

受理年月日	受理番号

## 帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

平成 26 年 5 月 30 日

採択番号	25-共同-13		
研究部門	診断治療研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	河津信一郎
研究課題名	東南アジアの住血吸虫症の新規診断法開発のための抗原解析		
研究代表者	(ふりがな) 氏名	所属部局等・職名	
	(きりのき まさし) 桐木 雅史	獨協医科大学熱帯病寄生虫病室・准教授 抗原試料調整、免疫組織学的解析、診断法への導入	
研究分担者			
研究期間	平成 25 年 4 月 1 日 ~ 平成 26 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	<p>東南アジアや中国に分布し問題となっている日本住血吸虫症およびメコン住血吸虫症について、有病地での使用に有効な診断法の開発が望まれている。しかしながら現在我々が使用している虫卵粗抽出物を抗原とした免疫診断法は感度が高いものの抗原の供給に限られるため一般化には限界がある。本研究は、本症検査に好適な標的分子であることが期待される抗原について、その性状やアミノ酸配列、さらに遺伝子配列などの解析を進め、本症診断に応用することを目的とする。</p> <p>さらには、有用な抗原候補分子について組替え体抗原を作製し、免疫クロマトグラフィー法 (ICT) の開発につなげていきたい。</p>		
研究経過の概要	<p>日本住血吸虫成虫の二次元電気泳動およびウェスタンブロッティングをおこない、日本住血吸虫患者血清で認識されるスポットについて検討した。</p> <p>日本住血吸虫の排泄・分泌抗原に対して作製したモノクローナル抗体 1-7B で認識される循環抗原 SjCA の解析をおこなった。獨協医大にて SjCA 抽出、二次元電気泳動、ウェスタンブロッティング解析などを実施した。</p> <p>二次元電気泳動上のスポットを切り出し 2014 年 2 月に原虫病研究センター河津信一郎教授及び畜産衛生学研究部門の福田健二准教授にご協力いただき質量分析を実施した。</p> <p>これまで SjCA の同定には至っていないが、SjCA と同じ酸可溶性分画に含まれるタンパク質が、循環抗原として報告されている fatty acid binding protein 由来ペプチドであると同定された。</p>		

受理年月日	受理番号

<p>研究成果の 概要</p>	<p>日本住血吸虫成虫タンパク質を二次元電気泳動後、日本住血吸虫症患者血清により免疫染色をおこなった。患者血清で特異的に観察された顕著なスポットは <b>paramyosin</b> であった。一方、二次元電気泳動の免疫染色像には水平方向に複数のスポットがあること、免疫染色では検出できてもタンパク質量が少ない場合があることなどから、以前の研究において <b>SDS-PAGE</b> で特定した抗原性の高いバンドに相当するスポットを特定することが困難であった。今後、目的抗原の特定に適した抽出法・分画法などを検討し、抗原の解析を進める。</p> <p>日本住血吸虫の排泄・分泌抗原に対して作製したモノクローナル抗体 <b>1-7B</b> で認識される循環抗原 <b>SjCA</b> の質量分析を実施した。二次元電気泳動上のスポットをトリプシン消化後 <b>MALDI-TOF-MS(Bruker)</b> により解析を行ったが、有意なピークが得られなかった。試料の増量および手技見直しの上再度実施したが結果は同様であった。スポットはクーマジー染色で十分確認できる量であることから、量以外の何らかの阻害要因があると考えられる。対策を検討し、解析を進めていきたい。</p> <p>レクチンブロッキングにより <b>SjCA</b> が糖タンパク質であることが示されている。糖鎖抗原も宿主免疫に大きく作用することが知られていることから、<b>SjCA</b> の糖鎖解析を質量分析により進めている。糖鎖解析は糖鎖精製ラベル化キット <b>BlotGlyco</b> (住友ベークライト) を使用し、<b>MALDI-TOF-MS</b> により質量分析をおこなった。現在解析中である。</p> <p>メコン住血吸虫成虫の二次元電気泳動パターン上でモノクローナル抗体 <b>1-7B</b> に認識されるスポットが確認されたことから、メコン住血吸虫が <b>SjCA</b> と相同の分子を有している可能性が示唆された。</p> <p><b>SjCA</b> が含まれる酸可溶性分画の二次元電気泳動像で見られる 3 種のスポットについても同様に質量分析を行ったところ、一つは日本住血吸虫の <b>fatty acid binding protein</b> 由来ペプチドであると同定された。この <b>fatty acid binding protein</b> は比較的量の多い循環抗原のひとつであることが報告されている (Liu et al., <i>Mol Cell Proteomics</i> <b>8</b>:1236-1251)。循環抗原は、抗原検出検査の標的分子として期待される。その他のスポットの一つは宿主由来分子であり、もう一つのスポットは有意なピークが検出されなかった。</p>
<p>研究成果の 発表</p>	<p>2014 年 5 月 該当なし。</p> <p>今後、成果は学術雑誌および学会（日本寄生虫学会、日本熱帯医学会など）で発表する。</p>