

表13 2007年度の地域・種類別にみたマダニからの分離株リスト(2006年度報告書以後の追加分を含む)

株名	同定(一部推定)型別	マダニの採集データ				
		発育期	採集対象	採集地	採集年月日	
青森県						
<i>Haemaphysalis flava</i>						
1 Sai 109	<i>Rickettsia canadensis</i>	Nymph	植生	佐井村 橋掛沢	23.IX.2007	
<i>Ixodes monospinosus</i>						
1 Sai 1	<i>Rickettsia helvetica</i>	♀	植生	佐井村あすなろライン峠	03.VIII.2007	
2 Sai 92	<i>Rickettsia helvetica</i>	♀	植生	佐井村あすなろライン峠	23.IX.2007	
3 Sai 93	<i>Rickettsia helvetica</i>	♀	植生	佐井村あすなろライン峠	23.IX.2007	
4 Sai 111	<i>Rickettsia helvetica</i>	♀	植生	佐井村 橋掛沢	23.IX.2007	
5 Sai 125	<i>Rickettsia helvetica</i>	♀	植生	佐井村大佐井川源流の峠	24.IX.2007	
6 Sai 127	<i>Rickettsia helvetica</i>	♀	植生	佐井村大佐井川源流の峠	24.IX.2007	
7 Sai 128	<i>Rickettsia helvetica</i>	♀	植生	佐井村大佐井川源流の峠	24.IX.2007	
<i>Ixodes persulcatus</i>						
1 Sai 72	<i>Rickettsia</i> sp. 未知種	♀	植生	佐井村古佐井川	03.VIII.2007	
2 IP-49	<i>Rickettsia helvetica</i>	Larva	アカネズミ	東通村上田屋	23.IX.2007	
秋田県						
<i>Ixodes monospinosus</i>						
1 IM-27	<i>Rickettsia helvetica</i>	♀	植生	和賀岳	14.VI.2007	
岩手県						
<i>Ixodes monospinosus</i>						
2 IM-28	<i>Rickettsia helvetica</i>	♀	植生	五葉山	15.VI.2007	
山形県						
<i>Ixodes monospinosus</i>						
1 IM-17	<i>Rickettsia helvetica</i>	♀	植生	山形蔵王	02.VI.2007	
2 IM-18	<i>Rickettsia helvetica</i>	♀	植生	山形蔵王	02.VI.2007	
3 IM-19	<i>Rickettsia helvetica</i>	♀	植生	山形蔵王	02.VI.2007	
4 IM-20	<i>Rickettsia helvetica</i>	♀	植生	山形蔵王	02.VI.2007	
5 IM-21	<i>Rickettsia helvetica</i>	♀	植生	山形蔵王	02.VI.2007	
6 IM-22	<i>Rickettsia helvetica</i>	♀	植生	山形蔵王	02.VI.2007	
7 IM-23	<i>Rickettsia helvetica</i>	♀	植生	山形蔵王	02.VI.2007	
8 IM-24	<i>Rickettsia helvetica</i>	♀	植生	山形蔵王	02.VI.2007	
9 IM-25	<i>Rickettsia helvetica</i>	♂	植生	山形蔵王	02.VI.2007	
10 IM-26	<i>Rickettsia helvetica</i>	♂	植生	山形蔵王	02.VI.2007	
福島県						
<i>Ixodes columnae</i>						
1 IC-1	<i>Rickettsia helvetica</i>	Nymph	植生	福島市大笹生	03.XI.2007	
<i>Ixodes nipponensis</i>						
1 IN-1	<i>Rickettsia</i> sp. In56	Nymph	カナヘビ	福島市大作山	15.IV.2007	
2 IN-2	<i>Rickettsia</i> sp. In56	Nymph	カナヘビ	福島市大作山	29.IV.2007	
3 IN-3	<i>Rickettsia</i> sp. In56	Nymph	カナヘビ	福島市大作山	29.IV.2007	
4 IN-4	<i>Rickettsia</i> sp. In56	Nymph	カナヘビ	福島市大作山	29.IV.2007	
5 IN-5	<i>Rickettsia</i> sp. In56	Nymph	植生	福島市小倉寺	24.VI.2007	
6 IN-6	<i>Rickettsia</i> sp. In56	♂	植生	福島市小倉寺	24.VI.2007	
和歌山県						
<i>Haemaphysalis longicornis</i>						
1 LON-139	<i>Rickettsia</i> sp. LON	Larva	植生	田辺市上芳養1	11.VIII.2007	
2 LON-140	<i>Rickettsia</i> sp. LON	Nymph	植生	田辺市上芳養1	11.VIII.2007	
3 LON-141	<i>Rickettsia</i> sp. LON	♀	植生	田辺市上芳養1	11.VIII.2007	
4 LON-142	<i>Rickettsia</i> sp. LON	♀	植生	田辺市上芳養1	11.VIII.2007	
5 LON-143	<i>Rickettsia</i> sp. LON	♀	植生	田辺市上芳養1	11.VIII.2007	
6 LON-144	<i>Rickettsia</i> sp. LON	♂	植生	田辺市上芳養2	11.VIII.2007	
徳島県						
<i>Ixodes monospinosus</i>						
1 IM-31	<i>Rickettsia helvetica</i>	♂	植生	剣山見ノ越	03.X.2007	
香川県						
<i>Haemaphysalis longicornis</i>						
1 LON-145	<i>Rickettsia</i> sp. LON	Larva	植生	山本町薬師峠	05.X.2007	
鹿児島県						
<i>Ixodes asanumai</i>						
1 IA-13	<i>Rickettsia</i> sp. In56	♀	植生	トカラ列島口之島	13.I.2008	
2 IA-14	<i>Rickettsia</i> sp. In56	♀	植生	トカラ列島口之島	13.I.2008	
3 IA-15	<i>Rickettsia</i> sp. In56	♀	植生	トカラ列島口之島	13.I.2008	
4 IA-16	<i>Rickettsia</i> sp. In56	♀	クマネズミ	トカラ列島口之島	13.I.2008	
鹿児島県						
<i>Ixodes asanumai</i>						
1 IA-3	<i>Rickettsia</i> sp. In56	♂	植生	トカラ列島悪石島上村	14.XII.2007	
2 IA-4	<i>Rickettsia</i> sp. In56	♀	植生	トカラ列島悪石島上村	14.XII.2007	
3 IA-5	<i>Rickettsia</i> sp. In56	♀	植生	トカラ列島悪石島上村	14.XII.2007	
4 IA-6	<i>Rickettsia</i> sp. In56	♂	植生	トカラ列島悪石島上村	14.XII.2007	
5 IA-7	<i>Rickettsia</i> sp. In56	♀	植生	トカラ列島悪石島浜	15.XII.2007	
6 IA-8	<i>Rickettsia</i> sp. In56	♀	植生	トカラ列島悪石島浜	15.XII.2007	
7 IA-9	<i>Rickettsia</i> sp. In56	♀	植生	トカラ列島悪石島浜	15.XII.2007	
8 IA-10	<i>Rickettsia</i> sp. In56	♀	植生	トカラ列島悪石島浜	15.XII.2007	
9 IA-11	<i>Rickettsia</i> sp. In56	♂	植生	トカラ列島悪石島浜	15.XII.2007	
10 IA-12	<i>Rickettsia</i> sp. In56	♂	植生	トカラ列島悪石島浜	15.XII.2007	
鹿児島県						
<i>Ixodes asanumai</i>						
1 IA-1	<i>Rickettsia</i> sp. In56	Nymph	ヘリグロヒメトカゲ	トカラ列島宝島	26.VII.2007	
2 IA-2	<i>Rickettsia</i> sp. In56	Nymph	ヘリグロヒメトカゲ	トカラ列島宝島	26.VII.2007	
鹿児島県						
<i>Amblyomma testudinarium</i>						
1 AT-94	<i>Rickettsia tamurae</i>	Nymph	ケナガネズミ	赤土山	28.III.2007	
2 AT-95	<i>Rickettsia tamurae</i>	Nymph	植生	龍郷町自然観察の森	24.VII.2007	
3 AT-96	<i>Rickettsia tamurae</i>	Nymph	植生	龍郷町自然観察の森	24.VII.2007	

次に今回の調査におけるマダニ種と分離リケッチア（カッコ内）を一覧した。

1. タカサゴキラマダニ (*Rickettsia tamurae*)
2. オウシマダニ
3. タイワンカクマダニ
4. ツノチマダニ
5. キチマダニ (*Rickettsia canadensis*)
6. タカサゴチマダニ
7. ヤマアラシチマダニ
8. ヤマトチマダニ
9. ヒゲナガチマダニ
10. フタトゲチマダニ (*Rickettsia* sp. LON type)
11. マゲシマチマダニ
12. オオトゲチマダニ
13. アサヌマダニ (*Rickettsia* sp. In 56 type)
14. ハシプトマダニ (*Rickettsia helvetica*)
15. ミナミネズミマダニ
16. ヒトツトゲマダニ (*Rickettsia helvetica*)
17. タネガタマダニ (*Rickettsia* sp. In56 type)
18. ヤマトマダニ
19. シュルツエマダニ (*Rickettsia helvetica*)
(*Rickettsia* sp. Sai 72)
20. タヌキマダニ
21. アカコッコマダニ
22. *Ixodes* sp. NS

論文発表

御供田睦代, 松山茂樹, 石谷完二, 上野伸広,
久保園祥子, 蔵元 強, 坂元修治, 大橋典
男, 川森文彦, 田原研司, 角坂照貴, 川端
寛樹, 藤田博己, 宮田義彦: 鹿児島県奄美
地方におけるリケッチア等病原体検索. 鹿児
島県環境保健センター所報, 8: 90-91,
2007.
藤田博己: イノシシのダニとダニ媒介性感染

症検査. 田辺鳥獣害調査研究報告 (田辺鳥
獣害対策協議会編), 27-32, 2007.

学会発表

阿部茂俊, 谷村 忍, 辻 幸太, 藤田博己,
山本正悟, 堤 寛, 安藤勝彦, 鎮西康雄:
三重県志摩半島のリケッチア感染症: 日本
紅斑熱の症例. 第 59 回日本衛生動物学会大
会. 2007 年 4 月, 大阪.
高田伸弘, 矢野泰弘, 岩崎博道, 藤田博己,
鎮西康雄: 新たに紅斑熱多発地とみなされ
た三重県志摩半島におけるベクター調査
(予報). 第 59 回日本衛生動物学会大会.
2007 年 4 月, 大阪.
高野 愛, 安藤秀二, 坂田明子, 岸本寿男, 倉
根一郎, 渡邊治雄, 鶴見みや古, 仲村 昇,
佐藤文男, 高橋 守, 中村 豊, 福長将仁,
藤田博己, 川端寛樹: *Carios* 属ダニの病原
体ベクターとしてのリスク評価. 第 54 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. 2007 年 9 月, 仙台.
安藤秀二, 坂田明子, 高野 愛, 川端寛樹, 藤
田博己, 宇根有美, 五箇公一, 岸本寿男:
爬虫類寄生ダニ類からのリケッチアの検出.
第 54 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. 2007 年 9 月, 仙台.
藤田博己, 高田伸弘, 川端寛樹, 田原研司,
高野 愛, 山内健生, 川森文彦: 東北地方中
部のマダニ相とマダニ保有リケッチア検査.
第 54 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. 2007 年 9 月, 仙台.
藤田博己, 安藤秀二, 川端寛樹: 福島市の山
林におけるタネガタマダニの紅斑熱群リケ
ッチア保有状況調査. 第 54 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.
2007 年 9 月, 仙台.

獣医学領域からのリケッチア感染サーベイランス

分担研究者	猪熊 壽	帯広畜産大学畜産学部獣医学科	教授
研究協力者	松本高太郎	帯広畜産大学畜産学部獣医学科	助教
	古林与安志	帯広畜産大学畜産学部獣医学科	准教授
	石井三都夫	帯広畜産大学大動物特殊疾病研究センター	准教授
	秦 寛	北海道大学北方圏フィールド科学センター	准教授
	近藤誠司	北海道大学北方圏フィールド科学センター	教授
	鈴木正嗣	岐阜大学生物資源科学部	教授
	奥田 優	山口大学農学部獣医学科	准教授
	遠藤泰之	鹿児島大学農学部獣医学科	准教授
	松鶴 彩	鳥取大学農学部獣医学科	助教
	亘 敏広	日本大学生物資源科学部獣医学科	准教授
	松川義昌	沖縄県家畜衛生試験場	場長
	大城 守	沖縄県家畜衛生試験場	主任研究員
	井出直樹	徳島県動物病院開業	獣医師
	吉林台	帯広畜産大学畜産学部	外国人研究員
	佐鹿万里子	岐阜大学大学院連合獣医学研究科	大学院生
	清野信隆	帯広畜産大学畜産学部獣医学科	学生
	村田征周	帯広畜産大学畜産学部獣医学科	学生
	田川道人	帯広畜産大学畜産学部獣医学科	学生
	久保田直樹	帯広畜産大学畜産学部獣医学科	学生

研究要旨：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した。1. *Rickettsia japonica* の犬に対する病原性の検討：*R. japonica* Aoki 株の犬への実験感染では、接種後に一過性の体温上昇、白血球増多および血小板減少症がみられたが、健康な犬に対して強い病原性を示すとはいえなかった。抗体価上昇および一過性に末梢血中からリケッチアが検出されたことから、犬はJ S Fの保菌動物となり得る可能性が示唆された。2. 家畜と野生動物のリケッチア類感染状況調査：北海道および沖縄県の放牧牛から *Anaplasma phagocytophilum* および *Anaplasma bovis* DNA が検出され、わが国の牛にもこれら病原体が感染していることが初めて示されたが、牛に対する病原性については不明であった。またベクターおよび保菌動物についても不明な点が多かった。さらに北海道のエゾシカは *A. phagocytophilum* および *A. bovis* のほか、*Rickettsia asiatica* の保菌動物となる可能性が考えられた。3. 全国の飼育犬末梢血、北海道におけるアライグマおよびエゾタヌキ末梢血を採材した。

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、リケッチア感染の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疫

学的役割を解明することを目的とする。とくに本年度は次の2項目について重点的に研究を実施した。

1. 日本紅斑熱病原体 *Rickettsia japonica* の犬に対する病原性の検討

昨年度の調査結果から、わが国の犬は *R. japonica* に対する特異的な抗体を保有しており、同病原体に感染する可能性が示唆された。また日本紅斑熱 (JSF) 流行地である徳島県においては JSF 患者の飼い犬が急死し、その腎臓から JSF 抗原が検出されたことが報告されている。しかしながら、JSF 伝播における犬の疫学的役割および感染性については不明である。このため本研究では、①実験感染系、および②各種疾患犬末梢血を用いた疫学調査により *R. japonica* の犬に対する病原性を明らかにすることを目的とした。

2. 家畜と野生動物のリケッチア類感染状況調査

家畜と野生動物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疫学的役割を解明するため、北海道の放牧牛、エゾシカ、エゾタヌキおよびアライグマのリケッチア性病原体感染状況について分子生物学的手法を用いて検索することとした。また沖縄県では家畜伝染病である赤血球寄生 *Anaplasma* 種の存在が知られているため、定期的に放牧牛の *Anaplasma* 感染状況を調査しているが、今回偶発的に *Anaplasma phagocytophilum* および *Anaplasma bovis* DNA が検出されたため、その性状を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. *Rickettsia japonica* の犬に対する病原性の検討

(1) 犬への感染実験

帯広畜産大学バイオセーフティレベル3の実験動物施設において、临床上健康なビーグル犬2頭に対し、L929細胞で増殖させた *R. japonica* Aoki 株を実験的に皮下接種し、臨床症状、CBCおよび抗体価を経時的にモニターするとともに、末梢血と脾臓・腎臓のFNAサンプルからPCRにより病原体の検出を試みた。なお接種12日後からドキシサイクリン投与による治療を行い、以降は6週目まで臨床症状と抗体価の観察だけを行った。

(2) 全国の犬末梢血を用いた犬のJSF感染に関する調査

調査は2007年4月から2007年10月に全国の個人および大学動物病院に協力を求めて犬末梢血を収集した。なお対象動物は外出のある犬に限り、健康動物および不明熱または腎不全を呈した症例とした。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することとした。末梢血からは、DNAを分離しPCRによりSFGおよびエールリキア類のスクリーニングを行った。

2. 家畜と野生動物のリケッチア類感染状況調査

(1) 北海道の放牧地に侵入するエゾシカと放牧牛の調査

北海道大学北方圏フィールド科学センター静内研究牧場内牛放牧地で捕獲されたエゾシカ22検体(2005から2006年)および同放牧地に放牧中の牛の血清及び末梢血を材料とした。なお牛材料の採取は2007年7月と11月に実施し、それぞれ83頭および78頭から採材した。血清学的検索は間接蛍光抗体法により *R. helvetica* および *A. phagocytophilum* に対する抗体の有無を検索した。なお *A. bovis* に対する抗体は抗原が入手できないため実施し

なかった。また末梢血から DNA を分離後、16S rRNA 遺伝子を標的とする *A. phagocytophilum* および *A. bovis* にそれぞれ特異的な nested PCR を実施した。さらに、*Rickettsia* 属特異的 PCR についても実施した。PCR 陽性検体については 16S rRNA 遺伝子の解析を行った。

(2) 北海道におけるエゾタヌキ・アライグマの調査

紅斑熱リケッチアおよびエーリキア類の感染状況を調査するため、平成 19 年 4~10 月に北海道道央地方においてアライグマおよびエゾタヌキを捕獲し、末梢血を採取した。

(3) 沖縄県与那国島の放牧牛からの *A.*

phagocytophilum および *A. bovis* DNA の偶発的検出

2006 年 7 月、沖縄県与那国島で放牧飼育される黒毛和種牛 15 頭のうち、1 頭がタイレリア症のため貧血を呈した。鑑別診断のため赤血球感染性 *Anaplasma* (*A. marginale* および *A. centrale*) および近縁の *Anaplasma* の検索を分子生物学的に行った。検索は種特異的 PCR および属特異的 PCR 陽性検体の遺伝子解析により実施した。

C. 研究結果

1. *R. japonica* の犬に対する病原性の検討

(1) 犬への感染実験

体温は 2 頭とも Day1-5 にかけて、それぞれの犬の平熱に比較して上昇傾向を示したが、発熱 (39.5℃以上) に至ることはなかった (図 1)。皮膚における紅斑の出現は観察期間を通じて認められなかった。食欲元気等の一般状態にも変化はなかった。1 頭の犬で Day 4~9 に嘔吐がみられた。血液検査では 2 頭中 1 頭で Day2, 4, 7, 9 に白血球数増加がみられた。また接種した 2 頭では Day2 と 4 に血小板数の一過性減少傾向が認められたが、いずれも

基準値内での変化であった。末梢血から DNA を抽出し *gltA* を標的とした nested PCR を実施したところ、2 頭中 1 頭で Day2, 7, 9 に極めて弱い陽性バンドが認められた。Day13 に実施された脾臓と腎臓の FNA サンプル PCR はいずれも陰性であった。抗体価は 1 頭では 3 週目で 320 倍を示すまで上昇し、4 週目から下降した (図 2)。他の 1 頭では 2~4 週目に 80 倍の抗体価を示して、6 週間には下降した。

(2) 全国の犬末梢血を用いた犬の JSF 感染に関する調査

全国 32 都道府県 (北海道、青森、宮城、福島、栃木、茨木、埼玉、東京、千葉、神奈川、新潟、静岡、山梨、福井、愛知、三重、滋賀、大阪、京都、奈良、和歌山、兵庫、鳥取、島根、山口、香川、徳島、愛媛、高知、福岡、大分、熊本) の個人開業動物病院および大学動物病院の協力を得て約 1500 頭の犬末梢血を収集した。現在データ整理および末梢血から DNA を抽出中である。

2. 家畜と野生動物のリケッチア類感染状況調査

(1) 北海道の放牧地に侵入するエゾシカと放牧牛の調査

① 2007 年 7 月の調査

a) *R. helvetica*

抗体検査ではエゾシカ 15 頭 (68.2%) および牛 8 頭 (9.6%) が陽性を示し、牛もリケッチアに感染する可能性が考えられた。リケッチア属特異的 Nested PCR では、エゾシカ 14 頭 (63.6%) が陽性を示し、無作為に抽出した 3 検体の遺伝子解析の結果は *R. helvetica* よりもむしろ *Rickettsia asiatica* と近縁であった。牛検体はすべてリケッチア PCR 陰性であった。

b) *A. phagocytophilum*

抗体検査ではエゾシカ 16 頭 (72.7%) が陽性

を示したが、牛は全頭陰性であった。また種特異的 PCR では、エゾシカ 10 頭(45.5%)が陽性であったが、牛ではすべて陰性であった。

c) *A. bovis*

種特異的 PCR でエゾシカ 5 頭(22.7%)が陽性を示し、牛でも 3 頭(3.6%)が陽性を示した。

②11 月の調査

a) *A. phagocytophilum*

種特異的 PCR で牛 1 頭(1.3%)が陽性を示した。陽性牛の臨床症状は特に認められなかった。遺伝子解析により、この陽性検体の 16S rRNA 部分配列は、以前報告されたエゾシカ由来 *A. phagocytophilum* と高い相同性を示した。また、これらは欧米株とは別の clade を形成していた。

b) *A. bovis*

種特異的 PCR により、牛 12 頭(15.4%)が陽性を示した。このうち牛 1 頭は同時に *A. phagocytophilum* にも陽性を示していた。*A. bovis* 陽性牛にもとくに臨床症状は認められなかった。16S rRNA 遺伝子の部分配列解析では島根県のニホンジカから検出された *A. bovis* と 100%一致した。

(2) 北海道におけるエゾタヌキ・アライグマの調査

10 月末までにアライグマ約 200 頭およびエゾタヌキ約 20 頭を捕獲した。現在末梢血から DNA を分離中である。

(3) 沖縄県与那国島の放牧牛からの *A.*

phagocytophilum および *A. bovis* DNA の偶発的検出

与那国島の放牧黒毛和種牛 15 頭のうち、12 頭(80.0%)が *A. phagocytophilum* 種特異的 PCR で陽性を、また 8 頭(53.3%)が *A. bovis* 種特異的 PCR で陽性を示した。うち 6 頭(40.0%)は両方に陽性を示した。*A. marginale* および *A. centrale* に対してはすべて陰性であった。遺伝子解析の結果、与那国島牛由来 *A.*

phagocytophilum は本州・北海道のニホンジカ由来 *A. phagocytophilum* と高い相同性を示し、また与那国島牛由来 *A. bovis* の遺伝子解析でも本州と北海道のニホンジカ由来 *A. bovis* との相同性が高かった(図 3)。

D. 考察

1. *R. japonica* の犬に対する病原性の検討

(1) 犬への感染実験

今回の感染実験では、接種後の犬には一過性の体温上昇、白血球増多、および血小板減少症がみられたが、少なくとも培養増殖させた *R. japonica* Aoki 株が、健康な犬に対して強い病原性を示すとはいえなかった。なお 1 頭の犬で Day 4~9 に嘔吐がみられたが、接種との関係は不明であった。抗体価の上昇および一過性に末梢血中にリケッチアが出現したことから、犬は J S F の保菌動物となり得る可能性が示唆された。今後、免疫抑制状態の犬への接種、あるいは感染マダニを用いるなど接種ルートについても検討することが必要と考えられた。

(2) 各種疾患犬末梢血を用いた犬の J S F 感染に関する調査

現時点で結果が出ていないため早急に PCR 検査を行う必要がある。

2. 家畜と野生動物のリケッチア類感染状況調査

(1) 北海道の放牧地に侵入するエゾシカと放牧牛の調査

a) *R. helvetica*

抗体検査の結果より、エゾシカだけでなく、牛も紅斑熱リケッチアに感染する可能性が考えられた。なおリケッチア属特異的 Nested PCR で陽性を示した検体の遺伝子解析結果は *R. helvetica* よりもむしろ *Rickettsia asiatica* と近縁であった。昨年度は道内の別の場所(洞

爺湖)において *R. helvetica* DNA が検出されており、エゾシカは *R. helvetica* だけではなく、*R. asiatica* の保菌動物となる可能性が考えられた。なお牛検体はすべて S F G リケッチア PCR 陰性であり、牛のこれら病原体に対する感受性が低いことが考えられた。

b) *A. phagocytophilum*

牛およびエゾシカ末梢血から検出された *A. phagocytophilum* は、遺伝子解析の結果いずれの陽性検体も以前に報告されたエゾシカ由来 *A. phagocytophilum* と一致、または高い相同性を示した。欧州においては *A. phagocytophilum* は牛の放牧熱病原体として知られているが、今回の陽性牛には特に臨床症状が認められておらず、わが国で検出された *A. phagocytophilum* は牛に対する病原性は低いものと考えられた。なお、PCR 検査、抗体検査ともにエゾシカ陽性率に対し、牛の陽性率は極めて低く、我が国の *A. phagocytophilum* は牛に対する感受性も低い可能性が考えられた。

なお本病原体は欧米では人や馬での感染例も報告されているため、今後我が国においては牛のみならず、人や馬に関しても *A. phagocytophilum* 感染の臨床症状の発現等、病原性との関連について注意するとともに、ベクターの確定や浸潤状況を明らかにする必要があると思われた。

c) *A. bovis*

11月の検査で、種特異的 PCR では牛の陽性率はエゾシカ陽性率と比べて有意差は認められなかった。12頭(15.4%)の陽性牛のうち牛1頭は *A. phagocytophilum* にも陽性を示した。*A. bovis* 陽性牛にもとくに臨床症状は認められなかった。遺伝子解析でニホンジカから検出された *A. bovis* と100%一致した。*A. bovis* は我が国の牛からは初めての検出であり、獣医学領域では今後症状等病原性との関連につ

いて注意する必要があると思われた。

(2) 北海道におけるエゾタヌキ・アライグマの調査

現時点で結果が出ていないため早急に PCR 検査を行う必要がある。

(3) 沖縄県与那国島の放牧牛からの *A.*

phagocytophilum および *A. bovis* DNA の偶発的検出

沖縄県与那国島の黒毛和種放牧牛から *A. phagocytophilum* および *A. bovis* DNA が偶発的に検出された。これらの牛は軽度の貧血・血小板減少症を呈していたが、貧血や血小板減少症を引き起こすタイレリア原虫に重感染していたため、今回検出されたアナプラズマ病原体の牛に対する病原性は不明である。*A. phagocytophilum* は欧米では北方系の *Ixodes* 属マダニによって媒介される病原体であり、今回亜熱帯地方の牛から *A. phagocytophilum* が検出されることは予期されなかった。今後与那国島を含む亜熱帯地域における *A. phagocytophilum* のベクター、保菌動物等について検索する必要があると思われた。

E. 結論

1. *R. japonica* の犬に対する病原性の検討

今回行った犬への *R. japonica* Aoki 株感染実験では、接種後に一過性の体温上昇、白血球増多、および血小板減少症がみられたが、健康な犬に対して強い病原性を示すとはいえなかった。抗体価上昇および一過性に末梢血中からリケッチアが検出されたことから、犬は J S F の保菌動物となり得る可能性が示唆された。

2. 家畜と野生動物のリケッチア類感染状況調査

北海道および沖縄県の放牧牛から *A.*

phagocytophilum および *A. bovis* DNA が検出され、わが国の牛にもこれら病原体が感染すること初めて示されたが、牛に対する病原性については不明であった。またベクターおよび保菌動物についても不明な点が多かった。さらに北海道のエゾシカからは

A. phagocytophilum および *A. bovis* のほか、*R. asiatica* が検出され、エゾシカはこれら病原体の保菌動物となる可能性が考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Inokuma, H.: Vectors and reservoir hosts of Anaplasmataceae. In: Rickettsial Diseases (Raoult D. & Parola P. Eds.) 2007. p199-212. Taylor & Grancis Group, LLC. New York.
- 2) Brouqui, P., Matsumoto, K.: Bacteriology and Phylogeny of Anaplasmataceae. (Raoult D. & Parola P. Eds.) 2007. P188-198. Taylor & Grancis Group, LLC. New York.
- 3) Inokuma, H., Ohashi, M., Jilintai, Tanabe, S., Miyahara, K. 2007. Prevalence of tick-borne *Rickettsia* and *Ehrlichia* in *Ixodes persulcatus* and *Ixodes ovatus* in Tokachi district, Eastern Hokkaido, Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 69 (6): 661-664.
- 4) Tabuchi, M., Jilintai, Sakata, Y., Miyazaki, N., Inokuma, H. Serological survey of *Rickettsia japonica* infection in dogs and cats in Japan. *Clin. Vac. Immunol.* 14(10): 1526-1528 (2007)
- 5) Tamamoto, C., Seino, N., Jilintai, Suzuki, M., Kaji, K., Takahashi, H., Inokuma, H. Detection of *Ehrlichia muris* DNA from sika deer (*Cervus nippon yesoensis*) in Hokkaido, Japan. *Vet. Parasitol.* 150. 370-373 (2007)
- 6) Inokuma H., Seino, N., Suzuki, M., Kaji, K., Takahashi, H., Inoue, S. 2008. Detection of *Rickettsia helvetica* DNA from peripheral

blood of sika deer (*Cervus nippon yesoensis*) in Japan. *J. Wildl. Dis.* (in press)

- 7) 猪熊 壽. 犬と猫の血清を用いた日本紅斑熱リケッチアの疫学調査. 2007. *Avant.* No.8. 6-8.

2. 学会発表

- 1) 猪熊 壽, 玉本智枝, 清野伸隆, 田邊茂之, 早川大輔, 鈴木正嗣, 梶 光一, 高橋裕史, 伊吾田宏正, 井上 智. エゾシカ末梢血からの *Rickettsia helvetica*, *Anaplasma bovis* および *Ehrlichia muris* DNA の検出. 第 143 回日本獣医学会講演要旨集, p.200. 2007 年 4 月
- 2) 清野伸隆, 田川道人, 早川大輔, 鈴木正嗣, 秦 寛, 近藤誠司, 猪熊 壽. 牛放牧地で捕獲されたエゾシカ末梢血からのヘモプラズマおよびアナプラズマ DNA の検出. 第 144 回日本獣医学会講演要旨集, p.143. 2007 年 9 月
- 3) 吉林台, 清野伸隆, 早川大輔, 鈴木正嗣, 秦 寛, 近藤誠司, 松本高太郎, 猪熊 壽. 牛放牧地で捕獲されたエゾシカおよび放牧中の牛におけるアナプラズマおよびリケッチアの検出. 第 25 回日本クラミジア研究会・第 14 回リケッチア研究会合同研究発表会抄録集. P22. 2007 年 10 月
- 4) 猪熊 壽, 清野伸隆, 吉林台, 松本高太郎, 早川大輔, 鈴木正嗣, 秦 寛, 近藤誠司. 放牧牛末梢血からの *Anaplasma bovis* DNA の検出. 日本産業動物獣医学会. 平成 19 年度日本獣医師会学会年次大会 (高松) 講演要旨集. P. 2008 年 2 月
- 5) 猪熊 壽, 清野伸隆, 吉林台, 早川大輔, 鈴木正嗣, 秦 寛, 近藤誠司, 松本高太郎, 横山直明. 北海道の放牧牛からの *Anaplasma phagocytophilum* および *Anaplasma bovis* DNA の検出. 日仏獣医学会 第 38 回定例研究会. 2008 年 2 月

6) 猪熊 壽. ダニーその生態と媒介微生物の多様性. 第145回日本獣医学会 - 公衆衛生学分科会企画シンポジウム「わが国で問題となるダニ媒介性人獣共通感染症」2008年3月

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

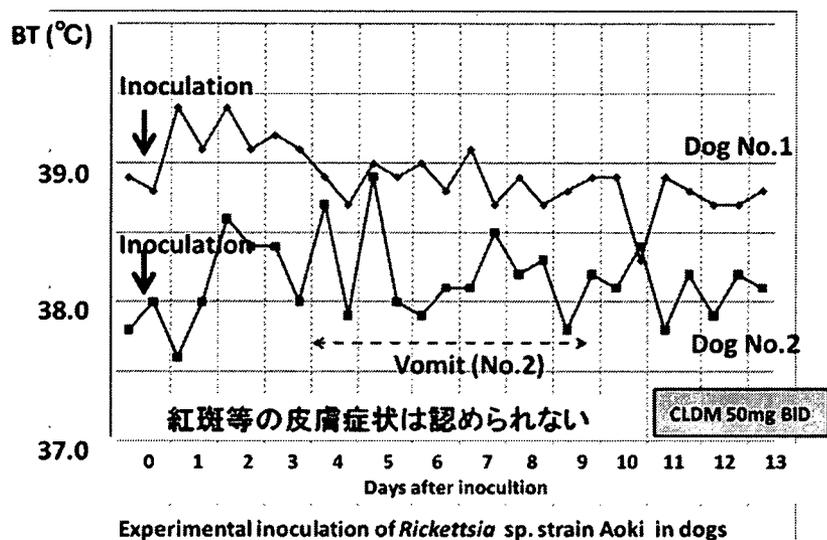


図1：犬に対する *R. japonica* の病原性の検討 - *R. japonica* 実験接種後の体温の変化。体温は2頭とも Day1-5 にかけて上昇傾向を示したが、発熱（39.5℃以上）に至ることはなかった

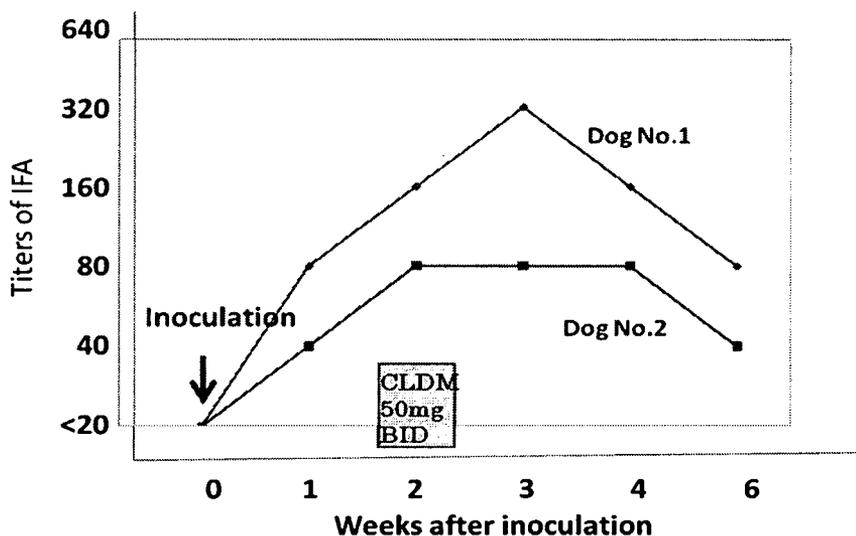


図2：犬に対する *R. japonica* の病原性の検討 - *R. japonica* 実験接種後の抗体価の推移。抗体価は1頭では3週目で320倍を示すまで上昇し、4週目から下降した。他の1頭では2～4週目に80倍の抗体価を示して、6週後には下降した。いずれも2週目に抗生物質投与を行った。

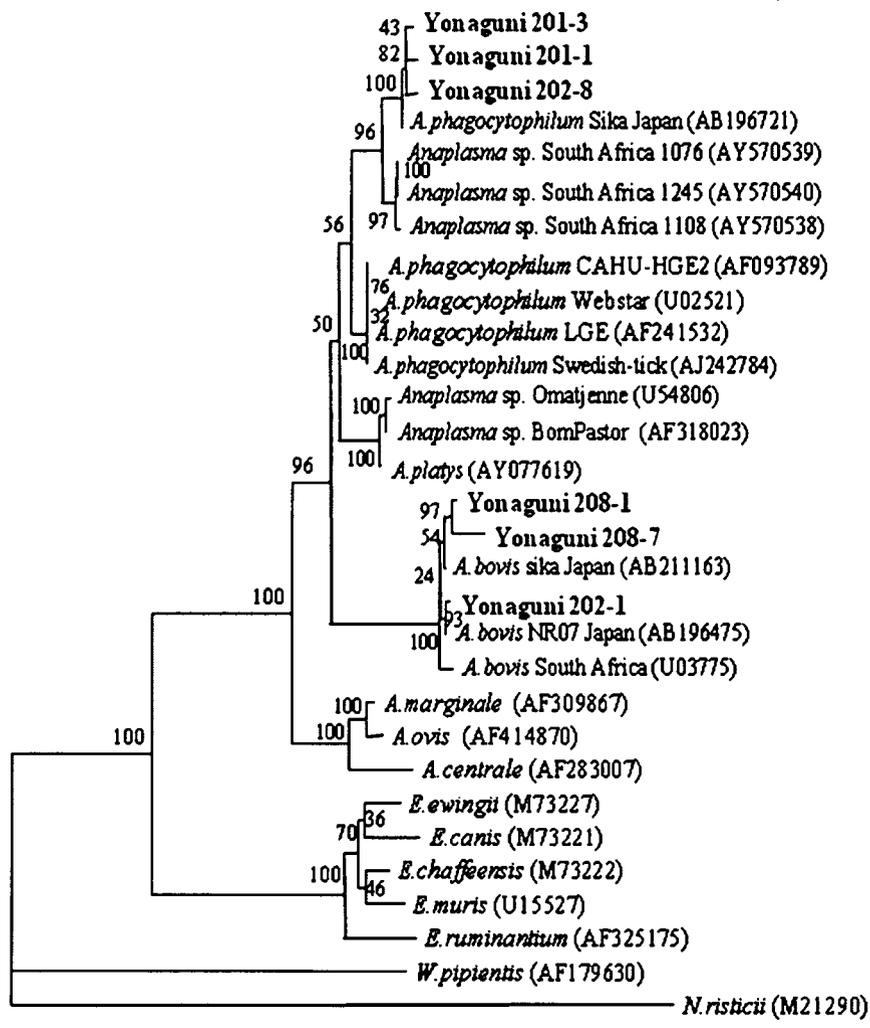


図3：沖縄県与那国島の放牧牛末梢血から検出された *A. phagocytophilum*、*A. bovis* および既知種の 16S rRNA 遺伝子に基づく系統樹。Bar=10% divergent

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）

研究協力者：藤本嗣人、佐藤弘、松井珠乃（国立感染症研究所 感染症情報センター）

要旨：つつが虫病・日本紅斑熱の症例報告がともに多い宮崎県において、内科標榜医療機関に対してつつが虫病・日本紅斑熱のサーベイランスの認知度および2006年の両疾患の診断・届出状況を調査する目的で、2007年6月にアンケート調査を実施した。回答率は40・9%であった。つつが虫病サーベイランスの認知度は75.5%、日本紅斑熱サーベイランスの認知度は41.8%であった。特に日本紅斑熱発生が少ない地域において、日本紅斑熱サーベイランスの認知度が低い傾向があった。2006年につつが虫病と診断された症例は25例、うち9例が確定診断され、8例が届け出られた。日本紅斑熱は6例臨床診断され、1例のみが確定診断された（届出漏れ）。地域別にみると、両疾患ともに、症例が比較的多く発生している地域においては、「臨床診断のみ」の症例が多かった。医療機関に対する日本紅斑熱サーベイランスの周知、および両疾患の検査室診断体制の周知が必要であると考えられた。

1. 背景

宮崎県は、感染症発生動向調査（以下、サーベイランス）において、1999年4月～2006年までのつつが虫の報告症例数の累計は290例（全国総計3633例）、日本紅斑熱は25例（全国総計378例）であり、両疾患ともに、全国有数の発生地域であることが確認されている。しかし、近年、両疾患ともに、宮崎県において報告数が減少傾向にあり、これが患者発生の実態を反映しているのかどうかよくわかっていない。なお、2006年の宮崎県における両疾患の報告数は、52週までの暫定集計で、つつが虫病11例、日本紅斑熱1例であった。

2006年12月、宮崎県皮膚科医会所属の医師に対して、宮崎県皮膚科医会の協力を得て、2005年の両疾患の診断状況について、アンケート調査を実施した。しかし、診断症例数が少なかったこともあり、外注検査機関での診断が難しいとされる両疾患の検

査室診断上の問題点を明らかにするにはいたらなかった。また、同時に行ったサーベイランスの認知度調査では、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回答医師の70%、日本紅斑熱が全数把握疾患であることを知っていたのは回答医師の48%との結果が得られた。

今回、宮崎県医師会、宮崎県内科医会の協力を得て、宮崎県内の内科を標榜する医療機関における、両疾患のサーベイランスの認知度調査と、2006年の診断・届出状況の調査を実施し、検査室診断体制の整備、およびサーベイランスの改善について検討した。

2. 目的

- 宮崎県の内科標榜医療機関における、つつが虫病、日本紅斑熱サーベイランスの認知度を調査すること
- 宮崎県の内科標榜医療機関における、つ

つつが虫病、日本紅斑熱について、2006年の診断届出状況を調査すること

3. 方法

「ひむか救急ネット」
<http://www.qq.pref.miyazaki.lg.jp/qqscripts/qq/qq45.asp> の医療機関データベースに、診療科が「内科」と届出がある、宮崎県内 567 施設に対して、2007 年 6 月末に別紙アンケートを往復はがきにて発送し、同年 8 月中旬までの返信分を解析した。独立性の検定については、epi info ver.3.3.2 によりカイ二乗検定を行った。

4. 結果

1) アンケートの回答率 232/567=40.9%。

医療機関の所在地域別の回答状況は、宮崎県北部 51.4% (36/70)、日向入郷 45.5%(15/33)、西都児湯 28.8%(15/52)、西諸 34.1%(15/44)、宮崎東諸県 44.7%(102/228)、都城北諸県 29.0%(29/100)、日南・串間 42.5%(17/40)。なお回答医療機関のうち、3 医療機関は所在地が不明であった。

注：地域区分は以下に示すとおり。宮崎県北部（延岡市、北川町、高千穂町、日之影町、五ヶ瀬町）、日向入郷（日向市、門川町、美郷町、諸塚村、椎葉村）、西都児湯（西都市、高鍋町、新富町、西米良村、木城町、川南町、都農町）、西諸（小林市、えびの市、高原町、野尻町）、宮崎県東諸県（宮崎市、清武町、国富町、綾町）、都城北諸県（都城市、三股町）、日南・串間（日南市、串間市、北郷町、南郷町）

2) サーベイランスの認知度

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、この設問に関して有効回答が得られた 220 施設中 166 施設 (75.5%)、日本紅斑熱が全数把握疾患であることを知っていたのは、有効回答施設 225 施設中 94 施設 (41.8%) であった。それぞれの疾患のサーベイランス認知度について、医療機関の所在地域別の状況は表 1、表 2 のとおり。

3) 2006 年の診断・届出状況

回答医療機関において、つつが虫病と診断（臨床診断のみを含む）されたのは、計 25 例であり、うち臨床診断のみであった 13 例を除く 12 例のうち、9 例が検査室診断により確定され（宮崎県衛生環境研究所 5 例、外注検査機関 4 例）、うち外注検査機関により確定診断された 1 例を除く 8 例が届け出られた。検査室診断により否定されたのは 3 例で、宮崎県衛生環境研究所、外注検査機関、その他（詳細不明）において各 1 例ずつ検査が実施された。

一方、日本紅斑熱については、回答医療機関において、6 例が日本紅斑熱と診断され、うち 5 例は臨床診断のみ、1 例が検査室診断により確定され（宮崎県衛生環境研究所 1 例）たが、届出漏れであった。

両疾患について、医療機関の所在地別の診断状況は表 3 のとおり。

5. 考察

●つつが虫病について

宮崎県のつつが虫病の発生状況データとして、宮崎県衛生環境研究所において、1991 年から 2006 年までの 16 年間に、つつが虫病と確定診断された地域別（地域：推定感染地もしくは症例の居住地—宮崎県のみ）の症例数を用いてアンケート結果の考察を

行った。ちなみに、宮崎県衛生環境研究所における同期間の地域別の合計症例数は、宮崎県北部は、0名、日向入郷は33名、西都児湯は15名、西諸は248名、宮崎県東諸県は123名、都城北諸県は217名、日南・串間は158名であった。地域の人口を補正する目的で、地域別の16年分の合計症例数を各地域の平成17年の人口10万人あたりで示すと、宮崎県北部は、0、日向入郷は34.7、西都児湯13.5、西諸は297.0、宮崎県東諸県は28.9、都城北諸県は110.0、日南・串間は190.6となった。本指標を3段階に区分し「本指標 \leq 25」を「つつが虫病発生が少ない地域」、「25 $<$ 本指標 $<$ 100」を「つつが虫病発生が中程度の地域」、「本指標 \geq 100」を「つつが虫病発生が多い地域」とすると、宮崎県北部、西都児湯は、「つつが虫病発生が少ない地域」、日向入郷、宮崎県東諸県は、「つつが虫病発生が中程度の地域」、西諸、都城北諸県、日南・串間は、「つつが虫病発生が多い地域」となる。

アンケートの回答状況は、「つつが虫病発生が少ない地域」においては、41.8% (51/122)、「つつが虫病発生が中程度の地域」においては、44.8% (117/261)、一方「つつが虫病発生が多い地域」においては、33.2% (61/184)となっており、特に「つつが虫病発生が多い地域」において、回答率が低かった($p<0.05$)。

つつが虫病が全数把握疾患であることを知っていた比率は、「つつが虫病発生が少ない地域」においては84.0%(42/50)、「つつが虫病発生が中程度の地域」においては71.4%(80/112)、「つつが虫病発生が多い地域」においては74.5%(41/55)であり、つつが虫の発生頻度との関連は認めなかった。

「臨床診断のみ」の症例がすべて真のつつが虫病であったとしたら、サーベイランスの感度は36% (8例/22例)、検査室診断がなされた症例と同程度の検査否定率(25%否定)であったとするとサーベイランスの感度は42% (8例/19例)となり(注:「届出漏れ」の症例は分母のみにカウント)、検査室診断を原則とする感染症発生動向調査においては、症例の発生を過少評価しているという現状が明らかとなった。また、「つつが虫病発生が中程度の地域」においては、つつが虫病と臨床診断された9例のうち「臨床診断のみ」が5例、「つつが虫病発生が多い地域」においては、臨床診断された14例のうち「臨床診断のみ」が8例となっており、多発地域ほど、感染症発生動向調査においては症例の発生を過少評価する傾向が明らかとなった。

●日本紅斑熱について

宮崎県の日本紅斑熱の発生状況データとして、宮崎県衛生環境研究所において、1983年から2006年までの24年間に、日本紅斑熱と確定診断された地域別(地域:推定感染地もしくは、症例の居住地—宮崎県のみ)の症例数を用いてアンケート結果の考察を行った。ちなみに、宮崎県衛生環境研究所における同期間の地域別の合計症例数は、宮崎県北部は、1名、日向入郷は0名、西都児湯は1名、西諸は4名、宮崎県東諸県は22名、都城北諸県は4名、日南・串間は16名であった。なお、地域別の24年分の合計症例数を各地域の平成17年の人口10万人あたりで示すと、宮崎県北部は0.6、日向入郷は0、西都児湯0.9、西諸は4.8、宮崎県東諸県は5.2、都城北諸県は2.0、日南・串間は19.3となった。本指標を3段階に区

分し、「本指標 ≤ 1.5 」を「日本紅斑熱発生が少ない地域」、「 $1.5 < \text{本指標} < 10.0$ 」を「日本紅斑熱発生が中程度の地域」、「本指標 ≥ 10.0 」を「日本紅斑熱発生が多い地域」とすると、宮崎県北部、日向入郷、西都児湯、は、「日本紅斑熱発生が少ない地域」、西諸、宮崎県東諸県、都城北諸県、は、「日本紅斑熱発生が中程度の地域」、日南・串間は、「日本紅斑熱発生が多い地域」となる。

アンケートの回答状況は、「日本紅斑熱発生が少ない地域」においては、29.9% (66/221)、「日本紅斑熱発生が中程度の地域」においては、28.2% (146/518)、「日本紅斑熱発生が多い地域」においては、29.8% (17/57) となっており、日本紅斑熱の発生状況との関連はみられなかった。

日本紅斑熱が全数把握疾患であることを知っていた比率は、「日本紅斑熱発生が少ない地域」においては30.8%(20/65)、「日本紅斑熱発生が中程度の地域」においては46.1%(65/141)、「日本紅斑熱発生が多い地域」においては43.8%(7/16)であり、「日本紅斑熱発生が少ない地域」において認知度が低かった($p < 0.05$)。

「日本紅斑熱発生が中程度の地域」においては、日本紅斑熱と臨床診断された5例のうち、4例が臨床診断のみ、「日本紅斑熱発生が多い地域」においては、日本紅斑熱と臨床診断された1例は臨床診断のみとなっており、日本紅斑熱についても、感染症発生動向調査は、特に多発地域において、症例の発生を過少評価する可能性があるという傾向であった。日本紅斑熱は、つつが虫病より重症化する可能性が高いと指摘されており、つつが虫病の治療に通常用いられるテトラサイクリン系抗生物質に加えて、

ニューキノロン系抗菌薬を併用することが必要な症例も多いといわれており、日本紅斑熱の確定診断をすることは、治療上も有意義である。

●今後の活動

▶ 宮崎県について

サーベイランスの認知度向上のために、宮崎県、宮崎県医師会および宮崎県内科医会と協力して各種の活動を実施していく必要があると考えられるが、その一環として、今回のアンケート調査結果を、アンケート調査の対象となった全医療機関に個別送付を行った。また、日本紅斑熱の疫学的な情報提供を目的として、宮崎県衛生環境研究所作成のパンフレットを同時に個別送付した。宮崎県衛生環境研究所における両疾患の特異検査の実施についても情報提供を行った。今後、宮崎県衛生環境研究所への特異検査の依頼状況やサーベイランスの届出状況を確認していきたい。

▶ 宮崎県以外について

他県においても同様の調査を実施し、つつが虫病および日本紅斑熱サーベイランスの現状を把握していくことは、サーベイランスの改善とその結果をうけた公衆衛生対応の向上のために有意義であると考えられる。

謝辞

本調査にご協力いただきました宮崎県医師会、宮崎県内科医会の関係者の皆様、貴重なデータを提供していただきました、宮崎県衛生環境研究所の関係者の皆様に深謝します。

6. 研究発表

1. 論文発表：松井珠乃、佐藤弘、岡部信

彦、安藤秀二、岸本寿男、尹 浩信、坂崎善門、瀬戸山充、成田博実. 熊本県、宮崎県の皮膚科医におけるつつが虫病、日本紅斑熱のサーベイランス認知度と、2005 年における診断・届出の現状. 日本皮膚科学会雑誌, 117, 1977-1979, 2007

2. 学会発表：松井珠乃、佐藤弘、岡部信彦、安藤秀二、岸本寿男、尹 浩信、坂崎善門、瀬戸山充、成田博実：熊本県、宮崎県

の皮膚科医におけるつつが虫病、日本紅斑熱のサーベイランス認知度と、2005 年における診断・報告の現状. 第 5 回南九州地区合同皮膚科地方会、2007 年 7 月

7. 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

表 1：つつが虫病サーベイランスの認知度—医療機関所在地別

	全数把握と知っていた	全数把握と知らなかった	無回答	認知度(無回答者は除いて集計)
宮崎県北部	28	8		77.8%
日向入郷	8	6	1	57.1%
西都児湯	14		1	100.0%
西諸	9	6		60.0%
宮崎東諸県	72	26	4	73.5%
都城北諸県	23	4	2	85.2%
日南・串間	9	4	4	69.2%
不明	3			
計	166	54	12	75.5%

表 2：日本紅斑熱サーベイランスの認知度—医療機関所在地別

	全数把握と知っていた	全数把握と知らなかった	無回答	認知度(無回答者は除いて集計)
宮崎県北部	14	22		38.9%
日向入郷	2	12	1	14.3%
西都児湯	4	11		26.7%
西諸	8	7		53.3%
宮崎東諸県	44	56	2	44.0%
都城北諸県	13	13	3	50.0%
日南・串間	7	9	1	43.8%
不明	2	1		
計	94	131	7	41.8%

表3：つつが虫病、日本紅斑熱の診断状況—医療機関所在地別

診断医療機関 所在地域	つつが虫病（症例数）				日本紅斑熱（症例数）	
	臨床診断 のみ	衛研で 確定	外注で 確定	検査で 否定	臨床診断 のみ	衛研で 確定
宮崎県北部				1		
日向入郷			1			
西都児湯						
西諸	2	1	1			
宮崎東諸県	5	1	1	2	3	1
都城北諸県	5	3	1		1	
日南・串間	1				1	
計	13	5	4	3	5	1

新型紅斑熱群リケッチアおよび国内アナプラズマ患者の発見

分担研究者	大橋典男	静岡県立大学・環境科学研究所・教授
研究協力者	川森文彦	静岡県環境衛生科学研究所
	本田俊郎	鹿児島県環境保健センター
	蔵元 強	鹿児島県環境保健センター
	千屋誠造	高知県衛生研究所
	藤田博己	大原総合病院附属大原研究所(分担研究者)
	岸本壽男	国立感染症研究所(主任研究者)
	安藤秀二	国立感染症研究所(分担研究者)
	川端寛樹	国立感染症研究所(分担研究者)
	廣井みどり	静岡県環境衛生科学研究所
	鳥日囃(ウリト)	静岡県立大学大学院博士課程 2 学年
	高娃(コウワ)	静岡県立大学大学院修士課程 1 学年
	呉東興(ウヅン)	静岡県立大学大学院研究生

研究要旨

国内におけるリケッチア関連細菌群の実態を把握するため、本年度は日本紅斑熱の流行地である鹿児島県および宮崎県でマダニを採集し、それら唾液腺から紅斑熱群リケッチアの特異遺伝子 (*gltA*, *rompA*, 16S rDNA) とアナプラズマ症起因細菌 (*Anaplasma phagocytophilum*) の特異遺伝子 (*p44* 外被膜蛋白遺伝子群) の検出と解析を行った。その結果、鹿児島県で採集したタカサゴチマダニとヤマアラシチマダニから、それぞれ新型の紅斑熱群リケッチアを見出した。また、鹿児島県のタカサゴキララマダニからは、今回初めて、*A. phagocytophilum* の *p44* 遺伝子群の検出に成功した。一方で、過去に高知県で日本紅斑熱が疑われた患者の起因細菌種の同定を、遺伝子解析と血清学的解析により試みたところ、この患者の中に日本紅斑熱リケッチア (*R. japonica*) と *A. phagocytophilum* による混合感染と *A. phagocytophilum* と *Borrelia* sp. による混合感染が存在することを明らかにした。さらに、鹿児島県で採集したタカサゴキララマダニから検出された *A. phagocytophilum* の *p44* 遺伝子群と高知県の患者から検出された *A. phagocytophilum* の *p44* 遺伝子群の一部が同一配列を持つことが判明し、アナプラズマ症を引き起こした媒介動物はタカサゴキララマダニである可能性を示した。

A. 研究目的

1. 鹿児島県および宮崎県のマダニが保有するリケッチア関連細菌種の解明

国内におけるリケッチア関連細菌群の実態を明らかにするため、本年度は日本紅斑熱の流行地である鹿児島県および宮崎県において、マダニを採集し、これらのマダニが保有するリケッチア関連細菌種(主に、紅斑熱群リケッチアとアナプラズマ症起因細菌について解析)を明らかにすることを目的とした。

アナプラズマ症起因細菌に関しては、我々はこれまでに、静岡県、山梨県、東北地方(青森県や岩手県)に生息するシュルツェマダニ(*Ixodes persulcatus*)とヤマトマダニ(*I. ovatus*)からヒトアナプラズマ症起因細菌である *Anaplasma phagocytophilum* の DNA 検出に成功し、国内にも *A. phagocytophilum* が存在することを初めて明らかにしている。本年度は、南方における *A. phagocytophilum* の分布状況を明らかにすることを目的に、鹿児島県と宮崎県で採集したマダニから *A. phagocytophilum* の DNA 検出を行った。

2. 過去に高知県で発生したリケッチア症起因細菌種の解明

リケッチア症と思われる不明発熱性疾患が多発していた高知県において、その起因細菌種を明らかにすることを目的として、過去に日本紅斑熱の診断依頼があった 18 名の患者の血液検体(血清診断から 13 名は日本紅斑熱陽性、5 名は日本紅斑熱陰性の不明熱)を入手し、紅斑熱群リケッチア、アナプラズマ症起因細菌(*A. phagocytophilum*)、エーリキア症起因細菌(*Ehrlichia* sp.), つつが虫病起因細菌(*Orientia tsutsugamushi*) の DNA 検出を行っ

た。

B. 研究方法

1. マダニからの紅斑熱群リケッチアと *A. phagocytophilum* の DNA 検出

2007 年 3-5 月に、鹿児島県(鹿児島市、肝属郡)と宮崎県(東諸郡や都城市)で旗ざり法により採集したマダニを、1 匹ずつ解剖して唾液腺を摘出し、DNA 抽出を行った。そして、紅斑熱群リケッチアに特異的な *gltA* 遺伝子および *A. phagocytophilum* に特異的な *p44* 外被膜蛋白遺伝子群を標的とした PCR を行った。得られた増幅産物は、紅斑熱群リケッチアの場合は direct sequence により塩基配列を決定し、さらに *rompA* 遺伝子と 16S rDNA の PCR 増幅とその塩基配列を direct sequence で解読した。また、*A. phagocytophilum* の *p44* 増幅産物の場合は、TA-cloning 後、各クローンの塩基配列を決定した。そして、得られた紅斑熱群リケッチアと *A. phagocytophilum* の塩基配列やアミノ酸配列を基に、系統樹解析を行い、マダニ中に存在するリケッチア関連細菌種の分類学的位置付けを行った。

2. リケッチア症患者の起因細菌種の解析

2002~2003 年にかけて、高知県で日本紅斑熱症の診断依頼があった 18 名の患者の血液検体(22 血餅)からそれぞれ DNA を抽出した後、PCR により、紅斑熱群リケッチアに特異的な 16S rDNA、*A. phagocytophilum* に特異的な *p44* 外被膜蛋白遺伝子群、*Ehrlichia* spp. に特異的な *p28* 外被膜蛋白遺伝子群、および *O. tsutsugamushi* に特異的な 16S rDNA の検出を行った。そして、得られた増幅産物は direct sequence により塩基配列を解読するか、または TA-cloning 後の各クローンの塩基配列

を決定した。そして、BLAST search や系統樹解析から 18 名の患者におけるリケッチア症起因細菌種の同定を試みた。

一方で、*Borrelia* sp. との混合感染も考えられるため、一部の患者においては患者血清中の抗 *Borrelia* 抗体の存否を Western blot 法で解析した。

(研究倫理における配慮)

本研究におけるヒト試料の使用については、国立感染症研究所・研究倫理委員会への申請(岸本、平成 18 年度)および静岡県立大学・研究倫理委員会への申請(大橋、平成 19 年度)を行い、両委員会の承認を得て実施している。

C. 結果および考察

1. 鹿児島県と宮崎県で採集したマダニが保有する紅斑熱群リケッチアとアナプラズマ症起因細菌について

本年度は、鹿児島県(鹿児島市、肝属郡)と宮崎県(東諸郡や都城市)でマダニの採集を行い、合計 251 匹のマダニを得ることができた(表 1)。そして、それぞれのマダニの唾液腺を摘出し DNA を抽出して、紅斑熱群リケッチアに特異的な *gltA* 遺伝子と *A. phagocytophilum* に特異的な *p44* 外被膜蛋白遺伝子群を標的とした PCR を行った。その結果、表 2 に示すように、採集した 251 匹のマダニのうち、鹿児島県で採集した 16 匹のマダニから *gltA* 遺伝子、また 3 匹のマダニから *p44* 遺伝子群の増幅産物が得られた。*gltA* が検出されたマダニ種はタカサゴチマダニ(*Haemaphysalis formosensis*: 140 匹中 2 匹陽性)、ヤマアラシチマダニ(*H. hystricis*: 21 匹中 7 匹陽性)、キチマダニ(*H. flava*: 9 匹中 1 匹陽性)およびタカサゴキララマダニ

(*Amblyomma testudinarium*: 12 匹中 6 匹)であった。また、*p44* が検出されたマダニ種はタカサゴキララマダニ(*A. testudinarium*: 12 匹中 3 匹陽性)のみであった。宮崎県のマダニについては、いずれのマダニからも *gltA* や *p44* 遺伝子は検出されなかった。鹿児島県のタカサゴチマダニ、ヤマアラシチマダニ、およびキチマダニから得られた *gltA* 増幅産物について direct sequence を試みたところ、10 個中 6 個の増幅産物の塩基配列を決定することができた。しかし、残りの 4 つは良好な配列結果が得られず解読不能であった。また、タカサゴキララマダニから検出された 6 個の *gltA* は、既存の *R. tamurae* のものと予想されたため、事前の RFLP 解析により同一パターンであることを確認し、それらのうち 2 つの *gltA* 増幅産物(RR239, RR242)の塩基配列を決定した。そして、得られたすべての *gltA* のアミノ酸配列を基にした系統樹を作成した(図 1)。ここで、タカサゴキララマダニから検出された *gltA* 配列は予想通り、*R. tamurae* の配列と同一であり、*R. tamurae* と同じクラスターに位置した。しかし、ヤマアラシチマダニから検出された 5 つの *gltA* 配列(RR6, RR38, RR41, RR43, RR46)はすべて同一であったが、他のいずれのリケッチア配列とも 100% の一致はなく、系統樹内に一つの独自のクラスターを形成した。最も相同性が高かったものは *R. montanensis* (99%) であった。また、タカサゴチマダニから得られた RR61 の *gltA* 配列はいずれのリケッチアに対しても低い相同性(93-96%)であり、系統樹内では他のリケッチアとかなり離れたところに位置した(図 1)。

以上のように、ヤマアラシチマダニから検出された RR6-RR46 の 5 つの *gltA* 配列とタカサゴチマダニから得られた RR61 の *gltA* 配列はいずれも *R. japonica* を含む既存の紅斑熱群リケッチアとは 100% の一致はなかったことから、

これらのリケッチアが新型の紅斑熱群リケッチアである可能性が示唆された。そこで、新型リケッチアであるか否かをさらに確かめるため、*gltA* 陽性のいくつかのマダニ検体において、*rompA* 遺伝子および 16S rDNA を増幅して塩基配列を決定し、それらの塩基配列またはアミノ酸配列を基にした系統樹解析を行った。その結果、ヤマアラシチマダニから検出された RR6 と RR38 の *rompA* アミノ酸配列は同一であったが、それらは既存のリケッチアのものとはかなり離れた位置 (相同性 87-91%) にあることが確認された (図 2)。また、*gltA* 陽性であったタカサゴチマダニ (RR61) については、*rompA* の増幅に成功しなかった。これは使用した PCR プライマーの配列が、この新型リケッチアの *rompA* 配列と異なっているため、増幅できなかったものと推察している。*rompA* 増幅に成功したヤマアラシチマダニ (RR6 と RR38) については、16S rDNA 配列も解読して系統樹解析を行ったところ、このリケッチアは 16S rDNA では *R. rickettsii* (相同性 99%) と *R. massilliae* (相同性 99%) と最も近い関係にあり、また *R. japonica* とは少し離れた関係 (相同性 98%) にあることが判明した (図 3)。よって、鹿児島県のヤマアラシチマダニ (*H. hystricus*) とタカサゴチマダニ (*H. formosensis*) の保有するリケッチアには、新型紅斑熱群リケッチアが潜在している可能性が強く示唆された。特に、日本紅斑熱の多発地帯にもかかわらず、起因菌の *R. japonica* がまったく検出されなかったことから、今回見出された新型リケッチアは、これまでの血清診断で日本紅斑熱と確定診断された発熱性疾患の本来の起因菌であった可能性が出てきた。

一方、鹿児島県で採集した 12 匹のタカサゴキラマダニのうち、3 匹のマダニからヒトアナプラズマ症起因細菌の *A. phagocytophilum* *p44* 外被膜蛋白遺伝子群が検出された。そし

て、これらの増幅産物を TA-cloning して、3 個体のマダニ 240, 241, 243 からそれぞれ 11 個、11 個、9 個の計 31 個の *p44* クローンを得た。このクローンの配列を決定して、そのアミノ酸配列を基にした系統樹を作成したところ、図 4 に示すように、これまで我々が静岡県、山梨県、東方地方のシュルツェマダニやヤマトマダニから検出した *A. phagocytophilum* の *p44* 遺伝子群とは異なった位置に、マダニ個体ごとのクラスターを形成した。これまで、シュルツェマダニとヤマトマダニ以外のマダニから *A. phagocytophilum* は検出されておらず、今回の研究で初めて、我が国のタカサゴキラマダニが *A. phagocytophilum* を保有することが明らかとなった。従って、我が国においては、北方ではシュルツェマダニやヤマトマダニが、また南方ではタカサゴキラマダニが *A. phagocytophilum* の主要な媒介動物である可能性が高い。

2. 過去に高知県で発生したリケッチア症の起因細菌種の同定

リケッチア症と思われる不明発熱性疾患が多発していた高知県において、その起因細菌種を解明することを目的として、2002-2003 年に日本紅斑熱の診断依頼があった 18 名 (血清診断から 13 名は日本紅斑熱陽性、5 名は日本紅斑熱陰性の不明熱) の患者血液検体 (22 血餅検体) から DNA を抽出し、紅斑熱群リケッチアに特異的な 16S rDNA、*A. phagocytophilum* に特異的な *p44* 遺伝子群、*Ehrlichia* spp. に特異的な *p28* 遺伝子群、および *Orientia tsutsugamushi* に特異的な 16S rDNA を標的とした PCR を行った。その結果、22 血餅検体の 4 検体で、紅斑熱群リケッチア 16S rDNA が検出され、また 2 検体では *A. phagocytophilum* の *p44* 遺伝子群が検出された。このうちの 1 検体