

2 3. ELISA による日本紅斑熱リケッチア抗体検出法の確立と

大阪府の日本紅斑熱の感染実態調査

○池森 亮, 青山幾子, 弓指孝博 (地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所)

【研究目的】

日本紅斑熱は、日本紅斑熱リケッチアを原因とするマダニ媒介感染症である。近年、日本紅斑熱の患者数の増加、ならびに感染地域の拡大が進んでいることから、日本紅斑熱の検査の需要も拡大している。現在、日本紅斑熱の血清診断法として間接蛍光抗体法 (IFA) が主に用いられている。遺伝子診断法と比較すると、血清診断法は回復後にも有効な検査法である。しかし、血清診断法の IFA は結果判定に経験が必要とするため、検査技術の継承が必要である。そのため、IFA を実施していない検査機関も存在する。

そこで本研究では、結果判定が IFA よりも容易かつ客観的であり、一度に多検体を診断可能である ELISA を日本紅斑熱の血清診断法として確立する。本法の確立により、安定的な技術の継承・普及が可能となる。

また確立した ELISA を用いて、大阪府民の日本紅斑熱に対する抗体保有状況を広範囲に調査し、近年患者が増加し続けている背景を明らかにすることで今後の啓発活動へ役立てる。

【研究の必要性】

日本紅斑熱は、日本紅斑熱リケッチア (*Rickettsia japonica*、以下 Rj) を病原体とする感染症であり、ヒトは野外で Rj を保菌するマダニに刺咬されて感染する。発症した場合、高熱や発疹などの症状が現れる。テトラサイクリン系の抗生物質が著効を示すが、治療が遅れると重症化し、肝機能障害、多臓器不全などを引き起こす。致死率は約 1~3% とされている(1, 2)。従来、日本紅斑熱は西日本を主な発生地としていたが、近年は東日本にも感染地域が拡大している。また、感染者数も増加傾向にある(3)。大阪府においても同様であり、大阪健康安全基盤研究所 (以下、当所) が検査診断した陽性症例数は増加しており、2017 年以降、4 例の死亡症例が確認されている。このような背景から、日本紅斑熱は公衆衛生上重要な感染症となっている。また、発症から治療開始までに 6 日以上を要した場合は重症化リスクが高まることから、迅速な検査による確定診断が求められている(4)。

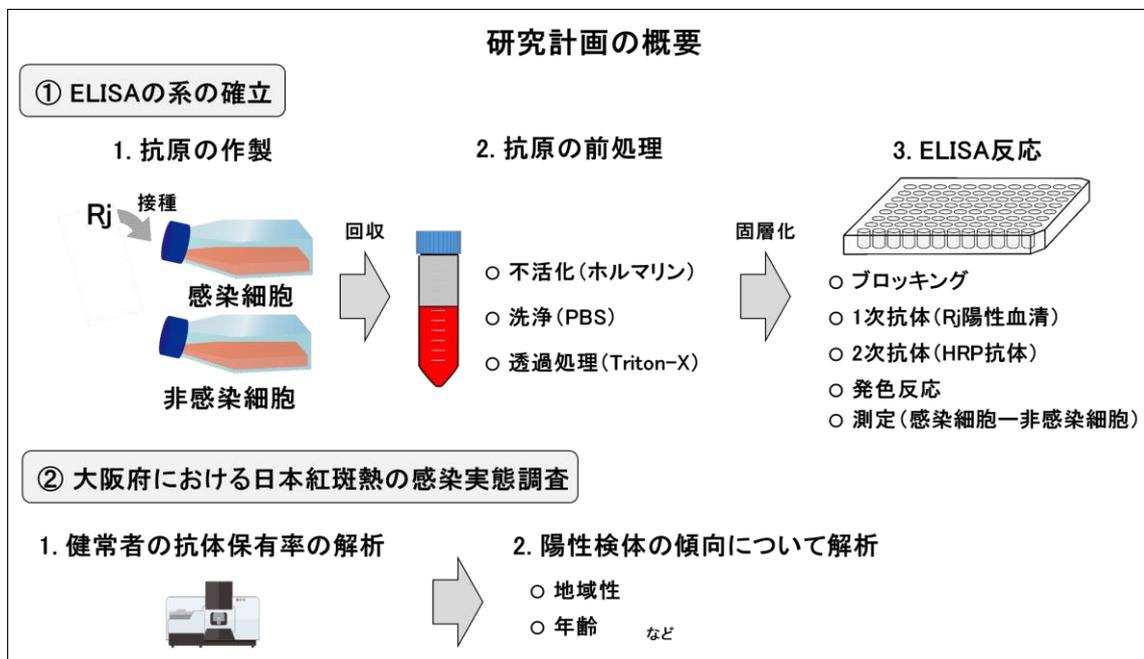
現在、日本紅斑熱の検査法として遺伝子検査法 (PCR 法) と血清診断法が存在する。感染初期は遺伝子検査法が有効であるが、血清診断法は回復期の診断においても有効である。血清診断方法としては間接蛍光抗体法 (IFA) が主に用いられている(1)。しかし、IFA は検査者が直接鏡検して結果を判定するため、検査者により判定値の差が生じやすく、結果判定に経験が必要となる。現在、地方衛生研究所などの検査機関において、世代交代が進むにつれて IFA の検査技術の継承が困難となってきた。そのため、日本紅斑熱の散発地

域において、遺伝子検査のみを実施し、血清診断は他の検査機関に依頼する地方衛生研究所も見られている(5)。以上より、迅速な診断・早期治療を行うために、結果判定が容易な血清診断法の普及が求められている。

そこで本研究では、日本紅斑熱の血清診断法として ELISA による測定法を確立する。ELISA は機器を用いた吸光度測定により結果を判定するため、結果判定が IFA よりも容易かつ客観的である。ELISA の使用により安定的な技術の継承・普及が可能となり、日本紅斑熱の血清診断を行える施設が増加すると考えられる。また、ELISA は一度に多検体の診断を行えることから、野生動物の抗体保有調査などの研究にも用いやすい。そのため、ヒトの診断のみでなく、動物の抗体検出にも利用できる ELISA の確立を目指す。

また、大阪府民の Rj 感染状況を把握するため、府民の血清を用いて Rj に対する抗体保有状況を調査する。これにより、近年患者が増加し続けている背景を明らかにすることができるため、今後の啓発活動において重要な資料となる。

【研究計画】



① ELISA の確立

培養細胞を用いて Rj を増殖させた後、感染細胞と非感染細胞それぞれを回収し、ホルマリンを用いて不活化処理をする。これに PBS による洗浄、Triton-X による透過処理を行ったものを抗原液とする。次に、炭酸バッファーを用いてこの抗原液を 96well plate に固相化し、ブロッキング処理を行う。1 次抗体として IFA にて抗 Rj 抗体陽性が確認されている血清（ヒト・アライグマ）を、2 次抗体として HRP 抗体（抗ヒト IgG、抗プロテイン A/G 抗体）を感作させる。ABTS で発色後、OD405/490 で吸光度を測定し、感染細胞と非感染細胞の吸光度の差を求め、カットオフ値を設定する。前処理の条件、抗体反応の条件、判定の閾値について検討し、この系の標準化を行う。

② 大阪府における日本紅斑熱の感染実態調査

当所で保存されている大阪府民の血清（当所の倫理審査委員会において承認済み）を用い、確立した ELISA を用いて大阪府民の抗体保有状況を調べる。これにより、大阪府内の

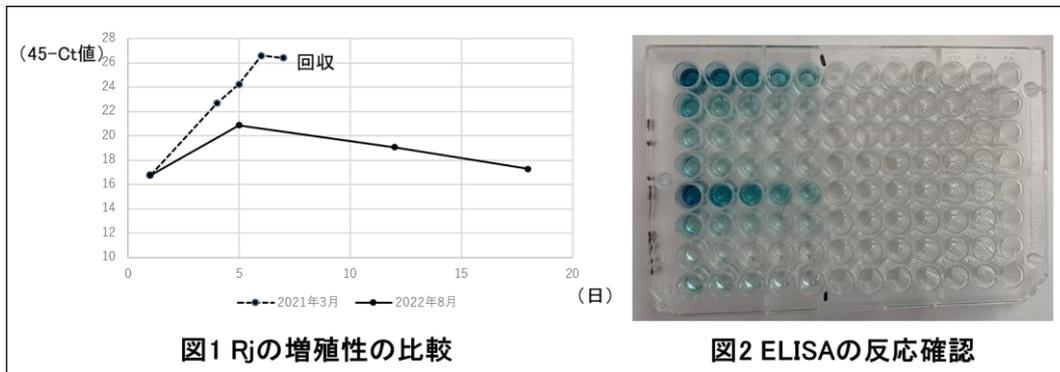
日本紅斑熱の感染実態を明らかにする。

【実施内容・結果】

① ELISA の確立

Rj を培養する細胞として、長期間の培養に向く Vero-E6 細胞を用いることにした。しかし、当所の保有する Vero-E6 細胞の増殖性が不安定であり、培養液などの条件を検討したが実験に使用できる状態にはならなかった。そのため、ATCC から Vero-E6 細胞を新しく入手し、研究に十分な量の細胞ストックを準備した後に実験を開始した。以上より、当初の予定よりも実験の開始までに時間を要した。

