

学 位 論 文 題 名

Immunological analysis of *Babesia equi* piroplasm proteins and development of polymerase chain reaction based assay for the diagnosis of equine piroplasmosis

(*Babesia equi* ピロプラズム蛋白質の免疫学的解析と DNA 診断の開発)

学位論文内容の要旨

Babesia equi ならびに *B. caballi* は Apicomplexa 門に属する赤血球内寄生性の原虫であり、ウマに貧血・発熱を主徴とする疾病を引き起こす。*B. equi* と *B. caballi* はともにダニにより媒介され、熱帯・亜熱帯のほとんどの地域で流行が見られる。ベクターとなる多種のダニが世界中に広く分布するために、馬ピロプラズマ症は大きな問題となっている。従来から用いられている血液塗抹標本検索法ならびに補体結合 (CF) 反応では *B. equi* と *B. caballi* の感染の識別は困難であり、また血液塗抹標本検索においては低寄生率の慢性感染馬の診断が困難である。そこで、より確実な血清学的診断法を開発するため、*B. equi* ならびに *B. caballi* ピロプラズムの主要表面蛋白質の生化学的および免疫化学的解析を行うとともに、遺伝子増幅法 (PCR) を用いた DNA 診断についても検討し、以下の結果を得た。

1. 二次元電気泳動によって *B. equi* ピロプラズムの主要な蛋白質の分子量は 18、28、30、41、43、54、66.5 および 96 キロダルトン (kDa) であることが示された。
2. *B. equi* ピロプラズムの 15、18、28、30、41 および 96 kDa の 6 種の主要抗原が Western blotting により実験感染馬の血清と反応した。
3. Triton X-114 相分離法により、*B. equi* ピロプラズムの分子量 18、28 および 30 kDa の蛋白質は膜結合型であることが示された。
4. *B. equi* の p28 および p30 の N 末端のアミノ酸配列は *Theileria sergenti* の p32 と相同性が高く、これら 2 種の類縁性が示唆された。
5. *B. equi* の p28 ならびに p30 の合成ペプチドに対する抗血清は、ウマの 2 種のバベシア (*B. equi* および *B. caballi*) の鑑別診断に有効であった。

6. *B. equi*ピロプラズムに対して作出された3つの単クローン抗体(MoAbs)は *B. equi* のp18と同一エピトープを認識することが競合酵素抗体法(競合ELISA)により示された。
7. MoAbsを用いたtwo-site ELISAの結果が陰性であったことから、*B. equi*のp18には反復するエピトープが存在しないことが示された。
8. *B. equi*のp18に対するMoAbsは、*B. caballi*ならびにウマ赤血球膜蛋白質とは交差反応が認められなかったことから、二種の原虫の混合感染による馬ピロプラズマ症の鑑別診断に有用であることが明らかになった。
9. *B. equi* のp37の塩基配列に特異的なプライマーを用いたPCRによって、アメリカ、南アフリカ、ロシアおよび中国の *B. equi*のgenomic DNAのサンプルから約935 bpのフラグメントが増幅された。
10. 同じプライマーを用いたPCRによって *T. sergenti* のChitose株ならびにIkeda株 genomic DNAから、1,353 bpのフラグメントが増幅され、*B. equi*と *T. sergenti* のこれらの株との間に遺伝子構造の類似が示唆された。
11. 本PCR法では他種のバベシア(*B. bovis*, *B. bigemina*および*B. ovata*)あるいはタイリア(*T. parva*, *T. annulata*および*T. buffeli*)原虫DNAからの増幅が認められなかった。また、*B. caballi* DNAからの増幅も認められず、*B. equi*に対するプライマーの特異性の高さが示された。
12. 本PCR法では鋳型として精製された *B. equi* DNAの10 pgから増幅が認められた。
13. PCRと血清学的検査を組み合わせることにより、0.001%の寄生率のウマの血液からも *B. equi* DNAを増幅することが可能となり、より正確な馬ピロプラズマ症の診断が可能となった。

以上の結果、*B. equi*のp28ならびにp30の合成ペプチドに対する抗血清を用いたWestern blottingおよびMoAbsを用いたELISAによる免疫学的方法に加えて、PCRを用いたDNA診断法が、*B. equi*単独感染あるいは*B. caballi*との混合感染による馬ピロプラズマ症感染馬から *B. equi* を検出する方法として有用であることが示された。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	小 沼	操
副 査	教 授	神 谷	正 男
副 査	教 授	前 出	吉 光
副 査	助教授	杉 本	千 尋

学 位 論 文 題 名

Immunological analysis of *Babesia equi* piroplasm proteins and development of polymerase chain reaction based assay for the diagnosis of equine piroplasmosis

(*Babesia equi* ピロプラズム蛋白質の免疫学的解析と DNA 診断の開発)

*Babesia equi*ならびに*B. caballi*は、ウマに貧血・発熱を主徴とする疾病を引き起こす赤血球内寄生性の原虫である。本研究では、血清学的診断法を開発するため、*B. equi*ならびに*B. caballi*ピロプラズムの主要表面蛋白質の生化学的および免疫化学的解析を行うとともに、遺伝子増幅法 (PCR) を用いたDNA診断について検討した。

*B. equi*ピロプラズムの蛋白質は二次元電気泳動によって分子量は18~96キロダルトン(kDa)に分布し、そのうち15~96kDaの6種の主要抗原がWestern blottingにより実験感染馬の血清と反応した。このうち分子量18、28および30kDaの蛋白質は膜結合型であり、p28ならびにp30の合成ペプチドに対する抗血清は、ウマの2種のバベシア原虫の鑑別診断に有効であった。

次に、*B. equi*ピロプラズムp18に対する3つの単クローン抗体(MoAbs)を作出した。本MoAbsは、*B. equi*に特異的であることからウマピロプラズマ症の鑑別診断に有用であることが明らかとなった。

最後に*B. equi*のp37の塩基配列に特異的なプライマーを用いたPCR法を開発した。本法により、アメリカ、南アフリカ、ロシア、および中国の*B. equi*のgenomic DNAのサンプルから約935bpのフラグメントが増幅されたが、*B. caballi* DNAの増幅は認められなかった。PCRと血清学的検査を組み合わせることにより、*B. equi*診断の特異性を向上させることができ、0.001%の赤血球寄生率のウマも陽性として摘発することが可能となった。

本研究は*B. equi*の免疫学的ならびにDNA診断法の確立について述べたものであり、ウマピロプラズマ症の診断・防疫に貴重な知見を提供するものである。よって審査員一同はシュジャ アリ ソン オブ サイヤド マズハル フセイン シャ氏が博士（獣医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。