

# N-ラウロイル-サルコシン処理可溶性蛋白抗原を用いた ELISA による 血清中抗 *Bartonella henselae* IgG 抗体価測定的确立

鶴岡恵子 指導教員 常岡英弘

キーワード ; 猫ひっかき病、*Bartonella henselae*、N-ラウロイル-サルコシン、ELISA

## 概要

猫ひっかき病 (CSD) の主要原因菌は *Bartonella henselae* である。本症の診断には抗 *B. henselae* 抗体価を測定する血清学的診断が有用である。しかし ELISA による抗 *B. henselae* IgG 抗体価測定は抗原に *B. henselae* 全菌体あるいは N-ラウロイル-サルコシン (サルコシン) 処理沈渣 (不溶性蛋白) が使用されており、未だ感度と特異性が不十分である。われわれは高感度 ELISA の開発を目的にまず基礎的検討として、*B. henselae* 全菌体、サルコシン不溶性および可溶性蛋白の 3 種類の抗原について、間接蛍光抗体 (IFA) 法陽性 CSD 患者 5 例と IFA 法陰性健常人 5 例のテストパネル血清を用いて ELISA とウエスタンブロット法で比較解析した。その結果、サルコシン可溶性蛋白が明らかに高い特異性を有し、抗原として最も優れていることが判明した。そこで、このサルコシン可溶性蛋白を抗原とする新たな ELISA を確立し、本法の臨床的有用性を検証するため、臨床的に CSD が疑われた 118 例の患者血清 (IFA 法陽性  $\geq 256$  倍 : 46 例、判定保留例 64~128 倍 : 34 例、陰性 < 64 倍 : 38 例) および健常人血清 88 例 (IFA 法 64~128 倍 : 5 例、< 64 倍 : 83 例) について検討した。その結果、本法の IFA 法陽性患者と健常人における感度および特異性は IFA 法を基準とした場合、それぞれ 95.7% (44/46) および 97.7% (86/88) であった。CSD 疑い患者血清 118 例のうち、IFA 法と ELISA の不一致例が 15 例認められた。その内訳は IFA 法陽性・ELISA 陰性が 2 例および IFA 法陰性・ELISA 陽性が 13 例であったが、これらはいずれもウエスタンブロット解析で CSD であることが確認された。以上よりサルコシン可溶性蛋白を抗原とする新たな ELISA は IFA 法に比べ高感度であり、今後、CSD の診断率向上が期待される。

## 1. はじめに

猫ひっかき病 (Cat scratch disease:CSD) は、グラム陰性小桿菌の *Bartonella henselae* によって引き起こされる人畜共通伝染病である<sup>1-3)</sup>。本症は局所リンパ節腫脹を主訴とする定型例から、不明熱、肝・脾臓肉芽腫、心内膜炎、脳症および視神経網膜炎など全身性の重症な非定型までその臨床像は多彩である<sup>1-3)</sup>。本菌は患者からの分離培養が極めて困難なため、その確定診断は主に *B. henselae* の血清抗体価を測定する血清学的方法あるいは遺伝子学的方法として Polymerase chain reaction (PCR) 法が主に行なわれている。

1992 年、Regnery<sup>4)</sup>らは、CSD の血清学的診断法として、高感度で特異性の高い間接蛍光抗体 (Indirect fluorescence antibody :IFA) 法による抗 *B. henselae* IgG 抗体価測定法を開発した。それ以来、IFA 法は CSD 診断に広く使用され、欧米では市販キットも発売されている<sup>5-7)</sup>。しかし、本法は使用抗原に Vero 細胞との共生培養菌が必要であり、判定の顕微鏡観察に個人差が入り、時間も要する。また IFA 法は自動化には適さず、多数の検体をこなすには不向きなどの問題点がある。

この IFA 法に代わるものとして、Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) が登場し、すでに *B. henselae* をソニケートした全菌体や外膜を利用する N-ラウロイル-サルコシン (サルコシン) 不溶性蛋白などを抗原とする、いくつかの ELISA が報告されている<sup>8-11)</sup>。しかし、これら ELISA による抗 *B. henselae* IgG 抗体価測定法は IFA 法と比べ、感度が劣り、また特異性にも問題が残る<sup>12,13,10)</sup>。したがって、ELISA による

抗 *B. henselae* IgG 抗体価測定には使用する抗原の改良が必要とされている。

われわれは、抗原として *B. henselae* のサルコシン可溶性蛋白が全菌体やサルコシン不溶性蛋白を使用するより優れていることを見出した。現在まで ELISA の抗原として、サルコシン可溶性蛋白を使用した報告はない。本研究ではこの新たなサルコシン可溶性蛋白を抗原とした ELISA による抗 *B. henselae* IgG 抗体価を IFA 法と比較検討した。

## 2. 材料および方法

### 1) 3 種類の ELISA 用の *B. henselae* 抗原

*B. henselae* の全菌体、サルコシン処理後の不溶性蛋白、および可溶性蛋白の 3 種類の抗原を準備した。最初に *B. henselae* ATCC49882 株をチョコレート寒天培地に接種後、35°C、5%CO<sub>2</sub> 下で 4~5 日間培養した。これを 10mM HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid) 緩衝液 pH 7.4 (Sigma) に浮遊させ、氷中で 20 分間超音波処理後、菌体浮遊液を 5 分間 3,000rpm、4°C で遠心し、その上清を全菌体抗原とした。次いでこの上清を 45 分間 40,000rpm、4°C で遠心後、沈渣に 0.4%サルコシン (HEPS 緩衝液) を加え 30 分間氷冷した。これを 2 時間 60,000rpm、4°C で遠心し、その沈渣をサルコシン不溶性蛋白抗原とした。さらに、その上清を、4°C、1 夜 HEPES 緩衝液で透析膜を使用して透析後、2 時間 60,000rpm、4°C で再遠心分離した上清をサルコシン可溶性蛋白抗原とした。これら 3 種類の抗原は使用まで - 80°C で保存した。

### 2) 3 種類の抗原を使用した ELISA の比較

3 種類の異なる抗原を使用した ELISA による抗 *B. henselae* IgG 抗体価測定を評価するテストパネル 血清として、CSD 患者血清 (陽性コントロール: IFA 法  $\geq$  IgG 256 倍) 5 例と健常人血清 (陰性コントロール: IFA 法  $<$  IgG 64 倍) 5 例を選んだ。マイクロプレート (Sumilon; 住友ベークライト、日本) に、50mM 炭酸緩衝液 (PH9.2) で希釈した各抗原を各ウェルに 100  $\mu$ l ずつ分注後、4°C で 1 夜固相化した。0.05%Teen20  $\cdot$  PBS (PBS-T) で 4 回洗浄後、5%スキムミルク PBS-T で室温、4 時間ブロッキング後、再び洗浄した。1%スキムミルク PBS-T で 100 倍希釈した陽性・陰性コントロール血清を 100  $\mu$ l ずつ分注後、37°C で 1 時間反応後、洗浄した。3000 倍希釈した HRP (horseradish peroxidase) 標識抗ヒト IgG 抗体 (Sigma) を 100  $\mu$ l 加え、1 時間反応後、洗浄した。次いで、Ortho-Phenylenediamine (Sigma) 含有 50mM リン酸クエン酸緩衝液 (pH5.0) を加え、室温で 30 分発色させ、4N 硫酸で反応停止後、490nm で吸光度 (OD) を測定した。なお、すべての血清は 3 重測定し、3 種類の抗原を使用した ELISA は陽性および陰性コントロールの平均吸光度をそれぞれ比較した。

### 3) 至適抗原使用による ELISA の検証

先に述べた 3 種類の抗原の中で最も有用であった抗原を使用した ELISA を確立し、その臨床的有用性を検証した。対象検体は猫や犬との接触歴があり、かつリンパ節腫脹または不明熱が認められ、臨床的に CSD が疑われた 118 人の患者 (小児 99 例、成人 19 例) 血清を使用した。これら検体は、いずれも IFA 法による血清学的診断を山口大学大学院医学系研究科常岡研究室に依頼されたものである。118 例中、46 例は IFA 法で *B. henselae* IgG 抗体価 256 倍以上 (陽性) で、残り 72 例は、IFA 法 64~128 倍 (判定保留) 34 例、64 倍未満 (陰性) 38 例だった。またコントロールとして猫との接触歴がなく、リンパ節腫脹の既往のない健常人 88 例の血清を使用した。その内訳は IFA 法 64~128 倍 (判定保留) 5 例と 64 倍未満 (陰性) 83 例である。すべての検体は 3 重測定で陽性・陰性コントロールと同時に測定した。なお本測定系は *B. henselae* IgG 抗体価と吸光度の間に直線性を認めたため、ELISA 指数は以下の計算式で求めた<sup>14)</sup>。

$$\text{ELISA 指数} = \frac{\text{サンプル吸光度 (OD)} - \text{陰性コントロール (OD)}}{\text{陽性コントロール (OD)} - \text{陰性コントロール (OD)}}$$

#### 4) Sodium dodecylsulfate (SDS) – ポリアクリルアミド電気泳動 (PAGE) とウェスタンブロット法による抗原蛋白解析

ELISA に用いた 3 種類の *B. henselae* 抗原について、SDS-PAGE とウェスタンブロット法で解析を行った。SDS-PAGE は Laemmli の変法<sup>15)</sup>に準じて行った。まず、各抗原を NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA) で定量し、蛋白量を 4mg/ml に揃えた。各抗原に等量のサンプル緩衝液 (0.05M Tris-HCl 緩衝液 pH6.8, 2% SDS, 6% 2-mercaptoethanol, 10% glycerine, 0.01% bromophenol blue) を加え、95°C 5 分間加熱後、10,000rpm 2 分間遠心した。その上清 10  $\mu$ l を 5~20% 勾配-ポリアクリルアミドゲル (ATTO, Japan) に載せ、泳動緩衝液 (25mmol/L Tris, 192mmol/L glycine, 0.1% SDS) 中で 20mA 85 分間泳動した。次いで、SDS-PAGE で分離された抗原蛋白を Polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜に転写し、セミドライ式転写法を用い、泳動後のゲルを転写緩衝液 (25mmol/L Tris, 192mmol/L glycine, 20% メタノール) 中で 1mA/cm<sup>2</sup> 60 分間通電し、転写を行った。その後、PVDF 膜を 5% スキムミルク TBS-T (1% Tween 20, Tris buffered saline) で 4°C 18 時間ブロッキングし、TBS-T で 3 回洗浄した。この膜に 1% スキムミルク TBS-T で 100 倍希釈した各血清を室温で 60 分間反応させ、上記と同様に洗浄後、HRP 標識抗ヒト IgG 抗体 (Dako, Denmark) を室温で 60 分間反応させ、同様に洗浄した。最後に、DAB 反応液 (3-3'diaminobenzidine, 1M Tris-HCl) で発色させて反応バンドを検出し、解析した。

#### 5) IFA 法

IFA 法による抗 *B. henselae* IgG 抗体価測定は Vero 細胞と *B. henselae* の共生培養菌を抗原とする方法で行なった<sup>4,7)</sup>。すなわち、5% 牛胎児血清加 Eagle MEM (GIBCO) で単層状に発育させた Vero 細胞に、*B. henselae* ATCC49882 株の菌液を接種し、5% CO<sub>2</sub>、35°C 下で 96 時間共生培養した菌液を抗原液とした。この抗原液を 12 穴のスライドガラス上にヘマトクリット毛細管で滴下、乾燥後、アセトン固定して抗原スライドを作成した。

被検血清を PBS で 1:64~1:1024 まで倍数希釈し、それらを各々 20  $\mu$ l ずつ抗原スライドに載せ、湿潤箱内に入れ 37°C、30 分間反応させた。洗浄、乾燥後、FITC 標識抗ヒト IgG ヤギ血清 (MBL, 日本) を 20  $\mu$ l ずつ載せ、再び 37°C、30 分間反応させた。洗浄、乾燥後グリセリン緩衝液で封入後、蛍光顕微鏡 (OPTIPHOT-2; Nikon, 日本) で観察した。判定は倍率 400 倍で鏡検し、明瞭に蛍光を発する菌体が観察された場合を陽性とし、その血清の最高希釈倍数をもって抗体価とした。菌体が観察されても、特異蛍光が見られない場合、および蛍光が不明瞭な場合は陰性とした。抗 *B. henselae* IgG 抗体価 256 倍以上を IFA 法陽性、64~128 倍は判定保留、64 倍未満は陰性とした<sup>7,16)</sup>。

#### 6) データ分析

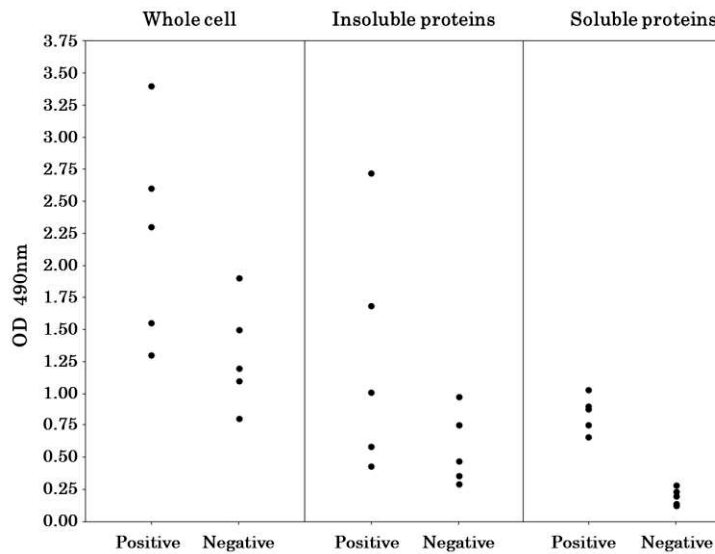
ELISA の評価として、感度は IFA 法陽性 CSD 患者 46 例のうち、ELISA 陽性例の割合で、また特異性は健康成人 88 例のうち、ELISA 陰性例の割合でそれぞれ算出した。また ELISA の日内変動係数 (CV) は 4 種類の血清を 8 重測定で 3 日間連続測定して算出した。なお本研究は山口大学大学院の倫理委員会によって承認された。

### 3. 結果

#### 1) 3 種類の抗原を使用した ELISA の比較

*B. henselae* の全菌体、サルコシン不溶性蛋白、およびサルコシン可溶性蛋白をそれぞれ抗原とした ELISA による抗 *B. henselae* IgG 抗体価測定を評価するため、陽性・陰性各 5 例のテストパネル血清を用いて検討した。その結果、Fig 1 のごとく、全菌体およびサルコシン不溶性蛋白を抗原とした ELISA は陽性例および陰性例の吸光度がサルコシン可溶性蛋白よりも高く、両者を区別することは困難であった。一方サルコシン可溶性蛋白では陽性例、陰性例の吸光度は減少するものの、両者の区別は容易で明瞭であり、本抗原は 3 種類の抗原

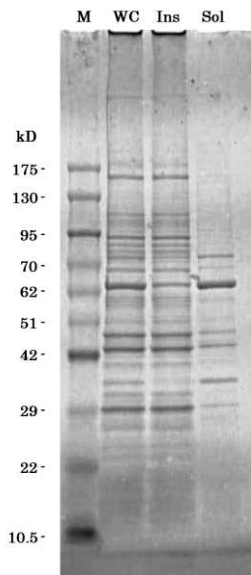
中、陽性と陰性を区別するのに最も適した抗原であった。



**Fig. 1. Comparison of three different antigens for ELISA to detect *B. henselae* IgG antibody by use of a panel**

Distribution of *Bartonella henselae* IgG antibody, expressed as optical density (OD) values, by ELISA using three different antigens in positive and negative control sera by immunofluorescence assay (IFA). Three different antigens are sonically disrupted *B. henselae* (whole cell) and 0.4% N-lauroyl-sarcosine-insoluble and soluble proteins of *B. henselae* (insoluble and soluble proteins). IFA-positive consists of serum samples from 5 patients clinically suspected of having cat scratch disease with IgG titers to *B. henselae* of  $\geq 1:256$  by IFA, and IFA-negative consist of serum samples obtained from 5 normal healthy individuals with IgG titers of  $< 1:64$ .

## 2) 3種類抗原の SDS-PAGE とウエスタンブロット解析

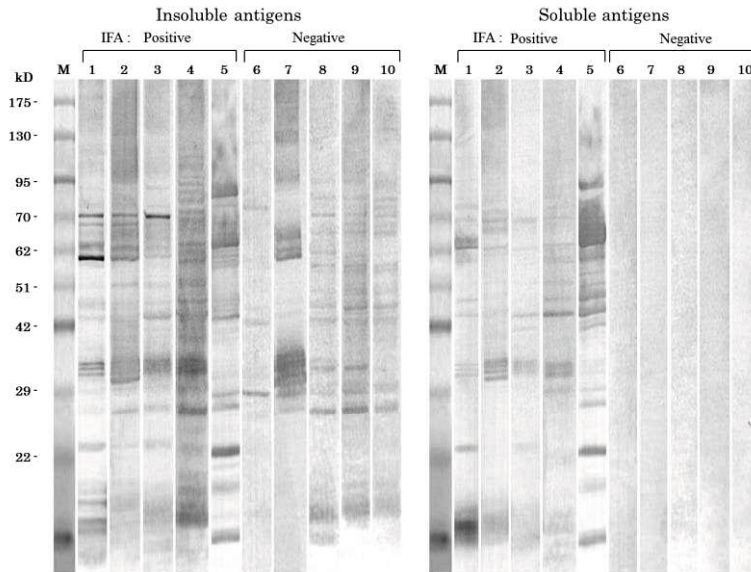


**Fig. 2. SDS-PAGE analysis of three antigens**

Analysis of three different antigens by sodiumdodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Lane 1, whole cell (WC) of *B. henselae*; Lane 2, 0.4%N-lauroyl-sarcosine-insoluble proteins (Ins); Lane 3, 0.4% N-lauroyl-sarcosine-soluble proteins (Sol). Molecular size markers (kDa) are indicated on the left.

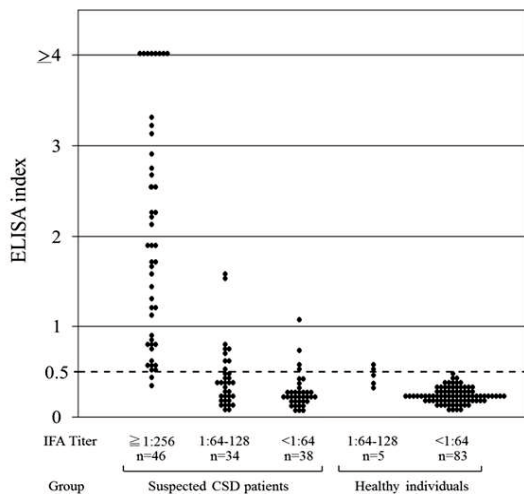
*B. henselae* 全菌体およびサルコシン不溶性蛋白抗原の両者における SDS-PAGE 分析は 10.5~175 kDa に多数のバンドを認め、同様のパターンを示した。しかしながら、サルコシン可溶性蛋白抗原では全菌体およびサルコシン不溶性蛋白抗原に比較して、バンド数が減少し、主に 29~80kDa の間に明らかなバンドが認められた (Fig 2)。

更にこれら 3 種類の抗原に対する 血清 IgG 抗体の反応性を見るために、陽性・陰性テストパネル血清を使用してウエスタンブロット解析を行なった。サルコシン不溶性および可溶性蛋白抗原に対する各陽性・陰性血清の反応性を Fig 3 に示した。全菌体抗原に対する反応性はサルコシン不溶性抗原と同様であったため省略した。サルコシン不溶性抗原では陽性血清に対し、12~95 kDa の間に多数のバンドが認められ、そのパターンも様々であった。また陰性血清に対しても、同様に 12~95 kDa の間に多数のバンドが認められた。一方、サルコシン可溶性抗原では陽性血清に対し、不溶性抗原に比べバンド数が減少したものの、11-15 kDa、32-35 kDa、45 kDa、67 kDa および 78 kDa に同様なバンドが認められた。また不溶性抗原では認められなかった新たな反応バンド (41 kDa、49 kDa および 61 kDa) も認められた (陽性パネル血清 No 5)。しかし陰性血清に対しては、いずれも明らかな反応バンドは認められなかった。



**Fig.3. Western blot analysis of two antigens IgG reactivity to positive and negative sera**  
 Western blot analysis of serum IgG reactivity to sarcosine-insoluble and -soluble antigens in positive and negative sera. Lanes 1-5 in sarcosine-insoluble and -soluble antigen indicate IgG activity in positive control sera from patients clinically suspected to have cat scratch disease by immunofluorescence assay (IFA) IgG titers to *B. henselae* of  $\geq 1:256$  (positive). Lanes 6-10 for each antigen indicate IgG activity in negative control sera from healthy individuals with IFA IgG titers of  $<1:64$  (negative). Molecular size markers (kDa) are indicated on the left.

### 3) 抗 *B. henselae* IgG 抗体価測定のためのサルコシン可溶性蛋白抗原を使用した新 ELISA と IFA 法との比較



**Fig.4. Comparison of ELISA using the sarcosine-soluble antigen with IFA for detection of *B. henselae* IgG antibody**

Comparison of the new ELISA using sarcosine-soluble antigen with immunofluorescence assay (IFA) for detection of *Bartonella henselae* IgG antibody. ELISA index distribution of IgG titer to *B. henselae* in sera from suspected cat scratch disease (CSD) patients and healthy individuals. Sera from suspected CSD patients consist of 46 sera with IFA IgG titers to *B. henselae* of  $\geq 1:256$ , 34 sera with titers of 1:64 to 1:128, and 38 sera with titers of  $<1:64$ . Healthy individuals are composed of 5 sera of threshold level with titers of 1:64 to 1:128 and 83 negative sera with titers of  $<1:64$  by IFA. The cutoff value of the new ELISA for positive serum was set at 0.50 (arrow).

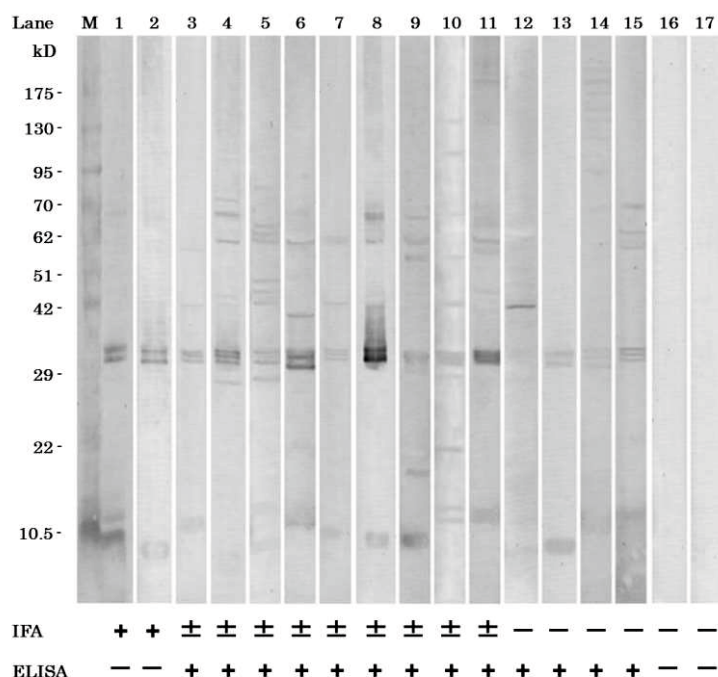
サルコシン可溶性蛋白抗原を使用した新たな ELISA の同時再現性の CV は 3 日間で 3.2%、4.5%および 3.1% (平均、3.6%) だった。118 例の CSD 疑い患者および 88 例の健常成人血清について、サルコシン可溶性蛋白抗原を使用した新 ELISA と IFA 法で抗 *B. henselae* IgG 抗体価を比較した。CSD 疑い患者血清 118 例の ELISA 指数は、IFA 法陽性 46 例で 0.39~4.00、判定保留 34 例で 0.13~1.57、陰性 38 例で 0.052~1.09 であった。一方、健常人 88 例では IFA 法判定保留 5 例で 0.30~0.56、陰性 83 例で 0.05~0.42 であった。

CSD 疑い患者および健常人の ELISA 指数の分布を Fig 4 に示した。ELISA の陽性・陰性カットオフ値は健常成人 88 例の ELISA 指数の平均値+3 標準偏差 (3SD) 以上として、0.50 を求めた。本カットオフ値での IFA 法陽性 CSD 患者と健常人における新 ELISA の感度と特異性は IFA 法を基準とした場合、それぞれ 95.8% (44/46) と 97.7% (86/88) であった。CSD 疑い患者 118 例のうち、IFA 法陽性 46 例中 2 例は ELISA 指数 0.39 と 0.41 で陰性であり、両者の IFA

法抗体価はいずれも 256 倍であった。同様に CSD 疑い患者の IFA 法判定保留例および陰性例 72 例中、13 例は ELISA 指数 0.53~1.57 で陽性であり、それらの IFA 法は 9 例が判定保留例 (64~128 倍)、4 例が陰性 (64 倍未満) であった。また健康成人 88 例中 86 例は ELISA・IFA 法共に陰性であったが、2 例は ELISA 陽性・IFA 法判定保留例であった。また CSD 疑い患者 118 例に対する新 ELISA の感度は 48.3% (57/118) で IFA 法 39.0% (46/118) より高率であった。

#### 4) CSD 疑い患者における IFA 法と新 ELISA 不一致例のウエスタンブロット解析

IFA 法陽性・ELISA 陰性の不一致例 2 例と IFA 法陰性・ELISA 陽性の不一致例 13 例、計 15 例について、健康人 2 例を対照にウエスタンブロットで解析した (Fig 5)。その結果、不一致例 15 例は 10.5~80 kDa に様々なパターンで多数の反応バンドが認められ、かつ 30~35 kDa に共通バンドが認められた。しかし健康人では明らかなバンドは認められなかった。



**Fig.5. Western blot analysis of patient sera with discrepant results by IFA and ELISA**

Western blot analysis of serum IgG reactivity in sera with discrepancy between the result of ELISA using sarcosine-soluble antigen and that of immunofluorescence assay (IFA). Lanes 1-15, IgG activity in sera of patients clinically suspected of having cat scratch disease and lanes 16 and 17, immunoblots from sera of healthy individuals with IFA IgG titers of <1:64 (-) as negative control. Lanes 1 and 2, sera from patients with negative ELISA and positive *B. henselae* IgG titers of 1:256 (+) by IFA. Lanes 3-11, positive ELISA and threshold level IgG titers of 1:64-128(±) by IFA. Lanes 12-15, positive ELISA and negative IgG titers of <1:64 by IFA. Molecular size markers (kDa) are indicated on the left.

#### 4. 考察

ELISA による抗 *B. henselae* IgG 抗体価測定法では *B. henselae* 全菌体やサルコシン不溶性蛋白を抗原とする方法がすでに多く報告されている<sup>8-11)</sup>。しかし、ELISA では健康人における抗 *B. henselae* IgG 抗体保有率が高いため、本法の臨床診断への有用性は低く、未だ普及に至っていない<sup>8,10,12,17)</sup>。したがって、CSD の血清学的診断法として有用な ELISA は、高感度で特異性の高い ELISA の開発、特に使用抗原の改良が必要である。本研究では ELISA に使用可能な抗原を検討し、CSD の血清学的診断法として有用な高感度 ELISA の確立を目的とした。

われわれは研究当初、諸家のごとく<sup>8,18,19)</sup> ELISA の抗原として *B. henselae* のサルコシン不溶性蛋白に注目

して研究を進め、その精製を目指していた。しかしその精製過程の超遠心上清であるサルコシン可溶性成分中に CSD 患者血清と反応する蛋白が存在することを見出した。そこで ELISA による抗 *B. henselae* IgG 抗体価測定の抗原としてサルコシン不溶性蛋白とサルコシン可溶性蛋白の両者を比較しながら、サルコシン濃度、サルコシンと菌体との反応時間、および超遠心条件等の種々基礎的条件を検討した。その結果、サルコシン可溶性蛋白を透析後、更に超遠心した上清の可溶性成分に CSD 患者と反応する特異性の高い蛋白が存在することが示唆された。

そこで本研究ではまずこのサルコシン可溶性成分、すなわちサルコシン可溶性蛋白抗原について、従来の *B. henselae* 菌体やサルコシン不溶性蛋白と比較した。IFA 法陽性例 5 例および陰性例 5 例のテストパネル血清を対象に、ELISA で抗 *B. henselae* IgG 抗体価を測定し、その抗原性を比較検討した。その結果、全菌体やサルコシン不溶性蛋白を抗原とした ELISA では IFA 法陽性例と陰性例との両者区別が不明瞭であったのに対し、サルコシン可溶性蛋白を抗原とした ELISA では両者区別が明瞭であった。これは前 2 者では健常人血清と反応する非特異物質を多く含有し、後者ではその含有は少なく、特異性の高い抗原蛋白を有し、抗 *B. henselae* IgG 抗体価測定の抗原として有用であることを示唆している。さらにテストパネル血清を用いたウェスタンブロット解析で、これら抗原の特異性を確認したところ、全菌体やサルコシン不溶性蛋白では IFA 法陰性血清に対し、多くの反応バンドが認められた。しかしサルコシン可溶性蛋白抗原では明らかな反応バンドを認めず、また IFA 法陽性血清に対し、11-15 kDa、32-35 kDa、45 kDa、67 kDa および 78 kDa と反応する種々な蛋白成分を含んでいることが判明した。これらの成績は先の ELISA の成績を支持するものであり、サルコシン可溶性蛋白抗原には健常人と反応する非特異成分は少なく、CSD 患者と反応する精製度の高い抗原成分が種々含まれていることを示唆している。

従来よりサルコシン処理した *B. henselae* 菌体を超遠心して得られたサルコシン不溶性蛋白は細胞外膜 (OMPs) とされ、ELISA の抗原として使用されている。しかし、Minnick<sup>20)</sup>は *B. henselae* 全菌体とそのサルコシン処理後の不溶性蛋白の SDS-PAGE 泳動パターンは同様であり、不溶性蛋白成分には菌の大多数の成分が含まれているため、この方法は *Bartonella* spp.からの OMPs 採取法として不適當であると述べている。われわれもサルコシン不溶性成分は全菌と同様な SDS-PAGE 泳動パターンであった。

一方、サルコシン可溶性蛋白には OMPs の成分が含まれているとの報告がある<sup>18)</sup>。本研究においても SDS-PAGE 泳動ではサルコシン可溶性蛋白は全菌体や不溶性蛋白に比べ、全く異なったパターンで、バンドの数は減少したものの、明瞭に 29~80 kDa に認められた。サルコシンは陰イオン界面活性剤であるが、一般的に界面活性剤はしばしば膜蛋白質の可溶化剤として使用され、膜蛋白成分は超遠心上清部分の可溶性部分に含まれるという実績がある<sup>21)</sup>。これは界面活性剤の種類、抽出条件、更に細胞の種類でも異なると推測されるが、これらの事実を考慮すれば、今回のサルコシン可溶性蛋白は OMPs の成分が含まれていると考えられる。いずれにせよ、ELISA による抗 *B. henselae* IgG 抗体価測定の抗原は全菌体やサルコシン不溶性蛋白でなくサルコシン可溶性蛋白が明らかに適しており、本抗原を使用することにより抗 *B. henselae* IgG 抗体価を、より特異的に測定できるものと期待される。このような ELISA の使用抗原として *B. henselae* のサルコシン可溶性蛋白に着眼した研究はこれが初めてである。

最近、イムノプロテオミク法、二次元電気泳動を含んだ技術で *B. henselae* の免疫蛋白質を同定することが盛んで<sup>22,23)</sup>、*B. henselae* 感染症の免疫的反応には多くの蛋白が関与していることが明らかになりつつある。今回のサルコシン可溶性蛋白抗原にはいかなる種類の特異性の高い蛋白が存在するかは不明であるが、今後このような新たな技術による本可溶性抗原の解析で、その内容が明らかとなれば、抗 *B. henselae* IgG 抗体価測

定の精度は一層向上するであろう。

サルコシン可溶性蛋白抗原を使用した新 ELISA を確立し、本法の臨床的有用性を検証するため、IFA 法での抗 *B. henselae* IgG 抗体価が明らかな CSD 疑い患者 118 例および健常人血清 88 例について検討した。ELISA 指数の陽性・陰性カットオフ値を 0.50 とした場合、IFA 法陽性 CSD 患者および健常人血清における本法の感度と特異度は IFA 法を基準とすると、それぞれ 95.7%および 97.7%だった。また CSD 疑い患者 118 例に対する本法の感度は 48.3%で IFA 法の 39.0%より優れていた。一方、CSD 疑い患者 118 例中、15 例に IFA 法と ELISA の不一致例が認められた。これら不一致例のウエスタンブロット解析では健常人では認められない 30~35 kDa に少数の共通バンドを含む明らかな数々のバンドが認められ、これら不一致例はいずれも CSD であることが確認された。不一致例 15 例のうち、2 例はいずれも IFA 法陽性 (256 倍) ・ELISA 陰性 (0.39 と 0.41) であり、カットオフ値付近の血清であった。しかしながら、残り 9 例は ELISA 陽性例で IFA 法判定保留 (64~128 倍) 6 例と IFA 法陰性例 (64 倍未満) 3 例であった。以上よりサルコシン可溶性蛋白を抗原とした新 ELISA は IFA 法以上の高感度であり、CSD の血清学的診断に有用と思われる。今後、更に本法の臨床的有用性を評価するには培養法や患者から直接 *B. henselae* 特異 DNA を検出する PCR 法で確定診断された多くの CSD 患者について検討する必要がある。

## 5. 結語

現在まで *B. henselae* 感染症の血清学的診断法のうち、IFA 法以上の優れた感度をもつ抗 *B. henselae* IgG 抗体価測定用 ELISA はない。本研究でのサルコシン可溶性蛋白を抗原とする新たな ELISA は、IFA 法と比較して、感度・特異性が優れ、また抗原の準備も比較的簡単で安価である。今後、このサルコシン可溶性蛋白抗原が解析されれば、ELISA の精度は一層向上し、*B. henselae* 感染症の血清学的診断に大きく貢献するであろう。

## 参考文献

- 1) Anderson BE, Neuman MA. *Bartonella* spp. as emerging human pathogens. Clin Microbiol Rev 1997; 10: 203-209.
- 2) Maurin M, Birtles R, Raoult D. Current knowledge of *Bartonella* species. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1997; 16: 487-506.
- 3) Murakami K, Tsukahara M, Tsuneoka H, Iino M, Ishida C, Tsujino K, et al. Cat scratch disease: analysis of 130 seropositive cases. J Infect Chemother. 2002; 8: 349-352.
- 4) Regnery RL, Olson JG, Perkins BA, Bibb W. Serological response to "*Rochalimaea henselae*" antigen in suspected cat-scratch disease. Lancet. 1992; 339: 1443-1445.
- 5) Nadal D, Zbinden R. Serology to *Bartonella (Rochalimaea) henselae* may replace traditional diagnostic criteria for cat-scratch disease. Eur J Pediatr. 1995; 154: 906-908.
- 6) Sander A, Posselt M, Oberle K, Bredt W. Seroprevalence of antibodies to *Bartonella henselae* in patients with cat scratch disease and in healthy controls: evaluation and comparison of two commercial serological tests. Clin Diagn Lab Immunol. 1998; 5: 486-490.
- 7) Tsuneoka H, Fujii R, Yamamoto K, Fujisawa K, Iino H, Matsuda M, et al. Determination of anti-*Bartonella henselae* antibody by indirect fluorescence antibody-test comparison of two types of



- antigen: non-cocultivated *B. henselae* and cocultivated *B. henselae* with Vero cells. *Kansenshogaku Zasshi*. 1998; 72: 801-807.
- 8) Giladi M, Keltter Y, Avidor B, Metzkor Cotter E, Varo M, Golan Y, et al. Enzyme immunoassay for the diagnosis of cat-scratch disease defined by polymerase chain reaction. *Clin Infect Dis*. 2001; 33: 1852-1858.
  - 9) Not T, Canciani M, Buratti E, Molin GD, Tommasini A, Trevisiol C, et al. Serologic response to *Bartonella henselae* in patients with cat scratch disease and in sick and healthy children. *Acta Paediatr*. 1999; 88: 284-289.
  - 10) Vermeulen MJ, Herremans M, Verbakel H, Bergmans AMC, Roord JJ, vanDijken P, et al. Serological testing for *Bartonella henselae* in the Netherlands: clinical evaluation of immunofluorescence assay and ELISA. *Clin Microbial Infect*. 2007; 13: 627-634.
  - 11) Welch DF, Hensel DM, Pickett DA, San Joaquin VH, Robinson A, Slater LN. Bacteremia due to *Rochalimae henselae* in a child: practical identification of isolates in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol*. 1993; 31: 2381-2386.
  - 12) Bergmans AM, Peeters MF, Schellekens JF, Vos MC, Sabbe LJM, Ossewaarde JM, et al. Pitfalls and fallacies of cat scratch disease serology: evaluation of *Bartonella henselae* - based indirect fluorescence assay and enzyme-linked immunoassay. *J Clin Microbiol*. 1997; 35: 1931-1937.
  - 13) Szcl-Kelly CM, Goral S, Perez-Perez GI, Perkins BA, Rebner RL, Edwards KM. Serological responses to *Bartonella* and *Afipia* antigens in patients with cat scratch disease. *Pediatrics*. 1995; 96: 1137-1142.
  - 14) Loa CC, Mordechai E, Tilton RD, Adelson ME. Production of recombinant *Bartonella henselae* 17-kDa protein for antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2005; 55: 1-7.
  - 15) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227: 680-685.
  - 16) Tsuneoka H, Tsukahara M. Analysis of data in 30 patients with cat scratch disease without lymphadenopathy. *J Infect Chemother*. 2006; 12: 224-226.
  - 17) Herremans M, Vermeulen MJ, Van de Kasstele J, Bakker J, Schellekens JF, Koopmans MP. The use of *Bartonella henselae*-specific age dependent IgG and IgM in diagnostic models to discriminate disease from non-diseased in Cat Scratch Disease serology. *J Microbiol Methods* 2007; 71: 107-113.
  - 18) Burgess AW, Anderson BE. Outer membrane proteins of *Bartonella henselae* and their interaction with human endothelial cells. *Microb Pathog* 1998; 25: 157-164.
  - 19) Rhomberg TA, Karlberg O, Mini T, Zimny Arndt U, Wiekenberg U, Rottgen M, Jungblut PR, Jenö P, Andersson SE, Dehio C. Proteomic analysis of the sarcosine-insoluble outer membrane fraction of the bacterial pathogen *Bartonella henselae*. *Proteomics* 2004; 4: 3021-3033.
  - 20) Minnick MF. Identification of outer membrane proteins of *Bartonella bacilliformis*. *Infect Immun* 1994; 62: 2644-2648.
  - 21) Gohon Y, Popot J-L. Membrane protein-surfactant complexes. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 2003; 8:

15–22.

- 22) Eberhardt C, Engelmann S, Kusch H, Albrecht D, Hecker M, Autenrieth IB, Kempf VA. Proteomic analysis of the bacterial pathogen *Bartonella henselae* and identification of immunogenic proteins for serodiagnosis. *Proteomics* 2009; 9: 1967-1981.
- 23) McCool TL, Hoey JG, Montileone F, Goldenberg HB, Mordechai E, Adelson ME. Discovery and analysis of *Bartonella henselae* antigens for use in clinical serologic assays. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 60: 17–23.