

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790554

研究課題名(和文) 病原因子VirB5とBepAによる猫ひっかき病の血清診断・型別法の確立と病態解明

研究課題名(英文) Establishment of a serodiagnosis method and a serotyping method using VirB5 and BepA for cat scratch disease

研究代表者

柳原 正志 (YANAGIHARA, Masashi)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40379954

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：猫ひっかき病(CSD)原因菌Bartonella henselaeの病原因子VirB5とBepAの各サブタイプに対するCSD患者ならび健常人の血清反応性を明らかにした。この結果を受けて、VirB5を用いた抗体価測定用ELISA法と血清型別法を確立した。間接蛍光抗体(IFA)法を基準としたVirB5 ELISA法の感度は72.6%、特異度は99.0%であった。VirB5抗体陽性例では、血清型別法により患者感染菌株のVirB5型の同定が可能となった。VirB5を用いた血清診断・型別法はB. henselae感染症の分子疫学研究に有用なツールになるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the seroreactivities of patients with cat scratch disease (CSD) and of healthy subjects against the VirB5 and BepA subtypes of Bartonella henselae. We developed an ELISA for measurement of anti-VirB5 antibody levels and a serotyping method for the VirB5 subtype. The sensitivity and specificity of the ELISA relative to an indirect fluorescence antibody (IFA) assay were 72.6% and 99.0%, respectively. For patients with positive results for anti-VirB5 antibodies, the serotyping method could identify the VirB5 subtype as being the strain causing infection. The VirB5 ELISA and the serotyping method for the VirB5 subtype are expected to be useful tools for molecular epidemiological studies of B. henselae infection.

研究分野：臨床微生物学

キーワード：猫ひっかき病 Cat scratch disease Bartonella henselae VirB5 ELISA

1. 研究開始当初の背景

Bartonella henselae は猫ひっかき病 (Cat scratch disease: CSD) の主要病原体で、ネコからヒトに感染する人獣共通感染症である。本症はリンパ節腫大と発熱を主訴とする定型例から、リンパ節腫大の認められない重症な非定型例 (不明熱、肝・脾肉芽腫、心内膜炎、視神経網膜炎、急性脳症など) までその臨床症状は多彩である。本菌は患者からの分離が極めて困難であるため、その診断には間接蛍光抗体 (Indirect fluorescence antibody: IFA) 法による抗 *B. henselae* 抗体価測定や PCR 法による *B. henselae* 特異 DNA の検出が行われている。中でも CSD の非定型例は確定診断が困難であり、血清学的診断に依存せざるを得ない。しかし、現在の IFA 法の特異度は高いものの、感度が低く、より高感度な血清学的診断法の確立が急務である。

我々はこれまでに、国内の CSD 患者およびネコ由来 *B. henselae* を対象に遺伝子解析法による分子系統解析を行い、本菌の遺伝学的背景を明らかにしてきた。菌の分離培養が困難な本症でも遺伝子解析は本菌に関する非常に貴重な情報を与えてくれるものの、その解析には本菌 DNA を含むリンパ節等の組織材料を必要とする。しかしながら、定型的な CSD では血清学的に診断できる場合は抗菌薬による治療が可能であり、リンパ節切除といった侵襲的な処置を必要とせず、他の疾患との鑑別が必要な場合にのみ、リンパ節等の組織材料中の本菌 DNA の検索が行われている。本研究では、患者血清に注目し、病原因子に対する抗体をサブタイプ別に検出できれば診断法の開発と疫学研究の両者に有意義であると考え、これまでに蓄積した本菌の遺伝子解析データから、サブタイプ間で相同性に大きな違いを認めた VirB5 と BepA (IV 型分泌装置構成蛋白とそのエフェクター蛋白) に注目した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、猫ひっかき病 (CSD) の原因菌 *B. henselae* の病原因子 VirB5 と BepA を用いた抗体価測定用 ELISA 法と血清型別法を確立し、その有用性を明らかにすることである。本研究では、*B. henselae* の VirB5 と BepA の各サブタイプの組換え蛋白質を作製し、VirB5 と BepA の各サブタイプに対する CSD 患者および健常人の血清反応性を明らかにし、ELISA 法と血清型別法を確立して、その有用性を検討した。

3. 研究の方法

(1) GST 融合タンパク質の作製

PCR 法で増幅した目的遺伝子 (*virB5*, *bepA*) を pGEX-6P-1 (GE ヘルスケア) の Glutathione S-transferase (GST) の下流のマルチクロニングサイトに挿入し、GST 融合タンパク質を発現するプラスミドを作製した。これを大腸菌 BL21 (DE3) に形質転換し、GST 融合タン

パク質の作製に用いた。37°C で一晩前培養した菌液を新たな LB 培地に接種し、37°C で 3 時間振盪培養後に IPTG を加えて 20°C で 6 時間振盪培養して、GST 融合タンパク質の発現を誘導した。培養液を遠心して集菌し、培養上清を除き、沈渣を -80°C で凍結した。凍結した沈渣を氷上で解凍し、EasyLyse Bacterial Protein Extraction Solution (Epicentre) を用いて溶菌し、遠心後、上清を回収した。Glutathione Sepharose 4B (GE ヘルスケア) の入ったオープンカラム (PD-10 empty column, GE ヘルスケア) に回収した上清を加え、4°C、1 時間反応させた。Phosphate buffered saline (PBS) で洗浄後、溶出液 (50mM Tris-HCl, 20mM 還元型グルタチオン, pH=8.8) を加えて GST 融合タンパク質を溶出し、回収した。溶出した GST 融合タンパク質を Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Devices (ミリポア) を用いてバッファー交換 (50mM Tris-HCl pH=7.0, 150mM NaCl, 1mM EDTA) を行った。タンパク質の濃度測定は BCA 法で行い、至適濃度に調整した。

(2) SDS-PAGE

精製した組換え蛋白質は 2×サンプルバッファーに溶解し、95°C で 5 分間煮沸後、氷上で 2 分間急冷したものを SDS-PAGE のサンプルとした。SDS-PAGE は 20mA/ゲルの定電流で行い、泳動後のゲルを Coomassie brilliant blue (CBB) 染色液で 1 時間振盪後、脱色した。

(3) Western blot

精製した組換え蛋白質を SDS-PAGE にて分離後、EzBlot Blotting Buffer (ATTO) を用いて PVDF 膜に転写した。5% スキムミルクで 1 時間ブロッキングを行った。Tris buffered saline with Tween 20 (TBS-T) で洗浄後、1% スキムミルク TBS-T で 100 倍希釈した血清と室温で 1 時間反応させた。TBS-T で洗浄後、1% スキムミルク TBS-T で 800 倍に希釈した HRP 標識抗ヒト IgG 抗体を室温で 1 時間反応させた。検出には DAB Metal Enhancer (Thermo Scientific) を用いた。

(4) 血清の吸収処理

1% スキムミルクで 100 倍希釈した血清に過剰量の GST-VirB5 組換え蛋白質を加えて、37°C、6 時間の吸収処理後に、Western blot を行った。

(5) ELISA 法の抗原の作製

GST-VirB5 融合タンパク質に PreScission protease (GE ヘルスケア) を加えて 4°C で 16 時間反応させ、GST タグを切断した。これに Glutathione Sepharose 4B を加え、遊離した GST を吸着させ、VirB5 を含む上清を回収した。これをゲル濾過カラム (HiLoad 16/600 Superdex 75pg, GE ヘルスケア) で精製を行い、ELISA 法の抗原とした。

(6) ELISA 法

炭酸緩衝液 (pH9.2) で希釈した抗原タンパク質を 96 穴のマイクロプレートに分注し、4°C 下で一晩固相化した。PBS with Tween 20 (PBS-T) で洗浄後、5% スキムミルク PBS-T で

ブロッキングを行った。PBS-T で洗浄後、1% スキムミルク PBS-T で 100 倍希釈した血清を加え、37°C で 1 時間反応させた。PBS-T で洗浄後、1% スキムミルク PBS-T で 20,000 倍希釈した HRP 標識抗ヒト IgG 抗体を加え、37°C で 1 時間反応させた。PBS-T で洗浄後、OPD 基質液を加えて室温で 10 分間発色させた。3M 濃硫酸を加えて、発色停止後、492nm で吸光度を測定した。プレート間差を補正するために各プレートに同一の陽性、陰性コントロールの値を測定し、次式で求めた Index 値を用いて評価した。ELISA Index=(S-N)/(P-N) (S:被験血清、P:陽性コントロール血清、N:陰性コントロール血清)。本法の臨床的有用性評価の対象として、健常人 96 例および CSD 疑い患者 189 例 (IFA 法陽性 84 例、IFA 法陰性 105 例) の血清を用いた。

4. 研究成果

(1) VirB5 サブタイプに対する CSD 患者および健常人の血清反応性

リンパ節や膿などの遺伝子解析により感染菌株の *virB5* 遺伝子型が決定済みの CSD 患者 19 例と健常人 4 例の血清について、VirB5-1 型、2 型、3 型を抗原とした Western blot を行った。その結果、19 例中 13 例 (68.4%) で VirB5 に反応を認め、反応性に強弱はあるものの、全ての VirB5 サブタイプに反応していた (図 1 A、B)。患者血清 19 例中 6 例と健常人血清 4 例中 4 例では反応を認めなかった (図 1 C、D)。

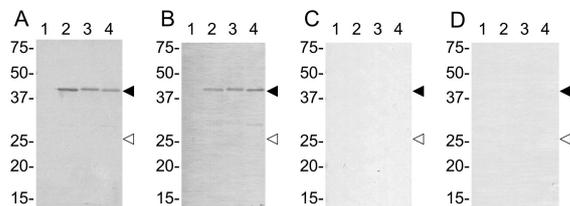


図 1 Western blot による VirB5 サブタイプに対する CSD 患者 (A~C) および健常人 (D) の血清反応性の解析

レーン 1:GST、レーン 2:GST-VirB5-1 型、レーン 3:GST-VirB5-2 型、レーン 4:GST-VirB5-3 型。左に分子量 (kDa)、右に GST-VirB5 (◀) と GST (◁) の位置を示す。

(2) BepA サブタイプに対する CSD 患者および健常人の血清反応性

リンパ節や膿などの遺伝子解析により感染菌株の *bepA* 遺伝子型が同定済みの CSD 患者 19 例と健常人 4 例の血清について、BepA-1 型、2 型を抗原とした Western blot を行った。CSD 患者 19 例中 13 例 (68.4%) で BepA との反応を認めた (図 2 A~C)。このうち、BepA-1 型のみと反応したものが 7 例、BepA-1 型と BepA-2 型とともに反応したものが 6 例であった。一方、健常人 4 例中 2 例で BepA との交差反応を認めたため、健常人を追加して解析したところ、健常人計 16 例中 9 例 (56.3%) で BepA との交差反応を認めた (図 2 D)。このう

ち、BepA-1 型のみと交差反応したものが 2 例、BepA-1 型と BepA-2 型とともに交差反応したものが 7 例であった。この結果から、BepA は健常人血清と交差反応することが明らかとなり、CSD の血清診断に用いる抗原として適していなかった。

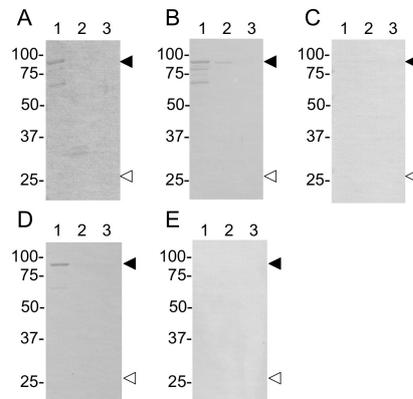


図 2 Western blot による BepA サブタイプに対する CSD 患者 (A~C) および健常人 (D、E) の血清反応性の解析

レーン 1:GST-BepA-1 型、レーン 2:GST-BepA-2 型、レーン 3:GST。左に分子量 (kDa)、右に GST-BepA (◀) と GST (◁) の位置を示す。

(3) VirB5 ELISA 法の確立

ELISA 法の抗原には、各サブタイプの GST-VirB5 融合タンパク質から GST タグを切断し、ゲル濾過カラムで精製した VirB5 を用いた。IFA 法陽性 6 例、IFA 法陰性 6 例、健常人 6 例の血清を用いて、ELISA 法の条件の検討を行った。健常人 96 例の血清を用いて、本法のカットオフ値 (mean+3SD) を設定した。

(4) VirB5 ELISA 法の有用性の検討

CSD 疑い患者血清 189 例 (IFA 法陽性 84 例、IFA 法陰性 105 例) 中、VirB5-1 型では 76 例、VirB5-2 型では 70 例、VirB5-3 型では 71 例が陽性となり、合わせて 189 例中 79 例が陽性となった (図 3)。IFA 法の結果と比較した場合、IFA 法陽性 84 例 (IFA 法 $\geq 1:256$) のうち、VirB5-1 型では 60 例が、VirB5-2 型と VirB5-3 型ではそれぞれ 56 例が陽性となった。一方、IFA 法陰性 105 例 (IFA 法 $< 1:256$) では、

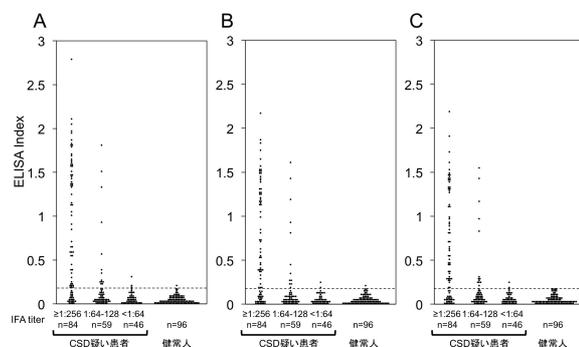


図 3 CSD 疑い患者および健常人の VirB5 抗体価の分布

(A) VirB5-1 型、(B) VirB5-2 型、(C) VirB5-3 型の ELISA Index 値をプロットした。カットオフ値は点線です。

VirB5-1 型で 16 例、VirB5-2 型で 14 例、VirB5-3 型で 15 例が陽性となり、合わせて 18 例が IFA 法陰性 ELISA 法陽性となる不一致例であった。これらの不一致例はいずれも臨床的に CSD が強く疑われる症例であった。また、健常人血清 96 例では、VirB5-1 型と VirB5-2 型でそれぞれ 1 例がカットオフ値を上回り陽性となった。IFA 法を基準とした本法の感度と特異度はそれぞれ、VirB5-1 型では 71.4%、99.0%、VirB5-2 型では 66.7%、99.0%、VirB5-3 型では 66.7%、100% であり、これら 3 種類を合わせると、感度 72.6%、特異度 99.0% であった。

(5) IFA 法陰性 ELISA 法陽性となった不一致例の Western blot 法による反応性の検証

IFA 法陰性 ELISA 法陽性となった患者血清について、VirB5 との反応性を Western blot 法で解析したところ、18 例中 10 例で VirB5 特異抗体を検出した。陽性となった 10 例のうち、6 例では全てのサブタイプに対する VirB5 特異抗体を検出し、4 例では 1 つのサブタイプだけに反応を示した。一方、残りの 8 例では、いずれのサブタイプにも反応を示さず、Western blot 法では VirB5 特異抗体を検出できなかった。

Western blot 法の結果と VirB5 ELISA Index 値の分布を比較したところ(図 4)、ELISA Index 値が 0.4 以上の患者血清ではそれぞれ VirB5-1 型では 6 例中 6 例(100%)、VirB5-2 型では 6 例中 6 例(100%)、VirB5-3 型では 5 例中 5 例(100%)で Western blot 法で特異抗体を検出できた。一方、ELISA Index 値 0.4 未満の患者血清では、それぞれ VirB5-1 型では 12 例中 2 例(16.7%)、VirB5-2 型では 12 例中 1 例(8.3%)、VirB5-3 型では 13 例中 4 例(30.8%)でしか特異抗体を検出できなかった。また、Western blot 法で 1 つのサブタイプだけに反応を示した 4 例のうち、3 例では反応を示したサブタイプだけが ELISA 法陽性であった。残る 1 例では、全てのサブタイプで ELISA 法陽性であったが、ELISA Index 値が最も高かったサブタイプだけが Western blot 法陽性であった。これらのことから、Western blot 法で VirB5 特異抗体を検出できなかった 8 例では、Western blot 法の検出感

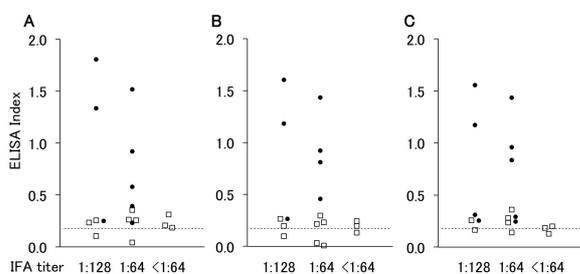


図 4 不一致例における VirB5 ELISA Index 値と Western blot 法の陽性・陰性例の分布 (A)VirB5-1 型、(B)VirB5-2 型、(C)VirB5-3 型の ELISA Index 値を、Western blot 法陽性例は●、Western blot 法陰性例は□でプロットした。カットオフ値は点線で示す。

度が ELISA 法に比べて低いことや抗原の高次構造の変化が原因であることが推察された。

(6) 血清を用いた VirB5 型別法の確立

感染菌株の *virB5* 遺伝子型に一致した VirB5 サブタイプに対する抗体の存在を明らかにするため、各サブタイプの GST-VirB5 組換え蛋白質で吸収処理した血清を用いて、Western blot 法により各 VirB5 サブタイプへの反応性の変化を検討した。

感染菌株の *virB5* 遺伝子型が 1 型の 5 例では、血清を VirB5-1 型の抗原で吸収処理すると全ての VirB5 サブタイプへの反応が完全に消失したが、他の VirB5-2 型、VirB5-3 型の抗原で吸収処理しても VirB5-1 型への反応は消失しなかった(図 5 検体 A)。同様に、感染菌株の *virB5* 遺伝子型が 3 型の 8 例では、これらの血清を VirB5-3 型の抗原で吸収処理すると全ての VirB5 サブタイプへの反応が完全に消失したが、他の VirB5-1 型、VirB5-2 型の抗原で吸収処理しても VirB5-3 型への反応は消失しなかった(図 5 検体 B)。

このように、VirB5 と反応した 13 例すべてにおいて、感染菌株と同一の VirB5 サブタイプの抗原で血清を吸収処理することで、全ての VirB5 サブタイプへの反応は完全に消失し(完全吸収)、感染菌株の遺伝子型と一致した。この結果は、血清の吸収処理によって感染菌株の VirB5 型を同定できることを示しており、血清を用いた VirB5 型別法を確立した。

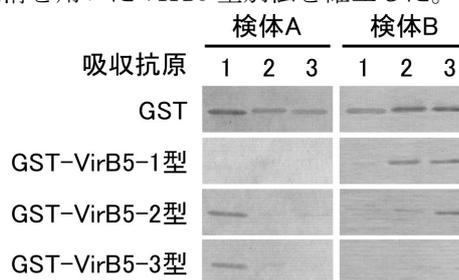


図 5 血清の吸収処理による VirB5 サブタイプへの反応性の変化

検体 A: *B. henselae* VirB5-1 型に感染した患者血清、検体 B: *B. henselae* VirB5-3 型に感染した患者血清。レーン 1: GST-VirB5-1 型、レーン 2: GST-VirB5-2 型、レーン 3: GST-VirB5-3 型。

以上の結果より、本研究では *B. henselae* の病原因子 VirB5 と BepA の各サブタイプに対する CSD 患者および健常人の血清反応性を明らかにし、VirB5 を用いた血清診断・型別法を確立した。VirB5-1 型~3 型の抗原の併用により VirB5 ELISA 法の感度は 72.6%、特異度は 99.0% であった。本法は IFA 法の感度を上回ることができなかったものの、VirB5 抗体陽性例では血清を用いた VirB5 型別法により患者感染菌株の VirB5 型の同定が可能となった。VirB5 を用いた血清診断・型別法は *B. henselae* 感染症の分子疫学研究に有用なツールになるものと期待される。

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2件)

- ① Tsuruoka K, Tsuneoka H, Kawano M, Yanagihara M, Nojima J, Tanaka T, Yamamoto M, Ichihara K. 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*. 74: 230-235, 2012. 査読有り DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2012.06.028.
- ② Motoki Y, Nojima J, Yanagihara M, Tsuneoka H, Matsui T, Yamamoto M, Ichihara K. 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. *Thrombosis Research*. 130: 667-673, 2012. 査読有り DOI:10.1016/j.thromres.2011.11.048

[学会発表] (計4件)

- ①河野允信、柳原正志、常岡英弘、猫ひっかき病患者の *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03月18-20日、幕張メッセ(千葉県)
- ②柳原正志、河野允信、常岡英弘、Real-time PCR法による *Bartonella henselae* の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6日、アクロス福岡(福岡県)
- ③鶴岡恵子、河野允信、柳原正志、常岡英弘、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6日、アクロス福岡(福岡県)
- ④砂川将直、石口博智、篠田崇平、宮野馨、内海仁志、金本将司、田中伸明、藤井崇史、柳原正志、常岡英弘、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例会、2012年6月2日、島根大学医学部看護学科棟(島根県)

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳原 正志 (YANAGIHARA Masashi)
山口大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：40379954