

Fig 1 TNF- α production by THP-1 cells stimulated with LPS alone or combined with antibiotics

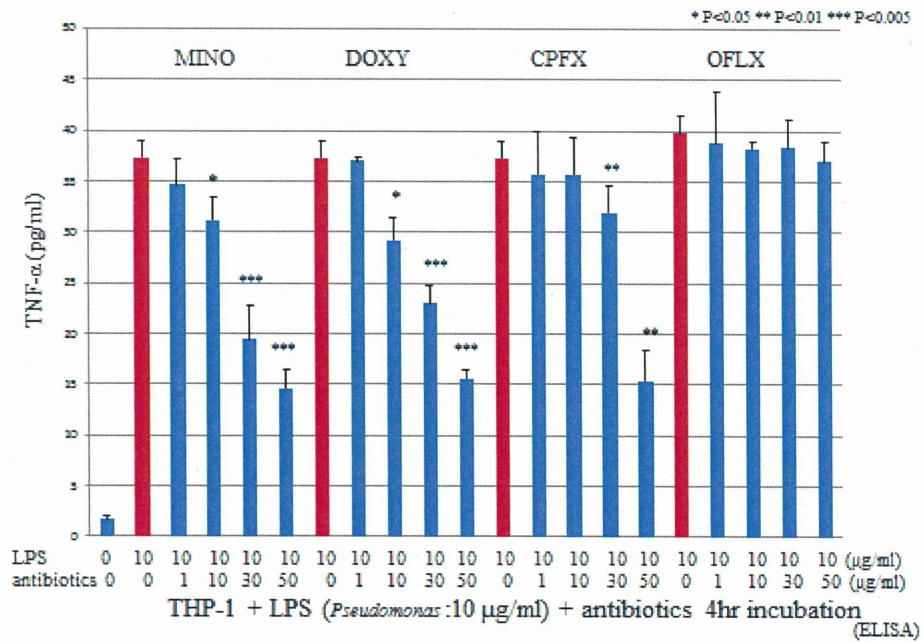


Fig 2 Cytokines/chemokines production by THP-1 cells stimulated with LPS or LPS + antibiotics.

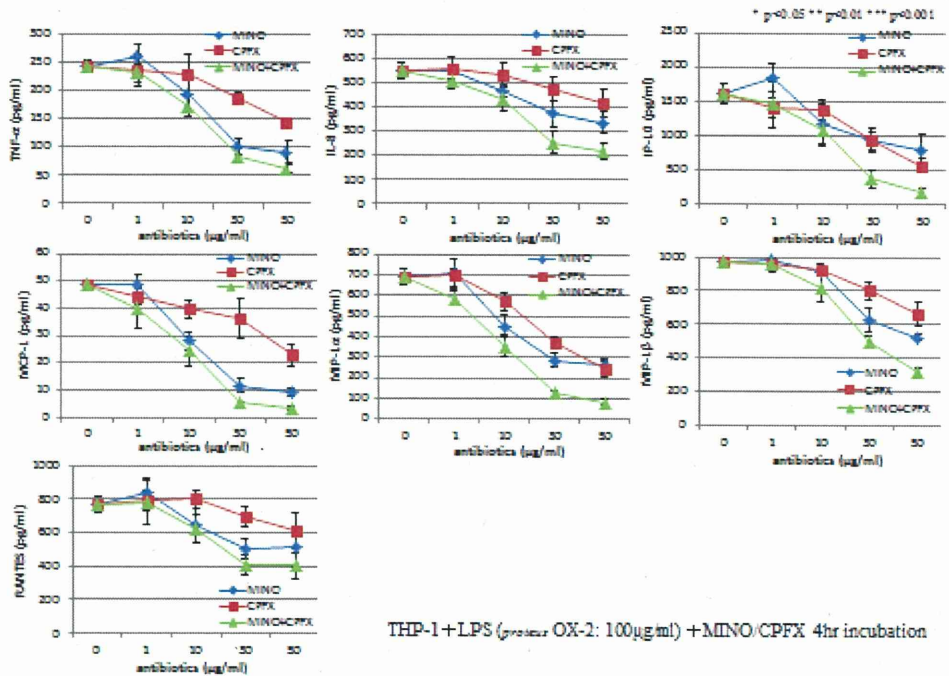


Fig 3 The effects of MINO on activation of I κ B α and three MAPKs (Erk, JNK and p38 MAPK) in LPS-stimulated THP-1 cells.

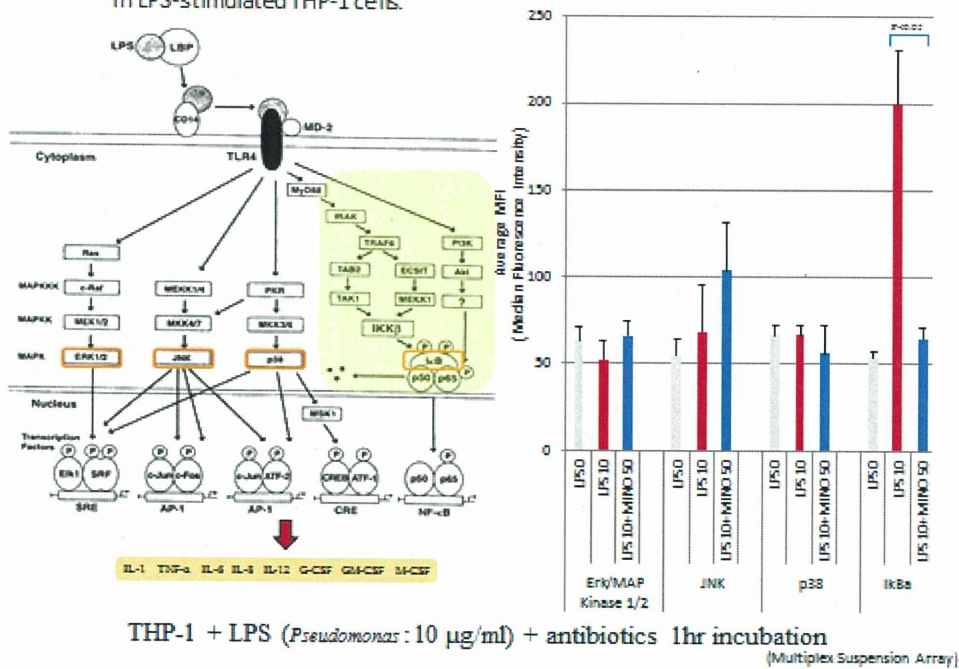
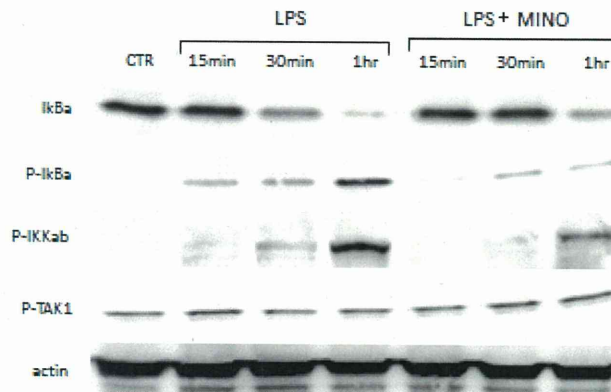


Fig 4

The effects of MINO on activation of I κ B α , IKK and TAK1 in LPS-stimulated THP-1 cells



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

研究分担者

堤 寛 (藤田保健衛生大学医学部 第一病理学、教授)

研究協力者

アOWN桂子 (藤田保健衛生大学医学部 第一病理学、元大学院生)

(現、Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort、フランス)

稲田健一 (藤田保健衛生大学医学部 第一病理学、准教授)

水谷泰嘉 (藤田保健衛生大学 第一病理学、助教)

宮本和昭 (和歌山医科大学 微生物学講座、准教授)

宇都宮洋才 (和歌山医科大学 医薬品探索講座、講師)

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) 日本紅斑熱が疑われる症例の皮膚(主として刺し口、一部紅斑)生検ホルマリン固定パラフィン切片を用いた免疫染色と切片から抽出したDNAを対象としたreal-time PCR法(Taq-Man法)による早期診断法を確立し、60症例以上に臨床応用した。多くの症例で、血清診断より早い段階で確定診断が可能だった。なお、我々の条件下では、免疫染色の感度がreal-time PCR(プロダクトサイズを100bp前後に構築)のそれを上回っていた。

2) 血清抗体価の上昇を欠く9症例が見いだされ、うち7例においてreal-time PCR(SYBR-Green法)で、17 k genus common antigen gene(114 bp)が陽性となった。シーケンス解析で5例は*R. japonica*、1例は*R. tamurae*に一致した。早期治療によって、血清抗体価上昇が抑制された結果と考えられた。

3) 1例の剖検解析で、リケッチアは血管内皮、マクロファージに加えて、尿細管上皮にも感染していた。この結果をもとに感染急性期の尿を解析すると、一部の症例でreal-time PCR陽性となった。ただし、*R. felis*に一致するシーケンスが得られた症例もあった。

4) 紅斑を欠くマダニ咬症の皮膚生検から、*R. sp.* LON(ないし*R. honei*)に一致するシーケンスが得られた。以上より、わが国における紅斑熱リケッチア感染症の多様性が示唆された。

A. 研究目的

(1) 日本紅斑熱の早期診断の確立

(2) 血清診断に頼らないリケッチア症の病理診断の導入

(3) *R. tamurae*、*R. felis*、*R. sp.*

LONなど、*R. japonica*以外のリケッチア症の発見と解析

B. 研究方法

(1) 対象：

ホルマリン固定パラフィン包埋された皮膚生検（刺し口ないし紅斑）、血液、尿検体。

提供施設：

- ① 馬原医院：馬原文彦博士
- ② 明神診療所：森田祐司博士
- ③ 市立宇和島病院：薬師寺直喜博士
- ④ 山田赤十字病院：坂部茂俊博士

2004年から2011年の間に、皮膚生検70件以上、剖検1、尿30、血液10が集積された。

(2) 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は既に確立した（マウス IgM 型モノクローナル抗体 S3、X1 を利用：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。

(3) Real-time PCR 法：

紅斑熱群リケッチア DNA に共通の 17k genus common antigen gene 特異的なプライマーを用いた Taq-Man 法（研究協力者、アウン桂子が開発）を確立した。増幅サイクルは 40、増幅産物の大きさは 114 bp。

一部検体については、SYBR-Green 法を用いた PCR プロダクトのシーケンス解析を加えた。

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。

(倫理面への配慮)

1) 日本紅斑熱リケッチアの取り扱いは、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と採血を行う際は、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、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、今回の方法が広く全国に浸透する可能性が高まるであろう。

C. 結果

(1)と(2)に、論文1の内容をまとめる。

(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）

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（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）。

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。

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 16/52 (31%)、real-time PCR のみ陽性は痂皮 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) 血清抗体価陰性例 (B 群) におけるシーケンス解析

論文 1 発表後に、さらなる検討を行った。血清抗体価の上昇を欠く 9 症例のうち 7 例において、real-time PCR (SYBR-Green 法) で、17 k genus common antigen gene (114 bp) が陽性となった。シーケンス解析で 5 例は *R. japonica*、1 例は *R. tamurae* に一致した (表 1)。早期治療の導入によって、血清抗体価上昇が抑制されると考えられた。

(4) 尿を用いた 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。PCR 産物のシーケンス解析により、一部は *R. felis* 様の配列を示した。

(5) マダニ咬症の皮膚生検解析

刺し口を中心とする局所性紅斑を呈するマダニ咬症の皮膚生検より、*R. sp. LON* (ないし *R. honei*) に一致するシーケンスが得られた。

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。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をもたらされると判断された。

ただし、このうちの少なくとも 1 例は、日本紅斑熱ではなく、*R. tamurae* 感染による可能性が示唆された。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と提唱したい。

ただし、シーケンス解析により、*R. japonica* でなく、*R. felis* 感染が示唆される症例が混在しており、さらなる検討が必要とみなされる。

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、シーケンス解析を加えない限り、陽性反応がすなわち、日本紅斑熱とは断定できない。今回

の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＝日本紅斑熱とみなされる。しかし、最近、仙台市内で見いだされた紅斑熱群リケッチア *R. heilongjiangensis* の存在に加えて、今回、*R. tamurae* 感染の可能性も考えられた。さらに、紅斑を欠くマダニ咬症の皮膚生検からは、*R. sp. LON* (ないし *R. honei*) に一致するシーケンスが得られた。

以上より、わが国の森林における多種多様な vector (マダニ) の分布に対応して、わが国でみられる紅斑熱リケッチア感染症の多様性が示唆された。

E. 結論：

1) 今後の課題

(1) 現在我々が用いているモノクローナル抗体 (S3, X1) や real-time PCR 用プローブは、紅斑熱リケッチアに共通に反応する。わが国におけるリケッチア症の多様性から、より特異性の高い抗体・プライマーの開発が求められる。real-time PCR には、複数の遺伝子をターゲットとしたシーケンス解析の必要性が高い。

(2) 日本紅斑熱以外の紅斑熱リケッチア症の存在が強く示唆されるため、今後、血清抗体価陰性例や臨床的に非定型的な症例を中心にして、徹底した臨床病理学的分析が必要である。

(3) 尿中へのリケッチア排出の臨床的意義は未確定である。その診断的・病態学的意義を含めて、今後さらに検討を要する。

(4) 日本紅斑熱による死亡例は毎年のように経験されるが、病理解剖症例があまりにも少ない。病理解剖例のさらなる解析が切望される。

2) 行政施策への貢献の可能性

(1) 血清診断に頼らない診断法として、刺し口からの皮膚生検の解析を普及させたい。新たな紅斑熱リケッチア感染症の解析手段として、刺し口からの皮膚生検

材料の有用性を広く啓発できれば、新たな疾病分布・病態解析に大きな進歩が期待できる。

(2) 病原性の高い日本紅斑熱リケッチアの取り扱いに関して、皮膚生検のホルマリン固定標本ではバイオハザードの問題は完全に解決できる。診断用患者検体の安全取り扱いに関する指針にこのアプローチを盛り込めないだろうか。

F. 健康危険情報

「該当なし」

G. 研究発表

A) 論文

(1) Tamakuma K, Mizutani Y, Ito M, Shiogama K, 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. Available on line, 2011. (<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-0691.2011.03569.x/abstract>)

(2) 玉熊桂子, 堤 寛. リアルタイム PCR によるホルマリン固定パラフィン包埋標本からの *Rickettsia japonica* DNA の検出：基礎的検討. 藤田学園医学会誌 35(1):25-27, 2011.

(3) 馬原文彦, 藤田博己. 野生動物と動物由来感染症：つつが虫病と日本紅斑熱. 公衆衛生 75(1):31-35, 2011.

(4) 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.

(5) 堤 寛. 劇症型感染症の病理. 法医病理 16:69-82, 2010.

(6) 堤 寛. 感染症における病理診断の役割. 病理と臨床 28(4): 360-366, 2010.

(7) 馬原文彦. 感染症法と保険診療: 日本紅斑熱、つつが虫病の臨床と保険診療の課題. 医学のあゆみ 232(8): 867-870, 2010.

(8) 馬原文彦. 感染症法と保険診療: 感染症法第四類感染症の検査、治療薬の保険適用について. 医学のあゆみ 231(12-13): 1185-1186, 2009.

(9) 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.

(10) 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.

B) 学会発表

(1) 馬原文彦. 日本紅斑熱. 感染症学雑誌 84(4): 491-492, 2010.

(2) 宇都宮洋才, 藤田博己, 玉熊桂子, 堤 寛, 馬原文彦. 日本紅斑熱リケツチアのイヌとマウスでの感染実験. 麻布大学雑誌 19-20: 44, 2010.

(3) 玉熊桂子, 伊藤舞, 宮本和明, 稲田健一, 宇都宮洋才, 馬原文彦, 堤 寛. 日本紅斑熱の病理診断: 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. 衛生動物 61(2): 172, 2010.

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

(5) 玉熊桂子, 宮本和明, 藤田博己, 馬原文彦, 堤 寛. 日本紅斑熱とツツガムシ病の in situ hybridization 法による鑑別. 大原総合病院年報 49: 52, 2009.

(6) 玉熊桂子, 武田公一, 宮本和明, 稲田健一, 宇都宮洋才, 藤田博己, 秋本茂, 馬原文彦, 堤 寛. ホルマリン固定パラフィン包埋皮膚生検サンプルを使用した日本紅斑熱の迅速診断: real-time PCR 法と免疫組織化学法の比較検討. 大原総合病院年報 49: 34-35, 2009.

(7) 馬原文彦. 地域から発信する感染症研究 日本紅斑熱. 感染症学雑誌 83(3): 269-270, 2009.

(8) 玉熊桂子, 稲田健一, 堤 寛, 宇都宮洋才, 宮本和明, 秋本茂, 馬原文彦. 皮膚生検標本からの日本紅斑熱リケツチアの検出: 免疫染色と real-time PCR 法の比較検討. 衛生動物 60(2): 159, 2009.

(9) Tamakuma K, Miyamoto K, Shiogama K, Utsunomiya H, Inada K, Fujita H, Mahara F, Tsutsumi Y. Detection of *Rickettsia japonica* and *Orientia tsutsuga-mushi* by in situ hybridization. 23rd Meeting of the American Society for Rickettsiology, 2009, South Carolina, USA

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

症例	地域	発症日	年齢	性別	刺し口	紅斑	発熱 > 38℃	IHC	Real-time PCR (皮膚)		尿/血液 (Taq- Man)	血清 <i>R. japonica</i> 抗体価				経過
									Taq- Man	Sybr Green		急性期		回復期		
												IgM	IgG	IgM	IgG	
1	徳島	Oct. 23_06	71	女	+	+	+	+	+	+		<40	<40			治癒
								(A)	(A)	(A)						
								-	-	-						
2	三重	Oct. 2_06	64	男	+	+	+	(A)	(A)	(A)		<40	<40	<40	<40	治癒
								+	+	+						
								(B)	(B)	(B)						
3	和歌山	May 25_09	65	男	+	+	-	+	+	(A)	- (尿) - (血液)	<40	<40	<40	<40	治癒
								(A)	(A)	*						
								+	-	+						
4	三重	Nov. 2_06	50	男	+	+	+	(A)	(A)	(A)		<40	<40	<40	<40	治癒
								+	-	-						
								(B)	(B)	(B)						
5	徳島	June 7_08	38	男	+	+	+	+	-	+	- (血液)	<40	<40	<40	<40	治癒
								(A)	(A)	(A)				(2w)	(2w)	
								+	-	-						
6	徳島	May 23_09	54	女	+	+		+	-	-	- (血液)	<40	<40	<40	<40	治癒
								(A)	(A)	(A)						
								+	-	-						
7	三重	Sep. 29_06	29	女	+	+	+	+	-	-		<40	<40	<40	<40	治癒
								(A)	(A)	(A)						
								+	-	-						
8	徳島	May 6_07	64	男	+	+		-	+	+		<40	<40	<40	<40	治癒
								(C)	(C)	(C)						
								-	+	+						
9	三重	Aug. 2_07	62	男	+	+	+	-	+	+		<40	<40			治癒
								(C)	(C)	(C)						
								-	+	+						

A: 刺し口、B: 紅斑、C: 痂皮

**R. tamurae* のシーケンスを検出

汎用されているリケッチア用 PCR 法に関する確認

研究分担者 安藤秀二 国立感染症研究所ウイルス第一部第五室
協力研究者 小笠原由美子 国立感染症研究所ウイルス第一部第五室

研究要旨：国内の公的研究機関で用いられている紅斑熱群リケッチア用 PCR 法に関し、その使用にあたっての留意点について再確認した。マニュアルに掲載されている R1 と R2、Rj5 と Rj10 のプライマーセットでの PCR を行う場合、その用い方によっては、複数のバンドが検出されるなど、判定にできない場合がある。これは、プライマーの位置関係が、nested PCR にも供することができるような位置関係にみえるため、実際に R1 と R2 の内側のプライマーとして Rj5 と Rj10 による nested PCR を行った場合、R1/R2/Rj5/Rj10 のそれぞれのプライマーの Forward と Reverse が外側と内側で組み合わせられた遺伝子も増幅されるためである。このことに留意してこれらの PCR プライマーを使用する必要がある。

また、国内外において、リケッチア属の多様性が広がっており、日本紅斑熱リケッチア *R. japonica* 特異的とされていた Rj5/Rj10 のプライマーでも増幅されるリケッチアが確認されている。さらに、リケッチアの多様性のために、種特異的な PCR プライマーの設計が難しくなっており、感染したリケッチアを PCR によって同定する際には、シーケンス解析が必須のものとなるであろう。

A. 研究目的

国内の紅斑熱群リケッチア検査用の PCR 法としてマニュアルに掲載されている系は、通常、第一に R1 と R2 の属共通の PCR で検出をこころみ、一回の PCR 反応で検出できない場合は、再度同じプライマーを使用して、増幅を試みる。R1 と R2 を用いた PCR により特異的バンドが確認された場合は、Rj5 と Rj10 のプライマーを用いて一次 PCR を行い、上記と同様に一回の反応でバンドが検出されない場合、再度 Rj5 と Rj10 でセカンド PCR を行う。Rj5 と Rj10 によって陽性となった場合は *R. japonica* 感染（日本紅斑熱）と判断するとなっている。これらのプライマーの位置関係は、nested PCR にも供すること

ができるような位置関係にみえるが、実際に R1 と R2 の内側のプライマーとして Rj5 と Rj10 による nested PCR を行った場合、複数のバンドが増幅されて認められることがしばしばある。この反応条件について、使用上の注意点のより細かな情報の提供のため検討を行った。

B. 研究方法

R. japonica と *R. tamurae* から抽出した DNA を鋳型に、R1 と R2 を outer primer、Rj5 と Rj10 を inner primer として、Takara ExTaq を酵素酵素として用い、nested PCR を行った。また、Rj5 と Rj10 による nested PCR の際に、アニーリ

ング温度を 44.7 度から 59.9 度の幅で PCR 反応を行った。

さらに、日本紅斑熱リケッチア *R. japonica* 感染推定地域で採取されたマダニ抽出 DNA について、既報の Hanaoka らの Real time PCR、その他のプライマーセットによる特異性等の検討をおこなった。

(倫理面への配慮)なし

C. 研究結果

プライマー R1 と R2 を outer primer、Rj5 と Rj10 を inner primer として、*R. japonica* と *R. tamurae* の DNA を鋳型に nested PCR を行ったところ、アニーリング温度 54 度まで 357bp のバンドが認められた。また、R1 と R2 による 533-539bp のバンドに加え、450bp 付近のバンドも認められた。アニーリング温度を上げ、59.9 度での PCR 反応では、*R. tamurae* の DNA を鋳型とした nested PCR では、357bp のバンドも 533-539bp のバンドも見られなくなったが、*R. japonica* の DNA を鋳型とした nested PCR では、エクストラバンドは若干減ったものの、59.9 度まで 357bp のバンドとともに、533-539bp のバンドも増幅された(図 1)。

Hanaoka らの Real time PCR では *R. tamurae* は増幅されなかった。また、今回供試した患者感染推定地域のマダニからも、同増幅系では遺伝子の増幅は認められなかった(図 2)。一方、マダニ抽出 DNA について、リケッチア遺伝子の複数の異なる領域を標的とした nested PCR を行ったところ、特異的なバンドの増幅がみられた。増幅産物の遺伝子解析をしたところ、検出されたリケッチアは *R. tamurae* であった(図 3)。

D. 考察

プライマー R1 と R2、Rj5 と Rj10 による 17 k-Da 抗原タンパク遺伝子を標的とした PCR では、リケッチア遺伝子の同領域のプライマー位置から、一見 nested PCR が可能の用に見える(図 4)。しかしながら、プライマー R1 と R2 を outer primer、Rj5 と Rj10 を inner primer とした nested PCR を行ったところ、Rj5 と Rj10 による 357bp のバンド、R1 と R2 による 533-539bp のバンドに加え、450bp 付近のバンドも認められた。これは、R1/R2/Rj5/Rj10 のそれぞれのプライマーの Forward と Reverse が外側と内側で組み合わせられた遺伝子も増幅されるためである。

また、マニュアルのアニーリング温度では、R1 と R2 と Rj5 と Rj10 の nested PCR を行ってしまうと、*R. japonica* 以外のリケッチアも増幅される。内側にあたる Rj5 の配列は *R. tamurae* ではその中央部 4bp が違うだけで、その前後は一致していることから、十分量の DNA 増幅産物が R1 と R2 の一次 PCR 反応で得られていた場合、*R. tamurae* も Rj5 と Rj10 を nested PCR で増幅されやすくなる。

これらのことから、R1 と R2 と Rj5 と Rj10 の PCR を行う際は、正規の標準法としては、最初に R1 と R2 の属共通の PCR で検出をこころみ、一回の PCR 反応で検出できない場合は、再度同じプライマーを使用して、増幅を試みる。R1 と R2 を用いた PCR により特異的なバンドが確認された場合は、Rj5 と Rj10 のプライマーを用いて一次 PCR を行い、上記と同様に一回の反応でバンドが検出されない場合、再度 Rj5 と Rj10 でセカンド PCR を行うことを再確認する必要がある。もし、検出感度等を上げるために、イレギュラーではあるものの、これらのプライマーを用いて nested PCR を行う場合は、他のリケッチアも増幅することを念頭に、増幅産物の切り出し、シ

ークエンズ解析も行う必要がある。また、PCR後のシーケンズ解析は、リケッチアの多様性から、Rj5 と Rj10 のプラマーでも増幅される病原性リケッチアがあることが明らかになってきたことから、必須のものである。

E. 結論

PCR 反応を行う際は、それぞれの反応系の特徴をきちんと理解し、弱点となりうる要素でも、他の標的領域の反応系と組み合わせて、確認できるようにする。特に非典型的な症例の材料などを供試する際は、複数の PCR 系を並行して行う必要がある。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 発表論文

- 1) 安藤秀二, リケッチア, 平松啓一監修、中込治、神谷茂編集, 標準微生物学, 第 11 版, in press
- 2) 安藤秀二, 最近の輸入発疹熱事例について. 人と動物の共通感染症研究会のニューズレター, 10: .4-6, 2011 年 10 月
- 3) 川端寛樹、高野愛、大西真、安藤秀二、小笠原由美子、藤田博己、角坂照貴、和田康夫、馬場俊一、清島真理子: マダニ刺咬例の調査、病原微生物検出情報 32(8):226-268, 2011 年 8 月
- 4) Fujisawa T, Kadosaka T, Fujita H, Ando S, Takano A, Ogasawara Y, Kawabata H,

Seishima M, *Rickettsia africae* Infection in a Japanese Traveler with many tick bites. (Accepted in Acta Dermato-Venereologica, 2012)

5) Takano A, Nakao M, Masuzaka T, Takada N, Yano Y, Ishiguro F, Fujita H, Ito T, Ma X, Oikawa Y, Kawamori F, Kumagai K, Mikami T, Hanaoka N, Ando S, Honda N, Tayler K, Tsubota T, Konnai S, Watanabe M, Ohnishi M, and Kawabata H. Multilocus sequence typing Implicates rodents as the main reservoir host of Human-pathogenic *Borrelia garinii* in Japan. Journal of Clinical Microbiology, 2011, 49: 2035-2039

2. 学会発表

- 1) ANDO S, Trend of rickettsioses in Japan, 6th International meeting of Rickettsiae and rickettsial Diseases, Crete, Greece, 5-7 Jun 2011
- 2) 安藤秀二, 宮古島のつつが虫病の国内外における位置づけと今後の検査対応について、つつが虫病に関する調査報告会、沖縄県宮古島市、平成 24 年 1 月 23 日
- 3) 安藤秀二、ズーノーシスとしての偏性細胞内寄生細菌の自然界におけるリスク、第11回日本バイオセーフティ学会、平成23(2011)年 12 月 2 日、筑波
- 4) 本井祐太, 鈴木正嗣, 安藤秀二, 川端寛樹, 高野愛, 猪熊壽、島根県美郷町のニホンイノシシに関する紅斑熱群リケッチアの疫学的役割、私立大学戦略的研究基盤形成推進事

業「人獣共通感染症の戦略的国際疫学研究の推進と若手研究者の実践的育成」平成23年度 公開シンポジウム「野生動物における人獣共通感染症の実態と研究の取り組み」、平成23年12月2日、神奈川県藤沢市

5) 仲田かおり、石垣里紗、高橋阿起子、堀川達弥、山本剛、安藤秀二、日本紅斑熱の1例、第62回皮膚科学会中部支部学術集会、四日市、平成23年11月19-20日

6) 御供田睦代、山本正悟、安藤秀二、北野智一、平良勝也、岡野 祥、宮代 守、梶山桂子、石橋哲也、高野 愛、角坂照貴、高橋守、藤田博己、高田伸弘。九州地域のリケッチア症の動向、第19回ダニと疾患のインターフェースSADI、広島、平成23年11月3~5日

7) 北野智一、平良勝也、岡野 祥、角坂照貴、藤田博己、高田伸弘、高橋 守、安藤秀二、高野 愛、川端寛樹、御供田睦代、本田俊郎、林 哲也、山本正悟、宮古島の恙虫病に関する調査(2011年)ー池間島のネズミとツツガムシから検出された病原体ー、第19回ダニと疾患のインターフェースSADI、広島、平成23年11月3~5日

8) 藤田博己、伊東拓也、大竹、高田、川端、中本、安藤秀二、高野愛、北日本のマダニ類からのリケッチア検出状況、第19回ダニと疾患のインターフェースSADI、広島、平成23年11月3~5日

9) 大迫英夫、古川真斗、徳岡英亮、松尾繁、松本一俊、八尋俊輔、本田俊郎、山本正悟、安藤秀二、齋藤亨、藤澤哲郎、猪熊壽、原田誠也、熊本県における日本紅斑熱の疫学調

査。第60回九州地区獣医公衆衛生学会、平成23年10月30日、長崎

10) 阪口直也、中村(内山)ふくみ、小林謙一郎、岩淵千太郎、安藤秀二、高崎智彦、小泉信夫、松岡裕之、大西健児：タイから帰国後、ショック、呼吸不全を合併した重症発疹熱の1例。第60回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第58回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会、平成23年10月26-28日、山形

11) 藤田博己、赤松達矢、高瀬欽庸、矢野泰弘、高田伸弘、及川陽三郎、川端寛樹、安藤秀二。香川県におけるマダニ相とマダニ保有リケッチア調査の2007年から2011年までの成績。第66回 日本衛生動物学会西日本支部大会、金沢、平成23年10月8日

12) 小笠原由美子、伊東拓也、藤田博己、安藤秀二、北海道日高地方で採取されたオオトゲ地まだニから分離されたリケッチアの分子生物学的解析、第57回日本衛生動物学会北日本支部会、山形、平成23年10月1日

13) 藤田博己、青山信子、大竹秀男、安藤秀二。宮城県仙台平野におけるイスカチマダニの2011年度の生息調査。第57回日本衛生動物学会北日本支部会、山形、平成23年10月1日

14) 水沼廣、吉田典行、藤田博己、川端寛樹、高野愛、安藤秀二、小笠原由美子、福島県でライム病病原体を検出し得たマダニ刺咬症の1例。第57回日本衛生動物学会北日本支部会、山形、平成23年10月1日

15) 伊東拓也、高田伸弘、藤田博己、川端寛樹、中本敦、赤松達也、安藤秀二、大久保梢、高野愛、小笠原由美子、礼文島におけるマダニ類及びダニ媒介性病原体の調査. 第 57 回日本衛生動物学会北日本支部会、山形、平成 23 年 10 月 1 日

研究、第 63 回日本衛生動物学会、東京、平成 23 年 4 月 14～16 日

16) 安藤秀二、リケッチア症、第 6 回輸入感染症講習会、東京、平成 23 年 9 月 24 日

H.知的財産権の出願・登録状況

なし

17) 成田雅、星の智祥、山本正悟、安藤秀二、藤田博己、11 月熱 福島県郡山市周辺のタテツツガムシ感染症、第 85 回日本感染症学会、東京、平成 23 年 4 月 21～22 日

18) 山内健生、佐藤雅彦、伊東拓也、藤田博己、高田伸弘、川端寛樹、安藤秀二、坂田明子、高野愛. 利尻島のマダニ相とマダニ保有病原微生物、第 63 回日本衛生動物学会、東京、平成 23 年 4 月 14～16 日

19) 高橋守、三角仁子、亀田和成、藤田博己、角坂照貴、高田伸弘、平良勝也、山本正悟、安藤秀二、川端寛樹、北野智一、岡野祥、御供田睦代、高野愛、屋の泰弘、及川陽三郎、本田俊郎、岩崎博道、平良セツ子、岸本寿男、宮古島のつつがむし病患者発生地に生息するカニ寄生ツツガムシ、第 63 回日本衛生動物学会、東京、平成 23 年 4 月 14～16 日

20) 川端寛樹、高野愛、中尾稔、増沢俊幸、高田伸弘、矢野泰弘、石畝史、藤田博己、伊東拓也、及川陽三郎、川森文彦、熊谷邦彦、三上稔之、花岡希、安藤秀二、本田尚子、Kyle Taylor、坪田敏男、今内覚、渡邊治雄、大西真、マダニ媒介性のライム病病原体 *Borrelia garinii* の維持伝播サイクルに関する

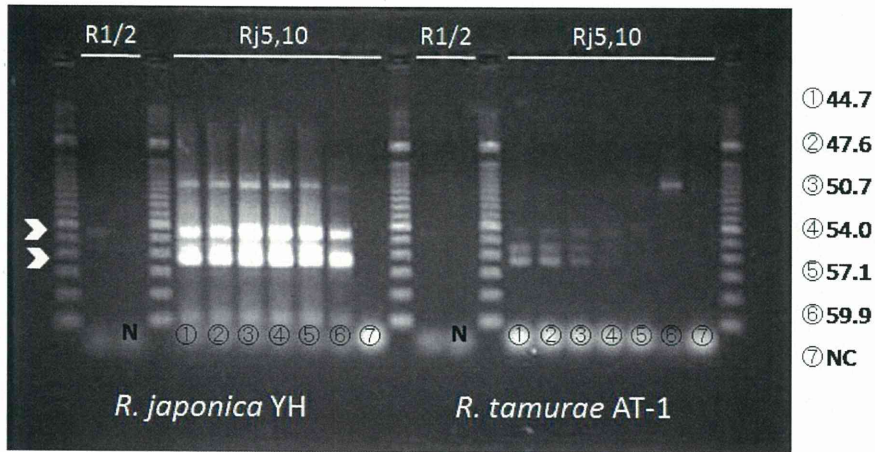


図1. RjとRtaのDNAを鋳型としたプライマーR1/R2のPCR増幅産物に対し、プライマーRj5/Rj10でnested PCRを行った結果

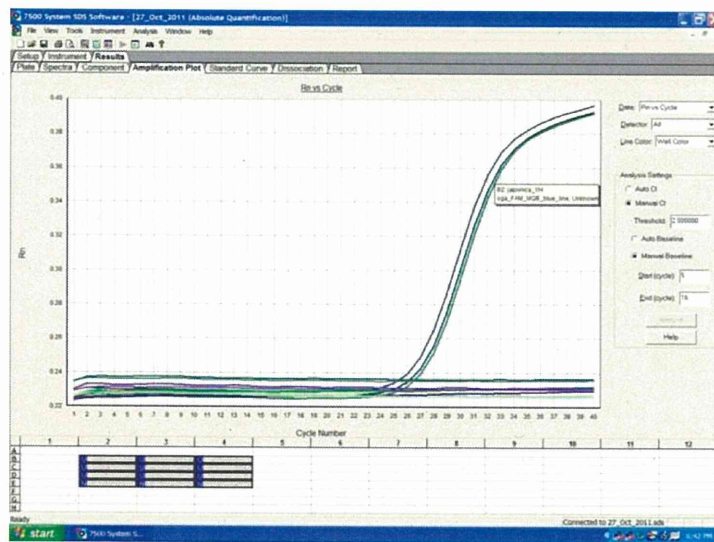


図2. HanaokaらのReal time PCRによるRjとRtaの増幅曲線



図3. 徳之島のマダニ材料をもちいたリケツチアの各種遺伝子のPCR

CLUSTAL W (1.83) Multiple Sequence Alignments

Sequence type explicitly set to DNA
Sequence format is Pearson
Sequence 1: TOKUMOSHIMA_17kDa_region_524bp 524 bp
Sequence 2: R. japonica_complete_genome (1207149 .. 1207685) 537 bp
Sequence 3: AB114825/R. tanurae 394 bp

```

R2
R110
TOKUMOSHIMA_17kDa_region_524bp
AB114825/R. tanurae
R. japonica_complete_genome
TTTACAAATTCCTAAAACC
TTTACAAATTCCTAAAACCATATACTG
TTTACAAATTCCTAAAACCATATACTGATTAAATTATATATTAAATTTAG
TTTACAAATTCCTAAAACCATATACTGATTAA-TTATATATTAAT--AG

Rr 17. 61p
TOKUMOSHIMA_17kDa_region_524bp
AB114825/R. tanurae
R. japonica_complete_genome
-->
AGAGATTATATGAAACTATTATCTAAATTTATGATTATAGCTCTTGCAA
AGAGATTATATGAAACTATTATCTAAATTTATGATTATAGCTCTTGCAA

Rr 17. 61p
TOKUMOSHIMA_17kDa_region_524bp
AB114825/R. tanurae
R. japonica_complete_genome
CTTCTATGTT
CTTCTATGTTACAAGCCTGTAAACGGTCCGGCGGTATGATAAACAAGGT
-----ACAAGCCTGTAAACGGTCCGGCGGTATGATAAACAAGGT
CTTCTATGTTACAAGCCTGTAAACGGTCCGGCGGTATGATAAACAAGGT
*****

TOKUMOSHIMA_17kDa_region_524bp
AB114825/R. tanurae
R. japonica_complete_genome
ACAGGAACACTTCTTGCGGTGCCGGCGGCATTACTTGCTCTCAATT
ACAGGAACACTTCTTGCGGTGCCGGCGGCATTACTTGCTCTCAATT
ACAGGAACACTTCTTGCGGTGCCGGCGGCATTACTTGCTCTCAATT
*****

TOKUMOSHIMA_17kDa_region_524bp
AB114825/R. tanurae
R. japonica_complete_genome
CGGTAAAGGTAAAGGACAGCTTGTCCGAGTAGGTGTAGGTGCATTACTTG
CGGTAAAGGTAAAGGACAGCTTGTCCGAGTAGGTGTAGGTGCATTACTTG
CGGTAAAGGTCACAGGACAGCTTGTCCGAGTAGGTGTAGGTGCATTACTTG
*****

TOKUMOSHIMA_17kDa_region_524bp
AB114825/R. tanurae
R. japonica_complete_genome
GAGCAGTCTTGGTGGACAAATCGGTGCAGGTATGGATGAGCAGGATAGA
GAGCAGTCTTGGTGGACAAATCGGTGCAGGTATGGATGAGCAGGATAGA
GAGCAGTCTTGGTGGACAAATCGGTGCAGGTATGGATGAGCAGGATAGA
*****

TOKUMOSHIMA_17kDa_region_524bp
AB114825/R. tanurae
R. japonica_complete_genome
R15 complement
AGACTTCAGAACTCACCTCACAAAGAGCTTTAGAAACAGCTCCTAGGG
AGACTTCAGAACTCACCTCACAAAGAGCTTTAGAAACAGCTCCTAGGG
AGACTTCAGAGCTCACCTCACAGAGAGCTTTAGAAACAGCTCCTAGGG
*****

TOKUMOSHIMA_17kDa_region_524bp
AB114825/R. tanurae
R. japonica_complete_genome
R15 complement
TAGTARVYVAGAAATGGCGAATCCGGATAACGGCAATTACGGTTACGTAA
TAGTAQTACAGAAATGGCGAATCCGGATAACGGCAATTACGGTTACGTAA
TAGTAACGTAGAATGGCGAATCCGGATAACGGCAATTACGGTTACGTAA
TAGTACGTAGAATGGCGAATCCGGATAACGGCAATTACGGTTACGTAA
*****

TOKUMOSHIMA_17kDa_region_524bp
AB114825/R. tanurae
R. japonica_complete_genome
CACCTAATAAACTTATAGAAATAGTACAGGTCAATATTGCCGTGAGTAC
CACCTAATAAACTTATAGAAATAGTACAGGTCAATATTGCCGTGAGTAC
CACCTAATAAACTTATAGAAATAGTACAGGTCAATATTGCCGTGAGTAC
*****

TOKUMOSHIMA_17kDa_region_524bp
AB114825/R. tanurae
R. japonica_complete_genome
ACTCAACAGTTGTAATAGCGGAAACACAAAAAGCATATGGTAATGC
ACTCAACAGTTGTAATAGCGGAAACACAAAAAGCATATGGTAATGC
ACTCAACAGTTGTAATAGCGGAAACACAAAAAGCATATGGTAATGC
*****

TOKUMOSHIMA_17kDa_region_524bp
AB114825/R. tanurae
R. japonica_complete_genome
Rr 17. 492n complement
R1 complement
ATGCCGCCAACCTGCCGAACATG-----
ATGC-----
ATGCCGCCAACCTGCCGAACATGCGAAGTTGGTAATTGA
CGCCAACCTGACGAACATG
AATGGCAAGTTGGTAATTGA
*****

```

図4. リケツチア属17kDa抗原遺伝子のPCR標的領域のシーケンス配列

ヒトアナプラズマ症における血清診断法の確立に関する研究

研究分担者 大橋典男	静岡県立大学 食品栄養科学部 教授
研究協力者 吉川悠子	静岡県立大学 食品栄養科学部 助教
川森文彦	静岡県環境衛生科学研究所 微生物部
鳥日図(ウリト)	日本予防医学協会・リサーチレジデント
高娃(コウワ)	静岡県立大学大学院博士課程 3 学年
呉東興(ウヅツ)	静岡県立大学大学院博士課程 1 学年

研究要旨

ヒトアナプラズマ症は、リケッチア目、アナプラズマ科に属する *Anaplasma phagocytophilum* により引き起こされるリケッチア感染症で、新興感染症として位置付けられている。我々は、これまでにこのアナプラズマ症の実態を明らかにするため、高知県と鹿児島県の日本紅斑熱が疑われる患者血液から *A. phagocytophilum* の特異遺伝子の検出を試み、3 例の陽性患者を見出した。しかし、血清診断については技術上の課題や微生物学的性状からの問題点が多く、良好な成果が得られていなかった。本研究は、この課題や問題点の一部を明らかにし、血清診断法の確立に成功して、遺伝子検査陽性の患者も弱いながら血清診断で陽性を示すこと、また静岡県のリケッチア症が疑われた不明発熱性疾患の患者の中に *A. phagocytophilum* に対する抗体が存在していることを明らかにした。

A. 研究の背景と目的

我々は、国内におけるマダニ媒介性ヒトアナプラズマ症の実態を明らかにするため、これまで、静岡県、山梨県、青森県、岩手県、鹿児島県、長崎県五島列島、沖縄県与那国島、和歌山県、三重県において、マダニを採集し、その唾液腺中に存在するヒトアナプラズマ症起因細菌、*Anaplasma phagocytophilum* の p44 外膜蛋白遺伝子の検出を行った。その結果、シュルツエマダニ (*Ixodes persulcatus*)、ヤマトマダニ (*I. ovatus*)、タカサゴキラマダニ (*Amblyomma testudinarium*)、タカサゴチマダニ (*Haemaphysalis formosensis*)、

オオトゲチマダニ (*H. megaspinosa*)、フタトゲチマダニ (*H. longicornis*) などの多種類のマダニが *A. phagocytophilum* を保有していることが明らかとなり、国内にもヒトアナプラズマ症が潜在している可能性を示唆した。実際、我々は高知県と鹿児島県で日本紅斑熱が疑われた発熱患者 3 例の血液検体から *Anaplasma phagocytophilum* の p44 外膜蛋白遺伝子の検出に成功している。しかし、血液中の *A. phagocytophilum* に対する抗体検出には成功しておらず、血清診断に問題があるかもしれないと考えていた。

本年度は、このヒトアナプラズマ症の血

清診断について種々の検討を行った。その結果、国内におけるヒトアナプラズマ症に関しては、米国で用いられている血清診断を改良する必要があることを見出し、我が国におけるヒトアナプラズマ症に関する血清診断が可能となった。

B. 研究方法

1. 免疫蛍光抗体法 (IFA) による抗体検出

IFA 抗原としては、*A. phagocytophilum* を HL60 細胞あるいは THP-1 細胞に感染させ培養したもの、および *R. japonica* や *Orientia tsutsugamushi* を L929 細胞で培養したものを用いた。2 次抗体としては、Goat F(ab')₂ anti-human IgM FITC conjugate (AH1608, Invitrogen) および Goat F(ab')₂ anti-human IgG FITC conjugate (AH1308, Invitrogen) を用いた。

2. Western blot 法による解析

Western blot 法には、*A. phagocytophilum* に感染した THP-1 細胞、非感染 THP-1 細胞、および組換え P44-1 蛋白質を抗原として用いた。2 次抗体としては、Goat anti-human IgM alkaline phosphate conjugate (AH10605, Invitrogen) および Goat anti-human IgG alkaline phosphate conjugate (AH10305, Invitrogen) を使用した。

(3) RT-PCR 法を用いた感染 THP-1 細胞における *A. phagocytophilum* の p44 外膜蛋白遺伝子群の発現解析

A. phagocytophilum 感染 THP-1 細胞から RNA spin Mini Kit (GE Healthcare Life Sciences) を用いて、Total RNA を抽出した。そして、PrimeScript RT reagent Kit (TaKaRa) により cDNA を作製し、p3726 と p4257 プライマーを用いて PCR を行った。得られた

増幅産物を TA-cloning し、個々の組換えクローンの塩基配列を解読した。

C. 研究結果

1. 高知県のリケッチア症が疑われた患者からの IFA 法による *A. phagocytophilum* 抗体の検出

我々は、これまでに日本紅斑熱が疑われる患者血液から *A. phagocytophilum* の p44 外膜蛋白質遺伝子群の検出を試み、高知県で 2 例、鹿児島県で 1 例の PCR 陽性患者を見出し報告した。しかし、この 3 例のうち、高知県の患者で血清が入手できた 2 例について、HL60 細胞で培養した米国由来株を抗原として、IFA 法により *A. phagocytophilum* に対する抗体価を度々測定したが、この抗原とはまったく反応性を示さなかった。この IFA 法は、米国で一般に用いられているヒトアナプラズマ症の血清診断法である。当初は、感染後に患者体内で抗体産生が起こらなかった可能性を考えていたが、患者の発熱状態やその他の症状から考えて抗体産生がないことに疑問を持っていた。我々は、最近、*A. phagocytophilum* を HL60 細胞よりも THP-1 細胞に感染させて培養する方がその増殖性が良いことを見出し、研究室では *A. phagocytophilum* を主に THP-1 細胞を用いて培養するようになった。そこで、これを抗原として IFA を試みてみた。その結果、表 1 に示すように、2 名のうちの 1 名の患者 K12 においては、抗原として THP-1 細胞に感染した *A. phagocytophilum* を用いた場合、急性期の血清で、IgM と IgG はいずれも 40 倍の抗体価を示し、回復期の血清では IgM は 160 倍、IgG は 80 倍の抗体価を示すことが判った。そこで、再度、HL60

細胞に感染させた *A. phagocytophilum* を抗原として IFA を行ったが、やはり、以前と同様に、これとはまったく反応性を示さなかった (表 1)。詳細は後述するが、その原因としては、THP-1 細胞と HL60 細胞に感染した *A. phagocytophilum* で発現している *p44* 外膜蛋白遺伝子種の違い、つまり菌体表面の抗原性の差異による可能性が考えられた。また、L929 細胞で増殖させた *R. japonica* を抗原とした場合、回復期血清の IgG において、320 倍の反応性を示した (表 1)。この患者血液からはすでに *A. phagocytophilum* の *p44* 外膜蛋白遺伝子群と *R. japonica* の 16S rDNA が検出されており、さらに今回の血清診断でいずれの病原体に対する抗体も検出されたことから、この患者は明らかに *A. phagocytophilum* と *R. japonica* の混合感染であることが判明した。

もう 1 例の患者 K18 では、表 1 に示すように、急性期血清の IgM で、THP-1 細胞に感染した *A. phagocytophilum* に対し 80 倍の抗体価を示し、また回復期血清の IgM と IgG で、それぞれ 320 倍および 80 倍の抗体価を示した。*R. japonica* および *O. tsutsugamushi* に対しては反応性を示さなかった。この患者からは、すでに *A. phagocytophilum* の *p44* 外膜蛋白遺伝子群が検出されており、これと今回の血清検査の結果を総合すると、患者 K18 は *A. phagocytophilum* のヒト感染症例であることが明らかとなった。

2. Western blot 法による高知県の患者血清が認識する *A. phagocytophilum* 抗原蛋白質の解析

IFA 結果の確認および血清により認識される *A. phagocytophilum* の抗原蛋白質を解析するため、抗原として THP-1 細胞に感染

した *A. phagocytophilum* および組換え P44 蛋白質を用いた Western blot を行った。その結果、図 1 に示すように、患者 K12 および K18 のいずれの血清も、組換え P44-1 蛋白質と感染細胞の P44 外膜蛋白質群に対して、その反応性にそれぞれ強弱はあるものの、特異的に結合する IgM および IgG を含んでいることが判明した。この *A. phagocytophilum* の P44 外膜蛋白質群は、免疫原性が極めて強く、米国の患者血清中には常にその抗体産生が認められている (Zhi et al., *J. Clin. Microbiol.* **36**, 1666-1673, 1998)。したがって、この 2 名の患者血清中には *A. phagocytophilum* に特異的な抗原性蛋白質、特に P44 外膜蛋白質群に対する抗体が産生されていることが確認された。

3. 静岡県のリケッチア症が疑われた不明発熱性患者からの IFA および Western blot 法による *A. phagocytophilum* 抗体の検出

静岡県において、リケッチア症が疑われ、日本紅斑熱およびつづが虫病の血清診断が陰性を示した 9 例の血清検体を入手した。これらについて、THP-1 細胞で培養した *A. phagocytophilum* を抗原とした IFA を行ったところ、9 名中 4 名の患者において、*A. phagocytophilum* に対し 40 倍から 160 倍の抗体価を示すことが明らかとなった (表 2)。図 2 には、陽性血清の IFA 顕鏡像の一例を示した。さらに、Western blot 法による解析では、図 2 に示すように、これらの陽性血清は、組換え P44-1 蛋白質や THP-1 感染細胞の P44 外膜蛋白群と反応することが判った。しかし、患者 3 の急性期および回復期の IgM については、Western blot では組換え P44-1 蛋白質および THP-1 感染細胞の P44 外膜蛋白群と反応するが、IFA 法では 20 倍以下の陰性と判断された。Western blot で

A. phagocytophilum の P44 蛋白質群と明らかに特異的に反応していることから、この矛盾は IFA の技術的な問題が考えられ、再度、IFA を行い確認する予定である。それ以外の IFA での反応性は、Western blot の結果とほぼ一致していた。

以上のように、静岡県のリケッチア症が疑われる不明発熱患者の中に、アナプラズマ症の患者が潜在している可能性が示唆された。

4. THP-1 と HL60 細胞に感染した *A. phagocytophilum* が発現する p44 外膜蛋白質遺伝子種について

上述のように、我々はこれまで、HL60 細胞で培養した *A. phagocytophilum* を抗原とした IFA 法により血清診断を行ってきた。しかし、抗体陽性血清はまったく得られなかった。今回、THP-1 細胞で培養した *A. phagocytophilum* を IFA 用抗原として使用したところ、抗体陽性血清が多数見つかった。この結果は、Western blot により、その特異性が確認できた。この原因として、HL60 細胞と THP-1 細胞で増殖した *A. phagocytophilum* では、その抗原性に差異があること推測された。*A. phagocytophilum* には、その菌体表面に P44 外膜蛋白質群を発現している。この蛋白質をコードする相同遺伝子群は、ゲノム上に 113 個存在し (*p44 multigene family*)、これらの遺伝子交換が抗原変異を引き起こす (Lin *et al.*, *Infect. Immun.* **71**, 5650-5661, 2003)。これまで、我々は HL60 感染細胞を抗原として用いてきたが、この感染細胞では主に *A. phagocytophilum* の P44-18E 蛋白質が発現している (Zhi *et al.*, *J. Biol. Chem.* **274**, 17828-17836, 1999)。そこで、ここでは、THP-1 細胞に感染した *A. phagocytophilum* について、その発現している *p44* 遺伝子種を解析した。RT-PCR と

TA-cloning を行い、得られた *p44* クローンを 40 個無作為に選出して、それらの配列を決定した。その結果、20 個中 15 個は P44-60 (62.5%) で、これら 15 個の間の相同性は 94.6-100%であった。また、残りの 5 個は P44-47 (25%)で、その相同性は 97.1-100%であった。この 2 種類の *p44* 遺伝子種のアミノ酸配列を、組換え P44-1 蛋白質と HL60 細胞内で発現している P44-18E の配列と比較したところ、表 3 に示すように、これらのアミノ酸配列の間ではその相同性が 54.2-69.6%とかなり低いことが判り、これらの間では血清学的交差反応性が乏しいものと推察された。つまり、国内のアナプラズマ症患者の血清中には P44-18E 蛋白質と反応する抗体がほとんど産生されていないが、P44-1、P44-60、P44-47 のいずれかに対する抗体が存在しているものと考えられた。よって、国内のアナプラズマ症の血清診断には、P44-1、P44-60、P44-47 蛋白質を発現している *A. phagocytophilum* を抗原として使用する必要があることが判った。

D. 考察

国内におけるアナプラズマ症の血清診断がこれまで困難であった点については、(i) *A. phagocytophilum* の主要抗原が抗原変異を起こす P44 外膜蛋白質群 (*p44 multigene family*) であること、(ii) 国内の分離株がないため米国ヒト分離株を抗原として使用しており、国内と米国の *A. phagocytophilum* の間で抗原性の差異が予想されること、(iii) アナプラズマ症について認知度が低いため、血液検体が入手困難であることなどが挙げられる。今回、我々は、(i)の問題点をほぼ明らかにした。つまり、(A) P44-18 蛋白質が発現している *A. phagocytophilum* 感染 HL60 細胞を抗原として利用しても国内の患者血清は

陰性となる、(B) 国内の血清診断には P44-60 や P44-47 蛋白質が発現している THP-1 感染細胞を IFA 抗原として使用すべきである、(C) 組換え P44-1 蛋白質や THP-1 感染細胞を抗原として用いた Western blot 法は血清診断の確定試験として極めて有効である、ことなどを明らかにした。

A. phagocytophilum は、生体に感染すると、生体防御免疫系を回避するため、抗原変異を引き起こす。この抗原変異は、ゲノム上の 1 箇所が存在する *p44* 発現領域に種々の *p44* 遺伝子種を組換えることで、菌体表面の P44 外膜蛋白質種が変わり引き起こるものである (Lin *et al.*, *Infect. Immun.* **71**, 5650-5661, 2003)。我々は、これまで組織培養で継代する *A. phagocytophilum* は、生体内と異なり免疫系のバイアスがないため、抗原変異が起らず、その抗原性は変化しないと考えていた。実際、HL60 細胞では、恒常的に P44-18E 蛋白質を発現している *A. phagocytophilum* が優占している (Zhi *et al.*, *J. Biol. Chem.* **274**, 17828-17836, 1999)。よって、我々は THP-1 細胞での培養においても、HL60 細胞の場合と同様に P44-18E 蛋白質を発現している *A. phagocytophilum* が優占していると考えていた。しかし、実際は、P44-60 や P44-47 蛋白質が発現しており、その血清学的反応性も著しく異なるものであった。その要因については、以下のことが推察される。HL60 細胞では、P44-18E 蛋白質を発現している *A. phagocytophilum* が優占しているが、その他の P44 蛋白質群を発現しているものも存在する (Zhi *et al.*, *J. Biol. Chem.* **274**, 17828-17836, 1999)。我々は、HL60 細胞から THP-1 細胞に継代したものをを用いているが、その環境変化により、THP-1 細胞に適応しやすい *A. phagocytophilum* の selection が起こり、

P44-60 と P44-47 蛋白質を発現している *A. phagocytophilum* が優占したものと考えられた。したがって、血清診断用の抗原を調製する場合、培養する宿主細胞種も考慮する必要があることが明らかとなった。

今後は、(ii)および(iii)の課題について取り組む予定である。

E. 研究発表

1. 発表論文

- 1) Gaowa, Wuritu, Wu, D., Yoshikawa, Y., Ohashi, N., Kawamori, F., Sugiyama, K., Ohtake, M., Ohashi, M., Yamamoto, S., Kitano, T., Takada, N., and Kawabata, H.: Detection and characterization of *p44/msp2* transcript variants of *Anaplasma phagocytophilum* from naturally infected ticks and wild deer in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* **65**, 79-83 (2012)
- 2) Matsumoto, K., Takeuchi, T., Yokoyama, N., Katagiri, Y., Ooshiro, M., Zakimi, S., Gaowa, Kawamori, F., Ohashi, N., and Inokuma, H.: Detection of the new *Ehrlichia* species closely related to *Ehrlichia ewingii* from *Haemaphysalis longicornis* in Yonaguni Island, Okinawa, Japan. *J. Vet. Med. Sci.* **73**, 1485-1488 (2011)
- 3) Sen, E., Uchijima, Y., Kadosaka, T., Ohashi, N., Okamoto, Y., Fukui, T., and Masuzawa, T. Molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks from Istanbul metropolitan area and rural Trakya (Thrace) region of Northwestern Turkey. *Ticks Tick Borne Dis.* **2**, 94-98 (2011)
- 4) Hiroi, M., Harada, T., Kawamori, F.,