

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月19日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21580391

研究課題名（和文） ベッドサイドで可能な犬レプトスピラ症迅速検査法の開発

研究課題名（英文） A new diagnostic method for canine leptospirosis

研究代表者

奥田 優 (OKUDA MASARU)

山口大学・農学部・教授

研究者番号：10325243

研究成果の概要（和文）：レプトスピラ症は人獣共通感染症である。犬では時に死の転機を辿るために早期の診断が求められるが、迅速な診断法はない。本研究では簡便かつ迅速な検査法の開発を目的とした。レプトスピラ蛋白の解析から fas1 と MaoC に着目し、これらの組換え蛋白を抗原とするラテックスビーズを作製した。本研究で開発したラテックス凝集法は、レプトスピラ症が疑われる症例に対して簡便かつ迅速な検査法として有用である可能性が強く示唆された。

研究成果の概要（英）：Leptospirosis is a zoonotic disease. Since the canine one may be lethal, it must be diagnosed in the early stage. However, there is no quick diagnostic method. A purpose of this study is developing a new convenient method for the canine leptospirosis. We identified fas1 and MaoC proteins as important antigens by analysis of leptospiral outer membrane proteins, and made latex beads for agglutination assays using their recombinant proteins. Our data suggest that this method is useful in the serological diagnosis of the canine leptospirosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：獣医内科学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・臨床獣医学

キーワード：レプトスピラ，ラテックス凝集法，犬，人獣共通感染症

1. 研究開始当初の背景

レプトスピラ症は犬で重篤な症状を示すばかりでなく、人獣共通細菌感染症であり、公衆衛生上も重要な疾患である。我々はこれまでに全国的な疫学調査を行い、現在も全国でレプトスピラ感染の危険性があることを明らかにしてきた。犬レプトスピラ症は時に急

速に死の転機をたどるため、早期の診断および治療が求められる。しかしながら、一般的に用いられている顕微鏡下凝集試験（MAT）をはじめとして迅速かつ簡便に実施できる診断法は存在しないため、仮診断は検査の結果が判明する前に行わなければならないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では臨床現場で簡便かつ迅速に実施可能な新たな犬レプトスピラ症の検査法を開発することを目的として、レプトスピラの凝集抗原を解析するとともに組換え蛋白をコートしたラテックス凝集法を検討した。

3. 研究の方法

(1) *L. interrogans* 凝集抗原の同定

当研究室で維持培養している *L. interrogans* serovar hebdomadis (strain Akiyami B) から Beyらの方法を改変して外膜蛋白を粗抽出し、レプトスピラ症例犬の血清を用いて Western blot 解析を行い、症例に共通する抗原を解析した。次にこれらの抗原の3次構造を症例犬の血清が認識することを確認するため、外膜蛋白を症例犬の血清と Protein A マグネットビーズを用いて免疫沈降を行い、さらに Western blot 解析を行った。次に外膜蛋白を SDS-PAGE で展開後、Coomassie brilliant blue で染色し、目的とするバンドをゲル片ごと切り出し、液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析 (LC-MS/MS) に供した。解析はトリプシン処理して得られた断片ペプチドを逆相 HPLC で分離・濃縮しながらハイブリッド型質量分析計で検出し、質量分析計により得られたペプチドの質量、および質量分析計内でアルゴンガスと衝突させることにより得られたフラグメントイオンのスペクトル (MS/MS データ) をデータベース検索 (Mascot サーチ) することにより候補蛋白質を同定した。

