

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590673

研究課題名(和文)猫ひっかき病の特異抗原別ELISAによる新血清診断法の確立と病態解明への応用

研究課題名(英文)New method of cat scratch disease by ELISA using specific antigens and its application to the pathological clarification

研究代表者

常岡 英弘 (TSUNEOKA, Hidehiro)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40437629

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：高感度ELISAによるBartonella henselae IgG抗体価測定には特異性の高い抗原精製が必要である。B. henselae ATCC49882菌体のN-ラウロイル-サルコシン(サルコシン)抽出液には多くの有用な蛋白成分が含まれている。

菌体を超音波処理せず直接、サルコシン液で連続2-4回抽出した液をイオン交換カラムクロマトグラフィ(DEAE)法で精製すると、245-295mM NaClで溶出する蛋白成分に特異性の高い蛋白成分が含まれていることが判明した。今後はこの精製液を抗原としたELISAの確立が期待される。

研究成果の概要(英文)：The measurement of Bartonella henselae IgG by highly-sensitive ELISA requires highly-specific purification of antigen. The extract of B. henselae ATCC49882 by N-lauroyl sarcosinate includes a great deal of useful protein component. We directly extracted B. henselae ATCC49882 by N-lauroyl sarcosinate for 2-4 times without supersonic treatment and purified it by diethylaminoethyl ion-exchange (DEAE) chromatography. As a result, it was clarified that highly-specific protein components were eluted with the salt concentration of 245-295mM. Further development of ELISA and its availability by using this antigenic component will be greatly expected.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：猫ひっかき病 ELISA

1. 研究開始当初の背景

Bartonella henselae は猫ひっかき病(CSD)の病原菌で、ネコからヒトに感染する人畜共通感染症である。本症は局所リンパ節腫脹を主訴とする定型例からリンパ節腫大を認めない全身性の重症な非定型例(不明熱、視神経網膜炎、急性脳症、肝・脾肉芽腫、心内膜炎など)まで、その臨床像は多彩である。本菌は患者からの分離培養が極めて困難なため、CSDの診断は間接蛍光抗体(IFA)法による血清学的診断が世界的標準検査法となっている。しかし現在のIFA法は、特異度は高いものの感度が低いため、偽陰性例が多く、高感度なELISAの確立が急務である。すでに欧米で報告されたELISAはあるが、感度・特異度共にIFA法より低く、未だ実用に至っていない。

申請者らは高感度ELISAの確立をめざし、*B. henselae* 菌体から抗原の精製を検討した結果、N-ラウロイル-サルコシン(以下サルコシン)処理後の溶解蛋白成分が抗原として優れていることを新たに見出した。

2. 研究の目的

B. henselae 菌体成分のサルコシン処理液(上清液)を二次元電気泳動やウエスタンブロット法で解析する。さらにイオン交換カラムクロマトグラフィ(DEAE)法で、特異性の高い蛋白成分を精製・解析し、高感度ELISAの確立をめざす。

3. 研究の方法

(1)陽性・陰性パネル血清:CSD患者血清(IFA法 1:256)および健常人血清(IFA法<1:64)の血清を使用した。

(2)サルコシン液による*B. henselae* 菌体抽出法:*B. henselae*ATCC49882株をチョコレート寒天培地に培養後、菌体浮遊液を作成・洗浄する。この菌液を超音波処理したものと処理しないものについて、サルコシン抽出した。すなわち最終濃度0.4%サルコシン液を加えた超音波処理有無の菌体洗浄液を30分間抽出後、超遠心し、その上清を透析した。

(3)二次元SDS-PAGE電気泳動と蛋白同定:サルコシン抽出液を二次元電気泳動後、蛍光染色した。さらに発光したスポットを切り取り、トリプシン消化後、質量分析(MALDI-TOFMS)を用い蛋白同定した。またウエスタンブロットは泳動後、PVDF膜に転写し、化学発光させた。

(4)イオン交換カラムクロマトグラフィ(DEAE)法:食塩濃度0mM トリス塩酸緩衝液(pH8.3)に溶かしたDEAE 3~4mlを専用カラムに重層後、試料をチャージした。その後0~1000mM・NaClで溶出する蛋白を3mlづつ採取した。これら各溶液の蛋白濃度を測定(280nm)後、各溶液を抗原としたELISAで陽性・陰性パネル血清の*B. henselae* IgG抗

体価を測定した。またCSD陽性血清が特に強く反応する蛋白成分が判明した際はその領域NaCl濃度で溶出する蛋白をステップワイズ法にて量産した。

(5)ELISAによるIgG抗体価測定:96穴マイクロプレートに炭酸緩衝液(pH9.2)で希釈した各抗原液を入れ、4で一晩固相化させた。5% skim milk PBSでブロッキング後、100倍希釈血清を加えて37 1時間反応させた。HRP標識抗ヒトIgG抗体を37 1時間反応後、o-phenylenediamine含有50mMリン酸クエン酸緩衝液(pH5.0)で発色させた。4N硫酸で反応停止後、マイクロプレートリーダー(492nm)で吸光度を測定した。

4. 研究成果

(1)*B. henselae* 菌体サルコシン抽出液の二次元電気泳動による解析:多種類の蛋白成分が検出され、DnaK, GroEL, Tuf, RL9, GroEsなど8種類の蛋白が同定された(図1)。これら蛋白に対する陽性・陰性パネル血清によるウエスタンブロット解析では陽性血清のみに反応する蛋白の同定は困難であった。したがって、この抽出液をさらにDEAE法で精製後に本法による解析を行うことが効率的と思われた。

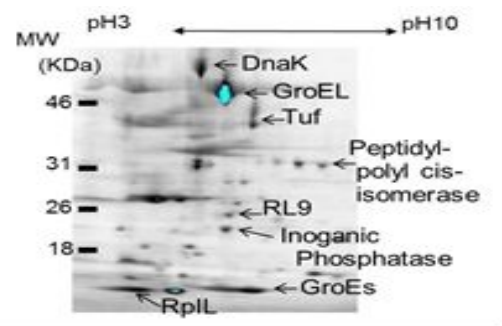


図1 サルコシン上清液の二次元電気泳動

(2)*B. henselae* 菌体のDEAE法による解析:*B. henselae* 超音波処理液をDEAE法で解析した結果、50-150mM NaClと350-450mM NaClに2つのピークが認められた。一方、CSD患者血清および健常人血清と反応する蛋白はそれぞれ100-300(特に245-295)mM NaClと100-200mM NaClで両者のピークは異なった(図2)。

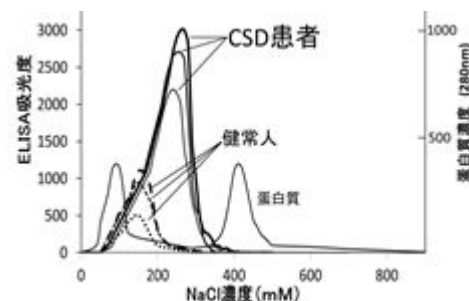


図2 *B. henselae* DEAE精製分画における健常人とCSD患者血清との反応性

(3)サルコシン抽出における超音波処理の影響：従来 *B. henselae* 菌体のサルコシン抽出は超音波処理していたが、処理しないほうが陽性・陰性血清の解離が大きかった。したがって、今後は直接サルコシン処理したほうが不要な蛋白成分が少なく有用と思われた。

(4)サルコシン抽出回数の影響：*B. henselae* 洗浄液を超音波処理せずに、連続5回サルコシン抽出を繰り返し、その上清液を DEAE 法で解析した。すなわち、先の DEAE 法の検討結果より、245-295m NaCl で陽性検体と反応する蛋白成分が溶出したことより、各抽出液を 245mM, 270mM, および 295mM NaCl で順次溶出させ、それぞれを 3ml、10 本採取した。各溶出液を抗原として ELISA でパネル血清の *B. henselae* IgG 抗体価を測定した。その結果、サルコシン抽出1回目では 245mMNaCl で特に陰性血清と反応する成分の溶出であった。しかし 2-3 回目では 270mM と 295mMNaCl で主に陽性血清と反応する蛋白成分が確認され、4 回目では 295mMNaCl のみに陽性検体と反応する蛋白成分が認められた。抽出5回目ではいずれの濃度も陽性・陰性血清と反応する成分は確認されなかった。

(5)サルコシン抽出 2~4 回目の DEAE 精製液のウエスタンブロット解析：サルコシン抽出 2~4 回目の DEAE 精製の 245-295mMNaCl 溶出混合液を SDS-PAGE とウエスタンブロット法で解析した。その結果、11kDa 付近で分離不能な蛋白成分が認められたが、他では 30~65kDa 付近で数本のバンドが認められた(図3-)。一方、ウエスタンブロット法では健常人血清で明らかなバンドが認められなかったが、患者血清では 11kDa 付近~52kDa の間に数本の明らかなバンドが確認され、患者によりそのパターンは異なった(図3-)。

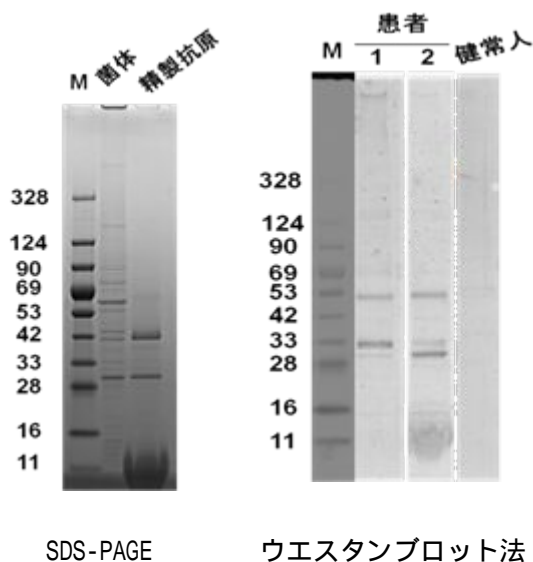


図3 DEAE 法精製による 245-295mMNaCl 溶液の解析

以上 *B. henselae* IgG 抗体価測定のための抗原精製について、サルコシン抽出液の溶解蛋白成分を検討した。その結果、多種類の蛋白成分が含まれており、8 種類の蛋白が同定されたが不要な蛋白が多いため、CSD 患者に特異的に反応する抗原蛋白の同定・検出は困難であった。そこでさらにこの溶液を DEAE 法で精製した。サルコシン抽出液は *B. henselae* 菌体を超音波処理せず、直接にサルコシン液で連続抽出したほうが優れ、しかも 2~4 回目の抽出液を DEAE 法で精製する際、245-295mMNaCl で溶出する蛋白成分が特異性の高い抗原蛋白が含まれていることが判明した。今後はこの精製液を大量生産すると同時にこの抗原液の解析により、種々の特異性の高い抗原蛋白の精製が可能となり、高感度 ELISA の確立が期待される。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計6件)

鶴岡恵子、堂岡英弘；中心静脈カテーテル挿入部の感染予防におけるマキシマルプレコーションの評価、環境感染誌、査読有、2013,28(6) 348-354

https://www.jstage.jst.go.jp/article/jsei/28/6/28_13-013/_pdf

Keiko Tsuruoka, Hidehiro Tsuneoka, Mitsunobu Kawano, Masashi Yanagihara 他4名・2番目：Evaluation of IgG ELISA using N-lauroyl-sarcosine-soluble proteins of *Bartonella henselae* for highly specific serodiagnosis of cat scratch disease; Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 査読有, 74,2012,230-235 DOI:

10.1016/j.diagmicrobio.2012.06.028.

Tomohiro Matsui, Moe Tasaki, Takahiro Yoshioka, Hidehiro Tsuneoka, 他2名・

4番目：Temperature- and time-dependent changes in TLR2-activated microglial NF- κ B activity and concentrations of inflammatory and anti-inflammatory factors; Intensive Care Med, 査読有, 38,2012,1392-1399 DOI:

10.1007/s00134-012-2591-3.

Yukari Motoki, Junzo Nojima, Masashi Yanagihara, Hidehiro Tsuneoka, 他3名・

4番目：Anti-phospholipid antibodies contribute to arteriosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus through induction of

tissue factor expression and cytokine production from peripheral blood mononuclear cells. Thromb Res. 査読

有, 130(4) 2012,667-673 DOI:

10.1016/j.thromres.2011.11.048

Junzo Nojima, Yukari Motoki, Hidehiro Tsuneoka, 他6名・3番目：‘Oxidation

stress index' as a possible clinical marker for the evaluation of non-Hodgkin lymphoma; British Journal of Haematology, 査読有, 155(4), 2011, 528-530
DOI: 10.1111/j.1365-2141.2011.08719.
Yuki Yamada, Kiyofumi Ohkusu, Masashi Yanagihara, Hidehiro Tsuneoka, 他4名
・4番目: Prosthetic valve endocarditis caused by Bartonella quintana in a patient during immunosuppressive therapies for collagen vascular diseases, Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 査読有, 70, 2011, 395-398 DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2011.03.011

[学会発表](計10件)

河野允信: 猫ひっかき病患者的 *Bartonella henselae* VirB5 サブタイプへの血清反応性の解析, 第86回日本細菌学会総会, 2013年3月18-20日, 幕張メッセ(千葉)
鶴岡恵子: N-ラウロイル-サルコシン可溶性菌体蛋白を用いたELISA法による血清 *Bartonella henselae* IgG抗体価測定の有効性, 第82回日本感染症学会西日本地方会学術集会, 2012年11月5-7日, アクロス福岡(福岡)
柳原正志: Real-time PCR法による *Bartonella henselae* 感染症の迅速診断法の開発とその有用性, 第82回日本感染症学会西日本地方会学術集会, 2012年11月5-7日, アクロス福岡(福岡)
砂川将直: パスツレラによる肺炎の1例, 第106回日本内科学会中国地方会, 2012年11月3日, 島根大学医学部看護学科棟(島根)
菅崎幹樹: 感染性心内膜炎より分離された *Bartonella henselae* の病原因子の遺伝子解析, 第44回中国四国医学検査学会, 2011年11月5-6日, アスティ徳島(徳島)
木村献: 胸膜炎のみを呈した猫ひっかき病の6歳女児例, 第43回日本小児感染症学会総会・学術集会, 2011年10月29-30日, 岡山コンベンションセンター(岡山)
Akiko Umeda: MORPHOLOGICAL STUDY OF ENCEPHALOPATHY CAUSED BY INFECTION WITH BARTONELLA HENSELAE, 第84回日本細菌学会総会, 2011年9月6-10日, 札幌コンベンションセンター(札幌)
細川卓利: *Bartonella henselae* 脳症後に可逆性白質病変をきたした11歳女児例, 第53回日本小児神経学会総会, 2011年5月26-28日, パシフィコ横浜(横浜)
柳原正志: 猫ひっかき病原菌 *Bartonella henselae* のIV型分泌装置とBepAの配列多型および病原性との関連性について, 第85回日本感染症学会, 2011

年4月21-22日、ザ・プリンス パークタワー東京(東京)
山田友紀: 諏訪部章人工弁疣贅より *Bartonella quintana* が分離された1例 ~c-ANCA との関連性~, 第85回日本感染症学会, 2011年4月21-22日, ザ・プリンス パークタワー東京(東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

常岡 英弘 (TSUNEOKA, Hidehiro)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 40437629

(2) 研究分担者

市原 清志 (ICHIHARA, Kiyoshi)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 10144495