

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10～12年度 総合研究報告書

平成12年度 研究報告書

平成13年3月

主任研究者 平井克哉

岐阜大学農学部

目 次

1. 総合研究報告書（平成10～12年度 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 主任研究者 平井克哉（岐阜大学農学部）	1
2. Q熱ワクチンの開発	18
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	27
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	32
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	34
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	41
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	47
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	52
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	59
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	66
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	76
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	86
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	92
分担研究者：森田千春（酪農学園大学獣医学部）	

14.	総括研究報告書（平成12年度 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	
	主任研究者 平井克哉（岐阜大学農学部）	95
15.	Q熱ワクチンの開発	309
	主任研究者：平井克哉（岐阜大学農学部）	
16.	リケッチア症の分子診断法	314
	分担研究者：福士秀人（岐阜大学農学部）	
17.	ヒトおよび動物のQ熱の疫学的研究	316
	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）	
18.	ヒトおよび伴侶動物のQ熱の疫学的・診断的研究	319
	分担研究者：小宮智義（北里研究所生物製剤研究所）	
19.	Q熱の実験室診断法の基準および疫学に関する研究	324
	分担研究者：萩原敏且（国立感染症研究所ウイルス第一部）	
20.	ヒトのQ熱の疫学的研究	327
	分担研究者：小久保弥太郎（東京都立衛生研究所微生物部）	
21.	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	330
	分担研究者：川原 真（名古屋市衛生研究所微生物部）	
22.	イヌのエールリキア症の疫学的研究	336
	分担研究者：山本静雄（麻布大学環境保健学部）	
23.	猫ひっかき病の疫学・診断	339
	分担研究者：丸山総一（日本大学生物資源科学部）	
24.	バルトネラ症の発症機序に関する研究	345
	分担研究者：小田 紘（鹿児島大学医学部）	
25.	猫ひっかき病の疫学的研究	349
	分担研究者：上野弘志（酪農学園大学獣医学部）	
26.	日本紅斑熱の疫学的研究	352
	分担研究者：森田千春（酪農学園大学獣医学部）	

平成12年度
研究報告書

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た。

我々は、急性および慢性Q熱由来株の24kDa外膜蛋白質は抗原性が異なり、この外膜蛋白質支配遺伝子が両由来株を識別できるマーカーとなる可能性を示唆した。今回は、この遺伝子をクローニングし解析した結果、630bpのopen reading frameが認められ、推定アミノ酸配列は24kDa外膜蛋白質のN末端アミノ酸配列を保有していることが確認された。また、24kDa発現蛋白質はウエスタンブロッティング法によりウサギおよびマウス抗*C. burnetii*免疫血清と特異的に反応した。これらの結果により、得られた遺伝子は24kDa外膜蛋白質支配遺伝子であることが確認された。

また、ラムダZaPIIをベクターとする発現ライブラリーを作製し、新しい抗原性蛋白質支配遺伝子をクローニングした。発現ライブラリーは、精製Nine Mile I相菌からゲノムDNAを抽出し、制限酵素EcoRIによりランダムに調製したゲノムDNA断片をラムダZaPIIベクターに組み込み、ファージの*in vitro*パッケージングにより作成した。マウス抗*C. burnetii*高力価免疫血清を用いて、発現ライブラリーのスクリーニングを行った。発現蛋白質の分子量および抗原性はSDS-PAGE電気泳動法およびウエスタンブロッティング法により解析した。また、クローン化遺伝子の塩基配列を決定した。発現ライブラリーのマウス抗血清によるスクリーニングから、得られた陽性5クローンは15および25kDa蛋白質を発現した。発現蛋白質はウエスタンブロッティング法によりマウス抗*C. burnetii*免疫血清と反応した。また、クローン化遺伝子は挿入DNA断片をプローブとしたサザンブロッティング法によりNine Mile I相菌ゲノムDNAに存在することを確認し、*C. burnetii*の特異的な遺伝子であることが判った。決定したクローン化遺伝子の塩基配列から、1,410bpのopen reading frameが認められ、約52.7kDa蛋白質を発現することが予測された。また、ウエスタンブロッティング法によりマウス抗15kDa発現蛋白質免疫血清はNine Mile、Priscilla、Q212、Q217、MEおよびMAN株の53kDa蛋白質を認識することが判った。さらに、この53kDa蛋白質はproteinase K処理により消化されず、本菌表面に存在する糖蛋白質であることが証明された。これらの結果により、クローン化遺伝子は本菌に53kDa糖蛋白質を発現していることが考えられた。

さらに、外膜蛋白質34 KDa支配する遺伝子性状を解析した。34 KDa蛋白質発現遺伝子のORFは915bpで305アミノ酸をコードし、そのGC含量は41.6mol%であった。N末端シグナルペプチドは26アミノ酸残基から成り、シグナルペプチダーゼによって認識されたことから、この蛋白質は菌体膜に関与することが示された。その推定分子量は約31 KDaであった。この蛋白質は、プロテナーゼKに感受性、またザルコシルに不溶性であることから、外膜に存在すると考えられた。このORFをomp-34とした。この蛋白質は、抗34

KDaマウス免疫血清のウエスタンブロッティングにより、*C. burnetii* の10株すべての34 KDaに反応したことから、株共通に存在すると考えられた。現在更に、この蛋白質の性状および機能を解析している。

A. 研究目的

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た。

B. 研究方法

24kDa外膜蛋白質のN末端アミノ酸配列を決定し、この遺伝子をクローニングした。発現ライブラリーは、精製Nine Mile I相菌からゲノムDNAを抽出し、制限酵素 *EcoRI* によりランダムに調製したゲノムDNA断片をラムダZaPIIベクターに組み込み、ファージの *in vitro* パッケージングにより作成した。マウス抗 *C. burnetii* 高力価免疫血清を用いて、発現ライブラリーのスクリーニングを行った。発現蛋白質の分子量および抗原性はSDS-PAGE電気泳動法およびウエスタンブロッティング法により解析した。また、クローン化遺伝子の塩基配列を決定した。*C. burnetii* のゲノムライブラリーをラムダDASH IIにて作出し、ウエスタンブロッティングにて約34-kDaの蛋白を発現するプラークを得た。

C. 研究結果・考察

精製Nine Mile I相菌をゼルコーシン処理

により外膜蛋白質を精製し、PVDF膜に転写後、24kDa外膜蛋白質のN末端31個のアミノ酸配列を決定した。この配列を基に、予想させる塩基配列から設計した混合プライマーを用いて本菌DNAから59bp産物を増幅後塩基配列を決定した。PCR増幅産物の塩基配列から推定したアミノ酸配列は24kDa外膜蛋白質のN末端アミノ酸配列と一致した。この塩基配列から新たにプライマーを設計し、本菌DNAから増幅した断片をプローブとし、遺伝子ライブラリーをスクリーニングした結果、約24kDa蛋白質を発現する陽性クローンが得られた。クローン化遺伝子の塩基配列を解析した結果、630bpの open reading frame が認められ、推定アミノ酸配列は24kDa外膜蛋白質のN末端アミノ酸配列を保有していることが確認された。また、24kDa発現蛋白質はウエスタンブロッティング法によりウサギおよびマウス抗 *C. burnetii* 免疫血清と特異的に反応した。これらの結果により、得られたクローン化遺伝子は24kDa外膜蛋白質支配遺伝子であることが確認された。

さらに、決定した遺伝子塩基配列から設計したプライマーを用いて急性Q熱由来株DNAから特異的な増幅産物が得られたが、慢性Q熱由来株からは得られなかった。また、サザンブロッティング法により24 kD外膜蛋白質支配遺伝子の特異的なプローブは急性Q熱由来株DNAと反応したが、慢性Q熱由来株DNAと反応しなかった。これらの結果から、24kDa外膜蛋白質支配遺伝子は急性Q熱由来株の特異的な遺伝子の可能性が示唆され、本菌の病原性に重要な役割を担うことが考えられた。

発現ライブラリーは、精製Nine Mile I相菌からゲノムDNAを抽出し、制限酵素

EcoRIによりランダムに調製したゲノムDNA断片をラムダZaPIIベクターに組み込み、ファージの*in vitro* パッケージングにより作成した。マウス抗*C. burnetii* 高力価免疫血清を用いて、発現ライブラリーのスクリーニングを行った。発現蛋白質の分子量および抗原性はSDS-PAGE電気泳動法およびウエスタンブロッティング法により解析した。また、クローン化遺伝子の塩基配列を決定した。

発現ライブラリーのマウス抗血清によるスクリーニングから、得られた陽性5クローンは15および25kDa蛋白質を発現した。発現蛋白質はウエスタンブロッティング法によりマウス抗*C. burnetii* 免疫血清と反応した。また、クローン化遺伝子は挿入DNA断片をプローブとしたサザンブロッティング法によりNine Mile I相菌ゲノムDNAに存在することを確認し、*C. burnetii*の特異的な遺伝子であることが判った。決定したクローン化遺伝子の塩基配列から、1,410bpのopen reading frame が認められ、約52.7kDa蛋白質を発現することが予測された。また、ウエスタンブロッティング法によりマウス抗15kDa発現蛋白質免疫血清はNine Mile、Priscilla、Q212、Q217、MEおよびMAN株の53kDa蛋白質を認識することが判った。さらに、この53kDa蛋白質はproteinase K 処理により消化されず、本菌表面に存在する糖蛋白質であることが証明された。これらの結果により、クローン化遺伝子は本菌に53kDa糖蛋白質を発現していることが考えられた。

一方、決定した遺伝子塩基配列から設計したプライマーを用いて、PCR法により特異的な432 bp DNA断片をダニ由来Nine Mile株、ヤギ流産胎仔由来Priscilla株および慢性例由来Q212、Q217、MEおよびMAN株から増幅した。また、これらのPCR増幅産物を制限酵素MobIにより切断したところ、慢性例由来Q212およびQ217株と他の株の切断パターンが異なることが判っ

た。この新しい抗原性蛋白質支配遺伝子は遺伝学的マーカーになる可能性が示唆された。さらに、急性および慢性Q熱の早期鑑別遺伝子診断法の開発も期待される。データベースでクローン化遺伝子の推定アミノ酸配列の相同性を検索したところ、*Legionella pneumophila* の感染初期に関わると思われる蛋白質のアミノ酸配列と37%の相同性が認められた。また、*Helicobacter* の29 kD 免疫防御蛋白質のアミノ酸配列と31%の相同性が認められた。この新しい抗原性蛋白質は*C. burnetii* の感染および免疫防御に関わる可能性が推測された。これらの知見はQ熱の病態や本菌の抗原性などを理解する上で興味ある。

C. burnetii のゲノムライブラリーをラムダDASH IIにて作出し、ウエスタンブロッティングにて約34-kDaの蛋白質を発現するプラークを得た。その遺伝子の性状解析を目的とし、陽性サブクローンを確立した。34-kDa蛋白質発現遺伝子の20-kDaの3'末端およびβガラクシターゼペプチドから成る融合蛋白質をコードするオープンリーディングフレーム (ORF) のシーケンスをした。制限酵素EcoR I およびHind III で処理した*C. burnetii* Nine Mile 株のゲノムDNAをプローブとしたサザンブロッティングでサブクローンの挿入DNAが陽性であったため、この挿入DNAは*C. burnetii* のゲノムにあると考えられた。34-kDaの完全長ORFを得るため、次にラムダZAP IIより構築したゲノムDNAライブラリーを陽性サブクローンの挿入DNAのプローブを用いたプラークハイブリダイゼーションによってスクリーニングした。これにより8クローンを得た。その内2クローンは34-kDa抗原を発現し、完全長ORFを含んでいた。このORFは915bpで305アミノ酸をコードし、そのGC含量は41.6mol%であった。その推定アミノ酸配列解析からN末端シグナルペプチドが26アミノ酸残基から成り、シグナルペプチダーゼによって認識されたことか

ら、この蛋白は*C.burnetii* 菌体膜に関わることが示された。その推定分子量は約31-kDaであった。*C.burnetii*全菌体上でこの蛋白はプロテナーゼK感受性、ザルコシル不溶性であったため、*C.burnetii*の外膜に存在すると思われたため、このORFをomp-34とした。抗34-kDaマウス免疫血清はウエスタンブロッティングで様々な由来の*C.burnetii* 10株の34-kDaに反応したため、この蛋白が*C.burnetii* 株の相異に関わらず存在する蛋白と示唆された。これが*C.burnetii*の病原性に関わるか、ワクチン抗原になり得るかは不明である。今後更にこの蛋白の性状および機能解析を行う予定である。

D. 結論

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、24、34および52kDa蛋白質を支配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た。

E. 研究発表

1. 発表論文

- 1) Quan, Y., To Ho., Zhang, G. Q. and Hirai, K.: Cloning and expression of the 34 kDa outer membrane protein gene of *Coxiella burnetii*. J. Vet. Med. Sci., in press, 2001.
- 2) Quan, Y., Zhang, G. Q., Fukushi, H., Yamaguchi, T. and Hirai, K.: Identification of a new group in *Coxiella burnetii* isolates from China based on the *com1* gene sequence. Microbiol. Immunol., in press, 2001.
- 3) Zhang, G. Q., To Ho. and Hirai, K.: Molecular cloning and sequence analysis of A novel *Coxiella burnetii* gene encoding An 24 kDa outer membrane protein. Microbiol.

Immunol., in press, 2001.

- 4) Zhang, G. Q., Hotta, A., Quan, Y., Yamaguchi, T., Fukushi, H. and Hirai, K.: Molecular cloning and sequence analysis of A novel *Coxiella burnetii* gene encoding an immunoreactive, membrane associated 53 kDa glycoprotein. Microbiol. Immunol., in press, 2001.

2. 口頭発表

- 1) 張 国全、堀田明豊、山口剛士、福士秀人、平井克哉：*Coxiella burnetii*の抗原性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）
- 2) 張 国全、堀田明豊、山口剛士、福士秀人、平井克哉：*Coxiella burnetii*の抗原性蛋白質支配遺伝子のクローニングおよび解析、第6回リケッチア研究会（1999.11）
- 3) 堀田明豊、山口剛士、福士秀人、平井克哉：*Coxiella burnetii*外膜に対するモノクローナル抗体の作製とそれによる型別、第6回リケッチア研究会（1999.11）
- 4) 丸山総一、石岡慎也、中尾るり子、湯川真嘉、壁谷英則、勝部泰次、石原加奈子、松館宏樹、山口剛士、福士秀人、平井克哉：獣医療関係者および健常者における人獣共通感染症の血清学的感染状況の比較、第129回日本獣医学会（2000.4）
- 5) 長岡宏美、杉枝正明、佐原啓二、秋山真人、原 元彦、平井克哉：*C.burnetii*感染者の呈する症状についての一考察、第46回東海公衆衛生学会（2000.7）
- 6) 安藤匡子、堀田明豊、山口剛士、福士秀人、平井克哉：Q熱起因菌*Coxiella burnetii*のSCIDマウスに対する病原性、第130回日本獣医学会（2000.10）
- 7) 安藤匡子、堀田明豊、山口剛士、福士秀人、柵木利昭、平井克哉：Q熱起因菌*Coxiella burnetii*のSCIDマウスに対する病原性、第7回リケッチア研究会（2000.10）
- 8) 張 国全、To Ho、山口剛士、福士秀

人、平井克哉：*Coxiella burnetii* の28kD
外膜蛋白質支配遺伝子のクローニングおよ
び解析、第130回日本獣医学会
(2000.10)

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

53kDa糖蛋白質支配遺伝子塩基配列から設計したプライマーを用いて、PCR法により特異的な432 bp DNA断片をダニ由来Nine Mile株、ヤギ流産胎仔由来Priscilla株および慢性例由来Q212、Q217、MEおよびMAN株から増幅した。また、これらのPCR増幅産物を制限酵素MobIにより切断したところ、慢性例由来Q212およびQ217株と他の株の切断パターンが異なることが判った。この新しい抗原性蛋白質支配遺伝子は遺伝学的マーカーになる可能性が示唆された。さらに、急性および慢性Q熱の早期鑑別遺伝子診断法の開発も期待される。データベースでクローン化遺伝子の推定アミノ酸配列の相同性を検索したところ、*Legionella pneumophila* の感染初期に関わると思われる蛋白質のアミノ酸配列と37%の相同性が認められた。また、*Helicobacter* の29 kD 免疫防御蛋白質のアミノ酸配列と31%の相同性が認められた。この新しい抗原性蛋白質は*C. burnetii* の感染および免疫防御に関わる可能性が推測された。これらの知見はQ熱の病態や本菌の抗原性などを理解する上で興味ある。

24kDa外膜蛋白質支配遺伝子塩基配列から設計したプライマーを用いて急性Q熱由来株DNAから特異的な増幅産物が得られたが、慢性Q熱由来株からは得られなかった。また、サザンブロット法により24 kD 外膜蛋白質支配遺伝子の特異的なプローブは急性Q熱由来株DNAと反応したが、慢性Q熱由来株DNAと反応しなかった。これらの結果から、24kDa外膜蛋白質支配遺伝子は急性Q熱由来株の特異的な遺伝子の可能性が示唆され、本菌の病原性に重要な役割を担うことが考えられた。

A.研究目的

Q熱の遺伝子診断用プライマーを開発することが目的である。

B.研究方法

C. burnetii 計21株のうち主にNine Mile株を用いた。

C.研究結果・考察

精製Nine Mile I相菌をゼルコーシン処理により外膜蛋白質を精製し、PVDF膜に転写後、24kDa外膜蛋白質のN末端31個のアミノ酸配列を決定した。この配列を基に、予想させる塩基配列から設計した混合プライマーを用いて本菌DNAから59bp産物を増幅後塩基配列を決定した。PCR増幅産物の塩基配列から推定したアミノ酸配列は

24kDa外膜蛋白質のN末端アミノ酸配列と一致した。この塩基配列から新たにプライマーを設計し、本菌DNAから増幅した断片をプローブとし、遺伝子ライブラリーをスクリーニングした結果、約24kDa蛋白質を発現する陽性クローンが得られた。クローン化遺伝子の塩基配列を解析した結果、630bpの open reading frame が認められ、推定アミノ酸配列は24kDa外膜蛋白質のN末端アミノ酸配列を保有していることが確認された。また、24kDa発現蛋白質はウエスタンブロット法によりウサギおよびマウス抗 *C. burnetii* 免疫血清と特異的に反応した。これらの結果により、得られたクローン化遺伝子は24kDa外膜蛋白質支配遺伝子であることが確認された。

さらに、決定した遺伝子塩基配列から設計したプライマーを用いて急性Q熱由来株DNAから特異的な増幅産物が得られたが、慢性Q熱由来株からは得られなかった。また、サザンブロッティング法により24 kDa外膜蛋白質支配遺伝子の特異的なプローブは急性Q熱由来株DNAと反応したが、慢性Q熱由来株DNAと反応しなかった。これらの結果から、24kDa外膜蛋白質支配遺伝子は急性Q熱由来株の特異的な遺伝子の可能性が示唆され、本菌の病原性に重要な役割を担うことが考えられた。

一方、52kDa蛋白質支配遺伝子から設計したプライマーを用いて、PCR法により特異的な432 bp DNA断片をダニ由来Nine Mile株、ヤギ流産胎仔由来Priscilla株および慢性例由来Q212、Q217、MEおよびMAN株から増幅した。また、これらのPCR増幅産物を制限酵素MobIにより切断したところ、慢性例由来Q212およびQ217株と他の株の切断パターンが異なることが判った。この新しい抗原性蛋白質支配遺伝子は遺伝学的マーカーになる可能性が示唆された。さらに、急性および慢性Q熱の早期鑑別遺伝子診断法の開発も期待される。データベースでクローン化遺伝子の推定アミノ酸配列の相同性を検索したところ、*Legionella pneumophila* の感染初期に関わると思われる蛋白質のアミノ酸配列と37%の相同性が認められた。また、*Helicobacter* の29 kD 免疫防御蛋白質のアミノ酸配列と31%の相同性が認められた。この新しい抗原性蛋白質は*C. burnetii* の感染および免疫防御に関わる可能性が推測された。これらの知見はQ熱の病態や本菌の抗原性などを理解する上で興味深い。

D. 結論

24および52kDa蛋白質支配遺伝子から、Q熱の遺伝子診断用プライマーを開発した。

E. 研究発表

1. 発表論文

- 1)Zhang,G. Q., To Ho. and Hirai, K.: Molecular cloning and sequence analysis of A novel *Coxiella burnetii* gene encoding An 24 kDa outer membrane protein. Microbiol. Immunol., in press, 2001.
- 2)Zhang,G. Q., Hotta,A., Quan,Y., Yamaguchi, T., Fukushi, H. and Hirai, K.:Molecular cloning and sequence analysis of A novel *Coxiella burnetii* gene encoding An immunoreactive, membrane associated 53 kDa glycoprotein. Microbiol. Immunol., in press, 2001.

2. 口頭発表

- 1)張 国全、堀田明豊、山口剛士、福士秀人、平井克哉：*Coxiella burnetii* の抗原性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）
- 2)張 国全、To Ho、山口剛士、福士秀人、平井克哉：*Coxiella burnetii* の28kD外膜蛋白質支配遺伝子のクローニングおよび解析、第130回日本獣医学会（2000.10）

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ところ、下記の成績を得た。

①慢性Q熱と診断された患者の5年間の追跡調査の結果、慢性Q熱が難治性であることが示唆された。②乳製品(ナチュラルおよびプロセスチーズ)の *C.burnetii* 汚染を確認し、分離株はわが国のヒトやウシの間に浸淫している株と同一であることが遺伝子検索の結果から明らかになった。

A 研究目的

Q熱(コクシエラ症)の、ヒトおよび動物(イヌ、ネコ)における治療効果について調査し、本症の感染拡大を防止するための基礎的疫学調査を実施した。また、感染源追求のため、乳製品の汚染実態について調査した。

B 研究方法

①臨床的ならびに血清学的に慢性Q熱と診断された患者(72歳、女性)の血液について、5年間ほぼ1~2ヶ月間隔で採血した当該患者の血液108検体を供試しNested PCR法を用いた遺伝子検索ならびに抗体価の測定、一部については病原体の分離を行った。すなわち、供試材料をlysis bufferで処理後、ヨウ化ナトリウムを添加したIsopropanolで抽出したDNAを鋳型として *C.burnetii* 外膜蛋白をコードする *Com I* 遺伝子をターゲットに設計されたプライマーを用いて *C.burnetii* に特異的なDNAの検出を試みた。抗体価は間接蛍光抗体法により測定した。遺伝子陽性であった検体を含めた前後の検体については、マウス接種による病原体の分離をあわせて行った。

②静岡県内で買い上げた製造方法の異なる2種類のチーズ、すなわちナチュラルチーズ2種(外国産8、国内産2)と、プロセスチーズ3種(国内産3)の計13検体についてマウス接種による *C.burnetii* の分離を試みた。接種材料はチーズ25gにPBS(-)

50mlを加えて乳剤を作製し、56℃15分加熱処理後得られた沈渣の浮遊液とし、免疫抑制状態を保持したマウスの腹腔内接種により病原体の分離を行った。

(倫理面への配慮)

本調査に供試した検体は、患者、提供者および臨床医の十分な理解を得た後、検査および研究に供試した。また、得られた成績を含むプライバシーの保護には十分配慮するとともに、結果は速やかに臨床医に還元し、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

①慢性Q熱患者の108回にわたる経時的検索の結果、発症後7ヶ月目までは常に遺伝子が検出された。その後は陰性と陽性を繰り返し、この間患者の臨床症状も改善と悪化を繰り返した。遺伝子検出の成績は、臨床症状およびCRP値の変動に呼応していた。

血清抗体価は発症時 Nime Mile I 相菌に対しては IgM 1:32、IgG 1:256、Nime Mile II 相菌に対しては IgM 1:16、IgG 1:64 で108検体すべてにおいて変動は認められなかった。一方、*C.burnetii* は2000年3月まで分離された。

②供試したナチュラルチーズ10検体中6検体(外国産5、国内産1)から *C.burnetii* が分離され、ある種のチーズにおける

C.burnetii 汚染を確認した。一方、プロセスチーズからは3検体のいずれからも病原体は分離されなかった。分離株の遺伝子解析を試みたところ、*C.burnetii* Com I 領域の遺伝子配列は国内のヒトおよびウシ生乳由来株と100%の相同性を示した。

D 考察

慢性Q熱患者の追跡調査の結果、継続的にQ熱治療薬 MINO 投与あるいは LVFX + DOXY 投与が行われたにもかかわらず、5年間断続的に遺伝子が検出され病原体が分離されたこと、患者の臨床症状も改善と悪化を繰り返したことから、慢性Q熱が難治性であることが示唆された。当該患者が急性から移行して慢性化したか否かは明らかではないが、早期診断・早期治療により慢性化への移行を防止することは重要であると思われた。また、遺伝子診断成績が臨床症状を明確に反映していたことから、早期診断法として遺伝子診断は有用であることが示唆された。

一方、感染源追求のために市販チーズにおける *C.burnetii* 汚染状況の実態調査を行ったところ、ナチュラルチーズの一部から *C.burnetii* が分離され、汚染が確認された。しかし、プロセスチーズでは汚染は認められなかった。チーズの原材料である生乳が *C.burnetii* に汚染していた場合、製造過程に過熱工程のないナチュラルチーズでは原材料中の *C.burnetii* が残存し、チーズが汚染していた可能性が考えられる。一方、プロセスチーズに汚染が確認されなかったのは、製造中の加熱工程により原材料中の *C.burnetii* が完全に殺滅されたことに由来すると考えられた。

E 結論

ヒトのコクシエラ症、特に慢性Q熱についてはこれまで詳細な調査報告がなく、その実態が不明であった。本研究で調査対象とした慢性Q熱患者は5年間もの長期にわたり *C.burnetii* 感染を持続しつづけたことが病原体の分離ならびに遺伝子診断から明らかになった。臨床症状も重篤で、Q熱治療薬 MINO 投与も急性Q熱患者に対す

るような顕著な効果はみられず、難治性であることが強く示唆された。これらの知見は海外での報告と一致するものであり、早期診断・早期治療により慢性Q熱への移行を回避する重要性を、医学領域における専門家へ啓蒙することが必要であると思われた。

さらに、本症の予防対策上感染源、感染経路の解明は必須の課題であり、海外では *C.burnetii* に汚染した食品を感染源とした経口感染のルートが報告されている。わが国においても動物における不顕性感染が多くウシに広く病原体が浸淫していることが昨年までの疫学調査で明らかになったが、これらの動物の生産物である生乳を原材料としたチーズの一部に *C.burnetii* 汚染が確認された。本菌の病原性などからチーズの中に存在する *C.burnetii* の全てが直ちに危険性を意味するものではないと思われるが、チーズなどの乳製品を中心とした食品媒介コクシエラ症発生の可能性は否定できない。今後は、乳や乳製品中での *C.burnetii* の挙動、特に熱抵抗性について再検討することが必須であると思われた。

F 研究発表

1.論文発表

- 1) 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(11)：935-938，1999.
- 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(6)：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(2)：251-252,1998.

2.学会発表

- 1) 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. 福岡)

2) 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. 江別)

3) 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. 札幌)

4) 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. 相模原)

5) 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. 藤沢)

6) 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. 熊本)

7) 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年度全国食品衛生監視員研修会：(1999.11. 東京)

8) 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. 静岡)

9) 長岡宏美、佐原啓二、杉枝正明、秋山真人、原元彦、山本茂貴、平井克哉：*C.burnetii* 感染者の呈する症状についての一考察：第46回東海公衆衛生学会：(2000.7. 岐阜)

10) 長岡宏美、佐原啓二、秋山真人：市販チーズにおける *C.burnetii* 汚染の実態調査：平成12年度日本獣医公衆衛生学会・中部：(2000.9. 名古屋)

11) 長岡宏美、杉枝正明、秋山真人、原元彦、山本茂貴、平井克哉：慢性疲労症候群様患者からの *C.burnetii* 遺伝子の検出：第48回日本ウイルス学会：(2000.10. 三重)

12) 長岡宏美、秋山真人、塩崎裕士、三竹啓敏、小林健司、山本茂貴：慢性Q熱と診断された患者の5年間の追跡調査：(2000.10. 千葉)

13) 長岡宏美、秋山真人、山本茂貴、平井克哉：市販チーズからの *C.burnetii* 検出の試み：(2001.2. 奈良)

G 知的所有権の取得

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

分担研究報告書

ヒトおよび伴侶動物の Q 熱の疫学的・診断的研究

分担研究者 小宮智義

研究要旨

一般病院外来初診患者を対象に *Coxiella burnetii* に対する血清学的検査とその臨床症状との関係について調査した。その結果、血清学的に陽性と診断された患者は全体の約 17% で、その臨床症状は微熱や微熱の持続 31.3%、高熱 41.8%、全身倦怠感 23.9%、頸部リンパ節の腫脹 37.3%、鼠経部リンパ節の腫脹 16.4%、肺炎 1% 並びに無症状 4.5% であり、多様な臨床像を呈していた。血清学的に陽性と診断された症例とその臨床症状との間に特異的な相関は認められなかったが、初診患者の約 17% が *C. burnetii* に対して血清学的に陽性を示したことは、他の一般病院においても原因不明もしくは風邪と診断される患者の中に *C. burnetii* 感染の可能性があることが示唆された。

乳牛、特に繁殖障害乳牛の牧場別個体別に血清、生乳及び子宮スワブを用いて調査した結果、牧場別による抗体陽性率及び遺伝子検出率に明らかに差が認められた。また、材料別の遺伝子陽性率と血清抗体価を比較検討した結果、乳牛では *C. burnetii* に感染後リケッチア血症を呈した後に乳汁子宮へとその個体における感染が移行していく事が考えられた。

A. 研究目的

Q 熱は、リケッチアの一種 *Coxiella burnetii* の感染によって起こる人獣共通感染症で、世界に広く分布し、我が国においても近年広く浸透していることが明らかにされてきた。*C. burnetii* 感染におけるヒトの臨床症状は、他の呼吸器疾患や感冒症状などと極めて類似し臨床鑑別が難しいため、その診断は血清学的、病原学的小および遺伝学的により行われている。

そこで今回、1) 一般病院来院初診患者の臨床症状と血清学的診断結果との関係について検討をし、*C. burnetii* の感染実態を明らかにすることを目的とした。また、ヒトへの感染源として注目されている伴侶動物の疫学調査を昨年度までに実施し、その感染実態を明らかにしてきたが、今回は、2) これまでにも感染源として報告されている家畜の中で特に乳牛に注目し、*C. burnetii* 感染と繁殖障害乳牛との関連を明らかにするための疫

学調査を実施した。

B. 研究方法

1. 1998年9月から2000年8月までに、発熱や全身倦怠感を主訴として一般病院に来院した初診患者392名より得られた血液及び血清を用いて調査した。遺伝子の検出は、*C.burnetii*のcom1遺伝子をターゲットとしたNested PCRにより、また一部の血液についてはicd遺伝子をターゲットとしたNested PCRも併せて行い、さらに得られたPCR産物のPCR-RFLP解析による病態の識別が可能か否か臨床検体より検討した。さらに、得られたicd遺伝子のPCR産物については、ダイレクトシーケンスを行いその塩基配列を決定した。血清抗体検査はNine Mile II相菌を抗原とした間接蛍光抗体法(IFA)を用いて行った。血清学的診断における陽性判定基準はPCR陽性またはIFAで多価抗体価128倍以上、またはIgM抗体価32倍以上、IgG抗体価128以上を陽性とした。

2. 東日本某地区の7つの牧場より、延べ337頭の乳牛を対象として、各個体の血清、生乳および子宮スワブを用い、IFAによる抗体測定およびNested PCRによる遺伝子検出を試みた。IgG抗体価64倍以上を抗体陽性と判定した。

(倫理面)

今回の調査に供試したヒト血液検体は、病院医師がその初診時症状よりQ熱を疑い当研究所に診断依頼したものであり、患者に対してはインフォームドコンセントがあったものと確認しており、倫理面への問題は無いものと判断している。

C. 研究結果

1. 一般病院外来初診患者392例のPCRでは、21例(5.4%)が陽性を示した。そのうちicd遺伝子をターゲットとしたPCRで陽性となったものは15例であり、そのPCR-RFLP解析の結果はAcc II制限酵素で切断され、急性Q熱患者由来分離株の切断パターンと一致した。また、そのPCR産物についてダイレクトシーケンスを行ったが、これまでの分離株と今回の患者検体との間に特異的塩基置換は認められなかった。血清学的には、IgG抗体価128倍以上が11例(5.4%)、IgM抗体価32倍以上が23例(11.3%)、IgG+M+Aの多価抗体価128倍以上が35例(8.9%)であった。PCRおよびIFA抗体より今回陽性と診断された症例は67例(17.1%)で、この血清学的診断陽性例の臨床症状は、微熱もしくは微熱の持続が21例(31.3%)、高熱が28例(41.8%)、全

身倦怠感が 16 例 (23.9%)、頸部リンパ節の腫脹が 25 例 (37.3%)、鼠経部リンパ節の腫脹が 11 例 (16.4%)、肺炎が 1 例 (1.5%) であったが、無症状も 3 例 (4.5%) 認められた。また、患者とペットとの接触もしくは飼育歴が判明しているのは 6 例 (9.0%) であった。

2. 乳牛特に繁殖障害乳牛を対象とした 7 牧場別 (A~G) 調査において、遺伝子検出陽性は、A 牧場 15.1% (8/53)、B 牧場 22.0% (11/50)、C 牧場 36.0% (18/50)、D 牧場 46.5% (20/43)、E 牧場 18.0% (9/50)、F 牧場 27.3% (12/44) 並びに G 牧場 10.6% (5/47) であり、全体で 24.6% (83/337) であった。検体別陽性率は、血清 3.6% (12/337)、生乳 14.0% (47/337) 及び子宮スワブ 13.6% (46/337) であった。抗体陽性率は、A 牧場 9.4% (5/53)、B 牧場 10.0% (5/50)、C 牧場 52.0% (26/50)、D 牧場 76.7% (33/43)、E 牧場 24.0% (12/50)、F 牧場 40.9% (18/44) 並びに G 牧場で 68.1% (32/47) であり、全体で 38.9% (131/337) であった。

D. 考察

1. ヒトでの調査において、今回特に一般病院外来初診時患者について調査したが、血清学的に陽性として診断された患者の臨床症状は、諸外国

のそれと同様に、発熱、全身倦怠感、リンパ節腫脹などを示していた。しかし、その他にも肺炎など *C.burnetii* 感染によって引き起こされる症状は多様であることも示唆された。血清学的診断において初診患者全体の約 17%が *C.burnetii* に対して陽性を示したことは、一般健康人を対象とした疫学調査結果との間に明らかな有意差が認められた。これらの結果より他の一般病院においても原因不明もしくは風邪と診断されている患者の中に *C.burnetii* 感染の可能性が存在することが示唆され、*C.burnetii* 感染の潜在性についての医師への啓蒙活動をはじめ検査センターにおける Q 熱診断の必要性があるものと考えられた。そのためにも、今後さらに調査を進め *C.burnetii* 感染実態を明らかにするとともに、より簡便な検査方法の確立を検討していく必要があると考えられた。

2. 乳牛、特に繁殖障害乳牛を中心とした農場別疫学調査では、牧場別による抗体陽性率および遺伝子検出率に明らかな差が認められ、繁殖障害乳牛の多い牧場では *C.burnetii* 感染率が高い傾向にあることが明らかになった。同一個体での血清、生乳、子宮スワブを用いた遺伝子検出率を比べてみると、生乳からの遺伝子検出率が最も高く、次に子宮スワブ、

血清の順であったが、その血清抗体検査結果との比較から、感染し、リケッチア血症を呈した後に乳汁中および子宮に移行する個体内における感染の可能性が示唆された。

E. 結論

ヒトのコクシエラ症における血清学的診断と臨床症状との関係を検討した。血清学的検査において陽性と診断された症例に、特徴的な臨床症状は認められなかったが、発熱、全身倦怠感、リンパ節腫脹など多様な症状を呈することが改めて明らかになった。さらに今回、一般病院での調査により、初診患者の約 17%が *C.burnetii* に対し血清学的に陽性を示したことから、ヒトにおける *C.burnetii* 感染が我が国に広く浸透していることが示唆され、今後一層の疫学調査によって感染実態を明らかにするとともに、より迅速簡便な診断方法の確立普及が必要であると考えられた。

乳牛、特に繁殖障害乳牛における疫学調査では、繁殖障害と *C.burnetii* 感染との間に何らかの因果関係の可能性が示唆されたが、今後ヒト並びに家畜、伴侶動物などを含めた相互的な感染経路、及び個体内での感染様式を明らかにすることが本症の予防にも繋がるものと考えられた。

F. 研究発表

1.論文発表

1)Kubota,H.,Tanabe,Y.,Komiya,T.,Hirai,K.,Takahashi,J.,Kohno,Y.,:Q Fever Encephalitis with Cytokine Profiles in Serum and Cerebrospinal Fluid. The Pediatric Infectious Disease Journal,2001, in press

2.学会発表

1)久保田博昭、田辺雄三、小宮智義、平井克哉：Q 熱脳炎の 1 例、第 103 回日本小児科学会学術集会（2000.4）

2)安部 崇、清水 信、斎藤裕子、西山 理、市川元司、加藤景介、山木健市、平井克哉、小宮智義：第 43 回日本感染症学会中日本地方会総会（2000.11）

3)小宮智義、相澤主税、日高康雄、貞升健志、平田一郎、福士秀人、平井克哉：一般病院外来初診時の臨床症状と *Coxiella burnetii* 血清診断について、第 7 回リケッチア研究会（2000.10）

4)貞升健志、小宮智義、新開敬之、山崎 清、中村敦子、長谷川道弥、平田一郎、諸角 聖、相澤主税、山本茂貴、小久保弥太郎、鎌田信一：第 7 回リケッチア研究会（2000.10）

5)小宮智義、日高康雄、貞升健志、平田一郎、駒瀬勝啓、平井克哉：一般病院外来初診患者における *Coxiella burnetii* 陽性率とその臨床症状につい

て、第 75 回日本感染症学会総会
(2001.3)

分担研究報告書

Q熱の遺伝子および血清診断法の再検討

研究者 萩原敏且

研究要旨

Q熱の実験室診断法を再検討するため、PCR法による遺伝子検出および間接蛍光抗体(IF)法による血清診断の感度、特異性について検討した。PCR法(POM12-34, ISF1R1-F2R1 および CB12)の感度は、ISF1R1-F2R1 = POM12-34 > CB12の順に高かった。また、特異性は、POM12-34 >> CB12 > ISF1R1-F2R1の順に高かった。次に、IF法を検討した結果、使用した抗原により反応像に違いがみられた。精製粒子を抗原として得られた陽性血清と患者回復期血清は、精製粒子および感染細胞と反応した。一方で、感染VERO細胞を抗原として得られた陽性血清は、感染細胞において細胞内の封入体のみ反応し、細胞外粒子および精製粒子とは反応がみられなかった。さらに、ウエスタンブロッティングにより陽性血清の反応像を比較した結果、患者回復期血清のみが29kDa外膜蛋白質(推定)に反応した。今回の結果から、今後も感度および特異性の高い診断法を確立するために、PCRによる遺伝子検出およびIFによる血清診断とともに、Q熱と診断された患者検体を用いてさらに検討するなどして、さらに検討する必要があるものと考えられた。

A. 研究目的

ヒトのコクシエラ症(Q熱)は *Coxiella burnetii* を起因菌とする健康を脅かす重要な疾患であるが、病像は多岐にわたっているために、臨床診断において本病を発見することを難しくしている。このため実験室診断が重要となるが、PCR法による遺伝子検出および間接蛍光抗体(IF)法による血清診断の感度、特異性、安

定性などに問題があることが指摘されている。そこで、本研究では、わが国で使用されている主な遺伝子診断法および血清診断法の再検討を行うことを目的としている。

B. 研究方法

3つのPCR法(*com1*: nested PCR: POM12-34, *htpAB* operon: hemi-nested PCR: ISF1R1-F2R1, *sodB*: