

図1 ペスト菌 (Alexander 株) の検出例

ペスト菌 (Alexander 株) 4×10^5 菌体分の検出例を示す。

検出はすべての反応を一度に表示するモードで表示した。

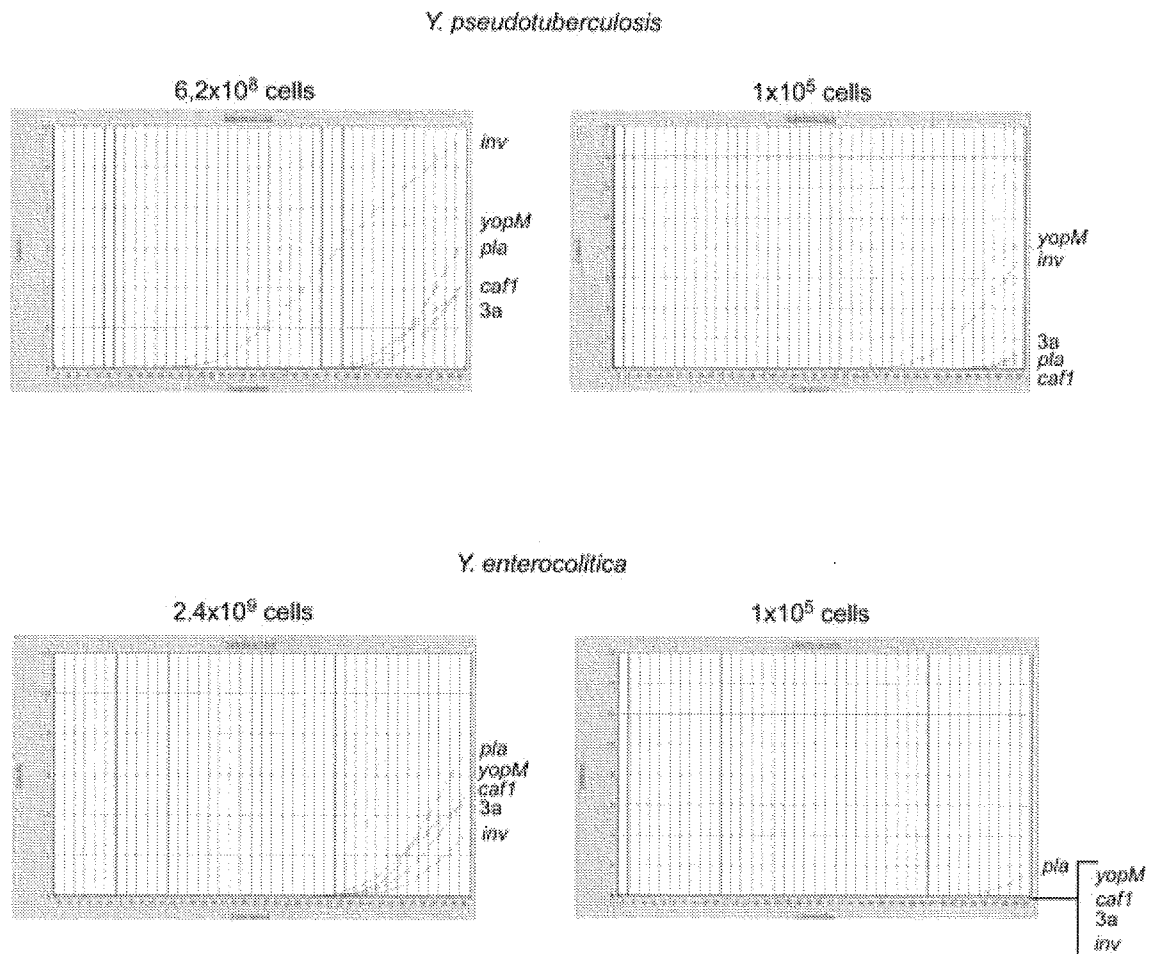


図2 病原性 *Yersinia* 属菌に対する real time PCR 法の交差反応性

検出はすべての反応を一度に表示するモードで表示した。

仮性結核菌 (*Y. pseudotuberculosis*) は *yopM* 及び *inv* 遺伝子を保持していることに注意。仮性結核菌、*Y. enterocolitica* 共にその鋳型 DNA が反応液に多量に存在する場合には 30 サイクル当たりで非特異的な疑陽性の反応が出始めた (左)。しかし、検出に適切な量を反応に供した場合には鋳型 DNA が多量に存在していた時に認められた「非特異的疑陽性反応」が認められ無くなった (右)。

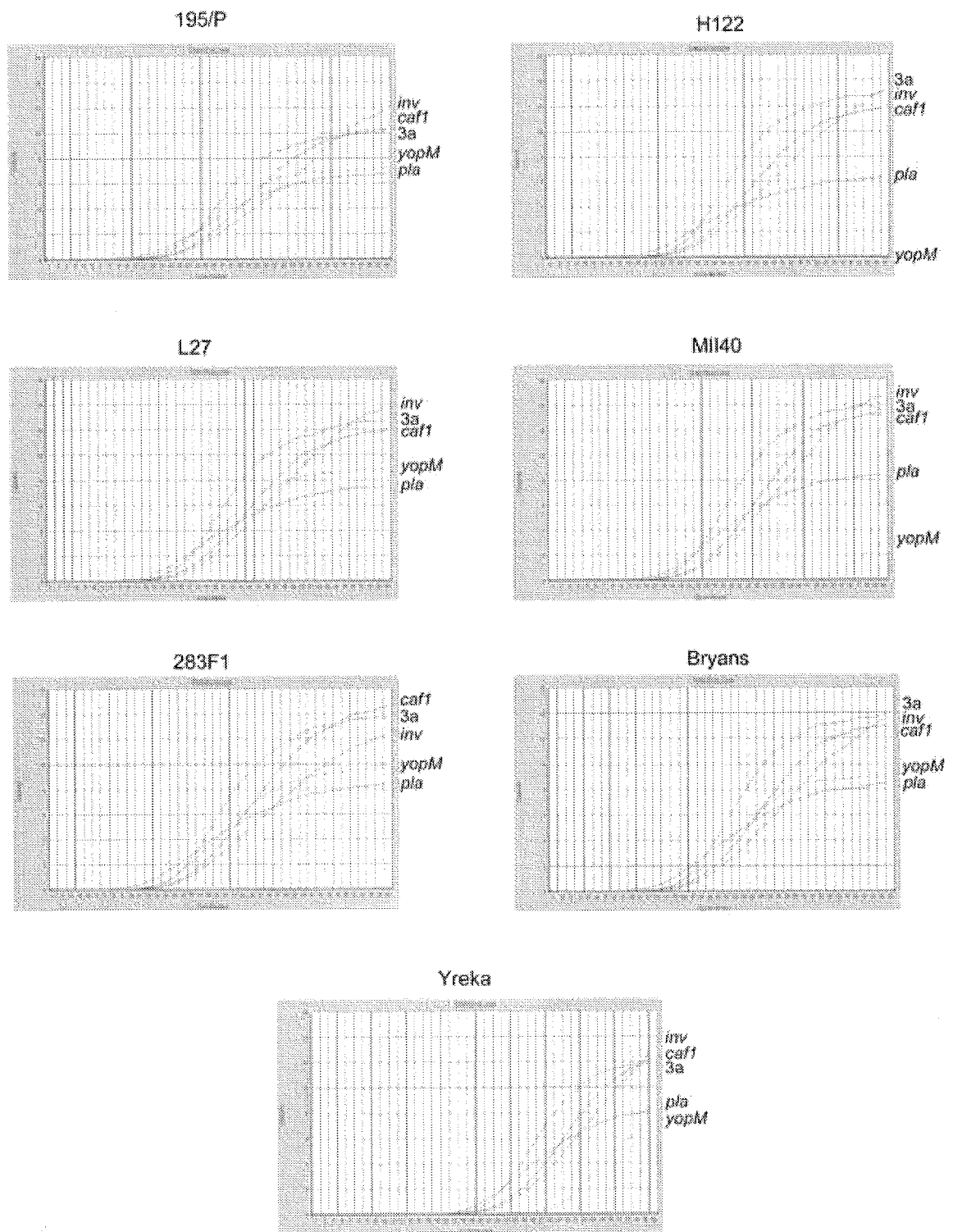


図3 各種ペスト菌株に対する検出の傾向

検出はすべての反応を一度に表示するモードで表示した。

ペスト菌株の中には *yopM* に対して反応が弱い、もしくはない株も存在する。

YokohamaQ 株

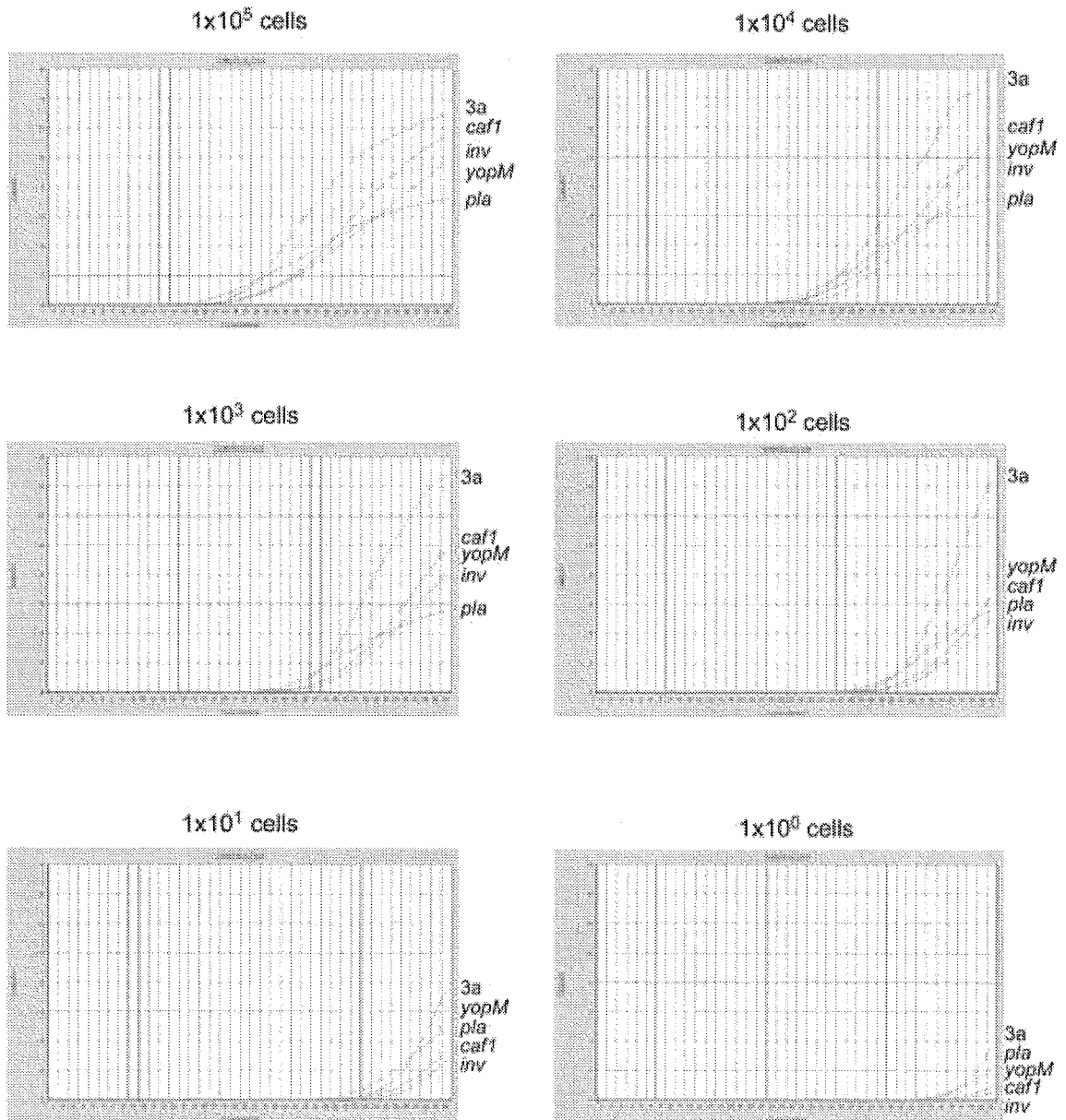


図 4-1 realtime PCR 法によるペスト菌株の検出限界 (横浜 Q 株)

検出はすべての反応を一度に表示するモードで表示した。

1 オーダー(10 菌体)程度の鋳型でも検出可能であると思われるが、高濃度の仮性結核菌、*Y. enterocolitica* の DNA に対する非特異的疑陽性反応と区別がつきにくい状態である。

Alexander 株

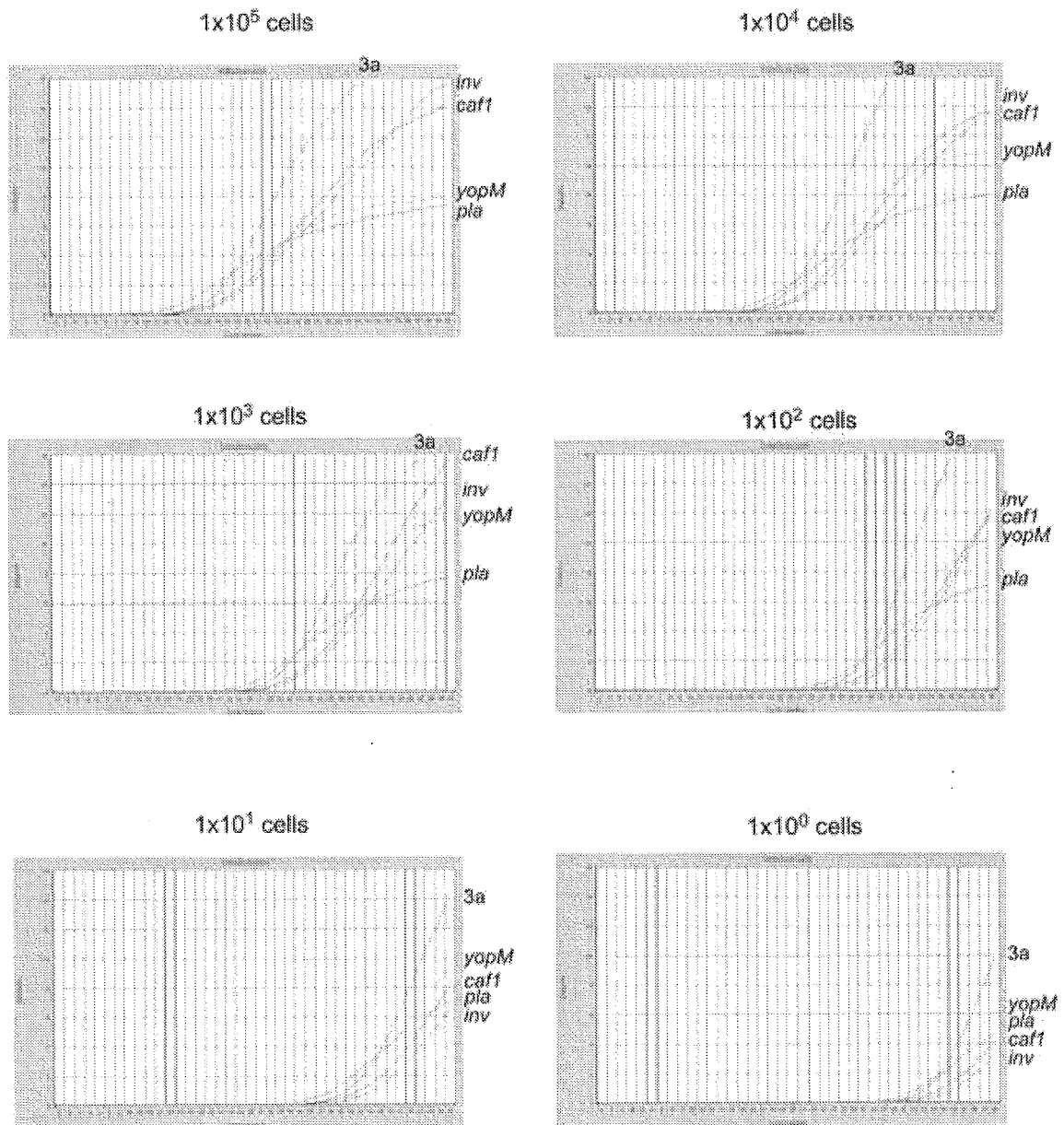


図 4-2 real-time PCR 法によるペスト菌株の検出限界 (Alexander 株)

