

日本財団補助金による

1998年度日中医学協力事業報告書


— 中国人研究者・医療技術者招聘助成 —

財団法人 日 中 医 学 協 会

理 事 長 中 島 章 殿

1999年 3月 23日

研究室で撮影した本人のスナップ写真、及び発表論文等のコピーを添付

1. 招 へ い 責 任 者 仙道富士郎 
- 所属機関 山形大学医学部 職名 教授
- 所在地 〒990-9585 山形市飯田西 2-2-2 電話 023-628-5265
- 招へい研究者氏名 錢 元恕
- 所属機関 重慶医科大学附属第一病院伝染病寄生虫病研究所 職名 教授
- 研 究 テ ー マ 多包虫に対する単クローン抗体の樹立

2. 日 本 滞 在 日 程

1998年7月1日～9月30日

7月1日：山形大学医学部免疫学・寄生虫学教室に於いて研修開始

～7月3日：オリエンテーション

7月4日：マウスへの3回目の免疫

7月7日：細胞融合操作実施

8月20日：ハイブリドーマ樹立/細胞凍結・保存

8月23日～：産生抗体の特異性等について検討開始

9月30日：研修終了

3. 研 究 報 告

別紙書式を参考に、報告本文4000字以上で報告して下さい（枚数自由・ワープロ使用）

タイトル・要旨等は日本語で、KEY WORDS以下は日本語或いは英語で記入して下さい。

研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。

論文発表に当っては、日本財団補助金による旨を明記して下さい。

研究テーマ：多包虫に対する単クローン抗体の樹立

来日研究者氏名：錢 元恕

中国での所属・役職：重慶医科大学附属第一病院伝染病寄生虫病研究所・教授

招聘者氏名・所属・役職：仙道富士郎・山形大学医学部・教授

【要旨】

多包虫*Echinococcus multilocularis*の原頭節protoscolex抗原を用いて、他種寄生虫抗原と交叉反応のない単クローン抗体を作製し、確度の高い免疫学的診断法を確立することを目的として本研究を行なった。多包虫protoscolex粗抗原を作製し、BALB/cマウスに免疫後、脾細胞とミエローマ細胞を融合し、単クローン抗体産生ハイブリドーマを樹立した。多包虫に対する単クローン抗体7株を作製し、認識抗原の特異性について検討した。その結果、4株は、多包虫抗原とのみ高い反応性を呈し、単包虫抗原、その他の7種蠕虫抗原およびBALB/cマウス腎抽出抗原とは反応が認められなかった。免疫組織学的検討から、単クローン抗体は1) laminated layerとtegument of the germinal layerとのみ反応する単クローン抗体、2) laminated layer, tegument of the germinal layerおよびyoung protoscolexと反応する単クローン抗体、3) germinal layer, brood capsuleおよびprotoscolexと反応する単クローン抗体の3群に分類された。各群の単クローン抗体ともに虫体の他に虫体周囲の結合織とも反応したが、その他の虫体周囲正常組織とは反応が認められなかった。したがって、この虫体周囲結合織の反応は、虫体外に分泌された虫体抗原が結合織に沈着し、この沈着抗原と単クローン抗体が反応したものと推察された。今回得られた単クローン抗体を用いて認識抗原を精製することにより、他種寄生虫抗原と交叉反応のない診断用法を樹立する可能性が期待される。

<KEY WORDS> 多包虫、免疫学的診断法、単クローン抗体、protoscolex

研究報告

【目的】

中国を含む開発途上国においては、寄生虫症は未だ重要な疾患であり、診断が遅れ重篤な病状に陥るケースが少なくない。このような地域における早期治療には、簡便迅速で、確度の高い早期診断が重要なポイントになる。中国における重要な寄生虫症としては、住血吸虫症、マラリア、リーシュマニア症、糸状虫症、有鉤囊虫症等、数多くあげられるが、これらはいずれも診断技術に習熟すれば、必ずしも確定診断が難しい寄生虫症ではない。しかしながら、中国にも分布する包虫症は、診断法が確立し

ていないため、治療が遅れ、死にいたることが多い寄生虫症である。すなわち、最初に肝臓に寄生することが多く、ここで徐々に発育する。症状がでるまでの潜伏期間が長く数年～数十年を要するが、この間に血流を介して他臓器に転移している場合もあり、発症した時点ですでに手遅れであることが多いため治療が非常に困難な寄生虫症である。このため、感染早期に確定診断を行ない、外科的に摘出する以外に有効な対応策がないが、現時点ではそのような診断法がないのが実情である。そこで今回は、多包虫抗原に対するモノクローナル抗体を作製し、血中に存在する可溶性多包虫抗原を検出し得る新しい免疫学的診断法を確立することを最終目的において、以下の研究を行なった。なお、中国には、今回研究対象とした多包虫のほかに単包虫が分布しているが、抗原入手等、技術的問題から前者について検討した。

【方法】

- 1) 弘前大学医学部寄生虫学教室神谷春男教授から分与いただいたスナネズミ肝臓寄生多包虫のprotoscolexを凍結、融解処理後、50 mM n-heptyl- β -D-thioglycoside存在下で超音波破碎した。10,000 x gで1時間遠心処理後、上清を採取し、多包虫protoscolex粗抗原として以下の実験に用いた。
- 2) 上記protoscolex粗抗原100 μ g量をFreund's complete adjuvantと混合し、BALB/cマウスに腹腔内及び皮下に注入、免疫した。さらに同粗抗原をFreund's incomplete adjuvantと混合したものを、最初の免疫から2週間目と更にその10日後に免疫した(日程の関係上、錢教授は、最後の免疫処置から実験に直接携わった)。この免疫の期間にマウス尾静脈から採血、血清を採取し、血中のprotoscolex抗原に対する抗体価の上昇をELISA法で確認することにより、protoscolex粗抗原を用いた免疫効果について判定した。すなわち、a) 多包虫protoscolex粗抗原を3%スキムミルク含有PBSで希釈し、ELISA用96穴プレートに100 μ lずつ加えた。b) 37°Cで2時間インキュベーション後、さらに4°Cで一晩静置した。c) 0.05% Tween 20 (Tween 20-PBS)で5分、3回洗浄した。d) 5%スキムミルク含有PBS (スキムミルク-PBS)で各wellを満たし、37°Cで1時間インキュベーション(ブロッキング操作)した。e) Tween 20-PBS)で5分、3回洗浄後、3%スキムミルクで希釈したマウス血清を100 μ l加え、37°Cで1時間反応させた。f) Tween 20-PBSで5分、3回洗浄後、3%スキムミルクで希釈したperoxidase-conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulins polyclonal antibody (二次抗体)を加え、37°Cで1時間反応させた。g) Tween 20-PBSで5分、5回洗浄した。h) OPD水溶液(メタノールで可溶化させたOPD: O-phenylene diaminと過酸化水素水を蒸留水で希釈したもの)を加え、暗所・室温にて30分間、静置した。i) 吸光度計にてO.D.値を測定し、抗体価の上昇の有無について検討することにより、protoscolex粗抗原を用いた免疫効果について判定した。なお、樹立したハイブリドーマ産生単クローン抗体の下記7種蠕虫粗抗原との交叉反応性の有無

の判定も本法により行なった。一次抗体としては、樹立した7株ハイブリドーマの培養上清を用いた。

3) protoscolex抗原に対する抗体価の上昇を確認したうえで最後の免疫処置の3日後にマウス脾臓を摘出し、ガラスホモジナイザーを用いて脾細胞懸濁液を作製をした。この脾細胞とマウスミエローマ細胞(P3X63-Ag8.653 cell)をポリエチレングリコール存在下で融合させ、ハイブリドーマ細胞を作製した。protoscolex粗抗原を用いたELISA法によりスクリーニングし、多包虫protoscolexに対する単クローン抗体産生ハイブリドーマを樹立した。

4) 樹立したハイブリドーマが産生する単クローン抗体のクラス及びサブクラスを、抗マウスIgM, IgG1, IgG2aおよびIgG2b抗体とアガロースゲルを用いたオクタロニー法により判定した。

5) 単クローン抗体の抗原認識特性を明らかにするために、多包虫感染スナネズミの肝臓を用いて病理切片を作製し、免疫組織学的検討を行なった。すなわち、a) 上記肝臓をスナネズミから取り出し、10%ホルマリン-PBSで固定した。b) 固定した肝臓を適当な大きさに切り出し、エタノール(70%~100%)で脱水後、パラフィンにて包埋し、パラフィンブロックを作製した。c) このパラフィンブロックを用いて、4 μ mの厚さの切片を作り、免疫組織学用のプレパラートを作製した。d) このプレパラートを十分乾燥後、キシレンにてパラフィンを除去し(脱パラフィン)、エタノール(100%~70%)を経て、PBSにまで移行した。e) さらに、スキムミルク-PBS中に1時間静置し、ブロッキング操作を行った。Tween 20-PBSで5分、3回洗浄した。f) 次に、このプレパラート上の組織切片に、樹立した7株ハイブリドーマの培養上清をまんべんなくかけ、室温で1時間反応させた。g) Tween 20-PBSで5分、3回洗浄後、3%スキムミルク-PBSで希釈したperoxidase-conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulins polyclonal antibodyを同様に組織切片にかけ、室温で1時間反応させた。h) Tween 20-PBSで5分、5回洗浄後、蒸留水で軽く水洗した。i) このプレパラートをDAB水溶液(DAB: 3, 3'-ジアミノベンチジンと過酸化水素水を蒸留水で希釈したもの)中に浸漬し、ハイブリドーマ産生単クローン抗体認識抗原を黄褐色に発色させた。j) プレパラートを蒸留水で水洗、エタノールで脱水、キシレンで透徹後、カナダバルサムで封入し、顕微鏡観察を行った。

6) 単クローン抗体認識抗原の特異性について、巨大肝蛭*Fasciola gigantica*、イヌ糸状虫*Dirofilaria immitis*、旋毛虫*Trichinella spiralis*、広節裂頭条虫*Diphyllobothrium latum*、肝吸虫*Clonorchis sinensis*、単包虫*Echinococcus granulosus*および有鉤囊虫*Cysticercus cellulosae*の7種蠕虫粗抗原およびBALB/cマウス腎抽出抗原を用いたELISA法により、交叉反応の有無を判定することにより比較検討した。

【結果】

1) 96穴プレート3枚(288 wells)に融合細胞懸濁液を100 μ lずつ蒔き、そのうち184 wells (約64%) にハイブリドーマのコロニーが認められた。さらにそのうちの56 wells (約19%) が、多包虫protoscolexに対する抗体を産生しているハイブリドーマであった。

2) 抗体産生ハイブリドーマ56 wellsのうちから、抗体の力価の高低等の反応性の違いをもとに7 wellsを選び、リミッティングダイリューション操作を3回繰り返して実施し、多包虫protoscolexに対する単クローン抗体産生ハイブリドーマ7株を樹立した。

3) この樹立したハイブリドーマ7株が産生する単クローン抗体のクラス及びサブクラスは、4株がIgG1、2株がIgG2b、1株がIgMであった。

3) この7株のうち4株は、多包虫抗原と高い特異性を呈し、単包虫抗原を含むその他の7種蠕虫抗原およびBALB/cマウス腎抽出抗原とは反応(交叉反応)が認められなかった。

免疫組織学的検討から、単クローン抗体認識抗原の分布は、大別して次の3群に分類された。

4) 一群の抗体により認識される抗原は、laminated layerとtegument of germinal layerのみに認められた。

5) 二群の抗体により認識される抗原は、laminated layer、tegument of germinal layerおよびyoung protoscolexに認められた。

6) 三群の抗体により認識される抗原は、germinal layer, brood capsuleおよびprotoscolexに認められた。

7) 各群の単クローン抗体ともに虫体の他に、虫体周囲の結合織とも反応したが、その他の虫体周囲正常組織とは反応が認められなかった。

8) この虫体周囲結合織の反応は、虫体外に分泌された虫体抗原が結合織に沈着し、この沈着抗原と単クローン抗体が反応したものと推察された。

【考察】

多包虫のprotoscolex抗原をマウスに免疫し、7株の単クローン抗体産生ハイブリドーマを樹立した。その認識抗原の分布から、a) laminated layerとtegument of germinal layerのみと反応するもの、b) laminated layer、tegument of germinal layerおよびyoung protoscolexと反応するもの、c) germinal layer, brood capsuleおよびprotoscolexと反応するものの三群に分類された。これまでlaminated layerが宿主と虫体のいずれから産生されるかは明らかでなかったが、今回得られた単クローン抗体の反応性から、虫体由来である可能性が示唆された。今後、多包虫protoscolexをスナネズミに感染させ、経時的にlaminated layerについて観察することにより、その可能性について検討する予定である。さらに他種寄生虫抗原と交叉反応性のない単クローン抗体が得られた可能性が高

い。そこでこの単クローン抗体を用いて認識抗原を精製し、ELISA法のコーティング用抗原として使用することにより、他種寄生虫抗原と交叉反応のない多包虫症診断法を樹立する可能性が期待される。また免疫診断法の一つとして、血流中に存在する寄生虫抗原、いわゆる循環抗原を検出する方法がある。今回得られた結果から、虫体抗原が虫体に接する正常肝臓組織に沈着していたことから、循環抗原として血流中に移行するかは判断しづらいところではあるが、今後は、この循環抗原検出の可能性についても単クローン抗体を用いて検討していく予定である。