

平成29年3月30日

安全な農林水産物安定供給のためのレギュラトリーサイエンス研究委託事業
研究成果報告書

課題番号：2606

馬の伝染性疾病の迅速検査法の開発

研究期間：平成26年度～平成28年度（3年間）

研究総括者名：横山 直明

試験研究機関名：国立大学法人帯広畜産大学

1 研究目的

馬ピロプラズマ病は、ダニによって媒介される *Babesia caballi* と *Theileria equi* の2種類の赤血球内寄生原虫によって引き起こされ、発熱、貧血、黄疸などの症状を呈し、死亡率が10～20%に達する家畜法定伝染病である。現在、動物検疫所において、血液塗抹鏡検やELISA、IFAT、補体結合反応などが用いられている。しかし、多数の検体を同時に検査するために、時間と熟練した検査官が必要な上に、診断薬を海外に依存しているなどの問題がある。2020年東京オリンピックの馬術競技には海外から多数の出場馬が輸入されることが予想されている。そこで、競技出場馬の検疫を円滑に実施するため、多検体処理が可能で感度・特異度が高く、国内で診断薬の自給が可能な馬ピロプラズマ病の検査方法を確立することを目的とする。

2 研究内容

(1) 研究課題

1) 中課題1：馬ピロプラズマ病競合 ELISA 用(cELISA)の開発

これまでに報告されている *Babesia caballi* および *Theileria equi* の複数の抗原から、診断用抗原として最適な抗原を選抜し、これらを用いて国際標準診断法の一つとなっている馬ピロプラズマ病競合 ELISA 用(cELISA)の開発を行う。

・小課題1：*Babesia caballi* および *Theileria equi* 組換え抗原の作製

B. caballi と *T. equi* についてそれぞれ、Bc48 と Bc134 および EMA, Be82 の完全長およびC末端、N末端欠損蛋白質をコードするプライマーを用いてPCRを行い、得られたPCR産物を大腸菌に組み込み、目的とする組換え蛋白質を産生する。得られた組換え抗原を用いて、SDS-PAGE, ウェスタンブロットを行い、抗原性を確認する。

・小課題2：馬ピロプラズマ症血清診断に適する原虫蛋白質の選択

小課題1で得られた組換え抗原を用いてELISAプレートを作製する。次に *B. caballi* と *T. equi* 実験感染馬から得られた感染血清を用いてELISAを行い、特異性と感度について比較して、診断用抗原として最適な組換え蛋白質を決定する。

・小課題3：競合 ELISA (cELISA)の作製

小課題2で選抜された組み換え抗原に対するモノクローナル抗体を数種類作製する。次にその中から、cELISAとして使用可能なモノクローナル抗体を選抜する。以上の結果で得られた組換え抗原およびモノクローナル抗体の濃度、反応時間などの至適条件について検討し、cELISAを開発する。また、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを適切に管理・供給できる体制を確立についても検討する。

2) 中課題2：馬ピロプラズマ病 cELISA の性能評価

本研究で開発された馬ピロプラズマ病 cELISA の性能を評価するため、現在動物検疫で使用されている方法と感度や特異性などについて、実験感染馬や動物検疫所で保存している馬血清を用いて確定診断の検査方法として妥当か、性能評価を行う。

- ・小課題1：新規に開発された cELISA 用キットと市販 cELISA キットとの性能比較

新規 cELISA と現在市販されている cELISA キットについて、*B. caballi* と *T. equi* 実験感染馬血清および動物検疫所で保存している馬血清を用いて、その特異性、感度について比較検討する。

- ・小課題2：新規 cELISA と現行検査法との性能比較

実験感染馬血清および動物検疫所で保存している馬血清を用いて、新規 cELISA と培養原虫を用いた間接蛍光抗体法（IFAT）、間接 ELISA、迅速で簡便な血清診断法であるイムノクロマト法（ICT）、補体結合反応（CF）とその特異性、感度について比較検討し、多検体処理が可能で感度・特異度が高く、国内で診断薬の自給が可能な馬ピロプラズマ病の検査方法を決定する。

(2) 年次計画

項目	平成26年度	平成27年度	平成28年度
1. 競合ELISA用キットの開発			
(1) 組換え抗原の作製	<i>B. caballi</i> , <i>T. equi</i> の組換え抗原作製		
(2) 診断蛋白質の選択	←→ 診断用抗原の選抜		
(3) 新規cELISAの作製		cELISAの作製	
2. 競合ELISA用キットの性能評価		←→	
(1) 新規 cELISA と市販キットとの性能比較			新規 cELISA と市販キットとの比較 ←→
(2) 新規 cELISA と現行血清診断法との性能比較			新規 cELISA と現行血清診断法との比較 ←→
所要経費（合計）	4,900千円	4,760千円	4,580千円

(3) 実施体制

項目	担当研究機関	研究担当者	エフォート (%)
研究総括者	帯広畜産大学	横山 直明	10
1. 競合 ELISA 用キットの開発	帯広畜産大学	○ 横山 直明	10
(1) 組換え抗原の作製	帯広畜産大学	△ 非常勤研究補助員 大学院生	100 15
(2) 診断蛋白質の選択	帯広畜産大学	△ 非常勤研究補助員 大学院生	100 15
(3) cELISA キットの作製	帯広畜産大学	非常勤研究補助員 大学院生	100 15
2. cELISA用キットの性能評価	帯広畜産大学	○ 横山 直明	前出
(1) 現行および新規競合 ELISA キットとの性能比較	帯広畜産大学	△ 非常勤研究補助員 大学院生	前出
(2) 現行血清診断法との性能比較	帯広畜産大学	△ 非常勤研究補助員 大学院生	前出

研究担当者欄について、中課題担当者には○、小課題担当者には△を付すこと。

3 研究推進会議の開催状況

別紙の(1)のとおり

4 研究成果の概要

I 主要な成果

(1) 成果の内容（別紙の（2）参照）

1) 間接 ELISA およびイムノクロマト法の開発

本研究で選抜された抗原を用いて新たに作製した間接 ELISA とイムノクロマト法は実験感染馬血清を用いた検討により、市販 cELISA より早期に抗体検出が可能であり、cELISA の開発に代わる成果が得られたと言える（p 7）。

(2) 成果の活用（別紙の（2）参照）

1) 動物検疫所での活用の可能性

動物検疫所より分与を受けた馬ピロプラズマ病陽性および陰性の血清を用いて間接 ELISA とイムノクロマト法を行った結果、相関ある結果が得られた。特に *T. equi* のイムノクロマト法は動物検疫所で得られた結果と高い相関が認められ、今後の活用が期待できる（p 8, 9）。

II 各研究課題の成果

(1) 中課題 1（馬ピロプラズマ病競合 ELISA 用(cELISA)の開発）の研究成果の概要

1) 工程管理及び成果目標

工程表
①既報告の抗原の組換え蛋白質を大腸菌で作製、精製（小課題 1 関連）。（平成 26 年度）
↓
②診断用の抗原として最適な抗原を選抜診断蛋白質の選択（小課題 2 関連）。（平成 26 年度）
↓
③選抜した抗原を用いて、組み換え抗原に対するモノクローナル抗体を作製し、これを用いて cELISA を作製。（小課題 3 関連）。（平成 27、28 年度）
成果目標：既報告の抗原の組換え蛋白質を作製し、ELISA にから最適な抗原を選抜し、馬ピロプラズマ病診断用の競合 ELISA（cELISA）を作製。

