

機関番号：10101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20688014

研究課題名(和文) イヌバベシア症の病態解析を通じた抗赤血球抗体による溶血メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanisms of hemolysis caused by anti-erythrocyte antibodies in the pathological condition of canine babesiosis.

研究代表者

山崎 真大 (YAMASAKI MASAHIRO)

北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授

研究者番号：40322846

研究成果の概要(和文)：イヌバベシア症において、イヌ血清中に抗イヌ heat shock protein 70 (hsp70)抗体が産生されることが明らかになった。これはバベシア原虫の hsp70 とイヌ hsp70 の構造がよく似ているために引き起こされることが示唆された。イヌ hsp70 は赤血球膜にも存在するため、抗イヌ hsp70 抗体は抗赤血球抗体の一種であることが疑われたが、イヌ hsp70 は赤血球膜の表面には存在せず、この抗体は赤血球膜を傷害しないことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In canine babesiosis, antibodies that reacted with canine heat shock protein 70 (hsp70) were detected in dog sera. Because hsp70 from Babesia parasites showed high homology with canine hsp70, anti-Babesia parasite hsp70 antibody might cross-react with canine hsp70. Since canine hsp70 was expressed in canine erythrocytes, it was possible that anti-hsp70 antibodies in dog sera would be anti-erythrocyte membrane antibodies; however, canine hsp70 was not found on the membrane surface of erythrocytes, suggesting that erythrocytes would not be targets of anti-hsp70 antibody.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
総計	8,000,000	2,400,000	10,400,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・臨床獣医学

キーワード：イヌバベシア症、抗赤血球抗体、heat shock protein 70、バベシア原虫、貧血

1. 研究開始当初の背景

(1) イヌバベシア症はイヌを宿主とする *Babesia gibsoni* がダニによる媒介を受けてイヌに感染することで発症する。本症の主訴は発熱や溶血性貧血であるが、感染犬血清中に赤血球に対する自己抗体が存在することで溶血性貧血が引き起こされると考えられている。しかしながら、この抗赤血球抗体の標的となる赤血球膜抗原は明らかになっていない。

(2) *B. gibsoni* とイヌの heat shock protein 70 (hsp70) のクローニングに成功し、組み換えタンパク質を作成した。これらを用いて解析を行ったところ、イヌバベシア症罹患犬血清中にはこれら *B. gibsoni* とイヌ両方の hsp70 に対する抗体が存在することが明らかになってきていた。このことから、この抗体はイヌバベシア症における抗赤血球抗体の一種ではないかと考えられた。

(3) 一部の赤血球において、赤血球膜表面に

hsp70が存在することが観察されたことから、このような赤血球が抗 hsp70 抗体の標的になることが疑われた。しかし、膜に hsp70 を発現している赤血球の数は少なく、*B. gibsoni* の寄生により赤血球膜に変化が起ることが考えられた。

2. 研究の目的

(1) 以上の背景より、*B. gibsoni* の感染により赤血球膜に変化や修飾がおこり、抗 hsp70 抗体の標的となることが考えられた。そこでまず、*B. gibsoni* の感染による赤血球膜の変化について分析を行うことを目的とした。

(2) さらに、*B. gibsoni* の感染による赤血球膜の変化がなぜ引き起こされるかを明らかにすることを目的とした。

(3) 最後に、抗 hsp70 抗体がイヌバベシア症において溶血の原因あるいは悪化因子となっているかどうかを検討した。

3. 研究の方法

(1) *B. gibsoni* 感染犬血清の採取

B. gibsoni 慢性感染犬 2 頭、急性感染犬 5 頭を、感染犬血清を得るために使用した。採血は感染前と感染後におこない、血液から血清を分離し、使用するまで -30°C で保存した。

(2) 抗 BgHsp70 抗体の作成

抗 *B. gibsoni* hsp70 (BgHsp70) 抗体を作成するためにウサギ 2 頭を使用した。作成した組み換え BgHsp70 タンパク質をウサギに免疫し、抗 BgHsp70 抗体を作成した。この抗体はアフィニティ精製を行い、単離して使用することにした。

(3) *B. gibsoni* の培養

B. gibsoni 感染血液を得るために、培養 *B. gibsoni* を用いた。*B. gibsoni* の培養は、以前研究代表者らが確立した *B. gibsoni* の培養方法を用いて行った。*B. gibsoni* は RPMI-1640 と正常イヌ血清を 8:2 の割合で混合した原虫培養液を用いて、ヘマトクリット値 5% に調整した赤血球浮遊液中で培養を行った。培養は 90%N₂、5%O₂、5%CO₂ の通気下で行い、24 時間毎に培養上清の 60% を新鮮なものに入れ替えた。7 日毎に、新鮮な赤血球を同量加えて継代培養を行った。

(4) immunoblot analysis

組み換え BgHsp70 タンパク質あるいは組み換えイヌ hsp70 (cHsp70) タンパク質を試料として電気泳動し、これをニトロセルロース膜に転写して immunoblot analysis を行った。一次抗体には(1)で用意した感染犬血清を用いて、二次抗体には抗イヌ IgG 抗体を用いた。immunoblot analysis の結果をデンストメーターを用いて解析を行い、感染前と感染後で抗 BgHsp70 抗体および抗 cHsp70 抗体の量を比較した。

(5) 間接蛍光抗体法(IFA)

培養 *B. gibsoni* の塗抹標本を MAS コートされたスライドガラス上に作成し、赤血球膜表面の抗原のみを検出する目的で固定を行わず、間接蛍光抗体法に用いた。一次抗体として、市販のマウス抗ヒト hsp70 抗体あるいは(2)で作成した抗 BgHsp70 抗体を使用し、二次抗体には抗マウス IgG 抗体および抗ウサギ IgG 抗体を使用した。二次抗体は FITC が結合しており、加えて原虫の核を蛍光色素の hoechst 33342 を用いて染色し、染色後は蛍光顕微鏡を用いて観察を行った。

(6) 抗 BgHsp70 抗体による赤血球の傷害の観察

培養 *B. gibsoni* 感染赤血球および非感染赤血球をそれぞれ 1.2 mg/mL の抗 BgHsp70 抗体を含む原虫培養液中で 1 時間インキュベーションを行い、溶血の指標として培養上清中のヘモグロビン濃度を測定した。

4. 研究成果

(1) *B. gibsoni* 感染前後での抗体量の変化

慢性感染犬および急性感染犬の血清中に存在する抗 BgHsp70 抗体および抗 cHsp70 抗体を Immunoblot analysis を用いて検出し、その量をデンストメーターにより比較した。

図 1 は慢性感染犬 2 頭の血清を解析した結果である。A は組み換え BgHsp70 を、B は組み換え cHsp70 を、C は無関係な組み換えタンパク質として GST を試料として用いた結果である。レーン 1、2 はイヌ 1、レーン 3、4 はイヌ 2 の血清であり、レーン 1、3 は感染前、レーン 2、4 は感染後の血清の解析結果である。慢性感染犬では、感染後に抗 BgHsp70 抗体 (矢印) および抗 cHsp70 抗体 (矢頭) の量が増加していた。他方、慢性感染犬血清中には GST を認識する抗体は存在しなかった(C)。

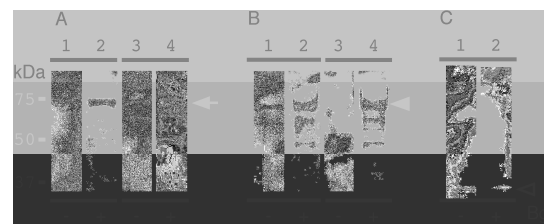


図 1

図 2 は急性感染犬 5 頭の血清を解析した結果である。A は組み換え BgHsp70 を、B は組み換え cHsp70 を試料として用いた結果である。レーン 1、2 はイヌ 3、レーン 3、4 はイヌ 4、レーン 5、6 はイヌ 5、レーン 7、8 はイヌ 6、およびレーン 9、10 はイヌ 7 の血清であり、レーン 1、3、5、7、9 は感染前、レーン 2、4、6、8、10 は感染後の血清の解析結果である。急性感染犬でも、感染後に抗 BgHsp70 抗体 (矢印) および抗 cHsp70 抗体

(矢頭)の量が増加していた。

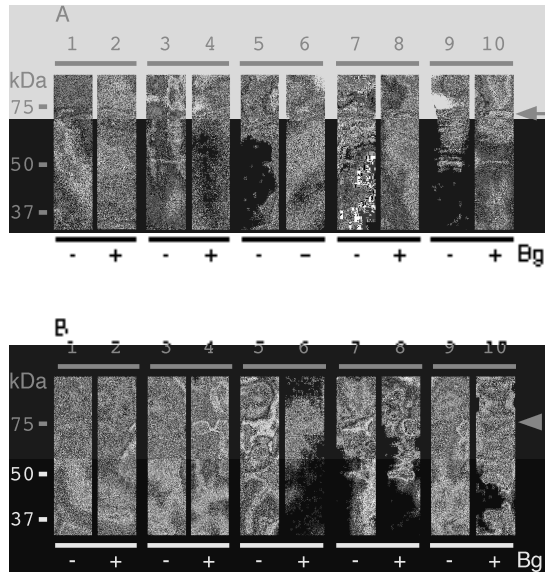


図 2

以上の immunoblot analysis の結果をデンストメトリーにより分析したところ、*B. gibsoni* 感染後血清に含まれる抗 BgHsp70 量はバンドの強度で表すと $80,651,492.7 \pm 39,145,582.3$ であり、感染前 ($12,124,832.6 \pm 11,893,468.4$) よりも明らかに ($P < 0.001$) 増加していた。また、抗 cHsp70 量も感染後で $46,285,985.0 \pm 37,483,891.2$ であり感染前 ($14,190,153.4 \pm 9,974,237.8$) よりも明らかに ($P < 0.05$) 増加していた。

以上の結果から、*B. gibsoni* に感染することにより BgHsp70 に対する抗体が増加、同時に cHsp70 に対する抗体も増加することが明らかになった。これらの抗体は、*B. gibsoni* 感染前にも検出されるイヌが複数存在した。これは、hsp70 は種を超えてよく保存されていることから、*B. gibsoni* 以外に以前に感染した病原体に対して産生されたものあるいはワクチンに含まれる hsp70 の類似タンパク質に対して産生された抗体であると考えられた。

(2) ウサギ抗 BgHsp70 抗体の作成

ウサギ 2 頭に組み換え BgHsp70 タンパク質を免疫し、抗 BgHsp70 抗体を作成した。この抗体はアフィニティ精製を行い実験に使用した。

図 3 は作成したウサギ抗 BgHsp70 抗体および免疫前後のウサギ血清を用いた解析結果である。A は組み換え BgHsp70 を、B は組み換え cHsp70 を、C は赤血球膜を、D は無関係な組み換えタンパク質として GST を試料として用いた結果である。レーン 1 は免疫前ウサギ血清、レーン 2 は免疫後ウサギ血清、レーン 3 は精製したウサギ抗 BgHsp70 抗体を用いた解析結果である。免疫前ウサギ血清には BgHsp70 に対する抗体も、cHsp70

に対する抗体も存在しないが、ウサギを組み換え BgHsp70 タンパク質を用いて免疫した後は、BgHsp70 だけでなく、cHsp70 を認識する抗体が産生された。さらに、組み換え BgHsp70 タンパク質を使ってアフィニティ精製を行ったウサギ抗 BgHsp70 抗体は組み換え cHsp70 タンパク質 (B、レーン 3) と赤血球膜由来の cHsp70 (C、レーン 3) を認識した。他方、ウサギ抗 BgHsp70 抗体は GST を認識しなかった (D)。

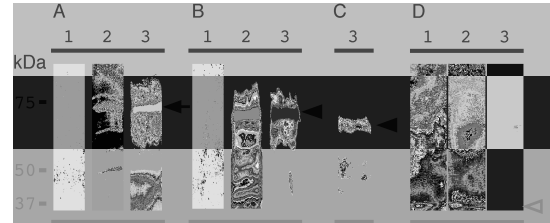


図 3

以上の結果から、ウサギにおいて BgHsp70 タンパク質が cHsp70 に対する抗体を誘導することが示された。同様に *B. gibsoni* 感染犬においても、BgHsp70 が抗原として認識され産生された抗 BgHsp70 抗体が cHsp70 と交差反応を起こすと考えられた。この抗 cHsp70 抗体が、イヌバベシア症における抗赤血球抗体の一種であることを疑ったが、この抗体が赤血球を傷害するためには膜表面に cHsp70 が発現している必要があると考えられた。

(3) IFA による cHsp70 および BgHsp70 の検出

赤血球および *B. gibsoni* の細胞膜表面に cHsp70 および BgHsp70 が発現しているかどうかを観察するために、IFA を実施した。

図 4 はマウス抗ヒト hsp70 抗体を用いて実施した IFA の結果である。A、B、C は蛍光顕微鏡による観察の結果を、D、E、F は位相差顕微鏡による観察の結果を、G、H、I はこれらを重ね合わせた写真である。A、B はマウス抗ヒト hsp70 抗体を用いて hsp70 を緑色に染色した。*B. gibsoni* の核を hoechst 33342 を用いて青色に染色している。C では特発性免疫介在性溶血性貧血 (IMHA) に罹患したイヌから入手した血清を用いて赤血球膜を赤色に染色した陽性対照である。A に示すとおり、緑色に染色され細胞膜表面に hsp70 が存在すると思われる赤血球は、一致して青色に染色されており、多数の *B. gibsoni* が感染していることが示唆された (矢印)。一方、赤血球外の *B. gibsoni* はマウス抗ヒト hsp70 抗体では染色されず (塗りつぶし矢頭)、細胞膜表面にはこの抗体が認識する分子が存在したと思われる。さらに、IMHA 症例の血清では赤血球膜が染色されたが、*B. gibsoni* の核とは一致しなかった (空き矢頭)。以上より、多数の原虫が寄生する赤血球のみ、

