

計畫編號：DOH94-DC-1011

行政院衛生署疾病管制局九十四年度科技研究發展計畫

對恙蟲病原菌(*Orientia tsutsugamushi*)具特異性之單株抗體製備

研究報告

執行機構：財團法人佛教慈濟綜合醫院

計畫主持人：陳立光

研究人員：廖偉如

執行期間：94年1月1日至94年12月31日

目次	頁數
摘要	(3)
(一) 前言	(5)
(二) 材料與方法	(8)
(三) 結果	(11)
(四) 結論與建議	(13)
(五) 參考文獻	(15)
(六) 圖表	(18)

中文摘要

按照本研究計畫預訂的工作內容及期程，在過去一年中恙蟲病病原菌 Karp、Kato 及 Gilliam 三個原型株被分別免疫注射 Balb/c 小鼠，經過細胞融合技術及篩選，本計畫成功地得到 22 株對抗恙蟲病病原菌之單株抗體。其中兩株單株抗體只能辨認部份菌株的 56Kd 抗原，是從免疫 Karp 株的老鼠得到的；而免疫 Kato 株的小鼠產生了一株抗 47Kd 抗原及六株抗 60Kd 抗原的單株抗體，且這些單株抗體可辨認每一菌株；但免疫 Gilliam 株的小鼠同樣地產生了 5 株抗 60Kd 之單株抗體，不同的是卻只能辨認少數菌株。這些恙蟲病病原菌的單株抗體應用於臨床診斷或研究工具的潛力有待進一步評估。

中文關鍵詞：恙蟲病病原菌、單株抗體、47Kd、56Kd、60Kd

Abstract

Following the research proposal of the first year, three prototype of *Orientia tsutsugamushi* (OT) Karp, Kato, and Gilliam strains have been prepared and immunized into Balb/c mice. After fusion and selection of hybridoma, 22 monoclonal antibodies (MoAb) specific to OT have been successfully generated and characterized. Two MoAbs against 56Kd antigen from Karp and other strains were acquired from the mouse immunized with Karp. All strains of OT could be recognized by one 47Kd-specific and six 60Kd-specific MoAbs generated from mouse immunized with Kato strain. However, only Gilliam and some Taiwan local strains could be identified by five 60Kd-specific MoAbs acquired from mouse immunized with Gilliam strain. The mechanism, how such a bias of immune response has been initiated by different strain of OT, has not been cleared yet. The potential of these MoAbs in application to basic research tool and to clinical diagnosis needs further evaluation.

Keyword: *Orientia tsutsugamushi*, Monoclonal Antibody, 47Kd, 56Kd, 60Kd

前 言

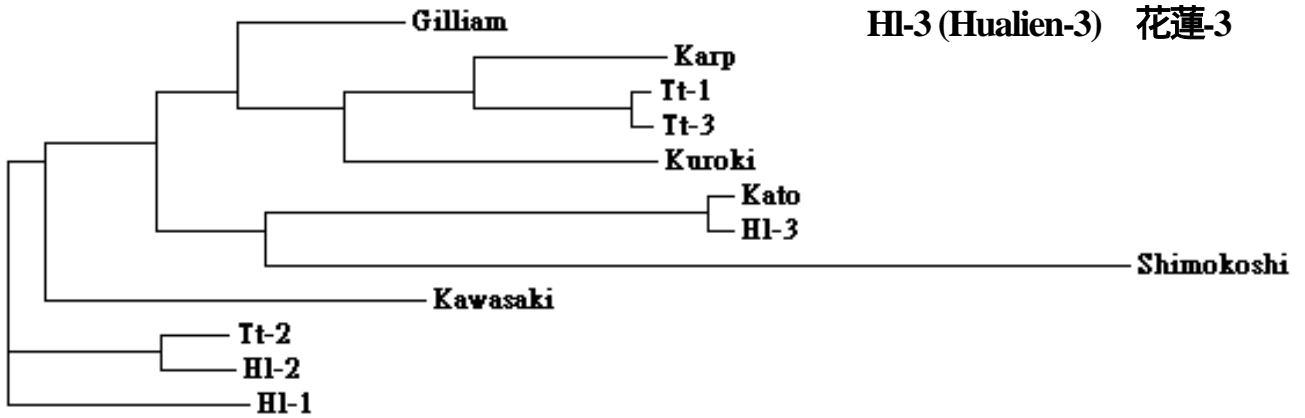
恙蟲病（又稱叢林性斑疹傷寒），為患者遭帶有病原立克次體 *Orientia tsutsugamushi* 之恙蟲幼蟲叮咬，所引起之急性傳染性疾病^(6,7)。在臨床症狀中，造成包括發熱、焦痂(eschar)、紅疹與淋巴腺病等症狀。若在缺乏治療的情形下，可能造成患者的無尿、肺水腫與心衰竭，致死率可由 1 到 30%⁽¹⁹⁾。恙蟲病之地理分佈，北由日本北部與俄羅斯東部，南至澳洲北部與西太平洋群島，西至阿富汗均有病例發生。雖然恙蟲病可藉由抗生素治療而痊癒，但由於錯誤之診斷與抗生素選用不當，世界上每年均有零星致死之案例發生。而台灣在 1955 年即將此病列為通報傳染病，現歸類為第三類乙種傳染病⁽¹⁻⁴⁾。台灣地區的恙蟲病近年有增加的趨勢，83 年至 89 年報告病例為 295、467、601、1058、1353、1355 及 1277 例，確定病例則為 103、140、156、246、327、302 及 255 例，各縣市均有病例報告，但主要在金門縣、台東縣、花蓮縣及南投縣，發生月份以每年 5 月至 10 月較多，感染的年齡層多為 20-29 歲。台灣區傳播媒介主要為地里恙蟲(*Leptotrombidium deliense*)。恙蟲的動物宿主主要為嚙齒類(rodent)，哺乳類(羊、豬、狗、貓)，鳥類(鳥、雞)等，其中又以嚙齒類為最主要宿主。

恙蟲病之潛伏期約 9 至 12 天，特徵為在螫口處 50% 的病人會形成特有的無痛性洞穿式潰瘍性焦痂 (Eschar)。併發高燒(39°C 以上甚至 40.5°C)，若未治療高燒可持續約 14 天。局部淋巴腺發炎腫大。自發病日起 4-5 天開始，軀幹先出現紅疹繼而擴至四肢及臉，約第 9-10 病日間會消退。常伴有頭痛、出汗、結膜充血、昏迷、末期心跳衰竭、休克等症狀。本病的死亡率依地區、立克次體株、感染史與治療與否有關，有 1-30% 之差異，但若經正確診斷適當用藥則死亡率可低於 1%。

正確的臨床診斷，有賴於診治的醫師是否能將臨床症狀及病史聯想到恙蟲病。在非流行疫區，即使典型的病例也常被疏忽；至於非典型的病例則須依靠實驗室提供檢驗結果。目前實驗室診斷主要利用間接免疫螢光法（Indirect immunofluorescence assay；IFA）來檢驗病患血清抗體，以 L 細胞分離培養、免疫染色及核酸增幅法（PCR）^(4,5,8,9,13) 來偵測病原體或抗原。分離培養至少須要 21 天，曠日費時而緩不濟急。以 PCR 法來擴增恙蟲病立克次體的 56kD 基因，可以在 1 個工作天內完成^(4,5)，但因已知恙蟲病立克次體 6 個原型種間的 56kD 基因就有高達 40% 的變異性^(6,13)，更加上本實驗室執行衛生署立克次體合約實驗室時已提出證據（見下圖），指出造成台灣東部地區流行的恙蟲病其立克次體是與 6 個外國原型大不相同的本土新種，所以，現有的 PCR 引子(Primer)常造成力有未迨的偽陰性。因此，血清學陽轉，仍在診斷恙蟲病上扮演黃金定律的份量⁽¹⁰⁻¹²⁾，可惜現在實驗室中採用的 IFA 法有 1.勞力密集、2.判讀主觀、3.無法定量及 4.無法大量等四大缺點。如何改善恙蟲病血清學診斷方法是目前當務之急。

有鑑於近年來國內恙蟲病病例逐年增加^(1,2)，如果無法即時確診，可能會造成國人的生命威脅。本計畫將分別以恙蟲病立克次體原型株（Gilliam，Karp，Kato）^(14,15) 及本土株（台東-1、台東-2 及花蓮-3）為抗原免疫小鼠後，以細胞融合法篩選出可以長期大量產製辨認恙蟲病立克次體抗原單株抗體的融合瘤細胞^(16,17)，經抗原專一性定性及交叉配對挑選出可以作為恙蟲病血清學診斷之 ELISA 試劑⁽¹⁸⁾，也可以成為恙蟲病立克次體抗原性分型之工具。

Tt-1 (Taitung-1) 台東-1
Tt-2 (Taitung-2) 台東-2
Tt-3 (Taitung-3) 台東-3
Hl-1 (Hualien-1) 花蓮-1
Hl-2 (Hualien-2) 花蓮-2
Hl-3 (Hualien-3) 花蓮-3



恙蟲病立克次體 56kD 基因全長之演化樹分析

材 料 與 方 法

本計畫將分別以恙蟲病立克次體原型株 (Gilliam , Karp , Kato)^(6,7)及本土株 (台東-1 , 台東-2 及花蓮-1) 為抗原免疫小鼠後 , 以細胞融合法篩選出可以長期大量產製辨認恙蟲病立克次體抗原的融合瘤細胞 , 經抗原專一性定性及交叉配對挑選出可以作為恙蟲病血清學診斷之 ELISA 試劑 , 也可以成為恙蟲病立克次體抗原性分型之工具。

恙蟲病立克次體及培養細胞 :

本計畫中所將使用的恙蟲病立克次體說明見下表 :

恙蟲病立克次體	來源	參考資料
Gilliam	衛生署疾病管制局	Burma ^(6,7)
Karp	衛生署疾病管制局	New Guinea ^(6,7)
Kato	衛生署疾病管制局	Japan ^(6,7)
台東-1	自有	Genbank No. AF516948
台東-2	自有	Genbank No. AY335819
花蓮-1	自有	Genbank No. AY243357

以上恙蟲病立克次體的增殖將以 L 細胞於 RPMI 1640(GIBCO)培養液中進行^(6,17)。

單株抗體之製備 :

六至八週齡之 BALB/c 雌性小鼠經由腹腔內免疫注射 100 TCID₅₀ 的恙蟲病立克次體 , 加等體積之 Freund's 完全佐劑。追加免疫注射三次 , 分別間隔兩週 , 但改加不完全佐劑。免疫四次後隻小鼠抽取眼窩血 , 以免疫螢光法 (IFA) 測定血清中抗恙蟲病立克次體抗體之效價。小鼠之脾臟細胞以無菌技術取出後和 NS-1 骨髓瘤細胞在含有 PEG 之溶液中融合 , 在經含有 HAT 之培養液篩選⁽¹⁶⁾ ,

會分泌抗恙蟲病立克次體抗體之融合瘤細胞用免疫螢光法挑選出來，以限制稀釋法進行單一細胞培養成單細胞株，再一次使用免疫酵素法⁽¹⁸⁾找出能分泌辨識恙蟲病立克次體單株抗體的融合瘤細胞株。

能生產單株抗體的融合瘤細胞株冷凍保存在液態氮中，當要生產時取出解凍培養至足夠的數目後， 1×10^7 個細胞注射入經 Freund's 不完全佐劑刺激過的多產 BALB/c 母鼠腹腔中，等待腹腔漲大時，定時抽取腹水。收集起來的含單株抗體腹水將經含 Protein A 或 Protein G 之親和性層析管柱吸附後沖下，純化之單株抗體以抗體純化液相層析系統 (AKTA Prime System) 收集後，再以光譜儀及蛋白質分析法定量保存於-80 凍箱中。

單株抗體種類之定性：

經恙蟲病立克次體免疫小鼠脾臟細胞融合瘤產生之單株抗體之種類或亞種，將用小鼠融合瘤亞種分型組件 (Borehringer Mannheim 公司) 來測定^(18b)。這是實驗室採用免疫酵素法來區別單株抗體是小鼠抗體種類中的 IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 或 IgM，其詳細步驟將依據廠商隨附之使用方法手冊。單株抗體為何種類決定其吸附實驗時使用 Protein A 或 Protein G。

單株抗體結合恙蟲病立克次體抗原之定性：

對恙蟲病立克次體抗原呈免疫酵素反應陽性的單株抗體將進一步進行所結識恙蟲病立克次體抗原之定性。本計劃將採用輻射免疫沉澱法測定病毒抗原之分子量大小，推算出是恙蟲病立克次體抗原中的那一個。恙蟲病立克次體感染細胞在無 Methionine 及 Cysteine 的 RPMI-1640 中培養一小時後，加入 $50 \mu\text{Ci}$ 的 ^{35}S Pro-Mix (Amersham) 再培養四小時。細胞經 PBS 經 PBS 洗淨後溶解在含有蛋白酶抑制劑的細胞溶解緩衝液中。細胞溶液中加入待測單株抗體及 Protein A (或

Protein G) 包裹之 Sepharose (Pharmacia 公司) 後在室溫中作用一小時。免疫複合物吸附之 Sepharose 以 RIPA 緩衝液沖洗後煮沸, 釋出之抗原分子再經 10% SDS-PAGE 後, 自我輻射顯影找出抗原分子量之大小。

單株抗體對不同恙蟲病立克次體抗原之交叉反應定性:

已經測知抗原性的恙蟲病立克次體單株抗體經量產純化後, 將進一步以免疫墨漬法 (Immunoblot) 測定是否會交叉反應其他恙蟲病立克次體抗原^(10,11)。要點如下: 不同恙蟲病立克次體感染之細胞以溶解緩衝液溶解, 其蛋白質經 SDS-PAGE 分開後轉漬至 Nitrocellulose 膜 (Hybond-C Super; Amershan 公司) 上, 經含 5% 脫脂奶粉之 PBS 阻斷非特異結合後, 加入待測單株抗體及 HP 酵素結合之山羊抗小鼠免疫球蛋白反應後, 轉變受質 4-chloro-1-naphthol 呈色。

二、Balb/c 小鼠經恙蟲病病原菌免疫結果：

6 週齡之 Balb/c 小鼠經製備之三株恙蟲病病原菌免疫 8 週後(詳細步驟請見材料與方法), 血清中抗 OT 的抗體效價以免疫螢光法(IFA)結果見圖二。效價結果請見表一。

免疫之 OT 細菌株	八週後血清中抗 OT 抗體效價
Karp	> 1 : 5000
Kato	> 1 : 5000
Gilliam	> 1 : 5000

表一、經免疫 Karp , Kato , Gilliam 三株 OT 後, 小鼠血清中抗體效價之 IFA 測定結果

三、免疫 Karp , Kato , Gilliam 三株 OT 後, 以融合瘤法生產之抗 OT 單株抗體之定性結果：

經 Karp 株免疫後得到產生抗 OT 單株抗體之融合瘤 2 株(表二 A), 免疫 Kato 株後得到產生抗 OT 單株抗體 13 株(表二 B), 而表二 C 中列出 7 株單株抗體為免疫 Gilliam 後篩選出的融合瘤細胞株。專一性測試除了未感染之 L929 細胞(MOCK)外, 感染 Gilliam(GL), Karp(KP), Kato(KT), Taiwan A(TA), Taiwan B(TB), Taiwan C(TC), Taiwan G(TG), Taiwan H(TH), Taiwan J(TJ), Taiwan N(TN)等株之 L929 細胞被當作抗原, 以數字及+號代表 IFA 試驗之螢光強度。西方墨點試驗(Western Blot)除了定出抗原分子量的大小外(圖二), 加上還原作用處理比對分析, 若為線性抗原位(lineal epitope)則以(L)表示, 若是立體抗原位(conformation epitope)則以(C)表示之。NT 代表未完成(Not Tested), ND 則表示無法測定(Not Detectable)。單株抗體之亞型為 Borehringer Mannheim 公司之組件測定之結果。

討 論

一、免疫小鼠的途徑：

本年度計畫中以 Karp、Kato 及 Gilliam 株 OT 免疫小鼠均採用後腳掌免疫之途徑，主要的原因 Balb/c 小鼠如果接受腹腔內注射 OT，將會在五天內發病死亡，尤其是第一次免疫時特別敏感，為了避免小鼠死亡^(9,17)，所以選擇從腳掌免疫。

二、不同 OT 株引起小鼠不同免疫反應：

免疫 Karp 株的小鼠產生的單株抗體為抗 56Kd 抗原⁽¹⁷⁾；免疫 Kato 株的小鼠產生了 8 株抗 60Kd 抗原⁽¹⁷⁾，1 株抗 47Kd 抗原之單株抗體；而免疫 Gilliam 株的小鼠產生了 5 株單株抗體都是抗 47Kd。造成這種結果的原因不明，但從單株抗體的數目及抗原分子的分佈，唯一可肯定的是小鼠對 OT 的免疫反應仍有太多地方是仍待弄清楚的⁽¹¹⁾。

三、單株抗體的特異性因免疫之 OT 株而異：

免疫 Karp 株產生抗 56Kd 之單株抗體選擇性辨認部份 OT 株，而免疫 Gilliam 株產生的單株抗體也只認部份 OT 株，但不同之處為其抗原分子為 47Kd。但免疫 Kato 株所產生的單株抗體 13 株，不論其抗原分子為何(47Kd、56Kd 及未明者)，均顯出辨認所有 OT 株，也就有泛 OT 之特異性，此類單株抗體應用在未來臨床診斷的潛力無限^(11,17)。

結 論

本計畫照原訂進度於第一年完成了下列工作目標：

1. 製備恙蟲病立克次體國外原生株 Gilliam、Karp 及 Kato 之抗原。
2. 恙蟲病立克次體抗原免疫小鼠。
3. 測定小鼠血清中抗體效價。
4. 進行細胞融合。
5. 篩選融合瘤細胞。
6. 完成製備 22 株抗 OT 單株抗體。
7. 單株抗體可辨認 OT 之 47Kd、56Kd 及 60Kd 抗原。
8. 單株抗體辨認之抗原位包含線性及立體兩種。
9. 抗 47Kd 及抗 60Kd 之單株抗體可辨認泛 OT 之共同抗原。

參考文獻

1. 陳慧玲、陳豪勇、洪其璧。台灣地區恙蟲病的發生近況。中華民國微生物及免疫學雜誌。26(4):166-170。1993。
2. 李淑芳、蔡淑芬、施清河等。一九九三年台閩地區恙蟲病流行病學調查報告。中華公共衛生雜誌。14(4):334-341。1995。
3. 陳慧玲 謝國珍 陳豪勇等 由病人血液中分離台灣地區 *Rickettsia tsutsugamushi* 之探討。台灣醫誌。94 (suppl2) :S112-119。1995。
4. 謝國珍、陳慧玲、陳豪勇等。以聚合酵素連鎖反應來判定恙蟲病立克次氏菌之血清型。中華民國微生物及免疫學雜誌。29(2):116-121。1996。
5. 陳慧玲、邱淑君、陳豪勇等。利用限制酵素切割片段圖法分析台灣地區的恙蟲病立克次菌株。中華民國微生物及免疫學雜誌。32:68-72。1999。
6. Kawamura A, Jr. Tanaka H, Tamura A. *Tsutsugamushi Disease*. Tokyo: Tokyo.1995.
7. Tamura A. Genetic diversity of *Orientia tsutsugamushi*. In: Raoult D, Brouqui P, eds. *Rickettsiae and Rickettsial Diseases at the Turn of the Third Millenium*. Paris: Elsevier, 1999; 67-73.
8. Kawamori F, Akiyama M, Sugieda M, Kanda T, Akahane S, Yamamoto S, Ohashi N, Tamura A. Two-step polymerase chain reaction for diagnosis of scrub typhus and identification of antigenic variants of *Rickettsia tsutsugamushi*. *J Vet Med Sci*. 55(5): 749-55, 1993.
9. Kee SH, Choi IH, Choi MS, Kim IS, Chang WH. Detection of *Rickettsia tsutsugamushi* in Experimentally infected mice by PCR. *J. Clin. Microbiol*. 32: 1435-1439, 1994.
10. Ohashi N, Fukuhara M, Shimada M, Tamura A. Phylogenetic position of *Rickettsia*

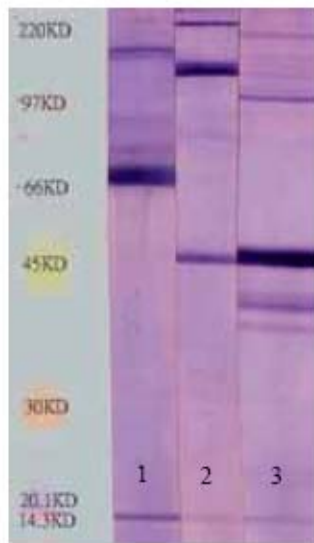
- tsutsugamushi* and the relationship among its antigenic variants by analyses of 16S rRNA gene sequences. *FEMS Microbiol Lett* 125: 299-304, 1995.
11. Ohashi N, Koyama Y, Urakami H, Fukuhara M, Tamura A, Kawamori F, Yamamoto S, Kasuya S, Yoshimura K. Demonstration of antigenic and genotypic variation in *Orientia tsutsugamushi* which were isolated in Japan, and their classification into type and subtype. *Microbiol Immunol* 40: 627-38, 1996.
 12. Seong SY, Park SG, Kim HR, Han TH, Kang JS, Choi MS, Kim IS, Chang WH. Isolation of a new *Orientia tsutsugamushi* serotype. *Microbiol Immunol* 41: 437-43, 1997.
 13. Shieh GJ, Chen HL, Chen HY, Horng CB. Detection of *Rickettsia tsutsugamushi* specific DNA from the lymphocyte of patients by polymerase chain reaction. *Proc Natl Sci Counc Repub China B* 19: 43-6, 1995.
 14. Shirai A, Coolbaugh JC, Gan E, Chan TC, Huxsoll DL, Groves MG. Serologic analysis of scrub typhus isolates from the Pescadores and Philippine Islands. *Jpn J Med Sci Biol* 35: 255-9, 1982.
 15. Tamura A, Ohashi N, Koyama Y, Fukuhara M, Kawamori F, Otsuru M, Wu PF, Lin SY. Characterization of *Orientia tsutsugamushi* isolated in Taiwan by immunofluorescence and restriction fragment length polymorphism analyses. *FEMS Microbiol Lett* 150: 225-31, 1997.
 16. Kohler G, Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of pre-defined specificity. *Nature (London)* 256: 495-7, 1975.
 17. Murata, M., Yoshida, Y., Osono, M., Ohashi, N., Oyanagi, M., Urakami, H., Tamura, A., Nogami, S., Tanaka, H. and Kawamura, A. Jr. Production and characterization of monoclonal strain-specific antibodies against prototype strains

of *Rickettsia tsutsugamushi*. *Microbiol. Immunol* 30: 599-610, 1986

18. Manufacture Instruction for Mouse-IgG ELISA (Catt. No. 1 333 151), Roche

(Germany) Version 3, July 1999.

19. Tsay RW, Chang FY. Serious complications in scrub typhus. *J Microbiol Immunol Infect* 31: 240-4, 1998.

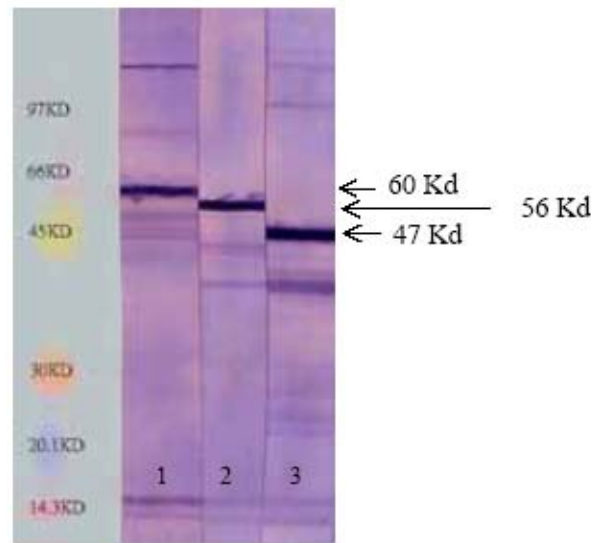


A. Non-denature SDS PAGE

lane 1:單株抗體辨認 60Kd

lane 2:單株抗體辨認 56Kd

lane 3:單株抗體辨認 47Kd



B. Denature SDS PAGE

lane 1:單株抗體辨認 60Kd

lane 2:單株抗體辨認 56Kd

lane 3:單株抗體辨認 47Kd

圖二、產製成功的單株抗體經西方墨點試驗顯示抗原分子為 47Kd、56Kd 及 60Kd

表二 A：經 Karp 株免疫後，得到抗 OT 單株抗體的型別專一性，抗原分子及抗原位定性結果

Clone	GL	KP	KT	TA	TJ	TG	TB	TH	TC	Mock	Wesatm Blot	PS.
1-12D	4+	3+	-	4+	-	4+	-	4+	-	-	57KD (L)	
1-11E	4+	3+	-	4+	-	4+	-	4+	-	-	NT	

表二 B：經 Kato 株免疫後，得到抗 OT 單株抗體的型別專一性，抗原分子及抗原位定性結果

Clone	KT	GL	KT	653 (TH)	CST4 (TA)	859 (TN)	Mock	Western Blot	PS.
14-3C	4+	4+	4+	4+	4+	4+	-	47KD(L)	
22-7A	4+	4+	4+	4+	4+	4+	-	60KD(C)	
27-6A	1+	W	W	W	W	W	-	ND	SDS sensitive
31-6F	W	2+	2+	3+	3+	2+	-	ND	SDS sensitive
33-11H	W	1+	3+	3+	3+	1+	-	ND	SDS sensitive
35-8E	1+	2+	3+	4+	4+	2+	-	60KD(C)	SDS sensitive
38-2G	1+	2+	2+	3+	3+	2+	-	ND	SDS sensitive
51-2E	4+	4+	4+	4+	4+	4+	-	60KD(L)	
51-5B	W	2+	3+	3+	3+	3+	-	60KD(C)	SDS sensitive
52-2G	4++	4+	4+	4+	4+	4+	-	60KD(L)	
54-8D	W	1+	2+	3+	3+	2+	-	60KD(C)	
55-11E	4+	4+	4+	4+	4+	4+	-	60KD(L)	
63-8G	4++	4+	4+	4+	4+	4+	-	60KD(L)	

表二 C：經 Gilliam 株免疫後，得到抗 OT 單株抗體的型別專一性，抗原分子及抗原位定性結果

Clone	GL	KP	KT	TA	TJ	TG	TB	TH	TC	Mock	Wesatm Blot	PS.
1-2E	4+	-	-	-	-	-	-	4+	4+	-	47KD (L)	
1-4G	4+	-	-	-	-	-	-	3+	3+	-	47KD (L)	
1-6H	4+	-	-	-	-	-	-	4+	3+	-	47KD (L)	
1-12H	4+	-	-	-	-	-	-	4+	2+	-	47KD (L)	
2-2B	4+	-	-	-	-	-	-	4+	3+	-	47KD (L)	
2-2E	4+	-	-	-	-	-	-	4+	2+	-	NT	
3-4B	w	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	