

# 厚生科学研究費補助金事業実績報告書

平成10年度厚生科学研究費補助金（新興再興感染症）  
研究事業の報告書

リケッチアによる新興・再興感染症の疫学、  
診断および予防に関する研究

H10-新興-7

主任研究者

平井克哉

平成11年3月29日

厚生大臣 宮下創平 殿

住所 岐阜県岐阜市柳戸1番1  
 フリガナ ヒライカツヤ  
 研究者氏名 平井克哉  
 生年月日 1939年12月11日 日生

平成10年度厚生科学研究費補助金 ( 新興・再興感染症 研究事業) の事業実績報告書について

平成10年6月10日厚生省発健医第250号をもって交付の決定 (又は変更承認) を受けた標記の事業を完了したので、関係書類を添えて報告する。

1. 国庫補助金精算所要額 : 金 20,000,000 円也
2. 研究課題名 (課題番号) : リケッチアによる新興・再興感染症の疫学、診断および予防に関する研究 (H10-新興-7)
3. 研究実施期間 : 平成10年4月1日から平成12年3月31日まで  
( 3 ) 年計画の ( 1 ) 年目
4. 研究者及び経理事務担当者

研究者	①所属施設 (部局)	岐阜大学農学部	②所属施設所在地	〒 501-1193 岐阜市柳戸1番1
	③連絡先 TEL・FAX E-mail	TEL 058-293-2945 FAX 058-293-2945 E-mail: khirai@cc.gifu-u.ac.jp	④所属施設における職名	教授
	⑤最終卒業学校・卒業年次及び学位	北海道大学大学院・ 昭和40年修了・ 獣医学博士	⑥専攻科目	家畜微生物学
経理事務担当者	(フリガナ) ⑦氏名	キハラ ヒロシ 北裏 博	⑧連絡先 所属施設・TEL FAX・E-mail	〒 501-1193 岐阜市柳戸1番1 岐阜大学農学部会計係 058-293-2835

5. 分担した研究事業の概要

①研究者名	②分担した研究項目	③研究実施場所 (施設)	④研究実施期間	⑤配分を受けた研究費の額 (円)
平井克哉	Q熱ワクチンの開発 (総括)	岐阜大学農学部・家畜微生物学教室	平成10年4月1日～ 平成11年3月31日	3,500,000
小田 紘	Q熱簡易診断法の開発	鹿児島大学医学部・細菌学教室	平成10年4月1日～ 平成11年3月31日	2,500,000
森田千春	日本紅斑熱の疫学的研究	酪農学園大学獣医学部・獣医公衆衛生学教室	平成10年4月1日～ 平成11年3月31日	2,000,000
福士秀人	リケッチア症の分子診断法	岐阜大学農学部・家畜微生物学教室	平成10年4月1日～ 平成11年3月31日	3,500,000
山本静雄	イヌのエールリキア症の疫学的研究	麻布大学環境保健学部・免疫学教室	平成10年4月1日～ 平成11年3月31日	2,500,000
川原 真	ヒトのエールリキア症の疫学的研究	名古屋市衛生研究所・微生物部	平成10年4月1日～ 平成11年3月31日	2,500,000
上野弘志	猫ひっかき病の疫学的研究	酪農学園大学獣医学部・獣医公衆衛生学教室	平成10年4月1日～ 平成11年3月31日	1,000,000
丸山総一	猫ひっかき病の疫学・診断	日本大学生物資源科学部・獣医公衆衛生学教室	平成10年4月1日～ 平成11年3月31日	2,500,000

## 6. 研究結果の概要

分担者の川原は愛知県内で捕獲した野鼠から新種の *Ehrlichia* を世界で初めて分離した。本菌はアメリカで最近発見されたヒトのエールリキア症を起こす *E. chaffeensis* に極めて近い遺伝子型を保有すること、また野鼠 (5%~63%) をはじめ各種野生動物 (1%~117%) や愛玩動物 (約5%)、ヒト (1%) にも抗体が存在することを明らかにし、わが国にも *E. chaffeensis* や最近アメリカでヒトから発見された *Human granulocytic ehrlichia* の起原菌が分布している可能性を示唆した。分担者の山本は、アメリカでヒトにも感染することが知られているイヌのエールリキア症について、*Ehrlichia canis* に対するイヌの抗体は沖縄県の捕獲犬319頭中76頭 (23.8%)、徳島市およびその周辺の飼育犬341頭中8頭 (2.3%)、山口市およびその周辺の飼育犬448頭中22頭 (4.9%) 検出されることを示した。抗体陽性犬の血清39例中24例に *Ehrlichia canis* の遺伝子を検出し、イヌから本菌の分離を継続している。また沖縄県住民の抗体保有状況についても継続調査中である。

分担者の丸山・上野は、猫ひっかき病の起原菌 *Bartonella henselae* に対する抗体はネコ471頭中43頭 (9.1%) から、本菌は462頭中15頭 (3.2%) から分離されたことを示した。また最近アメリカおよびフランスで分離されている *B. clarridgeiae* は日本のネコから分離されなかった。ヒトの疫学調査は継続中である。分担者の森田は日本紅斑熱の指標動物が野生小動物の他にイヌの可能性を抗体保有 (沖縄県の放浪犬32.5%) から明らかにし、ヒトの抗体保有状況も含め、継続調査中である。

分担者の森田は日本紅斑熱の指標動物は野生小動物の他にイヌの可能性を抗体調査から示唆した。

一方、主任研究者の平井および分担者の小田・福士は、内科医および小児科医と共同で、Q熱の典型的な不明熱をはじめ気管支炎、肺炎、肝炎、小脳炎、髄膜炎などの症例を明らかにし、抗体調査と病原体検出の疫学的調査から、わが国にも急性および慢性のQ熱患者が相当数存在することを示した。また、Q熱の起原菌 *Coxiella burnetii* の抗原性を担う新しい *idh* 遺伝子をクローニングして性状を解析し、主要外膜蛋白支配 *com1* 遺伝子と共に、遺伝子診断用プライマーの開発およびQ熱の遺伝子組換えワクチンの開発に可能性が拓け、精力的に研究を継続している。

## 7. 研究により得られた成果の今後の活用・提供

近年、野生動物の飼育・伴侶化の増加、国際交易による食生活の多様化、国際交流による海外渡航者の増加、免疫抑制剤や抗癌剤の長期投与による生体の感染防御能の低下やエイズの増加、森林・環境破壊、環境汚染、地球温暖化などによる生態系の変化などから、従来、未知や遭遇する機会の少なかった病原体に、ヒトや動物の新興・再興感染症が世界で注目されている。このような中に、リケッチア性の新興・再興感染症も公衆衛生上の大きな問題になっている。

本研究においてはエールリキア症、猫ひっかき病、日本紅斑熱およびQ熱を取り上げ、我が国における各疾病の疫学的成績を踏まえ、新しい診断および予防法を確立し、これらの成績を総合して、サーベイランスシステムや予防対策などを立案・策定する。

エールリキア症：川原は東京都西多摩郡および愛知県内で捕獲した野鼠からネズミに脾臓肥大を起こす新種の *Ehrlichia muris* を世界で初めて分離した。また、*E. muris* は愛知県足助町で採取されたキチマダニ (*Haemaphysalis flava*) から分離され、このダニが *E. muris* のベクターの一つであると考えられた。西多摩郡の捕獲野鼠血清は抗体保有率が高かった(58%)が、周辺地区の日の出町、八王子市および青梅市で捕獲した野鼠は低く(0~5%)、地域局在性(Hotspot)が認められた。さらに、東京都のヒト血清中に *E. muris* 抗体陽性者が認められた。東海地方のヒトおよび動物の抗体保有率を調査したところ、イヌ、クマ、サル、シカ、イノシシ、野鼠など各種動物に抗体が認められたが、ヒトおよびドブネズミには認められなかった。この菌株が遺伝学的に米国でヒトから新しく発見された *E. chaffeensis* に極めて近い遺伝子型に属することを明らかにし、野鼠をはじめ野生動物や愛玩動物、そしてヒトにも抗体が存在することから、わが国にもこの *Ehrlichia* が広範囲に分布している可能性を示した。また、米国でヒトから新たに発見された Humangranulocytic ehrlichia がわが国にも存在する可能性が高い。

山本はイヌのエールリキア症の疫学調査を行った。*E. canis* に対する抗体保有率は、沖縄県下の捕獲犬で20.5%、山口市の飼育犬で4.9%および徳島市の飼育犬で2.3%で、*E. canis* の拡散が示唆された。*E. canis* を実験的に感染させたビーグル犬ではPCR陽性で抗体価1:10,240と著しく上昇し、94日後以降にはPCR陰性になり、中和抗体の産生が考えられた。さらに、PCR陽性を示す捕獲犬の血液を健康なビーグル犬6頭とシェパード6頭に輸血しても感染が成立しなかったことから、中和抗体の存在が強く疑われた。また、ELISAにより *E. canis* の抗体を測定できる可能性を示した。

猫ひっかき病：上野は1997年に猫ひっかき病起因病原体 (*Bartonella henselae*) 様の細菌を米国で鹿から分離した。今回は日本における鹿のバルトネラ感染を調査した。濾紙吸着鹿血液21材料につき、リケッチアおよびバルトネラに特異的なプライマー2種類を用いPCR法で遺伝子の検出を試み、3例にバルトネラの、2例にバルトネラとリケッチアに混合感染の症例を見出した。また、鹿由来のバルトネラ菌株を抗原として、105検体中2例に抗体陽性例が見され、日本の野生動物にもバルトネラ菌が浸潤していることを示唆した。

丸山は、我が国のペット猫および不要猫の血清について、間接蛍光抗体法で *B. henselae* 抗体保有状況を調査。その結果、471頭中43頭(9.1%)が *B. henselae* 抗体(IgG)を保有していた。抗体陽性猫は1歳以下~14才までみられたが、陽性率には雌雄差は見られなかった。関東地方の猫462頭中15頭(3.2%)から *B. henselae* が分離された。飼育猫200頭中10頭(5.0%)、不要猫174頭中5頭(2.9%)からも菌が分離された。新生子猫88頭からは分離されなかった。日本、アメリカおよびフランスで分離された株のDNAの異同をパルスフィールド電気泳動法を用いて解析したところ、日本の猫は複数 *B. henselae* の株に、アメリカおよびフランスの猫は *B. henselae* と新種の *B. clarridgeiae* に感染していることが明らかになった。*B. henselae* の染色体

DNAは1.6MB~2.4MB, *B. clarridgeiae* のそれは約1.6MBであった。

日本紅斑熱：流行地域における紅斑熱群リケッチア (SFGR) について血清学的および分子学的に疫学調査を行った。北海道では *Apodemus speciosus* (26.8%) , 大阪では野生シカ (31%) , 沖縄では放浪犬 (31%) ・ヒト (45%) , インドネシアでは野生ネズミ (*Rattus*属4種) に高い保有率でSFGR抗体が存在した。PCRにより大阪のシカおよび沖縄の放浪犬で特異的増幅がみられた検体は, シークエンシングの結果, *R. japonica*と非常に高い相同性を示した。また大阪や沖縄のマダニから何らかのSFGRが検出され, 両地域におけるSFGRの侵淫が強く示唆される。北海道では *A. speciosus*, *Ixodes ovatus*, *I. persulcatus*でPCRによる特異的増幅が見られた。RFLP解析の結果, *A. speciosus*と *I. ovatus*で同じパターンが見られ, 両者の間で感染環が成立している可能性がある。インドネシアの *R. norvegicus*, および数種のマダニがPCR陽性を示し, 同地域においてヒトへの感染源の存在が示唆された。

Q熱：我々はわが国にも急性および慢性Q熱患者が存在することを疫学的に明らかにした。また、家畜や伴侶動物などにも本菌が広く浸潤し感染源になる可能性を示してきた。

今回小田は九州の疫学実態調べた。鹿児島県内農村部の一般健康人956検体中, 32倍以上の抗体価を示した検体は8例 (0.84%) であった。また, 福岡市の某病院を受診したかぜ症状の患者239検体中32倍以上の抗体価を示した検体は1例 (0.42%) , 同市の某大学病院で不明熱と診断された患者45検体中32倍以上の抗体価を示した検体は1例 (2.2%) であった。一方, 鹿児島大学医学部付属病院における各種神経疾患患者80検体中32倍以上の抗体価を示す例はなかった。以上の如く、今回調べたヒト血清合計1,320検体中 32倍以上の抗体価を示した検体は10例 (0.76%) で、抗体陽性例にQ熱様疾患の既往は確認されず, ほとんどは不顕性感染例であると考えられた。さらに, 今回の検査で *C. burnetii* 抗体疑陽性例の中に, *Legionella micdadei*や *Bartonella henselae*に対する抗体陽性例が見られたことから, 今後, Q熱の血清診断には交差反応の存在を留意する必要があると考えられた。

平井は1998年に岐阜県の一般健康者について抗体保有状況を調査した結果, 1,051名中抗体価16倍以上を陽性にするに17.4%、このうち16名は256倍以上の高い抗体価を示し, 9名から遺伝子も検出された。仮に64倍以上を陽性と判断しても, 44名 (4.2%) から抗体が検出された。獣医師に関しては, 公衆衛生関係の従事者で約22%、小動物臨床の従事者では34%から抗体が証明され, 21名は256倍以上の高い抗体価を示し, 3名から遺伝子も検出された。畜産関係者に抗体保有率が多く, *C. burnetii* による不顕性感染あるいは顕性感染の可能性が血清学的に示唆される。また, サルコイドーシス患者89例中44例 (49.4%) が64倍以上の抗体価を示し, 関東地方の患者では19例 (55.9%)、北海道の患者では25例 (45.5%) であった。サルコイドーシス患者の抗 *Coxiella* 抗体保有率は, 健康者や獣医師に比べ有意に高く, 発症に何らかの関連が示唆された。

また、平井は国内外の分離株を用いて以下の結果を得た。1) *C. burnetii* の16S rRNAの塩基配列は株間で99.4%以上の高い相同性を示し、1属1種であることが確認された。2) 27kDa主要外膜タンパク質をコードする *Com1* 遺伝子は特定の塩基が株により異なり、ヒトの病態別由来株や動物由来株などにより4群に分けられた。3) 低分子量(33~14kDa)のポリペプチド構成と抗原性は株により異なり、病態別や動物由来株などにより4群に分けられた。この遺伝子を大腸菌で挿入し感染防御抗原を発現させ、組換えワクチンになる可能性を示唆した。4) 野外にはLPS構造の異なるI相型、II相型および中間型の菌が存在することが明らかになった。また、モルモットに対し病原性の異なるI相菌が存在する。5) 代謝酵素 (isocitrate dehydrogenase, IDH と dihydrolipoamide succinyltransferase, ODH) をコードする新しい遺伝子をクローニングし、それらの性状を解析して、診断用抗原および組換えワクチンになる可能性を示唆した。6) 単クローン抗体 (Mab) を作出し、Mabsによる本菌型別の可能性を示した。また、27kDa認識Mabsの中和抗体価が著しく高かったことから、本菌の27kDa蛋白は感染と感染防御に重要な機能を担っていることが示唆された。

一方、福士は *C. burnetii* の27kDa主要外膜タンパク質をコードする *Com1* 遺伝子の塩基配列を解析し、PCR用のプライマーとして遺伝子診断に応用できることを明らかにした。また、免疫反応用担体として開発されている、高比重複合粒子(HDP)に菌体成分を感作・調整し、高比重粒子凝集(HDPA)反応を開発した。この方法は、ヒト血清のHDPA抗体価とIF抗体価は高い相関を示し、HDPAの感度はペア血清と急性期血清ではHDPA抗体陽性とIF抗体陽性が100%一致した。IF抗体陰性検体の大部分はHDPAでも陰性であった。また、家畜や愛玩動物血清においても高い相関を示した。したがって、HDPA反応は高感度かつ特異的で、Q熱の迅速診断に応用できると考えられた。さらに、*QpH1* および *QpRS* プラスミドのそれぞれに特異的な遺伝子からプライマーを設計し、患者血清を用いて遺伝子診断ができることを示した。

平成 11 年 3 月 29 日

厚生大臣 宮下創平 殿

住 所	フリカノ	ヒライカツヤ
氏 名	平井克哉	
(所属施設)	岐阜大学	

平成 10 年度から実施した厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症 研究事業）に係る研究事業を完了したので、次のとおり報告する。

研究課題名（課題番号）： リケッチアによる新興・再興感染症の疫学、診断および予防に関する研究（H10-新興-7）

国庫補助金精算所要額：金 20,000,000 円也

1. 厚生科学研究費補助金総合研究報告書（別添1のとおり）

2. 研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊 行 書 店 名	執筆者氏名
別紙			

3. 研究成果による特許権等の知的財産権の取得状況

（作成上の留意事項）

1. 「2. 研究成果の刊行に関する一覧表」に記入した書籍又は雑誌は、その刊行物又は別刷り一部を添付すること。
2. その他
  - (1) 手書きの場合は、楷書体で記入すること。
  - (2) 氏名は、自署又は記名押印で記入すること。
  - (3) 日本工業規格A列4番の用紙を用いること。各項目の記入量に応じて、適宜、欄を引き伸ばして差し支えない。

別添1

厚生科学研究費補助金総合研究報告書

（作成上の留意事項）

1. 総合研究報告書は、様式A(4)別紙2を参考に作成すること。

2. 研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
1. 日本獣医師会雑誌、51: 361-364 沖縄島における犬のマダニ寄生 およびマダニ媒介性疾患の感染 状況	1998		猪熊 壽ら
2. J.Vet. Med. Sci. 60: 761-763 Survey of Tick-Borne Disease in Dogs Infested with Rhipicephalus sanguineus at a Kennel in Okayama Prefecture, Japan.	1998		Inokuma H. et al.
3. European J. Epidemiol. (in press) Serosurvey of wild rodents for Rickettsioses (spotted fever, murine typhus and Q fever) in Java Island, Indonesia.	1998		Ima N. I. et al.
4. 臨床検査 42 (5), 561-562 Q熱の血清学的診断法	1998		小田 紘
5. Asian Medical Journal 41 (4)171-176 Chlamydial and rickettsial diseases	1998		Oda, H
6. 臨床医 25 (2), 168-169 Q熱	1999		小田 紘
7. 内科学進歩のトピックス 93-95 Coxiella burnetii 感染症 (Q熱) 仁保喜之 (編)	1998		小田 紘
8. Int. J. System. Bacteriol. 47: 883-884 Identification of rickettsiae isolated in Japan as <i>Coxiella burnetii</i> . by 16S rRNA sequencing.	1997		Matsuzawa, T. et al.
9. FEMS microbiol. Lett. 154: 201-205 Relationship between pathogenicity of <i>Coxiella burnetii</i> isolates and gene sequences of the macrophage infective potentiator gene ( <i>Cb mip</i> ) and sensor - like protein gene ( <i>qrs A</i> ).	1997		Matsuzawa, T. et al.
10. Immunol. 41: 871-877 Differentiation of <i>Coxiella burnetii</i> by sequence analysis of the gene ( <i>com1</i> ) encoding a 27-kDa outer membrane protein. Microbiol.	1997		Zhang, G. Q. T. et al.
11. J. Vet. Med. Sci., 60: 267-270 Antigenic characteristics in the lipopolysaccharides of <i>Coxiella burnetii</i> isolates.	1997		To, H. et al.
12. Microbiol. Immunol. 42: 81-85 Antigenic characteristics of polypeptides of <i>Coxiella burnetii</i> isolates.	1998		To, H. et al.
13. J. Wildlife Dis. 34: 310-316 Coxiellosis in domestic and wild birds from Japan.	1998		To, H. et al.
14. J. Vet. Med. Sci., 60: 781-790 Advances in the understanding of <i>Coxiella burnetii</i> infection in Japan.	1998		Hirai, K. et al.



2. 研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
15. J. Vet. Med. Sci., 60: 859-861 Prevalence of <i>Coxiella burnetii</i> infection in dairy cattle with reproductive disorders.	1998		To, H. et al.
16. 日本小児科学会雑誌、印刷中 髄膜炎を伴うQ熱の1例、	1999		山添 文他
17. Annals of Neurology, 印刷中 Life-threatening acute cerebellitis caused by <i>Coxiella burnetii</i> .	1999		Sawaishi, Y. et al.
18. J. Clin. Microbiol. 印刷中 Comparison of <i>Ehrlichia muris</i> isolated from wild mice and ticks, and serologic evidence of human and animal exposure to <i>E. muris</i> .	1999		Kawahara, K. et al.
19. J. Bacteriol. 印刷中 Molecular cloning and sequence analysis of the isocitrate dehydrogenase gene from <i>Coxiella burnetii</i> , and some characteristics of the enzyme.	1999		Nguyen, Sa V. et al.
20. Microbiol. Immunol., 印刷中 Characterization of the <i>Coxiella burnetii</i> <i>suc B</i> gene encoding an immunogenic enzyme.	1999		Nguyen, Sa V. et al.
21. 臨床獣医、15: 18-25 -今、注目のヒトと動物の感染症- Q熱（コクシエラ症）	1997		平井克哉
22. 獣医畜産新報、50: 667-670 -今注目されている動物の感染症 疫学とそのコントロール- Q熱（コクシエラ症）の現状、	1997		平井克哉
23. AD&S 14: 19-23. 系統分類学 - リケッチア -	1998		平井克哉
24. 日本小動物獣医師会誌（JSAVA） 38: 1-5 Q熱（コクシエラ症）	1998		平井克哉
25. 日本獣医師会誌、52: 77-83 Q熱に関する最近の知見	1999		平井克哉
26. 臨床科学、33: 1156-1161 -最近注目される感染症- Q熱（コクシエラ症）	1997		平井克哉
27. Diag. Lab. Immunol. 4: 676-680 Evaluation of the high-density agglutination test for <i>Coxiella burnetii</i> antibodies in animals Clin.	1997		Nguyen, Sa V. et al.
28. J. Clin. Microbiol. 36: 77-80 Clinical evaluation of new polymerase chain reaction assay for detection of <i>Coxiella burnetii</i> in human serum samples.	1998		Zhang, G. Q. et al.

2. 研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊 行 書 店 名	執筆者氏名
29. Microbiol. Immunol. 42:423-428 Evaluation of a recombinant 27-kDa outer membrane protein of <i>Coxiella burnetii</i> as an immunodiagnostic reagent.	1998		Zhang,G.Q. et al.
30. J. Clin.Microbiol. 36 : 2210-2213 Direct identification of <i>Coxiella burnetii</i> plasmids in human sera by nested polymerase chain reaction.	1998		Zhang,G.Q. et al.
31. Contrib. Microbiol. Basel, Karger 11: 201-210. <i>Bartonella</i> and <i>Afipia</i> species emphasizing <i>Bartonella henselae</i> . Epidemiology and pathogenicity of <i>Bartonella henselae</i> in cats.	1998		Maruyama, S. et al.
32. J. Vet. Med. Sci. 60:997-1000 Seroprevalence of <i>Bartonella henselae</i> and <i>Toxoplasma gondii</i> infections among pet cats in Kanagawa and Saitama Prefectures.	1998		Maruyama, S. et al.
33. J. Clin.Microbiol. 印刷中 Comparison of <i>Ehrlichia muris</i> isolated from wild mice and ticks, and serologic evidence of human and animal exposure to <i>E.muris</i> .	1999		Kawahara,K.et al.

# リケッチアによる新興・再興感染症の疫学、診断および予防に関する研究

(代表研究者：平井克哉)

## Q熱ワクチンの開発

分担研究者 平井克哉

### 研究要旨

気管支炎、肺炎、肝炎、小脳炎、髄膜脳炎など多彩な病像を示す急性Q熱患者および心内膜炎や肝炎など慢性Q熱患者がわが国にも広く存在することを疫学的に明らかにした。また、家畜、伴侶動物、野生動物、家禽および野鳥にも本菌が広く浸潤し、感染源になる可能性を示した。国内外の分離株を用いて以下の結果を得た。1) *C. burnetii* の16S rRNAの塩基配列は株間で99.4%以上の高い相同性を示し、1属1種であることが確認された。2) 27kDa主要外膜タンパク質をコードする*Com1*遺伝子は特定の塩基が株により異なり、ヒトの病態別由来株や動物由来株などにより4群に分けられた。3) 低分子量(33~14kDa)のポリペプチド構成と抗原性は株により異なり、病態別や動物由来株などにより4群に分けられた。この遺伝子を大腸菌で挿入し感染防御抗原を発現させ、組換えワクチンになる可能性を示唆した。4) 野外にはLPS構造の異なるI相型、II相型および中間型の菌が存在することが明らかになった。また、モルモットに対し病原性の異なるI相菌が存在する。5) 代謝酵素(isocitrate dehydrogenase, IDH とdihydrolipoamide succinyltransferase, ODH)をコードする新しい遺伝子をクローニングし、それらの性状を解析して、診断用抗原および組換えワクチンになる可能性を示唆した。6) 単クローン抗体(Mab)を作出し、Mabsによる本菌型別の可能性を示した。また、27kDa認識Mabsの中和抗体価が著しく高かったことから、本菌の27kDa蛋白は感染と感染防御に重要な機能を担っていることが示唆された。

### A. 研究目的

本研究の第1の目的は、ヒトをはじめ哺乳類、鳥類およびダニについて、広汎に病原体および抗体分布を調べて、Q熱およびコクシエラ症の疫学実態を明らかにすることである。第2は、分離*C. burnetii*の免疫化学的抗原解析および病原性支配遺伝子の解析を行い、ヒトや動物に感染・発症されるQ熱リケッチアは、どのような遺伝子配列を持つのか分子レベルで明らかにし、診断や予防などに応用することである。

### B. 研究方法

1. ヒト、哺乳動物、鳥類およびダニにおける病原体の疫学的調査
  - 1) ヒト、哺乳動物および鳥類における血清疫学的調査  
IFA(間接蛍光抗体法)や凝集反応により調査を実施する。
  - 2) ヒト(健康者および各種の患者)、家

畜、2愛玩動物、野生動物、4鳥類および媒介昆虫ダニについて、病原体分離およびPCRによる抗原検出による疫学的調査を実施する。3) 分離株のDNAプラスミドによる分子疫学的解析を行う。

### 2. 抗原構造蛋白質の解析

- 1) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)によって分離70株のQ熱リケッチアを抗原特異蛋白質およびLPS(リポ多糖体)の比較解析をする(PAGE型別)。
- 2) 抗原決定ポリペプチドのミノ酸配列を同定する。
- 3) 抗原決定糖鎖を同定する。

3. 感染防御抗原を免疫化学的および分子遺伝学的に解析し、予防と診断の基礎とする。

### C. 研究結果・考察

1. 疫学的研究

1) ヒト：一般の健康者60名中3.3%に対し、獣医師275名中22.5%、食鶏処理場従業員107名中11.2%、呼吸器疾患患者184名中15.2%に抗体が検出され、畜産関係者や呼吸器疾患患者にQ熱が存在する可能性を血清学的に示唆した。また、ウシの各種材料や牧場のダニから本菌を多数分離した。国内で確実な症例がなかったが、呼吸器疾患患者および異型肺炎患者血清を調査した結果、前者の血清40例中、遺伝子はIgM抗体陽性10例のうち9例とIgG抗体陽性25例のうち3例から、また後者の血清58例中、遺伝子はIgM抗体陽性23例のうち21例(91%)から検出され、さらに、IgM抗体陽性21例中19例から本菌が分離され、病原学的にもわが国にQ熱が広く浸淫していることが明らかになった。

最近、飼育ネコが感染源と推定される典型的な症例および感染源不明な小脳炎、髄膜脳炎、壊死性リンパ節炎などの症例が内科医により集積されてきた。また、急性Q熱の回復期に本菌によると推定される壊死性多発性血管炎で死亡した症例も報告された。さらに、伴侶動物を含む家族内感染事例も確認された。某医学部附属病院17診療科に来院した3,000名の血清について調査した結果、抗体陽性率は放射線科(11.8%)、精神神経科(9.7%)、皮膚科(9.2%)の順に高く、また、遺伝子は抗体陽性患者の82.4%および陰性患者の11%から検出された。カルテから現在までに明らかになった診断名別陽性患者は、腫瘍31名、肝臓疾患21名、心臓疾患8名、HTLV感染症5名、呼吸器疾患4名、腎臓疾患4名、自己免疫疾患4名、リウマチ3名、甲状腺機能異常3名、神経疾患2名、その他18名であった。このように、腫瘍、肝臓、心臓疾患などに比較的陽性患者が多く認められたこと、また慢性例由来株に特異的なQpRSプラスミドが検出されたことから、わが国にも慢性Q熱患者が相当数いると推察された。わが国ではQ熱に関して法的にも公的機関が把握し得る体制がないので正確な統計値はない。厚生省の統計によると、呼吸器疾患患者は、人口1万人当たり年間100名から200名発生する。国民1億2千万人に前記の遺伝子検出陽性率を代入すると、年間のQ熱患者は相当数いると推定され、原因不明のまま見落とされていると考えられる。

2) 動物とダニ：ウシの各種材料や牧場のダニから病原体の分離を試みた。繁殖障害

牛の生乳214検体中36例(16.8%)、子宮スワブ61検体中13例(21.3%)、健康牛乳房50検体中4例(8%)、流産胎子4検体中2例(50%)およびダニ15プール検体中4例(26.7%)から*C. burnetii*が分離された。したがって、日本の家畜およびダニに本菌が広く存在することを病原学的に明らかにした。

3) 鳥類：家禽では、ニワトリ1,589検体中2%、ウズラ174検体中2.9%、アイガモ238検体中1.3%およびマスコビーダック30例中3.3%が陽性であった。また、野鳥のカラス35%、ハト6%からも抗体が検出された。特にカラスは血清と腸管から本菌とその遺伝子が検出され、わが国の野生動物にも広く浸潤していることが示唆された。

## 2. 日本分離株の病原性について

分離12株のモルモットに対する病原性を発熱と脾臓および精巣の腫脹を指標として調べた。3株(3M, 60M, 53U)は高熱(40℃以上)と脾臓および精巣の重度な腫脹が、2株(58T, 605P)は微熱(38.9-39.9℃)および脾臓の軽度な腫脹が、また7株(1M, 27M, 82M, 50F, 57T, TK-1P, 307P)は正常体温を示したが4株に脾臓の軽度な腫脹が認められた。このことから、日本には病原性の異なる*C. burnetii*が存在する可能性が示唆された。

## 3. 日本分離株の免疫化学的性状について

日本分離株の免疫化学的性状を国外分離株と比較解析した。まず、分離株の大量培養法および精製法を確立した。すなわち、本菌を発育鶏卵で3代から5代継代後さらにBGM細胞で3代から5代継代すると最もよく増殖することが判った。また、精製はWilliamsの方法を改良し蔗糖およびリノグライフィン密度勾配遠心法により行った。国内分離9株のリポ多糖体(LPS)は5株(3M, 53U, 307P, TK-1P, 1M)がI相、2株(27M, 82M)がII相および2株(50F, 58T)が中間型のパターンに分けられた。新鮮株は強毒のI相菌であるが、*in vitro*で50代以上継代すると弱毒のII相菌に相変異することが知られている。国内分離株はわずか4代から5代の継代歴でもII相菌のLPSパターンを示すことから、病原性の弱いII相菌が野外に存在する可能性が示唆された。

国内分離12株のポリペプチドを国外分離13株と比較解析した。国内分離株は分子量約8kDaから137kDaの広い範囲に認められ、主要ポリペプチドは13, 15.7, 19.5, 28,

29.5, 45 および 67 kDa であった。その他微量な30 から40のポリペプチドが検出された。29.5 kDa 以上のポリペプチドパターンは国外分離株と同一であったが、29 kDa 以下の低分子領域のポリペプチドは国外分離株も含めて株による相異が認められ、5群に分けられた。

国内分離 12 株のポリペプチドの抗原性状を感染マウス耐過血清のイムノブロッティングにより国外分離13株と比較解析した。交差反応から本菌は5群に大別された。1群には国内および国外分離株を含め牛乳、流産胎子、ダニおよび急性Q熱患者由来の17株が属した。2群には国外の急性Q熱患者由来株および羊流産胎盤由来2株が属した。3、4 および 5 群には慢性Q熱患者由来6株が属した。したがって、*C. burnetii*にはポリペプチドの抗原性状の異なる株が存在することをはじめて明らかにした。なお、国内分離株は急性Q熱由来株と同一の反応を示した。

*C. burnetii* はグラム陰性細菌で当初よりLPSの存在が推定され、我々の以前の化学的および生物学的研究により、その存在が明らかにされた。その後病原株と非病原株のLPS構造が異なっていることを示し、LPSが病原性と大きく関わっていることが推察された。今回我々は日本分離野生株のLPS構造を検討したところ、数株において、非病原性型のLPSの存在を明らかにした。このことは日本の野生株の中に、非病原性株の存在を示唆している。

#### 4. 国内外分離株の遺伝学的性状について

日本分離 *C. burnetii* 株の分子生物学的性状およびヒトQ熱の分子疫学については十分理解されていない。我々は、急性および慢性例由来株の27-kDa外膜蛋白質の遺伝的および抗原的性状を解析し、得られた情報により、Q熱の診断および疫学調査に有用な方法を開発した。さらに、日本のヒトQ熱の分子疫学についても検討した。

*C. burnetii* の国外分離11株（急性例由来5株、慢性例由来5株およびヤギ流産胎子由来1株）および国内分離10株（ウシ由来5株、ダニ由来3株、ウシ流産胎子由来1株およびヒト急性例由来1株）計21株のcom1遺伝子の塩基配列を決定した。21株の塩基配列を比較解析した結果、com1遺伝子の塩基および推定アミノ酸配列は株間で相同性が極めて高いが、慢性例由来株に特異的な塩基およ

びアミノ酸残基がみられた。*C. burnetii* の21株は com1遺伝子の特異的な塩基および推定アミノ酸により4群に分けられた。国外急性例由来4株と国内ダニ、生乳および急性例由来10株は1群に、国外慢性例由来の2および3株はそれぞれ2および3群に、国外急性例由来1株およびヤギ流産胎子由来1株は4群に属した。以上のように、ウシ、ダニおよびヒト急性および慢性例由来株は、塩基配列で異なり、*C. burnetii* 株の鑑別に有用であることが示唆された。

#### 5. 主要外膜蛋白com1遺伝子の発現と診断用抗原への応用

*C. burnetii* の27-kDa外膜蛋白質のアミノ酸残基がどのような抗原決定基をコードするを明確にするため、急性および慢性例由来計8株からのcom1遺伝子を発現ベクター pET21cにクローニングし、大腸菌に発現させた。SDS-PAGEおよびimmunoblotting法により、8株の組換え体はすべて分子量約32および30kDaの蛋白質を発現していることが確認された。発現蛋白質は*C. burnetii* 免疫血清および27-kDa外膜蛋白質を認識するモノクローナル抗体とすべて反応することから、少数のアミノ酸の相異にもかかわらず、8株の27-kDa外膜蛋白質には共通な抗原決定基が存在することが判った。一方、精製した27-kDa発現蛋白質はELISA抗原として有用であることをQ熱ヒト血清を用いて評価した。すなわち、発現蛋白質およびNine Mile II 相菌を抗原として用い比較したところ、IF陽性の40検体は全例が陽性で、IF陰性の20検体は全例が陰性であった。この結果から、27-kDa発現抗原を用いたELISA法は、特異性が高く、抗体検出に有用であることが示唆された。

#### 6. 代謝酵素 (isocitrate dehydrogenase, IDH と dihydrolipoamide succinyltransferase, ODH) をコードする遺伝子のクローニングとそれらの性状解析、および診断用抗原への応用

本菌は他の菌と異なりファゴリソソームの極めて低いpHの条件で増殖する。この特徴はの病原性に関与すると考えている。現在まで *C. burnetii* の抗原性を担う蛋白質支配遺伝子として、熱ショックおよび27kDa外膜蛋白質支配の2種遺伝子(*htpB*

および*comI*)が知られているに過ぎない。我々は、*C. burnetii* 遺伝子ライブラリーのスクリーニングにより、本菌の新しい抗原性を担う、isocitrate dehydrogenase (IDH)をコードする*icd*遺伝子および dihydrolipoamide succinyltransferase, ODHをコードする*sucB*遺伝子をクローニングし、塩基配列決定と組換えIDHおよび生化学的性状を解析した。

*C. burnetii* の*icd* 遺伝子はpUC18ベクターで作成した遺伝子ライブラリーから clone pC16としてクローン化した。DNA塩基配列を決定したところ、427個のアミノ酸からなる46.6kDaの蛋白質をコードするopen reading frame (ORF) が同定された。推定分子量はclone pC16の*E. coli* における発現蛋白質の分子量とほぼ同じであった。この推定アミノ酸配列は、*E. coli* および *S. enterica* のIDHと、それぞれ74および73%の高い相同性を示した。Clone pC16は*E. coli* DEK2004株 (*trp, icd, recA*)を相補し、未変性ゲル電気泳動で*C. burnetii* のIDHと同じ易動度を示す組換えIDHを産生した。*C. burnetii* の15株からの*icd*遺伝子を比較した結果、急性Q熱由来株と慢性Q熱由来株を区別する塩基およびアミノ酸配列に一つのマーカーが見られた。生化学的解析から、*C. burnetii* のIDHは、NADP依存性で他の細菌のIDHと異なり、至適pHは低く6.5から7.2であった。また、pC16形質転換 *E. coli* DEK2004 におけるIDH産生はpH 5.0から5.5の間で高かった。*C. burnetii icd* 遺伝子およびIDHの特徴は本菌の増殖環境と関係があると考えられる。

一方、*C. burnetii* 遺伝子ライブラリーのウサギ抗血清によるスクリーニングから41個の陽性クローンを選択した。そのうち、12クローンは50kDaの蛋白質を発現した。代表的なクローンとしてクローンλC19を使用し、サブクローニング後、約2kbのインサートを含むクローンpC19-6aを作成した。このクローンのインサートフラグメントは挿入方向に関わらず常に50kDaの蛋白

質を発現した。塩基配列を決定した結果、1212 bpのopen reading frame (ORF)が同定された。このORFの推定アミノ酸配列は、*E. coli* および*H. influenzae* ODHと、それぞれ54.3および54%の高い相同性を示したが、N-末端側のアミノ酸配列はそれぞれ45.5および42%の相同性を示した。クローン化遺伝子断片は*E. coli* JRG153株を相補し、本変異株のODH産生性能を回復した。この*E. coli* 株から作製した細胞抽出液を用い、ウエスタンブロットの結果、発現組換え蛋白質はマウス感染回復血清、ウサギ免疫血清およびQ熱患者血清と反応した。ベクターのみの形質転換*E. coli* JRG153の細胞抽出液はこれらの陽性血清と反応しなかった。以上の結果から、*C. burnetii* のODH組換え酵素は、抗原性を持ち、Q熱の診断用抗原に応用可能であると考えられた。

## 7. 単クローン抗体による本菌の型別と構成蛋白質の機能

*C. burnetii* Nine Mile株 I 相菌のLPSに反応する23種のモノクローナル抗体(MAb)および蛋白を認識する9種のMAbsを作出し、IFによる反応性から型別を試みた。急性例由来13株(QpH1プラスミド保有)および慢性例由来6株(QpRSプラスミド保有1株、QpDVプラスミド保有2株、プラスミド非保有3株)のI相菌を用いた。

供試19株は、全てのMAbsに反応した1群、14MAbsに反応し9MAbsに反応しない2群、7MAbsに反応し16MAbsに反応しない3群、2MAbsのみに反応する4群に型別された。1群には全ての日本分離8株(ヒト、動物、ダニ由来)、ヒト急性由来3株およびダニ由来4株を含むQpH1プラスミド保有13株中11株とヒト由来QpDVプラスミド保有の2株が属した。2群には動物由来QpH1プラスミド保有の海外由来2株が属した。3群にはヒト由来プラスミド非保有の慢性例由来3株が属した。4群にはヤギ由来QpRSプラスミド保有の慢性例由来1株が属した。以上の結果から、*C. burnetii* は1属1種で血清型が知られていないが、MAbsによる型別の可能性が示唆された。QpRSプラ

スミド保有株とプラスミド非保有株は QpH1 および QpDV プラスミド保有株と異なる LPS 構造を持つ可能性、また QpDV プラスミド保有株は QpH1 プラスミド保有株に類似する LPS 構造を持つ可能性が示唆された。

一方、本菌の構成蛋白質の機能や株による病原性の相異などについての研究は進展していない。我々は蛋白質の機能解析のため、Mabs の中和活性について検討した。用いた Mabs は 60kDa 認識の 9 種、27kDa 認識の 10 種および 20kDa 認識の 2 種の計 21 Mabs のマウス腹水である。中和試験は BGM 細胞を用い抗体希釈法により行った。すなわち、*C. burnetii* Nine Mile 株 I および II 相菌の 200TCID<sub>50</sub> と各 Mabs 希釈液を 1:1 で混合し、1 時間感作後 BGM 細胞に接種して、96 時間後に CPE を判定した。I 相菌に対する中和抗体価は 20kDa 認識 Mabs で 128 倍、27kDa 認識 Mabs で 1,024 倍、60kDa 認識 Mabs で 128 倍まで認められた。II 相菌に対する中和抗体価は 20kDa 認識 Mabs で 1,024 倍、27kDa 認識 Mabs で 4,096 倍、60kDa 認識 Mabs で 512 倍まで認められた。各 Mabs の IF 抗体価と中和抗体価を相対的に比較したところ、60 および 20kDa 認識 Mabs は抗体価が高く、中和抗体価が低かった。27kDa 認識 Mabs は IF 抗体価が低く、中和抗体価が高かった。27kDa 認識 Mabs の相対的中和抗体価が著しく高かったことから、本菌の 27kDa 蛋白質は感染ないし菌の増殖に重要な機能を担っていることが示唆され、感染防御の重要な抗原であると考えられた。一方、27kDa 蛋白質同様、抗原性および免疫原性を持つと考えられている 60kDa 蛋白質を認識する Mabs の中和活性は 27kDa 認識 Mabs と比較して明らかに低かった。Q 熱では細胞性免疫が感染防御の主体であると考えられているが、液性免疫の関与も示唆された。

#### D. 結論

日本に Q 熱 (コクシエラ症) が広く存在することを血清疫学および病原学的に証明し、また、国内外の *C. burnetii* には生物学的および免疫化学的性状の相異なる株があることを明らかにした。本研究の成果はコクシエラ菌の病原性発現機構の基盤になり、また、Q 熱の疫学および診断に有用な情報を提供し、Q 熱の感染防御に極めて重要な基礎資料を提供すると考えられる。

今後本邦における Q 熱のより詳細な実態を解明するには、一般市民をはじめ医師や獣医師などに Q 熱に対する知識や診断法の普及をしなければならない。また、ヒトの Q 熱や動物のコクシエラ症に関する詳細な疫学的調査および研究体制は勿論、サーベイランスシステムや予防策の確立などは急務であろう。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Matsuzawa, T., Sawaki, K., Nagaoka, H., Akiyama, M., Hirai, K. and Yanagihara, Y.: Identification of rickettsiae isolated in Japan as *Coxiella burnetii* by 16S rRNA sequencing. Int. J. System. Bacteriol., 47: 883-884, 1997.
- 2) Matsuzawa, T., Sawaki, K., Nagaoka, H., Akiyama, M., Hirai, K. and Yanagihara, Y.: Relationship between pathogenicity of *Coxiella burnetii* isolates and gene sequences of the macrophage infective potentiator gene (*Cb mip*) and sensor-like protein gene (*qrs A*). FEMS microbiol. Lett. 154: 201-205, 1997.
- 3) Zhang, G.Q., To, H., Yamaguchi, T., Fukushi, H. and Hirai, K.: Differentiation of *Coxiella burnetii* by sequence analysis of the gene (*com1*) encoding a 27-kDa outer membrane protein. Microbiol. Immunol. 41: 871-877, 1997.
- 4) To, H., Hotta, A., Amano, K., Yamaguchi, T., Fukushi, H. and Hirai, K.: Antigenic characteristics in the lipopolysaccharides of *Coxiella burnetii* isolates. J. Vet. Med. Sci., 60: 267-270, 1997.
- 5) To, H., Hotta, A., Zhang, G.Q., Nguyen, Sa V., Ogawa, M., Amano, K., Yamaguchi, T., Fukushi, H. and Hirai, K.: Antigenic characteristics of polypeptides of *Coxiella burnetii* isolates. Microbiol. Immunol. 42: 81-85, 1998.
- 6) To, H., Sakai, R., Shirota, K., Kano, C., Abe, S., Sugimoto, T., Takehara, K., Morita, C., Takashima, K., Maruyama, T., Yamaguchi, T., Fukushi, H., and Hirai, K.: Coxiellosis in domestic and wild birds from Japan. J. Wildlife Dis. 34: 310-316, 1998.
- 7) Hirai, K. and To H.: Advances in the understanding of *Coxiella burnetii* infection in Japan. J. Vet. Med. Sci., 60: 781-790, 1998.
- 8) To H., Htwe, K.K., Kako, N., Kim, H.S., Yamaguchi, T., Fukushi, H. and Hirai, K.: Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in dairy cattle with reproductive disorders. J. Vet. Med.

Sci., 60: 859-861,1998.

9)山添 文、平山康浩、高橋郁夫、沢石由記夫、高田五郎、平井克哉：髄膜炎を伴うQ熱の1例、日本小児科学会雑誌、印刷中1999.

10)Sawaishi, Y., Takashima, I., Hirayama, Y., Hirai, K., Takada,Goro.: Life-threatening acute cerebellitis caused by coxiella burnetii. Annals of Neurology, 印刷中1999.

11)Kawahara,K., Suto, C., Rikihisa,Y., Shibata,S. Ito, T., Fujita, H. and Hira K. : Comparison of *Ehrlichia muris* isolated from wild mice and ticks, and serologic evidence of human and animal exposure to *E. muris*. J. Clin.Microbiol. 印刷中、1999

12)Nguyen, Sa V., Yamaguchi, T., Fukushi, H. and Hirai, K.: Molecular cloning and sequence analysis of the isocitrate dehydrogenase gene from *Coxiella burnetii*, and some characteristics of the enzyme. J. Bacteriol. 1999. 印刷中

13)Nguyen, Sa V., To H., Yamaguchi, T., Fukushi, H. and Hirai, K.: Characterization of the *Coxiella burnetii* suc B gene encoding an immunogenic enzyme. Microbiol. Immunol., 印刷中, 1999.

## 2. 総説

1)平井克哉：-今、注目のヒトと動物の感染症-、Q熱（コクシエラ症）、臨床獣医、15: 18 -25, 1997.

2)平井克哉：-今注目されている動物の感染症：疫学とそのコントロール-、Q熱（コクシエラ症）の現状、獣医畜産新報、50: 667-670, 1997.

3)平井克哉：系統分類学 - リケッチア- AD&S 14: 19-23,1998.

4)平井克哉：Q熱（コクシエラ症）、日本小動物獣医師会誌（JSAVA）38：1-5,1998

5)平井克哉：Q熱に関する最近の知見、日本獣医師会誌、52：77-83、1999.

6)平井克哉：-最近注目される感染症-、Q熱（コクシエラ症）、臨床科学、33: 1156-1161, 1997.

## 3. 学会発表

1)Hirai, K., To Ho, Guo Q.Zhang: Q fever in Japan. The 6th China-Japan international Congress of Microbiology (CJICM) (第6回日中微生物会議), 60-61, 1997.

2) Kimura,K.Isogai,E.Isogai,H.Hirai,K.

Mizutani,M.Hiraga,Y. Isihara,M. Ohno, Kotake,S.Kubota, T. and Fujii,N. : The pathogenesis of sarcoidosis. The 3rd World Congress on Inflammation from Molecular Biology to the Clinic, (1997, 11, Tokyo)

3)Nagaoka, H., Sugieda, M., Nakamura, N., Yamamoto, S. and Hirai, K.: Q fever in Japan. Proceeding of The 2 nd International Symposium on Lyme Disease in Japan. " Emerging and Re-emerging Diseases Transmitted by Arthropod Vectors and Rodents" (1997,10. Shizuoka)

4)Kawahara,K., Suto,C., Rikihisa,Y., Shibata,S. Ito, T., Fujita,H. and Hira K. : Characterization of *Ehrlichiae* spp isolated from wild mice and ticks, and seroepidemiology to *E. muris* during human and animals in Japan, 98 th General Meeting of the American Society for Microbiology (1998,5. Atlanta)

5)張 国全、To Ho、山口剛士、福士秀人、平井克哉： *Coxiella burnetii* 27kda外膜蛋白遺伝子 (Com1) の株間における塩基配列の比較解析、第122回日本獣医学会 (1996)

6)張 国全、To Ho、福士秀人、平井克哉： *Coxiella burnetii* 27KDa外膜蛋白質 (Com1) の大腸菌における発現、第70回日本細菌学会 (1997)

7)張 国全、To Ho、福士秀人、平井克哉： *Coxiella burnetii* 27KDa外膜蛋白質 (Com1) の株間における塩基配列の比較解析、第70回日本細菌学会 (1997)

8) 沢木勝志、増澤俊幸、柳原保武、長岡宏美、秋山真人、平井克哉：日本のQ熱コクシエラの16S rRNA遺伝子解析、第70回日本細菌学会 (1997)

9) 河村美登里、堀田明豊、To Ho、張 国全、山口剛士、福士秀人、平井克哉：Q熱コクシエラの蛋白質認識単クローン性抗体の作出、第124回日本獣医学会 (1997)

10) 水谷美穂、張 国全、To Ho、河村美登里、堀田明豊、山口剛士、福士秀人、平井克哉：QpRSプラスミド保有 *Coxiella burnetii* の分離、第124回日本獣医学会 (1997)

11)堀田明豊、河村美登里、To Ho、山口剛士、福士秀人、平井克哉：野鼠からの *Coxiella burnetii* の分離、第125回日本獣医学会 (1998)

12) 川原 真、須藤千春、力久泰子、柴田伸一郎、伊藤忠彦、藤田博己、平井克哉：野鼠およびマダニから分離された *Ehrlichia* spp. について、第4回リケッチア研究会総会 (1997.10)



13) 高田伸弘、矢野泰弘、岩崎博道、石畝史、平井克哉：わが国のマダニ類および野鼠類のQ熱病原体保有について、日本微生物学会（1998.4）

14) 磯貝恵美子、木村浩一、磯貝 浩、平井克哉、水谷美穂、平賀洋明、石原麻美、大野重昭、小竹 聡、久保田耐、藤井暢弘：サルコイドーシスの病因、第35回レプトスピラシンポジウム（1998.4）

15) 松館宏樹、安田恵子、石原加奈子、小川基彦、水谷美穂、堀田明豊、落合由嗣、山口剛士、福士秀人、平井克哉：オウム病クラミジアの一般健康者および小動物臨床獣医師における疫学的調査、第126回日本獣医学会（1998.8）

16) 河村美登里、堀田明豊、山口剛士、福士秀人、平井克哉：Coxiella burnetii に対するモノクローナル抗体の中和活性、第126回日本獣医学会（1998.8）

17) 石原加奈子、松館宏樹、安田恵子、小川基彦、水谷美穂、堀田明豊、落合由嗣、山口剛士、福士秀人、平井克哉：Coxiella burnetii（Q熱）の一般健康者および小動物臨床獣医師における疫学的調査、第126回日本獣医学会（1998.8）

18) 小宮智義、本川賢司、岡田 奨、荒井節夫、斉藤 博、相澤主税、福士秀人、平井克哉：コンパニオンアニマル（ネコ・イヌ）におけるCoxiella burnetii の血清疫学的調査、第127回日本獣医学会（1999.4）

19) Nguyen, Sa V., 福士秀人、平井克哉：Coxiella burnetii のisocitrate dehydrogenase (IDH) をコードするicd 遺伝子のクローニングおよびIDHの生化学的解析、第127回日本獣医学会（1999.4）

20) Nguyen, Sa V., 福士秀人、平井克哉：Coxiella burnetii のdihydrolipoamide succinyl-transferase 遺伝子(sucB) のクローニング、解析および抗原性について、第127回日本獣医学会（1999.4）

## 分担研究報告書

### ヒトにおける *Coxiella burnetii* 抗体保有状況

分担研究者 小田 紘

#### 研究要旨

日本におけるQ熱の実態解明と、血清学的診断における交叉反応の関与を知ることを目的として *Coxiella burnetii* II 相菌に対するヒトの抗体保有状況を間接蛍光抗体法 (IFA) で調べ、以下の結果を得た。

鹿児島県内の農村部における一般健康人956検体中、32倍以上の抗体価を示したものは8例 (0.84%) であった (抗体価は32~128倍)。これらの抗体陽性者8名に血清生化学検査値の異常は認められなかった。また、福岡市の某病院を受診したかぜ症状の患者血清239検体中32倍以上の抗体価を示したものは1例 (0.42%) のみであり、同市の某大学病院で不明熱と診断された患者血清45検体中32倍以上の抗体価を示したものは1例 (2.2%) であったが、いずれも抗体価の変動は認められずQ熱とは診断されなかった。一方、鹿児島大学医学部付属病院における各種神経疾患患者の血清80検体中32倍以上の抗体価を示したものはなかった。

以上のごとく、今回調べたヒト血清合計1,320検体中32倍以上の抗体価を示したものは10例 (0.76%) であった。しかし、抗体陽性例においてQ熱様疾患の既往は確認されず、ほとんどは不顕性感染にとどまっているものと考えられた。上記の結果より、わが国にもQ熱の病原体 *Coxiella burnetii* が存在し、感染者がいることは確実と考えられるが、感染率は従来への報告に比して低い結果であった。

さらに、今回の検査で *C. burnetii* 抗体疑陽性例の中には *Legionella micdadei* や *Bartonella henselae* に対する抗体陽性例が見られたことから、今後、Q熱の血清診断においてはこれらの菌に対する交差反応の存在に留意する必要があると考えられた。

#### A. 研究目的

最近の研究により、わが国にもQ熱が存在することを示す証拠が蓄積しつつある。しかし、実際の患者発生状況や不顕性感染者の実態については未だ明らかではない。また、血清学的検査法についても陽性の判定基準等についていくつかの解決すべき問題点が残されている。本研究では、一般健康人を中心とした多数のヒト血清について間接蛍光抗体法 (IFA) により抗体保有状況を調べ、*Coxiella burnetii* の日本における浸淫状況の一端を明らかにすることを目的とした。またQ熱の血清診断において問題となる他の微生物との交叉反応の有無についても検討した。

#### B. 研究方法

1. 対象：鹿児島県曾於郡某町における住民健康診断時に採取された血清で、一般生化学検査のほかに、寄生虫に関する検査、および各種リケッチアの抗体検査も行うことを承諾されたもの956検体を検査対象

とした。検査対象者の年齢分布は24~88歳、平均年齢59.2歳であった。その他、福岡市内の某病院を受診した“かぜ症状”の患者血清239検体、福岡市内の某大学病院で不明熱と診断された入院患者の血清45検体、および鹿児島大学医学部付属病院における各種神経疾患患者の血清80検体 (内訳はHTLV-1 associated myelopathy 50例、各種の非炎症性神経疾患30例) についても調べた。

2. 抗体価の測定：IFAを用いて行った。スロバキア科学アカデミーから購入したIFA用 *Coxiella burnetii* Nine Mile株 II 相菌抗原を24穴テフロンコートスライドグラスに塗抹し、アセトンで室温10分間固定したものを使用した。被検血清を0.3% ウシ血清アルブミン (BSA) 加リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で32倍希釈し、抗原プレートの各穴にのせてモイストチェンバー中で37℃ 30分間インキュベートした。PBSにて十分に洗浄後、二次血清として FITC 標識抗ヒ

トIgGヤギ血清をのせ37°C30分間反応させたのち十分に洗浄し、PBS-グリセリンで封入して蛍光顕微鏡で観察した。陽性コントロール血清としては、急性Q熱回復期患者血清を用いた。

3. 判定基準：米国CDCのIFA検査法マニュアルの判定基準に準じてIFAの結果判定を行い、希釈倍数32倍以上でIFA陽性と判定された場合を抗体陽性とした。

### C. 研究結果

#### 1. 農村部の一般健康人の抗体保有状況

鹿児島県曾於郡住民の血清956検体中IFA抗体価が32倍以上のものは8例(0.84%)であった。抗体陽性者の年齢は54~84歳、平均68.5歳で、男女比は5:3であった。また、抗体陽性者の抗体価は32~128倍であった。このうち血清の生化学的検査所見でGOT, GPT, ALP, LDH, ChEに異常値を示すケースはなかった。抗体陽性者において、過去にQ熱を思わせる症状等の既往については現時点では確認されていない。

#### 2. 都市部のかぜ症状患者の抗体保有状況

福岡市の某病院を受診したかぜ症状の患者239名中32倍以上の抗体価を示したものは1名(0.42%)で、その抗体価は32倍であった。この患者はその後抗体価の変動がみられず、Q熱は否定された。

#### 3. 不明熱患者の抗体保有状況

不明熱の診断で入院した患者45名中32倍以上の抗体価を示したものは1名(2.2%)であった。しかしその抗体価は32倍で変動せず、Q熱は否定された。

#### 4. 神経疾患患者の抗体保有状況

HTLV-1関連脊髄症(HAM)50例、および非炎症性神経疾患30例の合計80例中32倍以上の抗体価を示した症例はなかった。

#### 5. 他の細菌との交差反応

*Coxiella burnetii* は *Legionella micdadei* および *Bartonella henselae* と共通抗原性を持つことが報告されている。そこで、今回調べた血清(956検体)のうち、*C. burnetii* 抗体が明らかに陽性のもの、および抗体陰性と判定したが弱い反応が見られた血清(疑陽性血清)について *L. micdadei*、および *B. henselae* に対する反応をIFAで調べた。その結果 *C. burnetii* 陽性者(8例)のうち

*Legionella micdadei* 陽性例はなく、*Bartonella henselae* 陽性例は1(12.5%) (抗体価は64×)であった。一方、*C. burnetii* 疑陽性者(48例中任意に抽出した12例)のうち *Legionella micdadei* 陽性例は1(8.3%) (抗体価は32×)、*Bartonella henselae* 陽性例は5(41.7%) (抗体価は32×~64×)であった。

また、*L. micdadei* 陽性者は *C. burnetii* 陽性8例中0、疑陽性12例中1で、*B. henselae* 陽性者は *C. burnetii* 陽性8例中1、疑陽性12例中5であった。

### D. 考察

畜産業の盛んな鹿児島県の農村部における一般住民の血清956検体中32倍以上の抗体価を示したものは8例(0.84%)であった。また、今回調査した合計1,320検体(各種疾患患者も含む)中32倍以上の抗体価を示したものは10例(0.76%)であった。これら陽性と判定された血清は全てCDCの判定基準における2+以上の典型的な陽性染色像を示した。上記の抗体陽性率は従来他の報告に比してかなり低いものである。調査対象の地域性も考慮する必要があるが、IFAの結果の判定基準、および抗体陽性の判定基準(cut off値)の設定も重要な因子であると考えられる。IFA染色標本では、非定型的な染色像がかなりの頻度で見られることがあり、その判定に迷うことがあるが、我々が用いたCDC基準ではこのことについてかなり明解な判定を行うことができる。一方、抗体陽性の判定に関するcut off値については問題が残されている。今回は一応32倍以上を陽性と判定したが、その妥当性については今後さらに検討する必要がある。ちなみにスロバキアのKazarらはIFAによるIgGの判定については100~200倍をcut off値とすべきであると述べている。仮に128倍以上を陽性とすれば、今回の1,320名における陽性者は2名となり、抗体保有率は0.15%ということになる。しかし、いずれにせよ明らかな抗体陽性者が存在していることは確実である。

現在、上記の抗体陽性者の血清についてPCR法による *Coxiella burnetii* DNAの検出とヒト培養細胞系による菌の分離を試みている。現時点ではPCR用のプライマーの比較検討、培養細胞に対する検体の接種法、および各種培養細胞における本菌の増殖性について検討中である。さらに、今後の計画として、*C. burnetii* を抗原とする血清学的反

応に影響を与える可能性のある諸因子の特定と、それらに対する対応策の検討を予定している。具体的には*C. burnetii*と共通抗原性を有する他の微生物（例えばレジオネラ属、バルトネラ属、クラミジア属の数菌種が考えられる）について*C. burnetii*との交叉反応性の有無と程度を検討するとともに、他の非特異的因子（例えばリウマチ因子、各種の自己抗体、その他の未知因子等）の関与について検討し、その結果をもとにQ熱の血清診断の精度を高めるための方策の確立を目指している。

## E. 結論

わが国にもQ熱の病原体*Coxiella burnetii*が存在し、一般健康人の中にも感染者がいることが確認された。今回の調査では、cut off値を32倍とした場合の一般健康人における抗体保有率は約0.8%で、従来への報告に比して低い結果であった。また、抗体陽性者のほとんどは不顕性感染であると考えられた。一方、Q熱の血清診断においては、レジオネラ属やバルトネラ属との交差反応が存在することに留意する必要がある。

## F. 研究発表

### 1. 発表論文

- 1) 小田 紘：Q熱の血清学的診断法 臨床検査 42 (5), 561-562, 1998.
- 2) Oda, H.: Chlamydial and rickettsial diseases Asian Medical Journal 41 (4), 171-176, 1998.
- 3) 小田 紘：Q熱 臨床医 25 (2), 168-169, 1999.
- 4) 小田 紘：*Coxiella burnetii*感染症（Q熱）. 仁保喜之（編）内科学進歩のトピックス pp. 93-95, 1998.

### 2. 学会発表

- 1) 古屋由美子, 他：ELISAおよびIFによる*Coxiella burnetii*抗体測定. 第46回日本ウイルス学会総会（東京）, 1998