

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 9 ～ 11 年度 総合研究報告書

平成 11 年度 研究報告書

平成 12 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. 総合研究報告書：
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・・・ 1
主任研究員： 高島郁夫 （北海道大学大学院獣医学研究科）
2. 総括研究報告書：
ダニ媒介性新興感染症の疫学、発症機序および予防法に関する研究・・・ 17
主任研究員： 高島郁夫 （北海道大学大学院獣医学研究科）
3. Q熱の疫学的研究・・・ 27
分担研究者： 平井克也 （岐阜大学農学部）
4. ライム病の診断・・・ 33
分担研究者： 増澤俊幸 （静岡県立大学薬学部）
5. ダニ脳炎ウイルスの病原性・・・ 37
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・・・ 41
分担研究者： 荻和宏明 （北海道大学大学院獣医学研究科）
7. ツツガムシ病の疫学に関する研究・・・ 45
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. ライム病の疫学・・・ 49
分担研究者： 中村和幸 （長野県衛生公害研究所感染症部）
9. ライム病の組換え抗原の開発・・・ 53
分担研究者： 渡辺治雄 （国立感染症研究所細菌部）

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

主任研究者 高島郁夫 北海道大学大学院獣医学研究科 教授

研究要旨

ダニ媒介性脳炎については北海道ウイルス株の起源を調べたところ、約240～600年前にロシア極東地区において祖先ウイルスから分岐し北海道に出現したと考えられた。北海道と極東ロシアに流行しているダニ媒介性脳炎ウイルス同定できる単クローン性抗体を作出した。さらにマウス感染モデルにおいて免疫組織化学的手法を用いてダニ媒介性脳炎の病態が解析可能となった。

Q熱については職業別の感染の相違を検討するため一般健康者と小動物臨床獣医師のQ熱リケッチアに対する抗体保有率を比較した。その結果獣医師は、一般健康者より有意に高い抗体保有率を示した。

ライム病については林業作業員に高い抗体陽性率を認めた。ライム病の診断用抗原としてp83, fla, BmpA, OspCを遺伝子組換えマルトース結合蛋白質融合蛋白質として発現させることに成功し、患者血清のウエスタンブロットの検査において特異性と感度の改善が見られた。ライム病ボレリア新規病原因子VIs抗原が特定の組織への菌の生着に関与している可能性が示された。

ツツガムシ病の患者は宮崎、山形、熊本で増加していた。年齢別では60歳以上が大半を示していた。発生時期は5月を小ピーク11月を大きなピークとする2峰性のパターンであった。

研究分担者

平井克哉	岐阜大学・農学部	教授
増沢俊幸	静岡県立大学・薬学部	助教授
岩崎琢也	国立感染症研究所・ 感染病理部	室長
苅和宏明	北海道大学・ 大学院獣医学科	助教授
萩原敏且	国立感染症研究所・ ウイルス第一部	室長
中村和幸	長野県衛生公害研究所・ 感染症部	部長
渡辺治雄	国立感染症研究所・ 細菌部	部長

B. 研究方法

単クローン性抗体の作出および遺伝子工学的的手法による抗原の作出などにより特異性の高い診断法を確立する。国内の各地においてヒト、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ヒトの感染状況、汚染地の特定を計り、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体の起源を推定するとともに病原因子の同定を計った。

C. 研究結果

ダニ媒介性脳炎については1998年にハバロフスクにおいてウイルスを分離し、これらハバロフスク株とすでに分離されている北海道渡島株のエンベロープ蛋白遺伝子の核酸塩基配列を比較した。これらのウイルス株の同義置換率から、これらのウイルス株は約260～430年前に分岐したと推定された。さらに、ダニ

A. 研究目的

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査を実施して汚染状況を明確にする。また病原性に関与する病原体の因子を同定する。さらに効果的な診断法を開発する。

媒介性脳炎ウイルス渡島株とハバロフスク株はマウスにおいて同様の強い毒力を示した。さらにダニ媒介性脳炎ウイルスを同定するための診断用抗体として、北海道で分離された渡島株に対する単クローン性抗体が得られ、これらはすべて渡島株のエンベロープ蛋白と反応した。これらの単クローン性抗体はフラビウイルス属特異的、ダニ媒介性脳炎ウイルス群特異的またはダニ媒介性脳炎ウイルス特異的なものに分類され、分離ウイルス株の同定に有用であることが判明した。またダニ媒介性脳炎ウイルスのマウス感染実験モデルの脳ならびに脊髄の組織学的変化について、上記の単クローン抗体を使用して免疫組織学的に解析した。Sofjin株ならびにOshima 5-10株の感染マウスでは感染後5日目より脳組織内に感染細胞を同定できたことにより、人体感染組織のretrospectiveな診断も期待できる。

Q熱について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について血清疫学的調査を行った。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抗体陽性率の高い群と低い群に分けられた。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に差は認められなかった。

ライム病診断用抗原の安定供給を目的として、ライム病の診断抗原として重要とされるp83、fla、BmpA、OspCを遺伝子組換えマルトース結合蛋白質(MBP)融合蛋白質として発現させることに成功

した。遺伝子組換え大腸菌より得られたこれらの精製抗原は、アミロース樹脂カラムにより精製した。日本のライム病患者、健康人血清と得られた抗原の反応性をウエスタンブロットにより検討した。遺伝子組換え抗原を用いることで、全菌体抗原を用いた場合に比べ、特異性、感度の改善が見られることを確認した。また、健康者血清の中にはMBPと反応するものが見られることから、今後ファクターXaにより、融合蛋白質を消化した後、診断に用いるべきであることが明らかになった。本研究により、ライム病診断用遺伝子組換え抗原の安定供給法が確立できた。さらにライム病ボレリア新規病原因子VIs抗原は、特定の組織への生着に関与している可能性が極めて高いことを明らかにした。ライム病流行地域において、顔面神経麻痺の有無を指標とした神経ライムの疫学調査を実施し、ライム病に起因する顔面神経麻痺患者は極めて少数であること、単純ヘルペスウイルス(HSV)性顔面神経麻痺患者は有意にライム病偽陽性となる可能性があることを明らかにした。さらに医療機関からのライム病を疑うマダニ咬症患者についてライム病血清抗体調査を実施したところ、約2割が血清抗体の上昇がみられた。林業従事者に対してライム病血清抗体検査を実施し、およそ2割の従事者が過去にライム病の原因とされるボレリアに感染していたことを強く疑う結果となり、山林等では感染の危険性が高いことが窺えた。また山林従業者の約35%がマダニ刺咬経験者であり、そのほとんどが作業中もしくは休憩中に刺咬されていた。刺咬後の対処方法は、9割以上が自分や同僚、家族等が除去しており、医療機関を受診したものはわずかであった。このことから、ライム病に対する認識の低いことが明らかになった。

1998年に国立感染症研究所に報告されたツツガムシ病および紅斑熱患者は430名(うち13名は紅斑熱)で1997年(480名、うち24名は紅斑熱)に比べやや減少した。地域別にみると、ツツガムシ病では、千葉、大分では患者が減少したが、宮崎、山形、熊本は増加していた。紅斑熱は鹿児島および千葉での減少が目立った。ツツガムシ病、紅斑熱とも患者発生は例年と同様に性差はなく、年齢も60歳

以上が大半を占めていた。発生時期はツツガムシ病では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、11月のピークは関東以西の患者発生であった。紅斑熱では7月をピークとする発生がみられた。感染場所および作業内容は両疾患ともに例年の如く山地あるいは農地での作業が最も多いことがわかった。神奈川、千葉および宮崎県から1999年の調査結果が報告された。99年はツツガムシ病が増加傾向にある。また、神奈川におけるツツガムシ病リケツチアは1998年と同様にKawasakiであるが、Kurokiも少数ながら検出された。しかし、Kurokiが特定の地域に限局する傾向はなかった。宮崎では血清反応のみであるがKawasakiが主体で、Kurokiの比率はKawasakiのおよそ1/2であった。

D. 考察

今回の解析の結果、北海道の渡島株はロシア極東地区の祖先のウイルスから分岐し約260～430年前に北海道に出現したと推定された。この成績とこれまで北海道での疫学調査の成績を合わせると、ダニ媒介性脳炎ウイルスは北海道で長い間にわたり定着していることが示唆された。次の疑問はどのような方法でウイルスが北海道に持ち込まれたかである。一つの可能性は渡り鳥が感染でマガニをロシア極東地区から日本に持ち込んだことである。次の可能性は病原巣の小哺乳動物がウイルスに感染したままで大陸から日本に移動したことである。ダニ媒介性脳炎ウイルスの北海道における媒介マガニはウイルス分離の成績からヤマトマガニと推定された。ロシア極東地区ではシュルツエマガニが主要媒介マガニである。ダニ媒介性脳炎ウイルスが数百年の間に容易に媒介マガニを変えて新しい地に定着できたことは興味深い。今回の免疫組織学的解析ではSofjin株とOshima 5-10株感染マウスにおいて高感度の検出法を用いてウイルス感染細胞の局在を示した。興味深いことに、従来の感度の検出法ではSofjin株感染マウスのみが陽性であった。このことはSofjin株が感染した神経細胞とOshima 5-10株が感染した細胞ではウイルスの増

殖の程度が非常に異なることを意味している。また、初年度報告したようにSofjin株感染マウスではウイルスの感染によると思われる神経細胞の破壊像が容易に検出できるのに対し、Oshima 5-10株感染マウスでは炎症性反応の所見は認められるのに、神経細胞の変性・壊死が乏しいことと相関している。この両者のウイルス株の違いについてはさらに検討する必要がある。

分離ウイルスの同定のためにダニ媒介性脳炎ウイルス渡島株に対する単クローン性抗体を作出し反応パターンを調べた。その結果フラビウイルス属特異的、ダニ脳炎ウイルス群特異的、ダニ脳炎ウイルス特異的な単クローン性抗体が得られた。これらの抗体は今後分離ウイルス株の同定に有効に使用できる。さらにこれらの単クローン性抗体を抗原捕捉用に用い、抗体測定用ELISAの開発への利用が期待される。

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。

ライム病の血清診断では、遺伝子組換え抗原を用いることにより、血清診断の特異性が向上することが報告されている。また、ボレリアの増殖速度が極めて遅く大量培養が困難なため、広く普及可能な血清診断法を開発する上で、遺伝子組換え蛋白質を抗原として用いることが必要不可欠である。米国では、*B. burgdorferi* s. s. 由来の遺伝子組換え抗原を用いた血清診断キットが広く普及し、このことが米国のライム病の早期診断を可能にしている。昨年度まではHisタグをC末端に結合させた遺伝子組換え抗原を作製したが、発現量が少なく、実用に供給するには不十分と判断し、新たな遺伝子組換え抗原作製を計画した。MBP融合蛋白質をIPTGで誘導することにより多量に発現させ、さらにアミロース樹脂を用いた発現蛋白質の精製

後も、実用に供するに十分な抗原が回収できた。さらに、この遺伝子組換え抗原を用いたイムノブロット法により健常者血清、ならびに患者血清の反応性を検討しところ、全菌体抗原よりも総合的に診断抗原の検出に感度、精度に優れることが明らかとなった。また、交差反応を減少させることができることも示唆され、血清診断の一次スクリーニングに適することが明らかになった。一方、健常者血清中にはMBPと反応する抗体が存在することが確認されたため、今後、更にファクターXaによるMBPと抗原蛋白質の分離を行うことが必要と考える。4種遺伝子組換え蛋白質を組み合わせたイムノブロット法は全菌体抗原を用いたウエスタンブロット、あるいはELISA法に代わる方法として広く普及が可能であり、今度本法の普及を実現していく計画である。これを行うことで日本におけるライム病血清診断の確立を達成できるものと考えている。

一方、ライム病患者は、髄膜炎、心筋炎など多彩な病状を呈するが、これは一過性の全身感染を経て、特異的な組織に病原体が生着した結果であると考えられているが、既存の病原因子では心筋炎、髄膜炎などの成因を説明する病原体の組織特異的生着能を説明できない。本研究で見いだされた、特定のVls-typeによる免疫が、心臓での生着を阻害したことは、ボレリア感染による多彩な病態がVls抗原変換に起因する可能性を示している。

ツツガムシ病患者発生は1997年は480であったが、98年は417とやや減少した。1997年に患者が多数発生したが98年は未報告の地域があるため、総数での減増は明確でないが、両年とも報告された地域についてみると、千葉および大分では減少し、宮崎、山形、熊本では増加していた。宮崎県での調査では患者増減の原因として感染リケッチアの型の変動、すなわちKawasaki型の増加をあげている。また、神奈川でも1998年はKawasaki型の増加が目立っている。したがって、感染リケッチア型の変動が患者発生の増減にかなり関与していると思われるが、その原因はまだ不明である。昨年度すでに報告したが、1997年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、阿武隈川流域のダニについて調査したところ、タテツツガムシの生息が確認されている。リケッチアは分離できていないが、われわれのところでも山形でKawasaki型にのみ特異的に反応する患者を確認している。本来暖かい地域に生息するとされていたタテツツガムシ(Kawasaki型を媒介)の北上により、東北・北陸のツツガムシ病も変化すると考えられることから、今後感染リケッチアの型別調査を実施したい。

E. 結論

北海道のダニ媒介性脳炎は数百年ほど前に極東ロシアで祖先ウイルスから分岐し北海道に出現したものと推定された。またマウスの感染モデルでダニ媒介性脳炎の病態の解析が可能となった。さらにウイルス同定のための単クローン性抗体が作出された。

Q熱については一般健康者に比べ小動物臨床獣医師がQ熱リケッチアに対する抗体陽性率が有意に高く、愛玩動物からの感染が疑われた。

ライム病については森林作業員に高い抗体陽性を見いだすとともに、遺伝子組換え技術により良好な診断用抗原の量産が可能となった。

ツツガムシ病については1998年の患者発生数はやや減少傾向にあった。

F. 研究発表

1. 発表論文

- 1) 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, 1999
- 2) 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* 17: 1532-1539, 1999
- 3) Terajima M, Hendershot JD 3rd, Kariwa H, Koster FT, Hjelle B, Goade D, DeFronzo MC, Ennis FA,.: High levels of viremia in patients with the

- Hantavirus pulmonary syndrome. J. Infect. Dis. 180, 2030-2034, 1999
- 4) Hayasaka, D., Suzuki, Y., Kariwa, H., Ivanov, L., Volkov, V., Demenev, V., Mizutani, T., Gojobori, T., Takashima, I. : Phylogenetic and virulence analysis of tick-borne encephalitis viruses from Japan and far-eastern Russia. J. Gen. Virol., 80, 3127-3135, 1999
- 5) Takeda, T., Ito, T., Osada, M., Takahashi, K., Takashima, I. : Isolation of tick-borne encephalitis virus from wild rodents and a seroepizootologic survey in Hokkaido, Japan. Am. J. Trop. Med. Hyg. 60, 287-291, 1999
- 6) 高島郁夫, 早坂大輔 : ウイルス性ダニ媒介脳炎, 医学のあゆみ, 189, 949-950, 1999
- 7) 高島郁夫, 早坂大輔 : ダニ媒介性脳炎, ウイルス, 49, 155-163, 1999
- 8) Kariwa, H, Yoshimatsu K, Sawabe J, Yokota E, Arikawa J, Takashima I, Fukushima H, Lundkvist Shubin FN, Isachkova LM, Slonova RA, Leonova GN, Hashimoto N. Genetic diversities of hantaviruses among rodents in Hokkaido, Japan and Far East Russia. Virus Res., 59, 219-228, 1999
- 9) Morii M, Yoshimatsu K, Arikawa J, Zhou G, Kariwa H, Takashima I. Antigenic characterization of Hantaan and Seoul virus nucleocapsid proteins expressed by recombinant baculovirus: application of a truncated protein, lacking an antigenic region common to the two viruses, as a serotyping antigen. J. Clin. Microbiol. 36: 2514-2521, 1999
- 10) Kariwa, H., Yoshimatsu, K., Araki, K., Chayama, K., Kumada, H., Ogino, M., Ebihara, H., Murphy, M.E., Mizutani, T., Takashima, I., Arikawa, J.: Detection of hantaviral antibodies among patients with hepatitis of unknown etiology in Japan. Microbiol. Immunol. (In press) 2000
- 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, 103:341-342, 1999.
- 12) Sawaishi, Y., Takashima, I., Hirayama, Y., Hirai, K., Takada, Goro.: Life-threatening acute cerebellitis caused by coxiella burnetii. Annals of Neurology, 45:124-127, 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. 37:1123-1129, 1999.
- 14) 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.
- 15) Nguyen, S. V., To H., Yamaguchi, T., Fukushi, H. and Hirai, K.: Characterization of the *Coxiella burnetii* *suc B* gene encoding an immunogenic dihydrolopoamide succinyltransferase. Microbiol. Immunol. 43:743-749, 1999.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) Masuzawa, T., Fukui, T., Miyake, M., Oh, H-B., Cho, M-K., Chang, W-H., Imai, Y. and Yanagihara, Y. Determination of members of a *Borrelia afzelii*-related group isolated from *Ixodes nipponensis* in Korea as *Borrelia valaisiana*. Int. J. Syst. Bacteriol., 49, 1409-1416 (1999)
- 19) 増澤俊幸 : 特集 新興・再興感染症「ライム病」 CURRENT THERAPY, 17, 331-334 (1999)
- 20) 増澤俊幸: 感染症とその治療-新しい視点から- () 細菌感染症「日本にお

- けるライム病」最新医学 54, 733-740 (1999)
- 21) 増澤俊幸, 柳原保武: エールリッヒア症. エマージングディゼイズ (竹田美文, 五十嵐章, 小島荘明 編集) 近代出版 (東京) pp.116-121 (1999)
- 22) 増澤俊幸, 柳原保武: ライム病. エマージングディゼイズ (竹田美文, 五十嵐章, 小島荘明 編集) 近代出版 (東京) pp.122-126 (1999)
- 23) 増澤俊幸: ライム病. 感染症診断・治療ガイドライン, 日本医師会雑誌増刊 (岩本愛吉, 大月邦夫他 編集) 医学書院 (東京) pp.176-177 (1999)
- 24) 尾崎弘岳, 笹尾ゆき, 松山孝, 小澤明, 篠永哲, 増澤俊幸. アカコッコマダニの人体咬着の一例. 皮膚科の臨床ミニレポート (印刷中)
- 25) Ishiguro F., Takada, N., Masuzawa, T., and Fukui T. Prevalence of Lyme disease *Borrelia* spp. In ticks from migratory birds on the Japanese mainland. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66 (in press)
- 26) Matsuo K, Iwasaki T, Asanuma H, Yoshikawa T, Chen Z, Tsujimoto H, Kurata T, Tamura S: Cytokine mRNAs in the nasal-associated lymphoid tissue during influenza virus infection and nasal vaccination. *Vaccine* 18: 1344-1350, 2000
- 27) 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
- 28) 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* 144: 675-685, 1999
- 29) Osaki M, Matsubara K, Iwasaki T, Kurata T, Nigami H, Harigaya H, Baba K: Severe aplastic anemia associated with human parvovirus B19 infection in a patient without underlying disease. *Ann Hematol* 78: 83-86, 1999
- 30) 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
- 31) Kobayashi M, Nagata S, Iwasaki T, Yanagihara K, Saitoh I, Ihara S, Fukui Y: Dedifferentiation of adenocarcinomas by activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc Nat Acad Sci USA*. 96: 4874-4879, 1999
- 32) Sato Y, Asahi Y, Iwasaki T, Matsukura T, Kurata T, Sata T: Detection of adeno-associated virus type 2 in patients with viral infection. *Jpn J Infect Dis* 52: 50-51, 1999
- 33) Tamura S, Iwasaki T, Thompson AH, Asanuma H, Chen Z, Suzuki Y, Aizawa C, Kurata T. Antibody-forming cells in the nasal-associated lymphoid tissue during primary influenza virus infection. *J Gen Virol* 79: 291-299, 1998
- 34) 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
- 35) 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
- 36) Kawabata H, Myouga F, Inagaki Y, Murai N and Watanabe H. Genetic and immunological analyses of VIs (VMP-like sequences) of *Borrelia burgdorferi*. *Microbial Pathogenesis*. 24, 155-166, 1998

- 37) Furuta Y, Ohtani F, Kawabata H, Fukuda S, Bergstrom T.: High prevalence of Varicella-zoster virus reactivation in Herpes simplex virus-seronegative patients with acute peripheral facial palsy. Clin Infect Dis. 2000 (in press)
- 38) 落合豊子, 森嶋隆文, 松本千幸, 川端寛樹. 多発性遊走性紅斑とライム病. 皮膚病診療. 21(10), 937-940. 1999.
- 39) 海保郁男, 水口康雄: 千葉県における紅斑熱群リケッチア症とその発生状況、病原微生物検出情報、20, 214-215, 1999.
- 40) 山本正悟, 木添和博, 吉野修司: 宮崎県における紅斑熱の発生状況、病原微生物検出情報、20, 216-217, 1999.
- 41) 古屋由美子, 片山 丘, 原 みゆき, 吉田芳哉, 今井光信: 日本紅斑熱野実験室診断、病原微生物検出情報、20, 217-218, 1999.
- 42) 萩原敏且, 吉田芳哉, 海保郁男, 伊藤忠彦, 根本治育, 後藤敦, 益川邦彦 (衛生微生物技術協議会検査情報委員会ツツガムシ病小委員会): 1998年ツツガムシ病・紅斑熱様患者集計報告、病原微生物検出情報21, 2000.
2. 学会発表
- 1) 早坂大輔, 長田美母衣, 苺和宏明, 千葉暢幸, 水谷哲也, 高島郁夫: 北海道のダニ媒介性脳炎ウイルスの分布と起源: 第127回日本獣医学会、相模原 (1999. 4)
- 2) 千葉暢幸, 水谷哲也, 苺和宏明, 高島郁夫: ダニ媒介性脳炎ウイルス北海道株に対する単クローン性抗体の作製と性状解析: 第1267回日本獣医学会、相模原 (1999. 4)
- 3) 田邊寛樹, 苺和宏明, 水谷哲也, 高島郁夫: ハンタウイルスの高感度な遺伝子検出法の開発と複製機構の解析: 第127回日本獣医学会、相模原 (1999. 4)
- 4) 稲垣永恵, 水谷哲也, 苺和宏明, 高島郁夫: ボルナ病ウイルス持続感染細胞におけるウイルスの複製と転写の調節: 第127回日本獣医学会、相模原 (1999. 4)
- 5) Yoshimatsu, K., Araki, K., Ogino, H., Ebihara, A., Lundkvist, A., Kariwa, H., Takashima, T., Arikawa, J.: Application of a truncated hantavirus nucleocapsid protein for serotyping Hantaan, Seoul, and Dobrava viruses: Thirty-Third Joint Working Conference On Viral Diseases, The Japan-United States Cooperative Medical Science Program, Chevy Chase, Maryland, United States, (1999, 6)
- 6) Kariwa, H., Tanabe, H., Mizutani, T., Murphy, M. E., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Takashima, T.: Plus and minus strand RNA synthesis of Seoul type hantavirus in vitro and in vivo: Thirty Third Joint Working Conference On Viral Diseases, The Japan-United States Cooperative Medical Science Program, Chevy Chase, Maryland, United States (1999. 6)
- 7) Takashima, I., Hayasaka, D., Suzuki, Y., Kariwa, H., Mizutani, T.: Phylogenetic analysis of tick-borne encephalitis viruses from Japan and Far East Russia and the efficacy of European vaccine.: Thirty-Third Joint Working Conference On Viral Diseases, The Japan-United States Cooperative Medical Science Program, Chevy Chase, Maryland, United States (1999. 6)
- 8) 川田倫子, 早坂大輔, 水谷哲也, 苺和宏明, 高島郁夫: 中和試験によるダニ媒介性脳炎の血清診断法: 第128回日本獣医学会、熊本 (1999. 10)
- 9) 稲垣永恵, 水谷哲也, 早坂大輔, 苺和宏明, 高島郁夫: アクチノマイシンDによるボルナ病ウイルスの転写促進機構の解析: 第128回日本獣医学会、熊本 (1999. 10)
- 10) Michel E. Murphy, 苺和宏明, 田邊寛樹, 水谷哲也, 吉松組子, 有川二郎, 高島郁夫: ラクトフェリンの抗ハンタウイルス活性の評価と作用機序の解析: 第128回日本獣医学会、熊本 (1999. 10)
- 11) 荒木幸一, 吉松組子, 萩野倫子, 海老原秀喜, 苺和宏明, 高島郁夫, 有川二郎: ハンタウイルス組み換え核蛋白を用いた血清型鑑別診断法の開発: 第128回日本獣医学会、熊本 (1999. 10)
- 12) 有川二郎, 吉松組子, 王華, 海老原秀

