

氏名（国籍）	黄 曉 紅（中華人民共和国）		
学位の種類	博士（獣医）		
学位記番号	獣医博乙第63号		
学位授与年月日	平成15年9月17日		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当		
学位論文題目	Development of Immunodiagnostic Tests for Protozoan Infections (原虫感染症の免疫診断法の開発)		
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 隼 汎
	副査	東京農工大学 教授	本 多 英 一
	副査	岐 阜 大 学 教 授	福 士 秀 人

論 文 の 内 容 の 要 旨

原虫感染症において、ヒトのマラリアやリーシュマニア症などに対する免疫診断法の開発が進んでいるが、トキソプラズマやバベシアのような動物原虫感染症に対する免疫診断法の開発は遅れている。本研究では組換えタンパク質を作製し、ネコトキソプラズマ感染症とウマバベシア・エキイ感染症に対する感度と特異性が高く、迅速で簡便な免疫診断法の検討を行った。

第1章ではトキソプラズマ原虫の表面抗原 2(SAG2) を大腸菌で発現させ (G-rSAG2)、イムノプロット法でその特異性を検討したところ、トキソプラズマ原虫の感染血清に特異的反応を示したが、近縁のネオスポラ原虫の感染血清との交差反応は認められなかった。G-rSAG2 を抗原とした ELISA 法では、トキソプラズマ原虫の実験感染と非感染ネコ血清を明確に区別可能であった。日本で採集したネコ血清を本 ELISA 法と市販のラテックス凝集反応 (LAT) 法を比較した結果、有意な相関性と一致性が認められ、前者は後者より高い感度を示した。

第2章では、トキソプラズマ原虫の SAG2 を組換えバキュロウイルスを用いて昆虫細胞に発現させた (S-rSAG2)。S-rSAG2 は、イムノプロット法によりトキソプラズマ実験感染ネコ血清と特異的反応を示した。また、トキソプラズマを抗原として用いた間接蛍光抗体法で、S-rSAG2 免疫血清は G-rSAG2 免疫血清より強い反応を示した。S-rSAG2 を抗原とした ELISA 法では、トキソプラズマ原虫の実験感染と非感染ネコ血清を明確に区別した。日本で採集したネコ血清について本 ELISA 法と第1章で述べた G-rSAG2 を抗原とした ELISA 法及び市販の LAT 法を比較検討したところ、これらの3方法の間には強い相関性が認められたが、本 ELISA 法は G-rSAG2 を抗原とした ELISA 法より高い感度を示した。この結果は、S-rSAG2 抗原が G-rSAG2 抗原より天然型抗原に類似していることによるものと考

えられた。

第3章では、NとC末端の疎水性領域を除去した組換えSAG2 (G-rSAG2t)を大腸菌で発現させ、G-rSAG2tを抗原としたイムノクロマトグラフィ- (ICT)法について検討した。G-rSAG2tはG-rSAG2と比べ、その抗原性に変化は認められなかったが、発現量と発現タンパク質の可溶性が著しく改善された。G-rSAG2tを抗原としたICT法は、トキソプラズマ原虫実験感染と非感染ネコ血清についてそれぞれ明瞭な陽性反応と陰性反応を示した。野外ネコ血清について本ICT法と市販のLAT及びG-rSAG2tを抗原としたELISA法を比較検討した結果、それぞれ95.5%と96.1%の一致性が認められた。

第4章では、NとC末端の疎水性領域を除去した組換えバベシア・エキイメロゾイト抗原2 (rEMA-2t)を大腸菌に発現させ、これを抗原としたELISA法とイムノブロット法について検討した。GSTとの融合タンパク質として発現した抗原 (G-rEMA-2t)を用いたELISA法では、バベシア・エキイ実験感染ウマと非感染ウマの血清を明確に区別できた。感染後6日目から特異抗体が検出され、少なくとも感染後244日目まで認められていた。一方、GSTを除去したrEMA-2tをもちいたイムノブロット法の感度と特異性はELISAとほぼ同様であった。野外採集した血清サンプルで、両法に98.4%の一致性が認められた。

第5章では、第4章で述べたrEMA-2tを抗原としたICT法について検討したところ、バベシア・エキイ実験感染と非感染ウマの血清を明確に区別することができた。また、バベシア・エキイ実験感染ウマの経時血清では感染後4日目から特異抗体の検出が可能であった。本ICT法は、第4章で述べたELISA法とイムノブロット法とはそれぞれ96.7%と95.1%の一致性を示した。

本研究では、トキソプラズマおよびバベシア原虫の組換えタンパク質を抗原として用いた感度と特異性が高いELISA法とICT法を検討し、ネコトキソプラズマ感染症とウマバベシア・エキイ感染症に対する血清診断方法として応用できる可能性が高いことを示した。特にICT法は、感度と特異性が高い上に、迅速、簡便、安価な血清診断法として、今後他の原虫症診断への応用や野外での実用化が期待される。

審 査 結 果 の 要 旨

ネコトキソプラズマ感染症とウマバベシア・エキイ感染症はともに獣医学領域において重要な原虫感染症として知られている。前者の診断にはLAT法が、また後者の診断にはCFT或いはIFATが広く使われているが、何れの方法にも特異性と感度に課題が残されており、より精密な診断法の確立が求められている。そこで本研究において、申請者は組換えタンパク質を抗原として用いた、検出感度と特異性が高く、迅速で簡便な免疫診断法の開発を行ったものである。

まず、前半では組換え表面抗原2 (SAG2)を用いた免疫診断法の確立とネコトキソプラズマ感染症診断への応用を検討した。全長のSAG2遺伝子が大腸菌と昆虫細胞でそれぞれ発現させ、得られた組換えタンパク質を抗原としたELISA法を確立した。両方法共にトキソプラズマ感染ネコ血清と非感染ネコ血清を明確に区別することが可能であり、またLAT法より感度が高いことを示した。次に野外で実用化し易い方法として組換えSAG2を用いたICT法を確立した。ICT法は一般的に純度が高い可溶性抗原を大量に必要とされる。大腸菌と昆虫細胞で発現させた全長のSAG2は何れも収量或いは純度が不十分で、ICT抗原としては適していないことから、NとC末端の疎水性領域を持たないSAG2tの大腸菌での発現を試みたところ、高純

度の抗原が大量に得られ、ICT 法用に適した抗原作製が可能となった。組換え SAG2t を抗原とした ICT 法は、トキソプラズマ感染ネコ血清と非感染ネコ血清についてそれぞれ明瞭な陽性反応と陰性反応を示し、本法は検出感度と特異性が高く、かつ迅速で簡便なネコトキソプラズマ感染症の診断法であることを明らかにした。本 ICT 法は、トキソプラズマ感染症の診断においては初の報告である。

次に、後半では組換えメロゾイト抗原 2 (EMA-2) を用いた免疫診断法の確立とウマバベシア・エキイ感染症診断への応用を検討した。N と C 末端の疎水性領域を持たない EMA-2t を大腸菌で発現させ、得られた組換え EMA-2t を抗原とした ELISA 法と ICT 法をそれぞれ確立した。何れの方法もバベシア・エキイ感染ウマと非感染ウマの血清を明確に区別することができた。前者は、大量検体のスクリーニングに適し、また後者は野外での応用に適していることを示した。本 ICT 法は、ウマバベシア・エキイ感染症の診断においては初の報告である。

このように、本研究ではネコトキソプラズマ感染症とウマバベシア・エキイ感染症の感度と特異性が高い ELISA 法と ICT 法を確立し、従来の方法の欠点を解消出来ることを示した。特に ICT 法は、検出感度と特異性が高いだけでなく、迅速・簡便で、かつ安価な診断法として、今後野外での実用化が期待される。

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の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

- 1) 題 目: Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant SAG2 for diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in cats
著 者 名: HUANG, Xiaohong XUAN, Xuenan KIMBITA, Elikira BATTUR, Banragch MIYAZAWA, Takayuki FUKUMOTO, Shinya MISHIMA, Masayuki MAKALA, Levi SUZUKI, Hiroshi SUGIMOTO, Chihiro NAGASAWA, Hideyuki FUZISAKI, Kozo MIKAMI, Takeshi and IGARASHI, Ikuo
学術雑誌名: Journal of Parasitology
巻・号・頁・発行年: 88(4):804-807, 2002
- 2) 題 目: Characterization of *Toxoplasma gondii* SAG2 expressed in insect cells by recombinant baculovirus and evaluation of its diagnostic potential in an enzyme-linked immunosorbent assay
著 者 名: HUANG, Xiaohong XUAN, Xuenan SUZUKI, Hiroshi SUGIMOTO, Chihiro NAGASAWA, Hideyuki FUZISAKI, Kozo MIKAMI, Takeshi and IGARASHI, Ikuo
学術雑誌名: Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology
巻・号・頁・発行年: 9(6):1343-1347, 2002
- 3) 題 目: High-level expression and purification of a truncated merozoite antigen-2 of *Babesia equi* in *Escherichia coli* and its potential for immunodiagnosis
著 者 名: HUANG, Xiaohong XUAN, Xuenan YOKOYAMA, Naoaki XU, Longshan SUZUKI, Hiroshi SUGIMOTO, Chihiro NAGASAWA, Hideyuki FUZISAKI, Kozo and IGARASHI, Ikuo
学術雑誌名: Journal of Clinical Microbiology
巻・号・頁・発行年: 41(3):1147-1151, 2003

既発表学術論文

- 1) 題 目: Detection of antibodies to *Hypoderma lineatum* in cattle by Western blotting with recombinant hypodermin C antigen
著 者 名: BOLDBAATAR, Damdinsuren XUAN, Xuenan KIMBITA, Elikira, HUANG, Xiaohong IGARASHI, Ikuo BYAMBAA, Badarch BATTSETSEG, Badgar BATTUR, Banzragch BATTSETSEG, Gonchigoo BATSUKH, Zayat NAGASAWA, Hideyuki FUJISAKI, Kozo and MIKAMI, Takeshi
学術雑誌名: Veterinary Parasitology
卷・号・頁・発行年: 99(2):147-154, 2001
- 2) 題 目: Serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in cats by enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant SAG1
著 者 名: KIMBITA, Elikira XUAN, Xuenan HUANG, Xiaohong MIYAZAWA, Takayuki FUKUMOTO, Shinya MISHIMA, Masayuki SUZUKI, Hiroshi SUGIMOTO, Chihiro NAGASAWA, Hideyuki FUJISAKI, Kozo SUZUKI, Naoyoshi MIKAMI, Takeshi and IGARASHI, Ikuo
学術雑誌名: Veterinary Parasitology
卷・号・頁・発行年: 102(1-2):35-44, 2001
- 3) 題 目: Diagnosis of equine piroplasmiasis in Xinjiang province of China by the enzyme-linked immunosorbent assays using recombinant antigens
著 者 名: XUAN, Xuenan BAYN, Chahan HUANG, Xiaohong YOKOYAMA, Naoaki MAKALA, Levi IGARASHI, Ikuo FUJISAKI, Kozo MARUYAMA, Soichi SAKAI, Takeo and MIKAMI, Takeshi
学術雑誌名: Veterinary Parasitology
卷・号・頁・発行年: 108(2):179-182, 2002