

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

継続			
研究分野	先端予防治療学分野	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	井上 昇
研究課題名	アフリカトリパノソーマ症簡易血清診断法の開発		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	ごとう やすゆき 後藤 康之	東京大学大学院農学生命科学研究科 応用免疫学研究室・准教授・研究総括、抗原の評価、ICTの作製と評価	
研究分担者	まつもと よしつぐ 松本 芳嗣	東京大学大学院農学生命科学研究科 応用免疫学研究室・教授・血清サンプルの入手、抗原評価法の確立	
	Nguyen, Thuy	帯広畜産大学 原虫病研究センター・大学院生・ 抗原の評価、ICTの作製と評価	
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>本研究では、アフリカでヒトや家畜に対して甚大な被害を与えているアフリカトリパノソーマ症に対する簡易血清学的診断テスト (ICT) の開発を行うことを目的とした。平成23年度の帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究を通して既に診断に有用な抗原をいくつか同定しており、また複数抗原の融合蛋白を発現するコンストラクトの作製も行っていった。平成24年度はこの複数抗原の融合タンパクである Tbg46F を作製して、その血清学的診断における有用性についてトリパノソーマ感染ウシ血清を用いて検討した。次に、Tbg46F を用いた ICT を作製し、その有用性について検討を行った。</p>		
研究経過の概要	<p>平成23年度までの成果により、眠り病の原因原虫である <i>Trypanosoma brucei</i> にはアミノ酸の繰返し (Tandem Repeat: TR) を持つ蛋白が豊富であり、それら TR 蛋白が非常に高い抗原性を持ち血清学的診断に有用であることを示してきた。アフリカトリパノソーマ症と診断されたウシから採取された血清について、陰性コントロールとして日本で採取されたウシ血清を用いて陰性群 OD 値平均+3SD をカットオフ値としたところ、これら TR 抗原の多くが高い感度を有することが確認された。その中でも Tbg4 は感度 (89%)、特異性 (100%) が最も高かった。</p> <p>平成24年度は Tbg4 のさらなる改善を目指して、ヒト血清に大して高い反応性を示す Tbg6 との融合蛋白の作製を行った。図1に示す通り、大腸菌発現用ベクター pET28a の <i>NdeI/BamHI</i> サイトに Tbg4 を、<i>EcoRI/XhoI</i> サイトに Tbg6 を組み込み、6xHis tag との融合蛋白として発現し Ni-NTA を用いて精製した。</p>		

受理年月日	受理番号

研究成果の 概要	<div data-bbox="383 264 1284 347" data-label="Diagram"> </div> <div data-bbox="370 423 1505 633" data-label="Text"> <p>融合蛋白 Tbg46F の血清学的診断における有用性について、ウシ血清を用いて ELISA により検討した。2 種蛋白の mixture (Tbg4+6) は Tbg4、Tbg6 それぞれ単独と比較して感度に改善が見られたが、Tbg46F も Tbg4+6 と同様の反応を示したことから (図 2)、融合蛋白においてもコンポーネントの抗原性が維持されていることが示唆された。</p> </div> <div data-bbox="405 685 1457 981" data-label="Figure"> </div> <div data-bbox="370 1028 1505 1240" data-label="Text"> <p>次に、Tbg46F を用いて ICT プロトタイプを作製し、ELISA の場合と同じウシ血清を用いて評価を行った。しかしながら、ELISA では Tbg46F に対する反応が見られるにもかかわらず、ICT 上においては陽性反応が検出できなかった。この結果は、Tbg46F 自体の抗原性に問題があるのではなく、ICT 作製上の問題であることを示唆している。</p> </div> <div data-bbox="370 1285 1505 1583" data-label="Text"> <p>今後は抗原塗布、ブロッキング、検出系などの条件検討を行うとともに、キャリア蛋白との融合などによる抗原固相化の改善を試みる必要がある。また、Tbg46F についてもさらなる抗原性改善の余地がある。我々は既に別の TR 蛋白である GM6 が有望な抗原であることを示しているが、今後は GM6 も含めた 3 種抗原の融合蛋白を作製する予定である (実際、GM6 の挿入が出来るように Tbg4 と Tbg6 の間には BamHI/EcoRI サイトをあらかじめ用意している)。</p> </div>
	研究成果の 発表