

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460678

研究課題名(和文)日本人由来株を用いた高感度ELISA法による猫ひっかき病特異抗体の検出と病態解析

研究課題名(英文) Detection and pathological analyses of specific antibody in cat scratch disease by highly-sensitive ELISA using Japanese-derived strain

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) 3,900,000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。その抗原液を得るには 1) Bartonella henselaeを二層培地(5%ウサギ血液加HI寒天培地+D-MEM液体培地)で培養する。2) その菌液を37℃下で0.1%CHAPS液で抽出(1回目)した不溶性成分を再度0.5%CHAPS液で抽出(2回目)する。3) その可溶性成分をDEAE-Sepharose法で245-310mMNaCl中に溶出する蛋白成分を精製する。この精製液中には特異性の高い蛋白成分が含まれており、これを抗原としたELISA-IgGの臨床的有用性が期待される。

研究成果の概要(英文)：The measurement of anti-Bartonella henselae IgG by highly-sensitive ELISA requires highly-specific purification of antigen. To obtain this antigen, it is needed 1) to culture Bartonella henselae in double-phase culture media (Heart infusion agar medium with 5% rabbit blood and D-MEM liquid medium), 2) to put the liquid in 0.1% CHAPS (ampholytic surfactant) at 37℃ to extract insoluble components, which is to be put in 0.5% CHAPS for the second time to extract soluble components, and 3) to purify the protein in the soluble components using 245-310mMNaCl by DEAE-Sepharose chromatography. This purified solution contains highly-specific protein components and therefore, clinical implication of this protein as an antigen is greatly expected in the measurement of anti-Bartonella henselae IgG by ELISA.

研究分野：臨床微生物学

キーワード：Bartonella henselae 猫ひっかき病 ELISA CHAPS

### 1. 研究開始当初の背景

猫ひっかき病 (CSD) は主にネコとの接触により引き起こされる人獣共通感染症であり、その原因菌は *Bartonella henselae* である。本症は局部リンパ節腫脹を認める定型例から不明熱、視神経網膜炎、肝・脾肉芽腫、急性脳症などの全身性の非定型な重症例までその臨床病型は多彩である。本菌は患者からの分離培養が困難なため、CSD 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。

申請者らは高感度 ELISA-IgG の確立をめざし、*B. henselae* 菌体から陰イオン界面活性剤 N-ラウロイル-サルコシン (以下サルコシン) による抗原抽出法を行ってきた。しかし抽出後のサルコシン液は低温で結晶析出が認められ、操作が煩雑になるためこれに替わる界面活性剤が憂慮された。今回、両性界面活性剤 CHAPS に着目した。

### 2. 研究の目的

高感度 ELISA-IgG 抗体価測定の確立を目的に、両性界面活性剤 CHAPS による抽出法の基礎的検討を行った。同時にその抽出蛋白を DEAE-Sepharose クロマトグラフィ (DEAE) 法による抗原精製を行ない、ELISA-IgG を確立し、その有用性について検討した。

### 3. 研究の方法

(1) 使用血清: パネル血清 (健康人: IFA 法陰性 6 例、CSD 患者: IFA 法陽性 6 例) および CSD (疑) 患者血清 61 例 (IFA 法 < 128 倍: 38 例、256 倍: 23 例) と健康人血清 25 例を使用した。

(2) *B. henselae* 菌液の作成: *B. henselae* ATCC49882 株を使用して 2 種類の菌液 (固形培地由来菌: チョコレート寒天培地での発育コロニーを 5mM HEPES Buffer pH7.4 で洗浄した菌液、二層培地由来菌: 5% ウサギ血液加 HI 寒天培地+D-MEM 液体培地での発育菌を洗浄した菌液) を作成した。

(3) CHAPS 抽出条件の検討: *B. henselae* 菌体の CHAPS 抽出限界濃度 (0.25 ~ 1.0%) を 37 下で検討し、それ以下の各濃度中の不溶性物を抽出限界濃度で一緒に 2 回目を抽出し、各上清液 (可溶性成分) の抗原性を ELISA で比較した。

(4) DEAE 法による精製: CHAPS 抽出液を DEAE 法 (245~310mM NaCl 濃度 Tris-HCl Buffer pH8.3) で溶出する蛋白質を回収し、これを抗原として ELISA を確立して、パネル血清の *B. henselae* IgG 抗体価を測定した。更にこれら精製抗原を SDS-PAGE およびウエスタンブロット (W-B) 法で解析した。

(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) に各抗原液を入れ、固相化させた。5% skim milk

PBS でブロッキング後、希釈血清を加えて反応させた。HRP 標識抗ヒト IgG 抗体を反応後、o-phenylenediamine 含有 50mM リン酸クエン酸緩衝液 (pH5.0) で発色させ、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。

(6) 精製抗原の有用性: 2 種類の精製抗原 (固形培地由来菌と二層培地由来菌) を使用した ELISA-IgG を確立し、CSD (疑) 患者血清と健康人血清の *B. henselae* IgG 抗体価を測定し、両者を比較した。

### 4. 研究成果

(1) CHAPS 抽出法の抽出条件の検討: 最初に固形培地を用いた CHAPS 液による *B. henselae* 菌体抽出限界濃度を検討したところ、その濃度は 0.5% であった。

(2) CHAPS 液濃度と抽出回数: 菌体限界濃度 0.5% と判明したため、1 回目を 0.025 ~ 0.5% CHAPS で抽出後、その不溶性成分を 0.5% CHAPS 液で一緒に 2 回目抽出を行った。これら 1 回目、2 回目の各抽出液 (可溶性成分) の抗原性を ELISA-IgG で比較したところ、1 回目抽出を CHAPS 濃度 0.025~0.1% で行ったものは患者血清と反応する抗原量は少なく、また 0.2~0.5% でも患者血清のみに反応する抗原量は顕著でなかった (図 1-1)。しかしこれら沈渣 (不溶性成分) を再度 0.5% CHAPS 液で抽出する (2 回目) 方が CSD 患者血清と強く反応する抗原成分が明らかに多く含まれていることが判明した (図 1-2)。

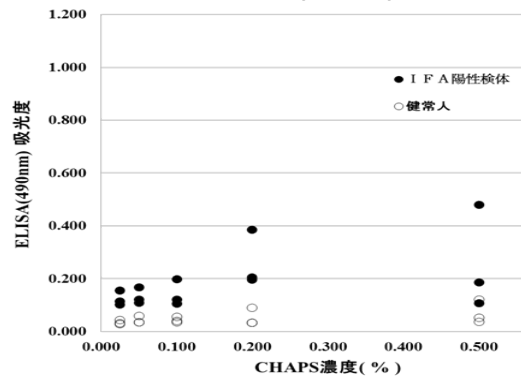


図 1-1 : 1 回目抽出液の ELISA 反応

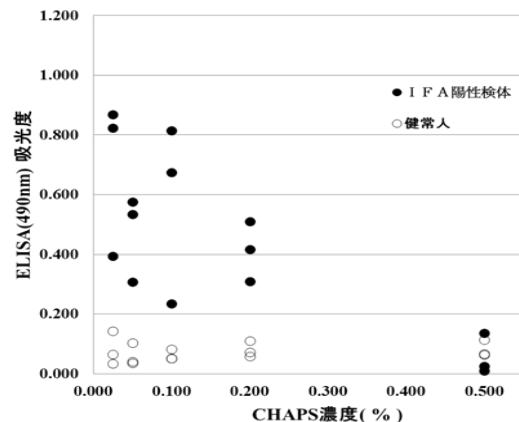


図 1-2 : 各濃度 CHAPS による 2 回目抽出液の ELISA 反応性

(3) CHAPS 抽出後の DEAE 精製効果：  
CHAPS 抽出液 (1 回目と 2 回目) を DEAE 精製後、各精製前後の IgG-ELISA 抗体価を測定した。その結果、抽出から精製に伴い、健常人血清と反応する蛋白成分が低値を示す傾向を認めた。一方、患者血清と反応する蛋白成分の増加傾向を認め(図 2)、精製効果が確認された。

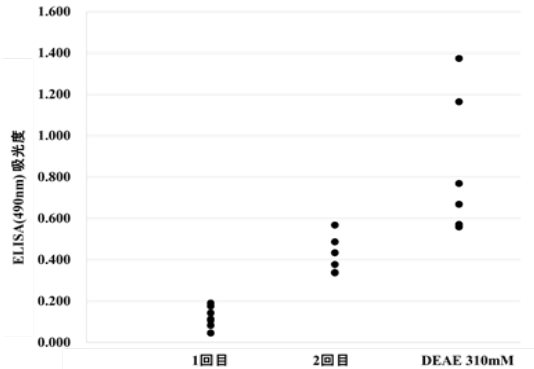


図 2 : 抽出・精製に伴う CSD 患者血清の ELISA-IgG 反応変化

(4) 精製抗原の SDS-PAGE および W-B 解析：  
精製抗原液を SDS-PAGE で解析後、パネル血清で W-B 法を行った。SDS-PAGE では主に 53-64kDa 付近、42kDa 付近、30kDa 付近、11kDa の蛋白が認められ、W-B 解析では 33kDa および 11kDa 付近に患者血清と強く反応するバンドが認められた(図 3)。

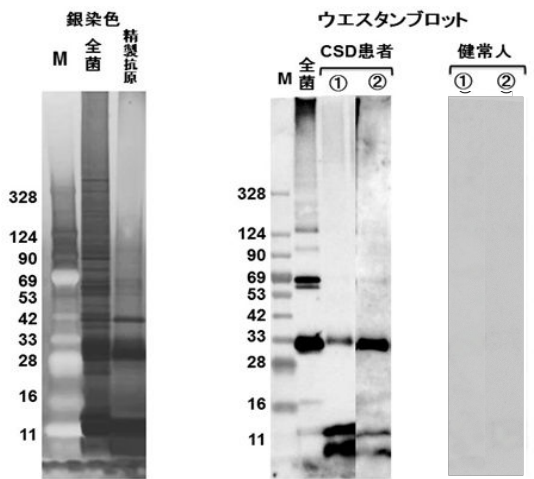


図 3 : DEAE 法による精製後抗原の SDS-PAGE と W-B 解析

(5) 精製抗原の有用性  
以上の CHAPS 抽出・DEAE 精製法で 2 種類の培地、すなわち固形培地由来菌および二層培地由来菌の *B. henselae* 菌液より抽出・精製抗原を作成し、IgG-ELISA の有用性を CSD (疑) 患者血清 61 例と健常人血清 25 例で比較検討した。その結果、固形培地由来抗原では健常人血清の吸光度は 0.1 以下と低く、CSD 疑い患者とはそれぞれ異なった分布を示した (図 4-1)。しかし、二層培地由来抗原の方が健康人血清と CSD (疑) 患者血清との分布の相違が明らかであった (図 4-2)。これ

は ROC 曲線解析(図 5-1,5-2)によっても証明され、健常人と患者血清 IFA 256 倍 (両培地の両側確率  $p < 0.05$ )、健常人と患者血清 IFA  $< 128$  倍 (両培地の両側確率  $p < 0.04$ ) と、いずれも有意に二層培地由来菌抗原の方が優れていた。

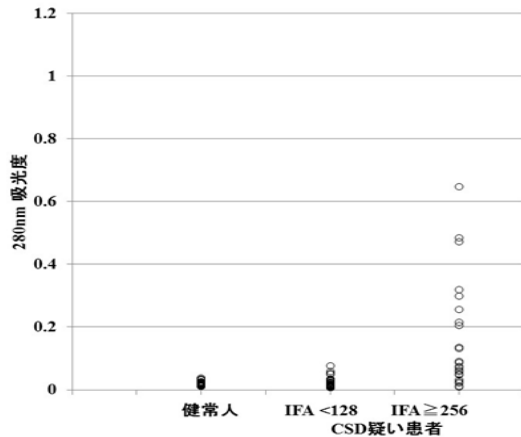


図 4 - 1 : 固形培地由来菌抗原による ELISA-IgG

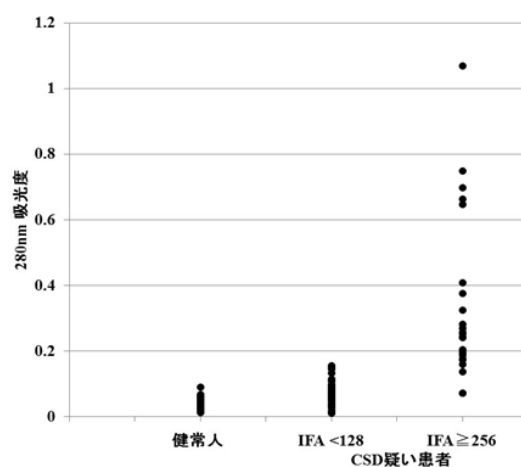


図 4 - 2 : 二層培地由来菌抗原による ELISA-IgG

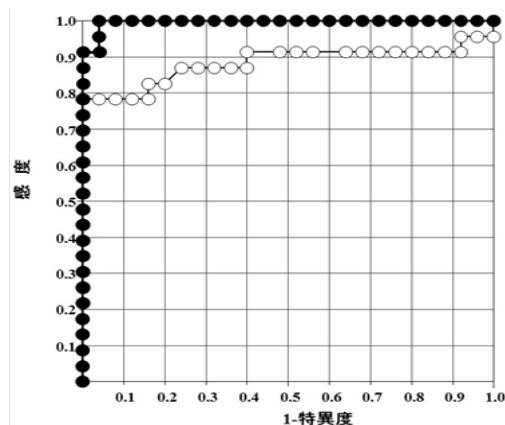
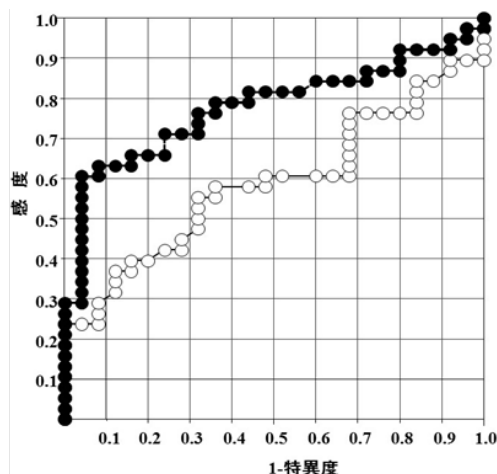


図 5 - 1 : 固形培地由来菌抗原と二層培地由来菌抗原使用 IgG-ELISA における健常人と CSD 患者 256 倍との分離比較 (ROC 曲線)  
● : 二層培地由来抗原 ○ : 固形培地由来抗原、二層培地由来菌抗原の方が優れている ( $P < 0.05$ )



**図5-2：固形培地由来菌抗原と二層培地由来菌抗原使用 IgG-ELISA における健常人とCSD(疑)患者<128倍との分離比較(ROC曲線)●：二層培地由来抗原 ○：固形培地由来抗原、二層培地由来抗原の方が優れている(P<0.04)**

以上、ELISAによる*B. henselae*-IgG抗体価測定の抗原は二層培地由来*B. henselae*菌体を37下で0.1% CHAPS液で1回目を抽出した沈査(不溶性成分)を2回目0.5% CHAPS液で抽出した液(可溶性成分)を更に、DEAE法で精製した抗原が有用である。今後、本抗原を使用したIgG-ELISAの臨床的有用性が期待される。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

Hidehiro Tsuneoka, Masashi Yanagihara, Ayano Tanimoto, Nobuko Tokuda, 他3名・1番目: The utility of a country-specific *Bartonella henselae* antigen in an IgM-indirect fluorescent antibody assay for the improved diagnosis of cat scratch disease; *Diagnostic Microbiology & Infectious Disease*, 査読有, 2017, 87, 22-24

<http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.10.015>

宮城 恵、岡田隆文、西村恵子、柳原正志、常岡英弘、5番目: 発熱と視神経網膜炎のみを呈した10歳女児が発端となった猫ひっかき病の家族内発症、小児感染免疫、査読有、2016(27)4, 285-289

Ken-ichiro Otsuyama, Hidehiro Tsuneoka, Kaori Kondou, 他4名・2番目: Development of a highly specific IgM Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for *Bartonella henselae* using refined N-Lauroyl-sarcosine-insoluble proteins for Serodiagnosis of Cat Scratch Disease; *J. Clin. Microbiol.*, 査読有、2016, 54, 1058-1064  
DOI: 10.1128/JCM.03009-15

Sasagu Kimura, Shunji Hasegawa, Masashi Yanagihara, Hidehiro Tsuneoka, 他2名・6番目: Cat scratch disease with severe pleuritis in a 6-year-old girl; *Pediatrics International*, 査読有, 2015, 57, 501-503  
doi: 10.1111/ped.12680

[学会発表](計4件)

柳原正志: *Bartonella henselae* VirB5 IgG ELISA法の確立と臨床的有用性、第90回日本細菌学会総会、2017年3月19-21日、仙台国際センター展示棟(宮城県・仙台市)

近藤香: “ELISAによる*Bartonella henselae*抗体価測定”の抗原精製 N-ラウリルサルコシン抽出法の基礎的検討 第90回日本細菌学会総会、2017年3月19-21日、仙台国際センター展示棟(宮城県・仙台市)

谷本 綾乃: 日本人株を使用した間接蛍光抗体法による*Bartonella henselae* IgM抗体価測定の試み、2016年10月15-16日、第69回日本細菌学会中国・四国支部総会: かがわ国際会議場(香川県・高松市)

Masashi Yanagihara: improved Laboratory diagnosis of cat scratch disease by a combination of serology and PCR on blood. 第89回日本細菌学会総会 2016年3月23-25日・大阪国際交流センター(大阪府)

## 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

徳田 信子 (TOKUDA, Nobuko)  
山口大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 70227578

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

大津山 賢一郎 (OTSUYAMA, Ken-ichiro)  
山口大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号: 10432741