

令和元年9月17日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15681

研究課題名(和文) 活動期トキソプラズマ感染症における新規血清学的診断法の開発

研究課題名(英文) Development of novel serodiagnostic method for the detection of active toxoplasmosis

研究代表者

保科 斉生 (Hoshina, Tokio)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：60648830

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：人畜共通感染症の原因となるトキソプラズマ原虫の疫学調査と、血清学的診断法の開発をテーマに研究を実施した。疫学調査の一環として、人々がジビエとして喫食する機会が増えているエゾジカのトキソプラズマ抗体保有率を明らかにした。またトキソプラズマ感染が重篤な合併症となりうる、HIV感染者におけるトキソプラズマ抗体保有率と、また関連する因子を、国内で初めて明らかにした。さらに国内で実施が不能となっていた血清学的検査であるSabin-Feldman dye testの再開に成功し、トランスジェニックトキソプラズマを用いた改良dye testの開発、実験動物と患者の血清を用いた検査精度の評価を実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ジビエとして喫食されるエゾジカのトキソプラズマ抗体保有率を明らかにし、適切な処理方法や調理方法が必要であることを発表した。HIV感染者における疫学調査で得られた情報は、今後のHIV感染者におけるトキソプラズマ症の有病率として診療上役立つと見込まれ、また明らかになったリスク因子は患者の生活指導に有用であると予想される。改良dye testは、活性のある病原体を検査試薬として用いるため、一般的な検査方法としての普及には至っていない。ただし、HIV感染者の血清を用いた改良dye testの検査結果は、旧来法の結果と高い一致率を認め、さらなる改良により臨床検査として実装可能であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Toxoplasma gondii is a zoonotic protozoan that affects both animals and humans worldwide. We revealed the toxoplasma seroprevalence of wild Yezo-sika deer (*Cervus nippon yesoensis*), which is served in restaurants as game meat across the country and found a high seropositivity rate compared to the previous studies. Next, we unveiled the seroprevalence of toxoplasma among HIV-positive Japanese patients and associated factors as well. Contrary to other countries, infected ratio was low and association between classical factors (consuming under-cooked meat and owning cats) were not observed in our research. Development of novel serodiagnostic method using transgenic-tachyzoites was successful and feasibility studies were conducted in the research.

研究分野：寄生虫学

キーワード：トキソプラズマ 血清学的診断法 エゾジカ HIV感染

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

トキソプラズマ(*Toxoplasma gondii*)感染症は人畜共通の原虫感染症であり、全世界に数十億人の感染者が存在すると推計される。終宿主である猫が排出するオーシストにより汚染された、食肉用家畜や飲料水の存在する地域では、抗体保有率も比較的高く、フランス、イタリア、オーストリアでは約 80%の国民が抗トキソプラズマ抗体を保有すると報告されている。本邦における、妊婦を対象とした疫学調査では、約 10%の妊婦が抗体陽性であったが(Sakikawa *et.al.*, *Clinical and Vaccine Immunology*(2011))、妊婦以外の集団を対象とした抗体保有率はほとんど知られていない。一方、トキソプラズマ症の発症リスクとなる、HIV 感染者、免疫抑制薬使用者は国内で増加の一途を辿っている。また、国内の妊婦健診でトキソプラズマスクリーニングを受検する妊婦の割合は、約 50%にとどまっていることが明らかになっており、先天性トキソプラズマ症の症例数は過小評価されている可能性がある。近年、国内の食文化は多様化し、感染の原因となる豚、鳥、羊、山羊、二枚貝などの食材を摂取する機会が増加しており、今後、感染者の増加が懸念される。

国内で利用可能なトキソプラズマ検査法は、抗トキソプラズマ IgG、IgM 抗体測定(ELISA 法)のみである。しかしながら、IgM の上昇期間は一定ではなく(ときに年単位の上昇となる)、また HIV 感染者や免疫不全者でみられる再燃病態では IgM そのものの上昇がないため診断に不向きである。血清学的検査方法の一つである Sabin-Feldman dye test(以下ダイテスト)は、トキソプラズマ感染による総合的な抗体の上昇を測定する。過去の報告では感度・特異度が非常に高く、血清学的診断法のゴールドスタンダードとされている。初感染時の抗体のダイナミクスを明らかにすることで、感染時期の判別を含む、より精度の高い診断が可能になると見込まれる。

しかし、ダイテストは試料として新鮮活性虫体、アクセサリーファクター(約 10%の未感染健常人が有す補体系成分を含む血清または血漿)が必要であり、さらに評価スキルの習熟を要するため、現在国内で実施可能な施設は東京慈恵会医科大学のみである。より簡便な方法で、旧来法と同等の検査精度を再現することで、トキソプラズマ症の診断に寄与することが可能になる。

2. 研究の目的

本邦で不足している、トキソプラズマ感染に関する疫学情報を明らかにする。具体的には抗体保有率の調査であるが、過去に採用された検査方法の感度・特異度は不十分であり、正確ではない結果であった可能性がある。本研究では検査精度の高いダイテストにより抗体測定を行うため、これまでの報告と比較して、よりリアルな感染率に近い抗体保有率が明らかになる。また臨床試験では抗体保有率を明らかにすると同時に、トキソプラズマ感染と関連する因子(生活習慣や生活歴)に関しての情報を収集し、解析を行う。

ダイテストの改良により、高い再現性をもつ定量的な測定と、評価方法の簡便化を試みる。開発した改良ダイテストで動物感染実験、臨床検体を対象に測定を行い、臨床応用に向けた検査精度を明らかにする。同時に多数の検体評価を可能にするためには、十分量のアクセサリーファクターが必要であり、検査の開発と並行して血液検体の確保とスクリーニングによる選別が必要である。

3. 研究の方法

①多検体評価を目的としたアクセサリーファクターストックの確立

ダイテストの実施に必要なアクセサリーファクターを確保すべく、成人ボランティアを対象にその保有率の調査を実施した。提供された血液を用いて、タキゾイト(急速分裂虫体)傷害能を測定し、基準を満たしたサンプルをアクセサリーファクター候補とした。さらに、陽性対照を用いてダイテストを行い、既知の判定値が得られたサンプルをアクセサリーファクターとした。

上記結果(保有率)をもとに日本赤十字社が公募する、「献血血液等の研究開発等への使用に関する

指針」に基づく献血血液等の有効利用についての事業に応募し、新鮮凍結血漿の提供を受けた(研究課題番号 28J0044)。提供された検体のスクリーニングと適正検査を行い、条件に適した検体を選抜した。またアクセサリーファクターは補体活性と関係するため検体の CH50 を測定し、適合検体との関連について評価した。

②野生動物検体におけるトキソプラズマ抗体陽性率調査

東北海道で狩猟された野生エゾジカ 80 頭分の血液検体を用いて、抗体保有率の調査を実施した。トキソプラズマの抗体測定には Sabin-Feldman dye test を用い、各個体の抗体価を測定した。また、抗体陽性に相関する因子(年齢、性別、狩猟シーズン、狩猟地域など)についての検討を行った。

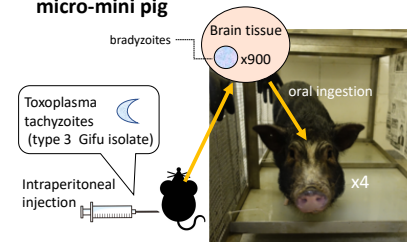
③国内 HIV 感染患者におけるトキソプラズマ抗体保有率と関連因子の検討

本邦の HIV 感染者を対象とした、抗トキソプラズマ抗体保有率を明らかにした研究は少なく、詳細は不明である。東京慈恵会医科大学附属病院にかかりつけの HIV 陽性者 400 人を対象に、トキソプラズマ抗体価の測定とアンケート調査を行い、抗体陽性率と感染に関連する因子についての検討を行った(単施設クロスセクショナル研究)。抗体価の測定には ELISA 法を用い、陽性者に関してはダイテストによる確認検査を実施した(倫理委員会承認番号 27-023(7907))。

④マイクロミニピッグ感染実験:改良ダイテストのダイナミクス評価

感染マウスの脳組織から分離したブラディゾイト(緩徐分裂虫体)を、マイクロミニピッグ 4 頭に経口投与し、各個体における抗体価の推移を経時的に測定した。先天性トキソプラズマ症の原因となる、妊婦の初感染における検を想定し、感染から 182 日後までの抗体価測定を実施した。

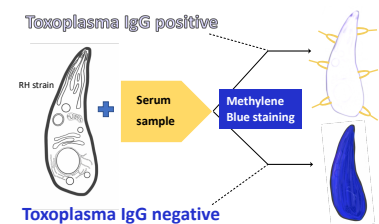
Experimental infection model with micro-mini pig



⑤改良ダイテストのフィージビリティ・スタディ(野生動物検体、臨床検体の評価)

旧来のダイテストプロトコルをもとに、検査の改良を実施した。具体的にはダイテストで使用するタキゾイトをトランスジェニックタキゾイト(GFPを発現)に置換することで、これまで染色虫体を目視で計数していた作業を、画像データと画像処理ソフトで自動化することに成功した。我々は本検査を Toxoplasma Killing Observation test (TOKIO テスト)と名付け、上記研究テーマで取り扱った、野生エゾジカ血清、HIV 陽性者血清を用いたフィージビリティスタディを実施した。また、検査で評価したタキゾイトを蛍光抗体法で染色し、TOKIO テストで生じるタキゾイト傷害についての観察を行った。

Phenomenon of SFDT

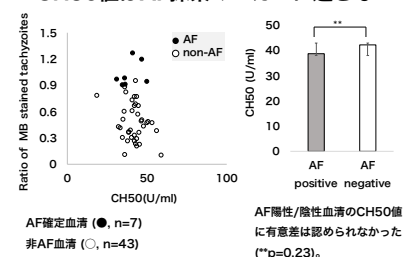


4. 研究成果

①多検体評価を目的としたアクセサリーファクターストックの確立

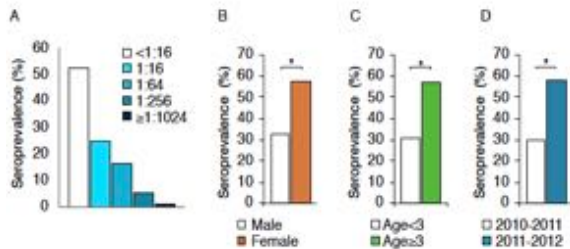
50 人の健康成人ボランティアが参加し血液検体を得た。全体の 66% (33 人)が女性であり、30 歳代の参加者が最も多かった。参加者 4 例で抗トキソプラズマ IgG 抗体が認められ、トキソプラズマの既感染者であることが判明した。またそのうちの一人は IgM の上昇も認め、比較的最近の感染であることが示唆された。一方、アクセサリーファクタ

CH50値はAF探索マーカーに適さない



一候補は計 7 人で確認され、すべての検体がアクセサリーファクターとして使用可能であった。なお、年齢、性別に有意差はなく、CH50 との関連性は見られなかった。日本赤十字社から提供を受けた、新鮮凍結血漿 25 サンプルについては、そのうち 6 例がアクセサリーファクターとして使用可能であることが判明し、約 3000ml 程度の血漿の確保に成功した。

②野生動物検体におけるトキソプラズマ抗体陽性率調査

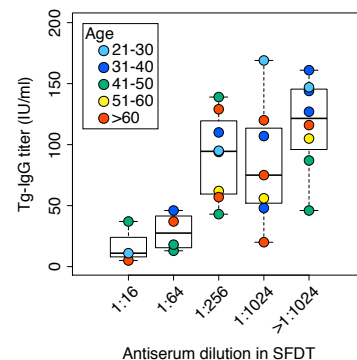


東北海道を中心とした地域で狩猟された野生エゾジカの血清を用い、ダイテストによる抗体保有率の調査を実施した。検体は 2 期のハンティングシーズンに収集された 80 検体を使用した (2010-11, 2011-12)。抗体保有率は 47.5% であり、これまでの報告と比較して非常に高い結果であった。感染個体はメス、3 歳

以上の条件で優位に高く、狩猟期間による差もみられた。論文中には記載を省略したが、抗体が陽性であった一個体において、血清のトキソプラズマ LAMP が陽性となり、活動期の感染であったと考えられた。本研究では予想外に高い抗体保有率が確認され、鹿肉の適切な処理 (冷凍)、適切な調理が必要であることを確認した。

③国内 HIV 感染患者におけるトキソプラズマ抗体保有率と関連因子の検討

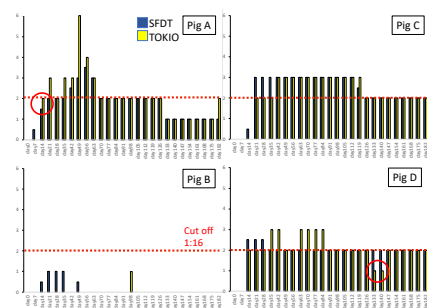
東京慈恵会医科大学に通院する HIV 陽性者 400 人を対象に、トキソプラズマ抗体保有率の調査、抗体保有と関連する因子についてアンケート調査を実施した。参加者 400 人中、399 例が血液検体を提供し、396 人がアンケート調査を提出した。血液検査を実施した参加者 399 人中 381 人 (95.5%) は男性であり、16 人 (4.0%) の外国人が試験に含まれた。ELISA 法で抗トキソプラズマ抗体が陽性となった参加者は 33 人 (8.8%) であり、国外の報告と比較すると、その頻度は



低いことが判明した。ELISA 法で陽性であった 33 例全例がダイテスト陽性であり、国内の HIV 感染者を評価する上で有効な検査方法であることが裏付けられた。リスク因子に関しては他の報告同様、年齢と感染率は正の相関関係にあったが、従来より感染症のリスクとされてきた、調理不十分な食肉の摂取、猫の飼育歴は統計学的に有意な差が観察されなかった。その原因として、国内の畜産産業における衛生管理が行き届いていること、飼い猫の飼育方法の変化 (生涯室内のみで飼育) などが考えられた。一方、過去に北海道居での住歴を有す症例群で有意に高い感染率が確認され、調理不十分な羊肉の摂取が原因の候補として考えられた。

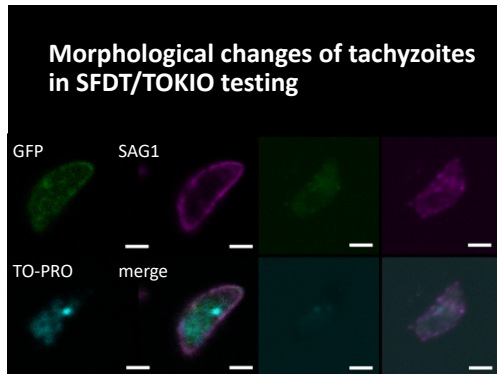
④マイクロミニピッグ感染実験: 改良ダイテストのダイナミクス評価

マウスを用いて国内で分離されたトキソプラズマ type3 (岐阜分離株) のブラディゾイトを含むシストを作成し、マイクロミニピッグ 4 頭に経口感染させた。感染後の抗体推移は 4 頭で異なり、1 頭では (B) 抗体価の上昇を認めず、感染が成立しなかった可能性がある。2 頭 (C, D) では感染後 14-21 日後より抗体価の上昇を



認め 182 日まで抗体価の低下を認めなかった。1 頭では感染 14 日後より抗体価の上昇を認め、約 3 ヶ月間にわたり高値を維持したが、133 日目より抗体価の低下を認め、陽性判定以下となった。ダイテストと TOKIO テストの検査判定結果は概ね一致したが(105/108 測定、97.2%)、各抗体価を比較した場合に 1 管差程度の誤差が散見された。結論として、TOKIO テストの感度・特異度は(ダイテストと比較して)、98.1%、100%であることが示された。

⑤改良ダイテストのフィージビリティ・スタディ(野生動物検体、臨床検体の評価)



マイクロミニピッグで TOKIO テストの方法を確立し、野生エゾジカ検体を用いたフィージビリティスタディを実施した。エゾジカ血清 80 検体の評価では、全検体で結果が一致し、ダイテストと同等の感度・特異度を確認した。また HIV 患者血清を用いた評価も解析中であり、下記の知見と合わせて、今後報告の予定である。

TOKIO テストで使用したタキゾイト(抗トキソプラズマ IgG 抗体陽性血清に感作)と、陰性対象のタキゾイトを固定し、それぞれ抗 SAG1 抗体(細胞膜に分布)、GFP(細胞膜、細胞質)、TO-PRO(核酸)を蛍光顕微鏡で観察した。抗トキソプラズマ IgG 抗体に感作したタキゾイトでは細胞膜の著しい傷害が観察され、細胞内に存在していた細胞質、核酸が失われていることが判明した。タキゾイトはアクチンフィラメントを主とする細胞骨格を有するため、細胞膜の傷害は形態の変化に寄与しない。ただし細胞質と核は流出するため、ダイテストの最終行程で行われるメチレンブルー染色が不染となる。ダイテスト、TOKIO テストは、タキゾイト細胞膜傷害性メカニズムをもつ抗タキゾイト抗体の測定が基本原理であることを証明した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① 保科斉生、青沼宏佳、堀誠治、嘉糠洋陸、健康者ボランティアを対象とした Sabin-Feldman Dye Test 用アクセサリファクターの保有率調査. *Clinical Parasitology* 2017, 28(1); 68-73
- ② Hoshina Tokio, Fukumoto Shinya, Aonuma Hiroka, Saiki Erisha, Hori Seiji, Kanuka Hirota, Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in wild sika deer in Japan. *Parasitology International* 2019, 71; 76-79
<https://doi.org/10.1016/j.parint.2019.03.016>

[学会発表] (計 7 件)

- ① 保科斉生、HIV 感染症患者における微生物検査の注意点 トキソプラズマ症
2019 年 第 30 回日本臨床微生物学会総会・学術集会(招待講演)
- ② 保科斉生ら、HIV 感染者における抗トキソプラズマ IgG 抗体検出の有用性について
2019 年 第 88 回日本寄生虫学会大会
- ③ Tokio Hoshina, Revisiting Sabin-Feldman dye test: Serodiagnosis for Toxoplasmosis
2018 ICOPA 14th, International Congress of Parasitology(招待講演)(国際学会)
- ④ 保科斉生ら、HIV 感染者におけるトキソプラズマ抗体保有率とリスク因子の検討
2018 年 第 92 回日本感染症学会学術講演会
- ⑤ 保科斉生ら、HIV 感染者におけるトキソプラズマ抗体保有率とリスク因子の検討
2018 年 第 92 回日本感染症学会学術講演会・第 66 回日本化学療法学会総会 合同学会
- ⑥ 保科斉生ら、国内 HIV 感染者における抗トキソプラズマ抗体保有率の検討

2017年 第87回日本寄生虫学会大会

- ⑦ 保科斉生ら、健康成人における Sabin-Feldman Dye Test 用アクセサリーファクターの保有率調査
2017年 第28回日本臨床寄生虫学会

〔図書〕 (計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

東京慈恵会医科大学熱帯医学講座ウェブサイト

http://www.jikei-tropmed.jp/research/theme_16.html

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
保科斉生 (HOSHINA Tokio)
東京慈恵会医科大学・感染症科・助教
研究者番号：60648830
- (2) 研究協力者
嘉糠洋陸 (KANUKA Hirotaka)
東京慈恵会医科大学・熱帯医学講座・教授
研究者番号：50342770
- (3) 研究協力者
青沼宏佳 (Aonuma Hiroka)
東京慈恵会医科大学・熱帯医学講座・助教
研究者番号：60451457
- (4) 研究協力者
齋木選射 (SAIKI Erisha)
東京慈恵会医科大学・実験動物研究施設・助教
研究者番号：70738971
- (5) 研究協力者
高島康弘 (TAKASHIMA Yasuhiro)
岐阜大学・応用生物科学部・准教授
研究者番号：20333552
- (6) 研究協力者
福本晋也 (FUKUMOTO Shinya)
帯広畜産大学・原虫病研究センター・准教授
研究者番号：50376422
- (7) 研究協力者
山本雅裕 (YAMAMOTO Masahiro)
大阪大学・微生物病研究所・教授
研究者番号：00444521