

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 1998,10, 東京

図の説明

図1 皮下接種後のマウス脳。U-5-10 (a-d)なら
 びに Sofjin (e-g)、コントロール (h)。a-d
 はそれぞれ接種後 5, 7, 9, 11 日、e-g は
 それぞれ接種後 5, 7, 9 日。ヘマトキシ

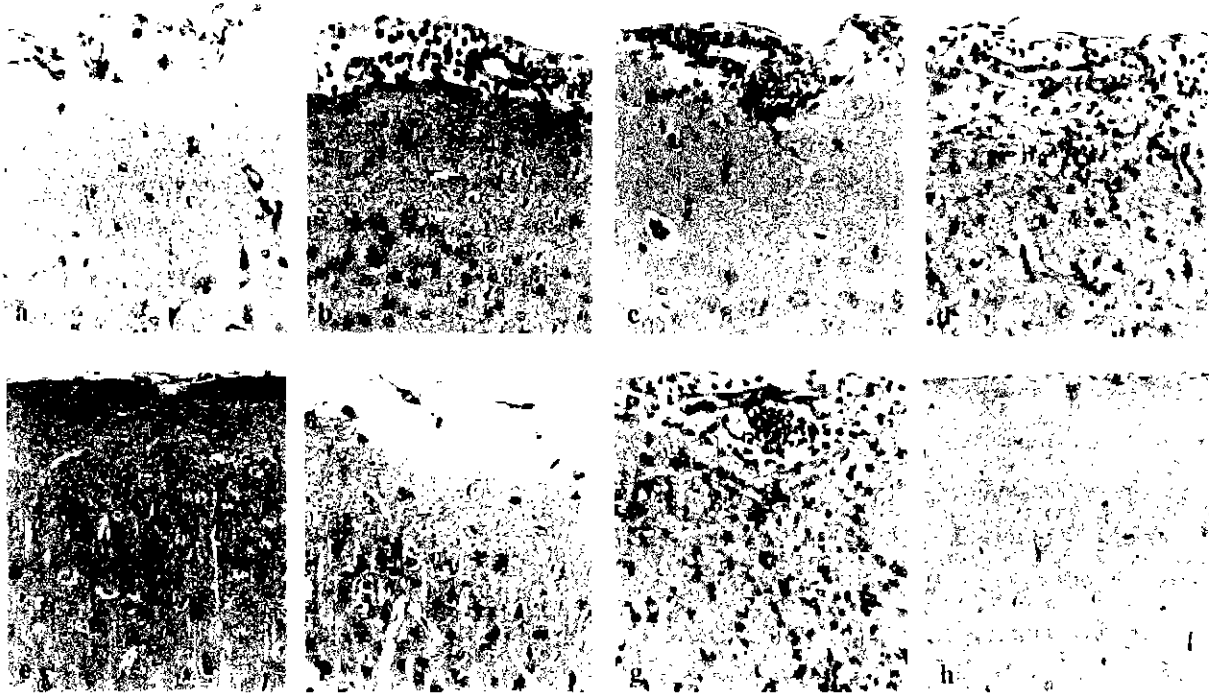


図1

リンエオシン染色。

図2 Sofjin 株接種マウスの視床。接種後9日。
 ヘマトキシリンエオシン染色。

図3 Sofjin 株接種マウスの視床。接種後9日。
 in situ ハイブリダイゼーション。

図4 Sofjin 株接種マウスの視床。接種後9日。
 in situ ハイブリダイゼーション。

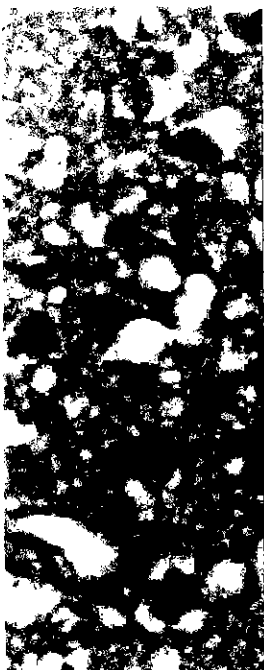


図2

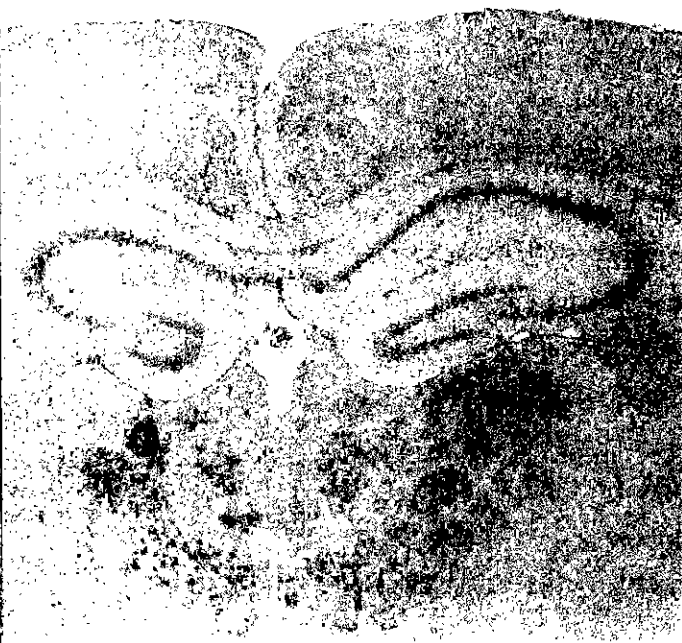


図3



図4

分担括研究報告書

ダニ媒介性脳炎の疫学と予防法に関する研究

分担研究者 荻和宏明 北海道大学大学院獣医学研究科 講師

研究要旨 ダニ媒介脳炎につき、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。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。

A. 研究目的

近年、北海道で新たに発見され問題となっているダニ媒介脳炎の血清疫学調査を実施して汚染地域を明確にする。また分離ウイルスの病原性をマウスを用いた感染実験で明らかにする。さらにヨーロッパで実用化されているワクチンのダニ媒介脳炎ウイルス北海道株に対する効果を判定する。

B. 研究方法

道内の各地において家畜、野生動物の材料を採取するとともにダニ類を採集した。これらにつき血清疫学調査を実施し汚染地の特定を計った。ノネズミとダニ類をウイルス分離に供した。分離ウイルスの病原性をマウスの感染実験で判定した。ヨーロッパ産のワクチンにつき、マウスの実験感染系と人の中和抗体産生性で効果を判定した。

C. 研究結果

ダニ媒介脳炎では、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。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。

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。

E. 結論

ダニ媒介脳炎についてはウマ、イヌおよびノ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。

今後、本ワクチンを道内の流行地の住民および極東ロシアへ旅行する邦人を対象に適応し本感染症の予防に努めなければならない。

F. 研究発表

1. 発表論文

- 1) Takeda, T., Ito, T., Chiba, M., Takahashi, K., Niioka, 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

2. 口頭発表

- 1) 長田美母衣、竹田努、早坂大輔、水谷哲也、荻和宏明、高島郁夫: 北海道におけるダニ脳炎流行巣の分布: 第125回日本獣医学会、栃木 (1998. 4)
- 2) 千葉暢幸、水谷哲也、荻和宏明、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、荻和宏明、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巣の分布: 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 Hokkiado 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、荻和宏明、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) 荻和宏明、吉松組子、萩野倫子、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) 荻和宏明、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
- 11) 荻和宏明、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

ダニ媒介性新興・再興感染症の疫学、発症機序および予防法に関する研究
つつが虫病の疫学に関する研究

分担研究者 萩原敏且 国立感染症研究所ウイルス第一部

研究要旨

1997年に国立感染症研究所に報告されたつつが虫患者480名について患者年齢、性別、発生時期、感染推定場所および感染時の作業内容について解析した。患者は1996年(400名)に比べ増加したが、患者発生には例年どおり性別による差はなく、また、年齢も60歳以上が大半を占めていた。また、発生時期には5月を小さなピーク、11月を大きなピークとする2峰性のパターンがあり、5月のピークは東北、北陸であり、11月のピークは関東以西の患者発生であった。感染場所および作業内容は例年のように山地あるいは農地での作業が最も多いことがわかった。また、神奈川および宮崎県の調査では感染つつが虫病リケッチアの主要な型はKawasakiであることが明らかにされた。また、福島県におけるつつが虫病媒介ダニの調査で本来生息していないとされていた地域でタテツツガムシの存在が証明されたが、リケッチア分離はできなかった。紅斑熱については1995年から1997年までに報告された54名について解析した。患者の約6割は50歳以上で、患者総数には性差はなかった。感染推定場所および感染時の作業内容はつつが虫病と同様であった。臨床所見ではダニの刺し口が不明なものが40%近くあること、リンパ節の腫脹は25%程度にとどまるなど、つつが虫病とは異なっていた。

