
免疫プロテオームによる家畜病原性原虫ネオスポラの 新規診断方法の開発

帯広畜産大学原虫病研究センター・教授 西川 義文

■ 目的

農場経営を進める上で家畜生産に損害を与える疾病、特に感染性の繁殖障害に注意する必要がある。家畜動物の繁殖障害(流産・死産)を引き起こす病原性寄生虫として、細胞内寄生原虫であるネオスポラが挙げられる。ネオスポラの感染例が日本を含む世界中で報告されており、子牛と搾乳量の損耗などによる経済的損失は年間数千億円と試算されている。しかしながら、わが国では横断的な疫学調査が進んでいないのが現状である。その原因として国産の診断キットが使用できないこと、近年の法改正により海外メーカーの診断キットの輸入が困難になっていることが挙げられる。そこで本研究では、ネオスポラ感染に対する社会実装可能な診断方法の開発を目的とした。

■ 方法

ネオスポラ感染牛には、ネオスポラ症を発症する個体と発症しないがネオスポラ抗体が陽性である個体が存在する。ここではネオスポラ症を発症する個体で効率よく検出される抗原に着目し、ネオスポラ症を発症した個体8検体とネオスポラ抗体陽性の未発症個体14検体の血清を用いてウェスタンブロットを行った。これら血清の反応性を比較解析し、ネオスポラ抗原と反応するタンパク質をLTQ-Orbitrapで解析した。得られたアミノ酸配列を元に、NcSAG1抗原を同定した。NcSAG1抗原は、大腸菌発現系にてグルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)融合組換えタンパク質として作製した。比較対象抗原としてNcGRA6とNcGRA7、ネオスポライセートを用いた。抗原を固定したプレートを用いた酵素免疫法(ELISA)および抗原を搭載したイムノクロマト(ICT)を作製し、マウスおよびウシ血清に対する反応性を評価した。ネオスポラ抗体陽性血清をICTに添加すると、ニトロセルロース膜上のサンプル移動に伴いネオスポラ特異抗体が金粒子標識抗原と結合し、その複合体が非標識抗原を固定した場所にトラップされるため、テストライン上のバンドの出現により判定が可能となった。

■ 結果および考察

今回比較対象とした抗原と比べて、同定したNcSAG1はマウスおよびウシのIgMとIgG抗体を検出するELISAで優れた反応性を示した。この結果により、感染急性期にNcSAG1特異的IgMとIgG抗体、感染慢性期にNcSAG1特異的IgG抗体の産生が確認された。NcSAG1を搭載したICTはマウスおよびウシの感染血清に対しても良好な反応性を示し、NcSAG1のELISAの結果と高い一致度を示した。この結果は、NcSAG1-ICTのネオスポラ感染の血清診断法としての有用性を強く示している。

■ 結語

ネオスポラの診断系を普及させるためには、簡易迅速性が必須条件となる。本研究の成果であるネオスポラ用ICT(NcSAG1-ICT)は、検査に特別な測定器は必要とせず、ICTの大きさは5cm×0.5cm、判定時間は5分であるため、既存の診断方法であるELISAや間接蛍光抗体法と比較しても利点が多い。将来的に本ICTの検査現場への普及を促進することで、ネオスポラの防疫対策に大きく貢献し、我が国の畜産振興に大きく寄与できると考える。