

japonica の塩基配列と一致した。

また、これら 4 例中 3 例はペア血清を用いた血清診断でも陽性であったが、残る 1 例は急性期 (6 病日) の血清しか入手できず、判定不能であった。さらに、4 例中 2 例について血液を用いた PCR を実施した結果、1 例のみが陽性を示した。

PCR 陽性例の痂皮は 6 病日から 9 病日にかけて採取されていた。また、テトラサイクリン系抗菌剤投与後に採取された痂皮 2 例においても PCR は陽性であった。

さらに、これら 4 例は、血清学的につつが虫病を否定され、PCR 法による痂皮からの *O. tsutsugamushi* の検出も陰性であった。

D. 考 察

つつが虫の報告数は、2001 年以降減少傾向を示し、特に 2005 年と 2006 年には 70 例台にまで減少した。しかし、2007 年から増加傾向にあり、今後、サーベイランス体制をさらに充実させる必要がある。

2008 年には、沖縄県衛生環境研究所や本研究班の関係者により沖縄県におけるつつが虫の存在が明らかにされた。今後、九州南部の島々を含めた地域における実態を明らかにすることが重要である。

九州地域の日本紅斑熱については、鹿児島県の大隅半島から宮崎県の南部に至る地域が従来から多発地域として知られていたが、2006 年以降の熊本県における患者数の増加が著しい。熊本県では、特に天草 (上島) に患者発生地が集中していることから、九州における日本紅斑熱の感染環を明らかにする上で、重要な地域と思われる。また、全国的に患者数が増加しており、日本紅斑熱についても、サーベイランス体制およびレファレンス体制の構築が望まれる。

現在、病原体分離法、血清診断法および血液を用いた PCR 法が、つつが虫病と日本紅斑熱の一般的な実験室診断法として実施

されている。これらの中で、病原体分離法は、(日本紅斑熱の場合には数日で結果を得られることもあるが) 通常結果を得られるまでに 1 週間から 1 ヶ月程度を要するため、早期診断には適していない。血清診断法では、IgM 抗体を分別測定することによって比較的早期に診断が可能であるが、10 病日以前に採取された血清では、抗体を検出できない場合が多い。また、血液を用いた PCR 法はこれらの方法の中で最も早期診断に適しているが、血液中の阻害因子の影響や、抗生物質投与により検出困難となることが知られている。

つつが虫の陰性例に日本紅斑熱であった 3 例 (患者番号 8020, 8026, 8030) を含めて血清診断法と比較した結果、今回実施したつつが虫の痂皮を用いた PCR 法の感度、特異度および一致率は、それぞれ 100% (13/13)、100% (6/6) および 100% (19/19) であった (表 4)。

韓国の Lee ら (J. Clin. Microbiol. 44:11169-1171, 2006)¹ と Kim ら (Clin. Infect. Dis. 43, 1296-1300, 2006) は、韓国内のつつが虫患者の痂皮を用いて PCR 法を実施し、本法がつつが虫の早期診断に適していることを報告している。韓国内と宮崎県内では、原因となる *O. tsutsugamushi* の血清型が異なっているが、血清型とは関係なく、刺口を用いた PCR 法が早期診断に有用なことが確認された。また、4 例ではあるが、実施できた全ての例で *R. japonica* を検出できたことから、本法は日本紅斑熱の早期診断法としても有用と思われる。

つつが虫の早期診断法として従来から実施されている血液を用いた PCR 法の感度、特異度および一致率は、刺口を用いた PCR 法と比較した場合、それぞれ 67% (8/12)、100% (3/3) および 100% (11/15) であった (表 5)。日本紅斑熱においても、血液では、感度が劣っていた。つつが虫病と日本紅斑熱

では、刺口の見つからない例もあることから、血液を材料としたPCR法についての検討も必要と思われる。

また、今回実施したPCR法は、結果が得られるまでに10時間程度を要するため、より短時間で結果の得られる方法の検討が必要である。

E. 結論

結論

1. 九州地域では、2007年から、つつが虫病の患者数が増加傾向にある。さらに2008年には、沖縄県衛生環境研究所や本研究班の関係者により沖縄県におけるつつが虫の存在が明らかになった。

また、2007年から、九州地域における日本紅斑熱の患者数も著しく増加し、2008年には38例に達し、全国の患者数の30%を占めた。特に熊本県の天草（上島）地区における患者数の増加が著しい。患者数の増加に加え、九州地域では新たな感染地も確認されてきており、今後の動向に注意する必要がある。

2. 刺口の痂皮を用いたPCR法が、つつが虫病と日本紅斑熱の早期診断法として有用なことが確認された。

課題

これまでの調査研究結果をふまえ、以下の課題が残されていることを明記したい。

1. 今後も、リケッチア症の九州地域における発生動向の把握に努め、公衆衛生上重要な情報を積極的に提供する必要がある。このため、サーベイランス体制の充実と、レファレンス体制の構築が必要である。

2. 九州におけるリケッチア症の感染環と感染リスクを明らかにするために、今後も野鼠等の病原体保有動物やベクター、環境要因等

の調査を継続が必要である。

3. つつが虫病あるいは日本紅斑熱による死亡例が報告された。両疾患ともに、抗菌剤による治療が可能で、早期発見早期治療が最も重要となっている。今後さらに、迅速で、特異性の高い検査法を開発する必要がある。

G. 研究発表

1. 学会発表

1) 山本正悟, 岩切章, 安藤秀二, 岸本壽男: 宮崎県南部における日本紅斑熱のベクター. 第82回日本感染症学会総会, 島根県松江市, 2008年4月17, 18日.

2) 山本正悟: 九州本土域にみる日本紅斑熱の発生と媒介マダニー広がる掘り起こし. 第60回日本衛生動物学会, 栃木県下野市, 2008年4月17~19日.

H. 知的財産権の出願・登録状況

- | | |
|-----------|------|
| 1. 特許取得 | 該当なし |
| 2. 実用新案登録 | 該当なし |
| 3. その他 | 該当なし |

図1 九州地域におけるつつが虫病患者の報告数

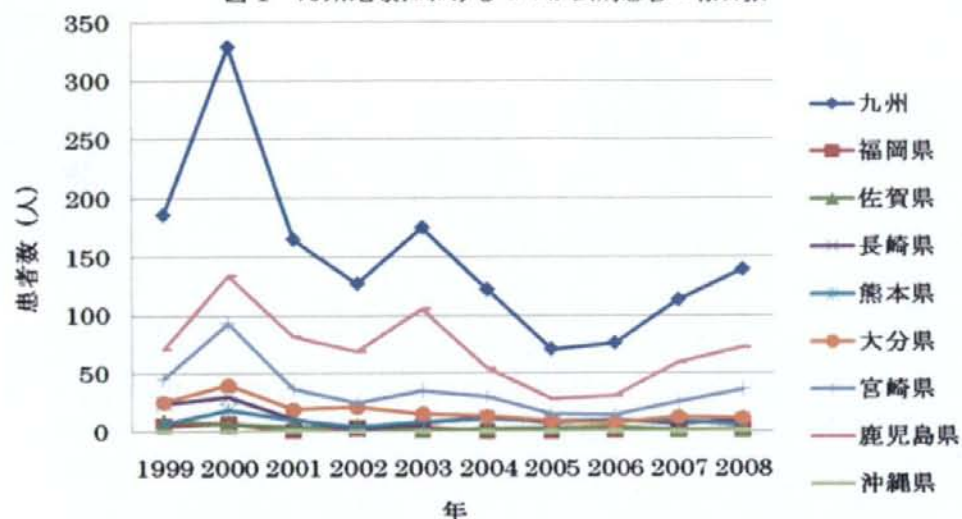


表1 九州地域におけるつつが虫病患者の報告数

	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
九州	186	329	165	127	175	122	71	76	113	199
福岡県	5	7	1	3	4	0	0	1	1	2
佐賀県	9	6	4	5	1	2	3	4	1	1
長崎県	24	30	11	1	7	12	7	10	6	10
熊本県	7	19	10	4	8	11	9	9	9	6
大分県	25	40	19	21	15	13	9	7	12	11
宮崎県	45	93	37	24	35	30	15	14	25	36
鹿児島県	71	134	82	69	105	54	28	31	59	72
沖縄県	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1

図2 九州地域における日本紅斑熱患者の報告数

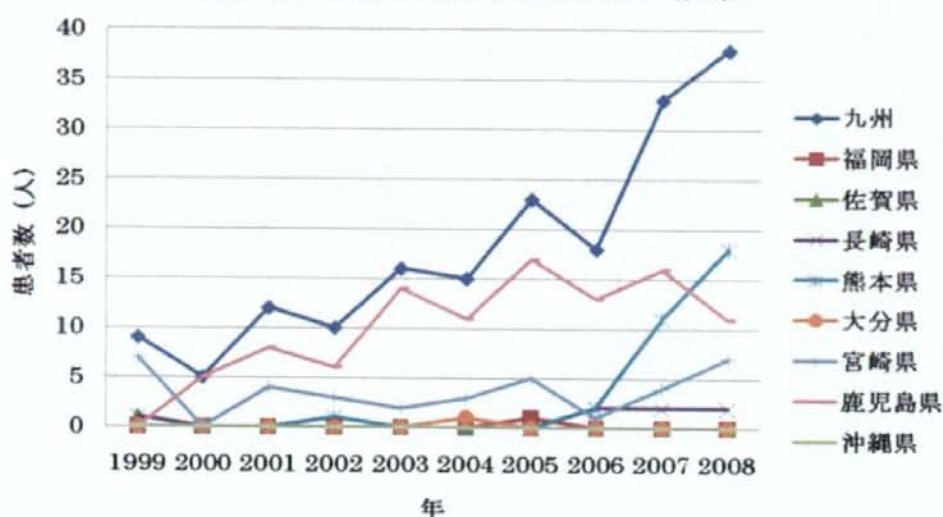


表2 九州地域における日本紅斑熱患者の報告数

	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
九州	9	5	12	10	16	15	23	18	33	38
福岡県	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
佐賀県	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
長崎県	1	0	0	0	0	0	0	2	2	2
熊本県	0	0	0	1	0	0	0	2	11	18
大分県	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
宮崎県	7	0	4	3	2	3	5	1	4	7
鹿児島県	0	5	8	6	14	11	17	13	16	11
沖縄県	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

表3 つつが虫病の血清診断および痲皮、血液を用いたPCRの比較

患者番号	血清診断		血清型	PCR					採取病日
	O _c ³	YH ²		痲皮			血液(白血球層)	血液(血餅)	
				O _t primer ³	R1/R2 ⁴	R5/RJ10 ⁵	O _t primer	O _t primer	
8040	+	-	Kawasaki	+	ND ⁶	ND	+		7
8045	+	-	Kawasaki	+	ND	ND	無 ⁷	+	5
8054	+	-	Kuroki	+	ND	ND	+		15
8066	+	-	Kawasaki	+	ND	ND	+		8
8067	+	-	Kawasaki	+	ND	ND	+		8
8068	IgM+	-	Kawasaki	+	ND	ND	+		不明
8070	IgM+	-	Kawasaki	+	ND	ND	無	-	17
8072	+	-	Kawasaki	+	ND	ND	無	-	3
8077	+	-	Kuroki	+	-	-	+		9
8078	IgM+	-	Kawasaki	+	-	-	無	無	4
8079	IgM+	-	Kawasaki	+	-	-	-		6
8081	+	-	Kawasaki	+	-	-	無	+	3
8083	IgM+	-	Kawasaki	+	-	-	無	-	12
8074	-	-		-	-	-	-		10
8082	-	-		-	-	-	無	-	44
8084	-	-		-	-	-	-		3

- 1): *Orientia tsutsugamushi* (Gilliam, Karp, Kato, Kawasaki, Kuroki strain)を抗原として、間接蛍光抗体法で実施した。
 2): *Rickettsia japonica* (YH strain)を抗原として、間接蛍光抗体法で実施した。
 3): 古屋らの方法により、*Orientia tsutsugamushi*の56kDa蛋白質遺伝子を標的としたPCRを実施した。
 4): 古屋らの方法により、リケッチア属の17kDa蛋白質遺伝子を標的としたPCRを実施した。
 5): 古屋らの方法により、*Rickettsia japonica*の17kDa蛋白質遺伝子を標的としたPCRを実施した。
 6): 実施せず
 7): 検体無し

表4 日本紅斑熱の血清診断および痲皮、血液を用いたPCRの比較

患者番号	血清診断		PCR							採取病日
	ペア血清		痲皮			血液(白血球層)		血液(血餅)		
	YH ²	O _c ³	R1/R2 ⁴	R5/RJ10 ⁵	O _t primer ³	R1/R2	R5/RJ10	R1/R2	R5/RJ10	
8014	判定不能		+	+	-	+	+	+	+	6
8020	+	-	+	+	-	-	-	ND ⁶		不明
8026	+	-	+	+	-	無 ⁷		-	-	9
8030	+	-	+	+	-	無		無		6

1), 2), 3), 4), 5), 6), 7): 表4に準じる

表5 痲皮を用いたPCRの評価

痲皮PCR	血清診断		計
	陽性	陰性	
陽性	13	0	13
陰性	0	6	6
計	13	6	19

血清診断に対する痲皮PCRの評価
 感度 13/13 100% (陽性一致率)
 特異度 6/6 100% (陰性一致率)
 一致率 19/19 100%

表6 血液を用いたPCRの評価

血液PCR	痲皮PCR		計
	陽性	陰性	
陽性	8	0	8
陰性	4	3	7
計	12	3	15

痲皮PCRに対する血液PCRの評価
 感度 8/12 100% (陽性一致率)
 特異度 3/3 100% (陰性一致率)
 一致率 11/15 100%

リケッチア症感染病理診断のためのペプチド抗体作成

研究分担者	川端寛樹	(国立感染症研究所・細菌第一部)
研究協力者	武藤麻紀, 高野愛, 渡邊治雄 藤田博己 安藤秀二, 花岡望, 坂田明子, 岸本壽男 海保郁男 及川陽三郎 玉熊桂子, 堤 寛	(国立感染症研究所・細菌第一部) (大原総合病院附属研究所) (国立感染症研究所・ウイルス第一部) (元 千葉県衛生研究所) (金沢医科大学) (藤田保健衛生大学)

研究要旨

紅斑熱リケッチア症に対する新規の早期診断ツール開発を目的として、病理診断に有用な抗体の作成、評価を行った。

1) ペプチド抗体の作成と評価:

