

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K08952

研究課題名(和文) ダニ媒介感染症の診断精度の向上を目指して

研究課題名(英文) Towards improved diagnostic accuracy of tick-borne infections.

研究代表者

佐々木 正大 (Sasaki, Tadahiro)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：20547533

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではダニ媒介性感染症である日本紅斑熱の鑑別診断の精度向上を目指し、日本紅斑熱リケッチア(Rj)に対して特異的に反応するRjマウス単クローン抗体(抗Rj抗体)を作製し、イムノクロマトグラフ法による迅速診断キットの開発を目的とした。不活化Rjをマウスへ免疫した後、脾細胞を摘出し、PAI細胞と共に細胞融合法により抗Rj抗体産生ハイブリドーマの樹立を試みた。その結果、最終的に2種類の抗Rj抗体の作製に成功した。それらの抗体はIgG1であり、ツツガムシ病リケッチア、SFTSウイルス、及びデングウイルスには交差反応性を示さなかった。現在、本抗体を用いたキットの開発を研究協力企業にて行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本において近年、ダニ媒介性感染症として日本紅斑熱、ツツガムシ病、SFTSの臨床現場における鑑別診断が問題となっている。本研究において作製した抗Rj抗体を用いた迅速診断キットが開発されれば、別の研究にて開発したSFTSに対する迅速診断キットと併用することにより臨床現場での鑑別診断が容易になり、抗生物質の投与の遅れによるリケッチア症の重症化や、SFTSに対して効果が無い抗生物質の不必要な投与などを防ぐことが可能となり、社会的な意義が大きいものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to improve the accuracy of differential diagnosis of Japanese spotted fever, which is one of the tick-borne infections, by generated anti-Rickettsia japonica (Rj) mouse monoclonal antibodies (anti-Rj mAbs) and developing a rapid diagnosis test kit by immunochromatography. After immunizing eight mice with inactivated Rj, splenocytes were collected from the mouse and generated hybridomas by cell fusion with PAI cells, which are fusion partner cells. As a result, two clones of anti-Rj mAbs producing hybridomas were finally successfully established. These antibodies were IgG1 and did not cross-react with Orientia tsutsugamushi, Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome virus, or Dengue virus, which are difficult to differentiate and diagnose. Immunochromatographic kits using these antibodies are currently being developed by a research collaborator.

研究分野：ウイルス学

キーワード：日本紅斑熱 リケッチア 迅速診断キット イムノクロマトグラフ法 モノクローナル抗体

1. 研究開始当初の背景

リケッチア症はリケッチア科の *Rickettsia* 属及び *Orientia* 属による感染症であり、紅斑熱群リケッチア、ツツガムシ病リケッチア群、及び発疹チフス群リケッチアに大別される。日本においては、古くから *Orientia tsutsugamushi* を病原体とするダニ媒介のツツガムシ病が知られていた。1984年に *Rickettsia japonica* を病原体とするダニ媒介の日本紅斑熱の患者が初めて報告されて以降、患者数の全国的増加とともに感染地域の拡大が顕著である。2016年の患者数は日本紅斑熱が276例、ツツガムシ病が505例報告されており、致死率はそれぞれ0.98%、0.43%であった。死亡例の解析より、両感染症ともにテトラサイクリン系抗生物質が有効であるにも関わらず治療開始の遅れが重症化を引き起こし死に至った可能性が示唆されている。また、リケッチア症は世界各地に広く分布しており、グローバル化において輸入感染症としても重要な疾患である。重症熱性血小板減少症候群(SFTS)は2011年に中国で報告されたブニヤウイルス科フレボウイルス属のSFTSウイルスによる新興感染症である。これまで中国、韓国、日本のみで発生が報告されている。日本では2013年に初めて患者が確認されて以来、日本紅斑熱同様に患者数の全国的な増加とともに感染地域が拡大している。2017年までに311件の報告がなされ、致死率は18.3%と非常に高い。一方で、日本では重症例に偏って診断がなされている可能性があるとしてされており、軽症例の診断を十分に行う必要があるとされている³⁾。また、本感染症はマダニ媒介の感染症であるが、ウイルス血症の動物や急性期患者の体液による動物(ヒト)ヒト感染も発生していると報告されている。日本紅斑熱及びSFTSは全て4類感染症に指定されており、病原体はバイオセーフティーレベル3での取り扱いとなる。そのため、これらの感染症の実験室病原診断は限られた施設でしか行えないこともあり検査に時間を要し、臨床現場において検査結果を反映させた診断および治療方針の決定はほぼできていない。一方で、臨床所見が定型通りの症状を示さないケースなどもあり、臨床所見のみでの鑑別診断も非常に困難である。実際に研究代表者が兼職する大阪健康安全基盤研究所(大安研)においても、リケッチア症とSFTSに対する検査が同時に依頼されることが多い。また、SFTSはウイルス血症の動物やヒトからの感染が示唆されていることから、医療従事者や動物医療従事者の安全を図るためにも早期診断が必要と考えられる。そのため、臨床現場即時検査(POCT)の開発が早急に求められている。POCTとして抗リケッチア抗体検出迅速診断キットはすでに海外で市販されているが、日本では承認を受けているものはまだ無い。また、抗体検出の場合、抗体が十分に誘導されていない感染初期の患者に対する感度が劣ると考えられている。一方、抗原検出迅速診断キットは感染初期の感度が高く、また、キットの組成をあまり変えることなく、吸血しているダニや動物などへの応用も可能である。そこで、本研究では日本紅斑熱(紅斑熱群)、ツツガムシ病、及びSFTSに対するマウスモノクローナル抗体を用いてイムノクロマトグラフ(IC)法に応用した鑑別診断用迅速診断キットの開発及びその評価を行う。ダニ媒介感染症の場合、病原体の浸淫状況による地域感染リスク把握が臨床所見として重要である。地域における感染リスクは、媒介動物の保菌状況の検討、野生動物の抗体保有率、地域住民の抗体保有率などから推測可能である。しかしながら、媒介動物の保菌状況や野生動物を用いた報告が多くなされているものの、ヒトの抗体保有に関してはあまり報告がない。近年の患者数の増加を考慮すると不顕性感染のリスクも増加している可能性が否定できず、臨床所見として患者発生地域における流行リスクをヒトの抗体保有率により検討する必要がある。本研究では大阪府で過去に収集したヒト血清の抗体保有率の検討を行い、臨床所見への知見を深めることにより診断精度の向上を目指す。

2. 研究の目的

ダニ媒介感染症である日本紅斑熱とSFTSは、それぞれ1984年と2013年に患者が報告された新興感染症であり、共に4類感染症に指定されている。両感染症の患者数は年々増加しており、全国で日本紅斑熱は2016年に505例(致死率:0.98%)、SFTSは2017年に90例(致死率:18.3%)報告され、特にSFTSの致死率は非常に高い。両感染症は、日本で古くから報告されているダニ媒介媒介性感染症であるツツガムシ病とも臨床所見が非常に類似している。しかしながら、これらの感染症に対する検査には時間を要し、臨床現場において検査結果を治療計画に役立てることはほぼできていない。そのため、臨床現場即時検査(POCT)法として迅速鑑別診断キットの開発が求められている。本研究では、紅斑熱群リケッチア及びツツガムシ病リケッチアそれぞれに対して特異的なマウスモノクローナル抗体の作製し、抗SFTS抗体とともに同一のキットとして組み合わせたダニ媒介感染症鑑別用抗原検出迅速診断キットの開発及び評価を行う。また、臨床所見から診断する際にダニ媒介感染症の感染推定地域における病原体の流行把握が重要であることから、本研究ではELISA法による抗体価測定法の確立を行い、ヒト保管血清を用いてこれらのダニ媒介感染症の抗体保有率の検討を並行して行う。これら病原体の流行把握並びにPOCTの導入により臨床現場におけるダニ媒介感染症の診断精度の向上を目指す。

す。

3. 研究の方法

1. ダニ媒介感染症鑑別用抗原検出迅速診断キットの開発

本研究では、紅斑熱群リケッチア、ツツガムシ病リケッチア、及び SFTS の鑑別診断用 POCT として抗原検出イムノクロマトグラフキットの開発及び評価を行う。紅斑熱群及びツツガムシ病リケッチアそれぞれに特異的なマウスモノクローナル抗体は図のように作製する。SFTS に対する抗体に関して研究代表者が研究分担者として行う「日本と近隣諸国間で行き来する輸入ウイルス感染症に対する迅速診断法の開発（国際共同研究強化（B）課題番号：18KK0271）、以下“国際 B”にて作製する抗体を使用する。得られた抗体の抗体認識領域は、リコンビナントタンパク質として発現させ、キットの陽性コントロールとして使用する。このようなダニ媒介感染症に対する抗原検出迅速診断キットの開発はこれまでに報告はされておらず、さらにダニ媒介感染症鑑別を同一のキット上で判定するようなキットの開発は本研究の独自性を示すものである。

2. 健常人を対象としたダニ媒介感染症の抗体保有率の検討

大安研は厚生労働省感染症流行予測調査事業に参加しており、長期にわたり毎年健常人の血液を収集している。この事業にて収集した血液を用い、紅斑熱群リケッチア及びツツガムシ病リケッチア、SFTS に対する抗体検査を実施することにより、大阪府下におけるヒト抗体保有率の年次ごとの変化を検討する。なお、多検体処理が必要なことから、初めにそれぞれの感染症に対する ELISA 法による抗体検査系を確立させる。本研究のような健常人での抗体保有率を同一地域で年毎に検討することは独創的な研究であるものと考えられる。

4. 研究成果

本研究では、当初は大阪健康安全基盤研究所(大安研)にて日本紅斑熱リケッチアを培養した後にホルマリン不活化を行い、それを免疫抗原として大阪大学微生物病研究所(微研)にてマウスへ免疫する予定であった。実際、2020年2月に免疫抗原を大安研より入手し、マウスへ初回免疫を行った。しかしながら、その後新型コロナウイルスの流行拡大のため、新型コロナウイルスに対する緊急的な研究への集中、種々の行動制限、そして地方衛生研究所である大安研での検査数の急激な増加に伴い、一時的に研究の停止を余儀なくされた。その後、新型コロナ対応により大安研での抗原作製は困難であると判断し、2021年3月に大安研より *Rickettsia japonica* YH 株(以下 Rj) の分与を受け、微研にて培養及びホルマリン不活化を行うことで免疫抗原を作製し、マウスへ免疫を行った。

免疫にはマウスは BALB/c 系統を使用し、アジュバントとして初回免疫は Freund's Complete Adjuvant、2 回目の免疫は Freund's Incomplete Adjuvant、そして 3 回目の免疫は Freund's Incomplete Adjuvant もしくはアジュバントなしにて免疫を行い、初回から 2 回目、2 回目から 3 回目の免疫は 2 週間以上、3 回目免疫から脾臓の摘出までは 3 日ないし 4 日の間隔をあけて行った。脾臓より脾細胞を分離し、その脾細胞と Fusion partner cell である PA1 細胞を用いて、ポリエチレングリコールを用いた細胞融合法によりハイブリドーマの作出を行った。1st screening では、ハイブリドーマの培養上清中の IgG 量を ELISA 法により定量すると共に、リケッチアの培養に使用する VeroE6 細胞を非感染の状態に固定・透過処理したものをを用いて間接蛍光抗体法 (IFA) にて VeroE6 細胞に対する抗体の有無を確認し、IgG を産生しかつ VeroE6 細胞に対して反応を有しない抗体を産生しているハイブリドーマを選択し、限界希釈法により cloning を行った。2nd screening も 1st screening と同様の手法にて行った。2nd screening で選択されたハイブリドーマは、ホルマリン不活化した Rj をスライドガラス上にアセトン固定したものをを用いた IFA 法にて、Rj に対する特異的な抗体産生を確認した。

これまでに 8 匹のマウスに対して免疫を行い、それらの脾細胞からハイブリドーマの作出を行った。2nd screening の結果、5 クローン (6 サブクローン) の抗 Rj 抗体の産生するハイブリドーマの樹立に成功した。IsoStrip (Roche Diagnosis) を用いてアイソタイピングを行ったところうち 2 クローンが IgG1、型であり、残りは IgM、型であることが示された。イムノクロマトグラフ法を用いた迅速診断キットには IgM 抗体は不向きであることから、IgG1 を産生している Rj-BH-1 及び Rj-BC-2 抗体産生ハイブリドーマを用いてマウス腹水を作製し、さらに性状解析を行った。まず、再度得られた抗体が不活化 Rj に反応することを確認するために、得られた抗体を 1 次抗体、抗マウス Alexa488 抗体を 2 次抗体として免疫染色を行った。対比染色としてエバンスブルーにて細胞を染色したする共に、陰性コントロール (NC) としては PBS を、陽性

コントロール(PC)としては1次抗体としてヒト患者血清、2次抗体として抗ヒト Alexa488 を使用しようとした。その結果、両抗体はPCの反応と同様の染色像を示した(図1)。

次に日本紅斑熱リケッチアと鑑別診断が困難でかつ同じダニ媒介性感染症であるツツガムシ病リケッチアに対する反応性の検討を行った。不活化した5種類のツツガムシ病リケッチア株(Gilliam, Karp, Kato, Kuroki, Kawasaki)を固相化したスライドガラスを用いて、Rjと同様の手法において免疫染色を行い反応性の検討を行った。なお、PCとして1次抗体は患者血清、2次抗体は抗ヒト Alexa488 を使用した。その結果、両抗体は全てのツツガムシ病リケッチア株に対して反応しないことが示された(図2)。

同様に、ダニ媒介性感染症であるSFTSV及び蚊媒介性感染症であるデングウイルス(DENV)に対する反応も検討した。SFTSVはJaOF2017-7(F)株をVeroE6細胞へ感染させたものを、インキュベートした後、ホルマリン不活化及びTriton X-100にて透過化したものを用いてIFA法により検討した。PCとしては、国際Bにて作製した抗SFTSVマウス単クローン抗体である3-5-8抗体を使用した。DENVは2型であるTh16-026DV2株をVero細胞へ感染させたものをインキュベートした後、ホルマリン不活化及びTriton X-100にて透過化したものを用いてIFA法により検討した。PCとしては、抗デングウイルスマウス単クローン抗体である4G2抗体を使用した。その結果、両抗体共にSFTSV及びDENVに対し反応を示さなかった(図3)。

これらの結果から、本研究で得られた2種類の抗Rjマウス単クローン抗体は、他のウイルスや病原体に対し交差反応性が無く、Rjに対して特異性の高いIgG1抗体であることが示された。そこで、マルホ株式会社にて依頼して現在迅速診断キットへの応用を行っている。

新型コロナパンデミックの影響により、本研究期間において種々の制限があり計画が大きく遅延し、1年延長手続きを行った。実際、最終的に上述の2種類の抗体の腹水を作製できたのが2024年1月末ということで、期間中には迅速診断キットの試作品の開発もできなかった。また、本抗体陽性コントロールとしたELISA系の樹立及びそれを応用した健常人を対象としたダニ媒介感染症の抗体保有率の検討に関しても期間中に間に合わなかった。しかしながら、これらの検討内容に関しては、本研究期間後も引き続き検討を行っていく予定であり、最終的にはすでに国際Bにて出来上がっているSFTSVに対するイムノクロマトグラフ法による迅速診断キットに本抗体を乗せたダニ媒介性感染症に対するPOCTの開発を継続して進めていく予定である。

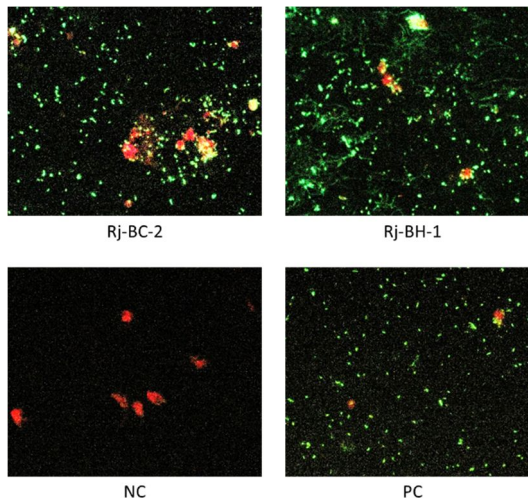


図1 日本紅斑熱リケッチアに対する反応

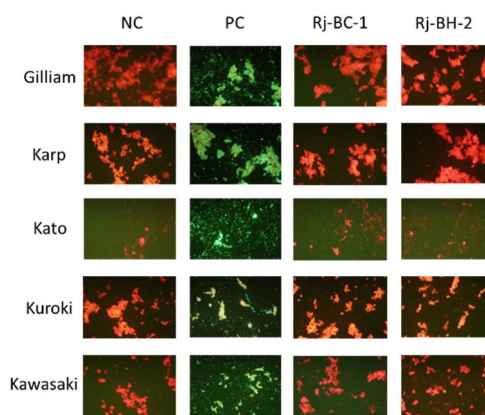


図2 ツツガムシ病リケッチアに対する抗体反応

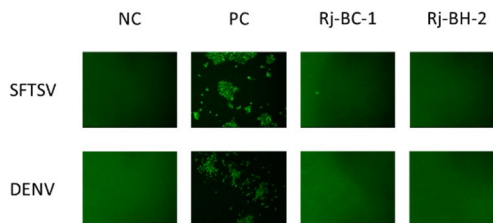


図3 SFTSVとDENVに対する抗体反応

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 |
|-------|---|--|----|
| 研究分担者 | 青山 幾子 (Aoyama Ikuko) (90332452) | 地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所・微生物部・主任研究員 (84407) | |
| 研究分担者 | 弓指 孝博 (Yumisashi Takahiro) (10250284) | 地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所・微生物部・主任研究員 (84407) | |
| 研究分担者 | 池森 亮 (Ryo Ikemori) (90827255) | 地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所・微生物部・研究員 (84407) | |

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 |
|---------|---------|
| | |