

平成21年6月15日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790310
 研究課題名 組換え特異抗原を基盤としたエキノコックス感染イヌの血清診断システムの開発

研究課題名 Studies on development of serodiagnosis system for dog infected in *Echinococcus multilocularis* by using specific recombinant antigen

研究代表者
 孝口 裕一 (KOUGUCHI HIROKAZU)
 北海道立衛生研究所・感染症センター生物科学部・研究職員
 研究者番号：50435567

研究成果の概要：エキノコックス症に感染したイヌの血清診断法に関する研究を行った。それまで、イヌの血清診断は全く未開発であったが、本研究により、診断法の基盤となる抗原をコードするいくつかの遺伝子や糖タンパク質成分を見いだすことが出来た。2年間の研究期間中、その遺伝子群を基に10数種の組換え抗原タンパク質を作製し、感染イヌおよび健常イヌ血清を用いて評価を行った。その中、数種類の感度および特異性共に良好な組換えタンパク質の作製に成功した。また、幼虫から抽出した糖タンパク質成分の血清学的評価も良好であった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,000,000	0	1,000,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計			2,430,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：基礎医学、寄生虫学（含衛生動物学）

キーワード：蛋白質、遺伝子、バイオテクノロジー、エキノコックス、寄生虫、組換え抗原、血清診断

1. 研究開始当初の背景

ヒトのエキノコックス症は、本寄生虫の排出する虫卵を偶発的に経口摂取することにより発症する難治性寄生虫疾患である。この寄生虫は、キツネやイヌ等の終宿主の腸管において成虫まで成育し、感染源である虫卵をその糞便中に排出する。

北海道内のイヌのエキノコックス感染率は0.4%～1%との報告がなされており、推定上、800～2000頭もの感染イヌが道内に存在することになる。イヌと人との濃厚な接触頻度を考慮すると、イヌの感染は飼い主はもと

より、その家族、地域住民にとって重大な脅威となる。

現在、犬のエキノコックス感染を判定する技術としては、糞便内虫卵検査や糞便内抗原検査が主流であるが、前者においては他の寄生虫虫卵との区別が極めて困難である点、後者においては測定精度の問題がある。さらにどちらの検査法も、感染源となりうる糞便を試料として取り扱わなければならない、飼い主あるいは試験実施者の感染リスクや実験室の虫卵汚染等の問題もある。

2. 研究の目的

(1) イヌのエキノコックス感染を判定するより安全かつエキノコックス対策・感染監視に適した血清試料を用いる新しい診断法を開発すること。

(2) この診断法を開発することにより、飼い主、地域住民、獣医師および試験実施者の感染リスクを回避させること。

(3) 血清診断の測定原理（血清中の抗体はある程度の期間、血清中に保持される）を利用し、飼育しているイヌの過去の感染履歴を追跡できる可能性があるかどうかを追求すること（感染履歴を調べた結果、陽性であれば早期に飼い主への診断を促すことができる重要な情報となりうる）。

(4) イヌの血清に高度に反応する成分は、将来的なワクチン抗原の候補となりうることから、なるべく多くの本寄生虫由来抗原性成分物質についての情報を得ること。

3. 研究の方法

(1) エキノコックスの幼虫、幼弱成虫および成虫の3種類の成育段階において、mRNAを抽出し、cDNAライブラリーを構築した。

(2) 構築したライブラリーを基に、ランダムスクリーニングによる遺伝子解析を行った。

(3) 遺伝子解析を基に、分泌蛋白質であることを示す、特徴的な配列を持つクローンを選出した。さらに、実験感染させたイヌの血清に反応する蛋白質をコードする遺伝子を探した。

(4) 選出した遺伝子群のうち、組換えタンパク質を作製し、実験的に感染させたイヌの血清および健常イヌ血清を用いてこれらの組換え抗原を評価した。

4. 研究成果

(1) エキノコックスの幼虫、幼弱成虫および成虫 mRNA を基に cDNA ライブラリーを構築し、分離された多数の遺伝子（およそ 1200 クローン）の塩基配列を調べているうちに、寄生虫の細胞内プロテアーゼ（カテプシン様タンパク質）やヒートショックプロテイン（hsp）に類似したタンパク質、膜表面に発現する事が示唆される、ある種のタンパク質がそれぞれ見いだされた。これらのタンパク質が、感染したイヌの血清中の抗体価を上昇させているかを調べると、5頭感染させたイヌ全ての血清中にそれぞれのタンパク質に対する特異抗体の存在が確認された。このことから、イヌの血清診断法を開発するに当たり、初年度に見いだしたそれぞれのタンパク質は有望な候補になると考えられた。

(2) さらに、本研究において、マウスに免疫すると、エキノコックスの虫卵感染におけ

る感染率を有意に抑制させるタンパク質を見いだした。図1に示すように、このタンパク質 EMY162 を免役したマウスは、コントロール群に対して病巣の数がおよそ 1/5 に減少していた。これは、EMY162 抗原が将来的にヒトのエキノコックスのワクチンとして使用できる可能性を意味する。この新しい抗原・遺伝子の発見に関する成果は国際誌に発表された。

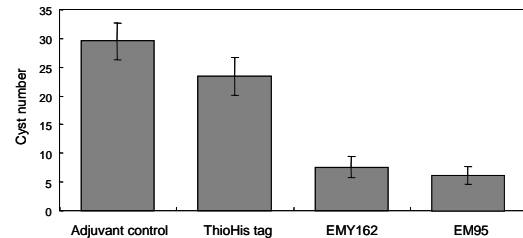


図1. EMY162 抗原のマウスに対する多包条虫虫卵感染抑制効果

(3) ヒートショックプロテイン様タンパク質 (putative hsp20) をコードする遺伝子を基に組み換え抗原を作製した。感染イヌ血清9件および健常犬血清10件を用いたウェスタンブロットにより、その血清学的な評価を行った。図2Aに示すように、組換え抗原 putative hsp20 は感染イヌ血清9件中8件に高度に反応した。一方、健常イヌ血清には有意は反応を示すことは無かった。なお hsp はいくつかの感染症原因生物において強い免疫原性を示す事が知られ、ワクチン抗原候補として見いだされている。本抗原は全ての成育段階に発現していることから診断抗原のみならず、終宿主に対するワクチン効果を発現する可能性も期待される。

同時に、本組換え抗原に対して感染イヌ血清における抗体価がどのくらいの期間保持されているかを調べた。この実験は以下のような問題意識を基に行われている。

①エキノコックスに感染したイヌは生理的あるいは免疫的な生体反応により数ヶ月で本寄生虫の成虫を自然に排出する 경우가多く認められる。②この場合、現在主に用いられている、糞便内抗原検査を用いれば、確実に感染していないという判定が下されてしまう。③イヌの飼い主は、過去に感染があったかもしれないイヌと濃厚な接触を繰り返していた可能性があるかと判明した場合、早期に診断を受けなければならないという情報を受け取ることが出来る。

図2Bは、実験的に2頭のイヌをエキノコックスに感染させ、感染成立後40日目に薬剤の投与により本寄生虫を排出させ、自然排出を再現したイヌの血清を経時的に採取し、組換え抗原の血清学的評価を行ったものである。図2Bに示すとおり、組換え putative

hsp20 に対する感染イヌの血清中の抗体価は寄生虫排出後もおよそ2ヶ月間程度保持されていることが明らかになった。血清診断法により、過去の感染の履歴を追跡・感染の判定が出来ると言う現在の糞便を用いた診断法にはない、血清を用いる診断特有の利点が示唆された研究成果と言える。現在、感度の増強などにより、より長い期間抗体価が検出できる方法の改良を行っている段階である。これらの成果は現在、国際誌に投稿中である。

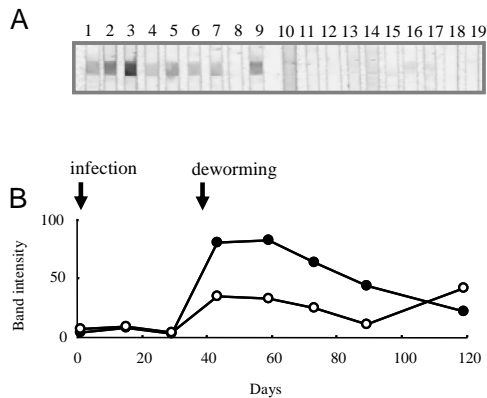


図2 組換え putative hsp20 の血清学的評価
(A)エキノコックス感染イヌ血清 (レーン 1~9) および健常イヌ血清 (レーン 10~19) を用いたウェスタンブロット
(B) 駆虫後の本組換え抗原に対する抗体価の経時変化：感染成立後40日目に薬剤投与による駆虫を行った場合のイヌから経時的に血清を採取し、ウェスタンブロット法により抗体価を評価した。

(4) 二年間の研究期間中、クローン化した遺伝子の発現産物をエキノコックス幼虫、幼弱成虫および成虫の細胞破碎液中に確認する機会があった。それぞれの細胞破碎液を SDS-PAGE を用いたゲル電気泳動に供し、ウェスタンブロット法により、遺伝子産物の発現を確認していたところ、偶然、幼虫細胞破碎液のウェスタンブロット膜上に感染イヌの血清に反応している領域を見出した。この領域は明確なバンドを示さず、膜上の分子量約 80kDa から膜の上端に至る部分にスメアーなバンド領域として検出された。通常、SDS-PAGE ゲル電気泳動上において単純タンパク質を分離した場合に、このような分離パターンを示すことは無く、この成分は泳動を妨害する物質が結合している成分であることが推察された。代表的な翻訳後修飾として糖鎖修飾やリン酸化が考えられることから、それぞれの修飾を検出する試薬 (PRO-Q® 染色キット) を用いて染色した結果、このスメア

