

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 3月31日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591292

研究課題名（和文）

新興リケッチア感染症・日本紅斑熱の重症化機序解明と救命治療法の確立

研究課題名（英文）

Mechanism of severity of emerging rickettsial infection, Japanese spotted fever.

研究代表者

岩崎 博道 (IWASAKI HIROMICHI)

福井大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：10242588

研究成果の概要（和文）：研究期間内にも *Rickettsia japonica* 感染である日本紅斑熱の患者数は増加の一途たどった。さらに、重症例や死亡例の存在も明らかとなった。*Orientia tsutsugamushi* 感染のつつが虫病と比較し、急性期のサイトカインの血中濃度は日本紅斑熱では著明高値を呈し、とくに TNF- α において重症化との関連性が示唆された。日本紅斑熱ではテトラサイクリン系薬に加え、一部のニューキノロン系薬の併用が有効性を示した。実験的にもこの2剤の併用が、単独投与時より TNF- α 産生抑制を増強した。日本紅斑熱の救命のための治療法として、これら2剤の併用が有力な候補となる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Recently, emerging rickettsial infection, Japanese spotted fever (JSF: *Rickettsia japonica* infection) is becoming a major rickettsioses in Japan. Many severe patients are reported, however we don't have an appropriate chemotherapy to recover from the severe state of this infectious disease. In this research we present an effective combined chemotherapy for JSF using tetracyclines and fluoroquinolons simultaneously. Many severe cases showed high concentration of TNF- α in the serum. In vitro assay, the TNF- α production was suppressed by tetracyclines, and this phenomenon was accelerated by a part of fluoroquinolons. This combined chemotherapy is a candidate for suitable treatment of JSF.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：感染症治療学・新興リケッチア感染症

1. 研究開始当初の背景

わが国では、リケッチア症としてつつが虫病の存在が長く知られていたが、1984年に新興リケッチア症・日本紅斑熱(*Rickettsia japonica* 感染)が、徳島県にてはじめて確認された。その後、日本紅斑熱は感染症法の4類感染症に指定されて以来、国内の報告数は急増し、2007年には98例に達していた。感染地域も拡大し、死亡例の報告も相つぎ、感染症対策上の大きな課題となった。日本紅斑熱の病態解明と、重症化の原因追究は喫緊の課題として、本研究に着手することとした。

近年になって日本紅斑熱の発生が助長された理由は、気象や生物相の攪乱、交通や流通の多様化などの感染環の変動があるとしても、背景には診断技術の普及や啓蒙活動による潜在感染例の発掘も見逃せない。日本紅斑熱の治療法に目を向けると、日本紅斑熱の詳細な病態の解析は少数例にとどまり(Mahara. Ann NY Acad Sci 2006, Iwasaki, et al. J Clin Microbiol 2001)、治療反応性の解析も不十分であった。つつが虫病においてテトラサイクリン系薬は、投与後24時間以内に臨床症状が劇的に軽快する例が殆どであるのに対して、日本紅斑熱では、同薬の有効性が低いことも経験された。しかし、その理由は明らかではなかった。近年、日本紅斑熱の死亡例の報告が増加していることより、有効な治療法の確立は学術的にも急務となった。

2. 研究の目的

(1) 日本紅斑熱を含む我が国固有のリケッチア症の病態解明および背景要因の解析

リケッチア症疑診時(急性期)の臨床所見の詳細な観察、血液採取(確定診断を含む)ならびに治療後の効果判定を行う。診断確定には免疫ペルオキシダーゼ法による血清診断(*O. tsutsugamushi* または *R. japonica* 特異抗体価の上昇)および遺伝子診断(PCR)法を用いる。確定診断されたつつが虫病および日本紅斑熱症例を調査し、重症度ならびに治療の有効性を評価する。臨床経過全体を解析し日本紅斑熱に対する標準治療法を提案する。

(2) つつが虫病患者および日本紅斑熱患者の血中サイトカイン値の変動と重症度との関連性解析

重症リケッチア症の背景には高サイトカイン血症に起因するSIRS(systemic inflammatory response syndrome)の存在があると考えられる。僅かではあるがこれまで行った重症患者の経時的採血による血中サイトカイン濃度の検討からは、急性期に多種のサイトカイン(TNF- α , IL-10, IL-12p40, IL-8, IFN- γ)が高値を示した。本研究では、症例を重症度に応じて層別化し複数の血中サイトカイン値を経時的に測定し解析する。急性期

のサイトカインが重症度を示す指標となるか、確定診断のなされたつつが虫病および日本紅斑熱において評価を加える。

(3) 日本紅斑熱において重症化から回避するための有効治療法の提案および、論理背景の実験的解明

代表研究者はつつが虫の重症例にマクロファージの異常活性化(血球貪食症候群)があることを示した(Iwasaki et al, Lancet, 1994)。その背景にはマクロファージ関連サイトカインの過剰産生が関与することを考察し、この観点からも本研究ではTNF- α に特に注目している。しかし、つつが虫病では有効であるテトラサイクリン系薬がなぜ日本紅斑熱では有効性が低いのかという疑問が残る。現段階では同薬の抗*R. japonica*活性が不十分であることが推測され、ニューキノロン系薬がテトラサイクリン系薬の有効性を補う可能性が示唆されることより、当研究では実験的にサイトカイン産生抑制の立場から検討する。

3. 研究の方法

(1) リケッチア症の患者調査

統一した患者調査票(図1)を用い、感染推定日時および場所、急性期の臨床症状、臨床検査値、選択治療薬(投与抗菌薬名、投与量、投与方法)、治療経過等を調査し、客観的に評価する。代表研究者の考案した重症度スコア(Iwasaki H et al. J Clin Microbiol 1997)を用い(表1)、臨床症状と臨床検査値の11項目についてポイント化し、その総計を重症度として数値化した。さらに現在、日本紅斑熱治療にはテトラサイクリン系薬およびニューキノロン系薬の併用が経験的に用いられているが、客観的評価が加えられていないため、その有効性を確認した。患者情報は匿名化し、個人情報の扱いには十分な配慮をする。この案件は既に当大学倫理審査委員会(福井大学倫審18第24号)にて承認を得ている。

図1 患者背景調査票

1) central nervous system involvement	1
2) severe myalgia	1
3) radiographically documented pulmonary involvement	1
4) elevated creatinine level: 1.5-3.5 mg/dl	1
:>3.5 mg/dl	2
5) elevated serum transaminase (ALT) level: 41-100 IU/L	1
:> 100 IU/L	2
6) hepatosplenomegaly	1
7) thrombocytopenia with PLT counts: 100-149 x 10 ⁹ /L	1
:< 100 x 10 ⁹ /L	2
8) elevated level of FDP	1

表 1 Clinical severity scoring

該当する項目の合計をスコア化する。最高値は 14 となる。

(2) リケッチア症の診断および血中サイトカイン測定

血清診断法または PCR を用いて日本紅斑熱あるいは類縁リケッチア症の診断を確定した。患者の経時的な血中サイトカイン濃度 (TNF- α , IL-8, IL-12p40, IL-10, IL-4, IFN- γ) をマルチプレックスサスペンションアレイ (Bio-Plex 200 システム) または ELISA (Cytoscreen) を用いて測定し、各サイトカイン濃度と疾患の重症度との関連性を検証した。

(3) in vitro における抗菌薬によるサイトカイン産生制御に関する作用メカニズムの検討

ヒト単球系 THP-1 細胞を用い、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 由来 lipopolysaccharide (LPS) または, Proterus OX-K 株または OX-2 株由来の LPS により刺激された後に産生されるサイトカインのテトラサイクリン系薬、さらには有効性が示唆されるニューキノロン系薬 (Iwasaki et al., J Clin Microbiol, 2001) による影響を実験的に確認した。

4. 研究成果

(1) 我が国では近年、新興リケッチア感染症・日本紅斑熱の報告数が急増し (図 2)、発生地域の広がりも認められる。2008 年には新型の紅斑熱群リケッチア症として *Rickettsia heilongjiangensis* 感染症の存在も明らかになった。日本紅斑熱の治療としては、テトラサイクリン系薬に加えニューキノロン系薬併用例では全てが有効であったことが報告され、テトラサイクリン系薬単独で有効性の得られるこのとの多いつつが虫病との最大の相違点として認識された。



図 2 近年報告のあったリケッチア症 (2004 年以降)

(2) 確定診断された、つつが虫病 32 例および、日本紅斑熱 21 例の、急性期における血中サイトカイン濃度を比較した。適切な治療により、いずれの症例も軽快した。日本紅斑熱において急性期には炎症性サイトカイン (TNF- α , IL-6, IFN- γ) ならびに、ケモカイン (IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β) の血中濃度はいずれも有意につつが虫病より高値を呈した。とくに、TNF- α は 2.6 倍、IFN- γ は 3.0 倍を呈し、IL-8 は 9.6 倍、IL-10 は 4.0 倍に達していた (図 3, 4)。多くの臨床家により報告されている日本紅斑熱がつつが虫病に比較し、重症化しやすいこととの関連性が示唆された。重症化を回避するためには、高サイトカイン血症を背景とする SIRS を鎮静化する必要があると考えられた。この高サイトカイン血症の制御が日本紅斑熱治療の鍵となることが考えられた。臨床現場からはテトラサイクリン系薬とニューキノロン系薬の併用の有効性が報告されていることより、この併用療法がサイトカイン産生抑制に有利に作用している可能性が示唆された。

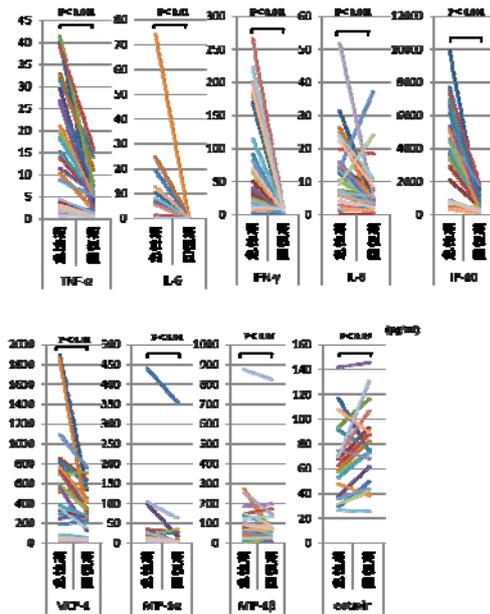


図 3 つつが虫病 32 症例の血中サイトカイン値の変動

(3) これまでに臨床所見を確認し得たつつが虫病 (31 例) および日本紅斑熱 (23 例) において、スコア化した重症度をもとに比較した。つつが虫病においては 8 例 (25.8%) が、日本紅斑熱では 10 例 (43.5%) が、それぞれ重症度 2 以上に相当し、日本紅斑熱がつつが虫病より重症度が高いことが示された。また重症群 (重症度 2 以上) と軽症群 (同 2 未満) に分け比較すると、急性期の血中 TNF- α 濃度は有意に重症群が高く、いずれのリケッチア症においても TNF- α が重症度を示す指標となりうるこ

とが示唆された (図5)。他のサイトカイン値は、重症度による、明らかな差異を認めなかった。

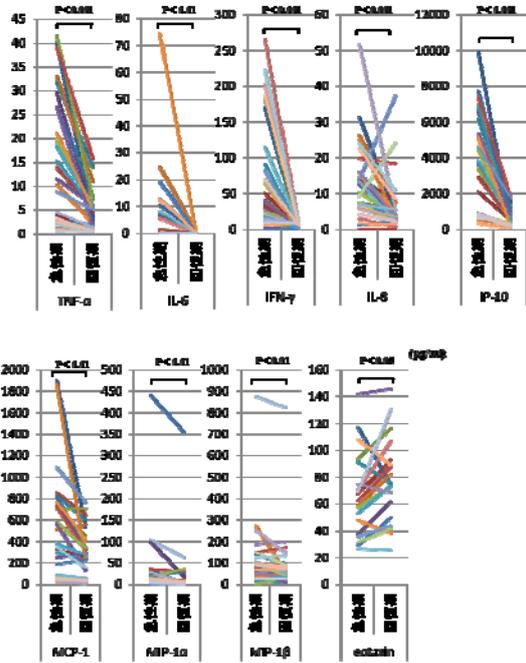


図4 日本紅斑熱 21 症例の血中サイトカイン値の変動

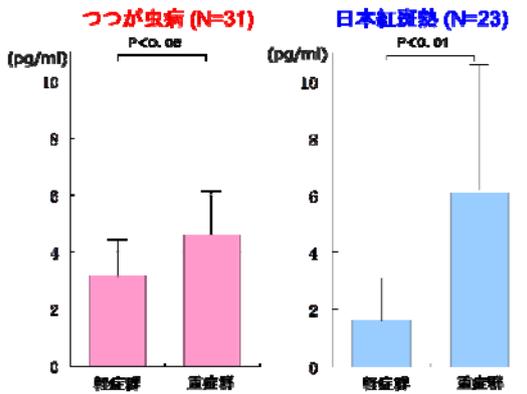


図5 重症度別の急性期血中 TNF-α濃度

(4) Weil-Felix 反応として、つつが虫病の診断に用いられる *Proteus* OX-K 株および日本紅斑熱の診断に用いられる *Proteus* OX-2 株由来の LPS 100 μg/ml による刺激において、THP-1 細胞から産生される TNF-α は MINO により産生抑制を示した。しかし、ofloxacin (OFLX) は TNF-α 産生には影響を与えなかった (図6)。他方、ciprofloxacin (CPF) を併用した実験では、MINO 単独より TNF-α 産生の抑制効果が増強されることも示された (図7)。リケッチア感染症重症例の背景には SIRS の存在があり、その発症に関与する TNF-α 産生を抑制するためには、テトラサイクリン系抗菌薬 (MINO) に加え、一部のニューキノロン系薬 (CPF) を併用することが有効である可能性

が実験的に示された。従って、日本紅斑熱に対して臨床的に有効とされるテトラサイクリン系薬とニューキノロン系薬の併用療法は高サイトカイン血症を背景とする SIRS 回避のためには意義があり、このことは日本紅斑熱の重症化回避のためには極めて重要な治療概念と考えられた。

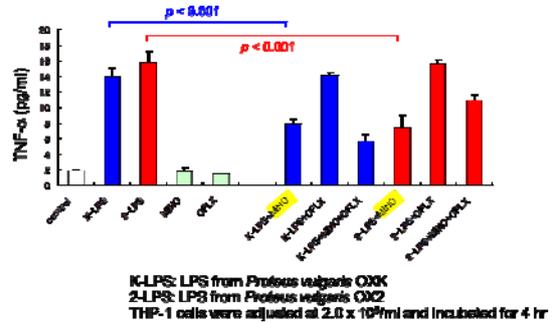


図6 *Proteus* 由来 LPS により誘導される TNF-α の MINO および OFLX による産生修飾

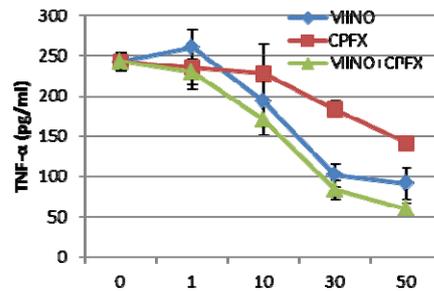


図7 MINO および CPF の単独ならびに併用における TNF-α 産生抑制効果 (*P. aeruginosa* 由来 LPS 10 μg/ml 刺激)

5. 主な発表論文等
〔雑誌論文〕 (計 6 件)

- 1) 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. (査読有) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21948264>
- 2) Iwasaki H, Mizoguchi J, Takada N, Tai K, Ikegaya S, Ueda T. Correlation between the concentrations of tumor necrosis factor-α and the severity of disease in patients infected with *Orientia tsutsugamushi*. *Int J Infect Dis* 14: 328-333, 2010. (査読有) DOI:10.1016/j.ijid.2009.06.002
- 3) 岩崎博道, 安藤秀二, 高田伸弘. 肝リケッチア症. 日本臨床・新領域別症候群シ

- リーズ No.13, pp140-144, 2010. (査読無)
- 4) 池ヶ谷諭史, 岩崎博道, 上田孝典. 血液疾患患者の血液培養から検出された Coagulase-negative Staphylococci の臨床的意義: 真の菌血症か単なる汚染か. 臨床血液 51: 398-401, 2010. (査読有) https://www.jstage.jst.go.jp/article/rinketsu/51/6/51_6_398/article
 - 5) Ikegaya S, Inai K, Iwasaki H, Naiki H, Ueda T. Azithromycin reduces tumor necrosis factor-alpha production in lipopolysaccharide-stimulated THP-1 monocytic cells by modification of stress response and p38 MAPK pathway. J Chemother 21: 396-402, 2009. (査読有) [PMID:19622457](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19622457/)
 - 6) Yamauchi T, Negoro E, Kishi S, Takagi K, Yoshida A, Urasaki Y, Iwasaki H, Ueda T. Intracellular cytarabine triphosphate production correlates to deoxycytidine kinase/cytosolic 5'-nucleotidase II expression ratio in primary acute myeloid leukemia cells. Biochem Pharmacol 77: 1780-1786, 2009. (査読有) <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2009.03.011>

[学会発表] (計 18 件)

- 1) Iwasaki H, Mahara F, Tai K, Ueda T. Cytokine modulation induced by anti-rickettsial antibiotics, tetracyclines and quinolones. EPS Modern Medical Forum 2011 (招請講演). 2011 年 9 月 8 日, モントリオール.
- 2) Mahara F, Iwasaki H. Clinical studies on Japanese spotted fever and other rickettsiosis in Japan. EPS Modern Medical Forum 2011 (招請講演). 2011 年 9 月 8 日, モントリオール.
- 3) 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 年 6 月 24 日, 札幌.
- 4) 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 型つつが虫病事例の急性期中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 年 4 月 22 日, 東京.
- 5) 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 年 4 月 22 日, 東京.
- 6) 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 年 4 月 21 日, 東京.
- 7) 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 年 4 月 14 日, 東京.
- 8) 田居克規, 岩崎博道, 池ヶ谷諭史, 上田孝典. 各種抗菌薬によるサイトカイン産生修飾作用の検討. 第 58 回日本化学療法学会西日本支部総会. 2010 年 11 月 26 日, 大分.
- 9) Iwasaki H, Ikegaya S, Tai K, Negoro E, Takagi K, Kishi S, Yamauchi T, Yoshida A, Urasaki Y, Ueda T. Kinetics of serum cytokine levels in the ANLL patients associated with febrile neutropenia. 第 72 回日本血液学会学術集会. 2010 年 9 月 24 日, 横浜.
- 10) 岩崎博道. 新興リケッチア感染症・日本紅斑熱の重症化機序解明と救命治療法の確立. 第 18 回ダニと疾患のインターフェイスに関するセミナー. 2010 年 6 月 10 日, 佐渡.
- 11) 田居克規, 池ヶ谷諭史, 岩崎博道, 上田孝典. 単球系細胞におけるテトラサイクリン系およびマクロライド系によるサイトカイン産生修飾. 第 58 回日本化学療法学会. 2010 年 6 月 3 日, 長崎.
- 12) 岩崎博道, 上田孝典. 3 者 (ヒト・微生物・薬剤) 相互作用とサイトカイン. 第 84 回日本感染症学会総会・会長シンポジウム. 2010 年 4 月 5 日, 京都.
- 13) 岩崎博道, 高田伸弘, 上田孝典. 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. 第 84 回日本感染症学会総会・シンポジウム. 2010 年 4 月 5 日, 京都.
- 14) 田居克規, 池ヶ谷諭史, 岩崎博道, 高木和貴, 浦崎芳正, 上田孝典. 抗菌薬によるサイトカイン産生修飾作用の網羅的解析. 第 84 回日本感染症学会総会. 2010 年 4 月 5 日, 京都.
- 15) Iwasaki H, Ikegaya S, Tai K, Hosono N, Negoro E, Takagi K, Kishi S, Yamauchi T, Yoshida A, Urasaki Y, Ueda T. Significance of GPC bacteremia during the neutropenic status in hematological malignancies. 第 71 回日本血液学会学術集会, 2009 年 10 月 24 日, 京都.
- 16) 岩崎博道. 感染対策を意識した院内環境整備. 日本医療機器学会 第 8 回機器と感染カンファレンス. 2009 年 7 月 11 日, 福井.
- 17) 岩崎博道. 新興リケッチア症の重症化機

序解明と救命治療法. 第 17 回ダニと疾患
のインターフェースに関するセミナー.
2009 年 6 月 13 日, 福井.

- 18) 岩崎博道. 国内発症ダニ媒介性リケッチ
ア感染症における重症度と血中サイトカ
イン動態の関連. 第 83 回日本感染症学会
総会. 2009 年 4 月 23 日, 東京.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩崎 博道 (IWASAKI HIROMICHI)

福井大学・医学部附属病院・教授

研究者番号: 10242588

(2) 研究分担者

高田 伸弘 (TAKADA NOBUHIRO)

福井大学・医学部・シニアフェロー

研究者番号: 90003409

(3) 連携研究者

池ヶ谷 諭史 (IKEGAYA SATOSHI)

福井大学・医学部・助教

研究者番号: 10324162