

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* は主としてげっ歯類に感染するが、ヒトにも感染が認められ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おり、更に近年では世界的な感染の拡大が報告されている。日本でも、1999年に神戸において輸血により本邦初の *B. microti* の人感染例が認められた。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27年度は、*B. microti* の組換え Bmn1-17 蛋白質を用いたイムノクロマト法（ICT）および簡便で迅速な遺伝子増幅法である LAMP (loop-mediated isothermal amplification) 法について検討を行った。その結果、アメリカの流行地のヒト血清のうち、ELISA で高い OD 値を示した血清で陽性ラインが確認されが、ELISA で低い OD 値を示した陽性血清では陽性ラインが認められなかった。また、アメリカの流行地で得られたヒト DNA サンプルを用いた LAMP で PCR とほぼ同様の陽性結果が得られた。

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**ナンタケット**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) ヒト血液試料

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。また、P. Kraus 教授から提供を受けた16例のヒト DNA を LAMP の検討に用いた。

(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 pGEX6P2 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、得られた大腸菌を融解後、Glutathione Sepharose で溶出させ、限外濾過フィルターにより蛋白質の濃縮を行なった。

(3) 金コロイドの組換え蛋白質標識条件の検討

Bmn1-17 組換え蛋白質を精製・濃縮後、直径 30 nm の金コロイド粒子を標識するために、蛋白質濃度と pH の条件を変えて検討した。

(4) *B. microti* 遺伝子増幅用の LAMP プライマーの設計

B. microti の 18S ribosomal DNA (rDNA) 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) を設計した。また、FIP、BIP の配列を基に PCR用のプライマーも設計した。

(5) LAMP の感度の検討

B. microti の グレイ株とミュンヘン株から DNA を抽出し、3 種類の DNA 量を用いて検出感度について検討を行った。

(6) ヒト DNA を用いた PCR と LAMP の検討

B. microti 実験感染マウスモデル系を用いて、標的遺伝子の定量解析を行った。最初に、作製したプラスミドベクターを段階希釈し、コピー数を基に Real-time LAMP を行ってスタンダードカーブを作成した。次に *B. microti* をマウスに感染させ、経時的に血液を採取し、標的遺伝子の定量解析を行った。

また、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。

(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) 金コロイドの組換え蛋白質標識条件の検討

直径 30nm の金コロイド粒子を Bmn1-17 組換え蛋白質に標識する最適条件を見つけるために、蛋白質濃度が 50, 100, 200, 400, 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の組換え抗原を用意し、標識緩衝液の pH を 4, 5, 5.5, 6, 6.5, 7 と変えて検討した。その結果、蛋白質濃度が 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、標識緩衝液の pH が 6 の条件で最適な標識が認められた。

(2) ICT の試作と人血清に対する感度の検討

エール大学で陰性と判定され、ELISA でも 0.2 以下の低い OD 値を示した血清では、対照ラインに陽性バンドが認められたが、テストラインに陽性バンドは認められなかった。

方、エール大学で陽性と判定され、ELISA でも 1.0 以上高い OD 値を示し、1:1 で希釈された血清では、対照ラインおよびテストラインに陽性バンドが認められた。しかし、1:5 希釈では、陽性バンドの発色が減弱した。また、エール大学で陽性と判定されたが、ELISA でも 1.0 以下の OD 値を示した血清では、テストラインに陽性バンドが認められなかった。

(3) LAMP の感度の検討

B. microti グレイ株とミュンヘン株から 3 種類の DNA 量 (0.1, 1.0, 10 ng) を用いて LAMP を行ったところ、1.0, 10 ng では両株に増幅が認められたが、0.1 ng ではグレイ株に遺伝子増幅が認められたが、ミュンヘン株では認められなかった。

(4) ヒト DNA を用いた LAMP の検討

16 例のヒト DNA を用いて LAMP を行ったところ、7 例で遺伝子増幅が認められた。また、LAMP に用いられた 4 種類のプライマーから 2 種類を用いて PCR を行った結果、6 例で濃いバンド、1 種類で弱いバンドが認められた。この 1 例については、LAMP で増幅が認められる場合と認められない場合があった。

D. 考察

26 年度は、*B. microti* の Bmn1-17 組換え抗原は、人バベシア病の流行地であるアメリカのヒト血清を用いた ELISA の検討により、診断用抗原として有用であることが示唆された。そこで、本年度はこの組換え抗原を用いた迅速簡便血清法であるイムノクロマト法に確立について検討を行った。その結果、ELISA で高い OD 値を示したアメリカの患者血清に陽性反応が確認された。しかし、希釈倍数を高くすると陽性バンドの減弱が認められた。従って、今後使用する血清の希釈倍数について更に検討する必要がある。また、陽性とされた血清でも ELISA の OD 値が 1.0 以下の場合は、陽性バンドが認められなかった。以上の事から、今後金コロイドの大きさや標識粒子の材料に関して更に検討し、検出感度を向上させることが必要である。

また、本研究では、人バベシア症の遺伝子診断法についても検討を行った。PCR は最も用いられている遺伝子診断法であるが、高価な機器や増幅法や結果を得るまでに時間を

要するなどの難点がある。そこで、PCR と比較して、簡便で迅速に診断可能な LAMP 法について検討した。その結果、アメリカ人の患者 DNA を用いて検討した LAMP は PCR と同様の検出率を示した。しかしながら、1 例については、PCR での増幅が悪く、LAMP でも安定した増幅が得られなかった。今後、プライマー、増幅条件の改良を、より多くのヒトサンプルを用いて行い、LAMP 法の感度並びに特異性を向上させる事が重要である。

E. 結論

本研究では、迅速で簡便な血清並びに遺伝子診断法である ICT と LAMP に関して検討を行なった。その結果、組換え抗原を用いた ICTA はヒト感染血清中の抗体を検出する事が可能であったが、更なる感度の向上が必要である。また、LAMP においても PCR と同様の検出率が認められたが、実用化するためには反応条件や感度に関して更なる改良が必要である。

F. 研究発表

1 論文発表

1) Terkawi MA, Cao S, Herbas MS, Nishimura M, Li Y, Moumouni PF, Pyarokhil AH, Kondoh D, Kitamura N, Nishikawa Y, Kato K, Yokoyama N, Zhou J, Suzuki H, Igarashi I, Xuan X. 2015. Macrophages are the determinant of resistance to and outcome of nonlethal *Babesia microti* infection in mice. *Infect Immun.* 83:8-16.

2) Tuvshintulga B, Sivakumar T, Battsetseg B, Narantsatsaral SO, Enkhtaivan B, Battur B, Hayashida K, Okubo K, Ishizaki T, Inoue N, Igarashi I, Yokoyama N. 2015. The PCR detection and phylogenetic characterization of *Babesia microti* in questing ticks in Mongolia. *Parasitol Int.* 64:527-532.

2 書籍

五十嵐郁男、バベシア症、木村哲、木田宏編、人獣共通感染症（改訂3版） 医薬ジャーナル社、大阪、2016年、p430-434.

3 学会発表

なし

G . 知的財産権の出願・登録状況

なし