

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	Marcello Otake Sato
学位論文題目			
Evaluation of purified <i>Taenia solium</i> glycoproteins and recombinant antigens in the serologic detection of human and swine cysticercosis			
(ヒトおよびブタ囊虫症の血清学的検出における有鉤囊虫精製糖蛋白質抗原と組換え抗原の評価)			
共著者名			
Marcello Otake Sato, 迫 康仁、中尾 稔、中谷 和宏、山崎 浩、伊藤 亮			
The Journal of Infectious Diseases 194(12)巻 1783-1790 平成 18年 11月 15日			
研究目的			
<p>有鉤囊虫症は有鉤条虫の幼虫（有鉤囊虫）である囊虫の感染に起因する疾患である。有鉤条虫の終宿主はヒト、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。</p> <p>本症の診断には画像診断が適用されているが、寄生する囊虫数が少ない場合や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、発展途上国の流行地において画像診断はコストの点からその適用が困難であるため、血清診断法の重要性が高い。血清診断用の特異抗原として囊虫液に含まれる分子サイズ 10-50kDaの糖蛋白質 (GPs) が特異性の高い抗原として国際的な評価を得ている。我々は、GPsの簡便な精製法を開発するとともに、その組換え蛋白質抗原 (Rec-Ag1V1/Ag2) も作製し、血清診断抗原としての有用性を示してきた。</p> <p>最近、我々は 1)有鉤条虫のミトコンドリアゲノム解析により、有鉤条虫が 2つの遺伝子型 (アフリカ/アメリカ型およびアジア型) に型別できること、2)異なる地域で採取された囊虫液間でGPsのバンドパターンが異なることを明らかにした。これらの結果はGPsを抗原として使用する際、そのGPsの起源が血清診断結果に影響を及ぼす可能性を示唆している。</p> <p>本研究では、有鉤条虫の2つの遺伝子型由来GPsを精製し、その性状解析を行うとともに、その抗原性をRec-Ag1V1/Ag2の抗原性と比較した。また、世界各国で分離された有鉤条虫のGPs抗原遺伝子 (Ag1V1 およびAg2) の多型解析も行った。</p>			
材料・方法			
<p>精製に用いた囊虫液は世界各国で分離された囊虫より採取したものである。GPsは抗GPs ウサギ血清およびモノクローナル抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。精製GPsの一部はN-グリコシダーゼFを用いて糖鎖を除去し、イムノブロット解析にて糖鎖付加の電気泳動距離に対する影響を解析した。Rec-Ag1V1/Ag2 はpTWIN1 ベクターを用いて大腸菌ER2566 により発現させた。発現した組換え蛋白質はキチン結合蛋白質およびインテインとの融合蛋白質であるため、キチンカラムを用いて精製した。血清学的解析はヒト血清 60 検体、ブタ血清 30 検体を用いてELISA法を用いて行った。被検血清は 100 倍希釈したものを、抗体検出プローブにはペルオキシダーゼ標識プロテインGを、発色基質にはABTSを使用した。統計学的処理には、ピアソンの相関係数およびピアソンの χ^2 検定を用いた。Ag1V1 およびAg2 遺伝子の多型解析は囊虫より抽出したゲノムDNAを鋳型としたPCR法により両遺伝子を増幅し、その塩基配列を決定することにより行った。</p>			

成 績

精製GPsに対して作製したマウスモノクローナル抗体を用いたイムノブロット解析では、分子サイズ 8-50kDaの数本のバンドが検出され、そのバンドパターンは遺伝子型間で異なっていた。すなわち、アフリカ/アメリカ型で検出された 22kDaのバンドはアジア型では検出されず、逆に、アジア型で検出された 18kDaのバンドはアフリカ/アメリカ型では検出されなかった。このバンドパターンの違いは患者血清を用いたイムノブロット解析でも確認された。このバンドパターンの差異がGPsの糖鎖付加によるものか否かを明らかにするために、糖鎖を除去した精製GPsを用いてイムノブロット解析を行ったところ、8 および 16kDaの 2 本のバンドのみが検出され、遺伝子型間の違いは消失した。

次に、精製GPsの抗原性は患者血清および感染ブタ血清を用いたELISA法で解析した。ELISA法で得られた各検体のOD値について相関関係を解析したところ、アメリカ由来GPsとアフリカ由来GPs間で得られた相関係数はアメリカあるいはアフリカ由来GPsとアジア由来GPs間で得られた相関係数より高かった。しかし、また、アジア人血清ではアジア由来GPs抗原に対して強陽性であったにもかかわらず、アメリカ/アフリカ由来GPs抗原に弱陽性を示すものがあり、また逆の現象も観察された。診断感度に関しては各GPs間で違いは認められなかった。組換え蛋白質Rec-Ag1V1/Ag2の抗原性についてGPsと比較したところ、Rec-Ag1V1/Ag2 で得られたOD値は各GPsで得られたOD値と強い相関を示し、診断感度に統計学的有意差は認められなかった($p > 0.1$)。

