

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28年度は、*B. microti* の組換え Bmn1-17 蛋白質を用いた ELISA とイムノクロマト法（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60例のうち、33例が ELISA と ICT で陽性と判定され、両診断法に高い相関が認められた。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が、サンプル数が少ないため、引き続き検討中である。

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。しかし、ヒトにも感染し、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。ヒト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、近年キャリアー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、アジア、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ヒト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28年度は、*B. microti* の純度の高い組換え蛋白質を ELISA および ICT の作製を行い、アメリカのヒト血清を用いて評価を行った。

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) 組換え蛋白質を用いた ELISA と ICT の比較

Bmn1-17組換え蛋白質の ELISA を60検体のヒト血清を100倍希釈で検討を行った。また、Bmn1-17組換え蛋白質で作製した ICT ストリップを60検体のヒト血清を5倍希釈で検討した。

(3) ヒト DNA を用いた LAMP の検討

B. microti の LAMP についてプライマー、増幅条件の改良、ヒトサンプル数の増やして LAMP 法の感度並びに特異性を向上させる事を計画した。

(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、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) ヒト感染血清による bmn1-17 組換え抗原を用いた ELISA の検討

エール大学より得られた60例のヒト血清を用いて ELISA(IgG)を行った。その結果、OD 値が 0.2 以上を示した33例を陽性、OD 値が 0.2 以下の27例を陰性と判定した。アメリカの結果では、49例が陽性とされており、感度の違いが認められた。

(2) ヒト感染血清による bmn1-17 組換え抗原を用いた ICT の検討

日本のヒト感染血液を用いた ICT では、輸血によって発症した患者血清および血液を提供した不顕性感染者由来血清でバンドが認められた。エール大学より得られた60例のヒト血清では、使用可能な血清料に限りがあるため、血清5倍希釈で ICT を行った。その結果、33例のテストラインにバンドが認められ、陽性と判定された。bmn1-17 組換え抗原を用いた ELISA と ICT の結果は、個々の患者血清ですべて一致した。

(3) ヒト DNA を用いた LAMP の検討

LAMP 法の感度並びに特異性向上のため、プライマーの設計、増幅条件の検討をおこなったが、顕著な改善は認められなかった。また、ヒトサンプル数の増加もエール大学の倫理委員会への申請不備のため、実現しなかった。

D. 考察

Bmn1-17組換え蛋白質を用いたELISAのヒト血清を用いたELISAでは、アメリカで陰性と診断された結果と高い相関が認められた。しかしながら、アメリカで陽性と診断された血清で、抗体検出ができなかった例が認められた。これは、アメリカでのELISAに用いられた抗原やELISAプレートのへのコーティング量、用いるヒト血清の希釈倍数による試験法の感度の違いによるものと考えられる。

また、bmn1-17組換え蛋白質を用いたICTでもELISAと同様、33例の陽性例が検出可能であった。しかし、アメリカで得られた陽性率もりも低い結果となった。今回血清は、提供された患者血清が少量に限られていたため、5倍希釈で用いた。5倍希釈では、2倍希釈に比較して、テストラインの発色が減弱する事をマウスの血清を用いた検討で経験しており、ICTの低い感染率がヒト血清の希釈倍数に起因する可能性が考えられる。また、ICTストリップの抗原の標識粒子の材質や大きな感度に影響することが報告されており、今後これらに関する検討し、検出感度を向上させることが必要である。

マウスの感染実験例では LAMP 法の感度は PCR に比較して 10~100 倍高いことがあきらかである。しかしながら、ヒトの DNA サンプルを用いた結果は、LAMP 法の優位性は認められなかった。これは、*B. microti* DNA の 18S rDNA 配列に地域的相違が認められたため、今後改めて、プライマーの新規の設計、増幅条件の検討を行う必要性がある。

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。

G. 研究発表

1 論文発表

- 1) Munkhjargal T, Aboge GO, Ueno A, Aboulaila M, Yokoyama N, Igarashi I. 2016. Identification and characterization of profilin antigen among *Babesia* species as a common vaccine candidate against babesiosis. *Exp Parasitol.* 166:29-36.
- 2) Munkhjargal T, Ishizaki T, Guswanto A, Takemae H, Yokoyama N, Igarashi I. 2016. Molecular and biochemical characterization of methionine aminopeptidase of *Babesia bovis* as a potent drug target. *Vet Parasitol.* 221:14-23.
- 3) Munkhjargal T, Yokoyama N, Igarashi I. 2016. Recombinant methionine aminopeptidase protein of *Babesia microti*: immunobiochemical characterization as a vaccine candidate against human babesiosis. *Parasitol Res.* 15(9):3669-3676.

2 書籍

なし

3 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし