

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K10047

研究課題名(和文) ペットネコからヒトへの猫ひっかき病感染防御を目指したネコに対するワクチン開発

研究課題名(英文) Development of a vaccine against cats aimed at defending infections of cats from cat pet cats to humans

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究目的は、ネコに対するワクチンを開発し、ヒトへのバルトネラ感染(CSD)を防ぐことである。本研究では、サルコシン処理後150～300mM NaClで精製した分画の蛋白質の質量分析を行った。候補遺伝子(論文投稿のため未記載)を用いて無細胞蛋白合成を行い、IgM-Western Blot(IgM-WB)陽性者の45%にみられる蛋白抗原(31-35kDa)の同定を行った。本合成蛋白質についてCSD患者血清15例と健康人血清7例でIgM-WBを行った。CSD患者血清では46.6%(7/15)に陽性バンドが見られたが、健康人血清では全例検は認められず、本蛋白の抗原性が確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ペットブームと重なるようにCSD症例は急増しており、飼い猫にバルトネラ感染が広まっていることが危惧される。本研究の独自性は、ヒトに対するワクチンではなく、感染源のバルトネラ保菌動物であるネコに対して開発する点にある。次に本研究の創造性は、バルトネラ感染防御抗原を同定し、そのリコンビナント蛋白質をワクチンに用いる点である。従来のワクチンの多くは不活化ワクチンか生ワクチンである。本研究では菌体の抗原蛋白質成分のみを合成あるいは精製するため、管理や操作方法が簡便である。本研究が成功すれば、世界に先駆けたCSDの予防対策になることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to develop a vaccine against cats and prevent Bartonella infection (CSD) in humans. In this study, mass spectrometry was performed on the protein fractions purified with 150-300 mM NaCl after sarcosine treatment. Cell-free protein synthesis was performed using candidate genes (not described for submission of a paper), and protein antigens (31-35 kDa) found in 45% of IgM-Western Blot (IgM-WB) -positive individuals were identified. IgM-WB was performed on this synthetic protein in 15 CSD patient sera and 7 healthy human sera. A positive band was observed in 46.6% (7/15) of CSD patient sera, but no detection was observed in all healthy sera, confirming the antigenicity of this protein.

研究分野：感染症学

キーワード：猫ひっかき病 ワクチン サルコシン 抗原同定

1. 研究開始当初の背景

バルトネラは猫ひっかき病 (CSD) の病原菌で、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、急性脳症、肝・脾肉芽腫、心内膜炎など) まで、その臨床像は多彩である。そのため、本症は多くの診療科でも遭遇する感染症であり、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。患者からのバルトネラの分離培養は極めて困難であり血清学的診断に頼らざるを得ない。わが国では我々以外に CSD 鑑別診断を実施できる施設はなく、診断および感染防御に関する開発研究も報告されていない。昨今のペットブーム (特にネコ) に伴い、疑診例は増加の一途を辿っており、確定診断の重要性が増している。わが国のネコの飼育数はおよそ 1000 万頭以上 (一般社団法人ペットフード協会平成 26 年度調べ) 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は全く講じられておらず、感染者が増大している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ネコに対するワクチンを開発し、ヒトへのバルトネラ感染 (CSD) を防ぐことである。わが国で CSD 鑑別診断が行えるのは我々のグループのみである。必然的に、CSD 疑いのある患者検体の多くが送られて来る状態にあり、1~2 日で確定診断を行っている。ペットブームと重なるように CSD 症例は急増しており、飼い猫にバルトネラ感染が広まっていることが危惧される。本研究の独自性は、ヒトに対するワクチンではなく、感染源のバルトネラ保菌動物であるネコに対して開発する点にある。すでに、狂犬病やワイル病の予防のためイヌにワクチン投与が行われるが、ネコを対象としたワクチン開発は世界初の試みであり画期的といえる。わが国でのネコのバルトネラ感染率は 10% であり、実施効率も高い。一般に、ヒトに対するワクチン開発は臨床応用に至るまでに膨大な費用と時間がかかるが、ネコではそれらを軽減できる利点がある。次に本研究の創造性は、バルトネラ感染防御抗原を同定し、そのリコンビナント蛋白質をワクチンに用いる点である。従来のワクチンの多くは不活化ワクチンが生ワクチンである。しかし、これらは細菌を増殖させる方法や保管条件、また表現形の変化を防ぐため継代培養を三代以上は行わないなど管理や操作方法が厳格に決められている。本研究では菌体の抗原蛋白質成分のみを合成あるいは精製するため、管理や操作方法が簡便である。以上から我々の CSD ワクチン開発に向けた計画は明確であり、本研究が成功すれば、世界に先駆けた CSD の予防対策になることが期待される。さらに、このワクチン開発の手技手法は、他の人獣共通感染症に広く応用できる可能性がある。

3. 研究の方法

(1) 新培養法による新たな CSD 抗原抽出および精製

バルトネラは通常チョコレート寒天培地で約 1 週間培養する。我々は既にこの従来の培養法で採取したバルトネラを独自に開発した抗原抽出・精製法 (J Clin Microbio 2016) で得た蛋白質の同定を一部行っている。しかし、従来法では増殖はみられるが抗原性が低く、また数種の液体培地では抗原性は高まるものの増殖がみられないという欠点があった。したがって、新培養法の確立が急務であった。そこで、ある寒天培地と液体培地からなる二層培地を

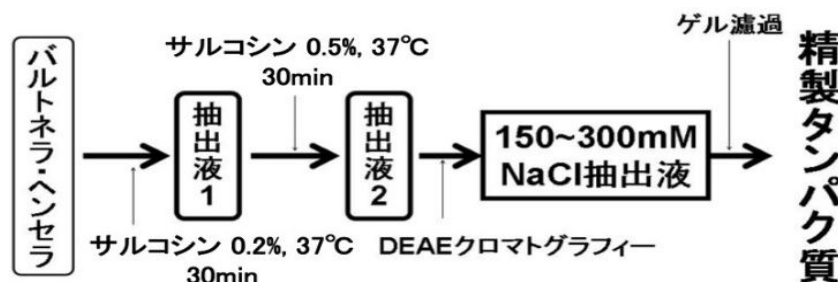


図1 バルトネラのサルコシン処理による蛋白質精製過程

この方法で抗原の特異性と反応性が向上する。

考案し培養を試みた (特許申請により詳細は記載しない)。その結果、バルトネラは増殖し、かつ抗原性の向上がみられた。その抗原性向上の要因として CSD 患者血清を用いたウエスタンブロット解析の結果、蛋白質の新たな発現および発現の増加が考えられた。そこで二層培地による新たな抗原を含め、全 CSD 抗原蛋白質の抽出・精製 (J Clin Microbio 2016) を実施した (図 1)。

(2) 感染防御抗原の同定および合成蛋白質の作成

抗原として同定した蛋白質がCSD感染防御抗原となることを確認するため、バルトネラに感染させたウサギ血清を用いてウエスタンブロット解析を行った。その結果、バルトネラ感染ウサギ血清と反応している(図2)ことから、我々が以下の手法で同定した蛋白質が感染防御抗原であること、つまりCSDワクチン成分となり得ることを示していた。そこで新たな培養法で得られる抗原蛋白質を以下のように作成する。

精製したサルコシン(界面活性剤)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解析し、バルトネラ感染ネコ血清と特異性が高い蛋白質を抗原液から選出する。また選出した蛋白質スポットを切り出し、質量分析により蛋白質を同定する。

質量分析で同定された蛋白質の遺伝子をPCR法にて増幅させ、大腸菌でクローニングする。

発現ベクターpGEX-6p-1を用い、この遺伝子をGST融合蛋白質として大腸菌BL21(DE3)株に発現させ、発現した蛋白質をアフィニティカラムクロマトグラフィ法にて精製する。

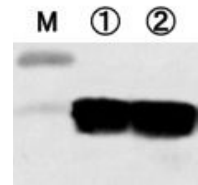


図2 CSD感染防御抗原確認のウエスタンブロット解析。バルトネラ全菌()、同定した蛋白質()、バルトネラに感染させたウサギ血清はに反応。

4. 研究成果

本研究目的は、ネコに対するワクチンを開発し、ヒトへのバルトネラ感染(CSD)を防ぐことである。わが国でCSD鑑別診断が行えるのは我々のグループのみである。ペットブームと重なるようにCSD症例は急増しており、飼い猫にバルトネラ感染が広まっていることが危惧される。本研究の独自性は、ヒトに対するワクチンではなく、感染源のバルトネラ保菌動物であるネコに対して開発する点にある。次に本研究の創造性は、バルトネラ感染防御抗原を同定し、そのリコンビナント蛋白質をワクチンに用いる点である。従来のワクチンの多くは不活化ワクチンか生ワクチンである。本研究では菌体の抗原蛋白質成分のみを合成あるいは精製するため、管理や操作方法が簡便である本研究が成功すれば、世界に先駆けたCSDの予防対策になることが期待される。本研究では、サルコシン処理後150~300mM NaClで精製した分画の蛋白質の質量分析を行った。今回簡易的に行くため、発現ベクターを用いたタンパク質合成ではなく、候補遺伝子(論文投稿のため未記載)を用いて無細胞蛋白合成を行い、IgM-WB陽性者の45%にみられる蛋白抗原(31-35kDa)の同定を行った。IgM-WBにて30kDaに反応がみられる患者血清を用いたIgM-WBを行った。本合成蛋白質についてCSD患者血清15例と健常人血清7例でIgM-WBを行った。CSD患者血清では46.6%(7/15)に陽性バンドが見られたが、健常人血清では全例検出認められず、本蛋白の抗原性が確認できた。CSD患者血清中のIgM抗体に特異的なB. henselae抗原を同定することができた。今後同様な手法により8-10、31-35、42-45kDaおよび70kDaに相当する4群の蛋白質抗原を同定することが可能となり、高感度IgM-ELISA開発が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Uchi Sho-Hei, Yanai Ryoji, Tsuneoka Hidehiro, Otsuyama Ken-ichiro, Sonoda Koh-Hei, Kimura Kazuhiro	4. 巻 Publish 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 <i>Bartonella henselae</i>	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 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 <i>Bartonella henselae</i> 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 -

〔学会発表〕 計3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 <i>Bartonella henselae</i> 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 浜松
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大津山賢一郎
2. 発表標題 猫ひっかき病血清学的診断における <i>Bartonella henselae</i> 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 IgM-ELISE開発のための抗原選択による臨床的有用性
3. 学会等名 第90回日本感染症学会西日本地方学術集会 福岡
4. 発表年 2020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	常岡 英弘 (Tsuneoka Hidehiro) (40437629)	山口大学・大学院医学系研究科・教授(特命) (15501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------