

ヒトバベシア症に対する新規診断法の開発
研究分担者 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。本研究は3年間にわたり、簡易・迅速遺伝子診断法として最近注目を浴びている LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法および簡易・迅速血清診断法であるイムノクロマト法 (ICT) の開発について、実験モデルの系を用いて検討を行った。その結果、設計した LAMP プライマーは、*B. microti* ribosomal DNA 遺伝子を増幅し、既存の PCR 法よりも高い検出感度を示した。また、マウスを用いた感染実験では、赤血球寄生率が低い感染初期及び慢性期においても、LAMP 法により感染の検出が可能であった。一方、大腸菌により発現させた組換え BMN1-17 蛋白質を用いた ICT は、*B. microti* に対する高い特異性を示した。ハムスターを用いた感染実験では、赤血球寄生率が検出されるほぼ同時期に ICT により抗体の検出が可能であった。また、神戸の人感染血液を用いた LAMP 法および ICT においても、標的遺伝子の増幅並びに抗体検出が可能であった。以上の結果を基盤にして今後、国内ばかりでなく海外の流行地で得られた人の試料を用いてこれらの遺伝子および血清診断法の実用性を検討する必要がある。

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の開発を目的とした。主として実験動物モデル系を用いて、簡易・迅速遺伝子診断法として最近開発された LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法および簡易・迅速血清診断法であるイムノクロマト法 (ICT) について、実

験モデルの系を用いて検討を行った。また、日本で最初に認められ、*B. microti* 感染者の試料を用いて、人患者への有用性について検討した。

B. 研究方法

(1) LAMP の開発

B. microti 18s ribosomal DNA (rDNA) の遺伝子情報を基に、LAMP用のプライマー4種類 (FIP、BIP、F3、及びB3) を設計し、遺伝子増幅の条件検討を行った。また、*B. microti*、*Anaplasma*、*Ehrlichia*、及び *Plasmodium falciparum* の DNA サンプルを用いて、LAMPの特異性ならびに感度についても検討を行った。

(2) 実験感染マウスを用いた LAMP の評価

B. microti をマウスに感染させ、経時的に血液を採取し、Real-time LAMP を標的遺伝子の定量解析を行った。ヒトバベシア患者の血液を用いて、マウスモデル系と同様に Real-time LAMP を行い、標的遺伝子の増幅を検討した。

(3) ICTの開発

*B. microti*に特異的なBMN1-17の組換え蛋白質を大腸菌に発現させ、SDS-PAGEおよびウエスタンブロットを行い、組換え蛋白質の分子量と抗原性について検討を行った。次に異なる蛋白質濃度(10~1,000 mg/ml)およびpH(5.0~7.0)の条件検討を行い、rBMN1-17抗原と金コロイド(50nm)への最適な標識条件の検討を行った。次に、得られた金コロイド標識rBMN1-17蛋白質をサンプルパットに、rBMN1-17蛋白質と抗ウサギBMN1-17蛋白質IgGをニトロセルロース膜へジェット塗布しICTストリップを作製した。更に、ハムスターの陽性、陰性コントロール、アナプラズマやエールリキアの感染血清を用いて得られたICTストリップの特異性について検討を行った。

(4) 実験感染ハムスターを用いた ICT の評価

ハムスターを用いて *B. microti* 感染実験を行い、継時的に血液試料を採取した。血液塗沫標本のギムザ染色による赤血球寄生率の算定、IFAT、rBMN1-17を用いたELISA及びICTの検出感度を比較した。また、ヒトバベシア患者の血液を用いて、rBMN1-17蛋白質を用いたICTにより患者血清の抗体検出について検討した。

(5) ヒト血液試料

神戸医療大学薬学部より日本で最初の人バベシア患者、献血者、その他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採血されている。

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。

(倫理面への配慮)

マウスを用いた実験は、帯広畜産大学実験動物委員会の承認を得て実施した。また、人の血液材料を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) LAMP法の特異性と感度の検討

B. microti の18s rDNA 遺伝子の塩基配列

に基づいて設計した4種類のプライマーを用いて、63度で90分の反応条件でLAMP法を実施したところ、スメア状の陽性増幅が認められた。また、増幅産物を制限酵素で切断しその配列を決定した結果、目的とする18s rDNA 遺伝子が正確に増幅されていることが確認された。さらに、マダニに媒介される可能性が考えられる *Anaplasma*, *Ehrlichia* や形態的にバベシアに類似性が認められる *P. falciparum* のDNAサンプルを用いてLAMP法の特異性を検討した。その結果、*B. microti* にのみ増幅が認められ、特異性が高いことが示された。

精製DNAサンプルを用いてLAMP法とPCR法の検出感度を比較したところ、LAMPの方が約100倍の高い感度を示した。次に熱処理によるDNA抽出物を用いて検討した結果、同様にLAMP法はPCRに比べて約100倍高い感度を示した。

(2) 実験感染マウスの試料を用いた real-time LAMP 法の評価

最初に、real-time LAMPによる標的遺伝子の定量化について検討したところ、検出時間と標的遺伝子のコピー数をプロットした結果、直線上の検量線が得られた。次に *B. microti* 感染マウスでは、血液塗沫による原虫の検出は実験感染6日目まで1%未満だったが、real-time LAMP法による定量検出では3日目あるいは4日目から血中に含まれる微量の標的遺伝子を検出できることが示された。また、血液塗沫で検出できなくなった28日以降もreal-time LAMP法により感染の検出が可能であった。

(3) *Babesia microti* BMN1-17 組換え蛋白質を用いた ICT) ストリップの作製

B. microti BMN1-17 抗原をST融合蛋白質として大腸菌に発現させた。この蛋白質は可溶性で、SDS-PAGEにより、約75kDaのGST融合蛋白質として認められ、GSTを除いた分子量は約50kDaと推定された。また、rBMN1-17蛋白質を用いてウエスタンブロットを行ったところ、約50kDaに主要バンドが確認され、GST蛋白質にはバンドが認められなかった。

次に、組換え抗原を用いて金コロイド標識の条件について検討した結果、組換えBMN1-17蛋白質の濃度が200mg/ml、pH 5.0で金コロイド標識が最良であった。得られた

金コロイド標識 rBMN1-17 蛋白質、BMN1-17 蛋白質と抗ウサギ BMN1-17 蛋白質 IgG を用いて、ICT ストリップを作製し、特異性について検討を行った。その結果、ハムスターの陽性血清、陰性血清、アナプラズマやエールリキアの感染血清を用いて検討を行ったが、陽性コントロールにのみバンドが確認され、他のサンプルでは陽性ラインは認められなかった。

(4) 実験感染ハムスターの試料を用いた ICT の評価

ハムスターに *B. microti* を感染実験させ、継時的に血液を採取して、血液塗沫標本のギムザ染色による赤血球寄生率の測定、IFAT、rBMN1-17 を用いた ELISA 及び ICT の抗体検出感度を比較した。赤血球寄生率は、実験感染後 5 日目に 1% を越えて急激に増加し、約 2 週間後にピークを迎えた後、8 週後に 1% 以下に減少した。ELISA では、5 日目から抗体が検出され始め、1 週間ほどで急激に上昇してその後高い値を維持した。一方、ICT と IFAT では 7 日後から検出され始め、その後抗体が継続的に検出された。

(5) ヒト検体を用いた診断法の検討

マウスおよびハムスターで高い特異性と感度が認められた、LAMP と ICT について、日本で初めて認められた人バベシア患者、献血者の検体を用いてその有用性について検討した。LAMP では、バベシア患者と感染源と考えられる献血者の DNA から、標的遺伝子の増幅が認められた。また、ICT でも、患者血清および感染源とされる献血者血清で陽性バンドが認められた。

さらに、111 例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。しかし、*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。

また、ICT の人血清の有用性について検討するため、アメリカのエール大学より 60 例の人患者の血清の提供を受けた。今後、これらの血清を用いて ICT の人への応用の可能性について検討する予定である。

D. 考察

本研究では、輸血による感染が懸念される人バベシア症に対する迅速で正確な血清及び遺伝子診断法の開発を目的とした。迅速で PCR よりも簡便な遺伝子増幅法である LAMP 法は、約 60 度の等温で短時間(1 時間以内)に標的遺伝子を増幅することが可能である。また、特別の機器を必要とせず増幅の結果を目視で判定することも可能である。また、4 種類のプライマーを使用するため、特異性も高いとされている。これらの特徴は、多数の検体を短時間で検定する必要がある輸血の安全性を評価する方法として非常に適していると考えられる。

本研究では、輸血用血液の *B. microti* 感染の有無を評価する遺伝子診断法として LAMP 法の開発を試みた。*B. microti* の 18s rDNA 遺伝子配列に基づいて設計した 4 種類のプライマーを用いた LAMP 法は、*B. microti* の遺伝子のみを増幅し、ダニによって媒介される *Anaplasma*, *Ehrlichia*、形態や臨床症状が類似しているマラリア原虫の遺伝子を増幅せず、高い特異性を有することが明らかにされた。また、制限酵素によって切断される遺伝子配列を挿入することにより、増幅遺伝子の塩基配列の確認も可能であった。更に、この LAMP 法は、遺伝子診断法として最も広く普及している PCR 法と比較して約 100 倍高い感度を有していることが明らかになった。また、熱処理した血液上清を用いても遺伝子増幅が認められ、DNA 抽出の簡易化も可能であった。*B. microti* 感染マウスを用いた実験では、赤血球感染率が 1.0% 未満の感染初期や原虫がほとんど血液中に認められない慢性期においても、*B. microti* の 18s rDNA 遺伝子の増幅が認められた。

ICT は、ニトロセルロースなどの毛細管現象を利用した免疫学的測定法の 1 つである。微小金属粒子やラテックス粒子などを標識体として用い、検出対象が存在すると、多孔質体上に設けられた判定部位に標識体が捕捉されることで判定部位が発色し、検出対象の存在が確認できる。この方法は、血清試料などを滴下するだけで操作が簡便であり、判定時間も約 15 分と短い。また判定は目視で可能であり、コスト面からも利点がある。

本研究では、血液中の *B. microti* 抗体の検出をする迅速血清診断法として ICT の開発を試みた。最初に、*B. microti* の遺伝子を大腸菌に組み込み、約 50kDa の可溶性 BMN1-17 蛋白質として発現させた。この組換え抗原を用い

て作製したICTストリップは、*B. microti*のハムスター感染血清にだけ陽性バンド認められ、ダニに媒介されるアナプラズマやエールリキアの感染血清ではバンドは認められず、*B. microti*に対する高い特異性が認められた。また、ハムスター感染モデル実験では、感染後5日に赤血球内に*B. microti*に認められ、ELISAによっても抗体が検出された。ICTでは、やや遅れてIFATと同様感染後7日後に抗体が検出された。一般的にICTはELISAと同程度の検出感度を有するとされている。しかしながら、本研究ではICTによる抗体検出がELISAよりも若干遅れたことから、更にICTの検出感度を上げる改善が必要である。

以上の実験動物モデルでの結果に基づき、日本で初めて感染が確認される人試料を用いて、real-time LAMP法およびICTを実施した。その結果、LAMP法により*B. microti*に特異的なバンドパターンが得られた。また、ICTにより、*B. microti*重症感染発症患者および不顕性の血液ドナーの血清中から抗体が検出された。更に、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。しかし、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、3種の株で遺伝子増幅が認められた。これら神戸株、ミュンヘン株、グレイ株はそれぞれ日本、ドイツ、アメリカから分離されたものであり、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LAMP法が世界的な*B. microti*の検出に使用可能であると示唆される。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遺伝子情報はミュンヘン株から得られており、世界的に非常に良く保存されている。このミュンヘン株の遺伝子情報に基づいて作製される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患者血清で抗体を検出できたことから、本ICTの実用化の可能性は高いと考えられる。今後、更により多くの人血清数を用いて、これらの遺伝子ならびに血清診断法のその有用性について検討する必要がある。

E. 結論

本研究において、*Babesia microti*の18s rDNA 遺伝子を標的としたLAMP法および組換えBMN1-17蛋白質を用いたイムノクロマト（ICT）法が確立された。LAMP法は、PCR法より高い感度を示し、日本初の人患者の血液から抽出したDNAサンプルからも標的遺伝子の増幅が認められた。また、ICTによりハムスター実験感染モデルにおいて、IFATやELISAとほぼ同様の感度が示された。更に、*B. microti*発症患者と血液ドナーの血清中からも抗体が認められた。LAMP法とICTは国際的に応用できる可能性を有しており、今後その実用化に向けて、多数の人血液試料を用いて更に検討する必要がある。

F. 健康危険情報

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., Ishizaki T., 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