

Takahashi, N., Kanda, T., Sugiyama, K., Masuda, T., Yoshikawa, Y., and Ohashi, N.: A survey of  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in farm animals and raw retail meat in Shizuoka prefecture, Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* **64**, 153-155 (2011)

- 5) Shinohara, M., Uchida, K., Shimada, S., Tomioka, K., Suzuki, N., Minegishi, T., Kawahashi, S., Yoshikawa, Y., and Ohashi, N.: Novel concentration method for detection of norovirus and sapovirus from water using minute particles of amorphous calcium phosphate. *J. Med. Microbiol.* **60**, 780-786 (2011)

## 2. 学会発表

- 1) Gaowa, Wuritu, Aochi M., Kawamori, F., Yoshikawa, Y., and Ohashi, N.: Molecular detection of *Rickettsiales* bacteria from ticks in western Japan., International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, Sep. 9 (2011)
- 2) Wuritu, Wu, D., Yoshikawa, Y., Furukawa, E., Murakami, T., Minato, C., Kawamori, F., Ohtake, M., Ohashi, M., and Ohashi, N.: Molecular epidemiological study of *Rickettsiales* bacteria in wild deer and mice in Shizuoka prefecture, Japan., International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, Sep. 9 (2011)
- 3) 高娃、烏日図、呉東興、古川英嗣、吉川悠子、川森文彦、大橋典男 : Human infection with *Anaplasma phagocytophilum* in Japan. 第94回日本細菌学会関東支部総会（東京）2011年10月6日
- 4) 呉東興、烏日図、高娃、川森文彦、吉川

悠子、大橋典男 : 静岡県野性シカが保有するリケッチア関連細菌群の解析. 第19回ダニと疾患のインタフェースに関するセミナー (SADI) つつがの里大会 (広島) 2011年11月5日

## F. 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



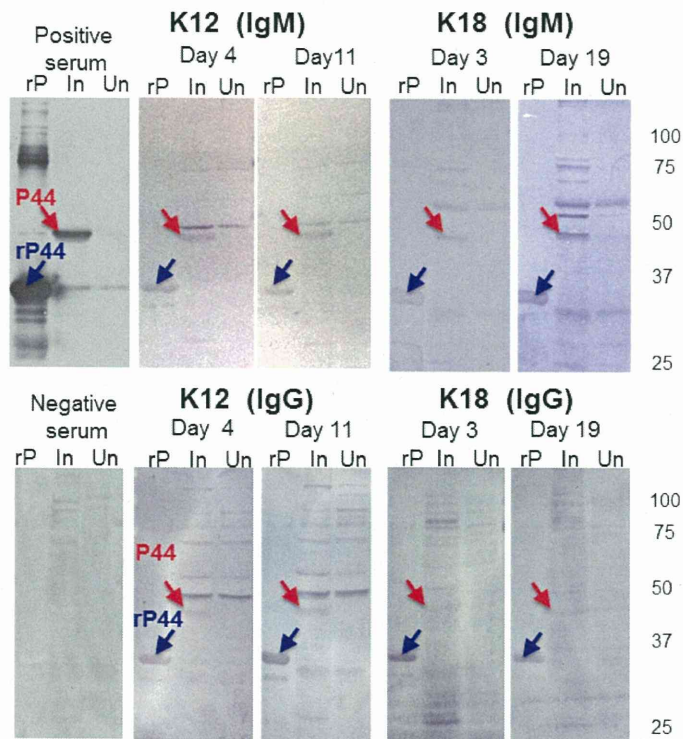


Fig. 1. Detection of *A. phagocytophilum* proteins by western blot analysis using sera from 2 patients in Kochi Prefecture. rP: recombinant P44-1 protein, In: *A. phagocytophilum*-infected THP-1 cells, Un: uninfected THP-1 cells. Primary sera used in this study were 500-fold diluted. Positive serum was prepared in rabbit by immunization with recombinant P44-1 protein. Patient serum with fever, but not human anaplasmosis, was used as a negative control.

Table 2. IFA titers of sera from 4 out of 9 patients with unknown fever in Shizuoka Prefecture

Patient	Onset of illness (day)	Antigen	
		<i>A. phagocytophilum</i> -infected THP-1 cells	
		IgM	IgG
1	2	40	40
	6	40	40
2	23	<20	80
	31	160	<20
3	4	<20 ?*	40
	15	<20 ?*	80
4	14	40	160

\* Specific antigens were detected in western blot analysis in Fig. 2. The IFA test will be done again in near future for the confirmation.

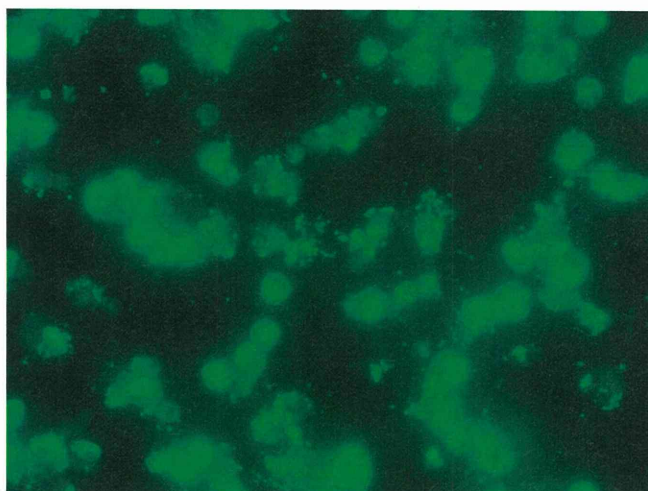


Fig. 2. IFA image of a positive serum from a human patient with unknown fever in Shizuoka Prefecture using *A. phagocytophilum*-infected THP-1 cells as an antigen

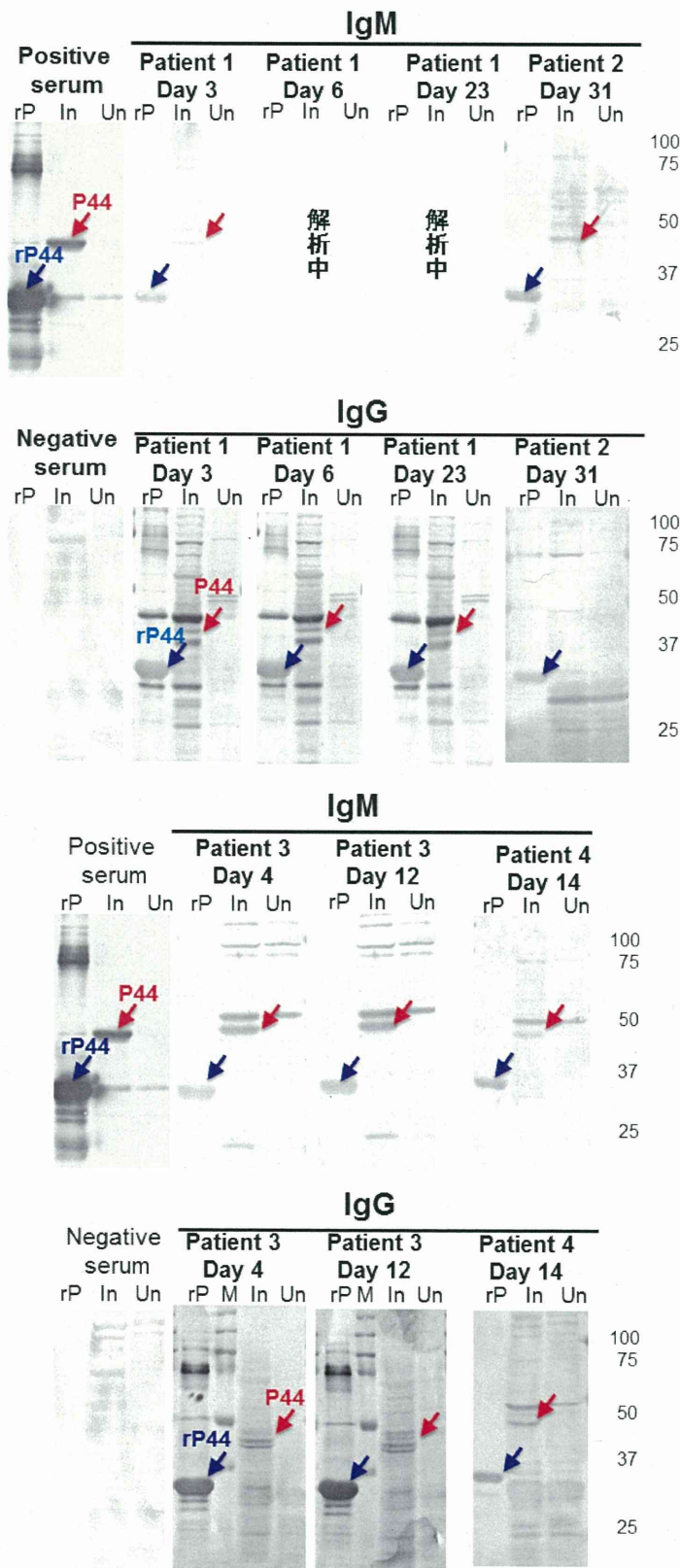


Fig. 3. Detection of *A. phagocytophilum* proteins by western blot analysis using sera from 4 patients in Shizuoka Prefecture. rP: recombinant P44-1 protein, In: *A. phagocytophilum*-infected THP-1 cells, Un: uninfected THP-1 cells. Primary sera used in this study were 500-fold diluted.

Table 3. Comparison of similarities of P44 homologous proteins expressed in HL60, THP-1, and a recombinant clone

Protein or transcript	Similarity (%)			
	P44-1	P44-18E	P44-47	P44-60
P44-1 (recombinant clone)		59.4	55.6	54.2
P44-18E (HL60)			63.0	63.0
P44-47 (THP-1)				69.7
P44-60 (THP-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

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	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	松村 隆之	(国立感染症研究所 免疫部 第二室 研究員)
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	角坂 照貴	(愛知医科大学 医学部寄生虫学講座 講師)

### 研究要旨

つつが虫病は*Orientia tsutsugamushi*の感染によって起こる。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-Gilliam)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。

#### 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。つつが虫病は近年増加傾向にあり、病細菌遺伝学的、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、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。

本研究では、つつが虫の起因菌である*Orientia tsutsugamushi*のなかで、標

準株と見なされ、マウスに強い病原性を示すGilliam、Karp、Katoと、新型つつが虫病の原因となり、マウスに弱い病原性しか示さないKuroki、Kawasaki、およびJapanese-Gilliamに分類されるKaiseiを用いて、感染マウスモデルを作成し、感染の経過、肝臓の病理組織学的検索、および宿主防御応答としてサイトカイン産生応答を解析した。

#### B. 研究方法

##### (1) マウス

C57BL/6マウスは日本SLCより購入した。

マウスは国立感染症研究所動物実験施設において飼育された。

#### (2) リケッチアストック

リケッチアは、T75cm<sup>2</sup>フラスコに単層培養したVero細胞に感染させ、感染3日目の培養細胞を10mlに希釈し、-80°Cで保存してストックとした。

#### (3) マウス感染実験

6-10週齢のマウスに*Orientia tsutsugamushi*のストック原液それぞれ500 $\mu$ lを腹腔内に投与し、経時的に臨床症状の観察と体重の測定を行い、屠殺後、体重および脾臓重量の測定、血液、腹水、脾臓、肝臓を採取した。

#### (4) 病理学的解析

肝臓組織は10%ホルマリン/リン酸緩衝液(PBS)で固定後、パラフィン切片を定法に従って作成し、ヘマトキシリン-エオジン染色後に観察した。

#### (5) 血漿サイトカイン濃度の測定

マウス血漿中サイトカイン濃度は、マウスTh1/Th2マルチプレックスキット(eBiosciences)と、FACSCaliburフローサイトメトリーを用いて解析した。

#### (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

*O. tsutsugamushi*を野生型C57BL/6マウス腹腔内感染したところ、株によって感染経過が異なることが明らかとなった。すなわち、Gilliam株およびKarp株の感染では、体重減少、立毛を来とし、感染約7日で死に至る。腹膜及び腹腔に激しい

炎症性の癒着と、壊死による肝萎縮を認めるが、脾腫や腹水は明らかではなかった。一方、Kaisei(JG)株とKato株の感染では、体重減少など全身の炎症応答は認めず、感染後約14日で漿液性腹水および胸水の貯留による呼吸不全により死亡に至る。腹腔内の炎症は明らかではなく、著しい脾腫と軽度の肝腫大を認めた。また、マウスに弱毒株と考えられているKawasaki株およびKuroki株の感染では、28日観察しても、明らかな感染症状もなく、脾腫もごく僅かであった。以上のことから、*O. tsutsugamushi*マウス感染は、3種類の臨床病型をとることが判明した(表1)。

次に、肝臓における病理像を解析した。どの*Orientia*株感染においても、肝臓に軽度-中等度の門脈周囲を中心とした単核球細胞浸潤が認められた。また、Gilliam株、Karp株、Kaisei株、Kato株の感染肝臓においては、肝細胞変性が認められた。一方、Kawasaki株、Kuroki株の感染では肝細胞の変性は認められなかった(図1)。

次に、感染に対する宿主応答を解析するため、血漿中サイトカインの網羅的解析を行った。その結果、急激な進行を示すGilliam株、Karp株の感染では、様々なサイトカインの産生が一度に上昇するサイトカインストームと呼ばれる過剰な炎症所見を示し、中でもIFN $\gamma$ 、Tumor necrosis factor(TNF)、インターロイキン(IL)-1 $\beta$ 、IL-6などの全身の炎症に強く関与しているサイトカインの産生亢進が認められた。これに対し、Kaisei(JG)株、Kato株感染マウス血漿では、顆粒球、単



球、NK細胞、Th1ヘルパーT細胞を感染局所に遊走させるケモカインCXCL1(KC)、CCL2(MCP-1)、CXCL10(IP-10)の有意な産生亢進が認められたが、産生量はGilliam株感染、Karp株感染より低く、IFN $\gamma$ 、TNF、IL-1 $\beta$ 、IL-6の産生は認められなかった。また、Kawasaki株およびKuroki株の感染でも、上記三種類のケモカインの産生が認められたが、その産生量は他の株に比べてより少なかった(図2)。以上より、*O. tsutsugamushi*はマウスに対する病原性の違いによって、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-Gilliam)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。

#### D. 考察

我が国で発生するつつが虫病の型別分類は、*O. tsutsugamushi*の媒介節足動物であるダニの種類、生息域、活動時期による古典型(Kato)と新型(その他)に分けられる。また、血清型分類としてGilliam, Karp, Kato, Kuroki, Kawasakiなどに分類され、56K蛋白を用いた遺伝子型別分類も、血清型に準じて行われている。しかし、これらの型別、遺伝子型禁煙度と臨床経過、重症化との関係はまだ判明していない。そこで、本研究ではマウス感染モデルを用いて、各株間における感染経過と免疫応答の解析を行った。

当マウスモデルにおける肝臓の肝細胞変

性を伴う病理所見は、ヒトのつつが虫病で高頻度に認められる肝障害を反映すると考えられる。

以前の報告より、標準株であるGilliam、Karp、Katoは感受性の高いマウス系統に致死感染を起こす一方、KawasakiやKurokiはマウスに感染しても死に至らしめないということが知られている(Groves et al., 1978; Nagano et al., 1996)。今回、我々は、病原性が高いとされてきた群が、サイトカインストームを伴い急激に進行するGilliam、Karp感染と、亜急性に進行し、炎症を伴わずに増殖するKaisei、Karp感染の二群に分類されることを見いだした。今後、マウスモデルの詳細な解析をしつつ、それぞれの遺伝子型に対するヒト臨床例と病理学的、血清学的に照合することによって、本研究で見いだされた病型の違いが、実際のヒト感染でもあてはまるかを確認する予定である。実際な前者では、過剰に産生されたサイトカインが組織障害を引き起こし、高い感受性の原因になっている可能性がある。また、後者の群では、炎症応答を伴わずにOrientiaが増殖していることから、免疫機構を抑制して宿主生体防御から回避している可能性がある。今後、炎症メディエーターのマウスへの投与や、遺伝子欠損マウスを用いて、つつが虫病の病態生理を解析し、それぞれの感染型における重症化因子を同定することで、つつが虫病の早期診断、新規治療法につながる研究を目指す。

#### E. 結論

*O. tsutsugamushi*の各株間におけるマウス病原性を比較解析した結果、遺伝学的近

縁度と異なり、少なくとも三群に分類されることが判明した。今後、ヒトつつが虫病における宿主応答と照合し、つつが虫病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。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Murase Y, Konnai S, Hidano A, Githaka W.N, Ito T, Takano A, Kawabata H, Ato M, Tajima T, Tajima M, Onuma M, Murata S and Ohashi K. Molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* in cattle and *Ixodes persulcatus* ticks. **Vet. Microbiol.** 2011 May **5;149(3-4):504-7.**
2. Matsumura T, Ato M, Ikebe T, Ohnishi M, Watanabe H, Kobayashi K. Interferon- $\gamma$ -producing immature myeloid cells confer protection

against severe invasive group A *Streptococcus* infections. **Nat Commun.** (In press)

3. 阿戸 学「リケッチア」免疫の事典 桂 義元、河本 宏、小安重夫、山本一彦 編集 朝倉書店 2011 471.

##### 2. 学会発表

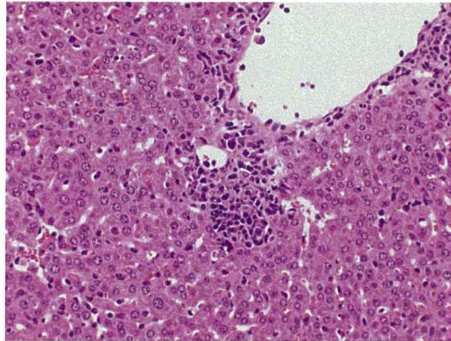
阿戸 学、安藤秀二、松村隆之、川端寛樹、角坂照貴、小林和夫 *Orientia tsustugamushi*株間におけるマウス感染様式および宿主応答の比較解析 第18回リケッチア研究会 2012 2月 大阪

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

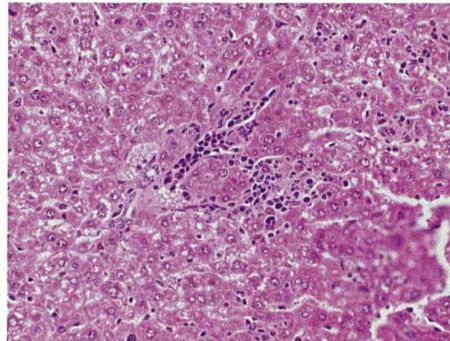
1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

# 図1 Orientia感染肝臓の病理組織

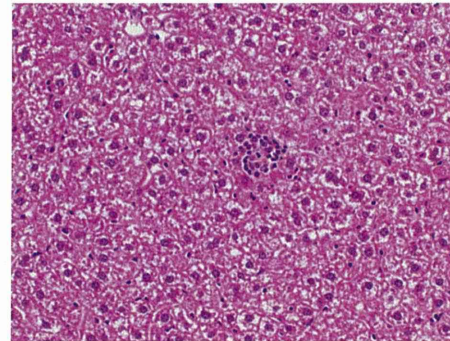
Gilliam



Kaisei (JG)



Kawasaki



Kuroki

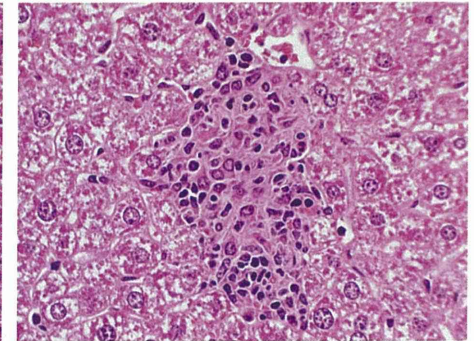


図2 Orientia感染マウスにおける血漿サイトカイン産生

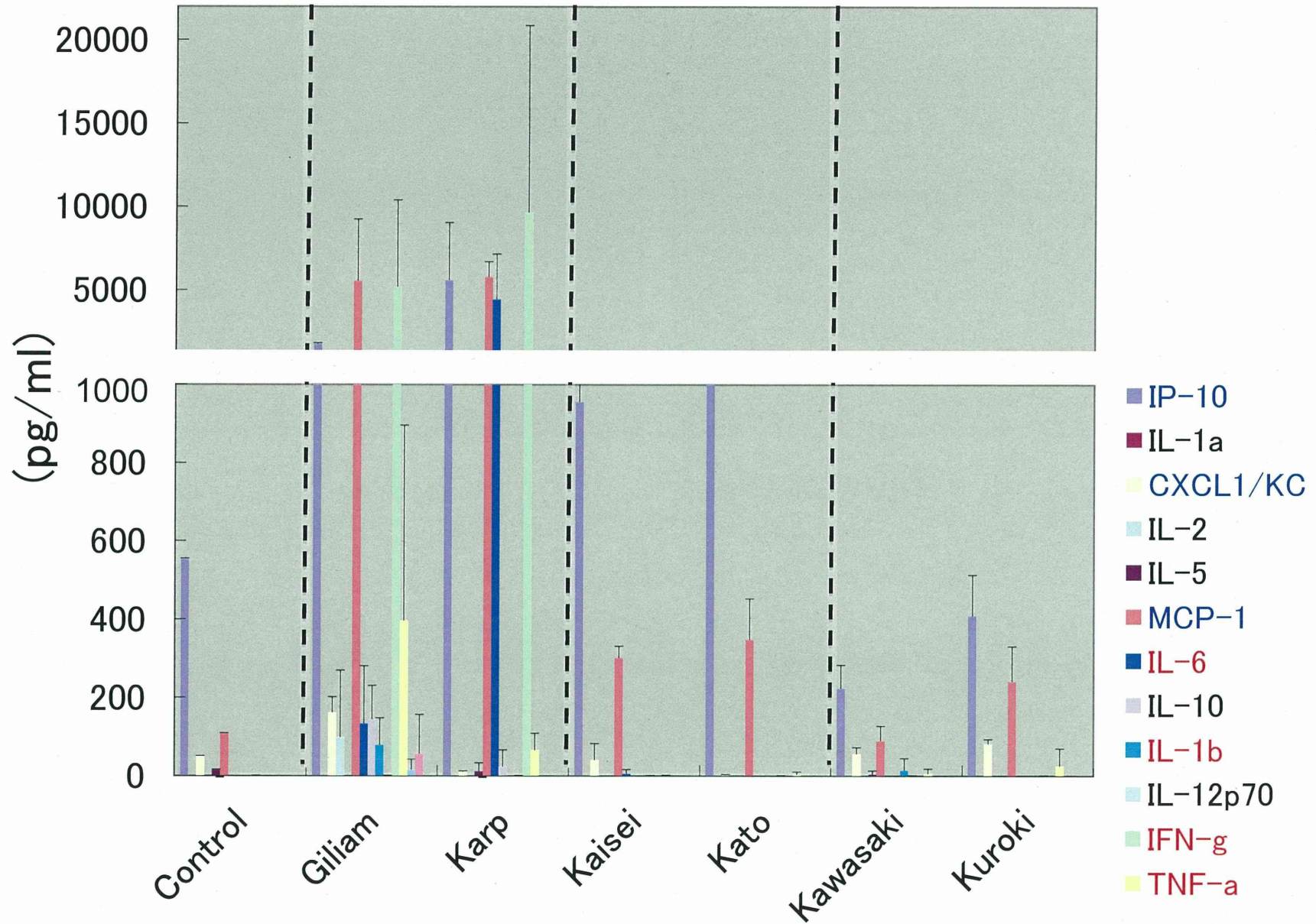


表1 Orientia 感染マウスモデルの経過まとめ

<i>O. tsustugamushi</i>	マウス	臨床症状(転帰)	肝の病理	サイトカイン	脾腫	腹水
-	C57BL/6	-	-	-	-	-
<i>Giliam</i>	C57BL/6	体重減少, 立毛 (感染後1週間で死亡)	単核球浸潤、肝細胞変性	++	+	-
<i>Karp</i>	C57BL/6	体重減少, 立毛 (感染後1週間で死亡)	単核球浸潤、肝細胞変性	++	+	-
<i>Kaisei</i>	C57BL/6	- (感染後2週間で死亡)	単核球浸潤、肝細胞変性	+	+++	+++
<i>Kato</i>	C57BL/6	- (感染後2週間で死亡)	単核球浸潤、肝細胞変性	+	+++	+++
<i>Kuroki</i>	C57BL/6	-	単核球浸潤	+/-	-	-
<i>Kawasaki</i>	C57BL/6	-	単核球浸潤+/-	+/-	+	-

## 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 杉森千恵子, 高野 愛, 大久保 (佐藤) 梢, 高橋英之, 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)  
大橋典男, 吉川悠子 (静岡県立大学)

### 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、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。

### 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。

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の組み合わせにおいて, ボレリア国内分離株を用いた場合, 同様に重症化がおこるかな否かを *in vitro* で調べることを目的として研究を行った。

## B. 方法

### 1) 使用した *Borrelia* 株

本研究に使用した *Borrelia* 株は国内患者由来 *Borrelia garinii* J-16 株, アメリカ患者髄液由来の *Borrelia burgdorferi* 297 株である。国内患者由来株は中尾稔博士 (旭川医科大学) 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。

### 2) ヒト好中球からのマトリックスメタロプロテアーゼ産生能

健康者由来好中球を常法に従い分離し実験に用いた。ヒト脳血管内皮細胞(human brain microvascular endothelial cells; HBMEC)は 10% FBS, 1% GlutaMax (Invitrogen) 添加 M199 培地 (以下 M199 培地と略す) を用い 5%CO<sub>2</sub> 存在下 37°C で培養を行った後, コラーゲン-I コートした 24 穴プレートにて  $1-5 \times 10^5$  細胞まで増殖させ試験に使用した。HBMEC は米国 John Hopkins 大学の Kim 博士より分与を受けた。*Borrelia* 株は国内患者由来 *B. garinii* J-16 株(ST group-B) および米国患者髄液由来 297 株を BSK-H 培地を用いて増菌後, M199 培地を用

いて 3 回洗浄し試験に供した。ボレリア株は HBMEC に対して  $Moi=10$  で作用させた。HBMEC は共存させるボレリアの量に依存して Matrix metalloproteinases (MMP)-1 を産生させることが昨年度までの研究で明らかになっており, 昨年度同様に  $Moi=100$  で作用させた場合, 本試験での測定範囲を大幅に超過する危険性があったため, 本試験では  $Moi=10$  に減少させマトリックスメタロプロテアーゼ量を計測している。*A. phagocytophilum* 株は静岡県立大学・大橋典男博士, 米国 Ohio 州立大学・Rikihisa 博士より分与を受け使用した。*A. phagocytophilum* 株はヒトマクロファージ様細胞である THP-1 細胞を用いて培養し, 感染率が約 90% に達した条件下で大橋らの方法(大橋私信)により菌懸濁液を調製し好中球へ感染後試験に用いた。MMP-1 assay および MMP-8 assay は昨年度報告書に記載した方法に従って行った。好中球への *A. phagocytophilum* 感染率は感染 24 時間後の好中球塗抹標本スライドをディフクイック染色 (シスメックス) し, モルラの有無を計数し算出した。

### 3) THP-1 細胞からのマトリックスメタロプロテアーゼ産生能

THP-1 細胞は 10% FBS, 14.3mM 2-メルカプトエタノール (Sigma-Aldrich), 1% GlutaMax (Invitrogen) 添加 RPMI-1640 培地 (Sigma-Aldrich) (以下 RPMI 培地と略す) を用い 5%CO<sub>2</sub> 存在下 37°C で培養を行った。*Borrelia* 株は *B. garinii* 国内分離株である J-16 株を用いた。*B. garinii* は BSK-H 培地にて培養後, RPMI 培地で 3 回洗浄し試験に供した。ボレリアは HBMEC に対して  $Moi=10$  で作用さ

せ前述の方法と同様に産生されるマトリックスメタロプロテアーゼ量を定量した。

### C. 結果および D. 考察

#### *Anaplasma phagocytophilum* は *Borrelia* 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

HBMEC および好中球の共在下での細胞培養上澄中の MMP-1 濃度を、*Borrelia* の有無、*A. phagocytophilum* の有無について各々調べ、その結果の一部を図 1 に示した。我が国の患者由来 *Borrelia* 株においても米国患者由来由来 *Borrelia* 株同様に、好中球の共在下で、HBMEC 培養上澄中に宿主細胞から MMP-1 の産生誘導が見られ、かつ *Borrelia* による MMP-1 産生誘導は *Anaplasma* 共在下で増強される傾向が見られた (図 1)。また *Anaplasma* 属に近縁な *Ehrlichia* 属細菌が感染することが知られているマクロファージ様の THP-1 細胞を用いた実験でも好中球を用いた実験と同様の結果が見出された一方、*Anaplasma* による宿主細胞からの MMP-1 産生増強作用は、好中球を用いた場合と比較して低い傾向が見られた (data not shown)。また HBMEC 非存在下で THP-1 細胞に *Borrelia* のみを作用させた場合では、MMP-1 の誘導はほとんど見られなかったことから、MMP-1 は THP-1 細胞、*Borrelia* の共在下、HBMEC より産生されていることが示唆された。本研究では、宿主細胞からの MMP-8 の誘導についても同様の傾向があることを見出している (data not shown)。

ヒト血管内皮細胞表面の VCAM1 は、白血球細胞表面の Integrin  $\alpha 4 \beta 1$  と結合し、PI3K/Rac1 経路を介してマトリックスメタロ

プロテアーゼを発現させることが知られている。1990 年代より血管内皮細胞は *Borrelia* に感染した場合、VCAM1 を発現することが知られている (Böggemeyer et al. 1994)。また Integrin  $\alpha 4 \beta 1$  に対する antagonist はマウスモデルにおいて *Borrelia* 感染時の病態悪化を予防することも報告されている (Gläsner et al. 2005)。本研究ではこれら分子の発現を確認していないが、これら細胞内シグナル伝達機構を介してマトリックスメタロプロテアーゼ産生が誘導されたと考えられる。

MMP-1 は分泌型の間質コラゲナーゼであり、これらが細菌感染時に宿主細胞から過剰に分泌されることにより、宿主は炎症症状を呈する。このため、アナプラズマとボレリアが共感染した場合には、炎症症状が強く引き起こされる可能性が考えられる。また、近年 Schubert-Unkmeir ら (Schubert-Unkmeir et al., 2010) は髄膜炎菌が HBMEC に MMP-8 を産生させ、これにより HBMEC 間のタイトジャンクション構成因子である occludin を分解させることを示している。本研究でも国内患者由来 *B. garinii* は宿主細胞に MMP-8 を産生させることが明らかとなった。ライム病ボレリアは特殊な条件下以外では非細胞内寄生性と考えられていることから、ボレリア属細菌も髄膜炎菌同様、MMP-8 を利用して血管内皮細胞間構造を破壊し細胞間隙を通過する可能性が考えられた。



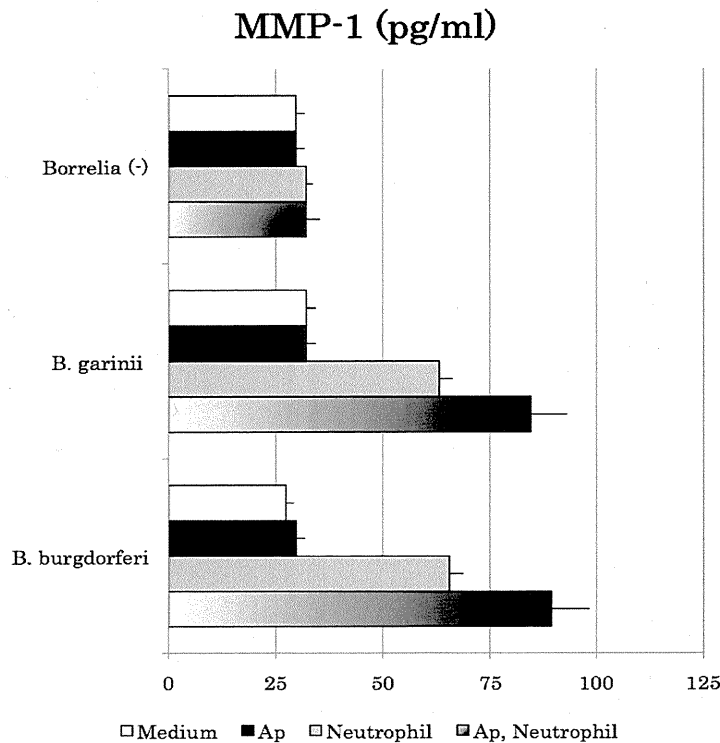


図1. HBMEC, 好中球共在下におけるマトリックスメタロプロテアーゼ-1 産生.

### E. 結論

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.

### F. 健康危機情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Fujisawa T, Kadosaka T, Fujita H, Ando S, Takano A, Ogasawara Y, Kawabata H, Seishima M. Rickettsia africae Infection in a Japanese Traveller with Many Tick Bites. Acta Dermato-Venereologica. (In press).

2. Gaowa, Wuritu, Wu D, Yoshikawa Y, Ohashi N, Kawamori F, Sugiyama K, Ohtake M, Ohashi M, Yamamoto S, Kitano T, Takada N, Kawabata H. Detection and characterization of p44/msp2 transcript variants of Anaplasma phagocytophilum from naturally infected ticks and wild deer, Japan. Japanese Journal of Infectious Diseases. 65: 79-83, 2012.

#### 2. 学会発表

1. 猪熊 壽, 藤塚淳史, 前谷茂樹, 増澤俊幸, 川端寛樹. 北海道における犬の *Borrelia garinii* 感染症の発生. 第64回日本衛生動物学会大会. 2012年3月. 上田.
2. 高野 愛, 坪川理美, DeMar Taylor, 川端寛樹. マダニとボレリアの共種分化説に

- におけるパラダイム・シフト. 第 64 回日本衛生動物学会大会. 2012 年 3 月. 上田.
3. 本井祐太, 鈴木正嗣, 安藤秀二, 川端寛樹, 高野 愛, 猪熊 壽, 田原研司, 金森弘樹. 島根半島部のイノシシ再分布による紅斑熱群リケッチアへの影響. 第 153 回日本獣医学会学術集会. 2012 年 3 月. 大宮.
  4. 佐藤 梢, 後藤みなみ, 村井厚子, 柳井徳麿, 高野 愛, 川端寛樹. 猟犬における抗ライム病ボレリア抗体の保有状況. 第 153 回日本獣医学会学術集会. 2012 年 3 月. 大宮.
  5. 川端寛樹, 多田有希, 高野 愛, 佐藤梢, 大西真. 我が国におけるライム病の現状と疫学解析. 第 153 回日本獣医学会学術集会. 2012 年 3 月. 大宮.
  6. Kyle Taylor, 高野 愛, 川端寛樹, 下鶴倫人, 坪田敏男. Rodent dynamics and *Borrelia* spp. infection rates in Hokkaido. 第 153 回日本獣医学会学術集会. 2012 年 3 月. 大宮.
  7. 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 回日本衛生動物学会北日本支部大会. 2011 年 10 月. 山形.
  8. 高野 愛, 石畝史, 増澤俊幸, 井上智, Sergey E. Tkachev, 莉和宏明, Viacheslav G. Morozov, 矢野泰弘, 高田伸弘, 藤田博己, Xiaohang Ma, 川端寛樹. 欧州型 *Borrelia* の大陸分布に関する調査研究. 第 57 回日本衛生動物学会北日本支部大会. 2011 年 10 月. 山形.
  9. 水沼廣, 吉田典行, 藤田博己, 川端寛樹, 高野 愛, 安藤秀二, 小笠原由美子. 福島県でライム病病原体を検出し得たマダニ刺咬症の 1 例. 第 57 回日本衛生動物学会北日本支部大会. 2011 年 10 月. 山形.
  10. 山内健生, 佐藤雅彦, 伊東拓也, 藤田博己, 高田伸弘, 川端寛樹, 安藤秀二, 坂田明子, 高野 愛. 利尻島のマダニ相とマダニ保有リケッチア. 第 63 回日本衛生動物学会大会. 2011 年 4 月. 東京.
  11. 馬原文彦, 藤田博己, 赤松達矢, 矢野泰弘, 藤田信子, 川端寛樹, 小泉信夫, 徳島県大島における日本紅斑熱媒介マダニ調査. 第 63 回日本衛生動物学会大会. 2011 年 4 月. 東京.
  12. 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, 岸本壽男. 宮古島のつつがむし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 年 4 月. 東京.
  13. 川端寛樹, 高野 愛, 中尾稔, 増沢俊幸, 高田伸弘, 矢野泰弘, 石畝史, 藤田博己, 伊東拓也, 及川陽三郎, 川森文彦, 熊谷邦彦, 三上稔之, 花岡希, 安藤秀二, 本田尚子, カイルテイラー, 坪田敏男, 今内覚, 渡邊治雄, 大西真. マダニ媒介性のライム病病原体 *Borrelia garinii* の維持伝播サイクルに関する研究. 第 63 回日本衛生動物学会大会. 2011 年 4 月. 東京.

14. 高野 愛, 関塚剛史, 黒田誠, 大西真, 川端寛樹. マダニ媒介性の新型ボレリア *Borrelia turcica* の比較ゲノム解析. 第63回日本衛生動物学会大会. 2011年4月. 東京.
15. 高野 愛, 藤田博己, 角坂照貴, 高橋守, 山内健生, 大西真, 川端寛樹. 日本国内に生息するマダニのミトコンドリア 16S rRNA. データベース構築とマダニ遺伝子同定の試み. 第63回日本衛生動物学会大会. 2011年4月. 東京.
16. 忽那賢志, 笠原敬, 高野 愛, 大西真, 川端寛樹. ウズベキスタンからの輸入回帰熱の1例. 第63回日本衛生動物学会大会. 2011年4月. 東京.
17. 忽那賢志, 笠原敬, 三笠桂一, 高野 愛, 川端寛樹. 本邦初の回帰熱症例. 第85回日本感染症学会総会. 2011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

## 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、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序の解析を行った。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。

### A. 研究目的

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、1. オリエンチア感染細胞における脂肪滴形成機序の解析、2. 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析などを目的として研究を行った。

### B. 研究方法

1. 感染による脂肪滴形成の解析：L-929細胞に *Orientia tsutsugamushi*, Ikeda株をMOI=0.35で接種後、FCS不含MEM培地で培養し、感染細胞を経時的に蛍光抗体法および透過型電子顕微鏡で観察し、脂肪滴の形成を調べた。

2. 脂質滴の成分解析：i) 感染5日目に感染細胞を回収し、Bligh&Dyer法(Can. J. Biochem. Physiol. 37:911-7, 1959)により脂質画分を抽出し(methanol/chloroform/H<sub>2</sub>O)、薄層クロマトグラフィ(展開溶媒：hexane/diethylether/acetate=70/30/1)により中性脂質画分を分離・分画した。トリグリセリドおよびコレステロール画分はヨード発色により確認した。各画分のシリカゲルよりchloroform/methanol (2/1) 溶媒にて各脂質を抽出し、酵素反応を利用した比色法にて定量した(トリグリセリド定量はリパーゼ法、コレステロール定量はコレステロールオキシダーゼ・DAOS法)。ii) また、<sup>14</sup>C標識-オレイン酸を用い、感染細胞における脂質代謝を解析した。

3. 非病原性リケッチア感染細胞における

増殖抑制機序の解析：i) 哺乳動物由来のVero細胞、マダニ由来のDALBE3細胞に *Rickettsia montanensis* をMOI=0.01 pfu/cellで感染した。7日目に透過型電子顕微鏡を用い、感染細胞を観察した。また、感染3日目に *R. japonica* を重感染し、さらに4日後に感染細胞を観察した。ii) *R. japonica* に遺伝的に非常に近縁の非病原性株LON-13を用い、これまでと同様に増殖の解析を行なった。

(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。

本研究に用いるオリエンチア、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

1. 感染による脂肪滴形成の解析：L-929細胞に *O. tsutsugamushi* を接種後、感染細胞を経時的に形態学的に観察したところ、脂肪滴の蓄積が認められた(図1, 2)。

2. 脂質滴の成分解析：i) 感染細胞では脂肪滴の主要成分であるトリグリセリド量が多く、一方、細胞膜の主要成分であるコレステロール量は感染細胞でも変わらなかった(図3a)。ii) 非感染細胞に比べ、感染細胞ではトリグリセリドへの<sup>14</sup>C-