

図4 *Orientia tsutsugamushi* 56kDa 蛋白遺伝子(プライマー10/11領域)のアミノ酸配列による系統樹
(Maximum likelihood estimation, ML法により作成)

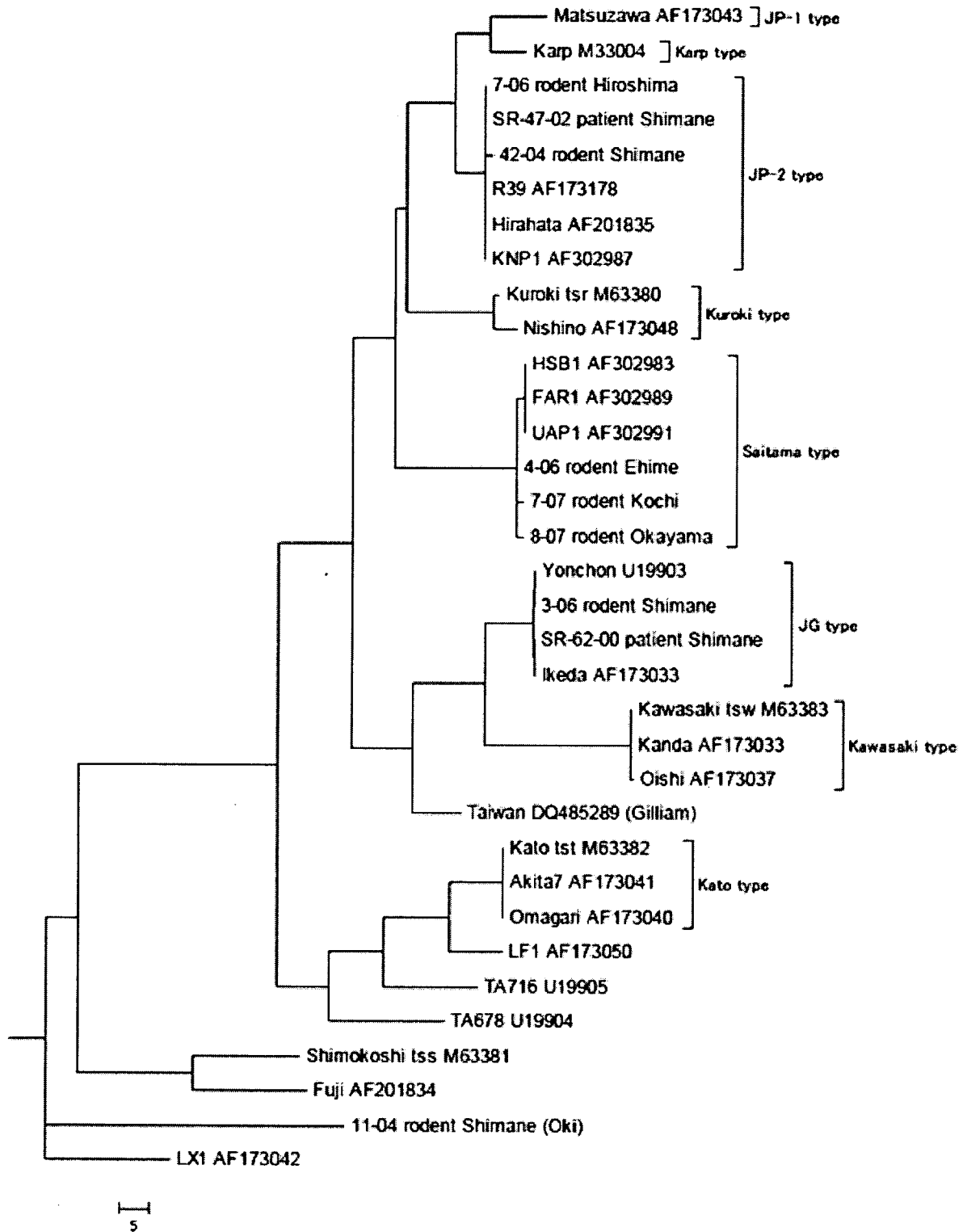


表1 島根半島および中国山地側におけるマダニ相 (成ダニ3,537個体における割合%)

| 捕集マダニ数 | キチマダニ | フタトゲチマダニ | オオトゲチマダニ | ヒゲナガチマダニ | ツノチマダニ | ヤマトマダニ | アカコッコマダニ | その他 |
|--------|-------|----------|----------|----------|--------|--------|----------|-----|
| A | 1512 | 8.8 | 27.7 | 17.9 | 43.8 | 0.4 | 1.2 | 0.2 |
| B | 898 | 18.5 | 20.4 | 2.2 | 48.2 | 1.5 | 8.1 | 1.1 |
| C | 990 | 60.5 | 1.7 | 2.9 | 0 | 0 | 31.8 | 2.5 |
| D | 137 | 45.9 | 21.8 | 0 | 0 | 0 | 31.6 | 0 |

表2 島根半島および中国山地側におけるマダニ類からの *Rickettsia* 属遺伝子 (17k Da) の検出状況

| 検査数 | <i>Rickettsia</i> 属 | 検出ダニ種 | <i>R. japonica</i> | 検出ダニ種 |
|-----|---------------------|-----------|--------------------|--------------------|
| A | 1136 | 80 (7%) | フタトゲチマダニ キチマダニ | フタトゲチマダニ ヤマトマダニ |
| B | 337 | 13 (3.8%) | フタトゲチマダニ | フタトゲチマダニ ヤマトマダニ |
| C | 155 | 1 (0.6%) | フタトゲチマダニ | 0 |
| D | 75 | 0 | 0 | 0 |

Rickettsia 属: フライマー-R1/R2

R. japonica : フライマー-R15/R110 (陽性DNAについてはダイレクトシークエンスを行った)

表3 野ネズミ(脚腕)からの *Orientia* 属および *Rickettsia* 属の検出

| NO | 捕獲地 | ネズミ種 | <i>Orientia</i> 属 | | <i>Rickettsia</i> 属 | | | | | *NT:血清無し | |
|----|---------|-------|-------------------|----------------|-------------------------------|---------|----------|--------|-------|----------|----------------|
| | | | 遺伝子(50kDa) | 遺伝子(17kDa,t-A) | <i>Orientia tsutsugamushi</i> | | | | | | |
| | | | | | Karp株 | Giliam株 | Kawasak株 | Kurok株 | Kato株 | | 148株 (鳥根県野ネズミ) |
| 1 | 鳥根県野岐島 | アカネズミ | - | - | - | - | - | - | - | - | 160 |
| 2 | 鳥根県野岐島 | アカネズミ | - | - | - | - | - | - | - | - | 160 |
| 3 | 鳥根県野岐島 | アカネズミ | - | - | - | - | - | - | - | - | 320 |
| 4 | 鳥根県野岐島 | アカネズミ | - | - | - | - | - | - | - | - | 320 |
| 5 | 鳥根県野岐島 | アカネズミ | - | - | - | - | - | - | - | - | 1280 |
| 1 | 岡山県 | アカネズミ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 2 | 岡山県 | アカネズミ | - | - | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| 3 | 岡山県 | アカネズミ | - | - | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| 4 | 岡山県 | アカネズミ | - | - | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| 5 | 岡山県 | アカネズミ | - | - | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| 6 | 岡山県 | アカネズミ | - | - | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| 7 | 岡山県 | アカネズミ | - | - | 160 | - | 40 | - | - | - | - |
| 8 | 岡山県 | アカネズミ | + | - | 160 | - | 40 | 40 | - | - | 80 |
| 9 | 岡山県 | アカネズミ | - | - | - | - | - | - | - | - | 320 |
| 10 | 岡山県 | アカネズミ | - | - | 1280 | - | - | - | - | - | 320 |
| 11 | 岡山県 | アカネズミ | - | - | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| 12 | 岡山県 | アカネズミ | - | - | 320 | - | - | - | - | - | - |
| 13 | 岡山県 | アカネズミ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 14 | 岡山県 | アカネズミ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 15 | 岡山県 | アカネズミ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 16 | 岡山県 | アカネズミ | - | - | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| 17 | 岡山県 | アカネズミ | - | - | - | - | - | - | - | - | 320 |
| 18 | 岡山県 | アカネズミ | - | - | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| 19 | 岡山県 | アカネズミ | - | - | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| 1 | 徳島県(西部) | アカネズミ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 2 | 徳島県(西部) | シネズミ | - | - | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| 3 | 徳島県(西部) | アカネズミ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 4 | 徳島県(西部) | アカネズミ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 5 | 徳島県(西部) | アカネズミ | - | - | - | - | - | - | - | - | 320 |
| 6 | 徳島県(西部) | アカネズミ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 7 | 高知県(北部) | アカネズミ | + | - | 80 | - | 40 | 40 | - | - | 80 |
| 8 | 高知県(北部) | アカネズミ | - | - | - | - | 160 | 80 | - | - | - |
| 9 | 高知県(北部) | アカネズミ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 10 | 高知県(北部) | アカネズミ | - | - | 80 | - | 320 | 80 | - | - | - |
| 11 | 高知県(北部) | アカネズミ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 12 | 高知県(北部) | アカネズミ | - | - | 320 | 320 | - | - | - | - | - |
| 13 | 高知県(北部) | アカネズミ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 14 | 高知県(北部) | アカネズミ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 15 | 高知県(北部) | アカネズミ | - | - | 320 | 80 | 1280 | 80 | - | - | 160 |
| 16 | 高知県(北部) | アカネズミ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 17 | 高知県(北部) | アカネズミ | - | - | - | - | 320 | 80 | - | - | - |
| 18 | 高知県(北部) | アカネズミ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 19 | 高知県(北部) | アカネズミ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 20 | 高知県(北部) | シネズミ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 21 | 高知県(北部) | シネズミ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 22 | 高知県(北部) | アカネズミ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

九州地域におけるリケッチア感染症の実態調査
－日本紅斑熱の患者発生状況および宮崎県、長崎県、熊本県の患者発生地における
媒介マダニの調査－

| | | |
|-------|-------|-----------------------|
| 分担研究者 | 山本正悟 | 宮崎県衛生環境研究所 |
| 協力研究者 | 平野 学 | 長崎県環境保健研究センター |
| | 山口顕徳 | 長崎県環境保健研究センター |
| | 松尾 繁 | 熊本県保健環境科学研究所 |
| | 八尋俊輔 | 熊本県保健環境科学研究所 |
| | 田原研司 | 島根県保健環境科学研究所：分担研究者 |
| | 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：分担研究者 |
| | 本田俊郎 | 鹿児島県環境保健センター |
| | 御供田睦代 | 前鹿児島県環境保健センター |
| | 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 |
| | 藤田博己 | 大原総合病院附属大原研究所：分担研究者 |
| | 高田伸弘 | 福井大学医学部：分担研究者 |
| | 矢野泰弘 | 福井大学医学部 |
| | 川端寛樹 | 国立感染症研究所細菌第一部：分担研究者 |
| | 安藤秀二 | 国立感染症研究所ウイルス第一部：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： 日本紅斑熱の早期診断体制の確立に役立てるため、九州地域における患者の発生動向を調べた。また、従来から患者発生の確認されている宮崎県南部に加え、報告数が増加傾向にある長崎県と熊本県の患者発生地でマダニを採取し、PCR 法と分離法により *Rickettsia (R.) japonica* の検出を試み、これらの地区における媒介マダニを推定した。

1. 2007 年の九州地域における患者数は、鹿児島県 16 例、宮崎県 4 例、熊本県 11 例、長崎県 2 例であった。従来、九州地域では鹿児島県と宮崎県が日本紅斑熱の多発地と考えられていたが、今回、熊本県が多発地であることが判明し、さらに長崎県に本疾患が常在することが確認された。

2. 九州地域では、チマダニ属が優勢種であることが知られているが、今回調査した長崎県や熊本県の患者発生地においても同様のマダニ相が観察された。

3. 宮崎県南部の患者発生地で採取したヤマアラシチマダニ（若虫）および長崎県本土の患者発生地で採取されたヤマアラシチマダニ（♀）から *R. japonica* が分離され、ヤマアラシチマダニがこれらの発生地における媒介種である可能性が示唆された。

今後、九州各県における患者の発生動向の把握に努めるとともに、マダニおよび野鼠等の病原体保有状況を明らかにし、本疾患の早期診断に結びつけることが必要である。

研究目的

日本紅斑熱は、*R. japonica* を原因とするマダニ媒介性の急性熱性発疹性疾患で、1984年に馬原らが徳島県で患者を発見して以来、関東以西の各地で発生が確認されている。本疾患は重症化しやすく、DIC を呈する例や、死亡例も報告されており、早期診断と早期治療が必須であることから、各発生地における患者の発生動向や、媒介マダニに関する情報を医療関係者等に提供することが必要となっている。

このため、九州地域における患者の発生動向を確認するとともに、従来から患者発生地として知られている宮崎県南部に加え、近年新たに患者の発生が確認された長崎県と熊本県における媒介マダニ種を明らかにすることを目的に、関係機関と連携して調査を実施した。

調査内容および方法

1. 患者発生数

感染症発生動向調査による報告数を九州各県の患者数とした。但し、宮崎県については宮崎県衛生環境研究所での血清診断による確認数を患者数とした。また、実態把握に寄与することを目的に、必要に応じて地研に診断用抗原を供給した。

2. マダニの採取地点および採取時期

宮崎県、長崎県および熊本県で、それぞれ患者が感染したと推定された地区を主な調査地点として、旗振り法により、植生上からマダニを採取した。宮崎県の調査地点は県南部（日南市）の山間地で、患者が感染したと推定される畑および患者の家近くの竹林において9月と10月にマダニを採取した。長崎県の調査地点は県本土域の海岸沿いの山間部と五島列島（福江島、中通島）で、前者では推定感染地のミカン畑とその周辺の雑木林を中心

として9月と11月にマダニを採取した。また、離島では、11月に推定感染地を含めた複数の地点でマダニを採取した。熊本県では、10月に、上天草の推定感染地を中心にマダニを採取した。

3. リケッチア属リケッチアおよび

R. japonica の検出

採取したマダニの一部について、PCR法と分離法により、個々のマダニからリケッチア属リケッチアと *R. japonica* の検出を試みた。

マダニをイソジン加70%エタノールで消毒した後、ガラス棒を用いて内容物を phosphate-glutamate-sucrose (PGS) 液中に懸濁させ、これをPCR法および分離用の材料とした。PCR法は、アルカリ処理法による抽出物を鋳型として、リケッチア属の17kDaタンパクをコードする遺伝子を標的とした古屋らの方法 (J. Clin. Microbiol., 33 (2), 487-489) に従って実施した。また、リケッチア属リケッチアの検出を目的としたR1/R2プライマーを用いてPCRを行った後、その陽性例について、*R. japonica* の検出を目的としたRj5/Rj10プライマーを用い、抽出物を鋳型として改めてPCRを実施した。

分離に際しては、培養チューブ（培養液量1ml）に単層培養したL929細胞に前記の内容物を接種し、1時間吸着させた後、培養液（1%FBS加イーグルMEM「ニッスイ」③）を加え、34℃で培養した。

研究結果

1. 患者発生状況

鹿児島県では、2000年以降に患者数が増加傾向にあり、2007年の報告数は2005年の17例に次いで多い16例であった。また、宮崎県では、感染症法の施行された1999年に過去最多の9例の患者が確認されたが、例年数例の発生に留まっており、2007年の確認例も4例

であった。(図 1)

過去 10 年間の九州各県における患者報告数は図 2 に示すとおりで、鹿児島県と宮崎県で比較的多発していた。また、福岡県、佐賀県および大分県における報告数はそれぞれ 1 例であるが、長崎県と熊本県では 2006 年と 2007 年に連続して患者発生が確認され、特に熊本県の 2007 年の報告数は 11 例と急増し、鹿児島県に次ぐ患者数であった(表 1)。

2007 年も、鹿児島県本土域では依然として患者発生地は大隅半島に限られていた。宮崎県では、大隅半島に続く県南部で患者が発生していた。また、長崎県と熊本県でも患者発生地に偏りがみられた。

2. マダニ相

宮崎県南部の患者が感染したと推定される畑ではキチマダニとフタトゲチマダニのみが採取された。また、患者の自宅近くの竹林では、タカサゴキラマダニ、キチマダニ、タカサゴチマダニ、ヤマアラシチマダニ、フタトゲチマダニの 2 属 5 種のマダニが採取された(表 2)。

長崎県本土域の患者発生地区では、タカサゴキラマダニ、キチマダニ、タカサゴチマダニ、ヤマアラシチマダニ、フタトゲチマダニの 2 属 5 種のマダニが採取された(表 3)。また五島列島の福江島では、キチマダニ、フタトゲチマダニ、オオトゲチマダニの 1 属 3 種のマダニが、中通島ではキチマダニ、タカサゴチマダニ、ヒゲナガチマダニ、フタトゲチマダニの 1 属 4 種のマダニが採取された(表 4)。

熊本県の調査地域では、キチマダニ、タカサゴチマダニ、ヤマアラシチマダニの 1 属 3 種のマダニが採取された(表 5)。

3. PCR 法および分離法によるリケッチア属

リケッチアおよび *R. japonica* の検出

宮崎県南部の患者発生地で採取した 2 属 5 種のマダニ 37 個体のうち、竹林で採取されたヤマアラシチマダニ(若虫)からリケッチア様微生物が分離され(表 2、図 3)、分離株の 17kDa タンパク遺伝子の塩基配列は *R. japonica* の塩基配列と一致した。

長崎県本土域の患者発生地で採取された 2 属 5 種のマダニ 81 個体(未同定幼虫 40 個体を含む)を調べた結果、ヤマアラシチマダニ 2 個体とフタトゲチマダニ 3 個体および未同定幼虫 9 個体が R1/R2 プライマーで陽性を示した。これらの陽性例のうち、竹林で採取されたヤマアラシチマダニ 1 個体(♀)が Rj5/Rj10 プライマーで陽性を示した(表 3)。また、このヤマアラシチマダニからリケッチア様微生物が分離され(図 4)、本分離株の 17kDa タンパク遺伝子の塩基配列は *R. japonica* の塩基配列と一致した。

また、フタトゲチマダニ(若虫) 2 個体および未同定幼虫 3 個体から *R. japonica* とは異なるリケッチア様微生物が分離された(未同定)。

五島列島の福江島で採取された 38 個体(未同定幼虫 17 個体を含む)では、キチマダニ 2 個体とオオトゲチマダニ 4 個体および未同定幼虫 2 個体が R1/R2 プライマーで陽性を示したが、Rj5/Rj10 プライマーでは陰性であった(表 4)。また、中通島で採取された 40 個体(未同定幼虫 8 個体を含む)のうち、キチマダニ 1 個体が R1/R2 プライマーで陽性を示したが、Rj5/Rj10 プライマーでは陰性であった(表 4)。

熊本県の上天草で採取された 78 個体(未同定幼虫 55 個体を含む)のうち、タカサゴチマダニ 1 個体、ヤマアラシチマダニ 1 個体および未同定幼虫 1 個体が R1/R2 プライマーで陽性を示したが、Rj5/Rj10 プライマーでは陰性であった(表 5)。

考察

2007年の九州地域における患者数は、鹿児島県16例、宮崎県4例、熊本県11例、長崎県2例であった。従来、九州地域では鹿児島県と宮崎県が日本紅斑熱の多発地と考えられていたが、今回、熊本県も多発地と確認され、さらに長崎県に本疾患が常在することが確認された。本研究事業により、九州地域における患者発生の実態が明らかになりつつある。また、佐賀県、大分県および福岡県では、それぞれ1999年、2004年および2005年に1例の患者が報告されて以降に確認例はないが、実態解明には医療関係者や住民への本疾患に関する積極的な情報提供が必要である。

日本紅斑熱の多発地である鹿児島県本土域や宮崎県ではチマダニ属が優勢種であり、今回調査した長崎県や熊本県においても同様のマダニ相が観察された。また、九州地域では鹿児島県の患者発生地で採取されたヤマアラシチマダニから *R. japonica* が分離されており(本田ら、第56回衛生動物学会大会、福井、2004年)、我々も、福岡県の患者発生地から採取されたヤマアラシチマダニ(幼虫)から *R. japonica* の17kDa 蛋白遺伝子断片を検出している。今回、宮崎県の患者自宅近くの竹林で採取されたヤマアラシチマダニ(若虫)と長崎県の患者発生地地区の竹林で採取されたヤマアラシチマダニ(成虫、♀)から *R. japonica* が分離された。これらの調査結果を考え合わせると、九州地域では、ヤマアラシチマダニが日本紅斑熱の媒介種として重要な役割を果たしていると思われる。また、九州地域では、キチマダニ(野田ら、衛生動物、55、21-28、2004)およびフタトゲチマダニからも *R. japonica* の遺伝子断片が検出されており、ヤマアラシチマダニとともに、これらのマダニの役割についても、さらなる検討が必要である。

結論

1. 本研究事業により、長崎県と熊本県にも日本紅斑熱が常在し、特に熊本県は鹿児島県に次ぐ多発地であることが明らかになった。
2. 宮崎県南部と長崎県本土域の患者発生地から採取されたヤマアラシチマダニから、*R. japonica* が分離され、これらの発生地における媒介種がヤマアラシチマダニであることが示唆された。
3. 鹿児島県と福岡県でもヤマアラシチマダニから *R. japonica* が分離あるいは検出されており、九州地域では、ヤマアラシチマダニが日本紅斑熱の媒介種として重要な役割を果たしていると思われる。

課題

1. 今後も九州各県の発生動向の把握に努めるとともに、マダニ・野鼠等の病原体保有状況や、媒介種と推定されるマダニの季節消長を調査し、九州地域における日本紅斑熱の全体像とリスクを明らかにすることが必要である。
2. 熊本県が患者多発地であることが判明した。しかし、媒介マダニに関しては依然として不明であり、引き続き調査を実施する必要がある。
3. 本事業の目的に沿って要望のあった地研に対して診断用抗原の供給等を行うことにより、患者発生の実態把握に寄与できたが、早期診断体制の確立には早期検査法の開発導入が必要である。

研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

1) 山本正悟 九州地域におけるリケッチア症. 第 59 回日本皮膚科学会西部支部学会, 宮崎, 2007 年 10 月 27 日

2) 山本正悟、岩切章、三浦美穂他 九州地域におけるリケッチア症（つつがむし病・日本紅斑熱）の発生状況と疫学的特徴, 衛生微生物技術協議会第 28 回研究会, 岡山, 2007 年 7 月 6 日

3) 山本正悟, 岩切章, 安藤秀二, 岸本壽男 宮崎県南部における日本紅斑熱のペクター日本感染症学会, 松江, 2008 年 (4 月発表予定)

3. 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。

患者数(人)

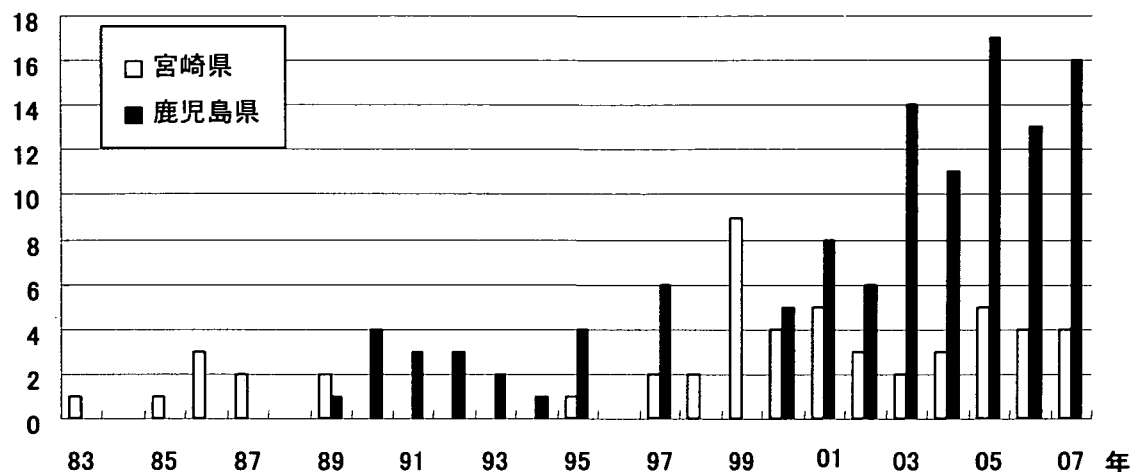


図1 宮崎県および鹿児島県における日本紅斑熱の年別報告数(感染症発生動向調査による報告例以外の確認例も含む。)

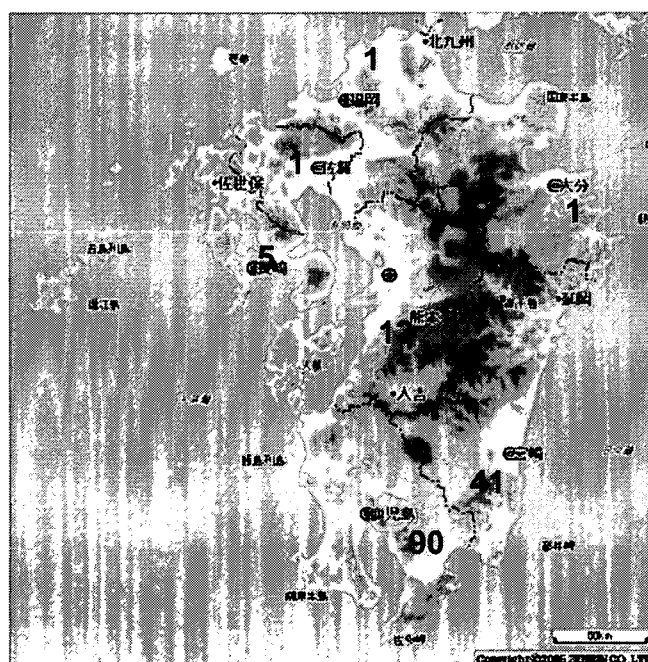


図2 過去10年間(1998年から2007年)における九州各県の日本紅斑熱患者報告数(宮崎県では、感染症発生動向調査以外の確認例も含む。)

表1 九州地区における日本紅斑熱患者の報告数
(宮崎県および鹿児島県を除いた。報告数は感染症発生動向調査による。)

| | 1999年 | 2002年 | 2004年 | 2005年 | 2006年 | 2007年 |
|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 福岡県 | | | | 1 | | |
| 長崎県 | 1 | | | | 3 | 2 |
| 佐賀県 | 1 | | | | | |
| 熊本県 | | 1 | | | 2 | 11 |
| 大分県 | | | 1 | | | |

表2 宮崎県の日本紅斑熱患者発生地で採取したマダニからの *Rickettsia japonica* の分離

| 種類 | 発育期 | 竹林 | | | | 畑 | |
|-------------------------|-------|------|------------|-------|------------|------|------------|
| | | 9月5日 | | 10月2日 | | 9月5日 | |
| | | 採取数 | 分離数 検体数 | 採取数 | 分離数 検体数 | 採取数 | 分離数 検体数 |
| <i>A. testudinarium</i> | Nymph | | | 2 | 0/2 | | |
| <i>H. flava</i> | ♂ | | | 1 | | | |
| | Nymph | 2 | 0/2 | 22 | 0/10 | 1 | 0/1 |
| | Larva | 10 | 0/5 | | | | |
| <i>H. formosensis</i> | ♂ | 5 | 0/5 | 19 | | | |
| | ♀ | | | 8 | 0/5 | | |
| <i>H. hystricis</i> | ♀ | 1 | 0/1 | | | | |
| | Nymph | 1 | 1/1 | 3 | 0/3 | | |
| <i>H. longicornis</i> | Larva | | | | | 14 | 0/2 |
| <i>Not identified</i> | Larva | | | 多数 | | | |

A: *Amblyomma*、*H*: *Haemaphysalis*

マダニの採取は、旗振り法により9月5日および10月2日に実施した。



図3 *Rickettsia japonica* が分離された *Haemaphysalis hystricis* の若虫

図の *H. hystricis* は、宮崎県の日本紅斑熱の患者発生地で採取された。

表3 長崎県本土域の日本紅斑熱患者発生地で採取したマダニからの *Rickettsia japonica* の検出

| 種類 | 発育期 | 採取数 | 検体数 | P C R | |
|-------------------------|-------|--------|-----|-------|----------|
| | | | | 陽性数 | |
| | | | | R1/R2 | Rj5/Rj10 |
| <i>A. testudinarium</i> | Nymph | 1 | 1 | 0 | |
| <i>H. flava</i> | Nymph | 10+(1) | 11 | 0 | |
| <i>H. formosensis</i> | ♂ | 6 | 6 | 0 | |
| | ♀ | 5 | 5 | 0 | |
| | Nymph | (1) | 1 | 0 | |
| <i>H. hystricis</i> | ♀ | 2 | 2 | 1 | 1 |
| | Nymph | 12 | 12 | 1 | 0 |
| <i>H. longicornis</i> | Nymph | 3 | | 3 | 0 |
| 未同定 | Larva | 多数 | 40 | 9 | |

A: *Amblyomma*, H: *Haemaphysalis*

マダニの採取は、旗振り法により2007年9月26～28日および11月25日に実施した。

()内の数字は11月25日に採取した個体数を示す。

PCRは、17kDa蛋白質遺伝子を標的とした古屋らの方法で実施した。



図4 *Rickettsia japonica* が分離された *Haemaphysalis hystricis* の成虫(♀)

図の *H. hystricis* は、長崎県本土域の日本紅斑熱の患者発生地で採取された。

表4 長崎県の五島列島で採取したマダニからの *Rickettsia japonica* の検出

| 種類 | 発育期 | 福江島 | | | | 中通島 | | | |
|-----------------------|-------|-----|-----|-----------|----------|-----|-----|-----------|----------|
| | | 採取数 | 検体数 | PCR | | 採取数 | 検体数 | PCR | |
| | | | | positives | | | | positives | |
| | | | | R1/R2 | Rj5/Rj10 | | | R1/R2 | Rj5/Rj10 |
| <i>H. flava</i> | ♂ | 2 | 2 | 1 | 0 | | | | |
| | ♀ | 1 | 1 | 1 | 0 | | | | |
| | Nymph | 2 | 2 | 0 | | 1 | 1 | 1 | 0 |
| <i>H. formosensis</i> | Nymph | | | | | 39 | 23 | 0 | |
| <i>H. Kitaokai</i> | ♂ | | | | | 3 | 3 | 0 | |
| | ♀ | | | | | 4 | 4 | 0 | |
| <i>H. longicornis</i> | Nymph | 1 | 1 | 0 | | 1 | 1 | 0 | |
| <i>H. megaspinosa</i> | ♂ | 2 | 2 | 1 | 0 | | | | |
| | ♀ | 4 | 4 | 1 | 0 | | | | |
| | Nymph | 9 | 9 | 2 | 0 | | | | |
| 未同定 | Larva | 多数 | 17 | 2 | 0 | 11 | 8 | 0 | |

H. Haemaphysalis

マダニの採取は、旗振り法により2007年11月23～25日に実施した。

表5. 熊本県で採取したマダニからの *Rickettsia japonica* の検出

| 種類 | 発育期 | 採取数 | 検体数 | PCR | |
|-----------------------|-------|-----|-----|-------|----------|
| | | | | 陽性数 | |
| | | | | R1/R2 | Rj5/Rj10 |
| <i>H. flava</i> | Nymph | 3 | 3 | 0 | |
| <i>H. formosensis</i> | ♂ | 7 | 7 | 1 | 0 |
| | ♀ | 4 | 4 | 0 | |
| <i>H. hystricis</i> | Nymph | 9 | 9 | 1 | 0 |
| 未同定 | Larva | 多数 | 55 | 1 | 0 |

H. Haemaphysalis

マダニの採取は、旗振り法により2007年10月15～17日に実施した。

PCR法を用いたリケッチア症病原体検出法の改良
—コンタミネーション防止のためのポジティブコントロール作製—

| | | |
|-------|------|---------------------------|
| 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 | 花岡希 | 国立感染症研究所ウイルス第一部第五室 |
| | 坂田明子 | 国立感染症研究所ウイルス第一部第五室 |
| | 川端寛樹 | 国立感染症研究所細菌第一部第四室(分担研究者) |
| | 高野愛 | 国立感染症研究所細菌第一部第四室(岐阜大学大学院) |
| | 岸本壽男 | 国立感染症研究所ウイルス第一部第五室(主任研究者) |

研究要旨

PCR法を用いた特異的遺伝子の検出は、リケッチア感染症において病因を同定する簡便かつ有用な診断ツールではある。しかしながら、ポジティブコントロール(PC.)としてリケッチア菌体から抽出した全ゲノムDNAを用いることから、PC.のキャリアオーバーが発生してしまうリスクが常にあった。今回、組換え技術を用いて国内で常用されているつつが虫病診断用のPCRプライマー領域を含みながら、リケッチアとは明らかに異なる遺伝子配列を持つ他の微生物の同定済みDNAを組み込んだプラスミドを作製した。作製したプラスミドをテンプレートにPCRを実施し、確実にPCR産物が増幅されることを確認し、反応系が確実に実施されたことの指標となることが示された。また、その増幅産物のサイズが*O. tsutsugamushi*全DNAから増幅されるPCR産物と明らかに異なることから、キャリアオーバーの有無をも確認できる。以上より、有用なポジティブコントロール作製に成功した。

A. 研究目的

リケッチアによって引き起こされる感染症は早期診断系の確立が重要な課題となっている。リケッチアは偏性細胞内寄生菌であるため、培養による同定には時間を要し、ペア血清による抗体上昇の確認もまた発症後の臨床経過を追う必要があり、時間を要する。PCR法を用いた特異的遺伝子の検出によって、病因となるリケッチアを同定する方法は簡便かつ有用な診断ツールではある。しかしながら、これまでポジティブコントロール(PC.)としてリケッチア菌体から直接抽出した菌の全ゲノムDNAを用いていることから、検査現場においては、PC.のキャリアオーバーが発生してしまうリスクが常にあっ

た。本研究では、上記の問題を解決するような全ゲノムから増幅されるPCR産物と明らかに鑑別可能な有用なPC.作製を目指した。リケッチア感染症のひとつである「つつが虫病」の原因となる*Orientia(O.) tsutsugamushi*の遺伝子検出用に開発され、国内で常用されているPCR法に利用可能なPC.を、遺伝子組み換え技術を用いて作製を試みた。また、つつが虫病疑いの患者由来血液及び痂皮の臨床サンプルを用いて、*O. tsutsugamushi* DNAの検出をPCRによって行い、作製したPC.の有用性を検討した。

B. 研究方法

O. tsutsugamushi Gilliam株感染L929細胞、

臨床検体(血液、痂皮)からのゲノムDNA抽出はPUREGEN[GENTRA]を用いて行った。

はじめに、*O. tsutsugamushi* DNAのPCR検出におけるターゲットである56kDa抗原をコードする遺伝子(TSG56: Gene. 1990 Jul 2;91(1):119-22.)の一部を制限酵素サイトを付与したプライマーを用いてPCR法によって増幅後制限酵素処理し、同様に処理をしたpUC19ベクターにクローニングした[図1-①]。クローニング用PCR反応にはLA taq[TAKARA]を用い、反応組成は添付されている説明書に従った。PCR反応条件は、94°Cで3分処理後、94°C、52°C、72°Cで各々30秒反応後、処理を30回繰り返した。反復反応終了後72°Cで3分反応させ終了させた。作製したプラスミドをテンプレートにし、TSG56遺伝子の中央部、約200bを削るように、作製したプライマー(制限酵素サイトXbaIとBamHIを含む)を用いて、再度PCRを行い、PCR産物をライゲーションさせた[図1-②③]。ライゲーション反応にはT4 Dnaligase[NEB]を用い、プラスミドDNA精製にはQIAprep Spin Miniprep Kit[QIAGEN]を用いた。*Candida albicans* TUA4株のYVH1遺伝子の上流部位LFHA配列(Microbiology 2005 Jul;151(Pt 7):2223-32.)を作製したプラスミドの制限酵素サイトに組み込み、*E. coli* DH5 α 株で増幅させた。その際、LFHAには、*O. tsutsugamushi*各株に対する検出用のプライマー配列を付与させた[図1-③④]。これらの作製したプラスミドは、図1-①がリアルタイムPCR等を用いた菌数測定等のための*O. tsutsugamushi* DNAコピー数検討用として、図1-③が*O. tsutsugamushi* DNA検出時のPC.として(1st PCR、2nd PCRともに*O. tsutsugamushi* DNAよりも200ba短く増幅される)、図1-④が型別診断PCR用のPC.として有意に使用でき

ることが期待できた(1st PCRでは*O. tsutsugamushi*ゲノムと同じサイズで増幅されるが2nd PCRではつつが虫ゲノムよりも約400bp長く増幅される。また、型別診断PCRでは各種診断プライマーとは異なったサイズで増幅される)。

作製したプラスミドを用いて*O. tsutsugamushi*病原体検出法(リケッチア感染症診断マニュアル)に従ってPCR法を行い、検出バンドサイズを検討した。泳動マーカーにはすべて2-log DNA ladder[NEB]を用いた。

C.研究結果

GilliamゲノムDNAをコントロールにし、作製したPC.(図1-④)を10の6乗コピーから10倍希釈で3段階希釈したものをテンプレートにし、PCRを行った(図2)。その結果、2nd PCRにおいて、GilliamゲノムDNAとは異なった位置にバンドが出現し、検出サイズの異なるPC.の作製に成功した。また、10の4乗コピーのプラスミドDNAでも反応が認められた(図2)。実際の検出系においては、2nd PCRにおいて、陽性になったサンプルは、2nd PCRと同じ組成で、プライマーセットを変更し、型別診断PCRを行う。作製したPC.を用いて、型別診断時におけるPCR産物のバンドサイズを確認した(図3)。図3左側のPCR産物泳動結果より、各PCR産物は通常検出されるバンドサイズとは異なった位置にバンドが出現していることから、作製したPC.は型別診断にも使用できることが明らかとなった。各々のプライマーがターゲットとしているバンドサイズとは異なった位置にDNAの増幅が認められ、型別診断用PC.として使用できることが明らかとなった。

PC.として使用できることが確かめられたことから、実際の臨床サンプルを使用した診

断 PCR を行った。PCR テンプレートに用いたサンプルは、血液、痂皮ともに原液のサンプルと 10 倍希釈したサンプルを用いた。PC.として、図 1-③④のプラスミドを用いた。1st PCR では臨床サンプルにおいてバンドの増幅が認められないが、使用した PC.にはバンドの増幅が認められ、PCR 自体は問題なく行われていることが確認できた(図4.左)。2nd PCR においては、血液サンプルからの PCR 増幅バンドは確認できなかったが、痂皮サンプルからは、希釈したサンプルでもバンドの増幅が認められ、*O. tsutsugamushi* DNA の存在が確認できた。また、PC.は検出目的部位とは異なった位置にバンドが出現していることが確認できた(図4.左)。*O. tsutsugamushi* DNA の存在が確認できたことから、型別診断 PCR を行った(図4.右)。テンプレートとして、痂皮 10 倍希釈サンプルと型別診断 PC.(図4.左レーン⑥)の各々 1st PCR 産物を用いた。その結果、図4.右レーン⑥に、バンドの増幅が認められた。レーン①にはバンドの増幅が確認できないことから、本臨床サンプルには Japanese Gilliam (JG)DNA の存在が認められた(図4.右)。また、PC.は検出目的部位とは異なった位置にバンドが出現していることが確認できた(図4.右)。つまり、PCR 検定結果としては、本臨床サンプル提供患者は *O. tsutsugamushi* に感染しており、菌の型別としては Japanese Gilliam であることが示唆できた。また、図4.左の 2nd PCR 結果で、確認した DNA バンドのシーケンスを確認したところ、確かに *O. tsutsugamushi* Japanese Gilliam であることが確認できた(非公表)。

D. 考察

作製したプラスミドを用いて、*O. tsutsugamushi* Gilliam ゲノムをコントロール

にし、『リケッチア感染症診断マニュアル』に従い、PCR 法を用いた *O. tsutsugamushi* の同定法を行ったところ、Gilliam ゲノムとは異なった位置に DNA の増幅が認められ、PCR の PC.として使用できることが明らかとなった。作製したいくつかのプラスミドの特徴を以下にまとめると、*O. tsutsugamushi* DNA コピー数検討用[分子量:2204848g/mol]:リアルタイム PCR 等を用いた菌数測定等に使用できる。*O. tsutsugamushi* DNA 検出用[分子量:2088857g/mol]:1st PCR:*O. tsutsugamushi* DNA よりも約 200bp 短く増幅される。2nd PCR:*O. tsutsugamushi* DNA よりも約 200bp 短く増幅される。型別診断 PCR:Gilliam 株検出時にのみ約 200bp 短く増幅される。*O. tsutsugamushi* 型別診断用[分子量:2240662g/mol]:1st PCR:*O. tsutsugamushi* DNA と同じサイズで増幅される。2nd PCR:*O. tsutsugamushi* DNA よりも約 400bp 長く増幅される。型別診断 PCR:各種診断プライマーとは異なったサイズ(>200bp)が増幅される。図4より、PC.を実際の臨床サンプルと同様に、1st PCR を行い、同量を 2nd PCR に用い、PCR 産物を泳動したところ、スミア状にバンドが確認できた。PC.の PCR 結果としては、検出目的バンドサイズとは異なった位置にバンドが出現しているので問題は無いが、実際の使用時には、泳動量やテンプレート量を少なくするとこや 2nd PCR 時には PC.のみ Nested PCR にしないことで、図2、3ような泳動結果を得ることができる。

近年、カルタヘナ法(遺伝子組換え生物等規制法)により、遺伝子組換え生物等を用いて研究を行う場合は、実験の申請・確認が必要である。このような現状からも、同定済み核酸であり、かつ病原性に関与しない遺伝子配列を用いた本手法は有用かつ

簡便な手法であり、今後は本方法を応用し、他のリケッチア感染症等の PCR 法を用いたポジティブコントロール作製を目指す。

E. 結論

O. tsutsugamushi 菌体から抽出した全ゲノム DNA をポジティブコントロールとして用いる現行の PCR は、そのキャリアオーバーのリスクがともなう。今回作製したプラスミドは、国内の多くの施設で行われている PCR において確実に PCR 産物が増幅される。このことは、反応系が確実に実施されたことの指標となるとともに、その増幅産物のサイズが *O. tsutsugamushi* 全 DNA から増幅される PCR 産物と明らかにことなることから、キャリアオーバーの有無をも確認できる。以上より、有用なポジティブコントロール作製に成功した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Nomura T., Fujimoto T., Ebisutani C., Horiguchi H. and Ando S. The First Fatal Case of Japanese Spotted Fever Confirmed by Serological and Microbiological Tests in Awaji Island, Japan. *Japanese Journal Infectious Diseases*, 60:241-243, 2007

Matsui T., Nakashima K., Ohyama T., Kobayashi J., Arima Y., Kishimoto T., Ogawa M., Cai Y., Shiga S., Ando S., Kurane I., Tabara K., Itagaki A., Nitta N., Fukushi H., Matsumoto A., and Okabe N. An outbreak of psittacosis in a bird park in Japan. *Epidemiology and Infection*, 11:1-4, 2007

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*, 117:1977-1980, 2007

2. 学会発表

安藤秀二 国内のリケッチア感染症検査について. 第 15 回ダニと疾患のインターフェース 宮崎市, 平成 19 年 5 月 25 日~27 日

安藤秀二 国内のリケッチア症の状況と実験室診断の課題. 衛生微生物技術協議会第 28 回研究会, 岡山市, 平成 19 年 7 月 5 日-6 日

山本正悟, 岩切章, 三浦美穂, 御供田陸代, 本田俊郎, 千々和勝己, 石橋哲也, 小河正雄), 平野学, 原健志, 船津丸貞幸, 松尾, 藤田博己, 片山丘, 古屋由美子, 田原研司, 大瀬戸光明, 安藤秀二, 川端寛樹, 岸本壽男. 九州地域におけるリケッチア症(つつが虫病・日本紅斑熱)の発生状況と疫学的特徴. 衛生微生物技術協議会第 28 回研究会, 岡山市, 平成 19 年 7 月 5 日-6 日

田原研司, 保科 健, 高尾信一, 島津幸枝, 葛谷光隆, 藤井理津志, 松本尚美, 近藤玲子, 大瀬戸光明, 山本保男, 千屋誠造, 山内健生, 山本正悟, 片山丘, 古屋由美子, 新井 智, 川端寛樹, 安藤秀二, 高野 愛, 藤田博己, 矢野泰弘, 高田伸弘. 中国・四国地域におけるリケッチア症(つつが虫病・日本紅斑熱)の発生状況と疫学的特徴. 衛

生微生物技術協議会第 28 回研究会, 岡山市, 平成 19 年 7 月 5 日-6 日

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, 鹿児島市, 7 月 14~15 日

安藤秀二. 感染症研究におけるフィールド調査の重要性. 静岡県立大学大学院月例セミナー. 静岡市, 平成 19 年 7 月 9 日

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, 平成 19 年 9 月 21 日, 仙台市

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, 平成 19 年 9 月 21 日, 仙台市
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, 平成 19 年 9 月 21 日, 仙台市

安藤秀二. 輸入動物に見るマダニと病原体. 第 62 回日本衛生動物学会西日本支部大会シンポジウム特別発言. 平成 19 年 10 月 21 日, 大津市

花岡希, 安藤秀二, 坂田明子, 川端寛樹, 高野愛, 岸本寿男, 倉根一郎. PCR 法を用いたリケッチア症病原体検出法の改良ーコンタミネーション防止のためのポジティブコントロール作製ー. 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. 平成 19 年 10 月 27 日~28 日, 東京

松井珠乃, 佐藤弘, 岡部信彦, 安藤秀二, 岸本寿男, 山本正悟. 宮崎県の内科標榜医療機関を対象としたつつが虫病・日本紅斑熱サーベイランスの認知度および報告状況. 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. 平成 19 年 10 月 27 日~28 日, 東京

鶴見みや古, 尾崎清明, 藤田博己, 川端寛樹, 安藤秀二, 高橋守. 鳥類標識調査における外部寄生虫採集調査. 第 22 回日本鳥類標識協会全国大会, 2007 年 12 月 16 日, 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

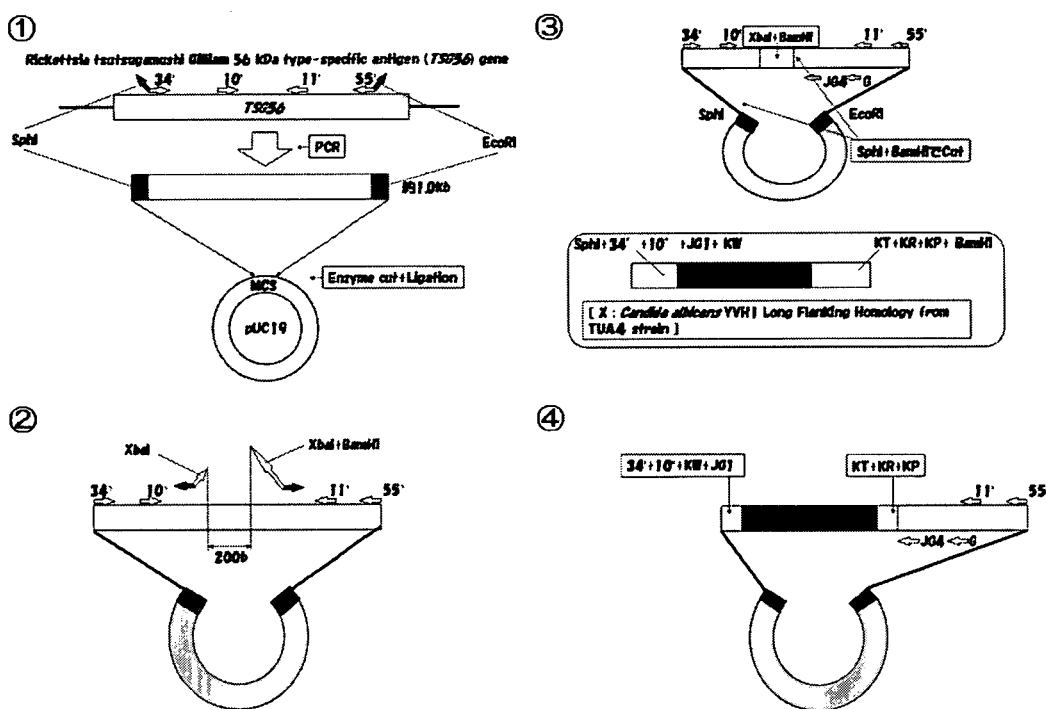


図1. プラスミド作製方法

Orientia tsutsugamushi Gilliam ゲノムから PCR 検出におけるターゲットである 56kDa 抗原遺伝子の一部をクローニングした①。TSG56 遺伝子の中央部、約 200b を削るように、再度 PCR を行い、PCR 産物をライゲーション後、*E. coli* DH5 α 株で増幅させた②③。X 断片を作製したプラスミドに組み込み込んだ。その際、Xには、*O. tsutsugamushi* 各株に対する検出用のプライマー配列を付与させた③④。

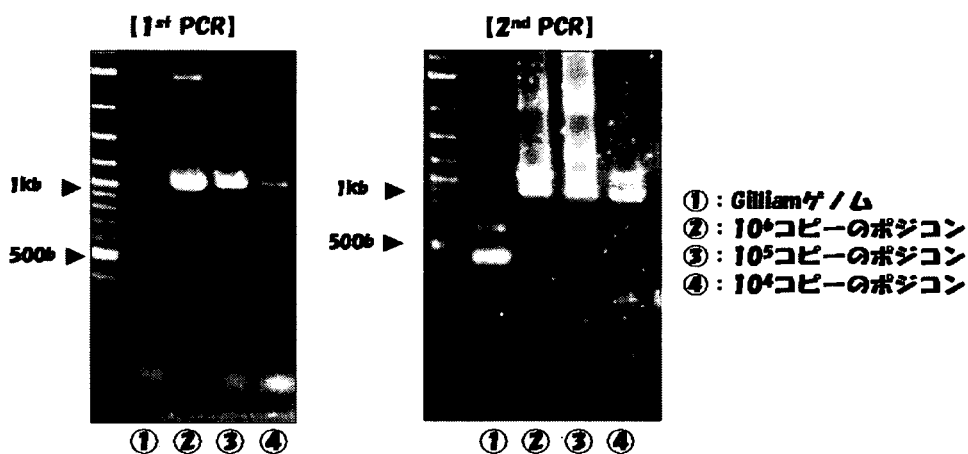


図2.

Gilliam ゲノムとは異なった位置に DNA の増幅が認められ、PCR ポジティブコントロールとして使用できることが明らかとなった。

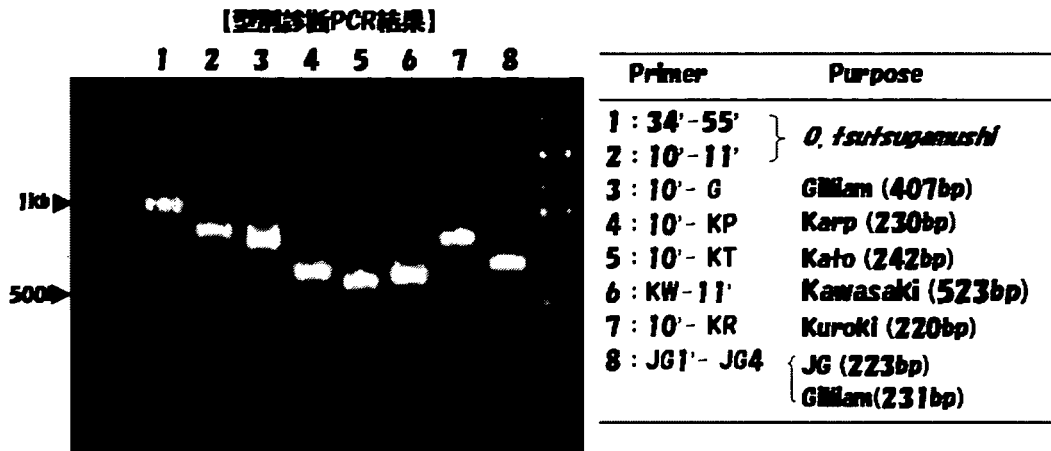


図3. 作製したポジティブコントロールを用いた型別診断 PCR
 2nd PCR において陽性を示したサンプルは、1st PCR 産物を型別診断 PCR を行う。 *O. tsutsugamushi* には、大きく分けて Karp, Kawasaki, Kato, Kuroki, Gilliam Japanese Gilliam の血清型が異なる株が存在する。本 PCR では各々の型別を診断できるように設計されている。ターゲットは 1st PCR と同様に *O. tsutsugamushi* 56kDa antigen gene である。図中の右側に示したのは、各レーンにおける、*O. tsutsugamushi* であった場合の検出型別と目的サイズ、目的株である。図左側は PCR 産物の泳動結果であり、両端のレーンにはマーカーとして 2-log DNA ladder を使用している。泳動図中の各クレーン番号は、図右側の表と対応している。

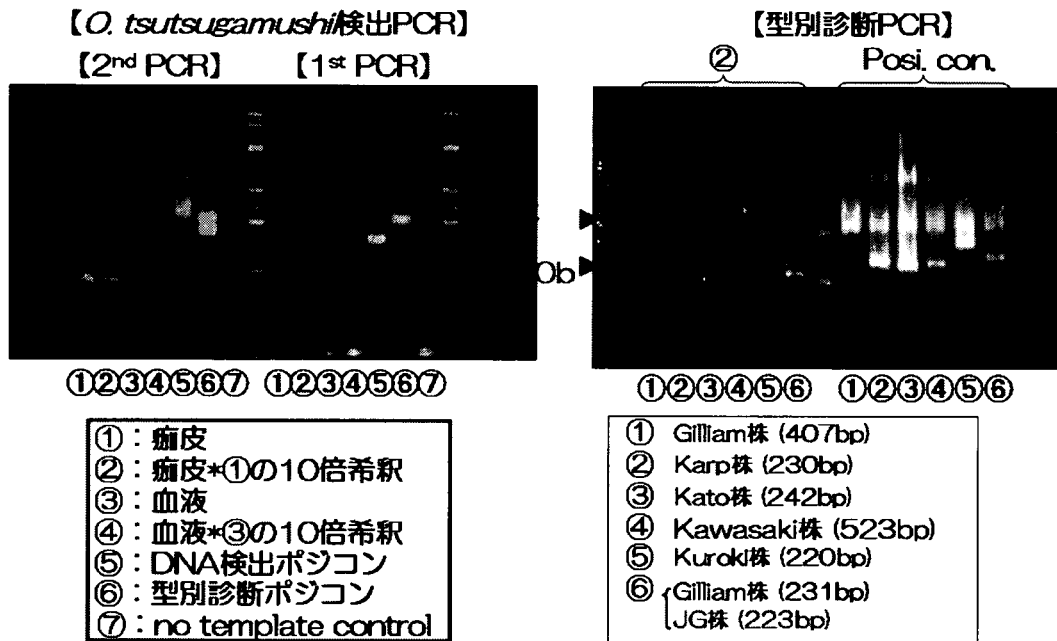


図4. 実際の使用例

左側は *O. tsutsugamushi* PCR 検出結果を示した。つつが虫病疑いの患者血液、痂皮から抽出した DNA を用いて、検定 PCR を行った結果である。①～⑦はすべて、図下の四角の黒枠内に示したサンプルをテンプレートにしたものである。⑤には作製した図2-③を、⑥には図2-④のプラスミドを用いた。各々 1st PCR、2nd PCR の結果を示している。

右側は、型別診断 PCR の結果を示した。テンプレートには、左側の【*O. tsutsugamushi* 検出 PCR】のレーン②皮膚試料 10 分の 1 量をテンプレートに PCR を行った 1st PCR での PCR 産物を用いた。またポジティブコントロールとして同様に⑥の 1st PCR での PCR 産物を同量用いた。右図下の四角枠内には各株での予想される PCR 産物サイズを示している。

新規 *Rickettsia* 感染症診断ツールの開発

| | | |
|-------|-----------------------|--------------------|
| 分担研究者 | 川端寛樹 | (国立感染症研究所・細菌第一部) |
| 協力研究者 | 堤 寛, 玉熊桂子 | (藤田保健衛生大学) |
| | 藤田博己 | (大原総合病院付属研究所) |
| | 角坂照貴, 長岡文晃 | (愛知医科大学) |
| | 今内 覚 | (北海道大学) |
| | 安藤秀二, 坂田明子, 花岡希, 岸本壽男 | (国立感染症研究所・ウイルス第一部) |
| | 高野愛, 武藤麻紀, 本田尚子, 渡邊治雄 | (国立感染症研究所・細菌第一部) |

研究要旨 *Rickettsia* 感染症に対する新規の早期診断ツール開発を目的として、1) 実験室診断に応用可能な基礎的学術情報を収集、2) 診断ツールとしての材料作成、3) 作成された材料の実験室診断への応用の検討、4) 実際の診断現場への配布と検証、5) 至便性の向上、ツールの改善・改良、を計画した。本年度は 2004 年にフランスで報告された宿主細胞のアクチン繊維と結合、伸張反応を誘導するリケッチア因子 RickA に着目し、ペプチド抗体を作成、その反応性を調べた。また国内に分布するリケッチア属細菌の RickA 遺伝子の普遍性についても調べ、感染種同定のための遺伝情報アーカイブ構築を平行して行った。

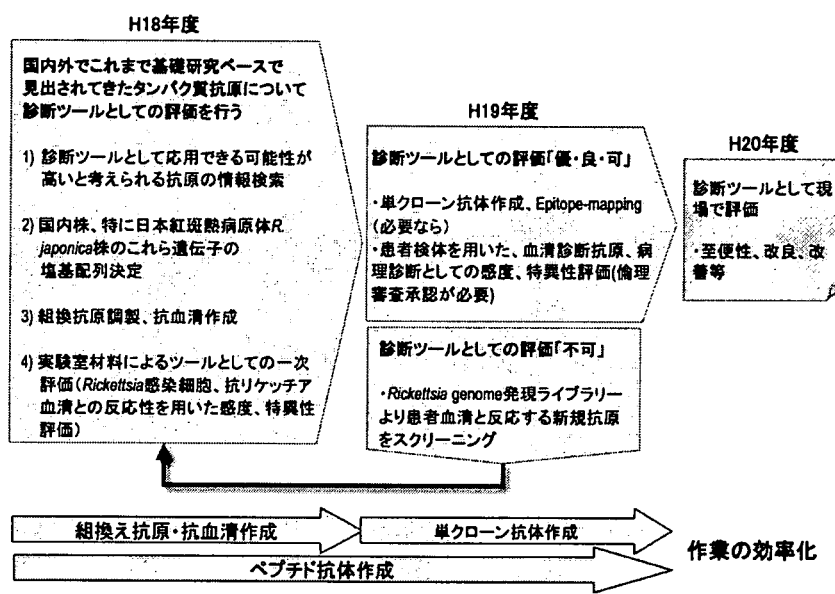


図1. 本研究の研究内容と公衆衛生への応用

A. 研究目的

日本紅斑熱などの *Rickettsia* 感染症は、死亡例が報告されたこと、近年患者数が増加傾向にあることから、公衆衛生上重要な感染症として認知されるようになってきた。

Rickettsia 感染症の診断は、海外では 1) 血清診断、2) 病原体の分離、PCR 法等による病原体 DNA の検出、3) 病変部病理、および病原体の免疫染色、が推奨されている。我が国でも、概ね同様の方向性で実験室診断が