

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 ダニ咬傷を契機とし tick-borne encephalitis virus (TBEV)が中枢神経系に感染し、引き起こすダニ媒介性脳炎 TBE の発症機序は十分に解明されていない。本年度は1昨年度、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 Oshima 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、高島らが開発した抗 TBE 単クローン抗体を使用して免疫組織学的に解析した。この抗体(クローン 4A2)を用いた高感度の免疫組織学的検出法では、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。一方、従来の感度の免疫組織学的検索では Oshima 5-10 感染マウスでは感染細胞は検出できず、Sofjin 感染マウスでは感染後9日目より感染細胞が検出可能であった。従って、ウイルス株の違いにより感染細胞での産生されるウイルス抗原量が非常に異なっていることが判明した。ウイルス抗原陽性細胞の分布は昨年度報告した in situ hybridization による陽性細胞の分布とほぼ一致した。また、この両者の検出系を用いることにより、人体感染組織の retrospective な診断も期待できる。

A. 研究目的

ダニが媒介するフラビウイルスによる脳炎は世界的に広く分布し、極東アジアではロシアのシベリアならびに沿海州に分布している。本邦では高島ら(1997)により、北海道渡島地域にウイルスが存在している可能性が指摘され、人体感染も1例確認されている。本研究では人体剖検ならびに生検組織でのウイルス病理学的診断方法の確立とその発症病理の解明を目的として、マウス皮下組織にダニ媒介脳炎ウイルスを接種し、経時的に神経病変を追跡した。

B. 材料と方法

ウイルス：Tick-borne encephalitis-far eastern subtype の Sofjin ならびに Oshima 5-10 株を用いた。

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。

摘出した脳・脊髄は直ちに4%フォルムアルデハイド 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%フォルムアルデハイド 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) 染色ならびに免疫組織化学的検索を行った。

免疫組織学的染色は、パラフィン切片を脱パラフィン後、親水化し、内因性 peroxidase 活性を0.3%過酸化水素/メタノール液中で失活させ、正常山羊血清と反応後、一次抗体と反応させ、ビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体(山羊、RPN1177, Amersham)を使用し、streptavidin-peroxidase 法にて、diaminobenzidine を基質として過酸化水素を加えて発色した。核染色には methylgreen を使用した。さらに、高感度の検出を行

うため、GenPoint System (DAKO)を使用し解析を行った。このシステムの方法はキットの使用書に準じた。

一次抗体としては高島らが作製した抗 TBE 単クローン抗体 4A2 を使用した。

C. 結果

組織学的変化：1 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、脳幹部、視床ならびに小脳に認められた。

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。

ウイルス抗原の検出：抗 TBE 単クローン抗体 4A2 を使用した免疫組織学的解析では、Sofjin 株ならびに Oshima 5-10 株の感染マウスでは解析を開始した感染後 5 日目の大脳皮質の神経細胞にすでに抗原陽性細胞を高感度の染色法により検出することができた。一方、従来の感度の免疫組織学的検索法では Sofjin 株感染マウスにのみ抗原陽性細胞を認め、Oshima 5-10 株感染マウスでは検出することはできなかった。

感染細胞の局在は前年度報告した in situ hybridization により検出された細胞とほぼ一致し、神経細胞のみの感染が確認され、また、soma のみならず、軸策・神経突起も陽性であった(図)。グリア系細胞の感染は確認できなかった。

D. 考察

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だした。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。

E. 結論

ダニ媒介性脳炎ウイルスの Sofjin 株ならびに U-5-10 株を皮下接種したマウスの in situ ハイブリダイゼーションならびに免疫組織化学的解析を行うことにより、ホルマリン固定パラフィン標本でのウイルスの局在の解析法を確立することができた。今後の人体例における解析に有用な方法と考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 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
- 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
- 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
- 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* 17: 779-787, 1999
- 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
- 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
- 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

