

図2 未同定検体のVP1-2C領域における、エコーウイルス9型特異的
プライマーによる遺伝子増幅

3. 1) 角膜ヘルペス患者涙液中の単純ヘルペスウイルス(HSV-1) 遺伝子のReal Time PCR法による定量
- 2) 角膜ヘルペスにおけるサイトカイン・ケモカインの発現と 浸潤細胞による実質免疫病変発症の機序について

分担研究者 林 皓三郎 神戸市環境保健研究所長

研究要旨

- (1) 角膜ヘルペス患者涙液中の単純ヘルペスウイルス(HSV-1)遺伝子の Real Time PCR法による定量

Real Time PCR法によって、各病型の角膜ヘルペス患者涙液中のHSV-1 DNA量を測定した。上皮型角膜ヘルペスHSV-1 DNA量(平均値)= 1.0×10^5 copies/シルマー試験紙採取サンプル。実質型(活動期)角膜ヘルペスDNA量 = 8.0×10^4 copies/サンプル。実質型(沈静期)角膜ヘルペスDNA量=0/サンプル。上皮型、実質型(活動期)角膜ヘルペスをアシクロビルで治療し、臨床所見が改善してウイルスの活動性増殖病変が治まったものでは、ウイルスDNA量は検出限界以下であった。両側の帯状角膜変性患者の角膜にエキシマレーザー切除術を行って3日後の涙液からは 2.0×10^6 および 1.3×10^5 copies/サンプルのHSV-1 DNAが検出された。Real Time PCR法によって角膜ヘルペスの各病変時のウイルス量を知る事が出来る。活動期実質型角膜炎でのウイルス量が急性期の上皮型角膜炎の場合に近いウイルス量を示したことは病変進行を阻止するうえでウイルス増殖の抑制が重要であることを示している。

- (2) 角膜ヘルペスにおけるサイトカイン・ケモカインの発現と浸潤細胞による実質免疫病変発症の機序について

Balb/cマウス角膜にHSV-1 (CHR3株)を感染させると、急性期(感染1日-5日)に上皮性角膜炎、7-8日以後に角膜実質混濁が起こる。免疫組織染色では、急性期には多数の多核白血球、マクロファージが輪部から上皮下、実質に浸潤してくる。CD4,CD8T細胞、B細胞は感染6-7日後ごろから浸潤が見られる。サイトカインを定量的に検出すると、角膜では非特異的炎症性サイトカインが、三叉神経節ではIL-2,IFN- γ ,IL-12が強く誘導された。Th2サイトカインはほとんど誘導されなかった。ウイルス価とサイトカインの発現を図示して重ねると、角膜、三叉神経節ともにウイルス価の低下とともにサイトカインの発現が増加していることが明らかである。このことは角膜実質炎がサイトカインストームによることを示すと同時に、三叉神経節では、IL-12,IFN- γ がウイルスの中樞神経系への拡がりを抑えることを示している。ケモカインの定量的検出では、角膜、結膜、三叉神経節にはTh1 反応に伴うケモカインが急速に増加するが、所属リンパ節ではhomeostatic chemokineが他の組織とは対照的に減少する。

こうしたサイトカイン、ケモカインの変化をコントロールすることができれば、ウイルス増殖抑制と炎症反応による角膜混濁に対する新しい予防・治療の道が開けるであろう。

A. 研究目的

角膜ヘルペスはアシクロピルのような優れた抗ヘルペス剤が使われるようになってから、軽症化したと言われているが、欧米諸国、日本では依然として強い視力障害をもたらし、角膜移植にまでにも及ぶ代表的な疾患である。視力の予後を悪くする原因は、繰り返す再発に伴う、サイトカインストームに伴う免疫病変であると考えられている。したがって、角膜の透明性維持のためには、ウイルス増殖をおさえるための抗ヘルペス剤とともに、注意深いステロイド剤の投与を余儀なくされ、治療上に困難さを加えている。この免疫による角膜実質炎症反応のdriving forceの一つは、局所のウイルス DNA であるとされている。その病態をさらに検討するために：

- (1) Real Time PCR法によって、各病型の角膜ヘルペス患者涙液中のHSV-1 DNA量を測定しその病像との関係を調べた。
- (2) マウス角膜ヘルペスモデルを用いて、局所でのウイルス増殖、サイトカイン、ケモカインの発現、それに伴う炎症性細胞浸潤、角膜混濁の発生のメカニズムを解析し、角膜実質炎の病理発生とそれに対する予防・治療の新しい方法を見いだす手掛かりを得ることを目指している。

B. 研究方法

- (1) 上皮性角膜ヘルペス=11眼/9症例、実質型角膜ヘルペス=8眼/8症例、エキシマレーザー角膜手術眼(ヘルペス以外の疾患)=5眼/3症例からシルマー試験紙を用いて涙液を採取し、DNAを抽出後real time PCR法をもちいてウイルス(HSV-1) DNA を定量した。涙液採取に際しては患者に検査内容を説明し、了解を得た。
- (2) 実験動物とウイルス接種：Balb/cマウス(8週令、♀)腹腔内にケタラール、セラクターを投与し麻酔後、角膜を27ゲージ針を用いて縦横に擦過してからHSV-1 (CHR3株 0.01ml= 10^6 PFU/ml)を結膜嚢に滴下した。組織採取と試料作製：感染後継時的に眼球、局所リンパ節、眼瞼結膜、三叉神経節を摘出

し、ウイルス価測定、免疫組織化学用凍結標本、サイトカイン、ケモカイン測定用に試料を作製した。ウイルス価測定：無菌的に摘出した組織の10%乳剤をつくり、Vero細胞 monolayer へ吸着後、antibody を overlay して48時間後のplaque数をかぞえて摘出各組織中のウイルス価を求めた。免疫組織化学：OCT compoundに包埋した凍結標本をクリオスタットで薄切し、アセトン固定後、FITC標識抗体、または一次抗体を反応させた(40°C, overnight)。使用一次抗体：抗HSV-1, Neutrophil (7/4 antigen), Macro-phage (F4/80), NK cell (asialo GM1), CD4, CD8, γ δ TCR+ cell, IFN- γ , IFN- α \cdot β , TNF- α , IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, MIP-1 α , β , RANTES, Eotaxin, MCP-1 一次抗体を反応したものは洗浄後、FITC標識二次抗体を反応させ(37°C, 60分)、洗浄後マウントして、蛍光顕微鏡下で観察した。サイトカイン測定：組織を液体窒素で凍結し粉末にした。抽出可溶性部の液中のサイトカインを各ELISA定量キットを用いて定量した。ケモカイン測定：各組織片からtotal RNAを抽出し28種類のケモカインをRT-PCR法によって半定量的に検出した。実験動物の取り扱いにはARVO Resolution に準じていたずらに苦痛を与えないように十分の注意を払って行った。

C. 研究結果

- (1) 角膜ヘルペス患者涙液中の単純ヘルペスウイルス (HSV-1) 遺伝子の Real Time PCR法による定量では：
 - a) 上皮型角膜ヘルペスHSV-1 DNA量平均値= 1.0×10^5 copies/サンプル。
 - b) 実質型(活動期)角膜ヘルペスDNA量平均値= 8.0×10^4 copies/サンプル。
 - c) 実質型(沈静期)角膜ヘルペスDNA量平均値= 0/サンプル。
 - d) 上皮型及び実質型(活動型)角膜ヘルペスをアシクロピルで治療し、臨床所見が改善してウイルスの活動性病変が治まったものでは、涙液中のウイルスDNA量はこの方法の検出限

界以下であった。

- e) 両眼の帯状角膜変性症患者の角膜にエキシマレーザー切除術を行って3日後の涙液からは 2.0×10^5 及び 1.3×10^5 copies/ サンプルのHSV-1 DNAが検出された。

- (2) 角膜ヘルペスにおけるサイトカイン・ケモカインの発現と浸潤細胞による実質免疫病変発症の機序について:

Balb/cマウス角膜にHSV-1を感染させると、ウイルス抗原は1日後から角膜上皮に認められ、3日目をピークに上皮、実質細胞に見られ以後6日目まで同部に検出できる。ウイルス価も4日目がピークで 6×10^4 PFU/0.1g tissueであった。浸潤細胞としては多核球が初期から多数上皮下、実質に輪部から侵入する。感染後2-3日でピークになりさらに8-12日にもう一度ピークが見られる。マクロファージ、NK細胞も早期から浸潤する。CD4、CD8細胞は比較的后期に実質浸潤が見られる。サイトカインを定量すると、角膜では非特異的炎症性サイトカインであるIL-1 α 、IL-1 β 、IL-6の発現が増強し12日後に最大値になった。三叉神経節ではTh1サイトカインであるIL-2、IFN- γ が感染4日-8日後に増加しさらにIFN- γ にくわえてIL-12が感染12日後には強く発現誘導された。Th2サイトカインは角膜・三叉神経節ともにELISAによる検出限界以下であった。ウイルス価の増減とサイトカインの発現を重ねると、角膜・三叉神経節ともにウイルス価の低下と共にサイトカインの発現量が増していることが明らかである。また臨床所見は、上皮病変は3-4日をピークに軽快するが、実質混濁は、7日に最も強くなりそのまま持続する。ケモカインの定量的検出結果では、角膜、結膜、三叉神経節にはTh1反応にともなうケモカイン:IP-10, Mig, MIP-1 α 、 β , RANTES が急速に増加している(3日後)。一方homeostaticケモカインのうちSLC, ELC, BLC, 炎症性ケモカインのMCP-1, 2, 3, 5は局所リンパ節では感染後3日目には減少する。しかし他の組織ではこれらのケモカインはいずれも増加する。Th2ケモカインについてはEotaxinが3日後には強く見られるのを除くといずれも変化がない。

D. 考察

- (1) Real Time PCR法によって涙液からHSV-1 DNA が定量的に感度よく検出された。

この方法によって、角膜ヘルペスの各病変時のウイルス量を知ることができ、抗ウイルス剤の効果判定や、病変におけるウイルスの活動状況を知る一助となることが期待される。

活動期の実質型角膜炎でのウイルス量が、急性期の上皮性角膜炎の場合とあまり変わらないウイルス量を示したことは、病変進行を抑える上に、まずウイルス増殖のコントロールが重要であることを示している。涙液からのHSV DNA検出定量が感度よくできることから、さらにこのウイルスshedding量を持続的に計測できれば、再発しやすい患者についてsheddingから発症への変化を予知し予防的な措置が取れるかもしれない。

- (2) Balb/cマウスの角膜ヘルペスはその臨床症状、病変の病理像、経過、治療に対する反応性などいろいろの点で人の角膜ヘルペスに類似し、よいモデルと考えられて居る。角膜及び三叉神経節の感染後の経過を追った定量的なサイトカインの発現カーブとウイルス価の変化を重ねて見ると、両方の組織で、ウイルス価の低下とともにサイトカインの増加が見られる。このことは免疫反応によるウイルスのeliminationを示すが、他方ではそれは角膜実質混濁による視力障害の増強という、宿主にとって大きな代償を支払ったうえでのことであることを示している。つまり角膜実質混濁はサイトカインストームによるが、宿主は視力の犠牲によってウイルスが中枢神経系へ侵入し生命の危機に至ることを防いだといえる。このことは三叉神経節でのThサイトカインにつづくIL-12、IFN- γ の強い誘導が如実に示して居ることである。ケモカインについても感染後、角膜・結膜・局所リンパ節・三叉神経節に強く誘導される。リンパ節における3日後のhomeostaticケモカイン・炎症性ケモカインの一時的な発現低下は、この強い侵襲に緊急対応するためのショック反動的なものかもしれない。

い。ケモカイン・サイトカイン反応の更なる解析によって、角膜浸潤細胞をコントロールし実質混濁を可及的に避けつつウイルスを排除する新たな治療・予防のストラテジーが開発されることが期待される。

E. 結論

- (1) Real Time PCR法によって涙液中のHSV-1 DNAを感度よく定量的に検出できる。
病変の活性度との関連がこの方法によって理解でき、治療の進展、再発の予見に役立つことが期待できる。
- (2) Balb/cマウス角膜ヘルペスモデルの解析から、実質浸潤細胞のkinetics,関与するサイトカイン・ケモカインとウイルス排除、感染の拡がりの阻止、サイトカインストームによる角膜実質混濁の関係があきらかになった。今後更に研究を進め新しい治療予防法についての手掛かりを求めたい。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. T. Inoue, Y. Inoue, T. Nakamura, A. Yoshida, K. Takahashi, Y. Shimomura, Y. Tano, Y. Fujisawa, A. Aono, K. Hayashi: Preventive effect of local plasmid DNA encoding gD or gD-IL-2 on herpetic keratitis. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 41 4209-4215 2000.
2. T. Inoue, Y. Inoue, T. Nakamura, A. Yoshida, Y. Tano, Y. Shimomura, Y. Fujisawa, A. Aono, K. Hayashi: The effect of immunization with herpes simplex virus glycoprotein D fused with interleukin-2 against murine herpetic keratitis. J. Jap. Ophthalmol. 45 551 2001.

3. T. Inoue, Y. Inoue, R. Kosaki, Y. Inoue, K. Nishida, Y. Shimomura, Y. Tano, K. Hayashi: Immunohistological study of infiltrated cells and cytokines in murine herpetic keratitis. Acta Ophthalmol. Scand. 79 484-487 2001.

2. 学会発表

1. T. Deai, M. Fukuda, T. Hibino, Y. Shimomura, A. Iwagaki, Y. Tomoda, H. Kimura, K. Hayashi: Quantification of herpes simplex virus genomes in tear film by using real-time PCR assay. 10th International Conference on Immuno- biology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infection Osaka Nov. 21 - 23 2001.
2. K. Hayashi, T. Inoue, Y. Inoue, A. Yoshida, Y. Shimomura, Y. Tano, Y. Fujiwara, A. Aono: Topical administration of HSV-1 gD-IL-2 prevents herpetic stromal keratitis. ARVO Meeting. Ft. Lauderdale FL. USA April 30 2001.

H. 知的所有権の取得状況

なし。

4. 磁性ビーズを用いたプリオン病診断方法の構築に関する研究

分担研究者 田中 智之 堺市衛生研究所長

研究要旨 プリオン病の診断に繁用されている免疫組織染色法やウエスタン・ブロット法に対し、血清などの体液を用いて、より簡便な測定方法の構築を検討した。免疫磁気ビーズ法を応用したモノクローナル抗体と免疫ウサギ抗血清を用いた検出系は、大腸菌発現プリオン蛋白を50pg/mlの感度で検出できた。

A. 研究目的

Creutzfeldt-Jakob病(CJD)を主とするプリオン病は異常プリオン蛋白の中樞神経系への異常沈着による。その診断法は限られていて最も信頼性があり、頻用されている方法はプリオン蛋白に対する各種の抗体と中樞神経材料特に脳組織を用いた免疫組織染色方法およびウエスタン・ブロット(WB)法であるといえる。変異型CJD(vCJD)では、プリオン蛋白が中樞神経系への沈着のみならず、扁桃、脾臓、虫垂などの樹状突起細胞(FDC)への沈着も報告され、免疫組織染色で診断的価値があると報告している。一方、プリオン蛋白が血液中や尿中からも検出されるという報告がなされ、プリオン病の新たな診断方法の検討が求められている。

我々は、東北大学医学部病態神経学講座 北本教授との共同研究で、大腸菌で発現したプリオン蛋白に対する種々のモノクローナル抗体を作製してきた。その中で、可溶性プリオン蛋白に対して反応性のある抗体について、ELISA法による検出性を検討してきたが、検出感度に問題点を残した。そこで今回、磁性ビーズを用いてプリオン蛋白検出方法の構築を試みた。

B. 研究方法

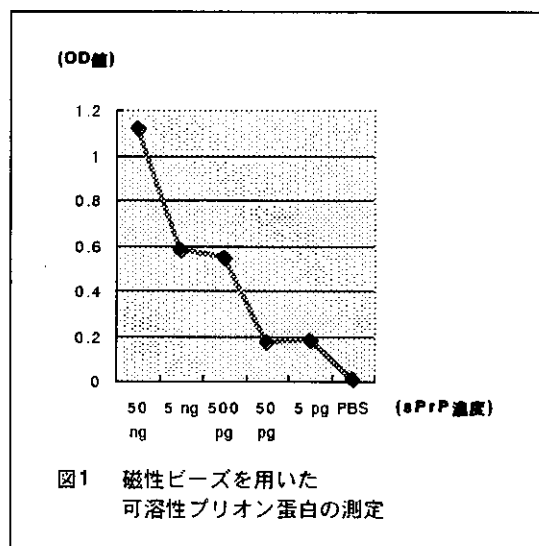
磁性ビーズはDYNAL社製のDynabeads M-280 Sheep anti-Mouse IgG および DYNABEADS M-280 Sheep anti-Rabbit IgGを用いた。プリオン蛋白に対するモノク

ローナル抗体の既に作製したクローン#4抗体、#2065抗体、#376抗体、#65抗体を使用した。また北本教授より分与を受けたRabbit 抗プリオン蛋白免疫血清を使用した。

実際的には、beadsをPBSで洗浄後1mg/mlに調整し、各検出検体を調整液の50ulで検出できるようにした。50ul含有チューブに1:500倍希釈した#4抗体あるいはRabbit抗血清を、4℃、一昼夜あるいは37℃、60分吸着させた。洗浄後段階希釈した大腸菌発現可溶性プリオン蛋白を37℃、60分反応させた。洗浄後、#4抗体には希釈した免疫Rabbit抗血清を、Rabbit抗血清には#4モノクローナル抗体を同様に37℃、60分反応させた。洗浄後、前者にはHRPO標識anti-Rabbit IgG goat IgGを、後者にはHRPO標識anti-Mouse IgG goat IgGを反応させた。H₂O₂添加ABTSで20分後の吸光度を測定したモノクローナル抗体は、融合細胞をマウス腹腔内に挿入し産生抗体は腹水として採取した。採取後マウスはクロロホルム麻酔下で安楽死させた。

C. 研究結果

Beadsへの固層抗体はウサギ抗血清のほうが、モノクローナル抗体固層より良い反応性を示した。さらに#4抗体は他のモノクローナル抗体より高い反応性を示した。#4を用いた成績を図1に示す。この系での可溶性プリオン蛋白は約50pg前後で検出可能と考えられた(図1)。



D. 考察

今回は、構築された反応系が大腸菌発現の可溶性プリオンといかなる感度で反応するかを検討したものである。この結果、プリオン蛋白は約50pgで検出可能であることが推測された。この測定系が、果たしてどの程度の臨床的応用を有するか、次の検討課題として確認しなければならない。第一は、健常人血清、CJDを含む患者血清との反応性を検討する。第二は血液以外の体液、例えば尿など、の測定が可能であるかという点である。体液を用いた測定方法としてのWestern blotting法による尿中プリオン蛋白検出は、優れた方法の一つであるといえるが、beads法はプリオン蛋白の吸収などに簡便さを有している。第三は、検出系にはウサギ抗体とマウスモノクローナル抗体を使用しているが、今後は大量の抗体の得られるモノクローナル抗体のみを用いた検出系の構築を予定している。

E. 結論

可溶性プリオン蛋白検出系の構築を試みた。この系では約50pgのプリオン蛋白の検出が可能と考えられたが、今後は、CJD患者などから得られた臨床材料を用いた更なる検討が必要である。

謝辞:

この研究は北本哲之教授(東北大学医学部 病態神経学講座)および北元憲利教授(姫路工業

大学 環境人間学部)との共同研究である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 田中智之、北元憲利、村本 環、藤井秀治、阪本晴彦、吉田宗平、辻 力、北本哲之;ヒト型のプリオン蛋白のコードン219 polymorphismを認識する新しい単クローン抗体の作製—その診断的価値— 病理と臨床 19(1); 91-93, 2001
2. Muramoto T, Tanaka T, Kitamoto N, Sano C, Hayashi Y, Kutomi T, Yutani C, Kitamoto T; Analysis of Gersmann-Strussler syndrome with 102Leu219Lys using monoclonal antibodies that specifically detect human prion protein with 219Glu. Neuroscience Letters; 288(2000), 179-182

H. 知的所有権の取得状況

なし。

5. アデノウイルス感染症診断における 適切な検査法の選択に関する研究

分担研究者 荻野 武雄 広島市衛生研究所長

研究協力者 野田 衛、池田 義文、山岡 弘二

（広島市衛生研究所生物科学部）

研究要旨 広島市で1983年から2000年の間に分離されたアデノウイルス22型分離株はいわゆる中間型で、中和試験では22型を、血球凝集抑制試験では8または9型(Ad22/H8, 9)と10、19または37型(Ad22/H10, 19, 37)を示す2種類が認められた。全ウイルスDNAの制限酵素切断解析により、それぞれに2種類の遺伝子型が認められた。ヘキソン領域増幅PCRと制限酵素切断との組み合わせによる型別ではプロトタイプとは異なる遺伝子型ではあるが、22型と同定可能であった。ファイバー領域増幅PCRと制限酵素切断との組み合わせによる型別ではそれぞれ8型、および19または37型と推定された。これらの結果をもとに、中和試験、血球凝集抑制試験、遺伝子検査におけるアデノウイルス同定上の問題点、利点等を検討、考察した。

A. 研究目的

現在、ヒトアデノウイルス(Ad)の血清型同定は中和試験が基本となっている。しかし、Adには多くの血清型があり、全血清型に対する抗血清の整備が困難なこと、型間で抗原交差があること、リコンビナントによる中間型が存在すること、また中和試験は手技が煩雑、かつ時間がかかること等により、血清型同定には問題点が少なくないことがしばしば指摘されてきた。これを補う、あるいは替わる迅速、簡便な型別法として、近年遺伝子検査法が数多く開発、報告されてきているが、遺伝子検査法にも問題点がある。Adは日本で7型が1995年から再興感染症として全国的に流行したことや流行性角結膜炎では病原ウイルスとして近年8型以外に新しい型である19型、37型の流行が世界的にもみられていることなど、新興・再興感染症としての観点から血清型を含めた流行状況の監視が必要である。また、感染症法において第四類感染症に位置付けられている流行性角結膜炎、急性出血性結膜炎、咽頭結膜熱から主としてAdが分離されており、Ad同定上の問題点を検討することは感染症発

生動向調査事業における病原体情報を的確に提供する上で重要である。このことから、今回、広島市で眼科疾患から分離されたD亜属Ad22分離株を取り上げ、中和試験法、血球凝集抑制(HI)試験法、遺伝子検査法についてAd同定上の問題点、利点を検討した。

（倫理面への配慮）

本研究は病原微生物検査法の検討、それに伴う病原微生物の解析を行ったものであり、倫理面での問題点は含まれない。また、アンケートでの質問項目には個人情報に関する事項は含まれておらず、特定の個人等に不利益を及ぼすことはなく、倫理面で問題がないと考える。

B. 研究方法

中国・四国地区地方衛生研究所(地研)におけるAd検査の現状は2001年12月末に行ったアンケート調査により把握した。Ad分離株は感染症法に基づく広島市感染症発生動向調査事

業で眼科定点において眼科疾患から主にHEp2細胞を用いて分離した。中和試験及びHI試験は常法により行った。抗血清は国立感染症研究所(感染研)より分与された1-6, 8, 11, 19, 34, 35, 37型、デンカ生研より購入した1-7, 11, 19, 37型、イスマニットより購入した7a-18, 21-33型、自家製の8, 9, 10, 19, 22, 37型を用いた。用いた制限酵素の種類は研究結果の項で示すが、仕様書で指示された方法に従い使用した。プライマーはこれまで報告された塩基配列を参照し、日本ジーンで作成した。

C. 研究結果

1. Ad22型の分離、同定

1983年から2000年の18年間に広島市感染症発生動向調査事業のもとで、眼科疾患から636株のAdが分離された。このうちD亜属Adは8型が133株、19型が48株、22型が21株、37型が112株で、22型の21株は流行性角結膜炎から17株、急性出血性結膜炎から3株、急性結膜炎から1株分離され

た。22型は、当初D亜属同定用抗血清として、8型、19型、37型の3種類の抗血清のみを用いていたため、8型、19型、37型あるいは同定困難株と同定された。しかし、22型抗血清を加えた中和試験では22型を示したが、HI試験では22型以外の血清型を示した。すなわち、22型と他型との中間型(intermediate 株)であることが示され、当初、8型、19型あるいは同定困難とされた13株は8型あるいは9型とのリコンビナント株、当初37型あるいは同定困難と同定された8株は10型、19型、もしくは37型とのリコンビナント株と判明した。これらの中間型は、それぞれ、Ad22/H8,9、Ad22/H10,19,37 と仮称した(J Clin Microbiol 29: 1286-1289, 1991、広島市衛生研究所年報 11: 39-44, 1992)。2000年末までに広島市で分離された22/H8,9型、22/H10,19,37型分離株を既発表分を含めて表1に示した。22/H10,19,37型は1986年7月から1988年6月までの間に分離され、それ以降は分離されていない。22/H8,9型は1988年6月以降に分離され、2000年10月まで分離された。

表1 アデノウイルス22型分離株

分離株名	臨床診断名	検体採取日	当初同定血清型	修正血清型	遺伝子型
860316C	EKC	1986/7/25	Ad37	Ad22/H10,19,37	A
860355C	EKC	1986/8/4	Ad37	Ad22/H10,19,37	A
870003C	AHC	1987/1/5	Ad37	Ad22/H10,19,37	A
870006C	EKC	1987/1/6	Ad37	Ad22/H10,19,37	A
870040C	AC	1987/1/29	Ad37	Ad22/H10,19,37	A
870050C	EKC	1987/1/31	Ad37	Ad22/H10,19,37	A
880501C	EKC	1988/11/14	同定困難	Ad22/H10,19,37	A
880249C	EKC	1988/6/22	Ad37	Ad22/H10,19,37	B
880199C	EKC	1988/6/6	Ad8	Ad22/H8,9	A
890283C	EKC	1989/6/28	Ad8	Ad22/H8,9	A
890312C	EKC	1989/7/11	Ad8	Ad22/H8,9	A
890331C	EKC	1989/7/18	Ad8	Ad22/H8,9	A
890346C	EKC	1989/7/31	Ad8	Ad22/H8,9	A
890357C	EKC	1989/8/8	同定困難	Ad22/H8,9	A
890358C	EKC	1989/8/9	Ad8	Ad22/H8,9	A
960528C	EKC	1996/6/21	同定困難	Ad22/H8,9	B
960727C	EKC	1996/8/26	同定困難	Ad22/H8,9	B
980256C	EKC	1998/2/10	同定困難	Ad22/H8,9	B
001144C	EKC	2000/10/7	Ad8	Ad22/H8,9	B
001155C	AHC	2000/10/16	Ad19	Ad22/H8,9	B
001192C	AHC	2000/10/31	Ad8	Ad22/H8,9	B

EKC: 流行性角結膜炎、AHC: 急性出血性結膜炎、AC: 急性結膜炎

研究所名	通常用いる抗血清※2	保有している抗血清
広島市	(1,2,5,6)(3,7,11)(4)(8,19,22,37)の組合せ※3	1-19,22,34,35,37
A	(1,2,5)(3,7,6)(11)(4)(8,19,37)の組合せ	1-8,11,19,37
B	1-8	1-8,11,19,31,37
C	1-7	1-8,11,19,31,35,37
D	1-8	1-8,11,19,34,35,37
E	(1-3,5-7)(4,8,11,19,37)の組合せ	1-8,11,19,37
F	(1-3,5,6)(4)(8)の組合せ	1-8,11,19,31,35,37
G	(1-7)(3,4,7,19,37)(2-4,7,8)(2-8,11,19,37) (1,2,31)(7,11,34,35)(2,19)(3,7)の組合せ	1-8,11,19,34,35,37
H	1-7	1-8,10-14,19,37,40,41
I	1-6	1-13,19,31,37

※1: 中和試験はF研究所でチューブ法、その他はマイクロプレート法で実施
 ※2: 通常用いる抗血清で中和されない場合は保有抗血清を適宜使用
 ※3: CPEおよび臨床診断名等を参考に適当な組合せ血清を選択

広島市以外でAdの分離同定がどのように行われているかを把握するため中国四国地区地研へのアンケート調査を行った。Ad同定に抗22型血清をルーチンに用いている地研、また抗22型血清を保有している地研は広島市以外になかった(表2)。調査は中国四国地区の地研のみであるが感染研の病原微生物検出情報から推測すると全国的に同じ状況下にあると考えられ、現在日本において抗22型血清は型同定にほとんど用いられておらず、したがって、広島市で分離された22型リコンビナント株のような稀な血清型ウイルスが分離された場合、他の血清型に誤同定されている可能性があると考えられた。今後、同定を行う際に用いる抗血清の検討が必要である。

2. Ad22/H8,9 およびAd22/H10,19,37の遺伝子型

全ウイルスDNAの8種類制限酵素(*Bam*HI, *Bgl* I, *Bst*EII, *Hind*III, *Pst*I, *Pvu*II, *Sal* I, *Sma* I)による分析を行い、遺伝子型を調べた。両リコンビナント株とも22型プロトタイプとは*Sal* Iを除く7種類の制限酵素で切断パターンが異なっていた。22/H8,9型、22/H10,19,37型共に2種類の遺伝子型が認められた。仮にA, Bとした(表1)。22/H10,19,37型ではA型が7株、B型が1株で、A型とB型とは*Pvu*IIでのみ異なっていた。22/H8,9型ではA型が7株、B型が6株で、AとBとは*Bam*HI, *Bgl* I, *Bst*EII, *Hind*III, *Pst*I, *Sma* Iで異なっていた。図1に*Pvu*II, *Sma* I, *Sal* Iによる切断パターンを示す。表1の検体採取日に示すように、

時期による遺伝子型の変遷がみられた。なお、ウイルス全DNAの制限酵素切断解析では全体のパターンから中間型分離株はD亜属Adであることが推定可能であったが、22型であるとの型同定はできなかった。

3. PCRと制限酵素による型同定の検討

近年、迅速、簡便なAd同定法としてPCRと制限酵素切断を用いた方法が多く検討され、報告されている。PCRに用いるプライマーもヘキソン、ファイバー、VA RNA、pIXなど各種領域増幅用のものが、また、制限酵素も種々のものが用いられている。

(1) ヘキソン領域を対象とした方法

ヘキソン領域の一部を増幅するプライマー、HS294(5'-CACGTA CTTTGACA TCCGCG-3')とHA2000(5'-TTTGCG GCGGAAAGGTAGTC-3')との組合せを用いてPCRを行った。両22型中間型分離株のほか、22型プロトタイプ、8型プロトタイプおよび分離株、9型プロトタイプ、10型プロトタイプ、13型プロトタイプ、15型プロトタイプ、19型プロトタイプおよび分離株、30型プロトタイプ、37型プロトタイプおよび分離株を用いたがいずれも約1700bpsと推定されるバンドが検出された。

PCR産物について9種類の制限酵素(*Afa*I, *Sau*3AI, *Hae*III, *Hin*FI, *Msp*I, *Dde*I, *Hha*I, *Acc*II, *Hpa*II)を用いた切断解析を行ったところ、両中間型分離株は全制限酵素で同一切断パターンを

を示した。22型プロトタイプとの比較では、*HaeIII*で両中間型は22型プロトタイプと切断パターンが異なり(図2、Lanes 2, 3, 4)、他の制限酵素では同一切断パターンを示した(データ示さず)。全酵素での切断パターンの比較から両中間型は22型のプロトタイプと*HaeIII*で異なるが、22型であることが推定され、中和試験の結果と矛盾しなかった。

(2) ファイバー領域を対象とした方法

最近、ファイバー領域部分のPCRとPCR産物の制限酵素(*Hinfl*, *Ddel*, *RsaI*)切断分析により型同定が可能との報告がなされた(Adhikary AK et al., IOSV 42: 2010-2015, 2001)。この報告されたプライマーAF2(5'-CGGGTGGAA GATGACTTC-3')とAR2(5'-CGTGCTGGTGTA AAAATC-3')の組み合わせ、およびArnbergら(*Virology* 227: 239-244, 1997)が報告したファイバー領域増幅プライマーF1(5'-AAGGGA TGTC AAATTC-3')とR1(5'-CTG GTGGTGGGAGA-3')との組み合わせのPCRを行い、上記3酵素(*Hinfl*, *Ddel*, *RsaI*)での分析を行った。両プライマーでの結果は同じであった。すなわち、両プライマーともD亜属Adで増幅されると予想される約1200 bpsのバンドが検出された。なお、同時に22型プロトタイプのほか8型プロトタイプおよび分離株、9型プロトタイプ、10型プロトタイプ、19型プロトタイプ、19a型および19型分離株、37型プロトタイプおよび分離株も同時に増幅したが、同一バンドを検出し、22/H8,9型、22/H10, 19,37型はD亜属Adであることが確認された。しかし、3制限酵素での切断パターンはHI試験結果から予想された通り、22/H8,9では3酵素とも8型と同一であり、22/H10,19,37では3酵素とも19型および37型と同一であった。3酵素での切断パターンを図3に示す。すなわち、この方法では、当然のことながら中和試験に相当する型同定ではなく、HI試験に相当する型同定となることが示された。本PCR産物の切断パターンから22/H8,9型は22/H8型の可能性が、22/H10,19,37型は22/H19,37型である可能性が考えられ、このことは中和試験、HI試験の結果と矛盾しな

かった。

なお、22型についてではないが、Adhikaryらの報告では19型の同定の参照株にプロトタイプを用いているが、現在日本を含め世界的に流行しているとされている19a型はプロトタイプとは異なり、ファイバー領域は37型と同一とされている。事実、今回19a型と19分離株は37型のパターンとなっている(図3、lanes 4, 5, 7, 8, 9)。このように標準とする参照株の選択も重要である。

D. 考察

Adは多種多彩な疾患と関連することが知られているが、感染症法に基づく感染症発生動向調査では第四類感染症である流行性角結膜炎、急性出血性結膜炎、咽頭結膜熱の病原体として検出されている。Adには51血清型があり、AからFの7亜属に分類され、同一亜属に属する血清型は似た臓器特異性を示し、似た疾患を起こすことも、Ad感染症の特徴であるとされている。したがって、臨床的には亜属の同定までで充分との考えもあるが、疫学的調査やウイルス学的研究には血清型別まで必要である。しかし、Adは血清型が多いため各検査機関で全血清型の抗血清を整備できないこと、血清型間で抗原交差があること、リコンビナントによる中間型が存在すること、また基本となっている中和試験での同定手技が煩雑、かつ時間がかかること等により、中和血清型同定には問題があることがこれまでしばしば指摘されてきた。それらを補う、もしくは替わる迅速、簡便な型別法として、近年遺伝子検査法が多く開発、報告され、遺伝子検査法への移行傾向すらみられてきている。しかし、一方ではAdは遺伝子変異をしながら流行し、主流遺伝子型の入れ替わりが見られることが、特に3型や7型で多く報告されている。さらに、血清型を規定している遺伝子部分はヘキサンの超可変領域と呼ばれる部位によることも明らかにされている。これらのことから、遺伝子検査法による同定にも問題点が生じることが容易に推察される。このように血清学的同定法が煩雑、時間がかかること等の理由で遺伝子検査法を安易に用いることには問題がある。今回、当所で経験した日本では稀な22型の同定を例に取り、従来の中和試験法、HI試験法と近年汎用されている遺伝子検査法を用いて同定上の問題点、利点を検討した。

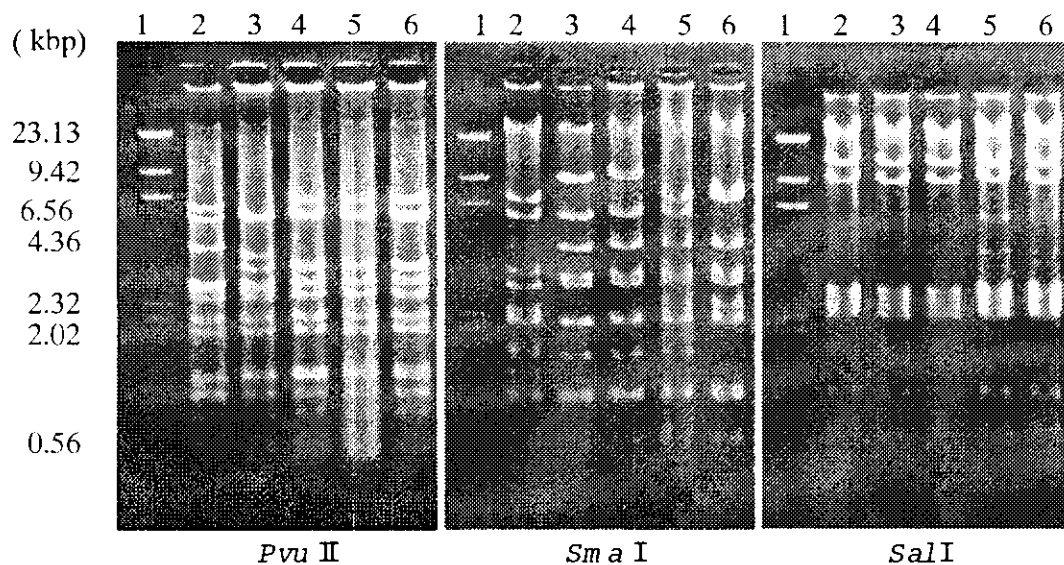


図1 アデノ22型の制限酵素切断パターン

1: λ /HindIII digest, 2: Ad22p, 3: Ad22/H10,19,37(A)
 4: Ad22/H10,19,37(B), 5: Ad22/H8,9(A), 6: Ad22/H8,9(B)

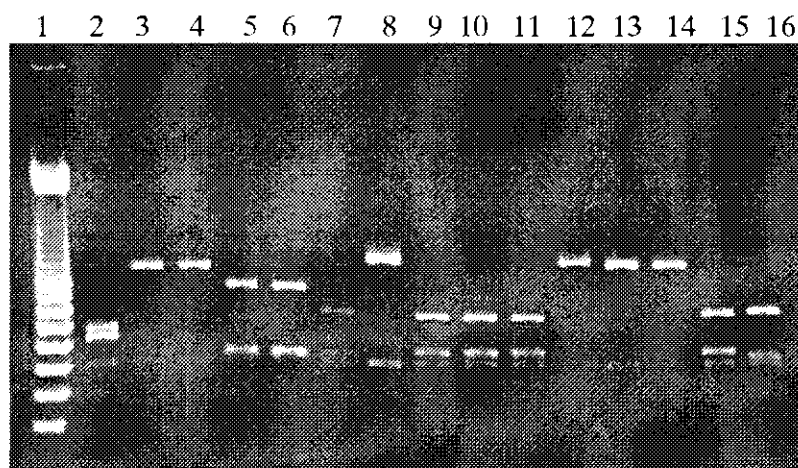


図2 ヘキソン増幅産物のHaeIII切断パターン

1: 100bp ladder, 2: Ad22p, 3: Ad22/H8,9, 4: Ad22/H10,19,37, 5: Ad8p
 6: Ad8分離株, 7: Ad9p, 8: Ad10p, 9: Ad19p, 10: Ad19a, 11: Ad19分離株
 12: Ad37p, 13: Ad37分離株, 14: Ad13p, 15: Ad15p, 16: Ad30p

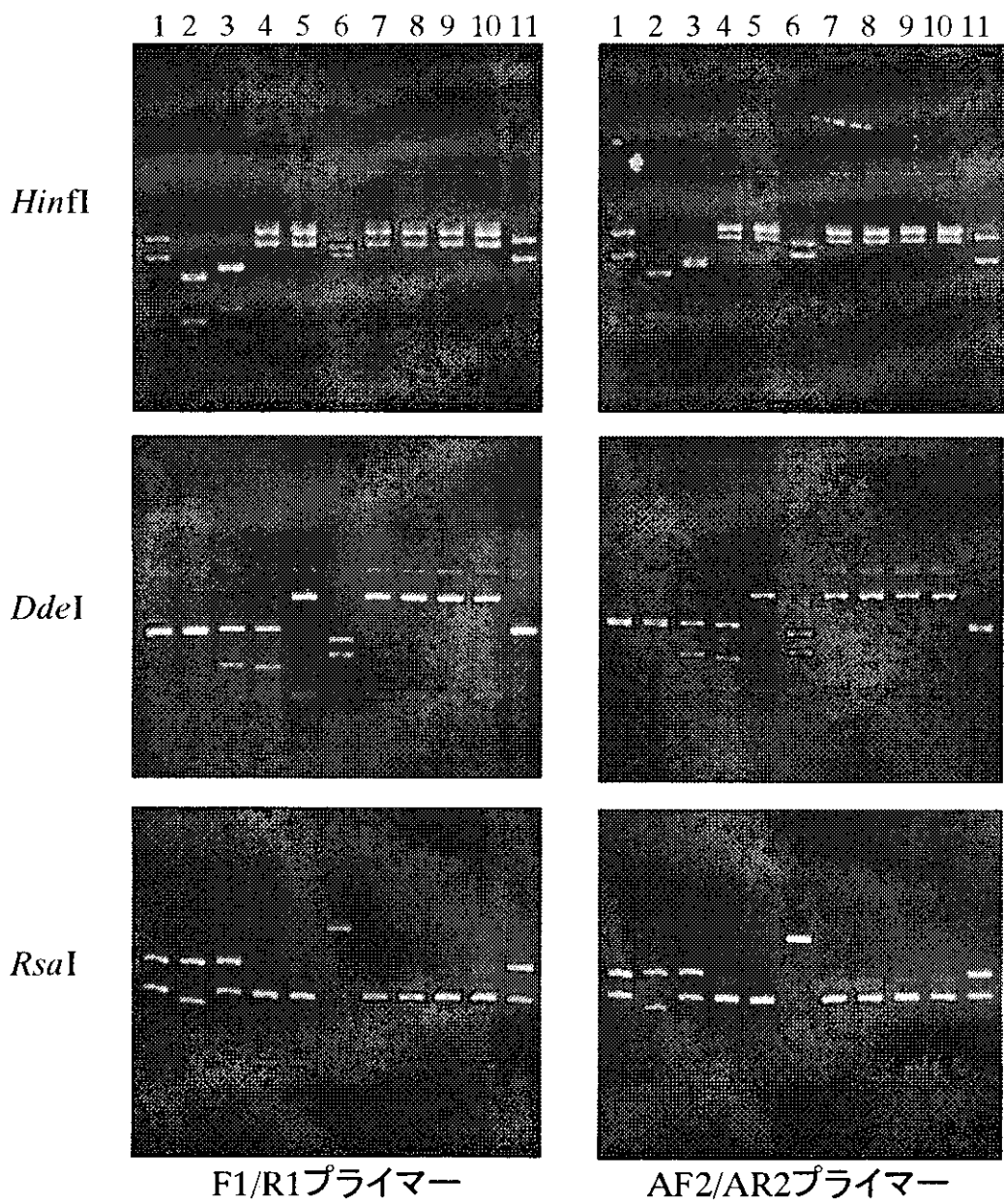


図3 ファイバー増幅産物の制限酵素切断パターン

1: Ad8p, 2: Ad9p, 3: Ad10p, 4: Ad19p, 5: Ad19a, 6: Ad22p, 7: Ad37p
 8: Ad37分離株, 9: Ad19分離株, 10: Ad22/H10,19,37, 11: Ad22/H8,9

22/H8.9型 および22/H10.19.37型は分離当初、8型、19型、37型と誤って同定されていた(表1)。当所では、それまでの日本でのAd検出状況から、D亜属Ad同定を目的とした中和試験では抗血清として8型、19型、37型の3種類の抗血清を使用していた。しかし、37型分離株の遺伝子解析の過程で37型と同定した株に22型が含まれていることが分かり、過去の分離株を再検討した。その結果、当初、8型、19型、37型あるいは同定困難とされた分離株に22型が含まれていることが明らかとなり、現在では22型抗血清もルーチンの同定に用いている。中国四国地区においてAd同定に22型抗血清を用いている地研はなく、誤同定は広島市に限らないと思われる。異血清型間の抗原交差はAdの特徴でもあり、分離稀なAdは間違った型同定が行われていることが推察される。では同定に何種類の抗血清を用いるべきかが問題である。全血清型の抗血清を用いることが解決となるが、コスト・ベネフィットの観点からも今後検討すべき点と考えられる。少なくとも現時点では極めて稀な血清型が出現した場合は誤同定が起こることはやむを得ないとの認識が必要である。世界的に見ても、これまでに、37型が出現した直後では多くの37型分離株が19型と誤同定された。また、南米で、Ad7hは分離当初、3型として報告された。日本においても1995年に7型が再出現した直後は3型と誤同定された分離株も少なくなかった。今後、世界、日本での最新ウイルス分離情報を常に把握し、必要と考えられる抗血清を同定用抗血清に加えていくことが必要である。また、ナショナルセンターとなる機関、たとえば感染研で抗血清の供給、最新情報の提供を行うシステムの構築も有効な解決策の一つであると考えられる。

全ウイルスDNAでの制限酵素切断分析は各血清型の遺伝子型を決める、いわゆる分子疫学的な研究に主に用いられているが、全体のパターンを比較検討することにより、血清型同定に際しての補助試験としても有効である。事実、われわれの22型中間型も遺伝子型を調べる過程で見つかった。DNA切断解析を同定に用いるためにはAd流行株のDNA切断パターンを参照することが効果的であり、流行株のDNA切断パターンや遺伝子型に関する情報を入手することが大切である。このことはPCR産物切断解析においても同じで、上記血清学的診断で述べたと同様、遺伝子検査に関する情報を試験研究機関で共有すること、できればデータベースを構築、利用できる全国システムを作ることが望まれる。また、現在までAd

の遺伝子型の命名法に統一されたものがなく、遺伝子パターンの比較解析を困難にしている一因となっており、今後検討すべき問題と考えられる。

遺伝子検査法は病原体同定法として迅速、簡便な検査法として近年多用される傾向にある。遺伝子検査法の特徴は迅速性のほか、抗血清の無い型の同定も可能、中和試験より安価、ウイルス分離ができない環境でも実施可能、などがあるが、現時点では、従来法である中和試験、HI試験法とは排他的でなく互いに相補的であると考えられ、適宜組み合わせることにより、よりの確な同定が行えるものと考えられる。

E. 結論

1. 広島市において分離されたアデノウイルス22型、21株のうち、13株は8または9型との、7株は10型、19型または37型との中間型であった。それぞれ、22/8,9型、22/10.19.37型と仮称した。同様の分離株が他の血清型に誤同定されている可能性が考えられた。
2. 22/H8.9型、22/H10.19.37型ともに、それぞれ2種類の遺伝子型が存在した。
3. ヘキソン領域増幅プライマーを用いたPCR法と制限酵素切断法との組み合わせにより、22/H8,9型、22/H10.19.37型ともに、*HaeIII*ではプロトタイプと切断パターンが異なったが、22型と同定可能であった。
4. ファイバー領域増幅プライマーを用いたPCR法により、22/H8,9型、22/H10.19.37型ともに、D亜属Adと同定でき、制限酵素切断法との組み合わせを用いて、22/H8型、22/H19,37型の可能性が示された。
5. 以上総合的にみて、中和試験、HI試験、遺伝子検査法は互いに補完的であり、適宜組み合わせることにより、Ad同定をより効率的、的確にすると結論された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 荻野武雄。アデノウイルス感染症—検査、臨床像、疫学SRL宝冠 25: 249-254, 2001.
2. Noda M, Yoshida T, Sakaguchi T, Ikeda Y, Yamaoka K, Ogino T. Molecular and epidemiological analyses of human adenovirus type 7 strains isolated from the 1995 nationwide outbreak in Japan. J Clin Microbiol 40: 140-145, 2002.

2. 学会発表

1. 池田義文、阿部勝彦、山岡弘二、荻野武雄、野田衛。結膜由来アデノウイルス8型分離株の疫学解析。第42回日本臨床ウイルス学会。2001年6月7日。
2. 池田義文、上村真由美、阿部勝彦、野田衛、藤井彰人、山岡弘二、荻野武雄。結膜由来アデノウイルスの制限酵素切断解析。平成13年日本獣医衛生学会(中国)。2001年10月22日。

H. 知的所有権の取得状況

なし。

6. エーリキアの検査法（同定）に関する基礎的研究

分担研究者 児嶋 昭徳 名古屋市衛生研究所長
研究協力者 川原 眞 (同 主任研究員)

研究要旨 蛍光抗体法によるスライドガラス上での抗体検出のため、エーリキア属に分類される *E.muris* および HF565 株 (*E.muris* と遺伝学的に異なる) の抗原作成法を検討した。マウスを用いた方法では、*E.muris* は腹水浸出細胞（マクロファージ）を用いる事で良好な結果を得たが、HF 株は腹水浸出細胞には感染が認められず、抗原作成が困難であった。また、抗原を安定して作成するためにはアナプラズマの培養細胞での増殖が不可欠となるため、これらアナプラズマの株化細胞による培養を試み、両者とも細胞への感染および継代に成功した。*E.muris* は培養細胞での継代を重ねることにより、ほぼ 100% の細胞に感染させることができ、蛍光抗体検査用抗原としても良好であった。しかし、HF 株は 2~4% の感染細胞しか得られず今後の検討が必要であった。*E.muris* 抗原および分類を異にするヒトに感染するアナプラズマ (*Anaplasma phagocytophila*) を抗原として、197 件の北海道在住のヒト患者血清を用いアナプラズマ抗体検出を試みた。その結果、*E.muris* 抗原に対し 5 人の血清中に抗体が検出された。しかし、*A.phagocytophila* に対する抗体は検出されなかった。

一方、アナプラズマ遺伝子を PCR で検出する方法についても検討した。*E.muris*、HF 株、および *A.phagocytophila* の 16S rRNA シークエンスからプライマーを作成し、PCR を試みた。いずれのプライマーを用いても良好な結果が得られた。そこで、実際にアナプラズマのベクターであるダニを採取し遺伝子検出を行った。北海道をはじめとして日本各地で採取された約 400 個体のダニについて PCR を行ったところ、複数の PCR 産物を得た。そこでそれらについてシークエンスを行ったところ、*E.muris* および HF 株の検出に成功すると共に、それらとは異なる新しいアナプラズマ遺伝子を検出した。*A.phagocytophila* は検出できなかった。

A. 研究目的

エーリキアは、最近 16S rRNA シークエンスの結果に基づき分類が見直され (Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51: 2145-2165, 2001)、リケッチア目のアナプラズマ科に属し、*E.chaffeensis*、*E.muris*、*E.canis* 等が属するエーリキア属、*Anaplasma phagocytophila*、HGE agent、*A.platys* 等が属するアナプラズマ属、*Noricketsia sennetsu*、*N.risticii* 等が属するネオリケッチア属、*Wolbachia pipirntis* 等が属する *Wolbachia* 属に再分類された。アナプラズマ

(本報告書では新しい分類方法にしたがい、アナプラズマ科のエーリキア属、アナプラズマ属、ネオリケッチア属、ウオルバキア属を包括して呼ぶ) は細胞内寄生細菌で、人や動物にエーリキア症を引き起こす重要な新興感染症であり、1987 年にアメリカで初めてダニ媒介性のアナプラズマが報告 (N. Engl. J. Med. 316:853-856, 1987) されて以来、北米、南米、ヨーロッパ、アジアから相次いで感染者、患者が発見された。日本では *N.sennetsu* がヒトに感染するアナプラズマとして世界で初めて分離された (Med. Biol. 32:200-209, 1954、Tokyo Iji Shinshi.

71:683-686, 1954)。私達は、愛知県の山中で捕獲されたカゲネズミから世界で初めてマウスに感染するダニ媒介性のアナプラズマを分離し (J. Clin. Microbiol. 31:89-96, 1993)、そのアナプラズマがエーリキア属に分類され、アメリカで人に感染する *E. chaffeensis* に遺伝学的に最も類似する事を明らかにした (Int. J. Syst. Bacteriol. 45:250-254, 1995)。さらに、愛知県だけでなく、東京都の山中で捕獲された野鼠にも多くの *E. muris* が存在する事を示した (J. Clin. Microbiol. 37: 1123-1129, 1999)。また、日本の東北地方や四国地方で採取されたダニからエーリキア属エーリキアを分離し、*E. muris* より *E. chaffeensis* に類似する事を報告した (J. Clin. Microbiol. 38: 1331-1338, 2000)。また、日本の最南端である沖縄の Brown dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) から *E. platys* の遺伝子が検出された (J. Clin. Microbiol. 38: 4219-4221, 2000)。また、日本の犬の血液中に *E. canis* に対する抗体が存在することも明らかとなり、日本でも多種のアナプラズマが存在する事が明らかとなった。

しかし、日本ではこれらアナプラズマの研究・検査機関は少なく、また、検査法も十分な検討がなされていない。世界中で感染者、発病者が見つかっている事から、日本だけが例外とも考えられず、検査・研究体制を確立する事が必要である。今回、アナプラズマ感染の有無を確認する血清学的検査法、また、PCR法による遺伝子検査について検討するとともに、ヒト血清中の抗体およびエーリキアのベクターであるダニのアナプラズマの保菌状況を明らかにすることを目的とした。

1. アナプラズマ抗体の検出

1) 株化細胞によるエーリキアの培養

エーリキア属に分類される *E. muris*、HF565 株および *E. chaffeensis* の培養細胞を用いた増殖を下記の方法で検討した。*E. muris* をマウスに接種し、10 日後に、MEM-eagle 液 5 ml を腹腔内に接種し、腹腔内を洗い出し、*E. muris* 感染腹腔内滲出細胞を得た。MEM-eagle 液を用い、遠心分離機で 2 回遠心洗浄した後、DH82 細胞 (イヌのマクロファージ株化細胞) と混合培養した。また、ダニから分離されたエーリキアの HF565 株をマウスに接種し、8 日後に HF565 感染脾臓を採取し、MEM-eagle 液中でピンセットで脾臓をほぐし、細切してパスツール

ピペットで細胞浮遊液を取り出し、遠心で洗浄後、DH82 細胞と混合培養した。*E. chaffeensis* は、米国、オハイオ州立大学の Dr. Rikihisa から分与を受け、DH82 細胞で培養した。それぞれ、5-8 日後に、トリプシン処理し、細胞を剥がし、Statspin Cytofuge を用いてスライドガラスに貼り付けた後、ドライヤーのクールで乾燥させ、Diff-Quick で染色および間接蛍光抗体法で、封入体の有無を確認した。封入体の数が少ない場合、継代を繰り返した。

2) 蛍光抗体法によるエーリキア交差試験

E. muris、*E. chaffeensis* を DH82 細胞で培養し、トリプシン処理し、感染細胞を剥がした後、5% 牛胎児血清を含む MEM-eagle で細胞浮遊液とした。その細胞浮遊液 10 μ l を 15 ウェルのスライドガラスに載せ、37°C で 2 時間培養し、PBS で洗浄した後、冷アセトンで 10 分間固定した。*A. phagocytophila* (HGE agent) 検出用のスライドガラス抗原は Dr. Rikihisa より分与された。*E. muris* 抗体および HF565 株抗体は Kawahara ら (J. Clin. Microbiol. 31:89-96, 1993) の方法に従い作成した。*E. chaffeensis* 抗体は、米国、Center for Disease Control and Prevention (CDC) の Dr. Jacqueline より分与されたヒト患者血清を用いた。*A. phagocytophila* 抗体は、Dr. Rikihisa から分与されたマウスモノクローナル抗体を陽性コントロールとして用いた。各抗体を 10 倍希釈からスタートし、倍々希釈で 640 倍まで希釈し、37°C で一時間反応させた後、PBS で洗浄し、二次抗体として FITC ラベル抗マウスおよびヒト血清を用い、同様に 37°C 1 時間反応させ蛍光顕微鏡で観察した。

3) *E. muris* および *A. phagocytophila* に対する抗体調査

2000 年 4 月から 2001 年 11 月にかけて、北海道の病院を訪ねた患者 197 人の血清について *E. muris* および *A. phagocytophila* を抗原として間接蛍光抗体法で抗体検査を行なった。抗原は各病原体の感染 DH82 細胞およ

び感染マウスの腹腔内滲出細胞で作成した。反応条件は上記方法に従った。

(倫理面への配慮)

患者には、共同研究者の医師が研究目的を説明し、了解を得て採血した。

2. アナプラズマ遺伝子の検出

1) アナプラズマ遺伝子検出のための PCR の検討

Gene Bank に記載されている *E.muris* (アクセッション番号: EMU15527) および HF565 株 (アクセッション番号: AB024928) の 16S rRNA のシーケンスに基づき下記のプライマーペア (EM87f および EM584r, EM74S-f と EM793S-r, HF51f および HF954r, HF44S-f と HF589S-r) を作成した。反応条件として、94°C60 秒、55°C60 秒、72°C60 秒を 40 サイクル行なった。 *E. chaffeensis* および *A. phagocytophila* については、Anderson B.E.ら(J. Clin. Microbiol. 30:775-780, 1992)および Robert F.ら(J. Clin. Microbiol. 37: 1090-1095, 1999)の方法に従い、プライマーとして HE-1 および HE-3、GE9f および GE10r を用いた。また、Nested PCR についても検討し、CDC の Dr. Sumner より提供された情報に基づき、EC9、EC12A を作成し、1st プライマーとして用いた。1st PCR の反応は、94°C30 秒、48°C30 秒、68°C30 秒で 40 サイクル行なった。ダニ抽出 DNA を用いた PCR には、Nested PCR を用いた。1st PCR には EC9 および EC12A のプライマーを用い、2nd PCR には 3 組のプライマー (EM87f および EM584r, HF10f および HF985r, GE9f および GF10r) を用いると共に、新たなシーケンスの結果に基づき、さらに一組のプライマーペア (IS58-62f, IS58-594r) を追加した。

2) 制限酵素による切断パターン比較

E. muris および HF565 株に共通のプライマー (A17a および EM584r, EM-HF9f および EM-HF327r) を作成し、その PCR 産物を制限酵素 Sty

I で、37°C で 16 時間放置した後、1% アーガロースゲルで電気泳動し切断パターンを比較した。

3) DNA の抽出

E. muris, HF565 株、*E. chaffeensis* および *A. phagocytophila* の感染細胞もしくは感染マウスの 10% 脾臓乳剤から、QIAamp blood kit を用い説明書に従い DNA を抽出した。また、1995 年から 2001 年にかけて、日本の各地 (島根県、京都府、愛知県、北海道) で合計 320 個体のダニを採取した。採取されたダニは、*I. ovatus*、*I. persulcatus*、*Haemaphysalis longicornis*、*H. kitaokai*、*H. flava* であった。採取されたダニは 1 個体、もしくは 2~3 個体をブールして (合計 281 サンプル)、PBS あるいは SPK 液でガラスホールを用い乳剤にした。その一部、もしくはすべてを、同様に QIAamp blood kit を用い DNA を抽出した。抽出 DNA は使用されるまで -20°C で保存した。

4) PCR 産物のシーケンス

PCR 陽性産物はすべて、QIAquick gel extraction kit を用い説明書に従い精製した後、シーケンス会社 (MediGenomix, Germany) にシーケンスを依頼した。

5) 新しく検出されたエーリキアの解析

16S rRNA の塩基配列を決定するため 4 組のプライマーペア (EC12A と IS58-52r, A17a と EM584r, Ehr387 と EM924, EM749 と IS58-1345r, IS58-1203f と EC9) を用い、その PCR 産物をシーケンスし、国立遺伝学研究所のウェブサイトのソフト、CLUSTALW を用いて遺伝子解析を行なった。

C. 研究結果

1. 株化細胞によるエーリキアの培養

E. muris および HF565 株を DH82 細胞で培養を試みたところ、前者はほぼ 100% の細胞に封入体が確認でき、*E. muris* は効率よく培養する事ができた。しかし、

HF565 株は、培養に成功したものの細胞への感染率が低く、2~4%の細胞に封入体が確認できたのみであった。

2. 各エーリキアの交差試験について

抗 *E.muris* 抗体は、*E.muris* に対して 640 倍、HF565 に対し 160 倍、*E.chaffeensis* に対し 160 倍を示した。抗 HF565 抗体は HF565 に対して 160 倍、*E.muris* に対して 160 倍、*E.chaffeensis* に対して 80 倍を示した。抗 *E.chaffeensis* 抗体は、*E.chaffeensis* に対して 1280 倍、*E.muris* に対して 1280 倍、HF565 に対し 1280 倍を示した。*A.phagocytophila* に対してはいずれの抗血清も 10 倍以下を示した。

3. ヒト血清中の抗体調査

北海道に在住で、病院を訪れた 197 人の患者から集められた血清サンプルについて、*E.muris* および *A.phagocytophila*(HGE agent)を抗原として血清疫学調査を行なった。197 人のうち男性が 99 人、女性が 97 人、不明が 1 人であった。年齢は 60 代が最も多く 45 人で、続いて 50 代が 35 人、70 代が 18 人、40 代が 16 人、30 代が 14 人、80 代と 20 代が、各 13 人、10 代以下が 8 人、10 代が 7 人、不明が 28 人であった。これらの患者の約 32%はダニに刺されていた。*E.muris* を抗原とした場合、男性 3 人、女性 2 人の計 5 人が血清抗体陽性で、抗体価は 40 倍~160 倍であった。陽性患者の年齢は 50 代 2 人、60 代 1 人、70 代が 2 人であった。抗体価 160 倍を示した患者は 50 代の男性 2 人であった。一方 *A.phagocytophila* に対する抗体は認められなかった。

4. PCR によるアナプラズマ遺伝子の検出

抽出した各アナプラズマの DNA とそれぞれに対応するプライマーを用いて PCR を行ったところ、それぞれ明瞭な PCR 産物を得た。EM87f と EM584r のプライマーペアは、*E.muris*、HF565 株および *E.chaffeensis* のエーリキア属で陽性を示した。EM74S-f と EM793S-r のプライマーペアでは *E.muris* のみ陽性を示した。HF51f と HF954r、HF44S-f と HF589S-r のプライマーペアは HF565 株のみ陽性であった。HE1 と HE3 のプライマーペアは *E.chaffeensis* のみが陽性であった。GE9f と GF10r のプライマーペアは *A.phagocytophila* のみで陽性であった。

5. 制限酵素による切断パターンの比較

A17a と EM584r および EM-HF9f と EM-HF327r のプライマーペアで、これまで日本で分離された *E.muris*、HF565 株のエーリキアについて PCR を行い、それぞれから得た PCR 産物を制限酵素 Sty I で処理したところ、HF565 株は二つの断片に切断されたが、*E.muris* は切断されず、PCR 産物の識別が可能であった。

6. ダニからのアナプラズマ遺伝子の検出

北海道で採取されたダニ 150 個体 (111 サンプル)、京都府で採取されたダニ 71 個体 (71 サンプル)、愛知県で採取されたダニ 15 個体 (15 サンプル)、島根県で採取されたダニ 84 個体 (84 サンプル)、合計 320 個体 (281 サンプル) が PCR 法で検査され、9 サンプルから陽性が得られた。愛知県のダニ (*I.persulcatus*) および島根県のダニ (*H.longicornis*) では各一例陽性であり、残りの 7 陽性例は全て北海道のダニ (*I.ovatus*) から検出された。

7. PCR 産物のシーケンス

9 サンプルすべての PCR 産物の制限酵素処理およびシーケンスを行い、*E.muris* 型エーリキアを 1 株、HF565 株型のエーリキアを 3 株、それらと異なる新型の 3 種類、計 5 種類の型を検出した。新型 3 種類のシーケンス結果およびその遺伝子解析の結果、一種類がエーリキア属の *E.ewingii* に相同性が最も高く (99.12%) エーリキア属に分類されると思われた。別の一種類はエーリキア属とアナプラズマ属の中間に位置し、L.M.Schoulsらがオランダのダニから検出した *Ehrlichia* sp.(J. Clin. Microbiol. 37:2215-2222, 1999)に最も相同性が高かった(98.95%)。もう一種類がウオルバキア属とアナプラズマ属の中間に位置しており、*E.ruminantium*に最も相同性が高かった(92.81%)。

D. 考察

アナプラズマ (エーリキア) 感染症が新興感染症として世界的な広がりを見せる中、日本でも多数のアナプラズマ科のエーリキアが見つかったことから、人への感染も含めた実態調査が必要であり、今回、アナプラズマの検査方法の検討と実態調査を行った。これまで *E.muris* の蛍光抗体用抗原は、マウスに接種し

て腹腔内細胞を取り出し、培養して抗原としていた。しかし、マウスの飼育が必要な事、また、腹腔内細胞に免疫細胞（抗体産生細胞）を含む事があり、自然環境での増殖系としての野鼠の抗体調査検査には障害となる事があった。DH82 細胞を用いて、*E.muris* を *E.chaffeensis* 同様培養できる事が明らかとなり、抗原の作成、検査が容易に、また、確実にになった。交差試験の結果 *E.muris* は、*E.chaffeensis* と抗原性に若干の違いがあるものの、エーリキア属エーリキアの抗体調査に抗原として用いる事が可能と思われた。最近、中国のダニに *E.chaffeensis* が存在する事が報告された(J. Clin. Microbiol. 38: 2778-2780, 2000)。また、韓国で *E.chaffeensis* 患者と *A.phagocytophila* 患者の存在が報告された(Abstract #43. American Society for Rickettsiology- Bartonella as an Emerging Pathogen Group Joint Conference, Big Sky, Montana, August 18-22, 2001.)。これらの報告は、日本でもアナプラズマの検査の必要性を示していると思われる。分与された *E.chaffeensis* の使用には制約があり、*E.muris* を抗原として活用できる事は、今後の検査を普及させる上で大変有意義である。

アナプラズマ属の *A.phagocytophila*(HGE agent)はライム病と密接なかわりがある。それは、ライム病の病原体であるボレリアを媒介するダニと *A.phagocytophila* を媒介するダニが共通である事による(J. Clin. Microbiol. 37:3448-3451, 1999)。すなわちライム病流行地には *A.phagocytophila* も分布生息している。最近、中国のライム病流行地で採取されたダニ (*I.persulcatus*) から、*A.phagocytophila* が PCR で検出された(J. Clin. Microbiol. 38: 4208-4210, 2000)。北海道はライム病の流行地である事から、*A.phagocytophila* 患者の存在が想定され、北海道で採血されたヒト血清について抗体調査を行った。なお、これらの患者の約 30%はダニに刺されており、また、これらの血清サンプルの約 20%は Dotblot method でボレリア抗体陽性であった。*E.muris* および *A.phagocytophila* を抗原として抗体検査を行ったところ、*A.phagocytophila* 抗体は検出されなかったが、*E.muris* に対する抗体は 197 人中 4 人から検出された。抗体価は最高値で 160 倍であった。前回、東京都の奥多摩地区のヒト血清について抗体調査を行ったところ、抗体価が低いながらも抗体陽性者の存在を確認している(J. Clin. Microbiol. 37:1123-1129, 1999)。今回の陽性患者が *E.muris* に感染しているのか、あるいは他の

エーリキア感染による交差反応なのか、あるいは非特異的反応なのか、今後さらに詳しい解析が必要である。

アナプラズマは宿主特異性が高く、その分離培養は必ずしも容易ではない(Clin. Microbiol. Rev. 4:286-308,1991)。そこで、PCR 法を用いたアナプラズマ遺伝子の検出が検査法として多く用いられている。今回、*E.muris* 及び HF565 株、また、*E.chaffeensis* および *A.phagocytophila* の検出を目的とした PCR 法を検討した。今回作成したプライマー、また、既報に従って作成したプライマーはいずれも明瞭な PCR 産物を作成し、検査法として用いる事ができることを示した。また、制限酵素処理の結果も *E.muris* と HF565 株の違いを示し、シーケンスが出来なくともその違いを明らかにする事が出来た。

我々は、野鼠やダニからアナプラズマの分離を試み、日本に *N.sennetsu* 以外にダニ媒介性のエーリキアが存在する事を明らかにし、*E.muris* や *Ehrlichia* sp. (HF 株)等が国内に存在する事が明らかになった。今回、行った PCR 法によるダニの調査で 320 個体 (281 サンプル) のダニから合計 9 株のアナプラズマ DNA を検出した。これらをシーケンスした結果、HF565 株、*E.muris* が検出された。HF565 株は *I.ovatus* のみから検出されたが、これはこれまでの結果と一致していた。*E.muris* はこれまで、*H.flava* から検出されているが、*I.persulcatus* から検出されたのは初めてである。ロシアでは *I.persulcatus* から多くの *E.muris* が検出されている(J. Clin. Microbiol. 39: 2237-2242, 2001)。また、北海道で採取された *I.ovatus* から検出された DNA をシーケンスしたところ、このアナプラズマは L.M.Schouls らがオランダのダニから検出した *Ehrlichia* sp. (J. Clin. Microbiol. 37:1123-1129, 1999) に最も相同性が高かった (98.95%)。また、遺伝子解析から、このアナプラズマがエーリキア属とアナプラズマ属の中間に位置する新しいアナプラズマであると考えられた。日本の西部に当たる島根県で採取された *H.longicornis* から検出した DNA も従来報告株とは異なっており、*E.ewingii* に最も高い相同性があった (99.12%)。*E.ewingii* は犬から発見されたエーリキアであるが、最近、ヒトからも検出されており注目されている(New Engl. J. Med. 341:148-155, 1999)。日本では *E.ewingii* の報告はない。さらに、それらとは全く異なるアナプラズマ DNA が検出され、遺伝子解析の結果、それはウオルバキア属とアナプラズマ属の中間に位置した。相同性からいえば *E.ruminantium* に最も近かつ