

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2007～2008
課題番号：19590460
研究課題名 (和文) 日本紅斑熱の免疫染色法による早期診断法の開発と人畜共通感染症としての病態学的解析
研究課題名 (英文) Rapid diagnosis of Japanese spotted fever by immunohistochemistry and pathophysiological significance of the rickettsiosis as zoonosis
研究代表者 馬原 文彦 (MAHARA FUMIHIKO) 藤田保健衛生大学・医学部・客員教授 研究者番号：20104656

**研究成果の概要：**日本紅斑熱の早期診断のために、刺し口ないし皮疹からの皮膚生検組織を対象とした酵素抗体法の確定診断に加えて、Real-time PCR 法による日本紅斑熱 DNA の検出や *in situ* hybridization 法の確立へ向けた条件検討を行った。なお、残念なことに、イヌおよびヌードマウスを用いた *Rickettsia japonica* の感染実験は不成功に終わった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、細菌学 (含真菌学)

キーワード：日本紅斑熱、早期診断、病理診断、皮膚生検、ホルマリン固定パラフィン切片、酵素抗体法、Real-time PCR 法、*in situ* hybridization 法

### 1. 研究開始当初の背景

リケッチア症の一つである日本紅斑熱 (Japanese spotted fever) は、研究代表者である馬原が 1984 年に徳島県阿南市で 3 例を経験したことに端を発して確立された、*Rickettsia japonica* を原因とする新興感染症であり、感染症新法の四類感染症に指定されている。最近、感染地域が拡大し、年間 60 名以上の患者と数名の死者が記録されている。

われわれは、日本紅斑熱を早期診断のために、刺し口ないし皮疹からの皮膚生検組織を対象とした酵素抗体法を 2006 年度に確立し、実際のヒトへの症例へ応用している。血清診断より早期にリケッチア症の確定診断が可

能となった。ただし、抗体は紅斑熱群リケッチア共通抗原を認識するため、現在、日本紅斑熱特異的モノクローナル抗体の開発を計画している。

2007 年度からは、皮膚生検材料を用いた Real-time PCR 法による日本紅斑熱 DNA の検出を開始した。2008 年度からは、*R. japonica* 特異的プローブを用いた *in situ* hybridization 法の条件検討を行っている。

ホルマリン固定後組織を対象とすることで、バイオテロリストとしてリストアップされているリケッチアの感染リスクをゼロにすることができ意義は大きい。

## 2. 研究の目的

本研究では、日本紅斑熱の早期診断の目的で、刺し口の皮膚生検組織を利用した各種組織化学技法を確立する。具体的には、日本紅斑熱リケッチアだけに反応するモノクローナル抗体の作製、**real-time PCR**法の確立、**in situ hybridization (ISH)**法の開発を通じて、従来の血清学的診断法や治療反応性との比較検討を行い、臨床的な実用性を検証する。

本研究における研究手順は、(1) 試料収集、(2) 陽性対照となる感染培養細胞系の作製、(3) 酵素抗体法染色の特異性検定、(4) ISH法による病原体の特異的同定法の開発、(5) Real-time PCR法の検出条件の決定、(6) 研究の総括である。

## 3. 研究の方法

### (1) 試料収集

流行地臨床医の連携協力のもと、日本紅斑熱疑いの患者試料（皮膚生検：刺し口あるいは紅斑部）収集をおこなった。バイオハザード防止の目的をかねて、すべての検体をホルマリン固定パラフィン包埋し、組織所見と対比できるようにした。

### (2) 感染培養細胞の作製

培養L細胞に *R. japonica* (Aoki 株ほか)に加えて、*R. conorii*、*O. tsutsugamushi*を感染させ、ホルマリン固定パラフィン切片を作製した。酵素抗体法、Real-time PCR法、ISH法の陽性対照とした。

### (3) 酵素抗体法の特異性検定

人畜共通感染症の可能性が高い日本紅斑熱は、ヒトの他にも、イヌやヌードマウスに感染する可能性がある。感染実験を通じて、動物種間での反応を調べるとともに、新たな *R. japonica* 特異抗体の作製を試みている。

### (4) *in situ hybridization (ISH)*法による *R. japonica*の特異的同定法の開発

*R. japonica*に特異性の高いrRNA配列をもとにしたオリゴプローブ (locked nucleic acid: LNA プローブ) を作製し、感染L細胞を対象としたISH法を行った。

### (5) Real-time PCR法による検出条件

Sybr green法による紅斑熱リケッチアに特異的な primer を作製後、皮膚（刺し口または紅斑部）から抽出したDNAを鋳型としたPCR増幅を行った。

### (6) 研究の総括

学会発表や研究会等に積極的に参加した。

## 4. 研究成果

### (1) 試料収集

日本紅斑熱疑いの患者、計28例から試料収集を行った。皮膚生検のホルマリン固定パラフィン包埋に加えて、血液や尿の収集も行った（表1）。日本紅斑熱患者の皮膚生検に対する免疫染色所見を示す（図1-3）。2種のモノクローナル抗体（S3およびX1）を用いた免疫染色により、血管内皮細胞とマクロファージの細胞質内に茶褐色の顆粒状陽性所見が観察される（加熱前処理後）。

	数	年齢	皮膚	尿	便
女性	12	29-78y	15	4	1
男性	16	38-84y	15	3	0
計	28	29-84y	30	7	1

表1. サンプルのサマリー

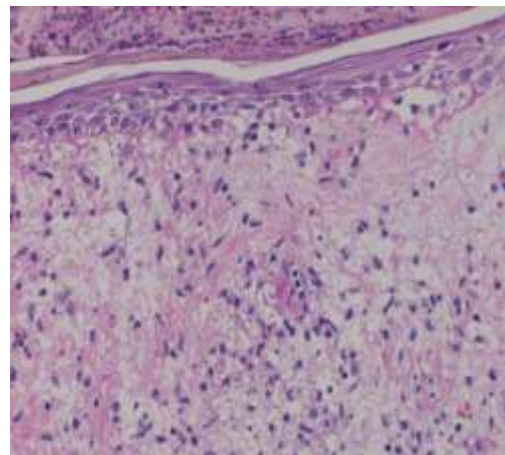


図1. 刺し口の生検所見 (HE染色)

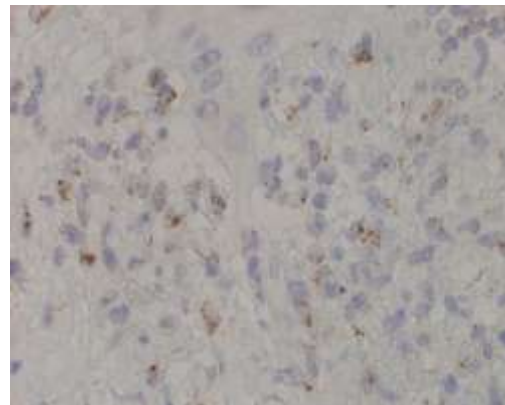


図2. 免疫染色：モノクローナル抗体S3

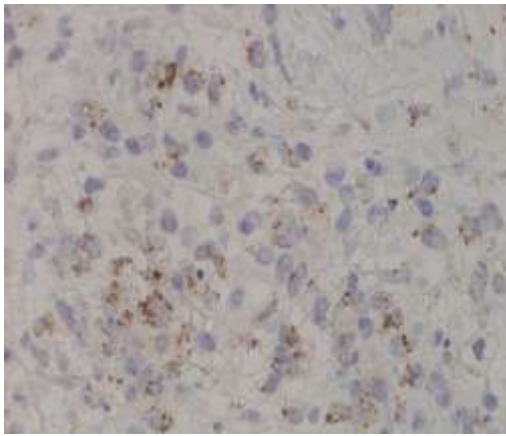


図3. 免疫染色：モノクローナル抗体X1

### (2) 感染培養細胞の作製

L細胞に *R. japonica* と *O. tsutsugamushi* (強毒株・弱毒株) を感染させ、ホルマリン固定パラフィン細胞ブロックを作製した。感染実験には、和歌山県立医科大学のP3施設を利用した(微生物学講座、宮本和明博士の協力による)。紅斑熱グループリケッチアである *R. conorii* はVero細胞に感染させている(米国Fuller laboratories社より、特定病原体の法令に従い、10%ホルマリン固定法の指示をおこない、感染力を不活化させた上で入手した)。

### (3) モノクローナル抗体の特異性検定

	リケッチアIgM抗体	
	X1	S3
<i>R. japonica</i>	+	+
<i>R. conorii</i>	+	+
<i>O. tsutsugamushi</i>	-	-

表2. モノクローナル抗体2種の反応性

現在使用しているIgM型モノクローナル抗体2種(S3、X1)は、金沢医科大学の及川陽三郎博士から分与された。ツツガムシ属には全く反応しないが、*R. japonica*を含む紅斑熱グループに広く反応する(表2)。L細胞

への *R. japonica* 感染4日目の酵素抗体法の染色結果を示す(図4、図5)。細胞質内に顆粒状陽性所見を認める。

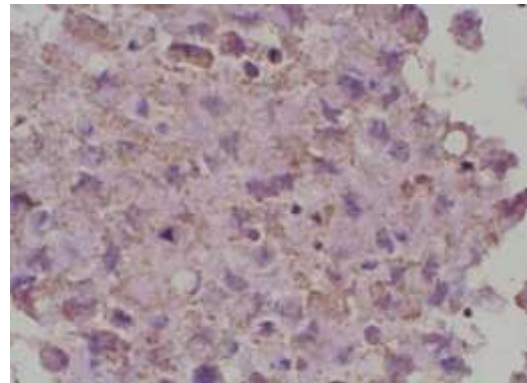


図4 L細胞への *R. japonica* 感染4日目：モノクローナル抗体S3

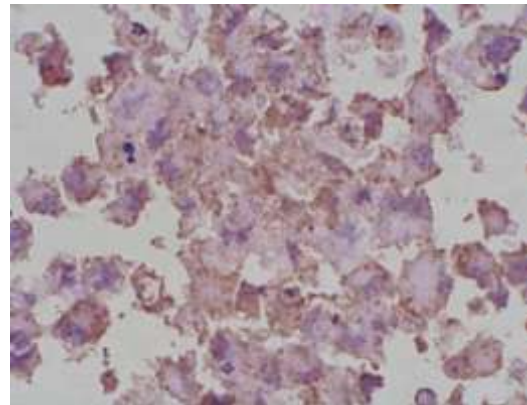


図5 L細胞への *R. japonica* 感染4日目：モノクローナル抗体X1

これら2種の抗体は、ヒト組織には高い特異性をもって使用できる(背景染色は全くない)が、実験的に感染させたイヌでは非特異的反応が検出されるために応用できなかった。マウス抗体であるため、感染ヌードマウスに対しても使いづらい。そこで、国立感染症研究所の川端寛樹博士が作製した抗RickAペプチド抗体(日本紅斑熱特異性が期待される)を用いて、感染L細胞や日本紅斑熱の皮膚生検組織に対して免疫染色を試みたが、特異的な陽性所見を得ることができなかった(厚生労働科学研究費補助金 新興・再興感



感染症研究事業リケッチア感染症の国内実態調査及び早期診断体制の確立による早期警鐘システムの構築平成19年度総括・分担研究報告書にて報告)。

実験動物に応用可能な抗体の作製と *R. japonica* に特異的な抗体の開発が課題として残された。

#### (4) *in situ* hybridization法の開発

*R. japonica* 特異的に反応するプローブ (rRNAに反応するオリゴLNAプローブ) を作製し、*R. japonica* 感染L細胞を陽性対照として染色条件の検討を行った (表3)。非感染細胞に顆粒状陽性所見は検出されず、*R. japonica* 感染細胞の細胞質に一致して顆粒状の陽性像が確認された (図6、図7)。免疫染色と同様の所見だった。

1	<i>R. japonica</i> 感染L細胞パラフィン切片 患者皮膚生検サンプル
2	脱パラフィン, DEPC洗浄 (3分×2回) 0.3%過酸化水素DEPC水処理 (20分)
3	0.008% proteinase K/TBS (37°C, 15分)
4	95%エタノール後固定 (1分)
5	プローブ: <i>R. japonica</i> 合成LNAプローブ
6	切片とプローブのdenature (90°C, 5分)
7	Hybridization (37°C, overnight)
8	1x SSC洗浄 (50°C, 30分)
9	TBS洗浄
10	1% BSA/TBSで溶解したHRP標識FITC抗体 (100倍希釈, 60分)
11	HRP標識Tyramide Signal Amplification reagent (60分)
12	HRP標識抗FITC抗体 (40分)
13	DAB発色
14	核染色 (ヘマトキシリン)、封入

表3. *in situ* hybridization法の染色手順

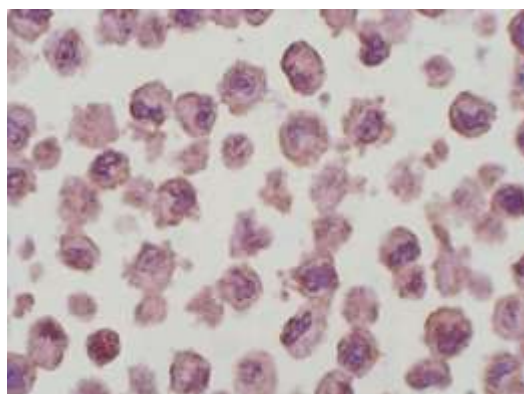


図6. 非感染L細胞 (ISH法: 陰性)

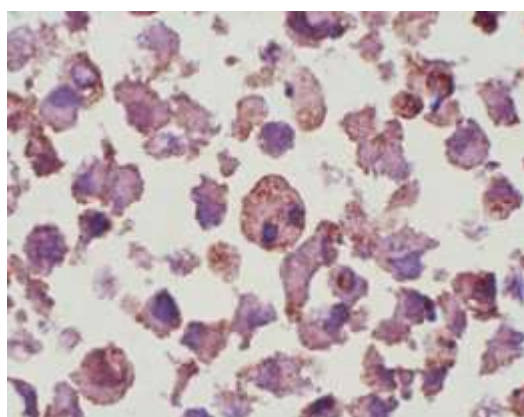


図7. *R. japonica* 感染L細胞 (ISH法: 陽性)

今後、免疫染色陽性を呈した皮膚生検標本を対象にISH法の応用を開始する予定である。

#### (5) Real-time PCR法の検討

まず、ホルマリン固定パラフィン切片から安定した高品質DNAを抽出する手技を確立した。

次いで、紅斑熱グループ特異的な R17k common antigen をコードする DNA に対する primer pair を利用した Sybr Green Real-time PCR 法を確立した。図8および図9に、皮膚生検標本から抽出したDNAを鋳型とした real-time PCR 法の解析結果を提示する。免疫染色陽性を呈した検体の一部に明らかな陽性所見が得られた。

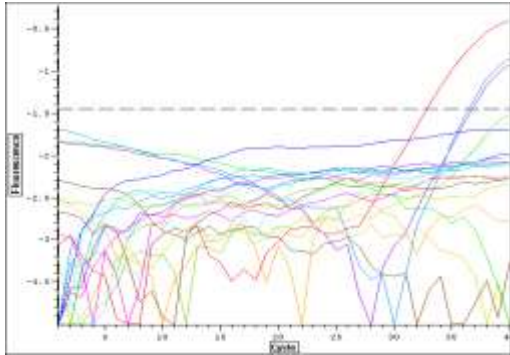


図 8. Sybr-Green 法 real-time PCR 法  
～紅斑熱グループリケッチアに反応～

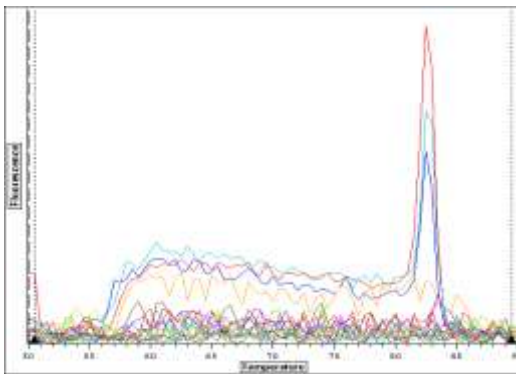


図 9. 図 8 の解離曲線 (特異性の検定)

日本紅斑熱の早期診断に、酵素抗体法と Real-time PCR 法を併用することによって、早期診断への有用性が高まった。

#### (6) 結果の総括

皮膚生検組織のホルマリン固定パラフィン切片を利用した日本紅斑熱の病理学的早期診断法を検討した。これら検討結果を総括して、国際学会 (フランス、マルセイユ) および国内学会で発表した。

詳細は省略するが、和歌山医科大学の動物実験施設 (P3) で、イヌおよびヌードマウスを用いた感染実験を行ったが、これら動物への感染は十分に成立せず、死亡する動物はみられなかった。残念ながら、人畜共通感染症としての日本紅斑熱の意義を確立するには至らなかった。

## 5. 発表論文等

(研究代表者、研究分担者および連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① 馬原文彦. 臨床現場からの提言 (特集基礎医学研究の活性化を目指して)、四国医学雑誌、64 巻 p10-14、2008 年、査読無
- ② 馬原文彦. リケッチア感染症、最新医学、63 巻 p. 680-702、2008 年、査読有
- ③ 馬原文彦、藤田博己、堤寛. 抗体価が上がらない日本紅斑熱の症例はあるのか (会議録)、大原総合病院年報、48 巻 p. 48、2008 年、査読無
- ④ 馬原文彦、藤田博己. 日本紅斑熱患者の血清抗体価の長期推移 (その 2) (会議録)、感染症学雑誌、82 巻 6 号 p. 686-687、2008 年、査読有
- ⑤ 馬原文彦. 【症例から学ぶ小児救急疾患異物と咬傷】マダニ刺傷 (日本紅斑熱) (解説/特集)、小児外科、40 巻 11 号 p. 1295-1299、2008 年、査読無
- ⑥ 堤寛、佐野壽昭、馬原文彦. 36 年ぶりに再発掘された、日本紅斑熱が疑われる 1 剖検例 (会議録/症例報告)、日本病理学会会誌、97 巻 2 号 p. 32、2008 年、査読無
- ⑦ 馬原文彦. 【知らないと怖い旅行者感染症】アウトドアライフとリケッチア感染症 (解説/特集)、アニムス、特別号 p. 25-33、2007 年、査読無
- ⑧ 馬原文彦、藤田博己、堤寛. マダニが媒介者であることを証明しえた日本紅斑熱の 1 例 (会議録/症例報告)、衛生動物、58 巻 2 号 p. 128、2007 年、査読無
- ⑨ 馬原文彦、藤田博己、堤寛. マダニを付着してきた日本紅斑熱の 1 例 (会議録/症例報告)、大原総合病院年報、47 巻 p. 37、2007 年、査読無
- ⑩ 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/編集、p. 119-127、2007 年、査読有

[学会発表] (計 5 件)

- ① 堤寛、佐野壽昭、馬原文彦. 36 年ぶりに再発掘された、日本紅斑熱が疑われる 1 剖検例、第 54 回日本病理学会秋期特別総

会、2008年11月20日、松山市

- ② 堤寛、病理組織内に病原体の姿を探る、第63回日本衛生動物学会西日本支部大会、2008年11月3日、神戸市
- ③ 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ッチアの検出：免疫染色とReal-time PCR法の比較検討、第63回日本衛生動物学会西日本支部大会、2008年11月3日、神戸市
- ④ 宇都宮洋才、宮本和明、奥野祥治、秋本茂、玉熊桂子、稲田健一、堤寛、馬原文彦。日本紅斑熱の実験動物における感染実験、第63回日本衛生動物学会西日本支部大会、2008年11月3日、神戸市

- ⑤ Tamakuma K, Takeda K, Miyamoto K, Inada K, Utsunomiya H, Fujita H, Mahara F, Tsutsumi Y. Quick diagnosis of Japanese spotted fever using formalin-fixed, paraffin-embedded skin biopsy specimens: Comparison between real-time PCR analysis and immunohistochemistry. 5<sup>th</sup> International Meeting on Rickettsiae and Rickettsial Diseases, May20, 2008, Marseille, France.

[図書] (計1件)

- ① 堤寛、完全病理学各論全12巻、学際企画、総ページ数1296、2007年

[その他]

- ① ホームページ  
<http://info.fujita-hu.ac.jp/~tsutsumi/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

馬原 文彦 (FUMIHIKO MAHARA)  
藤田保健衛生大学・医学部・客員教授  
研究者番号：20104656

### (2) 研究分担者 (1名)

堤 寛 (YUTAKA TSUTSUMI)  
藤田保健衛生大学・医学部・教授  
研究者番号：80138643

### (3) 連携研究者 (3名)

下村 龍一 (RYOICHI SHIMOMURA)  
藤田保健衛生大学・医学部・助教 (現、益田日本赤十字病院病理)  
研究者番号：20360232

宇都宮 洋才 (HIROTOSHI UTSUNOMIYA)

和歌山県立医科大学・医学部・講師  
研究者番号：60264876

宮本 和明 (KAZUAKI MIYAMOTO)  
和歌山県立医科大学・医学部・講師  
研究者番号：30229885

### (4) 研究協力者 (1名)

玉熊 桂子 (KEIKO TAMAKUMA)  
藤田保健衛生大学・医学部・大学院生