

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05998

研究課題名(和文)急性Q熱病態多様性の解析：マウスモデルを用いた肺炎、肝炎、不定愁訴の起因解析

研究課題名(英文)Analysis of clinical manifestation diversity of acute Q fever in mouse model

研究代表者

安藤 匡子 (ANDOH, MASAKO)

鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・准教授

研究者番号：10466914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Q熱は世界中にある人獣共通感染症である。人は、海外では肺炎と肝炎、国内では不定愁訴が多い。病態の多様性の要因をマウスモデルにて解析した。

マウスでは、経気道感染により臨床症状を含む感染病態がみられ、経口感染では感染が成立しにくいことが明らかになった。C. burnetii 遺伝子型によっても症状に相異が認められた。

人の病態は、感染経路、菌量、菌の遺伝子型により、臨床症状が様々に発生すると考えられる。感染しても同じ臨床症状とならないことが明らかとなり、Q熱の診断は臨床症状だけでは極めて難しいことが裏付けられた。国内の人獣共通感染症の安全対策として、実態に即した診断方法の普及が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Q熱は、厚生労働省と農林水産省が管轄する法令で指定されている重要な人獣共通感染症である。世界各地に分布する菌の遺伝子型が異なり、それが臨床症状に関連していると考えられているが証明されていなかった。特に日本では「不明熱」として確定診断されずに見過ごされている。本研究によりQ熱の病態の多様性には様々な要因が関与しており、臨床症状からの診断は極めて困難であることが裏付けられた。人獣共通感染症の安全対策として、実験室内診断の普及啓発が必要である。希少感染症は、研究者の有無で国単位の対策に大きな差が出ることから、今後も継続してQ熱の研究に取り組みたい。

研究成果の概要(英文)：Q fever is a worldwide zoonoses. Acute Q fever symptoms reported in abroad are mainly pneumonia and hepatitis, while in Japan it is fatigue syndrome. Factors for variation of the symptoms are still unclear.

In this study, mouse challenged *Coxiella burnetii* intratracheally demonstrated apparent clinical signs and different outcome depends on genotype of *C. burnetii*. Oral challenge resulted unsuccessful infection. Variation of Q fever symptom may be affected by route of infection, amount of exposure, and *C. burnetii* genotype. These results highlight difficulty of clinical diagnoses of Q fever. Promotion of appropriate laboratory diagnoses is needed for safer management of zoonoses in Japan.

研究分野：人獣共通感染症学

キーワード：Q熱 *Coxiella burnetii* コクシエラ マウスモデル 感染経路

1. 研究開始当初の背景

Q熱は偏性細胞内寄生性細菌 *Coxiella burnetii* による人獣共通感染症である。世界各地で発生が報告されており、近年オランダで2007～2010年に発生した長期間にわたる大規模アウトブレイクにより世界的に注目が高まっている。極めて多様な病態の要因は不明であり、あらゆる動物が感染するがヒト以外は一般的に不顕性である。マダニが本菌を保有することが古くから知られているが、人への感染源にはならないと考えられている。ヒトの急性Q熱の主訴は国内外で異なり、欧州では、肺炎あるいは肝炎に偏っている地域が明らかにされている。近年、仏領ギアナの特定の地域に極めて病原性の強い *C. burnetii* 株の存在が報告された。以上から、病原性の異なる *C. burnetii* 株の地域特異的な分布があることは確かである。

C. burnetii の遺伝子は世界中の分離株で相同性が高く、全ゲノム解析が可能となるまで病原性因子は全く不明であった。現在、標準株を含む急性Q熱および慢性Q熱由来株や他の genotype 代表株の全ゲノム配列も決定され、複数の genotype に分類されることが明らかになった。

国内においてQ熱は、厚生労働省「感染症法」では四類感染症（全数届け出）および三種病原体、農林水産省「と畜場法」では解体禁止疾病であり「乳等省令」では乳の殺菌条件とされる重要な人獣共通感染症である。しかし、Q熱に関する研究は現在国内では行われていない。海外でのQ熱の病態解析は、急性肺炎および慢性心内膜炎を中心に人の臨床例の病理学および免疫学的解析が実施されてきたが、肝炎や不定愁訴については報告が少なく、多種多様な病態の発生要因については未解明である。Q熱の発生が多い地域では基礎疾患などの宿主因子が重要視されているが、病原体側の研究が進展せず結論は出ていない。症例が多いにも関わらず顧みられなかった病態（肝炎、不定愁訴）への進行要因を究明し、「不明熱」として確定診断されずに見過ごされている現状の改善に寄与したい。

2. 研究の目的

生体内での *C. burnetii* 主要感染細胞はマクロファージである。実験観察された *C. burnetii* 感染直後のマウス肺組織には、常在マクロファージおよび誘導された単球由来マクロファージが観察され、常在マクロファージは *C. burnetii* 標準株の殺菌能が低いことが *C. burnetii* の肺組織への定着に寄与していると報告された (Calverley, 2012)。これまでの *in vivo* 研究では、*C. burnetii* 標準株と肺への感染について報告があるが、他の分離株や臓器については解析がほとんどなく、急性Q熱が肺炎や肝炎など異なる病態へと進行する理由は不明である。発生学的由来が異なり複数の細胞表面マーカーの比較から、肺と肝臓の常在マクロファージは、性状の相異が至適されている (Wynn, 2013)。本研究では、急性Q熱の病態発現の多様性には、最初に感染が成立する臓器に常在するマクロファージの *C. burnetii* 感染応答に起因すると考えた。

また、これまでに、免疫不全マウスモデルを用いて *C. burnetii* の genotype 特異的な病原性があることを報告し、標準株と異なる病原性の分離株の存在を明らかにした。このマウス感染モデルにおいて、全身の感染臓器における主要標的細胞は単球/マクロファージ系であることを確認している。これらのことから、本研究では、急性Q熱の病態発生を決定すると仮定される臓器特異的常在マクロファージにおける異なる genotype の *C. burnetii* 感染を解析することとした。*C. burnetii* は、BSL3の偏性細胞内寄生性細菌であるうえに増殖が遅く、感染細胞にストレスを与えない（細胞変性効果がみられない）ことから、*in vitro* での病原性解析は極めて困難である。遺伝子組み換えは弱毒の馴化クローン株 (BSL2) で実現しているが、BSL3病原体である野

外株では未だ成功していない。このため、病原性の評価には、ゲノム解読された野外株を *in vivo* 解析が必須である。*C. burnetii* の *in vivo* 研究は世界的にも少なく、国内では代表者以外に実施経験者は現役しない。申請者らは標準株の他に各 genotype 代表株および国内分離株を所持しており、これらの比較研究は国際的にも貴重な成果となる。特に、日本分離株は1980年代の初分離から性状解析が滞っている。日本株と海外株との相異は不明であり、本研究により初めて比較解析される。Q熱は、安全なワクチンがなく、病態発現の解明は人と動物(特に反芻家畜)において重要課題である。Q熱の適切な臨床診断・診断方法・予防法の確立に向け、獣医学および医学分野に有用な情報を提供し、公衆衛生向上に貢献する。

3. 研究の方法

(1) 感染経路による病態発現の比較解析

免疫正常(通常の免疫応答)であるBALB/cマウスに *C. burnetii* 標準株 (genotype1) を経気道および経口感染において、それぞれの感染病態の発現を観察、比較した。従来の実験感染経路である腹腔内感染とも比較した。感染マウスの肺および肝臓の病変から、感染経路と病型(肺炎、肝炎、不顕性)の関連を解析するためである。経気道感染は、実験の安全性確保のため、主要な感染経路と考えられているエアロゾル感染の代替として実施した。本研究で用いる経気道感染の手法は、他の病原体(結核など)においてエアロゾル感染と同等であることが確認されている。感染後1~2日、各臓器における *C. burnetii* の菌量と組織の細胞応答などを評価した。

(2) 臓器特異的常在マクロファージの関与確認

感染組織におけるマクロファージの集積、マクロファージ内の *C. burnetii* 菌体の有無を組織学的に観察し、免疫組織学的にマクロファージの由来(組織特異的あるいは誘導単球由来)を特定し、常在マクロファージが病変形成に関与している仮説を検証する予定であった。しかし、研究期間内に実施できなかった。

(3) *C. burnetii* genotypeによる病態発現の相異解析

(1)において確認した病態発現に影響する感染経路を用いて、全ゲノム解析が行われた genotype 代表株および日本分離株を用いて実験感染を解析する。マウスの病態とゲノム情報との関連解析は、本研究で使用する代表株のゲノム解析を行った研究協力者(J. Samuel 博士: Texas A&M University Health ScienceCenter)と実施した。*C. burnetii* genotypeによる病態に相異が認められない場合には、宿主の免疫因子を追求する方向へ今後の研究を展開することを考えていた。

C. burnetii の性状解析の多くは、弱毒の馴化株(BSL2、LPS欠損型)で報告されている。馴化株と野外株(BSL3、LPS野生型、人病原性)の生物学的性状は、免疫正常動物では区別できない。また、世界的に、野外株の病原性に関する研究報告は標準株1株で行われてきた。申請者は過去に、免疫不全マウスモデルを確立し、馴化株と野外株の相異を明確に評価できること報告し、さらに標準株だけでなく各 genotype 代表株を先に確立した免疫不全マウスモデルでの感染を報告した。これらの経験を融合し、馴化株と野外株の病態発現を免疫正常動物モデルで解析する必要があると考え、本研究で実施した。

4. 研究成果

本研究の開始以前に準備していた *C. burnetii* 培養に不備があることが判明し、マウス感染実験の開始が遅れた。また、2施設のBSL3実験室を使用予定であったが、一方の施設では点検整

備期間が予定以上に長くなり利用できない期間が長かった。もう一方の施設ではCovid-19の流行により実験室へのアクセスが困難になった。*C. burnetii*は感染症法において特定病原体に指定されており国内においても移動に大きな制約があり、本研究内で実験施設を変更することは予算的に不可能であった。このため、計画を大幅に変更した。最終的に実験室の利用制限により、経気道感染実験は継続できなくなったため、経口感染について標準株（急性Q熱型とされる genotype I）とQ熱の肝炎患者由来株（慢性Q熱型とされる genotype V）を用いて、比較解析を行った。

まず、標準株（genotype I）による感染経路による病態発現は、これまでの一般的な実験感染経路である腹腔内投与による感染と比較した。経気道感染では、免疫正常マウスでは初めて体重減少など明確な臨床症状が観察された。一方、経口感染では臨床症状は観察されなかった。血清中の特異抗体と脾臓の腫大を全身感染の指標とした場合、経気道感染は腹腔内投与と同等に全ての感染個体で認められた。経口感染では、特異抗体が認められないまたは抗体価が低い個体があり、脾腫も軽度であり、効率的に感染が成立しないことが明らかになった。肺と肝臓において、*C. burnetii*菌量は、経気道感染では肺および肝臓の両臓器において*C. burnetii*が長期間検出され、組織の細胞浸潤も顕著であった。経口感染では肝臓からのみ、*C. burnetii*が低量検出され細胞浸潤も軽度に認められた。また、感染菌量により臨床症状の有無があったことから、少量の菌に暴露された場合には感染が成立しても不顕性に留まる（特異抗体は産生されるが、臨床症状はない）ことも実験的に確認できた。

C. burnetii genotypeの相異解析は、実験施設の制限により経気道感染のみとなった。経気道感染では、genotype Iおよびgenotype Vを用いた。感染マウスの臨床症状はgenotype Iでのみ観察され、肺および肝臓の*C. burnetii*菌量と細胞浸潤についてもgenotype Iでは顕著であったが、genotype Vでは軽度であった。このことから、感染するgenotypeも病態発現に影響することが明らかになった。

経口感染の結果は、単回投与であること、投与菌量、投与時に胃内内容物があることの影響があることから、単純に経口摂取では感染しないと結論できない。人のQ熱肝炎は、汚染された乳・乳製品の経口感染が原因であると疫学的に考えられている。乳・乳製品の汚染の程度は不明であり、感染経路として感染が成立しにくいとしても、これらの食品は日常的に摂取することから感染源・感染経路として否定できない。実験的に証明するために、複数回投与と長期間観察が必須と考えられる。

*C. burnetii*は、偏性細胞内寄生性であり細胞外では増殖できないが、乾燥や温度など物理的ストレスに強い菌体構造（small cell variant）により、宿主細胞外・環境中においても長期間生残する。*C. burnetii*は宿主細胞のオートリソソーム内の酸性条件で活性化し、増殖の至適pHは4程度である。このような特徴から胃酸による影響は少ないかもしれないが、その他の消化酵素が殺菌や不活化に有効なのかもしれない。また、菌体と同時に存在する食品成分などが影響しているかもしれない。今回、マウスへの胃内投与により経口感染が非効率的であったことは、人のQ熱肝炎の原因（感染源）が特定できないことと矛盾しない結果である。

本研究は当初の計画から大きく制限されたが、Q熱の臨床を理解する上で重要な知見が得られた。人の病態には、感染経路、感染菌量、*C. burnetii*のgenotypeが影響しており、これらの組み合わせにより、臨床症状が様々に発生すると考えられる。さらに宿主側の要因も加われば、Q熱の病態に多様性が存在することが理解できるだろう。感染しても同一の臨床症状とならないことが明らかとなり、Q熱の診断は臨床症状だけでは極めて難しいことが裏付けられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Galay R, Llaneta CR, Faye Monreal MK, Armero A, Baluyut AB, Regino CM, Sandalo KA, Vidina B, Talactac M, Tapawan L, Mojares MC, Alvarez C, Mago E, Encarnacion N, Andoh M, Tanaka T.	4. 巻 8
2. 論文標題 Molecular prevalence of Anaplasma marginale and Ehrlichia in domestic large ruminants and Rhipicephalus (Boophilus) microplus ticks from southern Luzon, Philippines.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Veterinary Science	6. 最初と最後の頁 e746705
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fvets.2021.746705	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Galay R, Talactac M, Ambita B, Chu D, dela Costa L, Salangsang C, Caracas D, Generoso F, Babelonia J, Vergano J, Berana L, Sandalo K, Divina B, Alvarez C, Mago E, Andoh M, Tanaka T	4. 巻 5(2)
2. 論文標題 Molecular detection of Rickettsia spp. and Coxiella burnetii in cattle, water buffaloes, and Rhipicephalus (Boophilus) microplus ticks in Luzon Island of the Philippines	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Trop. Med. Infect. Dis.	6. 最初と最後の頁 54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/tropicalmed5020054	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Galay LR, Manalo AA, Dolores LS, Aguilar PI, Sandalo AK, Cruz BK, Divina PB, Andoh M, Masatani T, Tanaka T	4. 巻 11(1)
2. 論文標題 Molecular detection of tick-borne pathogens in canine population and Rhipicephalus sanguineus (sensu lato) ticks from southern Metro Manila and Laguna, Philippines	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Parasites and Vectors	6. 最初と最後の頁 648
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13071-018-3192-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安藤匡子
2. 発表標題 Q熱の診断について
3. 学会等名 リケッチア研究会・日本リケッチア症臨床研究会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Andoh M, Gokuden M, Honda T, Fujita H, Yamamoto S, Kadosaka T, Takano A, Yano Y, Takada N, Kawabata H, Ando S	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Hokuto Shobo Publishing	5. 総ページ数 163
3. 書名 The Tokara Islands	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	安藤 秀二 (ANDO Shuji) (30360803)	国立感染症研究所・ウイルス第一部・室長 (82603)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------