

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：82603

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K19866

研究課題名(和文)組換え発現リケッチア抗原タンパク質の作製と臨床応用に関する研究

研究課題名(英文)Construction and application of recombinant protein of Rickettsia

研究代表者

佐藤 正明(Sato, Masaaki)

国立感染症研究所・ウイルス第一部・主任研究官

研究者番号：30442966

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,700,000円

研究成果の概要(和文)：R. japonicaは日本紅斑熱の原因菌である。本研究でR. japonicaの感染価測定の方法を確立し、抗菌薬感受性に応用し、その結果はJournal of Infection and chemotherapyに掲載された。さらにマウスにR. japonicaを接種した。1E6 PFUのR. japonicaの接種でC3H/HeNとBALB/cマウスで有意に体重が減少した。またC3H/HeNマウスからはR. japonica特異的抗体、脳、肺、肝臓、脾臓からR. japonicaの存在が確認された。これらの結果から、C3H/HeNマウスは日本紅斑熱のモデル動物として有用であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

R. japonicaの感染価測定の方法を確立したことで、今後ワクチンの効果を測定するための50%致死量を決定に応用できる。また、日本紅斑熱のモデル動物の確立を提唱することで、今後、未だに不明瞭な部分がある日本紅斑熱の病態進行メカニズムやそれに伴う宿主の免疫反応の解明といった基礎研究で、またモデル動物を用いて薬剤試験を行うことで、日本紅斑熱治療における適正な薬剤使用についてのガイドラインを確立することに寄与できる。ワクチンおよび組換えタンパク質のようなサブユニットワクチンの効果測定といった日本紅斑熱の予防に向けた臨床への応用につながることを期待できた。

研究成果の概要(英文)：Japanese spotted fever (JSF) is a tick-borne infectious disease caused by Rickettsia japonica. In this study, we established the method for definition of infectious dose of R. japonica. Using this method, we measured the minimum inhibitory concentration of several antibiotics against R. japonica. This result was published in the Journal of Infection and Chemotherapy. Next, we attempted to establish the murine model of JSF. By inoculation of 1E6 PFU of viable R. japonica, C3H/HeN and BALB/c mice survived for 28 days. Weight loss of C3H/HeN mice were significant compared with those of BALB/c mice. Specific sera against R. japonica were detected. And pathology of R. japonica infection was indicated by histological analysis. DNAs of R. japonica were detected in blood, brain, lung, liver, and spleen of 1E6 PFU of viable R. japonica-inoculated C3H/HeN mice. From these results we propose that C3H/HeN mice inoculated 1E6 PFU of viable R. japonica are available murine model of JSF.

研究分野：感染症 ウイルス ワクチン

キーワード：日本紅斑熱 Rickettsia japonica モデル動物 感染実験

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

リケッチア症は紅斑熱群リケッチア症および発疹チフス群リケッチア症およびつつが虫病に大別され、それぞれ紅斑熱群リケッチア (*R. japonica*, *R. conorii*, *R. rickettsii*, 等)、発疹チフス群リケッチア (*R. prowazekii*, *R. typhi*) および *O. tsutsugamushi* の感染によっておこる熱性疾患である。これらリケッチア症は日本国内でも流行し、輸入症例としても報告されている。リケッチア性病原体はグラム陰性の偏性細胞内寄生細菌であり、増殖のためには宿主細胞が必要である。感染伝播にはマダニやノミ、シラミのような節足動物(ベクター)の媒介が必要であり、これらの菌を保有したベクターの刺咬で菌体が宿主に侵入することで感染が成立する。リケッチアは宿主細胞に侵入すると二相分裂しながら細胞内増殖し、感染細胞の崩壊により菌体が放出され、新たな宿主細胞に感染する。

わが国におけるリケッチア症は国内で定められた四類感染症に属し、診断後は直ちに届出が必要な疾病で国内では主に日本紅斑熱とつつが虫病である。その他にも海外渡航者の中で外来性 *Rickettsia* spp. を起因とする輸入感染症としてのリケッチア症も存在する。これらの疾病対策における診断法の一つが患者血清を用いた血清診断法であり、間接蛍光抗体法が用いられている。この中で紅斑熱リケッチアではその患者血清は感染源であるリケッチア以外にも他の紅斑熱群リケッチアの種に広く交差反応するのに対し、つつが虫のそれでは患者血清の特異性は高く、数株の *O. tsutsugamushi* (Gilliam, Karp, Kato, Kawasaki, Kuroki) のいずれかに反応する。これらのリケッチア症は早期に行われるべき診断と治療の遅れによる重症化や死亡例もあり、またこれらリケッチア症に対する予防ワクチンは未開発であることからわが国を取り巻くリケッチア症対策にとってその予防と診断はいまだ検討の余地のある分野である。

2. 研究の目的

現在リケッチア症の確定診断は地方衛生研究所や国立感染症研究所に依存している。このことは一刻を争う効果的な治療が必要な臨床現場においては迅速性という点で検討の余地のあるところである。本研究ではリケッチア症陽性患者血清に特異性の高い反応を示し、臨床現場でも使用できる簡易型コマーシャルキットの開発に応用できる組換えタンパク質を作製することを目的とし、迅速なリケッチア症の診断・治療につなげられることを目指した。

また免疫学的観点から *R. japonica* に関しては免疫原性に関する基礎的な知見について未だ不明な点が多く、感染予防の観点からワクチンの開発につながる組換えタンパク質を作製することも目的とした。また、本研究を通じて、日本紅斑熱リケッチアである *Rickettsia japonica* (*R. japonica*) の感染価測定法の確立、その応用、また実験用マウスを用いた *R. japonica* の感染実験を行い、モデル動物の確立を目指した。

3. 研究の方法

6xHis タグ付き *R. japonica* の抗原融合タンパク質について、3種類(groEL, ompB, ompA)を作成した(図1)。これらのタンパク質について、国立感染症研究所ウイルス第1部で保存している紅斑熱患者血清を用いて、ウェスタンブロット解析を試みた。

次にメチルセルロースを用いた *R. japonica* のプラーク形成の性質を利用して、各種抗菌剤(テトラサイクリン系、ニューキノロン系、マクロライド系)の最少発育阻止濃度(MIC)を算出した。

日本紅斑熱モデル動物の作製を目的として *R. japonica* を C3H/HeN および BALB/c マウスにそれぞれ接種した。接種後 28 日間様子と体重を計測した。接種後 7, 14, 21, 28 日目で採血をおこなった。また、接種後 5, 6 日目で解剖し臓器をホルマリン固定し、組織解析を行った。次に C3H/HeN マウスに *R. japonica* を接種、血液、脳、肺、肝臓、脾臓を摘出し、DNA を抽出した。これらの DNA を用いて qPCR にて *R. japonica* のコピー数を計測した。

4. 研究成果

ウェスタンブロット解析ではコントロールとして用いた紅斑熱リケッチア陰性の血清をあてたサンプルでも非特異のバンドが検出され、本研究で作製した組換えタンパク質は血清診断には有効なタンパク質ではないことが示された。プラーク形成能を利用した抗菌薬に対する MIC 測定では *R. japonica* は他の紅斑熱リケッチアにおける既知の MIC の範囲にあった(表)。 10^6 PFU *R. japonica* の接種で両種類のマウスは 28 日間生存した。しかし C3H/HeN マウスの方が BALB/c マウスよりも有意な体重の減少が接種後 15 日目まで観察された。C3H/HeN マウス血清からは *R. japonica* 特異 IgG 抗体が検出された。組織解析と qPCR により C3H/HeN マウスの脳、肺、肝臓、脾臓より *R. japonica* の存在が確認された(図2)。これらの結果から 10^6 PFU *R. japonica* を接種した C3H/HeN マウスは非致死性日本紅斑熱のモデル動物として有効であることが示された。今後、このマウスを用いて、組換えタンパク質ワクチン効果を測定する実験系を構築できる可能性につなげることができた。

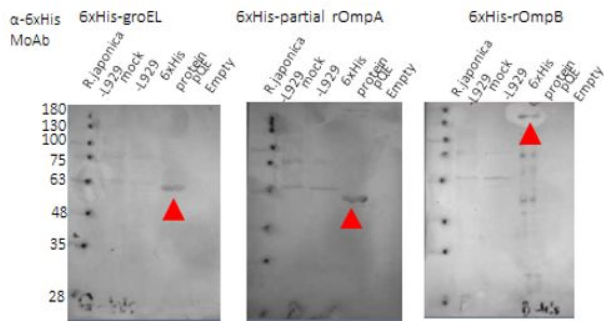


図 1 : GST タグ付き *R. japonica* 融合タンパク質 ()

Table 1
Summary of MICs of antibacterial agents against *R. japonica*, *R. rickettsii*, and *R. conorii*.

Antibacterial agents	<i>Rickettsia</i> spp.	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	Reference
Tetracycline	<i>R. japonica</i>	0.026 \pm 0.005	This study
		0.31	[12] ^a
		0.04	[13] ^b
	<i>R. rickettsii</i>	0.25	[9]
	<i>R. conorii</i>	0.25	[9]
Doxycycline	<i>R. japonica</i>	0.041 \pm 0.010	This study
	<i>R. rickettsii</i>	0.06	[9]
	<i>R. conorii</i>	0.06	[9]
Minocycline	<i>R. japonica</i>	0.052 \pm 0.010	This study
		0.15	[12] ^a
Tigecycline	<i>R. japonica</i>	0.104 \pm 0.021	This study
Ciprofloxacin	<i>R. japonica</i>	0.5	This study
		1.56	[13] ^b
		1	[10]
Ofloxacin	<i>R. japonica</i>	0.25	This study
		0.5	[13] ^b
		1	[10]
Levofloxacin	<i>R. japonica</i>	0.25	This study
		0.5	This study
Azithromycin	<i>R. japonica</i>	0.5	This study
		0.5	This study
Clarithromycin	<i>R. japonica</i>	0.5	This study
		2	[11]

All of other MICs were evaluated using plaque assay using Vero cells.

^a MICs were evaluated by Macchiavello staining using GM cells.

^b MICs were evaluated by Macchiavello and Giemsa staining using L cells.

表 日本紅斑熱リケッチア(*R. japonica*)と他の紅斑熱リケッチアの各種抗菌薬に対する MIC (佐藤ら、Journal of Infection and Chemotherapy, 2019 より抜粋)

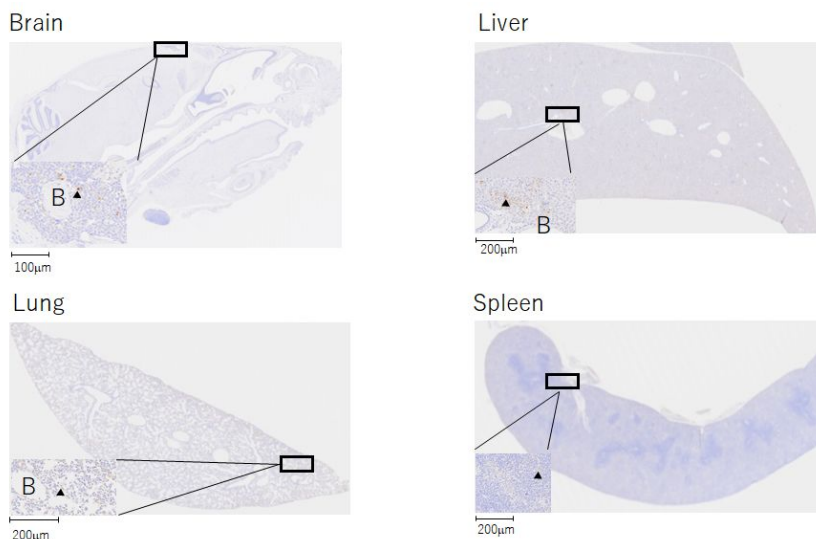


図 2 : 抗 *R. japonica* ウサギ血清を用いた C3H/HeN マウス脳、肺、肝臓、脾臓組織の免疫染色 (: *R. japonica*、B : 血管 未発表)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Masaaki Satoh, Hirofumi Kato, Mutsuyo Takayama-Ito, Motohiko Ogawa, Shuji Ando, Masayuki Saijo	4. 巻 25(11)
2. 論文標題 In Vitro Evaluation of Minimum Inhibitory Concentration of Several Antibacterial Agents Against Rickettsia Japonica Using a Plaque Reduction Assay System	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy,	6. 最初と最後の頁 917-919
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jiac.2019.05.019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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 佐藤正明、小川基彦、安藤秀二、西條政幸
2. 発表標題 Plaque assay を用いたR. japonicaに対する各種抗菌薬の最小発育阻止濃度(MIC)の測定
3. 学会等名 第91回日本細菌学会総会
4. 発表年 2018年

〔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
---------	---------