細胞膜表面にマウス抗ヒト hsp70 抗体に認識される分子が発現していると考えられた。

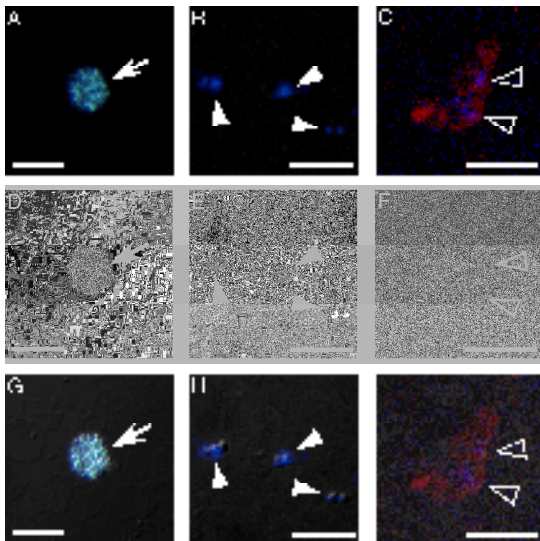


図 4

図 5 は抗 BgHsp70 抗体を用いて実施した IFA の結果である。A、B、C は蛍光顕微鏡による観察の結果を、D、E、F は位相差顕微鏡による観察の結果を、G、H、I はこれらを重ね合わせた写真である。A、B は抗 BgHsp70 抗体を用いて hsp70 を緑色に染色した。B. gibsoni の核を hoechst 33342 を用いて青色に染色している。C では免疫前のウサギ血清を用いた陰性対照である。A に観られるように、赤血球外の B. gibsoni は抗 BgHsp70 抗体で緑色に染色され (矢印)、細胞膜表面に hsp70 を発現していることが疑われた。一方、赤血球内に寄生する原虫は核のみ染色され (矢頭)、細胞膜表面に hsp70 は発現していないと考えられた。

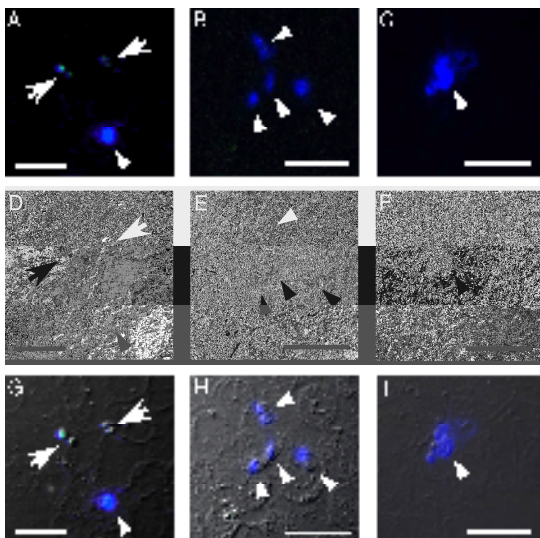


図 5

加えて、イヌ赤血球に対する抗 BgHsp70 抗体の傷害作用を観察したところ、この抗体

はイヌ赤血球の溶血を亢進させず、抗 BgHsp70 抗体はイヌ赤血球を直接的には傷害しないと考えられた (表 1)。

表 1. イヌ赤血球に対する抗 BgHsp70 抗体の傷害作用の観察結果。イヌ赤血球を 4°C で 2 週間保存した後に、抗 BgHsp70 抗体 (1:1000) を添加し、25°C で 2 日間培養した。培養後の赤血球を、抗 BgHsp70 抗体 (1:1000) で染色し、蛍光顕微鏡で観察した。結果は、赤血球の溶血率 (%) と、抗 BgHsp70 抗体の存在による溶血率の増進率 (%) を示している。

	溶血率 (%)	増進率 (%)	増進率 (%)
対照 (n=10)	0.1±0.02	1.7±0.19	16.6±1.7
抗 BgHsp70 (n=10)	0.1±0.02	1.7±0.19	16.6±1.7

以上より、正常な赤血球膜表面には hsp70 分子は発現しておらず、標的となる分子が存在しないため抗 BgHsp70 抗体は赤血球を傷害しないと考えられた。すなわち、抗 BgHsp70 抗体はイヌバベシア症において観察される抗赤血球抗体の一種ではなく、溶血性貧血を悪化させることはないと思われた。

一方、細胞膜表面に hsp70 分子の発現を認めたのは赤血球外の原虫および多数の原虫の寄生を受けた赤血球のみであった。B. gibsoni は赤血球内で成熟、分裂を行いメロゾイトとなって放出された後、新しい赤血球に侵入するが、今回の観察結果よりこのメロゾイトにのみ、細胞膜表面に hsp70 分子が発現していることが推測された。このことより、バベシア原虫では赤血球内での成熟と分裂が十分に進み、赤血球外に放出される際のみ hsp70 分子が現れると考えられ、hsp70 が分子シャペロンであることと合わせて、hsp70 は原虫の赤血球外への脱出あるいは赤血球内への侵入に重要な分子をサポートしていることが推測された。今後、BgHsp70 の機能や役割を解明し、BgHsp70 のサポートを受ける分子を解明することで、バベシア原虫の赤血球への侵入や赤血球外への脱出の機序が明らかになり、それらを応用したバベシア原虫の増殖を阻害する方法が確立されることが期待できる。