次に不活化抗原の作製を行った。Rj の増殖を確認するため、Vero-E6 細胞に Rj を接種した後、定期的に培養上清を回収し、リアルタイム PCR で Rj の遺伝子量を確認した。しかし、Rj の接種から 2 週間以上培養しても、過去の培養実験と比較して Rj の十分な増殖が確認できなかった (図 1)。培養条件を検討したが、Rj の増殖性には改善は見られなかった。そのため、当初の予定より少ない抗原量となったが、作製した抗原を用いて ELISA 試験を実施した。



まず、透過処理の有無について検討した。回収した感染細胞と非感染細胞を不活化処理後、それぞれ 2 等分し、1 つには 0.1% Triton-X 含 PBS を加えて 37°C で 10 分間反応させ、透過処理を行った。透過処理した抗原液、処理していない抗原液それぞれを 50 倍から段階希釈した後、プレートに固層化した。1 次抗体として 80 倍希釈した抗 Rj 抗体陽性ヒト血清、2 次抗体として HRP 抗ヒト IgG 抗体を作用させた。どちらの抗体反応も 37°C、1 時間の条件で行った。発色反応の開始から 30 分後、プレートに発色が確認された (図 2)。感染細胞と非感染細胞の吸光度の差を求めたところ、Triton-X 処理した 50 倍希釈の抗原液のみ十分な差 (0.35 以上) が見られた (表 1)。そのため以降の ELISA 反応は、Triton-X で透過処理した 50 倍希釈の抗原液を用いることにした。

次に ELISA の検出感度と動物種による反応性を IFA と比較した。ヒト血清 1 (IFA 抗体価: 320 倍)、ヒト血清 2 (IFA 抗体価: 80 倍)、アライグマ血清 1 (IFA 抗体価: 320 倍)、アライグマ血清 2 (IFA 抗体価: 80 倍) を 1 次抗体とし、40 倍から段階希釈した。これらを 37°C で 1 時間感作させた。2 次抗体はヒト血清に対し HRP 抗ヒト IgG 抗体、アライグマ血清に対し HRP 抗プロテイン A/G 抗体をそれぞれ 37°C で 1 時間感作させた。その結果、ヒト血清 1 において、40 倍、80 倍希釈で十分な吸光度の差が確認されたのに対し、その他のサンプルでは十分な差が見られなかった (表 2)。

② 大阪府における日本紅斑熱の感染実態調査

ELISA の確立が済み次第、実施する予定である。

表1 透過処理の有無と抗原の希釈濃度の比較							表2 ELISAの検出感度と動物種による反応性の比較				
抗原の希釈濃度	Triton-X処理あり			Triton-X処理なし			(吸光度)				
	A.感染細胞 B.非感染細胞 差 (A-B)			C.感染細胞 D.非感染細胞 差 (C-D)			抗体の希釈倍率	ヒト血清1 (320倍)	ヒト血清2 (80倍)	アライグマ血清1 (320倍)	アライグマ血清2 (80倍)
	×50	1.318	0.906	0.412	1.371	1.218	0.153	×40	0.3638	0.2545	0.1206
×100	0.976	0.681	0.295	1.083	0.914	0.169	×80	0.3056	0.129	0.1097	0.0938
×200	0.681	0.558	0.123	0.842	0.781	0.061	×160	0.1567	0.0819	0.0575	0.0467
×400	0.665	0.524	0.141	0.698	0.589	0.109	×320	0.0656	0.0387	0.0425	0.0546
×800	0.575	0.503	0.072	0.626	0.53	0.096	×640	0.0644	0.0164	0.0312	0.0173
×1600	0.547	0.471	0.076	0.606	0.531	0.075					

【考察と今後の課題】

本研究で試行した ELISA において、IFA で抗 Rj 抗体が陽性のヒト血清について、Rj 抗体陽性と判定することができた (表 2)。しかし、IFA で抗体価が 320 倍と判定された血清に対し、ELISA では抗体価 80 倍と判定されたことから、本研究で試行した実験条件において、ELISA の感度は従来の IFA の約 4 分の 1 であった。この原因として、抗原量の少なさが考えられる。抗原量が十分でなかったために、ELISA による発色も十分でなく、感染細胞と非感染細胞の発色に明確な差が生じなかった可能性がある。

抗原の作製のために Rj を Vero-E6 細胞に接種したが、約 1 年前に実施した培養と比較し、Rj が十分に増殖しなかった (図 1)。この原因として、Rj の保存方法が最適でなかった可能性が考えられる。Rj と近縁であるロッキー山紅斑熱リケッチア (*Rickettsia rickettsi*) の場合、凍結保存する際に DMSO を添加することが推奨されている(6)。DMSO を添加することにより、凍結保存の際に細胞が保護され、後に融解した際も効率よくリケッチアを増殖させることが出来るとされている。当所の場合、Rj 感染細胞を保存する際、細胞保存液などは使用していなかった。また、良い増殖性が確認できた 1 年前の培養実験は、Rj を凍結保存してから 1 か月以内に実施していた。これらのことから、長期間の凍結保存の間に Rj 感染細胞が傷害されており、サンプル使用時に細胞が起きなかったために、Rj の増殖性が著しく低下していた可能性が考えられた。ELISA に十分な抗原量を確保するためにも、より効率的に Rj を培養できるような保存法、培養方法を検討する必要がある。

また本研究では、ヒト以外にアライグマをサンプルとして用い ELISA の反応性を検討した。IFA 抗体価が 320 倍のヒト、アライグマ検体において、ヒトでは 80 倍希釈まで ELISA で検出できたが、アライグマにおいては 40 倍希釈でも検出限界以下であった。これらの原因として、動物種による差が考えられる。重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) ウイルスに対する抗体を検出する ELISA の場合、アライグマでは抗体検出の結果が IFA と一致していたのに対し、シカ、イノシシ等その他の野生動物種では ELISA の感度および特異度が不十分であったと報告されている(7)。この原因は明らかになっていないが、抗 Rj 抗体を対象とする ELISA においても、動物種の違いのために感度や特異度が異なると考えられる。本研究において、アライグマ血清に対する 2 次抗体として用いた抗プロテイン A/G 抗体は、幅広い動物種の抗体に反応する(8)。そのため、抗ヒト IgG 抗体等の動物種特異的な抗体を用いた場合と比較すると、プロテイン A/G は特異度が低く、それにより感染細胞と非感染

細胞の吸光度に差が見られなかった可能性も考えられる。ヒト以外の動物種を対象とする場合、2次抗体の種類や固層化する抗原量などについてさらに検討が必要である。

本研究期間において、Vero-E6細胞とRjの不調、ならびに新型コロナウイルスの第6波におけるオミクロン株への対応などがあり、当初の予定通りに研究を進行させることが出来なかった。しかし、感度はIFAに劣るものの、ELISAによって抗Rj抗体を検出できることが確認できた。今後、Rjの培養法、ELISAの反応条件について検討を続け、ELISAの系の完成を目指していきたい。

【参考文献】

1. Kinoshita H, Arima Y, Shigematsu M, Sunagawa T, Saijo M, Oishi K, Ando S. 2021. Descriptive epidemiology of rickettsial infections in Japan: Scrub typhus and Japanese spotted fever, 2007–2016. *Int J Infect Dis* 105:560–566.
2. Sakabe S, Tanaka H, Nakanishi Y, Toyoshima H. 2022. The clinical course of 239 cases of Japanese spotted fever in Ise Red Cross Hospital, 2006-2019. *J Infect Chemother Off J Japan Soc Chemother* 28:211–216.
3. 国立感染症研究所 (NIID) . 2022. 感染症発生動向調査 週報 (IDWR) .
4. Kodama K, Senba T, Yamauchi H, Nomura T, Chikahira Y. 2003. Clinical study of Japanese spotted fever and its aggravating factors. *J Infect Chemother* 9:83–87.
5. 小野澤菜穂子, 小林文宗, 小林良清. 2020. 長野県におけるレプトスピラ症と日本紅斑熱の重複感染患者の発生について. *信州公衆衛生雑誌* 14.
6. Ammerman NC, Beier-Sexton M, Azad AF. 2008. Laboratory Maintenance of *Rickettsia rickettsii*. *Curr Protoc Microbiol* 11:3A.5.1-3A.5.21.
7. TATEMOTO K, ISHIJIMA K, KURODA Y, MENDOZA MV, INOUE Y, PARK E, SHIMODA H, SATO Y, SUZUKI T, SUZUKI K, MORIKAWA S, MAEDA K. 2022. Roles of raccoons in the transmission cycle of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. *J Vet Med Sci* 84:982–991.
8. Scientific TF. 2020. みんなが知りたいプロテインA/G/Lの性質 | 知っておきたい! タンパク質実験あれこれ 第14回.

【経費使途明細】

使 途	金 額
VERO C1008 [Vero 76 clone E6 Vero E6] 細胞 ATCC 社	118,800 円
Eppendorf Research® plus	84,414 円
Recombinant Protein A/G, Peroxidase Conjugated	29,920 円
TaqMan MGB プローブ Small size	66,096 円
振込手数料	770 円
合 計	300,000 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円