

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いるが、近年ではさらに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。その結果、*B. microti* の組換え Bmn1-17 蛋白質を用いて作製したイムノクロマト法（ICT）により、日本およびアメリカの流行地の患者血清から抗体検出が可能であった。また、PCR より簡便で迅速な遺伝子増幅法である LAMP (loop-mediated isothermal amplification) 法も、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。しかしながら、今後実用化するためには、感度および特異性をさらに改善することが必要である。

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、ヒトにも感染し、人獣共通感染症としても重要である。アメリカ北東部の沿岸地帯やナンタケット島では地方病として知られている。さらに最近では、米国では東海岸から西海岸の感染拡大、新種のバベシアの発見、ヨーロッパから中近東、モンゴル、中国や台湾などアジアなど世界的な感染地域の拡大が認められている。ヒトへの感染は主として感染ダニによる刺咬によるが、米国ではキャリアーからの輸血により感染する例が 2000年代から急激に増加しており、その対策が急がれている。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、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を開発し、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た。そのために、簡便で迅速な血清診断法のイムノクロマト法と遺伝子診断法である LAMP 法について検討を行った。

B. 研究方法

(1) 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 Pre-Scission 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った。また、*B. microti* 抗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。

(2) 組換え蛋白質を用いた ELISA の検討

96 穴プレートの 1 ウエル当たり Bmn1-17 組換え蛋白質 0.2 µg 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 µl 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。

(3) 組換え蛋白質を用いたイムノクロマト法 (ICT) の検討

Bmn1-17 組換え蛋白質を金コロイド粒子に標識するために、蛋白質濃度と pH の条件を変えて検討した。また、Bmn1-17 組換え蛋白質に対する抗体をウサギで作製した。これらの

条件に基づいて得られた金コロイド標識 Bmn1-17組換え蛋白質をサンプルパットに、抗体をニトロセルロース膜に塗布し、吸収パットと共に1枚のシートとして組み立て、カットし、ICTストリップを作製した。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ICTストリップの特異性について検討を行った。

(4) ヒト血液試料

兵庫医療大学の斎藤あつ子教授より、日本人の患者血清とDNA、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、ELISAおよびICTの検討に用いた。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。

(5) *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。*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、人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)

人の血液材料用いた実験については、帯広畜産大学、兵庫医療大学、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) LAMP の特異性と感度の検討

B. microti 18S rDNA を標的とした LAMP は、マダニが媒介する *Anaplasma*, *Ehrlichia* 形態が *B. microti* と類似し類症鑑別が必要な *Plasmodium falciparum* の DNA を用いた特異性の検討でも、バベシアのみに増幅が認められた。また、LAMP は PCR に比較して 10~100 倍程度の高い感度が認められた。しかし、*B. microti* グレイ株とミュンヘン株から3種類の DNA 量を用いて 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。

マウスの *B. microti* 実験感染では、血液塗沫上では検出することのできない感染急性期と慢性期の血液からも、real-time LAMP により感染検出が可能であった。

国内の発症者の DNA を用いた LAMP でも増幅が認められています。さらに、米国の16例のヒト患者 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。

D. 考察

イムノクロマト法 (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。この方法は頻用されているELISAと比較し、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、コスト面でも利点がある。

本研究では、輸血用血液の*B. microti* 感染の有無を評価する血清診断法として ICT の開発を試みた。ICT の作製には、*B. microti* の高純度に精製した bmn1-17 組換え蛋白質を用いた。最初に、Bmn1-17 組換え蛋白質を用いた ELISA の検討を行ったところ、*B. microti* 感染と非感染のマウス血清で、明確な OD 値の差が認められた。次に、アメリカの流行地で採集されたヒト血清を用いた 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、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。

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、結果も目視で判定することが可能である。これらの特徴は、多数の検体を短時間で検定する必要の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 LAMP 法は、ダニによって媒介される *Anaplasma*, *Ehrlichia*, 及び形態や臨床症状が類似しているため類症鑑別が必要となるマalaria 原虫 *Plasmodium falciparum* の遺伝子を増幅せず、この LAMP 法が *B. microti* に対して高い特異性を有することが明らかとなった。

更に、マウス感染モデル系を用いて、感染経過に伴う遺伝子検出の検討を行った。その

結果、血液塗抹標本による原虫検出に長時間を有する赤血球感染率が 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長期間 *B. microti* の 18S rDNA 遺伝子の増幅が認められた。また、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 10~100 倍高い感度を有していることが明らかになった。

日本の発症者の血液からも LAMP 法により *B. microti* の遺伝子増幅が確認された。しかしながら、米国のヒト患者 DNA を用いて LAMP では、半分以下の検出率であった。この原因として、*B. microti* の地域的な DNA 配列の変異が示唆される。今後、遺伝子疫学調査に基づいた地域特異的な LAMP プライマーの設計が重要と考えられる。

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 ICT はヒト感染血清中の抗体を迅速に検出可能である事が示唆された。また、新規の遺伝子診断法である LAMP 法は、実験モデルでは、特異性と感度が高かった。しかし、ヒト DNA を用いた LAMP 法は地域により感度に差が認められ、更なる検討が必要である。また、輸血による *B. microti* の感染をより確実に防止するためには、血清診断法と遺伝子診断法を組み合わせるスクリーニングする事も考慮することが重要である。

G. 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, Enkhtaiwan 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.

- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.15:3669-3676.

2. 書籍

- 1) 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

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし