

図4 タイおよびネパールにおけるリケッチア症の調査地域  
(2006年12月7日～15日)



表6 タイ北部のマダニ刺症経験者の抗リケッチア血清抗体

協力：チェンマイ大学医学部、メホンソン地域の病院

抗体価	40	80	160	320	640	1280	2560	...	40980
日本系Ot抗原									
Gilliam	1	3	1	1	3	-	-	-	-
Karp	3	4	1	2	-	1	1	-	-
Kato	3	2	-	1	-	-	2	-	-
Kawasaki	3	2	-	-	1	1	1	-	-
Kuroki	4	3	2	2	2	-	1	1	1
Shimokoshi	1	2	-	-	-	-	-	-	-
日本系Rj抗原	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cb抗原	-	4	-	2	-	-	-	-	-

被験者：計47名 抗体測定：IP染色法

表7 タイおよびネパールのマダニと野鼠からのリケッチア検出

協力：チェンマイ大学医学部、ネパール医科大学

調査地 年月	未寄生マダニ			野鼠		
	<i>I. ovatus</i>	<i>I. turdus</i>	<i>H. birmaniae</i>	<i>S. murinus</i>	<i>S. bedfordiae</i>	<i>R. rattus</i>
タイ北部						
チェンライ郊外	なし	なし	なし	なし	なし	なし
チェンマイ (ドイステープ山)	なし	なし	なし	なし	なし	なし
チェンマイ大学構内	なし	なし	なし	なし	なし	なし
ネパール中部						
シバプリー山麓061212	3♂2♀	なし	1♂	2♂1♀	1♀	1♂
分離	-	-	-	ND	ND	ND
PCR (SPG)	-	-	-	ND	ND	ND
PCR (アル浸プール)	-	-	-	ND	ND	ND
PCR (脾臓)	-	-	-	-	-	-
ナガルコット山頂061212	9♂8♀	1♀	2♂3♀	なし	なし	なし
分離	-	-	-	-	-	-
PCR (SPG)	-	-	-	-	-	-
PCR (アル浸プール)	-	-	+	-	-	-
カトマンズ郊外	なし	なし	なし	なし	なし	なし

+: *H. japonica*由来 *Candidatus Rickettsia principis* (AY578114) と1塩基違い、中国 *R. heilongjiangensis* と3塩基違い

なし：試料ないもの一切 -：陰性 ND：実施せず  
PCR：試料はSPG乳剤やアルコール浸漬また冷蔵脾臓

平成18年度厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

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

分担研究報告

獣医学領域からのリケッチア感染サーベイランス

研究分担者	猪熊 壽	帯広畜産大学畜産学部獣医学科	教授
研究協力者	田辺茂之	同	助教授
	宮原和郎	同	教授
	鈴木正嗣	北海道大学大学院獣医学研究科	助教授
	奥田 優	山口大学農学部獣医学科	助教授
	遠藤泰之	鹿児島大学農学部獣医学科	助教授
	松鶴 彩	鳥取大学農学部獣医学科	助手
	杉村 肇	兵庫県動物病院開業	獣医師
	吉林台	岐阜大学大学院連合獣医学研究科	大学院生
	玉本智枝	帯広畜産大学畜産学部獣医学科	学生
	田淵正恵	同	学生
	大橋美里	同	学生
	小西健治	同	学生
	清野信隆	同	学生
	久保田直樹	同	学生
	田川道人	同	学生

研究要旨：獣医学領域からリケッチア感染症のサーベイランスを実施した。（1）まず全国30都道府県の動物病院の協力を得て35都道府県の犬1207頭および猫584頭を歩哨動物としたりケッチアの全国的血清疫学調査を行ったところ、*Rickettsia japonica* に対する抗体陽性（40倍以上）を示したのは、犬20頭（1.7%）と猫4頭（0.7%）であった。これまで日本紅斑熱患者発生のない地域（新潟、香川）においても、*R. japonica* 特異的抗体を保有する動物が確認されたことから、今後これらの地域における日本紅斑熱患者の発生に注意する必要があると考えられた。またマダニ寄生機会の多い動物を歩哨動物としてマダニ媒介性リケッチア感染症の疫学調査を行うことは有用であると考えられた。（2）次に北海道におけるエゾシカおよびマダニを材料に、属特異的PCRと遺伝子解析によりリケッチア性病原体の検索を行ったところ、エゾシカ末梢血から *Rickettsia helvetica*, *Ehrlichia muris* および *Anaplasma bovis* にそれぞれ近縁な遺伝子断片が検出された。また同様の手法を用いて十勝管内のマダニを検索したところ、シュルツェマダニから *R. helvetica* 近縁種および *Candidatus Rickettsia tarasevichiae* 近縁種の遺伝子断片が、また別のシュルツェマダニから *E. muris* と遺伝子配列が100%一致するものが、さらにヤマトマダニからは *Ehrlichia sp.* strain HF 近縁種が検出された。

## A. 研究目的

我が国の医学領域で問題となっているリケッチア感染症について、獣医学領域からアプローチする、すなわち家畜と野生動物を材料に、その感染実態を明らかにするとともに、リケッチア感染症における動物の役割を解明することを目的とする。

1. 犬と猫を歩哨動物としたリケッチアの全国的調査：人と比較してマダニに刺咬される機会の多い動物、とくにコンパニオンアニマルである犬と猫を歩哨動物としてマダニ媒介性リケッチアの感染状況を調査し、分布等、疫学的情報を明らかにする。

2. 北海道のエゾシカおよびマダニを材料としたリケッチア性病原体の分子生物学的検索：野生動物およびマダニがどのようなリケッチア性病原体を保有しているか、またリケッチア伝播における役割を解明するため北海道のエゾシカおよびマダニを材料として、リケッチア性病原体について分子生物学的手法を用いて検索する。

## B. 研究方法

1. 犬と猫を歩哨動物としたリケッチアの全国的調査

1) 検体：調査は2005年7月から2006年7月に全国30都道府県（北海道、青森、宮城、福島、栃木、埼玉、東京、千葉、神奈川、新潟、福井、長野、静岡、山梨、愛知、三重、大阪、京都、奈良、和歌山、兵庫、鳥取、山口、香川、徳島、福岡、長崎、熊本、宮崎、沖縄）の動物病院の協力を得て35都道府県の犬計1207検体および猫584頭の血清を収集して実施された。なお、秋田、茨城、岐阜、岡山、高知の各県は当初調査対象ではなかったが、それぞれの住所地の犬が近県の動物病院を来院したため今回の調査に含めた。なお対象動物は外出のある犬と猫に限り、闘犬は除いた。

同時に、住所、年齢、性別、マダニ寄生歴、旅行歴、病歴などの記録を収集した。

2) 間接蛍光抗体法 (Indirect Fluorescence Antibody Assay (IFA 法))：犬または猫の血清中に存在する *R. japonica* (strain Aoki), *Rickettsia* sp. strain IO-1 (以下 IO-1), *Rickettsia* sp. strain AT-1 (以下 AT-1) に対する抗体を検出するために、IFA を実施した。抗原には、各リケッチアの持続感染細胞 (L929) 浮遊液をホルマリンで不活化したもの (抗原液) を用いた。まず、アセトンで脱脂し乾燥させた 18 ウエルスライド (Cell-Line/Erie Scientific Co, U.S.A.) の各ウエルに、各抗原液を適量載せた。スライドは室温にて自然乾燥させた後、アセトンで固定した。次に、3% PBS-milk で 20 倍希釈した検体血清をスライドの各ウエルに 40  $\mu$ l ずつ載せた。なお、陽性コントロールとして市販の抗ロッキー山紅斑熱-犬血清 (VMRD, Inc., U.S.A.)、また陰性コントロールとして 3% PBS-milk を用いた。スライドを湿潤箱に入れ 37°C で 30 分間インキュベートした後、0.05% Tween-PBS で 2 回、さらに蒸留水で 1 回洗浄した。スライドを乾燥させ、次に二次抗体として FITC でラベルした抗犬または抗猫 IgG 抗体 (Rockland, U.S.A.) を 3% PBS-milk で 200 倍希釈したものを、40  $\mu$ l ずつ各ウエルに載せた。スライドを湿潤箱に入れ同様の手順でインキュベートし、洗浄後乾燥させた。最後に、スライドを 50% グリセリン-PBS で封入し、蛍光顕微鏡を用いて観察した。本研究では、まず 20 倍希釈した被検血清を用いてスクリーニングを行い、抗原と反応するものについてはさらに 20、40、80、160、320、640 倍と段階希釈して再び IFA を行い、抗体価を測定した。

3) 吸収試験：これまで日本紅斑熱患者が未報告の都道府県において *R. japonica* 抗体が

陽性を示す動物がみられた場合には、特異性を確認するために、被検血清をそれぞれの抗原で 37°C 2 時間反応させることにより吸収操作を行い、再度 I F A を実施した。

2. 北海道のエゾシカおよびマダニを材料としたリケッチア性病原体の分子生物学的検索

1) エゾシカ：2004 年～2006 年に北海道洞爺湖中島、西興部および浦河で捕獲されたエゾシカのうち、末梢血を冷凍保存していた 112 検体を対象とした。末梢血から DNA を分離後、リケッチアについてはクエン酸合成酵素遺伝子 (*glTA*)、アナプラズマとエールリヒアでは 16S rRNA をそれぞれ標的としたスクリーニング PCR を実施した。リケッチア陽性検体については PCR 産物の遺伝子解析により、またアナプラズマ/エールリヒア陽性検体については 16S rRNA の 5' 末端近傍 divergent region を含む遺伝子配列をあらためて解析することにより、感染種を推定した。

2) マダニ：2005 年 5～8 月に北海道十勝地域における複数の牛放牧地および山林において、旗振り法によってマダニ 111 個体を採取した。形態学的に同定後、80 検体を無作為に抽出し、DNA を分離後、リケッチアでは *glTA*、アナプラズマとエールリヒアでは 16S rRNA をそれぞれ標的としたスクリーニング PCR を実施した。リケッチア陽性検体については PCR 産物の遺伝子解析により、またアナプラズマ/エールリヒア陽性検体については 16S rRNA の 5' 末端近傍 divergent region を含む遺伝子配列をあらためて解析することにより、感染種を推定した。

### C. 研究結果

1. 犬と猫を歩哨動物としたリケッチアの全国的調査

1) *R. japonica* については犬 20 頭 (1.7%)

と猫 4 頭 (0.7%) が *R. japonica* に陽性を示した。抗体価は 40 倍から 320 倍の範囲であった。陽性検体は、千葉、神奈川、新潟、静岡、三重、大阪、兵庫、和歌山、山口、香川、徳島、高知、福岡、長崎、宮崎において認められた (図 1)。いっぽう IO-1 については犬 10 頭 (0.8%) と猫 11 頭 (1.9%) が陽性を示した。抗体価は 40 倍から 320 倍までの範囲であった。陽性検体は、青森、新潟、千葉、長野、三重、福井、京都、和歌山、大阪、山口、徳島、高知、長崎、宮崎において認められた。また AT-1 については犬 10 頭 (1.4%) と猫 5 頭 (0.9%) が AT-1 に陽性を示し、抗体価は 40 倍から 320 倍までの範囲であった。陽性検体は、栃木、千葉、神奈川、静岡、長野、三重、和歌山、大阪、兵庫、山口、高知、長崎、宮崎において認められた。

*R. japonica*、IO-1 または AT-1 に陽性を示した動物は、いずれも紅斑熱群リケッチア感染症と直接関係すると思われる発熱、紅斑などの症状は認められなかった。

これらの陽性検体において、2 種類以上のリケッチアに陽性を示した検体が存在した。

なお、年齢、性別、犬種 (または猫種)、マダニ寄生歴、旅行歴、病歴、行動範囲において、各リケッチアに関する陽性検体と陰性検体の間に有意差は認められなかった。

2) 吸収試験：これまで日本紅斑熱患者が未報告の都道府県にうち、新潟、山口および香川県の 3 県において *R. japonica* 抗体が陽性を示す動物がみられたため各種抗原を用いて吸収試験を行った。新潟の陽性検体は最初 Rj, IO-1, AT-1 に対する抗体価がそれぞれ 80, <20, <20 であったものが、Rj 抗原吸収後に、<20, <20, <20 となった。また香川の陽性検体は最初 Rj, IO-1, AT-1 に対する抗体価がそれぞれ 40, <20, <20 であったものが、Rj 抗原吸収後に <20, <20, <20 となった。い

っぼう山口県の陽性検体は最初 Rj, I0-1, AT-1 に対する抗体価がそれぞれ 80, 320, 320 であったものが、Rj 抗原吸収後に、40, 160, 160 となった。

2. 北海道のエゾシカおよびマダニを材料としたリケッチア性病原体の分子生物学的検索：

1) 北海道のエゾシカ末梢血の属特異的 PCR と遺伝子解析の結果、112 検体中 8 検体がリケッチア陽性、また別の 6 検体がアナプラズマ/エールリヒア陽性を示したが、陽性はいずれも洞爺湖の検体であった。PCR 産物の遺伝子解析の結果、リケッチアではすべてが *Rickettsia helvetica* と一致した。いっぼうアナプラズマ/エールリヒアでは 5 検体が *Anaplasma bovis* と、また残り 1 検体は *Ehrlichia muris* と高い相同性を示した。

2) 十勝管内のマダニの属特異的 PCR と遺伝子解析の結果、シュルツェマダニ (Ip) から *R. helvetica* 近縁種および ' *Candidatus Rickettsia tarasevichiae* ' 近縁種の遺伝子断片が、また別の Ip から *E. muris* と遺伝子配列が 100% 一致するものが、さらにヤマトマダニからは *Ehrlichia sp. strain HF* 近縁種が検出された。

#### D. 考察

1. 犬と猫を歩哨動物としたリケッチアの全国的調査：今回の検査では、*R. japonica* に対する抗体陽性を示したのは、犬 20 頭

(1.7%) と猫 4 頭 (0.7%) であった。日本紅斑熱患者の発生は、徳島県で初症例を認めて以降、2005 年末までの間に 23 府県で報告されている。紅斑熱患者の発生地域は年々拡大傾向がみられるが、現在のところ関東以西までにとどまっている。本研究において、*R. japonica* 抗体陽性を示した犬と猫の検体は、

人の紅斑熱患者の発生報告がない新潟、山口、香川でも認められた。

リケッチアの表面抗原の LPS は群特異的であり、主要外膜蛋白 rOmpB は属共通の抗原性を保有するため、リケッチア種間で、血清学的な交差反応がみられることが知られているため、*R. japonica* 抗体陽性検体の一部は、IFA における交差反応によるものであると思われる。

特異性確認のために新潟、山口、香川の陽性検体について、各抗原を用いた吸収試験を行ったところ新潟と香川の陽性検体は、*R. japonica* 抗原吸収後の抗体価が < 20 となり、抗体が *R. japonica* に対するものであったことが示唆された。いっぼう山口県の検体については、*R. japonica* 抗原吸収後でも、抗体価は完全には消失しておらず、また当初の I0-1 および AT-1 に対する抗体価も高値を示したことから、I0-1 または AT-1 に対する抗体を保有していたことが考えられた。

2. 北海道のエゾシカおよびマダニを材料としたリケッチア性病原体の分子生物学的検索：

エゾシカは *R. helvetica*、*A. bovis* および *E. muris* の保菌動物である可能性が示唆された。また道東のマダニは *R. helvetica* 近縁種、' *Candidatus Rickettsia tarasevichiae* ' 近縁種、*E. muris* および *Ehrlichia sp. strain HF* 近縁種等のリケッチア性病原体を保有していることが明らかになった。とくに *R. helvetica* は人への病原性、また *A. bovis* は牛への病原性が知られており、今後人と家畜への影響等を調査する必要があると思われる。

#### E. 結論

1. 犬と猫を歩哨動物としたリケッチアの全国的調査：*R. japonica* に対する抗体陽性 (40

倍以上)を示したのは、犬20頭(1.7%)と猫4頭(0.7%)であった。またこれまで日本紅斑熱患者発生のない地域においても、*R. japonica*に特異的に陽性を示す動物が確認されたことから、今後これらの地域における日本紅斑熱患者の発生に注意する必要があると考えられた。さらにマダニ寄生機会の多い動物を歩哨動物としてマダニ媒介性リケッチア感染症の疫学調査を行うことは有用であると思われた。

2. 北海道のエゾシカおよびマダニを材料としたリケッチア性病原体の分子生物学的検索：エゾシカは*R. helvetica*、*A. bovis*および*E. muris*の保菌動物である可能性が示唆された。また道東のマダニは*R. helvetica*近縁種、'*Candidatus Rickettsia tarasevichiae*'近縁種、*E. muris*および*Ehrlichia* sp. strain HF近縁種等のリケッチア性病原体を保有していることが明らかになった。とくに*R. helvetica*は人への病原性、また*A. bovis*は牛への病原性が知られており、今後人と家畜への影響等を調査する必要があると思われた。

#### F. 健康危険情報

とくになし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 杉村 肇, 坂口真也, 今村圭太, 見山孝子, 島田洋二郎, 坂田義美, 板本和仁, 奥田 優, 猪熊 壽. 犬糸状虫感染症予防に来院した犬のバベシア、ヘモバルトネラおよびエールリヒア感染状況調査. 日本獣医師会雑誌. 59, 267-270, 2006.
- 2) 猪熊 壽. 小動物のリケッチア性疾患 (4) 紅斑熱リケッチア感染症. Small Animal

Clinic. No.143, 4-10, 2006.

- 3) 猪熊 壽. マダニ媒介性疾患. Avant. No. 4, 24-26, 2006.
  - 4) 船津 格, 見山孝子, 平岡博子, 金子直樹, 板本和仁, 水野拓也, 奥田 優, 山本芳美, 猪熊 壽. 山口県における犬の紅斑熱群リケッチア抗体保有状況調査. 山口県獣医学雑誌. (in press)
  - 5) 猪熊 壽. 獣医学からみたダニ起因性疾患. ダニと新興再興感染症(柳原保武監修, 高田・馬原・吉田・岸本・藤田編集, YUKI 書房. 福井. (in press)
  - 6) Chahan B., Jian Z., Jilintai, Tanabe, S., Miyahara, K., Xuan, X., Sato, Y., Moritomo, T., Nogami, S., Mikami, T., Maruyama, S., Inokuma, H. Detection of rickettsial DNA from ticks recovered from domestic cattle in Xinjiang Uygur autonomous region area, China. *Vet. Parasitol.* 144, 184-187, 2007.
  - 7) Inokuma, H., Makino, T., Kabeya, H., Nogami, S., Fujita, H., Asano, M., Inoue, S., Maruyama, S. Serological survey for *Ehrlichia* and *Anaplasma* infection of feral racoons (*Procyon lotor*) in Kanagawa Prefecture, Japan. *Vet. Parasitol.* (in press)
  - 8) Inokuma, H., Ohashi, M., Jilintai, Tanabe, S., Miyahara, K. Prevalence of tick-borne *Rickettsia* and *Ehrlichia* in *Ixodes persulcatus* and *Ixodes ovatus* in Tokachi district, Eastern Hokkaido, Japan. *J. Vet. Med. Sci.* (in press)
- ##### 2. 学会発表
- 1) 猪熊 壽, 大橋美里, 吉林台, 宮原和郎, 田邊茂之. 北海道十勝地域のマダニからのリケッチアおよびエールリヒアDNAの検

- 出. 第 58 回日本衛生動物学会大会, 長崎, 平成 18 年 4 月, 衛生動物 57: Suppl. p. 72.
- 2) 猪熊 壽, 大橋美里, 吉林台, 田邊茂之, 宮原和郎. 十勝地方の公共牧場からの採取したマダニとマダニ媒介性病原体. 平成 18 年度北海道地区三学会, 札幌, 平成 18 年 9 月, 北海道獣医師会雑誌 50 (8), p. 52.
- 3) 猪熊 壽, 清野伸隆, 鈴木正嗣, 梶 光一, 高橋裕史, 井上 智. エゾシカ末梢血からのリケッチアおよびエールリヒアの検出. 第 24 回日本クラミジア研究会・第 13 回リケッチア研究会合同研究発表会, 北九州, 平成

18 年 10 月, 抄録集. P18.

- 4) 田淵正恵, 坂田義美, 宮崎直美, 田邊茂之, 猪熊 壽. 犬と猫における紅斑熱群リケッチアについての全国疫学調査. 第 27 回動物臨床医学会年次大会, 大阪, 平成 18 年 11 月, 一般講演. プロシーディング No. 3, pp 89-93.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

### *Rickettsia japonica* (Aoki)

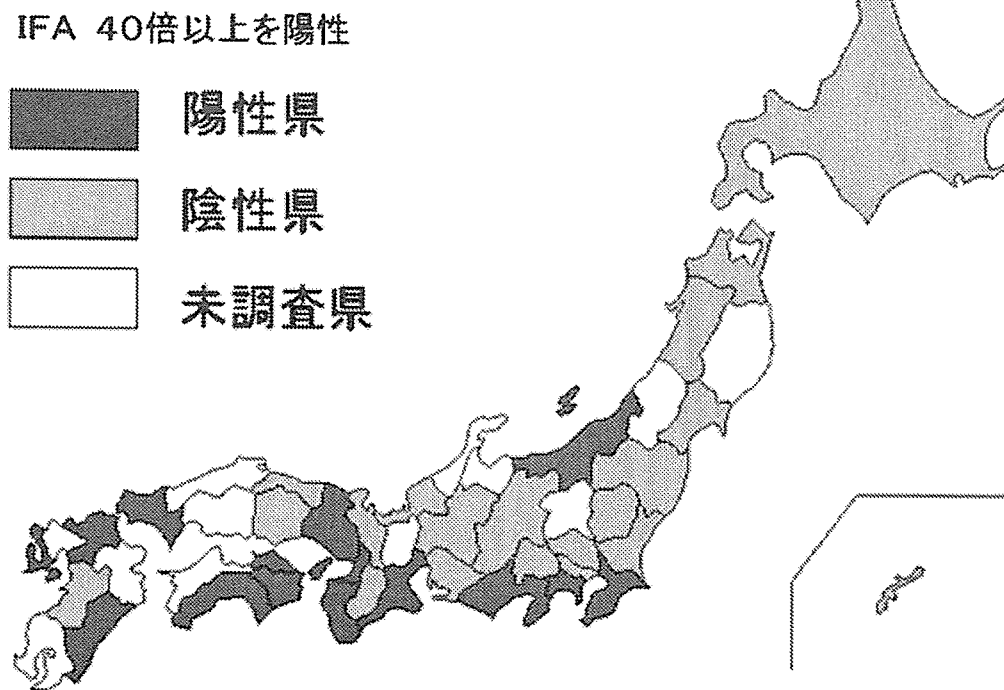


図 1. *Rickettsia japonica* 抗体陽性 (40 倍以上) の犬または猫が検出された都道府県

分担研究報告書

## 鳥類に由来するマダニ材料からのリケッチアの検出

分担研究者	安藤 秀二	国立感染症研究所ウイルス第一部 主任研究官
研究協力者	坂田 明子	国立感染症研究所ウイルス第一部
	藤田 博己	大原総合病院附属大原研究所 (分担研究者)
	鶴見 みや古	財団法人山階鳥類研究所
	尾崎 清明	財団法人山階鳥類研究所
	高野 愛	国立感染症研究所細菌第一部
	川端 寛樹	国立感染症研究所細菌第一部 (分担研究者)
	岸本 壽男	国立感染症研究所ウイルス第一部 (主任研究者)

### 研究要旨

日本国内の紅斑熱群リケッチアには様々な種が存在することが知られており、近年、日本紅斑熱リケッチア (*Rickettsia japonica*) 以外の紅斑熱群リケッチアによる患者の発生の可能性が指摘されている。また、リケッチア症は、自然界においてマダニと野生動物の間に感染サイクルが構築されており、そのサイクルにヒトが侵入、マダニの刺咬によって感染を受け、発症する。このことから、自然界のマダニ、野生動物からの材料を用い、直接リケッチアを検出することは、ヒトの感染の可能性をあらかじめ防ぐ情報を提供するためのハザード・マップの作成に必要な情報を得るために有用である。今回、山階鳥類研究所に協力する全国の関係者から集められた、野生鳥類に関連するマダニからリケッチアの検出、解析を試みた。

### A. 研究目的

日本国内の紅斑熱群リケッチアには様々な種が存在することが報告されており、近年、日本紅斑熱リケッチア (*Rickettsia japonica*) 以外の紅斑熱群リケッチアによる患者の発生の可能性が指摘されている。また、リケッチア症は、自然界においてマダニと野生動物の間に感染サイクルが構築されており、そのサイクルにヒトが侵入、マ

ダニの刺咬によって感染を受け、発症する。このことから、自然界のマダニ、野生動物からの材料を用い、直接リケッチアを検出することは、ヒトの感染の可能性をあらかじめ防ぐための情報を提供するためのハザード・マップの作成に必要な情報を得るために有用である。

日本国内に新たなリケッチアが侵入する経路のひとつとして、渡り鳥よる病原体の



侵入は他の病原体（インフルエンザウイルス、ウエストナイル熱ウイルス、ライム病ボレリア等）においても重要視されており、すでに幾つかの病原体においては、国内侵入における渡り鳥の関与が指摘されている。

## B. 研究方法

### 1) 材料の収集

財団法人山階鳥類研究所ならびに同研究所に協力する全国のバンダー（標識員）によって収集された野鳥に付着、または巣材から得られたマダニを中心とした外部寄生虫についてリケッチア、アナプラズマ、エーリキア遺伝子の保有を検討した（資料「業務委託報告」参照）。

収集された 1000 件を超える材料のうち、形態同定、マダニのミトコンドリア遺伝子の同定が終了し、リケッチアの分離行程に進行することができた 248 個体をリケッチア、アナプラズマ、エーリキアの遺伝子検出に供した。

### 2) 材料の処理

供試したマダニは、1.5mL のチューブ中で破碎し、QIAGEN DNeasy Blood and tissue kit を用いて鋳型 DNA を抽出、PCR を実施した。

### 3) リケッチア遺伝子の検出とシーケンス解析

リケッチア、アナプラズマ、エーリキア遺伝子の検出は表 1 に示す各プライマーを用いて実施した。リケッチアにおいては、R1 と R2 に陽性となったものについて *gltA* 遺伝子と *OmpA* 遺伝子についても PCR を実施し、得られた PCR 産物についてシーケンスを解析し、データベースに登録されている様々なリケッチアと比較検討した。

## C. 研究結果

### 1) PCR によるリケッチア遺伝子の検出

供試した 248 個体のうち、36 個体からリケッチア 17 kDa 蛋白遺伝子が検出された（14.5%、表 2、3、図 1）。陽性となった鳥由来マダニの採集地域の分布は全国に広がるが、各地域で得られたマダニ類材料の採集数に大きな開きがあるため、地域ごとの有意差は求められない（表 2、図 1）。また同様に、マダニ類が付着していた鳥の種類別のリケッチア保有マダニ陽性率も鳥の種類ごとのマダニ供試数に開きがある（表 3）。

アナプラズマとエーリキアの遺伝子は供試した鳥由来マダニ類 248 個体からは検出されなかった。

### 2) シークエンス解析

リケッチア 17 kDa 蛋白遺伝子と *gltA* 遺伝子の解析により得られた系統樹を図 2 及び図 3 に示す。両遺伝子について全てのリケッチア種のデータが登録されていないため、それぞれの系統樹をそのまま比較することはできないが、両遺伝子で種が一致するものを含め様々なリケッチア種の遺伝子が検出された（☆印）。検出されたリケッチア遺伝子を大別すると、*R. canadensis*、*R. tamurae*、*R. helvetica* にそれぞれ近縁のグループに分けられる。紅斑熱リケッチア群の日本紅斑熱リケッチア（*R. japonica*）、ロッキー山紅斑熱リケッチア（*R. rickettsii*）、地中海紅斑熱リケッチア（*R. conorii*）、発疹チフス群の発疹チフスリケッチア（*R. prowazekii*）、発疹熱リケッチア（*R. typhi*）に一致するリケッチア遺伝子は検出されていない。17kDa 遺伝子の登録は無いものの、検討した *gltA* 遺伝子の領域において遺伝子配列が *R. tarasevichiae* に 100% 一致する

ものが多数検出された。

#### D. 考察

リケッチア症は、自然界においてマダニを中心とする様々な節足動物（ベクター）と野生動物の間に感染サイクルが構築されており、そのサイクルにヒトが侵入、マダニの刺咬によって感染を受け、発症する。このことから、自然界のマダニを中心としたベクター、野生動物からの材料を用い、直接リケッチアを検出することは、各地に生息するリケッチア種の正確な情報を提供することになる。また、ヒトのダニ刺咬を予防することで感染リスクをあらかじめ下げること、感染・発症時の迅速かつ適切な治療を可能とするために有用な情報を提供するハザード・マップの作成に必要不可欠である。

今回検討した鳥由来マダニ材料から得られたリケッチア遺伝子の情報は、日本国内に様々なリケッチア種が存在していることを示している。検出されたリケッチア遺伝子は、*R. canadensis*、*R. tamurae*、*R. helvetica* にそれぞれ近縁のグループに大別される。毎年国内で患者が報告される日本紅斑熱リケッチア (*R. japonica*) の他、紅斑熱群リケッチアのロッキー山紅斑熱リケッチア (*R. rickettsii*) や地中海紅斑熱リケッチア (*R. conorii*) に一致するリケッチア遺伝子は検出されていない。今回検討したダニ等のベクターの種別に関する情報は示していないが、発疹熱群リケッチアを媒介するノミやシラミは含まれておらず、国内感染による患者がこれまで報告されている発疹チフス群の発疹チフスリケッチア (*R. prowazekii*)、発疹熱リケッチア (*R. typhi*)

も検出されていない。媒介種と考えられるマダニ類を検索したにもかかわらず、日本紅斑熱リケッチア *R. japonica* が検出できなかったことは、日本紅斑熱患者が報告される関東以西の太平洋岸の材料が今回用いた材料に少なかったことがあげられる。今後、現在日本紅斑熱患者が報告される地域の材料を重点的に収集、解析する必要がある。

今回の調査においても検出された *R. helvetica* は、ヨーロッパにおいて複数の患者報告があるが、その病原性については不明な点が多く、日本でも北海道を含む全国で分離又は遺伝子の検出がされているもののその感染・発症が示唆される症例は一例のみである。*R. helvetica* の病原性を含め、分離株の解析を進める必要がある。

渡り鳥による病原体の侵入は、インフルエンザウイルスやウエストナイル熱ウイルス等の病原体において重要視されており、すでに幾つかの病原体においては、国内侵入における渡り鳥の関与が指摘されている。したがって、日本国内に新たなリケッチアが侵入する経路のひとつの可能性として、渡り鳥の関与を考慮する必要がある。分担研究者らはすでに、アメリカ大陸で検出されたものと同じのリケッチア遺伝子配列をもつリケッチアを国内で検出している。また、検討した *gltA* 遺伝子の領域において遺伝子配列が *R. tarasevichiae* に 100%一致するものが多数検出されたが、*R. tarasevichiae* はロシアにおいて初めて報告され、日本国内では北海道の哺乳動物に付着したマダニからその遺伝子が検出されている。今回、我々が検出した鳥由来のマダニからの同じ遺伝子はすべて北海道において採取されたものからであることから、

鳥に付着したマダニにより国内に新たなリケッチアが侵入する可能性を示唆するものかもしれない。

リケッチア症患者の背景にある自然界に分布するリケッチア種を正確に把握し、これまで患者報告のない地域において不明熱疾患とされていたものから新たなリケッチア症を掘り起こすことが、国内のリケッチア症の正確な把握につながると考えられる。このことは、適切な治療を迅速に開始するための情報ともなりうる。この中で、鳥由来のマダニ材料を用いてリケッチアを網羅的に検索することにより、鳥の移動に伴う国内のリケッチア種の分布、拡大、侵入の可能性も検討することができる。しかしながら、日本国内へのリケッチア侵入の可能性は、渡り鳥のような自然界の動物の移動だけではなく、物品の輸出入にあわせての人為的要因による侵入も考慮する必要があり、様々な生物材料についてリケッチアの検出を試みることは、日本国内のリケッチア症発生の可能性について多くの情報をもたらすものと考えられる。

#### E. 結論

鳥由来のマダニ類より様々なリケッチア遺伝子が検出された。鳥の移動に伴うリケッチアの国内侵入の可能性も示唆され、川由来のマダニは、今回供試しなかった野生哺乳類由来の材料とともに国内の各種リケッチア種の分布状況を考察するために有用な試料と考えられた。このことから、他の野外材料とともに、リケッチア症に関する国内のハザードマップを作成するために、流行地の材料を含めた更なる解析が必要である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Kawabata, H., Ando, S., Kishimoto, T., Kurane, I., Takano, A., Nogami, S., Fujita, H., Tsurumi, M., Nakamura, N., Sato, F., Takahashi, M., Ushijima, Y., Fukunaga, M., Watanabe, H. First Detection of *Rickettsia* in Soft-Bodied Ticks Associated with Seabirds, Japan. *Microbiol. Immunol.*, 50(5): 403-406, 2006

2) 安藤秀二, 岸本寿男。バイオテロリズムとダニ媒介性感染症。柳原保武監修。高田伸弘ほか編 YUKI 書房、p249-255、2007年3月

##### 2. 学会発表

1) Ando, S., Shigematsu, M., Ogawa, M., Kishimoto, T., Trend of Tsutsugamushi Disease in Japan. The 12<sup>th</sup> International Congress on Infectious Disease, Lisbon, Portugal, June 15-18, 2006

2) 安藤秀二 日本のリケッチア感染症の現状－日本紅斑熱を中心に－平成18年度希少感染症診断技術研修会 平成19年2月15日、東京

3) 藤田博己 国内に分布するマダニとリケッチア属 平成18年度希少感染症診断技術研修会 平成19年2月15日、東京

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得・実用新案登録その他

なし

表1. PCR & Sequencing primer

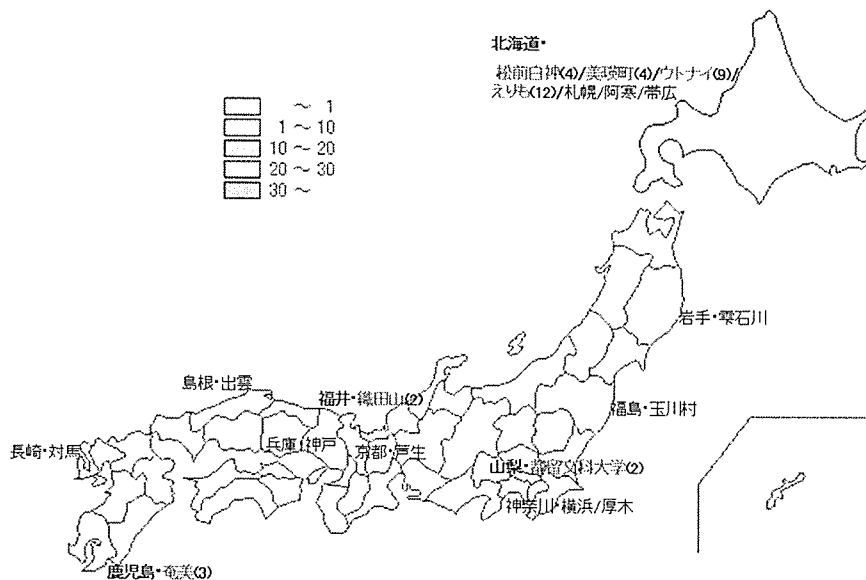
target	primer	primer sequence	reference	comment	
<i>Rickettsia</i>	17kDa	R1	TCAATTCACAACCTTGCCATT	Anderson BE, et al, J Bacteriol, 171(9), 5199-5201, 1989.	rickettsia genus-specific outer membrane antigen
		R2	TTTACAAAATCTAAAAACC		
	<i>ompA</i>	Rr190.70p	ATGGCGAATATTTCTCCAAAA	Noda H et al, AEM, 63(10), 3926-32, 1997	spotted fever group specific 190kDa outer membrane protein A
		Rr190.602n	AGTGCAGCATTGCTCCCCCT		
	<i>gltA</i>	RpCs977p	GGGGGCTGCTCACGGCGG	Regnery RL, et al, J Bacteriol, 173, 1576-1589, 1991	rickettsial citrate synthase gene
RpCs1258n		ATTGCAAAAAGTACAGTGAAC			
<i>Ehrlichia</i>	<i>omp-1</i>	conP28-F1	ATYAGTGSAAARTAYRTRCCAA*	Inayoshi M, et al, Microbiol Immunol, 48(10), 737-745, 2004	1st: conP28-F1 / conP28-R1
		conP28-R1	TTARAARGYAAAAYCTKCCCTCC*		2nd: conP28-F2 / conP28-R2
		conP28-F2	CAATGGRWGGYCCMAGARTAG*		
		conP28-R2	TTCCYTGRGTARGMAAKTTTAGG*		
	<i>groEL</i>			Tabara K, et al. 投稿中	
<i>Anaplasma</i>	<i>p44</i>	p3726	GCTAAGGAATTAGCTTATGA	Kim HY, et al, Clin Diagn Lab Immunol, 9(5), 1079-1084, 2002.	outer membrane protein P44s
		p4257	AGAAGATCATAACAAGCATTG		
		p3761	CTGCTCKGCCAAARACCTC*		1st: p3726 / p4257
		p4183	CAATAGTYTTAGCTAGTAACC*		2nd: p3761 / p4183

\*: M=A,C W=A,T K=G,T  
R=A,G S=C,G Y=C,T

表2. 捕獲地別リケッチア遺伝子陽性率

地名	捕獲数(♀)	陽性数	陽性率		
山梨県	都留文科大学	45	2	4.4%	
福井県	丹生郡越前町	藤田山	51	2	3.9%
鹿児島県	大島郡宇検村湯岳/奄美市名瀬大川河口	奄美	6	3	50%
北海道	松前町白神天狗山	松前白神	26	4	15.4%
北海道	上川郡美瑛町望岳台	美瑛町	12	4	33.3%
北海道	苫小牧市ウトナイ	ウトナイ	24	9	37.5%
北海道	幌泉郡えりも	えりも	69	12	17.4%
島根県	出雲市灘分町斐伊川	出雲	1	0	0%
兵庫県	神戸市北区榎楽茶屋東	大村	1	0	0%
兵庫県	神戸市東灘区北2区六甲山頂	神戸・村田	1	0	0%
京都府	南丹市(旧美山町)芦生	芦生	1	0	0%
岩手県	盛岡市下太田翠石川	翠石川	1	0	0%
長崎県	対馬市上県町弓ノ原仁田川	対馬	1	0	0%
福島県	石川郡玉川村竜崎	玉川村	1	0	0%
神奈川県	厚木市七沢自然保護センター	厚木	1	0	0%
神奈川県	横浜市区上白根町	横浜	2	0	0%
北海道	不明	北海道	1	0	0%
北海道	札幌市南区精野石山	札幌	2	0	0%
北海道	釧路市阿寒 阿寒ツルセンター	阿寒	1	0	0%
北海道	帯広市稲田	帯広	1	0	0%
		248	36	14.5%	

図1. リケッチア遺伝子陽性マダニの分布(全国)



( )内はリケッチア遺伝子陽性マダニ個体数

表3. トリの種類別リケッチア遺伝子陽性率

トリ	捕獲数(羽)	陽性数	陽性率
ノゴマ	26	9	34.6%
ピンズイ	35	7	20%
シマゼンニュー	16	4	25%
クロングミ	38	3	7.9%
アオジ	17	3	17.6%
エゾゼンニュー	4	1	25%
シロハラ	18	3	16.7%
ヤマドリ	34	1	2.9%
イワツバメ	11	1	9.1%
コルリ	7	1	14.3%
ヤブサメ	4	2	50%
アカハラ	2	1	50%
シジュウカラ	6	0	0%
ヤマガラ	1	0	0%
キビタキ	3	0	0%
コヨシキリ	1	0	0%
カシラダカ	1	0	0%
クロジ	6	0	0%
マミチャシナイ	3	0	0%
メボソムシクイ	1	0	0%
トラツグミ	3	0	0%
ノスリ	1	0	0%
センダイムシクイ	2	0	0%
ウグイス	2	0	0%
ヒヨドリ	1	0	0%
ニューナイスズメ	1	0	0%
モズ	1	0	0%
ミヤマホオジロ	1	0	0%
ホオジロ	1	0	0%
?(Bird-1)	1	0	0%
	248	36	14.5%

図2. トリ由来マダニ材料から得られたリケツチア遺伝子の系統樹  
2006年度 (*Rickettsia* 17kDa)

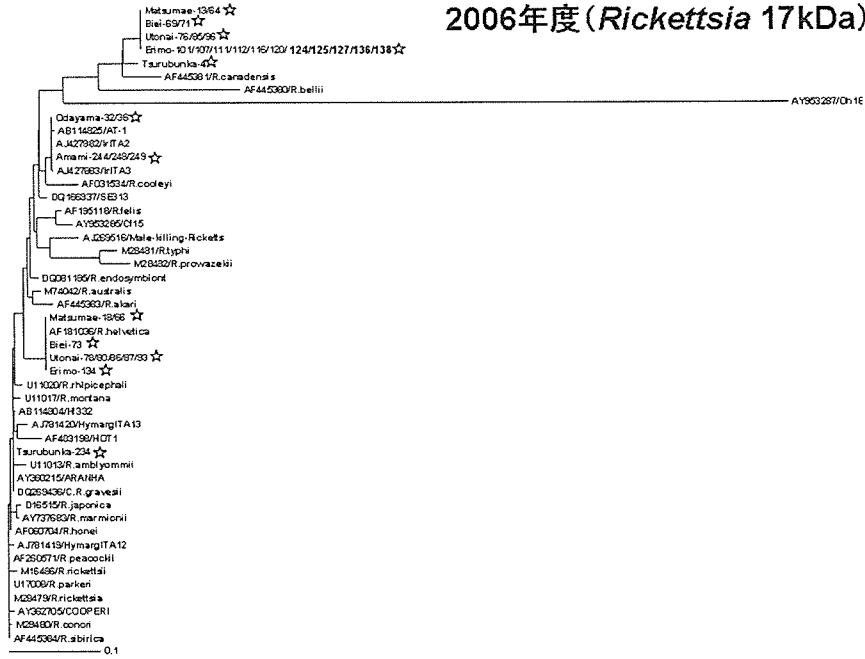
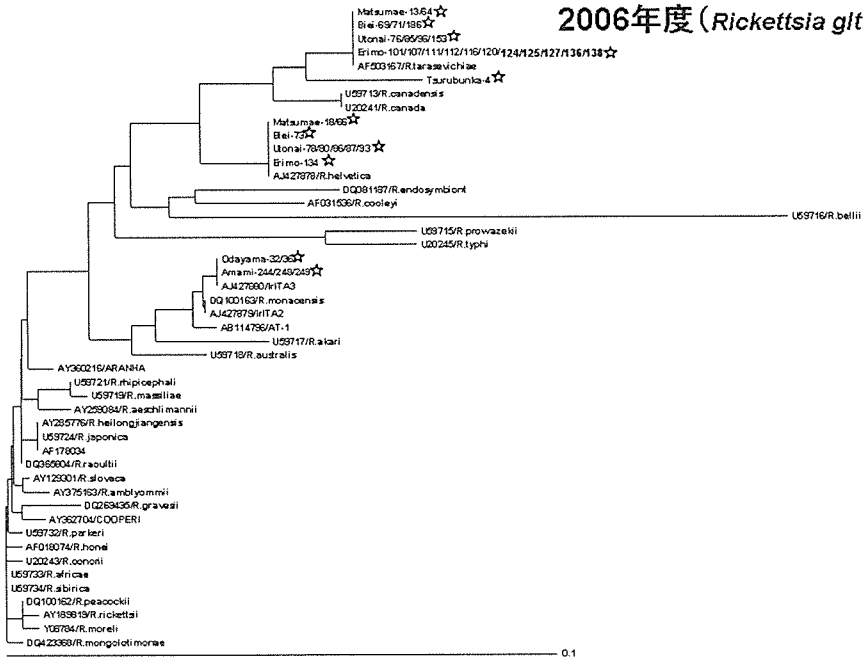


図3. トリ由来マダニ材料から得られたリケツチア遺伝子の系統樹  
2006年度 (*Rickettsia* gltA)



平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)

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  
分担研究報告

リケッチア感染症の国内サーベイランスのまとめおよびサーベイランス改善に関する研究

分担研究者： 岡部信彦 (国立感染症研究所 感染症情報センター長)

研究協力者：佐藤弘、松井珠乃 (国立感染症研究所 感染症情報センター)

研究要旨

2006 年 8 月と 12 月にそれぞれ熊本県および宮崎県の皮膚科医会に所属する医師に対し、つつが虫病、日本紅斑熱などの感染症サーベイランスの認知度と、2005 年の両疾患の診断・届出状況等を調査した。熊本皮膚科医会の回答率は 60% (73/121)、宮崎皮膚科医会は 53% (27/51) であった。熊本皮膚科医会の回答者のうち、感染症法に基づいてサーベイランスが実施されているのを知っていたのは 70%、つつが虫病が全数把握疾患であることを知っていたのは 74%であり、2001 年に熊本皮膚科医会会員に対して実施した調査結果 (順に 28%、26%) と比較すると大きく認知度が上がっている現状が確認できた。一方、日本紅斑熱の認知度は 51%とつつが虫病とくらべるとやや低かった。宮崎県においても、今回の熊本県の調査とほぼ同様の結果が得られた。2005 年には、熊本県の回答者により 7 例がつつが虫病と臨床診断され、うち 3 例が確定診断されて 2 例が届け出られた。宮崎県においては、2 例がつつが虫病と臨床診断され、うち 1 例が確定診断され届け出られた。日本紅斑熱は、同年熊本県では診断例がなく、宮崎県では、1 例が臨床診断・確定診断され、届け出られた。九州地方においては、実際に分離されるつつが虫の株はコマーシャルラボの検査で使われていない株が多く含まれており、また日本紅斑熱はコマーシャルラボにおいては検査が実施されていないため、今後さらに、対象を拡大して両疾患の患者についての診断・届出状況に関する調査を実施したい。

研究目的

断・報告状況について調査を行うこと。

- 1) 熊本県、宮崎県の皮膚科医会に所属する医師におけるつつが虫病・日本紅斑熱などの感染症サーベイランスの認知度や、サーベイランス情報の利用状況について、現状をアンケート調査すること。
- 2) アンケート回答者における、2005 年のつつが虫病・日本紅斑熱症例の診

研究方法

熊本県での調査：皮膚科専門医をもつ熊本県内の勤務医、開業医のほとんどが所属する熊本皮膚科医会会員に対して、2006 年 8 月に郵送でのアンケートの送付・回収を行った。

宮崎県での調査：医師会所属の宮崎県内の皮膚科専門医が所属する宮崎県皮膚科医会会員に

対して、2006年12月に郵送でのアンケートの  
送付・回収を行った。

統計学的解析は、Epi info ver3.3.2 を用いた。

## 研究結果

### 回答率

熊本皮膚科医会：60%（73/121）、宮崎皮膚科医会：53%（27/51）

	熊本皮膚科医会			宮崎皮膚科医会		
	はい (人)	いい え (人)	無回 答 (人)	はい (人)	いい え (人)	無回 答 (人)
1999年4月より、感染症法に基づき、感染症発生動向調査（感染症サーベイランス）が行われていることを知っていた	51 (70%)	22	0	15 (56%)	11	1
つつが虫病が、感染症発生動向調査において、全数把握疾患であることを知っていた	54 (74%)	19	0	19 (70%)	8	0
日本紅斑熱が、感染症発生動向調査において、全数把握疾患であることを知っていた	37 (51%)	36	0	13 (48%)	14	0
感染症発生動向調査の症例情報を見たことがある	34 (47%)	38	1	10 (37%)	17	0

### 感染症発生動向調査情報をどの媒体で見たことがあるか？（複数回答）

	熊本皮膚科医会 (人)	宮崎皮膚科医 会 (人)
国立感染症研究所感染症情報センターホームページ	18	0
医師会の広報誌	10	8
新聞紙上	10	3
地方行政機関ホームページ	2	1
地方行政広報誌	1	0
その他		
医療情報誌	1	1
製薬会社医療情報担当者	1	
県からの感染症週報のメール連絡		1



2005年1月1日から12月31日までの期間につつが虫病と診断された症例とその検査室診断・届出の詳細

熊本県：7例（7医療機関）

医療機関所在地	つつが虫病特異検査の実施機関	保健所への届出の有無	未届けの理由
熊本市	外注検査	あり	
山鹿市	外注検査	あり	
熊本市	外注検査	なし	忘れた
八代市	外注検査	なし	検査陰性
不明	地方衛生研究所	なし	検査陰性
熊本市	未実施	なし	他院へ紹介
大津市	未実施	なし	検査未実施

宮崎県：2例（2医療機関）

医療機関所在地	つつが虫病特異検査の実施機関	保健所への届出の有無	未届けの理由
日南市	地方衛生研究所	あり	
都城市	未実施	なし	検査未実施

2005年1月1日から12月31日までの期間に日本紅斑熱と診断された症例とその検査室診断・届出の詳細

熊本県：なし

宮崎県：1例（1医療機関）

医療機関所在地	つつが虫病特異検査の実施機関	保健所への届出の有無	未届けの理由
宮崎市	地方衛生研究所	あり	

考察

<サーベイランスの認知度>

熊本県皮膚医会の会員に対して、前回実施した同様の調査（回答率66%=69名/105名）において、感染症法に基づいてサーベイランスが実施されているのを知っていたのは28%、つつが虫病が全数把握疾患であることを知っていたのは26%であった。今回の調査において、これらの割合はそれぞれ

70%、74%へと大きく上昇した（ともに  $p<0.01$ ）。新制度導入後の年数の経過とともに、医師の認知度が大きく上がってきた現状が確認できた。

今回の調査について、サーベイランスの認知度について、熊本県と宮崎県で比較すると、法律に基づくサーベイランスの認知度については、宮崎県がやや低かったが、有意な差ではなかった。つつが虫病・日本

紅斑熱それぞれのサーベイランスの認知度についても、2 県でほぼ差がみられなかった。

一方、熊本県、宮崎県それぞれについて、つつが虫病、日本紅斑熱のサーベイランスの認知度を比較してみると、ともに、日本紅斑熱のほうが認知度が低かったが、熊本県においては両疾患の認知度に有意差を認めた ( $p < 0.01$ )。これには、熊本県においては、これまでに日本紅斑熱はきわめてまれとされていること、およびつつが虫病についての前回の調査が影響しているのではないかと考えた。

#### <サーベイランス情報の利用>

サーベイランスの結果の還元状況であるが、両県において新聞や医師会の広報誌など受動的な媒体が有効である状況は、2001年の熊本の調査状況とほとんど変化がないが、熊本県においては、国立感染症研究所感染症情報センター (IDSC) ホームページの閲覧者の数は、2001年の1名からすると18名へと格段に増加しており、これは、インターネットが手近に使えるようになってきたこと、前回の調査による宣伝効果なども要因ではないかと考えた。熊本県と宮崎県において IDSC ホームページの閲覧状況が異なることについては、インターネットの利用状況などの情報がないため、評価が困難である。

#### <つつが虫病・日本紅斑熱の診断報告の現状>

今回の調査においては、両県とも、回答者により診断された症例数が少なく、診断・報告の傾向を解析するにはいたらなかった。ただし、九州地域のつつが虫病は、外注検査で使用されている Kato,

Karp ,Gilliam 株では有意な上昇をみない株によるつつが虫病が高頻度に見られることが知られており<sup>2,3)</sup>この点については、医師に対する継続した注意喚起が必要であると考えます。

#### <まとめ>

両疾患が多発している地域である宮崎県については、今後皮膚科以外の医師を対象を拡大して、同様の調査を行い発生状況を明らかにしていくとともに、同時にサーベイランスについての評価も行っていきたい。

また、全数サーベイランスは 2006 年 4 月より届出様式、届出内容が変更されているため、症例情報がまとまったところで、サーベイランス情報の解析も行う予定である。

#### 謝辞

調査にご協力いただいた、熊本皮膚科医会、宮崎県皮膚科医会の会員の皆様、貴重な助言をいただいた、熊本県保健環境科学研究所、熊本市環境総合研究所、宮崎県衛生環境研究所に深謝します。

- 1) 松井珠乃、大山卓昭、岡部信彦、小野友道：熊本県におけるツツガムシ病の診断・報告の現況—感染症サーベイランスの重要性—、日本皮膚科学会雑誌 112(9),1253-55,2002.
- 2) 山本正悟、川畑紀彦、大浦恭子、村田道里、南嶋洋一：宮崎県における恙虫病患者由来の *Rickettsia tsutsugamushi* の抗原型とその分布、感染症誌、63,109-117, 1989
- 3) 小川基彦、萩原敏且、岸本寿男、志賀

定禰、吉田芳哉、古屋由美子他：わが  
国のツツガムシ病の発生状況、感染症  
誌 75, 353-358, 2001

健康危険情報：なし

研究発表

1. 論文発表：なし
  2. 学会発表：松井珠乃、佐藤弘、岡部信彦、安藤秀二、岸本寿男、坂崎善門、尹 浩信：熊本県内の皮膚科医におけるつつが虫病・日本紅斑熱サーベイランス. 第 190 回日本皮膚科学会熊本地方会, 2006 年 12 月
- 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
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  
分担研究者報告書

九州地域におけるリケッチア感染症の実態調査  
－宮崎県における日本紅斑熱の発生状況および媒介マダニに関して－

分担研究者	山本正悟	宮崎県衛生環境研究所
協力研究者	鈴木 泉	前宮崎県衛生環境研究所
	岩切 章	宮崎県衛生環境研究所
	三浦美穂	宮崎県衛生環境研究所
	井料田一徳	宮崎県衛生環境研究所
	高取一郎	宮崎県衛生環境研究所
	藤田博己	大原総合病院附属大原研究所
	片山 丘	神奈川県衛生研究所
	古屋由美子	神奈川県衛生研究所
	御供田睦代	鹿児島県環境保健センター
	本田俊郎	鹿児島県健康増進課感染症保健係
	田原研司	島根県保健環境科学研究所
	板垣朝夫	前島根県保健環境科学研究所

研究要旨：宮崎県における日本紅斑熱の実態の把握を目的に、患者の発生状況、マダニ相および媒介マダニに関する調査を実施した。宮崎県内では、1984 年以降に 49 例の患者が確認され、このうち 3 例の患者が DIC を呈していた。患者は 8 月をピークに 4 月から 12 月にかけて発生し、5 月にも発生のピークが見られた。60 歳以上の患者が約 7 割を占め、主な感染機会は農作業、山林作業および山菜採りであった。また、マダニの調査により、県内に少なくとも 4 属 12 種のマダニが分布し、チマダニ属の 6 種（キチマダニ、タカサゴチマダニ、ヤマアラシチマダニ、ヒゲナガチマダニ、オオトゲチマダニ）が優勢種であることが確認された。また、キチマダニとフタトゲチマダニがいずれの地域においても優勢で、これらの種に加えて、県中部と南部ではタカサゴチマダニとヤマアラシチマダニが、県北部と西部ではヒゲナガチマダニとオオトゲチマダニが優勢となる傾向が見られた。さらに、県中部で採取されたヤマアラシチマダニとフタトゲチマダニから *Rickettsia japonica* の遺伝子断片が検出され、これらが媒介種と推定された。

#### A. 研究目的

1984 年に馬原らが徳島県で日本紅斑熱の患者を発見して以来、関東以西の各地で患者

の発生が報告されており、九州地区では鹿児島県につぐ患者の発生が宮崎県で報告されている。また、鹿児島県については患者の発生