

問5 鑑別を要する疾患は何ですか？

答 回帰熱と同様の症状を呈しうる疾患には様々なものが考えられますが、ダニ媒介性の疾患としては、つつが虫病、日本紅斑熱を含むリケッチア感染症、ライム病、アナプラズマ症、エーリキア症などが挙げられます。そのほか、レプトスピラ症、ブルセラ症（波状熱）、鼠咬症、野兔病や、海外渡航歴がある場合は、さらに、マラリア、デング熱などと鑑別が必要です。

問6 どのようにして診断すればよいですか？

答 マダニによる咬傷後、上記問3・4にあるような症状・検査所見が認められた場合は、回帰熱を疑います。ただし、全ての症状や検査所見が認められるわけではありません。また、患者がマダニに咬まれたことに気がついていなかったり、刺し口が見つからなかったりする場合があります。そのため確定診断には、発熱期の血液検体（全血、血清、血液培養ボトル等）を用いて、以下のような方法により、病原体診断を行います。

- ボレリア菌の分離・同定
- 暗視野顕微鏡下鏡検による病原体の検出
- 蛍光抗体法等による末梢血スミアの観察による病原体の抗原の検出
- PCR 法による病原体の遺伝子の検出

なお、同じくボレリア属菌によるライム病については、これまで実施されてきた検査では、回帰熱との鑑別ができないことから、過去にライム病と診断された症例についても、実際には回帰熱であったか、もしくは、回帰熱との共感染であった可能性があります。よって、回帰熱もしくはライム病を疑い、病原体診断を行う場合は、回帰熱・ライム病両方の検査を依頼する必要があります。これら確定診断のための検査は、国立感染症研究所で実施することが可能ですので、まずは最寄りの保健所にご相談ください。

問7 治療方法はありますか？

答 ミノサイクリンやドキシサイクリンなどのテトラサイクリン系抗菌薬の投与が有効です。ペニシリン系の抗菌薬も有効ですが、殺菌的な抗菌薬を使用した場合、希に Jarisch-Herxheimer 反応（ヤーリッシュ-ヘルクスハイマー反応）*を起す場合があります。注意が必要です。

*発熱、悪寒、頭痛、筋肉痛、頻脈などを主徴とする急性全身症状。死菌から放出されたエンドトキシン（菌体内毒素）等により引き起こされると考えられている。

問8 検査で回帰熱であることが確定した場合、どう対応したらよいですか？

答 回帰熱は感染症法において四類感染症に位置付けられていますので、患者を回帰熱と診断した場合には、直ちに最寄りの保健所長を通じて届け出てください。

→届出様式

問9 患者や患者検体（サンプル）を取り扱う上で、特に注意することはありますか？

答 回帰熱は、ヒトからヒトには感染しませんが、発熱期患者の血液には回帰熱の病原体が存在するので、標準予防策を遵守してください。

問10 検査方法等、技術的な内容の相談窓口を教えてください。

答 国立感染症研究所 info@niid.go.jp にお問い合わせください。

<参考文献>

回帰熱 診断マニュアル

http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/relapsing_fever_120608.pdf

ライム病と回帰熱の比較

疾病名	ライム病（四類感染症）	回帰熱（四類感染症）
国内で確認されている病原体	スピロヘータ科ボレリア属菌 <i>Borrelia garinii</i> , <i>B. afzelii</i> など	スピロヘータ科ボレリア属菌 現在のところ、 <i>Borrelia miyamotoi</i> のみ(※)
感染経路	主としてマダニによる咬傷（ヒト-ヒト感染はなし） （回帰熱については、シラミ媒介性のももある）	
主な媒介マダニ	シュルツェマダニ（病原体保有率：20～30%程度）	シュルツェマダニ（病原体保有率：1～5%程度）
国内発生届出数	年間 10 件程度 （死亡例は 2007 年に 1 件報告あり）	感染症法施行後の届出無し（輸入症例 2 例を除く）
国内患者発生地域	シュルツェマダニの生息地域に一致（主に中部以北の高地、寒冷地）。北海道、長野県など。	国立感染症研究所が保存していた血清約 800 検体を検査したところ、 <u>北海道の 2 検体から <i>B. miyamotoi</i> を検出。</u>
潜伏期間	（マダニ咬傷から）3～32 日（平均 7～10 日）	（マダニ咬傷から）12～16 日（平均 15 日）
主症状	<ul style="list-style-type: none"> マダニ刺咬部を中心とした遊走性紅斑が特徴的 発熱（回帰熱ほどではない）、頭痛、関節痛、筋肉痛などインフルエンザ様症状を伴うこともある 	<ul style="list-style-type: none"> 発熱（39℃以上）、頭痛、筋肉痛、関節痛、全身の倦怠感など 回帰熱（3～6 日の発熱期と 7～10 日の無熱期の反復） <i>B. miyamotoi</i> による死亡例の報告は無い
確定診断検査	<ul style="list-style-type: none"> 血清中の抗ボレリア抗体の検出：可 血液検体を用いた PCR：不適 皮膚生検による病原体の分離・同定：可 	<ul style="list-style-type: none"> 血清中の抗ボレリア抗体の検出：可 有症期の血液検体を用いた PCR：可
	*抗ボレリア抗体の検出検査のみでは、ライム病と回帰熱の鑑別不能	
治療・予防	テトラサイクリン系の抗菌薬（ミノサイクリン、ドキシサイクリンなど）の投与が有効	

※*Borrelia miyamotoi* は、1995 年に我が国で新種として発見された。当時、その病原性は不明であったが、2011 年にロシア、また、2013 年に米国において、回帰熱の病原体であることが確認されている。

平成 25 年度 厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
ダニ媒介性細菌感染症の診断・治療体制構築とその基盤となる技術・情報の体系化に関する研究
分担研究報告書

新興回帰熱の病態解析を目的とした動物感染モデルの開発研究

研究分担者	高野 愛	山口大学共同獣医学部 准教授
研究協力者	阿戸 学、松村 隆之	国立感染症研究所免疫部
	長谷川 秀樹	国立感染症研究所感染病理部
	佐藤 梢	国立感染症研究所細菌第一部
	川端 寛樹	国立感染症研究所細菌第一部（研究分担者）

研究要旨

感染症法4類に規定される回帰熱の国内感染例は 1950 年代より1例も報告されていなかったが、1995 年に我が国で発見された *Borrelia miyamotoi* による新興回帰熱の国内感染事例の存在が本研究班の後ろ向き疫学調査により明らかとなった。このことから本研究では、ヒトの病態解析のモデルとして、マウス感染モデルが成立するか明らかにすることを目的とし、マウスにおける *Borrelia miyamotoi* 感染時の病態解析を行なった。

A. 研究目的

Borrelia miyamotoi は 1995 年に Fukunaga ら¹⁾によってシュルツェマダニ *Ixodes persulcatus*、およびヒメネズミ *Apodemus argenteus* より分離された回帰熱群のボレリアである。1995 年の発見以来、その病原性は不明であったが、2011 年にロシアでマダニ刺咬後の発熱を伴う多彩な症状が *B.miyamotoi* 感染に起因すること²⁾、また 2013 年に米国およびオランダで慢性髄膜炎を呈した本菌感染例が報告されたこと^{3,4)}、およびマダニの生息域で、その活動期に何らかのウイルス感染が推定された患者群で、上気道や腸管でのウイルス感染が否定された症例群では、*B.miyamotoi* に対する抗体陽性率

が高いことが示されたことから⁵⁾、これまで知られていない新たな感染症の起原菌であることが確定的となった。さらに、本研究班において国立感染症研究所が行なった後ろ向き疫学調査により、*B.miyamotoi* の国内感染事例が確認された⁶⁾。ロシアや米国のヒト感染患者では肝機能障害や髄膜刺激症状、菌血症による thrombocytopenia が報告されること、発症から来院までの期間が他の *Borrelia* 属感染症であるライム病などより比較的短いこと等から、急速に全身症状が進行することが推定されており、今後、ヒトにおける本感染症の病態解明が急務である。

他方、*B.miyamotoi* は、*Ixodes scapularis* によって媒介される北米型、

Ixodes ricinus によって媒介されるヨーロッパ型、そして日本やロシアにおいて *I.persulcatus* によって媒介されるシベリア・極東型に分けられる。この内、北米型 *B.miyamotoi* は免疫不全マウスでは感染が維持されるが C3H マウスなどの実験動物では感染が維持されないため、ヒト病態解析に適していないと考えられる⁷⁾。

本研究では、日本国内で問題となる可能性があり、かつロシア等で患者報告数が多いシベリア・極東型 *B.miyamotoi* について、マウスにおける感染時の病態解析モデルの開発研究を行った。

B. 研究方法

【被験動物】

C57BL/6J (crj) マウス雌5週齢

【接種方法】

2×10⁵ cells を腹腔内接種

【接種株】

試験(1回目)

B. miyamotoi MYK1 株

B. miyamotoi MYK3 株

試験(2回目)

B. miyamotoi MYK1 株

試験(3回目)

B. miyamotoi MYK1 cloneG3 株

MYK1: 2012年北海道 *Ixodes pavlovskyi* より分離

MYK3: 2012年北海道 *I. persulcatus* より分離

MYK1 clone G3: MYK1 株の段階希釈クローン株

【感染実験スケジュール】

接種後 1, 3, 5, 10, 20 日目(1回目)、接種前および接種後 5, 10, 20, 30 日目(2回目)、あるいは接種後 5, 10, 20 日目(3回目)に安楽殺後、全採血を行なった後に各臓器を摘出し試験に供した。

【*B. miyamotoi* 遺伝子の検出、病理学的解析】

採取した臓器から DNA を抽出後、*B. miyamotoi* 遺伝子検出に供した。ボレリアの遺伝子検出は、昨年度の報告書(研究分担者、川端寛樹)に記載したリアルタイム PCR 法に従って行なった。病理学的解析は、薄層切片を作成後、H. E.染色を行うと共に、ヤギ抗ボレリアポリクローナル IgG 抗体 (Kirkegaard and Perry Laboratories)を用いた免疫染色を行い、顕微鏡下観察を行なった。

【抗体検出】

B.miyamotoi 全菌体を抗原としたウエスタンブロット法にて血清中における抗ボレリア抗体の検出を行なった。また一部の血清について、*B.miyamotoi* HT31 株由来の組換え GlpQ 抗原(回帰熱群ボレリア特異的抗原)を用いた抗体検査も試験的に行なった。

C. 研究結果

感染実験 1 回目、2 回目において、接種後 10 日目までは肝臓、脾臓等の臓器で高率に *B.miyamotoi* の DNA が検出されるとともに、脳を含む全身臓器からもボレリア DNA が検出された(図 1)。さらに感染により、一過性の脾臓重量およびサイズの増加・上昇が観察された(図 2)。一方、病理解析では組織中(血管外)に菌体を確認したものの、炎症像などは見られなかった。

他方、1、2回目実験で用いた *B.miyamotoi* MYK1 株を段階希釈法にてクローン化した *B.miyamotoi* MYK1 cloneG3 株を用いた3回目の実験では、試験に供した全ての個体、いずれの臓器からも *B.miyamotoi* の遺伝子は検出されなかった。なお、*B.miyamotoi* を接種したマウスはいずれの実験においても臨床症状を示さなかった。

ウエスタンブロット法による抗体検出の結果、いずれの実験においても、接種5日目以降抗体が検出された(図3)。また、試験的に行なった組換え GlpQ 抗原を用いたウエスタンブロットにおいても抗体が検出された(接種後20日目のみ実施)。

D. 考察

北米型 *B.miyamotoi* のマウス感染実験例では、免疫不全マウスのみで持続感染をし、近交系マウス(BALB)においては一過性の感染にとどまる(Tom G. Schwan 私信)。本研究では、接種後10日目までは複数の臓器組織中に菌体が確認されている一方、20日目以降はいずれの実験においても *B.miyamotoi* DNA が検出されなかったことから、北米型と同様に、近交系マウスにおいてはシベリア-極東型 *B.miyamotoi* でも一過性の感染にとどまる可能性が示唆された。さらに、接種後5日目より抗体の産生が確認されたことから、抗体価の上昇に伴って早期に菌体が排除されている可能性が示唆された。

他方、10日目まで遺伝子が検出された *B.miyamotoi* MYK1 株をクローニングした *B.miyamotoi* MYK1 cloneG3 株では、全ての接種後日数、臓器からも *B.miyamotoi* DNA は検出されなかったことから、クローニン

グにより感染性が低下した可能性が考えられた。人工培地での継代による感染性の欠損はライム病ボレリアで複数の報告がなされており、その多くは感染に必須な遺伝子をコードしたプラスミドの欠損に起因することが明らかとなっている^{8,9)}。クローニング化の過程で、人工培地に適応した株が選択された可能性があり、今後、菌株間(クローン間)の感染性の違いを検証することで、*B.miyamotoi* の感染性に関与する因子を明らかにできる可能性がある。

E. 結論

我が国で分離されたシベリア-極東型 *B.miyamotoi* を用いても、マウスではヒトにおける本回歸熱の病態を再現できない可能性が示唆された。他方、菌株によって感染性に違いが見られたことから、今後の基礎的研究において感染性の違いを引き起こす責任遺伝子の同定などが望まれる。

○引用論文

- 1) Fukunaga M, et al., Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia miyamotoi* sp. nov., isolated from the ixodid tick *Ixodes persulcatus*, the vector for Lyme disease in Japan. Int J Syst Bacteriol. 1995. 45: 804-810.
- 2) Platonov AE, et al., Humans infected with relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi*, Russia, Emerg Infect Dis. 2011. 17: 1816-1823.
- 3) Gugliotta JL, et al., Meningoencephalitis from *Borrelia miyamotoi* in an Immunocompromised

Patient. N Engl J Med. 2013. 368:
240-245.

4) Hovius JW, et al. A case of
meningoencephalitis by the relapsing
fever spirochaete *Borrelia miyamotoi* in
Europe. Lancet. 2013. 382: 658.

5) Krause PJ, et al., Human *Borrelia*
miyamotoi infection in the United
States. N Engl J Med. 2013. 368:
291-293.

6) 国内感染が確認された回帰熱の2例. 2
IASR. 34: 305, 2013.

7) Hue F, et al., Chromosome sequence of
Borrelia miyamotoi, an uncultivable
tick-borne agent of human infection.
Genome Announc. 2013. 1: e00713-13.

8) Norris SJ, et al., High- and
low-infectivity phenotypes of clonal
populations of in vitro-cultured *Borrelia*
burgdorferi. Infect Immun. 1995. 63:
3670-3677.

9) Purser JE, Norris SJ. Correlation
between plasmid content and infectivity
in *Borrelia burgdorferi*. Proc Natl Acad
Sci U S A. 2000. 97: 13865-70

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表
1. 論文発表
なし

2. 学会発表

1) 高野愛, 川端寛樹, 大久保(佐藤)梢, 中
尾稔, 伊東拓也, カイル テイラー, 李 景
利, 坪田 敏男, 今内 寛, 吉村英紘, 豊間
根耕地, 村田史郎, 大橋和彦. 国内に潜在
すると考えられる新興回帰熱に関する疫学
調査研究. 第 156 回日本獣医学会学術集
会. 2013.9.20-22. 岐阜県岐阜市

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

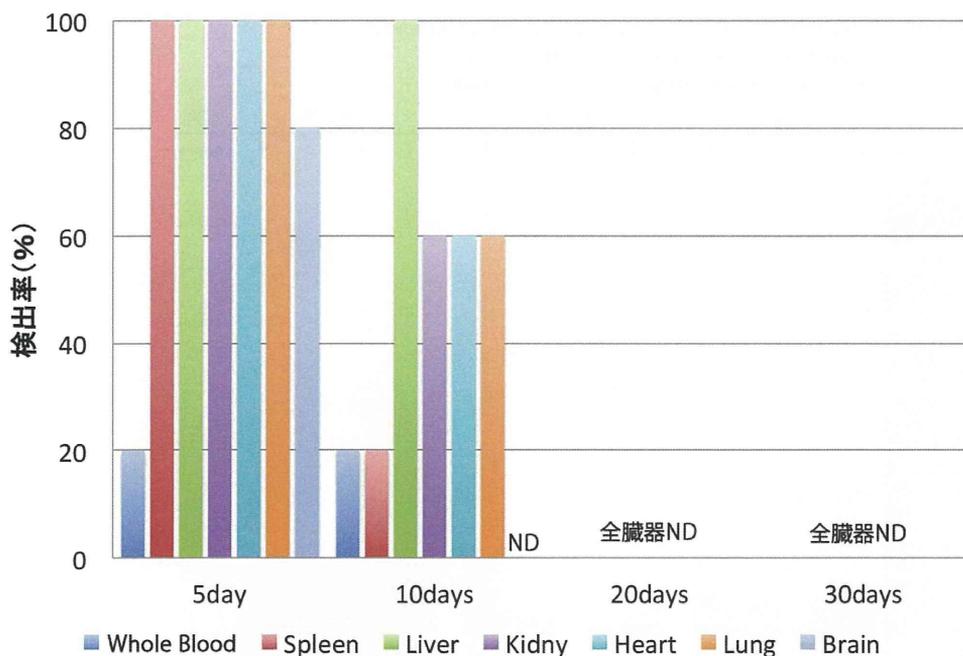


図 1. *B. miyamotoi* DNA 検出臓器

縦軸に検出率 (%), 横軸に接種後日数を示す。接種後 10 日目までは複数臓器より *B. miyamotoi* DNA が検出された。

ND: Not detected.

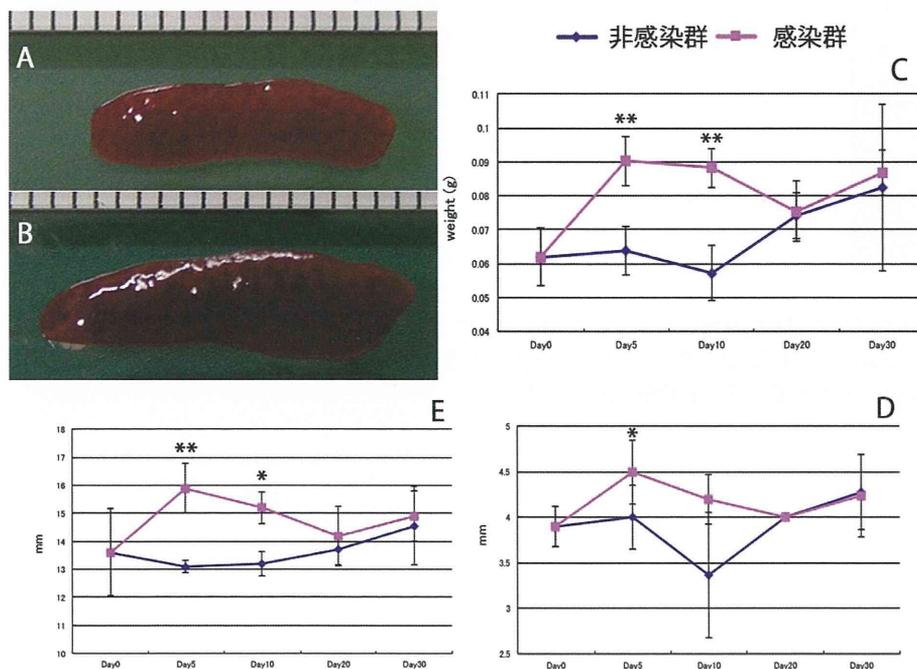


図 2. 脾臓サイズ、重量の変化

B. miyamotoi 感染により引き起こされた一過性の脾腫。AB: 接種 5 日後脾臓 (A: 非感染群脾臓、B: *B. miyamotoi* 感染群)。C: 脾臓重量の推移、D: 脾臓サイズ (幅) の推移、E: 脾臓サイズ (長さ) の推移。実験感染により、接種 5 日後及び 10 日後に脾臓重量が有意に上昇し、サイズも拡大した。

