

リケッチア感染症

岸本 寿男*・木田 浩司**

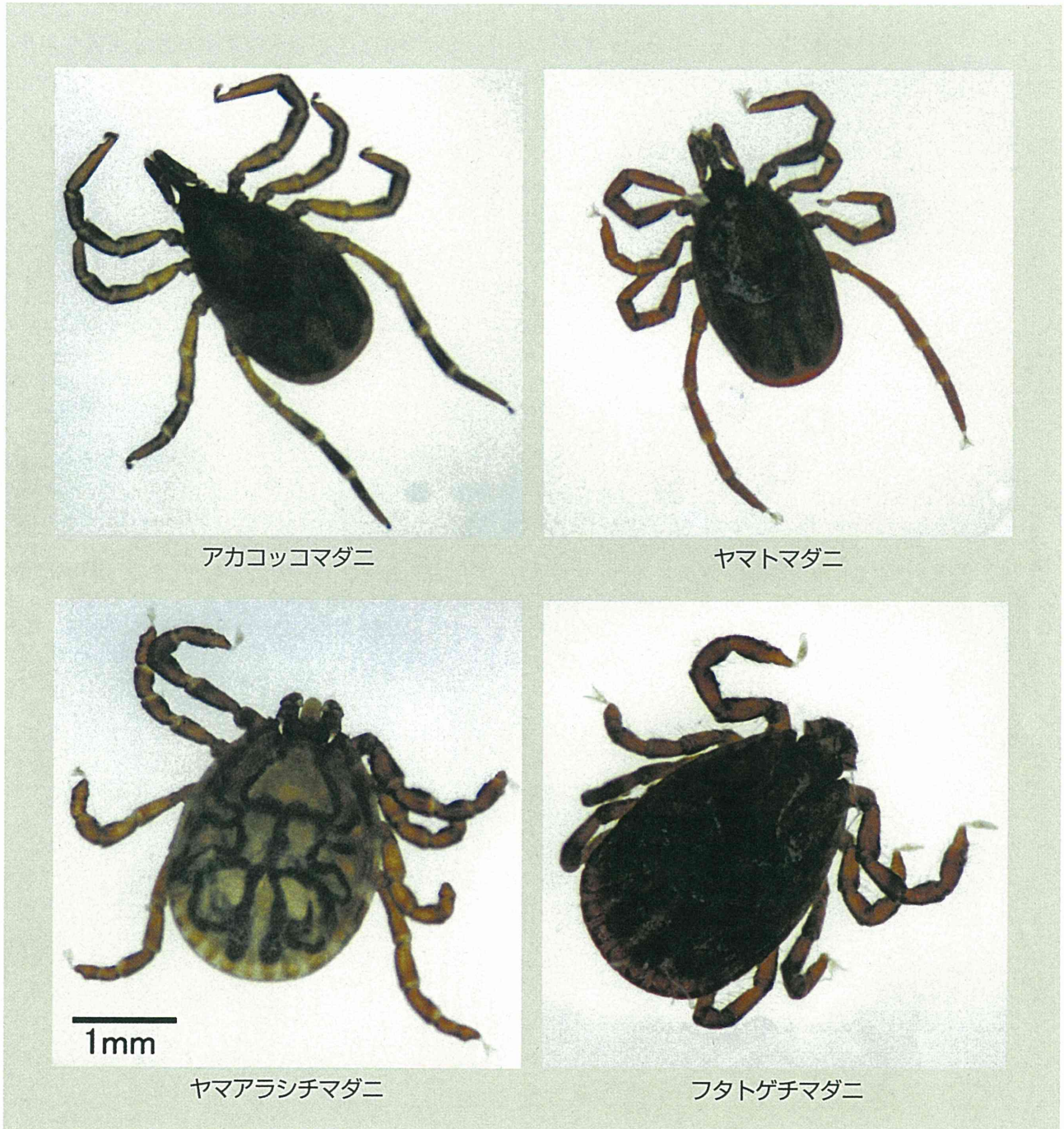
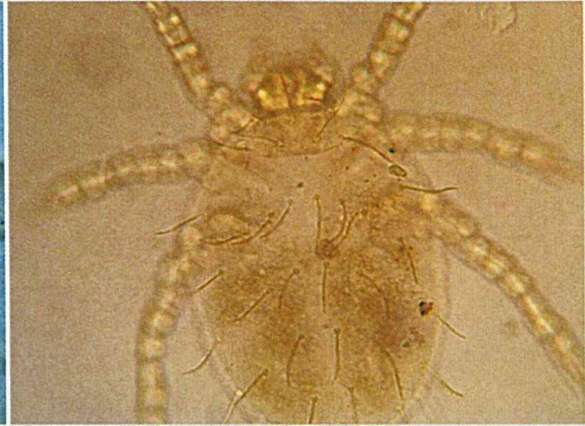


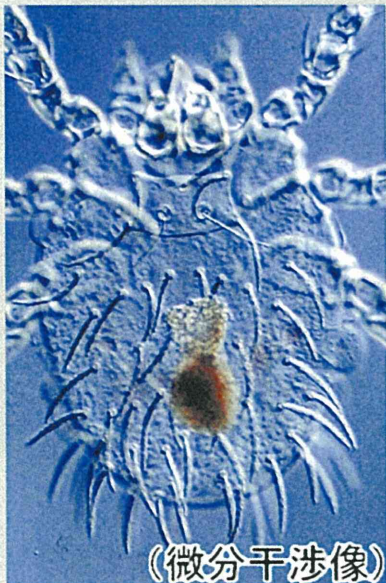
図1 各種マダニの姿

*Toshio KISHIMOTO 岡山県環境保健センター／所長
**Koji KIDA 岡山県環境保健センター



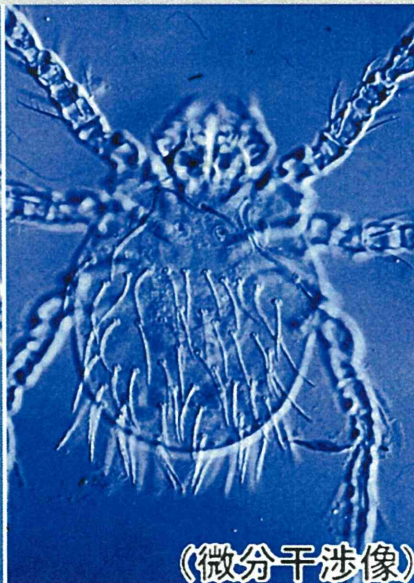
(微分干渉像)

デリーツツガムシ(宮古島)



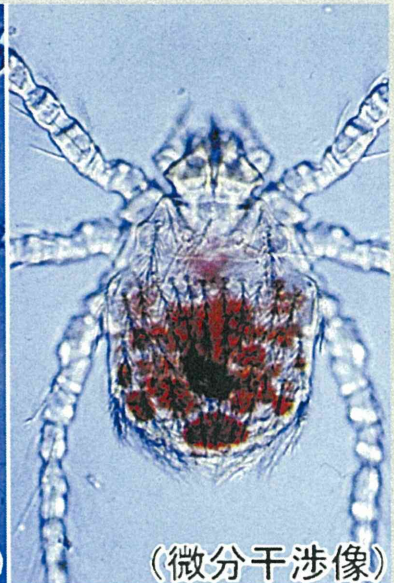
(微分干渉像)

アカツツガムシ



(微分干渉像)

タテツツガムシ



(微分干渉像)

フトゲツツガムシ

図2 各種ツツガムシの微分干渉像
(写真提供：福井大学医学部 高田伸弘博士)

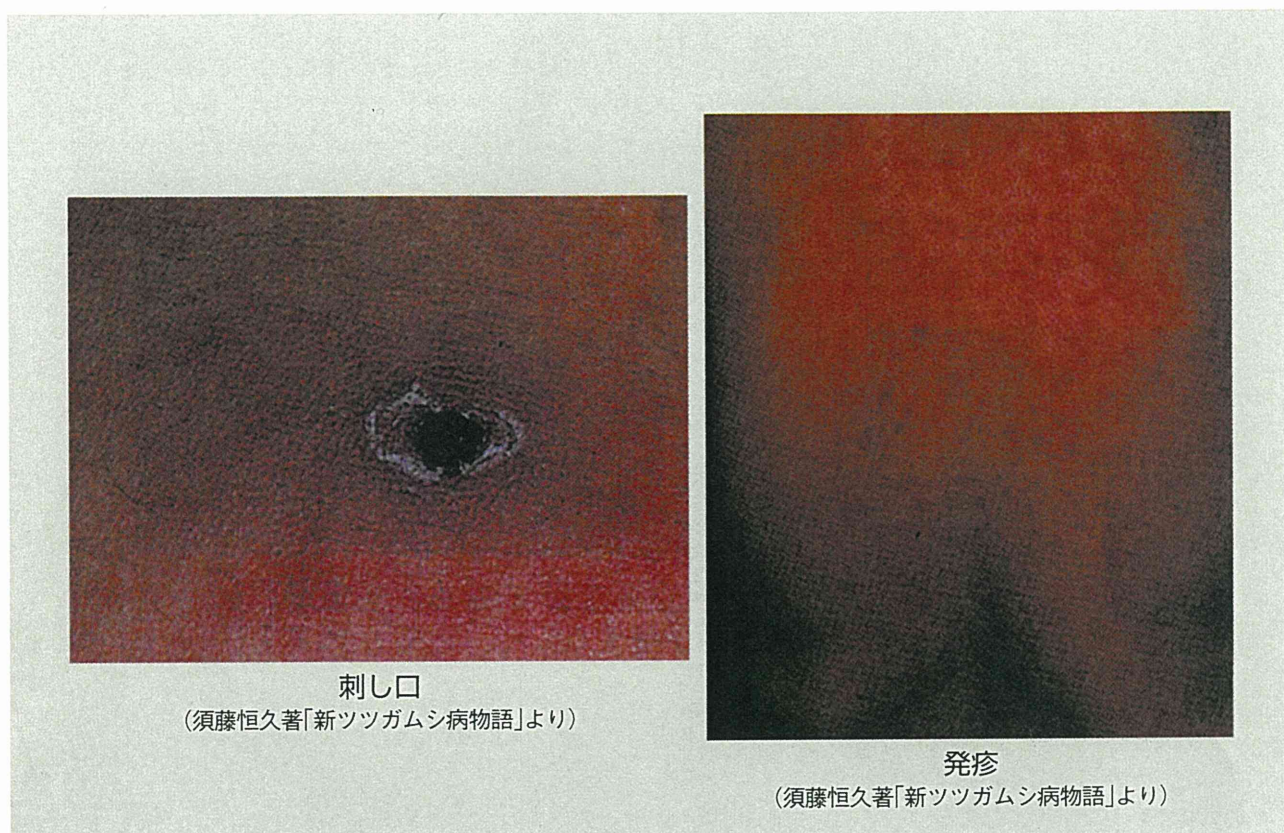


図3 つつが虫病症例の刺し口と発疹

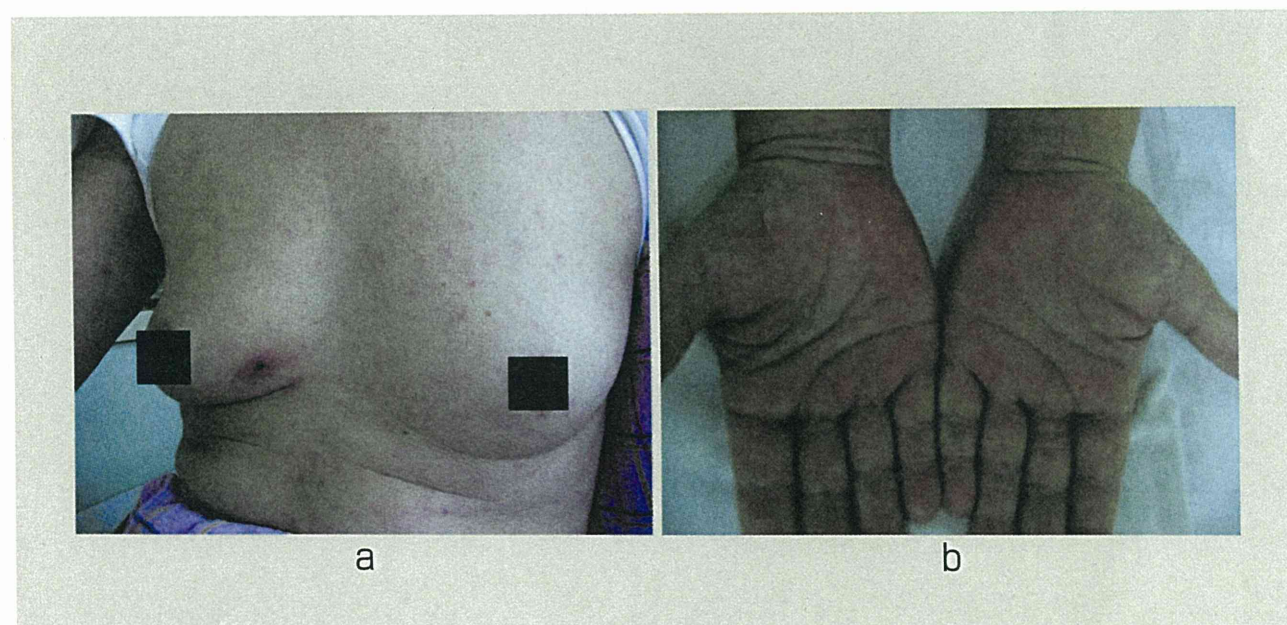
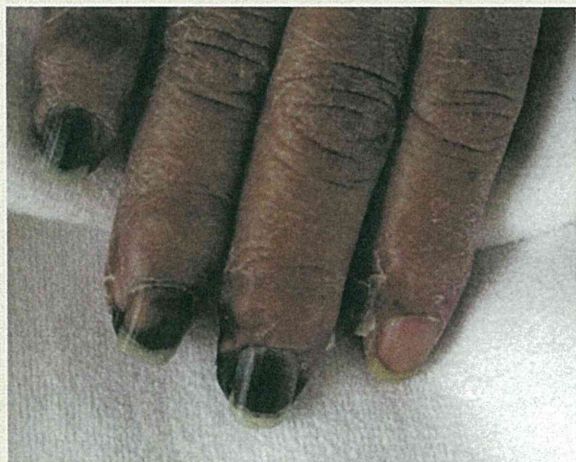


図4 日本紅斑熱症例

64歳女性。発熱、発疹、刺し口を伴った典型例。全身の発疹と前胸部の刺し口(a)ならびに手掌の発疹(b)。ペア血清での*R. japonica*に対する有意な抗体価の上昇と、刺し口の痂皮からの*R. japonica*遺伝子検出にて日本紅斑熱と確診した。入院後minocycline 200mg/日の点滴で改善した。
(提供：川上万里先生)



右手指



左手指



右足趾



左足趾

図5 日本紅斑熱による感染性電撃性紫斑病症例の四肢末梢の黒色壊死
(提供：山下眞史先生)

2 特殊微生物の抗微生物薬感受性測定法

クラミジア，リケッチア

KISHIMOTO TOSHIO/KIDA KOJI/KUZUYA MITSUTAKA/HAMANO MASAKO/FUJII RITSUSHI

岸本寿男/木田浩司/葛谷光隆/浜野雅子/藤井理津志

●岡山県環境保健センター

要旨 クラミジアならびにリケッチアは、偏性細胞内寄生細菌であり、抗微生物薬感受性測定法も培養細胞に感染させた病原体を用いて行う。病原体取扱い規約上の制限や施設設備、技術の煩雑さなどから薬剤感受性測定を行える施設は限定されているのが現状である。しかし近年、耐性株が出現しつつあるとの報告があり、分離株の各種薬剤に対する感受性検討の必要性は増している。ここでは国内で標準法が存在するクラミジアのMIC，MLC測定法について解説し、リケッチアについても本邦で行われてきたMIC測定法について述べた。

はじめに

クラミジアならびにリケッチアは、偏性細胞内寄生細菌で、その分離培養、増殖継代には培養細胞や、動物等を用いる必要があり、液体培地や寒天培地などの無細胞培地で増殖する一般細菌とは大きく異なる。抗微生物薬感受性測定法も培養細胞に感染させた病原体を用いて行うため、細胞およびこれらの病原体の扱いに習熟した者が行う必要がある。さらに病原体取扱い規約上、クラミジア(*Chlamydomphila pneumoniae*, *Chlamydomphila psittaci*, *Chlamydia trachomatis*)は、通常安全キャビネット内のP2レベルで取り扱えるが、*C. psittaci*の10L以上の大量培養を行う場合は2重ドア、陰圧室内に設置した安全キャビネット内のみのP3レベルとなる。またリケッチアはすべてP3レベルで取り扱うことが義務付けられている。したがってクラミジアやリケッチアの薬剤感受性測定を行える施設はこれらの設備をもつ大学、研究所等に限られ、その中でも実際に取り扱える施

設はごく一部であり、施行者も限定されることから技術の継承が困難な現状である。しかしながら、元来耐性菌が出現しにくいとされていたクラミジアやリケッチアにも、近年耐性株が出現しつつあるとの報告が外国でみられており、分離株の各種薬剤に対する感受性を検討することは、薬剤耐性株の監視、新薬の効果の検討、治療法の開発に欠かせない。ここでは国内で標準法が存在するクラミジアについての最小発育阻止濃度 (minimal inhibition concentration : MIC) や最小殺菌濃度 (minimal lethal concentration : MLC) の測定法を中心に解説し、リケッチアについても本邦で行われてきたMIC測定法について述べる^{1,2)}。

1 クラミジアの薬剤感受性について

各種クラミジアに対する抗菌剤のMICは属、種の間でほとんど差は認めない。ただしサルファ剤に対しては*C. trachomatis*のみが感受性を持っている。また株間では今後耐性株の出現と広がり

の状況によって感受性が異なってくる可能性があり注意が必要である。抗菌力が優れているものはテトラサイクリン系薬の minocycline (MINO), doxycycline (DOXY), マクロライド系薬では clarithromycin (CAM), azithromycin (AZM) で、またケトライド系薬の telithromycin (TEL) もほぼ同等で、これらの MIC は 0.015~0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と優れている。その他、フルオロキノロン系薬も tosufloxacin (TFLX) や moxifloxacin (MFLX) の MIC 値は前述のものと匹敵し levofloxacin (LVFX) はそれに次ぐ。臨床ではあまり使用されないものの refampicin (RFP) や chloramphenicol (CP) も優れている。一方、細胞壁合成阻害薬であるペニシリン系やセフェム系などの β -ラクタム系薬、またアミノ配糖体は、クラミジアにはほとんど無効である。実験的に細胞に同期感染させて MIC を測定するので、その系では β -ラクタム系薬は網様体 (RB) の時期から基本小体への成熟を阻害し giant RB を形成する。しかし薬剤を除去すると再び基本小体 (EB) への成熟を始める。実際の臨床例では、封入体の中にはあらゆる時期のクラミジア粒子が存在するため無効となる。

2 クラミジア MIC 測定法

クラミジアの薬剤感受性測定法については、諸外国での方法と原理的には同様の方法に準じつつ、国際的に通用する統一化を目指して日本化学療法学会の MIC 測定法検討委員会にて検討がなされた結果、わが国での標準法として 1992 年に示された^{1,2)}。クラミジア MIC 測定法と MLC 測定法があり、現在でもほぼこれに準じて施行されている。以下はこれらのマニュアルを基にその後の知見や変更点を含めて概略を解説する。

●原 理

被験クラミジアを接種した HeLa229 細胞を抗菌薬存在下で培養し、封入体形成阻害を示す最小抗菌薬濃度を検定する。

●測定方法

1) 培養細胞の準備

MIC 測定には 24 穴細胞培養用 plastic plate を用いる。1.5~2.0 $\times 10^5/\text{mL}$ の HeLa229 細胞を含む培養液 [Eagle's MEM+熱非働化牛胎児血清 (FCS) 10%] を plate の各 well (直径 14mm のカバーガラスを予め入れておく) に 1mL ずつ分注する。37°C, 5%CO₂ incubator で 24 時間培養して confluent monolayer の形成を確認後、培養液を吸引除去する。各 well に 10⁴IFU/well (4 \times 10⁴IFU/mL, 0.25mL) の検討すべきクラミジア株を接種する。なお reference strain も同時に接種し、測定法に誤りが無いことを確認することが望ましい。室温 500~900 $\times g$ にて 1 時間遠心吸着を行い、上清を吸引除去する。各薬剤濃度 (master dilution 法にて希釈) を含む培養液 (Eagle's MEM+FCS+終末 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cycloheximide) を各 well に 1mL ずつ分注する。下記の条件にて培養する。

C. trachomatis 培養条件：37°C, 5%CO₂ incubator で 72 時間培養して判定する。

C. psittaci 培養条件：37°C, 5%CO₂ incubator で 48 時間培養して判定する。

C. pneumoniae 培養条件：35°C, 5%CO₂ incubator で 72 時間培養終了後、培養液を吸引し、直接蛍光抗体法 (DFA 法) にて染色判定する。

100 倍を判定倍率とし蛍光顕微鏡にて全視野を観察する。封入体が全く認められないものを陰性と判定し、封入体を抑制した最小薬剤濃度を MIC とする。

●MIC 測定に関連する注意事項

1) 使用細胞

使用細胞の種類としてはいずれのクラミジアにも HeLa229 細胞を使用することが推奨されているが、*C. pneumoniae* 培養には、近年ではより増殖が良好な HL 細胞や HEp2 細胞等が主に用いられるようになっており、これらを使用しても MIC 値に大きな変動がないため、*C. pneumoniae*

表1 各抗菌薬のクラミジアに対する MIC ($\mu\text{g/mL}$)

	<i>C. trachomatis</i>	<i>C. psittaci</i>	<i>C. pneumoniae</i>	
	D/UW-3/Cx	Budgerigar No.1	TW-183	KKpn-1
minocycline	0.016~0.063	0.016~0.063	0.016~0.063	0.016~0.063
doxycycline	0.031~0.063	0.016~0.063	0.031~0.063	0.031~0.063
erythromycin	0.125~0.5	0.25~0.5	0.25~0.5	0.25~0.5
clarithromycin	0.008~0.031	0.008~0.031	0.008~0.031	0.008~0.031
roxithromycin	0.063~0.125	0.063~0.125	0.063~0.125	0.063~0.125
azithromycin	0.063~0.125	0.063~0.125	0.063~0.125	0.063~0.125
ofloxacin	0.25~1.0	0.25~1.0	0.25~1.0	0.25~1.0
ciprofloxacin	0.25~1.0	0.25~1.0	0.25~1.0	0.25~1.0
tosufloxacin	0.125~0.25	0.125~0.25	0.25~0.5	0.25~0.5
levofloxacin	0.25	0.063	0.5	0.5
ampicillin	128<	128<	128<	128<

に関しては必ずしも HeLa229 細胞に限定する必要はないと考えられる。

2) 接種菌量 (感染力価)

菌株は、増殖させて十分に封入体が観察できた時点で、培養液を除去後、等量のクラミジア保存液 (SPG: sucrose, KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , glutamic acid, 蒸留水) を加えラバーポリスマンにて感染細胞を剥離する。超音波やピペッティングなどによってその細胞からクラミジアを遊離させた上、 $500\sim 900\times g$ にて5分間遠心する。その上清を菌浮遊液とする。作成した浮遊液は -72°C にて凍結保存し、使用時に解凍する。接種時の濃度が高すぎるとクラミジアの即時毒性により細胞に損傷を与え、感染率もそれほど上がらない。また低すぎると封入体数が少なく判定が困難である。 10^4 IFU/well が適当な接種量である。

3) IFU (inclusion forming unit) の測定法

Confluent monolayer の HeLa229 細胞に段階希釈した一定量のクラミジア浮遊液を接種、培養の後、生じた封入体を測定して、封入体数、接種量、希釈倍率から単位浮遊液量当たりの封入体形成単位、すなわち IFU を算定する。

4) Reference strain

臨床分離株の測定に関しては reference strain を同時に使用して MIC 測定法の正確性の確認をすることが望ましく、報告に際してはそれらの株

に対する薬剤の MIC も付記することが推奨されている。Reference strain には、*C. trachomatis* D/UW-3Cx 株、*C. psittaci* Budgerigar No.1 株が指定されており、これらは国立感染症研究所から分与を受けることができる。最近バイオテロに関連して輸入ができなくなった *C. psittaci* 以外のクラミジアは ATCC から購入することも可能であり、*C. pneumoniae* については ATCC から購入するか、国内分離株を国立感染症研究所から分与を受ける。Reference strain に対する MIC 測定成績と筆者らが検討した臨床分離株の各種薬剤に対する成績を表1に示す³⁻⁵⁾。

5) 薬剤希釈

薬剤の希釈方法の違いによって薬剤濃度の違いが生じ、MIC に影響を与える可能性がある。特に少量の溶液にて希釈系列を作成した場合、または2倍希釈を何度も繰り返し施行した場合、その誤差は大きくなる。したがっていわゆる master dilution 法にて希釈する。たとえば各薬剤に関し目的とする最大薬剤濃度の20倍を各薬剤により指定された溶液にて master 液を作製し、使用時には培養液 9mL に20倍濃度薬剤液 1mL を加え、10mL の2倍濃度溶液とした後、5mL 単位でピペットを使用し、2倍希釈系列を作製するなどである。2倍希釈は6回までに留める。

6) 薬剤濃度

β -lactam 系薬などの高 MIC 薬では、高濃度にて封入体が観察されるので、薬剤濃度の上限は $128 \mu\text{g/mL}$ まで算定して打ち切る。薬剤濃度の表示は $1 \mu\text{g/mL}$ を基準とし、0.002, 0.004, 0.008, 0.016, 0.031, 0.063, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0, 32.0, 64.0, $128.0 (\mu\text{g/mL})$ などとする。

7) Cycloheximide

クラミジア増殖は宿主細胞の蛋白合成を阻害すると増強され、封入体が観察されやすくなる。したがって、MIC 測定に際しては終末 $1 \mu\text{g/mL}$ の cycloheximide を加える。

8) 温度条件

それぞれのクラミジアの生物学的特性によって MIC 測定時の培養温度を設定している。いずれも $\pm 1^\circ\text{C}$ は許容範囲であるが、incubation 温度が高くなると、成績に大きな影響を及ぼすので温度条件は厳守する必要がある。

9) MIC の判定

判定には DFA 法が用いられるが、現在すべてのクラミジアを染色できるモノクローナル抗体で国内で入手できるものは、クラミジア FA デンカ®のみとなっている。カバーグラスを取り出し、エタノールにて室温 15 分間固定、乾燥後遮光して染色する。直ちに染色できない場合は、固定乾燥後、 -20°C に保存できる。観察倍率としては、400~1,000 倍の高倍率で観察すると、変形した micro inclusion が数段階にわたり少数残存することがあるので消失判定が困難である。そこで変形した micro inclusion が見えにくい 100 倍にて観察する。

3 クラミジア MLC 測定法

●原 理

被験クラミジアを接種した HeLa229 細胞を抗菌薬存在下で培養し、その抗菌薬効果が、抗菌薬を除去し再培養してもなお封入体の再形成阻害を示す最小抗菌薬濃度を検定する。

●測定方法

培養細胞の準備やその他の条件等は MIC 測定法と同様である。ただし MLC 測定に際しては、同一測定系で同時に MIC 測定を行う必要がある。以下に MIC 測定法と大きく異なる点についてのみ記載する。

1) 抗菌薬除去

抗菌薬含有培養液を吸引除去する。感染細胞を 37°C に温めた Eagle's MEM 1mL (血清添加なし) で 3 回洗浄する。抗菌薬無添加培養液 (Eagle's MEM + 熱非働化 FCS + 終末 $1 \mu\text{g/mL}$ cycloheximide) を 1mL ずつ分注する。C. trachomatis および C. psittaci は 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$ は許容範囲)、C. pneumoniae は 35°C ($\pm 1^\circ\text{C}$ は許容範囲) にて、いずれも 5%CO₂ incubator で 24 時間培養する。さらに新たな抗菌薬無添加培養液と交換し、C. trachomatis および C. pneumoniae は 48 時間、C. psittaci は 24 時間再び培養する。

2) MLC 判定

MIC 測定法マニュアルに従って、培養液を吸引後 DFA 法にて染色判定する。100 倍を判定倍率とし、蛍光顕微鏡にて全視野を観察し封入体を以下の 3 type に区別する。Normal inclusion とは、MIC, MLC の control に認められる inclusion、もしくはこれに準じる大きさの inclusion で 100 倍にて明瞭に認められるもの。Small inclusion とは、normal inclusion より明らかに小さいが、100 倍で明瞭に inclusion と識別できるもの。Micro inclusion とは、100 倍で spot 状、もしくはやや大きめの spot として認められるが、これを 200 倍で見ると数個のクラミジア菌体を含む inclusion であることが識別できるものとする。判定は、normal または small inclusion を全く認めない場合を、封入体再形成阻害ありと判定する。また micro inclusion のみでは継代培養を繰り返しても封入体を再形成しないため、再形成阻害ありと判定する。このような判定により、封入体再形成が阻害された最小抗菌薬濃度を MLC とする。

表2 各抗菌薬のクラミジアに対する MLC ($\mu\text{g/mL}$)

	<i>C. trachomatis</i>	<i>C. psittaci</i>	<i>C. pneumoniae</i>	
	D/UW-3/Cx	Budgerigar No.1	TW-183	KKpn-1
minocycline	0.125~0.5	0.5~4.0	0.063~0.125	0.063~0.125
doxycycline	0.125~1.0	4.0~8.0	2.0~4.0	2.0~4.0
erythromycin	2.0~4.0	16~32	2.0~8.0	2.0~8.0
clarithromycin	0.03~0.125	0.5~2.0	1.0~2.0	1.0~2.0
ofloxacin	2.0~16	64~128	1.0~2.0	1.0~2.0
ciprofloxacin	ND	ND	0.5~1.0	0.5~1.0
tosufloxacin	ND	ND	0.25	0.25
levofloxacin	0.25~0.5	8.0	0.5	0.5

ND: no data

3) Reference strain

Reference strain に対する MLC 測定成績と筆者らが検討した臨床分離株の各種薬剤に対する成績を表2に示す³⁻⁵⁾。MLCはMICよりばらつきがあり、レンジがやや大きくなるのは測定原理上やむを得ない。

4 リケッチアの薬剤感受性について

各種リケッチアに対する抗菌剤のMICは、報告自体が少ないものの、概ね以下のような成績が報告されている⁶⁻⁸⁾。つつが虫病の病原体 *Orientia tsutsugamushi* については、MINO, DOXY に対する効果は標準株の Kato, Karp, Giliam をはじめ Kawasaki, Kuroki, Shimokoshi 間で $0.012\sim 0.39\ \mu\text{g/mL}$ とほとんど差は認めない。実際の臨床事例でも同様で、これらが投与されれば、24~48時間以内に速やかに解熱することから第一選択薬になっている。テトラサイクリン系薬が奏功するまでの時間が抗菌薬としては非常に早いことについては、抗菌効果のほかに抗サイトカイン効果による効果が指摘されている。一方、マクロライド系薬の leucomycin (LM) も MIC では同等の優れた成績を示し、他のマクロライド系薬の CAM, AZM の実験室内の MIC データでは中等度の効果が期待できる値を示す⁶⁾。しかし臨床的には、実際には国内のリケッチア症例の治療にマクロライド系薬は推奨されておらず、MIC

と臨床効果との乖離については不明な点が多く残されている。フルオロキノロン系薬も、日本紅斑熱ではテトラサイクリン系薬との併用は推奨されるものの、つつが虫症例でマクロライド系薬やフルオロキノロン系薬が奏功した症例の報告はほとんどなく、推奨されていない。*O. tsutsugamushi* に対する norfloxacin, ciprofloxacin, ofloxacin の MIC はそれぞれ $50\sim 100\ \mu\text{g/mL}$, $6.25\sim 25\ \mu\text{g/mL}$, $3.12\sim 25\ \mu\text{g/mL}$ と比較的高いと報告されているが、*R. japonica* と同じ紅斑熱群のロッキー山紅斑熱の病原体 *R. rickettsii* に対しては norfloxacin, ciprofloxacin, ofloxacin の MIC はそれぞれ $1.56\ \mu\text{g/mL}$, $0.19\ \mu\text{g/mL}$, $0.09\ \mu\text{g/mL}$ と良好であり、臨床効果とある程度相関が認められている⁸⁾。また CP の *O. tsutsugamushi* に対する MIC は $0.39\sim 6.25\ \mu\text{g/mL}$, *R. japonica* に対しては $5.0\ \mu\text{g/mL}$ と報告されやや高い。一方、細胞壁合成阻害薬であるペニシリン系やセフェム系などの β -ラクタム剤、またアミノ配糖体は、クラミジア同様リケッチアにはほとんど無効である。

5 リケッチア MIC 測定法

リケッチアの薬剤感受性測定法については、国際的に通用する統一化はなされていない。これまでに報告された測定方法や成績を示す⁶⁻⁸⁾。

●原 理

被験リケッチアを接種した BS-C40 細胞（アフリカミドリザル腎細胞）および L-929 細胞（マウス繊維芽細胞）を抗菌薬存在下で培養し、培養細胞中のリケッチアを染色鏡検し、その存否によって最小抗菌薬濃度を検定する。

●測定方法

チャンバー付きマルチスライドガラスの各チャンバーに、約 10^4 /mL の未感染細胞とリケッチア感染細胞を 3:1 に 2%FCS+MEM に懸濁したものを、0.4mL 宛分注し、さらに被検薬剤をそれぞれ 100 μ g/mL から 1/2 段階の濃度に含むように希釈した MEM を 40 μ L 宛添加し、5%CO₂ incubator 37°C 内で静置培養する。O. tsutsugamushi では培養 4~6 日に、R. japonica では 10 日目にチャンバー枠を除いたスライドガラスを洗浄しメタノール固定したのち、2% Giemsa あるいはマキャベロ法等で染色後、光学顕微鏡で観察し 1,000 倍の倍率で薬剤希釈濃度の高い方から順に観察し、リケッチアの感染・増殖が認められなくなる薬剤濃度をもってその薬剤のリケッチアに対する MIC とする。

6 クラミジアとリケッチアの 有効薬剤耐性・低感受性株の出現

近年問題になりつつあるクラミジアとリケッチアの有効薬剤低感受性株についての話題を紹介する。クラミジアにおける抗菌薬耐性菌の存在については、テトラサイクリン系、フルオロキノロン系、マクロライド系、REP などに対する耐性菌が存在するとする報告が散見される。また REP やその誘導体に対する耐性菌が *in vitro* で耐性化を誘導することも報告されているが、現時点では国内で問題になった事例の報告はない⁹⁾。いまだこれらの抗菌薬耐性と臨床的無効例の関連については不明な点が多く、米国 CDC でのコンセンサスミーティングでは、薬剤感受性測定に用いる培養細胞やチャレンジ菌数、感受性の測定方法とし

て、抗菌薬の添加や除去のタイミングなどの標準化、MIC 等の定義やブレイクポイントの決定が必要としている。わが国では、分離培養法は日常的には行われていないため、クラミジアに対する耐性菌の存在を発見することは困難な現状である。抗菌薬耐性菌の存在が疑われた場合の対応が求められており、そのためにも分離の重要性を見直す必要がある。

リケッチアについては O. tsutsugamushi に対する DOXY, CP, AZM に対する耐性化がタイをはじめ欧米でも報告されており、問題視されている^{10,11)}。欧米ではテトラサイクリン系の使用薬剤は DOXY に限られ、MINO を使用している国はほぼ日本のみであり MINO については薬剤耐性のリケッチアの報告はない。今後 DOXY 耐性株が増えた場合、諸外国で MINO の再評価の必要性も出てくるかもしれない¹²⁾。

おわりに

以上述べたようにクラミジアの MIC 測定については、病原体を取り扱う設備や安全精度管理、技術者の技術継承の面で解決すべき課題が多い。リケッチアについては、現在残念ながら国内で MIC を測定できる状況にある施設は確認できていない。今後の耐性菌への対応、新規薬剤の検討等の要望に答えられる体制づくりが今改めて問われている。

文 献

- 1) クラミジア MIC 標準委員会(代表:熊本悦明): クラミジア MIC 測定法-日本化学療法学会標準法-(1991年改定版). *Chemotherapy* 40: 303-307, 1992.
- 2) クラミジア MIC 標準委員会(代表:熊本悦明): クラミジア MLC 測定法-日本化学療法学会標準法-(1991年改定版). *Chemotherapy* 40: 315-321, 1992.
- 3) 岸本寿男: クラミジア・ニューモニエ感染症. *臨床と微生物* 25: 143-151, 1998.
- 4) 岸本寿男: クラミジア, リケッチア. *小児科* 41: 872-877, 2000.
- 5) 佐藤 梢, 安藤秀二, 岸本寿男ほか: *Chlamydia trachomatis* に対する gatifloxacin の *in vitro* 抗菌作用および殺菌作用. *あたらしい眼科* 25: 85-87, 2008.
- 6) 浦上 弘, 多村 憲, 宮村達夫ほか: 最近分離された恙虫病リケッチアの化学療法剤に対する感受性について. *感染症学雑誌* 62: 931-937, 1988.

- 7) 須藤恒久, 畠山 浩, 伊藤玲悦ほか: 日本で分離された紅斑熱リケッチアの各種化学療法剤に対する感受性について. 感染症学雑誌 63: 35-38, 1989.
- 8) 宮村定男, 太田達夫, 多村 憲: 各種化学療法剤に対する *Rickettsia prowazekii*, *R. rickettsii*, *R. sibirica* および *R. tsutsugamushi* の感受性の比較. 日本細菌学雑誌 44: 717-721, 1989.
- 9) Kutlin A, Kohlhoff S, Roblin P *et al.*: Emergence of resistance to rifampin and rifalazil in *Chlamydophila pneumoniae* and *Chlamydia trachomatis*. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 903-907, 2005.
- 10) Strickman D, Sheer T, Salata K *et al.*: *In vitro* effectiveness of azithromycin against doxycycline-resistant and -susceptible strains of *Rickettsia tsutsugamushi*, etiologic agent of scrub typhus. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 2406-2410, 1995.
- 11) Kollars TM Jr, Bodhidatta D, Phulsuksombati D *et al.*: Short report: variation in the 56-kD type-specific antigen gene of *Orientia tsutsugamushi* isolated from patients in Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 68: 299-300, 2003.
- 12) Mahara F, Iwasaki H: Tetracycline: A historical pitfall and additional concept on the treatment of rickettsial diseases. Ehrlich II -2nd World conference on Magic Bullets. October, 2008. (abstract)

* * *

ダニ関連細菌感染症，特にリケッチア症の新たな展開

福井大学医学部¹⁾，岡山県環境保健センター²⁾高田 伸弘¹⁾，岸本 寿男²⁾

本学会総会においてリケッチア症全般にわたるシンポジウムが開催されたことは近年記憶になく，今回，リケッチアを中心としたダニ関連細菌感染症の臨床，診断，疫学，感染環の新たな研究の展開をテーマに，それぞれの分野の専門家によるシンポジウムが開催されることは，以下の点からタイムリーで意義深いことと考える。まず，つつが虫病は感染症法の4類感染症のうち2番目に多い疾患であり，数百例を維持し，重症例もみられている。日本紅斑熱では報告症例の急増や，相次ぐ死亡例発生で社会的な関心が高まっている。また，新型紅斑熱リケッチア症の存在，ヒトアナプラズマ症の本邦初確認，発疹熱の輸入例などが確認され，それらの実態や病態の解明，ならびに対策の必要性が明らかとなった。一方，*O.tsutsugamushi*，*R.japonica*などのゲノム情報を利用した新たな疫学研究や病原性の解析，診断ツールの開発そして治療，予防法への応用等も可能な状況となりつつある。もちろん，媒介種ダニ，動物等の生態系に内在するリケッチア類について，その存在様式や多様性を解明し感染リスク度を測る仕事も急展開している。そこで今回はこれらの分野での最近の研究成果や現状を発表いただき，リケッチア症を中心としたダニ媒介性細菌感染症の総合対策へ向けて議論を交わしたいと考えている。

まず前半の3題は臨床面での話題として，岩崎博道先生からリケッチア症例にみられる重症化について，サイトカインの動態等，患者の免疫応答と治療についてお話しいただく。次に診断についての話題として，安藤秀二先生にダニ関連病原体遺伝子の症例試料からの検出の意義や血清診断の課題について述べていただく。さらに大橋典男先生から本邦におけるアナプラズマ症の確認と診断における課題について述べていただく。引き続き後半の3題は感染環の話題として，矢野泰弘先生からダニとリケッチアの相互関係を見える情報として電顕による微細構造学をお示しいただく。次いで田原研司先生からは島根半島をモデルとして日本紅斑熱の感染環につき特に動物相や社会環境を含む多発要因を分析いただく。最後に，藤田博己先生からダニ類が保有する紅斑熱リケッチアの多様性，特に最近知られた新型紅斑熱の実態を明らかにしていただく。

以上，6つのご発表を基に，演者，司会ならびにフロア間で時間の許す限り活発な議論がなされることを期待するとともに，ご参加の方々に，今では我国のどこでも見出し得る常在感染症としてのリケッチア症について，認識を新たにさせていただく機会になれば，本シンポジウムの目的はほぼ達せられることになろう。

1. リケッチア感染症の病態とサイトカイン動態から何がみえてくるか

福井大学医学部内科学 (1)¹⁾，福井大学医学部医動物学²⁾岩崎 博道¹⁾，高田 伸弘²⁾，上田 孝典¹⁾

感染症の重症化は本来，病態の顕在化であり病原体に由来する毒性に依存するが，重症化への進展は宿主側にもその要因があることが指摘されている。我々は感染に関連する生体防御反応としての宿主のサイトカイン産生制御に着目し，検討を行っている。健康人でも同一病原体の感染において，宿主によっては軽症に経過することもあれば，重症化に至ることもある。国内発生のリケッチア感染症にてしばしばこのことを経験する。たとえば，近年再興しているつつが虫の重症化例の検討では，高率にサイトカイン血中濃度が上昇する。サイトカインの異常活性化が生じた宿主は，

cytokine stormあるいはsystemic inflammatory response syndrome (SIRS)を呈し，重症化すると考えられる。極端な場合，骨髓のマクロファージ増殖が著明となり，自己血球を貪食することによる血球減少症を示す血球貪食症候群を合併する例を認める。他方，過去に実施された一般住民の抗体保有状況調査において，不顕性感染の存在を示唆する報告も存在する。つつが虫病 (*Orientia tsutsugamushi*感染)ではテトラサイクリンが有効性を示すのは普遍的と認識され，病状が進行していても同薬剤が投与された後には，診断が誤っていなければ短時間に臨床症状が劇的に改善す

る。テトラサイクリンが抗リケッチア作用に加え、重症化症例の背景となっているサイトカイン産生制御に係る可能性に着目し、単球・マクロファージ系細胞 (THP-1) を用いた *in vitro* 実験系において検討した結果、テトラサイクリンが TNF- α 産生修飾に関与することが示唆された。一方、1984年に確認された新興感染症である日本紅斑熱 (*Rickettsia japonica* 感染) はつつが虫病と比較し、重症化の頻度が高く、致死症例の報告も散見される。つつが虫病と日本紅斑熱の臨床経過の差異は、治療として投与されるテトラサイクリンに対する反応性の違いにあらわれるが、詳細は未だ明らかではない。抗微生物薬の一部には、本来期待さ

れる抗微生物作用の他に、宿主の生体防御機構に影響を及ぼす作用があることが明らかになりつつある。我々は抗菌剤では、テトラサイクリンのほかにマクロライドにおいて、さらに抗真菌薬の一部においても、サイトカイン産生修飾能があることを明らかにしている。感染症から生体を防御する際に、マクロファージが重要な役割を担うと考えられるが、場合によってはその活性化が顕著となり cytokine storm が惹起され、重症化へ進展すると考えられる。このような場合、サイトカイン産生の制御が、新たな感染症の治療戦略となる可能性がある。

2. ダニ関連細菌感染症における遺伝子検出の意義と課題

国立感染症研究所ウイルス第一部

安藤 秀二

ダニ関連細菌感染症においても、遺伝子検出技術の進歩は実験室診断、疫学調査、また基礎研究の分野で大きな役割をはたしている。ここではリケッチア症を中心に、医療、公衆衛生、各種調査研究での遺伝子検出の意義と同時に、併せ持つ課題について概説する。

リケッチア症では、日本に常在のつつが虫病、日本紅斑熱に加え、ロッキー山紅斑熱、発疹チフスが感染症法における届出でも実験室診断を必須とし、輸入感染症としても様々なリケッチア症への対応が求められる。その実験室診断は間接蛍光抗体法や間接免疫ペロキシダーゼ法などによるペア血清での抗体上昇や IgM 抗体の確認が従来からの Gold Standard であったが、複数の型の診断用抗原の準備や交差反応性への考慮が必要であり、新たな種が世界中で報告され続けるリケッチア種すべてに対応するための抗原の準備と維持をすることは難しい。また、血清診断においては急性期のみではリケッチアに対する抗体が検出されないことも多々あり、ペア血清をそろえてからの検査では、治療後の確認となることから、検査結果を待たずに治療を開始しなければならない。

血清診断に対し、PCR 法など遺伝子の増幅・検出技術は、迅速、特異的、高感度など多くの恩恵をもたらした。すべての菌株を維持し、すべての陽性コントロールとする必要もなく、血清診断に比べ多くの施設で実施可能である。近年でも、急性期の血液、刺し口の痂皮、紅斑部生検などの材料が遺伝子検出に供され、輸入リケッチア症例、*Rickettsia japonica* 以外の紅斑熱群リケッチアによる国内における感染例、感染推定地域として報告のなかった沖縄県でのつつが虫病的確認

にも大きく貢献した。また、日本紅斑熱患者の確認の増加にも貢献していると考えられる。さらに Real time PCR 法は、診断のみならず、多種多量の検体処理を行なう疫学調査などでも有効である。

しかし、遺伝子検出の特異性、高感度という利点は、欠点やリスクも併せ持つ。高い特異性は遺伝子の変異や脱落、標的とする配列と異なる遺伝子配列を持つ新たなものは検出できない。また高感度検出系は、わずかなコンタミネーションで誤った結果を導く危険性もある。さらに、リケッチアは人体の中で血管内皮細胞を標的としているため、急性期であっても循環血中にリケッチアが存在する時期は限られる。個人差もあり、高感度であるために、血液を用いた PCR の結果が陰性の場合、「リケッチア症ではない」と判断されてしまう場合もある。これらのことから、遺伝子検出による診断にも限界があり、血清診断等と併せて実施を行うことが重要である。

また、遺伝子検出は、あくまでも病原体の遺伝子断片の検出であり、生きた菌でのみ可能な生物学的性状の解析や薬剤耐性試験もできない。リケッチアでは、偏性細胞内寄生細菌であることから、ウイルスなどで進んでいる遺伝子を再構築するリバースジェネティック技術による生きた菌体の再構築もできない。遺伝子検出の限界や課題を理解せずにリケッチアの実験室診断、調査研究が進められると、生きたリケッチアを分離・培養するという基本的な技術の重要性が置き去りにされることになりかねない。リケッチアの遺伝子がどのように生きたリケッチアの中で生物性状として発現しているか、病態発現の機序を解析するためにも、

生きたりケッチアを得ることによって可能となることを忘れてはならない。

以上のことから、遺伝子検出に関する意義と課題は、

実験室診断の結果、調査研究の結果の解釈においても十分な理解と注意をもって行う必要がある。

3. 最近本邦でも確認されたアナプラズマ症, その実態と今後の課題

静岡県立大学食品栄養科学部微生物学研究室

大橋 典男

1994年, 米国で発生した発熱患者の末梢血好中球中に, 封入体を形成し, その中で増殖する細菌が見つかった。その後, 1996年に, その病原体の分離報告がなされ, この細菌はヒト顆粒球エーリキア症病原体 (Human Granulocytic Ehrlichiosis [HGE] agent) と呼ばれるようになった。そして2001年, この細菌は *Ehrlichia* 属から *Anaplasma* 属へと配置換えされ, そこで初めて *Anaplasma phagocytophilum* という学名が付された。それに伴って, 病名もヒト顆粒球アナプラズマ症 (Human Granulocytic Anaplasmosis [HGA]) に変更されている。アナプラズマ症 (Human anaplasmosis) は, マダニ媒介性の新興感染症であり, その病原体は上述のように偏性寄生性の *A. phagocytophilum* である。生体内に侵入した *A. phagocytophilum* は顆粒球 (特に好中球) に特異的に感染し, 細胞質中に独自の寄生性空胞を形成する。そして, その空胞内で増殖して, 特徴的なマイクロコロニーをつくる。このコロニーは, 「桑の実」に類似することから, モルラ (morula: mulberry のラテン語が語源) と呼ばれている。自然界では, *A. phagocytophilum* は媒介マダニと保菌動物の間を, マダニの咬着を介して, 交互に移動する生活環を有している。*A. phagocytophilum* の媒介マダニは, 北米では *Ixodes scapularis* (クロアシマダニ) および *I. pacificus* (西部クロアシマダニ) で, 保菌哺乳動物はシロアシネズミと考えられている。また, 欧州での媒介マダニは *I. ricinus* (ヒツジマダニ) である。アナプラズマ症の臨床症状としては, *A. phagocytophilum* を保有するマダニに刺されると, 5~10日の潜伏期を経て, 発熱, 頭痛, 筋肉痛, 倦怠感, 下痢, 白血球減少, 血小板減少などの症状が現れる。発疹が現れる症例は少ないようである。治療にはテトラサイクリン系抗生物質が有効であるが, 治療が遅れた場合や HIV 感染者のような免疫力が低下している場合は, 持続性発熱, 腎障害, DICなどに陥り, 死亡

する場合がある。日本国内では, 我々のこれまでの研究で, *A. phagocytophilum* が検出されたマダニの生息地域とそのマダニ種は, 静岡県, 山梨県, 青森県, 岩手県ではシュルツエマダニ (*Ixodes persulcatus*) とヤマトマダニ (*I. ovatus*), 三重県, 和歌山県では, フタトゲチマダニ (*Haemaphysalis longicornis*) とヤマトマダニ (*I. ovatus*), 鹿児島県ではタカサゴキラマダニ (*Amblyomma testudinarium*), 長崎県五島列島ではタカサゴチマダニ (*H. formosensis*) とオオトゲチマダニ (*H. megaspinosa*), 沖縄県与那国島ではフタトゲチマダニ (*H. longicornis*) であることが判明している。このように, 様々な地域で異なるマダニ種が *A. phagocytophilum* を保有しているが明らかとなり, このことは我が国の *A. phagocytophilum* は媒介するマダニの種類を制限せず伝播していることを示唆している。つまり, 問題となるのは, 媒介するマダニの種類よりも *A. phagocytophilum* を保菌する野生動物の種類とその分布にあると考えられる。我々は, 最近, 過去に日本紅斑熱が疑われた2症例の血液から, *A. phagocytophilum* に特異的な遺伝子の検出に成功し, 国内にもアナプラズマ症患者が存在する可能性を強く示唆した。その内の1例は日本紅斑熱リケッチア (*Rickettsia japonica*) との混合感染の可能性が高いと考えている。欧米では, *A. phagocytophilum* を媒介する *Ixodes* 属マダニが「ライム病ボレリア」も媒介するため, *A. phagocytophilum* とボレリアの混合感染が問題となっている。しかし, 欧米では *Rickettsia* spp. との混合感染の症例は少ない。ところが, 我が国では, 西日本地域を中心に日本紅斑熱が発生しており, それらの地域にも *A. phagocytophilum* を保有するマダニが生息している。したがって, 今後は, 日本紅斑熱リケッチアを含む *Rickettsia* spp. と *A. phagocytophilum* の混合感染を視野に入れた大規模な患者探査が望まれる。

4. 形態学からみえてくるリケッチアのマダニ共生微生物としての存在様式

福井大学医学部病因病態医学講座

矢野 泰弘

偏性細胞内寄生体であるリケッチア類の形態に関しては、培養細胞を使った実験系で詳細に研究されている。それに比べて、媒介動物であるダニ類の体内におけるリケッチアの形態に関する報告は少ない。ところで、マダニ媒介性リケッチア症の感染環を決定する際には、保菌動物からのリケッチアの分離状況や遺伝子の検出結果が大きな根拠となる。我々はマダニ体内におけるリケッチアの存在様式の解明も同様に重要と考え、特にマダニ細胞に自然感染したリケッチア類に注目し、電顕による検出と観察を行ってきた。今回はこれまでの研究成果について紹介し、大方の議論を求めたい。

今回はタイワンカクマダニとタカサゴキララマダニを材料とし、その唾液腺、中腸、マルピーギ管、卵巣および中央神経塊を構成する細胞内で紅斑熱群リケッチアを確認した。細胞内に遊離して存在するリケッチア菌体は、その周囲に halo zone と呼ばれる電子密度の低い周辺域を有していた。細胞壁は紅斑熱群リケッチアに特有の明瞭な三層構造を呈していた。リケッチアに感染している宿主細胞には形態的に顕著な障害は確認できなかった。なお、タイワンカクマダニに見られた紅斑熱群リケッチアはヘモリンフテストの結果から日本紅斑熱リケッチアと思われた。一方、タカサゴキララマダニの保有するリケッチアは直近の遺伝子解析から新種の紅斑熱群リケッチア *Rickettsia tamurae* と命名・同定された試料であった。

マダニ類は病原微生物の他にも体内の組織に共生リケッチア様微生物をも保有している。実際、演者らがこれまでに電顕観察を行ったマダニ類の卵巣、特に卵

巢上皮細胞にはしばしばリケッチア様の共生微生物が観察された。例えば、タカサゴキララマダニとタイワンカクマダニでは不定形な共生微生物の数個体が球状の集合体を形成し、細胞質のほとんどを占有していた。また、キチマダニとフタトゲチマダニでは短桿状の微生物 1-2 個体が集合体を形成していた。これらマダニ類に存在する共生微生物はいずれも宿主細胞の空胞膜で覆われており、菌体の中央部に電子密度の高い核封入体と、数層からなる波状の細胞壁を持っていた。これらの微細構造学的特徴は *Coxiella* 属のそれと類似しているように思われた。一方、ヤマトマダニとシュルツェマダニでは上述の微生物の形態とは異なる桿状の共生微生物を認めた。これらは宿主の細胞膜に覆われることなく細胞質内に遊離して存在し、また宿主細胞の核内への侵入像も確認できたため、紅斑熱群リケッチアに近い種類かと思われた。

近年、マダニからの病原体分離・培養技術の発達および分子生物学的手法の開発によって、マダニ類の共生微生物の同定が試みられ、新知見が得られつつある。すなわち、これまでマダニの共生微生物とされてきた *Wolbachia* は *Francisella* 属に近縁であること、ある種のマダニ類から *Coxiella* 属と近縁な微生物の遺伝子が発見されること、また、日本産マダニ類から遺伝子学的に異なる数種の紅斑熱群リケッチアが検出されることが知られるようになった。今後、形態学と分子生物学との協調によって、マダニとリケッチアの種特異的な親和性、ひいては宿主細胞との反応性などの検討へ研究の発展が期待される。

5. 日本紅斑熱の感染環の実態—島根半島をモデルとして—

島根県保健環境科学研究所¹⁾、富山県衛生研究所²⁾

田原 研司¹⁾、山内 健生²⁾

島根県北東部に位置する島根半島（東西約 70km、南北 5~10km）では、毎年 10 数例の日本紅斑熱患者が発生している。患者の多くは、島根半島西部に位置する弥山山地（東西約 15km、南北 5~6km）に集積がみられる（102/110 例中；2009.9 末現在）。

生物多様性情報システム (<http://www.biodic.go.jp>)

/J-IBIS.html) における島根半島の野生動物の分布相を参照したところ、日本紅斑熱患者の発生地域がニホンジカの分布域とほぼ一致した。これに対し、アナグマ・イノシシ・ニホンザル・ツキノワグマ・キツネの分布域とは一致していなかった。

そこで、病原体の *Rickettsia japonica* を媒介するとさ

れるマダニの島根半島における生息相を2001～2005年にかけて調査（成虫3,400個体：2属8種を捕集；フラッキング法）した結果、島根半島に生息しているニホンジカの分布域と相関が認められた。すなわち、ニホンジカが多数生息している弥山山地では、フタトゲチマダニ、ヒゲナガチマダニ、オオトゲチマダニが多数捕集され、ニホンジカの生息が希薄になる島根半島東部に行くに従い、これら3種のマダニの捕集割合は減少した。また、2005年4～6月に害獣駆除のため捕獲された弥山山地に生息するニホンジカ61頭に寄生していたマダニを無作為に796個体（成虫361、若虫434、幼虫1）捕集したところ、86%がフタトゲチマダニであった。

次に、2001～2005年にかけてフラッキング法で捕集したマダニ、成虫3,400個体のうち1,703個体について、*Rickettsia japonica*遺伝子（17kDa）の検出*を試みた。結果、マダニの*Rickettsia japonica*遺伝子検出率は、弥山山地で1.4%、その東側地域で0.6%、島根半島東半分地域で0%となり、患者の集積地域との相関が認められた。また、*Rickettsia japonica*遺伝子はフタトゲチマダニとヤマトマダニのみから検出された。フタトゲチマダニからの*Rickettsia japonica*遺伝子検出率

は弥山山地で4.2%、その東側地域で1%となったのに対し、ヤマトマダニが弥山山地で8.3%、その東側地域で1.9%であった。すなわち、この地域における生息数の絶対的多さから鑑み、フタトゲチマダニが*Rickettsia japonica*の主要なベクターと推定された。

一方、2001、2002年に害獣駆除のため捕獲された弥山山地に生息するニホンジカ52頭の血清を用い、紅斑熱群リケッチアに対する抗体の有無を間接蛍光抗体法で検査した結果、49頭（94.2%）が陽性となった。

以上のことから、島根半島で多発する日本紅斑熱は、*Rickettsia japonica*の主要なベクターであるフタトゲチマダニが多数生息している地域で多くの患者が集積し、そこにはマダニの生活環に不可欠な野生動物、特に大型で体表面積の大きいニホンジカの生息が大きく関与していると示唆された。

このような宿主動物とベクターの相互関係は、他の日本紅斑熱多発地域においても、島根半島とはやや異なるにせよ、根底にあるものと思われる。

*17kDa 遺伝子検出方法；Furuya Y. et al 1995.(J. C. M)

primer R1/R2（約540bp）領域をダイレクトシーケンスにて確認

6. 本邦におけるリケッチア症の多様性—特に新型紅斑熱の出現による新たな展開

大原総合病院附属大原研究所

藤田 博己

1984年の日本紅斑熱発見以後、マダニ媒介性リケッチアの探索が活性化したこともあって、本邦に分布するリケッチアの多様性が明らかになってきた。ヒト病原種を含む紅斑熱群においては、主にマダニ類から日本紅斑熱病原体を含む多数のリケッチア種が見いだされている。これまでの分離例だけからも、紅斑熱群10種、チフス群（暫定的分類）1種、その他の不明3種などが知られる。これらリケッチアのヒト病原性については不明な部分が多いものの、病原種として確実なのは、日本紅斑熱病原体*Rickettsia japonica*、福井県での症例の起因種とされる*R. helvetica*、そして最近、東北地方の宮城県から症例が見いだされた*R. heilongjiangensis*の紅斑熱群3種である。*R. japonica*は南方系のヤマアラシチマダニから検出される頻度が高く、他にはフタトゲチマダニやキチマダニなどのチマダニ属が主な保有種となっている。本リケッチア種の分布範囲は、千葉県以西の本州、四国、九州本土域におよぶ。*R. helvetica*は、ヨーロッパに共通する種類で、国内のリケッチア保有例がマダニ属の数種に見いだされてい

て、とくにヒトツトゲマダニとシュルツェマダニに多い。これらのマダニ種が、高いリケッチア保有率（50%以上）を示す地域もある。したがって、*R. helvetica*感染症例は国内各地に潜在しているものと推測される。国内における本リケッチアの分布は、礼文・利尻両島を含む北海道北部を北限に、本州、四国、九州（熊本県が現在の確認南限）にまでおよぶが、主要媒介種ヒトツトゲマダニの分布南限にあたる屋久島からも見つかる可能性がある。*R. heilongjiangensis*による極東紅斑熱（仮称）は、比較的最近発見された疾患であるが、これまでは中国東北部とロシア極東部が主な発生地帯として知られていた。主要媒介種のイスカチマダニは北方系の種類で、国内からは佐賀県の未確認例とともに、北海道東部、青森県東南部および岩手県北上川流域での分布記録があったが、2008年の宮城県仙台市における*R. heilongjiangensis*感染例の発生を受けた調査から、仙台市街地を含む宮城県内にも広く分布し、当該リケッチア種の保有も確認された。イスカチマダニは、他の多くのマダニ種が森林内に生息するのは

対照的に草地環境を好み、都市部の市街地内やそれに隣接する河川敷などにも生息可能な種類である。青森県で2007年に発生した症例については、地理的に見て *R. helvetica*あるいは *R. heilongjiangensis*感染が有力視されるが、まだ特定できていない。他にも、国内には紅斑熱の発生が確認されながら、リケッチアの種類や媒介種が特定できていない地域がいくつかある。南西諸島の徳之島と奄美大島では、これまでに血清診断で確定された症例が見つかっていて、*R. japonica*の感染が有力視されるが、まだ特定には至っていない。最

近、沖縄本島と宮古島からは *R. honei*類似あるいは同種と推定されるリケッチアが見つかった。*R. honei*は Flinders Island spotted fever やタイ・マダニチフスの病原体であり、本邦における当該疾患の新たな潜在も予感される。ヒト刺咬例の多いタカサゴキラマダニに特異的な *R. tamurae*は、ヒト病原性が不明で、リケッチア保有マダニの分布域にあたる南西諸島と日本本土域南西部一帯における紅斑熱症例との関連性の解明が待たれる。

