

## 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

研究分担者	阿戸 学	(国立感染症研究所 免疫部第二室長)
研究協力者	川端 寛樹	(国立感染症研究所 細菌第一部第四室長)
研究協力者	安藤 秀二	(国立感染症研究所 ウイルス第一部第五室長)
研究協力者	花岡 希	(国立感染症研究所 ウイルス第一部流動研究員)
研究協力者	松村 隆之	(国立感染症研究所 免疫部第二室研究員)

### 研究要旨

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。

### A. 研究目的

我が国では、つつが虫病、日本紅班熱、アナプラズマ症などのリケッチア感染症が発生しており、その総合的な対策が望まれる。細菌学的、疫学的な研究成果および対策ネットワークの構築は、一定の成果を上げているものの、*in vitro* 細胞への感染実験による解析のみでは、その病態、経時的な免疫応答の解析を介して新規診断、治療の開発につながる研究は困難であり、動物モデルの確立が必要である。

しかし、我が国で発生が認められる日本紅班熱より分離された *Rickettsia japonica*、アナプラズマ感染症より分離された *Anaplasma phagocytophilum* に関して、免疫応答が正常に保たれているマウスを用いての分離継代、および動物モデルを確立する試みはすべて失敗に終わっている。本研究では、リケッチアの細胞内殺菌に必要とされる NO の産生が好中球で欠損する *iNOS* KO マウス、内皮細胞で欠損する *eNOS* KO マウス、両方で欠損する *i/eNOS* ダブル KO マウス、体内のすべての NO 産生が欠損する *i/e/nNOS* 欠損マウ

ス、病原体に対する自然免疫応答が広範囲に障害されている *MyD88* KO/*TRIF* マウス、NK 活性、補体活性および獲得免疫系に異常がある *NOD/SCID/Jak3* KO マウス等の免疫応答不全マウスを用いてマウスモデルを確立し、国内で発生するリケッチア感染症の、早期診断および治療の改良に役立つ病態と免疫応答の解析が可能なモデルの確立をめざす。

一方、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、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. 研究方法

マウス

*iNOS* ノックアウトマウス、*eNOS* ノックアウトマウス、*i/eNOS* ダブルノックアウトマウス

ウス、n/i/e/NOS トリプルノックアウトマウスは、琉球大学医学部筒井正人教授より供与された。Myd88/TRIF ダブルノックアウトマウスは大阪大学微生物学研究所 審良静男教授より供与された。NOS/scid/Jak3 ノックアウトマウスは熊本大学岡田誠治教授より供与され、国立感染症研究所動物実験施設において飼育された。

#### (2) マイコプラズマ DNA 同定 PCR

マイコプラズマ DNA の検出のため、培養細胞から DNA を抽出し、Ex Taq ポリメラーゼ (TAKARA 社) と 4 種類のマイコプラズマ特異的塩基配列増幅用プライマーを用いて 2 段階の PCR を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験については、国立感染症研究所動物実験実施規定に基づき、動物実験委員会の承認を得て執り行われた。

### C. 研究結果

マイコプラズマを種に関わらずに検出する目的で、マイコプラズマに共通して存在する 16S リボソームの塩基配列をターゲットとして、プライマーを設計し PCR 法を用いて検出をした。その結果、リケッチアの継代培養に用いた細胞からマイコプラズマ DNA が検出された (図)。一方、アナプラズマ継代培養用に使用予定の細胞株 HL-60 と THP-1 にはマイコプラズマ DNA が検出されず、当該目的に使用可能であると思われた。以上より、この PCR 法を用いて細胞株や検体のマイコプラズマ汚染の有無、マイコプラズマ除去効果の判定が可能となった。

### D. 考察

リケッチア感染マウスモデルは *R. conorii* の系のみで確立しており、我が国で発生が認められる病原性リケッチアでは確立していない。その理由として、リケッチア感染防御において重要なエフェクター分子である一酸化窒素 (NO) の産生に関して、マウスはヒトに比べて NO 合成酵素 (NOS) 活性が

高く、リケッチア感染が成立しにくいことが考えられる。NO 合成酵素はほ乳類において 3 種類知られており、感染防御には誘導型の NOS (iNOS) が最も重要であるが、NOS 活性は相補的であり、他の神経型 NOS、内皮型 NOS (eNOS) の作用も感染防御に関与すると考えられている。中でも、リケッチアは内皮細胞に感染するため eNOS の影響は重要である可能性がある。従って各 NOS のノックアウトマウス、およびそれらを掛け合わせたノックアウトマウスを用いて、リケッチア感染モデルを確立できる可能性は高いと考えられる。これと平行して、重度に免疫応答が障害されているノックアウトマウスを用いて、感染モデルの確立をめざす。

我が国のリケッチアストックのほほ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、このストックを用いた場合、リケッチアに対する免疫応答とマイコプラズマに対する免疫応答が同時に起こり解析不能であるため、免疫学的研究に使用できないことが明らかとなった。このため、*in vitro* 細胞継代にゲンタマイシンなどの抗生物質を添加して、リケッチアストックからマイコプラズマのみを除去することも考慮されている。しかし、この方法では、完全なマイコプラズマの除去は困難であるとされ、上記のマウスモデルを確立することは、マウスを用いた継代でのマイコプラズマ除去にも応用できるため、マウスモデルの作成は、我が国のリケッチア研究のためのツール作成という意味においてもきわめて重要な意味を持つと思われる。

### E. 結論

我が国のリケッチアストックのほほ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、リケッチアに易感

染性を示すと考えられる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

**F. 健康危害情報**

なし

**G. 研究発表**

1. 論文発表

1. なし

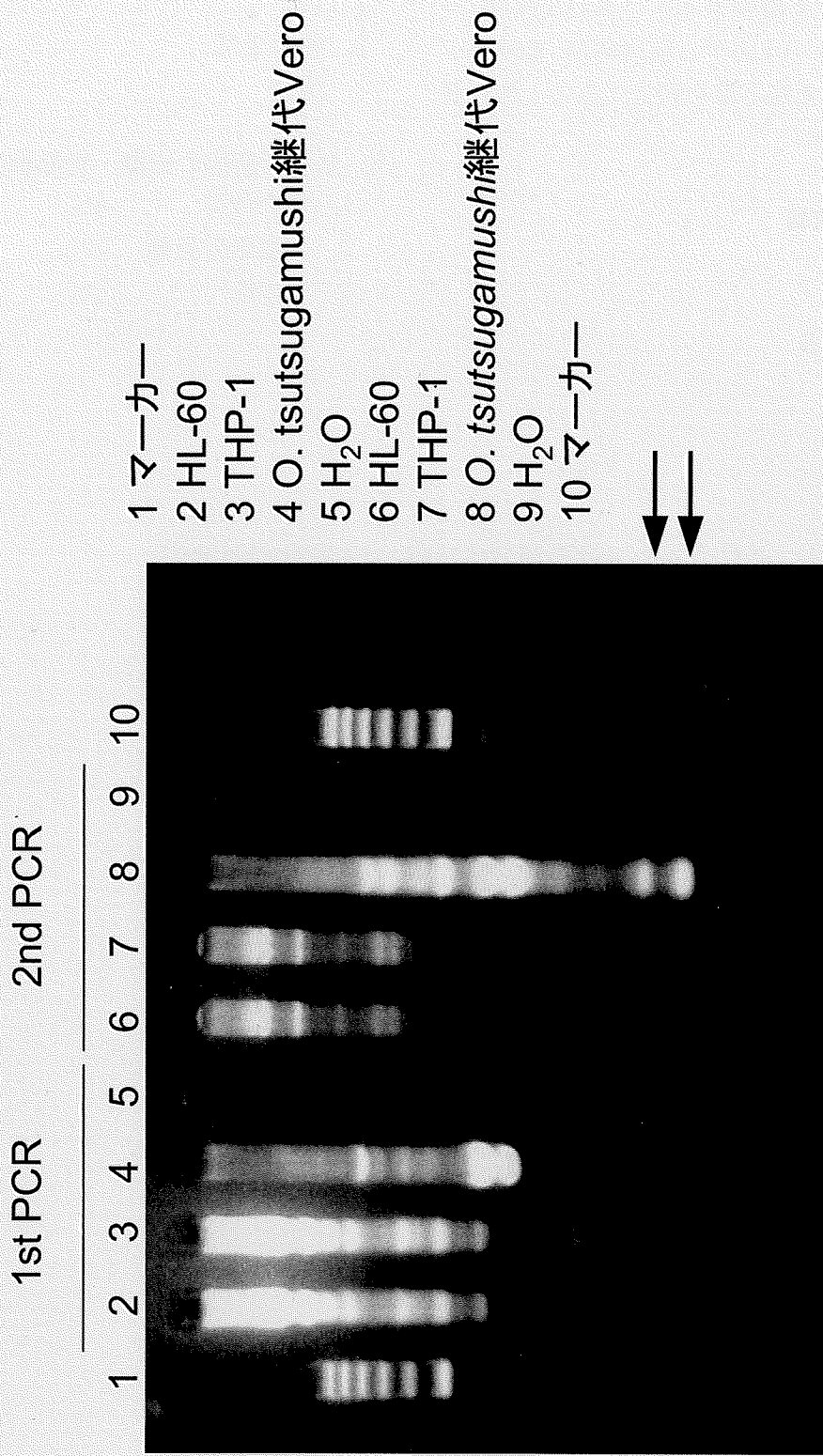
**2. 学会発表**

1. なし

**H. 知的財産権の出願・登録状況**

1. 特許取得      なし
2. 実用新案登録      なし
3. その他      なし

# PCRを用いたマイコプラズマコンタミネーションの判定



2ndPCRで、100-200bp間にマイコプラズマ16S配列の増幅が認められる。

# 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

研究分担者 川端寛樹 (国立感染症研究所・細菌第一部)

研究協力者 今内 覚 (北海道大学)  
高橋英之, 高野 愛, 渡辺治雄 (国立感染症研究所・細菌第一部)  
安藤秀二 (同上・ウイルス一部)  
阿戸学, 松村隆之 (同上・免疫部)  
Kwang Sik Kim (School of Medicine, John Hopkins University)

## 研究要旨

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。

## A. 目的

感染症法規定疾患には動物由来感染症は 50 疾患が含まれているが、このうちの約半数は節足動物媒介性感染である。さらにマダニが媒介する疾患はペスト、クリミア-コンゴ出血熱など 1 類感染症を含む 13 疾患であり、公衆衛生上、重要な位置づけがなされている。また、マダニが媒介する病原微生物、ことに病原性細菌は世界中で公衆衛生上重要な問題となっている。北米では、マダニ媒介性感染症としてライム病、およびアナプラズマ・エーリキア感染症が重要視されている。ライム病患者発生数は年間 2 万人以上と推定され、また一部についてはアナプラズマ属細菌との重複感染も見出される。このような重複感染例においてはライム病症状の重篤化が示されている(Nadelman et al. 1997, Swanson et al. 2006.)。欧州では、ダニ媒介性脳炎ウイルスとライム病が最も重要なマダニ媒介性感染症として知られているが、今世紀に入って、北米同様、

ライム病ボレリアとアナプラズマ症起因菌の重複感染が報告されている(Krause et al. 2002)。

我が国においては、感染症法で規定される疾患の内、ライム病、日本紅斑熱が患者数、病態の観点から特に重要な疾患とされてきた。これに加えて、近年、ライム病媒介性マダニであるシュルツェマダニから北米、欧州で広く見出される *Anaplasma* 属細菌、および紅斑熱群リケッチアである *Rickettsia helvetica* が見出されていること(Ohashi et al. 2005, Fournier et al. 2002), 野生シカより *Anaplasma* 属細菌も検出されること(Kawahara et al. 2006.), また大橋らは、四国地方で *Rickettsia* と *Anaplasma* および *Anaplasma* と *Borrelia* の重複感染事例が存在する可能性を示していることから(Ohashi et al. manuscript in preparation), 我が国でも欧米同様にライム病ボレリアとアナプラズマ属細菌、もしくは紅斑熱群リケッチアの重複感染が潜在化している可能性が極めて高い。

そこで本研究では、海外では重複感染時、

病態の重症化を誘導するアナプラズマとボレリア、または重症化を誘導する可能性があるリケッチアとボレリアの組み合わせにおいて、国内分離株を用いた場合、同様に重症化がおこるか否かを調べることを目的として研究を開始した。

## B. 方法, C. 研究結果 および D. 考察

ライム病感染モデルである C3H/HeN マウスでの感染実験では, *Anaplasma phagocytophilum* および *Borrelia burgdorferi* の重複接種時, マウス体内での *Borrelia* 菌数が増加する可能性が示されている(Holden et al. 2005). また, 北米由来 *Anaplasma phagocytophilum* および *Borrelia burgdorferi* をヒト脳血管内皮細胞(BMEC)と共存させた場合, それぞれの細菌種単独で感染させた場合と比較し, TNF- $\alpha$ 等の炎症性サイトカインおよびメタロプロテアーゼ(MM-3,-7,-9)がより強く誘導されることが報告されている(Grab et al. 2007). そこで本研究では上記の細胞を米国 John Hopkins 大学の Kim 博士より分与を受け, 国内分離 *Borrelia garinii* と *Anaplasma phagocytophilum* について評価する予定である. これに先立ち, 国内分離 *Borrelia* で実験に使用する菌株の選定について, C3H/HeN マウスでの急性関節炎形成を指標とした検討を行った. 検討に供した株は遊走性紅斑を呈した国内患者皮膚由来株 J-14 株 J-16 株, および J-21 株である. ライム病の感染モデルである C3H/HeN マウス 3 頭以上を一群とし, マウス足蹠へ培養菌株 0.05ml( $1 \times 10^5$  cells/0.05ml)を接種後, 5 日目の足蹠腫脹は J-14 株および J-16 株で *Borrelia burgdorferi* 標準株で強病原性株である B31-5A4 株と同様顕著に見られた一方, J-21 株では足蹠腫脹はほとんど見出されなかった (図 1).

J-14 株および J-16 株は, マウス解剖後採取した臓器 (膀胱, 関節, 心臓, および耳介) す

べてから再分離された. 一方, J-21 株では接種した 4 頭の内, 1 頭からのみ再分離がなされ, その感染性は弱い可能性が示唆された. 今後 Holden らおよび Grab らの手法を用いて, 国内分布の病原体が重複感染した場合の重症化の有無について検討を行っていく予定である.

## E. 結論

マダニ媒介性感染症における重複感染の重要性を評価する目的で In vitro における細胞応答性を指標とした評価を開始した. 結論はまだ得られていないが, 国内でライム病ボレリア媒介マダニの *Anaplasma*, *Borrelia* 保有率は各々 10%程度と考えられることから, 相当数の重複感染事例が潜在化しているものと考えられる. これら重複感染時の重症化を明らかにすることは公衆衛生上極めて重要である.

## 【参考文献】

- Nadelman RB. et al. 1997. Simultaneous human granulocytic ehrlichiosis and Lyme borreliosis. *N. Engl. J. Med.* 337:27-30.
- Swanson SJ. et al. 2006. Coinfections acquired from *Ixodes* ticks. *Clin. Microbiol. Rev.* 19: 708-727.
- Krause PJ. et al. 2002. Disease-specific diagnosis of coinfecting tickborne zoonoses: babesiosis, human granulocytic ehrlichiosis, and Lyme disease. *Clin. Infect. Dis.* 34:1184-1191.
- Fournier PE. et al. 2002. Genetic identification of rickettsiae isolated from ticks in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 40: 2176-2181.
- Ohashi N. et al. 2005. *Anaplasma phagocytophilum* infected ticks, Japan. *Emerg. Infect. Dis.* 11: 1780-1783.
- Kawahara M. et al. 2006. Novel genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum*,

*Anaplasma bovis*, *Anaplasma centrale*, and a novel *Ehrlichia* sp. in wild deer and ticks on two major islands in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 1102-1109.

- Holden K. et al. 2005. Coinfection with *Anaplasma phagocytophilum* alters *Borrelia burgdorferi* population distribution in C3H/HeN mice. *Infect Immun.* 73: 3440-3444.
- Grab DJ. Et al. 2007. *Anaplasma phagocytophilum* - *Borrelia burgdorferi* coinfection enhances chemokine, cytokine, and matrix metalloprotease expression by human brain microvascular endothelial cells. *Clin. Vaccine Immunol.* 14: 1420-1424

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Yamauchi T, Tabara K, Kanamori H, Kawabata H, Arai S, Katayama T, Fujita H, Yano Y, Takada N, Itagaki A. Tick fauna associated with sika deer density in the Shimane Peninsula, Honshu, Japan. *Medical Entomology and Zoology.* 60(4): 297-304, 2009.
2. Hanaoka N, Matsutani M, Kawabata H, Yamamoto S, Fujita H, Sakata A, Azuma Y, Ogawa M, Takano A, Watanabe H, Kishimoto T, Shirai M, Kurane I, Ando S. Diagnostic assay for *Rickettsia japonica*. *Emerging Infectious Diseases.* 15: 1994-1997, 2009.
3. Hanaoka N, Sakata A, Takano A, Kawabata H, Watanabe H, Kurane I, Kishimoto T, Ando S. Development of a pUC19-based recombinant plasmid to serve as a positive control in PCR

for *Orientia tsutsugamushi*. *Microbiology and Immunology.* 53: 305-308, 2009.

4. Takada N, Fujita H, Kawabata H, Ando S, Sakata A, Takano A, Chaithong U. Spotted fever group *Rickettsia* sp. closely related to *Rickettsia japonica*, Thailand. *Emerging Infectious Diseases.* 15: 610-611, 2009.
5. Takano A, Ando S, Kishimoto T, Fujita H, Kadosaka T, Nitta Y, Kawabata H, Watanabe H. Novel *Ehrlichia* sp. found in *Ixodes granulatus* infested to rodents in Okinawa, Japan. *Microbiology and Immunology.* 53: 101-106, 2009.

##### 2. 学会発表

1. 川端寛樹, 高野 愛, 藤田博己, 武藤麻紀, 渡邊治雄. MLST 法による国内野生鳥類由来ボレリアと北海道患者由来ボレリアの遺伝子型別解析. 第 83 回日本細菌学会総会. 2010 年 3 月. 横浜.
2. 高野 愛, 藤田博己, 角坂照貴, 今内覚, 田島朋子, 五箇公一, 宇根有美, 川端寛樹, 渡邊治雄. 爬虫類および爬虫類寄生マダニより発見された新群のボレリアとその性状解析. 第 149 回日本獣医学会学術集会. 2010 年 3 月. 東京.
3. 高野 愛, 川端寛樹, 武藤麻紀, 藤田博己, 渡邊治雄. 国内産爬虫類寄生性マダニから見いだされたボレリアとそのマダニ体内での動態. 第 83 回日本細菌学会総会. 2010 年 3 月. 横浜.
4. 佐藤寛子, 柴田ちひろ, 佐藤了悦, 斎藤博之, 安部真理子, 齊藤志保子, 高橋守, 藤田博己, 角坂照貴, 高田伸弘, 川端寛樹, 高野 愛. 秋田県において 15 年ぶりに確認されたアカツツガムシ媒介性つつが虫病と感染推定地におけるツツガムシの生息状況調査. 第 16 回リケッチア研究会. 2009 年

- 11月. 東京.
5. 松谷峰之介, 東慶直, 小川基彦, 花岡希, 川端寛樹, 倉根一郎, 安藤秀二, 岸本寿男, 白井睦訓. 日本紅斑熱の原因菌 *Rickettsia japonica* の全ゲノム配列解析. 第16回リケッチア研究会. 2009年11月. 東京.
  6. 花岡希, 松谷峰之介, 川端寛樹, 山本正悟, 藤田博己, 坂田明子, 東慶直, 小川基彦, 岸本寿男, 白井睦訓, 倉根一郎, 安藤秀二. 病原性 *Rickettsia japonica* グループにおける特異的 ORF の同定と検出系への応用. 第16回リケッチア研究会. 2009年11月. 東京.
  7. 藤田博己, 高田伸弘, 矢野泰弘, 及川陽三郎, 川端寛樹, 安藤秀二, 坂田明子, 高野愛. 国内のキチマダニから分離された *Rickettsia canadensis* について. 第16回リケッチア研究会. 2009年11月. 東京.
  8. 佐藤寛子, 柴田ちひろ, 佐藤了悦, 斉藤博之, 安部真理子, 斉藤志保子, 高橋守, 藤田博己, 角坂照貴, 高田伸弘, 川端寛樹, 高野愛. 秋田県における古典的つつがむ虫病患者の症例とツツガムシの生息状況調査の経過報告. 第55回日本衛生動物学会北日本支部大会. 2009年10月. 帯広.
  9. 安藤秀二, 藤田博己, 坂田明子, 矢野泰弘, 大竹秀男, 及川陽三郎, 角坂照貴, 黒澤昌啓, 川端寛樹, 高田伸弘. 仙台市での *Rickettsia heilongjiangensis* 感染症例の発見と保有マダニ調査. 第55回日本衛生動物学会北日本支部大会. 2009年10月. 帯広.
  10. 伊東拓也, 高田伸弘, 藤田博己, 坂田明子, 安藤秀二, 川端寛樹, 高野愛. 日本北端地域におけるマダニ媒介性病原体の調査. 第55回日本衛生動物学会北日本支部大会. 2009年10月. 帯広.
  11. 藤田博己, 高田伸弘, 安藤秀二, 川端寛樹, 高野愛, 坂田明子. 青森県における紅斑熱のベクター調査. 第55回日本衛生動物学会北日本支部大会. 2009年10月. 帯広.
  12. 高野愛, 川端寛樹, 武藤麻紀, 小笠原由美子, 藤田博己, 鶴見みや古, 渡邊治雄. 国内で初めて見いだされた回帰熱ボレリアの感染性に関する研究. 第55回日本衛生動物学会北日本支部大会. 2009年10月. 帯広.
  13. 川端寛樹, 武藤麻紀, 高野愛, 小笠原由美子, 藤田博己, 鶴見みや古, 増沢俊幸, 宮本健司, 渡邊治雄. Multi-locus sequence typing 法による国内野生鳥類由来ボレリアと北海道患者由来ボレリアの遺伝子型別解析. 第55回日本衛生動物学会北日本支部大会. 2009年10月. 帯広.
  14. 今内覚, 村瀬優介, 山田慎二, 肥田野新, 伊東拓也, 川端寛樹, 小沼操, 大橋和彦. シュルツェマダニにおけるライム病ボレリア伝播関連遺伝子の同定. 第148回日本獣医学会学術集会. 2009年9月. 鳥取.
  15. 肥田野新, 今内覚, 村瀬優介, 山田慎二, 伊東拓也, 川端寛樹, 小沼操, 大橋和彦. シュルツェマダニ (*Ixodes persulcatus*)由来 Salp16 様遺伝子の同定と発現解析. 第148回日本獣医学会学術集会. 2009年9月. 鳥取.
  16. 高野愛, 藤田博己, 角坂照貴, 今内覚, 田島朋子, 武藤麻紀, 小笠原由美子, 川端寛樹, 渡邊治雄. 国内産爬虫類寄生性マダニから見いだされたボレリアとそのマダニ体内での動態. 第148回日本獣医学会学術集会. 2009年9月. 鳥取.
  17. 山内健生, 田原研司, 金森弘樹, 川端寛樹, 新井智, 片山丘, 藤田博己, 矢野泰弘, 高田伸弘, 板垣朝夫. 島根県の日本紅斑熱汚染地域におけるマダニ相. 日本昆虫学会第69回大会. 2009年10月. 三重.
  18. 高田伸弘, 藤田博己, 安藤秀二, 川端寛樹, 矢野泰弘, 高野愛, 岸本寿男. 仙台市内



河川敷にみるネズミ分布相の特性—広東住血線虫や紅斑熱感染環との絡み—。第61回日本衛生動物学会大会。2009年4月。香川。

19. 矢野泰弘, 高田伸弘, 岩崎博道, 藤田博己, 角坂照貴, 及川陽三郎, 田原研司, 山本正悟, 本田俊郎, 平良勝也, 安藤秀二, 川端寛樹, 岸本壽男. 環東シナ海の島嶼に分布するツツガムシ, 疫学的な連関は? 第61回日本衛生動物学会大会。2009年4月。香川。
20. 藤田博己, 大竹秀男, 矢野泰弘, 安藤秀二, 川端寛樹, 岸本壽男, 坂田明子, 高田伸弘. 宮城県で確認できたマダニとマダニ保有リケッチア。第61回日本衛生動物学会大会。2009年4月。香川。
21. 藤田博己, 高田伸弘, 矢野泰弘, 馬原文彦, 川端寛樹, 安藤秀二, 岸本壽男, 坂田明子. 四国のマダニ類における紅斑熱群リケッチアの分離状況。第61回日本衛生動物学会大会。2009年4月。香川。
22. 大橋典男, 千屋誠造, 船戸豊彦, 塩尻正明,

高野愛, 川端寛樹, 安藤秀二, 岸本壽男. 国内初の新興感染症「ヒトアナプラズマ症」2症例について。第83回日本感染症学会総会2009年4月。東京

23. 安藤秀二, 黒澤昌啓, 坂田明子, 藤田博己, 矢野泰弘, 高野愛, 川端寛樹, 花岡希, 斉藤若奈, 岸本壽男. 仙台市で確認された新しい紅斑熱リケッチア症。第83回日本感染症学会総会2009年4月。東京
24. 小泉信夫, 谷川力, 林英治, 赤尾信明, 川端寛樹, 渡邊治雄. 東京都で発生したレプトスピラ症とドブネズミのレプトスピラ保有状況。第83回日本感染症学会総会2009年4月。東京

#### H.知的財産権の出願・登録状況(予定を含む.)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

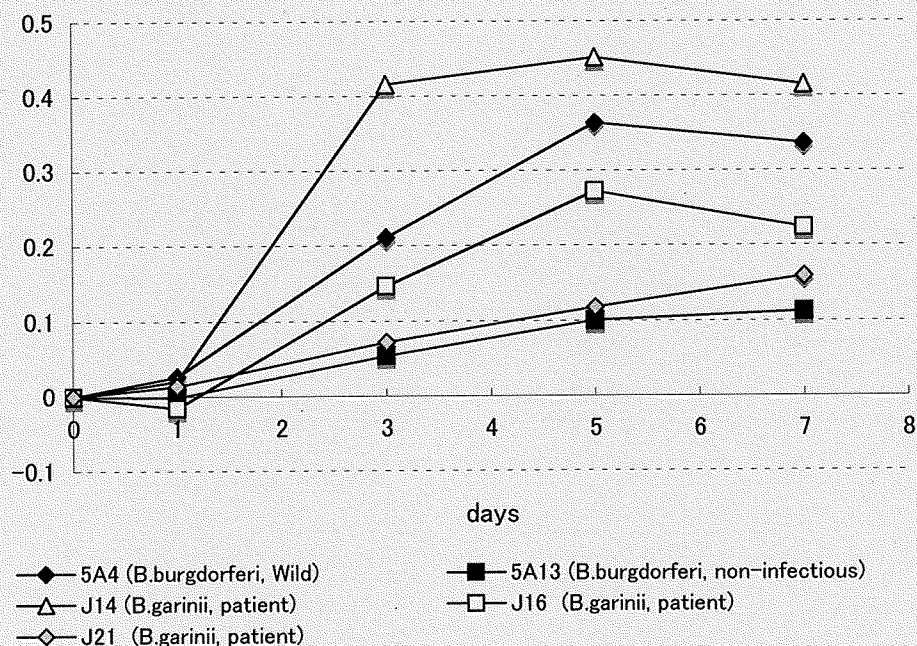


図1. 国内患者分離株を用いたマウス接種と腫関節の腫脹

## リケッチアの病原性に関する基礎的研究

研究分担者 内山 恒夫 徳島大学 准教授

研究協力者 小川 基彦 国立感染症研究所 主任研究官

研究要旨：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、i) リケッチア Sca 外膜蛋白質群の機能解析、ii) 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、iii) 複数種のリケッチア重感染の機序の解明、iv) 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、i) 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。ii) 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。iii) 病原性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。iv) 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。

### A. 研究目的

(1) 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た。

特に今年度は、i) リケッチア Sca 外膜蛋白質群の機能解析、ii) 宿主ベクター（ダニ、ノミ等）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のためのツールとして、ダニ細胞のオートファジー関連蛋白質に対する抗体作製、iii) 複数種のリケッチア重感染の機序の解明、iv) つつが虫病の起原菌 *Orientia tsutsugamushi* の病原性の異なる株間の発現蛋白質の比較を目的として解析を行った。

### B. 研究方法

i) リケッチア Sca 外膜蛋白質群のいくつかの遺伝子の ORF を発現ベクター pET-22b(+) の *perB* リーダー配列の下流に挿入したもので大腸菌 BL21 (DE3) をトランスフォームした (図 1A)。これらの大

腸菌に蛋白質発現を誘導し、それぞれの Sca 外膜蛋白質を外膜上に発現する大腸菌を得た (図 1B)。これらについて昆虫、マダニ、哺乳動物由来の各細胞への接種実験を行い、リケッチアの各細胞への付着におけるこれらの蛋白質の役割を調べた。

ii) 飢餓誘導したダニ細胞 (DALBE3 細胞 = *Dermacentor albipictus* 由来) 内での寄生リケッチアの感染性の保存を解析するためには、飢餓により誘導されると思われるオートファジー関連蛋白質をモニターすることで飢餓状態をチェックする必要がある。既に配列の分かっている *Haemaphysalis longicornis* の *atg12* 遺伝子の塩基配列を基に *D. albipictus* の Atg12 遺伝子の塩基配列を調べた。得られた ORF を pGEX-6P-3 の GST 配列の後ろに挿入し、BL21 をトランスフォームして GST 融合蛋白質発現を誘導した。

iii) 疫学的研究において、マダニ中に複数種の紅斑熱群リケッチアが重感染している場合があることが知られている。

一方、発疹チフス群リケッチアはマダニ中には認められない。また、日本紅斑熱等の比較的重症化しにくい紅斑熱でも重症化例が存在する。この重症化が複数種のリケッチアの重感染によって起こる可能性を検証する目的で、本研究では、種々の細胞に複数種のリケッチアが重感染した場合の、リケッチアの付着侵入、増殖について検討した。

iv) 病原性の異なる強毒の Karp 株と弱毒の Kuroki 株について、蛍光ディフレンスゲル二次元電気泳動 (2D-DIGE) を行い、その発現パターンを比較した。さらに、一部の蛋白質については、質量分析による同定を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は安全対策に対する取組が必要とされている研究であり、以下の対策・措置を講じている。

本研究に用いるリケッチアはレベル 3 の病原体であり、徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部および国立感染症研究所の P3 実験室内で取り扱った。

本研究に含まれる遺伝子組換え実験計画は、「徳島大学遺伝子組換え実験安全管理委員会」および「国立感染症研究所組換え DNA 実験安全委員会」の承認を受けている。

### C. 研究結果

i) Vero 細胞には Sca0、Sca5 発現大腸菌は付着したが、Sca3 発現大腸菌は付着しなかった。ISE6 細胞にはいずれの発現大腸菌も付着しなかった。AeA12 細胞にはいずれの発現大腸菌も付着したが、発現を誘導しない大腸菌も付着した。

ii) *D. albipictus* の Atg12 オートファジー関連蛋白質と GST の融合蛋白質が発現し、可溶性画分に得られた (図 2)。

iii) マダニ由来の DALBE3 細胞の場合、*Rickettsia typhi* と同時感染あるいは感染 3 日後に重感染した *R. japonica* は増殖したが、*R. typhi* の増殖は抑制を受けた。これとは逆に昆虫 (カ) 由来の NIAS-AeA1-2 細胞では、*R. japonica* と同時感染あるいは感染 3 日後に *R. typhi* を

重感染した場合、*R. typhi* は増殖したが、*R. japonica* は増殖抑制を受けた。また、また、哺乳動物 (アフリカミドリザル) 由来の Vero 細胞では、いずれの場合も、両リケッチアともに単独で感染した場合と同程度の増殖が見られた (図 3)。

紅斑熱群に属する *R. japonica* および *R. conorii* を同時感染あるいは片方の種の感染 3 日後に他方を重感染した場合、各リケッチアの各種培養細胞における増殖は紅斑熱群と発疹チフス群に属するリケッチアの重感染の場合と同様、単独感染の場合とほぼ同じ増殖動態を示した (図 4)。

iv) 強毒の Karp 株と弱毒の Kuroki 株の蛋白質の発現パターンは、大きく異なっていた。一方で、発現量が多く、株間で共通に発現している蛋白質が検出された。その中で特に主要な蛋白質は、56kDa 型特異的抗原、熱ショック蛋白質 HSP60 と DnaK、セリンプロテアーゼ HtrA、ペプチド伸張因子 Tuf と同定された (図 5)。

### D. 考察

i) Sca0 と Sca5 は Vero 細胞へのリケッチア付着に関与するが、Sca3 は Vero 細胞および ISE6 細胞へのリケッチア付着に関与しないと考えられる。さらに、ISE6 細胞にはいずれの発現大腸菌も付着しないため、ISE6 細胞へのリケッチアの付着には Sca0、Sca5、Sca3 以外の因子が関与していると考えられる。AeA12 細胞にはいずれの発現大腸菌も付着したが、発現を誘導しない大腸菌も付着したため、この細胞へのリケッチアの付着に関与する因子は不明である。

ii) 発現蛋白質が可溶性画分に得られたため、この画分に直接に酵素処理をして GST 蛋白質領域を除くことが可能と考えられた。

iii) 両リケッチアを同時感染あるいは時期をずらして重感染した場合のいずれでも、各リケッチアの増殖は他のリケッチアの増殖に影響しなかった。このことから、人に複数種のリケッチアが感染した場合、単独で感染した場合よりリケッ

チア産生量が多くなり、重症化に繋がる可能性があると思われた。

iv) 株間で共通に検出された蛋白質は、発現量が極めて多く、菌体表面の主要抗原や正常な蛋白質の産生に必要な因子など、本菌の偏性細胞内寄生細菌としての生存に重要な役割を担っていると考えられた。一方で、同菌種にもかかわらず、株間で発現の異なる蛋白質が数多く存在することが明らかになった。

#### E. 結論

i) 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明らかになった。AeA12 細胞へのリケッチアの付着における Sca 外膜蛋白質群の関与を明らかにするため、まず、未発現大腸菌の付着に関与する細胞表面因子を特定する。この因子に対する抗体を用いれば未発現大腸菌の細胞への付着はブロックできる。この処理をした細胞に発現大腸菌を接種し、Sca 外膜蛋白質群のいずれがリケッチアの AeA12 細胞への付着を担っているかを決定する予定である。

ii) *D. albipictus* Atg12 の GST との融合蛋白質が発現し、可溶性画分に得られた。この画分について PreScission™ Protease により融合部位で切断後、Glutathione Sepharose 4B を用いて Atg12 領域を精製し、家兎を免疫して抗体を作製する予定である。

iii) 病原性のリケッチアを種々の細胞に重感染しても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。今後、非病原性株、あるいはオリエンチアとの重感染について解析を進める。

iv) 強毒、弱毒株間で共通に発現が見られる蛋白質のうち、主要なものを同定した。今後、発現量の異なる蛋白質を同定し、病原性関連因子を決定する予定である。

#### F. 健康危険情報

該当せず。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

(1) 分担研究者：内山恒夫

内山恒夫. リケッチア 一紅斑熱群, 新居士郎・倉田 毅・林 英生・本田武司・小田 紘・松本 明 編, 病原細菌・ウイルス図鑑, 北海道大学出版会, 北海道, 印刷中.

Uchiyama, T., Ogawa, M., Kishi, M., Yamashita, T., Kishimoto, T., and Kurane, I. Restriction of the growth of typhus group rickettsiae in tick cells. *Clinical Microbiology and Infection* 15 (Suppl. 2) 332-333, 2009.

Ogawa, M., Shinkai-Ouchi, F., Uchiyama, T., Hagiwara, K., Hanada, K., Kurane, I., and Kishimoto, T. Shotgun proteomics of *Orientia tsutsugamushi*. *Clinical Microbiology and Infection* 15 (Suppl. 2), 239-240, 2009.

Chan, Y.G.Y., Cardwell, M.M., Hermanas, T.M., Uchiyama, T., and Martinez, J.J. Rickettsial outer-membrane protein B (rOmpB) mediates bacterial invasion through Ku70 in an actin, c-Cbl, clathrin and caveolin 2-dependent manner. *Cellular Microbiology* 11:629-644, 2009.

(2) 協力研究者：小川基彦

Uchiyama, T., Ogawa, M., Kishi, M., Yamashita, T., Kishimoto, T., and Kurane, I. Restriction of the growth of typhus group rickettsiae in tick cells. *Clinical Microbiology and Infection* 15 (Suppl. 2) 332-333, 2009.

Ogawa, M., Shinkai-Ouchi, F., Uchiyama, T., Hagiwara, K., Hanada, K., Kurane, I., and Kishimoto, T. Shotgun proteomics of *Orientia tsutsugamushi*. *Clinical Microbiology and Infection* 15 (Suppl. 2), 239-240, 2009.

##### 2. 学会発表

(1) 分担研究者：内山恒夫

内山恒夫, 岸 真帆美, 小川基彦. リケッチアの重感染. 第 83 回日本細菌学会 小川基彦, 大内史子, 萩原健一, 松谷峰之介, 内山恒夫. 病原性の異なる

*Orientia tsutsugamushi* の発現タンパク質の 2 次元電気泳動による比較・解析～第一報. 第 27 回日本クラミジア研究会・第 16 回リケッチア研究会合同研究発表会, 2009.

内山恒夫, 岸真帆美, 小川基彦. リケッチア Sca 外膜蛋白質発現大腸菌の種々の細胞への付着侵入能. 日本ウイルス学会学術集会, 2009.

(2) 協力研究者: 小川基彦

内山恒夫, 岸真帆美, 小川基彦. リケッチアの重感染. 第 83 回日本細菌学会総会, 2010. (採択済)

小川基彦, 大内史子, 萩原健一, 松谷峰之介, 内山恒夫. 病原性の異なる *Orientia tsutsugamushi* の発現タンパク質の 2 次元電気泳動による比較・解析. 第 83 回日本細菌学会総会, 2010.

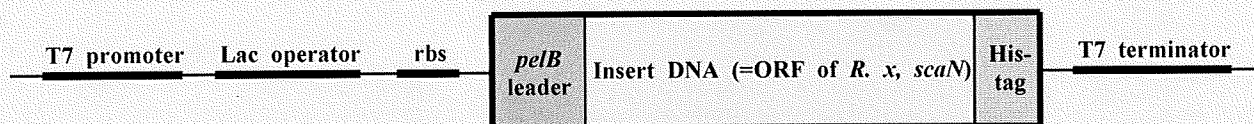
(採択済)

小川基彦, 大内史子, 萩原健一, 松谷峰之介, 内山恒夫. 病原性の異なる *Orientia tsutsugamushi* の発現タンパク質の 2 次元電気泳動による比較・解析～第一報. 第 27 回日本クラミジア研究会・第 16 回リケッチア研究会合同研究発表会, 2009.

内山恒夫, 岸真帆美, 小川基彦. リケッチア Sca 外膜蛋白質発現大腸菌の種々の細胞への付着侵入能. 日本ウイルス学会学術集会, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
該当せず。

A.



B.

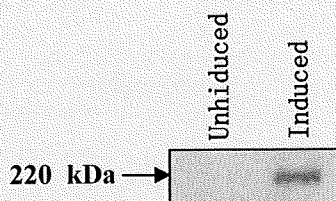


図1. A. リケッチア Sca 外膜蛋白質発現ベクター；pET-22b(+)ベクターの *pelB* リーダー配列の下流に *sca* 外膜蛋白質遺伝子の ORF を挿入する。B. 誘導により大腸菌外膜に発現された Sca3 リケッチア外膜蛋白質；His-プローブによるウェスタンブロット法。

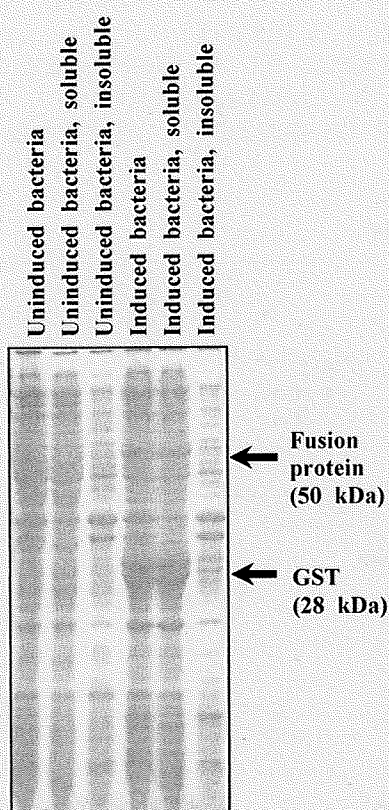


図2. SDS-PAGE (12%) ; *Dermacentor albipictus* の Atg12 遺伝子配列を pGEX-6P-3 の GST 配列の後ろに挿入し、BL21 をトランスフォームして融合蛋白質の発現を誘導した。発現蛋白質が可溶化画分にとめられた。

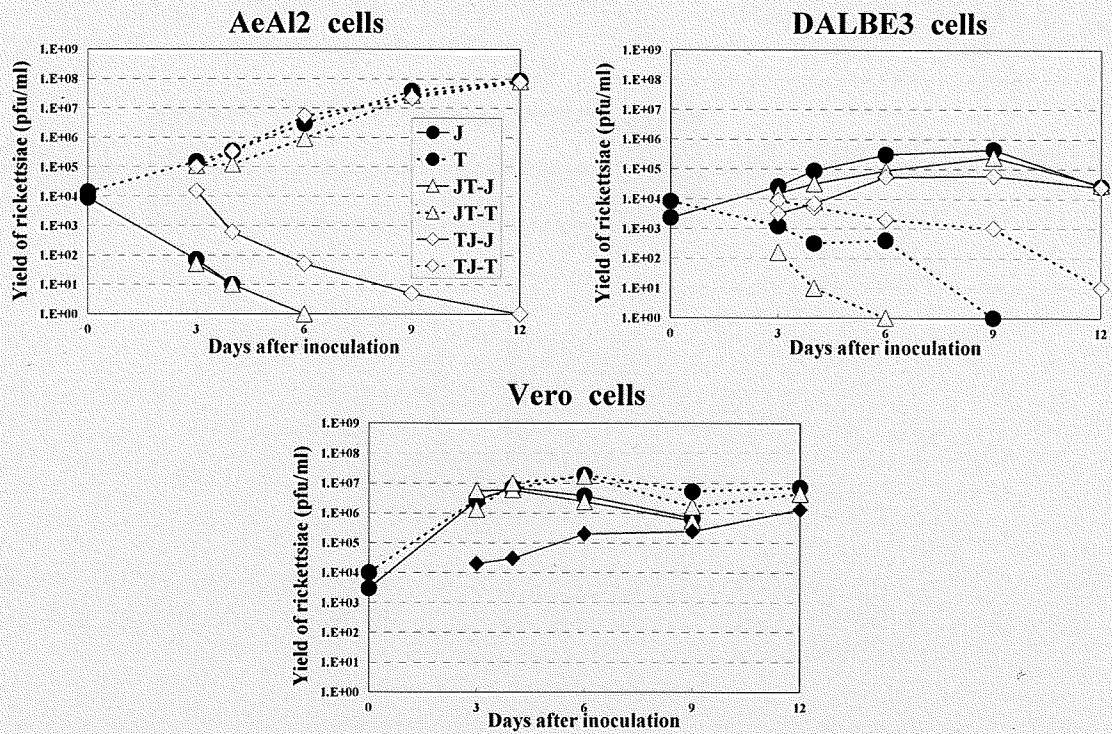


図3. AeA12昆虫(カ)由来細胞、DALBE3マダニ由来細胞、Vero哺乳動物由来細胞における異なる群のリケッチアの重感染；紅斑熱群リケッチア *R. japonica* 単独感染 (J)、発疹チフス群リケッチア *R. typhi* 単独感染 (T)、*R. japonica* 感染3日目に *R. typhi* 感染後の *R. japonica* 産生量 (JT-J) および *R. typhi* 産生量 (JT-T)、*R. typhi* 感染3日目に *R. japonica* 感染後の *R. japonica* 産生量 (TJ-J) および *R. typhi* 産生量 (TJ-T)。

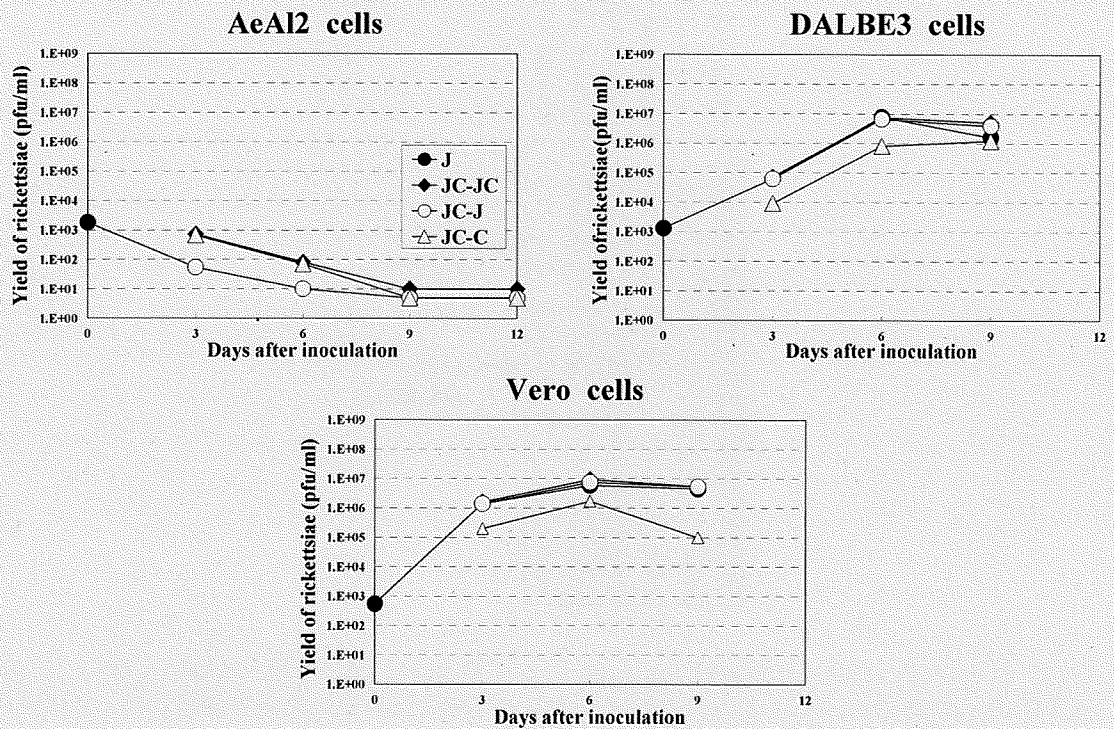


図4. AeA12細胞、DALBE3細胞、Vero細胞における紅斑熱群リケッチアの重感染；*R. japonica* 単独感染 (J)、*R. japonica* 感染3日目に *R. conorii* 感染後の全リケッチア産生量 (JC-JC)、*R. japonica* 産生量 (JC-J)、*R. conorii* 産生量 (JC-C)。

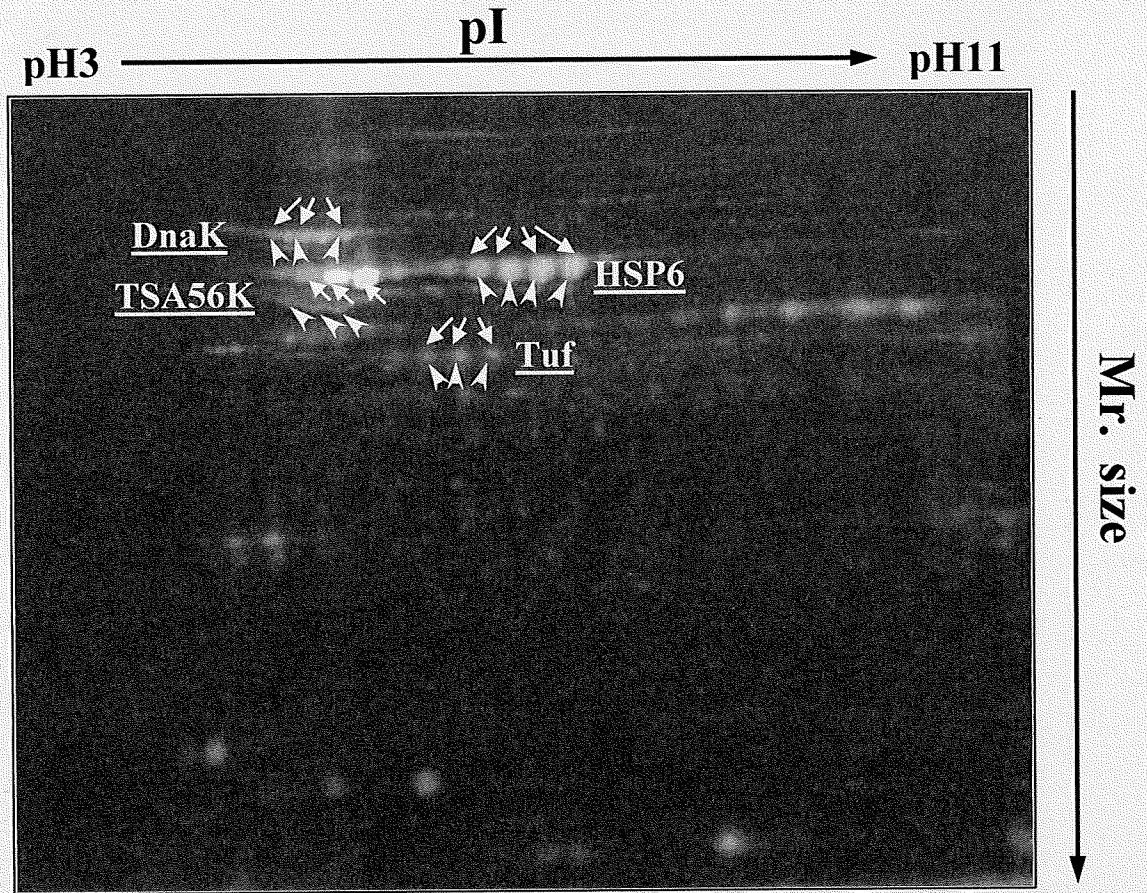


図 5. 強毒の Karp 株と弱毒の Kuroki 株の蛍光ディファレンスゲル二次元電気泳動；主要スポットを切り出して質量分析し、蛋白質の同定を行った。矢印=Kuroki 株のスポット。矢尻=Karp 株のスポット。TSA56K は両株で分子サイズが異なる。



## 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

研究分担者

林 哲也

宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター 教授

研究協力者

中山 恵介

宮崎大学・医学部 助教

### 研究要旨：

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。

### A. 研究目的

つつが虫の起因菌はオリエンチア・ツツガムシ（以下、オリエンチア）である。本菌はリケッチア科に属する偏性細胞内寄生菌であり、他のリケッチア属細菌と同様に、一般的な遺伝学的手法を用いた解析ができないことから基礎的研究が遅れてきた。しかし、オリエンチア2株の全塩基配列が韓国の研究グループ（Boryong 株）と研究分担者である林のグループ（Ikeda 株）により決定され、ゲノム情報を利用したアプローチが可能となった。そこで本研究において、ゲノム情報を基盤とした恙虫の発症・重症化機構の解明、

新規疫学・診断ツールの開発を試みた。本年度は、以下の5項目を中心とした解析を行った。

①Boryong 株と Ikeda 株の比較ゲノム解析：オリエンチア株間におけるゲノムの共通性とバリエーションを明らかにするため、配列が決定された2株のゲノムの詳細な比較解析を行った。

②ペプチドグリカン（以下、PG）の解析：ゲノム解析の結果、PGが存在しないと考えられていたオリエンチアにも、リケッチア属細菌と同様にPG合成系遺伝子群がほぼ完全に保存されていることが明らかになった。ただし、合成遺伝子群の構成からオリエ

ンチアの PG は通常とは異なる構造をもつ可能性も考えられる。そこで、オリエンチアにおける PG 産生性の有無や PG の機能、これを認識するヒトの免疫機構を明らかにする。

③MLS 解析法を用いたオリエンチアの進化系統解析：これまで本菌においては、主要な外膜抗原蛋白質である 56 kDa Type specific antigen (TSA) をコードする遺伝子の配列を用いたタイピングが行われてきたが、TSA 遺伝子は進化系統解析には適さない。そこで、複数の house keeping 遺伝子の塩基配列を用いた MLS (Multi-Locus Sequencing) 解析系を確立し、主要なオリエンチア株の系統関係を明らかにする。

④国内に存在するオリエンチア株の一元的な維持管理や分譲のための体制の構築：オリエンチアには病原性や抗原性の異なる多数の株が存在し、我が国の研究者によっても多くの株が分離されてきた。しかし、これらの菌株は各研究施設でばらばらに保管・管理されており、研究者の移動・退職に伴い破棄されるケースも多い。そこで国立感染症研究所と共同で、国内に存在するオリエンチア株の一元的な維持管理や分譲のための体制を構築する。

⑤新型リケッチア株のゲノム解析：新種のリケッチア症に対応するため、我が国に分布することが近年明らかとなった新型リケッチア株のゲノム解析を行い、ゲノム情報に基づいた実効性のある疫学研究を行う基盤を構

築する。

## B.研究方法

①Boryong 株と Ikeda 株のゲノム比較：Boryong 株のゲノム配列 (accession number: AM494475) をデータベースより取得し、我々が配列を決定した Ikeda 株のゲノム配列との詳細な比較ゲノム解析を行った。

②PG の解析：L929・HeLa・RAW264 細胞に M.O.I.=10 にて Ikeda 株を感染させた後、培地に 0・5・10・25・50・100  $\mu$ g/ml 濃度のホスホマイシン、0・50・100・150・200・300  $\mu$ g/ml 濃度の D-サイクロセリンを加え、37°C・二酸化炭素濃度 5%条件下で 7 日間静置培養した。各ウェルから培養細胞と共にオリエンチアを回収し、DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出した後、リアルタイム PCR 法により菌体数の定量を行い、各 PG 合成阻害剤のオリエンチア増殖抑制効果を解析した。

③MLS 解析による進化系統の解明：オリエンチア主要 8 株 (Gilliam 株・Karp 株・Matsuzawa 株・423H 株・Kato 株・Kawasaki 株・Kuroki 株・Shimokoshi 株) について、11 種の house keeping 遺伝子 (*atpD*・*clpX*・*dnaJ*・*dnaK*・*fabD*・*gyrB*・*icd*・*mdh*・*nrdA*・*sucD*・*ubiD*) の内部領域を PCR にて増幅した後、配列決定を行った。得られた配列を株ごとに連結して 5247 bp の配列とし、これを用いて近隣結合法 (NJ 法) による系統解析を行った。Ikeda 株と Boryong 株の配列はゲノム情報から得

て使用した。

④オリエンチア株の維持管理・分譲体制の構築：「ダニと疾患のインターフェースに関するセミナー」「リケッチア・クラミジア研究会」等においてオリエンチア株維持管理体制の構築への協力を要請し、国内分離株の収集を行った。

⑤新型リケッチア株のゲノム解析：ゲノム解析対象株の選定を行うため、大原総合病院附属大原研究所の藤田博己氏より、宮城県仙台市で採取したイスカチマダニから分離した *Rickettsia heilongjiangensis*・10株と、国内各地で採集したフタトゲチマダニから分離した *Rickettsia* spp. LON type・10株の分与を受け、予備的な解析を開始した。

(倫理面への配慮)

倫理面への配慮が必要な解析は行っていない。

#### C.D. 結果と考察

①Boryong 株と Ikeda 株のゲノム比較：2株間における比較ゲノム解析の結果、両株には全く同じ種類の重複配列が大量に存在し、これらを介した大規模なゲノム改変が生じているものの、リケッチア科細菌に共通して存在するほとんど全てのコア遺伝子が保存されていることが明らかとなった。PG合成系遺伝子についても完全に保存されており、合成系が働いている可能性が強く示唆された。また、それぞれの菌株に特異的なゲノム領域の特

定を行い、これら領域のオリエンチア主要8株における分布パターンを明らかにした。この知見を基に、新しいタイピング法の開発が可能となった。

②PGの解析：PG合成阻害剤であるホスホマイシンがオリエンチアの増殖を強く抑制することが明らかになり、本菌がPG、もしくはPG関連分子を産生する可能性が強く示唆された。ホスホマイシンは、宿主細胞としてL929・HeLa・RAW264のいずれの培養細胞を用いた場合においても抑制効果を示した(図1)。この結果は、本剤を恙虫病の新規治療薬として使用できる可能性を示唆する。今後、オリエンチア感染マウスを用いてホスホマイシンの治療効果を検証し、実際の臨床応用が可能か否かを検討する予定である。

一方、D-サイクロセリンには増殖抑制効果が認められなかった(図2)。この理由については現時点で不明であるが、オリエンチアのPG合成遺伝子群の一部が欠失していることと併せて考えると、本菌のPGが通常と異なる構造をもつ可能性が示唆される。そこで、PG関連分子の同定と構造の解明を広島大学の菅井基行教授との共同研究において開始した。なお、PGの構成成分であるM-tri-DAPやTri-DAP、iE-DAP、もしくはMDPといったPG合成の中間体は宿主細胞の自然免疫系分子であるNOD1あるいはNOD2のリガンドであり、NF-kBの活性化を介して宿主免疫反応の誘導を促すことが知られている。オリエン

チアにおいても、産生された PG 中間体が NOD によって認識され、免疫応答が誘導される可能性があることから、今後、オリエンチア感染細胞における NF-kB 活性化のレベルを指標とした解析を行う予定である。なお、既に NF-kB 活性化のモニタリング系は確立した。

③MLS 解析による進化系統の解明：11 種類の遺伝子を用いた MLS 解析系を確立し、主要オリエンチア菌株の進化系統を明らかにした。その結果、潜在的病原性の高い遺伝系統群と低い遺伝系統群の存在が示唆された (図 3)。今後、病原性の高いグループが特異的に保有、もしくは発現する遺伝子等を探索することで、つつが虫病の重症化に関わる因子が同定できる可能性がある。また、興味深いことに、二つのグループ間で宿主となるダニ (ツツガムシ) 種が異なることも示唆された (図 3)。複数の必須遺伝子の配列を用いたタイピング (MLST) は、各株の進化系統関係を考慮したタイピング法であり、疫学調査に有用であると考えられる。

④オリエンチア株の維持管理・分譲体制の構築：本年度は、国内分離株を中心に 1366 株が宮崎大学に移管された。今後は、各株の情報等を整理すると共に、主要株については国立感染症研究所と 2 カ所で保管する方向で作業を進める予定である。

⑤新型リケッチア株のゲノム解析：大原総合病院附属大原研究所・藤田博己氏より分与されたそれぞれ 10 株の

*Rickettsia heilongjiangensis* と *Rickettsia spp.* LON type について、現在マイコプラズマ属細菌の混入 (汚染) レベルを確認する作業を進めている。マイコプラズマ属細菌の混入量を減らすための処理を行った後、ゲノム DNA を回収し、全塩基配列決定を開始する予定である。

## E. 結論

ゲノム比較解析の結果、Ikeda 株のゲノム解析から見出された PG 合成系遺伝子は Boryong 株においても完全に保存されていることが明らかとなった。PG 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たことから、オリエンチアが PG もしくは PG 関連分子を産生し、これがオリエンチアの宿主細胞内増殖に必須であることが示唆された。また、MLS 解析により主要オリエンチア株の進化系統が明らかになり、本菌には潜在的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す結果が得られた。さらに、国内に存在するオリエンチア株の一元的な維持管理や分譲のための体制の構築、および新型リケッチア株のゲノム解析に向けた取り組みを開始した。

## F. 健康危機情報

国民に至急知らせた方がよい情報に該当するものはない。

G. 研究発表 (発表誌名巻号・頁・発行年等)