



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	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. [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	塩川, 愛絵
Description	配架番号 : 2180
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11933号
Issue Date	2015-06-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59669
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Kanae_Shiohawa_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 塩川 愛絵

主査 教 授 瀬谷 司
審査担当者 副査 教 授 大滝 純司
副査 教 授 村上 正晃
副査 准教授 森松 組子

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)

本研究では、病原性レプトスピラに特異的な菌体外膜抗原 LipL32 の組換え LipL32 抗原を用いた、レプトスピラ症の媒介動物として重要なげっ歯類のレプトスピラ感染血清診断法の開発を行った。また、より安定した感度特異度の高い組換え抗原を作成するため、診断用主要抗原領域および、組換え抗原発現宿主の選定を行い、酵母発現の主要抗原領域を含む短縮組換え抗原がげっ歯類のレプトスピラ感染血清診断には優れていることが示された。

審査にあたり、大滝純司教授から、組換え LipL32 抗原をヒトのレプトスピラ症へ応用する際にはどのようなことを考えているか、と質問があり、申請者は、早期治療の開始が重要であるため、サンドイッチ ELISA 法を用いた高感度の IgM 検出系 ELISA への応用を考えている、と回答した。大滝純司教授から、無症状のヒトレプトスピラ症例の場合、どのように診断するのか、と質問があり、申請者は、患者血清を用いて抗レプトスピラ IgM の検出を試みることで、血液、髄液から菌体分離を試みる方法がある、と回答した。大滝純司教授から、げっ歯類のレプトスピラ感染調査に今まで組換え LipL32 が使われてこなかった理由は何と考えるか、と質問があり、申請者は、他の研究でも診断基準への問題点が見られるなど、発表されていないネガティブデータの存在が考えられる、と回答した。村上正晃教授から、家畜やヒトへのレプトスピラ症診断用に研究されている組換え LipL32 抗原も短縮抗原を使っているのか、と質問があり、申請者は、既報の短縮抗原に関する論文例を挙げ、短縮抗原として切り出した部位が研究チームにより異なる、と回答した。村上正晃教授から、本研究で使用した単クローン抗体について、診断用 ELISA には応用していないのか、と質問があり、申請者は、本研究では発現抗原が LipL32 であることの確認

および陽性コントロール、また主要抗原領域の解析にのみ使用し、診断用 ELISA の構成要素には含まれていない、と回答した。村上正晃教授から、野生ラットの PCR、イムノブロット、ELISA による陰性または陽性の判定結果が異なるのは何故か、と質問があり、申請者は、レプトスピラは免疫反応を回避して、げっ歯類に持続感染することが知られており、PCR で保菌していることが証明されても抗体価が上がっていない場合があること、また、イムノブロットが ELISA より高感度またはバックグラウンドが低いことが考えられる、と回答した。村上正晃教授から、酵母組換え抗原と大腸菌による事前処理血清を用いた際に、事前処理による影響はあるのか、と質問があり、申請者は、処理を行う際に血清の希釈がおこり、やや全体的な吸光度の低下は観察されるものの、被験血清の吸光度分布傾きが変化しなかったため、診断への影響はない、と回答した。村上正晃教授から、本研究にて開発した野生げっ歯類のレプトスピラ感染血清診断法には、特異度に問題があるのではないかと、この研究計画での改善点の指摘があった。瀬谷司教授から、動物種によりエпитープが異なる可能性があるのではないかと、本研究で作成した短縮 LipL32 抗原は全ての動物の診断法に応用できるのかと質問があり、申請者は、現時点で得られる情報の限りではウサギの過剰免疫血清、マウスで作成したモノクローナル抗体を用いて行ったエпитープマッピングのみであり、ヒトなどにおける情報は無い旨を回答し、ゆえに本研究で作成した短縮 LipL32 抗原が全ての動物の診断法に応用できるエビデンスがない、と回答した。瀬谷司教授から、競合 ELISA 試験において、単クローンによる実験感染ラット血清中抗体の組換え LipL32 抗原への結合阻害度はラットの個体差があったのではないかと、質問があり、申請者は、病原体接種後、同日に採血したラットの個体間で個体差は見られなかった、と回答した。森松組子准教授から、大腸菌発現抗原が酵母発現抗原と比べて抗原性が低い理由として何が考えられるか、と質問があり、申請者は大腸菌抗原には精製後も大腸菌由来成分が混入しており、純粋な組換え抗原濃度が相対的に低くなっている可能性が考えられる、と回答した。森松組子准教授から、レプトスピラ症とげっ歯類の関係性は、と質問があり、申請者は、げっ歯類は病原性レプトスピラの媒介動物として知られており、ラットは感染後、生涯にわたって尿中への排菌が観察されていること、またげっ歯類は家畜や愛玩動物、ヒトと生活環境が非常に近いため、レプトスピラ感染症対策として重要な動物である、と回答した。

本研究は病原性レプトスピラ特異的な共通抗原に着目した点で新規性を有し、今回、野生げっ歯類の血清学的診断については診断基準の設定に関して課題が残ったが、今後のレプトスピラ症感染制御の研究について重要な意義を持つと考えられる。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。