

201123006A (別刷あり)

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23年度 総括・分担研究報告書

平成24(2012)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23年度 総括・分担研究報告書

平成24（2012）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23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
岩崎 博道	福井大学医学部	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	静岡県立大学食品栄養科学部	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
角坂 照貴	愛知医科大学医学部	講師
川端 寛樹	国立感染症研究所細菌第一部	室長
御供田 睦代	鹿児島県環境保健センター	研究専門員
鈴木 正嗣	岐阜大学応用生物科学部	教授
高田 伸弘	福井大学医学部	シニアフェロー
堤 寛	藤田保健衛生大学医学部	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	センター長
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
松本 道明	高知県衛生研究所保健科学課	課長

\*研究分担者 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23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23年度）	
疫学的研究	
1. 多様化したリケッチア症等の対策へ向けベクター要因の検討	15
高田 伸弘（福井大学 シニアフェロー室）	
2. リケッチアを中心としたダニ媒介性細菌感染症に関するダニ類の実態調査 －北日本における2011年度のマダニ調査成績－	33
藤田 博己（(財)大原総合病院附属大原研究所）	
3. オオトゲチマダニから分離されたリケッチアの遺伝子解析	43
安藤 秀二（国立感染症研究所ウイルス第一部第五室）	
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 －2011年度の秋田県におけるアカツツガムシ生息調査成績－	49
佐藤 寛子（秋田県健康環境センター）	
5. 九州沖縄地域におけるリケッチア症を中心としたダニ媒介性感染症の レファレンスネットワークの構築と疫学的解明	55
御供田 睦代（鹿児島県環境保健センター）	
6. 日本紅斑熱患者発生地域における調査支援（2011年福岡市）から得られた リケッチア生息情報	63
安藤 秀二（国立感染症研究所ウイルス第一部第五室）	
7. 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調査 －島根半島におけるニホンジカおよびニホンイノシシのリケッチア抗体・DNA検査, 北海道静内におけるエゾシカの紅斑熱群リケッチア感染状況調査－	67
鈴木 正嗣（岐阜大学応用生物科学部獣医学講座）	
8. 四国地域におけるリケッチア症を中心としたダニ媒介性感染症の レファレンスネットワークの構築と疫学的解析	75
松本 道明（高知県衛生研究所）	
9. 赤磐市及び総社市で発生した日本紅斑熱の感染源調査	85
木田 浩司（岡山県環境保健センター）	
10. 岡山県の野ネズミにおけるリケッチア侵淫調査	93
中本 敦（岡山県環境保健センター）	

1 1. 山口県における日本紅斑熱初発事例の感染源調査 .....	107
木田 浩司 (岡山県環境保健センター)	

#### 臨床的研究

1. リケッチア症重症化に関する臨床および基礎的検討 .....	113
岩崎 博道 (福井大学医学部)	

#### 検査・診断的研究

1. 臨床像や病態の解析、重症化予防、治療法等へつなげるための病理学的な検討 .....	121
堤 寛 (藤田保健衛生大学医学部 第一病理学)	
2. 汎用されているリケッチア用PCR法に関する確認 .....	127
安藤 秀二 (国立感染症研究所ウイルス第一部第五室)	
3. ヒトアナプラズマ症における血清診断法の確立に関する研究 .....	135
大橋 典男 (静岡県立大学 食品栄養科学部)	

#### 基礎的研究

1. 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 .....	147
阿戸 学 (国立感染症研究所 免疫部 第二室)	
2. 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 .....	155
川端 寛樹 (国立感染症研究所・細菌第一部)	
3. リケッチアの病原性に関する基礎的研究 .....	161
内山 恒夫 (徳島大学大学院)	
4. 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 .....	169
林 哲也 (宮崎大学フロンティア科学実験総合センター)	
5. ツツガムシ幼虫に対する数種薬剤の殺ダニ効力試験 .....	177
角坂 照貴 (愛知医科大学医学部)	

#### 予防・啓発的研究

1. リケッチア症ハイリスク地域における住民等への啓発のモデル化 .....	183
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 23 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ている。具体的には、疫学的研究、臨床的研究、検査・診断的研究、基礎的研究、予防・啓発的研究の5本柱をたてて、統合的に有機的に進めてきた。3年目は(1)疫学的研究としては、リケッチア症に関する疫学の実態解明を、患者、ベクター、病原体、動物の分野でさらに進めた。(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した臨床像や重症化の病態解析、将来の治療指針等の作成や有効薬剤の保検適応に向けた治療のエビデンス蓄積を行った。(3)検査・診断的研究としては、リケッチア症の診断とレファレンス体制構築における課題の改善に努めた。(4)基礎的研究としては、発症や重症化、複数のダニ媒介性細菌の共感染等のメカニズム解析や、細胞レベルでの宿主の免疫応答。またゲノム情報の応用等をした治療薬のメカニズム解析と新たな治療法の開発を検討した。(5)予防・啓発的研究としては、疫学情報の医療関係者、行政、メディア、一般社会への適切な情報提供と、啓発による感染予防を目指し、HPを作成・公開した。

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)  
岩崎博道(福井大学医学部教授)  
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)  
角坂照貴(愛知医科大学講師)  
川端寛樹(国立感染症研究所細菌第一部室長)  
御供田睦代(鹿児島県環境保健センター研究専門員)  
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(福井大学シニアフェロー)  
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)  
松本道明(高知県衛生研究所保健科学課長)

## 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四類感染症で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たが、2008年には東北で15年ぶりに古典的つつが虫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、重症例や死亡例の報告もみられている。加えて最近 *R.japonica* 以外の紅斑熱群リケッチアによる紅斑熱の発生が東北地域や中国地域で確認され、我が国での紅斑熱の多様性が明らかとなってきた。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、その他の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。添付の図に示すように、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険適応化につなげる。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つの柱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してきた。

3年目は疫学的研究としては、リケッチア症に関する疫学の実態解明を患者、ベクター、病原体、動物の分野でさらに進めることとした。臨床的研究としては、多医療施設での症例解析をもとにした臨床像や重症化の病態解析将来の治療指針等の作成や有効薬剤の保検適応に向けた治療のエビデンス蓄積を行うこととした。検査・診断的研究としては、リケッチア症の診断とレファレンス体制の構築の課題の改善が重要である。本年度リファレンスセンターの設置が決定されたものの、本格的な運用には多くの課題も残されており、それらの改善に努めることとした。基礎的研究としては、発症や重症化、複数のダニ媒介性細菌の共感染等のメカニズム解析や、細胞レベルでの宿主の免疫応答についてさらに研究を進



め、またゲノム情報の応用等をした治療薬のメカニズム解析と新たな治療法の開発を検討することとした。予防・啓発的研究としては、疫学情報の医療関係者、行政、メディア、一般社会への適切な情報提供と、啓発による感染予防を目指し、リケッチア疾患に関する一般付向けの HP を作成し公開することとした。

B、C、Dの研究手法、結果、考察については、5本柱の個々のテーマをより理解しやすいように、目次の順に以下まとめて記載した。

## 1. 疫学的研究

### ・多様化したリケッチア症等の対策へ向けベクター要因の検討

(研究分担者 高田伸弘)

ダニ媒介性感染症の総合対策の一環として、今年度もリケッチア症等（一部ボレリア含む）への対策の基盤作りに向け、ベクター要因を中心に検討した。①注目される地域のマダニ相については、近年紅斑熱確認が続く瀬戸内、特に淡路島のマダニ保有病原体の検索、また北日本の紅斑熱やライム病に係る感染環の探査、さらに我国と共通性をみる欧州北半部のマダニ相の調査視察、コウモリ寄生マダニへの対応、潜在感染スクリーニングのためELISAの有用性検討、②注目される地域のツツガムシ相については、東北地方南部（福島県南部また栃木・茨城県の北半部で放射線測定含み）でつつが虫病患者発生と相関するタテツツガムシ探査、および中国地方（広島県西部）のタテツツガムシ浸淫の再確認、また宮古列島池間島で発見したデリーツツガムシの分布や季節的消長の特性および対策、そしてトカラ列島中之島の冬季ツツガムシ相の

調査、③ベクターへの直接対応として、秋田県のアカツツガムシおよび石川県のタテツツガムシ防除の意義、そしてツツガムシ種ごとのヒト刺し口の皮膚科的な検討を試みた。

### ・リケッチアを中心としたダニ媒介性細菌感染症に関するダニ類の実態調査 —北日本における2011年度のマダニ調査成績— (研究分担者 藤田博己)

北海道と東北地方において、2011年に実施したマダニ媒介性リケッチア症に関するマダニ類の実態調査の成績をまとめた。北海道では、道東地域を中心に新ひだか町から釧路、標津、稚内に至る太平洋からオホーツク海沿岸地域に加え、礼文島と利尻島をカバーした。ヒト病原種の *R. helvetica* は礼文島の数地点のシュルツェマダニから高率に分離され、高い感染リスクが推測された極東型紅斑熱の媒介種イスカチマダニは、釧路と野付崎で採集できたが、この地点以北のオホーツク海沿岸一帯には生息を確認できなかった。また、イスカチマダニからのリケッチア分離はすべて陰性であった。新ひだか町ではオオトゲチマダニから国内初となる *Rickettsia kotlanii* を分離した。

青森県では、紅斑熱発生地の中戸市内でイスカチマダニの生息を再確認、また新たに階上町での生息が確認できた。この地域のマダニからのリケッチア分離は陰性であった。

岩手県の太平洋岸北部の洋野町でも新たにイスカチマダニの生息を確認し、同県奥州市水沢区の北上川流域の生息地からも少数個体を採集し得たが、いずれの個体もリケッチア分離は陰性であった。

宮城県仙台平野の極東型紅斑熱感染地を

含む一帯の継続調査地は、マダニの活動期に入る3月に大地震と大津波に襲われ、いたるところで海水の激流による浸水があった。4月から可及的に調査を実施し、媒介種イスカチマダニの新たな生息地として大崎市と松島町の鳴瀬川流域を加えた。仙台市の継続調査地の一部においては、震災前と変わりなくイスカチマダニが生息し続けていて *R. heilongjiangensis* の保有も確認できた。

**・リケッチアを中心としたダニ媒介性細菌感染症に関するダニ類の実態調査 —2011年度の秋田県におけるアカツツガムシ生息調査成績—**

(研究協力者 佐藤寛子 秋田県健康環境センター)

2008年8月、秋田県大仙市の雄物川河川敷での感染が疑われる高病原性のつつが虫病患者が15年ぶりに発生した。2009年以降の調査においてアカツツガムシの生息が患者感染推定地のほか、全国的に有名な大仙市の花火大会会場内でもイベント開催時期に多数の生息が確認された。加えて2010年に、横手市を流れる同河川敷での感染が疑われる患者が発生した。さらなる患者続発が懸念されたため調査地域を雄物川上流～支流の河川敷まで広げたアカツツガムシ・ハザードマップ作製を試みた。調査は過去に患者発生記録がある地点を参考に雄物川上流部の湯沢氏から中流部の大仙市に至る約70kmの河川敷を対象地域に黒布見取り法によって行った。その結果、アカツツガムシの生息は、大仙市郊外～湯沢市郊外の雄物川河川沿い約60kmの河川敷であると推定された。生息域の中には河川沿いの公園や釣り場、船着き場等も含まれたが、

アカツツガムシの生息数は広域な河川敷の中でも水際の砂地や中洲に多い傾向にあることが確認された。

**・九州沖縄地域におけるリケッチア症を中心としたダニ媒介細菌感染症のレファレンスネットワークの構築と疫学的解明 (研究分担者 御供田睦代)**

九州沖縄地域におけるつつが虫病及び日本紅斑熱について発生状況を把握するとともに、検査診断のための検査を2010年5月に設置されたリケッチアレファレンスセンターを通し、各県の地方衛生研究所と医療機関との連携を図り、迅速な診断が行えるように支援することや患者発生時の疫学調査などを行った。媒介種ダニ類の採集及び野鼠を捕獲し、病原体の検出を行い、感染予防対策・啓発に役立てた。

リケッチアレファレンスセンターとして検査診断の支援では、福岡県・佐賀県・長崎県で発生したリケッチア症患者診断のための検査を宮崎県衛生環境研究所が実施し、血清抗体価及び遺伝子検査等を行った。沖縄県の患者発生地の疫学調査では、沖縄県のつつが虫病患者発生地調査を継続して行っているが、患者は発生しているものの媒介種である野鼠及びツツガムシからの病原体は検出されていなかったため現地調査を行った。福岡県の患者発生地の疫学調査では、日本紅斑熱患者発生地調査において、福岡市保健環境研究所及び福岡県保健環境研究所の職員とともにダニ類の採集及び野鼠を捕獲し、病原体検索を行った。奄美大島及びトカラ列島(宝島)における疫学調査では、鹿児島県トカラ列島では、3島(口之島、諏訪之瀬島、悪石島)での患者の報告があり、ツツガムシは、デリーツツガム

シおよびタテツツガムシと考えられているが、採集及び病原体の検索においてのデータが不十分である。また、宝島においては、これまでツツガムシの採集及び野鼠の捕獲ができていないため調査を行った。

#### ・ヒトアナプラズマ症における血清診断法の確立に関する研究

(研究分担者 大橋典男)

ヒトアナプラズマ症は、リケッチア目、アナプラズマ科に属する *Anaplasma phagocytophilum* により引き起こされるリケッチア感染症で、新興感染症として位置付けられている。これまでにこのアナプラズマ症の我が国での実態を明らかにするため、静岡県、山梨県、青森県、岩手県、鹿児島県、長崎県五島列島、沖縄県与那国島、和歌山県、三重県において、マダニを採集し、その唾液腺中に存在する *A. phagocytophilum* の p44 外膜蛋白遺伝子の検出を行った。その結果、シュルツェマダニ、ヤマトマダニ、タカサゴキララマダニ、タカサゴチマダニ、オオトゲチマダニ、フタトゲチマダニなどの多種類のマダニが *A. phagocytophilum* を保有していることが明らかとなり、国内にもヒトアナプラズマ症が潜在している可能性を示唆した。さらに高知県と鹿児島県の日本紅斑熱が疑われる患者血液から *A. phagocytophilum* の特異遺伝子の検出を試み、3例の陽性患者を見出した。しかし、血清診断については技術上の課題や微生物学的性状からの問題点が多く、良好な成果が得られていなかった。本年度は、この課題や問題点の一部を明らかにし、血清診断法の確立に成功して、遺伝子検査陽性の患者も弱いながら血清診断で陽性を示すこと、また静岡県のリケッチア症が疑われた不明発

熱性疾患の患者の中に *A. phagocytophilum* に対する抗体が存在していることを明らかにした。すなわち国内におけるヒトアナプラズマ症に関しては、米国で用いられている血清診断を改良する必要があることを見出し、我が国におけるヒトアナプラズマ症に関する血清診断が可能となった。

#### ・ツツガムシ幼虫に対する数種薬剤の殺ダニ効力試験

(研究分担者 角坂照貴)

殺ダニ効果が期待される8種の製剤(農薬および天然物)を使用して、2種のツツガムシ幼虫に対する殺ダニ効果を継続接触試験法と直接噴霧試験法で検討した。その結果、殺ダニ効果が高かった薬剤は、スミチオン乳剤(フェニトロチオン)、テルスタースプレー(ピフェントリン)とイベルメクチン(アイボメクトピカル)で、提供したツツガムシ幼虫の全数が死亡した。天然物由来のカラギーナン(カラギーナン、リンゴ酸、展開剤)にも殺ダニ効果が確認されたが、これには薬剤によりダニ全体が被われることが殺ダニ効果として必須であるために野外での効果が薄れる。テルスタースプレー(ピフェントリン)は、ピレスロイド系薬剤で十分に効果が期待されるが適応植物に制限があるため適応範囲が狭く雑草地には散布できない。イベルメクチン(アイボメクトピカル)は、散布が動物体表に限定される製品であるため雑草地での使用適応許認可には時間を要す。以上のことから、スミチオン(フェニトロチオン)は、樹木類から草本植物まで広域にわたって使用可能であることから、河川、養殖池等に飛散、流入しないよう注意して使用すれば生息数低減に効果的と考えられた。

・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調査 —島根半島におけるニホンジカおよびニホンイノシシのリケッチア抗体・DNA 検査, 北海道静内におけるエゾシカの紅斑熱群リケッチア感染状況調査—

(研究分担者 鈴木正嗣)

日本紅斑熱発生と野生動物との関連性について明らかにすることを目的として、以下の調査を行った。①島根半島で捕獲されたニホンジカ(以下シカ)およびニホンイノシシ(以下イノシシ)における紅斑熱群リケッチア感染状況調査を実施したところ、シカ血液1検体および咬着していたオオトゲチマダニから *Rickettsia sp.* Hf332 の DNA 断片が検出された。イノシシから採取されたタカサゴキララマダニから *R. tamurae* の DNA 断片が検出され、島根半島における *R. tamurae* の浸潤が初めて確認された。タカサゴキララマダニは、イノシシに対して宿主特異性を持つことが強く示唆された。*R. japonica* に対する抗体に関して、シカでは0歳が1歳以上と比較して抗体陽性率が有意に低かった。イノシシでは、日本紅斑熱非発生地域のイノシシと比較して差は確認されなかった。②北海道静内のシカ血液から DNA を抽出し、紅斑熱群リケッチアの感染状況を調査したが、陽性検体は認められなかった。

・四国地域におけるリケッチア症を中心としたダニ媒介性感染症のレファレンスネットワークの構築と疫学的解析

(研究分担者 松本 道明)

疫学としては、四国における日本紅斑熱の患者は、年間30例程度報告され2009年から3年間で88例の報告があった。この88例につ

いて解析を行ったところ、4県すべてで初めての感染推定地域からの報告があった。特に、香川県では県内初であった。患者の年齢は60歳以上が84%であった。88名の患者の症状は、日本紅斑熱の三主徴である発熱・発疹・刺し口は、それぞれ87名、87名、66名でみられた。また、肝機能異常は71名、DICは24名でみられた。つつが虫病の患者は、2007年以降香川県以外の3県では毎年報告され5年間で27例の報告があった。

ダニの調査としては、2011年9月から10月にダニ相調査を実施し、高知県ではフタトゲチマダニ、キチマダニ、タカサゴチマダニ、ヤマアランチマダニの1属4種類であった。徳島県ではキチマダニ、フタトゲチマダニの1属2種類であった。香川県ではキチマダニ、タカサゴチマダニの1属2種類であった。高知県及び香川県で採集したすべてのマダニから *R. japonica* の遺伝子検索を実施したが、検出限界以下であった。徳島県で採集したキチマダニ1匹から非特異の反応があった。

リケッチア症のネットワーク構築に向けての活動としては、四国内の地方衛生研究所間の連携や患者報告の無かった香川県及び高知県のハイリスク地域やその近隣の医療機関と連携を図り患者の把握に努めた。

リケッチア症の予防・啓発のため、高知県内の日本紅斑熱ハイリスク地域の市民祭の機会を利用して予防啓発活動を行った。また、県民へ広く情報提供するためマスコミを活用し、新しく患者が報告された地域住民には市町村広報誌を活用した。

・赤磐市及び総社市で発生した日本紅斑熱の感染源調査

(研究協力者 木田浩司 岡山県環境保健センター)

岡山県における日本紅斑熱は、2009年10月に倉敷市で初めての患者が報告されたが、2010年は患者の報告が無かったものの、2011年5月に赤磐市で、また9月に総社市で相次いで患者が報告された。そこで本年度は、赤磐市及び倉敷市の患者発生地域における *R. japonica* の感染源を特定することを目的として調査を行った。赤磐市周辺調査は2011年6月及び7月、総社市周辺調査は10月に実施した。患者居住地を中心として、赤磐市周辺調査では半径10キロメートルに5地点を、総社市周辺調査では半径2キロメートルに4地点を設定してマダニを捕獲した。形態観察によってマダニの種を同定し、生存個体の一部についてはL929細胞を用いて微生物分離を試みた。また、DNAを抽出し、リケッチアの種特異抗原である17kDa領域についてnested PCRによる遺伝子検索を行った。陽性検体については遺伝子配列を決定し、系統解析を実施した。その結果、赤磐市周辺調査で捕獲したマダニ397匹のうち、検査に供した240匹における微生物分離は全て陰性であったが、PCRについては23匹が陽性であった。系統解析の結果、すべてSFGRに属していた。既知種の塩基配列と100%一致した2株について、クエン酸合成酵素(*glutA*)領域についても検討したところ、ヤマトマダニからの検出株は *R. asiatica*、タカサゴキララマダニからの検出株は *R. tamurae* であると考えられた。また、総社市周辺調査で捕獲したマダニ320匹のうち、検査に供した108匹における微生物分離は全て陰性であったが、PCRについては3匹が陽性であった。系統解析の結果、全てSFGRに属するものの既知種ではなかった。本調査では、いずれの調査地域でも *R. japonica* が検出されなかったが、2010年に島根県で初めて病原性が示唆された *R. tamurae* が本県で初めて検出

された。今後も調査を継続することで患者発生地域のリケッチア侵淫実体を明らかにし、適切な治療・啓発へ繋げたいと考えている。

#### ・岡山県内の野ネズミにおけるリケッチア侵淫調査

(研究協力者 中本 敦 岡山県環境保健センター)

岡山県における現在のリケッチアの侵淫状況を把握するとともに、日本紅斑熱の発生メカニズム及び伝播様式を明らかにするために、2010年10月～2011年12月に岡山県全域を対象とした小型哺乳類とマダニ類の生息状況調査、採集されたネズミ類の脾臓及びマダニ類からのPCRによるリケッチアの検出、ネズミ類の全血からのリケッチアの分離及びネズミ類の血清抗体価の測定を行った。遺伝子陽性検体については遺伝子配列の決定後、系統解析を実施した。食虫目2種、齧歯目6種、計135個体を捕獲した。優占種はアカネズミで(61.5%)、その生息密度は年2回の繁殖によって大きく変動していた。マダニ属3種、チマダニ属6種の計1783個体が採集された。マダニ類の生息密度には種ごとに異なった季節的な消長が見られた。マダニ類は山地で多く採集された。小型哺乳類とマダニ類から病原性リケッチアは検出されなかった。5種の紅斑熱群リケッチアに対する抗体陽性率にはネズミ種による違いが見られた。抗体価の中央値はアカネズミで全ての株に対して1280～2560倍、ヒメネズミで *Rickettsia. asiatica* に対して320倍と高い値を示した。アカネズミの成獣は亜成獣よりも高い抗体価を示した。アカネズミ個体群の抗体価は繁殖による新規個体の加入により減少した。今回の調査では病原性リケッチアは検出できなかったが、いくつかのネズミ種は紅斑熱群リケッチアに対する高い抗体価を示し



た。このことから、岡山県内では広範囲に紅斑熱群リケッチアが侵淫しているが、病原性リケッチアは低い密度で潜在していると思われる。また、アカネズミの生息密度は季節や年によって大きく変動しており、紅斑熱群リケッチアの動態に係わっていると考えられた。

#### ・山口県における日本紅斑熱初発事例の感染源調査

(研究協力者 木田浩司 岡山県環境保健センター)

2010年4月、山口県東部で、県内初めての日本紅斑熱患者が報告された。そこで、患者発生地域における *R. japonica* の感染源を特定することを目的として調査を行った。昨年度、我々は患者の臨床経過と疫学調査の実施について報告したが、今回はその調査に加え、2011年5月に追加調査を行った。本調査では、患者居住地含む半径7キロメートルの範囲で4地点を設定し、野ネズミ及びマダニを捕獲した。L929細胞を用い、野ネズミの全血から SFGR の分離を試みた。血清抗体価は、*R. japonica* を含む紅斑熱群リケッチア6種を抗原とした間接蛍光抗体法で測定した。マダニについては、種の同定と同時に、生存個体の一部について同様に微生物分離を試みた。また、DNA を抽出し、リケッチアの種特異抗原である17kDa領域について nested PCR による遺伝子検索を実施した。陽性検体については遺伝子配列を決定し、系統解析を実施した。その結果、患者宅周辺で捕獲したアカネズミ2頭の微生物分離は全て陰性であった。*R. japonica* に対する血清抗体価は、それぞれ320倍及び1280倍と高かった。しかし、6種のリケッチアに対する抗体価の違いは無かった。捕獲したマダニ492匹のうち、検査に供した215匹における微生物分離は全て陰性であったが、PCR については

2地点で捕獲されたキチマダニ4匹が陽性であった。4匹から検出されたリケッチア遺伝子17kDa領域394塩基の相同性は100%であった。系統解析の結果、SFGR であると考えられたが、既知種ではなかった。

## 2. 臨床的研究

### ・リケッチア症重症化に関する臨床および基礎的検討

(研究分担者 岩崎博道)

新興感染症・日本紅斑熱の重症例が多発しているが、その重症化機序は明らかではない。再興感染症・つつが虫病でも、まれではあるがテトラサイクリン単剤治療が無効である重症例も経験される。我が国においてリケッチア症患者救命のための有効治療法の確立は重要な課題である。2011年9月、福井県においてDICを合併し、テトラサイクリンに加えニューキノロンの併用により救命し得たつつが虫病の1重症例を経験した。本症例では当初日本紅斑熱の可能性も考慮され、これら2剤が併用され救命できた例であった。

リケッチア感染症の急性期には、患者背景として高サイトカイン血症が存在することより、この制御が重症化からの回避に係る可能性がある。この課題について、ヒト単球系培養細胞(THP-1)を用いた基礎的実験系を用いて検討した。その結果、テトラサイクリンおよび一部のニューキノロンにより、サイトカイン/ケモカイン(TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , eotaxin)が抑制されることが示された。さらに両薬剤の併用により、その抑制効果は単剤に比較し有意に増強した。細胞内シグナル伝達経路において、MINOによるI $\kappa$ B $\alpha$ のリン酸化の抑制が、TNF- $\alpha$ 産生制御に係

っていることが明らかとなった。さらに重症リケッチア感染症においては、ニューキノロンのうち CPFX を併用することが重症化からの回避に有効である可能性が示唆されたが、臨床的には今後更なる症例の集積を続け、検討を加える必要がある。

### 3. 検査・診断的研究

・臨床像や病態の解析、重症化予防、治療法等へつなげるための病理学的な検討

(研究分担者 堤 寛)

日本紅斑熱が疑われる症例の皮膚（主として刺し口、一部紅斑）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切片から抽出した DNA を対象とした real-time PCR 法（Taq-Man 法）による早期診断法を確立し、60 症例以上に臨床応用した。多くの症例で、血清診断より早い段階で確定診断が可能だった。なお、我々の条件下では、免疫染色の感度が real-time PCR（プロダクトサイズを 100 bp 前後に構築）のそれを上回っていた。血清抗体価の上昇を欠く 9 症例が見いだされ、うち 7 例において real-time PCR（SYBR-Green 法）で、17 k genus common antigen gene（114 bp）が陽性となった。シーケンス解析で 5 例は *R. japonica*、1 例は *R. tamurae* に一致した。早期治療によって、血清抗体価上昇が抑制された結果と考えられた。

1 例の剖検解析で、リケッチアは血管内皮、マクロファージに加えて、尿細管上皮にも感染していた。この結果をもとに感染急性期の尿を解析すると、一部の症例で real-time PCR 陽性となった。ただし、*R. felis* に一致するシーケンスが得られた症例もあった。

紅斑を欠くマダニ咬症の皮膚生検から、

*R. sp.* LON（ないし *R. honeii*）に一致するシーケンスが得られた。以上より、わが国における紅斑熱リケッチア感染症の多様性が示唆された。

・汎用されているリケッチア用 PCR 法に関する確認

(研究分担者 安藤秀二)

国内の公的研究機関で用いられている紅斑熱群リケッチア用 PCR 法に関し、その使用にあたっての留意点について再確認した。マニュアルに掲載されている R1 と R2、Rj5 と Rj10 のプライマーセットでの PCR を行う場合、その用い方によっては、複数のバンドが検出されるなど、判定にできない場合がある。これは、プライマーの位置関係が、nested PCR にも供することができるような位置関係にみえるため、実際に R1 と R2 の内側のプライマーとして Rj5 と Rj10 による nested PCR を行った場合、R1/R2/Rj5/Rj10 のそれぞれのプライマーの Forward と Reverse が外側と内側で組み合わさった遺伝子も増幅されるためである。このことに留意してこれらの PCR プライマーを使用する必要がある。また、国内外において、リケッチア属の多様性が広がっており、日本紅斑熱リケッチア *R. japonica* 特異的とされていた Rj5/Rj10 のプライマーでも増幅されるリケッチアが確認されている。さらに、リケッチアの多様性のために、種特異的な PCR プライマーの設計が難しくなっており、感染したリケッチアを PCR によって同定する際には、シーケンス解析が必須のものとなるであろう。

・オオトゲチマダニから分離されたリケッチアの遺伝子解析

(研究分担者 安藤秀二)

オオトゲチマダニ *Haemaphysalis megaspinosa* は国内に広く分布するマダニである。近年、日本国内に生息するマダニが多様なリケッチアを保有することが明らかになってきたが、北海道で採取された *H. megaspinosa* から分離されたリケッチアについてその遺伝子について解析したところ、これまで国内にない紅斑熱群リケッチアの一種であり、ヨーロッパのハンガリーで報告されているものと、遺伝子配列が一致した。マダニは、その種によって、気候的条件、地理的条件などから分布域が決まっているものが多いが、今回確認されたリケッチアは、地理的にきわめて離れた異なる地域のマダニにおいて保有されていたことから、リケッチアの分布と進化には気象的条件が影響している可能性がある。本リケッチアのヒトへの病原性は確認されていないものの、マダニ類の分布とともに、リケッチアの分布は、さまざまな環境因子の影響を受けているといえる。

・日本紅斑熱患者発生地域における調査支援(2011年福岡市)から得られたリケッチア生息情報

(研究分担者 安藤秀二)

平成 23(2011)年 6 月に福岡市において日本紅斑熱患者が確認されたことにもない、感染推定地域の調査を同年 7 月に実施した。この調査により、各研究機関ならびに地域の公衆衛生機関の施設間の技術共有、連携を試み、患者発生に即応できる情報の集積と、リケッチア症の地域における情報発信のあり方について検討した。感染推定地域で採取されたマダニ類は、日本紅斑熱群リケッチア *R. japonica* を含む紅斑熱群リケッチアを高率に保有して

おり、今後も同地域を感染推定地域とする日本紅斑熱の患者発生が再び起こる可能性がある。地域におけるリケッチアに関する情報を、地域の医師会、公衆衛生機関等の関係者と共有し、生息情報、リケッチア保有情報の蓄積を行いつつ、検査診断体を構築することが、患者発生時の迅速な対応の流れを可能とすると考える。

#### 4. 基礎的研究

・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

(研究分担者 阿戸 学)

つつが虫病は *Orientia tsutsugamushi* の感染によって起こる。これまで各株間の宿主、分布域、遺伝学的解析は行われているが、病態及び免疫応答の解析はなされていない。そこで、*O. tsutsugamushi* 感染マウスモデルを作製し、臨床経過、サイトカイン産生応答、肝臓の病理組織学的検索を行った。その結果、従来の *Orientia* の遺伝学的分類とは異なり、1)サイトカインストームを伴う Gilliam 株および Karp 株感染、2)炎症性サイトカインの産生を伴わず、腹水の貯留と *Orientia* の増殖のみを認める Kaisei(Japanese-Giliam)株および Kato 株感染、3)マウスに病原性を示さない Kawasaki 株および Kuroki 株の 3 群に分類されることが明らかとなった。今後、ヒトつつが虫病における応答と照合し、つつが虫の病態解明及び病型分類と適切な治療法への応用が期待される。

・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基礎的研究

(研究分担者 川端寛樹)

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した。本年度は、我が国のライム病患者から分離された株について、*Anaplasma phagocytophilum* による宿主細胞からのマトリックスメタロプロテアーゼ産生能の増強作用について調べた。その結果、我が国に存在する *B. garinii* は海外で分離されたライム病ボレリア同様に、*A. phagocytophilum* と共役的に宿主細胞からのマトリックスメタロプロテアーゼ産生を誘導することが *in vitro* 実験で示されるとともに、これが病態悪化と関係する可能性が考えられた。

#### ・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)

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、オリエンチア感染細胞における脂肪滴形成機構の解析、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構の解析を行った。その結果、オリエンチア感染細胞では脂肪滴が形成されるが、その主成分のトリグリセリドの合成が盛んになり、細胞膜の主成分であるリン脂質の合成には変化がみられないことを明らかにした。また、哺乳動物細胞、節足動物細胞について作製したリケッチア感染細胞実験系

を用い、非病原性紅斑熱群リケッチア *Rickettsia montanensis* の感染細胞における増殖抑制の少なくとも一部がオートファジーによることを電子顕微鏡でも確認した。さらに、同様に非病原性の LON-13 株の増殖性についても解析したところ、哺乳動物細胞ではいずれも増殖抑制がみられたが、マダニ細胞では抑制を受けていないことが明らかになり、新たな機序の可能性が示唆された。

#### ・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 (研究分担者 林 哲也)

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。本年度は、①オリエンチア Ikeda 株と Boryong 株の全ゲノム配列比較解析の結果に基づいて昨年度までに確立した Multi Locus Sequence (MLS) 解析法を用いたオリエンチア新規分離株（池間島でのフィールド調査で分離された菌株）の系統解析、②日本紅斑熱リケッチアおよび新興リケッチアのゲノム配列決定と近縁菌種・菌株とのゲノム比較解析を中心に研究を進めた。その結果、池間島に棲息するオリエンチア菌株は本州で分離される主要系統とは異なる進化系統に属すること、さらに異なった 56KDa Type specific antigen (TSA) を有する 3 種の近縁クローンが混在していることを明らかにした。また、日本紅斑熱リケッチア *R. japonica* YH 株および新興リケッチアである *R. heilonjiangensis* Sendai-29 株の全ゲノム配列を決定し、さらに日本紅斑熱リケッチア MZ08014 株の概要配列を得た。*Rickettsia* sp. LON type 90 株

については、現在配列解析中であり、本年度内には概要配列が得られる見通しである。

## 5. 予防・啓発的研究

### ・リケッチア症ハイリスク地域における住民等への啓発のモデル化

(研究分担者 岡部信彦)

これまでに実施した医療関係者や一般市民に対するリケッチアサーベイランスやリケッチア感染症についての認知・認識調査の結果から、積極的な啓発活動により感染症に対する認知度は確実に浸透していくことが明らかになった。しかしながら、一部のリケッチア症多発地域では、風評被害等を考慮し、周知活動をほとんど行っていないことがわかった。そこで、本年度は、リケッチア感染症を一部地域に限った風土病ではなく、全国的に患者発生のある疾患であることをアピールし、各地方自治体等での啓発活動に利用しやすいツールとして、本リケッチア研究班を中心とした啓発用ホームページ(HP)を作製することとした。一般市民に親しみ易くわかりやすいように、動的コンテンツを多用し、Flash ベースのHPを作製した。また、アンケートを組み込み、理解度等を調査した。また、Google analytics™を用いてアクセス解析を行い、実際の広報活動が適切に行えているかを解析した。

その結果、アンケート内容や、HP アクセス解析によって、全国各地の幅広い年齢層にリケッチア感染症を啓発できたことが推測された。平成24年1月20日現在約7705のアクセスがあり、9割が新規であった)。今後もHPによる啓発の継続と、さらに専門家に対する啓発HPの追加も検討すべきと考える。

## 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、疫学的研究、臨床的研究、検査・診断的研究、基礎的研究、予防・啓発的研究の5本柱で、3年間にわたり統合的に有機的に進めてきた結果、多くの成果を残すことができた。しかしながら、それぞれの領域で残された課題も多く存在する。たとえば疫学的研究については、古典型つつが虫病の再出現や、新たに明らかとなった南方型つつが虫病に対する実態把握とリスク対応、また各地で急増している日本紅斑熱と、新たな紅斑熱リケッチア症、輸入リケッチア症への具体的な対策の検討。臨床的検討では、日本紅斑熱による電撃性紫斑病はじめ重症例への対応を多施設検討によりさらに重点的に検討し、治療薬の保険適応化に向けた情報の蓄積を必要とする。検査・診断的研究では、恒久的リケッチア実験室診断体制の構築のため、必要な要件を洗い出し、優先度の高い項目についての強化の方法を検討し、実施する。レファレンス体制の維持に必要な情報を整理し、バイオリソースとしてのリケッチアのバンク構築をすすめる。基礎的研究としては、動物実験系、細胞実験系の確立をさらに進め、病原性の解析の基盤の充実を図る。予防・啓発的研究として、作成したHPの活用に加えて、より専門的なリケッチア関連情報を医療関係者向けに作成する。等、以上のように、今後に残された課題も多い。今後は、本研究班の成果を、国立感染症研究所、地方衛生研究所、関連研究機関とのネットワークにおいて生かしつつ、さらなる研究の継続、進展を目指すことで、国民の保健・医療・福祉の向上、



健康維持に貢献できると考えている。

## F. 健康危機情報

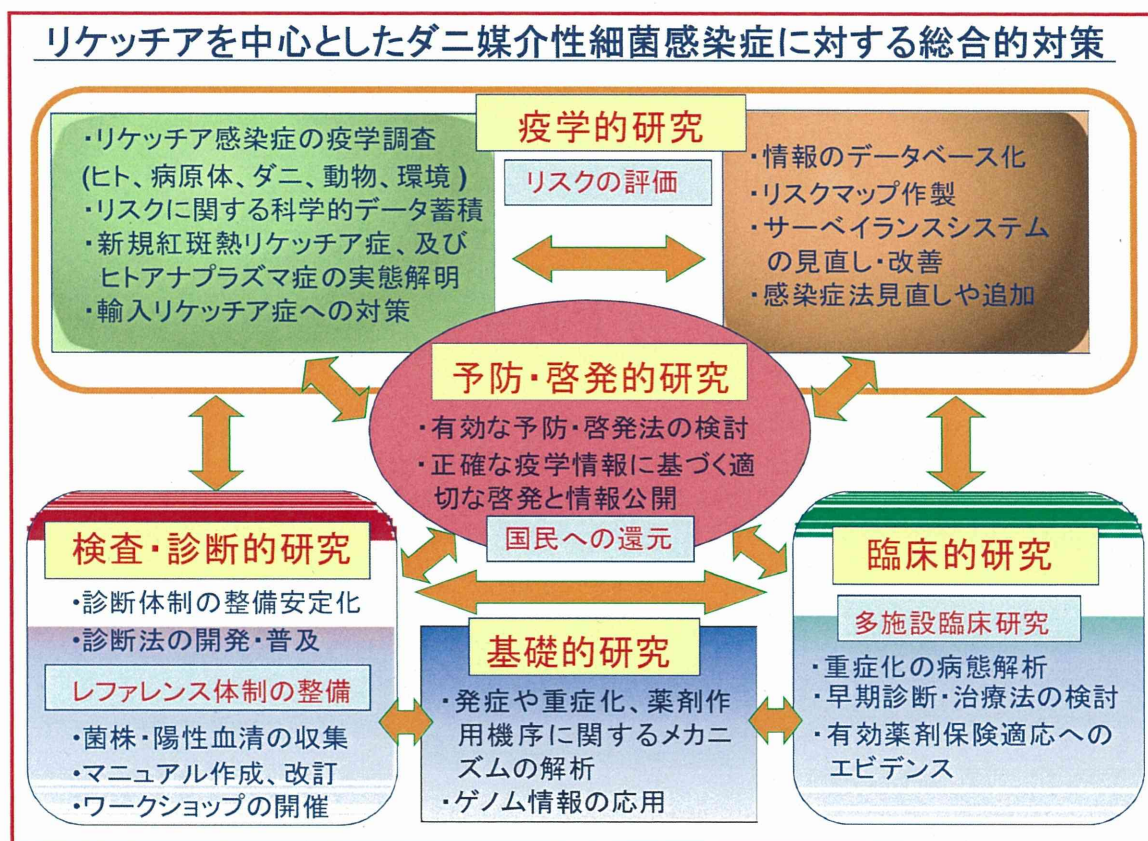
なし

## 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

該当なし



## II 分担研究報告書