

バベシア症に対する新規血清及び遺伝子学的診断法の開発に関する研究

井関 博

Development and Evaluation of Molecular and Serological Diagnostic Methods for Babesiosis

Hiroshi ISEKI

バベシアは赤血球内寄生による貧血を始めとした様々な症状を引き起こし、世界の熱帯・亜熱帯地域に広く分布しているために畜産業における経済的損失は甚だしく、また一方で公衆衛生上の問題ともなっている。しかし未だにそれらに対する有効なワクチンや治療法は乏しく、検査を行う状況に応じた適切な診断法を適用することが対策として重要である。そこで本研究では社会的に重要なヒトバベシア症及びウシバベシア症への対策の一助として、その被害の軽減のために効果的と思われる二つの異なるアプローチを新規診断法の開発を中心に行った。

ヒトバベシア症は主に *Babesia microti* を保持するマダニがヒトから吸血を行った際に感染が成立することがある。現在ヒトバベシア症の診断は間接蛍光抗体法 (IFAT) や PCR 等の幾つかの診断法を組み合わせで行われるが、特殊な機器や専門性の高い手技が必要であること等多くの問題を抱えている。そこで *B. microti* 感染症に対して、有用な血清診断法と遺伝子診断法の双方を開発することで、新しい診断法のコンビネーションを提案することを計画した。

続くウシバベシア症対策においては、新規診断法の開発に加えて免疫賦活物質の試験を行った。*B. bovis* 及び *B. bigemina* はウシに発熱や貧血を引き起こす赤血球内寄生性原虫であり、世界中で甚大な経済的損失を引き起こしている。未だ効果的な予防法や治療法が確立されていないこれらウシバベシア症に関しては、迅速な簡易診断とそれによる感染源の淘汰が被害の拡大を防ぐ最も有効な手段だと言える。そこでウシバベシアに対しては、免疫賦活剤によって自然免疫を活性化することでバベシ

アの感染が成立する個体数を減少させ、開発した新規診断法によって摘発淘汰を行うという対策を提案することとした。

1. ヒトバベシア症血清診断のための

Immunochromatographic test (ICT) の開発

ICT 作製に必要な抗原及び抗体を用意するため、*B. microti* の *bmn1-17* 遺伝子を GST 融合蛋白質として大腸菌に発現させ、得られた組換え蛋白質 (rBMN1-17) に対するウサギ抗体を精製し、ICT スティックを作製した。ハムスターを用いて感染実験を行い、継時的に血液を採取して従来から行われている血液塗沫標本のギムザ染色による観察及び IFAT、そして今回発現精製した rBMN1-17 を用いた enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) 及び ICT の検出感度を比較した。その結果、顕微鏡検査による赤血球寄生率の測定及び ELISA では実験感染 5 日目から、ICT 及び IFAT ではやや遅れて 7 日目から陽性判定が可能であった。これらの結果から rBMN1-17 を用いた検出系は簡便迅速であることに加えて、従来の診断法と同等の検出感度であることが確認された。さらに実際のヒト感染血清を用いて試験を行ったところ、抗体陽性血清においてはテストラインに明瞭なバンドが確認され、また抗体陰性血清においてはいずれも非特異反応は確認されなかったことから、ICT の今後の実用化が期待される。

2. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法を用いたヒトバベシア症遺伝子診断法の開発

前章で述べた ICT による診断法が血清中に存在するバベシアに対する抗体を検出するものであったのに対し、本研究では温度変化を必要とせずに短時間で特異的な遺伝子増幅産物を得ることができる LAMP 法を応用して血液中に存在するバベシアの遺伝子を直接検出する遺伝子診断の開発を行った。始めに *B. microti* 遺伝子を標的とした LAMP 法のプライマーをデザインし、特異性の評価として近縁原虫種等の DNA を用いて試験を行ったところ、非特異的反応は確認されなかった。次に血液から DNA を抽出する方法として従来のキットや手法を用いず、血液を加熱処理した上清を使用することによって利便性及び実用性を高めることを試みた。標的遺伝子である ribosomal DNA をプラスミドに挿入したものを段階希釈し、一定量の正常血液に混和した。これらを熱処理して上清を回収し、PCR 法を比較対照として LAMP 法の検出感度を調べたところ、LAMP 法は PCR 法よりも 100 倍高い検出感度であった。加熱抽出物を用いた方法は市販の DNA 抽出キットを用いた場合よりも検出感度は 100 倍劣るものの、本方法と LAMP 法の組み合わせが野外や設備の乏しい場所での応用において期待できる結果を示すことができた。続いてマウスを用いた感染実験を行い、経時的に採取した血液を用いて Real-time LAMP により *in vivo* 実験における検出限界を測定した。その結果、100 コピー程度の微量の標的 DNA を安定して検出することができた。最後に前章で述べた ICT と併せ、国内のヒト発症例の血液サンプルから診断が可能であることを確認した。

3. 二種のウシバベシアを同時に診断可能な Multiplex LAMP 法の開発

B. bovis 及び *B. bigemina* はウシに対して強い病原性を発揮するため、畜産衛生上特に重要なバベシアである。本研究では同時に両原虫遺伝子を検出可能な LAMP 法のマルチプレックス化 (mLAMP) について検討を行った。*B. bovis* 及び *B. bigemina* の rhoptry-associated protein 1 遺伝子から 4 つのプライマーを設計し、そのうち 2 つのプライマーの中に制限酵素の切断配列を組み込んだ。これによって制限酵素処理を行った反応物は電気泳動にてそれぞれの原虫に特異的なサイズのバンドとして確認することができた。さらに検出感度を検討するために、*in vitro* 培養で増殖させた両原虫を段階希釈して

mLAMP を行い、PCR 及び nested PCR 法を用いた結果と比較した。*B. bovis* 及び *B. bigemina* の DNA それぞれ、あるいは双方を用いた反応で、アガロース上でラダーパターンを確認した。またそれらの増幅産物を制限酵素処理することで二種類の明瞭なバンドとして集約させることに成功した。さらに mLAMP 法の検出感度は nested PCR 法と比較して *B. bovis* で 100 倍、*B. bigemina* で 10 倍高く、他原虫種との交差反応も認められなかった。以上からウシバベシア症への簡易迅速診断法として、機器の必要性や検出時間等の点から mLAMP 法の活用が強く期待される結果が得られたため、次いで野外サンプルを用いた試験を行った。ガーナ共和国のウシ及びザンビア共和国のウシ、ゼブー、インパラ、アフリカンバッファローから血液を採取し、DNA を抽出して mLAMP を行った。*B. bovis* 及び *B. bigemina* のウシにおける感染率はそれぞれ 12 及び 27% (ガーナ共和国)、13 及び 21% (ザンビア共和国) であった。また野生動物であるゼブー、インパラ、アフリカンバッファローから *B. bigemina* 遺伝子が検出され、さらにゼブーとアフリカンバッファローからは *B. bovis* 遺伝子が検出された。アフリカンバッファロー以外の野生動物からウシバベシアが検出された報告はなく、本研究によってこれらの野生動物が自然界でウシバベシアのリザーバーとなっていることを示した。さらに mLAMP 法は PCR 及び nested PCR 法に比較しても高い検出率が得られ、ウシバベシア症の疫学的研究においても mLAMP の実用性が示された。

4. *Propionibacterium acnes* の死菌投与によってマウスに誘導されるバベシア増殖抑制効果の解析

免疫賦活作用があることで知られる *Propionibacterium acnes* のバベシアに対する増殖抑制効果についてマウスモデルを用いて試験した。熱処理した *P. acnes* あるいは EqStim (市販 *P. acnes* 製剤) をマウスに接種し、2 週から 4 週間後に非致死性のマウスバベシアである *B. microti* あるいは致死性のマウスバベシアである *B. rodhaini* を感染させて観察を行った。*P. acnes* の死菌を接種してから 2 週間後に *B. microti* を接種した群では、*P. acnes* 非接種群と比較して有意な増殖抑制効果が観察された。さらに *P. acnes* の死菌接種 4 週間後に *B. microti* を接種した群では、ほとんど原虫の増殖は認められなかった。一方、*B. rodhaini* を感染させた群では、*P. acnes* 非接種群において 5 日以内に全個体が死亡したことに対し、*P. acnes* 接種群は生存率において有意差が認められ、2 匹はそのまま生存した。また EqStim 投与 3 週間

後に血清中の IL-6, IL-10, TNF- α の有意な上昇が見られ、それに引き続く実験感染後の増殖抑制効果に重要な役割を果たしていると考えられた。また *B. microti* 実験感染後においては IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α がコントロール群と比較して有意に低い値を示したことに對し、*B. rodhaini* 実験感染後においては IL-12 及び TNF- α がコントロール群と比較して有意に高い値を示した。このように両原虫実験感染後のサイトカインの動態は大きく異なっており、それぞれ全く異なる作用で増殖抑制が起こっていることが示唆された。さらに *P. acnes* による免疫賦活効果は少なくとも 4 週間持続することが示された。また *B. bovis* 及び *B. bigemina* が全く異なるメカニズムで病原性を発揮しているとしても、*P. acnes* の構成成分

がウシバベシアの増殖に対して抑制効果を発揮することが期待される。

本研究で得られたヒトバベシア症及びウシバベシア症に対する診断法開発及び免疫賦活剤のバベシア増殖抑制効果に関する知見は、これまで行われてきたバベシア症対策を刷新するものであり、これら技術の実用化によって世界的なバベシア症の被害軽減に貢献することが期待される。

岐阜大学大学院連合獣医学研究科 博士 (獣医学)

平成 21 年 3 月 13 日授与