

厚生労働科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）  
分担研究報告書（平成 15 年度）

野生動物およびマダニ類を保有・媒介者とする人畜共通感染症とくに野兔病  
と紅斑熱群リケッチア症に関するフィールド調査の経過報告

分担研究者	藤田博己	大原総合病院附属大原研究所
研究協力・共同研究者	川端寛樹	分担研究者，国立感染症研究所
	本田俊郎	鹿児島県環境保健センター
	山本正悟	宮崎県衛生環境研究所
	石畝 史	福井県衛生環境研究センター
	高田伸弘	福井大学医学部
	矢野泰弘	福井大学医学部
	斎藤あつ子	神戸大学大学院
	鶴見みや古	山階鳥類研究所
	佐藤文男	山階鳥類研究所
	馬原文彦	馬原医院
	高 美喜男	奄美野鳥の会
	鳥飼久裕	奄美野鳥の会
	増澤俊幸	主任研究者，静岡県立大学薬学部

国内各地における野兔病と紅斑熱群リケッチア症の各病原体について，おもに野ネズミ類とマダニ類を対象にした浸淫状況を調査している。各調査地域における病原体分離と一部の野ネズミ類について実施した各病原体に対する抗体検出の経過を報告する。

方法

野ネズミはシャーマントラップかケージトラップによる生け捕り後に，麻酔死させて剖検，検査材料を採取した。野兔病菌とリケッチアの分離には肝臓，脾臓，血液のいずれかを接種材料として用いた。野ネズミの抗体検出には心臓採取血液から分離した血清を用いた。ただし捕獲時点ですでに死亡していた場合には，心臓を摘出して 0.5ml の PBS 中で細切し，血液成分を滲出させた後の遠心上清を用いた。抗体検出は，野兔病菌の場合，野兔

病菌凝集反応迅速スライド法を用い，最終血清希釈は 20 倍（心臓滲出液では 2 倍）を下限とした。リケッチアの抗体検出は，紅斑熱群リケッチア (*Rickettsia japonica*, *Rickettsia helvetica*, *Rickettsia* sp. AT-1) とツツガムシ病リケッチア *Orientia tsutsugamushi* (Gilliam, Karp, Kato, Kawasaki, Kuroki, Shimokoshi) を抗原とした間接免疫ペルオキシダーゼ反応によった。なお，この反応の二次抗体にはペルオキシダーゼ標識 protein G を用いた。血清希釈は 10 倍（心臓滲出液では

原液) を下限とした。

マダニ類は、おもに植生上で宿主を待機中の未寄生期の虫体を白色フランネル布によるハタズリ (flagging) 法で採集した。マダニの発育期の表示は、L: 幼虫, N: 若虫, ♀: 成虫雌, ♂: 成虫雄とした。

野兎病菌の分離には、ユーゴン寒天 (DIFCO) にヒト血液を添加した血液寒天培地を用いた。リケッチアの分離は材料乳剤を L929 細胞に接種し増殖を確認する方法によった。分離は野ネズミ、マダニともに個別別実施した。

#### 調査地域

鹿児島県 (与路島, ハンミヤ島, 奄美大島, トカラ列島有人7島, 屋久島, 本土域の薩摩地区と大隈地区), 宮崎県 (串間市穂佐ヶ原, 都井岬, 日南市, 宮崎市), 高知県 (京柱峠), 徳島県 (阿南市), 福井県 (野坂岳, 百里ヶ岳, 取立山, 経ヶ岳, 小浜市), 長野県 (木曾地方, 八ヶ岳, 軽井沢町), 岩手県 (早池峰)

#### 調査結果

##### 与路島

奄美大島南部に隣接する有人3島のうちでもっとも南に位置する。2003年8月下旬の調査において島内の植生上から採集されたマダニは、オウシマダニ *Boophilus microplus* (23L), タカサゴチマダニ *Haemaphysalis formosensis* (1♀, 2♂) およびヤマアラシマダニ *Haemaphysalis hystrix* (1♀, 2♂) の2属3種, 合計29個体で, うちオウシマダニ10個体, タカサゴチマダニ3個体 (1♀, 2♂) からリケッチアの分離を試みたが陰性であった。ネズミ類の調査は別項で分担研究者 (川端) に述べられているように, クマネ

ズミのみが採集され, これらにはダニ類の寄生は認められなかった。また島内に生息するアオカナヘビ, ヘリグロヒメトカゲなどの小型爬虫類も随時捕獲して体表面を精査したが, ダニ類の寄生は認められなかった。植生上から採集されたマダニの種類はいずれも終宿主として大型動物への寄生が必須であり, したがって島内においては, オウシマダニは主として放牧牛が, ほか2種は野生化しているヤギが, それぞれ主要な宿主となっているものと推測される。

##### ハンミヤ島

与路島と請島の間位置する小無人島で, オオミズナギドリの繁殖コロニーが存在する。島内には移入されたヤギが野生状態で生息している。2003年8月下旬に, 夜間に帰巢するオオミズナギドリを捕獲し, うち3個体にマダニの寄生を認め, 虫体を採集した。また同島の繁殖巣穴28から各巣穴当たり約200mlの土壌を採取して研究室に持ち帰り, ツルグレン装置でダニを採集した。採集されたマダニはいずれも *Ornithodoros* sp. で (サワイカズキダニ *Ornithodoros sawaii* と推定されるが同定は保留), 鳥からは幼虫のみを合計32個体, 巣穴では15サンプルから同種のマダニが合計49個体 (10L, 25N, 5♀, 9♂) 採集された。このうち, 鳥から採集した飽血幼虫から脱皮した3Nと巣穴から採集した1Nからリケッチアの分離を試みたが陰性であった。

##### 奄美大島

2003年9月28日に瀬戸内町の中央林道で, アマミノクロウサギ1頭の死体が回収されたのを機に, 寄生マダニを検索した。ヤマアラ

シチマダニ (1L) と特異寄生種のクロウサギチマダニ *Haemaphysalis pentalagi* (11N, 5♀, 2♂) の1属2種, 合計 19 個体が採集された。このうち 2N と 1♂ からリケッチアの分離を試みたが陰性であった。

#### トカラ列島

2003 年 5 月 20 日と 21 日に同列島の有人 7 島 (口之島, 中之島, 平島, 諏訪之瀬島, 悪石島, 小宝島, 宝島) についてマダニ相の調査を実施した。悪石島と小宝島の間は生物地理学上の分布境界線 (渡瀬線) として知られ, 悪石島以北が旧北区, 小宝島以南が東洋区とされる。各島ともに牛の放牧が盛んで, また野生化したヤギ (トカラヤギ) の生息数も多い。

植生上から採集したマダニは, オウシマダニ (14L), キチマダニ *Haemaphysalis flava* (10N, 2♂), タカサゴチマダニ (3N, 3♀, 4♂), ヤマアラシチマダニ (1♂), フタトゲチマダニ *Haemaphysalis longicornis* (77L, 13N) およびアカコッコマダニ *Ixodes turdus* (1♂) の 3 属 6 種, 合計 128 個体で, リケッチア分離はキチマダニ (7N, 1♂), タカサゴチマダニ (1N, 2♀, 2♂) およびフタトゲチマダニ (12L, 6N) について実施したがすべて陰性であった。

2003 年 10 月 25 日に悪石島で捕鼠とマダニ採集を行った。ネズミはまったく捕れなかった。植生上からフタトゲチマダニ 17L と 6N を採集し, うち 13L と 5N からリケッチアの分離を試みたが陰性であった。

#### 屋久島

2003 年 1 月 31 日と 2 月 1 日に捕鼠とマダニ採集を行った。野生のシカとサルが生息密

度が高く, 調査中も容易に目撃された。捕獲したヒメネズミ *Apodemus argenterus* 2 頭はリケッチア, 野兔病菌ともに分離陰性であった。マダニは次の 2 属 6 種, 合計 70 個体が採集された: ツノチマダニ *Haemaphysalis cornigera* (1L), キチマダニ (3N, 2♀), ヒゲナガチマダニ *Haemaphysalis kitaokai* (18♀, 12♂), オオトゲチマダニ *Haemaphysalis megaspinoza* (9N, 1♀), イエンチマダニ *Haemaphysalis yeni* (20L, 1N, 1♀, 1♂) およびアカコッコマダニ (1N)。採集されたほぼ全虫体について野兔病菌とリケッチアの分離を実施したが陰性であった。

#### 鹿児島県本土域の薩摩地区

2003 年 10 月 27 日に郡山町花尾山から八重山に至る地域でアカネズミ *Apodemus speciosus* 10 頭, 2004 年 1 月 28 日に薩摩半島南部地域でアカネズミ 6 頭, 2004 年 2 月 14 日に松元町角免地区でアカネズミ 6 頭と霧島でヒメネズミ 5 頭をそれぞれ捕獲した。薩摩半島南部のサンプルを除く 21 頭について野兔病菌とリケッチアの分離を実施し, すべて陰性結果であった。

野ネズミ血清の抗体は, 郡山町の 10 頭と霧島の 4 頭を除く 13 頭について検査したところ, 野兔病菌に対してはすべて陰性であったが, 薩摩半島南部の 6 頭中 5 頭に紅斑熱群リケッチアの抗体が 40 倍から 640 倍の範囲で陽性, 松元町の 6 頭は紅斑熱群が 2 頭で 8 倍から 32 倍の陽性で, 同個体はまたツツガムシ病リケッチアに対しても 1 倍から 32 倍に陽性反応を示した。

マダニの採集は 2004 年 2 月 14 日に松元町で実施し, キチマダニ (6N, 3♀, 3♂)

とタカサゴチマダニ (5N) の合計 17 個体を採集, キチマダニの全採集個体からの病原体分離を試みたがすべて陰性であった。

#### 鹿児島本土域の大隈地区

野ネズミの捕獲は 2004 年 2 月 13 日から 15 日に実施し, 垂水市でアカネズミ 3 頭ならびに内之浦町でアカネズミ 9 頭とヒメネズミ 8 頭を得た。野兎病菌とリケッチアの分離はすべて陰性であった。内之浦町のアカネズミ 2 頭のリケッチア分離中の培養細胞中に少数個体ながら活発に運動するトリパノソーマが見られた。現在, KG-2 株と KG-3 株として培養を継続している。抗体検出では, 垂水市の 3 頭中 1 頭に紅斑熱群抗体が 20 倍陽性, 別の 1 頭にツツガムシ病リケッチア抗体が 2 倍 (Gilliam) と 16 倍 (Kawasaki) の陽性反応が認められた。内之浦町ではアカネズミ 8 頭とヒメネズミ 2 頭の抗体を検査し, アカネズミ 3 頭に 1 倍から 32 倍の紅斑熱群陽性例とアカネズミ 2 頭に 16 倍のツツガムシ病リケッチア陽性例を見いだした。このうちの 1 頭は紅斑熱群とツツガムシ病の両方に抗体陽性であった。

マダニの採集は, 垂水市で 2003 年 3 月 14 日と 9 月 4 日, 2004 年 2 月 12 日と 13 日, 内之浦町で 2003 年 3 月 15 日, 5 月 22 日, 7 月 31 日, 12 月 9 日, 2004 年 2 月 15 日, 高山町で 2003 年 3 月 15 日にそれぞれ実施した。

垂水市で採集されたマダニは, タカサゴキラマダニ *Amblyomma testudinarium* (13N, 1♂), キチマダニ (31N, 6♀, 6♂), タカサゴチマダニ (33N, 5♀, 9♂), ヤマアラシチマダニ (1L, 1N, 3♀, 4♂) およびフタトゲチマダニ (17L, 5N) の 2 属 5 種, 合計 135 個体であった。これらのマダ

ニからはほぼ全数についてリケッチア分離のみを実施し, ヤマアラシチマダニの 1L から紅斑熱群リケッチア (HH-1 株) を分離した。HH-1 株は単クローン抗体との反応性からは日本紅斑熱病原体の *Rickettsia japonica* と同定された。

内之浦町ではタカサゴキラマダニ (9N), タイワンカクマダニ *Dermacentor taiwanensis* (1♂), キチマダニ (2L, 58N, 9♀, 6♂), タカサゴチマダニ (193N, 37♀, 28♂), ヤマアラシチマダニ (10L, 4N, 12♀, 13♂), フタトゲチマダニ (16L, 14N, 1♀) およびヤマトマダニ *Ixodes ovatus* (2♂) の 4 属 7 種, 合計 415 個体が採集された。タイワンカクマダニは鹿児島県本土域ではこれが最初の記録となる。病原体分離は, ほぼ全採集個体について実施した。野兎病菌については, 2003 年 12 月以降のサンプルから分離を試みているがこれまでのところ陽性例はない。リケッチアはフタトゲチマダニの若虫から 3 株 (LON-79, LON-80, LON-81) の紅斑熱群リケッチアが分離された。これらの分離株の単クローン抗体による同定では, 日本紅斑熱リケッチアに酷似するものの, これには一致しない LON タイプの血清型を示した。このタイプのリケッチアは, これまでに国内と中国のフタトゲチマダニからのみ分離されている。

今回の病原体の分離過程で, ヤマアラシチマダニ 1♂ からトリパノソーマ科の不明原虫が分離され, 培養細胞で良好な増殖が得られたことから, KG-1 株として維持している。

高山町ではタカサゴキラマダニ (3N), キチマダニ (13N, 6♂), タカサゴチマダニ (18N, 3♀, 4♂), ヤマアラシチマダニ (8♀, 8♂), *Haemaphysalis* sp. (1♂) お

よびヤマトマダニ（1♀）の3属6種、合計65個体が採集された。全採集個体についてリケッチアの分離のみを実施し、すべて陰性であった。

鹿児島県本土域では、これまでにマダニから *Rickettsia helvetica* と不明種 *Rickettsia* sp. ATタイプが分離されているが、*Rickettsia japonica* と LON タイプの分離はこれが最初である。

#### 宮崎県串間市

2003年5月22日に串間市市街に隣接する穂佐ヶ原地区で植生上からのマダニを採集した。種類と個体数は、タカサゴキララマダニ（1N）、キチマダニ（10N, 1♂）、タカサゴチマダニ（8N, 2♀）、ヤマアラシチマダニ（1N, 1♂）およびフタトゲチマダニ（44N）の2属5種、合計65個体であった。フタトゲチマダニ10Nを除く全個体についてリケッチア分離を試みたが陰性であった。

#### 宮崎県都井岬

2003年5月23日に半野生ウマの生息地である都井岬内の数箇所においてマダニを採集した。植生上からは、タカサゴキララマダニ（1L）、キチマダニ（7L, 9♀）、タカサゴチマダニ（38N, 8♀, 12♂）、ヤマアラシチマダニ（4N, 2♀, 1♂）およびフタトゲチマダニ（53N, 1♀）の2属5種、合計136個体を、またウマからフタトゲチマダニ（4♀, 7♂）を採集した。リケッチア分離は植生上から採集のほぼ全個体、ただしフタトゲチマダニは一部の少数個体、について実施し、フタトゲチマダニ若虫から4株（LON-82～LON-85）のLONタイプ紅斑熱群リケッチアを分離した。

ウマから採集したフタトゲチマダニのうち飽血状態にあった2個体がともに6月4日から産卵を開始し、さらに6月23日から幼虫の孵化が始まった。各個体由来の幼虫3個体、合計6個体から分離を試みたところ、全個体からLONタイプの紅斑熱群リケッチアが分離され、ウマ寄生個体がリケッチアに感染していたことが明らかとなった。

#### 宮崎県日南市

2003年5月23日に徳之峯地区で植生上からマダニを採集した。タカサゴキララマダニ（4N）、キチマダニ（1N, 1♀）、タカサゴチマダニ（16N, 3♀）、ヤマアラシチマダニ（1L, 3♀, 2♂）およびフタトゲチマダニ（3N）の2属5種、合計34個体が採集され、全個体についてリケッチア分離を実施し陰性の結果であった。

#### 宮崎県宮崎市

2003年5月23日に宮崎市郊外好隣梅地区でマダニを採集した。キチマダニ（2N）、タカサゴチマダニ（3N）、ヤマアラシチマダニ（2L, 1♀）、フタトゲチマダニ（4L, 25N, 1♂）およびタネガタマダニ *Ixodes nipponensis*（1N）の2属5種、合計39個体を採集し、フタトゲチマダニ24Nを除く全個体についてリケッチア分離を実施した。リケッチアはフタトゲチマダニからのみ分離され、幼虫から3株（LON-86～88）と若虫から1株（LON-89）が得られた。これらの分離株は血清反応からすべてLONタイプの紅斑熱群リケッチアと型別された。

#### 高知県京柱峠

2003年5月に高知県衛生研究所の千屋誠

造先生から分与いただいたマダニ2属5種、合計11個体を検査する機会を得た。種類と個体数は、キチマダニ(4N, 1♀), ヤマトチマダニ *Haemaphysalis japonica* (1N), オオトゲチマダニ(3N), ヒトツトゲマダニ *Ixodes monospinosus* (1♀) およびシュルツェマダニ *Ixodes persulcatus* (1♂) で、このうちヤマトチマダニを除く全個体について病原体分離を試み、ヒトツトゲマダニから紅斑熱群リケッチアを分離した(IM-5株)。

分離株の詳細な同定には至っていないが、マウス坑血清によるスクリーニング検査では *Rickettsia helvetica* に一致した。高知県のマダニからは *Rickettsia* sp. の AT タイプと LON タイプがすでに分離されているので、今回の分離例は新たな種類の追加となる。

#### 徳島県阿南地区

2004年1月17日と18日に阿南市の新野町と福井町で野ネズミの捕獲を行った。新野町ではアカネズミ11頭とヒメネズミ1頭、福井町ではアカネズミ2頭を捕獲した。野兔病菌とリケッチアの分離はいずれも陰性であった。

新野町では野ネズミ捕獲と同時に植生上からのマダニを採集し、キチマダニ(6N, 1♀, 3♂)とタカサゴチマダニ(3N)を得た。全13個体について病原体分離を実施したが、野兔病菌、リケッチアともに陰性であった。

#### 福井県野坂岳

2003年5月24日に野坂山地野坂岳の植生上から採集したマダニは、キチマダニ(44N, 17♀, 7♂), オオトゲチマダニ(19N, 1♀), フタトゲチマダニ(5L, 39N, 1♂), ヒト

ツトゲマダニ(4♀, 2♂) およびヤマトマダニ(1♀, 5♂)の2属5種、合計145個体であった。このうち、フタトゲチマダニ26Nを除く全個体について、リケッチア分離のみを実施した。結果は、フタトゲチマダニのみに各発育期を含む11の陽性例(LON-90~LON-100)が見いだされた。これらの分離株はすべて血清反応においては紅斑熱群リケッチア LON タイプとみなされた。

#### 福井県小浜市と百里ヶ岳

2003年6月7日, 9月18日, 9月30日に小浜市の山間部と隣接の百里ヶ岳の植生上から採集したマダニからリケッチアの分離を行った。採集した種類と個体数は、タカサゴキララマダニ(4N), タイワンカクマダニ(32L, 1♀), キチマダニ(22L, 40N, 7♀, 7♂), フタトゲチマダニ(118L, 25N, 7♀, 7♂), オオトゲチマダニ(2♀), ヒトツトゲマダニ(2♀), タネガタマダニ(1L) およびヤマトマダニ(1♀, 1♂)の4属8種、合計277個体であった。分離はリケッチアについてのみ実施した。種類ごとの各発育期の個体数が10未満のものは全数を、それより多いものは10個体前後を分離に使用した。リケッチアはフタトゲチマダニの各発育期から合計16株(LON-101~LON-116)とヒトツトゲマダニから2株(IM-6とIM-7)が分離された。血清反応によるスクリーニングでは、フタトゲチマダニからの分離株はこれまでと同様に LON タイプ、ヒトツトゲマダニからの分離株は *Rickettsia helvetica* と同定された。

#### 福井県側白山山地(取立山, 経ヶ岳)

2003年7月5日, 8月3日, 8月13日,

8月23日に白山山地の福井県側の各地点において採集されたマダニは、キチマダニ（1N）、ヤマトチマダニ（1N, 1♀, 1♂）、ヤマトマダニ（46♀, 30♂）およびシュルツェマダニ（1N, 1♀）の2属4種、合計82個体であった。全個体について行った野兔病菌とリケッチアの分離結果はすべて陰性であった。

#### 長野県木曾地方

2003年5月1日と2日に木曾地方の南木曾町、大桑村、上松町、王滝村および御岳南面でマダニを採集した。キチマダニ（32N, 3♀, 5♂）、ヒトツトゲマダニ（5♀, 2♂）、ヤマトマダニ（10♀, 16♂）およびシュルツェマダニ（2N）の2属4種、合計75個体についての野兔病菌とリケッチアの分離結果は、野兔病菌陰性、リケッチアはヒトツトゲマダニの1♀（IM-3）と1♂（IM-4）が陽性であった。2分離株は血清反応からいずれも *Rickettsia helvetica* と同定された。

#### 長野県八ヶ岳

2003年5月2日に麦草峠でマダニを採集し、ヒゲナガチマダニ（1♀）とシュルツェマダニ（3♂）を得た。これらは野兔病菌、リケッチアともに分離陰性であった。

#### 長野県軽井沢地区

2003年5月3日、9月13日、14日に植生上からマダニを採集した。キチマダニ（1♂）、ヤマトマダニ（5♀, 4♂）およびシュルツェマダニ（2N, 3♀, 4♂）の2属3種、合計19個体が採集され、全個体について野兔病菌とリケッチアの分離を実施した。分離結果は、野兔病菌陰性、リケッチアはシュルツェ

マダニの1♀が陽性で（IP-4株）、分離株は血清反応から *Rickettsia helvetica* と同定された。

#### 岩手県早池峰山

2003年6月26日と27日に北上高地の早池峰山山ろく地区の植生上からマダニを採集した。ヤマトマダニ（1♀, 1♂）とシュルツェマダニ（1N, 2♂）が採集され、全個体について野兔病菌とリケッチアの分離を行った。野兔病菌は陰性であったが、シュルツェマダニ1Nがリケッチア陽性で（IP-5株）、分離株は血清反応によると *Rickettsia helvetica* に一致した。岩手県における同リケッチア種はこれに先立ち、奥羽山脈の湯田町のヒトツトゲマダニから1株（IM-2）の分離例がある。

#### まとめ

2003年から2004年にかけて、日本国内各地の野ネズミ類とマダニ類からの野兔病菌と紅斑熱群リケッチアの検索を、おもに分離によって調査した。これまでの野兔病菌の分離結果はすべて陰性であったが、紅斑熱群リケッチアは日本紅斑熱病原体、*Rickettsia helvetica* および不明種 LON タイプからなる多数の株が分離され、国内にこれらのリケッチアが広く分布していることが明らかとなった。また、鹿児島県の調査地点において、アカネズミとヤマアラシチマダニから病原性は不明ながらトリパノソーマ科の原虫が分離された。分離株の一覧表を資料として付した。

#### 論文発表・著書

1. 藤田博己：野兔病 人獣共通感染症 ー 最近のトピックス、臨床と微生物、30、375-379, 2003.

2. 藤田博己：野兔病. In 感染症 (竹田美文, 木村 哲 編). 朝倉書店, 東京. (印刷中)
3. Ishikura M, Ando S, Shinagawa Y, Matsuura K, Hasegawa S, Nakayama T, Fujita H, Watanabe M: Phylogenetic analysis of spotted fever group rickettsiae based on gltA, 17-kDa, and rOmpA genes amplified by nested PCR from ticks in Japan. *Microbiology and Immunology*, 47, 823-832, 2003
4. 高田伸弘, 石畝 史, 小野恵美, 矢野泰弘, 藤田博己：陸水源に起因する疾病リスクの分析ならびに対応への指針. 大原総合病院年報, 45, 3-17, 2003.
5. 山本 進, 野田伸一, 木場順一, 藤田博己：鹿児島県薩摩半島のイノシシから採集された寄生性ダニ類. 大原総合病院年報, 45, 31-34, 2003.

#### 学会発表

1. 藤田博己, 渡辺百合子：日本の野兔病菌保有鳥獣の種名リスト. 第50回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会北日本支部合同大会. 2003年.
2. 藤田博己, 渡辺百合子, 高田伸弘：東北地方のマダニ類からの紅斑熱群リケッチアの分離状況. 第10回リケッチア研究会. 2003年.
3. 藤田博己, 渡辺百合子, 高田伸弘：長野県のマダニ類からの紅斑熱群リケッチアと野兔病菌の分離経過. 第11回ダニと疾患のインターフェイスに関するセミナー. 2003年.
4. 田原研司, 板垣朝夫, 領家敬子, 片山 丘, 海保郁男, 藤田博己：島根県における日本紅斑熱群リケッチアの疫学. 第10回リケッチア研究会. 2003年.



国内のマダニ類と野ネズミ類から分離されたリケツチア・原虫 2003年・2004年

分離株	株の種類・型別	種類	発育期	採集地	採集年月日
rickettsiae					
HH-1	<i>Rickettsia japonica</i>	<i>Haemaphysalis hystricis</i>	幼虫	鹿児島県垂水市新御堂	2003.0904
LON-79	LON	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	若虫	鹿児島県内之浦町乙田	2003.0315
LON-80	LON	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	若虫	鹿児島県内之浦町大平見	2003.0522
LON-81	LON	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	若虫	鹿児島県内之浦町大平見	2003.0522
LON-82	LON	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	若虫	宮崎県都井岬	2003.0523
LON-83	LON	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	若虫	宮崎県都井岬	2003.0523
LON-84	LON	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	若虫	宮崎県都井岬	2003.0523
LON-85	LON	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	若虫	宮崎県都井岬	2003.0523
LON-86	LON	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	幼虫	宮崎県宮崎市好隣梅	2003.0523
LON-87	LON	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	幼虫	宮崎県宮崎市好隣梅	2003.0523
LON-88	LON	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	幼虫	宮崎県宮崎市好隣梅	2003.0523
LON-89	LON	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	若虫	宮崎県宮崎市好隣梅	2003.0523
LON-90	LON	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	幼虫	福井県野坂岳	2003.0524
LON-91	LON	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	若虫	福井県野坂岳	2003.0524
LON-92	LON	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	若虫	福井県野坂岳	2003.0524
LON-93	LON	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	若虫	福井県野坂岳	2003.0524
LON-94	LON	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	若虫	福井県野坂岳	2003.0524
LON-95	LON	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	若虫	福井県野坂岳	2003.0524
LON-96	LON	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	若虫	福井県野坂岳	2003.0524
LON-97	LON	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	若虫	福井県野坂岳	2003.0524
LON-98	LON	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	若虫	福井県野坂岳	2003.0524
LON-99	LON	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	若虫	福井県野坂岳	2003.0524
LON-100	LON	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	♂	福井県野坂岳	2003.0524
LON-101	LON	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	幼虫	福井県百里ヶ岳	2003.0607
LON-102	LON	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	幼虫	福井県百里ヶ岳	2003.0607
LON-103	LON	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	幼虫	福井県百里ヶ岳	2003.0607
LON-104	LON	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	若虫	福井県百里ヶ岳	2003.0607
LON-105	LON	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	若虫	福井県百里ヶ岳	2003.0607
LON-106	LON	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	若虫	福井県百里ヶ岳	2003.0607
LON-107	LON	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	若虫	福井県百里ヶ岳	2003.0607
LON-108	LON	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	若虫	福井県百里ヶ岳	2003.0607
LON-109	LON	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	若虫	福井県百里ヶ岳	2003.0607
LON-110	LON	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	♀	福井県百里ヶ岳	2003.0607
LON-111	LON	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	♀	福井県百里ヶ岳	2003.0607
LON-112	LON	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	♀	福井県百里ヶ岳	2003.0607
LON-113	LON	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	♂	福井県百里ヶ岳	2003.0607
LON-114	LON	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	♂	福井県百里ヶ岳	2003.0607
LON-115	LON	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	♂	福井県百里ヶ岳	2003.0607
LON-116	LON	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	♂	福井県百里ヶ岳	2003.0607
IM-3	<i>Rickettsia helvetica</i>	<i>Ixodes monospinosus</i>	♀	長野県大桑村野尻	2003.0501
IM-4	<i>Rickettsia helvetica</i>	<i>Ixodes monospinosus</i>	♂	長野県大桑村野尻	2003.0501
IM-5	<i>Rickettsia helvetica</i>	<i>Ixodes monospinosus</i>	♀	高知県京柱峠	2003.05
IP-4	<i>Rickettsia helvetica</i>	<i>Ixodes persulcatus</i>	♀	長野県軽井沢町峰の茶屋	2003.0503
IP-5	<i>Rickettsia helvetica</i>	<i>Ixodes persulcatus</i>	若虫	岩手県早池峰山	2003.0626
protozoa					
KG-1	<i>Trypanosoma</i>	<i>Haemaphysalis hystricis</i>	♂	鹿児島県内之浦町大平見	2003.0731
KG-2	<i>Trypanosoma</i>	<i>Apodemus speciosus</i>	♂	鹿児島県内之浦町大平見	2004.0215
KG-3	<i>Trypanosoma</i>	<i>Apodemus speciosus</i>	♀	鹿児島県内之浦町大平見	2004.0215

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

塹壕熱の疫学的研究

分担研究者 小林陸生（国立感染症研究所・昆虫医科学部）  
協力研究者 佐々木年則、関 なおみ、伊沢晴彦、富田隆史、沢辺京子  
（国立感染症研究所・昆虫医科学部）  
佐々木次雄、久保田眞由美（国立感染症研究所・細菌第2部）  
シュリー・カンタ・シャルマ・パウデル（ネパール・トリヴァン大学）  
矢口 昇・望月信宏（豊島区池袋保健所）

研究要旨

再興感染症である塹壕熱の病原体 *Bartonella quintana* の遺伝子が、我が国の路上生活者由来のコロモジラミから初めて検出された。また、高い抗体価も有する路上生活者が6割を超し、今後、継続的な調査が必要であると思われる。日本以外のアジア諸国における塹壕熱の流行状況は全く知られていない。今年、アタマジラミおよびコロモジラミの罹患率が高いことで知られているネパールより検体を入手することが出来た。そこで、*Bartonella quintana* をシラミが保有するか否かを検討したところ、頭由来のシラミから世界で初めて *Bartonella quintana* の遺伝子を検出した。全体では、ネパール児童から採取された43サンプルのシラミにおいて7サンプル(16.3%, 7/43)から *Bartonella quintana* 遺伝子を検出した。ネパールのある種の児童集団において、塹壕熱の流行が起こっていることが明らかとなった。

A. 研究目的

*Bartonella quintana* は小型のグラム陰性桿菌で、コロモジラミが媒介する塹壕熱 (trench fever) の病原体である。第一次世界大戦中、ヨーロッパ戦線で100万人以上の兵士・一般人が感染し大きな問題になった。戦争終結後患者数が激減したが、第二次世界大戦で再び流行した。しかし、戦後の急速な衛生環境の改善、コロモジラミ対策として DDT 等の殺虫剤の散布が広範に行われた結果、先進諸国において発疹チフスを含むコロモジラミ媒介性疾患はほとんど見られなくなった。1990年代になって、先進諸国の路上生活者やヒト免疫不全ウイルス (HIV) 患者に *Bartonella quintana* が

検出され始め、現在までに、米国のシアトル、フランスのマルセイユ、ロシアのモスクワ等で、路上生活者やコロモジラミから病原体や抗体、および PCR 法による特異的 DNA が検出されている。我が国においても、東京都、大阪府を中心に路上生活者が増加傾向にある。東京都福祉局の統計では、1995年に23区内の路上生活者の推定数は3,300人であったが、2000年には5,700人と明らかに増加している。そこで、シラミや人における塹壕熱病原体の保有状況を調べ、流行の実態を明らかにすることを目的に疫学的研究を進めている。また、シラミの罹患率が高いことが知られているネパールの児童や路上生活者において、塹壕熱の流行が見られるかを、アタマジラミ

とコロモジラミから *Bartonella quintana* の遺伝子を検出することで検討した。

## B. 研究方法

### 1. 採血

東京都内の P 区における路上生活者対策（年 2－3 回）において、インフォームドコンセントを行い、本人の同意を得てバキュテイナ採血管（日本ベクトン・ディッキンソン（株）、東京）を用いて採血を行った。

### 2. IgG IFA

BARTONELLA IFA IgG（重松貿易、東京）の検査キットを用い、蛍光抗体価を説明書に従って判定した。

### 3. PCR

血液に関しては、BACTEC PED PLUS/F MEDIUM（日本ベクトン・ディッキンソン（株）、東京）で 35℃ 10 日間培養して、培養液の一部（0.5 ml）から Sepa Gene（三光純薬（株）、東京）を用いて DNA 抽出を行った。シラミに関しては、IsoQuick（（株）タネハシ、東京）および Mixer Mill MM 300（（株）キアゲン、東京）を用いて 1 個体ずつ DNA 抽出を行った。PCR 反応および Nested PCR 反応を行い、電気泳動で解析した。得られた PCR 産物は、Direct Sequencing にて遺伝子配列を解析し、登録された *Bartonella* 遺伝子の配列と比較し、種の同定を行った。

### （倫理面への配慮）

コロモジラミおよび血液をホームレスから入手する際は、塹壕熱に関してよく説明を行い、協力が得られた場合に、提供者から承諾書に自筆でサインを得、採血を行った。なお、個人情報の管理を厳格に行って対応した。

## C. 研究結果

### 1. 路上生活者由来の血液およびコロモジラミからの *Bartonella quintana* の検出

2001 年 5 月から 2003 年 10 月にかけて *Bartonella* の抗体価と遺伝子の検出を試みた（表 1）。3 年間でのべ 307 名の路上生活者を対象に *Bartonella* に対する抗体価の調査および培養された血液から遺伝子の検出を試みた。コロモジラミの寄生が認められた者は、全体で 4.8%（24/496）であった。また、採取されたコロモジラミから *Bartonella quintana* の遺伝子が検出された率は 8.3%（2/24）で、約 1 割のコロモジラミに病原体が検出された。

*Bartonella quintana* に対する IgG 抗体は、128 倍を陽性限界とした場合、62.9%（193/307）と高い値を示した。また、血液中の *Bartonella quintana* 遺伝子は、3.6%（11/307）と低いながらも検出された。

### 2. コロモジラミ由来 *Bartonella quintana* 遺伝子の検出

1999 年 5 月から 2003 年 10 月にかけて合計 48 名の路上生活者からシラミを採取し、*Bartonella quintana* 遺伝子の検出を行った（表 2）。その結果、6 名の路上生活者のコロモジラミから *Bartonella quintana* 遺伝子を検出し、感染率は 12.5%（6/48）であった。

### 3. ネパール児童由来のシラミからの *Bartonella quintana* 遺伝子の検出

ネパールにおいてストリートチルドレンや路上生活者においてアダマジラミとコロモジラミの罹患率が高いことが知られ、公衆衛生上の問題になっている。今回、ネパールの学童、スラム街の児童およびストリートチルドレンを対象にシラミを採取し、*Bartonella quintana* の遺伝子の検出を試みた。その結果、スラム街の児童、ストリートチルドレン、学童いずれの集団由来のシ

ラミからも *Bartonella quintana* の遺伝子が検出された。(表3)。また、今回、世界で初めて頭由来のシラミ(アタマジラミと考えられる)から *Bartonella quintana* の遺伝子を検出した。サンプル番号3, 11の児童において、コロモジラミと頭部由来のシラミの両方から *Bartonella quintana* の遺伝子が検出され、これら10才と11才の男児の血液中に *Bartonella* が存在していることが強く示唆された。また、今回、コロモジラミは20名から採取され、その *Bartonella* 遺伝子の陽性率は20%(4/20)であった。また、アタマジラミと思われる頭由来のシラミは23名から採取され、*Barotonella* 遺伝子の陽性率は13.0%(3/23)であり、両種のシラミにおける *Barotonella* 遺伝子の陽性率は予想以上に高かった。また、10名の児童は、頭および衣服の両方にシラミの寄生が見られ、その内、3名から病原体の遺伝子が検出された。

#### D. 考察

フランス、ロシア、米国と同様に、日本の都市における路上生活者においても塹壕熱の病原体 *Bartonella quintana* が、寄生しているコロモジラミおよび血液から検出され、静かに塹壕熱が流行していることが示された。フランスでは *Bartonella quintana* の分離培養に成功しているが、我々は今のところ成功していない。血中における *Bartonella quintana* の感染程度によるものか、あるいは技術的な問題であるかは今のところ不明である。今後さらに検討する必要がある。また、東京以外の都市部における調査が全く行われていないことから、我が国における塹壕熱がどのような広がりを持って流行しているのか分かっていない。治療しなくとも死に至ることが少ない反面、慢性的に発熱を伴う再発を繰り返し、

関節痛や心内膜炎を起こすことが知られており、路上生活者の生活意欲や労働意欲にも大きな影響があると考えられる。今後も継続的な調査研究が必要と思われる。

一方、ネパールの児童において、頭および衣類由来のシラミから塹壕熱の病原体遺伝子が検出された。スラム街の子供(7-14才)、ストリートチルドレン(8-14才)さらに学童(11-13才)の集団から分離された事実は、衣服を着替える頻度の低さ、風呂に入る習慣の無いこと、貧困、親による衛生的保護(世話)が行き届かない等の要因が関係していると考えられ、今後のネパールと日本の医療協力の対象疾患として考慮する必要があると思われる。

#### E. 結論

日本で初めて、路上生活者の血液とコロモジラミから塹壕熱の病原体 *Bartonella quintana* の遺伝子が検出された。また、ネパールの児童から採取されたコロモジラミおよび頭由来のシラミ(アタマジラミと考えられる)から世界で初めて塹壕熱病原体の遺伝子が検出された。今後、この新興感染症の流行状況を注意深く調査する必要がある。また、ネパールにおいて、頭由来のシラミから病原体が検出されたことから、アタマジラミも塹壕熱の媒介者となりうる应考虑すべきで、アタマジラミの流行状況の把握にも注意する必要がある。

#### F. 健康危険情報

1. 小林睦生、佐々木年則、安居院宣昭 路上生活者より採取されたコロモジラミから *Bartonella quintana* が検出された 病原微生物検出情報 2001, 22 (4), 6.
2. 富田隆史、高橋正和、三原 實、矢口 昇、関 なおみ、牧上久仁子、小林睦生、安居院宣昭 東京都内で採取された

コロモジラミの殺虫剤感受性の現状 病原体微生物検出情報 2000, 21 (3): 7.

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sasaki, T., Kobayashi, M. and Agui, N. Detection of *Bartonella quintana* from body lice, *Pediculus humanus* (Anoplura: Pediculidae) infesting homeless people in Tokyo by molecular technique. J. Med. Entomol..2002, 39 : 427-429.

2. 小林睦生 : シラミに関する諸問題. 生活と環境, 2002, 47(7): 26-30.

3. 小林睦生 : 海外におけるシラミ症とその対策およびシラミ媒介性疾患の現状. 生活と環境, 1999, 44 (8): 33-37.

2. 学会発表

1. コロモジラミからの壱壕熱病原体、*Bartonella quintana* 遺伝子の検出(2) 第54回日本衛生動物学会大会 平成14年4月 佐々木年則、小林睦生、佐々木次雄、安居院宣昭

2. コロモジラミからの壱壕熱病原体、*Bartonella quintana* の検出 第70回日本寄生虫学会・第53回日本衛生動物学会合同大会 平成13年4月 佐々木年則、小林睦生、安居院宣昭

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

表1. 東京都P区の路上生活者における抗 *Bartonella* 抗体価と *Bartonella quintana* 遺伝子の検出

採血者数/ 対象者数	コロモジラミ 寄生者 (%)	コロモジラミ中の <i>B. quintana</i> 遺伝子 陽性者数 (%)	IgG 抗体価 ≥ 128 (%)	血液中の <i>B. quintana</i> 遺伝子陽性者数 (%)
10 / 84	4 (4.7)	0	5 (50.0)	0
70 / 90	8 (8.9)	0	47 (67.1)	4 (5.7)
83 / 100	2 (2.0)	0	36 (43.3)	6 (6.0)
30 / 46	4 (8.7)	0	20 (66.6)	1 (3.3)
50 / 77	4 (5.2)	2 (50)	38 (76.0)	0
64 / 99	2 (2.0)	0	47 (73.4)	0
307 / 496	24 (4.8)	2 (8.3)	193 (62.9)	11 (3.6)

表2. 東京都P区の路上生活者由来コロモジラミからの  
*Bartonella quintana* 遺伝子の検出

日付	サンプル番号	<i>Bartonella quintana</i> の遺伝子
1999年5月18日	#24	-
	B	-
	#38	-
	A	-
5月26日		-
10月27日		+
12月22日		-
2000年5月25日	#22	-
	B	-
	#43	-
	#80	+
	#1	-
6月22日		-
10月25日		-
2001年1月11日	#42	-
	#44	-
2月7日		-
3月5日		-
3月12日		+
5月2日		-
5月30日	#13	-
	#31	-
	#59	-
	#79	-
9月7日		-
10月25日	#70	-
	#80	-
12月19日		-
2002年1月4日	#1	-
	#2	-
1月30日		-
2月4日		-
2月18日		-
3月29日		-
5月29日		-
10月24日		-
2003年2月4日		-
	#27	-
2月6日		-
2月13日		-
4月17日		+
4月21日		-
6月3日	#22	-
	#49	+
	#59	-
	#61	+
10月23日	#10	-
	#54	-
		6 / 48 (12.5%)

表3. ネパールの児童より採取されたシラミ由来 *Bartonella quintana* 遺伝子の検出

場所	サンプル番号	日付	年齢または学年	性別	シラミ寄生 期間	採取され たシラミ 数	<i>Bartonella quintana</i> の遺伝子
スラム街の 児童	1B**	2002年11月	7歳	男	不明	24	-
	2H***		6歳	女	不明	7	-
	3H		11歳	男	2年	10	+
	3B		11歳	男	2年	14	+
	4B		14歳	男	6ヶ月	19	-
	5B		7歳	男	不明	14	+
	6B		8歳	男	不明	5	-
	7B		6歳	女	不明	5	-
	8H		6歳	女	不明	22	-
ストリート チルドレン	9H	2002年12月	9歳	男	1.5年	15	-
	9B		9歳	男	1.5年	16	-
	10H		10歳	男	2年	14	-
	10B		10歳	男	2年	17	-
	11H		10歳	男	2年	7	+
	11B		10歳	男	2年	19	+
	12H		15歳	男	1.5年	15	-
	13H		9歳	男	不明	6	-
	14H		11歳	女	3-4ヶ月	8	-
	15H		12歳	男	6ヶ月	18	-
	15B		12歳	男	6ヶ月	16	-
	16H		8歳	男	不明	6	-
	16B		8歳	男	不明	7	-
	17H	2002年2月	9歳	男	不明	11	-
	17B		9歳	男	不明	9	-
	18H		11歳	男	1年	10	<i>Bartonella*</i>
	18B		11歳	男	1年	7	-
	19H		12歳	男	2年	15	-
	19B		12歳	男	2年	11	-
	20H		14歳	男	6ヶ月	5	-
	20B		14歳	男	6ヶ月	7	-
21H		11歳	男	不明	7	-	
21B		11歳	男	不明	14	-	
学童	22H	2002年3月	クラス-5(11歳)	女	不明	6	-
	23H		クラス-6(12歳)	女	1年	5	-
	24H		クラス-2(8歳)	女	不明	16	-
	25H		クラス-1(7歳)	女	不明	14	-
	26B		クラス-5(11歳)	男	不明	14	-
	27B		クラス-2(8歳)	男	不明	9	+
	28H		クラス-7(13歳)	女	3年	18	-
	29B		クラス-7(13歳)	男	1.5年	9	-
	30B		クラス-4(10歳)	男	不明	17	-
	路上生活者	31H	2002年3月	60歳	女	6ヶ月	3
32H			60歳	女	3年	3	-
合計						7/43 (16.3%)	

\* PCRは陽性(遺伝子配列の未確認)

\*\* B:コロモジラミ

\*\*\* H:頭部由来のシラミ

太字(3,10,11,15,16,17,18,19,20,21)は頭と衣服の両方にシラミの寄生が認められた。

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

全国の港湾区域等で捕獲した野鼠におけるレプトスピラ保有状況

分担研究者

後藤郁夫 神戸検疫所・輸入食品・検疫検査センター・副統括検査官

研究協力者

楠井善久、森英人、林昭宏、川本千枝、勝部宗幸、杉本昌生、尾山勇一（神戸検疫所）、野田孝治、中溝芳行（小樽検疫所）、稲垣俊一（仙台検疫所）、野田孝政、長谷山路夫（成田空港検疫所）、島村博、加藤雅英（東京検疫所）、犬竹義明（東京検疫所川崎検疫所支所）、飯塚信二（横浜検疫所）、木田中、石橋治（新潟検疫所）、岡本浩一郎、鈴木一郎（名古屋検疫所）、仲里保（名古屋検疫所清水検疫所支所）、田野田長喜、田島章太郎（大阪検疫所）、高木和裕、多賀賢一郎（関西空港検疫所）、三本憲雄、藤澤重喜（広島検疫所）、福井康朗、黒木志郎（福岡検疫所）、古川徹也（福岡検疫所福岡空港検疫所支所）、佐久本微笑、平井秀和（那覇検疫所）、伊芸英敏（那覇検疫所那覇空港検疫所支所）、安藤秀二（富山県衛生研究所）

研究要旨

日本の港湾、空港区域に生息する野鼠におけるレプトスピラの保有状況調査および海外からのレプトスピラ病原体の侵入を監視する目的で、全国の検疫所からなる全国的な野鼠のレプトスピラ保有状況調査体制の確立を行った。

海外との交流が活発な現在においては、海外から未知血清型のレプトスピラ病原体の侵入が危惧されている。そこで、海外との接点である国際海港、空港における病原体の侵入監視と平常時からの野鼠の病原体保有状況を調査するため、検疫所で捕獲した野鼠からレプトスピラの分離を行った。

また、野鼠腎臓を接種した培養液中からレプトスピラ鞭毛遺伝子 *flaB* のPCRによる検出を行い、早期にレプトスピラの存在の有無を推定し、複数の培養基に接種して分離培養の確実性を高める試みを行った。

これまでに、227頭の野鼠を調査し、那覇港で捕獲した野鼠1頭からレプトスピラ培養陽性所見を得たが、培養期間がまだ短いことから血清型、遺伝子型の確認はしていない。

野鼠を主な媒介動物とするレプトスピラ病は、野鼠の間で一旦その蔓延を許すと周辺環境も汚染され、その根絶は困難を極めることから、国際港湾、空港区域では、定期的な野鼠の病原体保有調査による海外からのレプトスピラの侵入に備えた監視体制の強化が必要である。

研究目的

検疫所は全国の国際海港、空港に設置されており、国際保健規則に準拠した検疫法に基づき、国内に常在しない感染症（黄熱、ペスト、デング熱など）の病原体が海外から国内に侵入することを防止するため、水際で感染症の監視業務を行っている。また、これら感染症の媒介動

物（ねずみ、蚊など）や国内での定着を防止するため、海港や空港の一定区域（以下、「港湾区域等」という。）の衛生状態を調査し、必要に応じ防疫措置を実施している。検疫所では、定期的に港湾区域等に生息する野鼠を捕獲し、生息状況ならびにペスト、腎症候性出血熱などの検疫法に規定されている病原体の検査を実



施している。平常時から港湾区域等に生息する野鼠における病原体保有状況を調査することにより、病原体の侵入を早期に察知し、的確な防疫措置を実施できる体制となっている。

ワイル病に代表されるレプトスピラ病は、野鼠などのげっ歯類が主な病原体保有動物で、その排尿等で汚染された水から経皮的に感染する人獣共通感染症である。我が国では患者数は激減しているが、海外では全世界的に流行が繰り返されており、現代の世界規模での交通網の拡大等により、レプトスピラ保有野鼠を介して海外からレプトスピラが侵入する可能性がある。野鼠の間で一旦その蔓延が起これば周辺環境水等も汚染され、その根絶には広範な対策が必要となる。

前年度までの調査で、未知血清型の株が港湾区域等でも見出され、これまで日本にはその存在が知られていない血清型が存在する可能性も示唆されている。

そこで、全国の検疫所で平常時から行っている港湾衛生業務と平行して、捕獲した野鼠についてレプトスピラの保有状況を調査し全国的なレプトスピラの分布状況を明らかにするとともに、海外からの侵入監視を行う。

## 研究方法

### 1. 調査地.

小樽港、仙台塩釜港、石巻港、気仙沼港、宮古港、八戸港、秋田港、成田空港、東京港、川崎港、新潟港、伏木富山港、名古屋港、清水港、関西空港、大阪港、神戸港、広島港、博多港、那覇港、那覇空港において捕獲した野鼠のうち、227頭を検査に供した(表1)。

### 2. レプトスピラの分離および培養法.

捕獲した野鼠から無菌的に腎臓を摘出し、2.5mlのディスポシリンジ(針なし)に投入し、2.5%ウサギ血清加EMJH培地(ウシ血清アルブミン 10g、Tween80 1.25g、リン酸水素二ナトリウム 12水 2.5g、塩化ナトリウム 1.0g、リン酸二水 表1. 日本の港湾区域等におけるレプトスピラ分離状況(2003~2004.2)

素カリウム 0.3g、硫酸第一鉄 7水和物 0.0914g、25%塩化アンモニウム液 1ml、0.5%塩酸チアミン液 1ml、10%ピルビン酸ナトリウム液 1ml、10%グリセリン液 1ml、1.5%塩化カルシウム二水和物液 1ml、1.5%塩化マグネシウム 6水和物液 1ml、0.4%硫酸亜鉛 7水和物 1ml、0.02%シアノコバラミン液 1mlを滅菌蒸留水に溶解し、全量を1000mlとし、pH7.4に調整する。5-フルオロウラシルを最終濃度100 $\mu$ g/mlになるように加えて、56 $^{\circ}$ C、30分間非働化した新鮮ウサギ血清を2.5%の割合で加えた後、0.2 $\mu$ mのフィルターでろ過滅菌する。)中に押し出した。30 $^{\circ}$ Cで、半日もしくは一夜静置後、培養液の上清部分を約0.5ml新しいEMJH培地に接種して、2週~3ヶ月間、2本とも30 $^{\circ}$ Cで培養を続けた。この間1週間ごとに暗視野顕微鏡でレプトスピラ増殖の有無を確認した。

### 3. 培養液中のレプトスピラ鞭毛遺伝子 *flaB* の検出.

レプトスピラの培養には数週~数ヶ月を要すること、また野生株は、時として初代培養では同定に必要な十分な発育菌量が得られない場合もあることから、培養液から直接 *flaB*-PCRを実施して、レプトスピラの有無を早期に推定した。陽性と判定された培養については、培養液の一部を直ちに新しいEMJH培地およびKorthof培地に移植して継続培養を確実にものとした。

PCR用試料の調製. インスタジーンDNA精製マトリックス(BIO RAD)を用いて、DNAを抽出した。培養液0.5mlをマイクロチューブに取り、13000rpm、4 $^{\circ}$ Cで5分間遠心分離した。上清を捨て、200 $\mu$ lのインスタジーンを加え、56 $^{\circ}$ Cで25分間反応後、10秒間ボルテックスして、沸騰温浴中で8分間煮沸した。10秒間ボルテックスした後、13000rpm、4 $^{\circ}$ Cで3分間遠心分離し、上清をPCRの鋳型とした。

PCRによる *flaB* 遺伝子の増幅. PCRは川端ら(分担研究者)の方法により、次の

表1. 日本の港湾区域等におけるレプトスピラ分離状況 (2003~2004.2)

調査機関	捕獲地	捕獲数 (頭)	培養陽性数	培養陽性率 (%)
小樽検疫所	小樽港	11	0	0
仙台検疫所	仙台塩釜港	29	0	0
	石巻港	16	0	0
	気仙沼港	2	0	0
	宮古港	1	0	0
	八戸港	4	0	0
	秋田港	3	0	0
新潟検疫所	新潟港	6	0	0
新潟検疫所・富山県衛生研究所	伏木富山港	14	0	0
東京検疫所	東京港	5	0	0
	川崎港	2	0	0
名古屋検疫所	名古屋港	29	0	0
名古屋検疫所清水検疫所支所	清水港	5	0	0
関西空港検疫所	関西空港	18	0	0
神戸検疫所	神戸港	40	0	0
広島検疫所	広島港	2	0	0
福岡検疫所	博多港	5	0	0
那覇検疫所	那覇港	30	1	3.3
那覇検疫所那覇空港検疫所	那覇空港	5	0	0
合計		227	1	0.4

とおり実施した。PCR プライマーは、*flaB-F* (5'-CTCACCGTTCTCTAAAGTTCAAC-3')、*flaB-R* (5'-TGAATTCGGTTTCATATTTGCC-3') を使用し、*Taq* DNA ポリメラーゼ (TAKARA) を用いて、熱変性 94℃、30 秒、アニーリング 50℃、30 秒、伸張反応 72℃、1 分間の反応を 30 サイクル行った。PCR 産物をアガロースゲルで電気泳動後、約 790bp の目的遺伝子の増幅を確認した。

#### 倫理面への配慮

捕獲した野鼠については、「動物の保護と管理に関する法律」に基づき取り扱いを行った。

#### 研究結果

##### 1. 捕獲野鼠の状況.

2003 年から 2004 年 2 月までに、全国の検疫所において港湾区域等で捕獲され検査に供した野鼠は、ドブネズミ *Rattus norvegicus* 192 頭、クマネズミ *Rattus rattus* 9 頭、ハツカネズミ *Mus musculus* 22 頭およびアカネズミ *Apodemus speciosus* 4 頭の合計 227 頭であった。

##### 2. レプトスピラの分離状況

那覇港で捕獲されたドブネズミ 1 頭の培養液から *flaB*-PCR 陽性の結果を得た。暗視野顕微鏡で顕微鏡学的にも特徴的なレプトスピラ菌体を確認した。直ちに、培養液の一部を新しい EMJH 培地および Korthof 培地に移植し、培養の継続を確実なものとした。培養期間がまだ短いことから、現在も培養は継続中である。

また、2004 年に培養を開始したその他の検体についても現在培養継続中である。

##### 3. 培養液の *flaB*-PCR の結果.

培養液からの *flaB*-PCR は、培養液 1ml あたり  $1.1 \times 10^3$  cell で検出可能であった。この濃度は通常の顕微鏡的検査において、全視野を観察して数個の菌体を確認できる程度である。全ての検体の初期培養と二次培養の培養液から *flaB*-PCR を行い、那覇港で捕獲された野鼠の培養液から陽性反応を得た。

## 考察

今回、那覇港で捕獲されたドブネズミ1頭の培養液からレプトスピラに特異的な鞭毛遺伝子を検出し、顕微鏡的にも特徴的なレプトスピラの菌体を確認した。

分離株は、培養期間がまだ短いことから現在も培養継続中であるが、今後は血清型および遺伝子型の同定を行う予定である。

沖縄地方では、患者が散発的に確認されており、生息する野鼠においてもレプトスピラを保有することが確認されていることから、今後も重点的な監視が必要である。

野鼠の腎臓培養液は時に他の微生物による汚染が多く、少数のレプトスピラ菌体の確認は困難な場合がある。また、長期間培養を続けていると他の微生物の増殖によりレプトスピラの増殖が阻止され死滅する可能性も考えられる。このため、早期に培養液中の微量のレプトスピラの存在を確認できる *flaB*-PCR は、レプトスピラの分離培養に有効な手段であることが確認できた。

日本ではレプトスピラ病の患者数は減少しているものの、海外での流行は、全世界的に発生しており、特に近隣の東南アジアや中南米を中心に未だ多くの患者が報告され重大な被害をもたらしている。海外との人、物流の接点である港湾区域等では、海外の流行株や未知の血清型のレプトスピラが侵入する可能性も十分考えられる。このような状況では、今後も定期的な野鼠の生息調査を実施してレプトスピラの分布状況を明らかにする必要がある。

また、レプトスピラの実態解明にあたっては、海外からの輸入血清型の存在の可能性を考慮しながら、詳細な血清学的、分子生物学的解析を行う必要がある。レプトスピラは起因菌の血清型が解明できればワクチンで十分に予防可能な感染症である。そのためにも、広域的な監視体制によりレプトスピラの分布状況を解明すると共に未知の血清型に対する早期診断法の確立が不可欠である。

今日でもなお、レプトスピラの病原体は身近に存在し、今後も各地でレプトスピラ病は発生する可能性がある。今年度は、検疫所本所を中心とした調査を行ったが、今後は、検疫所支所を含めた広域的な調査を実施して、全国的な野鼠におけるレプトスピラ分布状況を明らかにする必要がある。さらに、海外との接点である港湾区域等でレプトスピラの侵入の監視を平常時から行い、海外からの侵入に備えた監視体制および防疫対策の確立が必要である。

## 論文発表

1. 後藤郁夫、中野義則、小澤毅彦、柳井慶明、品川道夫、加邊純雄、増澤俊幸、中溝芳行、稲垣俊一、長谷山路夫、大神田実、木田中、小林順一、大友雅人、黒飛敏、林昭宏、出水美成、高橋直樹：日本の港湾区域等で捕獲された野鼠におけるレプトスピラ保有状況。日本検疫医学会誌 5、76-79(2003)

2003年度野外調査成果第一覧

調査名	参加主任・外相調査者	年月日	調査地(県・市町村)	調査場所の名称例	調査者人数	調査回数	採集の野鳥種	備考
名古屋市区調査1	角坂	2003年1月23日～24日	名古屋市区	住居地帯	4人	3回	クマノズミ	新研究助成からの採集
名古屋市区調査2	角坂	2003年2月27日～28日	名古屋市区	住居地帯	4人	3回	トビノズミ	新研究助成からの採集
千葉調査1	小泉	2003年4月7日	千葉県船橋市	千葉犬小塚近く	3人	6回		
千葉調査2	小泉	2003年4月12日	千葉県船橋市		3人	2回		
千葉調査3	小泉	2003年4月30日	千葉県船橋市		3人	1回		
東京調査1	小泉	2003年4月24日～28日	東京都新宿区	新宿緑	3人	5回		
千葉調査4	小泉	2003年5月21日	千葉県船橋市			1回		
千葉調査5	小泉	2003年5月26日	千葉県船橋市			1回		
千葉調査6	小泉	2003年5月29日	千葉県船橋市			1回		
千葉調査7	小泉	2003年6月2日	千葉県船橋市			1回		
千葉調査8	小泉	2003年6月11日	千葉県船橋市			1回		
名古屋市区調査3	角坂	2003年6月17日～19日	名古屋市区	マンホール	4人	4回	トビノズミ	
東京調査2	小泉	2003年6月24日	東京都豊島区	野瀬川、新緑地	3人	13回		
名古屋市区調査4	角坂	2003年7月18日～18日	名古屋市区	マンホール	4人	8回	トビノズミ	
富士山調査1	増澤、大橋	2003年8月26日～28日	静岡県富士市、裾野市(富士山(谷目)～3谷目)	山林	11人	40回	アカネズミ、ヒメネズミなど	
伊豆調査、ハンミョウ調査	川崎、藤田	2003年8月26日～9月2日	静岡県伊豆市、裾野市、裾野市(富士山(谷目)～3谷目)	耕作地、家畜舎	6人		クマノズミ	
名古屋市区調査5	角坂	2003年8月26日～28日	名古屋市区	マンホール	4人	3回	トビノズミ	
養蜂調査	川崎、藤田	2003年8月26日～9月2日	静岡県大島郡大島町(生島島)	耕作地、生舎、畑地	6人	19回	クマノズミ	ダニ採集調査(藤田)
同上	川崎、藤田	2003年8月26日～9月2日	静岡県大島郡大島町(生島島)	無人島(オカズミズキドリ養蜂場)	同上	21回	オカズミズキドリ	回帰熱調査、外産卵生虫記調査(藤田)
同上	川崎、藤田	2003年8月26日～9月2日	同上	同上	同上	25回	サワイカズキダニ	回帰熱調査
名古屋市区調査6	角坂	2003年9月9日～11日	名古屋市区	マンホール	4人	3回	トビノズミ	
狭井沢地区調査	増澤、川崎、大橋、藤田	2003年9月12日～9月14日	長野県狭井沢町など	山林	10名	30ほど	アカネズミ	
富士山調査2	大橋	2003年10月7日～8日	静岡県富士市、裾野市	富士山周辺の樹木林	5人	5回	アカネズミ	
名古屋市区調査7	角坂	2003年10月9日～9日	名古屋市区	マンホール	4人	3回	トビノズミ	
鹿児島県薩摩地区調査	藤田	2003年10月24日～27日	鹿児島県薩摩市、山形町、山形町	山林、畑地、川	5人	10回	アカネズミ	
茨城調査	増澤、角坂、川崎	2003年10月2日～4日	静岡県浜松市	公園、野山	4人	14回	アカネズミ	
伊豆調査1	大橋	2003年11月4日～5日	静岡県天城町、河津町、下田市、南伊豆町	森林、樹木林	3人	4回	アカネズミ	
鳥取調査	角坂	2003年11月19日～19日	鳥取県鳥取市	山形、田圃	2人	19回	アカネズミ	
新潟調査	角坂	2003年11月17日～19日	愛知県新城市	田圃	1人	20回	アカネズミ	
小浜村調査	角坂	2003年11月26日～28日	愛知県小浜村	田圃	1人	16回	アカネズミ	
伊豆調査2	大橋	2003年11月27日～28日	静岡県天城町、河津町	森林、樹木林	3人	10回	ヒメネズミ	
名古屋市区調査8	大橋	2003年12月9日～11日	名古屋市区	山形、田圃	4人	5回	アカネズミ	
伊豆調査3	大橋	2003年12月1日～2日	静岡県下田市	山林	3人	14回	アカネズミ、ヒメネズミなど	
鹿児島県阿蘇地区調査	藤田	2004年1月16日～18日	鹿児島県阿蘇市	山林	2人	14回	アカネズミ	
鹿児島調査	藤田	2004年1月30日～2月1日	鹿児島県阿蘇市、上郷町	山林	3人	2回	ヒメネズミ	
鹿児島県薩摩大島調査	藤田	2004年2月12日～16日	鹿児島県薩摩市、松元町、内之浦町	山林	4人	31回	アカネズミ	
伊豆調査3	増澤、角坂、川崎	2004年2月18日～20日	静岡県伊豆市、下田市など	灌漑、庭舎、牛舎	10人	9回	クマノズミ	
八ヶ岳調査	藤田	2004年2月22日～24日	長野県八ヶ岳村、原村、富士原町	山林	2人	28回	アカネズミ	