

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15226

研究課題名(和文) ペットネコとの接触による猫ひっかき病のワクチン開発

研究課題名(英文) Development of vaccine for cat scratch disease by contact with pet cat

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ネコひっかき病(CSD)の原因菌であるバルトネラ・ヘンセラ(以後バルトネラ)を我々が開発したN-ラウロイルサルコシン(以後サルコシン)を用いた抗原抽出法より、患者血清に高感度に反応する抗原を注することに成功した。この抗原からIgMウェスタンブロットおよびSDS-PAGEを用いた解析により世界で初めて患者特異的に反応する抗原が分子量から3～4群に分類することができた。現在、この特異抗原の同定を遂行中である。

研究成果の概要(英文)：Based on the antigen extraction method using N-Lauroylsarcosine that we developed *Bartonella henselae*, the causative fungus of cat scratch disease (CSD), an antigen sensitive to patient's serum sensitivity I succeeded in doing. Antigen reacting specifically to the patient for the first time in the world by this analysis using IgM Western blot and SDS-PAGE from this antigen could be classified into 3 to 4 groups from the molecular weight. Currently, identification of this specific antigen is underway.

研究分野：病原細菌学

キーワード：ネコひっかき病 N-ラウロイルサルコシン IgM-ウェスタンブロット バルトネラ・ヘンセラ

1. 研究開始当初の背景

本研究は、申請者らがバルトネラ・ヘンセラ(以後バルトネラ)感染ネコより分離した日本菌株を用いて、猫ひっかき病(Cat Scratch Disease: CSD)ワクチンを作成し、ネコを対象としたワクチン開発を目指すものである。CSDは、わが国で急激に症例報告されるようになった人獣共通感染症であるが、その予防対策は皆無である。これまでの研究で、申請者らは“N-ラウロイル・サルコシン(以後サルコシン)抽出・精製法”によりCSDの原因菌であるバルトネラから、効率よく抗原となるタンパク質を抽出する方法を独自に開発した。さらに、日米欧バルトネラ菌株間の遺伝子の相違から、日本国民にとって日本菌株を用いたCSDワクチンの開発が火急の課題である。このワクチンによるCSD予防対策は、ネコとの接触による感染を未然に防ぎ、ペット飼育を安全かつ安心に行うことを可能にする。

2. 研究の目的

本研究目的は、ネコに対するワクチンでヒトへの感染を防ぐことである。CSDはネコとの接触による人獣共通感染症で、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、肝脾肉芽腫、脳症、心内膜炎など)まで、その臨床像は多彩であり、死に至るケースもみられる。そのため、本症はいずれの診療科でも遭遇する感染症であり、どの診療科でも診断に苦慮し、確定診断に至ることが困難な状況にある。わが国では年間1万人以上が罹患していると推測され、CSDは決して稀な感染症ではない。CSD鑑別診断は国内では唯一申請者らのグループが行い、その検査依頼数は近年急増している。一方、バルトネラに感染したネコは無症状のため飼育者はその保菌に気づかない。申請者らは疫学的調査を

行い、約100万頭の飼育ネコに感染が疑われることを明らかにしている。わが国のネコの飼育数はおよそ1000万頭であるにもかかわらず、ネコに対するバルトネラ感染予防策が何ら講じられていない。ゆえに感染者を増大させている。以上のことから、本研究の着想に至った。さらに、申請者らがバルトネラ感染ネコから分離した日本菌株の遺伝子解析で、日米欧菌株間の遺伝子に相違があることを明らかにしている。すなわち、わが国のワクチン開発には日本菌株の使用が必須である。申請者らが独自に考案した“サルコシン抽出・精製法”によりバルトネラ日本菌株からタンパク質の抽出・精製を行い、それを抗原としたワクチン開発を目指すものである。

3. 研究の方法

(1)バルトネラタンパク質の抽出条件の検討

バルトネラは日本菌株を用い、それぞれ血液要求性のためチョコレート寒天培地に塗布し37℃で1週間培養した。サルコシンは陰イオン界面活性剤であり、温度や濃度等によって抽出効果が異なる。一般的な抽出条件は4℃、0.4%サルコシンである。これまでの予備実験で、ある温度で最も多くタンパク質を抽出することができた(特許に関わるため温度は記載しない)。一方、0.4%サルコシンでは1回目の抽出で非特異抗原だけでなく特異抗原も多く取られ、2回目以降の特異抗原回収量が減ることがわかっている。そこで、決定した温度で一定にした状態で、1回目の濃度と2回目以降の濃度を変えて抽出を行った。考えられるパターンとしては、一回目のサルコシン濃度より二回目の濃度の方が濃くなるよう設定する。これらからより収量の多い条件を決定した。

(2)サルコシン抽出後のタンパク質の精製

NaClの濃度から150~300mMの範囲に患

者検体に特異的に反応する抗原が存在する。この範囲のタンパク質精製を行った。これには DEAE クロマトグラフィーによる精製とゲル濾過による精製を考えている。DEAE により NaCl 濃度 150~300mM 分画のタンパク質を分取し、この操作を数回くりかえし、その精製度を高めた。精製度が不十分な場合は更にゲル濾過クロマトグラフィー法を新たに追試し、検討した。

(1)及び(2)の抽出タンパク質の抗原性の確認

精製した抗原液は ELISA 法にてバルトネラの特異性を確認した。すなわちバルトネラ感染ネコ血清 10 例(IFA 法: IgG256 倍以上・IgM20 倍以上の陽性例) および健常ネコ血清 10 例(IFA 法陰性例) を用いて、健常ネコ血清には反応せず、バルトネラ感染ネコ血清のみに強く反応することを確認した。バルトネラ感染ネコ血清に特異性の高い抗原液が得られるまで精製を繰り返す。また抗原液を SDS-PAGE および 2 次元電気泳動にてタンパク質を解析した。

(3)抗原としてのタンパク質の同定および合成タンパク質の作成

精製したサルコシン抽出液(抗原液)を 2 次元電気泳動で分離後、バルトネラ感染ネコ血清 10 例および健常ネコ血清 10 例との反応をウエスタンブロット法で解析し、バルトネラ感染ネコ血清と特異性が高い代表的なタンパク質を抗原液から選出した。また選出したタンパク質スポットを切り出し、質量分析によりタンパク質を同定中である。

4 . 研究成果

本研究の成果はサルコシンによるバルトネラの抗原を効率良く抽出生成することを可能にした。これにより感染初期に出現する IgM において患者血清特異的で健常人にはほとんど出現しない抗原があることがわかった。これは世界で初めての成果であり今後の発展に

期待ができる。このことから以下の報告を行っている。我々のグループはサルコシンを用いた抗原抽出法から得られた CSD 血清中の IgM と反応する抗原を用いた ELISA を開発した (J Clin Microbiol. 2016 ; 54(4):1058-64.)。また、世界で初めてウエスタンブロットにより CSD 患者血清中の IgM と反応する抗原の出現パターンを報告した (J Clin Microbiol. 2017 ;56(1).) 現在、CSD 患者血清中の IgM に特異的に反応する抗原の同定を行なっている。

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 3 件)

Bartonella henselae DNA in Seronegative Patients with Cat-Scratch Disease.

Yanagihara Masashi、Tsuneoka Hidehiro、Tanimoto Ayano、Otsuyama Ken-ichiro、Nishikawa Jun、Matsui Tomohiro、Nojima Junzo、Ichihara Kiyoshi. Emerg Infect Dis: 24, 924-925, 2018. 査読有り
doi:10.3201/eid2405.152033

Utility of Bartonella henselae IgM Western Blot Bands for Serodiagnosis of Cat Scratch Disease.

Otsuyama Ken-ichiro、Tsuneoka Hidehiro、Yoshidomi Hiroka、Haraguchi Mio、Yanagihara Masashi、Tokuda Nobuko、Nojima Junzo、Ichihara Kiyoshi. J Clin Microbiol: 56, e01322-17, 2017. 査読有り

doi: 10.1128/JCM.01322-17

The utility of a country-specific Bartonella henselae antigen in an IgM-indirect fluorescent antibody assay for the improved diagnosis of cat scratch disease. Tsuneoka Hidehiro、Yanagihara Masashi、Tanimoto Ayano、Tokuda Nobuko、Otsuyama Ken-ichiro、Nojima Junzo、Ichihara Kiyoshi. Diagn Microbiol Infect Dis : 87, 22-24, 2017 査読有り doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2016.10.015

なし

〔学会発表〕(計 2 件)

猫ひっかき病血清診断IgM-ELISAの確立と
その有用性 大津山賢一郎、柳原正志、常岡
英弘 第87回西日本感染症学会西日本地方
学術集会 2017年

ELISAによるBartonella henselae抗体価測
定の抗原生成-N-ラウロイルサルコシン抽
出法の基礎的検討ー 近藤香、大津山賢一郎、
柳原正志、常岡英弘 第90回日本細菌学会総
会 2017年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

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

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者