

財団法人日中医学協会
2008年度共同研究等助成金－調査・共同研究－報告書

平成21年 3月 7日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

受給者氏名： 山崎 浩 
所属機関名： 国立感染症研究所
所属部署： 寄生動物部第二室 職名： 室長
〒162-8640
所在地： 東京都新宿区戸山1-23-1
電話： 03-5285-1111 内線： 2200

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

中国青海省におけるエキノコックス症：プロテインチップを用いた早期診断バイオマーカーの検索

3. 成果の概要（100字程度）

ヒトのエキノコックス症(単包虫症)の早期診断のためのバイオマーカーを検索するために、中国青海省の単包虫症患者と健常者、各々20、計40の血清を対象にプロテインチップ解析を行った。その結果、単包虫症患者群と健常人群との間に診断バイオマーカー候補分子が見出された。

※発表論文等

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 山崎 浩 職名： 室長
所属機関： 国立感染症研究所 部署： 寄生動物部第二室
中国側研究者氏名： 王 虎 職名： 所長
所属機関： 中国・青海省地方病予防抑制所 部署： _____

中国青海省におけるエキノコックス症:プロテインチップを用いた早期診断バイオマーカーの検索

研究者氏名 山崎 浩
所属機関 国立感染症研究所 寄生動物部第二室 室長
共同研究者名 王 虎
所属機関 中国青海省地方病予防抑制所 所長

要 旨

ヒトのエキノコックス症には多包虫症と単包虫症があり、いずれもエキノコックスと呼ばれる幼虫の寄生によって引き起こされる。ヒトは虫卵を経口摂取することによって感染し、自覚症状が出現するまでに、通常、数年～20 数年を要する。この間、無症状で経過するので、発症した時には病巣が進行して難治性となる。とくに、多包虫症は致死性である。しかしながら、感染早期に発見されれば、薬物治療や外科手術によって完治し、予後も良い。エキノコックス症の検査診断は、画像検査の他に、血清診断法が普及しているが、血清検査法による感染初期患者の発見は難しい。そこで、エキノコックス症感染初期患者の血清タンパク質を網羅的に調べ、エキノコックス症早期患者に特徴的に検出される、あるいは減少・消失するような分子を捕捉することができれば、それはエキノコックス症の早期診断バイオマーカーとして臨床的に応用することができる。プロテインチップ (ProteinChip) はそのような分子の検出に最も適した新しい解析技術である。

本研究では、中国青海省チベット族自治州のエキノコックス症流行地域における疫学調査で得られた単包虫症患者と健常者(非感染者)の血清を用いてプロテインチップによるエキノコックス症の早期診断に役立つバイオマーカーの検索を行った。

その結果、単包虫症患者と健常人との間で検出された 33 種類のバイオマーカー候補のうち、両群で最も大きなシグナル強度差を示した分子について、その性状を解析した。

Key Words エキノコックス症、単包虫症、プロテインチップ、早期診断バイオマーカー

緒 言:

ヒトのエキノコックス症には多包虫症と単包虫症があり、それぞれ多包条虫 (*Echinococcus multilocularis*) と単包条虫 (*Echinococcus granulosus*) の幼虫 (= 包虫、エキノコックス) が寄生することによって引き起こされる寄生虫感染症である。前者はユーラシア大陸(わが国では北海道に分布)と北米など北半球で流行する。後者は世界の遊牧・牧畜地域に広く蔓延している。ヒトはこれら条虫卵を偶発的に経口摂取することによって感染し、自覚症状が出現するまでに、通常、数年～20 数年を要する。この間、無症状で経過するので、発症した時には病巣は進行し、診断治療が遅れることとなり難治性となり、とくに多包虫症は致死性である。

申請者らの研究グループは、中国疾病予防センター・上海寄生虫病研究所ならびに青海省地方病予防抑制所

との共同研究として 2005 年より青海省のチベット族住民、ならびに野生動物を対象にエキノコックス症に関する研究を行ってきたが、これまでの調査研究から、住民 10 人に対して 1 人がエキノコックス症に感染しているという、極めて深刻な状況であることが明らかになってきた。流行地は都市部からのアクセスが悪く、医療設備の不備、またエキノコックス症に関する住民の医学的知識の欠如などにより、その対策は遅々として進んでおらず、感染状況は年々悪化の一途を辿っている。

エキノコックス症は難治性疾患ではあるが、感染早期に発見されれば、薬物治療や外科手術による治療が効を奏し、予後は良い。エキノコックス症では、その病巣は肝臓を主体に、肺や脳、骨などに形成されるために、病態の進行に伴って、患者血清中のタンパク質あるいはペプチドの発現様態に変化が起きる可能性が考えられる。現在、検査診断法として、画像検査の他に、血清中の抗体検出に基づく血清診断法が普及しているが、血清検査法による感染初期患者の発見は難しい。そこで、エキノコックス症感染初期患者の血清タンパク質を網羅的に調べ、エキノコックス症早期患者に特徴的に検出される、あるいは減少・消失するような分子を捕捉することができれば、診断バイオマーカーとして臨床応用することができる。プロテインチップ技術はそのような分子の発現様態や検出に最も適した最新の解析法であることから、エキノコックス症早期感染者の早期発見に役立つバイオマーカーを検索し、それを同定することが本研究の目的と動機である。

対象と方法:

1. 血清サンプルの採取: 解析に用いたヒト血清は、中国・青海省玉樹チベット族自治州囊謙県(Nangqian)のエキノコックス症流行地において、2007年に中国青海省地方病予防抑制所のスタッフによって行われた住民検診で採取されたものである。住民検診に際して、研究目的を住民に説明し、住民の同意を得た。結果的には 1,329 名が受診し、受診者の氏名、年齢、性別、民族、職業、病歴などを聞き取り、超音波診断装置により、腹部検査を行った。超音波検査受診者のうち、エキノコックス抗体検査を希望する者については採血を実施した。
2. 単包虫患者の診断基準: 超音波腹部検査所見による単包虫症患者の診断は WHO による診断基準に準じて行い、その中から、早期と考えられる CL 型および CEI~CEII 型を選んだ。エキノコックス抗体検査は、単包虫の包虫液から精製した血清診断抗原(Antigen B)を用いた酵素抗体法(ELISA)を用いて実施した。また、血清抗体検査(ELISA)でエキノコックス症陽性と診断された者についてはエキノコックス症診断キット(LDBIO 社製 Echinococcus IgG Western Blot)を用いて精査した。
3. プロテインチップ解析に用いた血清サンプル: 腹部画像検査で単包虫症と診断された 36 名の患者のうち、エキノコックス抗体陽性者は 23 名、抗体陰性者は 13 名であった。この中から、民族はチベット族とし、早期の単包虫症と考えられる患者(男性 10 名、女性 10 名)を選んだ。これらの患者と性別、年齢がマッチした健常人を男女それぞれ 10 名ずつ対照群血清として選んだ。年齢構成は単包虫症患者が 9~40 歳、健常者は 8~35 歳であった。
4. プロテインチップシステムによる解析: 前述の被検血清は変性バッファー(9 M urea/2% CHAPS/50 mM Tris-HCl, pH 9.0)で前処理し、その遠心上清をプロテインチップ解析に用いた。今回は、陽イオン交換チップ

(CM10)と陰イオン交換チップ(Q10)を用いて、バイオマーカー分子のチップへの結合、洗浄、溶出条件を検討した。プロテインチップへの結合実験に先立って、陽イオン交換チップおよび陰イオン交換チップ表面をそれぞれ 100 mM sodium acetate buffer, pH 4.0 と 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 で平衡化し(150 μ L/spot)、次いで、前処理した血清(10 μ L)をチップに吸着させた。チップの洗浄を 3 回繰り返す、さらに 50%飽和シナピン酸(sinapinic acid, SPA)をチップ上に添加し、乾燥させた。質量分析計によるバイオマーカーの検出はチップ上に吸着された成分を ProteinChip SELDI-TOFMS system (BioRad Laboratories)により行い、測定範囲は低分子領域として 0~100,000 m/z (Focus mass/SPA-Low; 6,500)、また高分子領域として 10,000~200,000 m/z (Focus mass/SPA-High; 20,000)とした。

5. データ解析: 得られたスペクトルデータは ProteinChip Data Manager Software を用いて解析した。バイオマーカーの候補分子として、単包虫症患者群と健常人群で検出されたスペクトルのピーク比(S/N)が 2.5 以上のものを解析の対象とし、2 群間の有意差検定は Mann-Whitney u-test (独立 2 群比較)で検討し、 $p < 0.05$ を有意差の目安としてバイオマーカー候補を抽出した。
6. バイオマーカー候補分子の精製と同定: バイオマーカー候補分子を同定は次の 4 つの工程で実施した。第 1 工程は精製条件のスクリーニング、すなわち精製条件について、陽イオン交換チップ、陰イオン交換チップを用いた場合の吸着バッファー、溶出バッファーの pH と塩濃度のプロテインチップ上で候補分子の最適吸着条件、および溶出条件を検討した。第 2 工程と第 3 工程では、バイオマーカー候補分子の 2 段階の精製を行った。血清中のバイオマーカー候補分子を超高速分析用イオン交換カラム(HPLC TSK-Gel Amido-80, 1 x 100 mm)と超高速分析用逆相カラム(HPLC TSK-Gel Super ODS, 1 x 50 mm)を用いて精製した。次いで、最終精製した標品はトリプシン分解し、得られたペプチド断片を質量分析計で分析し、そのアミノ酸配列と分子サイズから想定されるタンパク質を同定した。

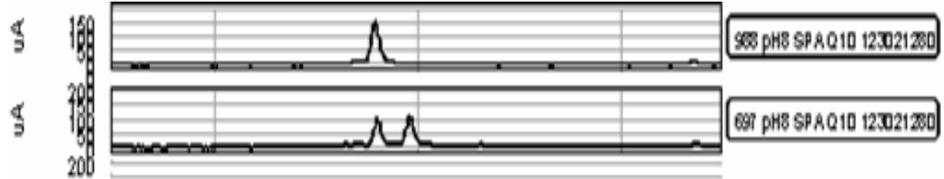
結果:

1. バイオマーカー候補分子の抽出: 単包虫症患者と健常人の性別、年齢、民族をマッチングさせた血清サンプルについて陰イオン交換チップと陽イオン交換チップに結合したバイオマーカー候補分子の ProteinChip SELDI-TOFMS system を用いて検索を行った結果、単包虫症群と健常人群の 2 群間で検出されたスペクトルピークのうち、ピーク強度差が 2 倍以上のものが 5 個、2 倍未満のものが 28 個、計 33 個のバイオマーカー候補シグナルが得られ、表 1 にはそのうちの 5 つのバイオマーカー候補ピークを示した。陰イオン交換チップを用いた時にのみ検出されたピークのうち、Fig. No. 3 のピークはその強度差が 14 倍と最も大きかった。単包虫症患者でのみ検出される、あるいは増加するスペクトルピークは無かったが、ピーク強度差が最も大きかった Fig. No. 3 を EGHU と名づけ、より詳細な解析を行った。興味深いことに、この EGHU は健常者でより高頻度に検出され、単包虫症患者ではむしろこのスペクトルピークは低下、もしくは消失する傾向が見られた(図 1)。

表 1. バイオマーカー候補シグナルピークの一覧

ProteinChip Condition	p-value	2 群間のピーク強度の差	対照群に対する変化傾向	備考	Fig. No.
陰イオン交換 pH8 /Low	0.008	14.0 倍	減少	m/z 5106 と同一タンパク質の可能性あり 同 タンパク質の可能性あり	3
陰イオン交換 pH8 /Low	0.007	2.2 倍	減少		4
陰イオン交換 pH8 /Low	0.005	2.1 倍	減少		5
陰イオン交換 pH8 /Low	0.001	2.2 倍	減少		6
陰イオン交換 pH4 /Low	0.007	2.0 倍	減少		7

図 1. 陰イオン交換チップ (Q10) を使用し、50 mM Tris-HCl, pH 8.0 の条件下に



おけるスペクトルピークの比較。 上段: 単包虫症患者血清. 下段: 健康人血清. 単包虫症患者では、右側のスペクトルピークが低下、または消失する傾向が見られた。

2. EGHU の精製条件と同定: EGHU の分子同定を行うために、その精製条件を検討した。陰イオン交換カラム(Q Sepharose)で pH 4-pH 9 で吸着し、pH 8 においては、0.1 M NaCl 条件下で強く吸着したことから、EGHU は疎水性の高い物質であると考えられた。そこで、陰イオン交換カラムで分画し、有機溶媒、もしくは 90% アセトニトリル/0.1% TFA で溶出された分画を質量分析計で分析したところ、EGHU であることが確認された。この Q Sepharose の分画をさらに逆相 HPLC と順相 HPLC を用いてさらに精製し、質量分析を行ったところ、逆相 HPLC の分画には EGHU 以外の混入はなく、単一シグナル (Fr 30) として精製された (図 2)。この分画をトリプシン消化したところ、EGHU 由来の 2~4 本のペプチド断片しか検出されなかったことから、高純度のバイオマーカー候補を精製することが出来た。現在、その同定作業を行っている。

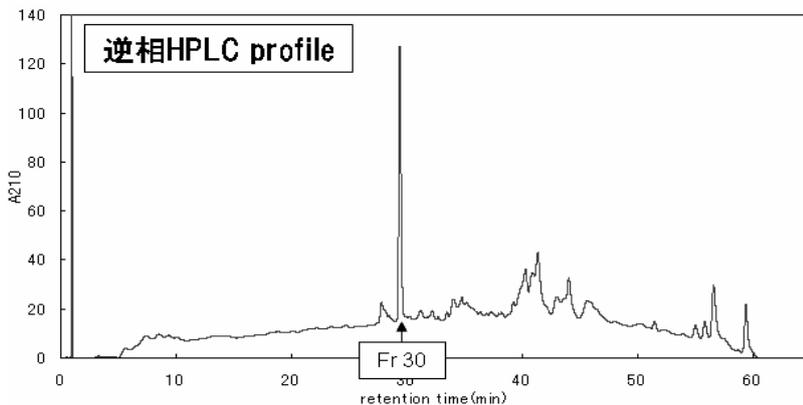


図 2. 超高速分析用逆相カラム Q Sepharose によるバイオマーカーの精製。
カラム: TSK-Gel Super ODS (1 x 50 mm)
流速: 53 μ L/min
分画: 53 μ L/min/Tube
溶媒 A: 0.1% TFA
溶媒 B: 90% アセトニトリル/0.1% TFA

考察:

本研究では、エキノコックス症早期診断に有用なバイオマーカーを検索し、臨床に応用することを目的として研究を行った。エキノコックス症の中で、単包虫症は超音波画像所見によって概ね、病態の進行状況が把握できることから、感染早期患者の特定が可能であり、得られたデータ解析が多包虫症に比べて単純化することが可能と考え

られたので、本研究では単包虫症に焦点を絞ってバイオマーカーを検索した。今回は 2 種類のイオン交換チップを用いて、それらに結合するバイオマーカーを検索し、最終的には EGHU という分子がバイオマーカー候補として抽出されたが、この分子はむしろ健常人で高いシグナルピークとして検出され、単包虫症患者ではそのシグナルが低下、もしくは消失する傾向が見られた。プロテインチップ技術を用いて診断用バイオマーカーも検索が行われた寄生虫症として、羊の肝蛭症¹⁾と豚の有鉤囊虫症²⁾が報告されているが、ヒトのエキノコックス症に関する早期診断にプロテインチップ技術を応用した報告はない。今後は、この EGHU がエキノコックス症早期診断のマーカーの一候補として有用であるか否かについてより多くの血清サンプルを用いた検討が必要と考えられた。また、EGHU の機能や単包虫症における臨床的意義についても検討する必要性が考えられた。

参考文献:

1. Rioux MC, Carmona C, Acosta D, Ward B, Ndao M, Gibbs BF, Bennett HP, Spithill TW. Discovery and validation of serum biomarkers expressed over the first twelve weeks of *Fasciola hepatica* infection in sheep. *International Journal of Parasitology* 38:123-136, 2008.
2. Deckers N, Dorny P, Kanobana K, Vercruyssen J, Gonzalez AE, Ward B, Ndao M. Use of ProteinChip technology for identifying biomarkers of parasitic diseases: the example of porcine cysticercosis (*Taenia solium*). *Experimental Parasitology* 120: 320-329, 2008.

作成日:2009年3月10日