作成が容易でかつ商業ベースで標準化が可能なペプチド抗体を、細胞表層に恒常的に発現していると考えられた RickA 抗原について *In silico* 解析によりエピトープとなりうる領域を選定、このうちの4配列についてペプチド抗体を作製した。この内、1種類(8476)が RickA 抗原を検出できることを Immunoblotting 法により示した。一方、H19年度の報告書にあるように、*Rickettsia japonica* 感染 L-929 細胞(ホルマリン固定)での染色性は、特異的な染色像は見いだされなかった。*R. japonica* 感染細胞では *R. conorii* で見られるようなコメット・テイル様細胞内移動像は見いだされないこと、さらに Balrajらは、RickA 抗原がアクチン重合による宿主細胞内移動に関与しないこと、*R. raoultii* で示している(PLoS One, 2008)。今後、本抗原の局在、および細胞外ドメインの再確認が必要であると考えられた。一方、近年ゲノム解析等により病理診断に有効と考えられる抗原候補が *In silico* 解析から見いだせること、また検査ツールとしての標準化作業の容易さから、今後もこれら新規抗原に対するペプチド抗体による同様のアプローチは有効であると考えられる。

2) モノクローナル抗体の評価:

海保らによって作成されたモノクローナル抗体について、その特異性についてウエスタンブロット法によって調べた。3YH2C6を除きいずれのモノクローナル抗体においても Immunoblotting による特異的な反応は見いだされなかった。3YH2C6はタンパク抗原を認識していると考えられたがその抗原同定にはいたらなかった。

A. 研究目的

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, L-929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, 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, 研究を行った。

B. 研究方法

抗 RickA-ペプチド抗体による *R. japonica* -RickA 抗原の検出(ウエスタンブロットング法)

実験室診断への応用が可能と考えられた RickA 遺伝子を候補として選択した。抗原として適切な部位の予測を行い, 以下 4 配列に対しペプチド抗体を作成した(括弧内は RickA 抗原内のアミノ酸配列の位置を示す)。

8475 (31-44) C+IEIQNETKALEKEH

8476 (112-125) C+NFKDLTKKDLKSKDQ

8477 (178-191) C+ISENSNIRELKEIQ

8478 (230-243) C+KNKESNTRTISKIE

これら抗体に対する反応抗原として, L-929細胞により増殖させた *R. japonica* YH株を用いた。*R. japonica* YH株の増殖は安藤秀二, 花岡望, 坂田明子氏によって行われた。対照としてL-929細胞を用いた。抗原 *Rickettsia* はL-929細胞で増殖させた後, 常法に従い集菌, 洗浄後, 10%中性ホルマリンにて不活化させ, 不活化菌体とした。対照となるL-929細胞は遠心集細胞を *Rickettsia*

細菌同様に不活化させL-929細胞浮遊液とした。

不活化菌体およびL-929細胞浮遊液は超音波破碎後, SDS-PAGE用可溶性緩衝液にて懸濁しウエスタンブロットング抗原とした。抗原濃度は吸光度(OD600)にてL-929細胞, 不活化菌体それぞれ 4.2×10^8 cells/ml (OD=0.42), 4.2×10^9 cells/ml (10倍希釈液OD=0.42) に調製し使用した。

ウエスタンブロットング法は常法で行った。抗RickA-ペプチド抗体は100倍希釈で用いた。また抗RickA-ペプチド抗体検出のための2次抗体にはHRP-conjugateされたanti-Rabbit IgGを用いた。

抗 *Rickettsia* モノクローナル抗体による *R. japonica* 抗原の検出(ウエスタンブロットング法)

元千葉県衛生研究所, 海保郁男先生より分与を受けた抗 *Rickettsia* モノクローナル抗体(マウス腹水)の *R. japonica* 全菌体抗原に対する反応性をウエスタンブロットング法で調べた。方法は常法に従って行った。また各モノクローナル抗体は希釈倍率を 50 倍で使用した。2次抗体には HRP-conjugate された Anti-Mouse IgA, IgG, IgM-mixtureを用いた。*Rickettsia* 抗原への反応がウエスタンブロットで見いだされた抗体については, 不活化全菌体の Proteinase K 処理を行い, 反応抗原がタンパク質か否かの確認を行った。

使用したモノクローナル抗体は以下の通りである(表1)。モノクローナル抗体 S3は *R. japonica* Aoki株接種BALB/cから得られたミエローマP3U1由来ハイブリドーマの培養上清である。YH株に対する抗体価は, 32倍とされている(Oikawa et al. Jpn J Med Sci Biol, 1993)。これら抗体は海保郁男氏, および及川陽三郎氏から分与を受けた。

表 1 本研究で使用したモノクローナル抗体の一覧

No.	抗体名		免疫抗原	Ig-subclass	IF Titer to <i>R. japonica</i> YH
1	7(2)YH1F12	/B9	<i>R. japonica</i> YH	IgG2a	>20480
2	7YH1G8	/F10	<i>R. japonica</i> YH	IgG2a	1280
3	1YH2A3		<i>R. japonica</i> YH	IgG2b	>20480
4	7YH1H3	/H10	<i>R. japonica</i> YH	IgG2b	>20480
5	8YH1A2	/G9	<i>R. japonica</i> YH	IgG2b	>20480
6	7YH1B2	/C1	<i>R. japonica</i> YH	IgG3	5120
7	9(2)YH1F10	/A10	<i>R. japonica</i> YH	IgG2b	>20480
8	7(2)YH1B7	/B11	<i>R. japonica</i> YH	IgG2a	>20480
9	3(2)YH2B10		<i>R. japonica</i> YH	IgG2b	10240
10	3(2)YH2C3		<i>R. japonica</i> YH	IgG2b	>20480
11	7(2)YH1E11	/E7	<i>R. japonica</i> YH	IgM	320
12	3YH2C6	/A8	<i>R. japonica</i> YH	IgG2a	>20480
15	9(2)YH1B3	/C6	<i>R. japonica</i> YH	IgM	>20480
16	3YH2D11		<i>R. japonica</i> YH	IgG3	2560
17	3YH2F5		<i>R. japonica</i> YH	IgG3	2560
18	S3		<i>R. japonica</i> Aoki	IgM	32

C. 研究結果 および D. 考察

抗 RickA-ペプチド抗体による *R. japonica* - RickA 抗原の検出

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、特に病理診断に有用な抗体の作成を試みた。検出抗原の候補として、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と考えられたリケッチア因子 RickA に着目した。これは RickA 抗原の N'-末端側が、細胞表層にディスプレイされることが示されているためである。本 RickA 抗原に対し、まず *R. japonica* FLA-1 株の RickA 5'末端の G-actin 結合部位と目される領域を含む約 800bp の塩基配列を direct sequencing により決定した。ついで抗原として適切な部位の予測を行い、4 配列を抗ペプチド抗体作成候補抗原として選出後これら合成ペプチドに対して抗ペプチド抗体を作成した。これら抗ペプチド抗体の反応性をウエスタンブロット法により調べ、RickA 抗原が *R. japonica* で発現していること、また抗 NFKDLTKKDLKSKDQ 抗体が RickA 抗原を認識していることを確認した(図 1)。

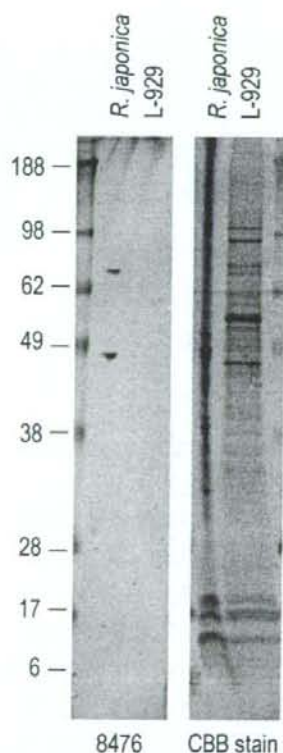


図 1. 抗 RickA 抗体(抗 NFKDLTKKDLKSKDQ 抗体)の *R. japonica* に対する反応性

一方、H19年度の報告書にあるように、*R. japonica* 感染 L-929 細胞(ホルマリン固定)での染色性は、特異的な染色像を示さなかった(図2)。

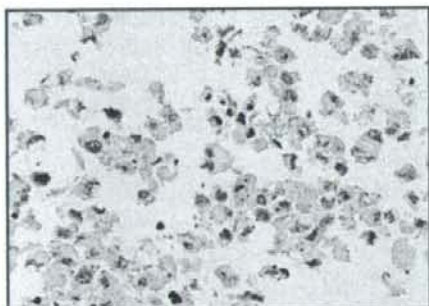


図2.抗 NFKDLTKKDLKSKDQ 抗体による *R. japonica* 感染細胞の免疫染色像(玉熊、堤による、H19年度報告書より再掲)

