

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08811

研究課題名(和文) ナノ技術を応用した赤痢アメーバ症迅速診断法の確立と評価

研究課題名(英文) Establishment and evaluation of a rapid diagnosis using nanotechnology for amebiasis

研究代表者

橘 裕司 (TACHIBANA, Hiroshi)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：10147168

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：アメーバ症の迅速な血清診断法を確立するため、赤痢アメーバに特異的な表面タンパク質の組換え断片(C-IgI)を抗原とし、蛍光シリカナノ粒子を用いたイムノクロマトキットを開発した。日本とタイにおいて、アメーバ症患者や他の感染症患者の血清を用いた評価を行い、実用レベルの感度と特異性を確認した。また、蛍光観察スコープによる判定が有効であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

赤痢アメーバ症は、わが国で発生する寄生虫症の中で最も問題になっている疾患の一つである。早期に治療を開始するために確実な診断が必要であり、特に鏡検によって虫体を検出することが難しい腸管外アメーバ症では、血清中の特異抗体の検出が有用である。国内で用いられていたキットが製造中止になっており、本研究で開発された新しい簡便な診断キットの活用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：To establish rapid serodiagnosis for amebiasis, we developed a fluorescence immunochromatography kit using fluorescent silica nanoparticles coated with a recombinant fragment of Entamoeba histolytica-specific surface protein (C-IgI). The kit was evaluated by using sera from patients with amebiasis and other infectious diseases in Japan and Thailand. The study confirmed that the assay has an acceptable level of sensitivity and specificity. In addition, the use of a fluorescence scope was effective for distinguishing between positive and negative results.

研究分野：寄生虫学

キーワード：アメーバ症 赤痢アメーバ 原虫感染症 血清診断 ナノ材料 組換えタンパク質

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

赤痢アメーバ症は、わが国で発生する寄生虫症の中で最も問題になっている疾患の一つである。五類感染症としての報告数は、1999年(4月以降)の276例から2015年は1095例まで増加している。HIVとの混合感染も多く、治療が遅れると致命的になる場合もある。従って、早期に治療を開始するためにも、確実な診断が求められている。特に、腸管外アメーバ症では鏡検によって虫体を検出することが容易ではないため、血清抗体の検出は診断上有用である。2017年4月時点では、輸入された間接蛍光抗体法キット(Amoeba-Spot IF)が唯一国内で認可された診断薬であり、多くの医療機関では外注によってこの血清抗体検査を行っている。しかし、結果を得るまでに数日を要し、迅速な対応が困難である。かつて、わが国では間接赤血球凝集反応のキットも製造販売されていたが、現在、国内でアメーバ症の血清診断キットは製造されていない。

研究代表者らは赤痢アメーバの表面抗原に関する研究を実施し、赤痢アメーバに特異的な150-kDaの表面レクチンサブユニット(Intermediate subunit of Gal/GalNAc lectin, IgI)を同定し、その性状を明らかにした。そして、IgIの組換えタンパク質断片のうち、特にC末端側の断片(C-IgI)が血清診断用抗原として有用であることをELISA系で証明し、疫学応用研究を実施した。各種組換え抗原の中で、C-IgIの患者血清との反応における特異性は、文献上で最も優れているものであった。また、動物実験で肝臓瘍形成を阻止できるC-IgI特異的なヒトモノクローナル抗体を作製しており、C-IgIがワクチン候補として有望であることも明らかにしている。最近、蛍光シリカナノ粒子にC-IgIを結合させることにより、蛍光イムノクロマト(FIC)法によって抗体を高感度に検出できる系の開発に成功しており、実用化に向けて更なる評価や検討が必要である。

## 2. 研究の目的

本研究ではIgIに着目し、赤痢アメーバ症の確定診断のために有用なFICキットを開発することを目的としている。その系は、特異的で感度が高く、かつ迅速に実施できることが重要である。研究期間内により多くの患者血清を用いて詳細な評価を行い、新規血清診断法の実用化をめざす。これまで国内で使用されていたAmoeba-Spot IFが製造中止になったために、それに代わる血清診断法確立の重要性はより高まっている。

## 3. 研究の方法

蛍光色素を内包したシリカナノ粒子 Quartz Dot (古河電気アドバンスエンジニアリング)表面に大腸菌で作製したC-IgIを結合させ、一方、メンブレン上にもC-IgIを線状に塗布したFIC法による検出キットを作製し、使用した。患者血清あるいはヒトモノクローナル抗体20 $\mu$ lと緩衝液60 $\mu$ lを凍結乾燥した蛍光シリカナノ粒子に加え、全量をイムノクロマトに使用した。15分後、30分後にDiaScan (大塚電子)(図1左)によって蛍光強度を測定し、判定した。血清は、過去に研究代表者のもとに検査依頼のあった赤痢アメーバ症やその他の寄生虫症患者の検体、東海大学医学部附属病院における臨床検査残余検体を使用した。また、タイのチュロンコン王記念病院の患者血清を用い、間接赤血球凝集反応(IHA)法における抗体価、C-IgIを抗原としたELISA法との反応性を比較した。また、蛍光スコープ QD Scope (古河電気アドバンスエンジニアリング)(図1右)を用い、3名の検査者がそれぞれ判定を行い、DiaScanによる判定と比較した。この他、緩衝液で洗った健常人の血球分画を使用した。本研究は、東海大学医学部臨床研究審査委員会とチュロンコン大学医学部の臨床研究審査委員会において、それぞれ17R-017と246/61として承認された。

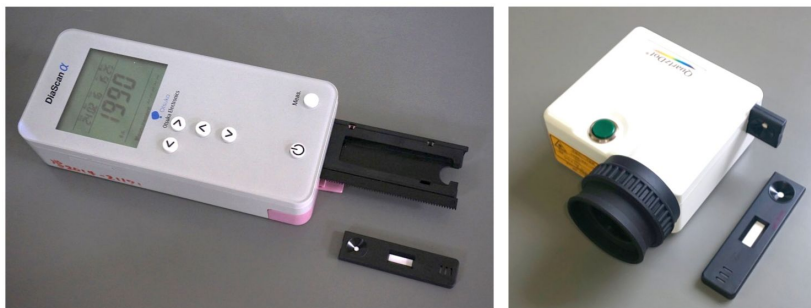


図1 .蛍光強度測定装置 DiaScan (左)と蛍光スコープ QD Scope(右)

## 4. 研究成果

### (1)FIC法によるアメーバ症の血清診断法の評価

国内のアメーバ性大腸炎患者(35検体)、アメーバ性肝臓瘍患者(28検体)、無症候性赤痢アメーバ嚢子排出者(17検体)の血清を使用し、健常人血清(70検体)を陰性対照としてROC曲線を描き、cut-off値(2,181)を設定した。その結果、無症候性感染者も含めてすべての赤痢アメーバ症患者血清が陽性と判定された(図2)。さらに、ジアルジア症(6検体)、ヒト

プラストシスチス感染症(7検体)、マラリア(29検体)、トキソプラズマ症(7検体)、リーシュマニア症(9検体)、シャーガス病(7検体)などの原虫疾患と、クロストリジウム・ディフィシル感染症(32検体)の合計97検体の患者血清を用いて特異性の評価を行った。その結果、マラリアの6検体とクロストリジウム・ディフィシル感染症の2検体を除き、陰性と判定された。陽性と判定された6検体は、間接蛍光抗体法による検査では陰性であったことから、いずれも偽陽性であると推定された。これらの結果から、本FIC法の感度は100%、特異性は95.2%と判定され、この抗体検出系は赤痢アメーバ症の血清診断に有用であると考えられた。

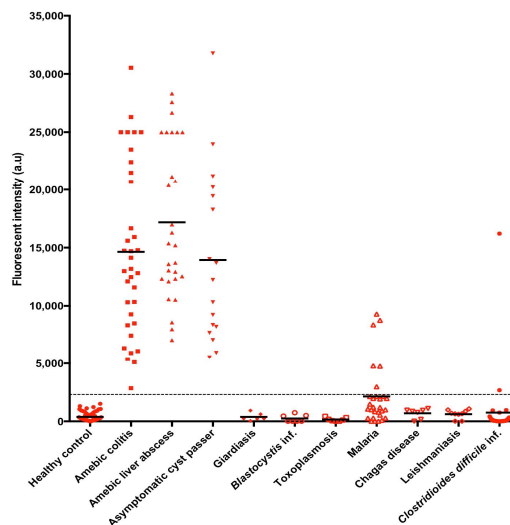


図2. 赤痢アメーバ症と他の感染症の患者血清のFIC法における反応性

### (2) タイのアメーバ症患者血清を用いた評価

チュラロンコン大学医学部の共同研究者とともに、タイの赤痢アメーバ症患者血清56検体を用いて検出系の評価を実施した。これらの血清はIHA法で抗赤痢アメーバ抗体陽性と判定されていたが、FIC法では52検体(93%)が陽性となった(図3)。従って、タイの患者血清においても、本FIC法が有用であると考えられた。国内のアメーバ症患者血清を含めたFIC法の感度は97.1%となった。蛍光強度とIHA抗体価には相関が認められ、陰性検体4例のうち3例は、IHA抗体価が陽性境界値(1:128)であった。また、同じ抗原を使用したELISA法のOD値とFIC法における測定値の相関係数は0.5846であり、有意な相関を示した。

