

2019年度 北陸大学特別研究助成金【 挑戦的研究 】 成果報告書

北 陸 大 学
学 長 殿

代表者	所属	医療保健学部	職位	准教授	氏名	小宮 智義
-----	----	--------	----	-----	----	-------

研究課題名	我が国におけるQ熱の迅速血清診断法に関する研究
-------	-------------------------

交付額	1,000,000 円
-----	-------------

研究成果の概要

Q熱コクシエラ症で現在行われている蛍光抗体法（IFA）に変わる簡易血清診断法の開発を目的として、*Coxiella burnetii* 日本分離株のゲノムライブラリーから得られた主要抗原の一種L7/L12 (rpIL) proteinの組換えタンパク質を抗原に利用したELISA法について、Q熱特殊外来患者の臨床検体を用い評価検討した。間接ELISA法で保存血清を用いて検討した結果、非特異反応が見られたが血清の非働化およびブロッキング条件の検討により、IFAとの相関係数0.55と従来法と一定の相関が認められた。客観的反応が不向きで、かつBSL3実験室での実験や特別な機器が必要なIFAに変わる方法として、今回検討したELISA法は簡易血清診断法、キット化への応用が可能となった。

研究目的 研究開始時の背景・着想に至った経緯などを含めて目的を記入して下さい。

Q熱（コクシエラ症）は、レジオネラ科コクシエラ属の*Coxiella burnetii* によって起こる人獣共通感染症で、ヒトをはじめ、産業動物、愛玩動物、野生動物、鳥類など極めて広い宿主域を持っている。感染動物は、流産や繁殖障害などを起こし、乳汁や糞便などに病原体を排泄する。ヒトは主に病原体を含む粉塵吸入感染と稀に乳製品から経口感染する。急性例ではインフルエンザ様症状から気管支炎、肺炎などの多彩な病像を、慢性例では心内膜炎や肝炎などを呈し、治療が遅れると死亡することもある。欧米では古くから重要な疾病として関心が高く、現在でも多くの集団発生例が報告されている。

本症は、多彩な病態を呈するため、診断は病原学的・血清学的に行われているが、各診断には一長一短がある。汎用性のある血清学的診断についても、抗体検出感度や実技の煩雑さなどに多々問題がある。しかし、潜在的感染者が多く知られていながらも、診断の特殊性から現在我が国で血清診断が出来る民間施設は北陸大学医療保健学部当研究室のみで、全国の病院から多くの血清診断依頼があり実施している。

申請者は、前所属機関から本菌の疫学、診断及び予防に関する研究を行ってきており、諸外国と異なる我が国の病態と低抗体価を示すQ熱の実態解明をするために、2002年に本邦唯一の特殊専門外来を研究協力者と北里大学北里研究所病院に開設し、本菌の遺伝学的および生物学的研究から臨床症状との関連および治療経過についての症例を集積している。その過程で、我が国の本症起因菌には、諸外国と違う血清型が存在することを報告してきた。また、これを解明するため、日本分離株の遺伝子ライブラリーの構築から特異的抗原遺伝子候補を明らかにし、その候補遺伝子を用い、特殊な施設のいらない簡易特異的診断法の確立を行ってきた。

本研究では、基礎および臨床の両側面から見た本症の我が国での実態をより明らかにすることを目的として、第一に、抗原特異遺伝子候補の発現蛋白質を抗原とした簡易特異的診断法の臨床検体応用を行い、第二に、既に得られている本菌の遺伝子解析を行い、血清型との関連を明らかにする。第三に、微生物学的に得られた情報より、本邦唯一の特殊外来より集積される症例を中心とした臨床的側面との関連を明らかにする。本研究により、未だ実態不明な本症を日本固有の本菌血清型と臨床との関連を明らかにする。これらによって、特殊な施設でない実験室でも行える血清診断法の開発研究を本邦初めて行うことを目的とした。

研究の方法

多くの潜在的感染者が示唆されている本症も、その感染実態は未だ明らかにされておらず、その原因の一つとして考えられる諸外国との菌株の相異を解析するため、過去の報告とは違った幾つかの日本分離株における特異的抗原支配遺伝子候補を明らかにしてきた（第82～84回感染症学会他）。その発現蛋白質を用い、特別な施設や技術が必要でなく、臨床現場でも使用可能な特異的診断法を確立することにより、臨床医師を初めとする医療現場からの要望にも堪えることが可能となる。申請者らが本症疑いに特化した特殊外来を実施している我が国唯一の機関としての特色を生かして、本菌の基礎および応用研究のみならず、臨床面から見た本症の実態を本研究で両側面から明らかにするため、今年度以下の方法で評価検討した。

ELISA用抗原には、*C. burnetii* 日本分離株406株（BGM細胞馴化株）を用いたゲノムライブラリーから得られた ribosomal protein L7/L12 (rpIL) proteinの一種の塩基配列から予想される遺伝子を元に作製した組換えタンパク質を用いた。また、比較のために *C. burnetii* の外膜糖タンパク質の一種 com1 遺伝子の組換えタンパク質を用いた。

ELISA法は、常法に従った間接ELISA法で行い、IFA法は、*C. burnetii* 感染Vero細胞を抗原とした間接蛍光抗体法で行った。使用血清は、研究使用同意が得られている旧北里研究所生物製剤研究所に血清診断依頼があった保存血清と、北里大学北里研究所病院にQ熱外来で受診した診断依頼血清を用いた。臨床症状との関連性については、血清診断結果を基に研究協力者が考察した。日本分離株のゲノム解析は、主に国立感染症研究所で行っている。

研究成果

引用文献は文末に〈引用文献〉として記入して下さい。

C. burnetii 日本分離株406株のゲノムライブラリーから得られたクローンよりribosomal protein の1種L7/L12 (*rpIL*) proteinの全塩基配列より予想される遺伝子を発現ベクターにリクローニングし、得られた発現蛋白質を元に作製した組換えタンパク質を抗原に用いた。IFA抗体価既知の血清76検体を用いてELISAを行ったところ、相関係数0.55で相関が得られ、感度81%、特異度78%であった。一方、*C. burnetii* 外膜糖タンパク質の一種 *com1* 遺伝子発現蛋白質抗原を用いた方法での相関は得られなかった。

一定の相関性が認められたが、Preliminaryで行った実験では相関係数0.75であったことに対し (Data not shown)、今回使用した血清の殆どがIFA陰性又は低抗体価であったことが相関係数の低かった原因であったと考えられた。高抗体価症例数を多く用いた再検討が必要であるが、客観的反応が不向きで、かつBSL3実験室での実験や特別な機器が必要なIFAに変わる方法として、今回検討したELISA法は簡易血清診断法、キット化への応用が可能となり、今後さらに簡易化検討をしていくこととした。

今回用いた臨床検体の血清抗体価と臨床症状との関連性を検討した結果、特異的臨床症状は認められず、従来から言われている非特異的臨床症状を呈す本症を改めて示唆することになった。また、日本分離株のゲノム解析は、今年度結果まで報告することが出来ず継続中である。

本研究の過程で、輸入症例の確定血清診断を行った¹⁾。

以上、今年度中心に行った組換え抗原を用いた血清診断法の臨床評価について、従来法であるIFAと相関が認められ、臨床応用の目処が立ったと考えられた。一般検査室で行えない本症の血清抗体価診断について、組換え抗原を用いる事により、どこでも出来ることが可能となることで、今後、免疫クロマト法など院内で出来るキット化を目指していきたいと考え計画している。

1) Matusi, T., Nakamoto, T., Hayakawa, K., Yamamoto, K., Nakamura, K., Kutsuna, S, Nagashima, M., Toriniwa, H., Komiya, T., Ohmagari, N. Two Cases of Acute Q Fever from the Same Family Who Returned from Malawi to Japan. *Am J Trop Med Hyg.* 101(6):1263-1264. 2019.

主な発表論文等

論文・学会・HP等の発表があれば、項目ごとに記入して下さい

1) Matusi, T., Nakamoto, T., Hayakawa, K., Yamamoto, K., Nakamura, K., Kutsuna, S, Nagashima, M., Toriniwa, H., Komiya, T., Ohmagari, N. Two Cases of Acute Q Fever from the Same Family Who Returned from Malawi to Japan. *Am J Trop Med Hyg.* 101(6):1263-1264. 2019.

2) Urushiyama, F., Tokiwa, T., Matsubara, K., Taira, M., Komiya, T. First record of infestation by an exotic tick *Amblyomma geayi* (Acari: Ixodida) from pet sloth in Japan. *J. Vector Ecology.* in press. 2020

3) 犬と猫の検査・手技ガイド2019 私はこう読む. Interzoo. 2019