*R. conorii*で見られるようなコメット・テイル様細胞内移動像は *R. japonica*では見いだされないこと、さらにBalrajらはRickA抗原はアクチン重合による宿主細胞内移動に関与しないことを *R. raoultii*で示している(PLoS One, 2008)。今後、本抗原の局在、および細胞外ドメインの再確認が必要であると考えられた。

抗 *Rickettsia* モノクローナル抗体による *R. japonica* 抗原の検出

1) Dot blottingによる抗 *R. japonica* モノクローナル抗体希釈倍率の決定

S3を除く17抗体について希釈倍率を検討した。蛍光抗体法による希釈倍率を基準とし、その約10倍濃度を一時的に用いた結果、7(2)YH1E11を除くすべての抗体で反応は見いだされなかった。次いで抗体希釈倍率を一律50倍希釈とし、その反応性を検討した結果、すべての抗体でdot抗原量に比例した反応が見られた。そこで以下実験においては、モノクローナル抗体希釈倍率

を50倍とし実験を行った(図3)。

2) ウエスタンブロット法による抗 *R. japonica* モノクローナルの反応性

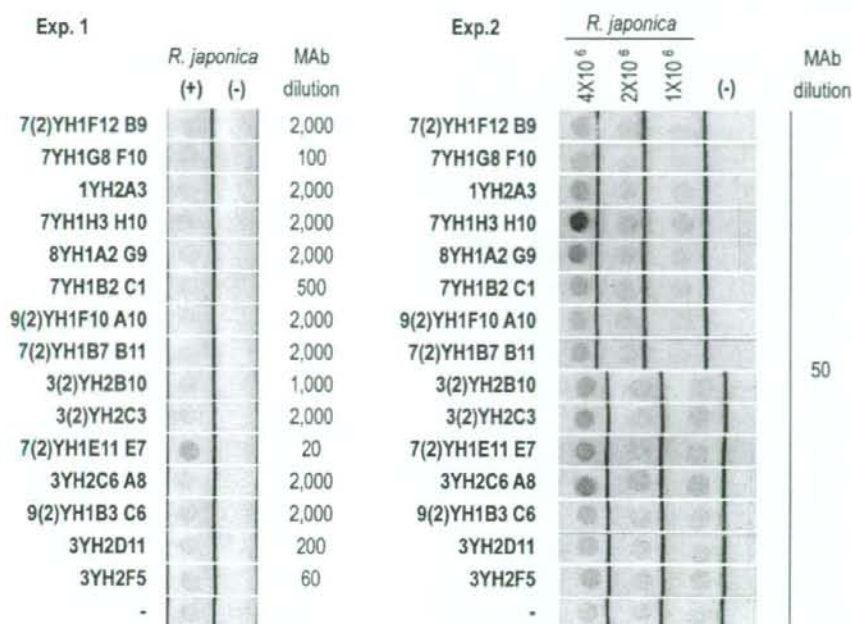
17抗体の内、比較的抗体価が高いと考えられた15抗体についてウエスタンブロット法によるImmunoblotを行った。3YH2C6について、約30-35kDa付近に反応バンドが見いだされた。一方他の抗体では、*R. japonica*特異的と考えられる反応抗原は見いだせなかった。また一部抗体については、*Rickettsia*非感染のL-929細胞に反応抗原が見られたことから、これら抗体については、L-929細胞への交差反応、もしくはL-929細胞抗原に対する反応抗体である可能性が考えられた(図4)。

3) 3YH2C6抗体の反応抗原の推定

*R. japonica*への反応が見られたモノクローナル抗体3YH2C6について、その反応抗原の推定を行った。結果を図5に示す。対照としてS3を用い、ウエスタンブロットを行い、約30kDaの反応抗原が検出された。一方でProteinaseK処理後では反応抗原は消失した(図6)ことから本抗体の反応抗原は約30kDaのタンパク質抗原であると考えられた。しかしながらその反応性は極めて弱く、反応抗原の同定にはいたらなかった。

E. 結論

病原体診断ツールとしての、抗ペプチド抗体、モノクローナル抗体の評価を行った。標準化が容易であることから、病理診断用の抗体作製法として有効であると考えられる一方、RickA抗原以外のタンパク質抗原を標的とした抗原検出方法などについて今後検討する必要がある。国内に存在するモノクローナル抗体についてその評価を行ったが、S3を除くモノクローナル抗体の性能については今後さらなる検討が必要であろう。



Anti-Mouse Ig A,M,G mixture, 1,000-fold dilution

図3. Dot blottingによる抗*R. japonica*モノクローナル抗体希釈倍率の決定。Exp.1では*R. japonica*抗原量は4X10⁶ cell相当量をspotした。Exp.2ではdotした菌数を段階希釈してspotした。

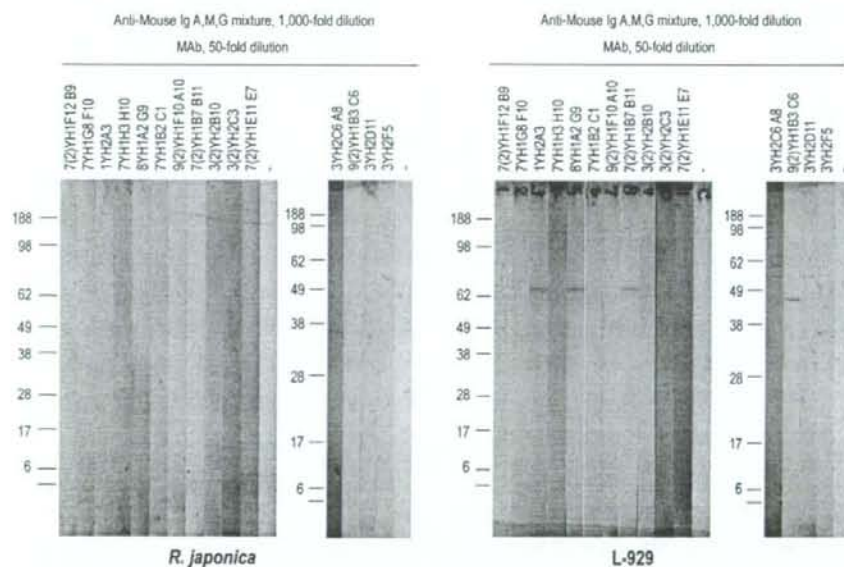


図4. ウェスタンブロット法による抗*R. japonica*モノクローナルの反応性

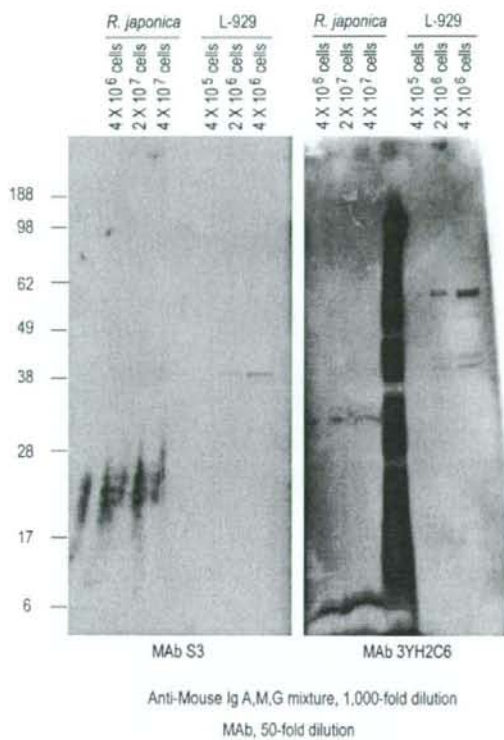


図5.モノクローナル抗体3YHC6の反応性。S3はLPS様抗原に反応する陽性対照として用いた。

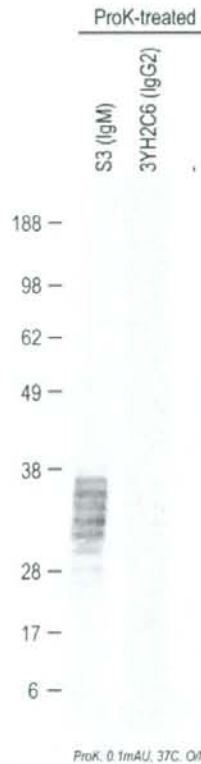


図6. Proteinase K処理後の*R. japonica*に対するモノクローナル抗体(S3および3YH2C6)の反応性

G. 研究発表

発表論文、著書

1. Takano A, Ando S, Kishimoto T, Fujita H, Kadosaka T, Nitta Y, Kawabata H, Watanabe H. Novel *Ehrlichia* sp. found in *Ixodes granulatus* infested to rodents in Okinawa, Japan. **Microbiology and Immunology**. (In press) DOI: 10.1111/j.1348-0421.2008.00093.x
2. Hanaoka N, Sakata A, Takano A, Kawabata H, Watanabe H, Kurane I, Kishimoto T, Ando S. Development of a pUC19-based recombinant plasmid to serve as a positive control in PCR for *Orientia tsutsugamushi*. **Microbiology Immunology**. (Accepted)
3. Takada N, Fujita H, Kawabata H, Ando S, Sakata A, Takano A, Chaithong U. *Rickettsia japonica* in Thailand. **Emerging Infectious Diseases**. (In press)
4. Sato H, Takano A, Kawabata H, Une Y, Watanabe H, Mukhtar MM. Trypanosoma cf. varani in an imported ball python (*Python regnus*) from Ghana. **Journal of Parasitology**. 2009. (In press)
5. Fujita H, Kadosaka T, Nitta Y, Ando S, Takano A, Watanabe H, Kawabata H. Isolation of *Rickettsia* sp. from *Ixodes granulatus*, Japan. **Emerging Infectious Diseases** 14: 1963-1965, 2008.

6. Inoue K, Maruyama S, Kabeya H, Yamada N, Ohashi N, Sato Y, Yukawa M, Masuzawa T, Kawamori F, Kadosaka T, Takada N, Fujita H, Kawabata H: Prevalence and genetic diversity of *Bartonella* species isolated from wild rodents in Japan. *Applied Environmental Microbiology*. 74: 5086-5092, 2008.
7. Ato M, Ikebe T, Kawabata H, Takemori T, Watanabe H. Incompetence of Neutrophils to Invasive Group A streptococcus Is Attributed to Induction of Plural Virulence Factors by Dysfunction of a Regulator. *PLoS ONE*. 3: e3455. 2008.

学会発表

1. 高野 愛, 藤田博己, 安藤秀二, 川端寛樹, 渡邊治雄. 野生鳥類を主とした国内生態系におけるボレリアの存在様式と病原体拡散に関するリスクの検討. 第 82 回日本細菌学会総会. 2009 年 3 月. 愛知.
2. 大橋典男, 鳥日図, 高蛙, 川森文彦, 高野愛, 川端寛樹, 安藤秀二, 岸本壽男. 国内初の新興感染症「アナプラズマ症」について. 第 82 回日本細菌学会総会. 2009 年 3 月. 愛知.
3. 井上 快, 壁谷英則, 川端寛樹, 宇根有美, 吉川泰弘, 丸山総一. 小型哺乳類を自然宿主とする病原性 *Bartonella* 属菌の生態に関する研究. 第 147 回日本獣医学会学術集会. 2009 年 3 月. 栃木.
4. 岡田玲奈, 木花いづみ, 武藤麻紀, 高野愛, 川端寛樹, 渡邊治雄. ライム病にの一例. 第 823 回日本皮膚科学会東京地方会. 2009 年 1 月. 神奈川.
5. 川端寛樹, 高野 愛, 渡邊治雄. 実験室内に病原体の姿を探る. 第 63 回日本衛生動物学会西日本支部大会(教育講演). 2008 年 11 月. 神戸.
6. 大橋典男, 高蛙, 鳥日図, 川森文彦, 干屋誠造, 安藤秀二, 川端寛樹, 岸本壽男. 新興感染症「アナプラズマ症」患者の発見. 第 26 回日本クラミジア研究会・第 15 回リケッチア研究会合同学術集会. 2008 年 11 月. 岐阜.
7. 安藤秀二, 坂田明子, 宇根有美, 五箇公一, 藤田博己, 花岡 希, 高野 愛, 川端寛樹, 岸本壽男. 輸入爬虫類が病原体を持ち込むリスクに関する考察. 第 26 回日本クラミジア研究会・第 15 回リケッチア研究会合同学術集会. 2008 年 11 月. 岐阜.
8. 岸本壽男, 安藤秀二, 猪熊壽, 岩崎博道, 大橋典男, 岡部信彦, 川端寛樹, 倉田毅, 高田伸弘, 堤寛, 田原研司, 藤田博己, 古屋由美子, 山本正吾. リケッチア感染症の早期警鐘システム構築-国内実態調査及び早期診断体制の確立に向けた現状と課題. 第 26 回日本クラミジア研究会・第 15 回リケッチア研究会合同学術集会. 2008 年 11 月. 岐阜.
9. 安藤秀二, 坂田明子, 鶴見みや古, 尾崎清明, 藤田博己, 花岡希, 高野 愛, 川端寛樹, 渡邊治雄, 岸本壽男. 鳥類に関連するマダニ類からのリケッチアの検出. 第 146 回日本獣医学会学術集会. 2008 年 9 月. 宮崎.
10. 高野 愛, 鶴見みや古, 尾崎清明, 藤田博己, 安藤秀二, 川端寛樹, 渡邊治雄. 野生鳥類を主とした国内生態系におけるボレリアの存在様式と病原体拡散に関するリスクの検討. 第 146 回日本獣医学会学術集会. 2008 年 9 月. 宮崎.
11. 森 亜紀奈, 今内 覚, 山田慎二, 今村彩貴, 伊東拓也, 川端寛樹, 小沼 操, 大橋 和彦. シュルツェマダニ (*Ixodes persulcatus*) 唾液腺由来免疫抑制因子の同定および発現解析. 第 146 回日本獣医学会学術集会. 2008 年 9 月. 宮崎.
12. 下長根藍, 井上 快, 壁谷英則, 川端寛樹, 高田伸弘, 林谷秀樹, 丸山総一. わが国の野鼠における *Yersinia enterocolitica* の保有状況と分離株の *gyrB* 遺伝子系統解析. 第 146 回日本獣医学会学術集会. 2008 年 9

- 月、宮崎。
13. 鶴見みや古, 尾崎清明, 藤田博己, 坂田明子, 武藤麻紀, 高野愛, 山内健生, 川端寛樹, 安藤秀二, 岸本壽男. 鳥類外部寄生虫からの病原体の検出—鳥類標識調査を主とした外部寄生虫採集—. 日本鳥学会 2008 年度大会, 2008 年 9 月, 東京.
 14. 藤田博己, 安藤秀二, 川端寛樹, 坂田明子, 高野 愛. 福島県のハシブトマダニとタネガタマダニからのリケッチア分離例. 第 60 回日本衛生動物学会大会, 2008 年 4 月, 栃木.
 15. 本田俊郎, 藤田博己, 藏元強, 御供田睦代, 角坂照貴, 高田伸弘, 矢野泰弘, 川端寛樹, 高野 愛, 山本正悟, 田原研司, 及川陽三郎. 鹿児島県トカラ列島のマダニ相とマダニ保有病原体の調査. 第 60 回日本衛生動物学会大会, 2008 年 4 月, 栃木.
 16. 本田俊郎, 角坂照貴, 川端寛樹, 高野 愛, 藤田博己, 藏元強, 御供田睦代, 高田伸弘, 矢野泰弘, 山本正悟, 田原研司, 及川陽三郎. 鹿児島県トカラ列島の野鼠類と野鼠保有病原体の調査. 第 60 回日本衛生動物学会大会, 2008 年 4 月, 栃木.
 17. 川端寛樹, 坂田明子, 安藤秀二, 高野 愛, 渡辺治雄, 鶴見みや古, 尾崎清明, 藤田博己. 国内生態系における *Borrelia* 属細菌の拡散に関する宿主鳥類と媒介マダニ. 第 60 回日本衛生動物学会大会, 2008 年 4 月, 栃木.
 18. 川端寛樹, 高野 愛, 安藤秀二, 花岡希, 坂田明子, 藤田博己, 河村好章, 清島真理子, 角坂照貴, 渡辺治雄. マダニ刺咬例調査によって見いだされた新しいボレリア感染症. 第 82 回日本感染症学会総会 2008 年 4 月, 島根.
 19. 田原研司, 藤田博己, 新井 智, 矢野泰弘, 高田伸弘, 片山 丘, 川端寛樹, 島根県におけるダニ媒介性感染症の実態と病原体

の浸淫状況. 第 82 回日本感染症学会総会 2008 年 4 月, 島根

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

日本紅斑熱の病理診断法の確立

研究分担者

堤 寛

藤田保健衛生大学医学部 第一病理学

研究協力者

玉熊桂子

藤田保健衛生大学医学部 第一病理学

稲田健一

藤田保健衛生大学医学部 第一病理学

宮本和昭

和歌山医科大学 微生物学講座

奥野祥治

和歌山医科大学 医薬品探索講座

宇都宮洋才

和歌山医科大学医学部 医薬品探索講座

馬原文彦

馬原医院, 藤田保健衛生大学医学部客員教授

花岡 希

国立感染症研究所 ウイルス第一部

安藤秀二

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

藤田博己

大原総合病院附属大原研究所

研究要旨

日本紅斑熱の早期診断法として、皮膚生検（刺し口、皮疹部）のホルマリン固定パラフィン切片による酵素抗体法と Real-time PCR 法の有用性を確認し、ヒト症例へ応用した。両法を併用することにより、診断の有用性が確実に高まった。現在、*in situ* hybridization 法をあらたに開発中である。また、日本紅斑熱の剖検例の Real-time PCR 解析で、諸臓器のパラフィン切片から日本紅斑熱リケッチア DNA が同定された。ヌードマウスを用いた感染実験では、日本紅斑熱リケッチア 4 株を皮下ならびに腹腔投与して観察したが、マウスに対する本菌の病原性は証明されなかった。

A. 研究目的

マダニ媒介性の日本紅斑熱は毎年症例数が増加し、ときに死亡者が報告される重症感染症であり、公衆衛生学上の対策としての早期診断の重要性が高まってきている。

本研究では、日本紅斑熱の早期診断のための方法論として、病理診断法の確立をめざすとともに、重症死亡例の病理学的病態解析を行った。さらに、人畜共通感染症としての日本紅斑熱の可能性を証明にする目的で、ヌードマウスを用いた感染実験を施行し、病態解析を試みた。

本研究の軸は以下の 4 点である。(1) 皮膚生検のホルマリン固定パラフィン切片を用いた酵素抗体法と Real-time PCR 法による日本紅斑熱の早期診断

(2) *in situ* hybridization 法による日本紅斑熱の新規病理診断法の確立

(3) ヒト日本紅斑熱剖検例を用いた病理学的病態解析

(4) ヌードマウス感染実験による日本紅斑熱の人畜共通感染症としての意義ならびに株間における病原性の違いの解析

B. 研究方法

(1-1) 皮膚生検のホルマリン固定パラフィン切片を利用した酵素抗体法：

酵素抗体法については、すでに加熱処理を利用した染色条件を確立している（平成 18 年度報告）。一次抗体は紅斑熱群リケッチアに広く反応するモノクローナル抗体 2 種（S3、X1）で、切片の加熱処理後にアミノ酸ポリマー法を適応する。この方法は、紅斑熱群リケッチア感染症の病理診断に継続的に応用されている。

(1-2) 紅斑熱グルーブリケッチア DNA の real-time PCR による検出:

酵素抗体法と同様、ホルマリン固定パラフィン切片から抽出した DNA を利用した Real-time PCR 法についても、ルーチンワークとして継続的に行った。本年度から、*glt-A* に対する SYBR-Green 法に加えて、MGB probe Real-time PCR 法を取り入れて、日本紅斑熱リケッチア DNA の標準化を検討した。さらに、尿検体からリケッチア DNA が検出されたことから、病態によっては、尿からの病原体ゲノムの検出が有用である可能性が示され、今後の重要な検討課題となった。

(2) in situ hybridization 法による新規病理診断法の確立:

国立感染症研究所の花岡希博士からいただいた日本紅斑熱リケッチアの ORF 配列情報をもとに、FITC 標識オリゴプローブを合成した。検出系は CSA II 法 (超高感度検出系) を介した DAB 発色とした。

染色手順は以下の通りである。

1. 脱パラフィン
2. DEPC 水洗浄
3. 内因性ペルオキシダーゼ阻止
4. Proteinase K 処理
5. DEPC 水洗浄→95%エタノール
7. Probe 反応、overnight 37°C
8. SSC→TBS 洗浄
9. 家兎 Anti-FITC/HRP、室温 60 分
10. TBST→TBS 洗浄
11. FITC-tyramide 増幅、室温 30 分
12. TBST→TBS 洗浄
13. 家兎 Anti-FITC/HRP、室温 40 分
14. TBST→TBS 洗浄
15. DAB 発色、室温 5 分
16. ヘマトキシリン核染
17. 脱水、透徹、封入

(3) 日本紅斑熱の剖検例の解析:

36 年前に剖検された日本紅斑熱疑い症例 (徳島大学例) が再発掘された。酵素抗体法 (S3, XI 抗体) で血管内皮細胞に一致した紅斑熱群リケッチア抗原の顆粒状陽性像を認めた。今回、この古い剖検症例のパラフィン切片から抽出した DNA を対象に Real-time PCR 法をおこない、以下の 2 種の方法によってリケッチア DNA が検出された。Taq Man MGB probe 法は日本紅斑熱に特異的に反

応する。SYBR-Green 法は紅斑熱群リケッチア全体を認識する。

(4) ヌードマウスを用いた感染実験による日本紅斑熱の病態解析:

生後 7 週齢のヌードマウス、オス Balb/c-nu/nu に、日本紅斑熱リケッチア 4 株 (Aoki, Tsuneishi, Katayama, Mori-B) を皮下投与群と腹腔投与群に分けて、 2×10^5 pfu 投与した。リケッチアを投与しない皮下投与群と腹腔投与群をコントロールとした。固形飼料と水は自由摂取とした。毎日、体温測定と体重測定を行った。投与第 9 日目に安楽死のもと、諸臓器をホルマリン固定し、形態観察と real-time PCR 解析をおこなった。

C. 研究結果 ならびに D. 考察

(1) 皮膚生検のホルマリン固定パラフィン切片による酵素抗体法と real-time PCR 法による日本紅斑熱の早期診断:

成績を表 1 に示す。一般実験室 (検査室) で安心して試料を取り扱えるようなバイオハザード対策と、将来における広範囲応用を意図して、対象はあえて、ホルマリン固定パラフィン切片とした。一般的に血液検体などで検討対象とされる新鮮材料に比して、感度や特異性に関する慎重な検討を要するが、とくに偽陰性をいかに減らすかが、今後の大きな課題といえよう。

免疫染色と Real-time PCR 法を比較すると、免疫染色のほうが 62%と陽性率は高かった。ただし、皮膚生検サンプルの状態 (乾燥検体、痂皮検体) によっては、免疫染色での診断は不適となる。この際、real-time PCR 法のみ陽性となる場合が経験された。したがって、両法併用の必要性和有用性がよく示唆された。

免疫染色に用いたモノクローナル抗体 2 種は紅斑熱群リケッチアに広く交差反応するため、この陽性像のみでは、日本紅斑熱と断定はできないものの、日本におけるリケッチア性紅斑熱の頻度・分布 (大部分が日本紅斑熱) と治療的視点 (治療法に根本的な違いがない) から、免疫染色の実用性は十分に証明されたと考えられる。今後、日本紅斑熱リケッチアに特異性の高い抗体

パネルの開発を含め、さらに検討を加える予定である。

Real-time PCR の 2 つの方法論間の比較では、SYBR-Green 法と MGB probe 法のどちらか一方のみが陽性になる例が少なくなかったため、今後さらに、高感度証明技法に工夫・検討を要すると思われた。

なお、皮膚生検サンプル以外からも real-time PCR 法によるリケッチア DNA 検出が可能となった。尿 DNA からリケッチア DNA が陽性となる可能性が示唆された。

本研究の対象がホルマリン固定材料であることを克服する点は、病理学的に非常に重要性・必要性が高い。今後とも、病理学的視点に立った検討を進めてゆきたい。

(2) *in situ* hybridization 法による日本紅斑熱の新規病理診断法:

in situ hybridization 法に関して、まず感染培養を用いて基礎的な検討を加えた。日本紅斑熱リケッチアの ORF に対するオリゴプローブを作製した(表 2)。日本紅斑熱リケッチア感染 L 細胞(ホルマリン固定パラフィン切片利用)の細胞質に顆粒状茶褐色の陽性反応が確認された(図 1)。今後、臨床サンプルへ応用するためには、高感度 LNA プローブを作製して、さらに感度を増幅させる必要がある。発現量の多い 16S RNA に対するプローブも合成して検討する予定である。

(3) 日本紅斑熱の剖検例の解析:

36 年前の剖検例に対する免疫染色で、肝臓、脾臓、腎臓、唾液腺、精巣、回腸の血管内皮細胞における顆粒状陽性像がすでに確認されていた。精巣の陽性像を図 2 に示す。今回、これらの臓器のホルマリン固定パラフィン切片から Real-time PCR 法によってリケッチア DNA の検出を試みた。結果を表 3 に示す。日本紅斑熱リケッチアに反応する MGB probe 法では、精巣に陽性、紅斑熱群リケッチアに反応する SYBR-Green 法では、唾液腺に陽性の所見が得られた。比較的体温の低い表面臓器から陽性が得られたこと、36 年前の剖検例のパラフィン切片から日本紅斑熱リケッチア DNA 断片を同定し得たことから、この病理学的ツールの有用性が示唆された。今後、剖検例の蓄積お

よび動物の感染モデルの成功を待って、さらに慎重に検討してゆく予定である。

(4) ヌードマウスを用いた日本紅斑熱リケッチアの感染実験:

感染実験では、日本紅斑熱リケッチア 4 株(L 細胞継代)を大量投与(皮下ならびに腹腔内)したが、マウスの死亡例はなかった。投与後の体重減少は、陰性対照を含む全個体で観察された。体温は、投与後に 2~3°C の低下を示した。その後、投与前とほぼ同温度まで増加したものの、高体温は観察されなかった。株による差異もみられなかった。図 3 に脾臓と肝臓の代表的な HE 染色所見を示す。脾臓に明らかな異常所見は得られなかったが、肝臓には軽微な炎症巣が認められた。表 4 に、Real-time PCR 法によるリケッチア DNA の検索結果をまとめた。各臓器から日本紅斑熱リケッチア DNA は検出されなかった。陰性結果は、組織学的所見とよく対応していた。

前年度に行ったヌードマウス感染実験(Katayama 株使用)と比較すると、感染死個体がなかった点は共通だったが、今回は肝臓および脾臓にリケッチア DNA が証明され、組織学的にマクロファージの集簇巣が観察された点と対照的だった。今回のヌードマウス感染実験(投与経路=皮下および腹腔内、投与株=5 株、投与量=前回以上に大量、観察期間=9 日で前回より短い)では、残念ながら、諸臓器からリケッチアゲノムの証明ができず、形態学的にも異常所見に乏しかった。感染性に関する厳密な意味での再現性は得られなかったが、少なくともマウスに対する病原性はほとんどない(ヌードマウスを利用しても感染が成立しない)と結論してかまわないだろう。

当初の感染実験で、イヌ(ビーグル犬 2 頭)に対する病原性も否定的だった。今後、モルモットなど他の動物種を使った感染実験を追加する予定である。

なお、いずれの感染実験でも、日本紅斑熱リケッチア抗体価の上昇は、各個体ごとに確認された。

E. 結論

紅斑熱群リケッチア感染症の早期確定診断に病理学的診断ツールが有用であること

が示された。今後、再現性と感度のより高い方法論の確立とその臨床応用が切望される。日本紅斑熱の死亡例の病理学的解析は、重症化の機序を知るための必須の手段であると思慮された。ヌードマウスを用いた感染実験は成立しなかったため、本リケッチア症が人畜共通感染症とは確定できなかった。

PCR analysis and immunohistochemistry. 5th ESCAR/ASR. 2008 May, France

2) 玉熊桂子, 稲田健一, 堤 寛, 宮本和昭, 宇都宮洋才, 秋本茂, 馬原文彦. 皮膚生検標本からの日本紅斑熱リケッチアの検出: 免疫染色と Real-time PCR 法の比較検討. 日本衛生動物学会西日本支部会. 2008、神戸

G. 研究発表

学会発表

1) TAMAKUMA K, TAKEDA K, MIYAMOTO K, INADA K, UTSUNOMIYA H, FUJITA H, MAHARA F, TSUTSUMI Y. Quick diagnosis of Japanese spotted fever using formalin-fixed, paraffin-embedded skin biopsy specimens: Comparison between real-time

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

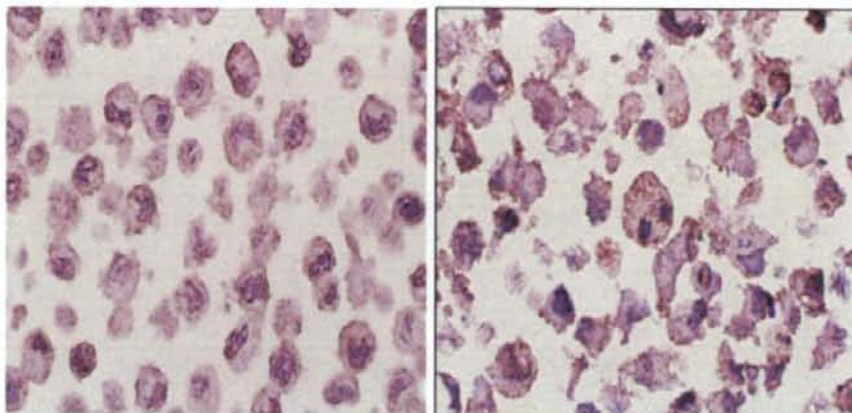
表 1. 日本紅斑熱患者の酵素抗体法と Real-time PCR 法の結果比較

Positive (%)	免疫染色	Real-time PCR	日本紅斑熱	紅斑熱グループ
Skin	18/29 (62.0)	12/29 (41.3)	6/29 (20.6)	6/29 (20.6)
Urine	-	1/7 (0.14)	0/7	1/7 (0.14)
Stool	-	0/1	0/1	0/1

陽性数/総数

表 2. *in situ* hybridization 法の標識プローブ

Probe		label	bp	
<i>R. japonica</i> (ORF)	oligo	FITC	85	DNA



Non-infected cells

R. japonica-infected (Katayama)
L cells

図1. *in situ* hybridization 法によるリケッチアの証明 (左=陰性対照)

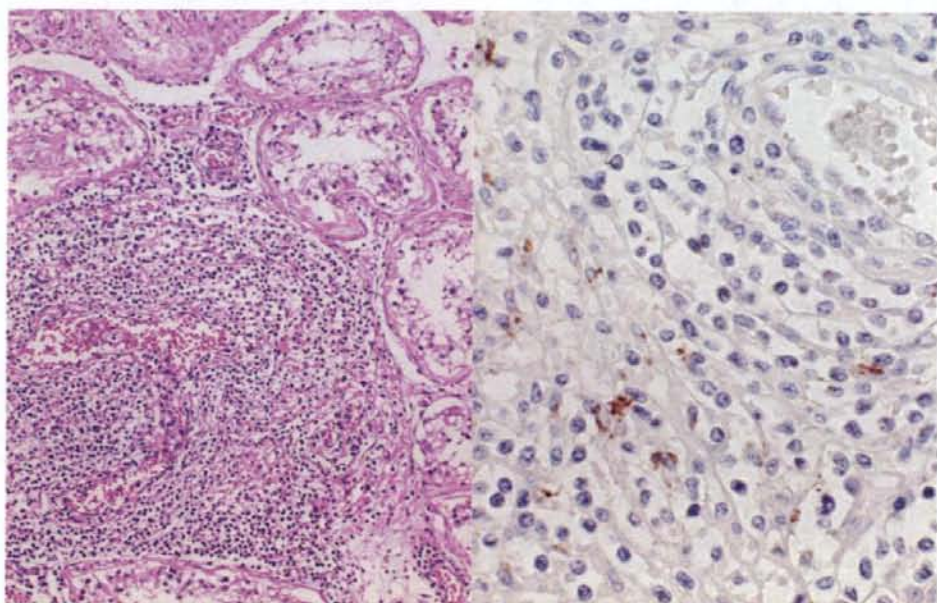


図2. 日本紅斑熱剖検例の精巣 (左: H&E、右: S3 抗体による免疫染色)
～炎症のある血管内皮細胞の細胞質に顆粒状にリケッチア抗原が陽性～

表3. Real-time PCR 法による剖検例サンプルのリケッチア DNA の解析結果

	日本紅斑熱リケッチア特異的配列 MGB probe 法	紅斑熱群リケッチア共通配列 SYBR-green 法
唾液腺	-	+
肝臓	-	-
脾臓	-	-
腎臓	-	-
精巣	+	-
リンパ節	-	-

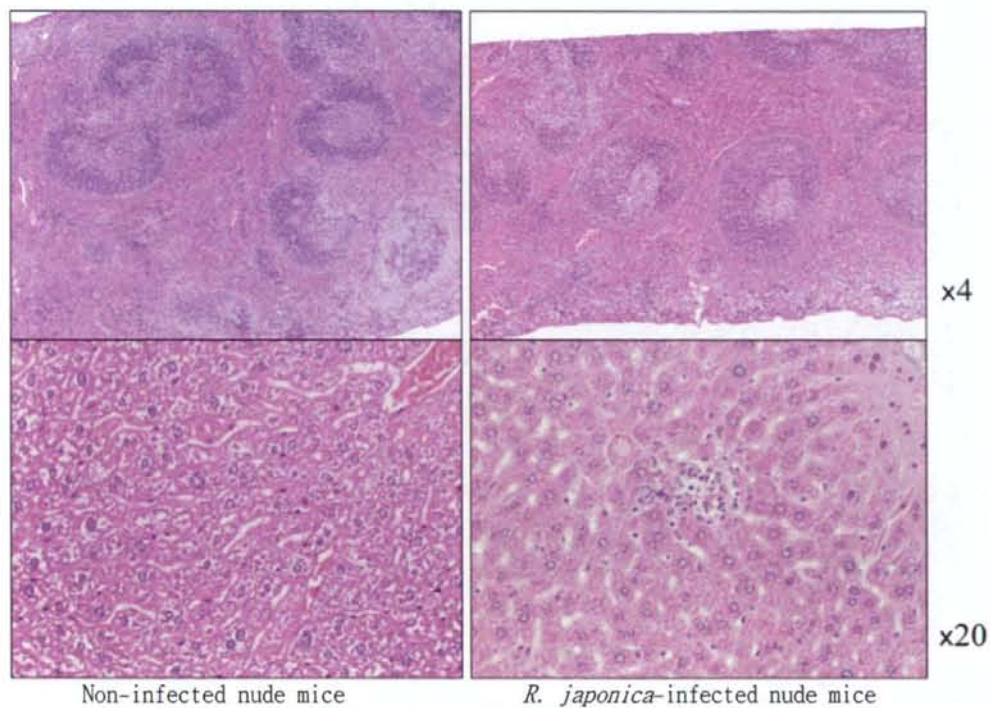


図3. 感染ヌードマウスの組織像 (H&E) : 脾臓 (上) と肝臓 (下)

表4. 感染ヌードマウスにおけるリケッチア DNA の証明 (Real-time PCR 法)

ヌードマウス											
DNA	Primer	Mori-B		Tsuneishi		Katayama		Aoki		Ctrl	
		皮下	腹腔	皮下	腹腔	皮下	腹腔	皮下	腹腔	皮下	腹腔
唾液腺	<i>Rj</i>	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	SFG	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
肝臓	<i>Rj</i>	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	SFG	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
脾臓	<i>Rj</i>	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	SFG	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
精巣	<i>Rj</i>	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	SFG	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	1?/5
尿	<i>Rj</i>	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	SFG	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

R. j: *R. japonica*-specific sequence, SFG: spotted fever group-common