

2. 遺伝子組換え蛋白質抗原と糖鎖抗原を応用した新しいエキノコックス症血清診断法の開発

山野公明 (北海道立衛生研究所生物科学部感染病理科)

後藤明子 (北海道立衛生研究所生物科学部感染病理科)

澤田幸治 (旧所属 天使大学、現所属 札幌医大)

【目的】

日本国内で問題となる難治性寄生虫感染症・エキノコックス症は主に2つである。

1つは *Echinococcus multilocularis* (Em) の感染が引き起こす多包虫症 (AE 症) で、北海道が主な流行地となっている。¹⁾ 北海道立衛生研究所では、流行する AE 症検出のために、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法²⁻³⁾ 及びその確認診断法としてウェスタン・ブロット (WB) 法による検査法を確立し実施している⁴⁻⁵⁾。いずれの方法も、これまでに改良を加えながら行われ、住民検診システムの中で成果をあげている。⁶⁻⁸⁾ しかし、現在の AE 症血清診断で用いられている抗原は、コットラットに感染増殖させた Em シストから調製した、いわゆる“粗抗原”であり、ロット間差や他種との交差反応など、改善すべき課題が残っている。

もう1つは、*E. granulosus* (Eg) が感染することによって起こる単包虫症 (CE 症) である。⁹⁾ 日本における CE 症は、基本的に輸入症例であり発生例は少ない。とはいえ、これらへの対応も非常に重要で、AE 症との鑑別の意味においても CE 症血清診断の体制も整えておく必要がある。ただし、この場合、検査に必要な Eg 由来の抗原入手に難がある。

このように、血清診断を行うためには良い抗原の存在が欠かせない。粗抗原には大きく蛋白質系の抗原と糖鎖関連抗原が含まれている。そのうち、蛋白質抗原については、近年、国内外のグループにより感度・特異性に優れたリコンビナント抗原の探索・応用が試みられている。¹⁰⁻¹⁶⁾ 一方の糖鎖抗原については、蛋白質抗原ほどには研究報告例が多くはないが、我々は、構造既知の Em 由来糖鎖の幾つかを化学合成し、¹⁷⁻¹⁸⁾ 個々の抗原性を調べてきた。¹⁹⁻²⁰⁾

このような状況下、今回我々は、粗抗原が抱える課題を克服しつつ、AE 症血清診断の標準化を目指し、合成抗原による ELISA 法を検討した。また、併せて、CE 症血清診断についても同様に応用する可能性についても検討した。

【方法】

1 使用血清

AE 症 (50 名) 及び CE 症 (35 名) の確定患者と一般健常者 (60 名 : NH) の血清を使用した。

2 抗原

今回、ELISA 法検討用に使用した合成抗原は、ペプチド抗原 2 種と糖鎖抗原 1 種である (表 1)。ペプチド抗原については、AE 症血清診断の主流である EmII/3 及び CE 症血清診断に使われ AE 症患者も約 40% が反応すると言われる antigen B に着目し、それらの部分アミノ酸配列 (抗原 A 及び B) を用いた。一方、糖鎖抗原については既に合成済みの化合物の中から、これまでの検討で最も感度・特異性が高かったもの (抗原 C) を使用した。AE 症血清診断用としては、抗原 A を主軸として考え、これによる検出漏れを補完する目的で抗原 B 及び抗原 C についても検討を行った。

表 1 検討に使用した合成抗原

ペプチド	抗原 A	EmII/3 内のアミノ酸 40 残基
ペプチド	抗原 B	antigen B 内のアミノ酸 40 残基
糖鎖	抗原 C	Gal β 1-6(Fuc α 1-3)Gal β 1-6Gal-cer

3 ELISA 法の手順

抗原液は、コーティングバッファーを用いて 5 μ g/mL の濃度に調製した。マイクロプレートの各ウェルに 100 μ L ずつ分注し、4 で一晩かけて抗原を吸着させた。翌日、洗浄バッファーを各ウェルに 300 μ L ずつ分注し、3 min 攪拌することにより洗浄した。この操作を 3 回繰り返した。0.05% Tween-PBS を用いて 100 倍希釈した血清を 100 μ L ずつ各ウェルに分注し、37 で 1 hr 静置した。先程と同様にウェルを 3 回洗浄後、1,000 倍希釈した二次抗体 (anti-human IgG / HRP) を 100 μ L ずつ各ウェルに分注し、37 で 1 hr 静置した。ウェルを 3 回洗浄後、基質液 (ABTS) を 100 μ L ずつ各ウェルに分注し、37 で 15 min 発色させた。405 nm で各ウェルの吸光度 (OD) を測定した。

健常者 60 名の「平均 OD 値 + 2SD」を基準値とし、この値以上の OD 値を示した検体を陽性と判定した。

【 結果及び考察 】

図 1 に抗原 A~C に対する AE 症・CE 症患者及び健常者血清の反応によって得られた OD 値の分布を示す。

また、それらの結果から、感度・特異度・診断効率を算出し表 2 にまとめた。

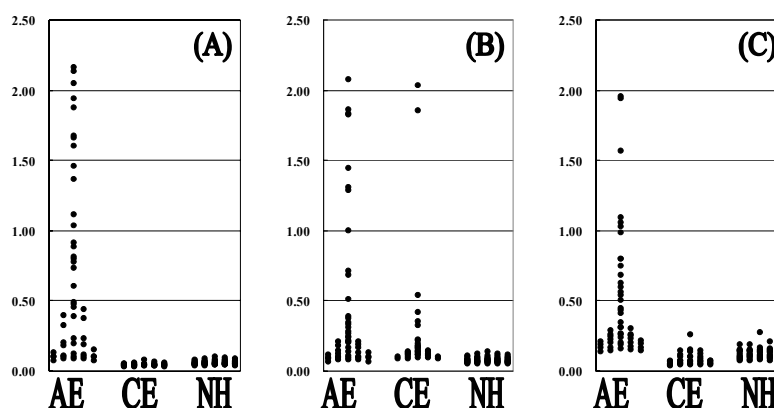


図 1 各抗原に対する AE 症・CE 症患者及び健常者血清の反応

表2 結果のまとめ

Cut-off	A E				C E			
	陽性数	感度	特異度	診断効率	陽性数	感度	特異度	診断効率
抗原 A 0.085	45 / 50	90.0	96.8	94.5	0 / 35	0.0	-	-
抗原 B 0.116	35 / 50	70.0	-	-	25 / 35	71.4	95.0	86.3
抗原 C 0.200	38 / 50	76.0	-	-	1 / 35	2.9	-	-

AE 症検出のための検査用抗原として主軸に考える抗原 A では、AE 症患者 50 名中 45 名を陽性として検出することができ（感度 90.0%）、特異度 96.8%・診断効率 94.5%という結果を得た。感度の点で、粗抗原で見積もられている 96%よりも現状は下回っているものの、単独の抗原成分に対する反応としては、ほぼ満足のいくものである。特に、この抗原は AE 症に特異性が高いとされる EmII/3 系の抗原であることから、CE 症患者が 1 名も陽性判定とならなかった（0 / 35）ことは、AE 症診断用抗原としての有用性を示す大きな要因といえる。実際の検査に応用するために検出効率を上げる工夫として、複数の抗原を組み合わせることによって不足分を補完することを検討した。すなわち、抗原 A では検出できなかった 5 名について、抗原 B 及び抗原 C で検出できるか否かを調べた。その結果、表 3 が示すように抗原 A では陰性判定だった AE 症患者 5 名のうち、抗原 B によって 3 名、抗原 C によって 1 件が検出されていることが判明した。従って、2~3 種の抗原を組み合わせる使用することによって、数字の上では 50 名中 48 名の AE 症患者を検出することができたことになり（患者検出率 96%）、粗抗原の感度に匹敵する結果を得ることが可能である。

表3 補完成分の検討

	抗原 A	抗原 B	抗原 C
1	-	+	+
2	-	+	-
3	-	+	-
4	-	-	-
5	-	-	-

一方、CE 症検出用として最も期待する antigen B 系の抗原 B では、CE 症患者 35 名中 25 名を検出し（感度 71.4%）、特異度 95.0%・診断効率 86.3%という結果を得た。antigen B の native 抗原やリコンビナント抗原を検査に用いた場合の感度は、文献的には約 80%とされているので、それと同等以上の結果が得られるよう、選択するアミノ酸配列についてさらに検討する必要があると思われる。

これまで、粗抗原がもつ課題を克服するために、精製抗原²¹⁾ やリコンビナント抗原など、多くの研究がなされてきたが、単一の抗原で粗抗原に匹敵する患者検出率を示すものはないと思われる。従って、現状は、患者の見逃しを最小限に抑えるためには、複数の抗原に対する特異的な反応を検出し、複合的

に判断する必要がある。^{8,22)}

また、今回は個々の抗原に対する反応性をみる形で検討を行った。しかし、この場合、使用する抗原の数だけプレート ELISA を行うことになる。よって、今後は必要な抗原成分を混合し、いわゆるカクテル抗原によって、1 度の検査で検出できるよう検討したい。合成抗原の使用により、各成分の濃度を常に一定に保つことが可能であることから、ロット間差のない抗原を安定供給できる上、検査の標準化や精度管理にも大いに役立つと考えられる。

- 参考文献 -

- 1) Kimura H, Furuya K, Kawase S, Sato C, Yamano K, Takahashi K, Uruguchi K, Ito T, Yagi K, Sato N: *Jpn. J. Infect. Dis.*, **52**, 117 (1999)
- 2) 佐藤秀男, 三田村弘, 新井純理, 熊谷 満: 道衛研所報, **33**, 8 (1983)
- 3) 佐藤秀男, 三田村弘, 新井純理, 熊谷 満: 道衛研所報, **33**, 16 (1983)
- 4) 古屋宏二, 佐藤秀男, 熊谷 満: 医学のあゆみ, **141**, 41 (1987)
- 5) Furuya K, Sasaki S, Honma H, Kumagai M, Sato N, Takahashi M, Uchino J: *Jpn. J. Parasitol.*, **38**, 184 (1989)
- 6) 山野公明, 古屋宏二, 澤田幸治: 道衛研所報, **55**, 73 (2005)
- 7) 古屋宏二, 川中正憲, 佐藤直樹, 山野公明, 本間 寛: 感染症学雑誌, **78**, 320 (2004)
- 8) Yamano K, Goto A, Miyoshi M, Furuya K, Sawada Y, Sato N: *J. Helminthol.*, **83**, 57 (2009)
- 9) Furuya K, Kawanaka M, Sato N, Honma H, Tamura M: *Jpn. J. Infect. Dis.*, **53**, 176 (2000)
- 10) 澤田幸治, 山野公明, 八木欣平, 古屋宏二, 田村正秀: 道衛研所報, **52**, 24 (2002)
- 11) 山野公明, 八木欣平, 澤田幸治: 道衛研所報, **52**, 58 (2002)
- 12) 澤田幸治, 山野公明, 北村哲也, 八木欣平, 本間 寛, 田村正秀: 道衛研所報, **53**, 105 (2003)
- 13) 山野公明, 澤田幸治: 道衛研所報, **54**, 81 (2004)
- 14) 山野公明, 北村哲也, 澤田幸治: 道衛研所報, **54**, 85 (2004)
- 15) Kouguchi H, Suzuki T, Yamano K, Honma H, Sawada Y: *The Protein J.*, **24**, 57 (2005)
- 16) 山野公明, 後藤明子, 澤田幸治: 道衛研所報, **55**, 77 (2005)
- 17) Yamamura T, Hada N, Kaburaki A, Yamano K, Takeda T: *Carbohydr. Res.*, **339**, 2479 (2004)
- 18) Koizumi A, Hada N, Kaburaki A, Yamano K, Schweizer F, Takeda T: *Carbohydr. Res.*, **344**, 856 (2009).
- 19) Yamano K, Hada N, Yamamura T, Takeda T, Honma H, Sawada Y: *J. Helminthol.*, **80**, 387 (2006)
- 20) Yamano K, Goto A, Nakamura-Uchiyama F, Nawa Y, Hada N, Takeda T: *Parasite Immunol.*, **31**, **481** (2009)
- 21) 山野公明, 澤田幸治: 道衛研所報, **56**, 91 (2006)
- 22) Yamano K, Yagi K, Furuya K, Sawada Y, Honma H, Sato N: *Jpn. J. Infect. Dis.*, **58**, 122 (2005)

【 経費使途明細 】

フリーザー用貯蔵ボックス (30 個入り)	23,625 円
試薬合成 (ペプチド 5 mg)	336,000 円
ピペット用チップ (12.5 mL × 50 入り)	3,633 円
ピペットコントローラー (充電式)	44,520 円
電気泳動用試薬類 <ul style="list-style-type: none"> ・ プレミックスバッファー10× Tris/Gly、1L ・ レディーゲルJ 5-20%、2D、4 枚入り ・ Laemli サンプルバッファー、30 mL 	20,181 円
バッファー調製用試薬 (PBS 調製用タブレット、100 錠入り)	12,862 円
ELISA プレート用シール (100 枚入り)	16,380 円
発色用試薬 (6 本入り)	25,221 円
ニトロセルロース膜 (10 枚入り)	11,802 円
プリンターインクカートリッジ (黒)	5,776 円
合 計	500,000 円