

レプトスピラ症の早期診断： 尿中抗原を標的にする診断法の開発

琉球大学 大学院医学研究科 細菌学講座
准教授 トーマ クラウディア

令和2年12月8日

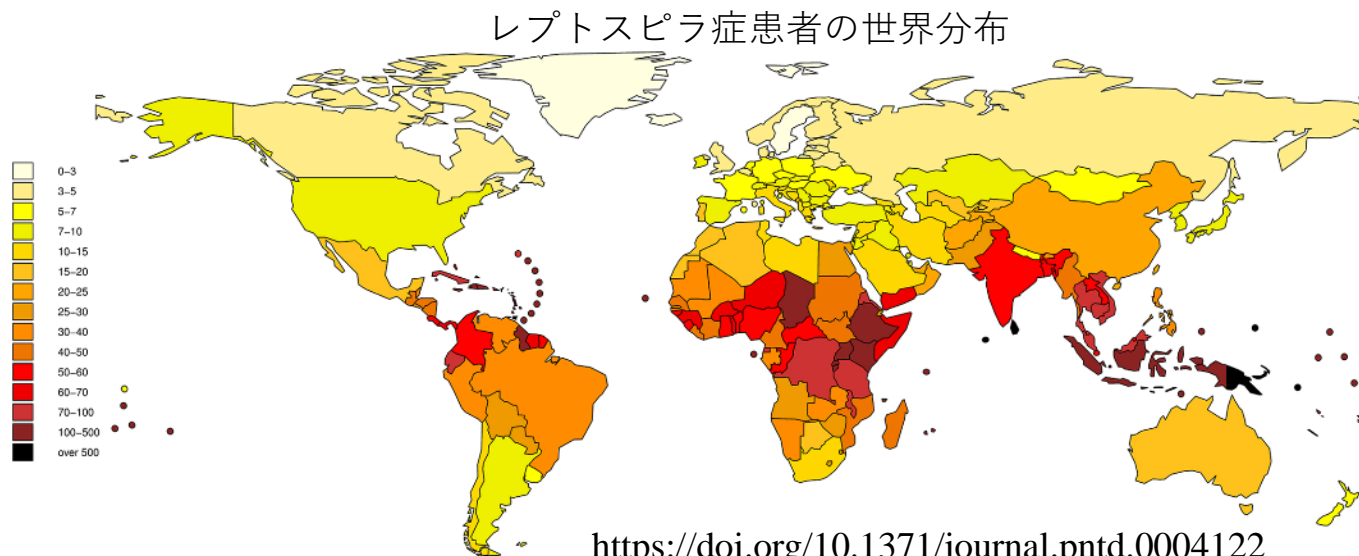
- 熱帯地方を中心に広く分布する人獣共通感染症
- 症状： 発熱、頭痛、筋痛、結膜充血等
軽症型から黄疸、出血、腎障害を伴う重症型

問題点

レプトスピラ症の抗菌薬による早期治療は効果的であるが、早期診断が難しい

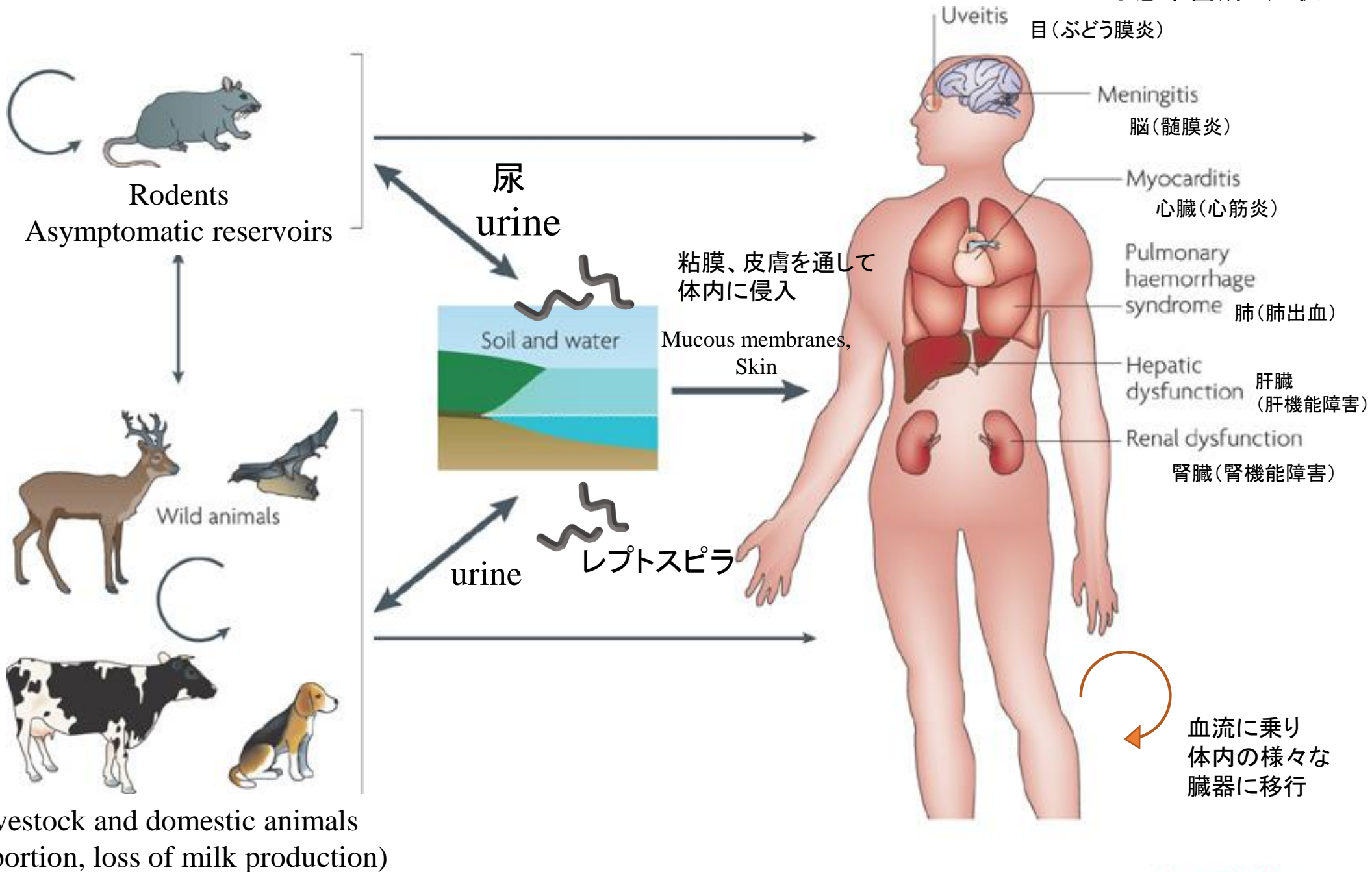
レプトスピラ症の患者発生は
世界では年間：約100万人

致命率： 6%~10%



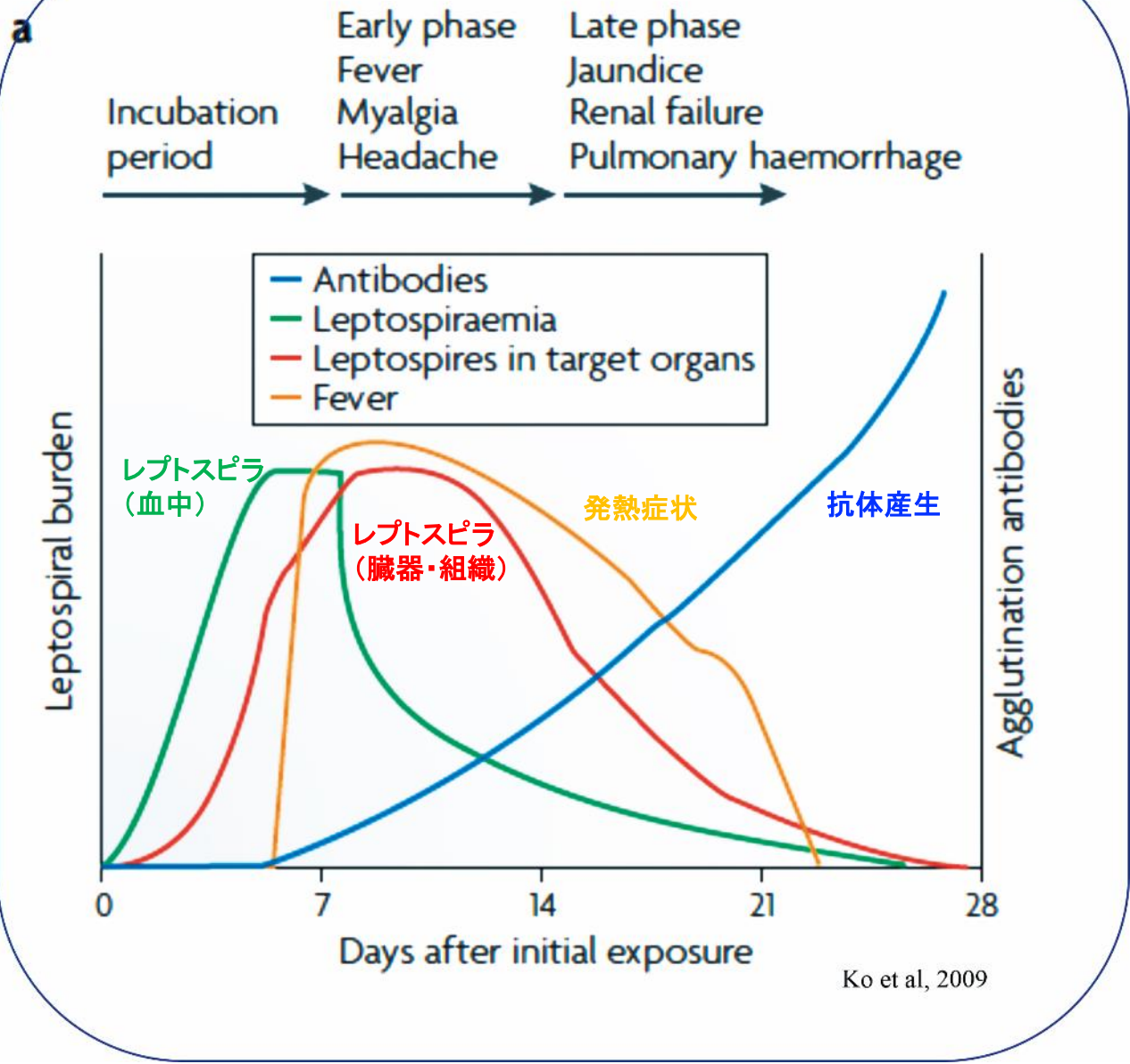
レプトスピラの感染様式

主な感染箇所と症状



Livestock and domestic animals
(abortion, loss of milk production)

レプトスピラ症の経過



- 潜伏期間: 5~14日
- 発熱(1~2週間):
血液にレプトスピラが存在
- レプトスピラに対する抗体:
10日前後で出現する
- 抗体が出現し、レプトスピラ
が排除されても、腎臓の尿細管
に定着したレプトスピラは排除
されない

現行の診断法の問題点

- 血清診断法（抗体陽転に時間を要する、200以上の血清型に分類される）
- 病原体の分離（菌の培養に時間を要する）
- DNAの検出（PCR、LAMP法等：特別な機器や技術が必要）

理想な簡易迅速診断キット：ベッドサイドで診断可

- 感染初期に尿から菌の抗原を検出できるもの
- 感度、特異度ともに高いもの

感染初期に尿から排出されるレプトスピラの抗原: 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (3-HADH)

Segawa et al. *BMC Microbiology* 2014, 14:132
http://www.biomedcentral.com/1471-2180/14/132



RESEARCH ARTICLE

Open Access

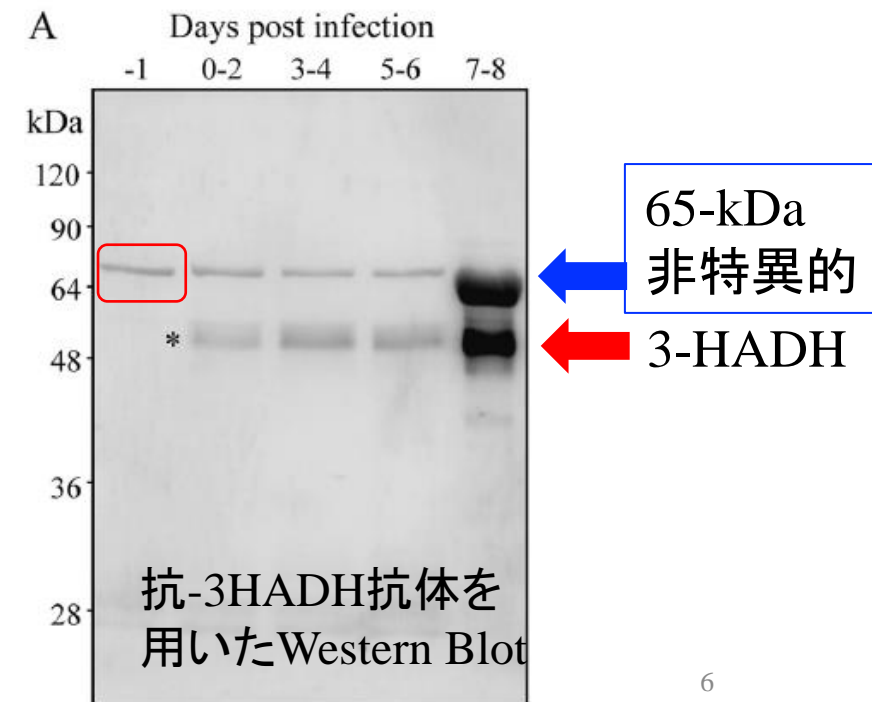
Identification of leptospiral 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase released in the urine of infected hamsters

Takaya Segawa^{1*}, Kazuko H Nomura², Sharon Yvette Angelina M Villanueva¹, Mitsumasa Saito¹, Kazuya Nomura², Nina G Gloriani³ and Shin-ichi Yoshida¹

尿中抗原 : 3-HADH: 48 kDa

問題点

感染していないハムスターの尿でも抗-3-HADH抗体と反応する65kDaのタンパク質が存在する

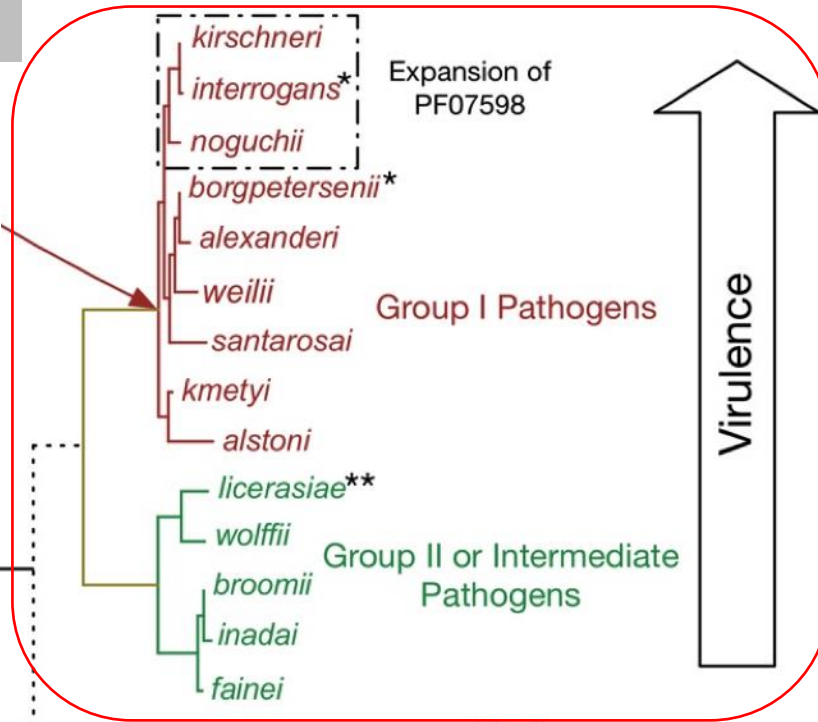


抗-3-HADH抗体作製：ペプチド抗体

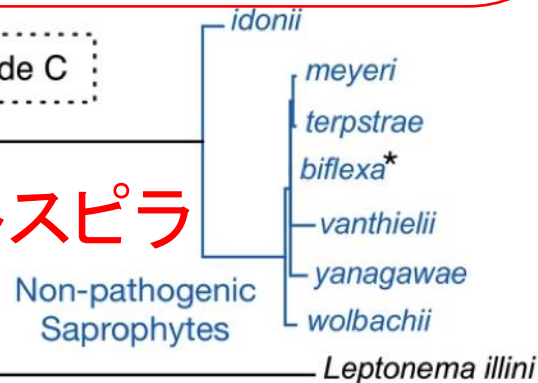
病原性レプトスピラ と非病原性レプトスピラの3-HADHのアミノ酸配列を比較し、非病原性とのクロスを避けるようにペプチドを選択した。

Leptospira 属

病原性
レプトスピラ



非病原性レプトスピラ

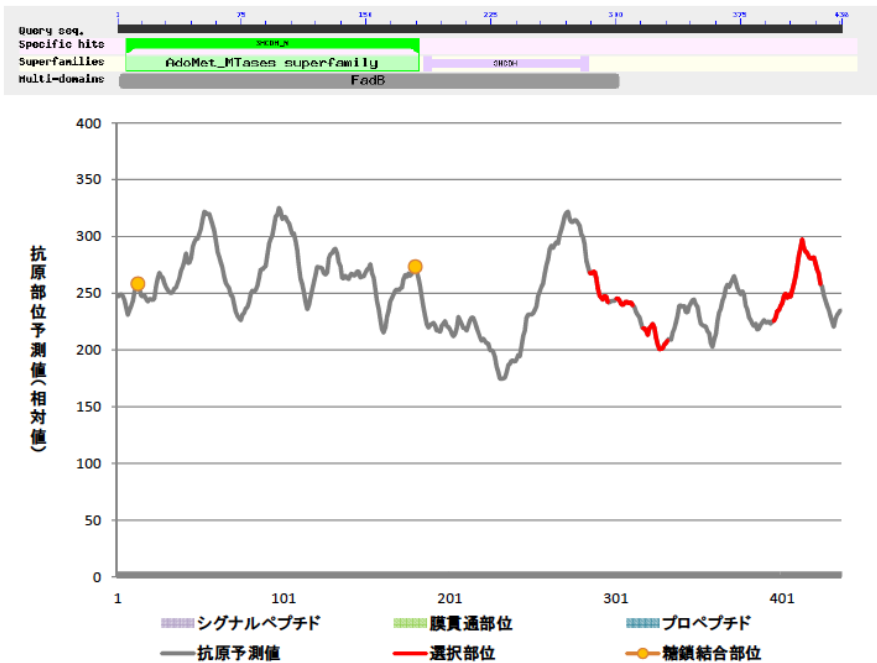


目的

全ての病原性レプトスピラ
に反応する抗体

特異性が高い抗体

抗原 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase
生物種 *Leptospira interrogans*
残基数 436



```

Leptospira_interrogans 1 MREIKTVTLLGANGMGRGSAIIVASFGAKVHMLAPDTRKARGIEAIGSVKRTDIRP 60
Leptospira_biflexa 1 MREIKTVTLLGANGMGRGSAIVIASFGAKVHMLAPDTRKARGIEANVASVKTDIRA 60

Leptospira_interrogans 61 REIPGSYDADLEKAVESDQWVVELVAESYEVREPINRIASSRRPGTIVSTVSSGLSIE 120
Leptospira_biflexa 61 REIPGSYDADLEKAVESDQWVVELVAESYEVREPINRIASRRPGTIVSTVSSGLSIE 120

Leptospira_interrogans 121 LKRAEDDGGQRHYGTHFFNPPYKMLCELVHSRGGDKKVLKQLGEYLEKVLGRAVVYTN 180
Leptospira_biflexa 121 LKRAEDDGGQRHYGTHFFNPPYKMLCELVHSRGGDKKVTQQLGEYLEKVLGRAVVYTN 180

Leptospira_interrogans 181 DTPAFAGNRIGFQINNEVAQAEKYS DKGGIALMDEIMSGYTGRAMPLDTADFVGLDVH 240
Leptospira_biflexa 181 DTPAFAGNRIGFQINNEVAQAEKYS DKGGIALMDEIMSGYTGRAMPLDTADFVGLDVH 240

Leptospira_interrogans 241 KAIVDNRYEYTKDRAHSTFKRFDYFOKLIDGGLGRTGGGLIYKSHADGKREKRYNI 300
Leptospira_biflexa 241 KAIVDNRYEYTKDRAHSTFKRFDYFOKLIDGGLGRTGGGLIYKSHADGKREKRYNI 300

Leptospira_interrogans 301 GADLYEPVPKFIIFRQANKRRISEADYTGAMNIVRBAAGFEADLARYFIRYVSYSLSE 360
Leptospira_biflexa 301 KTGEYEPVPKFIIFRQANKRRISEADYTGAMNIVRBAAGFEADLARYFIRYVSYSLSE 360

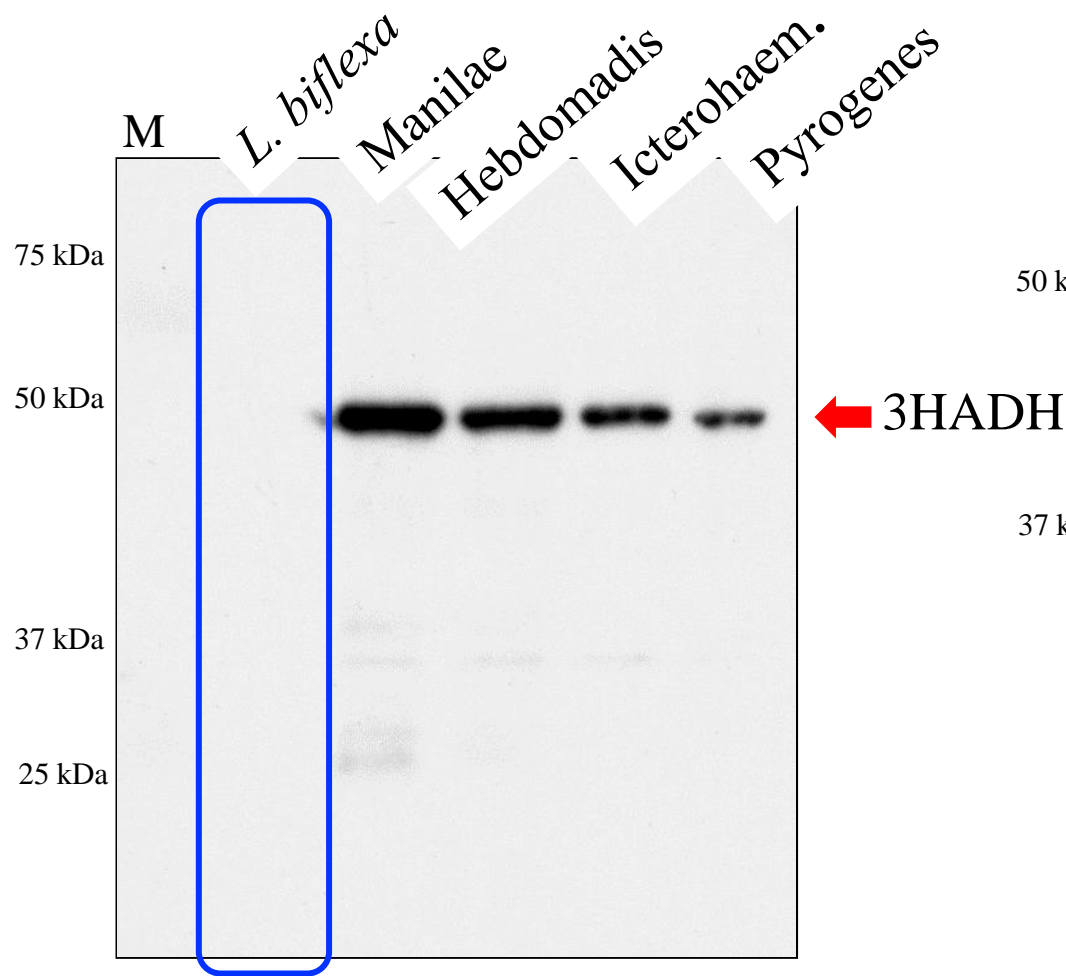
Leptospira_interrogans 361 VGEVVDTKENTDSAMGGFNWRPASAFVDFLGGPFDIQLIEKAKLPVPEVLAK 420
Leptospira_biflexa 361 VGEVVDTKENTDSAMGGFNWRPASAFVDFLGGPFDIQLIEKAKLPVPEVLAK 420

Leptospira_interrogans 421 FYELERLDARSLFKG 436
Leptospira_biflexa 421 FYELERLDARSLFKG 436
    
```

※ 赤枠内が抗原候補配列となります。

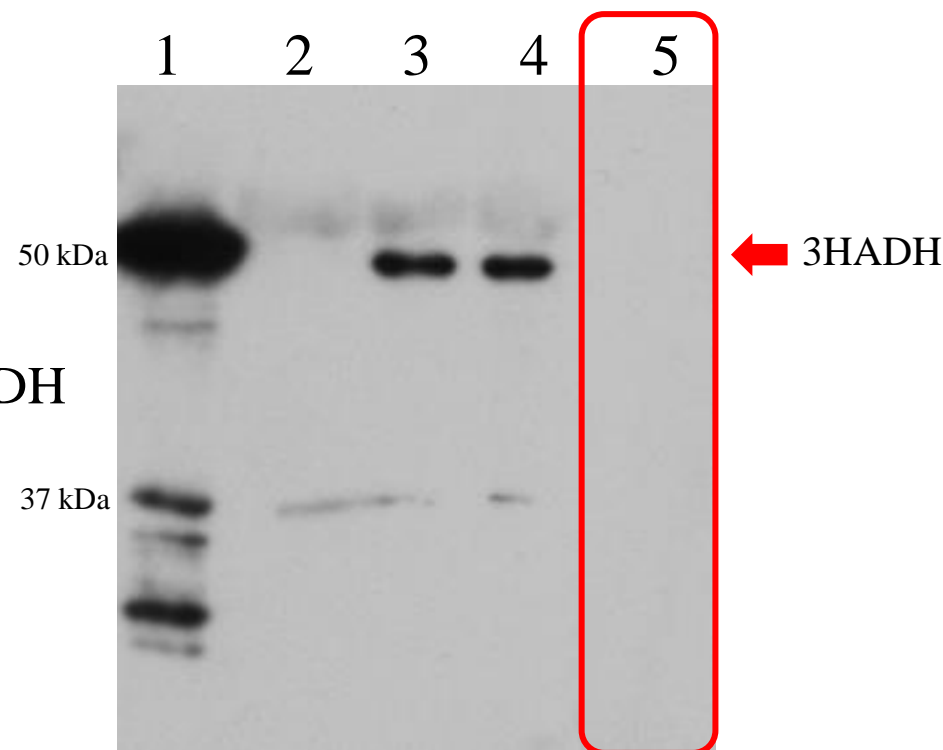
Peptide No.	Sequence	Aminoacid position
1	MSKTPDGKKEKL	285 - 296
2	GADLYEPVPKF	301 - 311
3	RQANKRISEADYTGAM	317 - 332
4	DAIQLIEKAKLPVPEVLAK	396 - 414
5	EVLAKAKPGKPFYEL	410 - 424

抗-HADH⁴¹⁰⁻⁴²⁴抗血清は 病原性レプトスピラに特異的である



非病原性
レプトスピラ

L. interrogans
(病原性レプトスピラ)



1. *E. coli* DE3 (pET28a:HADH)
2. *Leptospira biflexa*
3. *L. interrogans* ser Manilae
4. *L. interrogans* ser Hebdomadis
5. Normal urine

病院



国立感染症研究所
細菌第一部



衛生環境研究所
衛生生物班

DNA検出(PCR)、菌の培養、
抗体検出(MAT)

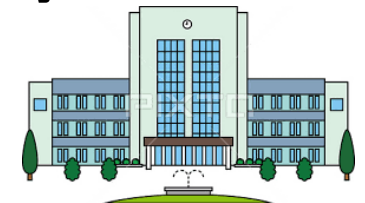
レプトスピラ症と疑われたら：

- 沖縄県衛生環境研究所
 - 国立感染症研究所
- に検査を依頼



尿検体
検査結果等

レプトスピラの3-HADH
の検出 (Western Blot)



琉球大学

健常者の尿を陰性コントロールとする
(沖縄県健康づくり財団)

レプトスピラ症の疑い例
n:70

確定の症例
MAT 陽性
and/or
PCR陽性
n:40 症例

MAT/PCR検査
陰性
n: 30 症例

レプトスピラ患者の尿のWestern Blot

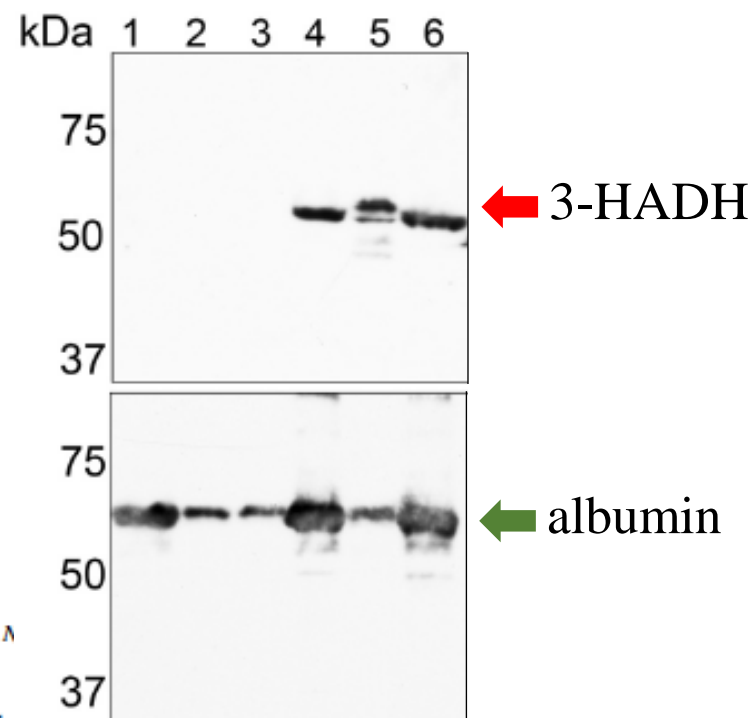
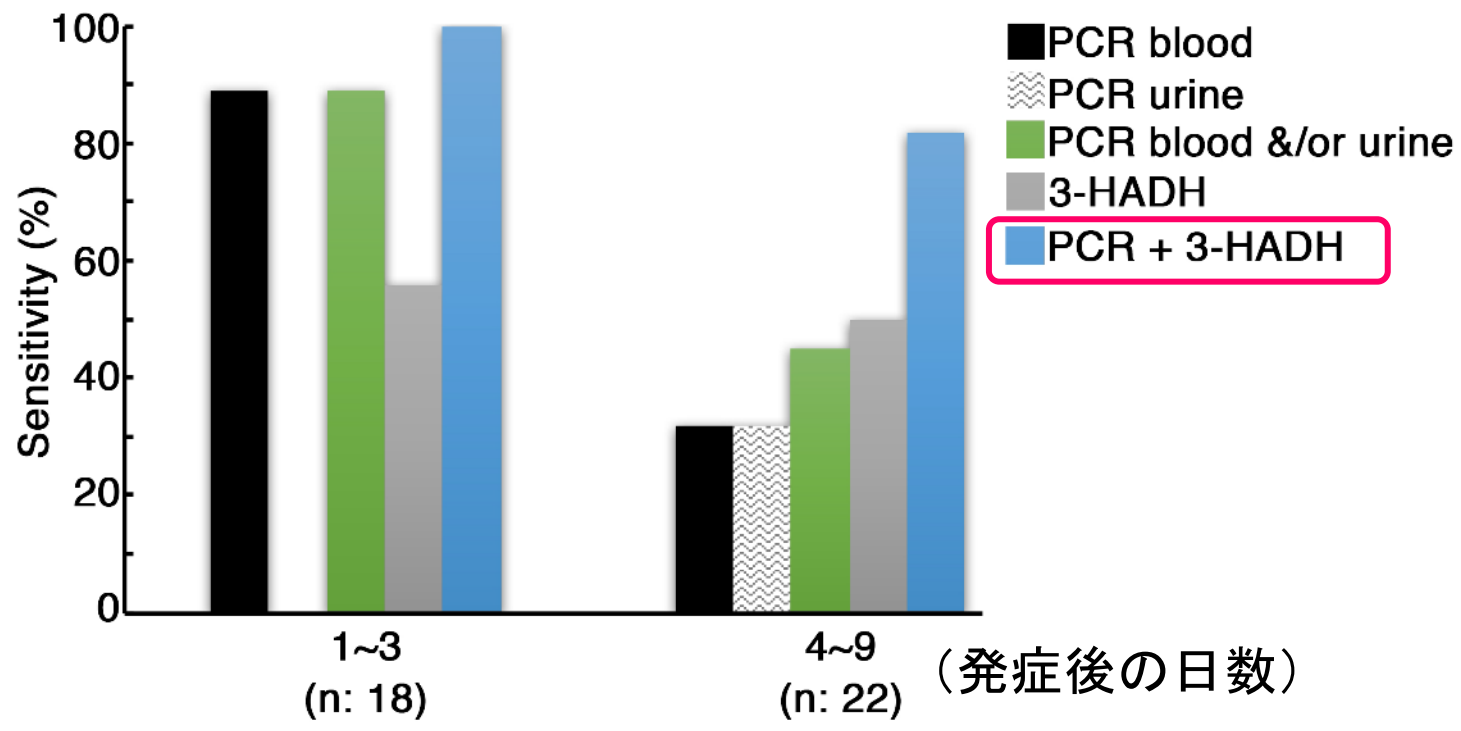


Table 3. Results of MAT, PCR and detection of 3-HADH in urine samples from laboratory-confirmed leptospirosis patients.

Patient No.	Urine collection ^a	PCR (Blood)	PCR (Urine)	MAT Serogroups	3-HADH (1x)	3-HADH (8x)
1	1	+	-	Hebdomadis	-	-
2	1	+	-	Hebdomadis	-	-
3	2	+	-	Hebdomadis	+	+
4	2	+	-	Hebdomadis	-	-
5	2	+	-	Pyrogenes	-	+
6	2	+	-	Hebdomadis	-	-
7	2	+	-	Hebdomadis	+	+
8	2	+	-	Hebdomadis	-	+

3-HADHは菌のDNAより早期に尿で検出可能

レプトスピラ症の臨床研究: まとめ



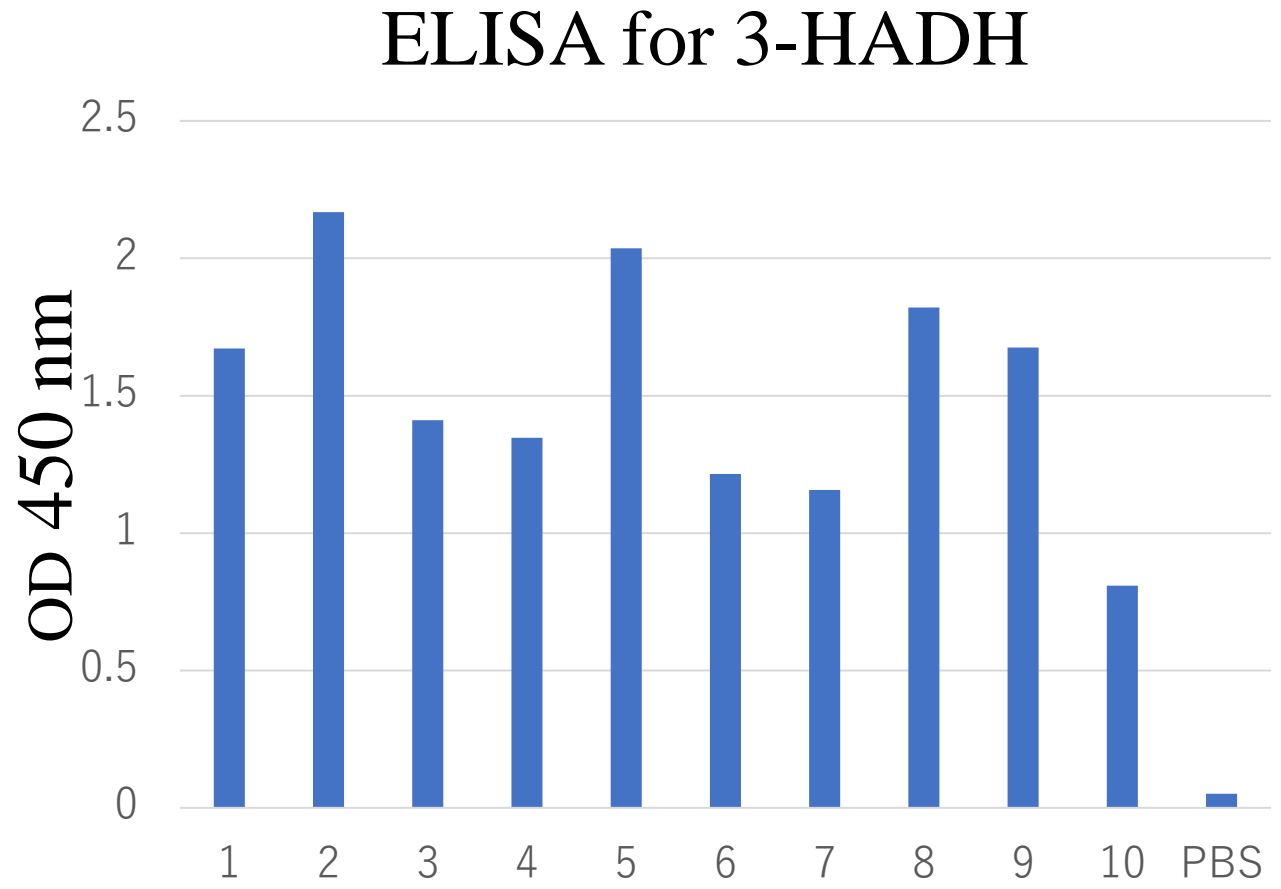
方法	検出感度
3-HADH	52.5 %
blood PCR	57.5 %
urine PCR	12 %

発症後の日数	方法	検出感度
1~3日	PCR blood &/or urine	89 %
1~3日	PCR + 3-HADH	100 %
4~9日	PCR blood &/or urine	43 %
4~9日	PCR + 3-HADH	82 %






Toma et al, 2018

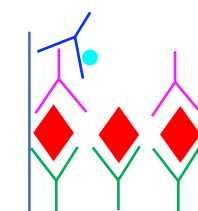
抗-3HADH モノクローナル抗体の作製

Clone No.	Clone Name	Subclass
1	3H12	IgG _{2b}
2	5A9	IgG _{2a}
3	16D10	IgG ₁
4	17C7	IgG _{2a}
5	17C8	IgG _{2b}
6	19A6	IgG ₁
7	21C10	IgG ₁
8	23A2	IgG _{2b}
9	25F11	IgG _{2b}
10	30G1	IgG _{2a}

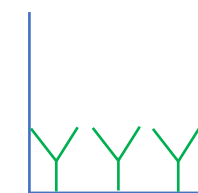


Sandwich-ELISAの検討

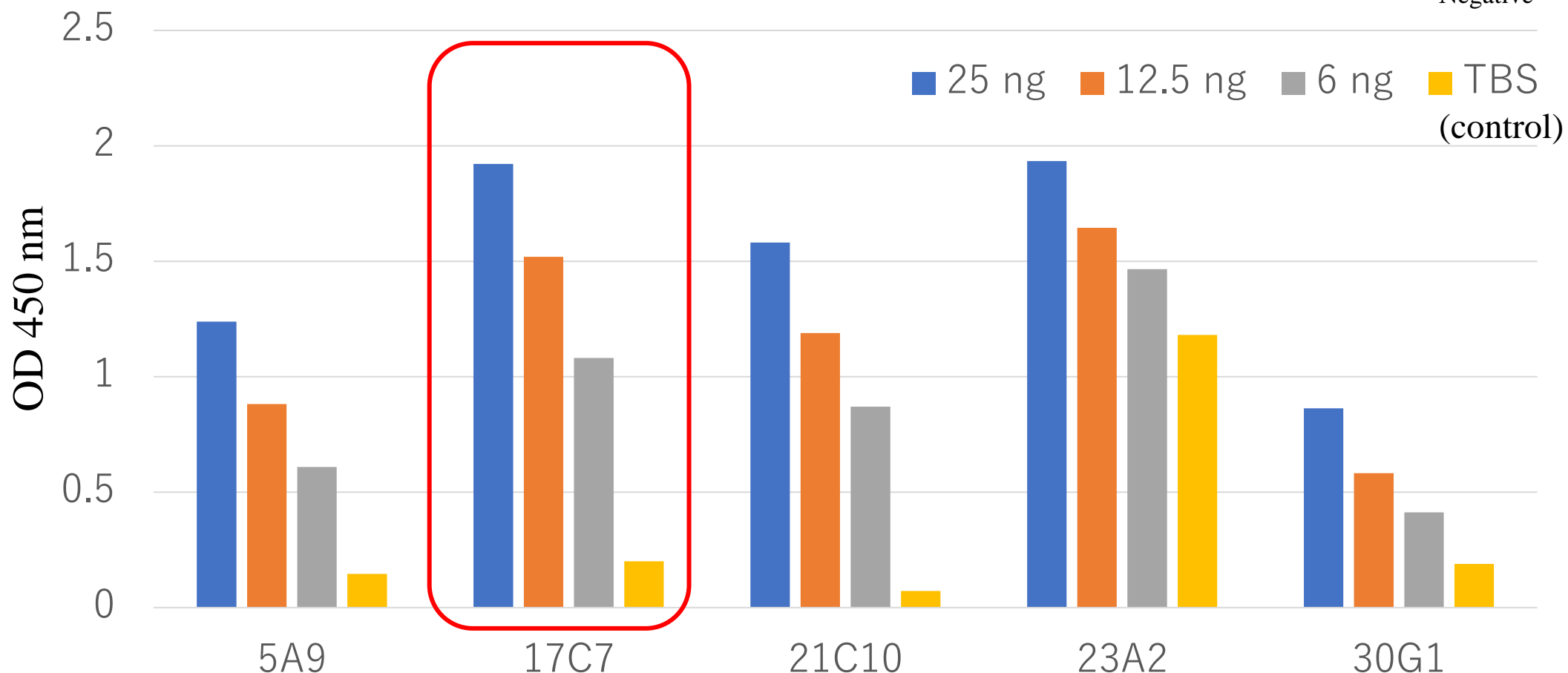
	Coating antibody:	anti-3HADH ⁴¹⁰⁻⁴²⁴ Rabbit (polyclonal)
	First Antibody:	Purified MAbs (20 mg/ml)
	Second Antibody:	Donkey anti-mouse PO-labeled
	Detection Reagent:	ELISA POD substrate
	Recombinant 3-HADH	



Positive



Negative

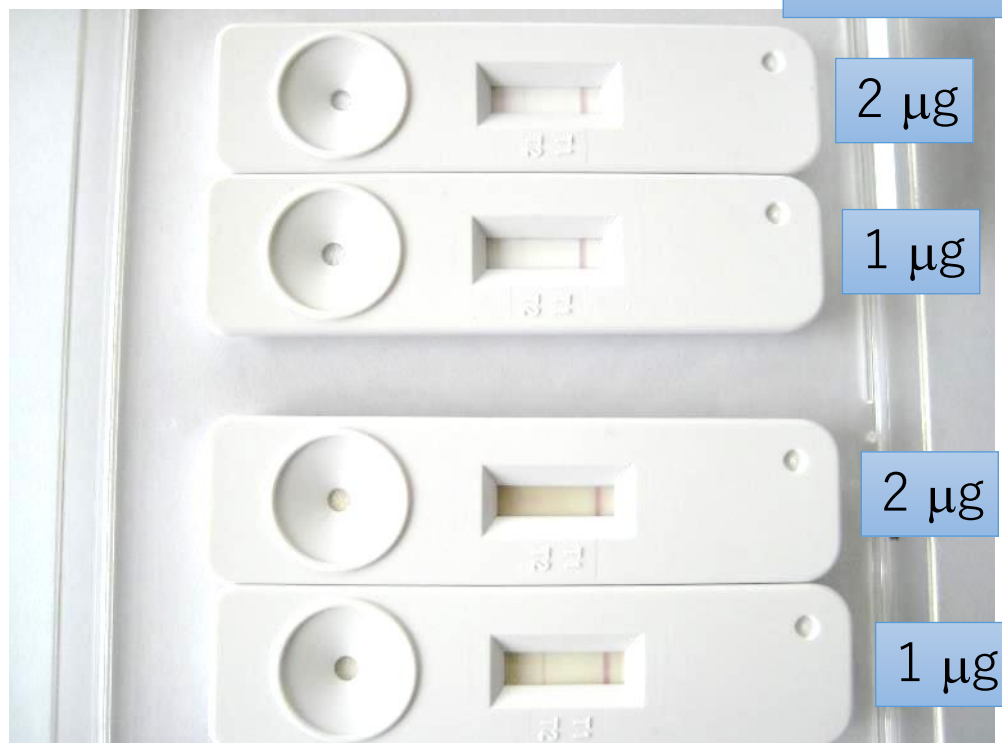


レプトスピラの診断キット (イムノストリップの試作品)

- | | |
|---|-----------|
| 1. 抗-3-HADH ウサギ抗体(anti-3HADH ⁴¹⁰⁻⁴²⁴) : | 金コロイド標識抗体 |
| 2. 抗-3-HADH モノクローナル抗体 17C7: | 固相化抗体 |

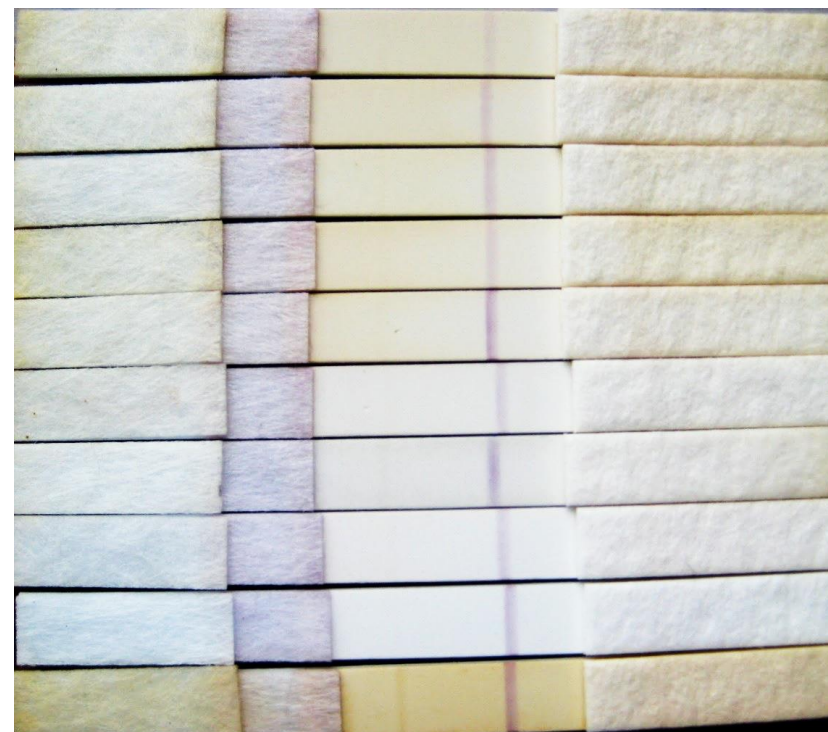
組換え3-HADHでテスト

3-HADH量



test line ↓
control line ↓

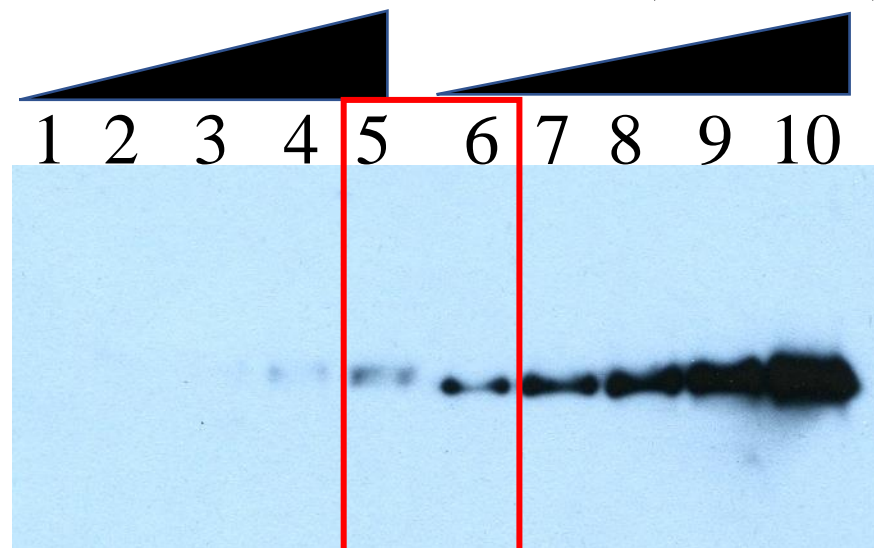
レプトスピラ患者の尿でテスト



- 健常者の尿: 100 % 陰性
- レプトスピラ患者の尿: 1/10検体のみ陽性

レプトスピラ患者の3-HADH抗原の量？

レプトスピラ患者の尿3-HADH(精製抗原)



3-HADHのWestern Blot

3-HADH (μg/ml)
 6) 0.25
 7) 0.5
 8) 1
 9) 2
 10) 5

レプトスピラ患者の尿の3-HADH濃度は0.25 μg/ml以下

イムノストリップの安定性？

月 \ μg/ml	0.078	0.156	0.312	0.625	1.25	2.5	5	10	25	50	100
2017年12月	-	-	+	+	+	+	+	+	nd	nd	nd
2018年1月	nd	nd	nd	nd	nd	-	-	+	+	+w	+w

nd: not done
w: weak

- 病原性レプトスピラと反応し、非病原性レプトスピラと反応しない
- 多くの血清型と反応する
- 3-HADH抗原は尿に排出されるため、検体採取が簡便

実用化に向けた課題

- イムノストリップの感度と安定性を改善する
- 3-HADHの有用性を検証するための大規模臨床研究が必要
（現在スリランカで進行中）

想定される用途

- 抗-3HADH抗体を用いた診断キットの開発
- レプトスピラ症の簡便、迅速、早期診断
- 早期診断・早期治療で重症化を防ぐことが可能になる

企業への期待

- バイオマーカー診断を開発する企業へのライセンス
- 微量バイオマーカーを検出する技術を持つ企業との共同研究を希望

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称：

レプトスピラ症の診断に用いるレプトスピラ抗原
検出用抗体

- 出願番号 ： 特願2017-226148
 (特開2018-127442)
- 出願人 ： 国立大学法人 琉球大学
- 発明者 ： トーマ クラウディア

お問い合わせ先

琉球大学 総合企画戦略部
研究推進課 産学連携推進係

T E L 098 - 895 - 8031

F A X 098 - 895 - 8185

e-mail: sangaku@acs.u-ryukyu.ac.jp

担当コーディネーター：

琉球大学 研究推進機構 研究企画室

主席URA 殿岡 裕樹

TEL: 098-895-8703 E-mail: tonooka@lab.u-ryukyu.ac.jp