

れは従来言われているアカネズミが山地を好むこととも一致するが、実際には好適環境とは思われない河川敷で生息密度が非常に高い地点がいくつか見られる。この理由は今回の調査結果からは明らかではないが、断片化した環境下では高密度化が生じる例などが報告されている。したがって、マダニ類の多い山地に近接する地域で繁殖によってアカネズミの生息密度が極端に高くなった時に生息地周辺の人の生活圏にマダニ類及びリケッチアを浸潤させている可能性が疑われる。またネズミ類の中でアカネズミの抗体価は陽性率、中央値ともに非常に高く、リケッチアの維持やマダニ類の重要な吸血源になっていることは明らかである。アカネズミが日本紅斑熱のリザーバーとしての機能を持たず、また、マダニ類の運搬に関与していないとしても、優占種であるアカネズミの個体数の変動幅の大きさは少なくともマダニの個体数の増減や個体群維持に強く影響を及ぼしている可能性は高いと思われる。アカネズミの個体数の増減が翌年の日本紅斑熱患者の発生数に係わっている可能性もあるだろう。新たな感染地域の出現やその変遷を時系列で追うことが日本紅斑熱の発生メカニズムの解明や今後のリスク管理に有用と思われるため、ベクターやホストの生息調査を含めた生態調査を今後も継続していく必要がある。

E. 結論

今回の調査では小型哺乳類とマダニ類の遺伝子検索の結果 *R. japonica* は検出されなかったが、ネズミ類からは高い抗体価が認められた。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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 小林秀司・中本 敦・清水慶子・高田歩・森脇正巳, 岡山県における野生アライグマの初捕獲とその外部寄生性ダニ類および発撮影記録. *Naturalistae* 16: 83-90, 2012. (印刷中)

2. 学会発表

- 1) 木田浩司・中本 敦・葛谷光隆・濱野雅子・藤井理津志・岸本壽男・城ヶ原貴道・小林秀司: 岡山県に生息するヌートリア及び付着マダニにおけるリケッチア保有状況. 第3回リケッチア臨床研究会・第17回リケッチア研究会合同研究発表会. 大津. 2011年1月.
- 2) 木田浩司・中本 敦・葛谷光隆・濱野雅子・藤井理津志・岸本壽男・城ヶ原貴道・小林秀司: 岡山県のヌートリアにおけるリケッチア保有状況調査. 日本衛生動物学会. 東京. 2011年4月.
- 3) 中本 敦・木田浩司・森光亮太・小林秀司・岸本壽男: ダニ媒介性感染症のリスク評価に対する小型齧歯類の生態学的研究からのアプローチ (予報). 日本動物学会・日本植物学会・日本生態学会 生物系三学会 中四国支部大会 (香川大会). 高松. 2011年5月.
- 4) 木田浩司・中本 敦・溝口嘉範・葛谷光隆・濱野雅子・藤井理津志・岸本壽男・福士秀人・大屋賢司・松本千聖・猪熊 壽: ウシにおける Q 熱コクシエラ感染実態. 岡山県獣医公衆衛生学会 2011 年度大会.

岡山. 2011年8月.

- 5) 中本 敦・木田浩司・森光亮太・小林秀司・岸本壽男：ダニ媒介性感染症のリスク評価への小型哺乳類の生態学的研究からのアプローチ. 日本哺乳類学会 2011 年度大会. 宮崎. 2011 年 9 月.
- 6) 伊東拓也・高田伸弘・藤田博己・川端寛樹・中本 敦・赤松達矢・安藤秀二・大久保(佐藤) 梢・高野 愛・小笠原由美子：礼文島におけるマダニ類及びダニ媒介性病原体の調査. 第 57 回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会北日本支部合同大会. 山形. 2011 年 10 月.
- 7) 高田 歩・小林秀司・都志見有希・森光亮太・城ヶ原貴通・中本 敦・貸谷康宏・河東重光・三枝道生・木田浩司・岸本壽男：岡山県産ヌートリアに見られたマダニ類. 第 66 回日本衛生動物学会西日本支部大会. 金沢. 2011 年 10 月.
- 8) 高田伸弘・川端寛樹・高橋 守・中本 敦：中部山岳乗鞍高原のクビワコウモリのコロニーに見出されたコウモリマルヒメダニの概況. 第 66 回日本衛生動物学会西日本支部大会. 金沢. 2011 年 10 月.
- 9) 中本 敦・木田浩司・森光亮太・小林秀司・岸本壽男：日本紅斑熱のリスク評価へのアカネズミの生態学的研究からのアプローチ. 第 66 回日本衛生動物学会西日本支部大会. 金沢. 2011 年 10 月.
- 10) 高田伸弘・川端寛樹・高橋 守・中本 敦：乗鞍のコウモリとマルヒメダニ. 第 19 回ダニと疾患のインターフェイスに関するセミナー-SADI つつがの里大会 2011. 広島. 2011 年 11 月.
- 11) 中本 敦・木田浩司・森光亮太・小林秀司・岸本壽男：小型哺乳類の生態学的研究からの日本紅斑熱のリスク評価へのアプローチ. 第 19 回ダニと疾患のインターフェイスに関するセミナー-SADI つつがの里大会 2011. 広島. 2011 年 11 月.
- 12) 高田 歩・織田銑一・清水慶子・城ヶ原貴通・中本 敦・森光亮太・大島有理・木田浩司・岸本壽男・小林秀司：中国地方 2 例のツキノワグマに見られたマダニ類. 第 19 回ダニと疾患のインターフェイスに関するセミナー-SADI つつがの里大会 2011. 広島. 2011 年 11 月.
- 13) 中本 敦・木田浩司・森光亮太・小林秀司・岸本壽男：岡山県内の小型齧歯類におけるリケッチア侵淫調査. 第 4 回日本リケッチア症臨床研究会・第 18 回リケッチア研究会合同研究発表会. 2012 年 2 月.
- 14) 木田浩司・中本 敦・岸本壽男ほか：2011 年 5 月に赤磐市で発生した日本紅斑熱の感染源調査. 第 4 回日本リケッチア症臨床研究会・第 18 回リケッチア研究会合同研究発表会. 2012 年 2 月.

G. 知的財産権の出願・登録状況

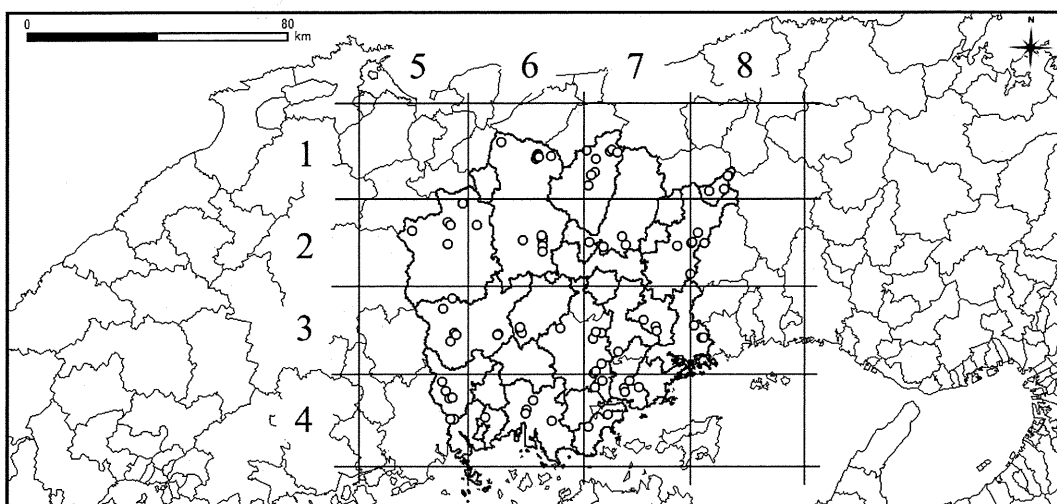


図1 調査地 白抜きの丸は調査地点を示す。1から8までの数字はメッシュの行と列を示す。

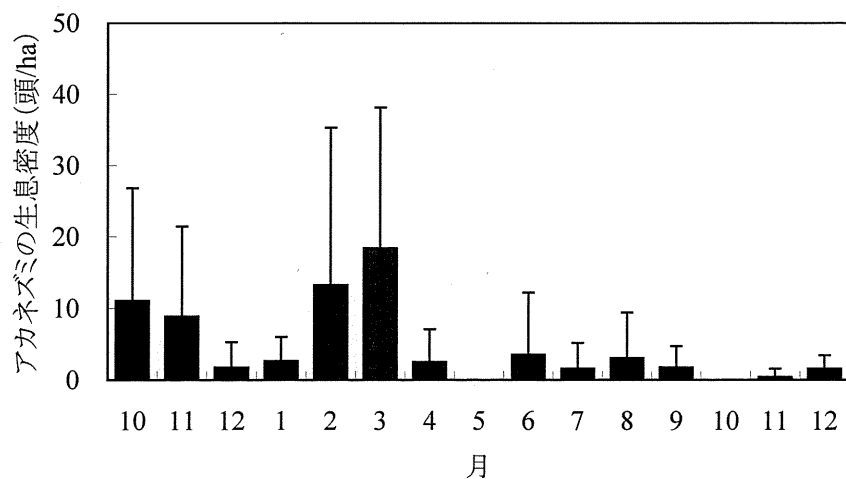


図2 アカネズミの生息密度の月変化.

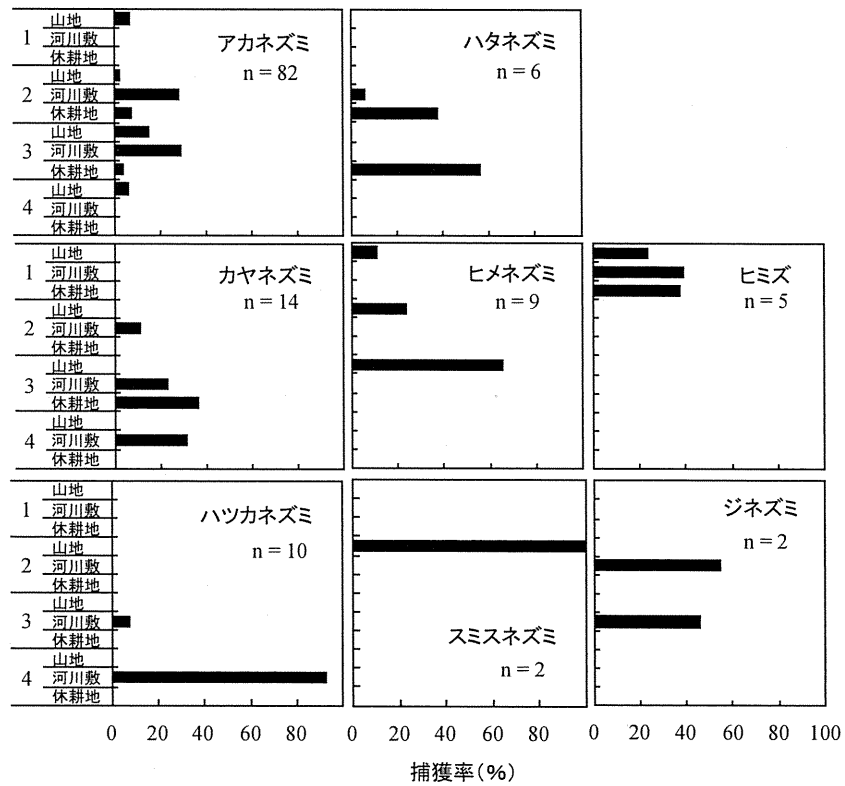


図3 捕獲場所と捕獲環境ごとの小型哺乳類の相対捕獲率. 1~4は図1のメッシュラインに対応する。

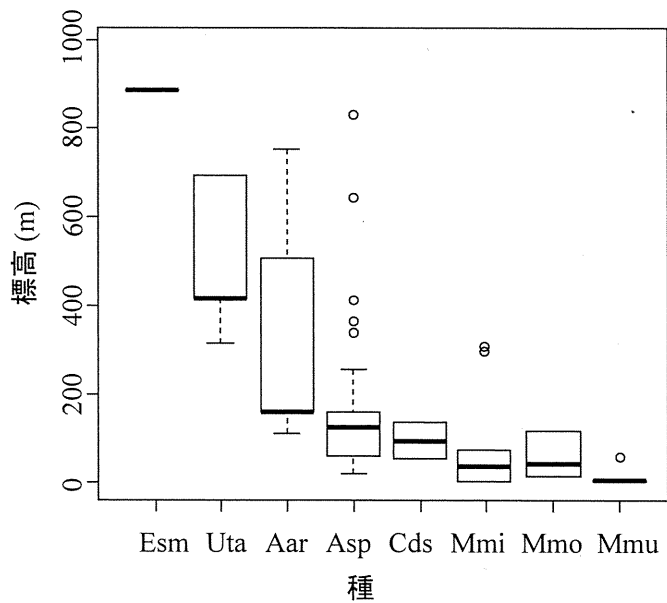


図4 小型哺乳類の捕獲場所の標高. Esm: スミスネズミ, Uta: ヒミズ, Aar: ヒメネズミ, Asp: アカネズミ, Cds: ジネズミ, Mmi: カヤネズミ, Mmo: ハタネズミ, Mmu: ハツカネズミ.

表1 小型哺乳類における外部寄生虫の付着率

種	マダニ類		ツツガムシ類	
	n	付着率(%)	n	付着率(%)
ジネズミ	0	-	1	0.0
ヒミズ	4	50.0	4	0.0
スミスネズミ	2	100.0	2	100.0
ハタネズミ	6	0.0	6	33.3
カヤネズミ	12	0.0	14	28.6
ヒメネズミ	9	11.1	9	44.4
アカネズミ	67	9.0	80	66.3
ハツカネズミ	10	10.0	10	0.0

表2 マダニ種の季節的消長. L: 幼虫, N: 若虫, F: 成虫メス, M: 成虫オス.

種	ステージ	月												計		
		11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		11	12
キチマダニ	L		11	55								5	255	565	7	898
<i>Haemaphysalis flava</i>	N	3	22	12	4	21	2	15	2	5	2	4	20	5	4	121
	F		1		1	3										6
	M		1			3	1	1					2	1	4	13
タカサゴチマダニ	L															0
<i>Haemaphysalis formosensis</i>	N		1													1
	F															0
	M															0
ヤマアラシチマダニ	L															0
<i>Haemaphysalis hystricis</i>	N								1							1
	F															0
	M															0
ヒゲナガチマダニ	L										3					3
<i>Haemaphysalis kitaokai</i>	N														1	1
	F					1			1						1	1
	M					1									1	1
フタトゲチマダニ	L	1								26	72	14	8	1		122
<i>Haemaphysalis longicornis</i>	N							1	5	3	1					10
	F							1	2	1						4
	M															0
オオトゲチマダニ	L			2		1			91		28			9	53	184
<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	N			5		3			47		1			205	6	267
	F					1								3		4
	M					1								2		3
タネガタマダニ	L															0
<i>Ixodes nipponensis</i>	N							2								2
	F															0
	M															0
ヤマトマダニ	L															0
<i>Ixodes ovatus</i>	N															0
	F									1						1
	M															0
アカコッコマダニ	L			20	70	39	1									130
<i>Ixodes turdus</i>	N			1	1	3		1								6
	F															0
	M															0
計		4	36	95	76	77	4	21	150	35	112	273	595	235	70	1783

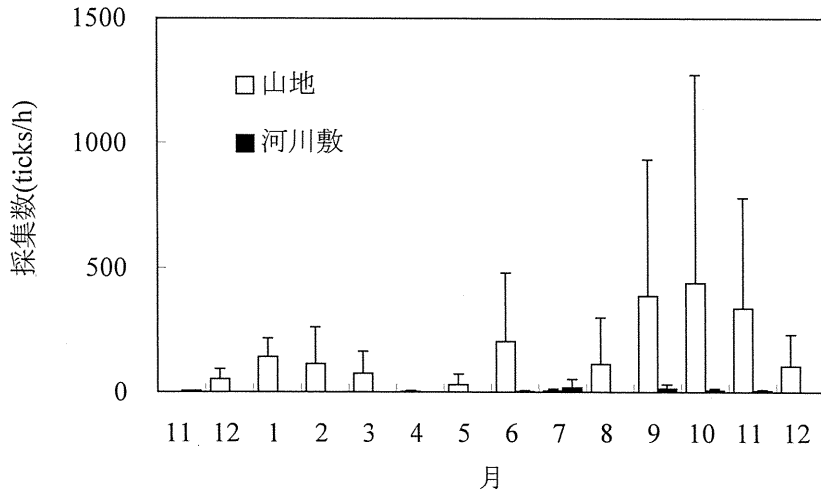


図5. 山地と河川敷におけるマダニ類の採集数の季節変化. エラーバーは標準偏差を示す。

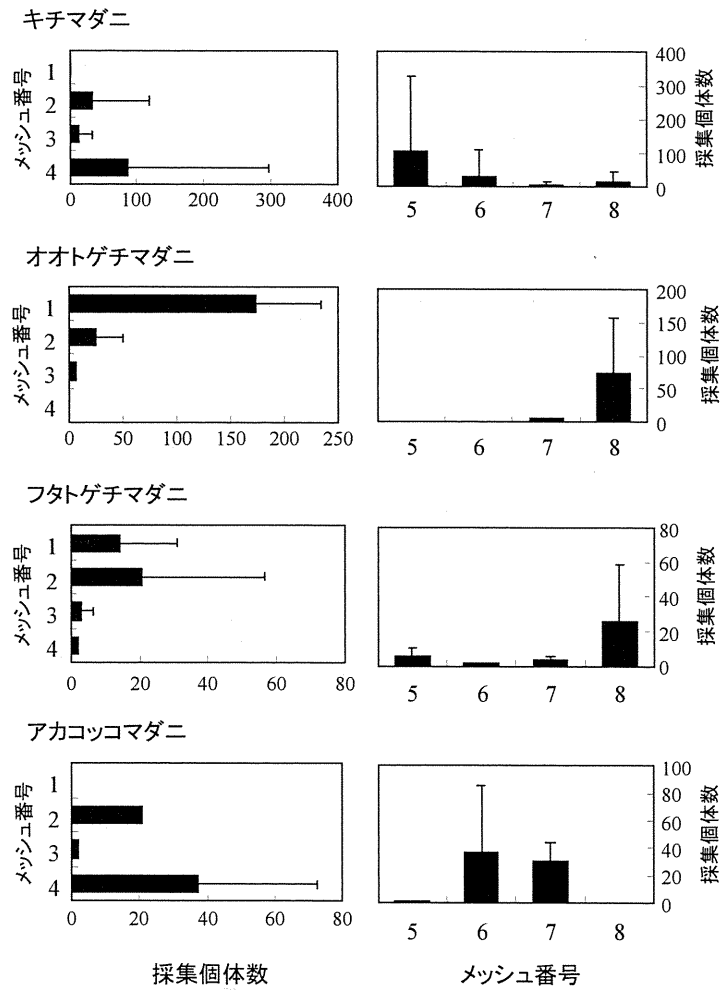


図6. 各メッシュラインにおけるマダニ類の平均個体数. エラーバーは標準偏差を示す。

表3 各種抗原に対する陽性率(%) (80倍以上)

	n	Rj	Rhe	Ra	Rt	Rho
アカネズミ	53	94.3	96.2	98.1	94.3	98.1
カヤネズミ	7	14.3	14.3	14.3	14.3	14.3
スミスネズミ	2	50.0	50.0	50.0	0.0	50.0
ハタネズミ	6	33.3	33.3	33.3	33.3	33.3
ハツカネズミ	5	60.0	60.0	60.0	60.0	80.0
ヒメネズミ	7	0.0	80.0	100.0	0.0	20.0

表4 各種抗原に対する抗体価の中央値

	n	Rj	Rhe	Ra	Rt	Rho
アカネズミ	53	1280	1280	1280	1280	2560
カヤネズミ	7	0	0	0	0	0
スミスネズミ	2	40	40	40	20	100
ハタネズミ	6	20	20	20	20	40
ハツカネズミ	5	80	80	80	80	160
ヒメネズミ	7	20	80	320	20	20

表5 *Rickettsia japonica* に対するアカネズミの抗体価の中央値

	n	Rj
成獣	39	1280
亜成獣	14	320

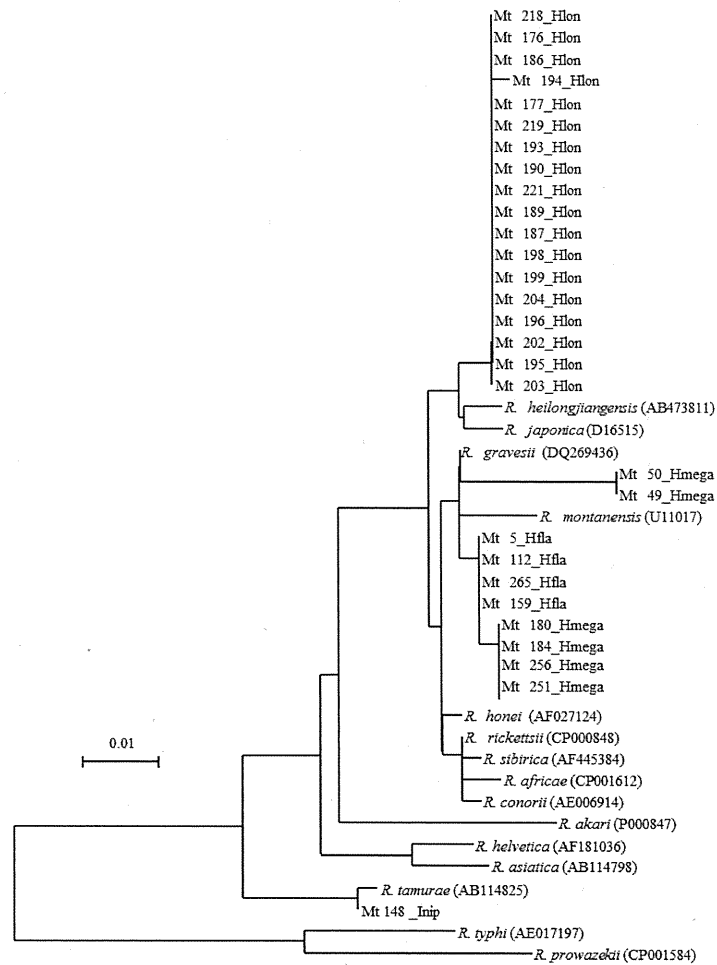


図7 マダニから検出されたリケッチアの系統樹

マダニから検出したリケッチア遺伝子の17kDa領域394塩基について、近隣結合法による系統解析を実施した。ブートストラップ反復は1,000回行った。アンダーバーの後にマダニ種を示した(Hfla : *H. flava*, Hlon : *H. longicornis*, Hmega : *H. megaspinosa*, Inip : *I. nipponensis*)。既知株の塩基配列のAccession No.を括弧内に示した。なお、遺伝的距離(サイトあたりの塩基期待置換数)をスケールバーで示した。

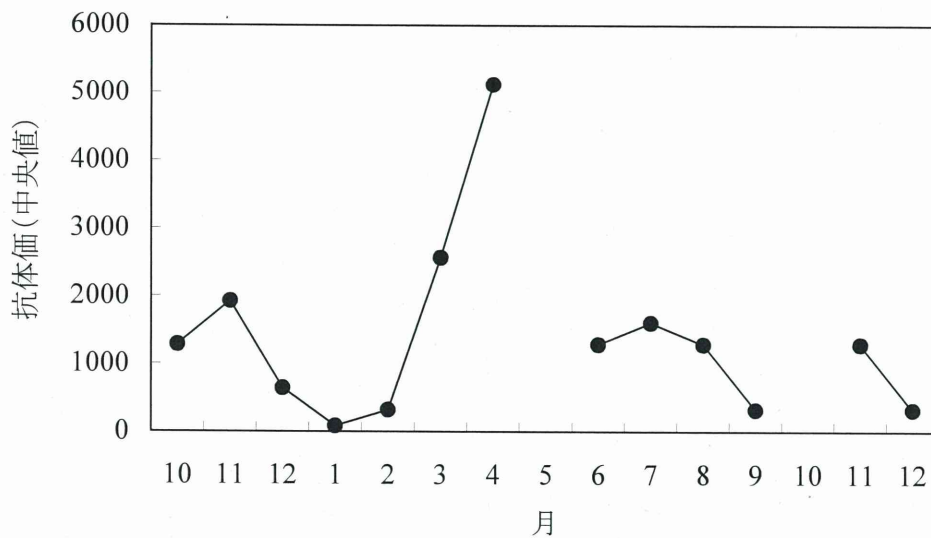


図 8. *Rickettsia japonica* に対するアカネズミの抗体価 (median) の月変化

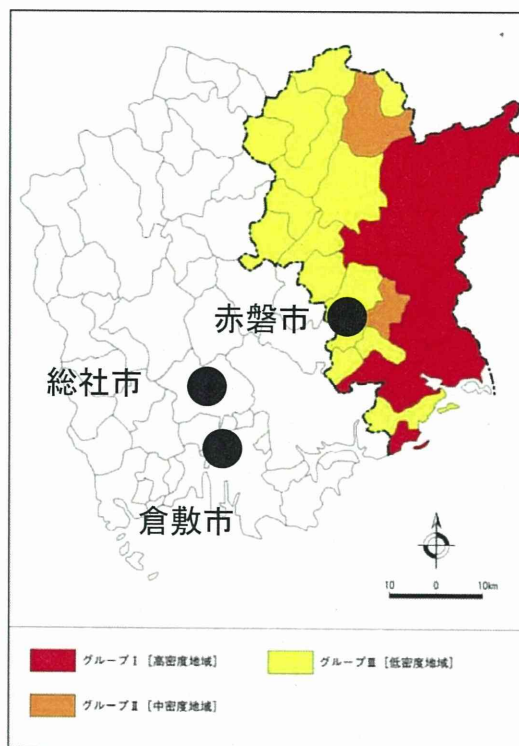


図 9 岡山県におけるニホンジカの分布図 (岡山県 平成 19 年第 2 期ニホンジカ保護管理計画書より改変) 黒丸は日本紅斑熱の患者が発生した市町村を示す。(市町村の境界は合併前のものを表しているが、患者の発生位置は現在の市町村区分のおおよその中心に表示)

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	保健科学部	研究員
研究代表者	岸本壽男	岡山県環境保健センター		所長
研究協力者	中本 敦	岡山県環境保健センター	保健科学部	リサーチレジデント
	溝口嘉範	同		研究員
	葛谷光隆	同		専門研究員
	濱野雅子	同		専門研究員
	藤井理津志	同		部長
	矢端順子	山口県環境保健センター		専門研究員
	亀山光博	同		研究員
	富田正章	同	保健科学部	副部長
	島津幸枝	広島県立総合技術研究所保健環境センター		主任研究員
	高田伸広	福井大学医学部		シニアフェロー(分担研究者)
	矢野泰弘	福井大学医学部		助教
	及川陽三郎	金沢医科大学		助教

研究要旨 日本紅斑熱は、紅斑熱群リケッチア (spotted fever group rickettsia : SFGR) に属する *Rickettsia japonica* を保有するマダニによって媒介される熱性発疹性疾患である。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、今回はその調査の詳細に加え、2011年5月に追加調査した結果について報告する。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。

A.研究目的

日本紅斑熱は 1984 年に発見された感染症であるが、近年、患者数は増加傾向にある。紅斑熱群リケッチア (spotted fever group rickettsia : SFGR) の一種 *Rickettsia japonica* を保有するマダニによって媒介される熱性発疹性疾患であり、西日本を中心に発生が報告されているが、その詳細は未だ明らかにされていない。治療が遅れると致死的な経過をとる症例も報告されており、病原体保有マダニの地理的分布と野生動物の関与についての解明が望まれている。2010 年 4 月、山口県で初めての日本紅斑熱患者が報告された。そこで、患者発生地域を中心に、野ネズミ及びマダニを捕獲し、*R. japonica* の感染源を特定することを目的に調査を行った。

B.研究方法

1) 野ネズミ及びマダニの捕獲

調査は 2010 年 7 月及び 2011 年 5 月に実施した。調査地点として、患者居住地含む半径 7 キロメートルの範囲で 4 地点を設定した。旗振り法によってマダニを捕獲し、形態観察によって種を同定した。また網式トラップを用いて野ネズミを捕獲し、形態観察によって種を同定した後、全血及び血清を採取した。

2) 病原体分離

捕獲した野ネズミの全血を L929 細胞 (マウス結合組織由来) に接種した。また、マダニの体表面を 1%イソジン加 70%アルコールで消毒・圧潰後、100 μ l のウシ胎児血清に浮遊した内臓浮遊液についても、同様

に L929 細胞に接種した。接種細胞を 14 日後に回収し、スライドグラスに冷アセトンで固定後、間接蛍光抗体法により、分離の有無を確認した。1 次抗体として milk diluent(KPL)で IgG 抗体価 40 に調整した患者血清を 37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた。0.05% tween20 加リン酸緩衝バッファー (PBS) で 5 分間 2 回洗浄後、0.001%エバンスブルー加 milk diluent で 20 倍希釈した FITC 標識抗ヒト IgG(Dako)を 37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた。PBS で 5 分間 2 回洗浄後、蛍光顕微鏡で観察した。

3) SFGR に関する血清疫学調査

野ネズミの血清抗体価を、6 種の SFGR (*R.japonica* HH-1 株、*R.helvetica* IM-1 株、*R.asiatica* IO-1 株、*R.tamurae* AT-1 株、*R.honei* GRA-1 株) を抗原とした間接蛍光抗体法で測定した。1 次抗体として milk diluent で 2 倍階段希釈した被検血清を 37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた。0.05% tween20 加リン酸緩衝バッファー (PBS) で 5 分間 2 回洗浄後、0.001% エバンスブルー加 milk diluent で 20 倍希釈した FITC 標識抗マウス Ig(Dako)を 37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた。PBS で 5 分間 2 回洗浄後、蛍光顕微鏡で観察した。

4) リケッチア遺伝子の検索

マダニの内臓浮遊液 50 μ l から、QIAamp DNA mini kit (Qiagen)を用いて DNA を抽出し、PCR によるリケッチア遺伝子検索を実施した。リケッチア属共通抗原である 17kDa 領域は、1 次増幅プライマーとして Anderson(1989) らの報告した R1=TCAATTCACAACCTTGCCATT 及び

R2= TTTACAAAATTCTAAAAACC を、2 次増幅プライマーとして Noda(1997)らの報告した Rr17.61p=GCTCTTGCAACTTCTATGTT 及び Rr17.492n=CATTGTTTCGTCAGGTTGGCG を使用した nested PCR によって検出した。遺伝子検索陽性検体については Applied Biosystems 3500 ジェネティックアナライザ (life technologies) を用い、ダイレクトシーケンス法によって遺伝子配列を決定した。また、Genetyx Ver. 10 (ゼネティックス) を用い、系統解析を実施した。

C. 研究結果

1) 捕獲された野ネズミ及びマダニ

野ネズミは 2011 年 5 月に 1 調査地点 (感染推定地) で 2 頭捕獲されたが、いずれもアカネズミであった。

マダニは 2010 年 7 月に 135 匹、2011 年 5 月の調査で 271 匹 (合計 406 匹) 捕獲された。捕獲したマダニの種類とその内訳を表 1 に示した。当該地域におけるマダニ類は、*Haemaphysalis longicornis* (フタトゲチマダニ) 297 匹が最も多く、次いで *H. flava* (キチマダニ) 91 匹、*H. formosensis* (タカサゴチマダニ) 13 匹、*H. hystricis* (ヤマアラシチマダニ) 4 匹及び *Ixodes turdus* (アカコッコマダニ) 1 匹であった。

2) 病原体分離

野ネズミ 2 頭の全血から L929 細胞を用いて病原体分離を試みたが、全て陰性であった。また、捕獲したマダニ 406 匹のうち、215 匹について病原体分離を試みたが、全て陰性であった。

2) SFGR に関する血清疫学調査

野ネズミの 6 種の SFGR に対する血清抗体価を表 2 に示した。6 種の SFGR に対し、1 頭は 320~640、もう 1 頭は 1280~2560 の血清抗体価を示し、SFGR の種による差はなかった。

3) マダニからのリケッチア遺伝子検索

捕獲したマダニ 406 匹のうち、215 匹について遺伝子検索を実施したが、*H. flava* のみ 4 匹が陽性となった。遺伝子配列による系統解析の結果を図 1 に示した。検出された遺伝子は、全て 100%の相同性を示した。

D. 考察

捕獲数の多かったフタトゲチマダニ及びキチマダニは、いずれも *R. japonica* の媒介種と言われている。また、現在まで、*I. turdus* からは *R. japonica* の遺伝子は検出されたものの、分離されたという報告は無いが、*H. hystricis* は主要な媒介種として知られている。2010 年と 2011 年の調査で、捕獲されたマダニ種にばらつきがみられたのは、1 年間でマダニ相が変化したか、または調査月が異なったためと考えられる。患者は 4 月中旬に病原体保有マダニに刺咬されたものと考えられ、季節的には 2011 年の調査結果が感染時期のマダニ相を推測する上で参考になる。感染推定地では特にフタトゲチマダニが多く捕獲されており、感染源となった可能性がある。しかしながら、今回の調査では *R. japonica* は検出されず、リケッチアの遺伝子が検出されたのはキチマダニのみであった。これらの遺伝子断片は全て 100%の相同性を示し、SFGR に

属すると考えられたが、既知種では無く、病原性の有無等については確認することができなかった。他の可能性として、感染地域には元来 *R.japonica* は存在せず、患者が刺咬された病原体保有マダニは他の地域から鳥類等に少数が運搬されたのみであったために本調査で検出できなかったことも考えられるが、推測の域を出ない。いずれにしても、調査を継続することで本県のリケッチア侵淫実体を解明する必要があると考えられた。

E.結論

本調査では *R.japonica* は検出されなかった。しかし、感染推定地で捕獲した野ネズミが高い抗体価を示したことから、SFGR の侵淫が確認された。マダニ 4 匹から検出されたりケッチア遺伝子 17kDa 領域 394 塩基の相同性は 100%であり、同一種と考えられた。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。本調査では *R.japonica* の感染源を明らかにすることはできなかったが、患者は全国的に増加しており、今後も調査を継続して実体を解明する必要があると考えられた。

F.健康危険情報

特になし

G.研究発表

学会発表

特になし

論文発表

特になし

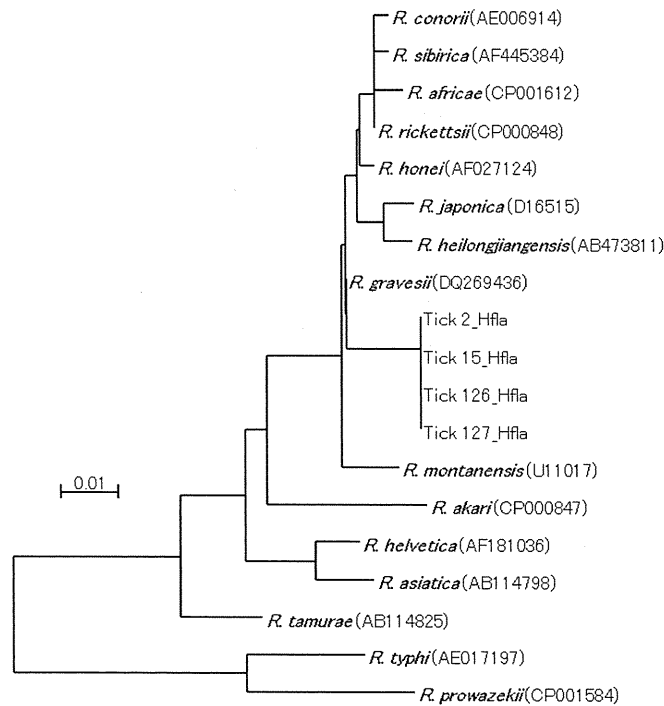


図1 マダニから検出されたリケッチアの系統樹

マダニから検出したリケッチア遺伝子の1.7kDa領域394塩基について、近隣結合法による系統解析を実施した。ブートストラップ反復は1,000回行った。アンダーバーの後にマダニ種を示した(Hfla: *H. flava*)。既知株の塩基配列のAccession No.を括弧内に示した。なお、遺伝的距離(サイトあたりの塩基期待置換数)をスケールバーで示した。

表1 山口県東部で捕集したマダニ

マダニ種	2010年	2011年	合計
<i>Haemaphysalis flava</i>	71	20	91
<i>Haemaphysalis hystricis</i>	2	2	4
<i>Haemaphysalis longicornis</i>	61	236	297
<i>Haemaphysalis formosensis</i>	1	12	13
<i>Ixodes turdus</i>	0	1	1
合計	135	271	406

表2 野ネズミの血清抗体価

種類	抗原				
	<i>R.japonica</i>	<i>R.helvetica</i>	<i>R.asiatica</i>	<i>R.tamurae</i>	<i>R.honei</i>
抗体価					
アカネズミ	320	320	320	320	640
アカネズミ	1280	1280	1280	1280	2560

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	(福井大学医学部 教授)
研究協力者	高田伸弘	(福井大学医学部 シニアフェロー)
	田居克規	(福井大学医学部 大学院生)
	池ヶ谷諭史	(福井大学医学部 助教)
	上田孝典	(福井大学医学部 教授)

研究要旨

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- α , IL-6, IFN- γ , IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , 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 κ B α のリン酸化の抑制が、TNF- α 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。

A. 研究目的

国内発症リケッチア感染症において、公表されていない潜在例や、確定診断に至らない死亡例を含めると実際の重症例は未知数である。しかし、近年重症例や死亡例がしばしば報告されるようになった。日本リケッチア症臨床研究会およびリケッチア研究会では、具体的な臨床症例を集積し、重症化の背景要因を検討している。さらにリケッチア敗血症にともなう全身性炎症反応症候群(systemic inflammatory response syndrome: SIRS)の制御が重症化回避のため、重要であることが示唆されてきた。本研究では SIRS の病態背景にある高サイトカイン血症の制御に係るテトラサイクリンの有効性、さらにニューキノロンの役割について、臨床的および基礎的に検討した。

B. 研究方法

1. つつが虫病と日本紅斑熱の臨床症例の比較

3年間の本研究で蓄積したつつが虫病32例と、日本紅斑熱21例の急性期の各種サイトカイン/ケモカイン(TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , eotaxin)を測定し比較した。

2. 2011年に経験された重症つつが虫病症例

福井県鯖江市にて、2011年9月に発症し確認された65歳、男性のギリアム型つつが虫病の重症例を経験した。本症例は当初、日本紅斑熱の可能性も示唆され、単独では有効性を示さなかったミノサイクリンに加え、シプロフロキサシンを追加投与し救命し得た。本症例の全臨床経過を調査するとともに、血中サイトカインの濃度を測定した。

3. THP-1細胞を用いたテトラサイクリンおよびニューキノロンのサイトカイン

ン産生に及ぼす影響

対数増殖期にあるヒト単球系 THP-1 細胞を用いて検討した。細胞数を 2×10^5 /ml に調整し、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)由来 LPS (5 or 10 μ g/ml)またはプロテウス(*Proteus vulgaris*)由来 LPS: OX-2 (100 μ g/ml)により刺激し、抗菌剤 (minocycline: MINO, doxycycline: DOXY, ciprofloxacin: CPFX, ofloxacin: OFLX) 10~50 μ g/ml をそれぞれ添加後、4hr 培養によるサイトカイン産生修飾について検討した。さらに TNF- α 産生に関与する細胞内シグナル伝達経路において、抗菌剤の修飾作用点を明らかにするために、1hr 培養による細胞内リン酸化蛋白量を測定した。サイトカインおよびリン酸化蛋白の測定は、ELISA (Cytoscreen, USA)または、multiplex suspension array (Bio-Rad, UK)を用いた。さらに、リン酸化蛋白は Western blot 法を用いて定性評価を加えた。対象としたサイトカイン/ケモカインとして、TNF- α , IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES を測定した。リン酸化蛋白は、p38, extracellular signal-regulated kinase (Erk)/ mitogen-activated protein (MAP) kinase 1/2, c-Jun N-terminal kinase (JNK), inducer of NF- κ B (I κ B) α を測定した。

4. 統計

群間の比較は student *t* test を用い、 $p < 0.05$ を有意差有りとした。

5. 倫理面への配慮

本件研究における倫理に関する条件は、福井大学倫理委員会により承認されている。

承認番号：倫審 21 第 4 号(平成 21 年 7 月 2 日)

課題名：リケッチア感染症における病態ならびに重症化機序解明に関する研究

申請者：岩崎博道

C. 研究結果

1. リケッチア症における急性期の血中サイトカイン/ケモカイン

急性期に測定した各種サイトカイン/ケモカイン(TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , eotaxin)において、eotaxin を除いて、すべて有意に日本紅斑熱がつつが虫病より高値を呈した。これまでの検討よりつつが虫病に比較し、日本紅斑熱の方が重症化しやすいことに符合した(Table 1)。

2. DIC を合併し、テトラサイクリンおよびニューキノロンの併用により救命し得たつつが虫病症例

本症例は2011年8月中旬より古墳の発掘作業に従事し、9月8日より38°C以上の発熱が出現した。9月14日入院時にWBC 4,400/ μ l、RBC 374万/ μ l、Hb 11.6 g/dl、PLT 4.1万/ μ l、AST 164 IU/l、ALT 80 IU/l、LDH 584 IU/l、CRP 18.3mg/dl、フェリチン 7,496 ng/dl、FDP 88.4 mg/dlであった。重症度スコア (J Clin Microbiol 1997, Iwasaki et al.)を用いると、血小板数減少2ポイント、FDP上昇(DIC所見)1ポイント、肝障害2ポイント、合計5ポイントを呈していた。急性期における血中サイトカイン/ケモカインは、TNF- α 、IL12-p40、MIP-1 α 、IP-10、IFN- γ 、IL-10いずれも高値を示した(Table 2)。入院第3病日に臀部に刺し口と思われる皮膚病変を確認したため直ちにMINOに変更。DICに対してトロンボモジュリン製剤の投与、血球貪食の所見に対してステロイドパルスを経験した。併用投与後、症状・所見ともに徐々に改善傾向を認め、DIC所見、血球減少、肝機能障害も改善し第22病日に退院となった。刺し口発見と同時に提出した抗体検査では、ギリアム型のIgM抗体がx640と高値を示していた。2週間後の検査では同型の

IgMのさらなる増加およびIgG抗体の出現も認め診断が確定した。

一般的につつが虫病ではテトラサイクリンが著効するが、本症例ではMINOに加えCPFXの追加投与を要した。日本紅斑熱も疑ったの抗菌剤の選択であったが、つつが虫病であっても重症例では、ニューキノロンの併用も考慮すべきことが示唆される症例であった。

3. 抗菌剤によるヒト単球系細胞におけるサイトカイン/ケモカイン産生修飾

緑膿菌由来LPS 5~10 μ g/mlまたはプロテウス(OX-2)由来LPS 100 μ g/mlにより刺激したTHP-1細胞はTNF- α を産生し、細胞上清に放出する。その上清中のTNF- α をELISAにて経時的に測定すると、ピークは3~4hr後に迎える(data not shown)。MINO、DOXおよびCPFXのいずれを用いても、濃度依存的にTNF- α 産生抑制を示した。しかしOFLXはTNF- α 産生に影響を及ぼさなかった(Fig. 1)。また、MINOとCPFXの同時添加における様々なサイトカイン/ケモカインの産生抑制を検討した結果、単剤と比較して、さらなる抑制が認められた(Fig. 2)。

multiplex suspension arrayおよびWestern blot法を用いたMINOによる細胞内シグナル伝達経路に及ぼす検討(緑膿菌由来LPSおよびMINO添加)では、I κ B α のリン酸化においてのみ有意な抑制が確認された(Fig. 3,4)。

D. 考察

国内発症の日本紅斑熱はつつが虫病に比較し重症化する例が多いことが指摘されてきた。急性期の多種の血中サイトカイン/ケモカイン濃度が有意に、日本紅斑熱においてつつが虫病より高値を呈していた。一部のサイトカイン(IL-6)では10倍程度に達していた。このことが日本紅斑熱の高頻度の重症化に関連することが推測された。

福井県における重症つつが虫病症例において、テトラサイクリンに加えニューキノロンの投与が必要とされ、結果的に救命できた症例を経験した。本症例では日本紅斑熱の可能性を考慮し、テトラサイクリン単独投与開始3日後にニューキノロンを追加したが、このことが救命に繋がった可能性がある。我が国ではリケッチア症を疑った場合、診断が確定するまでは、テトラサイクリンとニューキノロンを併用することも必要なのかもしれない。もし後に、つつが虫病の診断が確定すれば、テトラサイクリン単独治療に de-escalation することも考慮できる。今後の詳細な臨床例の蓄積が待たれる。

培養細胞を用いた基礎的実験研究の結果から、TNF- α 産生が CPFX により抑制されることが示されたが、OFLX は抑制しなかった。リケッチア症におけるニューキノロンの併用の際に CPFX を選択した場合、より強力なサイトカイン産生抑制を促す可能性が示唆された。経験的に、日本紅斑熱で OFLX を併用した症例でも有効性が得られた臨床例の報告もあり、薬剤の選択は今後の検討課題であると考ええる。過去に宮村らにより、ニューキノロンが *R. japonica* (片山株) に対し抗リケッチア作用を有し、*O. tsutsugamushi* (Glliam 株) には同作用を示し得ないことが報告されている (Chemotherapy 39: 258-259, 1991)。日本紅斑熱において、ニューキノロンのリケッチア症に対する直接的作用が、有効性増強の面から意義があるのかもしれない。他のサイトカイン/ケモカイン(IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES)にも、テトラサイクリンとニューキノロンの併用が、産生抑制増強を示すことが multiplex suspension array により明らかとなった。細胞内シグナル伝達経路において、MINO による I κ B α のリン酸化の抑制が、TNF- α 産生制御に係っていることが推測された。

E. 結論

未だにリケッチア症に罹患して死亡する症例が存在する。日本紅斑熱において重症化の頻度はつつが虫病より高いことが知られるが、臨床的にテトラサイクリンとニューキノロンの併用治療により、救命された症例が報告されつつある。我が国に発生するリケッチア症において、重症化のメカニズム解明、さらに重症化を回避するための治療法の確立はそれぞれ大きな課題である。今後、さらに多くの症例を解析し、この点を明らかにしていく必要がある。

F. 今後の展開

日本紅斑熱は我が国固有の疾患であり、疾患の病態解明は我が国に課せられた重要な研究課題であると考ええる。

G. 健康危険情報

日本紅斑熱発症の全国的な広がりを受け、国民に対し本疾患の存在を周知し、注意を喚起する必要がある。さらに、一部のつつが虫病において、テトラサイクリン単独では有効性を示し得ない症例が存在することも、医療者に周知する必要がある。

H. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 岩崎博道、高田伸弘、上田孝典、池ヶ谷論史. 国内発生新興リケッチア症における重症患者の救命治療法開発. 明日への挑戦(福井大学重点研究成果集) 福井大学研究推進委員会 pp114-115, 2011,4.
- 2) Takagi K, Kawai Y, Yamauchi T, Iwasaki H, Ueda T. Synergistic effects of combination with fludarabine and carboplatin depend on fludarabine-mediated inhibition of enhanced nucleotide excision repair in leukemia. Int J Hematol 94: 378-389, 2011,10.

2. 学会発表

- 1) 高橋 守、三角仁子、亀田和成、藤田博己、角坂照貴、高田伸弘、平良勝也、山本正悟、安藤秀二、川端寛樹、北野智一、岡野 洋、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、岸本壽男. 宮古島のつつが虫病患者発生地に生息するカニ寄生ツツガムシ. 第 63 回日本衛生動物学会大会. 2011, 4.
- 2) 岩崎博道、玉置幸子、高田伸弘、矢野泰弘、田居克則、池ヶ谷諭史、高木和貴、稲井邦博、上田孝典. Kawasaki 型つつが虫病症例の急性期血中サイトカイン濃度と重症度. 第 85 回日本感染症学会総会. 2011, 4.
- 3) 池ヶ谷諭史、田居克則、高木和貴、山内高弘、岩崎博道、上田孝典. PK-PD 理論導入前後での FN に対する治療効果の比較. 第 85 回日本感染症学会総会. 2011, 4.
- 4) 田居克規、岩崎博道、池ヶ谷諭史、上田孝典. 抗菌薬によるサイトカイン産生修飾作用の検討. 第 85 回日本感染症学会総会. 2011, 4.
- 5) 岩崎博道. 耐性菌と院内感染. 福井県内科医会学術講演会. 2011, 6.
- 6) 田居克則、岩崎博道、池ヶ谷諭史、高木和貴、上田孝典. 抗菌薬によるサイトカイン産生修飾作用を介したリケッチア感染症の生体防御. 第 59 回日本化学療法学会総会. 2011, 6.
- 7) 池ヶ谷諭史、田居克則、根来英樹、高木和貴、浦崎芳正、岩崎博道、上田孝典. 血液疾患に合併した MEPM 3g の効果. 第 59 回日本化学療法学会総会. 2011, 6.
- 8) 岩崎博道. 感染症と免疫応答. 平成 23 年度第 1 回徳島県医師会感染症講演会. 2011, 7.
- 9) 岩崎博道. 発熱性好中球減少症. 抗菌化学療法・感染制御専門領域薬剤師研究会. 2011, 8.
- 10) Iwasaki H, Mahara F, Tai K, Ueda T. Cytokine modulation induced by anti-rickettsial antibiotics, tetracyclines and quinolones. EPS Modern Medical Forum 2011. 2011, 9.
- 11) Mahara F, Iwasaki H. Clinical Studies on Japanese spotted fever and other rickettsiosis in Japan. EPS Modern Medical Forum 2011. 2011, 9.
- 12) Ikegaya S, Lee S, Matsuda Y, Negoro E, Takagi T, Kishi S, Yamauchi T, Yoshida A, Urasaki Y, Iwasaki H, Ueda T. Clinical efficacy of meropenem 1.5g versus 3g per day as empirical therapy in febrile neutropenia. 73rd Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. 2011, 10.
- 13) Takagi K, Iwasaki H, Ikegaya S, Kishi S, Yamauchi T, Urasaki Y, Yoshida A, Ueda T. Retrospective study for efficacy of rhG-CSF prophylaxis to febrile neutropenia in lymphoma patients. 73rd Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. 2011, 10.
- 14) 岩崎博道. リケッチア症重症化に関する臨床的検討. 平成 23 年度岸本班班会議. 2011, 11.
- 15) 池ヶ谷諭史、田居克規、根来英樹、高木和貴、岸 慎治、山内高弘、浦崎芳正、岩崎博道、上田孝典. 血液疾患に合併した FN に対する TAZ/PIPC の効果. 第 54 回感染症学会中日本地方会学術集会・第 59 回日本化学療法学会西日本支部総会. 2011, 11.

I. 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

謝辞：つつが虫病の症例情報について、玉置幸子先生（医療法人洗人会・玉置病院）に、日本紅斑熱の症例情報について、田原研司先生（島根県・薬事衛生課）の協力を戴いた。

Table1 The difference in the serum cytokine/chemokine levels in acute phase between tsutsugamushi disease and Japanese spotted fever.

	Tsutsugamushi disease 32 patients Average \pm SD (pg/ml)	Japanese spotted fever 21 patients Average \pm SD (pg/ml)	T.TEST
TNF-α	13.78 \pm 13.37	36.43 \pm 27.69	P< 0.001
IL-6	11.64 \pm 17.17	146.25 \pm 351.77	P< 0.05
IFN-γ	73.38 \pm 78.12	221.33 \pm 222.48	P< 0.001
IL-8	13.20 \pm 10.50	126.94 \pm 260.90	P< 0.01
IP-10	3215.88 \pm 2786.12	12852.03 \pm 9665.07	P< 0.001
MCP-1	467.54 \pm 491.95	1510.64 \pm 1047.26	P< 0.001
MIP-1α	28.30 \pm 79.28	190.18 \pm 443.64	P< 0.05
MIP-1β	113.03 \pm 152.45	205.87 \pm 233.65	P< 0.05
eotaxin	67.10 \pm 31.69	71.59 \pm 42.26	n.s.

Table2 The concentrations of serum cytokine/chemokine levels during treatment of a case of severe tsutsugamushi disease in Fukui Prefecture.

(pg/ml)	急性期 (治療開始日)	第4病日	第15病日
TNF- α	21.3	3.9	1.8
IL12p40	265.6	50.5	154.5
MIP1- α	73.3	50.9	5.7
IP-10	447.1	445	442.4
IFN- γ	296.5	25.7	14.5
IL-10	45.1	6.1	1.0