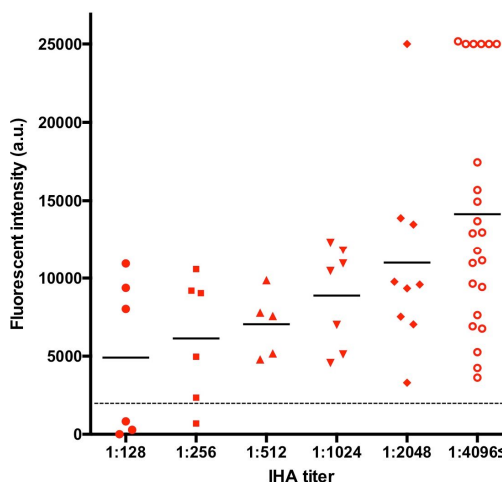


図3. タイの赤痢アメーバ症患者血清におけるFIC法とIHA法の反応性比較

### (3) 蛍光スコープによる判定の評価

DiaScanによる蛍光強度の測定ではなく、簡便な蛍光スコープを用いた観察法について検討した。FIC法で様々な蛍光強度を示した50検体について判定結果を比較したところ、2,181よりもわずかに低い値を示した2検体について、1検体では3名全員が、1検体では3名中2名が蛍光スコープでは陽性と判定した。その他の検体については、すべて判定結果が一致した。DisScanでは、それぞれのキットの条件に適したプログラムが必要であるが、スコープは汎用性に優れ、陽性検体について正確に判定できることを確認した。

### (4) キットの均質性評価

同一ロットにおけるFICキットの均質性評価を行った。陽性の患者血清を用いた評価の結果、反応開始後15分の測定値では平均2.3倍(1.7~4.0倍)の差を認めたが、30分の測定値では1.8倍(1.2~2.0倍)の差に減少した。また、陰性検体に抗C-Ig1ヒトモノクローナル抗体を添加した系による評価では、反応開始後15分の測定値では平均2.3倍(1.5~3.4倍)の差を認めたが、30分の測定値は1.6倍(1.0~2.0倍)の差であった。これらの結果から、同一ロットにおいてキット間で差があるものの、反応開始後30分の測定値を使用することで、その影響は小さくなると考えられた。キット間において差異の生じる原因が、蛍光シリカナノ粒子を含むチューブ側にあるのか、メンブレンを含むカセット側にあるのかについて検討したところ、カセット側に起因することが確認された。

### (5) FICにおける血球細胞の影響

分離した血清ではなく、全血を直接使用した測定が可能かどうかを検討するため、血球を添加した系による評価を行った。患者血清に等量の健常人血球を添加しても、このキットの緩衝液に含まれている界面活性剤の濃度では溶血は起きず、また、血球はメンブレン上をほとんど移動しなかった。血球の存在によって蛍光強度の測定値には有意な影響がないことが確認され

た。血漿に血球を加えた系での検討は行っていないが、採血後に血清分離を行うことなく、より迅速に診断できる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計20件（うち査読付論文 19件 / うち国際共著 15件 / うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Tachibana Hiroshi, Kakino Azumi, Kazama Makoto, Feng Meng, Asai Satomi, Umezawa Kazuo, Nozaki Tsukasa, Makiuchi Takashi, Kamada Takayuki, Watanabe Hideki, Horiki Noriyuki, Cheng Xunjia, Masuda Gohta	4. 巻 145
2. 論文標題 Development of a sensitive immunochromatographic kit using fluorescent silica nanoparticles for rapid serodiagnosis of amebiasis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Parasitology	6. 最初と最後の頁 1890 ~ 1895
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1017/S0031182018000690	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Pattanawong Urassaya, Putaporntip Chaturong, Kakino Azumi, Yoshida Naoko, Kobayashi Seiki, Yanmanee Surasuk, Jongwutiwes Somchai, Tachibana Hiroshi	4. 巻 15
2. 論文標題 Analysis of D-A locus of tRNA-linked short tandem repeats reveals transmission of Entamoeba histolytica and E. dispar among students in the Thai-Myanmar border region of northwest Thailand	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS Neglected Tropical Diseases	6. 最初と最後の頁 e0009188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pntd.0009188	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計21件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 橋 裕司
2. 発表標題 赤痢アメーバ症の診断 - 知っておきたい近縁種 -
3. 学会等名 第77回日本寄生虫学会東日本支部大会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 橋 裕司、垣野あずみ、風間 真、馮 萌、浅井さとみ、梅澤和夫、野崎 司、牧内貴志、堀木紀行、程 訓佳、増田剛太
2. 発表標題 赤痢アメーバ症迅速血清診断のための蛍光イムノクロマト法の開発と評価
3. 学会等名 第87回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 橋 裕司、Urassaya Pattanawong、垣野あずみ、Napaporn Kuansab、Chaturong Putaporntip、Somchai Jongwutiwes
2. 発表標題 赤痢アメーバ症の迅速血清診断のための蛍光イムノクロマト法の評価
3. 学会等名 第60回日本熱帯医学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
タイ	チュラロンコン大学			
中国	復旦大学			