(4) まとめ

本研究課題では、イヌバベシア症において感染犬血清中に抗 BgHsp70 抗体および抗 cHsp70 抗体が産生されることが明らかになったが、これらの抗体はイヌ赤血球を傷害することはなく、抗赤血球抗体の一種ではないことが明らかになった。しかしながら同時に、hsp70 分子がバベシア原虫のメロゾイトの膜表面に存在することが明らかになり、このことはイヌバベシア症に関する研究のさらなる発展に貢献することが期待される。

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 11 件)

① Masahiro Yamasaki, Mikiko Ishida,

Kensuke Nakamura, Noboru Sasaki, Masahiro Murakami, Wickramasekara Rajapakshage Bandula Kumara, Yu Tamura, Sue Yee Lim, Hiroshi Ohta, Mitsuyoshi Takiguchi, Detection of anti-*Babesia gibsoni* heat shock protein 70 antibody and anti-canine heat shock protein 70 antibody in sera from *Babesia gibsoni*-infected dogs. *Veterinary Parasitology*, 査読有、(in press)、2011年

② Masahiro Yamasaki, Yusuke Kobayashi, Kensuke Nakamura, Noboru Sasaki, Masahiro Murakami, Wickramasekara Rajapakshage Bandula Kumara, Hiroshi Ohta, Osamu Yamato, Yoshimitsu Maede, Mitsuyoshi Takiguchi, *Babesia gibsoni*: Detection in blood smears and formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using deoxyribonucleic acid in situ hybridization analysis. *Experimental Parasitology*, 査読有、127巻、2011年、119-126頁

③ Shiang-Jyi Hwang, Masahiro Yamasaki, Kensuke Nakamura, Noboru Sasaki, Masahiro Murakami, Wickramasekara Rajapakshage Bandula Kumara, Hiroshi Ohta, Yoshimitsu Maede, Mitsuyoshi Takiguchi, Reduced transcript levels of the heat shock protein 70 gene in diminazene aceturate-resistant *Babesia gibsoni* variants under low concentrations of diminazene aceturate. *Japanese Journal of Veterinary Research*, 査読有、58巻、2010年、155-164頁

④ Shiang-Jyi Hwang, Masahiro Yamasaki, Kensuke Nakamura, Noboru Sasaki, Masahiro Murakami, Wickramasekara Rajapakshage Bandula Kumara, Hiroshi Ohta, Yoshimitsu Maede, Mitsuyoshi Takiguchi, Development and characterization of a strain of *Babesia gibsoni* resistant to diminazene aceturate *in vitro*. *Journal of Veterinary Medical Science*, 査読有、72巻、2010年、765-771頁

⑤ Masahiro Yamasaki, Kensuke Nakamura, Norihisa Tamura, Shiang-Jyi Hwang, Muneyoshi Yoshikawa, Noboru Sasaki, Hiroshi Ohta, Osamu Yamato, Yoshimitsu Maede, Mitsuyoshi Takiguchi, Effects and mechanisms of action of ionophorous antibiotics valinomycin and salinomycin-Na on *Babesia gibsoni in vitro*. *Journal of Parasitology*, 査読有、95巻、2009年、1532-1538頁

⑥ Kazuaki Yamada, Subeki, Kensuke Nabeta, Masahiro Yamasaki, Ken

Katakura, Hideyuki Matsuura, Isolation of antibabesial compounds from *Brucea javanica*, *Curcuma xanthorrhiza*, and *Excoecaria cochinchinensis*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 査読有、73巻、2009年、776-780頁

⑦ Ryo Nakao, Chiaki Mizukami, Yuta Kawamura, Subeki, Saw Bawm, Masahiro Yamasaki, Yoshimitsu Maede, Hideyuki Matsuura, Kensuke Nabeta, Nariaki Nonaka, Yuzaburo Oku, Ken Katakura, Evaluation of efficacy of Bruceine A, a natural quassinoid compound extracted from a medicinal plant, *Brucea javanica*, for canine babesiosis. *Journal of Veterinary Medical Science*, 査読有、71巻、2009年、33-41頁

⑧ Aya Matsuu, Masahiro Yamasaki, Xuenan Xuan, Hiromi Ikadai, Yoshiaki Hikasa, In vitro evaluation of the growth inhibitory activities of 15 drugs against *Babesia gibsoni* (Aomori strain). *Veterinary Parasitology*, 査読有、157巻、2008年、1-8頁

⑨ Masahiro Yamasaki, Shiang-Jyi Hwang, Hiroshi Ohta, Osamu Yamato, Yoshimitsu Maede, Mitsuyoshi Takiguchi, Flow cytometry to evaluate the level of *Babesia gibsoni* parasitemia *in vivo* and *in vitro* by using the fluorescent nucleic acid stain SYTO16. *Japanese Journal of Veterinary Research*, 査読有、55巻、2008年、129-136頁

⑩ Masahiro Yamasaki, Motoshi Tajima, Osamu Yamato, Shiang-Jyi Hwang, Hiroshi Ohta, Yoshimitsu Maede, Heat shock response of *Babesia gibsoni* heat shock protein 70. *Journal of Parasitology*, 査読有、94巻、2008年、119-124頁

〔学会発表〕(計7件)

① 山崎 真大、黄 香寂、W. R. Bandula Kumara、谷山 祐介、坪井 嘉啓、大田 寛、滝口 満喜、アムホテリシンBによるイヌ babesiosis症の治療に関する研究、第151回日本獣医学会学術集会(東京都府中市、東京農工大学)、2011年3月31日(東日本大震災のため、講演要旨集の発行をもって終了)

② 谷山 祐介、山崎 真大、黄 香寂、大田 寛、滝口 満喜、培養 *Babesia gibsoni* の末梢血単核球への侵入と増殖の検討、第79回日本寄生虫学会大会(北海道旭川市、旭川医科大学)、2010年5月20日

③ M. Yamasaki, S. J. Hwang, H. Ohta, M. Takiguchi, Localization of *Babesia gibsoni* heat shock protein 70 in the parasites and erythrocytes *in vitro*. 2009 Asian Meeting

of Animal Medicine Specialities (AMAMS), Asian Veterinary Meeting (Grand Victoria Hotel Taipei, Taipei, Taiwan), Dec. 12th, 2009.

④黄 香寂、谷山 祐介、山崎 真大、大田 寛、滝口 満喜、Diminazene aceturate 耐性 *Babesia gibsoni* 株に対する他の抗バベシア原虫薬の効果、第 148 回日本獣医学会学術集会（鳥取県鳥取市、鳥取大学）、2009 年 9 月 26 日

⑤山崎 真大、黄 香寂、大田 寛、滝口 満喜、培養 *Babesia gibsoni* のストレス環境下における heat shock protein 70 の役割に関する研究、第 78 回日本寄生虫学会大会（東京都千代田区、法政大学市ヶ谷キャンパス外濠校舎）、2009 年 3 月 28 日

⑥原田 絵梨子、山崎 真大、大田 寛、滝口 満喜、ポリエン系抗生物質アムホテリシン B の抗 *Babesia gibsoni* 効果、第 146 回日本獣医学会学術集会（宮崎県宮崎市、宮崎大学）、2008 年 9 月 25 日

⑦黄 香寂、山崎 真大、大田 寛、滝口 満喜、Diminazene aceturate 耐性 *Babesia gibsoni* 株の作成、第 146 回日本獣医学会学術集会（宮崎県宮崎市、宮崎大学）、2008 年 9 月 25 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 真大(YAMASAKI MASAHIRO)
北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授
研究者番号：40322846

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし