

200931039A

厚生労働科学研究費補助金
新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

リケッチアを中心としたダニ媒介性
細菌感染症の総合的対策に関する研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

平成22（2010）年3月

研究代表者 岸本 壽男

（岡山県環境保健センター）

厚生労働科学研究費補助金
新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

リケッチアを中心としたダニ媒介性
細菌感染症の総合的対策に関する研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

平成22（2010）年3月

研究代表者 岸本 壽男
（岡山県環境保健センター）

平成21年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
 リケッチアを中心としたダニ媒介性細菌感染症の総合的対策に関する研究
 研究班 名簿

氏名	所属	職名
岸本 壽男	岡山県環境保健センター	所長
阿戸 学	国立感染症研究所 免疫部第二室	室長
安藤 秀二	国立感染症研究所 ウイルス第一部	室長
猪熊 壽	帯広畜産大学獣医内科学・感染症学	教授
岩崎 博道	福井大学 医学部病態制御医学講座内科学(1)領域	准教授
内山 恒夫	徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部	准教授
大橋 典男	静岡県立大学 微生物学	教授
岡部 信彦	国立感染症研究所 感染症情報センター	センター長
川端 寛樹	国立感染症研究所 細菌第一部	室長
鈴木 正嗣	岐阜大学 応用生物科学部野生動物管理学	教授
高田 伸弘	福井大学医学部 病因病態医学講座	准教授
田原 研司	島根県保健環境科学研究所 ウイルスグループ	専門研究員
堤 寛	藤田保健衛生大学 医学部第一病理学	教授
林 哲也	宮崎大学フロンティア科学実験総合センター細菌遺伝学	教授
藤田 博己	財団法人大原総合病院附属大原研究所	主任研究員
山本 正悟	宮崎県衛生環境研究所 微生物部	部長

*分担研究者 50音順

目次

リケッチアを中心としたダニ媒介性細菌感染症の総合的対策に関する研究

I 総括研究報告書（平成21年度）	1
研究代表者 岸本 壽男（岡山県環境保健センター）	
II 分担研究報告書（平成21年度）	
疫学的研究	
1. 常在リケッチア症など感染環調査ならびに防圧に向けた環境要因の検討	13
高田 伸弘（福井大学 医学部病因病態学講座）	
2. マダニ・宿主動物の相互関係を考慮したサンプリング	29
－最近明らかになった紅斑熱群の多様性に絡んで－	
高田 伸弘（福井大学 医学部病因病態学講座）	
3. リケッチアを中心としたダニ媒介性細菌感染症に関係するダニ類の実態調査	33
藤田 博己（（財）大原総合病院附属大原研究所）	
4. リケッチアを中心としたダニ媒介性細菌感染症に関係するダニ類の実態調査	45
－2009年度の秋田県雄物川流域におけるツツガムシ調査成績－	
藤田 博己（（財）大原総合病院附属大原研究所）	
5. 中国・四国地域におけるリケッチア症（つつが虫病・日本紅斑熱）の発生状況と疫学 （2009年）	49
－リアルタイム PCR 法を用いた日本紅斑熱患者の各種臨床検体からの <i>Rickettsia japonica</i> 検出－	
田原 研司（島根県保健環境科学研究所 ウイルスグループ）	
6. 九州地域におけるつつが虫病と日本紅斑熱の発生状況、長崎県中通島における日本 紅斑熱のベクターと保有動物に関する調査および宮崎県の日本紅斑熱発生における イノシシの役割に関する調査	61
山本 正悟（宮崎県衛生環境研究所 微生物部）	
7. 紀伊半島のマダニが保有するアナプラズマ属菌と静岡県のマダニが保有する紅斑熱群 リケッチアの実態調査	71
大橋 典男（静岡県立大学 食品栄養科学部）	
8. 伴侶動物、家畜および野生動物におけるダニ媒介性細菌感染症に関する研究	83
猪熊 壽（帯広畜産大学獣医内科学・感染症学）	
9. 各種野生動物を対象とするリケッチアに関する血清疫学的調査	91
鈴木 正嗣（岐阜大学応用生物科学部野生動物管理学）	
臨床的研究	
10. リケッチア症重症化に関する臨床および基礎的検討	99
岩崎 博道（福井大学 医学部病態制御医学講座内科学（1）領域）	

- 1 1. 岡山県で初めて確認された日本紅斑熱症例ならびに急性感染性電撃性紫班病 …… 109
(AIPF) を合併した日本紅斑熱 1 例の臨床的検討
川上 万里 (真備中央病院内科)
山下 眞史 (川崎医科大学附属病院脳卒中科)
- 1 2. 上天草総合病院における日本紅斑熱 3 9 症例の検討 …… 117
和田 正文 (上天草市立上天草総合病院内科)

検査・診断的研究

- 1 3. 日本国内のリケッチア症実験室診断に関する状況調査 …… 127
安藤 秀二 (国立感染症研究所 ウイルス第一部)
- 1 4. 日本紅斑熱の病理診断とその有用性 …… 135
堤 寛 (藤田保健衛生大学 医学部第一病理学)

基礎的研究

- 1 5. 我が国で発生するリケッチア感染における宿主免疫応答の解析 …… 141
阿戸 学 (国立感染症研究所 免疫部第二室)
- 1 6. ダニ媒介性感染症起因菌の重複感染における重症化に関する研究 …… 145
川端 寛樹 (国立感染症研究所 細菌第一部)
- 1 7. リケッチアの病原性に関する基礎的研究 …… 151
内山 恒夫 (徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部)
- 1 8. ゲノム情報に基づいたつつが虫病発生・重症化機序の解明とその応用 …… 159
林 哲也 (宮崎大学 フロンティア科学実験総合センター)

予防・啓発的研究

- 1 9. 市民におけるリケッチア症の認知度調査ならびに都道府県衛生研究所等における啓発
活動状況調査 …… 167
岡部 信彦 (国立感染症研究所 感染症情報センター)

I 総括研究報告書

平成 21 年度厚生労働科学研究費補助金 (新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)
「リケッチアを中心としたダニ媒介性細菌感染症の総合的対策に関する研究」
総括研究報告書