** : $P < 0.01$, * : $P < 0.05$ (ANOVA)

2014.1.10 Western Blot (SuperSep™, 5-20% 2D, Antigen; *B.miyamotoi* MYK1 whole)

1st Ab; MYK1G3 injected B6 Mouse serum 1:100

2nd Ab; Anti-mouse IgG+M(H+L) 1:10000

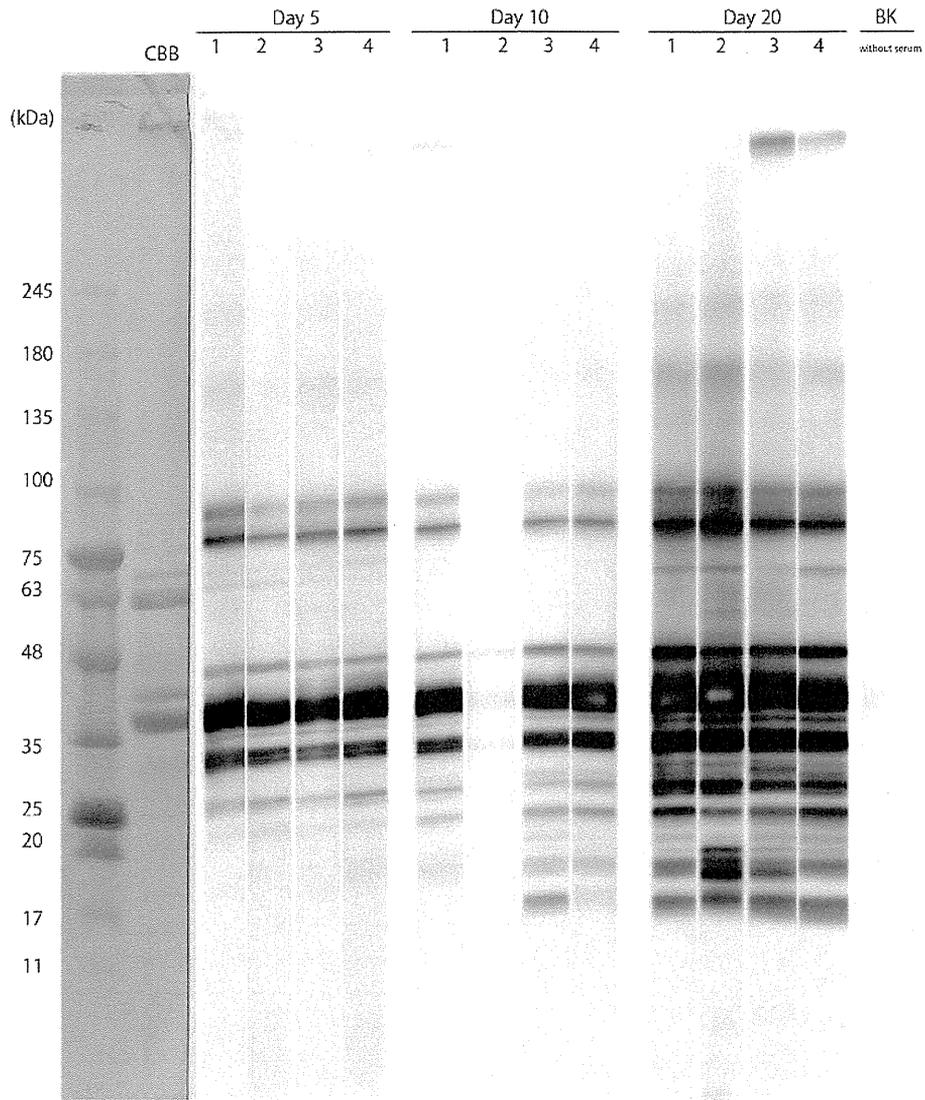


図 3. 全菌体を用いて行なったウエスタンブロット法による抗体検出
抗原は *B. miyamotoi* 全菌体を用い、1次抗体に感染実験マウス血清 (100倍希釈)、
2次抗体に抗マウス IgG+M (10000倍) を用いた。

平成 25 年度 厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
ダニ媒介性細菌感染症の診断・治療体制構築とその基盤となる技術・情報の体系化に関する研究
分担研究報告書

ダニ媒介性病原体の伝播機序の解明と制御法の開発

研究分担者	今内 覚	北海道大学大学院獣医学研究科 准教授
	川端 寛樹	国立感染症研究所 室長（研究分担者）
	高野 愛	山口大学共同獣医学部（研究分担者）
	伊東 拓也	北海道衛生研究所
	中尾 稔	旭川医科大学

研究要旨

マダニは熱帯から温帯にかけて広く分布しており、日本でも人をはじめ多くの動物にウイルス、細菌、リケッチア、原虫などの病原体を伝播している。これまでの研究において、種々のダニ媒介性病原体が引き起こす病態が分子レベルで解明され、制圧にむけたワクチン開発など行われているが、有効な予防、治療法が確立されていない病原体も多い。また、これら多くの病原体はベクターであるマダニ体内でも増殖し、伝播するためさらにその制圧を困難にしている。マダニは宿主に吸血すると10～14日間吸血を続け、その間に唾液腺から多種の生理活性物質を動物体内に注入し吸血を持続する。すなわち、血管拡張因子、抗血液凝固因子、接着因子、組織溶解因子および免疫抑制因子などである。病原体の伝播にはダニの唾液が重要な役割を担い、マダニが吸血して数日で、マダニ唾液腺内の病原体が唾液とともに動物体内に注入されて感染が成立する。現在、マダニに対するコントロール法として殺ダニ剤による駆除が一般的であるが、殺ダニ効果には限界が有り、使用薬剤に対する耐性ダニの出現や薬剤散布による環境汚染、畜産製品への薬剤残留等が問題点として指摘されている。そこで、低コストであり、殺ダニ剤使用による環境汚染や薬剤耐性ダニの出現のリスクが少ない抗ダニワクチンの開発が注目されている。抗ダニワクチンとは、ダニ由来因子を抗原として宿主に免疫し、マダニの吸血を阻害することで、病原体の伝播・拡散を防ぐことを目的としたワクチンである。また、複数種のマダニ由来因子を抗原に用い、多くの種類のマダニを標的としたワクチンは、より効果的に病原体伝播を防ぐことが可能であると考えられている。欧米では一部市販化され、その抗ダニ効果も実証されている。ダニ媒介性病原体の伝播機序を解明することで、病原体伝播に関与する因子の同定がなされれば、新規抗ダニワクチンなどの新規制御法の開発へ寄与することが可能になる。そこで平成 25 年度は、北海道のシュルツェマダニ(*Ixodes persulcatus*)における回帰熱ボレリア起因菌(*Borrelia miyamotoi*)の分子疫学調査ならびに *I. persulcatus* 由来因子の機能解析を行ったので報告する。

A. 研究目的

ダニは動物に寄生し体重の減少や畜産物に対して影響を与えるだけでなく、病原体を伝播しヒトや動物の健康を脅かしている。ダニ媒介性疾患の例としては現在問題となっている重症熱症血小板減少症候群やライム病、回帰熱などが挙げられる。このうち回帰熱は、近年ヒトでの感染が報告され問題となっている。この回帰熱の原因である *Borrelia miyamotoi* はライム病 *Borrelia* とは別の *Spirochete* である。この *B. miyamotoi* は 1995 年に北海道の知床で採取された *Ixodes persulcatus* (シールツェマダニ) から初めて分離されたが、発見以降、研究が進んでおらず病原性については不明であった。しかしながら、近年ロシアとアメリカ合衆国において *B. miyamotoi* がヒトに感染し回帰熱を起こしていることが報告された。このうちロシアで分離された *B. miyamotoi* の遺伝子を調べたところ、日本で初めて分離された株と酷似していた。そこで本研究では、*B. miyamotoi* の浸淫調査を行うとともにダニから動物への伝播機構の解明を行い、*B. miyamotoi* 伝播促進因子を同定することを目的とする。現在、この伝播促進因子の候補の一つとしてダニが吸血する際に分泌する免疫抑制因子が予想される。ダニは吸血を行う際に血管拡張因子や血液凝固阻害因子などを宿主へ分泌するが、そのうちの一つが免疫抑制因子である。免疫抑制因子は宿主の防御機構を阻害し、ダニが長時間吸血することを可能にする。また、宿主免疫を抑制することから病原体の伝播を助長することも知られている。さらに *I. scapularis* で同定された免疫抑制因子 Salp15 はライム病の原因病原体である *B. burgdorferi* の抗原部分に付着し、抗体や補体等の宿主免疫から防御していることも報

告されている。これらのことから免疫抑制因子をワクチン抗原として用いればダニの吸血を阻害するだけでなく、ダニが媒介する病原体の伝播も予防できると考えられる。この免疫抑制因子を抗原として用いた抗ダニワクチンは、ダニから分泌された免疫抑制因子の機能を不活化することでダニの吸血を阻害させるというものである。具体的には、ダニの吸血中から吸血後での死亡率の上昇や飽血率の減少、産卵率の減少や孵化率の減少が報告されており野外でのダニの数を減らす効果が認められている。現在、海外にて唯一種類のダニワクチンが市販されるが、他のダニに効果が低いことや耐性ダニの出現が報告され、新規の抗ダニワクチンの樹立が期待されている。本研究によって抗ダニワクチンの創出がなされれば、従来の殺ダニ剤の散布により起こっている畜産物中への薬物残留や薬物耐性ダニの出現の解決策となり畜産生産上の貢献度も高い。また、特定の病原体に対するワクチンではなくダニを媒介する複数の病原体の伝播を予防できるワクチンであることから本研究は独創的だと考えられ、ダニ媒介性の感染症に対する新規制御法になりうると考えられる。

そこで今年度は、北海道各地で *I. persulcatus* を採取して、*B. miyamotoi* の分子疫学調査を行うとともに、病原体伝播に係ると考えられる免疫抑制因子および中腸由来因子について解析を行った。

B. 研究方法

1. 道内の種々の地区で採取した *I. persulcatus* から、個体ごとに全細胞 DNA を抽出し、*16S rDNA* 遺伝子を標的として Real-time PCR を行い、道内に生息するマダニの *B. miyamotoi* の保有状況を調査した。

2. 研究室で樹立された実験室株の成ダニをハムスターに吸血させ、中腸および唾液線から RNA を抽出し cDNA を合成した後、PCR を行い免疫抑制因子 3 因子、すなわち *Salp16*, *I. persulcatus immunosuppressor* (IPIS) および *Ferritin2* 遺伝子配列を決定した。得られた情報を基にそれぞれの組換えダニ蛋白を作製し機能解析を行った。

C. 結果

1. 北海道における *B. miyamotoi* 分子疫学調査

1) 北海道全域 14 カ所で *I. persulcatus* 1801 匹を採取し、*B. miyamotoi* およびライム病 *Borrelia* の陽性率を調査した結果、*B. miyamotoi* は 2.4%、ライム病 *Borrelia* は 34.0% だった。*B. miyamotoi* とライム病 *Borrelia* の共感染の比率は、オスで 5 匹 (0.6%)、メスで 11 匹 (1.14%)、合計 16 匹 (0.89%) で認められた。

2. ダニ因子の同定と機能解析

1) *I. persulcatus* Salp16 (Salp16 Iper) の発現解析および機能解析

Salp16 Iper 遺伝子は若ダニおよび成ダニにおいてのみ発現し、唾液腺に特異的に発現していた。*Salp16 Iper* は宿主に曝露される抗原であることから、*Salp16 Iper* は吸血により発現が誘導され吸血初期から中期にかけて吸血の開始および維持に関与する因子であることが示唆された。また *A. phagocytophilum* 感染により、*Salp16 Iper* 遺伝子の発現が増強されることが確認され、*A. phagocytophilum* が何らかの形で *Salp16 Iper* を利用していることが示唆された。組換え *Salp16 Iper-1* および *Iper-2* はともに好中球の遊走能および活性酸

素産生を抑制した。さらに宿主への組換え *Salp16 Iper* 免疫により、吸血途中および飽血後に死亡するマダニが観察され、吸血 72 時間後のダニ体内に流入した好中球量は有意に増加していた。以上の結果から、本因子は自然免疫において重要な役割を持つ好中球の機能を阻害し、宿主免疫応答を抑制することでダニ吸血の開始および維持に大きく寄与している可能性が示唆された(投稿中)。

2) *I. persulcatus immunosuppressor* (Ipis) の同定および機能解析

I. persulcatus から 2 種類の *I. ricinus* の免疫抑制因子 IRIS 様遺伝子配列が得られ、それぞれ *Ixodes persulcatus immunosuppressor -1, 2* (Ipis-1, 2) 遺伝子と命名した。Ipis-1, 2 遺伝子の全長は IRIS 遺伝子と同じく 1,134bp であった。また IRIS 遺伝子との相同性を比較すると、Ipis-1 は 95.5%、Ipis-2 は 95.4% であり、予想アミノ酸配列を Iris と比較すると、Ipis-1 は 94.4%、Ipis-2 は 96.6% の相同性を示した。Ipis-1、Ipis-2 ともにセルピンに特徴的なドメインである s3a ドメイン、RCL ドメイン、serpin signature を持ち、セルピファミリーに属すると考えられた。Ipis-1 の機能解析を行うために、Ipis-1 の C 末端部にウサギ IgG Fc 部を融合させた組換えタンパク質 (Ipis-1-Fc) を哺乳細胞発現系 (COS-7 細胞) により作製した。Ipis-1-Fc によるウシ PBMC の増殖能に与える影響を検討したところ、Ipis-1-Fc はウシ PBMC の増殖を抑制した。さらに、ウシ PBMC のサイトカイン産生への影響を評価したところ、IFN- γ の産生量抑制効果が認められた。また、Ipis の免疫抑制効果の標的細胞を明らかにするため、フローサイトメトリー法により Ipis-1-Fc の結合する細胞を検索したところ、

Ipis は CD4⁺T 細胞, CD8⁺T 細胞および単球へ結合することが明らかになった。また, Ipis-1-Fc は CD14⁺細胞非存在下においても PBMC の増殖や IFN- γ 産生を抑制したことから, 単球やマクロファージに依存せず, T 細胞に直接作用して免疫抑制効果を発揮する可能性が示唆された(投稿予定)。

3) ダニ Ferritin 2 の同定および抗ダニワクチンへの応用

抗ダニワクチンの開発を目的に, 鉄貯蔵タンパクの一種である Ferritin2 (FER2) に着目し, *I.persulcatus* および *Rhipicephalus appendiculatus* から FER2 遺伝子全長を同定した。得られた情報をもとに組換え *I.persulcatus*-Ferritin2 (IperFER2) を作製して, モルモットを用いて IperFER2 の抗ダニワクチンの効果の検討を行った。その結果, IperFER2 免疫により *I.persulcatus* の有意な吸血量の減少と産卵量の減少が認められた。さらに IperFER2 は, 異種のダニである *I.ovatus* に対しても抗ダニ効果が認められ, 広いスペクトルを示す抗ダニワクチン抗原として期待された(投稿予定)。

D. 考察

以上の結果から, Salp16 は好中球, IPIS は単球や T 細胞などの免疫担当細胞に結合し, これらの細胞の活性およびサイトカイン産生を抑制することで, 宿主の炎症性の反応を制御し, マダニの吸血維持に関わっていると考えられる。このように免疫抑制因子は, シュルツェマダニの吸血に重要な役割を果たすことが推測され, Iris と同様にワクチン抗原への応用が期待される。近年, 北米に分布する *I.scapularis* において, ダニの吸血局所における免疫応答を抑制することで病原体伝播を

助長する因子が同定され, 同因子を抑制すると病原体伝播率が抑えられることも報告されている。今後は, 今回得られた *I.persulcatus* 由来の免疫抑制因子の機能をはじめとしたダニの吸血戦略をさらに解明することで, 原体伝播を効率よく阻害できるような抗ダニワクチンの開発を進めたい。

E. 結論

今年度は, 回帰熱ボレリア(*B.miyamotoi*)のダニにおける分子疫学調査を行い北海道での感染率を明らかにした。今後も調査を継続するとともに予想されるレゼルボア(野鼠)の *B.miyamotoi* 保有率についても検討していく予定である。来年度以降は, 病原体伝播の機序解明のために, これまでに得られたダニ由来因子をはじめその他の因子の詳細な機能解析を分離 *B.miyamotoi* を用いて行う予定である。

(倫理面からの配慮について)

該当しない。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Gomes H, Romeiro NC, Braz GRC, Gamosa de Oliveira EA, Rodrigues C, Nunes da Fonseca R, Githaka N, Isezaki M, Konnai S, Ohashi K, Itabajara da Silva Vaz Jr, Logullo C, Moraes J. Identification and structural-functional analysis of cyclin-dependent kinases of the cattle

- tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. PLoS One. 2013. 8:e76128.
- 2) Parizi L, Githaka N, Acevedo C, Benavides U, Seixas A, Logullo C, Konnai S, Ohashi K, Masuda A, Itabajara da S. Vaz Jr. Sequence characterization and immunogenicity of cystatins from the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Ticks Tick Borne Dis. 2013. 4:492-9.
 - 3) Githaka N., Konnai S, Skilton R, Kariuki E, Kanduma E, Murata S, Ohashi K. Genotypic variations in field isolates of *Theileria* species infecting giraffes (*Giraffa camelopardalis tippelskirchi* and *G. c. reticulata*) in Kenya. Parasitol Int. 2013. 62:448-53.
 - 4) Murase Y, Konnai S, Githaka WN, Hidano A, Taler K, Ito T, Takano A, Ando S, Kawabata H, Tsubota T, Murata S, Ohashi K. Prevalence of Lyme borrelia in *Ixodes persulcatus* ticks from an area with a confirmed case of Lyme disease. J Vet Med Sci. 2013. 75:215-8.
 - 5) de Abreu LA, Calixto C, Waltero CF, Pita B, Githaka NW, Seixas A, Parizi LF, Konnai S, da Silva Vaz I Jr, Ohashi K, Logullo C. The conserved role of the AKT/GSK3 axis in cell survival and glycogen metabolism in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* embryo tick cell line BME26. Biochim Biophys Acta. 2013. 1830:2574-82.
 - 6) Imamura S, Konnai S, Yamada S, Parizi LF, Githaka N, da Silva Vaz I Jr, Murata S, Ohashi K. Identification and partial characterization of a gut *Rhipicephalus appendiculatus* cystatin. Ticks Tick Borne Dis. 2013. 4:138-44.
 - 7) Taylor KR, Takano A, Konnai S, Shimozuru M, Kawabata H, Tsubota T. Differential tick burdens may explain differential *Borrelia afzelii* and *Borrelia garinii* infection rates among four, wild, rodent species in Hokkaido, Japan, J Vet Med Sci. 2013. 75:785-90.
 - 8) Taylor KR, Takano A, Konnai S, Shimozuru M, Kawabata H, Tsubota T. *Borrelia miyamotoi* Infections among Wild Rodents Show Age and Month Independence and Correlation with *Ixodes persulcatus* Larval Attachment in Hokkaido, Japan. Vector Borne Zoonotic Dis. 2013. 13:92-7.
 - 9) 新聞掲載: O DEBATE DIARIO DE MACAE (ブラジル国内紙 2013年6月3日掲載). Professor da UFRJ/Macaé participa de pós-doutorado no Japão. Jorge Moraes viajou para o país em agosto de 2012 por meio do Programa Ciência sem Fronteiras e a previsão de retorno é para agosto deste ano (<http://www.odebateon.com.br/site/noticia/detalhe/28417/professor-da-ufrj-macaé-participa-de-pos-doutorado-no-japao>)

2. 学会発表

- 1) 今内 覚, 伊東 拓也, 川端 寛樹, 高野 愛, 安藤 秀二, 村田 史郎, 大橋 和彦.
シユルツエマダニ(*Ixodes persulcatus*)由来
因子の宿主免疫抑制機能の解析. 第 21 回
ダニと疾患のインターフェースに関するセミ
ナー. (2013 年 6 月 21 日). 稚内市
- 2) 今内 覚. 気をつけよう 虫さされによる感
染症. 札幌幌南ロータリークラブ市民講話(招
待講演). (2013 年 8 月 23 日). 札幌市
- 3) 豊間根 耕地, 今内 覚, 伊東 拓也, 川
端 寛樹, 高野 愛, 安藤 秀二, 村田 史
郎, 大橋 和彦. シユルツエマダニ由来免疫
抑制因子の機能解析. 第 156 回日本獣医
学会学術集会. (2013 年 9 月 20 日). 岐阜
市

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

平成 25 年度 厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
ダニ媒介性細菌感染症の診断・治療体制構築とその基盤となる技術・情報の体系化に関する研究
分担研究報告書

アナプラズマ症の血清診断について

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 部長
	池ヶ谷 朝香	長崎大学熱帯医学研究所
	高娃(コウワ)	日本予防医学協会・リサーチレジデント
	呉東興(トウシン)	山口大学共同獣医学部
	渡邊 卓哉	聖隷浜松病院
	齊藤 一仁	聖隷浜松病院
	武地 大維	聖隷浜松病院
	村上 陽一	聖隷三方原病院
	志智 大介	聖隷三方原病院
	麻生 克己	麻生クリニック
	安藤 秀二	国立感染症研究所（研究代表者）

研究要旨

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関連感染症で、新興感染症として位置付けられている。本年度は、2010~2011 年に静岡県でリケッチア感染症が疑われ、日本紅斑熱およびつつが虫病の血清診断が陰性を示した 9 名の患者血清検体について、THP-1 および HL60 細胞で培養した *A.phagocytophilum* を抗原とした間接免疫蛍光抗体法 (IFA) を行ったところ、9 名中 4 名の患者血清から *A.phagocytophilum* に対する抗体が検出された。これら 4 例の患者では、THP-1 細胞で培養した *A.phagocytophilum* を抗原として用いた方が *A.phagocytophilum* に対する抗体価が高いものがほとんどで、HL-60 細胞で培養した *A.phagocytophilum* では良好な反応性を示さないものが多かった。そして、western blot で確認を行った結果、THP-1 細胞で培養した *A.phagocytophilum* を抗原とした方が、HL-60 細胞で培養した *A.phagocytophilum* を抗原とした方より、*A.phagocytophilum* の P44 主要抗原性蛋白質 (P44) に対する反応性が良好であった。このように、THP-1 感染 *A.phagocytophilum* 抗原には反応するが、HL-60 感染 *A.phagocytophilum* には反応性を示さない場合が多々あることが判ってきた。これは、HL-60 細胞で培養した *A.phagocytophilum* と THP-1 細胞で培養した *A.phagocytophilum* では、その抗原性に差異があることを示している。そこで、次に

THP-1 感染 *A.phagocytophilum* の発現している可能性の高い P44-47E と P44-60、および HL60 感染 *A.phagocytophilum* で時折優位に発現することが報告されている P44-18ES をそれぞれの cell line の代表として選び、これらの組換え蛋白質を作製して、4 名の患者の血清との反応性を調べた。その結果、IFA で THP-1 感染 *A.phagocytophilum* に反応性を示した患者血清は P44-47E あるいは P44-60 (THP-1 代表) に反応し、IFA で HL60 感染 *A.phagocytophilum* と反応した患者血清は P44-18ES (HL60 代表) と結合することが明らかとなった。

現在、これら 3 種の rP44 蛋白質 (rP44-18ES、rP44-47E、rP44-60) の *in vitro* 系での大量発現と精製法の検討を進めており、これに成功すれば、今後のアナプラズマ症の血清診断に極めて役立つものと期待できる。

A. 研究目的

「アナプラズマ症」は、1990 年代に米国で発見されたマダニ媒介性の新興感染症で、その病原体はリケッチア目、アナプラズマ科に属する偏性寄生性細菌の *Anaplasma phagocytophilum* である。

A.phagocytophilum は、生体内では、特に好中球に感染して、その細胞質内にモルラ (morula) と呼ばれる寄生性空胞を形成し、その中で増殖する。「アナプラズマ症」の症状は、発熱、白血球減少、血小板減少などであるが、これと類似の症状を示す感染症として、近年、中国で発見され、最近、日本でも確認された「重症熱性血小板減少症候群 (Severe fever with thrombocytopenia syndrome [SFTS]) が知られている。実は、中国の SFTS は当初、*A.phagocytophilum* 感染による「アナプラズマ症」が疑われていた。

日本国内においては、我々の研究で、2005 年に *Ixodes* 属マダニが *A.phagocytophilum* を保有していることを報告したことにより、我が国の *A.phagocytophilum* の存在が初めて世界的に認知された。その後、様々な *Haemaphysalis* 属のマダニが

A.phagocytophilum を保有していることも明らかにした (発表論文 3)。さらに、最近になって、我々の retrospective な解析により、発熱性疾患の 2 名の患者から *A.phagocytophilum* の特異遺伝子と抗体を検出することに成功し、日本国内でのヒト感染の存在が初めて明らかとなった (発表論文 2)。この 2 名のうち 1 名は日本紅斑熱リケッチアとの混合感染であることも判明した。実は、血清診断において、国内の患者血清は HL60 よりむしろ THP-1 細胞で培養した *A.phagocytophilum* を抗原として認識する機会が多いことが判ってきた (発表論文 2)。つまり、抗原性の異なる *A.phagocytophilum* が THP-1 と HL60 細胞でそれぞれ優占的に増殖するのである。

本研究では、THP-1 および HL60 細胞の双方で培養した *A.phagocytophilum* を抗原として用いて、2010 年～2011 年にかけて静岡県内で発生した 9 名の不明発熱性疾患の患者血清を調べ、そのうち 4 名の患者が *A.phagocytophilum* に対する抗体を保有することを明らかにし、さらに THP-1 と HL60 細胞で優占的に増殖した *A.phagocytophilum*

がそれぞれ発現する異なった抗体結合タンパク質種の同定にも成功したので、報告する。

B. 研究方法

1. 間接免疫蛍光抗体法 (IFA) および Western blot 法による血清中の抗 *A. phagocytophilum* 抗体の検出

IFA 法の抗原としては、*A. phagocytophilum* を HL60 細胞と 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。また、Western blot 法では、*A. phagocytophilum* に感染した THP-1 と HL60 細胞、および組換え P44-1 蛋白質を抗原として用いた。

2. 組換え蛋白質の作製

THP-1 感染 *A. phagocytophilum* の発現している可能性の高い P44-47E と P44-60 外膜蛋白質、および HL60 感染 *A. phagocytophilum* で時折優位に発現することが報告されている P44-18ES 蛋白をそれぞれの cell line の代表として選び、これらの組換え蛋白質を作製した。ここで、組換え蛋白質を作製する際、大腸菌を用いた蛋白発現ではヒト血清の大腸菌蛋白のコンタミへの非特異反応が極めて強いため、今回は昆虫由来無細胞系のインビトロ発現システムを利用することとした。まず、*A. phagocytophilum* の P44-18ES、P44-47E および P44-60 蛋白質をコードする遺伝子の中心部に存在する超可変領域 (654~681 bp) を、昆虫でのコドン利用率を考慮して、人工的に全合成し、pUC57 に組み込んだ後、そのインサート領域を PCR により増幅し、in-fusion 法により、pTD1 発現 vector に組み込んだ。その後、その組換えプラスミドを鋳型として、T7 RiboMAX express

large scale RNA production system (Promega 社) を用いて、目的遺伝子配列を含む mRNA を in vitro 転写反応 (37°C、30 分) により合成した。続いて、昆虫由来無細胞タンパク質合成キット Transdirect insect cell (島津製) を用いて、転写後の反応液を翻訳液に添加して 25°C で 5 時間反応させ、上記 3 種類の組換え P44 (rP44) 蛋白質を得た。そして、これらの rP44 蛋白質と患者血清との反応性を Western blot 法により解析した。

C. 研究結果 および D. 考察

1. 2010~2011 年の不明発熱性患者からのアナプラズマ症病原体に対する抗体の検出

2010~2011 年に、静岡県でリケッチア感染症が疑われ、日本紅斑熱およびつつが虫病の血清診断が陰性を示した 9 名の患者血清検体について、THP-1 および HL60 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 名の患者血清から *A. phagocytophilum* に対する抗体が検出された。これら 4 例の患者では、THP-1 細胞で培養した *A. phagocytophilum* を抗原として用いた方が急性期または回復期の血清の IgM および IgG の双方で、*A. phagocytophilum* に対する抗体価が高いものも多く、さらに回復期血清での抗体価の上昇も見られた (表 1)。しかし、HL-60 細胞で培養した *A. phagocytophilum* の場合は、患者 1 を除いて THP-1 細胞の *A. phagocytophilum* とは異なり良好な反応性を示さなかった。すなわち、患者 2~4 では血清中の IgM の HL60 培養 *A. phagocytophilum* 抗原への反応が見られず、また IgG は患者 2 と患者 3 でのみ弱い反応性を示した。一方、患者 1 では HL-60 および THP-1 細胞で培養したいずれの

A. phagocytophilum 抗原に対してもほぼ同程度の反応性を示していた(表 1)。ここで見出した 4 名のアナプラズマ症患者の臨床所見等については表 2 にまとめた。

得られた IFA の結果をさらに確認するため、HL-60 と THP-1 細胞でそれぞれ培養した *A. phagocytophilum* および組換え P44-1 蛋白質 (rP44-1) を抗原として western blot を行った。その結果、THP-1 細胞で培養した *A. phagocytophilum* を抗原とした場合は、患者 1~4 の急性期または回復期の血清のいずれにおいても、感染細胞の P44 主要抗原性蛋白質 (P44) に対し、それぞれ反応性に強弱はあるものの、特異的に反応する IgM や IgG を含んでいるものが多かった (図 1)。しかし、患者 1 の IgG は、rP44-1 とは反応するものの、感染細胞の P44 蛋白質とは反応性が見られなかったが、この結果は IFA の結果とほぼ一致していた。さらに、HL-60 細胞で培養した *A. phagocytophilum* を抗原とした western blot においても IFA の結果を強く支持するものであった (図 2)。

2. アナプラズマ症患者血清中に含まれる抗体が認識する *A. phagocytophilum* の P44 蛋白質種の解析

アナプラズマ症の血清診断は、これまで、HL-60 細胞に感染させた *A. phagocytophilum* を抗原とした IFA 法が用いられてきたが、上述のように、THP-1 感染 *A. phagocytophilum* 抗原には反応するが、HL-60 感染 *A. phagocytophilum* には反応性を示さない場合が多々あることが判ってきた。これは、HL-60 細胞で培養した *A. phagocytophilum* と THP-1 細胞で培養した *A. phagocytophilum* では、その抗原性に差異があることを示している。

A. phagocytophilum は、菌体表面に P44 外膜蛋白質群を発現している。この蛋白質群はゲノム上に 113 個の相同性遺伝子 (p44 multigene family) が存在し、*A. phagocytophilum* は生体内で、p44 の異なる遺伝子種を交換して抗原変異を引き起こすことが知られている。しかし、細胞培養系では、生体内での免疫系のバイアスが存在しないため、この抗原変異は起こらないものと考えられる。したがって、HL-60 細胞で培養した *A. phagocytophilum* と THP-1 細胞で培養した *A. phagocytophilum* の抗原性の差異は、組織培養細胞の種類の違いによる *A. phagocytophilum* の selection、つまり異なる P44 蛋白質種を発現している *A. phagocytophilum* が優占的に増殖したことによるものと思われた。そこで、この仮説を実証するため、我々は先行研究で、RT-PCR 法により、HL-60 細胞と THP-1 細胞に感染した *A. phagocytophilum* の発現している p44 遺伝子種を mRNA レベルで解析した。その結果、HL-60 細胞では *A. phagocytophilum* は様々な種類の p44 mRNA を発現しているが、THP-1 細胞では主に 2 種類の p44 mRNA (P44-47E と P44-60) が発現しており、組織培養細胞の種類の違いによって、異なる P44 蛋白質種を菌体表面に発現している *A. phagocytophilum* が存在している可能性が高いことを突き止めた(発表論文 2)。

そこで、本研究では THP-1 感染 *A. phagocytophilum* の発現している可能性の高い P44-47E と P44-60、および HL60 感染 *A. phagocytophilum* で時折優位に発現することが報告されている P44-18ES をそれぞれの cell line の代表として選び、これらの組換え蛋白質を作製した。そして、陽性コントロール

血清として rabbit hyperimmune anti-rP44-1 serum を用いて、得られた rP44 蛋白抗原との反応性を Western blot 法により調べたところ、図 4 の左上に示すように、約 25 kDa 領域に 3 つの rP44 蛋白質 (rP44-18ES、rP44-47E、rP44-60) のバンドが確認できた。続いて、これらの 3 種類の rP44 蛋白質を用いて、4 名のアナプラズマ症患者からの血清検体との反応性を Western blot 法により評価した。その結果、患者 1 では、IFA の結果を支持するように、3 つのペア血清の IgM はいずれも HL60 代表の rP44-18ES と THP-1 代表の 1 つの rP44-60 と反応性を示したが、3 つのペア血清の IgG はいずれの rP44 蛋白質とも反応しなかった。患者 2 の血清 (発症後 13 日目) では、IgG のみが rP44-47E (THP-1 代表) に対して強い反応性を示した。また、患者 3 では 3 つのペア血清の IgG のいずれもが rP44-18ES (HL60 代表) と rP44-60 (THP-1 代表) と反応性を示した。回復期血清 (発症後 24 日目) の IgM も rP44-60 (THP-1 代表) と反応した。患者 4 の血清では、IgM が rP44-47E (THP-1 代表) を認識することが判った。

以上の患者血清と rP44 蛋白質との反応性の結果について、IFA の結果の表 1 に追記しまとめた。この表 1 において、IFA で THP-1 感染 *A.phagocytophilum* に反応性を示した患者血清は P44-47E あるいは P44-60 (THP-1 代表) にも反応し、さらに IFA で HL60 感染 *A.phagocytophilum* と反応した患者血清は P44-18ES (HL60 代表) とも結合することが明らかとなり、我々の仮説が実証された。現在、これらの 3 種の rP44 蛋白質 (rP44-18ES、rP44-47E、rP44-60) の *in vitro* 系での大量発現と精製法の検討を進め

ており、これに成功すれば、今後のアナプラズマ症の血清診断に極めて役立つものと期待できる。

E. 結論

日本国内に分布する *A.phagocytophilum* はその主要外膜蛋白である p44 が欧米のものと大きく異なることが強く示された。国内株に強く発現している rP44 蛋白質の開発により、国内の *A.phagocytophilum* の感染実態が明確になることが期待できる。

F. 健康危険情報

あり (総括研究報告書に記載)

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Gaowa, Yoshikawa Y, Ohashi N, Wu D, Kawamori F, Ikegaya A, Watanabe T, Saitoh K, Takechi D, Murakami Y, Shichi D, Aso K, Ando S: *Anaplasma phagocytophilum* antibodies in humans, 2010-2011, Japan. *Emerg Infect Dis* in press.
- 2) Ohashi N, Gaowa, Wuritu, Kawamori F, Wu DX, Yoshikawa Y, Chiya S, Fukunaga K, Funato T, Shiojiri M, Nakajima H, Hamauzu Y, Takano A, Kawabata H, Ando S, Kishimoto T: Human granulocytic anaplasmosis, Japan. *Emerg Infect Dis*. **19**, 289-292 (2013)
- 3) Gaowa, Ohashi N, Aochi M, Wuritu, Wu DX, Yoshikawa Y, Kawamori F, Honda T, Fujita H, Takada N, Oikawa Y, Kawabata H, Ando S, Kishimoto T: