

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医学） 氏名 塩川 愛絵

学位論文題名

Development of an enzyme-linked immunosorbent assay system based on recombinant leptospiral outer membrane protein LipL32 expressed by *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* for *Leptospira* infection in rodents.

(大腸菌およびメタノール資化酵母により発現させた組換えレプトスピラ外膜蛋白 LipL32 を用いたげっ歯類レプトスピラ感染症診断 ELISA 法の開発)

【背景と目的】

レプトスピラ症は *Leptospira* 属に分類されるグラム陰性好気性細菌を原因とする人獣共通感染症である。現在までに家畜、伴侶動物、野生動物などから病原性レプトスピラが分離されている。特にげっ歯類は無症状のまま一生にわたって排菌し続け、ヒトへの感染源として最も重要な保菌動物である。レプトスピラ症の症状は多岐に渡り、発熱、頭痛、筋肉痛、腹痛、倦怠感、出血、腎臓機能障害、神経症状などを呈する。重症例はウイルス病（黄疸出血性レプトスピラ）やレプトスピラ肺出血症候群として知られ、死亡率はそれぞれ 10% から 74% 以上とされている。ヒトは、保菌動物の尿で汚染された水や土壌から経皮的あるいは経口的に感染する。このため、レプトスピラ症は農業や林業従事者などの職業関連疾病とされ、亜熱帯、熱帯地域では発生が常在化している。一方、洪水等の自然災害に伴う流行や、近年では野外活動（水泳、ハイキング、筏下り）に伴う突発的な流行についての報告も増えている。レプトスピラ症の予防には、病原性レプトスピラの保菌動物及び環境を含めた疫学的情報を得ることが、予防医学的また公衆衛生学的見地から重要である。

ヒトや保菌動物の診断法として、PCR による病原体遺伝子の検出法、顕微鏡下凝集反応 (MAT)、ELISA およびイムノクロマトグラフィーなどによる抗体検出法が用いられている。MAT は血清学的標準診断法であるが、抗体による生菌の凝集を顕微鏡下で観察する方法であるため、実験室内感染の防止対策が必要であり、また、判定に熟練を要する等の問題点がある。このため、取扱いに特殊な施設を必要としない、遺伝子組換え技術によって調整されたレプトスピラの菌体表面抗原を用いた血清診断用抗原の開発が行われている。LipL32 は、病原性レプトスピラに特異的で遺伝子配列の保存性も高く、菌体表面抗原中最も発現量が多い。このため、LipL32 はヒト、ウシ、ウマ、ブタなどの血清診断に応用されてきた。しかし、げっ歯類はヒトへの重要な感染源にも関わらず、組換え LipL32 の血清診断への応用は未だなされていない。

本研究では、LipL32 の主要抗原領域をモノクローナル抗体を用いて解析し、さらに適切な組換え抗原発現ベクターを選定することにより、野生げっ歯類のレプトスピラ感染血清診断法に有用な診断用抗原の開発を試みた。

【材料と方法】

病原性レプトスピラのうち、全ゲノム配列が決定されている *L. interrogans* Lai の配列を元にプライマーセットを設計し、国立感染症研究所から分与された東南アジア分離株の *L. interrogans* serovar Manilae (マニラ株) より抽出した DNA を鋳型に用いて LipL32 遺伝子のクローニングを行った。また、LipL32 に対する 4 種のモノクローナル抗体 (MAb) を確立し、合成ペプチドに対する反応性から、エピトープ配列を決定した。6 個のヒスチジンが付加された組換え LipL32 を大腸菌 (*Escherichia coli*, 以下 *E. coli*) およびメタノール資化酵母 (*Pichia pastoris* 以下 *P. pastoris*) 発現系にて発現させ、ニッケルキレート法カラムにて精製後、LipL32 の ELISA 抗原としての有用性を検討した。被験血清として、マニラ株実験感染ラット血清 (24 例)、非感染ラット血清 (8 例)、野生ラット血清として、ベトナムのハイフォン

港(2011年7月、33例)とハノイ市内(2012年11月54例、2013年3月53例)捕獲ラットの血清を用いた。対照検査として、*flaB* 遺伝子を検出する PCR、マニラ株全菌体抗原を用いた Western Blot(WB)、WHO 推奨プロトコルによる非病原性レプトスピラ全菌体抽出抗原を用いた ELISA を行った。また、大腸菌発現抗原使用時に見られる非特異反応を低減させるため、大腸菌(BL21株)を吸着剤として血清と混和させる血清事前処理も検討した。

【結果と考察】

実験感染ラット血清と MAb を用いて結合競合阻害試験を行った。感染ラット血清中の抗体の結合が、105-114 および 167-174 番のアミノ酸に結合する MAb によって 46%~58%阻害され、これらの結合部意を含む領域が主要抗原領域と考えられた。本領域を含む短縮 LipL32(87-188 番アミノ酸)を、*E. coli* および *P. pastoris* 発現系にて発現させた (*E. coli* 発現:tLipL32e、*P. pastoris* 発現:tLipL32p)。全長 LipL32 を *E. coli* で発現させた (wLipL32)。

実験感染および非感染ラット血清ではいずれの組換え LipL32 を用いた ELISA でも感度、特異度共に 100%であった。また MAT よりも急性期抗体検出が可能であった。しかし、wLipL32 は抗原安定性が低く、凍結融解によって分解され易かった。一方、短縮 LipL32 は、いずれの発現系 (tLipL32e、tLipL32p) においても凍結融解などの温度変化に安定であった。このため、ベトナム野生ラット血清の抗体測定には短縮 LipL32 を用いた。対照検査にて陰性判定となった野生ラット血清に対して、tLipL32p-ELISA ではほとんど非特異反応は認められず、*P. pastoris* 発現抗原の特徴と考えられた。一方、tLipL32e-ELISA では高い非特異反応が認められたが、血清を *E. coli* 菌体で処理することにより反応が軽減されたため、*E. coli* 菌体成分に対する抗体が非特異反応の原因と考えられた。

ハイフォン港捕獲ラット血清について、PCR 及び WB で陰性結果を示した血清群の ELISA OD 値をもとに、ELISA カットオフ値を 95% 特異度になるよう設定した。その結果、tLipL32p-、tLipL32e-ELISA の感度 (%) はそれぞれ 83%、50% であり、tLipL32p-ELISA の感度が高かった。しかし、大腸菌体吸着処理血清を用いた場合、tLipL32e-ELISA でも感度の改善がみられた (92%)。

非病原性レプトスピラ全菌体抗原 ELISA は WHO 推奨プロトコルとなっているが、非感染ラット血清(8例)から得られた成績をもとに設定したカットオフ値で野生ラット検体の 95% が陽性となり、非特異反応を検出している可能性が示唆された。

【結論】

LipL32 の主要抗原領域および組換え抗原発現ベクターを選択することにより、野生ラット血清に対してより非特異反応の低い組換え抗原を開発することができた。*P. pastoris* 発現抗原では血清事前処理無しでも、大腸菌発現抗原より非特異反応が低く、大腸菌に比べて発現効率も良いため、より優れた組換え抗原であると考えられた。ヒト血清でも同様に大腸菌発現抗原への非特異反応が血清の大腸菌吸着による事前処理にて軽減されることが報告されており、事前処理の必要がない *P. pastoris* 発現抗原はヒト血清を対象とする診断抗原としての有用性も示唆された。

高度に精製された組換え抗原を血清学的診断に使用することは非特異反応の抑制に非常に有効であるが、一方で検査に十分な抗原量を確保するのに多大な労力と費用を要する。シンプルで再現性のある組換え抗原発現及び精製システムの開発を、*P. pastoris* 発現系も含めて今後進展させていく必要がある。また、LipL32 以外の病原性レプトスピラに特異的とされる菌体抗原の組換え抗原作製、血清学的診断への有用性の検討、さらに、LipL32 を含めた複数の抗原を用いた診断系開発も今後の研究課題である。