

IL-8 <2.5pg/ml)

【リケッチアに関する検査】

抗体価測定:*R.japonica* IgM <20 IgG 20 ツツガムシ 5 血清型 すべて陰性

遺伝子検出: 全血からの *R.japonica* DNA(+)

Figure 1 皮疹の肉眼所見

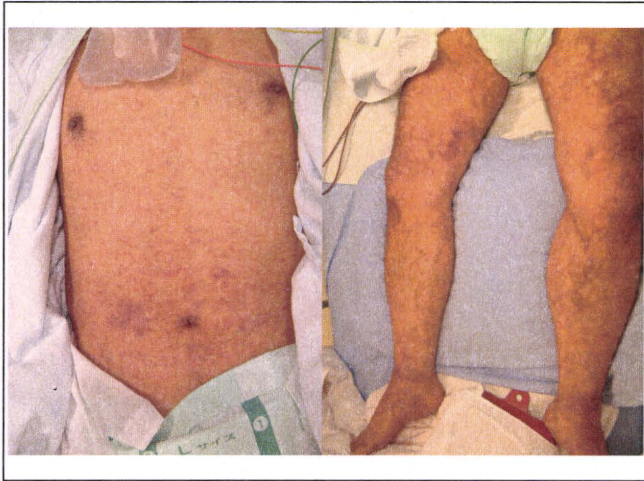


Figure 2 入院時胸部 XP

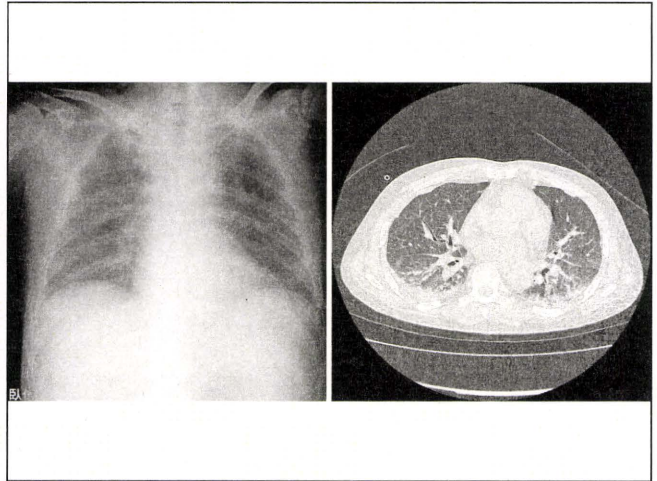


Figure 3 入院時腹部 CT

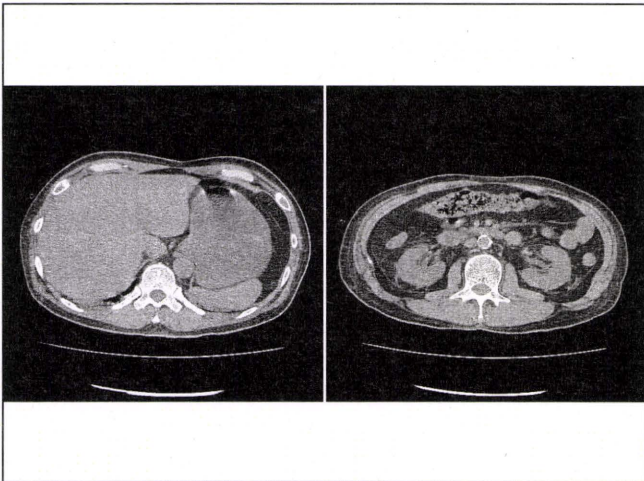
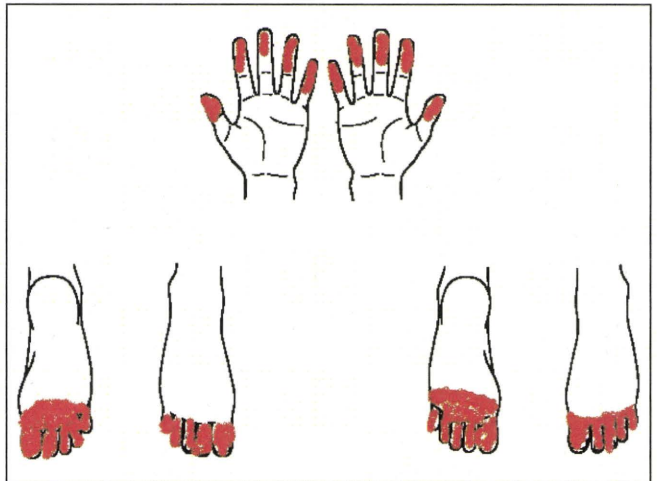


Figure 4 四肢末端の壊死



## 紅斑熱群リケッチア多糖体抗原を用いた間接赤血球凝集反応による 日本紅斑熱の簡易・迅速診断法の検討（予報）

研究分担者	藤田博己	大原綜合病院附属大原研究所
研究協力者	赤松達矢 藤田信子 馬原文彦	馬原医院アカリ疾患研究センター

### 研究要旨

日本紅斑熱の簡易・迅速診断法としての間接赤血球凝集反応を検討した。培養細胞で増殖させた各種紅斑熱群リケッチアからアルカリ抽出した多糖体抗原を結合させたホルマリン固定ニワトリ赤血球は、日本紅斑熱患者の回復期血清と反応して凝集することを確認した。マイクロプレートを用いた凝集反応系によれば、患者血清中の抗体を30分ほどで検出可能であった。反応性を従来の間接免疫ペルオキシダーゼ反応と比較したところでは、感度・特異性ともに相関性が高く、日本紅斑熱の血清診断に有用であることがわかった。この感作血球は保存性に優れ、冷蔵保存すると6～10ヶ月間は安定的に使用できた。

### A. 研究目的

微生物成分の多糖体には赤血球に対する結合能が知られているが、その中でもアルカリ多糖体は結合力が強い物質とされる。病原菌から抽出した多糖体が結合した赤血球（感作赤血球）はその病原菌に対する抗体と特異的に結合し凝集する性質があることから、間接赤血球凝集反応（IHA）として、各種の感染症の血清診断に使われてきた。IHAの手技については、いくつかの報告があるが、アメリカ合衆国においては、ロッキー山紅斑熱病原体 *Rickettsia rickettsii* と発疹熱病原体 *Rickettsia typhi* からアルカリ抽出した赤血球感作物質（erythrocyte-sensitizing substance, ESS）を結合させたグルタルアルデヒド固定ヒツジ赤血球が、ロッキー山紅斑熱、発疹熱、発疹チフスなどの血清診断に使用されてきた。ちなみに ESS とアルカリ多糖体は、その抽出方法の共通性から同一物質とみなすことができる。

本研究では、紅斑熱群の国内分布種の各リケッチアから多糖体のアルカリ抽出法の簡易化を試みるとともに、これらの多糖体を感作させたホルマリン固定ニワトリ赤血球を用いて、日本紅斑

熱の IHA による簡易・迅速血清診断の実用化を目的とした。

### B. 研究方法

#### 1. アルカリ多糖体の調製

多糖体の抽出には、培養細胞 L929 の単層に感染・増殖させた紅斑熱群の *Rickettsia heilongjiangensis* Sendai-16 株, *R. japonica* 類似種 HH-1 株, *R. asiatica* IO-1 株, *R. helvetica* IM-1 株, *R. tamurae* AT-1 株, *R. honei* GRA-1 株および発疹熱リケッチア *R. typhi* Wilmington 株を用いた。リケッチアが十分に増殖した時点で、感染細胞と遊離リケッチアを含む培養液を合わせて回収し、10,000rpm, 5 分間遠心後に沈渣を 0.01M PBS, pH7.2 (以下, PBS) に再浮遊させた。量的には、培養面積 100cm<sup>2</sup> 相当からの回収沈渣当り 1ml の PBS に浮遊させたものを「原材料」とし、使用までの間、-20℃で凍結保存、または 0.1%にホルマリンを添加して 4℃で冷蔵保存した。抽出時には、原材料を 10,000rpm, 5 分間遠心後に上清を捨て、沈渣を廃棄上清と等量の 0.8% NaOH に浮遊させ、100℃で 30 分間加熱後に室温に放置して温度を下げ、次いで PBS で 1 晩透

析した。透析には膜規格 10,000 NWCO の透析カセット(Thermo Scientific 社製, Slide-A-Lyzer<sup>®</sup>)を用いた。透析後に回収したものに 0.1%にホルマリンを添加し、「原液」として使用まで 4°Cに保存した。

## 2. 赤血球のホルマリン固定

ニワトリ赤血球は、Alsever 液保存のものを用いた。赤血球は PBS で 3 回遠心洗浄(各 1,000rpm, 5 分間, 以後の赤血球洗浄は同条件)後, 10%にホルマリンを添加した PBS で 10%に浮遊させ, 37°C1 時間で固定した。その後, PBS で 3 回遠心洗浄後, 0.5%ホルマリン添加 PBS で 10%浮遊液として, 感作時まで 4°C保存した。

## 3. 赤血球の感作

保存赤血球を PBS で 3 回遠心洗浄後, 多糖体原液の PBS 希釈液を赤血球の 4 倍量加えて混和し, 37°Cで 1 時間感作させた。感作赤血球は PBS で 3 回遠心洗浄後, 1% ニワトリ血清(またはウシ胎児血清), 0.25%アラビアゴム, 0.1% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 0.01% Tween80 を添加した PBS に 1%に浮遊させ, 使用まで 4°Cに保存した。なお, 原液の至適希釈倍数は, 既知の抗血清を用いた Box 定量試験によって決定した。

## 4. 赤血球凝集と凝集抑制反応

両反応ともに U 底の 96 well マイクロプレートを用いた。被検患者血清の凝集価測定においては, PBS で well 当り 0.025ml の 2 倍階段希釈を行った。開始は 20 倍で, 11 番目の 20,480 倍までの希釈系列を作成し, 12 番目は PBS のみの陰性対照とした。これらの希釈血清系に 1%感作赤血球浮遊液を等量加え, 十分に混和後, 室温に静置し, 30 分以降に凝集像を観察した。最終希釈倍数は, 等量の感作赤血球の添加分があるために, 開始の well の 40 倍から 11 番目の 40,960 倍として判定した。また, 未感作赤血球についても同様の反応を実施し, 陽性反応が認められたときには, 被検血清から未感作赤血球の凝集素を吸収後に再検査した。凝集抑制反応は, PBS

で被検液の 5 倍の開始から 11 番目の 5,120 倍までの希釈系と 12 番目の PBS のみの陰性対照を作成し, 既知陽性抗血清の 4 単位希釈を等量加えて混和, 室温に 30 分間静置後, 1%感作赤血球浮遊液を 0.025ml 加え, 十分に混和, 再度室温に静置し, 30 分以降に凝集抑制像を観察した。最終希釈倍数は, 抗血清を等量加えた時点での 10 倍から 10,240 倍の範囲とみなした。

## C. 研究結果

### 1. 多糖体の抗原力価と感作濃度について

アルカリ多糖体原液の力価を, 赤血球凝集抑制反応によって測定した。力価はリケッチアの種類のほか, 同種内のロットの違いによってもばらつきが見られ, 160 倍から 1,280 倍の範囲であった(表 1)。

感作濃度を決定するために, 原液を未希釈から 128 倍まで, または 5 倍から 640 倍まで 2 倍階段希釈し, 各濃度で感作した赤血球と抗体陽性血清を用いた Box 試験を行った。原液の力価に応じた至適濃度が予想されたが, 概して凝集価は, 未希釈からある程度の希釈倍数までの範囲のいずれにおいても同程度の値を維持し, ある希釈倍数以上から低下するものがある一方で, 未希釈よりもある程度の希釈において最高値を示したものもあった。したがって, 感作には凝集価の高さを維持している範囲の最大の希釈倍数

表 1. 各種リケッチアから抽出したアルカリ多糖体の力価。(感染細胞 100cm<sup>2</sup>/ml 相当)

Lot No.	<i>Rickettsia</i> の種類	Titer of HA-inhibition
1	<i>R. heilongjiangensis</i> Sendai-16	320
2	<i>R. heilongjiangensis</i> Sendai-16	320
3	<i>R. heilongjiangensis</i> Sendai-16	160
4	<i>R. heilongjiangensis</i> Sendai-16	320
5	<i>R. japonica</i> -like HH-1	160
6	<i>R. japonica</i> -like HH-1	1,280
7	<i>R. asiatica</i> IO-1	320
8	<i>R. helvetica</i> IM-1	1,280
9	<i>R. tamurae</i> AT-1	256
10	<i>R. tamurae</i> AT-1	1,280
11	<i>R. honei</i> GRA-1	160
12	<i>R. typhi</i> Wilmington	ND

の濃度で使用することにした。これまでに調べた各抽出ロットにおける使用濃度は、8～20 倍の範囲にあり、多糖体の抗原力価に換算すると、20～80 倍相当となった。

抽出に用いたリケッチアの種類による感作赤血球の抗血清との反応性に違いは特に認められず、*R. japonica* とは抗原性が異なる *R. helvetica* や *R. tamurae* からの多糖体で感作した赤血球を用いても、日本紅斑熱患者血清の凝集価は同程度であった。

## 2. 凝集価測定例

日本紅斑熱患者2症例のペア血清における IHA の実例を図 1 に示した。いずれも急性期の 40 倍未満から回復期での凝集価の有意な上昇が認められた。発疹熱患者症例についても同様の結果であった。ただし、両疾患間における交差反応は全く認められなかった。

日本紅斑熱患者において、間接免疫ペルオキシダーゼ (IP) 法での抗体陽性が確認された中に、IHA では陰性、もしくは凝集像が不鮮明で判定ができない症例が少数見られた。このような場合には、抗 IgM 抗体を各 well 当り 0.025ml を追加することによって、陽転や凝集像の鮮明化が起こることがわかった。また、この追加によって、無添加時よりも高い凝集価を示す症例が多いこともわかってきたので、高感度化へ向けた改良も検討中である。

## 3. 安定性

感作赤血球は、4℃で保存した場合、6～10 ヶ月間は大きな凝集価の低下は認められなかった。多糖類は単独で保存した場合には、抗原性が極めて安定しているので、かなりの長期間におよぼ保存が期待できる。リケッチアのアルカリ多糖体については、少なくとも 12 ヶ月間の 4℃保存でも抗原活性の低下が認められなかったという報告もある。一方、ホルマリン固定赤血球については、偶然に 4℃で 7 年間以上放置されていたものが見つかったのを機に、これを使用してみたところ、新たに固定した赤血球との比較でも劣化等は認

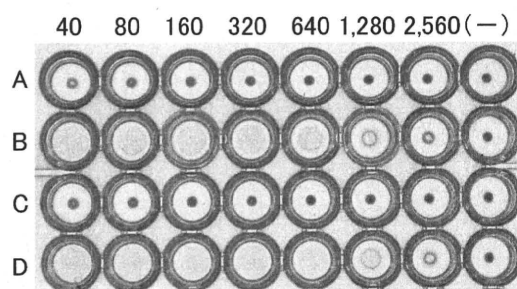


図 1. 日本紅斑熱症例における間接赤血球凝集反応。  
症例 1: A, 第 2 病日; B, 第 11 病日。  
症例 2: C, 第 4 病日; D, 第 18 病日。

められず、抗原感作と凝集反応の新旧間における違いは見いだせなかった。

## D. 考察

日本国内においては、1984 年の日本紅斑熱の発見以降、当該疾患の血清診断には主に免疫蛍光 (IF) 法と IP 法が使われてきた。これらの診断方法は、従来、設備の整った特定機関での実施に限定されがちであるが、最近の韓国では、ツツガムシ病の毎年が多発に対応すべく、ツツガムシ病リケッチアの DNA 情報を応用して調製されたリコンビナント抗原使用の IHA やイムノ・クロマト法の各キットが市販されて広く使われている。一方、日本紅斑熱における簡易・迅速法の開発としては、操作が容易な凝集反応系について、*Rickettsia japonica* の超音波破碎抗原で感作したゼラチン粒子凝集反応が検討されたことがあったが、普及には至らなかった。

今回は赤血球との結合能が高いアルカリ多糖体の簡易抽出法をほぼ確立できたことから、これを抗原とした IHA の実用化を検討したものである。本反応の使用にあたっては、使用する赤血球への抗原感作が極めて容易なことも特徴の一つであり、現在、本反応を研究協力者の医療現場で実施しつつ、日本紅斑熱の症例についての使用例を集積しつつある。

判定までに要する時間については、従来のヒツジ赤血球を用いた IHA では、判定までに 1 晩を要していたが、今回の方法では 30 分後の時点でも十分に判定可能で迅速性にも優れていること

がわかった。

## E. 結論

IHA の迅速性と簡便性は、リケッチア症の診断を従来の研究室レベルから臨床現場へ移すことを可能とする。今後、検体数を増やした上で、現在主流の IF 法や IP 法による結果との比較を通して、特異性、感度、安定性などをさらに検討する予定である。ちなみに、今回の抽出抗原は、IHA 以外に ELISA への利用も検討されつつある。

## G. 研究発表

### 発表論文

藤田博己, 藤田信子, 馬原文彦: 紅斑熱群と発疹熱リケッチアから簡易抽出したアルカリ多糖体感作赤血球凝集反応によるリケッチア症の迅速抗体検出法の検討(予報). 大原年報, 50:37-40, 2010.

### 学会発表

藤田博己: リケッチア症と野兔病の簡易抗体検査法の検討. 第 18 回ダニと疾患のインターフェイスに関するセミナー(2010 年 6 月 11 日, 佐渡市).

及川陽三郎, 藤田博己, 矢野泰弘, 高田伸弘: 日本紅斑熱リケッチアより抽出したアルカリポリサッカライド抗原感作プレートを用いた酵素抗体法. 第 65 回日本衛生動物学会西日本支部大会(2010 年 11 月 5 日, 倉敷市)

赤松達矢, 藤田博己, 青山信子, 馬原文彦: 日本紅斑熱の簡易・迅速診断法としての間接赤血球凝集反応の医療現場における使用経験. 第 3 回日本リケッチア症臨床研究会・第 17 回リケッチア研究会合同研究発表会(大津市, 2011 年 1 月 16 日)

臨床像や病態の解析、重症化予防、治療法等へつなげるための  
病理学的な検討

分担研究者

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)

宇都宮洋才 (和歌山医科大学 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)

研究要旨

1) 症例検討のまとめ

これまでわれわれが検討してきた、皮膚生検ホルマリン固定パラフィン切片による日本紅斑熱 (JSF) の早期診断の成績をまとめた。方法論は、モノクローナル抗体 2 種 (S3、X1) による免疫染色 (加熱処理を加えたアミノ酸ポリマー法) と 17k genus common antigen gene を標的とする real-time PCR 法である。2004 年から 2010 年前半の間に日本紅斑熱を疑われた症例は計 52 例、皮膚生検 (刺し口、皮疹、痂皮) が実施されたのは 49 例 (60 検体) であり、さらに剖検 1 例、尿 23 検体、血液 7 検体を検討した。血清学的に陽性だった 34 例 + 剖検例 1 例を A 群、血清学的に陰性だったが免疫染色ないし real-time PCR で陽性だった 9 例を B 群、非 JSF 例 8 例を C 群とした。A+B 群において、免疫染色陽性は、刺し口 32/35 (91%)、皮疹 8/10 (80%)、痂皮 2/6 (33%)、real-time PCR 陽性では、刺し口 21/35 (60%)、皮疹 3/10

(30%)、痂皮 3/6 (50%) だった。痂皮では、免疫染色陰性、real-time PCR 陽性の症例 2 例がみられた。18 件の皮膚生検は 100%ホルマリン液に固定されたため、とくに real-time PCR の陽性率に悪影響がみられた。血清反応陽性だった 34 例のうち 28 例 (82%) では、血清診断より病理診断が先行した。さらに、尿 3 検体で real-time PCR 陽性となった (血液は全例陰性)。免疫染色と real-time PCR 法の併用は、日本紅斑熱の早期診断に確実なサンプルであることが証明された。血清抗体価の上昇がみられなかった B 群では、早期治療の導入による病原体の早期消失が成因と推測された。

2) 免疫電顕観察

免疫染色の特異性を検定する目的で、*R. japonica* 感染培養 L929 細胞に対して、post-embedding colloidal gold 法による免疫電顕検索を行った。細胞質内に感染する桿菌の細胞壁に一致した陽性所見が得られた。共感染するマイコプラズマには陰性だった。



## A. 研究目的

マダニ媒介性の日本紅斑熱は毎年初夏から秋に観察され、無治療だと重症化しやすい日本固有の紅斑熱群リケッチア感染症である。当然ながら、公衆衛生上、早期診断の重要性が強調される。

われわれは、日本紅斑熱の早期診断のための方法論として、皮膚生検（刺し口、皮疹部）を用いた病理診断法を確立し、臨床医の協力のもと、2004年以來、臨床応用を実践してきた。

今年度は、2004年から2010年前半の間に経験された52例を分析し、皮膚生検を用いた免疫染色とReal-time PCR法の両法併用の有用性と限界を再検討した。血清抗体価陰性と判断された9症例および尿検体が陽性だった3例が注目された。

また、日本紅斑熱リケッチア感染培養細胞に対する免疫電顕の検討を加え、桿菌細胞壁に一致した陽性像を確認した。

## B. 研究方法

### (1) 免疫染色：

免疫染色（アミノ酸ポリマー法）については、加熱処理を利用した染色条件が既に確立されている（マウス IgM 型モノクローナル抗体 S3、X1 を利用：平成 18 年度報告：論文 1）。この 2 種のモノクローナル抗体は、紅斑熱群リケッチアに共通の抗原を認識する。

### (2) Real-time PCR 法：

Real-time PCR 法に関しては、紅斑熱群リケッチア DNA に共通の 17k genus common antigen gene に特異的なプライマーを用いた Taq-Man 法（研究協力者、玉熊桂子が開発）を確立した（平成 20 年度報告）。増幅サイクル数は 40、増幅

産物の大きさは 114 bp だった。DNA 抽出には、Qiagen 社の QIAamp DNA FFPE Tissue kit（皮膚生検）、同 Mini kit（血液）、同 Micro kit（尿）を用いた。

### (3) 臨床検体の採取と対照検体

臨床医（馬原医院：馬原文彦博士、明神診療所：森田祐司博士、市立宇和島病院：薬師寺直喜博士、山田赤十字病院：坂部茂俊博士）の協力のもと、2004年から2010年前半の間に、皮膚生検 60、剖検 1、尿 23、血液 7 が集積され、免疫染色ないし real-time PCR 法の検討対象とした。

このうちの皮膚生検 18 検体（馬原医院例）は、100%ホルマリン固定が行われたことが、検討過程で判明した。

剖検例は、兵庫県立淡路病院の症例を利用した（論文 2）。

陽性対照として、日本紅斑熱リケッチア（Aoki 株、Katayama 株）感染 L929 細胞の cell block から薄切したホルマリン固定パラフィン切片を用いた。

### (4) 免疫電顕：

日本紅斑熱リケッチア Aoki 株を感染させたマウス線維芽細胞（L929 細胞）をパラホルムアルデヒド+グルタルアルデヒド固定後に LR White 包埋し、water bath 加熱処理ののち、immunogold 技法で観察した（post-embedding 法）。

## C. 結果

### (1) 血清抗体価と病理学的検討によるグループ化

A 群：日本紅斑熱リケッチアに対する血清抗体価の上昇が確認された 34 例+1 例の剖検例（兵庫県立



淡路病院例：急性期に死亡したため抗体価上昇なし、論文2)

B群：皮膚生検ホルマリン固定パラフィン切片を用いた免疫染色および/または real-time PCR 法で陽性だったが、回復期血清（発症後2~3週以降）の抗体価上昇が明らかではなかった9症例（これらはいずれも、臨床的に日本紅斑熱として矛盾しない。早期抗菌剤治療により回復、表1）。

C群：血清抗体価ならびに病理学的検討いずれも陰性だった8例

A+B群(計44例)：男女比24:20、年齢：28~87歳(平均62.5歳)

## (2) 皮膚生検における免疫染色および real-time PCR 法の結果

皮膚生検を実施したのは48例(60検体：刺し口41、皮疹12、痂皮7)だった。免疫染色では、血管内皮細胞ないしマクロファージの細胞質に粗大顆粒状の陽性所見が確認された。2種の抗体がともに陽性だった(図1)。

real-time PCR の反応パターンを図2に示す。

免疫染色では、刺し口32/35(91%)、皮疹8/10(80%)、痂皮2/6(33%)に陽性だった。一方、real-time PCR 陽性率は、刺し口21/35(60%)、皮疹3/10(30%)、痂皮3/6(50%)だった。

このうち、18件の皮膚生検は100%ホルマリン固定されたため、とくに real-time PCR の陽性率に悪影響がみられた。通常の10~20%ホルマリン固定材料における real-time PCR 陽性率が痂皮16/23(69%)、皮疹3/5(60%)だったのに対して、100%ホルマリン固定材料では、痂皮5/12(42%)、皮疹0/5(0%)と成績不良だった。ちなみに、免疫染色の陽性率は、10~

20%ホルマリン固定材料で27/33(82%)、100%ホルマリン固定材料で15/18(83%)と不変だった。

免疫染色と real-time PCR がともに陽性は剖検例1例を含めて26/52(50%)、免疫染色のみ陽性は16/52(31%)、real-time PCR のみ陽性は痂皮の2検体(4%)、ともに陰性は8例(15%)だった。

血清反応陽性だったA群34例を検討すると、28例(82%)で、病理学的診断が血清診断に先行していた。

## (3) 尿および血液を用いた real-time PCR の検討

血液検体8件(A+B群では5件)はいずれも陰性だった。尿検体21件(A+B群では17件)では、3件(A+B群の18%)に real-time PCR 陽性反応が確認された。

## (4) 日本紅斑熱リケッチア感染培養細胞を用いた免疫電顕

細胞質内に感染する日本紅斑熱リケッチアに一致する桿菌の細胞壁に一致する陽性所見が観察された(図3)。

## D. 考察

免疫染色ならびに real-time PCR の対象となる皮膚生検検体としては、刺し口が最も適していた。表層の痂皮のみが採取されると陽性率が低下した。免疫染色の陽性所見は、真皮内の血管内皮およびマクロファージに観察されるため、真皮成分を含むしっかりした生検が望まれた。

痂皮のみが提出された場合は、免疫染色より real-time PCR の陽性率の方が高かった。

たまたま100%ホルマリン固定されてしまった皮膚生検検体では、

免疫染色の陽性率は変わらなかったが、real-time PCR の陽性率は明らかに低下した。高濃度ホルマリン固定による DNA の断片化・蛋白質との相互作用がその成因とみなされた。

ホルマリン固定パラフィン切片から抽出した DNA を PCR 増幅の対照にする場合、増幅産物の長さが重要である。経験的に、増幅産物の大きさが 200 bp を超えると偽陰性になりやすい（論文 3）。今回、増幅産物の長さを 114 bp と短く設計したことで、比較的安定した成績が得られた。

血清反応陽性だった A 群 34 例を検討すると、28 例（82%）で病理学的診断が血清診断に先行していた点は、この病理学的診断法の早期診断における有用性を端的に示している。

血清抗体価陰性だった 9 例は、皮膚生検による病理学的が確定診断となった。臨床的にいち早く日本紅斑熱が疑われ、早期に治療が行われると、皮膚生検でリケッチア陽性だが血清抗体価が上昇しない状況がもたらされると判断された。この点は、今後、長期にわたる血清抗体価チェックの追加検討が求められる。

3 例（A+B 群の 18%）において、尿検体の real-time PCR が陽性だった点は特記される。剖検例の検討で、尿細管上皮の細胞質内にリケッチア抗原が陽性だった点を反映していると思われる。おそらく、病初期に尿中にリケッチアが陽性となると考えられる。陽性率は低いですが、繰り返し検査可能な尿検体が、新たな診断材料となりうることを提唱したい。

今回検討した方法論は、免疫染色、real-time PCR とともに、紅斑熱

群リケッチア全体を拾いあげるため、陽性反応がすなわち、日本紅斑熱とは断定できない。しかし、今回検討した症例はすべて日本列島南西部の太平洋沿岸地域で発生しており、この条件で検討する範囲内においては、紅斑熱リケッチア＝日本紅斑熱であるため、特異性に問題はないと考えられる。最近、東北地方、仙台市内で新たに見いだされた紅斑熱群リケッチア *R. heilongjiangensis* は南西日本には今のところみられない。

事実、感染細胞株の免疫電顕で、桿菌の細胞壁に一致した陽性所見が観察された（図 3）。ちなみに、その他の細胞成分や共感染するマイコプラズマには陰性だった。

今回の成績（除く免疫電顕）は、論文 4 としてまとめた。

## E. 結語

①日本紅斑熱の早期診断には、皮膚生検に対して免疫染色と real-time PCR 法を併用が優れており、この病理診断的アプローチの有用性が示された。

②早期診断により早期治療が実施された日本紅斑熱患者 9 例では、回復期血清の抗体価上昇がみられなかった。今後、引き続き抗体価をチェックし、半年以上の長期の経過観察が必要である。

③尿検体は日本紅斑熱の新たな診断材料となりうる。

## F. 健康危険情報および倫理面への配慮

1) 日本紅斑熱リケッチアの取り扱い、和歌山医科大学の病原体取扱施設 P3 実験室の厳重な管理下で扱った。検体の持ち出しは、ホルマリンによる不活化後とした。

2) 日本紅斑熱疑いの患者から皮膚生検を行う際は、インフォームド・コンセントを得たのちに採取した。

3) わが国でバイオテロリストに分類される紅斑熱リケッチアに対するバイオハザードを考慮して、一般実験室（検査室）で安心して分析できるように、検出対象をホルマリン固定パラフィン切片とした。この手順により、今回開発中の方法が広く全国に浸透する可能性が高まるであろう。

## G. 研究発表

### A) 論文

1) 堤 寛, 馬原文彦. 日本紅斑熱の早期診断: 皮膚生検を利用した免疫染色の実用性. 病原微生物検出情報(月報 27(2)(No. 312): 12-14(38-40), 2006.

2) 堤 寛, 鈴木舞, 塩竈和也, 堀口英久, 佐野壽昭, 馬原文彦. 日本紅斑熱の病理. ダニと新興再興感染症. SADI 組織委員会編、東京. 全国農村教育協会. 119-127, 2007.

3) Shiogama K, Teramoto H, Morita Y, Mizutani Y, Shimomura R, Inada K, Kamahora T, Makino M, Tsutsumi Y. Hepatitis C virus infection in a Japanese leprosy sanatorium for the past 67 years. J Med Virol 82: 556-561, 2010.

4) Tamakuma K, Ito M, Shiogama K, Mizutani Y, Inada K, Miyamoto K, Utsunomiya H, Mahara F, Tsutsumi Y.

Histopathological diagnosis of Japanese spotted fever using formalin-fixed, paraffin-embedded skin biopsy specimens. Usefulness of immunohistochemistry and real-time PCR analysis. Clin Microbiol Infect 2011 (in press).

### B) 学会発表

1) 堤 寛. ダニ咬傷の病理. 第18回 SADI トキの里大会 2010、佐渡ヶ島.

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. 日本紅斑熱とツツガムシ病の *in situ* hybridization 法による鑑別. SADI 越の国大会. 2009、福井

3) Tamakuma K, Miyamoto K, Shiogama K, Utsunomiya H, Inada K, Fujita H, Mahara F, Tsutsumi Y. Detection of *Rickettsia japonica* & *Orientia tsutsugamushi* by *in situ* hybridization. 23<sup>rd</sup> Meeting of the American Society for Rickettsiology, 2009, South Carolina, USA

4) 玉熊桂子, 伊藤舞, 稲田健一, 堤 寛, 宮本和昭, 宇都宮洋才, 秋本茂, 馬原文彦. 日本紅斑熱に病理診断: 10%ホルマリン固定パラフィン包埋皮膚生検標本を利用した免疫染色と Real-time PCR 法の比較検討. 2009、滋賀

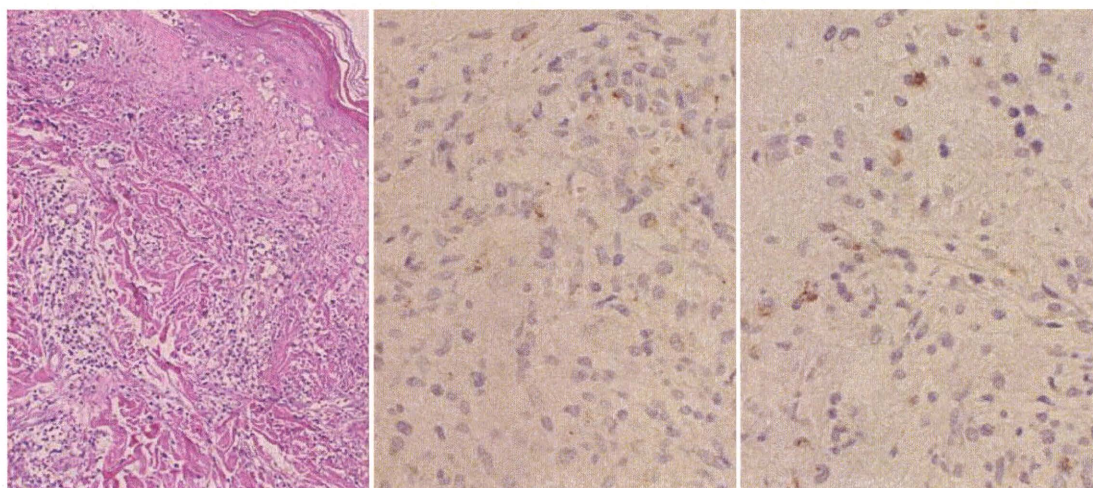
## H. 知的財産権の出願・登録状況 とくになし

表 1. 日本紅斑熱リケッチア抗体価上昇を認めず、免疫染色ないし real-time PCR が陽性となった 9 症例

Pt. No	District	Date of onset	Age (yr)	Sex	History of tick bite	Rash	Fever >38 C	IHC	Real-time PCR	Urine/bl ood	Serological assay of <i>R. japonica</i> antibodies				Outcome
											Acute		Convalescent		
											IgM	IgG	IgM	IgG	
1	Tokushima	Oct. 23_06	71	F	Yes	Yes	Yes	+ (A) - (B)	+ (A) - (B)		<40	<40			Recovered
2	Mie	Oct. 2_06	64	M	Yes	Yes	Yes	- (A) + (B)	- (A) + (B)		<40	<40	<40	<40	Recovered
3	Wakayama	May 25_09	65	M	Yes	Yes	No	+ (A)	+ (A)	- (urine) - (blood)	<40	<40	<40	<40	Recovered
4	Mie	Nov. 2_06	50	M	Yes	Yes	Yes	+ (A) + (B)	- (A) - (B)		<40	<40	<40	<40	Recovered
5	Tokushima	June 7_08	38	M	Yes	Yes	Yes	+ (A)	- (A)	- (urine)	<40	<40	<40 (2w)	<40 (2w)	Recovered
6	Tokushima	May 23_09	54	F	Yes	Yes	Yes	+ (A)	- (A)	- (urine)	<40	<40	<40	<40	Recovered
7	Mie	Sep. 29_06	29	F	Yes	Yes	Yes	+ (A)	- (A)		<40	<40	<40	<40	Recovered
8	Tokushima	May 6_07	64	M	Yes	Yes	Yes	- (C)	+ (C)		<40	<40	<40	<40	Recovered
9	Mie	Aug. 2_07	62	M	Yes	Yes	Yes	- (C)	+ (C)		<40	<40	<40	<40	Recovered

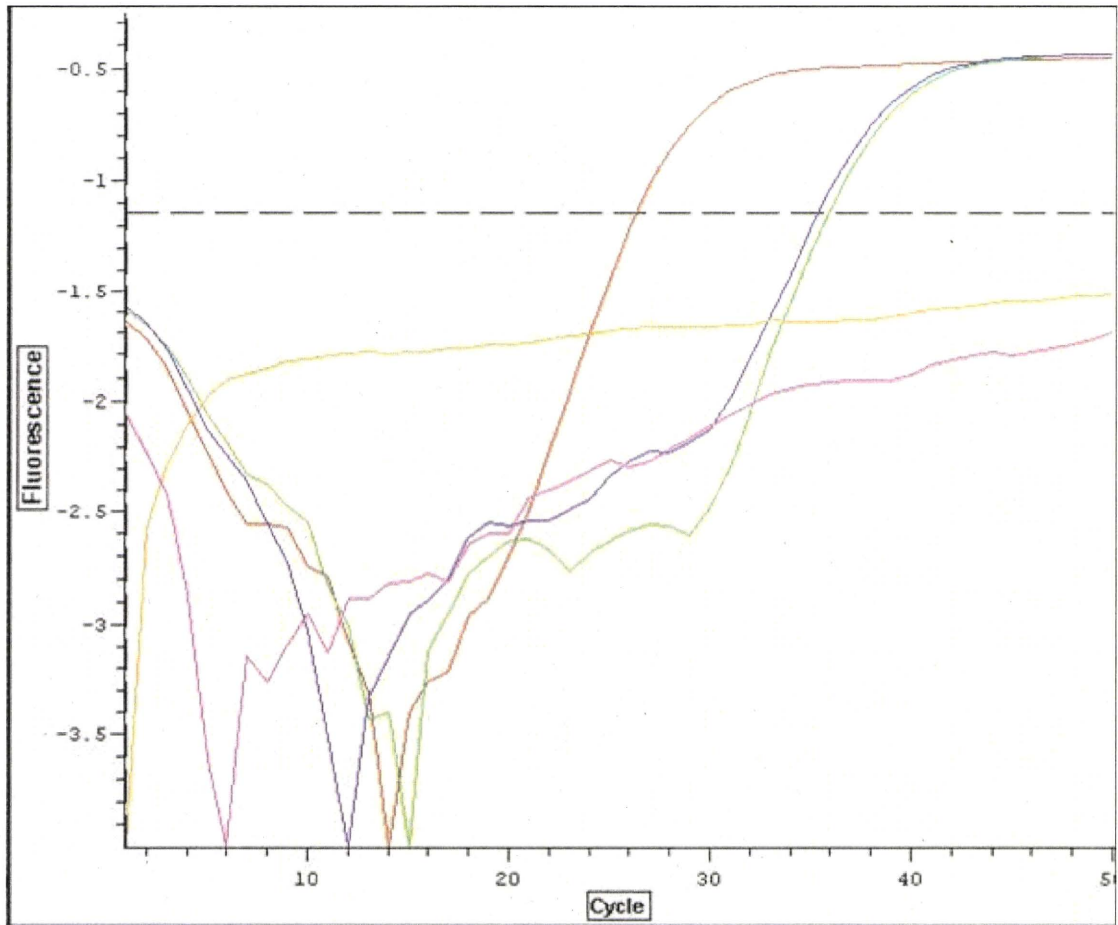
A: eschar, B: eruption, C: scab

図 1. 代表的な免疫染色所見（皮膚生検、刺し口）



左 (HE 染色) : 真皮血管周囲性にリンパ球・マクロファージの浸潤を認める。中 (加熱処理後のアミノ酸ポリマー法、S3) および右 (加熱処理後のアミノ酸ポリマー法、X1) : 血管内皮細胞ならびに血管周囲性のマクロファージの細胞質内に、紅斑熱群リケッチア抗原の粗大顆粒状陽性所見が観察される。

図2. 紅斑熱群リケッチア 17k genus common antigen gene の real-time PCR による増幅パターン (増幅産物 114 bp)



材料：皮膚生検（刺し口）のホルマリン固定パラフィン切片

赤：陽性対照（*R. japonica* 感染 L929 細胞）

青&緑：患者検体（2種）

黄：陰性対照（剖検時採取正常皮膚）

ピンク：blank（DNA なし）



図3. 日本紅斑熱リケッチアの免疫電顕所見 (X1抗体使用、加熱処理後のpost-embedding法)



L929細胞の細胞質内に感染する桿菌 (*R. japonica*, Aoki株) の細胞壁に一致して、15 nm金コロイド粒子が沈着している。

分担研究報告書

我が国で発生するリケッチア感染における宿主免疫応答の解析

- 研究分担者 阿戸 学 （国立感染症研究所 免疫部 第二室長）  
研究協力者 安藤 秀二 （国立感染症研究所 ウイルス第一部 第五室長）  
研究協力者 松村 隆之 （国立感染症研究所 免疫部 第二室 研究員）  
研究協力者 川端 寛樹 （国立感染症研究所 細菌第一部 第四室長）  
研究協力者 角坂 照貴 （愛知医科大学 医学部寄生虫学講座 講師）

研究要旨

我が国におけるリケッチア感染症において、その免疫応答に関しては未だ不明な点が多い。その理由の一つとして、ヒトの病態を反映する動物感染モデルが確立しておらず、免疫学的な解析がなされていないことが挙げられる。本研究では、種々の遺伝子改変マウスを用いて、これらの病原体に関する動物モデルを検討し、診断、治療、予防に貢献しうる免疫研究を目的とする。しかし、我が国のリケッチアストックのほぼすべてがマイコプラズマのコンタミネーションによって汚染していることが判明したため、本年度は、マウスにリケッチアストックを腹腔内投与して、脾臓を摘出して乳剤とすることにより、マイコプラズマの除去と動物感染モデルを確立することを試みた。*Orientia tsutsugamushi* の Kuroki 株と Kawasaki 株のマウス感染脾臓組織から抽出した DNA を用いた PCR において、マイコプラズマは検出されず、*O. tsutsugamushi* が認められ、当方法がマイコプラズマ除去に有効であることが示唆された。また、野生マウスより一酸化窒素合成酵素(nitric oxide synthetase: NOS)欠損マウスで陽性率が高かったことから、NO が *Orientia* 感染防御因子であることが示唆された。今後、他の遺伝子改変マウスを含めてリケッチア科ストックよりマイコプラズマを除去すると同時に、動物モデルを確立し、免疫応答を解析することを今後の研究で目指す。



## A. 研究目的

我が国では、つつが虫病、日本紅班熱、アナプラズマ症などのリケッチア感染症が発生しており、その総合的な対策が望まれる。細菌学的、疫学的な研究成果および対策ネットワークの構築は、一定の成果を上げているものの、*in vitro* 細胞への感染実験による解析のみでは、その病態、経時的な免疫応答の解析を介して新規診断、治療の開発につながる研究は困難であり、動物モデルの確立が必要である。

しかし、我が国で発生が認められる日本紅班熱より分離された *Rickettsia japonica*、アナプラズマ感染症より分離された *Anaplasma phagocytophilum* に関して、免疫応答が正常に保たれているマウスを用いての分離継代、および動物モデルを確立する試みはすべて失敗に終わっている。本研究では、リケッチアの細胞内殺菌に必要とされる NO の産生が好中球で欠損する iNOS 欠損(KO)マウス、内皮細胞で欠損する eNOS KO マウス、両者で欠損する i/eNOS ダブル KO マウス、体内のすべての NO 産生が欠損する i/e/nNOS 欠損マウス、病原体に対する自然免疫応答が広範囲に障害されている MyD88 KO マウス、NK 活性、補体活性および獲得

免疫系に異常がある NOD/SCID/Jak3 KO マウス等の免疫応答不全マウスを用いてマウスモデルを確立し、国内で発生するリケッチア感染症の、早期診断および治療の改良に役立つ病態と免疫応答の解析が可能なモデルの確立をめざす。

一方、我が国のリケッチアストックのほぼすべてがマイコプラズマのコンタミネーションによって汚染していることが判明し、免疫学的研究に使用できないことが明らかとなった。そこで、マイコプラズマの感染が認められない培養細胞と、遺伝子改変マウスにリケッチアを継代させることによって、マイコプラズマを除去すると同時に、動物モデルを確立し、免疫応答を解析することを今後の研究で目指す。

## B. 研究方法

### (1)マウス

iNOS KO マウス、eNOS KO マウス、i/eNOS ダブル KO マウス、i/e/nNOS トリプル KO マウスは、琉球大学医学部筒井正人教授より供与された。Myd88/TRIF ダブル KO マウスは大阪大学微生物学研究所 審良静男教授より供与された。NOS/scid/Jak3 KO マウスは熊本大学岡田誠治教授より供与された。それぞれのマ

ウスは、国立感染症研究所動物実験施設において飼育された。

#### (2)リケッチアストック

リケッチアは、T75cm<sup>2</sup> フラスコに断層培養した Vero 細胞に感染させ、感染 3 日目の培養液を 50 倍に希釈し、-80°C で保存してストックとした。

#### (3)マウス感染実験

6-10 週 齢 の マ ウ ス に *Orientia tsutsugamushi* の Kuroki 株と Kawasaki 株ストック原液または 1/2 希釈液、もしくは *Rickettsia japonica* DT-1 株、*Rickettsia japonica* 286 株原液それぞれ 500ul を腹腔内に投与し、経時的に臨床症状を観察し、屠殺後、体重および脾臓重量の測定、血液、腹水、脾臓を採取した。

#### (4)PCR

マイコプラズマ r16SDNA およびオリエンチア 56kDa、リケッチア 17kDa の検出のため、血液、腹水、脾臓から DNA を抽出し、Ex Taq ポリメラーゼ (TAKARA 社) と特異的塩基配列増幅用プライマーを用いて 2 段階の PCR を行った (図 1)。

#### (倫理面への配慮)

動物実験については、国立感染症研究所動物実験実施規定に基づき、動物実験委員会の承認を得て執り行われた。

### C. 研究結果

実験 1 : C57BL/6 マウスまたは、i/e/nNOS トリプル (KO) マウスに、マイコプラズマのコンタミネーションが確認されている *O. tsutsugamushi* の Kuroki 株と Kawasaki 株ストック原液または 1/2 希釈液、もしくは *R. japonica* DT-1 株をマウスに感染させ、感染 5 日目の脾臓を摘出して DNA を抽出し、各種プライマーを用いて PCR をおこなった。その結果、Kuroki 株ストック原液感染 i/e/nNOS KO マウスのすべてから *Orientia* DNA が検出された。一方、マイコプラズマ DNA は全く検出されなかった (図 2)。Kawasaki 株ストックに関しては、感染 i/e/nNOS KO マウスの 50%(2/4) および野生型マウスの 25%(1/4) から *Orientia* DNA が検出された。一方、マイコプラズマ DNA が野生型マウスの 25% に株からは検出された。*R. japonica* に関しては、感染脾臓よりリケッチア核酸は同定されなかった。以上より、当方法が *Orientia* ストックからのマイコプラズマ除去に有効 (除去率 15/16) であることが示唆された。また、野生マウスより一酸化窒素合成酵素 (nitric oxide synthetase: NOS) 欠損マウスで陽性率が高かった (4/8 vs 1/8) ことか

ら、NO が *Orientia* 感染防御因子であることが示唆された。

実験 2 : 実験 1 において、*R.japonica* の分離が成功しなかったため、他の免疫不全マウスを用いて、マイコプラズマ除去とリケッチアの動物モデルの確率を試みた。マウスにリケッチアストックを感染し、3 日目に臨床症状の評価を行い、7 日目と 14 日目に脾臓を摘出して、リケッチアとマイコプラズマ核酸の同定を PCR で行った。その結果、感染 3 日目で MyD88 KO マウスと NOD/SCID/JAK3KO マウスにおいて、立毛、活動低下などの重篤な感染症状が認められた (図 3)。感染 7 日目、感染 14 日目の脾臓乳剤における PCR の結果、NOD/SCID/JAK3KO マウスにおいて、*R. japonica* および *R.siberica* の核酸が検出され、感染が確認されたが、同時にマイコプラズマ核酸も検出され、マイコプラズマの除去はできなかったことが確認された。一方、MyD88 KO マウスに *R.japonica* を感染させた所、*R. japonica* の核酸が検出されたが、マイコプラズマ核酸は検出されず、マイコプラズマ除去に成功したことが示唆された。

#### D. 考察

リケッチア感染マウスモデルは *R.*

*conorii* の系のみで確立しており、我が国で発生が認められる病原性リケッチアでは確立していない。その理由として、リケッチア感染防御において重要なエフェクター分子である一酸化窒素(NO)の産生に関して、マウスはヒトに比べて NO 合成酵素(NOS)活性が高く、リケッチア感染が成立しにくいことが考えられる。NO 合成酵素はほ乳類において 3 種類知られており、感染防御には誘導型の NOS(iNOS)が最も重要であるが、NOS 活性は相補的であり、他の神経型 NOS、内皮型 NOS(eNOS)の作用も感染防御に関与すると考えられている。中でも、リケッチアは内皮細胞に感染するため eNOS の影響は重要である可能性がある。従って各 NOS のノックアウトマウス、およびそれらを掛け合わせたノックアウトマウスを用いて、リケッチア感染モデルを確立できる可能性は高いと考えられる。本研究によって、少なくとも *Orientia* では i/e/nNOSKO マウスにおいて感染 5 日目の感染頻度が高く、NO がつつが虫病における宿主防御因子であることが示唆された。今後、それぞれの NOS の *Orientia* 感染に関する寄与の程度を動物感染実験によって明らかにする予定である。一方、*R. japonica* の NOSKO マウスからの分離

はできなかった。このことは、*R. japonica* ストックによる問題か、*R. japonica* 感染における NO の寄与の程度が低い可能性が考えられる。清浄リケッチアストックの確立後、これらに関して検討する必要があると思われる。

また、本研究では、重度に免疫応答が障害されているノックアウトマウスを用いて、リケッチアストックからマイコプラズマのみを除去しつつ、感染モデルの確立を試みた。*Orientia* のマイコプラズマ除去は *i/e/nNOSKO* マウスへの感染によって、効果的に達成され、かつ野生型マウスよりも *Orientia* 維持効率が良好だったことから、このマウスによって他の *Orientia* ストックのマイコプラズマ除去を進めていくことが可能であると考えられた。一方、*Rickettsia* ストックのマイコプラズマ除去に関しては、*i/e/nNOSKO* マウスではリケッチアの感染が成立せず、*NOD/SCID/Jak3KO* マウスではリケッチア感染は成立するものの、マイコプラズマ除去ができないことが明らかになった。今後、*MyD88KO* マウスを用いて、マイコプラズマを除去し、かつリケッチアの維持が可能であるか検索するとともに、清浄化したリケッチアを *NOD/SCID/Jak3KO* マウスで維持、ある

いはこれらを感染実験のツールとして使用することが可能であり、今後の免疫学的研究のツールとして重要な意味を持つと思われる。

## E. 結論

マウスにリケッチアストックを腹腔内投与して、脾臓を摘出して乳剤とすることにより、マイコプラズマの除去と動物感染モデルを確立することを試みた。*Orientia tsutsugamushi* に関しては当方法がマイコプラズマ除去に有効であることが示唆された。また、野生マウスより *NOS* 欠損マウスで陽性率が高かったことから、*NO* が *Orientia* 感染防御因子であることが示唆された。今後、他の遺伝子改変マウスを含めてリケッチア科ストックよりマイコプラズマを除去することを試みると同時に、動物モデルを確立し、免疫応答を解析することを今後の研究で目指す。

## F. 健康危害情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Ikebe T, Ato M, Matsumura T, Hasegawa H, Sata T, Kobayashi K, Watanabe H. 2010. Highly frequent mutations in

negative regulators of multiple virulence genes in group A streptococcal toxic shock syndrome isolates. **PLoS Pathog.** 6:e1000832.

2. Murase Y, Konnai S, Hidano A, Githaka W.N, Ito T, Takano A, Kawabata H, Ato M, Tajima T, Tajima M, Onuma M, Murata S and Ohashi K. Molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* in cattle and *Ixodes persulcatus* ticks. **Vet. Microbiol.**, in press

## 2. 学会発表

Ato, M. 2010. Neutrophil dysfunctions by pathogenic bacteria. Symposium on High Throughput Approaches in Infection & Immunity (Hua Hin, タイ王国、12月)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし