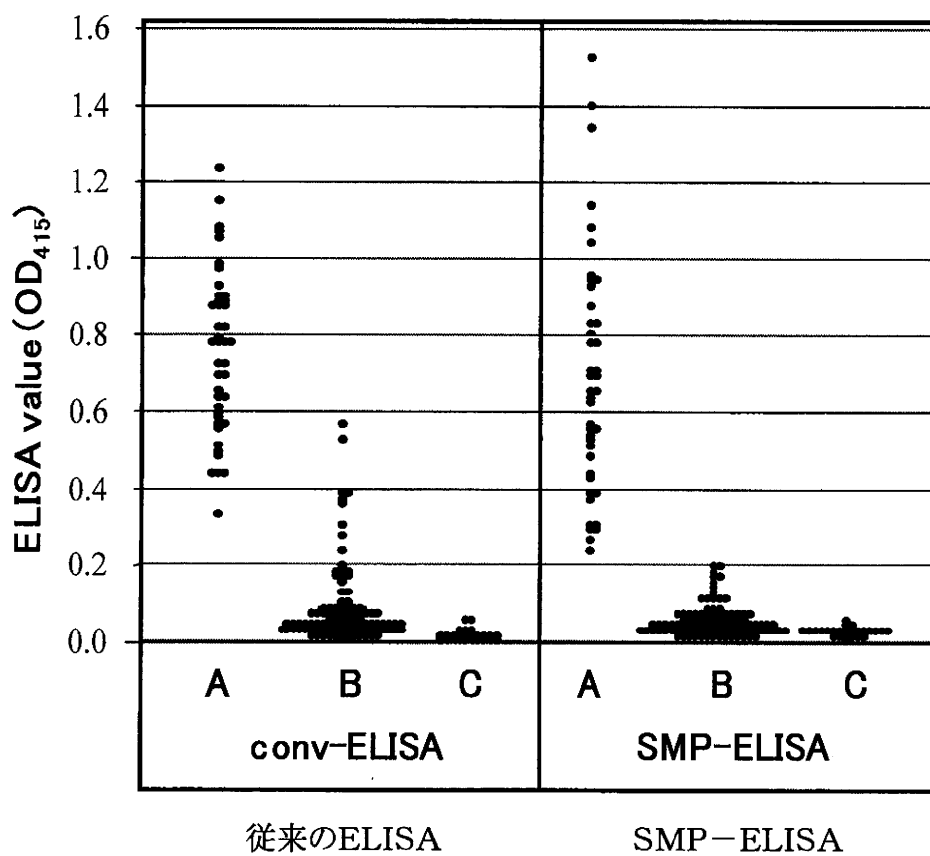
	被験者数	陽性者数	陽性率 (%)
Achen	87	7	8.0
Kompong Krabei	112	30	26.8
Srekhoeun	82	14	17.1
Chatnol	118	6	5.1
Kbal Chuor	122	62	50.8
Sambok	124	10	8.1

Blood samples were collected in filter papers,
Antigen: *S.mekongi* soluble egg antigen (SMP-treated)

表 2 ラオス, Van Vieng 地区に滞在後、消化器症状を示したイスラエル人旅行者における 2 種類の住血吸虫卵を用いた ELISA の結果

番号	採取年度	使用した虫卵抗原	
		<i>S. mekongi</i>	<i>S. japonicum</i>
1	2006	+	-
2	2006	-	-
3	2006	-	-
4	2007	-	-
5	2008	+	+
6	2008	-	-
7	2008	+	+
8	2008	+	+
9	2008	-	-
10	2008	+	-
11	2010	-	-
12	2010	-	-
13	2010	+	-

図 メコン住血吸虫症の検査診断における通常の ELISA と SMP-ELISA の比較



A 虫卵陽性者, B 虫卵陰性のカンボジア人対照者, C 日本人対照者

平成 22 年度厚生労働科学研究費補助金 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
(分担研究報告書)

顧みられない病気に関する研究：
住血吸虫症の免疫診断キット開発及び評価

研究分担者 朝日博子 国立感染症研究所 研究官

研究要旨

ヒト住血吸虫症の感染、疾病コントロールに不可欠となる簡便かつ非侵襲性の診断方法の開発を目途として、第1段階として、日本住血吸虫(SJ)感染者の尿中および血清中に検出される各種抗体の特徴や治療後消長を解析した。次にSJ成虫体の tegument に局在し、22.6kDaの理論分子量をもつ成分のレコンビナントタンパク(rSJT226)をSJ症の免疫診断に導入した。その結果、rSJT226は抗体検出に優れる事が判明した。当該分子をSJ症診断に利用する為に、peptide library 作製とB-cell epitope 決定を行い、人工合成抗原を作出した。これらの抗原を酵素抗体法および Immunochromatography (ICT) に適用した結果、粗製成虫抗原と比較して優れた検出率及び特異性が確認出来た。即ち合成抗原を用いた簡易診断法が作出できた。他方、先に作製したモノクローナル抗体を用いてSJT226循環抗原を検出した結果、高率に循環抗原として存在することが判明した。ことから抗原検出による active infection の検出に、当該分子に対する antibody の利用が期待される。

A. 研究目的

世界中で数億人の感染者を数える住血吸虫症は広範な観点からコントロールを不可欠とされる感染症として重要である。ヒト住血吸虫症は主として Manson 住血吸虫 (*Schistosoma mansoni*)、日本住血吸虫 (*S. japonicum*)、ビルハルツ住血吸虫 (*S. haematobium*)、メコン住血吸虫 (*S.*

mekongi) 感染によって起こるものであるが、本症はいずれの種によっても 1) 長期に渉る経過を辿る事、2) 虫卵による不可逆的な組織破壊がある事、3) 自覚症状のない感染者も多く、ライフサイクルの維持の機会を供与すること、4) 流行地では再感染が繰り返される事等々疾病のコントロールの障害となっている。これらの問題

に対処するため、感染の状態、すなわち active 感染なのか否か、morbidity と active 感染との関連等を的確に把握する為の簡易診断法の開発が特に必要とされる。本研究では第一段階として主としてアジアで流行している日本住血吸虫 (SJ) 症の簡便かつ非侵襲的な診断法の開発を目途とした。

まず最初に日本住血吸虫 (SJ) 感染者の尿中および血清中に検出される各種抗体の特徴や治療後消長を解析した。SJ 感染者の尿中には、血清中と同様、診断に役立つ事が十分に期待できる程度の高い抗体価が検出された。次いで、診断用抗原作製維持に伴う困難を回避する為に、SJ 成虫抗原 (SWAP) および SJ 虫卵抗原 (SEA) と同等以上の感度を付与できる人工合成抗原を作製した。これらの人工合成抗原を酵素抗体法 (ELISA) および Immunochromatography (ICT) に適用した。

B. 研究方法

抗原として有用であろうと推測された成虫体の tegument に存在する 22.6kDa タンパク成分 (SJT226) のレコンビナントタンパク (rSJT226) を導入して、尿および血清中の特異抗体との反応性を調べた。さらに当該タンパクのアミノ酸配列に基づいてペプチドライブラリーを作製し、特異的モノク

ローナル抗体 (SJA111 mAb) , 感染マウス血清、感染者血清および尿中抗体と反応する B-cell epitope を決定した。

決定した B-cell epitope を含む人工合成抗原を作製して、免疫診断法 (ELISA および ICT) に導入して有用性を確認した。

<倫理面への配慮>

検体は提供者が自由意志のもとで、本研究に関してその研究目的、内容について十分な説明を受けた上で、提供者の同意を得て供与を受けた。

C. 研究結果

SJT226 分子内の B-cell epitope として、感染マウス、感染者の血清、尿中抗体を用いて 5 種を特定した。ペプチド配列等抗原構造の詳細は割愛する。

決定した B-cell epitope を含む人工合成抗原を作製して、免疫診断法 (ELISA および ICT) に導入した結果、同等あるいは優越な検出率及び特異性が確認出来た (Fig. 1, Fig. 2)。

D. 考察

本研究で導入した rSJT226 および合成抗原は、特異抗体検出に優れている事から、SWAP や SEA の代わりに診断に利用できると考えられる。低レベルの抗体も含めて検出する為に、酵素抗体法