

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K08944

研究課題名(和文) マウス病態モデルを用いたつつが虫病の重症化メカニズムの解明～死亡症例0を目指す～

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of severe cases of scrub typhus using a mouse model - For zero fatal cases

研究代表者

小川 基彦 (Ogawa, Motohiko)

国立感染症研究所・ウイルス第一部・主任研究官

研究者番号：10322710

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：つつが虫病の重症化メカニズムを解明するため、つつが虫病リケッチア強毒株および弱毒株の感染マウスを致死および治癒の病態モデルとして用い、主な標的器官であるマクロファージ、肝臓および脾臓におけるリケッチア数およびサイトカインの変動を解析した。単独で強毒株および弱毒株をそれぞれ感染した場合、および弱毒株感染により防御免疫を誘導後に強毒株を感染した場合について検討した。その結果から、重症化および治癒それぞれに関与する可能性が強い特徴的なサイトカインの挙動を明らかにできた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

わが国では、年間およそ400人-800人の患者が発生し、毎年のように死亡症例が報告されている。臨床医が、典型的な臨床所見の刺し口を発見できなかった場合には、本症を疑う決め手に欠き、適切な抗菌薬の投与が遅れてしまうと重症化し死亡することが多い。しかし、適切な抗菌薬の投与が遅れても重症化や致死的な機転をとらず自然治癒する症例もあり、そのメカニズムが注目されている。つつが虫病の病態発生メカニズムは、いまなお十分解明されていないのが現状であり、本研究では重症化とあわせて自然治癒にも焦点を当てた研究を展開したことが特徴であり、医学的な意義も大きい点である。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the mechanism of sever/fatal cases of scrub typhus, mice infected with highly virulent and avirulent strains of *Orientia tsutsugamushi* were used as lethal and healing pathological models. The changes in numbers of *O. tsutsugamushi* and cytokines were analyzed in the main target organs, macrophages, liver and spleen and blood. The following cases were investigated: infection with the highly virulent strain and avirulent strain alone, and infection with the avirulent strain followed by infection with the highly virulent strain. The results suggested that specific cytokines are likely to be involved in both exacerbation and healing.

研究分野：ダニ媒介感染症

キーワード：つつが虫病リケッチア 強毒株 弱毒株 感染病態モデル サイトカイン リケッチア数 標的器官

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

つつが虫病は、ダニ媒介性の感染症で、アジア太平洋地域に広く分布し、患者は少なくとも年間1万人以上に上る。テトラサイクリン系の抗菌薬が効くが、投与が遅れた場合は重症化しやすく、死亡率が高くなる。

わが国では、年間およそ400～800人の患者が発生し、毎年のように死亡症例が報告されている。つつが虫病は、発熱、発疹、刺し口を主要三徴候とする熱性疾患である。臨床医は、患者の臨床所見や行動歴から本症を疑い、実験室診断による確定診断を待たずに適切な抗菌薬の投与を開始しなければならない。テトラサイクリン系の抗菌薬は、風邪などには処方されないため、臨床医による早期診断と早期治療が極めて重要となる。しかし、臨床医が、典型的な臨床所見の刺し口を発見できなかった場合には、本症を疑う決め手に欠き、適切な抗菌薬の投与が遅れてしまうことが多い。全国規模の発生状況の調査により、およそ15%のつつが虫病患者には刺し口を発見できなかったことが明らかになった(小川基彦ら、感染症学雑誌75(5)、2001)。流行地でつつが虫病患者の症例を多く経験している医師でさえも、初診時には刺し口を発見できず、C型インフルエンザの流行がつつが虫病患者の流行時期と重なったことによりインフルエンザと誤診したため、患者が死亡した症例が報告されている(国立感染症研究所 病原微生物検出情報 Vol22 No9,2001)。

ところが、適切な抗菌薬の投与が遅れても重症化や致死的な機転をとらず自然治癒する症例もあり、そのメカニズムが注目されはじめている。つつが虫病患者の病態発生メカニズムは、いまなお十分解明されていないのが現状である。解明には、重症化とあわせて自然治癒にも焦点を当てた研究を展開していくことが必要であると考えた。

2. 研究の目的

つつが虫病患者の起因菌のリケッチアは、ダニの一種ツツガムシによって媒介され、ダニの刺し口近傍で一時的に増殖し、血行性およびリンパ行性に全身の臓器に拡散する。主な標的器官は、脾臓、肝臓、血管内皮細胞などである。つつが虫病患者のリケッチアには、マウスに致死的な感染を起こす強毒株と、感染しても自然治癒する弱毒株があり、ヒトのつつが虫病患者の『重症化』および『自然治癒』のメカニズムを解明するための格好の病態モデルとなる。本研究では、「つつが虫病患者のマウス病態モデルを用いて、主要な標的器官におけるリケッチアの動態と免疫応答を比較解析し、病態の免疫学的基盤の構築により、つつが虫病患者の重症化および治癒メカニズムを解明すること」を目的とした。

3 . 研究の方法

マウス病態モデルを用いて、以下のように研究を行なった。強毒株および弱毒株のそれぞれをマウスに感染させた場合、および弱毒株を感染させ感染防御を誘導後に強毒株を感染した場合について、主要な標的器官におけるリケッチアの動態と免疫応答を比較解析した。

4 . 研究成果

1) 強毒株および弱毒株感染の比較

各標的器官のつつが虫病リケッチア数を解析したところ、感染 Day4 のリケッチア数は、マクロファージ > 脾臓 > 肝臓の順に多く、その後 Day8 以降は、いずれの臓器でも強毒株は増加に転じ、弱毒株は、脾臓および肝臓で横ばい、マクロファージでは減少する傾向が見られた。各器官における 10 種類のサイトカインの産生を、mRNA の発現解析により行った。Day4 では、弱毒株が感染した腹腔マクロファージにおいて炎症性サイトカインの IFN および TNF の発現量が、強毒株感染や非感染群より上昇していた。他の臓器や他のサイトカインの優位な変動は観察されなかったため、感染成立時のマクロファージにおける弱毒株の増殖抑制に何らかの役割を担っている可能性が示唆された。弱毒株感染において、サイトカインの変動はほとんどなく、肝臓において、炎症性サイトカインの IL-1 と TNF の軽度の上昇、脾臓における IFN の軽度の現象が見られる程度であった。一方で、強毒株感染では、肝臓において IL-1、IFN および TNF の急激な減少、抗炎症性サイトカインの IL-10 の軽度の減少、および炎症性サイトカインの IL-6 の上昇が見られ、脾臓においては適応免疫に關与する IL-2、IL-4、炎症性サイトカインの IL-6、抗炎症性サイトカインの IL-12 および IL-13 の上昇、および IL-10、IFN および TNF の減少が見られた。

血中のサイトカイン量の解析では、炎症性サイトカインの IL-1、IL-6、IL-17、IFN、TNF、IL-18 および GM-SCF、適応免疫に關与する IL-2 および IL-4 は、弱毒株感染マウスや非感染対象マウスと比較して、強毒株感染マウスで Day4 から Day12 まで顕著に増加した。一方で、抗炎症性サイトカインの IL-12 は強毒株のみで変動が見られ、Day 8 に最大となり減少した。IL-13 は、強毒株感染、弱毒株感染および非感染マウスともに、Day4 から低い値を示した。

マウスを 100% 致死させる強毒株感染のみで、感染後期の炎症性サイトカインの顕著な上昇が見られることから、重症化や死の転機と密接に關与することが示唆された。さらに、感染成立時期の Day4 における腹腔マクロファージでは、弱毒株感染によるのみ IFN および TNF 産生が促進され、感染抑制につながっている可能性が示唆された。この結果は、弱毒株感染では、治癒機転がおきているのではなく、感染そのものが抑制されていることが明らかとなった。

2) 弱毒株を感染させ防御免疫を誘導後の強毒株感染の解析

つつが虫病の治癒機転に関与する免疫応答を解明するため、弱毒株感染後に強毒株を感染させたマウスの主な標的器官の肝臓および脾臓におけるリケッチア数および血中のリケッチア数とサイトカインの変動を解析した。弱毒 Kuroki 株 (10,000 FFU/匹) を接種した2週間後に、強毒 Ikeda 株を、マウスが100%死亡するリケッチア量 (10,000 FFU/匹) を接種したところ、すべてのマウスが顕著な体重減少を示すこともなく生存した。肝臓、脾臓および血中のリケッチア数は、Day4 から上昇し Day8 で最大になり、Day12 では Day4 程度に減少し、治癒機転に転じたことが示された。血中のサイトカイン量を見ると、炎症性サイトカインである IL-6、IL-18、IFN γ 、抗炎症性サイトカインの IL-12、適応性免疫に関与する IL-2 や IL-4 は、感染初期の Day4 から Day8 にかけて上昇し、Day12 では Day4 とほぼ同程度まで減少した。一方、炎症性サイトカインの IL-1 β 、GM-CSF、適応免疫に関与する IL-5 は一貫して低い値を示し、TNF α は、Day4 から Day8 まで上昇したが、その後 Day12 まで横ばいに推移し、IL-13 は感染初期に高値を示しその後低い値に維持された。強毒株単独で感染させ、100%マウスが死亡した場合と比較して、今回異なる挙動を示したサイトカインは、IL-1 β 、IL-13、TNF α および GM-CSF であった。IL-13 は、マクロファージの活性を抑制し、それによって炎症性サイトカインの産生を抑制する機能がある。感染初期の Day 4 に、IL-13 が高値で認められたことは、抗炎症方向に免疫応答をシフトし、強毒株単独で感染時に見られるような炎症性サイトカインの過度の産生により引き起こされる死の機転からマウスを治癒に導いた可能性が示唆された。

まとめ

つつが虫病のマウス病態モデルを用いた解析により、重症化には炎症性サイトカインの過度の産生が重要な役割を担っている可能性が示唆された。さらに、弱毒株感染による免疫の誘導は、強毒株感染の防御に顕著に有用であり、治癒機転には抗炎症性サイトカインの IL-13 が重要な役割を担っている可能性が示唆された。重症化と治癒機転それぞれについて特徴的な免疫応答を明らかにできた。本研究では、免疫担当細胞、特にリケッチアの感染制御に重要なことが示唆されている細胞障害性 T 細胞などに関する解析を行っておらず、今回明らかになった感染におけるサイトカインの挙動とあわせた説明が今後必要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ogawa M, Takada N, Noda S, Takahashi M, Matsutani M, Kageyama D, Ebihara H.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Genetic variation of Leptotrombidium (Acari: Trombiculidae) mites carrying Orientia tsutsugamushi, the bacterial pathogen causing scrub typhus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Parasitol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Motohiko Ogawa, Mamoru Takahashi, Minenosuke Matsutani, Nobuhiro Takada, Shinichi Noda, Masayuki Saijo	4. 巻 64
2. 論文標題 Obligate Intracellular Bacteria Diversity in Unfed Leptotrombidium Scutellare Larvae Highlights Novel Bacterial Endosymbionts of Mites	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12745	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小川基彦、高橋守、松谷峰之助、野田伸一、高田伸弘、西條政幸
2. 発表標題 つつが虫病媒介ダニ・ツツガムシの共生細菌の解明
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	深澤 征義 (Fuykasawa Masayoshi) (20291130)	国立感染症研究所・細胞化学部・部長 (82603)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------