



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Title	Development of Serodiagnostic Methods for Babesia equi Infection(内容・審査結果の要旨(Summary))
Author(s)	平田, 晴之
Report No.(Doctoral Degree)	博士(獣医学) 甲第126号
Issue Date	2003-03-13
Type	博士論文
Version	
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/2180

この資料の著作権は、各資料の著者・学協会・出版社等に帰属します。

氏名(本籍)	平田晴之(大阪府)				
学位の種類	博士(獣医)				
学位記番号	獣医博甲第126号				
学位授与年月日	平成15年3月13日				
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当				
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻				
研究指導を受けた大学	帯広畜産大学				
学位論文題目	Development of Serodiagnostic Methods for <i>Babesia equi</i> Infection (バベシア・エクイ感染症の血清診断法の開発)				
審査委員	主査	帯広畜産大学	教授	五十嵐	郁男
	副査	帯広畜産大学	教授	藤崎	幸蔵
	副査	岩手大学	教授	品川	弁汎
	副査	東京農工大学	教授	本多	英一
	副査	岐阜大学	教授	平井	克哉

論文の内容の要旨

ウマバベシア症は、ダニ媒介性の *Babesia equi* および *Babesia caballi* 原虫によるウマ属の感染症である。両原虫は熱帯、亜熱帯および温帯地域に分布し、ウマ産業界に大きな被害を与えている。現在、我が国は非汚染国であるが、汚染国からの輸入馬は増加傾向にあり、感染もしくは原虫保有馬の我が国へ侵入が危惧されている。一般的にウマバベシア感染症の検出に用いられている補体結合反応法(CFT)は感度および特異性が低いことおよび我が国には病原虫媒介能を有するダニの存在が報告されていることから、原虫保有馬が我が国に侵入すれば、これら原虫感染の流行拡大と常在化が懸念される。したがって、ウマバベシア原虫の侵入を阻止するためには、より迅速で、高感度、および特異性の高い検出法の開発が重要である。そこで、*B. equi* 診断用に有用である免疫原性の高い抗原を特定し、それを用いた新たな血清学的診断法の開発を行った。

第1章では、免疫原性の高いタンパク質をコードする *B. equi* 遺伝子の検索のため、*in vitro* で培養された *B. equi* 虫体由来の mRNA から cDNA ライブラリーを作製し、*B. equi* 感染馬血清を用いたイムノスクリーニングによって陽性を示した cDNA クローン 18 個を選択した。

18 個の cDNA のうちもっとも強い陽性反応を示した cDNA を得て Be82 遺伝子と命名した。この遺伝子を大腸菌発現ベクター pGEX-4T によって発現させたリコンビナントタンパク質 (GST/Be82) の ELISA 用抗原としての有用性を検討した。GST/Be82 タンパク質を ELISA 抗原として用いた ELISA は *B. equi* 抗体に高い特異性を示したが、*B. caballi* 感染馬血清のいくつかのサンプルで GST/Be82 タンパク質に対して交差反応が認められた。*B. caballi* 感染馬血清にする GST/Be82 タンパク質の交差反応の存否は確かではないが、GST/Be82 タンパク質は *B. caballi* 虫体タンパク質と抗原性の類似した領域が存在している可能性が示唆された。これらの結果から、GST/Be82 タンパク質は ELISA におけるカットオフ値を高く設定した場合、*B. equi* 感染馬を高感度に検出することができる有用な抗原であることが明らかとなった。

第 2 章では、GST/Be82 タンパク質の交差反応を取り除いた *B. equi* 感染馬血清に対して特異的かつ高感度に検出できる ELISA 抗原の検討を目的として、5 個の Be82 遺伝子のデリベーションクローンを作製した。さらに、リコンビナントタンパク質を作製し、それぞれ ELISA 抗原として使用した。これら 5 つの抗原のうち、Be82 全アミノ酸領域における 236 から 381 までの領域の Be82/236-381 タンパク質を ELISA 抗原として用いた ELISA は *B. caballi* 感染馬血清に対して交差反応は認められず、*B. equi* 感染馬血清に対して高感度で特異性の高い結果を示した。一方、他の 4 つのデリベーションクローン抗原は *B. equi* に対して感度の低下や非特異反応が認められた。以上の結果より、Be82 全アミノ酸領域における 236 から 381 までの領域は *B. equi* 抗体に対して特異的であり、さらに Be82/236-381 蛋白質は馬バベシア感染の検出に有用な診断用抗原であることが確認された。

第 3 章では、迅速、簡便かつ正確にウマバベシア症を検出するために新しい診断法として dipstick assay の開発を試みた。第 2 章における ELISA の結果から最も成績のよかった GST/Be82/236-381 抗原を用いて dipstick assay キットの作製を試みた。最初に GST/Be82/236-381 抗原感作金コロイド作製における最適な条件、すなわち、GST/Be82/236-381 抗原と金コロイド感作に必要な最小タンパク質量、至適 pH、最適な金コロイド粒子の大きさをそれぞれ決定した。また、決定された最適条件で dipstick assay キットを作製し、*B. equi* 実験感染馬血清、*B. caballi* 実験感染馬血清、正常馬血清を用いて ELISA との比較検討を行った。その結果、試作された dipstick assay キットは *B. equi* 実験感染馬血清に対して相対的に高い特異性と感度を示した。しかし、将来的にバベシア症診断の mass-screening のための更なる改良が必要であることが示唆された。

B. equi および *B. caballi* 感染症のため国際間で馬の自由な輸出入が妨げられている。我国は、本症に対して血清学的手法を含めた検疫の実施により感染馬の侵入を阻止している。し

かし、これらの血清学的診断方法は感度および特性に問題がある。そこで、本研究では、バベシア原虫の血清学的診断法の一つである CFT における問題点を解消するために、リコンビナントタンパク質を用いた ELISA や dipstick assay キットの開発が試みられた。これらリコンビナントタンパク質を用いた診断法は CFT のもつ欠点を解消し、さらに正確で疫学的な研究を可能にすると共に、ウマバベシア症の標準診断法となることが示唆された。

審 査 結 果 の 要 旨

馬バベシア症は、我が国では家畜法定伝染病に指定されている。現在、我が国は非汚染国であるが、汚染国からの輸入馬は増加傾向にあり、我が国に感染馬もしくは原虫保有馬が侵入するおそれがある。日本を含むいくつかの国は、これら原虫に対して血清学的手法を基礎とし感染馬の侵入を阻止している。本研究において、*B. equi* 抗体の検出のためにバベシア原虫に対して特異的な抗体を検出するための CFT における問題点を解消するために、リコンビナントタンパク質を用いた ELISA や Dipstick assay の開発を行ったものである。

まず、免疫原性の高いタンパク質をコードする *B. equi* 遺伝子を分子免疫学的手法により得て、さらに、大腸菌発現システムによって発現させたリコンビナントタンパク質(GST/Be82)は ELISA 抗原として用いた。GST/Be82 タンパク質を用いた ELISA は *B. caballi* 抗体にわずかな交差反応が認められるものの、*B. equi* 抗体に高い特異性を示した。

次いで、GST/Be82 タンパク質の *B. caballi* に対する交差反応を除去し *B. equi* 感染馬血清に対して特異的且つ、高感度に検出できる ELISA 抗原にするために、GST/Be82 タンパク質の断片化を行い、それぞれの ELISA 抗原としての評価を行った。断片化したタンパク質のうち GST/Be82/236-381 タンパク質は *B. equi* 感染馬の検出に有用な診断用抗原であることを明らかにした。

最終章では、迅速、単純で且つ正確に *B. equi* 感染馬を検出するために新しい診断法として Dipstick assay の開発を行った。GST/Be82/236-381 抗原を用いて Dipstick の最適な条件の検討を行い、最適条件での Dipstick assay と ELISA との評価を比較検討した。その結果、*B. equi* 実験感染馬血清に対して相対的に高い特異性と感度を示した。しかしながら、将来的にバベシア症の野外診断に用いるために、更なる改良が必要であることを示唆している。

以上の結果に基づいて、*B. equi* 診断用に有用で免疫原性の高い抗原 (GST/Be82/236-381) を特定し、それを用いた ELISA や Dipstick assay などの新たな血清学的診断法の開発を行った。これらの研究成果において、リコンビナントタンパク質を用いた診断法は CFT の持つ欠点を解消し、さらに正確で疫学的な研究を可能にすると共に、馬バベシア症の標準診断法となる可能性が示唆された。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分な価値のあるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

題 目 Cloning of a truncated *Babesia equi* gene encoding an 82-kilodalton protein and its potential use in an enzyme-linked immunosorbent assay
著 者 名 HIRATA, Haruyuki IKADAI, Hiromi YOKOYAMA, Naoaki XUAN, Xuenan FUJIKAKI, Kozo SUZUKI, Naoyoshi MIKAMI, Takeshi and IGARASHI, Ikuo
学術雑誌名 Journal of Clinical Microbiology
巻・号・頁・発行年 : 40 (4) : 1470 ~ 1474, 2002

題 目 Identification of a specific antigenic region of the P82 protein of *Babesia equi* and its potential use in serodiagnosis
著 者 名 HIRATA, Haruyuki XUAN, Xuenan YOKOYAMA, Naoaki NISHIKAWA, Yoshifumi FUJISAKI, Kozo SUZUKI, Naoyoshi and IGARASHI, Ikuo
学術雑誌名 Journal of Clinical Microbiology
巻・号・頁・発行年 : 41 (2) : ~ , 2003

既発表学術論文

題 目 Cellular localization of *Babesia bovis* merozoite rhoptry-associated protein 1 and its erythrocyte-binding activity
著 者 名 YOKOYAMA, Naoaki BOONCHIT, Suthisak HIRATA, Haruyuki MATSUO, Tomohide INOUE, Noboru SUGIMOTO, Chihiro and IGARASHI, Ikuo
学術雑誌名 Infection and Immunity
巻・号・頁・発行年 : 70 (10) : 5822 ~ 5826, 2002

題 目 Roles of the maltose cross form in the development of parasitemia and protection against *Babesia microti* infection in mice
著 者 名 YOKOYAMA, Naoaki BORK, Sabine NISHISAKA, Mitsuhiro HIRATA, Haruyuki MATSUO, Tomohide INOUE, Noboru XUAN, Xuenan SUZUKI, Hiroshi SUGIMOTO, Chihiro and IGARASHI Ikuo
学術雑誌名 Infection and Immunity
巻・号・頁・発行年 : 71 (1) : 411 ~ 417, 2003