

平成 29 年 6 月 30 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461519

研究課題名(和文) リケッチア感染症の病態解明のための実験学的解析

研究課題名(英文) Experimental analysis for understanding pathophysiology of rickettsial infection

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：つつが虫病は致死性から非致死性まであり、臨床病態と血清型の関連が示唆されるが未解明である。血清型特異的病態検討のためマウスに *Orientia tsutsugamushi* を感染させ、主標的細胞はマクロファージと血管内皮細胞、その重要な免疫因子、IFN γ や一酸化窒素(NO)の影響もみた。血清型マウス感染感受性指標として体重減少の有無を認め、IFN γ 、NO不全マウスの感受性は高く、特にIFN γ 不全マウスの体重減少が著しかった。体重減少群では、脾腫と共に脾臓の菌量がより多かった。血清型によるマウス病原性は、免疫不全マウス群に株間の相異が著しく、その免疫因子が感染制御に重要、機序の相異も示された。

研究成果の概要(英文)：Scrub typhus caused by *Orientia tsutsugamushi* (Ot) ranges from lethality to non-lethality depending on Ot serotype, but relationship between pathology and serotype has been unexplained. To clarify serotype-specific pathophysiology, we infected Ot to mice. The main target cells are macrophage and vascular endothelial cells. Therefore we investigated the influence of IFN γ or nitric oxide (NO). By the serotype, increase and decrease in weight was showed as clinical symptom which was the index of infectivity in mice. The sensitivity of IFN γ or NO-knockout mice was high, especially in the IFN γ -knockout mice, weight loss was significant. In the weight loss group, a larger amount of rickettsia in spleen was detected with splenomegaly. A pathogenic difference was observed due to Ot serotype. In particular, the strain-difference was remarkable among the immunodeficient mouse, suggesting that these immune factors are important for infection control, and the mechanism is different.

研究分野：医歯薬学、感染症学、リケッチア、病態モデル

キーワード：つつが虫病 動物モデル 免疫応答 病態発現

1. 研究開始当初の背景

リケッチア感染症は、節足動物をベクターとする急性熱性疾患である。その多くが発熱とともに全身の発疹を特徴とし、ときには重症化、DIC から多臓器不全により死にいたることも少なくない。

DIC を含むリケッチア症の重症化の機序に関しては、不明な点がいまだ多い。リケッチアは血管内皮細胞に感染することから、感染局所での増殖後、全身に播種され、全身の血管内皮細胞に感染することにより多臓器の機能障害も起こっていると考えられる。また、感染宿主細胞でのサイトカインの亢進が引き起こされることにより、血管内皮細胞での炎症因子の亢進と同時に凝固阻止物質の発現低下につながると考えられている。しかしながら、病態解析のための動物モデルの研究は、極めて限定的で、劇症化に対応する治療法へつながる病原性発現機序の解析も進んでいない。日本国内では、代表的なリケッチア症の *Orientia tsutsugamushi* によるつつが虫病が多発しており、死亡例も毎年報告されている。また、*O. tsutsugamushi* は血清型が多様であり、その病原性も血清型に依存して弱毒のものから強毒のものまで存在する。*O. tsutsugamushi* 感染の動物モデル研究では、1980 年前後にマウスの感受性が 5 番目のクロモソーム上に存在する Ric 遺伝子が影響していることが報告されているが、その後の多くの研究のほとんどが接種された実験動物の生き死による病原性の強弱を見るにとどまり、詳細な解析はほとんどなく、メカニズム解明に至る研究はない。

2. 研究の目的

リケッチア性病原体として日本国内で患者発生が最も多く、多様な病原性を示す *O. tsutsugamushi* を中心に、遺伝子改変マウスを用いた *in vivo* 感染実験と、リケッチアの生体内での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マウスおよびヒト由来の初代培養細胞や株化細胞を用いた *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し、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する。

3. 研究の方法

(1) *in vivo* によるマイコプラズマのクリーンアップと *in vitro* による *O. tsutsugamushi* の培養増殖

O. tsutsugamushi に関し、偏性細胞内寄生細菌の過去の取り扱いから、その多くがマイコプラズマに汚染されていることがわかっている。このコンタミネーションの因子を排除するため、複数の血清型の標準株と分離

株について、マウス腹腔内接種法にてマイコプラズマ除去を試み、マイコプラズマが除去されたことを確認、株化細胞に接種し、大量培養し、再現性試験を検討しうる体制を整えた。

(2) *O. tsutsugamushi* 標準株と分離株の野生型ならびに遺伝子改変マウスへの感染実験

マイコプラズマ・フリーの各種 *O. tsutsugamushi* を野生型マウス (C57BL/6) と各種遺伝子改変マウスに強毒株致死量である 5×10^6 copy/匹の菌量でマウス腹腔内に接種し、体重の 20% 減等を人的エンドポイントとし、また、衰弱等の発症状況から随時解剖しながら、各群の体重測定、臨床的観察を 2 週間の期間継続して行った。

(3) マウス生体内のリケッチア量と各種サイトカイン量の測定

O. tsutsugamushi の菌量は、16S rRNA 遺伝子を標的とした qPCR (in house 系) により測定、血漿中のサイトカイン産生は、FlowCytomix (Bender MedSystems GmbH) を用いて測定した。

(4) 病理学的検索

解剖時に採集した脾臓、肝臓について、病理学的解析ならびに抗血清を用いた免疫染色を行った。

4. 研究成果

(1) マイコプラズマ・フリーの *O. tsutsugamushi* 株シード作製

実験基盤となる複数の *O. tsutsugamushi* 血清型 (標準株および分離株) 計 7 株について、i/e/nMOS 欠損マウスとその野生型 C57BL/6 マウスの腹腔内接種によりマイコプラズマ除去を試み、マイコプラズマ共通領域を標的とするリアルタイム PCR によりマイコプラズマが除去されたことを確認した。続いて株化 L929 細胞にマウス脾臓乳剤を接種し、実験用シードの作製、再現性を検討しうる体制を整えた。準備できた血清型各株は表の通りである。

表 マイコプラズマ・フリーの *O. tsutsugamushi* 株

型	代表株	由来	株の分離地	分離年
Kato	Kato	ヒト	日本 (新潟)	1955
Karp	Karp	ヒト	ニューギニア	1943
Gilliam	Gilliam	ヒト	ビルマ	1943
Kuroki	Kuroki	ヒト	日本 (宮崎)	1981
Kawasaki	Kawasaki	ヒト	日本 (宮崎)	1981
Shimokoshi	Shimokoshi	ヒト	日本 (新潟)	1980
Japanese Gilliam	Kaisei	アカネズミ	日本 (福島)	1993

(2) *in vivo* における *O. tsutsugamushi* 接種 i/e/nNOS 欠損抹マウスとその野生型 C57BL/6 マウスに加え, IFN 欠損マウス群に対し, 各血清型株を同一量腹腔内接種し, 経過観察を行った。

野生型マウスと i/e/nNOS 欠損抹マウスでは差がわかりにくい, IFN 欠損マウスでは *O. tsutsugamushi* 接種による体重減少が著しく, 安楽殺が必要になる血清型 (Karp, Gilliam, Kato, Kaisei), 減少するが安楽殺には至らない血清型 (Shimokoshi), 変化がない血清型 (Kawasaki, Kuroki) の 3 群に分かれた。(図 1 には体重減少群の Kaisei と変化のない群の Kuroki を示す。Shimokoshi は接種後 1 週間目ごろまで一過性の体重減少が認められたが, その後回復した。)

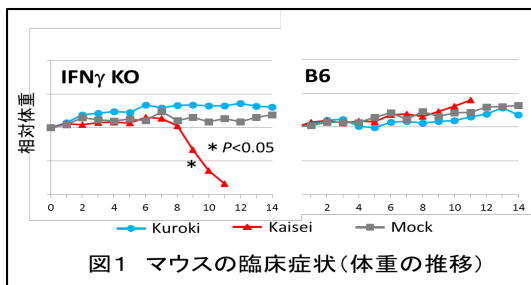


図1 マウスの臨床症状(体重の推移)

腹水・胸水の貯留, 脾腫に関しても, 型による差が認められた。腹水貯留のため, 致死性の強毒株 (Karp, Gilliam, Kato) でも肉眼的病態や体重変動に幅が認められた。

(3) 臓器ならびに血液中の *O. tsutsugamushi* 菌量とサイトカイン産生に関する検討

各血清型とも, 脾臓の菌量は, IFN 欠損マウスが最も多く, 次いで NOS 欠損マウス, 野生型マウスという傾向であった。野生型マウスにおいて, Shimokoshi 型は観察 2 週間目の解剖時には, 脾臓からも血中からも検出できなかった。

血中サイトカインについては, NOS 欠損マウス, IFN 欠損マウスでは, Gilliam 型接種マウスにおいて炎症性サイトカイン量の上昇が顕著であり, 野生型マウスでは Shimokoshi 型接種群が KC, MCP-1, IL-6, IL12, p70 が突出して濃度上昇していた。Kawasaki, Kuroki では明瞭な変化は認められなかった。

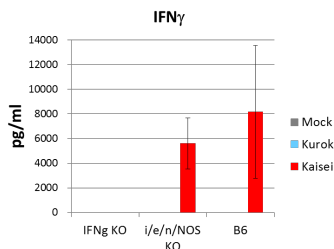


図2 サイトカイン産生量 (IFN γ)

(4) 病理学的検討

細胞浸潤は, 肝臓辺縁部, 実質, 管周囲に認められ, 抗原は, 細胞質内のみ認められ(特に内皮細胞), 細胞外には認められなかった。野生型マウスでは, 細胞浸潤が散見され, 抗原は, 浸潤部位の他にも認められた。NOS 欠損マウスでは, 野生型マウスと同様の所見であったが, 浸潤細胞が比較的少なく, 抗原は比較的多かった。IFN 欠損マウスでは, 細胞浸潤が少なく, 抗原の分布と浸潤細胞の分布は必ずしも一致していなかった。野生型ならびに NOS 欠損マウスよりも抗原が多く認められた。特に, Karp, Gilliam, Kaisei で多く認められた。しかしながら, 全体としてリケッチアの増殖巣とみられる細胞内のリケッチアの集塊は多くはなく, *ex vivo* の標的細胞を見極めるには, より細かな経時的な解析が必要と考えられた。

以上をまとめると, 体重減少の認められた血清型においては, リケッチア感染の指標となる脾腫と共に脾臓における菌量がより多く検出された。マウスにおいて, *O. tsutsugamushi* 血清型により病原性に相異があることが認められた。特に免疫不全マウス群にて株間の相異が顕著であり, これらの免疫因子が感染制御に重要であること, また, その機序に相異があることが示唆された。つつが虫病の重篤度には起因 *O. tsutsugamushi* 血清型も影響すると考えられることがマウス感染実験においても, 免疫系の関連とともに証明された。

<引用文献>

Jerrells TR and Osterman JV. Host defenses in experimental scrub typhus: inflammatory response of congenic C3H mice differing at the Ric gene. 1981, Infect Immun., 31: 1014-22.

5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 件)
投稿準備中

〔学会発表〕(計 3 件)

安藤秀二, 成田雅: リケッチア研究会情報 update ~リケッチア症の発生状況とトピックスのレビュー 第 23 回リケッチア研究会, 2016 年 12 月 3 - 4 日, 東京

安藤秀二: リケッチア・クラミジアの基礎研究の話題, 感染症学会西日本支部会, 2015 年 10 月 23 ~ 25 日, 岡山 (招待講演)

安藤匡子, 松村隆之, 阿戸学, 安藤秀二: *Orientia tsutsugamushi* 血清型によるマウスに対する病原性の相異, 第 87 回日本細菌学会, 2014 年 3 月 26-28, 東京

〔図書〕(計1件)

安藤秀二, つつが虫病, 木村哲・喜田宏編
人獣共通感染症 第3版, p192-196, 医薬ジ
ャーナル社, 大阪, 2016年2月

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)
なし

取得状況(計 件)
なし

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

阿戸 学 (ATO Manabu)

国立感染症研究所・免疫部・部長

研究者番号: 20392318

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

村松 隆之 (MATSUMURA Takayuki)

国立感染症研究所・免疫部・主任研究官

安藤 匡子 (ANDOH Masako)

鹿児島大学・農水産獣医学領域獣医学系・
准教授