

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08820

研究課題名(和文) レプトスピラ症早期診断法の開発 - 高速・高感度・簡便・高精度を可能にする新技術 -

研究課題名(英文) Development of early diagnosis of leptospirosis

研究代表者

林 史夫 (Hayashi, Fumio)

群馬大学・研究・産学連携推進機構・准教授

研究者番号：60400777

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：レプトスピラは菌体が包膜で覆われているため、レプトスピラを特異的に同定するためには、包膜を破壊し、べん毛繊維タンパク質を露出させ、抗原抗体反応が可能な状態にしなければいけない。べん毛繊維タンパク質の単離方法は確立されているが、既存方法で単離できるべん毛繊維量は非常に少なく高感度検出には向かない。申請者らはアルカリ溶液をベースとした薬剤カクテルを複数調整し、処理時間、処理濃度などを細かく検討することで、べん毛繊維の露出に成功した。しかしながら、その量はまだまだ希望する量には及ばず、べん毛繊維の露出条件や調製条件を更に追求する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

レプトスピラ症は、大雨災害の後や屋外水上レジャーを楽しむ際に「最も注意すべき感染症」の一つとして注意喚起されています。沖縄県で川遊びをしていた小中学生が集団感染をしたり、東南アジアや南米などでは毎年数千人が感染するほどの一般的な感染症であり、重症化(ワイル症)すると死亡率は30%にも及びます。このようにレプトスピラ症は身近になりつつあり、危険性をはらんだ細菌感染症です。しかし、様々な理由で予防が困難なことから、レプトスピラ症は早期診断と早期治療が求められています。これまでとは全く異なるアプローチで早期診断法の開発にの望みましたが、成果を出すためにはさらなるトライが必要です。

研究成果の概要(英文)：Since the cells of leptospira are covered with the envelope, in order to specifically identify the leptospira, the envelope must be destroyed, the flagellar filaments must be exposed. Although a method for isolating flagellar filaments have been established, the amount of flagellar filaments that can be isolated by the method is very small and not suitable for high-sensitivity detection. We succeeded in exposing the flagellar filaments by alkaline-based solutions. However, the amount is still less than the desired amount, and it is necessary to further pursue the exposure conditions and preparation conditions of flagellar filaments.

研究分野：生物物理学

キーワード：レプトスピラ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

レプトスピラ症は、大雨災害の後や屋外水上レジャーを楽しむ際に「最も注意すべき感染症」の一つとして国立感染症研究所より注意喚起されている。2016年度は沖縄県で川遊びをしていた小中学生の集団感染を中心に30件もの感染が報告された。また、東南アジアや南米などでは毎年数千人が感染するほど一般的な感染症であり、グローバル化に伴いそれら地域からの輸入感染数も増加している。レプトスピラに感染したにもかかわらず処置が不適切であれば、重症化(ワイル症)することもあり、その時の死亡率は30%にも及ぶ。このように、レプトスピラ症は身近になりつつあり、危険性をはらんだ細菌感染症である。しかしながら、血清型が多いことから万能なワクチンは存在せず、予防することは非常に難しい。このような背景から、レプトスピラ症は早期診断と早期治療が求められている。

2. 研究の目的

現在の診断方法のゴールドスタンダードは顕微鏡下凝集試験(MAT)とPCR法である。これらの方法は早期診断には適しているが、コストや検査手技の難易度が高く、結果を得るまでに数日を要する。一方で最近開発された免疫クロマト法はコストや難易度が低く、容易に結果を知ることができるが、その検出原理が理由で早期診断には適していない。本研究では、コストや検査手技の難易度が低く、素早く結果を知ることができる新しい早期診断法として、生体分子間相互作用解析装置を用いた方法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

生体分子間相互作用解析装置で検出すべき最も適したタンパク質はべん毛タンパク質(特にFlaB)である。その理由として、病原性の発揮にはべん毛が必要であること、一菌体あたりのタンパク質量が多く検出に有利であることが挙げられる。しかしながら、レプトスピラは菌体が包膜で覆われているため、レプトスピラを特異的に同定するためには、包膜を破壊し、べん毛繊維タンパク質を露出させ、抗原抗体反応が可能な状態にしなければいけない。これまで、複数の工程を経ることでべん毛繊維タンパク質を単離する方法は報告されてきたが、既存方法で単離できるべん毛繊維量は非常に少なく高感度検出には向かず、より簡便により多くのべん毛を調製する方法は確立されていなかった。

EMJH培地で培養したレプトスピラ(*Leptospira interrogans Patoc*)を集菌し、リン酸バッファーで洗浄した後、アルカリ溶液をベースとした複数の薬剤カクテルと菌体とを混合し、一定時間後にその一部を暗視野顕微鏡と透過型電子顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

アンモニアとリン酸水素二カリウムをベースにした溶液がべん毛繊維の露出に一定の成功を収めたいえる。収量はまだまだ不足しているため、さらなる検討が必要である。

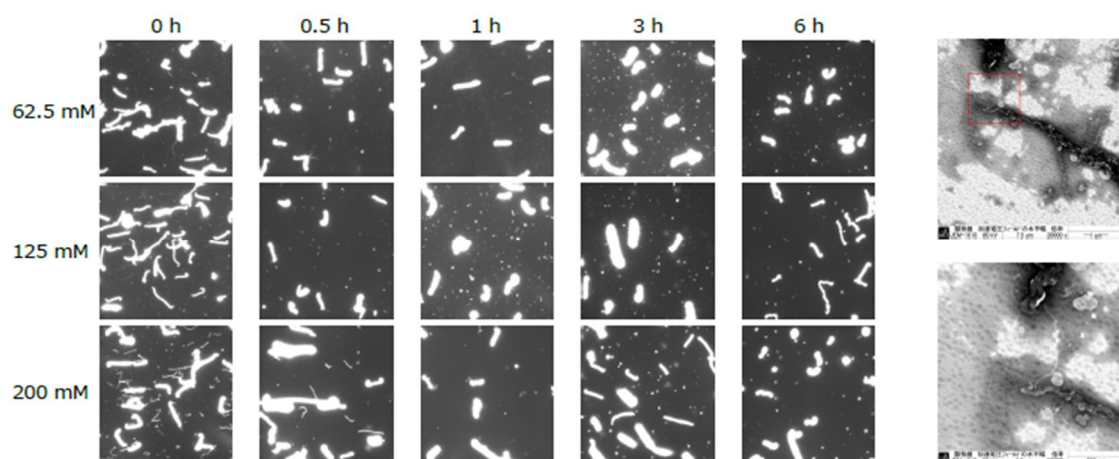


図1 様々な濃度のリン酸水素二カリウムをベースにした溶液で処理したレプトスピラ。左側)暗視野顕微鏡像。右側)透過型電子顕微鏡像。上段の赤枠部分を拡大した像が下段。

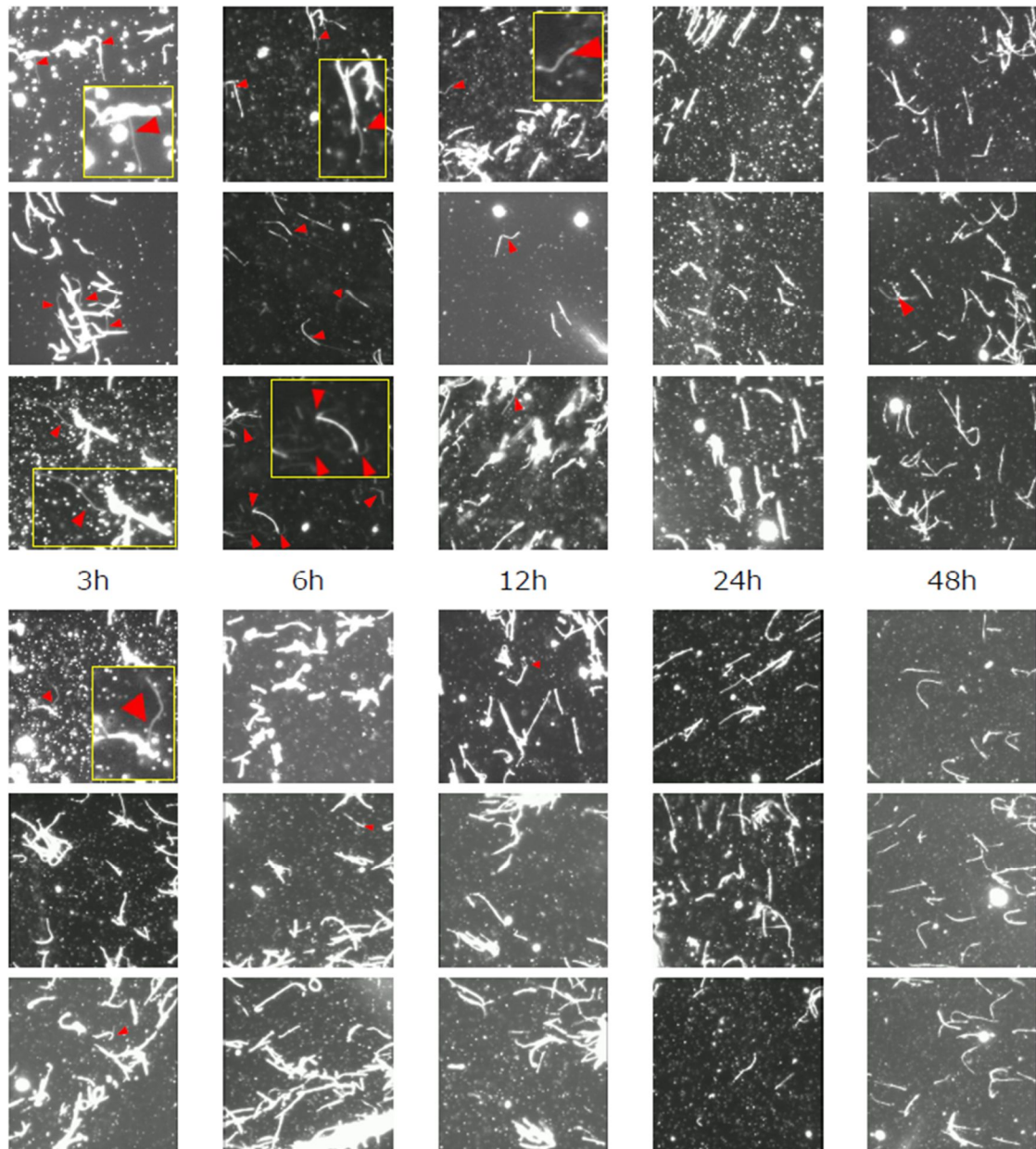


図2 アンモニア濃度 8% (上段) 20% (下段) をベースにした溶液で処理したレプトスピラ。矢じりが注目すべきべん毛繊維を示す。黄枠は同市箭内の一部を拡大表示した像

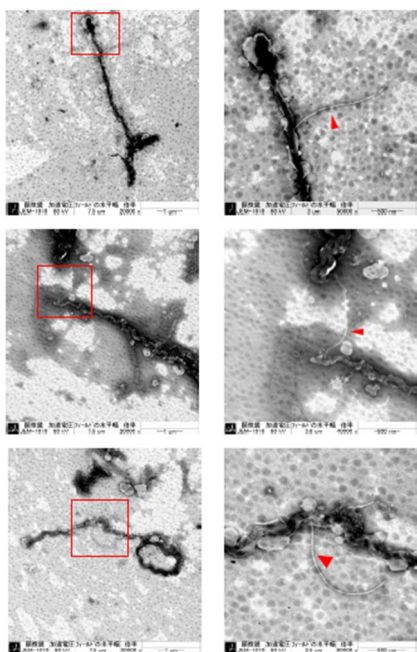


図3 図2の試料の透過型電子顕微鏡像。左側の赤枠部分を拡大した像が右側。矢じりが注目すべきべん毛繊維を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中暢晃, 寺脇慎一, 林史夫, 若松馨
2. 発表標題 レプトスピラべん毛繊維の大量調製と多型変換
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中村 修一 (Nakamura Shuichi) (90580308)	東北大学・工学研究科・助教 (11301)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	若松 馨 (Wakamatsu Kaori) (40222426)	群馬大学・理工学府・教授 (12301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------