検出はすべての反応を一度に表示するモードで表示した。

図 4-1 の横浜 Q 株よりも検出感度が高いように思われるが、横浜 Q 株同様高濃度の仮性結核菌、*Y. enterocolitica* の DNA に対する非特異的疑陽性反応と区別が付きにくい状態であるため、絶対的信頼性があるのは 2 オーダー程度であると推測される。

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症)
分担研究報告書(平成 17 年度)

国内の *Ixodes* 属マダニが保有する *Anaplasma* 属菌に関する分子疫学的調査

分担研究者 大橋典男 静岡県立大学・環境科学研究所・助教授

研究協力者 内藤博敬 静岡県立大学・環境科学研究所・助手

増澤俊幸 千葉科学大学・薬学部・助教授(主任研究者)

川森文彦 静岡県環境衛生科学研究所・微生物部・主幹

稲吉 恵 静岡県環境衛生科学研究所・微生物部・副主任

廣井みどり 静岡県環境衛生科学研究所・微生物部・技師

研究要旨

1994 年に米国で発見された新興感染症「アナプラズマ症」は、マダニにより媒介される発熱性疾患で、その病原体は顆粒球に感染する偏性寄生性のグラム陰性桿菌、*Anaplasma phagocytophilum* である。我が国ではこれまで「アナプラズマ症」に関する知見は皆無であった。今回我々は国内の *Ixodes* 属マダニが *A. phagocytophilum* を保有することを発見し、その遺伝学的性状を明らかにすることに成功した。*Ixodes* 属マダニは、静岡県、山梨県、長野県内においてシュルツェマダニとヤマトマダニを捕獲し、これらのマダニの全組織または唾液腺 DNA から *A. phagocytophilum* の *p44* 遺伝子の検出を試みた。その結果、123 匹中 20 匹のマダニが陽性を示した。一方、150 匹分のマダニ組織を ddY マウスに腹腔内投与して、その脾臓 DNA から検出を試みたところ、マダニ投与マウスの 15 匹中 1 匹が陽性を示した。得られた増幅産物の組換え体の塩基配列から系統樹を作成した結果、シュルツェマダニとヤマトマダニの *A. phagocytophilum* の *p44* 遺伝子はそれぞれ異なるクラスターに位置することが判明した。また、日本の *p44* 遺伝子は米国あるいは英国の *p44* 遺伝子と 85.6% 以上の高い相同性を示すものと 73.1% 以下の相同性を示すものが存在することが判った。さらに、16S rRNA 遺伝子のダイレクトシーケンスの結果は、米国の *A. phagocytophilum* human agent のものと同一であった。以上、我が国にもヒトに感染する可能性のある *A. phagocytophilum* の存在が明らかとなった。

A. 研究目的

新興感染症「アナプラズマ症」はマダニにより媒介される発熱性疾患で、その病原体は顆粒球に特異的に感染する偏性寄生性のグラム陰性桿菌である。1994 年、米国で発熱性疾患の患者の好中球中にエーリキア様細菌の感染が認められ、ヒト顆粒球エーリキア症病原体

(Human Granulocytic Ehrlichiosis [HGE] agent) と呼ばれるようになった。そして、1996 年にはその病原体が分離報告された。その後、2001 年に、HGE agent は *Ehrlichia* 属から *Anaplasma* 属へと配置換えされ、*Anaplasma phagocytophilum* という学名が付された。それに伴って、昨今ではその病名もヒト顆粒球アナ

プラズマ症 (Human Granulocytic Anaplasmosis [HGA]) と呼ばれている。 *A. phagocytophilum* は、ヒトの他、ウマやヒツジなどにも感染しアナプラズマ症を引き起こすことから「人獣共通感染症」病原体としても知られている。

我が国では、これまで *A. phagocytophilum* に関する知見は皆無であった。そこで、本研究では、我が国の *A. phagocytophilum* の実態を明らかにすることを目的として、国内のマダニを捕獲し、これらのマダニが *A. phagocytophilum* を保有するか否かを調査した。

B. 研究方法

静岡県、山梨県、長野県内において 273 匹の *Ixodes* 属マダニ(114 匹のシュルツェマダニ [*I. persulcatus*] および 159 匹のヤマトマダニ [*I. ovatus*]) を捕獲した。このうち、123 匹のマダニについては、全組織または唾液腺を個々のマダニより摘出し、DNA を抽出して、*A. phagocytophilum* に特異的な *p44* 遺伝子を標的とした PCR を行った。一方、150 匹のマダニの全組織を摘出後、6~15 匹分ずつプールし、それらを免疫抑制剤(シクロホスファミド)処理した 15 匹の ddY マウスにそれぞれ腹腔内投与した。10 日後、マウスの脾臓を摘出し、DNA を抽出して、*p44* 遺伝子および 16S rRNA 遺伝子を標的とした PCR を行った。そして、得られた増幅産物をクローニングし、組み換え体の塩基配列を解読して、系統樹解析により遺伝学的性状を調査した。

C. 結果および考察

捕獲した 123 匹中 20 匹のシュルツェマダニとヤマトマダニから *A. phagocytophilum* の *p44*

遺伝子の検出に成功した(表 1)。これらのマダニは静岡県あるいは山梨県で捕獲したもので、長野県内で捕獲した 6 匹のマダニについては PCR 陰性であった。また、150 匹のマダニを投与した 15 匹のマウスのうち、1 匹のマウスの脾臓から *A. phagocytophilum p44* 遺伝子が検出できた。そして、得られた *p44* 増幅産物を TA-cloning によりクローニングして組換えクローンを作製し、28 個のクローンの塩基配列を解読して、相同性検索を行った。その結果を表 2 に示す。さらに、これらの塩基配列を基にして系統樹解析を行ったところ、シュルツェマダニとヤマトマダニからの *A. phagocytophilum p44* 遺伝子はそれぞれ異なるクラスターに位置することが判明した(図 1)。また、28 個中 11 個の日本の *p44* 遺伝子は米国あるいは英国の *p44* 遺伝子と 85.6% 以上の高い相同性を示したが、残りの 17 個の日本の *p44* 遺伝子は米国あるいは英国のものとは 73.1% 以下の相同性を示し、我が国独自の *A. phagocytophilum* の存在が示唆された。

一方、*p44* 遺伝子で PCR 陽性を示した 1 匹のマウスについて、16S rRNA 遺伝子の解析を行ったところ、得られた 6 個の 16S rRNA 遺伝子クローンは、それぞれの間で 99.3~99.6% の相同性が認められ、米国の *A. phagocytophilum human agent* とは 99.6~99.8% の相同性が見られた。増幅した 16S rRNA 遺伝子をダイレクトシーケンスした場合、その塩基配列は米国の *human agent* のものと同一であった。

以上、我が国においてもヒトに感染する可能性のある *A. phagocytophilum* が存在するものと思われる。

D. 危機管理情報

「国内に生息するマダニからのアナプラズマ属菌の検出」, 国立感染症研究所感染症情報センター, 病原微生物検出情報 (Infectious Agents Surveillance Report [IARS]), Vol. 27, p 44-45, 2006年2月号

発表論文等

1. Ohashi, N., Inayoshi, M., Kitamura, K., Kawamori, F., Kawaguchi, D., Nishimura, Y., Naitou, H., Hiroi, M., Masuzawa, T.: *Anaplasma phagocytophilum*-infected ticks, Japan. *Emerg Infect Dis.* **11**, 1780-1783 (2005)
2. Güner, E.S., Watanabe, M., Kadosaka, T., Polat, E., Gargili, A., Gulamber, A., Ohashi, N., Kaneda, K., Imai, Y., Masuzawa, T.: Seroepidemiology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in wild mice captured in northern Turkey. *Epidemiol Infect.* **133**, 331-336 (2005)
3. Naitou, H., Kawaguchi, D., Nishimura, Y., Inayoshi, M., Kawamori, F., Masuzawa, T., Hiroi, M., Kurashige, H., Kawabata, H., Fujita, H., Ohashi, N.: Molecular Identification of *Ehrlichia* species and 'Candidatus Neoehrlichia mikurensis' from ticks and wild rodents in Shizuoka and Nagano Prefectures, Japan. *Microbiol Immunol.* **50**, 45-51 (2006)
4. Ohashi, N. (他38名、17番目): Comparative Genomics of Emerging Human Ehrlichiosis Agents. *PLoS Genet.* **2**, 208-223 (2006)
5. Niu, H., Rikihisa, Y., Yamaguchi, M., Ohashi, N.: Differential expression of VirB9 and VirB6 during the life cycle of *Anaplasma phagocytophilum* in human leucocytes is associated with differential binding and avoidance of lysosome pathway. *Cell Microbiol.* **8**, 523-534 (2006)
6. 大橋典男: エーリキア症とアナプラズマ症, 日本細菌学会関東支部ニュース, 第46号, p. 9-10, 2005年10月
7. 大橋典男: 国内に生息するマダニからのアナプラズマ属菌の検出, 国立感染症研究所感染症情報センター, 病原微生物検出情報 (Infectious Agents Surveillance Report [IARS]), Vol. 27, p 44-45, 2006年2月号

学会発表

1. 大橋典男, 西村祐作, 内藤博敬, 丸山総一, 川森文彦, 稲吉恵, 増澤俊幸: 日本国内の野鼠が保有する *Bartonella* 属菌の分類学的解析. 日本細菌学会第78年会 (東京), 2005年4月
2. 内藤博敬, 川口大蔵, 大橋典男, 稲吉恵, 川森文彦, 増澤俊幸: 野鼠が保有する *Ehrlichia* 属菌および 'Candidatus Neoehrlichia mikurensis' に関する分子疫学的解析. 日本細菌学会第78年会 (東京), 2005年4月

3. 神村卓也, 渡邊むつみ, 今井康之, 内藤博敬, 大橋典男, 増澤俊幸: ライム病ボレリアのポーリンタンパク質 Oms28 の発現変動解析. 第 42 回レプトスピラ・シンポジウム (東京), 2005 年 4 月
4. 北邑かよ子, Zorana Orescanin, 大橋典男, 今井康之, Marija Milutinovic, 増澤俊幸: セルビアモンテネグロと日本由来マダニからの *p44* 遺伝子をターゲットとした *Anaplasma phagocytophilum* の検出およびその性状解析. 第 42 回レプトスピラ・シンポジウム (東京), 2005 年 4 月
5. 増澤俊幸, 渡邊むつみ, 神村卓也, 今井康之, 内藤博敬, 大橋典男: ライム病ボレリア発現プロテオーム解析と外膜タンパク質 Oms28 発現に及ぼす影響. 日本薬学会主催第 17 回微生物シンポジウム (東京), 2005 年 9 月
6. Toshiyuki Masuzawa, Yoshihiro Okamoto, Norio Ohashi: Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in East Asia and neighboring country and region. 10th International Conference on Lyme borreliosis and other tick-borne disease (Vienna, Austria), Sep, 2005
7. 稲吉恵, 川森文彦, 内藤博敬, 廣井みどり, 大橋典男: *Ehrlichia* sp. Shizuoka 株感染マウスの病理組織学的解析. 第 13 回ダニと疾患のインターフェースに関するセミナー[SADI 伊豆大会] (下田), 2005 年 9 月
8. 内藤博敬, 川口大蔵, 稲吉恵, 川森文彦, 増澤俊幸, 大橋典男: 野鼠が保有する *Ehrlichia* 属菌および '*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*' について. 第 13 回ダニと疾患のインターフェースに関するセミナー[SADI 伊豆大会] (下田), 2005 年 9 月
9. 大橋典男: 国内で見出されるエーリキアとバルトネラについて. 第 13 回ダニと疾患のインターフェースに関するセミナー (シンポジウム III : 基礎の立場から見たダニ媒介性感染症の現状)[SADI 伊豆大会] (下田), 2005 年 9 月
10. 大橋典男: エーリキア症とアナプラズマ症. 第 88 回日本細菌学会関東支部総会 (シンポジウム 2「Vector-Borne Disease」) (浜松), 2005 年 10 月
11. 大橋典男: *Ixodes* 属マダニから検出された *Anaplasma phagocytophilum* について. 第 23 回日本クラミジア研究会・第 12 回日本リケッチア研究会合同学術集会 (東京), 2005 年 10 月

Table 1. PCR detection for *A. phagocytophilum* p44/msp2 paralogs from ticks or spleens of experimental mice inoculated with tick tissues

Collection site of ticks (Prefecture, year)	<i>I. persulcatus</i>										<i>I. ovatus</i>			
	Whole tissue ^a		Salivary gland ^d		Experimental infection with ticks ^b		Total	Whole tissue ^a		Salivary gland ^d		Experimental infection with ticks ^b		Total
	Female	Male	Female	Male	Female	Male		Female	Male	Female	Male	Female	Male	
(Yamanashi, 2004)														
Site A	0 / 2	0 / 4					0 / 6	0 / 8	0 / 8					0 / 16
Site B	2 / 16	2 / 17					4 / 33	0 / 9	0 / 3					0 / 12
(Nagano, 2004)														
Site C	0 / 3	0 / 0					0 / 3	0 / 1	0 / 2					0 / 3
(Shizuoka, 2004)														
Site D			6 / 9				6 / 9			9 / 17				9 / 17
Site E			1 / 8				1 / 8			0 / 16				0 / 16
(Shizuoka, 2003)														
Site D					0 / 14 (2)	0 / 10 (1)	0 / 24 (3)					0 / 32 (3)	1 / 16 (2)	1 / 48 (5)
Site E					0 / 22 (2)	0 / 9 (1)	0 / 31 (3)					0 / 26 (2)	0 / 21 (2)	0 / 47 (4)
Total	2 / 21	2 / 21	7 / 17		0 / 36 (4)	0 / 19 (2)	11 / 114 (6)	0 / 18	0 / 13	9 / 33		0 / 58 (5)	1 / 37 (4)	10 / 159 (9)

^a No. positives / no. examined. One hundred twenty-three ticks were dissected (whole tissues from 73 ticks and salivary glands from 50 ticks) were individually examined by PCR

^b No. positive mouse spleen / no. ticks examined (no. of mice used). Six to 15 ticks were pooled and homogenized (55 *I. persulcatus* and 95 *I. ovatus*), and were intraperitoneally infected into ddY male mice.

Table 2. Properties of the recombinant *p44 msp2* clones obtained from DNA of ticks or a spleen of a mouse inoculated with whole tick tissues

<i>p44 msp2</i> clones	Tick no. ^a (Mouse no.)	Tick species	Tick sex	Tick specimens	Collection sites of ticks (Prefecture, year)	Most closely related <i>p44 msp2</i> paralogs Nucleotide similarity (%) / GenBank no. (Country)
Tick1-4	1	<i>I. persulcatus</i>	Female	Salivary gland	TK (Shizuoka, 2004)	<i>p44-32</i> (99.7) / AY064521 (US)
Tick1-5						<i>p44-32</i> (99.2) / AY064521 (US)
Tick9-2	9	<i>I. persulcatus</i>	Female	Salivary gland	TK (Shizuoka, 2004)	<i>msp2</i> NY18 (72.7) / AY164513 (US)
Tick9-4						<i>msp2</i> NY18 (72.4) / AY164513 (US)
Tick9-5						<i>msp2</i> NY18 (72.7) / AY164513 (US)
Tick18-3	18	<i>I. ovatus</i>	Female	Salivary gland	TK (Shizuoka, 2004)	<i>p44</i> Cairn (63.5) / AY176516 (UK)
Tick18-4						<i>p44</i> Feral Goat (58.6) / AY176551
Tick18-5						<i>p44</i> Cairn (63.5) / AY176516 (UK)
Tick23-1	23	<i>I. ovatus</i>	Female	Salivary gland	TK (Shizuoka, 2004)	<i>msp2</i> var B (100) / AY164504 (US)
Tick23-3						<i>p44</i> Cairn (73.0) / AY176516 (UK)
Tick23-4						<i>msp2</i> var B (100) / AY164504 (US)
Tick23-5						<i>p44</i> Cairn (71.6) / AY176516 (UK)
Tick36-1	36	<i>I. persulcatus</i>	Male	Whole tissues	UM (Yamanashi, 2004)	<i>p44-27</i> (71.5) / AY064516 (US)
Tick36-2						<i>msp2</i> var B (70.4) / AY164504 (US)
Tick41-1	41	<i>I. persulcatus</i>	Male	Whole tissues	UM (Yamanashi, 2004)	<i>p44</i> Cairn (73.0) / AY176516 (UK)
Tick41-2						<i>p44-32</i> (73.1) / AY064521 (US)
Tick44-1	44	<i>I. persulcatus</i>	Female	Whole tissues	UM (Yamanashi, 2004)	<i>msp2</i> NY18 (71.6) / AY164513 (US)
Tick44-2						<i>msp2</i> NY18 (71.6) / AY164513 (US)
Tick44-3						<i>p44</i> North Wales (66.3) / AY176574 (UK)
Tick68-1	68	<i>I. persulcatus</i>	Male	Whole tissues	UM (Yamanashi, 2004)	<i>p44</i> Lephimore (86.5) / AY176521 (UK)
Tick68-2						<i>p44</i> Somerset (69.1) / AY176521 (UK)
Tick68-3						<i>p44</i> Cairn (68.8) / AY176516 (UK)
J4-1-2	(4) ^b	<i>I. ovatus</i>	Male	Whole tissues	TK (Shizuoka, 2003)	<i>p44-29</i> (99.7) / AY064518 (US)
J4-1-6						<i>p44-9</i> (99.5) / AF414589 (US)
J4-2-1						<i>p44-36</i> (99.5) / AY0644525 (US)
J4-2-2						<i>msp2</i> var B (99.7) / AF164497 (US)
J4-2-4						<i>p44-9</i> (99.5) / AF414589 (US)
J4-2-5						<i>p44-17</i> (99.2) / AF412830 (US)

^a PCR-positive tick (or -positive mouse inoculated with whole tick tissues).

^b No. 4 mouse which was inoculated with the whole tissues of 10 pooled *I. ovatus* ticks was PCR-positive in the spleen DNA.

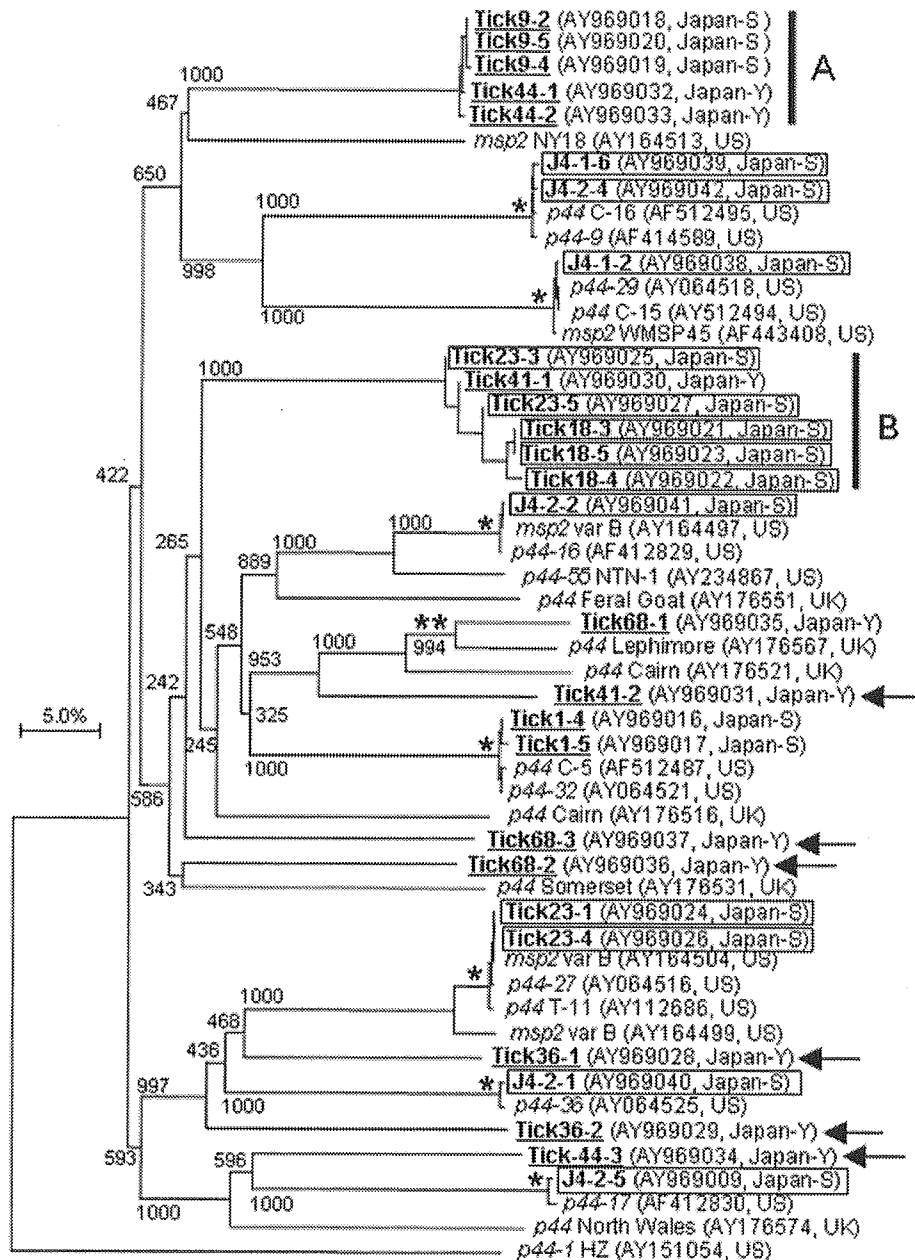


Fig. 2. Phylogram of *A. phagocytophilum* p44 paralogs including Japanese paralogs. The tree was constructed using the neighbor-joining method and numbers on the tree indicate bootstrap values for branch points. Japanese p44 paralogs from *I. persulcatus* and *I. ovatus* are underlined and boxed, respectively, with boldfaced characters. A single asterisk shows p44 clusters with 99.2%-100% similarities and double asterisks show a cluster with 85.6% similarity. Two vertical bars and 6 arrows indicate Japanese p44 clusters and paralogs, respectively, which are distinct from the previously identified p44 (less than 73.1% similarity). A horizontal bar indicates % of sequence divergence. Accession numbers and location (Japan-Y [Yamanashi], Japan-S [Shizuoka], US [the United States], and UK [United Kingdom]) are in parentheses.

Table 3. Sequence similarities (1.4 kb) of the recombinant *A. phagocytophilum rrs* clones from the spleen DNA of no. 4 infected mouse

<i>rrs</i> clones (GenBank accession numbers)	Sequence similarity (%)						
	J4-3-1	J4-3-2	J4-3-4	J46-3-5	J4-3-6	J4-3-7	AP-ha ^a
J4-3-1 (AY969010)		99.5	99.5	99.4	99.5	99.3	99.7
J4-3-2 (AY969011)			99.6	99.5	99.6	99.4	99.8
J4-3-4 (AY969012)				99.5	99.6	99.5	99.8
J4-3-5 (AY969013)					99.5	99.3	99.7
J4-3-6 (AY969014)						99.4	99.8
J4-3-7 (AY969015)							99.6
Direct sequence ^b							100

^a The *rrs* sequence (U02521) from *A. phagocytophilum*-human agent (AP-ha) reported by Chen et al. (2) was used for comparison.

^b The PCR product of *rrs* was directly sequenced.

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（平成 17 年度）

国内各地の小型哺乳類とマダニ類における野兔病菌と紅斑熱群リケッチアの検索
－2005 年 3 月～2006 年 1 月のフィールド調査の結果－

分担研究者 藤田博己 大原綜合病院附属大原研究所

共同・協力研究者

川端寛樹（分担研究者，感染症研究所），角坂照貴（分担研究者，愛知医科大学），馬原文彦（馬原医院），新田芳樹（沖縄県家畜衛生試験場），高田伸弘，矢野泰弘（福井大学医学部），及川陽三郎（金沢医科大学），石畝 史（福井県衛生環境研究センター），本田俊郎（鹿児島県出水保健所），御供田睦代（鹿児島県環境保健センター），山本 進（鹿児島大学），山本正悟（宮崎県衛生環境研究所），田原研司，板垣朝夫，保科 健（島根県保健環境科学研究所），伊東拓也（北海道立衛生研究所），増澤俊幸（主任研究者，千葉科学大学薬学部）

要旨

2005 年 3 月から 2006 年 1 月に，国内各地の小型哺乳類とマダニ類における野兔病菌と紅斑熱群リケッチアの保有状況について分離培養法による調査を実施した．また当該病原体の媒介マダニ相の調査も併行した．対象の微生物はいずれも細胞寄生性であることから，分離方法は培養細胞 L929 を用いた shell vial 法の変法に統一した．

小型哺乳類は 6 属 10 種，79 頭を捕獲し，このうち 77 頭から分離を試みたがすべて陰性であった．

マダニ類は野外調査から 5 属 19 種，3,346 個体，ヒト刺咬症例から 3 属 4 種，28 個体を採集した．今回の採集過程において，病原媒介の重要種キチマダニ *Haemaphysalis flava* が石垣島にも分布すること，世界各地でさまざまな病原体の媒介に関与しているクリイロコイタマダニ *Rhipicephalus sanguineus* が従来沖縄本島以外にも石垣島と徳之島からも見出されたこと，陸ガメを主要な宿主とするカメキララマダニ *Amblyomma geoemydae* がヒトを刺咬し，その頻度は本種生息地ではごく普通であるらしいことなどが新たに判明した．

採集したマダニ類のうち，野外由来の 5 属 18 種 1,093 個体と刺咬症例の 2 属 3 種 22 個体からの分離を試み，野兔病菌はすべて陰性，紅斑熱群リケッチアは 6 種類のマダニ類から病原種を含む次の 6 種類のリケッチア 39 株を分離した：*Rickettsia japonica*，*Rickettsia helvetica*，"*Rickettsia tamurae*"，"*Rickettsia asiatica*"，*Rickettsia honei*-like，*Rickettsia* sp. LON タイプ．

Rickettsia honei-like については，これを保有するミナミネズミマダニ *Ixodes granulatus* の室内飼育を試み，リケッチアが経期的および経卵的に通過することを確認するとともに，今後の研究用として当該リケッチア種を維持する 1 マダニ・コロニーを確保した．

目的

前年度に引き続き，国内における野兔病と紅斑熱群リケッチア症の実態把握を目的に，

これらの保菌者ならびに媒介者と推定される小型哺乳類やマダニ類を対象とした調査を実施した．今回は野鼠寄生性ミナミネズミマダ

ニとこれが特異的に保有すると推定される *Rickettsia honei*-like の詳細なデータを得るために、小型哺乳類の捕獲調査は当該マダニ種の主な分布域にあたる南西諸島方面に集中させた。また、ヒト刺咬マダニ種と紅斑熱との具体的関係を把握するために、日本紅斑熱の多発地にあたる徳島県阿南市の馬原医院を受診するマダニ刺咬患者において、摘出虫体からのリケッチア分離も試行した。

調査の地域、期間、担当者、調査対象

沖縄県西表島：2005年4月17日、18日、調査担当者は川端、藤田、同島に生息するセマルハコガメに特異的に寄生するカメキララマダニ。

沖縄県石垣島：2005年4月19日、川端、藤田；10月13日-15日、川端、角坂、後藤、藤田、カメキララマダニを含むマダニ類と小型哺乳類。

沖縄県沖縄本島：2005年4月20日、21日、10月11日、12日、川端、角坂、新田、藤田、4月には本島北部の山地に生息するリュウキュウヤマガメ寄生性のカメキララマダニを主体としたマダニ類、10月はミナミネズミマダニ関連の小型哺乳類。

鹿児島県徳之島：2005年11月24日-28日、本田、御供田、角坂、川端、藤田、マダニ類と小型哺乳類。

鹿児島県屋久島：2006年27日-30日、本田、御供田、矢野、藤田、マダニ類と小型哺乳類。

鹿児島県種子島：2005年3月3日-7日、本田、御供田、藤田、マダニ類と小型哺乳類。

鹿児島県薩摩地区：2005年4月-11月、山本進、マダニ類。

福岡県北部：2005年22日-24日、本田、御供田、山本正悟、藤田、マダニ類。

島根県松江市と西部地域：2005年27日-30日、田原、板垣、保科、高田、矢野、川端、藤田、マダニ類と小型哺乳類。

高知県室戸岬：2005年11月4日、高田、矢野、及川、藤田、マダニ類。

徳島県牟岐大島：2005年5月12日、7月29日、11月5日、矢野、藤田、マダニ類。

徳島県阿南市新野町：2005年5月11日、13日、7月28日、30日、矢野、藤田、マダニ類。

徳島県阿南市一帯：2005年4月-9月、馬原、刺咬症例からのマダニ類。

徳島県日和佐町：2005年5月13日、矢野、藤田、マダニ類。

福井県荒島岳：2005年4月-6月、石畝、高田、マダニ類。

福井県赤兎山：2005年6月19日、石畝、高田、マダニ類。

福井県高倉峠：2005年6月19日、石畝、高田、マダニ類。

石川県白山：2005年7月8日、9日、高田、及川、石畝、川端、藤田、マダニ類。

長野県梅池：2005年5月8日、6月25日、高田、マダニ類。

静岡県富士山：2005年5月8日、6月19日、川端、マダニ類。

山梨県小淵沢町：2005年5月28日、川端、マダニ類。

山梨県信州峠：2005年6月5日、高田、マダニ類。

山梨県夜叉神峠：2005年5月5日、高田、マダニ類。

宮城県丸森町：2005年5月1日、藤田、マダニ類。

青森県大鰐町：2005年5月3日、4日、藤田、マダニ類。

青森県下北半島：2005年6月3日、4日、高田、藤田、マダニ類。

青森県白神山地：2005年6月21日、22日、高田、マダニ類。

北海道馬追丘陵：2005年6月2日、高田、矢野、川端、山本正悟、藤田、マダニ類。

方法

小型哺乳類はシャーマントラップまたは角坂式カゴトラップを用いて生け捕りした。なおトラップの設置は1地点につき1晩を基本とした。

捕獲した動物はクロロホルムまたはエーテルで麻酔死させた後に無菌的に剖検して検査材料を採取した。分離材料には肝臓、脾臓、血液のいずれかを用いた。

マダニ類の採集は主に植生上から白色フランネル布によるハタズリ法で行った。一部のマダニ種については、宿主体表から肉眼的に摘出採集した。

野兎病菌、紅斑熱群リケッチアとともに、分離は材料から調製した乳剤を培養細胞 L929 に接種し、病原体の増殖を確認する方法による。細胞収納容器にはガラス製の小型バイアルを使用した「shell vial 法」の変法とした。なお、分離は材料動物の個体別に実施した。

