

図1 本研究で用いたPCR条件およびプライマー

template DNA : マウス脾臓由来 total DNA (Puregene DNA抽出試薬、定法)

PCR program	SFG	
	temp	time cycle
	95°C	2:00
	94°C	0:45
	52°C	0:30 x 35
	72°C	0:45
	72°C	7:00
	4°C	hold

PCR program	OT	
	temp	time cycle
	94°C	3:00
	94°C	0:30
	57°C	2:00 x 30
	72°C	2:00
	72°C	7:00
	4°C	hold

PCR program	MycO_check	
	temp	time cycle
	94°C	2:00
	94°C	0:30
	57°C	0:30 x 30
	72°C	0:30
	4°C	hold

target 17kDa

primer R1/R2 : 533-539bp
 R1 tcaattcacaaacttgccatt
 R2 ttacaaaattctaaaaaac

Rj5/Rj10 : 357bp

Rj 5 CGCCATTCTACGTTACTACC
 Rj 10 ATTCTAAAACCATATACTG

target 56kDa protein

primer 34/55 : 1003-1030bp
 34 tcaagcttattgtagtcaagtctgc
 55 agggatccctgctgctgctgctgcg

10/11 : 481-507bp

10 gatcaagctctcagcctactataatgcc
 11 ctagggatccgacagatgcaactattggc

target 16SrDNA

primer F1/R1-2 : 369-681bp
 F1 ACACCATGGGAGTTGGTAAT
 R1-2 CTTTCATCGACTTCCAGACCCCAAGGCAT

F2/R2 : 145-237bp

F2 GTTCTTTGAAAACTGAAT
 R2 GCATCCACCAAAAACTCT

PCR mixture	Takara	ExTag
DW	33.75ul	
10 x buffer	5ul	
2.5mM dNTPs	4ul	
50uM primer 1	1ul	
50uM primer 2	1ul	
5U/ul ExTag	0.25ul	
template	5ul	
total		50ul

PCR mixture	ExTag
DW	35.25ul
10 x buffer	5ul
2.5mM dNTPs	4ul
50uM primer 1	0.25ul
50uM primer 2	0.25ul
5U/ul ExTag	0.25ul
template	5ul
total	50ul

PCR mixture	ExTag
DW	38.5ul
10 x buffer	5ul
2.5mM dNTPs	4ul
100uM primer 1	0.5ul
100uM primer 2	0.5ul
5U/ul ExTag	0.5ul
template	1ul
total	50ul

図2 経腹腔感染マウス脾臓におけるRickettsia/Orientiaの検出と
デコンタミネーション

Pathogen	dose	Mice	PCR		
			Rickettsia 17kDa	Ot 56kDa	Mycoplasma
-		WT	0/2	0/1	0/3
		i/e/nNOS KO	0/2	ND	0/2
<i>O. tsutsugamushi</i> Kuroki	1x	WT	ND	0/2	0/2
		i/e/nNOS KO	ND	2/2	0/2
	1/2x	WT	ND	0/2	0/2
		i/e/nNOS KO	ND	0/2	0/2
<i>O. tsutsugamushi</i> Kawasaki	1x	WT	ND	1/2	0/2
		i/e/nNOS KO	ND	1/2	0/2
	1/2x	WT	ND	0/2	1/2
		i/e/nNOS KO	ND	1/2	0/2
<i>R. japonica</i>	1x	WT	-	ND	-
		i/e/nNOS KO	-	ND	-
	1/2x	WT	-	ND	-
		i/e/nNOS KO	-	ND	-

図3 経腹腔Rickettsia 感染マウスの経過

Pathogen	Mice	3d		7d			14d		
		Clinical symptom		Splenomegaly	Ascites	Rickettsia	Splenomegaly	Ascites	Rickettsia
-	WT	-	-	-	-	-	-	-	-
	i/e/nNOS KO	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>R. sibirica</i> 246	WT	-	+	+	-	-	+	-	-
	i/e/nNOS KO	-	-	+/-	-	-	+/-	-	-
	NOD/SCID/Jak3 KO	+	+	+	+/-	+	3+	+/-	+
	MyD-88 KO	+	+	ND	ND	ND	+	-	-
<i>R. japonica</i> DT-1	WT	-	-	3+	-	-	+/-	-	-
	i/e/nNOS KO	-	-	+	-	-	-	-	-
	NOD/SCID/Jak3 KO	+	+	3+	+	+	+	+/-	+
	MyD-88 KO	++	++	ND	ND	ND	+	-	+

*Day 3 臨床症状は活動低下、立毛

*ND: not determined

分担研究報告書

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基礎的研究

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 高橋英之, 高野 愛, 大久保梢, 杉森千恵子, 大西 真
(国立感染症研究所・細菌第一部)

阿戸 学, 松村隆之(同上・免疫部)

Kwang Sik Kim (School of Medicine, John Hopkins University)

Yasuko Rikihisa (The Ohio State University)

角坂照貴(愛知医科大学)

研究要旨

海外ではこれまでに、マダニ媒介性病原体が重複感染した場合、患者病態が重症化しやすいことが報告されている。これら重症化は *Borrelia* と *Anaplasma*, または *Borrelia* 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、その有無とメカニズムについては全く明らかにされていない。そこで本研究ではこれら病原体の重複感染時の重症化について実験室レベルで解明することを目的とする。本年度は、国内ライム病患者から分離された株を中心に、ヒト血清感受性を指標とした全身感染の有無、およびヒト脳血管内皮細胞の応答について、欧米株との比較解析を行った。

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。このうち、特にマダニ媒介性病原細菌による感染症は世界中で重要な問題となっている。

米国では、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症化が示されている

(Nadelman et al. 1997)。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た(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 *Ixodes persulcatus* 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(大橋典男博士 私信), 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. 国内で報告されるライム病は欧州で神経ライム病起因菌である *Borrelia garinii* 感染が主であることが知られている. 一方で, これら *B. garinii* の病原性についてはほとんど調べられていない.

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. 本年度は特に国内患者由来 *B.*

garii の病原性を欧州株と比較・解析した.

B. 方法

1) 使用した *Borrelia* 株

本研究に使用した *Borrelia* 株の一覧を表 1 に示した. 国内患者由来株および *I. persulcatus* 由来 NT25, HT59 株は中尾稔博士(旭川医科大学)より分与を受けた. 欧州ヒト髄液由来株および *I. uriae* 由来株は Peter Olivier 博士より分与を受けた. *B. burgdorferi* 297 株は増沢俊幸博士(千葉科学大学)より分与を受けた.

B. garinii 分離株の sequence type (ST) は, Margos らの Multi-locus sequence typing 法 (Margos et al. 2008 & 2009) に従って決定し, Web 上に公開されている MLST database (www.mlst.net/) と照合するとともに, 系統解析を行い, 各々の系統群 (*B. garinii* ST-group A および B) に大別した(高野ら 未公開データ).

表 1. 本研究で使用したボレリア株一覧

菌株名	<i>Borrelia</i> 種	由来	<i>B. garinii</i> ST-group*
J-14	<i>B. garinii</i>	ヒト遊走性紅斑, 北海道	B
J-16	<i>B. garinii</i>	ヒト遊走性紅斑, 北海道	B
J-20t	<i>B. garinii</i>	ヒト遊走性紅斑, 北海道	B
J-21	<i>B. garinii</i>	ヒト遊走性紅斑, 北海道	A
J-32	<i>B. garinii</i>	ヒト遊走性紅斑, 北海道	B
J-37	<i>B. garinii</i>	ヒト遊走性紅斑, 北海道	A
J-39	<i>B. garinii</i>	ヒト遊走性紅斑, 北海道	B
J-40	<i>B. garinii</i>	ヒト遊走性紅斑, 北海道	B
J-41	<i>B. garinii</i>	ヒト遊走性紅斑, 北海道	B
NT25	<i>B. garinii</i>	シュルツェマダニ, 長野	A
HT59	<i>B. garinii</i>	シュルツェマダニ, 長野	A
VSBM	<i>B. garinii</i>	ヒト髄液, スイス	A
VSDA	<i>B. garinii</i>	ヒト髄液, スイス	A
Fis01	<i>B. garinii</i>	<i>I. uriae</i> マダニ, フィンランド	A
Far01	<i>B. garinii</i>	<i>I. uriae</i> マダニ, フィンランド	A
Far02	<i>B. garinii</i>	<i>I. uriae</i> マダニ, フィンランド	A
297	<i>B. burgdorferi</i>	ヒト髄液, アメリカ合衆国	-

*:系統樹解析によりそれぞれの ST-group を決定した.

2) ヒト血清 (Normal human serum; NHS) 感受性試験

健常者血清を常法に従い分離し実験に用いた。 *Borrelia* 株を BSK-H 培地を用いて増菌後、PBS を用いて 3 回洗浄し試験に供した。試験は 40% ヒト血清を含む BSK 緩衝液 (ウサギ血清非添加) での生存率を 16 時間後に測定した。

3) ヒト H 因子結合試験

ヒト補体系制御因子である H 因子と結合することによりボレリアは補体による不活性化から逃避することが示されている。そこで本研究では、Affinity legend binding (ALBI) assay によりそれぞれの株について H 因子結合能を調べた。各々の *Borrelia* 株は対数増殖期後期まで培養後、遠心 (5,000 × g, 10 min, 4° C) により菌体を回収、PBS により 3 回洗浄した。洗浄した菌体は常法にしたがって 10-20% グラジエントゲルにて SDS-PAGE 後 PVDF 膜に転写した。H 因子結合抗原の検出は Metts らの方法に従い行った (Metts et al. 2003)。

4) Matrix metalloproteinases (MMPs) assay

細菌感染時におけるヒト脳血管内皮細胞 (human brain microvascular endothelial cells; BMEC) および好中球の応答は、疾患の重症化を調べる上で重要である。そこで本研究では、感染時における好中球の血管透過性に関与するとされるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) 産生を調べるために、以下 MMP について評価を行った。本研究で使用した BMEC は米国 John Hopkins 大学の Kim 博士より分与を受けた。

4-1) MMP-1 assay

BMEC を Grab らの方法に従い 2×10^5 cells/well まで増殖させ実験に用いた (Grab et al. 2007)。

国内患者由来株、マダニ由来株、および陽性対照である 297 株をそれぞれ $Moi=100$ で BMEC と 24 時間接触培養し、培養上澄中の MMP-1 を Sandwich ELISA 法 (R&D systems) により定量した。

4-2) MMP-8 assay

好中球による MMP-8 産生は病原細菌の血管透過性を亢進させる可能性が髄膜炎菌などで報告されている (Leppert et al. 2000, Schubert-Unkmeir et al. 2010)。そこで本実験では BMEC と好中球を共存させた場合、ボレリアが好中球に MMP-8 を産生させるか否かについて検討を行った。BMEC を MMP-1 assay 同様に増殖させ、 $Moi=1$ になるようヒト好中球を加えた。ついで $Moi=100$ になるように *Borrelia* 株を加え、4 時間のちに上澄中に産生される MMP-8 量を Sandwich ELISA 法 (R&D systems) により定量した。

C. 結果および D. 考察

国内患者由来 *B. garinii* は NHS 低感受性であり、かつ補体制御因子である H 因子と結合する

B. garinii の NHS に対する感受性は、国内患者由来株と欧州患者髄液より分離された株、および *I. uriae* 由来株間で顕著な差がみられた (図 1)。国内患者由来株は、低感受性対照株である 297 株同様に ST-group の違いに係わらずいずれの株も、NHS に対して低感受性であった。欧州分離 *B. garinii* 株では、患者由来株および *I. uriae* 分離株ともに NHS の非働化により感受性が低下した一方で、国内患者由来株は非働化による影響を受けなかった。このことから国内患者由来株は、感染患者血中で

の補体による不活性化を，陽性対照株である *B. burgdorferi* 同様，回避している可能性が強く示唆されるとともに，これら *B. garinii* 株感染時には全身感染状態が維持されやすい可能性が考えられた。

これまでの海外での研究により，ライム病ボレリアは補体系制御因子である H 因子に結合することで補体系による殺菌機構を抑制す

ることが知られている．一方，国内で分離される *B. garinii* 株の H 因子結合活性については調べられていなかった．本研究では，国内患者由来 *B. garinii* が NHS に対して低感受性を示したことから，これら国内分離 *B. garinii* がヒト血中で H 因子結合による補体系反応の抑制を行っている可能性を考え，ALBI assay により H 因子結合能をそれぞれの株について調

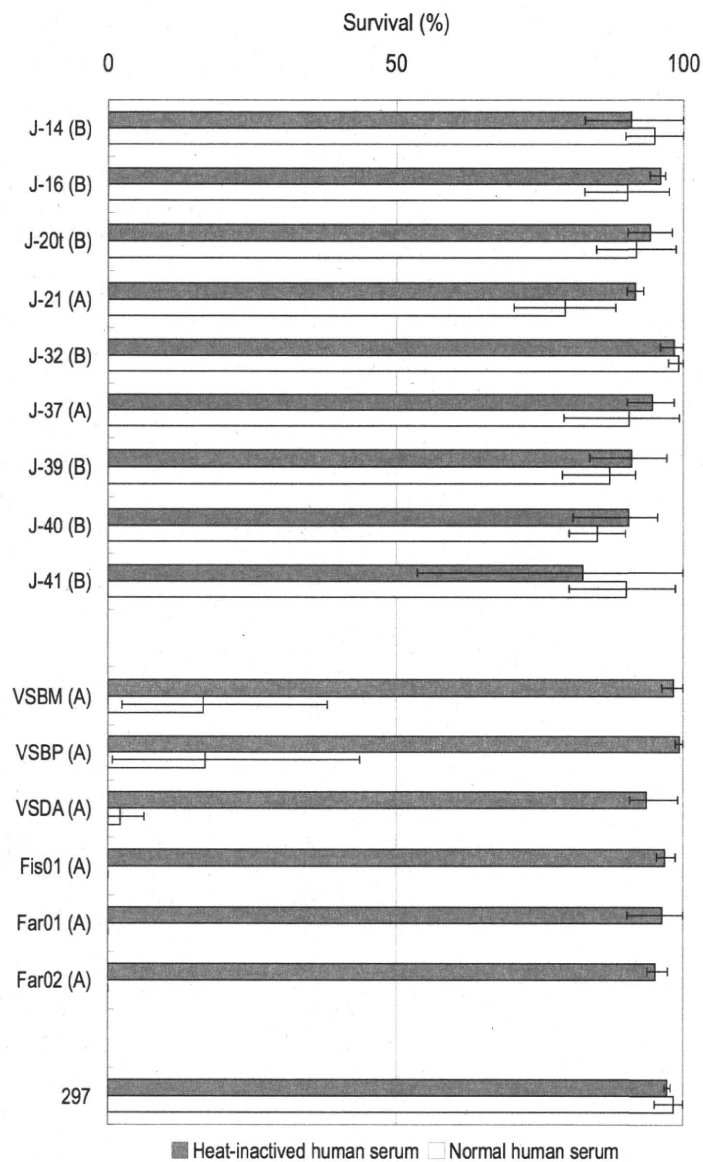


図 1. 国内患者分離株の NHS 感受性. ()内は ST-group を示す.

べた。その結果、国内患者由来株 9-15kDa の分子量と推定される抗原が H 因子結合抗原として見出された (図 2)。一方、結果は示さないがマダニ由来 HT59 株は H 因子結合抗原を有しているにもかかわらず、NHS に対する感受性は約 70% 高かった。Coleman らは、H 因子結合性抗原の一種 BbCRASP-2 は NHS 低感受性に関与しないことを示している (Coleman et al. 2008)。今回 HT59 株で見出された H 因子結合抗原は上記 BbCRASP-2 である可能性がある。また、NT25 株は NHS 低感受性であったが H 因子結合抗原は ALBI assay では見出されなかった。

近年、回帰熱ボレリアである *B. recurrentis* は H 因子同様、補体系制御因子である C4b に

結合することが明らかにされた (Grosskinsky et al. 2010)。C4b 結合性のボレリア抗原は未同定であるが本因子の homolog が *B. garinii* NT25 株にも存在し、NHS 低感受性を付与している可能性がある。

一方、欧州で分離される *B. garinii* が患者由来株および *I. uriae* 由来株ともに NHS にたいして感受性を示し、かつ ALBI assay においても H 因子結合抗原は検出されなかった。近年、Bhide らは欧州で分離される *B. garinii* の H 因子結合抗原の陽性率が低いことを示している (Bhide et al. 2009)。このことから、欧州で見出される *B. garinii* は、少なくとも *in vitro* では、H 因子を介した補体系活性化を抑制できないと考えられた。

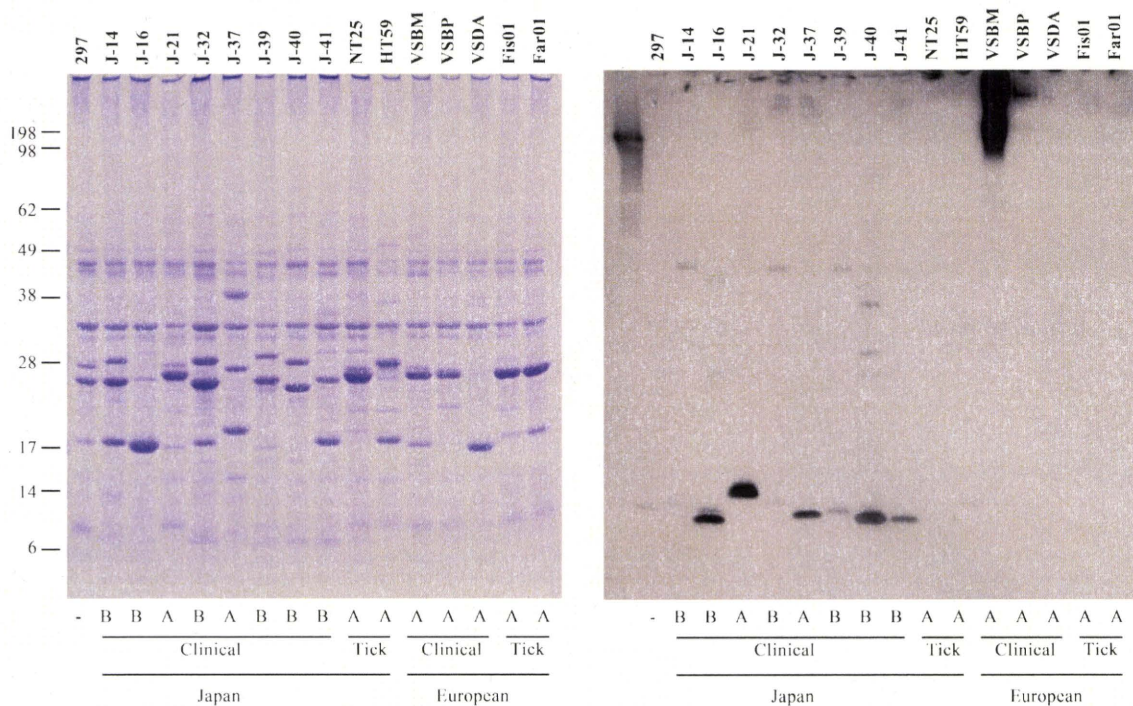


図 2. ALBI assay による H 因子結合抗原の検出。左は SDS-PAGE ゲルの CBB 染色を、右は H 因子結合試験結果を示す。それぞれの株の ST-group, 由来を下段に示した。分子量 25-49kDa の反応抗原は H 因子を加えない陰性対照においても見出されたことから、非特異的反応であると考えられる。

国内患者由来 *B. garinii* は BMEC に作用し
MMP-1 産生を誘導する

欧州においてライム病ボレリア *B. garinii* は多彩な神経症状（神経根炎，顔面神経麻痺，髄膜炎，脳脊髄炎など）を引き起こすことが知られている．細菌性髄膜炎は血流から髄液への細菌の移行と，引続いて起る好中球等の免疫細胞の髄液侵入により増悪するが，その一次作用点は，多くの場合脳血管内皮である．これまで，国内においてヒト髄液中から病原体ボレリアが検出された例は報告されていないが，本研究では，国内患者由来ボレリアは血流中で補体系の活性化を抑制することでヒト自然免疫から逃避できる可能性が示されたことから，宿主体内では血流を介した髄膜炎を惹起する可能性が考えられた．

本実験では，実験に使用したすべての国内

患者由来 *B. garinii* が BMEC からの MMP-1 産生を誘導した（図 3）．国内患者由来 *B. garinii* ST-groupB で MMP-1 産生誘導能が高い傾向がみられたが，それぞれの群間で有意差はみられなかった．一方，個々の株間での誘導能を比較した場合，マウスに対する病原性と MMP-1 誘導能には相関が見られた (data not shown)．MMP-1 は分泌型の間質コラゲナーゼであり，これらが細胞から分泌されることにより，細菌は宿主側に炎症を惹起する．このため，MMP-1 誘導能の高い株でマウスに対して強い病変が引き起こされた可能性は高い．一方，ボレリアによる BMEC の MMP-1 誘導メカニズムは未だ明らかではない．Gebbia らは *B. burgdorferi* がヒト末梢血白血球から MMP-1 および MMP-9 の産生を誘導すること，これら産生は Toll-like receptor 2 を介したシグ

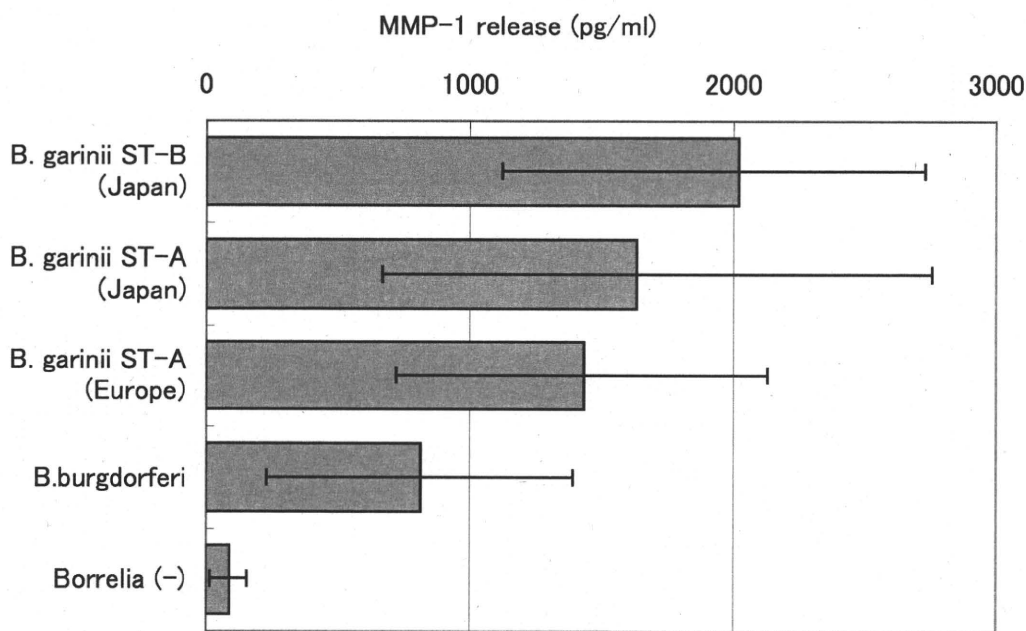


図 3. 国内患者由来ボレリアによる BMEC からの MMP-1 産生誘導．各々の地域および ST-group 毎に結果をまとめて示した．

ナル伝達により誘導されることを見出した (Gebbia et al. 2001 & 2004). 同様に Behera らは condrocyte を用いた実験で, *B. burgdorferi* は MAPK と JAK/STAT を介したシグナル伝達により MMP-1 を誘導することを報告している. 血管内陽細胞は種々の刺激(IL-8, Thrombin, Plasmin, Monocyte の結合など)に応答して MMP-1 を分泌することが知られているが (Wang et al. 2006, Duhamel-Clérin et al. 1997), *B. garinii* による MMP-1 産生誘導がどのようにして起るかは不明である.

国内患者由来 *B. garinii* の一部は好中球に作用して MMP-8 の分泌を促進する

好中球による MMP-8 分泌量を図 4 に示した. 対照群による試験から, ほぼすべての MMP-8 が好中球由来と考えられた. MMP-8 分泌量は, マウスに対して病原性が弱かった J-21 株で最

大値である約 6,000pg/ml の分泌が見出された一方で, マウスに対して病原性の高かった J-16 株ではほとんどその分泌は見出されなかった. また, ボレリア種, ST 間で有意の差はみられなかった. Hartiala らは *B. burgdorferi* B31 株の OspA, OspB 遺伝子破壊株とその相補株を用いた解析により, ボレリアの OspA, OspB 依存的な好中球の活性の変化を報告している (Hartiala et al. 2008). 図 4 でみられるような株間での MMP-8 産生誘導能の相違はこのような allele の違いに起因するのかもしれない.

E. 結論

国内で見出された病原性ボレリアの病原性について, 宿主自然免疫の回避, および宿主応答を指標とした In vitro での評価を行った.

本研究では, 国内患者分離ボレリア株は,

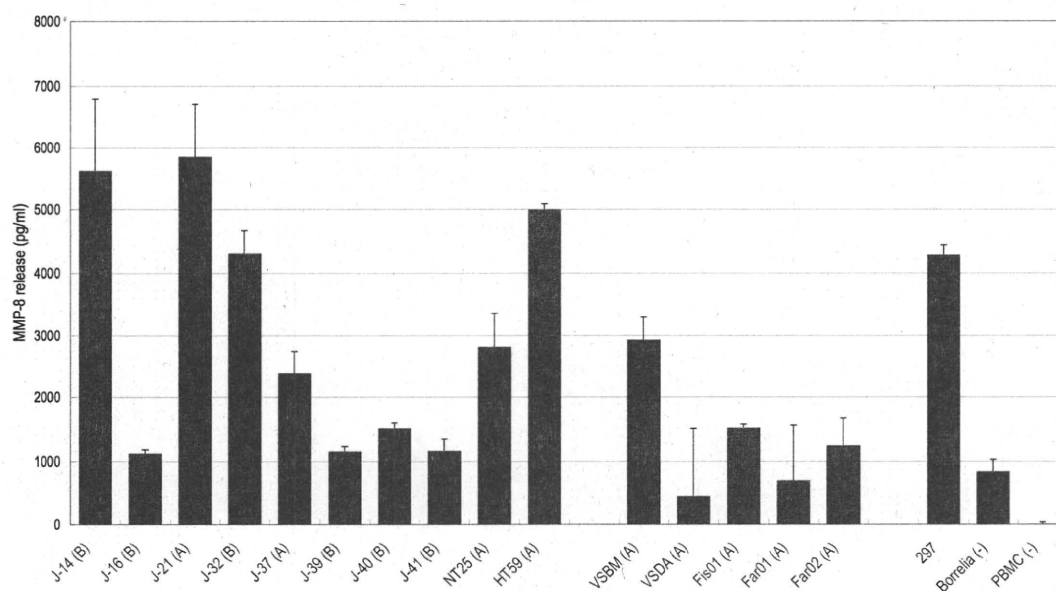


図 4. 国内患者由来ボレリアによる好中球からの MMP-8 産生誘導. それぞれの株の ST-group は()内に示した.

1) 米国患者髄液より分離された *B. burgdorferi* 株と同様に血流循環中で自然免疫に対して抵抗性を示し、かつ、2) BMEC による MMP-1 産生を誘導すること、さらに3) MMP-1 誘導能はマウスに対する病原性と相関が見られることを明らかにした。来年度はこれら現象が *A.phagocytophikum* 共存下増強されるか否かを明らかにする予定である。

参考文献

- Nadelman et al. 1997. *N Engl J Med*. 337:27-30.
- Krause et al. 2003. *Am J Trop Med Hyg*. 68:431-6.
- Ohashi et al. 2005. *Emerg Infect Dis*. 11:1780-3.
- Fournier et al. 2002. *J Clin Microbiol*. 40: 2176-81.
- Kawahara et al. 2006. *Appl Environ Microbiol*. 72:1102-9.
- Margos et al. 2008. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105:8730-5.
- Margos et al. 2009. *Appl Environ Microbiol*. 75:5410-6.
- Metts et al. 2003. *Infect Immun*. 71:3587-96.
- Leppert et al. 2000. *Clin Infect Dis*. 31:80-4.
- Schubert-Unkmeir et al. 2010. *PLoS Pathog*. 6(4):e1000874.
- Grosskinsky et al. 2010. *PLoS Negl Trop Dis*. 4:e698.
- Coleman et al. 2008. *PLoS One*. 3:3010e.
- Bhide et al. 2009. *BMC Res Notes*. 2:134.
- Wang et al. 2006. *Clin Pharmacol Ther*. 79: 303-15.
- Duhamel-Clérin et al. 1997. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 17:1931-8.

- Gebbia et al. 2001. *Infect Immun*. 69:456-62.
- Gebbia et al. 2004. *J Infect Dis*. 189:113-9.
- Behera et al. 2004. *Infect Immun*. 72:2864-71.
- Grab et al. 2007. *Clin Vaccine Immunol*. 14:1420-4.
- Hartiala et al. 2008. *Microbes Infect*. 10:60-8

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tabara K, Kawabata H, Arai S, Itagaki A, Yamauchi T, Katayama T, Fujita H, Takada N. High incidence of rickettsiosis correlated to prevalence of *Rickettsia japonica* among *Haemaphysalis longicornis* tick. **Journal of Veterinary Medical Science**. (In press)
2. Ando S, Kurosawa M, Sakata A, Fujita H, Sakai K, Sekine M, Katsumi M, Sakai W, Yano Y, Takada N, Takano A, Kawabata H, Hanaoka N, Watanabe H, Kurane I, Kishimoto T. Human *Rickettsia heilongjiangensis* infection, Japan. **Emerging Infectious Diseases**. 16: 1306-1308, 2010.
3. 山内健生, 高野 愛, 坂田明子, 馬場俊一, 奥島雄一, 川端寛樹, 安藤秀二. タカサゴキラルマダニによる人体刺症の 5 例. 日本ダニ学会誌. 19(1), 15-21, 2010.
4. 森下綾子, 谷口裕子, 大滝倫子, 川端寛樹. ワシントン DC で刺傷し, 帰国後発症したライム病の 1 例. 臨床皮膚科. 64(4), 343-346, 2010.

2.学会発表

1. 本井祐太, 鈴木正嗣, 安藤秀二, 川端寛樹, 高野 愛, 猪熊 壽. 島根県美郷町のニホンイノシシと紅斑熱群リケッチアとの関連性について. 第151回日本獣医学会学術集会. 2011年3月. 東京.
2. 高田伸弘, 平良克也, 藤田博己, 山本正悟, 安藤秀二, 角坂照貴, 高橋 守, 川端寛樹, 北野智一, 岡野 祥, 御供田睦代, 高野 愛, 矢野泰弘, 及川陽三郎, 本田俊郎, 岩崎博道, 平良セツ子. 台湾系ツツガムシ病をみた宮古列島, そこで確認したデリーツツガムシの浸淫と消長. 第65回日本衛生動物学会西日本支部大会. 2010年11月. 岡山.
3. 山内健生, 高野 愛, 丸山宗利, 川端寛樹. マレー半島における *Amblyomma* 属マダニによる人体刺症, およびその人体咬着輸入例. 第65回日本衛生動物学会西日本支部大会. 2010年11月. 岡山.
4. 藤田博己, 藤田信子, 高田伸弘, 及川陽三郎, 安藤秀二, 川端寛樹, 大竹秀男. 青森県と岩手県におけるイスカチマダニの生息調査. 第56回日本衛生動物学会北日本支部大会. 2010年10月. 札幌.
5. 佐藤寛子, 柴田ちひろ, 佐藤了悦, 斎藤博之, 安部真理子, 千葉真知子, 高橋守, 藤田博己, 角坂照貴, 高田伸弘, 川端寛樹, 高野 愛. 秋田県の著名観光スポットにおけるアカツツガムシ生息状況調査. 第56回日本衛生動物学会北日本支部大会. 2010年10月. 札幌.
6. 伊東拓也, 高田伸弘, 藤田博己, 川端寛樹, 大竹秀男. 北海道におけるイスカチマダニの再発見. 第56回日本衛生動物学会北日本支部大会. 2010年10月. 札幌.
7. 佐藤寛子, 國生泰範, 柴田ちひろ, 斎藤博之, 齊藤志保子, 藤田博己, 角坂照貴, 高田伸弘, 高野 愛, 川端寛樹, 須藤恒久. Kato型ツツガムシ病の発生と野外調査における *O. tsutsugamushi* の分離. 第59回日本感染症学会東日本地方学術集会. 2010年10月. 東京.
8. 本田俊郎, 藤田博己, 御供田睦代, 角坂照貴, 矢野泰弘, 高田伸弘, 及川陽三郎, 安藤秀二, 川端寛樹, 山本正悟, 高野 愛, 坂田明子. 鹿児島県薩南諸島におけるアサヌマダニと紅斑熱群リケッチア保有状況調査. 第62回日本衛生動物学会大会. 2010年4月. 鹿児島.
9. 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, 高野 愛, 渡邊治雄, 岸本寿男, 白井睦訓, 倉根一郎, 安藤秀二. *In silico* 解析から新規に構築した日本紅斑熱迅速診断法とその応用. 第84回日本感染症学会総会2010年4月. 京都.

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

リケッチアを中心としたダニ媒介性感染症の総合的対策に関する研究

分担研究報告書

リケッチアの病原性に関する基礎的研究

分担研究者： 内山 恒夫 徳島大学大学院 准教授

協力研究者： 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、1. オリエンチア Kuroki 株の病原性関連遺伝子の同定および解析、2. 従来のオリエンチア菌株ストックに広く汚染しているマイコプラズマの除去、3. オリエンチア感染細胞における脂肪滴形成の解析、4. リケッチア感染細胞実験系の確立とその感染系を用いた宿主特異性および増殖制御機序の解明、5. 複数種のリケッチア共感染の機序やその病原性に及ぼす影響などの解析を行った。その結果、1. Kuroki 株ゲノムの塩基配列を決定し、病原性との関連が示唆される遺伝子を同定し、その特徴を示した。2. オリエンチア菌株ストックに汚染しているマイコプラズマ除去にリンコマイシンが有効であった。3. オリエンチア感染細胞で脂肪滴が形成され、triglyceride が主成分であった。4. 哺乳動物細胞、節足動物細胞に対するリケッチア感染細胞実験系を作製した 5. 非病原性リケッチア感染細胞ではオートファジー等の関与によりリケッチアは持続感染したが、病原性株の共感染により、病原性株が増殖すると共に、非病原性株の増殖の増強が認められた。

A. 研究目的

リケッチア(Ric)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、1. オリエンチア(Ots) Kuroki 株のゲノムの全塩基配列決定と病原性関連遺伝子の同定および解析、2. 従来の Ots 菌株ストックに広く汚染しているマイコプラズマの除去、3. Ric 感染細胞実験系の確立とその感染系を用いた宿主特異性および増殖制御機序の解明、4. 複数種の Ric 共感染の機序やその病原性に及ぼす影響の解析などを目的として研究を行った。

B. 研究方法

1. Ots Kuroki 株ゲノムの塩基配列を次世代シーケンサーにて決定した。既報の Ikeda 株および Boryong 株にホモロジーのある CDS を決定し、ortholog 解析を行った。3 株に共通な CDS について病原性関連が示唆される遺伝子を同定し、その特徴を解析した。

2. Ots 菌株ストックに汚染しているマイコプラズマ(Myco)除去のため、種々の濃度のクラ

リスロマイシン、シプロフロキサシン、リンコマイシン等の抗菌薬存在下で感染細胞を継代培養し、nested PCR 法、リアルタイム PCR 法、特異抗体による蛍光抗体法などの検出法を用いて Myco、Ots をモニターし、菌株ストックより Myco を除去する条件を決定した。

3. Ots 感染細胞を経時的に観察し、脂肪滴(LD)形成を蛍光抗体法などにより解析した。脂質画分を抽出し、薄層クロマトグラフィーにより中性脂質画分を分離・分画した。各脂質を抽出し、酵素法を利用した比色法にて定量した。

4. 哺乳動物由来細胞 (Vero[サル], HeLa[ヒト]), 節足動物細胞 (DALBE3[マダニ], ISE6[マダニ], NIAS-AeA1-2[AeA12;カ]) に対する Ric 感染細胞実験系を作製した。この感染系を用い、宿主特異性および増殖制御機序を解析した。

5. 疫学的研究において、マダニ中に複数種の紅斑熱群 Ric が重感染している場合があることが知られている。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 Ric の重症感染によって起こる可能性を検証するため、種々の細胞に複数種の Ric が共感染した場合の、Ric の増殖について検討した。

(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 Ots、Ric 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

1. オリエンチア Kuroki 株ゲノムの塩基配列を決定し、既報の Ikeda 株および Boryong 株にホモロジーのある 862 CDS を決定した。

ortholog 解析の結果、このうち 674 CDS は 3 株に共通で、その他は、2 株に共通なもの、および各株に特異的であった (図 1)。この 674 CDS についてさらに解析を行い、病原性との関連が示唆される *tuf*, *virB6*, *hsp90*, *ompA*, *sca4* などの遺伝子が存在し、それらに次のような特徴があることを明らかにした。

(i) ペプチド鎖伸長因子 *tuf* は、Kuroki 株と Boryong 株には paralog がふたつ存在するが、Ikeda 株には存在しなかった。

(ii) TypeIV 分泌機構に関連する蛋白質 *virB6* および熱ショック蛋白質 *hsp90* は、3 株間で保存されていなかった(図 2)。

(iii) *ompA* 様外膜蛋白質遺伝子は、3 株ともに複数の paralog および ortholog が存在した(図 2)。

(iv) Ikeda 株に存在する *sca4* 様外膜蛋白質遺伝子は、Boryong 株と Kuroki 株では分断遺伝子であった(図 3)。

(v) また、その他の CDS の大部分は、AKR, TPR などの繰り返し配列であった。

2. Ots の菌株ストックに汚染しているマイコプラズマ除去のため、抗菌薬の検討を行った。その結果、リンコマイシン 10 µg/ml 存在下で継代しながら感染細胞の培養を続けると、5 継代目でマイコプラズマの nested PCR が陰性となるが、Ots は蛍光抗体法で陽性であった。その後、リンコマイシンを除い

た継代培養においてもマイコプラズマ陰性の状態は維持された。

3. Ots の感染が進むにつれて LD 形成が促進された。LD の大きさや数は感染している Ots 量に比例する傾向にあった。また、形成された LD は、中性脂質 triglyceride が主成分であった(図 4)。

4. 哺乳動物細胞、節足動物細胞に対する Ric 感染細胞実験系を作製した。

(i) Ric の Sca 外膜蛋白質群の機能解析を行い、ほ乳動物細胞(Vero 細胞)への Ric 付着侵入において、rOmpB 同様 rOmpA が機能することを示した。

(ii) 発疹チフス群 Ric は昆虫類のノミ、シラミ等を、紅斑熱群 Ric はクモ類のマダニ等をベクターとするが、このベクターと許容 Ric 群との相互関係が細胞レベルでも示された。

(iii) Ric 増殖が抑制される Ric 群と細胞種の組み合わせについて、紅斑熱群 Ric と昆虫細胞では細胞死が、発疹チフス群 Ric とマダニ細胞ではオートファジーの関与が示唆された(図 5, 6)。

5. 非病原性 Ric の *R. montanensis* をほ乳動物由来細胞(Vero 細胞)およびマダニ由来細胞(DALBE3 細胞、ISE6 細胞)に感染すると、オートファジー等の関与により Ric は持続感染した。これに病原性株 *R. japonica* を共感染すると、病原性株が増殖すると共に、非病原性株の増殖抑制が解除された(図 7, 8)。

D. 考察

1. Ots 3 株に共通の病原性との関連が示唆される 5 遺伝子が同定され、株によって paralog, ortholog の存在するものや存在しないもの、あるいはその数の違い、また分断遺伝子になっている株が存在するなどの特徴があった。これらの株間の違いがどのような生物学的意味を持つのかは不明である。

2. マイコプラズマに汚染された Ots 菌株ストックで感染した細胞をリンコマイシン 10 µg/ml 存在下で継代培養することにより、菌株ストックから汚染マイコプラズマのみを除去できることが明らかとなった。

3. Ots 感染が脂質代謝に影響し、感染が進行するにつれて triglyceride を主成分とする脂肪滴の形成が進むことが示された。これが、感染過程に必要なものか、感染の副産物であるかは不明である。

4. ほ乳動物細胞、マダニ細胞、昆虫細胞等の培養細胞で Ric 感染細胞系を作製することが出来た。また、リケッチア群とその媒介節

足動物との組み合わせは、培養細胞内でのリケッチアの増殖の有無という点で一致した。

5. 非病原性 Ric のほ乳動物由来細胞およびマダニ由来細胞での増殖抑制にオートファジーが関与し、病原性株の共感染により、増殖抑制が解除された。重感染した病原性株により、オートファジー抑制因子がもたらされた可能性が推測される。

E. 結論

1. Ots ゲノム中に5つの病原性関連遺伝子が同定された。今後、Ots 感染細胞内でのそれらの発現動態および細胞因子との相互作用の解析を行う。

2. Myco 汚染した Ots 菌株ストック中の Myco を除去できた。今後、多くの汚染ストックから Myco の除去を行うとともに、Myco を除去した Ots 菌株を用いて種々の宿主細胞への付着侵入および細胞内増殖動態の解析を行う。Ots では媒介つつが虫にいくつかの Ots 株の共感染がみられる場合があるが、そのメカニズムの解析を培養細胞レベルで行う。

3. Ots 感染により LD が形成されたが、そのメカニズムおよび生物学的な意味は不明である。今後、脂質代謝に関連する蛋白質の Ots 感染細胞内での挙動の解析を行う。また、siRNA を用いて関連遺伝子をノックアウトし、Ots 感染動態や LD 形成への影響を解析する。

4. Ric 感染細胞実験系が作製された。今後、rOmpA、rOmpB 以外の Sca 外膜蛋白質群の機能解析、および Ric 増殖抑制メカニズムの解析を行う。

5. Ric の病原性とオートファジーとの関連を推測する知見が得られた。今後、非病原性 Ric の増殖抑制のメカニズム、および、それに病原性株を重感染した場合に惹起される抑制解除のメカニズムの解析を行う。特に、オートファジーの抑制に関係する因子の同定を行う。

F. 健康危険情報

該当せず。

G. 研究発表

1. 論文発表

(i) 分担研究者：内山恒夫

内山恒夫, リケッチア ―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。

2. 報告書

(i) 分担研究者：内山恒夫

内山恒夫. 日本および東南アジアに見られる種々のリケッチア症の血清学的鑑別診断法の開発. 財団法人大山健康財団 年報, No.35, 2009 年度版 14-17 頁, 2010.

3. 学会発表

(i) 分担研究者：内山恒夫

内山恒夫, 岸 真帆美, 小川基彦. 非病原性リケッチア *Rickettsia montanensis* の増殖制御機序. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 2010.

小川基彦, 深澤征義, 内山恒夫, つつが虫病リケッチア感染による脂肪滴形成に関する研究~第一報~. 第 3 回日本リケッチア症臨床研究会・第 17 回リケッチア研究会合同研究発表会, 2011.

小川基彦, 内山恒夫, つつが虫病リケッチア培養系からの抗菌薬によるマイコプラズマ汚染の除去の試み. 第 3 回日本リケッチア症臨床研究会・第 17 回リケッチア研究会合同研究発表会, 2011.

内山恒夫, 岸 真帆美, 小川基彦. 非病原性リケッチア株の培養細胞における増殖抑制. 第 3 回日本リケッチア症臨床研究会・第 17 回リケッチア研究会合同研究発表会, 2011.

(ii) 協力研究者：小川基彦

内山恒夫, 岸 真帆美, 小川基彦. 非病原性リケッチア *Rickettsia montanensis* の増殖制御機序. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 2010.

小川基彦, 深澤征義, 内山恒夫, つつが虫病リケッチア感染による脂肪滴形成に関する研究~第一報~. 第 3 回日本リケッチア症臨床研究会・第 17 回リケッチア研究会合同研究発表会, 2011.

小川基彦, 内山恒夫, つつが虫病リケッチア培養系からの抗菌薬によるマイコプラズマ汚染の除去の試み. 第 3 回日本リケッチア症臨床研究会・第 17 回リケッチア研究会合同研究発表会, 2011.

内山恒夫, 岸 真帆美, 小川基彦. 非病原性リケッチア株の培養細胞における増殖抑制. 第 3 回日本リケッチア症臨床研究会・第 17 回リケッチア研究会合同研究発表会, 2011.

山本徳栄, 近 真理奈, 増田純一郎, 高橋 守, 藤田博己, 岸本寿男, 小川基彦, 安藤秀二. 埼玉県内のネズミ類における *Orientia tsutsugamushi* の保有状況. 第 3 回日本リケッチア症臨床研究会・第 17 回リケッチア研究会合同研究発表会, 2011.

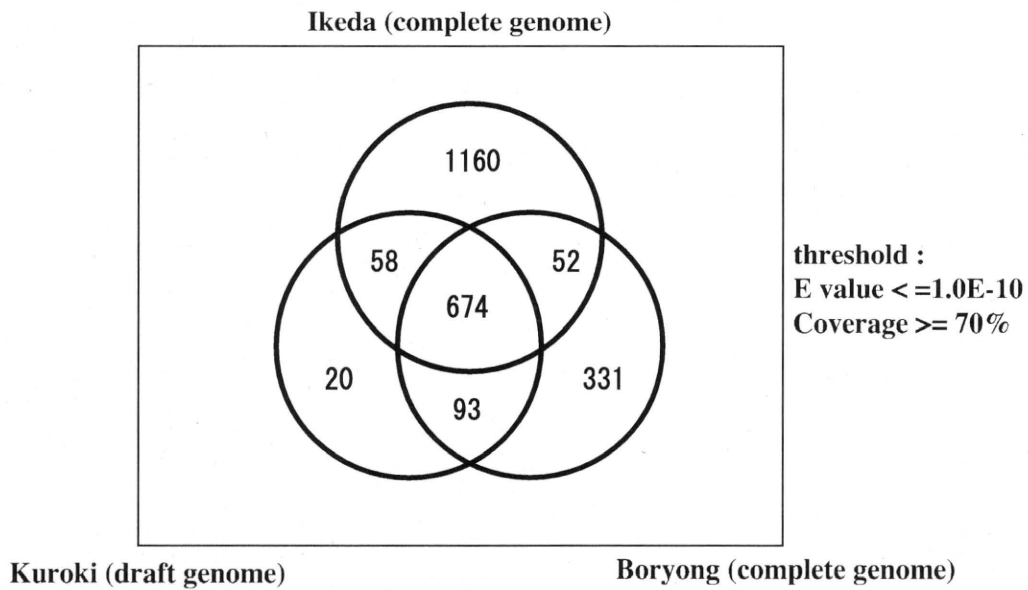


図 1. Ots, Kuroki 株の 862CDS についての 3 株巻での ortholog 解析。
674 CDS は 3 株に共通で、その他は、2 株に共通なもの、および各株に特異的であった。

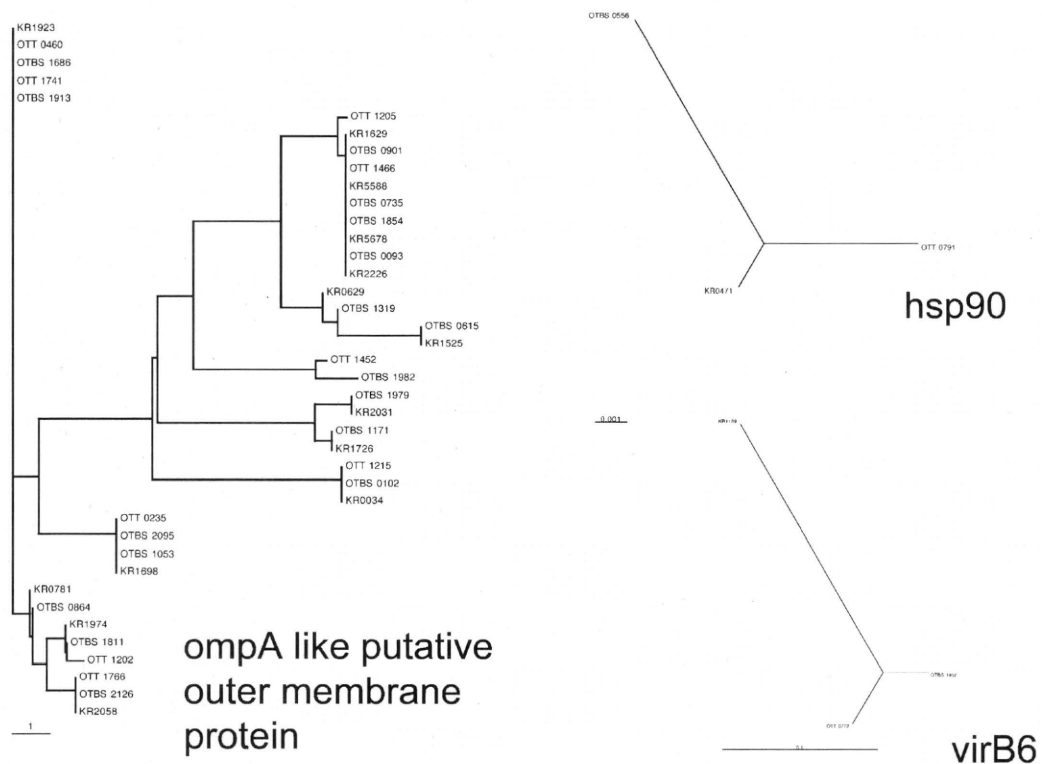


図 2. *ompA*、*hsp90*、*virB6* のオリエンチア株間の系統樹。
ompA 様外膜蛋白質遺伝子は、3 株間で複数の paralog および ortholog が存在する。また、*virB6* および *hsp90* は 3 株間の相同性が低い。

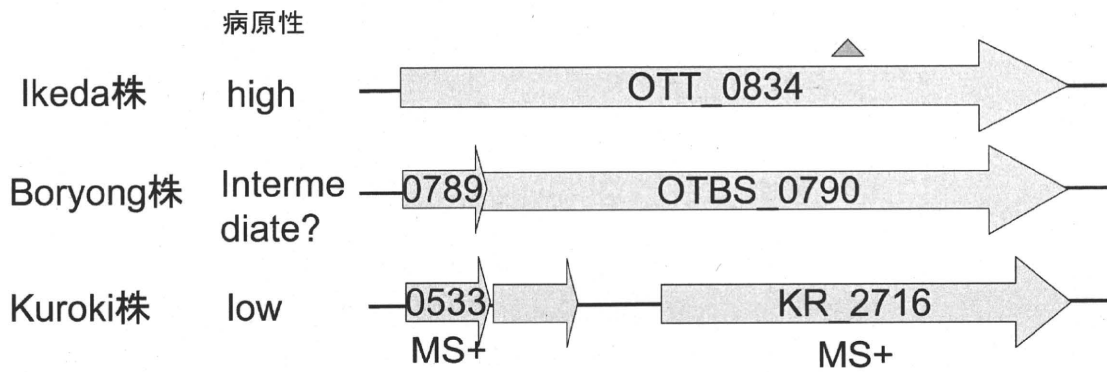


図 3. Ots, Ikeda 株、Boryong 株、Kuroki 株の *sca4* 様外膜蛋白質遺伝子。
Ikeda 株は完全遺伝子だが、他の 2 株は分断遺伝子。

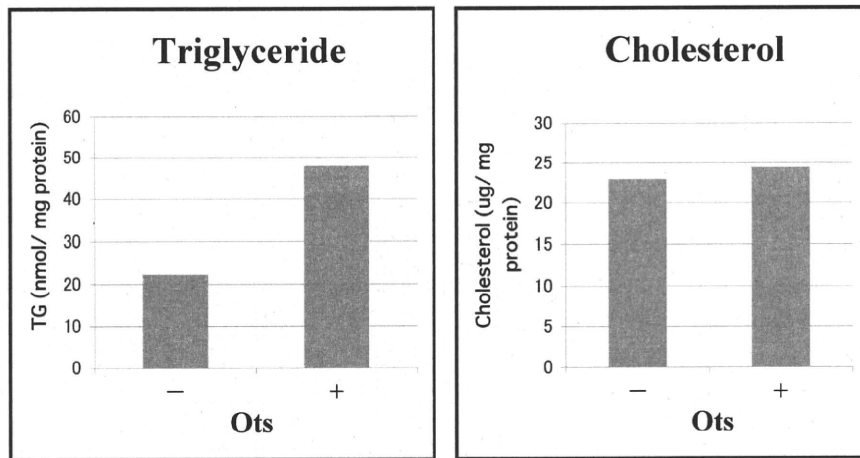


図 4. Ots, Ikeda 株感染 5 日目の L-929 細胞の脂質成分の解析。
感染細胞では triglyceride の増加が見られ、形態学的な LD の増加と一致していた。

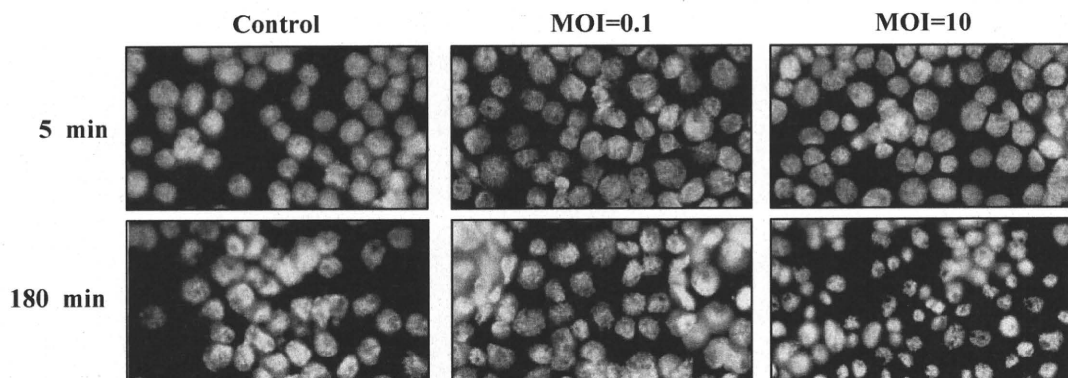


図 5. 紅斑熱群 Ric の *R. japonica* を感染させた AeA12 細胞の Hoechst33342 による染色。
感染細胞およびその核は縮退し、細胞死に至る。

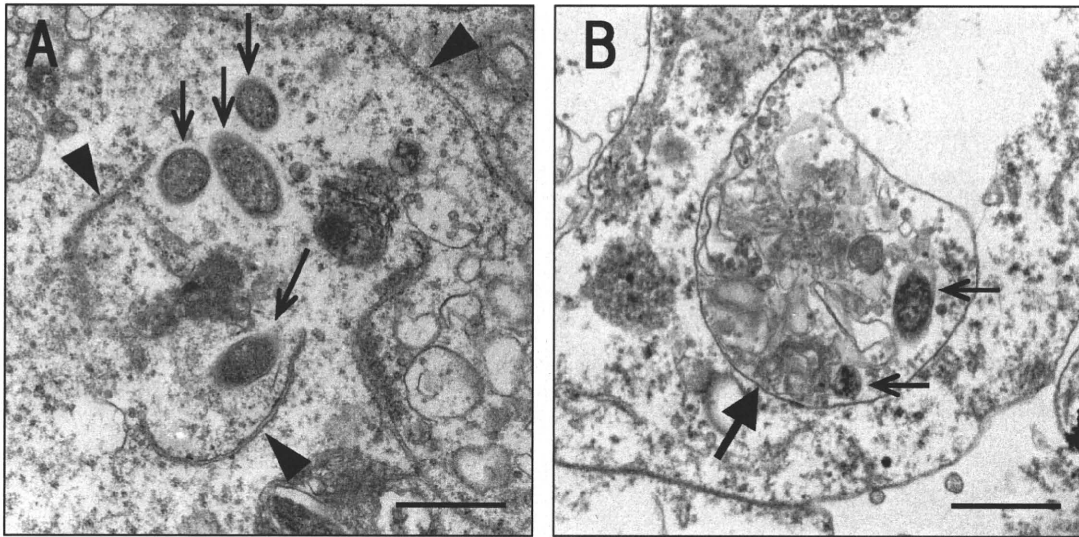


図 6. 発疹チフス群 Ric の *R. prowazekii* 感染 ISE6 細胞 (マダニ由来) の透過電顕。
 A. 感染 1 日目; オートファゴゾームの形成が見られる。B. 感染 3 日目; オートリソゾーム中で消化される途中のリケッチアが見られる。矢尻; 形成途中のオートファゴゾーム。小矢印; リケッチア。大矢印; オートリソゾーム。バー; 1 μm 。

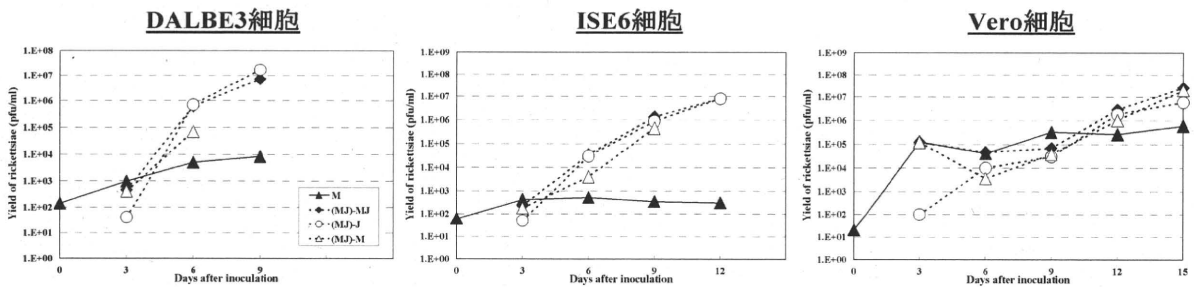


図 7. 非病原性リケッチア *R. montanensis* 感染細胞における増殖抑制と、病原性リケッチア *R. japonica* 共感染による抑制解除。

黒三角(M); *R. montanensis* 単独感染。 *R. montanensis* 感染 3 日目に *R. japonica* 重感染する。黒菱形((MJ)-MJ); 全リケッチア産生量。白丸; *R. japonica* 産生量 ((MJ)-J)。白三角; 重感染後の *R. montanensis* 産生量 ((MJ)-M)。

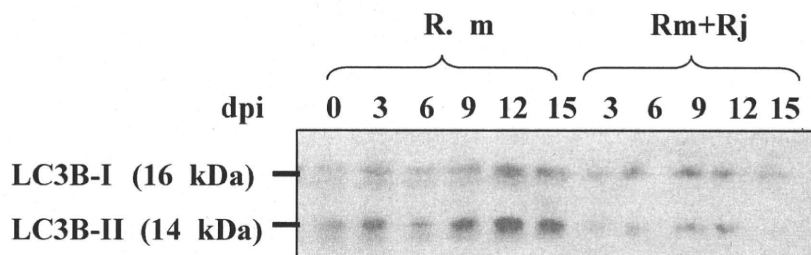


図 8. *R. montanensis* 単独感染、および *R. japonica* 共感染 Vero 細胞のオートファジー関連蛋白質 LC3B に対する抗体を用いたウエスタン・ブロッティング。

R. montanensis 感染細胞ではオートファジーが惹起されるが、 *R. japonica* の重感染によりオートファジーは抑制される。

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
分担研究報告書

ゲノム情報に基づいたツツガムシ病発症・重症化機序の解明とその応用

分担研究者

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 感染症学講座 微生物学分野 助教

研究要旨：

本研究の目的は、ゲノム情報解析に基づいたツツガムシ病およびリケッチア症の発症・重症化機構の解明と新規疫学・診断ツールの開発である。昨年度までに解析が終了したオリエンチア・ツツガムシ（以下、オリエンチア）Ikeda株と Boryong 株の全ゲノム配列比較解析と、その結果に基づいて実施した Multi Locus Sequence (MLS) 解析による主要オリエンチア株の進化系統解析の結果については、論文として発表した(Nakayama et al., DNA Res, 17(5):281-91, 2010)。本年度は ①「オリエンチアのペプチドグリカン産生性の解明と新規治療法の開発への応用」②「オリエンチア新規分離株の MLS 解析」③「新興リケッチア症起因株等のゲノム解析」を中心に研究を進め、ホスホマイシンがツツガムシ病の治療薬となりうることを示唆する結果などを得た。

A. 研究目的

ツツガムシ病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不可能である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ツツガムシ病の発症・重症化機構の解明、新規疫学・診断ツールの開発を試みる。本年度は、以下の 3 項目を中心とした解析を行った。

①「オリエンチアのペプチドグリカン産生性の解明と新規治療法の開発への応用」：従来、オリエンチアにはペプチドグリカンが存在しないとされてきたが、ゲノム解析の結果、ペプチドグリカン合成に関わる遺伝子群が、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することが示唆された。そこで、L929・HeLa・RAW264等の細胞を用いて培養したオリエンチアの増殖に対する各種ペプチドグリカン合成阻害剤の影響を解析したところ、宿主細胞内移行性の高いホスホマイシン（FOSMICIN-S）が本菌の増殖を強く抑制することが明らかになり、本剤がツツガムシ病の新規治療薬として利用できる可能性が示唆された。

以上の知見に基づき、本年度はマウスを用いた動物感染実験を行い、*in vivo*におけるホスホマイシンの作用を検討した。

②「オリエンチア新規分離株のMLS解析」：これまでオリエンチア株間の系統解析は、主に外膜蛋白質（56kDa蛋白質）をコードする遺伝子の配列を用いて行われてきた。しかし、免疫系などによる選択圧を強く受ける膜蛋白質コード遺伝子の配列には一度に大きな変化が生じることが多く、そのバリエーションを菌株の型別に応用することは可能であるが、菌株の進化系統解析に用いることは不適切である。一方、MLS（Multi Locus Sequence）解析では、複数のhouse-keeping遺伝子の部分配列を結合して作成した配列を用いるため、菌株の進化系統関係を明らかにすることが可能である。すなわち、house-keeping遺伝子においては、一度に大きな配列変化が生じると菌の生存が不可能になることが多いため、

遺伝子機能を激しく損なわない形の変化が時間をかけて生じる。このような様式による配列の変化量は、変化に要した時間の長さを反映すると考えられるため分子進化時計として利用可能であり、複数のhouse-keeping遺伝子の配列を比較することによって、より正確な株間の進化系統関係を明らかにできると考えられている。

本年度は、2010年7、8月の野外調査において、沖縄県宮古島市池間島で捕獲されたクマネズミから分離したオリエンチア6株の進化系統を明らかにすることを目的としてMLS解析を行った。

③「新興リケッチア症起因株等のゲノム解析」：平成20年8月に宮城県仙台市において*R. heilongjiangensis*による紅斑熱群リケッチア症患者が国内で初めて確認された。野外調査の結果、イスカチマダニが本菌を保有することが明らかになり、宮城県以外の地域においても本菌種に起因するリケッチア症が存在する可能性が示唆された。一方、フタトゲチマダニが保有するLONタイプのリケッチア種は日本紅斑熱の起因菌である*R. japonica*と遺伝学的に非常に近いものの、哺乳動物に対して病原性を示さないことが知られており、二菌種間で比較ゲノム解析を行うことにより、*R. japonica*の病原性に関与する遺伝子群が同定されることが期待される。そこで本年度は、*R. heilongjiangensis*とLON型リケッチア種の遺伝学的な特徴の解明や近縁菌種との関係を明らかにす