

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10398

研究課題名（和文）猫ひっかき病のヒトへの感染予防に向けたネコワクチン・急性期診断・抗原バンクの開発

研究課題名（英文）Development of Cat Vaccines, Acute Phase Diagnosis, and Antigen Bank for the Prevention of Human Infection with Cat Scratch Disease

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・講師

研究者番号：10432741

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：猫ひっかき病（CSD）の病原菌である *Bartonella henselae* を CSD 患者血清を用いた IgM ウエスタンブロット（IgM-WB）解析から得られた4群パターンのうち、特に10kDa付近はCSD患者血清全体の60%に検出される。10kDaは抗原となる蛋白質としては分子量が小さいためLPSの可能性がある。そこで *B. henselae* からLPSを抽出しIgM-WBを行うとLPSの反応は見られなかった。しかし、十分な抽出ではなかった可能性があり今後の検討が必要である。また、質量分析により検出された抗原候補蛋白質の合成を行っており、同定を現在進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

わが国のネコの飼育数は1000万頭であり、疫学的調査の結果 *B. henselae* 感染率は10%であることから少なくとも100万頭の保菌が考えられる。また、ヒトへの感染はノミが媒介しており年間1万人は感染していることが推測されている。これらのことから市中医療機関で容易に検出できるCSD検出キットの開発と予防法としてワクチンの開発は急務である。検出では急性期に検出することが重要となるため感染初期に出現するIgMの抗原を同定する必要がある。今回の研究成果は質量分析により得られた抗原候補のうち合成できた蛋白質に関しては抗原候補から除外することができたため、LPSの解析も含め後一步のところまで来ている。

研究成果の概要（英文）：Among the four group patterns obtained from the IgM Western Blot (IgM-WB) analysis using sera from patients with cat scratch disease (CSD), caused by the pathogen *Bartonella henselae*, a band around 10 kDa was detected in 60% of the CSD patient sera. Since 10 kDa is a small molecular weight for a protein to serve as an antigen, it could potentially be lipopolysaccharide (LPS). Therefore, we extracted LPS from *B. henselae* and conducted IgM-WB, but no reaction to LPS was observed. However, there is a possibility that the extraction was insufficient, and further investigation is required. Additionally, we are currently synthesizing and identifying the candidate antigen proteins detected by mass spectrometry.

研究分野：臨床微生物学

キーワード：猫ひっかき病 ワクチン *Bartonella henselae* 急性期診断

1. 研究開始当初の背景

(1) *Bartonella henselae* 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。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。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、2010 年以降申請者らへの CSD 診断依頼が年間 100 件以上送られてくる。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令和元年度調べ) であるにもかかわらず、ネコに対する *B. henselae* 感染予防策は全く講じられておらず、感染者が増大しており、ペットネコやヒトへのワクチン開発が求められている。一方、CSD 診断は間接蛍光抗体 (IFA) 法で *B. henselae* 抗体価測定する血清学的診断が世界的標準検査法であるが、感度が低いため偽陰性例が多い。これまで、*B. henselae* IgM 抗体陽性血清の WB 解析は従来の検出条件では不適切であり、IgM 陽性血清解析に関する詳細な報告は無い。

(2) 世界的にも我々以外に CSD 患者血清 (特に IgM 抗体) に反応する抗原をウエスタンブロット法 (WB) で検出できる研究機関は文献上報告がない。特に、感染症の急性期に産生される IgM は、IFA 法で CSD 陽性であった血清は *B. henselae* 菌体を用いた WB でバンドが 100% 検出されるが、健康人血清にはほとんど検出されない。さらに、検出される蛋白質は分子量ごとにおよそ 10kDa、30kDa、40kDa および 70kDa の 4 群のパターンが認められた。これら 4 つの検出率がそれぞれおよそ 30~50% 以上であることから、統計学上 CSD 特異的な反応であり、他の感染症における交差反応はなく、4 群のうち何れかが検出されれば CSD と診断できることを報告した。したがって、CSD 患者血清と反応するバルトネラ菌の蛋白質を同定できるのは我々のみである。

2. 研究の目的

わが国で CSD 鑑別診断が行えるのは申請者ら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 *B. henselae* 感染が広まっていることが危惧される。本研究の目的はバルトネラから抗原となり得る蛋白質を同定し、その抗原蛋白質を用いた CSD 鑑別診断キットとネコに対するワクチンを開発することである。つまり、ヒトへの *B. henselae* 感染 (CSD) の診断と感染防御を実現することである。さらに、山口大学には AI とシステムバイオロジーを両輪として推進する AI システム医学・医療研究教育センター (ASIMEC) があり、診療をサポートする AI システムを構築することで、早期の予測的診断に基づく予防的介入の実施などを図っている。そこで、ASIMEC を介してこれら抗原情報を広く公開し、かつ抗原試料を提供する、いわゆる『抗原バンク』を開設すれば、CSD 研究のみならず公衆衛生的観点からも国内外に CSD を啓発できるのではないかと考えた。

3. 研究の方法

CSD 抗原の新たな同定法の確立および抗原蛋白質合成

現在保存しているすべての CSD 患者血清から独自の改良 WB で検出した抗原となる *B. henselae* の蛋白質を以下の手技手法で行った。

(1) 申請者らは免疫沈降法を新たに構築し (詳細は論文掲載のため不記載)、特異度の高い蛋白質をすべて抽出した。

(2) 抽出した蛋白質を SDS-PAGE 電気泳動を行い免疫沈降に用いた CSD 患者血清を 1 次抗体として WB 法を行う。検出された分子量と照らし、銀染色した SDS-PAGE のポリアクリルアミドゲルに検出した箇所を切り取り、質量分析を行った。

(3) 質量分析で選出された蛋白質遺伝子を PCR 法で増幅し、無細胞蛋白質合成を行なった。

(4) 精製蛋白質を CSD 患者血清の WB 法で評価した。

(5) *B. henselae* はグラム陰性桿菌である。したがって外膜に LPS を有している。10kDa 付近は LPS の可能性があるため、LPS 抽出キットにより LPS を抽出した。LPS が抽出されることを SDS-PAGE を銀染色し確認した。この抽出した LPS を CSD 患者血清の WB 法で評価した。

4. 研究成果

(1) 患者血清を用いた免疫沈降は血清中に複数の抗体が雑多にあるため非常に難しいことが知られているが、我々が独自に考案した免疫沈降法により蛋白質は複数得られるものの目的とする抗原の抽出ができた。(図 1) これにより目的とする抗原を効率よく得られ、質量分析の試料として使用することが可能となった。また、この手法は二次元電気泳動のような特殊な過程を踏む必要が無く、より簡便であるため、その他の感染症にも応用可能である。

(2) 図1の銀染色とCSD患者血清を用いたIgM-WBを参照し、抗原バンドを切り取り質量分析にかけた。その結果107の遺伝子候補が検出された。そのうち最も検出頻度が高いアサインから上位10遺伝子を候補として抽出した。(各遺伝子の詳細は論文掲載のため不記載)

(3) これらの遺伝子は大腸菌由来の無細胞蛋白質合成によって作製した。これら10遺伝子のうち6遺伝子は蛋白質合成されたもののCSD患者血清を用いたIgM-WB解析では全て検出されなかった。合成ができなかった4遺伝子のうち2遺伝子は蛋白質合成前の鋳型DNA合成あるいはmRNA合成ができず確認ができなかった。残りの2遺伝子は、鋳型はできたものの蛋白質合成ができなかった。前者の原因としてプライマーデザインに問題があることが考えられる。後者は遺伝子の長さが大き過ぎことである。質量分析で検出された遺伝子は10kDa程度の遺伝子ではなく100kDaを超えるものであった。質量分析から検討を重ねてきたが、アサインから考えるとこの遺伝子の可能性は非常に高いことがわかった。今回用いた大腸菌リボゾームは蛋白質合成が困難な配列がある可能性があること。もう一つは合成できる分子量に限界があることである。この問題を解決するためコムギ由来の無細胞蛋白質合成がある。特徴として種に関係なく蛋白質合成が可能であること。分子量の大きさに左右されないことが挙げられる。したがって、今後コムギ由来無生物蛋白質合成キットを用いて抗原候補蛋白質を合成しIgM-WBにより同定する予定である。

(4) 一方、*B. henselae*はグラム陰性桿菌であり、外膜にLPSを有している。CSD患者血清のうち60%が10kDa付近であることからLPSである可能性が否定できない。したがって、LPS抽出キットを用いてLPSを抽出し銀染色により確認した(図2)。さらにCSD患者血清を用いたIgM-WB解析の結果抗原として検出が見られなかった。しかしながら、LPS抽出量としては少なく反応するには十分な量で解析ができなかった可能性も否定できない。したがって、LPSの検討も今後行う予定である。

猫ひっかき病は発熱や有痛性のリンパ節腫脹を呈する定型例80%と肝・脾肉芽種や視神経網膜炎などの非定型例20%である。昨年、山口大学医学部附属病院では劇症な悪性リンパ腫疑いで搬送されたが病理診断においてCSDが疑われた。われわれはこの患者血清をCSD診断のゴールドスタンダードである間接蛍光抗体法(IFA)を行なった結果、力価が非常に高かったためCSD陽性と診断となった。このようにCSDの診断は除外診断も含め非常に重要である。抗原を同定することにより市中の医療機関において簡便に検査できる検査キットの開発は急務である。さらに、免疫力が弱い小児や高齢者の感染が多いこともありワクチン開発が求められる。今回の研究手法は様々な感染症において抗原を同定する方法として免疫沈降法を開発した。今回蛋白質合成において予定通りには同定できなかったが、この点を克服すればCSD迅速診断およびCSDワクチンができ感染予防が可能となる。

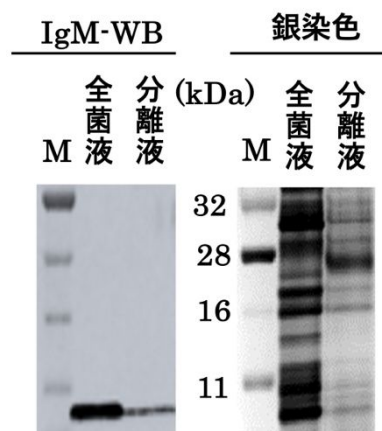


図1 独自の免疫沈降法による抗原抽出免疫沈降により得られた*B. henselae*蛋白質(分離液)は患者血清を用いたIgM-WBで検出された。

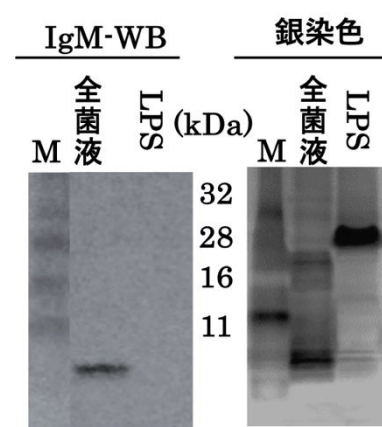


図2 LPS抽出および抗原確認10kDa付近にLPSを銀染色により確認しCSD患者血清を用いたIgM-WBの結果検出されなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Tsuneoka Hidehiro, Otsuyama Ken-ichiro, Hirano Akari, Nojima Junzo, Nishikawa Jun, Ichihara Kiyoshi	4. 巻 104
2. 論文標題 Clinical utility of indirect fluorescent assay for IgA class antibodies against Bartonella henselae in serodiagnosis of cat scratch disease in its early stage	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diagnostic Microbiology and Infectious Disease	6. 最初と最後の頁 115809 ~ 115809
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.diagmicrobio.2022.115809	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 Tokunaga Yasuko, Otsuyama Ken-Ichiro, Hayashida Naoki	4. 巻 11
2. 論文標題 Cell Cycle Regulation by Heat Shock Transcription Factors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 203 ~ 203
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells11020203	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 Tsuneoka Hidehiro, Otsuyama Ken-ichiro, Motoki Yukari, Nojima Junzo, Nishikawa Jun, Ichihara Kiyoshi	4. 巻 28
2. 論文標題 Exploring the seasonal and regional features of cat-scratch disease on the basis of anti-Bartonella henselae IgM/IgG positive rates in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 112 ~ 115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2021.09.003	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 Fukuda Soichiro, Ito Shunsuke, Nishikawa Jun, Takagi Tatsuya, Kubota Naoto, Otsuyama Ken-ichiro, Tsuneoka Hidehiro, Nojima Junzo, Harada Koji, Mishima Katsuaki, Suehiro Yutaka, Yamasaki Takahiro, Sakaida Isao	4. 巻 9
2. 論文標題 Deep Ultraviolet Light-Emitting Diode Light Therapy for Fusobacterium nucleatum	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 430 ~ 430
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms9020430	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤 渉, 山本 薫, 佐々木貴宏, 大津山賢一郎, 星井嘉信, 常岡英弘, 太田康晴
2. 発表標題 リンパ節生検により診断に至った猫ひっかき病の一例
3. 学会等名 第128回山口大学医学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大津山賢一郎, 常岡英弘
2. 発表標題 間接蛍光抗体法によるBartonella henselae IgA抗体価測定の臨床的有用性
3. 学会等名 第92回日本感染症学会西日本学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大津山賢一郎, 常岡英弘
2. 発表標題 DEAE-Sepharoseカラムクロマトグラフィ法により 抗原精製した3種類ELISAのBartonella henselae IgM抗体価の比較検討
3. 学会等名 第91回日本感染症学会西日本地方会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大津山賢一郎, 常岡英弘
2. 発表標題 Bartnella henselae サルコシン処理液から精製した3種抗原によるIgM-ELISA の比較検討とその臨床的有用性
3. 学会等名 第93回日本感染症学会西日本地方会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川上万里, 池田房雄, 藤岡真一, 常岡英弘, 大津山賢一郎
2. 発表標題 猫ひっかき病の一例
3. 学会等名 第97回日本感染症学会学術総会
4. 発表年 2023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
---------	---------