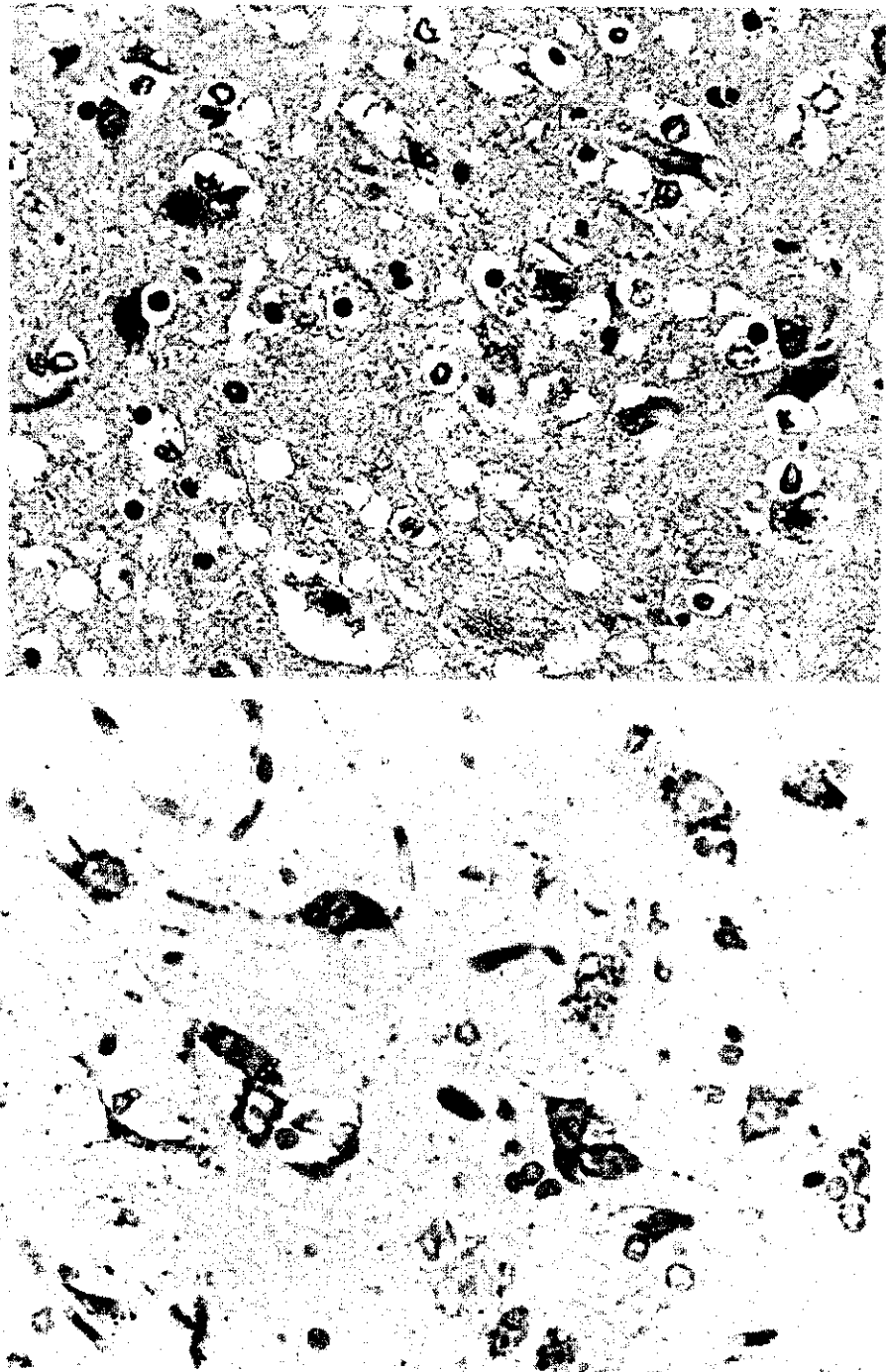


図1 Sofjin 株感染マウス、皮下接種後 7 日 (上: HE, 下: 4A2)

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 助教授

研究要旨

1998年にハバロフスクにおいてダニ媒介性脳炎ウイルスを分離し、すでに分離されている北海道渡島株とハバロフスク株のウイルス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毒力を示した。これらの成績は、北海道のダニ媒介性脳炎ウイルスは数百年前に極東ロシアで出現したことを示し、そのことが北海道の分離株がロシア株と同様の毒力を示したことを説明している。

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試薬を開発するために、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た。これらの単クローン性抗体は分離ウイルス株の同定に有用である。

A. 研究目的

我々の1998年までの研究により、ダニ媒介性脳炎の流行巣が北海道の特定地域に分布していることが判明した。さらに道内の渡島管内において1995年と1996年にダニ媒介性脳炎ウイルスがおとりのイヌ、マダニおよび野ネズミから分離された。これらのダニ媒介性脳炎ウイルスがいつどこで出現したのかを明らかにするために、渡島株と極東ロシア株の分岐の年代を推定した。さらに北海道や極東ロシアの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、北海道株に対する単クローン性抗体を作出した。これら単クローン性抗体の性状を解析して診断的価値を評価した。

B. 研究方法

1998年ロシアハバロフスク地方でマダニ類を採集し、マダニ乳剤を作りマウス脳内接種法によりウイルス分離を実施した。分離ウイルス株を単クローン性抗体を用いて同定した。さらにウイルスエンベロープ蛋白遺伝子の塩基配列を蛍光オートシーケンサーにて決定した。塩基配列の決定に用いたウイルス株は渡島で以前に分離した6株とハバロフスクで1998年に分離した4株である。これら

の株の塩基配列を基に系統樹解析を行った。さらにウイルス株間の同義置換率を基にこれらの株の分岐の年代を推定した。

北海道分離ウイルス渡島株をホルマリンにて不活化し、BALB/cマウスを免疫した。ミエローマ細胞(SP2/0-Ag1)と免疫マウス脾細胞を常法に従い融合させた。ハイブリドーマからの抗体産生を間接蛍光抗体(IFA)法にてスクリーニングした。確立した抗体産生クローンについて各種フラビウイルス株に対する抗体価を、IFA法、赤血球凝集阻止(HI)試験、中和試験において決定した。

C. 研究結果

ハバロフスクで採集した550匹のシュルツェマダニから4株のウイルスが分離され、単クローン性抗体の反応性からダニ媒介性脳炎ウイルスと同定された。これらのハバロフスク分離株とすでに北海道で分離された渡島株6株とハバロフスク株3株および1937年にハバロフスクの脳炎患者の脳から分離されたSofjin株について、マウス皮下接種により毒力を比較するとともにエンベロープ蛋白遺伝子の核酸塩基配列を決定した。今回分離されたハバロフスク株と渡島株はマウスに対して同様に強い毒力を示した。塩基配

列の比較から北海道株、ハバロフスク株およびSofjin株は一つのクラスターを形成したため、これらのウイルス株は極東型ウイルスと同定した。さらに各ウイルス株の核酸の同義置換率から、分岐年代を推定すると北海道株とハバロフスク株は240～430年前に分岐したと判明した。

ウイルス同定への診断用抗体として単クローン性抗体の作出を試みた。7つの抗体が得られIFA法、HI法および中和試験における各種フラビウイルス株に対する抗体価を測定した。3種の単クローン性抗体(4A2, 4H8, 5D10)がフラビウイルス特異的であった。単クローン性抗体1H4はダニ媒介性脳炎ウイルス群特異的で、2F9はダニ媒介性脳炎ウイルス特異的であった。これらの抗体を用いることにより分離されたダニ媒介性脳炎ウイルスの同定が可能となった。

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ダ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ダニはウイルス分離の成績からヤマトマダニと推定された。ロシア極東地区ではシュルツェマダニが主要媒介マダニである。ダニ媒介性脳炎ウイルスが数百年の間に容易に媒介マダニを変えて新しい地に定着できたことは興味深い。

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。

E. 結論

ダニ媒介性脳炎ウイルス北海道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。また北海道と極東ロシアのダニ媒介性脳炎ウイルスを同定できる単クローン性抗体が作出された。これらの単クローン抗体は今後分離したウイルスの同定に実用可能であった。

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) 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
- 6) 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
- 7) 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
- 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、苅和宏明、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、苅和宏明、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, 苅和宏明、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、荻野倫子、海老原秀喜、苅和宏明、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、苅和宏明、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
- ## 2. 学会発表
- 1) 早坂大輔、長田美母衣、苅和宏明、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、苅和宏明、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、苅和宏明、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、苅和宏明、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:

- 較・解析：第47回日本ウイルス学会
- 13) 早坂大輔、鈴木善幸、苅和宏明、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、苅和宏明、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) 苅和宏明、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、苅和宏明、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、苅和宏明、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)

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

分担研究報告書

ツツガムシ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

研究協力者 藤田博己 大原総合病院附属大原研究所
海保郁男 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

研究要旨

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。紅斑熱の媒介ダニはタイワンカクマダニとキチマダニが疑われたが、紅斑熱群リケッチアを保有するダニは多種にわたっていた。

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ッチアは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が特定の地域に局限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。

A. 研究目的

ツツガムシ病は東北・北陸の一部の風土病（古典型ツツガム病）であったが、その後患者数は減少し一時絶滅も予想された。しかし、1980年頃より患者が急増し（新ツツガム病）、年間数百名が報告され死者も数名が記録されるなど再興感染症として注目されている。一方、ツツガムシ病類似の疾患である紅斑熱は1984年に四国で初めて発見され、その後九州・本州からも報告されるようになり、毎年20名近くの患者が報告されている。国立感染症研究所では全国地方衛生研究所の協力を得て1988年よりツツガムシ病を、1995年から紅斑熱も合わせて患者の実態調査を実施している。1999年の「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」（新法）によりツツ

ガムシ病、紅斑熱は第四類の全数届け出疾患となったが、書式により報告される患者情報は患者が診断された自治体から提出されるため感染場所と一致しないこと、臨床症状などの記載が必ずしも十分でないなど患者情報は十分でない。ツツガムシ病、紅斑熱ともに現在でも発生地域が拡大傾向にある。そこで、未発生地域への警鐘と感染予防・治療対策を講じるために、患者個票のよる感染実態の解析を実施している。1997年まではすでに報告してのので、今年は1998年の全国での実態と1999年の千葉、神奈川、宮崎各県の状況について調査した。

B. 研究方法

1998年に全国地方衛生研究所（地研）より感染症研究所に報告されたツツガムシ病・

紅斑熱様患者個票について、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するとともに、神奈川県、千葉、宮崎県については1999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の実態ならびに流行しているツツガムシ病リケッチアの型について解析した。

C. 研究結果

1. ツツガムシ病

1998年に報告されたツツガムシ病様患者584例のうち417例が血清抗体測定(383)、臨床診断(34)によりツツガムシ病と診断されていた。地域別にみると秋田、群馬、千葉、熊本、宮崎、鹿児島野各県から20名以上の患者発生が報告された。患者が多く報告されたのは鹿児島、宮崎県で、全患者の半数は九州地方での発生であった。患者数は男女ともほぼ同数(212; 205)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70歳以上(27%)、ついで60~69歳が25%であった。また、女性では70歳以上が32%、次いで60~69歳(28%)であった。患者発生数を地域別・季別に見ると、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、無記載もあるが山地が50%と最も多く、次いで平地(27%)となっている。また、作業内容では農作業が32%と最も多いが、山菜・山芋などの採取時(10%)やレジャー(6%)で感染している。

地方衛生研究所から報告された1999年のツツガムシ病患者発生状況をみた。神奈川県では血清診断により31例報告された。また、ツツガムシ病を疑われながら血清診断で陰性もしくは未定とされた12例のうち4例が遺伝子診断で陽性であったことから合計35例がツツガムシ病患者とされた。患者数は1996-97年と減少していたが、98年から増加し、感染推定場所も拡がる傾向にあった。感染ツツガムシ病リケッチアの型は、遺伝子が検出された28例中24例がKawasaki型、3例がKuroki型、残りの1例がKarp型であったが、感染地域と感染リケッチアの型(Kuroki)には特に関連はなかった。1998年はKawasaki型が8例、Kuroki型が3例であり、99年はKawasaki型が増加した。千葉県では患者が121名発生しており1998年の3倍弱の増加であっ

た。患者発生地域は20市町村に及んでいるが、ここ数年は勝浦保健所管内での発生が増加している。宮崎県での患者発生は99名と前年(85名)に比べやや増加した。1994-96年は年間50名程度の発生であったことから、この3年間は患者が増加傾向にある。患者発生は9月末から県の南西部から始まり11月にピークとなり、翌年の始めまで続いている。感染ツツガムシ病リケッチアの型は血清抗体価からの推定によるとKawasakiとKurokiであるが、多くはKawasaki型である。患者が減少した1994-96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、98年はKuroki型の増加し、99年は再びKawasaki型が増加している。

2. 紅斑熱

1998年は13例報告された。1997年の24に比べ減少している。地域別では千葉、島根、高知、宮崎および鹿児島各県で、いずれもツツガムシ病患者の少ない5~10月に発生している。患者の約8割は50歳以上で、患者総数に性差はないが(6、7)、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(46%)、感染時の作業は農作業が最も多いなど(46%)、ツツガムシ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確認される例が多くなったもののまだ4割近くは無しとしている。また、リンパ節の腫脹は25%程度にとどまるなど、ツツガムシ病とは異なっていた。1999年については千葉から3名が報告されている。このうち1例はいままで発生のなかった地域からのものであった。媒介ダニについて、1993-98年に紅斑熱群リケッチア(紅斑熱特異モノクローナル抗体に反応)が分離されたダニ63について種別をみたところ、タカサゴキラマダニ25、タイワンカクマダニ1、キチマダニ1、ヒトツゲマダニ1、ヤマトマダニ33、シュルツエマダニ2であった。地域別にみると、タカサゴキラマダニは徳島および鹿児島、タイワンカクマダニとキチマダニは徳島、ヒトツゲマダニは熊本、ヤマトマダニは福島、鹿児島、秋田、徳島、シュルツエマダニは北海道からのものであった。このうち日本紅斑熱特異モノクローナル抗体に反応したのは徳島の患者発生地域で採取されたダニ2種(タイワンカクマダニとキチマダニ)のみであった。

D. 考察

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。

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。その後1997年までに約200例が報告されている。1998年は13名が報告され、98年の24に比べ減少した。千葉、島根、高知、徳島、宮崎および鹿児島県の各県で発生をみると、鹿児島が8から1と減少が目立った。1999年は千葉から3例報告されているが、今まで発生の無かった地域に患者が発生するなど感染地域野拡大が懸念される。紅斑熱の検出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、ツツガムシ病とは異なっていた。患者はいずれもツツガムシ病患者の少ない4~10月に発生していることから、夏の時期のツツガムシ病様患者については紅斑熱を疑う必要がある。媒介ダニとしてタイワンカクマダニおよびキチマダニがあげられているが、他種のダニにも紅斑熱リケッチアを保有していることから、ダニについてはさらに検討する必要がある。

E. 結論

1997年に国立感染症研究所に報告されたツツガムシ病患417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平地での農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1998年に13例が報告された。千葉、島根、高知、徳島、宮崎および鹿児島県の各県でいずれもツツガムシ病患者の少ない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%)、ツツガムシ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ツツガムシ病とは異なっていた。媒介ダニとしてタイワンカクマダニおよびキチマダニがあげられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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(感染症学雑誌予定)。
- 2) 藤田博己、渡辺百合子、高田伸弘：福島県中通り地方北部の野鼠における寄生ツツガムシ類とツツガムシ病リケッチアの保有状況、衛生動物(投稿予定)。
- 3) 藤田博己、三川正秀、萩原敏且、高田伸弘：福島県の阿武隈川と久慈川流域において初確認されたタテツツガムシとツツガムシ病発生との関係、衛生動物(投稿予定)。
- 4) 藤田博己、三川正秀：福島県浜通り地方におけるツツガムシ類生息調査とツツガムシ病患の発生状況、衛生動物(投稿予定)。

- 5) 古屋由美子、片山 丘、原 美由紀、吉田芳哉、今井光信、萩原敏且：神奈川県におけるツツガムシ病発生状況および感染型、JJID（投稿予定）。
- 6) 海保郁男、水口康男、萩原敏且：1982年に千葉県で再興したツツガムシ病のその後の患者発生動向、JJID（投稿予定）。
- 7) 山本正悟、木添和博、吉野修司、萩原敏且：宮崎県におけるツツガムシ病発生状況および感染リケチアの抗原型、JJID（投稿予定）。

2. 学会発表

- 1) 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.
- 2) 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、東京、1999.

3. その他

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.

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

ライム病の疫学

分担研究者 中村 和幸 長野県衛生公害研究所感染症部長
協力研究者 宮島 勲 長野県衛生公害研究所感染症部

研究要旨

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割が血清抗体価の上昇がみられた。

林業従事者に対してライム病血清抗体調査を実施し、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、林業従事者の約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ることから、ライム病に対する認識の低いことが明らかとなった。

A. 研究目的

ライム病は、高原や山地等の高地に生息するマダニ(*Ixodes* 属)に刺咬されることにより、マダニが保有しているボレリアに感染して発症することが知られている。

長野県は、マダニの生息環境である山地や高地が多く、その中で生活している人々や山林等で作業を行う機会が多い林業従事者は、マダニ刺咬によりボレリアに感染する危険性が高いと考える。

そこで、米国流行株および国内分離株を使用し、医療機関からのライム病が疑われるマダニ咬症患者の血清抗体検査、林業従事者に対する血清抗体検査およびアンケート調査を行い、本疾病の検査方法、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

ライム病を疑うマダニ咬症患者については、従来より医療機関から当所へ依頼

検査として送付される患者血清を使用し、林業従事者に対する調査は、林業木材製造業労働災害防止協会長野県支部を通じて、長野県内6保健所(佐久、諏訪、飯田、木曾、大町、北信)管内の林業従事者を対象に、各保健所で年1回実施している振動病検診に併せて採血およびアンケート調査を実施し、採取した血液で血清抗体検査を行った。また、アンケート調査は対象者全員に刺咬経験の有無、刺咬時の状況、時期、回数、対処方法等の項目について行った。

なお、林業従事者に対する採血は、対象者全員に調査目的の理解を求め、理解が得られた上で採血をした。

血清抗体検査の方法は、米国流行株である *Borrelia burgdorferi sensu stricto* 由来の B31 株を使用した酵素抗体法(ELISA法)市販キットを用いて定性検査を行い、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)で定量検査を行った。また、国内で分離された *B.garinii* 由来の

PGau 株および *B.afzelii* 由来の HP1 株を使用した IF法の定量検査も併せて実施した。

C. 研究結果

(1) 医療機関からの依頼検査

平成9年からの3年間、医療機関からの全依頼検査数は136名、190検体であり、その内114名、166検体について血清抗体検査を行った。

その結果、ELISA法陽性数は15検体(9.0%)であり、その内13検体(7.8%)がIF法による B31 株の血清抗体価が、160倍以上であった。IF法による PGau 株の血清抗体価では、20倍未満が96検体(57.8%)、20から80倍が54検体(32.5%)、160倍以上が16検体(9.6%)であった。HP1 株では、20倍未満が108検体(65.1%)、20から80倍が43検体(25.9%)、160倍以上が15検体(9.0%)であった。

また、いずれかの抗原に対する血清抗体価が160倍以上であった者は22名、32検体(19.3%)であり、その内14名がペア血清で、7名は回復期血清が急性期血清より4倍以上抗体価が上昇していた。

(2) 林業従事者に対する検査

調査対象者407名中、採血協力者は387名であった。その内ELISA法による陽性者数は6名(3.1%)であり、IF法による B31 株の血清抗体価は、6名全員が160倍以上であった。また、IF法による PGau 株の血清抗体価は、20倍未満が158名(40.8%)、20から80倍が155名(40.1%)、160倍以上が74名(19.1%)であった。HP1 株では、20倍未満が168名(43.4%)、20から80倍が173名(44.7%)、160倍以上が46名(11.9%)であった。また、ELISA法陽性およびIF法(PGau 株、HP1 株)160倍以上であった100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。

アンケート調査は全員(407名)に対して行った。その結果、マダニ刺咬経験者数は144名(35.4%)であり、その内、刺咬回数が2回以上と回答した経験者は93名(64.6%)、刺咬時期(複数回答)では110名(81.3%)が春から夏にかけて刺咬があったと回答しており、刺咬の状況では、作業中もしくは休憩中と回答した者が121名(88.5%)と高かった。また、刺咬後の対処方法は、自分もしくは家族や同僚が除去あるいは自然脱落まで放置していたと回答(複数)した者が134名(94.9%)であり、医療機関で除去もしくは除去後医療機関を受診した者はわずか7名(4.5%)であった。

D. 考察

血清診断用の抗原として以前から当所で使用していた米国流行株の B31 株に加え、国内分離株である 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、医療機関からの依頼検体ではあまり大きな差はみられないものの、林業従事者に対する検査では、PGau 株および HP1 株とも B31 株より高い抗体価を示し、どちらの株も1割以上の高抗体価率であることから、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、検査手技において、再現性が低く検査精度の面ではまだ課題が多く、血清(確定)診断には難しいと思われる。

林業従事者に対する調査では、調査地点における対象者数に差があり、また、作業地区が特定地域とは限らないため地域差を比較することは難しいが、血清高抗体者(ELISA法陽性、IF法160倍以上)は、長野県南西部(飯田、木曾地域)が北東中部(佐久、諏訪、大町、飯山地域)より高い傾向にあった。

マダニ刺咬経験者の134名(94.9%)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。また、高抗体価者100名の内、57名（57.0%）がマダニ刺咬未経験（あるいは記憶にない）と回答していることから、山林内で作業する人をはじめ、行楽の人達の中には、本人の自覚がないうちに感染している危険性があると考えられる。

E. 結論

今回の調査では、米国の流行株である *B.burgdorferi sensu stricto* 由来の B31 株に加え、我国で多く分離されている、 *B.garinii* 由来の PGau 株および *B.afzelii* 由来の HP1 株による検査を行い、国内株の有効性が明らかになった。しかし、検査精度には課題があり、比較的簡易的に行える IF法での1次検査としては使用可能であるが、確定検査にはウエスタン・ブロット法等別の方法が必要であると考えられる。

また、最近のアウトドアブームで都会から高原や山地へ出かける人達が増え、マダニ刺咬によるライム病患者の増加が懸念される。そのためにも、早急にライム病に対する意識を高める啓蒙活動や医療機関等の検査体制の確立が必要であると考えられる。

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： 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

分担研究課題：ライム病の組換え抗原の開発

研究要旨

- 1) ライム病ボレリア新規病原因子 Vls 抗原は、宿主免疫からの逃避に関与しない。むしろ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。
- 2) 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。(北海道大学 古田 康 博士との共同研究)

1) 新規病原因子 Vls の機能解析

<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ことから、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。欧米の現状と比較しても、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。

ライム病の病態を調べた場合、疾病の慢性化にともない重篤な症状の発生頻度が増加傾向にあること、すなわち病原体が何らかの原因で特定の臓器への生着を成立させ、その結果持続感

染を引き起こした場合、患者は重篤な症状に陥ると考えられている。そこで本研究では、病原体の持続感染と抗原変換との関連を調べる目的で、新規病原因子 Vls に対する宿主応答と各種臓器への生着性、および Vls 抗原の変換と宿主免疫からの逃避について、Vls 抗原の可変ドメイン中の Hot spot である可変領域に絞って、*In vivo* での解析を行った。

<昨年度までの経過>

ライム病ボレリア *Borrelia burgdorferi* の Vls 抗原の機能解明を目的として、遺伝学的・免疫学的解析を行い、国内で分離されるライム病ボレリア *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. japonica* も北米由来 *B. burgdorferi* 同様 *vls* 遺伝子群を有すること、これら遺伝子群は線状プラスミド末端付近にコードされていることを明らかにするとともに、Vls 抗原に対する抗体は感染初期から上昇していること、またこれら抗体認識部位は Vls 可変ドメイン中の可変領域のみならず保存領域にも存在することを明らかにしてきた。

一方、サイレント遺伝子を元にした組換え体可変ドメイン部分による感染防御試験結果から、

少なくとも異なる Vls 型による感染防御は不可能であることが示された。このことは、宿主免疫の交差性に基づく、可変ドメイン中の保存領域に対する抗体は中和活性を持たないこと、すなわち、可変ドメイン中の保存領域は免疫原としては重要な役割を持たないことを示している。これらのことから、Vls 抗原の可変ドメイン中の "Hot spot" である可変領域が抗体からの逃避以外の重要な機能を有する可能性が推測された。

<結果・考察> vls 遺伝子群は、遺伝子構造、遺伝子配列などが回帰熱ボレリア vmp 遺伝子群と極めてよく似ていることから、その機能も vmp 遺伝子群同様、宿主免疫からの逃避に関与すると考えられていた。しかしながら本研究で明らかとなった、可変ドメイン (サイレント型、発現型。表 1) が感染防御活性を持たないこと、

免疫によって抗原変換が誘導されないこと、またライム病患者は回帰熱様症状を呈さないこと、すなわち宿主免疫からの逃避に起因する菌血症を起さないことから、少なくともライム病ボレリア vls 遺伝子群が宿主液性免疫からの逃避に関与している可能性は極めて低いと云わざるを得ない。

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 (表 2)、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。

表 1. 発現 Vls 型による感染防御試験

接種菌株	分離臓器	免疫抗原 MalE (Control)	VlsF16	VlsFE30 (cl7-VlsE)	VlsFE32 (cl3-VlsE)
297 cl3	耳介(cells)	62.75	156.5	36.75	136.25
	心臓(cells)	0.25	0.5	0.25	0.25
	膀胱(%)	100(4/4)	100(4/4)	100(4/4)	100(4/4)
	心血(%)	0	0	0	0

表 2. 各種 Vls による耳介、心臓、膀胱への生着率

接種菌株	分離臓器	免疫抗原 MalE-lacZ (Control)	VlsF2	VlsF8	VlsF15	VlsF16	VlsF30 (Vls II)
297 cl7	耳介	100	100	100	100	100	100
	心臓	85.7	83.3	90.9	100	37.5	87.5
	膀胱	100	100	100	100	100	100

<結論>ライム病ボレリア Vls 抗原は、回帰熱ボレリア vmp 抗原と遺伝子構造・一次配列が似ているが、その機能は異なり、宿主液性免疫からの逃避機構に関与すると言うよりは、むしろ感染のトロピズム、特に心筋炎発症に関与し

ている可能性が高い。今後は、宿主側の因子同定を行い、ボレリアが心臓へ生着する何れの過程に Vls が関与しているのかを明らかにする必要がある。

II) 神経ライムの現状把握

<研究目的>

ライム病は様々な病態を示すことが明らかにされているが、本邦における原因不明神経症状のうちどの程度がライム病に起因するかは未だ明らかでない。本研究ではライム病流行地域である北海道で、ライム病の一病態とされる顔面神経麻痺の有無を一つの指標とし、患者血清中の抗体価を調べ、原因不明顔面神経麻痺患者中のライム病起因性患者の頻度、および血清診断の有用性について評価を行った。

<方法>

血清：北海道大学・医学部、古田康博士より分与を受けた。ライム病流行地域である北海道内の Bell's 麻痺 72 検体 (non-HSV 性 Bell's 麻痺 50 検体、HSV 性 Bell's 麻痺 22 検体)、Hunt 症候群 (VZV 性) 32 検体、健常者 58 検体、計 162 検体を血清診断に用いた。

血清診断：*B.garinii* HP1 株及び *B.atzeli* P/Gau 株を用い、ウエスタンブロット法により各 IgM、IgG について行った。判定は米国 CDC により推奨された診断基準に従った。

<結果・考察>

結果の一覧を表 3 に示す。

原因不明顔面神経麻痺 (Non-HSV 性 Bell's 麻痺) では、50 検体中 3 検体で *B.garinii*-IgG 陽性である一方、これら 3 検体は全て *B.atzeli* 陰性であった。また、HSV 性 Bell's 麻痺、Hunt 症候群、健常者でも各 1 検体ずつ IgG 陽性例が見られた。欧州では神経症状を引き起こすライム病ボレリアはほとんどが *B.garinii* であることから、*B.garinii* が主な流行株と考えられている本邦においても、同様の状況が推測されていた。しかしながら本研究で、原因不明の Bell's 麻痺患者で高率に抗ライム抗体が検出される欧州の状況とは異なり、北海道にお

ける神経ライム性 Bell's 麻痺の比率は欧州と比較して低い可能性が示された。このことはライム病確定例 (病原体分離などによってライム病と確定診断が下された例) においても、何らかの神経症状を呈した症例は極めて稀であることから頷ける結果である。一方で、本邦におけるライム病患者がなぜ顔面神経麻痺などの神経症状を呈さない理由として、病原体の性質や人種に起因するもの、あるいは医療環境の差異 (抗生剤の使用頻度など) によるもの、などが考えられるが詳細は今後の研究課題であろう。

IgM に関して、IgG 陽性率と比較して 8.0-40.9% と極めて高頻度で IgM 陽性例が見いだされた。ほとんどの患者は流行地域内に在住してはいるが、ここ数年、明確なマダニ刺咬の既往およびライム病に特徴的な皮膚症状 (遊走性紅斑) がともに否定されており、健常者群でも 15.5-17.2% で抗体陽性と判定されたこと、発症直前にボレリアに感染した可能性は極めて低いと考えられた集団であること、追跡調査を行った一部の例でも IgG 抗体への移行は見られなかったことから、これらは偽陽性である可能性が強く疑われた。CDC 推奨のウエスタンブロット判定基準では、鞭毛抗原、表層蛋白質 C (OspC)、39kDa 抗原の内 2 種類以上で反応が見られた場合陽性としている。今回陽性と判定された検体のほとんどが OspC 陽性による抗体陽性例であった。またこれら反応は HSV 性顔面神経麻痺患者で有意に高かったことから、一部の例では、何らかの HSV 抗原と OspC 抗原との交差性が考えられたが、ATCC 由来 HSV-1 株および抗 P/Gau マウス血清 (抗 OspC 反応-強陽性) を用いた実験では交差抗原の特定はできなかった。交差抗原の特定は今後の課題である。

<結論>

1) ライム病ライム性顔面神経麻痺の頻度は、欧

州と比較して低い可能性がある。

2) 本邦におけるライム病血清診断では、ウエスタンブロット法による IgM 調査ではより特異性の高い方法若しくは診断基準の導入が必要であ

ろう。またこれら反応は HSV 性顔面神経麻痺患者で有意に高かったことから、一部の例では、何らかの HSV 抗原と OspC 抗原との交差性が考えられた。

表 3.顔面神経麻痺患者におけるライム病ボレリア抗体陽性率 (CDC 判定基準に準拠)

	<i>B.garinii</i>		<i>B.atzei</i>	
	IgM	IgG	IgM	IgG
Bell's (non-HSV)	8.0	6.0	8.0	0
Bell's (HSV)	27.3	4.5	40.9	4.5
Hunt 症候群	12.5	3.1	18.8	3.1
健常者	15.5	0	17.2	1.7

<研究発表> (下線は分担研究員もしくは協力研究員を示す)

論文発表 (英文)

1. Hiroki Kawabata, Myouga F, Inagaki Y, Murai N and Haruo Watanabe. Genetic and immunological analyses of Vls (VMP-like sequences) of *Borrelia burgdorferi*. Microbial Pathogenesis. 24, 155-166, 1998.
2. Yasushi Furuta, Ohtani F, Hiroki Kawabata, Fukuda S, Bergstrom T.: High prevalence of Varicella-zoster virus reactivation in Herpes simplex virus-seronegative patients with acute peripheral facial palsy. Clinical Infectious Diseases. 2000 (in press)

論文発表 (和文)

1. 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.

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.
6. 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.
7. 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.
8. 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。

9. 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。

10. 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。