

ヒトバベシア症に対する新規診断法の開発

研究者分担 横山直明 帯広畜産大学・原虫病研究センター教授

研究要旨：赤血球内寄生原虫 *Babesia microti* によるバベシア症は、通常げっ歯類とダニの間で感染が成立している一方、人獣共通感染症としても重要であり、アメリカ北東部では地方病として知られている。近年、本症の世界的な感染拡大が報告されており、日本でも、1999年に神戸で輸血により本邦初の人感染例が発生した。そこで、本研究では“バベシア症が疑われる患者の血液”あるいは“輸血用血液”の迅速で正確な血清及び遺伝子診断法を開発することを目的とした。平成25年度は、23年度および24年度にマウスモデル系を用いた開発された遺伝子診断法の LAMP および簡易・迅速血清診断法であるイムノクロマト法 (ICT) について、人血液試料を用いてその有用性を確認することを目的とした。LAMP については神戸医療大学から提供を受けた 111 検体の人血液より DNA を抽出して検討を行った。その結果、抗体陽性を示した 61 検体中、LAMP で陽性を示した検体は 5 検体のみで、非常に検出率が低かった。また、IFAT で陰性を示した 50 検体中、LAMP で陽性を示した検体が 1 例認められた。ICT については、アメリカエール大学より人血清の提供を受けて実施予定であった。しかしながら、ヒト試料の使用について、エール大学並びに帯広畜産大学の倫理委員会の承認を得るのに時間を要し、最近エール大学より 60 検体の人血清を入手したところである。現在、これらの血清を用いて、検討中である。

A. 研究目的

赤血球内寄生原虫 *Babesia microti* は、通常げっ歯類とダニの間で感染が成立しているが、感染ダニによる刺咬やキャリアーからの輸血により人にも感染し、人獣共通感染症として重要視されている。ヒトバベシア症は、アメリカ北東部の離島や沿岸地帯では地方病として知られている。最近、米国での感染拡大に加えて、中国、メキシコ、台湾、エジプト、南アフリカなどにおいても人感染例が報告され、その感染の拡大が懸念されている。日本でも、1999年神戸で輸血により本邦初の人感染例が報告され、血液製剤の安全性確保や更なる人への感染拡大防止のため、正確で迅速な血清並びに遺伝子診断法の開発が急務となっている。

本研究では、“バベシア症が疑われる患者の血液”あるいは“輸血用血液”の迅速で正確な血清及び遺伝子診断法を開発することを目的としている。25年度は、マウスモデル系を用いた開発された遺伝子診断法の LAMP および簡易・迅速血清診断法である ICT について、人血液試料を用いてその有用性を確認することを目的とした。

B. 研究方法

(1) ヒト血液試料

神戸医療大学薬学部斎藤あつ子教授より 111 検体のヒト血液の提供を受けた。これらの試料は、インフォームドコンセントを実行して得られて採血されている。111 検体中、IFA により 61 検体が抗体陽性、50 例が抗体陰性であることが確認されている。これらの血液 25 μ m を用いて市販の DNA 抽出キットにより DNA を精製した。

また、エール大学より、60 検体の人血清の提供を受けた。これらの血清は、インフォームドコンセントを実行して得られている。

(2) LAMP の実施

B. microti の 18s ribosomal DNA (rDNA) 遺伝子情報を基に設計した LAMP 用のプライマー 4 種類 (F1P、B1P、F3、及び B3) を用いて、63度で 90 分の反応条件で増幅を行った。本 LAMP 法は、マウス感染モデル系で特異性や感度が高いことが確認されている。さらに、日本で最初に輸血により感染が認められた患者並びに献血者の DNA を用いた実験で遺伝

子の増幅が確認されている。

(3) イムノクロマトストリップの作製

組換え BMN1-17 蛋白質の濃度が 200mg/ml、pH 5.0 の条件で金コロイド標識を標識し、ICT ストリップを作製した。ハムスターを用いた感染実験により、特異性ならびに IFAT と同等の感度を有していることが確認されている。また、輸血による *B. microti* 感染が日本で初めて確認されたヒト患者および献血者で、抗体が確認されている。

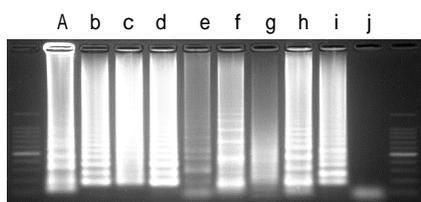
(倫理面への配慮)

人の血液材料用いた実験については、帯広畜産大学、神戸医療大学、エール大学の倫理委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

(1) ヒト DNA を用いた LAMP の検討

111 検体の人血液より得られた DNA を用いて LAMP を実施した。その結果、IFA で抗体陽性を示した 61 検体中、LAMP で陽性を示した検体は 5 検体のみであった。また、抗体陰性が確認されている 50 検体中 1 例で LAMP 陽性反応が確認された。また、*B. microti* の神戸株、ミュンヘン株、グレイ株の DNA でも遺伝子の増幅が認められた(下図)。



a: 神戸株、b: ミュンヘン株、c: グレイ株、
d: IFA 陽性、e: IFA 陽性、f: IFA 陽性、
g: IFA 陽性、h: IFA 陽性、i: IFA 陰性、j: 蒸留水

(2) ヒト DNA を用いた ICT の検討

24 年度に、ハムスター感染モデルで ICT による抗体検出の有用性が確認された。そこで、本年度は流行地でのヒト血清を用いて検討すべく、エール大学公衆衛生学部の P. Krause 博士にヒト血清の提供依頼を行ったところ、快く承諾を戴くことができた。しかしながら、帯広畜産大学ならびにエール大学

の倫理委員会の承認を得るのに、予想よりも長い時間を要した。その後 MTA を締結し、1 月下旬に 60 検体を入手したところである。今後、提供された 60 検体を用いて、早急に行う予定である。

D. 考察

B. microti 18s rDNA 遺伝子を標的とした LAMP 法は、マウス感染モデルにおいて、高い特異性と感度と示した。また、ヒト感染血液および献血者においても、LAMP 法により標的遺伝子が増幅されている。そこで、今回 100 例以上のヒト DNA サンプルを用いて、LAMP 法を実施した。しかしながら、61 例の抗体陽性者の DNA サンプルを用いた LAMP 法で、5 例より陽性反応が認められなかった。これは、採血された人はほとんど無症状であり、血液中の原虫数が極めて少ないと考えられる。そのため、少数の原虫により抗体産生系は刺激され、血清中に全血清中に抗体は認められるが、DNA 調整に使用された 25 μ m 中に原虫が含まれていなかったと推察される。

今回、3 株の *B. microti* から抽出された DNA を陽性対照として用いたところ、すべての DNA で遺伝子増幅が認められた。神戸株、ミュンヘン株、グレイ株はそれぞれ日本、ドイツ、アメリカと地理的に非常に隔だっているにも関わらず遺伝子増幅が認められたことは、本プライマーセットを用いた LAMP 法が世界的に使用可能であることを示唆している。

また、アメリカの流行地で採取された人血清を用いて、ICT の有用性の検討は残念ながら今回期限内に実施できなかった。しかしながら、ICT の作製に使用された BMN17 は、世界的に非常に良く保存されている原虫蛋白質である。組換え蛋白質をコードしている BMN17 の遺伝子情報は、ミュンヘン株から得られたものである。この遺伝子情報に基づいて作製され組換え蛋白質を用いた ICT により、地理的および遺伝的に遠い神戸の人血清で抗体を検出できたことから、本 ICT の汎用性は高いと考えられる。

E. 結論

本研究では、マウスモデル系を用いた開発された遺伝子診断法の LAMP および簡易・迅速血清診断法である ICT について、人血液試

料を用いてその有用性を確認することを目的とした。残念ながら、人試料を用いた検討では、マウスモデルで得られた高い感度が認められなかった。しかし、本研究で開発された、LAMP と ICT は国際的に使用可能な可能性を有しており、今後その実用化に向けて、更に検討する必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Iseki H., Alhassan A., Kim C., Saito-Ito A., Inokuma H., Kawazu S., Masuzawa T., Yokoyama N., and Igarashi I.; Development of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Diagnosis of *Babesia microti* Infection. (準備中)
2. Iseki H., Kim C., Saito-Ito A., Minoda Y., Inokuma H., Yokoyama N., and Igarashi I.; Development of an immunochromatographic test for convenient serodiagnosis of human babesiosis. (準備中).

2) 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし