

令和 5 年 6 月 29 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K07055

研究課題名(和文) リケッチア症の感染成立と病態発現に関する実験学的解析

研究課題名(英文) Experimental analysis of the establishment of infection and pathogenesis of rickettsiosis

研究代表者

安藤 秀二 (Ando, Shuji)

国立感染症研究所・ウイルス第一部・室長

研究者番号：30360803

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)：リケッチア症のヒト生体内で病態機序解明を目的とした。つつが虫病は、血清型により病原性が異なるが、死亡例も多い日本紅斑熱の病態機序は不明のままであった。しかし、日本紅斑熱はBSL3施設を必要とし、特定病原体である。新型コロナウイルス感染症の流行継続により、研究代表者所属施設において、その他の研究が停止される状況が続いた。実験室責任者として新型コロナウイルス横断的業務に対応し、制限解除後も、一般ユーザーより自身の研究を優先することははばかられた。限られた時間で複数種のシード株を増やし、品質確認、野外調査でマダニ材料を収集・保管することにより、定年にもあたり本研究を後進にゆだねることとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

偏性細胞内寄生細菌であるリケッチアによる疾患は、希少疾患ととられがちであるが、近年、日本紅斑熱は増加傾向が続き、有効な治療法がありながら、死亡例も報告され、つつが虫病と合わせると、年間1000例ほどが確定、報告される。これらの病態機序を解明することは、治療法の選択肢を増やすことにつながり、死亡例を減少させ、地域社会の健康維持に資することとなる。その解明のリソースとなる複数のリケッチア株、マダニ材料のリソース構築を可能とした。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to elucidate the pathomechanism of rickettsiosis in humans in vivo. Although the pathogenicity of scrub typhus varies according to serotype, the pathogenic mechanism of Japanese spotted fever, which is associated with many deaths, has remained unclear.

However, Japanese spotted fever rickettsia requires BSL3 facilities and is a select agent. Due to the continuing pandemic of novel coronavirus infection (COVID-19), other research was suspended at the principal investigator's institution. As the laboratory director, I had to deal with cross-disciplinary work on novel coronaviruses, and even after the restrictions were lifted, I was reluctant to give priority to my own research over that of general users. With limited time to increase the number of seed strains of several species, check their quality, and collect and store tick materials for field surveys, I decided to leave this research to future generations, even at retirement age.

研究分野：感染症学、リケッチア

キーワード：リケッチア 日本紅斑熱 つつが虫病 病態発現 動物モデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 日本国内のダニ類によって媒介されるリケッチア症において、古く江戸自体から知られるつつが虫病とともに、国内患者発生、死亡例も多く、増加傾向の日本紅斑熱の原因菌 *Rickettsia japonica* をはじめとする紅斑熱群リケッチアのヒトでの病態発現機序は不明のままである。また、その病態モデルや *in vivo* で治療効果を評価する系もない。

(2) リケッチア感染症の病態解析モデルは極めて限定的であり、つつが虫病の原因となる *Orientia tsutsugamushi* は、血清型により異なる病原性を示すことが明らかになってきた。

2. 研究の目的

(1) 不明のままである紅斑熱リケッチアの病態発現機序の解明のため、*R. japonica* を主なりケッチアとし、野生型ならびに遺伝子改変マウス等を用いた *in vivo* 感染実験と、生体内でのリケッチア標的細胞である血管内皮細胞やマクロファージについて単球系分化細胞、初代培養細胞や株化細胞を用いた *ex vivo*、*in vitro* 感染実験を行う。個々の実験系のデータを有機的に結合、外挿することにより、ヒト生体内での発病環境に近い条件を検討、リケッチア感染における重症度を規定する免疫応答と病態発現機序を明らかにすることを目的とした。

(2) 実験材料として必須のリケッチア株、感染に影響を及ぼすマダニ成分について、品質の良い材料の安定確保に取り組み、バイオリソースとして準備することも目的とした。

3. 研究の方法

(1) マイコプラズマフリーの *R. japonica* の安定的供給体制の準備：先行研究から、マイコプラズマフリーと推定される分離株等に関し、L929 細胞による細胞培養で増殖後、リケッチア及びマイコプラズマに対する PCR を実施して、その品質を確認、十分なシード数の確保を行った。

(2) マダニ成分確保のためのマダニ収集

リケッチアの病態に必須のマダニの刺咬に伴って生体に注入されるマダニ成分を確保するため、分担研究者とともに各地で旗擦り法により各地でマダニの収集を行い、形態同的、リケッチアの保有等について検討した。

(3) 感染の *in vivo* 背景データの収集

リケッチア感染の背景データを得るための陰性コントロールマウスの検討を行い、材料を採取した。

4. 研究成果

(1) マイコプラズマフリーのリケッチア株の準備

当初は、リケッチアシード作製として MyD88 KO マウス継代により維持されている *R. japonica* 標準株の実験用シードの予備実験においてマイコプラズマフリーを確認し、大量培養、再現性を検討しうる体制を整えることを開始したが、増殖が不安定であった。このことから、他の機関との共同研究の *R. japonica* ゲノム解析において、標準株に極めて近縁な株を含む全国の分離株のうち(図1)、基本データからマイコプラズマフリーが推定され、研究代表者も保有していた株を、L929 細胞による細胞培養により安定増殖させ、シード作製した。

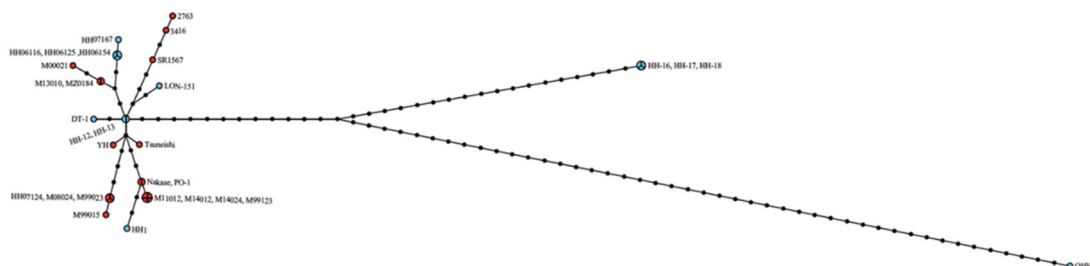


図1. 日本国内で分離された *R. japonica* 株の系統樹 <参考>

その後、リケッチア属 17k Da 抗原等を標的とする PCR とマイコプラズマ検出用の PCR Mycoplasma Detection Set (Takara 6601, Japan) でシードの品質を確認した。リケッチア属 PCR は 1st PCR ですべて陽性である一方(図2)、マイコプラズマは、キットの nested PCR でも検出できなかった(図3)。

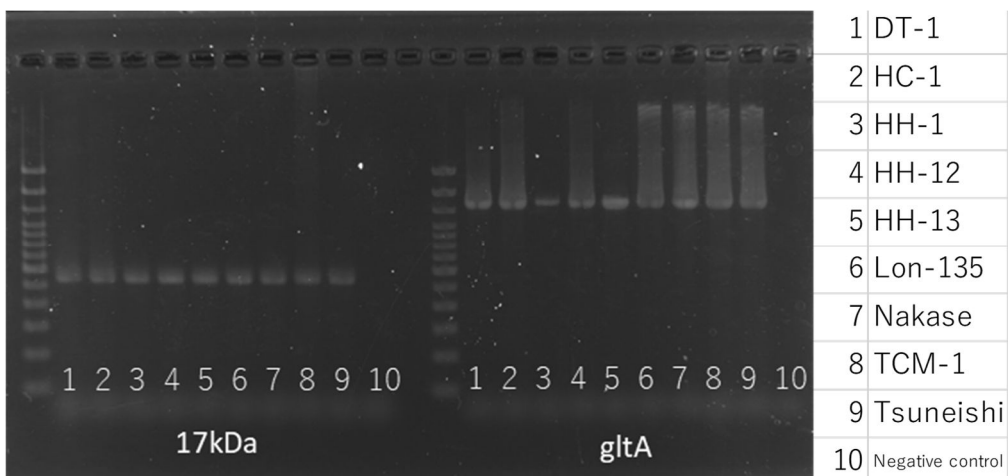


図2. *R. japonica* 分離株シードのPCR確認

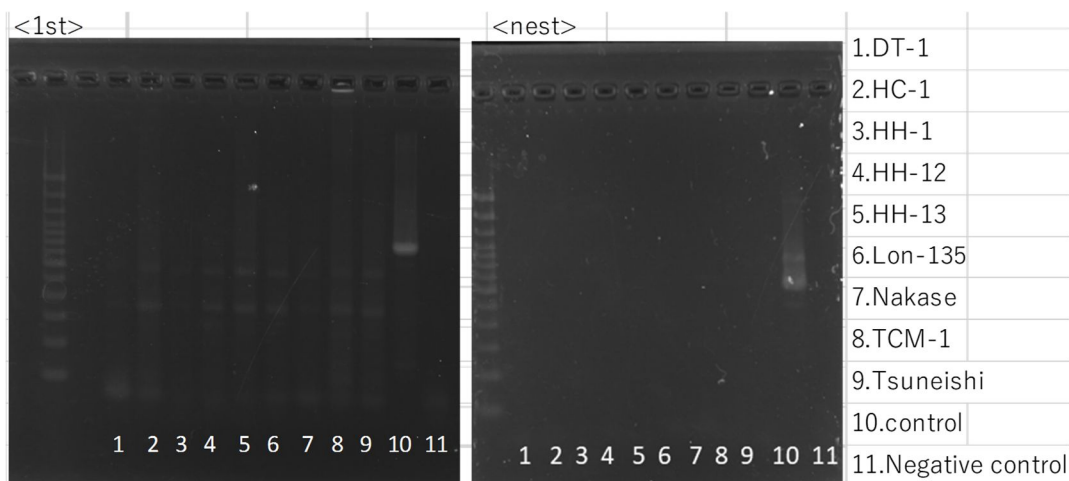


図3. PCRによるマイコプラズマフリーの確認

(2) マダニ成分確保のためのマダニ収集

リケッチアの病態に必須のマダニの刺咬に伴って生体に注入されるマダニ成分を確保するため、分担研究者とともに各地で旗擦り法により各地でマダニの収集を行い、形態同的、リケッチアの保有等について検討した。表1に一例を示す。

2022年6月に実施した、研究代表者の研究機関から調査のアプローチがしやすい北関東（群馬県、栃木県、茨城県）は東西にほぼ同じ緯度に位置するが、調査地点の地勢的条件により優占種が明らかに異なった。日本紅斑熱の主要ベクターとされるヤマアラシチマダニが優占種となる地点、日本紅斑熱や重症熱性血小板減少症候群を保有、媒介するとするフタトゲチマダニを優占種とする地点、北海道でダニ媒介脳炎を媒介するとされているヤマトマダニが優占種とする地点が確認された。これらのマダニを形態同定後、リケッチア等の保有状況をPCRで確認したが、半数以上が保有しておらず、リケッチア等の感染に影響を及ぼすマダニ成分確保のために継続的に材料を収集するための調査基本情報も得た。

表. 北関東地域におけるマダニ調査

	群馬県 東部 中山間部A	群馬県 東部 中山間部B	栃木県 西部 中山間部	茨城県 中部 低山西A	茨城県 中部 低山東	茨城県 南部 雑木林	茨城県 中部 低山西B	茨城県 北部 山間部	栃木県 北東部 中山間部A	栃木県 北東部 中山間部B
フタトゲチマダニ	3	1	17							
キチマダニ	1		2	2	4	3	1	8		2
ヒゲナガチマダニ		1	1							
ヤマアラシチマダニ				13			5			
ヤマトマダニ	2	2		2	2	1	1	1	24	12
タヌキマダニ									1	
タカサゴキラマダニ			1	1N	1N			1N		

(3) *R. japonica* 標準株接種の背景データを得るための陰性コントロールマウスの検討を行い、材料を採取した。

本研究で対象とするリケッチア性病原体はいずれも BSL3 施設を必要とし、*R. japonica* は特定病原体に指定されている。ウイルスや一般的な細菌に比較して増殖に時間を要する上、BSL3 病原体であり、日本紅斑熱リケッチア *R. japonica* 等一部は特定病原体であることから、新型コロナウイルス感染症パンデミックのような事態が発生した際、施設の利用制限などにより影響を大きく受ける。2019 年度末より始まった新型コロナウイルス感染症のパンデミックが継続したことにより、研究代表者が所属する施設においては新型コロナウイルスに関する業務が優先され、その他の研究が停止される状況が約 2 年続いた。さらに 2022 年から研究代表者が管理運営責任をもつ BSL3 実験室に Mpox への対応が加わり、研究代表者は、BSL3 実験室の責任者として、実験室利用研究者の調整、指導、その他施設内の横断的新型コロナウイルス対応の業務に対応し、実験制限解除後、一般ユーザーを差し置いての自身の研究を優先することははばかれた。また、リケッチアの *in vivo* 実験に必要な ABSL3 実験室も同様であった。期間を延期し申請することにより対応することとしたが、上記のことから、夜間や限られた時間をぬって *R. japonica* 分離株をさらに複数種に増やしてシード作製とその品質を確認、野外調査によりマダニ材料を収集・保管することにより、定年にもあたることから本研究を後進にゆだねることとした。

< 引用文献 >

Arzuba Aktera, Tadasuke Ooka, Yasuhiro Gotoh, Seigo Yamamoto, Hiromi Fujita, Fumio Terasoma, Kouji Kida, Masakatsu Taira, Fumiko Nakadouzono, Mutsuyo Gokuden, Manabu Hirano, Mamoru Miyashiro, Yukie Shimazu, Kenji Tabara, Atsushi Toyoda, Dai Yoshimura, Takehiko Itoh, Tomokazu Kitano, Keisuke Katsura, Shakhinur Islam Mondel, Yoshitoshi Ogura, Shuji Ando, Tetsuya Hayashi: Extremely Low Genomic Diversity of *Rickettsia japonica* Distributed in Japan. *Genome Biology and Evolution*, 2017 Jan 4. pii: evw304. doi: 10.1093/gbe/evw304.

安藤秀二 他, リケッチア感染症診断マニュアル 2019 年 6 月版

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kirino Y, Yamamoto S, Nomachi T, Mai TN, Sato Y, Sudaryatma PE, Norimine J, Fujii Y, Ando S, Okabayashi T	4. 巻 8
2. 論文標題 Serological and molecular survey of tick-borne zoonotic pathogens including severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in wild boars in Miyazaki Prefecture, Japan.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Veterinary Medicine and Science	6. 最初と最後の頁 877-885
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/vms3.696.	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 安藤秀二、篠塚（杉森）千恵子	4. 巻 49
2. 論文標題 ダニ媒介性感染症の発生動向の変化	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 臨床と微生物	6. 最初と最後の頁 175-182
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 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 安藤秀二	4. 巻 73
2. 論文標題 つつが虫病・日本紅斑熱	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本獣医師会雑誌	6. 最初と最後の頁 6-12
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 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 安藤秀二	4. 巻 67
2. 論文標題 つつが虫病とは	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 新薬と臨床	6. 最初と最後の頁 1246-1250
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 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 安藤秀二	4. 巻 17
2. 論文標題 マダニ媒介性の日本紅斑熱と紅斑熱群リケッチア	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ヒトと動物の共通感染症ニュースレター	6. 最初と最後の頁 9-12
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 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 安藤秀二
2. 発表標題 国内のダニ媒介感染症の発生状況 (2021年9月11日現在)
3. 学会等名 第28回ダニと疾患のインターフェイス (SADI2021神戸)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安藤秀二
2. 発表標題 リケッチア症の概況
3. 学会等名 令和3年度 希少感染症診断技術研修会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安藤秀二
2. 発表標題 ダニ媒介感染症における東日本と全国との比較～リケッチア症を中心に
3. 学会等名 第69回日本感染症学会 東日本地方会 シンポジウム「野生生物とダニ媒介性疾患」(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安藤 秀二
2. 発表標題 日本紅斑熱～日本で最も多いマダニ媒介感染症
3. 学会等名 第 20 回 人と動物の共通感染症研究会（招待講演）
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	安藤 匡子 (Andoh Masako) (10466914)	鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・准教授 (17701)	
研究 分担者	松村 隆之 (Matsumura Takayuki) (50434379)	国立感染症研究所・免疫部治療薬・ワクチン開発研究センター・室長 (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
---------	---------