

オレイン酸の取り込みは顕著に盛んであった。これに対し、リン脂質への取り込みは両者で差がなかった（図3b）。

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) *R. montanensis* 感染Vero細胞では細胞内リケッチア粒子が少なく、また、オートファゴソームと思われる二重または複数の膜に覆われた小胞内で変性したリケッチア粒子の存在が認められた。これに対し、感染3日目に *R. japonica* を重感染したものでは、小胞中のリケッチアも一部存在するものの、細胞室内で増殖する多くのリケッチア粒子が認められた（図4a）。DALBE3細胞についても同様の結果が得られた（図4b）。ii) LON-13株を用い、これまでと同様に細胞内増殖の動態を調べたところ、Vero細胞、HeLa細胞などの哺乳動物細胞では *R. montanensis* 同様に増殖抑制が認められた。また、これに *R. japonica* を重感染するとLON-13株の増殖が回復した。これに対し、DALBE3、ISE6などのマダニ細胞では *R. montanensis* の場合と異なり、LON-13株の増殖が認められた（図5）。

D. 考察

脂肪滴は真核細胞の細胞質中にある単層のリン脂質に囲まれた中性脂肪が主要成分のオルガネラであり、種々の細胞、特に肝細胞中に多く見られる。脂肪滴の機能は良く分かっていないが、脂質のホメオスタシス、膜輸送、シグナリング等の種々の役割を担っていると考えられている。また、病原体との関係については、HCV感染における役割などが論じられている。今回の結果によって、オリエンチア感染においても、宿主細胞内に脂肪滴が形成されることが明らかとなった。

非病原性の *R. montanensis* は哺乳動物細胞およびマダニ細胞中で増殖抑制を受けていたが、病原性の *R. japonica* の共感染により増殖が誘導された。この事実が感染電顕観察においても確認され、*R. montanensis* の少なくともその一部はオートファゴソームと考えられる小胞中で分解されつつあった。昨年度の感染細胞におけるオートファジー関連蛋白質の発現動態の結果と合わせて、オートファジーが非病原性株の増殖抑制の機序の少なくとも一部を担っていると考えられる。また、LON-13株も哺乳動物細胞での増殖は抑制を受けており、*R. japonica* の重感染により増殖が誘導された。ところが、マダニ細胞中では増殖抑制はみられず、*R. montanensis* の場合と異なっていた。この増殖動態の違いが何によるのかは今のところ不明である。

E. 結論

オリエンチア感染により宿主細胞の代

謝が影響を受け、トリグリセリドの蓄積を伴う脂肪滴の形成が誘導されることが明らかとなった。この脂肪滴形成の機序、およびその感染における役割については不明で今後の課題である。

非病原性の紅斑熱群リケッチアの増殖は哺乳動物細胞では抑制がみられた。この増殖抑制は感染により誘導されるオートファジーがその原因の少なくとも一部であった。これに対し、マダニ細胞での増殖性は非病原性の2株で異なり、*R. montanensis* は増殖抑制を受けるがLON-13株では抑制を受けなかった。この原因は不明であり、今後の課題である。

今回の研究により、オリエンチアおよびリケッチアの増殖あるいは増殖抑制に関係する幾つかの事象が明らかとなり、リケッチア症の病原性の解明に寄与したと考えられる。今後、オートファジー、ディフェンシン、インターフェロンなどの自然免疫との関連を含め、これらを詳細に解析することが重要である。

F. 健康危険情報

該当なし

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 - 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., Kishi, M., and Ogawa, M. Restriction of the growth of a nonpathogenic spotted fever group rickettsia. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 64(1):42-47, 2012.

(2) 協力研究者：小川基彦

Uchiyama, T., Kishi, M., and Ogawa, M. Restriction of the growth of a nonpathogenic spotted fever group rickettsia. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 64(1):42-47, 2012.

2. 学会発表

(1) 分担研究者：内山恒夫

内山恒夫, 小川基彦, 藤田博己. 2012. 非病原性紅斑熱群リケッチアの哺乳動物細胞における増殖抑制. 第85回日本細菌学会総会, 長崎 (採択済)

小川基彦, 内山恒夫, 安藤秀二. 2012. 抗菌薬によるつつが虫病リケッチアおよびQ熱リケッチアの細胞培養系からのマイコプラズマ汚染の除去. 第85回日本細菌学会総会, 長崎 (採択済)

Uchiyama, T., and Fujita, H. 2011. Coinfection of mammalian and tick cells

with pathogenic and nonpathogenic spotted fever group rickettsiae. The Joint Meeting of the XVIIth International Symposium on Gnotobiology and the XXXIVth Congress of the Society for Microbial Ecology and Disease. Yokohama, Japan.

Uchiyama, T., and Ogawa, M. 2011. Coinfection of pathogenic and nonpathogenic rickettsiae. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology [兼 第84回日本細菌学会総会]), Sapporo, Japan.

Ogawa, M., Fukasawa, M., and Uchiyama, T. 2011. Infection with the obligated intracellular bacterium *Orientia tsutsugamushi*, a causative agent of scrub typhus facilitates formation of lipid droplets in L-929, mouse fibroblast cells. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology [兼 第84回日本細菌学会総会]), Sapporo, Japan.

Uchiyama, T., Kishi, M., and Ogawa, M. 2011. Restriction of the growth of a nonpathogenic spotted fever group rickettsia. 6th International meeting on rickettsiae and rickettsial diseases Heraklion, Greece.

(2) 協力研究者：小川基彦

内山恒夫、小川基彦、藤田博己。2012. 非病原性紅斑熱群リケッチアの哺乳動物細胞における増殖抑制。第85回日本細菌学会総会，長崎（採択済）

小川基彦、内山恒夫、安藤秀二。2012. 抗菌薬によるつつが虫病リケッチアおよびQ熱リケッチアの細胞培養系からのマイコプラズマ汚染の除去。第85回日本細菌学会総会，長崎（採択済）

Uchiyama, T., and Ogawa, M. 2011. Coinfection of pathogenic and nonpathogenic rickettsiae. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology [兼 第84回日本細菌学会総会]), Sapporo, Japan.

Ogawa, M., Fukasawa, M., and Uchiyama, T. 2011. Infection with the obligated intracellular bacterium *Orientia tsutsugamushi*, a causative agent of scrub typhus facilitates formation of lipid droplets in L-929, mouse fibroblast cells. International Union of Microbiological Societies 2011

Congress (XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology [兼 第84回日本細菌学会総会]), Sapporo, Japan. Uchiyama, T., Kishi, M., and Ogawa, M. 2011. Restriction of the growth of a nonpathogenic spotted fever group rickettsia. 6th International meeting on rickettsiae and rickettsial diseases Heraklion, Greece.

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
該当なし

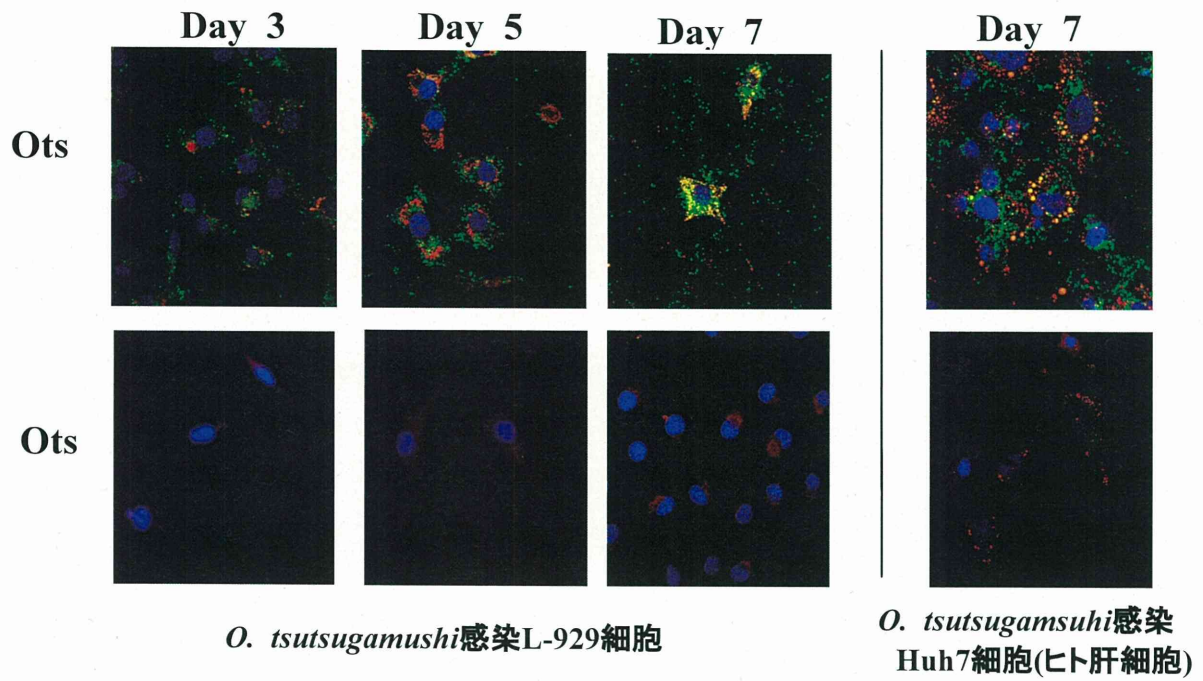


図1. オリエンチア感染細胞における脂肪滴形成（蛍光染色）：経時的に脂肪滴が増大した。緑＝オリエンチア；一次抗体＝ヒト抗*O. tsutsugamushi*血清、二次抗体＝Alexa488標識-抗ヒトIgG抗体。赤＝脂肪滴；Nile Red染色。青＝細胞核；DAPI染色。

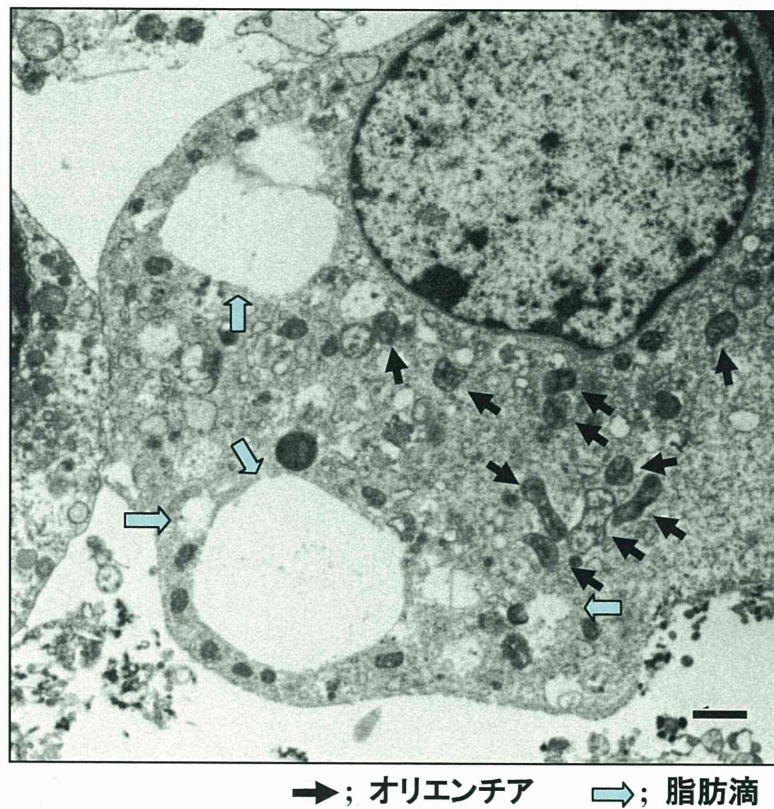
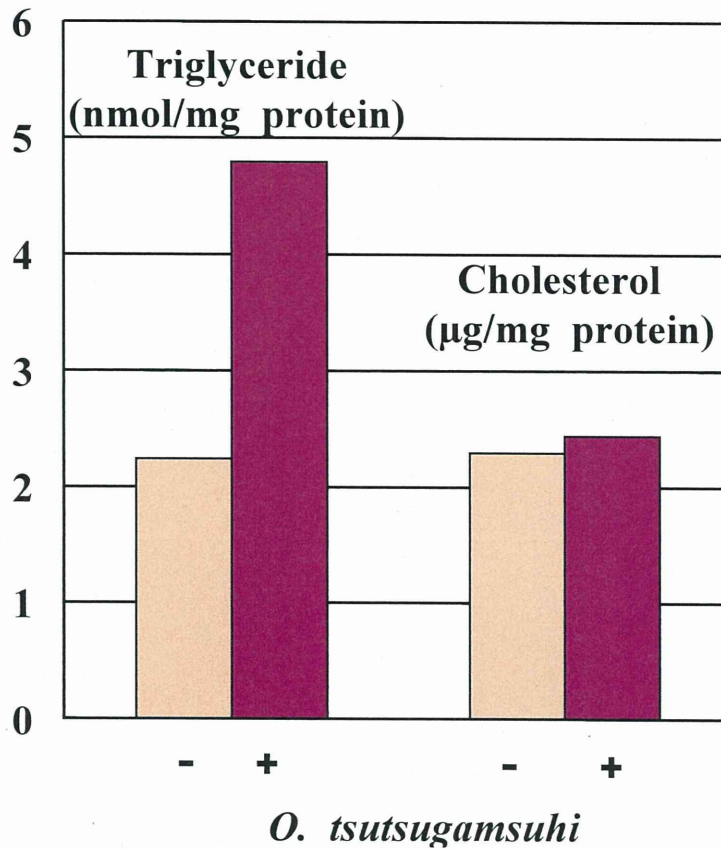


図2. オリエンチア感染7日目のL929細胞における脂肪滴形成（透過型電子顕微鏡）。

(a)



(b)

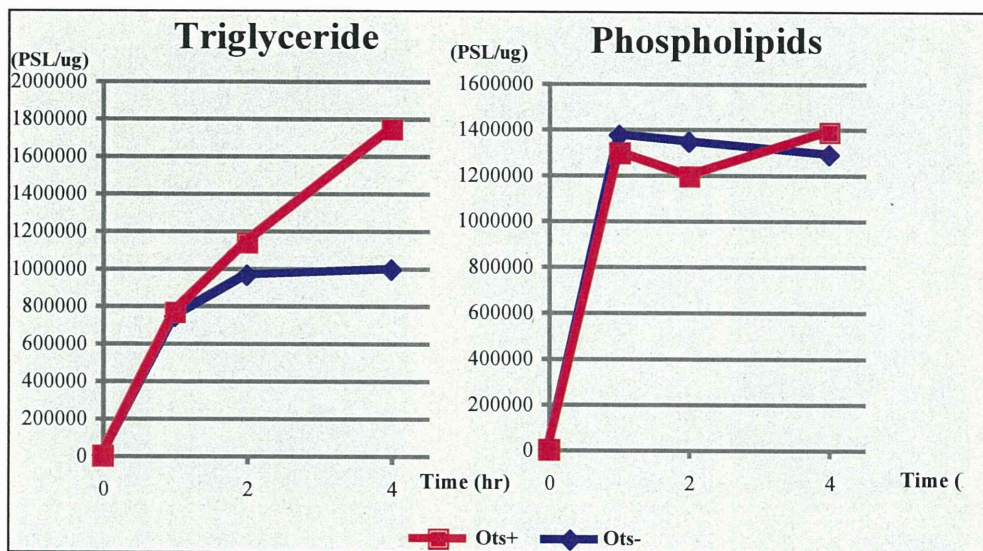


図3. (a) オリエンチア感染細胞の脂肪組成 (薄層クロマトグラフィー)。感染細胞では脂肪滴の主要成分であるトリグリセリド量が多い。一方、細胞膜の主要成分であるコレステロール量は感染細胞でも変わらない。(b) ^{14}C -オレイン酸の取り込み。非感染細胞に比べ、感染細胞ではトリグリセリドへの ^{14}C -オレイン酸の取り込みは顕著に盛ん。しかし、リン脂質への取り込みは両者で差がない。

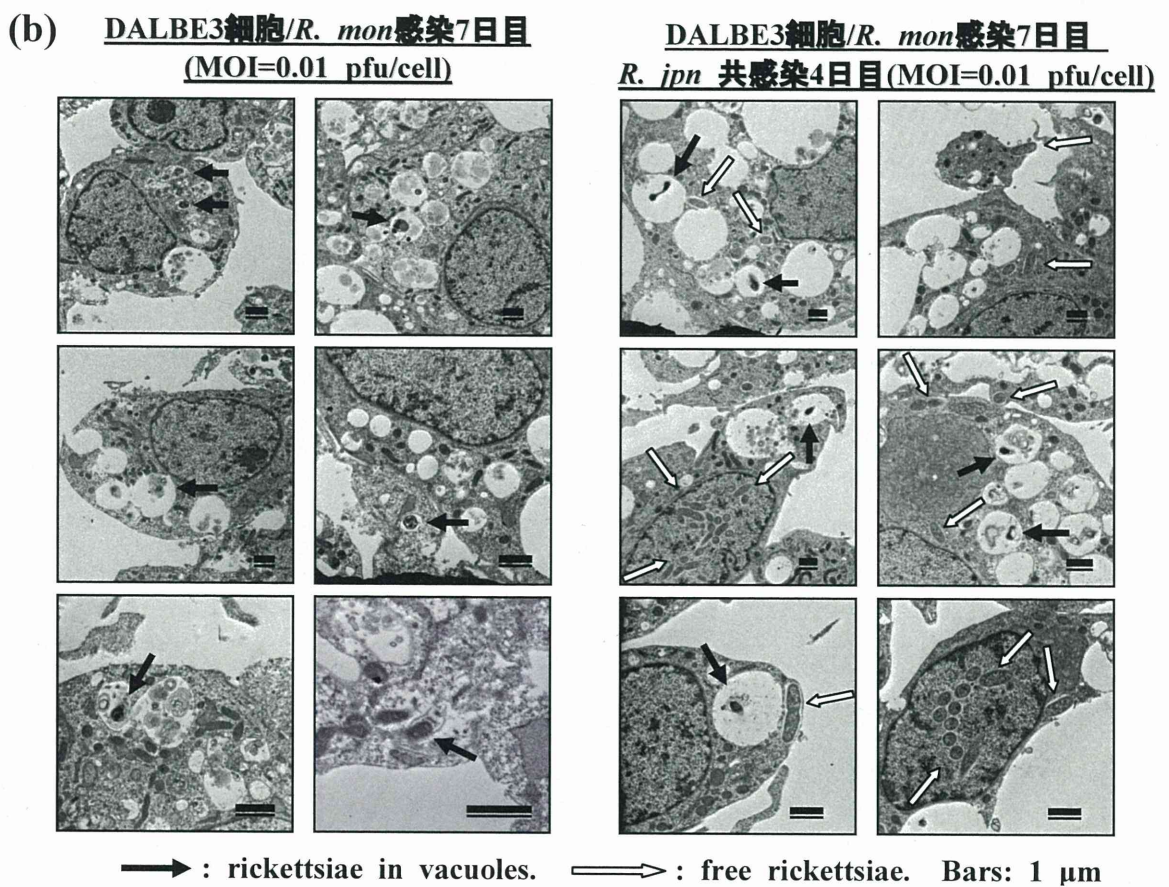
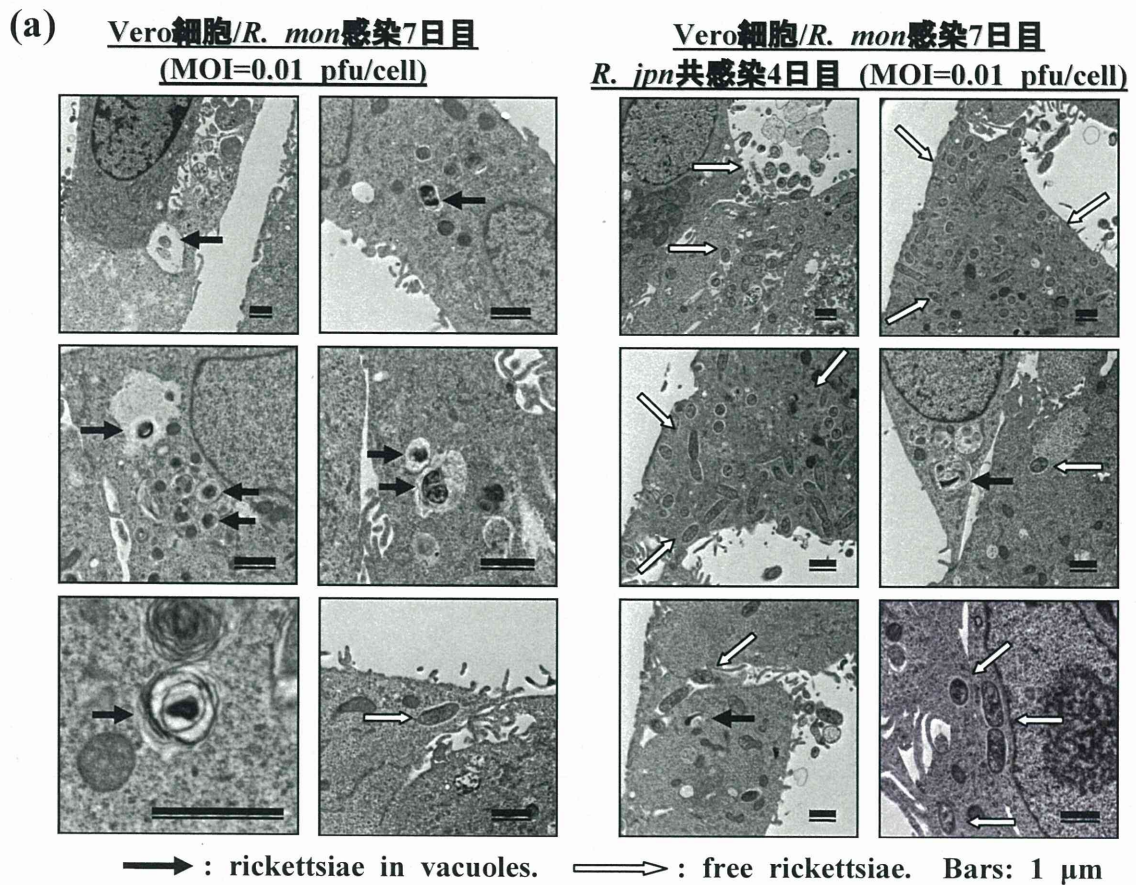
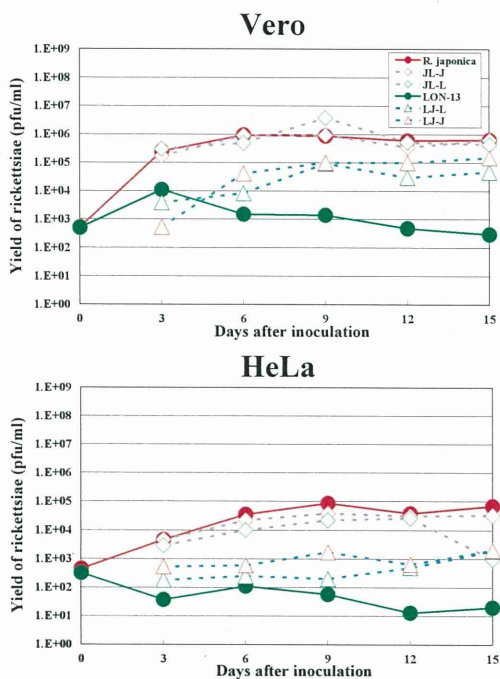


図4. リケッチア感染細胞の透過型電子顕微鏡像。(a) *R. montanensis* 感染 Vero 細胞では小胞中で消化途中のリケッチアが、*R. japonica* を重感染した細胞ではリケッチア増殖が認められる。(b) DALBE3 細胞。

哺乳動物由来細胞



マダニ由来細胞

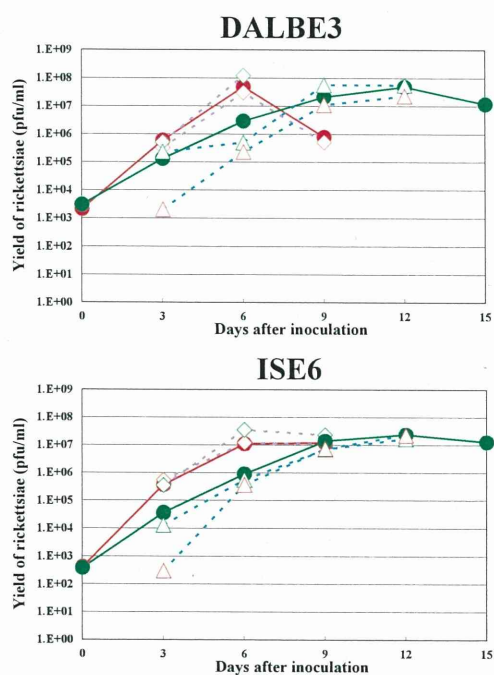


図 5. 非病原性の LON-13 株と病原性の *R. japonica* の哺乳動物およびマダニ細胞中での増殖および感染 3 日目にもう一方の株を重感染した場合の増殖：*R. japonica* 単独感染 (*R. japonica*)。LON-13 単独感染 (LON-13)。 *R. japonica* 感染細胞に LON-13 を重感染後の *R. japonica* 産生量 (JL-J) と LON-13 産生量 (JL-L)、LON-13 感染細胞に *R. japonica* を重感染後の *R. japonica* 産生量 (LJ-J) と LON-13 産生量 (LJ-L)。

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	宮崎大学 教授
研究協力者	小椋 義俊	宮崎大学 助教
研究協力者	大岡 唯祐	宮崎大学 助教
研究協力者	山本 正悟	宮崎大学 客員研究員
研究協力者	北野 智一	宮崎県衛生環境研究所 技師

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。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。

A. 研究目的

ツツガムシ病の起原菌である *O. tsutsugamushi* (以下、オリエンチア) はリケッチア科の偏性細胞内寄生菌であり、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等が不可能であるため基礎的研究が進んでいない。しかし、オリエンチア2株の全塩基配列が韓国のグループ (Boryong株) と我々のグループ (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は、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た。また、平

行して、我が国で問題となるリケッチア菌種のゲノム解析も進めた。本年度は、以下の2項目を中心とした解析を行った。

①「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」：オリエンチア株間の系統解析は、外膜蛋白質 (56kDa蛋白質) の遺伝子配列を用いて行われてきた。しかし、免疫系による選択圧を強く受ける外膜蛋白質の配列には極端な変化が生じる可能性などがあり、そのバリエーションを菌株の型別に应用することは可能であるが、進化系統解析には不適切である。そこで、昨年度までに、Ikeda株と Boryong株の全ゲ

ノム配列比較解析の結果に基づいて、11 種類の house-keeping 遺伝子の配列を用いた MLS (Multi Locus Sequence) 解析法を確立した。一方、2008 年 6 月に沖縄県宮古島市において沖縄県初となるツツガムシ病が確認された。野外調査から、患者の発生やベクター種として疑われる *Leptotrombidium deliense* の浸潤およびオリエンチアを保有するネズミの分布は、宮古列島の池間島との関連がみられた。また、*L.deliense* は日本本土とは異なるベクター種で、東南アジアにおけるツツガムシ病の主要ベクターであったことから、池間島における本疾病の感染環が注目された。池間島という限定的な地域において *L.deliense* が単一でベクター種と強く疑われたにも関わらず、患者や野外調査で捕獲したネズミから検出されたオリエンチアの主要な外膜蛋白質である 56KDa Type specific antigen (TSA) をコードする遺伝子の配列は多様性を示した。そこで昨年度に引き続き、本法を用いて、沖縄県宮古島市の野外調査において分離された菌株の進化系統解析を行った。

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」：我が国における主要なリケッチア感染症は日本紅斑熱リケッチア (*R. japonica*) であるが、ゲノム配列は公表されていない。一方、平成 20 年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。その後、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ている。また、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哺乳動物に対して病原性を示さないが、*R. japonica* と遺伝学的に非常に近いことが明らかとなっている。そこで、*R. japonica* や *R. heilongjiangensis* の病原性に関与する遺伝子群や有用遺伝子マーカーの同定、および正確な 3 菌種間の遺伝進化系統関係の解明等を目的として、これらの 3 菌種のゲノム配列決定と比較ゲノム解析を進めた。

B.研究方法

①「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」：

福井大学・高田博士、国立感染症研究所・安藤博士、大原総合病院附属大原研究所・藤田博士および本研究グループの山本・北野らによって、2008 年 10 月から 2011 年 7 月までに実施された池間島における野外調査に関連して得られたオリエンチア分離株（クマネズミ由来 4 株とドブネズミ由来 2 株およびクマネズミに吸着していた *L.deliense* から分離された 1 株の計 7 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 5,247 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。オリエンチア主要株の配列情報としては、本研究グループが昨年度に論文発表したデータ (Nakayama *et al.*, DNA Res, 17:281-91,2010) を用いた。また、昨年度に解析した 2010 年 7~8 月の分離株（クマネズミ由来の 5 株）のデータもあわせて解析した。さらに、56KDa TSA 遺伝子

配列の解析も行い、両データの比較を行った。

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」:

配列決定に用いた *R. japonica* (YH 株と MZ08014 株;前者は本菌種の代表株であり、後者は 2008 年に宮崎県で分離された死亡患者由来株)は L929 細胞を用いて培養した (MEM 培地で 4 日間)。培養上清および培養細胞の細胞破壊液の混合サンプルを調整し、DNAase 処理後、Blood & Tissue kit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出した。また、*R. heilongjiangensis* Sendai-29 株と LON タイプ 90 株はいずれも大原総合病院附属大原研究所の藤田博己博士より分与を受けた菌株であり、*R. japonica* の場合と同様の方法で DNA 標品を得た。配列決定には次世代シーケンサ (GS-FLX Titanium) を用いた。なお、上記の DNA 抽出法では、大量のマウス DNA (培養細胞由来) が混入してくる。そのため、今回の解析では、通常の倍量の外列データを取得し、マウス由来配列を blastn 解析で除去した後にアセンブリを行うことにより概要配列を得た。また、完全配列取得のためのフィニッシング作業は、contig 末端に設計したプライマーを用いた PCR とその産物の配列決定により行った。

(倫理面への配慮)

全ての実験については、「宮崎大学病原体等安全管理規定」および「宮崎大学遺伝子組換え実験安全管理規定」に則り、宮崎大学病原体等安全管理委員会および宮崎大学遺伝子組換え実験安全管理委員会の承認を

受けた後に実施した。

C. D. 研究結果と考察

①「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」:

解析したオリエンチア菌株は、池間島という地理的に極めて限られた地域から分離・検出されたにも関わらず、56kDa TSA 遺伝子の配列は大きなバリエーションが存在し、56kDa TSA 遺伝子配列の系統解析では、台湾系 Gilliam 株、Saitama 株、Karp 株、TA678 株に一致または近縁な 4 つのグループに分類された (図 1)。TA678 株に近縁なグループは、*L. deliense* からオリエンチア遺伝子が検出されたのみで分離株は得られていない。分離株の得られている台湾系 Gilliam 株、Saitama 株、Karp 株に一致または近縁な 3 つのグループについて MLS 解析を行った。その結果、*L. deliense* 由来株を含めたすべての株は、Kato、Ikeda に比較的近縁であったが、国内で分離されている主要株とは異なる一つのクラスターを形成した (図 2)。これらの株はさらに 3 つのサブクラスターに分かれた。また、MLS 解析により明らかとなった各サブクラスター内では 56kDa TSA 遺伝子型が一致していることも明らかとなり、56kDa 外膜蛋白の異なる 3 種の近縁クローンが池間島に混在していると考えられる。また、クマネズミに吸着していた *L. deliense* 由来分離株は、Saitama 型の 56kDa 外膜蛋白を持つサブクラスターに属することが明らかとなった。この結果は、池間島におけるベクター種として *L. deliense* を強く示唆する。しかし、池間島で発生した患者サンプルの 56kDa TSA 遺伝

子解析からは、患者は台湾系 Gilliam 株に近縁なオリエンチアに感染したと推定されており、当該患者が *L. deliense* から感染したという証拠は得られていない。

池間島は日本本土（本州・四国・九州）と中国・東南アジア諸国との中間に位置しており、本土とは異なるダニ種 (*L. deliense*) が棲息していることも高田博士（福井大学）らによる野外調査で明らかになっている。さらに、*L. deliense* は東南アジアにおけるツツガムシ病の主要なベクターであることが知られている。したがって、池間島から得られるデータは、ベクター種とオリエンチア株間の関係や菌の進化系統と地理的關係、または 56KDa 外膜蛋白の進化・多様化のメカニズム解明などにおいて貴重な研究材料であると考えられる。今後さらに調査を継続するとともに、解析技術の向上を図り、多くの材料を解析することで、宮古島列島における本疾病の感染環や東南アジアとの疫学的関連を解明できる可能性がある。また、オリエンチアの地理的な隔離による進化・多様化についての新たな知見が得られるものと期待される。

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」:

R. japonica の代表株である YH 株および *R. heilongjiangensis* Sendai-29 株については完全配列の取得に成功した。その結果、YH 株の染色体は 1,283,377 bp の環状染色体であり、プラスミドは存在しないこと、また、*R. heilongjiangensis* Sendai-29 株の染色体は 1,279,157 bp の環状染色体であり、やはりプラスミドは存在しないことが明らかになった。さらに、両者および既に公開されて

いるリケッチア属細菌のゲノム配列との比較解析を行った結果、いずれも他のリケッチア属細菌のゲノムバックボーンと高い保存性を示し、大きなゲノム再編が生じていないことが明らかとなった。また、本年度に公開された中国での *R. heilongjiangensis* 分離株 (054 株) と Sendai-29 株との比較から (図 3)、86 カ所の single nucleotide polymorphism (SNP) と 12 カ所の in-del (挿入・脱落) を同定したが、両株の配列保存性は極めて高いことが明らかになった。一方、YH 株と Sendai-29 株との比較解析では、予備的な解析ではあるが、約 1.27 Mb の領域がアラインメント可能 (配列が保存されていることを意味する) であり、アラインメントされた領域の配列相同性は 99% identity という極めて高い値を示すことが明らかになった (図 4)。このことは両菌種が極めて近縁であることを意味するが、今後、両菌種の違いを正確に理解するために、*R. japonica* MZ08014 株の配列を含めた詳細なゲノム配列比較解析を行う予定である。この解析からは、両菌種を区別するために有用な遺伝子マーカーの同定も期待される。

なお、MZ08014 株については、現在は概要配列の段階であり、完全配列の取得を目指したフィニッシング作業を進めている。本株と YH 株との配列比較から、*R. japonica* 内での菌株間ゲノム多様性の実態が明らかになると期待できる。LON タイプのリケッチア種については増殖が極めて悪いため、DNA サンプルの取得が困難であったが、90 株については、解析に足る DNA 量が確保できたため、現在 GS-FLX Titanium を用いた配列決定を進めている (ライブラリーの作成段階)。非病原性である LON タイプリケ

ツチアと病原性リケツチア (*R. japonica* と *R. heilongjiangensis*) のゲノム配列比較から、病原性にかかわる遺伝子配列情報が得られると期待される。

E. 結論

池間島で分離されたオリエンチア株の MLS 解析により、同島に存在するオリエンチアは本土に分布する株とは異なる進化系統に属すること、56kDa TSA 遺伝子型の異なる 3 種の近縁クローンが混在していること、本土とは異なるダニ (*L. deliense*) が同島におけるベクターの 1 つであることが明らかとなった。池間島は日本本土と中国・東南アジア諸国との中間に位置し、しかも地理的に隔離された環境にあるため、今回得られた菌株は、56kDa TSA 遺伝子型の多様化のメカニズムやオリエンチアの進化と分布地域あるいはベクター種との関係などを解析するうえで貴重な研究対象となる。また、*R. japonica* YH 株および新興リケツチアである *R. heilongjiangensis* Sendai-29 株の全ゲノム配列の決定に成功し、さらに *R. japonica* MZ08014 株および *Rickettsia* sp. Lon type 90 株の全配列も近く取得できる見通しとなった。これらの菌株同士の詳細な全ゲノム配列比較あるいは公開されている他のリケツチア属細菌とのゲノム配列との比較解析により、我が国に存在する病原性リケツチアの特徴や病原性関連遺伝子、診断や疫学解析に有用な遺伝子マーカーの同定等が期待できる。

F. 健康危険情報

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)

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

(1) 北野智一, 平良勝也, 岡野祥, 角坂照貴, 藤田博己, 高田伸弘, 高橋守, 安藤秀二, 高野愛, 川端寛樹, 御供田睦代, 本田俊郎, 林哲也, 山本正悟: 宮古島の恙虫病に関する調査—池間島のネズミとツツガムシから検出された病原体—. 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. 11/3-5, 2011, 広島県安芸太田町.

(2) 北野智一, 平良勝也, 岡野祥, 角坂照貴, 藤田博己, 高田伸弘, 高橋守, 安藤秀二, 高野愛, 川端寛樹, 御供田睦代, 本田俊郎, 林哲也, 山本正悟: 宮古島の恙虫病に関する調査—池間島のネズミとツツガムシから検出された病原体—. 第 18 回リケツチア研究会. 2/12, 2012, 大阪市.

(3) 北野智一, 平良勝也, 岡野祥, 角坂照貴, 藤田博己, 高田伸弘, 高橋守, 安藤秀二, 高野愛, 川端寛樹, 御供田睦代, 本田俊郎, 林哲也, 山本正悟: 宮古列島における *Orientia tsutsugamushi* の分離および遺伝子解析. 第 64 回日本衛生動物学会大会. 3/29-31, 2012, 長野県上田市.

図1 池間島由来オリエンチアの56-kDa TSA 遺伝子による系統解析 (NJ法による系統樹)

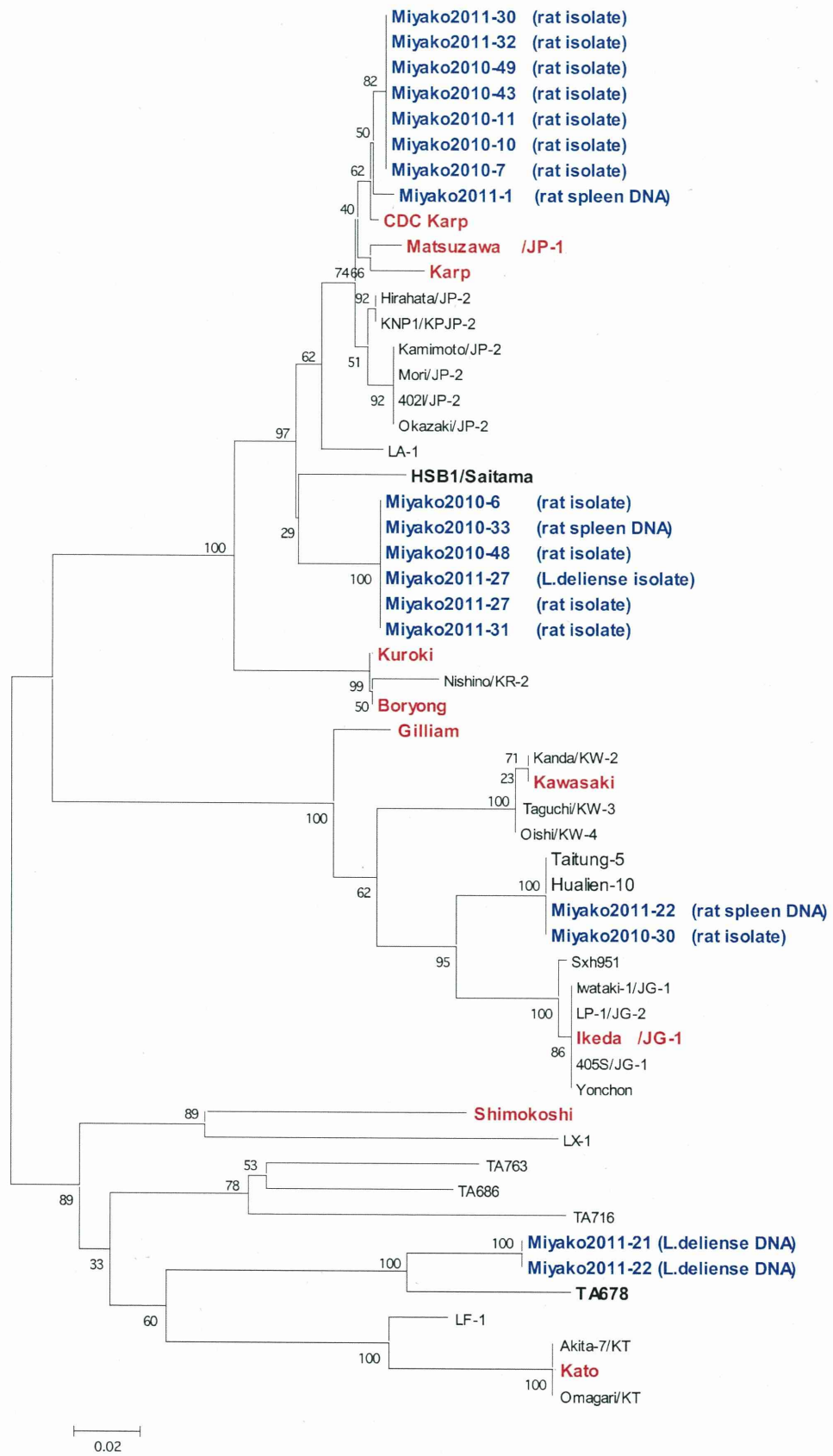


図2 池間島由来オリエンチア分離株のMLS解析 (NJ法による系統樹)

赤字で示した本土での主要血清型株のデータは昨年度に論文発表したもの (Nakayama *et al.*, DNA Res, 17: 281-291,2010) を使用した。

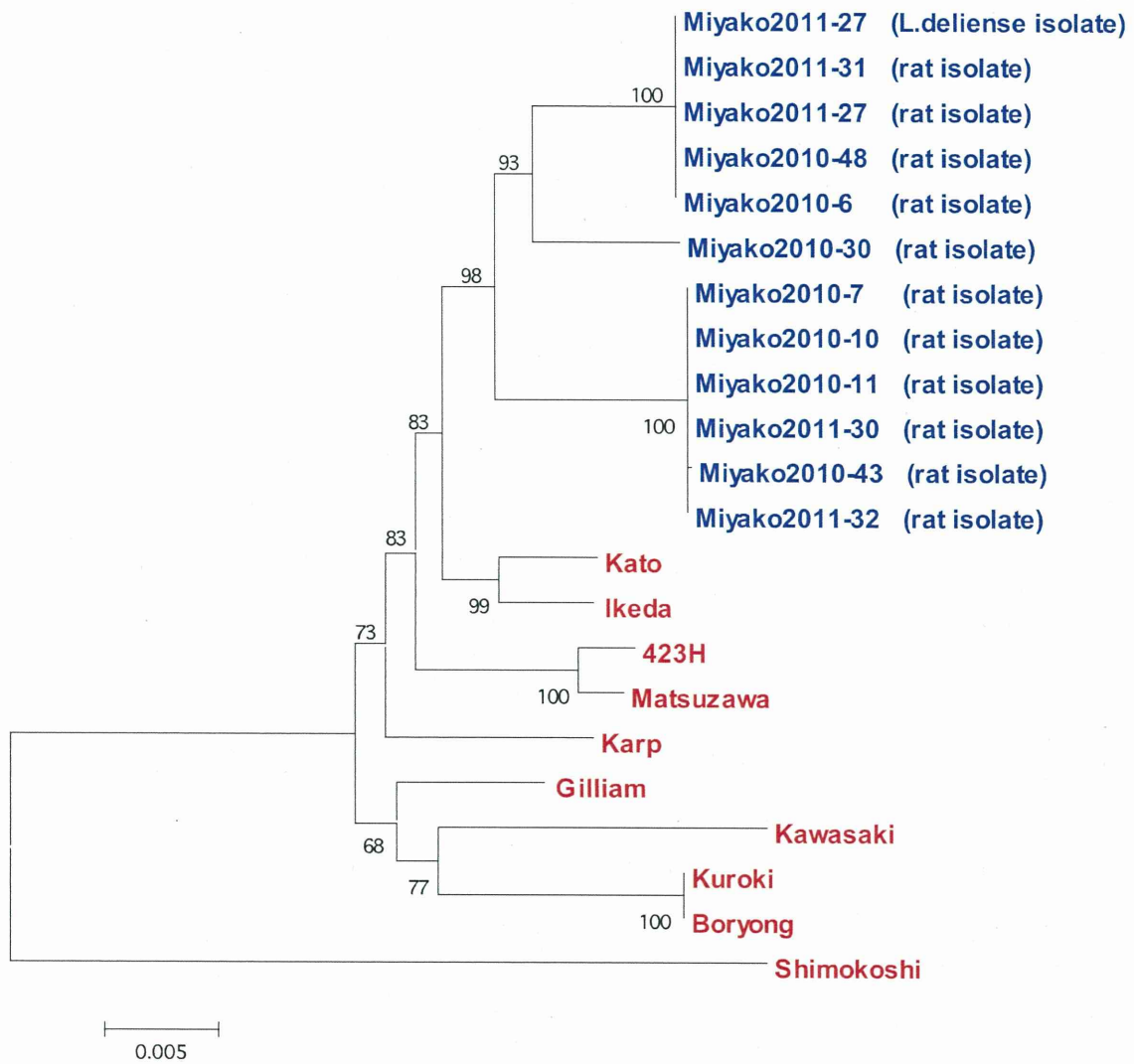


図3 *R. heilongjiangensis* 菌株間 (054株と Sendai-29株)のゲノム比較

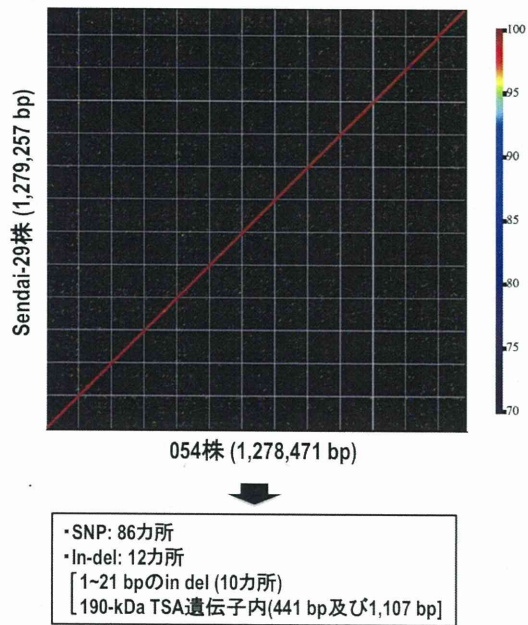
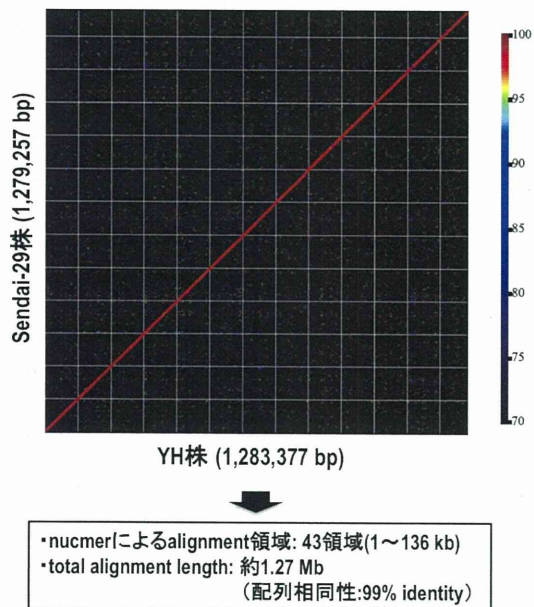


図4 *R. heilongjiangensis* (Sendai-29株) と *R. japonica* (YH株)のゲノム比較



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 愛知医科大学 講師
研究協力者 佐藤寛子 秋田県健康環境センター 研究員
研究協力者 村上英樹 秋田大学 講師
研究分担者 藤田博己 大原研究所 研究員

研究要旨

高病原性つつが虫病の発生が懸念される秋田県大仙市周辺の雄物川流域では、現在もアカツツガムシ幼虫（つつが虫病媒介性ツツガムシ）の生息密度が極めて高い地点が存在し患者の発生も認められる。多数の人が危険地区に近づく際には、個人的対策（忌避剤の使用）の他に、ツツガムシ幼虫の一時的な生息密度低減対策が求められる。そこで殺ダニ効力が期待される8種の殺ダニ製剤（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力を継続接触試験法と直接噴霧試験法で検討した。

殺ダニ効果が高かった薬剤は、フェントロチオン（スミチオン乳剤）、ピフェントリン（テルスタースプレー）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。ピフェントリン（テルスタースプレー）は、ピレスロイド系薬剤で十分な効力が期待されるが適応植物に制限があるために、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許認可には時間を要する。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）にも殺ダニ効力が確認されたが、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は効力が限定される。フェントロチオン（スミチオン乳剤）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一時的な生息数低減に効果的と考えられた。

A. 研究目的

つつが虫病はダニ媒介性の急性熱性リケッチャ感染症で北海道を除く各地で発生している。国内での主な媒介ダニは、アカツツガムシ、タテツツガムシ、フトゲツツガムシである。個人的な感染予防としては忌避剤の使用も考えられるが効果は不十分で、ヒト刺咬性の高いアカツツガムシ、タテツツガムシ幼虫の高密度生息地点では、一時的にでも生息数を減少させる手法として殺ダニ剤の散布が考えられた。1950年代には

アカツツガムシやタテツツガムシに対する DDT, Lindane (BHC) などの有機塩素系農薬の有効性が報告されたが、これらは1970年代に使用禁止となった。

そこで殺ダニ効果が期待される8種の殺ダニ製剤（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ツツガムシ効力を継続接触試験法と直接噴霧試験法で検討したので報告する。これらにより、野外で使用できる薬剤を検索することが期待される。

表 1. 使用薬剤

	成分分類	一般名	商品名
1	有機リン剤	フェニトロチオン	スミチオン乳剤 (MEP 50%)
2	ピレスロイド系	ビフェントリン	テルスタースプレー
3	オキサゾール系	エトキサゾール	バロックフロアブル
4	カーバメート系	ビフェナゼート	ダニ太郎
5	マクロライド系	ミルベマイシン	コロマイト乳剤
6	マクロライド系	イベルメクチン	アイボメクトピカル
7	ヒドロキシプロピルデンプン	デンプン	粘着くん
8	カラギーナン	カラギーナン, リンゴ酸, ダイソ	(展開剤)

(倫理面への配慮)

愛知医科大学医学部動物実験委員会の承諾を得て、実験動物管理運営規定ならびに動物保護と管理に関する法律に基づいて行われた。

B. 研究方法

1. ツツガムシ幼虫

1) *Leptotrombidium pavlovskyi*
(パブロフスキーツツガムシ)

表 2, 3, 4, 5, 7.

2) *Leptotrombidium akamushi*
(アカツツガムシ)

表 6.

使用した 2 種のツツガムシは、動物感染実験によりリケッチア非保有コロニーであることを確認した。

2. 使用薬剤

殺ダニ効果が期待される 8 種の薬剤で殺ツツガムシ効力を検討した (表 1)。

3. 試験容器

直径 25mm, 高さ 37mm の円筒形容器の底に 5mm の厚さで石膏を敷いて保水した。中間層に 2 枚の濾紙層を作成、その間に 10-20 匹程度のツツガムシ幼虫を閉じ込めた (図 1)。上層濾紙は無処理と薬剤処理、下層濾紙は薬剤滴下処理とスプレー散布処理を行った。試験容器の蓋は解放とし、同じ試験

組毎に飽和食塩水 (相対湿度 75%) を浸した密閉した保存容器内に放置することで安定した湿度を保ち、48 時間後まで継続接触試験を実施し生死を判定した (図 2)。

4. 濾紙の薬剤処理

1) 薬剤浸透濾紙: 100ml/m² を滴下し作成した。

2) 噴霧処理濾紙: 15cm の高さから 1 回噴霧し作成した。

5. ダニへの薬剤噴霧

濾紙上にツツガムシ幼虫を放飼し、直後に 15cm の高さから 1 回噴霧した。

6. 生死判定

48 時間経過後、実体顕微鏡下で判定した。小筆の先を虫体に接触させて動きの無い個体を死亡個体とした。

7. 試験法

1) 継続接触試験

容器内の 2 枚の薬剤処理濾紙層内にツツガムシ幼虫を閉じ込め 48 時間後の生死を判定した。上濾紙は薬剤処理濾紙と未処理濾紙を使用した。

2) 直接噴霧試験

下濾紙上にツツガムシ幼虫を放飼し、直後に 15cm の高さから薬剤を噴霧した。48 時間後に生死を判定した。上濾紙は薬剤処理濾紙と未処理濾紙を使用した。

表2. 継続接触試験（上下濾紙に薬剤滴下・10分後にダニを放飼）

	商品名	一般名	希釈倍率	72時間後結果
1	スミチオン乳剤	フェニトロチオン	1,000倍	30全数死亡（48時間後）
2	テルスタースプレー	ビフェントリン	-	-
3	バロックフロアブル	エトキサゾール	1,000倍	13生存, 1死亡
4	ダニ太郎	ビフェナゼート	1,000倍	11生存, 1死亡
5	コロマイト乳剤	ミルベマイシン	1,000倍	20全数生存
6	アイボメックトピカル	イベルメクチン	製剤	26全数死亡
7	粘着くん	デンブン	-	-
8	カラギーナン	カラギーナン	-	-

表3. 直接噴霧試験（上濾紙に1回噴霧・60分乾燥, 下濾紙にダニ放飼・直後に噴霧）

	商品名	一般名	希釈倍率	48時間後結果
1	スミチオン乳剤	フェニトロチオン	1,000倍	25全数死亡
2	テルスタースプレー	ビフェントリン	1,000倍	27全数死亡
3	バロックフロアブル	エトキサゾール	1,000倍	23全数生存
4	ダニ太郎	ビフェナゼート	製剤	17全数死亡
5	コロマイト乳剤	ミルベマイシン	1,000倍	22全数生存
6	アイボメックトピカル	イベルメクチン	-	-
7	粘着くん	デンブン	1,000倍	37全数生存
8	カラギーナン	カラギーナン	通常量	-

表4. スミチオン継続接触試験（上濾紙未処理・下濾紙に薬剤）

	商品名	希釈倍率	濾紙乾燥時間	48時間後結果
1	スミチオン乳剤	1,000倍	10分	31全数死亡
2	スミチオン乳剤	2,000倍	10分	35全数死亡
3	スミチオン乳剤	3,000倍	10分	33死亡, 1生存

表5. スミチオン直接噴霧試験（上濾紙未処理・下濾紙に薬剤）

	商品名	希釈倍率	方法	48時間後結果
1	スミチオン乳剤	1,000倍	ダニ放飼直後に噴霧	25全数死亡
2	スミチオン乳剤	2,000倍	ダニ放飼直後に噴霧	27全数死亡
3	スミチオン乳剤	3,000倍	ダニ放飼直後に噴霧	24死亡, 1生存

表6. アカツツガムシ幼虫に対するスミチオン継続接触試験（上濾紙未処理・下濾紙に薬剤）

	商品名	希釈倍率	濾紙乾燥時間	48時間後結果
1	スミチオン乳剤	1,000倍	10分	40全数死亡
	スミチオン乳剤	1,000倍	60分	96全数死亡
2	スミチオン乳剤	2,000倍	10分	55全数死亡
	スミチオン乳剤	2,000倍	60分	46全数死亡

表7. カラギーナン・リンゴ酸直接噴霧試験

	商品名	展開剤	方法	48時間後結果
1	カラギーナン	なし	ダニ放飼直後に噴霧	23生存, 1死亡
2	カラギーナン・展開剤	30 μ l/100ml	ダニ放飼直後に噴霧	11生存, 20死亡

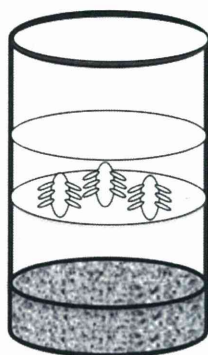


図1. 試験容器

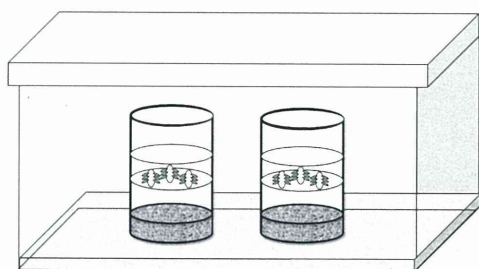


図2. 保存容器

1. 継続接触試験（表2）

1) 1,000倍希釈スミチオン乳剤とアイボメクトピカル原液は全数が死亡した。バロックフロアブル、ダニ太郎、コロマイト乳剤は有効性が認められなかった。

2. 直接噴霧試験（表3）

1) 1,000倍希釈スミチオン乳剤、テルスタースプレー（製品）は、放飼ツツガムシ幼虫の全数が死亡した。バロックフロアブル、ダニ太郎、コロマイト乳剤、粘着くんは有効性が認められなかった。

3. スミチオン乳剤継続接触試験（表4）

1) 1,000倍希釈、2,000倍希釈スミチオン乳剤では全数死亡した。3,000倍希釈スミチオン乳剤では僅かに1匹のみ生存個体がみられたが他は死亡した。

4. スミチオン直接噴霧試験（表5）

1) 1,000倍希釈、2,000倍希釈スミチオン乳剤では全数死亡した。3,000倍希釈スミチオン乳剤では僅かに1匹のみ生存個体がみられたが他は死亡した。

5. スミチオン乳剤継続接触試験（表6）

1) 1,000倍、2,000倍希釈スミチオン乳剤でアカツツガムシ幼虫全数の死亡が確認された。

C. 研究結果

表6（アカツツガムシ幼虫）以外は全てパブロフスキーツツガムシ幼虫を使用し効力試験を行った結果である。

6. カラギーナン直接噴霧試験 (表7)

1) カラギーナン・リンゴ酸混合液の噴霧では無効であったが、これに展開剤ダイソ (住友化学) を添加すると放飼ダニの2/3で死亡が認められた。

D. 考察

つつが虫病は媒介ダニであるアカツツガムシ、タテツツガムシ、フトゲツツガムシに刺されることで発症する。個人的な感染予防として忌避剤の使用も推奨されるが効果は十分とはいえない。これらのことからヒト刺咬性の高いアカツツガムシ、タテツツガムシ幼虫の高密度生息地点では生息数を減少させるために殺ダニ剤の散布が考えられた。1950年代にはアカツツガムシやタテツツガムシに対する DDT, Lindane (BHC) などの有機塩素系農薬の有効性が報告され野外実験も行われたが残留性有機汚染物質の問題から1970年代に使用禁止となった。そこでハダニ類で殺ダニ効果が認められている8種の殺ダニ剤 (農薬および天然物) を選び、2種のツツガムシ幼虫に対する殺ツツガムシ効力を継続接触試験法と直接噴霧試験法で検討し野外で使用できる薬剤を検索した。

殺ツツガムシ効力が高かった薬剤は、スミチオン乳剤 (フェニトロチオン)、テルスタースプレー (ビフェントリン) とイベルメクチン (アイボメクトピカル) で試験したツツガムシ幼虫の全数が死亡した。テルスタースプレー (ビフェントリン) は、ピレスロイド系薬剤で十分な効力が期待されるが適応植物に制限があるために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、動物体表に散布する製品であるため雑草地での使用許認可には時間を要する。天然物由来のカラギーナン (カラギーナン, リンゴ酸, 展開剤混合液) にも殺ダニ効力が確認されたが、殺ダニ効果を得るためには薬剤

によりダニ全体が被われることが必須であるため野外では効果が限定される。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り、残効性も比較的大きいとされることから散布後2~3日は降雨のない期間を選び、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一時的な生息数低減に効果的と考えられた。

E. 結論

スミチオン (フェニトロチオン) に高い殺ツツガムシ効力が得られたことから、殺ツツガムシ剤としての効果的な散布の基礎資料が提供された。使用法に注意すれば野外での殺ツツガムシ効力が十分に期待される。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 学会発表

1. 角坂照貴、佐藤寛子、村上英樹、藤田博己. ツツガムシ幼虫に対する数種薬剤の殺ダニ効力試験. 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. 2011. 11. 5. 広島.
2. 佐藤寛子、柴田ちひろ、齊藤志保子、門馬直太、高橋守、藤田博己、角坂照貴、高田伸弘、川端寛樹. 秋田県におけるアカツツガムシ生息域 (2011). 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. 2011. 11. 4. 広島.

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

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	国立感染症研究所感染症情報センター長
研究協力者	藤本嗣人	国立感染症研究所感染症情報センター第四室 室長
	花岡 希	国立感染症研究所感染症情報センター第四室 研究官
	島田智恵	国立感染症研究所感染症情報センター第二室 研究官
	佐藤弘	国立感染症研究所感染症情報センター第三室 研究官
	松井珠乃	国立感染症研究所感染症情報センター第一室 主任研究官
	富岡鉄平	元国立感染症研究所感染症情報センター FETP

研究要旨

これまで我々が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、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。一般市民に親しみ安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。

アンケート結果や、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)。

A. 背景と目的

昨年度までに、リケッチア感染症多発地域での日本紅斑熱・ツツガムシ病の一般市民における疾患知識の認知度と受診行動について調査や全国の地方衛生研究所 77 か所に対して、日本紅斑熱・ツツガムシ病の報告の有無と、一般市民および医療機関に対する両疾患の啓発の実施状況について調査を行った。その結果、疾患の認知度と受診行動に負の相関がみられる場合や、リケッチア感染症ホットスポットであるにもか

かわらず積極的な周知啓発活動が行われていない状況が明らかとなった。感染症の情報として①臨床症状、②早期診断・治療の有効性、③重症化の危険性の 3 点の認知が重要であるが、地域によっては感染症の啓発活動は畜産物や観光資源への風評被害を生じる危険性が生じるため、「風評被害への懸念」により自治体からの積極的な啓発活動の限界がみられた。そこで、風評被害を懸念する自治体の担当者との意見交換を行っ