

2. 国内におけるエーリキアとリケッチアの実態調査

我が国では、これまでにヒトエーリキア症病原体である *Ehrlichia chaffeensis* に遺伝的に近縁の *Ehrlichia ovata* (学名提案中) が発見されているが、*E. chaffeensis* そのものはまだ見出されていない。米国では、*E. chaffeensis* の媒介ベクターが *Amblyomma americanum* であることが知られており、さらに近年、中国のタカサゴキララマダニ (*Amblyomma testudinarium*) から *E. chaffeensis* DNA が検出され報告されている。つまり、*E. chaffeensis* の媒介ベクターとしては主に *Amblyomma* 属マダニの可能性はある。国内の *Amblyomma* 属マダニとしては、主に南西地方に生息するタカサゴキララマダニ (*A. testudinarium*) が知られている。

そこで我々は、本年度に当研究班により実施された奄美大島における紅斑熱フィールド調査(野鼠・マダニ捕獲)に同行し、タカサゴキララマダニを中心にマダニの採集を行い、これらマダニからエーリキアおよびリケッチアの遺伝子検出を行った。

3. TaqMan 法および LAMP 法を用いた早期遺伝子診断法開発の検討

患者白血球細胞内に存在するリケッチア、エーリキア、およびアナプラズマはその遺伝子検出が極めて困難である。そこで、我々は TaqMan 法および LAMP 法を応用した簡易且つ早期遺伝子診断法について検討した。

B. 研究方法

1. 国内におけるアナプラズマの実態調査

青森県(岩木山および県民の森周辺)、岩手県(安比高原付近)、および北海道の一部(札幌市周辺)でマダニ採取を行い、これらのマダニを1匹ずつ解剖して唾液腺を摘出し DNA 抽出を行った。そして、アナプラズマに特異的な *p44* 外被膜蛋白遺伝子群

を標的とした PCR により、そのマダニ唾液腺 DNA から *A. phagocytophilum* DNA の検出を試み、得られた増幅産物を TA クローニングして塩基配列の解読を行った。その後、系統樹解析からこれら *A. phagocytophilum* の分類学的位置付けについて検討した。

2. 国内におけるエーリキアとリケッチアの実態調査

奄美大島において、マダニ採取を行い、得られたマダニ組織から DNA を抽出して、エーリキアに関しては LAMP 法を用いて、またリケッチアの場合は Nested PCR 法および LAMP 法を用いてそれぞれの遺伝子検出を行った。

3. TaqMan 法および LAMP 法を用いた早期遺伝子診断法開発の検討

[TaqMan 法]

エーリキアの *E. chaffeensis*、*E. ovata*、*E. canis*、*E. muris* が検出可能な *Ehrlichia* 属特異的 TaqMan 法と *A. phagocytophilum* が検出可能な TaqMan 法の開発を検討した。

[LAMP 法]

LAMP 法については、特許出願予定であるため、記載を控える。

C. 結果および考察

1. 国内におけるアナプラズマの実態調査

表1に示すように、青森県、岩手県、北海道において、シュルツェマダニ、ヤマトマダニ、ヤマトチマダニ (*Haemaphysalis japonica*) の計155匹を採集した。これらの唾液腺 DNA からアナプラズマの *p44* 遺伝子群の検出を試みたところ、青森県および岩手県の5匹のシュルツェマダニとヤマトマダニから増幅産物が得られ、その後 TA クローニングを行って塩基配列を決定した。そして系統樹解析を行った結果、図1に示

すように、2 匹のヤマトマダニからの *p44* 遺伝子クローン群はそれぞれのクラスターに位置していたが、3 匹のシュルツェマダニから得られた *p44* 遺伝子クローン群は多様性を示し、様々なクラスターの中に分類された。この結果は、ヤマトマダニの中で宿主に順応しやすい *A. phagocytophilum* の種類選択が起こっている可能性を示唆するものとする。

また、得られた *p44* 遺伝子クローン群は、米国のヒト感染型 *A. phagocytophilum*、あるいはこれまで静岡県と山梨県で検出された *p44* 遺伝子群のいずれかと近い関係があることが判明した。(図 1 の矢印はこれまで GenBank に登録されている *p44* 遺伝子群を示す。また、Bar A と Bar B はヤマトマダニからの *p44* 遺伝子クローン群を示し、その他はシュルツェマダニからの *p44* 遺伝子クローン群を示す)。

2. 国内におけるエーリキアとリケッチアの実態調査

奄美大島において、得られたタカサゴキラマダニ 19 匹、ヤマアラシチマダニ (*Haemaphysalis hystricis*) 6 匹、タイワンカクマダニ (*Dermacentor taiwanensis*) 2 匹の全組織から DNA を抽出し、Nested PCR あるいは LAMP 法により、エーリキアおよび紅斑熱群リケッチアの遺伝子検出を試みた(表 2、LAMP 法の結果は特許出願予定のため掲載していない)。その結果、LAMP 法によるエーリキア検出はすべて陰性であった(アナプラズマ検出も行い、陰性であった)。しかし、紅斑熱群リケッチアの Nested PCR および LAMP では、タカサゴキラマダニ 19 匹すべてが陽性を示した。これまでの報告から考えて、タカサゴキラマダニから検出されたリケッチアは *R. tamurae* と推定している。またタイワンカ

クマダニの 1 匹が偽陽性を示したが、詳細は不明である。

ここで、奄美大島における 19 匹すべてのタカサゴキラマダニがエーリキア陰性を示したが、これは奄美大島が小島という地理的に特異な環境であることが要因かもしれないと考えている。来年度は九州地方のタカサゴキラマダニを中心にエーリキアの実態調査を行う予定である。

3. TaqMan 法および LAMP 法を用いた早期遺伝子診断法開発の検討

[TaqMan 法]

エーリキア遺伝子を標的とした TaqMan 法を考案し、これによりエーリキア遺伝子の検出を試みたところ、*E. chaffeensis*、*E. ovata*、*E. canis*、*E. muris* の *Ehrlichia* 属特異的に検出することに成功した。その感度は、エーリキア遺伝子クローンのコピー数を基にして計測したところ、10 コピーまで検出可能であることを確認した(100 コピーを検出した場合、陽性検体として確定判定が可能)。この標的エーリキア遺伝子はゲノム上に 1 コピーのみ存在するので、その遺伝子コピー数はエーリキア細菌数に相当する。国内のヒトエーリキア症患者がまだ見出されていないため、実際の早期診断法として有効か否かはまだ判断しかねるが、かなり有望であり、来年度以降の患者探索に応用する予定である。

一方、アナプラズマについては、さらに感度の高い TaqMan 法に取り組んだ。この標的アナプラズマ遺伝子はゲノム上に複数存在するので、ゲノム上に 1 コピーのみ存在する遺伝子を標的とするよりも検出感度の向上が期待できる。しかし、プライマーの設計が難しく、結局 16 個の遺伝子を同時に増幅するプライマーとなった。それを用いて、これまで *A. phagocytophilum* が検出

された我が国のマダニ DNA からの *A. phagocytophilum* 遺伝子の検出を試みた。その結果、一部の検体で陽性を示すものの、すべての検体では陽性を示さないことが判った。この結果は、マダニ DNA 中のアナプラズマ DNA の絶対量が少ないため陰性となったのか、またはプライマー設計が米国のアナプラズマのゲノム配列を参考にす以外に方法がないため、その特異性に問題があったため陰性となったのかの、いずれかであると考えており、今後、改善を加える予定がある。

[LAMP 法]

LAMP 法については、今後、特許出願を予定しているため、研究成果の記載を控えた。

以上、本年度は我が国におけるアナプラズマ、エーリキア、リケッチアの実態調査と遺伝子検出法の開発に着手し、ある一定の成果をあげることができた。今後は、(i)これまで不明であったアナプラズマの実態が徐々に明らかになってきているので、マダニ調査を継続するとともに患者の探索を行う。(ii)エーリキアについては、隣国で見られるヒトエーリキア症病原体の *E. chaffeensis* が実際に我が国に存在するか否かを早急に明らかにするよう努める。また、(iii)リケッチア感染症の早期遺伝子診断法の確立を目指す。

D. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

「LAMP 法を用いたリケッチア関連細菌群の早期遺伝子診断法」については、特許出願予定である。

発表論文等

1. Naitou H, Kawaguchi D, Nishimura Y, Inayoshi M, Kawamori F, Masuzawa T, Hiroi M, Kurashige H, Kawabata H, Fujita H, and Ohashi, N. Molecular identification of *Ehrlichia* species and ‘*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis’ from ticks and wild rodents in Shizuoka and Nagano Prefecture. *Microbiol Immunol.* 2006; **50**: 45-51
2. Niu H, Rikihisa Y, Yamaguchi M, and Ohashi N. Differential expression of VirB9 and VirB6 during life cycle of *Anaplasma phagocytophilum* in human leucocytes is associated with differential binding and avoidance of lysosome pathway. *Cell Microbiol.* 2006; **8**: 523-534
3. Dunning Hotopp JC, Lin M, Madupu R, Crabtree J, Angiuoli SV, Eisen J, Seshadri R, Ren Q, Wu M, Utterback TR, Smith S, Lewis M, Khouri H, Zhang C, Niu H, Lin Q, Ohashi N, Zhi N, Nelson W, Brinkac LM, Dodson RJ, Rosovitz MJ, Sundaram J, Daugherty SC, Davidsen T, Durkin AS, Gwinn M, Haft DH, Selengut JD, Sullivan SA, Zafar N, Zhou L, Benahmed F, Forberger H, Halpin R, Mulligan S, Robinson J, White O, Rikihisa Y, Tettelin H. Comparative Genomics of Emerging Human Ehrlichiosis Agents. *PLoS Genet.* 2006; **17**: 208-223
4. 大橋典男. 国内に生息するマダニからのアナプラズマ属菌の検出. 国立感染症研究所感染症情報センター, 病原微生物検出情報 (Infectious Agents Surveillance Report [IARS]), 2006; **27**: 44-45

5. 内藤博敬, 大橋典男. 蛍光ディフアレ
ンスゲル二次元電気泳動 (2D-DIGE) 法
を用いた細胞内寄生性新興感染症起因
細菌の宿主応答解析. 生物物理化学.
2006; 50: 201-210
6. 大橋典男. 潜在するエーリキア症関連群.
「ダニと新興再興感染症」. SADI組織委員
会編. 全国農村教育協会. 印刷中.

学会発表

1. 大橋典男, 稲吉恵, 北邑かよ子, 川森
文彦, 川口大蔵, 西村祐作, 廣井みど
り, 内藤博敬, 増澤俊之: *Ixodes*属マ
ダニが保有する *Anaplasma*
phagocytophilum の分子疫学的解析.
第79回日本細菌学会総会 (石川),
2006年3月
2. 稲吉恵, 廣井みどり, 川森文彦, 内藤
博敬, 大橋典男: *Ehrlichia* sp. Shizuoka
株感染マウスの病理組織学および
血液学的解析について. 第79回日本
細菌学会総会 (石川), 2006年3月
3. 大橋典男: エーリキアおよびアナプラ
ズマのゲノム構造解析の紹介. 第 13
回ダニと疾患のインターフェースに
関するセミナー. [SADI 白神大会]
(青森), 2006年6月

表1. 東北地方および北海道のマダニから検出された*A. phagocytophilum* p44

採集地点	<i>I. ovatus</i>		<i>I. persulcatus</i>		<i>H. japonica</i>		計
	採集数	p44 (+)	採集数	p44 (+)	採集数	p44 (+)	
県民の森(青森)	94	(2)	5	(1)	0	(0)	99(3)
岩木山麓(青森)	2	(0)	4	(1)	1	(0)	7(1)
安比高原(岩手)	0	(0)	23	(1)	1	(0)	24(1)
札幌・定山溪	24	(0)	1	(0)	0	(0)	25(0)
計	120	(2)	33	(3)	2	(0)	155(5)

A. phagocytophilum 保有率 3.23% (5 /155匹)

Fig. 1. Phylogenetic classification of *A. phagocytophilum* p44 from ticks in Tohoku area

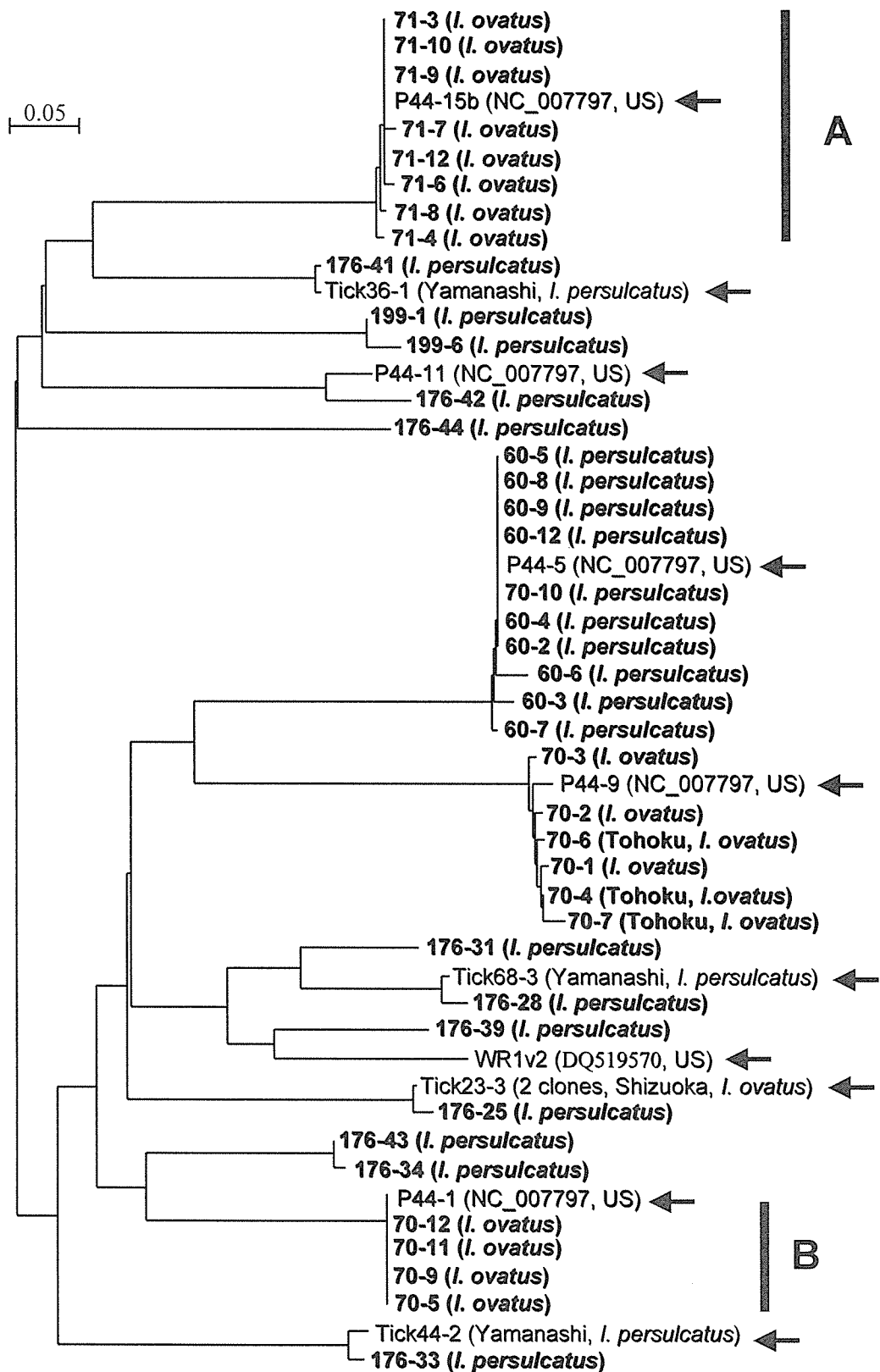


表2. 奄美大島で捕獲したマダニのリストおよび紅斑熱群リケッチア遺伝子を標的としたNested PCR

No.	マダニ種類	採取地		Nested PCR	
		Choi	Kawamori 16S	Choi	Kawamori 16S
A 1	<i>Haemaphysalis hystricis</i>	名瀬大字知名瀬	29.VII.2006	-	-
A 2	<i>Haemaphysalis hystricis</i>	名瀬大字知名瀬	29.VII.2007	-	-
A 3	<i>Haemaphysalis hystricis</i>	名瀬大字知名瀬	29.VII.2008	-	-
A 4	<i>Haemaphysalis hystricis</i>	名瀬大字知名瀬	29.VII.2009	-	-
A 5	<i>Haemaphysalis hystricis</i>	名瀬大字小宿(松長山)	29.VII.2006	-	-
A 6	<i>Haemaphysalis hystricis</i>	名瀬大字小宿(松長山)	29.VII.2007	-	-
A 7	<i>Amblyomma testudinarium</i>	奄美市住用町山間	29.VII.2006	+	+
A 8	<i>Amblyomma testudinarium</i>	奄美市住用町山間	29.VII.2006	+	+
A 9	<i>Amblyomma testudinarium</i>	奄美市住用町山間	29.VII.2006	+	+
A 10	<i>Amblyomma testudinarium</i>	奄美市住用町山間	29.VII.2006	+	+
A 11	<i>Amblyomma testudinarium</i>	奄美市住用町山間	29.VII.2006	+	+
A 12	<i>Amblyomma testudinarium</i>	奄美市住用町山間	29.VII.2006	+	+
A 13	<i>Amblyomma testudinarium</i>	奄美市住用町山間	29.VII.2006	+	+
A 14	<i>Amblyomma testudinarium</i>	奄美市住用町山間	29.VII.2006	+	+
A 15	<i>Amblyomma testudinarium</i>	奄美市住用町山間	29.VII.2006	+	+
A 16	<i>Amblyomma testudinarium</i>	奄美市住用町山間	29.VII.2006	+	+
A 17	<i>Amblyomma testudinarium</i>	奄美市住用町山間	29.VII.2006	+	+
A 18	<i>Amblyomma testudinarium</i>	奄美市住用町山間	29.VII.2006	+	+
A 19	<i>Amblyomma testudinarium</i>	奄美市住用町山間	29.VII.2006	+	+
A 20	<i>Amblyomma testudinarium</i>	奄美市住用町山間	29.VII.2006	+	+
A 21	<i>Amblyomma testudinarium</i>	奄美市住用町山間	29.VII.2006	+	+
A 22	<i>Amblyomma testudinarium</i>	奄美市住用町山間	29.VII.2006	+	+
A 23	<i>Amblyomma testudinarium</i>	奄美市住用町山間	29.VII.2006	+	+
A 24	<i>Amblyomma testudinarium</i>	奄美市住用町山間	29.VII.2006	+	+
A 25	<i>Dermacentor taiwanensis</i>	奄美市名瀬塩浜町	28.VII.2006	-	+
A 26	<i>Dermacentor taiwanensis</i>	奄美市名瀬大字知名瀬	29.VII.2006	-	-

日本国内におけるリケッチア感染症検査法の検証

分担研究者	安藤 秀二	国立感染症研究所ウイルス第一部 主任研究官
協力研究者	小原 真弓	富山県衛生研究所 研究員
	田原 研司	島根県保健環境科学研究所(分担研究者)
	古屋 由美子	神奈川県衛生研究所(分担研究者)
	藤田 博己	大原総合病院附属大原研究所(分担研究者)
	山本 正悟	宮崎県衛生環境研究所(分担研究者)
	岸本 壽男	国立感染症研究所ウイルス第一部 室長(主任研究者)

研究要旨

日本国内のリケッチア症(つづが虫病や日本紅斑熱)の実験室診断は、これまで血清学的手法を主体に実施されてきたが、PCR法による遺伝子検出診断が加わる一方、用いる血清診断の手法、抗原において施設ごとに差があり、また判定に熟練を要する診断法でもあるため、診断技術レベルの維持が重要となってくる。今回、リケッチア症の実験室診断の実績を多数持つ施設の協力を得、現在国内で実施可能なリケッチア診断法の評価を行った。

A. 研究目的

日本国内のリケッチア症の実験室診断は、つづが虫病に関しては地方衛生研究所や国立感染症研究所のような公立試験検査機関、民間検査機関、大学研究室等とさまざまな施設で実施されている一方、日本紅斑熱は流行地の一部の公的試験研究機関など限られた施設において実施されている。様々な検査施設において実施されているつづが虫病の実験室診断の多くは、血清学的手法により実施されており、公的機関では間接蛍光抗体法(IFA)または免疫ペルオキシダーゼ法(IP)を実施し、民間機関では補体結合反応(CF法)も行われてきた。また使用

する診断用抗原も、検査施設で菌株を自家増殖させて作製している施設と市販抗原を使用している施設がある。抗原に用いる血清型も民間検査機関が標準3株(Karp, Kato, Gilliam)であり、市販抗原も同様に標準3株であるのに対し、流行地の地方衛生研究所などでは流行株(Kawasaki, Kuroki)などの株も合わせて血清学的検査を実施している。リケッチア症に関しては、いまだIFAやIPによる抗体測定が国際的に標準の検査法であるが、近年では、これら血清学的診断法に加えPCR法によるリケッチア特異遺伝子の検出による報告もある。このような状況に対し、国内のリケッチア検査法の

精度管理については不明な点が多いことから、今回、リケッチア症の実験室診断の実績を多数持つ施設の協力を得、現在国内で実施可能なリケッチア診断法の評価を行った。

B. 研究方法

1) 血清学的診断法に関する検証

リケッチア抗原を自家作製し、リケッチア症の診断実績の豊富な国内の施設に同一ロットの市販つつが虫病 IFA 抗原、市販つつが虫病 CF 抗原および必要試薬を配布し、過去にペア血清により特異的抗体上昇を確認した各施設が有する回復期の保存血清検体の市販抗原に対する抗体測定を依頼した。その結果とそれぞれの施設の自家抗原に対する抗体価データと比較した。

2) 遺伝子検出に関する聞き取り調査

リケッチア症、特に日本紅斑熱の実験室診断の実績のある施設に聞き取りを行い、ペア血清で血清学的に確定した症例で急性期検体に関し PCR の実施が可能であった結果を集め、その陽性率を算出した。

3) 同一検体を用いた施設間の比較検討例

過去に患者報告のなかった地域から、22 病日の血清においてつつが虫病リケッチア血清型 Karp と Kato いずれの株に対しても IgM 40 倍、IgG 10 倍の抗体が民間検査機関で検出され、国立感染症研究所に確認依頼があった。この症例のペア血清について国立感染症研究所を含めたつつが虫病流行地の複数の施設において抗体価を測定し、その結果を比較した。

4) 遺伝子診断に用いる検査材料の検討例

急性期の血液と痂皮 (Eschar) のみしか検査材料の得られなかった症例について、PCR 検体としての検体の種類の適正について検討した。

(倫理面への配慮)

協力検査機関における検体は過去につつが虫病と確定診断が行われたものであり、また市販検査用抗原を用いて各施設で再度抗体価を測定し、その抗体価データのみを分担研究者で集約したものであり、連結不能匿名化が図られている。また、各施設のその他のリケッチア遺伝子検査データも同様である。国立感染症研究所において用いた検体については、医学研究倫理審査により承認を受けている。

国立感染症研究所ヒトを対象とする医学倫理審査

承認受付番号 102「リケッチア感染症における病態と免疫応答の解析と特異的診断法の開発に関する研究」平成 18 年 6 月 21 日

C. 研究結果

血清学的検討における抗体価の比較は、すべての検査において報告書作成までにエンドポイントが得られたものについてのみ集約し、本報告書に記す。

1) 血清学的診断法 (IFA) に関する自家抗原と市販抗原の比較検討

市販抗原として供給されている標準 3 株 (Karp, Kato, Gilliam) について、自家作製抗原との抗体価を比較した (図 1)。同一血清型抗原に対して相関は見られるものの、全体として自家抗原に対して若干高い抗体

価が得られ、まれに市販抗原に対し高い抗体価を示す検体があった。

2) 市販 IFA 抗原と CF 抗原による抗体価の比較

両法を実施し、今回の報告書までに集約できた IFA 陽性の 40 症例のうち、CF 法において陽性となった症例は 16 例(40%)、Karp/Gilliam が流行の主体の地域では 55% (11/20)、Kawasaki/Kuroki が主体の地域の検体では 25% (5/20)であった。その一部を表 1 にまとめた。

3) 血清型による抗体価の比較検討

つつが虫病の市販抗原、自家抗原の各血清型の抗体価の結果の一部を(表 2)に示す。Kawasaki 型による患者は Gilliam 型に対して高く、Kuroki 型による患者は Karp と Kato に高い傾向が見られた。標準 3 株(Karp, Kato, Gilliam)を診断用 IFA 抗原に用いた場合、ほとんどの症例において検出可能であるが、検体 9 のように現在患者発生が見られない古典的つつが虫病の血清型である Kato 型に対する抗体価が最も高い症例も見られた。

4) PCR 遺伝子診断の陽性率

ペア血清による抗体上昇によって診断が確定し、PCR に供試できる急性期全血を得られた 24 症例における PCR 陽性症例は 1 例のみ(4.2%)であった。

5) 同一検体を用いた施設間の比較検討例

診断に慎重を要す症例について国立感染症研究所を含む 4 施設においてペア血清を用いて血清診断を実施した(表 3)。2 つの

施設において抗体価が示されたが、いずれの施設のコメントも 4 倍以上の明らかな抗体上昇を示す検体の反応と比較して非典型的な反応であり、抗体価の上昇も見られないことから血清学的にはつつが虫の感染は否定的であると回答した。すなわち、すべての施設において、同検体はつつが虫は血清学的に陰性と判断された。

6) 遺伝子診断に用いる検査材料の検討例

急性期全血の血漿、末梢血単球 PBMC、痂皮 Eschar を材料に Gentra 社 Puregene を用いて鋳型 DNA を抽出した。定法どおりつつが虫病特異的 PCR を実施したところ、か皮 Eschar から得た鋳型 DNA のみ特異的遺伝子が陽性となった(図 2)。

D. 考察

つつが虫病の実験室診断は様々な施設で行われている。その国際的標準法は IFA や IP による、最終的にヒトの目により判定することから主観が入りやすく、熟練を要することが知られている。また、使用する抗原のロットにより反応性が変わることもあり、流行地におけるホモの抗原を使用しないと抗体価が低く示されることもある。また、CF 法と IFA を比較した結果から明らかなように、使用する検査法によって明らかに異なる結果を出してしまうこともある。CF 法に関しては、平成 18 年末に診断用抗原の製造が終了しており、これは、その感度、特異性が低いことや IgM を測定できないことなどが用いられなくなった理由と考えられる。しかしながら、過去の届出をみると CF 法による血清抗体価の検出を実験室診断結果として報告しているものもあり、

CF法のみ実施され、陰性となって症例として届けられなかったものも多数あることが推測される。国内のつつが虫病には、標準3株のほか関東以西では Kawasaki、Kuroki などの血清型の地域が多く、まれにこれら5株と血清学的反応性がことなる Shimokoshi 株も知られている。また、それぞれの血清型の株の分布も、異なる媒介ツツガムシの分布とともに地域によって異なり、このツツガムシの分布も変化していることが報告されている。本研究報告書が示すように、診断を多く経験している施設は、主観の入りやすいこれらの診断法について、非特異的反応を考慮のうえ、ペア血清による確実な判定や、過去の明らかに陽性となった症例を参考に常に自施設の診断技術の検証を行っている。客観的判断の難しい血清診断法が現行の国際的な標準法である以上、地域に適した診断抗原を用いるとともに、その血清診断の精度管理には常に注意が必要である。

また、急性期の検査材料を用いる PCR などの遺伝子診断は、回復期の血清が得られない場合、感染を判定する有効な手段であるが、今回示した日本紅斑熱の結果と同様、つつが虫病においても検出率が高くはないといわれている。今回示した症例のように急性期の刺口の痂皮材料からのみ PCR 陽性となる場合もあり、PCR に適した急性期の検査材料について、その採取時期とともに再度検討する必要がある。

国内のリケッチア感染症の実験室診断技術は、いまだ熟練の担当者に頼ることが多い。今回得られた現行検査法におけるデータ比較は限られたものである。より統計学的に信頼度の高いものとするために比較検

討する検体数を増やし、現行の検査法のより適切な実施法と精度管理のあり方を示すとともに、特異性と客観性の高い実験室診断法の開発が求められる。

E. 結論

リケッチア症の国際的に標準法である IFA や IP などの血清診断は、熟練を要し、主観が入りやすい判定に対し自主的に精度管理を行うことができる経験豊富な施設に限られ、徐々に減少していることから、全国レベルで相互の精度管理を定期的に行う体制を構築する必要がある。同時に、より特異性が高く客観的判断が可能な血清診断系の開発が求められる。また、リケッチア症の PCR 診断におけるより適切な検査材料の選択を検討する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kawabata, H., Ando, S., Kishimoto, T., Kurane, I., Takano, A., Nogami, S., Fujita, H., Tsurumi, M., Nakamura, N., Sato, F., Takahashi, M., Ushijima, Y., Fukunaga, M., Watanabe, H. First Detection of *Rickettsia* in Soft-Bodied Ticks Associated with Seabirds, Japan. *Microbiol. Immunol.*, 50(5): 403-406, 2006
- 2) 安藤秀二, 岸本寿男. バイオテロリズムとダニ媒介性感染症. 柳原保武監修. 高田伸弘ほか編 YUKI 書房, p249-255, 2007年3月

2.学会発表

1) Ando, S., Shigematsu, M., Ogawa, M., Kishimoto, T., Trend of Tsutsugamushi Disease in Japan. The 12th International Congress on Infectious Disease, Lisbon, Portugal, June 15-18, 2006

2) 安藤秀二 日本のリケッチア感染症の現状－日本紅斑熱を中心に－平成 18 年度希少感染症診断技術研修会 平成 19 年 2 月 15 日、東京

3) 藤田博己 国内に分布するマダニとリケッチア属 平成 18 年度希少感染症診断技術研修会 平成 19 年 2 月 15 日、東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得・実用新案登録その他

なし

図1. 自家抗原と市販抗原によるIFA抗体価の比較

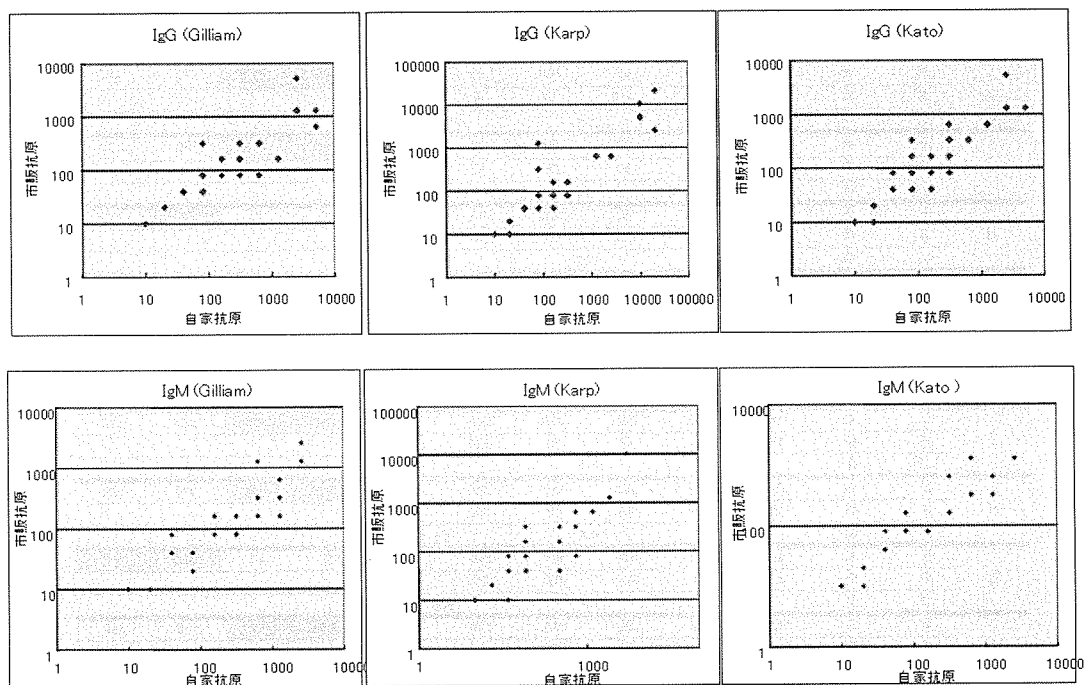


表1. IFAとCFの市販抗原に対する抗体価の比較

No	Gilliam			Karp			Kato		
	IgM	IgG	CF	IgM	IgG	CF	IgM	IgG	CF
1	320	160	-	640	640	-	640	640	-
2	80	80	-	<20	40	-	20	40	-
3	640	160	-	80	80	-	80	80	-
4	80	160	-	<20	160	128	40	160	64
5	1280	160	-	40	40	-	160	80	-
6	80	80	-	40	80	-	80	40	-
7	160	320	-	80	80	-	320	320	-
8	80	160	-	40	80	-	160	80	-
9	320	80	-	320	320	-	1280	160	-
10	2560	320	-	40	160	-	160	320	-
M3	80	40	-	<20	20	-	<20	40	-
M4	40	40	-	160	40	64	640	40	-
M5	<20	20	-	20	80	≧128	<20	160	-
M6	<20	20	-	<20	40	≧128	80	40	-
M7	320	160	-	320	640	-	320	320	-
M8	<20	40	-	<20	160	16	<20	640	-
T4	320	320	-	1280	2560	-	640	320	-
T8	1280	1280	32	1280	5120	32	1280	1280	32
T9	320	320	32	1280	1280	32	320	320	32
T11	2560	5120	128	10240	20480	128	2560	5120	128
T16	1280	1280	16	10240	10240	32	1280	1280	32
T17	40	40	-	320	320	-	80	80	-
T18	640	640	-	5120	5120	-	1280	640	-
T20	1280	1280	16	10240	10240	32	1280	1280	16

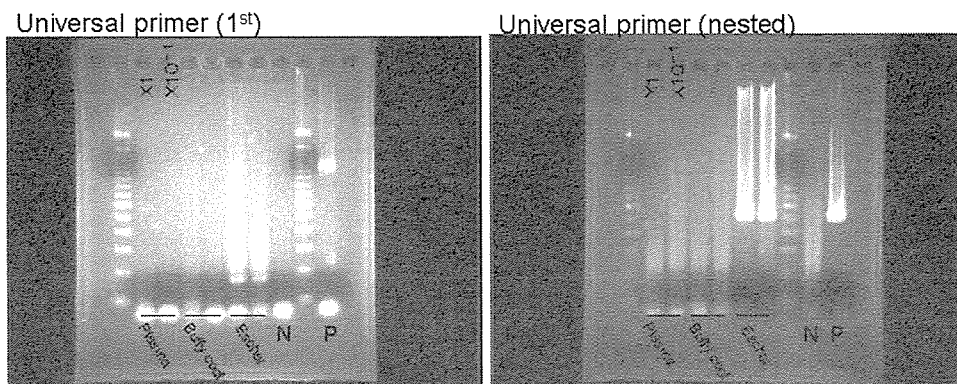
表2. 血清型ごとのつつが虫病血清診断の結果例

検体	方法	抗原	Gilliam		Karp		Kato		Kawasaki		Kuroki	
			IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG
1	IF	自家(h)	1280	1280	1280	1280	1280	1280	640	80	5120	1280
	IF	市販⊙	320	160	640	640	640	640				
	CF	市販⊙	<4		<4		<4					
2	IF	ih	320	160	10	160	20	160	2560	640	10	160
	IF	⊙	80	80	<20	40	20	40				
	CF	⊙	<4		<4		<4					
3	IF	ih	1280	320	40	80	80	160	2560	640	80	160
	IF	⊙	640	160	80	80	80	80				
	CF	⊙	<4		<4		<4					
4	IF	ih	40	160	40	320	40	320	40	20	320	320
	IF	⊙	80	160	<20	160	40	160				
	CF	⊙	<4		128		64					
5	IF	ih	2560	320	80	80	80	80	5120	320	80	20
	IF	⊙	1280	160	40	40	160	80				
	CF	⊙	<4		<4		<4					
6	IF	ih	320	320	80	80	160	160	2560	640	160	40
	IF	⊙	80	80	40	80	80	40				
	CF	⊙	<4		<4		<4					
7	IF	ih	640	320	640	320	640	320	1280	1280	640	320
	IF	⊙	160	320	80	80	320	320				
	CF	⊙	<4		<4		<4					
8	IF	ih	320	320	320	320	320	320	1280	640	320	320
	IF	⊙	80	160	40	80	160	80				
	CF	⊙	<4		<4		<4					
9	IF	ih	640	640	80	80	640	320	160	40	2560	1280
	IF	⊙	320	80	320	320	1280	160				
	CF	⊙	<4		<4		<4					
10	IF	ih	2560	640	320	320	320	320	10240	2560	160	320
	IF	⊙	2560	320	40	160	160	320				
	CF	⊙	<4		<4		<4					

表3. 各施設における同一検体の血清診断検査結果

	施設A (IP)						施設B (IFA)						施設C (IFA)						施設D (IFA)					
	13病日		23病日		26病日		13病日		23病日		26病日		13病日		23病日		26病日		13病日		23病日		26病日	
	Ig G	Ig M	Ig G	Ig M	Ig G	Ig M	Ig G	Ig M	Ig G	Ig M	Ig G	Ig M	Ig G	Ig M	Ig G	Ig M	Ig G	Ig M	Ig G	Ig M	Ig G	Ig M	Ig G	Ig M
ツツガムシ病 <i>Ornithi tsutsugamushi</i>	Gilliam	<10	<10	<10	<10	<10	<10	∞	∞	∞	∞	∞	∞	<10	<10	<10	<10	∞	∞	NT	NT	∞	∞	
	Karp	20	80	10	40	10	40	40	∞	40	∞	40	∞	<10	<10	<10	<10	∞	∞	NT	NT	∞	∞	
	Kato	10	80	10	40	10	40	∞	∞	∞	∞	∞	∞	<10	<10	<10	<10	∞	∞	NT	NT	∞	∞	
	Kawasaki	<10	<10	<10	<10	<10	<10	40	∞	40	∞	40	∞	<10	<10	<10	<10	∞	∞	NT	NT	∞	∞	
	Kuroki	40	80	40	20	40	20	20	∞	20	∞	20	∞	<10	<10	<10	<10	∞	∞	NT	NT	∞	∞	
	Shimokoshi	10	<10	10	<10	10	<10	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
日本紅斑熱 <i>R. japonica</i>	<10	<10	<10	<10	<10	<10	∞	∞	∞	∞	∞	∞	<10	<10	<10	<10	∞	∞	NT	NT	∞	∞		
発疹熱 <i>R. typhi</i>	<10	<10	<10	<10	<10	<10	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
ツツガムシ病 <i>C. burnetii</i> 相菌	<10	<10	<10	<10	<10	<10	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	

図2. 各種の供試検査材料によるPCR



Plasma (500 μ l), Buffy coat (300 μ l), Eschar (2 x 2 mm) Gentra社 Puregeneを用い、50 μ l に抽出

平成 18 年度厚生労働科学研究費(新興・再興感染症研究事業)
 リケッチア感染症の国内実態調査及び早期診断体制の確立による早期警鐘システムの構築
 分担研究報告

新規 *Rickettsia* 感染症診断ツールの開発

分担研究者	川端真樹	(国立感染症研究所・細菌第一部)
協力研究者	安藤秀二	(国立感染症研究所・ウイルス第一部、分担研究者)
	坂田明子	(国立感染症研究所・ウイルス第一部)
	岸本壽男	(国立感染症研究所・ウイルス第一部、主任研究者)
	高野 愛	(国立感染症研究所・細菌第一部)
	武藤麻紀	(国立感染症研究所・細菌第一部)
	藤田博己	(大原総合病院付属研究所、分担研究者)
	角坂照貴	(愛知医科大学)
	御供田睦代	(鹿児島県鹿児島県環境保健センター)

概要

Rickettsia 感染症に対する新規の早期診断ツール開発を目的として、1) 実験室診断に応用可能な基礎的学術情報を収集、2) 診断ツールとしての材料作成、3) 作成された材料の実験室診断への応用の検討、4) 実際の診断現場への配布と検証、5) 至便性の向上、ツールの改善・改良、を計画した。本年度は2004年にフランスで報告された宿主細胞のアクチン繊維と結合、伸張反応を誘導するリケッチア因子 RickA に着目し診断ツールとしての材料作成を行った(実験室診断に応用可能な基礎的学術情報を収集、および診断ツールとしての材料作成)。

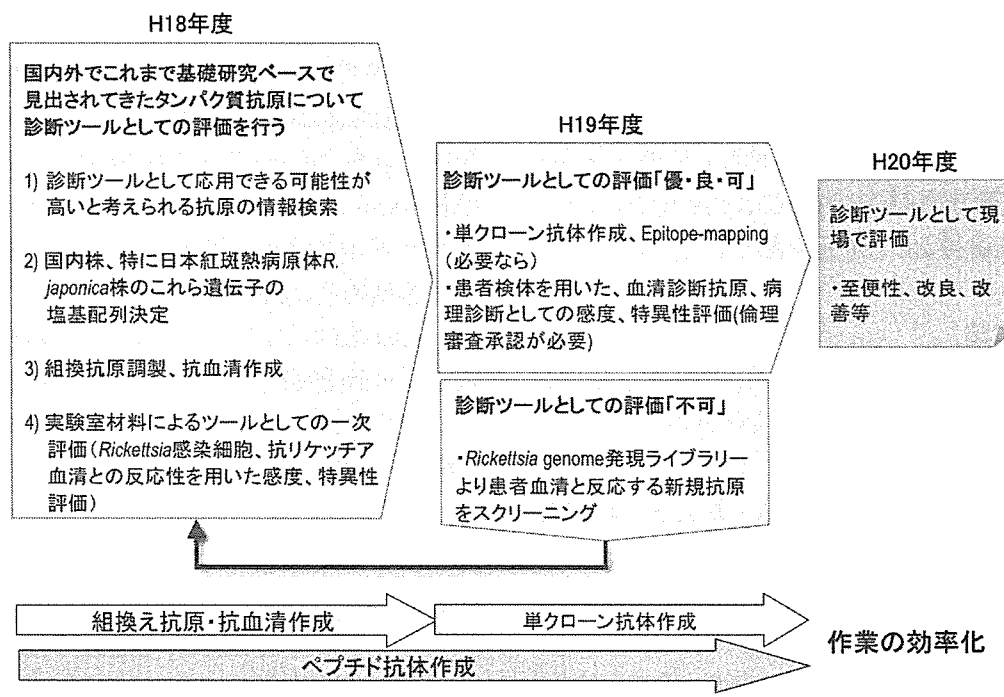


図1. 本研究の研究内容と公衆衛生への応用

日本紅斑熱などの *Rickettsia* 感染症は、死亡例が報告されたこと、近年患者数が増加傾向にあることから、公衆衛生上重要な感染症として認知されるようになってきた。*Rickettsia* 感染症の診断は、海外では 1)血清診断、2)病原体の分離、PCR 法による病原体 DNA の検出、3)病変部病理、および病原体の免疫染色、が推奨されている。我が国でも、概ね同様の方向性で実験室診断が行われている。すなわち、培養された国内株等をもちいた蛍光もしくは発色法などによる血清診断、L929 細胞や Vero 細胞を用いた分離培養法、PCR 法による病原体 DNA の検出が一般的に行われている。また近年、分担研究者である堤らによって、病理組織を用いた免疫染色法による確定診断も試行されるようになってきている。

一方で、これら診断においては、血清診断では、検査材料として培養された *Rickettsia* 菌体が必要である。また病理免疫染色には、標準化された抗体の供給が必要である。

そこで本研究では、3年間を目処に、これら実験室診断に“実際に用いることの出来る”検査材料の新規開発と検討、複数の検査施設への試験的配布と感度、特異性の検証、検査施設間での標準化と至便性の向上を到達目標とし、研究を開始した(図 1)。

研究方法

1) 診断ツールとしての有用性が考えられるリケッチア抗原遺伝子の情報検索

実験室診断への応用が可能と考えられた *Rickettsia* 遺伝子として RickA 遺伝子を候補として選択した。Tool としての必須 3 項目として、1)感度が期待されること、2)特異性が何らかの方法で検証出来ること、3)検出効率が見込まれること、が考えられた。また、検出効率を向上させるためには、1) *Rickettsia* 菌体表層に存在すること、2)感染時に高度に

発現していることが重要と考えられた。

本研究で候補として選択した RickA は Gouin らによれば(Gouin E et al. 2004)、紅斑熱群リケッチア(*R. conorii*) では見出されるがチフス熱群リケッチア(*R. prowazekii*) では見出されない。RickA は *R. conorii* では 517 残基のタンパク質で、大きく3つのセクションから構成されている。N'末端より約 100 残基の部分に 14 残基からなる推定 G-actin 結合部位が見出され、続いて 311-376 残基には宿主 Ena/VASP 蛋白との結合部位が想定されている。また C'末端近傍の 440-473 残基には、WASP-family の CA-domains との共通配列が存在する。このことから RickA はリステリア細菌で単離された ActA 抗原同様、宿主細胞内で、G-actin の重合に関与していることが考えられた。また Gouin らは、RickA は、N'末端部位でのアミノ酸配列はリケッチア種間で高度に保存されること、感染宿主細胞内で菌体表層に発現していることを報告している。このことは実験室診断に十分な感度および検出効率が見られる可能性を示唆している。さらに、感染細胞内では actin 繊維先端に RickA を発現している *Rickettsia* 菌体が観察されることを報告している(コメットテイル構造物)。このことは抗 RickA 抗体による免疫染色と同時に、コメットテイル構造物が観察できれば、その特異性を高めることが見込まれる。

以上の理由により、本遺伝子が国内に存在する紅斑熱群リケッチア細菌で見出されるならば、有効な実験室診断 tool となりうると考えられた。

2) 国内分離株の RickA 遺伝子の塩基配列決定

2-1) RickA 遺伝子の塩基配列決定のため、ゲノムシーケンスが完了した紅斑熱群リケッチアの RickA 遺伝子の Multiple alignment を作成、保存領域を調

べ、PCR用 primer を以下のように作成した。

RickA F1: 5'-AATAAATTATTAGCACAAAGA-3'

RickA R7: 5'-TACTTACTATCTTTTGTAAC-3'

- 2-2) 死菌体より抽出したDNAを鋳型としPCRの条件設定を行った。使用した株は *Rickettsia japonica* FLA-1 株、*Haemaphysalis kitaokai* 分離の未同定 *Rickettsia* 株、および *Haemaphysalis longicornis* より分離された *Rickettsia marmionii* LON-2 株である。死菌体は大原研究所、藤田博己博士より分与を受けた。死菌体からのDNA抽出は Genomic DNA purification kit (Promega)を用い、添付仕様書に準じてDNA抽出精製を行った。PCR反応条件は 95°C(10秒)→50°C(30秒)→72°C(30秒)で30サイクル行った。PCR反応後、反応液は0.8% Agarose gel 電気泳動、EtBr染色にて電気泳動し、増幅産物を確認した。
- 2-3) 増幅産物の direct sequencing を行い、塩基配列の決定を行った。増幅DNAは High pure PCR product purification kit(Roche)にて精製後、増幅に使用した primer にて direct sequencing を行った。
- 2-4) 得られたDNA配列からアミノ酸配列を推定、抗 RickA 抗体作成のための一次情報とした。
- 2-5) *Rickettsia japonica* FLA-1 株 RickA 抗原のアミノ酸配列をもとにペプチド抗体を作成した。

結果と考察

増幅産物の direct sequencing により決定されたDNA配列をもとに、各リケッチア株のRickA抗原のアミノ酸配列を推定し結果を図2にまとめた。またFLA-1株RickA抗原のアミノ酸配列情報をもとに抗原部位予測解析を行い、複数の候補配列が得られた。このうち以下4配列についてペプチド抗体を作成した。抗

原部位予測解析、ペプチド合成、およびペプチド抗体作成はオペロンバイオテクノロジー社に依頼した。

配列1 (31-44) C+EIQNETKALEKEH

配列2 (112-125) C+NFKDLTKKDLKSKDQ

配列3 (178-191) C+ISENSNIRELKEIQ

配列4 (230-243) C+KNKESNTRTISKIE

2007年2月1日現在でペプチド抗体が完成しておらず、抗体の感度、特異性については来年度以降に明らかにする予定である。

近年のゲノム細菌学の発展により、本抗原遺伝子は紅斑熱群 *Rickettsia* 細菌に広く見出される可能性が示されている。このことは迅速診断のためのDNA検出法に応用可能である可能性を示唆している。また、本研究で明らかになった *Rickettsia japonica* FLA-2 株の RickA 遺伝子配列は *Rickettsia conorii*, *Rickettsia montanensis*, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia felis* の RickA 遺伝子と96%以上のhomologyが見出される一方、*Rickettsia bellii* との homology は80%台であり遺伝学的に variation が存在することが考えられた。このことは、国内で見出されるリケッチア細菌の検出されたDNA配列の系統解析、疫学調査に有用である可能性を示している。来年度の本研究においては、RickA 遺伝子 DNA断片を標的としたPCR法等のDNA検出法もあわせて開発を行う予定である。また *Rickettsia felis*, *Rickettsia bellii*、および *Rickettsia japonica* を含む *Rickettsia rickettsii* cluster 群では RickA もしくは RickA-homolog が見出されることから、Typhus 群リケッチアでは RickA 遺伝子が欠落した、と考えられた。本遺伝子もしくは本遺伝子近傍の領域の欠失により病態の差異が起っているか否かはリケッチア細菌の病原性を調べる上で極めて重要であると考えられた。

発表論文、著書

Rickettsia 属及び *Rickettsia* 属類縁の細菌感染症

1. Tabara K, Hoshina K, Itagaki A, Katayama T, Fujita H, Kadosaka T, Yano Y, Takada N, Kawabata H: Epidemiological study on Japanese spotted fever and scrub typhus in Shimane Prefecture, Japan. **Japanese Journal of Infectious Diseases**. 59 (3), 204-205, 2006.
2. Kawabata H, Ando S, Kishimoto T, Kurane I, Takano A, Nogami S, Fujita H, Tsurumi M, Nakamura N, Sato F, Takahashi M, Ushijima Y, Fukunaga M, Watanabe H: First detection of *Rickettsia* in soft-bodied ticks associated with seabird, Japan. **Microbiology and Immunology**. 50: 403-406, 2006.
3. Naitou H, Kawaguchi D, Nishimura Y, Inayoshi M, Kawamori F, Masuzawa T, Hiroi M, Kurashige H, Kawabata H, Fujita H, Ohashi N: Molecular Identification of *Ehrlichia* Species and 'Candidate Neoehrlichia mikurensis' from Ticks and Wild Rodents in Shizuoka and Nagano Prefectures, Japan. **Microbiology and Immunology**. 50: 45-51, 2006.

ダニ媒介性感染症

4. Botkin DJ, Abbott A, Stewart PE, Rosa PA, Kawabata H, Watanabe H, Norris SJ. Identification of potential virulence determinants by *Himar1* transposition of infectious *Borrelia burgdorferi* B31. **Infection and Immunity**. 74: 6690-6699, 2006
5. Saito-Ito A, Kasahara M, Kasai M, Dantrakool A, Kawai A, Fujita H, Yano Y, Kawabata H, Takada N. Survey of *Babesia microti* infection in field rodents in Japan: records of the Kobe-type in new foci and findings of a new type related to the Otsu-type. **Microbiology and Immunology**. 51(1):15-24, 2007.
6. Botkin DJ, Abbott A, Howell JK, Mosher M,

Stewart PE, Rosa PA, Kawabata H, Watanabe H, Norris SJ. Transposon Mutagenesis of Infectious *Borrelia burgdorferi* B31: a Pilot Study. In press.

7. 川端寛樹. 回帰熱(回帰熱ボレリア感染症)relapsing fever. ダニと新興再興感染症. SADI 組織委員会編. 全国農村教育協会. (印刷中)
8. 川端寛樹, 高崎智彦. 警戒すべきウイルス感染症「マダニが関わる出血熱と西ナイル熱」. ダニと新興再興感染症. SADI 組織委員会編. 全国農村教育協会. (印刷中)
9. 川端寛樹, 高野愛, 渡邊治雄: ライム病. 日本臨床 2007 増刊「新感染症学(下)」-新時代の基礎・臨床研究-(印刷中)
10. 川端寛樹: ライム病. 日常臨床に役立つ小児感染症マニュアル 2007. 日本小児感染症学会編. 233-243. 2006.
11. 川端寛樹: 節足動物媒介性感染症と媒介動物のインターフェイス: cutting edge. ダニ類研究班会報. 2006.

動物由来感染症

12. Masuzawa T, Okamoto Y, Une Y, Takeuchi T, K, Koizumi N, Kawabata H, Ohta S, Yoshikawa Y. Leptospirosis in human exposed to Southern flying squirrel (*Graecomys volans*) imported from USA to Japan. **Emerging Infectious Diseases**. 12(7), 1153-1155, 2006.
13. Kawabata H, Sakakibara S, Imai Y, Masuzawa T, Fujita H, Tsurumi M, Sato F, Takano A, Nogami S, Kaneda K, Watanabe H: First record of *Leptospira borgpetersenii* isolation in the Amami Islands, Japan. **Microbiology and Immunology**. 50: 429-434, 2006.
14. 増沢俊幸, 岡本能弘, 宇根有美, 竹内隆浩, 塚越啓子, 川端寛樹, 小泉信夫, 吉川泰弘. 輸入動物(アメリカモモンガ)に起因するレプトスピラ症感染事例. 獣医畜産新報. 59(4), 295-297, 2006.

学会発表

1. 石橋哲也, 千々和勝己, 山本正悟, 藤田博己, 片山丘, 古屋由美子, 田原研司, 御供田睦代, 大瀬戸光明, 荻野和正, 川端寛樹. 福岡県の紅斑熱患者発生地における媒介マダニの調査. リケッチア・クラミジア研究会. 2006年10月.
2. 近藤玲子, 大瀬戸光明, 稲荷公一, 豊嶋千俊, 市川高子, 井上博雄, 田原研司, 山本正悟, 御供田睦代, 古屋由美子, 藤田博己, 川端寛樹, 高野愛. 愛媛県の日本紅斑熱発生地域におけるマダニ類の *Rickettsia japonica* 保有状況. リケッチア・クラミジア研究会. 2006年10月.
3. 井上快, 丸山総一, 壁谷英則, 山田直樹, 佐藤雪太, 湯川真嘉, 大橋典男, 増沢俊幸, 川森文彦, 角坂照貴, 高田伸弘, 藤田博己, 小泉信夫, 川端寛樹. わが国の野生齧歯類における *Bartonella* 属菌の分布. 第14回 SADI(ダニと疾病のインターフェイスに関するセミナー). 2006年6月.
4. 川端寛樹, 齋藤幹, 小泉信夫, 藤田博己, 高野愛, 渡邊治雄. 海外での *Borrelia valaisiana* 近縁種感染によるライム病輸入例. 第14回 SADI(ダニと疾病のインターフェイスに関するセミナー). 2006年6月.
5. 高野愛, 新田芳樹, 角坂照貴, 藤田博己, 御供田睦代, 本田俊郎, 増沢俊幸, 河村好章, 江崎孝行, 渡邊治雄, 川端寛樹. 南西諸島における *Borrelia valaisiana* 近縁種の浸潤. 第14回 SADI(ダニと疾病のインターフェイスに関するセミナー). 2006年6月.
6. 田原研司, 保科 健, 新井 智, 辻 正義, 川端寛樹, 角坂照貴, 藤田博己, 矢野泰弘, 高田伸弘. 島根県下に生息する野ネズミからの *Babesia microti* SSU rRNA 遺伝子の検出. 日本衛生動物学会大会. 2006年4月.
7. 田原研司, 板垣朝夫, 藤田博己, 角坂照貴, 矢野泰弘, 高田伸弘, 川端寛樹. 島根県産アカネズミ寄生個体に基づくタヌキマダニ幼虫期確定. 日本衛生動物学会大会. 2006年4月.
8. 角坂照貴, 藤田博己, 後藤郁夫, 川端寛樹. 石垣島におけるカメキラマダニ幼虫の人体寄生例. 日本衛生動物学会大会. 2006年4月.