

受理年月日	受理番号

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

平成 25 年 5 月 31 日

採択番号 24—共同—10			
研究部門	高度診断学分野	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	五十嵐 郁男
研究課題名	ヒトバベシア症の診断法の開発研究		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	(さいとう あつこ) 齋藤 あつ子	兵庫医療大学薬学部微生物学分野・教授	
研究分担者	(ながの もとこ) 長野 基子	兵庫医療大学薬学部微生物学分野・講師	
	(おおもり しほ) 大森 志保	兵庫医療大学薬学部微生物学分野・助教	
	(かわい あつこ) 河合 敦子	兵庫医療大学薬学部微生物学分野・研究支援者	
研究期間	平成 24 年 4 月 1 日 ~ 平成 25 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	<p>本研究においては、五十嵐郁男教授らが開発したバベシア診断法（BmSA1 を用いた抗体検出クロマトグラフィー法/ELISA 法、LAMP 法など）の実用可能性について、研究代表者らがこれまでのヒトバベシア症疫学調査で得た陽性または陰性患者血液および血清試料などを用いて、詳細な検討を行う。また、研究代表者らは、各遺伝子型原虫の主要抗原のクローニング/同定を進め、五十嵐郁男教授らのグループは、同定された抗原について、抗体または抗原検出クロマトグラフィー法や ELISA 法などへの適応可能性について検討を行う。</p> <p>本研究は、以上の研究を行うことにより、より実用性の高いヒトバベシア症の診断法の確立を目指す。</p>		
研究経過の概要	<p>1) LAMP 法の実用性の検討 研究代表者らはこれまでに、兵庫県を中心にヒトバベシア症の疫学調査を行ってきている。平成 24 年度、本共同研究では、研究代表者らがこれまでの疫学調査で得た、IFA/Immunoblot による神戸型または大津型の <i>B. microti</i> に対する抗体陽性患者 61 例および抗体陰性患者 50 例（いずれも PCR 陰性）の血液（全血）サンプルについて、五十嵐郁男教授らが開発した LAMP 法の臨床サンプルへの応用の可能性について検討した。</p> <p>2) 各遺伝子型原虫の抗体反応主要抗原の遺伝子クローニング/同定 感染動物抗体または IFA 陽性血清を用いて、神戸型（神戸株、梅山株）、大津型（鉢巻株）、大津亜型（長野株）の cDNA-expression library の作製、screening、主要抗原のクローニング、同定を順次進めている。</p> <p>3) 台湾ヒトサンプルのバベシア抗体検査 新たに入手した高雄県桃源郷を中心としたヒトサンプルを、計 490 例入手し、神戸型、大津型、合衆国型の <i>B. microti</i> に対して IFA を行い、疫学調査を進めている。[桃源郷は台湾のヒトバベシア症発生地嘉義県民雄郷周辺で、野ネズミから神戸型 <i>B. microti</i> が見出された地域の近くに位置する。]</p>		

受理年月日	受理番号

<p>研究成果の概要</p>	<p>1) LAMP 法の実用性の検討 研究代表者らが保有するバベシア抗体陽性／PCR 陰性患者 61 例、バベシア抗体陰性／PCR 陰性患者 50 例について、LAMP 法で検討した結果、それぞれ、5 例、1 例が陽性となり、LAMP 法が、PCR より感度の高い優れた抗原検出法であることが示唆された。 (平成 25 年度は、引き続き、研究代表者らが有する既存の、または、新たに入手した患者血液などについて、各遺伝子型原虫に対し陽性／陰性を示したものをを用いて、更に LAMP 法の臨床応用の可能性について検討していく予定である。)</p> <p>2) 各遺伝子型原虫の抗体反応主要抗原の遺伝子クローニング／同定 抗血清を用いたスクリーニングが可能な神戸型神戸株、神戸型梅山株、大津型鉢巻株のライブラリーを作製できた。スクリーニングの結果、神戸株からは、<i>B. microti</i> (Gray 株) の Secreted antigen 1 と約 70% の相同性を有するタンパク質 (ただし、N 末欠除) と <i>B. microti</i> (R1 株) の第 3 染色体上のタンパク質の一部と約 70% の相同タンパク質 (N 末、C 末欠除) を得た。なお、Secreted antigen 1 は、これまでに合衆国型の cDNA ライブラリーを用いたスクリーニングにより、主要抗原の候補遺伝子として報告されているタンパク質である。鉢巻株からは、<i>B. microti</i> (R1 株) 第 3 染色体の一部と約 60% の相同性を有するタンパク質 2 種 (いずれも、N 末欠除) と 80% の相同性を有するタンパク質 1 種 (N 末欠除) を得た。梅山株からは 5 種類の陽性クローンを得ており、現在解析中である。 (平成 25 年度には、五十嵐郁男教授らのグループが既に同定している抗原とともに、候補抗原が新たに同定されればそれらについても、抗体または抗原検出クロマトグラフィー法や ELISA 法などへの適応の可能性について検討を行っていきたい。)</p> <p>3) 台湾ヒトサンプルのバベシア抗体検査 台湾においては、これまで 239 例の血清について、IFA で神戸型梅山株、大津型鉢巻株、合衆国型 GI 株 <i>B. microti</i> に対する抗体の有無について x128 で screening を行い、一定の結果が出ているところである。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>1. ネズミバベシア (<i>Babesia microti</i>) の主要抗原探索を目的とした、神戸型及び大津型 <i>B. microti</i> cDNA 発現ライブラリーの作製 名賀梨沙、石井利佳、宮宇地珠世、山本千琴、水民愛、河合敦子、大森志保、長野基子、斎藤あつ子 第 68 回日本寄生虫学会西日本支部大会 2012 年 10 月 奈良</p> <p>2. <i>B. microti</i> 神戸株 (神戸型)、梅山株 (神戸型)、鉢巻株 (大津型) の cDNA 発現ライブラリーの作製とスクリーニングによる各株の主要抗原探索の試み 長野基子、大森志保、河合敦子、名賀梨沙、小野純平、西井久貴、宮宇地珠世、山本千琴、斎藤あつ子 第 82 回日本寄生虫学会大会 2013 年 3 月 東京</p>