世界各地で分離された有鉤条虫におけるAg1V1 およびAg2 遺伝子多型解析に関しては、Ag1V1 遺伝子特異的プライマーでは 379bpのPCR産物が、Ag2 遺伝子特異的プライマーでは 361bpのPCR産物が得られた。それぞれの塩基配列解析によって、1) 両遺伝子とも 2 つのイントロンが存在すること、2) 推定アミノ酸配列の比較により、Ag1V1 ではブラジルと中国の有鉤条虫で 1 アミノ酸の変異が認められたが、他の分離株間では同一のアミノ酸配列であること、3) Ag2 では全ての有鉤条虫株でアミノ酸置換はないことが明らかとなった。

考 案

有鉤囊虫症の血清診断用抗原である囊虫液内GPsを精製し性状解析を行った結果、有鉤条虫の遺伝子型間で認められたGPsのバンドパターンの差異は糖鎖を除去することにより消失した。GPsのアミノ酸配列中にはアスパラギン結合型糖付加部位が存在することから、遺伝子型間におけるバンドパターンの差異は付加された糖鎖の分子サイズ、構造および組成の違いに起因すると考えられる。

有鉤条虫の2つの遺伝子型に由来するGPs抗原が血清診断結果に及ぼす影響については、両遺伝子型間で抗原に対する反応性に違いは観察されたが、血清診断結果に影響を及ぼすことはなかった。その理由として、1) 遺伝子型間で異なる抗原性をもつ糖鎖が付加されている可能性、2) GPsをコードする遺伝子は多型に富む多重遺伝子であることから、遺伝子型間で発現パターンが異なり、異なった宿主免疫応答を誘導する可能性などが考えられる。組換え蛋白質Rec-Ag1V1/Ag2の抗原性については、GPsでは患者血清 60 検体全てが陽性であったのに対し、Rec-Ag1V1/Ag2 では 60 例中 4 検体が陰性と判断された。GPsは高度に糖修飾を受けた分子であり、糖鎖を除去することによりその抗原性が低下することが本研究でも証明されたことから、抗糖鎖抗体の存在がRec-Ag1V1/Ag2 を用いた診断結果に反映されていると考えられる。しかしながら、GPs、組換え抗原ともに検出感度に統計学的有意差は認められなかったこと、また、Ag1V1 およびAg2 遺伝子が有鉤条虫の2遺伝子型で高度に保存されていることから、Rec-Ag1V1/Ag2の診断用抗原としての有用性が示された。

結 論

有鉤囊虫液内GPsのバンドパターンが有鉤条虫の遺伝子型間で異なり、それが糖鎖付加によることが初めて明らかにされた。また、血清診断の感度においても両遺伝子型間でGPsならび組換え蛋白質Rec-Ag1V1/Ag2 においても有意差は認められず、診断用抗原としての有用性が高いことが証明された。本研究で得られた知見は、ヒトおよび豚の囊虫症感染把握を容易にする手段を提供するものであり、有鉤囊虫症の拡散防止対策に大きく貢献する重要な成果であり、本研究の意義は大きい。

引用文献

1. Obregon-Henao A, Gil DL, Gomez DI, Sanzon F, Teale JM, Restrepo BI. The role of N-linked carbohydrates in the antigenicity of *Taenia solium* metacestode glycoproteins of 12, 16 and 18 kD. **Molecular and Biochemical Parasitology** 2001; 114:209-215.
2. Sako Y, Nakao M, Nakaya K, Yamasaki H, Ito A. Recombinant antigens for cysticercosis and echinococcosis. **Parasitology International** 2006; 55:S69-S73.
3. Nakao M, Okamoto M, Sako Y, Yamasaki H, Nakaya K, Ito A. A phylogenetic hypothesis for the distribution of two genotypes of the pig tapeworm *Taenia solium* worldwide. **Parasitology** 2002; 124:657-662.

参考論文

1. Sato MO, Cavalcante TV, Sako Y, Nakao M, Yamasaki H, Yatsuda AP, Nakaya K, Ito A. Evidence and potential for transmission of human and swine *Taenia solium* cysticercosis in the Piracuruca region, Piauí, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 2006; 75(5)卷 (in press)
2. Sato MO, Yamasaki H, Sako Y, Nakao M, Nakaya K, Plancarte A, Kassuku AA, Dorny P, Geerts S, Benitez-Ortiz W, Hashiguchi Y, Ito A. Evaluation of tongue inspection and serology for diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis in swine: usefulness of ELISA using purified glycoproteins and recombinant antigen. **Veterinary Parasitology** 2003;111:309-322.
3. Ito A, Yamasaki H, Nakao M, Sako Y, Okamoto M, Sato MO, Nakaya K, Margono SS, Ikejima T, Kassuku AA, Afonso SM, Ortiz WB, Plancarte A, Zoli A, Geerts S, Craig PS. Multiple genotypes of *Taenia solium*: ramifications for diagnosis, treatment and control. **Acta Tropica** 2003; 87(1):95-101.
4. Yamasaki H, Allan JC, Sato MO, Nakao M, Sako Y, Nakaya K, Qiu D, Mamuti W, Craig PS, Ito A. DNA differential diagnosis of taeniasis and cysticercosis by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology** 2004; 42:548-553.
5. Ito A, Putra MI, Subahar R, Sato MO, Okamoto M, Sako Y, Nakao M, Yamasaki H, Nakaya K, Craig PS, Margono SS. Dogs as alternative intermediate hosts of *Taenia solium* in Papua (Irian Jaya), Indonesia confirmed by highly specific ELISA and immunoblot using native and recombinant antigens and mitochondrial DNA analysis. **Journal of Helminthology** 2002; 76:311-314.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	Marcello Otake Sato
<p>審査委員長 伊藤喜久 ㊟</p> <p>審査委員 鈴木裕 ㊟</p> <p>審査委員 伊藤亮 ㊟</p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Evaluation of purified <i>Taeniia solium</i> glycoproteins and recombinant antigens in the serologic detection of human and swine cysticercosis</p> <p>(ヒトおよびブタ囊虫症の血清学的検出における有鉤条虫精製糖蛋白質抗原と組み替え抗原の評価)</p>			
<p>ヒトが終宿主の有鉤条虫は、その幼虫である有鉤囊虫もヒト、ブタなどに寄生し中間宿主となることがあり、これを有鉤囊虫症と呼ぶ。</p> <p>申請者らはこれまで、囊胞液中に存在する分子量 10-50 kDa の糖タンパク質 (GPs) を精製し、同時にキメラ組み替え抗原を作製、抗体検出酵素免疫測定法 (ELISA) を開発している。同時に genotypes がアメリカ/アフリカ、およびアジア型の 2 種類存在すること、それぞれの地域由来の囊胞中の GPs は、バンドパターンが異なることが明らかにしている。</p> <p>このような成果の上に、本研究では、2つの異なる遺伝子型由来の GPs を囊胞液中より新たに精製し、遺伝子型分布に従い世界 3 箇所から収集したヒト、ブタ血清を用いて、精製抗原の性状、ELISA における免疫反応性について、組み換え抗原との比較検討を行い、さらに世界各国で分離された有鉤条虫の GPs の遺伝子多型解析との関連性の追求から、血清診断の基礎検討を行った。</p>			

方法は既に確立されたものによる。すなわち、GPs精製は抗体結合 affinity chromatography、性状解析はイムノプロット法、組み換え抗原 Rec:Ag1V1/Ag2 の作製は、pWIN1 ベクターを用いて大腸菌 (ER2566) に発現させ、タグとしてインテインを用いてキチンカラムで精製した。遺伝子多型解析は囊虫より抽出したゲノム DNA から、Ag1V1、Ag2 遺伝子特異的 primer を用いて PCR 法により増幅した。血清はヒト 60 検体、ブタ 30 検体を南アメリカ、アフリカ、アジア各地区から得た。

この結果、囊胞液中のイムノプロット法では、マウスモノクローナル抗体、患者、ブタ血清共に反応し、アメリカ・アフリカ型は同一で、アジア型とは異なるバンドパターンを示し、N-glycosidase 処理により全て 8 および 16 kDa の 2 本のバンドとなったことから、糖鎖の差異を反映することが示された。ELISA 法による反応性では、アメリカ、アフリカは高い相関性が得られ、これに対してアメリカとアジア、アフリカとアジアは良好な相関性を認めるもののやや相関性の低い結果を得た。また GPs と血清を交差反応させると、一部に反応が見られないものがあり、血清中には糖鎖を含む epitope を強く認識する抗体が含まれていることが明らかとなった。事実、組み替え抗原と反応しないものが、4 例認められている。また遺伝子多型解析では、推定アミノ酸配列は Ag1V1 は 1 箇所 1 塩基変換が認める 2 地域を除き、ほぼ同一であり、また Ag2 は全て地域間で同一配列であった。

以上から、囊胞液中の GPs は遺伝子型間で異なるものの、推定一次構造はほぼ同一であり、糖鎖の種類、数、組み合わせが、抗体反応性の相違を反映することが示された。遺伝子組み換え抗原の免疫反応性は、native と異なるケースもあるが、native および組み替え抗原両者を組み合わせることにより十分対応ができ、世界の罹患地域での ELISA によるヒト、ブタ囊虫症の早期診断、治療、拡散予防に大きな道を開く研究と判断される。

本論文審査後、周辺領域に関する試問を行いました。的確に明快に説明がなされ、新たな研究に向けての意欲に満ち溢れていた。

審査委員全員が、学位授与に値する研究と判定した。

なお本論文は Journal of Infectious Disease 2006 年に発表されている。