

令和 5 年 4 月 7 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K17366

研究課題名（和文）ダニ媒介性感染症の迅速診断法の開発 ベッドサイド診断への応用

研究課題名（英文）Development of diagnostic procedures for tick and mite-borne diseases

研究代表者

尾之内 佐和（Onouchi, Sawa）

岐阜大学・応用生物科学部・助教

研究者番号：10808330

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ダニ媒介性感染症の重篤な症例においては播種性血管内凝固症候群による多臓器不全を示し、死に至る可能性もある。しかしながら、臨床症状や血液検査所見ではこれらの感染症を診断することは難しい。多くの地方衛生研究所において実施可能な検査は検査終了までには1日半から2日を要する他、P3施設を要するなどの制限がある。本研究では、解決策として、SFTSとリケッチア感染症について組換えタンパク質を用いたELISA法の開発を行う。本研究では重症熱性血小板減少症候群（SFTS）ウイルスのエンベロープタンパク質及びツツガムシ病リケッチアの外膜タンパク質の組換えタンパク質の作出を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではダニ媒介性感染症のエンベロープタンパク質や外膜タンパク質をターゲットとして組換えタンパク質を作出した。病原体の最外層にあるタンパク質であるため、病原体の感染動態にも関与すると考えられ、本研究で作出した組換えタンパク質は診断法の開発だけでなく、感染動態機序の解明などの基礎的研究にも活用できると考えられる。また、組換えタンパク質を用いたELISAはP3実験設備のない地方衛生研究所でも扱いが可能であるため、広く活用できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The tick and mite-borne diseases sometimes cause lethal symptoms although they are difficult to be diagnosed. Their golden-standard diagnostic methods take time to make a diagnosis and need a special facility P3 to prepare materials for their diagnostic methods. Therefore, the objective of this study is to establish Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) by using recombinant proteins as an easy-diagnostic method. In this study, we could make recombinant Gn envelope-proteins of severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS) virus and recombinant 47kDa outer-membrane proteins of Orientia tsutsugamushi which causes tsutsugamushi disease in Japan.

研究分野：獣医解剖学

キーワード：ダニ媒介性感染症 組換えタンパク質 診断法

1. 研究開始当初の背景

ダニ媒介性感染症は病原体を保有するダニに刺咬されることで起こる感染症であるが、日本では主に重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) ツツガムシ病、日本紅斑熱が問題となっている。SFTS は 2011 年に中国で発見され、国内では 2013 年より患者が確認された新興感染症で、ブニヤウイルス科フレボウイルス属のウイルスによる血小板減少と発熱・消化器症状を主徴とする感染症である。また、ツツガムシ病と日本紅斑熱はリケッチアによる再興及び新興感染症で、ツツガムシ病は *Orientia tsutsugamushi*、日本紅斑熱は *Rickettsia japonica* を原因とし、発熱と紅斑を主徴とする。いずれの感染症も重篤な症例においては播種性血管内凝固症候群による多臓器不全を示し、死に至る可能性もあるが、臨床症状や血液検査所見ではこれらの感染症を診断することは難しい。テトラサイクリン系抗生物質はこれらの感染症の有効な治療薬であるため、迅速な診断法の開発は早期治療、ひいては死亡リスクの低下に貢献する。

多くの地方衛生研究所において実施可能な検査として、SFTS では病原体遺伝子検査、リケッチア感染症ではこれに加えて間接蛍光抗体法による血中抗体検査がある。通常、SFTS もリケッチア感染症も病原体遺伝子検査が選択されることが多く、全血及び痂皮から RNA を抽出し、SFTS では 2 種類の核タンパク遺伝子を標的とした PCR、リケッチア感染症では 5 種類の遺伝子を標的とした nested PCR を行う。検査する遺伝子数が多く、試薬調整が煩雑なことに加え、これらの検査終了までには 1 日半から 2 日を要する。また、ダニの刺し口に形成される「痂皮」は最も適した検査材料であるが、搬入されることが稀で、通常は検出率 50% と言われる全血を検体とするため、患者数が実際の件数より少なく見積もられている可能性がある。一方、蛍光抗体法は血中 IgM 抗体の検出又はペア血清での血中 IgG 抗体 4 倍以上の上昇をもって陽性と診断するが、抗原スライドは不活化した病原体を使用しており、検査機関は病原体を保有していなければ検査ができない。また、P3 施設において病原体を培養し、抗原スライドを作製する作業に手間を要し、手技や判定にも経験が必要である。

このように、現在実施されている病原体遺伝子検査と抗病原体抗体検査は互いの検査を補完するうえで双方必要な検査であるが、前述のような問題点を残している。解決策として、SFTS とリケッチア感染症について新しい抗原及び抗体検出プロトコルの開発が必要である。

2. 研究の目的

本研究では、検査機関における診断法として高感度な ELISA 法の開発を目的とする。開発に当たっては組換えタンパク質を用いることで、病原体保有及び P3 施設保有の有無に関わらず利用可能な診断法を目指す。

3. 研究の方法

(1) 候補となるタンパク質の検討

SFTS ウイルスのエンベロープ上の糖タンパク質をコードする Gn 及び Gc 遺伝子、及び *O. tsutsugamushi* の外膜タンパク質をコードする 47kDa・56kDa 遺伝子、*R. japonica* の外膜タンパク質をコードする rOmpB 遺伝子を候補とし、クローニング用プライマーを作製した。

Target	Primer	Sequence
SFTS virus	F-Gn	agtcattcaagtcgacatggattcggcccaatcatctg
	R-Gn	ccctctcggggtcgacctactcaatcctaacaatcatctt
	F-Gc	aatagggcttctcgacatgtgtgatgagatgggtccatgc
	R-Gc	tagaccagaagtcgacctactcaatcctaacaatcatct
<i>O. tsutsugamushi</i>	F-47kDa	ctactaaaaggctcgacatgcctcaacaaaaatctgatgc
	R-47kDa	cgcccttaaagtcgactacttattaatattaggtaaag
	F-56kDa	cgtttccagtcgacatgatagaattgggggatgaa
	R-56kDa	ttttaaagaagtcgacgaagttatagcgtacacccaaac
<i>R. japonica</i>	F-rOmpB	acgtgctaagtctcgacatgttagaagtttacacggactt
	R-rOmpB	aatatagggtcgatctaattggctcaaaaaccaaatt

SFTS ウイルスの RNA 抽出物を逆転写した cDNA 産物 (Super Script III Reverse Transcriptase: Invitrogen, CA, USA) *O. tsutsugamushi* の Gillium 株・Karp 株・Kato 株の DNA 抽出物、*R. japonica* の DNA 抽出物をテンプレートとして各プライマーについて PCR を行った (Takara Ex Taq: Takara, Shiga, Japan)。PCR 産物は 1.2% アガロースゲルに

て電気泳動を行い、バンドサイズを確認後、ゲルから PCR 産物を精製し、マルチキャピラリー-DNA シーケンサーにて塩基配列を解析した。

(2) 組換えタンパク質の作出

シーケンス解析により目的の PCR 産物を得られた遺伝子について、精製後の PCR 産物を 100 倍希釈したものをテンプレートとしてクローニング PCR を行った (KOD One PCR Master Mix: TOYOBO, Osaka, Japan)。得られた PCR 産物は精製後、制限酵素処理 (Sal I/HF) によりインサート DNA として用いた。インサート DNA はベクタープラスミド (pET-32b 及び pET-43.1b: Merck Millipore, Darmstadt, Germany) へ Takara DNA ligation kit (Takara) によってライゲーション処理を行った。ライゲーション後のベクタープラスミドは大腸菌 DH5 Competent cell (Merck Millipore) にトランスフォーメーションし、組換え大腸菌の液体培養物から GenElute Plasmid Miniprep Kit (Merck Millipore) にて目的遺伝子を含むプラスミド DNA を作製した。作製したプラスミド DNA は大腸菌 Rosetta (Merck Millipore) にトランスフォーメーションし、組換えタンパク質発現大腸菌を作出した。

組換えタンパク質発現大腸菌を IPTG 添加液体培地で培養して発現した組換えタンパク質を抗 His tag 抗体を用いたウエスタンブロッティング法にて確認した。

(3) ELISA 法の検討

大量培養で得た組換えタンパク質を精製し、抗体検出用 ELISA 法作製の検討を行なった。

4. 研究成果

(1) 候補となるタンパク質の検討

SFTS ウイルスのエンベロープ上の糖タンパク質をコードする Gn 及び Gc 遺伝子、及び *O. tsutsugamushi* の外膜タンパク質をコードする 47kDa・56kDa 遺伝子、*R. japonica* の外膜タンパク質をコードする rOmpB 遺伝子について、PCR を行った結果、Gn 遺伝子、47kDa 及び 56kDa 遺伝子において遺伝子の増幅が確認された (図 1、図 2)。なお、47kDa 及び 56kDa 遺伝子については *O. tsutsugamushi* の Kato 株でのみ増幅した (図 2)。他の遺伝子についてはプライマー設計や PCR 条件の試行を行ったが、本研究では増幅が確認できなかった。

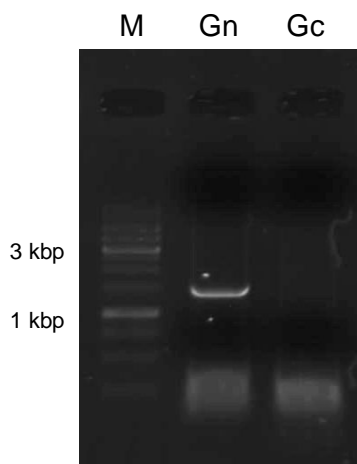


図 1. SFTS ウイルス Gn・Gc 遺伝子の RT-PCR 像
Gn 遺伝子においてバンドが確認できた。
M: marker

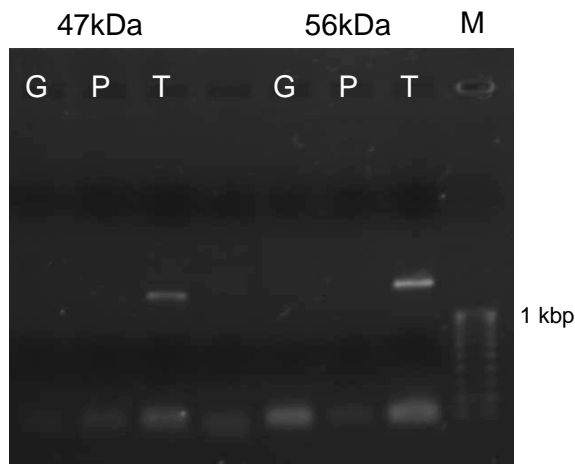


図 2. *O. tsutsugamushi* 47kDa・56kDa 遺伝子の PCR 像
Kato 株 (T) について両遺伝子のバンドが確認できた。
G: Gillium 株、P: Karp 株、M: marker

増幅した遺伝子をシーケンス解析した結果、目的の遺伝子の塩基配列と一致したため、3 つの遺伝子について組換えタンパク質の作出に供した。

(2) 組換えタンパク質の作出

Gn 遺伝子、47kDa 及び 56kDa 遺伝子をインサート DNA とするベクタープラスミドを作成した。Gn 遺伝子は pET-32b 及び pET-43.1b ベクタープラスミドに挿入したが、大腸菌 Rosetta にてタンパク質発現誘導を行うと、pET-43.1b ベクタープラスミドのみで約 50kDa の組換えタンパク質の発現が確認できた (図 3)。また、組換え Gn タンパク質は可溶性画分に発現した。一方、47kDa 及び 56kDa 遺伝子は pET-32b ベクタープラスミドのみに挿入でき、pET-43.1b ベクタープラスミドには挿入できなかった。大腸菌 Rosetta にて組換え 47kDa タン

パク質の発現誘導を行うと、目的の 50kDa 付近に細いバンドが確認でき、可溶性画分と不溶性画分両方で発現を確認した。不溶性画分の方が発現量が多かった。組換え 56kDa タンパク質は発現誘導ができなかった。

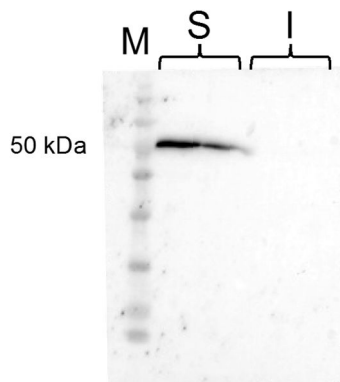


図 3.組換え Gn タンパク質のウエスタンブロッティング
可溶性画分にバンドが確認できた。
M: marker、S: 可溶性画分、I: 不溶性画分

(3) ELISA 法の検討

組換え Gn タンパク質、組換え 47kDa タンパク質を得るため、各組換えタンパク発現大腸菌の大量培養を試みたが、目的の収量が得られなかった。特に組換え 47kDa タンパク質は不溶性画分に多く発現していたことから、十分な収量を得にくいようであった。今後、プラスミドの種類・デザイン、発現用大腸菌の種類などを検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------