

厚生科学研究費  
新興・再興感染症研究事業

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

平成11年度 研究報告書

平成12年3月

主任研究者 平井克哉  
岐阜大学農学部

## 目 次

1. 研究総括 .....	1
主任研究者：平井克哉（岐阜大学農学部）	
2. Q熱ワクチンの開発 .....	11
主任研究者：平井克哉（岐阜大学農学部）	
3. リケッチア症の分子診断法 .....	17
分担研究者：福士秀人（岐阜大学農学部）	
4. ヒトおよび動物のQ熱の疫学的研究 .....	21
分担研究者：長岡宏美（静岡県環境衛生科学研究所微生物部）	
5. ヒトおよび伴侶動物のQ熱の疫学的・診断的研究 .....	25
分担研究者：小宮智義（北里研究所生物製剤研究所）	
6. Q熱の実験室診断法の基準および疫学に関する研究 .....	27
分担研究者：萩原敏且（国立感染症研究所ウイルス第一部）	
7. ヒトのQ熱の疫学的研究 .....	29
分担研究者：小久保弥太郎（東京都立衛生研究所微生物部）	
8. ヤマトダニ( <i>Ixodes ovatus</i> )から分離されたエールリキアについて .....	31
分担研究者：川原 真（名古屋市衛生研究所微生物部）	
9. イヌのエールリキア症の疫学的研究 .....	35
分担研究者：山本静雄（麻布大学環境保健学部）	
10. 猫ひっかき病の疫学・診断 .....	41
分担研究者：丸山総一（日本大学生物資源科学部）	
11. バルトネラ症の発症機序に関する研究 .....	45
分担研究者：小田 紘（鹿児島大学医学部）	
12. 猫ひっかき病の疫学的研究 .....	49
分担研究者：上野弘志（酪農学園大学獣医学部）	
13. 日本紅斑熱の疫学的研究 .....	53
分担研究者：森田千春（酪農学園大学獣医学部）	

# 厚生科学研究費補助金総括研究報告書

## 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

代表研究者 平井克哉

### 研究要旨

Q熱の疫学に関する研究は、インフルエンザ様症状、上気道炎、不明熱、(34.8%)、異型肺炎などの患者からQ熱起因菌が高率に分離された。Post Q fever fatigue syndromeのQ熱の関与も示唆された。また、サルコイドーシス患者に抗体保有率が極めて高く、肺胞洗浄液から遺伝子も検出され、原因不明のサルコイドーシスに本菌が関与する可能性が示唆された。小動物臨床獣医師は一般健康者より抗体保有率が有意に高かった。動物病院来院伴侶動物にも高率に抗体が検出され、一般家庭の伴侶動物に広く本菌が浸透しヒトへの重要な感染源になっている可能性が示唆された。ウシに広く*C.burnetii*が浸淫し不顕性感染し、感染初期にはリケッチア血症により乳汁に移行する可能性が示唆された。

Q熱の診断に関しては、*icd* 遺伝子から急性Q熱と慢性Q熱を迅速に識別できる新しいPCR-Restriction Fragment Length Polymorphism 法を開発した。一方、LPS認識モノクローナル抗体Mabsから株間のプラスミド別および相別に型別できることを、また、ポリペプチド認識MabsからQ熱の特異診断に有用であることを明らかにした。

Q熱のワクチン(感染防御抗原)に関しては、抗原性を担う新しい蛋白質(62、56、46.6、45、31、27、28、17および14.7kDa) 支配遺伝子をクローニングし、これらの遺伝子発現蛋白質の抗原性や診断用抗原・ワクチンの開発などについて解析を進めている。

エールリキアの疫学に関して、ヤマトマダニから分離した*E. muris*は、16S rRNAの遺伝子配列の比較から、最近アメリカで注目され死亡率の高いヒトのエーリキア症を起こす*E. chaffeensis*と遺伝学的に極めて近いことを明らかにした。

猫ひっかき病の疫学に関して、飼育猫の7.2%に*Bartonella*属菌が感染し、分離*B. henselae*の多くはtype Iで、*B. clarridgeiae*も分布し、混合感染もあることを明らかにした。また、アメリカ分離*B. henselae*と日本分離*B. henselae*はDNAゲノムパターンと抗原性が異なり、今後血清学的診断法には日本分離株のよる方法を開発する必要がある。本州在住者8名中5名に患者が診断された。保菌猫の報告がない北海道でも、原因不明リンパ節炎の小児31名中10%に抗体が検出され、同地域の健康妊婦200名の陽性率より高かった。*B. henselae*をヒト臍帯静脈内皮細胞で培養すると、培養液中に細胞増殖活性因子が産生され、本症の毛細血管増生性病変の発生機序解明の糸口を明らかにした。

紅斑熱群リケッチア(SFGR)の疫学に関して、日本紅斑熱の未報告地域で調査した結果、北海道のヤマトマダニ、大阪のニホンジカとフタトゲチマダニ、沖縄の放浪犬より日本紅斑熱リケッチア様の遺伝子が検出されたが、北海道の野生齧歯類、沖縄のイヌに寄生していたクリイロコイタマダニからは同様のリケッチアは検出されなかった。

### 研究分担者

平井克哉	岐阜大学・農学部 教授	上野弘志	酪農学園大学・獣医学部 助教授
福士秀人	岐阜大学・農学部 助教授	小久保弥太郎	都立衛生研究所・微生物部 部長
小田 紘	鹿児島大学・医学部 教授	山本静雄	麻布大学・環境保健学部 教授
萩原敏且	国立感染症研究所・ウイルス第一部 室長	丸山総一	日本大学・生物資源科学部 助教授
森田千春	酪農学園大学・獣医学部 教授		

川原 真 名古屋市衛生研究所・微生物部 主任研究員  
長岡宏美 静岡県環境衛生科学研究所 微生物部 副主任研究員  
小宮智義 北里研究所・生物製剤研究所 研究員

#### A. 研究目的

近年、わが国で注目されているリケッチア性のQ熱、エールリキア症、猫ひっかき病および紅斑熱について疫学調査を実施して汚染状況を明確にする。また病原体の各種性状や病原性などから新しく簡便な診断法を検索し、さらに効果的な遺伝子組換えワクチン（感染防御抗原）を開発する。

#### B. 研究方法

国内各地のヒトをはじめ家畜・伴侶動物の血清を採取した。これらにつき血清疫学のおよび病原学的に調査を実施した。また、分離病原体の生化学的性状、病原性、遺伝学的性状などを解析し、新しい診断法、診断用抗原、組換え感染防御抗原の開発を行った。

#### C. 研究結果および考察

Q熱の疫学に関しては、一般健康者では2,003例中多価抗体が73例(3.6%)、IgG抗体が220例(11.0%)、IgM抗体が103例(5.1%)、IgA抗体が15例(0.7%)に認められた。小動物臨床獣医師では267例中多価抗体が36例(13.5%)、IgG抗体が53例(19.9%)、IgM抗体が19例(7.1%)、IgA抗体が1例(0.4%)に認められた。獣医師は、一般健康者と比較し高い抗体陽性率を示し、多価およびIgG抗体の陽性率に有意差が認められた。また、一般健康者において性別による抗体陽性率を比較すると、女性は男性と比較し、有意に高いIgM抗体陽性率を示した。年齢による抗体陽性率を比較すると、年齢によりIgM抗体陽性率の高い郡と低い郡に分けられた。一方、小動物臨床獣医師において居住地域、性別、年齢および臨床経験年数による抗体陽性率の差は認められなかった。

各種臨床症状の336例の検体のうち、インフルエンザ様症状24/49例(48.9%)、上気道炎7/12例(58.3%)、不明熱8/23例(34.8%)、異型肺炎3/16例(18.8%)などのほか川崎病、血管性紫斑病、水痘、腸炎、発疹症、頸部リンパ節炎からも*C.burnetii*が分離された。また、慢性疲労症候群様患

者35/110例(31.8%)の血液中に*C.burnetii*遺伝子を確認した。遺伝子検出率は一般健康人との間に明らかな有意差を認めた。患者の性別、年齢、居住地に偏りはなく、35例の遺伝子陽性患者にはMINO投与が施されたが、このうち6/7例で治療効果が確認された。一方、サルコイドーシス患者では49.4% (44/89) の抗体陽性率を示したが、血清中から遺伝子は検出されなかった。しかし、26例のサルコイドーシス患者の肺胞洗浄液 (BALF) を用いて*com1*遺伝子の検出を試みたところ、5例 (19.2%) より遺伝子が検出された。

Q熱の血清診断基準として、わが国および諸外国の発生報告を参考に、1) ペア血清では4倍以上の抗体価の上昇、2) シングル血清ではIgM抗体価1:16~32倍以上あるいはIgG抗体価1:128~256倍以上と定めた。この診断基準で、既に報告されている国内患者は全例が陽性と診断された。この診断基準を基に、Q熱の検査依頼があった不明熱患者19名(内13名ペア血清)について血清診断を行った結果、全例が陰性で、うち8名の遺伝子検出も陰性であった。さらに、虚血性心疾患患者と大学病院小児科に来院した呼吸器疾患患者および千葉県の成人を対象とした疫学調査では、千葉県の成人500名中9名にのみに抗体が認められた。

食肉衛生検査所に搬入されたウシの生乳では57例中21例(36.8%)、血液は10例中5例(50%)から*C.burnetii*が分離された。*C.burnetii*が分離されたウシのうち30%は乳房炎、肝炎、胃炎、卵巣嚢腫、心膜炎を呈していたが、70%は臨床的および病理学的異常は認められなかった。また、生乳と血液の両方が採取できた10例について抗体価を測定したところ、IgG抗体価は血液から*C.burnetii*が分離された群より生乳から分離された群で高かった。動物病院来院ネコでは14.2% (44/310)、イヌでは10.7% (27/252) の抗体陽性率を示し、ネコ1.3% (4/310) およびイヌ0.8% (2/252) より遺伝子の検出がされた。また、富山県由来野良ネコでは41.7% (15/36)、韓国由来野良ネコは8.6% (8/33) の抗体陽性率を示したが、遺伝子は検出されなかった。

Q熱の予防（感染防御抗原）に関しては、抗原性を担う蛋白質支配遺伝子をクローニングし解析の結果、62、56、46.6、45、31、27、28、17および14.7kDa蛋白質を発現する新しい遺伝子であった。これ

らの新しい遺伝子から発現する蛋白質の抗原性、株間の相異、診断用抗原・ワクチンの開発などについて解析を進めている。以下に*C. burnetii*のdihydrolipoamide succinyltransferase (ODH)をコードする*sucB*遺伝子と、isocitrate dehydrogenase (IDH)をコードする*icd*遺伝子の解析結果を記載する。*sucB*遺伝子は、405個のアミノ酸をコードする1,212 bp open reading frame (ORF)からなる。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。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。また、*icd*遺伝子は、427個のアミノ酸からなる46.6kDaの蛋白質をコードするORFが同定された。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。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7.7であった。また、本遺伝子形質転換 *E. coli* DEK2004におけるIDH産生はpH 5 から5.5の間で高かった。*C. burnetii icd* 遺伝子およびIDHのこれらの特殊性は本菌の増殖環境と関連すると考えられた。これらODH, IDH および27-kDa発現蛋白質を精製し、感染防御抗原(ワクチン抗原)になるかをモルモットに接種し強毒Nine Mile I 相菌の攻撃を行った結果、3つの抗原は完全な感染防御が成立しなかった。今後はその他のクローニング遺伝子からの発現蛋白を含め、各発現蛋白の各種の混合物による感染防御の実験が必要である。

Q熱の診断に関しては、Q熱の新しい遺伝子診断法を開発する目的で、isocitrate dehydrogenase (IDH)をコードする*icd*遺伝子を解析した結果、急性Q熱患者由来株と慢性Q熱患者由来株を識別できる遺伝子の相異マーカーを見出した。このマーカーに基づき、分離株を迅速に識別するために新しいPCR-Restriction Fragment Length Poly-morphism (PCR-RFLP)法を開発した。各株の*icd*遺伝子から400bpのDNAフラグメントをPCRにより増幅し、*AccII*により切断してからアガロースゲルで電気泳動を行った。急性Q熱患者由来株を含む1群の分離株はアガロースゲルで2つのバンドを示したが、慢性Q熱患者由来株は

1つのバンドだけを示した。本方法を用い、Q熱患者血清から本菌の遺伝子を検出および識別できることが示された。*icd* 遺伝子に基づくPCR-RFLP法はQ熱の病態診断に貢献できる。

LPS認識モノクローナル抗体Mabs8種を作出解析した結果、*C. burnetii* 22株(QpH1プラスミド保有16株、QpDVプラスミド保有2株、QpRSプラスミド保有1株およびプラスミド非保有株3株)は、プラスミド別および相別に型別ができ、株間におけるLPSの相異(病原性)の比較に応用であると考えられた。また、構成ポリペプチドに対するMabsを作出解析した結果、3種は62kDaを、6種は29-31kDaを認識し、Q熱の特異診断および特異的抗原の解析に有用であると考えられた。

エールリキアに関する疫学的研究では、東北地方および四国で採取されたヤマトマダニ(*Ixodes ovatus*)から分離された7株のエールリキア様因子について調べた。これらの株を接種したマウスは、すべて血液中に*E. muris*に対する抗体を示し、抗原の一部類似性を示した。分離された7株中6株(HF株)を接種したマウスは食欲不振、行動緩慢、体重減少などの症状を示し、10日以内に死亡した。一方、残りの一株(Anan株)を接種したマウスは、顕著な症状を示さず死亡もしなかった。HF株を接種したマウスの脾臓を電子顕微鏡で観察すると、細胞質中の封入体中に多くのエールリキア様粒子が観察された。しかし、Anan株接種マウスにはそれら粒子を認めることが出来なかった。分離株の16S rRNAの遺伝子配列を決定し比較したところ、HF株はすべて同じであった。Anan株との相違は3塩基のみで、その相同率は99.7%であった。*E. chaffeensis*: human monocytic ehrlichiosis agentおよび*E. muris*とは、それぞれ98.2 および97.7%であった。また、HF株およびAnan株のGroEL amino acid配列を決定し、他の*Ehrlichia*と比較したところ、相同率は*E. chaffeensis* に対し99.0%、Anan株に対し98.5%、また、*Ehrlichia. canis* に対し97.3%であった。これらの結果から、これらの分離株はヒトから分離された*E. chaffeensis* に遺伝学的に最も近いエールリキアであることが明らかとなった。これらの株は、マウスを用いた感染モデルの研究に極めて有益であると思われる。

*E. canis*の抗体調査では、イヌの抗体保有率は、沖縄県下の捕獲犬で19.0% (158/831)、鹿児島県下の捕獲犬2.8% (11/399)、福岡県下の捕獲犬1.9% (12/622)、飼育犬では山口市4.9%、徳島市2.3%、鹿屋市8.0%、沖縄県10.9%で、我が国における*E. canis*の拡散が明らかにされた。*E. canis*を人為的に感染させたビーグル犬ではPCRが陽性で抗体価が1:10,240と著しく上昇した後に、94日後以降にPCRが陰性に転じた例は感染の経過中に*E. canis*が末梢血から臓器へ移行し、臓器に潜っていた結果と考えられた。さらに、*E. canis*のPCRが陽性を示す捕獲犬の血液を健康な6頭のビーグル犬、4頭のシェパードに輸血しても*E. canis*の感染が成立しなかったことは*E. canis*が末梢血から消失していたためと考えられた。*E. canis*感染犬から胎児へ*E. canis*が垂直感染することを示唆する成績が得られた。沖縄県下のヒトの血清1,011例について*E. canis*の抗体保有調査を実施した結果、全例が陰性であった。

猫ひっかき病の疫学的研究では、飼育猫の7.2% (50/690) が*Bartonella* 属菌に感染しており (北海道0%~沖縄20.0%)、分離された*B. henselae*のほとんどがtype Iであった。また、日本の猫にも*B. clarridgeiae*が分布しており、*B. henselae*との混合感染もあることが初めて明らかになった。従って、猫ひっかき病の病原巣である猫に対して、ワクチン開発などの予防対策が必要であると思われた。さらに、アメリカとわが国で分離された*B. henselae* 8株のゲノムDNAパターンと抗原性の関係を検討したところ、ゲノムパターンは全て異なっており、そのサイズは1.75~2.13Mbpであることが明らかになった。株間のゲノムパターンと抗原性の関連性はみられなかったが、各株に抗原性の違いがあることが判明した。したがって、わが国に分布する株を用いた至適血清学的診断方法の開発が重要な課題であると思われた。日本では患者報告の稀な猫ひっかき病について、1998年に診断依頼を受けた本州在住者8名中5名を試験室内的手法で患者と確定診断できた。保菌猫報告のない北海道でも、原因不明のリンパ節炎の小児31名中10%が*B. henselae*の抗体を保有し、同地域の健康妊婦200名の陽性率(1%)より高かった。ヒトへの感染源動物の猫間で*B. henselae*はネコノミで媒介されるが、その実態は十分解明されて

いない。今回は、インドネシアのネコおよびそれに寄生するネコノミから同時この病原体を分離した。日本の一地域の鹿34匹と1,110匹のダニから*Bartonella* 遺伝子の検出を試み、それぞれ、15%および10%(最小感染率)に特異遺伝子を検出し、それらの16SrRNA遺伝子領域では*B. henselae*との相同性が最も高かった(96%以上)。

*B. henselae*による毛細血管増生性病変の発生機序を解明するため、*in vitro*の系で*B. henselae*と血管内皮細胞の相互作用を検討し以下の結果を得た。ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) の培養系に*B. henselae* ATCC 49882を添加し、HUVECの増殖度をMTT法により測定した。その結果、*B. henselae*の生菌10<sup>7</sup> CFU/mlを添加してcocultivateした場合、培養4日目でHUVECの増殖はコントロールの約3倍に達した。このような増殖促進作用はヒトの血管平滑筋細胞、線維芽細胞、および小腸上皮細胞では認められず、内皮細胞に特異的な作用であると考えられた。一方、熱または紫外線で不活化した*B. henselae*をHUVECと混合培養した場合には内皮細胞の増殖促進は全く認められず、菌体の超音波破壊産物の遠沈上清でも増殖促進活性は認められなかった。*B. henselae*の線毛欠損変異株を用いて上記の増殖促進作用を調べた結果、線毛欠損株においても線毛保有株と同程度の増殖促進作用が認められたことから、この反応にはHUVECへの菌の付着や侵入は必要ないものと考えられた。さらに、菌とHUVECをフィルター膜で隔離しても、HUVECの増殖促進がある程度認められたことから、増殖促進作用の活性因子は菌の増殖過程で培養液中に分泌される物質であると考えられた。

紅斑熱群リケッチアの疫学的研究では、北海道ではヤマトマダニおよびシュルツェマダニについて*gltA*および*rompA*についてPCRによる検索を行った結果、複数のヤマトマダニからは日本紅斑熱の病原体である*R. japonica*に何れの遺伝子領域においても一致するリケッチアが検出されたが同一の地域で捕獲した10%程度抗体を保有する野生アカネズミ全例から検出されなかった。シュルツェマダニからはこれと全く異なるリケッチアが検出された。紅斑熱流行地に近接する大阪北部の産地に生息するシカ及び同一地域のチマダニについて調査したところ、紅斑熱の最も重要なベクターと考えられるフタトゲチマダニとシカから

*gltA*, *rompA*で*R. japonica*と一致するリケッチアが検出され、シカを一つのほ乳類宿主とする*R. japonica*様のリケッチアの存在を明らかとすることが出来た。一方、キチマダニ、オオトゲチマダニからは前述のシュルツェマダニに由来するものと近縁のリケッチアが検出されこれらは世界各地でダニのみから検出されるリケッチアと系統的に類似するものであることが明らかとなった。沖縄では既にヒト、イヌから抗体が高率に検出されることを明らかと成っており、今年もイヌでは30%前後の陽性率を認めた。今年もイヌ、およびこれに寄生するクリイロコイタマダニについての調査を行った。イヌからは大阪と同様に*R. japonica*様のリケッチアが検出されたが寄生しているクリイロコイタマダニからは*gltA*のみが検出され、*rompA*は検出されない。

#### D. 結論

リケッチアによるQ熱、エールリキア症、猫ひっかき病および紅斑熱について疫学調査を実施し、その一端が明らかになった。また、病原体の各種性状、新しい診断法の開発、さらに効果的な遺伝子組換え感染防御抗原(ワクチン)の開発を目指して研究を進めている。

#### E. 研究発表

##### 1. 発表論文

- 1) Nagaoka, H., Sugieda, M., Nakamura, N., Yamamoto, S and Hirai, K. : Q fever in Japan. Proceedings of 2nd International Symposium on Lyme Disease in Japan. Emerging and Re-emerging Disease Transmitted by Arthropod Vector and Rodents (1997, 10, Shizuoka)
- 2) 長岡宏美、杉枝正明、秋山真人、仁科徳啓、赤羽荘資、山本茂貴：静岡県における犬および猫の *Coxiella burnetii* 感染症の疫学、日獣会誌、51:323-325, 1998.
- 3) Nagaoka, H., Sugieda, M., Akiyama, M., Nishina, T., Akahane, S and Fujiwara, K. : Isolation of *Coxiella burnetii* from the vagina of feline clients at veterinary clinics. J. Vet. Med. Sci. 60:251-252, 1998.
- 4) Inokuma, H. et al.: Survey of Tick-Borne disease in dogs infested with

*Rhipicephalus sanguineus* at a kennel in Okayama prefecture, Japan. J. Vet. Med. Sci., 60: 761-763, 1998.

- 5) 猪熊壽 他：沖縄県における犬のマダニ寄生およびマダニ媒介性疾患の完成状況、日獣会誌、51:361-364, 1998.
- 6) 長岡宏美、山本茂貴：犬と猫のコクシエラ症、獣医畜産新報、52:935-938, 1999.
- 7) Nguyen, S. V., To, H., Yamaguchi, T., Fukushi, H. and Hirai, K.: Molecular cloning of an immunogenic and acid-induced isocitrate dehydrogenase gene from *Coxiella burnetii*. FEMS Microbiol. Lett. 175: 101-106, 1999.
- 8) Nguyen, S. V., To, H., Yamaguchi, T., Fukushi, H. and Hirai, K.: Characterization of the *Coxiella burnetii* *sucB* gene encoding an immunogenic dihydrolopoamide succinyltransferase. Microbiol. Immunol. 43:743-749, 1999.
- 9) Nguyen, Sa V. and Hirai, K.: Differentiation of *Coxiella burnetii* isolates by sequence determination and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of isocitrate dehydrogenase gene, FEMS Microbiol. Lett. 180:243-254, 1999.
- 10) Brahim, I. N., Okabayashi, T., Ristiyanto, Lestari, E. W., Yanase, T., Muramatsu, Y., Ueno, H. and Morita, C. : Serosurvey of wild rodents for Rickettsioses (spotted fever, murine typhus and Q fever) in Java Island, Indonesia. Europ. J. Epidemiol. 15, 89-93, 1999.
- 11) Okabayashi, T., Hasebe, F., Samui, K. L., Mweene, A. S., Pandey, S. G., Yanase, T., Muramatsu, Y., Ueno, H. and Morita, C. : Prevalence of antibodies against spotted fever, murine typhus and Q fever Rickettsiae in humans living in Zambia. Amer. J. Trop. Me. Hyg., 61, 70-72, 1999.
- 12) Morita, Y., Maruyama, S., Hashizaki, T., and Katsube, Y. : Pathogenicity of *Mycobacterium avium-intracellulare* complex serovar 9 isolated from a Blue-breasted Quail (*Coturnix chinensis*). J. Vet. Med. Sci. 61:1309-1312, 1999.
- 13) Maruyama, S., Tanaka, T., Sakai, T.,

- and Katsube, Y. : Prevalence of *Bartonella* species among pet cats in Japan. *J. Microbiol. Methods* 37: 284-285,1999.
- 14) Maeno, N., Oda, H., Yoshiie, K., Wahid, M.R., Fujimura, T., Matayoshi, S.: Live *Bartonella henselae* enhances endothelial cell proliferation without direct contact. *Microbial Pathogenesis*. 27:419-427, 1999.
- 15) Yoshiie, K., Matayoshi, S., Fujimura, T., Oda, H.: Induced production of nitric oxide and sensitivity of alveolar macrophages derived from mice with different sensitivity to *Coxiella burnetii*. *Acta Virologica* 43, 273-278, 1999.
- 16) Maruyama, S., Nakamura, Y., Kabeya, H., Tanaka, S., Sakai, T. and Katsube, Y. :Prevalence of *Bartonella henselae*, *Bartonella clarridgeiae* and the 16S rRNA Gene Types of *Bartonella henselae* among pet cats in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 62:273-279,2000.
- 17) Ishihara, K., Matudate, H., Yamaguchi, T., Fukushi, H. and Hirai, K.: Seroepidemiology of *Coxiella burnetii* in veterinarians of Japan. *J. Clin. Microbiol.* in press, 2000.
- 18) Hotta, A., Kawamura, M., Yamaguchi, T., Fukushi, H. and Hirai, K: Antigenic analysis of *Coxiella burnetii* using monoclonal antibodies to LPS. *J. Clin. Microbiol.* in press, 2000.
- 19) Maruyama, S., Boonmar, S., Morita, Y., Sakai, T., Tanaka, S., Yamaguchi, F., Kabeya, H. and Katsube, Y. : Seroprevalence of *Bartonella henselae* and *Toxoplasma gondii* among healthy individuals in Thailand. *J. Vet. Med. Sci.* 62: in press, 2000.
- 20) Shibata, S., Kawahara, M., Rikihisa, Y., Fujita, H., Watanabe, Y., Suto, C. and Ito, T.: New *Ehrlichia* sp. closely related to *E. chaffeensis* isolated from *Ixodes ovatus* ticks in Japan. *J. Clin. Microbiol.* in press, 2000.
2. 総説
- 1) 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.
- 2) 高橋 洋、渡辺 彰、平井克哉：Q熱、目で見える感染症、化学療法の領域 15：5-8, 1999.
- 3) 小田 紘：紅斑熱. 中山宏明ら(編), 知っておきたい現代感染症事情 vol. 1, 医歯薬出版(東京), p 126-131, 1999.
- 4) 小田 紘：ネコひっかき病. 中山宏明ら(編), 知っておきたい現代感染症事情 vol. 1, 医歯薬出版(東京), p 132-139, 1999.
- 5) 小田 紘：菌が検出されたときの抗生物質の選択と使用法 -リケッチア-. 斉藤 厚(編), 感染症と抗生物質の使い方, 文光堂(東京), p 128-131, 1999.
- 6) 小田 紘：Q熱. 日本医師会(編), 感染症の診断・治療ガイドライン, 医学書院(東京), p 104-105, 1999.
- 7) 小田 紘, 吉家清貴：慢性Q熱. 感染症症候群監(別冊日本臨床), 日本臨床社(東京), p 252-254, 1999.
- 8) 小田 紘：感染症とその治療-Q熱-. 最新医学, 54(増刊) 749-756, 1999.
- 9) 小田 紘：小児のQ熱. 小児科臨床, 52 :693-695, 1999.
- 10) 小田 紘：セミナーQ熱. 臨床医, 25: 36-37, 1999.
- 11) 小田 紘：つつがむし病. *Medical Practice*, 16:1839-1841, 1999.
- 12) 小田 紘：Q熱. *Medical Practice*, 16 :1853, 1999.
3. 著書
- 1) 平井克哉：牛クラミジア症 (p141-142), Q熱, 病性鑑定マニュアル(第2版), 農林水産省畜産局監修、1999.
- 2) 平井克哉：リケッチアによる感染症 (p397-409), 獣医感染症カラーアトラス、見上 彪・丸山 務 監修、文永堂、東京、1999.
- 3) 平井克哉：家畜のリケッチア症 (p61-62, 94), 獣医伝染病学、清水悠紀臣ら監修、1999.
- 4) 平井克哉：リケッチアおよびクラミジア性ズーノーシス (p95-99), 獣医公衆衛生学(第2版)、小川益男・金城俊夫・丸山 務編、1999.
- 5) 平井克哉：リケッチア (p449-453), 最



- 新獣医診療ハンドブック、長谷川篤彦編、(株)インターズー、1999.
- 6) 平井克哉：Q熱、知っておきたい現代感染症事情、中山宏明・多田 功・南嶋洋一編、p112-125、医歯薬出版株式会社、1999.
4. 口頭発表
- 1) 長岡宏美：Q熱の分離・家族内感染例と感染経路、衛生微生物協議会第18回研究会(1997.7)
  - 2) 長岡宏美、杉枝正明、秋山真人、仁科徳啓：Q熱の家族内感染例と感染経路の検討、平成9年度日本獣医公衆衛生学会・中部(1997.8)
  - 3) Nagaoka,H., Sugieda,M., Nakamura, N., Yamamoto,S and Hirai,K. : Q fever in Japan. (1997.10)
  - 4) 沼崎啓、千葉俊三、上野弘志、横尾佳寿子、村松康和、森田千春：北海道の小児の不明熱および頸部リンパ節炎患者における *Bartonella henselae* および *Coxiella burnetii* 感染に関する検討、日本ウイルス学会第47回学術集会・総会(1997年)
  - 5) 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)
  - 6) 長岡宏美、杉枝正明、秋山真人、仁科徳啓：Q熱の家族内感染例と感染経路の検討、平成9年度日本獣医公衆衛生学会年次大会(1998.2)
  - 7) 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)
  - 8) 石原加奈子、松舘宏樹、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)
  - 9) 長岡宏美、佐原啓二、杉枝正明、山本茂貴：家畜盲腸内容物および糞便からのQ熱病原体遺伝子の検出、第126回日本獣医学会(1998.8)
  - 10) 上野弘志、加藤英治、村松康和、森田千春：1998年に猫ひっかき病の確定診断の依頼を受けた9人の検査成績、第128回日本獣医学会(1998年)
  - 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) 長岡宏美、杉枝正明、宮本秀樹、中村信也、山本茂貴：不定愁訴症候群患者からのQ熱病原体遺伝子の検出、平成10年度日本獣医公衆衛生学会年次大会(1999.2)
  - 13) 前野伸昭、又吉盛健、藤村剛、吉家清貴、小田紘： *Bartonella henselae* による血管内皮細胞増殖促進機構。第72回日本細菌学会総会(1999.3)
  - 14) 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)
  - 15) 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)
  - 16) 小宮智義、本川賢司、岡田 奨、荒井節夫、斎藤 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)
  - 17) 小宮智義、本川賢司、岡田 奨、荒井節夫、斎藤 博、相澤主税、福士秀人、平井克哉：コンパニオンアニマル(イヌ・ネコ)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)
  - 18) 岡林環樹、石塚 譲、大谷新太郎、川井裕史、山田倫章、佐藤 弘、村松康和、上野弘志、森田千春：大阪における野生シカの紅斑熱群リケッチアに対する血清抗体調査および遺伝子的検出、第127回日本獣医学会(1999.4)
  - 19) 丸山総一、中村陽介、上野一生、田中茂男、酒井健夫、勝部泰次：日本の飼育猫における *Bartonella henselae* と *B. clarridgeiae* の感染状況について、第127回日本獣医学会(1999.4)
  - 20) 丸山総一、青木俊夫、半沢典子、原智之、Bruno B Chomel、勝部泰次：日本の猫から分離された *Bartonella henselae* の遺伝子型と抗原性の比較に

- ついて、第127回日本獣医学会(1999.4)
- 21) 長岡宏美、山本茂貴：イヌとネコのコクシエラ症(Q熱)、第127回日本獣医学会(1999.4)
  - 22) 佐藤 弘、猪熊 壽、伊澤雅子、喜友名強、森田千春：南西諸島における紅斑熱群リケッチア～種子島、屋久島、および西表島から検出されたSFGR伝子学的解析、第6回リケッチア研究会(1999.6)
  - 23) 岡林環樹、佐藤 弘、村松康和、上野弘志、森田千春：北海道のダニから検出した複数の紅斑熱群リケッチア、第6回リケッチア研究会(1999.6)
  - 24) 三好猛晴、野田博明、岡林環樹、森田千春：マダニに共生する微生物、病原微生物との系統関係、第6回リケッチア研究会(1999.6)
  - 25) 長岡宏美、佐原啓二、三輪好伸、杉枝正明、秋山真人、宮本秀樹、中村信也、山本茂貴：牛乳等におけるQ熱のリスクアセスメントに関する検討、第39回食品衛生監視員協議会関東ブロック研修大会(1999.9)
  - 26) 張 国全、堀田明豊、山口剛士、福士秀人、平井克哉：Coxiella burnetii の抗原蛋白質支配遺伝子のクローニングおよび解析、第128回日本獣医学会(1999.10)
  - 27) Nguyen Van Sa, To Ho, 山口剛士、福士秀人、平井克哉：Coxiella burnetii icd 遺伝子の塩基配列同定・比較およびPCR-Restiction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) の解析による分離株の識別、第128回日本獣医学会(1999.10)
  - 28) 佐藤 弘、岡林環樹、村松康和、上野弘志、喜友名強、森田千春：沖縄県およびその周辺地域における紅斑熱群リケッチアの遺伝子学的解析、第128回日本獣医学会(1999.10)
  - 29) 岡林環樹、佐藤 弘、村松康和、上野弘志、森田千春：北海道のダニから検出した複数の紅斑熱群リケッチア、第128回日本獣医学会(1999.10)
  - 30) 小宮智義、美 文日、坪島貞夫、本川賢司、岡田 奨、相澤主税、福士秀人、平井克哉：Coxiella burnetii (Q熱)の日本および韓国におけるネコの疫学調査、第128回日本獣医学会(1999.10)
  - 31) 長岡宏美、佐原啓二、三輪好伸、杉枝正明、秋山真人、山本茂貴：ウシにおけるCoxiella burnetii 感染様式に関する研究、第128回日本獣医学会(1999.10)
  - 32) 岡林環樹、石塚 譲、川井裕史、弓指孝博、木村朝昭における紅斑熱群リケッチアの疫学調査、第47回日本ウイルス学会(1999.11)
  - 33) 長岡宏美、佐原啓二、三輪好伸、杉枝正明、秋山真人、宮本秀樹、中村信也、山本茂貴：牛乳等におけるQ熱のリスクアセスメントに関する検討、平成11年度全国植皮衛生監視員研修会(1999.11)
  - 34) 長岡宏美、佐原啓二、三輪好伸、杉枝正明、秋山真人、原 元彦、山本茂貴：C. burnetii 感染者の呈する症状についての一考察、第6回リケッチア研究会(1999.11)
  - 35) 石原麻美、鳥山聖子、中村 聡、大野重昭、石田敬子、小野弘光、平賀洋明、磯買恵美子、小宮智義、平井克哉：サルコドーシスとコクシエラ症(Q熱)、第53回日本臨床眼科学会(1999)
  - 36) 石原麻美、鳥山聖子、中村 聡、大野重昭、石田敬子、小野弘光、平賀洋明、磯買恵美子、小宮智義、平井克哉：サルコイドーシスにおける抗Coxiella抗体保有率、第103回日本眼科学会総会(1999)
  - 37) 塩見正司、外川正生、丸山総一、勝部泰次：血清学的に診断された猫ひっかき病7例、題42回日本感染症学会中日本地方総会(1999)
  - 38) 萩原敏且：Q熱の診断、衛生微生物技術協議会第20回研究会(1999)
  - 39) 萩原敏且、小川基彦、志賀定祠、古屋由美子、吉田芳哉：Q熱の血清診断について、第6回リケッチア研究会(1999)
  - 40) 古屋由美子、片山丘、原みゆき、吉田芳哉、今井光信、山本正悟、海保郁男、小川基彦、萩原敏且、小田紘：ELISAおよびIFによるCoxiella burnetiiの抗体測定-第2報-、第47回ウイルス学会学術集会
  - 41) Maruyama, S., Tanaka, T., Sakai, T., and Katsube, Y. : Prevalence of Bartonella species among pet cats in Japan. 1st International Conference on Bartonella as emerging pathogens. Tuebingen, Germany. (1999, March)

- 42) Maruyama, S., Tanaka, S., Sakai, T., and Katsube, Y.: Prevalence of *Bartonella* species among pet cats in Japan. 26th World Veterinary Congress, Lyon, France. (1999, Sept. 23-26)
- 43) Morita, Y., Amada, T., Nakabayashi, Y., Nakajima, T., Maruyama, S. and Katsube, Y. : Detection and identification of *Mycobacterium avium* complex in the swine lymph node and others by PCR. 26th World Veterinary Congress, Lyon, France. (1999, Sept. 23-26)
- 44) 長岡宏美、佐原啓二、三輪好伸、杉枝正明、秋山真人、山本茂貴：牛乳等における*C.burnetii* 汚染状況、平成11年度日本獣医公衆衛生学会年次大会 (2000.2)

## 分担研究報告書

### Q熱ワクチンの開発

主任研究者 平井克哉

#### 研究要旨

抗原性を担う蛋白質支配遺伝子をクローニングし解析の結果、62、56、46.6、45、31、27、28、17および14.7kDa蛋白質を発現する新しい遺伝子であった。これらの新しい遺伝子から発現する蛋白質の抗原性、株間の相異、診断用抗原・ワクチンの開発などについて解析を進めている。以下に*C. burnetii*のdihydroliipoamide succinyltransferase (ODH)をコードする*sucB*遺伝子と、isocitrate dehydrogenase (IDH)をコードする*icd*遺伝子の解析結果を記載する。*sucB*遺伝子は、405個のアミノ酸をコードする1,212 bpのopen reading frame (ORF)からなる。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。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。また、*icd*遺伝子は、427個のアミノ酸からなる46.6kDaの蛋白質をコードするORFが同定された。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。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7.7であった。また、本遺伝子形質転換*E. coli* DEK2004におけるIDH産生はpH 5から5.5の間で高かった。*C. burnetii icd*遺伝子およびIDHのこれらの特殊性は本菌の増殖環境と関連すると考えられた。これらODH, IDHおよび27-kDa発現蛋白質を精製し、感染防御抗原(ワクチン抗原)になるかをモルモットに接種し強毒Nine Mile I相菌の攻撃を行った結果、3つの抗原は完全な感染防御が成立しなかった。今後はその他のクローニング遺伝子からの発現蛋白を含め、各発現蛋白の各種の混合物による感染防御の実験が必要である。

一般健康者では2,003例中多価抗体が73例(3.6%)、IgG抗体が220例(11.0%)、IgM抗体が103例(5.1%)、IgA抗体が15例(0.7%)に認められた。小動物臨床獣医師では267例中多価抗体が36例(13.5%)、IgG抗体が53例(19.9%)、IgM抗体が19例(7.1%)、IgA抗体が1例(0.4%)に認められた。獣医師は、一般健康者と比較し高い抗体陽性率を示し、多価およびIgG抗体の陽性率に有意差が認められた。また、一般健康者において性別による抗体陽性率を比較すると、女性は男性と比較し、有意に高いIgM抗体陽性率を示した。年齢による抗体陽性率を比較すると、年齢によりIgM抗体陽性率の高い郡と低い郡に分けられた。一方、小動物臨床獣医師において居住地、性別、年齢および臨床経験年数による抗体陽性率に差は認められなかった。

#### A. 研究目的

##### I. Q熱ワクチンの開発

Q熱の予防ワクチンおよび診断用抗原は、*C. burnetii*の死菌が用いられているが、大量培養が困難であることから、組換えワクチンや診断用抗原の開発が望まれている。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。したがって、抗原性を担う新しい蛋白質支

配遺伝子をクローニングし、これらの遺伝子の発現蛋白質の抗原性、株間の相異、診断用抗原・ワクチンの開発などに分子構築の基盤を目指して研究している。

##### II. Q熱の疫学

今回著者は、我が国のヒトにおける*C. burnetii*の汚染状況をより明らかにし、職業による*C. burnetii*感染の危険性の相異を検討するため、一般健康者および小動物臨床獣医師の血清を用い、間接蛍光抗体(IF)

法により *C. burnetii* 抗体を測定し、疫学調査を行った。

## B. 研究方法

*C. burnetii* 遺伝子ライブラリーは、1 EMBL3 ベクターで作製し、宿主菌として *E. coli* LE392を用いた。ウサギ抗血清をプローブとしてイムノスクリーニングし、さらにサブクローニングはpUC18 および pUC19 ベクターで行なった。プラスミドDNAはアルカリ方法で抽出し、相補試験は *E. coli* JRG153 株 (sucB17, iclR, trpR) で行なった。dihydro-lipoamide succinyl-transferase (ODH) の活性はNADHの産生率により決定した。またヒト、ダニおよび動物由来19株を用いた。icl 遺伝子のフラグメントはPCRにより増幅後、pT7Blue T-Vectorおよび *E. coli* DH5aでクローニングした。DNAシーケンシングはSanger方法により行った。塩基およびアミノ酸配列解析はClustalw 7.0により行った。

被検血清は、1998年3月から4月までに主に岐阜県在住の16から67才の健康な献血者より得た血清2,003検体（性別:男1,196例、女807例）および1997年11月から1999年10月に小動物臨床獣医師より採取した血清267例（性別:男160例、女107例、居住地域:北海道・東北12例、関東94例、甲信越・北陸22例、東海36例、関西89例、中国・四国5例および九州9例）をそれぞれ一般健康者血清および小動物臨床獣医師血清として用いた。抗体の検出はIF法により行った。精製した *C. burnetii* Nine Mile II 相菌を抗原とし、被検血清はPBSで16倍から2,048倍まで2倍段階希釈し、明らかな特異蛍光を示した最も高い血清希釈倍率の逆数をそれぞれ多価、IgG、IgMおよびIgA抗体価とした。

## C. 研究結果・考察

*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多数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入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熱の感染防御あるいは診断用抗原に応用可能であると考えられた。

*C. burnetii* のicl 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, icl, 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icl 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も見られた。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* icl 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。

これらODH、IDH および27-kDa発現蛋白質を精製し、それぞれの抗原が感染防御抗原（ワクチン抗原）になるかをモルモットに接種して抗体産生と強毒株の攻撃を行った結果、3つの抗原はそれぞれ抗体産生が悪く、Nine Mile I 相菌に対し感染防御が成立しなかった。今後はその他のクローニング遺伝子からの発現蛋白を含め、各発現蛋白の各種の混合物による感染防御の

実験が必要である。

一般健康者の血清2,003例の多価の抗体価は64倍が42例、128倍が15例、256倍が10例、512倍が4例、1,024倍が1例、2,048倍以上が1例であった。IgG抗体の抗体価は64倍が119例、128倍が67例、256倍が24例、512倍が9例、1024倍が1例であった。IgM抗体の抗体価は32倍が55例、64倍が27例、128倍が21例であった。IgA抗体の抗体価は32倍が14例、64倍が1例であった。IgG抗体は二峰性を示したことから、64倍を陽性限界にした。一方、IgM抗体は、*C. burnetii* 感染後の動態が通常の感染症と異なり、10から14ヶ月間にわたり高い抗体価を示すとされている。このことから、発症200日後まで多くの患者血清が示すIgM抗体価40倍以上を考慮し、IgM抗体32倍を陽性限界とした。また、IgA抗体については通常、慢性Q熱患者において非常に高い抗体価が認められるとされるが、急性Q熱患者においても25倍から50倍の抗体価で推移するとされ、それらを考慮して、IgA抗体32倍を陽性限界とした。多価抗体についてはIgG抗体に合わせ64倍以上を陽性とした。その結果、多価抗体が73例(3.6%)、IgG抗体が220例(11.0%)、IgM抗体が103例(5.1%)、IgA抗体が15例(0.7%)に認められた。

小動物臨床獣医師の血清267例の多価の抗体価は64倍が16例、128倍が11例、256倍が5例、512倍が4例であった。IgG抗体の抗体価は64倍が18例、128倍が14例、256倍が11例、512倍が6例、1,024倍が4例であった。IgM抗体の抗体価は32倍が9例、64倍が7例、128倍が2例、512倍が1例であった。IgA抗体の抗体価は32倍が1例であった。一般健康者と同様に多価およびIgG抗体は64倍以上を、IgMおよびIgA抗体は32倍以上を陽性とした。その結果、多価抗体が36例(13.5%)、IgG抗体が53例(19.9%)、IgM抗体が19例(7.1%)、IgA抗体が1例(0.4%)に認められた。

小動物臨床獣医師は、一般健康者と比較し高い抗体陽性率を示し、多価およびIgG抗体の陽性率に有意差が認められた。小動物臨床獣医師を居住地別により北海道・東北、関東、甲信越・北陸、東海、関西、中国・四国および九州に分類し、*C.*

*burnetii* 抗体陽性率を比較した。多価抗体が、関東94例中14例(14.8%)、甲信越22例中1例(4.5%)、東海36例中4例(11.1%)、関西89例中15例(16.9%)、中国・四国5例中1例(20.0%)、九州9例中1例(11.1%)に認められ、北海道・東北12例中に陽性検体は認められず、獣医師の居住地による多価抗体陽性率に有意差は認められなかった。同様に、IgG、IgMおよびIgA抗体についても居住地による抗体陽性率に有意差は認められなかった。性別による*C. burnetii* 抗体陽性率を比較した。一般健康者において、男性では多価抗体が1,196例中33例(2.8%)、IgG抗体が120例(10.0%)、IgM抗体が32例(2.7%)およびIgA抗体が10例(0.8%)に認められた。女性では多価抗体が807例中40例(5.0%)、IgG抗体が100例(12.4%)、IgM抗体が71例(8.8%)およびIgA抗体が5例(0.6%)に認められた。女性は男性と比較し、高いIgM抗体陽性率を示し、性別によるIgM抗体陽性率に有意差が認められた。小動物臨床獣医師において、男性では多価抗体が160例中22例(13.8%)、IgG抗体が36例(22.5%)およびIgM抗体が8例(5.0%)に認められ、IgA抗体は認められなかった。女性では多価抗体が107例中14例(13.1%)、IgG抗体が17例(15.9%)、IgM抗体が11例(10.3%)およびIgA抗体が1例(0.9%)に認められた。多価、IgG、IgMおよびIgA抗体のいずれにも性別による抗体陽性率に有意差は認められなかった。一般健康者を年齢によって16から19、20から24、25から29、30から34、35から39、40から44、45から49、50から54、55から59および60歳以上に分類し、それぞれの*C. burnetii* 抗体陽性率を比較した。多価抗体は16から19歳の127例中10例(7.9%)、20から24歳の323例中10例(3.1%)、25から29歳の307例中21例(6.8%)、30から34歳の231例中5例(2.2%)、35から39歳の217例中4例(1.8%)、40から44歳の217例中5例(2.3%)、45から49歳の220例中6例(2.7%)、50から54歳の176例中7例(4.0%)、55から59歳の115例中2例(1.7%)および60歳以上の70例中3例(4.3%)に認められた。IgM抗体は16から19歳の127例中11例(8.7%)、20から24歳の323例中27例(8.4%)、25から29歳の307例中24例(7.8%)、30から34歳の231例中8例(3.5%)、

35から39歳の217例中6例(2.8%)、40から44歳の217例中8例(3.7%)、45から49歳の220例中6例(2.7%)、50から54歳の176例中8例(4.5%)、55から59歳の115例中2例(1.7%)および60歳以上の70例中3例(4.3%)に認められた。低い年齢層は高い年齢層と比較すると、高いIgM抗体陽性率を示し、年齢による抗体陽性率に有意差が認められた。IgG抗体は7.4から17.1%、IgA抗体陽性検体は0から1.6%に認められ、年齢による有意差は認められなかった。

一方、小動物臨床獣医師を年齢によって24、25から29、30から34、35から39、40から44、45から49および50歳以上に分類し、年齢が不明であった8例を除いて、年齢による*C. burnetii*抗体陽性率を比較した(表8)。多価抗体陽性検体は24歳の23例中2例(8.7%)、25から29歳の54例中14例(25.9%)、30から34歳の54例中6例(11.1%)、35から39歳の43例中6例(14.0%)、40から44歳の41例中2例(4.9%)、45から49歳の28例中2例(7.1%)および50歳以上の16例中4例(25.0%)で、年齢による有意差が認められた。IgG抗体陽性率は4.3から30.2%、IgM抗体は0から13.0%、IgA抗体陽性検体は0から1.9%で認められ、いずれにおいても年齢による抗体陽性率に有意差は認められなかった。小動物臨床獣医師において検体を臨床経験年数によって0から4、5から9、10から14、15から19、20から24および25年以上に分類し、臨床経験年数が不明であった14例を除いて、臨床経験年数による*C. burnetii*抗体陽性率を比較した。多価抗体陽性率は3.3から25.0%、IgG抗体陽性率は12.5から28.9%、IgM抗体陽性率は0から12.5%、IgA抗体陽性率は0から1.2%で、臨床経験年数による抗体陽性率に有意差は認められなかった。

一般健康者および小動物臨床獣医師におけるIgGおよびIgM抗体価の関係をみると、一般健康者2,003例中334例(16.5%)はIgMよりIgGの抗体価が高く、33例(1.6%)はIgGよりIgMの抗体価が高かった。小動物臨床獣医師267例中48例(17.9%)はIgMよりIgGの抗体価が高く、10例(3.7%)はIgGよりIgMの抗体価が高かった。

## D. 結論

抗原性を持つ代謝酵素(isocitrate dehydrogenase, IDH と dihydrolipoamide succinyltransferase, ODH)をコードする新しい*sucB*および*icd*遺伝子をクローニングし、それらの性状を解析した。ODH, IDH および27-kDa発現蛋白質はそれぞれ完全な感染防御抗原にはならなかった。今後はその他のクローニング遺伝子からの発現蛋白を含め、各発現蛋白の各種の混合物による解析が必要である。

小動物臨床獣医師は*C. burnetii*感染の危険性が高いことが判明し、愛玩動物が感染源になっている可能性が示唆された。また、一般健康者にも*C. burnetii*が広く浸潤していることが再確認された。今回、我が国においても、感染源として愛玩動物の危険性が示唆され、Q熱発生状況の把握や早急な対策を講じる必要があると考えられた。今回の疫学的調査はQ熱の疾病制御の基礎データとして重要である。

## E. 研究発表

### 1. 発表論文

- 1) Nguyen, S. V., To, H., Yamaguchi, T., Fukushi, H. and Hirai, K.: Molecular cloning of an immunogenic and acid-induced isocitrate dehydrogenase gene from *Coxiella burnetii*. FEMS Microbiol. lett. 175: 101-106, 1999.
- 2) Nguyen, S. V., To H., Yamaguchi, T., Fukushi, H. and Hirai, K.: Characterization of the *Coxiella burnetii* *suc B* gene encoding an immunogenic dihydrolopoamid succinyltransferase. Microbiol. Immunol. 43: 743-749, 1999.
- 3) Ishihara, K., Matudate, H., Yamaguchi, T., Fukushi, H. and Hirai, K.: Sero-epidemiology of *Coxiella burnetii* in veterinarians in Japan. J. Clin. Microbiol. in press, 2000.

### 2. 総説

- 1) 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.
- 2) 高橋 洋、渡辺 彰、平井克哉: Q熱、目で見る感染症、化学療法の領域 15:5-8, 1999.

### 3. 著書

- 1) 平井克哉：牛クラミジア症 (p141-142), Q熱, 病性鑑定マニュアル(第2版), 農林水産省畜産局監修, 1999.
- 2) 平井克哉：リケッチアによる感染症 (p397-409), 獣医感染症カラーアトラス, 見上 彪・丸山 務 監修, 文永堂, 東京, 1999.
- 3) 平井克哉：家畜のリケッチア症 (p61-62, 94), 獣医伝染病学, 清水悠紀臣ら監修, 1999.
- 4) 平井克哉：リケッチアおよびクラミジア性ズーノーシス (p95-99), 獣医公衆衛生学(第2版), 小川益男・金城俊夫・丸山 務編, 1999.
- 5) 平井克哉：リケッチア (p449-453), 最新獣医診療ハンドブック, 長谷川篤彦編, (株) インターズー, 1999.
- 6) 平井克哉：Q熱, 知っておきたい現代感染症事情, 中山宏明・多田 功・南嶋洋一編, p112-125, 医歯薬出版株式会社, 1999.

### 4. 口頭発表

- 1) 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)
- 2) 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)
- 3) 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)
- 4) 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)
- 5) 張 国全, 堀田明豊, 山口剛士, 福士秀人, 平井克哉：  
*Coxiella burnetii* の抗原蛋白質支配遺伝子のクローニングおよび解析, 第128回日本獣医学会 (1999. 10)



## 分担研究報告書

### リケッチア症の分子診断法

分担研究者 福士秀人

#### 研究要旨

Q熱の新しい遺伝子診断法を開発する目的で、isocitrate dehydrogenase (IDH)をコードする*icd* 遺伝子を解析した結果、急性Q熱患者由来株と慢性Q熱患者由来株を識別できる遺伝子の相異マーカーを見い出した。このマーカーに基づき、分離株を迅速に識別するために新しいPCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)法を開発した。各株の*icd* 遺伝子から400bpのDNAフラグメントをPCRにより増幅し、*AccII*により切断してからアガロースゲルで電気泳動を行った。急性Q熱患者由来株を含む1群の分離株はアガロースゲルで2つのバンドを示したが、慢性Q熱患者由来株は1つのバンドだけを示した。本方法を用い、Q熱患者血清から*C. burnetii* 遺伝子を検出および識別できることが示された。*icd* 遺伝子に基づくPCR-RFLP法はQ熱の病態診断に貢献できる。

LPS認識モノクローナル抗体Mabs8種を作出解析した結果、*C. burnetii* 22株(QpH1プラスミド保有16株、QpDVプラスミド保有2株、QpRSプラスミド保有1株およびプラスミド非保有株3株)は、プラスミド別および相別に型別ができ、株間におけるLPSの相異(病原性)の比較に応用であると考えられた。また、構成ポリペプチドに対するMabsを作出解析した結果、3種は62kDaを、6種は29-31kDaを認識し、Q熱の特異診断および特異的抗原の解析に有用であると考えられた。

#### A. 研究目的

Q熱の遺伝子診断用プライマーは、我々の研究室により27kDa外膜蛋白質支配の*com1*遺伝子と熱ショック外膜蛋白質支配の*htpB*遺伝子から開発され実用化されているが、患者の病態を識別することができなかった。急性および慢性Q熱患者、ダニおよび各種動物由来株あるいはQ熱患者血清を用い、*icd*遺伝子の塩基配列の差異から、患者の病態を識別することが目的である。

*C. burnetii*の抗原構造、病原因子、感染防御抗原の解析および型別を目標に、本菌の標準株であるNine Mile株を免疫抗原としてモノクローナル抗体(Mabs)を作出した。このMabsの反応性により、*C. burnetii*の抗原の構造・相異を比較・解析し考察した。

#### B. 研究方法

ヒト、ダニおよび動物由来19株を用いた。*icd* 遺伝子のフラグメントはPCRにより増幅後、pT7Blue T-Vectorおよび*E. coli* DH5aでクローニングした。DNAシーケンシングはSanger方法により行った。塩基およびアミノ酸配列解析はClustalw

7.0により行った。

*C. burnetii* 計21株のうち主にNine Mile株を用いた。免疫抗原には精製不活化Nine Mile株のI相菌を用い、その脾臓細胞を洗浄し細胞融合に用いた。マウス由来骨髄腫細胞(ミエローマ細胞)はSP2/0-Ag14、P3-X63-8.653およびNSO(理研細胞開発銀行)の3種を用いた。抗体の検出はIFAで行った。モノクローナル抗体の反応性の比較は、IFAおよびドットブロッキングによって、日本分離8株、慢性例由来6株を含む海外由来11株、Nine Mile株のIおよびII相菌を用いて、各単クローン性抗体の20株に対する反応性を比較した。各抗体において5回検査し、その反応性を決定した。

#### C. 研究結果・考察

*icd* 遺伝子の塩基および推定アミノ酸配列を同定・解析した結果、19株は3群に分けられた。1群は、QpHIプラスミドを保有するヒトの急性Q熱、ダニおよび牛由来株が、2群は、QpRSおよびQpDVプラスミドを保有するヤギおよびヒトの慢性Q熱由来株が、3群は、プラスミドを保有しないヒ

トの慢性Q熱由来株が属した。また、急性および慢性Q熱由来株を識別できるマーカーがあった。このマーカーに基づき、迅速に識別できる新しいPCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)法を開発した。即ち、各株の*icd* 遺伝子から400bpのDNAフラグメントをPCRにより増幅し、*AccII*により切断してからアガロースゲルで電気泳動を行った。急性Q熱患者由来株を含む1群の分離株はアガロースゲルで2つのバンドを示したが、慢性Q熱患者由来株は1つのバンドだけを示した。この方法を用い、Q熱患者血清から*C. burnetii* 遺伝子の検出と識別の可能性が同時にできることが示された。この結果はQ熱の病態識別の診断に有効であると考えられる。

*C. burnetii* のLPSに対するMabsの作出：LPSはリピドA、コアおよび糖鎖より構成され、病原因子の一つと考えられている。著者はNine Mile株 I 相菌を免疫抗原として8種のMabs(H5B、H45、H64、H70、H72、H73、H78およびH80)を得た。これらのMabsはウエスタンブロッティングにおいて、プロテナーゼK処理抗原に梯子状の反応像を示したことから、LPSを認識すると考えられた。MabsH45およびH5Bは多数のバンドに弱く反応したが、他のMabsの反応像は同一で、3本のバンドに強く反応した。プロテナーゼK未処理抗原に対して、MabH64は14kDaに、MabsH78、H70およびH80は7および14kDaに、MabsH72およびH73は14および29-31kDaに反応した。過ヨウ素酸処理抗原に対する反応性から、MabsH45およびH5BはLPSの糖鎖を、他6種のMabsはコア・リピドA領域を認識すると考えられた。コア・リピドA領域認識Mabsは酢酸処理抗原に対し反応性が消失したため、コア部を認識すると推察された。作出したMabsは本菌の株間におけるLPSの相異の比較に有用であると考えられた。

*C. burnetii* の蛋白抗原に対するMabsの作出：本菌を構成するポリペプチドの構造および機能はほとんど解明されていない。演者は、蛋白抗原を認識するMabsを作出するため、トリクロロ酢酸処理Nine Mile株 II 相菌を免疫抗原として、3種(K7、K24およびK57)の62kDaおよび6種(K13、K34、

K43、K59、K64およびK82)の29-31kDa認識Mabsを作出した。これらのMabsと共にI相菌の免疫により作出した62kDaおよび29-31kDa認識Mabs各1種(H21およびH106)の計11種のMabsを用い、その反応性を解析した。1) *C. burnetii* の熱ショック蛋白質に対するMabs：本菌の62kDa抗原は、免疫原性の熱ショック応答蛋白質(HSP)とされ、*Escherichia coli* のGroELに高い相同性を示す。HSPは病原因子の一つと考えられ、多種の細菌が保有する。62kDa認識Mabsは他の細菌との交差性から3種に分かれた。MabK7は本菌と特異的に反応したが、他3種のMabsは交差反応した。本菌のHSPは早期免疫抗原と考えられているため、それに対する本菌特異的抗体の検出は、臨床診断への応用の可能性がある。今後、MabsK7はQ熱の診断法の確立を目指したHSP上の本菌特異的抗原の解析に有用と考えられた。2) *C. burnetii* の主要外膜抗原に対するMabs：本菌の67および29kDa抗原は免疫原性外膜抗原とされている。29-31kDaに対するMabsは非加熱処理抗原の67kDaと、また、ムタノリシン(N-アセチルムラミダーゼ)処理抗原の29および31kDaの両者のバンドに反応した。MabK64を含む2種のMabsは2-メルカプトエタノール処理抗原の24kDa、プロテナーゼK処理抗原の18kDaに反応し、アルカリ処理抗原には反応しなかった。したがって、これらのMabsはAmanoら(1984)によって報告されている本菌のペプチドグリカン蛋白複合体を認識すると考えられた。MabsK34および43は29-31および20kDaに反応した。29-31kDaにはLPS認識MabH72も反応した。したがって、29-31kDa抗原はLPS、20kDa蛋白、ペプチドグリカンなどが結合している複合体と考えられた。

*C. burnetii* 22株のMabsによる型別：作出したMabs19種を用い、間接蛍光抗体法およびドットブロッティングにより、*C. burnetii* 22株(QpH1プラスミド保有16株、QpDVプラスミド保有2株、QpRSプラスミド保有1株およびプラスミド非保有株3株)を型別した。蛋白認識Mabsはすべての株に反応し、22株は型別ができなかった。LPS糖鎖認識MabsのMabsH45およびH5B

はI相菌型LPS保有株にのみ反応し、II相菌には反応しなかった。したがって、これらのMabsは*C. burnetii*のLPS型を識別できることが示唆された。LPSコア部認識Mabs3種はQpH1プラスミド保有の16株すべてに反応したが、MabH64はそれ以外の6株に、MabsH72およびH73はプラスミド非保有3株およびQpRSプラスミド保有株に、また、MabsH78、H70およびH80はQpRSプラスミド保有株に反応しなかった。このため、本菌の保有プラスミド型はコア部認識Mabsの反応より識別できることが示唆された。ウエスタンブロッティングにより、各プラスミド型の代表株(Nine Mile, MAN, PriscillaおよびS Q217)に対するMabsH45、H78、H72およびH64の反応性の相異を確認したところ、MabsH45およびH72は型別の結果と同様の反応を示した。一方、MabsH78およびH64は、型別の結果と異なり、MabsH72と同様に反応した。このため、QpH1とQpDVプラスミド保有株間、および、QpRSプラスミド保有とプラスミド非保有株間のエピトープレベルにおける相異は確認できなかった。

#### D. 結論

*C. burnetii icd* 遺伝子から患者の病態を識別できる新しい遺伝子診断法を開発した。

本菌の主要免疫原性抗原とされるLPS、29および62kDa抗原に対するMabsを多数作製した。これらのMabsはそれぞれ免疫化学的および遺伝子学的研究において、診断法の開発、抗原構造および機能の解析、病原性支配遺伝子の決定などに有用と考えられる。

#### E. 研究発表

##### 1. 発表論文

- 1) Nguyen, Sa V. and Hirai, K.: Differentiation of *Coxiella burnetii* isolates by sequence determination and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of isocitrate dehydrogenase gene, FEMS Microbiol. Lett. 180:243-254, 1999.
- 2) Hotta, A., Kawamura, M., Yamaguchi, T., Fukushi, H. and Hirai, K: Antigenic analysis of *Coxiella burnetii*

using monoclonal antibodies to LPS. J. Clin. Microbiol. in press, 2000.

##### 2. 口頭発表

- 1) Nguyen Van Sa, To Ho, 山口剛士、福士秀人、平井克哉: *Coxiella burnetii icd* 遺伝子の塩基配列同定・比較およびPCR-Restiction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)の解析による分離株の識別、第128回日本獣医学会(1999.10)
- 2) 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)
- 3) 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(1998.4)
- 4) 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)

## 分担研究報告書

### ヒトおよび動物におけるQ熱の疫学的研究

分担研究者

長岡宏美

#### 研究要旨

ヒトと動物におけるQ熱の疫学調査を行った結果下記の成績を得た。1) *C. burnetii* 感染によって引き起こされるヒトの症状は多彩であることが示唆された。2) 我が国においても、Post Q fever fatigue syndromeの存在が示唆された。3) 牛群に *C. burnetii* が広く浸淫し不顕性感染が多いことが示唆された。4) ウシの *C. burnetii* 感染初期にはリケッチア血症を呈し、後に乳汁に移行することが示唆された。

#### A 研究目的

Q熱(コクシエラ症)は、わが国にも広く存在する人獣共通感染症であり、平成11年4月から施行された感染症新法において4類感染症に位置し、ヒトにおける症例報告が義務付けられたが、ヒトの症状をはじめとして未解明の部分が多い。ヒトの症状の解明と感受性と産業動物であるウシの浸淫状況、感染様式について疫学調査を実施した。

#### B 研究方法

336症例の血液、鼻咽頭ぬぐい液、血清についてマウス接種またはPCRによる遺伝子検出を行い、*C. burnetii* 感染が確認された患者についてはその臨床症状について疫学調査を行った。また、慢性疲労症候群様患者110例の血液についてPCRにより *C. burnetii* 遺伝子の検出を試み、Post Q fever fatigue syndromeの存在について検討した。

ウシの浸淫状況および感染様式の調査には、静岡県内の食肉衛生検査所に搬入されたウシの生乳57検体および血液10検体についてマウス接種により *C. burnetii* の分離を試みると共に、間接蛍光抗体法により抗体価を測定した。

(倫理面への配慮)

本調査に供試したヒトの検体は、臨床医がQ熱を疑い当研究所に検査を依頼したものであり、患者との間には十分なインフォームドコンセントがあったと理解している。また、得られた成績は速やかに臨床医に還元され、患者の治療に役立てられた。また、本実験に用いたマウスに対してはエーテル麻酔下で解剖を行うなど動物愛護に

十分配慮した。

#### C 研究結果

各種臨床症状の336例の検体のうち、インフルエンザ様症状24/49例(48.9%)、上気道炎7/12例(58.3%)、不明熱8/23例(34.8%)、異型肺炎3/16例(18.8%)などのほか川崎病、血管性紫斑病、水痘、腸炎、発疹症、頸部リンパ節炎からも *C. burnetii* が分離された。また、慢性疲労症候群様患者35/110例(31.8%)の血液中に *C. burnetii* 遺伝子を確認した。遺伝子検出率は一般健康人との間に明らかな有意差を認めず、患者の性別、年齢、居住地に偏りはなく、35例の遺伝子陽性患者にはMINO投与が施されたが、このうち6/7例で治療効果が確認された。

一方、食肉衛生検査所に搬入されたウシの生乳では57例中21例(36.8%)、血液は10例中5例(50%)から *C. burnetii* が分離された。*C. burnetii* が分離されたウシのうち30%は乳房炎、肝炎、胃炎、卵巣嚢腫、心膜炎を呈していたが、70%は臨床的および病理学的異常は認められなかった。また、生乳と血液の両方が採取できた10例について抗体価を測定したところ、IgG抗体価は血液から *C. burnetii* が分離された群より生乳から分離された群で高かった。

#### D 考察

ヒトにおける調査の結果、諸外国での報告と同様に、わが国においてもインフルエンザ様症状、上気道炎、異型肺炎、不明熱など従来から急性Q熱の典型的症状と言われている患者からの *C. burnetii* 検出率が高かったが、一方で川崎病、血管性紫斑病、