

厚生科学研究費

新興・再興感染症研究事業

ダニ媒介性新興感染症の疫学、発症機序および予防法に関する研究

平成10年度 研究報告書

平成11年3月

主任研究者 高 島 郁 夫
北海道大学大学院獣医学研究科

目 次

1. ダニ媒介性新興感染症の疫学、発症機序および診断法に関する研究 1
主任研究者： 高島郁夫 (北海道大学大学院獣医学研究科)
2. Q熱の疫学的研究 9
分担研究者： 平井克哉 (岐阜大学農学部)
3. ライム病の診断 15
分担研究者： 増澤俊幸 (静岡県立大学薬学部)
4. ダニ脳炎ウイルスの病原性 17
分担研究者： 岩崎琢也 (国立感染症研究所感染病理部)
6. ダニ媒介性脳炎の疫学と予防法に関する研究 21
分担研究者： 荻和宏明 (北海道大学大学院獣医学研究科)
7. つつが虫病の疫学に関する研究 25
分担研究者： 萩原敏且 (国立感染症研究所ウイルス第一部)
8. 林業従事者におけるライム病血清疫学調査 29
分担研究者： 中村和幸 (長野県衛生公害研究所感染)
9. ライム病の組換え抗原の開発 31
分担研究者： 渡辺治男 (国立感染症研究所細菌部)

厚生科学研究費補助金総括研究報告書

ダニ媒介性新興感染症の疫学、発症機序および診断法に関する研究

代表研究者 高島郁夫 北海道大学大学院獣医学研究科 教授

研究要旨 ダニ媒介脳炎についてはウマ、イヌおよび野ネズミの血清を用いた疫学調査を実施したところ、ウイルスの汚染地は道南の4支庁を中心に広範に分布していることを明らかにした。ダニ媒介脳炎の患者発生地区で採集したヤマトマダニ600匹から2株のウイルス分離に成功した。さらに、エゾアカネズミ11匹中1匹とエゾヤチネズミ79匹中1匹からダニ媒介性脳炎ウイルスを分離した。ダニ媒介脳炎ウイルス接種マウスにおいて*in situ hybridization*により脳における増殖部位を特定した。オーストリア産のダニ媒介脳炎ウイルスワクチンはOshima株に有効なことがマウスの実験感染とヒトの中和抗体産生で証明された。

Q熱については、国内外の*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。一方、*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。

ライム病では高比重粒子(HDP)を用いた受身凝集反応に基づくライム病血清診断法(HDPA)を開発し、本法は検出感度、並びに検出精度ともにELISA法と同等であることを明らかとした。

研究分担者		査を実施して汚染状況を明確にする。また
平井克哉	岐阜大学・農学部 教授	病原性に関与する病原体の因子を同定す
増沢俊幸	静岡県立大学・薬学部 助教授	る。さらに効果的なワクチンを開発する。
岩崎琢也	国立感染症研究所・ 感染病理部 室長	B. 研究方法
苅和宏明	北海道大学・ 大学院獣医学科 講師	国内の各地において家畜、野生動物の材
萩原敏且	国立感染症研究所・ ウイルス第一部 室長	料を採取するとともにダニ類を採集した。
中村和幸	長野県衛生公害研究所・ 感染症部 部長	これらにつき血清疫学調査を実施し汚染地
渡辺治雄	国立感染症研究所・ 細菌部 部長	の特定を計り、病原体を分離した。分離し
		た病原体の遺伝子学的、生化学的性
		状を調査し病原因子の同定を計った。
		C. 研究結果
A. 研究目的		ダニ媒介脳炎では、ウマ、イヌおよび野
近年、わが国で問題となっているダニ媒介性の新興感染症であるダニ脳炎、Q熱、ライム病およびつつが虫病について疫学調		ネズミの血清を用いた疫学調査を実施した
		ところウイルスの汚染地は道南の4支庁を
		中心に広範に分布していることを明らかに
		した。ダニ媒介脳炎の患者発生地区で採集
		したヤマトマダニ600匹から2株のウイル

ス分離に成功した。さらに、エゾアカネズミ11匹中1匹とエゾヤチネズミ79匹中1匹からダニ媒介性脳炎ウイルスを分離した。先に犬から分離したダニ媒介脳炎ウイルスのOshima株の病原性をマウスモデルで検討したところ、本ウイルス株はダニ媒介脳炎ウイルスに共通する神経侵襲性を示した。オーストリア産のダニ媒介脳炎ウイルスワクチンはOshima株に有効なことがマウスの実験感染とヒトの中和抗体産生で証明された。

Q熱では国内の *C. burnetii* 分離株は16S rRNAの塩基配列が株間で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。27kDa主要外膜タンパク質をコードする *Com1* 遺伝子の塩基配列は、相同性が極めて高く、PCR用のプライマーとして遺伝子診断に応用できることが明らかになった。一方、*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。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。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。野外にはモルモットに対し病原性の異なるI相菌が存在すること明らかになった。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に応用できることを示した。単クローン抗体 (Mab) を作出し、Mabsによる本菌の型別が可能であること、および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蛋白は感染ないし本菌の増殖に重要な機能を担っていることが示唆された。

ライム病では高比重粒子(HDP)を用いた受身凝集反応に基づくライム病血清診断法(HDPA)の開発を目的として本研究を遂行

し、以下に示す知見を得た。0.5% n-octyl- β -D-thiogluconide による抽出菌体表層画分を感作したHDPを用いて、本法の有用性を日本のライム病が疑われた患者血清を用いて検討し、検出感度、並びに検出精度ともにELISA法と同等であることを明らかとした。本法は梅毒患者血清と交差反応を示すことはなく特異性の高い診断法であること、また、感作粒子は0.1% Na₂S₂O₃存在下、4℃保存で少なくとも3か月間は安定であることを明らかとした。BmpA、及びp83の遺伝子組換え抗原を用いたHDPA法による血清診断の有用性を検討し、界面活性剤による抽出抗原と比較し、検出感度は低下する反面、検出精度は上昇する事を明らかとした。

D. 考察

ダニ媒介脳炎についてウイルス汚染地の特定を計ったところ、道南の4支庁を中心に広範に汚染地の存在することが判明した。このことから、流行地の住民にたいする予防対策の実施が緊急の課題となった。ダニ媒介脳炎ウイルスがヤマトマダニとノネズミから分離されたことから、ウイルスはヤマトマダニとノネズミとの間に感染環を形成し、流行地に定着していることが示された。ヤマトマダニは道南に優勢な種であり、実際渡島支庁管内の患者発生地区で採集したマダニの90%以上が本種であった。極東ロシアではシュルツェマダニが本ウイルスの媒介マダニ種である。シュルツェマダニの優勢な道東、道北地区ではまだウイルス汚染陽性地区を発見していないので、今後の調査が必要と考えている。北海道のダニ媒介ウイルスの病原性はマウスの神経侵襲性を指標に調べたところ、他のダニ媒介脳炎ウイルスに共通の毒力を示した。さらにこのマウス感染実験系を用いてヨーロッパで実用化されているワクチン (中央ヨーロッパ型ウイルス) の効果を調べたところ北海道および極東ロシア流行ウイルス株の有効なことが判明した。今後北

海道の流行地および極東ロシアに旅行する邦人を対象にワクチンによる感染予防が期待される。

Q熱については、国内で分離される *Coxiella burnetii* が16sRNAの遺伝子解析の結果一属一種であることが判明した。しかしCom1遺伝子とLPS構造ならびに患者の病態との関連から病原性のことなる株が存在することが示唆された。またCom1遺伝子を大腸菌に発現させることに成功した。このCom1発現蛋白を精製しELISAに応用したところ、特異性と感度に優れた血清診断法が確立された。

日本分離株 *Borrelia garinii* HP1株菌体からの抽出抗原を用いたHDP法の開発に成功し、本法が感染初期のライム病の診断に有用であることを明らかにした。また、遺伝子組換え抗原を用いたHDP法は検出精度に優れるが、感度の低下が起こることを明らかにした。今後は、2種の遺伝子組換え抗原だけでなく、べん毛、OspCなどその他の診断に重要とされる抗原を組み合わせるなどの改良が必要である。

E. 結論

ダニ媒介脳炎についてはウマ、イヌおよびネズミの血清を用いた疫学調査を実施したところ、ウイルスの汚染地は道南の4支庁を中心に広範に分布していることを明らかにした。ダニ媒介脳炎の患者発生地区で採集したヤマトマダニ600匹から2株のウイルス分離に成功した。さらに、エゾアカネズミ11匹中1匹とエゾヤチネズミ79匹中1匹からダニ媒介性脳炎ウイルスを分離した。オーストリア産のダニ媒介脳炎ウイルスワクチンはOshima株に有効なことがマウスの実験感染とヒトの中和抗体産生で証明された。

Q熱については、国内外の *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。一方、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。

ライム病では高比重粒子(HDP)を用いた受身凝集反応に基づくライム病血清診断法(HDPA)を開発し、本法は検出感度、並びに検出精度ともにELISA法と同等であることを明らかとした。

今後この研究で確立された診断法をダニ媒介感染症のモニタリング事業に応用するとともに本感染症の流行予防に応用する必要がある。

F. 研究発表

1. 発表論文

- 1) Takeda, T., Ito, T., Chiba, M., Takahashi, K., Nioka, T. and Takashima, I. : Isolation of tick-borne encephalitis virus from *Ixodes ovatus* (Acari: Ixodidae) in Japan. J. Med. Entomol. 35: 227-231, 1998
- 2) Takashima, I. : Epidemiology of tick-borne encephalitis in Japan. Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis., 21: 81-90, 1998
- 3) Chiba, N., Iwasaki, T., Mizutani, T., Kariwa, H., Kurata, T., Takashima, I.: Pathogenicity of tick-borne encephalitis virus isolated in Hokkaido, Japan in mouse model. Vaccine 17: 779-787, 1998
- 4) Takeda, T., Ito, T., Osada, M., Takahashi, K. and Takashima, I. : Isolation of tick-borne encephalitis virus from wild rodents and seroepizootiological survey in Hokkaido, Japan. Am. J. Trop. Med. Hyd. 59: (in press), 1999
- 5) Chiba, N., Iwasaki, T., Osada, M., Komoro, K., Mizutani, T., Kariwa, H., Takashima, I. Protection against tick-borne encephalitis virus isolated in Japan by active and passive immunization. Vaccine 18:(in press), 1999
- 6) 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.
- 7) 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.
 - 8) Zhang,G.Q., To, H., Nguyen, Sa V., Ogawa, M., Hotta, A., Yamaguchi, T., Fukushi, H. and Hirai, K.: Clinical evaluation of new polymerase chain reaction assay for detection of *Coxiella burnetii* in human serum samples. J. Clin.Microbiol. 36: 77-80,1998.
 - 9)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.
 - 10) 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.
 - 11) Zhang,G.Q., To, H., Yamaguchi, T., Fukushi, H. and Hirai, K.: Evaluation of a recombinant 27-kDa outer membrane protein of *Coxiella burnetii* as an immunodiagnostic reagent . Microbiol. Immunol., 42: 423-428,1998.
 - 12) Zhang,G.Q., To, H., Yamaguchi, T., Fukushi, H. and Hirai, K.: Direct identification of *Coxiella burnetii* plasmids in human sera by nested polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol., 36 : 2210-2213, 1998.
 - 13) Hirai, K. and To H. : Advances in the understanding of *Coxiella burnetii* infection in Japan J. Vet. Med. Sci., 60: 781-790,1998.
 - 14) 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.
 - 15) 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 seroepidem-iology to *E. muris* during human and animals in Japan、98 th General Meeting of the American Society for Microbiology (1998,5.Atlanta)
 - 16) 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.
 - 17) 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.
 - 18) 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
 - 19) 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. FEMS Microbiol.Lett., 印刷中, 1999.
 - 20) 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.
- 21) Li Muqing et al.: Lyme disease *Borrelia* species in Northeastern China resemble those isolated from far eastern Russia and Japan. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 2705-2709 (1998)
- 22) Kazuhide Kaneda et al.: Infectivity and arthritis induction of *Borrelia japonica* on SCID mice and immune competent mice: Possible role of galactosylceramide binding activity on initiation of infection. *Microbiol. Immunol.*, 42, 171-175 (1998)
- 23) Nobuhiro Takada, et al.: Lyme disease spirochetes in ticks from northeastern China. *J. Parasitol.*, 84, 499-504 (1998)
- 24) 矢島あゆみ 他: 刺し口の周囲にしびれ感を伴ったオーストラリア毒マダニ刺咬症の1例. *皮膚*, 40, 399-402 (1998)
- 25) 矢野泰弘 他: マダニ幼虫の人体多数寄生に関する疫学的考察. *日本ダニ学会誌*, 7, 145-148 (1998)
- 26) 柳原保武 他: ライム病 (ライムボレリア症). *Pharma Medica*, 16, 47-53 (1998)
- 27) 増澤俊幸: ライム病の診断. *感染症と化学療法*. 37-45 (1998)
- 28) Chen, Z., Sahashi, Y., Matsuo, K., Asanuma, H., Takahashi, H., Iwasaki, T., Suzuki, Y., Aizawa, C., Kurata, T., Tamura, S.: Comparison of the ability of viral protein-expressing plasmid DNAs to protect against influenza. *Vaccine* 16: 1544-1549, 1998
- 29) Mitsuishi, T., Sata, T., Iwasaki, T., Matsukura, T., Manaka, I., Nogita, T., Ohara, K., Kawashima, M.: The detection of human papillomavirus 16 DNA in erythroplasia of Queyrat invading the urethra. *Br J Dermatol* 138: 188-203, 1998
- 30) Yoshikawa, T., Suzuki, K., Ihira, M., Furukawa, H., Suga, S., Iwasaki, T., Kurata, T., Asonuma, K., Tanaka, K., Asano, Y.: Human herpesvirus 6 latently infects mononuclear cells but not liver tissue. *J Clin Pathol* 52: 65-67, 1999
- 31) Iwasaki, T., Tamura, S., Kumasaka, T., Sato, Y., Hasegawa, H., Asanuma, H., Aizawa, S., Yanagihara, R., Kurata, T.: Exacerbation of influenzavirus pneumonia by intranasal administration of surfactant in a mouse model. *Arch Virol* (in press)
- 32) Chenn Z., Matsuo, K., Asanuma, H., Takahashi, H., Iwasaki, T., Suzuki, Y., Aizawa, C., Kurata, T., Tamura, S.: Enhanced protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with both hemagglutinin- and neuraminidase-expressing DNAs. *Vaccine* 17: 653-659, 1999
- 33) Kawabata, H., Myouga, F., Inagaki, Y., Murai, N., Watanabe, H.: Genetic and immunological analyses of VIs (VMP-loke sequences) of *Borrelia burgdorferi*. *Microbial Pathogenesis* 24: 155-166, 1998

2. 口頭発表

- 1) 長田美母衣、竹田努、早坂大輔、水谷哲也、苅和宏明、高島郁夫: 北海道におけるダニ脳炎流行巢の分布: 第125回日本獣医学会、栃木 (1998. 4)
- 2) 千葉暢幸、水谷哲也、苅和宏明、高島郁夫: ダニ脳炎ウイルス北海道分離株のマウスに対する病原性: 第126回日本獣医学会、江別 (1998. 8)
- 3) 長田美母衣、早坂大輔、千葉暢幸、水谷哲也、苅和宏明、高島郁夫: 北海道におけるダニ脳炎ウイルスの感染環と流行巢の分布: 第126回日本獣医学会、江別 (1998. 8)

- 4) Murphy, M. E., Kariwa, H., Mizutani, T., Takashima, I.: In vitro activity of ribavirin on hantavirus replication.: 第126回日本獣医学会、江別 (1998. 8)
- 5) Takashima, I., Chiba, N., Iwasaki, T., Osada, M., Hayasaka, D., Mizutani, T., Kariwa, H., Kurata, T. Pathogenicity of tick-borne encephalitis virus Hokkaido strain in mice.: Thirty-Second Joint Working Conference On Viral Diseases, The Japan-United States Cooperative Medical Science Program, Kyoto (1998. 9)
- 6) Kariwa, H., Yoshimatsu, K., Murphy, M. E., Ebihara, H., Ogino, T., Mizutani, T., Arikawa, J., Takashima, T., Kumada, H., Chayama, K.: Detection of hantavirus antibody among patients with hepatitis of unknown etiology in Japan.: Thirty-Second Joint Working Conference On Viral Diseases, The Japan-United States Cooperative Medical Science Program, Kyoto (1998. 9)
- 7) 千葉暢幸、岩崎琢磨、水谷哲也、苅和宏明、倉田毅、高島郁夫: ダニ脳炎ウイルス北海道株マウスに対する病原性: 第46回日本ウイルス学会総会、東京 (1998. 10)
- 8) 苅和宏明、吉松組子、荻野倫子、有川二郎: 肝炎患者におけるハンタウイルス抗体の検出: 第46回日本ウイルス学会総会、東京 (1998. 10)
- 9) Arikawa, J., Morii, M., Yoshimatsu, K., Kariwa, H. and Takashima, I. : Application of truncated recombinant nucleocapsid protein of hantaviruses for serologic differentiation between Hantaan and Seoul virus infection : 4th International Conference on HFRS and Hantavirus, Atlanta, U.S.A. (1998.3)
- 10) 苅和宏明、吉松組子、森井麻祐子、水谷哲也、有川二郎、高島郁夫 肝炎患者血清におけるハンタウイルス抗体の検出 第126回日本獣医学会総会 江別 (1998.8)
- 11) 苅和宏明、吉松組子、森井麻祐子、水谷哲也、有川二郎、高島郁夫、熊田博光、茶山一彰 肝炎患者血清におけるハンタウイルス抗体の検出 第46回日本ウイルス学会学術集会 東京 (1998.10)
- 12) 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)
- 13) 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回リケッチャ研究会総会 (1997.10)
- 14) 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)
- 15) 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)
- 16) 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)
- 17) 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)
- 18) 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)
- 19) 小宮智義、本川賢司、岡田 奨、荒井

- 節夫、齊藤 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）
- 20) 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）
- 21) 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）
- 22) 下宮嗣央 他：ライム病ボレリア日本分離株の p83 および BmpA の遺伝学的解析。第35回レプトスピラシンポジウム（松本）、（1998. 4）
- 23) 増澤俊幸他：シンポジウム 新しい感染症と古くて新しい感染症、分子疫学的アプローチによるライム病ボレリアの世界的分布の解析。第79回日本細菌学会関東支部総会、大井町、（1998. 7）
- 24) 下宮嗣央 他：日本型ライム病ボレリア血清診断法の開発に向けた p83 および BmpA の遺伝学的解析。第44回日本薬学会東海支部総会、静岡（1998, 7）
- 25) 下宮嗣央 他：高比重粒子凝集法によるライム病血清診断法の開発。第36回レプトスピラシンポジウム、東京（1999. 3）
- 26) 熊坂利夫、佐多徹太郎、岩崎琢也、植草俊公、須田耕一、倉田毅：_膠原病肺における KHSV (HHV8) の検出。第87回日本病理学会総会、東京（1998）
- 27) 岩崎琢也、笠原健弘、佐藤由子、佐多徹太郎、倉田毅：_VZV 感染における前初期蛋白 ORF63 産物の発現。第87回日本病理学会総会、東京（1998）
- 28) 永田典代、網康至、吉井久美子、須崎百合子、原島綾子、岩崎琢也、倉田毅：ポリオウイルスレセプター遺伝子導入トランスジェニックマウス PVR-Tg21) とカニクイサルにおけるポリオウイルス病原性の比較。第46回日本ウイルス学会総会、東京（1998,10）
- 29) 荒尾雄二郎、岩崎琢也、山田雅夫、倉田毅：Human herpesvirus 6 variant B (HHV-6B) によるヒト単球系 U937 細胞の増殖抑制は HHV-6B 複製によらず、連鎖反応的に拡大する。第46回日本ウイルス学会総会、東京（1998,10）
- 30) 岩崎琢也、佐藤由子、谷口貴代美、熊坂利夫、田村慎一、倉田毅：インフルエンザウイルス気道感染に及ぼすサーファクタントの影響。第46回日本ウイルス学会総会、東京（1998,10）
- 31) 陳則、松尾和俊、浅沼秀樹、高橋秀宗、岩崎琢也、倉田毅、田村慎一、鈴木雄二郎、相沢主税：インフルエンザウイルスの主要な蛋白質を発現するプラスミド DNA の感染防御能力の比較。第46回日本ウイルス学会総会、東京（1998,10）
- 32) 松尾和俊、陳則、浅沼秀樹、岩崎琢也、倉田毅、田村慎一、鈴木雄二郎、相沢主税：インフルエンザウイルス経鼻感染および経鼻ワクチン接種時のマウス NALT 領域でのサイトカイン mRNA の比較。第46回日本ウイルス学会総会、東京（1998,10）
- 33) 川端寛樹、渡辺治雄：ライム病ボレリア由来 *vIs* 遺伝子のクローニング。第71回日本細菌学会総会、東京（1998, 4）
- 34) 川端寛樹、大谷昌、渡辺治雄：ライム病ボレリア *Vmp* 様遺伝子 (*vIs*) の発現と *VIs* 抗原のエピトープ解析、第35回レプトスピラシンポジウム、松本（1998, 4）
- 35) 川端寛樹、松高望、高橋朋子、渡辺治雄：ライム病ボレリア *vIs* 遺伝子領域の解析、第36回レプトスピラシンポジウム、東京、（1999, 3）

分担研究報告書

ダニ媒介性新興感染症の疫学、発症機序および予防法に関する研究

分担研究者 平井克哉

分担研究課題 Q熱の疫学的研究

研究要旨

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*遺伝子の塩基配列は、相同性が極めて高く、PCR用のプライマーとして遺伝子診断に応用できることが明らかになった。一方、*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。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。5) 野外にはモルモットに対し病原性の異なるI相菌が存在すること明らかになった。6) 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に応用できることを示した。7) 単クローン抗体 (Mab) を作出し、Mabsによる本菌の型別が可能であること、および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蛋白は感染ないし本菌の増殖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

本研究の目的は、ヒトをはじめ家畜およびダニから分離した日本分離*C. burnetii* について、免疫化学的性状および抗原支配遺伝子の解析を行うことである。

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。

B. 研究方法

1. 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12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) 抗原性のあるポリペプチドのアミノ酸配列を解明する。

2. 感染防御抗原の解析やその発現抗原を免疫化学的および分子遺伝学的に同定し、予防と診断の基礎とする。

2. 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

C. 研究結果・考察

1. 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

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 137 kDa 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、非病原性株が存在することを示唆している。

3. 日本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、本研究において、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仔由来 1 株）および国内分離 10 株（ウシ由来 5 株、ダニ由来 3 株、ウシ流産胎仔由来 1 株お

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仔由来 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。

4. 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 30 kDa 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。

5. 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 C19 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。

6. 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) および蛋白質を認識する 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、14 MAbs に反応し 9 MAbs に反応しない 2 群、7 MAbs に反応し 16 MAbs に反応しない 3 群、2 MAbs 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21MAbs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200TCID₅₀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

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*遺伝子の塩基配列は、相同性が極めて高く、PCR用のプライマーとして遺伝子診断に応用できることが明らかになった。一方、*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。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。5) 野外にはモルモットに対し病原性の異なるI相菌が存在すること明らかになった。6) 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に応用できることを示した。7) 単クローン抗体(Mab)を作出し、MAbsによる本菌の型別が可能であること、および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本菌の増殖に重要な機能を担っていることが示唆された。

E. 研究発表

1. 発表論文

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) Zhang, G.Q., To, H., Nguyen, Sa V., Ogawa, M., Hotta, A., Yamaguchi, T., Fukushi, H. and Hirai, K.: Clinical evaluation of new polymerase chain reaction assay for detection of *Coxiella burnetii* in human serum sample. J. Clin. Microbiol. 36: 77-80, 1998.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Zhang, G.Q., To, H., Yamaguchi, T., Fukushi, H. and Hirai, K.: Evaluation of a recombinant 27-kDa outer membrane protein of *Coxiella burnetii* as an immunodiagnostic reagent. Microbiol. Immunol., 42: 423-428, 1998.
- 7) Zhang, G.Q., To, H., Yamaguchi, T., Fukushi, H. and Hirai, K.: Direct identification of *Coxiella burnetii* plasmids in human sera by nested polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol., 36 : 2210-2213, 1998.
- 8) Hirai, K. and To, H.: Advances in the understanding of *Coxiella burnetii* infection in Japan. J. Vet. Med. Sci., 60: 781-790, 1998.
- 9) 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.
- 10) Kawahara, K., Suto, C., Rikihisa, Y., Shibata, S., Ito, T., Fujita, H. and Hirai, 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)
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) Kawahara, K., Suto, C., Rikihisa, Y., Shibata, S., Ito, T., Fujita, H. and Hirai, 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
- 14) 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.

FEMSMicrobiol.Lett., 印刷中、1999.

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

2) 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.

3) 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.

3. 口頭発表

1) 堀田明豊、河村美登里、ToHo、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)

2) 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)

3) 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)

4) 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)

5) 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)

6) 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)

7) 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)

8) 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)

9) 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)

10) 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)

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症）
分担研究報告書

ライム病の診断

分担研究者 増澤俊幸 静岡県立大学・薬学部・助教授

研究要旨

高比重粒子(HDP)を用いた受身凝集反応に基づくライム病血清診断法(HDPA)の開発を目的として本研究を遂行し、以下に示す知見を得た。0.5% n-octyl- β -D-thioglycoside による抽出菌体表層画分を感作したHDPを用いて、本法の有用性を日本のライム病が疑われた患者血清を用いて検討し、検出感度、並びに検出精度ともにELISA法と同等であることを明らかとした。本法は梅毒患者血清と交差反応を示すことはなく特異性の高い診断法であること、また、感作粒子は0.1% NaN₃存在下、4℃保存で少なくとも3カ月間は安定であることを明らかとした。BmpA、及びp83の遺伝子組換え抗原を用いたHDPA法による血清診断の有用性を検討し、界面活性剤による抽出抗原と比較し、検出感度は低下する反面、検出精度は上昇する事を明らかとした。

A. 研究目的

ライム病はマダニ媒介性スピロヘータである*Borrelia burgdorferi sensu lato*に起因する新興感染症の一つである。本症は極めて多様な病態を示すため、臨床所見のみによる診断は困難であり、確定診断には血清診断結果が重要な意味を持つこととなる。現在、ライム病の血清診断法には、ELISA法やイムノブロットング法が用いられているが、操作が煩雑であり、また迅速性に欠けることから日本では広く普及していない。本年4月から施行される新感染症予防治法では、ライム病は第4類感染症に指定され患者発生の報告が義務付けられることから、地方レベルでも統一した診断が実施されなければならない。そこで、本研究ではこれまでの診断法の問題点を解消した、受身凝集反応に基づく高比重粒子凝集

(HDPA)法による血清診断法の開発を行った。更に、HDPA法のボレリア抗体に対する特異性、すなわち検出精度の向上を図る目的で、ライム病の診断抗原として重要とされる39kDaボレリア膜蛋白質A

(*Borrelia* membrane protein A, BmpA)、

及び83kDa蛋白質(p83)の遺伝子組換え体を抗原とするHDPA法の有用性を評価した。

B. 研究方法

日本分離株*Borrelia garinii* HP1株菌体から0.5% n-octyl- β -D-thioglycosideで抽出した菌体表層画分を抗原としたHDPA法による血清診断法の確立を行った。粒子を抽出抗原で2時間感作し、ブロッキング処理した。感作粒子と被検血清を混和させ、40分間反応させた後、凝集の有無で判定を行った。

BmpA, P83の遺伝子にアニーリングする配列の5'側にBamH I、またはSma Iの制限酵素切断部位を含むアダプターを付加した特異的プライマーを用いてPCRを行い、得られた増幅遺伝子をベクタープラスミドpQE-30のマルチクローニングサイトに連結し、大腸菌JM109に導入した。スクリーニングを行い、特異的組換え産物を産生する大腸菌より、目的産物をニッケルカラムを用いて精製した。精製蛋白質をHDPに感作し、その診断特異性、感度を評価した。

C. 研究結果

全菌体抽出抗原を用いたHDP法法の検出感度、精度はともにELISA法と同等であった。また、本法は梅毒患者血清と交差反応を示さず、更にIgM抗体に対して優れた検出能力を示し、ライム病の初期診断に有用であることを明らかとした。感作粒子は0.1% NaN₃存在下、4℃保存で少なくとも3カ月間は保存できることから、本法を広く普及するにあたり十分な安定性を有する事を明らかとした。また、遺伝子組換えBmpA、及びp83を抗原とするHDP法法による血清診断の有用性を検討し、抽出全菌体抗原と比較し、検出感度は低下する反面、検出精度は上昇する事を明らかとした。

D. 考察

今回、日本分離株*Borrelia garinii* HP1株菌体からの抽出抗原を用いたHDP法法の開発に成功し、本法が感染初期のライム病の診断に有用であることを明らかにした。また、遺伝子組換え抗原を用いたHDP法法は検出精度に優れるが、感度の低下が起こることを明らかにした。今後は、2種の遺伝子組換え抗原だけでなく、べん毛、OspCなどその他の診断に重要とされる抗原を組み合わせるなどの改良が必要である。

E. 結論

HDP法法に基づくライム病血清診断法の確立に、世界で初めて成功した。感作抗原として遺伝子組換え抗原蛋白質を用いることで、抗原の安定供給と診断精度の改善が可能となることを示した。この研究成果は、日本で広く普及可能なライム病の血清診断法を開発する上で重要な知見を提供し、また日本におけるライム病の早期診断、早期治療、ひいては本症の実態解明に大きく寄与するものと考えられる。

F. 研究発表

1. 発表論文

- 1) Li Muqing et al.: Lyme disease *Borrelia* species in Northeastern China resemble those isolated from far eastern Russia and Japan. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 2705-2709 (1998)
- 2) Kazuhide Kaneda et al.: Infectivity and arthritis induction of *Borrelia japonica* on SCID mice and immune competent mice: Possible role of galactosylceramide binding activity on initiation of infection. *Microbiol. Immunol.*, 42, 171-175 (1998)
- 3) Nobuhiro Takada, et al.: Lyme disease spirochetes in ticks from northeastern China. *J. Parasitol.*, 84, 499-504 (1998)
- 4) 矢島あゆみ 他: 刺し口の周囲にしびれ感を伴ったオーストラリア毒マダニ刺咬症の1例. *皮膚*, 40, 399-402 (1998)
- 5) 矢野泰弘 他: マダニ幼虫の人体多数寄生に関する疫学的考察. *日本ダニ学会誌*, 7, 145-148 (1998)
- 6) 柳原保武他: ライム病 (ライムボレリア症). *Pharma Medica*, 16, 47-53 (1998)
- 7) 増澤俊幸: ライム病の診断. *感染症と化学療法*. 37-45 (1998)

2. 学会発表

- 1) 下宮嗣央 他: ライム病ボレリア日本分離株のp83およびBmpAの遺伝学的解析. 第35回レプトスピラシンポジウム, 松本, (1998, 4)
- 2) 増澤俊幸 他: シンポジウム 新しい感染症と古くて新しい感染症、分子疫学的アプローチによるライム病ボレリアの世界的分布の解析. 第79回日本細菌学会関東支部総会, 大井町 (1998, 7)
- 3) 下宮嗣央 他: 日本型ライム病ボレリア血清診断法の開発に向けたp83およびBmpAの遺伝学的解析. 第44回日本薬学会東海支部総会, 静岡, (1998, 7)
- 4) 下宮嗣央 他: 高比重粒子凝集法によるライム病血清診断法の開発. 第36回レプトスピラシンポジウム, 東京 (1999, 3)

ダニ媒介性新興感染症の疫学、発症機序および予防法に関する研究

(代表研究者：高島郁夫)

ダニ脳炎ウイルスの病原性

分担研究者	岩崎琢也	国立感染症研究所感染病理部室長
研究協力者	倉田 毅	国立感染症研究所感染病理部部长
	佐藤由子	国立感染症研究所感染病理部
	高島郁夫	北海道大学獣医学部公衆衛生学教授

研究要旨 中枢神経系に感染するダニ媒介性の flavivirus 脳炎の発症病理は十分に解明されていない。本年度は昨年度に引き続き高島らが作製したダニ媒介性脳炎ウイルスのマウス感染実験モデルについて病理学的変化の解析した。マウスにダニ媒介性脳炎ウイルスの Sofjin 株ならびに U-5-10 株を皮下接種し、脳ならびに脊髄の組織学的変化について経時的に検討した。さらに、ウイルスゲノムを一部 RT-PCR 法により増幅し、目的のサイズの増幅産物を確認後、PCR の反応液中に digoxigenin-11-dUTP を加え、digoxigenin で標識した DNA プロンプを作製し、*in situ* hybridization を行った。その結果、Sofjin 株を感染させた9日目の脳の主として視床に、さらに海馬、脳幹、小脳の一部に陽性細胞を検出することができた。なお、日本脳炎ウイルス感染マウス脳は陰性であった。

A. 研究目的

人体に感染するフラビウイルスのうち、本邦で問題となるのは蚊により媒介される日本脳炎ウイルスが代表的であり、東南アジアにみられるデング熱あるいはアフリカを中心とする黄熱病ウイルスが時に問題とされてきた。近年、ダニが媒介するフラビウイルスによる脳炎が中央ヨーロッパならびに極東ロシアで発見され、本邦でもその罹患症例が高島ら(1997)により発見され、臨床診断ならびにウイルス病理学的診断、さらには予防と治療が問題となっている。本研究ではマウス皮下組織にダニ媒介脳炎ウイルスの接種実験を行い、経時的に神経病変を追跡し、本ウイルス感染による病理学的変化ならびにマウスを用いた感染実験モデルの病理学的基盤確立を目的とした。

B. 材料と方法

ウイルス：Tick-borne encephalitis-far eastern subtype の Sofjin ならびに U-5-10 株を用いた。また、日本脳炎ウイルス Jagar01 株も比較のため用いた。

マウス：ICR マウスを用いた。

マウス感染実験：高島らが作製したマウスの実験系の中枢神経病変をウイルス病理学的に解析した。マウスの腋下部皮下に 10^4 FFU のウイルスを接種し、経時的に脳・脊髄を摘出した。発症時に脳・脊髄を摘出した。比較のため、日本脳炎ウイルス Jagar01 10^2 FFU を脳内接種し、発症時の脳・脊髄を解析した。

摘出した脳・脊髄は直ちに4%フォルムアルデヒド PBS 溶液中で固定し、パラフィン包埋を行った。一部のマウスは深麻酔下で開胸し、右心耳を開放後、左心室から PBS 10 ml ついで、4%フォルムアルデヒド PBS 溶液 10 ml 脊髄は脊椎とともに固定し、EDTA を用いて脱灰後包埋した。厚さ $3\mu\text{m}$ の薄切切片を作製し、Hematoxylin-Eosin (HE) 染色ならびに *in situ* ハイブリダイゼーションによる解析を行った。

in situ ハイブリダイゼーションに使用するプロンプは以下のように準備した。P3 実験室において U-5-10 株を生後1日の suckling マウス(ICR)の脳に直接接種し、感染後深麻酔下で脳を取り出し、凍結保存した。凍結脳をグアニジウムチオサイアネートとフェノー

ル溶液中でホモゲナイズし、クロロフォルムを加え、13000回転で5分間遠心し、上清をフェノール処理で除蛋白後にイソプロパノールを加え、RNAを沈殿させ、75%エタノールで洗浄後、水に溶解し、RNA量をスペクトロフォトメーターを用いて定量した。random hexanucleotide primerを用いて逆転写反応を行い、1本鎖 complementary DNA(ss cDNA)を合成した。ss cDNAを鋳型としてPCRを行った。使用したプライマーはNS1領域をターゲットとし、GC%が50%となるようにオリゴヌクレオチドプライマーを設計した。このプライマーを用いて94度30秒、56度1分、72度2分を1サイクルとし、40サイクルのPCRを行い、予想サイズの増幅産物(1.2 kilo base pairs)を得た。

この増幅産物を1%アガロースゲルにて電気泳動し、長波長の紫外線下でゲルより切り出し、ゲルから増幅産物を抽出し、定量した。この精製増幅産物10 ngを鋳型とし、同じプライマーを使用して、PCR反応液中にdigoxigenin-11-dUTPを加えて同じ条件でPCRを行った。アガロースゲル電気泳動を行い、1.2 kbpの予想サイズの増幅産物を確認後、PCR purification kit (Quiagen)を用いて未標識digoxigenin-11-dUTPを除去し、短波長の紫外線下でnickを加え、プローブとした。

パラフィン切片を脱パラフィン後、親水化し、Proteinase K 10 ng/ml中で37度20分間処理を行い、洗浄後、4%パラフォルムアルデハイド/PBS溶液にて再固定、0.2%グリシン/0.1M Tris (pH8.0)にてブロッキングを行った。その後、脱水乾燥し、それぞれの解析を行った。ハイブリダイゼーションはフォルムアミドとSSCを含む液にてプレハイブリダイゼーションし、プローブを含むハイブリダイゼーション溶液と42度16時間反応し、その後Tm-20度の条件にて洗浄し、ついで、alkaline phosphatase-anti-digoxigenin抗体と反応させ、NBT/BCIP液中で発色し、メチルグリーンで核染色を行った。

C. 結果

組織学的変化：昨年度報告したようにU-5-10株を皮下接種した群では接種後9日目より症状が出現したが、神経病理学的変化は解析を始めた5日目より生じた。脳実質の変化は接種後9日目より検出され、血管周囲に炎症性細胞が浸潤 vascular cuffing が散見され、さらに11日目になると海綿状変化が巣状に見出された。これらの脳実質の変化は主

として、視床ならびに小脳に認められた(図1)。

Sofjin株を接種した群では接種後5日目より症状が出現し、神経病理学的変化はクモ膜下の炎症性細胞浸潤はU-5-10株よりも軽度であるのに対し、9日目では脳実質とくに視床の壊死性変化が生じた。

Sofjin株とU-5-10株を接種したマウスの視床の神経細胞の比較では前者においては細胞が小さくなり、核が好酸性となった神経細胞が多数みとめられ(図2)、後者ではこのような細胞は少数であった。

ウイルスゲノムの検出：PCR法を利用して作製したdigoxigenin標識プローブを用いたin situハイブリダイゼーション法によりSofjin株感染マウスの脳を検索したところ感染9日の視床の神経細胞の細胞質が強陽性となった(図3,4)。シグナルは海馬、脳幹部、さらに小脳のPurkinje細胞の細胞質にも認められた。同時に行った日本脳炎ウイルス接種マウス脳は陰性であり、U-5-10株を接種したマウス脳も陰性であった。

D. 考察

同じflavivirusの日本脳炎ウイルスの神経系の感染については以下のことが明らかにされてきている。日本脳炎ウイルスの標的部位は人体例の検索では視床部と脳幹である(Johnson RT et al. Japanese encephalitis: immunohistochemical studies of viral antigen and inflammatory cells in fatal case. *Ann Neurol* 1985; 18: 567-573、倉田 毅、日本脳炎、病理。青山友三ら編：ウイルス感染症の臨床と病理。医学書院1991)。神経細胞が選択的に侵され、神経膠細胞、脈絡叢、血管、髄膜にはウイルス抗原は認められない。日本脳炎のマウス実験モデルはHuangとWongにより発表されており(Relation of the peripheral multiplication of Japanese B encephalitis virus to the pathogenesis of the infection in mice. *Acta Virol (Praha)* 1963; 7: 322-330)、急性期の肉眼的変化は鬱血、浮腫、小出血で、組織学的には神経細胞変性、グリア結節、血管周囲の細胞浸潤が認められている。これらの変化は間脳、中脳、脳幹部の灰白質で、小脳のPurkinje細胞の破壊が特徴的である。

今回のin situハイブリダイゼーションによる解析で、Sofjin株が視床、海馬、脳幹部、さらには小脳のPurkinje細胞に選択的に感染することが明らかにされた。これらの感染病

巢は日本脳炎ウイルス感染と非常に類似しており、ウイルス感受性細胞が媒介動物は異なる flavivirus に共通する可能性と、ウイルスレセプターの共通性も示唆される。

E. 結論

マウスにダニ媒介性脳炎ウイルスの Sofjin 株ならびに U-5-10 株を皮下接種し、ウイルス感染細胞の局在を明らかにするための in situ ハイブリダイゼーションの解析を行い、Sofjin 感染マウスに感染細胞を検出することに成功した。今後、脳炎発症の経時的解析ならびに Sofjin 株と U-5-10 株との相違の解析を行う予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Chen Z, Sahashi Y, Matsuo K, Asanuma H, Takahashi H, Iwasaki T, Suzuki Y, Aizawa C, Kurata T, Tamura S: Comparison of the ability of viral protein-expressing plasmid DNAs to protect against influenza. *Vaccine* 16: 1544-1549, 1998

Mitsuishi T, Sata T, Iwasaki T, Matsukura T, Manaka I, Nogita T, Ohara K, Kawashima M: The detection of human papillomavirus 16 DNA in erythroplasia of Queyrat invading the urethra. *Br J Dermatol* 138: 188-203, 1998

Yoshikawa T, Suzuki K, Ihira M, Furukawa H, Suga S, Iwasaki T, Kurata T, Asanuma K, Tanaka K, Asano Y: Human herpesvirus 6 latently infects mononuclear cells but not liver tissue. *J Clin Pathol* 52: 65-67, 1999

Iwasaki T, Tamura S, Kumasaka T, Sato Y, Hasegawa H, Asanuma H, Aizawa S, Yanagihara R, Kurata T: Exacerbation of influenza virus pneumonia by intranasal administration of surfactant in a mouse model. *Arch Virol* (in press)

Chiba N, Iwasaki T, Mizutani T, Kariwa H, Kurata T, Takashima I: Pathogenicity of tick-borne encephalitis isolated in Hokkaido, Japan in mouse model. *Vaccine* (in press)

Chen Z, Matsuo K, Asanuma H, Takahashi H, Iwasaki T, Suzuki Y, Aizawa C, Kurata T, Tamura S: Enhanced protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with both hemagglutinin- and neuraminidase-expressing DNAs. *Vaccine* 17: 653-659, 1999

2. 学会発表

熊坂利夫、佐多徹太郎、岩崎琢也、植草俊公、須田耕一、倉田毅: 膠原病肺における KHSV (HHV8) の検出。第 87 回日本病理学会総会 1998, 4, 東京

岩崎琢也、笠原健弘、佐藤由子、佐多徹太郎、倉田毅: VZV 感染における前初期蛋白 ORF63 産物の発現。第 87 回日本病理学会総会 1998, 4, 東京

千葉暢行、岩崎琢也、水谷哲也、刈和宏明、倉田毅、高島郁夫: ダニ脳炎ウイルス北海道分離株のマウスに対する病原性。第 46 回日本ウイルス学会総会 1998, 10, 東京

永田典代、網康至、吉井久美子、須崎百合子、原島綾子、岩崎琢也、倉田毅: ポリオウイルスレセプター遺伝子導入トランスジェニックマウス (PVR-Tg21) とカニクイサルにおけるポリオウイルス病原性の比較。第 46 回日本ウイルス学会総会 1998, 10, 東京

荒尾雄二郎、岩崎琢也、山田雅夫、倉田毅: Human herpesvirus 6 variant B (HHV-6B) によるヒト単球系 U937 細胞の増殖抑制は HHV-6B 複製によらず、連鎖反応的に拡大する。第 46 回日本ウイルス学会総会 1998, 10, 東京

岩崎琢也、佐藤由子、谷口貴代美、熊坂利夫、田村慎一、倉田毅: インフルエンザウイルス気道感染に及ぼすサーファクタントの影響。第 46 回日本ウイルス学会総会 1998, 10, 東京

陳則、松尾和俊、浅沼秀樹、高橋秀宗、岩崎琢也、倉田毅、田村慎一、鈴木雄二郎、相沢主税: インフルエンザウイルスの主要な蛋白質を発現するプラスミド DNA の感染防御能力の比較。第 46 回日本ウイルス学会総会 1998, 10, 東京

松尾和俊、陳則、浅沼秀樹、岩崎琢也、倉田毅、田村慎一、鈴木雄二郎、相沢主税: インフルエン