



我国及び周辺アジア諸国におけるヒトバベシア症発生状況調査と地域特有のバベシア原虫の性状の比較解析（第四報）平成23年度 地域における疾病並びに医療等に関する研究調査

斎藤, あつ子

(Citation)

神戸大学医学部神緑会学術誌, 28:17-20

(Issue Date)

2012-08

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.24546/81006783>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/81006783>



平成23年度 地域における疾病並びに医療等に関する研究調査

我国及び周辺アジア諸国におけるヒトバベシア症発生状況調査と地域特有のバベシア原虫の性状の比較解析（第四報）

兵庫医療大学薬学部微生物学分野

斎 藤 あつ子（昭和57年卒）

はじめに

胞子虫綱，ピロプラズマ目，バベシア属の原虫である「バベシア」は，同じピロプラズマ目，タイレリア属の原虫「タイレリア」とともに，マダニ媒介性の赤血球内寄生原虫である。「バベシア」は多くの家畜動物，野生動物に宿主種特有の寄生種があり，宿主特異性が高い寄生原虫であると信じられている。蚊によって媒介される赤血球内寄生原虫であるマラリア原虫と異なり，ヒトを自然宿主とする種はなく，ヒトへの感染は起こらないと考えられていた。ところが，近年，バベシアのヒト感染例が報告されるようになり，人獣共通感染症として注目されるようになった。ただし，人獣共通感染を起こすのは，ウシ寄生種の *Babesia divergens* またはその近縁種，ネズミ寄生種の *Babesia microti* および，偶蹄動物を自然宿主とする *Babesia duncani* とその近縁種（いわゆる WA1, CA1）にはほぼ限られる。健康人に発症するヒトバベシア症のほとんどは *B. microti* によるものである¹⁾。*B. microti* は世界各地の野ネズミに寄生が確認されているが，*B. microti* によるヒトバベシア症は，ほぼ，合衆国東海岸沿岸地域中西部地域に流行地が限局していた。ところが，1994年に，台湾で，台湾土着の野ネズミに寄生する *B. microti* がヒトに感染したと思われる症例が見つかった。私達は1999年，神戸で我国初のヒトバベシア症患者を確認した。患者は *B. microti* に不顕性感染していた淡路島居住の献血者からの輸血血液を介して感染し，発症したものであった。病原原虫は，合衆国流行地の *B. microti*（合衆国型）とは small subunit ribosomal RNA（SSUrRNA）遺伝子型（SSUrDNA 型）も血清型も異なり，我国の野ネズミに寄生する土着の *B. microti*（神戸型）であることが示された¹⁾。その後，アジアでは，中国，インド，韓国などから，散発的にヒトバベシア症患者が報告されている。中国，インドの患者の病原原虫は *B. microti* である可能性がある。一方，韓国の症例の病原原虫は，*B. divergens* に近縁の原虫であることが示されて

いる。

これまでの私達の調査から，我国の野ネズミには少なくとも4種類の SSUrDNA 型（神戸型，大津型，長野型，合衆国型）の *B. microti* が寄生していることが示された。神戸型が淡路島とごく限られた地域の *Apodemus* 属のネズミに寄生しているのに対し，大津型は北海道～本州～四国～九州までの広い範囲で，*Apodemus* 属を含む種々の野ネズミおよびジネズミにも寄生が確認されている。また，これまでに，合衆国型 *B. microti* が北海道の *Apodemus* 属や *Clethrionomys* 属の野ネズミから，長野型の *B. microti* が長野県のヤチネズミ（*Eothenomys andersoni*）から確認されている²⁾。さらに，台湾，中国のヒトバベシア症例発生地域周辺の野ネズミ（*Rattus coxinga* や *Niviventer confucianus* など）にも，神戸型 *B. microti* の寄生を認めた。この結果から，神戸型 *B. microti* がアジアのヒトバベシア症発生に関与していることが示唆された³⁾。なお，台湾，中国の野ネズミ由来の神戸型 *B. microti* は internal transcribed spacer（ITS）1-5.8S rDNA-ITS2の塩基配列が，互いには数塩基違いであったが，我国由来の神戸型 *B. microti* とは数十塩基異なった³⁾。

平成22年度から平成23年度の研究

平成22年度には，台湾のヒトバベシア症発生地周辺地域における住民または外来患者の血清疫学調査に先立ち，我国のヒトバベシア症第一例患者由来の神戸型 *B. microti* である“Kobe strain”と台湾のヒトバベシア症発生地周辺の野ネズミ由来の神戸型 *B. microti* である“Meishan strain”について，その抗原性を中心に比較検討した。“Kobe strain”と“Meishan strain”感染 ICR マウス血清の，“Kobe strain”および“Meishan strain”の原虫抗原（SCID mice で調整）に対する間接蛍光抗体法（IFAT）および Immunoblot の結果より，互いにある程度の抗原交差反応性があることがわかった。しかし，いず

れもホモ抗原に対する IFAT titers はヘテロ抗原に対する IFAT titers の 2 ～ 8 倍で、SPD (specificity difference) が 4 以上のため、血清型は異なると判断された。また、Immunoblot では、主要抗原の数やサイズも異なることが示された。

この結果を受け、平成23年度は、これまでに IFAT による抗バベシア抗体価の測定が終了している神戸大学附属病院および淡路島の外来患者血清について、Immunoblot で、反応抗原について詳細に解析した。さらに、台湾中部～南部の住民または外来患者から収集した血清については、IFAT で、抗体価の測定を開始した。その際、神戸型原虫に対する抗体価の測定には、“Kobe strain” の代わりに、“Meishan strain” を用いた。本稿では、主に平成23年度に、ヒト血清を用いて行った検討について、これまでに得られた結果をまとめて報告する。

材料と方法

兵庫県のヒトバベシア症疫学調査では、2000年に神戸大学附属病院にてインフォームドコンセントの下に収集した血清973例、淡路島で、寄生虫感染の疫学調査のために集められ連結不可能匿名化した外来患者血清300例が用いられた。今回は兵庫医療大学倫理委員会の許可を得て、これらの血清のうち、いずれかの株に x128 以上の抗体価を示したものを中心に調べた。

台湾の疫学調査については、台湾高雄医学大学附属病院内科学講座の余明隆教授らと共同で、本学および台湾高雄医学大学の倫理委員会の許可を得て、血清ならびに EDTA 加全血が収集された。台湾では、嘉義県でヒトバベシア症患者が発生している。また、南投県、高雄県の野ネズミに神戸型の *B. microti* が確認されている。そこで、本疫学調査では、2008年～2010年に、野ネズミに *B. microti* が確認された地点の周辺地域を含め、高雄県と屏東県で、インフォームドコンセントの下、計740例の住民または外来患者の血清および EDTA 加全血を収集した。今回はそのうち、138例の血清について IFAT を行った。

“Kobe strain” (神戸型)、“Meishan strain” (神戸型)、“Otsu strain” (大津型)、“Hachimaki strain” (大津型) は、神戸型 *B. microti* に感染していた日本の第一症例患者の血液、神戸型 *B. microti* に感染していた台湾の野ネズミ (*R. coxinga*) の血液、大津型 *B. microti* に感染していた大津市および六甲山の *Apodemus speciosus* の血液を Syrian hamster に腹腔内接種し、SCID mice にて継代し、確立した。合衆

国型株としては“GI strain” (Dr T.N. Mather より贈与) と“N/A strain” (ATCC No.30222) を用いた。陽性コントロールの感染血清は、それぞれの株を、ICR mice に接種し、感染後 1 ヶ月以上経過した慢性期のものを用いた。

各バベシア原虫株の IFAT 用抗原スライドは、SCID mice を各原虫株に感染させ、心腔採血で得た感染血液 (30 ～ 50% の赤血球感染率) を、PBS で洗浄後、50% FCS (fetal calf serum) 入り PBS で、懸濁し、スライドガラスに薄層塗抹し、アセトン固定し準備した⁴⁾。

各バベシア原虫株の粗抗原は、心腔採血で得た感染血液 (30 ～ 50% の赤血球感染率) から白血球をフィルター除去後、サポニン処理溶血を行い、遠心し、沈殿したバベシア原虫を、PBS で洗浄後、SDS 入りホモジネートバッファー内で超音波処理した。

結果と考察

< IFAT >

兵庫県下 (神戸大学附属病院および淡路島) の血清、計1273例 (神戸大学附属病院973例；淡路島300例) については、“Kobe strain” (神戸型)、“Otsu strain” (大津型) いずれかに128倍以上の抗体価を示すものが計109例 [8.6%] (神戸大学附属病院86例；淡路島23例) あった。そのうち“Kobe strain” に128倍以上の抗体価を示した血清は22例 (神戸大学附属病院12例；淡路島10例) あり、“Otsu strain” に128倍以上の抗体価を示したのは98例 (神戸大学附属病院83例；淡路島15例) あった。しかし、両遺伝子型株に同程度の高抗体価を示す血清には、SLE 患者などが多く含まれていることがわかり、偽陽性が強く疑われた。そこで、このような血清を除くため、一方の遺伝子型に対する抗体価が他方の型に対する抗体価の 8 倍以上の高い抗体価を示す血清の数を調べた。いずれかに128倍以上の抗体価を示すもののうち、神戸型に対する抗体価が大津型に対する抗体価より 8 倍以上高かった (神戸型に特異的に高い抗体価を示した) 血清は計 9 例 [0.7%] (神戸大学附属病院 2 例 [0.2%]；淡路島 7 例 [2.3%])、大津型に対する抗体価が神戸型に対する抗体価より 8 倍以上高かった (大津型に特異的に高い抗体価を示した) 血清は計78例 [6.1%] (神戸大学附属病院70例 [7.2%]；淡路島 8 例 [2.7%]) であった。この結果は、兵庫県本土では、大津型の *B. microti* しか野ネズミに寄生が確認されていないのに対し、淡路島では、神戸型と大津型の *B. microti* が野ネズミ

に寄生している事実とうまく符合した。

一方、台湾の高雄県の血清の一部138例に関して、128倍の血清を用いて、“Meishan strain”（神戸型），“Hachimaki strain”（大津型），“GI strain”（合衆国型）について、IFAT screeningを行った。いずれかの遺伝子型株に128倍で陽性を示した血清は40例 [29%] で、神戸型、大津型、合衆国型に対してそれぞれ19例 [14%]、23例 [17%]、6例 [4%] であった。そのうち、一つの遺伝子型にのみ128倍で陽性を示した血清は、それぞれ14例 [10%]、16例 [12%]、2例 [1%] であった。この結果から、台湾でも、神戸型、大津型に対して高い抗体価を示すヒト（患者または住民）がかなり高率に存在すると推定された。しかし、これまでに台湾の野ネズミには大津型原虫の寄生は確認されておらず、今後の検討課題である。

< Immunoblot >

今回、兵庫県下の血清のうち IFAT で神戸型、大津型のいずれかに128倍以上の抗体価を示す血清109例のう

ち108例について Immunoblot 解析を行うことができた。

我国第一例患者、感染源となった献血者、および“Kobe strain”感染 ICR マウスいずれの血清も“Kobe strain”の約42kD 抗原を最も強く認識する。そこで、“Kobe strain”に128倍以上の抗体価を示した血清22例中、“Kobe strain”に対する抗体価が“Otsu strain”に対する抗体価の8倍以上であった血清9例 [0.7%] にしぼってみると、うち6例 [0.5%]（神戸大学附属病院2例 [0.2%]；淡路島4例 [1.3%]）が“Kobe strain”の約42kD の抗原と反応した。一方、“Otsu strain”感染 ICR マウス血清は“Otsu strain”の約35kD の抗原を強く認識する。そこで、同様に、“Otsu strain”に128倍以上の抗体価を示した血清98例 [7.7%] 中、“Otsu strain”に対する抗体価が“Kobe strain”に対する抗体価の8倍以上であった血清78例 [6.1%] についてみたところ、44例 [3.5%]（神戸大学附属病院40例 [4.1%]；淡路島4例 [1.3%]）が、“Otsu strain”の約35kD の抗原に反応した（Table 1）。

Table 1 Results of IFAT and Immunoblot for sera in Hyogo

Sera with titers $\geq$ x128 against Kobe strain										
IFA titers against Kobe strain	Total no. of sera [%]			Sera with titers $\geq$ 8 times the titers against Otsu strain						
				Total no. of sera [%]			No. of sera with 42-kD antigen [%]			
	Hyogo	Kobe Hosp.	Awaji	Hyogo	Kobe Hosp.	Awaji	Hyogo	Kobe Hosp.	Awaji	
$\geq$ x128	22 [1.7]	12 [1.2]	10 [3.3]	9 [0.7]	2 [0.2]	7 [2.3]	6 [0.5]	2 [0.2]	4 [1.3]	
x16384	2	2	0	0	0	0	0	0	0	
x8192	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
x4096	1	0	1	1	0	1	1	0	1	
x2048	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
x1024	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
x512	2	1	1	1	0	1	0	0	0	
x256	7	3	4	1	0	1	0	0	0	
x128	10	6	4	6	2	4	5	2	3	
<x128	1251	961	290	-	-	-	-	-	-	
Total	1273	973	300	-	-	-	-	-	-	

Sera with titers $\geq$ x128 against Otsu strain										
IFA titers against Otsu strain	Total no. of sera [%]			Sera with titers $\geq$ 8 times the titers against Kobe strain						
				Total no. of sera [%]			No. of sera with 35-kD antigen [%]			
	Hyogo	Kobe Hosp.	Awaji	Hyogo	Kobe Hosp.	Awaji	Hyogo	Kobe Hosp.	Awaji	
$\geq$ x128	98 [7.7]	83 [8.5]	15 [5]	78 [6.1]	70 [7.2]	8 [2.7]	44 [3.5]	40 [4.1]	4 [1.3]	
x65536	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
x32768	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
x16384	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
x8192	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
x4096	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
x2048	2	2	0	2	2	0	2	2	0	
x1024	6	5	1	5	4	1	4	3	1	
x512	12	12	0	12	12	0	12	12	0	
x256	30	26	4	24	21	3	20	18	2	
x128	46	36	10	35	31	4	6	5	1	
<x128	1175	890	285	-	-	-	-	-	-	
Total	1273	973	300	-	-	-	-	-	-	

少なくとも，“Kobe strain”の約42kDの抗原，“Otsu strain”の約35kDの抗原に反応する血清は、真の陽性であると言っても良いと思われる。即ち、これらの抗原をクローニングし、遺伝子型特異的な抗体検出検査ならびに抗原検出検査に応用できる可能性がある。ただし，“Kobe strain”に特異的に高い抗体価を示した血清、または，“Otsu strain”に特異的に高い抗体価を示した血清の中で，“Kobe strain”の約42kDの抗原，“Otsu strain”の約35kDに反応しない血清があることに留意しておく必要がある。

今後の展望

台湾の疫学調査においては、IFATをさらに進めて、一方の株に対して特異的に高い抗体価を示す血清がどの程度あるかを明らかにしていきたい。また、immunoblotで、このような血清が反応する抗原について解析を進める予定である。さらに、高抗体価を示した例については、EDTA加全血を用い、PCRを行い、血液採取時の*B. microti*感染の有無についても検討する。

また、私達は、これまでに、本助成事業の中で、4種類の遺伝子型を区別して検出できるreal-time PCRを開発した^{5),6)}。また、帯広畜産大学五十嵐郁男教授らとの共同研究でnovel secreted antigen 1がELISA法やimmunochromatography法に利用できることを示した⁷⁾。平成23年度の検討により，“Kobe strain”の42kDの抗原、および“Otsu strain”の35kDの抗原を利用して、遺伝子型別に*B. microti*の抗体または抗原を検出できる新しい診断法の開発につながる可能性が示唆された。そこで、私達は“Kobe strain”および“Otsu strain”のcDNAライブラリーを作製した。今後、これらの抗原のクローニングを進めていく予定である。

謝 辞

本研究は兵庫医療大学薬学部微生物学分野大森志保助教、河合敦子研究員、台湾高雄医学大学附属病院内科科学講座の余明隆教授らとの共同で行われ、台湾の血清のIFATは兵庫医療大学薬学部の6年次園田直也君（微生物学分野研究研修生）が河合敦子研究員の指導の下、主に解析を行ったものである。

本研究の実施にあたっては、多くの関係の方々からご支援ご協力をいただきました。深謝してここに表します。また、最後になりましたが、本研究に助成して下さいました神緑会の皆様に心よりお礼申し上げます。

文 献

1. ネズミと人のバベシア症（特集 マダニが媒介する小動物と人の共通感染症） 斎藤あつ子，大森志保，河合敦子 獣医畜産新報 62（12），987-992, 2009
2. Survey of *Babesia microti* infection in field rodents in Japan: Records of the Kobe-type in new foci and findings of a new type related to the Otsu-type.
Saito-Ito, A., Kasahara, M., Kasai, M., Dantrakool, A., Kawai, A., Fujita, H., Yano, Y., Kawabata, H., Takada, N.
Microbiol. Immunol. 51（1），15-24, 2007
3. Detection of Kobe-type *Babesia microti* associated with Japanese human babesiosis in field rodents in central Taiwan and southeastern mainland China.
Saito-Ito, A., Takada, N., Ishiguro, F., Fujita, H., Yano, Y., Ma, X.-Y., Chen, E.-R.
Parasitol. 135（6），691-699, 2008
4. 間接蛍光抗体法による人獣共通感染症病原体 *Babesia microti* の抗体検査
斎藤あつ子，河合敦子 寄生虫学研究：材料と方法 三恵社 編集者：宇賀昭二，丸山治彦 in press
5. Development of real-time PCR assay for differential detection and quantification for multiple *Babesia microti*-genotypes.
Ohmori, S., Kawai, A., Takada, N., Saito-Ito, A.
Parasitol. Int. 60（4），403-409, 2011
6. 遺伝子型特異的 *Babesia microti* の Real-Time PCR 法による絶対的定量法
大森志保，斎藤あつ子 寄生虫学研究：材料と方法 三恵社 編集者：宇賀昭二，丸山治彦 in press
7. Identification and characterization of a novel secreted antigen 1 of *Babesia microti* and evaluation of its potential use in enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic test.
Luo, Y., Jia, H., Terkawi, M.A., Goo, Y.K., Kawano, S., Ooka, H., Li, Y., Yu, L., Cao, S., Yamagishi, J., Fujisaki, K., Nishikawa, Y., Saito-Ito, A., Igarashi, I., Xuan, X.
Parasitol. Int. 60（2），119-125, 2011