

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460516

研究課題名(和文) 蛍光ナノ粒子を用いた赤痢アメーバ症迅速診断法の開発

研究課題名(英文) Development of a rapid diagnostic test for amebiasis by using fluorescent nanoparticles

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：赤痢アメーバ症の迅速な血清診断を行うために、蛍光シリカナノ粒子を利用したイムノクロマトキットを開発した。赤痢アメーバの表面レクチン中間サブユニット(Igl)のC末端側断片を大腸菌で調製し、抗原に使用した。Iglに特異的なヒトモノクローナル抗体を用いた評価において、100 pgの抗体量まで検出可能であった。また、患者血清を用いた評価において、このイムノクロマトキットの高い感度と特異性が確認された。

研究成果の概要(英文)：Immunochromatographic assay kit using fluorescent silica nanoparticles was developed for rapid serodiagnosis of amebiasis. C-terminal fragment of intermediate subunit from *Entamoeba histolytica* surface lectin (Igl) was prepared in *Escherichia coli* and used as antigen. When the kit was evaluated by human monoclonal antibody specific to Igl, the lower detection limit was 100 pg. High sensitivity and high specificity of the kit were demonstrated by evaluation using serum samples from patients.

研究分野：寄生原虫学

キーワード：原虫感染症 赤痢アメーバ 診断 ナノ材料

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となっている疾患の一つであり、5類感染症としての報告数は年間1,000例を超えている。治療が遅れると致命的になる場合もあり、早期に治療を開始するためにも、確実に迅速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。また、糞便中に虫体が検出された場合でも、赤痢アメーバと形態的に鑑別できない非病原性アメーバも存在するため、特異抗体の検出は意義がある。現在わが国では、輸入された間接蛍光抗体法のキットが唯一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検査を実施している。しかし、結果を得るまでに時間を要し、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販売されていたが、現在、国内で赤痢アメーバ症の血清診断キットは製造されていない。

これまでに研究代表者らは、赤痢アメーバの表面レクチン中間サブユニット (Intermediate subunit of Gal/GalNAc lectin, Igl) を同定し、その性状を明らかにしてきた。そして、大腸菌で作製した Igl の組換えタンパク質のうち、特に C 末端側の断片 (C-Igl) が診断用抗原として適していることを ELISA 系で証明し、その系を利用した疫学研究を実施している。

2. 研究の目的

本研究では、赤痢アメーバ症の確定診断に有用な新規の抗体検出系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、かつ迅速で簡便に実施できることが重要である。そこで、研究代表者らが同定した赤痢アメーバの表面タンパク質である Igl に着目する。既に開発した ELISA による抗体検出系は特異性と感度に優れ、特に多数検体の検査に適しているため、疫学研究においては有用であった。しかし、わが国の医療機関において、個々の患者の診断に利用するには、より迅速で簡便なイムノクロマトの系が適している。また、従来のイムノクロマト法は、金コロイド粒子や着色ラテックス粒子の色を肉眼で検出するものである。本研究では、蛍光色素を内包したシリカナノ粒子を用いることで、より感度の優れた検出系の開発をめざしている。

3. 研究の方法

(1) 組換えタンパク質の調製

赤痢アメーバ HM-1:IMSS 株の C-Igl を大腸菌で作製した。既に研究代表者らが確立した方法 (Tachibana *et al.*, J. Clin. Microbiol., 2004) に基づいて、精製と refolding を行った。

(2) 蛍光イムノクロマトキットの作製

蛍光シリカナノ粒子 Quartz Dot (古河電工) の表面に C-Igl を結合させた。緩衝液とともにチューブに分注し、凍結乾燥した。イムノクロマト用メンブレン上にも C-Igl を線状に塗布した。乾燥後に細断し、イムノクロマト用にハウジングした。この過程は特殊な装置を必要とするため、外注によって行った。

(3) 蛍光イムノクロマト法の実施手順

蛍光シリカナノ粒子を含むチューブに検体と緩衝液を合わせて 80 μ l を加え、その全量をイムノクロマトの反応に用いた。そして、15 分ごとに蛍光強度を測定した。

(4) 蛍光強度の測定

専用プログラムされた小型蛍光リーダー DiaScan (大塚電子) を用い、機器に表示される測定値を記録した。また、連続的な測定値から得られる蛍光強度の波形データを取得し、解析した。

(5) 評価用ヒトモノクローナル抗体

Igl に特異的なヒトモノクローナル抗体 XEh1-H2 (Tachibana *et al.*, Infect. Immun., 2009) を精製後に使用した。対照には健康人の血清より精製した免疫グロブリンを使用した。

(6) 患者血清

赤痢アメーバ症の患者血清、その他の各種原虫感染症の患者血清、感染症が明らかになっていない健常者の血清を使用した。いずれの検体も匿名化されたものを使用した。

4. 研究成果

(1) 蛍光イムノクロマト法による抗 Igl 抗体検出系の構築

蛍光イムノクロマトによる抗体検出系の原理を図 1 に示す。まず、C-Igl を認識する抗体が蛍光シリカナノ粒子に結合する。そして、抗体が結合した蛍光シリカナノ粒子は、メンブレン上を移動する際に C-Igl によって捕捉される。

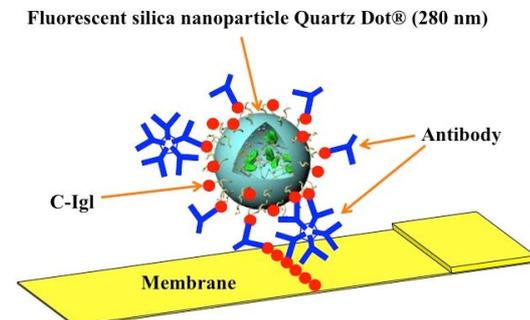


図 1. 蛍光イムノクロマト法の原理

蛍光シリカナノ粒子表面の抗原量とメン

ブレン上の捕捉抗原量とのバランスについて、XEhI-H2 を使用して検討し、至適な条件を決定した。

(2) 蛍光イムノクロマト法による検出限界の検討

作製されたキットについて、様々な濃度のXEhI-H2 を用い、蛍光強度を15分ごとに測定した(図2)。100 ng以上の抗体濃度では、反応開始後15分で最大値に達した。100 pgという低濃度でも経時的な測定値の上昇が観察され、検出が可能であった。

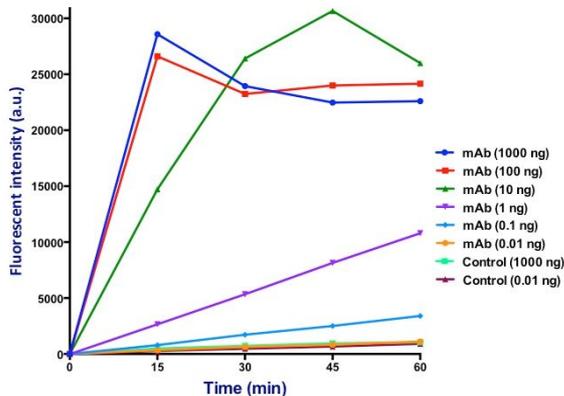


図2. 様々な濃度の抗IgI抗体による蛍光強度の経時変化

また、反応開始後30分においてスキャンした蛍光の波形を図3に示す。100 ngでは測定限界を超えており、100 pgにおいても僅かにピークが確認できた。一方、対照群では、1 µgの抗体でも波形のピークは認められなかった。

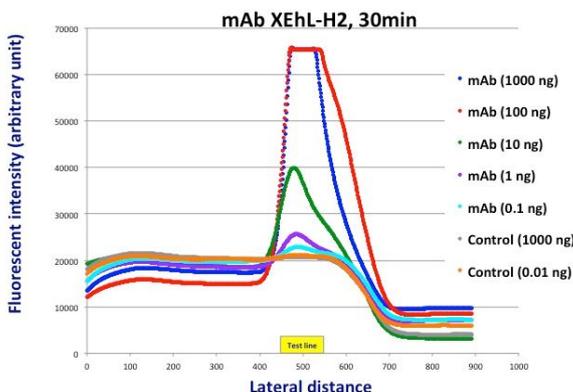


図3. 様々な抗体濃度における蛍光の波形パターン

(3) 適切な検体量と反応時間の検討

蛍光イムノクロマト法に使用するのに適切な検体(血清)量と反応時間の検討を行った。間接蛍光抗体法(IFA)における抗赤痢アメーバ抗体価が1024倍、256倍、64倍の各陽性血清と陰性血清を使用した。それぞれの5 µl、10 µl、20 µl、40 µlを緩衝液と合わせて80 µlとし、使用した。

血清量が5 µlの場合には、抗体価の高い検体では高い蛍光強度が観察されたものの、抗体価64倍の検体では、陰性検体と明瞭な差が認められなかった。この検討結果から、血清を20 µl使用した場合は30分間、あるいは40 µl使用した場合は15分間の反応後に測定し、判定するのが適切であると考えられた。

(4) 病態の異なる患者血清を用いた評価

アメーバ性大腸炎やアメーバ性肝膿瘍などの患者、更には無症候性嚢子排出者など、異なる病態を示す感染者の血清を用いて評価を行い、高い感度が確認された。無症候性嚢子排出者の血清においても、明瞭なピークが観察された。

(5) 他の原虫感染症の患者血清を用いた評価

ジアルジア症、ヒトプラストシスチス症、トキソプラズマ症、マラリア、リーシュマニア症、シャーガス病などの他の原虫感染症の患者血清を用い、交差反応の有無を調べた結果、赤痢アメーバ症診断用の蛍光イムノクロマト法が高い特異性を示すことを確認できた。

(6) 今後の展望

本研究課題において、赤痢アメーバ症の迅速で簡便な血清診断法を開発できた。今後、多数の患者血清を用いた評価を実施する予定である。また、陰性対照バンドの設定やより簡便な蛍光強度判定機器の導入により、更に実用化に近づけたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計15件)

Makoto Kazama, Sanae Ogiwara, Takashi Makiuchi, Kazuhiro Yoshida, Kumiko Nakada-Tsukui, Tomoyoshi Nozaki, Hiroshi Tachibana, Behavior of DNA-lacking mitochondria in *Entamoeba histolytica* revealed by organelle transplant, Sci. Rep., 査読有, 7:44273, 2017

DOI:10.1038/srep44273

Josef Tuda, Meng Feng, Mihoko Imada, Seiki Kobayashi, Xunjia Cheng, Hiroshi Tachibana, Identification of *Entamoeba polecki* with unique 18S rRNA gene sequences from Celebes crested macaques and pigs in Tangkoko Nature Reserve, North Sulawesi, Indonesia, J. Eukaryot. Microbiol., 査読有, 63: 572-577, 2016

DOI:10.1111/jeu.12304

横田恭子, 橘裕司 他(9人中8番目), IUD使用者で認めた歯肉アメーバと放線菌の子宮内感染から生じた腹腔内膿瘍の

1 例, Clin. Parasitol., 査読無, 27:93-95, 2016
Xiangyang Min, Meng Feng, Yue Guan, Suqin Man, Yongfeng Fu, Xunjia Cheng, Hiroshi Tachibana, Evaluation of the C-terminal fragment of *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin intermediate subunit as a vaccine candidate against amebic liver abscess, PLoS Negl. Trop. Dis., 査読有, 10:e0004419, 2016
DOI:10.1371/journal.pntd.0004419
Hiroshi Tachibana, Tetsuo Yanagi, Meng Feng, K. B. Anura T. Bandara, Seiki Kobayashi, Xunjia Cheng, Kenji Hirayama, R. P. V. Jayanthe Rajapakse, Isolation and molecular characterization of *Entamoeba nuttalli* strains showing novel isoenzyme patterns from wild toque macaques in Sri Lanka, J. Eukaryot. Microbiol., 査読有, 63: 171-180, 2016
DOI: 10.1111/jeu.12265
Kentaro Kato, Kazuhide Yahata, Bhim G. Dhoubhadel, Yoshito Fujii, Hiroshi Tachibana, Novel hemagglutinating, hemolytic and cytotoxic activities of the intermediate subunit of *Entamoeba histolytica* lectin, Sci. Rep., 査読有, 5:13901, 2015
DOI:10.1038/srep13901

〔学会発表〕(計 13 件)

加藤健太郎, 牧内貴志, 橘 裕司, *Entamoeba histolytica* と *Entamoeba dispar* の IgI レクチンの活性比較研究, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年 12 月 1 日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
吉田和弘, 牧内貴志, 風間 真, 福西菜穂子, 橘 裕司, 赤痢アメーバにおけるペルオキシレドキシンの局在と機能, 第 49 回日本原生生物学会大会, 2016 年 10 月 9 日, 岡山大学津島キャンパス(岡山県・岡山市)
加藤健太郎, 橘 裕司, *Entamoeba histolytica* と *Entamoeba dispar* レクチンの活性比較研究, 第 35 回日本糖質学会年会, 2016 年 9 月 3 日, 高知市文化プラザかるぼーと(高知県・高知市)
橘 裕司 他, 蛍光シリカナノ粒子を用いたイムノクロマト法による赤痢アメーバ症迅速血清診断法の開発, 第 85 回日本寄生虫学会大会, 2016 年 3 月 20 日, 宮崎市民プラザ(宮崎県・宮崎市)

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究協力者

程 訓佳 (CHENG, Xunjia)
東海大学・医学部・客員教授