(2) GST-fas1, GST-MaoC 融合蛋白の精製と GST の分離

L. interrogans serovar hebdomadis (strain Akiyami B) の cDNA を鋳型として *L. interrogans* serovar Copenhageni の fatty acid synthase subunit beta 遺伝子 (GenBank accession No. 45659137) を基に5'側に制限酵素 (それぞれ *Bam*HI と *Sma*I) の認識部位を付加したプライマー、ならびに *L. interrogans* serovar Copenhageni (GenBank accession No. 45657237) の hypothetical protein LIC11359 遺伝子 (GenBank accession No. 45657237) を基に5'側に制限酵素 (それぞれ *Bam*HI と *Sma*I) の認識部位を付加したプライマーをそれぞれ用いて *fas1* 遺伝子, *MaoC* 遺伝子を PCR にて増幅し, GST 融合蛋白発現用プラスミド pGEX-6P-1 ベクターに挿入した。得られたプラスミドを大腸菌に形質転換し, IPTG で融合蛋白の発現誘導を行い, 常法により発現蛋白を回収・精製した。

(3) 組換え蛋白ラテックスビーズを用いた凝集法の検討 得られた *fas1* および *MaoC* の組換え蛋白を用

いて Protocol for Glutaraldehyde Kit とラテックスビーズ (直径 3 μ M) (いずれも Polysciences, Germany) によりラテックス凝集ビーズをそれぞれ作製した。作製したビーズ 15 μ l と PBS で 10 倍希釈した検体血清または血漿 15 μ l を黒色の反応板上で混和し, 攪拌しながら 5 分後, 10 分後, 15 分後にビーズの凝集の有無を確認した。ラテックス凝集法の感度と特異性に関する検討には Iwamoto らが報告した犬の保存血清の一部を用いた。これらの検体は 2006 年 11 月から 2007 年 10 月までの間, 全国 47 都道府県の動物病院に健康診断やワクチン接種を目的として来院し, 生涯レプトスピラワクチンを接種していない犬, または同ワクチン接種後 11 カ月以上経過している犬より血清を採取し, -20 $^{\circ}$ C フリーザー内で保存していた。この中から MAT で前述の 5 血清型のすべてに対して 80 倍未満の抗体価を示した犬 24 頭の保存血清を用いた (陰性コントロール群)。

また, レプトスピラ発症犬におけるラテックス凝集法の有用性に関する検討では, 当研究室で過去にレプトスピラ症と診断された犬 6 頭の保存血清を用いた (レプトスピラ群)。これらの検体は当該犬から血清を採取し, -20 $^{\circ}$ C フリーザー内で保存していた。ラテックス凝集法の非特異反応を検討するために, 山口大学動物医療センターに来院した犬の血清と血漿 (血液系の腫瘍 6 頭, 自己免疫疾患 5 頭, ビリルビン 1.0mg/dl 以上を示した 2 頭, 心臓疾患でクレアチニンが高値を示した 1 頭) を採取し, 同様に -20 $^{\circ}$ C フリーザー内で保存していたものを用いた (非レプトスピラ疾患群)。

4. 研究成果

(1) 犬レプトスピラ症例に対する *L. interrogans* の凝集抗原を同定することを目的として, MAT で *L. interrogans* serovar hebdomadis に抗体陽性であった 3 症例 (症例 1, 2, 5) の血清を用いて, *L. interrogans* serovar hebdomadis の外膜蛋白を抗原とした Western blot 解析を行った。その結果, 33kDa と 40kDa 付近において 3 症例に共通に認識されるバンドが確認された (図 1)。

次に 33kDa と 40kDa 付近の分子の 3 次構造が症例の血清で認識されるかを確認する目的で, *L. interrogans* serovar hebdomadis の外膜蛋白を MAT で *L. interrogans* serovar hebdomadis に抗体陽性であった症例 1 の血清とあらかじめ反応させた Protein A マグネットビーズを用いた免疫沈降反応により分離し, SDS-PAGE で展開後, 同血清を用いて Western blot 解析を行った。その結果, 33kDa 付近にバンドは認められなかったが, 40kDa 付近にバンドが確認された。この約 40kDa のバンドが外膜蛋白抽出の際に混入したリン

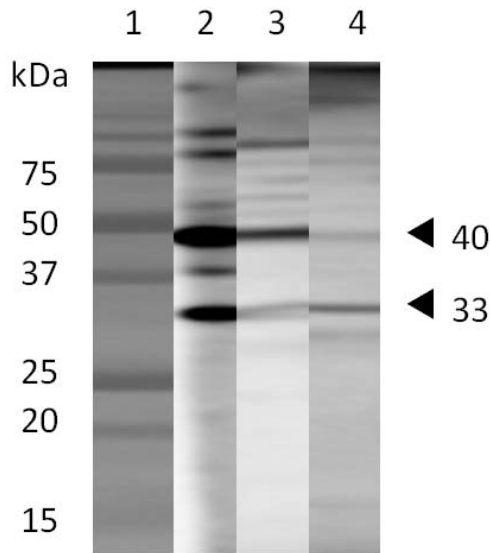


図1 *L. interrogans* serovar hebdomadis strain Akiyami B (AkiB) 陽性犬の血清が認識する外膜蛋白

脂質ではなく、蛋白であることを確認することを目的として、外膜蛋白をプロテアーゼ処理し、レプトスピラ症例の血清を用いた Western blot 解析を行ったところ、約 40kDa 付近のバンドは消失し、これがリン脂質ではなく外膜蛋白であることが明らかとなった。この 40kDa 付近のバンドを LC-MS/MS 分析することを目的として、*L. interrogans* serovar hebdomadis の外膜蛋白を SDS-PAGE で展開後、クマシーブルー染色し、このバンドをゲルから切り出した。LC-MS/MS 分析の結果、8 種の蛋白が検出された。中でも fatty acid synthase subunit beta と hypothetical protein LIC11359 に対するペプチドマッチ数がそれぞれ 24, 31 個と高く、MOWSE アルゴリズムに基づくスコアも高かった。

(2) GST-fas1, GST-MaoC 融合蛋白の精製と GST の分離

それぞれの蛋白に対する GST 融合蛋白を作成した。作製した融合蛋白を SDS-PAGE で泳動後、クマシーブルーで染色したところ、予想される約 65kDa のバンドが確認された。PreScission Protease を用いて GST と切断後、再びこれら蛋白を SDS-PAGE で展開し、GST が分離されていることを確認した。作製した fas1, MaoC の組換え蛋白が *L. interrogans* serovar hebdomadis 陽性犬の血清で認識されることを確認するため、症例 1 の血清を用いて Western blot 解析を行った。その結果、fas1, MaoC とともに *L. interrogans* serovar hebdomadis 陽性犬 (症例 1) の血清で認識されることが確認された (図 2A)。また、fas1, MaoC の組換え蛋白が *L. interrogans* serovar hebdomadis 以外の血清型に感染している犬の血清で認識されるかを確認するため、MAT で *L. interrogans* serovar australis に陽性であった症

例 3 の血清を用いて Western blot 解析を行った。その結果、fas1 は *L. interrogans* serovar australis 陽性犬 (症例 3) の血清で認識されるが、MaoC は認識されなかった (図 2B)。しかしながら追加として、別の *L. interrogans* serovar hebdomadis 陽性犬 (症例 5) の血清を用いて Western blot 解析を行ったところ、*L. interrogans* serovar australis 陽性犬 (症例 3) と同様、fas1 は認識されるが、MaoC は認識されないという結果が得られた。

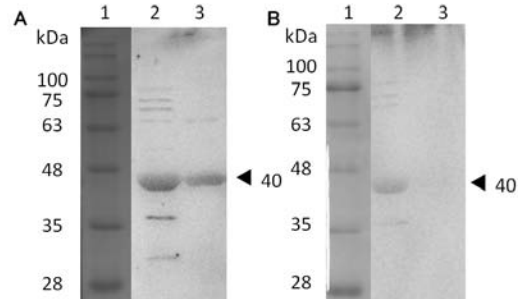


図2 *L. interrogans* serovar hebdomadis strain Akiyami B (AkiB), *L. interrogans* serovar australis strain Akiyami C (AkiC) 陽性犬の血清による組換え蛋白の認識

(3) 組換え蛋白ラテックスビーズを用いた凝集法の検討

fas1, MaoC の組換え蛋白を用いてラテックスビーズ作製し、ラテックス凝集法の有用性を検討した。まず、レプトスピラ症と診断された 6 症例の血清を用いたところ、fas1, MaoC をそれぞれ結合させたビーズがすべて凝集した。次に、ラテックス凝集法の結果と過去のワクチン接種との関連性を解析するために、MAT で陰性であった血清をワクチン接種歴の有無により分類し、それぞれ 12 検体ずつ凍結血清を用いてラテックス凝集試験を行った。その結果、fas1, MaoC 結合ビーズともに過去にワクチン接種歴の無い個体から得られた 1 検体を除く 24 検体中 23 検体において凝集は認められなかった。

さらに、ラテックス凝集法の非特異反応を検討するために、非レプトスピラ疾患群 (血液系の腫瘍 6 頭、自己免疫疾患 5 頭、心臓疾患でクレアチニンが高値を示した 1 頭) の凍結血清を用いてラテックス凝集試験を行ったところ、過去に我々の研究室で開発した *L. interrogans* serovar hebdomadis 外膜蛋白粗抽出結合ビーズ (AkiB ビーズ) を用いると血清では 12 症例中 4 症例、血漿では 14 症例中 6 例で偽陽性を示した。一方、fas1 結合ビーズと MaoC 結合ビーズを用いると血漿では AkiB ビーズと同じ 6 例で偽陽性を示したが、血清ではすべて陰性であった。以上の結果から fas1, MaoC 結合ビーズの感度と特異性は血清を用いた場合、それぞれ 100%, 97.2% であった。

本研究では *L. interrogans* の凝集抗原を LC-MS/MS で解析し、その候補蛋白である fas1, MaoC ビーズを用いたラテックス凝集系を作製した。ラテックス凝集法は1回の検査に要する時間は15分程度と迅速であり、レプトスピラ生菌を使用しないため特別な設備が必要なく、検査試薬さえ用意しておけば病院内で容易に実施することが可能である。残念ながら、本研究では用いることが出来た症例数が少なく、実際の臨床応用には犬レプトスピラ症例の検体を増やして検討を重ねる必要があると考えられる。また、レプトスピラ症以外の疾患で肝不全や腎不全となり、総ビリルビン値や尿素窒素値、クレアチニン値が上昇している症例の検体を用いた本検査法の特異性についても症例数を増やして再検討する必要があると考えられる。しかしながら、*L. interrogans* の凝集抗原を解析することで得られた fas1, MaoC ビーズを用いたラテックス凝集法は粗抽出した外膜蛋白を用いたビーズより非特異反応が低く、レプトスピラ症が疑われる症例に対して簡便かつ迅速な検査法として臨床的に有用である可能性が強く示唆された。

以上の結果は現在、投稿準備中である。

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2件)

- ① 和田優子, 藤崎由香, 前田健, 佐藤宏, 横山真弓, 宇仁茂彦, 水野拓也, 奥田優, 大阪府および兵庫県の2地域における野生アライグマと犬のレプトスピラ抗体保有状況調査, 日本獣医師会雑誌, 査読有, 63巻, 2010, 707-710
- ② Iwamoto E, Wada Y, Fujisaki Y, Umeki S, Jones MY, Mizuno T, Itamoto K, Maeda K, Iwata H, Okuda M, Nationwide survey of *Leptospira* antibodies in dogs in Japan: Results from Microscopic agglutination test and enzyme-linked immunosorbent assay, Journal of Veterinary Medical Science, 査読有, Vol. 71, No. 9, 2009, 1191-1199

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥田 優 (OKUDA MASARU)
山口大学・農学部・教授
研究者番号: 10325243