

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業
（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業））

分担研究報告書

バベシア感染の検査法に関する研究

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：バベシア症は、ダニ媒介性の赤血球内寄生原虫病で、主として動物に感染する。*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、人にも感染し人獣共通感染症の原因として重要である。*B. microti* による人バベシア症はアメリカ北東部では地方病として知られているが、近年世界的な感染の拡大が報告されている。日本でも、1999年に神戸で輸血により本邦初の *B. microti* の人感染例が発生した。そこで、本研究では輸血用血液や血液製剤の安全性確保と安定供給のために、*B. microti* 感染に対する血清及び遺伝子診断法の開発と標準化、血液スクリーニング法の標準化を目的とした。平成26年度は、多数の血清を検査するためのELISAおよびイムノクロマト法（ICT）の開発を目的とし、*B. microti* の純度の高い組換え蛋白質の調整、組換え蛋白質の抗原性の検討、人感染血清による組換え抗原を用いたELISAの有用性について検討した。その結果、純度と濃度が高い *B. microti* の bmn1-17 の組換え蛋白質の作製が可能となった。この組換えタンパク質と2種類の株に感染した実験動物血清を用いたウエスタンブロットにより、その抗原性が確認された。また、この抗原を用いたELISAは、ミュンヘン株に対するマウス抗体の検出が可能であった。更に、アメリカの流行地の人陽性血清中60例を用いてELISAを行ったところ、本ELISAはアメリカで得られている感染結果と非常に高い相関を示した。

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。しかし、人にも感染し、人獣共通感染症として重要で、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。人への感染は主としてダニによる刺咬によるが、アメリカでは、近年キャリアからの輸血により感染する例が増加しており、その対策が急がれている。また、本症は米国での感染拡大に加えて、中国、メキシコ、台湾、アフリカやヨーロッパ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ている。そのため、血液製剤の安全性確保や更なる人へのバベシア症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、バベシア症に対する迅速で正確な血清及び遺伝子診断法を作製し、感度・

特異性の確認と標準化、我が国および献血血液における抗体陽性状況および遺伝子陽性状況の調査開発することを目的としている。平成26年度は、ELISAおよびICTの作製を目的とし、*B. microti* の純度の高い組換え蛋白質の調整、組換え蛋白質の抗原性の検討、人感染血清による組換え抗原を用いたELISAについて検討した。

B. 研究方法

（1）ヒト血清試料

エール大学公衆衛生学部 Peter Kraus 教授より60検体のヒト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おり、非感染者血清10例、陽性血清49例、感染の有無が不明の1例を含んでいる。

（2）Bmn1-17の組換え蛋白質の産生

B. microti からDNAを抽出し、bmn1-17遺伝子をクローニングしてpGEX発現ベクターに

組み込み、GST融合蛋白質として大腸菌に発現させた。次に、この融合蛋白質を PreScission Protease で処理し、GSTを除去した。更に、限外濾過フィルターを用いることにより、バッファー交換及び蛋白質の濃縮を行なった。

(3) 組換え蛋白質の抗原性の検討

Bmn1-17組換え蛋白質を精製・濃縮後、*B. microti* グレイ株に感染したハムスターおよびミュンヘン株に感染したマウス感染血清を用いてウエスタンブロットを行い、その反応性について検討した。また、ミュンヘン株に感染したマウス血清を用いたELISAによっても、抗原性について検討した。

(4) 人血清を用いた ELISA の実施

96 穴プレートの1ウエル当たり Bmn1-17組換え蛋白質 0.2 μ gを一晩4℃でコーティングした。その後、3%スキムミルク-PBSでブロック後、100倍希釈した人血清100 μ lと37℃1時間反応させた。T-PBSで洗浄後、抗ヒト IgG 抗体で37℃1時間反応させた。T-PBSで洗浄後、DAB基質と室温で反応させ、15分後に OD₄₁₅ 値を測定した。

(倫理面への配慮)

人の血液材料を用いた実験については、帯広畜産大学、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) *B. microti* の組換え蛋白質の調整

B. microti グレイ株の遺伝子情報にもとづき、bmn1-17組換え蛋白質をGST融合蛋白質として大腸菌を用いて産生した。PreScission Protease 処理によりGSTが除去され、純度の高い組換え蛋白質が得られた。また、精製後限外濾過フィルターを用いることにより、バッファー交換と蛋白質濃度をこれまでの透析法に比べて100倍以上に濃縮する事が可能となった。

(2) 組換え蛋白質の抗原性の検討

B. microti グレイ株に感染したハムスターおよびミュンヘン株に感染したマウス血清を用いてウエスタンブロットを行った結果、目的のバンドおよびそれ以外のバンドが認められた。しかし、ミュンヘン株に感染し

たマウス血清を用いたELISAを行なったところ、0.5のOD値が認められたが、非感染マウス血清では0.1以下のOD値であった。

(3) 人感染血清によるbmn1-17組換え抗原を用いたELISAの討

エール大学より得られた60例の人血清を用いてELISA(IgG)を行い、アメリカで得られた結果と比較した。非感染者血清10例および感染記録が不明の1例は、0.2以下のOD値を示した。陽性と判定されている残りの49例中、35例が1.0以上、8例が0.5~1.0、3例が0.32~0.38のOD値を示した。また、IAFTでIgGが3.2倍以下、IgMが1.28倍と6.4倍であった2例は0.12と0.14と低いOD値を示した。以上、Bmn1-17組換え抗原を用いたELISAは、アメリカで得られている結果と高い相関を示した。

D. 考察

特異性と感度の高い血清診断法の開発には高純度・高濃度の組換え抗原が必要である。本研究では、GST融合蛋白質として大腸菌で産生されたbmn1-17組換え蛋白質をPreScission Proteaseで処理する事により、GSTを除去した。更に、限外濾過フィルターを用いることにより、バッファー交換及び従来行っていた透析法に比較して15倍以上蛋白質を濃縮する事が可能になった。Bmn1-17組換え蛋白質とマウス血清を用いてウエスタンブロットでは、目的とするバンドとそれ以外の複数のバンドが認められた。しかし、Bmn1-17組換え蛋白質を用いたELISAでは、感染と非感染のマウス血清で、大きなOD値の差が認められ、ELISA用抗原としての可能性が示唆された。

更に、アメリカの流行地で採集された人血清を用いたELISAでは、アメリカでの診断結果と高い相関が認められた。すなわち、血液塗抹標本で原虫が確認された例やIAFTにより高い抗体価を示した陽性血清では、ELISAではIgGに対する高いOD値が認められた。しかし、陽性と診断された2例については、健康者と同様0.2以下の低いOD値であった。これらの血清はIFATでIgGが3.2倍以下、IgMが1.28倍と6.4倍であり、感染初期の患者からの血清と推察される。今回のELISAは感染後期から検出されるIgGを測定した結果であり、今後感染初期に主として検

出される IgM を測定する事により、高い OD 値を示す可能性が高い事が予想される。以上の結果は、Bmn1-17 組換え蛋白質を用いた ELISA は、人のバベシア感染の診断にも有用である事が示唆された。今後、IgM を測定する ELISA を行なうとともに、ICT ストリップとその評価を行なう必要がある。

E. 結論

本研究では、多数の血清を検査するための ELISA および ICT 作製を目的として検討を行った。その結果、人バベシア感染の血清学的に診断するための純度と濃度の高い組換え抗原の産生が可能となった。また、組換え抗原を用いた ELISA は人感染血清中の抗体を検出する事が可能で、これまで得られている診断結果とほぼ一致した。今後これらの結果により、組換え抗原を用いたイムノクロマトスティックを作製し、アメリカで得られた人血清を用いて特異性や感度について検討を行う予定である。

F. 研究発表

1) 論文発表

1. Iseki H., Takemae H., Ishizaki T., Kim C., Saito-Ito A., Inokuma H., Krause P., Igarashi I. and Yokoyama N.; Development of an immunochromatographic test for rapid serodiagnosis of human babesiosis.(準備中).

2) 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし