

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590574

研究課題名(和文) 猫ひっかき病の新たな血清学的診断法の確立

研究課題名(英文) Improved method of ELISA for cat scratch disease

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

研究成果の概要(和文)：猫ひっかき病(Cat Scratch Disease: CSD)の新たな血清学的方法として *Bartonella henselae* IgG 抗体価測定用 Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) を確立した。本法の特徴は液体培地で培養した *Bartonella henselae* ATCC49882 株を N-ラウリルルーサルコシン液で処理し、その上清液を抗原とするものである。本法の感度は 0.952、特異度は 0.987 であり、その臨床的有用性が期待される。

研究成果の概要(英文)：We established a new serological diagnostic method of anti-*Bartonella henselae* IgG-ELISA for cat scratch disease(CSD). The remarkable characteristic of the ELISA is the use of N-lauroyl-sarcosine-soluble proteins antigens from liquid medium-grown *Bartonella henselae* ATCC49882. The sensitivity and specificity of the ELISA relative to indirect fluorescence assay (IFA) were 0.952 and 0.982, respectively. This tool may be useful for the test for diagnosis of CSD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：Cat scratch disease, *Bartonella henselae*, ELISA

1. 研究開始当初の背景

猫ひっかき病(CSD)は人獣共通感染症であり、局所リンパ節腫脹を主訴とする定型例から不明熱、パリノー眼腺症候群、肝脾肉芽腫、急性脳症など全身性の非定型的な重症例までその臨床像は多彩であり、わが国のペットブームの中、確定診断の重要性が増している。本症の原因菌は *B. henselae* であるが分離培養が困難なため、本症の診断は主に間接蛍光抗体(Indirect Fluorescence Antibody: IFA)法である血清学的診断法で行

われおり、特にリンパ節腫脹の認められない非定型例では血清診断以外、本症確定診断は困難である。しかし本法の特異性は高いものの、感度が低く、また多数検体処理が困難である。この IFA 法の欠点を補うべく新たな血清学的診断法として ELISA 法の開発が急務とされている。

2. 研究の目的

本研究の目的は CSD の血清学的診断率の向上をめざした高感度 ELISA 法の確立である。

血清学的診断法は抗原の選択が極めて重要である。本研究では *B. henselae* の培養法(固形培地と液体培地)や菌体成分による相違など使用抗原に焦点を絞り検討し、ELISA 法を確立する。また多数の CSD 患者血清の *B. henselae* IgG 抗体価を測定し、従来の IFA 法の値と比較し、本法の有用性を検証する。

3. 研究の方法

(1) 使用抗原: *B. henselae* ATCC49882 株をチョコレート寒天培地で培養後、その菌体浮遊液を作成し①超音波処理したもの ②超音波後の全菌を N-ラウリル-サルコシン(サルコシン)処理後、超遠心した沈渣物 ③その上清液 以上3種類の抗原を作成した。次いでそれぞれを抗原とした ELISA 法を確立し、以下のコントロール血清を測定して、最も有用な抗原を選んだ。また同様に我々が“独自に考案した液体培地”で培養した菌液についても①~③について検討し、固形培地由来抗原と液体培地由来抗原との比較をした。

(2) 至適抗原選択のための陽性・陰性コントロール血清(標準曲線)

陽性コントロール血清(IFA法でIgG抗体価 \geq 1:256のCSD患者血清)6検体および陰性コントロール血清(IFA法でIgG抗体価 \leq 1:64の健常人血清)6検体について、各抗原によるELISA法で測定した。

(3) ELISA法によるIgG抗体価測定

炭酸緩衝液(pH9.2)で希釈した抗原液を96穴のマイクロプレートに分注し、4℃下で一晩固相化を行った。Phosphate buffered saline (PBS, pH7.4)で洗浄後、5%スキムミルクPBSでブロッキング後、洗浄した。次いで100倍希釈血清を加えて37℃1時間反応させ、洗浄後、HRP標識ヒトIgG抗体を加えて37℃1時間反応させた。洗浄後、0-Phenyldiamine含有50nMリン酸クエン酸緩衝液(pH5.0)を加えて室温30分間発色させ492nmで吸光度を測定した。

(4) 抗原精製における食塩添加サルコシン液比重差の抗原性への影響

菌体含有サルコシン液中に食塩濃度0~8%になるように添加し、その処理・超遠心後の上清中の抗原性を比較した。

(5) 大腸菌による吸収操作

臨床材料由来大腸菌を普通寒天培地に接種し、37℃、1夜培養した。その菌体浮遊液を超音波処理し、遠心した沈渣を吸収用菌液として用いた。この吸収用菌液含有1%スキムミルクで血清を希釈後、室温にて30分間反応させ、遠心後の上清をELISA法用の検体血清とした。

(6) 至適抗原によるELISA法の有用性

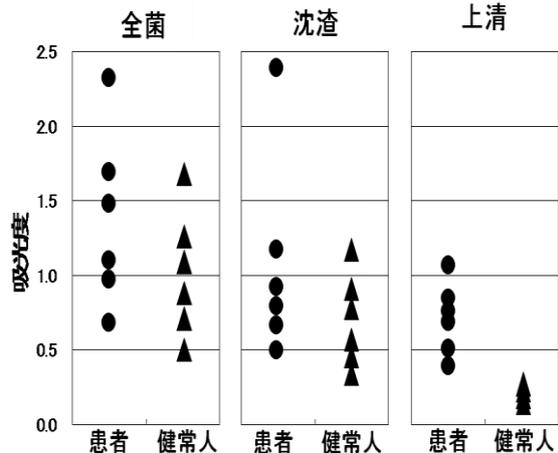
3種類の各抗原によるELISA法で陽性・陰性コントロールを測定して、最も有用である抗原を選択する。次いで抗原の至適条件下で

のELISA法を確立するし、本法の臨床的有用性を検証するため、健常人80例、CSD疑い例88例(臨床的にCSDが疑われる例がIFA法: \leq 1:128倍)およびCSD患者42例(IFA法: \geq 1:256倍)について *B. henselae* IgG抗体価を測定した。

4. 研究成果

(1) 至適抗原の決定

抗原として①超音波処理したもの(全菌) ②サルコシン処理後、超遠心した沈渣物 ③その上清液の3種類を使用したELISA法を確立して、陽性および陰性コントロールの *B. henselae* IgG抗体価を測定した。その結果、図1のごとく、3種類の抗原のうち、サルコシン処理上清液が、陽性コントロールと陰性コントロールの間に明瞭な差が認められ、*B. henselae* IgG抗体価測定用のELISA法の抗原として最も適していることが見出された(図1)。また *B. henselae* 抗原菌株の液体培地と固形培地由来の違いでは液体培地由来菌株で作製した抗原のほうが、吸光度が高く、感度的に優れており、菌株由来による抗原性の違いが認められた。



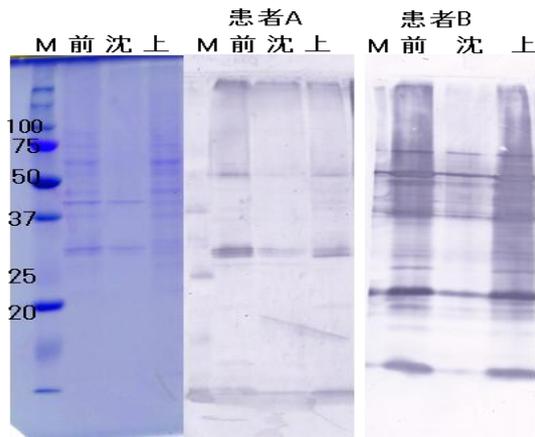
全菌: 超音波処理液(サルコシン処理前)
沈渣: サルコシン処理沈渣
上清: サルコシン処理上清

図1 各抗原液における反応

(2) サルコシン処理抗原の蛋白解析

3種類の抗原液について、SDS-PAGE蛋白電気泳動およびウエスタンブロット法で蛋白解析をした。その結果、抗原液として最も優れた上清液では沈殿物よりも濃く反応し、複数の蛋白バンドが認められた。また患者により反応する蛋白がそれぞれ異なることもわかった(図2)。

SDS蛋白電気泳動 ウェスタンブロット法



M: マーカー
 前: サルコシン処理前
 (ソニケート液)
 沈: サルコシン処理沈渣
 上: サルコシン処理上清

図2 各抗原液の蛋白解析

(3) 抗原精製における食塩添加サルコシン液比重差の抗原性への影響

より精製度の高い抗原液を作製するため、菌体含有サルコシン液中の比重を食塩添加により変化させ、その精製効果について検討した。その結果、食塩無添加液が最も優れ、食塩添加の比重差による抗原精製効果は認めなかった。

(4) 大腸菌による非特異物質の吸収効果

血清中の *B. henselae* 以外の非特異物質を吸収する目的で大腸菌による吸収操作を試みた。健常人陰性検体では吸光度が減少したが CSD 陽性検体では吸光度の変化は見られず、大腸菌による非特異物質の吸収効果が認められた。

(5) サルコシン処理後上清液抗原による ELISA 法の有用性

液体培地で培養した菌株を用いたサルコシン処理上清液を抗原とした ELISA 法を確立し、本法の臨床的有用性を検証するため、CSD 患者 42 例、CSD 疑患者 88 例および健常人 80 例について *B. henselae* IgG 抗体価を測定した(図3)。カットオフ値を 0.48 とした場合、本法は感度 0.952 特異度 0.987 であり、また ROC 曲線 0.986 と本法の臨床的有用性が示唆された。IFA 法との比較では IFA 法陽性 42 例中 2 例は ELISA 法陰性だったが、逆に IFA 法陰性だった CSD 疑い患者 11 例が ELISA 法で陽性と判定された。この 11 例中 9 例は猫や犬との濃厚接触歴があり、かつ局所リンパ節腫大と発熱を有し臨床的に強く CSD の疑われる症例であった(表1)。

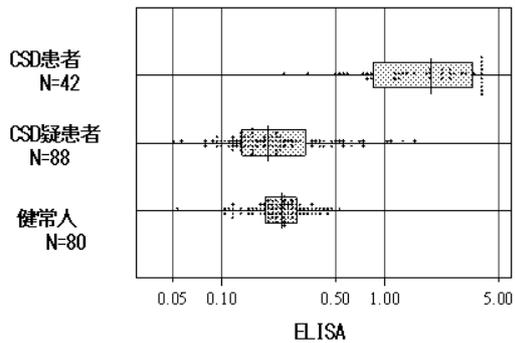


図3 CSD 患者、CSD 疑い患者および健常人に対する *B. henselae* IgG 抗体価

表1 IFA 法と ELISA 法との関係

IFA法* (例)	ELISA法	
	陽性	陰性
陽性	42	2
判定保留	42	34
陰性	46	43

*IFA法 陽性 \geq 1:256 判定保留 1:64-125 陰性 $<$ 1:64

**11例中9例は猫・犬と接触歴あり。局所リンパ節腫大、発熱あり

従来の ELISA 法による *B. henselae* IgG 抗体価測定用の使用抗原は菌体を超音波処理したものやサルコシン処理沈渣であったため、非特異反応が多く、感度も低かった。しかし本研究では過去に報告例のない、液体培地由来菌体のサルコシン処理上清液を抗原に使用することにより、感度・特異性の優れた ELISA 法を確立することができた。この精度は IFA 法以上と推定される。今後はさらに抗原の精製や抗原成分の同定を行うことにより、その精度は一層高まるものと思われる。またこれら成分を抗原とした IgM 抗体価測定を併用することにより CSD の診断率は大きく向上す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7件)

- ① Masashi Yanagihara, Hidehiro Tsuneoka, Motoki Sugasaki, Junzo Nojima, Kiyoshi Ichihara、Multispacer Typing of *Bartonella henselae* Isolates from Humans and Cats, Japan、Emerging Infectious Diseases, 査読有、Vol. 16, No. 12, December 2010, 1983-1985、
- ② Hidehiro Tsuneoka, Masashi Yanagihara, Junzo Nojima, Kiyoshi Ichihara、Antimicrobial susceptibility by Etest

of *Bartonella henselae* isolated from cats and human in Japan, Journal of Infection and Chemotherapy, 査読有, vol.16, 2010, 446-448、

- ③ Hidehiro Tsuneoka, Masashi Yanagihara, Satoru Otani, Yusuke Katayama, Hiroko Hujinami, et al, A first Japanese case of *Bartonella henselae* induced endocarditis diagnosed by prolonged culture of a specimen from the excised valve. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, vol.68, 2010, 174-176、査読有
- ④ Masashi Yanagihara, Hidehiro Tsuneoka, Shoko Hoshide, Erina Ishido, Akiko Umeda, et al, Molecular typing of *Bartonella henselae* DNA extracted from human clinical specimens and cat isolates in Japan. FEMS Immunol Med Microbiol vol.60, 2010, 44-48、査読有
- ⑤ 野島順三、宮川真由美、児玉麻衣、本木由香里、常岡英弘、市原清、日野田裕治、自動分析装置BM-1650による酸化ストレス度の測定、医学検査、Vol.159、No.3、2010、199-207、査読有
- ⑥ 常岡英弘、柳原正志、最近注目される微生物-その臨床的意義と検査法、*Bartonella quintana, B. henselae*、臨床と微生物、Vol.36、No.2、2009、139-142、査読無
- ⑦ Junzo Nojima, Yoshinori Iwatani, Kiyoshi Ichihara, Toshizo Ishikawa, Hidehiro Tsuneoka, Masashi Yanagihara, et al, Acquired activated protein C resistance is associated with IgG antibodies to protein S in patients with systemic lupus erythematosus, *Thrombosis Research*, 2009, MAY. Vol.124, 127-131、査読有

[学会発表] (計16件)

- ① 菅崎幹樹、他、感染性心内膜炎患者より分離された *Bartonella henselae* の分子系統解析と病原因子の遺伝子解析、第115回山口医学会学術講演会、2011年2月19日、山口、山口大学
- ② 柳原正志、他、わが国におけるヒトおよびネコ由来 *Bartonella henselae* の Multispacer typing による遺伝子型の分布、第80回日本感染症学会西日本地方会学術集会、2010年11月19-20日、愛媛、松山市総合コミュニティセンター
- ③ 菅崎幹樹、他、感染性心内膜炎患者より分離された *Bartonella henselae* の病原因子の遺伝子解析、第63回日本細菌学会 中国・四国支部総会、2010年10月16日、愛媛、松山大学文京キャンパス カル

フル・ホール

- ④ 柳原正志、他、感染性心内膜炎患者より分離された *Bartonella henselae* の分子系統解析、第63回日本細菌学会 中国・四国支部総会、2010年10月16日、松山大学文京キャンパス カルフル・愛媛、ホール
- ⑤ 細川卓利、他、*Bartonella henselae* 脳炎後に一過性白質病変をきたした11歳女児例、第15回日本神経感染症学会、2010年10月8日、福島、福島ビューホテル
- ⑥ 柳原正志、他、*Bartonella henselae* ST-1型 (MLST法) のSpacer配列による亜型分類、第84回日本感染症学会総会、2010年4月5-6日、京都、国立京都国際会館
- ⑦ 柳原正志、他、The presence of two different copies of the tRNA-Ala/GCA-tRNA-Ile/AUC spacer in *Bartonella henselae*、第83回日本細菌学会総会、2010年3月26日、神奈川、パンフィコ横浜
- ⑧ 常岡英弘、他、本邦初めての *Bartonella henselae* による感染性心内膜炎-大動脈弁疣贅からの分離例-第21回日本臨床微生物学会、2010年1月30-31日、東京、東京ドームホテル
- ⑨ 柳原正志、他、わが国のヒトおよびネコ由来 *Bartonella henselae* の MLST 法による分子系統解析、第78回日本感染症学会西日本地方会学術集会、2009年12月5日、広島、広島国際会議場
- ⑩ 浅利祥子、他、感染性心内膜炎患者の大動脈弁疣贅から *Bartonella henselae* を分離した1症例、第42回中国四国医学検査学会、2009年10月31日、香川、サンポートホール高松
- ⑪ 柳原正志、他、MLST法によるわが国のヒトおよびネコ由来 *Bartonella henselae* の分子系統域、第83回日本感染症学会2009年4月23-24日、東京、京王プラザホテル
- ⑫ 柳原正志、他、Multilocus sequence typingによるわが国のヒトおよびネコ由来 *Bartonella henselae* の分子系統解析、第82回日本細菌学会、2009年3月13-14日、愛知、名古屋国際会議場
- ⑬ 梅田昭子、他、*Bartonella henselae* 感染による急性脳症発症機序の解明、第82回日本細菌学会、2009年3月13-14日、愛知、名古屋国際会議場
- ⑭ 梅田昭子、他、バルトネラによる脳症-B. *henselae* 感染によるグリア細胞傷害の電子顕微鏡、第40回日本臨床分子形態学会、2008年10月3日、福岡、福岡国際会議場

- ⑮ 常岡英弘、他、*Bartonella henselae* 感染症“猫ひっかき病” 第19回「SCANIC」学術研究会、2008年5月24日、大阪、梅田スカイビル
- ⑯ 常岡英弘、他、*Bartonella henselae* 感染症診断における間接蛍光抗体法について—なぜ Vero 細胞共生培養菌により感度が向上するか?—、第82回日本感染症学会、2008年4月17-18日、島根、島根県民会館

〔図書〕(計1件)

- ① 常岡英弘、他、新・カラーアトラス微生物検査 (*Bartonella henselae* による猫ひっかき病) 2009、221

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計0件)
○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等
なし

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

なし

(3) 連携研究者

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
梅田 昭子 (UMEDA AKIKO)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：30078604