研究代表者 岸本壽男 岡山県環境保健センター所長

研究要旨:

本研究では、リケッチアを中心としたダニ媒介性細菌感染症に対して総合的対策を実施することを目指し、とくに、依然多くの発生がみられるつつが虫病、近年急増している日本紅斑熱のほか、最近明らかになった新型紅斑熱リケッチア症や、ヒトアナプラズマ症、複数のダニ媒介性病原体の共感染症例、輸入リケッチア症などに関する研究を行った。具体的には、①疫学的研究を、ヒト、病原体、ベクター、動物、環境面から広く行い、今後リスクマップを作製するための情報を集積した。②臨床的研究としては、多医療施設での症例解析をもとに臨床像や重症化の病態解析を進めるとともに、将来治療指針等の作成や有効薬剤の保検適応につなげることも視野に入れて、治療法のエビデンスの蓄積を行った。③検査・診断的研究としては、日本国内におけるリケッチア感染症の診断並びにレファレンス体制構築における課題と改善方法を明確にし、実験室診断体制をより安定したものにすることを目的に、本年度は、つつが虫病と日本紅斑熱の実験室診断の主体となっている地方衛生研究所における検査の実施状況について調査した。また病理学的診断法の有用性の確立を目指して研究した。④基礎的研究として、発症や重症化のメカニズム、複数菌感染時の病態、薬剤の作用機序等に関して、細胞レベル、宿主の免疫学的レベル、病原体のゲノムレベルでの解析を進めた。⑤予防・啓発的研究では、有効な予防啓発法の検討をするため、市民におけるリケッチア感染症の認知度調査ならびに都道府県衛生研究所等における啓発活動状況調査を行った。

研究分担者:所属氏名

阿戸 学(国立感染症研究所免疫部第二室室長)

安藤秀二(国立感染症研究所ウイルス第一部第五室室長)

猪熊 壽(国立大学法人帯広畜産大学獣医内科学・感染症学教授)

岩崎博道(福井大学・医学部病態制御医学講座内科学(1)領域准教授)

大橋典男(静岡県立大学食品栄養科学部微

生物学研究室教授)

内山恒夫(徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・微生物学(ウイルス病原学分野)准教授)

岡部信彦(国立感染症研究所感染症情報センターセンター長)

川端寛樹(国立感染症研究所細菌第一部室長)

鈴木正嗣(岐阜大学応用生物科学部野生動物管理学教授)

高田伸弘(福井大学医学部病因病態医学講座准教授)

田原研司(島根県保健環境科学研究所ウイルスグループ専門研究員)

堤 寛(藤田保健衛生大学医学部第一病理学教授)

林 哲也(宮崎大学フロンティア科学実験総合センター細菌遺伝学教授)

藤田博己(財団法人大原総合病院附属大原研究所主任研究員)

山本正悟(宮崎県衛生環境研究所微生物部部長)

A. 研究目的

本研究の背景として、我が国におけるリケッチアを中心としたダニ媒介性細菌感染症の現状には多くの課題が存在する。すなわち、つつが虫病については依然年間数百例の報告で推移しており4類感染症で2番目に多い疾患である。近年ではほぼ全例がいわゆる新型つつが虫病と考えられているが、2008年には東北で15年ぶりに古典的つつが虫病の再出現もみられている。また日本紅斑熱は、近年症例が急激に増加し4類感染症の3番目となり、死亡例の報告もみられている。加えて最近新規紅斑熱群リケッチア症の発生が東北地域で2例確認され、我が国での紅斑熱症の多様性が明らかとなった。さらに我が国でこれまで報告がなかったヒトアナプラズマ症についても、本研究班の研究分担者のこれまでの検討により確認することができた。その中で複数のダニ媒介性病原体の共感染症例が存在することも判明した。ほかにも輸入紅斑熱症や発疹熱などの輸入リケッチア症などへの新たな課題も明らかになってきた。

これらの現状を鑑みると、ダニ媒介性細菌

感染症についてさらなる実態把握とリスク対策が望まれる。しかしながらリケッチア感染症の早期診断体制はいまだ未整備であり、病態解析や治療法の確立も不十分である。さらに予防啓発に関しても立ち遅れているのが現状である。

そこで本研究では、我が国におけるリケッチアを中心としたダニ媒介性細菌感染症すなわち、つつが虫病、日本紅斑熱、新型紅斑熱リケッチア症、ヒトアナプラズマ症、複数のダニ媒介性病原体の共感染症、輸入リケッチア症などに関して、総合的対策を講じるために以下の検討を行うことを目的とした。添付した図に示すように、①疫学的研究を、ヒト、病原体、ベクター、動物、環境面から広く行い、リスクマップ作製のための情報を集積する。②臨床的研究として、多くの医療施設での症例解析をもとに臨床像や重症化の病態解析をすすめ、治療法のエビデンスを蓄積し、治療指針等の作成や有効薬剤の保検適応化につなげる。③検査・診断的研究として、検査体制の現状の検証を行うとともに、より有用な診断法の開発や、レファレンス体制の確立、臨床や検査施設間の連携を構築する。また病理学的診断法の有用性の確立を目指す。④基礎的研究として、重症化の病態や薬剤の作用機序等に関して、細胞レベル、宿主の免疫学的レベル、病原体のゲノムレベルで解析する。⑤予防・啓発的研究として、有効な予防啓発法の検討を行い国民への情報提供を実施する。これらの5つのテーマを研究者間で統合的にかつ有機的に進めることで、リケッチアを中心としたダニ媒介性細菌感染症への総合的対策につなげることを目指す。

B, C, D. 研究方法、結果、考察(個々のテーマをより理解しやすいようにまとめて記載した)

1. 疫学的研究

a. リケッチア症の疫学調査並びに環境要因とリスク度の検討

常在リケッチア症などの感染環調査ならびに防圧に向けた環境要因の検討を紀伊半島、淡路島、香川県および南西諸島などで行い、患者発生の環境要因として地理、気象、地域社会などを検討考察した。タテツツガムシの分布北限域を再検しつつ、福島県で本種分布と患者発生との強い相関を証明し、リスクマップ試作の意義を確認した。さらに、近年注目される *R. heilongjiangensis* などによる新型紅斑熱のベクター背景を北-東-中日本において調べ、ほぼ東北地方中部の太平洋側に偏ることが示唆された。そういう中で、三重県の日本紅斑熱多発地の患家環境をモデルに、媒介マダニの防除防圧策の実践的基準化を目指した試行も開始した。なお、東アジア共通性の感染環を比較検討するため、本分担としては初めて中国中部(浙江省~安徽省)にて渡航調査し、参考データを得た。以上、今後も関連の調査を集積することで、ベクター研究の側からリケッチア症対策に資したい。

b. マダニ・宿主動物の相互関係を考慮したサンプリング-最近明らかになった紅斑熱群の多様性に絡んで-

感染環の実態把握の基礎としての的確なサンプリングが求められていることから、最近、紅斑熱群で明らかになった我が国での多様性に絡んで、マダニ・宿主動物の相互関係を考慮した調査試料の選択について総括して図示、考察した。

c. リケッチアを中心としたダニ媒介性細菌感染症に係るダニ類の実態調査

国内各地のリケッチアを中心とした細菌感染症に係るマダニ類の 2009 年度実態調査経過をまとめた。北海道道東地域と東北地方においては、極東型紅斑熱(仮称)の病原体 *R. heilongjiangensis* のベクターの有力種イスカチマダニを青森県八戸市と宮城県仙台平野の複数の地点に見だし、宮城県の複数の個体から当該病原体を追加、北海道のシュルツェマダニからは *R. helvetica* をそれぞれ分離した。西日本の本土域においては、香川県東部のタネガタマダニから *Rickettsia* sp. In56 タイプとキチマダニから *R. canadensis* を新たに分離し、淡路島ではタカサゴキラマダニから *R. tamurae* とヤマトマダニから *R. asiatica* を追加分離した。南西諸島では、奄美大島のアサヌママダニから *Rickettsia* sp. In56 を、西表島のタカサゴキラマダニから *R. tamurae* を初めて分離した、沖縄本島から *Ornithodoros* (あるいは *Carios*) 属マダニの生息確認と石垣島のウミヘビキラマダニからのリケッチア分離を試みたが陰性であった。マダニ、リケッチアともに実態把握にはまだ遠いが、情報量は確実に増えつつある。

d. リケッチアを中心としたダニ媒介性細菌感染症に係るダニ類の実態調査-2009 年度の秋田県雄物川流域におけるツツガムシ調査成績-

秋田県において 2008 年 8 月に 15 年ぶりとなるアカツツガムシ媒介性つつが虫病(Kato 型 *Orientia tsutsugamushi* 感染症例)の発生確認を受けて、2009 年に感染推定地を含む雄物川流域一帯におけるアカツツガムシの生息調査を実施した。同流域の

複数の地点から多数の個体を採集し、同地域の野鼠類にKato型 *O. tsutsugamushi* が感染していることを確認した。

e. 中国・四国地域におけるリケッチア症(つつが虫病・日本紅斑熱)の発生状況と疫学(2009年)-リアルタイムPCR法を用いた日本紅斑熱患者の各種臨床検体からの *Rickettsia japonica* 検出-

2009年の中国・四国地域におけるリケッチア症(つつが虫病・日本紅斑熱)患者の発生は、つつが虫病26例、日本紅斑熱42例であった。岡山県では、はじめての日本紅斑熱患者2例が報告された。つつが虫病・日本紅斑熱ともに広島県(つつが虫病11例、日本紅斑熱17例)からの報告が最も多かった。一方、つつが虫病・日本紅斑熱ともに、山口県および香川県からの患者報告は無かった。2009年に島根県で報告されたつつが虫病患者4例の内、1例から韓国の症例(Yeo-joo株)と100%相同する *O. tsutsugamushi* 56kDa 遺伝子断片が検出された。また、島根県において *R. tamurae* の感染例がはじめて確認された。2008年に四国地域において捕獲したアカネズミ79頭のうち、3頭の脾臓から Saitama 型 *O. tsutsugamushi* 56kDa 遺伝子断片が検出された。また、2008年および2009年に鳥取県東部地域において捕獲したアカネズミ9頭のうち、1頭の脾臓から *R. japonica* 17kDa 遺伝子断片が検出された。

2006年~2009年の島根県および岡山県における日本紅斑熱患者21例の臨床検体-ダニ刺し口の痂皮(10検体)と皮膚(1検体)、全血(9検体)、血餅(11検体)および壊死皮膚(1検体)-について、花岡らの開発した *R. japonica* 検出系リアルタイムPCR法(TaqMan-MGB probe法)を実施

したところ、ダニ刺し口の痂皮や皮膚からはほぼ100%検出され、その感度は17kDa 遺伝子領域を標的としたNested-PCR法とほぼ同等であった。すなわち、結果判定にかかる時間を大きく短縮できる本法は、早期治療のための診断に有益な検査法と判断された。

f. 九州地域におけるつつが虫病と日本紅斑熱の発生状況、長崎県中通島における日本紅斑熱のベクターと保有動物に関する調査および宮崎県の日本紅斑熱発生におけるイノシシの役割に関する調査-

九州地域はつつが虫病および日本紅斑熱の多発地域として知られており、なかでも熊本県では日本紅斑熱の患者報告数がこの数年で急増している。また、2008年には宮崎県で初めての日本紅斑熱による死亡例も発生するなど、これらの疾患に対する早期診断体制の確立に加え、病原体、ベクター、保有動物、感染リスク等の疫学情報の適切な提供が急務となっている。

今年度は、つつが虫病と日本紅斑熱の九州地域における発生状況を整理し、長崎県中通島における日本紅斑熱のベクターと保有動物の調査を実施した。さらに、宮崎県におけるイノシシの *R. japonica* に対する抗体保有状況と *R. japonica* 保有状況を検討し、以下の結果が得られたので報告する。

1. 2009年の九州地域におけるつつが虫病患者の報告数は、鹿児島県59例、宮崎県20例、大分県17例、長崎県6例、熊本県6例、福岡県1例、佐賀県4例の計113例で、全国の患者数(455例)の25%を占めた。九州地域では、2007年、2008年と患者報告数が増加傾向にあったが、2009年には減少して2007年と同程度の発生数であった。また、日本紅斑熱患者の報告数は、熊

本県 14 例、鹿児島県 9 例、宮崎県 5 例、長崎県 2 例の計 30 例で、全国 の患者数 (125 例) の 24% であった。2007 年以降に熊本県天草の上島での多発が確認されているが、2009 年度も三重県、広島県に次ぐ患者発生が報告されており、多発の原因を明らかにすることがこの地域における今後の課題となっている。

2. 2009 年 8 月に長崎県中通島で捕獲したマダニ類と野鼠から *R. japonica* の検出を試みたが陰性であった。中通島ではこれまでに 2 例の日本紅斑熱患者の発生が報告されており、本島における日本紅斑熱の感染環の解明が今後にも必要である。

3. 患者発生の確認されている県南部で捕獲されたイノシシの 35% が *R. japonica* に対して 1:40 以上の抗体を保有していたが、血液と脾臓から *R. japonica* の遺伝子断片は検出されなかった。これらの結果から、病原体の供給源としてのイノシシの役割は低いと推定されたが、宮崎県の日本紅斑熱の感染環におけるイノシシの役割については、さらに検討する必要がある。

g. 紀伊半島のマダニが保有するアナプラズマ属菌と静岡県のマダニが保有する紅斑熱群リケッチアの実態調査

日本国内におけるリケッチア関連細菌群 (特に、紅斑熱群リケッチア、アナプラズマ属菌、およびエーリキア属菌) の実態を明らかにするため、2008 年に和歌山県と三重県で採集したマダニからアナプラズマ属菌とエーリキア属菌の検出を試みるとともに (紅斑熱群リケッチアの検出については昨年度報告した)、静岡県におけるマダニが保有する紅斑熱群リケッチアを調査した。その結果、和歌山県と三重県のマダニにおいては、353 匹中 2 匹のフタトゲチマダニ

と 1 匹のヤマトマダニからアナプラズマ属菌に特異的な *p44* 遺伝子群の PCR 産物が検出された。系統樹解析から、これらは米国のヒト分離株の *Anaplasma phagocytophilum* の *p44* 遺伝子群と近い関係にあることが判明した。これにより、紀伊半島のマダニは *A. phagocytophilum* を保有していることが初めて明らかとなった。エーリキア属菌の *p28* 遺伝子群の PCR 検出では、いずれのマダニからも増幅産物は得られなかった。また、静岡県の主に東部地域の調査では、採集した 2,566 匹のマダニのうち 726 匹について、紅斑熱群リケッチアの *gltA* 遺伝子を標的とした PCR を行った。その結果、181 匹 (24.9%) が陽性を示した。そして、これら PCR 産物の一部の塩基配列の解読結果を基に PCR-RFLP 型別法を構築し、これを用いてリケッチアの型別を行ったところ、主としてキチマダニが保有していた *R. japonica* タイプ (JAP) やシュルツェマダニとヤマトマダニが主に保有していた *R. helvetica* タイプ (HEL) を含む計 10 型に分類することができた。さらに、マダニからの紅斑熱群リケッチアの分離を試みたところ、ヤマアラシチマダニおよびタイワンカクマダニからそれぞれ *R. japonica* を分離することに成功した。この結果は、静岡県では未だ日本紅斑熱が発生する可能性があることを示しており、今後も慎重に実態調査を継続する必要があるものとする。

h. 伴侶動物、家畜および野生動物におけるダニ媒介性細菌感染症に関する研究

我が国の医学領域で問題となっているダニ媒介性細菌感染症、とくにリケッチア目細菌について、伴侶動物、家畜および野生動物の感染状況を調査した。

1. 伴侶動物のダニ媒介性細菌感染状況調査
1) 全国の犬1427頭の末梢血からDNAを収集し、欧米で問題となっている *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum* をはじめとするアナプラズマ科細菌の感染状況をPCRにより調査したところ、*E. canis*, *A. platys*, *A. phagocytophilum* については陽性が得られなかったが、13頭(0.9%)が *Anaplasma bovis* 陽性を示し、同病原体が犬にも感染することが示された。2) 全国の猫末梢血1773検体からDNAを抽出し、病原性リケッチアおよびアナプラズマ科細菌の感染状況調査を開始した。

2. 家畜のダニ媒介性細菌感染状況調査 1) 北海道十勝地方で飼育される牛のうち、何らかの臨床症状を呈して帯広畜産大学に搬入された病畜のDNAおよび血清280検体を採取した。2) 北海道十勝地方で放牧されている健康牛80頭はPCR検査により *A. phagocytophilum* および *A. bovis* は陰性であった。3) 北海道日高地方で放牧されている牛のうち、2007年から *A. phagocytophilum* または *A. bovis* 感染が認められている5頭のうち *A. bovis*-PCR陽性の1頭は、2009年にも継続的に *A. bovis* 陽性を示したが臨床症状は認められなかった。

3. 野生動物のダニ媒介性細菌感染状況調査
1) 北海道十勝地方のエゾシカ脾臓を採取し、*A. phagocytophilum* 感染状況をPCR法により調査したところ、27検体中10検体(37%)が陽性を示した。2) 北海道のアライグマ末梢血210検体を収集し、分子生物学的方法によりエーリキア/アナプラズマの検出を試みたところ、210検体中8検体(3.8%)が陽性を示した。PCR産物の遺伝子解析では6検体で *A. bovis* と相同性の高い遺伝子

が検出された。3) 近年日本紅斑熱患者が急増している熊本県上天草地方において保菌動物として疑われているイノシシの疫学的役割を解明するため、地元猟友会と協力してイノシシの血液および寄生マダニサンプルを収集した。

1. 各種野生動物を対象とするリケッチアに関する血清疫学的調査

野生動物を材料にリケッチアの感染状況調査を実施した。

1. イノシシの紅斑熱群リケッチア感染状況調査：紅斑熱群リケッチアに対する抗体が確認され、地域間で抗体陽性率が異なることから、野生のイノシシが紅斑熱群リケッチアに感染する可能性が示された。しかし、病原体遺伝子が検出されなかったことから、紅斑熱群リケッチアに対する感受性は高くはないことが示唆された。

2. 北海道知床地方におけるマダニの紅斑熱群リケッチア保有状況調査：分子生物学的検索により、北海道知床地方のマダニにおいても *Rickettsia tarasevichiae* および *Rickettsia* sp. HJ126 近縁種などの紅斑熱群リケッチアを保有していることが明らかとなった。

3. ツキノワグマの紅斑熱群リケッチア感染状況調査：紅斑熱群リケッチア遺伝子が検出されたことから、紅斑熱群リケッチアが広範な野生動物種に浸潤していることが示唆された。

2. 臨床的研究

a. リケッチア症重症化に関する臨床および基礎的検討

我が国では近年、新興リケッチア感染症・日本紅斑熱の報告数が急増し、発生地域の広がりも認められる。日本紅斑熱の治

療としては、テトラサイクリン系薬剤に加えニューキノロン系薬剤併用が有用である例が報告され、つつが虫病との最大の相違点として認識される。リケッチア症全般にわたる、重症化の客観的な評価、ならびに有効な治療法の確立が急務であり、本研究ではこの目的を達するための検討を行っている。

これまでに臨床所見を確認し得たつつが虫病(31例)と日本紅斑熱(23例)において、重症度を従来より用いている重症度スコア(Iwasaki et al, J Clin Microbiol, 1997)をもとに比較した。つつが虫病では8例(25.8%)が、日本紅斑熱では10例(43.5%)が、それぞれ重症度2以上に相当し、日本紅斑熱がつつが虫病より重症度が高いことが示された。また重症度を2以上(重症群)と2未満(軽症群)に分け比較すると、急性期の血中TNF- α 濃度はいずれの疾患においても有意に重症群が高く、TNF- α が重症度を示す指標となりうることが示唆された。

次にin vitro実験系における検討では、minocycline (MINO)が単球系細胞(THP-1)において、TNF- α 産生を濃度依存性に抑制することが示された。つつが虫病における普遍的なMINOの有効性が、本薬剤の有する本来の抗菌活性の他に宿主側のサイトカイン産生を制御し、過剰な生体防御反応を抑制することに起因することが推測された。日本紅斑熱ではMINOのみでは十分な有効性が得られない症例があり、テトラサイクリン系薬剤に加えニューキノロン系薬剤の併用が有効性を高めることが報告されてきた。この点について、実験系でMINO + ofloxacin (OFLX)によるTNF- α に与える影響を検討したが、OFLXによる相乗的な抑制

効果は確認できなかったことより、併用効果は抗リケッチア活性の直接的な増強によることが推測された。しかし、MINOによるIP-10, MCP-1, MIP-1 α およびMIP-1 β の産生制御が実験的に明らかとなったことより今後はTNF- α のみならず他のケモカインを含むサイトカイン産生修飾についても検討する必要がある、生体防御に及ぼす、単球・マクロファージ系細胞の影響について、今後明らかにしていきたい。

b. 岡山県で初めて確認された日本紅斑熱症例ならびに急性感染性電撃性紫斑病(AIPF)を合併した日本紅斑熱1例の臨床的検討

これまで岡山県では日本紅斑熱の報告例はなかったが、2009年10月に岡山県で初めて日本紅斑熱の発症例を確認するとともに、ほぼ同時に同じ地域で発症し急性感染性電撃性紫斑病(AIPF)を合併した日本紅斑熱症例を経験した。リケッチア症にAIPFを合併した事例は紅斑熱群リケッチア症での報告が外国で数例見られるのみで、日本紅斑熱症例での報告はこれまでない。重篤な病態を呈することから、今後注意すべきである。

c. 上天草総合病院における日本紅斑熱39症例の検討

2006年より天草上島の南東部を中心に日本紅斑熱が多発した。発熱を主訴に受診した患者でレントゲン・採血等で感染源不明であった場合、多発地域での農作業の有無・紅斑・刺し口・肝酵素の上昇・Na低下・血小板数低下・CRP上昇のうち複数認めるとき日本紅斑熱を強く疑った。CPK値が高い数値を示すほど重症度を反映すると考えられた。治療開始時期は、年々短縮してきている。治療開始時期の遅れが重症となると考えられるので、今後は市民・医療機関

などへ日本紅斑熱の知識を高める活動を行って行く予定である。

3. 検査・診断に関する研究

a. 日本国内のリケッチア症実験室診断に関する状況調査

日本国内におけるリケッチア感染症の診断並びにレファレンス体制構築における課題と改善方法を明確にし、実験室診断体制をより安定したものにするを目的に、本年度は、つつが虫病と日本紅斑熱の実験室診断の主体となっている地方衛生研究所における検査の実施状況について調査を行った。全国衛生微生物技術協議会に参加している地方衛生研究所 77 箇所を対象に、リケッチア症(つつが虫病および日本紅斑熱)の実験室診断の実施状況についてアンケート調査を実施したところ、地方衛生研究所における検査体制は、血清診断、遺伝子診断、分離までの充実した施設がある一方、つつが虫病については商業検査機関において血清診断が実施可能なことから、検査を日常業務から除外している施設もあり、全国的には実施施設が減少している。今回の調査した各項目をより多角的に解析すると共に、商業検査機関の情報収集とあわせ、より効率的な検査体制の構築と安定強化のための施策を検討、実施、継続することが必要である。

b. 日本紅斑熱の病理診断とその有用性

今年度は以下 3 点を重点的に検討した。1) 従来、日本紅斑熱の皮膚生検ホルマリン固定パラフィン切片を用いた免疫染色と Real-time PCR 法による早期診断の有用性を検討してきた。2004 年から 2009 年の間に日本紅斑熱と判断された症例は、56 例中 51 例であった。そのうち皮膚生検(主とし

て刺し口)が実施されたのは 47 例で、免疫染色の病理診断に適した(真皮成分の含まれる)皮膚生検サンプルは 37 例だった。免疫染色が陽性であったものは、37 例中 30 例(81%)であった。免疫染色陰性、real-time PCR 陽性の症例もみられた。皮膚生検に対する免疫染色と Real-time PCR 法の併用は、日本紅斑熱の早期診断に有用な方法であると考えられた。免疫染色および/または real-time PCR 法で陽性を呈した中で、回復期血清の上昇が遅延した 7 症例が経験された。

2) 日本紅斑熱リケッチアに対するモノクローナル抗体を新たに作製し、免疫染色への応用を試みた。検討した 7 種のうち、感染細胞株に顆粒状陽性所見を示したのは 3 種あったが、残念ながら臨床検体に応用できなかった。

3) 感染日本紅斑熱リケッチアの定量性について、real-time PCR で検討した。gltA 遺伝子と R17k 遺伝子の 2 種のプライマーを用いて株間の違いを検討したが、違いは見いだされなかった。したがって、患者サンプル内のリケッチア定量が可能であることが示唆された。今後、リケッチア感染症の病態や重症度との関連を検討する上で有用な情報を得られる可能性がある。

4. 基礎的研究

a. 我が国で発生するリケッチア感染における宿主免疫応答の解析

我が国におけるリケッチア感染症において、その免疫応答に関しては未だ不明な点が多い。その理由の一つとして、ヒトの病態を反映する動物感染モデルが確立しておらず、免疫学的な解析がなされていないことが挙げられる。本研究では、種々の遺伝

子改変マウスを用いて、これらの病原体に関する動物モデルを検討し、診断、治療、予防に貢献しうる免疫研究を目的とする。本年度は、我が国のリケッチアストックのほぼすべてがマイコプラズマのコンタミネーションによって汚染していることが判明したため、免疫学的研究に使用できないことが明らかとなった。そこで、マイコプラズマの感染が認められない培養細胞と、遺伝子改変マウスにリケッチアを継代させることによって、マイコプラズマを除去すると同時に、動物モデルを確立し、免疫応答を解析することを今後の研究で目指す。

b. ダニ媒介性感染症起因菌の重複感染における重症化に関する研究

海外ではマダニ媒介性感染症の重複感染時の患者病態の重篤化が報告されている。これら重複感染は *Borrelia* 細菌と *Anaplasma* 細菌、また *Borrelia* 細菌とバベシア原虫において見出されている。一方、国内において、これら病原体の重複感染における重症化についてはその有無とメカニズムについては全く知られていない。そこで本研究ではこれら病原体の重複感染時の重症化の有無を実験室レベルで解明することを目的として研究を開始した。

c. リケッチアの病原性に関する基礎的研究

リケッチア症の発症や重症化機構の解明、病原体の感染・細胞内増殖・病原性発現の分子機構の解明を目的とし、1) リケッチア Sca 外膜蛋白質群の機能解析 2) 宿主ベクターの長期に渡る飢餓状態に対する寄生リケッチアの生残り戦略の解明、3) 複数種のリケッチア重複感染の機序の解明、4) 病原性の異なるオリエンチア株間の発現蛋白質の比較などの解析を行った。その結果、5) Sca0 と Sca5 がほ乳動物細胞へのリケッ

チアの付着を担う因子であることが示されたが、ダニ細胞、昆虫細胞へのリケッチアの付着を担う因子は不明であった。6) DALBE3 マダニ由来細胞の飢餓状態をモニターするための抗体産生に必要な *Dermacentor albipictus* の Atg12 抗原が GST 融合蛋白質の形で得られた。7) 病原性のリケッチアを種々の細胞に重感染した場合、単独感染と同様の増殖動態をとることが明らかとなった。8) オリエンチアの強毒、弱毒株間で共通に発現が見られる蛋白質のうち、主要なものを質量分析した結果、菌体表面の主要抗原である 56 kDa 型特異的抗原、正常な蛋白質産生に必須の熱ショック蛋白質 HSP60 と DnaK、ペプチド伸張因子 Tuf、およびセリンプロテアーゼ HtrA が同定された。

d. ゲノム情報に基づいたつつが虫病発症・重症化機序の解明とその応用

本研究の目的は、ゲノム情報に基づいた解析により、つつが虫の発症・重症化機構の解明や新規疫学・診断ツールの開発を行うことである。本年度は、本菌におけるペプチドグリカン産生の有無の解明と、新規の進化系統解析法の開発を中心に研究を行った。その結果、ペプチドグリカン合成阻害剤であるホスホマイシンによりオリエンチアの増殖が抑制されることが明らかとなり、本菌がペプチドグリカン、もしくはペプチドグリカン関連分子を産生し、これが本菌の宿主細胞内増殖に必須であることが示唆された。また、11種の遺伝子を用いた MLS 解析法により主要オリエンチア菌株の進化系統を明らかにするとともに、本菌には潜在的に病原性の高い遺伝系統群と低い遺伝系統群が存在することを示唆する結果を得た。さらに、国内に存在するオリエ

ンチア株の維持管理体制の構築や新型リケッチア株のゲノム解析に向けての取り組みも開始した。

5. 予防・啓発的研究

a. 市民におけるリケッチア症の認知度調査ならびに都道府県衛生研究所等における啓発活動状況調査

熊本県上天草市の住民健診および兵庫県淡路島・神戸市の学校において日本紅斑熱・つつか虫病の一般市民における疾患知識の認知度と受診行動について調査を行った。日本紅斑熱の患者が報告されている地域においては、同疾患の知識がある方が受診行動を起こしにくい可能性が示唆された。また全国の地方衛生研究所を対象とした調査により、両疾患の発生状況により各自自治体の啓発活動の実施が異なっている状況が明らかとなったが、日本紅斑熱の方が、患者の報告があった地域において熱心に啓発活動が行われている傾向が示唆された。

E. まとめ

本研究では、リケッチアを中心としたダニ媒介性細菌感染症に対して総合的対策を実施することを目指し、以下の5つの課題について、多分野の専門家が統合的かつ有機的に進めてきた。本年度は①疫学的研究を、ヒト、病原体、ベクター、動物、環境面から広く行い、今後リスクマップを作製するための情報を集積した。②臨床的研究としては、多医療施設での症例解析をもとに臨床像や重症化の病態解析を進めるとともに、将来治療指針等の作成や有効薬剤の保検適応につなげることも視野に入れて、治療法のエビデンスの蓄積を開始した。③検査・診断研究としては、日本国内におけるリケ

ッチア感染症の診断並びにレファレンス体制構築における課題と改善方法を明確にし、実験室診断体制をより安定したものにすることを目的に、本年度は、つつか虫病と日本紅斑熱の実験室診断の主体となっている地方衛生研究所における検査の実施状況について調査した。また病理学的診断法の有用性の確立を目指して研究した。④基礎的研究として、発症や重症化のメカニズム、複数菌感染時の病態、薬剤の作用機序等に関して、細胞レベル、宿主の免疫学的レベル、病原体のゲノムレベルでの解析を進めた。⑤予防・啓発的研究では、有効な予防啓発法の検討をするため、市民におけるリケッチア症の認知度調査ならびに都道府県衛生研究所等における啓発活動状況調査を行った。

倫理面への配慮としては、患者検体や動物検体の採取に関して、また動物実験や野生動物の検体採取についても十分に考慮しており特に問題は見られなかった。

今後とも各研究分担者が統合的かつ有機的に研究を進めていくことで、リケッチアを中心としたダニ媒介性細菌感染症の総合的対策に資するように努めたい。

F. 健康危機情報

なし

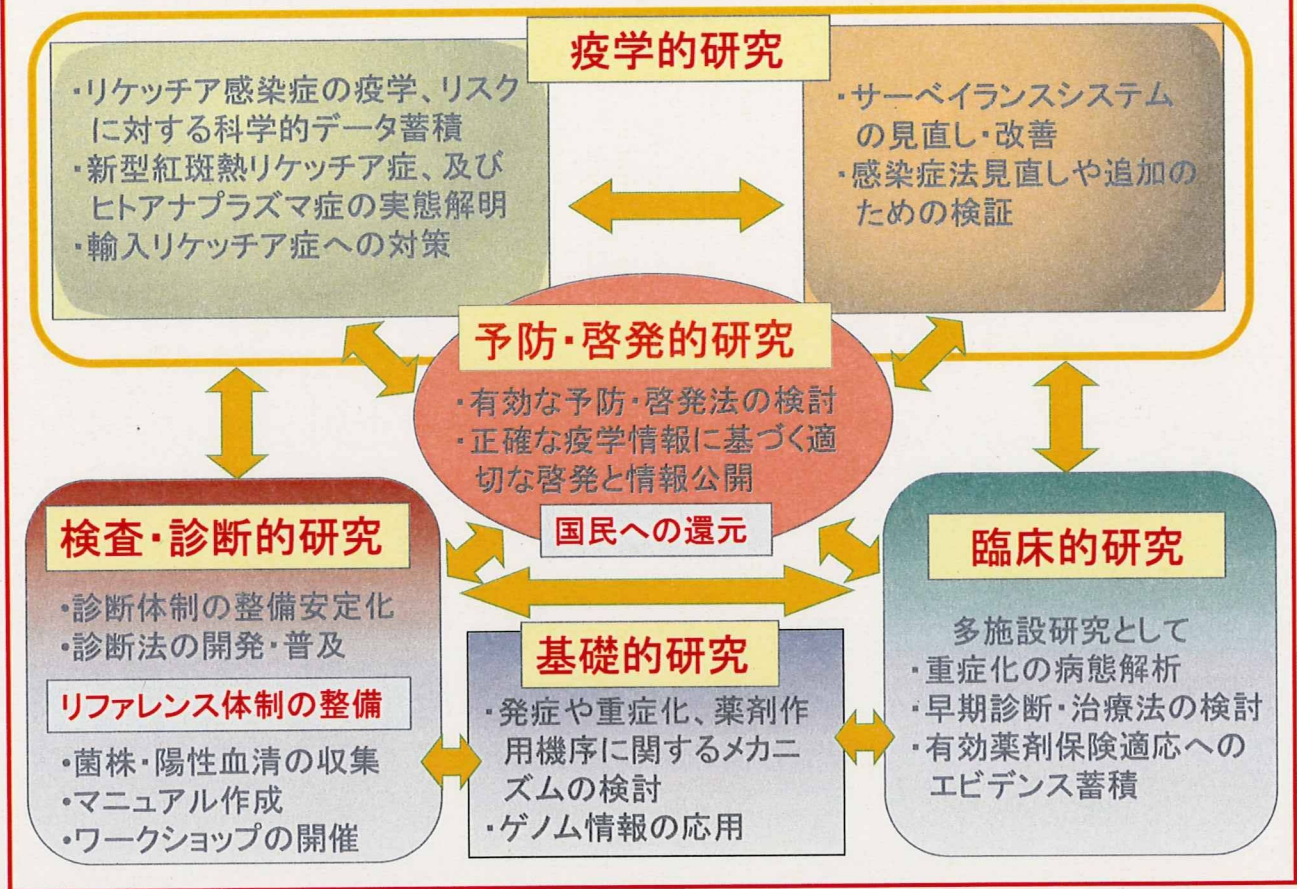
G. 研究発表

各研究分担者の報告書を参照。

H. 知的財産権の出願・登録状況

- | | |
|-----------|------|
| 1. 特許取得 | 該当なし |
| 2. 実用新案登録 | 該当なし |
| 3. その他 | 該当なし |

ダニ媒介性細菌感染症に対する総合的対策



Ⅱ 分担研究報告書

常在リケッチア症など感染環調査ならびに防圧に向けた環境要因の検討

研究分担者	高田伸弘	(福井大学医学部)
研究協力者	藤田博己	(大原研究所；研究分担者)
	及川陽三郎	(金沢医科大学医学部)
	山本正悟	(宮崎県衛生環境研究所；研究分担者)
	田原研司	(島根県保健環境科学研究所；研究分担者)
	川端寛樹	(国立感染症研究所；研究分担者)
	本田俊郎	(鹿児島県立大島病院)
	安藤秀二	(国立感染症研究所；研究分担者)
	角坂照貴	(愛知医科大学医学部)
	矢野泰弘	(福井大学医学部)
	岸本壽男	(岡山県環境保健センター；研究代表者)
	石畝 史	(福井県衛生環境研究センター)
	大橋典男	(静岡県立大学；研究分担者)
	川森文彦	(静岡県環境衛生科学研究所)
	高野 愛	(岐阜大学連合大学院；院生)
	御供田睦代	(鹿児島県立大島病院)
協力機関	伊勢保健福祉事務所	(三重県伊勢市；田畑好基)
	太田総合病院	(福島県郡山市；成田 雅)
	明神診療所	(和歌山県古座川町；森田裕司)
	玉置病院	(和歌山県田辺市；玉置幸子)

研究要旨

本事業の主目的“ダニ媒介性リケッチア症への総合的な対策”のため、①前回課題で残った地域として、紀伊半島、淡路島、香川県および南西諸島などで病原リケッチアのベクター（マダニおよびつつが虫）と宿主動物、またそれらと親和性の菌種など感染環の実態調査を行い、患者発生の環境要因として地理、気象、地域社会などを考察したほか、②タテツツガムシの分布北限域を再検討し、福島県で本種分布と患者発生との強い相関を証明し、リスクマップ試作の意義を確認した。さらに、③近年注目される *R. heilongjiangensis* などによる新型紅斑熱のベクター背景を北-東-中日本において調べ、ほぼ東北地方中部の太平洋側に偏ることが示唆された。そういう中で、④三重県の日本紅斑熱多発地の患家環境をモデルに、媒介マダニの防除防圧策の実践的基準化を目指した試行も開始した。なお、⑤東アジア共通性の感染環を比較検討するため、本分担としては初めて中国中部（浙江省～安徽省）にて渡航調査し、参考データを得た。以上、今後も関連の調査を集積することで、ベクター研究の側からリケッチア症対策に資したい。

A. 研究目的

本研究事業の本体は“我国のダニ媒介リケッチア症に対し総合的な対策を講ずる”ことであるので、当分担研究もその一翼を担うため、国内に常在するリケッチア症の感染環を調べ、その知見を国民へ広く啓蒙しつつ、それを基に具体的な感染防圧策を模索することとしたい。ここで、主な調査対象は既に国内常在が知られた病種ではあるが、国内に常在するにかかわらず未だ周知されていない（もしくは近年侵入したかのように見える）病種も進んで発掘したく思う。今後3年間に、およそ以下のような項目につき知見を蓄積してゆく予定である。

- ・前年度までの第一期課題の延長線で、ダニ媒介性リケッチア症についてベクターや宿主動物の分布生態の多様性、そしてそれらを取り巻く環境要因を視野に入れながら調査を進める。リスクマップのモデル試作にも努める。
- ・そういう中で、とりわけ患者発生の自然および社会環境の要因解析に努めつつ、実は常在するにかかわらず認知し難い新型紅斑熱や古典型つつが虫病などについても感染環の顕在化に努める。
- ・以上の調査知見を基に、媒介ダニ種の防除防圧策について、多発地域の現場で実践可能な基準作りに努める。
- ・ベクターや菌種にはユーラシア全体の共通性も見られるので、東アジアでキーとなる地域へ渡航調査して我国の実態と比較する。このような調査は、多彩な感染症に忙殺される新興国の代役を果たすことにもなる。

B. 研究の方向と方法

上記の目的に沿って、今年度は下記の5項目につき現地調査を行い、それに疫学情報や環境要因の知見も織り交ぜる形で集約を試みた。調査対象の地域は、分担者が列島中位の北陸に在

住する利点を活かして、東北～信越～北関東、また近畿～中四国に及んでいる。

1. ベクターと環境要因の調査として、未だ南西日本で唯一紅斑熱の知られない香川県での初調査、また多発地ながら実態不明な兵庫県淡路島で季節的消長も観察。さらに多発地の和歌山県紀南地方で環境要因の再確認、そして南方要素の強い宮古島で各々ベクターの生息調査を実施。
2. 感染予防に役立つべくリスクマップ策定のモデルとして、福島県南半部でつつが虫病発生とベクターのタテツツガムシ分布との相関を探查。関連して、本種の分布北限域も再検。
3. 東北～中日本で新型（極東）紅斑熱の潜在指標となる有力ベクターの分布を探查。北陸山間や北海道東部の調査も関連する。
4. 新型紅斑熱に関連しアジア大陸共通性リケッチア感染環につき中国へ渡航調査。
5. 媒介ダニ種の防除防圧策について、多発地域を例に実践可能な手技、方法を検討。これらフィールド調査における手法は、分担者らが報告してきたものに準じる。また、協力者の支援も得て行う実験手技としては、ベクターなどから継代細胞接種による生菌分離およびリケッチアDNAの検索と塩基配列シーケンスなどがある。なお、多くの協力者を項目ごとに逐一記名するのは大変煩雑なため割愛する。

なお、本報告で頻回に出る重要マダニ種の学名と和名は以下のように略記することがある。

Ig: *Ixodes granulatus* ミナミネズミマダニ

Im: *I. monospinosus* ヒトツトゲマダニ

In: *I. nipponensis* タネガタマダニ

Io: *I. ovatus* ヤマトマダニ

Ip: *I. persulcatus* シュルツェマダニ

Itu: *I. turdus* アカコッコマダニ

Hc: *Haemaphysalis concinna* イスカチマダニ

Hf: *H. flava* キチマダニ

Hfo: *H. formosensis* タカサゴチマダニ