

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	Agathe Nkouawa
<h3>学位論文題目</h3> <p>Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Differentiation and Rapid Detection of <i>Taenia</i> Species (Loop-Mediated Isothermal Amplification法を用いたヒトテニア科条虫の迅速鑑別検出法)</p> <p>共著者名</p> <p>迫 康仁、中尾 稔、中谷 和宏、伊藤 亮</p> <p>Journal of Clinical Microbiology 47 巻 168 頁～174 頁 平成 21 年 1 月</p> <h3>研究目的</h3> <p>有鉤条虫(<i>Taenia solium</i>)、無鉤条虫(<i>T. saginata</i>)およびアジア条虫(<i>T. asiatica</i>)はヒト小腸に寄生し、テニア症を引き起こす。テニア症は比較的軽度の疾患であるが、有鉤条虫の幼虫寄生に起因する有鉤囊虫症は臨床上極めて重要な感染症であり、全世界、特に発展途上国で公衆衛生上重要な疾患となっている。したがって、テニア症患者の検出と種の同定は疫学上また有鉤囊虫をコントロールする上で重要である。現在、テニア症の診断は検便等により虫卵を検出する方法と排出された片節あるいは頭節の形態を観察する方法がとられている。しかし、これらの方法は感度が低くまた種特異的ではないため、分子生物学的手法を用いた鑑別診断が必要である。PCRを基にした方法は高感度で特異的であるが、その実施にはサーマルサイクラーのような高価な機材が必要であり、途上国での応用は困難である。さらに、生物試料に含まれるDNAポリメラーゼ阻害剤はPCRに用いる <i>Taq</i>ポリメラーゼを不活性化し、感度や再現性に影響を与える。</p> <p>最近、Loop-Mediated Isothermal Amplification(LAMP)法と呼ばれる新規のDNA増幅方法が報告された。この方法は、サーマルサイクラーのような高価な機材を必要とせず、恒温槽でDNA増幅反応を行うことができる。また、DNA増幅反応の副産物であるピロリン酸マグネシウムの白濁を目視することにより標的遺伝子有無を判定することが出来る。</p> <p>本研究では、核由来のカテプシンL様ペプチダーゼ遺伝子(<i>clp</i>)とミトコンドリア由来のチトクロームcオキシダーゼサブユニット遺伝子(<i>cox1</i>)を標的としたLAMP法によるテニア科条虫の迅速鑑別診断法を開発し、その評価を行った。</p> <h3>材料・方法</h3> <p>有鉤条虫、無鉤条虫およびアジア条虫のゲノムDNAは、各条虫の六鉤幼虫をNOD/<i>shi-scid</i>マウスの腹腔内に接種し発育させた囊虫、テニア症患者より排出された片節、中間宿主であるウシやブタより得られた囊虫、などより抽出した。有鉤条虫、無鉤条虫およびアジア条虫の検体数は、それぞれ 78、43 および 47 検体であった。LAMP法に使用するプライマーは、各条虫の <i>clp</i> 遺伝子および <i>cox1</i> 遺伝子を基に、PrimerExplorer V4ソフトウェアを用いて設計した。DNA増幅反応は、<i>clp</i> 遺伝子では 63°C で 1 時間、<i>cox1</i> 遺伝子では 60°C で 1 時間行った。80°C で 5 分間処理しDNA増幅反応を停止させた後、アガロースゲル電気泳動により増幅産物の有無を確認した。本研究で開発したLAMP法の感度および特異性は、各遺伝子DNAを連結したプラスミドDNA(標準プラスミド)ならびに寄生虫由来ゲノムDNAを用いて解析した。</p>			

成 績

LAMP法を用いたDNA診断法を開発するにはプライマーの設計が極めて重要である。本研究では、有鉤条虫、無鉤条虫およびアジア条虫を鑑別可能なプライマーをミトコンドリアDNA由来のcox1 遺伝子配列を基に設計することが出来た。一方、核DNA由来のclp遺伝子に関しては、無鉤条虫とアジア条虫間で塩基配列が高度に保存されていたため、それらを鑑別するプライマーを設計することが出来なかったが、有鉤条虫と無鉤条虫およびアジア条虫を鑑別できるプライマーを設計する事が可能であった。ただし、無鉤条虫とアジア条虫の鑑別はclp遺伝子のLAMP産物を制限酵素処理することにより可能であった。

最初に、既知の条虫試料に対してLAMP法を適用しその特異性を解析した。各cox1 遺伝子プライマーあるいは各clp遺伝子プライマーを用いたLAMP法は種特異的に標的遺伝子を増幅することが出来た。また、それらの結果は種特異的PCR法の結果と一致していた。興味深いことに、cox1 遺伝子LAMP法では無鉤条虫と同定されclp遺伝子LAMP法ではアジア条虫と同定された試料が2つ存在していた。

次に、階段希釈した標準プラスミド溶液を試料としてそれぞれのプライマーを用いたLAMP法を行い、それらの検出限界を求めた。その結果、全てのLAMP法は反応液中に標的遺伝子が1コピー存在していれば検出可能であることが判明した。さらに、糞便1g中に少なくとも5個の虫卵が存在していればcox1 遺伝子LAMP法で検出可能であり、clp遺伝子LAMP法では10個の虫卵が存在していれば検出可能であることが明らかとなった。

考 案

本研究で開発したLAMP法はヒト寄生性のテニア科条虫を高感度かつ特異的に検出することが出来た。LAMP法の評価に用いた試料の中で、cox1 遺伝子とclp遺伝子間で異なる同定結果が得られたものが2つ存在していた。それぞれのclp遺伝子LAMP産物をクローニングし塩基配列を決定しところ、非特異的増幅ではないことが確認された。これら2つの試料は、無鉤条虫とアジア条虫が同所的に存在する流行地で得られたものである。したがって、これら2つの試料は無鉤条虫とアジア条虫とが交雑することにより生じた個体から得られたものである可能性が示唆された。また、虫卵を用いた実験により、cox1 遺伝子LAMP法がclp遺伝子LAMP法より高感度であることが明らかとなった。これは、一つの細胞中に核由来のclp遺伝子は1対存在している事に対し、ミトコンドリア由来のcox1 遺伝子は少なくとも数百個存在しているためであると推察された。

PCR法に比べて、LAMP法はDNA増幅反応が簡便であるため高価な機材を必要とせず、恒温槽があれば実施できる利点がある。さらに、①LAMP法で用いるBst DNAポリメラーゼは、生物試料に含まれるDNAポリメラーゼ阻害剤に対して抵抗性を示す、②LAMP陽性を目視で判断できる、③PCR法に比べ短時間で結果が得られる、などの利点もある。これらの特徴より、LAMP法はテニア症流行地、特に発展途上国で容易に導入することの出来る方法であり、テニア症・囊虫症のコントロールに重要な役割を果たすと考えられる。

結 論

LAMP法を用いたヒト寄生性テニア条虫の迅速鑑別診断法を開発を行った。ミトコンドリアDNA由来cox1 遺伝子を標的としたLAMP法では単独で、核DNA由来clp遺伝子を標的としたLAMP法では制限酵素処理を併用することにより、3種の条虫を鑑別することが出来た。全てのLAMP法は反応液中に標的遺伝子が1コピー存在していれば検出可能であった。本研究で開発した迅速鑑別診断法は、テニア症・囊虫症の疫学およびコントロールに重要な役割を果たすと考えられる。

引 用 文 献



1. Abu Al-Soud W, and Rådström P. Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces, and meat. *J Clin Microbiol* 2000; 38:4463-4470.

2. Murrell, K. D. Chapter 3: epidemiology of taeniasis and cysticercosis, p. 32-44. *In*: K. D. Murrell, (ed.), WHO/FAO/OIE Guidelines for the surveillance, prevention and control of taeniasis/cysticercosis, OIE, Paris., 2005.
3. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, and Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 2000; 28:e63.

参 考 論 文

1. Nkouawa A, Sako Y, Li T, Chen X, Wandra T, Swastika IK, Nakao M, Yanagida T, Nakaya K, Qiu D, Ito A. Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method using fecal specimens for differential detection of *Taenia* species from humans. *J Clin Microbiol* 2010; 48:3350-3352.
2. Nkouawa A, Sako Y, Itoh S, Kouojip-Mabou A, Nganou CN, Saijo Y, Knapp J, Yamasaki H, Nakao M, Nakaya K, Moyou-Somo R, Ito A. Serological studies of neurologic helminthic infections in rural areas of southwest cameroon: toxocariasis, cysticercosis and paragonimiasis. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; 4:e732.
3. Nkouawa A, Okamoto M, Mabou AK, Edinga E, Yamasaki H, Sako Y, Nakao M, Nakaya K, Blair D, Agatsuma T, Enyong P, Shibahara T, Moyou-Somo R, Ito A. Paragonimiasis in Cameroon: molecular identification, serodiagnosis and clinical manifestations. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009; 103:255-261.
4. Sudewi AA, Wandra T, Artha A, Nkouawa A, Ito A. *Taenia solium* cysticercosis in Bali, Indonesia: serology and mtDNA analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008;102:96-98.

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	Agathe Nkouawa (アガサ ンカウア)
<p>審査委員長 伊藤喜久 </p> <p>審査委員 西條泰明 </p> <p>審査委員 伊藤 亮 </p>			
<p>学位論文題目</p> <p>Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Differentiation and Rapid Detection of <i>Taenia</i> Species</p> <p>(Loop-Mediated Isothermal Amplification 法を用いた ヒトテニア科条虫迅速検出法の開発)</p>			
<p>Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)法を用いて、targetDNA を増幅し条虫科の有鉤条虫 (<i>Taeniasolium</i>)、無鉤条虫 (<i>Taeniasanginata</i>)、アジア条虫 (<i>Taeniaasiatica</i>) の、3 種の特異的同定法を新たに確立した研究である。</p> <p>現在、最も突然死が多い感染症の一つとして脳囊虫症(neurocysticercosis)が地球規模、特に発展途上国で問題になっている。さらに先進国での輸入症例が増加している。これは人体寄生有鉤条虫から排泄される虫卵を誤って口にしたりした人達の中枢神経系に、幼虫(囊虫)が寄生して引き起こされる重篤な脳疾患である。同時に、発展途上国では他に 2 種類の人体寄生テニア科条虫が分布している。それ故、発展途上国において条虫症の迅速、特異的診断とこれにもとづく治療、予防は急務であり、とりわけ重症度の高い有鉤条虫と他の条虫との鑑別は重要である。これまで検査法は感度、特異性、操作法に一長一短があり、これらの問題を解決するために申請者は、①感染者から排泄された条虫(いわゆるサナダ虫)を用いて、人体寄生テニア科条虫 3 種類の新しい鑑別法として LAMP 法を開発し、②この新しい検査法により、患者の糞便を検体として、人体寄生テニア科条虫感染の有無と種の同定が確実かつ簡便に実施できることを確認した。</p>			

世界各地から得た3種の条虫の片節、囊虫ゲノムDNA、計168サンプルを用いた。ターゲット遺伝子は、核由来の cathepsin L-like peptidase (clp)とミトコンドリア由来の cytochrome c oxidase subunit (cox1)とし、それぞれクローニングし、塩基配列を解析確認し、プラスミド組み換え体を作製し標準プラスミドとして用いた。

LAMP法のプライマー作製は専用ソフトウェア(PrimerExploer V4)により4種類の oligonucleotide primer を各条虫について設計した。PCR法を比較対象法とし、患者糞便、非感染患者に虫卵を添加し感度、特異性などの性能評価を行った。

この結果 cox1 遺伝子は320塩基、clp 遺伝子は289塩基の増幅産物を得た。3種間で塩基配列は高い相同性を示したが、cox1 遺伝子は単独で特異的に鑑別することができた。一方、clp 遺伝子は有鉤条虫と非有鉤条虫との鑑別が可能で、制限酵素 Hinf I により処理することで、無鉤条虫とアジア条虫との鑑別を可能とした。

LAMP法の性能評価では cox1 遺伝子(プライマー)は既知の条虫試料に対して特異性は100%であった。これに対して clp 遺伝子は無鉤条虫においてのみ2例の乖離ケースがあり、塩基配列を検索したところ、無鉤条虫のTからCへの一塩基変換が、偶々制限酵素作用部位に起きていることが原因として突き止められた。上記の実験結果は同時に実施したPCR検査でも同様の結果を得ており、無鉤条虫とアジア条虫の間での雑種個体であると推定された。

標準プラスミドの糞便添加実験から、有鉤条虫の clp 標的遺伝子が1g中1コピーから検出可能で、PCR法と同等の感度を有していた。一方虫卵の添加実験から無鉤条虫、アジア条虫で cox1 遺伝子は糞便1gあたり5コピー、無鉤条虫で clp 遺伝子は10コピーから検出されることが示された。患者症例においても特異的に種の鑑別が可能であることを実証している。

本論文は、LAMP法によりヒトテニア科条虫の特異的迅速鑑別診断法を確立した研究である。簡単な操作法できわめて短時間に特別の機器も必要とせず、また比較的安価に実施可能で、発展途上国における簡易検査として広く利用の道を開いた意義は大きい。

諮問に対して適切な回答を提示し、専門知識も幅広く有し、今後の研究の展望を明確に示すなど、高い研究活動性がうかがわれ、今後さらなる研究の進展が期待される。

以上より本審査委員会は一致して学位授与に相応しい論文と判断した。

なお本研究は J Clin Microbiol 2009; 47: 168-174 に発表されている。