ーバンド領域が糖鎖を含むタンパク質であることが強く示唆された。さらに、幼虫細胞破碎液の SDS-PAGE ゲルから、この領域を切り出し、分離された糖タンパク成分の抽出を行った。この抽出成分を感染イヌおよび健常イヌ血清を用いた酵素免疫測定法 (ELISA) に供すると感染イヌ血清に特異的に反応した。一方、健常イヌ血清には有意な反応は認められず、血清診断に用いることが出来る、新しい抗原物質として利用できる可能性が示唆された (図 3)。

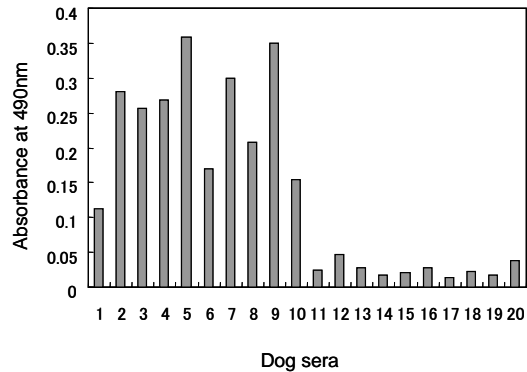


図3 多包虫幼虫由来糖タンパク成分の血清学的評価 エキノコックス感染イヌ (1~10) および健常イヌ血清 (11~20) を用いて幼虫由来糖タンパク成分の ELISA 法による評価を行った。糖タンパク質成分は切り出した SDS-PAGE 電気泳動ゲルをトリスグリシン緩衝液と共に透析チューブに挿入し、同様の緩衝液中において、100V で 8 時間泳動する事により抽出した。

現在、成分組成やこの成分の大量抽出法を検討している段階であるが、前述した EMY162、putative hsp20 に加えてこの成分を見出したことで、それぞれの組み合わせなどを考慮し、今後、感度、特異性ともに優れたエキノコックス感染イヌに対する血清診断法を構築していくことが可能となったと考えられる。また、将来的にこれら本研究期間中に見出されたいくつかの成分を用いて終宿主ワクチンの開発を同時に進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

① Hirokazu Kouguchi, Jun Matsumoto, Yoshinobu Katoh, Yuzaburo Oku, Tomohiro Suzuki and Kinpei Yagi

The vaccination potential of EMY162 antigen

against *Echinococcus multilocularis* infection, *Biochem Biophys Res Commun*, **363**, 915-920 (2007) 査読有

② Yoshinobu Katoh, Hirokazu Kouguchi, Jun Matsumoto, Akiko Goto, Tomohiro Suzuki, Yuzaburo Oku and Kinpei Yagi

Characterization of emY162 encoding an immunogenic protein cloned from an adult worm-specific cDNA library of *Echinococcus multilocularis*, *Biochim Biophys Acta*, **1780**, 1-6 (2008) 査読有

③ 孝口裕一 山野公明 加藤芳伸 鈴木智宏 八木欣平, 二次元電気泳動法を利用した多包虫血症血清診断の試み, 北海道立衛生研究所報, **58**, 87-90 (2008) 査読有

④ Suzuki T, Yoneyama T, Miyata K, Mikami A, Chikai T, Inui K, Kouguchi H, Niwa K, Watanabe T, Miyazaki S, Ohyama T,

Molecular characterization of the protease from *Clostridium botulinum* serotype C responsible for nicking in botulinum neurotoxin complex, *Biochem Biophys Res Commun*, **379**, 309-313 (2009) 査読有

⑤ Miyata K, Yoneyama T, Suzuki T, Kouguchi H, Inui K, Niwa K, Watanabe T, Ohyama T

Expression and stability of the nontoxic component of the botulinum toxin complex, *Biochem Biophys Res Commun*, **384**, 126-130 (2009) 査読有

[学会発表] (計 3 件)

① 孝口裕一 松本淳 加藤芳伸 奥祐三郎 鈴木智宏 八木欣平, 組換えEMY162 の中間宿主における多包条虫感染防御効果, 日本獣医学会, 2008年3月29日, 神奈川県相模原市

② Katoh Y, Kouguchi H, Matsumoto J, Suzuki T, Yagi K, EMY162 protein as a vaccine candidate to reduce level of alveolar hydatid disease, World Conference of Magic Bullets (EHRlich II) congress of hydatidology, Oct 3, 2008 Nuremberg, Germany.

③ 党志勝 八木欣平 奥祐三郎 孝口裕一 梶野喜一 渡辺純一 中尾 亮 杉本千尋, 多包条虫etacestodeに対するワクチン開発に関する研究, 日本獣医学会, 2009年4月3日, 栃木県宇都宮市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

孝口 裕一 (KOUUCHI HIROKAZU)
北海道立衛生研究所・感染症センター
生物科学部・研究職員
研究者番号：50435567

(2) 研究協力者

八木 欣平 (YAGI KINPEI)
北海道立衛生研究所・感染症センター
生物科学部・主任研究員
研究者番号：70414323

加藤 芳伸 (KATOH YOSHINOBU)
北海道立衛生研究所・感染症センター
生物科学部・主任研究員
研究者番号：00414326

松本 淳 (MATSUMOTO JUN)
日本大学・生物資源学部 獣医学科・専任
講師
研究者番号：70296169