

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤 (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. 研究計画の概要

本研究は一滴の血液サンプルから動物の原虫感染症を網羅的に診断できるペプチド(プロテイン)プロテインアレイを開発することを最終目的とし、以下の手順で実施する。

- (1) 牛に感染し得る主要病原原虫の診断用抗原の発現精成、
- (2) ウシ実験感染血清を用いた試作プロテインアレイの最適反応条件の検討、
- (3) 試作プロテインアレイによる野外検体の調査及びその総合評価、
- (4) 本法の導入による原虫感染症に対する万全な監視体制の確立。

2. 研究の進捗状況

(1) 牛に感染し得る主要病原原虫の診断用抗原の発現精成については、19年度までに *Babesia bovis* 及び *Babesia bigemina* の RAP-1 抗原、*Toxoplasma gondii* の SAG2 抗原、*Neospora caninum* の SAG1 抗原、*Cryptosporidium parvum* の p23 抗原の発現精成を完了した。

(2) ウシ実験感染血清を用いた試作プロテインアレイの最適反応条件の検討を重点的に行ってきた。20年度までに、下記の試験行程が確立された。

- ①スライドガラスに専用スポッターを用いて標的抗原を一定量固着
 - ②感染血清反応後に二次抗体として HRP 標識抗ウシイムノグロブリン抗体を反応
 - ③化学発光(ケミルミネッセンス)によりイメージアナライザーで検出
- 更に、スライド上に抗ウシ IgG 抗体の 10

倍希釈系列のスポット列を作成し、陽性コントロール血清及び陰性コントロール血清の蛍光発光レベルを数値化することに成功した。*Babesia bovis* 及び *Babesia bigemina* についてはコントロール血清の 10 倍希釈系列を作成して既存の ELISA とプロテインアレイによる検出感度を比較したところ、いずれもプロテインアレイはより高い感度を示し、フィールドサンプルを用いた比較試験において期待できる結果をえることができた。

3. 現在までの達成度

おおむね順調に進展している。

重要原虫の診断用抗原の発現精製が確立された。また、牛の複数の原虫病を同時に検出可能な診断系が確立され、今後の他の動物の原虫病に応用する可能性が高いことが示唆されている。

4. 今後の研究の推進方策

同様の試験を他 3 種の原虫においても行い、最終年度である平成 21 年度前期に 3) 試作プロテインアレイによる野外検体の調査及びその総合評価に移る。後期には論文の作成と学会発表の準備を進めつつ、ウマやブタといった他の動物由来血清を用いた応用の可能性について検討していく。

5. 代表的な研究成果

(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 48 件)

1. Altangerel K, Alhassan A, Iseki H, Sivakumar T, Boldbaatar D, Yokoyama N, Igarashi I. Evaluation of *Babesia bigemina* 200 kDa recombinant antigen in enzyme-linked immunosorbent assay. Parasitol Res. 査読有り、in press, 2009.
2. Kim CM, Blanco LB, Alhassan A, Iseki H, Yokoyama N, Xuan X, Igarashi I. Development of a rapid immunochromatographic test for simultaneous serodiagnosis of bovine babesioses caused by *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. Am J Trop Med Hyg. 査読有り、78:117-121. 2008.
3. Alhassan A, Thekisoe OM, Yokoyama N, Inoue N, Motloang MY, Mbatia PA, Yin H, Katayama Y, Anzai T, Sugimoto C, Igarashi I. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for diagnosis of equine piroplasmiasis. Vet Parasitol. 査読有り、143:155-160. 2007.
4. 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. 査読有り、13:553-555. 2006.
5. 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. 査読有り、137:28-35. 2006.

[学会発表] (計30件)

1. 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。
2. Abou-Laila M., 横山直明、五十嵐郁男。Inhibitory effect of (-)Epigallocatechin gallate from green tea on the growth of

Babesia parasites. 第78回日本獣医学会大会、平成21年3月27日～28日、法政大学市ヶ谷キャンパス外濠校舎。

3. Abou-Laila M, T. Sivakumar, N. Yokoyama, and I. Igarashi. Growth inhibitory effect of terpene nerolidol against *Babesia* parasites. 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)。
4. 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)。
5. 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。

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]