2) 各工程の進捗状況及び成果

【工程表の①】

T. equi 3 種類と *B. caballi* 5 種類の組換え蛋白質を作製し、融合蛋白質を除去し純度の高い蛋白質を作製した。（平成 26 年度）

【工程表②】

ウェスタンブロット、ELISA を行い、*T. equi* では EMA2t が最適な抗原候補として選抜された（図 1）。（平成 26 年度）

B. caballi では、Bc134(275-562)を細分化して ELISA を行った結果、Bc134（427-503）が最適な抗原候補として選抜された（図 2）。（平成 26、27 年度）

図1. ELISAによる*T. equi* 抗原の選択

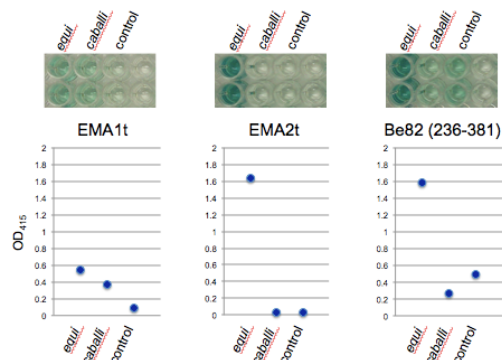
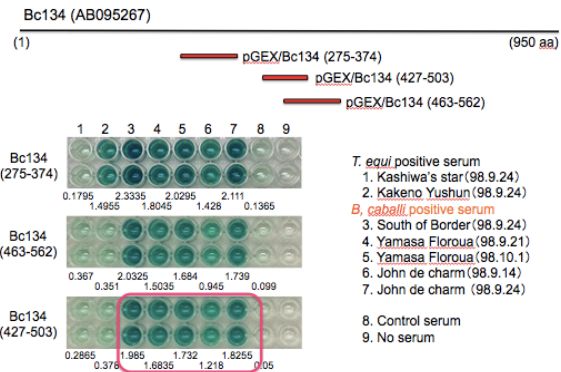


図2. Bc134 (275-562)の細分化の検討



<図の補足説明>

図 1：*T. equi* では、EMA1, EMA2, Be82 部分領域の精製された組換え抗原を用いた ELISA を行なった結果、EMA2t が陽性血清で最も高い OD 値および正常血清で最も低い OD 値を示し、有力な診断用抗原として選抜された。

図 2：*B. caballi* では、Bc48 と Bc134 の部分域を比較したところ、Bc134（275-562）を更に細分化した Bc134（427-503）を診断用抗原として選抜した。

【工程表③】

T. equi の EMA2t を認識する 37 クローンのハイブリドーマが作製され、cELISA に適する可能性のあるモノクローナル抗体が 1 株得られた。（平成 27 年度）*T. equi*：cELISA に適する可能性のあるモノクローナル抗体を多量生産し、濃度などの至適条件について検討を行ったが、cELISA 用に適さないことが明らかになった。

B. caballi では、Bc134（427-503）を認識するモノクローナル抗体 1 株が得られた。（平成 27 年度）更に、複数の Bc134 の抗原に対する 6 種類のモノクローナル抗体が得られた。（28 年度）今後、cELISA に適する可能性のあるモノクローナル抗体の検討が必要である。

3) 成果目標に対する達成状況

T. equi および *B. caballi* の抗原の組換え蛋白質を大腸菌で作製、精製し、これらの蛋白質から診断用の抗原の選択に関する目標は達成された。*T. equi* の EMA2t を認識するモノクローナル抗体の作製に成功したが、cELISA に適するモノクローナル抗体は得られず、

cELISA 作製の目標達成はできなかった。また、*B. caballi* に対するモノクローナル抗体の作製は達成されたが、cELISA に適するか否かの検討は達成できなかった。

(2) 中課題2 (馬ピロプラズマ病 cELISA の性能評価) の研究成果の概要

1) 工程管理及び成果目標

工程表
①新規 cELISA と市販キットとの性能比較 (小課題1 関連)。 ↓ ②現行血清診断法との性能比較 (小課題2 関連)。
成果目標：開発された馬ピロプラズマ病 cELISA の確定診断の有用性に関し、既存の診断法との比較評価。

2) 各工程の進捗状況及び成果

【工程表の①】

蛋白質濃度の高い *T. equi* に対するモノクローナル抗体を用いて検討を行ったが、cELISA は確立できなかった。また、*B. caballi* に対するモノクローナル抗体が作製されたが、cELISA の検討は検討中であるため、市販キットとの性能比較は実施できなかった。

【工程表②】

市販 cELISA と間接蛍光抗体法、組換え抗原を用いた間接 ELISA とイムノクロマト法を比較した結果、市販 cELISA は抗体検出の遅延、IFAT と間接 ELISA、イムノクロマト法の相関が認められた (図3、4、表1)。

図3. *T. equi* 実験感染馬血清による
間接ELISAと市販cELISAとの比較

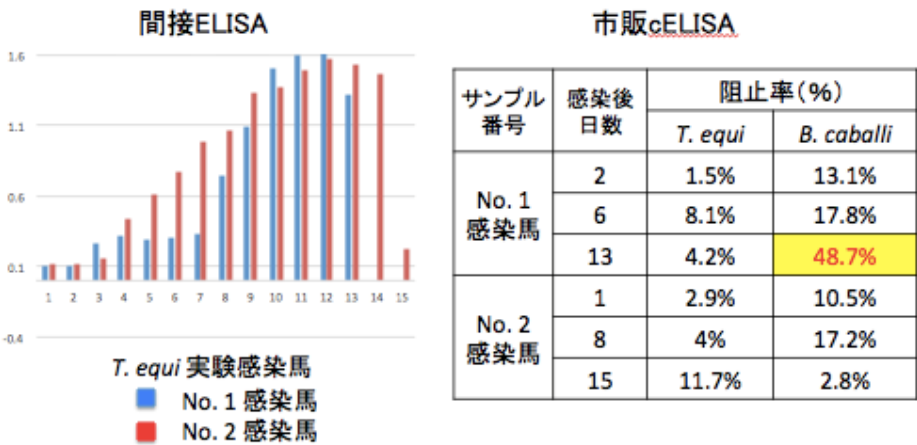
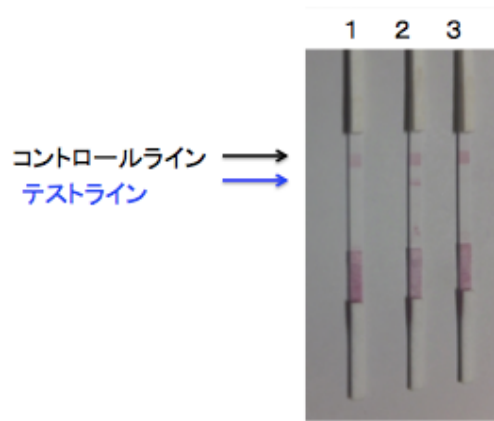


図4. イムノクロマト(ICT)法の開発

❖ BC48抗原を用いたICTの例



1. 非感染血清; 2. *B. caballi* 陽性血清; 3. *T. equi* 陽性血清

<図の補足説明>

図3：*T. equi* EMA2 の組換え抗原を用いた間接 ELISA では、感染後1週間前後で抗体が検出されたが、市販 cELSA では感染2週目以後で漸く抗体検出が認められた。

図4：*B. caballi* の Bc134 (427-503) を診断用抗原としたイムノクロマトーストリップを作製した。*B. caballi* 陽性血清では、コントロールラインとテストラインが15分以内に認め、非感染および *T. equi* 陽性血清ではコントロールラインのみが認められ、感染有無の判断が容易に可能である。

表1-1. 市販cELISA、IFAT、間接ELISA、イムノクロマト(ICT)法によるとの比較結果 I

Tube No	Date	cELISA (%)		Indirect ELISA (275.562)		IFAT		ICT	
		<i>T. equi</i>	<i>B. caballi</i>	<i>T. equi</i>	<i>B. caballi</i>	<i>T. equi</i>	<i>B. caballi</i>	<i>T. equi</i>	<i>B. caballi</i>
1	1989.9	62.5	8.9	0.197	0.3825	+	+	+	-
2	1989.9	71.9	55.4	0.286	0.4525	+	+	+	-
3	1989.9	52.8	4.9	0.517	0.551	+	+	+	-
4	1989.9	51.1	5.9	0.098	0.708	+	+	+	-
5	1989.9	27	64.2	0.257	0.346	+	+	+	±
6	1989.9	85.3	71.3	1.075	0.56	+	+	+	-
7	1989.9	76.5	1.3	0.963	0.359	+	+	+	-
8	1989.9	56.7	3.1	0.604	0.213	+	+	+	-
9	1989.9	60.3	7.3	1.271	0.396	+	+	+	-
10	1989.9	83.4	67.2	0.572	0.198	+	+	+	±
11	1989.9	64.2	2.6	0.638	0.43	+	+	+	-
12	1989.9	81.7	3.1	0.758	0.226	+	-	+	-
13	1995	80.5	6.1	0.27	0.169	+	-	+	-
14	1995	86.8	14.4	0.426	0.182	+	-	+	-
15	1995	90.1	2.2	0.405	0.133	+	-	+	-
16	1995	90.5	8.6	0.893	0.615	+	-	+	-
17	1998	63.6	3.1	0.584	0.668	+	±	+	-
18	1998	80.5	14.6	0.397	0.574	+	-	+	-
19	1998	88.9	13.1	0.5	0.306	+	±	+	-
20	1998	87.4	12.8	0.861	0.368	+	-	+	±
21	2016.2	73.6	10	0.393	0.412	+	±	+	-
22	2016.2	33.5	0.4	0.162	0.509	+	±	+	-
23	2016.2	39.2	41.4	0.128	0.677	+	+	+	-
24	2016.2	38.2	2.7	0.2	0.495	±	+	-	-
25	2016.2	23.9	64.2	0.076	0.558	-	±	-	+

表1-2. 市販cELISA、IFAT、間接ELISA、イムノクロマト(ICT)法によるとの比較結果 II

Tube No	Date	cELISA (% I)		Indirect ELISA (275-562)		IFAT		ICT	
		<i>T. equi</i>	<i>B. caballi</i>	<i>T. equi</i>	<i>B. caballi</i>	<i>T. equi</i>	<i>B. caballi</i>	<i>T. equi</i>	<i>B. caballi</i>
26	2016.6.16	6.6	15.9	0.079	0.286	-	±	-	-
27	2016.6.16	5.7	10.6	0.078	0.967	-	-	-	-
28	2016.10.28	10.1	9.8	0.075	1.038	-	-	-	-
29	2016.10.28	10.1	0.8	0.078	0.238	-	-	±	-
30	2016.10.28	1.5	1.7	0.082	0.261	-	-	-	-
31	2016.10.28	10.3	1.9	0.086	0.254	-	-	-	-
32	2016.10.28	7.9	2.4	0.083	0.212	-	-	+	±
33	2016.11.3	10.7	4.5	0.084	0.198	-	-	-	-
34	2016.11.3	1.6	13.1	0.073	0.257	-	-	-	-
35	2016.11.3	1.6	35.1	0.075	0.918	-	-	+	±
36	2016.11.9	9.3	4.4	0.083	0.264	-	-	±	-
37	2016.11.9	19.6	13.3	0.075	0.589	-	-	-	-
38	2016.11.9	1.7	13.1	0.079	0.26	-	-	-	-
39	2016.11.29	12.6	7	0.081	0.267	-	-	-	-
40	2016.11.29	3	22	0.119	0.637	-	-	-	-
41	2016.11.29	6.2	2.4	0.078	0.311	-	-	-	-
42	<i>B. caballi</i> + serum			0.076	1.518	±	+	±	+
43	<i>T. equi</i> + serum			0.417	0.209	+	±	+	-
44	Very Sydney			0.072	0.253	ND	ND	ND	
45	Negative control			0.071	0.335	-	-	-	
46	Taro			0.067	0.269	ND	ND	ND	

<表の補足説明>

表1： IFAT で陽性の血清は、選抜された組換え抗原を用いた間接 ELISA およびイムノクロマト法により *T. equi* についてはほとんどの例で陽性と認められた。

3) 成果目標に対する達成状況

新規の cELISA の作製ができなかったため、現在市販されている cELISA との性能評価は達成できなかった。しかし、本研究で選抜された組換え抗原を用いて新たに作製した間接 ELISA およびイムノクロマト法と市販 cELISA との性能評価は達成された。

5 研究成果の発表（主要な論文、取得した（申請中）の特許等を記述）

別紙の（3）～（8）のとおり

6 目的の達成に当たっての現時点での問題点等

B. caballi の cELISA の開発に関しては、得られた 6 種類のモノクローナル抗体を用いて原虫病研究センターにおいて引き続き研究を継続する。

また、本研究で選抜された組換え抗原を用いて新たに作製した間接 ELISA とイムノクロマト法は従来の診断法と相関ある結果が得られ、特に *T. equi* のイムノクロマト法は現在動物検疫所で実施されている間接蛍光抗体法と高い相関が示された。これらの診断法は、市販 cELISA よりも早期の抗体が検出可能で、今後イムノクロマト法をスクリーニングに間接 ELISA を確定診断法として、新規の血清診断法として活用される高い可能性を示した。

また、動物検疫所では主として馬ピロプラズマ病に対して血清診断法及び PCR を採用し

ているが、今後、より簡便で迅速な LAMP 等の遺伝子診断法と組み合わせる事により検疫体制の強化法と推奨される。

研究推進会議の開催状況、研究成果の発表(論文、特許等)等

試験研究課題名	馬の伝染性疾患の迅速検査法の開発
---------	------------------

課題 番号	(1) 研究推 進会議 等開催 回数	(2) 行政が 活用しう る成果の 有無	(3)学術論文数		(4)口頭発表回数		(5) 出版 図書数	(6)国内特許権等数		(7)国際特許権等数		(8) 報道 件数	物品購 入の有 無
			和文	欧文	国内	国際		出願	取得	出願	取得		
2606	8	有	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	無

(1)研究推進会議等の開催実績

区分:①推進会議、②現地検討会、③その他

区分	推進会議の名称	年月日	開催場所	参加者 数	消費・安全局担当 官の出席有無	主な議題及び決定事項
①	第1回研究推進会議	平成26年6月4日	農林水産省 消費・安全局第3会議室	7	有り	研究全体の打ち合わせと26年度実施計画の承認
①	第2回研究推進会議	平成27年2月16日	農林水産省 消費・安全局第5会議室	6	有り	26年度の研究成果の報告と27年度の実施計画の承認
①	第1回研究推進会議	平成27年7月1日	農林水産省 消費・安全局第2・3会議室	6	有り	研究全体の打ち合わせと27年度実施計画の承認
①	第2回研究推進会議	平成28年2月19日	農林水産省 消費・安全局第4会議室	8	有り	27年度の研究成果の報告と28年度の実施計画の承認
①	第1回研究推進会議	平成28年7月4日	農林水産省消費・安全局安全局第10会議室	7	有り	27年度の研究成果の概要と28年度の進捗の報告
①	第2回研究推進会議	平成29年3月13日	農林水産省消費・安全局安全局第1会議室	8	有り	26～28年度の研究成果の報告と今後の方針

(2) 行政が活用しうる成果

区分: ①行政がすでに活用した成果、②行政が活用する目途がたった成果

区分	成果の内容	主な利用場面	活用状況	機関名
②	馬ピロプラズマ病の簡易・迅速血清検査法の確立	動物検疫所における馬ピロプラズマ病の診断	馬ピロプラズマ病の検疫の血清診断法として取り入れる方向で検討中	帯広畜産大学

(3) 学術論文

タイトル、著者名、学会誌名、巻、ページ、発行年月	機関名
馬ピロプラズマ症、五十嵐郁男、横山直明、日本獣医寄生虫学会誌、14巻、p93-92、2015年12月	日本獣医寄生虫学会

(4) 口頭発表

タイトル、発表者名、学会等名、発表年月	機関名

(5) 出版図書

区分: ①出版著書、②雑誌、③年報、④広報誌、⑤その他

区分	著書名、(タイトル)、著者名、出版社名、発行年月	機関名

(6)国内特許権等

特許権等の名称	発明者	権利者 (出願人等)	特許権等の種類	番号	出願年月日	取得年月日	機関名

(7)国際特許権等

特許権等の名称	発明者	権利者 (出願人等)	特許権等の種類	番号	出願年月日	取得年月日	機関名

(8)報道件数

区分:①プレスリリース、②新聞記事、③テレビ放映

区分	記事等の名称	掲載紙・放送社名	年月日	機関名	備考