A. 研究目的

つつが虫病はリケッチアによる感染症で、古くは特定の地域で発生しアカツツガムシ (*Leptotrombium akamushi*) によって媒介されていたが(古典型つつが虫病-classical type of tsutsugamushi disease)、近年のつつが虫病は、全国的に拡がっておりタテツツガムシ (*L. scutellum*) およびフトゲツツガムシ (*L. pallidum*) によって媒介されている(新型つつが虫病-New type of tsutsugamushi disease)。古典型つつが虫病的減少により患者数一時少なくなっていたが、1980年頃より急増し1990

年に入っても年間数百名の患者発生が続いている。また、死者も毎年数名報告されるなど再興感染症として注目されている。国立感染症研究所では地方衛生研究所の協力により1991年から患者の実態調査を行っているが、開始年から1996年までのつつが虫病患者発生状況については昨年度報告した。今年度は1997年のつつが虫病的発生状況について全国での実態、さらに神奈川、千葉、宮崎の3県については1998年の実態についても併せて解析した。また、福島県の患者が多発している地域では従来フトゲツツガムシによる感染(リケッチアはKarp型)が多く見られていたが、1997年11月に阿武隈

川河川敷でタテツツガムシによる感染と思われるつつが虫病患者(Kawasaki型)が発生したことから、タテツツガムシ生息地の調査とともに、ダニのリケッチア汚染状況について調査した。さらに、最近注目されている日本紅斑熱(以下紅斑熱)についても、1995年から患者情報の収集を開始したので1995年以降の発生状況について解析した。

B. 研究方法

1997年(紅斑熱は1995-1997年)に全国地方衛生研究所(地研)より感染症研究所に収集されたつつが虫病・紅斑熱様患者情報(個票)による解析と、神奈川県、千葉、宮崎県については1998年に県衛生研究所が血清検査依頼を受けた患者の資料をもとに感染実態ならびに流行しているつつが虫病リケッチアの型について解析した。また、福島県でのダニ汚染実態調査では、見取り法(10mの線状調査区当たり25x25cmの黒布10枚を等間隔で配置し、地表に押し付けて付着したツツガムシを採取する)によりダニを採取し、リケッチア検出には培養細胞(L929)を用いた。

C. 研究結果

1. つつが虫病

1997年に報告されたつつが虫病様患者590例のうち480例が血清抗体測定(429)臨床診断(50)および遺伝子検出(1)によりつつが虫と診断されていた。1993年以降つつが虫病患者発生は減少傾向にあり、1996年は確定例は400であったが、1997年は増加した。地域別にみると福島、長崎、大分、宮崎、鹿児島での増加が目立った。確定患者について年齢・性別、感染時期、感染推定場所および感染時の作業内容をみた。患

者発生数は男女ともほぼ同数(250、230)であるが、年齢層別にみると高年齢の患者が多く、男性では60~69歳が29%、次いで70歳以上(24%)であった。また、女性では70歳以上が34%、次いで60~69歳(30%)であった。患者発生数を地域別・季節別に見ると、東北、北陸では春が高く晩秋が低いピークとなるが、関東以西では晩秋に集中している。感染推定場所および感染時の作業内容をみると、無記載が全体のおよそ15%を占めているものの、記載例では山地が53%と最も多く、次いで平地(24%)となっている。また、作業内容では農作業が34%と最も多いが、山菜・山芋などの採取時(13%)やレジャー(7%)で感染する機会もある。

1998年のつつが虫病患者発生数は、神奈川で14例(血清診断13、遺伝子診断1)報告された。1995年以降あまり変動していないが、感染推定場所は拡がる傾向にあった。また、前述の血清診断による確定例6を含め、抗体陽性14、陰性6、未測定1の内、遺伝子抽出用の血餅が得られなかった3例を除く18例についてPCRを行ったところ、抗体陽性または未測定12例中1例を除いてすべて陽性、血清抗体陰性例はすべて陰性であった。つつが虫病リケッチアの型は、抗体測定法では1例を除いて判定可能であった。また、PCRでは抗体測定での判定不能を含めすべて型別され、抗体測定法による結果と一致(判定不能を除く)していた。この結果、1998年のつつが虫病患者の感染リケッチアはKawasaki型が8例、Kuruki型が3例で、昨年同様Kawasaki型が優位であった。千葉では42例の患者が血清診断で確認された。患者発生数は前年の79例に比べて減少している。患者発生時期は11月と12月の2カ月に集中しており、前年に比して短期間であった。また、感染推定場所は例年のように南房総地域であるが、市内で土地計測中に感染したと考えられる例

が1例あった。患者発生数に性別による差はなく、年齢は50歳以上が大多数であった。宮崎での患者発生は81名と前年(58名)に比べ約4割増加したが(臨床診断のみは除く)、なかでも特定地域での増加が目立った。発生のピークは11月で、次いで12月に多い。また、県内のつつが虫病リケッチアの型はKawasakiとKurokiであるが、多くはKawasakik型であった。患者が減少した1994年から1996年はKawasaki型の大幅な減少があったが、増加に転じた1997年はKawasaki型、1998年はKuroki型の増加が目立った。

媒介ダニの調査を行った福島県内阿武隈川流域で、タテツツガムシは郡山市西田町を北限として南部地区に広く分布することがわかった。また、ダニの生息密度は地域により差があり、局所的なクラスターを形成していると思われた。しかし、ダニからのリケッチア分離はできなかった。

2. 紅斑熱

1995年から1997年までに54例が報告された。年次別にみると1995年16、1996年14、1997年24である。地域別では千葉、兵庫(淡路島)、島根、高知、徳島、宮崎および鹿児島各県でいずれもつつが虫病患者の少ない4~10月に発生している。患者の約6割は50歳以上で、患者総数には性差はないが(26、28)、60歳以上では女性が多い。感染推定場所は山地が最も多く(50%)、感染時の作業は農作業が最も多いなど(37%)、つつが虫病の感染とほぼ同様であった。臨床所見ではダニの刺し口が不明なものが40%近く見られた。また、リンパ節の腫脹は25%程度にとどまるなど、つつが虫病とは異なっていた。1998年の紅斑熱患者は千葉および宮崎の両県でそれぞれ3例、2例が確認されている。千葉の1例は野原の倉庫で感染したと推定された。

D. 考察

感染症研究所では平成元年からつつが虫病様患者情報をまた平成8年から紅斑熱患者情報を集めている。つつが虫病は届出伝染病であるが、報告される患者情報は患者診断された自治体から報告されるため、感染場所とかならずしも一致しないこと、患者の臨床症状などが不明である。さらに紅斑熱は届出伝染病になっていないため、感染の実態が不明である。そこで、感染症研究所は地方衛生研究所の協力により患者情報の収集を行っている。つつが虫病患者発生は1993年以降は減少傾向にあり1996年の患者数は400名であったが1997年は480名と増加した。地域別にみると福島、長崎、大分、宮崎、鹿児島での増加が目立った。この増加の要因は不明であるが、宮崎県では患者増減の原因として感染リケッチアの型の変動をあげていることから、この現象が全国的なものかどうか感染リケッチアの型別調査が望まれる。一方、東北地方南部(山形、宮城、福島)ではつつが虫病の媒介としてダニとしてフトゲツツガムシが主体で、暖地でのつつが虫病媒介ダニであるタテツツガムシは宮城県でのみ問題とされていた。しかし、1997年11月に阿武隈川河川敷でタテツツガムシ媒介による感染(Kawasaki型)と思われる患者が発生したことから、阿武隈川流域のタテツツガムシ生息地の調査とともに、ダニにおけるリケッチア汚染状況について調査したところ、県南部の阿武隈川流域でタテツツガムシの生息が確認された。今回の調査ではリケッチアは分離できなかったが、今後の調査が必要とされた。

紅斑熱患者は1984年に徳島および高知ではじめて報告されたが、その後、宮崎、島根、千葉からも報告されるようになった。年間の患者発生数は10名前後であり、調査が開始される1994年までの報告数は142名であった。調査が開始された1995年から19

97年までに54例が報告された。年次別にみると1995年16、1996年14、1997年24でやや増加傾向にある。地域別では千葉、兵庫（淡路島）、島根、高知、徳島、宮崎および鹿児島各県でいずれもつつが虫病患者の少ない4～10月に発生している。感染推定場所は山地が最も多く（50%）、感染時の作業は農作業が最も多いなど（37%）、つつが虫病の感染とほぼ同様であるが、臨床所見ではダニの刺し口が不明なものが多く、リンパ節の腫脹は25%程度にとどまるなど、つつが虫病とは異なっていた。つつが虫発生数の少ない夏の時期のつつが虫病様患者については紅斑熱を疑う必要があると思われた。また、紅斑熱もつつが虫病と同様に町中で感染することがあることがわかったが、どういう経路で運ばれて来たのかは不明である。

E. 結論

1997年に国立感染症研究所に報告されたつつが虫患者480例について感染時期、感染推定場所および感染時の作業内容について調査した。患者発生は例年と同様に春と晩秋にピークがある季節的消長が見られた。感染場所および作業内容として山地あるいは農地での作業が主体であるが、レジャーや山芋採取などのために山に入り感染する例も多い。神奈川、千葉および宮崎の3県では1998年に総計137の患者があったが、千葉では前年に比べて減少、宮崎では増加傾向があった。神奈川および宮崎では感染リケッチアの型を調査しているが、いずれも主要な型はKawasakiであった。紅斑熱は1995年から1997年までに54例が報告された。千葉、兵庫（淡路島）、島根、高知、徳島、宮崎および鹿児島各県でいずれもつつが虫病患者の少ない4～10月に発生している。感染推定場所は山地が最も多く（50%）、感

染時の作業は農作業が最も多いなど（37%）、つつが虫病の感染とほぼ同様であるが、臨床所見ではダニの刺し口が不明なものが多く、リンパ節の腫脹は25%程度にとどまるなど、つつが虫病とは異なっていた。

協力研究者

藤田博己 大原総合病院附属大原研究所
小川知子 千葉県衛生研究所
吉田芳哉 神奈川県衛生研究所
山本正悟 宮崎県衛生研究所

F. 研究発表

1. 論文発表

古谷由美子、片山 丘、原 みゆき、吉田芳哉、海保郁男、川村明義：抗体の上昇が認められず、PCRにより確定診断されたつつが虫病患者、感染症学雑誌、71;474-476.1997.

2. 学会発表

萩原敏且、吉田芳哉、海保郁男、伊藤忠彦、根本育治、後藤 淳、益川邦彦：日本紅斑熱の発生状況—調査票からの解析—、第73回日本感染症学会総会、東京、1999.

G. 知的所有権の取得状況

なし

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

ダニ媒介性新興感染症の疫学、発生機序および予防法に関する研究

分担研究者 中村 和幸 長野県衛生公害研究所感染症部長

研究要旨

林業従事者におけるライム病血清疫学調査

A. 研究目的

高原や山地は、ライム病のベクターであるマダニ (*Ixodes* 属) の生息環境であり、そこで作業を行う林業従事者の血清疫学調査をすることにより、ライム病の予防対策の基礎資料を得ることを目的とする。

B. 研究方法

長野県内の2保健所(諏訪、木曾)管内の林業従事者に協力を得て、アンケート調査および血清抗体検査を実施した。

血清抗体検査の方法としては、米国製の *Borrelia burgdorferi sensu stricto* 由来の B31 株を使用した酵素抗体法(ELISA法)を行い、陽性となった検体については、B31 株による間接蛍光抗体法(IF法)を行った。また、国内で多く分離される *B.garinii* 由来の PGau 株および *B.afzelii* 由来の HP1 株を使用したIF法も実施した。

C. 研究結果

採血協力者190名中、ELISA法による陽性者数は4名(2.1%)であり、B31 株によるIF法の血清抗体価は160倍以上であった。また、PGau 株によるIF法の血清抗体価では、20倍未満が41名(21.6%)、20から80倍が93名(48.9%)、160倍以上が51名(29.5%)であった。HP1 株によるIF法の血清抗体価では、20倍未満が39名(20.5%)、20から80倍が117名(61.6%)、160倍以上が34名(17.9%)であった。また、ELISA法およびIF法(PGau 株、HP1 株)160倍以上であった77名について、梅毒トレポネーマ(*Terpomema pallidum*)の交差反応を確認するため、TPHA法による定性試験を行った。その結果、1名が陽性となり、更に定量検査とFTA-ABS法を行い、血清抗体価1,280倍、FTA-ABS法IgM抗体陰性、IgG抗体陽性であることを確認した。

アンケート調査は198名に対して行い、マダニ刺咬経験者数は96名(48.5%)であ

った。その内、刺咬回数が2回以上の経験者は63名(65.6%)、刺咬時期は春から夏にかけて多く100名(52.6%)、刺咬の状況では作業中もしくは休憩中の85名(88.5%)であった。

D. 考察

この調査で血清抗体陽性者(ELISA法陽性、IF法160倍以上)に地域差が認められた。これはマダニ刺咬経験者数の違いによるものと思われるが、検査手技等における不均一性が影響していることも考えられる。また、B31 株の他に PGau 株および HP1 株についてもIF法による検査を実施したが、B31 株より高い陽性率を示し、特に PGau 株では約3割の陽性率であることから、国内株によるIF法検査の有効性が明らかになった。しかし、血清診断としてハイリスク者と一般感染者との判断基準が同じであることが適当であるかについては、今後、検査方法等も含め検討が必要であると思われる。

また、マダニ刺咬経験者の91名(94.8%)が、マダニの除去を本人もしくは家族、同僚等が行ったと答えており、感染の危険性に対する意識の薄さが窺える。このことから、山林内で作業する人をはじめ、行楽の人達に対する啓蒙活動が必要であると思われる。

E. 結論

今回の調査では、米国で流行している *B.burgdorferi sensu stricto* に加え、我国で多く分離されている、*B.garinii*、*B.afzelii* による検査を行い、国内株の有効性が明らかになった。このことから、今後、血清診断法としての国内判断基準の確立を図るとともに、林業従事者に対する調査を継続し、ライム病感染予防対策に取り組んでいきたい。

厚生科学研究費補助金 新興・再興感染症
分担研究報告書

ライム病の組換え抗原の開発

分担研究者 渡辺 治雄 国立感染症研究所 細菌部長
協力研究者 川端 寛樹 国立感染症研究所 研究員

研究要旨

- 1) 北米由来ライム病ボレリア株 Vls 抗原遺伝子(*vlsE1*)の塩基配列を決定した。また、本邦で分離されるライム病ボレリアでも *vls* 遺伝子群を含む遺伝子領域が存在していることを明らかにするとともに、この領域の遺伝子構造も明らかにした。
- 2) Vls 抗原中での保存性の高い領域にも B 細胞エпитープが存在することを示し、Vls 抗原に対する患者血清の反応性は病原体の抗原変換に影響されないことを明らかにした。
- 3) マウスモデルを用いた Vls 抗原による感染防御実験から、Vls 抗原が病原体の組織トロピズムに関与している可能性が示唆された。

A.研究目的：

ライム病は野鼠等を保菌動物とし、主に *Ixodes* 属のマダニによって媒介されるスピロヘータの一種 *Borrelia burgdorferi* 感染に起因する人畜共通の新興細菌感染症のひとつである。ライム病ボレリアは、主に北半球の世界各地で見い出されるが、特に人口密集地周辺で *Ixodes* 属マダニが生息する北米及び欧州では、年間数万人もの患者が発生すること、関節炎、神経炎、皮膚症状、循環器系障害等、多様で重篤な病態を示す事から、ライム病が重大な社会問題となっている。

本邦では 1986 年に初のライム病患者が報告されて以来、現在までに数百人の患者が、主に本州中部以北で見い出されている。しかしながら、欧米の現状と比較して、国内でのライム病患者発生報告数は少ないが、本邦においても野鼠やマダニの病原体保有率は欧米並みであることから、我々は、潜在的にライム病が蔓延している可能性が高いと考えている。

我々は、ライム病ボレリアの新規病原因子検索の過程で、回帰熱ボレリアの病原因子である回帰熱ボレリアの主要可変抗原(Vmp)と相同性の高い vmp-like sequence(Vls)を含む DNA 断片の単離に成功していた。本研究では、この Vls 抗原の抗原構造、およびその機能解析を目的として以下の実験を行った。

B.研究方法：

<*vlsE1* 遺伝子の塩基配列決定>

vlsE1 遺伝子の単離を目的として、*Xba*I-linked I-PCR 法をおこなった。増幅産物は pGEM-T vector にてクローニング後、塩基配列を決定した。

<日本分離株における *vls* 遺伝子群の存在の有無>

日本分離株 FujiP2 株(*B.garini*i)、HP1 株(*B.garini*i)、O612 株(*B.japonica*)、対照としてアメリカ株 297 株(*B.burgdorferi*)、ドイツ株 P/Gau 株(*B.atze*lii)を用いた。これらボレリア

から DNA を抽出・精製し、Southern 解析により、*vls* 遺伝子の存在の有無を調べた。次いで、通常条件下およびアルカリ条件下 RFLP 解析を行い、*vls* 領域の制限酵素地図を作成した。

<Vls 抗原中の B-cell epitope マッピング>

まず、VlsII 抗原および VlsF16 抗原のアミノ酸配列をもとに 10 残基ペプチドを約 140 ペプチド合成し、メンブランに固定、マッピングメンブランとした。ついで、昨年度までに作成した組換え体 VlsII 抗原、および組換え体 VlsF16 抗原をマウスに皮下接種、免疫血清をえた。これら血清をマッピングメンブランと反応させ、B-cell epitope を決定した。血清は感染後 28 日目に採取し、IgG クラスで測定した。

<マウスモデルにおける感染防御試験>

昨年度までに作成した組換え体 5 種 (VlsII, VlsF2, VlsF8, VlsF15, VlsF16 抗原) をマウスに皮下接種免疫した。実験には 5 週齢の C3H/He 系マウスを用い、5 ないし 8 匹 1 群で試験を行った。免疫成立後、ライム病ボレリア 297 株 10^7 cell 腹腔内接種、感染 28 日後各種臓器 (脳、心臓、耳介、脾臓、腎臓、膀胱、筋肉組織、関節、血液、尿) を分離、BSK-II 培地にて培養した。

組換え体作成は以下の方法で行った。*vls* カセットのうち塩基配列が決定できた 5 種を、制限酵素サイト (*EcoRI* 或いは *XbaI*) をリンクさせた PCR プライマーを用いて増幅し、大腸菌プラスミド pMal-C2 上の *EcoRI*、*XbaI* 部位に maltose-binding protein (MalE) 遺伝子と発現融合するよう組み込んだ。これら融合タンパク質 (MalE-VlsF2, MalE-VlsF8, MalE-VlsF15, MalE-VlsF16, MalE-VlsF30) を大腸菌中で過剰発現させた後、アフィニティカラムを用いて精製した。

C. 研究結果 :

<*vlsE1* 遺伝子の塩基配列決定>

B. burgdorferi sensu stricto 297 株の *vls* 発現遺伝子 (*vlsE1*) を含む 1,295bp の塩基配列及

び *vlsE1* の転写方向を決定、さらに *vls* 近傍の制限酵素地図作成に成功した。*vlsE1* 遺伝子は 1,140 base, 380 アミノ酸残基からなり、シグナルペプチド 19 残基を N 末端に含むことから、表層抗原である可能性が強く示唆された。

<日本分離株における *vls* 遺伝子群の存在の有無>

B. garinii FujiP2 株、HP1 株、*B. afzelii* P/Gau 株、*B. japonica* O612 株も *vls* を保有することを明らかにした。また HP1 株を除く、これらの株の *vls* 近傍の制限酵素地図を作成、*vls* はいずれも線状プラスミド末端近傍にコードされることを明らかにした。

<Vls 抗原中の B-cell epitope マッピング>

VlsII 抗原のアミノ酸配列をもとに 72 ペプチドを合成、VlsII 抗原免疫マウス血清との反応性を調べ、peptide 30, 31, 56, 59 が免疫血清すべてと反応する部位を含むことを明らかにした。Peptide 30, 31 は Vls 抗原間で保存性が低い領域を含んでいた。一方 Peptide 56, 59 は Vls 抗原間で高度に保存されている領域を含んでいた。VlsF16 抗原で免疫したマウス血清もほぼ同様の領域と強く反応していることから、これらの部位が宿主免疫によって B-cell epitope として認識されていることが明らかとなった。

<マウスモデルにおける感染防御試験>

各種臓器における VlsF16 抗原以外の 4 種類の組換え体抗原によって免疫されたマウスにおける感染防御活性は見られなかった (阻害率: 10.5% ± 10.5)。一方 VlsF16 抗原免疫マウスでは心臓における感染防御活性がみられた (阻害率: 62.5%)。

D. 考察 :

現在、ライム病研究先進地域である北米、欧州においても、ライム病と他の疾患の鑑別診断はきわめて難しく、世界的に診断法の標準化が望まれている。この問題を解決するには、血清診断に検出感度、特異性の高い組換え体診断抗原の導入が必須である。CDC が推奨するライム病

診断基準によれば、感染初期患者における血清診断の決め手になるボレリア抗原は現在、OspC, BmpA, Fla の3種類のみである。昨年までに我々は、ライム病患者、およびマウス感染実験により抗 Vls 抗体価は感染初期から上昇していること、その検出感度は既存の診断抗原とほぼ同等であったことから、上記3抗原に加わる感染の診断抗原となりうることを明らかにしてきた。

回帰熱ボレリア Vmp 抗原は遺伝子レベルでの組み換えにより抗原構造が変化することが明らかになっている。vls 遺伝子に関しても、遺伝子構造が vmp 遺伝子と極めて似ていることから、その変換の頻度は不明であるが、vmp 遺伝子同様、遺伝子レベルで vls カセット転移による組み換えを起こしている可能性が極めて高い。このことは、抗原変換が起こった場合、血清診断の検出感度が低下する危険性を示している。しかしながら、本研究では、イムノグロブリンが結合する部位である B 細胞エピトープが抗原変換の影響を受けない領域であることを明らかにした。このことは、例えばカセット変換が起こった場合においても血清診断における検出感度の低下はごくわずかであることを分子レベルで証明したことになる。

本研究で解析を行った vls 遺伝子は *B. burgdorferi* 株由来であるが、本邦で蔓延していると考えられているライム病病原体 *B. garinii*, *B. afzelii* 株も vls 遺伝子を有していること、さらにアメリカ由来株同様、線状クロモソーム末端付近に vls がコードされていることを初めて明らかにした。ospC 遺伝子などは種間で塩基配列が大幅に異なることから、本邦で分離されるボレリアと北米由来株間で vls 遺伝子の一次配列に相違がある可能性もある。今後は、本邦で分離されるボレリア由来の vls 遺伝子の塩基配列を決定することで、本邦における Vls 抗原の組換え体血清診断抗原としての有用性を調べることができよう。

ライム病病原体ボレリアの病原性は未だ未解明の部分が多い。とくに特定の臓器において病

原体が集積する原因はまったく明らかでない。本研究では VlsF16 抗原によって心臓に対する病原体の生着が阻害された。近年ナイセリア属の病原体がその表層抗原を変換させることによって宿主細胞に対する接着性を変化させることが明らかとなっている。ライム病ボレリアも Vls 抗原を変換させることによって心臓にたいする接着性が変化しているのかもしれない。今後はこの点を明らかにするために、分子生物学的手法をもちいて解析を試みる予定である。

E. 結論：

ライム病ボレリアが普遍的に保有している Vls 抗原について、その Vls 抗原中、保存性の高い領域に B 細胞エピトープが存在することを示した。また、Vls 抗原に対する患者血清の反応性は、病原体の抗原変換に影響されない可能性が高いことを明らかにした。マウスモデルを用いた Vls 抗原による感染防御実験から、Vls 抗原が病原体の組織トロピズムに関与している可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Hiroki Kawabata, Sho Ohtani, Noriyuki Murai and Haruo Watanabe. Identification of a B-cell epitope of Vmp-like sequence (Vls) of *Borrelia burgdorferi*. (In preparation)

2) Hiroki Kawabata, Fumiyoshi Myouga, Yoshishige Inagaki, Noriyuki Murai and Haruo Watanabe. Genetic and immunological analyses of Vls (VMP-like sequences) of *Borrelia burgdorferi*. *Microbial Pathogenesis*. 24, 155-166, 1998.

2. 学会発表

1) Hiroki Kawabata and Haruo Watanabe. Genetic and immunological analyses of Vls (VMP-like sequences) of *Borrelia burgdorferi*. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, Microbial Pathogen and Host Diffence. New York USA. Sep. 1997.

- 2) 川端寛樹、渡辺治雄。ライム病ボレリア由来 *vls* 遺伝子のクローニング。第 71 回日本細菌学会総会。1998 年 4 月。松本。
- 3) 川端寛樹、大谷昌、渡辺治雄。ライム病ボレリア Vmp 様遺伝子 (*vls*) の発現と *Vls* 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。1998 年 4 月。松本。
- 4) 川端寛樹、松高 望、高橋朋子、渡辺治雄。ライム病ボレリア *vls* 遺伝子領域の解析。第 36 回レプトスピラシンポジウム。1999 年 3 月。東京。
- 5) 川端寛樹、渡辺治雄。*vlsE1* 遺伝子可変領域の塩基配列決定-マウス感染実験による各種臓器回収株間での比較-。第 36 回レプトスピラシンポジウム。1999 年 3 月。東京。