小型哺乳類からの分離結果 (表1)

南西諸島を中心とした6地域から捕獲した小型哺乳類は、ワタセジネズミ3、ジネズミ1、ジャコウネズミ6、ヒミズ1、ハツカネズミ1、オキナワハツカネズミ2、アカネズミ36、ヒメネズミ6、クマネズミ18およびドブネズミ5の6属10種79頭である。このうちアカネズミ2頭を除く77頭について野兎病菌と紅斑熱群リケッチアの分離を実施したが、すべて陰性であった。

マダニ類の野外調査の結果とマダニ相への知見の追加

マダニ類は南西諸島の西表島から北海道にいたる27地域から採集したマダニ類は、カメキララマダニ *Amblyomma geoemydae*, タカサゴキララマダニ *Amblyomma testudinarium*, タイワンカクマダニ *Dermacentor taiwanensis*, キチマダニ *Haemaphysalis flava*, タカサゴチマダニ *Haemaphysalis*

formosensis, ヤマアラシチマダニ *Haemaphysalis hystricis*, ヤマトチマダニ *Haemaphysalis japonica*, ヒゲナガチマダニ *Haemaphysalis kitaokai*, フタトゲチマダニ *Haemaphysalis longicornis*, オオトゲチマダニ *Haemaphysalis megaspinosa*, イエンチマダニ *Haemaphysalis yeni*, ミナミネズミマダニ *Ixodes granulatus*, タネガタマダニ *Ixodes nipponensis*, ヒトツトゲマダニ *Ixodes monospinosus*, ヤマトマダニ *Ixodes ovatus*, シュルツェマダニ *Ixodes persulcatus*, タヌキマダニ *Ixodes tanuki*, アカコッコマダニ *Ixodes turdus* およびクリイロコイタマダニ *Rhipicephalus sanguineus* の5属19種, 3,345 個体である (表2)。今回の調査から、国内のマダニ相についての新知見が見られた。

カメキララマダニは、従来は陸生のカメ類を主な宿主として、ヘビ類などの一部の爬虫類への寄生が知られる南方系の種類で、国内では西表島、石垣島、沖縄本島など、陸生のセマルハコガメやリュウキュウヤマガメの生息地に分布する種類である。今回の石垣島における調査中に2名が本種幼虫による刺咬を受けたことにより、ヒトにも寄生し得ることが明らかとなった。また地域住民からの聞き取りにおいても、石垣島で発生している不明虫刺咬症が本種によるものであることが強く示唆された。また、前回採集の本種からは *Rickettsia* 属の DNA が検出されたこともあり、今後ともに要注意種のひとつである。

キチマダニはこれまで、国内では沖縄本島北部が分布南限とされてきたが、今回の調査で石垣島で幼虫が採集された。本種は野兎病菌や日本紅斑熱リケッチアの媒介者としても知られる重要種であることから、疫学上からも詳細な分布データの把握が必要と思われる。

世界的に分布が知られ、各地で病原体の媒介者となっている外来種のクリイロコイタマダニは、現在のところ国内では沖縄本島だけが唯一の定着地域であり、これまでも本土域

への侵入を繰り返しているものの、確実な分布拡大の報告はない。今回の調査では、石垣島の飼い犬に寄生例が見られ、また徳之島保健所の犬舎内でも、収容犬に由来すると推測されるおびただしい虫体を確認することができた。分布の拡大が懸念される。

タヌキマダニは幼虫期が不明で、これまでは *Ixodes* 属の不明種とされている *Ixodes* sp. LY がその候補として推定されてきたが証明を欠いていた。前回の調査において島根県のアカネズミから sp. LY を採集する機会を得たので飼育を続けていたが、脱皮した若虫の観察から本種がタヌキマダニであることを確認した。したがって、今回種子島で採集した sp. LY はタヌキマダニ幼虫として扱った。

野外調査で採集したマダニ類からの分離結果 (表 2)

分離には採集した種類のうちイエンチマダニを除く 5 属 18 種、1,094 個体を供した。

野兎病菌はすべて陰性であった。

リケッチアは、4 属 6 種から合計 30 株分離された。

タカサゴキララマダニからは本種に特異的な "*Rickettsia tamurae*" が 13 株分離された。前年度の報告書では "*Rickettsia tamurae*" と記述したが訂正する。分離陽性地域は、沖縄本島、鹿児島県薩摩地区、福岡県北部、徳島県の牟岐大島と阿南市である。福岡県からの分離はこれが最初となる。

ヤマアラシチマダニからは、徳島県の牟岐大島と阿南市のいずれも日本紅斑熱の推定感染地点で採集した個体から合計 3 株の *Rickettsia japonica* が分離された。

沖縄本島の前回陽性地点におけるミナミネズミマダニからは *Rickettsia honei*-like が 2 株分離された。

福井県荒島岳のヒトツトゲマダニ、静岡県側の富士山と青森県の白神山地のシュルツエマダニからは合計 11 株の *Rickettsia*

helvetica が分離された。ちなみに荒島岳は本リケッチア種による紅斑熱症例の推定感染地である。

ヤマトマダニからは青森県下北半島の個体から 1 株の "*Rickettsia asiatica*" が分離された。

ミナミネズミマダニの凍結保存材料ならびに飼育による次世代個体からの分離例

前年度の分離で雑菌汚染のために分離不能であった接種材料のうち凍結保存してあったものからの再分離を試みたところ、沖縄本島具志頭の 1 幼虫から追加分離できた (表 4 の IG-6 株)。飽血個体は室内飼育を継続していたが、前年度採集の個体のうち、次の発育期へ脱皮した 3 個体から *Rickettsia honei*-like が分離できた (表 4 の IG-7, 8, 9)。すなわち、幼虫から若虫へ脱皮した 1 個体、若虫から♀へ脱皮した 2 個体で、これによって本リケッチアの経期的通過が確認されたことになる。さらに沖縄本島具志頭のジャコウネズミから昨年 10 月 11 日に採集した飽血 1 ♀の室内飼育も続けていたところ、10 月 20 日に産卵を開始し、2006 年 1 月 26 日には幼虫の孵化が始まった。この卵と幼虫からも本リケッチアが分離され (それぞれ IG-12, IG-13 株)、次世代への経卵通過が確認された。このリケッチア感染幼虫に病的徴候は認められず、現在、研究用リケッチア保有コロニーとして維持されている。

ヒト刺咬症例におけるマダニ類からの分離結果 (表 3)

日本紅斑熱多発地域の徳島県阿南市にある馬原医院に、2005 年に受診したマダニ刺咬症の患者は合計 28 名であった。マダニの種類別にはタカサゴキララマダニによる患者が 17 名、キチマダニが 2 名、フタトゲチマダニが 8 名、タネガタマダニが 1 名で、多くは 1 個体による刺咬であったが複数例もあり、最多では 7 個体の例もあった。

患者体表で飽血かそれに近い状態の個体は、次発育期への脱皮後に、未飽血個体はそのまままで接種乳剤を調製した。死亡個体は分離に供しなかった。

タカサゴキラマダニによる症例では3個体からの分離を試み、1個体から"*Rickettsia tamurae*"が分離された。このリケッチア陽性マダニに刺咬された患者は、その後1ヶ月以上の経過観察においても紅斑熱あるいは何らかの症状はともに認められなかった。

フタトゲチマダニにおいては7症例、10個体からの分離を試み、2症例の各1個体からリケッチアが分離された。1例は飽血に至っていた若虫で、脱皮した♀から*Rickettsia* sp. LONタイプが分離された。患者にはとくに症状は認められなかった。もう1例からは*Rickettsia japonica*が分離された。この症例では受診時にすでに発熱していて、臨床的にも日本紅斑熱が疑われた。その後の刺咬部位の生検皮膚と全血からも同種リケッチアが分離され、日本紅斑熱の確定診断に至った。

分離リケッチアについて

今年度に分離されたリケッチア39株のリストを表4に示した。3属7種のマダニ種から6種類の紅斑熱群リケッチアが分離された。

タカサゴキラマダニの特異種"*Rickettsia tamurae*"は新種記載の準備中で、文献的に散見される*Rickettsia* sp. ATタイプ、*Rickettsia anan*などがシノニムとなる予定である。病原性の詳細は不明であるが、ネパールを旅行して本種マダニに刺咬された1例では刺咬部位の潰瘍形成とリンパ節腫脹が見られ、抗体の陽転があったとされる。

日本紅斑熱病原体の*Rickettsia japonica*は特定のマダニ種との強い対応関係は見られず、今回もヤマアラシチマダニとフタトゲチマダニから分離された。ただし最近では、たとえば愛媛県や鹿児島県におけるようにヤマアラシチマダニからの検出例が多いようである。

Rickettsia sp. LONタイプはフタトゲチマダニの両性系統に特異的な種類で、地域的にはかなりの高頻度での保有が認められる。ヒトに対する病原性は不明である。分離株に対してではないが、FUJ98や*Rickettsia marmionii*などのコードや種名が提案されている。

ミナミネズミマダニから特異的に分離されているリケッチアは、血清学的にはFlinders Island spotted feverやThai tick typhusの病原体*Rickettsia honei*に一致する。しかし、DNA解析では必ずしも一致しない部分もあるので本報告では*Rickettsia honei*-likeとした。

ヒトツトゲマダニ、シュルツェマダニおよびヤマトマダニからの分離株は、血清反応では一様なために、これまでは最初の分離株の名称をとってIOタイプとし、また後のDNA解析の結果からIOタイプ=*Rickettsia helvetica*としてきた。最近、ヤマトマダニからの分離株はDNAレベルで区別されるとして、新種名"*Rickettsia asiatica*"が提案され、記載作業が進んでいる。

論文発表・著書

1. 藤田博己：野兔病。広範囲血液・尿化学検査、免疫学的検査(3)、日本臨床、253-255, 2005.
2. 真鍋恵津子、寄藤和彦、藤田博己：野兔病—千葉県利根川河川敷近くで発生した症例。皮膚病診療、27: 253-256, 2005.
3. Noji, Y., Takada, N., Ishiguro, F., Fujino, S., Aoyama, T., Fujita, H., Yano, Y., Shiomi, S., Mitsuto, I., Takase, K., Haba, T. and Mabuchi, H.: The first report case of spotted fever in Fukui Prefecture, the northern part of central Japan. Jpn. J. Infect. Dis., 58: 112-114, 2005.

学会発表

1. 藤田博己, 川端寛樹, 小泉信夫, 角坂照貴, 新田芳樹: 沖縄本島のミナミネズミマダニからの紅斑熱群リケッチア分離例. 第 57 回日本衛生動物学会大会. 2005 年 6 月 2 日. 札幌.
2. 山本正悟, 鈴木 泉, 元明秀成, 岩切 章, 藤田博己, 片山 丘, 古屋由美子, 吉田芳哉, 田原研司, 板垣朝夫, 本田俊郎: 宮崎県のマダニ相と *Rickettsia japonica* 媒介マダニに関する検討. 第 57 回日本衛生動物学会大会. 2005 年 6 月 2 日. 札幌.
3. 高田伸弘, 石畝 史, 野路善博, 藤田博己, 矢野泰弘, 岩崎博道: 福井県で見出され我が国初確認となった欧州共通紅斑熱の疫学的背景. 第 57 回日本衛生動物学会大会. 2005 年 6 月 2 日. 札幌.
4. 馬原文彦, 藤田博己, 堤 寛, 稲田健一, 宇都宮洋才, 土橋賢治: 日本紅斑熱発生地におけるヒト感染とイヌの関わり (第 1 報). 第 57 回日本衛生動物学会大会. 2005 年 6 月 2 日. 札幌.
5. 石畝 史, 高田伸弘, 藤田博己, 矢野泰弘, 溝口二郎, 田原研司, 川端寛樹, 増澤俊幸: 島嶼を含む列島各地におけるライム病関連ボレリアの調査, 2004 年の成績と考察. 第 57 回日本衛生動物学会大会. 2005 年 6 月 2 日. 札幌.
6. 鈴木 泉, 山本正悟, 塩山陽子, 藤田博己: 宮崎県内の 1 地域におけるヘビ類寄生マダニに関する調査. 第 57 回日本衛生動物学会大会. 2005 年 6 月 2 日. 札幌.
7. 矢野泰弘, 田原研司, 板垣朝夫, 藤田博己, 角坂照貴, 川端寛樹, 高田伸弘: 隠岐諸島および島根県本土域におけるツツガムシ病の疫学的特性. 第 57 回日本衛生動物学会大会. 2005 年 6 月 2 日. 札幌.
8. 藤田博己: 国内に分布するマダニ媒介性リケッチア属・分離成績からの概観. 第 13 回ダニと疾患のインターフェイスに関するセミナー. 2005 年 9 月 24 日. 下田.
9. 安藤秀二, 高野 愛, 鶴見みや古, 仲村 昇, 佐藤文男, 高橋 守, 岸本寿男, 野上貞雄, 川端寛樹, 藤田博己: *Carios* 属ダニの病原体ベクターとしてのリスク評価. 第 23 回日本クラミジア研究会・第 12 回リケッチア研究会合同大会. 2005 年 10 月 29 日. 東京.
10. 高田伸弘, 石畝 史, 藤田博己, 馬 暁航: 中国南部の鼠類保有ボレリアおよび媒介マダニ種についての考察 (予報). 第 61 回日本寄生虫学会西日本支部大会・第 60 回日本衛生動物学会西日本支部大会合同大会. 2005 年 11 月 4 日. 高知.
11. 馬原文彦, 藤田博己: 日本紅斑熱流行地におけるマダニ咬症. 第 61 回日本寄生虫学会西日本支部大会・第 60 回日本衛生動物学会西日本支部大会合同大会. 2005 年 11 月 4 日. 高知.
12. 藤田博己, 馬原文彦: 日本紅斑熱発生地のマダニ刺咬症例における摘出虫体からのリケッチア分離の試み (予報). 第 61 回日本寄生虫学会西日本支部大会・第 60 回日本衛生動物学会西日本支部大会合同大会. 2005 年 11 月 4 日. 高知.

表1. 日本各地の野鼠類からの野兎病菌とリケッチア属の分離結果				
調査の地域と期間	種類	採集数	陽性数/検査数	
			野兎病菌	リケッチア
沖縄県石垣島 12-15.X.2005	クマネズミ	4	0/4	0/4
	ドブネズミ	4	0/4	0/4
沖縄県沖縄本島 10-12.X.2005	ワタセジネズミ	1	0/1	0/1
	ジャコウネズミ	3	0/3	0/3
	オキナワハツカネズミ	2	0/2	0/2
	クマネズミ	1	0/1	0/1
	ドブネズミ	1	0/1	0/1
鹿児島県徳之島 23-28.XI.2005	ワタセジネズミ	2	0/2	0/2
	ジャコウネズミ	3	0/3	0/2
	クマネズミ	13	0/13	0/13
鹿児島県屋久島 27-30.I.2006	ジネズミ	1	0/1	0/1
	ハツカネズミ	1	0/1	0/1
	アカネズミ	7	0/7	0/7
	ヒメネズミ	3	0/3	0/3
鹿児島県種子島 03-07.III.2005	アカネズミ	24	0/22	0/22
	ヒメネズミ	3	0/3	0/3
島根県西部地区 27-30.X.2005	ヒミズ	1	0/1	0/1
	アカネズミ	5	0/5	0/5
種類別合計	ワタセジネズミ	3	0/3	0/3
	ジネズミ	1	0/1	0/1
	ジャコウネズミ	6	0/6	0/6
	ヒミズ	1	0/1	0/1
	ハツカネズミ	1	0/1	0/1
	オキナワハツカネズミ	2	0/2	0/2
	アカネズミ	36	0/34	0/34
	ヒメネズミ	6	0/6	0/6
	クマネズミ	18	0/18	0/18
	ドブネズミ	5	0/5	0/5
合計		79	0/77	0/77