- 喜、荻野倫子、荻和宏明、高島夫：中国および極東地域で分離されたハンタウイルス株間の抗原性ならびに遺伝子の比較・解析：第47回日本ウイルス学会
- 13) 早坂大輔、鈴木善幸、荻和宏明、水谷哲也、五条堀孝、高島郁夫：日本と極東ロシアのダニ媒介性脳炎ウイルスの系統解析および病原性の比較：第47回日本ウイルス学会総会、横浜 (1999. 11)
- 14) 稲垣永恵、水谷哲也、早坂大輔、荻和宏明、高島郁夫：アクチノマイシンDによるボルナ病ウイルスの転写促進機構の解析：第47回日本ウイルス学会総会、横浜 (1999. 11)
- 15) 荻和宏明、Michel E. Murphy, 田邊寛樹、水谷哲也、吉松組子、有川二郎、高島郁夫：ラクトフェリンの抗ハンタウイルス活性の評価と作用機序の解析：第47回日本ウイルス学会総会、横浜 (1999. 11)
- 16) 吉松組子、王華、荻野倫子、海老原秀喜、荻和宏明、高島郁夫、有川二郎：中国で分離された新しいハンタウイルス、*Niviventer confucianus* および *Rattus rattus* 由来株の解析：第47回日本ウイルス学会総会、横浜 (1999. 11)
- 17) 荒木幸一、吉松組子、荻野倫子、海老原秀喜、荻和宏明、高島郁夫、有川二郎：共通抗原部位欠損核蛋白を用いたハンタウイルス血清型鑑別診断法の開発：第47回日本ウイルス学会総会、横浜 (1999. 11)
- 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* Disocitrate 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)
- 21) 宮本健司、橋本喜夫、増澤俊幸：平成10年度のマダニ刺咬例とライム病患者の発生。第51回日本衛生動物学会 (東京)、1999年4月8日
- 22) Toshiyuki Masuzawa, Nobuhiro Takada, Yasuyuki Imai, and Yasutake Yanagihara: Molecular Epidemiology of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato in the East Asia. VIII International Conference on Lyme Borreliosis and Other Emerging Tick-Borne Diseases. (Munich, Germany), June 21, 1999
- 23) 増澤俊幸、久手堅みどり、内海宏之、高田伸弘、今井康之：ライム病関連ボレリアの極東アジア地域における分布、維持、伝播に関する研究。第14回微生物シンポジウム (新潟)、1999年9月17日
- 24) 高田伸弘、矢野泰弘、藤田博己、大竹秀夫、馬曉航、増澤俊幸：中国新疆におけるマダニのボレリア保有状況、特に *ricinus-complex* について。第8回日本ダニ学会 (松山)、1999年9月27日
- 25) 増澤俊幸：山歩きに御用心! ダニによる感染症 ライム病 埼玉県衛生研究所 (地域保険推進事業)、2000年3月2日
- 26) 久手堅みどり、越智あやの、今井康之、増澤俊幸：東アジア地域におけるライム病関連ボレリア種の分布と維持伝播。生化学会 中部支部会 (静岡)、2000年5月13日 発表予定
- 27) 内海宏之、兼城亜由子、今井康之、増澤俊幸：4種遺伝子組換え抗原を用いた日本型ライム病血清診断法の開発。生化学会 中部支部会 (静岡)、2000年5月13日 発表予定
- 28) 久手堅みどり、越智あやの、今井康之、増澤俊幸：中国台湾におけるライム病関連ボレリアの系統解析。第37回レプトスピラシンポジウム (札幌)、2000年5月27日 発表予定
- 29) 内海宏之、兼城亜由子、今井康之、増澤俊幸：遺伝子組換えライム病ボレリアスフィンゴ糖脂質結合蛋白質 (Gbp37) の作製と結合活性の検討。第37回レプトスピラシンポジウム (札幌)、2000年5月27日 発表予定
- 30) 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.

東京、1999。

- 31) 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。
- 32) 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。
- 33) 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。
- 34) 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。
- 35) 宮本健司、片山 耕、増沢俊幸、川端寛樹：胸肋鎖関節炎を伴ったライム病の1例。第36回レプトスピラシンポジウム。1999年3月。東京。
- 36) 松本千幸、落合豊子、布施寧子、伊藤英介、森嶋隆文、川端寛樹：多発性慢性遊走性紅斑(ECM)を初発皮膚症状とした Lyme病。第36回レプトスピラシンポジウム。1999年3月。東京。
- 37) 矢野貴彦、磯貝恵美子、川端寛樹、田坂佳千：広島県内で発生した *Haemaphysalis flava* による Lyme病の一例。第7回ダニと疾患のインターフェイスに関するセミナー。1999年6月。島根。
- 38) 矢野貴彦、金子栄、江木素子、磯貝恵美子、川端寛樹、井口王秀吉：ライム病-広島県届出第一例目。第17回安佐医学会。1999年11月。広島。
- 39) 矢野貴彦、江木素子、金子栄、磯貝恵美子、川端寛樹、井口王秀吉：ライム病の1例。第106回日本皮膚科学会広島地方会。2000年2月。広島。
- 40) 萩原敏且、吉田芳哉、海保郁男、伊藤忠彦、根本治育、後藤 敦、敦、益川邦彦：日本斑熱の発生状況—調査票からの解析—第73回日本感染症学会総会、東京、1999。
- 41) 小川基彦、萩原敏且、志賀定詞、吉田芳哉、海保郁男、伊藤忠彦、根本治育、後藤敦、益川邦彦：1998年ツツガムシ病の発生状況、第6回リケッチア研究会、

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

Q熱は、*Coxiella burnetii* を原因とする人獣共通感染症で、家畜や愛玩動物がヒトの感染源となるため、農業従事者、と畜場従業員、獣医師など家畜および愛玩動物と接触頻度の高い職業に危険性が指摘されている。我が国においては職業別の疫学調査や感染源の特定などがほとんど行われておらず、その実態は不明である。今回、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について血清疫学的調査を行った。

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に差は認められなかった。

A.研究目的

C. burnetii の宿主域は極めて広く、哺乳類、鳥類およびダニを代表とする節足動物にも感染し、動物のククシエラ症の原因菌としても知られている。*C. burnetii* はダニと野生動物を宿主とした野生動物-ダニ、野鳥-ダニという感染環を持つ。この感染環に家畜およびヒトが介入し、ダニ-家畜-家畜もしくはダニ-家畜-ヒトの第二の感染環が生じる。感染動物は尿、糞便、乳汁、特に出産時の胎盤や羊水などと共に病原体を排出し、環境を汚染する。ヒトは汚染されたエアロゾルを吸入することにより経気道感染することが多い。感染源はウシ、ヤギ、ヒツジなどの家畜が最も一般的で、Q熱はと畜場従業員や農業従事者など家畜との接触があるヒトに多く認められる。海外では感染源となる家畜と接触の機会の多い農業従事者および獣医師における疫学的調査が行われ、職業による感染の危険性が示唆されている。我が国においては、農業従

事者、と畜場従業員および大動物臨床獣医師における疫学的調査はほとんど行われず、その実態は不明である。近年、家畜のみでなく愛玩動物が感染源となったQ熱患者の報告も多く、愛玩動物との接触に感染の危険性が示唆されているが、我が国においては感染源の特定された例はほとんどない。また、海外ではQ熱を呼吸器疾患の一つとして継続的監視が行われ、Q熱の発生状況が明らかにされているが、我が国においては散発例が報告されるのみで、広く疫学調査が行われたことはなく、疾病制御の基礎となる疫学的基盤が不足している。

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

1. 被検血清

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。

2. 間接蛍光抗体(IF)法

抗体の検出はIF法により行った。精製した*C. burnetii* Nine Mile株 相菌を抗原として0.05Mトリス緩衝液(Tris-HCl、pH7.1)で蛋白量4.0mg/mlになるように調整し、24穴スポットスライド(CEL-LINE \ ERIE SCIENTIFIC CO.)に点置き、風乾後メタノールで15分間固定した。被検血清はPBSで16倍から2,048倍まで2倍段階希釈し、各スポットに10 μ lずつ滴下し、37 $^{\circ}$ C、30分間湿潤箱内にて感作した。その後、PBSで5分間3回洗浄し、FITC標識アフィニティ精製抗ヒト免疫グロブリン(IgG+M+A)、ヒトIgG(Fc)、ヒトIgM(5Fc μ)およびヒトIgA(α chain)ヤギ抗体(CAPPEL, Aurora, Ohio, U.S.A.)をそれぞれPBSで200倍希釈し、各スポットに10 μ lずつ滴下し、同様に感作、洗浄後、蒸留水で5分間洗浄、風乾、50%グリセリン含有PBSで封入後、蛍光顕微鏡(BX50-FLA: OLYMPUS)で観察した。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。

3. 統計処理

得られたデータから、一般健康者および小動物臨床獣医師、性別、年齢別、小動物臨床獣医師における臨床経験年数別および居住地域別に抗体陽性率を集計し、各集団における抗体陽性率の差を比較した。有意差検定はExcelおよびStatcel(Microsoft, U.S.A.)を用い、 χ^2 独立性の検定により行った。

C.研究結果・考察

1. 一般健康者における*C. burnetii* 抗体の保有状況

一般健康者の血清2,003例について、IF法により*C. burnetii* 抗体の検出を行った。検出された多価抗体の抗体価は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倍を陽性限界とした。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(2, 10, 14)、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。

2. 小動物臨床獣医師における*C. burnetii* 抗体の保有状況

小動物臨床獣医師の血清267例についてIF法により*C. burnetii* 抗体の検出を行った。検出された多価抗体の抗体価は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。

3. 一般健康者および小動物臨床獣医師の*C. burnetii* 抗体陽性率の比較

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。

4. 小動物臨床獣医師の居住地域別による*C. burnetii* 抗体陽性率の比較

小動物臨床獣医師を居住地域別により北海道・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、獣医師の居住地域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域による抗体陽性率に有意差は認められなかった。

5. 性別による*C. burnetii* 抗体陽性率の比較

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。

6. 年齢別による*C. burnetii* 抗体陽性率の比較

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。

7. 小動物臨床獣医師における臨床経験年数別*C. burnetii* 抗体陽性率の比較

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。

8. 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

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

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) 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、103:341-342, 1999.
- 2) Sawaishi, Y., Takashima, I.,

Hirayama, Y., Hirai, K., Takada, Goro.: Life-threatening acute cerebellitis caused by *coxiella burnetii*. *Annals of Neurology*, 45:124-127, 1999.

- 3) 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.* 37:1123-1129, 1999.
- 4) 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.
- 5) Nguyen, S. V., To H., Yamaguchi, T., Fukushi, H. and Hirai, K.: Characterization of the *Coxiella burnetii* *suc B* gene encoding an immunogenic dihydrolopoamide succinyltransferase. *Microbiol. Immunol.* 43:743-749, 1999.
- 6) 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.
- 7) 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. 口頭発表

- 1) 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（1999.4）
- 2) 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）
- 3) 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

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； 増澤俊幸 静岡県立大学・薬学部・助教授

分担研究課題；ライム病の診断

研究要旨

ライム病診断用抗原の安定供給を目的として、ライム病の診断抗原として重要とされるp83、fla、BmpA、OspCを遺伝子組換えマルトース結合蛋白質(MBP)融合蛋白質として発現させることに成功した。遺伝子組換え大腸菌より得られたこれらの抗原は、アミロース樹脂カラムにより精製した。日本のライム病患者、健常人血清と得られた抗原の反応性をウエスタンブロットにより検討した。遺伝子組換え抗原を用いることで、全菌体抗原を用いた場合に比べ、特異性、感度の改善が見られることを確認した。また、健常者血清の中にはMBPと反応するものが見られることから、今後ファクターXalにより、融合蛋白質を消化した後、診断に用いるべきであることが明らかになった。本研究により、ライム病診断用遺伝子組換え抗原の安定供給法が確立できた。今後、本抗原を用いた診断法の開発と普及を行う予定である。

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法やイムノブロッティ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。昨年4月から施行された新感染症予防法では、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たことから、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。ボレリアの培養が難しく、またその増殖速度の遅さから、一般の検査施設への抗原供給が容易でない問題を解決するための方策として、本研究では遺伝子組換え抗原の作製とその診断への応用を行った。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)、83kDa蛋白質(p83)、さらに41kDaべん毛蛋白質(Fla)、23kDa表層蛋白質C(OspC)をマルトース結合蛋白質(MBP)との融合蛋白質と

して発現させた。更に、BmpA、p83、Fla、OspC四種遺伝子組換え抗原を用いたイムノブロット法によるライム病血清診断法の有用性を検討した。

B. 研究方法

p83、Bmp Aの遺伝子は*B. afzelii* PGau株を鋳型としたポリメラーゼ連鎖反応により増幅した。得られた産物をpGEM-Tベクターにクローニングした。得られた形質転換体より、組換えプラスミドを抽出し、制限酵素BamH、さらにはPstにより、消化した。同じ酵素で消化したベクタープラスミドpMAL-c2のマルチクローニングサイトに目的遺伝子を連結した。組換えプラスミドを大腸菌JM109株に形質転換し、組換え体を得た。OspC、Fla組換え体は同様の方法で、研究分担者川端（国立感染症研）により、作製された。組換え抗原発現大腸菌の培養液から、超音波処理により抗原を遊離させ、アミロース樹脂カラムにかけた。マルトースによりMBP融合抗原蛋白質を溶出、精製した。

精製蛋白質の抗原性は特異的単クローン抗体により確認した。精製抗原をウエ

スタンブロットした後、日本の患者血清、健常者血清との反応性を調べた。

C. 研究結果

1. 融合蛋白質の発現

遺伝子組換え抗原の発現を SDS-PAGE で確認した。MBP(43kDa)との融合蛋白質として BmpA は 82kDa、p83 は 126kDa、FlaB は 84kDa、OspC は 66kDa の位置に発現が確認された。さらに、目的の融合蛋白質はアミロース樹脂カラム精製により単離された。

2. 遺伝子組換え抗原の単クローン抗体との反応性

それぞれの抗原蛋白質に特異的単クローン抗体と、発現させた MBP 融合蛋白質との反応性を検討した。これら単クローン抗体は精製 MBP とは全く反応しなかったが、一方、それぞれの標的融合蛋白質と反応したことから、目的とする抗原蛋白質の発現に成功したことを確認した。

3. 遺伝子組換え抗原のヒト血清との反応性

遺伝子組換え抗原のヒト血清との反応性を、日本のライム病患者血清 9 検体、健常人血清 5 検体を用いてウエスタンブロット法で検討した。BmpA、OspC の 2 抗原では、PGau 全菌蛋白質と比べ遺伝子組換え抗原を用いることで、反応性が向上した。また、MBP のみと 9 検体中 4 検体が反応した。一方、健常者血清 5 検体のうち 2 検体が全菌抗原中の Fla と反応したが、組換え蛋白質、及び MBP とは反応しなかった。

D. 考察

ライム病の血清診断では、遺伝子組換え抗原を用いることにより、血清診断の特異性が向上することが報告されている。また、ポレリアの増殖速度が極めて遅く大量培養が困難なため、広く普及可能な血清診断法を開発する上で、遺伝子組換

え蛋白質を抗原として用いることが必要不可欠である。

米国では、*B.burgdorferi* s. s. 由来の遺伝子組換え抗原を用いた血清診断キットが広く普及し、このことが米国のライム病の早期診断を可能にしている。しかし、米国製血清診断キットは日本には存在しない *B.burgdorferi* s. s. 株を抗原としているため、日本の患者に対して検出感度が充分ではない。また、CDC 基準にもあるように、最終判定はいまだイムノブロット法に委ねているのが現状である。そこで、日本における血清診断法の開発に向け、日本並びに欧州由来の様々な免疫学的性状を示す *B. garinii*、*B. afzelii* のうちで、日本のライム病患者血清と高い反応性を示した *B. afzelii* PGau 株を今回選んだ。昨年度までは His タグを C 末端に結合させた遺伝子組換え抗原を作製したが、発現量が少なく、実用に供給するには不十分と判断し、新たな遺伝子組換え抗原作製を計画した。MBP 融合蛋白質を IPTG で誘導することにより多量に発現させ、さらにアミロース樹脂を用いた発現蛋白質の精製後も、実用に供するに十分な抗原が回収できた。

さらに、この遺伝子組換え抗原を用いたイムノブロット法により健常者血清、ならびに患者血清の反応性を検討した。

感染第 II 期に抗体産生が誘導される p83 では、遺伝子組換え抗原に対する患者血清の反応性は、全菌体に比べ低下した。p83 は p83/100 と呼ばれる高分子量のファミリー蛋白質の 1 つであり、他に 93kDa、100kDa などのホモログが存在する。遺伝学的に異種間で保存性が高く、血清診断での有用性が報告されている。しかし、今回クローニングした PGau-p83 遺伝子は約 1.8kbp の部分配列であり、これが全菌に比べて反応性が低下した一つの理由であると考えられる。

一方、種間で遺伝学的に多様であり、感染第 I 期に抗体産生が誘導される BmpA では患者血清中の IgG 抗体での検出に優れていることが確認された。全菌

蛋白質中に占める BmpA の発現量は、Fla や OspA よりもはるかに少ない。組換え抗原を用いることで、より多くの BmpA を抗原として使用でき、その結果として検出感度が向上したと考えられる。

Fla は、ボレリアの運動装置であるべん毛を構成する蛋白質であり、感染初期にこれに対する抗体産生が誘導される。患者血清では全菌抗原とほぼ同等の反応性を示したが、一方健常者血清との反応は組換え抗原では見られなくなった。これまでの当研究室での血清診断においても、健常者血清が高頻度にボレリア全菌中の Fla と反応することが確認されている。これはこの抗原が様々な細菌のべん毛蛋白質と交差抗原性を有するためと推察される。組換え抗原を用いることでこの非特異的交差反応を減少させることが可能なことが示されたが、この原因については不明である。

OspC は、感染初期に抗体産生が誘導され、Fla と並んで主に IgM 抗体と高い反応性を示す。今回用いた遺伝子組換え抗原のうち、OspC のみが *B. afzelii* PGau 株ではなく *B. burgdoferi* s. s. 297 株由来のものである。OspC 遺伝子は同一種に属す種間でも非常に多様性に富むが、一方 OspC の C 末端の血清診断に重要なエピトープ部分は高度に保存されていることが知られる。このため日本に存在しない *B. burgdoferi* s. s 由来株の OspC を用いても診断結果に影響は少ないと判断した。その結果、全菌体に比べ特に IgM 抗体での反応性が向上することが確認された。

これらの結果より、遺伝子組換え抗原を用いた場合、全菌体抗原よりも総合的に診断抗原の検出に感度、精度に優れることが明らかとなった。また、交差反応を減少させることができることも示唆され、血清診断の一次スクリーニングに適することが明らかになった。一方、健常者血清中には MBP と反応する抗体が存在することが確認されたため、今後、更にファクター Xa による MBP と抗原蛋

白質の分離を行うことが必要と考える。

4 種遺伝子組換え蛋白質を組み合わせたイムノプロット法は全菌体抗原を用いたウエスタンプロット、あるいは ELISA 法に代わる方法として広く普及が可能であり、今度本法の普及を実現していく計画である。これを行うことで日本におけるライム病血清診断の確立を達成できるものと考えている。

F. 研究発表

1. 発表論文

1. Masuzawa, T., Fukui, T., Miyake, M., Oh, H-B., Cho, M-K., Chang, W-H., Imai, Y. and Yanagihara, Y. Determination of members of a *Borrelia afzelii*-related group isolated from *Ixodes nipponensis* in Korea as *Borrelia valaisiana*. Int. J. Syst. Bacteriol., 49, 1409-1416 (1999)
2. 増澤俊幸：特集 新興・再興感染症 「ライム病」 CURRENT THERAPY, 17, 331-334 (1999)
3. 増澤俊幸：感染症とその治療-新しい視点から - (I) 細菌感染症「日本におけるライム病」最新医学 54, 733-740 (1999)
4. 増澤俊幸, 柳原保武：エールリッヒア症、エマージングディゼイズ (竹田美文, 五十嵐章, 小島荘明 編集) 近代出版 (東京) pp.116-121 (1999)
5. 増澤俊幸, 柳原保武：ライム病、エマージングディゼイズ (竹田美文, 五十嵐章, 小島荘明 編集) 近代出版 (東京) pp.122-126 (1999)
6. 増澤俊幸：ライム病、感染症診断・治療ガイドライン, 日本医師会雑誌 増刊 (岩本愛吉, 大月邦夫他 編集) 医学書院 (東京) pp.176-177 (1999)
7. 尾崎弘岳, 笹尾ゆき, 松山孝, 小澤明, 篠永哲, 増澤俊幸. アカコッコマダニの人体咬着の一例. 皮膚科の臨床ミニレポート (印刷中)
8. Ishiguro F., Takada, N., Masuzawa, T., and Fukui T. Prevalence of Lyme disease *Borrelia* spp. In ticks from migratory birds on the Japanese mainland. Appl. Environ. Microbiol., 66 (in press)

2. 学会発表

1. 宮本健司, 橋本喜夫, 増澤俊幸：平成 10 年度のマダニ刺咬例とライム病患者の発生. 第

51 回日本衛生動物学会（東京）、1999 年 4 月 8 日

2. Toshiyuki Masuzawa, Nobuhiro Takada, Yasuyuki Imai, and Yasutake Yanagihara: Molecular Epidemiology of *Borrelia burgdorferi* Ssensu Lato in the East Asia. VIII International Conference on Lyme Borreliosis and Other Emerging Tick-Borne Diseases. (Munich, Germany), June 21, 1999
3. 増澤俊幸、久手堅みどり、内海宏之、高田伸弘、今井康之：ライム病関連ボレリアの極東アジア地域における分布、維持、伝播に関する研究. 第 14 回微生物シンポジウム（新潟）、1999 年 9 月 17 日
4. 高田伸弘、矢野泰弘、藤田博己、大竹秀夫、馬曉航、増澤俊幸：中国新疆におけるマダニのボレリア保有状況、特に *ricinus-complex* について. 第 8 回日本ダニ学会（松山）、1999 年 9 月 27 日
5. 増澤俊幸：山歩きに御用心！ダニによる感染症 ライム病 埼玉県衛生研究所（地域保険推進事業）、2000 年 3 月 2 日
6. 久手堅みどり、越智あやの、今井康之、増澤俊幸：東アジア地域におけるライム病関連ボレリア種の分布と維持伝播. 生化学会 中部支部会（静岡）、2000 年 5 月 13 日 発表予定
7. 内海宏之、兼城亜由子、今井康之、増澤俊幸：4 種遺伝子組換え抗原を用いた日本型ライム病血清診断法の開発. 生化学会 中部支部会（静岡）、2000 年 5 月 13 日 発表予定
8. 久手堅みどり、越智あやの、今井康之、増澤俊幸：中国台湾におけるライム病関連ボレリアの系統解析. 第 37 回レプトスピラシンポジウム（札幌）、2000 年 5 月 27 日 発表予定
9. 内海宏之、兼城亜由子、今井康之、増澤俊幸：遺伝子組換えライム病ボレリアスフィンゴ糖脂質結合蛋白質(Gbp37)の作製と結合活性の検討. 第 37 回レプトスピラシンポジウム（札幌）、2000 年 5 月 27 日 発表予定