

(様式 7)

受理年月日	平成24年5月31日
-------	------------

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

平成 24 年 5 月 28 日

帯広畜産大学原虫病研究センター長 殿

研究代表者 古屋宏二

所属機関 国立感染症研究所
寄生動物部

職 名 客員研究員

氏 名 古屋宏二 

下記の共同研究について別紙のとおり報告します。

記

1. 採択番号 23—共同—8
2. 研究課題名 エンセファリトゾーン症の診断法の開発

研究課題名：エンセファリトゾーン症の診断法の開発

研究代表者：国立感染症研究所・寄生動物部 古屋宏二

共同研究者：帯広畜産大学・原虫病研究センター 五十嵐慎

1. はじめに

Encephalitozoon cuniculi は *Microsporidia* に属し、ヒト・サル類を含め色々な動物に感染する (1)。動物の中でもウサギは感受性が高く、わが国における感染率はかなり高いと考えられている (2)。ウサギの *Encephalitozoon* 症は神経症状が典型像であるが、感染例の多くは不顕性であり、診断は難しいとされる (3)。尿中スポアの検出は感染の確実な診断となるが、微小で形態的特徴がなく、排泄も散発的であり、その上、ウサギ尿は多量の沈殿物を含むため、ヒトや他の動物の尿には見られない検査・診断の難点をもつ (3)。最近、血中 IgG 抗体を測定する検査法が普及しつつあり、尿中スポア検出法よりはるかに容易な感染の有無の判定法であると考えられているが、不顕性感染例では血清情報の臨床的意義の難しさが指摘されている (3)。そんな中、我われは、新たな検査の対象として尿に注目し、血清抗体強陽性ウサギ群から尿抗体を検出した (4)。上述したごとくスポア検査のための材料として、ウサギ尿沈査の使用は検査上不利な面がある一方、尿上清の使用は検査上有利な点が多く、尿に特異抗体が排泄されるなら、血清検査との併用で、検査室診断の精度を格段に高められるのではと考えられた。しかし、尿抗体の排泄が本当に E 感染あるいは E 症に随伴するものであるのか、あるいは感染後いつ排泄されるのかなど、尿抗体の臨床的意義を考える前に、証明すべき根本的で非常に重要な命題があった。

2. 研究経過

これらの点について、昨年度 (平成 22 年度)、共同研究者の織田・五十嵐 (帯広畜産大・原虫病センター) は、SPF ウサギを用いて実験的に世界で初めて、スポア接種後尿抗体は 45 日目以後に排泄されること、排泄は 200 日以後も持続することを明らかにした。しかも、彼らはこれらの新しい知見を、複数の遺伝子組換え蛋白をそれぞれ抗原とした ELISA (rec-ELISA) 法で示し、排泄された尿抗体が感染経過に伴いどんな抗原に対して産生されたものかを明確にした。これらの成果の上に、本年度 (平成 23 年度) は特異抗体の尿排泄とスポアの尿排泄との関係及び臓器内スポアとの関係について更に解析を進めた。尿・血清材料中抗体の測定は rec-ELISA により、尿・臓器材料中スポアの検出は高感度な nested PCR によって遺伝子的に測定が行われた (方法の詳細は文献 5 を参照)。感染実験に使われた 4 頭 (No. 1~No. 4) のウサギのうち 2 頭 (No. 2 と No. 4) についてはスポア接種後 59 日まで、残りの 2 頭 (No. 1 と No. 3) についてはその後も経過的に観察し検査材料を収集、検査に供した。

3. 研究結果と考察

実験に供した 4 頭についての尿スポアの検出状況を調べると、全頭で接種後 35~60 日にスポアが検出された。長期観察の 2 頭 (No. 1 と No. 3) では、実験終了前の 150~190 日にもスポアが検出されることが分かった。実験期間を通して No. 1 と No. 3 のウサギの間の尿スポアの検出頻度には大きな違いは認められなかったが、尿抗体の排泄量 (ELISA 価) に明らかな違いが認められた。No. 1 ウサギの ELISA 価は明らかに高かったが、No. 3 ウサギの ELISA 価は非常に低かった。両ウサギの間の顕著な違いは実験終了日 (200 日) における臓器内スポア量にも認められた。尿抗体が高く測定された No. 1 では肝と腎からスポアが検出されたが、尿抗体が非常に低く測定された No. 3 ではいずれの臓器 (肝、腎、脾、肺、心) からもスポアは検出されなかった。しかしながら、実験

期間を通して血清中 IgG、IgM 抗体の産生についての有意な差は No. 1 と No. 3 のウサギの間には認められなかった。また、接種後 59 日目で実験を終了し、この間血清中 IgG と IgM 抗体の産生が No. 1、No. 3 とほぼ似た経過を辿った No. 2、No. 4 のウサギでは、前者の場合は脳・腎から、後者の場合は脾・脳・腎からスポアが検出された。

実験的に接種されたウサギでの尿スポアの主な排泄は 35～60 日であり、この時期が腎内におけるスポア産生の最大期とみなすなら (Cox ら (6) は、実験感染後スポア排泄は 21 日目ごろから始まり、40 日頃にピークとなり、80 日ごろまで排泄されることを報告している。)、No. 1 の場合、最大期を過ぎてスポア産生が減少していくことと反比例して尿抗体排泄が始まるかのように見える (尿抗体の排泄は感染後 50～60 日に始まり、実験終了日 (200 日) まで持続的に排泄され、採取ごとに測定値が変動するも、大雑把に見ると 110 日頃に第一ピーク、180 日頃に第二ピークが出現しているように見える)。

E 症の特徴的病理所見は脳炎と腎炎であり、腎で増殖したスポアが尿へ排泄される (7)。スポア排泄は感染した尿管上皮における *E. cuniculi* 増殖に基づく破壊の結果と考えられている。一方、免疫グロブリンの排泄は腎の尿ろ過機能の異常によるものと考えられている (3)。このように、両者の排泄の機序は異なっていることから、尿抗体陽性一尿スポア陰性の例やその逆の例も検出されても何ら不思議ではないだろう。それでは、なぜ、No. 1 ウサギは No. 3 ウサギに比べ尿抗体の排泄が多かったのであろうか。最近、Jeklova et al (8) は *E. cuniculi* の接種量の多い実験的な経口感染では 6 週から 13 週 (実験終了) の間に有意な特異的細胞性免疫が起こることを観察した。接種量の多い経眼感染においては経口感染より高い細胞性免疫反応が 8 週を最大反応に 4 週から 13 週 (実験終了) の間で認められた。接種量の少ない感染実験では細胞性免疫反応は観察されなかった。このような細胞性免疫の最盛の時期 (感染後 8 週) は丁度、今回の織田・五十嵐の実験感染で明らかになった尿抗体の排泄が始まる時期でもある。臓器内スポアが検出された No. 1 ウサギでは明らかに高い尿抗体排泄を示し、臓器内スポアが不検出の No. 3 ウサギでは尿抗体排泄は極少量であったことを考えるなら、腎のろ過機能の異常は細胞性免疫現象と関連があり、結果的に尿抗体が排泄されたかもしれない。この点について更なる研究が必要とされるだろう。

4. まとめ

昨年度 (平成 22 年度) の織田・五十嵐によるウサギの感染実験を通して血清抗体の免疫グロブリン・クラス別宿主応答、感染に伴う尿抗体の排泄の確認と排泄時期の決定、スポアの排泄時期と血清・尿抗体との関連などが明らかとなってきた。今年度 (平成 23 年度) においては、特に尿抗体の排泄量と尿中及び臓器内 (腎と脳) スポア有無との関連性についての分析と考察を行った。ベンズイミダゾール系薬物による E 症の治療効果が報告されている (9)。ごく最近、例数は少ないが当該薬物治療後の尿抗体の減少・消失が観察されている (10)。尿抗体は感染後期を示唆するマーカーとしての臨床的意義のみならず、薬物治療効果の判定のためのマーカーとしても有用な可能性が出てきたと考えられる。

参考文献

1. Furuya, K. et al.: J. Neuroparasitol. 2, ID: N110701, 2011
2. Igarashi, M. et al.: J. Vet. Med. Sci., 70, 1301-04, 2008
3. Furuya, K.: Jpn. J. Infect. Dis., 62, 413-22, 2009
4. Furuya, K. et al.: Vet. Rec., 165, 85-6, 2009
5. Adilbish, A. & Igarashi, M.: Mid-term report, Advanced Research Course on International Animal Health, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, 2011

6. Cox, J. et al.: J. Protozool., 26, 260-5, 1979
7. Snowden, KF. & Shadduck JA.: in The Microsporidia and Microsporidiosis, ASM Press, pp393-417, 1999
8. Jeklova, E. et al., Parasitology, 137, 1749-57, 2011
9. Suter, C. et al.: Vet. Rec., 148, 478-80, 2001
10. Furuya, K. et al.: in preparation