

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 年 月 日

採択番号	25-共同-15		
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) 斎藤 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	
		帯広畜産大学原虫病研究センター・	
研究期間	平成 25 年 4 月 1 日 ~ 平成 26 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）の実用性について、研究代表者が有する試料、新たに入手した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を確立することを目的とする。</p>		
研究経過の概要	<p>1) <u>抗体検出クロマトグラフィー法およびLAMP法の実用性の検討</u> 疫学調査で、各遺伝子型原虫に対し、陽性/陰性を示した患者血清ならびに患者血液を用いて、BmSA1を用いた抗体検出クロマトグラフィー法およびLAMP法の臨床サンプルへの応用可能性について、昨年度に引き続き検討した。現在、五十嵐郁男教授らがまとめて論文作成中である。</p> <p>2) <u>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</u> 昨年度に引き続き、抗血清を用い、神戸型神戸株、神戸型梅山株、大津型鉢巻株 <i>Babesia microti</i> の cDNA-expression library を用いて、感染動物抗体またはIFAT陽性血清によるライブラリースクリーニングを行い、主要抗原候補遺伝子の同定を進め、昨年度得られた陽性クローンのうち神戸株からの1種類の陽性クローンの5'末端について遺伝子解析した。また、動物およびヒトの陽性血清を用いてimmunoblot解析を行い、遺伝子型共通主要抗原と神戸型特異的主要抗原について質量分析のアプローチによる抗原の同定を始めた。</p> <p>3) <u>台湾ヒトサンプルのバベシア抗体検査</u> ヒトバベシア症発生地である台湾の住民または外来患者の血清サンプル、計740例（高雄県334例と屏東県406例）について、神戸型、大津型、合衆国型の <i>B. microti</i> に対してIFAT（間接蛍光抗体法）による抗体検査を進めた。</p>		

受理年月日	受理番号

研究成果の概要	<p><u>1) 抗体検出クロマトグラフィー法およびLAMP法の実用性の検討</u></p> <p>平成 24 年度には、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 年度には、平成 24 年度に得られた結果について再現性などを検討し、現在それらについてまとめ、論文を作成中である。</p> <p><u>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</u></p> <p>平成 24 年度には、<i>B. microti</i> 神戸型神戸株のライブラリーの抗血清によるスクリーニングを行い、<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%の相同性を示すタンパク質をコードした遺伝子断片 (5-1-3) を得ていたが、このクローンには開始コドンが含まれていなかった。そこで、遺伝子の全長を得るため、<i>B. microti</i> 神戸株由来 cDNA を用いて 5' -race (rapid amplification of cDNA end) 法を行った。5' -race 法によって得られた遺伝子産物の塩基配列を複数解析した結果、クローン 5-1-3 の直近の上流 86bp は同一配列であったが、その上流の塩基配列が異なっているものが少なくとも 3 種類得られた。しかしながら、いずれの遺伝子産物にも開始コドンは認められなかった。これまでの結果と合わせると、<i>B. microti</i> 神戸株には、C 末端側約 490 aa が同じアミノ酸配列で、N 末端側が異なるタンパク質が存在している可能性があることになる。今後これらの遺伝子の全長を得て、いずれかが主要抗原であるのかを検討していく。なお、昨年度、神戸型梅山株のライブラリーの抗血清によるスクリーニングで得られていた陽性クローン 5 種類は、偽陽性であることがわかった。</p> <p>なお、各遺伝子型原虫に対し動物およびヒトの IFAT で高抗体価を示した血清を用いて immunoblot 解析を再度行い、遺伝子型共通の主要抗原 28、72kDa、および神戸型特異的の主要抗原は 42kDa について、現在、質量分析のアプローチによる同定を始めている。</p> <p><u>3) 台湾ヒトサンプルのバベシア抗体検査</u></p> <p>これまでに、高雄県のヒトサンプル 334 例 (桃源郷 65 例、那瑪夏郷 174 例、梓官郷 95 例) の血清について、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を IFAT で調べ、一定の結果が出ているところである。[台湾共同研究施設の了解が必要]</p>
研究成果の発表	