

厚生労働科学研究費補助金 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 (H24~26 年度)

## 強毒型および弱毒型 *Orientia tsutsugamushi* の マウス血中における推移

佐藤寛子 柴田ちひろ 秋野和華子 佐藤了悦 斎藤博之 安部真理子 齊藤志保子

つつが虫病の病原体 *Orientia tsutsugamushi* (Ot) の主要 6 型のうち、Shimokoshi 型は弱毒性とされるが、秋田県で 1992 年以降に発生した同型つつが虫病患者 16 例は、全てが軽症とは言えなかった。そこで、16 例のうち急性期の検査所見が高度異常値を示した患者血液から分離された Shimokoshi 型 Matsui 株 (AB742542) について、ICR マウス (クローズドコロニー、免疫正常モデル) および ICR ノードマウス (免疫不全モデル) に対する致死毒性の確認と共にそれぞれの血中 Ot コピー数を経時的に定量した。比較対象には Kato 型 Kakuma-2 株 (強毒型株; AB701788) を使用した。強毒型 Kakuma-2 株 (以下、強毒型株) を接種した ICR マウスおよび ICR ノードマウスはそれぞれ接種後 10~11 日目に死亡した。Matsui 株では、ICR マウスは生存したが、ICR ノードマウスは 16~19 日目に死亡した。マウス血中の Ot 濃度は、強毒型株接種系が Matsui 株接種系よりも増加が顕著であった。さらに ICR ノードマウス死亡時の血中濃度も強毒型株接種系の方が高い傾向にあった。ヒトに対して比較的強い病原性を示した Shimokoshi 型 Matsui 株は ICR マウスに対しては弱毒性であることが確認された。

### 1. 緒言

つつが虫病の病原体 *Orientia tsutsugamushi* (Ot) は、マウスに対する致死性をモデルとしてヒトに対する病原性の強弱が表現されているが、これは血清型でおおよそが判別されている<sup>1)</sup>。日本国内で発生するつつが虫病患者から分離される Ot の血清型は主に 6 種で、このうち Shimokoshi 型は弱毒性とされている<sup>1,2)</sup>。しかし、この型の感染症例に関する報告は少なく、分離された株は 2014 年現在、国内で 2 株のみである<sup>3)</sup>。本県ではこの型の患者発生が 1992 年以降 2013 年までに 15 例<sup>3)</sup>、2014 年の 1 例を含めると国内最多の 16 例が確認されている。この中には DIC や脳炎等の併発例はないものの、全例が軽症とは言えず、検査所見からは CRP 値 10.0 mg 以上、AST と ALT が 101 IU/L 以上など、重症とみなし得る数値を示す例も含まれていた<sup>3)</sup>。国内分離例として 2 株目の Shimokoshi 型株である Matsui 株は、重症例から分離された。同じ血清型でも株によっては毒性に差があるといわれていることから、このヒトに対して弱毒ではなかった株のマウスに対する致死毒性の確認をすると共にマウスの血中 Ot コピー数を経時的に定量した。

### 2. 方法

マウス接種には Shimokoshi 型 Matsui 株 (弱毒型: 重症例の患者由来) を使用した。対象として Kato 型 Kakuma-2 株 (強毒型: 野鼠由来) を用いた。両株は、L929 細胞で培養後 DNA 抽出し、real-time PCR<sup>4)</sup>によって Ot コピー数を定量した。その後各株を PBS で  $1.0 \times 10^7$  copies/ml (E7) および  $1.0 \times 10^5$  copies/ml (E5) に希釈調製した Ot 溶液を作成した。各株各濃度の Ot 溶液 100  $\mu$ l を ICR マウスと ICR ノードマウスそれぞれ 2 頭の腹腔に接種した。その後、マウスの外見・行動観察と尾静脈からの採血を 8 日目までは 1 日 1 回行い、9 日目以降は 1~2 日毎に行った。マウス血液の Ot コピー数は、株の場合と同様に DNA 抽出後に定量し、各群の血液 1 ml 当たりに換算した 2 匹の平均値を求めた。

### 3. 結果

#### 3.1 ICR マウスの血中 Ot 濃度 (図 1)

ICR マウスにおける強毒型株接種系で初めて Ot が検出されたのは、E7 を接種した群 (E7 群) が 2 日目、E5 を接種した群 (E5 群) が 4 日目で、その後コピー数は増加し、10 日目に E7 群が、11 日目に E5 群のマウスが衰弱不動となり死亡したため観察を終了した。この時点で E7 群の

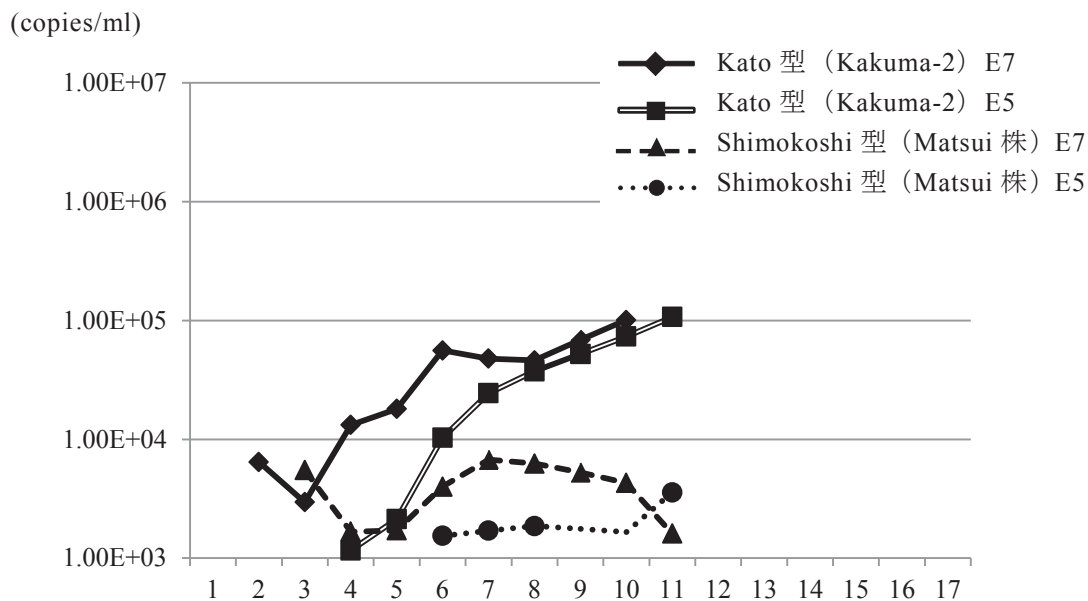


図1 ICR マウスの血中 Ot 濃度の推移 (days)

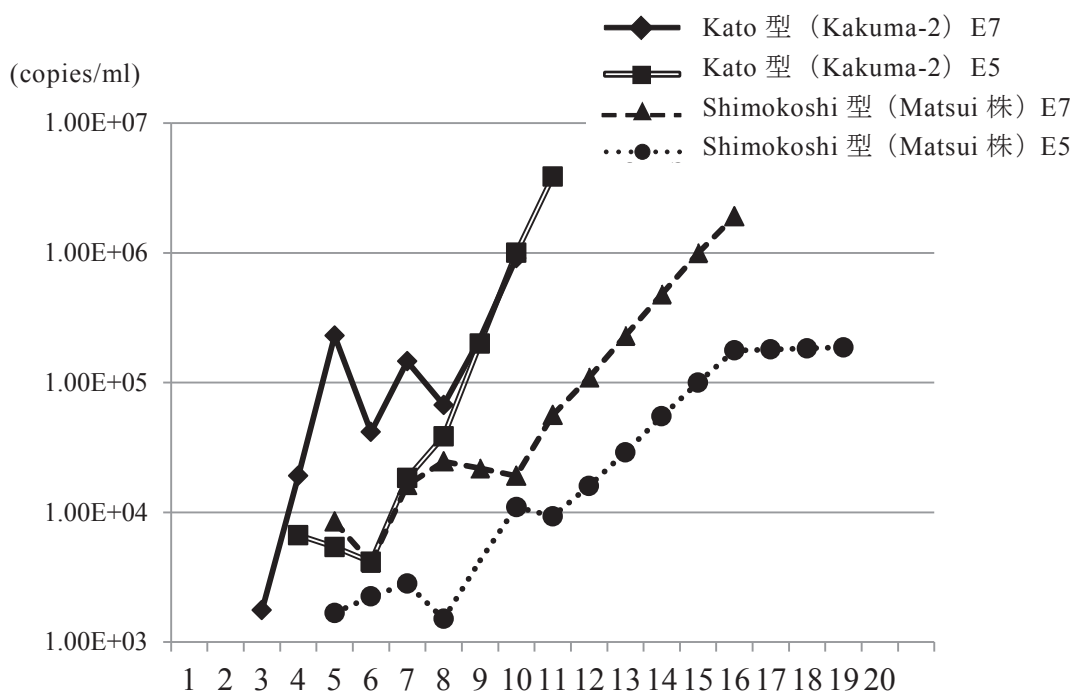


図2 ICR ノードマウスの血中 Ot 濃度 (days)

血中平均 Ot コピー数は  $1.0 \times 10^5$  copies/ml, E5 群は  $1.1 \times 10^5$  copies/ml であった。

一方, Matsui 株接種系で初めて Ot が検出されたのは, E7 群が接種後 3 日目, E5 群が 6 日目であった。その後, 血中コピー数に顕著な増加はなく, E7 群は 7 日目, E5 群は 11 日目 (平均  $7.1 \times 10^3$  copies/ml) を最高値とし, それぞれ 12 日目に降は不検出となった。マウスはその後 1 ヶ月間,

外見と行動に大きな変化がないまま生存した。

### 3.2 ICR ノードマウスの血中 Ot 濃度 (図 2)

ICR ノードマウスで初めて Ot が検出されたのは, 強毒株では E7 群が 3 日目, E5 群が 4 日目で, その後コピー数は ICR マウスよりも顕著な増加を示し, 10 日目に E7 群が, 11 日目に E5 群が死亡した。この時点で血中平均 Ot コピー数

はそれぞれ  $1.0 \times 10^6$  copies/ml,  $2.4 \times 10^6$  copies/ml と同株を接種した ICR マウス死亡時の 10 倍量を示した。Matsui 株において、Ot の検出が初めて確認されたのは両群共に 5 日目で、その後、コピー数は著しく増加し、E7 群は 16 日目、E5 群は 19 日目に死亡した。この時点の血中平均 Ot コピー数はそれぞれ  $1.9 \times 10^6$  copies/ml,  $1.9 \times 10^5$  copies/ml と、同株を接種した ICR マウスにおける最高値の 1000 倍を示した。

#### 4. 考察

臨床検査値から比較的重症と見なし得た患者血液由来の Shimokoshi 型 Matsui 株のマウスに対する致死毒性を確認したところ、ICR マウスにおいて、Matsui 株は強毒性の Kato 型 Kakuma-2 株よりも体内での増殖が非常に緩慢であり、致死性は確認されなかった。これにより、従来の“Shimokoshi 型→弱毒性”というセオリーはこの株においても同様であった。

これまでのマウスを用いた Ot の毒性に関する研究において、マクロファージ内での増殖性の可否や感染初期に TNF 産生の有無が Ot 増殖抑制に関連性することが指摘されている<sup>5,6)</sup>。また、ヒトの急性期血液を調べると、サイトカインが高値を示しており、免疫応答の過剰反応が重症化に関連すると指摘されている<sup>7)</sup>。これらのことは、Ot のヒトに対する病原性は Ot そのものの増殖性の強弱に加えて、宿主側の免疫応答が病原性に影響を与えていることを示している。ヒトの免疫状態は個々様々であるため、本県におけるわずか 16 症例の臨床症状にも多様性が見られたものと思われる。今後より多くの症例が集積されることで、ヒトに対する病原性が明確になるとと思われるが、Shimokoshi 型は発生が稀であるという通説から、ほとんどの検査機関が検査対象としていない。そのため、2014 年現在、国内で Shimokoshi 型の患者発生が確認されているのは、この型をルーチン検査に加えている 5 県（新潟、山形、福島、福井および秋田県）となっており<sup>2,3,8-10)</sup>、これからの国内における検査体制の整備に期待したい。

また、前述のとおり病原性はヒト側の応答も大きく関与することから、つつが虫病は早期に MINO による治療を開始することが最善策であることに変わりはない。今後も県民への啓発を強化

すると共に、分かり易い十分な情報提供を継続し、早期受診を促すことが必要と考えられた。

#### 参考文献

- 1) Norio OHASHI, et al.: Demonstration of antigenic and genotypic variation in *Orientia tsutsugamushi* which were isolated in Japan, and their classification into type and subtype, *Microbiol. Immunol.*, **40(9)**, 1996, 627-638.
- 2) Akira TAMURA, et al.: Isolation of *Rickettsia tsutsugamushi* antigenically different from Kato, Karp and Gilliam strains from patients, *Microbiol. Immunol.*, **28(8)**, 1984, 873-882.
- 3) 佐藤寛子, 他: 秋田県における Shimokoshi 型つつが虫病の遡及的疫学調査, *衛生動物*, vol. **65**, 2014, No.4, 183-188.
- 4) 川森文彦, 他: リケッチア感染症の迅速診断法に関する研究, 静岡県環境衛生科学研究所報告, No.5, 2011, 37-40.
- 5) 多村憲: 恙虫病病原体 *Orientia tsutsugamushi* の微生物学, *日本細菌学雑誌*, **54 (4)**, 1999, 815-832.
- 6) 福原正博: *Orientia tsutsugamushi* の毒力決定因子および感染宿主応答に関する研究, 千葉大学, 博士論文, **58**, 2006. p24-25.  
<http://mitizane.ll.chiba-u.jp/metadb/up/assist1/Y2006-16.pdf>
- 7) 岩崎博道: ツツガムシ病における重症化とサイトカイン産生制御: 厚生労働省 (編): 厚生労働科学研究補助金 (新興・再興感染症事業) リケッチア感染症の国内実態調査及び早期診断体制の確立による早期警鐘システムの構築, 厚生労働省, 2007, 134-144.
- 8) 大谷勝美, 他: 山形県で発生した Shimokoshi 型リケッチア感染によるつつが虫病の一例, *衛生動物*, **60**, 2009, 317-321.
- 9) 竹之下秀雄, 他 Shimokoshi 型 *Orientia tsutsugamushi* 感染によるツツガムシ病の 1 例, *皮膚臨床*, **55**, 2013, 1181-1185.
- 10) Satoshi IKEGAYA, et al.: Tsutsugamushi disease caused by Shimokoshi-Type *Orientia tsutsugamushi*: The first report in western Japan. *Am. J. Trop. Med.* **88**, 2013, 1217-1219.