

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09013

研究課題名(和文)猫ひっかき病急性期診断のための特異IgM抗体検出高感度ELISAの確立と病態解明

研究課題名(英文) Establishment of highly sensitive ELISA to determine specific IgM antibody for diagnosis of acute cat scratch disease and elucidation of its pathology

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(特命)

研究者番号：40437629

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は猫ひっかき病(CSD)の血清診断のための組換え蛋白質抗原を使用した高感度Bartonella henselae ELISA-IgM抗体価測定法の確立である。抗原はB. henselae IgM抗体陽性患者の主要蛋白質8-10kDa中に見出された7種類について、2法(無細胞法と大腸菌遺伝子導入法)で組換え蛋白質合成を行い、それらの抗原性の検討を行った。その結果、両者による蛋白質合成は確認できたものの、CSD患者血清との反応性は認められず、抗原性は確認できなかった。今後さらなる検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

猫ひっかき病(CSD)の病原菌Bartonella henselaeは培養困難なため、血清学的診断法が有用であり高感度ELISAの開発が求められている。本研究は未だ存在しない“特異性の高い組換え蛋白質抗原を使用した高感度ELISA-IgM抗体価測定法の確立”を目指し、研究代表者らの一連の研究よりB. henselae菌体の8-10kDaの解析から研究を進めた。その結果、遺伝子解明とその組換え蛋白質生成成はできたものの、それら蛋白質の抗原性は認められず、更なる検討が求められた。本ELISA確立時には一層のCSDの診断率向上と病態の解明が期待される。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to establish a highly sensitive IgM ELISA using recombinant protein antigens of Bartonella henselae for serodiagnosis of cat scratch disease (CSD). We used seven types of candidate genus as antigens found at 8-10kDa of the major protein in the B. henselae IgM antibody-positive patients and examined the antigenicity of these proteins by two methods: cell-free protein synthesis and protein synthesis introduced into Escherichia coli. As a result, genus protein expression was confirmed in all the genera in both methods, while responsiveness to CSD patients' sera was not confirmed and no antigenicity was clarified in the Western blot assay. Further investigation will be required to establish the optimal IgM ELISA for the detection of CSD.

研究分野：臨床微生物学

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

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

猫ひっかき病 (CSD) は猫に受傷後、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、心内膜炎などの全身性の非定型的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、本症診断は *B. henselae* 抗体価 (IgG/IgM) を測定する間接蛍光抗体 (IFA) 法による血清学的診断が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、偽陰性例が多い。その一因に IgM 測定の感度が低いことが知られており、高感度 ELISA-IgM の確立が急務である。

研究代表者らは独自の改良ウエスタンブロット (WB) 法により 34 例の CSD 患者血清の *B. henselae* IgM 抗体を解析し、主要バンドが 8-10kDa, 31-35kDa, および 70kDa であることを明らかにした。またこれらのバンドは健常人では認められず、特異性が極めて高いことが確認された。

2. 研究の目的

特異性の高い組換え蛋白質抗原を使用した高感度 ELISA-IgM 抗体価測定の確立を目的とする。本研究ではまず IgM 陽性患者の半数に認められる 8-10kDa 蛋白質に注目した。本バンドの蛋白質を同定し、クローニング後、組み換え蛋白質抗原を作成し、本抗原の有用性を検討した。

3. 研究の方法

(1) *B. henselae* 8-10kDa バンドの蛋白質同定

改良 WB で患者血清中の *B. henselae* IgM と反応する *B. henselae* 8-10kDa バンド部位を一次電気泳動後、抽出する。次いで MALDI/TOFMS を用いて質量分析後、National Center for Biotechnology Information で遺伝子名を検索し同定した。

(2) 特異抗原の組換え蛋白質作成

無細胞および大腸菌 (遺伝子導入) による方法の 2 法で組換え蛋白質の作成を行った。

無細胞による方法

・遺伝子の増幅および精製: 各目的遺伝子の Primer (3'末端; FLAG 配列・ROR primer, 5'末端; REV primer) を作成し、PCR (TaKaRa Ex Taq[®] Hot Start Version) 後、2% アガロース電気泳動で各遺伝子増幅を確認した。次いで PCR 産物を Gene[™] ゲル/PCR 抽出キット (Nippon Geneticus) を使用して精製した。

・蛋白質合成用 PCR 産物の増幅と精製: PUREflex[®] 2.0 キット・T7PRO-SD primer を用いて PCR 後、アガロース電気泳動で確認し、上記と同様精製した。

・蛋白質の合成: 上記の精製 PCR 産物 1kbp あたり 1.0ng/μL 濃度になるよう調整後、サーマルサイクラー (37、2 時間) で蛋白質合成を行った。

大腸菌 (遺伝子導入) による方法

・遺伝子の増幅とプラスミドへの組み込みおよび形質転換: 各目的遺伝子の Primer を作成 (FLAG 配列・REV primer) し、増幅した。増幅確認後、プラスミド (pCold GST BamHI cut) に組み込んだ。これを大腸菌 *Escherichia coli* DHα に形質転換 (42、熱ショック 40 秒) 後、SOC 培地で振盪培養 (37、1 時間) し、LB/Amp 寒天培地に接種後、培養 (37、18 時間) した。

・各遺伝子を組込んだプラスミドの増幅: 発育良好なコロニーをピペットで釣菌し、マスタープレートを作成し、培養 (37、18 時間) した (コロニー PCR 用)。同時に同ピペットに付着した菌を用いてアガロース電気泳動で増幅を確認した。プラスミド増幅が確認できたコロニーをマスタープレートより採取し、LB/Amp 液体培地で培養し、大腸菌 (プラスミド) を増やした。

・蛋白質の合成: 増菌した大腸菌を LB/Amp 液体培地に IPTG (蛋白合成関連試薬) を添加後培養 (15、18 時間) した。菌液を遠心 (10000rpm, 5 分) 後、沈渣に Sample Buffer を等量加え、超音波により溶菌させた。

(3) 2 法で作成した各蛋白質の抗原性の確認

前述の 無細胞および 大腸菌による 2 種類の方法で作成した組換え蛋白質の抗原性を確認するため、5-20% アクリルアミドゲルで電気泳動 (20mA, 80 分) した。泳動後、FLAG を 1 次抗体 (モノクローナル抗体)、2 次抗体 (抗マウス IgG 抗体) で各種蛋白質の合成を WB で確認した。次いでこれら蛋白質の抗原性を *B. henselae* IgM 陽性患者 (8-10kDa) 血清を用いて確認した。

4. 研究成果

(1) *B. henselae* 8-10kDa バンドの蛋白質同定

次の 12 種類の遺伝子が同定された。

50S ribosomal protein L33(6kDa)、ATP F0F1 synthase subunit C(8kDa)、Hu-like protein (9kDa)、30S ribosomal protein S15 (10kDa)、Hypothetical protein BhenCHDE101_04750 (17 kDa)、50S ribosomal protein L10(18kDa)、Invasion protein (20 kDa)、Phosphatidylserine decarboxylase proenzyme (26kDa)、Elongation factor Tu (38 kDa)、Molecular chaperone GroEL(44kDa)、Bifunctional phosphoribosylaminoimidazoleca

-rboxamide formyltransferase/inosine monophosphate cyclohydrolase (58kDa)、Aconitate hydratase AcnA (99kDa)

(2) 各遺伝子の組換え蛋白質作成

(1) の 12 種類の遺伝子のうち 7 種類 (8、10、18、20、26、38、58kDa) について、検討した。
無細胞による方法

・各遺伝子と蛋白質合成用 PCR 産物の増幅：各遺伝子を *B. henselae* ゲノム DNA を鋳型とし、FLAG 配列 primer 付加 PCR を実施した。各種目的遺伝子の分子量 (表 1) が確認できた (図 1)。さらにその産物を鋳型とした T7PRO-SDprimer を使用した PCR でもその分子量 (表 2) を確認できた (図 2)。

表 1 各遺伝子の目的分子量(bp)

遺伝子 (kDa)	目的分子量 (bp)	遺伝子 (kDa)	目的分子量 (bp)
8 (A)	283	26 (E)	751
10 (B)	322	38 (F)	1228
18 (C)	571	58 (G)	1669
20 (D)	613		

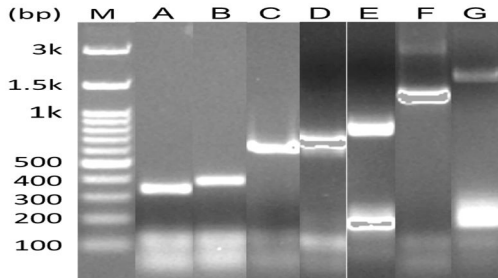


図 1 遺伝子増幅の電気泳動

表 2 蛋白質合成用 PCR 産物の目的分子量

遺伝子 (kDa)	目的分子量 (bp)	遺伝子 (kDa)	目的分子量 (bp)
8 (A)	354	26 (E)	822
10 (B)	393	38 (F)	1299
18 (C)	642	58 (G)	1740
20 (D)	684		

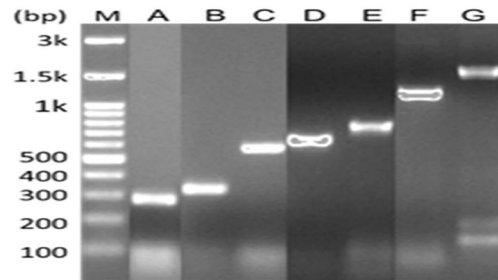


図 2 蛋白質合成用 PCR 産物の電気泳動

・蛋白質合成の確認：表 2 に示した PCR を鋳型にして蛋白質合成を行った。FLAG タグの付いた各種目的蛋白質の目的分子量は表 3 に示した。これら遺伝子の WB を図 3 に示した。無細胞による蛋白質合成を確認できた。

表 3 FLAG 付き各種目的蛋白質の分子量

遺伝子 (kDa)	目的分子量 (kDa)	遺伝子 (kDa)	目的分子量 (kDa)
8 (A)	1+8 (9)	26 (E)	1+26 (27)
10 (B)	1+10 (11)	38 (F)	1+38 (39)
18 (C)	1+18 (19)	58 (G)	1+58 (59)
20 (D)	1+20 (21)		

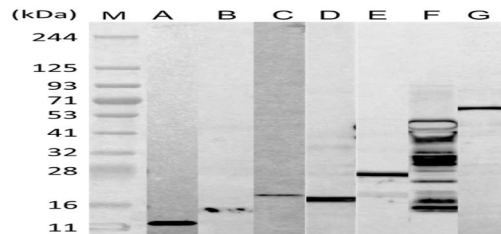


図 3 無細胞法による蛋白質発現の確認

大腸菌 (遺伝子導入) による方法

・遺伝子の増幅とプラスミドへの組み込み：各遺伝子を *B. henselae* ゲノム DNA を鋳型とし、FLAG 配列 primer 付加 PCR を実施した。その結果、各種目的遺伝子の分子量 (表 4) を確認できた (図 4)。さらにコロニー-PCR 後、各遺伝子組み込みプラスミドの目的分子量 (表 5) を電気泳動で確認できた (図 5)。

表 4 各遺伝子の目的分子量

遺伝子 (kDa)	目的分子量 (bp)	遺伝子 (kDa)	目的分子量 (bp)
6 (A)	224	18 (E)	575
8 (B)	287	20 (F)	617
9 (C)	332	26 (G)	755
10 (D)	326		

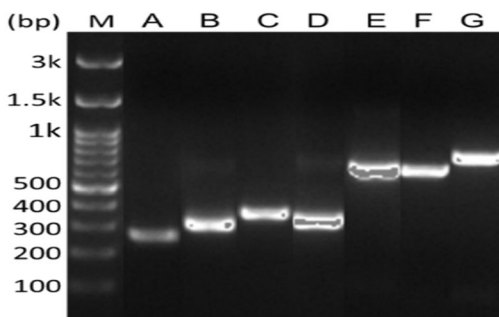


図 4 遺伝子増幅の電気泳動

表 5 各遺伝子導入プラスミドの目的分子量

遺伝子 (kDa)	目的分子量 (bp)	遺伝子 (kDa)	目的分子量 (bp)
6 (A)	521	18 (E)	872
8 (B)	584	20 (F)	914
9 (C)	629	26 (G)	1052
10 (D)	623		

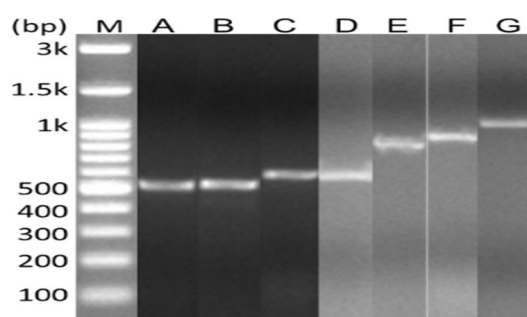


図 5 遺伝子導入プラスミドの電気泳動

・蛋白質合成の確認：FLAG タグを付した各遺伝子を組込んだ各目的蛋白質の分子量を表 6 に示した。これら遺伝子の WB を図 6 に示した。大腸菌の遺伝子導入による蛋白質合成を確認できた。

表 6 合成蛋白質の目的分子量

遺伝子(kDa)	目的分子量(kDa)	遺伝子(kDa)	目的分子量(kDa)
6 (A)	30+6 (36)	18 (E)	30+18 (48)
8 (B)	30+8 (38)	20 (F)	30+20 (50)
9 (C)	30+9 (39)	26 (G)	30+26 (56)
10 (D)	30+10 (39)		

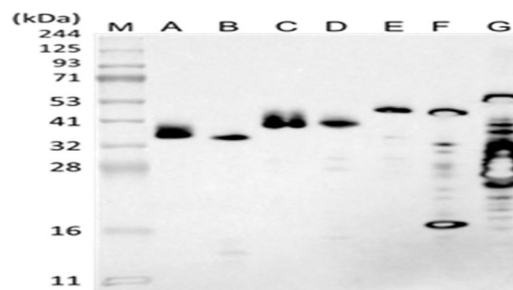


図 6 合成蛋白質発現の確認

(3) 無細胞の方法および大腸菌による方法で得た各蛋白質の抗原性の確認

両法で得た蛋白質抗原と CSD 患者血清 (*B. henselae* IgM 陽性：8-10kDa) との反応性を図 7、8 に示した。両法の蛋白質と患者血清との反応は観察できず、抗原性は認められなかった。

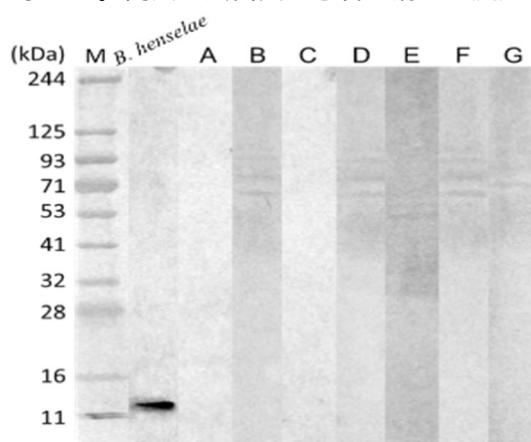


図 7 無細胞法により合成した蛋白質と CSD 患者血清との反応

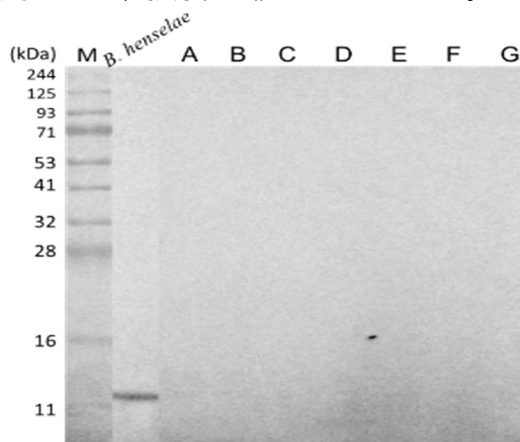


図 8 大腸菌により合成した蛋白質と CSD 患者血清との反応

以上、*B. henselae* IgM 抗体価陽性 CSD 患者血清中の半数以上に認められる 8-10 kDa について、質量分析により得られた 12 遺伝子のうち、7 種類について組換え蛋白質合成と抗原性の検討を行った。無細胞による方法と大腸菌遺伝子導入による方法で試みた結果、両者による蛋白質合成は確認できたが、CSD 患者血清との反応性は認められず、抗原性は確認できなかった。今後さらなる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yanagihara Masashi, Tsuneoka Hidehiro, Tanimoto Ayano, Otsuyama Ken-ichiro, Nishikawa Jun, Matsui Tomohiro, Nojima Junzo, Ichihara Kiyoshi	4. 巻 24
2. 論文標題 Bartonella henselae DNA in Seronegative Patients with Cat-Scratch Disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Emerging Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 924 ~ 925
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3201/eid2405.152033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Uchi Sho-Hei, Yanai Ryoji, Tsuneoka Hidehiro, Otsuyama Ken-ichiro, Sonoda Koh-Hei, Kimura Kazuhiro	4. 巻 Epub ahead of print
2. 論文標題 A CASE OF CAT SCRATCH DISEASE DIAGNOSED BY INDIRECT FLUORESCENT ANTIBODY ASSAY OF IGM SPECIFIC FOR A JAPANESE STRAIN OF Bartonella henselae	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Retinal Cases & Brief Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/ICB.0000000000000854	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Otsuyama KI, Tsuneoka H, Yoshidomi H, Haraguchi M, Yanagihara M, Tokuda N, Nojima N, Ichihara K	4. 巻 56(1)
2. 論文標題 Utility of Bartonella henselae IgM Western Blot Bands for Serodiagnosis of Cat Scratch Disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Microbiology	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JCM.01322-17	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大津山賢一郎 常岡英弘
2. 発表標題 猫ひっかき病血清学的診断におけるBartonella henselaeウエスタンブロット-IgM解析の有用性
3. 学会等名 第88回日本感染症学会西日本地方学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大津山賢一郎 常岡英弘
2. 発表標題 Bartonella henselae IgG-ELISAの培地別・精製法別抗原の比較検討
3. 学会等名 第89回日本感染症学会西日本地方学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 市毛博之 常岡英弘
2. 発表標題 腹部造影CT検査所見が診断の契機になった播種性猫ひっかき病の1例.
3. 学会等名 第116回茨城小児学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 柳原正志 常岡英弘
2. 発表標題 猫ひっかき病検査診断における血清抗体価測定と末梢血PCR検査の併用の有用性について
3. 学会等名 第87回 日本感染症学会西日本地方学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	大津山 賢一郎 (OTSUYAMA Ken-ichiro) (10432741)	山口大学・大学院医学系研究科・助教 (15501)	

