

氏名(本籍)	井 関 博 (神奈川県)		
学位の種類	博士(獣医)		
学位記番号	獣医博甲第266号		
学位授与年月日	平成21年3月13日		
学位授与の要件	学位規則第3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 and Evaluation of Molecular and Serological Diagnostic Methods for Babesiosis (バベシア症に対する新規血清及び遺伝子学的診断法の開発に関する研究)		
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 猪 熊 壽
	副査	岩手大学	教授 品 川 邦 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

バベシア原虫は、マダニにより宿主に媒介され、発熱、貧血、血色素尿などの臨床症状を示すバベシア症を引き起こす。本症は、熱帯・亜熱帯地域を中心として世界的規模で畜産業に甚大な経済的被害をもたらしているばかりでなく、いくつかのバベシア原虫はヒトにも感染し、新興・再興感染症として公衆衛生学的見地からも重要である。しかし、未だに本症に対する有効なワクチンや治療法は乏しいため、感度及び特性が高く迅速・簡便な診断法を開発し、疫学情報を蓄積することによりバベシア症対策に応用することが重要である。そこで、本研究では公衆衛生学および畜産業に重要なヒトバベシア症及びウシバベシア症に対する新規血清及び遺伝子診断法の開発を中心に検討を行った。

第1章では、*Babesia microti* 感染によるヒトバベシア症に対する簡易血清診断法の開発のため、Immunochromatographic test (ICT) について検討を行った。まず、*B. microti* の *bmn1-17* 遺伝子を GST 融合蛋白質として大腸菌に発現させ、得られた組換え蛋白質に対するウサギ抗体を作製し、ICT ストリップを試作した。次に、ハムスターを用いた感染実験より得られた血清を用いて ICT の特異性及び感度について検討を行った。その結果、IFAT 及び enzyme linked immunosorbent assay と同程度の検出感度が得られた。また、ヒトの患者より得られた血清においても、陽性反応が得られた。

第2章では、*B. microti*に対する新規の遺伝子増幅法である Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法について検討を行った。*B. microti* small subunit ribosomal RNA 遺伝子に基づいてデザインしたプライマーを用いた LAMP 法では、近縁原虫種等の DNA に対する交差反応は認められず、標準 PCR 法よりも高い検出感度が得られた。また、マウス感染血液を用いたりリアルタイム LAMP 法により、定量的に微量の DNA を検出することも可能となった。更に、*B. microti* 感染血液を加熱処理して、その上清をテンプレートとして用い、DNA 抽出の簡略化も可能となった。最後に、国内のヒト発症例の血液サンプルを用いたところ、LAMP 法による遺伝子増幅が認められた。

第3章では、*B. bovis* 及び *B. bigemina* が引き起こすウシバベシア症に対する新規遺伝子診断法の開発のため、両原虫遺伝子を検出可能な LAMP 法のプライマーを作製し、さらに同時に検出可能なマルチプレックス LAMP (mLAMP) 法について検討を行った。*B. bovis* 及び *B. bigemina* の rhoptry-associated protein 1 遺伝子に制限酵素の切断配列を組み込んだプライマーを設計した。これにより、制限酵素処理を行った mLAMP 反応物を電気泳動した後、それぞれの原虫に特異的なサイズのバンドを確認することが可能であった。さらに、mLAMP 法の検出感度は nested PCR 法よりも優れており、他原虫種との交差反応も認められなかった。次いでガーナ共和国及びザンビア共和国の野外サンプルを用いた検討により、野外調査への応用できる可能性が高い事が示唆された。

第4章では、家畜バベシア症に対する新規予防法の開発を目的として、免疫賦活作用を有する *Propionibacterium acnes* のバベシアに対する増殖抑制効果について、マウスモデルを用いて検討を行った。熱処理した *P. acnes* あるいは EqStim (市販 *P. acnes* 製剤) をマウスに接種し、2週から4週間後に *B. microti* あるいは *B. rodhaini* を感染させた結果、*B. microti* の増殖及び *B. rodhaini* の生存率において、対照群と比較して有意な差が見られた。また、EqStim 投与3週間後に IL-6, IL-10, TNF- α の有意な上昇が見られ、それに引き続き実験感染後の増殖抑制効果に重要な役割を果たしていると考えられた。

以上、本研究によりヒトバベシア症に対する新たな血清及び遺伝子診断法が開発された。今後、多くの試料を用いてその有用性について検討を重ね、これらの方法が実用化される事が期待される。また、ウシバベシア症に対する簡便な新たな遺伝子診断法の開発により、野外調査への活用が期待される。更に、マウスモデルを用いた免疫賦活剤のバベシア増殖抑制効果に関する知見は、今後更なる検討を加え最終的に家畜のバベシア症の世界的な被害の軽減に貢献することが期待される。

審 査 結 果 の 要 旨

申請者の研究は、マダニによって媒介され、世界的規模で畜産業に甚大な経済的被害をもたらす、ヒトにも感染し、新興・再興感染症としても重要であるバベシア症に対する新たな診断法の開発を主目的としたものである。本論文は、バベシア症に対する Immunochromatographic test (ICT) と

Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)法および予防法に関する基礎的な検討を重ねたもので、総論、第1-4章、考察から構成されている。本論文について、平成21年1月20日に審査委員会が開催され、申請者より下記のような論文内容に関する説明が行われた後、審査員よりその内容について質疑が行われた。第1章では、*B. microti*の**bmnl-17**組換え蛋白質を用いたICTが作製され、ハムスター感染血清を用いて、ICTはIFAT及びenzyme linked immunosorbent assay(ELISA)と同程度の検出感度が得られ、さらにヒトの患者より得られた血清においても、陽性反応が得られたことを明らかにした。第2章では、*B. microti* small subunit ribosomal RNA 遺伝子に基づいたプライマーを用いたLAMP法が、近縁原虫種等のDNAに対して交差反応をせず、標準PCR法よりも高い検出感度が得られたことを明らかにした。さらに、マウス感染血液を用いたリアルタイムLAMP法により、定量的なDNAの検出、加熱処理によるDNA抽出の簡略化、ヒト患者の検出が可能である事が明らかにされた。第3章では、*B. bovis*及び*B. bigemina*感染の同時検出が可能なマルチプレックスLAMP(mLAMP)法について検討を行った。その結果、mLAMP法の検出感度はnested PCR法よりも優れており、他原虫種との交差反応も認められず、野外調査への応用できる可能性が高い事が明らかにされた。第4章では、家畜バベシア症に対する新規予防法の開発を目的として、マウスモデルを用いて免疫賦活作用を有する*Propionibacterium acnes*のバベシアに対する増殖抑制効果が検討された。熱処理した*P. acnes*あるいはEqStim(市販*P. acnes*製剤)の接種により、*B. microti*の増殖及び*B. rodhaini*の生存率において、対照群と比較して有意な差が見られた。また、EqStim投与3週間後にIL-6、IL-10、TNF- α の有意な上昇が見られた。

本論文の内容は、ヒトおよびウシバベシア症に対する新たな血清及び遺伝子診断法を提供するものであり、今後流行地における迅速で正確なバベシア症の診断に活用される事が期待される。また、マウスモデルを用いた免疫賦活剤のバベシア増殖抑制効果に関する知見は、家畜のバベシア症の予防法の開発に大きく貢献することが期待される。これらの成果は、海外の雑誌に発表あるいは投稿準備中であり、研究者としての素質及び能力は学位を与えるに足るだけの価値があると判断された。

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価値があると認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification (mLAMP) method for the simultaneous detection of bovine *Babesia* parasites

著 者 名 : Iseki, H., Alhassan, A., Ohta, N., Thekiso, M. M. O., Yokoyama, N., Inoue, N., Nambota, A., Yasuda, J. and Igarashi, I.

学術雑誌名 : Journal of Microbiological Method

巻・号・頁・発行年 : 71(3):281-287, 2007

- 2) 題 目 : *Babesia*: The protective effects of killed *Propionibacterium acnes* on the infections of two rodent *Babesia* parasites in mice

著 者 名 : Iseki, H., Takabatake, N., Ota, N., Ishigame, T., Yokoyama, N. and Igarashi, I.

学術雑誌名 : Experimental Parasitology

巻・号・頁・発行年 : 118(4):543-548, 2008

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Comparison of polymerase chain reaction methods for the detection of *Theileria equi* infection using whole blood compared with pre-extracted DNA samples as PCR templates
著 者 名 : Alhassan, A., Iseki, H., Kim, C., Yokoyama, N. and Igarashi, I.
学術雑誌名 : Tropical Animal Health and Production
巻・号・頁・発行年 : 39(5):369-374, 2007
- 2) 題 目 : Development of Taqman-based real-time PCR assays for diagnostic detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*
著 者 名 : Kim, C., Iseki, H., Herbas, M. S., Yokoyama, N., Suzuki, H., Xuan, X., Fujisaki, K. and Igarashi, I.
学術雑誌名 : American Journal of Tropical Medicine and Hygiene
巻・号・頁・発行年 : 77(5):837-841, 2007
- 3) 題 目 : Development of a rapid immunochromatographic test for simultaneous serodiagnosis of bovine babesiosis caused by *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*
著 者 名 : Kim, C., Blanco, L. B., Alhassan, A., Iseki, H., Yokoyama, N., Xuan, X. and Igarashi, I.
学術雑誌名 : American Journal of Tropical Medicine and Hygiene
巻・号・頁・発行年 : 78(1):117-121, 2008
- 4) 題 目 : Diagnostic real-time PCR assay for the quantitative detection of *Theileria equi* from equine blood samples
著 者 名 : Kim, C., Blanco, L. B., Alhassan, A., Iseki, H., Yokoyama, N., Xuan, X. and Igarashi, I.
学術雑誌名 : Veterinary Parasitology
巻・号・頁・発行年 : 151(2-4):158-163, 2008
- 5) 題 目 : Rapid identification of *Plasmodium*-carrying mosquitoes using loop-mediated isothermal amplification
著 者 名 : Aonuma, H., Suzuki, M., Iseki, H., Perera, N., Nelson, B., Igarashi, I., Yagi, T., Kanuka, H. and Fukumoto, S
学術雑誌名 : Biochemical and Biophysical Research Communications
巻・号・頁・発行年 : 376(4) : 671-676, 2008