

平成22年6月16日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2009
 課題番号：18380181
 研究課題名（和文）重要動物原虫症を一滴の血液で網羅的に診断可能なペプチドアレイの開発
 研究課題名（英文）Development of peptide array for diagnosis of important protozoan diseases using one drop of blood sample.
 研究代表者
 五十嵐 郁男（IGARASHI IKUO）
 国立大学法人帯広畜産大学・原虫病研究センター・教授
 研究者番号：80159582

研究成果の概要（和文）：

バベシア病等の原虫感染症は、世界規模で家畜に甚大な被害を与えている。現在、多くの動物が海外から日本に輸入されており、これらの動物の原虫病の日本への侵入を水際で阻止することが重要である。そこで、本研究において、一滴の血液サンプルから多数の原虫感染症を網羅的に診断できる血清診断法の開発を目的とした。その結果、組換え抗原を用いて2種類のバベシア原虫を同時に検出可能なプロテインアレイの開発に成功した。今後、他の原虫を加えることにより、多数の原虫症を一度に診断可能な新規血清診断法となる事が期待される。

研究成果の概要（英文）：

Protozoan diseases such as babesiosis cause great economical losses to animal industry world-wide. Many animals are imported from foreign countries to Japan every year, and it is important to prevent invasion of infected these animals to Japan at the edge of the water. Objective of the present study was to develop the serodiagnostic test that was able to diagnose protozoan diseases with one drop of the blood sample. The protein array using recombinant antigens were successfully established to detect two bovine *Babesia* species at the same time. By adding other protozoan antigens, novel serological diagnostics will be established for diagnosis of many protozoan diseases at a time in the future.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	4,200,000	0	4,200,000
2007年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2008年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2009年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
総計	15,300,000	3,330,000	18,630,000

研究分野：原虫病診断学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、応用獣医学

キーワード：重要原虫病、網羅的、診断、ペプチド(プロテイン)アレイ、血清、少量試料

1. 研究開始当初の背景

ピロプラズマ病、トキソプラズマ病、ネオスポーラ病、クリプトスポリジウム病などの原虫感染症は、世界規模で家畜の生産性を著

しく低下させ、甚大な経済的被害を与えている。しかし、現在のところ有効なワクチンや治療薬はないのが現状である。一方で、多くの家畜動物、畜産物、野生動物等が海外から

日本に輸入されており、それに伴う海外病原体の侵入が懸念されている。海外原虫感染症が、一旦日本国内に侵入してしまうと、動物の安全だけでなく人々の食の安全・安心までも脅かされると考えられる。

我が国では年間約2万5千頭の生体牛や約3千頭の馬等が、海外から輸入されている。動物検疫所では、全ての家畜の悪性伝染病の潜伏期間を考慮した係留期間を設け、一般的な臨床検査を実施するとともに、必要に応じて法定伝染病や海外悪性伝染病に該当する病原体に対する血清診断や遺伝子診断が行われている。しかし、実際は家畜のほか、家禽、ペット、野生動物等も輸入されており、これらの動物数十種類の原虫病に対する万全な監視体制を整えることが急務となっている。

2. 研究の目的

現在日本では、ウマバベシア原虫とウシタイレリア原虫など6種類が法定伝染病に、トキソプラズマ原虫やトリパノソーマ原虫など8種類が届出伝染病に指定されているが、これらの原虫症を摘発あるいは鑑別する現行の診断法は、個々の病原体に対して行われている。それら診断法は時間や技術の習得を必要とし、膨大な検査対象を処理する必要があることから診断法の煩雑性の改善が課題となっている。このような状況を踏まえ、高い感度と特異性を持ち、かつ極微量なサンプルでも診断可能なペプチドあるいはプロテインアレイを開発し、これらの重要原虫感染症を網羅的かつ容易に検出できる新たな血清診断法の確立を目的とした。

3. 研究の方法

家畜の重要原虫病を網羅的に検出可能な血清診断法を開発することを目的とし、以下の手順で実施した。

- (1) 各種原虫の主要抗原エピトープの解析
- (2) 各種主要抗原のペプチド合成
- (3) 各種主要抗原の感染血清を用いた合成ペプチドの抗原特異部位の決定
- (4) 試作ペプチドアレイの作製と抗体の最適反応条件の検討
- (5) 試作ペプチドチップの野外試験およびその総合評価
- (6) 本法の導入による原虫症に対する万全な監視体制の確立

4. 研究成果

- (1) 各種原虫の主要抗原エピトープの解析
ウシバベシア原虫、ネオスポーラ、トキソプラズマ原虫のこれまで報告されている抗原の中から、これまでELISAにより特異性、感度が高い診断用の抗原として優れ

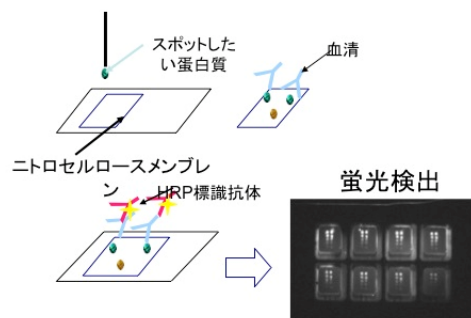
ている抗原を検討した。その結果、ウシバベシア原虫 *B. bovis*, *B. bigemina* では両方とも RAP-1 抗原、*Toxoplasma* では、SAG2 抗原、*Neospora* では SAG 1 抗原が選択された。

(2) 主要抗原のペプチド合成及び解析

最初に *B. bovis* の RAP-1 抗原について、それぞれ 10 アミノ酸残基を 5 アミノ酸残基ずつずらしながらペプチドを合成した。次に得られた合成ペプチドをセルロース膜に塗布したセルロース膜に感染血清および陰性血清を反応させ、抗原性の高い部位を検索した。しかしながら非特異的反応が高く、抗原性の高い部位の特定には至らなかった。また他の原虫のペプチド合成を用いた結果も同様であった。

(3) プロテインアレイの至適条件の検討

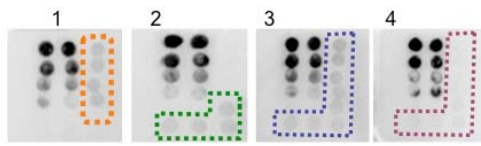
B. bovis と *B. bigemina* RAP-1/CT 蛋白質を、Fast スライド上のウェルに固着し、乾燥させた。その後、Fast スライドに固着した診断抗原の濃度、標識抗体の希釈濃度、ブロッキングに要した時間等の至適条件について検討した。その結果、抗原濃度が 200 μ g/ml、血清試料の希釈液は 0.0005% Triton x-100-PBS、標識 2 次血清は 6,000 倍が至適条件であった。



(4) プロテインアレイの特異性

B. bovis 実験感染血清、*B. bigemina* 実験感染血清あるいは非感染ウシ血清を 200 倍に希釈し、標識抗ウシ IgG 抗体を 6,000 倍に希釈して蛍光検出を行った。その結果、*B. bovis* の実験感染ウシ血清を加えたウェルにおいて、*B. bovis* 組換え RAP-1/CT 蛋白質を固着させた場所の蛍光が明瞭に確認され、*B. bigemina* の実験感染ウシ血清を加えたウェルでは、*B. bigemina* 組換え RAP-1/CT 蛋白質を固着させた場所の蛍光が明瞭に観察された。また、*B. bovis* 実験感染血清と *B. bigemina* 実験感染血清を混合させ加えたウェルでは、*B. bovis* 及び *B. bigemina* 組換え RAP-1/CT 蛋白質を固着した 8 つの場所の蛍光が明瞭に確認された。非感染ウシ血清を加えたウェルでは、*B. bovis* と *B. bigemina*

組換え RAP-1/CT 蛋白質の蛍光は確認されなかった。以上結果、*B. bovis* および *B. bigemina* 抗原を用いたプロテインアレイは特異性が高い事が示された。

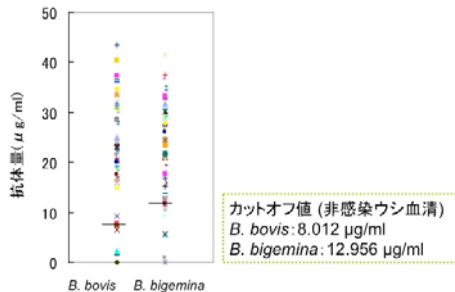


1: *B. bovis* 実験感染血清
2: *B. bigemina* 実験感染血清
3: *B. bovis* 及び *B. bigemina* 混合血清
4: 非感染ウシ血清

(5) 野外のウシ血清サンプルを用いたプロテインアレイの特異性及び検出感度

最初に、非感染ウシ血清 20 検体を用いてカットオフ値を算出した結果、*B. bovis* と *B. bigemina* それぞれ、 $8.012 \mu\text{g/ml}$ 、 $12.956 \mu\text{g/ml}$ となった。解析ソフトを用いて蛍光度算出を行ったウシ IgG の発光量をもとに、プロテインアレイによる標準曲線を作成し、野外のウシ血清サンプル中の抗体量を算出した。

次に、野外のウシ血清サンプルを用いて、ELISA とプロテインアレイの比較検証を行った。53 検体の抗体量を算出し、カットオフ値を用いて陽性と陰性に判別した結果、プロテインアレイを用いた野外サンプルの *B.*



bovis あるいは *B. bigemina* のスポットの抗体量が陽性を示した検体数はそれぞれ 53 検体中 46 検体 (86.8%) 及び 53 検体中 43 検体 (81.1%) であった。

一方、ELISA による野外サンプルの陽性検体数は *B. bovis* では 44 検体が陽性を示し、*B. bigemina* においては、39 検体が陽性を示した。プロテインアレイと ELISA の陽性検体の一致率は *B. bovis* において 95.7% (44/46)、*B. bigemina* においては 90.7% (39/43) と高い一致率を示した。

(6) まとめ

本研究において、*B. bovis* 及び *B. bigemina* の組換え抗原を用いたプロテインアレイは *B. bovis* 及び *B. bigemina* の 2 種類の感染症を特異的に検出可能である事が示された。また、野外のウシ血清サンプルを

用いた実験では、プロテインアレイによる *B. bovis* 及び *B. bigemina* の抗体陽性率は ELISA の結果とほぼ同程度であった。従って、今回開発したプロテインアレイは、他の原虫原虫の組換え抗原を加えた系を開発する事で、1 動物個体の持っている複数の原虫に対する特異抗体の有無を一度に診断できる可能性を持つ有用な新規血清診断法となる事が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 5 件)

- Hikosaka K, Watanabe YI, Tsuji N, Kita K, Kishine H, Arisue N, Palacpac NM, Kawazu SI, Sawai H, Horii T, Igarashi I, Tanabe K. 2010. Divergence of the mitochondrial genome structure in the apicomplexan parasites, *Babesia* and *Theileria*. Mol Biol Evol. 27(5):1107-1116. 査読有り。
- Aboulaila M, Sivakumar T, Yokoyama N, Igarashi I. 2010. Inhibitory effect of terpene nerolidol on the growth of *Babesia* parasites. Parasitol Int. 59:278-282. 査読有り。
- Iseki H, Zhou L, Kim C, Inpankaew T, Sununta C, Yokoyama N, Xuan X, Jittapalpong S, Igarashi I. 2010. Seroprevalence of *Babesia* infections of dairy cows in northern Thailand. Vet. Parasitol. 170:193-196. 査読有り。
- Aboulaila M, Yokoyama N, Igarashi I. 2010. Development and evaluation of a nested PCR based on spherical body protein 2 gene for the diagnosis of *Babesia bovis* infection. Vet Parasitol. 169(1-2):45-50. 査読有り。
- Aboulaila M, Yokoyama N, Igarashi I. 2010. Inhibitory effects of (-)-Epigallocatechin-3-gallate from green tea on the growth of *Babesia* parasites. Parasitology. 37 (5):785-791. 査読有り。
- Altangerel K, Alhassan A, Iseki H, Sivakumar T, Boldbaatar D, Yokoyama N, Igarashi I. 2009. Evaluation of *Babesia bigemina* 200 kDa recombinant antigen in enzyme-linked immunosorbent assay. Parasitol Res. 105(1):249-254. 査読有り。
- Ota N, Mizuno D, Kuboki N, Igarashi I, Nakamura Y, Yamashina H, Hanzaike T, Fujii K, Onoe S, Hata H, Kondo S, Matsui S, Koga M, Matsumoto K, Inokuma H, Yokoyama N. 2009. Epidemiological survey of *Theileria orientalis* infection in grazing cattle in the eastern part of Hokkaido, Japan. J Vet Med Sci. 71(7):937-944. 査読有り。
- Takabatake N, Iseki H, Ikehara Y, Kanuka H,

- Yokoyama N, Sekimizu K, Igarashi I. 2009. Isolation and pathogenic characterization of an OB1 variant of *Babesia rodhaini* which has a glycoprotein A-independent pathway to murine red blood cells. *Vet Parasitol.* 159(2):97-104. 査読有り。
9. Burenbaatar B, Bakheit MA, Plutzer J, Suzuki N, Igarashi I, Ongerth J, Karanis P. 2008. Prevalence and genotyping of *Cryptosporidium* species from farm animals in Mongolia. *Parasitol Res.* 102(5):901-905. 査読有り。
 10. Iseki H, Takabatake N, Ota N, Ishigame T, Yokoyama N, Igarashi I. 2008. *Babesia*: The protective effects of killed *Propionibacterium acnes* on the infections of two rodent *Babesia* parasites in mice. *Exp Parasitol.* 118(4):543-548. 査読有り。
 11. Kim CM, Blanco LB, Alhassan A, Iseki H, Yokoyama N, Xuan X, Igarashi I. 2008. Diagnostic real-time PCR assay for the quantitative detection of *Theileria equi* from equine blood samples. *Vet Parasitol.* 151(2-4):158-163. 査読有り。
 12. Kim CM, Blanco LB, Alhassan A, Iseki H, Yokoyama N, Xuan X, Igarashi I. 2008. Development of a rapid immunochromatographic test for simultaneous serodiagnosis of bovine babesioses caused by *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *Am J Trop Med Hyg.* 78:117-121. 査読有り。
 13. Alhassan A, Thekisoe OM, Yokoyama N, Inoue N, Motloang MY, Mbatia PA, Yin H, Katayama Y, Anzai T, Sugimoto C, Igarashi I. 2007. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for diagnosis of equine piroplasmiasis. *Vet Parasitol.* 143:155-160. 査読有り。
 14. Iseki H, Alhassan A, Ohta N, Thekisoe OM, Yokoyama N, Inoue N, Nambota A, Yasuda J, Igarashi I. 2007. Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification (mLAMP) method for the simultaneous detection of bovine *Babesia* parasites. *J Microbiol Methods.* 71:281-287. 査読有り。
 15. Bork S, Yokoyama N, Hashiba S, Nakamura K, Takabatake N, Okamura M, Ikehara Y, Igarashi I. 2007. Asexual growth of *Babesia bovis* is inhibited by specific sulfated glycoconjugates. *J Parasitol.* 93(6):1501-154. 査読有り。
 16. Takabatake N, Okamura M, Yokoyama N, Ikehara Y, Akimitsu N, Arimitsu N, Hamamoto H, Sekimizu K, Suzuki H, Igarashi I. 2007. Glycophorin A-knockout mice, which lost sialoglycoproteins from the red blood cell membrane, are resistant to lethal infection of *Babesia rodhaini*. *Vet Parasitol.*, 148:93-101. 査読有り。
 17. Aboge GO, Jia H, Terkawi MA, Goo Y, Kuriki K, Nishikawa Y, Igarashi I, Suzuki H, Xuan X. 2007. A novel 57-kDa merozoite protein of *Babesia gibsoni* is a prospective antigen for diagnosis and serosurvey of canine babesiosis by enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet Parasitol.*, 149:85-94. 査読有り。
 18. Okubo K, Yokoyama N, Govind Y, Alhassan A, Igarashi I. 2007. *Babesia bovis*: Effects of cysteine protease inhibitors on in vitro growth. *Exp Parasitol.* 117:214-217. 査読有り。
 19. Takabatake N, Okamura M, Yokoyama N, Okubo K, Ikehara Y, Igarashi I. 2007. Involvement of a host erythrocyte sialic acid content in *Babesia bovis* infection. *J Vet Med Sci.* 69:999-1004. 査読有り。
 20. Kim C, Iseki H, Herbas MS, Yokoyama N, Suzuki H, Xuan X, Fujisaki K, Igarashi I. 2007. Development of Taqman-Based Real-Time PCR Assays for Diagnostic Detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *Am J Trop Med Hyg.* 77:837-841. 査読有り。
 21. Kim C, Alhassan A, Verdida RA, Yokoyama N, Xuan X, Fujisaki K, Kawazu S, Igarashi I. 2007. Development of two immunochromatographic tests for the serodiagnosis of bovine babesiosis. *Vet Parasitol.* 148:137-143. 査読有り。
 22. Thekisoe OM, Kuboki N, Nambota A, Fujisaki K, Sugimoto C, Igarashi I, Yasuda J, Inoue N. 2007. Species-specific loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for diagnosis of trypanosomiasis. *Acta Trop.*, 102:182-189. 査読有り。
 23. Alhassan A, Iseki H, Kim C, Yokoyama N, Igarashi I. 2007. 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. *Trop Anim Health Prod.* 39:369-374. 査読有り。
 24. Alhassan A, Govind Y, Tam NT, Thekisoe OM, Yokoyama N, Inoue N, Igarashi I. 2007. Comparative evaluation of the sensitivity of LAMP, PCR and in vitro culture methods for the diagnosis of equine piroplasmiasis. *Parasitol Res.* 100:1165-1168. 査読有り。
 25. Huang X, Xuan X, Verdida R A, Zhang S, Yokoyama N, Xu L, Igarashi I. An Immunochromatographic Test for the Simultaneous Serodiagnosis of *Babesia caballi* and *B. equi* Infections in Horses. *Clin Vaccine Immunol.* 13:553-555. 2006. 査読有り。
 26. Huang X, Xuan X, Yokoyama N, Katayama Y, Anzai T, Igarashi I. 2006. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays with

recombinant antigens for the serodiagnosis of equine *Babesia* infections. *Vet. Parasitol.* 140:158-161. 査読有り。

27. Boonchit S, Alhassan A, Chan B, Xuan X, Yokoyama N, Ooshiro M, Goff WL, Waghela SD, Wagner G, Igarashi I. Expression of C-terminal truncated and full-length *Babesia bigemina* rhoptry-associated protein 1 and their potential use in enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet. Parasitol.* 137:28-35. 2006. 査読有り。

〔学会発表〕(計35件)

1. Terkawi M Alaa, Sensu J, AbouLaila M, 横山直明, 玄学南, 五十嵐郁男. Molecular characterization of a new spherical body protein of *Babesia bovis* and evaluation its potential use for serodiagnosis. 第149回日本獣医学会学術集会。平成22年3月26-28日、武蔵野市
2. 横山直明他9名。北海道十勝・日高管内における生息マダニの小型ピロプラズマの保有調査。第148回日本獣医学会, 平成21年9月25-27日、鳥取市。
3. Iseki Hiroshi 他4名。Development of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid diagnosis of *Babesia microti* infection. XXII Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, 平成21年8月8-13日, カルガリー。
4. 井関博, C. Kim, 齋藤あつ子, 箕田友香, 猪熊壽, 横山直明, 五十嵐郁男。ヒトバベシアの症の簡易迅速診断法の開発。第147回日本獣医学会学術集会、平成21年4月2日~4日、栃木県総合文化センター。
5. Abou-Laila M., 横山直明, 五十嵐郁男。Inhibitory effect of (-) Epigallocatechin 3 gallate from green tea on the growth of *Babesia* parasites. 第78回日本寄生虫学会大会、平成21年3月27日~28日、東京。
6. 周麗佳, 井関博, Tawin Inpankaew, 横山直明, 玄学南, Sathaporn Jittapalpong, 五十嵐郁男。タイにおけるウシバベシア症の疫学調査。第146回日本獣医学会学術集会、平成20年9月24日~26日、シーガイア(宮崎県)。
7. Application of the immunochromatographic test (ICT) for the diagnosis of tick borne-disease. 五十嵐郁男ほか7名, VI International Conference on ticks and tick-borne pathogens, 平成20年9月21-26日, ブエノスアイレス。
8. 彦坂健児ほか5名。ピロプラズマ類原虫及びマラリア原虫ミトコンドリアのゲノム

構造。第77回日本寄生虫学会, 平成20年4月3-4日、長崎市。

9. 横山直明, C. Kim, L. Blanco, A. Alhassan, 玄学南, 五十嵐郁男。Diagnostic real-time PCR assay for the quantitative detection of *Theileria equi* from equine blood samples. 第145回日本獣医学会学術集会、平成20年3月28日~30日、麻布大学キャンパス。
10. 五十嵐郁男他6名。Development of a Multiplex Loop-Mediated Isothermal Amplification (mLAMP) Method for Rapid Detection of Bovine *Babesia* parasites. The 2nd Thailand-Japan Joint Forum on Infectious Diseases. 平成19年10月8日。バンコック。
11. C. Kim ほか4名。Development of real-time PCR assays for detection of *B. bovis* and *Babesia bigemina*. 第143回日本獣医学会, 平成19年4月3-5日、つくば。
12. 井関博ほか5名。ウシバベシア症の簡易迅速診断法を目的とした mLAMP (Multiplex Loop-mediated isothermal amplification)法の確立。第76回日本寄生虫学会, 平成19年3月29-30日、吹田市。
13. C. Kim ほか5名。Development of immunochromatographic test for serodiagnosis of bovine babesiosis. 第142回日本獣医学会, 平成18年9月22-24日、山口。
14. Alhassan ほか11名。Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for diagnosis of equine piroplasmiasis. A. 第11回世界寄生虫学会、平成18年8月6-11日、グラスゴー。
15. A cysteine protease inhibitor (cystatin) from *Haemaphysalis longicornis* is involved in tick innate immunity. J. Zhou 他4名、第75回日本寄生虫学会、平成18年5月19-20日、弘前。

〔図書〕(計2件)

- ①小野憲一郎他編、講談社、イラストでみる猫の病気、2008年(9版)、128-129。
- ②長谷川篤彦監訳、インターズー、犬・猫の感染症と寄生虫病、2007年、293-297、303-309、310-312、313-314、315-318、328-332、333-337。

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.obihiro.ac.jp/~protozoa/index.html>

国際獣疫事務局（OIE）の馬ピロプラズマ病
と牛バベシア病のレファレンスラボラトリー
に認定（平成19年5月）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

五十嵐 郁男 (IGARASHI IKUO)
帯広畜産大学・原虫病研究センター・教授
研究者番号：80159582

(2) 研究分担者（2006～2008）

玄 学南 (XUAN XUENAN)
帯広畜産大学・原虫病研究センター・教授
研究者番号：10292096

中村 一哉 (NAKAMURA KAZUYA)
国立感染症研究所・ウイルス研究室・研究員
研究者番号：00400078

(3) 連携研究者（2009）

玄 学南 (XUAN XUENAN)
帯広畜産大学・原虫病研究センター・教授
研究者番号：10292096

(4) 研究協力者

① 井関 博 (ISEKI HIROHI)
動物衛生研究所・ウイルス病研究
チーム・研究員

② 玉城 志保 (TAMAKI SHIHO)
帯広畜産大学・畜産学科4年